

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200426030

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

对虾养殖沉积环境细菌多样性的分子分析与若干可培养技术优化探讨

Molecular analysis of bacterial diversity in the sediment of shrimps culture environment and research on some optimization methods for culturable bacteria

蔡莹

指导教师姓名: 郑天凌教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2007年10月22日

论文答辩日期: 2007年11月25日

学位授予日期: _____年____月____日

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2007年10月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的工作成果。对本文的研究工作作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	错误! 未定义书签。
1 前 言.....	5
1.1 我国对虾养殖业以及病害控制简况	5
1.1.1 我国对虾养殖业的发展简况.....	5
1.1.2 抗生素在病害控制中的应用.....	5
1.1.3 抗菌肽及其应用前景.....	6
1.2 微生态制剂在水产养殖中的应用	7
1.2.1 微生态制剂的定义.....	7
1.2.2 微生态制剂在水产养殖中的应用.....	8
1.2.3 微生态制剂的缺陷.....	9
1.3 微生物培养技术的局限性以及改进策略	10
1.3.1 传统微生物纯培养技术的局限性.....	10
1.3.2 微生物培养技术的改进策略.....	13
1.3.3 结冷胶技术的研究进展.....	15
1.4 分子生态学技术方法及其应用	19
1.4.1 从自然环境中提取核酸.....	20
1.4.2 分子杂交法.....	20
1.4.3 基于 PCR 的指纹图谱分析法.....	21
1.4.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术及其应用	23
1.5 本论文的研究思路、内容和意义	26
2 材料与方 法	29
2.1 材 料	29
2.1.1 采样地点概况与样品采集.....	29
2.1.2 菌株和质粒.....	29
2.1.3 主要试剂.....	30
2.1.4 工具酶.....	30

2.1.5 引物.....	30
2.1.6 主要仪器.....	30
2.1.7 培养基.....	31
2.1.8 溶液配制.....	34
2.1.9 分析软件.....	38
2.2 基本方法	39
2.2.1 虾池表层沉积物样品的采集和环境参数的测定.....	39
2.2.2 虾池表层沉积物总菌和异养细菌计数.....	39
2.2.3 沉积物细菌的培养.....	40
2.2.4 培养前后沉积物细菌群落结构变化与优势菌的分析.....	40
2.2.5 细菌遗传多样性的统计学分析.....	47
3 结果与分析	48
3.1 虾池的环境因子分析	48
3.1.1 虾池的基本概况.....	48
3.1.2 虾池的主要环境因子.....	48
3.2 虾池表层沉积物的细菌计数分析	48
3.2.1 虾池表层沉积物总菌计数.....	48
3.2.2 培养期内可培养异养菌计数.....	49
3.3 虾池表层沉积物的细菌多样性分析	50
3.3.1 表层沉积物细菌总 DNA 的提取.....	50
3.3.2 表层沉积物细菌 16SrDNA-V3 高变区的 PCR 扩增.....	50
3.3.3 DGGE 基因指纹图谱的构建与细菌多样性分析	51
3.3.4 表层沉积物优势种群的分子鉴定与系统发育分析.....	52
3.4 富集培养后虾池表层沉积物的细菌群落结构分析	55
3.4.1 液体培养基富集培养后表层沉积物的细菌群落结构分析.....	55
3.4.2 固体培养基富集培养后表层沉积物的细菌群落结构分析.....	76
4 讨论.....	85
4.1 微生物培养技术改进策略的选择以及实施	85
4.1.1 培养基的选择.....	85

4.1.2 接种方式和培养方式的选择.....	87
4.1.3 培养时间的界定.....	88
4.1.4 固体培养基凝固剂的选择.....	90
4.2 虾池表层沉积物中优势种群的分析	90
4.3 固体培养基富集培养后特征种群的分析	92
4.4 关于变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术在应用中的若干问题.....	94
5 结论与展望	98
参考文献	100
附 录.....	111
附录一：攻硕期间参与的课题	111
附录二：载体图谱	111
附录三：DNA 分子量标准.....	112
附录四：缩略语对照表	113
附录五：整理待发表的文章	113
致 谢.....	114

Contents

Abstract(in Chinese)1

Abstract(in English).....错误！未定义书签。

1 Introduction.....5

1.1 Brief introduction of shrimp farming and diseases control in China. 5

1.1.1 Development situation of shrimp farming in China5

1.1.2 Application of antibiotics in diseases control5

1.1.3 Antimicrobial peptides and their application6

1.2 Application of probiotics in aquaculture 7

1.2.1 Definition of probiotics7

1.2.2 Application of probiotics in aquaculture8

1.2.3 Limitation of probiotics9

1.3 Limitations and improved strategies of microbial culture technique 10

1.3.1 Limitation of traditional pure culture technique10

1.3.2 Improved strategies of microbial culture technique.....13

1.3.3 Progress in research of gellan gum technique.....15

1.4 Application of molecular ecology techniques and methods 19

1.4.1 Extraction of nucleic acid from environment20

1.4.2 Molecular hybridization.....20

1.4.3 Genetic fingerprinting techniques based on PCR21

1.4.4 Introduction and application of denaturing gradient gel electrophoresis
(DGGE) technique23

1.5 Content,purpose and significance of the research 26

2 Materials and methods29

2.1 Materials 29

2.1.1 Introduction of sampling place and sample collection29

2.1.2 Strains and plasmids29

2.1.3 Main reagents.....30

2.1.4 Restrictive endonucleases and other enzymes	30
2.1.5 Primers	30
2.1.6 Instruments.....	30
2.1.7 Culture media.....	31
2.1.8 Solutions	34
2.1.9 Softwares.....	38
2.2 Methods.....	39
2.2.1 collection of surface sediment samples and mensuration of environmental parameters.....	39
2.2.2 Number of total bacteria and heterotrophic bacteria in surface sediments.....	39
2.2.3 Cultivation of bacteria in sediments	40
2.2.4 Changes of bacterial community structure and analysis of dominant population	40
2.2.5 Statistic analysis of bacterial genetic diversity	47
3 Results and analysis	48
3.1 Analysis of environmental factors in the shrimp pond.....	48
3.1.1 General situation of the shrimp pond.....	48
3.1.2 Main environmental factors of the shrimp pond.....	48
3.2 Number analysis of surface sediment bacteria in shrimp pond	48
3.2.1 Number of total bacteria of surface sediment in shrimp pond	48
3.2.2 Number of heterotrophic bacteria between cultivate periods.....	49
3.3 Analysis of bacterial diversity of surface sediment in the shrimp pond... 50	
3.3.1 Extraction of DNA in surface sediment.....	50
3.3.2 PCR amplification of 16S rRNA V3 fragment gene	50
3.3.3 Construction of DGGE fingerprint and analysis of bacterial diversity	51
3.3.4 Molecular identification of dominant population and phylogenetic analysis of bacteria in surface sediment.....	52
3.4 Analysis of bacterial community structure of the enrichment samples.....	55

3.4.1 Analysis of bacterial community structure of the enrichment samples cultured by liquid media	55
3.4.2 Analysis of bacterial community structure of the enrichment samples cultured by solid media	76
4 Discussion.....	85
4.1 Choice and implement of the improved strategies of microbial culture technique	85
4.1.1 Choice of media	85
4.1.2 Choice of inoculate and cultivate mode.....	87
4.1.3 Choice of cultivate time	88
4.1.4 Choice of solid media gelling agent.....	90
4.2 Analysis of dominant population of surface sediment in shrimp pond	90
4.3 Analysis of characteristic population of the enrichment samples cultured by solid media.....	92
4.4 Something attentive in the application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) technique	94
5 Conclusions and prospect.....	98
References.....	100
Appendix.....	111
Appendix 1: Research projects	111
Appendix 2: Vectors	111
Appendix 3: DNA markers	112
Appendix 4: Abbreviations	113
Appendix 5: List of preparing papers.....	113
Acknowledgements	114

摘要

传统的微生物纯培养技术能够分离得到的微生物仅为自然界中微生物总数的1%左右,绝大多数微生物还处于未培养和未研究状态,针对新型培养技术的探索已经成为了研究热点。本论文在传统微生物培养技术的基础上进行改进,对泉州湾滩涂虾池表层沉积物中的细菌进行富集培养,并运用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对培养后的细菌多样性变化进行比较和研究;同时,对虾池表层沉积物样品总DNA以及多种固体培养基富集后培养物的总DNA的DGGE图谱中16SrDNA片段的显著条带进行切割、克隆和测序,并进行系统发育分析。本研究取得了以下主要结果:

1. 对虾池表层沉积物细菌多样性进行分析,得出该沉积环境细菌多样性指数为3.4971,丰度为41,均匀度指数为0.94171;对DGGE图谱上的特征条带进行切割回收和克隆测序后得到了优势菌的信息。测序结果为:17个优势条带分别属于变形菌门、 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 ϵ -变形菌纲、绿弯菌门、放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和环境样品中的未知菌群等10个类群,其中有15个条带的序列与各个门类中未培养细菌具有大于98%的同源性。

2. 采用直接接种(I)和稀释接种(II)等2种接种方式、匀速摇动(Y)和间歇扰动(R)等2种培养方式以及2216E、D2216E、VL55、DNB、HM₁、HM₂、DR_{2A}和R_{2A}等8种液体培养基对虾池表层沉积物细菌进行为期2周的富集培养,结合各样品的DGGE图谱和细菌多样性指数,对接种方式、培养方式的改进效果和各种培养基的使用效果做出评价,结果表明:IY和IIR方式可以适用于大多数液体培养基,低营养基质培养基比高营养基质培养基更能获得较多的DGGE条带和较高细菌多样性。

3. 采用A2216E、AD2216E、AVL55、ADNB、AHM₁、AHM₂、ADR_{2A}、AR_{2A}和G2216E、GD2216E、GVL55、GDNB、GHM₁、GHM₂、GDR_{2A}、GR_{2A}等16种固体培养基对虾池表层沉积物细菌进行为期12周以上的富集培养,菌落计数结果显示:AVL55、GVL55、GDNB、GHM₂和GDR_{2A}等培养基在2周和12周的菌落计数结果还有明显的增长;将2周富集培养物DGGE图谱中的显著条带进行切割回收和克隆测序,得到培养后的优势菌落信息。测序结果为:19个显著条带分别属于 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、 ϵ -变形菌纲、厚壁菌门、海洋细

菌和环境样品中的未知菌群等 6 个类群, 其中有 9 个条带的序列与各门类中未培养细菌具有大于 98% 的同源性。

4. 成功的将新型微生物胞外多糖——结冷胶(Gellan gum)应用于固体培养基的配制, 与琼脂相比, 结冷胶具有用量少、成胶质量高、胶体透明度高、性质稳定等优点。实验证明, 对比 8 种培养基的结冷胶平板和琼脂平板, 除了常规使用的 2216E 培养基外, 其它 7 种培养基的结冷胶平板均能获得比琼脂平板具有更高多样性指数、丰度和均匀度指数的富集培养物; 其中, 以 GDNB 和 GDR₂A 培养基的各项指数为最高。

关键词: 虾池表层沉积物; 培养技术; PCR-DGGE; 结冷胶; 细菌多样性

Abstract

Less than 1% of the microorganisms have been cultured and isolated by traditional pure culture technique, most of them in nature remain uncultured. Current researches have focused on the development of new culture techniques. In this research, we improved the pure culture technique, and the denaturing gradient gel electrophoresis technique was applied to study the bacterial diversity variation of the enriched samples to evaluate the improved pure culture technique. In the same time, we excised the dominant intensity bands in DGGE patterns of surface sediments of shrimp pond and the enrichment samples cultured by solid media, after cloning, sequencing, the phylogenetic relationship of the bacteria was analyzed. The main results were as follows:

1. Bacterial diversity of sediment in shrimp pond was analyzed by using PCR-DGGE technique, the Shannon-wiener index (H) is 3.4971, the Richness (S) is 41 and the Evenness (E_H) is 0.94171; 17 dominant bands were excised from DGGE profile of surface sediment bacteria in shrimp pond and the V3 region of 16S rRNA gene was cloned and sequenced followed by phylogenetical analysis. The results showed that these 17 bands represented bacteria from proteobacteria (including α -proteobacteria, γ -proteobacteria, δ -proteobacteria and ϵ -proteobacteria), Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and the unknown species. There are 15 bands belong to uncultured bacteria.

2. 2 kinds of inoculation mode (designated as I and II), 2 kinds of cultivate mode (designated as Y and R) and 8 kinds of liquid media (designated as 2216E, D2216E, VL55, DNB, HM₁, HM₂, DR₂A and R₂A) were applied to the enrichment of bacteria from shrimp pond sediments for 2 weeks. The effect of different inoculation mode, cultivate mode and media was evaluated by DGGE and bacterial diversity index. The results showed that I Y and II R mode could be applied to most of the liquid media, and low nutrient media got more DGGE bands and higher bacterial diversity than that of the high nutrient media.

3. 16 kinds of solid media (designated as A2216E, AD2216E, AVL55, ADN_B,

AHM₁, AHM₂, ADR_{2A}, AR_{2A} and G2216E, GD2216E, GVL55, GDNB, GHM₁, GHM₂, GDR_{2A}, GR_{2A}, respectively) were applied to the enrichment of bacteria from shrimp pond sediments for 12 weeks. The colony counting results showed that the colony number on AVL55, GVL55, GDNB, GHM₂ and GDR_{2A} media in 2 weeks and 12 weeks cultivation increased obviously. Dominant bands excised from the DGGE profile of enrichment samples were sequenced. The results revealed that the 19 characteristic bands represent bacteria from proteobacteria (including γ -proteobacteria, α -proteobacterium and ϵ -proteobacteria), Firmicutes, marine bacteria and unknown bacteria. There are 9 bands belong to uncultured bacteria.

4. As a new type of bacterial exopolysacchsride (EPS), Gellan gum can be used as a substitute for agar, because of its few dosage, high gelling quality diaphaneity and stability, *et al.*. In our experiment, we compared the culture effects of 8 kinds of media gelled respectively with gellan gum and agar, the results showed that the media gelled by gellan gum had better effect in a higher value in the index of H, S and E_H, and GDNB and GDR_{2A} media got the highest index value.

Keywords: surface sediments in shrimp pond; culture technique; PCR-DGGE; gellan gum; bacterial diversity

1. 前言

1.1 我国对虾养殖业以及病害控制简况

1.1.1 我国对虾养殖业的发展简况

我国对虾养殖业曾创造过辉煌的业绩，20 世纪 70 年代后期人工育苗技术和养成技术获得突破，80 年代对虾养殖业进入快速发展阶段，90 年代初期对虾养殖业进入高峰，养殖面积 16 多万 hm^2 ，年育苗能力 1000 多万尾，年产对虾 20 多万吨，年创汇 5 亿美元以上，连续几年保持世界领先地位，成为经济效益最好的产业之一，为繁荣沿海经济、丰富国内外市场做出了重要贡献。

然而，伴随着我国水产养殖业的迅速发展，一些制约水产养殖业健康、持续发展的问題也日益突显。1993 年以后，由于对虾病毒性疾病的暴发，我国对虾养殖业出现了大幅度的滑坡，对虾养殖业步入了低谷，养殖对虾总产量急剧下降。该年的产量只有 8.7 万吨，1994 年又下降到 5.5 万吨，只相当于鼎盛时期的 1/4，年直接经济损失达数十亿元人民币；1996 年以后，全国的对虾养殖业开始出现复苏迹象，养殖产量已开始回升^[1]，2000 年产量恢复到 21.79 万吨，2001 年又迅猛增产到 30.4 万吨。但是病害，特别是病毒流行病仍然是目前困扰我国对虾养殖业生存和发展最突出的问题。目前，已经报道的对虾疾病种类有数十种，病原种类包括病毒、细菌类、真菌类、寄生虫类、原生动物类等，危害的范围几乎包括对虾生活史的各个阶段，即从育苗、养成到越冬的各个时期都会有虾病发生。如何在现有养殖模式下，采取有效的措施，维持良好的池塘生态环境，促进水产养殖动物健康生长，是实现水产养殖业可持续发展的重要一环。

1.1.2 抗生素在病害控制中的应用

抗生素是指由细菌、放线菌、真菌等微生物经培养而得到的某些产物或是用化学半合成法制造的相同或类似的物质，它们在低浓度下对特异性微生物（包括细菌、立克次氏体、病毒、支原体、衣原体等）有抑制生长或杀灭作用。

抗生素在水产养殖病害防治中的应用是广泛的，它可用于疾病防治、促进生长以及降低对某些营养成分的需求量等方面，抗生素有效的控制了许多水产疾病的发生，极大的促进了水产养殖业的发展。但是，近年来抗生素的大规模使用带给水产养殖的副作用也日益凸显，其具体表现在如下四个方面^[2]：一、耐药菌株的产生，低剂量、长时间的使用抗生素，会出现药效减弱或完全无效的现象，导

致细菌耐药菌株增加和耐药性增强，最终向人类传播，威胁人类健康；二、在水产品中产生药物残留，该现象对人类的影响主要表现为：毒性损伤、变态反应或过敏反应和三致（致癌、致畸形、致突变）；三、破坏生态平衡，抗生素在抑制或杀灭病原微生物的同时可能会抑制有益微生物，从而打破水生动物体内外的生态平衡；四、抑制免疫系统，抗生素的使用会抑制吞噬细胞的功能等。

鉴于以上负面效应，为了确保水产养殖业的可持续性发展，在生产中应该谨慎使用抗生素，并且应该加强其替代品的研发。郑天凌^[3]等在对虾弧菌病药物的研究中也指出，药物的不合理使用，非但无法有效的控制疾病，而且还会导致诸如药物残留、养殖水污染、正常菌群失调等一系列的连锁问题。近年来，陆续出现了很多抗生素的替代品，如酶制剂、植物提取饲料添加剂、微生态制剂等。其中，抗菌肽类物质由于其对细菌的广谱高效杀灭性引起了研究者的兴趣。

1.1.3 抗菌肽及其应用前景

抗菌肽(Antimicrobial peptides)，也称肽类抗生素，广泛分布于细菌、病毒和各种动植物体内，是宿主防御系统产生的一类对抗外界病原体感染的肽类活性物质，是生物天然免疫防御系统的重要组成部分。

抗菌肽与传统抗生素的不同之处在于：(1)产生机制不同，传统抗生素主要是细菌的发酵产物，由酶促反应合成，而抗菌肽是由宿主基因编码在核糖体上合成的产物；(2)杀菌机制不同，传统抗生素大多数是通过抑制细菌细胞壁或 DNA 的合成而发挥作用，而抗菌肽主要通过带负电的微生物细胞膜直接作用，改变其通透性，造成膜的物理性损伤，内容物外渗而导致细胞死亡；(3)作用方式不同，传统抗生素作用涉及到与细菌细胞膜或胞内特异的受体结合，且受体类型有限，细菌容易通过变异而产生耐药性，抗菌肽的作用不涉及特定的受体，完全是阴阳离子的物理作用，它可以很快杀灭微生物而不产生抗性。

目前已分离鉴定 500 余种抗菌肽，发现其氨基酸序列具有较强的保守性，且具有以下共同特点：N 端由碱性氨基酸组成；C 端均酰胺化；绝大多数抗菌肽在第 2 位均为 Trp，它对杀菌活性至关重要，分子量在 4kD 左右。研究证实，该类物质具有广谱、不产生耐药性等优点，研究和应用前景十分广阔^[4,5]，其中，可利用于水产养殖的抗菌肽主要为细菌抗菌肽和病毒抗菌肽。但存在的问题是，抗菌肽是一类小分子多肽，容易被蛋白酶降解；在生物组织中含量少，分离获得大

量天然产物困难很大；人工化学合成成本较高，基因工程由于有害于宿主本身而无法获得高水平表达；与抗生素相比，某些抗菌肽活性不够理想，需要改造已有抗菌肽，设计新抗菌肽；目前有关抗菌肽的药动力学和药效学研究较少。有关抗菌肽的研究大都处于实验室阶段，还有很多问题有待解决。

郑天凌^[3]、李庆彪等^[6]研究了对虾养殖生态系的特点，认为对虾养殖生态系统是一个简单的脆弱生态体系，主要问题是物质和能量循环不畅通，导致生态失衡，病毒肆虐，从而引起对虾发病。目前尚缺乏有效的治疗对虾病毒性疾病流行的措施，因此，普遍认为优化和保持良好的养殖环境、进行健康的生态养殖才是对虾养殖业走出低谷的一条较好出路^[7]。在现阶段，微生态制剂的研究和应用为水产养殖提供了一个相对健康的平台。

1.2 微生态制剂在水产养殖中的应用

1.2.1 微生态制剂的定义

1974年 Parker^[8]首次将益生菌（Probiotics）定义为“有助于肠道菌群平衡的微生物和物质（可能含有抗生素）”。1989年 Fuller^[9]则认为“益生菌是一种活的微生物饲料添加剂，通过改善肠道内菌群平衡而对动物施加有利的影响”。Moriarty^[10]把益生菌的含义扩展为“一类添加到养殖水体中的有益微生物”。1990年全国微生态学学术研讨会会议纪要中正式提出“微生态制剂”一词^[11]。Gatesoupe^[12]给微生态制剂下的定义为“有助于增进动物健康，能够进入其胃肠道并保存活力的微生物细胞”。而在某种程度上水环境中的微生物还可生活于养殖动物的鳃或皮肤上。Gram^[12]去掉对肠道的限制，将微生态制剂的定义扩展为“一种活的微生物添加剂，通过改善动物的微生物平衡而对其产生有利的影响”。水生动物往往产卵于水中，使其周围水中的细菌能在卵表面定居，而且刚孵化的幼体或新生的动物肠道系统发育并不完全，其肠道、皮肤和鳃上没有微生物群落。由于水生幼体早期阶段的主要微生物群落部分地取决于饲养它们的水^[13]，故水中细菌的性质尤为重要。Verschur等^[14]将微生态制剂的定义进一步扩展为“一种活的微生物添加剂，通过改善与动物相关的或其周围的微生物群落，确保增加饲料的利用或增强其营养价值，增强动物对疾病的应答或改善其周围环境的水质而有益于养殖动物。

Kozasa^[15]首次将微生态制剂应用于水产养殖，用1株从土壤中分离的芽孢杆

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库