

家蚕肠道细菌群体调查与分析

袁志辉^{1*}, 蓝希钊^{1*}, 杨廷¹, 肖杰¹, 周泽扬^{1,2*}

(¹ 西南大学农业部蚕桑学重点实验室微生物分室 重庆 400716)

(² 重庆师范大学生命科学学院 重庆 400047)

摘要: 目前,环境微生物中绝大部分是无法获得纯培养的。为了比较全面地了解家蚕肠道的细菌群体结构,研究采用了非培养法和传统培养法相结合的方法进行调查分析。非培养法是先直接提取家蚕肠道中的微生物群体基因组 DNA,用 PCR 法扩增细菌 16S rRNA 基因,建立 16S rDNA 文库,再以限制性片段长度多态性(RFLP)方法从文库中筛选可能不同细菌来源的克隆,并测定其核苷酸序列。将所获得的序列与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析,并通过系统发育分析,推测它们可能代表的细菌种属,以及对家蚕生长发育所起的作用。结果表明,家蚕肠道中的细菌主要是节杆菌属、乳杆菌属、大肠杆菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属。它们在家蚕消化利用桑叶和疾病预防中可能有着重要意义。非培养法和培养法均有各自的长处和不足,两者具有较强的互补性。

关键词: 家蚕肠道细菌 群体基因组 DNA 16S rRNA 非培养法

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2006) 02-0285-07

家蚕作为一种重要的经济动物与鳞翅目昆虫研究模型^[1],具有生长快、周期短的特点。在幼虫期 20 多天,家蚕除了本身具有消化食物的能力之外,肠道中种类繁多、数量巨大的微生物群体也对其食物的消化和营养的吸收起重要作用。同时,由于长期驯化的结果,家蚕防病能力极其脆弱,肠道内有益菌群的存在,能够有效地帮助家蚕抵制内源性细菌病害的侵袭。因此,肠道里的微生物对家蚕具有重要意义。

早在 20 世纪 60 年代,日本的潼泽义郎、河北俊彦等^[2-3]就对家蚕肠道内细菌进行过一些研究。在国内,孙雪奇等^[4]研究了家蚕肠道的部分微生物,并制成微生态制剂,用于降低幼蚕发病率和提高对桑叶的利用率;易发平等^[5]研究了家蚕肠道微生物好氧菌群。但这些研究都是按照传统的微生物研究方法,即先要分离培养肠道中的微生物,然后再对它们进行研究。

然而,近几十年来的分子生物学研究表明,99% 以上的环境微生物是无法获得纯培养的^[6];以纯培养技术为基础对微生物世界进行的研究结果也就无法代表其真实的情况。分子方法在微生物种属的鉴定与群体调查分析上有其独特的优势,特别是细菌

核糖体 RNA 序列的比对分析为人们寻找微生物间的进化关系提供了一条更有效的途径^[7],使人们能够绕过培养障碍,把研究对象深入到目前还未能培养的微生物领域中去。

本文先采用非培养法,直接提取家蚕肠道微生物群体基因组 DNA,通过 PCR-RFLP 法对细菌 16S rDNA 进行序列分析,同时,与传统纯培养法相结合,探讨了家蚕肠道的细菌群体结构及其对家蚕生长发育的影响,以及两种方法的优势与不足。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 家蚕肠道样品: 取 150 头 5 龄家蚕(品种为大造),饥饿过夜。依次用 70% 乙醇和火焰灼烧进行体表消毒,无菌条件下剖取家蚕肠道内容物,置于灭菌的离心管中。将其中 80 头蚕中的每 10 头的肠道内容物作为一个提取单位,分 4 次、2 种方法提取。另外 70 头蚕的肠道内容物单独分开留作细菌分离与培养基的制作。

1.1.2 其它材料及试剂: DNA 纯化用购自北京鼎国公司的 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒,质粒 pMD 18-T 和细菌 *E. coli* JM109, DNA 分子量标记,限制性

基金项目: 国家“863 计划”(2005BA711A07) 重庆市科委科技计划项目院士专项基金(2005-8804)

* 通讯作者。Tel: 86-23-68251088; E-mail: zyzhou@swau.cq.cn

** 作者简介: 两位作者对本文有同等贡献。蓝希钊(1976-),男,畲族,江西赣州人,助教,从事微生物分子生化与次生代谢研究。E-mail: lanxqwhx@hotmail.com; 袁志辉(1981-),男,江西宜春人,硕士研究生,从事微生物分子生化与次生代谢研究。E-mail: oldflying@126.com

收稿日期: 2005-01-04 接受日期: 2006-01-04 修回日期: 2005-12-15

内切酶,PCR 扩增试剂等均购自 TaKaRa 公司,基因组扩增引物^[8], 27-F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1392-R: 5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3'; pMD18-T 载体扩增引物 M13-F: 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3', M13-R: 5'-CAGCACTGACCCCTTTTGGGACCGC-3', 引物由上海博亚公司合成。

1.2 家蚕中肠微生物总 DNA 的提取(两种方法)

1.2.1 方法 1 参照 Julie 等^[9]介绍的方法,并作适当改进。将准备好的家蚕肠道样品与 4mL DNA 提取缓冲液(100mmol/L Tris-Cl, 100mmol/L EDTA-Na2, 100mol/L 磷酸钠, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, pH8.0)混合,再加入 800 μ L SDS (10%), 24.0 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL), 37℃ 水浴 30min, 每隔 5min 颠倒混匀一次 随后在 80℃ 水浴 10min, 冷却到室温;与等体积氯仿-异戊醇(24:1 体积比)混合,涡旋 10s, 15000 $\times$ g 离心 5min, 收集上清液,用等体积平衡酚抽提,离心,吸取水相;再与等体积氯仿-异戊醇(24:1 体积比)混合,离心;取水相转移到另一 1.5mL 离心管中,用 0.6 倍体积的异丙醇室温沉淀 1h, 室温下 15000 $\times$ g 离心 10min, 收集沉淀;用冷的 70% 乙醇洗涤沉淀,重悬于 100 μ L TE 缓冲液(pH8.0, 含 20 μ g/mL RNaseA)中, -20℃ 保存。

1.2.2 方法 2 参照张瑞福等的方法^[10], 稍作改变。即在 80℃ 水浴 10min 之后,放入液氮罐中速冻 3min, 之后立即取出, 80℃ 水浴 5min 重复 3 次。其余步骤同方法 1。

0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将 4 次提取到的 DNA 混合,用紫外分光光度计测量总 DNA 的纯度。之后,将两种提取的总 DNA 混合,用作 PCR 模板。

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

反应体系中(100 μ L) 1 $\times$ PCR 缓冲液, 2.5mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L dNTP, 20 μ mol/L 引物 27-F 和 1392-R 各 0.8 μ mol/L, 0.6U Ex Taq DNA 聚合酶,以及模板 DNA 1 ~ 50ng。反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 1min, 55℃ 30s, 72℃ 1.5min, 30 个循环 72℃ 5min。PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后,切下目的 DNA 条带,按回收试剂盒的使用说明进行回收。

1.4 16S rDNA文库的构建与筛选

将经过纯化的 PCR 扩增产物按 pMD18-T 载体试剂盒说明进行克隆并筛选出含重组质粒的阳性克隆子。

1.5 阳性克隆子的 PCR-RFLP 分析

阳性克隆子经 LB 平板(含 50 μ g/mL Ampicillin)单菌落后,接入 5mL LB 液体培养基中培养 12h。

取 10 μ L 菌液,加入到 200 μ L 无菌水中, 100℃ 水浴 4min, 再冰浴 5min, 直接作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(10 μ L), 含引物 M13-F 和 M13-R 各 0.025 μ mol/L, 其余药品及反应程序同 16S rDNA 的 PCR 扩增。扩增产物按 Orphan^[12] 等方法用 4 碱基限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hae* III 过夜消化, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选出酶切图谱不同的克隆子。

1.6 测序和分析

提取 PCR-RFLP 筛选出的阳性克隆子的质粒 DNA, 送交 Invitrogen 上海英俊生物技术有限公司进行序列测定。序列通过 (NCBI) 进行 BLAST 同源性检索。取 GenBank 中与被检索序列具有 90% 以上同源性的前 3 条 16S rDNA 序列, 用分子进化遗传学分析与序列比对软件 MEGA3.1^[14] 的邻近相接法 (Neighbor-Joining Method) 与本文非培养法所获得的序列一起构建系统发育树。通过研究所得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中的登录号为 DQ298139-DQ298154。

1.7 家蚕肠道细菌的分离培养

1.7.1 分离培养基的制备 取已去除蚕体残留的家蚕内容物与 0.1mol/L 的磷酸钠 (pH8.0) 缓冲液 100mL 混合, 置于摇床 200r/min 振荡 1h 纱布过滤除去固体颗粒物质, 在所得液体中加入琼脂, 115℃、20min 灭菌, 倒平板备用。

1.7.2 家蚕肠道微生物的梯度稀释法分离 按梯度稀释法将已去除蚕体残留的家蚕内容物稀释至 10⁻⁴, 取 10⁻³、10⁻⁴ 两个稀释度涂布在上述内容物营养液培养基、LB、牛肉膏蛋白胨平板上, 37℃ 培养。对所获得细菌进行菌落 PCR 扩增 16S rDNA, 并纯化测序。序列的 BLAST 分析同以上方法。同时结合本文非培养法所获得的序列进行本地 BLAST 分析, 以检查本文两种方法的重叠度。用 MEGA3.1 的邻近相接法对培养法获得的细菌序列、与培养法所得序列具有最高同源性的非培养法序列、来源于 GenBank 的具有 90% 以上同源性的前 3 条 16S rDNA 序列进行系统发育分析。通过本方法所得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中的登录号为 DQ298155-DQ298160。

2 结果和分析

2.1 家蚕中肠道微生物总 DNA 的抽提

将家蚕肠道样品抽提所得的 DNA 溶液经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 23kb 左右出现条带(图略), 表明已获得较长片段的家蚕中肠道微生物的总

DNA。紫外分光光度计检测显示方法 1 和方法 2 提取到的 DNA 的纯度均较高。直接用未纯化的总 DNA 作为模板进行 16S rDNA 扩增能够获得与目的片段大小(1.4kb)一致的条带,也说明其纯度较高。其原因可能是家蚕以桑叶为唯一食物,因此肠道内除桑叶颗粒之外,不含有其它杂质如腐殖质、色素等,这对于群体基因组 DNA 的提取及后续分子生物学操作比较有利。

2.2 从总 DNA 中扩增 16S rRNA 基因

有研究表明,PCR-RFLP 分析可以用于菌种的分型、鉴定和近似的分类分析^[11],并且已经在环境微生物群体的调查研究中得到应用^[12,13]。因此,为降低测序成本,我们通过 PCR-RFLP 先对文库进行筛选。首先按阳性克隆筛选的方法进行 PCR 扩增,扩增产物按 Orphan 等^[12]的方法用 4 碱基限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hae* III 过夜消化,2% 琼脂糖凝胶电泳检测,选出酶切图谱不同的克隆。

从家蚕中肠道获得的总 DNA 用细菌通用引物 27-F 和 1392-R 经过 PCR 扩增后,获得 16S rDNA 的特异性扩增片段,大小在 1.4kb 左右(图略)。

2.3 16S rDNA 文库的构建与筛选

从文库中共挑取白色菌落 288 个。纯化后通过菌液 PCR 检测阳性克隆。PCR 扩增产物大约 1.4kb 的为带有目的插入片段的阳性克隆。共获得阳性克隆 205 个,阳性率为 71.2%。两种限制性内酶酶切分析表明,在 205 个阳性克隆中存在 16 种不同的酶

切谱型。其中 *Msp* I 消化后有 11 种差异谱型, *Hae* III 消化后有 5 种差异谱型(图 1)。

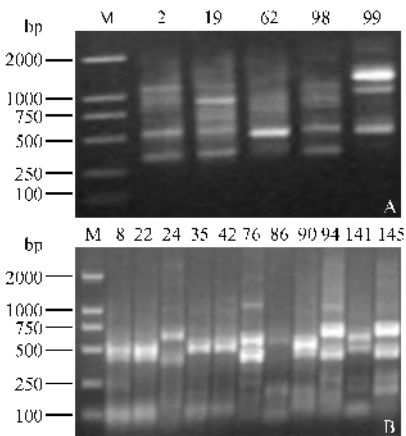


图 1 阳性克隆 PCR 产物 RFLP 电泳图谱

Fig.1 Agrose gel electrophoretic restriction fragment patterns by *Hae* III (A) or *Msp* I (B) of PCR products of positive clones. M was DL2000 Marker, and 2,8,19,22,34,35,42,62,76,86,90,94,98,99,141,145 represents clone SWM2, SWM8, SWM19, SWM22, SWM34, SWM35, SWM42, SWM62, SWM76, SWM86, SWM90, SWM94, SWM98, SWM99, SWM141, SWM145 respectively.

2.4 序列比对及系统发育分析

测定 RFLP 筛选获得的 16 个克隆的插入片段序列及 BLAST 分析显示(表 1),16 个序列中有 7 个与 6 个已知的细菌属具有同源性,分别是节杆菌属 (*Arthrobacter*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、大肠杆菌属 (*Escherichia*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

表 1 家蚕肠道细菌 16S rDNA BLAST 同源性比对结果

Clone No.	Sequences source with highest identity (%)	GenBank accession No.	Origina
SWM2	Uncultured bacterium clone I12 (98)	AY187895	Mine water
SWM8	Arthrobacter agilis strain WED2.2 (98)	AF440440	Estuarine
SWM19	Uncultured bacterium clone KD1-100 (98)	AY177414	Penguin droppings sediments
SWM22	Lactobacillus aviarius (98)	AB001836	—
SWM34	Uncultured bacterium clone pLW-99 (97)	DQ067040	Lake sediment
SWM35	Uncultured Pseudomonas sp. (98)	AM071377	Mining wastes
SWM42	Uncultured bacterium clone JEG.g5 (97)	DQ228409	Subglacial environments
SWM62	Uncultured bacterium clone pLW-66 (96)	DQ067038	Lake sediment
SWM76	Escherichia coli (99)	J01859	—
SWM86	Uncultured bacterium clone 8 (93)	DQ238608	Piglet gastrointestinal
SWM90	Bacillus alcalophilus strain DSM485T (99)	X76436	—
SWM94	Uncultured bacterium clone JEGxsh4 (98)	DQ228420	Subglacial environments
SWM98	Uncultured bacterium clone JEGxsh1 (98)	DQ228419	Subglacial environments
SWM99	Staphylococcus cohnii (98)	AB009936	—
SWM141	Uncultured bacterium clone BG.f8 (98)	DQ228378	Subglacial environments
SWM145	Arthrobacter monumenti (98)	AJ315070	Biodeteriorated mural paintings

The figures in brackets present the percentage of identities compared to the GenBank Database. “—” labeled as unknowable original microbe.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

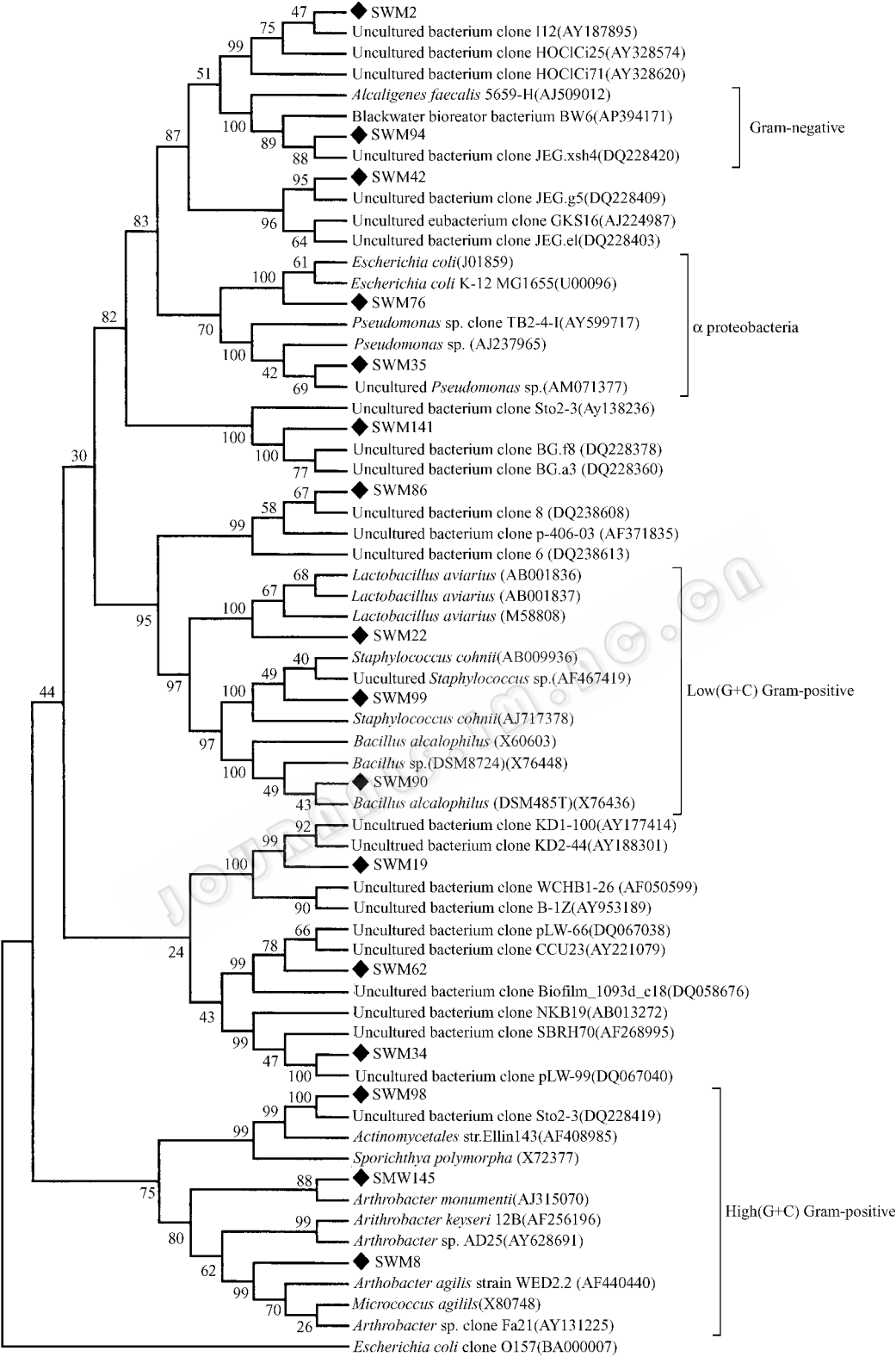


图 2 家蚕肠道细菌系统发育树

Fig.2 Unrooted tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of bacteria from silkworm midgut. Bacteria 16S rDNA sequences from silkworm midgut are signed as ◆, and Bootstrap values are indicated at the branching points.

其中 SWM8、SWM145 分别与节杆菌两个不同的种即 *Arthrobacter agilis* strain WED2.2 与 *Arthrobacter monumeti* 具有较高的同源性,表明用 RFLP 筛选方法能够有效地区分来源不同种属微生物的16S rDNA 序列,而假单胞菌属的序列则来自于一个尚未获得纯培养的未鉴定种。另外 9 条序列与一些未知细菌的16S rRNA基因具有同源性。图 2 为系统发育分析结果。

2.5 家蚕肠道细菌的分离培养

从 3 种培养基上共获得细菌菌落 10 个,16S rDNA测序及相互间同源性分析后共获得 6 条有差异性的序列。将这些序列与未培养法的 16 条序列进行本地 BLAST 分析后显示,与其中的 6 条具有很高同源性(表 2)。系统发育分析(图 3)也显示 6 个分离菌分别与 SWM8、SWM22、SWM76、SWM90、SWM99、SWM145 具有很高的同源性,表明它们来源于同一种属的细菌。说明将未培养法应用于环境微生物群体的调查能有效补充培养法的缺陷与不足。

3 讨论

微生物纯培养技术的发明使微生物学研究获得了长足的发展与进步,也使我们能够充分的认识这种肉眼看不到的生物并加以利用。然而有研究显示,99%以上的微生物不能通过经典的纯培养法获得。这就是说,我们必须寻找新的方法去进行研究。1985 年,Woese、Pace 等将核糖体 RNA (5S、16S rRNA) 基因作为微生物的进化标尺,以一种未培养的方法对微生物的多样性进行研究^[15~17],从而开创了微生物学研究方法的新纪元。本文通过直接从 5 龄家蚕肠道内容物中提取微生物群体基因组 DNA,以其为模板扩增细菌 16S rDNA 并进行测序分析表明,5 龄家蚕肠道中寄生有 16 种甚至更多种类的细菌,多于易发平^[5]等用纯培养法获得的 6 种(春蚕)或 4 种(秋蚕)。并且易发平等培养到的微球菌属、葡萄球菌属、芽胞杆菌属在本次研究中都能够检测到(表 3)。除此之外,我们检测出了他们在 5 龄家蚕肠道

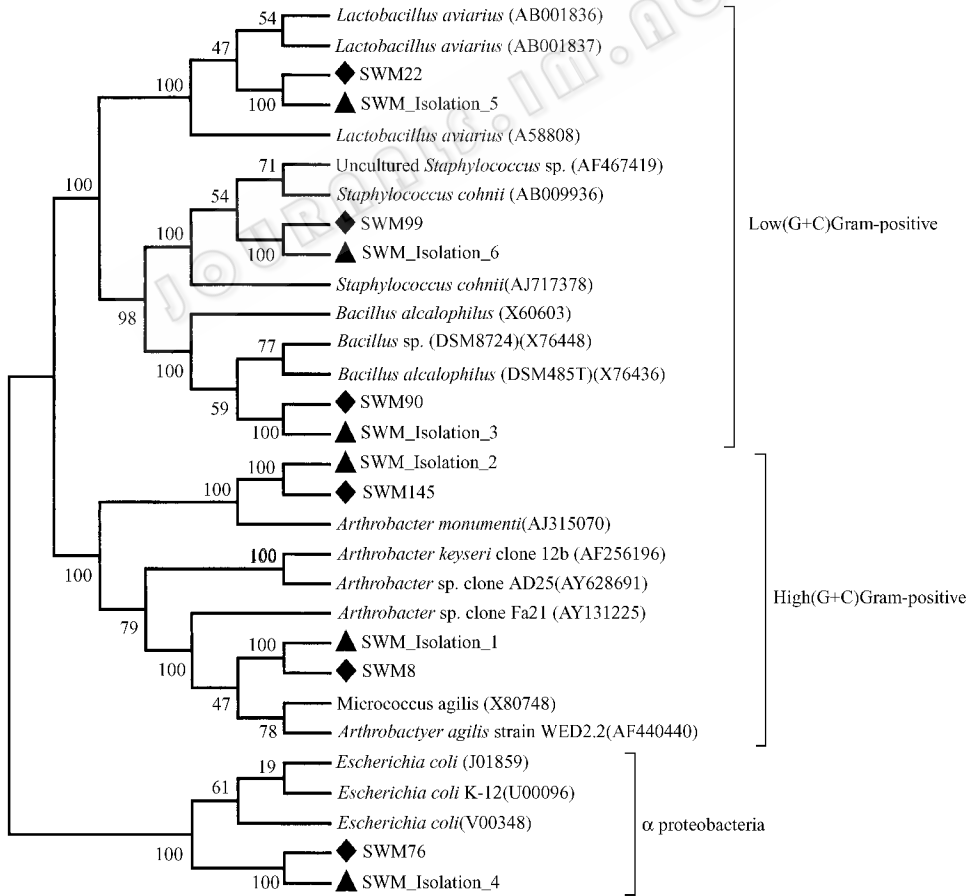


图 3 分离细菌与非培养法同源序列、GenBank 同源序列系统发育树

Fig.3 Unrooted tree based on 16S rRNA gene sequences from culture-dependent, culture-independent method and GenBank showing the phylogenetic position between them. Cultured-based and uncultured-based sequences are signed as ▲, ◆ respectively, and others signed nothing are sequences from GenBank.

表 2 分离细菌与非培养法16S rDNA序列比对及 NCBI 检索结果

Table 2 Result of Cultured-Dependent and Cultured-Independent Sequences NCBI and Local BLAST

Strain No.	Homology sequence in GenBank(NCBI)		In this study		
	Gene ID	Strain	Identity/ %	Clone No.	Identity/ %
SWM-Isolation-1	AF440440	Arthrobacter agilis	98	SWM8	99
SWM-Isolation-2	AJ315070	Arthrobacter monumeti	98	SWM145	99
SWM-Isolation-3	X76436	Bacillus. alcalophilus	99	SWM90	100
SWM-Isolation-4	J01859	E. coli	99	SWM76	100
SWM-Isolation-5	AB001836	Lactobacillus avarius	98	SWM22	100
SWM-Isolation-6	AB009936	Staphylococcus cohnii	98	SWM99	100

中没有培养到或只从 3 龄、4 龄家蚕肠道中培养出的埃希氏菌属、乳杆菌属、节杆菌属、假单胞杆菌属及其它 9 种未知种属的细菌。由此推测,家蚕肠道细菌的可培养率为 37.5%,虽然相对于其它一些环境来说较高,但仍然有着为数众多的细菌生活在人们的视野之外。

同时本研究也采用了与前研究^[5]不同的培养法进行对比性研究,获得了葡萄球菌属、芽胞杆菌属、乳杆菌属、节杆菌属、埃希氏菌属共 5 个属 6 个种的细菌(表 3),其序列与未培养法获得序列中的 6 条具有很高的同源性。将两次纯培养法研究结果与本次非培养法的研究结果进行对比发现,非培养法能够有效地弥补在纯培养法中遇到的获得微生物种类不足的弱点。这对于了解以家蚕肠道为寄生环境的细菌种群结构,它们之间的相互作用及细菌与家蚕之间的作用极为有利。

表 3 非培养法与培养法对家蚕中肠道已知种属细菌的研究对比

Table 3 Comparison of known genera silkworm midgutal bacteria got from culture-independent and culture-dependent research

Genera	Culture-Independent	Culture-Dependent in reference 5	Culture-Dependent in this study
Micrococcus	+	+	-
Staphylococcus	+	+	+
Lactobacillus	+	-	+
Bacillus	+	-	+
Serratiae	-	+	-
Klebsiella	-	+	-
Enterobacter	-	+	-
Escherichia	+	+	+
Pseudomonas	+	-	-
Arthrobacter	+	-	+

+ , the genera detected ; - , the genera didn't detect.

但是,本次未培养法所获得的序列中没有找到沙雷氏铁属及肠杆菌属的同源序列,而易发平等却能够通过培养法获得。可能原因有五 其一,某些种属的细菌在家蚕肠道中为非优势菌群,在取样过程中被遗漏 其二,有些微生物能够吸附在固体颗粒表面甚至内部,提取液难以深入进去发生作用^[18],从

而在提取群体基因组 DNA 过程中产生偏差 其三,由于细胞结构的差异^[19],有些种类的细菌(如革兰氏阳性菌)较难使其裂解 其四,DNA 提取方法产生的偏差。如在土壤微生物群体基因组 DAN 提取过程中,加入研磨、超声波破碎等步骤,能够明显提高 DNA 的产量^[19] 其五,在 PCR 过程中,模板的取样量只占总体积的很小一部分,而 PCR 次数不足以弥补其发生的偏差。以上这些问题,都有待于在进一步的实验中解决。

系统发育分析(见图 2)显示,SWM35 和 SWM76 分别来源于 γ -变形杆菌纲的假单胞菌属和埃希氏菌属,这类细菌的共性为化能有机营养型、兼性厌氧,能通过糖酵解和戊糖磷酸途径降解碳水化合物^[20]。由此可以推测,它们可能与家蚕肠道内桑叶的消化分解有关。SWM22、SWM90、SWM99 分别来源于低 GC 含量革兰氏阳性菌类的乳杆菌属、芽胞杆菌属、葡萄球菌属。乳杆菌属能利用糖类物质通过糖酵解途径进行单纯乳酸发酵或通过戊糖磷酸途径进行异质乳酸发酵,其获取能量的途径为底物水平磷酸化。因此我们可以推测寄居于家蚕肠道内的乳杆菌属可能与家蚕体内营养物质及能量的转化有关 芽胞杆菌属与葡萄球菌属为两种重要的病原性细菌,能够使家蚕致病与死亡。SWM8、SWM98、SWM145 来源于高 GC 含量革兰氏阳性菌类的放线菌目和节杆菌属,它们也可能与家蚕的致病有关。SWM94 可能来源于革兰氏阴性菌,与产碱菌属的一个种粪产碱菌具有同源性。粪产碱菌能够产生脂肪酸和稀有氨基酸,因此 SWM94 的来源菌可能促进家蚕营养的转化与吸收。其它 16S rDNA 序列因只与一些未知细菌具有同源性,因此它们的来源菌与宿主家蚕的关系我们也不得而知。

我们通过 PCR-RFLP 方法获得对家蚕中肠道内存在的细菌种类的认识,并通过分析这些细菌种属本身的生理生化特性来推测它们与宿主家蚕之间可能存在的相互作用关系。但是因为只有少数种属的

细菌为已知的, 所以整个家蚕中肠道内细菌群体的代谢网络及其对家蚕的生长发育所起的作用仍然是难窥其全貌。这个问题可以通过两种途径来解决 ①改善与提高培养方法的手段与技巧, 尽可能多的获得家蚕中肠道内细菌的纯培养, 在研究它们的代谢与生化特性, 从而也能够了解它们对家蚕的影响 ②进行家蚕中肠道内细菌群体基因组测序^[21,22]和群体蛋白质组学^[23]研究, 获得细菌群体的基因组和蛋白质组信息, 重建细菌全基因组序列。通过基因组和蛋白质组信息, 获得家蚕中肠道内细菌群体的代谢信息及其与宿主的作用关系。

参 考 文 献

- [1] Xia Q, Zhou Z Y, Lu C, *et al.* A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, **306**: 1937 – 1940.
- [2] 潼泽义郎. 家蚕胃肠内好气性细菌的检索: (I) 分离用培养基与活菌数目的关系. 日本蚕丝学杂志, 1968, **37** (4): 295 – 305.
- [3] 饭冢敏彦. 家蚕胃肠内好气性细菌的检索: (II) 在人工饲养下的细菌检索. 日本蚕丝学杂志, 1969, **38** (2): 95 – 102.
- [4] 孙雪奇, 黄玉祥, 董长江, 等. 家蚕肠道好氧和部分兼性厌氧微生物及蚕用微生态制剂的研究. 四川蚕业, 1996, **24** (1): 13 – 15.
- [5] 易发平, 王林玲, 周泽扬, 等. 蚕肠道好氧微生物菌群的研究. 西南农业大学学报, 2001, **23** (3): 117 – 119.
- [6] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734 – 740.
- [7] Delong EF. Microbial community genomics in the ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, **3**: 459 – 469.
- [8] Tringe SG, Mering C von, Rubin EM, *et al.* Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 2005, **308**: 554 – 557.
- [9] Julie AH, David AB, John AB. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in a mid-ocean ridge seafloor habitat. *Appl Envir Microbiol*, 2002, **68** (4): 1585 – 1594.
- [10] 张瑞福, 崔中利. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. 微生物学报, 2003, **43** (2): 276 – 282.
- [11] Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K. 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **152** (1): 125 – 132.
- [12] Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, *et al.* Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, **66** (2): 700 – 711.
- [13] Massana R, Murray AE, Preston CM, *et al.* Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara channel. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 50 – 56.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150 – 163.
- [15] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 6955 – 6959.
- [16] Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, *et al.* Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**: 1379 – 1384.
- [17] Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987, **51**: 221 – 271.
- [18] Priemé A, Sitaula JIB, Klemmedsson ÅK, *et al.* Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. *FEMS Microbiol. Ecol*, 1996, **21**: 59 – 68.
- [19] Frostegard A, Courtois S, Ramisse V, *et al.* Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soil. *Appl Envir Microbiol*, 1999, **65** (12): 5409 – 5420.
- [20] Prescott LM, Harley JP, Donald AK. Microbiology. 5th ed. Beijing: Higher Education Press/McGraw-Hill Companies, 2002, 498 – 507.
- [21] Tyon GW, Banfield JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, **428** (6978): 37 – 43.
- [22] Venter JC, Remington K. Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *Science*, 2004, **304**: 66 – 74.
- [23] Ram RJ, Banfield JF. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 2005, **308**: 1915 – 1919.

Investigation and analysis of the bacteria community in silkworm intestine

YUAN Zhi-hui¹, LAN Xi-qian¹, YANG Ting¹, XIAO Jie¹, ZHOU Ze-yang^{1,2*}

⁽¹⁾ Sericultural Key Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China)

⁽²⁾ College of Bioscience of Chongqing Normal University, Chongqing 40047, China)

Abstract Majority of the environmental microorganisms are still unculturable. To shed a light on the bacteria community in the silkworm intestine more completely, culture-dependent and culture-independent methods were used to perform the investigation. As the latter, 16S rRNA gene was amplified and a library was constructed by using the meta-genomic DNA extracted from the bacteria in the silkworm intestine as template. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) method was used to screen recombinants originated from different bacteria, and the nucleotide sequences were determined. A BLAST searching in the GenBank and an analysis on phylogenesis were performed. The taxonomy of these bacteria and their physiological function to silkworm were speculated. Results showed that the bacteria in silkworm intestine are mainly belong to the genera *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Bacillus*, and *Staphylococcus*. They may play important roles to the host silkworm in the utilization of their food mulberry and disease prevention. Both the culture-dependent and culture-independent methods have their advantages and disadvantages, and they are complemented with each other.

Keywords : Silkworm intestine bacteria ; Meta-genomic DNA ; 16S rRNA ; Culture-independent method

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2004AA2Z1020) ; Chongqing Science and Technology Committee Academician Foundation (2005-8804)

* Corresponding author. Tel : 86-23-68251088 E-mail : zyzhou@swau.cq.cn

Received : 4 January 2005 / Accepted : 4 January 2006 / Revised : 15 December 2005