



## 利用改良培养基探究西太平洋海水可培养细菌多样性

孙创<sup>1</sup>, 王金燕<sup>1,2</sup>, 张钰琳<sup>1</sup>, 张蕴慧<sup>1</sup>, 朱晓雨<sup>1</sup>, 陈朝晖<sup>3,4</sup>, 张晓华<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003

<sup>2</sup> 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071

<sup>3</sup> 中国海洋大学深海圈层与地球系统前沿科学中心, 山东 青岛 266100

<sup>4</sup> 中国海洋大学物理海洋教育部重点实验室, 山东 青岛 266100

**摘要:** 【目的】西太平洋复杂的海洋生态环境孕育了其独特的生物群落, 蕴含着种类丰富的海洋微生物资源。本研究基于分离培养技术探究了西太平洋海域不同水深细菌的多样性, 并尝试通过改良培养基提高海洋细菌可培养性。【方法】采用改良的2216E固体培养基(IMA)、R2A固体培养基(R2A)、MBM固体培养基(MBM)、TCBS固体培养基(TCBS)和改良的2216E液体富集培养基(IMB) 5种不同培养基进行微生物培养, 通过菌株分离纯化、16S rRNA基因序列鉴定, 分析西太平洋表层至6000 m水深可培养细菌的多样性以及不同培养基在分离培养异养细菌方面的优势。【结果】本研究共获得1293株异养细菌, 分属于4门7纲14目26科52属119种, 其中变形菌门(*Proteobacteria*)为主导类群。纲水平上,  $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、 $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和放线菌纲(*Actinobacteria\_c*)为优势菌群。5种培养基所获得的最优势门都为变形菌门, 最优势纲都为 $\gamma$ -变形菌纲, 除TCBS培养基优势目是弧菌目(*Vibrionales*), 最优势目都为交替单胞菌目(*Alteromonadales*)。此外, 5种培养基在各分类水平上均体现出不同的选择性。5种培养基在种水平上可培养细菌多样性由高到低依次为R2A、IMA、MBM、TCBS以及IMB。分离自R2A的特有属数目最多, 可达10个。随水深增加, 可培养异养微生物属的数量呈减少趋势。分得菌株中共有68株为潜在新菌, 新菌率在IMA、R2A和MBM中相对较高。【结论】本研究用5种不同培养基从西太平洋海水中获得大量可培养细菌, 具有较高的多样性, 同时揭示了不同培养基对可培养海洋细菌的选择性。本研究为进一步的生态学研究 and 分子生物学研究等提供了宝贵的种质资源, 也为未来利用改良培养基分离难培养海洋微生物带来启发。

**关键词:** 西太平洋, 细菌多样性, 16S rRNA 基因, 改良培养基

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(202072003); 国家重点研发计划(2018YFE0124100, 2016YFA0601303); 山东省重大科技创新工程专项(2018SDKJ0105-1)

\*通信作者。Tel: +86-532-82032767; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-11-06; 修回日期: 2021-01-28; 网络出版日期: 2021-02-14

西太平洋海洋环境复杂, 有独特的沟弧盆构造和弧后盆地热液系统, 存在着海底板块运动的遗迹和众多海山生态系统, 更是“大洋传送带”冷暖水系的转换区<sup>[1]</sup>, 因此, 这一特殊区域可能存在着丰富的海洋微生物类群。目前对西太平洋可培养细菌的群落结构及功能研究较少, 其潜在的种质资源仍有待发掘。

海洋微生物在地球能量流动和物质循环中扮演了重要角色, 有物质和能量储存者的作用, 更是新型生物活性物质的潜在载体<sup>[2-3]</sup>。开展海洋微生物多样性的研究将有助于了解微生物的生态功能, 开发和利用微生物资源。近年来, 宏基因组学、扩增子、单细胞测序等测序技术的快速发展, 使得我们能够对环境中的不可培养微生物进行基因水平上的物种分类和代谢功能分析。尽管这些方法从环境中发现了很多新的微生物类群, 但这些方法无法获取这些新型微生物的活体细胞, 致使无法准确了解其外在形态、生理代谢特性、生态功能等。且如果缺乏基本的生理学实验数据支撑, 分子生物学方法产生的数据仍难以解释。

纯培养技术一直是研究微生物的有力手段, 对我们研究微生物的生物生理学, 正确理解它们的生态作用至关重要。然而迄今为止, 依靠传统纯培养方法海洋环境中微生物的可培养率仅为 0.001%–0.100%<sup>[4]</sup>。可培养率低的主要原因包括实验室纯培养破坏了微生物间的互作关系、原位海洋环境难以复现<sup>[5]</sup>、培养基质富营养化<sup>[6]</sup>以及生长过缓的细菌易被忽视等<sup>[7]</sup>。此外, 绝大多数微生物细胞当受到外界环境胁迫时会进入休眠状态, 即活的非可培养状态(viable but nonculturable state, VBNC)<sup>[8]</sup>, 从而无法被分离得到。因此, 改进传统培养基或设计新型培养基是突破现纯培养技

术局限性的迫切需求。

近年来, 许多学者通过改变培养基营养配方以及改进细胞培养方式, 显著提高了环境中可培养微生物的多样性, 并获得了更多微生物新类群。岳秀娟等<sup>[9]</sup>在培养基中加入甜菜碱、丙酮酸钠或过氧化氢酶等化合物, 使从土壤中分离到的微生物种类及菌落总数明显增加。Nikki 等<sup>[10]</sup>将改良后的厌氧培养基进行稀释, 从反刍动物的胃里分离培养出 14 个潜在新属 27 株细菌。Nichols 等<sup>[11]</sup>通过在普通培养基中添加五氨基酸的短肽 LQPEV 从海洋砂坪中分离得到了 MSC33 类型的未培养细菌。Connon 等<sup>[12]</sup>采用高通量培养法对贫营养细菌进行培养和计数, 使微生物可培养性较常规培养法高出 1.4–120.0 倍, 并从海水分离到多株未培养的浮游细菌。近期有研究发现, 改变培养基灭菌方式也会影响细菌分离效果, 刘阳等<sup>[13]</sup>通过过滤除菌培养基分离获得的细菌的多样性、均匀性和新颖性均高于使用高压灭菌培养基。这些研究为今后合理设计培养条件以丰富环境可培养细菌的多样性提供了方法借鉴。此外, 向普通培养基中添加特定底物有助于分离具有特殊代谢功能的细菌类群, 例如为了获得在硫循环及气候调节过程中的扮演重要角色的二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP) 合成细菌, Williams 等<sup>[14]</sup>将 DMSP 合成途径的中间产物加入到 MBM 基础培养基中, 从而增加了盐沼沉积物中 DMSP 的产量并实现富集 DMSP 合成细菌类群的目的。

为获得更多可培养微生物, 取得高效的培养结果, 本研究采用 5 种不同营养成分的培养基, 分析了不同培养基条件下西太平洋可培养微生物的多样性。这一结果将为充分利用各培养基的

优势, 通过优化多培养基组合提高环境微生物的可培养性提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 西太平洋海水样品采集

本研究的海水样品于 2019 年 11 月搭乘中国海洋大学“东方红 3”综合科学考察船采集自西北太平洋黑潮延伸体海区。采用 Niskin 瓶对 P1-19-1、P1-19-5、P1-19-9、P1-19-13、P1-19-21 和 P1-19-25, 6 个站位进行全水深(5–6050 m)采样(图 1)。

### 1.2 海水样品处理与培养基

在船上获得各水层海水样品后, 现场立即将样品分别接种于五种培养基中, 即改良的 2216E 固体培养基(Improved MA, 简称 IMA)<sup>[15]</sup>、R2A 固体培养基(简称 R2A)<sup>[16]</sup>、MBM 固体培养基(简称 MBM)<sup>[14]</sup>、TCBS 固体培养基(硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基, 简称 TCBS)<sup>[16]</sup>和改良的 2216E 液体富集培养基(Improved MB, 简称 IMB)<sup>[15]</sup>。各培养基配方详情如下。

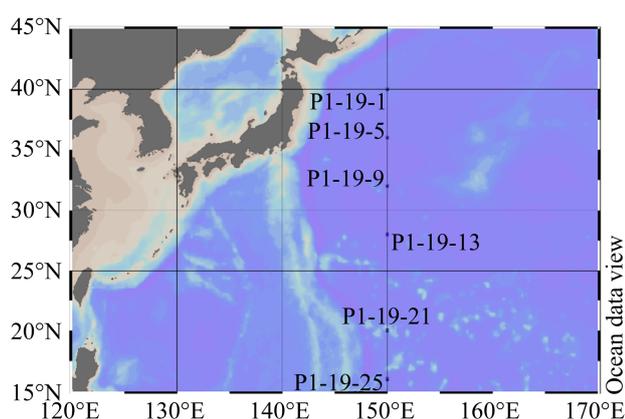


图 1. 西太平洋采样站位分布

Figure 1. Distribution of sampling stations in the Western Pacific.

2216E 培养基配方为: 蛋白胨 5 g, 酵母提取物 1 g,  $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 海水 1 L, pH 调至 7.6。IMA/IMB 培养基配方为:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 酵母提取物 0.2 g, 蛋白胨 0.2 g,  $\text{EDTA-Na}_2$  1.0 g,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$  1.1 g, 海水 1 L, 10 mL 2% (W/V)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mL 10% (W/V)  $\text{NaHCO}_3$ , pH 调至 7.5, 若配制固体培养基, 则再加入 20 g 琼脂。R2A 配方为: 葡萄糖 0.5 g, R2A 专用蛋白胨 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 酵母提取物 0.5 g, 丙酮酸钠 0.3 g, 酸水解酪素 0.5 g, 海水 750 mL, 蒸馏水 250 mL, pH 调至 7.5, 若配制固体培养基则加入琼脂 20 g。MBM 配方为: MBM Basal 溶液① 250 mL, 海盐 35 g, 1 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  贮存液 10 mL, 50 mg/mL FeEDTA 贮存液 50 mL, 蒸馏水 680 mL, 琼脂 20 g, 1 mL 混合维生素贮存液②, 10 mL 混合碳源贮存液③, 最后加入 L-甲硫氨酸(用于 DMSP 合成菌筛选)或终浓度为 0.5 mmol/L DMSP (DMSP 降解菌筛选)终浓度为 1 mmol/L。其中①②③的主要成分及贮存方法如下: ① MBM Basal 溶液主要成分为: 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 150 mL,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  87 mg, 375 mL 蒸馏水, 配置成 525 mL MBM Basal 溶液贮存液, 121 °C 高温高压灭菌 20 min 后, 室温贮存。②混合维生素贮存液: 生物素 20 mg, 叶酸 20 mg, 盐酸吡哆醇 100 mg, 二水合盐酸硫胺素 50 mg, 核黄素 50 mg, 烟酸 50 mg, D-泛酸钙 50 mg, 氰钴胺素 1 mg, 对氨基苯甲酸 50 mg, 硫辛酸 50 mg, 溶于 1 L 蒸馏水, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌并分装, 4 °C 贮存。③混合碳源贮存液: 六水合琥珀酸钠 54 g, 葡萄糖 36.3 g, 蔗糖 68.4 g, 丙酮酸钠 22 g, 丙三醇 14.6 mL, 985.4 mL 蒸馏水, 调节 pH 至 7.5, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌

并分装, 4 °C 贮存。TCBS 配方为: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 硫代硫酸钠 10 g, 柠檬酸钠 10 g, 牛胆汁盐 8 g, 蔗糖 20 g, 氯化钠 10 g, 柠檬酸铁 1 g, 溴麝香草酚兰 0.04 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 调至 8.6。

其中, IMA、R2A、MBM 和 TCBS 培养基的海水涂布量为 200  $\mu$ L; 而 IMB 培养基则按海水: 培养基=1:100 的比例进行接种。每个深度用到的培养基各设置 2 个平行。所有培养基均置于 10 °C 恒温培养箱进行培养。

在所选择的 5 种培养基中, R2A 是广泛应用于异养微生物培养的寡营养培养基, 其中可溶性淀粉能够吸附细菌有毒的代谢副产物, 丙酮酸钠的抗氧化作用, 有利于受损微生物的修复。MBM 是一种基础性海洋细菌培养基, 各营养物质成分较为明确, 本次研究为富集 DMSP 合成和降解菌株, 分别向 MBM 基础培养基中添加一定浓度 L-甲硫氨酸和 DMSP。TCBS 是一种专门用来分离培养弧菌的培养基, 其高浓度的氯化钠可刺激弧菌的生长, 而胆酸钠、牛胆粉、硫代硫酸钠和柠檬酸钠及较高的 pH 可抑制革兰氏阳性菌和大肠杆菌等的生长。IMA 和 IMB 是将分离培养海洋细菌常用的 2216E 培养基中的主要营养物质, 酵母提取物和蛋白胨分别稀释了 5 倍和 25 倍, 同时添加丙酮酸钠和乙酸钠等细菌复苏诱导因子。

### 1.3 菌株的分离纯化

由于本研究中各培养基分离得到的菌株均来源于海水样品, 为了简化实验过程, 对于在 IMA、R2A、MBM 和 TCBS 培养基平板上生长的细菌, 挑取不同形态单菌落后, 于最常用的海洋微生物培养基 2216E 平板上进行划线分离纯化。对于 IMB 培养基样品, 将 1 mL 初步富集的样品

与 9 mL IMB 培养基加入 15 mL 离心管中, 28 °C 摇床中恒温培养。每隔一周左右转接 1 mL 至新的 9 mL IMB 培养基中。对于经过多轮转接的样品, 使用灭菌生理盐水, 将样品梯度稀释至  $10^{-5}$  倍, 涂布于 IMA 培养基平板上。待生长出菌落后, 从培养基上挑取不同形态单菌落, 于 2216E 培养基平板上进行划线分离纯化。所有纯化的菌株均用 15% 甘油保藏液于 -80 °C 保藏。

### 1.4 菌株的物种鉴定

对于纯化获得的菌株的物种鉴定。以菌株 DNA 为模板对 16S rRNA 基因序列进行体外扩增。PCR 引物使用细菌 16S rRNA 基因序列的通用引物 B8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 B1510R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 Chromas 软件对单端测序所获得的菌株的 16S rRNA 基因序列进行分析, 去除质量不佳的测序碱基后, 将获得的有效序列(约 650 bp)提交至 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行在线 BLAST 比对, 比对结果若相似度大于 98.65%, 则认为该菌株与其最相近菌株是同种; 若相似度小于等于 98.65%, 则认为该菌株为疑似新菌<sup>[17]</sup>。

### 1.5 菌株的系统发育分析

基于上一步 EzBioCloud 和 NCBI 数据库比对结果, 下载数据库中与分离菌株最相似的标准菌 16S rRNA 序列, 将所有分离菌株及其最相近标准菌的 16S rRNA 序列整合到一个 fasta 文件中用于后续的进化分析。建树流程: 首先使用 MAFFT 在线服务 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 进行多序列比对<sup>[18]</sup>, 再者, 对对比后的序列用

Gblocks 在线服务 ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html))截齐<sup>[19]</sup>, 最后通过 IQtree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>)构建最大似然法(Maximum Likelihood)系统进化树<sup>[20]</sup>。

## 1.6 菌株核苷酸序列登录号

在分得的 1293 株异养细菌中, 将选取非重复的 118 株细菌的 16S rRNA 基因序列保存在 GenBank 数据库中, 登录号为 MW198071–MW198188。

## 2 结果和分析

### 2.1 西太平洋可培养异养细菌的多样性

本研究共分离纯化可培养细菌 1293 株, 其中 181 株分离自 IMA, 354 株分离自 R2A, 398 株分离自 MBM, 159 株分离自 TCBS, 201 株分离自 IMB。经 16S rRNA 基因测序鉴定以及系统发育分析, 这 1293 株菌分属于 4 门 7 纲 14 目 26 科 52 属 119 种。门水平上(图 2-A), 变形菌门(*Proteobacteria*)为主导类群(1177 株), 其次是放线

菌门(*Actinobacteria*) (46 株)、厚壁菌门(*Firmicutes*) (43 株)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*) (27 株)。纲水平上(图 2-B)、 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、 $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、放线菌纲(*Actinobacteria*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)和黄杆菌纲(*Flavobacteriia*)是丰度最高的 5 个纲, 分别为 941、232、44、43 和 27 株, 分别占总分菌的 72.8%、17.9%、3.4%、3.3%和 2.1%。而其他两个纲 *Actinomycetia* 和  $\beta$  变形菌纲(*Betaproteobacteria*) 丰度较低, 仅获得 2–4 株。同时,  $\alpha$ -变形菌纲共包含 21 个属,  $\gamma$ -变形菌纲包含 14 个属, 放线菌纲包含 5 个属, 芽孢杆菌纲包含 7 个属, 黄杆菌纲包含 4 个属, 而其他的两个纲仅包含 1 个属。

属水平上(图 2-C), 属于  $\gamma$ -变形菌纲的假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)为主导优势属, 共计 282 株, 分属于 9 个种, 占总分菌数量的 21.9%;  $\gamma$ -变形菌纲的交替单胞菌(*Alteromonas*)为第二优势属, 共计 271 株, 分属于 9 个种, 占总分菌的 20.9%; 而弧菌属(*Vibrio*)、海杆菌属(*Marinobacter*)和赤杆菌属(*Erythrobacter*)也具有较高丰度, 分别包括 136、

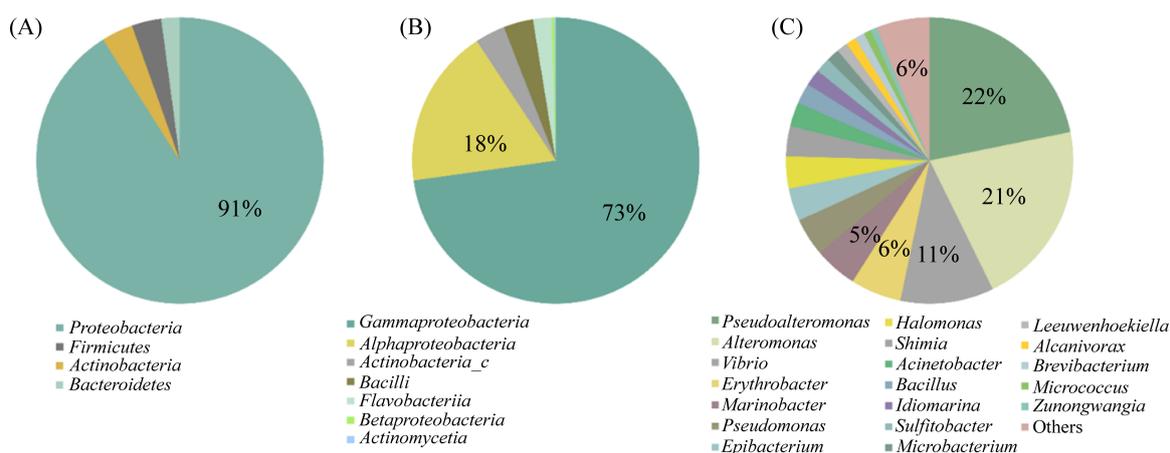


图 2. 西太平洋可培养细菌群落组成

Figure 2. The Community composition of culturable bacteria from the Western Pacific at phylum level (A), class level (B) and genus level (C) (Top 19 dominant genera).

62 株和 74 株, 分属于 10 个种、6 个种和 5 个种。而有部分属, 如德沃斯氏菌属(*Devosia*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、默里特氏菌属(*Microcella*)、诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、

*Chachezhania*、*Exiguobacterium*、*Henriciella*、*Hyphomonas*、*Gramella*、*Muricauda*、*Paralkalibacillus*、*Salinicoccus* 等属, 仅分离获得 1 株。以上结果表明, 西太平洋可培养微生物具有丰富的多样性(图 3, 4)。

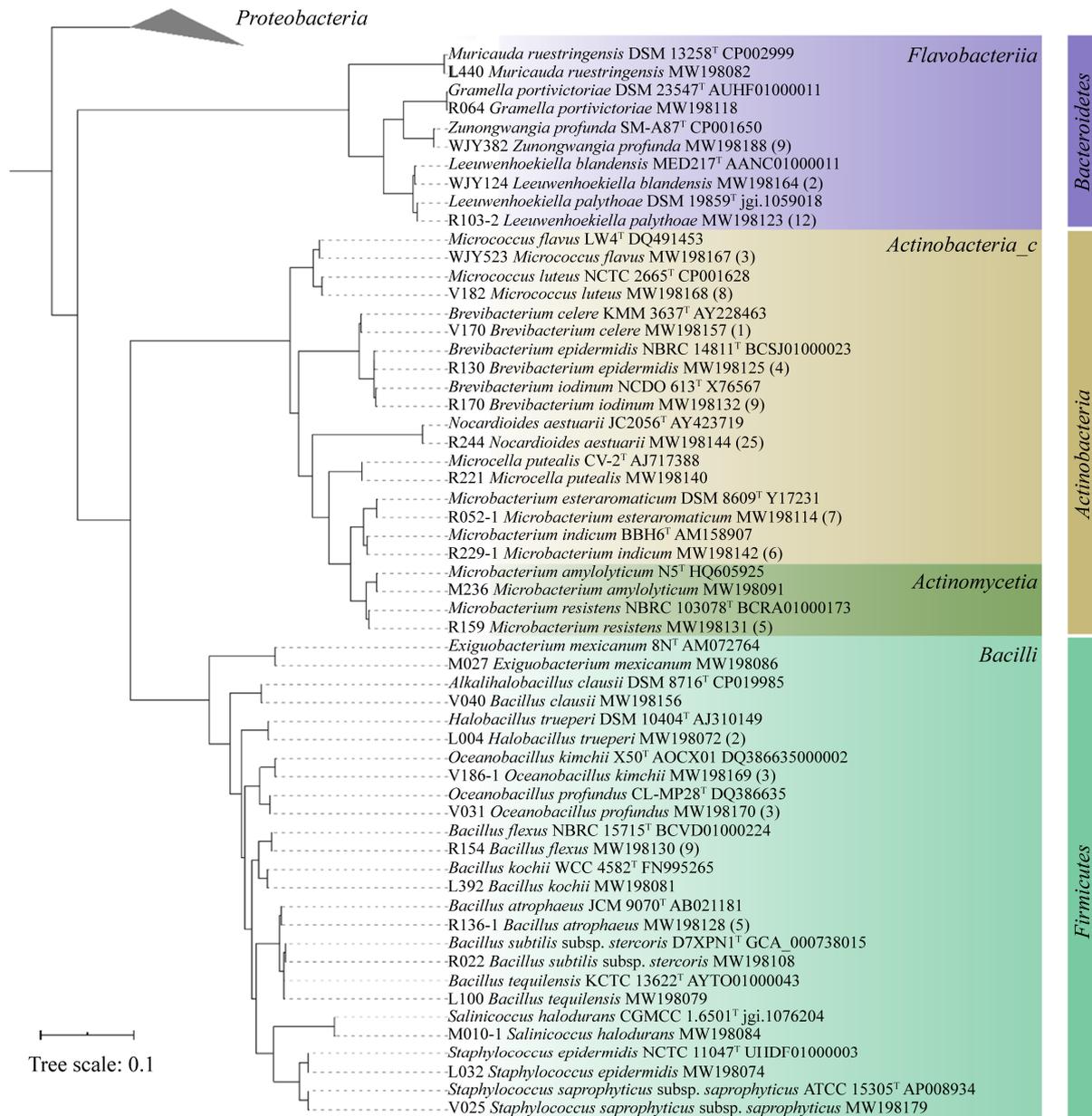


图 3. 基于 16S rRNA 基因序列构建西太平洋可培养微生物系统发育树

Figure 3. Neighbor-joining phylogenetic tree of representative cultivated bacteria isolated from the Western Pacific based on 16S rRNA gene sequences and the effective sequence length was 524 bp; the numbers inside brackets represents the amount of strains within the same species; bar, number of substitutions per site.

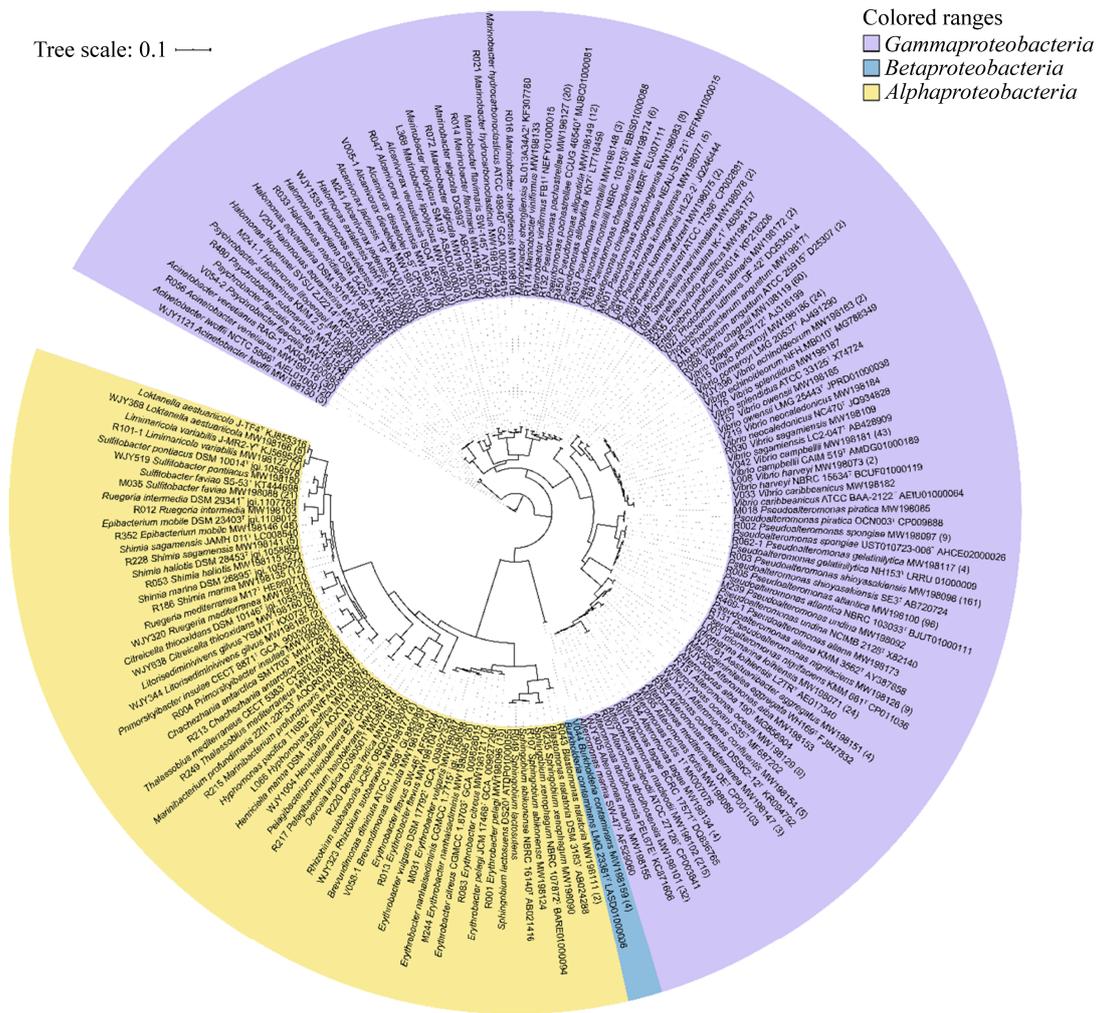


图 4. 变形菌门之间系统发育树

Figure 4. Neighbor-joining phylogenetic tree of members of *Proteobacteria*. The effective sequence length was 526 bp; bar, number of substitutions per site.

### 2.2 西太平洋不同水深可培养微生物的群落组成

在所有水层中,  $\gamma$ -变形菌纲和  $\alpha$ -变形菌纲均是占主导优势的纲(图 5-A), 各水层的相对丰度分别能够达到 55.5%–100%和 0%–26.8%。芽孢杆菌纲在浅层深层水体均有分布, 在 5500 m 相对丰度最高(33.3%), 黄杆菌纲分布在 5–5000 m 深度, 且在 55 m 和 215 m 相对丰度较高(7.3% 和 7.9%)。在属水平上(图 5-B), 假交替单胞菌属几乎分布于整个水柱, 且在各水层分布差异较小, 在 4000 m 处具有最高相对丰度(41.8%)。

第二优势属为交替单胞菌属, 在 215 m 深处相对丰度最高(52.6%)。弧菌属为第三优势属, 在 25 m 和 5750 m 水深相对丰度最高。赤杆菌属相对丰度在 4000 m 以浅水层中比 5000 m 以深水层高, 而海杆菌属则与其相反, 相对丰度在 5000–6050 m 更高。

我们将水体按海洋上层/真光层(从海面到水下 200 m)、海洋中层(水层深度为水下 200–1000 m)、海洋深层(水深 1000–4000 m)和深渊层(水深 4000–6000 m)划分, 以进一步比较不同水深细菌在属水平上的差异(图 6)。结果表明, 全水深共有

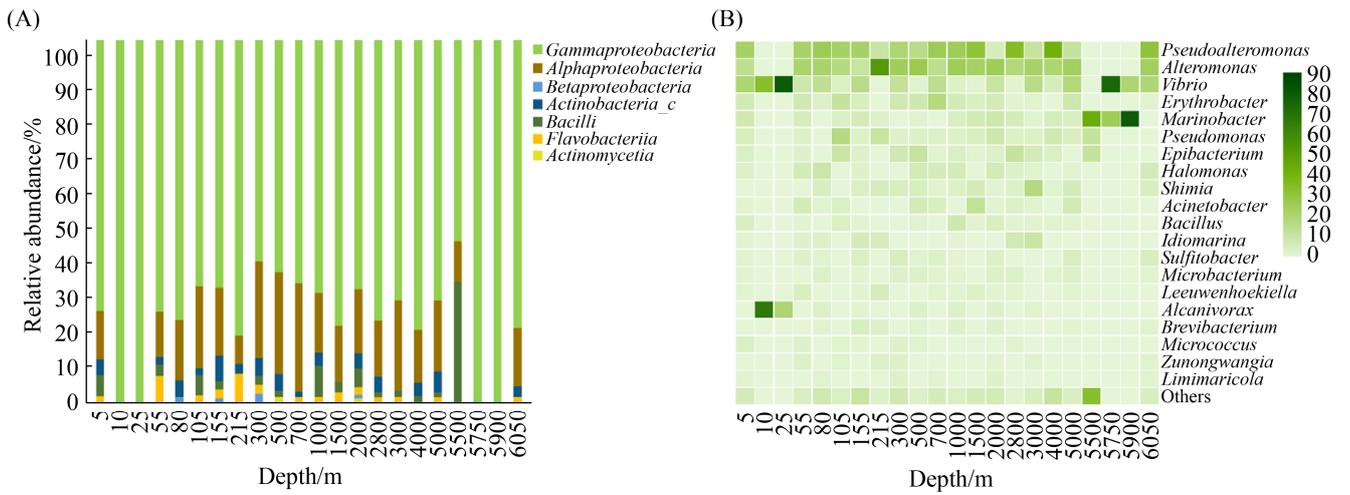


图 5. 不同水层可培养微生物多样性

Figure 5. The diversity of cultivable bacteria isolated from different water layers at class level (A) and genus level (B) (Top 20 dominant genera).

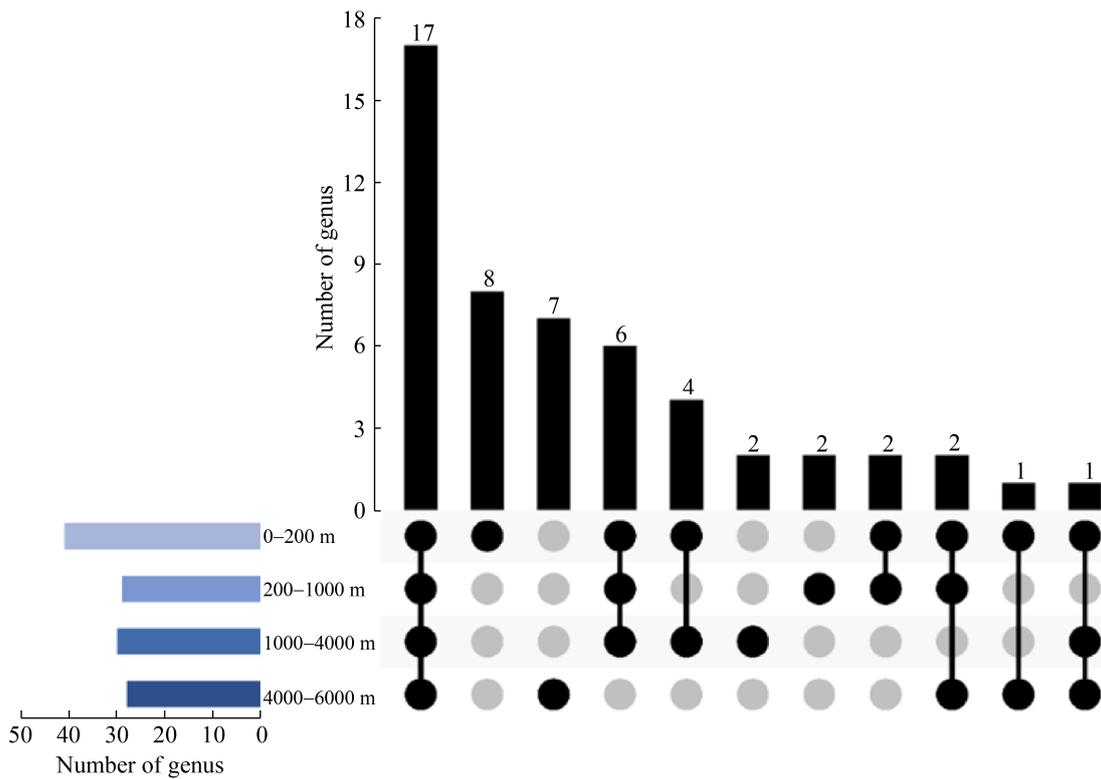


图 6. 不同水层分离获得的属的数量(左边柱状图)和不同水深特有及共有的属的数量(右边 Upset 图)

Figure 6. The number of genera separated in different water depths (bar chart on the left) and the number of genera unique to and shared in different water depths (graph on the right).

的属有 17 个, 大部分属于变形菌门, 占 32.7%。真光层特有的属数量最多, 为 8 个, 其中芽单胞菌属(*Blastomonas*)为光异养细菌。值得一提的是, 在深渊层, 特有属有 7 个, 数量仅次于真光层。就整体而言, 随水深增加可培养异养微生物多样性呈现降低趋势, 由真光层的 41 个属递减到深渊层的 28 个属。

### 2.3 不同培养基分离到的微生物多样性比较

本研究所使用的 5 种培养基所获得的最优势门都为变形菌门, 最优势纲都为  $\gamma$ -变形菌纲, 除 TCBS 优势目是弧菌目(*Vibrionales*)以外, 其他

4 种培养基最优势目都为交替单胞菌目(*Alteromonadales*)。在门水平和纲水平上, IMB 对厚壁菌门和芽孢杆菌纲呈现更好选择性, TCBS 对放线菌门和放线菌纲呈现更好选择性, 而拟杆菌门中的黄杆菌纲主要分离自寡营养的 MBM。此外  $\beta$ -变形菌纲仅从 TCBS 上分离得到 4 株。IMA 与 R2A 分得的细菌多样性在门水平和纲水平上呈现较为一致的趋势(图 7-A、B)。

在种水平上, 5 种培养基分得的细菌多样性由高到低依次为 R2A (56 个种)、IMA (45 个种)、MBM (42 个种)、TCBS (31 个种)、IMB (28 个种) (图 7-C)。

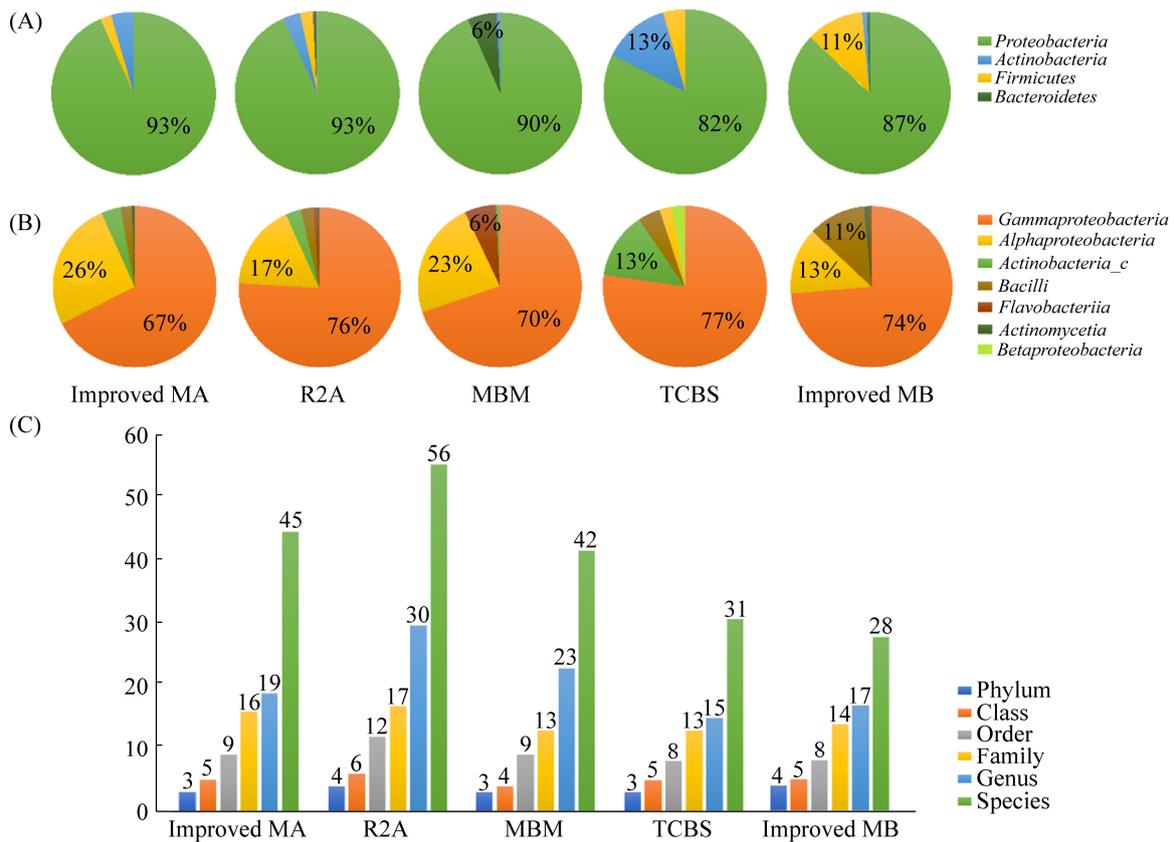


图 7. 不同培养基分离可培养细菌群落结构及在不同分类水平上的多样性

Figure 7. The community composition of cultivable bacteria on different culture media at phylum level (A), class level (B) and the diversity of bacteria cultured in different media at different taxonomic levels (C).

通过比较不同培养基中的可培养细菌多样性,我们发现 IMB 与 TCBS 分得的属的多样性明显不同其他 3 种,且分到的属的数量较少,分别为 17 和 15 个属(图 8-A)。IMB 分得最多的是海杆菌属(20.3%)和弧菌属(19.9%)。同时,海杆菌属、弧菌属、附小杆菌属(*Epibacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Halobacillus*)在 IMB 中的相对丰度与这些属在其他 4 种培养基中的相对丰度存在 7% 以上的差异。TCBS 分得的弧菌属细菌最多,分属于 8 个种。其次是盐单胞菌属,分属于 2 个种。其余 3 种培养基分得的前

三大优势属较为一致,分别是假单胞菌属、交替单胞菌属和赤杆菌属。

在 5 种培养基中均可以分得的有 3 个属,分别为附小杆菌属、假单胞菌属和弧菌属,均属于变形菌门,占有属的 5%。不同培养基体现出对某些特殊类群细菌的选择性,每种培养基均能分得其他培养基培养不出的特殊菌(图 8-B)。其中仅能在 R2A 分得的属数量最多,为 10 个,占总属数量的 19.2%。仅在 MBM 里分得的属有 6 个,占总属的 11.3%。仅在 TCBS 及 IMB 分得的属各有 4 个。仅在 IMA 分得的属有 2 个(表 1)。

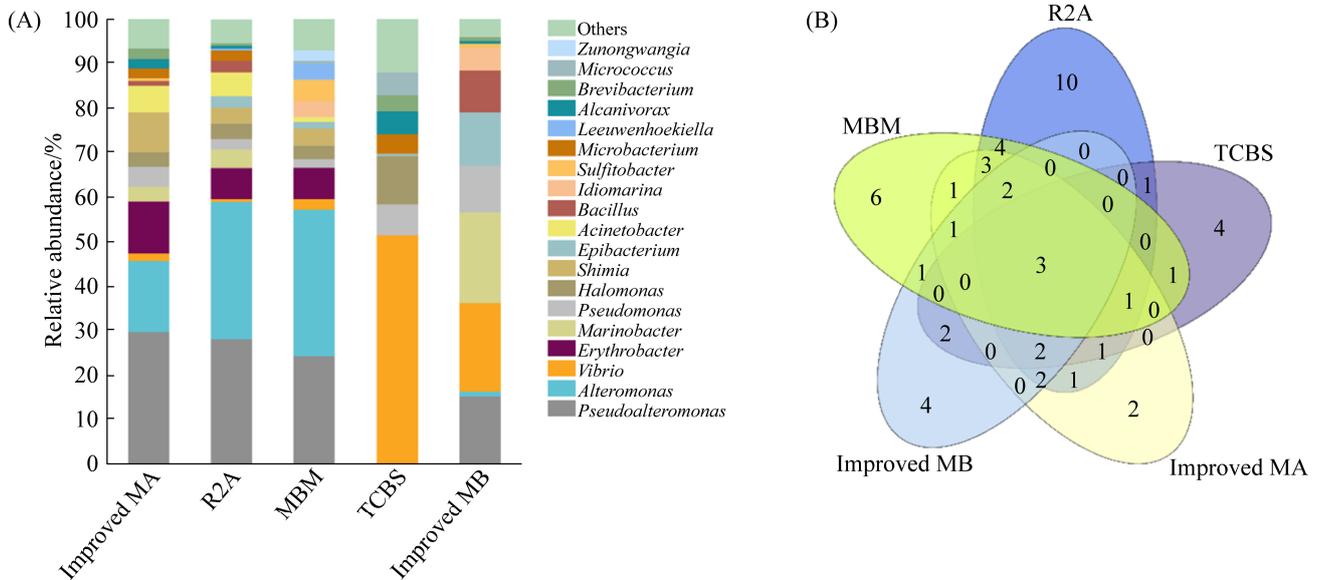


图 8. 不同培养基分离可培养微生物属水平群落结构(A)及属水平数目韦恩图(B)

Figure 8. The community composition of cultivable bacteria (A) and Venn diagram of the number of bacterial genera (B) on different culture media.

表 1. 可培养细菌在不同培养基中特有的属

Table 1. Particular genera of culturable bacteria in different media

Medium type	The unique genus isolated from each medium
R2A	<i>Chachezhania</i> , <i>Marinibacterium</i> , <i>Primorskyibacter</i> , <i>Devosia</i> , <i>Microcella</i> , <i>Pelagibacterium</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Blastomonas</i> , <i>Enterovibrio</i> , <i>Gramella</i>
IMA	<i>Exiguobacterium</i> , <i>Salinicoccus</i>
IMB	<i>Halobacillus</i> , <i>Hyphomonas</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Muricauda</i>
TCBS	<i>Paralkalibacillus</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Photobacterium</i>
MBM	<i>Gramella</i> , <i>Henriciella</i> , <i>Litorisediminivivens</i> , <i>Loktanella</i> , <i>Zunongwangia</i> , <i>Citreicella</i> , <i>Rhizobium</i>

## 2.4 添加不同底物的 MBM 对 DMSP 合成及降解菌的富集

本研究在 MBM 培养基分得 398 株菌, 分属于 9 目 13 科 23 属 42 种。其中柠檬胞菌属(*Citricella*)、鲁杰氏菌属、*Thalassobius* 属、*Rhizobiales* 目和交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)中有菌株已被报道有 DMSP 合成能力<sup>[14]</sup>。盐单胞菌、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和亚硫酸盐杆菌属(*Sulfitobacter*)中分别有菌株被报道有 DMSP 降解能力<sup>[21]</sup>, 并已鉴定得到其相关功能的关键基因。此外, 盐单胞菌属、短杆菌属(*Brevibacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)和赤杆菌属的一些菌株在先前研究中发现有不同程度的 DMSP 合成或降解能力, 但未在其中检测到已知的被验证功能的合成或降解基因的同源序列<sup>[22]</sup>, 因此, 此次获得的纯培养菌株将是进一步探究其是否具有新型 DMSP 合成或降解基因的得力资源。

添加了不同底物的 2 种 MBM 培养基, 在门和纲水平 2 种培养基都具有几乎相同的选择能力, 在属水平上, 两种培养基共有的属有 16 个, 添加了 DMSP 底物的 MBM 特有的属有 5 个, 其中鲁杰氏菌属中的 *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 菌株和根瘤菌属中的 *Rhizobium* sp. NGR234 菌株已被报道有 DMSP 降解能力, 其余则可能为潜在的新型 DMSP 降解菌。添加 L-甲硫氨酸底物的 MBM 分得特有属 2 个(*Henriciella* 和 *Thalassobius*), 其中 *Thalassobius* 属的菌株已被报道具有 DMSP 合成能力<sup>[14]</sup>。鉴于参与 DMSP 分解代谢细菌的物种和遗传多样性均较高, 这些菌株的 DMSP 合成及降解能力有待进一步验证。

## 2.5 西太平洋可培养细菌中的潜在新菌

本文所得 1293 株细菌中 68 株菌与其最相似物种的 16S rRNA 基因相似度低于 98.65%, 为潜在新菌, 占总分菌 5.26%, 分属于 22 个潜在新种。根据 16S rRNA 基因比对结果, 初步确定此 68 个潜在新菌分类地位。包括黄杆菌纲 1 株,  $\alpha$ -变形杆菌纲 41 株,  $\gamma$ -变形杆菌纲 16 株, 放线菌纲 8 株, 芽孢杆菌纲 1 株, *Actinomycetia* 纲 1 株(图 9-A)。

从水层分布来看, 此 68 株潜在新菌中 16 株分离自海洋上层/真光层; 19 株分离自海洋中层; 23 株分离自海洋深层; 10 株分离自海洋深渊层。在海洋深层、深渊层海水中分得潜在新菌概率高, 新菌率达到 6.4%; 中层海水深次之, 新菌率 5.40%; 真光层潜在新菌分得概率明显低于深层海水(图 9-C)。

此外, 在培养基水平, 68 株潜在新菌中有 23 株分离自 R2A, 分属于 13 个潜在物种; 7 株分离自 TCBS, 分属于 5 个潜在新种; 12 株分离自 IMA, 分属于 6 个潜在新种, 2 株分离自 IMB, 分属于 2 个潜在物种, 24 株分离自 MBM, 分属于 13 个潜在物种。新菌率最高的是 IMA (6.63%), 其次是 R2A (6.50%), MBM 新菌率为 6.03%, TCBS 为 4.40%, 最低的为 IMB (1.00%) (图 9-B)。

## 3 讨论

### 3.1 西太平洋可培养异养微生物具有丰富的多样性

微生物群落结构是其整体功能的基础, 在海洋环境中有着重要的意义, 一直是微生物生态学研究的重点问题<sup>[23]</sup>。近年来非培养方法推动微生物多样性研究不断发展, 但仍需以纯培养为基础

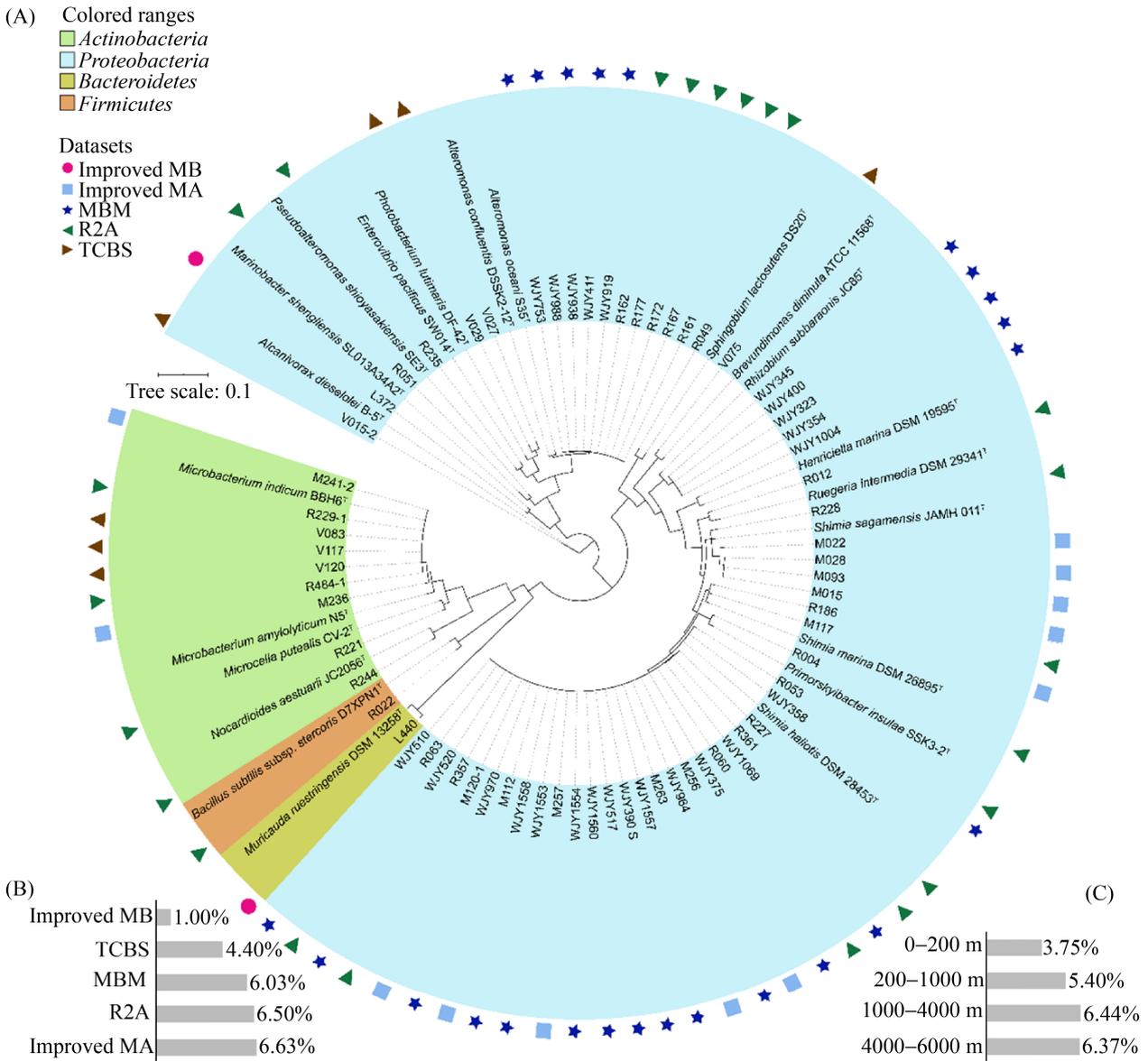


图 9. 不同培养条件下所得潜在疑似新菌的系统发育树(A)、不同培养基新菌率(B)和不同水层新菌率(C)  
 Figure 9. The phylogenetic tree (A), novel strain rate of different media (B) and different water layer (C) of potential novel bacterial strains under different culture conditions. The effective sequence length was 519 bp; top-hit taxon of potential novel strains named with the genus name; bar, the number of substitutions per site.

进行微生物生理特性及功能研究。本研究采用纯培养方式对西太平洋 6 个站点全水深(0-6050 m)环境微生物多样性进行研究,共使用 5 种培养基,完成 1293 株菌的 16S rRNA 基因测序及分析(属于 52 个属 119 个种,包括 68 个潜在的新菌),分离规模及获得的可培养细菌多样性远高于单独

使用一种培养基。其中变形菌门中  $\gamma$ -变形菌纲是最主要的微生物类群,  $\alpha$ -变形菌纲也占有很大比例,放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门则占比例较低。先前研究表明,  $\gamma$ -变形菌纲细菌在世界范围各种海洋环境中常作为高丰度主导菌出现,如大西洋中脊、南大西洋<sup>[24]</sup>、中国东海、南海<sup>[25]</sup>等。

除  $\gamma$ -变形菌纲以外,  $\alpha$ -变形菌纲、放线菌纲、芽孢杆菌纲和黄杆菌纲占本论文所得可培养微生物的大多数。这 5 个纲也是通过分子生物学手段研究西太平洋海域深海微生物群落时的优势纲<sup>[12,26-28]</sup>, 所以本论文结果在一定程度上反映着西北太平洋的总微生物群落构成。

我们还发现, 随水深加深, 分得新菌的概率增高。这可能是因为西太平洋海底独特的地质构造格局, 越接近海底, 潜在的深海新型细菌资源可能越丰富。一直以来, 由于采样条件限制、实验室培养难以复现深海原位环境等原因, 能被培养出来的深海微生物多样性始终不及表层海水高。因此, 深海环境中可能存在大量未被发现的细菌类群, 需要我们利用多种培养基、探索不同培养条件, 从而获得更多新型可培养的深海细菌。

### 3.2 培养基多样化可获得种类更多的异养微生物

与自然海洋环境接近的寡营养培养条件及改良微生物培养基组成皆有助于改善未培养微生物的可培养性。本研究所用的 R2A、IMA、MBM、IMB 与 2216E 比, 不同程度地降低了营养物质浓度。IMA、IMB 又通过改良培养基组分, 添加了细胞复苏因子、解毒物质, 微量元素、信号分子, 电子受体和供体等。MBM 通过特异性地添加甲硫氨酸和 DMSP 从海水体系中分离筛选目标微生物。

海洋环境是典型的寡营养环境, 在微生物培养过程中, 个别种类的微生物由于数量占优势或生长速度较快等原因, 在培养初期大量生长, “淹没”了数量较少, 生长速度较慢的物种, 高浓度的营养物质对一些微生物反而是一种毒性, 样品稀释或培养基营养成分稀释是解决这些问题的有效方法<sup>[29]</sup>。R2A 与 2216E 相比是一种寡营养的培养基, 常用于陆生环境, 特别是淡水系统细菌的

分离培养。而本次分菌用的 2 种改良培养基(IMA 与 IMB)将 2216E 中的主要营养物质酵母提取物、蛋白胨分别稀释了 5 倍、25 倍。从本次研究结果看, 寡营养的 R2A 和 IMA 的确获得了较其他 3 种培养基更高的物种多样性和新菌率, 可见寡营养条件对于获得较高的可培养多样性十分重要, 以往利用普通 2216E 培养基这种单一的培养条件可能会使海洋可培养细菌的多样性被大大低估。

微生物的 VBNC 状态是可复苏的, 但其复苏机制的研究主要集中于医学和流行病学领域, 甚少关注潜在环境功能菌群的 VBNC 状态<sup>[30]</sup>。在常规实验室环境中, 将海洋环境中众多的休眠状态的细菌进行诱导复苏, 分离出传统培养基无法分离的 VBNC 状态细菌是当前挖掘新菌资源重要途径之一。不同的研究表明, 通过改良经典方法, 培养基配方的变化, 包括使用非传统电子供体, 电子受体和碳源, 已被证明可以有效地恢复未培养的类群<sup>[31-32]</sup>, 本次实验在稀释 2216E 培养基营养成分的基础上加入了氯化铵、乙酸钠、七水合硫酸镁、丙酮酸钠、乙二胺四乙酸二钠、磷酸二氢钾及碳酸氢钠<sup>[15]</sup>。丙酮酸钠和乙酸钠有助于降低培养过程中优势菌种代谢所产生的过氧化物、自由基和一些拮抗物质的毒害作用, 诱导细菌从 VBNC 状态复苏<sup>[8,33-34]</sup>。此次仅在 IMB 分得的物种有特氏盐芽孢杆菌(*Halobacillus trueperi*)、*Muricauda ruestringensis*、海动物肠希瓦氏菌(*Shewanella marinintestina*)、*Hyphomonas pacifica*; 仅在 IMA 分得的物种有 *Salinicoccus halodurans* 以及墨西哥微小杆菌(*Exiguobacterium mexicanum*), 这些物种中绝大多数以往未在西太平洋海域分离得到过, 有可能是被复苏的 VBNC 菌。其中个别种属的菌株甚至是沙漠干旱地带土壤样品中的优势菌<sup>[35]</sup>, 由此可见, 添加复苏因子能够有效

分离出常规培养方法无法获得的细菌类群。

海洋异养细菌不仅能够合成 DMSP，同时也是 DMSP 的最主要分解者。其相关关键酶及编码基因陆续被发掘验证<sup>[14,21]</sup>。DMSP 合成及降解细菌物种和关键基因的多样性研究也在个别细菌基因组和环境宏基因组数据开展<sup>[36]</sup>。本研究通过向 MBM 添加特定底物，富集并分离 DMSP 相关代谢功能的细菌类群，为获得更多 DMSP 合成或降解菌株提供了新思路。这也启发我们在今后的研究中可针对特殊的研究目的添加特定底物，提高相关细菌类群的分离效率。

本研究为通过改良或创新培养基的方法复苏海洋“微生物暗物质”<sup>[37-38]</sup>提供了思路和素材。但除培养层面的差异，本实验未设置其他更多的差异培养条件，后续细菌分离将考虑采用更多种类的改良培养基、不同温度梯度等条件以获得更多菌种资源。由于纯培养方法相比非培养方法在多样性方面本身存在的局限性，本研究结果仅能展现自然环境现有微生物多样性的一小部分。在未来的研究中，免培养的分子技术与传统的纯培养方法相结合，才能更加准确地评价海洋环境微生物多样性情况。同时，非培养分析结果可指导和改进纯培养的方法和技术，在提高微生物的可培养性的基础上，设计针对性的分离方案，富集培养策略和检测技术，形成一系列模型化的增菌培养方法，形成多类型的“增菌培养基”<sup>[39]</sup>，帮助我们获得多样性更高的可培养海洋微生物，为深入研究微生物多样性、起源和演化<sup>[40]</sup>、生理生态学、地球化学等提供新视角和新机遇。

## 致谢

感谢中国海洋大学“东方红 3”船全体科学家和船员在航次中协助采集海水样品。

## 参考文献

- [1] Qin YS, Yin H. Western Pacific: the strategic priority in China deep-sea research. *Advances in Earth Science*, 2011, 26(3): 245–248. (in Chinese)  
秦蕴珊, 尹宏. 西太平洋——我国深海科学研究的优先战略选区. *地球科学进展*, 2011, 26(3): 245–248.
- [2] Kolber ZS. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science*, 2001, 292(5526): 2492–2495.
- [3] Luo ZH, Huang XL, Wang L, Pei YW, Ye DZ. Screening of marine bacteria with antimicrobial activity. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2002, 21(2): 181–186. (in Chinese)  
骆祝华, 黄翔玲, 王琳, 裴耀文, 叶德赞. 海洋细菌抑菌活性菌株的筛选. *台湾海峡*, 2002, 21(2): 181–186.
- [4] Stackebrandt E, Embley TM. Diversity of uncultured microorganisms in the environment. // *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Boston, MA: Springer US, 2000: 57–75.
- [5] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6–17. (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6–17.
- [6] Button DK, Schut F, Quang P, Martin R, Robertson BR. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 881–891.
- [7] Simu K, Hagström A. Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2445–2451.
- [8] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 1982, 8(4): 313–323.
- [9] Yue XJ, Yu LY, Li QP, Wei YZ, Guan Y, Zhang YQ. Study of methods to isolate viable but non-culturable microorganisms from natural environments. *Microbiology*, 2006, 33(3): 77–81. (in Chinese)  
岳秀娟, 余利岩, 李秋萍, 魏玉珍, 关艳, 张月琴. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 77–81.
- [10] Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen PH. Isolation of previously uncultured rumen

- bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(1): 52–60.
- [11] Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouros P, Kaeberlein T, Epstein S. Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4889–4897.
- [12] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3878–3885.
- [13] Liu Y, Pei T, Du J, Deng MR, Zhu HH. Effect of the medium sterilization on bacterial isolation efficiency. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 576–584. (in Chinese)  
刘阳, 裴韬, 杜娟, 邓名荣, 朱红惠. 培养基灭菌方式对细菌分离效率的影响. *生物资源*, 2020, 42(5): 576–584.
- [14] Williams BT, Cowles K, Martínez AB, Curson ARJ, Zheng YF, Liu JL, Newton-Payne S, Hind AJ, Li CY, Rivera PPL, Carrión O, Liu J, Spurgin LG, Brearley CA, MacKenzie BW, Pinchbeck BJ, Peng M, Pratscher J, Zhang XH, Zhang YZ, Colin Murrell J, Todd JD. Bacteria are important dimethylsulfoniopropionate producers in coastal sediments. *Nature Microbiology*, 2019, 4(11): 1815–1825.
- [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): 1–15.
- [16] 张晓华. 海洋微生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2016: 369–375.
- [17] 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.
- [18] Rozewicki J, Li SL, Amada KM, Standley DM, Katoh K. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W5–W10.
- [19] Talavera G, Castresana J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 2007, 56(4): 564–577.
- [20] Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W232–W235.
- [21] Zhang XH, Liu J, Liu JL, Yang GP, Xue CX, Curson ARJ, Todd JD. Biogenic production of DMSP and its degradation to DMS—their roles in the global sulfur cycle. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(10): 1296–1319.
- [22] 刘骥. 中国东海 DMSP 分解和合成代谢细菌多样性及典型菌株相关功能基因研究. 中国海洋大学学位论文, 2018.
- [23] Wang X, Zhou YY, Zheng TL. Recent advances in marine bacterial ecology—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(3): 291–297. (in Chinese)  
王新, 周艳艳, 郑天凌. 海洋细菌生态学的若干前沿课题及其研究新进展. *微生物学报*, 2010, 50(3): 291–297.
- [24] Wang K, Yan PS, Ma R, Jia WW, Shao ZZ. Diversity of culturable bacteria in deep-sea water from the South Atlantic Ocean. *Bioengineered*, 2017, 8(5): 572–584.
- [25] Nercessian O, Fouquet Y, Pierre C, Prieur D, Jeanthon C. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(5): 698–714.
- [26] Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Rappe MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 2002, 418(6898): 630–633.
- [27] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, 296(5570): 1127–1129.
- [28] Tripp HJ, Kitner JB, Schwalbach MS, Dacey JWH, Wilhelm LJ, Giovannoni SJ. SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. *Nature*, 2008, 452(7188): 741–744.
- [29] Lu JW, Zhang XQ, Du LL, Yang ZJ, Wu M, Lu LD. Bacterial isolation and diversity analysis of four seawater sampling sites of the East China Sea and the South China Sea. *Journal of Zhejiang University: Science Edition*, 2012, 39(4): 443–449. (in Chinese)  
卢婧雯, 张心齐, 杜丽丽, 杨志坚, 吴敏, 卢龙斗. 中国东海及南海近海 4 采样点海水可培养细菌的多样性研究. *浙江大学学报: 理学版*, 2012, 39(4): 443–449.
- [30] Zhang S, Ding LX, Su XM. Formation and resuscitation of the viable but non-culturable state in microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(8): 1331–1339. (in Chinese)  
张硕, 丁林贤, 苏晓梅. 微生物 VBNC 状态形成及复苏机制. *微生物学报*, 2018, 58(8): 1331–1339.

- [31] Köpke B, Wilms R, Engelen B, Cypionka H, Sass H. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 7819–7830.
- [32] Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 2009, 13(4): 583–594.
- [33] Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and Acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3978–3987.
- [34] Morishige Y, Fujimori K, Amano F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella*. *Microbes and Environments*, 2013, 28(2): 180–186.
- [35] Guesmi A, Ettoumi B, Hidri D, Essanaa J, Cherif H, Mapelli F, Marasco R, Rolli E, Boudabous A, Cherif A. Uneven distribution of *Halobacillus trueperi* species in arid natural saline systems of southern Tunisian Sahara. *Microbial Ecology*, 2013, 66(4): 831–839.
- [36] Zheng YF, Wang JY, Zhou S, Zhang YH, Liu J, Xue CX, Williams BT, Zhao XX, Zhao L, Zhu XY, Sun C, Zhang HH, Xiao T, Yang GP, Todd JD, Zhang XH. Bacteria are important dimethylsulfoniopropionate producers in marine aphotic and high-pressure environments. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4658.
- [37] Lok C. Mining the microbial dark matter. *Nature*, 2015, 522(7556): 270–273.
- [38] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, 499(7459): 431–437.
- [39] Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, Lévassieur A, Rolain JM, Fournier PE, Raoult D. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(9): 540–550.
- [40] Wang FP, Zhou YH, Zhang XX, Xiao X. Biodiversity of deep-sea microorganisms. *Biodiversity Science*, 2014, 21(4): 445–455.

## Exploring the diversity of cultivated bacteria in the Western Pacific waters through improved culture media

Chuang Sun<sup>1</sup>, Jinyan Wang<sup>1,2</sup>, Yulin Zhang<sup>1</sup>, Yunhui Zhang<sup>1</sup>, Xiaoyu Zhu<sup>1</sup>, Zhaohui Chen<sup>3,4</sup>, Xiaohua Zhang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

<sup>2</sup> Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao 266071, Shandong Province, China

<sup>3</sup> Center for Advanced Science of Deep-Sea Spheres and Earth Systems, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

<sup>4</sup> MOE Key Laboratory of Physical Oceanography, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

**Abstract: [Objective]** The complex marine environment of the Western Pacific has unique ecosystems and biological communities, and contains abundant marine microbial resources. The community structure of bacteria in different

---

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (202072003), by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0124100, 2016YFA0601303) and by the Innovation Project of Science and Technology of Shandong Province (2018SDKJ0105-1)

\*Corresponding author. Tel: +86-532-82032767; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

Received: 6 November 2020; Revised: 28 January 2021; Published online: 14 February 2021

water depths in the Western Pacific was studied based on isolation culture technique. We tried to improve the capturability of marine bacteria by modifying the culture medium. **[Methods]** We used five different culture media in this study: improved 2216E agar medium (IMA), R2A agar medium (R2A), MBM agar medium (MBM), thiosulfate citrate bile salts sucrose agar medium (TCBS) and improved 2216E liquid enriched medium (IMB). Through strain isolation and 16S rRNA gene sequence identification, the community structure and diversity of culturable bacteria from the surface layer to 6000 meters water depth of the Western Pacific were analyzed. We compared the similarities and differences of bacterial diversity in different culture media. **[Results]** In this study, we isolated and identified 1293 strains in total, which affiliated to four phyla, seven classes, 14 orders, 26 families, 52 genera and 119 species. *Proteobacteria* were the dominant group recovered from the seawaters. At the class level,  $\gamma$ -*Proteobacteria*,  $\alpha$ -*Proteobacteria*, and *Actinobacteria\_c* were the dominant microflora. The most dominant phyla obtained from the five cultures were all *Proteobacteria*, and the most dominant class was  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Except for the TCBS in which the dominant order was *Vibrionales*, the most dominant order in other four media was *Alteromonadales*. In addition, the five media exhibited different selectivity at each taxonomic level. The diversity of the cultivable bacteria in the five culture media from high to low was R2A, IMA, MBM, TCBS and IMB. The most unique genera (up to 10) were isolated from R2A. With the increase of water depth, the number of cultivable heterotrophic microorganisms showed a decreasing trend. A total of 68 strains were potential new bacteria among all the isolates, and the rates of new bacteria were relatively high among IMA, R2A and MBM. **[Conclusion]** In this study, cultivable bacteria from the seawater of the Western Pacific were studied by using five different culture media, showing a high diversity and revealing the selectivity of different media for cultivable marine bacteria. This research has provided valuable microbial resources for other ecological and molecular studies, and it has also brought more inspiration for using improved culture medium to isolate uncultured marine microorganisms in the future.

**Keywords:** Western Pacific, bacterial diversity, 16S rRNA gene, improved culture

(本文责编: 李磊)

张晓华, 中国海洋大学教授, 博士生导师, 主要从事微生物海洋学研究(包括海洋微生物的生物地球化学作用、海洋细菌的密度感应及密度感应淬灭、海洋微生物的分离鉴定及资源开发等)。主持国家自然科学基金重点项目、国家重点研发计划项目、科技部国际合作重点项目等多项项目。以通讯作者在 *Nature Microbiology*、*Nature Communications*、*The ISME Journal*、*Microbiome*、*Environmental Microbiology*、*Applied and Environmental Microbiology* 等权威期刊发表多篇 SCI 论文。主编《海洋微生物学》(2016 年第 2 版, 科学出版社)。

