

琼东海域珊瑚共附生放线菌的多样性

周 渊^{1,2}, 谢富全², 牛文涛², 郑新庆², 李登峰¹, 张改云²

(1. 宁波大学, 浙江 宁波 315000; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:应用免培养方法与可培养方法相结合的方式对琼东海域6种珊瑚样品中的共附生放线菌进行研究, 具体为滨珊瑚(*Porite*)、扁脑珊瑚(*Platygyra*)、角蜂巢珊瑚(*Favites*)、盔形珊瑚(*Galaxea*)和鹿角珊瑚(*Acropora*)。免培养方法中, 利用放线菌特异性引物对样品总DNA进行16S rRNA基因序列扩增, 并将扩增产物进行Miseq高通量测序, 测序结果分析表明, 6种珊瑚样品中的放线菌序列属于37个分类单元, 主要分布在酸微菌目、棒杆菌目、微球菌目、丙酸杆菌目和假诺卡氏菌目, 其中37.8%的分类单元与已有效发表菌株的序列相似性小于97%, 可能代表着放线菌新的类群。可培养方法中, 通过6种培养基分得137株放线菌, 分属于放线菌门放线菌纲5个目11个科下的20个属, 优势类群为分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、考克氏菌属(*Kocuria*)和微球菌属(*Micrococcus*), 其中放线孢菌属(*Actinomycetospora*)、柠檬球菌属(*Citricoccus*)和涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)是第一次从珊瑚样品中发现; 琼东海域珊瑚共附生放线菌多样性丰富, 新类型的放线菌资源挖掘潜力比较大。

关键词:海洋生物学; 珊瑚; 共附生放线菌; 多样性

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 009

中图分类号:P735

文献标识码:A

文章编号:2095-4972(2018)02-0218-11

珊瑚礁生态系统是海洋中生物多样性最丰富的生态系统之一, 其中栖息着大量的珊瑚虫、海绵、贝类等肉眼可见生物, 同时也蕴含了大量的微生物。Yang等(2013)采用可培养和免培养的方法从疣冠形软珊瑚(*Alcyonium graellimum*)和短管星珊瑚(*Tubastraea coccinea*)分离到19个放线菌类群^[1]; Mahmoud等(2016)从柱形筛珊瑚(*Coscinaraea columna*)、精巧扁脑珊瑚(*Platygyra daedalea*)和哈里森滨珊瑚(*Porites harrisoni*)中分得19个放线菌属, 其中链霉菌属(*Streptomyces*)、微球菌属(*Micrococcus*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和短状杆菌属(*Brachybacterium*)的菌株具有抑菌活性^[2]; Kuang等(2015)在调查滨钟形孔笠珊瑚(*Porites lutea*)共附生放线菌的多样性中, 发现有12个放线菌属是第一次从珊瑚样品中检测到^[3]; 周俊勇(2011)从南海珊瑚样品中分离到一株来自诺卡氏菌属(*Nocardia*)的放线菌, 它能够大量生产出具有抗菌、抗肿瘤、抗HIV活性的利迪链霉素^[4]。Harvell等(1999)认为珊瑚共

附生微生物在保护珊瑚宿主抵御捕食者和抗病原微生物等生物过程中发挥了重要作用, 而珊瑚共附生放线菌很有可能通过产生一些重要的生物活性物质, 参与了珊瑚宿主化学防御过程^[5]。因此研究珊瑚共附生放线菌对于寻找新型药物具有重要意义, 在珊瑚生态系统中, 珊瑚共附生放线菌有着巨大的未发现的多样性亟需调查。

1 材料和方法

1.1 样品采集与鉴定

珊瑚样品采集自海南琼东海域(19°20'N, 110°63'E), 水深5 m。样品采集完毕后分别保存于4℃冰箱和液氮中, 用于纯培养和免培养分析。珊瑚样品的类别鉴定工作由国家海洋局第三海洋研究所海洋生物与生态实验室完成。所采集珊瑚样品总共可分为6类, 分别为: 滨珊瑚(*Porite*)、扁脑珊瑚(*Platygyra*)、角蜂巢珊瑚(*Favites*)、盔形珊瑚(*Galaxea*)和鹿角珊瑚(*Acropora*)。

收稿日期:2017-05-15

基金项目:国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科2015002)

作者简介:周渊(1991~), 男, 硕士研究生; E-mail:iori63@qq.com

通讯作者:张改云(1980~), 女, 副研究员; E-mail:zhgyun@tio.org.cn

1.2 基因组总 DNA 提取、PCR 扩增和测序

基因组 DNA 采用 Fast DNA Spin Kit (MP Bio-medicals) 提取,得到的 DNA 样品储存于 -20°C 。为提高放线菌的特异性,先用细菌通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GT-TACCTTGTACGACTT-3')对基因组 DNA 进行扩增,PCR 反应体系为 50 mm^3 体积,包括 $5\text{ mm}^3\ 10\times\text{Buffer}$, 5 mm^3 二甲亚砜, 4 mm^3 dNTP mix (2.5 mM), 2 mm^3 27F 引物, 2 mm^3 1492R 引物, 0.3 mm^3 rTaq 酶, 2 mm^3 菌株基因组 DNA 和无菌水 30 mm^3 ; PCR 程序为 94°C 预变性 5 min , 然后 94°C 变性 30 s , 55°C 退火 1 min ; 72°C 延伸 1.5 min 共进行 30 个循环然后再于 72°C 延伸 10 min 。然后,再以扩增产物为模板用放线菌特异性引物(235F:5'-CGCGGCCTATCAGCTTGT-TG-3'和 878R:5'-CCGTACTCCCCAGGCGGG-3')进行放线菌 16S rRNA 基因部分序列的 PCR 扩增,扩增体系和 PCR 程序同基因组 DNA 扩增;扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3 免培养放线菌多样性分析

Miseq 高通量测序完成后,先通过 Trimmomatic 和 FLASH 软件平台对原始数据进行过滤处理,得到优化序列;然后再对优化序列提取非重复序列,并去除没有重复的单序列,按照 97% 相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU (Operational Taxonomic Units) [6] 聚类,在聚类过程中去除嵌合体,得到 OTU 的代表序列;将所有优化序列 map 至 OTU 代表序列,选出与 OTU 代表序列相似性在 97% 以上的序列,生成相应 OTU。使用 97% 相似度的 OTU,利用 Mothur 做 Rarefaction 分析,计算菌群丰度指数(Chao 和 ACE)、菌群多样性指数(香农指数和辛普森指数)和覆盖率(Coverage) [7-8]。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析;采用 R 语言 PCA 统计分析和作图软件完成主成分分析 [9]。

1.4 可培养放线菌的分离

珊瑚样品用无菌水冲洗,并在无菌研钵中磨碎,取一定量珊瑚粉末以无菌海水连续梯度稀释得 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 系列稀释溶液,分别取 0.5 cm^3 上述稀释液涂布在 6 种选择性分离培养基上:(1)高氏一号培养基: $\text{KNO}_3\ 1.0\text{ g}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 0.5\text{ g}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 0.01\text{ g}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4\ 0.5\text{ g}$, 可溶性淀粉 20.0 g , 琼脂 15.0 g , 海水 1.0 dm^3 , pH 值 $7.2\sim 7.6$; (2)ISP2 培养基: 酵母提取物 4.0 g , 麦芽提取物 10.0 g , 葡萄糖 4.0 g , 琼脂 15.0 g , 海水 1.0 dm^3 , pH 值 7.0 ; (3)棉子糖-组氨酸培养基: 棉子糖 10.0

g , L-组氨酸 1.0 g , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 0.1\text{ g}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4\ 1.0\text{ g}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\ 0.5\text{ g}$, 琼脂 15.0 g , 海水 1 dm^3 , pH 值 $7.2\sim 7.4$; (4)甘露醇-酪蛋白培养基: D-甘露醇 0.2 g , 酪蛋白 1.0 g , $\text{K}_2\text{HPO}_4\ 0.7\text{ g}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4\ 0.5\text{ g}$, 琼脂 15.0 g , 海水 1.0 dm^3 , pH 值 $7.0\sim 7.5$; (5) TSA 培养基 (Tryptic Soy Agar, DifcoTM): 胰蛋白胨 15.0 g , 大豆蛋白胨 5.0 g , 氯化钠 5.0 g , 琼脂 15.0 g , 去离子水 1.0 dm^3 , pH 值 7.3 ; (6) MA 培养基 (Marine Agar 2216, DifcoTM): 主要成分为蛋白胨 5.0 g , 酵母提取物 1.0 g , 琼脂 15.0 g , pH 值 7.6 。培养基灭菌后,添加制霉菌素和萘啶酮酸至终含量 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$; 分离平板倒置于 28°C 培养箱培养 $3\sim 5$ 周。

1.5 菌种鉴定

纯菌株基因组 DNA 提取采用 DNA 快速提取试剂盒,采用 BOX-PCR (BOX-AIR: 5' -CTACGGCAAG-GCGACGCTGACG-3') 和形态观察相结合的方法去除重复的菌株,以细菌通用引物(27F 和 1492R) 扩增其 16S rRNA 基因序列,扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6 系统发育分析

用 CExpress Application 和 DNAMAN 7.0 等软件对测序获得的 16S rRNA 基因序列进行拼接。使用 EzTaxon 数据库 (old.ezbiocloud.net) [10] 进行序列比对,采用 Mothur 软件,以 16S rRNA 基因 97% 相似性为标准划分操作分类单元,每个 OTU 选取一条代表序列,利用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-Joining 系统发育进化树 [11]。

2 结果与讨论

2.1 Miseq 高通量测序

本研究利用 Miseq 高通量测序平台对 6 个珊瑚样品中的放线菌进行了 16S rRNA 基因多样性测序分析,测序结果在 Trimmomatic 和 FLASH 软件平台上拼接优化后,每个样品平均获得了 43 286 条优化序列,每条序列平均长度为 431bp;去除单序列后,按照 97% 相似性对非重复序列进行 OTU 聚类 (Usearch vesion 7.1),共得到 66 个 OTU。使用 97% 相似度的 OTU,利用 Mothur 做 Rarefaction 分析,利用 R 语言工具制作曲线图,根据 Kemp (2004) 的研究,随着库容的增大,OTUs 的数目总是在增加,这一研究结果说明几乎没有哪一个文库能够穷尽样品中微生物的多样性,当稀有度曲线趋于平缓或者趋近平台期时也就可以认为库容已经足够 [12]。从图 1 可以看出,各文库稀有度曲线已经趋于平缓,接近平台期,说明 6 个珊瑚文库中物种的数量已经可以较好的反

映出实际环境中放线菌的真实情况. 各文库库容覆盖率达到 99.9% 以上(表 1),也进一步说明本次测

序结果的放线菌多样性涵盖了样品中的绝大部分,测序深度达到要求.

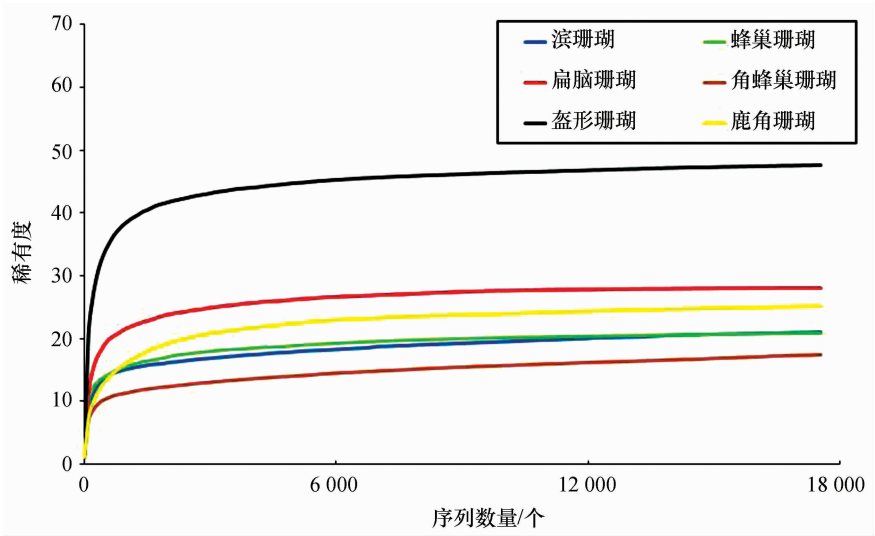


图 1 珊瑚共附生放线菌 16S rRNA 基因文库的稀有度曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of 16S rRNA gene libraries from coral-associated actinobacteria

2.2 免培养多样性指数分析

6 个珊瑚样品中 16S rRNA 基因测序结果分析显示,各样品 OTU 平均数量为 27 个,其中盔形珊瑚 OTU 数量最高,为 48 个;角蜂巢珊瑚的 OTU 数量最低,为 19 个. 丰度 ACE 指数平均为 29,其中,盔形珊瑚 ACE 指数最高,为 49;蜂巢珊瑚 ACE 指数最低,为 22. 丰度 Chao 指数平均为 28,其中盔形珊瑚 Chao 指数最高,为 49;蜂巢珊瑚和滨珊瑚 Chao 指数最

低,为 21;香农指数平均为 2.09,其中盔形珊瑚香农指数最高,为 2.74;滨珊瑚 Shannon 香农指数最低,为 1.02. 辛普森指数平均为 0.396 6,其中滨珊瑚辛普森指数最高,为 0.581 2;盔形珊瑚辛普森指数最低,为 0.094 6. 各样品微生物的详细多样性指数见表 1,通过多样性指数分析可以判断出盔形珊瑚中共附生微生物丰度和多样性水平都是最高的.

表 1 珊瑚共附生放线菌基因文库的多样性指数

Tab. 1 Diversity index of the gene libraries from coral-associated actinobacteria

样品	OTU/个	ACE 指数	Chao 指数	覆盖率	香农指数	辛普森指数
盔形珊瑚	48	49(48,57)	49(48,56)	0.999 903	2.74(2.72,2.75)	0.096 4(0.094 6,0.098 2)
扁脑珊瑚	28	28(28,28)	28(28,28)	1.000 000	1.59(1.58,1.61)	0.353 6(0.347 5,0.359 6)
鹿角珊瑚	26	27(26,37)	26(26,32)	0.999 919	1.04(1.03,1.06)	0.506 0(0.499 9,0.512 0)
角蜂巢珊瑚	19	24(20,49)	22(19,42)	0.999 845	1.16(1.15,1.18)	0.398 6(0.395 4,0.401 8)
滨珊瑚	21	23(21,37)	21(21,26)	0.999 886	1.02(1.00,1.04)	0.581 2(0.572 3,0.590 0)
蜂巢珊瑚	21	22(21,30)	21(21,0)	0.999 947	1.39(1.37,1.41)	0.443 5(0.435 4,0.451 5)

注:括号内数字为置信区间上限和下限

根据样品 OTU 进行主成分分析(PCA,principal component analysis),结果如图 2 所示滨珊瑚、扁脑珊瑚和蜂巢珊瑚的共附生微生物菌群落结构具有较高的相似性,角蜂巢珊瑚和鹿角珊瑚共附生微生物群落结构具有较高的相似性,盔形珊瑚的共附生微生物群落结构与其他珊瑚都不相同.

2.3 不同珊瑚样品中放线菌的免培养多样性分析

在获得的 66 个 OTU 中,2 个不能用 RDP 分类工具进行类群划分,27 个被划分到非放线菌门,其中蓝细菌门 1 个、厚壁菌门 5 个、芽单胞菌门 2 个、硝化螺旋菌门 4 个、浮霉菌门 5 个、变形菌门 8 个及疣微菌门 2 个. 剩余 37 个 OTU 属于放线菌门(图

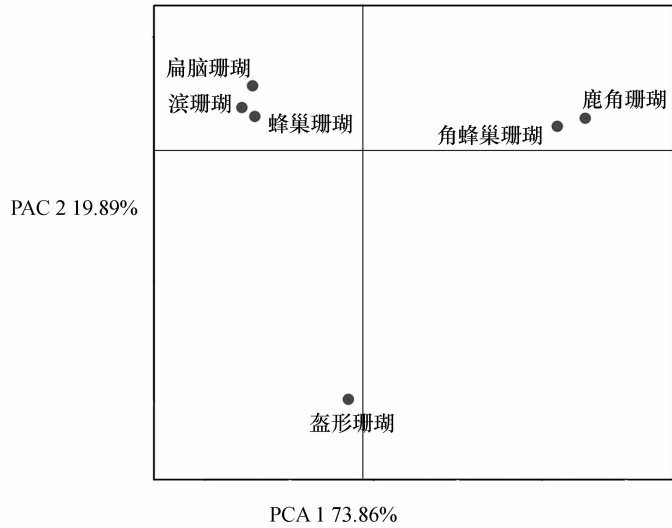


图2 珊瑚共附生放线菌群落结构的主成分分析
Fig.2 Principal component analysis for the community structure from coral-associated actinobacteria

3),其中4个OTU无法分配到指定的目,5个OTU无法分配到指定的科,6个OTU无法分配到指定的属,这些OTU同数据库中已发表典型种之间的16S rRNA基因序列相似性低于97%,可能代表放线菌新的分类单元;22个OTU可分配到指定的属,即拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*,1个OTU)、短状杆菌属(*Brachybacterium*,1个)、短杆菌属(*Brevibacterium*,2个)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*,5个)、皮生球菌属(*Dermacoccus*,1个)、乔治菌属(*Georgenia*,1个)、沉积杆菌属(*Ilumatobacter*,1个)、考克氏菌属(*Kocuria*,1个)、微球菌属(*Micrococcus*,1个)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*,1个)、丙酸菌属(*Propionibacterium*,3个)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*,3个)和罗氏菌属(*Rothia*,1个)。

在各个样品中(图4),盔形珊瑚文库中包含了26个放线菌OTU,优势放线菌类群为微球菌科(21.70%)和微酸菌科(15.61%),微球菌科中主要为微球菌属和考克氏菌属;滨珊瑚文库中包含17个放线菌OTU,优势放线菌类群为丙酸杆菌科(79.18%)和微杆菌科(10.27%);蜂巢珊瑚文库中包含15个放线菌OTU,其中丙酸杆菌科(66.77%)和微杆菌科(9.52%)是优势放线菌类群;在扁脑珊瑚文库中,包含20个放线菌OTU,其中57.91%和20.20%的微生物属于丙酸杆菌科和假诺卡氏菌科,其假诺卡氏菌科中主要的属为拟无枝酸菌属和假诺卡氏菌属;在角蜂巢珊瑚文库中,包含15个放线菌OTU,其中优势放线菌为微杆菌科(46.08%)和假诺卡氏菌科(43.09%),其假诺卡氏菌科中主要的属

为拟无枝酸菌属;鹿角珊瑚文库中包含26个放线菌OTU,优势类群为微杆菌科(67.28%)和假诺卡氏菌科(23.70%)。

从总体来看,丙酸杆菌科(32.68%)、微杆菌科(26.45%)和假诺卡氏菌科(17.40%)为主导放线菌类群;每个文库中都发现了丙酸杆菌科、假诺卡氏菌科、微杆菌科、短杆菌科、博戈里亚湖菌科和棒状杆菌科,表明了这些放线菌在本次实验的珊瑚样品中具有广泛的分布;微酸菌科只在盔形珊瑚文库和鹿角珊瑚文库中发现,因此微酸菌科在珊瑚样品中可能有独特的分布。

2.4 可培养放线菌的多样性

采用6种选择性分离培养基从6个珊瑚样品中共分离到137株放线菌,分属放线菌门放线菌纲5个目11个科下的20个属,包括细杆菌属(*Microbacterium*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、糖多孢属(*Saccharopolyspora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、柠檬球菌属(*Citricoccus*)、鸟氨酸微菌属(*Ornithinimicrobium*)、丝氨酸球菌(*Serinicoccus*)皮肤球菌属(*Kytococcus*)、放线孢菌属(*Actinomycetospora*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、考克氏菌属、微球菌属、短杆菌属、假诺卡氏菌属、短状杆菌属、涅斯捷连科氏菌属、皮生球菌属和链霉菌属;其中优势类群为分枝杆菌属35株(25.5%)、考克氏菌属23株(16.8%)和微球菌属20株(14.6%)。菌株E2A、G10c和W7.2分别与*Saccharopolyspora cavernae* YIM C01235^T、*Mycobacterium tokaiense* ATCC 27282^T和*Brevibacterium casei*

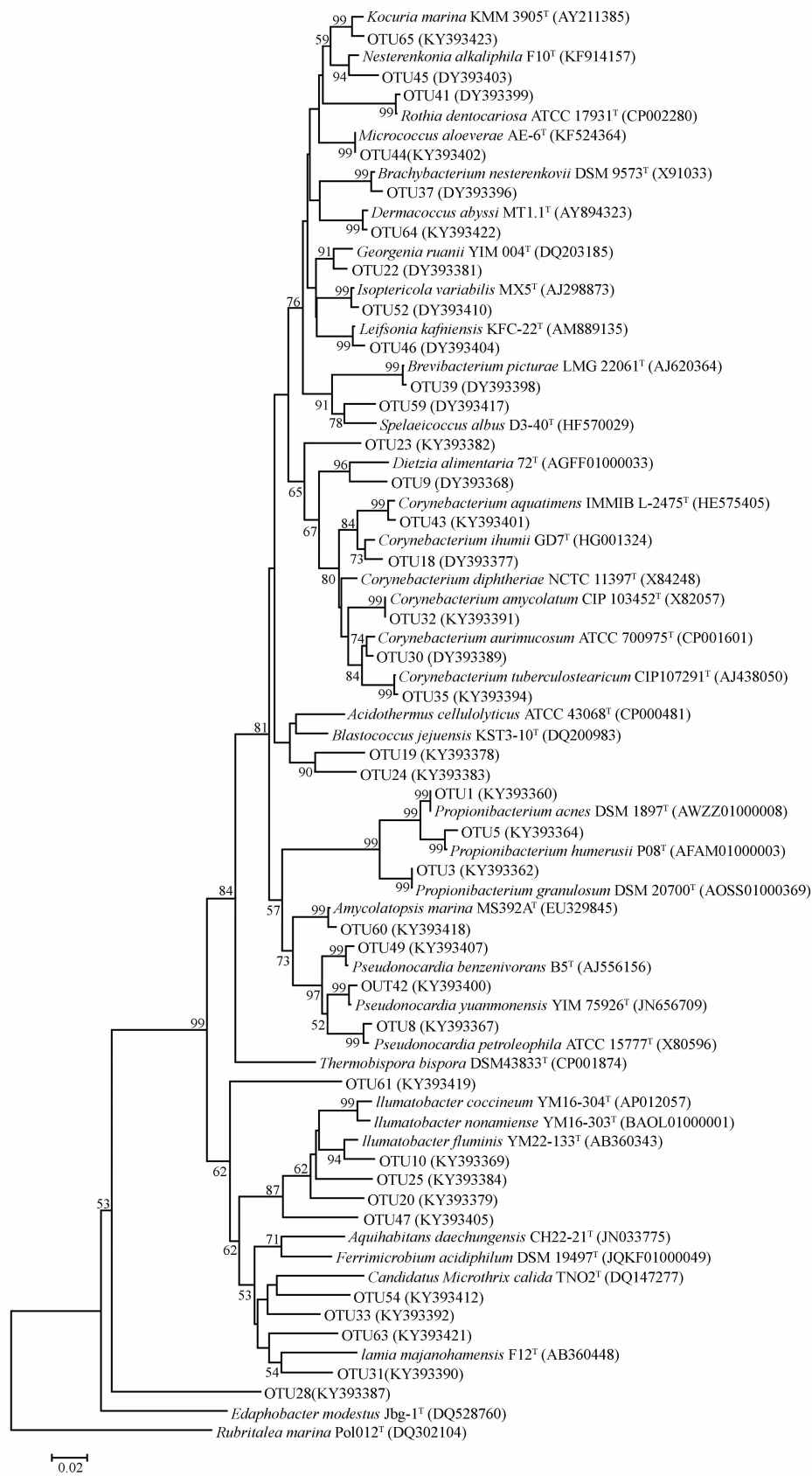


图 3 基因文库中珊瑚共附生放线菌代表性序列的 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic analysis of the culture-independent 16S rRNA gene sequences with neighbor joining analysis from coral-associated actinobacteria

Bootstrap 为 1 000

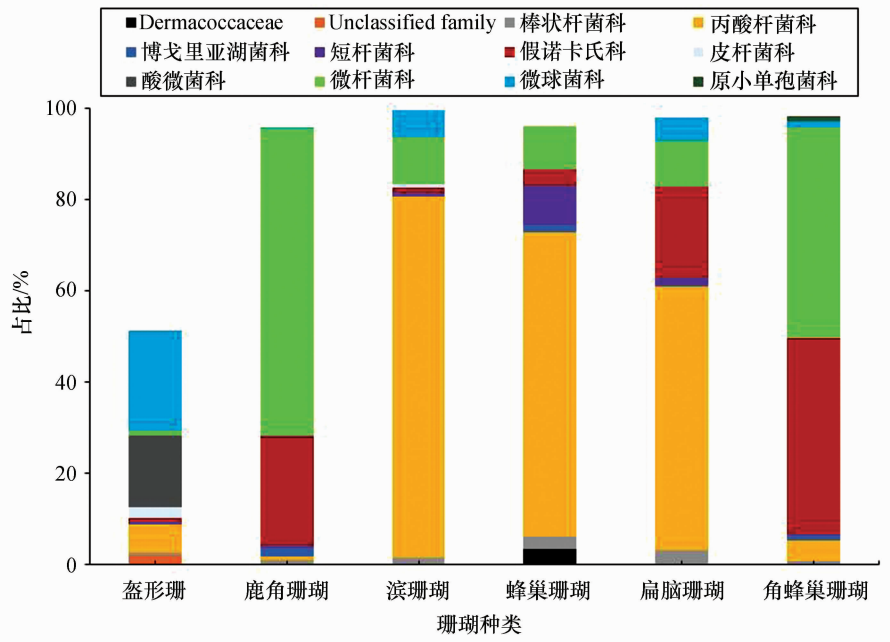


图 4 文库中珊瑚共附生放线菌在科上的分布

Fig. 4 Distribution in family of the coral-associated actinobacteria in the libraries

NCDO 2048^T 具有最高 16S rRNA 基因相似性, 为 96.57%、97.86% 和 98.27%, 这 3 株菌疑似放线菌新种. 使用 Mothur 软件以 16S rRNA 基因序列 97% 相似性为标准, 分离到的 137 株放线菌可划分为 27 个 OTU, 在每个 OTU 中选一个菌株为代表性菌株, 其代表性菌株信息如表 2 所示.

表 2 分离到的珊瑚共附生放线菌的代表性菌株

Tab.2 Representatives of the coral-associated actinobacteria

菌株编号	最相近菌株(序列注册号)	相似性/%	GenBank 序列号
L3.2	<i>Actinomycespora lutea</i> TT00-04 ^T (AB514515)	99.05	KY297000
L8.3	<i>Arthrobacter mysorens</i> LMG 16219 ^T (AJ639831)	99.32	KY297001
28.2	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 ^T (AJ415377)	99.85	KY296990
W7.2	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 ^T (X76564)	98.27	KY072802
Iy5b	<i>Dermacoccus barathri</i> MT2.1 ^T (AY894328)	99.85	KY296997
M7m7	<i>Gordonia terrae</i> NBRC 100016 ^T (BAFD01000032)	100.00	KY297007
Ly8m	<i>Kocuria kristinae</i> DSM 20032 ^T (X80749)	99.92	KY297004
L18.6	<i>Kocuria marina</i> KMM 3905 ^T (AY211385)	99.85	KY296998
G18c	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T (Y16263)	100.00	KY296995
11.5	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 ^T (X87756)	99.85	KY296988
E7.1	<i>Microbacterium resistens</i> DMMZ 1710 ^T (AJ491806)	99.02	KY297003
Ly13.0	<i>Microbacterium paraoxydans</i> CF36 ^T (AJ491806)	99.80	KY296992
M13.5	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238 ^T (EU005372)	99.92	KY297006
Y17.2	<i>Micrococcus terreus</i> V3M1 ^T (FJ423763)	99.92	KY297011
W13.4	<i>Mycobacterium conceptionense</i> CIP 108544 ^T (AY859684)	99.46	KY297010
G10C	<i>Mycobacterium tokaiense</i> ATCC 27282 ^T (AF480590)	97.86	KY072801
E5.1	<i>Nesterenkonia halobia</i> DSM 20541 ^T (X80747)	99.85	KY296991

续表 2

菌株编号	最相近菌株(序列注册号)	相似性/%	GenBank 序列号
G20.5	<i>Nesterenkonia lacusekhoensis</i> IFAM EL-30 ^T (AJ290397)	99.70	KY296996
17A	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111 ^T (ABUI01000017)	99.85	KY296989
G10.2	<i>Nocardiopsis fildesensis</i> GW9-2 ^T (FJ853144)	99.31	KY296994
Ly11.2	<i>Ornithinimicrobium pekingense</i> DSM 21552 ^T (ATWJ01000007)	98.64	KY297002
T7.3	<i>Pseudonocardia kongjuensis</i> LM 157 ^T (AJ252833)	100.00	KY297009
L20c	<i>Rhodococcus nanhaiensis</i> SCSIO 10187 ^T (JN582175)	99.77	KY296999
E2A	<i>Saccharopolyspora cavernae</i> YIM C01235 ^T (KF177334)	96.57	KY072800
E8d	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i> SPE 10-1 ^T (EF030715)	99.47	KY296993
O13.3	<i>Serinicoccus chungangensis</i> CAU 9536 ^T (HM068886)	99.33	KY297008
M13.1	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ^T (Z76676)	100.00	KY297005

就分离培养基来看(表3),TSA 培养基分离到的放线菌数量最高、多样性最多,为 40 株(29.2%,来自 11 个属);其次为高氏一号培养基 33 株(24.1%,10 个属),甘露醇-酪蛋白培养基 20 株(14.6%,8 个属),ISP2 培养基 16 株(11.7%,8 个属),棉子糖-组氨酸培养基 15 株(10.9%,8 个属),MA 培养基 13 株(9.5%,8 个属)。

表 3 不同培养基分离到的珊瑚共附生放线菌放线菌种类与数量

Tab. 3 Coral-associated actinobacterium communities and amounts isolated from different media

放线菌属	放线菌数量/株					
	高氏一号培养基	ISP2培养基	棉子糖-组氨酸培养基	甘露醇-酪蛋白培养基	TSA培养基	MA培养基
放线孢菌属	-	-	-	2	-	-
节杆菌属	-	-	-	1	-	-
短状杆菌属	1	-	-	2	1	2
短杆菌属	-	1	2	-	4	-
柠檬球菌属	1	-	-	-	-	-
皮生球菌属	-	1	-	-	-	-
乔治菌属	-	-	1	-	-	-
考克氏菌属	5	4	1	2	11	-
皮肤球菌属	1	-	-	-	1	-
细杆菌属	2	1	2	-	3	2
微球菌属	1	2	5	2	8	2
分枝杆菌属	13	5	1	8	7	1
涅斯捷连科氏菌属	2	-	-	-	-	1
拟诺卡氏菌属	4	-	-	-	1	1
鸟氨酸微菌属	-	1	-	-	2	-
假诺卡氏菌属	-	1	2	2	1	1
红球菌属	1	-	-	1	-	-
糖多孢属	-	-	-	-	-	3
丝氨酸球菌	2	-	-	-	1	-
链霉菌属	-	-	1	-	-	-
总计	33	16	15	20	40	13

就不同珊瑚种类来看(表 4),盔形珊瑚分得的放线菌数量和种类最多,为 40 株(28.8%) 10 个属;其次为鹿角珊瑚 27 株(19.4%)8 个属;角蜂巢珊瑚 22 株(15.8%) 10 个属;蜂巢珊瑚 21 株(15.1%)11 个属;滨珊瑚 20 株(14.4%) 10 个属;扁脑珊瑚 7 株(5.4%) 5 个属.

表 4 不同珊瑚分离到的珊瑚共附生放线菌种类与数量
Tab.4 Coral-associated actinobacterium communities and amounts isolated from different coral hosts

放线菌属	放线菌数量/株					
	盔形珊瑚	鹿角珊瑚	角蜂巢珊瑚	蜂巢珊瑚	滨珊瑚	扁脑珊瑚
放线孢菌属	1	-	-	1	-	-
节杆菌属	-	-	1	-	-	-
短状杆菌属	-	1	2	2	-	1
短杆菌属	-	4	1	1	1	-
柠檬球菌属	1	-	-	-	-	-
皮生球菌属	-	-	-	-	-	1
乔治菌属	-	1	-	-	-	-
考克氏菌属	12	2	3	2	4	-
皮肤球菌属	-	-	1	1	-	-
细杆菌属	3	1	-	1	4	1
微球菌属	4	3	4	4	3	2
分枝杆菌属	13	7	6	5	4	-
涅斯捷连科氏菌属	1	1	-	-	-	1
拟诺卡氏菌属	2	-	2	1	1	-
鸟氨酸微菌属	1	-	1	-	1	-
假诺卡氏菌属	-	7	-	-	-	-
红球菌属	2	-	-	-	-	-
糖多孢属	-	-	1	-	1	1
丝氨酸球菌	-	-	-	2	1	-
链霉菌属	-	-	-	1	-	-
总计	40	27	22	21	20	7

2.5 讨论

2.5.1 珊瑚共附生放线菌多样性 本研究采用可培养和免培养方法来调查琼东海域珊瑚共附生放线菌的多样性,在文库中发现了放线菌门下的 10 个科,并从 6 种培养基中分离到了来自 20 个属的 137 株放线菌. 根据之前的研究可以得知^[3],放线孢菌属、柠檬球菌属和涅斯捷连科氏属是第一次从珊瑚样品中分离到.

综合免培养和可培养的结果来看,部分放线菌(短状杆菌属、短杆菌属、皮生球菌属、乔治菌属、微球菌属、涅斯捷连科氏菌属和假诺卡氏菌属)能同时在 2 种方法中都检测到;而有些放线

菌(丙酸杆菌科、微酸菌科和棒状杆菌科等)只在文库检测到,却不能分离到纯菌株,这种现象可能是由于不合适的营养剂营养配比、不合适的培养条件或者是由于纯化过程中目标菌落太小无法被肉眼观察到^[13]. 因此,应该设计出合理的一系列培养基用于分离放线菌或者新种. 此外,根据 Xiong 等(2015)的报道,应用新的预处理方法也可以提高微生物的分离效率^[14]. 与之相对的,有些放线菌类群(如柠檬球菌属、节杆菌属,鸟氨酸微菌属和丝氨酸球菌等)在可培养方法中分离到,却没有在文库中发现,这可能是 PCR 扩增程序偏好所致,或是某些序列由于数量太少无法在

文库中被归为一类.除此之外,还有一部分序列不能被归类到确定的分类中,这些序列有成为新的微生物类群的潜质.本次实验中采用放线菌特异性引物(235F/878R)进行放线菌免培养多样性的研究,然而测序结果仍然含有相当比例的非放线菌类群,这种现象在之前的报道中也有出现,如 Zhang 等(2014)采用该引物研究北极海洋沉积物放线菌多样性时,文库中出现了变形菌门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门、浮霉菌门和疣微菌门的微生物^[15],Sun 等(2010)采用该引物研究海绵共附生放线菌多样性时,引物发现了变形菌门和浮霉菌门微生物^[16].后续研究应该提高设计引物的特异性.此外,免培养方法中得到的放线菌 OTU 数量较少,可能有以下几个方面原因:① 本实验中采用的放线菌特异性引物并不能完全涵盖所有的放线菌类群^[17];② 总 DNA 提取和 PCR 过程都可能存在偏向性;③ 放线菌不是该地区或者该种珊瑚的优势类群.

2.5.2 珊瑚类群与珊瑚共附生放线菌多样性 不同的珊瑚共附生放线菌的群落结构有着显著的差异,Li 等(2014)从束状盔珊瑚(*Galaxea fascicularis*)、钟形微孔笠珊瑚(*Porites lutea*)和多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)中分离到 15 个类群的 70 株放线菌,其优势类群为短杆菌属,戈登氏菌属,拟诺卡氏菌,链霉菌属以及小单孢菌属^[1, 18-22];陈淇等(2014)采用免培养方法调查海南省三亚市鹿回头礁区的澄黄滨珊瑚(*Porites lutea*)和丛生盔型珊瑚(*Galaxea fascicularis*)的共附生放线菌的多样性,结果显示滨珊瑚文库中主要类群为酸微菌亚目、棒状杆菌亚目、微球菌亚目和丙酸杆菌亚目,盔型珊瑚文库中主要类群为酸微菌亚目,滨珊瑚共附生放线菌的多样性高于盔型珊瑚^[23].本研究中滨珊瑚文库中优势放线菌为丙酸杆菌科(丙酸杆菌亚目)和微杆菌科(微球菌亚目),盔型珊瑚文库中优势放线菌为微球菌科(微球菌目)和微酸菌科(微酸菌目),和陈淇的结果相比较,2 种珊瑚中的优势放线菌都分别有丙酸杆菌亚目和微酸菌目,但又不完全相同,并且盔型珊瑚共附生放线菌多样性高于滨珊瑚,显示了同一个种类的珊瑚宿主的共附生放线菌类群的差异性.在可培养方法中,本试验中分支杆菌属、考克氏菌属和微球菌属分离得的菌株数量最多,是主导类群;从不同的珊瑚宿主中分离到的类群来看,微球菌属在 6 种珊瑚中都有发现,具有最广泛的分布;细杆菌属、分支杆菌属、考克氏菌属在五种珊瑚中被分离到,有着较为广泛的分布;和之前的报道相比较,可

以认为某些放线类群,如细杆菌属、短杆菌属、分支杆菌属、考克氏菌属以及诺卡氏菌等广泛分布于珊瑚中.另有一些类群只能在一种珊瑚中分离到,如放线多孢菌属只在滨珊瑚中发现^[3],盐水孢属(*Salinispora*)只在白穗软珊瑚中分离到^[24],本实验中皮生球菌只在扁脑珊瑚属中分离到等,因此可能存在某种放线菌类群只存在于某种或某些珊瑚中.但是由于目前关于珊瑚共附生放线菌的研究较少,能支撑这一假说的证据并不充分,还需要进一步的研究来证明.

此外,Hong 等(2009)的研究表明,珊瑚共附生微生物群落的影响因子有环境条件、珊瑚种类、季节性的变化和微生物的生理条件^[25];Littman 等(2009)认为地理间隔的珊瑚是使微生物主导类群有所不同的主要原因^[26];然而 Rohwer(2002)的文章中指出同一种珊瑚尽管相隔 1a 或相隔 3 000 km,其共附生微生物群落是相同的^[27];另一种来自 Kvennefors 等(2010)的观点指出,珊瑚微生物群落同时受地理位置和珊瑚种类的影响^[28],对比本次实验和陈淇的实验结果,此种说法更具有说服力.从另一个角度来看,珊瑚宿主自身也有着相应的机制来调控其共附生生物的数量和多样性^[2],这种观点支持了 Reshef 等(2006)提出的“珊瑚益生菌假说(Coral Probiotic Hypothesis)”^[29],该假说假定在共附生微生物和环境条件中存在着一个动态关系,当环境条件变化时,使得珊瑚宿主能迅速的改变共附生微生物的数量.

3 结论

根据免培养实验结果,本次实验的各个珊瑚文库中共附生放线菌可以划分为 66 个 OTU(97% 相似度),盔形珊瑚 OTU 数量最多,根据多样性指数分析,具有最高的共附生放线菌多样性;37 个 OTU 属于放线菌门,其中 15 个 OTU 无法分配到指定的分类单元,可能代表放线菌新的分类单元;22 个 OTU 可分配到指定的属;其中丙酸杆菌科、微杆菌科和假诺卡氏菌科为主导放线菌类群.这表明了在文库中含有大量的新的未被鉴定的新菌株以及珊瑚样品中潜藏的丰富的多样性.

本次实验中分得 137 株放线菌,分属 11 个科,以及 20 个属,其中优势类群为分枝杆菌属、考克氏属和微球菌属;其中,放线孢菌属柠檬球菌属和涅斯捷连科氏属是第一次从珊瑚样品中分离到.

参考文献:

- [1] Yang S, Sun W, Tang C, et al. Phylogenetic diversity of actinobacteria associated with soft coral *Alcyonium gracillimum* and stony coral *Tubastraea Coccinea* in the east China Sea[J]. Microb Ecology, 2013,66(1): 189-199.
- [2] Mahmoud H M, Kalendar A A. Coral-associated actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials [J]. Front Microbiol, 2016,7: 204.
- [3] Kuang W, Li J, Zhang S, et al. Diversity and distribution of actinobacteria associated with reef coral *Porites lutea* [J]. Front Microbiol, 2015,6: 1 094.
- [4] 周俊勇. 南海珊瑚礁样品中菌株分离及其活性代谢产物研究[D]. 福州:福建师范大学, 2011.
- [5] Harvell C D, Kim K, Burkholder J M, et al. Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors[J]. Science, 1999,285(5 433):1 505-1 510.
- [6] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009,75(23): 7 537-7 541.
- [7] Giovannoni S J, Mullins T D, and Field K G. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes[M]. Berlin Heidelberg:Joint I. Springer Berlin Heidelberg, 1995:217-248.
- [8] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984,11(4): 265-270.
- [9] Wang Y, Sheng H F, He Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012,78(23):8 264-8 271.
- [10] Kim O, Cho Y, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012,62(3): 716-721.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011,28(10):2 731-2 739.
- [12] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiol Ecology, 2004,47(2): 161-177.
- [13] Simu K, Hagström K. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004,70(4): 2 445-2 451.
- [14] Xiong Z Q, Liu Q X, Pan Z L, et al. Diversity and bioprospecting of culturable actinomycetes from marine sediment of the Yellow Sea, China[J]. Arch Microbiol, 2015,197(2): 299-309.
- [15] Zhang G, Cao T, Ying J, et al. Diversity and novelty of actinobacteria in Arctic marine sediments[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014,105(4): 743-754.
- [16] Sun W, Dai S, Jiang S, et al. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010,98(1): 65-75.
- [17] Stach J E M, Maldonado L A, Ward A C, et al. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments[J]. Environmental Microbiology, 2003,5(10): 828-841.
- [18] Li J, Dong J D, Yang J, et al. Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral-associated actinomycetes[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014,106(4): 623-635.
- [19] De-Voogd N J, Cleary D F R, Polónia A R M, et al. Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia[J]. FEMS Microbiol Ecology, 2015, 91(4), doi:10.1093/femsec/fivo19.
- [20] Elahwany A M D, Ghozlan H A, Elsharif H A, et al. Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015,55(1): 2-10.
- [21] Sarmiento-Vizcaíno A, González V, Braña A F, et al. Pharmacological potential of phylogenetically diverse actinobacteria isolated from deep-sea coral ecosystems of the submarine Avilés Canyon in the Cantabrian Sea[J]. Microbial Ecology, 2017;73(2):338-352.
- [22] Pham T M, Wiese J, Wenzel-Storjohann A, et al. Diversity and antimicrobial potential of bacterial isolates associated with the soft coral *Alcyonium digitatum* from the Baltic Sea[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016,109(1): 105-119.
- [23] 陈淇,龙丽娟,张偲,等. 澄黄滨珊瑚和丛生盔型珊瑚非培养放线菌多样性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(4): 691-698.
- [24] 马亮,张文军,朱义广,等. 永兴岛白穗软珊瑚共附生放线菌筛选及部分活性次级代谢产物的鉴定[J]. 微生物学报,

2013, 53(10):1 063-1 071.

- [25] Hong M J, Yu Y T, Chen C A, et al. Influence of species specificity and other factors on bacteria associated with the coral *Stylophora pistillata* in Taiwan[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009,75(24):7 797-7 806.
- [26] Littman R A, Willis B L, Pfeffer C, et al. Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef[J]. FEMS Microbiol Ecology, 2009,68(2):152-163.
- [27] Rohwer F. Diversity and distribution of coral-associated bacteria[J]. Marine Ecology Progress Series, 2002,243(4):1-10.
- [28] Kvennefors E C E, Sampayo E, Ridgway T, et al. Bacterial communities of two ubiquitous Great Barrier reef corals reveals both site- and species-specificity of common bacterial associates[J]. PLoS One, 2010,5(4):e10401.
- [29] Reshef L, Koren O, Loya Y, et al. The Coral Probiotic Hypothesis[J]. Environmental Microbiology, 2006,8(12):2 068-2 073.

Diversity of coral-associated actinobacteria in the east coast of Hainan Island

ZHOU Yuan^{1,2}, XIE Fu-quan², NIU Wen-tao², ZHENG Xin-qing², LI Deng-feng¹, ZHANG Gai-yun²

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315000, China; 2. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: In this study, six coral samples belonging to the genera *Porite*, *Platygyra*, *Favites*, *Galaxea*, *Acropora* and *Favia* were sampled from the east coast of Hainan Island. Diversity of coral-associated actinobacteria was investigated using culture-dependent and culture-independent approaches. Specific primers for the phylum Actinobacteria were used to amplify the actinobacterial 16S rRNA gene, and 16S rRNA gene libraries were constructed and sequenced with the Illumina MiSeq platform. The analysis of 16S rRNA gene sequences showed that the actinobacterial sequences were grouped in 37 OTUs on the basis of 97% sequence similarity within one OTU. These OTUs mainly belonged to classes *Acidimicrobiales*, *Corynebacteriales*, *Micrococcales*, *Propionibacteriales* and *Pseudonocardiiales*. 37.8 % of these OTUs showed less than 97% 16S rRNA gene sequence similarity with validly published species and represented novel taxa. A total of 137 strains were isolated used six different media. As results, they belong to 20 known genera, among them the genera *Mycobacterium*, *Kocuria* and *Micrococcus* were the dominants. The genera *Actinomycetospora*, *Citricoccus* and *Nesterenkonia* were first isolated from coral hosts. Cumulatively, the east coast of Hainan Island harbors abundant actinobacteria, including large number of unknown actinobacterial groups.

Key words: marine biology; coral; associated-actinobacteria; diversity

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2018.02.009

(责任编辑:杜俊民)