

应用 RFLP 和 DGGE 技术分析工厂化养殖 凡纳滨对虾肠道微生物群落特征

李玉宏^{1,2} 柴鹏程² 胡修贵^{2,3} 孙艳² 黄捷² 宋晓玲^{2*}

(¹ 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³ 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘要 本研究应用 PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) 和 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 技术, 对工厂化养殖的凡纳滨对虾肠道菌群进行多样性分析。RFLP 结果显示, 8 月样品中不同的克隆子为 5 个, 其中以不可培养细菌 (Unculturable bacteria) 为主要优势菌, 其次为鲁杰氏菌属菌种 *Ruegeria* spp. 和 *Rhodobacterales* spp.。依据微生物多样性的覆盖率分析结果表明, 所构建 16S rDNA 克隆文库的覆盖率为 97.5%。10 月样品中克隆子为 8 个, 其中以不可培养细菌、芽孢杆菌属 *Bacillus* spp. 和弧菌属 *Vibrio* spp. 为主要优势菌属, 其次为 *Photobacterium* spp. 和 *Neptunomonas* spp.; 所构建 16S rDNA 克隆文库的覆盖率为 90.8%。应用 DGGE 分析 8 月和 10 月对虾肠道样品, 菌群以不可培养细菌和弧菌属为主, 其次为 *Streptomyces* spp.、*Ruegeria* spp.、*Enterococcus* spp. 和 *Photobacterium damsela*。

关键词 凡纳滨对虾; 肠道; 微生物; 工厂化养殖; PCR-RFLP; PCR-DGGE

中图分类号 S917.1 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)02-0083-07

Analysis of intestinal microecology of *Litopenaeus vannamei* in industrial aquaculture by RFLP and DGGE techniques

LI Yu-hong^{1, 2} CHAI Peng-cheng² HU Xiu-gui^{2, 3} SUN Yan²

HUANG Jie² SONG Xiao-ling^{2*}

(¹ College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³ Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT The composition of bacterial community in the intestine of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under industrial culture conditions was investigated by 16S rDNA-based molecular methods of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Sequencing results of cloned 16S rDNA amplicons revealed that unculturable

山东省自主创新专项(2013CXC80202)和国家科技支撑计划经费项目(2012BAD17B03)共同资助

* 通讯作者。E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期:2013-04-01;接受日期:2013-07-11

作者简介:李玉宏(1987-),女,硕士研究生,主要从事对虾养殖环境微生物研究。E-mail: sue1987031@163.com, Tel:13585836859

bacteria were the dominant species, *Ruegeria* spp., and *Rhodobacterales* spp. were subdominant species in samples collected in August 2011. The coverage rate by the 16S rDNA clone library was 97.5%. Eight different RFLP patterns of the clones were obtained by restriction RFLP analysis from samples collected in October 2011. Sequencing results of cloned 16S rDNA amplicons revealed that unculturable bacteria, *Bacillus* spp. and *Vibrio* spp. were the dominant species; *Photobacterium* spp. and *Neptunomonas* spp. were subdominant species. The coverage rate by the 16S rDNA clone library was 90.8%. DGGE analysis was also carried out for the samples. Sequencing results of cloned 16S rDNA amplicons revealed that unculturable bacteria and *Vibrio* spp. were the dominant species. Comprehensive analysis of PCR-RFLP and PCR-DGGE experimental results would be helpful to understand the microbial components in the intestine of the white shrimp, and to comprehensively and objectively reveal the structure and diversity of white shrimp microbial community.

KEY WORDS *Litopenaeus vannamei*; Intestinal; Microbial; Industrial aquaculture; PCR-RFLP; PCR-DGGE

对虾养殖是我国渔业重要支柱产业之一,2011年虾类养殖总产量达到241万t,其中凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 的养殖产量达到132万t,占虾类养殖产量的54.8%(2012年中国渔业统计年鉴)。对虾养殖内外环境中存在着大量的细菌类微生物,它们不仅是对虾食物链/网的重要组成部分,参与养殖系统内的物质循环和能量流动,而且在维持生态平衡及优化环境质量方面担当着重要的角色(王亭芳等 2012; Chaiyapechara *et al.* 2012; 柴鹏程等 2013)。光合细菌和化能异养菌可以作为水质净化剂用于优化养殖的水质条件(王李宝等 2006),对虾消化道的益生菌以不同配伍形式作用于凡纳滨对虾,可显著提高对虾机体免疫水平和抗白斑综合征病毒感染能力(兰萍等 2010)。了解动物肠道菌群及其变化是研究和应用益生菌的先决条件。

限制性内切酶片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)结合16S rDNA文库构建技术已广泛应用于微生物种群多样性研究中。在RFLP技术的酶切指纹图谱中,每一类型理论上代表某一种类微生物,且其分析的16S rDNA几乎是全长序列,因此涵盖信息量更加广泛,重复性和可靠性较高。但是,其中纯化DNA、高通量的PCR和酶切反应比较繁琐(陈金华等 2008)。

从1993年变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)被引入微生物生态学研究以来,此技术被广泛地应用于分析比较微生物种群多样性及其动态变化。DGGE检测率高,能把相同片段长度的不同DNA序列分离,但其只能反映肠道中一定丰度的微生物。有研究报道,当某一微生物的DNA含量小于其所在群体总DNA的1%时,该条带不能被辨认出。因此,DGGE只能反映出微生物群落中数量大于1%的优势菌群(Muyzer *et al.* 1993; Li *et al.* 2007)。

在现有微生物培养技术下,99%以上的环境微生物是不可培养的。为了克服传统微生物培养技术的缺陷,本研究采用直接提取凡纳滨对虾肠道微生物基因DNA、建立16S rDNA克隆文库的方法,利用RFLP和DGGE指纹图谱技术分析工厂化养殖条件下的凡纳滨对虾肠道微生物主要种类和组成,以期更全面、客观地反映凡纳滨对虾微生物群落结构和多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 凡纳滨对虾肠道样品

2011年8月和10月在山东省青岛市胶州某养殖场采集养殖凡纳滨对虾样品[养殖水质条件为盐度22-24,温度25-29℃,pH值7.5-7.6,本研究采集的对虾于5月放苗,放苗量为200尾/m²对虾,养殖环境为正方形水泥池,体积30 m³(4 m×7.5 m×1 m),采用循环水养殖,每天定时定点投喂饲料]。用75%医用酒精擦拭

对虾体表,无菌条件下剖取对虾肠道,再用灭菌镊子挤出粪便,用生理盐水清洗肠道,放于灭菌后的离心管中,用于下一步 DNA 提取。

1.1.2 试剂

DNA 纯化试剂盒,质粒 pMD18-T (PCR 产物克隆载体)、限制性内切酶 (*Afa* I 和 *Msp* I) 和 PCR 扩增试剂均购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 购于秀百锐公司。

1.1.3 引物设计

引物序列参照文献(表1)由上海生物工程技术有限公司合成。

表1 实验中用到的引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers used in this experiment

引物 Primer	序列 Sequence	文献 Reference
27-F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Edwards <i>et al.</i> 1989
1492-R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	Weisburg <i>et al.</i> 1991
M13-47	5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'	TaKaRa
RV-M	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'	TaKaRa
GC341F	5'-CCTACGGGAGGCGAGCAG-3'	Baker <i>et al.</i> 2004
534R	5'-ATTACCGGGCTGCTGG-3'	Muyzer <i>et al.</i> 1993

1.2 凡纳滨对虾肠道总 DNA 提取

将对虾肠道内容物放于离心管中,7500 r/min 离心 10 min,弃上清液。向沉淀中加入 180 μ l Buffer GTL,震荡使菌体重悬。加入 20 μ l Proteinase K,涡旋混匀,56 $^{\circ}$ C 孵育直至菌体完全裂解,涡旋震荡 15 s,加入 200 μ l Buffer GL,涡旋震荡充分混匀;加入 200 μ l 无水乙醇,涡旋震荡充分混匀,8000 r/min 离心 1 min,弃废液。加入 500 μ l Buffer GW1,8000 r/min 离心 1 min,弃废液。加入 500 μ l GW2,14000 r/min 离心 1 min,弃废液。14000 r/min 重复离心 2 min,弃废液。加入 200 μ l Buffer GE, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

PCR 反应采用 50 μ l 体系,包括 1 μ l DNA 模板, Premix Ex *Taq* 1.25 U,引物各 1 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,切下目的 DNA 条带,按胶回收试剂盒使用说明进行纯化。

1.4 16S rDNA 克隆文库构建和 RFLP 分析

将回收的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体中,用无菌枪头分别挑取 LB/Amp 平板上所有阳性单克隆于加有 10 μ l 无菌水的 PCR 管作为模板,用引物 RV-M 和 M13-47 进行菌落 PCR;再以 0.5 μ l 稀释 10⁶ 倍的菌落 PCR 产物为模板进行巢式 PCR(利用 16S 通用引物 27-F 和 1492-R),巢式 PCR 产物即为连接到载体上的 16S rDNA 片段,大小约为 1500 bp。将巢式 PCR 产物用 *Afa* I 和 *Msp* I 两种核酸限制性内切酶进行 RFLP 分析,在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳;分析克隆子 RFLP 谱型,计算每个谱型的出现频率,使用 Good(1953)提出的 Coverage (*C*)来阐述 16S rDNA 克隆文库的库容,及所获得到信息能否代表凡纳滨对虾肠道微生物的多样性。计算公式如下:

$$C = 1 - n1/N$$

式中,*N* 为 16S rDNA 克隆文库的库容,*n1* 为 16S rDNA 克隆文库中出现过一次的克隆子。

若 Coverage *C* 很高,可说明库容足够。挑取代表克隆子于北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序;所得测序用 DNAMAN 去除载体序列后,将有效序列在 NCBI 上进行比对,找出相关序列及其所属的微生物种类范畴。

1.5 16S rDNA V3 区的 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA V3 区通用引物 GC341F 和 534R(Baker *et al.* 2004; Muyzer *et al.* 1993)。GC 夹防止 DNA 在 DGGE 电泳过程中完全解链。50 μ l 反应体系包括 1 μ l DNA 模板, Premix Ex *Taq* 1.25 U,引物各 1 μ l。采用 Touchdown-PCR:95 $^{\circ}$ C 4 min,20 个循环 94 $^{\circ}$ C 1 min,65 - 55 $^{\circ}$ C 每一循环降 0.5 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 45 s,20 个循环 94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 10 min 进行扩增(Don *et al.* 1991),PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 DGGE 图谱条带分析

将肠道细菌 16S rDNA V3 区扩增产物在 DGGE 垂直电泳系统中进行电泳,温度为 60℃。聚丙烯酰胺凝胶变性浓度梯度为 45% - 65%,60 V 电泳 16 h 后使用银染显色,在成像系统紫外下照相检测条带(宫曼丽等 2004)。使用软件 Quantity One 分析 DGGE 图像。

1.7 DGGE 条带回收和序列分析

选择图谱中条带清晰的优势条带,切胶并将其捣碎浸于 50 μ l 灭菌水中,4℃ 过夜,然后取 2.5 μ l 作为模板进行 PCR 反应,除引物不带 GC 夹子外,其他反应条件同上。纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体中,蓝白斑筛选并鉴定阳性克隆,选择含有正确插入片段的克隆测序,测序结果在 GenBank 中进行序列同源性比对。

2 结果与分析

2.1 RFLP 结果和分析

8 月对虾肠道文库中的 200 个克隆子中筛选可能不同来源的克隆子 5 个。以 Coverage *C* 来评估所构建文库对环境微生物多样性的体现。结果表明,所构建的 16S rDNA 克隆文库覆盖率为 97.5%,即包含了对虾肠道中 97.5% 的细菌多样性状况。

10 月样品克隆文库中的白色菌落共 87 个,菌落 PCR 检测阳性克隆为 85 个,阳性率为 97.7%。巢氏 PCR 产物经过双酶切显示共有 8 个细菌谱型(图 1)。以 Coverage *C* 来评估所构建文库对环境微生物多样性的体现,结果表明,所构建的 16S rDNA 克隆文库覆盖率为 90.8%,即包含了对虾肠道中 90.8% 的细菌多样性状况。8 月和 10 月代表克隆子测序所得序列在 GenBank

中进行 BLAST 比对,序列来源、菌株名称、相似度和归属类群见表 2。8 月中的 Unculturable bacterium 所占比例为 94.63%,同属变形细菌门(Proteobacteria) α -proteobacteria 类群中的 *Ruegeria* spp. 和 *Rhodobacterales* spp. 分别占 0.671% 和 4.70%。10 月中的 Unculturable bacterium 所占比例为 11.8%,变形细菌门中的 γ -proteobacteria 类群中的弧菌属、*Neptunomonas* spp.、发光杆菌属 *Photobacterium* spp. 细菌分别为 32.8%、2.4% 和 7.1%,杆菌(Bacilli)中的芽孢杆菌属 *Bacillus* spp. 细菌为 45.9%。

2.2 DGGE 结果和分析

本研究 DGGE 结果表明,使用 16S rDNA V3 区的引物得到的微生物多样性很丰富,并且不同取样时间的条带数量、位置及亮度均有差异。其中 8 月样品出现 9 条(图 2-A),10 月样品出现 12 条(图 2-B)。有的条带两个月中都出现,有的条带只在单月中出现。即使同时出现在 8 月和 10 月的同一条带其光密度也存在差异,例如同一条带(D0805/D1011)在两个月中的光密度明显不同(图 3),这种光密度的变化一定程度上反应了菌群相对丰度的变化。克隆子经测序所得序列,在 GenBank 中进行 BLAST 比对,其序列来源、菌株名称、相似度和归属类群见表 3。两个月以 Unculturable bacterium 和弧菌属为主要优势菌属,其次为 *Ruegeria* spp.、*Streptomyces* spp.、*Enterococcus* spp. 和发光杆菌属菌株。

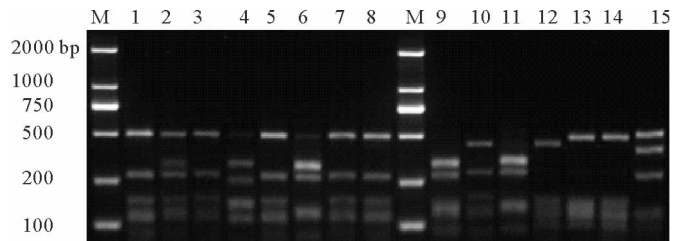


图 1 16S rDNA 克隆文库部分克隆子双酶切图谱

Fig. 1 Double enzyme digestion of partial clones of 16S rDNA library

M: DNA marker; 1 - 15: 部分克隆子双酶切图谱

Double enzyme digestion of partial clones

表 2 16S rDNA 序列来源和数据库存取号

Table 2 Source and accession number of 16S rDNA sequences

菌株编号 Strain number	登录号 Accession No.	菌株名称 Bacterium for alignment	相似度 Identity(%)	归属类群 Taxonomic group
R0801 (8 月第 1 种谱型)	KC120656.1	Unculturable bacterium	96	Unculturable bacterium
R0802 (8 月第 2 种谱型)	DQ015774.1	Unculturable bacterium	97	Unculturable bacterium
R0803 (8 月第 3 种谱型)	CU915017.1	Unculturable bacterium	96	Unculturable bacterium
R0804 (8 月第 4 种谱型)	FM180519.1	<i>Rhodobacterales</i> spp.	98	α -proteobacteria
R0805 (8 月第 5 种谱型)	EU624444.1	<i>Ruegeria</i> spp.	99	α -proteobacteria
R1001 (10 月第 1 种谱型)	HM852450.1	<i>Bacillus</i> spp.	99	Bacilli
R1002 (10 月第 2 种谱型)	EU584537.1	<i>Bacillus</i> spp.	99	Bacilli
R1003 (10 月第 3 种谱型)	EF187010.1	<i>Vibrio</i> sp.	99	γ - proteobacteria
R1004 (10 月第 4 种谱型)	AF493803.1	<i>Vibrio</i> sp.	99	γ - proteobacteria
R1005 (10 月第 5 种谱型)	JQ218514.1	Unculturable bacterium	99	Unculturable bacterium
R1006 (10 月第 6 种谱型)	AY147860.1	<i>Photobacterium</i> spp.	99	γ - proteobacteria
R1007 (10 月第 7 种谱型)	GU293173.1	Unculturable bacterium	96	Unculturable bacterium
R1008 (10 月第 8 种谱型)	JF748732.1	<i>Neptunomonas</i> spp.	99	γ - proteobacteria

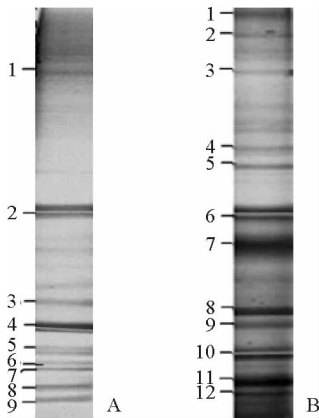


图 2 DGGE 分析凡纳滨对虾肠道微生物多样性
Fig. 2 DGGE analysis of intestinal bacteria diversity
in *Litopenaeus vannamei*

A: 8 月对虾肠道 DNA 样品; B: 10 月对虾肠道 DNA 样品
A: Samples in Aug; B: Samples in Oct

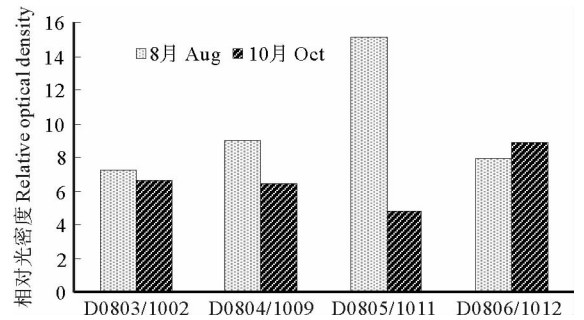


图 3 部分条带在不同月份的光密度变化
Fig. 3 Optical density of respective bands
in different month

表 3 DGGE 分离的 16S rDNA 序列来源和数据库存取号

Table 3 Source and accession number of 16S rDNA sequence separated by DGGE

菌株编号 Strain Number	登录号 Accession No.	菌株名称 Bacterium for alignment	相似度 Identity(%)	归属类群 Taxonomic group
D0801 (8 月第 1 条带)	JX915780.1	<i>Streptomyces</i> sp.	99	Actinobacteridae
D0802 (8 月第 2 条带)	JX523669.1	Unculturable <i>Enterococcus</i> spp.	98	α -proteobacteria
D0803 (8 月第 3 条带)	JX679625.1	Unculturable <i>Enterococcus</i> spp.	100	α -proteobacteria
D0804 (8 月第 4 条带)	JN399993.1	Unculturable bacterium	100	Unculturable bacterium
D0805 (8 月第 5 条带)	JX028545.1	<i>P. damsela</i>	100	γ - proteobacteria

续表 3

菌株编号 Strain Number	登录号 Accession No.	菌株名称 Bacterium for alignment	相似度 Identity(%)	归属类群 Taxonomic group
D0806 (8 月第 6 条带)	JX861208.1	<i>Vibrio</i> sp.	98	γ - proteobacteria
D0807 (8 月第 7 条带)	JN399826.1	Unculturable bacterium	100	Unculturable bacterium
D0808 (8 月第 8 条带)	JN871705.1	<i>Vibrio</i> sp.	97	γ - proteobacteria
D0809 (8 月第 9 条带)	HF558767.1	Unculturable bacterium	100	Unculturable bacterium
D1001 (8 月第 1 条带)	AY620976.1	<i>Vibrio</i> sp.	99	γ - proteobacteria
D1002 (10 月第 1 条带)	JX468071.1	<i>Vibrio</i> sp.	100	γ - proteobacteria
D1003 (10 月第 2 条带)	JX679625.1	Unculturable <i>Enterococcus</i> spp.	100	α -proteobacteria
D1004 (10 月第 3 条带)	JX206566.1	Unculturable bacterium	100	Unculturable bacterium
D1005 (10 月第 4 条带)	JX468071.1	<i>Vibrio</i> sp.	100	γ - proteobacteria
D1006 (10 月第 5 条带)	JQ217323.1	Unculturable <i>Ruegeria</i> spp.	100	α -proteobacteria
D1007 (10 月第 6 条带)	EU267654.1	<i>Vibrio</i> sp.	98	γ - proteobacteria
D1008 (10 月第 7 条带)	EU413955.1	<i>Vibrio</i> sp.	99	γ - proteobacteria
D1009 (10 月第 8 条带)	JX679625.1	Unculturable <i>Enterococcus</i> spp.	100	α -proteobacteria
D1010 (10 月第 9 条带)	JN399993.1	Unculturable bacterium	100	Unculturable bacterium
D1011 (10 月第 11 条带)	JX028545.1	<i>P. damsela</i>	100	γ - proteobacteria
D1012 (10 月第 12 条带)	JX861208.1	<i>Vibrio</i> sp.	98	γ - proteobacteria

3 讨论

对虾肠道中的细菌起到保障肠道黏膜体系的屏障作用,其良好的微生态群落结构对提高养殖对虾饲料消化率、机体免疫力和抗病力意义重大。然而常规细菌培养有一定的局限性,大量研究表明,可分离培养的海洋细菌数量不足客观存在的 1%,即 99% 以上的细菌是目前传统方法所不能培养的。以 PCR-16S rDNA 为基础的方法中,PCR 模板为对虾肠道细菌总 DNA,其中既含有可培养微生物的 DNA,也含有不可培养微生物的 DNA,反应的微生物种类要比传统可培养微生物的种类多。李可等(2007)应用 RFLP 技术分析了在实验养殖条件下对虾肠道菌群的微生物群落特征。Papakostas 等(2006)运用 DGGE 技术分析欧洲养殖场鱼苗培育所用的轮虫并不是通常认为的 *Brachionus plicatilis* 和 *B. rotundiformis*,而是 *B. sp. Cayman*。Mohamed 等(2008)运用 DGGE 技术结合 16S rRNA 基因克隆文库分析,研究了养殖水体与自然水体中海绵 *Mycale laxissima* 上的细菌群落的差异性,结果表明,在 *M. laxissima* 上细菌多样性明显增加。但国内应用 DGGE 和 RFLP 分析水产动物微生物动态变化的研究尚少。

本研究应用 RFLP 和 DGGE 分析技术得出 8 月以 Unculturable bacterium 为主要优势菌,其次为 *Ruegeria* spp.、弧菌属、*Rhodobacterales* spp.、*Streptomyces* spp.、*Enterococcus* sp. 和 *Photobacterium damsela*。10 月以 Unculturable bacterium 和弧菌属为主要优势菌属,其次为发光杆菌属、*Neptunomonas* spp.、*Streptomyces* spp.、*Ruegeria* spp.、*Enterococcus* sp. 和芽孢杆菌属 *Bacillus* spp.。宛力等(2006)从健康养殖的凡纳滨对虾肠道中分离出 111 株细菌,其优势菌为发光杆菌属、弧菌属、气单胞菌属、肠杆菌科、黄单胞菌属。Wang 等(2000)从野生健康中国对虾中分离出 47 株菌,其弧菌属和发光杆菌属在整个肠道中为优势菌属。李可等(2007)从实验养殖条件下凡纳滨对虾肠道中分离出希瓦氏菌属、泛菌属、假单胞菌属和弧菌属。本研究也发现了弧菌属发光杆菌属,且在本研究中弧菌属在 10 月中所占的比例要大于 8 月,可能是由于 WSSV 的发生,导致肠道菌群结构的改变。因为在 9 月养殖场出现大批量对虾死亡,有典型的 WSSV 症状。病毒病的发生可能影响了对虾肠道微生物菌群的组成,这也是 8 月和 10 月样品微生物差异的原因之一。

Tannock(1998)研究哺乳动物肠道中正常菌群对宿主健康状况的影响实验,证实了动物肠道中正常菌群的失衡会引起不同类型的疾病,反之,不同类型的疾病也可能造成正常微生物的失衡。通过本研究表明,利用 RFLP 和 DGGE 两种方法对对虾肠道样品进行分析都可以得到一定的微生物多样性方面的信息,但是二者结

果有差异, RFLP 分析的肠道类群归属为 γ -proteobacteria、 α -proteobacteria、Unculturable bacterium、Bacilli。DGGE 分析的肠道类群归属为 γ -proteobacteria、 α -proteobacteria、Unculturable bacterium、Actinobacteridae。两种方法分析的肠道菌群有相同归属类群如 γ -proteobacteria、 α -proteobacteria、Unculturable bacterium, 不同类群如 RFLP 分析得到了 Bacilli, DGGE 分析得到了 Actinobacteridae, 可能是 Actinobacteridae 占肠道总菌群落数的 1%, 因为 DGGE 可检测到数量仅占总群落数 1% 的微生物。所以将二者的分析结果综合考虑, 可以形成互补, 更充分和全面地了解微生物多样性, 使实验结果更接近对虾肠道的真实情况, 为开展水产动物肠道菌群的研究及益生菌的应用提供理论依据。

参 考 文 献

- 王亭芳, 金凤杰, 马士禹, 常忠文, 赵云龙, 高红亮. 2012. DGGE 技术对南美白对虾养殖水体中微生物多样性的研究. 生物技术通报, (10):131-136
- 王李宝, 万夕和, 徐献明, 丁楠, 陈颀, 吴兴兵. 2006. 四株异氧硝化细菌的鉴定及硝化能力的初步研究. 水产养殖, 27(2):7-9
- 兰萍, 宋晓玲, 张辉, 成君军. 2010. 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫功能及抗病力的影响. 渔业科学进展, 31(1):65-73
- 李可, 郑天凌, 田蕴, 袁建军. 2007. 南美白对虾肠道微生物群落的分子分析. 微生物学报, 47(4):649-653
- 陈金华, 王中康, 贺闻, 殷幼平. 2008. DGGE 和 RFLP 方法分析桑粒肩天牛幼虫肠道微生物多样性. 生物技术通报, (6):113-119
- 宛力, 王吉桥, 高峰, 杨士勇, 王年斌. 2006. 南美白对虾肠道细菌菌群影响的研究. 水产科学, 25(1):13-15
- 官曼丽, 任南琪, 邢德峰. 2004. DGGE&TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用. 微生物学报, 44(6):846-847
- 柴鹏程, 宋晓玲. 2013. 饲料中添加芽孢杆菌 PC₄₆₅ 对凡纳滨对虾生长和 STAT 基因表达的影响. 渔业科学进展, 34(3):97-103
- Baker PW, Harayama S. 2004. An analysis of microorganisms in environments using denaturing gradient gel electrophoresis. In: Spencer JFT, Ragout de Spencer A Leds. Methods in Biotechnology, vol. 16: Environmental Microbiology: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey 323-338
- Chaiyapechara S, Rungrassamee W, Suriyachay I and 4 others. 2012. Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms. Microbiol Ecol 63(4):938-953
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ and 2 others. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res 19(14):4008
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H and 2 others. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 17(19):7843-7853
- Good IJ. 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika 40(3-4):237-264
- Li P, Burr GS, Gatlin DM and 4 others. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. J Nutr 137(12):2763-2768
- Mohamed NM, Enticknap JJ, Lohr JE and 2 others. 2008. Changes in bacterial communities of the marine sponge *Mycale laxissima* on transfer into aquaculture. Appl Environ Microbiol 74(4):1209-1222
- Muyzer GE, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695-700
- Papakostas S, Dooms S, Triantafyllidis A and 9 others. 2006. Evaluation of DNA methodologies in identifying *Brachionus* species used in European hatcheries. Aquaculture 255(1-4):557-564
- Tannock GW. 1998. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. Int Dairy J 8(5-6):527-533
- Wang XH, Li HR, Zhang XH and 3 others. 2000. Microbial Flora in the digestive tract of adult Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). Journal of Ocean University of Qingdao 30(3):493-498
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and 1 other. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173(2):697-703