

## 三份南海岛礁珊瑚砂样品中可培养细菌多样性

李存<sup>1,3,4</sup>, 崔林青<sup>1,3,4</sup>, 杨红强<sup>2</sup>, 龙丽娟<sup>1,3</sup>, 田新朋<sup>1,3</sup>

1. 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室(中国科学院南海海洋研究所), 广东 广州 510301;

2. 中国科学院边缘海与大洋地质重点实验室(中国科学院南海海洋研究所), 广东 广州 510301;

3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458;

4. 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 岛礁珊瑚砂环境中存在着大量未被培养和利用的微生物资源, 微生物多样性研究是了解微生物生态功能、开发和利用微生物资源的基础。文章采用多种寡营养培养基选择性分离南海岛礁珊瑚砂中的可培养细菌, 共获得纯培养细菌菌株 349 株, 通过 16S rRNA 基因序列分析, 发现它们隶属于 4 门(Actinobacteria、Proteobacteria、Firmicutes 和 Bacteroidetes)、6 纲、26 目、43 科、73 属、134 种, 可培养细菌的优势类群为放线菌门, 占有分离菌株数量的 60%; 而且还发现 18 个 16S rRNA 基因序列相似性低于 97% 的潜在新种。本研究使用改良优化的寡营养培养基进行分离, 较好地显示出样品中微生物的群落组成, 且获得了大量潜在的稀有新物种资源。研究结果表明, 岛礁珊瑚砂样品的可培养细菌资源十分丰富、细菌群落所涉及的生态功能完整、潜在新种比例较高, 为后期岛礁微生物资源挖掘打下了良好的基础, 也为后期开发应用积累了丰富且稀有的菌种资源。

**关键词:** 南海岛礁; 寡营养培养基; 可培养细菌多样性; 微生物资源

中图分类号: P735.51

文献标识码: A

文章编号: 1009-5470(2022)02-0149-10

## Diversity of cultured bacteria isolated from three coral reef sediments in South China Sea

LI Cun<sup>1,3,4</sup>, CUI Linqing<sup>1,3,4</sup>, YANG Hongqiang<sup>2</sup>, LONG Lijuan<sup>1,3</sup>, TIAN Xinpeng<sup>1,3</sup>

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences (South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), Guangzhou 510301, China;

2. Key Laboratory of Ocean and Marginal Sea Geology, Chinese Academy of Sciences (South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), Guangzhou 510301, China;

3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China;

4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** There are a large number of uncultured microbial resources in coral reef environments. Microbial diversity research will help us understand their ecological functions, and also help develop and utilize microbial resources. In this study, a total of 349 pure bacterial strains were obtained by selective isolation media with multiple oligotrophic components, from three samples collected from three coral reef islands in the South China Sea. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, we found the cultivable bacteria belong to four phyla of Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes and

收稿日期: 2021-04-15; 修订日期: 2021-05-12。殷波编辑

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA19060301); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0402); 广东省“珠江人才计划”本土创新科研团队项目(2019BT02Y262)

作者简介: 李存(1995—), 男, 山东省枣庄市人, 硕士研究生, 从事海洋微生物研究。email: licun18@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 田新朋。email: xinpengtian@scsio.ac.cn; 龙丽娟。email: longlj@scsio.ac.cn

Received date: 2021-04-15; Revised date: 2021-05-12. Editor: YIN Bo

**Foundation item:** Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA19060301); Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou) (GML2019ZD0402); Local Innovative and Research Teams Project of Guangdong Pearl River Talents Program (2019BT02Y262)

**Corresponding author:** TIAN Xinpeng. email: xinpengtian@scsio.ac.cn; LONG Lijuan. email: longlj@scsio.ac.cn

Bacteroidetes; and they spread into six class, 26 orders, 43 families, 73 genera, and 134 species. There are 18 potential new taxa with 16S rRNA gene sequence similarities less than 97%. The dominant group is Actinobacteria, which accounts for 60% of all isolates. In this study, the improved and optimized oligotrophic media were used, which showed better isolation results including the composition of the microbial community and rare or new taxa in every sample. The results showed that the cultivable microbial resources are rich and diverse in coral reef island environments of the South China Sea, and the microbial community has comprehensive functions for material and energy metabolism; and the proportion is higher to obtain potential new taxa. This research has laid a good foundation for the methods to mine microbial resources in coral reef islands; it also accumulated abundant and rare microbial resources for the deep development and application in the future.

**Key words:** Coral reef island; oligotrophic medium; cultivable bacterial diversity; microbial resources

珊瑚礁是典型的生物礁, 珊瑚礁生态系统是全球物种多样性最高、资源最丰富的生态系统之一, 被誉为“海洋中的热带雨林”(龙丽娟等, 2019)。岛礁生态系统中的微生物至关重要, 它不仅参与珊瑚礁生态系统的化学循环和物质转化, 还与珊瑚礁生态系统中各种生物的健康息息相关(周进等, 2014), 但目前对岛礁环境微生物的研究相对较少, 因此岛礁环境中微生物资源有待深入的研究。

微生物在地球能量流动和物质循环中扮演了重要角色, 也是珊瑚礁生态系统中重要成员, 开展微生物多样性研究将有助于了解微生物在珊瑚礁生态系统中的功能, 对珊瑚礁生态系统微生物资源的开发和利用有促进作用。近年来为了对纯培养微生物多样性进行研究, 许多学者通过改进培养基配方以及优化培养条件, 显著提高了分离得到的可培养微生物的多样性, 并获得了更多新的微生物类群。孙创等(2021)采用改良的 2216E 固体培养基、R2A 固体培养基、MBM 固体培养基、TCBS 固体培养基和改良的 2216E 液体培养基对西太平洋海水中的微生物进行分离纯化, 而且获得了多株新分类单元。Xian 等(2020)通过微生物网络分析, 发现温单胞菌在群落中可以将复杂底物转化为绿弯菌等难培养微生物生长必需的小分子底物, 于是利用菌株 *Tepidimonas* SYSU G00190W 的上清液改良培养基, 实现了热泉生境中未培养绿弯菌的定向分离培养, 进一步代谢组学研究表明, 培养基上清液中含有很多小分子有机基质, 可作为未培养细菌生长的潜在营养物质。何媛秋等(2020)通过采用不同培养温度、盐度、pH、样品稀释倍数和营养浓度条件对南海沉积物样品进行可培养细菌的多样性研究, 发现寡营养、20 倍的样品稀释倍数、pH 6 和 0.05% 以下的有机

营养物浓度更有利于稀有细菌类群的分离培养。熊盈盈等(2021)总结前人对微生物分离培养的经验, 提出针对未培养的环境微生物培养基和培养条件改良方法, 比如添加抑制剂、样品抽提液或菌液、信号分子、电子供受体以及维生素、生物酶或蛋白因子等物质, 或用其他凝固剂代替琼脂, 延长培养时间以及极限稀释培养法等。

珊瑚礁样品采集难度较大, 非常珍贵, 为获得更多种类的可培养微生物, 本研究采用 5 种不同营养成分的培养基, 并添加不同的微量元素, 对 3 个岛礁陆域珊瑚砂样品进行可培养微生物的分离; 同时分析了不同培养基条件下岛礁可培养细菌的多样性, 岛礁可培养细菌的群落组成, 以及使用 PICRUST2 软件对不同岛礁微生物群落功能进行了合理预测, 以展示其生态功能状况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 珊瑚砂样品

本次试验的南海岛礁珊瑚砂样品从有人岛礁永暑礁(Y11-S)以及无人岛礁扁参礁(BS2-S)和贝壳礁(BK-S)采集获得, 使用无菌采样勺取珊瑚砂表层 0~3cm 的新鲜沉积砂样, 装入无菌塑料保藏袋, 放于-20℃ 保藏备用。

#### 1.1.2 分离培养基

试验采用 5 种寡营养培养基, 即 5% 2216E 固体培养基、5% AIA (Difco<sup>M</sup> actinomycete isolation agar)固体培养基、5% R2A 固体培养基、SN 固体培养基和 10% 菌液琼脂培养基(表 1)。同时单独添加不同的微量元素(终浓度为 0.05%), 分别为醋酸钠、二甲基巯基丙酸(DMSP)、半胱氨酸、甲硫氨酸、牛磺酸。每种培养基中琼脂终浓度为 15.0g·L<sup>-1</sup>。

表 1 不同培养基的类型及其成分

Tab 1 Components of selective isolation media used in this study

培养基名称	培养基成分/(g·L <sup>-1</sup> )
5% 2216	蛋白胨 5.0, 酵母浸粉 1.0, 柠檬酸铁 0.1, NaCl 19.45, MgCl <sub>2</sub> 5.98, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3.24, CaCl <sub>2</sub> 1.8, KCl 0.55, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.16, KBr 0.08, SrCl <sub>2</sub> 0.034, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0.022, Na <sub>2</sub> O·SiO <sub>2</sub> 0.004, NaF 0.0024, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.0016, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.008, 稀释 20 倍, 琼脂 15.0
5% AIA	酪蛋白酸钠 2.0, 天冬酰胺 0.1, 丙酸钠 4.0, K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.5, MgSO <sub>4</sub> 0.1, FeSO <sub>4</sub> 0.001, 沸水浴 1min 后加入甘油 5.0, 稀释 20 倍, 琼脂 15.0
5% R2A	胰蛋白胨 0.25, 酸水解酪蛋白 0.5, 酵母浸粉 0.5, 可溶性淀粉 0.5, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.3, MgSO <sub>4</sub> 0.1, 丙酮酸钠 0.3, 蛋白胨 0.25, 葡萄糖 0.5, 稀释 20 倍, 琼脂 15.0
SN	NaNO <sub>3</sub> 0.75, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.0159, EDTA 二钠 0.0056, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.0104, VitaminB <sub>12</sub> 0.001(过滤除菌), 1 × 10 <sup>-6</sup> 微量盐(乙酸 6.25, 柠檬酸铁铵 6.0, MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1.4, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.39, Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.025, ZnSO <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.222, 单独灭菌), 琼脂 15.0
10%菌液琼脂	离心收集菌株 <i>Gaiella occulta</i> F2-233 <sup>T</sup> 的发酵液 100mL, 过滤除菌, 加入 900mL 纯水, 琼脂 15.0

1.1.3 试验试剂与仪器

细菌 16S rRNA 基因扩增的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。5% Chelex 100 试剂(5g Chelex 100 Resin (Bio-rad, USA)溶解于 100mL 灭菌超纯水); Taq DNA 聚合酶(北京全式金); PCR 仪 (Eppendorf, German); 凝胶成像系统(Bio-rad, USA); 小型台式高速离心机和恒温箱(ESCO, Singapore)。

1.2 菌株的分离、纯化与保藏

称取 0.5g 珊瑚砂样品, 使用灭菌的无菌海水稀释 20 倍, 手动用力震荡摇动 3min 后取 150μL 稀释后的样品悬浊液涂布于固体培养基表面, 每份样品每种培养基涂布两个平板。将涂布好的分离培养基倒置培养于 28℃ 恒温培养箱中, 连续培养一个月后挑取培养基中所有细菌形态的单菌落, 利用平板划线法在 2216E 固体培养基(MA)上进行分离纯化, 将纯化后的菌种转入体积质量 30%甘油管中, 放置于 -80℃ 冰箱中保藏。

1.3 16S rRNA 基因扩增测序分析

细菌总 DNA 通过 5% Chelex-100 试剂提取 (Walsh et al, 1991), 采用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。获得的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 送广州天一辉远测序公司进行基因测序。测序结果采用 SeqMan 5.0 (Swindell et al, 1997)软件进行拼接, 去除质量不佳的测序碱基后, 将获得的有效序列(近 1500bp)提交至 EzBioCloud (Yoon et al, 2017)和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行在线 BLAST 比对, 比对结果按照 98%作为区分物种的标准(Yarza et al, 2014), 若与已知菌种相似度小于等于 98%, 则认为该菌株为潜在新种。

1.4 系统进化分析

根据序列比对结果, 选取同源性较高的模式菌

株的 16S rRNA 基因序列作为参比序列, 使用 CLUSTAL\_W 软件进行多序列比对, 使用 MEGA-X (Kumar et al, 2018)软件, 结合 Kimura2-parameter 模型估算系统进化矩阵, 采用邻近法(neighbor-joining, N-J)(Saitou et al, 1987)进行聚类分析, 设置 1000 次重采样构建系统发育树, 使用 iTOL (Letunic et al, 2019)在线网站对系统发育树进行可视化。

1.5 多样性分析与群落功能预测

统计 3 份样品中获得的细菌种类和丰度, 制作样品-细菌物种丰度矩阵表, 使用 R 语言 vegan 包计算样品的 α 多样性, 包括 Shannon 多样性指数、Simpson 指数、invsimpson 多样性指数和 Chao1 指数。使用 PICRUSt2 软件(Douglas et al, 2020)基于 16S rRNA 基因数据对群落功能进行预测, 参考京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库, 得到直系同源 (KEGG orthology)功能的丰度预测表及 KEGG 代谢途径丰度表。

2 结果与分析

2.1 细菌多样性

通过菌株分离纯化, 本研究共从 126 个未污染的分离平板获得 349 株细菌, 经 16S rRNA 基因序列相似性比对分析, 显示这些新分离的菌株分别与目前 134 个已知种亲缘关系相近, 这些菌株分别属于 4 门、6 纲、26 目、43 科、73 属。4 个分离到的细菌门中放线菌门(Actinobacteria)的菌株占有所有分离菌株的 60%, 为优势菌门, 其他依次为变形菌门 (Proteobacteria, 28%)、厚壁菌门(Firmicutes, 11%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 2%)。分离到较多的属级类群为链霉菌属(*Streptomyces*, 46 株)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*, 40 株)和产微球茎菌属 (*Microbulbifer*, 37 株)。图 1 展示了纯培养菌株在不同分类等级中细菌类群所占的比例。图 2 展示了

134 个物种(选取同种菌株中相似度最高的作为代表菌株)与其最相似已知物种菌株的 16S rRNA 基因组

列构建的系统发育关系。对获得的 4 个门级类群纯培养菌株的多样性分别进行描述。

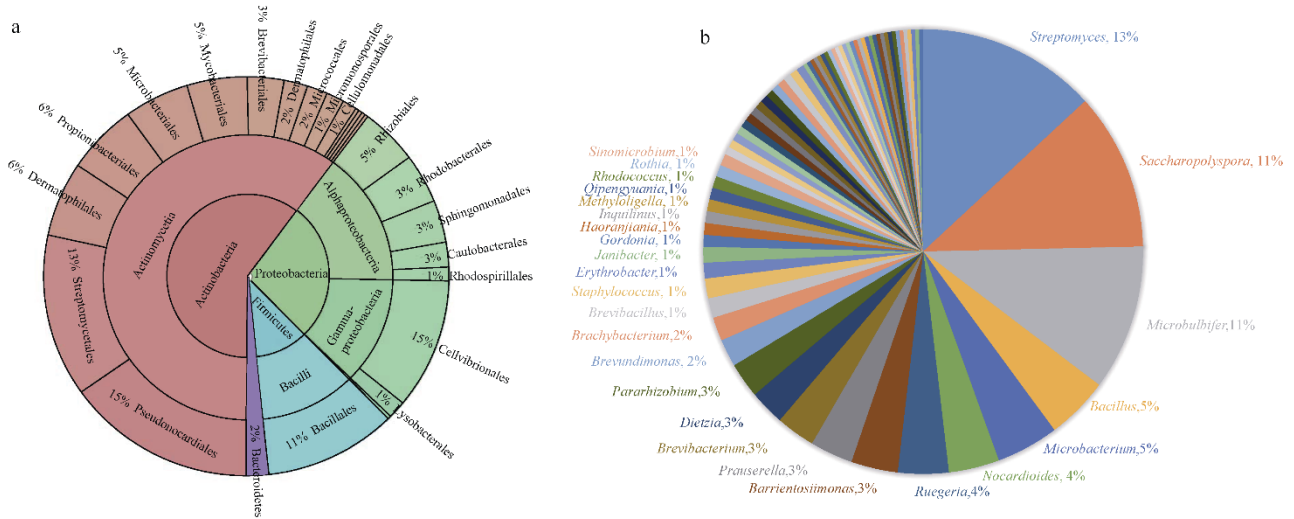


图 1 分离获得的纯培养细菌在各分类等级中的分布情况

a. 在不同门级、纲级、目级水平下细菌类群比例; b. 在不同属水平下细菌类群比例(标注了菌株中丰度前 25 的属)

Fig. 1 Distribution of isolated pure culture strains in each classification grade. (a) Proportion of pure culture strains at different phylum, class and order levels, and (b) proportion of pure culture strains in the top 25 genera

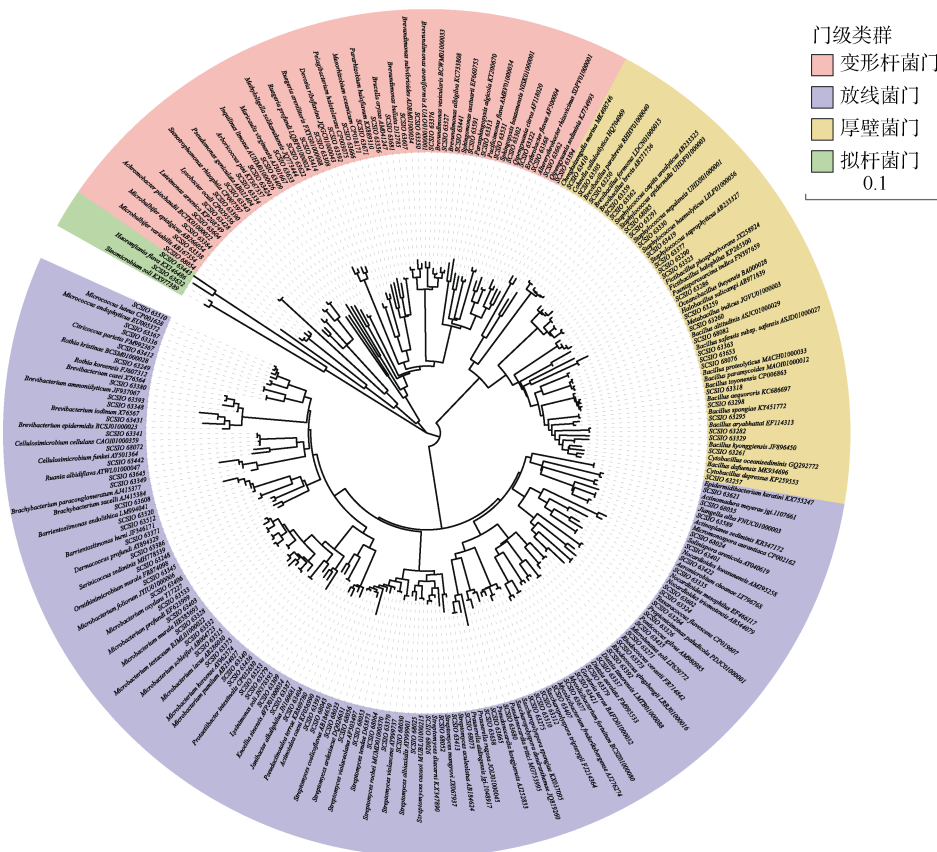


图 2 采用邻接法基于 16S rRNA 基因序列构建的 134 个代表菌株系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of 134 representative strains reconstructed based on the 16S rRNA gene sequences

### 2.1.1 放线菌门

分离得到的放线菌门细菌共计 210 株, 属于放线菌纲(Actinomycetia)的 15 目 22 科 37 属 74 个菌种, 分

离菌株数量最多的为链霉菌和糖多孢菌属, 其中包含链霉菌属下的 11 个菌种、糖多孢菌属下的 3 个菌种, 其中 *Saccharopolyspora spongiae* (27 株)、*Streptomyces*

*diacarni* (20 株)、*Saccharopolyspora tripterygii* (12 株)、*Streptomyces albiacialis* (11 株)、*Nocardioideis iriomotensis* (11 株)为分离到的主要优势菌株, 其他优势属还包括微杆菌属(*Microbacterium*)、类诺卡氏属(*Nocardioideis*)、*Barrientosiimonas*、布劳氏菌属(*Prauserella*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、两面神菌属(*Janibacter*)、罗斯氏菌属(*Rothia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)等。

2.1.2 变形菌门

本研究分离得到的变形菌门菌株共计 96 株, 涵盖了 3 纲( $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲)、8 目(*Burkholderiales*、*Caulobacterales*、*Cellvibrionales*、*Lysobacterales*、*Rhizobiales*、*Rhodobacterales*、*Rhodospirillales*、*Sphingomonadales*)、15 科、23 属、33 种。在纲水平上优势类群为  $\alpha$ -变形菌纲(53 株)和  $\gamma$ -变形菌纲(42 株)。前者中以红细菌目(*Caulobacterales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)和柄杆菌目(*Caulobacterales*)为主, 后者则以 *Cellvibrionales* 为主。获得菌株中最多的物种为 *Microbulbifer variabilis* (34 株)、*Ruegeria arenilitoris* (11 株)、*Pararhizobium haloflavum* (9 株)。

2.1.3 厚壁菌门和拟杆菌门

本研究中获取的 37 株厚壁菌门菌株分别属于

芽孢杆菌目的 4 科 11 属, 以芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)为主, 优势菌株为 *Bacillus altitudinis* (5 株)。另外, 拟杆菌门仅分离得到 6 株, 分别属于土壤中华微杆菌(*Sinomicrobium soli*, 3 株)和黄色简浩然菌(*Haoranjiana flava*, 3 株)。

2.2 3 份珊瑚砂样品中可培养细菌多样性的比较

本研究所采集的 3 份样品中可培养细菌的主要优势类群不同, 选择 Shannon、Simpson、Invsimpson、Chao1 和 ACE 指数对 3 份样品的细菌群落多样性进行评估。由表 2 和图 3 可知, 样品 BK-S 和 BS2-S 的多样性较高, 而 Y11-S 样品的多样性较为单一。BK-S 样品中获得的 80 个菌种分别属于 4 门、5 纲、21 目、32 科、48 属, 优势类群为放线菌纲、 $\alpha$ -变形菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲。BS2-S 样品中获得的 64 个物种分别属于 4 门、7 纲、20 目、32 科、43 属, 优势类群为放线菌纲、 $\alpha$ -变形菌纲和芽孢杆菌纲。Y11-S 样品中获得的 20 个物种分别属于 2 门、2 纲、6 目、7 科、10 属, 其优势类群为放线菌纲的链霉菌属。虽然采集 3 个样品的水深均为 10m 左右, 采集样品的水温、透光性等环境参数也相似, 但样品可培养细菌多样性存在明显差异, 样品间细菌多样性差异是否与人类活动有关, 仍需进一步验证。

表 2 3 份珊瑚砂样品中细菌群落多样性指数

Tab. 2 Diversity index of pure cultured strains isolated from three coral reef samples

样品名称	Shannon 指数	Simpson 指数	Invsimpson 指数	Chao1 指数	ACE 指数
Y11	2.39	0.85	6.78	53.00	42.54
BK-S	3.83	0.95	20.40	182.67	259.60
BS2-S	3.81	0.97	30.07	169.11	176.52

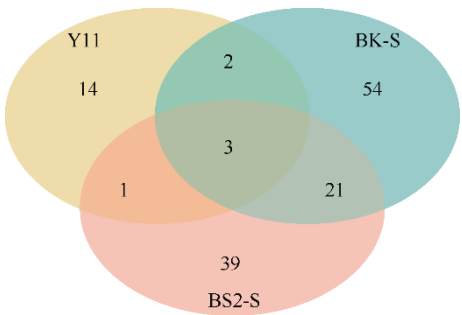


图 3 3 份样品(Y11、BK-S、BS2-S)中共有菌种数量

Fig. 3 Numbers of same species discovered in three samples of Y11-S, BK-S and BS2-S

2.3 不同培养基分离到的可培养细菌多样性比较

本研究使用 5 种培养基获得的最优势门级类群都为放线菌门, 最优势纲为放线菌纲。在 5 种培养

基中, 5% 2216、SN、10%菌液琼脂培养基分离得到的细菌多样性较高, 除放线菌纲外, 3 种培养基中都分离到了芽孢杆菌纲、 $\alpha$ -变形菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲。在 SN 培养基中还获得了 3 株黄杆菌纲菌种, 在 10%菌液琼脂培养基中还获得了 3 株 Chitinophagia 纲和 1 株  $\beta$ -变形菌纲菌种。在这种水平上, 5 种培养基分离得到细菌的多样性由高到低依次为 5% 2216 培养基(61 种)、10%菌液琼脂培养基(59 种)、SN 培养基(53 种)、5% AIA 培养基(9 种)、5% R2A 培养基(8 种)(图 4)。5% 2216 培养基和 10%菌液琼脂培养基中含有丰富多样的营养物质, 其营养成分比更接近于海洋环境, 如碳氮硫浓度、盐度, 可以为多种类型的菌株提供生长所需的营养环境。分析添加的微量元素的分离效果, 含有醋酸钠的培养基获得了更

多的菌株数量；同时发现与已知物种 *Pseudactinotalea terrae*、*Actinoplanes sediminis*、*Tessaracoccus flavescens*、*Achromobacter piechaudii* 等相近的潜在新分类单元仅在含有醋酸钠的分离培养基中获得，与 *Micromonospora aurantiaca* 相近的潜在新分类单元仅在含有甲硫氨酸的分离培养基中获得，与 *Actinomadura meyeri* 相近的潜在新分类单元仅在含有 DMSP 的培养基中获得。

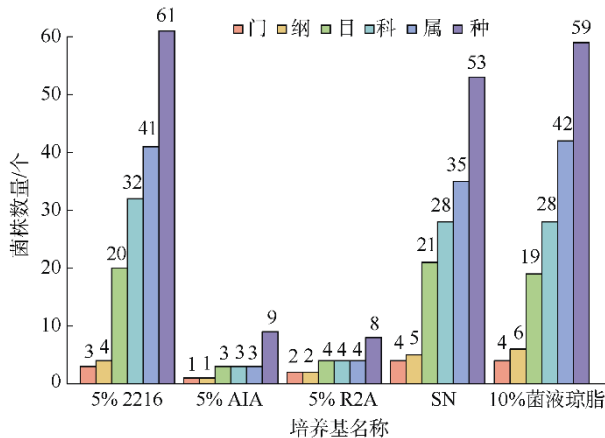


图 4 不同培养基获得的可培养细菌在不同分类水平上的多样性

Fig. 4 Bacterial diversity in different classification grades isolated from different selective isolation media

## 2.4 潜在新物种信息

以 16S rRNA 基因相似度大于 98% 时作为同一物种，本试验中共分离得到 56 株潜在新种，与目

前有效发表的最相近菌种的 16S rRNA 基因相似度范围在 89.9%~98.0%，其中 89.9%~95.0% 的有 7 株，95.0%~97.0% 的有 21 株，97.0%~98.0% 的有 28 株；去重复后为 18 个潜在新种，见表 3。图 5 为 56 株潜在新种与已知物种的系统进化发育树，其中 31 株潜在新分类单元属于放线菌纲，19 株属于  $\alpha$ -变形菌纲，3 株属于芽孢杆菌纲，3 株属于 Chitinophagia 纲。获得的 31 株潜在放线菌纲新种分别属于短杆菌属 (*Brevibacterium*)、短状杆菌属 (*Brachybacterium*)、*Barrientosiimonas* 属、赖氨酸单胞菌属 (*Lysinimonas*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、花金龟菌属 (*Protaetiibacter*)、迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、戈登氏菌属 (*Gordonia*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioideis*)、普劳氏菌属 (*Prauserella*)、阮氏菌属 (*Ruania*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。对潜在新种的来源培养基进行分析，发现在 5% 2216 培养基 (19 株) 和 SN 培养基 (19 株) 中获得了最多的潜在新种。图 6 展示了部分潜在新物种的平板菌落形态情况。

## 2.5 PICRUST2 功能预测分析

基于 PICRUST2 软件，进行菌群功能分析，得到不同样品细菌的功能预测信息。利用 KEGG 数据库对测序数据进行比对，所有样品分析的功能涉及 8 类生物代谢通路：代谢 (metabolism)、功能蛋白 (protein families)、遗传信息处理 (genetic information processing)、环境信息处理 (environmental information processing)、细胞转化 (cellular processes)、生物体系

表 3 潜在新菌种去重复信息表

Tab. 3 Potential new taxa information after removing the duplication

菌种编号	合并菌株数	最相似菌种	16S RNA 序列相似性	新分类单元
SCSIO 63424	1	<i>Arboricoccus pini</i>	89.88	潜在新属
SCSIO 63409	3	<i>Inquilinus limosus</i>	92.80	潜在新属
SCSIO 63602	1	<i>Nocardioideis mesophilus</i>	93.64	潜在新属
SCSIO 63346	1	<i>Brevibacterium ammoniilyticum</i>	94.61	潜在新属
SCSIO 63385	1	<i>Gordonia terrae</i>	94.74	潜在新属
SCSIO 63263	3	<i>Brevibacterium casei</i>	95.07	潜在新属
SCSIO 63650	1	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	95.66	潜在新属
SCSIO 63659	6	<i>Nocardioideis iriomotensis</i>	96.00	潜在新种
SCSIO 63265	2	<i>Haoranjiana flava</i>	96.19	潜在新种
SCSIO 63649	1	<i>Prauserella aidingensis</i>	96.34	潜在新种
SCSIO 63671	1	<i>Mesorhizobium oceanicum</i>	96.45	潜在新种
SCSIO 63658	1	<i>Prauserella rugosa</i>	96.56	潜在新种
SCSIO 63505	1	<i>Cohnella cellulosilytica</i>	96.58	潜在新种
SCSIO 63329	1	<i>Bacillus dafuensis</i>	96.71	潜在新种
SCSIO 63500	1	<i>Microbacterium oxydans</i>	96.72	潜在新种
SCSIO 63633	1	<i>Maricaulis virginensis</i>	96.77	潜在新种
SCSIO 68054	1	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	97.01	潜在新种
SCSIO 63591	1	<i>Sphingomonas aestuarii</i>	97.02	潜在新种

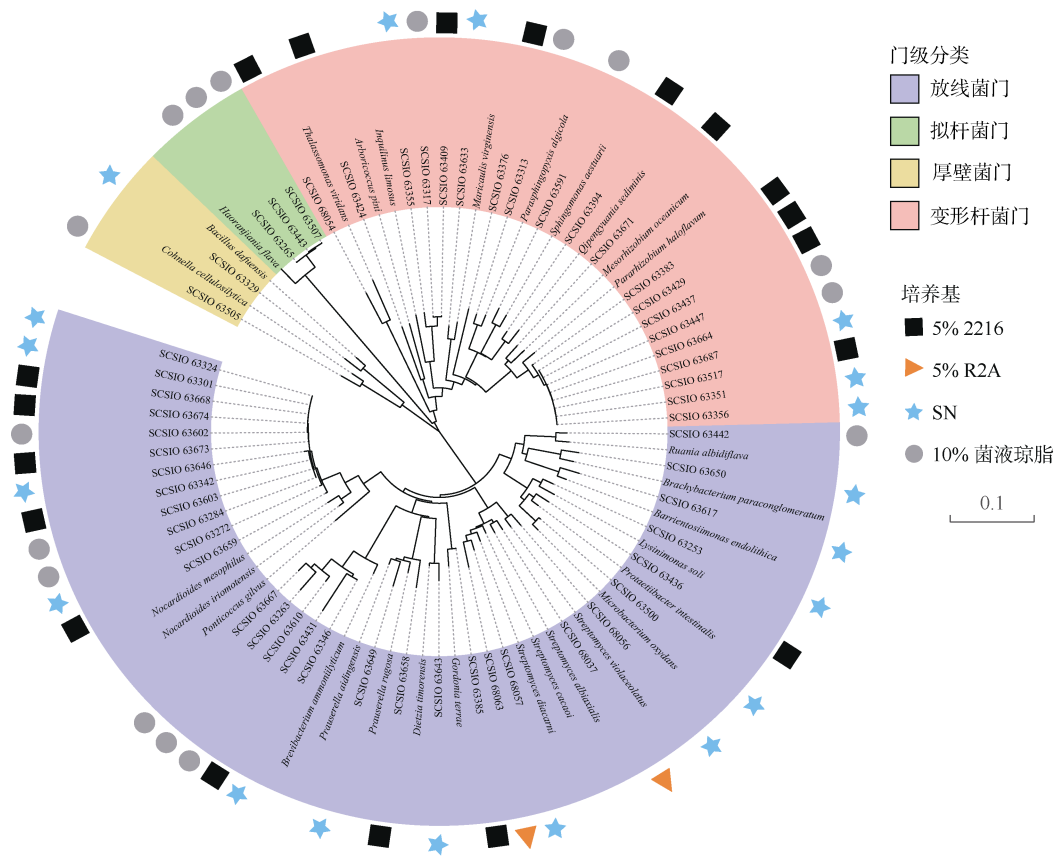


图 5 不同培养基分离得到的潜在新种的系统发育树  
Fig. 5 Phylogenetic tree of potential new taxa obtained from different media

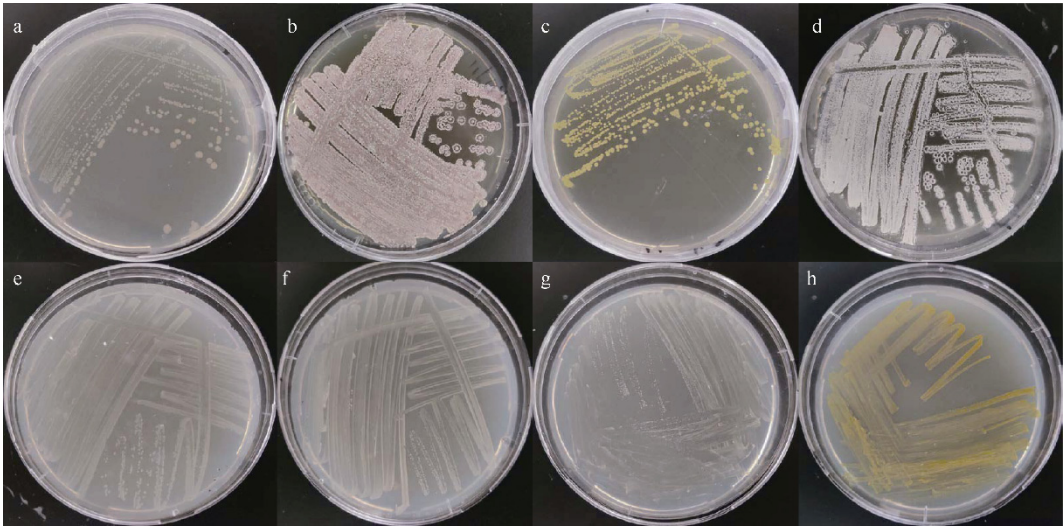


图 6 不同潜在新种在 2216E 培养基上培养 14 天后的菌落平板  
a. SCSIO 63409 (*Inquilinus limosus*); b. SCSIO 63263 (*Brevibacterium casei*); c. SCSIO 63671 (*Mesorhizobium oceanicum*); d. SCSIO 63659 (*Nocardioides iriomotensis*); e. SCSIO 63385 (*Gordonia terrae*); f. SCSIO 63505 (*Cohnella cellulosilytica*); g. SCSIO 63658 (*Prauserella rugose*); h. SCSIO 68054 (*Oceanobacillus iheyensis*)  
Fig. 6 Pure culture morphology of potential new taxa on 2216E medium after incubation for 14 days. (a) SCSIO 63409 (*Inquilinus limosus*); (b) SCSIO 63263 (*Brevibacterium casei*); (c) SCSIO 63671 (*Mesorhizobium oceanicum*); (d) SCSIO 63659 (*Nocardioides iriomotensis*); (e) SCSIO 63385 (*Gordonia terrae*); (f) SCSIO 63505 (*Cohnella cellulosilytica*); (g) SCSIO 63658 (*Prauserella rugose*); (h) SCSIO 68054 (*Oceanobacillus iheyensis*)

统(organismal systems)、人类疾病(human diseases)和未分类(Unclassified)(图 7), 这 8 个代谢通路主要体现了细菌菌群的生长繁殖、物质代谢与转运、能量代谢与传递、环境互作等方面的功能信息。分析结果显示, 代谢和编码功能蛋白是主要通路, 丰度分别为 40.64%~43.0%和 23.18%~23.83%。进一步对预测基因二级功能层级进行分析, 共发现碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)、转录(transcription)、膜转运(membrane transport)、信号传导(signal transduction)、细胞生长和死亡(cell growth and death)和能量代谢(energy metabolism)等 38 个子功能。分析发现 3 个样品的群落功能组成大体一致, 在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、编码遗传信息处理蛋白、编码信号转导和细胞过程蛋白等通路具有更高的丰度。PICRUSt2 功能预测分析显示出有人岛礁和无人岛礁细菌群体在其生态功能方面并无差异, 这说明岛礁周边水下环境细菌生态功能并未因为岛礁陆域上人为活动而受到影响。

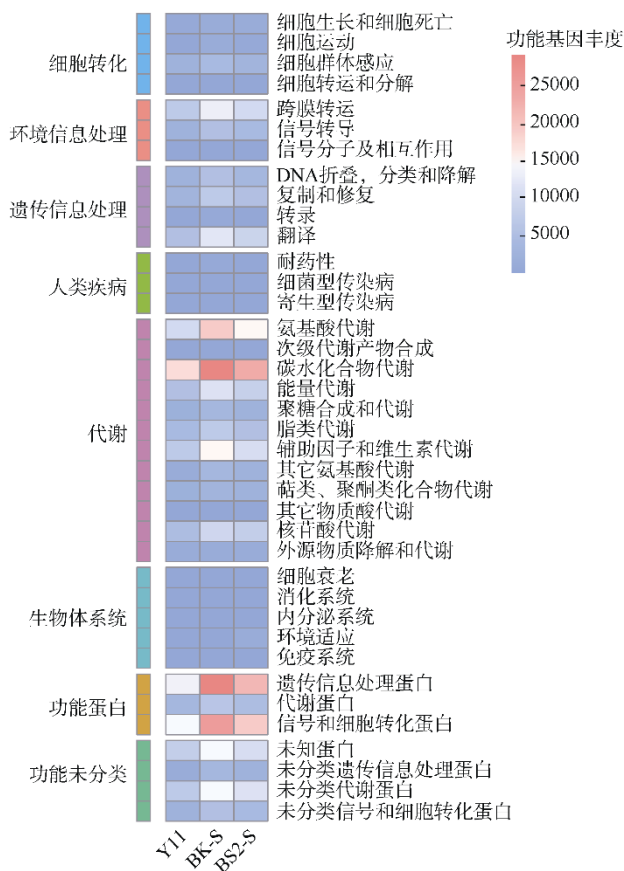


图 7 不同来源样品的 PICRUSt2 功能预测热图

Fig. 7 Function prediction heatmap of PICRUSt2 for three different samples

### 3 讨论

珊瑚砂是以珊瑚碎屑为主并有石灰藻、有孔虫、棘皮动物碎片、贝壳碎片等组成的砂质沉积物, 颗粒大小不等, 规格多种多样, 其最大的特点是表面微孔丰富, 适宜细菌生存。本研究采用纯培养方式对南海岛礁珊瑚砂环境可培养细菌多样性进行研究, 共获得 349 株纯培养菌株。鉴定结果显示这些菌株分别属于 4 门、6 纲、26 目、43 科、73 属、134 种, 包括 18 个潜在新种, 其中放线菌门是最优势的细菌类群, 占有分离菌株的 60%, 原因可能与 3 个样品营养贫瘠有关; 其他优势类群依次为变形菌门(28%)、厚壁菌门(11%)和拟杆菌门(2%)。分离得到较多的属级类群为链霉菌属(46 株)、糖多孢菌属(40 株)和产微球茎菌属(37 株)。分析发现样品 BK-S 和 BS2-S 中的细菌多样性较高, 而 Y11 样品的细菌多样性较为单一。样品 BK-S 和 BS2-S 来源于无人岛礁, Y11 样品来源的岛礁上有人类活动, 对细菌群落功能的预测分析结果显示有人岛礁和无人岛礁细菌群体在其生态功能方面并无差异, 这说明岛礁周边水下环境细菌生态功能并未因为岛礁陆域上人为活动而受到影响, 因此 Y11 样品来源岛礁周围环境中的细菌多样性低的原因仍然未知。Schöttner 等(2011)对红海亚喀巴湾东北部浅岸礁的碳酸盐砂和硅酸盐砂样品进行免培养细菌多样性的研究, 发现珊瑚砂样品中细菌的群落组成主要为  $\gamma$ -变形菌纲、放线菌纲、 $\alpha$ -变形菌纲、 $\delta$ -变形菌纲、厚壁菌门、拟杆菌门等。韩敏敏等(2020)使用 6 种普适性培养基对 Khai 岛和 Pathiu 岛采集的 2 份珊瑚礁沉积物样品进行分离培养, 获得的可培养细菌类群为变形菌门(54.55%)、厚壁菌门(31.82%)、放线菌门(9.09%)和拟杆菌门(4.54%)。对比已有的对珊瑚砂细菌多样性的研究, 本研究获得的可培养类群与珊瑚砂中主要细菌类群一致, 并且通过优化改良培养基, 从样品中获取了更多种类的菌株, 有助于更好的反映珊瑚砂样品中可培养细菌的多样性。

本研究将常用的 2216E、R2A、AIA 等基础培养基稀释到 5%, 以及使用 SN、10%菌液琼脂等寡营养培养基对样品进行分离, 从得到的纯培养菌株多样性来看, 寡营养培养基珊瑚砂样品具有更好的分离效果。根据文献报道, 在营养丰富的培养基中获得的微生物的数量并非最多, 相反培养基中高浓度的营养物质会影响寡营养微生物细胞生长, 而用于培养寡营养环境中微生物的培养基中有机碳水平不

应高于  $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Jannasch et al, 1959; Kadota, 1981; Kjelleberg et al, 1985)。Cho 等(2004)在分析太平洋及远洋样品时, 发现有 44 株  $\gamma$ -变形菌无法在经典培养基上形成菌落, 而其中 7 株菌却可以在 10% R2A 琼脂培养基上形成菌落。Koch(2001)认为当寡营微生物从营养贫乏的生态环境中突然转移到富营养环境中时, 微生物无法快速适应环境变化, 可能会在生长过程中产生有毒物质, 例如有氧代谢形成的有毒产物累积或细胞内自由基过快积累, 导致细胞损伤, 影响生长。同时, 大量非代谢物质的转运摄取会导致细胞壁、细胞质生长不均衡, 膜蛋白比例过高阻碍细胞质膜生长, 细胞内代谢失调, 影响细胞增殖机制。

环境中有些微生物具有乙酰辅酶 A 连接酶

(Acetate-CoA ligase, EC 6.2.1.1), 能利用乙酸盐作为唯一碳源, 使乙酸盐生成乙酰辅酶 A, 而乙酰辅酶 A 是细胞生化代谢过程中重要的中间产物, 可以转化成多种细胞所需要的营养物质。硫元素是生物体必需的营养元素, 在海洋生态系统中硫酸盐、硫化物储量巨大, 不同价态硫化物之间的转化主要由代谢功能多样的微生物等来完成, 环境中的硫元素对某些微生物的生长至关重要。因此, 本研究在寡营养培养基的基础上, 添加乙酸钠、含硫氨基酸、DMSP 等小分子物质来增加从环境中获取微生物的几率, 从结果来看, 与以往使用经典培养基进行环境样品分离相比, 本研究获得的菌株在多样性和潜在新种数量等方面都有显著的提高。

## 参考文献 References

- 韩敏敏, 李蜜, 刘昕明, 等, 2020. Khai 岛和 Pathiu 岛珊瑚礁沉积物细菌多样性及细菌粗提物延缓秀丽杆线虫衰老活性研究[J]. 热带海洋学报, 39(5): 19–29. HAN MINMIN, LI MI, LIU XINMING, et al, 2020. Studies on bacterial diversity in coral reef sediments in Khai Island and Pathiu Island and bacterial crude extract retards aging activity of *Caenorhabditis elegans*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 39(5): 19–29 (in Chinese with English abstract).
- 何媛秋, 李存, 陈柔雯, 等, 2020. 不同培养条件对海洋沉积环境细菌的选择性分离[J]. 生物资源, 42(5): 540–548. HE YUANQIU, LI CUN, CHEN ROUWEN, et al, 2020. Selective isolation of bacteria from marine sedimentary environment by different culture conditions[J]. Biotic Resources, 42(5): 540–548 (in Chinese with English abstract).
- 龙丽娟, 杨芳芳, 韦章良, 2019. 珊瑚礁生态系统修复研究进展[J]. 热带海洋学报, 38(6): 1–8. LONG LIJUAN, YANG FANGFANG, WEI ZHANGLIANG, 2019. A review on ecological restoration techniques of coral reefs[J]. Journal of Tropical Oceanography, 38(6): 1–8 (in Chinese with English abstract).
- 孙创, 王金燕, 张钰琳, 等, 2021. 利用改良培养基探究西太平洋海水可培养细菌多样性[J]. 微生物学报, 61(4): 845–861. SUN CHUANG, WANG JINYAN, ZHANG YULIN, et al, 2021. Exploring the diversity of cultivated bacteria in the Western Pacific waters through improved culture media[J]. Acta Microbiologica Sinica, 61(4): 845–861 (in Chinese with English abstract).
- 熊盈盈, 莫祯妮, 邱树毅, 等, 2021. 未培养环境微生物培养方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 48(5): 1765–1779. XIONG YINGYING, MO ZHENNI, QIU SHUYI, et al, 2021. Research progress on culture methods of uncultured environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 48(5): 1765–1779 (in Chinese with English abstract).
- 周进, 晋慧, 蔡中华, 2014. 微生物在珊瑚礁生态系统中的作用与功能[J]. 应用生态学报, 25(3): 919–930. ZHOU JIN, JIN HUI, CAI ZHONGHUA, 2014. A review of the role and function of microbes in coral reef ecosystem[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 25(3): 919–930 (in Chinese with English abstract).
- CHO J C, GIOVANNONI S J, 2004. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 70(1): 432–440.
- DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J R, et al, 2020. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. Nature Biotechnology, 38(6): 685–688.
- ISHIDA Y, KADOTA H, 1981. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs[J]. Microbial Ecology, 7(2): 123–130.
- JANNASCH H W, JONES G E, 1959. Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration[J]. Limnology and Oceanography, 4(2): 128–139.
- KJELLEBERG S, MARSHALL K C, HERMANSSON M, 1985. Oligotrophic and copiotrophic marine bacteria-observations related to attachment[J]. FEMS Microbiology Letters, 31(2): 89–96.
- KOCH A L, 2001. Oligotrophs versus copiotrophs[J]. BioEssays, 23(7): 657–661.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, et al, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547–1549.
- LETUNIC I, BORK P, 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments[J]. Nucleic Acids Research, 47(W1): W256–W259.
- SAITOU N, NEI M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 4(4): 406–425.
- SCHÖTTNER S, PFITZNER B, GRÜNKE S, et al, 2011. Drivers of bacterial diversity dynamics in permeable carbonate and

- silicate coral reef sands from the Red Sea[J]. *Environmental Microbiology*, 13(7): 1815–1826.
- SWINDELL S R, PLASTERER T N, 1997. SEQMAN[M]// SWINDELL S R. *Sequence data analysis guidebook. Methods in molecular medicine™*, volume 70. Totowa, NJ: Springer: 75–89.
- WALSH P S, METZGER D A, HIGUCHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. *Biotechniques*, 10(4): 506–513.
- XIAN WENDONG, SALAM N, LI MENG MENG, et al, 2020. Network-directed efficient isolation of previously uncultivated *Chloroflexi* and related bacteria in hot spring microbial mats[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 6: 20.
- YARZA P, YILMAZ P, PRUESSE E, et al, 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9): 635–645.
- YOON S H, HA S M, KWON S, et al, 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5): 1613–1617.