

养殖刀鲚与生长环境菌群 PCR-DGGE 指纹图谱及多样性分析

聂志娟¹, 徐钢春¹, 程起群², 张 勇¹, 杜富宽¹, 顾若波^{1*}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,江苏 无锡 214081;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室,上海 200090)

摘要: 为了分析养殖刀鲚体内与生长环境菌群结构,利用 PCR-DGGE 技术,对养殖刀鲚鳃、胃、肠壁及肠内容物和养殖水体菌群结构进行了初步分析。PCR-DGGE 指纹图谱分离显示,42 条清晰条带,其中养殖水体(27)、鳃(9)、胃(13)、肠道壁(19)、肠道内容物(18)的香农指数分别为 3.037、1.883、2.193、2.825、2.683;养殖水体与刀鲚鳃、胃、肠道壁及肠道内容物分别具有 6、9、11、8 共有带。UPGMA 聚类分析显示,样品 3 个重复相似性都在 95% 以上,差异不明显;不同样品之间,养殖刀鲚鳃和胃聚为一支,具有较高的相似性(76%),同时与养殖水体相似性达 29%;养殖刀鲚肠道壁和肠道内容物聚为一支,相似性为 38%。回收测定所有显示条带,主要包含变形菌、放线菌、拟杆菌、柔膜菌、蓝藻细菌、厚壁菌、梭杆菌及少量未定义菌种。研究表明,PCR-DGGE 技术能区分养殖刀鲚主要部位及水体微生物的结构差异和多样性,澄清养殖刀鲚及生长水体微生物区系,可为定植益生菌的开发提供参考。

关键词: 刀鲚; 细菌菌落; 香农指数; PCR-DGGE

中图分类号: Q 938.8; S 965.1

文献标志码: A

微生物是自然界分布最广、种类最多、数量最大、个体最小的生物类群,是大自然生态平衡的基础,并在水产养殖发挥重要作用^[1]。肠道菌群是肠道的正常组成部分,是动物另一“重要器官”,参与调控营养物质的消化吸收^[2]、免疫反映^[3]以及生长发育^[4]等,从而影响机体生长、发育、生理和病理。养殖生态环境条件的变化可造成机体肠道菌群紊乱,影响机体健康状态,造成各种疾病的暴发^[5],因此良好水质、水体微生物生态平衡是水生生物健康生长的基本保障。Cahill^[6]得出与鱼直接接触的水体环境对鱼肠道微生物菌群的影响要远远大于陆生动物和人所处的外部环境对肠道微生物菌群的作用,肠道微生物与宿主以及生长水体形成相互依赖、相互制约的微生态系,因此对重要水产养殖品种肠道及养殖水体菌群多样性开展研究具有至关重要的意义。

水域环境中仅 1% 细菌可培养^[7],Huber 等^[8]研究得出,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 50%~85% 的肠道菌群是无法纯化培养,且 20% 可培养细菌无法定性分析。基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE 基因指纹技术是一种不依赖分离纯化培养且菌群结构原位探究的有效方法,来较快速揭示某一环境样品中的微生物结构组成和动态变化^[9]。该方法已广泛运用于土壤^[10]、海洋湖泊^[11]、食品微生物^[12]及动物消化道^[13]等不同生态环境菌群结构调查和种群动态变化分析。在水产动物消化道环境微生态研究领域,栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[14]、青石斑鱼(*Epinephelus awoara*)^[15]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[16]、刺参(*Apostichopus japonicus*)^[17]等生长水域或消化道菌群结构研究都已有报道,但有关基于 PCR-DGGE 技术分析养殖刀鲚体内与养殖水体细菌群落组成的研究尚未报道。

收稿日期:2013-12-11 修回日期:2014-04-02

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013JBFT04);农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室开放课题;国家科技支撑计划(2012BAD26B05);公益性行业(农业)科研专项(201203065)

通信作者:顾若波,E-mail:gurb@ffrc.cn

刀鲚 (*Coilia nasus*), 隶属鲱形目 (Clupeiformes)、鲚科 (Engraulidae)、鲚属 (*Coilia*), 是中国长江中重要的洄游性鱼类, 分布于我国东海、渤海和黄海及长江流域^[18]。其肉质鲜美, 营养丰富, 与河豚、鲥并称为中国长江三鲜。在市场需求、捕捞强度不断提高、生态环境不断恶化的情况下, 刀鲚资源急剧衰退, 已不能形成渔汛^[19]。2003年, 张呈祥等^[20]采用“灌江纳苗”养殖长江刀鲚, 随着刀鲚运输技术及池塘养殖技术的突破, 长江刀鲚池塘养殖变为可能并已初具规模, 刀鲚养殖处于初级发展阶段。为了贯彻“预防为主、防重于治”的方针, 本研究从菌群多样性角度, 应用 PCR-DGGE 技术对养殖刀鲚体内与水体细菌群落结构及优势菌群进行了分析, 以期能探索养殖刀鲚体内与水体微生物多样性和结构差异性, 及养殖刀鲚与水体微生物的关系, 为养殖刀鲚疾病防治及可定植益生菌的开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本实验样品于2013年9月采集位于淡水渔业研究中心宜兴养殖基地, 随机抽取15尾新鲜活鱼置于无菌塑料袋中, 体质量为 (16.78 ± 2.64) g, 全长 (188.3 ± 14.2) mm, 并在刀鲚养殖池塘深0.5 m左右处采集水样1 L, 放置于冰上运输至实验室。

1.2 样品处理

样品处理在无菌环境下操作, 先用75%酒精喷洒刀鲚体表, 解剖并剪取养殖刀鲚鳃和肠, 用无菌镊子轻轻挤出肠内容物, 用无菌手术刀将肠剖开并用无菌水清洗3次。用具有0.22 μm的无菌滤膜的抽滤装置过滤水样, 收集滤膜上沉淀物。将鳃、肠、肠内容物和过滤水样样品-30℃保存备用。

1.3 总DNA提取

所有样品在提取DNA之前需完全解冻。DNA提取参照Yu等^[21]的方法, 并结合传统的CTAB法稍作修改。称取约0.25~0.5 g样品到灭菌的2 mL离心管, 加入1 mL细胞裂解液[1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 100 nmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA], 20 μL 20 mg/mL蛋白酶K, 20 μL 20 mg/mL溶菌酶, 漩涡震荡5 min; 37℃ 250 r/min摇床振动1 h, 加入100 μL的20% SDS, 漩涡混匀3 min, 65℃水浴40 min, 13 000 r/min 4℃

离心5 min, 将上清吸入2 mL离心管中; 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇抽提, 12 000 r/min离心5 min, 取上清; 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇重复抽提纯化一次; 取上清液加入等体积氯仿: 异戊醇去酚纯化; 上清液吸入至新的无菌离心管加入0.6倍体积的异丙醇沉淀, -20℃, 放置30 min; 12 000 r/min离心10 min, 弃上清; 用70%预冷乙醇洗涤沉淀, 无菌风吹干, 加适量无菌水溶解DNA。样品各取5 μL DNA, 0.7%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4 PCR-DGGE分析

PCR具体扩增条件参考文献[22]的方法进行。将具有清晰条带PCR产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。凝胶浓度为8%的聚丙烯酰胺凝胶(化学变性剂为100%尿素7 mol/L和40%(v/v, 体积百分比)的丙烯酰胺); 变性梯度为35%~55%。电泳条件: 60℃, 在1×TAE缓冲液中150 V下电泳10 h。银染步骤参考郁二蒙等^[23]的方法进行。银染后, 在Vilber凝胶成像扫描系统中照像, 并用BIO-RAD Quantity One软件对DGGE指纹图谱进行分析, 通过Biodap软件对样品泳道灰度值进行分析计算, 得出不同样品微生物多样性的基本指标。电泳条带的数量可以代表样品群落的丰富度指数; 香农多样性指数(Shannon diversity index)反应群落多样性, Evenness代表样品群落的均匀度; Berger-Parker Index用来表示优势度^[24-25]。

1.5 DGGE图谱中优势条带的回收与测序分析

切胶回收DGGE条带, 加入30 μL无菌水4℃静置过夜。以DNA浸出液为模板, 338F/518R为引物进行PCR扩增。PCR扩增体系和程序参考文献[26]的方法。PCR产物进行TA克隆, 并挑选阳性克隆子寄至上海博尚生物技术有限公司进行序列测定, 测序结果经NCBI同源性比对分析。

2 结果

2.1 DGGE指纹图谱建立及分析

采用PCR-DGGE技术分析养殖刀鲚及其生长水体微生物群落多样性, PCR-DGGE指纹图谱上共产生了42条可鉴别的条带, 电泳条带数目和迁移率均存在明显差异, 不同样品的菌落带型差别明显, 养殖水体、刀鲚鳃、胃、肠道壁和肠道内容物分别具有可鉴别的条带为27、9、13、19、18条(图1)。样品之间具有一些共带, 其中养殖水体与养殖刀鲚

表 1 DGGE 指纹图谱微生物多样性指数
Tab.1 Microbial diversity indices calculated from the DGGE banding patterns

样品 sample	泳道 lane	条带数 species richness	香农多样性指数 shannon diversity index	均匀度 evenness	优势度指数 berger-parker index
养殖水体 pondwater	1	27	3.03	0.923	0.157
	2	27	3.04	0.926	0.156
	3	27	3.04	0.929	0.142
	mean ± SD	27 ± 0.00	3.037 ± 0.006	0.926 ± 0.003	0.152 ± 0.008
鳃 gill	4	9	1.88	0.838	0.324
	5	9	1.88	0.838	0.319
	6	9	1.89	0.845	0.315
	mean ± SD	9 ± 0.00	1.883 ± 0.006	0.840 ± 0.004	0.319 ± 0.005
胃 stomach	7	13	2.19	0.841	0.299
	8	13	2.19	0.840	0.296
	9	13	2.20	0.848	0.288
	mean ± SD	13 ± 0.00	2.193 ± 0.006	0.843 ± 0.004	0.294 ± 0.006
肠道壁 intestinal wall	10	19	2.83	0.969	0.100
	11	19	2.82	0.966	0.097
	12	19	2.81	0.964	0.105
	mean ± SD	19 ± 0.00	2.825 ± 0.010	0.968 ± 0.003	0.099 ± 0.002
肠道内容物 intestinal content	13	18	2.67	0.923	0.196
	14	18	2.69	0.931	0.183
	15	18	2.69	0.930	0.187
	mean ± SD	18 ± 0.00	2.683 ± 0.012	0.928 ± 0.004	0.189 ± 0.007

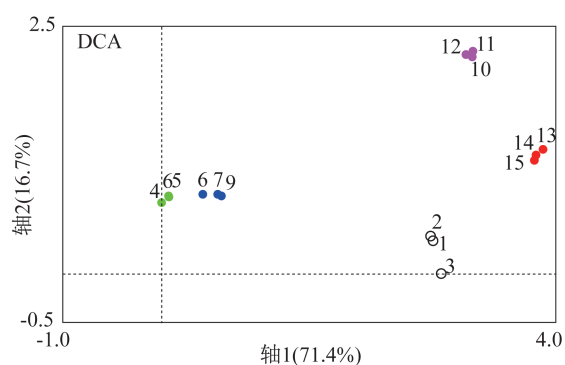


图 3 DGGE 指纹图谱 PCA

1~3. 养殖水体; 4~6. 鳃; 7~9. 胃; 10~12. 肠道壁; 13~15. 肠道内容物

Fig.3 PCA of DGGE profiles

1-3. the water from fishponds; 4-6. gill of *C. nasus*; 7-9. stomach of *C. nasus*; 10-12. intestinal wall of *C. nasus*; 13-15. intestinal contents of *C. nasus*

2.2 部分优势条带的序列比对与系统发育树分析

对 DGGE 指纹图谱中 42 条带全部切胶回收测序, 测序结果经 NCBI 的 BLAST 比对并制表分

析(表 2)。42 个测序结果中, 与 GenBank 数据库中微生物的同源性为 96% 以上, 39% 菌同源性达到了 100%。

养殖水体共显示 27 条带, 不同条带浓度及显示的灰度各异, 条带 9、16、17、22、24、25、28、30、31、32 为养殖水体的相对优势菌群, 包含拟杆菌、厚壁菌、 α -变形菌、 β -变形菌和放线菌, 其中 50% 为放线菌。鳃和胃菌群结构及优势菌相似, 条带 29 为其绝对优势菌, NCBI 比对为未定义菌种, 相似度为 98%; 条带 19 为胃部另一优势条带, 为梭杆菌。条带 1、2、5、7、23、26、27、36、37、38、39、41、42 和条带 2、5、13、23、33、39、40、41 分别为肠道壁和肠道内容的相对优势菌群, 其中 2、5、23、39、41 为两者共有条带, 为 α -变形菌、拟杆菌、放线菌, 比对相似度为 98% 以上; BLAST 相似度为 98% 以上的厚壁菌 1、7、10、18、30 条带分别存在于养殖水体、胃、肠道壁和肠道内容物样品中, 但是肠道壁上显示存在最多(1、7、10)。条带 8 为蓝藻菌, 仅在养殖水体中发现。

表 2 DGGE 谱带回收获得的 16S rDNA 序列分析比对结果
 Tab. 2 Sequence similarities to closest relatives of 16S rDNA recovered from DGGE gel

菌门 phylum	条带号 band	系统发育最相近的菌属 closest relative obtained from BLAST search	相似度/% identity
Firmicutes	1	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. clone H34 16S(KF003155. 1)	100
厚壁菌	7	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. clone T6(DQ168163. 1)	100
	10	Uncultured bacterium clone SM31(GU293229. 1)	99
	18	<i>Clostridium perfringens</i> strain SG7(FJ215324. 1)	98
	30	<i>Firmicutes bacterium</i> SCGC AAA043-A02(HQ663375. 1)	100
α- proteobacteria	2	<i>Aeromonas jandaei</i> strain SCMC75(KF358437. 1)	99
α-变形菌	16	Candidatus Pelagibacter sp. Nan172(JN941972. 1)	100
	21	Candidatus Pelagibacter sp. Nan172(JN941972. 1)	99
	24	<i>Erythrobacter</i> sp. JC212(HG008905. 1)	100
β- proteobacteria	3	<i>Acidovorax</i> sp. TEG20(AB607290. 1)	99
β-变形菌	25	<i>Beta proteobacterium</i> SCGC AAA041-B08(HQ663327. 1)	99
γ- proteobacteria	13	<i>Aeromonas jandaei</i> strain SCMC75(KF358437. 1)	100
γ-变形菌	33	<i>Aeromonas jandaei</i> strain SCMC75(KF358437. 1)	100
	34	<i>Aeromonas jandaei</i> strain SCMC75(KF358437. 1)	100
	35	<i>Aeromonas jandaei</i> strain SCMC75(KF358437. 1)	100
	36	<i>Plesiomonas shigelloides</i> strain hs0823(KC663645. 1)	99
	37	<i>Plesiomonas shigelloides</i> strain JX-09 16S(KC825322. 1)	100
Bacteroidetes	4	<i>Prevotella intermedia</i> strain OH5061(KF030203. 1)	99
拟杆菌	5	Uncultured Bacteroidetes bacterium Z53M80B(FJ484550. 1)	100
	6	Uncultured Bacteroidetes bacterium Z53M80B(FJ484550. 1)	97
	9	Uncultured Bacteroidetes bacterium 2K82(GU074267. 1)	98
	38	Uncultured Bacteroidetes bacterium A3-1(JN371374. 1)	99
Cyanobacteria	8	Uncultured cyanobacterium BksYy41000(KC463668. 1)	99
蓝藻细菌			
Fusobacteria	11	<i>Cetobacterium somerae</i> (HG326498. 1)	100
梭杆菌	19	<i>Fusobacterium nucleatum</i> strain YWH7415(KF444266. 1)	100
Actinobacteria	12	<i>Corynebacterium</i> sp. 32AP25(AB242687. 1)	100
放线菌	14	<i>Actinobacterium</i> SCGC AAA043-K09(HQ663403. 1)	96
	17	<i>Actinobacterium</i> SCGC AAA043-L13(HQ663405. 1)	97
	20	Uncultured Micrococccineae bacterium D7N78(KC006224. 1)	100
	22	<i>Actinomycetales bacterium</i> W2. 09-6(JX458455. 1)	99
	26	<i>Actinobacterium</i> SCGC AAA043-K09(HQ663403. 1)	98
	27	Uncultured Actinomycetales(JN866237. 1)	100
	28	Uncultured actinobacterium clone THAD1-40(JN049962. 1)	100
	31	Uncultured actinobacterium clone THAD2-29(JN049961. 1)	99
	32	<i>Actinobacterium</i> SCGC AAA043-K09(HQ663403. 1)	97
	39	Uncultured actinobacterium clone ME002C8(FJ827861. 1)	98
	40	<i>Actinobacterium</i> SCGC AAA043-E13(HQ663389. 1)	100
	41	Uncultured bacterium clone VE08-149-BAC(GQ340357. 1)	99
	42	Uncultured Actinomycetales B3_10_044(JN866237. 1)	100
Tenericutes	23	Uncultured bacterium M55(AM179931. 1)	97
柔膜菌			
unclassified bacteria	15	Uncultured bacterium DDFHAOP5P06(FJ471300. 1)	99
无定义菌	29	Uncultured bacterium clone 2901(HM452222. 1)	98

3 讨论

近年来,以 16S rRNA 基因为基础而形成的分子生物学技术广泛用于环境微生物的分析^[27],较传统的微生物培养方法,更全面完整显示样品菌群结构^[28]。本实验采用 PCR-DGGE 技术构建养

殖刀鲚与其生长水体群落指纹图谱,共显示了 42 条可鉴别的条带,反映样品群落中优势类群的数量及丰富的菌群多样性。通过对刀鲚胃、肠道壁和肠道内容物检测,分别检测出 13、19、18 条明显条带,条带数多于养殖鲈鲤 (*Percocypris pingi*)^[29]、刺参 (*Apostichopus japonicus*)^[17]、川纹

笛鲷 (*Lutjanus sebae*) 及圆白鲳 (*Ephippus orbis*)^[26] 检测出菌群条带。检出的条带中肠道壁和内容物菌群比胃丰富,这可能与宿主生理环境差异有关,这一点与川纹笛鲷及圆白鲳^[26] 的研究结论一致。有关鱼类菌群来源及影响因子, Romero 等^[30] 研究银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 生命早期的优势菌群得出,银大马哈鱼固定菌群建立于第一次开口摄食,主要来源于水体和海底生物。Tanaka 等^[31] 认为水体微生物菌群及理化因子、摄食饵料和鱼体自身的发育阶段及生理状态为影响鱼类肠道菌群的主要因素。本研究中养殖水体与刀鲚鳃、胃、肠道壁和肠道内容物分别具有 6、9、11、8 共有带,反映刀鲚体内绝大多数菌群来源于养殖水体并与其有密切关系。

通过对 DGGE 图谱所有条带序列测定分析,刀鲚与池塘养殖区的主要细菌群落分属变形菌、厚壁菌、放线菌、拟杆菌、梭杆菌、无壁菌、蓝细菌及少量为不可定义菌属,其中变形菌和放线菌占比例分别为 31%、33%,是主要优势菌群。Hugenhdtz 等^[32] 已研究得出变形菌和放线菌是自然界常见类群, Bull 等^[33] 认为放线菌具有有机质分解功能,同时也是生物活性物质和药物开发的主要微生物菌群来源。刀鲚养殖水体中 DGGE 图谱共检测出的 27 条明显谱带,可充分显示水体菌群多样性,其中 44.44% 条带序列经 NCBI 比对分析与不同来源淡水中菌群相似度最高^[34-35], 覆盖率 100%,相似度 96% 以上,结果表明来源不同的淡水水体的菌群结构具有一定的相似性。DGGE 图谱第 23 条带为养殖刀鲚绝对优势菌群,该条带与 Kim 等^[36] 研究的一株虹鳟鱼肠道不可培育菌相似度为 97%,显示不同鱼之间肠道菌群有一定的相关性;周志刚等^[26] 研究得出川纹笛鲷及圆白鲳两种鱼肠道壁具有 67% 较高的相似度,佐证了本实验结果的可参考性。条带 13 是刀鲚肠道内容物相对优势菌群,尽管相关研究认为刀鲚是肉食性鱼类^[37-38],但池塘养殖刀鲚或许因摄食含有大量浮游植物或青苔的虾、浮游动物等,肠道内容物才被检测出纤维素降解菌,同时又因该序列的比对结果为不可培养菌种,菌种功能尚不能确定,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Gao F S, Peng S. Application of microorganism group in aquaculture[J]. Environmental Science and Technology, 2009, 22(2): 76 - 79. [高方述, 彭松. 微生物群在水产养殖中的应用[J]. 环境科技, 2009, 22(2): 76 - 79.]
- [2] Ghosh K, Sen S K, Ray A K. Supplementation of an isolated fish gut bacterium, *Bacillus circulans*, in formulated diets for rohu, *Labeo rohita*, fingerlings [J]. The Israeli Journal of Aquaculture, 2003, 55(1): 13 - 21.
- [3] Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, et al. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2005, 243(1): 241 - 254.
- [4] Hu Y, Tan B P, Mai K S, Ai Q H, et al. Effects of dietary probiotic on growth, immunity and intestinal bacteria of juvenile *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 244 - 251. [胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长, 肠道菌群及部分免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 244 - 251.]
- [5] Xiong Q L. Studies on the bacterial communities in the gut of *Rachycentron canadum* and its living water by means of PCR-DGGE [D]. Guangzhou: Zhongshan University, 2006. [熊千龄. 利用 PCR-DGGE 研究军曹鱼肠道和水环境的细菌群落[D]. 广州: 中山大学, 2006.]
- [6] Cahill M M. Bacterial flora of fishes; a review [J]. Microbial Ecology, 1990, 19(1): 21 - 41.
- [7] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143 - 169.
- [8] Huber I, Spanggaard B, Appel K F, et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(1): 117 - 132.
- [9] Muyzer G, De Waal 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]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695 - 700.
- [10] Nakatsu C H, Torsvik V, Øvreås L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products [J]. Soil Science Society of America Journal, 2000, 64(4): 1382 - 1388.
- [11] Li Z Y, He L M, Wu J, et al. Bacterial community

- diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 329(1):75-85.
- [12] Hovda M B, Sivertsvik M, Tore L B, *et al.* Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE [J]. *Food microbiology*, 2007, 24(4):362-371.
- [13] Hovda M B, Lunestad B T, Fontanillas R, *et al.* Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1):581-588.
- [14] Yang C X, Wang C M, Li Y, *et al.* Seasonal changes of bacterial community composition in the scallop culture area of Liuqinghe Bay studied by PCR-DGGE [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(3):407-414. [杨彩霞,王崇明,李贲,等.应用 DGGE 技术分析流清河湾扇贝养殖海区细菌群落结构的季节变化[J]. *水产学报*, 2012, 36(3):407-414.]
- [15] Liu Y C, Zhou Z G, Shi P J, *et al.* The comparative analysis of the attached bacterial flora in the gill and body surface of *Epinephelus awoara* in cages by PCR-DGGE [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10(1):81-86. [刘玉春,周志刚,石鹏君,等.网箱养殖青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群的 PCR-DGGE 比较分析[J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(1):81-86.]
- [16] Luo P, Hu C Q, Zhang L P, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial communities in marine *Litopenaeus vannamei* culture system [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1):31-38. [罗鹏,胡超群,张昌平,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):31-38.]
- [17] Gao F, Sun H L, Xu Q, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the gut contents of *Apostichopus japonicas* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4):671-680. [高菲,孙慧玲,许强,等.刺参消化道内含物细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(4):671-680.]
- [18] Xu G C, Nie Z J, Zhang S L, *et al.* Morphological and molecular identification of *Heteromazocraes parasitizes* in *Coilia nasus* of the Yangtze River [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(7):1081-1086. [徐钢春,聂志娟,张守领,等.长江刀鲚寄生的异钩缺虫分子鉴定及形态学研究[J]. *水产学报*, 2013, 37(7):1081-1086.]
- [19] Li Y, Xie S, Li Z, *et al.* Gonad development of an anadromous fish *Coilia ectenes* (Engraulidae) in lower reach of Yangtze River, China [J]. *Fisheries Science*, 2007, 73(6):1224-1230.
- [20] Zhang C X, Zheng J L. Breeding of *Coilia nasus* achieved from the Yangtze River [J]. *Science Fish Farming*, 2006(7):26. [张呈祥,郑金良.长江刀鲚灌江纳苗与养殖[J]. *科学养鱼*, 2006(7):26.]
- [21] Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples [J]. *Biotechniques*, 2004, 36(5):808-813.
- [22] Ruamkuson D, Tongpim S, Ketudat-Cairns M. A model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia [J]. *Food Control*, 2011, 22(11):1742-1747.
- [23] Yu E M, Yu D G, Bi X M, *et al.* Fingerprinting and diversity of the intestinal bacterial community of Crisp grass carp and Dang-zai grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with PCR-DGGE [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(10):1184-1191. [郁二蒙,余德光,毕香梅,等.脆化草鱼与丞仔草鱼的肠道细菌群落 PCR-DGGE 指纹图谱及多样性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(10):1184-1191.]
- [24] Zhang X B, Shi Y W, Zeng J, *et al.* Endophytic bacterial diversity in *Achnatherum inebrians* by culture-independent approach [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(8):2178-2187. [张雪兵,史应武,曾军,等.醉马草免培养内生细菌的多样性[J]. *生态学报*, 2011, 31(8):2178-2187.]
- [25] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, *et al.* Using ecological diversity measures with bacterial communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1):1-11.
- [26] Zhou Z G, Shi P J, Yao B, *et al.* Comparison of the predominant bacterial community structure in the gastrointestinal wall between *Lutjanus sebae* and *Ephippus orbis* based on 16s rDNA PCR-DGGE fingerprint. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(5):682-688. [周志刚,石鹏君,姚斌,等.基于 PCR-DGGE 指纹图谱川纹笛鲷及圆白鲳消化道壁优势菌群结构比较分析[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(5):682-688.]
- [27] Chai L H, Peng Q, Xu L H, *et al.* Application of DGGE in microbial ecology [J]. *Biotechnology*, 2003, 13(4):2-3. [柴丽红,彭谦,徐丽华,等.

- DGGE 技术在微生物生态学研究中的应用[J]. 生物技术, 2003, 13(4): 2-3.]
- [28] Pond M J, Stone D M, Alderman D J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2006, 261(1): 194-203.
- [29] Lu Z H, Li W, Shi P, et al. Study on composition and generation of predominant intestinal bacteria in cultured *Percocypris pingi pingi* [J]. Freshwater Fisheries, 2011, 41(3): 29-33. [鲁增辉, 李伟, 石萍, 等. 养殖鲈鲤肠道优势菌群组成及来源分析[J]. 淡水渔业, 2011, 41(3): 29-33.]
- [30] Romero J, Navarrete P. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Microbial Ecology, 2006, 51(4): 422-430.
- [31] 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(1): 453-463.
- [32] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18): 4765-4774.
- [33] Bull A T, Stach J E M, Ward A C, et al. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2005, 87(1): 65-79.
- [34] Aizenberg-Gershtein Y, Vaizel-Ohayon D, Halpern M. Structure of bacterial communities in diverse freshwater habitats [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(3): 326-335.
- [35] Martinez-Garcia M, Swan B K, Poulton N J, et al. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton [J]. The ISME Journal, 2011, 6(1): 113-123.
- [36] Kim D H, Brunt J, Austin B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(6): 1654-1664.
- [37] Xu G C, Xu P, Gu R B, et al. Feeding habits and growth characteristics of pond-cultured *Coilia nasus* fingerlings [J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(9): 2014-2018. [徐钢春, 徐跑, 顾若波, 等. 池养刀鲚(*Coilia nasus*)鱼种的摄食与生长[J]. 生态学杂志, 2011, 30(9): 2014-2018.]
- [38] Nie Z J, Xu G C, Gu R B, et al. Morphology and histology of the digestive system in the larvae of *Coilia nasus* [J]. Chinese Journal of Zoology 2012, 47(4): 104-113. [聂志娟, 徐钢春, 顾若波, 等. 刀鲚幼鱼消化系统的组织形态学结构[J]. 动物学杂志, 2012, 47(4): 104-113.]

Fingertprinting and diversity analysis of the predominant bacterial community in *Coilia nasus* from ponds and its environment

NIE Zhijuan¹, XU Gangchun¹, CHENG Qiqun², ZHANG Yong¹, DU Fukuang¹, GU Ruobo^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: To know the microbiome composition and the relationship among *Coilia nasus* and living area, the preliminary analysis of the bacterial community structure in the water environment, gill, stomach and intestine of *Coilia nasus* from fishponds, including intestinal wall and intestinal contents based on 16S rDNA PCR-DGGE figure using a culture independent approach. Results indicated that bacterial community structure could be analyzed by PCR-DGGE, The DGGE fingerprint showed respectively 27, 9, 13, 19, 18 obvious different Signal strength bands in the samples of water environment, gill, stomach, intestinal wall and intestinal contents of *Coilia nasus*, meanwhile, the Shannon diversity index of which respectively were 3.037, 1.883, 2.193, 2.825, 2.683, these might reflect the existence of rich bacteria species. The clustering analysis to the DGGE fingerprint displayed that no significant differences between groups of Repeating sample, the similarity of which above 95%; The sample of gill and stomach of *Coilia nasus* get together for a branch, the bacteria structure similarity of which was 77% and that in the intestinal wall and intestinal contents of *Coilia nasus* was 38%. 42 DGGE bands were all successfully re-amplified, cloned, sequenced and aligned with BLAST, including Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Tenericutes, Bacteroidetes Cyanobacteria, Fusobacteria and some unclassified bacteria. These comparison analyses reveal that the great amount of bacterial community in *Coilia nasus* derived from the culture water. DGGE technique could be used to analyze the bacterial genetic diversity and clarify the predominant bacterial community of *Coilia nasus* from ponds and its environment. This research has contributed to the development and utilization of probiotics and disease control.

Key words: *Coilia nasus*; bacterial community; Shannon diversity index; PCR-DGGE

Corresponding author: GU Ruobo. E-mail: gurb@ffrc.cn