

池塘养殖和海上吊笼养殖仿刺参肠道菌群结构对比分析

陆振¹, 杨求华², 黄瑞芳², 林琪², 何丽斌², 葛辉², 周宸², 杜虹¹

(1. 汕头大学生物系, 广东 汕头 515063; 2. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013)

摘要:实验采用平板分离及16S rDNA序列分析法研究池塘养殖和海上吊笼养殖仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的前肠、中肠和后肠菌群结构并进行对比分析。结果显示,从海上吊笼养殖的仿刺参的肠道内分离鉴定的240株菌株分属于3个门、11个属和34个种。从池塘养殖仿刺参的肠道内分离鉴定的211株菌株分属于3个门、11个属和49个种。两种养殖模式仿刺参肠道菌群结构存在较大差异,且同一仿刺参肠道各部分之间的菌群结构也存在较大的差异。海上养殖仿刺参的肠道优势菌群为弧菌属(*Vibrio*)、*Formosa*属、希瓦氏菌属(*Shewanella*),池塘养殖仿刺参的肠道内优势菌群为弧菌属(*Vibrio*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、喜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)。两个菌群共有菌株有7个种,存在于在不同的肠道部位。两种养殖模式比较发现池塘养殖仿刺参的肠道菌群的丰富度大于海上吊笼养殖的仿刺参,且池塘养殖仿刺参肠道内芽孢杆菌(*Bacillus*)等益生菌的占比较高,海上吊笼养殖仿刺参分离得到较多的弧菌属(*Vibrio*)细菌。本研究可为南方仿刺参人工养殖中潜在益生菌的筛选提供基础资料。

关键词:海洋生物学;仿刺参;16S rDNA;肠道菌群结构;池塘养殖;海上吊笼养殖

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2017. 02. 005

中图分类号:P735

文献标识码:A

文章编号:2095-4972(2017)02-0187-08

动物的肠道内存在数量庞大的微生物,这些微生物与动物之间是一个相互依存的整体,对动物的消化吸收、代谢调节、免疫调控等方面有着重要的作用^[1]。肠道内的微生物群落是肠道内环境稳定的重要组成部分,研究肠道微生物群落与宿主的关系有助于提高水产动物对食物的利用效率和重量^[2-4]。仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又名刺参,沉积食性,是中国可食用海参中品质最好、价值最高的品种,在中国的分布地主要为山东半岛和辽东半岛沿海。肠道细菌对仿刺参的食物来源、消化吸收起重要作用,刺参需要的70%以上的能量与细菌有关^[5-6]。近年来,每年的11月到翌年的4月“北参南养”在福建地区(霞浦、莆田)养殖仿刺参的规模每年递增^[7],2014年全国的海参产量为200 969 t,福建省的产量为22 227 t。宁德市霞浦县仿刺参海上吊笼养殖规模

约达到15万箱,成为霞浦冬季重要的经济养殖品种^[8-9]。迄今为止有关于南方养殖仿刺参肠道细菌群落结构的研究很少,研究多见于北方养殖仿刺参。

本研究采用培养法对福建地区养殖仿刺参的前肠、中肠和后肠的肠壁和内容物的细菌群落结构进行分析,并用16S rDNA序列对分离的细菌进行分子鉴定^[10-11]。研究结果将有助于了解福建地区养殖仿刺参的肠道细菌群落结构,对于开发适合福建本土益生菌提供菌株资源。

1 材料和方法

1.1 仿刺参来源

实验所用仿刺参分别取自福建省宁德市霞浦县海上吊笼仿刺参养殖场和福建省莆田市城厢区灵川镇太湖村福建省太湖农业开发有限公司,选择养殖周期相同,体质健壮、体表无损伤、体色正常,平均体

收稿日期:2016-06-13

基金项目:福建省科技计划资助项目(2014R1003-1);福建省海洋高新技术产业发展专项资助项目(闽海洋高新[2015]29号)

作者简介:陆振(1992~),男,硕士研究生;E-mail:14zhu@stu.edu.cn

通讯作者:周宸(1961~),男,教授级高工;E-mail:cedafj@fjcs.ac.cn;杜虹(1976~),女,教授;E-mail:hdu@stu.edu.cn

重在 250 ± 10 g 的个体用于实验研究. 采集仿刺参肠道样品时间为 2015 年 3 月 18 日.

1.2 试剂、耗材和仪器

实验所用试剂、耗材、仪器包括:2216E 培养基; 无菌水;0.9% (*m/m*) 生理盐水;75% (*V/V*) 酒精; 30% (*V/V*) 生理盐水甘油;培养皿;三角烧瓶;无菌吸管;解剖剪;冻存管;研钵;生化培养箱;PCR 仪器;电泳仪.

1.3 取样方法

将取回的仿刺参在取样前暂养在实验室,暂养用水取自其养殖场. 取样解剖前饥饿 24h. 从 2 个养殖箱中随机选取 10 头仿刺参,解剖前测量体长、体重. 先用无菌生理盐水(0.9%)冲洗仿刺参的表皮, 无菌环境下,用灭菌解剖剪剪开刺参的体壁,取出刺参整个肠道,将其分为前肠、中肠和后肠. 用灭菌生理盐水冲洗肠道外壁,挤出肠道内容物. 将采集的刺参的肠道内容物和肠壁分别置于无菌试管中. 编号为海上养仿刺参前肠肠壁(HQB)、海上养仿刺参前肠内容物(HQN)、海上养仿刺参中肠肠壁(HZB)、海上养仿刺参中肠内容物(HZN)和海上养仿刺参后肠肠壁(HHB)、海上养仿刺参后肠内容物(HHN),池塘养仿刺参前肠肠壁(CQB)、池塘养仿刺参前肠内容物(CQN)、池塘养仿刺参中肠肠壁(CZB)、池塘养仿刺参中肠内容物(CZN)和池塘养仿刺参后肠肠壁(CHB)、池塘养仿刺参后肠内容物(CHN).

1.4 肠道菌群培养及细菌 16S rDNA PCR 扩增

取得的样品分别置于灭菌过的研钵内,充分研磨 5 min 使样品均匀成浆. 用无菌生理盐水对样品进行梯度倍比稀释至 1×10^{-6} ,用旋涡振荡器振荡各稀释度样品 30s. 选取 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 5 个浓度梯度样品液各 100 mm³ 涂布 2216E 平板,28℃ 条件下培养 5 d,每个浓度下设置 3 个重复. 5 d 后进行菌落计数,选择细菌菌落数在 30~300 个的平板,随机挑取 40 个单菌落并编号,在 2216 E 培养基上多次划线分离纯化,直到得到纯种菌株为止. 将得到的纯种菌株保存于 -80℃ 备用.

在 50 mm³ 离心管内加入 20 mm³ 的双蒸水,将分离纯化的菌种用灭过菌的枪头挑取单菌落放入的离心管中,在 PCR 仪器上设定 99.9℃ 10 min 使其裂解. 引物为通用引物 27F :5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3',1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC TT-3',PCR 扩增条件为: 94℃ 5 min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 90s, 重复 35 次;72℃ 7 min.

1.5 肠道菌的鉴定

PCR 产物送广州英潍捷基公司测序,测得序列用 NCBI 的数据库进行序列比对,获得与本研究所得序列相似性最高(序列匹配在 99% 以上)的序列,用于目的序列的分类确定其物种,并将所得序列提交到 NCBI 的 GenBank 核苷酸序列数据库. 应用 MEGA4.1 软件的邻位相接法进行系统发育的分析.

2 结果

2.1 南移仿刺参肠道菌群结构

从 2 种养殖模式的南移仿刺参的肠道内共分离得到 451 株细菌,从每个样品中随机挑选 40 个单菌落,经 16S 鉴定去除重复菌株,得到 78 个不同的细菌,分属 20 个不同的属,4 个细菌门,分别为拟杆菌门(Bacteroidete)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria). 池塘养殖仿刺参肠道菌群有 3 个门分别为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes),占比分别为 0.95%、62.56%、36.49% (表 1). 海上吊笼养殖仿刺参肠道菌群有 3 个门分别为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidete),占比分别为 92.08%、1.67%、6.25%.

表 1 实验样品在门水平上的细菌丰度
Tab.1 Bacterium abundance of the Phylum from the samples

分类	丰度/%	
	海上养殖仿刺参	池塘养殖仿刺参
变形菌门(Proteobacteria)	92.08	62.56
放线菌门(Actinobacteria)	0.00	0.95
厚壁菌门(Firmicutes)	1.67	36.49
拟杆菌门(Bacteroidete)	6.25	0.00

2.2 两种养殖模式仿刺参的肠道不同部位的菌群分布

2.2.1 池塘养殖仿刺参肠道的菌群分布 从池塘养殖仿刺参的肠道内共分离鉴定得到 211 株菌,属于 11 个属 49 个种,所得序列上传到 NCBI. 前肠肠壁(CQB)上得到 19 株菌,分属 9 个属(表 2).

从池塘养殖仿刺参的前肠肠壁上(CQB)分离得到 9 个属. 从前肠的内容物(CQN)分离的多为芽孢杆菌属(*Bacillus*),占比为 81%,从中肠的内容物(CZN)上分离的菌中弧菌属(*Vibrio*)占比为 94.3% (表 3). 弧菌属、芽孢杆菌属、喜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*) 在池塘养殖仿刺参肠道内占比较重.

表 2 池塘养殖仿刺参肠道菌群分布

Tab.2 Distribution of the intestinal flora of sea cucumber cultured in ponds

肠道组织部位	菌株数/株	种数/个	属数/个	NCBI 序列号
CQB	34	19	9	KR347210—KR347240 ,KT023500—KT023502
CQN	32	14	4	KR347298—KR347303 ,KR347305—KR347318 , KR347320—KR347322 ,KT023553—KT023558
CZB	39	17	6	KR347323—KR347345 ,KT023503—KT023518
CZN	35	11	2	KR347241—KR347272 ,KT023519—KT023520 ,KT023559
CHB	35	11	4	KR347273—KR347297 ,KT023541—KT023550
CHN	36	14	4	KR347175—KR347209 ,KT023551
总计	211	49	11	

表 3 池塘养殖仿刺参不同肠道部位的菌群丰度

Tab.3 Flora abundance in different parts of intestine of sea cucumber in ponds

分类	丰度/%					
	CQB	CQN	CZB	CZN	CHB	CHN
弧菌属 (<i>Vibrio</i>)	47.0	9.5	41.0	94.3	65.5	66.6
芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	5.9	81.0	2.6	0.0	8.6	2.8
嗜冷单胞菌属 (<i>Psychromonas</i>)	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
喜盐芽孢杆菌属 (<i>Halobacillus</i>)	14.9	6.4	33.0	5.7	23.0	25.0
产微球茎菌属 (<i>Microbulbifer</i>)	8.8	3.1	0.0	0.0	2.9	0.0
海水浴杆菌属 (<i>Thalassobacillus</i>)	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
拟诺卡氏菌属 (<i>Nocardiosis</i>)	0.0	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0
类芽孢杆菌 (<i>Pontibacillus</i>)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6
<i>Thalassomonas</i> 属	5.9	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0
<i>Octadecabacter</i> 属	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
链霉菌属 (<i>Streptomyces</i>)	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
枝芽孢杆菌属 (<i>Virgibacillus</i>)	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
别弧菌属 (<i>Aliivibrio</i>)	0.0	0.0	13.0	0.0	0.0	0.0

2.2.2 海上养殖仿刺参肠道的菌群分布 从海上养殖仿刺参的肠道分离培养得到 240 株菌,分属 11 个属 34 个种(表 4、图 1)。在后肠的内容物内分离得

到 20 种菌,分属于 7 个属。而在后肠的肠壁上仅仅分离到 9 个菌种,都属于弧菌属 (*Vibrio*)。

表 4 海上养殖仿刺参肠道菌群分布

Tab.4 Distribution of intestinal flora in sea cucumber insuspension cage

部位	菌株数/株	种数/个	属数/个	NCBI 序列号
HQB	32	11	5	KR270229—KR270255 ,KT023529—KT023532 ,KT023560
HQN	49	9	3	KR270283—KR270328 ,KT023533—KT023534 ,KT023561
HZB	31	16	6	KR270256—KR270282 ,KT023535—KT023537 ,KT023562
HZN	44	11	3	KR270110—KR270149 ,KT023538—KT023540 ,KT023563
HHB	39	9	1	KR270192—KR270228 ,KT023521—KT023522
HHN	45	20	7	KR270153—KR270191 ,KT023523—KT023528
总计	240	34	11	

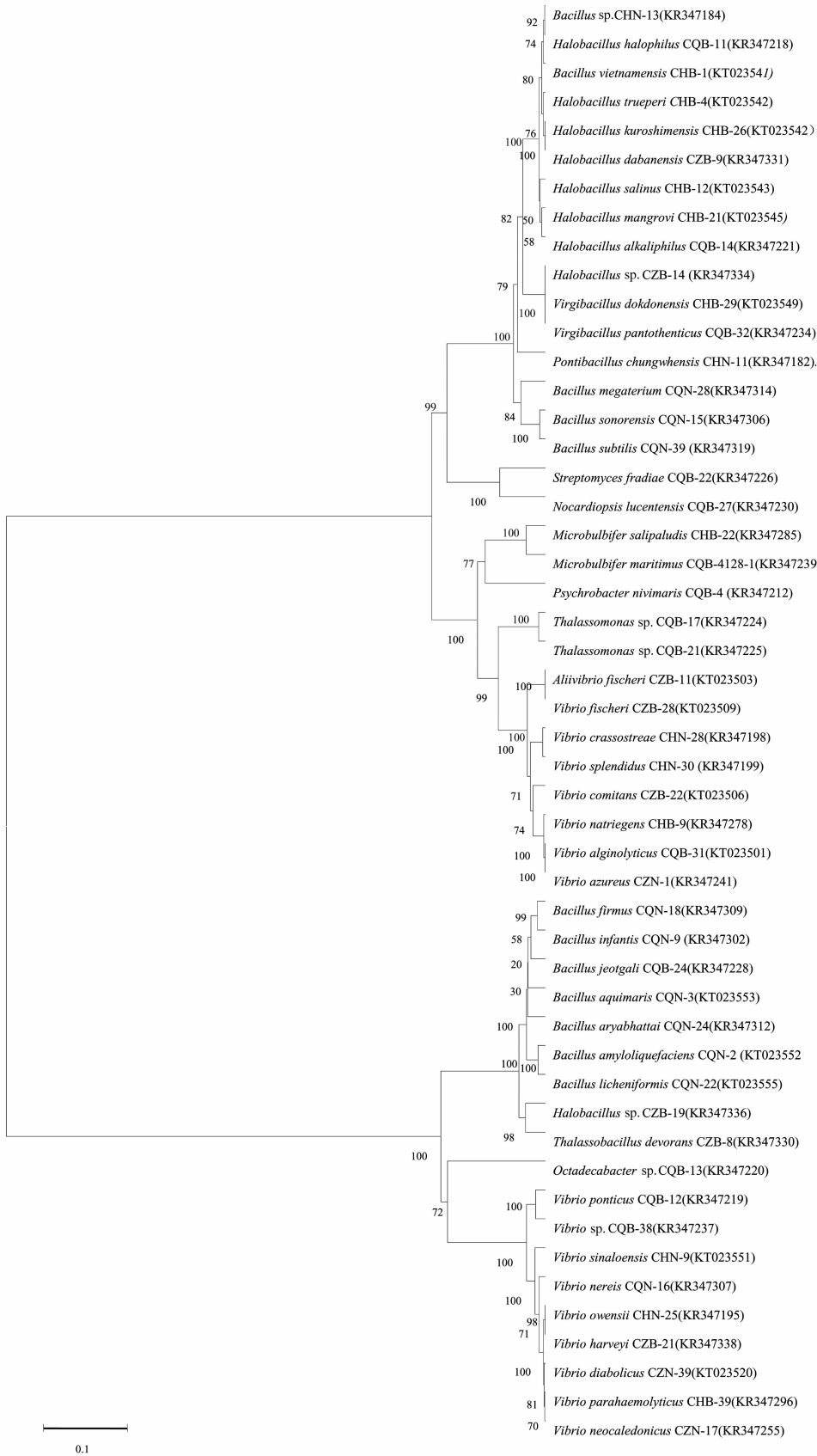


图 1 池塘养仿刺参肠道菌群系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the intestinal flora of sea cucumber cultured in ponds

从海上吊笼养殖仿刺参的肠道内分离培养的细菌中弧菌属占有较高的比例,在后肠的肠壁上的占

比为 100% (表 5、图 2). 弧菌属在其他肠道部分都是优势菌群. 从海上吊笼养殖仿刺参的中肠内容物中分离得到喜盐芽孢杆菌, 从后肠内容物中分离到

Lacinutrix 属. 分离得到的细菌不同, 说明每个部位特有的细菌可能对海上吊笼养殖仿刺参肠道的功能具有一定的影响.

表 5 海上吊笼养殖仿刺参不同肠道部位的菌群丰度
Tab. 5 Flora abundance in different parts of sea cucumber cultured in raft culture

分类	丰度/%					
	HQB	HQN	HZB	HZN	HHB	HHN
弧菌属 (<i>Vibrio</i>)	81.0	96.0	64.5	90.9	100.0	64.6
<i>Formosa</i> 属	3.1	2.0	12.9	0.0	0.0	11.0
希瓦氏菌属 (<i>Shewanella</i>)	6.4	2.0	9.7	0.0	0.0	11.0
交替单胞菌目 (<i>Alteromonadales</i>)	6.4	0.0	3.2	0.0	0.0	2.2
芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	0.0	0.0	0.0	6.8	0.0	0.0
噬纤维菌属 (<i>Cellulophaga</i>)	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5
噬琼胶菌属 (<i>Agarivorans</i>)	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	0.0
嗜冷单胞菌 (<i>Psychromonas</i>)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5
喜盐芽孢杆菌属 (<i>Halobacillus</i>)	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0
<i>Lacinutrix</i> 属	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2
鲁杰氏菌属 (<i>Ruegeria</i>)	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0

通过传统培养法培养福建地区养殖仿刺参的肠道菌群发现, 从 2 种养殖模式的南移仿刺参的肠道内共分离得到 451 株细菌, 分属 4 个细菌门, 分别为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidete), 20 个不同的属, 76 个不同的种. 其中, 从海上吊笼养殖的仿刺参的肠道内分离鉴定菌株 240 株有 11 个属, 34 个不同的种. 从池塘养殖仿刺参肠道内分离鉴定 211 株菌株有 11 个属, 49 个不同的种.

3 讨论

2 种养殖模式仿刺参肠道菌群结构存在较大差异, 且同一仿刺参肠道各部分之间的菌群结构也存在较大的差异. 在陆振等 (2016) 对南移仿刺参的肠道菌群结构进行的研究中发现拟杆菌门的 *Formosa* 属在后肠占比例较高^[12]. 本研究中也 在海参肠道的前、中、后肠中发现 *Formosa* 属, 其中后肠内容物发现最多有 5 株菌株 2 个种 *Formosa arctica*、*Formosa undariae*. *Formosa* 属是近年来由 Ivanova 等 (2004) 新发现的属^[13], 特性为异养型, 革兰氏阴性菌, 耐盐, 能够分解糖^[14-15]. 从福建海上吊笼养殖仿刺参的肠道中分离的菌中弧菌属占有较高的比例, 海上吊笼养殖采用饲料投喂的方式喂养海参, 单一的食物来源导致海参的肠道菌群的丰富度低, 且弧菌的

含量较高. 池塘养殖仿刺参肠道菌群有三个门, 分别为放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes), 变形菌门中占比较高的是弧菌属, 厚壁菌门占比较高的是芽孢杆菌属. 当厚壁菌门在肠道内为优势菌群时, 有助于宿主分解代谢营养物质, 多种与淀粉降解酶有关基因在厚壁菌门的细菌内被发现^[16-17]. 芽孢杆菌属的细菌多为益生菌, 有助于生物的健康生长.

仿刺参肠道内不同的部位的肠道菌群结构是不同的. 从海上养殖仿刺参的肠道内分离到了较多的弧菌, 而溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、灿烂弧菌 (*V. splendidus*) 等多为水产养殖中的病原菌. 在海上养殖的仿刺参多以饲料投喂为主, 而池塘养殖仿刺参是与虾混合养殖, 在自然环境中以池塘底泥为食物来源, 这样其肠道内的有益菌含量就较高, 菌群结构较为复杂, 对病原菌的拮抗作用较强. 分析陆振等 (2016) 等所做的研究也可发现池塘养仿刺参肠道的菌群丰富度比海上养殖的高^[12], 且芽孢杆菌等有益菌占比也较高. 芽孢杆菌在水产动物中作为益生菌已得到普遍的应用^[18-19]. 大量研究结果表明其在水产养殖中可以增加芽孢杆菌在水体以及动物肠道中的比例, 并且可以抑制有害菌的生长, 从而提高水产动物的产量^[20-22]. Decamp 等 (2008) 研究了芽孢

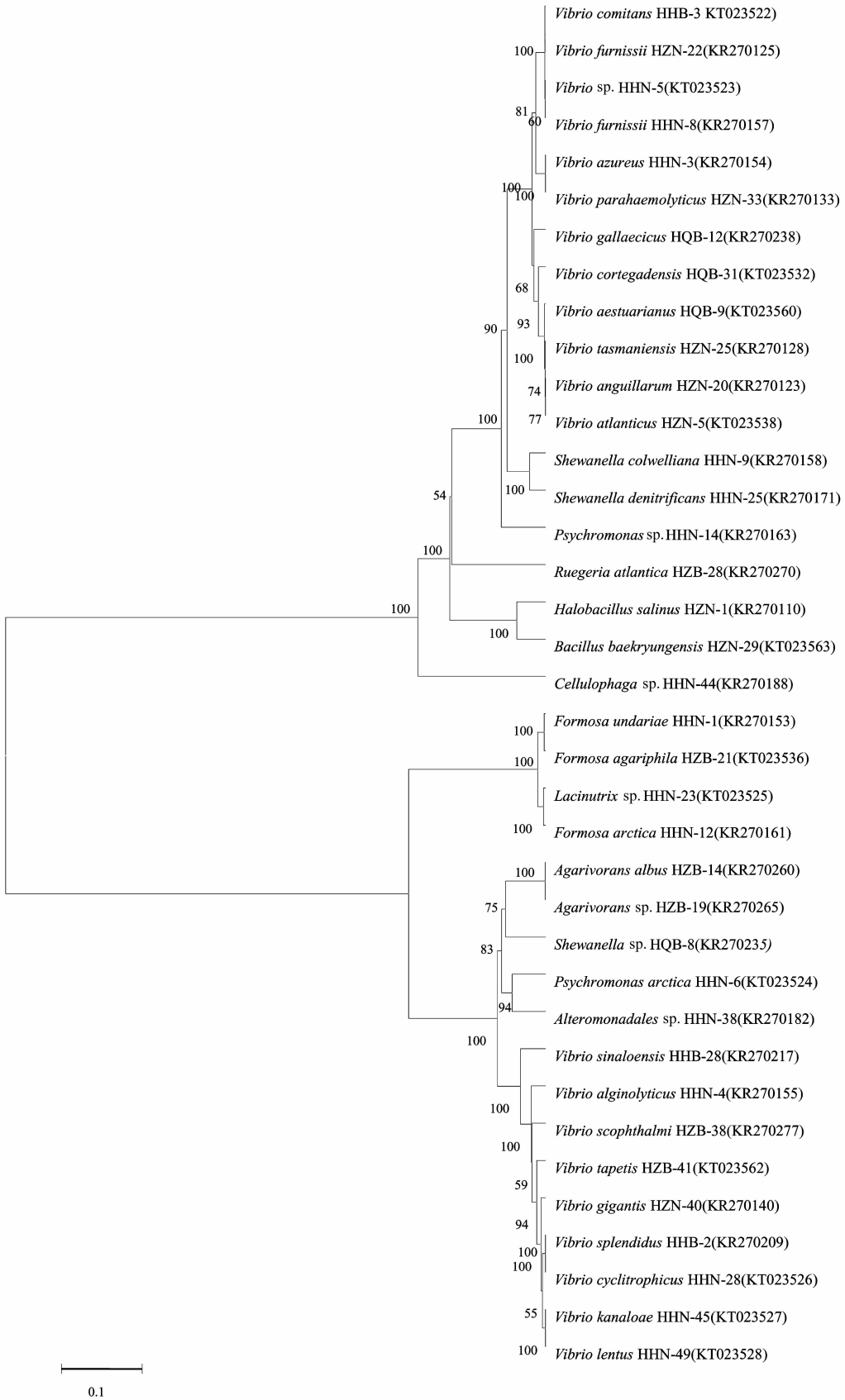


图 2 海上养殖仿刺参肠道菌群系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of intestinal flora of sea cucumber cultured in suspension cage

杆菌添加物在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 育苗生产中替代抗菌

药物的良好效果^[23]。

从海上养殖仿刺参的肠道内分离菌株,其中从后肠内容物(HHN)中分离到20种不同的菌株,显示菌群丰富度最高。从池塘养殖仿刺参的前肠肠壁(CQB)分离到19种不同的菌株,显示前肠肠壁(CQB)上的菌群丰富度最高。有资料指出,海参的后肠是行使吸收和代谢营养物质的功能,对摄取物质进行酶消化主要发生在前肠^[24-25]。所以仿刺参在前肠和后肠大量不同的细菌具有不同的功能。

生物的肠道菌群的结构会受到宿主的生理状态的影响,消化道的微生物菌群是肠道内环境的一部

分,消化道菌群结构的变化会影响仿刺参的生理状态。迄今为止,有关南方养殖仿刺参肠道微生物菌群的研究还很少^[26-27]。仿刺参在福建养殖是近年来开展的,但是关于仿刺参方面的研究报道较少。关于仿刺参肠道的报道多是关于北方养殖的,本文选用传统培养基培养法对福建地区两种养殖模式的仿刺参肠道内可培养细菌进行研究,这些肠道细菌有助于对南方养殖仿刺参益生菌制剂的开发。且在今后的研究中结合高通量测序、分子技术手段将有助于发现仿刺参肠道内细菌群落在仿刺参摄食、免疫、疾病等生理过程中的作用。

参考文献:

- [1] 高菲. 刺参 *Apostichopus japonicus* 营养成分、食物来源及消化生理的季节变化[D]. 青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2008.
- [2] Mackie R I, White B A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output[J]. *Journal of Dairy Science*, 1990, 73(10):2 971-2 995.
- [3] Hegarty R S, Goopy J P, Herd R M, et al. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production[J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85(6):1 479-1 486.
- [4] Zhou M, Hernandez-Sanabria E, Guan A L L. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(20):6 524-6 533.
- [5] 廖玉麟. 中国动物志:棘皮动物门. 海参纲[M]. 北京:科学出版社,1997:48-152.
- [6] 隋锡林. 日本鲍、海胆、海参增养殖技术现状[J]. *水产科学*, 1987(3):30-35.
- [7] 杨求华, 葛辉, 方旅平,等. 池塘养殖刺参病原菌塔式弧菌的分离与鉴定[J]. *南方水产科学*, 2014(4):45-51.
- [8] 葛辉, 何丽斌, 林琪,等. 福建海区网箱养殖刺参“腐皮综合症”病原分析与鉴定[J]. *福建水产*, 2012, 34(2):105-110.
- [9] 赵兴武. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2015:7-8.
- [10] 黄诗婷, 陈荣元, 刘克韶,等. 四个拟穴青蟹养殖池水环境中细菌群落结构的比较研究[J]. *应用海洋学学报*, 2012, 31(3):387-395.
- [11] Martínezmurcia A J, Antón A I, Rodríguezvalera F. Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multi gene family of *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(2):601-610.
- [12] 陆振, 杨求华, 林琪,等. 福建吊笼养殖仿刺参肠道菌群结构分析[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(3):9-14.
- [13] Ivanova E P, Alexeeva Y V, Flavie S, et al. *Formosa algae* gen. nov. sp. nov. a novel member of the family *Flavobacteriaceae*[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(3):705-711.
- [14] Nedashkovskaya O I, Kim S B, Vancanneyt M, et al. *Formosa agariphila* sp. nov. a budding bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from marine environments, and emended description of the genus *Formosa*[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(1):161-167.
- [15] Yoon B J, Oh D C. *Formosa spongicola* sp. nov. isolated from the marine sponge *Hymeniacidon flavia*[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(2):330-333.
- [16] Fouts D E, Szpakowski S, Purushe J, et al. Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(11):e48289.
- [17] Sonnenburg J L, Xu J, Leip D D, et al. *Glycan foraging* in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont[J]. *Science*, 2005, 307(5 717):1 955-1 959.
- [18] Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull J F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1/3):259-270.
- [19] Hong H A, Duc L H, Cutting S M. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(4):813-835.
- [20] Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immuno stimulatory effect in *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2004, 233(1/4):1-14.

- [21] Ziaieinejad S, Rezaei M H, Takami G A, et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2006, 252(2/4):516-524.
- [22] Blain Kennedy S, Tucker J W, Neidig C L, et al. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish; a case study with common snook(*Centropomus undecimalis*)[J]. Bulletin of Marine Science, 1998, 62(2):573-588.
- [23] Decamp O, Moriarty D J W, Lavens P. Probiotics for shrimp larviculture:review of field data from Asia and Latin America [J]. Aquaculture Research, 2008,39(4):334-338.
- [24] Filimonova G F, Tokin I B. Structural and functional peculiarities of the digestive system of *Cucumaria frondosa* (Echinodermata; Holothuroidea)[J]. Marine Biology, 1980, 60(1):9-16.
- [25] Khripounoff A, Sibuet M. Nutrition of deep-sea echinoderms. 2. Feeding of holothuroids[J]. Marine Biology, 1980, 60(2):17-26.
- [26] Ward-Rainey N, Rainey F A, Stackebrandt E. A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra*[J]. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology, 1996, 203(1):11-26.
- [27] 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.

Comparative analysis of intestinal microflora sea cucumber cultivated in ponds and sea suspension cages

LU Zhen¹, YANG Qiu-hua², HUANG Rui-fang², LIN Qi², HE Li-bin², GE Hui², ZHOU Chen², DU Hong¹

(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China; 2. Fisheries Research Institute of Fujian Province, Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian, Xiamen 361013, China)

Abstract: The intestinal flora is essential in shaping many of its host's functional attributes. The microbial community structure in gut, including anterior intestine, middle intestine and posterior intestine of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), was studied by 16S rDNA sequence analysis. The results showed that 240 strains were identified from *A. japonicus* in suspension cage closely relating to 3 Phylum, 11 genera and 34 different species. from the cultivated sea cucumbers in suspension cage. Similarly, 211 strains were relating to 3 Phylum, 11 genera and 49 different species from the sea cucumbers in ponds. The structures of flora were quite different between each part of intestinal, and microflora populations of the entire gut and between the sea cucumbers from ponds and suspension cage were quite different. *Vibrio*, *Formosa* and *Shewanella* were predominant flora in the gut of sea cucumber in suspension cage. *Vibrio*, *Bacillus* and *Halophilous* were predominant flora the gut of sea cucumber from in pond. There were 7 bacteria, which not only existed in the intestinal of sea cucumber in ponds but also existed in the gut of sea cucumber from suspension cage. However they dwelled in different parts of intestines. The species abundance in the gut of sea cucumber from ponds was significantly higher than those in suspension cage. The number of *Bacillus* and other probiotics were also higher.

Key words: marine biology; *Apostichopus japonicus*; 16S rDNA; intestinal microflora; pond culture; sea suspension cage culture

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2017.02.005

(责任编辑:肖 静)