

秦岭地区野生细鳞鲑肠道微生物多样性 及产酶活性分析

黄曼曼 邓百万* 谢修超 武晓雨 李艳丽

陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西省食药食用菌工程技术研究中心 汉中 723001

摘要: 为探究秦岭地区野生细鳞鲑 (*Brachymystax lenok*) 肠道细菌组成多样性, 筛选出产胞外酶菌株, 利用传统分离培养并分子鉴定的方法和基于 16S rRNA 基因克隆的现代分子生物技术相结合测定秦岭野生细鳞鲑肠道细菌菌群多样性并构建系统发育树, 利用淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶及脂肪酶 4 种胞外酶筛选培养基筛选出产上述酶的细菌。细菌传统分离培养并分子鉴定法从细鳞鲑肠道获得 18 个属的细菌类群, 分别归属于变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门, 其中, 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 为优势菌群。基于 16S rRNA 基因克隆的现代分子方法获得 22 个属的细菌类群, 分别归属于变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门, 其中, 鞘氨醇杆菌属 (*Sphingomonas*) 为优势菌群。4 种胞外酶筛选获得 53 株细菌产胞外酶, 其中 21 株可在低温 (10 °C) 环境下产胞外酶。结果表明, 传统分离培养法与基于 16S rRNA 基因克隆的现代分子生物技术相结合能够更有效全面地分析细鳞鲑鱼肠道微生物的多样性, 并且细鳞鲑肠道微生物具有一定的产酶活性。

关键词: 细鳞鲑; 传统的分离培养法; 16S rRNA 基因克隆; 产酶活性

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 01-114-12

Analysis of Microbial Diversity and Enzyme Activity in the Gut of Wild *Brachymystax lenok* from Qinling Mountains

HUANG Man-Man DENG Bai-Wan* XIE Xiu-Chao WU Xiao-Yu LI Yan-Li

Shaanxi University of Technology, School of Biological Science and Engineering, Shaanxi Provincial Engineering Research Center of Edible and Medicinal Microbes, Hanzhong 723000, China

Abstract: This research aimed to understand the bacterial diversity in the gut of wild *Brachymystax lenok* and screen extracellular enzyme-producing strains. We analyzed the species diversity of bacteria based on 16S rRNA phylogenetic relationships and screened isolates that produced extracellular enzymes including amylase, protease, cellulase and lipase. A total of 18 bacterial genera isolated were respectively belonged to Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes. *Aeromonas* were the dominant groups. On the basis of

基金项目 陕西省科技厅科技创新工程项目 (No. 2016HBGC-07), 陕西理工大学研究生创新基金项目 (No. SLGYCX1722);

* 通讯作者, E-mail: 2210309868@qq.com;

第一作者介绍 黄曼曼, 女, 硕士研究生; 研究方向: 微生物资源保育; E-mail: 765447467@qq.com.

收稿日期: 2017-09-20, 修回日期: 2017-11-17 DOI: 10.13859/j.cjz.201801015

culture-independent approach, a total of 22 bacterial genera were classified into Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes and Chlorophyta. *Sphingomonas* were the dominant genera (Table 1, Fig. 3, 4). Screening of enzyme activities showed that 53 strains produced different extracellular enzymatic activities and that 21 strains could produce extracellular enzymes in a low temperature (Table 2). This study revealed that combination of traditional separation culture and modern molecular biotechnology based on 16S rRNA gene cloning could be used to effectively analyze the bacterial diversity in the gut of wild *B. lenok* from Qinling mountainous regions and to obtain diverse enzyme-producing bacterial strains.

Key words: *Brachymystax lenok*; Traditional isolation culture; 16S rRNA gene cloning; Enzyme production activity

细鳞鲑 (*Brachymystax lenok*) 属鱼纲鲑形目鲑科细鳞鲑属, 属于国家 II 级保护野生动物, 仅分布于渭河上游及其支流和汉水北部支流以及子午河的上游等部分地区, 是一种珍稀的鲑科陆封型冷水鱼类 (周然等 2017)。由于自然和人为因素的双重影响, 生态环境日趋恶化, 野生资源量急剧减少, 再加上细鳞鲑对于生境的特殊要求, 人工养殖困难且周期较长, 近几年对于秦岭的野生细鳞鲑生物学研究及其保护研究较多 (李平等 2015), 但对于其肠道微生物的研究未见报道。

动物肠道是一个密闭系统, 其内部生长的微生物大多是一些厌氧或兼性厌氧的微生物 (兰阿峰等 2014)。动物肠道微生物中细菌种类最为丰富, 这类细菌利用宿主消化道内的食物满足自身生长, 同时还能产生各种酶、有机酸及营养类物质, 调节肠道微生态的平衡, 对宿主的生长及发育起着重要作用 (刘栋等 2016)。目前, 对于动物肠道微生物的研究主要包括传统的分离培养及现代分子生物学方法。微生物学传统的培养方法是用适当的培养基对微生物进行分离、培养, 但由于人们认知及客观条件的限制, 许多微生物很难被分离培养出来, 以至于分离到的微生物种类较少。现代分子生物学方法, 又称免培养方法, 是一种基于 16S rRNA 基因克隆的现代分子生物技术, 与传统的分离鉴定方法完全不同, 能够有效解决传统培养方法无法获取较多种微生物的缺点 (杨曼等 2014)。本研究利用传统的分离培养法与

现代分子生物学方法相结合, 对秦岭野生细鳞鲑肠道微生物多样性进行研究。可通过改变其食物链及其生存环境进而改变肠道微生物组成、增加优势菌群数量等一系列措施, 预防肠道疾病, 进而为秦岭野生细鳞鲑健康可持续地繁殖和生存做出贡献。

1 材料与方法

2017 年 3 月于陕西省佛坪县汉江流域采集野生细鳞鲑 6 尾, 体重 (1.3 ± 0.27) kg ($1.1 \sim 1.8$ kg), 体长 (205 ± 41.71) mm ($162 \sim 276$ mm)。带回实验室放入 -70 °C 低温冰箱冷冻保存。

1.1 主要培养基及其配制

牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 加水定容至 1 000.0 ml。固体培养基中加琼脂 18.0 g, pH 7.2。淡水鱼琼脂培养基 (fresh water fish agar medium, FWA): 蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 1.0 g, 磷酸高铁 0.1 g, 琼脂 18.0 g, pH 7.0。蛋白酶筛选培养基: 牛肉粉 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 脱脂高蛋白奶粉 20.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1 000.0 ml。淀粉酶筛选培养基: 酵母粉 5.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 可溶性淀粉 20.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1 000.0 ml。纤维素酶筛选培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 10.0 g, 羧甲基纤维素钠 10.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1 000.0 ml。脂肪酶筛选培养基: 蛋白胨 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20.0 g,

水 1 000.0 ml, 溴甲酚紫 0.04 g。

1.2 传统分离培养法对细鳞鲑肠道细菌的分离及分子鉴定

1.2.1 细鳞鲑肠道细菌的分离 用 70% 酒精擦拭细鳞鲑体表, 无菌生理盐水冲洗 3 遍。用无菌剪刀及镊子取细鳞鲑肠道, 置于无菌离心管中, 加无菌生理盐水研磨, 并稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度浓度, 取稀释液 0.1 ml 涂布牛肉膏蛋白胨培养基和淡水鱼类琼脂培养基平板, 每一稀释度做 3 个重复, 28 °C 培养 2 d。在适当稀释度 (10^{-3}) 的平板上随机挑取形状不同的单菌落, 经平板划线纯化, 获得纯培养物接种于牛肉膏蛋白胨培养基斜面, 4 °C 保存。

1.2.2 细鳞鲑肠道细菌的鉴定 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (上海生工生物技术有限公司) 提取菌株 DNA。采用细菌 16S rRNA 通用引物 27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 和 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' 对所提 DNA 进行 16S rRNA 扩增。PCR 反应体系 50 μ l: 2 \times Taq Master Mix 0.25 μ l, 10 μ mol/L 引物各 2 μ l, 模板 DNA 1 μ l (浓度 10 ng/ μ l), 10 \times Buffer 5 μ l, 10 mmol/L dNTP 5 μ l, dd H₂O 补齐至 50 μ l。反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 延伸 2 min, 4 °C 保存。PCR 产物电泳检测后送上海生工生物技术有限公司进行正、反双向测序, 再于 NCBI 进行序列比对, 确定属种, 并获取登录号。利用 MEGA 5, 按照邻接法 (neighbor-joining) 聚类, 选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析, 构建系统发育树。

1.3 现代分子生物学方法对细鳞鲑肠道细菌 16S rRNA 基因克隆文库的构建和筛选

1.3.1 总 DNA 提取和 16S rRNA 基因的扩增 解剖细鳞鲑后将其肠道内容物收集到灭菌的 1.5 ml EP 管中。使用 MP® Fecal DNA Isolation Kit 试剂盒 (美国 Mo Bio 公司) 提取肠道内容物总 DNA, -20 °C 保存备用。细菌 16S rRNA

采用通用引物 799F (5'-AAC AGG ATT AGA TAC CCT G-3') 和 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 进行扩增, 预期扩增长度为 730 bp 左右。PCR 反应体系 (20 μ l): 2 \times Taq Master Mix 10 μ l, 10 μ mol/L 引物各 1 μ l, 模板 DNA 2 μ l (浓度 10 ng/ μ l), ddH₂O 补齐至 20 μ l。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 33 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖电泳检测。

1.3.2 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选 用 Sanprep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工生物技术有限公司) 将上述扩增后 730 bp 左右的目的条带切胶纯化回收。纯化产物与 pMD18-Tvector 连接, 连接产物转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞。将转化后的细胞涂布含氨苄青霉素 (100 mg/L)、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板, 37 °C 避光培养 14 ~ 16 h, 进行蓝白斑筛选。选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落, 用牙签挑至牛肉膏蛋白胨液体培养基, 37 °C 过夜培养后送上海生工生物技术有限公司进行正反双向测序, 再于 NCBI 进行序列比对, 获取登录号, 建立系统发育树。

1.4 细鳞鲑肠道细菌胞外酶产生菌的筛选

对纯培养所获得的菌株进行胞外酶产生菌的筛选实验, 4 种胞外酶包括蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和脂肪酶。蛋白酶产生菌的筛选 (宋鹏等 2012): 使用蛋白酶筛选培养基平板, 穿刺接种后 37 °C 培养, 待菌落直径生长为 2 mm 时, 筛选出菌落周围出现透明圈菌株为产蛋白酶菌株, 并测量降解圈 (透明圈) 半径, 代表产酶活性。淀粉酶产生菌的筛选 (赵志丹等 2011): 使用淀粉酶筛选培养基平板, 无菌条件下穿刺接种后 37 °C 培养, 待菌落生长至直径 2 mm 时, 将卢氏碘液覆盖培养基染色 1 min, 筛选出菌落周围有透明圈出现的为产淀粉酶菌株, 并测量降解圈 (透明圈) 半径为产酶活性。纤维素酶产生菌的筛选 (樊程等 2012): 使用

纤维素酶筛培养基平板, 穿刺接种后 37 °C 培养, 待菌落生长至直径 2 mm 时, 加入刚果红染液染色 3 min, 再用 NaCl 水溶液脱色 3 min, 筛选出菌落周围具有透明圈出现的为产纤维素酶菌株, 并测量降解圈(透明圈)半径为产酶活性。脂肪酶产生菌的筛选(李珍等 2011): 按脂肪酶筛选培养基配制培养基, 灭菌后加入 PVA 橄榄油乳化液 120 ml, 摇匀倒平板, 无菌条件下穿刺接种后 37 °C 培养, 待菌落生长至直径 2 mm 时, 筛选出具有降解圈(透明圈)出现的为产脂肪酶菌株, 并测量黄色降解圈半径为产酶活性。产酶菌株即菌株具有产酶活性, 根据降解圈的大小比较各菌株的产酶活性大小。对于微生物的培养, 10 °C 为低温培养, 将所筛选出的产胞外酶菌株在 10 °C 低温培养环境下用上述同样的方式筛选低温环境下产胞外酶菌株。

2 结果与分析

2.1 细鳞鲑肠道细菌多样性结果

利用传统分离培养法获得 211 株菌株, 分别对其进行 16S rRNA 基因扩增和测序, 16S rRNA 基因序列提交 GenBank, 这 211 株菌株 16S rRNA 基因序列号 MF151907 ~ MF152118。测序结果在 NCBI 上用 BLAST 程序进行比对分析, 测序的 211 株菌株分属于 3 门 4 纲 18 属(表 1)。包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes) 3 个门。其中, 变形菌门(Proteobacteria)菌株均属于 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria), 隶属 12 属 16 种, 包含 159 个菌株, 占所分离菌株的 75.4%, 为优势群类; 拟杆菌门(Bacteroidetes)菌株为黄杆菌纲(Flavobacteriia)的 1 属 1 种, 包含 28 个菌株, 占所分离菌株的 13.3%; 厚壁菌门(Firmicutes)包括芽孢杆菌纲(Bacilli)和梭菌纲(Clostridium), 芽孢杆菌纲共有 4 属 4 种, 包含 23 个菌株, 占所分离菌株的 10.9%, 梭菌纲仅 1 属 1 种, 包含 1 个菌株, 占所分离菌株的 0.4%。

利用现代分子生物学方法(即免培养法)提取细鳞鲑肠道内生细菌总 DNA(图 1), 应用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行特异性扩增, 得到 730 bp 的目标片段(图 2), 对目的基

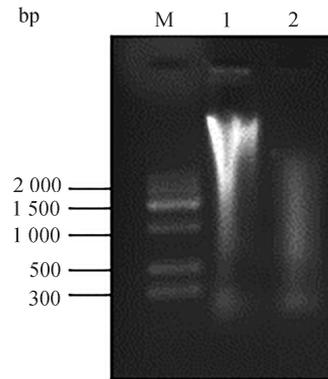


图 1 细鳞鲑肠道内生细菌总 DNA 电泳结果

Fig. 1 Total DNA extraction of intestinal bacteria from *Brachymystax lenok*

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1、2. 肠道细菌总 DNA。

M. DL2000 DNA marker; 1, 2 Total DNA of intestinal.

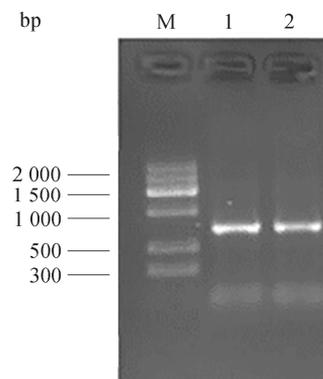


图 2 细鳞鲑肠道内生细菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification results of 16S rRNA gene of endophytic bacteria from the *Brachymystax lenok*

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1、2. 细菌 16S rRNA 基因产物。

M. DL2000 DNA marker; 1, 2. Bacterial 16S rRNA gene products.

因进行克隆筛选后得到 239 个阳性克隆, 对阳性克隆测序后获得的相应 16S rRNA 基因序列提交 GenBank, 序列号 MF152120 ~ MF152359。

此方法获得的 239 个阳性克隆测序后,在 NCBI 上用 BLAST 程序进行比对分析,克隆所代表菌株分属于 4 门 6 纲 22 个属(表 1),包括变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门(Actinobacteria),还有部分与未培养的细菌 16S rRNA 基因具有较高的相似性,未能确定种属。其中,变形菌门鉴定出 γ -变形菌纲和 β -变形菌纲(β -Proteobacteria)共 12 属 16 种,包含 148 个克隆序列,占克隆总数的 61.9%,为优势群类;拟杆菌门的隶属于纲黄杆菌纲 1 属 1 种,包含 4 个克隆序列,占克隆总数的 1.7%;厚壁菌门包括芽孢杆菌纲和梭菌纲的 8 属 8 种,包含 66 个克隆序列,占克隆总数的 27.6%;放线菌门(Actinobacteria)仅菌纲放线菌纲(Actinobacteria)的 1 属 1 种,包含 2 个克隆序列,占克隆总数的 0.8%。另外还存在 19 个克隆序列与未培养的细菌 16S rRNA 基因具有较高的相似性,未能确定种属,占总克隆数的 8.0%。根据细菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树见图 3 和图 4。

2.2 胞外酶产生菌的筛选

利用 4 种胞外酶筛选培养基共筛选出 53 株产胞外酶的菌株,其中经淀粉酶菌筛选培养基筛选出 39 株细菌产淀粉酶,经蛋白酶筛选培养基筛选出 33 株细菌产蛋白酶,经纤维素酶筛选培养基筛选出 30 株细菌产纤维素酶,经脂肪酶筛选培养基筛选出 38 株细菌产脂肪酶。产淀粉酶活性最高的菌株是 1-9、Y1-16、Y1-73、Y1-81,产蛋白酶活性最高的是菌株 Y1-9,产纤维素酶活性最高的是菌株 1-18、Y2-16,产脂肪酶活性最高的是菌株 1-1(表 2)。

10 °C 低温环境下培养,1-4、1-9、1-25、1-56、Y1-9、Y1-10、Y1-73、Y2-13、Y2-14、Y2-26、Y2-30 这 11 个菌株能在 10 °C 低温环境下产淀粉酶,1-2、1-3、1-25、1-26、Y1-9、Y2-21、Y2-30 这 7 个菌株能在 10 °C 低温环境下产蛋白酶,1-17、1-18、Y1-9、Y1-73、Y2-16、Y2-24、Y2-28 这 7 个菌株能在 10 °C 低温环境下产纤维素酶,菌株 1-1 能在 10 °C 低温环境

下产脂肪酶。

3 讨论

利用传统的分离培养法与现代分子生物技术相结合的方法对秦岭野生细鳞鲑肠道细菌多样性进行研究,并对其肠道微生物产胞外酶的活性进行测定,研究结果表明,秦岭野生细鳞鲑肠道内生细菌多样性丰富,部分菌株在中、低温培养环境下具有较好的产酶活性。

传统的分离培养和分子生物学方法两种分析方法中都检测到气单胞菌属(*Aeromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、黄质菌属(*Flavobacterium*)、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)和梭菌属(*Clostridium*),并且在所分离菌株及克隆序列中所占比例较大,这些菌属分别属于变形菌门、拟杆菌和厚壁菌门,表明这 3 门的细菌对秦岭的野生细鳞鲑肠道功能有重要影响作用。两种分析方法得到的肠道细菌群落的优势菌群有一定的差异,传统培养法中气单胞菌属为优势菌群,而在分子生物学方法中鞘氨醇杆菌属(*Sphingomonas*)为优势菌群,并且在利用分子生物学方法检测到的鞘氨醇杆菌属、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)、不动细菌属(*Acinetobacter*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*),在传统分离培养方法中未检测到。其中,乳酸菌属具有保护肠道上皮组织、促进人体及动物代谢调节和免疫激活作用,在肠道微生态的平衡中起到重要的作用,在动物饲养过程中作为饲料添加剂以更好地促进动物的生长(曹力等 2014)。乳酸菌属是严格厌氧菌,在传统培养分离过程中,本实验采用好氧、厌氧两种培养方式同时进行,但结果中也并未发现乳酸菌属,其原因是纯培养过程中不可避免会对微生物起筛选作用,一些微生物由于不适应人工提供的培养条件而不能被分离和鉴定出来,因此纯培养方法不能真正显示肠道中微生物的种群结构及多样性,需和分子生物学方法相结合才能更准确地反应肠道中微

表 1 细鳞鲑肠道细菌多样性结果
Table 1 Intestinal bacterial diversity in *Brachymystax lenok*

类群 Group	纯培养 Pure culture				免培养 Culture-independent			
	菌株数量 Strains number	代表菌株 Representative strains	最相似菌株 (GenBank 号) The most similar strain (GenBank number)	相似度 (%) Similarity	菌株数量 Strains number	代表菌株 Representative strains	最相似菌株 (GenBank 号) The most similar strain (GenBank number)	相似度 (%) Similarity
变形菌门 Proteobacteria γ-变形菌纲 γ-Proteobacteria	43	Y1-70	温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i> (JX860606.1)	100	58	1-A16	鞘氨醇杆菌属 <i>Phingomonas</i> (KF681223.1)	100
	9	Y1-69	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i> (KU525084.1)	99	3	1-A8	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i> (KX549468.1)	99
	8	Y1-59	中间气单胞菌 <i>A. media</i> (KP813654.1)	99	12	1-B38	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i> (FJ940841.1)	99
	6	1-14	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> (GU563994.1)	99	6	1-B3	维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i> (KX950809.1)	99
	13	Y1-53	气单胞菌属 <i>Aeromonas</i> (KT424961.1)	100	3	2-A73	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i> (KJ743719.1)	99
	4	Y1-85	拉恩菌属 <i>Rahnella</i> (KF720908.1)	99	11	2-A66	<i>A. allosacchar-ophila</i> (FJ940841.1)	99
	1	Y1-28	弗罗因德柯膝酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i> (JQ271810.1)	99	2	S77	嗜河湖菌 <i>A. fluvialis</i> (NR_116586.1)	99
	3	Y1-58	泛菌属 <i>Pantoea</i> (KT1767898.1)	99	1	S78	欧文式菌属 <i>Erwinia billingiae</i> (KF358451.1)	97
	1	Y1-80	布丘氏菌属 <i>Buttiauxella ferruginitae</i> (LN824004.1)	98	1	2-A57	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> (JF312984.1)	99
	2	Y1-14	美洲爱文氏菌 <i>Ewingella americana</i> (JX867760.1)	99	1	2-A59	肠球科 <i>Enterococcus</i> (GU905013.1)	97

续表 1

类群 Group	纯培养 Pure culture			免培养 Culture-independent			
	菌株数量 Strains number	代表菌株 Representative strains	最相似菌株 (GenBank 号) The most similar strain (GenBank number)	菌株数量 Strains number	代表菌株 Representative strains	最相似菌株 (GenBank 号) The most similar strain (GenBank number)	相似度 (%) Similarity
β-变形菌纲 β-Proteobacteria	4	1-85	哈夫尼菌属 <i>Hafnia</i> (HM489947.1)	2	1-B7	嗜麦芽芽窄单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i> (KM660694.1)	99
	1	Y2-20	肠杆菌属 <i>Enterobacteriaceae</i> (JX1162039.1)	1	S1	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> (KR085793.1)	99
	3	Y1-51	耶尔森氏鼠疫杆菌 <i>Yersinia</i> (CP009781.1)	13	2-A33	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (JF312947.1)	98
	44	Y2-36	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i> (KX185698.1)	16	1-A22	罗尔斯顿菌属 <i>Ralstonia</i> (KC860267.1)	99
	9	1-20	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (JX134634.1)	16	1-A50	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i> (KC211018.1)	99
	8	Y1-10	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> (KR189430.1)	1	S77	伯克氏菌属 <i>Burkholderia</i> (HE864347.1)	99
				1	S69	几丁质菌 <i>Chitinibacter</i> (NIR_132683.1)	98
				4	1-A18	黄质菌属 <i>Flavobacterium</i> (HQ113381.1)	99
				19	1-A71	细菌 <i>Bacterium</i> (KR026997.1)	99
				4	1-A65	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (AB968105.1)	99
拟杆菌门 Bacteroidetes 黄杆菌纲 Flavobacteriia	28	1-43	黄质菌属 <i>Flavobacterium</i> (JX287816.1)	9	S60	乳酸菌 <i>Lactobacillus</i> (GQ423763.1)	99
	厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌纲 Bacilli	15	Y1-46	肉食杆菌属 <i>Carnobacterium</i> (KY124220.1)	4		
		1	Y2-11	嗜冷杆菌 <i>Psychrobacter</i> (KJ735913.1)	9		
	3	2-14	杆菌 <i>Bacillus</i> (KY621966.1)				

续表 1

类群 Group	纯培养 Pure culture			免培养 Culture-independent		
	菌株数量 Strains number	代表菌株 Representative strains	最相似菌株 (GenBank 号) The most similar strain (GenBank number)	菌株数量 Strains number	代表菌株 Representative strains	最相似菌株 (GenBank 号) The most similar strain (GenBank number)
			嗜血杆菌属 <i>Haemophilus</i> (KY124179.1)			肉食杆菌属 <i>Carnobacterium</i> (HE999757.2)
	4	Y1-43		28	S62	
						魏斯氏菌属 <i>Weissella cibaria</i> (LC094435.1)
				1	S12	
						嗜血杆菌属 <i>Haemophilus</i> (NR_104935.1)
				1	S3	
						微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i> (KX998198.1)
				1	S20	
梭菌纲 Clostridium	1	Y2-37	梭菌属 <i>Clostridium</i> (FJ155850.1)	3	1-A4	梭菌属 <i>Clostridium</i> (NR_024945.1)
放线菌门 Actinobacteria						球菌属 <i>Pediococcus</i> (AB706354.1)
放线菌纲 Actinobacteria				2	1-B49	
未培养细菌 Uncultured bacterium				19	1-B11	未培养细菌 Uncultured bacterium (KU514668.1)

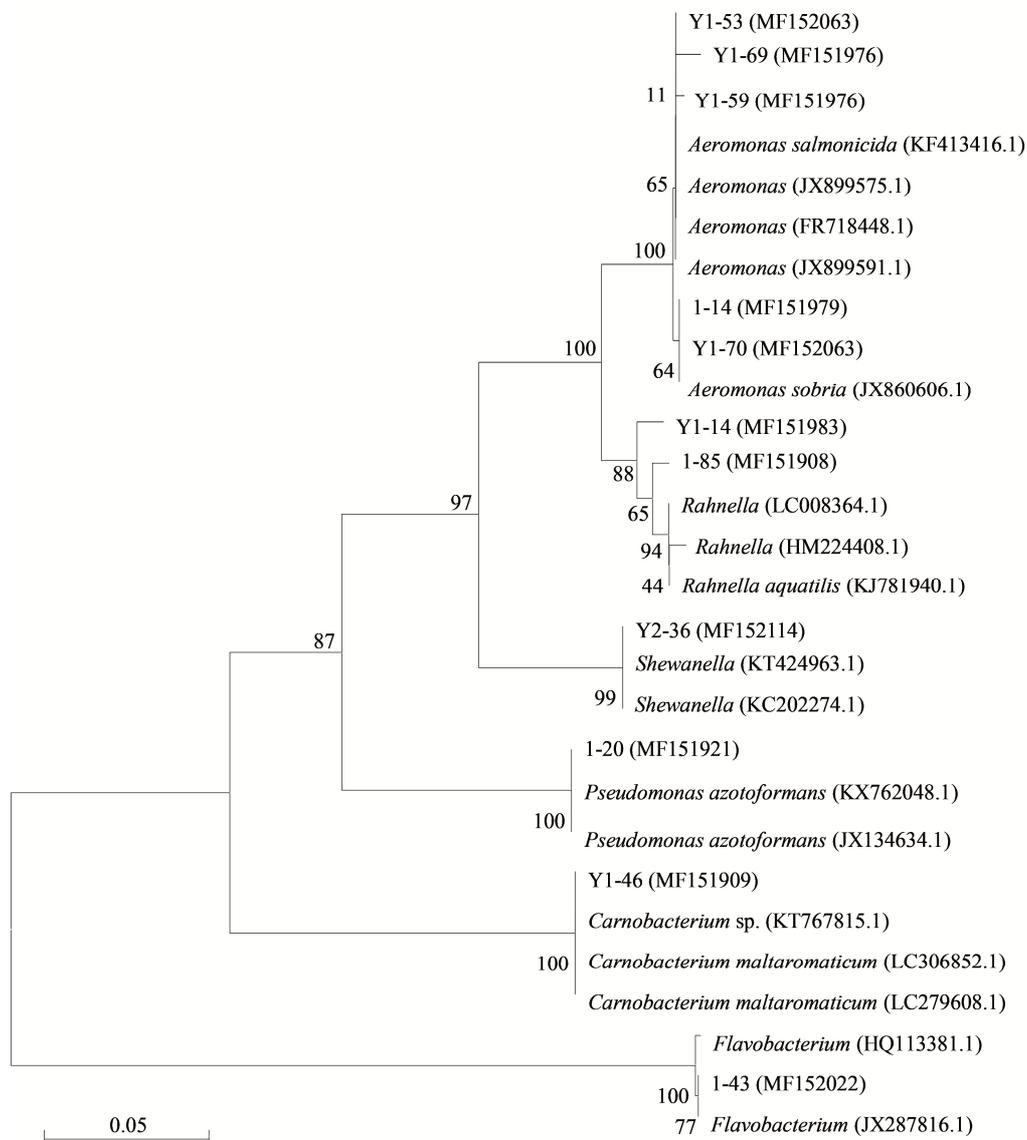


图3 纯培养细鳞鲑肠道细菌 16S rRNA 邻接系统发育树

Fig. 3 The neighbor-joining tree from *Brachymystax lenok* based on pure culture bacterial 16S rRNA gene

节点上数据为 1 000 次自展的自展值。标尺代表核苷酸替代率。括号中的数字是每个菌株序列的登录号。

Numbers above the nodes indicate the bootstrap values. The bars represent nucleotide substitution rates. The numbers in parentheses are the logon number for each strain.

生物的种群结构及多样性 (刘莉等 2008)。

动物肠道能够产各类的胞外酶,如淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶以及脂肪酶等。本实验从分离自野生细鳞鲑肠道中的菌株中得到产淀粉酶菌株 39 株,其中低温产淀粉酶菌株 11 株,产

蛋白酶菌株 33 株,低温产蛋白酶菌株 7 株,产纤维素酶菌株 38 株,低温产纤维素酶菌株 7 株,产脂肪酶菌株 17 株,低温产脂肪酶菌株 1 株。动物饲养过程中添加一些蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等来帮助动物的消化及代谢,促进动

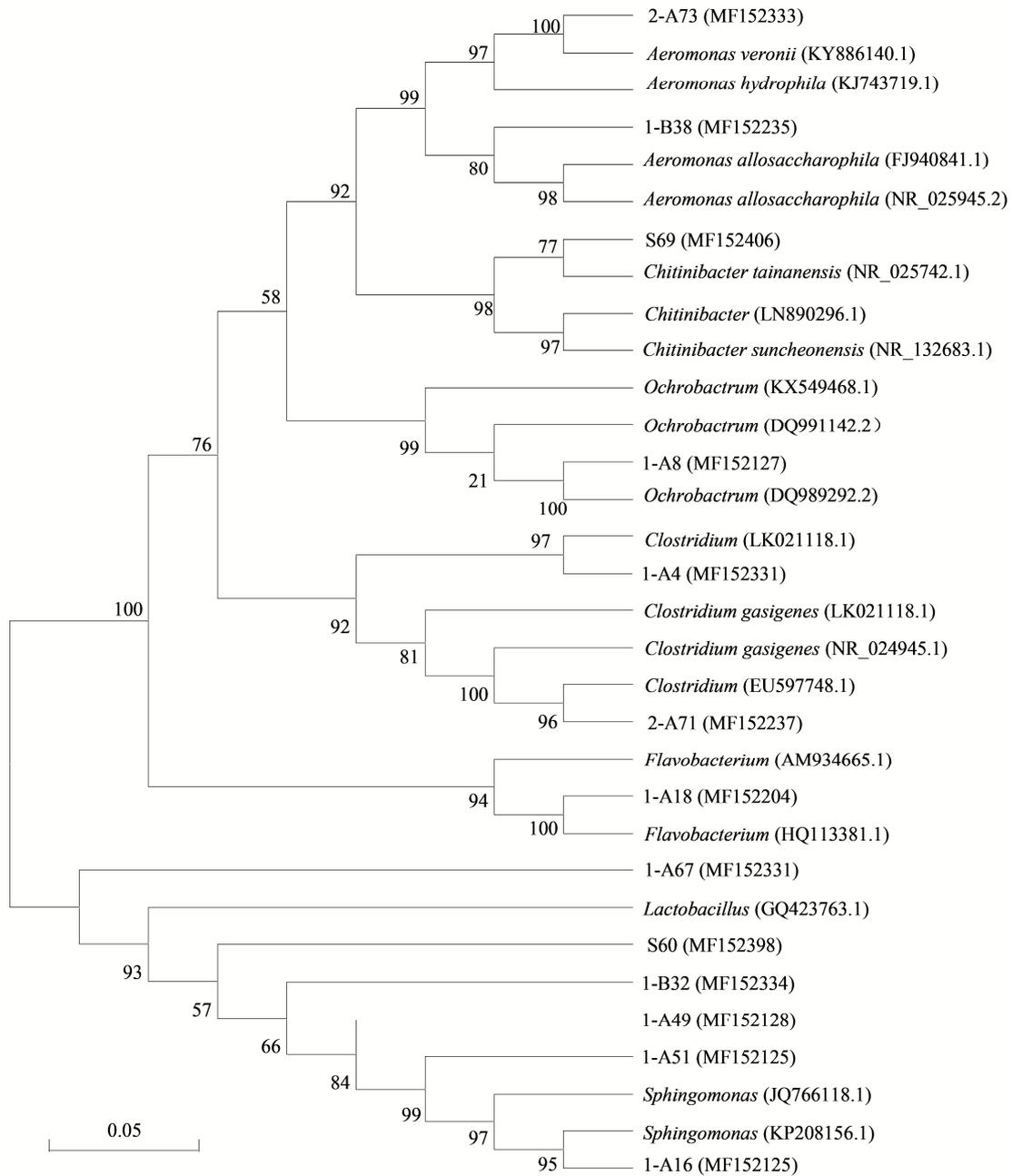


图 4 免培养细鳞鲑肠道细菌 16S rRNA 基因克隆文库系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on bacterial 16S rRNA gene clone library from *Brachymystax lenok*

节点上数据为 1 000 次自展的自展值。标尺代表核苷酸替代率。括号中的数字是每个菌株序列的登录号。

Numbers above the nodes indicate the bootstrap values. The bars represent nucleotide substitution rates. The numbers in parentheses are the logon number for each strain.

物更好的生长及发育。秦岭野生细鳞鲑长期生活在较低温环境下, 肠道微环境营养物质丰富

且天然厌氧, 从其肠道中分离出产酶及低温产酶菌株对于秦岭野生细鳞鲑鱼保护及工业生产

表 2 细鳞鲑肠道细菌胞外酶活性

Table 2 The extracellular enzyme activity of intestinal bacteria from *Brachymystax lenok*

菌株编号 Strain number	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	纤维素酶 Cellulase	脂肪酶 Lipase	菌株编号 Strain number	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	纤维素酶 Cellulase	脂肪酶 Lipase
1-1	++	-	-	++	Y1-62	++	+	-	-
1-2	+	++	+	-	Y1-71	++	++	+++	+
1-3	++	+++	+	-	Y1-72	+	-	+	+
1-4	+++	-	++	-	Y1-73	++++	++	+++	+
1-8	+	++	-	+	Y1-74	-	++	+	-
1-9	++++	+	+	-	Y1-81	++++	+	-	-
1-17	-	-	++	+	Y1-86	-	+	+	-
1-18	-	-	++++	+	Y1-87	-	++	+	-
1-25	++	++	+	-	Y1-88	++	-	+	-
1-26	+++	++	+	-	Y1-89	-	++	+++	-
1-39	-	-	-	-	Y1-92	+++	+++	++	+
1-52	++	+	++	+	Y1-95	+	-	-	-
1-53	+++	+	+	+	Y2-13	++	-	++	-
1-54	-	+	-	+	Y2-14	+++	-	+++	+
1-56	+++	++	+++	+	Y2-15	-	++	-	-
1-85	++	-	-	+	Y2-16	++	++	++++	-
1-92	-	+++	-	-	Y2-20	+	-	+++	-
1-93	+	++	+++	-	Y2-21	-	+++	-	-
1-95	++	-	-	+	Y2-23	++	-	++	-
Y1-9	+++	++++	++	-	Y2-24	-	++	+++	-
Y1-10	+++	-	+	-	Y2-26	++	-	++	-
Y1-15	-	++	+++	-	Y2-28	+	-	+++	+
Y1-16	++++	+++	++	-	Y2-29	++	+	-	-
Y1-41	+++	-	-	+	Y2-30	++	++	++	-
Y1-45	+	++	+	-	Y2-31	+++	-	+	-
Y1-47	+	++	++	-	Y2-35	++	-	+	-
Y1-61	-	++	-	-					

+. 降解圈半径 0~1 mm; ++. 降解圈半径 1~2 mm; +++. 降解圈半径 2~3 mm; +++. 降解圈半径大于 3 mm; -. 无降解圈。

+. Radius of degradation circle 0 - 1 mm; ++. Radius of degradation circle 1 - 2 mm; +++. Radius of degradation circle 2 - 3 mm; +++. Radius of degradation circle > 3 mm; -. Negative.

都具有较大意义。

参 考 文 献

曹力, 武晓红. 2014. 乳酸杆菌的肠道调节作用及其在动物生产中应用的研究进展. *中国畜牧兽医*, 41(11): 267-270.
樊程, 李双江, 李成磊, 等. 2012. 大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质. *微生物学报*, 52(9): 1113-1121.

兰阿峰, 杨曼, 邓百万, 等. 2014. 免培养法对大鲵肠道微生物多样性的研究. *微生物学通报*, 41(7): 1342-1349.
李平, 王丰, 问思恩. 2015. 秦岭细鳞鲑亲鱼培育和人工繁育技术研究. *上海海洋大学学报*, 24(6): 841-844.
李珍, 程子彰, 徐振杰, 等. 2011. 产脂肪酶真菌的选育及酶学性质研究. *菌物学报*, 30(1): 60-68.
刘栋, 兰阿峰, 王菲, 等. 2016. 野生大鲵肠道细菌多样性及产酶

- 活性研究. 生物技术, 26(1): 70–74.
- 刘莉, 王中康, 俞和韦, 等. 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622.
- 宋鹏, 陈亮, 郭秀璞. 2012. 产蛋白酶菌株的鉴定及酶学特性. 食品科学, (13): 152–155.
- 杨曼, 兰阿峰, 郭素芬, 等. 2014. 免培养法研究野生川金丝猴肠道内生细菌多样性. 微生物学通报, 41(8): 1605–1612.
- 赵志丹, 郭小华, 熊海荣. 2011. 产淀粉酶益生乳杆菌的筛选及鉴定. 中国微生态学杂志, 23(9): 769–773, 779.
- 周然, 郑维川. 2017. 探访秦岭细鳞鲑原生地. 中国水产, (5): 108–112.

棕腹杜鹃在山蓝仙鹟巢中寄生繁殖

罗康^{①②③} 关爽^⑤ 鲁志云^{①②} 赵海^④ 李东来^{⑤*}

① 中国科学院热带森林生态学重点实验室 西双版纳 666303; ② 中国科学院哀牢山亚热带森林生态系统研究站 景东 676200;

③ 中国科学院大学 北京 100049; ④ 云南省普洱市景东彝族自治县林业局 景东 676200;

⑤ 辽宁大学生命科学院 沈阳 110036

Brood Parasitism on Hill Blue-flycatcher (*Cyornis banyumas*) by Whistling Hawk Cuckoo (*Hierococcyx nisicolor*) in Yunnan, Southwestern China

棕腹杜鹃 (*Hierococcyx nisicolor*) 是鹃形目 (Cuculiformes) 杜鹃科 (Cuculidae) 的寄生性繁殖鸟类 (郑光美 2011, Dickinson et al. 2013)。目前棕腹杜鹃已记录的宿主主要为鹟科 (Muscicapidae) 鸟类, 例如北灰鹟 (*Muscicapa dauurica*)、白腹蓝姬鹟 (*Cyanoptila cyanomelana*) 等 (Payne 2005, Erritzøe et al. 2012)。棕腹杜鹃在中国的宿主报道很少, 仅栗通萍等 (2016) 报道了在广西大明山的棕腹杜鹃寄生于海南蓝仙鹟 (*Cyornis hainanus*) 一例。

2017年6月14日, 于云南景东县文井镇森林 (24°16'21.14"N, 100°55'34.50"E) 溪边的竹洞巢里发现1只杜鹃幼鸟, 约5~7日龄。该幼鸟长满羽锥, 头和背部皮肤呈黑色, 虹膜蓝色, 嘴黑色、内缘橙黄色, 下体浅色, 脚黄色, 尾脂腺黄色 (图1a)。4d以后再次观察发现该杜鹃长出羽毛, 整体呈黑色而缀细白点, 腹部具黑白相间横斑 (图1b), 这与 Erritzøe 等 (2012) 对棕腹杜鹃雏鸟的形态描述一致。之后, 取该雏鸟血样, 使用天根生化科技有限公司 DP304 试剂盒提取基因组 DNA, 利用鸟类 COI 基因通用引物 BirdF1 (5'-TTC TCC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3') 和 BirdR1 (5'-ACG TGG GAG ATA ATT CCA AAT CCT G-3') (Hebert et al. 2004) 扩增该雏鸟线粒体 COI 基因序列。PCR 产物委托金唯智生物科技公司测序, 序列拼接和校正后进行 BLAST 相似性搜索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 初步确定序列结果为棕腹杜鹃 COI 基因序列。

(下转第 142 页)

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31672316), 辽宁省教育厅项目 (No. L2015196);

* 通讯作者, E-mail: lidonglai@lnu.edu.cn;

第一作者介绍 罗康, 男, 博士研究生; 研究方向: 鸟类生态学; E-mail: luokang@xtbg.ac.cn。

收稿日期: 2017-08-09, 修回日期: 2017-11-13 DOI: 10.13859/j.cjz.201801027