

冬季刺参养殖环境与肠道内细菌菌群的研究

李 彬^{1,2}, 荣小军¹, 廖梅杰¹, 陈贵平¹, 张 正¹, 王印庚¹, 薛太山³

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 大连海洋大学, 辽宁大连 116023; 3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司, 山东 青岛 266409)

摘要: 运用传统细菌分离培养与分子生物学技术相结合的方法, 对 2008 年 11 月至 2009 年 1 月冬季刺参(*Apostichopus japonicus* Liao)养殖池塘环境(养殖水、底泥、附着基)及刺参肠道内的细菌菌群进行了分析。应用平板稀释涂布培养计数法测得刺参养殖池塘水体、底泥、附着基和肠道细菌数量分别为 $0.75 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$ cfu/mL、 $8.7 \times 10^4 \sim 8.1 \times 10^5$ cfu/g、 $3.8 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^6$ cfu/g、 $7.1 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^7$ cfu/g; 根据形态学差异从培养所得的细菌中筛选得到 22 株菌, 用限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Msp* I 对所分离菌株进行 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) 分析, 这 22 株菌被分为 8 种不同的分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU), 其中 OTU2 与 OTU3 所包含的菌株分别占分离菌株种数的 30% 和 20%; 此外, 作者对不同环境培养所得的优势度最高的细菌进行分子鉴定分析。结果表明: 水环境中优势菌为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)及巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 沉积物中优势菌为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*), 附着基中优势菌为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*), 灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*), 肠道中优势菌为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*), 灿烂弧菌(*V. splendidus*)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)。通过对冬季刺参池塘细菌菌群多样性分析和优势菌鉴定, 为筛选低温益生菌和防治刺参疾病提供了有益参考。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus* Liao); 肠道菌群; ARDRA; 分子鉴定; 16S rDNA

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)04-0064-06

刺参(*Apostichopus japonicus* Liao)是棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、仿刺参属(*Apostichopus*)的种类, 具有较高的食用、保健和药用价值, 被誉为“海产八珍”之首^[1]。中国北方地区刺参养殖总面积近 7 万 hm^2 , 鲜参总产量为 10 万 t 左右, 产值超过 150 亿元^[2]。刺参养殖形式多种多样, 池塘养殖是刺参养殖的主要方式之一, 该养殖系统具有水体面积小、营养结构简单、食物链较短、可控性强等特点, 是一种开放型生态系统, 环境气候的变化、养殖过程中的饵料投喂等扰动, 容易使该生态系统中的水质理化指标、微生物生物量种群组成及其生态结构功能发生变化, 这种变化往往与疾病的发生密切相关^[3-4]。因此, 研究养殖环境中的微生物群落结构变化与养殖动物病害的发生之间的关系, 对于刺参健康养殖显得十分重要。

近年来随着分子生物学技术在微生物生态学领域里相互渗透, 形成了一个新的科学的分支—微生物分子生态学。该学科把分离培养技术和分子生态

学手段有机结合起来, 在检测细菌种群的多样性以及研究微生物与环境之间的关系方面取得了显著进展^[5]。目前用于微生物生态研究的分子生物学方法主要是基于 PCR 技术利用扩增产物再进行分析, 较为成熟的方法有: 扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析 (Amplified rDNA Restriction Analysis, ARDRA)、16S rDNA 文库构建、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、限制性片段长度多态性(RFLP)、单链构象多态性分析(SSCP)、荧光原位杂交(FISH)等^[6-8], ARDRA 是基于 rDNA 的保守性和特异性, 利用 PCR 技术选择性扩增 rDNA 片段并对其进行酶切, 从而分析及揭示微

收稿日期: 2009-08-23; 修回日期: 2009-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901120); 国家高技术研究发展计划项目(2006AA100313); 山东省科技发展计划项目(2004GG2205116); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项

作者简介: 李彬(1984-), 男, 山东德州人, 硕士, 从事分子生态与疾病防控技术研究, 电话: 15865561932, E-mail: libin080808@hotmail.com; 王印庚, 通信作者, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

生物的多样性和系统发育差异^[9, 10], 该技术具有快速、简便、可靠、易于操作等优点, 为微生物的分类和鉴定提供客观真实的信息, 因此, 在微生物研究领域得到了广泛应用^[11]。作者利用传统微生物分离培养技术与 ARDRA 分析法相结合, 对养殖环境和刺参肠道的微生物群落结构进行了研究, 以期为筛选刺参低温益生菌和防控疾病提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 采样站点

自2008年11月至2009年1月每个月初采样, 对青岛胶南市室外刺参养殖池塘进行调查, 采样地理位置 35°39'N, 119°50'E。采样选4个池塘, 池塘长400 m, 宽100 m, 水深1.8 m。

1.2 样品采集

乘调查船驶到池塘中预先标记好的采样点, 按照《国家海洋调查规范》海洋生物调查中规定的方法, 使用击开式采水器(5 L)分别采集水体表层(距水面约5 cm)和水体底层(距底表5 cm)的水样, 用采泥器采集底层沉积物, 用无菌勺刮取刺参附着基上的沉积物放入无菌袋中, 每个池塘采集3头刺参, 样品采集后在12 h内处理完毕。

1.3 培养基的组成

TSB 培养基: 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 30g, NaCl 15g, 琼脂 15g, 海水1 000 mL, pH7.4~7.6, 121 °C, 20min 灭菌。

1.4 细菌的分离与计数

对样品进行梯度稀释, 取0.1 mL 稀释后样品涂布于TSB海水培养基上, 28 °C培养2 d后计数, 选取平均菌落数30~300之间的计数, 计数菌落形成单位数(colony forming units, CFU), 根据细菌形态学差异进行分离培养。

1.5 细菌的鉴定

1.5.1 细菌基因组DNA提取方法

参照改进的CTAB法提取基因组DNA^[12]。

1.5.2 16S rDNA 序列的克隆与测序

用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCATGG CTCAG-3')和1492R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCC GCA-3')对纯培养细菌16S rDNA序列进行PCR扩增。PCR反应采用25 μL反应体系: 1×buffer, 引物

0.1 μmol/L, dNTP 100 mmol/L, TaqDNA聚合酶2 U, DNA模板25 ng, 灭菌水补充至25 μL。PCR反应条件: 94 °C 预变性4 min, 35个循环(94 °C 变性1 min, 55 °C 复性1 min, 72 °C 延伸1 min), 72 °C 温育10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 对检测阳性的PCR扩增产物按照胶回收试剂盒的操作说明切胶纯化。

连接体系: pMD18-T 0.2 μL, 回收DNA 1.5 μL, Solution I 2.5 μL, 灭菌水补充至5 μL, 16 °C 反应2 h以上。

转化过程: 将5 μL连接产物加入50 μL感受态细胞, 冰浴30 min, 37 °C 5 min, 冰浴2 min, 加入900 μL无AMP的液体LB培养基, 170 r/min 37 °C 振荡培养1 h, 取120 μL涂布于含Amp的LB固体培养基上, 37 °C 培养6~8 h, 挑取单菌落于1 mL含Amp的LB液体培养基中, 170 r/min 37 °C 培养6~8 h, 用载体通用引物检测, 对检测阳性样品送测序公司测序。

1.5.3 序列的分析和系统发育树的构建

16S rDNA基因序列在NCBI中用BLAST进行同源性比较, 从中选取与其相似性最高的细菌16S rDNA基因序列, 采用Clustalw软件进行多序列匹配排序, 用系统发生推断软件包PHYLP 3.67进行聚类分析。采用邻位相连法获得系统发育树, 通过自举进行系统进化树的评估, 自举的数据集为1000次。

1.6 ARDRA 分析

取5 μL的16SrDNA的PCR产物, 分别加入1 μL *Rsa* I + *Msp* I, 2 μL相应的10×Buffer和12 μL去离子水, 使反应体系为20 μL, 37 °C 恒温2~3 h。酶切产物用3.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 冬季刺参养殖环境与肠道中异养细菌数量的动态变化

通过细菌平板培养表明(图1), 冬季刺参池塘养殖环境、肠道中异养细菌数量差异较大, 在水体表层可培养细菌的数量为 $75\sim 4.4\times 10^3$ cfu/mL, 水体底层可培养细菌数量为 $5.65\times 10^2\sim 1.4\times 10^4$ cfu/mL, 底层水体可培养细菌数量显著高于表层水体, 沉积物、附着基、肠道可培养细菌值分别为 $8.7\times 10^4\sim 8.1\times 10^5$ 、 $3.8\times 10^5\sim 2.8\times 10^6$ 、 $7.1\times 10^5\sim 1.5\times 10^7$ cfu/g, 附着基和肠道内可培养细菌数量差异不显著, 两者均显著高于沉积物异养细菌数量。冬季刺参池塘环境和肠道中

细菌数量变化趋势一致,均呈现下降趋势,各样品在 12 月份异养细菌显著下降,特别是水体异养细菌下降幅度较大,1 月份细菌数量较低。

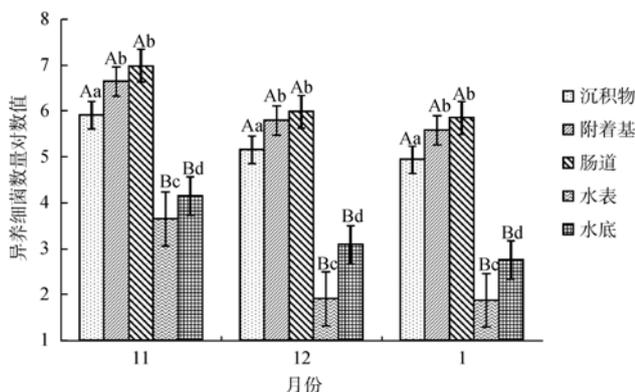


图 1 刺参养殖环境与肠道中可培养细菌数量
 Fig. 1 Quantity of bacteria in the intestine and culture environment of *A. japonicus*
 同一月份不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母者表示差异极显著 ($P < 0.01$)
 In the same month, values with different small letter superscripts mean significantly different ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean significantly different ($P < 0.01$)

2.2 ARDRA 分析

根据菌落形态差异从平板选取了差异较大的 22 株菌进行分离纯化、提取总 DNA。提取的 DNA 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 条带在 20 kb 左右(图 2), 对 22 株菌的 DNA 进行 16S rDNA 扩增, 其扩增片段在 1500 bp 左右(图 3)。



图 2 细菌基因组 DNA
 Fig. 2 Bacteria genomic DNA

用 *RsaI* 和 *MspI* 对 PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析, 每 1 个 16S rDNA 限制片段长度多态性类型代表了一个操作分类单元(Operational Taxonomic

Unit OTU), 根据酶切条带的差异将 22 株菌分为 8 个 OTU(图 4)。有研究表明, 对 2 种或 2 种以上酶切带谱均相同的菌株, 可以初步认为它们是同 1 种或是近缘种^[9]。其中 OUT1 只有 1 菌株, OUT4、OUT5、OUT6、OUT7、OUT8 分别有 2 株菌占总菌株的 50%, OUT2 和 OUT3 分别有 6 株和 4 株菌, 占分离菌株的 30% 和 20%, 是分离菌株的主要类型。

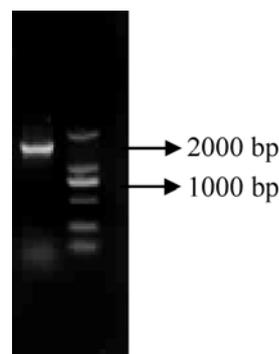


图 3 细菌 16S rDNA 的 PCR 产物
 Fig. 3 PCR products of 16S rDNA

2.3 细菌 16S rDNA 分子鉴定

利用分子手段对平板培养 6 株优势最高的细菌提取 DNA, 对 16S rDNA 的测序结果分析表明菌株 *rzl-1*、*rzl-2*、*rzl-3*、*rzl-4*、*rzl-5*、*rzl-6* 分别与 *Bacillus megaterium*、*Pseudomonas stutzeri*、*Pseudomonas mendocina*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus thuringiensis*、*Vibrio splendidus* 序列同源性最高, 同源性都是 100%, 其中 *rzl-1* 与 *rzl-4* 序列的相似性比较高, 都与 *B. megaterium* 聚类。6 株菌所测得的序列结果通过互联网 NCBI, 在 Genbank 采用 BLAST 程序与其他细菌的 16S rDNA 序列进行比对, 找出相似性高的序列构建系统进化树(图 5), 通过系统进化树的建立显示, 这 6 株菌分别是巨大芽孢杆菌、施氏假单胞菌、门多萨假单胞菌、巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和灿烂弧菌。

通过对优势菌的鉴定结果分析, 水环境中优势菌为施氏假单胞菌、门多萨假单胞菌及巨大芽孢杆菌; 沉积物(底泥)中优势菌为巨大芽孢杆菌、施氏假单胞菌、苏云金芽孢杆菌; 附着基中优势菌为巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、灿烂弧菌; 肠道中优势菌为巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、灿烂弧菌、施氏假单胞菌。



图 4 *Rsa* I 和 *Msp* I 酶切 22 株细菌的 16S rDNA PCR 产物后的 ARDRA 类型
Fig. 4 ARDRA analyzed with enzyme *Rsa*I and *Msp*I of PCR products of 22 bacteria

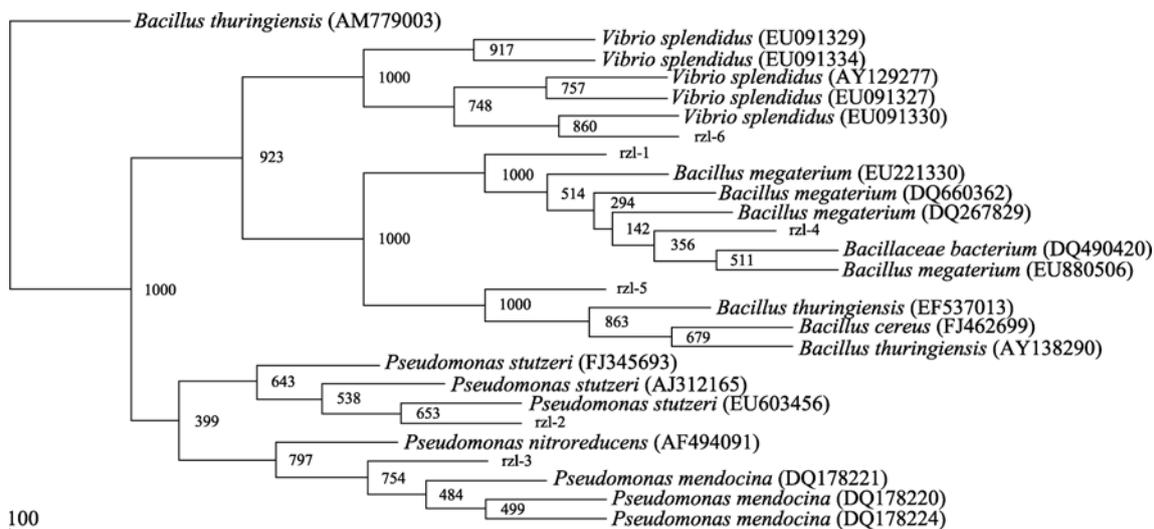


图 5 优势菌 16S rDNA 基因序列聚类分析结果
Fig. 5 Results of 16S rDNA cluster analysis based on 16S rRNA sequence of predominant bacteria

3 讨论

3.1 冬季刺参养殖塘中可培养细菌时空分布

刺参养殖塘营养结构简单、食物链短，养殖过程中投饵、养殖动物排泄物和有机生物残体等物质的分解，容易造成水体污染，为了保持刺参养殖塘中良好的水质条件，养殖期间定时的大量换水，水体透明度比较高，所以水体表层有机物质含量较少，细菌总数也相对较少，而水体底层受沉积物、附着基有机物质和细菌的影响，可培养细菌数量显著高于水体表层，冬季水体表层、底层可培养细菌总数分别在 $75\sim 4.4\times 10^3$ cfu/mL、 $5.65\times 10^2\sim 1.4\times 10^4$ cfu/mL 与张喆等^[13]报道的冬季青岛近岸水体中可培养细菌数量 (59~72cfu/mL) 存在一定的差异，这可能与采样地点和时间的不同有关。刺参池塘底泥、附着基和刺参肠道中有机物质丰富，细菌数量较多，异养细菌总

数在 $10^5\sim 10^7$ cfu/g。

从时间角度分析，温度是影响细菌生长的重要因素，在一定范围内细菌的新陈代谢与温度成正比^[14]，11月份海水的温度在 12 左右，12月份海水温度在 6 左右，水温大幅度下降使得大部分细菌繁殖、代谢能力降低，1月份水温-2，低温海水中有有机物质分解缓慢，细菌数量更低。因此，从 11月份到 1月份，随着时间的推移冬季细菌数量呈现减少的趋势。

3.2 ARDRA 分析

ARDRA(amplified rDNA restriction analysis)多态性分析的方法可以十分方便地对分离菌株进行类群划分，分成若干操作分类单元。研究表明：ARDRA多态性分析方法显示的多样性能用以估计分离物中存在最低限度细菌种的数目^[15]。通过对冬季刺参池

塘平板培养的细菌分析可以看出,对分离纯化的 22 株细菌至少有 8 种种属水平上完全不同的细菌,冬季刺参池塘的微生物群落具有种群多样性,其中 OUT2 和 OUT3 是培养细菌的主要类型,两者共占有分离细菌的 50%。

3.3 刺参养殖塘优势菌及其与疾病发生的关系

根据冬季刺参养殖池塘优势菌的分子鉴定结果可知:水体和沉积物中以假单胞菌和芽孢杆菌为主,附着基上以芽孢杆菌和弧菌为主,肠道中主要以芽孢杆菌、弧菌和假单胞菌为主。冬季沉积物和附着基上的优势菌种类与肠道中优势细菌种类存在差异,沉积物、附着基、肠道中具有共同的优势菌:苏云金芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌。苏云金芽孢杆菌具有显著的溶藻效果^[10],可以推测这种菌在刺参肠道消化藻类过程中有重要的作用,巨大芽孢杆菌可使水体环境中难溶性无机磷化物发生改变,从而增加可溶性磷的含量,转化有机磷增加其可用性,还可以降低养殖环境中氨氮的含量等,对养殖水体净化具有重要作用^[16, 17]。研究发现附着基和正常刺参肠道中还存在灿烂弧菌,灿烂弧菌是引起养殖刺参腐皮综合征的主要病原菌,该株细菌能够耐受低温^[18, 19],正常情况下,刺参肠道中的灿烂弧菌与芽孢杆菌等处于一种平衡状态,在低温状态下,刺参抵抗力较弱,环境变化容易使细菌菌群平衡遭到破坏,低温致病菌繁殖迅速,从而引发疾病。

利用生物修复的方法改良生态环境防治疾病的发生,具有低投资、高效益、使用方便等优点^[20],芽孢杆菌具有分解碳系、氮系、硫系污染物、分解淤泥、絮凝等作用,有些芽孢杆菌能抑制病原菌的生长,是生态修复中微生物修复的主要细菌类群。但进行微生物修复引入的外来菌株在低温季节不耐受低温、对环境不适应不能很快繁殖成为优势菌株,难以达到生态修复的效果。因此,从刺参养殖池塘的土著菌群中筛选益生菌株,有助于改善刺参养殖环境,进而预防疾病发生。本研究分离出的巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌等是刺参养殖环境中的土著菌株,具有潜在的益生作用可以适应低温环境,作为刺参养殖益生菌的可行性尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] 樊绘曾. 海参:海中人参关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001, 4:

37-44.

- [2] 田传远, 李琪, 梁英. 刺参健康养殖技术[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008. 1-3.
- [3] Wang Y G, Zhang C Y, Rong X J. *et al.* Diseases of cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in China[J]. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2004, 463: 297-310.
- [4] 刘金明, 王金山, 宋传民, 等. 刺参的池塘养殖技术[J]. 河北渔业, 2004, 133(1): 21-22.
- [5] 李明, 叶德赞, 黄翔玲. 东太平洋海洋微生物种群多样性初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 2008, 8(1): 66-70.
- [6] 张振东, 王淑芬, 曹宇峰. DGGE 技术及其在海洋环境微生物多样性研究中的应用[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(3): 297-300.
- [7] 彭宣宪, 高华, 王三英, 等. 采用通用引物 PCR 配合 SSCP 和 RFLP 技术检测鱼病病原菌[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 345-348.
- [8] 王明义, 袁晓燕, 宋雪珍, 等. 荧光原位杂交法在检测硫酸盐还原菌中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(3): 302-304.
- [9] 年洪娟, 张杰, 樊利强, 等. ARDRA 方法在荧光假单胞菌分离鉴定中的应用[J]. 中国农业科学, 2007, 40(1): 92-98.
- [10] 宁华, 张荣先, 陈浩, 等. 滇池中芽孢杆菌的 ARDRA 分类及溶藻特性[J]. 湖泊科学, 2008, 20(5): 675-680.
- [11] Wu X Y, Walker M J, Homitzky M, *et al.* Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2005, 64: 107-119.
- [12] 赵运胜, 卜友泉, 张宏娟, 等. 苛求芽孢杆菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 生物技术, 2006, 4(2): 41-42.
- [13] 张喆, 孟祥红, 肖慧, 等. 青岛近岸水体夏冬浮游病毒、细菌分布特征及其与环境因子的关系[J]. 武汉大学学报, 2008, 54(2): 209-214.
- [14] 姚雪梅, 王红勇, 邢少雷, 等. 不同水温和水质理化因子对糙海参摄食、生长影响研究[J]. 水产科学, 2007, 26(5): 292-295.
- [15] 宋志刚, 许强芝, 鲁心安, 等. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 63-67.
- [16] 侯颖, 孙军德, 徐建强, 等. 巨大芽孢杆菌对养殖水体氨氮降解特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4): 607-610.
- [17] 郑传进, 黄林, 龚明. 巨大芽孢杆菌解磷能力的研究[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(2): 190-192.
- [18] 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(1):

119-123 .

- [19] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata) [J]. *Aquaculture*, 2004, 242: 13-30.
- [20] 胡文佳, 杨圣云, 朱小明. 海水养殖对海域生态系统的影响及其生物修复[J]. 厦门大学学报, 2007, 46(1): 197-202 .

Bacteria community in the intestine and culture environment of *Apostichopus japonicus* in winter

LI Bin^{1,2}, RONG Xiao-jun¹, LIAO Mei-jie¹, CHEN Gui-ping¹, ZHANG Zheng¹, WANG Yin-geng¹, XUE Tai-shan³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology Qingdao 266071, China; 2. Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 3. Qingdao Ruizi Precious Seafood Development Limited Company, Qingdao 266409, China)

Received: Aug., 23, 2009

Key words: Sea Cucumber; Intestinal bacteria; ARDRA; Molecular identification; 16S rDNA

Abstract: Studies on the bacteria community in the intestine and culture environment of *Apostichopus japonicus* in winter were conducted using traditional bacterial cultivation method combined with molecular biology techniques during the period between November 2008 to January 2009. The total numbers of bacteria in the pond water, the sediment, the cultch and *A. japonicus* intestine, estimated by the traditional bacterial cultivation method, ranged from 0.75×10^2 to 1.4×10^4 cfu/mL, 8.7×10^4 to 8.1×10^5 cfu/g, 3.8×10^5 to 2.8×10^6 cfu/g and 7.1×10^5 to 1.5×10^7 cfu/g, respectively. Twenty-two strains were isolated judged by the morphological characteristics of bacteria cultured on the plates. ARADA analysis with restriction enzymes *Rsa* I and *Msp* I revealed that the 22 strains were divided into 8 Operational Taxonomic Units (OTUs), which were dominated by OTU2 and OTU3 that accounted for 30% and 20% of the total isolated strains, respectively. Molecular identification was employed to identify the dominant bacteria in different environments. It was shown that the dominant bacteria were *Pseudomonas stutzeri*, *P. mendocina*, and *Bacillus megaterium* in the pond water; *B. megaterium*, *P. stutzeri*, and *Bacillus thuringiensis* in the sediment; *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, and *Vibrio splendidus* on the cultch; *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *V. splendidus*, and *P. stutzeri* in the sea cucumber intestine. The result of this experiment may be helpful for hypothermia probiotics isolation and disease prevention in sea cucumber culture.

(本文编辑: 梁德海)