

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01225

## 杂色鲍幼体附着基藻际细菌群落的 PCR-DGGE 分析

赵旺<sup>1,2</sup>, 姜敬哲<sup>1</sup>, 王江勇<sup>1</sup>, 陈韬<sup>2</sup>, 刘广锋<sup>1</sup>, 王瑞旋<sup>1</sup>, 杨蕊<sup>1,3</sup>

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
2. 湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128;
3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

**摘要:** 附着基是苗期杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)生活的主要场所, 其表面藻际细菌对幼体的生长有重要的影响, 然而对附着基藻际细菌多样性的研究较为少见。本研究在杂色鲍育苗期间定期采集附着基样品, 再利用 PCR-DGGE 技术对藻际细菌群落进行多样性及变化规律分析。相似性和 UPGMA 聚类结果表明, 藻际细菌群落结构随时间变迁呈现出连续性变化, 相邻两天细菌群落的戴斯相似性系数  $C_s$  高达 80.9%~96.1%, 但育苗前期与育苗后期的藻际细菌群落组成差异较大。多样性指数分析显示, 育苗前期藻际细菌多样性随时间变化趋于丰富, 之后多样性稍有下降但仍维持较高水平。受附着基上藻类生长状况及鲍摄食活动等因素的影响, 细菌多样性指数出现一定波动。本研究旨在为鲍的科学育苗与健康养殖提供理论参考, 为进一步深入研究环境变化与鲍苗期细菌性病害的关系打下良好基础。

**关键词:** PCR-DGGE; 藻际细菌; 细菌多样性; 杂色鲍; 附着基

中图分类号: S944

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1225-09

藻际环境(Phycosphere)是指由藻类新陈代谢过程中分泌的胞外产物形成的特殊的自藻类细胞向外到一定距离的区域<sup>[1]</sup>, 由于细菌对藻类胞外产物有趋化性<sup>[2-3]</sup>, 不同藻类产生的胞外产物不同可能导致藻际环境中生长的细菌种类不同。因此在藻际环境里形成了具有一定结构和功能的, 并与藻类存在相互作用的藻际细菌群落。2001年以来, 杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)育苗过程中出现鲍幼体从附着基上大规模死亡脱落的现象(俗称“脱板症”), 该病发病范围广且死亡率高给鲍养殖业带来沉重打击, 研究发现引起鲍幼苗脱板症的病因可能有多种<sup>[4-8]</sup>, 其中细菌性病害可能是其主要原因。徐力文等<sup>[9]</sup>分析了硅藻对苗

期鲍的附着、消化器官发育、生长率和成活率的影响, 推测藻相变化以及附着基上菌-藻相互作用关系对鲍幼苗的生长有很大影响; 王江勇等<sup>[10]</sup>监测了杂色鲍育苗过程中养殖池及附着基上的异养细菌数量, 发现“脱板症”出现的前后池水及附着基上异养细菌数量差异达 2 个数量级。在藻际环境中, 藻际细菌群落多样性受细菌总体数量、群落结构、种群优势度和均匀度等方面的影响, 当这些因素发生明显改变或群落多样性变化显著时, 可伴随水质的变坏与病害的发生<sup>[11-12]</sup>。由此可见, 杂色鲍等贝类幼体极易受到生存环境的影响而发病, 尤其是附着基藻类及藻际细菌群落的变化对其影响更为重要。然而, 目前对于鲍整

收稿日期: 2013-03-02; 修订日期: 2013-05-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31172428, 41206118); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48); 广东省科技计划项目(2010B20201014); 广东省鱼病防治专项: 无特定病原(SPF)杂色鲍苗种的循环水养殖培育.

作者简介: 赵旺(1987-), 男, 硕士研究生, 从事海洋生物病害防治研究. E-mail: zhaowang522@163.com

通信作者: 王江勇, 博士, 研究员. E-mail: wjy104@163.com

个育苗期间(30~40 d)水体或附着基等养殖环境微生物生态学的研究却十分有限。鲍苗期附着基上藻际细菌群落的变化有何规律,其对鲍幼体生长的影响及其与鲍细菌性病害的发生有何联系等都值得深入研究。

基于 16S rDNA 的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)技术具有操作简便快速、直观、重复性好、分辨率高和不依赖于细菌培养等优点,是一种重要的研究微生物群落多样性的分子生物学技术<sup>[13]</sup>。本研究利用 PCR-DGGE 技术对杂色鲍幼体附着基上的藻际细菌群落进行动态监测,获得杂色鲍幼体附着基上藻际细菌群落的 PCR-DGGE 指纹图谱,并对其相似性、多样性和变化规律进行了分析,以期为鲍苗期的藻类培养及细菌病害防控提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

附着基样品(聚乙烯薄膜)采自广东汕尾某鲍养殖厂,苗池规格为 7 m×3 m×1 m,鲍浮游幼体采用静水培育,幼体附着后采用流水培育,每天换水量为养殖水体的 2~3 倍。附着基上的藻种来自沙滤海水且能透过 200 目滤网的藻类,接种藻类 3 天后开始投入鲍幼体,期间根据藻类生长的实际情况适当施加单细胞藻类生长素。采样期间水温 and 盐度分别维持在 27℃和 30 左右。

样品的采集从杂色鲍受精卵投入苗池开始,至鲍幼体从附着基上剥离为止,共 34 d。每天下午 2 点在指定苗池的进水口、出水口及苗池中间共剪取 3 块 10 cm×10 cm 的附着基,小心除去附着的鲍幼体后,放入无菌样品瓶中,迅速置于-20℃保存。

### 1.2 细菌总 DNA 的提取

采用 Omega E.Z.N.A.<sup>®</sup> Water DNA Kit 提取样品细菌基因组 DNA,操作方法按说明书进行。提取的 DNA 经 Thermo NanoDrop 2000 进行核酸质量与浓度检测。

### 1.3 细菌 16S rDNA-V3 的制备

采用巢式 PCR 制备 16S rDNA-V3 区。第一轮 PCR 扩增 16S rDNA,以提取的细菌基因组 DNA 为模板,用细菌通用引物对 8F/1492R(8F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。反应体系为: TaKaRa Ex *Taq*(5 U/μL) 0.25 μL, 10×Ex *Taq* Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus) 5.0 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4.0 μL, 上下游引物各 1.0 μL, 基因组 DNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 30 个循环; 72℃后延伸 10 min。第二轮 PCR: 以第一轮 PCR 纯化产物(使用 Omega E.Z.N.A. Ultra-Sep Gel Extraction Kit 切胶回收)为模板,用特异性引物对 341F-GC/534R(341F-GC: 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTAGGGGAGGCAGCAG-3', 下划线所示为“GC 夹”; 534R: 5'-AT TACCGCGGCTGCTGG-3')<sup>[14]</sup>扩增 16S rDNA-V3 可变区,扩增长度约为 234 bp(含 GC 夹),PCR 反应体系同上。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 40 s, 65℃退火 40 s, 72℃延伸 1 min, 之后每个循环降低 0.5℃,直到退火温度为 58℃,再以 58℃为退火温度进行 20 次循环; 72℃后延伸 10 min。PCR 产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 DGGE 分析

使用 Bio-Rad 公司的 DCode<sup>™</sup> 通用突变检测系统对 PCR 产物进行 DGGE 分离,将 100 μL V3 区 PCR 产物浓缩后加 6×Loading buffer 混匀,点样于 8%的聚丙烯酰胺凝胶中,变性剂浓度为 55%~75%(100%变性剂为 40%去离子甲酰胺和 7 mol/L 尿素)。使用 1×TAE 缓冲液在 100 V 电压下,60℃电泳 11 h。电泳结束后用 1×SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain 染色 30 min, Tanon 2500 凝胶成像系统成像和拍照。

### 1.5 DGGE 图谱分析

使用软件 Quantity One 4.6.2(Bio-Rad)分析 DGGE 图谱中各样品电泳的条带位置、数量及亮度<sup>[15]</sup>,参考 Mota<sup>[16]</sup>的方法用软件 NTSYS 2.10e

依据戴斯系数  $C_s$  (Dice coefficient) 计算个附着基样品间的相似性, 对相似性结果用非加权组平均法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means, UPGMA) 进行聚类分析。

评价微生物群落可从群落多样性、物种丰富程度、群落中个体分布的均匀程度及优势种群的优势度等方面进行<sup>[17-20]</sup>, 本研究选取 Shannon 指数、Pielou 指数、Margalef 指数和 Simpson 指数等从对附着基上藻际细菌群落进行评价。各指数计算公式如下:

$$\text{Shannon 指数}(H)^{[21]}: H = -\sum_{i=1}^S \left( \frac{N_i}{N} \right) \ln \left( \frac{N_i}{N} \right)$$

$$\text{Simpson 指数}(C)^{[22]}: C = \sum_{i=1}^S \left( \frac{N_i}{N} \right)^2$$

$$\text{Pielou 均匀度指数}(J)^{[23]}: J = H / \ln S$$

$$\text{Margalef 丰富度指数}(R)^{[24]}: R = (S-1) / \ln N$$

其中:  $N_i$  为第  $i$  条带的灰度值,  $N$  为样品的所有 DGGE 条带的灰度值之和,  $S$  为每个样品的条带数。

## 2 结果与分析

### 2.1 育苗过程基本情况

杂色鲍发育情况: 杂色鲍受精卵投入苗池后约 8 h, 可见大量幼体进入浮游阶段; 约 2 d 后, 鲍

发育为匍匐幼体; 幼体依次经过围口壳幼体、上足分化幼体和幼鲍等阶段, 到 34 d 壳长为 3~5 mm 时, 人工将幼体从附着基上剥离, 并转入稚鲍池培育。为便于对育苗期间附着基细菌多样性的变化规律进行描述, 我们根据育苗时间的长短将整个育苗期分为 3 个时期: 育苗前期(1~11 d)、育苗中期(12~23 d)和育苗后期(24~34 d)。

藻类生长状况: 附着基投入育苗池后施加适量单细胞藻类生长素并控制光照强度, 肉眼可见藻类生物量日趋增加, 附着基颜色由透明变为浅褐色; 随着时间推移, 快速生长的藻类在附着基上堆积形成黏滑的褐色厚层, 并于育苗后 23 d 出现藻类成片大量脱落并漂浮于水面上的现象。针对此现象再次施加单细胞藻类生长素后附着基上的藻类迅速生长, 附着基颜色变为褐色; 育苗后期, 随着鲍幼体食量和活动能力的增加, 附着基上留下较为清晰的摄食轨迹。

### 2.2 DGGE 样品的制备

经分光光度计检测提取后样品 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值均在 1.78~1.95, 说明 DNA 质量好, 可以作为 DNA 模板进行 PCR 反应。经巢式 PCR 后产物的电泳结果如图 1, 条带大小与细菌 16S rDNA-V3 区理论大小(约 234 bp)相同, 且无非特异性扩增, 可用于后续 DGGE 实验。



图 1 杂色鲍附着基上藻际细菌 16S rDNA-V3 区电泳结果

M 为 DL2000, 1~34 代表相应天数的附着基样品。

Fig. 1 The results of 16S rDNA-V3 region of bacteria in phycosphere on the attachment substances of *Haliotis diversicolor* Reeve  
M: DL2000 DNA Maker, 1-34: The attachment substance samples of the corresponding days.

### 2.3 DGGE 分离

理论上, DGGE 图谱中每一个条带代表一种微生物, 条带的数目及灰度可以反映出细菌的种类及相对数量<sup>[25]</sup>。不同天数的杂色鲍苗期附着基样品经 PCR-DGGE 分离后, 可见各样品间的条带数目、亮度和位置等均存在差异(图 2), 这充分反映了附着基

藻际细菌群落丰富的多样性。每个样品中均可分离出 41~54 条数目不等的条带, 其中第 8 天的条带数量最多(54 条), 第 33 天和第 34 天的条带数量最少(41 条)。多数条带在不同样品中均有出现, 可见样品间存在共有的细菌种群。但这些共有条带的亮度不同, 说明共有细菌的种群数量存在差异。某些条带亮度

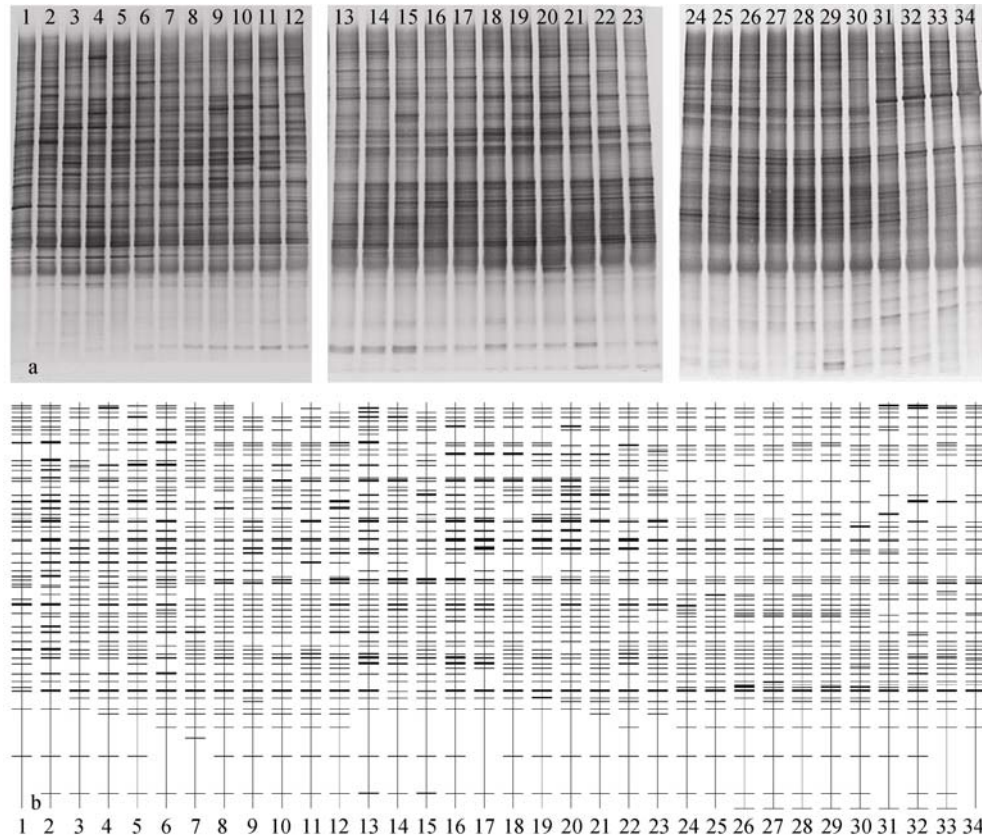


图 2 杂色鲍附着基上藻际细菌的 PCR-DGGE 指纹图谱

1~34 代表相应天数的附着基样品; 图 a: 实际的电泳图(样品上样于 55%~75%梯度变性剂浓度的 8% w/v 聚丙烯酰胺凝胶中, DGGE 使用 DCode™ 通用突变检测系统, 60℃, 100 V 电压 1×TAE 电泳 11 h), 图 b 为与图 a 对应的模式图(使用 Quantity One 4.6.2 软件辅助生成).

Fig. 2 PCR-DGGE finger-print of bacteria in phycospere on the attachment substances of *Haliotis diversicolor* Reeve

1–34: The attachment substance samples of the corresponding days; a: DGGE electrophoretogram (Samples were applied to 8% w/v polyacrylamide gels with a denaturing gradient that ranged from 55% to 75%, DGGE was performed with a Dcode™ universal mutation detection system Using 1×TAE running buffer at 60℃ for 11 h at 100 V), b: sketch map of DGGE profiles (made by Quantity One 4.6.2 software).

由强变弱直至消失, 而有些条带则呈现从无到有的现象, 说明藻际细菌种群处于不断的动态变化中。

#### 2.4 相似性分析与聚类分析

戴斯相似性系数  $C_s$  的大小可以体现出群落间细菌种群的差异。研究发现, 不同时间附着基样品间的相似性较高,  $C_s$  值在 59.1%~96.1%; 相邻两天样品的  $C_s$  值为 80.9%~96.1%, 说明相邻两天的附着基藻际细菌群落结构很相似。基于相似性系数构建 UPGMA 聚类结果如图 3 所示, 杂色鲍苗期附着基样品可聚为 3 大分支: 1~6 d、7~23 d 和 24~34 d。第 1 大支又可分为 2 个小支: 1~3 d 和 4~6 d;

第 2 大支可分为 3 小支: 7~12 d、13~21 d 和 22~23 d; 第 3 大支分为 2 小支: 24~30 d 和 31~34 d, 且第 3 大支与前 2 大支间的距离较远。根据聚类结果可初步得出结论: 各样品菌群结构可按时间变化而聚类, 即细菌群落是随时间的更替呈现缓慢而连续性的变化; 但随着育苗时间的延长, 藻际细菌群落相似性在育苗前期与育苗后期之间出现了较大差异。

#### 2.5 多样性指数分析

多样性指数是利用数学统计方法测度群落中物种数、个体数量及各物种均匀程度等方面的常用参数。Margalef 指数用于评价群落中种群的丰

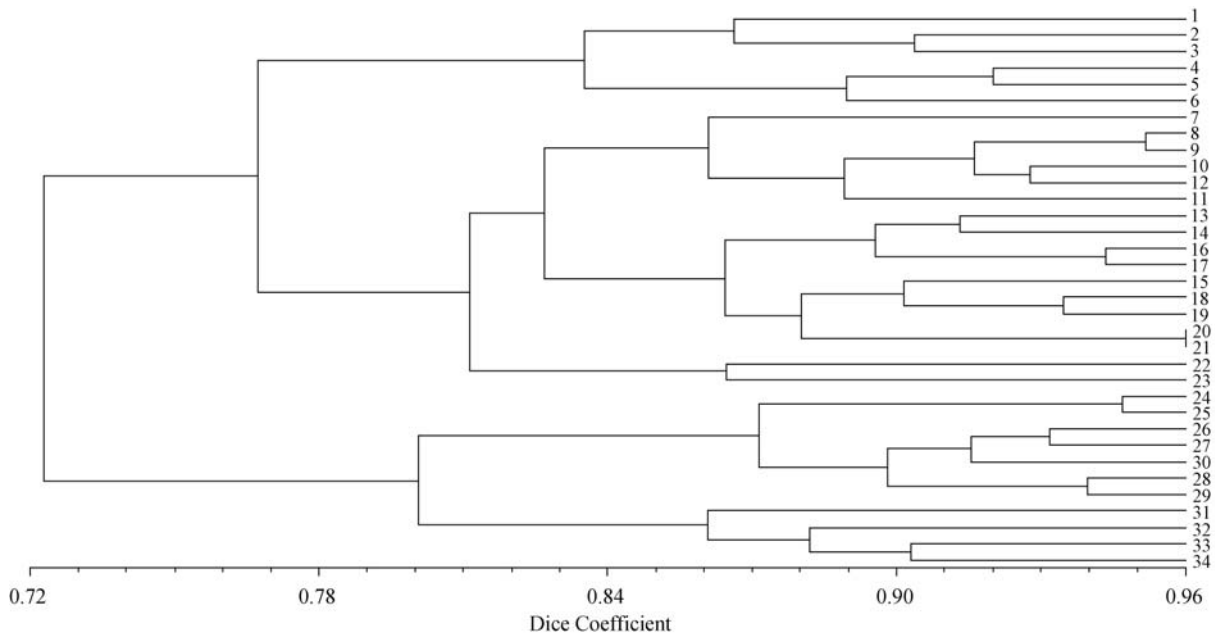


图 3 杂色鲍附着基上藻际细菌菌群的 UPGMA 聚类结果

1~34 代表相应天数采集的附着基样品; Dice Coefficient 数值表示相似性的大小; 聚类图使用软件 NTSYS 2.10e 绘制。

Fig. 3 The UPGMA clustering results of the bacterial community from the phycosphere on the attachment substances of *Haliothis diversicolor* Reeve

1~34: The attachment substance samples of the corresponding days; dice coefficient means that the size of similarity among samples; cluster analysis was performed by NTSYS 2.10e software.

富程度<sup>[24,26]</sup>; Pielou 指数用于测度群落中不同物种多度分布的均匀程度<sup>[23,26]</sup>; Shannon 指数常用于评价群落的多样性, 能体现群落内种群数和种群间个体分配的均匀性<sup>[21,27]</sup>, 是 Margalef 和 Pielou 指数的综合体现; Simpson 指数侧重于反映优势种群的优势度, 该指数反映群落中的常见种而弱化稀有种<sup>[22,28]</sup>。

根据 DGGE 图谱中条带的数量与灰度计算各多样性指数结果如图 4。图 4a 中 Shannon 指数变化不大, 维持在 3.409~3.795, 说明藻际细菌维持着较高且较为稳定的群落多样性; 育苗前期 Shannon 指数逐渐增加, 第 8 天后稍有回落, 之后处于平稳状态, 期间出现 2 个较小的低值(13 d 和 23 d), 但 1~2 d 后恢复平稳, 到鲍幼体剥离前期(29 d)Shannon 指数开始下降, 多样性降低。图 4b 中 Simpson 指数表现为与 Shannon 指数变化相反的趋势, 即 Simpson 指数随着细菌群落多样性的降低而增大; 其值在 0.025 8~0.041 8, 表明细菌种群优势度低, 无明显优势种群。图 4c 中 Margalef 指数为

5.727~7.446, 可见藻际细菌群落中物种较丰富, 而变化曲线的升降说明细菌种群处于动态变化中。而图 4d 可知 Pielou 指数在 0.903~0.956, 各群落整体均匀程度高, 虽在 13、23 和 32~34 d 时均匀度有所降低, 但变化的幅度较小。另外, 在桡足类大量暴发期间, 分别于 16 d、22 d 和 33 d 施加了浓度为  $2 \times 10^{-3}$  g/L 的敌百虫, 从 Shannon 指数的变化看, 这一浓度的敌百虫对细菌多样性的影响不明显。

### 3 讨论

杂色鲍育苗过程中, 多种藻类固着在附着基上生长与繁殖, 逐渐形成多样性丰富而相对稳定的藻类群落。藻类种群分泌大量特异的胞外产物为附着基上藻际细菌提供了营养物质及抑菌或杀菌的物质, 进而导致种类相对稳定的优势藻际细菌迅速繁殖(图 4b); 有研究推测不同藻类分泌的特异胞外产物(如碳水化合物、脂类、肽类、微囊藻毒素<sup>[29]</sup>、褐藻糖胶<sup>[30]</sup>、 $\beta$ -葡萄糖苷酶及几丁质

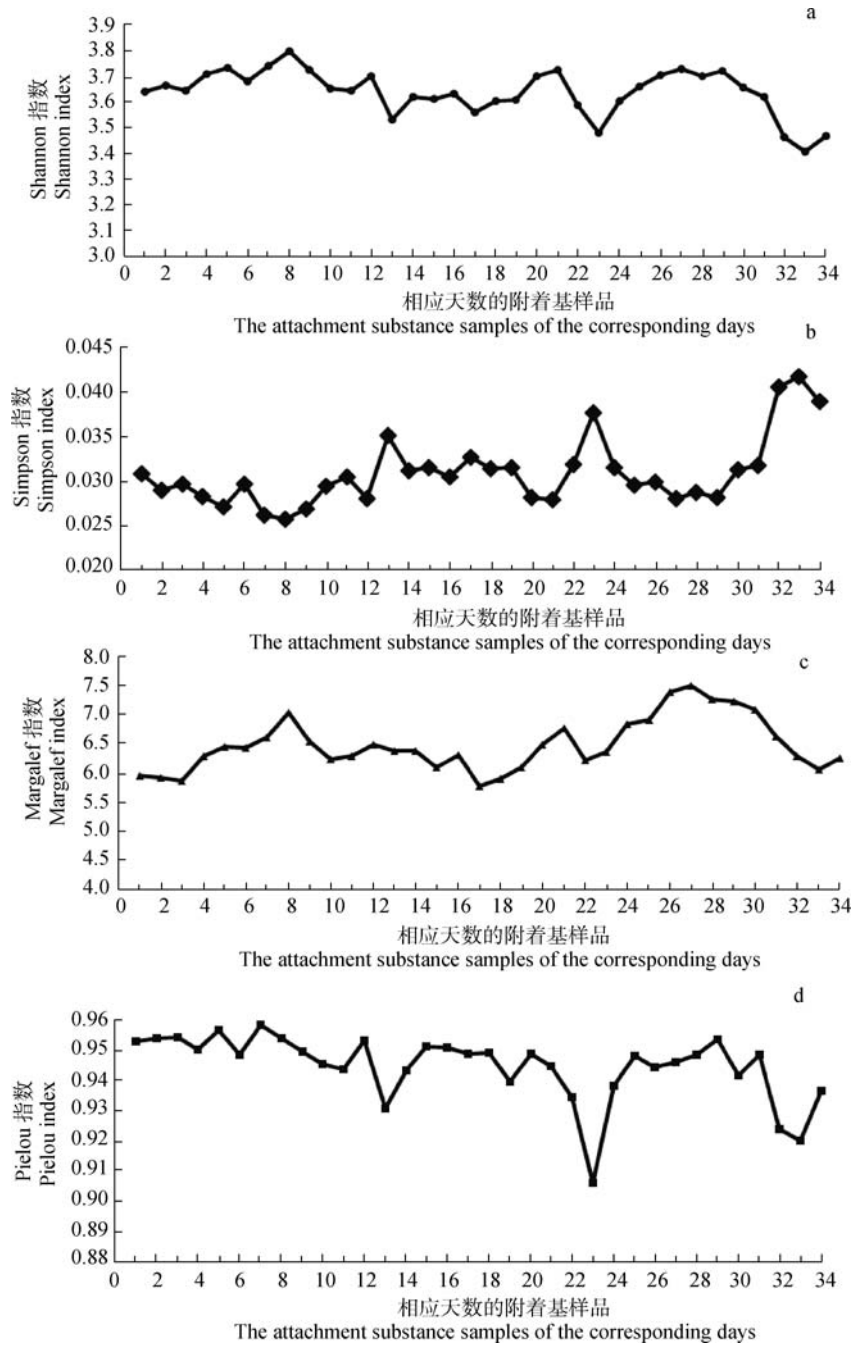


图 4 杂色鲍附着基藻际细菌的多样性指数

a. Shannon 指数变化曲线; b. Simpson 指数变化曲线; c. Margalef 指数变化曲线; d. Pielou 指数变化曲线. 各多样性指数结果由

软件 PAST 根据公式计算得出, Shannon 指数  $H = -\sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N}\right) \ln\left(\frac{N_i}{N}\right)$ , Simpson 指数  $C = \sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N}\right)^2$ , Pielou 指数  $J = H/\ln S$ , Margalef 指数

$R = (S-1)/\ln N$ , 其中  $N_i$  为第  $i$  条带的灰度值,  $N$  为样品的所有 DGGE 条带的灰度值之和,  $S$  为每个样品的条带数.

Fig. 4 The diversity index of bacteria in the phycosphere of the attachment substances of *Haliotis diversicolor* Reeve a. the change curve of Shannon index; b. the change curve of Simpson index; c. the change curve of Simpson index; d. the change curve of Pielou index. The diversity index results was performed with PAST software by its equation, Shannon index  $H = -\sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N}\right) \ln\left(\frac{N_i}{N}\right)$ , Simpson index

$C = \sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N}\right)^2$ , Pielou index  $J = H/\ln S$ , Margalef index  $R = (S-1)/\ln N$ , where  $N_i$  is the grayscale of the DGGE band and  $N$  is the sum of all grayscale of the sample's DGGE bands,  $S$  is the number of DGGE bands.



酶<sup>[31]</sup>等)是造成藻际细菌群落组成差异的主要原因之一<sup>[32-33]</sup>。同时,细菌所产生的胞外产物(维生素、生长因子、酶类和毒素等)能促进或抑制藻类的生长及改变藻类的生理特征<sup>[34-35]</sup>。在藻类与细菌的相互影响下,附着基的藻际环境中形成了稳定而复杂的藻类群落和藻际细菌群落。但是,从 DGGE 图谱来看(图 2a),泳道中条带的位置存在差异,说明藻际细菌的群落结构在发生变化。研究者发现藻际细菌与周围自由生活细菌的群落组成存在明显差异,对硅藻与藻际细菌的相关性分析认为,藻际细菌群落组成的变化与硅藻的种类及丰富度有很大关系<sup>[36-37]</sup>;而在附着基上,某些具有运动能力或固着强度较弱的藻类,受自身或水体流动的影响,不断处于浮游或固着的动态过程中,这将在一定程度上影响藻类群落结构;另外,原生动物的活动也有可能影响藻类种群的稳定<sup>[38]</sup>。同时,藻际细菌群落因受藻类群落稳定性及水质因子<sup>[39]</sup>的影响也将呈现一定的变化。

由聚类 and 多样性分析结果(图 3, 图 4)可见,不同样品间总体呈现较为稳定的连续性变化,说明鲍育苗附着基上的藻际细菌群落变化是稳定而缓慢的,这与理论分析是一致的。但从多样性分析结果来看,Shannon 指数曲线出现了 3 个变化较大的时间点(13 d、23 d 和 33 d),说明此时细菌群落在优势度、丰富度和均匀度方面发生了较大变化。根据实验过程中观察到的藻类生长状况分析,23 d 和 33 d 的变化可能与附着藻类减少有关。23 d 时,由于附着基上大部分藻类老化或受敌害生物桡足类活动影响,肉眼可见藻类成片脱落漂于水面,附着基颜色变浅,进而使得相应的藻际细菌随藻类脱落,最终导致细菌群落多样性的降低。而实践中针对藻类脱落的情况给育苗池施加单细胞藻类生长素后,附着基上的藻类迅速恢复生长,使得细菌群落多样性也迅速恢复到原有水平(图 4a);同时,施用单细胞藻类生长素后新生长藻类的种类可能与之前存在较大差异,进而引起藻际细菌群落结构发生相应变化,从而聚类结果显示 24~34 d 样品与其他 2 个大支的距离较远(图 3)。育苗前期,鲍幼体食量小且活动能力弱,对藻际

细菌多样性的影响小。但是,由于剥离前期鲍幼体摄食量的增长会导致附着基硅藻多样性降低,种类组成减少<sup>[40]</sup>,由此判断,33 d 藻际细菌群落多样性的降低可能与鲍幼体摄食量增加有关。随着鲍幼体食量和活动能力的增大,附着基上留下较为清晰的摄食轨迹,藻际细菌群落也因此受到影响,Shannon 指数也达到监测期的最低值(3.409, 图 4a)。

研究发现,稳定发展的藻类群落培养的鲍幼体存活率较高<sup>[41]</sup>,这可能与藻际环境中的藻类及藻际细菌有关。首先,不同藻类为幼体提供的营养成分存在差异,这将在一定程度上影响鲍幼体的活力与免疫力;其次,鲍肠道中的部分细菌直接或间接来自其生活环境<sup>[42]</sup>,而苗期幼体的肠道菌群与附着基藻际细菌的关系则更为密切,且稳定发展的藻类群落其周围的藻际细菌也相对稳定,进而可能维持苗期幼体肠道内菌群的平衡,减少幼体受细菌性病害的威胁。因此,鲍苗培育过程中,维持附着基藻类的稳定发展是尤为必要的。作者发现,控制光照强度、进水口水流速度、加氧泵气流的大小、桡足类的活动以及合理使用单细胞藻类生长素等可防止藻类老化死亡。

本研究利用 PCR-DGGE 技术研究了杂色鲍苗期附着基上藻际细菌群落的动态变化规律,发现鲍幼体附着基上的藻际细菌群落多样性丰富,群落结构较为稳定,但人为添加藻类生长素以及剥离前期的鲍幼体对藻类的大量摄食会对藻际细菌群落多样性产生较大影响。研究结果可为鲍的科学育苗与健康养殖提供一定参考,为进一步深入研究环境变化与鲍苗期细菌性病害的关系打下良好基础。

#### 参考文献:

- [1] Bell W, Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products[J]. *Biol Bull*, 1972, 143(2): 265-277.
- [2] Gonzalez J M, Simo R, Massana R, et al. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing north Atlantic algal bloom[J]. *Appl Environ Microb*, 2000, 66(10): 4237-4246.

- [3] Casamatta D A, Wickstrom C E. Sensitivity of two disjunct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* kutzin[J]. *Microb Ecol*, 2000, 40(1): 64-73.
- [4] 宋振荣, 霍振华, 倪子绵. 九孔鲍苗“脱板症”病原的初步研究[J]. *福建水产*, 2003 (4): 1-3.
- [5] 徐力文, 刘广峰, 王江勇, 等. 杂色鲍育苗中“掉板症”的药物防治研究[J]. *海洋水产研究*, 2004, 25(4): 41-45.
- [6] 周晶, 蔡俊鹏, 杨洪志. 南方杂色鲍苗大规模死亡病原菌的分离鉴定及其回归感染试验[J]. *海洋湖沼通报*, 2006 (3): 54-59.
- [7] 刘广峰, 周世宁, 徐力文, 等. 杂色鲍幼苗“急性死亡脱落症”病原菌分析[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(4): 655-661.
- [8] 王江勇, 刘广峰, 徐力文, 等. 杂色鲍鲍苗“掉板症”病因的探讨[J]. *海洋湖沼通报*, 2008 (3): 161-167.
- [9] 徐力文, 刘广峰, 王江勇. 鲍育苗生物学中饵料硅藻的相关研究进展[J]. *海洋科学进展*, 2006, 24(4): 611-618.
- [10] 王江勇, 王瑞旋, 刘广峰. 杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系[J]. *南方水产*, 2005, 1(1): 57-61.
- [11] 冯胜, 李定龙, 秦伯强. 太湖水华过程中微生物群落的动态变化[J]. *宁波大学学报*, 2010, 23(1): 7-12.
- [12] 邓钢, 吕军仪, 林强. 大海马育苗池水华发生期间细菌动态及相关理化参数[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 477-482.
- [13] MUYZER G. DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(3): 317-322.
- [14] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbio*, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] 兰兰, 刘广峰, 王江勇, 等. 湛江官渡近江牡蛎养殖水细菌群落的 DGGE 指纹分析[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(5): 31-38.
- [16] Mota F F, Gomes E A, Paiva E, et al. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method[J]. *FEMS Microbio Ecol*, 2005, 53(2): 317-328.
- [17] Chen K, Gao J, Li J X, et al. Effects of probiotics and antibiotics on diversity and structure of intestinal microflora in broiler chickens[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6(37): 6612-6617.
- [18] 胡芳, 魏婷婷, 杜彩贺, 等. 2 型糖尿病小鼠食道菌群的结构分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(10): 972-979.
- [19] 刘桂婷, 程林, 王保莉, 等. 长期不同施肥对黄土旱塬黑垆土氨氧化细菌多样性的影响[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(13): 2706-2714.
- [20] Lü D G, Li Z X, Qin S J, et al. Bacterial community structure in the *Cerasus sachalinensis* Kom. rhizosphere based on the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method[J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(62): 13430-13438.
- [21] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. *Bell Syst Techn J*, 1948, 27: 379-423.
- [22] Greenberg J H. The measurement of linguistic diversity[J]. *Language*, 1956, 32(1): 105-119.
- [23] Pielou E C. Association tests versus homogeneity tests: their use in subdividing quadrats into groups[J]. *Vegetation*, 1969, 18(1-6): 4-18.
- [24] Margelef D R. Information theory in ecology[J]. *Gen Syst*, 1958(3): 36-71.
- [25] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [26] 谢应忠. 生物多样性的生态学意义及其基本测度方法[J]. *宁夏农学院学报*, 1998, 19(3): 13-20.
- [27] 胡亮. 植被群落多样性分析指标研究[D]. 广州: 中山大学, 2006.
- [28] 胡晓娟, 李卓佳, 曹煜成, 等. 强天气干扰条件下粤西凡纳滨对虾养殖池塘细菌群落动态特征[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(5): 52-59.
- [29] Lionel Ho, Daniel Hoefel, Christopher P Saint, et al. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter[J]. *Wat Res*, 2007, 41(20): 4685-4695.
- [30] Lee K Y, Jeong M R, Choi S, et al. Synergistic effect of fucoidan with antibiotics against oral pathogenic bacteria[J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58(5): 482-492.
- [31] Wang X, Li Z, Su J, et al. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere[J]. *Biolog Contr*, 2010, 52(2): 123-130.
- [32] Shi L M, Cai Y F, Yang H L, et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria[J]. *J Envir Sci*, 2009, 21(11): 1581-1590.
- [33] Sapp M, Schwaderer A S, Wiltshire K H, et al. Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae[J]. *Microb Ecol*, 2007, 53(4): 683-699.
- [34] 高亚辉, 荆红梅, 黄德强, 等. 海洋微藻胞外产物研究进展[J]. *海洋科学*, 2002, 26(3): 35-38.
- [35] 邢鹏, 孔繁翔, 曹焕生, 等. 太湖浮游细菌与春末浮游藻



- 类群落结构演替的相关分析[J]. 生态学报, 2007, 27(5): 1696–1702.
- [36] Yang C, Li Y, Zhou Y, et al. Bacterial community dynamics during a bloom caused by *Akashiwo sanguinea* in the Xiamen sea area, China[J]. Harmf Alg, 2012, 20: 132–141.
- [37] Rooney-Varga J N, Giewat M W, Savin M C, et al. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment[J]. Microb Ecol, 2005, 49(1): 163–175.
- [38] Šimek K, Kasalický V, Zapomělová E, et al. Alga-derived substrates select for distinct betaproteobacterial lineages and contribute to niche separation in *Limnohabitans* strains[J]. Appl Envir Microbiol, 2011, 77(20): 7307–7315.
- [39] Eigemann F, Hilt S, Salka I, et al. Bacterial community composition associated with freshwater algae: species specificity vs. dependency on environmental conditions and source community[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2013, 83(3): 650–663.
- [40] 李振华, 杜琦, 梁君荣, 等. 九孔鲍育苗池附着基上底栖微藻群落及其多样性[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 999–1007.
- [41] 李振华. 鲍鱼幼体优质饵料的筛选、培育及其应用研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [42] Zhao J, Shi B, Jiang Q, et al. Changes in gut-associated flora and bacterial digestive enzymes during the development stages of abalone (*Haliotis diversicolor*) [J]. Aquaculture, 2012, 338-341: 147–153.

## Analysis of the bacterial community in the phycosphere of the attachment substances of larval abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve) by PCR-DGGE

ZHAO Wang<sup>1,2</sup>, JIANG Jingzhe<sup>1</sup>, WANG Jiangyong<sup>1</sup>, CHEN Tao<sup>2</sup>, LIU Guangfeng<sup>1</sup>, WANG Ruixuan<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1,3</sup>

1. Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou Province; Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
3. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** The attachment substances are used by larval abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve) during their early ontogeny. The bacteria in the phycosphere on the surface of the attachment substance has a significant impact on the growth of the larvae. Up to now, little is known about the bacterial diversity in the phycosphere on the adhering substance. We collected the attachment substance from seedling *Haliotis diversicolor* Reeve and analyzed the bacterial community diversity and variation in the phycosphere by PCR-DGGE. The bacterial community structure in the phycosphere changed over time. Although there was considerable similarity in the community between adjacent days (Dice coefficient  $C_s$ : 80.9%–96.1%) there was a significant difference between early stage and late stage seedlings. Analysis of the diversity index revealed an increase in the richness of the bacterial diversity of the phycosphere in early stage seedlings, and diversity was maintained thereafter. The bacterial diversity index remained within a given range because of the influence of algae growth and abalone feeding activity. Our results provide a theoretical basis for scientific breeding and healthy aquaculture of abalone, and lay a foundation for further study of the relationship between environmental changes and bacterial diseases of larval abalone.

**Key words:** PCR-DGGE; bacteria in phycosphere; bacterial diversity; *Haliotis diversicolor* Reeve; attachment substances

**Corresponding author:** WANG Jiangyong. E-mail: wjy104@163.com