



凡纳滨对虾肠道红杆菌科细菌富集碳源筛选及其定向分离

高繁^{1,2}, 干恩磊^{1,2}, 刘巍^{1,2}, 郭海朋^{1,2*}, 王艳婷^{1,2}, 王若愚^{1,2}, 燕孟琛^{1,2}, 董鹏生^{1,2}, 张德民^{1,2}

1 宁波大学农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江 宁波 315211

2 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

高繁, 干恩磊, 刘巍, 郭海朋, 王艳婷, 王若愚, 燕孟琛, 董鹏生, 张德民. 凡纳滨对虾肠道红杆菌科细菌富集碳源筛选及其定向分离. 微生物学报, 2022, 62(5): 1805–1818.

Gao Fan, Gan Enlei, Liu Wei, Guo Haipeng, Wang Yanting, Wang Ruoyu, Yan Mengchen, Dong Pengsheng, Zhang Demin. Screening of carbon sources for enrichment and directional isolation of *Rhodobacteraceae* from the gut of *Litopenaeus vannamei*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1805–1818.

摘要: 【目的】红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)细菌为凡纳滨对虾肠道微生物的优势类群, 在健康对虾肠道中具有较高的相对丰度, 是指示对虾健康的关键类群, 探究对虾肠道红杆菌科细菌定向富集和分离方法, 可为对虾养殖益生菌菌剂的研发提供基础。【方法】利用 16S rRNA 基因高通量测序技术研究不同碳源添加对凡纳滨对虾肠道中红杆菌科细菌的富集作用, 筛选对红杆菌科细菌有显著富集作用的碳源; 利用纯培养技术从红杆菌科细菌富集的样品中定向分离红杆菌科细菌, 并对其鉴定和遗传多样性分析。【结果】添加短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、戊酸)和碳酸氢钠对红杆菌科细菌有显著富集作用, 主要富集到 *Cribrihabitans*、*Tritonibacter*、*Rhodovulum*、*Ruegeria*、*Sagittula* 和 *Thalassobius* 属相关菌株; 对红杆菌科细菌相对丰度最高的样品进行稀释涂布培养, 共分离纯化出 303 株细菌, 分属于 2 门 12 科, 其中红杆菌科细菌为主导类群共 119 株, 主要包括 *Tritonibacter* (90 株)、*Phaeobacter* (25 株)、*Sulfitobacter* (1 株)、*Ruegeria* (1 株)、*Roseovarius* (1 株)和 *Aliiroseovarius* (1 株)等 6 个属; 分

基金项目: 国家自然科学基金(31672658); 宁波市农业重大专项(2021Z105); 象山县科技计划(2021X SX040003)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31672658), by the Ningbo Major Agricultural Project (2021Z105) and by the Xiangshan County Science and Technology Plan Project (2021X SX040003)

*Corresponding author. E-mail: guohaipeng@nbu.edu.cn

Received: 22 September 2021; Revised: 19 October 2021; Published online: 5 March 2022

离的各属红杆菌科细菌占总分离菌株比例与高通量测序结果中红杆菌科各属细菌占比相似。

【结论】本研究基于高通量测序技术探究了添加不同碳源连续传代培养对红杆菌科细菌富集的影响，筛选出了5种富集红杆菌科细菌的碳源，并定向分离获得119株红杆菌科细菌，构建了一种有效定向富集分离红杆菌科细菌的方法。

关键词：凡纳滨对虾；红杆菌科；碳源；16S rRNA 基因高通量测序；定向分离

Screening of carbon sources for enrichment and directional isolation of *Rhodobacteraceae* from the gut of *Litopenaeus vannamei*

GAO Fan^{1,2}, GAN Enlei^{1,2}, LIU Wei^{1,2}, GUO Haipeng^{1,2*}, WANG Yanting^{1,2}, WANG Ruoyu^{1,2}, YAN Mengchen^{1,2}, DONG Pengsheng^{1,2}, ZHANG Demin^{1,2}

1 State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-Products, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

2 School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

Abstract: **[Objective]** *Rhodobacteraceae*, the dominant group of gut microbiota in *Litopenaeus vannamei*, usually has higher relative abundance in the gut of healthy shrimps, and some members of this family have been identified as the indicators for shrimp health. Therefore, clarifying the method for the directional enrichment and isolation of *Rhodobacteraceae* from shrimp gut can provide a basis for the development of probiotics for shrimp farming. **[Methods]** The 16S rRNA gene high-throughput sequencing was applied in the screening of the suitable carbon sources for the enrichment of *Rhodobacteraceae*. Then, the bacteria were directionally isolated from the enriched samples via the pure culture method. Finally, the taxonomic status and genetic diversity of the isolates were determined. **[Results]** The addition of short-chain fatty acids (acetic acid, propionic acid, butyric acid, and valeric acid) and sodium bicarbonate facilitated the enrichment of *Rhodobacteraceae*, which mainly included *Cribrihabitans*, *Tritonibacter*, *Rhodovulum*, *Ruegeria*, *Sagittula*, and *Thalassobius*. A total of 303 bacterial strains belonging to 12 families of 2 phyla were isolated from the samples with high relative abundance of *Rhodobacteraceae*, and 119 out of the 303 strains were identified as members of *Rhodobacteraceae*, including 90 strains of *Tritonibacter*, 25 strains of *Phaeobacter*, 1 strain of *Sulfitobacter*, 1 strain of *Ruegeria*, 1 strain of *Roseovarius*, and 1 strain of *Aliiroseovarius*. In addition, all the isolates of *Rhodobacteraceae* had the relative abundance similar to the results of high-throughput sequencing. **[Conclusion]** We explored the effect of different carbon sources on the enrichment and directional isolation of *Rhodobacteraceae* by using high-throughput sequencing and screened out five carbon sources for isolating 119 strains of *Rhodobacteraceae*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; *Rhodobacteraceae*; carbon source; 16S rRNA gene high-throughput sequencing; directional isolation

红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)隶属于红细菌目(*Rhodobacterales*)^[1], 是 α -变形菌纲细菌的主要成员之一, 广泛存在于自然环境中^[2]。自 2017 年来, 已发现超过 100 个属, 300 个种, 是目前“人口最多”的科之一^[3]。红杆菌科细菌多存在于水生环境中, 其中许多物种需要钠离子或者复配盐才能够生长, 且在表型、代谢和生态上呈现多样性, 主要包括光能自养和化能自养的光合细菌、好氧和兼性厌氧的化能异养菌以及兼性甲基营养菌等^[4]。其可以利用多种有机物为碳源进行异养代谢反应, 起到降低水体中化学需氧量(COD)的作用^[5]。

红杆菌科细菌是水产养殖动物肠道的核心定殖菌群, 被认为是新型的抗逆防病的益生菌资源, 但是目前对对虾养殖系统红杆菌科细菌的定向富集分离方法还缺乏研究。研究发现, 养殖水体中添加碳源对红杆菌科细菌具有富集作用, 王思鹏^[6]和 Guo 等^[7]在凡纳滨对虾养殖系统中添加碳源发现提高养殖环境中的碳氮比(C/N)对 *Phaeobacter* 属、*Ruegeria* 属、*Paracoccus* 属、*Amaricoccus* 属等红杆菌科细菌有显著富集作用。其中, *Ruegeria* 属和 *Amaricoccus* 属为碳源添加后对虾肠道细菌群落的关键差异类群, 与对虾成活率呈显著正相关。张哲等^[8]在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)育苗期水体中添加 3 种不同碳源(葡萄糖、淀粉和蔗糖), 比较 3 种碳源诱导的生物絮团的特征发现, *Ruegeria* 属在 3 种生物絮团中为优势菌属, 且在葡萄糖组中占比较淀粉组高。体外富集实验结果也表明通过添加碳源提高培养基中 C/N 可以定向富集红杆菌科细菌。例如, Allers 等^[9]通过在海水中额外添加有机碳和无机磷并研究海水中的微生物演替发现红杆菌科细菌相对丰度随时间增加而增加。此外, 在实验的后半部分, 红杆菌科细菌占总细菌的绝大多数且

红杆菌科之间的系统发育性和形态多样性很高。Gómez-Consarnau 等^[10]从 3 个地区采取海水设置了 9 次实验发现玫瑰杆菌属(*Roseobacter*) S1-U1 和 S1-U5 可被所有碳源富集, 乙醇酸对红杆菌科的 S1-U2 富集显著, 葡萄糖对红杆菌属(*Rhodobacter*) B3-U1 有显著富集作用。因此, 筛选对红杆菌科细菌具有显著富集作用的碳源, 可为从对虾肠道中定向分离具有潜在益生作用的红杆菌科细菌提供理论基础。

基于此, 本实验首先通过高通量测序技术筛选出显著富集红杆菌科细菌的碳源, 然后利用纯培养技术从红杆菌科细菌富集的样品中定向分离红杆菌科细菌, 以期对对虾养殖系统中红杆菌科细菌的定向调控和红杆菌科益生菌的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 培养基

参考文献[11–14]以及课题组前期的实验结果, 设置 10 个不同碳源组和一个空白对照。富集培养基分别为海水培养基和 10 个添加不同碳源, 以尿素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)作为氮源, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)作为磷源的海水培养基。每个锥形瓶中添加 200 mL 用 100 μm 晒绢过滤大分子颗粒物后的海水并调节 pH 至 7.0, 1.0×10^3 Pa 高温高压灭菌 15 min 后使用。各碳源及添加物质的质量如表 1 所示。

分离纯化培养基分别为: (1) 添加乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和碳酸氢钠的海水固体培养基(配置方法同上); (2) 2216E 液体培养基^[15]; (3) 1/2 2216E 琼脂培养基, 以上培养基均于 121 $^\circ\text{C}$ 高温高压灭菌 15 min 后使用。

1.2 对虾肠道样品采集与处理

从浙江省宁波市鄞州区咸祥海微有限公司高位池中采集 15 只大小一致的凡纳滨对虾成

表 1 制备 200 mL 培养基添加碳源质量表

Table 1 Carbon mass for preparation of 200 mL medium

Groups	Carbon source	Nitrogen source (CH ₄ N ₂ O)/g	Phosphate sources (K ₂ HPO ₄)/g
Dimethylmercaptopropionic acid (DMSP)	1.707 g	0.128	0.030
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	0.840 g	0.026	0.007
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0.400 g	–	–
Sodium pyruvate	1.100 g	0.078	0.020
Succinic acid	1.180 g	0.103	0.027
Acetic acid (liquid)	0.571 mL	0.050	0.013
Propionic acid (liquid)	0.740 mL	0.078	0.020
Butyric acid (liquid)	0.914 mL	0.103	0.027
Valeric acid (liquid)	1.080 mL	0.128	0.033
Linolenic acid (liquid)	3.073 mL	0.463	0.121

–: not detected.

虾样品, 于无菌环境下用灭菌牙签从对虾第二、三节处挑取虾肠道, 5 只虾肠道作为一个样品, 共 3 个重复。将肠道样品预研磨处理后, 置于含有 50 mL 磷酸缓冲液(PBS, pH 7.0, 10 mmol/L)的 EP 管中, 作为肠道混合液备用。

1.3 红杆菌科细菌的富集与分离

设置 10 个不同碳源组, 1 个空白对照组, 碳源添加量为 50 mmol/L (墨角藻为 0.2%), 调节 C/N/P=100:10:1, pH 7.0。在无菌条件下分别向每个培养基中添加 2%肠道混合液, 每组 3 个平行, 混匀后获得初始接种物, 置于 30 °C 下静置培养 48 h 后晃动锥形瓶使每瓶培养物均质化, 取 2%混匀后菌液添加至对应的新培养基中进行传代培养^[16], 共计转接 4 次, 每次培养条件同初始接种物, 得到 5 批传代培养菌液。分别取 700 μL 肠道混合液及每次传代培养后菌液与 300 μL 80%甘油混合于–80 °C 保存, 剩余菌液用 0.22 μm 聚碳酸酯膜过滤后放置于–80 °C 保存, 用于高通量测序分析。

选取对红杆菌科细菌有显著富集作用的碳源处理组, 对其进行红杆菌分离培养。用 PBS 缓冲液分别对样品进行梯度稀释, 设置 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 共 6 个梯度, 分别涂布于相应碳源固体培养基和 1/2 2216E 固体

培养基上, 每组共 3 个重复, 于 30 °C 下静置培养 2–7 d, 期间挑取形态、颜色、大小有差异的菌落接种于 2216E 液体培养基中, 置于摇床中 30 °C 下扩大培养至菌液浑浊后再次进行分离纯化, 得到纯培养菌株。

1.4 高通量测序数据分析

微生物样品用 QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)试剂盒提取 DNA^[17], 具体操作参照试剂盒说明书。使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rRNA 基因中的 V3–V4 可变区进行体外扩增; PCR 扩增条件为 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 27 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物送至上海美吉生物医药科技有限公司完成高通量测序。采用 QIIME v2.0 平台中的 DADA2 对测序后的数据进行序列拼接、去嵌合体、去噪及质控等处理, 将相似性大于 99%的序列归为扩增子测序变体 (ASV), 得到包含细菌特征及特征丰度的表格和细菌代表性序列文件^[18]。针对 SILVA 132 数据库训练引物特异性细菌分类器, 再将得到的代表性序列与分类器进行比对, 从而获得具体细菌分类信息。使用 R 语言“vegan”函数计算各样

品中细菌群落的 α -多样性指数;利用“UPGMA”函数对不同组别的细菌群落基于 Bray-Cruttis 距离进行聚类分析, 同样基于 Bray-Cruttis 距离的非度量多维尺度法(NMDS)分析不同碳源培养后细菌群落结构间的变化; 分析富集培养后细菌群落在科水平(至少在一个组别中相对丰度>10%)的群落组成及演替特征。使用 SPSS 25.0 软件对原始样品和培养后样品进行组间的独立样本 *t* 检验分析(independent-samples *t*-test)和单因素方差分析(one way ANOVA)。

1.5 基于 16S rRNA 基因的菌株系统学鉴定

将纯培养菌株扩大培养后采取强碱裂解法提取 DNA: 即每个试管中取 12 μ L 菌液至 96 孔板中并做好标记, 分别添加 20 μ L 缓冲液 I (25 mmol/L NaOH, 0.2 mmol/L EDTA, pH 12.0), 95 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 快速冷却后再加入 20 μ L 缓冲液 II (40 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)。剩余菌液与 80%甘油混合(菌液:甘油=3:7), 置于保种管中, 于-80 $^{\circ}$ C 保存。使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')对 DNA 片段进行体外扩增。PCR 扩增体系为上下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μ L, 2 \times Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 共 25 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。使用 1.0% (W/V)的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, 电泳条件为电压 120 V, 电流 380 mA, 时间 15 min, 置于凝胶成像系统中观察结果, 将有清晰条带的样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。采用 DNA Star 7.1 软件对双端序列进行拼接, 将得到的拼接序列提交至 EZbioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>)进行同源序列比对, 对其进行初步鉴定。下载与其序列相似度最高的模式细菌, 用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 不同碳源富集培养对样品细菌多样性的影响

不同碳源条件下连续传代富集培养后 α -多样性分析结果显示, 第 3 次传代培养后, 雨生红球藻组和琥珀酸组的物种丰度显著升高, 丁酸组、亚麻酸组、丙酸组和丙酮酸钠组物种丰度显著降低(图 1); 第 5 次传代培养后, 丁酸组、DMSP 组和亚麻酸组物种多样性显著下降, 雨生红球藻组物种丰度依旧显著升高。除雨生红球藻组和琥珀酸组外, 其余实验组物种多样性基本都呈显著下降态势(图 1)。

对第 3 次和第 5 次传代培养结果进行非度量多维尺度分析(NMDS)发现, 第 3 次和第 5 次传代培养原始样品组和其他组距离都较远, 这表明了富集培养后细菌群落结构组成与原始样品差异较大; 亚油酸组、雨生红球藻组和碳酸氢钠组较其他处理组距离也较远, 说明它们之间群落结构也存在较大差异; 此外, 分析结果显示第 3 次传代培养后, 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、琥珀酸和 DMSP 组聚类交杂在一起并未明显区分, 但第 5 次传代培养后有明显聚类区分, 尤其是 DMSP 组与其他组距离极远, 说明随着富集传代培养, 不同碳源处理下细菌群落构建会产生差异(图 2)。对第 5 次富集传代培养结果继续进行非加权组平均法 UPGMA 法构建树状结构后进行可视化分析发现, 不同碳源处理组的 3 个平行样品几乎都聚类在一起, 说明细菌群落结构组间差异大于组内; 此外, 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、琥珀酸处理组聚类到一大枝, 说明以短链脂肪酸为碳源进行培养时, 细菌群落组成较为相似; DMSP 和亚麻酸自成一枝, 说明这两组细菌群落结构与其他组差异较大(图 3)。

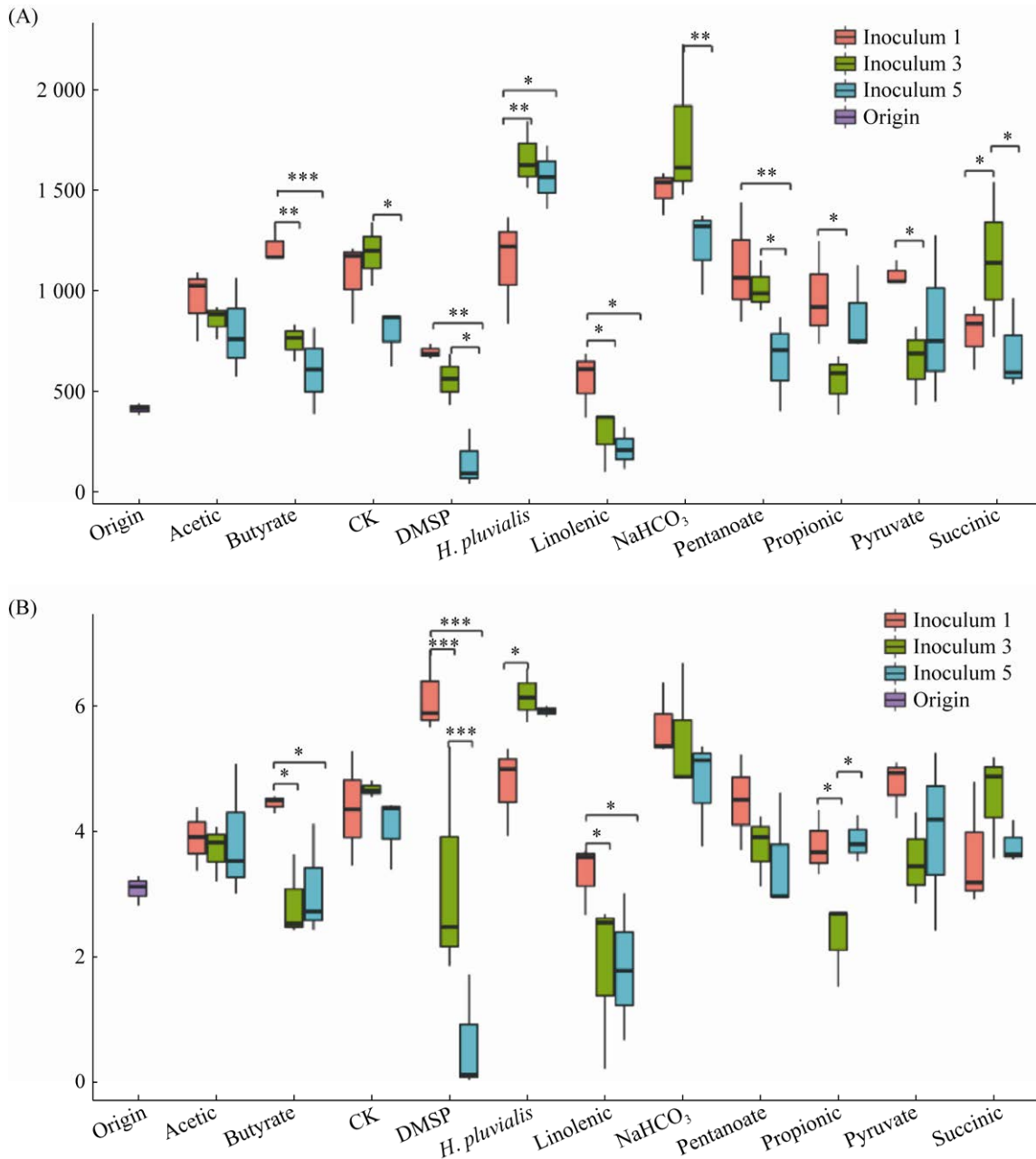


图 1 富集培养后细菌群落 α -多样性指数

Figure 1 The bacterial α -diversity index of bacterial community after enrichment culture. A: bacterial community richness index after enrichment culture; B: bacterial community shannon index after enrichment culture. Origin, acetic, butyrate, CK, DMSP, *Haematococcus pluvialis*, linolenic, NaHCO₃, pentanoate, propionic, pyruvate and succinic represent the original sample, acetic acid group, butyric acid group, control group, DMSP group, *Haematococcus pluvialis* group, linolenic acid group, sodium bicarbonate group, valerate group, propionic acid group, sodium pyruvate group and succinate group respectively (the same below); significant differences are obtained by one-way analysis of variance (one way ANOVA) between different passages of the same carbon source, *: significant difference ($P < 0.05$), **: significant difference ($P < 0.01$).

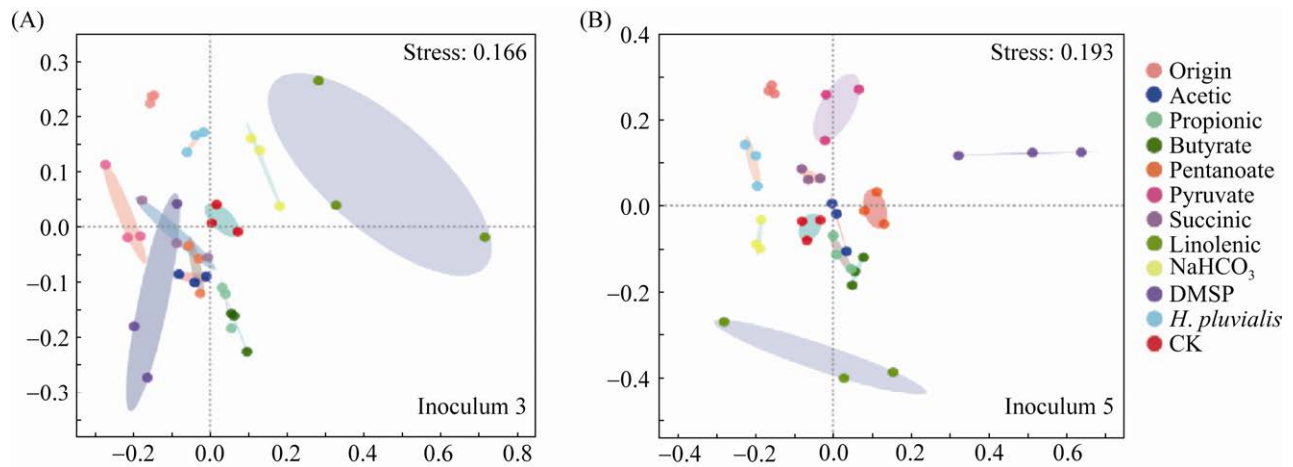


图 2 基于 Bray-Curtis 距离的不同富集代次细菌群落结构非度量多维尺度分析(NMDS)

Figure 2 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots of bacteria community structure of different inoculums based on Bray-Curtis distance. A: bacterial community structure after inoculum 3; B: bacterial community structure after inoculum 5.

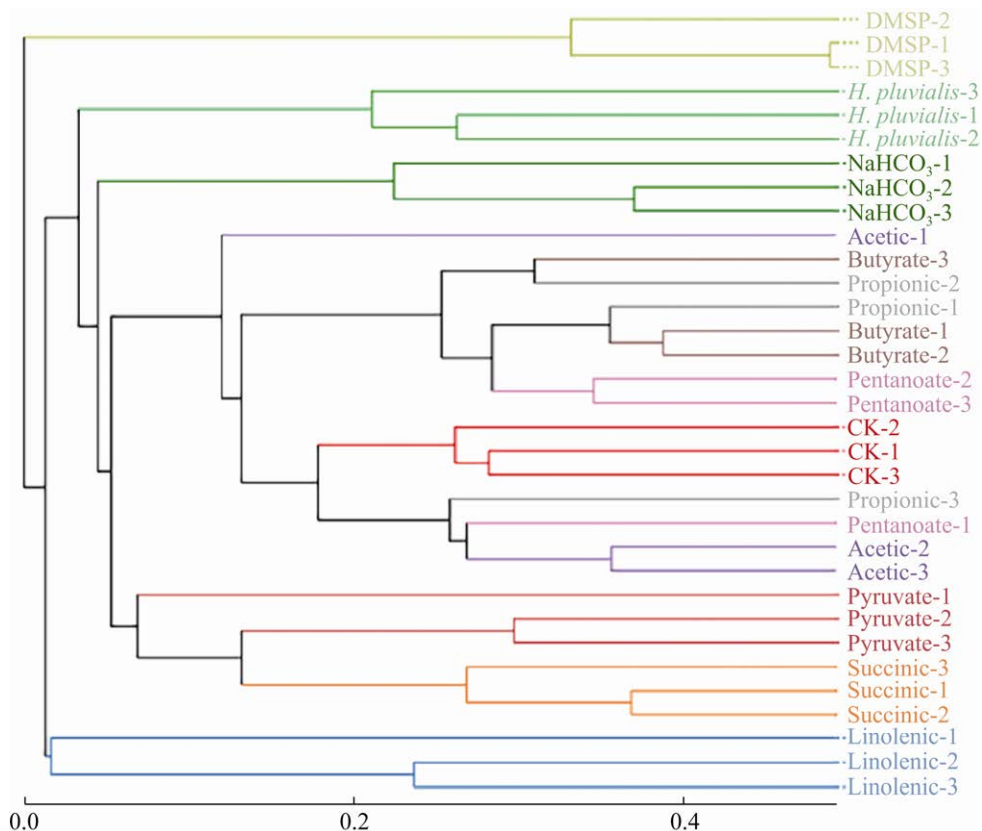


图 3 第 5 次富集传代培养细菌群落的层级聚类分析

Figure 3 The hierarchical cluster analysis of bacterial community in inoculum 5. The length of a branch represents the distance between different trees.

2.2 富集传代培养次数对微生物的群落组成的影响

对不同碳源处理下不同传代次数结果进行群落组成分析发现,科水平上,其优势细菌类群主要为弧菌科(*Vibrionaceae*)、红杆菌科和假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)等,但不同碳源传代培养物中对红杆菌科和弧菌科细菌丰度存在显著差异(图 4)。

弧菌科细菌于初始样品中丰度极高,但随着传代培养次数的增加,其在各个样品中的相对丰度皆极显著降低。第 1 次传代培养后,各个培养组中弧菌科细菌相对丰度显著下降,其余细菌如红杆菌科细菌相对丰度有所增加但不显著;第 3 次传代培养后,弧菌科细菌的相对丰度依旧呈显著下降趋势,而红杆菌科细菌相对丰度呈上升趋势,在乙酸组、丙酸组、对照组和丁酸组等短链脂肪酸处理组和碳酸氢钠组中,弧菌科细菌丰度显著降低,而乙酸组、丙酸组、戊酸组和丁酸组等短链脂肪酸处理组和碳酸氢钠组中,红杆菌科细菌丰度显著上升;第五次传代培养后,乙酸组和丁酸组中,弧菌

科细菌相对丰度依旧显著下降且丙酸组、丁酸组和戊酸组的红杆菌科细菌相对丰度依旧显著上升(图 4)。上述结果表明在培养基中添加丙酸、丁酸或戊酸对红杆菌科细菌可能有显著的富集作用。

对筛选出的红杆菌 16S rRNA 基因序列构建系统发育关系发现,实验分离中富集到的相对丰度较高的红杆菌主要聚为 5 个大枝(图 5)。除 ASV2927 (*Thalassobius* sp.)只在碳酸氢钠组被富集到外,大多数红杆菌科细菌可以在不止一种碳源上生长;乙酸、丙酸、丁酸和戊酸处理组富集到的红杆菌科种类相似,对照组中出现的红杆菌科种类最多,可能是由于没有特定碳源为特定的细菌提供生长环境,使得各种细菌能够自由生长竞争。

2.3 分离菌株的系统学组成分析

对第 3 次传代培养后的丙酸、丁酸和戊酸处理组及第 5 次传代培养后的乙酸、碳酸氢钠处理组进行分离纯化,共分离出 303 株细菌,这些细菌除芽孢杆菌科(*Bacillaceae*) (13 株)为厚壁菌门(*Firmicutes*)外,其余细菌

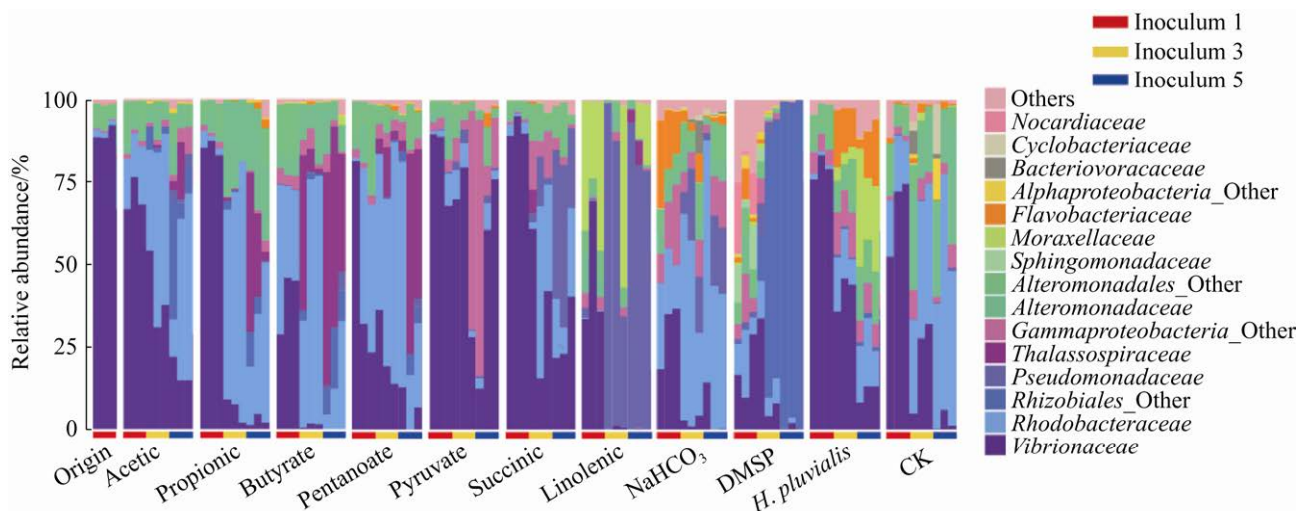


图 4 富集培养后细菌群落优势科组成图

Figure 4 Composition of dominant families of bacterial community after enrichment culture (relative abundance > 10% in at least one sample).

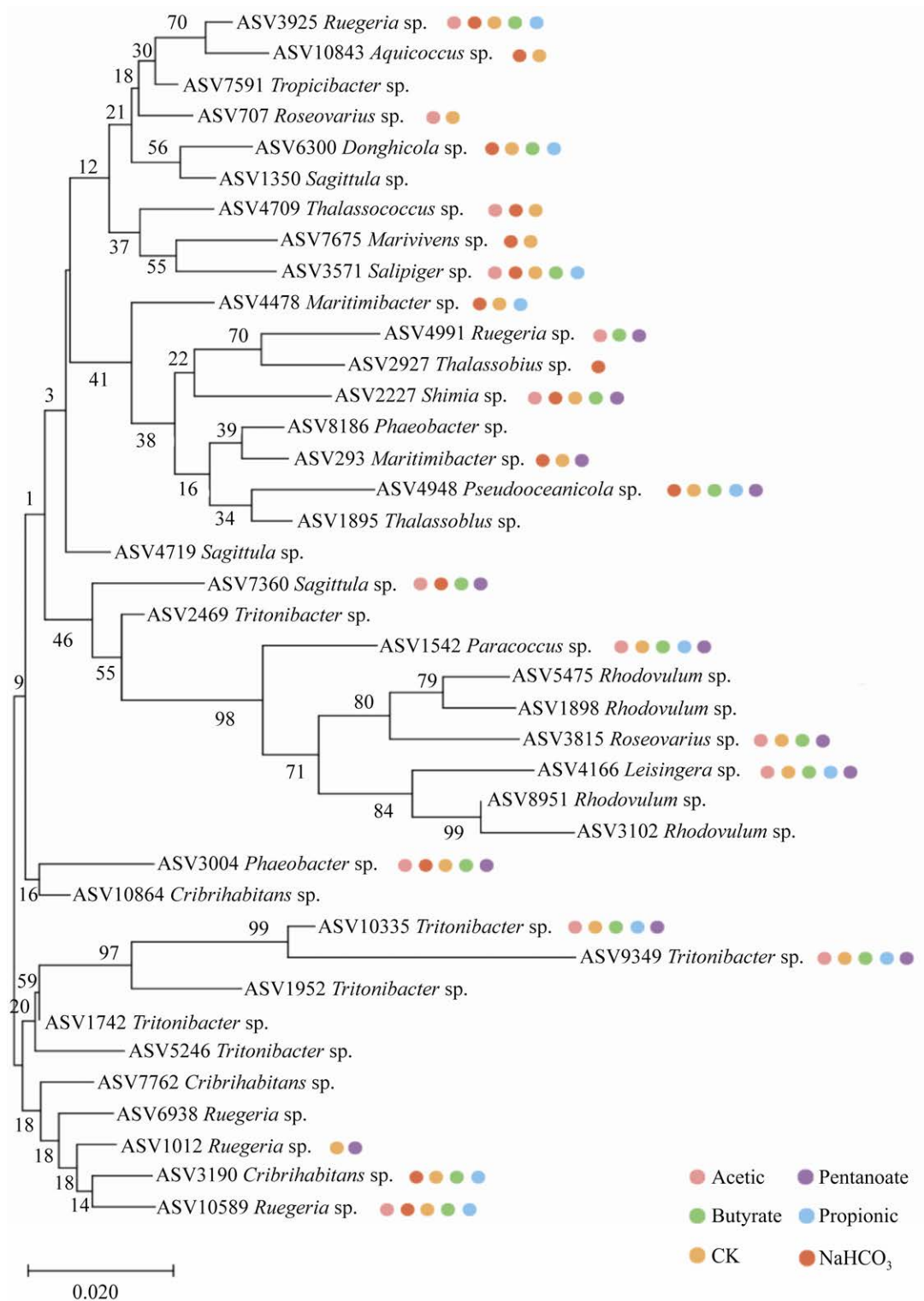


图 5 基于 neighbor-joining 法构建的富集后的优势红杆菌科细菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of dominant *Rhodobacteraceae* based on neighbor-joining method. The unmarked ones in the figure indicate that they can be enriched in six carbon sources.

皆来自于变形菌门(*Proteobacteria*)的 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*), 分别属于红杆菌科(119 株)、弧菌科(80 株)、假交替单胞菌科(*Pseudoalteromonadaceae*) (21 株)、交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*) (19 株)、海旋菌科(*Thalassospiraceae*) (18 株)、假单胞菌科(13 株)、海洋螺菌科(*Oceanospirillaceae*) (10 株)、盐单胞菌科(*Halomonadaceae*) (5 株)、莫拉菌科(*Moraxellaceae*) (2 株)、*Colwelliaceae* (2 株)和海杆菌科(*Marinobacteraceae*) (1 株) (图 6)。其

中第 5 次富集传代培养后的碳酸氢钠处理组分离到了最多数量红杆菌科细菌, 而弧菌大部分都分离于第 3 次富集传代培养后的戊酸组 (图 7)。

分离到的 119 株红杆菌科细菌分属于 6 属 7 种(2 个亚种)。属水平上, *Tritonibacter* 为主导类群(90 株), 其次为 *Phaeobacter* (25 株), 分别占有所有分离出红杆菌科细菌的 76.58%和 12.72%, 其余种类红杆菌科细菌都只分离出 1 株(图 8)。其中, 在 5 种培养基中都能分离到 *Tritonibacter* 属细菌, 而 *Ruegeria* 属细菌仅能

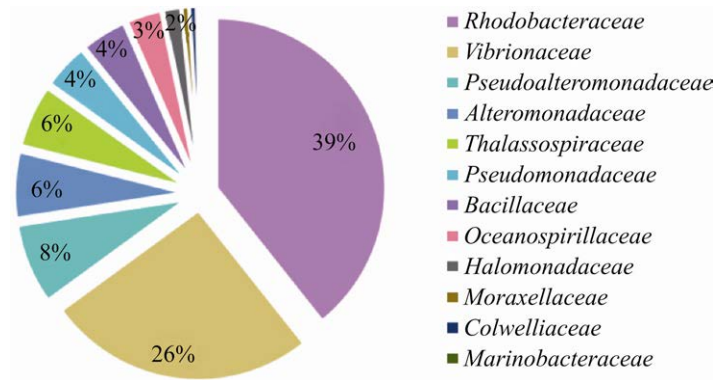


图 6 分离鉴定的细菌在科水平上的分布

Figure 6 Distribution of the isolated bacteria at the level of family.

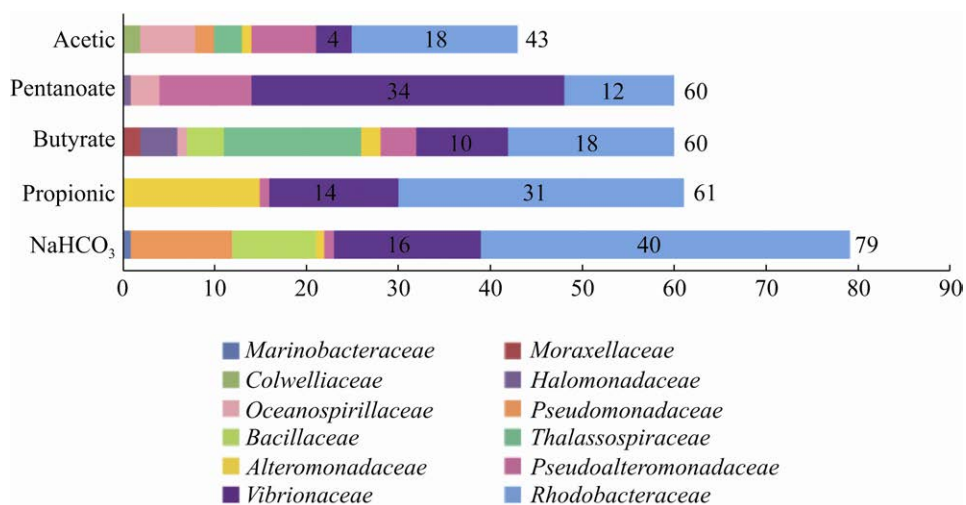


图 7 各碳源组分分离菌株数量统计

Figure 7 Statistics of the number of strains isolated from each carbon source group.

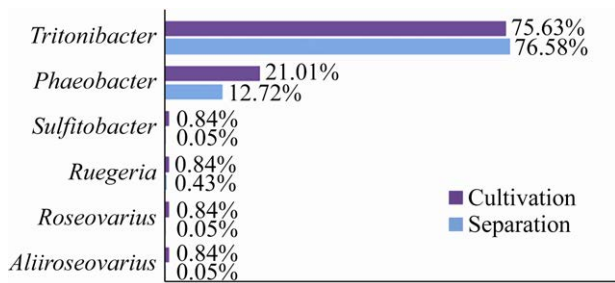


图 8 高通量测序结果和分离结果中不同属红杆菌科细菌所占比例

Figure 8 The proportion of different genera of *Rhodobacteraceae* in the results of high-throughput sequencing and isolation. Purple represents the high-throughput sequencing results after enrichment culture, and blue represents the identification results after isolation and purification.

在乙酸组分离到, 且其他属细菌都仅能从碳酸氢钠组中被分离到, 这表明碳酸氢钠处理可能有利于多种红杆菌科细菌共同生长, 前期高通量测序结果也显示富集培养后碳酸氢钠组物种多样性显著增加(表 2)。

2.4 红杆菌科细菌潜在的新种资源

一般认为分离到的可培养菌株与已知菌株的 16S rRNA 基因序列对比相似度低于 98.65%, 认为其为潜在新种^[19]。统计发现, 分离到的 119 株红杆菌科细菌中有 73 株为潜在新种, 其中 *Aliiroseovarius*、*Roseovarius* 属各 1 株, *Phaeobacter* 属 12 株, 其余均为 *Tritonibacter*

属(表 3), 表明对虾肠道细菌经碳源富集培养后有助于分离出红杆菌科细菌新种。

3 讨论

3.1 不同碳源富集培养显著改变了细菌群落的结构与组成

微生物群落组装理论通常能够帮助判定观察到的微生物群落组成特征是否是特异性因素决定的结果^[20]。研究表明, 即使简单的环境中也包含多种微生物群落, 且营养成分的改变可以在不同分类深度预测群落结构的变化^[21-24]。不同环境中的主要细菌类群对不同碳源偏好不同, 如林森等^[16]向秈稻发酵液中添加乙醇, 连续传代培养后显著提高了双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、产琥珀酸菌属(*Succinoclasticum*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)等细菌的相对丰度。本研究通过添加不同碳源对凡纳滨对虾肠道微生物进行培养, 经连续传代培养后, 结合高通量测序结果筛选对红杆菌科细菌有富集效果的碳源。

实验结果表明, 在不同碳源连续传代培养下, 各组微生物群落结构发生了显著变化。其中, 添加乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和碳酸氢钠组对红杆菌科细菌有显著富集作用, 而添加 DMSP 组主要对根瘤菌有富集作用, 亚麻酸对假单胞菌科细菌有显著富集作用, 表明乙酸、丙酸等

表 2 属水平上不同培养基中红杆菌科细菌分离情况

Table 2 Isolation of *Rhodobacteraceae* in different media at genus level

Genus	NaHCO ₃	Acetic	Propionic	Butyrate	Pentanoate	Sum
<i>Tritonibacter</i>	12	17	31	18	12	90
<i>Phaeobacter</i>	25	—	—	—	—	25
<i>Sulfitobacter</i>	1	—	—	—	—	1
<i>Ruegeria</i>	—	1	—	—	—	1
<i>Roseovarius</i>	1	—	—	—	—	1
<i>Aliiroseovarius</i>	1	—	—	—	—	1

—: not detected.

表 3 红杆菌科细菌潜在新种

Table 3 Potential new species of *Rhodobacteraceae*

Potential new species	Type strains	Corresponding to the number of isolates	16S rRNA gene similarity with model strain/%
<i>Aliiroseovarius</i> sp.	<i>Aliiroseovarius crassostreae</i> CV919-312 ^T	1	98.20
<i>Roseovarius</i> sp.	<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM ^T	1	98.24
<i>Phaeobacter</i> sp.	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> DSM 26640 ^T	1	97.29
<i>Phaeobacter</i> sp.	<i>Phaeobacter italicus</i> CECT 7645 ^T	11	98.16–98.60
<i>Tritonibacter</i> sp.	<i>Tritonibacter mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> DSM 23403 ^T	44	97.72–98.61
<i>Tritonibacter</i> sp.	<i>Tritonibacter mobilis</i> subsp. <i>pelagius</i> NBRC 102038 ^T	15	97.50–98.53

短链脂肪酸对红杆菌科细菌的生长有利。Zhang 等^[25]和郑耀通等^[26]的研究也表明，短链脂肪酸的添加有助于红杆菌科细菌的生长，并可以提升其产氢能力。此外，实验结果显示，虽然乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、碳酸氢钠处理组和对照组都对红杆菌科细菌有富集效果，但从第 3 次传代培养后乙酸和丁酸组红杆菌科细菌相对丰度基本保持稳定，而丙酸、丁酸和戊酸组的红杆菌科细菌相对丰度在第 5 次传代培养后显著降低，表明可能还需更多传代次数才能使细菌群落结构完全趋于稳定，以及可能不同碳源的添加会对群落构建趋于稳定的时间产生影响，这些需要后续实验加以验证。

3.2 碳源富集培养可提高红杆菌科细菌的分离比例

不同条件培养基中获得的微生物种类差异极大，创建出目标菌株更为喜好的生长环境将对其分离筛选有至关重要的作用^[27]。本研究发现，不同碳源处理下分离到的红杆菌科细菌差异较大，*Tritonibacter* 属细菌可以从每个碳源处理组中分离出，而 *Ruegeria* 属仅能在乙酸处理组中被分离到，其他 6 个属都仅从碳酸氢钠处理组中被分离到。这表明部分红杆菌科细菌可以适应于各种碳源条件下生长，但部分红杆菌科细菌仅能利用某种特定碳源，与

Gómez-Consarnau 等^[10]的实验结论相符。此外，在碳酸氢钠处理组分离了最多种类红杆菌科细菌，表明以碳酸氢钠为碳源可以使更多红杆菌科细菌“和谐共处”。

进一步分析发现，乙酸等短链脂肪酸组间优势红杆菌科细菌种类几乎没有差异，而丁酸组、碳酸氢钠组和对照组之间优势红杆菌科细菌种类差异很大，表明不同红杆菌科细菌对碳源的选择可能更偏好于某类相同物质。

3.3 红杆菌科细菌分离株在属水平的分布与高通量测序结果相似

对不同碳源条件下连续传代富集培养后的菌液进行高通量测序后发现，在乙酸、丙酸、丁酸和戊酸组中，红杆菌 ASV1742 皆被大量富集，碳酸氢钠组中则主要富集到了红杆菌 ASV8163。分离纯培养后测序对比发现，上述两种红杆菌科细菌皆被分离出，分别对应 *Tritonibacter* sp. 和 *Phaeobacter* sp.，且后者也仅在碳酸氢钠处理组中被分离出，说明富集培养对于红杆菌科细菌的分离有积极影响。

在属水平上对分离到的红杆菌科细菌进行分析发现，不同属红杆菌科细菌占总分离红杆菌科细菌的比例与高通量测序结果中相应属占总红杆菌科细菌的比例近乎一致，并且有大量潜在红杆菌科潜在新种被分离出来，这也进一

步说明了通过富集培养可以更好地分离目标菌株。因而可以推测在后续菌株分离纯培养实验中可以采取先添加特定生长因子富集到目标细菌再进行分离的方式, 从而减少实验中的不确定性。类似的, 杨隽娴^[28]也通过在红树植物内生菌分离培养实验中添加过氧化氢和丙酮酸钠等物质, 显著增加分离到的目标真菌数量。

本研究结合高通量测序技术和细菌的分离培养, 采用先富集再分离的方法来定向分离红杆菌科细菌。筛选出 5 种对红杆菌科细菌有富集作用的碳源, 为定向调控凡纳滨对虾肠道微生物群落构建提供指导。此外, 需传代多少次后可使细菌群落构建趋于稳定尚未可知, 以及不同碳源的添加是否会对群落构建趋于稳定的时间产生影响, 这些还需要后续重复添加对红杆菌科细菌有富集作用的碳源进行连续传代培养的实验, 并增加传代次数实验加以验证。

参考文献

- [1] Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Family I. *Rhodobacteraceae* fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2005, 2(Part C): 161.
- [2] Dogs M, Wemheuer B, Wolter L, Bergen N, Daniel R, Simon M, Brinkhoff T. *Rhodobacteraceae* on the marine brown alga *Fucus spiralis* are abundant and show physiological adaptation to an epiphytic lifestyle. *Systematic and Applied Microbiology*, 2017, 40(6): 370–382.
- [3] Simon M, Scheuner C, Meier-Kolthoff JP, Brinkhoff T, Wagner-Döbler I, Ulbrich M, Klenk HP, Schomburg D, Petersen J, Göker M. Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *The ISME Journal*, 2017, 11(6): 1483–1499.
- [4] Pujalte MJ, Lucena T, Ruvira MA, Arahal DR, Macián MC. The family *Rhodobacteraceae*. *The Prokaryotes*, 2014: 439–512.
- [5] 李亚峰, 李旭光, 单连斌, 赵勇娇, 魏春飞, 张磊, 王允妹. 不同填料对 AA-MBBR 系统处理效果及菌群多样性影响. *工业水处理*, 2019, 39(1): 73–77.
Li YF, Li XG, Shan LB, Zhao YJ, Wei CF, Zhang L, Wang YM. Influence of different fillers on the treatment effect and flora diversity of AA-MBBR systems. *Industrial Water Treatment*, 2019, 39(1): 73–77. (in Chinese)
- [6] 王思鹏. 添加蔗糖对凡纳滨对虾养殖水体及其肠道细菌群落的影响. 宁波大学学位论文, 2019.
- [7] Guo HP, Huang L, Hu ST, Chen C, Huang XL, Liu W, Wang SP, Zhu YY, Zhao YJ, Zhang DM. Effects of carbon/nitrogen ratio on growth, intestinal microbiota and metabolome of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 652.
- [8] 张哲, 杨章武, 葛辉, 杜秀萍, 卓吓晃, 许智海. 凡纳滨对虾育苗水体中三种生物絮团的菌群多样性及 tax4fun 基因功能预测分析. *水生生物学报*, 2019, 43(4): 786–796.
Zhang Z, Yang ZW, Ge H, Du XP, Zhuo XH, Xu ZH. Impacts of *Litopenaeus vannamei* on microbial diversity of three biofloc and predictive analysis of tax4fun gene function during hatchery period in water. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(4): 786–796. (in Chinese)
- [9] Allers E, Gómez-Consarnau L, Pinhassi J, Gasol JM, Šimek K, Pernthaler J. Response of *Alteromonadaceae* and *Rhodobacteriaceae* to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(10): 2417–2429.
- [10] Gómez-Consarnau L, Lindh MV, Gasol JM, Pinhassi J. Structuring of bacterioplankton communities by specific dissolved organic carbon compounds. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(9): 2361–2378.
- [11] Suman J, Zubrova A, Rojikova K, Pechar R, Svec P, Cajthaml T, Ulbrich P, Ridl J, Strnad H, Uhlik O. *Pseudogemmobacter bohemicus* gen. nov., sp. nov., a novel taxon from the *Rhodobacteraceae* family isolated from heavy-metal-contaminated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(8): 2401–2407.
- [12] Martens T, Gram L, Grossart HP, Kessler D, Müller R, Simon M, Wenzel SC, Brinkhoff T. Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microbial Ecology*, 2007, 54(1): 31–42.
- [13] Curson ARJ, Liu J, Bermejo Martínez A, Green RT, Chan Y, Carrión O, Williams BT, Zhang SH, Yang GP, Bulman Page PC, Zhang XH, Todd JD. Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17009.

- [14] He PJ, Han WH, Shao LM, Lü F. One-step production of C6–C8 carboxylates by mixed culture solely grown on CO. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 4.
- [15] Mu DS, Liang QY, Wang XM, Lu DC, Shi MJ, Chen GJ, Du ZJ. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing. *Microbiome*, 2018, 6(1): 230.
- [16] 林森, 王阔鹏, 陈映良, 孙文婧, 封丽梅, 胡梓轩. 乙醇对瘤胃液接种稻秸的体外发酵产物及细菌群落结构的影响. *生物技术通报*, 2020, 36(2): 91–99. Lin M, Wang KP, Chen YL, Sun WJ, Feng LM, Hu ZX. Effects of ethanol on metabolites and bacterial community of rice straw cocultured with rumen fluid *in vitro*. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(2): 91–99. (in Chinese)
- [17] Li M, Gong JH, Cottrill M, Yu H, De Lange C, Burton J, Topp E. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54(1): 13–20.
- [18] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 2016, 13 (7): 581–583.
- [19] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351.
- [20] Graham NAJ, Jennings S, MacNeil MA, Mouillot D, Wilson SK. Predicting climate-driven regime shifts versus rebound potential in coral reefs. *Nature*, 2015, 518(7537): 94–97.
- [21] David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, 505(7484): 559–563.
- [22] Louca S, Jacques SMS, Pires APF, Leal JS, Srivastava DS, Parfrey LW, Farjalla VF, Doebeli M. High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. *Nature Ecology & Evolution*, 2016, 1(1): 15.
- [23] Goldford JE, Lu NX, Bajić D, Estrela S, Tikhonov M, Sanchez-Gorostiaga A, Segrè D, Mehta P, Sanchez A. Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science*, 2018, 361(6401): 469–474.
- [24] Martiny AC, Tai APK, Veneziano D, Primeau F, Chisholm SW. Taxonomic resolution, ecotypes and the biogeography of *Prochlorococcus*. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(4): 823–832.
- [25] Zhang Y, Hu J, Ma HY, Yang HH, Guo LJ. Overexpressing *atpXF* enhanced photo-fermentative hydrogen production performance of *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, 42(15): 9641–9649.
- [26] 郑耀通, 高树芳. 耐氨光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* G_{2B} 处理有机废水产氢性能研究. *武夷科学*, 2003, 19(0): 10–15. Zheng YT, Gao SF. Studied on the characters of hydrogen production by endure ammonia photosynthetic *Rhodobacter sphaeroides* G_{2B} with organic wastewater. *Wuyi Science Journal*, 2003, 19(0): 10–15. (in Chinese)
- [27] Sørheim R, Torsvik VL, Goksøyr J. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. *Microbial Ecology*, 1989, 17(2): 181–192.
- [28] 杨隽嫻. 潮间带植物生境药用微生物的获得与鉴定. 青岛科技大学硕士学位论文, 2008.

(本文责编 李磊)