

姜钊, 张卫花. 印度洋深海沉积物样品纯培养细菌的分离鉴定[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 104–113, doi:10.12284/hyxb2022070
Jiang Zhao, Zhang Weihua. Isolation and identification of cultivable bacteria isolated from deep-sea sediment samples of the Indian Ocean[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(4): 104–113, doi:10.12284/hyxb2022070

印度洋深海沉积物样品纯培养细菌的分离鉴定

姜钊^{1,2}, 张卫花^{1,2*}

(1. 西藏民族大学 藏药检测技术教育部工程研究中心, 陕西 咸阳 712082; 2. 西藏民族大学 西藏高原相关疾病分子遗传机制与干预研究省级重点实验室, 陕西 咸阳 712082)

摘要: 为探索印度洋深海沉积物中纯培养细菌的多样性, 本文对采自印度洋 12 个沉积物样品进行细菌纯培养分离, 共获得 343 株细菌。所有细菌采用 16S rRNA 基因进行比对分析, 鉴定为 4 个门: 厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 5 个纲, 13 个目, 26 个科, 39 个属下的 121 个种。分离出的优势类群为链霉菌属 (*Streptomyces*, 分离率为 16.53%) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 分离率为 8.26%), 其中可能有 12 个潜在的新分类单元。研究结果表明, 印度洋深海沉积环境中纯培养细菌资源丰富, 潜在新物种较多; 其次, 分离培养方法与从海洋沉积物中获得的细菌物种多样性直接相关。

关键词: 印度洋; 沉积环境; 细菌; 分离鉴定

中图分类号: Q938.8

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)04-0104-10

1 引言

海洋环境复杂多样, 理化性质独特, 孕育了丰富的海洋微生物, 从海洋表层到海底几千米的地方都有其生命活动。海洋微生物不仅能进行光合作用, 也能通过同化海洋环境中的各种营养物质为大型生物提供营养; 同时, 也能以分解者的角色为海洋植物提供无机营养, 维持整个海洋生态系统的良性可持续的循环^[1]。然而, 随着海洋资源的过度开采, 人类正面临着诸如资源短缺、环境污染和人类健康危机等日益严重的生存与发展危机。在这种大背景下, 海洋微生物的重要性不仅仅体现在元素循环、物质转化和能量流动方面, 也在生物的演化研究、CO₂ 的减排、节能以及资源的可持续发展与利用等方面发挥积极作用^[2]。

2010 年由麦切·索基恩负责的全球海洋生物普查

计划顺利完成, 该计划分析了超过 1 200 个区域的海洋样本, 最终估计海洋微生物种类达到 10 亿种左右, 微生物的总重量相当于 2 400 亿头非洲象, 这些微生物无论是从多样性还是丰富度方面都达到了令人吃惊的程度^[3]。但是, 海洋微生物的纯培养数量依然较少, 科学家们开展了包括太平洋、印度洋、南海、Woodlark 海盆、日本海、秘鲁边缘、卡斯卡底古陆边缘海域、鄂霍次克海、地中海等一系列海洋环境微生物的纯培养及多样性分析工作^[4-11], 统计发现, 被描述的海洋来源微生物物种只占全球全部已描述微生物的 9.7%, 每年增加速率仅为 0.93%, 大多数海洋微生物还没有实现试验室的纯培养^[12]。环境样品中可培养微生物的多样性及出菌率与菌种分离时所用的样品预处理方法、选择培养基的种类以及培养条件等息息相关。比如, 样品稀释法可减少优势微生物的竞争, 利于寡营养微生物的分离^[13]; 稀有碳氮源的添加,

收稿日期: 2021-08-16; 修订日期: 2021-11-25。

基金项目: 西藏自治区科技创新基地自主研究项目(XZ2021JR0003G); 西藏自治区自然科学基金(XZ202001ZR0018G); 西藏民族大学青年学人培育计划(19MDX01)。

作者简介: 姜钊(1990—), 陕西省商洛市人, 博士, 研究方向为微生物资源及分类学。E-mail: xzmu_jiangz@163.com

* 通信作者: 张卫花, 讲师, 研究方向为微生物资源及分子生物学。E-mail: xzmu_zwh@163.com

可获得更多稀有放线菌和细菌类群^[14];新鲜湿样经过自然风干稀释后,进行瞬时湿热处理,适合放线菌类群的分离培养^[15-16]。因此,不同分离方法的探索、培养基的设计,在海洋微生物纯培养分离中显得尤为重要。

为调查印度洋深海沉积物放线菌资源的丰富性,同时探索放线菌分离条件,本研究以采自印度洋深海沉积物样品为研究对象,利用多种分离培养基,采用湿热处理法,在前期响应面法优化的样品处理条件基础上,对采自印度洋深海沉积物样品中放线菌进行纯培养分离,争取最大程度分离得到纯培养放线菌及其他类群,以期为后期放线菌代谢产物分离及相关研究提供材料。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 样品来源

本实验样品于2013年采自印度洋,为深海沉积物样品,采用抓斗、箱式取样方法获得,沉积表层约5 cm深度作为取样区域,共取样12份,-20℃保存,取样点的经纬度及深度信息见表1,图1。

表1 印度洋沉积物采样点信息
Table 1 Information of sampling sites from Indian Ocean sediment

站点名	纬度	经度	水深/m
HF02	6°11'11.226"S	97°46'3.168"E	5 725
HF04	2°57'26.370"S	95°19'2.982"E	4 810
HF05	1°25'32.280"S	94°20'11.039"E	4 617
HF06	0°27'52.800"S	93°48'52.740"E	4 527
HF08	1°32'1.500"N	81°2'59.219"E	4 481
HF10	1°33'15.180"N	82°1'41.580"E	4 426
HF13	10°0'2.700"N	84°32'55.140"E	3 571
HF14	10°0'9.480"N	86°29'54.120"E	3 515
HF16	10°0'13.380"N	88°43'40.919"E	3 386
HF17	9°15'42.560"N	89°7'41.820"E	3 437
HF18	8°45'38.880"N	89°15'58.740"E	3 471
HF19	7°56'37.380"N	89°26'33.600"E	3 614

2.1.2 分离培养基

依照预实验结果,选取14种分离培养基(表2)进

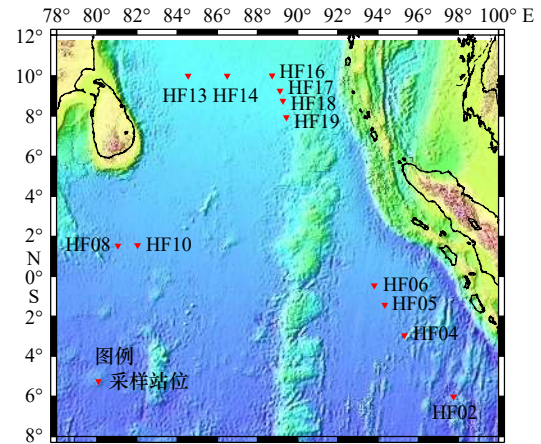


图1 取样点地理分布

Fig. 1 The geographical distribution of sampling sites

行培养分离,每种培养基添加2.12%海盐(海彩海水晶,上海海彩生物科技有限公司)以模拟海水环境,同时添加50 mg/L制霉菌素和25 mg/L萘啶酮酸,以抑制真菌和革兰氏阴性菌的生长,从而获得更多放线菌类群。

2.2 菌株分离、纯化及保藏

为获得更多海洋放线菌类群,根据前期优化获得样品的最优处理条件,采用湿热处理方法进行分离:(1)沉积物样品于无菌培养皿风干1.7 d;(2)称取2 g样品至18 mL无菌水中混匀,水浴锅湿热处理(湿热处理温度为55℃,湿热处理时间为1.3 min);(3)置于28℃摇床摇匀20 min,分别取100 μL样品稀释液涂布于14种分离培养基(均加2.12%海盐,同时添加50 mg/L制霉菌素和25 mg/L萘啶酮酸),每组3个重复,并置于28℃恒温培养箱培养30 d;(4)挑取每个平板不同形态菌落于TSA及IPS2培养基中划线、纯化、编号,记录分离来源及分离培养基信息;(5)纯化培养后收集每株菌菌体并利用牛奶管保藏。

2.3 16S rRNA 基因扩增及测序

利用酶解法提取收集的各菌株DNA^[17],采用细菌16S rRNA基因的通用引物^[18]进行PCR扩增(PA: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'; PB: 5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3'),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR扩增体系:10×Buffer(Mg²⁺ 2.5 mmol)5 μL、正向引物PA(0.25 μmol)1 μL、反向引物PB(0.25 μmol)1 μL、dNTP 1 μL、DNA 1 μL、Taq DNA聚合酶0.3 U,用ddH₂O定容至50 μL。PCR扩增反应条件:95℃预变性4 min;95℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min(循环30次);72℃延伸10 min。PCR产物用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳检测,用λ-

表 2 14 种分离培养基
Table 2 14 kinds of culture media

编号	名称	配方
M1	放线菌分离培养基	酪蛋白胨1 g、天冬酰胺0.1 g、丙酸钠4 g、K ₂ HPO ₄ 0.5 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g、FeSO ₄ ·7H ₂ O 1 mg、甘油1 mL、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2~7.4
M2	DA培养基	酪蛋白胨0.3 g、酵母膏0.1 g、葡萄糖0.01 g、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2~7.4
M3	高氏一号培养基	淀粉20 g、KNO ₃ 1 g、K ₂ HPO ₄ 0.5 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g、NaCl 0.5 g、FeSO ₄ 10 mg、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2~7.4
M4	淀粉-酪素培养基	淀粉10 g、酪蛋白0.3 g、KNO ₃ 2 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 g、K ₂ HPO ₄ 2 g、CaCO ₃ 0.02 g、FeSO ₄ 10 mg、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2~7.4
M5	甘油-甘氨酸培养基	甘油20 g、甘氨酸2.5 g、K ₂ HPO ₄ 1 g、FeSO ₄ 10 mg、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g、CaCO ₃ 0.1 g、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.4
M6	腐殖酸培养基	腐殖酸1.0 g、Na ₂ HPO ₄ 0.5 g、KCl 1.7 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 g、FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g、CaCl ₂ 1 g、复合维生素1 mL (维生素B1、维生素B2、烟酸、维生素B6、泛酸钙、肌糖、对氨基苯甲酸、维生素H各0.5 mg、双蒸水1 000 mL)、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2
M7	甘油-精氨酸培养基	甘油5 g、精氨酸1 g、葡萄糖1 g、K ₂ HPO ₄ 0.3 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2 g、NaCl 0.3 g、复合维生素1 mL (维生素B1、维生素B2、烟酸、维生素B6、泛酸钙、肌糖、对氨基苯甲酸、维生素H各0.5 mg、双蒸水1 000 mL)、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2
M8	海藻糖-脯氨酸培养基	海藻糖5 g、脯氨酸1 g、(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g、CaCl ₂ 2 g、K ₂ HPO ₄ 1 g、复合维生素1 mL (维生素B1、维生素B2、烟酸、维生素B6、泛酸钙、肌糖、对氨基苯甲酸、维生素H各0.5 mg、双蒸水1 000 mL)、琼脂1g、双蒸水1 000 mL、pH 7.4
M9	牛肉膏-蛋白胨培养基	蛋白胨10 g、牛肉膏3 g、丙酮酸钠3 g、KCl 2 g、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.0
M10	棉子糖-组氨酸培养基	棉子糖10 g、组氨酸1 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g、FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2
M11	改良海洋琼脂培养基	蛋白胨1 g、牛肉膏2 g、柠檬酸铁0.1 g、Na ₂ CO ₃ 0.16 g、柠檬酸钠4 mg、(NH ₄)NO ₃ 1.6 mg、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2
M12	ISP2培养基	牛肉膏0.4 g、葡萄糖0.4 g、麦芽膏0.4 g、复合维生素1 mL (维生素B1、维生素B2、烟酸、维生素B6、泛酸钙、肌糖、对氨基苯甲酸、维生素H各0.5 mg、双蒸水1 000 mL)、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 8.0
M13	R2A培养基	牛肉膏0.5 g、胨蛋白胨0.5 g、酪氨酸0.5 g、葡萄糖0.5 g、可溶性淀粉0.5 g、丙酮酸钠0.3 g、K ₂ HPO ₄ 0.3 g、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 g、琼脂15 g、双蒸水1 000 mL、pH 7.2
M14	海盐琼脂培养基	自来水1 000 mL、琼脂15 g、pH 7.2

EcoT14 Idigest DNA Marker 为对照, 产物检测回收后送昆明泊尚生物有限公司进行测序, 先测一个反应1~800 bp(V1-V4)判断种属相似性, 若低于98.5%再进行反向测序。

2.4 基于16S rRNA基因的系统发育分析

通过观察返回的16S rRNA基因序列峰图, 选取测序结果好的序列, 双向测序则利用Seqman进行拼接, 得到1 500 bp左右全长序列。利用EzBioCloud BLAST(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)^[19]进行序列相似性分析; 选取同源性较高的模式菌株的16S rRNA基因序列作为参比对象, 采用Clustal X软件^[20]进行多序列比对, 比对结果利用MEGA 7.0^[21]软件分析, 基于邻近法(NJ)^[22]进行系统发育树的构建。

3 结果与讨论

3.1 菌株的分离结果

分离平板培养30 d后, 根据菌落大小、形态、颜色等特征, 挑取分离平板上的单菌落进行纯化、去重, 总共从12个分离样品中纯化得到343株放线菌

和细菌纯培养物, 并对其16S rRNA基因进行了测序。测序结果经EzBioCloud数据库比对分析, 鉴定为4个门: 放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria); 分属5个纲: 放线菌纲(Actinobacteria)、噬纤维菌纲(Cytophagia)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)和 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria); 13个目: 棒杆菌目(Corynebacteriales)、微球菌目(Micrococcales)、丙酸杆菌亚目(Propionibacteriales)、弗兰克氏菌目(Frankiales)、链霉菌目(Streptomycetales)、链孢囊菌目(Streptosporangiales)、嗜纤维菌目(Cytophagales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、红细菌目(Rhodobacterales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)和海洋螺菌目(Oceanospirillales)下的26个科39个属121个种, 如表3所示。可以看出: 分离菌株中放线菌门占比最高, 占13个科, 20个属, 71个种(占比58.7%), 这可能是因为样品处理和培养条件更利于放线菌的选择性培养; 其次为变形菌门和厚壁菌门(分离种数分别占21.5%和17.4%); 拟杆菌

门最少。各属中分布的菌种数见表4, 其中链霉菌属 (*Streptomyces*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、考克氏菌属 (*Kocuria*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioide*s)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardio*psis) 为所采印度洋深海沉积物样品中的优势微生物类群, 其中链霉菌属和芽孢杆菌属分布最多。同时分离得到了部分数量较少类群, 如: 食烷菌属 (*Alcanivorax*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、叶杆菌属 (*Phyllobacterium*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingopyxis*)、紫杆菌属 (*Porphyrobacter*)、芽球菌属 (*Blastococcus*)、刘志恒菌属 (*Zhihengliuella*)、柠檬球菌属 (*Citricoccus*)、拉氏杆菌属 (*Rathayibacter*)、威廉姆斯菌属 (*Williamsia*) 等。将分离到的放线菌、细菌及近缘物种建立系统发育树, 见图2和图3。

表3 分离菌株整体分布表
Table 3 Overall distribution of isolated strains

门	纲	目	科	属	种	占总种数百分比/%
放线菌门	1	6	13	20	71	58.7
厚壁菌门	1	1	3	4	21	17.4
拟杆菌门	1	1	1	1	3	2.4
变形菌门	2	5	9	14	26	21.5
总计	5	13	26	39	121	100

3.2 不同样点的菌株分离比较

统计各样点菌株分离结果见图4, 由图可知 HF06、HF13、HF14、HF16、HF17、HF18、HF19 采样点样品的多样性较丰富, 这7个采样点都分离出了大于11个属, 18个种的菌株。其中 HF17 采样点样品的多样性最丰富, 可能因为样品的分离及处理条件更利于其样品纯培养菌株的分离。链霉菌属、微杆菌属在这12个样品中都分离到, 为海洋沉积物微生物优势类群。部分菌株只在极少数样品中分离得到, 例如: 拉氏杆菌属只在 HF02 采样点样品中分离得到; 威廉姆斯菌属只在 HF06 采样点样品中分离得到; 地中海菌属 (*Martellella*)、叶杆菌属只在 HF10 采样点样品中分离到; 短杆菌属 (*Brevibacterium*) 只在 HF13 采样点样品中分离到; 嗜冷杆菌属只在 HF14 采样点样品中分离得到; 刘志恒菌属只在 HF17 采样点样品中分离得到; 芽球菌属、类诺卡氏菌属只在 HF19 采样点样品中分离得到; 食烷菌属只在 HF10 采样点和 HF19 采样点样品中分离得到; 两面神菌属 (*Janibac-*

表4 种分布百分比

Table 4 Percentages of species distribution

属名	种数	百分比/%	属名	种数	百分比/%
<i>Streptomyces</i>	20	16.53	<i>Gemmibacter</i>	2	1.65
<i>Bacillus</i>	10	8.26	<i>Corynebacterium</i>	1	0.83
<i>Kocuria</i>	6	4.96	<i>Williamsia</i>	1	0.83
<i>Staphylococcus</i>	6	4.96	<i>Brevibacterium</i>	1	0.83
<i>Dietzia</i>	5	4.13	<i>Brachybacterium</i>	1	0.83
<i>Rhodococcus</i>	5	4.13	<i>Kytococcus</i>	1	0.83
<i>Microbacterium</i>	5	4.13	<i>Rathayibacter</i>	1	0.83
<i>Arthrobacter</i>	5	4.13	<i>Citricoccus</i>	1	0.83
<i>Nocardioide</i> s	5	4.13	<i>Zhihengliuella</i>	1	0.83
<i>Nocardio</i> psis	5	4.13	<i>Blastococcus</i>	1	0.83
<i>Planococcus</i>	4	3.31	<i>Macrococcus</i>	1	0.83
<i>Paracoccus</i>	4	3.31	<i>Croceicoccus</i>	1	0.83
<i>Pseudomonas</i>	4	3.31	<i>Porphyrobacter</i>	1	0.83
<i>Dyadobacter</i>	3	2.48	<i>Sphingopyxis</i>	1	0.83
<i>Erythrobacter</i>	3	2.48	<i>Martellella</i>	1	0.83
<i>Mesorhizobium</i>	3	2.48	<i>Nitratireductor</i>	1	0.83
<i>Janibacter</i>	2	1.65	<i>Phyllobacterium</i>	1	0.83
<i>Gulosibacter</i>	2	1.65	<i>Psychrobacter</i>	1	0.83
<i>Micrococcus</i>	2	1.65	<i>Alcanivorax</i>	1	0.83
<i>Rhizobium</i>	2	1.65			

ter)、鞘脂单胞菌属只在 HF02 采样点和 HF17 采样点样品中分离到; 中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*) 只在 HF10 采样点和 HF17 采样点样品中分离得到, 不同采样点中细菌分离多样性差异明显。

3.3 菌株的多样性与分离培养基的关系

在分离的所有菌株中, 由于对不同培养基的营养需求不同, 每种培养基分离出的菌株数量不同, 统计各培养基分离菌株数目见图5。由图可知, 在14种分离培养基中, M2、M3、M7、M9、M10、M12、M13 这7种培养基分离效果较好, 分离菌株数都在15个种以上, M7培养基分离的菌株数超过20个种, M12超过30个种。显而易见, 培养基 M7 和 M12 分离的菌株多样性最丰富, 因此, 包含不同营养物的培养基设计对菌株的分离极为重要。

3.4 潜在的新分类单元

目前普遍认为 16S rRNA 基因序列相似性小于 95%, 且在系统进化树上形成的稳定独立分支又具有特征性碱基, 可以大体作为属的界限; 16S rRNA 基因序列相似性小于 98% 且 DNA 杂交同源性小于 70%

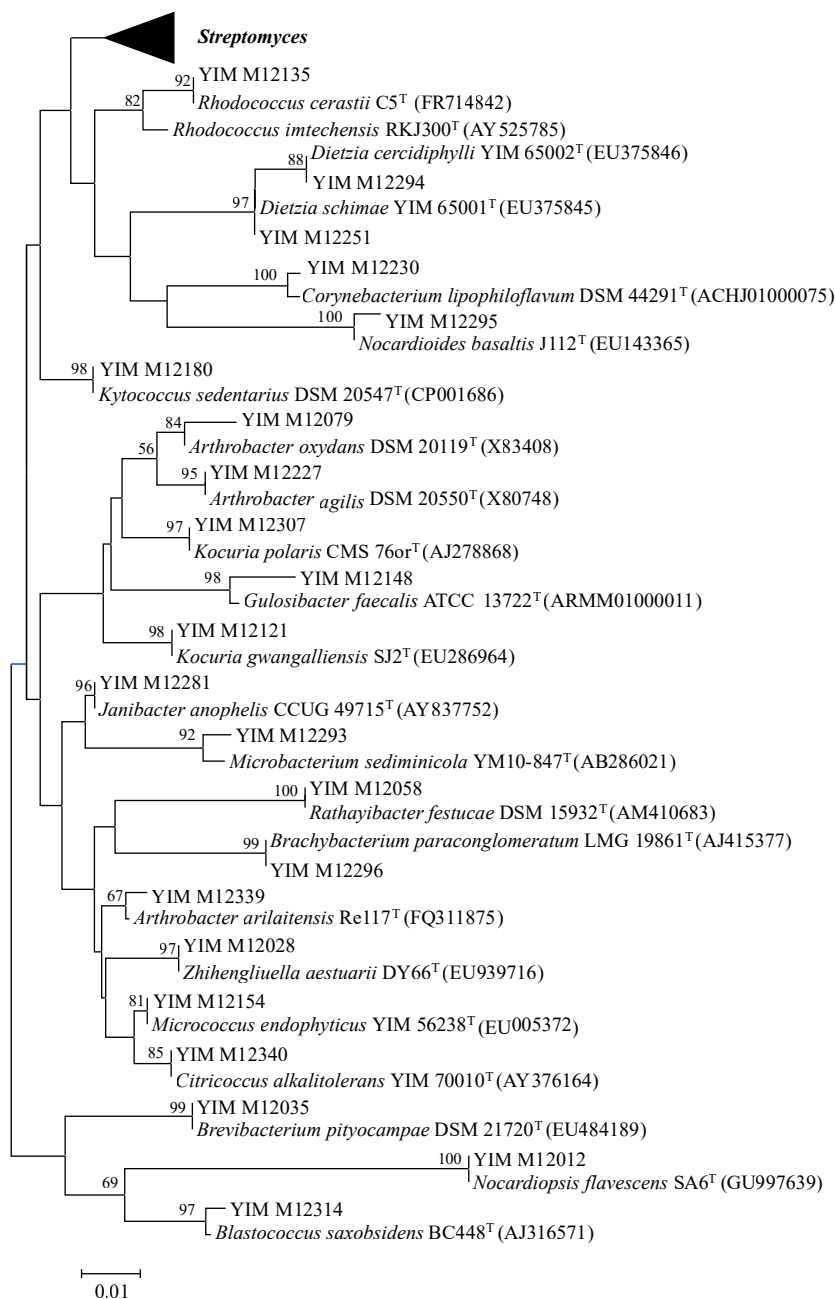


图 2 印度洋沉积物中放线菌 16S rRNA 基因序列邻近系统进化树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of actinobacterial isolates collected from the Indian Ocean sediment

为“种”的界限^[23-24]。因此,将 16S rRNA 序列相似性低于 98% 的菌株确定为潜在新分类单元,本研究共发现 12 个潜在分类单元(表 5)。主要分布在食烷菌属、节细菌属、成对杆菌属(*Dyadobacter*)、芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)、球菌属(*Macrococcus*)、中慢生根瘤菌属、叶杆菌属、动性球菌属(*Planococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)9 个属。其中,菌株 YIM M12122、YIM M12139 和 YIM M12140 与最相近的菌株 16S rRNA 基因相似性均低于 95%,是潜在的新属。由此可见,印度洋深海沉积物中存在着大量的未被发现的

微生物类群,是巨大的资源宝库。

4 结论

采自印度洋的 12 个样点中共分离得到 343 株放线菌和细菌纯培养物,共分布在 39 个属 121 个种。其中,放线菌门占 58.7%,变形菌门占 21.5%,厚壁菌门占 17.4%,拟杆菌门占 2.4%。对比以往海洋微生物分离结果(图 6): Goodfellow 和 Fiedler^[25] 的研究统计发现,在海洋环境中发现的放线菌共有 49 个属,包括 12 个新属,这 12 个新的分类单元全部是 2000 年后才

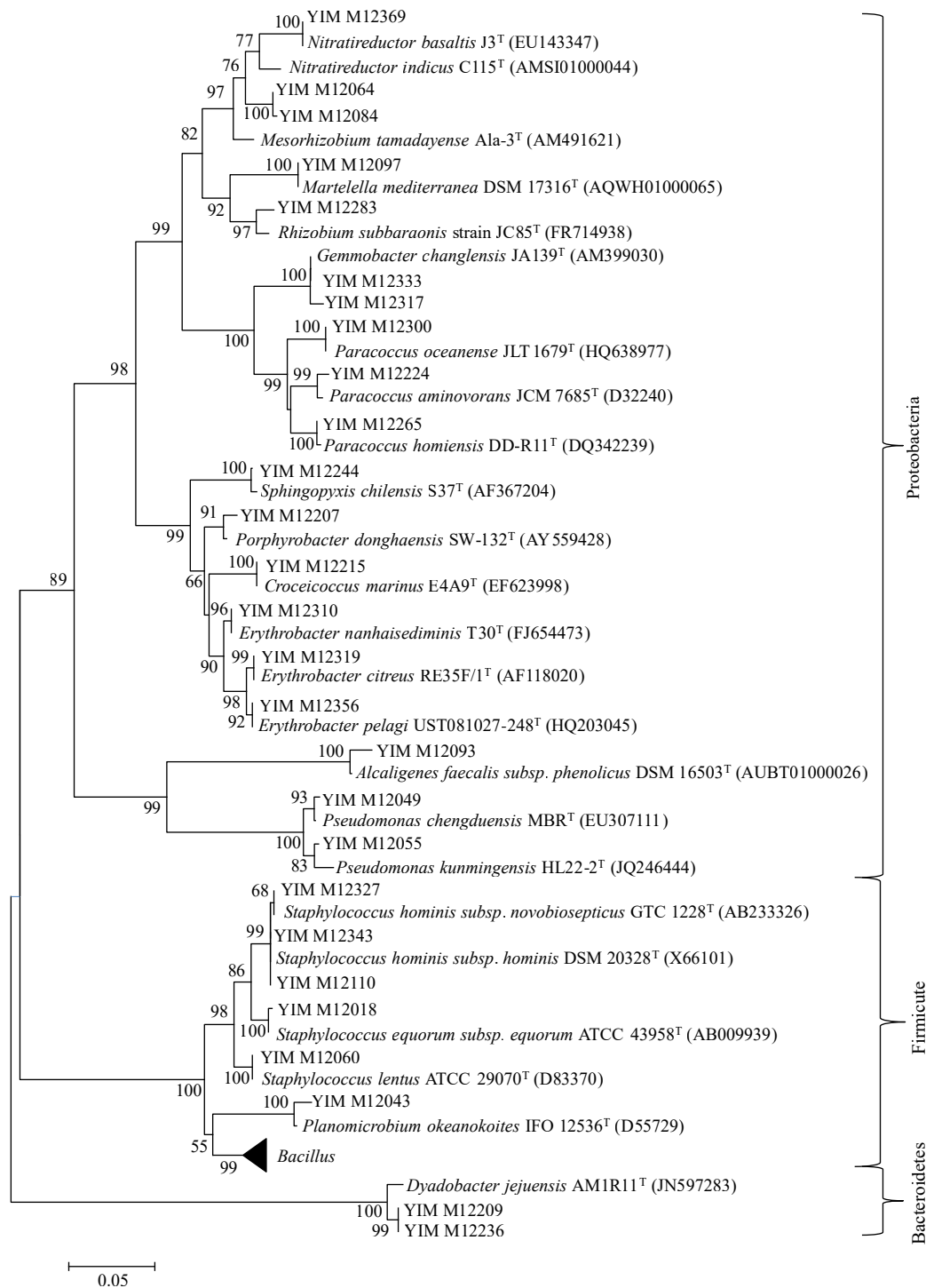


图3 印度洋沉积物中细菌16S rRNA基因序列邻近系统进化树

Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of bacterial isolates collected from the Indian Ocean sediment

从海洋环境中首次发现和描述的;徐盈^[26]从南海沉积物环境中分离得到40个科64个属,其中18个属与Goodfellow和Fiedler分离相同。在本研究中分离得到的39个属中分别有12个属和19个属与文献^[25-26]分离的细菌属相同,共有8个属在3次分离中均得到,而本研究中柠檬球菌属等16个属在以上研究中

并未分离得到。其中,人们很容易从海洋分离得到的优势类群如小单胞菌属、红球菌属、链霉菌属及迪茨氏菌属^[27]的后3个在本研究中大量分离得到,为本次分离得到的优势类群。而专属海洋菌盐细菌属(*Salinibacterium*)和盐水孢菌属(*Salinispora*)^[14]未被分离到,说明了在纯培养条件的局限下得到的微生物种类

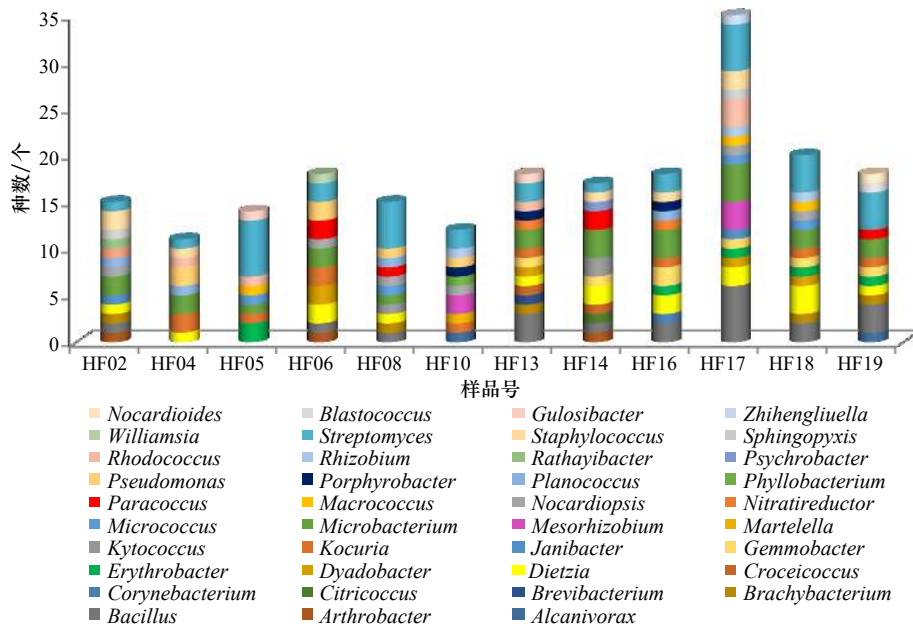


图 4 所有沉积物样品中不同类群细菌菌株数目

Fig. 4 Strain numbers of different bacteria groups isolated from all sediment samples

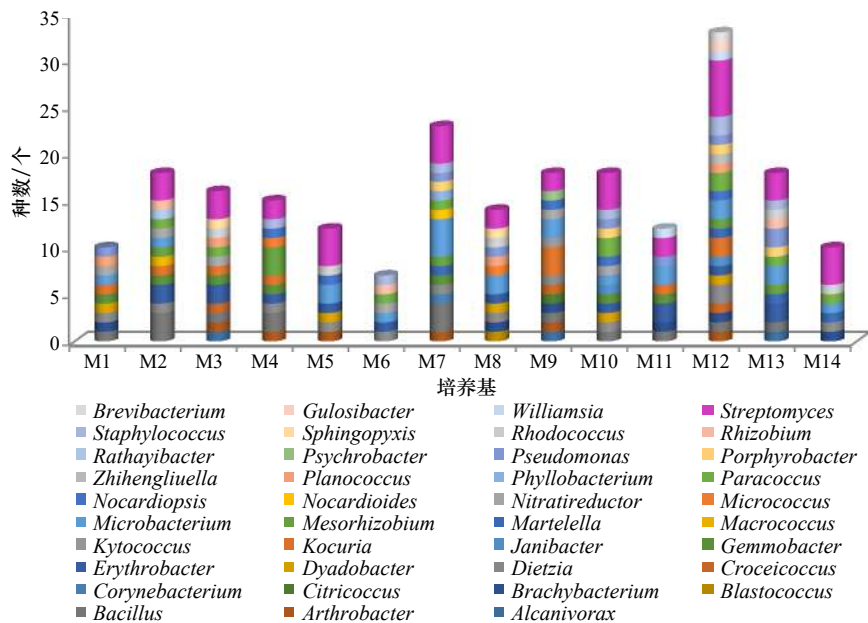


图 5 不同培养基中分离的细菌菌株类群及数目

Fig. 5 Strain numbers of different bacteria groups isolated from different culture media

仍然有限。在本次分离中,得到部分数量较少的类群,如食烷菌属、嗜冷杆菌属、叶杆菌属、鞘脂单胞菌属、紫杆菌属、芽球菌属、刘志恒菌属、柠檬球菌属、拉氏杆菌属、威廉姆斯菌属等,可能设计的培养基和样品处理条件不利于上述类群的生长。不同的培养基分离差异比较中发现,不同培养基分离得到的物种数差异较大,也证明了不同的针对性培养基的设计及样品处理方法的探索是得到更多可培养细菌的前提和保障。本研究共发现 12 个潜在分类单元,其

中菌株 YIM M12122、YIM M12139 和 YIM M12140 与最相近的菌株 16S rRNA 基因相似性均低于 95%,是潜在的新属。研究表明,不同的培养方法和培养基的选择直接影响到样品中纯培养微生物获得的几率和数量,后期可利用免培养的测序数据讨论样品所含微生物的多样性,并结合其他分子生物学手段更好地设计和改造纯培养方法及培养基,以加大纯培养微生物的获得率。

表 5 潜在新物种的 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 5 Comparison of 16S rRNA gene sequences of potential new species

菌号	相似菌株	相似性/%
YIM M12043	<i>Planococcus donghaensis</i> DSM 22276 ^T	97.27
YIM M12055	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> HL22-2 ^T	95.58
YIM M12064	<i>Mesorhizobium thioangeticum</i> SJT ^T	97.37
YIM M12082	<i>Dyadobacter tibetensis</i> CGMCC 1.12215 ^T	97.99
YIM M12084	<i>Mesorhizobium metallidurans</i> STM 2683 ^T	97.05
YIM M12100	<i>Mesorhizobium thioangeticum</i> DSM 17097 ^T	97.28
YIM M12113	<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 14358 ^T	97.87
YIM M12116	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ATCC 43590 ^T	97.28
YIM M12122	<i>Gemmobacter changlensis</i> CCUG 53722 ^T	94.88
YIM M12139	<i>Alcanivorax dieselelei</i> CGMCC 1.3690 ^T	92.66
YIM M12140	<i>Macrococcus brunensis</i> CCM 4811 ^T	91.40
YIM M12148	<i>Gulosibacter faecalis</i> ATCC 13722 ^T	97.05

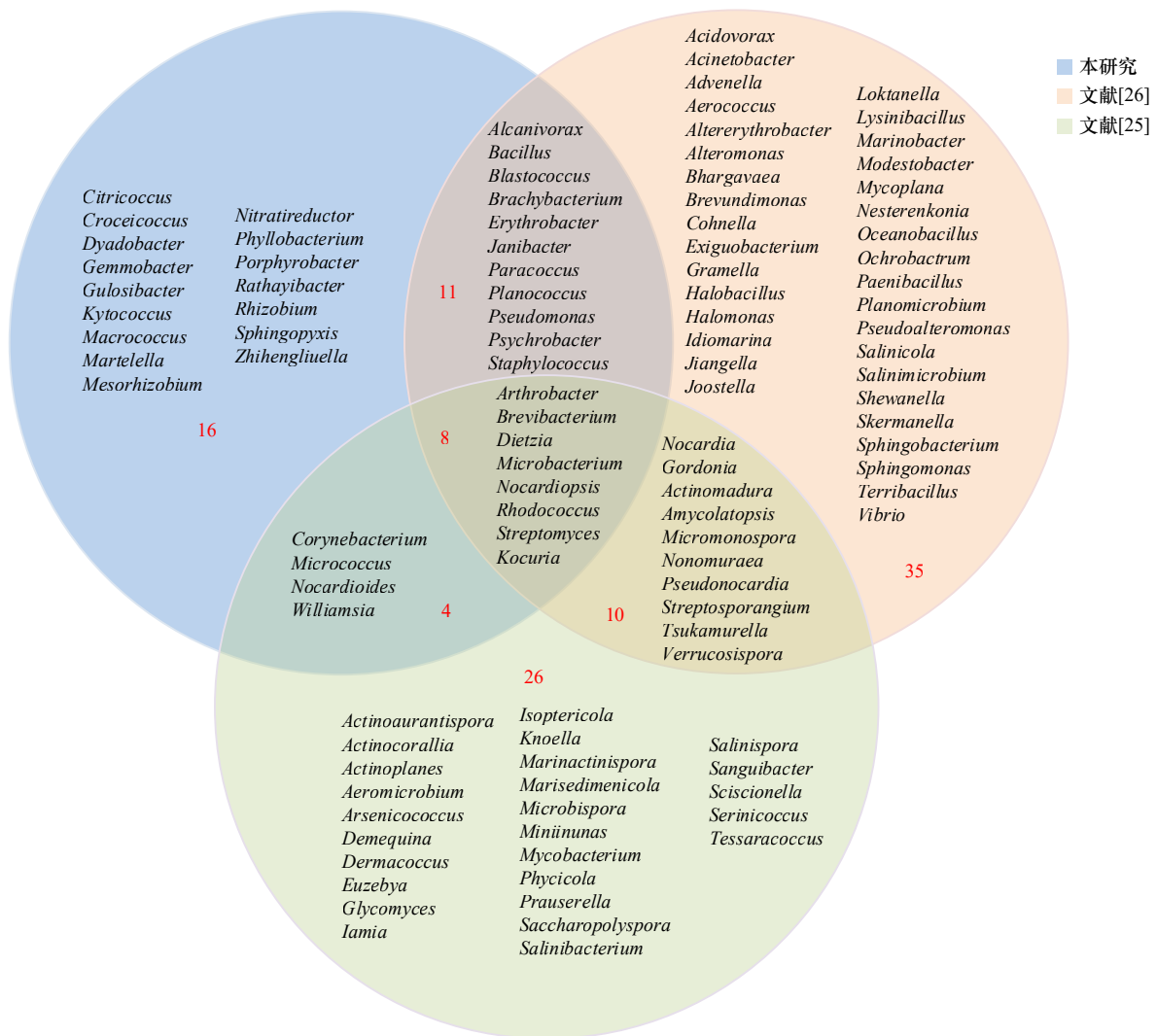


图 6 海洋环境分离到的可培养细菌类群比较

Fig. 6 Comparison of culturable bacteria isolated from marine habitats

参考文献:

- [1] Arrigo K R. Marine microorganisms and global nutrient cycles[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 349–355.
- [2] Bowler C, Karl D M, Colwell R R. Microbial oceanography in a sea of opportunity[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 180–184.
- [3] 张懿, 等. 中国海洋微生物多样性[M]. 1版. 北京: 科学出版社, 2013.
Zhang Si, et al. Diversities of Marine Microbes in China[M]. 1st ed. Beijing: Science Press, 2013.
- [4] Rochelle P A, Cragg B A, Fry J C, et al. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 15(1/2): 215–225.
- [5] Wellsbury P, Mather I, Parkes R J. Geomicrobiology of deep, low organic carbon sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(1): 59–70.
- [6] Newberry C J, Webster G, Cragg B A, et al. Diversity of prokaryotes and Methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 274–287.
- [7] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean margin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8): 2815–2820.
- [8] Bidle K A, Kastner M, Bartlett D H. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B)[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 177(1): 101–108.
- [9] Inagaki F, Suzuki M, Takai K, et al. Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the sea of Okhotsk[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7224–7235.
- [10] Heijs S K, Haese R R, Van Der Wielen P W J J, et al. Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(3): 384–398.
- [11] 徐丽华, 娄恺, 张华, 等. 微生物资源学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2010: 90.
Xu Lihua, Lou Kai, Zhang Hua, et al. Microbial Resources[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2010: 90.
- [12] Arrieta J M, Arnaud-haond S, Duarte C M. What lies underneath: Conserving the oceans' genetic resources[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18318–18324.
- [13] Schut F, De Vries E J, Gottschal J C, et al. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59(7): 150–161.
- [14] 王宏梅, 赵心清. 可培养海洋放线菌生物多样性的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(5): 996–1000.
Wang Hongmei, Zhao Xinqing. Progress in the bio-diversity studies of culturable marine actinobacteria[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(5): 996–1000.
- [15] Mincer T J, Jensen P R, Kauffman C A, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5005–5011.
- [16] Terahara T, Kobayashi T, Imada C. An effective method based on wet-heat treatment for the selective isolation of micromonospora from estuarine sediments[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(9): 1677–1684.
- [17] Li Wenjun, Xu Ping, Schumann P, et al. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt7): 1424–1428.
- [18] Messick J B, Berent L M, Cooper S K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(2): 462–466.
- [19] Kim O S, Cho Y J, 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.
- [20] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [21] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [22] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [23] Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 37(4): 463–464.
- [24] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. *Microbiology Today*, 2006, 8(4): 6–9.
- [25] Goodfellow M, Fiedler H P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98(2): 119–142.
- [26] 徐盈. 南海沉积环境细菌分离方法及多样性研究[D]. 昆明: 云南大学, 2012.
Xu Ying. Study on isolation methods and bacterial diversity in sediment environments from South China Sea[D]. Kunming: Yunnan Uni-

versity, 2012.

[27] 张德, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究[J]. *中国科学院院刊*, 2010, 25(6): 651–658.

Zhang Si, Zhang Changsheng, Tian Xinpeng, et al. The study of diversities of marine microbes in China[J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2010, 25(6): 651–658.

Isolation and identification of cultivable bacteria isolated from deep-sea sediment samples of the Indian Ocean

Jiang Zhao^{1,2}, Zhang Weihua^{1,2}

(1. *Engineering Research Center of Tibetan Medicine Detection Technology, Ministry of Education, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China*; 2. *Key Laboratory for Molecular Genetic Mechanisms and Intervention Research on High Altitude Disease of Tibet Autonomous Region, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China*)

Abstract: In order to explore the diversity of pure cultured bacteria in the deep-sea sedimentary environment of the Indian Ocean, bacteria were isolated and identified from 12 sediment samples collected from the Indian Ocean. A total of 343 strains of bacteria were obtained by pure culture isolation method and 16S rRNA gene sequence analysis showed that these isolates belonged to Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidete and were divided into 5 classes, 13 orders, 26 families and 121 species under 39 genera. The dominant taxa were *Streptomyces* (separation rate is 16.53%) and *Bacillus* (separation rate is 8.26%), among which there were 12 potential new taxa. The results show that the deep-sea sedimentary environment of the Indian Ocean is rich in culturable bacteria and contains many new species; secondly, the isolation and culture methods are directly related to the bacterial species diversity obtained from marine sediments.

Key words: Indian Ocean; sedimentary environment; bacteria; isolation and identification