

研究报告

环磷酸腺苷对太湖界面沉积物可培养细菌多样性的影响

张璐洁 屈建航* 符运会 李海峰 田海龙

(河南工业大学生物工程学院 河南 郑州 450000)

摘要:【背景】环境细菌可培养率只有 1%，菌间的信息交流是限制培养效率的一个重要原因。细胞间信息传递的“第二信使”——环磷酸腺苷(cAMP)是细菌感知和应对外界变化时使用广泛的物质。【目的】研究 cAMP 诱导培养下的细菌种群组成变化，以探讨对微生物可培养性的影响，为提高细菌可培养率和菌种资源开发提供参考。【方法】以太湖沉积物为对象，结合高通量测序和分离培养方法解析样品中细菌的多样性。【结果】高通量测序的物种组成分析结果表明，cAMP 作用下诱导出 60 个不同于对照组的 OTU (Operational taxonomic unit)，其中显著差异的是变形菌门和拟杆菌门，前者提高 4.08%，后者降低 3.36%，非常显著差异的是疣微菌门。在属分类水平有 8 个显著差异的菌属，2 个非常显著差异的菌属(气单胞菌属和 *Trichococcus*)。分离培养结果显示，cAMP 诱导下 CFU (Colony-forming unit)提高至 1.6 倍，诱导培养出微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、热单胞菌属(*Thermomonas*)、*Lacibacter*、*Pedobacter*、*Massilia*、*Kocuria* 和 *Arthrobacter*。【结论】从高通量结果可知 cAMP 对变形菌门的菌株生长有显著促进作用，而分离培养结果表明，cAMP 提高微小杆菌属、微杆菌属、热单胞菌属、*Lacibacter*、*Pedobacter*、*Massilia*、*Kocuria* 和 *Arthrobacter* 的可培养性。

关键词：细菌，可培养率，cAMP，高通量测序，沉积物

Effects of cyclic adenosine monophosphate on culturable bacterial diversity in the interfacial sediment from Taihu Lake

ZHANG Lu-Jie QU Jian-Hang* FU Yun-Hui LI Hai-Feng TIAN Hai-Long

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: 【Background】The culturable rate of environmental bacteria is only about 1%, and the exchange of information among bacteria is an important reason for limiting the rate of culture. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP), the second messenger known as intercellular information transmission, is a widely-used substance for bacteria to perceive and respond to the environmental changes. 【Objective】The study is aimed to research the changes of bacterial population composition induced by cAMP and investigate the effect on microbial culturability, further to provide reference

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31370147, 31400103); Program for Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (15IRTSTHN019)

*Corresponding author: Tel: 86-371-67756513; E-mail: qjh_bata@163.com

Received: August 14, 2017; **Accepted:** November 27, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 06, 2017
基金项目: 国家自然科学基金(31370147, 31400103); 河南省高校科技创新团队支持计划(15IRTSTHN019)

*通信作者: Tel: 86-371-67756513; E-mail: qjh_bata@163.com

收稿日期: 2017-08-14; 接受日期: 2017-11-27; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-12-06

for improving the culturability of bacteria and the exploration of strain resources. **[Methods]** Using the high-throughput sequencing and isolation methods to analyze the bacterial diversity in sediment of Taihu Lake. **[Results]** Results of high-throughput sequencing showed that 60 OTUs (Operational taxonomic units) which were different from the control group appeared. Among them, Proteobacteria and Bacteroides were the significant differences, the former increased by 4.08%, but the latter decreased by 3.36%, and Verrucomicrobia was high significant at $P < 0.01$. At the genus level, there were 8 significant different genera, and 2 (*Aeromonas* and *Trichococcus*) very significant statistic differences. Results of isolation and culture showed that, under cAMP's effect, the population diversity of the bacteria could be increased, with CFU (Colony-forming unit) up to 1.6 times as that of the control group, and the bacteria of *Exiguobacterium*, *Microbacterium*, *Thermomonas*, *Lacibacter*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Kocuria* and *Arthrobacter* were induced. **[Conclusion]** From high throughput results, cAMP can significantly promote the growth of strains of Proteobacteria, but the results from isolation and culture show that cAMP can improve the culturability of *Exiguobacterium*, *Microbacterium*, *Thermomonas*, *Lacibacter*, *Pedobacter*, *Massilia*, *Kocuria* and *Arthrobacter*.

Keywords: Bacterial, Culturable rate, cAMP, High-throughput sequencing, Interfacial sediment

目前环境中细菌可培养率仅 1% 左右^[1], 尤其是在实验室条件下采取传统纯培养方法获得的微生物种类更是十分有限。微生物培养率过低的一个主要原因是细胞间的相互作用被阻断, 无法进行信息的传递与交流^[2]。近年来, 添加微生物生长因子或信号物质以提高可培养率成为了一大研究热点^[3]。

环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是细菌感知和应对环境变化中使用最广泛的生长因子物^[4], 在低营养浓度的液体培养基中可提高获得活的非可培养(Viable but not culturable, VBNC)状态的细菌, 从而大幅度提高细菌可培养率^[5]。Bruns 等利用最大可能数技术(Most probable number, MPN)对比信号分子对细菌可培养率的影响发现, cAMP 是最有效的诱导剂, 10 $\mu\text{mol/L}$ cAMP 可显著提高淡水浮游细菌的可培养率^[6]。

水体沉积物是微生物天然的种质资源库, 本研究以太湖沉积物为对象, 研究 cAMP 生长因子对其细菌种群组成的影响, 为提高细菌可培养率和菌种资源开发提供参考。

1 材料与与方法

1.1 样品采集

供试样品于 2016 年 10 月以抓土漏斗法采集自

太湖 16[#]位点(120°48'70"E, 31°27'0.020"N)的表层沉积物, 低温保存并带回实验室, 立即使用。

1.2 培养基

R₂A 培养基(g/L)^[7-8]: 固体 K₂HPO₄ 或 KH₂PO₄ 调 pH 7.0-7.2, 0.75×10⁵ Pa 高压蒸汽灭菌 30 min。固体培养基添加 1.5% 琼脂。

cAMP-R₂A 培养基: 上述 R₂A 培养基中, 添加 0.22 μm 微孔滤膜过滤的 cAMP 溶液, 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。固体培养基添加 1.5% 琼脂。

1.3 主要试剂和仪器

PCR 试剂购自 TaKaRa 公司; Q5 高保真酶购自 New England Biolabs 公司; DNA 提取试剂盒 PowerSoil[®] 购自美国 MOBIO 公司; 胶回收试剂盒, QIAGEN 公司; 其余试剂为国产生物试剂、国产分析纯试剂。C1000 Touch PCR 仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

1.4 样品处理

10 g 沉积物样品与含 3 g 玻璃珠的 90 mL 无菌 cAMP-R₂A 培养基混合, 28 °C、120 r/min 振荡培养 7 d。同条件另以 R₂A 培养基代替 cAMP-R₂A 培养基作为对照。培养后摇匀, 一部分 8 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用以基因组 DNA 提取进行高通量测

序;另一部分静置 1 h, 上清做菌悬液进行菌种分离。所有处理均设置平行。

1.5 高通量测序分析

1.5.1 基因组 DNA 提取

将收集的沉淀以土壤 DNA 提取试剂盒依操作说明提取基因组 DNA, 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 16S rRNA 基因(V3-V4 区) PCR 扩增及测序

以提取的基因组 DNA 为模版, 使用细菌 16S rRNA 基因(V3-V4 区)引物^[9]338f (5'-ACTCCTACG GGAGGCAGCA-3')和 806r (5'-GGACTACHVGGG TWTCTAAT-3'), 高效和高保真酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: Q5 Buffer 5 μ L, Q5 Enhancer 5 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 0.75 μ L, dNTPs (1 mmol/L) 0.5 μ L, Q5 酶(5 U/ μ L) 0.1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 11.9 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保持。

PCR 产物通过胶回收试剂盒纯化后, 利用北京百迈克公司的 Illumina HiSeq 2500 平台进行高通量测序。

1.5.3 数据分析

用 Flash (v1.2.7)软件^[10]对每个样品测得的双端序列进行拼接, 得到原始序列, 再依次用 Trimmomatic 软件^[11]和 UCHIME 软件^[12]对其进行质控过滤和去除嵌合体, 得到有效数据。利用 QIIME 软件(1.8.0)^[13]对 97% 相似度水平的序列进行聚类, 获得操作分类单元(OTU), 基于 Silva 细菌分类学数据库^[14]进行分类学注释。用 Mothur 软件对样品进行多样性指数(Alpha-diversity)分析评估^[15], Meta Stats 软件^[16]对组间物种分布进行 *t* 检验, 选出导致样品组成差异的物种。

表 1 细菌多样性统计分析

Table 1 The statistical analysis of bacterial diversity

样品编号 Sample code	OTU 数 OTU number	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index	覆盖率 Coverage (%)
A	595	597.50	598.71	0.04	4.42	99.95
K	600	602.96	603.25	0.04	4.51	99.95

注: A: cAMP 诱导后的样品; K: 对照组的样品。

Note: A: The sample after cAMP induction; K: The sample of the control group without cAMP induction.

1.6 分离培养法鉴定细菌菌群

1.6.1 分离纯化

菌悬液进行 10 倍梯度稀释, 分别涂布于 R₂A 固体培养基和 cAMP-R₂A 固体培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 14 d。期间定时观察菌落生长情况并记录, 3 区划线法进行分离与纯化。

1.6.2 菌株 16S rRNA 基因系统发育鉴定

对分离纯化的细菌, 挑取少量新鲜菌体以碱裂解法制备 DNA 模板^[17]。使用原核生物通用引物 *E. coli* 27f 和 1495r 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增^[18]。

16S rRNA 基因 PCR 扩增产物测定核苷酸序列, 完成 GenBank 数据库 BLAST 比对, 下载相关序列用 MEGA 7.0 软件^[19]以邻接法^[20]构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次评价进化树分支聚类的置信值。根据比对信息和系统发育树结果, 分析分离培养的细菌种属组成。

2 结果与分析

2.1 基于高通量测序的种群差异

2.1.1 多样性分析

样品 Alpha 多样性分析(表 1)表明, 测试样品覆盖率均在 99.95%, 可代表分析实际样品细菌群落结构特征。cAMP 诱导后细菌群落的 Chao1 和 Ace 指数为 598.71 和 597.50, 而对照样品分别为 603.25 和 602.96, 表明 cAMP 诱导后的细菌群落物种丰度降低, 从 Shannon 指数和 Simpson 指数可见, cAMP 诱导后的细菌群落多样性也有所降低。

对比 97% 相似度下的 OTU, cAMP 诱导后物种数量接近但略低于对照, 但部分 OTU (60 个)仅在 cAMP 诱导组出现, 说明 cAMP 中能诱导出对照组中没有的菌种生长。

2.1.2 门水平上的菌群差异

在细菌分类门的水平(图 1),cAMP 诱导样品和对照组样品中有 6 个相同的优势菌门(相对丰度>0.70%为优势类群^[21]),即变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿菌门(Chlorobi)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和硝化螺旋菌门(Nitrospirae),分别占各自样品细菌总量的 97.47%和

97.58%。在优势类群中,cAMP 信号分子诱导后引起最大变化的是变形菌门和拟杆菌门,前者提高了 4.08%,后者降低了 3.36%,另外 cAMP 诱导下不同程度增加了绿菌门、蓝细菌门(Cyanobacteria)和浮霉状菌门(Planctomycetes),分别增加 0.07%、0.37%和 0.01%,而在 cAMP 诱导下厚壁菌门、硝化螺旋菌门、酸杆菌门分别减少了 0.40%、0.30%和 0.20%。

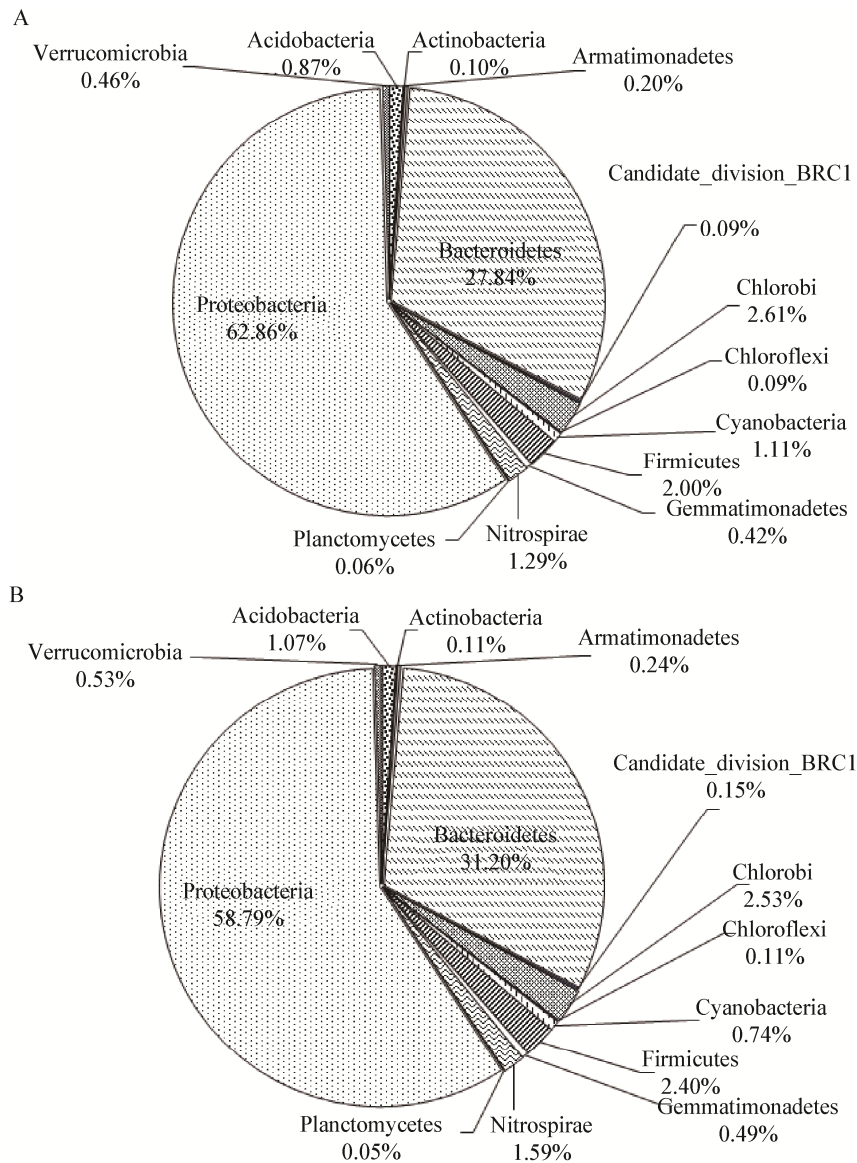


图 1 cAMP 诱导下门(Phylum)分类水平上细菌类群比较

Figure 1 Comparison of bacteria groups at phylum level in the cAMP induction experiment

注: A: cAMP 诱导后的样品 A; B: 对照组的样品 K.

Note: A: The sample A after cAMP induction; B: Control group K.

cAMP 诱导后, 相对于无诱导对照细菌种群门分类层次上组间差异分析结果表明(表 2), cAMP 作用下拟杆菌门和变形菌门差异显著 ($P<0.05$), 疣微菌门(Verrucomicrobia)差异非常显著 ($P<0.01$)。

2.1.3 属水平上的菌群差异

在细菌分类属的水平, cAMP 诱导和对照组有 9 个相同的优势菌属(相对丰度 $>0.70\%$ 为优势类群), 它们分别为气单胞菌属(*Aeromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、蛭弧菌属(*Bdellovibrio*)、*Chitinophaga*、*Cloacibacterium*、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和福格斯氏菌属(*Vogesella*), 分别占各自样品细菌总量的 67.28%和 66.33%。其余菌属的相对丰度较

低, 普遍小于 0.4%。除了以上 9 种外, 对照组还有 *Lacibacter* 和玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*) 2 种优势菌属。

属分类水平上, 各样品物种相对丰度前 10 的分布图如图 2 所示, cAMP 诱导的样品中相对丰度较高的菌属依次为福格斯氏菌属(17.55%)、气单胞菌属(10.81%)和黄杆菌属(10.60%), 而对照组中则为福格斯氏菌属(16.23%)、黄杆菌属(11.09%)和假单胞菌属(10.13%)。cAMP 诱导下, 气单胞菌属、*Cloacibacterium* 和福格斯氏菌属的相对丰度均高于对照, 其余菌属有所降低。在 cAMP 诱导作用下, 影响较大的是气单胞菌属和福格斯氏菌属, 分别提高了 3.79%和 1.32%, *Chitinophaga* 和假单胞菌属分别降低了 1.92%和 1.59%。

表 2 cAMP 诱导与对照组中细菌类群门分类水平的组间差异分析结果

Table 2 Results of the inter-group differences of bacteria at phylum level between the cAMP induction experiment and the control sample

菌群(门水平分类) Bacteria groups (phylum level)	cAMP 诱导组 A cAMP induction group A			对照组 K Control group K			P
	平均数	方差	标准误	平均数	方差	标准误	
	Average	Variance	Standard error	Average	Variance	Standard error	
Acidobacteria	8.73×10^{-3}	7.07×10^{-7}	5.94×10^{-4}	1.07×10^{-2}	1.06×10^{-6}	7.29×10^{-4}	0.22
Actinobacteria	9.96×10^{-4}	6.38×10^{-8}	1.79×10^{-4}	1.09×10^{-3}	2.01×10^{-8}	1.00×10^{-4}	0.53
Armatimonadetes	2.02×10^{-3}	1.32×10^{-11}	2.57×10^{-6}	2.41×10^{-3}	3.15×10^{-8}	1.25×10^{-4}	0.12
Bacteroidetes	2.78×10^{-1}	1.03×10^{-5}	2.27×10^{-3}	3.12×10^{-1}	1.69×10^{-6}	9.19×10^{-4}	0.04
Candidate_division_BRC1	9.23×10^{-4}	2.21×10^{-8}	1.49×10^{-4}	1.50×10^{-3}	7.61×10^{-8}	2.76×10^{-4}	0.12
Chlorobi	2.47×10^{-2}	5.57×10^{-6}	1.67×10^{-3}	2.33×10^{-2}	1.72×10^{-6}	9.27×10^{-4}	0.41
Chloroflexi	8.72×10^{-4}	2.05×10^{-8}	1.01×10^{-4}	1.13×10^{-3}	5.97×10^{-8}	1.73×10^{-4}	0.31
Cyanobacteria	1.11×10^{-2}	2.02×10^{-6}	1.01×10^{-3}	7.35×10^{-3}	6.16×10^{-7}	5.55×10^{-4}	0.08
Firmicutes	2.00×10^{-2}	4.11×10^{-7}	4.53×10^{-4}	2.40×10^{-2}	7.16×10^{-7}	5.99×10^{-4}	0.06
Gemmatimonadetes	4.22×10^{-3}	9.52×10^{-8}	2.18×10^{-4}	4.90×10^{-3}	4.75×10^{-7}	4.87×10^{-4}	0.33
Nitrospirae	1.29×10^{-2}	3.40×10^{-6}	1.30×10^{-3}	1.59×10^{-2}	2.51×10^{-7}	3.54×10^{-4}	0.18
Planctomycetes	5.88×10^{-4}	1.09×10^{-8}	7.39×10^{-5}	5.11×10^{-4}	3.33×10^{-9}	4.08×10^{-5}	0.37
Proteobacteria	6.28×10^{-1}	1.18×10^{-6}	7.67×10^{-4}	5.87×10^{-1}	2.47×10^{-7}	3.51×10^{-4}	0.02
Verrucomicrobia	4.55×10^{-3}	2.81×10^{-12}	1.18×10^{-6}	5.27×10^{-3}	1.97×10^{-10}	9.92×10^{-6}	0.00

注: $P<0.05$ 为显著性差异; $P<0.01$ 为非常显著性差异。

Note: $P<0.05$ indicated the significant difference; $P<0.01$ indicated extremely significant difference.

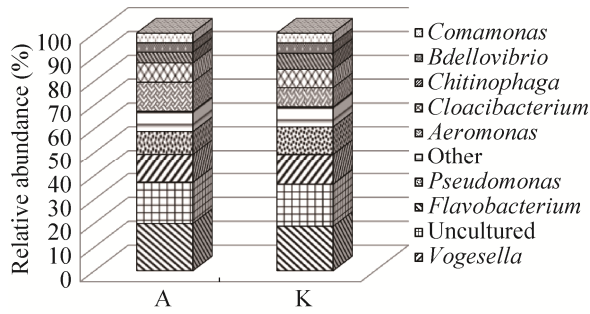


图 2 属(Genus)水平各样本物种相对丰度前 10 的菌种分布图

Figure 2 Distribution of bacteria groups of top 10 relative abundance at genus level

注: A: cAMP 诱导后的样品; K: 对照组的样品。

Note: A: The sample after cAMP induction; K: The sample of the control group.

此外,对 cAMP 诱导组和无诱导对照组样品中的细菌种群属分类层次上进行组间差异分析,结果显示 cAMP 诱导作用下,显著差异的菌属是假单胞菌属、*Algoriphagus*、*Alicyclophilus*、芽孢杆菌属、食酸菌属(*Acidovorax*)、*Deferrisoma*、福格斯氏菌属和 *Pedobacter*, 非常显著差异的是气单胞菌属和 *Trichococcus*。

2.2 基于分离培养的种群差异

2.2.1 CFU 值

选择合适稀释浓度涂布的平板,统计菌落个数,结果表明,在 cAMP 诱导作用下的 CFU 值为 3.70×10^8 , 而对照组为 2.31×10^8 , 前者是后者的 1.6 倍。

2.2.2 系统发育统计分析

基于 cAMP-R₂A 培养基和 R₂A 培养基所分离细菌的 16S rRNA 基因序列,提交 GenBank 获得登录号为 MF592263–MF592291。系统发育分析结果(图 3 和图 4)表明,诱导组和对照组分离得到的细菌均属于 4 大细菌类群,即变形菌门(Proteobacteria)(分别为 4 和 7 株)、放线菌门(Actinobacteria)(分别为 4 和 1 株)、厚壁菌门(Firmicutes)(分别为 1 和 4 株)和拟杆菌门

(Bacteroidetes)(分别为 3 和 5 株)。

cAMP 诱导后,保留了无诱导状态下的 γ -变形菌纲中的假单胞菌属(*Pseudomonas*)和拟杆菌门中的黄杆菌属(*Flavobacterium*),但增加了厚壁菌门中的微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、拟杆菌门中的 *Lacibacter* 和 *Pedobacter*、变形菌门中的马赛菌属(*Massilia*)和热单胞菌属(*Thermomonas*)、放线菌门中的 *Kocuria*、*Arthrobacter* 和微杆菌属(*Microbacterium*),但相对于对照组,变形菌门中的丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、福格斯氏菌属(*Vogesella*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)以及厚壁菌门中的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、拟杆菌门中的鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)和 *Cloacibacterium*、放线菌门中的迪茨氏菌属(*Dietzia*),未能培养获得。

3 讨论与结论

环磷酸腺苷(cAMP)广泛存在于动植物的各种组织和微生物中,是细胞内参与调节物质代谢和生物学功能的重要物质,是细胞内生命信息传递的“第二信使”,在细胞间信号转导中起到关键的作用,也是细菌感知和应对环境变化中使用最广泛的生长因子物^[4]。目前,Bruns 等利用 cAMP 提高海洋细菌可培养率达 100%的同时,诱导出 1 株 α -变形菌门 Rhodobacteraceae 科菌株^[22]。Hahnke 等利用 cAMP 诱导出 1 株 α -变形菌门 *Lentibacter* 属菌株^[23]。Sipkema 等在液体培养基中添加诱导物时,发现同时加入 cAMP 和 N-酰基-高丝氨酸内酯信号分子比单独添加或不添加时,*Haliclona* 属菌株的可培养率高^[24]。

本文研究了 cAMP 诱导对水体沉积物中细菌多样性的影响,结果表明 cAMP 能提高变形菌门数量,原因可能是基于变形菌门依赖 cAMP-CRP 途径调节碳分解代谢物,适应环境变化^[25]。在属水平,气单胞菌属和假单胞菌属是 cAMP 诱导作用下造成显著差异的菌属,有研究证明这 2 菌属也分别被发现能产生 cAMP 并调控其浓度^[26-27]。

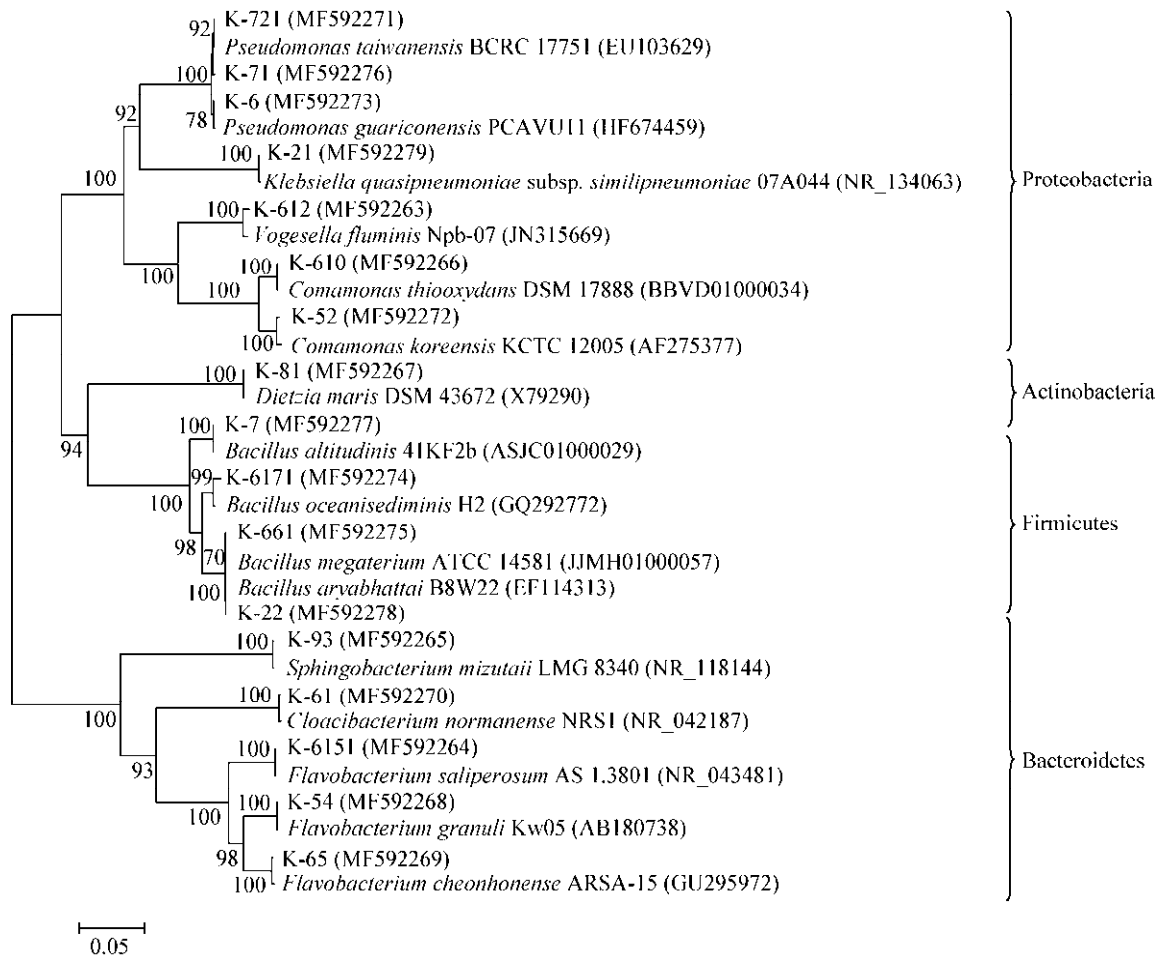


图3 对照组中分离培养的细菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences for strains isolated from the sample of the control

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets; Bar 0.05 represents sequence divergence.

本研究分离培养方法的结果表明, 在固体培养基中, cAMP 诱导下分离的细菌 CFU 为对照组的 1.6 倍, 但分离获得的细菌种类总数下降, 表明 cAMP 存在下影响了可培养群落的结构, 使部分类群大量生长, 而部分变得不可培养。在张雯雯等的研究中, cAMP 在 1/10 的 NB 固体培养基上对沿海滩涂微生物可培养性无明显效果, 在 NB 固体培养基上也只提高 CFU 1-2 个数量级^[28], cAMP 在固体培养时效果并不理想。但是本研究的结果同时也表明, cAMP 作用下固体培养时新增了微小杆菌属、

微杆菌属、热单胞菌属、*Lacibacter*、*Pedobacter*、马赛菌属、*Kocuria* 和 *Arthrobacter* 的菌株, 表明可以拓展分离培养的细菌类群。有研究表明, 细菌单个基因组内的 16S rRNA 基因多样性会导致基于 16S rRNA 基因分析的菌群多样性产生一定程度的高估^[29]。所以本文中分离培养采用形态学特征和 16S rRNA 基因序列分析相结合的方法, 确保细菌多样性的准确性, 即在观察菌落形态特征差异的基础上, 将形态相近的菌落进行 16S rRNA 基因序列测定, 剔除重复后, 将不同形态的单菌落进行 16S rRNA 基

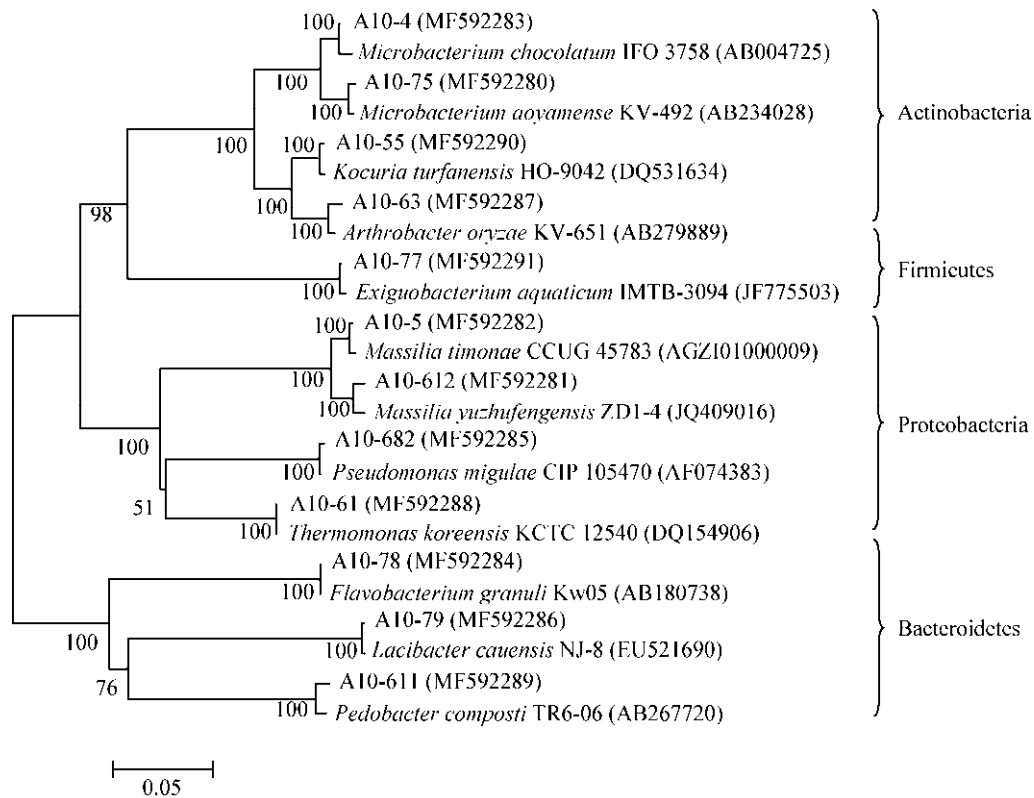


图4 cAMP 诱导下分离培养的细菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences for strains isolated from the sample with cAMP induction

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets; Bar 0.05 represents sequence divergence.

因核苷酸序列测定。结果表明菌落形态相近的菌株 16S rRNA 基因序列测序结果一样。

大力开发微生物培养技术, 以提高微生物可培养性, 尽可能培养至今不可培养的微生物, 有助于了解微生物细胞的生命活动以及微生物群落中各种微生物相互协调的规律, 并对环境微生物工艺进行更明确地设计、调控和利用。本研究探索了 cAMP 对水体沉积物中可培养细菌多样性的影响, 为相关研究提供参考依据。

REFERENCES

- [1] Wang N, Bao HF, Cui WD, et al. Diversity of bacteria isolated from saline alkali soil of Bishkek region in Kyrgyzstan[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1733-1740 (in Chinese)
王宁, 包慧芳, 崔卫东, 等. 比什凯克盐碱土壤可培养细菌
- [2] Vartoukian SR. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria[J]. Journal of Oral Biosciences, 2016, 58(4): 143-149
- [3] Li JX, Liu CG. Progress on methods for increasing microbial culturability[J]. Advances in Microbiology, 2016, 5(1): 1-8 (in Chinese)
李俊霞, 刘晨光. 提高微生物可培养性的方法的研究概况和进展[J]. 微生物前沿, 2016, 5(1): 1-8
- [4] Matange N. Revisiting bacterial cyclic nucleotide phosphodiesterases: cyclic AMP hydrolysis and beyond[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(22): fnv183
- [5] Tian T, Li DM, Dai SK, et al. Culture methods of the oligotrophic marine microbes[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 1031-1039 (in Chinese)
田甜, 李冬梅, 戴世鲲, 等. 海洋环境中难培养微生物的寡营养培养[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1031-1039
- [6] Bruns A, Nübel U, Cypionka H, et al. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 1980-1989

- [7] Gu KZ, Qian C, Luo YP. To improve the detection rate of total bacteria count using R2A cultural medium[J]. Water Purification Technology, 2004, 23(1): 42-44 (in Chinese)
顾孔珍, 钱纯, 罗岳平. 用 R2A 培养基提高饮用水中细菌总数检出率[J]. 净水技术, 2004, 23(1): 42-44
- [8] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(1): 1-7
- [9] Dennis KL, Wang Y, Blatner NR, et al. Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10-producing T cells[J]. Cancer Research, 2013, 73(19): 5905-5913
- [10] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963
- [11] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120
- [12] Edqar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [13] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [14] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [15] Pitta DW, Parmar N, Patel AK, et al. Bacterial diversity dynamics associated with different diets and different primer pairs in the rumen of Kankrej cattle[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111710
- [16] White JR, Nagarajan N, Pop M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. PLoS Computational Biology, 2009, 5(4): e1000352
- [17] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT, Trans. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 27 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 27
- [18] Zhou J. Study on the bacterial culturability of water-sediment interface[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan University of Technology, 2015 (in Chinese)
周佳. 水-沉积物界面细菌可培养性研究[D]. 郑州: 河南工业大学硕士学位论文, 2015
- [19] 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
- [20] Filipinski A, Murillo O, Freydenzon A, et al. Prospects for building large timetrees using molecular data with incomplete gene coverage among species[J]. Molecular Biology and Evolution, 2014, 31(9): 2542-2550
- [21] Xia WW, Jia ZJ. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(12): 1489-1499 (in Chinese)
夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报, 2014, 54(12): 1489-1499
- [22] Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3978-3987
- [23] Hahnke S, Brock NL, Zell C, et al. Physiological diversity of *Roseobacter* clade bacteria co-occurring during a phytoplankton bloom in the North Sea[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(1): 39-48
- [24] Sipkema D, Schippers K, Maalcke WJ, et al. Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Halictona (gellius)* sp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 2130-2140
- [25] Ouyang RZ, He YY, Xu H. Advances in integrase regulations of bacteria—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(10): 1231-1237 (in Chinese)
欧阳润泽, 贺艳艳, 徐海. 细菌整合子中整合酶基因调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(10): 1231-1237
- [26] Popoff M, Véron M. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group[J]. Journal of General Microbiology, 1976, 94(1): 11-22
- [27] Fulcher NB, Holliday PM, Klem E, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity[J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(4): 889-904
- [28] Zhang WW, Chen XB, Zhao XJ, et al. Culturability of bacteria in mudflat soils and optimization of culture schemes[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(3): 529-536 (in Chinese)
张雯雯, 陈新兵, 赵秀锦, 等. 江苏沿海滩涂土壤中细菌培养方法的优选[J]. 土壤学报, 2010, 47(3): 529-536
- [29] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969