

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

刘玉春, 周志刚, 石鹏君, 何凤旭, 姚斌, 韩少锋

(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要:采用免培养的 16S rDNA 梯度凝胶电泳技术(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)对海水网箱养殖青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃和体表粘附菌群结构进行了比较分析。结果表明青石斑鱼鳃粘附菌群结构相对简单,存在绝对优势种群,体表粘附菌群结构较为复杂,无绝对优势种群,聚类分析表明青石斑鱼鳃与体表粘附菌群结构存在较大差异性(相似度 52%),而个体间鳃或体表的粘附菌群结构相似性较好。测序结果表明青石斑鱼鳃与体表粘附菌群以未培养菌为主,鳃的绝对优势菌为 *Pantoea* sp., 体表相对优势菌为 *Meiothermus* sp.、Uncultured *Acinetobacter* sp.、*Wautersiella falsenii* 与未培养菌,提示在生产实践中采用复合菌制剂似乎更为可行。PCR-DGGE 技术能区别青石斑鱼鳃与体表粘附菌群的多样性,在可定植益生菌筛选上具指导意义。

关键词:青石斑鱼; DGGE; 粘附菌群; 指纹图谱

中图分类号: S962.3+2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2008)01-0081-06

The Comparative Analysis of the Attached Bacterial Flora in the Gill and Body Surface of *Epinephelus awoara* in Cages by PCR-DGGE

LIU Yu-chun, ZHOU Zhi-gang, SHI Peng-jun, HE Su-xu, YAO Bin, HAN Shao-feng

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Comparative analysis of the attached bacterial flora in the gill and body surface of *Epinephelus awoara* cultured in cages over sea was conducted by 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that the structure of those of the attached bacterial flora in the gill was relatively simple with absolute predominant bacterial species, and the structure in the body surface was relatively complicate without absolute predominant species. The cluster analysis showed that bigger difference (52% similarity) existed between the structure of the attached bacterial flora in the gill and body surface. However, higher similarity was found between different individual samples. The sequences show the attached bacterial flora in the gill and body surface were dominated by uncultured bacteria, and the absolute predominant bacterium in the gill was *Pantoea* sp. and the predominant bacteria in the body surface were *Meiothermus* sp., uncultured *Acinetobacter* sp., *Wautersiella falsenii* and another uncultured bacterium, which indicated that the combined prebiotics might be practical in production. The present study validated that the technique of PCR-DGGE could differentiate the variety of the attached bacterial flora in the gill and body surface in *Epinephelus awoara*, and could help to screen the planting-prebiotics in marine finfish culture.

Key words: *Epinephelus awoara*; DGGE; attached bacterial flora; fingerprint

石斑鱼是我国海水养殖的名贵品种之一,近年来养殖规模不断扩大。然而,由于海水养殖环境不断恶化、海水环保饲料的低普及率及种质质量的下降,养殖石斑鱼的疾病暴发时有报道,给养

殖户造成重大经济损失,也影响到居民的优质动物蛋白质供给。抗生素及化学药剂在水产养殖中逐步被禁用与慎用,安全的防病与治病替代手段彰显珍贵^[1]。病原菌侵染鱼类宿主的第一步是

收稿日期:2007-10-29;修回日期:2007-11-26

基金项目:中央级科研院所社会公益研究专项项目(2005DIB4J038)资助。

作者简介:刘玉春,硕士研究生,从事水产微生物学研究。通讯作者:姚斌,研究员,博士,博士生导师,从事微生物工程研究。Tel: 010-68975127; E-mail: yaobin@mail.caas.net.cn。周志刚,副研究员,博士,硕士生导师,主要从事水产动物营养与饲料研究。

粘附,而鱼类体表与鳃作为鱼体的第一道防御屏障,其健康个体的正常粘附菌群必然在抵抗病原菌侵染方面扮演着重要角色,因此,解构健康石斑鱼个体的体表与鳃的优势粘附菌群将有助于筛选集约化养殖用的益生菌。青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 是我国养殖石斑鱼的代表性品种,本文以海水网箱养殖青石斑鱼为研究对象。

常规的平板培养法在微生物学研究上存在很多局限性,因此变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 作为一种免培养的微生物分析手段已经逐步引起人们的重视^[2]。DGGE 最早是应用于染色体 DNA 点变异检测的方法,主要原理^[3]是:在含有线性浓度递增的变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的聚丙烯酰胺凝胶电泳中,部分解链的双链 DNA 分子的电泳迁移率降低;而序列不同的 DNA 分子有着不同的解链行为,它们在凝胶的不同位置停止迁移,从而使长度相同而序列不同的 DNA 片段分离。1993 年 Muyzer 等首先将 DGGE 方法应用于微生物生态研究^[4],之后 DGGE 及温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) 技术^[5]便在微生物生态学领域迅速发展,并在近 10 年里被广泛应用于环境微生物生态的研究,如活性污泥^[6,7]、食品微生物^[8]、动物肠道^[9]、底泥^[10]等不同环境样品中的微生物多样性检测和种群演替的分析,并与其他分子生态学技术结合,将微生物生态学、尤其是环境微生物学的研究引入了新的阶段。

本文在国际上首次应用 PCR-DGGE 技术研究海水网箱养殖青石斑鱼鳃及体表粘附菌群的多样性,为鱼鳃及体表可定植益生菌的筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品准备

两尾健康青石斑鱼(A 样与 B 样,体重约 1 kg),2006 年 4 月随机取自广东省湛江市霞山区同一海水养殖网箱,取样时水温 26℃、海水盐度 30‰,取样前网箱养殖青石斑鱼以投喂冰鲜鱼为食,每天投喂 2 次,取样当天没有投喂。取样时用抄网迅速将鱼从网箱中捞出,剪刀敲击头部致死,随后将鱼置于灭菌塑料密封袋内,保存在冰块

中,3 h 内转移到实验室,12 h 内处理鱼样。在无菌操作台上进行鱼样处理,用解剖剪取部分鳃丝及鱼体表皮,用 PBS 缓冲液反复冲洗 3 次^[2],装入样品管,然后在 -20℃ 条件下保存待分析。

1.2 总 DNA 提取

总 DNA 提取方法参照 Yu 和 Morrison 方法^[11],在无菌操作台称取约 0.25 g 样品置于 2 mL 裂解管,加入 1 mL 裂解缓冲液(500 mol·L⁻¹ NaCl,50 mol·L⁻¹ Tris-HCl[pH8.0],50 mol·L⁻¹ EDTA 及 4% SDS,灭菌 121℃,20 min),再加入 0.3 g 直径 0.1 mm 和 0.1 g 直径 0.5 mm 氧化锆珠;珠磨仪 (Mini-Beadbeater™, USA) 振荡 3 min;70℃ 水浴 15 min;4℃ 16 000 g 离心 5 min,将上清倒入 2 mL 离心管中;加入 300 μL 新鲜裂解液到裂解管中,重复以上步骤,合并两次上清。

在合并的上清中加入 260 μL 10 mol·L⁻¹ (NH₄)₂COOH 溶解产物,混匀,冰浴 5 min。4℃ 16 000 g 离心 10 min。将上清移入两个 1.5 mL 离心管中,每个管中加等体积异丙醇沉淀,冰浴 30 min。4℃ 16 000 g 离心 15 min,吸取上清,加入 70% 乙醇洗 DNA 沉淀,真空干燥 3 min。最后用 100 μL TE[pH 8.5] 溶解 DNA,并合并两管中 DNA。

在粗 DNA 样品中加入 12 μL RNA 酶(10 mg·mL⁻¹),37℃ 水浴 15 min。再加入 20 μL 蛋白酶 K,70℃ 水浴 10 min。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),混匀,离心 5 min,将上清液转入另一只离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1) 抽提上清液,9 000 rpm 离心 5 min 后,在上清液中加入 0.6 倍体积异丙醇,4℃ 过夜沉淀,12 000 rpm 离心 15 min,弃上清液,70% 冰乙醇清洗两次,无菌风吹干,用 100 μL TE 缓冲液溶解沉淀得到总 DNA 的粗提液。取约 50 μL DNA 样品按 Cycle-Pure DNA 纯化试剂盒操作。取 5 μL 样品,0.8% DNA 琼脂糖电泳检测。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 针对 16S rDNA v3 区片段的 PCR 扩增
将抽提所得总 DNA 进行适当稀释后作为模板扩增目的片段,使用引物为 16S rDNA 中 V3 区特异性引物^[12] BV₃F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGG-GCGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGG-AGGCAGCAG-3',其中 5' 包含 40 对 GC 夹子) 和 BV₃R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG -3')。50 μL

PCR 反应体系:5.0 μL 10 \times buffer (200 mol \cdot L⁻¹ Tris-HCl [pH8.4], 200 mol \cdot L⁻¹ KCl, 100 mol \cdot L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 15 mol \cdot L⁻¹ MgCl₂), 4.0 μL dNTPs, 1.5 mol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 8.0 μL 0.1% BSA, 0.5 μL TaqE 2.5 U \cdot μL^{-1} , 50 ng 模板 DNA, 0.5 μL 引物 BV₃F, 0.5 μL 引物 BV₃R, 然后用 dd H₂O 调整至 50 μL 。实验设置不添加模板的阴性对照组。

1.3.2 PCR 反应条件 采用降落式 PCR 反应程序^[13]:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 进入降落程序, 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 65 $^{\circ}\text{C}$ ~ 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 再进入以下循环 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后取 3 μL 反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 PCR 产物琼脂糖电泳回收纯化 取全部样品在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测 (100 V, 30 min), 紫外灯下切胶。

按 Cycle-Pure DNA 纯化试剂盒操作回收凝胶中的 DNA 片段。反应结束后取 3 μL 回收产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测及定量。

1.4 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

采用 BIO-RAD 公司 Dcode™ 基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离。使用梯度混合装置, 制备 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 40% 到 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物), 其中变性剂和丙烯酰胺的浓度从胶的上方向下方依次递增。待变性梯度胶完全凝固后, 将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 取 PCR 产物和 1/6 倍体积加样缓冲液混合后加入上样孔。引物 338f/534r 扩增片段, 在 50 V 的电压下, 61 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 16 h。电泳结束后, 将凝胶进行 EB 染色。将染色后的凝胶在 Vilber 凝胶成像扫描系统中获取胶图。用 Bio-ID + 软件分析 DGGE 的指纹图谱, 通过分析样品电泳条带的数目和亮度, 来评估微生物多样性的和种群相对数量。

1.5 优势条带的回收、克隆和测序

将 DGGE 图谱中清晰的优势性条带标记后割胶回收, 加入 TE (pH 8.0) 浸泡后取上清作为模板进行 PCR 扩增。所用引物是: BA338f (5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') 和 UN518r (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3')。PCR 反应程序为:

94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 25 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。将经过 OMEGA 试剂盒纯化的 PCR 产物用 T4 DNA 连接酶与载体 pGEM-T 连接, 然后热激转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。以氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 抗性和蓝白斑筛选阳性转化子, 碱变性法提取质粒, 应用 *Eco*RI 酶切验证确认阳性克隆。送样到北京三博远志公司测序。

1.6 相似性分析

测得的序列用 BLAST 程序在 GenBank 数据库进行相似性搜索。

1.7 细菌系统进化分析

将测序结果和相关种属代表菌株的 16S rDNA 部分序列用 Clustal X 程序进行序列排序, MEGA3.1 软件分析, Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结果

2.1 青石斑鱼鳃及体表总 DNA 的提取

将提取的样品总 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 如图 1 所示, A1、A2、B1、B2 样品总 DNA 抽提物中 90% 的条带大于 1.0 kb (16S rDNA 的 V3 区为 200 bp 左右), 适合进行下游反应。

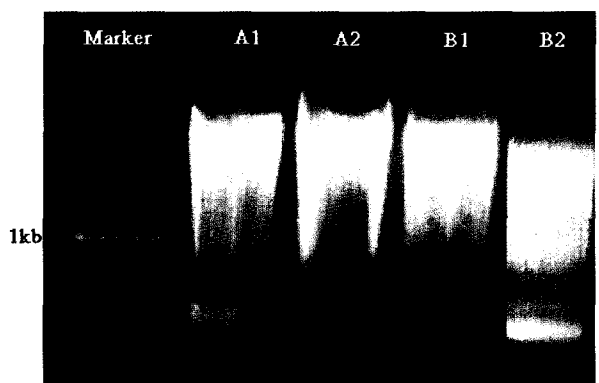


图 1 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表样品总 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the community DNA extracted from the gill and body surface of *Epinephelus awoara*. A1: 鱼样 A 鳃样; A2: 鱼样 A 体表样; B1: 鱼样 B 鳃样; B2: 鱼样 B 体表样; Marker: DNA marker
A1: the gill of sample A; A2: the body surface of sample A; B1: the gill of sample B; B2: the body surface of sample B; Marker: DNA marker.

2.2 青石斑鱼鳃及体表粘附菌群 16S rDNA-V3 区片段 PCR 扩增

4 个样品的基因组 DNA 的 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,如图 2 所示,经 PCR 扩增后获得的样品微生物的 16S rDNA 基因片段大小约为 200 bp,符合 16S rDNA V3 区特异性片段大小。

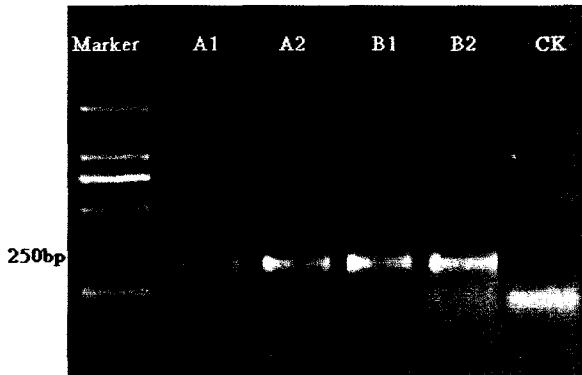


图 2 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群 16S rDNA-V3 区片段 PCR 扩增图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR for the V3 region of 16S rDNA of the bacteria from the gill and body surface of *Epinephelus awoara*.

A1:鱼样 A 鳃样; A2:鱼样 A 体表样; B1:鱼样 B 鳃样; B2:鱼样 B 体表样; Marker: DNA marker; CK:阴性对照

A1: the gill of sample A; A2: the body surface of sample A; B1: the gill of sample B; B2: the body surface of sample B; Marker:DNA marker; CK: negative control.

2.3 青石斑鱼鳃及体表粘附菌群 16S rDNA-DGGE 指纹图谱建立及聚类分析

青石斑鱼鳃及体表粘附菌群 16S rDNA-V3 区片段的 DGGE 指纹图谱及聚类分析结果如图 3、图 4 及表 1 所示。结果显示,青石斑鱼鳃粘附菌群结构相对简单,存在绝对优势种群(图 3 条带 6);体表粘附菌群结构较为复杂,无绝对优势种群。UPGMA 聚类分析结果表明青石斑鱼鳃与体表粘附菌群结构相似度为 52%,存在较大差异性(图 4);而两组平行样品中鳃粘附菌群结构的相似度 85%,体表粘附菌群结构相似度 90%,表明个体差异较小。

2.4 序列 BLAST 分析

测得的条带序列用 BLAST 程序在 GenBank 数据库进行相似性搜索。测得序列均已被 GenBank 数据库收录,登录号见表 2。

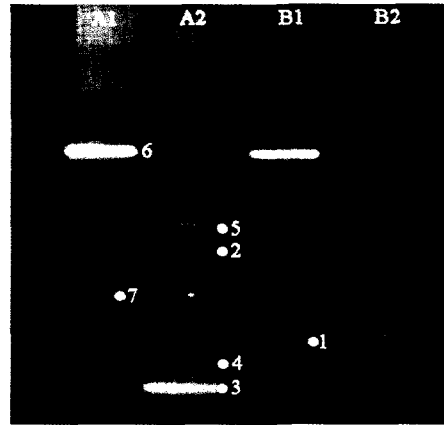


图 3 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.3 The PCR-DGGE fingerprint and its pattern of the 16S rDNA of the bacteria from the gill and body surface of *Epinephelus awoara*.

A1:鱼样 A 鳃样; A2:鱼样 A 体表样; B1:鱼样 B 鳃样; B2:鱼样 B 体表样
1~7:成功测序条带编号

A1: the gill of sample A; A2: the body surface of sample A; B1: the gill of sample B; B2: the body surface of sample B
1~7:the sequencing band

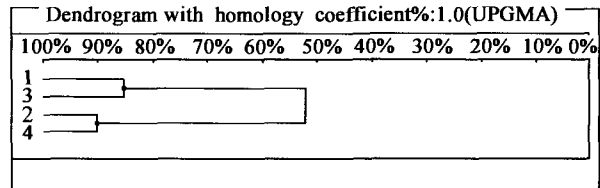


图 4 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱 UPGMA 聚类分析

Fig.4 The dendrogram of the PCR-DGGE fingerprint of the 16S rDNA of the bacteria from the gill and body surface of *Epinephelus awoara*.

1:鱼样 A 鳃样; 2:鱼样 A 体表样; 3:鱼样 B 鳃样; 4:鱼样 B 体表样

1: the gill of sample A; 2: the body surface of sample A; 3: the gill of sample B; 4: the body surface of sample B

表 1 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群结构相似系数矩阵

Table 1 The matrix of similar coefficient of the attached bacterial flora in the gill and body surface of *Epinephelus awoara*.

样本 Sample	A1	A2	B1	B2
A1	1.00			
A2	0.50	1.00		
B1	0.86	0.57	1.00	
B2	0.55	0.91	0.62	1.00

表 2 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群梯度凝胶电泳指纹图谱条带鉴定及 NCBI 登录号

Table 2 Sequences analysis of DNA recovered from single band in DGGE fingerprints of the attached bacterial flora in the gill and body surface of *Epinephelus awoara*.

条带号* Band*	鉴定菌种 Identified bacteria	相似度(%) Similarity	登录号 Accession number
Band 1	未培养 Uncultured bacterium clone E71-231 (DQ638472.1)	100%	EU004793
Band 2	<i>Meiothermus</i> sp. B-R2A5-50-3 (AM229107.1)	98%	EU004807
Band 3	未培养 Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. clone (EF423372.1)	100%	EU004798
Band 4	<i>Wautersiella falsenii</i> subsp. (AM238684.1)	100%	EU004796
Band 5	未培养 Uncultured bacterium (AB286562.1)	99%	EU004800
Band 6	<i>Pantoea</i> sp. G28A (EF432306.1)	100%	EU004802
Band 7	未培养 Uncultured bacterium clone PeM37 (AJ576396.1)	97%	EU004809

* Band 1~7 指图 3 上的条带

* Band 1~7 were shown in Fig. 3.

2.5 系统发育分析

将测序结果和相关种属的代表菌株 16S rDNA 部分序列用 Clustal X 程序进行序列排序,采

用 MEGA3.1 软件进行分析,并构建系统进化树(见图 5),采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,自展数(boot strap)为 100。

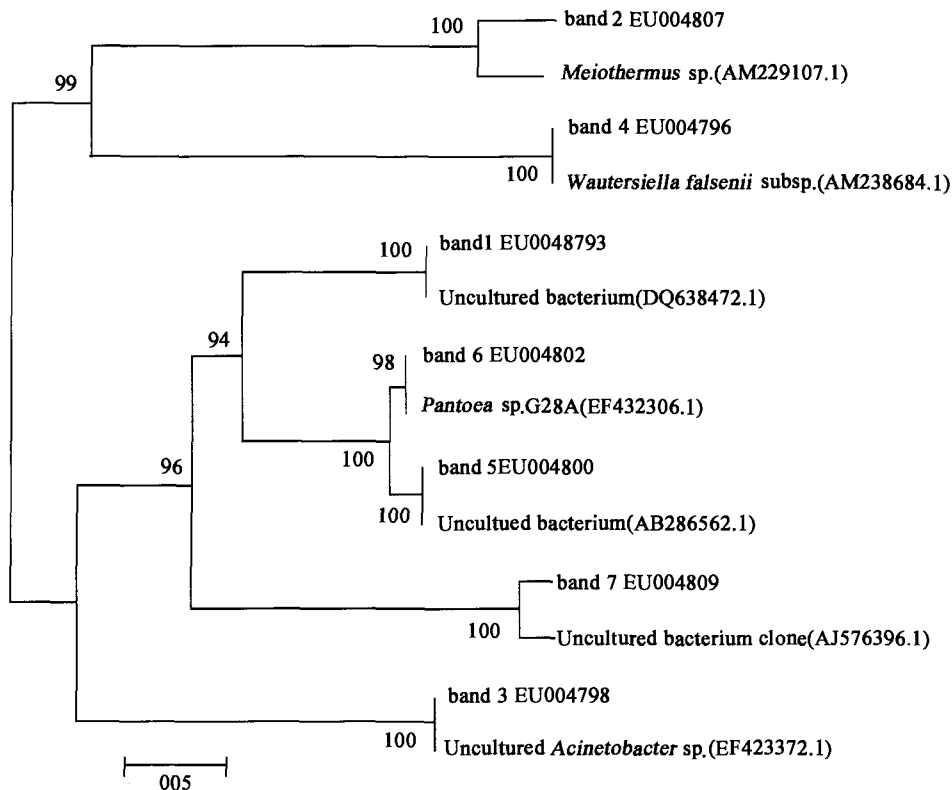


图 5 青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 鳃及体表粘附菌群的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the attached bacterial flora in the gill and body surface of *Epinephelus awoara*.

Band 1~7 为本研究获得的序列;括号内数字为 16S rDNA V3 区序列的登录号;标尺代表 0.05 进化距离。

Band 1~7 were the sequences excised from the gel. The accession numbers of reference sequences of bacterial 16S rDNA V3 region fragments are shown in parentheses. The bar indicates 5% sequence variation.

3 讨论

根据 PCR 产物在 DGGE 指纹图谱上所分离的条带数和条带迁移距离(图 3)及 DGGE 原理^[4],我们能够区别青石斑鱼鳃及体表粘附菌群的多样性。指纹图谱显示青石斑鱼体表样品的条带数较多,其菌群结构相对复杂;条带亮度相近,表明菌群丰度相差不大,绝对优势菌群不突出;而鳃样品的条带数目较少,菌群结构相对简单,但存在绝对优势菌群。UPMGA 聚类分析结果证实了这一点,鳃与体表粘附菌群结构相似度仅为 52%(图 4),可能与二者生理机制差异有关:鳃是鱼体的呼吸器官,鳃由鳃片组成,鳃片上排列着梳齿状的鳃丝,鳃丝上密布着毛细血管,鱼的血液免疫系统对鳃丝上的粘附菌群存在决定性影响;而鱼体表则不存在这一机制。因此,尽管鱼鳃与体表处于同一外部环境,二者粘附菌群结构也势必存在明显差异。此外,实验所分析两个样本之间,体表粘附菌群结构相似度高达 90%,而鳃粘附菌群结构相似度相对要低(相似度为 85%),从侧面反应了鱼体免疫性能的个体差异^[14]。

针对优势条带的测序结果表明(图 3,表 2),青石斑鱼鳃及体表绝大部分粘附菌为未培养菌,与其他海水鱼的报道一致^[15,16]。鳃的绝对优势菌为 *Pantoea* sp.(图 3,条带 6),为潜在的益生菌;而体表相对优势菌为 *Meiothermus* sp.(图 3,条带 2)、未培养 *Acinetobacter* sp.(图 3,条带 3)、*Wautersiella falsenii*(图 3,条带 4)与其他未培养菌(图 3,条带 5),其中 *Meiothermus* sp. 与 *Wautersiella falsenii* 为潜在的益生菌。同时,由于健康青石斑鱼鳃与体表粘附菌群的结构差异性,在生产实践中采用复合菌制剂似乎更为可行。

参 考 文 献

- [1] Zhou Z, Wang Z. Marine fish aquaculture in China[J]. Asia-Pacific Marine Finfish Aquaculture Network Magazine, 2004, 2: 18-20.
- [2] 周志刚,石鹏君,姚斌,等. 基于 PCR-DGGE 指纹图谱川纹

- 笛鲷及圆白鲟消化道壁优势菌群结构比较分析[J]. 水生生物学报,2007, 5:78-84.
- [3] Fischer S G, Lerman L S. Lengthindependent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis [J]. Cell, 1979,16: 191-200.
- [4] Muyzer G, Waal E C D, 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]. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(3):695-700.
- [5] Heuer H, Krsek M, Baker P, et al.. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of 16S rDNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997,63:3233-3241.
- [6] Liu W T, Chan O C, Fang H H P. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors [J]. Wat. Res., 2002, 36: 3203-3210.
- [7] 邢德峰,任南琪,宋佳秀,等. 不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. 环境科学,2006,27: 1424-1428.
- [8] Hovda M B, Sivertsvik M, Lunestad B T, 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.
- [9] 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, 272:581-588.
- [10] 赵兴青,陈 灿,杨柳燕,等. PCR-DGGE 技术用于湖泊沉积物中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态学报,2006,26: 3611-3616.
- [11] Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples [J]. Biotechniques, 2004,36(5):808-812.
- [12] Sambrook J. Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Erik J, Van H, Gabriel Z, et al.. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65:795-801.
- [14] 周志刚,石鹏君,姚斌,等. 海水鱼消化道菌群结构研究进展[J]. 海洋水产研究, 2008(刊印中).
- [15] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. J. Bacteriol., 1998,180(24): 4765-4774.
- [16] Rappe M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority [J]. Annu. Rev. Microbiol, 2003,57: 369-394.