

# 池塘养殖仿刺参(*Apostichopus japonicus*) 肠含物、附着基和底泥中的 菌群结构及其相关性\*

李 彬<sup>1</sup> 廖梅杰<sup>1</sup> 荣小军<sup>1</sup> 张 正<sup>1</sup>  
王印庚<sup>1,2①</sup> 陈贵平<sup>1</sup> 王 岚<sup>1</sup> 范瑞用<sup>3</sup>

1. 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;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;
3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266409)

**摘要** 2014年10月,利用 PCR-DGGE 技术分析了标准化养殖池塘中仿刺参(*Apostichopus japonicus*) 肠含物及附着基和底泥中细菌的菌群结构及其相关性。结果显示,仿刺参肠含物、附着基、底泥中细菌多样性较高,分别平均获得 30.00±1.00、15.33±1.70、21.67±2.62 条带,肠含物中细菌种类数显著高于附着基和底泥。聚类分析和戴斯系数表明,不同池塘的仿刺参肠含物样本单独聚为一支,相似性达到 0.785,附着基和底泥样品聚为一支,平均相似性达到 0.532。不同样品 DGGE 图谱中 20 条优势条带的切割、克隆、测序,共获得了 20 条细菌序列,表明肠含物细菌种类以聚球藻属(*Synechococcus* sp.)、脱硫杆菌属(*Desulfobacterium*)、脱硫叠球菌属(*Desulfosarcina* sp.)、极地杆菌属(*Polaribacter*)、*Algibacter* sp. 为主,附着基中主要以 *Robiginitalea* sp. 和 *Silicibacter* sp. 为主,底泥样品中主要以假单胞菌属(*Proteobacterium*)、噬胞菌属(*Cytophaga*)、*Desulfosarcina* sp. 为主,肠含物中细菌特有种类的分离与鉴定为仿刺参养殖潜在益生菌的开发提供基础数据。

**关键词** PCR-DGGE; 仿刺参; 肠含物; 环境; 细菌

中图分类号 S966 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2016)05-0127-06

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)属底栖性生物,主要以微生物、微藻、大型藻类碎片、有机碎屑、底泥等为食(于东祥等, 2005; 田传远等, 2008),其中细菌是仿刺参能量的主要来源(廖玉麟, 1997)。仿刺参的消化系统较为简单,肠道是主要的消化器官,能够利用简单的消化系统消化复杂的食物,除了消化系统消化外,肠道中的菌群也起到了重要的作用。食物进入肠道后,大量定植细菌也进入食物内,辅助仿刺参消化复杂的食物,抑制食物中病原菌的繁殖和侵袭

(Clifford *et al.*, 1982)。仿刺参肠道中的复杂细菌主要来源于栖息环境,并与外界环境菌群保持相对稳定的动态平衡。

仿刺参池塘养殖工艺简单、产量和效益可观,是仿刺参养殖主要的方式之一,其中山东省仿刺参池塘养殖面积占 23%(李成林等, 2010)。仿刺参池塘养殖过程中可通过投喂益生菌剂调节养殖环境和仿刺参肠道中的菌群结构,实现健康养殖。因此,研究池塘养殖中的仿刺参肠含物及环境中菌群结构,对解析仿刺

\* 中央级科研院所基本科研业务费专项资金项目(20603022015015)、山东省自主创新成果转化专项(2013ZHXX2A0801)、青岛市海洋经济创新发展区域示范项目(海水健康养殖专用微生态制剂的开发应用与产业化项目)和海洋经济创新发展区域示范重点项目(山东省海水养殖重要疾病高效专用药物研发及产业化)共同资助。李 彬, E-mail: libin@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王印庚, 研究员, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-07-27, 收修改稿日期: 2015-09-18

参肠道消化作用,分析肠道中潜在益生菌具有重要意义。

平板培养法是分析环境细菌数量和种类的传统方法,但受培养基种类、浓度及培养条件的限制,大多数细菌不能在同一种培养基上生长(乔旭东等,2007)。据报道,目前99%以上的海洋细菌为非可培养细菌(张晓华等,2007),传统的平板培养法不能客观、真实地反映样品菌群结构。近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,相继建立了不依赖于培养法的菌群结构分析方法,其中,PCR-DGGE 技术突破了传统方法的局限,且成本低、速度快、操作简单,广泛应用在环境微生物多样性的研究(刘新春等,2005;张振冬等,2008;马悦欣等,2003)。本研究利用 PCR-DGGE 技术分析了池塘养殖仿刺参肠含物和养殖环境的菌群结构,利用生物信息学解析了二者的相关性,以期为仿刺参健康养殖和开发益生菌提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 采样

实验在位于青岛市黄岛区琅琊镇的青岛瑞滋海珍品发展有限公司的 3 个标准化仿刺参养殖池塘中进行,池塘长 400 m、宽 100 m、水深 1.8 m;2014 年 10 月中旬采样,采样时水温为 16℃,盐度为 32;池塘附着基为瓦片附着基。

底泥样品用采泥器采集池底表层沉积物,每个池塘选 3 个采样点,样品采集后进行混合,-20℃保存,不同池塘的样品编号为 N1、N2、N3。

每个池塘随机取 3 片上层瓦状附着基,用无菌勺刮取其上的沉积物混合后-20℃保存,不同池塘附着基样品编号为 F1、F2、F3。

每个池塘的附着基周围随机采集 3 头仿刺参,仿刺参规格为(150±10) g,无菌操作下剖取完整肠道,用镊子轻轻挤压肠道,收集肠含物后混合样品,-20℃保存,不同池塘肠含物样品编号为 C1、C2、C3。

### 1.2 基因组 DNA 提取

利用 OMEGA 公司的 Soil DNA Kit 试剂盒提取样品的细菌 DNA。

### 1.3 PCR 扩增

采用细菌 16 S rDNA 的 V3-V5 区引物 341F-GC(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 907R(5'-CCGTC AATT CCTTGAGTTT-3')。PCR 反应采用 50 μl 反应体系:1×Buffer,引物 0.2 μmol/L, dNTP 200 μmol/ml, *Taq* DNA 聚合酶 4 U, DNA 模板 50 ng,灭菌水补充至 50 μl。反应条件为:94℃预变性 5 min,前 10 个循环为 94℃

30 s, 65℃-55℃ 30 s, 72℃ 1 min(其中每个循环复性温度下降 1℃),后 20 个循环为 94℃ 30 s,55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 72℃延伸 10 min, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

用于分离 16S rDNA 片段的 DGGE 电泳条件为:6%(w/v)聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1),变性剂为尿素,变性梯度浓度范围为 30%-70%,将 PCR 产物与 2×loading Buffer 按 1:1 进行混合,每个加样孔的上样量为 30 μl,120 V 60℃电泳 12 h。使用 1% Genefinder 对凝胶进行染色,UVP 凝胶影像系统拍照。

### 1.5 DGGE 条带的重扩增、克隆及测序

在紫外灯下切割各泳道主要的条带,切割后将胶置于 30 μl 的 ddH<sub>2</sub>O 中过夜,12000 r/min 离心 10 min 取上清液。用回收的 DNA 1 μl 做模板,以不带 GC 夹的 341F/907R 进行 PCR 扩增。对 PCR 产物纯化后,连接到 pEASY-T1 载体上,并转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞中,37℃培养,对检测阳性样品送公司测序。

### 1.6 数据处理

利用 Quantity One 软件处理与分析 DGGE 指纹条带,分析不同样品菌群结构的相关性。利用 BLAST 方法在 NCBI 数据库中,比较回收条带测序所获得的基因序列的同源性。从中选取与其相似性最高的细菌基因序列,采用 Clustalw 软件进行多序列匹配排序,用系统发生推断软件包 PHYLIP 3.67 进行聚类分析。采用邻位相连法获得系统发育树,通过自举进行系统进化树的评估,自举数据集为 1000 次。

## 2 结果

### 2.1 16 S rDNA PCR 扩增

利用细菌 16 S rDNA 通用引物 GC-F341/R907 对提取的细菌 DNA 进行 PCR 扩增。结果显示,扩增条带亮度和特异性均较好,未出现非特异性扩增条带,通过与 DNA Marker 对比,片段大小在 550 bp 左右。

### 2.2 DGGE 指纹图谱分析

DGGE 电泳结果显示,上述样品 DNA 扩增产物经聚丙烯酰胺变性梯度凝胶电泳均获得了条带清晰电泳图谱,将 DGGE 指纹图谱中位于相同位置的条带规定为一个可操作分类学单位(OTU, Operational Taxonomic Unit)(赵兴青等,2006)。不同样品之间条带的粗细、数目和位置不同,说明仿刺参肠含物与养

殖环境中细菌群落结构不同,泳道中条带粗细、数目不一,条带的数目反映出群落的生物种类的多样性,条带信号强弱反映各物种的丰度(罗鹏等,2009)。由 DGGE 指纹图谱(图 1)和(图 2)可以看出,C1、C2、C3、F1、F2、F3、N1、N2、N3 分别获得 29、30、31、17、16、13、24、23、18 条可见条带,肠含物、附着基、底泥平均条带数分别为 30.00±1.00、15.33±1.70、21.67±2.62。肠含物中细菌种类较多,底泥次之,附着基细菌种类最低,仿刺参肠含物与养殖环境中细菌群落优势条带十分明显,它们分别对应 DGGE 指纹图谱中的亮条带,肠含物中优势条带明显而且比较多,说明肠道中存在优势度较高的细菌种类。

用戴斯系数计算出的各样品相似性矩阵见图 3。图 3 显示,各样品按相似程度可以分为 4 大簇,其中 3 个肠含物(C1、C2、C3)聚为一簇,相似性在 0.725-0.843 之间,平均相似性为 0.785。附着基样品(F1、F3)聚为一簇,相似性为 0.658,底泥样品(N1、N3)聚为一簇,相似性为 0.642,附着基样品 F2 与底泥样

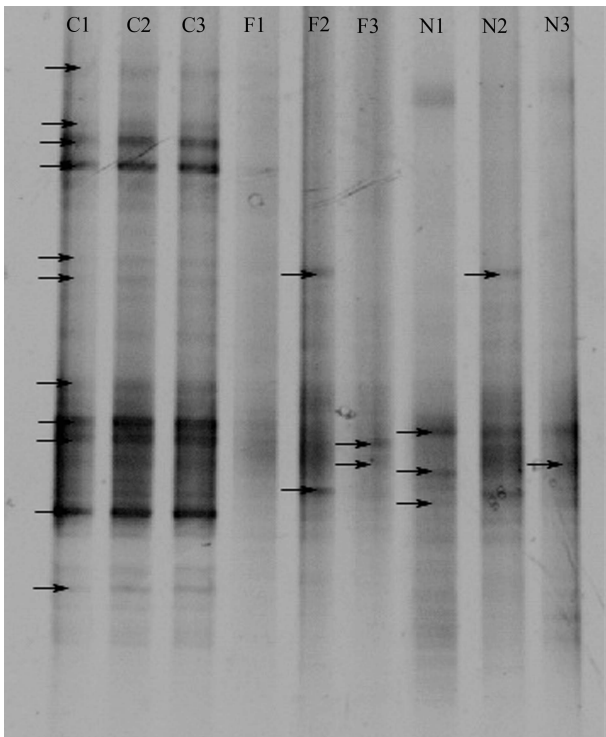


图 1 各样品 16S rDNA 扩增产物的 DGGE 电泳结果  
Fig.1 The PCR-DGGE electrophoresis results of 16S rDNA from different samples

C1、C2、C3 为肠含物样品; F1、F2、F3 为附着基样品; N1、N2、N3 为底泥样品  
C1, C2, C3: Gut content; F1, F2, F3: Attachments;  
N1, N2, N3: Bottom sediment

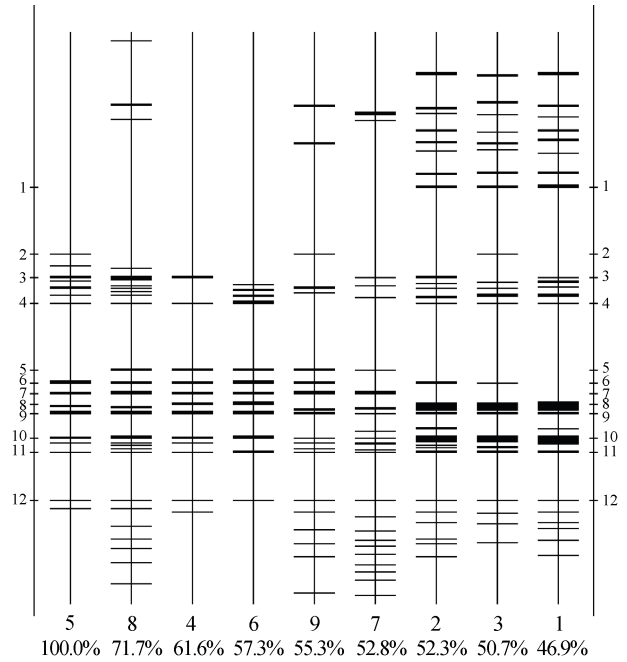


图 2 仿刺参肠含物与养殖环境样本 DGGE 指纹图谱  
Fig.2 The pattern of PCR-DGGE fingerprint of 16S rDNA from *A. japonicus* gut content samples and culture environment samples

1、2、3 为肠含物样品; 4、5、6 为附着基样品; 7、8、9 为底泥样品  
1, 2, 3: Gut content; 4, 5, 6: Attachments;  
7, 8, 9: Pond sediment

品 N2 聚为一簇,相似性为 0.717。从聚类分析和相似性系数可以看出: 3 个肠含物(C1、C2、C3)、2 个附着基样品(F1、F3)、2 个底泥样品(N1、N3)分别具有高度的相似性。其中,附着基 F2 与 F1、F3 有差异,底泥样品 N2 与 N1、N3 有差异,这种差异反映了它们细菌群落的不同。通过聚类分析还可以看出,附着基与底泥样品在各自聚为一簇的同时,最后聚为一大簇,说明附着基与底泥样品细菌群落结构相似性较高,平均相似性为 0.532。

### 2.3 DGGE 主要条带测序及序列比对分析

对 DGGE 指纹图谱的 20 条主要条带进行切割,切割条带位置如图 1 箭头所示。切割条带全部获得阳性克隆,所获得的序列在 NCBI 中用 BLAST 进行同源性比较,20 个序列所代表的细菌种类比较广泛(图 4),包括以下几个纲(门): 蓝藻门(Cyanophyta)、 $\alpha$ -变形菌纲、 $\delta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲、黄杆菌纲(Flavobacteria)、鞘脂杆菌纲(Sphingo bacteria), 其中 8 个序列在 NCBI 比对结果是未可培养的细菌(Uncultured bacterium)。变形细菌门(Proteobacteaia)在 12 个序列中占 41.6%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)占 33.3%, 说明变形细

菌门和拟杆菌门是养殖仿刺参肠含物与环境中的主要细菌类群。12个序列中,肠含物主要以聚球藻属(*Synechococcus* sp.)、脱硫杆菌属(*Desulfobacterium*)、脱硫叠球菌属(*Desulfosarcina* sp.)、极地杆菌属(*Polaribacter*)、*Algibacter* sp. 为主,附着基样品中主要以 *Robiginitalea* sp.、*Silicibacter* sp. 为主,底泥样品中主要以假单胞菌属(*Proteobacterium*)、噬胞菌属(*Cytophaga*)、*Desulfosarcina* sp. 为主。

仿刺参肠含物与养殖环境样本 DGGE 指纹图谱戴斯系数见表 1。

表 1 仿刺参肠含物与养殖环境样本 DGGE 指纹图谱戴斯系数  
Tab.1 The similarity index between the gut content of the sea cucumber and culture environment samples based on the PCR-DGGE fingerprint (%)

	C1	C2	C3	F1	F2	F3	N1	N2	N3
C1	100.0								
C2	84.3	100.0							
C3	72.5	81.8	100.0						
F1	39.2	46.1	39.8	100.0					
F2	46.9	52.3	50.7	61.6	100.0				
F3	49.5	52.1	51.6	65.8	57.3	100.0			
N1	40.1	40.3	36.2	48.7	52.8	35.9	100.0		
N2	49.0	55.4	52.5	67.0	71.7	65.9	59.8	100.0	
N3	33.0	40.3	43.1	53.5	55.3	47.2	64.2	60.7	100.0

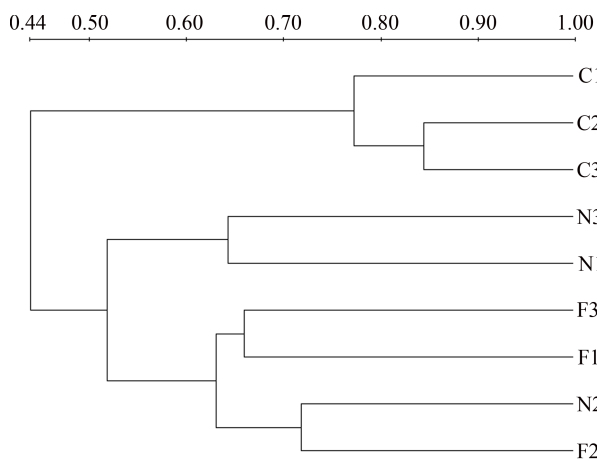


图 3 仿刺参肠含物与养殖环境样本 DGGE 指纹图谱的聚类分析

Fig.3 The clustering analysis of the gut content of the sea cucumber and culture environment samples based on the PCR-DGGE fingerprint

### 3 讨论

PCR 扩增片段的大小影响 DGGE 效果, 500 bp 以上的片段分辨率降低, 200 bp 片段分辨率最好, 但 200 bp 在片段分析过程中缺乏足够的序列信息, 判断细菌所属类群的片段必须在 500 bp 以上(Hugenholtz *et al*,

1998)。本研究利用细菌 16S rDNA V3-V5 区的特异性引物 341F/907R, 扩增片段大小在 550 bp 左右, 即保证了电泳的分辨率, 也保存了细菌的片段信息。

仿刺参能够利用简单的消化系统从藻类和有机碎屑中提取营养成分, 合成自身的蛋白质。据报道, 在仿刺参肠道中含有大量的消化酶如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、褐藻酸酶(王吉桥等, 2007), 除了消化酶外, 肠道内还具有大量辅助消化的细菌(Naomi *et al*, 1996)。本研究分析了仿刺参肠含物及养殖池塘环境(附着基、底泥)中的菌群结构, 结果显示, 肠含物、附着基、底泥中细菌群落多样性丰富, 肠含物中细菌的种类和丰度最为丰富, 推测肠含物中含有大量与消化有关的细菌。有研究表明, 海参消化道中细菌数量要比周围环境沉积物中的细菌数量多, 这与仿刺参的食性有关(于东祥等, 2005), 与本研究结果一致。Barlocher 等(1978)研究发现, 仿刺参摄入的一些细菌不能被消化, 而在肠道中定植下来, 通过分解食物或产生一些消化酶来辅助消化或提供营养物质。本研究中, 肠含物中的细菌与养殖环境不同, 肠道中特有的优势细菌可能与仿刺参苗期环境中细菌在肠道中定植有关, 是仿刺参肠道中定植辅助消化的定植菌。一般来自同一仿刺参养殖环境中相同来源样品细菌的多样性具有较高的相似性, 聚类分析表明, 本研究中来自同一养殖环境的同一样品之间存在着差异, 可能与仿刺参养殖环境中的大型藻类有关。

本研究中, PCR-DGGE 优势条带测序结果显示, 变形菌门是仿刺参养殖系统中最大的细菌菌群, 这一结论与其他海洋细菌研究结果一致(Stevens *et al*, 2005)。关晓燕等(2010)应用 PCR-DGGE 技术对高温季节养殖环境中的菌群进行了分析, 其主要的优势菌为假单胞菌属, *Uncultured delta bacterium*, *Ostreococcus* sp. *Uncultured alpha proteobacterium*, 其优势细菌的种类与本研究存在差异, 可能与采样时间和地点不同有关, 研究中未被培养的细菌占有优势, 与本研究结果一致。本研究发现, 40%的细菌是未被培养的细菌, 这些细菌是仿刺参肠含物和养殖环境中细菌群落的重要组成部分, Newberry 等(2004)对深海沉积物研究发现, 未被培养的细菌在总细菌中占有优势, 与本研究结果一致。海水中蓝细菌主要为聚球藻属(*Synechococcus*)和原绿球藻属(*Prochlorococcus*), 这 2 个属在海洋食物网中占有重要地位; 赵三军等(2005)研究表明, 胶州湾聚球藻对海洋初级生产力的贡献为 3.7%; Ning 等(2000)研究表明, 夏季聚球藻属对总初级生产力的贡献比较高, 春季较低; 罗鹏等(2009)利用 DGGE 对凡纳滨对



- 高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性. 海洋湖沼通报, 2010, 19(1): 82–88
- 孙奕, 陈騫. 刺参体内外微生物组成及其生理特性的研究. 海洋与湖沼, 1989, 20(4): 300–307
- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省刺参养殖产业现状分析与可持续发展对策. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 127–133
- 张振冬, 王淑芬, 曹宇峰. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用. 海洋环境科学, 2008, 27(3): 297–300
- 张晓华. 海洋微生物学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007, 181–182
- 陈吉刚, 杨秀芳. 极地微生物的工业应用及其与天体生物学研究的联系. 生命的化学, 2008, 28(1): 97–100
- 罗兰, 谢丙炎, 袁忠林, 等. 我国土壤中苏云金芽孢杆菌的分离与基因型的鉴定. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6): 756–759
- 罗鹏, 胡超群, 张吕平, 等. 凡纳滨对虾海水养殖系统内细菌群落的 PCR-DGGE 分析. 中国水产科学, 2009, 16(1): 32–38
- 赵三军, 肖天, 李洪波, 等. 胶州湾聚球菌(*Synechococcus* spp.) 蓝细菌的分布及其对初级生产力的贡献. 海洋与湖沼, 2005, 36(6): 534–540
- 赵兴青, 杨柳燕, 陈灿, 等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究. 生态学报, 2006, 26(11): 3610–3616
- 廖玉麟. 中国动物志. 北京: 科学出版社, 1997, 55–56
- Barlocher FB, Kendrick. Hyphomycetes as intermediaries of energy flow in streams. Recent Advances in Aquatic Mycology, Publisher: Paul Elek, London, 1978, 435–446
- Clifford C, Walsh J, Reidy N, et al. Digestive enzymes and subcellular localization of disaccharidases in some echinoderms. Comp Biochem Physiol B Comp Biochem, 1982, 71(1): 105–110
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J Bacteriol, 1998, 180(18): 4765–4774
- Naomi WR, Fred AR, Erko S. A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra*. J Exp Mar Biol Ecol, 1996, 203(11): 11–26
- Ning XR, Cloem JE, Cole BE, et al. Spatial and temporal variability of picocyanobacteria *Synechococcus* spp. In San Francisco Bay. Limnol Oceanogr, 2000, 45(3): 695–702
- Newberry CJ, Webster G, Cragg BA, et al. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. Environ Microbiol, 2004, 6(3), 274–287
- Stevens H, Stübner M, Simon M, et al. Phylogeny of *Proteobacteria* and *bacteroidetes* from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. FEMS Microbiol Ecol, 2005, 54(3): 351–365

(编辑 江润林)

## Correlation Analysis of Flora in the Habitat Environment and in the Gut Contents of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LI Bin<sup>1</sup>, LIAO Meijie<sup>1</sup>, RONG Xiaojun<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>1</sup>,  
WANG Yingeng<sup>1,2①</sup>, CHEN Guiping, WANG Lan<sup>1</sup>, FAN Ruiyong<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Qingdao Ruizhi Precious Seafood Development Limited Company, Qingdao 266409)

**Abstract** Here we studied the properties of flora in the gut content and attachments of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) as well as in the sediments of pond where sea cucumber were cultured. 16S rDNA PCR denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was employed as the major method. The DGGE band numbers were 30.00±1.00, 15.33±1.70, and 21.67±2.62 for gut content, attachments, and pond sediments respectively. This indicated that the gut content had the highest diversity of bacterial species. UPGMA cluster analysis showed that flora from three gut content samples could be categorized into one branch with a similarity value of 0.785, and that flora from attachments and pond sediment samples were clustered into another branch with a similarity value of 0.532. Twenty specific DGGE bands from the three kinds of samples were cut and sequenced. The results showed that *Synechococcus* sp., *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina* sp., *Polaribacter*, *Algibacter* sp. were the dominant bacterial species in the gut content; *Robiginitalea* sp., *Silicibacter* sp. were dominant in attachments; and *Proteobacterium*, *Cytophaga*, *Desulfosarcina* sp. were dominant in the sediment. The specific bacteria in the gut content could be candidates of probiotics in the sea cucumber culture.

**Key words** PCR-DGGE; *Apostichopus japonicus*; Gut content; Environment; Bacteria

① Corresponding author: WANG Yingeng, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn