

皱纹盘鲍肠道菌群组成及 PCR-DGGE 指纹图谱分析

冷晓飞¹, 姜海峰², 刘小林², 王高学², 张 艳², 高洪涛¹, 常亚青³

(1. 大连太平洋海珍品有限公司, 辽宁 旅顺 116045; 2. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 3. 大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 对养殖和野生皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)不同个体间肠道菌群数量和种类组成进行了研究, 并采用 PCR-DGGE 指纹技术对比分析了二者肠道优势菌群的差异。研究结果表明, 养殖和野生皱纹盘鲍肠道好氧及兼性厌氧菌总数分别为 $(3.50 \pm 0.85) \times 10^6$ 个/g, $(3.03 \pm 1.10) \times 10^6$ 个/g; 两组鲍鱼肠道优势菌基本相同, 均为弧菌属(*Vibrio*), 次优势菌均为玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*), 在养殖组中检测到芽孢杆菌属(*Bacillus*), 表明皱纹盘鲍对肠道细菌具有特异选择性。此外, PCR-DGGE 指纹图谱结果表明, 从养殖和野生皱纹盘鲍肠道样品分别获得 14 条和 12 条扩增条带, 其中人工组中有 2 条特异性条带; 二者相似性系数(戴斯系数)为 92.31%。

关键词: 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino); 肠道; 菌群; PCR-DGGE

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)05-0010-05

动物肠道的正常菌群是肠道的正常组成部分, 水生动物的肠道微生物与宿主以及所处的水生环境形成的相互依赖、相互制约的微生物生态系, 对营养物质的消化吸收、免疫反应以及器官的发育等方面具有其他因素不可替代的作用^[1]。并且, 随着对益生菌研究越来越多的关注, 很多研究表明水生动物肠道优势菌和次优势菌可以作为益生菌, 而且具有更好的定植效果^[2-3]。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)是中国北方海域重要的养殖珍品。近几年来, 随着集约化程度的提高, 养殖皱纹盘鲍病害频繁发生, 给苗种、成鲍生产造成很大的经济损失。与此同时, 对皱纹盘鲍病害尚无有效的防治措施^[4]。细菌性病害的原因很大程度上由环境和体内外的菌群结构失衡引起的^[5], 研究其肠道菌群结构与组成, 对纠正机体菌群失调、增强机体体质和开发苗种培育、人工养殖中的益生菌制剂应用具有重要的意义。最早 Sawabe 等^[6]研究了日本海域的皱纹盘鲍肠道内的微生物区系, 证明了不同环境下肠道菌群结构与组成具有显著的差异。而对我国海域的皱纹盘鲍肠道内微生物区系研究尚未见报道。因此本研究着重于研究人工养殖的皱纹盘鲍和野生皱纹盘鲍肠道中微生物的组成和数量, 并采用 PCR-DGGE 指纹图谱技术分析二者的相似度, 初步探讨了人工养殖阶段对皱纹盘鲍肠道菌群的影响, 从而对皱纹盘鲍肠道菌群有一个

初步的了解。为进一步深入研究皱纹盘鲍疾病防控以及鲍鱼专用益生菌制剂的研制提供科学基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

10 只健康野生皱纹盘鲍平均体质量 $126.72 \text{g} \pm 10.71 \text{g}$ 、平均壳长 $10.34 \text{cm} \pm 0.22 \text{cm}$ 于 2010 年 10 月由潜水员采集于辽宁省旅顺口区海域, 称谓野生组; 10 只健康养殖皱纹盘鲍平均体质量 $122.70 \text{g} \pm 15.50 \text{g}$ 、平均体长 $10.33 \text{cm} \pm 1.15 \text{cm}$ 随机挑选于辽宁省旅顺口大连太平洋海珍品有限公司养殖场称谓养殖组。养殖组鲍鱼从剥离后开始投喂粉状配合饵料, 5 个月后改为笼养饲喂海带。

1.2 方法

1.2.1 可培养细菌的分离、纯化

参照 Sawabe 等^[6]方法: 无菌条件下, 用手术刀将软组织同壳分离后立即浸入 70%酒精 1min 消毒体表, 再用无菌水冲洗数遍。用镊子及剪刀取下皱纹盘

收稿日期: 2012-02-11; 修回日期: 2012-07-17

基金项目: 辽宁省重点科技攻关项目(2011203003)

作者简介: 冷晓飞(1979-), 男, 辽宁鞍山人, 硕士, 主要从事水产养殖技术研究, E-mail: xiaofeileng@126.com; 常亚青, 通信作者, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

鲍消化道,置于预先称重的无菌离心管中称重并编号。为探讨个体间差异,对养殖组和野生组每个皱纹盘鲍个体的肠道样品进行单独分离。分离得到的样品经研磨后梯度稀释至 10^{-4} ,分别吸取各个稀释度 0.1 mL 涂布 2216E 平板,每个稀释度涂 3 个平板,22 °C 培养 5 d。将剩余的研磨样品分为养殖组和野生组均匀混合后保藏于 -80 °C 冰箱中备用。培养结束后取适当稀释度的平板计算细菌菌落数,并依据菌落的形态特征及菌体形态特征进行分类并统计各类型细菌的比例。随机挑取各类型菌株在 2216E 平板上分离纯化 3 次,单克隆菌株保种于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2.2 细菌鉴定

采用细菌基因组提取试剂盒(Bioteke)提取单克隆菌株的 DNA 作为模板,分别扩增 16S rDNA 基因片段,将获得的 16S rDNA 基因序列于 GenBank 中比对以获得序列信息,并构建系统发育树。将序列信息提交至 GenBank 中的核苷酸数据库中。

1.2.3 肠道微生物总 DNA 提取

采用细菌基因组提取试剂盒(Bioteke)提取肠道微生物总 DNA,操作步骤按照产品说明书进行。提取的总 DNA 采用微量核酸定量仪(Nano drop 2000)测定 DNA 浓度,置 -20 °C 保存备用。

1.2.4 PCR-DGGE 指纹图谱分析

采用 16S V3 可变区通用引物(F357-GC 和 R518)对 2 个样品中的肠道细菌进行 PCR-DGGE 指纹分析^[7],10%聚丙烯变性胶分离 V3 区扩增片段,变性剂梯度范围为 40%~60%。每个加样孔加入 10×Loading buffer 10 μL 和样品 PCR 产物 30 μL 的混合样品。先在 40 V 下电泳 1 h,然后 80V 电泳 10~12 h。

凝胶染色,电泳结束后,凝胶于 EB 染液中染色 20 min,用 Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像。采用 Quantity One(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)软件分析指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 皱纹盘鲍肠道细菌数量和组成

养殖组和野生组可培养的好氧及兼性厌氧菌数量分别为 $(3.50 \pm 0.85) \times 10^6$ 个/g, $(3.03 \pm 1.10) \times 10^6$ 个/g。根据在 2216E 培养基上的不同菌落形态及菌体形态特征,共分离到 12 类细菌。从中选出具有代表性的 43 株菌株测序(GenBank 登录号: JQ083308-JQ083350)结果表明:这 13 类细菌分别与 8 个属相似

度较高,分别为弧菌属(*Vibrio*)、玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、需盐杆菌属(*Salegendibacter*)、火红菌属(*Flammeovirga*)、古名菌属(*Tamlana*)、嗜琼脂属(*Agarivorans*)。其中,火红菌属、古名菌属、嗜琼脂属细菌具有降解琼脂能力。弧菌主要种类有 *Vibrio haliotocoli*、*Vibrio cyclitrophicus*、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和 *Vibrio Alcanivorax*;希瓦氏菌由 *Shewanella colwelliana*、*Shewanella pacifica* 组成;养殖组和野生组每个个体的肠道菌群组成及比例见表 1。

从表 1 可以看出,养殖组同野生组皱纹盘鲍肠道菌群组成相似度很高,共有优势菌均为 *Vibrio haliotocoli*。玫瑰杆菌属、希瓦氏菌属检出率及比例较高,可认为是皱纹盘鲍肠道的次优势菌群。*Vibrio haliotocoli*、玫瑰杆菌和希瓦氏菌在养殖组中的比例分别为 $76.47\% \pm 13.07\%$ 、 $9.74\% \pm 8.10\%$ 、 $6.54\% \pm 2.98\%$,在野生组的比例分别为 $81.89\% \pm 10.70\%$ 、 $7.74\% \pm 4.27\%$ 、 $10.28\% \pm 6.71\%$ 。其余种类细菌的检出率及所占比例都很低。其中,芽孢杆菌仅在养殖组中检出,且检出率较高(80%),属于养殖组的特异性细菌。此外,从表中可以看出个体间肠道细菌组成和比例差异很大。

2.2 16S rDNA V3 可变区指纹图谱的建立及分析

针对两种皱纹盘鲍肠道细菌的 16S rDNA 基因得到的 DGGE 指纹分析图谱及模式图(图 1):养殖组和野生组条带分别有 14 条与 12 条,表明皱纹盘鲍肠道具有丰富的微生物区系。其中,野生组泳道中 12 个条带对应位置均对应有养殖组的条带,而养殖组泳道中 band2、band7 属于特异性条带;共有条带中 band4、band5 和 band14 丰度较高,表明皱纹盘鲍肠道中优势的菌株种类约为 3 种。用戴斯系数 C_s (Dice coefficient)计算两样品的相似性^[8], $C_s = 2j/(a+b)$ (j 是样品 A 与 B 间相同的条带。 a 和 b 分别是各自的条带数),可知养殖组肠道菌群同野生组的相似性系数为 92.31%(24/26)。

3 讨论

关于海洋软体动物肠道菌群组成的研究相对于海水鱼类很少,几乎大多数的研究表明海水鱼类肠道的优势菌同海水中优势菌群结构一致,均为弧菌

表 1 皱纹盘鲍个体间肠道菌群组成比例
Tab. 1 The proportion of microflora in the tract of abalone individuals

菌群	NMF	玫瑰杆菌属	希瓦氏菌属	芽孢杆菌属	弧菌属	需盐杆菌属	火红菌属	古名菌属	嗜琼脂菌属
养殖组	85.55	6.30	3.33	Y	4.82	—	Y	—	—
	85.27	—	13.18	—	1.55	—	Y	Y	—
	79.25	7.55	5.66	Y	Y	—	—	7.55	—
	82.99	6.12	5.44	Y	Y	—	—	5.45	—
	79.50	7.50	9.50	Y	3.50	Y	—	Y	—
	87.50	—	5.35	3.57	1.79	Y	1.79	—	—
	81.94	4.63	6.02	2.78	3.24	—	1.39	Y	—
	53.57	8.93	2.98	33.30	Y	—	Y	—	—
	78.00	7.80	7.00	—	1.22	—	—	Y	—
	51.16	29.07	6.98	2.33	Y	—	—	10.46	Y
平均	76.47±13.07	9.74±8.10	6.54±2.98						
野生组	89.57	Y	7.83	—	Y	2.61	Y	—	—
	87.69	Y	6.93	—	5.38	Y	Y	—	Y
	90.28	Y	9.72	—	Y	Y	—	Y	Y
	78.00	6.00	9.00	—	7.00	—	—	Y	—
	57.16	10.34	27.50	—	3.57	1.43	—	—	—
	78.20	8.27	13.53	—	Y	Y	—	—	—
	92.40	3.62	3.98	—	Y	—	Y	—	—
	88.60	7.25	4.14	—	Y	—	—	Y	—
	83.33	7.58	9.09	—	Y	—	—	—	Y
	73.61	11.11	11.10	—	4.18	Y	Y	—	Y
平均	81.89±10.70	7.74±4.27	10.28±6.71						

注: “NMF”表示 *Vibrio* *haliotocoli*; “—”表示未检测到; “Y”表示检测到, 但比例小于 1%。

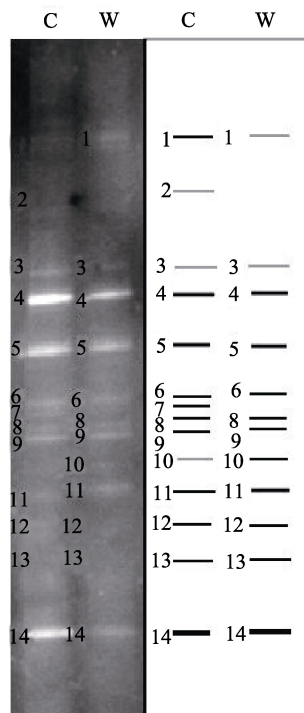


图 1 养殖组皱纹盘鲍及野生组皱纹盘鲍肠道细菌 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱及模式图

Fig.1 PCR-DGGE fingerprint and its pattern of the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gastrointestinal of *Haliotis discus hannai*
1~14. 条带数; C. 养殖组样品; W. 野生组样品
1-14. no. of the band; C. the sample of cultured group; W. the sample of wild group

或假单胞菌^[9]。Tanaka 等^[10]采用常规培养方法分析了日本海域的不同发育阶段皱纹盘鲍肠道内细菌变化规律: 1 龄后的个体微生物区系趋于稳定, 主要为具海藻酸降解酶活力的不动发酵菌(Alginolytic、non-motile fermenters)、弧菌属(*Vibrio*)、噬纤维菌属(*Cytophaga*), 其中, NMF(non-motile fermenters)细菌占肠道菌群总数的 80%以上, *V. haliotocoli* 占 NMF 的 96%。从大连海域皱纹盘鲍肠道菌群结构发现, 野生与人工养殖主要由 *V. haliotocoli* (比例≥76%)、玫瑰杆菌(比例≥7.74%)和希瓦氏菌(比例≥6.54%)组成, 同日本海域皱纹盘鲍肠道菌群组成具有一定的差异。大连海域的皱纹菌群中 *V. haliotocoli* 占主导, 希瓦氏菌和玫瑰杆菌检出数量较多, 但并未检出噬纤维菌; 希瓦氏菌和玫瑰杆菌均为海水中丰度较高的细菌, 在很多水生动物肠道内及藻类表面均有发现^[11-13], 可能通过皱纹盘鲍摄食进入肠道内并定植。有研究表明水域环境对鱼类肠道微生物菌群结构具有显著的影响^[14], 日本海域同大连海域

皱纹盘鲍肠道菌群组成的差异的原因可能是由于水域环境的不同。

对比大连海域养殖组和野生组个体间肠道菌群组成, 总体上看, 野生组和养殖组肠道细菌组成差异很小。关于鱼类的肠道菌群研究中有报道表明不同种类鱼的肠道菌群具有特异性, 这可能与自身免疫有关^[15-16], 而皱纹盘鲍在不同养殖环境下的肠道菌群组成的高度相似性同样反映了贝类肠道对其共生细菌具有特异选择性。值得注意的是, 芽孢杆菌仅在养殖组中检出, 其来源于人工养殖环境或饵料有待于进一步研究。

Sawabe 等^[6]报道皱纹盘鲍肠道可培养的细菌数量为 $10^6 \sim 10^9$ 个/g, 本研究中皱纹盘鲍可培养的好氧及兼性厌氧菌的平均数约为 10^6 个/g, 与之相比处于正常水平。另外, Ringø 等^[17]指出鱼类不同个体间由于摄食、健康状况等不定因素的影响, 肠道细菌数量存在较大差异, 与本文研究结果相符。

分析 16S rDNA 指纹图谱表明, 养殖组和野生组皱纹盘鲍肠道细菌组成的相似度很高($C_s=92.31\%$), 同常规培养方法得到的结果相吻合。养殖组和野生组有 12 个共有条带, 养殖组有 2 条特异性条带(band2、band7), 进一步说明了养殖皱纹盘鲍肠道菌群结构同野生皱纹盘鲍发生了改变, 但人工组两条特异性条带的丰度相对较低, 说明其所代表的细菌在肠道中的数量并不占优势。外来细菌在皱纹盘鲍肠道菌群中不能占优势的原因可能与皱纹盘鲍对肠道共生微生物的特异选择性相关。

鲍鱼是海洋植食性动物, 肠道细菌对降解海藻及营养合成具有重要的作用^[18-19], 对分离得到的肠道细菌的特性进行研究可以更加深入了解皱纹盘鲍肠道细菌的共生关系。在下一步的工作中, 作者将通过皱纹盘鲍肠道细菌产酶和拮抗能力进行研究, 并将指纹图谱上的条带回收测序, 确定皱纹盘鲍肠道微生物区系, 以便于深入了解皱纹盘鲍肠道生态规律, 为鲍鱼专用益生菌的开发奠定基础。

参考文献:

- [1] 李学梅, 余育和, 解绶后, 等. 三种室内饲养鱼类肠道微生物群落 PCR-DGGE 指纹分析[J]. 水生生物学报, 2011, (3): 423-429.
- [2] Watson A K, Kaspar H, Lategan M J, et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes [J]. Aquaculture, 2008, 274: 1-14.
- [3] Iehata S, Inagaki T, Okunishi S, et al. Improved gut environment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pediococcus*

- sp. Ab1 treatment [J]. *Aquaculture*, 2010, 305: 59-65.
- [4] 王瑞旋, 徐力文, 冯娟, 等. 鲍类微生物性疾病研究进展[J]. *海洋湖沼通报*, 2006, 2: 117-124.
- [5] 李彬, 荣小军, 廖梅杰, 等. 冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究[J]. *海洋科学*, 2010, (4): 64-69.
- [6] Sawabe T, Oda Y, Shiomi Y, et al. Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones[J]. *Microbiol Ecol*, 1995, 30: 193-202.
- [7] 王轶南, 朱世伟, 常亚青. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的PCR-DGGE指纹图谱分析[J]. *渔业科学进展*, 2010, 3: 119-122.
- [8] 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.
- [9] 周志刚, 石鹏君, 姚斌, 等. 海水鱼消化道菌群结构研究进展[J]. *海洋水产研究*, 2007, 5: 123-129.
- [10] Tanaka R, Sugimura I, Sawabe T, et al. Gut microflora of abalone *Haliotis discus hannai* in culture changes coincident with a change in diet [J]. *Fish Sci*, 2003, 9: 951-958.
- [11] Dang, H Y, Lovell C R. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 467-475.
- [12] Kim D, Baik K S, Kim M S, et al. *Shewanella haliotis* sp. nov., isolated from the gut microflora of abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57: 2926-2931.
- [13] Park S C, Baik K S, Kim M S, et al. *Shewanella marina* sp. nov., isolated from seawater [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59: 1888-1894.
- [14] Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, et al. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification [J]. *Aquaculture*, 2000, 182: 1-15.
- [15] Harrell L W, Etlinger H M, Hodgins H O. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement, [J]. *Aquaculture*, 1976, 4: 363-370.
- [16] Fletcher T C. Non-specific defence mechanisms in fish [J]. *Develop Comp Immunol*, 1982, 2(suppl.):123-132.
- [17] Ringø E, Strøm E, Tabachek J. Intestinal microflora of salmonids: a review[J]. *Aquacult Res*, 1995, 26: 773-789.
- [18] Tanaka R, Ootsubo M, Sawabe T, et al. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques [J]. *Aquaculture*, 2004, 241: 453-463.
- [19] Erasmus J H, Cook P A, Coyne V E. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae* [J]. *Aquaculture*, 1997, 155: 377-386.

Microflora in the digestive tract of *Haliotis discus hannai* Ino and PCR- DGGE fingerprint analysis

LENG Xiao-fei¹, JIANG Hai-feng², LIU Xiao-lin², WANG Gao-xue², ZHANG Yan², GAO Hong-tao¹, CHANG Ya-qing³

(1. Pacific Fisheries Co., LTD, Lü shun 116045, China; 2. College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 3. Key Laboratory of Mariculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Received: Feb., 11, 2012

Key words: *Haliotis discus hannai* Ino; intestinal tract; microflora; PCR-DGGE

Abstract: Microflora in the intestinal tract of cultured and wild abalones (*Haliotis discus hannai* Ino) individuals were studied in this paper. PCR-DGGE fingerprint was explored to analyze the differences between the dominant species in intestinal tract of these two groups. Results showed that the total aerobe and facultative anaerobe in the intestinal tract of cultured and wild abalone reached $3.50 \pm 0.85 \times 10^6$ and $3.03 \pm 1.10 \times 10^6$ cfu/g, respectively. The dominant species was similar. *Vibrio* was the dominant species, and *Shewanella* and *Roseobacter* were the secondary dominant species, *Bacillus* was detected in the cultured group only, suggesting that abalones have specific selectivity for microflora in the intestinal tract. Additionally, the result from PCR-DGGE fingerprint showed that 14 and 12 bands were observed from cultured and wild abalones, respectively. There were 2 special bands appeared in cultured group. The similarity between the two groups was 92.31%.

(本文编辑: 梁德海)