

唐小玉, 张颖, 张文谦, 等. 珊瑚共附生 DMSP 降解菌的分离及其多样性分析[J]. 海洋学报, 2021, 43(6): 108–117, doi:10.12284/hyxb2021110

Tang Xiaoyu, Zhang Ying, Zhang Wenqian, et al. Isolation and diversity analysis of coral-associated DMSP degrading bacteria[J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(6): 108–117, doi:10.12284/hyxb2021110

珊瑚共附生 DMSP 降解菌的分离及其多样性分析

唐小玉^{1,5}, 张颖^{1,5}, 张文谦^{1,5}, 张燕英^{2*}, 杨清松¹, 董俊德^{1,3,4}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 热带海洋生物资源与生态重点实验室/广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005; 3. 中国科学院海南热带海洋生物实验站, 海南 三亚 572000; 4. 三亚中科海洋研究院 海南省热带海洋生物技术重点实验室, 海南 三亚 572000; 5. 中国科学院大学 资源与环境学院, 北京 100049)

摘要: 二甲基巯基丙酸内盐 (DMSP) 是地球上最丰富的有机硫分子之一, 在全球硫循环和气候调节中具有重要的作用。DMSP 是“冷室气体”二甲基硫 (DMS) 最主要的前体物质; 在海洋中, DMSP 可被多种途径降解, 微生物降解是其最重要的途径之一。珊瑚礁是海洋 DMS 重要的来源之一, 珊瑚共附生 DMSP 降解菌在 DMS 生产过程中发挥着重要的作用。本研究从多孔鹿角珊瑚 (*Acropora millepora*)、美丽鹿角珊瑚 (*Acropora formosa*)、多棘鹿角珊瑚 (*Acropora echinata*)、指状鹿角珊瑚 (*Acropora digitifera*)、鹿角杯形珊瑚 (*Pocillopora damicornis*) 和丛生盔形珊瑚 (*Galaxea fascicularis*) 6 种造礁石珊瑚中分离获得珊瑚共附生 DMSP 降解菌 39 株, 基于 16S rRNA 基因序列对 DMSP 降解菌进行系统发育分析, 39 株 DMSP 降解菌株分别隶属于 4 个门、6 个纲、19 个属, 优势属为芽孢杆菌属 (*Bacillus*); 通过火焰光度检测器-气相色谱 (GC-FPD) 联用技术检测 DMSP 降解产物, 分析 DMSP 降解菌的 DMS 生产能力, 结果显示, 9 株菌具有高产 DMS 能力, 高产 DMS 菌株对于珊瑚应对气候变暖的益生作用有待后续深入研究。

关键词: 二甲基巯基丙酸内盐; 二甲基硫; 降解菌; 珊瑚礁生态系统; 硫循环

中图分类号: Q938.1[†]; P714[‡].5

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2021)06-0108-10

1 引言

珊瑚礁是地球上生物多样性最高的生态系统之一, 虽然全球珊瑚礁总面积只占全部海域的 0.2% 左右, 但是却为大约 30% 的海洋生物提供栖息地和食物来源, 同时为人类社会提供食物、药物、旅游、美学等方面的实际效益; 另外, 珊瑚礁在保护海岸和维持海洋生态系统碳、氮生物地球化学循环中发挥重要的作用^[1]。然而, 珊瑚礁生态系统非常脆弱, 在过去

的 50 年里, 受人类活动(过度捕捞、农业污染、陆地径流)、全球变暖及海洋酸化等的影响, 珊瑚死亡率急剧上升, 导致珊瑚覆盖率大幅下降^[2]。1998 年和 2010 年的珊瑚暖化事件在全球范围内影响了 48% 的珊瑚礁^[3-4]; 在第 3 次全球珊瑚白化事件期间(2014–2017 年)^[5], 所有热带珊瑚礁都经历了异常的海洋温度事件, 这些事件以后可能每年都会发生。

珊瑚礁被认为是海洋天然硫酸盐的主要来源, 珊瑚虫、共生藻和微生物都能够产生二甲基巯基丙酸

收稿日期: 2020-12-14; 修订日期: 2021-03-16。

基金项目: 国家自然科学基金(41976147, 41676107); 国家重点研发计划(2017YFC0506301); 中国科学院战略性先导科技专项 A(XDA13020300); 中国科学院南海生态环境工程创新研究院创新发展基金(ISEE2018ZD02); 广东省海洋牧场规划、建设与管理工程技术研究项目(GML2019ZD0402); 广东省科技计划项目(2017B030314052)。

作者简介: 唐小玉(1994—), 男, 河南省鹤壁市人, 研究方向为海洋环境学。E-mail: txy506@126.com

* **通信作者:** 张燕英, 女, 教授, 主要从事海洋微生物生态学研究。E-mail: zhyanying@163.com

内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)。DMSP 具有渗透压调节、化学引诱、抗氧化、冷冻保护等多种生物学功能^[6]。DMSP 是生源性气体二甲基硫(dimethyl sulfide, DMS)的前体物质,海洋中的 DMS 主要由 DMSP 降解产生。DMS 在驱动全球硫循环和调节气候变化中具有重要作用,海洋中产生的 DMS 通过海-气扩散的方式进入大气后被氧化成硫酸盐,其氧化产物促进气溶胶的形成,从而增加了云凝结核的数量、提高了云层折射率、减少了地面热量收入,起到了减缓温室效应的作用^[7]。高温会引起珊瑚共生体细胞活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)过量释放,过量的 ROS 会氧化细胞膜、使蛋白变性并破坏核酸,进而对宿主细胞造成损伤,导致珊瑚的白化^[8]。Sunda 等^[9]研究发现,DMSP 的裂解产物 DMS 和丙烯酸等能够有效地捕获羟基自由基和 ROS;并且, DMS 能够扩散进入光合膜中,显著地增加细胞内水相和脂质膜相的抗氧化保护功能。高温胁迫下,珊瑚体内 DMS 和丙烯酸的浓度相应地降低,其可能参与到 ROS 的捕获中,表明 DMSP 及其降解产物在珊瑚抗逆反应中具有重要的作用^[10]。

在海洋中,异养细菌是 DMSP 最主要的降解者^[11],了解细菌降解 DMSP 的机制,对海洋中硫循环意义深远。海洋微生物对 DMSP 的降解主要通过两条途径:一条为去甲基化途径,DMSP 经去甲基化反应生成 3-巯基丙酸甲酯(MMPA),进一步转化为甲硫醇(MeSH),该途径不产生 DMS;一条为裂解途径,DMSP 在酶的作用下裂解产生 DMS^[12-13]。目前,研究者从红杆菌属(*Rhodobacters*)、玫瑰杆菌属(*Roseobacters*)、硫杆菌属(*Sulfitobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonadales*)菌株中鉴定出相关的 DMSP 裂解酶,包括 DddP、DddY、DddQ、DddW、DddK 和 DddL,其催化 DMSP 裂解产生 DMS 和丙烯酸;另一种 DMSP 裂解酶——Dddd,催化 DMSP 裂解产生 DMS 和 3-羟基丙酸,其常见于海洋单胞菌属(*Marinomonas*)^[14-16]。

研究发现,某些珊瑚的共附生细菌具有降解 DMSP 的功能,并对珊瑚的健康发挥着重要作用。如 Raina 等^[17]从多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)和瘦叶表孔珊瑚(*Montipora aequituberculata*)中分离出能够降解 DMSP 的细菌,这些细菌大都来自于 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*);并且 DMSP 的降解产物能够影响珊瑚微生物群落结构,对珊瑚的健康具有重要作用。Tandon 等^[18]通过比较基因组学发现,*Endozoicomonas acroporae* 可以降解 DMSP 为 DMS,使珊瑚避免受到溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*)的侵害——

溶珊瑚弧菌利用 DMSP 作为信号分子寻找高温胁迫下的珊瑚,而 DMS 不能作为其信号分子^[19]。珊瑚共附生 DMSP 降解菌使得海洋中 DMS 浓度增加,更多的 DMS 通过海-气扩散进入大气,对气候调节起到了重要的作用。

目前,有关珊瑚共附生 DMSP 降解菌的研究还相对较少,鉴于珊瑚共附生 DMSP 降解菌在珊瑚应对高温胁迫及气候调节上的重要作用,本文利用纯培养技术从多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*)、美丽鹿角珊瑚(*Acropora formosa*)、指状鹿角珊瑚(*Acropora digitifera*)、多棘鹿角珊瑚(*Acropora echinata*)、鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)和丛生盔形珊瑚(*Galaxea fascicularis*)中分离筛选 DMSP 降解菌,探索 DMSP 降解菌在 6 种珊瑚中的多样性与分布特征,并通过火焰光度检测器-气相色谱联用技术分析 DMSP 降解菌的 DMS 生产能力,以填补国内关于珊瑚共附生 DMSP 降解菌研究的空缺。

2 材料与方 法

2.1 材 料

鹿回头岸礁(长约为 3 km、宽为 250~500 m)位于海南岛南岸,毗邻三亚市区,1990 年被划入三亚国家级珊瑚礁自然保护区。过去 50 年来,受人类活动的影响,鹿回头岸礁珊瑚群落组成多样性严重下降,活珊瑚覆盖率从约 85% 下降至 12% 左右^[20]。此外,全球变暖导致鹿回头岸礁海域水温升高,使该海域多数珊瑚物种长期处于温度胁迫状态^[21]。样品采集于 2019 年 9 月 11 日和 2019 年 9 月 22 日进行。

2.1.1 样品采集

6 种珊瑚样品采自三亚鹿回头岸礁(18°12'19"N, 109°28'27"E) 1.5~2 m 水深处,每种珊瑚采集 3 个重复样本,直径为 10~15 cm。采集的样品放置于温度为 28℃、光照强度为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的养殖缸中暂养 2 d,之后开展珊瑚共附生 DMSP 降解菌的分离筛选实验。

2.1.2 培养基

改良基础营养盐培养基的配方^[22]:基础盐溶液 [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g; CaCl_2 , 0.57 g; Fe-EDTA, 0.295 g; 微量元素母液 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.790 g; H_3BO_3 , 2.8 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.26 g; ddH_2O , 100 mL), 1 mL; ddH_2O , 100 mL], 5 mL; 维生素溶液(维生素 B_{12} , 2 mg; p-氨基苯酸、核黄素、维生素 B_6 、烟酸 B_5 、维生素 C、维生素 B_1 、D-(+)-生物素,各 10 mg; ddH_2O , 1 L), 0.5 mL; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.33 g; NaCl, 0.585 g; 酵母提取物, 0.05 g; 蒸馏水, 500 mL; 灭菌前

培养基 pH 调至 6.4, 灭菌后培养基 pH 用磷酸盐缓冲液调至 6.8。固体培养基加入 9 g 琼脂, 其中磷酸盐缓冲液单独灭菌。

甜菜碱或 DMSP 为唯一碳源改良基础营养盐培养基: 基础盐溶液, 5 mL; 维生素溶液, 0.5 mL; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.33 g; NaCl, 0.585 g; 甜菜碱或 DMSP, 终浓度 5 mmol/L; 蒸馏水, 500 mL; 灭菌前 pH 调至 6.4, 灭菌后 pH 用磷酸盐缓冲液调至 6.8。固体培养基加入 9 g 琼脂, 其中 DMSP 使用孔径为 0.22 μm 的滤器单独抽滤灭菌。

2.2 方法

2.2.1 DMSP 降解菌的分离筛选

初筛: 截取 10 g 左右的珊瑚样品, 无菌海水冲洗 2~3 次以除去珊瑚表面非共附生微生物。将冲洗后的珊瑚样品包裹于灭菌铝箔中, 锤子砸碎匀浆, 转移至 50 mL 无菌离心管, 加入 20 mL 灭菌海水混匀, 得到珊瑚母液, 每次处理 1 个珊瑚样品以避免不同珊瑚样品之间的污染。取 100 μL 母液于 200 mL 改良基础营养盐液体培养基中进行富集培养, 摇床温度为 28 $^\circ\text{C}$ 、转速为 180 r/min, 培养时间为 4 d。培养液出现浑浊后, 吸取 0.5 mL 稀释得到 10^{-1} ~ 10^{-5} 浓度梯度稀释液, 取 200 μL 10^{-5} 浓度稀释液涂布至以甜菜碱为唯一碳源的改良基础营养盐固体平板上, 28 $^\circ\text{C}$ 条件下培养 4 d。挑取平板上的单菌落, 采用三区划线法接种于新的平板, 培养 4 d 后进一步划线纯化, 直至平板上各菌落的颜色、形态一致。

复筛: 将初筛获得的菌株接种于以 DMSP 为唯一碳源的改良基础营养盐固体平板上, 观察其是否能够生长。

2.2.2 16S rRNA 基因扩增

用试剂盒 Bacterial DNA Kit (OMEGA, 美国) 提取细菌基因组 DNA。引物 27F (5'-GAGTTTGATCMTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3') 用于扩增 16S rRNA 基因, PCR 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增体系为: rTaq DNA 聚合酶 (takara, 大连宝生物) 12.5 μL , 正反向引物各 0.5 μL , 细菌 DNA 1 μL , 无菌去离子水补足 25 μL 。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰的送广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。

2.2.3 菌株鉴定及系统发育树构建

通过 Chromas 软件查看 16S rRNA 基因测序获得的峰图, 将单一无套峰的 16S rRNA 基因序列 (长约为 1 300 bp) 导入 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对, 获得最相似种属并确定其分类地位。下载相似度最

高的菌株的 16S rRNA 基因序列, 通过 ClustalW 进行多序列比对, 利用 MEGA 7.0 软件采用邻接 (Neighbor-joining) 法构建系统发育树, 其中替换模型选择 Kimura 双参数 (Kimura 2-parameter) 模型, 用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次。

2.2.4 DMS 浓度检测

采用吹扫捕集-冷阱富集气相色谱法测定 DMS 浓度。筛选菌株于含有 5 mmol/L 甜菜碱的改良基础营养盐液体培养基中预培养至 OD_{600} 值为 0.3 左右; 取 300 μL 菌液加入到含有 2 mL 5 mmol/L DMSP 改良基础营养盐液体培养基的进样瓶中, 另设空白对照, 于 28 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 48 h^[23]。用高纯氮气将培养基中的 DMS 进行吹扫, 吹扫出的 DMS 被捕集在浸泡于液氮中的聚四氟乙烯环形管中; 捕集到的气体使用 90 $^\circ\text{C}$ 热水加热解析, 注入装有长为 3 m、直径为 3 mm 的玻璃柱子和火焰光度检测器的气相色谱 (安捷伦 7890A, 美国) 中进行检测, 玻璃柱子中填充有 10% DEGS、Chromosorb W-AW-DMCS 混合物。该方法的检出限约为 0.4 nmol DMS^[24-25]。

3 结果

3.1 DMSP 降解菌 16S rRNA 序列多样性分析

从 6 种珊瑚中共分离获得 DMSP 降解菌 39 株, 通过 16S rRNA 基因测序进行分类学鉴定, 隶属于 4 个门、6 个纲、19 个属。其中, 21 株隶属于变形菌门 (Proteobacteria), 包括 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 9 株、 γ -变形菌纲 12 株; 13 株隶属于厚壁菌门 (Firmicutes), 4 株隶属于放线菌门 (Actinobacteria), 1 株隶属于异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus) (图 1)。优势属为芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 共 10 株, 占比为 25.6%; 其次为弧菌属 (*Vibrio*), 共 7 株, 占比为 17.9%。从鹿角杯形珊瑚分离获得的 DMSP 降解菌最多, 共 10 株, 隶属于 7 个属; 其次为丛生盔形珊瑚, 共 7 株, 隶属于 7 个属。4 种鹿角珊瑚中, 从多孔鹿角珊瑚分离获得的 DMSP 降解菌最多, 7 株, 隶属于 6 个属; 其次为美丽鹿角珊瑚, 6 株, 隶属于 5 个属; 指状鹿角珊瑚共附生 DMSP 降解菌有 5 株, 隶属于 4 个属; 多棘鹿角珊瑚共附生 DMSP 降解菌最少, 共 4 株, 隶属于 3 个属。从多孔鹿角珊瑚、美丽鹿角珊瑚和鹿角杯形珊瑚分离获得的 DMSP 降解菌均以芽孢杆菌属为主; 从多棘鹿角珊瑚分离获得的 DMSP 降解菌以不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 为主; 从指状鹿角珊瑚分离获得的 DMSP 降解菌以弧菌属为主 (表 1)。

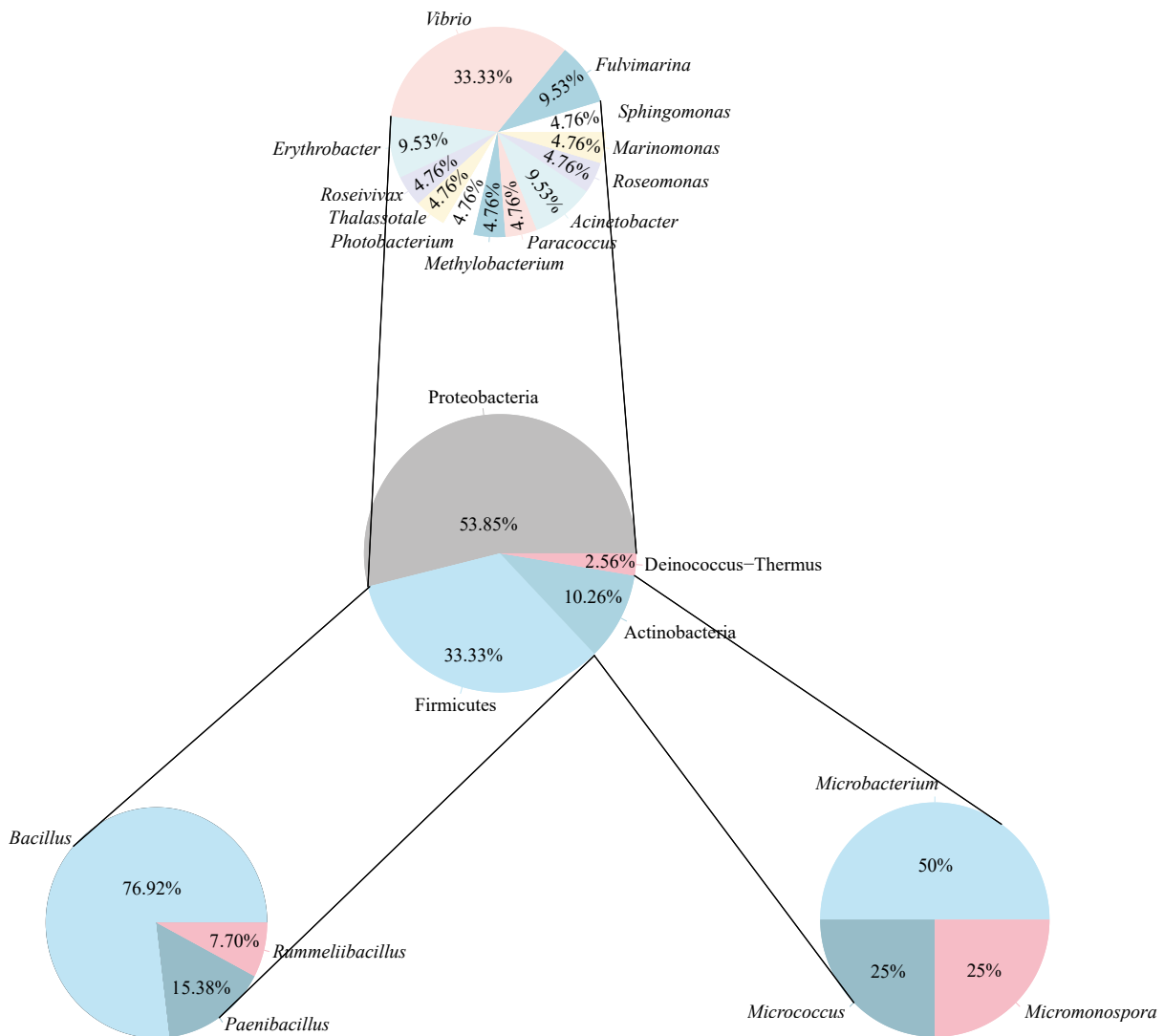


图1 DMSP降解菌分类信息

Fig. 1 Taxonomic information of DMSP degrading bacteria

3.2 系统发育树的构建

将DMSP降解菌的16S rRNA基因序列导入NCBI进行BLAST同源性比对,并下载同源性最高的序列进行ClustalW多序列比对分析,选择Kimura双参数模型采用邻接法构建系统发育树(图2)。从图2中可以看出,39株DMSP降解菌形成3个大的分支,菌株Pd3单独为一支,剩下的38株菌形成两个分支。筛选获得的39株菌,10株与芽孢杆菌属聚为一支,相似度最高为100%;7株与弧菌属聚为一支,相似度最高为99.93%;2株与赤杆菌属(*Erythrobacter*)聚为一支,相似度为99.48%;2株与不动杆菌属聚为一支,相似度最高为99.79%;2株与微杆菌属(*Microbacterium*)聚为一支,相似度最高为99.28%;2株与类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)聚为一支,相似度最高为98.96%;2株与*Fulvimarina*聚为一支,相似度最高为99.78%;剩下的12株各单独聚为一支。

3.3 DMS浓度检测结果分析

将筛选获得的菌株接种到含有5 mmol/L DMSP的改良基础营养盐液体培养基中,28℃、180 r/min条件下培养48 h后,使用火焰光度检测器-气相色谱联用技术检测DMSP降解产物DMS。结果显示,可以降解DMSP产生DMS的菌株有20株,分别为Ad1、Ad2、Ad3、Ae1、Ae2、Ae3、Af1、Af2、Am1、Am2、Am3、Am4、Gf1、Gf2、Gf3、Gf4、Gf5、Pd1、Pd2、Pd3,产量为3.759~16.240 μmol/L;其中,有9株菌产DMS能力较强,分别为Ad1、Ad2、Ad3、Ae1、Af2、Am4、Pd1、Pd2、Pd3,产量分别为11.826 μmol/L、16.185 μmol/L、16.240 μmol/L、15.220 μmol/L、13.843 μmol/L、10.473 μmol/L、9.430 μmol/L、9.976 μmol/L、9.265 μmol/L(图3)。所筛选获得的DMS产生菌株中,有3株来源于指状鹿角珊瑚、3株

表 1 6 种石珊瑚中分离获得菌株在属水平上的分布

Table 1 The distribution of strains isolated from six species of corals at genus level

属	鹿角杯形珊瑚	丛生盔形珊瑚	多孔鹿角珊瑚	指状鹿角珊瑚	美丽鹿角珊瑚	多棘鹿角珊瑚
<i>Acinetobacter</i>	-	-	-	-	-	2
<i>Bacillus</i>	4	1	2	-	2	1
<i>Deinococcus</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Erythrobacter</i>	1	1	-	-	-	-
<i>Fulvimarina</i>	-	-	1	1	-	-
<i>Marinomonas</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Methylobacterium</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Micromonospora</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i>	1	-	-	1	-	-
<i>Paenibacillus</i>	1	1	-	-	-	-
<i>Photobacterium</i>	-	-	-	-	1	-
<i>Paracoccus</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Roseomonas</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Roseivivax</i>	-	-	-	-	1	-
<i>Rummeliibacillus</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Thalassotale</i>	-	-	-	-	1	-
<i>Vibrio</i>	1	1	1	2	1	1

注: -表示没有获得隶属于该属的菌株。

来源于多棘鹿角珊瑚、2 株来源于美丽鹿角珊瑚、4 株来源于多孔鹿角珊瑚、5 株来源于丛生盔形珊瑚、3 株来源于鹿角杯形珊瑚。

4 讨论

大型有机体与微生物的共生有助于其对不断变化的环境条件的适应,对宿主的健康和进化具有重要作用^[26]。在珊瑚礁生态系统中,共生细菌为珊瑚宿主提供营养物质,并通过占用生态位和分泌抗菌化合物保护珊瑚不受致病菌的侵害^[27-29]。尽管珊瑚共附生 DMSP 降解菌对珊瑚健康意义重大^[17],但有关珊瑚共附生 DMSP 降解菌的研究还相对较少。本研究利用纯培养技术首次分离筛选三亚鹿回头 6 种造礁石珊瑚共附生 DMSP 降解菌,并对其多样性及降解特性进行了分析。早期研究发现^[30],珊瑚共附生 DMSP 降解菌主要来自于变形菌门,且大多分布于 α -变形菌纲与 γ -变形菌纲^[11]。本研究获得 9 株 α -变形菌纲菌、

12 株 γ -变形菌纲菌,其中橙单胞菌科 (*Aurantimonadaceae*)、红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*)、海洋螺菌科 (*Oceanospirillaceae*) 和弧菌属在先前的研究中已被证实可降解 DMSP^[31-33];然而,玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、赤杆菌属、*Thalassotale*、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、副球菌属 (*Paracoccus*) 和不动杆菌属首次被发现具有降解 DMSP 的能力。珊瑚共附生微生物群落组成具有时间和空间上的差异性,并且不同珊瑚物种具有独特的微生物群落多样性^[34],新的 DMSP 降解菌的发现不足为奇。Wagner 和 Stadtman^[35] 早在 1962 年首次发现了厚壁菌门中可降解 DMSP 的菌株,并指出该菌株隶属于梭菌属 (*Clostridium*)。本研究中,芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属和鲁梅尔芽孢杆菌属 (*Rummeliibacillus*) 被证明也具有降解 DMSP 的能力,这扩大了厚壁菌门中可降解 DMSP 菌株的范围。放线菌门细菌是常见的珊瑚共附生菌,其可通过产生重要的次生代谢产物保护珊

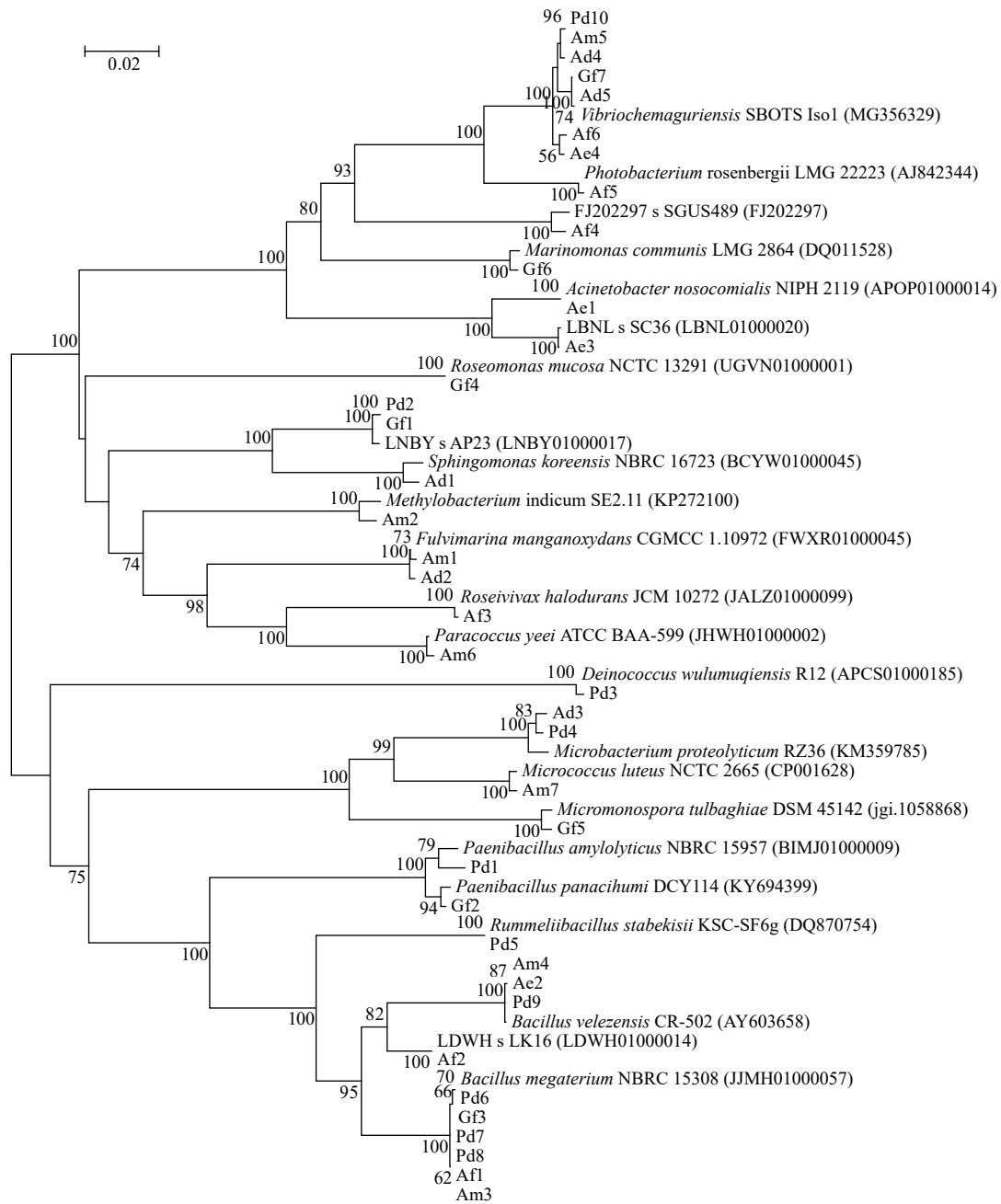


图2 DMSP 降解菌株系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of DMSP degrading bacteria

瑚的健康^[36]。林钰等^[37]从马里亚纳海沟沉积物中分离获得来自于放线菌门的菌株,并通过 DMSP 降解能力测定发现某些微杆菌属、微球菌属(*Micrococcus*)细菌可降解 DMSP。本研究分离获得来自于微杆菌属、微球菌属的 DMSP 降解菌,这与林钰等的研究结果相一致。此外,本研究获得 1 株隶属于异常球菌-栖热菌门的 DMSP 降解菌,首次证明异常球菌-栖热菌门菌株具有降解 DMSP 的能力。假单胞菌属(*Pseudomonas*)为典型的珊瑚共生菌并被发现具有降解 DMSP 的能力^[17];本研究未获得该属的菌株,分析其原因可能是由于本

次研究样品处理过程中黏液丢失过多,而假单胞菌属细菌主要存在于珊瑚黏液中^[38]。

相关研究表明^[39],50%~90%的 DMSP 通过去甲基化途径转化为 MMPA,剩余部分的 DMSP 通过 DMSP 裂解酶转化为 DMS 和丙烯酸。通过去甲基化途径降解 DMSP 的细菌多发生于玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)^[40],然而本研究未获得来自于该属的菌株。Newton 等^[41]研究发现,相比于可培养细菌,通过去甲基化途径降解 DMSP 的玫瑰杆菌属细菌多为不可培养细菌,这为本研究未获得玫瑰杆菌属细菌提供

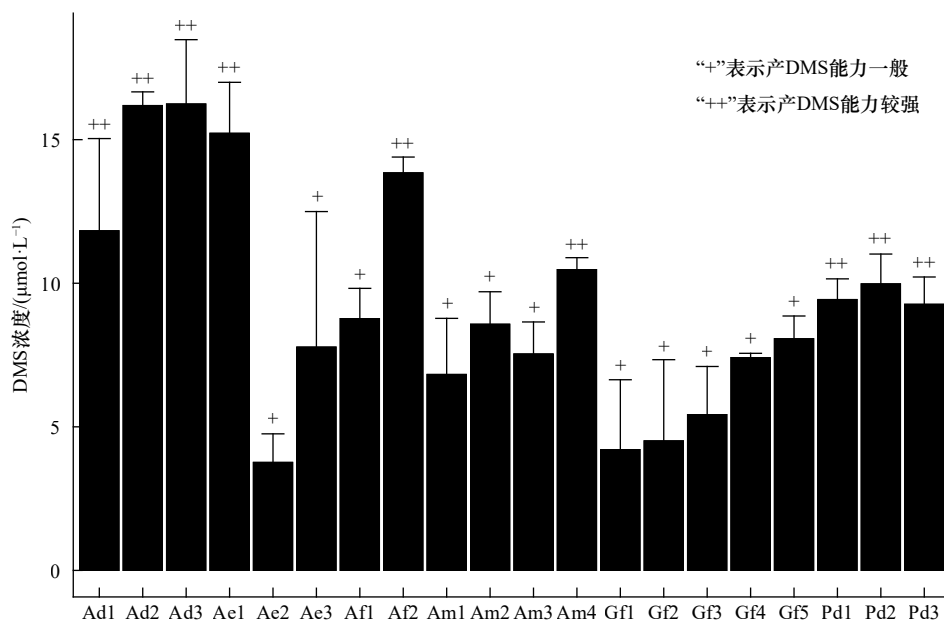


图3 DMSP降解菌株DMS产量柱形图

Fig. 3 Histogram of DMS production of DMSP degrading bacteria

了解释。能够降解 DMSP 产生 DMS 的细菌多来自于玫瑰杆菌属、红杆菌属 (*Rhodobacter*)、海洋单胞菌属及硫杆菌属 (*Sulfitobacter*) 等^[42]。Curson 等^[44]发现 *Fulvimarina* 菌株含有 *dddL* 基因, 并证明该菌株具有产 DMS 能力。本研究筛选获得的 39 株 DMSP 降解菌中, 有 20 株菌的降解产物中可检测到 DMS, 表明其通过裂解途径降解 DMSP, 剩余 19 株菌通过去甲基化途径降解 DMSP, 这与文献中报道的不同 DMSP 降解途径占比相符合。本研究获得的 9 株高产 DMS 菌株中, 有 3 株分别来自于 α -变形菌纲中的 *Fulvimarina*、鞘脂单胞菌属和赤杆菌属, 表明 α -变形菌纲中 DMS 产生菌有广泛的分类地位。此外, 微杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属和不动杆菌属细菌在本研究中也被发现具有高产 DMS 的能力, 这进一步扩大了可降解 DMSP 产生 DMS 的菌株的范围。孙浩等^[43]研究发现, 可降解 DMSP 的硫杆菌属细菌多分布于深层水体, 本次研究样品采集多位于浅层水体, 这可能是导致未获得硫杆菌属 DMSP 降解菌的主要原因。Zhang 等^[44]对鹿回头海域 4 种珊瑚的共附生微生物的功能基因进行了研究, 发现 *Thalassiobium* 等菌株具有 *dmdA* 基因。然而, 在其他区域的珊瑚礁生态系统中, 并未发现珊瑚共附生 *Thalassiobium* 菌株具有降解 DMSP 的功能, 表明不同区域的珊瑚共附生 DMSP 降解菌存在差异, 这为本研究获得的 DMSP 降解菌与前人有所差别提供了解释。此外, 本研究以甜菜碱为唯一碳源的改良基

础营养盐培养基对 DMSP 降解菌进行初筛, 导致能够利用 DMSP 而不能利用甜菜碱的潜在菌株的遗失, 这可能是本研究未获得前人所报道的 DMSP 降解菌株的重要原因。

目前, 有关珊瑚益生菌的研究越来越受到科学家的关注, 如 Rosado 等^[45]通过向珊瑚接种益生菌而增加了珊瑚对白化的抵抗力。DMSP 是影响细菌趋化作用的重要化学因子, Garren 等^[19]发现, 溶珊瑚弧菌对 DMSP 具有一定的趋化反应, 这对于其致病性具有关键意义。珊瑚共附生 DMSP 降解菌对 DMSP 的降解减少了溶珊瑚弧菌对珊瑚的侵害, 有力地促进了珊瑚的健康。虫黄藻产生的 DMSP 主要存在于囊泡、叶绿体和细胞质中, 其不仅为重要的细菌趋化因子, 并对珊瑚微生物群落结构有着重要的影响^[46]。由于珊瑚微生物群落结构与珊瑚健康密切相关^[47], 珊瑚共附生 DMSP 降解菌通过降解 DMSP 影响珊瑚微生物群落结构进而间接影响珊瑚健康。DMS 产生菌降解 DMSP 产生 DMS 和丙烯酸^[13], 捕获珊瑚因高温胁迫产生的 ROS^[8], 减少了 ROS 对珊瑚的损伤, 极大地促进了珊瑚对全球气候变暖的响应。DMSP 降解菌代谢 DMSP 产生原二植酸 (Tropodithetic Acid, TDA), 有效抑制了珊瑚致病菌——溶珊瑚弧菌和欧式弧菌 (*Vibrio owensii*) 的生长^[48]。这些研究表明, 珊瑚共附生 DMSP 降解菌为重要的珊瑚益生菌; 然而, 有关珊瑚共附生 DMSP 降解菌的益生效应验证实验目前尚缺乏。本研究提出的多种 DMSP 降解菌作用机制, 为

以后开展DMSP降解菌对珊瑚的益生效应验证实验奠定了理论基础。

5 结论及展望

通过以DMSP为唯一碳源的选择性改良基础培养基,从三亚鹿回头岸礁6种造礁石珊瑚中分离获得共附生DMSP降解菌39株,分布于19个属。其中,21株菌来自于变形菌门,13株菌来自于厚壁菌门,4株来自于放线菌门,1株来自于异常球菌-栖热菌门。6种珊瑚中,从鹿角杯形珊瑚中筛选获得的共附生DMSP降解菌最多,其次为丛生盔形珊瑚。所选的4种鹿角珊瑚中,多孔鹿角珊瑚的共附生DMSP降解菌最多,多棘鹿角珊瑚共附生DMSP降解菌最少。

参考文献:

- [1] Hoegh-Guldberg O, Mumby P J, Hooten A J, et al. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification[J]. *Science*, 2007, 318(5857): 1737–1742.
- [2] Hughes T P, Baird A H, Bellwood D R, et al. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs[J]. *Science*, 2003, 301(5635): 929–933.
- [3] Ateweberhan M, McClanahan T R, Graham N A J, et al. Episodic heterogeneous decline and recovery of coral cover in the Indian Ocean[J]. *Coral Reefs*, 2011, 30(3): 739–752.
- [4] Panithanarak T. Effects of the 2010 coral bleaching on phylogenetic clades and diversity of zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) in soft corals of the genus *Simularia*[J]. *Plankton and Benthos Research*, 2015, 10(1): 11–17.
- [5] Teixeira C D, Leitão R L L, Ribeiro F V, et al. Sustained mass coral bleaching (2016–2017) in Brazilian turbid-zone reefs: taxonomic, cross-shelf and habitat-related trends[J]. *Coral Reefs*, 2019, 38(4): 801–813.
- [6] Zhang Xiaohua, Liu Ji, Liu Jingli, et al. Biogenic production of DMSP and its degradation to DMS—their roles in the global sulfur cycle[J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(10): 1296–1319.
- [7] Charlson R J, Lovelock J E, Andreae M O, et al. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate[J]. *Nature*, 1987, 326(6114): 655–661.
- [8] Weis V M. Cellular mechanisms of *Cnidarian* bleaching: stress causes the collapse of symbiosis[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(19): 3059–3066.
- [9] Sunda W, Kieber D J, Kiene R P, et al. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae[J]. *Nature*, 2002, 418(6895): 317–320.
- [10] Raina J B, Tapiolas D M, Forêt S, et al. DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response[J]. *Nature*, 2013, 502(7473): 677–680.
- [11] Curson A R J, Todd J D, Sullivan M J, et al. Catabolism of dimethylsulphoniopropionate: microorganisms, enzymes and genes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(12): 849–859.
- [12] Liu Jingli, Liu Ji, Zhang Shenghui, et al. Novel insights into bacterial dimethylsulfoniopropionate catabolism in the East China Sea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3206.
- [13] Howard E C, Henriksen J R, Buchan A, et al. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean[J]. *Science*, 2006, 314(5799): 649–652.
- [14] Curson A R J, Rogers R, Todd J D, et al. Molecular genetic analysis of a dimethylsulfoniopropionate lyase that liberates the climate-changing gas dimethylsulfide in several marine α -proteobacteria and *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(3): 757–767.
- [15] Reisch C R, Moran M A, Whitman W B. Bacterial catabolism of dimethylsulfoniopropionate (DMSP)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 172.
- [16] Todd J D, Rogers R, Li Youguo, et al. Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria[J]. *Science*, 2007, 315(5812): 666–669.
- [17] Raina J B, Tapiolas D, Willis B L, et al. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3492–3501.
- [18] Tandon K, Lu C Y, Chiang P W, et al. Comparative genomics: dominant coral-bacterium *Endozoicomonas acroporae* metabolizes dimethylsulfoniopropionate (DMSP)[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(5): 1290–1303.

所获得的菌株中,20株具有产DMS的潜力,9株具有高产DMS的能力。本研究获得的DMSP降解菌在不同的珊瑚物种之间出现了部分重叠。本研究只关注了6种珊瑚共附生DMSP降解菌的多样性分布特征及降解特性,没有探讨DMSP降解菌对珊瑚应对高温胁迫是否具有益生作用,后续研究可以进行相关实验验证DMSP降解菌是否可以协助珊瑚应对高温胁迫,为三亚鹿回头海域的珊瑚保护提供参考。

致谢: 感谢中国科学院烟台海岸带研究所张升辉老师的技术支持;感谢中国科学院海南热带海洋生物重点实验室为本研究提供实验平台。

- [19] Garren M, Son K, Raina J B, et al. A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(5): 999–1007.
- [20] Zhao Meixia, Yu Kefu, Zhang Qiaomin, et al. Long-term decline of a fringing coral reef in the northern South China Sea[J]. *Journal of Coastal Research*, 2012, 28(5): 1088–1099.
- [21] Yuan Xiangcheng, Guo Yajuan, Cai Weijun, et al. Coral responses to ocean warming and acidification: implications for future distribution of coral reefs in the South China Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 138: 241–248.
- [22] Souza M P D, Yoch D C. Purification and characterization of dimethylsulfoniopropionate lyase from an alcaligenes-like dimethyl sulfide-producing marine isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1): 21–26.
- [23] Todd J D, Curson A R J, Dupont C L, et al. The *dddP* gene, encoding a novel enzyme that converts dimethylsulfoniopropionate into dimethyl sulfide, is widespread in ocean metagenomes and marine bacteria and also occurs in some Ascomycete fungi[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(6): 1624–1625.
- [24] Zhang Shenghui, Yu Juan, Ding Qiongyao, et al. Effect of elevated $p\text{CO}_2$ on trace gas production during an ocean acidification mesocosm experiment[J]. *Biogeosciences*, 2018, 15(21): 6649–6658.
- [25] Yang Guipeng, Zhang Shenghui, Zhang Honghai, et al. Distribution of biogenic sulfur in the Bohai Sea and northern Yellow Sea and its contribution to atmospheric sulfate aerosol in the late fall[J]. *Marine Chemistry*, 2015, 169: 23–32.
- [26] Bosch T C G, Mcfall-Ngai M J. Metaorganisms as the new frontier[J]. *Zoology*, 2011, 114(4): 185–190.
- [27] Benavides M, Bednarz V N, Ferrier-Pagès C. Diazotrophs: overlooked key players within the coral symbiosis and tropical reef ecosystems?[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2017, 4: 10.
- [28] Rypien K L, Ward J R, Azam F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(1): 28–39.
- [29] Nissimov J, Rosenberg E, Munn C B. Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 292(2): 210–215.
- [30] Tang Kaihao, Wang Yan, Wang Xiaoxue. Recent progress on signalling molecules of coral-associated microorganisms[J]. *Science China Earth Science*, 2019, 62(4): 609–618.
- [31] Bourne D G, Dennis P G, Uthicke S, et al. Coral reef invertebrate microbiomes correlate with the presence of photosymbionts[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1452–1458.
- [32] González J M, Kiene R P, Moran M A. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the α -subclass of the class Proteobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3810–3819.
- [33] Hernandez-Agreda A, Gates R D, Ainsworth T D. Defining the core microbiome in corals' microbial soup[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(2): 125–140.
- [34] Rosenberg E, Koren O, Reshef L, et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(5): 355–362.
- [35] Wagner C, Stadtman E R. Bacterial fermentation of dimethyl- β -propiothetin[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1962, 98(2): 331–336.
- [36] 张斯颖, 陈宇丰, 骆焱平, 等. 丛生盔形珊瑚共附生放线菌NLG-3的抑菌活性及鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(10): 97–105.
Zhang Siying, Chen Yufeng, Luo Yanping, et al. Antibacterial activity and identification of epiphytic actinomycete NLG-3 from *Galaxea facicularis*[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2019, 47(10): 97–105.
- [37] 林钰, 刘荣华, 周顺, 等. 马里亚纳海沟沉积物可培养异养细菌的多样性及其DMSP降解能力[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 828–844.
Lin Yu, Liu Ronghua, Zhou Shun, et al. Diversity of culturable heterotrophic bacteria from sediments of the Mariana Trench and their ability to degrade dimethylsulfoniopropionate (DMSP)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 828–844.
- [38] Kooperman N, Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E, et al. Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 276(1): 106–113.
- [39] Zeng Yinxin, Qiao Zongyun, Yu Yong, et al. Diversity of bacterial dimethylsulfoniopropionate degradation genes in surface seawater of Arctic Kongsfjorden[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33031.
- [40] Schnicker N J, De Silva S M, Todd J D, et al. Structural and biochemical insights into dimethylsulfoniopropionate cleavage by cofactor-bound DddK from the prolific marine bacterium *Pelagibacter*[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(23): 2873–2885.
- [41] Newton R J, Griffin L E, Bowles K M, et al. Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(6): 784–798.
- [42] Miller T R, Belas R. Dimethylsulfoniopropionate metabolism by *Pfiesteria*-associated *Roseobacter* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3383–3391.
- [43] 孙浩, 谭斯尹, 梁金昌, 等. 中国东海二甲基巯基丙酸内盐(DMSP)合成与降解菌的水平和垂直分布[J]. 微生物学报, 2020, 60(9): 1865–1881.
Sun Hao, Tan Siyin, Liang Jinchang, et al. Horizontal and vertical distribution of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) producing and catabolizing bacteria in the East China Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(9): 1865–1881.

- [44] Zhang Yanying, Ling Juan, Yang Qingsong, et al. The functional gene composition and metabolic potential of coral-associated microbial communities[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16191.
- [45] Rosano P M, Leite D C A, Duarte G A S, et al. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(4): 921–936.
- [46] Raina J B, Clode P L, Cheong S, et al. Subcellular tracking reveals the location of dimethylsulfoniopropionate in microalgae and visualises its uptake by marine bacteria[J]. *eLife Sciences*, 2017, 6: e23008.
- [47] Ritchie K B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 322: 1–14.
- [48] Raina J B, Tapiolas D, Motti C A, et al. Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals[J]. *PeerJ*, 2016, 4 (6242): e2275.

Isolation and diversity analysis of coral-associated DMSP degrading bacteria

Tang Xiaoyu^{1,5}, Zhang Ying^{1,5}, Zhang Wenqian^{1,5}, Zhang Yanying², Yang Qingsong¹, Dong Junde^{1,3,4}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology/Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biology Applications, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Ocean School, Yantai University, Yantai 264005, China; 3. Tropical Marine Biological Research Station in Hainan, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, China; 4. Key Laboratory of Tropical Marine Biotechnology of Hainan Province, Sanya Institute of Oceanology, SCSIO, Sanya 572000, China; 5. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) is one of the most abundant organic sulfur molecules on earth, and plays an important role in global sulfur cycle and climate regulation. DMSP is the principal precursor of dimethyl sulfide (DMS), which can be degraded through many ways in the ocean, and microbial degradation is one of the most important ways. Coral reef is one of the major sources of marine DMS, and coral-associated DMSP degrading bacteria play an important role in the process of DMS production. In the present study, 39 strains of DMSP degrading bacteria were isolated from six reef building corals, including *Acropora millepora*, *Acropora formosa*, *Acropora echinata*, *Acropora digitifera*, *Pocillopora damicornis*, and *Galaxea fascicularis*. The phylogenetic analysis of DMSP degrading bacteria was performed based on 16S rRNA gene sequence, 39 strains of DMSP degrading bacteria belonged to 4 phyla, 6 classes, and 19 genera, the dominant genus was *Bacillus*. The DMS production efficiency of DMSP degrading bacteria were analyzed by GC-FPD detection of DMSP products, the results showed that 9 strains had the ability of high DMS production. The probiotic effects of bacteria with high DMS production on corals in response to climate warming need to be further studied.

Key words: DMSP; DMS; degrading bacteria; coral reef ecosystems; sulfur cycle