

南美白对虾肠道微生物群落的分子分析

李 可¹, 郑天凌^{1,2*}, 田 蕴¹, 袁建军³

(厦门大学¹ 生命科学学院环境微生物研究所² 近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361005)

(³ 泉州师范学院生物学系 泉州 362000)

摘 要: 采用分子生物学手段 16S rDNA 克隆文库方法对实验室养殖条件下的南美白对虾肠道细菌进行了多样性研究。用限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法从文库中筛选出可能不同细菌来源的克隆子 12 个, 测定其 16S rDNA 片段核苷酸序列, 将所获得的序列与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 结果表明, 南美白对虾肠道的 16S rDNA 克隆文库中 126 个克隆子分属 2 个不同的细菌类群: 变形细菌 (Proteobacteria) 和厚壁细菌 (Firmicutes), 其中厚壁细菌为优势菌群占到 75.4%, 且与最相似序列同源性均低于 94%, 变形细菌占到 24.6%, 与最相似序列同源性均高于 98%, 分别为希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、泛菌属 (*Pantoea*)、*Aranicola* 属、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和弧菌属 (*Vibrio*)。

关键词: 南美白对虾 肠道 细菌多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0649-05

随着现代集约化和规模化水产养殖业的发展, 应激原增多, 导致水产动物免疫抗病力下降, 其对疾病的易感性大大增强。人们通常采用抗生素、化学合成药物等防治水产动物疾病, 但长期、大量使用抗生素的负面效应日益明显地暴露出来了: 不仅破坏水产动物肠道正常菌群组成, 造成肠道内生态失调, 导致对病原微生物的易感性以及细菌耐药性, 而且会在体内残留, 引起过敏等不良反应, 并造成整个生态环境的污染, 严重阻碍了无公害水产养殖业的发展^[1,2]。近年来, 人们开始尝试在养殖水体中施用微生态制剂 (Probiotics) 来改善养殖生态环境, 提高养殖动物的免疫力, 抑制病原微生物, 从而减少疾病的发生^[3-5]。在各国的水产养殖业中, 微生态制剂得到日益广泛的应用。微生态制剂大都是通过对肠道菌群施加影响而发挥作用的, 因此, 对动物肠道菌群的了解是研究和开发微生态制剂的先决条件^[6]。

迄今, 作为我国重要的水产养殖品种, 南美白对虾肠道细菌群落结构研究只限于可培养细菌的研究^[7,8]。然而, 近几十年来的分子生物学研究表明, 99% 以上的环境微生物是无法获得纯培养的^[9]。为了克服传统微生物培养技术的缺陷, 更全面深入地了解对虾肠道的微生物群落结构, 本文采用直接提取南美白对虾肠道微生物基因组 DNA, 建立 16S rDNA 克隆文库的方法, 通过序列分析探讨了对虾肠道细菌组成。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 南美白对虾肠道样品: 健康养殖南美白对虾样品 (5~6g/只) 于 2006 年 2 月随机采于福建省厦门市某养殖场, 于实验室条件下 (水体温度为 25~28℃, pH 为 7.8~8.2, 盐度为 8‰~10‰, 每天投喂 3% 虾体重的饲料, 分 3 次投喂: 08:00、15:00 和 22:00) 饲养 40d 后, 分别取 1~4 只进行解剖。用 70% 乙醇和火焰灼烧进行体表消毒后, 无菌条件下剖取对虾肠道, 再用灭菌的镊子取出肠道内的粪便等杂物, 将对虾肠道置于装有 70% 乙醇的灭菌离心管中以备下一步的 DNA 提取。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA 通用纯化试剂盒购自厦门鹭隆生物公司; 质粒 pMD18-T (PCR 产物克隆用载体), 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*) DH5 α 为本实验室保存。PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司); GIS-2008 凝胶成像分析系统 (中国天能科技有限公司)。

1.1.3 引物: 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。① 基因组扩增引物 27-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492-R: 5'-GGTTACCTTGTACGAC TT-3'; ② pMD 18-T 载体扩增引物 M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3', RV-M: 5'-AGC

基金项目: 国家自然科学基金 (30370276) 福建省科技重点项目 (2004J023) 高等学校博士学科点专项科研基金 (20050384002)

* 通信作者。Tel: 86-592-2183217; Fax: 86-592-2184528; E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

作者简介: 李 可 (1979-), 女, 山西长治人, 博士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: likeboma@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-12-26 接受日期: 2007-04-04 修回日期: 2007-03-29

GGATAACAATTTTCACACAGG-3'.

1.2 南美白对虾肠道微生物总 DNA 提取

参照 Hoelzel 等^[10]的方法,并作适当改进。将准备好的南美白对虾肠道样品(1条、2条、3条和4条)与 1mL DNA 提取缓冲液(50mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L EDTA-Na₂, 1.0mol/L NaCl, 1% CTAB, 1% PVP)混合,漩涡振荡 5~8min。加入 100 μ L 溶菌酶(50mg/mL) 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h,每 15min 颠倒混匀 1次。再加入 100 μ L SDS(10%),12.0 μ L 蛋白酶 K(20mg/mL) 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h。随后用等体积氯仿异戊醇(24:1 体积比)混合,14000 \times g 离心 15min,收集上清液。用等体积平衡酚抽提,离心,吸取水相转移到另一 1.5mL 离心管中。用 2 倍体积的无水乙醇-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。室温下 14000 \times g 离心 15min,收集沉淀,用预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀。重悬于 100 μ L TE 缓冲液(10mmol/L, pH8.0)中,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

PCR 反应采用 50 μ L 体系,反应条件 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 8min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,切下目的 DNA 条带,按回收试剂盒的使用说明进行回收纯化。

1.4 16S rDNA 克隆、转化和文库构建

按照 pMD18-T 载体试剂盒说明和文献^[11]的方法进行操作。

1.5 阳性克隆子的 PCR-RFLP 分析

取 4 $^{\circ}$ C 保存的阳性克隆子平板,用牙签挑取少量菌体于 PCR 管内作为模板,用引物 RV-M 和 M13-47 进行菌落 PCR,再以 0.5 μ L 稀释 10 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 1500bp。将巢式 PCR 产物用 *Afa*I 和 *Msp*I 两种核酸限制性内切酶进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析,在 3% 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。

1.6 DNA 序列测序和分析

挑取代表克隆子送上海英骏生物技术有限公司进行测序;所测得序列用 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,找出其所属的微生物种类范畴,并挑选相关序列,用 DNAMAN 软件采用邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育树,自举值(Bootstrap)为 1000。通过研究所得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中的登录号为 EF186758-EF186769。

2 结果和分析

2.1 南美白对虾生物总 DNA 的提取

图 1 为样品的总 DNA 提取电泳图。与 maker 比较可知,提取到的 DNA 片段比较完整,大小主要集中在 21kb 左右,其中泳道 3 拖带比较严重,究其原因可能是所提 DNA 没有经 RNA 酶消化,也未纯化,加之操作可能出现的机械力对 DNA 有比较强的剪切力,出现了较多的碎片,但是从后续实验来看,对 PCR 是没有影响的。

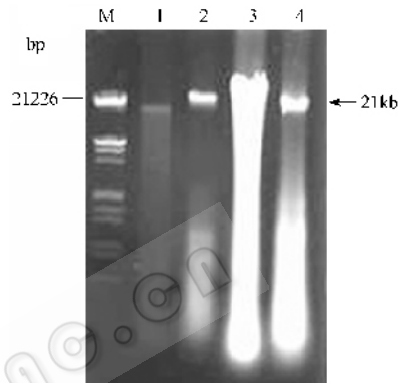


图 1 南美白对虾肠道细菌基因组 DNA

Fig.1 The genomic DNA of intestinal bacteria from different number of *Litopenaeus vannamei*. M: λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III; 1. One intestine; 2. Two intestines; 3. Three intestines; 4. Four intestines.

2.2 从总 DNA 中扩增 16S rDNA 基因

图 2 显示 4 个样品的各自 3 个稀释梯度 PCR 效果不尽相同,有的泳道未能扩增出目的条带,但是 4 个样品在其不同的稀释梯度均能获得较好的 16S rDNA 片段的 PCR 条带,且没有非特异性扩增现象,得到的 PCR 扩增产物适合下一步 16S rDNA 克隆文库的建立。

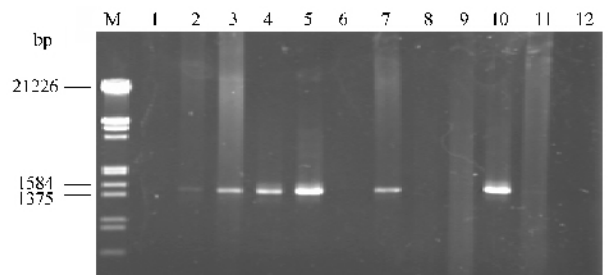


图 2 南美白对虾肠道细菌的 16S rDNA PCR 扩增图谱

Fig.2 PCR amplification of 16S rDNA fragment from intestinal bacteria of *Litopenaeus vannamei*. M: λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III; 1-3. The amplification results of bacterial 16 rDNA from one intestine with ten, hundreds and thousands of dilution of DNA template; 4-6, 7-9 and 10-12. Corresponding results of two, three and four intestines respectively.

2.3 16S rDNA 基因克隆文库分析

从中国非致病性白色菌落 76 个纯化后通过菌液 PCR

检测阳性克隆。PCR 扩增产物大约 1.7 kb 的为带有目的片段的阳性克隆。共获得阳性克隆 126 个, 阳性率为 71.6%。以巢式 PCR 产物作为底物, 用内切酶 *Afa* I 和 *Msp* I 进行双酶切, 3% 琼脂糖电泳后, 进行 RFLP 分析 (图 3)。根据样品酶切片段大小和数量区别电泳条带谱型, 结果表明在南美白对虾肠道 16S rDNA 文库中共有 12 种细菌 RFLP 谱型。

以覆盖率 (C) 来评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现, 计算公式为:

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100$$

其中, N 代表所分析的克隆数, n_1 代表具有不重复序列的克隆数。计算结果表明所构建的 16S rDNA 克隆文库覆盖率达到 90.5%, 即包含了对虾肠道中 90.5% 的细菌多样性状况。因此, 从覆盖率分析可以说明所构建的 16S rDNA 克隆文库能够较完整地反映所属环境中的细菌多样性状况。

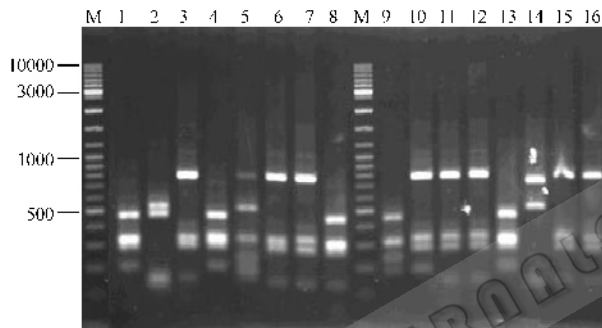


图 3 文库中部分阳性克隆子 RFLP 结果

Fig. 3 Partial results of RFLP analysis of 16S rDNA library.

M: GeneRuler DNA ladder; 1~16 Clones.

2.4 序列比对和系统发育分析

分别取代表克隆子测序, 去除载体序列部分, 将所得序列在 GenBank 中进行 BLAST, 搜索相关序列, 并构建了南美白对虾肠道中细菌的系统发育树 (图 4)。比对结果反映的微生物信息如表 1 所示, 126 个克隆子中与 GenBank 数据库中已知 16S rDNA 序列相似性最高为 99%, 最低为 87%; 其中 31 个克隆子与已知序列相似性高于 98%, 其余大多数克隆子 (95 个, 占 75.40%) 与已知序列同源性低于 94%。表明南美白对虾肠道中附着有新的未开发的微生物资源, 有待于进一步研究。结果显示南美白对虾肠道中的微生物大都为厚壁细菌 (Firmicutes) (75.4%), 其中与绝大多数克隆子同源性最高的序列都来自 Long-Jawed Mudsucker 肠道, 但同源性均低于 94%。其它可鉴定细菌均属于变形细菌 (Proteobacteria) 中的 γ -Proteobacteria 类群 (24.6%), 它们分别为希瓦氏菌属 (*Shewanella*), 泛菌属

(*Pantoea*), *Aranicola* 属, 弧菌属 (*Vibrio*) 假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 所占比例分别为 5.56%, 3.97%, 7.14%, 3.97%, 3.97%。这些细菌的进化关系如图 4 系统发育树所示, 系统发育树中包含了所有克隆子和表 1 中的相关序列。

3 讨论

水生动物从胃肠道发育不完全、免疫系统不完善的幼体阶段开始从水体中摄取食物^[12,13], 水体中的微生物随着食物不断进入体内, 形成复杂的微生物区系。南美白对虾肠道的微生物生态与外部水环境应是密切相关的, 虽然大多数肠道内细菌仅为肠道“过路菌”, 会随粪便再次排入水体, 但是不可否认, 对虾肠道结构有利于细菌的定殖加之肠腔内环境相对稳定且营养丰富, 所以会有一些数量和种类的细菌是作为肠道“土著菌”而存在于其中。为了更加全面了解对虾肠道“土著菌”的菌群结构组成, 在此实验中我们采用实验室养殖的方式排除了抗生素、激素等外界不良因素对对虾肠道菌群的影响。

国内外学者先后对水生动物肠道细菌进行了可培养技术的分离和鉴定。宛立等^[7]从健康养殖的南美白对虾肠道内分离出 111 株细菌, 其中革兰氏阴性菌比例占到 95.5%, 占据了绝对优势。这些分离菌株分别属于 13 个属 (科), 发光杆菌属 (*Photobacterium*) 弧菌属 (*Vibrios*) 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 小球菌属 (*Micrococcus*) 黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和色杆菌属 (*Chromobacterium*)。其中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。王祥红等^[14]从野生健康中国对虾成虾肠道中分离出 47 株菌, 分别属于弧菌属、发光杆菌属、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 假单胞菌属、黄杆菌属、气单胞菌属、屈挠杆菌属 (*Flexibacter*) 和色杆菌属 8 个属。其中弧菌属和发光杆菌属在整个肠道中为优势菌属, 不动杆菌属和假单胞菌属为次优势菌属。Moriarty^[15]的研究表明甲壳类动物消化道中最常见的菌属是弧菌属和假单胞菌属。

以上研究中均提到了弧菌属和假单胞菌属存在于水生动物的肠道, 而在本研究中也发现了有这两个属的存在, 但其并不是优势菌群。当然随着季节、动物发育阶段、采样地点及养殖方式的不同, 水产动物肠道菌群也将随之变化^[16-18]。但就本实验与过

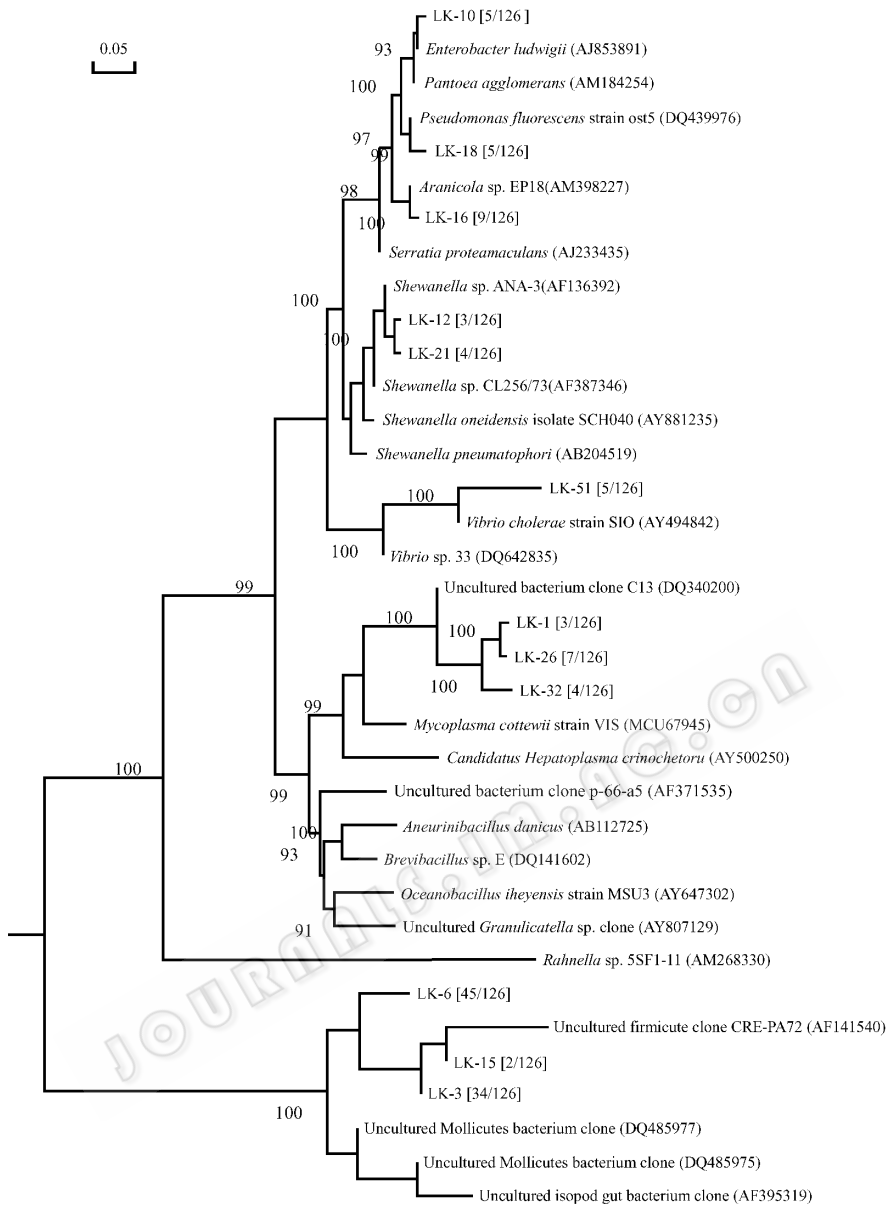


图 4 南白对虾肠道细菌系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of 16S rDNA clones from the intestinal bacteria of *Litopenaeus vannamei*. Clones detected in this study are given in boldface. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. Bootstrap values are indicated at the branching points. Bar, 5% sequence divergence.

去的研究成果对比,其显著差异说明过去靠传统可培养技术所获得的对虾肠道微生物群落结构的结论并不能准确反映其真实状况,本实验中两个代表最多克隆子数的序列 3 号(34 个克隆子)和 6 号(45 个克隆子)均显示为不可培养细菌序列,但对比结果表明与其同源性最高的参照菌和序列来源分别为等脚类动物的中肠腺和长颌泥吸鸟(Long-Jawed Mudsucker)的肠道。这提示我们对虾肠道内附着有与其他动物相似但又不同的细菌种类,而且在肠道内占据着绝对的优势地位,目前我们还不能利用分离培养技术将其得到,仍有待于进一步的深入研究

和突破。

本文的研究结果有助于建立一种不依传统分离培养技术而能原位揭示对虾体内细菌种群组成的分子诊断技术。通过对虾肠道内细菌群落结构的揭示为新的水产微生物制剂菌株的开发和应用提供候选菌株和理论基础。

参 考 文 献

- [1] Weston DP. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: Baird D, et al. eds. Aquaculture and Water Resource Management. Oxford: Blackwell, 1996, 140 - 165.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Towner KJ. The genetics of resistance. In : Greenwood D. 3rd ed. Antimicrobial Chemotherapy. Oxford : Oxford University Press , 1995 , 159 – 167.
- [3] Devaraja TN , Yusoff FM , Shariff M. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. *Aquaculture* , 2002 , **206** : 245 – 256.
- [4] Duc LH , Hong HA , Barbosa TM , *et al.* Characterisation of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** : 2161 – 2171.
- [5] Verscuere L , Rombaut G , Sorgeloos P , *et al.* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 2000 , **64** (4) : 655 – 661.
- [6] Tannock GW. Studies of the intestinal microflora : a prerequisite for the development of probiotics. *Int dairy Journal* , 1998 , **8** : 527 – 533.
- [7] 宛 立 , 王吉桥 , 高 峰 , 等. 南美白对虾肠道细菌菌群分析. 水产科学 , 2005 , **24** (1) : 13 – 15.
- [8] 尹军霞 , 沈文英 , 郗 萍. 水温对南美白对虾肠道菌群影响的研究. 海洋科学 , 2004 , **28** (5) : 33 – 36.
- [9] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* , 1997 , **276** : 734 – 740.
- [10] Hoelzel AR , Green A. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In : Hoelzel AR. ed. Practical Approach Series : Molecular Genetic Analysis of Populations , vol xvii. New York : IRL Press at Oxford University Press , 1992 , 159 – 187.
- [11] Samlnrook J , Fritsch EF , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 , 黎孟枫 等译. 第二版. 北京 : 科学出版社 , 1996.
- [12] Timmermans LPM. Early development and differentiation in fish. *Sarsia* , 1987 , **72** : 331 – 339.
- [13] Vadstein O. The use of immunostimulation in marine larviculture : possibilities and challenges. *Aquaculture* , 1997 , **155** : 401 – 417.
- [14] Wang X , Li H , Zhang X. Flora in the digestive tract of adult Penaeid Shrimp (*Penaeus chinensis*). *Journal of Ocean University of Qingdao* , 2000 , **30** (3) : 493 – 498.
- [15] Moriarty DJW. Interactions of microorganisms and aquatic animals , particularly the nutritional role of the gut flora. In : Lesel R. ed. Microbiology in Poecilotheims. Amsterdam : Elsevier , 1990 , 217 – 222.
- [16] Sugita H , Tsunohara M , Ohkoshi T. The establishment of an intestinal microflora in developing goldfish (*Carassius auratus*) of culture ponds. *Microbial Ecol* , 1988 , (15) : 333 – 344.
- [17] Sugita H , Oshima K , Tamura M. Bacterial flora in the gastrointestinal of freshwater fishes in the river. *Nippon Suisan Gakkaishi* , 1983 (49) : 1387 – 1395.
- [18] Yoshimizu M , Kimura T. Study on the intestinal microflora of salmonids. *Fish Pathol* , 1976 , (10) : 243 – 259.

Bacterial community structure in intestine of the white shrimp , *Litopenaeus vannamei*

LI Ke¹ , ZHENG Tian-ling^{1,2*} , TIAN Yun¹ , YUAN Jian-jun³

¹ Institute of Applied and Environmental Microbiology , School of Life Sciences ,

² State Key Laboratory of Marine Environmental Science , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

³ Department of Biology , Quanzhou Normal College , Quanzhou 362000 , China)

Abstract : The composition of bacterial community in the intestine of the white shrimp , *Litopenaeus vannamei* under laboratory culture condition was determined using the 16S rDNA clone library. 16s rRNA gene was amplified and a library was constructed by using the genomic DNA extracted from the bacteria in the shrimp intestine as template. 12 different RFLP patterns of the clones were obtained by restriction fragment length polymorphism analysis using *Afa* I and *Msp* I . Compared with the published sequences in GenBank database , sequencing results of cloned 16S rDNA amplicons revealed a diverse community including γ -proteobacteria and Firmicutes in the intestine of artificial diet-fed shrimp. Results showed that the Firmicutes group can be a dominant component (75.4%) in the shrimp intestinal microflora and other clones belong to γ -proteobacteria (24.6%) which were identified as *Shewanella* sp. , *Pantoea* sp. , *Aranicola* sp. , *Pseudomonas* sp. and *Vibrio* sp. , respectively. These results provide the first comprehensive description of microbial diversity of the white shrimp intestine and suggest that most of the bacteria associated with shrimp intestine are uncultured and novel species.

Keywords : *Litopenaeus vannamei* ; intestine ; bacterial diversity

Foundation item : National Science Foundation of China (G30370276) ; Key Project on Sciences and Technology of Fujian Province (20041023) ; Special Fund for PHD Program in University (20050384002)

* Corresponding author. Tel : 86-592-2183217 ; Fax : 86-592-2184528 ; E-mail : wshwzh@xmu.edu.cn

Received : 26 December 2006 / Accepted : 4 April 2007 / Revised : 29 March 2007