

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.05.005

湛江官渡近江牡蛎养殖水细菌群落的 DGGE 指纹分析

兰 兰^{1,2}, 刘广锋², 王江勇², 王瑞旋², 刘文生¹

(1. 华南农业大学, 广东 广州 510642; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 2011年3月~12月利用变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术对湛江官渡地区近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)养殖水细菌群落组成进行了监测研究。UPGMA聚类分析显示3月~12月的样品细菌主要分属2大类群;多样性指数结果显示3月~7月细菌多样性高于8月~12月;系统发育分析显示牡蛎养殖区水体优势菌群主要由以下种群组成:未培养的变形菌门(Proteobacteria)(α 、 γ 、 δ 、 ϵ)、未培养的拟杆菌门(Bacteroidetes)、未培养的疣微菌门(Verrucomicrobiae bacterium)、未培养的放线菌门(Actinobacteria)和未培养的蓝细菌门(Cyanobacter bacterium)。最优势菌群为 α -变形菌纲和拟杆菌门的黄杆菌属(*Flevobacterium*)。

关键词: 近江牡蛎; 养殖水; 细菌群落; DGGE

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)05-0031-08

DGGE fingerprinting of bacterial community in aquaculture water of *Crassostrea ariakensis* from Guandu district, Zhanjiang city

LAN Lan^{1,2}, LIU Guangfeng², WANG Jiangyong², WANG Ruixuan², LIU Wensheng¹

(1. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Key Lab. of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: We had monitored and investigated the bacterial community composition in aquaculture water for *Crassostrea ariakensis* in Guandu of Zhanjiang by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) from March to December, 2011. UPGMA clustering analysis shows that there are 2 major populations of bacterial species. Diversity index reveals that the diversities in March ~ July were higher than those in August ~ December. Phylogenetic analysis indicates that the dominant microbial populations in the water are uncultured Proteobacteria (α , γ , δ and ϵ), uncultured Bacteroidetes, uncultured Verrucomicrobiae bacterium, uncultured Actinobacteria and uncultured Cyanobacter bacterium. Uncultured α -proteobacterium and *Flevobacterium* of uncultured Bacteroidetes are the most dominant bacteria.

Key words: *Crassostrea ariakensis*; aquaculture water; bacterial community; DGGE

中国近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)养殖有 300 多年的悠久历史, 具有广泛的产业基础, 养殖规模大、产量高。近江牡蛎在广东省汕头牛田洋、珠海的横琴和南水高栏、阳江程村、湛江官渡等地

收稿日期: 2012-03-12; 修回日期: 2012-06-07

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金-贝类产业技术体系科学家岗位专项经费(CARS-48); 广东省农业攻关项目“贝类产业推进关键技术与示范”(2010B20201014)

作者简介: 兰 兰(1985-), 女, 硕士研究生, 从事海水生物病害防治研究。E-mail: 1114044074@qq.com

通讯作者: 王江勇, E-mail: wjy104@163.com

区已成为其海水贝类养殖的支柱和品牌。随着近江牡蛎养殖历史的延长和集约化生产的发展,逐渐出现养殖规模与环境容量不相适应、养殖密度过大、养殖技术缺乏规范等问题。近几年各地陆续出现近江牡蛎大规模死亡事件,导致严重的经济损失,如广东、广西等地近年牡蛎采苗及养成过程病害发生,尤其由于环境变化、盐度升高及在春夏或秋冬的季节更替时节,在采苗场保苗死亡异常严重,达80%以上,导致这几年本地苗源供应紧张,各核心养殖区大量引进外地苗种,养成过程大规模死亡现象时有发生。因此,研究养殖环境与病害发生的关系,建立牡蛎病害预警预报系统和病害防控技术体系,是满足牡蛎健康养殖及产业可持续发展的迫切需求。目前,PCR-DGGE技术主要应用于土壤微生物多样性^[1-2]、肠道菌群^[3-4]、海洋环境微生物多样性^[5]、养殖水环境中微生物多样性^[6-8]等领域,而针对水产养殖动物水环境中微生物的研究大多是进行异养细菌总数的宏观监测,或者通过传统分离培养的方法获得其中的优势细菌。该过程步骤繁琐、工作量大,且生态环境中未可培养的微生物易被遗漏^[8]。而变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术对微生物多样性的分析不依赖于微生物的培养过程,而是直接提取环境样品中总的DNA,由此包括了样品中可培养微生物和未可培养微生物的总遗传信息,从而真实地反映微生物群落的原始组成^[9-10]。此研究采用PCR-DGGE技术分析牡蛎养殖区微生物的数量和种群变化规律,为进一步探讨牡蛎养殖系统内微生物的生态变化与疾病发生的关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 水样采集

样品为湛江官渡牡蛎养殖区水体,于2011年3月~12月进行采样,采集固定站位表层水体1 L水样过滤(所用滤膜为Millipore 0.2 μm , GTTP04700),收集菌体后迅速放冰盒内保存,运回实验室于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。每约30 d采样1次,共采样10次。

1.2 水样细菌总DNA的提取

采用Omega E. Z. N. A. [®] BWater DNA Kit试剂盒提取,其操作方法参照说明书执行。

1.3 16S rDNA-V3区域的PCR扩增

采用16S rDNA基因V3可变区具有特异性的8

引物对341f + GC(5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGGG-CGGGGCGGGGGCACGGGGG G CC TA GGGGAG-GCAGCAG-3')(下划线处为GC夹序列)534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[11],扩增产物长约234 bp(含GC),用于DGGE分析。以不添加模板为阴性对照组,模板体积由ddH₂O补充。

16S V3区PCR反应条件为10 μL 5 \times PCR Buffer, 0.25 μL DNA STAR Polymerase 酶, 4 μL dNTP mix, 引物各1 μL , 模板2 μL , 无菌去离子水补足体积至50 μL 。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR反应程序为模板预变性条件94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 26次循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存模板备用。用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测, DNA green 染色观察。

1.4 DGGE

采用Bio-Rad公司DGGE分析系统进行试验。V3区PCR产物经浓缩后上样于8%的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)(变性梯度为50%~65%)进行电泳,恒压100 V, 10.3 h。溴化乙锭染液中染色60 min后拍照分析。

1.4.1 DGGE条带的切割和DNA回收 将DGGE图谱中清晰的优势条带标记后割胶回收、捣碎后放入EP管中加入30 μL 灭菌去离子水, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜保存, 取1 μL 上清液作为PCR的模板进行16S rDNA V3区扩增, 条件同1.3。

1.4.2 连接、转化以及序列测定 经纯化后的PCR产物连接到pMD18-T Simple Vector载体(TaKaRa, 大连产), 转化Top10细胞, 将阳性克隆株交上海英捷公司测序。

1.5 序列分析

将测序所得的20条优势细菌的16S rDNA序列通过NCBI在线投递工具BankIt(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>)提交至GenBank。利用BLAST功能(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行DNA序列匹配, 建立系统进化树。

1.5.1 聚类分析及多样性指数计算 采用凝胶定量软件Quantity One对DGGE图谱进行UPGAMA聚类分析, 同时利用输出的数据计算3月~12月样品的香农威尔多样性指数(Shanno-Wiener index)。

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

其中 s 为每个样品的条带数目, $P_i = N_i/N$, N_i 为第 i 条带的峰面积, N 为所有峰的总面积^[12]。

1.5.2 细菌系统进化分析 将测序得到的序列通过 NCBI 数据库的 BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 进行同源性比对搜索, 选择最高同源性的序列作为参比序列, 并同时记其序列登录号。利用 MEGA 4.0 软件的邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树, 其中自举值 Bootstrap 重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA-V3 区 PCR 扩增结果

通过采用紫外分光光度计检验水体细菌总 DNA 提取纯度, 光密度 OD_{260}/OD_{280} 为 1.75 ~ 1.91, 符合下步反应要求。以提取的总 DNA 为模板进行 16S rDNA PCR 扩增, 扩增产物经凝胶试剂盒切胶回收后以此回收产物为模板进行 16S rDNA-V3 区 PCR 片段扩增, PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶 110 V 电泳 20 min 后拍照 (图 1), 可见 PCR 扩增后样品的 16S rDNA-V3 区片段约为 234 bp, 符合 16S rDNA-V3 区高变区片段大小, 可以进行下步试验。

2.2 DGGE 指纹图谱分析结果

湛江牡蛎养殖区不同月份水体样品的 PCR 产物经 DGGE 后, 从图 2 可以直观地了解各个样品时空分布规律。依据 DGGE 技术能分离长度相同而碱基组成不同的 DNA 序列的原理, 认为 DGGE 指纹图谱中位于同一位置的条带看可以作为同一种细菌种群^[13], 因此, 此试验选取 20 条不同位置上的 DGGE 特征条带用于后续克隆测序 (图 2)。

3 月 ~ 12 月的海水样品 DGGE 电泳结果见图 2, 可见 2011 年 7 月站位采集的样品电泳谱带最为丰富, 因此, 此研究以 2011 年 7 月站位 1 采集的样品即泳道 7 为标准, 用 Quantity One 软件对 10 个月的海水样品的 DGGE 图谱进行分析 (图 3)。处于不同位置的条带数为 36 条, 优势条带 ZJ-11 和 ZJ-36 在整个采样时间内均存在。

基于各月水体细菌 DGGE 条带的位置、数量和亮度, 采用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行 UPGMA 聚类分析。各个样品细菌群落按相似程度聚为 2 个大簇, 即 2011 年 3 月 ~ 7 月样品聚为另一大簇, 2011 年 8 月 ~ 12 月样品聚为另一大簇 (图 3)。

不同的采样月份多样性指数成 W 状波动变化, 3 月 ~ 7 月样品多样性指数为 3.21 ~ 3.51; 8 月 ~ 12 月变化不大, 为 2.87 ~ 3.13, 低于 3 月 ~ 7 月样品的多样性指数; 在监测周期内 7 月的多样性指数最高 (图 4)。

2.3 系统发育分析

选取 DGGE 示意图中不同位置处 22 条特征条带切胶回收、测序。将所测条带的序列在 GenBank 数据库中用 Blast 进行检索和同源性比对, 并下载相近序列。运用 ClustalX 程序进行排序, 采用 MEGA 4.0 软件进行分析, 用邻接法构建系统进化树 (图 5)。

湛江牡蛎养殖区共成功克隆 20 个条带, 在已测定出的 20 种主要类型中未可培养的变形菌门 (Proteobacteria) 占 40%, 其中 α -变形菌纲占 20%, γ -变形菌纲占 10%, δ -变形菌纲占 5%, ϵ -变形菌纲占 5%; 未可培养的拟杆菌门 (Bacteroidetes) 占 35%; 未可培养的蓝细菌门 (Cyanobacteria) 占 15%,

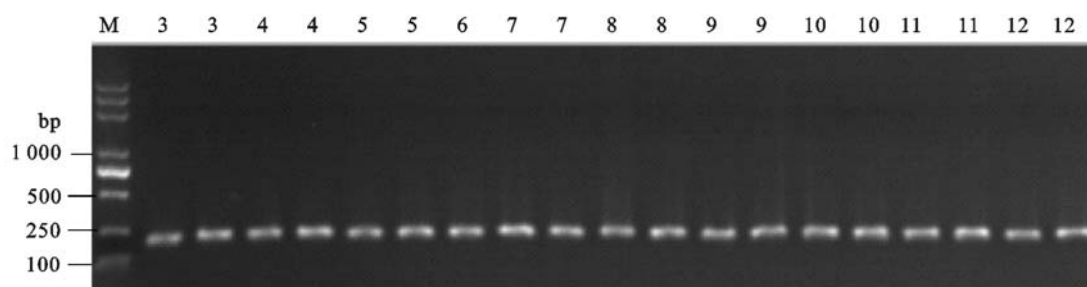


图1 水体细菌 16S rDNA-V3 的 PCR 扩增图谱

数字 3 ~ 12 对应 3 月 ~ 12 月样品编号, 下图同此

Fig. 1 PCR amplification of 16S rDNA-V3 of bacteria in water

Number 3 ~ 12 refer to the sample No. in March ~ December, respectively. The same case in the following figure.

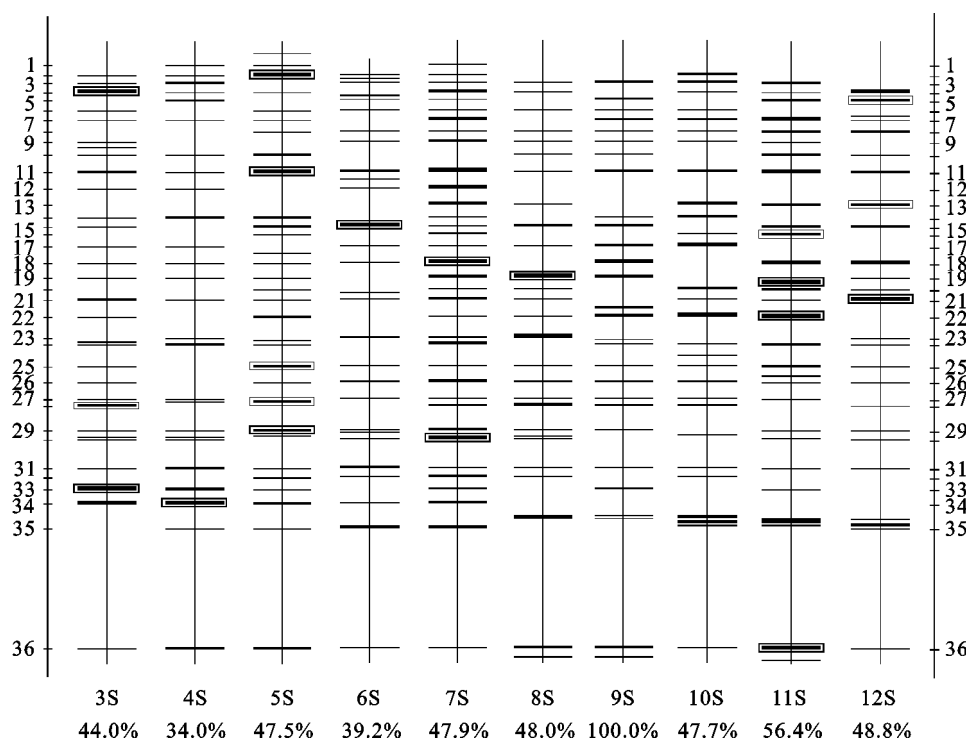


图2 不同月份细菌 DGGE 分析示意图

带边框 20 处为被切割的条带用于后续测序；切割条带编号依次为 ZJ-2、4、5、11、13、15、16、18、19、20、21、22、25、27、28、29、30、33、34、36

Fig. 2 Sketch map of DGGE analysis of bacteria in different months

The 20 framed cutting bands are for later sequencing; cutting band No. from top to bottom is ZJ-2, 4, 5, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 34 and 36.

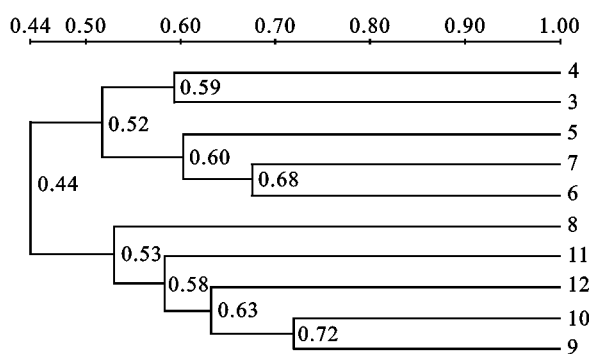


图3 样品细菌群落的 UPGMA 聚类图分析图

Fig. 3 UPGMA clustering analysis of bacterial populations

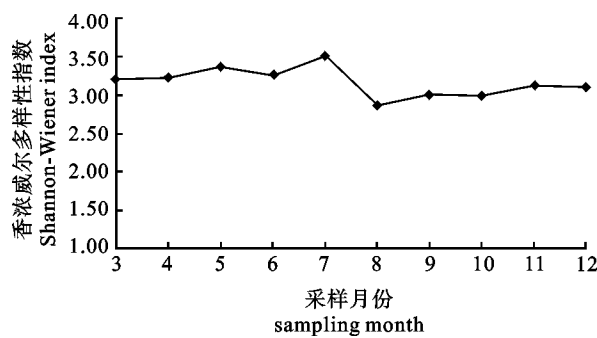


图4 各月份样品细菌的香浓威尔多样性指数

Fig. 4 Shannon-Wiener index of bacteria in different months

包括未可培养的片球藻属 (*Merismopedia* sp.) 和未可培养的 *Mycetocda* sp.; 未可培养的放线菌门 (*Actinobacteria*) 占 5%; 未可培养的疣微菌门 (*Verrucomicrobiae* bacterium) 占 5%。最优势群落为变形菌门和拟杆菌门, 其中未可培养的放线菌门和未可培养的拟杆菌门的黄杆菌属 (*Flevobacterium*) 在全年采样样品中均存在。

3 讨论

3.1 多样性指数变化与环境的关系

多样性指数又称差异指数 (discrepancy index), 是指应用数理统计方法求得表示生物群落和个体数量的数值, 用以评价环境质量。分析结果显示, 多样性指数在整个监测周期内呈周期性波动变化, 说明了牡蛎养殖水系统内微生物群落结构在时间上的

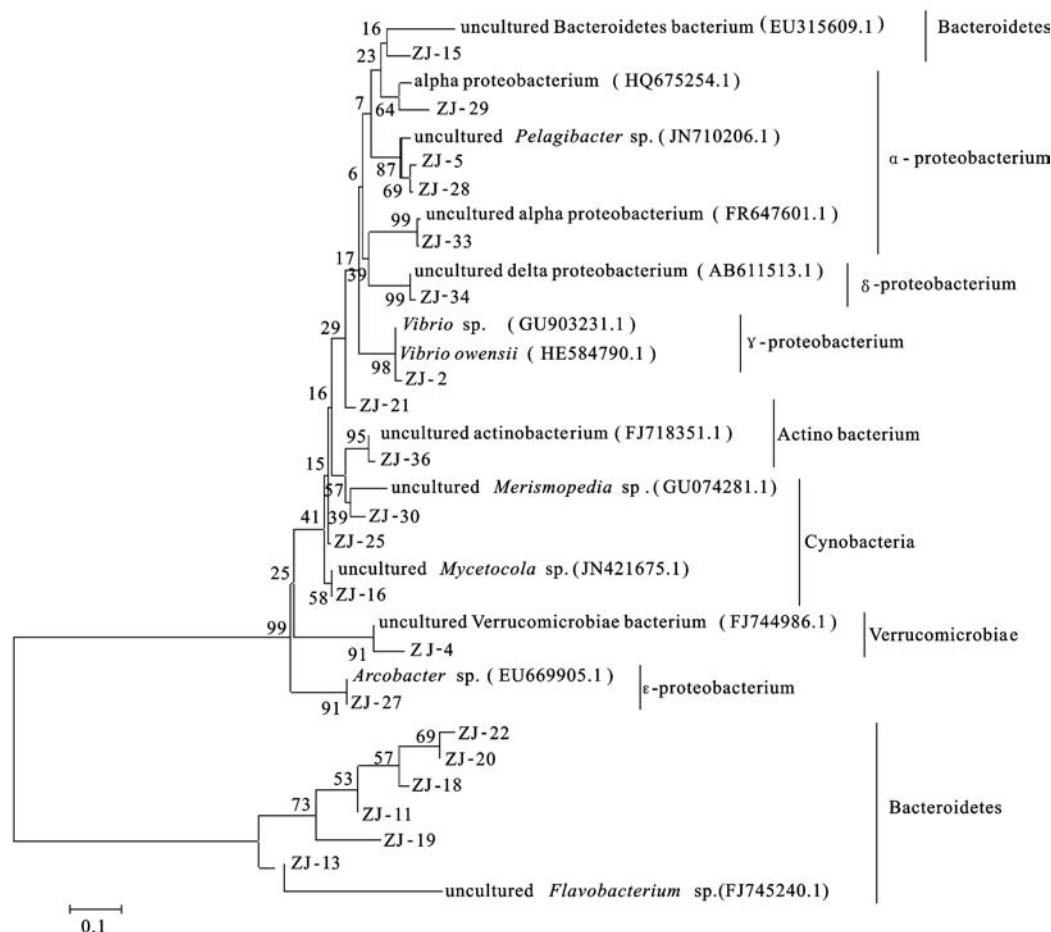


图5 20个序列与一些相似序列以邻接法构建的种系发生树

Fig. 5 Phylogeny tree of 22 main sequences and similar ones by using neighbor-joining method

演替变化。此研究发现在疾病的高发季节3月~7月样品的多样性指数均高于8月~12月,这可能与湛江牡蛎养殖区开放式的养殖系统内特殊地理位置、环境等影响相关。杨彩霞等^[14]对沙子口细菌群落多样性分析发现,夏季温度较高时由于某些高温性浮游生物迅速增长抑制了其他微生物的生长,夏季细菌群落多样性最低;而冬季温度相对较低,各种浮游生物的增长速率较缓慢,夏季被抑制的细菌种类得到增殖,冬季细菌群落多样性最为丰富。刘勇勤等^[15]研究发现冬季沉积雪中微生物数量最少,但多样性最高,而夏季恰恰相反。对于微生物多样性的影响并不是单一因子而是多因子的综合作用,浮游生物的变化对微生物群落结构也存在很大的影响,此结果的出现是生物变化与环境条件的复杂反应^[16]。

3.2 细菌群落结构组成及优势菌群变化规律

KELLY 和 CHISTOSERDOV^[17]通过克隆文库的

方法对美国大南湾夏季细菌群落的结构变化进行研究,发现大南湾海区细菌群落主要由变形菌门(α 、 β 、 γ)、屈挠杆菌(*Flexibacter*)和蓝细菌组成;SCHAUER 等^[18]研究表明布拉内斯湾海域细菌群落组成主要为 α -变形菌亚门、拟杆菌群(*Bacteroides*)和蓝细菌;姚延丹等^[19]对复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析发现,池塘优势菌群分属放线菌门、变形菌门、蓝细菌门和拟杆菌门4个门。邓德波等^[20]利用16S rRNA克隆文库的方法对养殖水系统研究,指出牡蛎壳上的附着细菌主要分属于变形菌门(包括 α -、 β -和 γ -变形菌纲)、拟杆菌门等。章洁香^[20]研究湛江湾微生物群落结构在营养盐中的变化发现,湛江湾水体第一优势菌群为变形菌门,其次为拟杆菌门,最后是放线菌门。杨彩霞等^[21]对清湾湾扇贝养殖海区细菌群落结构的季节变化研究发现,20个序列代表的细菌分属于 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、拟杆菌门、放

线菌门和疣微菌门。此研究获得的细菌类群为变形菌门(α 、 γ 、 δ 和 ϵ)、拟杆菌门、疣微菌门、放线菌门和蓝细菌门,与以上国内外对不同海域或养殖系统的研究结果大体一致,但不同生境中细菌群落优势类群也存在差异^[22-24]。

变形细菌(又称紫色细菌)是所有细菌中最大和最具多样性的一个族群,由5个亚门(α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ)组成,其中 α -和 γ -变形菌纲在海水浮游细菌中尤为重要。一般而言,海洋浮游真细菌中能利用光能生长的细菌以 α -变形菌纲为主^[25-27],而与人类生活密切相关的假单胞菌(*Pseudomonas*)、弧菌(*Vibrio*)及广泛分布于海洋厌氧环境中的硫酸盐还原细菌、海洋动物体内的氧化硫内共生菌等,绝大部分属于 γ -变形菌纲和 δ -变形菌纲^[28],并且多数易于培养的细菌都在 γ -变形菌纲类群中,被认为是最大优势的海洋细菌。 ϵ -变形菌纲的细菌常存在于海洋的厌氧和热液环境中,部分与该环境中的动物形成共生关系,对碳(C)、硫(S)循环起重要作用^[29]。此研究发现变形菌纲中的 α -变形菌纲在克隆测序序列中占20%,为变形菌门中的优势类亚群,而 γ -变形菌纲占10%,为次优势亚群。据报道, α -变形菌纲的代表种类是海水中最大优势的细菌,而 γ -变形菌纲是培养方法中最常见的种类,它在分子生物学方法构建的数据库中却最不常见^[30],这与此研究结果相一致。此研究中序列ZJ-5和ZJ-28与 α -变形菌纲的SAR11簇的一个成员*Pelagibacter* sp. 亲缘关系极近。据报道16S rDNA序列的SAR11几乎分布于所有的浮游环境中,可能是海洋中最丰富的微生物,从近岸浅海到深海中均有发现,几乎占表层水微生物数量的1/3和中层区域微生物数量的1/5^[31]。此研究中克隆条带ZJ-2与弧菌属的*V. owensii* AP55处于同一进化支上,该弧菌分离自澳大利亚发病极严重的人工养殖甲壳动物体内^[32]。已有研究表明,珊瑚、鱼、虾、软体动物、海绵和浮游动物等体表和体内常生存着高密度的弧菌,弧菌具有丰富多样的生理生化功能,对生物和生态系统可能会产生重要的影响,如有些弧菌具有致病性、发光现象、固氮作用及降解几丁质和琼脂等复杂多糖类的能力^[33]。

黄杆菌属(*Flavobacterium*)是好氧或兼性厌氧的化能异养菌,归属于细菌域中的一个主要分支拟杆菌门,其最显著的特征是能够滑动并产生可降解多聚物如琼脂、纤维素和几丁质等各种胞外酶,这

些酶的产生对降解复杂的有机物质(如甲壳动物的外壳)具有非常重要的生态学意义,有些种类的胞外酶对鱼类和无脊椎动物有致病性^[31]。黄杆菌属是某些海洋生物环境中的优势类群,占细菌总量的15%~25%^[34]。此研究中黄杆菌属所占比例为30%,比前人的研究结果略高,这可能是由于不同生境中细菌群落类群比例存在一定的差距,另一个原因可能是16S rDNA的分类方法尚具有一定的缺陷所致,具体原因还待进一步研究。

近江牡蛎的养殖环境是开放式生态养殖系统,养殖微生物生态系统的可持续稳定平衡与其生长及病害发生息息相关,且养殖系统内细菌群落组成中肠道菌群绝大多数可以从水环境中找到来源^[35]。因此,整个环境微生物生态系统的平衡直接影响牡蛎体内细菌生态系统,研究养殖海区微生物生态系统的平衡是探讨牡蛎养殖系统内微生物的生态变化与预防疾病发生的基础。

参考文献:

- [1] WATANABE T, ASAKAWA S, NAKAMURA A, et al. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 232(2): 153-163.
- [2] de JOURNETT T D, ARNOLD W A, la PARA T M. The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments[J]. Appl Soil Ecol, 2007, 35(3): 648-659.
- [3] PLUSKE J R, DURMIC Z, PAYNE H G, et al. Microbial diversity in the large intestine of pigs born and reared in different environments[J]. Livestock Sci, 2007, 108(1/2/3): 113-116.
- [4] ZOETENDAL E G, AKKERMANS A D, de VOS W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3854-3859.
- [5] DÍEZ B, PEDRÓS-ALIÓ C, MARSH T L, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of dgge with other molecular techniques[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 2942-2951.
- [6] 罗鹏, 胡超群, 张吕平, 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.
- LUO Peng, HU Chaoqun, ZHANG Lüping, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial communities in marine *Litopenaeus vannamei* culture system[J]. Fish Sci China, 2009, 16(1): 31-38. (in Chinese)

- [7] 关晓燕, 周遵春, 姜冰, 等. DGGE 分析不同盐度仿刺参养殖环境中菌群多样性[J]. 水产科学, 2011, 30(5): 276–280.
- GUAN Xiaoyan, ZHOU Zunchun, JIANG Bing, et al. Environmental bacterial diversity in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture under different salinities based on DGGE fingerprint[J]. Fish Sci, 2011, 30(5): 276–280. (in Chinese)
- [8] 关晓燕, 周遵春, 陈仲, 等. 应用 PCR-DGGE 指纹技术分析高温季节仿刺参养殖水环境中菌群多样性[J]. 海洋湖沼通报, 2010(1): 82–88.
- GUAN Xiaoyan, ZHOU Zunchun, CHEN Zhong, et al. Bacteria diversity analysis on the water of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) culture pond under high-temperature season based on PCR-DGGE fingerprint technology[J]. Trans Oceanol Limnol, 2010(1): 82–88. (in Chinese)
- [9] MUYZER G, SMALLA K. Application of denaturing gradient gelelectrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. Antome Van Leeuwenhoek, 1998, 73(1): 127–141.
- [10] MUYZER G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 317–322.
- [11] 刘淮德, 王雷, 王宝杰, 等. 应用 PCR-DGGE 分析南美白对虾肠道微生物多样性[J]. 饲料工业, 2003(20): 55–58.
- LIU Huaide, WANG lei, WANG Baojie, et al. Microbial diversity analysis on *Panaeus vannamei* intestinal under high-temperature season based on PCR-DGGE fingerprint technology[J]. Feed Ind, 2003(20): 55–58. (in Chinese)
- [12] EIEHNER C A, ERB R W, TIMMIS K N, et al. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(1): 102–109.
- [13] SIGLER W V, MINIACI I C, ZEYER J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure[J]. J Microbiol Meth, 2004, 57(1): 17–22.
- [14] 杨彩霞. 两个养殖海区及栉孔扇贝消化盲囊细菌群落多样性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- YANG Caixia. Seasonal changes of bacterial community composition in two culture area and digestive diverticula of scallops, *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. (in Chinese)
- [15] 刘勇勤, 姚檀栋, 康世昌, 等. 珠穆朗玛峰地区东绒布冰川冰雪微生物群落及其季节变化[J]. 科学通报, 2006, 51(11): 1287–1296.
- LIU Yongqin, YAO Tandong, KANG Shichang, et al. Microbial community and seasonal variation of east Flannelette glacier ice and snow in Mount Everest region[J]. Sci Bull, 2006, 51(11): 1287–1296. (in Chinese)
- [16] 张俊逸. 珠江广州城市河段水质和微生物多样性特征[D]. 广州: 暨南大学, 2011.
- ZHANG Junyi. Characteristics of water quality and microbial diversity in Guangzhou city segment of Pearl River[D]. Guangzhou: Jinan University, 2011. (in Chinese)
- [17] KELLY K M, CHISTOSERDOV A Y. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island)[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(1): 85–95.
- [18] SCHAUER M, BALAGUÉ V, PEDRÓS-ALIÓ C, et al. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system[J]. Aquat Microb Ecol, 2003, 31(2): 163–174.
- [19] 姚延丹, 李谷, 陶玲, 等. 复合池塘循环水养殖系统微生物群落结构分析[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 407–415.
- YAO Yandan, LI Gu, TAO Ling, et al. Analysis of microbial community structure in an integrated pond recirculating aquaculture system[J]. Fish Sci China, 2011, 18(2): 407–415. (in Chinese)
- [20] 章洁香. 湛江湾微生物群落在不同营养梯度水体中的变化[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.
- ZHANG Jiexiang. The changes of microbial community along the different trophic gradient of seawater in Zhanjiang Bay[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2011. (in Chinese)
- [21] 杨彩霞, 王崇明, 李赞, 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[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 407–414.
- YANG Caixia, WANG Chongming, LI Yun, et al. Seasonal changes of bacterial community composition in the scallop culture area of Liuqinghe Bay studied by PCR-DGGE[J]. J Fish China, 2012, 36(3): 407–414. (in Chinese)
- [22] GRAY J P, HERWIG R P. Phylogenetic analysis of the bacteria communities in marine sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(11): 4049–4059.
- [23] LI L, KATO C, HORIKOSHI K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench[J]. Mar Biotechnol, 1999, 1(4): 391–400.
- [24] RAVENSCHLAG K, SAHM K, PERNTHALER J, et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 3982–3989.
- [25] COTTRELL M T, KIRCHMAN D L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(12): 5116–5122.
- [26] SUZUKI T, MUROGA Y, TAKAHAMA M, et al. *Roseigium denhamense* gen. nov., sp. nov. and *Roseibium hemelinense* sp. nov., aerobic bacteriochlorophyll-containing bacteria isolated from the east and west coasts of Australia[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50(6): 2151–2156.
- [27] GONZÁLEZ J M, KIENE R P, MORAN M A. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 3810–3819.
- [28] DWIS, HIRATA K, ASADA Y, et al. Utilization of cyanobacte-

- rial biomass from water bloom for bioproduction of lactic acid[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2001, 17(3): 259–264.
- [29] CAMPBELL B J, CARY S C. Characterization of a novel spirochete associated with the hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 110–117.
- [30] AUSTIN B. Marine microbiology[M]. Australia: Cambridge University Press, 1988: 29–32.
- [31] 张晓华, 李筠, 纪伟尚, 等. 海洋微生物学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007: 68–73.
- ZHANG Xiaohua, LI Jun, JI Weishang, et al. Marine microbiology[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2007: 68–73. (in Chinese)
- [32] CANO-GÓMEZ A, GOULDEN E F, OWENS L, et al. *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia [J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 302(2): 175–181.
- [33] 王淑贤. 海洋弧菌中五类溶血素基因分布及其生物学活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- WANG Shuxian. Distribution of five kinds of haemolysin genes in *Vibrios* and its correlation with haemolytic and phospholipase activities[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007. (in Chinese)
- [34] EILERS H, PERNTHALER J, GLÖCKNER F O, et al. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(7): 3044–3051.
- [35] 王铁南, 朱世伟, 常亚青. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的PCR-DGGE指纹图谱分析[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(3): 119–122.
- WANG Yinan, ZHU Shiwei, CHANG Yaqing, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial community composition in the intestine and aquaculture pond of *Aostichopus japonicus*[J]. Prog Fish Sci, 2010, 31(3): 119–122. (in Chinese)

《水产养殖》2013 年征订启事

《水产养殖》是由江苏省水产学会主办、面向国内外公开发行的技术类期刊, 先后被评为中国农业类核心期刊、中国水产类核心期刊, 江苏省“农家书屋”指定刊物、“科技入户”指定刊物, 已被《中国水产文摘》、中国期刊网、中国数字化期刊群、中文科技期刊数据库等收录。

本刊创办于1980年, 月刊, 全年12期(其中4期“学术版”)。《水产养殖》主要刊登鱼、虾、蟹、贝、藻等水生动植物的繁殖技术、养殖技术及病害防治技术等, 注重实用性和可操作性。《水产养殖》“学术版”主要面向各级水产管理人员、科技人员和有关大专院校的师生, 及时报道我国水产业的最新研究成果和国内外科研动态。

《水产养殖》正文56页, 大16K, 定价: 5元/本, 全年60元。您可以通过邮局或直接汇款到编辑部订阅。国内发行: 全国各地邮局; 海外发行: 中国出版对外贸易总公司(北京782信箱), 邮发代号: 28–67。

地址: 江苏省南京市茶亭东街79号《水产养殖》编辑部 邮编: 210017

电话: 025–86581551 传真: 025–86581550

网站: <http://www.aquacu.com> 邮箱: aquaculture@china.com

联系人: 韩飞, 李濛