

# 南美白对虾养殖系统中弧菌为主的致病菌群的分子比较

张洪沂<sup>1</sup>, 赵勇<sup>1</sup>, 戴习林<sup>2</sup>, 潘迎捷<sup>1</sup>

(1. 上海水产大学 食品学院, 上海 200090; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:** 弧菌是最常见、最重要的细菌性病原菌, 采用 16 S rDNA 克隆文库法对南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖系统中水体和底泥的弧菌为主的致病群落的组成进行分析研究。从水体和底泥 16 S rDNA 克隆文库中各随机挑选 55 个克隆子进行测序 (约 114 bp), 对测序结果进行了 BLAST 比对。结果表明: 水体样品有 16 个 OTU, 主要 *Vibrio* (弧菌, 33.3%)、*Chloroflexi* (绿屈挠菌, 18.5%) 和 *Pantoea* (泛菌属菌, 7.41%); 底泥样品有 14 个 OTU, 主要是 *Vibrio* (弧菌, 50.0%) 和 *Chloroflexi* (绿屈挠菌, 13.6%); 2 个文库比较来看, *proteobacterium* (变形细菌) 仅在水体样品中, *Aeromonas* (气单胞菌) 仅在底泥样品中。用 MEGA 4 从测序的克隆子中选出 30 个 OTU 进行系统发育分析。

**关键词:** 南美白对虾; 16S rDNA 克隆文库; 弧菌属

中图分类号: S945.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0257-06

## Composition of Pathogenic Bacteria in *Litopenaeus vannamei* Culture Ecosystem

ZHANG Hong-yi<sup>1</sup>, ZHAO Yong<sup>1</sup>, DAI Xi-lin<sup>2</sup>, PAN Ying-jie<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** *Vibrio* is one of the most dominant pathogens. Using 16 S rDNA clone library method, the *Vibrio* composition of the *Litopenaeus vannamei* Culture Ecosystem was investigated. Compared with the published sequences in GenBank database, sequencing results of cloned 16 S rDNA amplicons revealed a diverse community in the *Litopenaeus vannamei* Culture Ecosystem. The results indicated that Water Sample was clustered into 16 OTUs, the dominant communities are *Vibrio*, *Chloroflexi* and *Pantoea*, which accounted for 33.3%, 18.5% and 7.41%; sediment sample was clustered into 14 OTUs, the dominant communities are *Vibrio* and *Pantoea*, which accounted for 50.0% and 13.6%, respectively. The results had a little difference from the two samples: there were not *Aeromonas* in the Water Sample and there were not *proteobacterium* in the sediment sample.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; 16 S rDNA clone library; *Vibrio* genus

南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称凡纳滨对虾, 是当前比较适合规模养殖的对虾种类<sup>[1]</sup>。随着养殖规模的扩大, 对虾病害已经成为制约该产业发展的重要障碍, 与这些问题息息相关的养殖系统内微生物群落组成也成为迫切需要研究的对象, 因此近年来对虾养殖系统内细菌群落组成的研究逐渐受到重视。弧菌是最常见、最重要的细菌性病原菌, 比如副溶血弧菌, 哈维氏弧菌, 溶藻弧菌等<sup>[2,3]</sup>。

王晓颖等<sup>[4]</sup>用传统计数方法研究虾池沉积环境中若干功能菌及弧菌的时空变化。采用传统的平板培养, 不仅费时费力, 更主要是不能准确测定出其所含的菌群, 尤其是其中的细菌组成。微生物分子生态学的发展和应用, 不需要得到环境中微生物的纯培养, 突破了用传统的微生物分离纯化的方法调查环境中微生物多样性时很多微生物无法得到纯培养的限制<sup>[5]</sup>。构建 16 S rDNA 克隆文库是微生物分子

收稿日期: 2007-11-18

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 2005 第 4-2 号; 沪农科攻字 2006 第 10-5 号); 上海市重点学科建设项目 (T1102);

上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (67171401)

作者简介: 张洪沂 (1982-), 女, 河北邯郸人, 硕士, 主要从事食品生物技术的研究。

通讯作者: 潘迎捷 (1951-), 男, 江苏人, 硕士, 博士生导师, 主要从事食用菌遗传育种和农业生物技术研究。

生态学中用来研究微生物组成的常用方法之一, 1990 年, Giovannoni 等<sup>[6]</sup> 首先用这一方法分析马尾藻海面浮游微生物的多样性, 之后这种方法大大增加了人们检测和鉴定环境中“非培养”微生物的能力, 已被广泛地应用到水体、土壤、海洋沉积物、生物水处理系统等的细菌多样性研究<sup>[7-10]</sup>。但目前国内还没有人对南美白对虾养殖水体和底泥中的弧菌群落组成及比例进行系统研究。

本研究在前人的基础上, 利用弧菌特异引物建立 16 S rDNA 克隆文库, 通过测序并与已知序列比较确定细菌种类, 以揭示养殖系统水体和底泥样品中的弧菌组成, 同时也可以根据克隆文库中克隆子出现的频率了解样品的弧菌组成比例, 目的是为南美白对虾的健康养殖提供基础资料, 为实行南美白对虾“从池塘到餐桌”全程质量安全监控, 确保水产品质量安全打下良好基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

采样点为上海金山廊下南美白对虾养殖基地, 养殖场以河流淡水为水源, 养殖模式为两茬放苗半精养养殖, 亩产对虾 100 kg 左右, 盐度平均为 1。采样时间为 2007 年 6 月。

### 1.2 环境样品总 DNA 提取

水样过滤于 0.22 μm 白色聚碳酸酯膜上, 应用 Bio 101 FastDNA Spin Kit (For Soil) 试剂盒 (Bio 101, Laiolla Calif.) 提取 DNA, 底泥直接应用 Bio 101 FastDNA Spin Kit (For Soil) 试剂盒 (Bio 101, Laiolla, Calif.) 提取 DNA<sup>[11, 12]</sup>。

### 1.3 弧菌 16 S rDNA 序列片断的扩增

弧菌 16 S rDNA 特异性引物参考文献<sup>[13]</sup> 设计, 上游引物 567F 的序列: 5'-GGCGTAAAGCGCAT-GCAGGT-3'; 下游引物 680R 序列: 5'-GAAATTCTACG-CCCCTCTACAG-3', PCR 产物大小预计在 120 bp 左右。参照 Bosshard 等<sup>[14]</sup> 和杨桂梅等<sup>[15]</sup> 的方法进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μL, dNTP (2.5 mol/L of each dNTP) 2 μL, 上游引物 (10 pmol/μL) 1 μL, 下游引物 (10 pmol/μL) 1 μL, Taq DNA polymerase 2U (0.4 μL), 模板 DNA 1 μL, 终体积 25 μL。扩增程序: 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 10 min。

### 1.4 弧菌 16 S rDNA 的克隆文库的构建

PCR 扩增产物经纯化以后, 使用 T4 DNA 连接酶连接至 pGEM T-easy 克隆载体 (Promega 公司), 转化到宿主 *E. coli* DH5α 中。用表面涂布有 IPTG 和

X-gal 的含有 Amp 的 LB 平板对转化子进行“蓝白”筛选, 随机挑取“白色”克隆, 然后使用“煮菌法”<sup>[16]</sup> PCR 扩增“白色”克隆的插入片段, 并用琼脂糖电泳检查插入片段的大小是否正确。这样挑选到的阳性克隆构成克隆文库。

养殖水体样品构建的文库, 以下称为 W 克隆文库; 养殖底泥样品构建的文库, 以下称为 S 克隆文库。

### 1.5 测序及序列分析

对克隆文库中的所有克隆用 T-7 通用引物测序, 测序由上海生物工程有限公司完成。所获得的 16 S rDNA 序列与 GenBank 进行比对, 并下载相近序列。根据序列相似性大于或等于 97% 以上的归为一个操作分类单元 (OTU, Provisional operational taxonomic units)<sup>[17]</sup>。用 MEGA 4 软件构建系统发育树。本研究所获得的 W 克隆文库和 S 克隆文库在 GenBank 数据库中的序列号分别为 EU547475~ EU547490 和 EU547461~ EU547474。

### 1.6 文库库容的评价

构建 16 S rDNA 克隆文库的目的是为了反映环境中微生物的种类与数量。所以在构建完 16 S rDNA 克隆文库后, 首先需要考虑所构建的 16 S rDNA 克隆文库的库容 (Library size) 是否足以包括环境中所有微生物的种类或者能否代表环境中微生物的多样性。目前文献中大多都是通过计算 Good 等<sup>[18]</sup> 提出的 Coverage C 来阐明这个问题。Coverage C 理论上表示 16 S rDNA 克隆文库中所包含的微生物的种类 (OTU) 占样品中全部微生物的类型的比例, 它的计算公式如下:

$$\text{Coverage } C = [1 - (n/N)] \times 100 \quad (1)$$

其中, n 代表具有不重复序列的克隆数, N 代表所分析的克隆数。很显然 Coverage C 如果很高或者达到 100% 可以说明库容已经足够。

其次, 我们还要考虑所构建的 16 S rDNA 文库中克隆或者 OTU 的相对比例是否与环境中的微生物的丰度一致, 常用的方法是 Rank-Abundance curve<sup>[19]</sup>。Rank-Abundance curve 是将克隆文库中所有 OTU 对它们在文库中的比例做柱状图并按比例从高到低排列。

## 2 结果与分析

### 2.1 养殖系统中水体和底泥样品的理化和微生物性状比较

水体和底泥样品中的理化和弧菌数量见表 1。不同样品中弧菌数量处于相同的数量级, 差异显著。

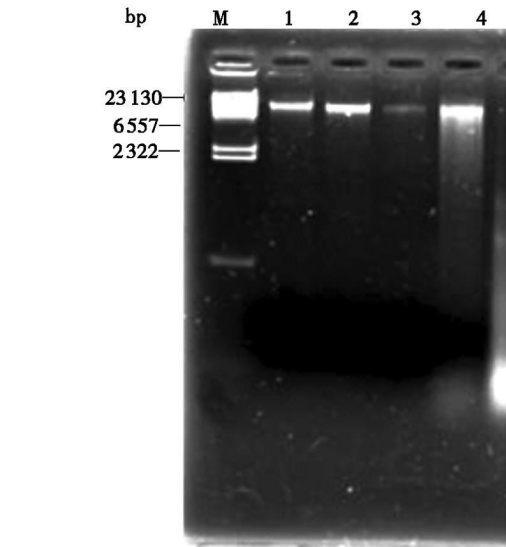
其中底泥中数量为  $7.89 \times 10^4$  cfu/ g; 水体中数量为  $1.35 \times 10^4$  cfu/ mL。

表 1 不同样品的理化 and 微生物性状(n= 2)

样品	pH	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	溶解氧	细 菌	弧 菌
水样	6.81( ±0.21)	1.28( ±0.30) mg/ L	7.18( ±0.27) mg/ L	$5.78( \pm 0.73) \times 10^4$ cfu/ mL	$1.35( \pm 0.51) \times 10^4$ cfu/ mL
底泥	7.33 ( ±0.10)	4.65( ±0.82) mg/ kg	6.88( ±0.15) mg/ L	$6.92( \pm 0.91) \times 10^5$ cfu/ g	$7.89( \pm 0.86) \times 10^4$ cfu/ g

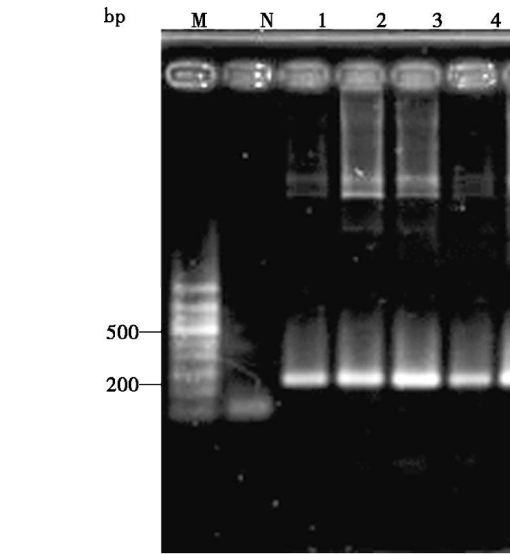
2.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

水体和底泥总 DNA 提取, 结果如图 1 表明提取的 DNA 可以用于后续 PCR 扩增。弧菌 16 S rDNA 特异性引物 PCR 扩增结果如图 2, 获得的特异扩增片断, 可用于后续克隆文库的构建。



M. Marker, 1 和 2 为水体样品, 3 和 4 为底泥样品  
M. Marker; Lane 1~ 2. Water samples; Lane 3, 4. Sediment samples  
图 1 样品的总 DNA 电泳图谱

Fig. 1 The genomic DNA from different samples



M. Marker, N. 阴性对照, 1 和 2 为水体样品, 3 和 4 为底泥样品  
M. Marber N. Negative; Lane 1, 2. Water sample; Lane 3, 4. Sediment samples  
图 2 样品的弧菌 16 S rDNA 特异性引物电泳图谱

Fig. 2 PCR amplification of 16 S rDNA fragment from different samples

2.3 样品的 16 S rDNA 克隆文库分析

从文库中挑选白色菌落各 100 个纯化后菌液以 567F 和 680R 为引物进行 PCR 来检测阳性克隆。PCR 扩增产物为 114 bp。每个样品随机挑选 95 个阳性克隆进行测序。根据序列相似性大于或等于 97% 以上的归为一个操作分类单元(OTU), W 克隆文库可分为 16 个 OTU, 序列编号为 OTUW1 至 O-TUW16, 而 S 克隆文库可分为 14 个 OTU, 序列编号为 OTUS1 至 OTUS14。计算结果表明所构建的 W 克隆文库和 S 克隆文库覆盖率 Coverage C 分别为 71.58% 和 76.84%。从 Coverage C 分析可以说明所构建的 16 S rDNA 基因克隆文库能够较完整地反映所属环境中的弧菌多样性状况。所以, 可以通过对 2 个文库组成的比较来分析南美白对虾养殖水体和底泥中弧菌群落的组成差异。

W 克隆文库中克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16 S rDNA 序列相似性最高为 100%, 最低为 86%, 其中 26 个克隆子( 占 27.37%) 与已知序列相似性低于 90%, 多数细菌( 68 个克隆子, 占 71.58%) 与已知序列同源性低于 97%。S 克隆文库中克隆子与 GenBank 数据库中已知细菌的 16 S rDNA 序列相似性最高为 100%, 最低为 86%, 其中 22 个克隆子( 占 23.16%) 与已知序列相似性低于 90%, 多数细菌( 71 个克隆子, 占 74.74%) 与已知序列同源性低于 98%。

由图 2 可以看出, W 克隆文库主要是 *Vibrio* (弧菌, 33.3%)、*Chloroflexi* (绿屈挠菌, 18.5%) 和 *Pantoea* (泛菌属菌, 7.41%), 还有耶尔森氏菌、变形细菌。S 克隆文库主要是 *Vibrio* (弧菌, 50.0%) 和 *Chloroflexi* (绿屈挠菌, 13.6%), 还有耶尔森氏菌、变形细菌、气单胞菌和绿屈挠菌。

其次, 用 Rank- Abundance curve 可以对样品中微生物的多样性进行比较。Rank- Abundance curve 是将 OTU 对应它们在文库中的比例做柱状图并按比例从高到低排列( 图 3 和图 4)。W 克隆文库的 OTU 可以分为三类, OTUW1, OTUW8 和 OTUW10 占总 OTU 的 18.75%, OTUW2, OTUW4, OTUW5 和 O-TUW6 占总 OTU 的 25%, 其余 OTU 占总 OTU 的 56.25%; S 克隆文库的 OTU 也可以分为三类, OTUS7

和 OTUS11 占总 OTU 的 14.29%, OTUS2, OTUS8 和 OTUS13 占总 OTU21.43%, 其余 OTU 占总 OTU 的 64.29%。

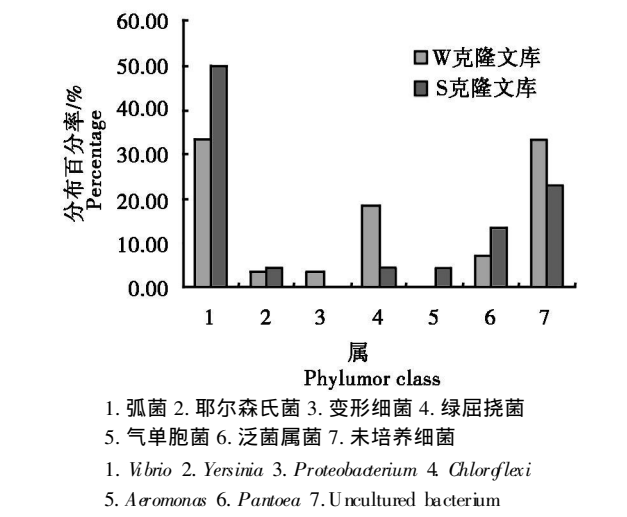


图3 W和S 16 S rDNA 克隆文库中克隆在不同属的分布  
Fig. 3 Phylogenetic distribution of clones in 16 S rDNA clone libraries of S and W

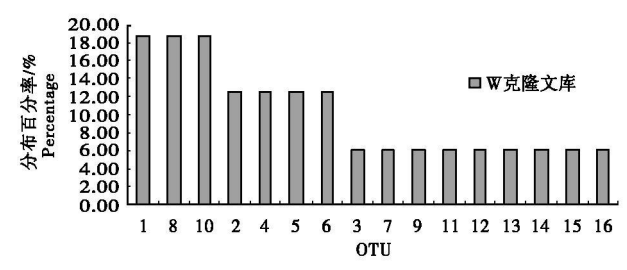


图4 W克隆文库的等级-丰度曲线  
Fig. 4 Rank-Abundance curve in 16 S rDNA clone libraries W

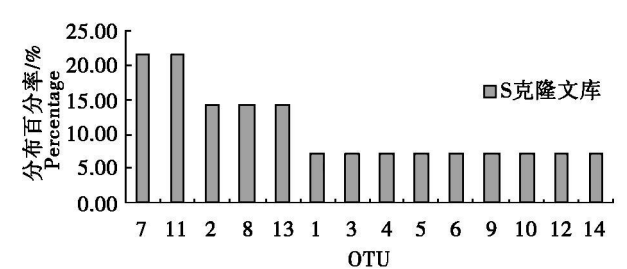


图5 S克隆文库的等级-丰度曲线  
Fig. 5 Rank-Abundance curve in 16 S rDNA clone libraries S

2.4 样品中弧菌菌群系统发育分析

对两种样品中弧菌菌群系统发育分析的比较如图5所示。OTUW7和 OTUS12 与 *Yersinia* (EF179131) 相似性达到 97%。OTUW9 和 OTUS13 与 *Vibrio* (EU177083) 相似性达到 100%。OTUW11 和 OTUS10 与 *Vibrio* (AB2573341) 相似性达到 93%。W 克隆文库共 5 种类群, 其中 4 个 OTU 属于未知类群, 与未获培养细菌 AY941836、AM909991、EF509797、EU379146 的同源性分别为 86%, 93%, 98% 和

100%。S 克隆文库共 5 种类群, 其中 5 个 OTU 属于未知类群, 与未获培养细菌 EF667583、AM909985)、EF509857、AM909991、DQ463225 的同源性分别为 88%, 94%, 80%, 94% 和 93%。

3 讨论与结论

本研究结果表明, 南美白对虾养殖系统中有弧菌、耶尔森氏菌、变形细菌、绿屈挠菌和泛菌属菌、气单胞菌。王祥红等<sup>[20]</sup> 从野生健康中国对虾成虾肠道中分离出 47 株菌, 分别属于弧菌属、发光杆菌属、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属、黄杆菌属、气单胞菌属、屈挠杆菌属 (*Flexibacter*) 和色杆菌属 8 个属。与本研究分离的菌种类型差别很大, 这可能是与对虾种类的不同有关。

耶尔森氏菌和气单胞菌也是水产细菌性病原菌, 鲁克氏耶尔森氏菌、嗜水气单胞菌、温和气单胞菌等细菌可以引起淡水鱼类暴发性出血病。本研究在养殖水体和底泥中发现耶尔森氏菌, 安贤惠等<sup>[21]</sup> 在中国对虾中抗菌短肽的分离纯化与功能分析中提到到鲁克氏耶尔森氏菌的危害。

在养殖底泥中发现有气单胞菌, 这与 Yasuda<sup>[22]</sup> 的结果一致, 而 Yasuda 的报道中弧菌没有成为优势。气单胞菌和弧菌均属弧菌科, Yasuda 是按照碳源降解试验而不是用克隆文库来区分弧菌和气单胞菌, 区分方法的不同以及对虾种类的不同可能是二者结果有所差异的原因。尽管很多研究表明对虾种类不同而出现的优势种属不同, 但弧菌、气单胞菌是对虾区系的主要组成部分的结果是一致的。

在养殖水体中发现变形细菌和泛菌属菌, 这与李可等<sup>[23]</sup> 的结果一致, 李可用克隆文库的方分析了南美白对虾肠道微生物群落组成, 分别为变形细菌 (*Proteobacteria*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、泛菌属 (*Pantoea*)、*Aranicola* 属、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和弧菌属 (*Vibrio*)。

而在克隆文库中发现的绿屈挠菌, 在以往水产养殖报道中没有出现过, 是首次出现, 绿屈挠菌在水体和底泥中所占比例很大, 尤其是水体。穆春华等<sup>[24]</sup> 从西北太平洋沉积物中发现有绿屈挠菌, 这类菌往往以巨大的数量生活于远洋深海及某些湖泊中, Morris 等<sup>[25]</sup> 在一项对此菌的研究中详细的分析了该种群在太平洋不同位置及不同深度的分布。认为此菌主要分布于海洋的中层位置, 约占细菌总量的 10% 左右。尽管这类菌在深海底层的比重更大, 但对其具体的功能仍没有透彻研究。

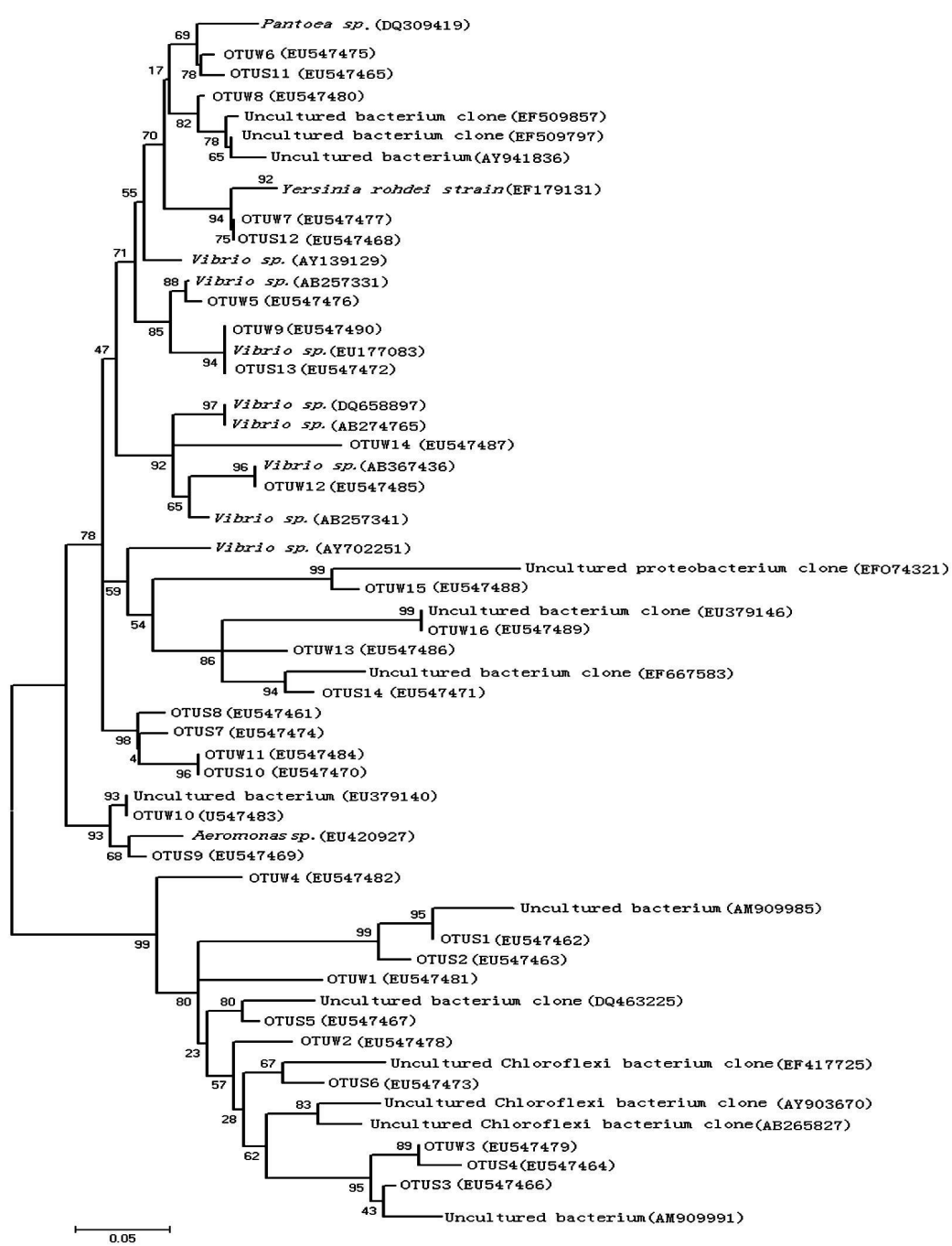


图 5 样品中弧菌菌群系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of *vibrio* in four samples based on analysis of all sequences

南美白对虾养殖系统中, 水体样品中包括弧菌、耶尔森氏菌、变形细菌、绿屈挠菌和泛菌属菌, 其中优势菌是弧菌 (*Vibrio*)、绿屈挠菌 (*Chloroflexi*) 和泛菌属菌 (*Pantoea*); 底泥样品中包括弧菌、耶尔森氏菌、气单胞菌、绿屈挠菌和泛菌属菌, 其中优势菌是弧菌 (*Vibrio*) 和泛菌属菌 (*Pantoea*)。

水体样品中优势菌顺序为弧菌 (33.3%)、绿屈挠菌 (18.5%)、泛菌属菌 (7.41%), 耶尔森氏菌 (3.7%)、变形细菌 (3.7%), 同时还存在 33.3% 的未培养类群; 底泥样品中优势菌顺序为弧菌 (50.0%)、泛菌属菌 (13.6%), 耶尔森氏菌 (4.54%)、气单胞菌

(4.54%)、绿屈挠菌 (4.54%), 同时还存在 22.7% 的未知培养类群。

参考文献:

[1] 吴琴瑟. 南美白对虾养殖现状与发展对策[J]. 科学养鱼, 2006, 10: 1-2.

[2] 赵永军, 刘延鑫, 徐文彦. 南美白对虾淡水养殖常见细菌性病害及防制技术[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2006, 26(1): 37-38.

[3] Moss S M, Lea Master B R, Sweeney J N. Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic

- bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water[J]. J World Aquacult Soc, 2000, 31(2): 255–263.
- [4] 王晓颖, 席峰, 袁建军, 等. 虾池沉积环境中若干功能菌及弧菌的时空变化[J]. 厦门大学学报, 2006, 45(5): 250–256.
- [5] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 143–69.
- [6] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, *et al.* Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton[J]. Nature, 1990, 345: 60–3.
- [7] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, *et al.* 16 S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica[J]. Extremophiles, 2001, 5(1): 23.
- [8] Felske A, Wolterink A, van Ls R, *et al.* Searching for predominant soil bacteria: 16 S rDNA cloning versus strain cultivation[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 30: 138–145.
- [9] 戴欣, 周惠, 陈月琴, 等. 中国南海南沙海区沉积物中细菌 16 S rDNA 多样性的初步研究[J]. 自然科学进展, 2002, 12(5): 479–484.
- [10] 严兴, 张晓君, 赵立平, 等. 焦化废水工业处理装置和实验室装置硝化菌群的分子比较[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 301–306.
- [11] 赵勇, 李武, 周志华, 等. 应用 PCR-RFLP 及 PCR-TGGE 技术监测农田土壤微生物短期动态变化[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 53–57.
- [12] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 854–860.
- [13] Janelh R T, Mark A R, Luisa A M, *et al.* Diversity and dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* community[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(7): 4103–4110.
- [14] Bosshard P P, Santini Y, Grater D, *et al.* Bacterial diversity and community composition in the chmmeline of the meromictic alpine lake Gadagno a revealby 16S rDNA analysis[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, 31: 173–182.
- [15] 杨桂梅, 唐文乔, 李会荣, 等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗纹东方纯的弧菌菌落组成[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 259–263.
- [16] Uu WT, Huang CL, Hu JY, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis polymorphism for rapid 16 S rDNA clone screening and microbial diversity study[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(1): 101–103.
- [17] Juretschko S, Loy A, Lehner A, *et al.* The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from all industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach[J]. Syst Appl Microbiol, 2002, 25(1): 84–99.
- [18] Good I L. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40: 237–264.
- [19] Molles, M C. ECOLOGY: CONCEPTS AND APPLICATIONS(影印版)[M]. 北京: 科学出版社, McGraw-Hill companie, Inc.
- [20] Wang X, Zhang Li H. Flora in the digestive tract of adult Penaeid Shrimp( *Penaeus chinensls* ) [J]. Journal of Ocean University of Qingdan, 2000, 30(3): 493–498.
- [21] 安贤惠, 梁建国, 张克云. 中国对虾中抗菌短肽的分离纯化与功能分析[J]. 中国水产科学, 2006(13): 1012–1016.
- [22] Yasuda K, Kitao T Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate [J]. Aquaculture, 1980, 19: 229–234.
- [23] 李可, 郑天凌, 田蕴. 南美白对虾肠道微生物群落的分子分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 649–653.
- [24] 穆春华, 包振民, 陈刚, 等. 西北太平洋沉积物中细菌多样性的研究[J]. 海洋学报, 2006, 28(4): 121–127.
- [25] Morris R M, Rapp M S, Ubach E, *et al.* Prevalence of the chloroflexi-related SAR202 bacterioplankton cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(5): 2836–2842.