

兰阿峰,郭素芬,彭浩,等. 养殖大鲵肠道细菌多样性[J]. 江苏农业科学,2019,47(1):146-151.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.035

养殖大鲵肠道细菌多样性

兰阿峰^{1,2,3}, 郭素芬¹, 彭浩^{1,2}, 刘栋¹, 邓百万^{1,2}

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院,陕西汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心,陕西汉中 723001;
3. 陕西理工大学大鲵研究所,陕西汉中 723001)

摘要: 纯培养分离大鲵肠道细菌,选用细菌通用引物进行 16S rRNA 扩增,测序后提交序列并分析;免培养方法采用试剂盒提取肠道内容物总 DNA,选用细菌通用引物对总 DNA 进行 16S rRNA 扩增,构建克隆文库,对阳性克隆进行 PCR-RFLP 分析,用 *Hae* III 内切酶进行片段插入性验证并进行测序,构建系统发育树。纯培养获得 103 个菌株,分属于 16 个不同的可操作分类单元(operational taxonomic units,OTUs),系统发育分析表明这些克隆序列分别属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)。其中,变形菌门(占克隆总数 87.63%)为最优势类群。免培养结果将随机挑取的 105 个阳性克隆归为 15 个 OTUs,系统发育分析表明这些克隆序列分别属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)4 个门。其中,变形菌门(占克隆总数的 71.43%)为最优势类群。养殖大鲵肠道细菌多样性丰富,具有进一步开发研究的价值。

关键词: 养殖大鲵;肠道细菌;纯培养;免培养;多样性

中图分类号: S966.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)01-0146-06

中国大鲵(*Andrias davidianus*)别称“娃娃鱼”,属于两栖纲有尾目隐鳃鲵科,是现存个体最大的两栖动物,1998 年被列为国家二级保护动物^[1]。我国大鲵主要分布在陕西、江西、湖北、四川等 17 个省(区)深山峡谷的溪流当中^[1-3]。中国大鲵是肉食性捕食动物,野生大鲵捕食的动物有螃蟹、昆虫、青蛙、鱼等^[4-5]。由于大鲵具有极高的经济价值和药用价值,其人工养殖逐渐得到了重视,目前在陕西汉中、四川巴中等地区出现了较大规模的养殖。

动物肠道寄生着大量的微生物,这些微生物同时也是动物体的组成部分,肠道微生物与寄主消化吸收及健康状况密切相关^[6-8]。肠道是一个相对密闭的系统,其内部生长的微生物以厌氧或兼性厌氧的微生物为主,采用传统的培养方法分离依然是肠道微生物研究的主要方法之一,有报道称传统方法分离到的微生物物种只有微生物总量的 1%~5%,而其余 95%~99% 的微生物种群还未被分离和识别^[9]。免培养方法是一种基于分子生物学的方法,与传统的分离鉴定方法完全不同,可以弥补传统培养方法的缺点^[10]。该方法利用分子生物学技术判断微生物的种类及各个物种之间的亲缘关系,其缺点是无法获取微生物^[11-12]。人工养殖由于其养殖密度高致使大鲵容易出现传染性病害,部分传染病与肠道微生物密切相关,因此研究养殖大鲵肠道微生物多样性对人工饲养大鲵保护工作具有理论价值。本研究利用纯培养及免培养

2 种方法对养殖大鲵的肠道微生物多样性进行研究,以期为大鲵保护工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 养殖大鲵采自陕西理工大学大鲵研究所大鲵养殖室,样本共 10 条,平均体质量 6.76 kg,解剖后取完整消化道放入 4℃ 的冰箱中保存,2 周内处理完。

1.1.2 主要仪器 超净工作台(江苏苏州净化设备有限公司),高压灭菌器(美国 Stik 公司),凝胶扫描成像系统(美国 Bio-Rad 公司),PCR 扩增仪(英国 Techon 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),移液器(Eppendorf 公司),恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司),超低温冰箱(日本 Panasonic 公司),核酸测定仪(Eppendorf 公司),超纯水净化系统(上海优普实业有限公司)。

1.1.3 主要试剂 Fast DNA Spin Kit For Feces(美国 Mo Bio 公司),2×Taq PCR Kit(Takara 公司),2×HieffTM PCR Master Mix(Takara 公司),高效感受态 DH5α(*Escherichia coli* competent cells, DH5α)(上海 Sangon 公司),pMDTM 19-T Vector Cloning Kit(Takara 公司),Spin 柱式 DNA 回收试剂盒(Biofulx 公司),PCR 引物(上海 Sangon 公司),*Hae* III(Takara 公司),Ampicillin(上海 Sangon 公司),Trytone(Oxoid 公司),Yeast Extract(Oxoid 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 大鲵肠道细菌纯培养 纯培养肠道细菌分离,按照文献[13]报道方法进行。将大鲵肠道内容物稀释涂布于牛肉膏蛋白胨平板,37℃ 培养,挑取单菌落进行纯化并保藏菌种于 4℃ 冰箱中。

1.2.2 对大鲵肠道纯培养细菌进行分子鉴定 纯培养肠道细菌 DNA 扩增,参照文献[14]报道方法进行。进行菌液 16S

收稿日期:2017-09-10

基金项目:陕西省教育厅项目(编号:15JK1123);陕西理工大学人才引进启动项目(编号:SLGQD-8)。

作者简介:兰阿峰(1978—),男,陕西宜川人,博士,讲师,主要从事肠道微生物多样性和植物内生菌多样性等研究。E-mail:lanafeng2004@126.com。

通信作者:郭素芬,博士,讲师,主要从事生物多样性和动物生理生态等研究。E-mail:gsf0611@126.com。

rRNA 扩增, 选用引物 799F: 5′ - AACAGGATTAGATACCCTG - 3′/1492R: 5′ - GGTACCTGTTACGACTT - 3′进行扩增, 长度 750 bp 左右。反应体系 (50 μL): 2 × Taq Master Mix 25 μL, 上下游引物各 2 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH₂O 19 μL。反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min; 55 ℃ 0.5 min; 72 ℃ 1 min, 33 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 产物用的琼脂糖电泳检测后送上海生工生物工程股份有限公司测序, 结果整理后提交 NCBI 申请大鲵肠道细菌菌株 16S rRNA 基因序列登录号。

1.2.3 大鲵肠道内容物中微生物总 DNA 提取及 16S rRNA 扩增 解剖大鲵后将其肠道内容物收集到灭菌的 1.5 mL EP 管中。总 DNA 的提取使用美国 Mo Bio 公司生产的粪便基因组提取试剂盒。按照试剂盒说明提取 DNA 后将其干燥, 加入 20 μL TE 缓冲液溶解 DNA, -20 ℃ 保存备用。总 DNA 特异性扩增, 参照纯培养肠道细菌扩增方法进行。

1.2.4 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选 用 Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒将扩增后 750 bp 左右的目的条带切胶纯化回收。纯化产物与 pMD™ 19 - T Vcoter 连接, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。阳性克隆子的初步筛选参照文献 [15], 将转化后的细胞涂布含氨苄青霉素 (100 mg/L)、X - gal、IPTG 的 LB 琼脂平板 37 ℃ 避光培养 14 ~ 16 h 进行蓝白斑筛选。对阳性 PCR 产物选用限制性核酸内切酶 *Hae* III 对目标插入片段多态性分析 (PCR - RFLP) 后进行测序。将 *Hae* III 酶切带谱分析不同, 且测序结果也不相同的克隆归为 1 个 OTU。克隆文库覆盖率统计分析应用公式: $C = [1 - (n/N)] \times 100\%$ [16], 这里 n 代表在 16S rRNA 基因克隆文库仅出现 1 次的 OTU 的数量, N 代表 16S rRNA 基因克隆文库的总数。

1.2.5 免培养获取细菌及克隆文库发育分析 免培养获取的测序结果及克隆文库获取的细菌测序结果用 Vector Screen 去除载体序列后提交到 EzTaxon - eserver (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) 进行 BLAST 检索, 下载同源性较高的模式菌株的数据, 生成 Fasta 格式文件。用 ClustalX 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 Mega 5.02, 按照 Neighbor - Joining 法聚类, 选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析, 构建系统发育树。所得的 16S rRNA 基因序列已提交 GenBank 数据库, 申请 16S rRNA 基因序列登录号。

2 结果与分析

2.1 大鲵肠道细菌纯培养

2.1.1 大鲵肠道细菌纯培养分离 经牛肉膏蛋白胨培养基, 获取 103 株纯细菌。对获取细菌菌株进行保藏, 待分析鉴定。

2.1.2 大鲵肠道纯培养细菌分子生物学的鉴定 应用细菌 16S rRNA 通用引物 799F 和 1492R 对分离得到的细菌进行菌液 PCR, 得到约 750 bp 清晰的片段 (图 1)。可见 PCR 产物条带清晰, 产物量大, 可用于测序反应。将 750 bp 的清晰条带所对应的 PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司测序, 成功测通 103 个序列。序列整理后提交 GenBank 数据库中 NCBI 并获得养殖大鲵纯培养肠道细菌保守区基因登录号。获取登陆号为 KU872287 - KU872389。

2.2 大鲵肠道免培养及鉴定

2.2.1 肠道内容物总 DNA 提取及 16S rRNA 扩增 参照粪

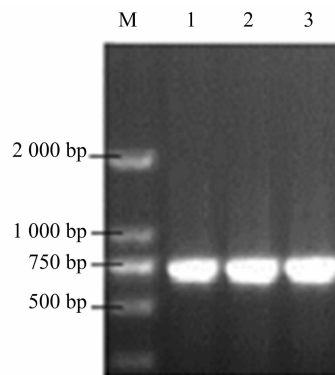


图1 养殖大鲵肠道细菌纯培养细菌基因片段 16S rRNA PCR 扩增 便总 DNA 提取试剂盒的步骤, 提取野生大鲵肠道内容物总 DNA。0.9% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。提取大鲵肠道微生物的总 DNA 较完整, 条带较为清晰, 可用于下游试验。应用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行特异性扩增, 得到约 750 bp 的目标片段见图 3。另外还可看到位于 100 ~ 200 bp 之间较清楚的条带, 推测可能为 PCR 扩增时, 退火温度不合适导致大量引物二聚体产生的基因片段。切胶纯化回收位于 750 bp 的目标条带可避免其影响。

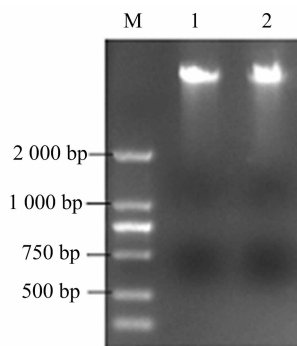


图2 养殖大鲵肠道内容物总 DNA 提取

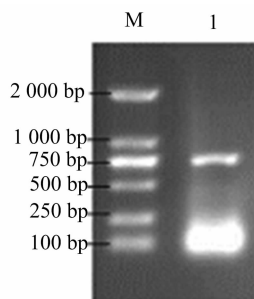


图3 养殖大鲵肠道细菌免培养 16S rRNA PCR 扩增

2.2.2 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选 将上述 750 bp 处 PCR 产物切胶回收后链接 pMD - 19T 载体, 并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞内。构建基因克隆文库后获取 191 个阳性克隆, 以质粒通用引物进行菌落 PCR 扩增, 扩增产物用 *Hae* III 进行插入目的片段的 RFLP 分析, 初步获取酶切带谱不同的克隆后选择 105 个样品送上海生工生物工程股份有限公司测序。测序结果去除嵌合序列, 并排除重复序列后共得到 15 个 OTUs (代表 100 个有效序列)。根据公式, 计算得克隆文库的覆盖率 C 为 85.00%, 可以代表大鲵肠道内生细菌的多样性。

2.3 细菌 16S rRNA 基因系统发育分析

2.3.1 大鲵肠道纯培养细菌 16S rRNA 基因系统发育分析
纯培养获得 103 个菌株,成功测通 9 个序列。整理后提交 NCBI 数据库,去除嵌合体后得到 93 条有效序列,登录号为 KU872251 – KU872389,进行 BLAST 检索对比,得到细菌 16S rRNA 序列如下:变形菌门(Proteobacteria)85 株,占总细菌分离数 87.63%,其中爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.)27 株,占总数的 27.81%,志贺氏菌属(*Shigella* sp.)11 株占总数的 11.34%,沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)5 株,占总数的 5.15%,其中埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)8 株,占总数的 8.25%,沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)2 株,占总数的 2.06%,肥杆菌属(*Obesumbacterium* sp.)1 株,占总数的 1.03%,邻单胞菌属(*Plesiomonas* sp.)2 株,占总数的 2.06%,耶尔辛氏菌属(*Yersinia* sp.)1 株,占总数的 1.03%,肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)1 株,占总数的 1.03%,弧菌属(*Vibrio* sp.)4 株,占总数的 4.12%,克吕沃氏菌属(*Kluyvera* sp.)1 株,占总数的 1.03%,克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)3 株,占总数的 3.09%,气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)17 株,占总数的 17.53%,假单胞菌(*Pseudomona* sp.)2 株,占总数的 2.06%;厚壁菌门(Firmicutes)占总分分离数 5.15%,芽孢杆菌属(*Bacilli* sp.)5 株,占总数的 5.15%;放线菌门(Actinobacteria)7 株,占总数的 7.22%,其中短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)7 株,占总数的 7.22%。

表 1 养殖大鲵肠道细菌纯培养 16S rRNA 序列多样性对比			
属	数量	相似菌株	相似性 (%)
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (HM196356)	100
	1	<i>Pseudomonas luteola</i> (HR037134).	99
<i>Klebsiella</i> sp.	3	<i>Klebsiella</i> sp. (KT461585)	99
<i>Kluyvera</i> sp.	1	<i>Kluyvera</i> sp. (KR029408)	100
<i>Edwardsiella</i> sp.	22	<i>Edwardsiella tarda</i> (KR857274)	100
	5	<i>Edwardsiella</i> sp. (KM187034)	99
<i>Escherichia</i> sp.	8	<i>Escherichia coli</i> (LC005843)	100
<i>Salmonella</i> sp.	2	<i>Salmonella enterica</i> (LN890524)	100
<i>Plesiomonas</i> sp.	2	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (KC825322)	100
<i>Obesumbacterium</i> sp.	1	<i>Obesumbacterium</i> sp. (KR190388)	98
<i>Yersinia</i> sp.	1	<i>Yersinia ruckeri</i> (CP011078)	99
<i>Enterobacter</i> sp.	1	<i>Enterobacter sacchari</i> (HQ204281)	100
<i>Aeromonas</i> sp.	6	<i>Aeromonas cavernicola</i> (HQ436040)	98
	4	<i>Aeromonas hydrophila</i> (AY538658)	99
	3	<i>Aeromonas</i> sp. (AB033472)	98
	2	<i>Aeromonas veronii</i> (FJ422569)	99
	2	Uncultured <i>Aeromonas</i> (FJ268966)	100
<i>Serratia</i> sp.	5	<i>Serratia</i> sp. (KR185996)	98
<i>Shigella</i> sp.	7	<i>Shigella flexneri</i> (KT581976)	99
	3	<i>Shigella</i> sp. (KM054548)	99
	1	Uncultured <i>Shigella</i> (JN423815)	100
<i>Vibrio</i> sp.	4	<i>Vibrio</i> sp. (KR071680)	98
<i>Bacillus</i> sp.	3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KP184703)	99
	2	<i>Bacillus licheniformis</i> (KC692185)	98
<i>Brevibacterium</i> sp.	4	<i>Brevibacterium</i> sp. (KT281590)	99
	3	<i>Brevibacterium</i> <i>Epidermidis</i> (KT818810)	99

依据 16S rRNA 构建的系统发育树(图 4),变形菌门(Proteobacteria)作为优势种群,其序列集中在 1 个大的分支

上,而这一分支又分为多个小分支。志贺氏菌属(*Shigella* sp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)在系统发育树上聚为一族。沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)及肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)相似性较高,在系统发育树上聚为一族。爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.)与肥杆菌属(*Obesumbacterium* sp.)相似性较高,在系统发育树上聚为一族。弧菌属(*Vibrio* sp.)与气单胞菌属(*Aeromonas* sp.)中的大部分相似性较高,聚为一族。厚壁菌门(Firmicutes)中的短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)占据了进化树的一个独立分支。放线菌门(Actinobacteria)中的短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)占据了进化树的一个独立分支。

2.3.2 大鲵肠道免培养细菌 16S rRNA 基因系统发育分析
将测序的 105 条有效序列,整理后提交 GenBank 数据库中,去除嵌合体序列获得 100 个养殖大鲵免培养肠道细菌登录号: KU872390 – KU872489。由表 2 可知,进行 BLAST 检索后,阳性克隆单元序列(operational taxonomic units,OTU)如下:变形菌门(Proteobacteria)75 株,占总克隆数的 71.43%,其中埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)29 单元,占总数的 27.62%,志贺氏菌属(*Shigella* sp.)30 单元,占总数的 28.57%,沙雷氏菌属(*Serratia*)3 单元,占总数的 2.86%,耶尔辛氏菌属(*Yersinia* sp.)2 单元,占总数的 1.90%,食碱菌属(*Alcanivorax* sp.)7 单元,占总数的 6.67%,沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)1 单元,占总数的 0.10%,哈夫尼菌属(*Hafnia* sp.)1 单元,占总数的 0.10%,希万氏菌属(*Shewanella* sp.)1 单元,占总数的 0.10%,布丘氏菌属(*Buttiauxella* sp.)1 单元,占总数的 0.10%;放线菌门(Actinobacteria)21 株,占总克隆数的 20.01%,其中短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)19 单元,占总数的 18.10%,戈登氏杆菌属(*Gordonibacter* sp.)1 单元,占总数的 0.10%,红螯杆菌属(*Coriobacterium* sp.)1 单元,占总数的 0.10%;厚壁菌门(Firmicutes)8 株,占总克隆数的 7.62%,其中芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)7 单元,占总数的 6.67%,葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)1 单元,占总数的 0.10%;拟杆菌门(Bacteroidetes)占总克隆数的 0.95%,其中理研菌属(*Rikenella* sp.)1 单元,占总数的 0.10%。

依据 16S rRNA 构建系统发育树(图 5),可见进化树明显分为 4 个大的分支,第 1 个分支中主要包含了变形菌门(Proteobacteria)大部分种属;第 2 个分支主要包含了放线菌门(Actinobacteria)的大部分种属;第 3 个分支只有 1 个属,是拟杆菌门(Bacteroidetes)的理研菌属(*Rikenella* sp.);第 4 个分支主要包含了厚壁菌门(Firmicutes)的大部分种属。

3 讨论与结论

本研究采用纯培养及免培养方法对养殖大鲵肠道细菌多样性进行研究,传统的纯培养方法获取 103 株细菌,分子生物学方法鉴定为 3 门 16 个分类单元。免培养方法获取 105 条序列,经 NCBI 上 BLAST 比对后,鉴定为 4 门 15 个分类单元。

笔者所在实验室前期应用免培养技术对野生大鲵肠道细菌多样性进行研究,野生大鲵肠道细菌免培养获得分 4 个门:变形菌门(Proteobacteria)占总克隆数的 92.08%,梭菌门(Clostridia)、衣原体门(Chlamydiae)、芽孢菌门各占总克隆数的 1.98%,其中变形菌门为最优势类群,另外还存在 1.98%

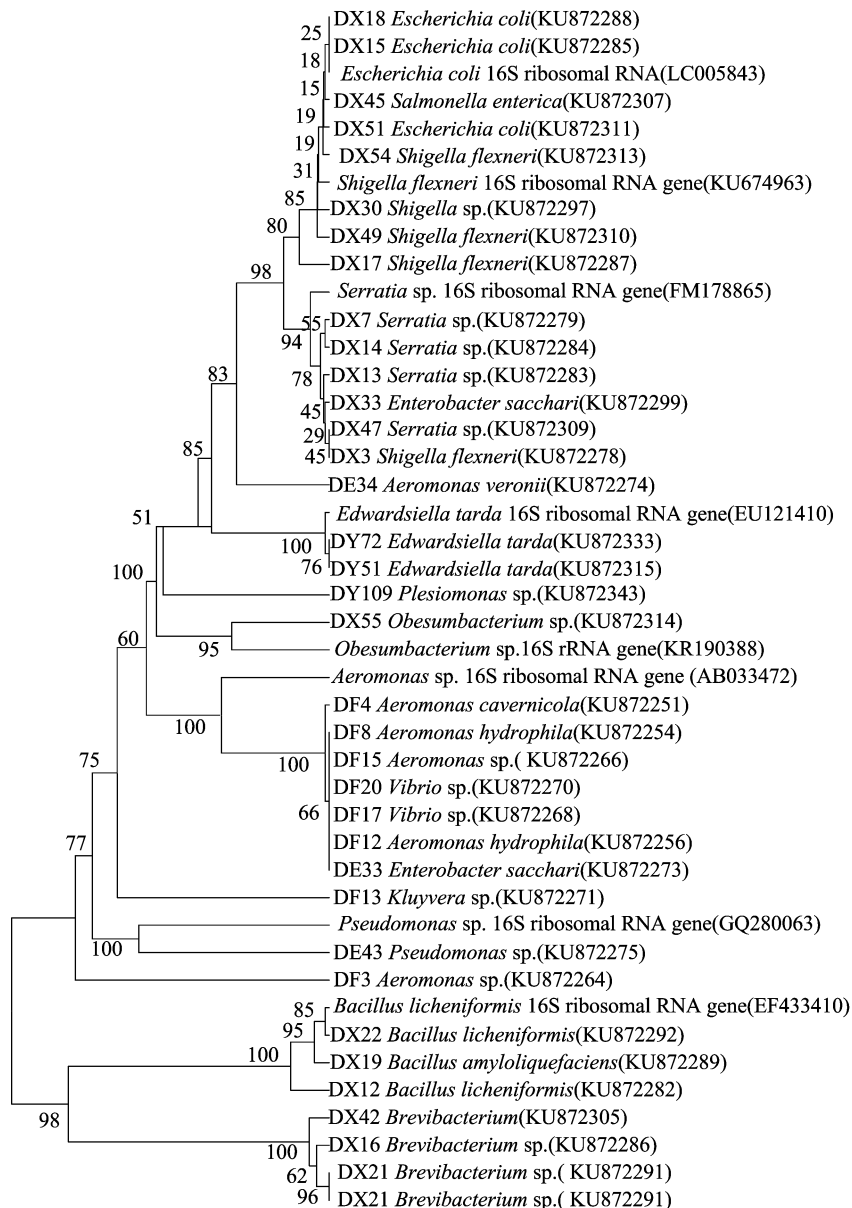


图4 养殖大鲵肠道细菌纯培养 16S rRNA 克隆文库系统发育树

细菌未确定到属^[15-16]。本研究中养殖大鲵肠道纯培养细菌共分离的 103 株细菌可分为 3 个门 16 个属,在门的分类上优势菌为变形菌门(Proteobacteria),占 87.63%,其次为厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria);免培养获取 105 条细菌克隆序列可分为 4 个门 15 个属,在门的分类上,优势菌株为变形菌门(Proteobacteria),占总克隆数的 71.43%。可见野生大鲵与养殖大鲵肠道细菌在门一级分类中最优势类群均为变形菌门。在属这一级分类上野生大鲵最优势细菌为气单胞菌属(*Aeromonas* sp.) 占总细菌数 66.34%;养殖大鲵免培养研究发现埃希氏菌属(*Escherichia* sp.) 29 单元占总数的 27.62%,志贺氏菌属(*Shigella* sp.) 30 单元占总数的 28.57%,这 2 个属数量基本相当,同为最优势细菌类群;纯培养养殖大鲵肠道细菌最优势菌群为爱德华氏菌属(*Edwardsiella* sp.) 占总数的 27.81%。可见在属一级分类上野生与养殖大鲵肠道细菌最优势菌群差异较大,这可能与大鲵的生活环境、摄食的物种种类等有一定的关系。野生大鲵

生活在环境温度较低的山涧溪流中,以小型水生动物及昆虫等为食,食性相对比较复杂,而本试验所用养殖大鲵以小鲫鱼为食,食性相对单一,环境也单一。

大鲵虽然是两栖类动物,但其一般都生活在水里,很少出水活动,所以大鲵生活环境与水生动物更相近。经比较中华绒螯蟹(*Brachyura*)肠道细菌研究^[17],东方鲀(*tetraodon fluviatilis*)肠道细菌^[18],南美白对虾(*Penaeus vannamei* Boone)肠道细菌^[19]与本研究大鲵(*Andrias davidianus*)肠道细菌多样性的差异,可知它们的肠道细菌优势种群都是变形菌门(Proteobacteria);而陆生环境中的扬州鹅^[20]、牛^[21]、猪^[22]等动物都是厚壁菌门(Firmicutes)为优势群落。可见环境对肠道细菌多样性的影响是明显的。

养殖大鲵肠道细菌多样性丰富,基于纯培养技术可将养殖大鲵肠道细菌归为 3 门 16 属,免培养技术可将养殖大鲵肠道细菌归为 4 门 15 属。养殖大鲵肠道细菌多样性研究纯培养技术与免培养技术的结果表明在门的差异性较小,在属的

表 2 养殖大鲵肠道细菌免培养 16S rRNA 序列多样性对比

属	数量	代表	相似菌株	相似性(%)
<i>Escherichia</i> sp.	19	DN1	Uncultured <i>Escherichia</i> (KM244790)	100
	1	DN3	Uncultured <i>Escherichia</i> (KC011123)	100
	1	DM23	Uncultured <i>Escherichia</i> (JN424023)	100
	2	DL8	<i>Escherichia coli</i> (CP013029)	100
	1	DL14	Uncultured <i>Escherichia</i> (KF464992)	99
	1	DL26	Uncultured <i>Escherichia</i> (JQ668603)	99
	1	DL43	<i>Escherichia coli</i> (KR822241)	87
	1	DL44	<i>Escherichia coli</i> (CP013025)	100
	2	DL51	<i>Escherichia coli</i> (KT873240)	100
	10	DN2	Uncultured <i>Shigella</i> (JN424039)	100
<i>Shigella</i> sp.	5	DN6	Uncultured <i>Shigella</i> (JN414027)	99
	1	DN7	Uncultured <i>Shigella</i> (JN424022)	99
	1	DN15	Uncultured <i>Shigella</i> (JN424021)	100
	1	DM1	Uncultured <i>Shigella</i> (JN424016)	100
	9	DM47	<i>Shigella flexneri</i> (KT581976)	99
	1	DL20	<i>Shigella</i> sp.(KT185160)	100
	1	DL24	Uncultured <i>Shigella</i> (JN423815)	99
	1	DL30	<i>Shigella</i> sp.(KT185160)	100
	3	DM44	Uncultured <i>Alcanivorax</i> (KF75590)	100
	4	DM45	Uncultured <i>Alcanivorax</i> (KF75590)	99
<i>Serratia</i> sp.	3	DL16	<i>Serratia</i> sp.(KR185996)	99
<i>Yersinia</i> sp.	2	DM46	<i>Yersinia ruckeri</i> (CP011078)	100
<i>Salmonella</i> sp.	1	DM41	Uncultured <i>Salmonella</i> (KM244788)	99
<i>Hafnia</i> sp.	1	DL57	<i>Hafnia alvei</i> (KT767797)	99
<i>Shewanella</i> sp.	1	DL45	<i>Shewanella</i> sp.(KT285867)	96
<i>Buttiauxella</i> sp.	1	DL47	<i>Buttiauxella brennerae</i> (KC951916)	96
<i>Bacillus</i> sp.	2	DN16	<i>Bacillus subtilis</i> (JX123316)	99
	4	DM4	<i>Bacillus</i> sp.(KM522834)	100
	1	DL48	<i>Bacillus subtilis</i> (EU862558)	99
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	DM36	<i>Staphylococcus</i> sp.(GU394944)	93
<i>Brevibacterium</i> sp.	15	DN5	<i>Brevibacterium</i> sp.(KT281590)	99
	1	DN19	<i>Brevibacterium</i> sp.(KM507606)	94
	2	DM43	<i>Brevibacterium permense</i> (FJ984431)	99
	1	DM51	<i>Brevibacterium</i> (FJ608062)	94
<i>Gordonibacter</i> sp.	1	DM11	<i>Gordonibacter</i> sp.(KP142880)	90
<i>Coriobacteriaceaes</i> sp.	1	DL39	Uncultured <i>Coriobacteriace</i> (KP690948)	96
<i>Rikenella</i> sp.	1	DM35	Uncultured <i>Rikenella</i> (KP231733)	94

差异性较大。就纯培养技术比较养殖与野生大鲵肠道细菌在属的分类上差异性很大。就免培养技术比较养殖与野生大鲵肠道细菌差异性在门与属的分类上都很大。

参考文献:

[1] 杨丽萍,蒙子宁,刘晓春,等. 中国大鲵 5 个野生种群的 AFLP 分析[J]. 中山大学学报(自然科学版),2011,50(2):99-104.

[2] 章克家,王小明,吴 巍,等. 大鲵保护生物学及其研究进展[J]. 生物多样性,2002,10(3):291-297.

[3] 罗庆华. 中国大鲵营养成分研究进展及食品开发探讨[J]. 食品科学,2010,31(19):390-393.

[4] Shiina Y, Li K, Iwanaga M. An *Aeromonas veronii* biovar *sobria* infection with disseminated intravascular gas production[J]. Journal of Infection and Chemotherapy,2004,10(1):37-41.

[5] 刘爱华,鲁振省. 陕西省大鲵资源保护及管理初探[J]. 水利渔业,2007,27(4):69-71.

[6] 问思恩,李 婵,侯淑敏. 陕西秦岭山区人工养殖大鲵肌肉中无机污染物含量分析[J]. 安徽农业科学,2011,39(16):9721-9722.

[7] 孟 彦,杨焱清,张 燕,等. 野生和养殖大鲵群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 生物多样性,2008,16(6):533-538.

[8] 樊汶樵,孙志芳,杨 帆,等. 中国大鲵主要传染病病原研究进展[J]. 中国兽医杂志,2015,51(6):73-75.

[9] 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.

[10] 李 莉,王锡昌,刘 源. 中国养殖大鲵的食用、药用价值及其开发利用研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(9):454-458.

[11] 王 旭. 中国大鲵腐皮病病原学及组织病理学研究[D]. 雅安:四川农业大学,2011.

[12] 吴中明,王 欢,敖弟书,等. 大鲵的迟钝爱德华菌感染[J]. 遵义医学院学报,2007,30(4):464-466.

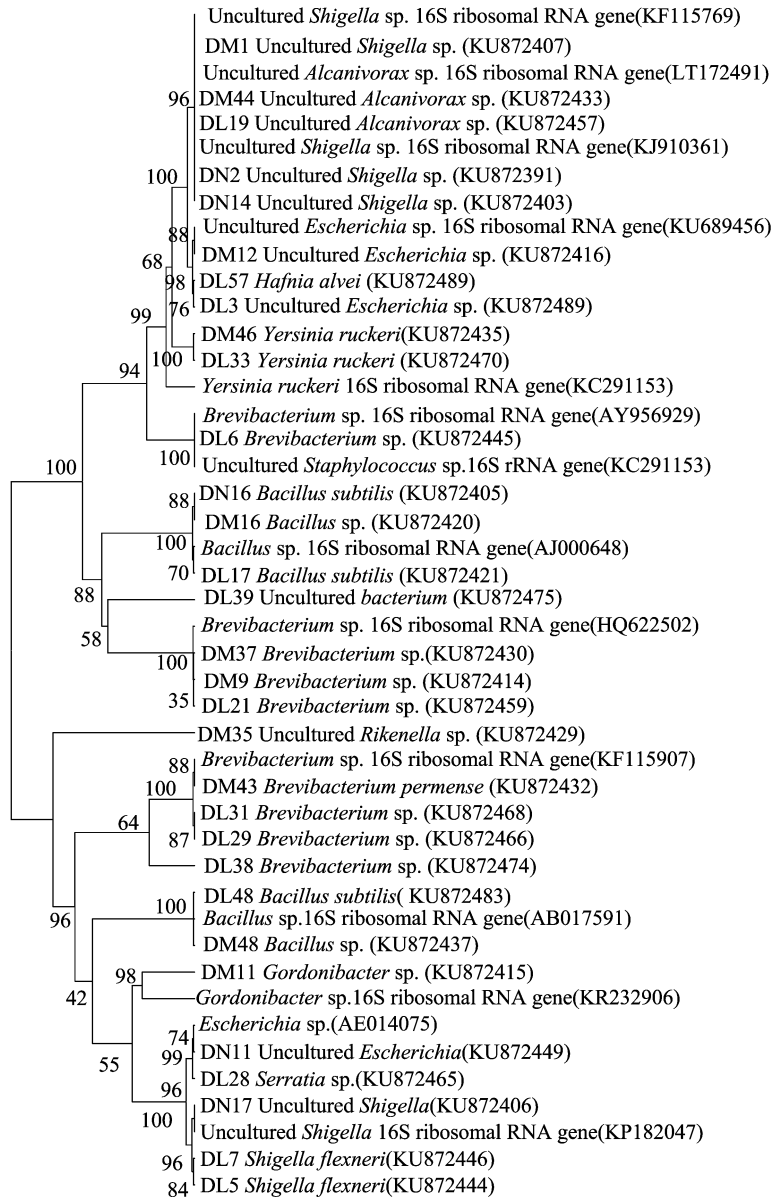


图5 养殖大鲈肠道细菌免培养16S rRNA 克隆文库系统发育树

- [13] 于超. 羊胚胎胃肠道细菌分离与鉴定[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [14] 杨曼,兰阿峰,郭素芬,等. 免培养法研究野生川金丝猴肠道内细菌多样性[J]. 微生物学通报,2014,41(8):1605-1612.
- [15] 刘栋,兰阿峰,王菲,等. 野生大鲈肠道细菌多样性及产酶活性研究[J]. 生物技术,2016,26(1):70-75,80.
- [16] 兰阿峰,杨曼,郭素芬,等. 免培养法对大鲈肠道微生物多样性的研究[J]. 微生物学通报,2014,41(7):1342-1349.
- [17] 狄盼盼. 太湖养殖中华绒螯蟹肠道菌群多样性研究[D]. 上海:上海海洋大学,2013.

- [18] 李艳宇,任盟,张丛尧,等. 红鳍东方鲀稚鱼肠道可培养细菌的多样性[J]. 水产科学,2015,34(10):652-656.
- [19] 孙振丽,宣引明,张皓,等. 南美白对虾养殖环境及其肠道细菌多样性分析[J]. 中国水产科学,2016,23(3):594-605.
- [20] 刘蓓一. 扬州鹅肠道微生物多样性及其受饲料纤维水平的调控研究[D]. 扬州:扬州大学,2012.
- [21] 马晨,张和平,刘彩虹,等. 牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展[J]. 动物营养学报,2014,26(4):852-862.
- [22] 孙盛. 松江黑猪肠道内容物及粪便总DNA提取方法对比研究及其盲肠微生物多样性分析[D]. 长春:吉林大学,2016.