

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(7):926-934; 4 July 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140450

氟化物对家蚕肠道微生物菌群的影响

李冠楠¹, 夏雪娟², Parfait Sendegeya¹, 赵欢欢¹, 隆耀航¹, 朱勇^{1*}

西南大学,¹ 生物技术学院,² 食品科学学院, 重庆 400716

摘要:【目的】探讨氟化物对家蚕肠道微生物菌群的影响, 开发具有潜在应用价值的益生菌以提高家蚕对氟化物的抗性。【方法】PCR 扩增家蚕肠道内细菌 16S rRNA 基因并构建克隆文库; 用核糖体 DNA 限制性分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 方法对克隆子进行分型。从家蚕 T6 和 734 肠道样品中共获得 14 种分类操作单元 (Operational taxonomic unit, OTUs), 以 16S rRNA 基因为基础构建系统发育树进行分析。再经巢式 PCR-DGGE 技术检测家蚕肠道内优势菌群的变化。【结果】结果表明: 家蚕氟中毒后肠道内肠球菌属 *Enterococcus* 和芽孢杆菌属 *Bacillus* 细菌菌群减少, 而葡萄球菌属 *Staphylococcus* 的细菌增多。【结论】氟化物能通过改变家蚕肠道内细菌的多样性和比例, 从而破坏家蚕肠道微生物菌群平衡, 且对家蚕 734 的影响作用大于 T6。

关键词: 家蚕, 氟化物, 肠道菌群, 克隆文库, 巢式 PCR-DGGE

中图分类号: Q965.8 **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0926-09

家蚕饲养在中国有五千年的悠久历史, 传统的养蚕业以生产蚕丝为主^[1]。近年来, 由于蚕蛹具有高蛋白、多种氨基酸和不饱和脂肪酸可满足人体对日常蛋白质的需求, 已成为养蚕业另一重要的经济生产点^[2]。由于工业发展迅速, 某些地区空气中氟化物污染严重, 氟化物随桑叶以离子形式进入蚕体, 在家蚕 (*Bombyx mori*) 中肠内累积之后进入血液和组织器官, 能削弱家蚕体质并且高浓度中毒时会导致家蚕大量死亡, 对蚕业生产造成严重破坏^[3]。

昆虫肠道居住着广泛多样的微生物, 这些微生物组成了昆虫肠道的微生态系统。研究表明肠道微生物菌群能够抵御外源致病微生物并且维持肠道微生态系统的平衡。此外, 昆虫肠道内的微生物菌群能参与昆虫的消化吸收和协助宿主免疫系统以抵御

感染^[4-5]。还有研究指出在家蚕肠道内的微生物菌群能够产生多种酶, 如: 蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、脲酶、明胶酶和木聚糖酶等等, 这些酶在家蚕肠道内对消化和免疫起着重要的作用^[6-7]。肠道微生物菌群可能受食物营养成分、饮食环境和其它微生物的改变而发生变化^[8-10], 其中食物环境的改变是导致昆虫生理活力和肠道菌群改变的最重要因素之一。

中肠是氟化物主要的吸收场所和直接受损器官, 并有研究表明氟中毒会对家蚕肠道内的产酶菌组成产生影响^[11]。但有关氟化物对家蚕肠道微生物菌群动态变化的研究尚未见报道。本研究以家蚕 T6 和 734 为试验材料, 利用家蚕肠道内细菌 16S rRNA 基因构建克隆文库, 结合扩增核糖体 DNA 限

基金项目: 国家农业科技成果转化资金(2012GB2F100376); 西南大学基本科研业务费专项资金(XDJK2014D039)

* 通信作者。Tel: +86-23-68251939; E-mail: zhuy@swu.edu.cn

作者简介: 李冠楠(1985-), 男, 吉林四平人, 博士, 主要从事家蚕遗传育种研究。E-mail: gn9899@163.com

收稿日期: 2014-09-22; **修回日期:** 2014-10-27

制性分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 方法分析不同品种家蚕肠道内菌群在氟离子胁迫下发生的变化,再经巢式 PCR-DGGE 技术检测家蚕肠道内微生物菌群变化后的优势菌群。利用多种分子技术方法能更真实的分析检测氟离子胁迫下不同品种家蚕肠道内微生物菌群的变化,为研究肠道菌群变化与家蚕耐氟性的相互关系和开发蚕用耐氟益生菌提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试家蚕:家蚕品种选用耐氟品种 T6 和氟敏品种 734,由中国农业科学院蚕业研究所提供。

1.1.2 主要仪器和试剂:DCode™ system 变性梯度凝胶电泳系统和 164-5050 基础电源电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Syngene Gene Genius 凝胶成像系统[基因科技(上海)有限公司];PCR 仪(美国 ABI 公司)。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、感受态细胞 DH5 α 和 Gene Green 染色液(天根生化科技有限公司,北京);Taq DNA 聚合酶套装、限制性内切酶 *Afa* I 和 *Msp* I、质粒 pMD19-T(宝生物工程有限公司,大连);琼脂糖凝胶回收试剂盒和聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒(美国 OMEGA 公司);特异性引物、DNA 分子量标记和基因测序(上海生工生物工程股份有限公司)。其他为实验室常用设备和试剂。

1.2 家蚕饲养

蚕种按常规方法催青饲养至 4 龄起蚕,两个品种家蚕共分为 4 区,两区对照组喂食清水浸泡 15 min 后自然晾干的新鲜桑叶,另外两区试验组喂食 200 mg/kg NaF 溶液浸泡 15 min 后自然晾干的新鲜桑叶,每 8 h 喂食 1 次,一天 3 次。到 5 龄 3 天每区各取 10 头蚕,饥饿 36 h 备用。

1.3 肠道细菌基因组 DNA 提取和细菌 16S rRNA 序列扩增

取饥饿后的家蚕用 75% 的酒精体表消毒,并在酒精灯下轻轻灼烧。无菌条件下解剖家蚕,取家蚕肠道内肠液和内容物,收集到已灭菌的离心管中。细菌基因组提取具体操作详见天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)说明书,基因组经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测(约 23 kb)后于 -20℃ 冰箱保存。以提取的细菌基因组

DNA 作为模板,利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGCTACCTGTTACGACTT-3') 进行扩增。50 μ L 扩增体系:4 μ L DNA 模板,正向和反向引物(10 mol/L)各 1 μ L,10 \times PCR buffer (Mg²⁺ plus) 5 μ L,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.3 μ L,灭菌超纯水补足至 50 μ L。反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测(约 1.5 kb),并用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化后于 -20℃ 冰箱保存备用,作为克隆文库的构建和后续巢式 PCR 的模板。

1.4 16S rRNA 文库的构建与分型

将 1.3 纯化后的 PCR 产物,用 pMD19-T 载体进行连接后转入到感受态细胞 DH5 α 中,分别构建 16S rRNA 基因文库。每个文库筛选含重组质粒的阳性克隆子 40 个,经质粒小提后,以提取质粒作为模板用 27F 和 1492R 为引物进行 PCR 扩增,得到产物约 1.5 kb。用限制性内切酶 *Afa* I 和 *Msp* I 对 PCR 扩增产物进行双酶切(37℃ 酶切 1 h)^[12],酶切产物经过 3% 琼脂糖凝胶电泳检测得到克隆的酶切图谱。根据该图谱分别对每个文库中的所有克隆子进行分型,每一种类型即为一个操作单元(operational taxonomic unit, OTU)^[13],属于同一个 OUT 的克隆即使不是完全一样,在系统分类学上也十分接近,所以选一个代表进行测序。测序结果用 BLAST 和 RDP (ribosomal database project) classifier^[14] 与 GenBank 数据库比对,并用 Rio-DAP 软件计算细菌多样性指数。

1.5 巢式 PCR-DGGE

将 1.3 纯化后的 PCR 产物,使用上游引物 343F-GC (5' -CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGCGGGGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCA G-3') 和下游引物 534R (5' -ATTACCGCGCTG CTGG-3') 对细菌 16S rDNA 的 V3 可变区进行扩增^[15]。扩增体系同 1.3,降落 PCR 反应程序^[16-17]: 94℃ 5 min;94℃ 40 s,65-55℃ 1 min (-0.5℃/Cycle),72℃ 30 s,20 个循环;94℃ 40 s,55℃ 1 min,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。目的片段约为 200 bp,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,于 -20℃ 冰箱保存。采用 Bio-Rad 公司的

DCode™通用突变检测系统进行 DGGE 电泳。取巢式 PCR 产物 15 μL 与 3 μL 6 \times Loading Buffer 混合加入到点样孔中,聚丙烯酰胺变性凝胶浓度为 8%,变性梯度范围为 30% - 60%。电泳在恒温 60 $^{\circ}\text{C}$ 、恒压 150 V 下进行 4 h。电泳结束后,将胶取出放入 200 mL Gene Green 染色液中浸染 25 min,之后使用 Syngene Gene Genius 凝胶成像系统拍照。切胶回收明显条带放入 20 μL 灭菌超纯水中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将回收条带纯化后与 pMD19-T 载体进行连接,挑取阳性克隆送至上海生工进行测序。测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中搜索与已知序列最相近的序列。

1.6 系统发育分析

序列对比完成后,取 GenBank 数据库中检索出的相似性最高的序列,用 Clustal X 软件进行多序列比对,用 MEGA 5.05 软件中的邻接法(N-J 法)构建

聚类进化树进行系统发育分析^[18]。并使用 RDP classifier 进行分类。

2 结果和分析

2.1 家蚕肠道细菌多样性的克隆文库分析

2.1.1 16S rRNA 文库构建和 ARDRA 分析:对双酶切图谱进行分析后,可筛选出家蚕 T6 和 734 样品的 OUTs 数共 14 种,其中肠道内有 6 种 OUTs 相同(表 1)。操作单元 OTU1、OTU2 和 OTU3 为肠道内的优势菌群,次优势菌群为操作单元 OTU4、OTU5 和 OTU6。氟中毒后家蚕 T6 和 734 肠道内操作单元 OTU1 和 OTU4 所代表的菌群的克隆数量比例降低,所占比例分别为 25%/15%、30%/5% 和 10%/5%、17.5%/5%,而操作单元 OTU2 所代表菌群的克隆数量比例升高为 12.5%/17.5%、10%/30%。

表 1. 家蚕肠道内细菌的 16S rRNA 克隆文库结果

Table 1. Results of bacterial 16S rRNA clone library in the gut of silkworm

OTU	GenBank accession No. (Similarity)	Clone No. (Proportion)				Strain	Phylogenetic group
		T6-Control	T6-Test	734-Control	734-Test		
OTU1	KJ784845.1 (97%)	10(25.0%)	6(15.0%)	12(30.0%)	2(5.0%)	<i>Enterococcus</i> sp. SMG137	Firmicutes
OTU2	KC310815.1 (99%)	5(12.5%)	7(17.5%)	4(10.0%)	12(30.0%)	<i>Staphylococcus</i> sp. A9	Firmicutes
OTU3	AF407742.1 (99%)	7(17.5%)	8(20.0%)	9(22.5%)	7(17.5%)	<i>Thermus</i> sp. B70-05	Deinococcus Thermus
OTU4	KJ733945.1 (99%)	4(10.0%)	2(5.0%)	7(17.5%)	2(5.0%)	<i>Bacillus</i> sp. KT12	Firmicutes
OTU5	HM132103.1 (100%)	4(10.0%)	4(8.0%)	2(5.0%)	5(12.5%)	<i>Acinetobacter</i> sp. BS6	γ -Proteobacteria
OTU6	KJ174506.1 (100%)	3(7.5%)	4(10.0%)	2(5.0%)	4(10.0%)	<i>Methylobacterium</i> sp. TCI 66211	α -Proteobacteria
OTU7	KJ524492.1 (99%)	1(2.5%)	3(7.5%)	1(2.5%)	-	<i>Curtobacterium</i> sp. EGY-WCJ2	Actinobacteria
OTU8	KF826885.1 (100%)	1(2.5%)	-	-	-	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. B14	γ -Proteobacteria
OTU9	KF442785.1 (99%)	-	-	-	1(2.5%)	<i>Phyllobacteriaceae</i> bacterium BAS211i	α -Proteobacteria
OTU10	KC759398.1 (99%)	2(5.0%)	-	1(2.5%)	1(2.5%)	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. SB3013	γ -Proteobacteria
OTU11	AB244440.1 (99%)	1(2.5%)	-	1(2.5%)	1(2.5%)	<i>Pantoea</i> sp. An4-1	γ -Proteobacteria
OTU12	KJ722475.1 (99%)	1(2.5%)	2(5.0%)	-	-	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> 104NE	Firmicutes
OTU13	KF843309.1 (100%)	1(2.5%)	-	1(2.5%)	3(7.5%)	Uncultured bacterium B671	γ -Proteobacteria
OTU14	JQ427273.1 (99%)	-	4(10.0%)	-	2(5.0%)	Uncultured bacterium AN14C1AC01	γ -Proteobacteria

- : Without the operational taxonomic unit (OTU) in the library.

2.1.2 RDP classifier 分类和肠道细菌多样性分析:所有 OUTs 代表序列经过 RDP classifier 在线软件分析后,可归于 12 个细菌属(表 1),包括肠球菌属 *Enterococcus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、栖热菌属 *Thermus*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、短小杆菌属 *Curtobacterium*、假黄单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*、叶杆菌属 *Phyllobacteriaceae*、肠杆菌属 *Enterobacter*、泛菌属 *Pantoea*、微小杆菌属 *Exiguobacterium*。由表 1 可知,在家蚕氟中毒后肠球菌属 *Enterococcus* 和芽孢杆菌属 *Bacillus* 的细菌有减

少趋势,而葡萄球菌属 *Staphylococcus* 的细菌有增多趋势。

利用 Bio-DAP 生物多样性计算软件,计算出各个样品中克隆子的香农-维尔指数和均匀度指数,再计算出覆盖度等(表 2)。由表 2 可知,4 个样品的覆盖率值最小的为 87.5%,说明克隆文库中所含的细菌种类比较全面。通过计算香农-维尔指数结果表明:氟中毒后家蚕 T6 的肠道内微生物菌群多样性略有降低但变化不大,而家蚕 734 的肠道内微生物菌群多样性则明显增加。

表 2. 16S rRNA 克隆文库的覆盖度和多样性指数

Table 2. Coverage and diversity index of the 16S rRNA clone library

Line	Species richness	Evenness index	Coverage C/%	Shannon-Wiener index
T6-Contral	12	0.88	87.5	2.18
T6-Test	9	0.95	100	2.10
734-Contral	10	0.83	90	1.90
734-Test	11	0.87	92.5	2.08

2.1.3 序列对比与发育分析:经 BLAST 序列比对,将所得结果用邻近相接法(N-J 法)构建系统发育进化树(图 1)。8 条 OTUs 的 16S rRNA 序列归为变形菌门 Proteobacteria,其中 6 条属于 γ -Proteobacteria,分别为不动杆菌属 *Acinetobacter*、假单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*、肠杆菌属 *Enterobacter*、泛菌属 *Pantoea* 和无法培养细菌,另 2 条属于 α -Proteobacteria,为甲基杆菌属 *Methylobacterium* 和叶杆菌属 *Phyllobacteriaceae*;4 条 OTUs 的 16S rRNA 序列归为厚壁菌门,分别为肠球菌属 *Enterococcus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、芽孢杆菌属 *Bacillus* 和微小杆菌属 *Exiguobacterium*;1 个 OTU 的 16S rRNA 序列归为异球菌栖热菌门,为栖热菌属 *Thermus*;1 个 OTU 的 16S rRNA 序列归为放线菌门,为短小杆菌属 *Curtobacterium*。由表 1 和图 1 可知,家蚕肠道内主要的优势菌群为变形菌门和厚壁菌门,且受氟化物影响最大的肠球菌属 *Enterococcus*、芽孢杆菌属 *Bacillus* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 细菌均归属于厚壁菌门。

2.2 家蚕肠道内微生物菌群的 PCR-DGGE 分析

2.2.1 PCR-DGGE 图谱分析:从家蚕肠道内细菌 16S rRNA V3 区序列的 DGGE 图谱(图 2)上共获得 16 条明显条带。由图 2 可知,1-6 号条带为共有条

带,7-16 号条带为差异条带。其中家蚕 T6 肠道内优势菌群在氟中毒前后相对保持不变;而家蚕 734 在氟中毒后除共有条带外,肠道内优势菌群由 9-12 号转变为 13-16 号条带,这也说明家蚕 734 肠道内优势菌群受氟化物影响较大。

2.2.2 DGGE 条带的序列对比分析:切取 DGGE 图谱上的明显条带经测序后与 GenBank 数据库比对(表 3)。由表 3 可知:1、7 和 11 号条带为不动杆菌属 *Acinetobacter*,2 和 6 号条带为栖热菌属 *Thermus*,3 号为短小杆菌属 *Curtobacterium*,4 和 5 号条带为甲基杆菌属 *Methylobacterium*,8、12 和 13 号条带为芽孢杆菌属 *Bacillus*,9、10 号条带为肠球菌属 *Enterococcus*,14 号条带为无法培养细菌,15 号条带为假单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*,16 号条带为叶杆菌属 *Phyllobacteriaceae*,这些条带在 GenBank 数据库比对中均有较高同源性。DGGE 检测出家蚕肠道内共有的优势菌群为栖热菌属 *Thermus*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、甲基杆菌属 *Methylobacterium* 和短小杆菌属 *Curtobacterium*,表明这几属细菌对氟化物的影响不敏感。而图 2 中明显改变的为 9、10 号肠球菌属 *Enterococcus* 细菌,和 8、12 号芽孢杆菌属 *Bacillus* 细菌,说明氟化物可能对此两属的细菌产生抑制作用。

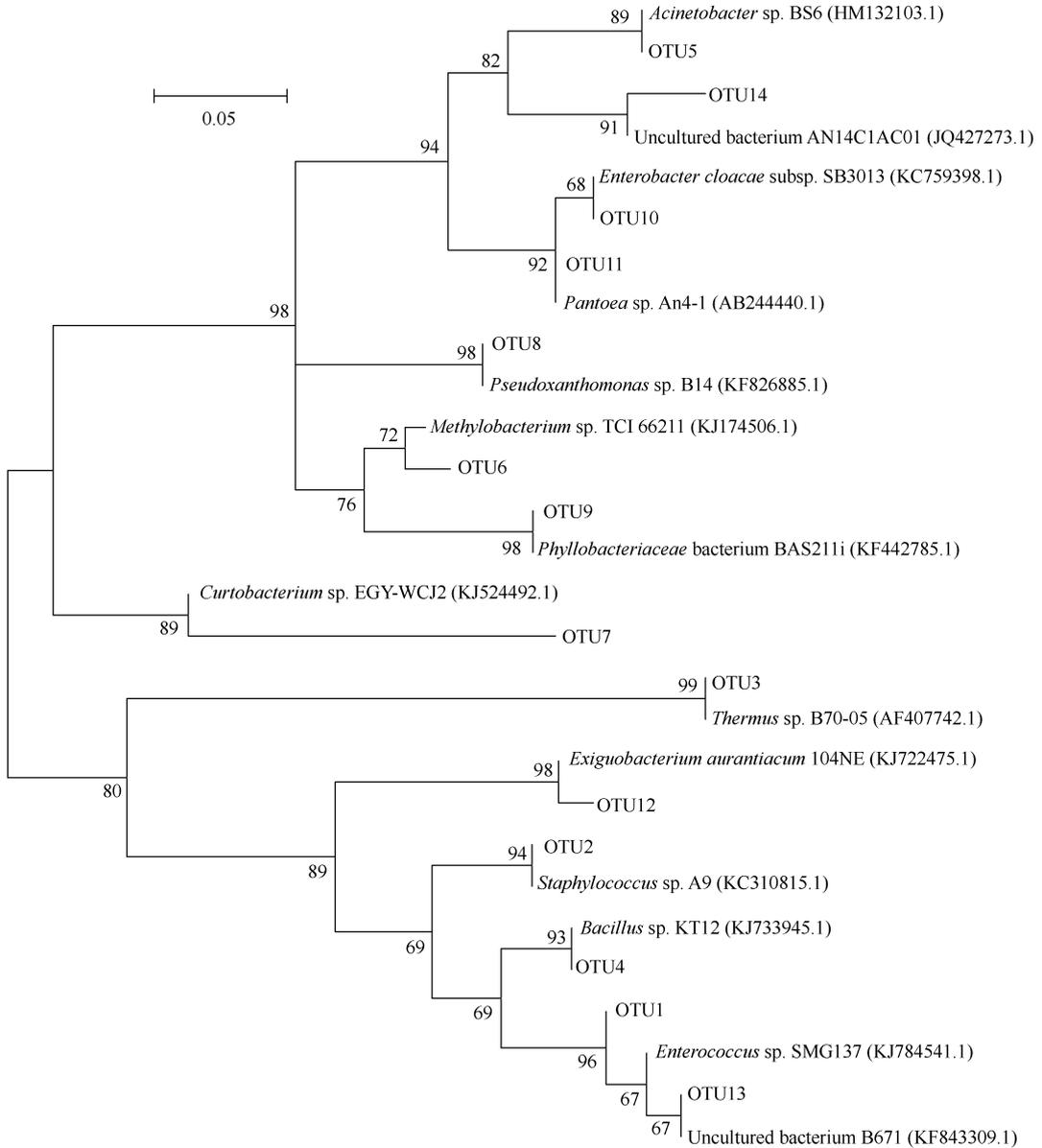


图 1. 家蚕肠道内细菌基于 16S rRNA 序列构建的邻接法系统发育进化树

Figure 1. Phylogenetic analysis of bacteria in the gut of silkworm with Neighbor-Joining method based on the sequence of 16S rRNA. "OTU1-OTU14" represents different band. Numbers represent the sequences, accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

3 讨论

所有已知昆虫的肠道都定居着大量复杂的微生物菌群,这些微生物参与了昆虫从发病机制到专性共生等多种类型的相互作用^[19]。本试验通过克隆文库法比较了家蚕在氟中毒后肠道内微生物菌群的变化和多样性的变化(表 1 和 2),结果表明:肠球菌属 *Enterococcus* 和芽孢杆菌属 *Bacillus* 在家蚕氟中毒

后肠道内微生物菌群中所占比例降低,而葡萄球菌属 *Staphylococcus* 所占比例升高,并且氟中毒后家蚕肠道菌群多样性发生改变。说明氟化物能明显改变家蚕肠道内的菌群结构。

克隆文库共获得家蚕肠道内菌群的 14 个 OTUs 类型,其中 6 个 OTUs 为共有,另外 8 个 OTUs 为差异类型。其中肠球菌属 *Enterococcus*、栖热菌属 *Thermus* 和不动杆菌属 *Acinetobacter* 这几类家蚕肠道内优势菌群与相辉等^[20]的研究结果一致。栖热菌

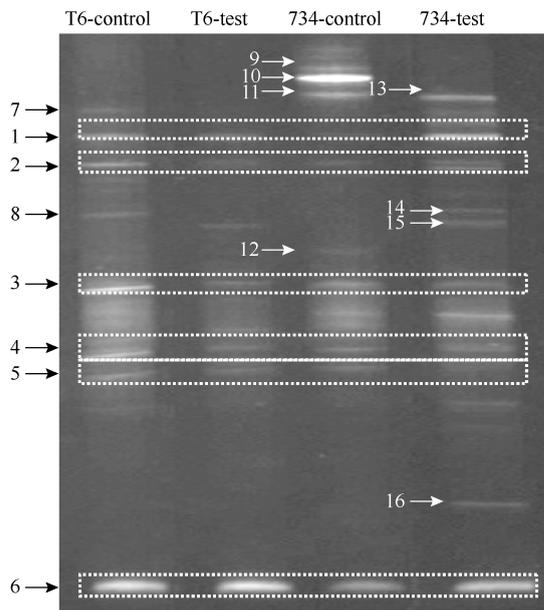


图 2. 家蚕肠道内细菌 PCR-DGGE 图

Figure 2. PCR-DGGE profiles based on 16S rRNA of bacteria in the gut of silkworm.

属 *Thermus* 细菌能产生木聚糖酶和淀粉酶, 从而能够利用纤维素和直连淀粉^[21-22]; 不动杆菌 *Acinetobacter* 能产生酪蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶, 这些酶有助于家蚕对桑叶中营养的消化和吸收。泛球菌 *Pantoea* 和微小杆菌 *Exiguobacterium* 均能产生淀粉酶, 能帮助家蚕消化多糖; 而肠杆菌 *Enterobacter*

不产生消化酶^[4]。推测其在家蚕肠道内的主要作用是维持肠道菌群平衡, 但该属细菌的具体功能还需要进一步研究。DGGE 图谱上与克隆文库中均出现的细菌还有甲基杆菌属 *Methylobacterium*、短小杆菌属 *Curtobacterium*、假单胞菌属 *Pseudoxanthomonas* 和叶杆菌属 *Phyllobacteriaceae*, 这些细菌广泛的存在于自然界中。甲基杆菌 *Methylobacterium* 能够广泛的利用一碳化合物从而参与自然界中的碳循环过程^[23-24]。萎蔫短小杆菌 *Curtobacterium flaccumfaciens* 是植物的一种病原菌, 能够导致植物叶斑病^[25]。这两属细菌可能是随桑叶一起进入家蚕肠道内, 但其在肠道内的作用尚不清楚。假单胞菌属 *Pseudoxanthomonas* 的某些菌株能够分解有机物和降解 DDT^[26], 但该属细菌只出现在 T6-Contral 和 734-Test 样品中。可能是某些桑叶表面有农药残留为该菌株提供了良好的生长环境, 从而在家蚕食桑时进入其肠道。Sophie 等^[27] 发现叶杆菌属 *Phyllobacteriaceae* 细菌能利用硝酸盐中的氮元素促进植物的生长, 此属细菌仅在 734-Test 样品中, 表明该属细菌能够适应氟中毒后的家蚕肠道微生态系统并成为优势菌群。

受氟化物影响最大的为肠球菌属 *Enterococcus*、芽孢杆菌属 *Bacillus* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 的微生物菌群。先前的研究表明, 当地家蚕品种肠道中的芽孢杆菌 *Bacillus* (短小芽孢杆菌 *Bacillus*

表 3. DGGE 条带与 NCBI 数据库比对结果

Table 3. Results of DGGE band sequence of alignment against NCBI database

Band No.	Closed relative	Accession no.	Identity/%
1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	HG008810.1	99
2	<i>Thermus scotoductus</i> strain SR55-1	KF279363.1	97
3	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KF003415.1	99
4	<i>Methylobacterium</i> sp. JC259	HG974550.1	100
5	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> clone YB010	GU430671.1	99
6	<i>Thermus</i> sp. TC10	GU119889.1	99
7	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain SW074	KC178882.1	99
8	<i>Bacillus</i> sp. A1-4	KF220427.1	97
9	<i>Enterococcus faecium</i> strain Bal 12	FJ619708.1	99
10	Uncultured <i>Enterococcus</i> sp.	JF427737.1	98
11	<i>Acinetobacter</i> sp. PUCM1018	FJ816065.1	99
12	<i>Brevibacillus</i> sp. HNH109	KF933640.1	97
13	<i>Paenibacillaceae</i> bacterium DV9-8	GQ407153.1	98
14	Uncultured bacterium clone AN14C2BH09	JQ428643.1	99
15	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. B14	KF826885.1	100
16	<i>Phyllobacteriaceae</i> bacterium BAS211i	KF442785.1	99

pumilus、萎缩芽孢杆菌 *Bacillus atrophaeus*、地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 和解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*) 是家蚕肠道内发挥着重要功能的有益微生物, 这些微生物能开发为新型的益生菌制剂以提高家蚕的生长发育^[28-29]。此外, 芽孢杆菌 *Bacillus* 还能够分解利用木聚糖、阿拉伯半乳糖、酪蛋白、淀粉、纤维素和脂肪等, 可以为家蚕提供多种营养物质, 因此芽孢杆菌 *Bacillus* 可能与家蚕的营养和能量吸收密切相关^[30-31]。但因氟化物可能对其有抑制作用, 导致了家蚕对营养吸收能力的降低从而大大削弱了家蚕的生理活力。有研究报道肠球菌 *Enterococcus* 是家蚕肠道中的高频微生物, 其能够抑制家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*, 并对蚕病有一定的抵抗作用^[32-33]。表 1 和图 2 均显示出该属细菌在家蚕氟中毒后明显减少或消失, 也说明氟化物对该属细菌有某种抑制作用导致了家蚕更易患病致死。有研究指出家蚕肠道内的葡萄球菌 *Staphylococcus* 主要产脂肪酶^[4], 而家蚕氟中毒后该属细菌明显增多, 使家蚕不能充分利用桑叶中的淀粉和纤维素等营养成分, 这也可能进一步导致了家蚕体质的削弱。

综上所述, 氟化物能改变家蚕肠道内微生物菌群多样性并破坏了肠道内微生态系统平衡。这种变化降低了肠道内消化酶的活性和家蚕的生理活力, 使养蚕业受到严重破坏。解决此问题的方法之一是筛选家蚕肠道内耐氟的有益微生物, 开发成新型蚕用微生态制剂, 以提高家蚕的健康性从而促进养蚕业的发展。有研究指出芽孢杆菌属 *Bacillus* 和肠球菌属 *Enterococcus* 的某些菌株对猪具有益生作用^[34-35], 是潜在开发的益生菌, 因此筛选家蚕肠道内芽孢杆菌属 *Bacillus* 和肠球菌属 *Enterococcus* 的耐氟菌株是可行的。针对益生菌能提高家蚕耐氟性的理论和筛选蚕用耐氟益生菌的相关试验正在进一步深入研究之中。

参考文献

[1] 黄君霆, 朱万民, 夏建国, 向仲怀. 中国蚕丝大全. 成都: 四川科学技术出版社, 1996.

[2] Liang X, Fu YM, Tong L, Hong L. Microbial shifts of the silkworm larval gut in response to lettuce leaf feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 3769-3776.

[3] Mi Z, Ruan C, Li J, Fu Q, Du W, Li G, Long Y, Zhu Y. Influence of fluoride on activity of carboxylesterase and esterase in hemolymph of *Bombyx mori*. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33 (4): 1134-1141. (in Chinese)
米智, 阮成龙, 李姣蓉, 付巧娟, 杜文华, 李冠楠, 隆耀航, 朱勇. 氟化物对家蚕血液羧酸酯酶及全酯酶活性的影响. *生态学报*, 2013, 33(4): 1134-1141.

[4] McKillip JL, Small CL, Brown JL, Brunner JF, Spence KD. Sporogenous midgut bacteria of the leafroller, *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 1997, 26(6): 1475-1481.

[5] Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley, AK. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 2005, 8(12): 1291-1298.

[6] Kalpana S, Hatha AAM, Lakshmanaperumalsamy P. Gut microflora of the larva of silkworm, *Bombyx mori*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1994, 15(4): 499-502.

[7] Anand AA, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DI, Vasan PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ, Vendan SE. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 2010, 10(107): 1-20.

[8] Butler JL, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6793-6800.

[9] Kiorboe T, Tang K, Grossart HP, Ploug H. Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3036-3047.

[10] Militza CC, Nakatsu CH, Konopka A. Effect of nutrient periodicity on microbial community dynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (5): 3175-3183.

[11] Li G, Xia X, Zhao H, Long Y, Li J, Zhu Y. Effects of fluoride on the community and diversity of the retained enzyme-producing bacteria in the intestina of silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (2): 187-193. (in Chinese)
李冠楠, 夏雪娟, 赵欢欢, 隆耀航, 李姣蓉, 朱勇. 氟化物对家蚕耐氟和氟敏感品种肠道中留存产酶菌群落组成和多样性的影响. *昆虫学报*, 2014, 57(2):

- 187-193.
- [12] Wang D, Wu W, Fu Y. Bacterial community in *Aleurodicus disperses* (Hemiptera: Aleyrodidae) estimated by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (7): 772-781. (in Chinese)
王甸洪, 吴伟坚, 符悦冠. 螺旋粉虱成虫体内细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rRNA 文库序列分析. *昆虫学报*, 2012, 55(7): 772-781.
- [13] Moyer CL, Tiedje JM, Dobbs FC, Karl DM. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2501-2507.
- [14] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (16): 5261-5267.
- [15] Nakatsu CH, Torsvik V, Ovreas L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(4): 1382-1388.
- [16] Hou Y, Ma Z, Dong SZ, Chen YH, Yu X. Analysis of yeast-like symbiote diversity in the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, using a novel nested PCR-DGGE protocol. *Current Microbiology*, 2013, 67 (3): 263-270.
- [17] Lefebvre T, Miambi E, Pando A, Diouf M, Lefebvre CR. Gut-specific actinobacterial community structure and diversity associated with the wood-feeding termite species, *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) described by nested PCR-DGGE analysis. *Insectes Sociaux*, 2009, 56(3): 269-276.
- [18] Hall BG. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequence. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22 (3): 792-802.
- [19] Dillon R J and Dillon V M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 2004, 49: 71-92.
- [20] Xiang H, Li M, Zhao Y, Zhao L, Zhang Y, Huang Y. Bacterial community in midguts of the silkworm larvae estimated by PCR-DGGE and 16S rDNA gene library analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 50 (3): 222-233. (in Chinese)
相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. *昆虫学报*, 2007, 50(3): 222-233.
- [21] Christoph W, Wolfgang L. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1810-1815.
- [22] Koch R, Spreinat K, Lemke K, Antranikian G. Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. *Archives of Microbiology*, 1991, 155(6): 572-578.
- [23] Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60 (2): 439-471.
- [24] Chistoserdova L, Lapidus A, Han C, Goodwin L, Saunders L, Brettin T, Tapia R, Gilna P, Lucas S, Richardson PM, Lidstrom ME. Genome of *Methylobacillus flagellatus*, molecular basis for obligate methylotrophy, and polyphyletic origin of methylotrophy. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4020-4027.
- [25] Collins MD, Jones D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1983, 129(11): 3545-3548.
- [26] Wang GL, Bi M, Liang B, Jiang JD, Li SP. *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. Nov., a DDT-degrading bacterium isolated from a long-term DDT-polluted soil. *Current Microbiology*, 2011, 62 (6): 1760-1766.
- [27] Sophie M, Desbrosses G, Larcher M, Tranbarger TJ, Marel JCC, Touraine B. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta*, 2006, 223(3): 591-603.
- [28] Subramanian S, Gadhave KR, Mohanraj P, Thangamalar A. Use of 16S rRNA probes for characterization of gut microflora of silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 22(3): 476-478.
- [29] Ceuppens S, Boon N, Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles.

- FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 84(3): 433-450.
- [30] Orhan E, Omay D, GÜVENLİR Y. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2005, 121: 183-194.
- [31] Schäfer A, Konrad R, Kuhnigk T, Kämpfer P, Hertel H, König H. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, 80(5): 471-478.
- [32] Takizawa Y, Iizuka T. The aerobic bacterial flora in the gut of larvae of the silkworm *Bombyx mori* L. (I) The relation between media and the numbers of living cells. *Journal of Sericultural Science Japanese*, 1968, 37: 295-305.
- [33] Lu XM, Wang FW. Inhibition of cultured supernatant of *Enterococci* strains on germination of *Nosema bombycis* spores *in vitro*. *Acta Sericologica Sinica*, 2002, 28(2): 126-128. (in chinese)
鲁兴盟,汪方炜. 家蚕肠球菌对微孢子虫体外发芽的抑制作用. *蚕业科学*, 2002, 28(2): 126-128.
- [34] Kreuzer S, Machnowska P, Aßmus J, Sieber M, Pieper R, Schmidt MF, Brockmann GA, Scharek TL, Johne R. Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 58.
- [35] Guo XH, Li DF, Lu WQ, Piao XS, Chen XL. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2006, 90(2): 139-146.

Effect of fluoride on gut microflora of silkworm (*Bombyx mori*)

Guannan Li¹, Xuejuan Xia², Parfait Sendegeya¹, Huanhuan Zhao¹,
Yaohang Long¹, Yong Zhu^{1*}

¹College of Biotechnology, ²College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: [**Objective**] We examined the effect of fluoride on gut microflora of silkworm. [**Methods**] After DNA extraction and PCR amplification, clone libraries of 16S rRNA gene fragment were constructed. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was performed by digestion of the 16S rRNA gene, and each unique restriction fragment polymorphism pattern was designated as an operational taxonomic unit (OTU). A total of 14 OTUs were identified from intestinal samples of both T6 and 734. Phylogenetic trees of bacterial 16S rRNA nucleotide sequences were constructed and analyzed. Furthermore, the dominant bacteria were studied by the nested polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DDGE) technology. [**Results**] After fluorosis, the flora of *Enterococcus* and *Bacillus* reduced. However, the flora of *Staphylococcus* increased. [**Conclusion**] Fluoride can destroy the balance of microflora in the gut of silkworm by changing the bacteria diversity and proportion, which has bigger effect to 734 than T6.

Keywords: *Bombyx mori*, fluoride, intestinal microflora, clone library, nested PCR-DGGE

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Agricultural Science and Technology Achievements Transformation Foundation (2012GB2F100376) and by the Special Research Foundation of Southwest University (XDJK2014D039)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68251939; E-mail: zhuy@swu.edu.cn

Received: 22 September 2014/Revised: 27 October 2014