

文章编号: 1674-5566(2010)04-0440-07

16S rDNA文库法分析草鱼肝胰脏和胆汁细菌群落组成

蒋燕, 鲍宝龙, 谢彩霞, 杨桂梅

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 利用 16S rDNA文库随机测序法分析了草鱼肝胰脏和胆汁细菌群落组成, 结果表明, 在肝胰脏中共鉴定出 19种共生细菌, 分别隶属于气单胞菌属、假单胞菌属、摩根菌属、不动杆菌属、弧菌属和变形杆菌属。气单胞菌属和假单胞菌属为优势属, 气单胞菌属的丰度为 36.17%, 假单胞菌属为 31.91%。其中, 气单胞菌属的 GZ16和假单胞菌属的 GZ9菌株丰度最高, 均为 12.77%。在胆汁中共鉴定出 10种共生细菌, 分别隶属于气单胞菌属、假单胞菌属、摩根菌属和变形杆菌属。气单胞菌属和假单胞菌属为优势属, 气单胞菌属的丰度为 35%, 假单胞菌属为 27.5%。其中, 变形杆菌属的 DN1菌株丰度最高, 为 25%。肝胰脏中只有 10.5%的细菌群落与胆汁的细菌群落相似, 胆汁中只有 20%的细菌群落与肝胰脏相似, 表明草鱼肝胰脏和胆汁有各自特有的共生细菌群落。本研究结果, 为进一步探讨肝胰脏和胆汁共生细菌的生理功能, 以及细菌与宿主草鱼之间的协同进化提供了基础。

关键词: 草鱼; 肝胰脏; 胆汁; 16S rDNA文库; 细菌群落组成

中图分类号: S 917 **文献标识码:**

Analysis of the composition of bacterial communities in the hepatopancreas and bile of *Ctenopharyngodon idellus* through sequencing 16S rDNA library

JIANG Yan, BAO Bao-long, XIE Cai-xia, YANG Guimei

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: The bacterial diversity and community composition in hepatopancreas and bile of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* were determined through sequencing the 16S rDNA gene library. The bacterial spectrum of hepatopancreas included eight species of *Aeromonas*, six species belonging to *Pseudomonas*, two species from *Morganella*, and one species each from *Vibrio* and *Proteus*. *Aeromonas* and *Pseudomonas* were two dominant genera with 36.17% and 31.91% relative abundance of community, respectively. Strains GZ16 of *Aeromonas* and GZ9 of *Pseudomonas* were two dominant species sharing same 12.77% relative abundance. The bacterial spectrum of bile included five species of *Aeromonas*, three species of *Pseudomonas*, and one species each from *Morganella* and *Proteus*. Same as found in hepatopancreas, *Aeromonas* and *Pseudomonas*

收稿日期: 2010-02-18

资助项目: 上海市教委重点学科建设项目 (J50701和 S30701)

作者简介: 蒋燕 (1984-), 女, 硕士研究生, 专业方向为细菌分子生态学。E-mail: 176558414@qq.com

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: bilbao@shou.edu.cn

were two dominant genera sharing 35% and 27.5% relative abundance of community respectively. Strain DN1 of *Proteus* was dominant species with 25% relative abundance of community. Comparative analysis showed that 10.5% community species in the hepatopancreas shared same as that in the bile and 20% community species in the bile shared same as that in the hepatopancreas. This means there was a specific parasitic community in hepatopancreas or bile of grass carp. The results present in this research should be helpful to further understand the unknown roles of these bacteria in the hepatopancreas and bile also to understand coevolution mechanism between bacterial community and host grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; hepatopancreas; bile; 16S rDNA library; bacterial community composition

正常细菌群落对宿主的作用,已逐渐被人类所理解,正常菌群在宿主体内的生存和增殖,对维持宿主组织器官的正常结构和功能起着十分重要的作用^[1]。在长期的进化过程中,宿主和其共生细菌存在协同进化的机制,探讨宿主与共生细菌的协同进化,有利于人们理解共生细菌在宿主的结构和功能演化中的作用。在鱼类,人们主要通过开展肠道细菌菌落的研究^[2-7],来理解肠道细菌菌落与宿主鱼类的关系。肠道细菌对宿主的新陈代谢、肠道上皮细胞的发育、肠道免疫系统、基因表达等方面起了重要的作用,同时,肠道细菌的存在可以保护宿主不被肠道病原体侵入^[8-10]。然而,由于肠道细菌群落的组成,易受水环境和饵料的影响^[11],是共生细菌,抑或是临时性来自水环境和饵料的细菌仍较难确定^[12-13]。通过分析不与外界直接接触的器官中的细菌组成,如肝脏、胰脏、性腺中的细菌,应该更易确定鱼类的共生细菌。通常认为,健康鱼类的内部器官,如肝脏,被认为是无菌的。Cahill^[14]认为,如果内部器官有细菌存在,表明宿主的免疫防御系统出了问题。Mevicar^[15]则认为,鱼类内部器官存在细菌,并不一定表示鱼类肯定得病。事实上,已相继有报道在一些健康鱼类的内部器官,如肝、肾脏、脾脏、卵巢等中,分离出各种细菌^[14, 16-18]。在暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)的肝脏和卵巢中也鉴定出许多细菌^[19-21]。

已有通过研究鲤科鱼类肠道细菌组成,来分析鲤科鱼类的系统进化的研究报道^[22]。本研究采用草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)作为研究对象,利用总基因组DNA的16S rDNA文库的随机测序方法,调查了健康草鱼的肝胰脏和胆汁中的细菌群落组成和相对丰度,为探讨草鱼与其共生细菌的协同进化作前期基础研究,为进一步了解

正常细菌群落对肝胰脏和胆汁的功能所起的可能作用提供信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集

5尾健康草鱼采于上海市青浦养殖池塘,平均体重2.081 kg。草鱼体表用75%的酒精棉球消毒,无菌条件下解剖,获得草鱼的肝胰脏和胆汁。肝胰脏用无菌的生理盐水清洗3次后,每尾草鱼各剪取5 g的肝胰脏混合,并研磨均匀,离心获得肝脏组织液。

1.2 总DNA提取

取1 mL肝胰脏组织液或胆汁,离心(6 000 r/min, 10 min)收集细胞,加500 μ L裂解缓冲液(50 mmol Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol EDTA, 50 mmol Sucrose)重悬细胞,加入溶菌酶至终浓度10 mg/mL, 37°C处理10 min,加入SDS至1% (mol/mL),蛋白酶K至100 μ g/mL, 37°C继续处理30 min,酚:氯仿:异戊醇按体积比25:24:1抽提,2倍体积的无水乙醇沉淀,最后用不含DNase的RNase A除去RNA。DNA样品可直接进行PCR扩增。

1.3 16S rDNA文库的构建

采用Bosshard等^[23]采用的扩增细菌16S rDNA的通用引物,SD-Bact0008-a-S-20, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; SD-Bact1492-a-A-19, 5'-GGTACCTGTGTTACGACTT-3',产生相应于大肠杆菌(*Escherichia coli*)16S rDNA序列核苷酸位置8到1510的PCR产物。25 μ L PCR反应体系中,包括:12.5 μ L 2 x GoTag Green Master Mix (Promega Madison WI),各50 pmol的上下引物,和50 ng细菌DNA。PCR反应经95°C预变

性 5 min 后,进行 30 个循环: 95℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 延伸 2 min。最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经纯化后连接到 pGEM-T 载体 (Promega), 然后热休克法转化至感受态大肠杆菌 TOP 10, 在含氨苄西林的 LB 平板上 37℃ 培养 16 h 挑出平板上的所有阳性克隆, 经含氨苄西林的 LB 液体培养基培养后, 加甘油后 -20℃ 保存。

1.4 文库随机测序和 16S rDNA 的系统关系分析

从肝胰脏和胆汁 16S rDNA 文库中, 各随机挑出 50 个克隆, 经含氨苄西林的 LB 液体培养基培养后, 抽提质粒后测序, 测序由上海生工完成。

所获得的 16S rDNA 序列经 BLAST N 在 GenBank 数据库中比对后, 挑选一个序列相似性最高且相似性至少大于 90% 的序列, 作为构建系统树的参考序列。用 MEGA 4 生物软件^[24]中的 NJ 法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树, 采用 Kimura 2-parameter 算法, 并设定 bootstrap 为 1 000 次重复。

2 结果

2.1 肝胰脏中的细菌菌落组成分析

来自肝胰脏细菌文库的 50 个克隆, 去掉空载和无效序列外, 共得 47 个 16S rDNA 序列, 其

中单一序列 19 个, 重复序列 28 个, 所得的序列长度在 524~654 bp 之间, 19 个单一序列均已提交至 GenBank (接受号: GQ223736-GQ223754), 代表 19 种细菌。通过 Blast N 搜索 GenBank 数据库, 选择了数据库中相似性最高且相似性至少大于 90% 的序列 (表 1), 相似性分别从 93% 到 100%。系统树分析表明 (图 1), 来自肝胰脏的 19 种细菌分别隶属于气单胞菌属 (Aeromonas)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、摩根菌属 (Morganella)、不动杆菌属 (Acinetobacter)、弧菌属 (Vibrio) 和变形杆菌属 (Proteus)。其中, 气单胞菌属共有 8 种细菌, 假单胞菌属 6 种, 摩根菌属 2 种, 而弧菌属和变形杆菌属均只有 1 种。在这 6 个属中, 气单胞菌属和假单胞菌属占了大多数, 气单胞菌属的相对丰度为 36.17%, 而假单胞菌属为 31.91%。在所鉴定的细菌中, 属于气单胞菌属的 GZ16 和假单胞菌属的 GZ9 相对丰度最高, 均为 12.77%。

2.2 胆汁中的细菌菌落组成分析

来自胆囊细菌文库的 50 个克隆, 去掉空载和无效序列外, 共得 40 个 16S rDNA 序列, 其中单一序列 10 个, 重复序列 30 个, 所得的序列长度在 415~580 bp 之间, 10 个单一序列均已提交至 GenBank (接受号: GQ223726-GQ223735), 代表

表 1 草鱼肝胰脏细菌组成和相对丰度

Tab 1 Relative abundance and affiliation of bacteria determined in the hepatopancreas of *C. idellus*

克隆	序列登录号	种系型	最相近物种序列及其登录号	相似性 (%)	相对丰度 (%)
GZ3	GQ223738	Aeromonas	Aeromonas salmonicida (AF108136)	100	4.26
GZ4	GQ223739	Aeromonas	Aeromonas veronii bv. veronii (AM184224)	100	6.38
GZ6	GQ223740	Aeromonas	Aeromonas sp. F8-9 (EF491851)	99	2.13
GZ14	GQ223745	Aeromonas	Aeromonas molluscorum (AY987772)	99	2.13
GZ16	GQ223746	Aeromonas	Aeromonas sobria (X74683)	100	12.77
GZ7	GQ223741	Aeromonas	Aeromonas sp. CDC 715-84 (ASU88658)	99	4.26
GZ28	GQ223751	Aeromonas	Aeromonas popoffii (AY534350)	93	2.13
GZ29	GQ223752	Aeromonas	Aeromonas sp. VKM B-2261 (AF430120)	100	2.13
GZ2	GQ223737	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens (EF528260)	99	2.13
GZ9	GQ223742	Pseudomonas	Pseudomonas sp. Nj-59 (AM491463)	100	12.77
GZ10	GQ223743	Pseudomonas	Pseudomonas psychrophila (AB041885)	100	10.64
GZ12	GQ223744	Pseudomonas	Pseudomonas sp. Nj-63 (AM491466)	100	2.13
GZ17	GQ223747	Pseudomonas	Pseudomonas sp. KBOS 04 (AY653221)	100	2.13
GZ20	GQ223748	Pseudomonas	Pseudomonas sp. BW DY-18 (DQ200857)	99	2.13
GZ1	GQ223736	Morganella	Morganella morganii (AY464464)	99	4.26
GZ33	GQ223754	Morganella	Morganella sp. JB-T16 (AJ781005)	96	2.13
GZ21	GQ223749	Acinetobacter	Acinetobacter xiamenensis (EF030545)	99	4.26
GZ24	GQ223750	Vibrio	Vibrio sp. OM02 (AB038029)	99	10.64
GZ30	GQ223753	Proteus	Proteus vulgaris (AB099401)	96	10.64

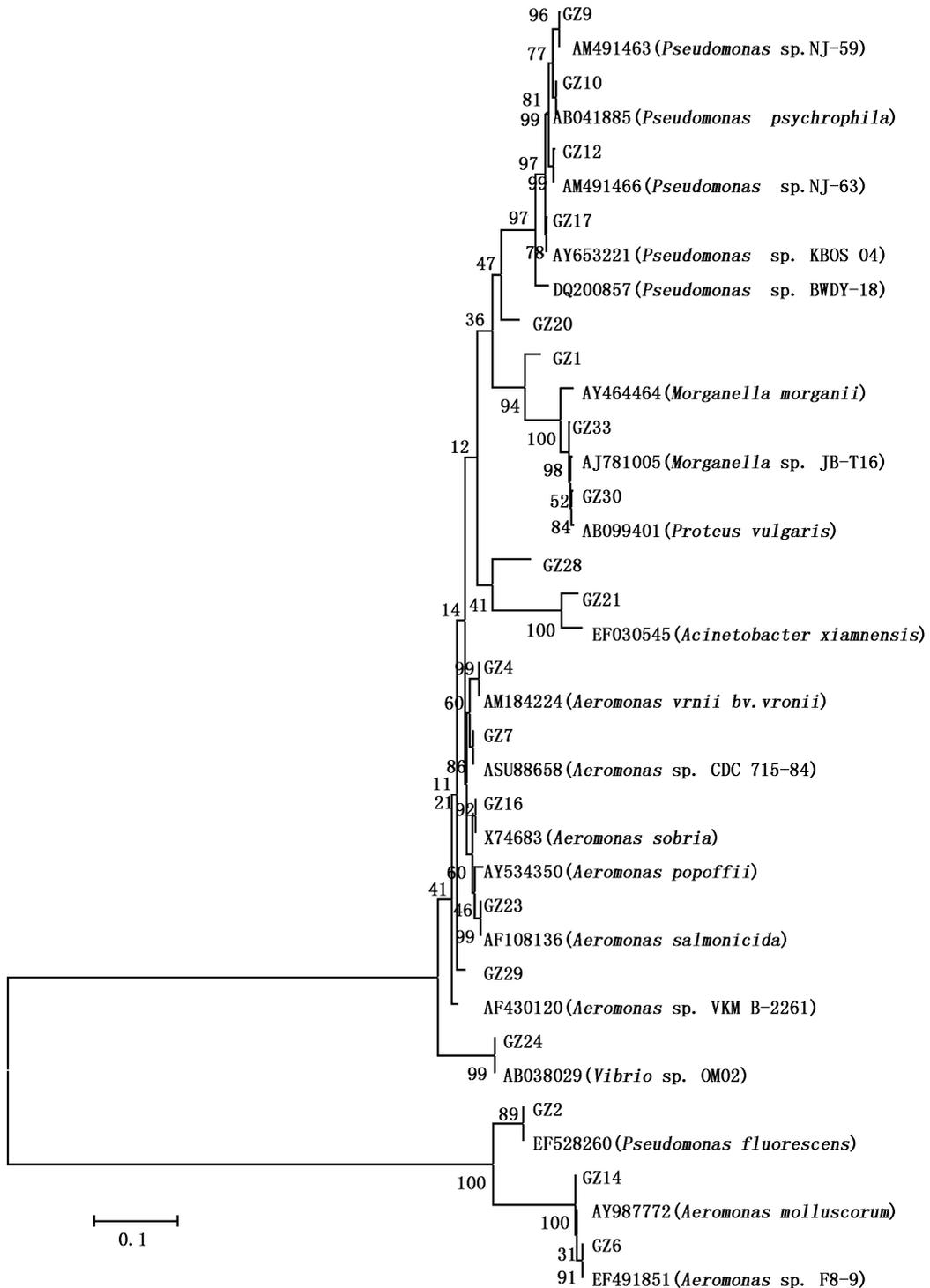


图 1 肝胰脏文库中根据细菌 16S rRNA 的特征序列所构建的系统发育树

Fig 1 Phylogenetic tree constructed based on bacterial 16S rRNA of hepatopancreas library

10种细菌。通过 Blast N 搜索 GenBank 数据库, 选择了数据库中相似性最高且相似性至少大于 90% 的序列 (表 2), 相似性分别从 96% 到 100%。进一步通过系统树分析 (图 2) 表明, 来自胆汁的 10 种细菌分别隶属于气单胞菌属、假单胞菌属、

摩根菌属和变形杆菌属。其中, 气单胞菌属共有 5 种细菌, 假单胞菌属 3 种, 摩根菌属和变形杆菌属各 1 种。在此 4 个属中, 气单胞菌属和假单胞菌属占了大多数, 气单胞菌属的相对丰度为 35%, 而假单胞菌属为 27.5%。在所有鉴定的细

菌中,而是变形杆菌属的 DN1 菌株相对丰度最高,为 25%。

表 2 草鱼胆汁细菌组成和相对丰度

Tab 2 Relative abundance and affiliation of bacteria determined in the bile of *C. idellus*

克隆	序列登录号	种系型	最相近物种序列及其登录号	相似性 (%)	相对丰度 (%)
DN3	GQ223727	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas sobria</i> (X74683)	99	10.0
DN10	GQ223729	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (AF468055)	100	2.5
DN12	GQ223731	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> (AY297782)	100	35.0
DN19	GQ223732	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas veronii</i> (EU770307)	100	7.5
DN36	GQ223735	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas molluscorum</i> (AY987772)	99	2.5
DN11	GQ223730	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas psychrophila</i> (AB041885)	100	2.5
DN31	GQ223733	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> (AY568511)	99	27.5
DN34	GQ223734	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Nj-60 (AM491464)	99	20.0
DN6	GQ223728	<i>Morganella</i>	<i>Morganella</i> sp. JB-T11 (AJ781004)	96	12.5
DN1	GQ223726	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (AB099401)	99	25.0

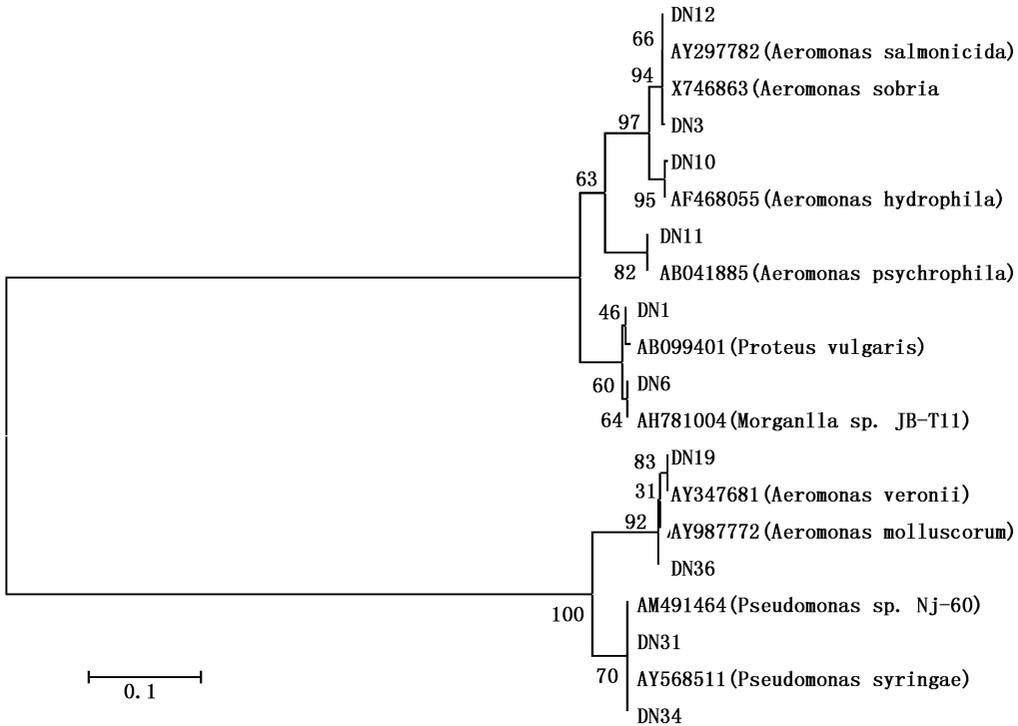


图 2 胆囊文库中根据细菌 16S rRNA 的特征序列所构建的系统发育树

Fig 2 Phylogenetic tree constructed based on bacterial 16S rRNA of bile library

3 讨论

草鱼的胰脏和肝脏混杂在一起,为肝胰脏。本研究在肝胰脏中鉴定了 19 种细菌,隶属气单胞菌属,假单胞菌属,摩根菌属,不动杆菌属,弧菌属和变形杆菌属,表明健康草鱼的肝胰脏中存在许多种类的共生细菌,并不是通常所认为的,健康鱼类的内部没有共生细菌。丰度较高的气单胞菌属和假单胞菌属,在暗纹东方鲀的肝脏和

卵巢中也曾被检测到。按照传统的培养分离技术,气单胞菌被认为是草鱼肠道中占优势的一类细菌^[11]。斑马鱼 (*Danio rerio*) 肠道中也有气单胞菌和假单胞菌这两属细菌^[10]。

本研究在草鱼的胆汁中也检测到 10 种细菌,种类之多出乎意料。所隶属的气单胞菌属、假单胞菌属、摩根菌属和变形杆菌属,在肝胰脏中全部有检测到。胆汁中也以气单胞菌属和假单胞菌属为优势类群。胆汁是脊椎动物特有的

肝脏分泌液,有着特殊的理化成分,并具有促进脂肪乳化、抗菌消炎、促进生长等功能^[25]。在雄性七鳃鳗(*Petromyzon marinus*),胆汁酸盐还是一种性外激素^[26]。草鱼肝胰脏中的共生细菌有可能进入胆囊,在本研究中,肝胰脏中的 GZ10和胆汁中的 DN11,肝胰脏中的 GZ14和胆汁中的 DN36为同一细菌(表 1,表 2),其 16S rDNA 序列完全相同,此两种细菌可存在肝胰脏和胆汁中。肝胰脏中有 10.5%的细菌群落与胆汁的细菌群落相似,胆汁中有 20%的细菌群落与肝胰脏相似,表明草鱼肝胰脏和胆汁有各自特有的共生细菌群落。鱼类的胆汁 pH 值一般为弱酸性,如鲤(*Cyprinus carpio*)为 5.5^[27],弱酸性的胆汁中,为什么会有自身特有的细菌群落呢?这些细菌是否有帮助胆汁起重要的生理作用?值得今后进一步的调查。

总的来说,由于目前还很少有关于鱼类肝脏和胆汁细菌菌落研究报道,存在于草鱼肝胰脏和胆汁中的细菌是否与宿主特异性有关,或与肝脏或胆汁的生理功能有关,需要今后对不同鱼类肝脏、胰脏和胆汁的菌落组成进行比较分析。相对于传统的细菌培养法进行细菌群落调查,本研究中所采用的 16S rDNA 基因组文库随机测序的方法,更为全面。传统的细菌培养法所能分离的细菌,只占全部群落很少的一部分^[28-29]。而相对于 16S rDNA-DGGE 法鉴定鱼类体内群落组成,16S rDNA 基因组文库随机测序的方法,不但能鉴定细菌,而且能评估各细菌的丰度^[10, 30-32]。本研究利用 16S rDNA 基因组文库随机测序法,比较容易地确定了草鱼肝胰脏的优势种为属于气单胞菌属的 GZ16和假单胞菌属的 GZ9,确定了胆汁中的优势种为变形杆菌属的 DN1菌株。此外,16S rDNA 基因组文库随机测序法方法简单,不需要昂贵的仪器。

参考文献:

- [1] McFall-Ngai M, Henderson B, Ruby E G. The Influence of Cooperative Bacteria on Animal Host Biology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [2] Saha S, Roy R N, Sen S K, et al. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters) and grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes) [J]. *Aquaculture Res* 2006, 37(4): 380-388.
- [3] Rimmer D W, Wiebe W J. Fermentative microbial digestion

- in herbivorous fishes[J]. *Journal of Fish Biology* 1987, 31: 229-236.
- [4] Clements K D, Sutton D C, Choat J H. Occurrence and characteristics of unusual protistan symbiosis from surgeonfishes (Acanthuridae) of the Great Barrier Reef, Australia [J]. *Marine Biology* 1989, 102(3): 403-412.
- [5] Clements K D. Endosymbiotic communities of two herbivorous labroid fishes *Odax cyanomelas* and *O. pullus* [J]. *Marine Biology* 1991, 109(2): 223-229.
- [6] Luczkovich J J, Stelwag E J. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish *Lagodon rhomboides*: size-related changes in diet and microbial abundance [J]. *Marine Biology* 1993, 116(3): 381-388.
- [7] Baiagi A, Sarker Ghosh K, Sen S K, et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts [J]. *Aquaculture International* 2002, 10(2): 109-121.
- [8] Hooper L V, Gordon J I. Commensal host-bacterial relationships in the gut [J]. *Science* 2001, 292(5519): 1115-1118.
- [9] Guamer F, Malagelada J R. Gut flora in health and disease [J]. *Lancet* 2003, 361(9356): 512-519.
- [10] Rawls J F, Samuel B S, Gordon J I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(13): 4596-4601.
- [11] 周文豪,陈孝焯,张冬晓,等. 摄食不同饵料对草鱼肠道菌群影响的研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(3): 252-255.
- [12] Lindsay G J H, Harris J E. Carboxymethylcellulase activity in the digestive tracts of fish [J]. *J Fish Biol* 1980, 16(3): 219-233.
- [13] Lesel R, Frumageot C, Lesel M. Cellulose digestibility in grass carp *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish *Carassius auratus* [J]. *Aquaculture* 1986, 54(1-2): 11-17.
- [14] Cahill M. Bacterial flora of fishes: a review [J]. *Microbiol Ecol* 1990, 19(1): 21-41.
- [15] Mécivar A H. Interactions of pathogens in aquaculture with wild fish populations [J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 1997, 17(6): 197-200.
- [16] Nieto T P, Toranzo A E, Barja J L. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North West of Spain [J]. *Aquaculture* 1984, 42(3-4): 193-206.
- [17] De Sousa J A, Silva-Sousa A T. Bacterial community associated with fish and water from Congohas River, Sertaneja, Paraná, Brazil [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2001, 44(4): 373-381.
- [18] Shakibazadeh S, Saad C R, Christianus A, et al. Bacteria flora associated with different body parts of hatchery reared juvenile *Penaeus monodon* tanks water and sediment [J]. *Annals of Microbiology* 2009, 59(3): 425-430.
- [19] 杨桂梅,唐文乔,鲍宝龙,等. 利用 PCR-DGGE 法分析暗

- 纹东方鲀的弧菌菌落组成 [J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 257—263.
- [20] Yang G, Bao B, Peatman E et al. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus* [J]. *Aquaculture* 2007, 262(2—4): 183—191.
- [21] Yang G, Bao B, Li H et al. Analysis on the composition of culturable bacterial communities in several tissues of puffer fish *Takifugu obscurus* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University* 2008, 17(1): 12—21.
- [22] 赵庆新, 谭远德. 利用肠道菌群的分布和 DNA 序列对鲤科鱼类系统演化关系的研究 [J]. 2001, 中国水产科学, 8(1): 26—32.
- [23] Bosshard P P, Santini Y, Grütter D et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis [J]. *FEMS Microbiol Ecol* 2000, 31(2): 173—182.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol* 2007, 24(8): 1596—1599.
- [25] 李小勤, 冷向军. 鱼类胆汁的应用 [J]. 天津农业科学, 2006, 12(4): 22—25.
- [26] Li W, Scott A P, Siefkes M J et al. Bile acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone [J]. *Science* 2002, 296(5565): 138—141.
- [27] 尾崎久雄. 鱼类消化生理 (上册) [M]. 吴尚忠, 译. 上海: 科学技术出版社, 1983.
- [28] Felske A, Akkermans A D L, De Vos W M. In situ detection of an uncultured predominant *Bacillus* in Dutch grassland soils [J]. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64(11): 4588—4590.
- [29] Fritsche T R, Hom M, Seyedinshiti S et al. In situ detection of novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. Phylogenetically related to members of the order *Rickettsiales* [J]. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(1): 206—212.
- [30] Tanaka R, Ootsubo M, Sawabe T et al. Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques [J]. *Aquaculture* 2004, 241(1—4): 453—463.
- [31] Li Z, Hu Y, Liu Y et al. 16S rDNA clone library-based bacterial phylogenetic diversity associated with three South China Sea sponges [J]. *World J Microbiol Biotechnol* 2007, 23(9): 1265—1272.
- [32] Liebner S, Harder J, Wagner D. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia [J]. *Int Microbiol* 2008, 11(3): 195—202.