

刺参消化道内含物细菌群落组成的PCR-DGGE分析

高菲¹, 孙慧玲¹, 许强², 谭杰¹, 燕敬平¹, 王清印¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用PCR-DGGE技术研究刺参(*Apostichopus japonicus*)前肠、中肠和后肠内含物的细菌群落组成。通过软件Bio-rad Quantity one 分析DGGE 指纹图谱,发现刺参后肠内含物的条带数目显著高于前肠和中肠($P=0.003$, $P=0.016$),表明刺参后肠内含物的细菌多样性最高,其次是中肠;前肠内含物的细菌多样性最低。UPGMA 聚类分析发现,不同刺参个体其后肠的细菌群落组成差异最小,前肠的细菌群落差异最大。经DGGE 分离、条带切割和序列测定,共获得了13条序列,系统发育分析表明,刺参消化道内含物的细菌群落可主要归属于5大类群,即 α -变形菌纲(α -proteobacteria)、 γ -变形菌纲(γ -proteobacteria)、 δ -变形菌纲(δ -proteobacteria)、拟杆菌纲(Bacteroidetes)和柔膜菌纲(Mollicutes)。刺参前肠、中肠和后肠内含物的优势菌群均为 γ -proteobacteria。Blast 分析显示,其中12条与之亲缘关系最近的序列来自从海洋环境中获得的细菌克隆,表明刺参消化道的细菌群落可能直接或间接来源于刺参的栖息地环境。[中国水产科学,2010,17(4): 671-680]

关键词: 刺参; PCR-DGGE; 消化道内含物; 细菌群落

中图分类号: Q959; S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)04-0671-10

动物消化道内生存着大量的微生物,这些微生物之间以及微生物与动物之间形成了相互依存、互相作用的不可分割的整体,它们在动物的消化、吸收、营养、免疫、生物拮抗等很多方面起重要作用。刺参(*Apostichopus japonicus*)为沉积食性,主要靠楯状触手扒取底质表面的沉积物为食,其消化道比其他许多海洋生物都简单。脂肪酸标志法分析显示,细菌是刺参重要的食物来源之一^[1],且刺参超过70%的能量需求来自于细菌^[2]。然而,迄今有关刺参消化道内含物中细菌群落组成的研究还很少,仅见于孙奕和陈驹^[3]通过分离培养法获得的研究结果。但是由于自然界中85%~99%的细菌不可分离培养^[4],他们的研究结果尚难以反映刺参消化道细菌群落组成的实际情况。直接抽提样品总DNA,通过DGGE指纹图谱更加全面地分析微生物群落

组成,目前已成为近年来国内外微生物分子生态学研究的常用方法^[5]。PCR-DGGE 技术可用来监测环境中微生物群落结构在时间或空间上的动态变化,也可以对环境中的微生物多样性进行定性和半定量分析^[6-7]。目前该方法已广泛运用于土壤、海洋、湖泊和肠道等多种生态系统中微生物多样性的调查^[8-11]。

在水产养殖动物胃肠道微生态学研究领域,PCR-DGGE技术已应用于鱼、虾等动物消化道菌群的研究中。Hovda等^[12]利用PCR-DGGE技术分析了大西洋鲑(*Salmo salar* L.)前肠、中肠和后肠的细菌群落组成及优势菌群;Zhou等^[13]利用该技术研究了网箱养殖的青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)胃、幽门盲囊、前肠、中肠和后肠的细菌群落组成;罗鹏等^[14-15]对比研究了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖

收稿日期: 2009-12-04; 修订日期: 2010-02-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40906071); 中国博士后科学基金资助项目(20090451355); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务经费资助项目(2009-ts-07).

作者简介: 高菲(1981-),女,博士后,从事养殖生态学研究. E-mail: gaofei@ysfri.ac.cn

通讯作者: 王清印,研究员,博士生导师. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

环境以及消化道内的细菌群落组成。但采用分子生物学技术分析刺参消化道细菌群落组成的研究还未见报道,本研究应用PCR-DGGE技术对刺参消化道内含物的细菌群落结构及优势菌群进行了分析,获得了前肠、中肠和后肠内含物的细菌群落指纹图谱及群落组成,研究结果将有助于揭示刺参消化过程中肠道细菌群落的动态变化以及细菌群落在刺参消化吸收过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 样品采集

刺参(*Apostichopus japonicus*) ($n=4$)取自青岛即墨刺参养殖池,体质量(109.8 ± 23.97)g,冷藏($0\text{ }^{\circ}\text{C}$)带回实验室。用70%酒精擦洗体表后,用无菌手术刀从腹面解剖刺参。以无菌纯水冲洗肠外壁,断开前肠、中肠和后肠,分别挤出肠内含物于已灭过菌的冻存管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 样品总DNA提取

取冷冻保存的刺参消化道内含物样品,解冻后, $10\ 000\text{ g}$ 离心 3 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$),弃上清。搅匀后称取相同质量(115 mg)的消化道内含物样品,用Epicentre土壤DNA提取试剂盒进行基因组总DNA的提取。提取的DNA通过琼脂糖凝胶电泳(1.0%)检测。

1.3 细菌16S rDNA V3区PCR扩增

以提取的刺参消化道内含物基因组DNA为模板,进行细菌16S rDNA V3区PCR扩增。细菌通用引物序列为:GC-341f($5' - \text{CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA CCG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG} - 3'$)和534r($5' - \text{ATT ACC GCG GCT GCT GG} - 3'$)^[6-7]。PCR程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ,然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s , $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s (每个循环降 $0.8\text{ }^{\circ}\text{C}$,进行18个循环)(Touchdown PCR), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s ,然后再进行12个循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s ,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4 DGGE凝胶电泳

取16S rDNA V3区PCR产物 $90\text{ }\mu\text{L}$ ($4\ 830\text{--}5\ 620\text{ ng}$),

用Bio-Rad公司D-code System电泳仪进行DGGE电泳分离^[6-7]。采用8%聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为35%~50%(7 mol/L尿素和40%去离子甲酰胺为100%变性),电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 135 V 条件下电泳 4 h 。电泳后,用SYBR Green I核酸染料染色 30 min ,超纯水中脱色 15 min 。蓝盾可见光透射仪下进行拍照,通过软件Bio-rad Quantity one进行DGGE指纹图谱的定性和半定量分析。

1.5 DGGE条带的切割、克隆与测序

从DGGE凝胶上小心切下DGGE条带,用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 无菌水冲洗3次后,加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 无菌水在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。 $12\ 000\text{ g}$ 离心 5 min ,收集上清。以此作为模板,用引物341f(不含GC-clamp)、534r进行16S rDNA V3区PCR扩增。PCR程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ;然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s , $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s (每个循环降 $0.8\text{ }^{\circ}\text{C}$,进行18个循环)(Touchdown PCR), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s ;然后再进行7个循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s ,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。将上述V3区PCR产物连接到pMD18-T载体(Takara,大连)上,转化到*E. coli* Top10感受态细胞中,在含有氨苄青霉素的SOB培养基上选择具有氨苄青霉素抗性的白色转化子。采用T载体通用引物M13F、M13R进行菌落PCR,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测是否为阳性克隆。再以阳性克隆的PCR产物为模板进行PCR,引物为GC-341f和534r,条件同上,再进行DGGE,与原来的条带在同一位置的克隆才是真正的阳性克隆,交由南京金斯瑞公司测序。

1.6 16S rDNA序列分析

所得序列提交到GenBank数据库中,并用BLAST程序进行同源性比对,获得与本实验所得序列相似性最高的序列。将这些序列与本实验获得的16S rDNA序列一起,使用CLUSTAL W工具^[7]进行多序列比对。然后使用MEGA中的Kimura双参数修正模型进行系统发育树的构建^[7]。

2 结果与分析

2.1 细菌16S rDNA V3区特征片段DGGE指纹图谱

图1所示为4头刺参前肠、中肠和后肠内含物样

品的DGGE图谱。DGGE图谱中条带的数量可以反映样品的细菌多样性,条带信号的强弱可以反映细菌的相对含量^[6,16]。通过软件Bio-rad Quantity one分析每个样品的条带数目和亮度,研究不同样品中细菌的种类和相对含量,得出其中的微生物多样性信息。

刺参前肠、中肠和后肠内含物的条带数量见图2。由图2可以看出,刺参后肠内含物DGGE图谱的条带数显著高于前肠和中肠($P=0.003$, $P=0.016$),表明刺参后肠内含物的细菌多样性最高,其次是中肠,前肠内含物的细菌多样性最低。

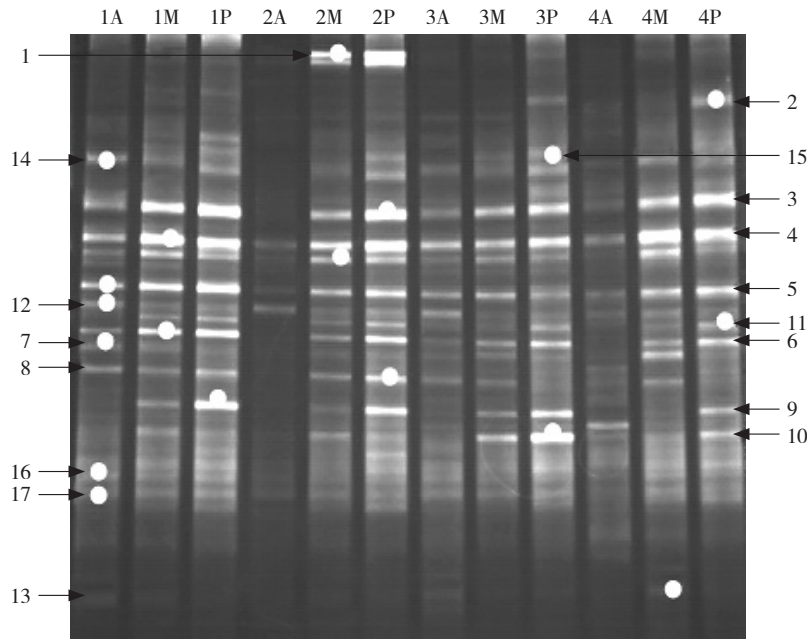


图1 刺参消化道内含物中细菌群落的DGGE图谱

A: 前肠内含物; M: 中肠内含物; P: 后肠内含物; 白点标记的条带为切割用于测序的条带.

Fig. 1 DGGE fingerprints profiles of bacterial communities in the gut content of *A. japonicus*

A: content in anterior intestine; M: content in middle intestine; P: content in posterior intestine. The bands indicated by the white spots were cut and used for sequencing.

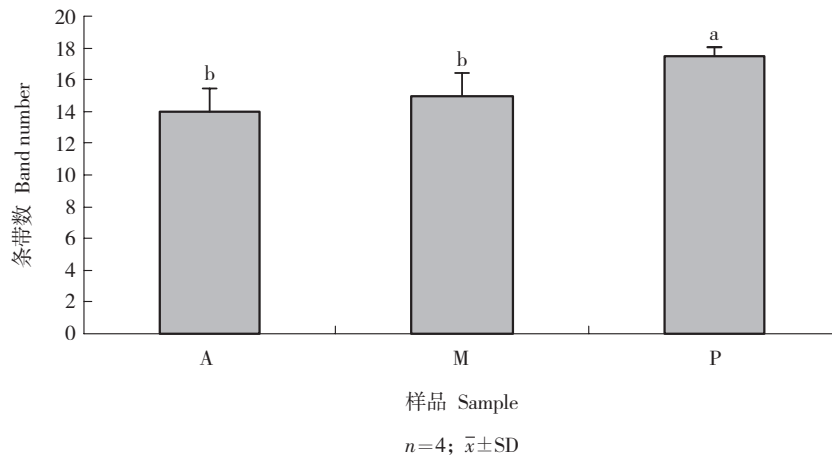


图2 刺参消化道内含物细菌DGGE图谱的条带数

A: 前肠内含物, M: 中肠内含物, P: 后肠内含物; 不同字母(a, b)表示样品间条带数差异显著性($P<0.05$).

Fig. 2 Band numbers of bacterial DGGE fingerprints based on 16S rDNA extracted from gut content of *A. japonicus*

A: content in anterior intestine; M: content in middle intestine; P: content in posterior intestine. Different letters indicate significant differences in numbers of bands among different sections of guts ($P<0.05$).

通过UPGMA聚类分析发现(图3):3个后肠内含物样品(1P、2P、4P)聚为一簇,且1P和2P的相似性系数高达0.83;中肠的1M和2M、3M和4M分别聚为一簇,且1M和2M相似性系数达到0.80;而前肠的四个样品相似性系数很低,不能聚为一簇。

2.2 16S rDNA 序列及系统发育分析

刺参肠道内含物的细菌16S rDNA V3区特征片段经DGGE分离、条带切割,共得到13条DGGE条带。将条带进行克隆、测序,所得到的序列大小为169~194 bp。序列已提交至GenBank核酸数据库,序列号为GQ980037-GQ980049(表1)。

将所得序列输入GenBank,用Blast程序进行相似性比较分析。结果表明,所有的最相似序列均来自于海洋环境的细菌克隆(表1),其中9条来自海洋沉积物、1条来自对虾肠道、1条来自海藻表面,还有1条来自珊瑚黏液。系统发育分析可以看出(图4),获得的13条序列分别归属于5个细菌类群,其中5条序列(GCD.4、GCD.5、GCD.6、GCD.7和GCD.11)属于 γ -变形菌纲(γ -proteobacteria),3条序列(GCD.1、GCD.10和GCD.13)属于 α -变形菌纲(α -proteobacteria),2条序列(GCD.2和GCD.8)属于柔膜菌纲(Mollicutes),2条序列(GCD.3和GCD.9)属于拟杆菌纲(Bacteroidetes),1条序列(GCD.12)属于 δ -变形菌纲(δ -proteobacteria)。

2.3 刺参消化道不同区段内含物的细菌群落组成及优势菌群分析

对克隆得到的序列进行比对分析,得到样品的细菌群落组成(图5、图6)。本实验分析的4头刺参,其消化道不同区段内含物的细菌群落中均包含 α -proteobacteria、Bacteroidetes、 γ -proteobacteria、Mollicutes和 δ -proteobacteria,但相对含量各不相同。刺参前肠、中肠和后肠内含物的优势菌群均为 γ -proteobacteria,而 δ -proteobacteria在前肠的相对含量要显著高于中肠和后肠($P < 0.05$),Mollicutes在前肠和后肠的相对含量显著高于中肠($P < 0.05$)。

3 讨论

迄今为止,有关海参消化道微生物区系的研究还很少。Ward-Rainey等^[17]通过传统培养法和16S rDNA克隆文库技术分析黑海参(*Holothuria atra*)消化道的细菌多样性;孙奕和陈驹^[3]在1989年通过培养法研究了刺参消化道内含物的细菌群落组成。然而由于水环境中可培养细菌仅占细菌总数的1%^[4],因此可以推断人工培养法无法获取刺参消化道内含物菌群的全面信息。PCR-DGGE技术是近年来国内外动物胃肠道微生态学研究的常用方法^[12,18-19],本研究采用PCR-DGGE技术,可望更加全面地揭示刺参消化道内含物的细菌群落组成。

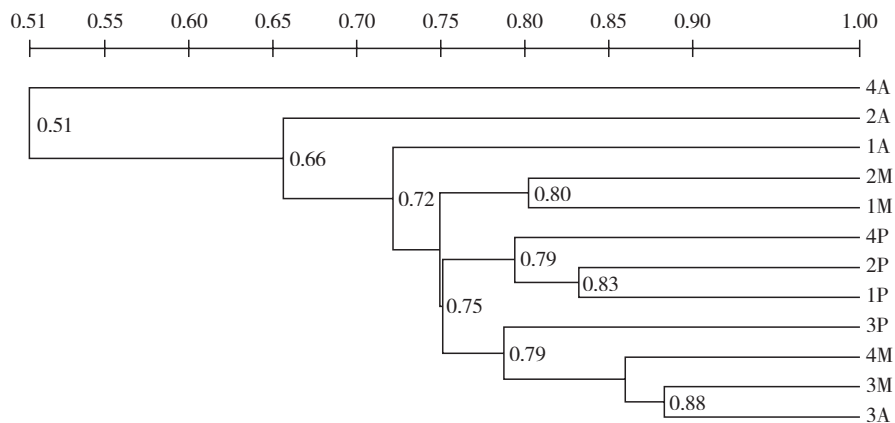


图3 刺参消化道内含物细菌群落的UPGMA聚类分析

A: 前肠内含物; M: 中肠内含物; P: 后肠内含物; 节点处的数字为相似性系数。

Fig. 3 UPGMA cluster analysis of bacterial community from the contents of *A. japonicus*

A: Content in anterior intestine; M: Content in middle intestine; P: Content in posterior intestine. The numbers represent the similarity coefficient.

表1 经DGGE分离获得的细菌16S rDNA V3区序列
 Tab. 1 Overview of bacterial 16S rDNA V3 sequences detected by PCR-DGGE

条带号 Band No.	序列号 Accession No.	最相似序列 Closest relatives	相似性/% Similarity	相似序列来源 Environmental description
GCD.1	GQ980037	黏液细菌 92 Mucus bacterium 92	100	地中海珊瑚黏液 Mucus of <i>Oculina patagonica</i>
GCD.2	GQ980038	未培养细菌克隆 LK3 Uncultured bacterium clone LK3	91	凡纳滨对虾肠道 Shrimp <i>Penaeus vannamei</i> gut
GCD.3	GQ980039	未培养细菌克隆 E08 Uncultured Bacteroidetes bacterium clone E08	97	海洋沉积物 Marine sediment
GCD.4	GQ980040	未培养变形细菌克隆 Bol19 Uncultured proteobacterium clone Bol19	99	海洋沉积物 Marine sediment
GCD.5	GQ980041	未培养 γ -变形菌纲细菌克隆 NdGal186 Uncultured γ -proteobacterium clone NdGal186	100	海洋沉积物 Marine sediment
GCD.6	GQ980042	未培养 γ -变形菌纲细菌克隆 NdSurf170 Uncultured γ -proteobacterium clone NdSurf170	100	海洋沉积物 Marine sediment
GCD.7	GQ980043	未培养 γ -变形菌纲细菌克隆 MS-B157 Uncultured γ -proteobacterium clone MS-B157	99	海洋沉积物 Marine sediment
GCD.8	GQ980044	螺原体属 Spiroplasma lampyridicola	90	—
GCD.9	GQ980045	未培养拟杆菌纲细菌 Uncultured Bacteroidetes bacterium	100	沙质潮间带沉积物 Sandy intertidal sediments
GCD.10	GQ980046	α -变形菌纲细菌 GWS-TZ-H190 Alpha proteobacterium GWS-TZ-H190	99	海洋沉积物 Marine sediment
GCD.11	GQ980047	未培养细菌克隆 Cm1-34 Uncultured bacterium clone Cm1-34	98	黄海北部沉积物 North Yellow Sea sediments
GCD.12	GQ980048	未培养细菌克隆 CK_1C5_3 Uncultured bacterium clone CK_1C5_3	98	海草床碎屑沉积物 Sediment from seagrass bed
GCD.13	GQ980049	玫瑰杆菌 <i>Roseobacter</i> sp.	100	海藻表面 Surface of marine alga

通过对DGGE图谱的分析发现刺参后肠内含物的细菌多样性显著高于中肠和前肠,前肠内含物的细菌多样性最低。刺参消化道内含物中可培养细菌也表现出相同的特征,即后肠内含物中可培养的细菌种类最多,前肠内含物的细菌组成相对单一^[3]。而且,一些在海泥中极为少见的细菌类群(如柄杆菌属),在饥饿刺参的后肠中以较高的比例分离得到了^[3]。因此可以推测,刺参消化道内含物中的细菌群落并非完全来自于摄入的饵料,消化道中可能定居着多种类群的常驻细菌(尤其是在中肠和后肠)。国外学者的研究表明,海参的前肠主要是对食物进行酶消化的场所,而吸收和代谢主要发生在后

肠^[20-21]。后肠中种类繁多的细菌可能在刺参的营养吸收以及代谢过程中起作用。

本研究结果表明,不同刺参个体后肠细菌群落组成的差异最小,前肠的细菌群落差异最大。刺参前肠内含物主要为刚从环境中摄取或是正在消化过程中的底泥,其细菌群落可能受食物中细菌组成以及消化程度的影响较大,因此前肠的细菌群落最不稳定。而后肠的细菌经过了消化系统的选择性利用,而且可能还包含一些相对稳定的与宿主共生的细菌,因此不同个体间后肠的细菌组成相似性提高。这一点与“鱼类的后肠比前肠和中肠有更加稳定的微生物群落^[12]”的结论一致。

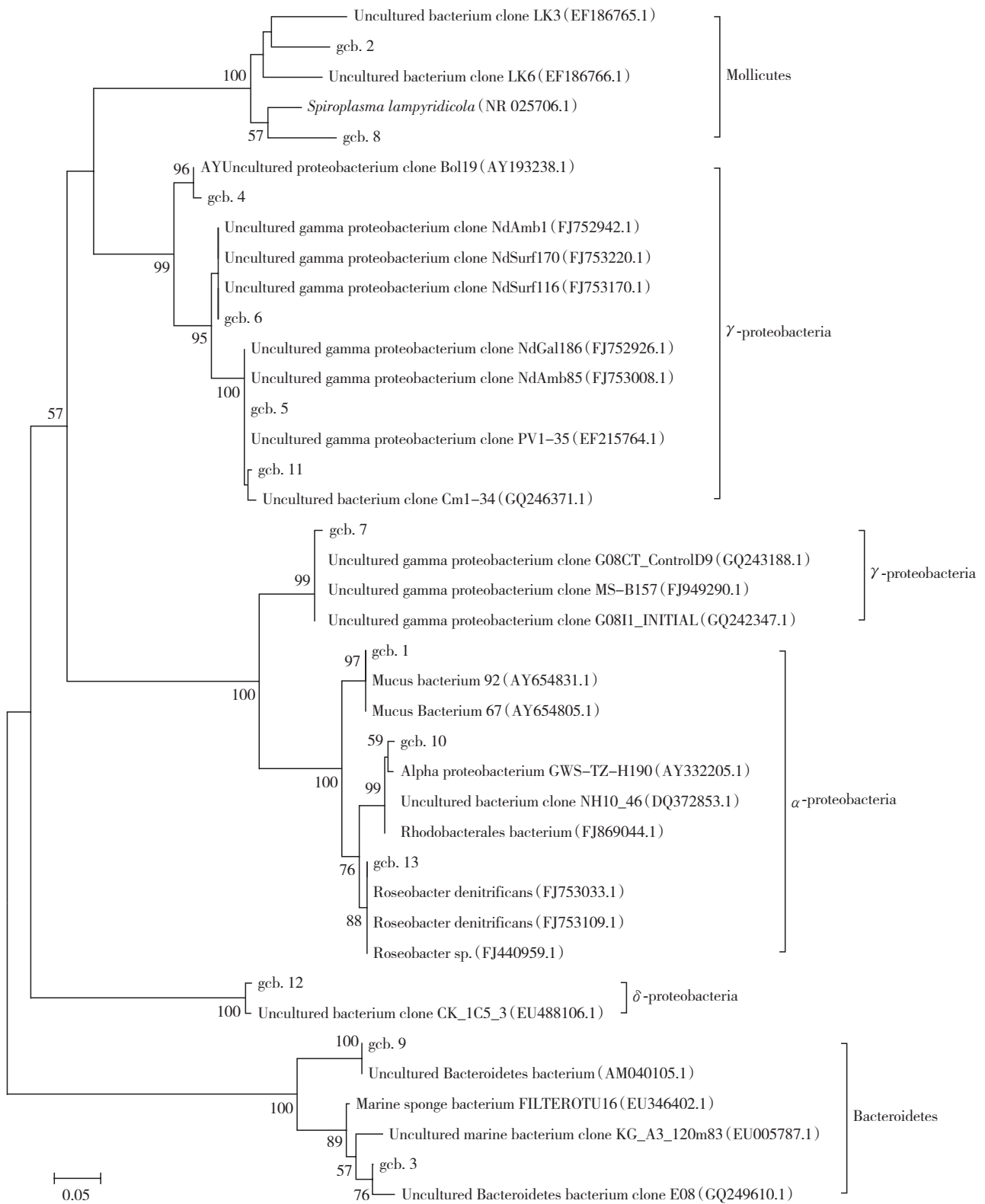


图4 刺参消化道内含物细菌16S rDNA系统发育树

节点处的数字为Bootstrap 1 000个循环的置信度(只显示在50%以上的置信度)。 α -proteobacteria: α -变形菌纲; γ -proteobacteria: γ -变形菌纲; δ -proteobacteria: δ -变形菌纲; Mollicutes: 柔膜菌纲; Bacteroidetes: 拟杆菌纲。

Fig. 4 Phylogenetic analyses of bacterial 16S rDNA V3 fragments retrieved from DGGE bands
Bootstrap test was based 1 000 replicates and the bootstrap values less than 50% were omitted.

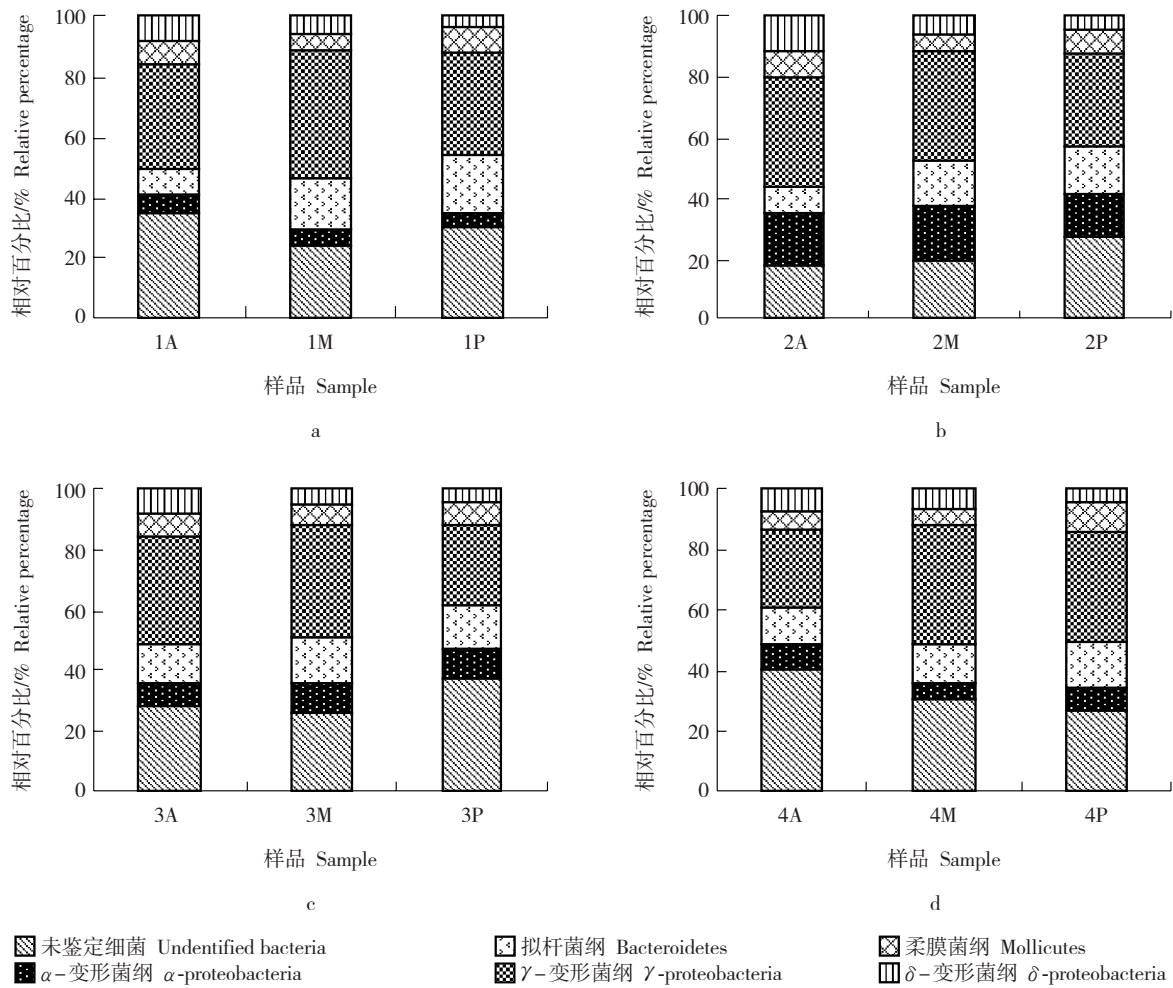


图5 不同刺参个体消化道内含物细菌群落组成

a、b、c、d 分别代表本实验研究的4头刺参；A：前肠内含物，M：中肠内含物，P：后肠内含物。

Fig. 5 Bacterial community structures of gut contents in each sea cucumber based on the quantitative analysis of the DGGE bands a, b, c and d represents the 4 sampled sea cucumbers in the present study. A: content in anterior intestine, M: content in middle, P: content in posterior intestine.

本实验对DGGE图谱中的17条优势条带进行切割、克隆和测序,但条带14、15没能够成功克隆,而且条带16、17经测序后发现为引物二聚体,因此最后共获得13条序列,这种现象在其他研究也有发现^[6,22]。系统发育分析发现,刺参消化道内含物的细菌群落主要归属于5大类群,即α-proteobacteria、γ-proteobacteria、δ-proteobacteria、Bacteroidetes和Mollicutes,而刺参消化道内含物中的可培养细菌群落主要归属于γ-proteobacteria中的弧菌属和假单胞菌属,Flavobacteria中的黄杆菌属以及Bacilli中的芽孢杆菌属^[3],表明采用PCR-DGGE方法获得的结果能够更加全面的反映刺参消化道细菌群落组成。目

前,有关海参消化道细菌组成的报道还很少,Ward-Rainey等^[17]通过16S rDNA序列分析法获得的黑海参(*H. atra*)肠道内含物菌群主要有α-proteobacteria、β-proteobacteria、γ-proteobacteria、噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌群(*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes*)以及放线细菌(Actinobacteria)。本实验所研究的刺参其前肠、中肠和后肠内含物的优势菌群均为γ-proteobacteria,相对含量在32.0%到33.6%之间,且均属于未培养细菌;而刺参消化道中可培养细菌中的92.7%也属于γ-proteobacteria^[3]。Ward-Rainey等^[17]发现黑海参(*H. atra*)肠内含物(前肠和中肠)中可培养菌群中的优势菌也属于γ-proteobacteria(弧

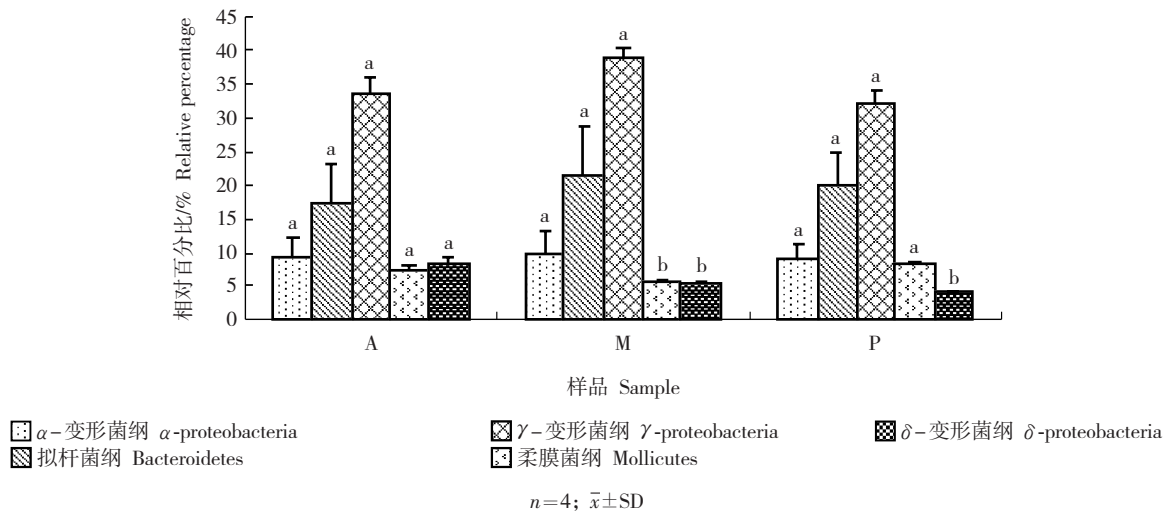


图6 刺参消化道不同区段内含物细菌群落组成相对含量的比较

A: 前肠内含物, M: 中肠内含物, P: 后肠内含物; 不同字母表示细菌群落间相对含量的差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Comparative analysis of the relative bacterial biomass among different sections of gut contents in *Apostichopus japonicus*. A: Content in anterior intestine; M: Content in middle intestine; P: Content in posterior intestine. Different letters indicate significant differences in relative bacterial biomass among different sections of guts ($P < 0.05$).

菌属,假单胞菌属),而他们通过16S rDNA序列分析却发现黑海参消化道内含物中67.5%的细菌归属于 β -proteobacteria。有关的研究表明,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的肠道优势菌群也属于 γ -proteobacteria^[23-24]。一些海水养殖鱼类如青石斑鱼(*E. awoara*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*S. salar* L.)以及暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)消化道的优势菌属于Proteobacteria^[12-13,18,25]。

与本研究获得的13条序列中的12条亲缘关系最近的序列来自海洋环境,其中9条与本研究获得序列亲缘关系最近的细菌来源于海洋沉积物环境,与GCD.13最相近的序列来源于海藻表面,表明刺参消化道内含物的细菌群落直接或间接来自于栖息地。与GCD.13最相近(100%)的细菌*Roseobacter* sp.对广泛存在于动物及人的肠道、呼吸道、生殖道中的致病链球菌*Streptococcus suis*和*Streptococcus aureus*有抑制作用,据此推测GCD.13所代表的刺参消化道细菌可能对抑制病原菌有一定的作用。但是需要指出的是,多数与本实验获得的序

列亲缘关系最近的细菌均是未培养细菌,尚难以分析其功能。

本研究表明,PCR-DGGE技术可以摆脱对传统培养条件的依赖,对样品细菌群落结构进行快速分析,是研究环境细菌群落结构在时间或空间上的动态变化的有效方法。本研究发现刺参消化道内含物中的细菌多数为未培养细菌,这些细菌可能包含了很多具有潜在研究及应用价值的细菌。在今后的研究中结合大片段基因组文库等进行进一步分析,将可能发现新的基因,并有助于揭示刺参消化道内含物中的细菌群落在刺参摄食、消化、免疫等生理生化过程中的作用。

参考文献:

- [1] 高菲. 刺参营养成分、食物来源及消化生理的季节变化[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2008: 44-52.
- [2] 隋锡林. 海参增殖养殖[M]. 北京: 农业出版社, 1988.
- [3] 孙奕, 陈驹. 刺参体内外微生物组成及其生理特性的研究[J]. 海洋与湖沼, 1989, 20(4): 300-307.
- [4] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169.

- [5] Kemp P F, Aller J Y. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? [J]. *Limnol Oceanogr: Methods*, 2004, 2: 114-125.
- [6] 刘敏, 朱开玲, 李洪波, 等. 应用PCR-DGGE技术分析黄海冷水团海域的细菌群落组成[J]. *环境科学*, 2008, 29(4): 1082-1091.
- [7] Li Y, Li F, Zhang X, Qin S, et al. Vertical distribution of bacterial and archaeal communities along discrete layers of a deep-sea cold sediment sample at the East Pacific Rise ($\sim 13^\circ \text{N}$) [J]. *Extremophiles*, 2008, 12: 573-585.
- [8] Lau W W Y, Jumars P A, Armbrust E V. Genetic diversity of attached bacteria in the hindgut of the deposit-feeding shrimp *Neotrypaea* (formerly *Callinassa*) *californiensis* (Decapoda: Thalassinidae) [J]. *Microb Ecol*, 2002, 43: 455-466.
- [9] Uthicke S, McGuire K. Bacterial communities in Great Barrier Reef calcareous sediments: Contrasting 16S rDNA libraries from nearshore and outer shelf reefs [J]. *Estuar Coast Shelf Sci*, 2007, 72: 188-200.
- [10] 李可俊, 管卫兵, 徐晋麟, 等. PCR-DGGE对长江河口八种野生鱼类肠道菌群多样性的比较研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(3): 268-272.
- [11] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海西沙海槽表层沉积物微生物多样性[J]. *生态学报*, 2008, 28(3): 1166-1173.
- [12] Hovda M B, Lunestad B T, Fontanillas R, et al. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture*, 2007, 272: 581-588.
- [13] Zhou Z, Liu Y, Shi P, et al. Molecular characterization of the autochthonous microbiota in the gastrointestinal tract of adult yellow grouper (*Epinephelus awoara*) cultured in cages [J]. *Aquaculture*, 2009, 286: 184-189.
- [14] 罗鹏, 胡超群, 谢珍玉, 等. 凡纳滨对虾咸淡水养殖系统内细菌群落组成的PCR-DGGE分析[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(2): 49-53.
- [15] 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[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(1): 32-38.
- [16] 刘新春, 吴成强, 张昱, 等. PCR-DGGE法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析[J]. *生态学报*, 2005, 25(4): 842-847.
- [17] Ward-Rainey N, Rainey F A, Stackebrandt E. A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra* [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1996, 203: 11-26.
- [18] Kim D H, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102: 1654-1664.
- [19] Knapp B A, Seeber J, Podmirseg SM, et al. Molecular fingerprinting analysis of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda) [J]. *Pedobiologia*, 2009, 55(5): 325-336.
- [20] Filiminova G F, Tokin I B. Structural and functional peculiarities of the digestive system of *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) [J]. *Mar Biol*, 1980, 60: 9-16.
- [21] Khrpounoff A, Sibuet M. The nutrition of abyssal echinoderms. I. Feeding of holothuroids [J]. *Mar Biol*, 1980, 60: 17-26.
- [22] Lasse R, Grieg F S, Laura B F, et al. Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes [J]. *Deep Sea Research II*, 1999, 46(6): 1791-1811.
- [23] 杨莺莺, 李卓佳, 林亮, 等. 人工饲料饲养的对虾肠道菌群和水体细菌区系的研究[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(3): 53-56.
- [24] 李可. 对虾养殖环境微生物多样性分析和微生态制剂的研究和应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2007: 21-49.
- [25] Yang G, Bao B, Peatman E, et al. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus* [J]. *Aquaculture*, 2007, 262: 183-191.

PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the gut contents of *Apostichopus japonicus*

GAO Fei¹, SUN Huiling¹, XU Qiang², TAN Jie¹, YAN Jingping¹, WANG Qingyin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The bacterial community composition in gut contents, including anterior intestine, middle intestine and posterior intestine of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), was studied by 16S rDNA PCR denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). The band numbers in posterior intestine were significantly higher than those in anterior intestine and middle intestine ($P=0.003$, $P=0.016$, respectively), which showed that the bacterial diversity in posterior intestine was higher than that in anterior intestine and middle intestine. UPMGA cluster analysis revealed that the bacterial community in posterior intestine had higher similarity than that in anterior intestine and middle intestine among different individuals. Phylogenetic analysis of 13 cloned bands showed that bacterial phylotypes were closely related to α -proteobacteria, γ -proteobacteria, δ -proteobacteria, bacteroidetes and mollicutes, and γ -proteobacteria were the dominant bacteria in the three parts of the digestive tract in *A. japonicus*. The closest relative bacteria of 12 cloned bands in the present study were from marine environment, which suggested that the bacteria in the gut contents of *A. japonicus* were from the surrounding habitat environment. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 671–680]

Key words: *Apostichopus japonicus*; PCR-DGGE; gut content; bacterial community

Corresponding author: WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn