

研究报告



基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析硃洲岛海星共附生微生物多样性

唐慧芳 孙力军* 刘颖* 陈全毅 房志家

广东海洋大学食品科技学院 广东 湛江 524088

摘要:【背景】海星作为海洋生物中的一类比较高级的棘皮类动物,其体内蕴藏着丰富且具有生物活性的共附生微生物资源。【目的】分析湛江硃洲岛海星中共附生微生物的多样性。【方法】采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分别对硃洲岛海星进行共附生细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区和共附生真菌 18S rRNA 基因 ITS1–ITS2 区的测序,并根据测序结果进行 OTU 聚类分析、 α 多样性分析及物种分类分析等。【结果】高通量测序获得细菌和真菌 Filtered 的数目分别为 61 992 和 71 196 个, OTU 数目分别为 2 384 和 529 个。经物种分类分析,共附生细菌主要为变形菌门(*Proteobacteria*),其平均相对含量高达 77.37%;其次是厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和梭杆菌门(*Fusobacteria*);其中优势细菌属为嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和乳球菌属(*Lactococcus*)。共附生真菌主要为子囊菌门(*Ascomycota*),其相对含量高达 92.33%;其次是霉菌门(*Fungi*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、被孢菌门(*Mortierellomycota*)和罗兹菌门(*Rozellomycota*);优势真菌属以毕赤酵母属(*Pichia*)为主,未经分类的(*unclassified*)假丝酵母属(*Candida*)次之;【结论】硃洲岛海星体内蕴藏着丰富的共附生微生物资源,该研究为今后从事海星微生物资源持续开发和挖掘生物活性物质的研究提供一定的参考依据。

关键词: 海星, 高通量测序技术, 共附生微生物, 多样性

Analysis of symbiotic microorganism diversity in starfish of Naozhou island based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology

TANG Hui-Fang SUN Li-Jun* LIU Ying* CHEN Quan-Yi FANG Zhi-Jia

College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China

Abstract: [Background] Starfish is a kind of advanced echinoderm in Marine life, which contains abundant and bioactive resources of Symbiotic microorganisms. [Objective] The diversity of starfish symbiotic microorganisms in Naozhou island of Zhanjiang was analyzed. [Methods] Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology was used to sequenced the 16S rRNA gene V3–V4 region and 18S

Foundation items: Science and Technology Project of Guangdong Province (2017A030303079, 2016A020222014)

*Corresponding authors: E-mail: SUN Li-Jun: suncamt@126.com; LIU Ying: liuying@gdou.edu.cn

Received: 29-09-2019; Accepted: 22-01-2020; Published online: 22-02-2020

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A030303079, 2016A020222014)

*通信作者: E-mail: 孙力军: suncamt@126.com; 刘颖: liuying@gdou.edu.cn

收稿日期: 2019-09-29; 接受日期: 2020-01-22; 网络首发日期: 2020-02-22

rRNA gene ITS1-ITS2 region of bacteria and fungi respectively, and OTUs clustering analysis, Alpha diversity analysis and species classification analysis were conducted according to the sequencing results. **[Results]** The number of Filtered bacteria and fungi obtained by high-throughput sequencing is 61 992 and 71 196, and the number of OTUs is 2 384 and 529, respectively. According to the classification of species, the common bacteria are mainly *Proteobacteria*, whose average relative content is up to 77.37%, followed by *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*. Among dominant genus are *Psychrobacter* and *Lactococcus*; Symbiotic Fungi were mainly *Ascomycota*, with a relative content of 92.33%, followed by *Fungi*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota* and *Rozellomycota*. The dominant fungi genus was *Pichia*, followed by unclassified *Candida*. **[Conclusion]** There are abundant resources of symbiotic microorganisms in the starfish of Naozhou island, This study provides some reference for the researchers who are engaged in the sustainable development of starfish microbial resources and the excavation of bioactive substances in the future.

Keywords: Starfish, High-throughput sequencing technology, Symbiotic microorganisms, Diversity

硃洲岛位于中国陆地最南端湛江市区 40 km 外,东邻南海,西邻雷州湾,大约在 20-50 万年前由海底火山爆发而形成的一座纯天然的海岛,该岛不仅具有独特的海洋环境(高盐、高压、缺氧、少光照、低营养等),同时还兼具了南海海域的生态特点,以得天独厚的海洋生境造就和孕育了岛内外的海洋生物,成为寻找和开发海洋共附生微生物的“巨大宝库”^[1-2]。海星(starfish)又名海盘车、星鱼,是生活在海洋中的一类较高级的棘皮类生物,也是目前国际上发现的天然产物最多的药用海洋生物之一^[3-4],由于其独特的摄食特性(主要摄食贝类、海胆、螃蟹等深海行动缓慢的海洋生物),使其富集了大量具有活性的共附生微生物^[5-6]。截至目前,各国研究人员已从海星体内筛选了许多新颖的微生物,并从其代谢产物中挖掘发现了十几类化合物,其中包括皂苷^[7]、甾醇^[8]、生物碱^[9]、萜醌^[10],这些化合物表现出抑菌、抗癌、抑制肿瘤细胞的生长等多种生物活性功能^[11]。陈洋等^[12]利用传统分离培养的方法,从海星的胃及幽门盲囊中分离出一株拮抗性强的黄色杆菌属菌株,该菌株的发酵液对革兰氏阴性菌具有较强的抑制作用;刘威等^[13]也利用传统分离培养方法从海星体内分离获得了一批能产生新颖活性物质的真菌。这些研究结果表明,海星中蕴藏着大量的具有生物活性的共附生微生物类群。

目前,利用传统的分离技术虽然从海星中获得

了一些共附生微生物,但只能代表具体培养条件所能分离到的微生物,无法分离到海星中所有微生物。有研究表明可培养微生物仅占整个微生物群落的 1%,因此仍有大量的非培养微生物未被发现^[14-15]。

近年来,随着分子生物学的快速发展,高通量测序、宏基因组学分析等技术已广泛应用于微生物群落多样性的分析,为探索与分离海洋生物相关的微生物种群提供了有效的支持,并且已取得不菲的科研成果,尤其是 Illumina 高通量测序技术具有通量高、检测全面、准确等特点,能够更加真实地揭示微生物种群结构,为获取更多种类的微生物资源提供依据^[16-18]。

本研究采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术,对硃洲岛海星共附生细菌的 16S rRNA 基因 V3-V4 和真菌的 ITS 区序列进行分析,从而更好地揭示其细菌和真菌的种类组成及菌群多样性的分布,以期开发与利用这一共附生微生物资源提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

海盘车海星(*aster rollestoni bell*),捕捞于硃洲岛海域,带少许海水冰运回实验室。

1.2 主要试剂和仪器

E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit, Omega 公司; DNA 检测试剂盒, Life 公司; 2×Taq Master Mix DNA 聚合酶, Vazyme 公司; DNA 纯化试剂盒,

TransGen 公司。台式离心机, Thermo Fisher 公司; 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 荧光计, Invitrogen 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪、电泳槽, 北京六一生物科技有限公司; 细胞破碎仪, 南京舜玛仪器设备有限公司; 凝胶成像系统, UVP 公司; Illumina MiSeq 高通量测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 海星样品的前处理

样品采集后立即用冰盒运回实验室, 用无菌的生理盐水将样品表面清洗 3 遍, 沥干水分后快速用无菌剪刀将 5 个海星剪碎混合均匀, 取 0.5 g 样品放入 2 mL 离心管中, 加入适量钢珠, 在细胞破碎仪上进行破碎, 破碎后于 -20°C 冷藏备用。

1.3.2 海星样品基因组总 DNA 的提取

取 0.2 g 海星样品参照 E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 的说明书操作, 从样品中提取 DNA, 利用 DNA 检测试剂盒和荧光计对基因组 DNA 精确定量, 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

1.3.3 细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 区域的 PCR 扩增及高通量测序

以海星样品提取的总 DNA 为模板, 采用引物对 341F/805R [5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATC TG(barcode)CCTACGGGNGGCWGCAG-3'/5'-GAC TGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCAGACT ACHVGGGTATCTAATCC-3']PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区域; 采用引物对 ITS1F/ITS2R [5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTN(barcode) CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'/5'-GTGACTG GAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCAGCTGCG TTCTTCAATCGATGC-3']PCR 扩增真菌 ITS1-ITS2 区域。两对引物上均加有接头序列和测序的引物序列, 并且 341F 与 ITS1F 引物还接有不同碱基的标签(barcode)序列用以区分不同样品^[19-20]。

第一次 PCR 反应体系: $2\times$ Taq Master Mix 15 μL , 341F 或 ITS1F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 805R 或 ITS2R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Genomic DNA 10-20 ng, 补双蒸水至 30 μL 。PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 45°C 20 s, 65°C 30 s, 5 个循环; 94°C

20 s, 55°C 20 s, 72°C 30 s, 20 个循环; 72°C 5 min; 10°C 10 min。第二次 PCR 反应体系: $2\times$ Taq Master Mix 15 μL , 341F 或 ITS1F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 805R 或 ITS2R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 第一次 PCR 产物 20 ng, 补双蒸水至 30 μL 。PCR 反应条件: 95°C 3 min; 94°C 20 s, 55°C 20 s, 72°C 30 s, 5 个循环; 72°C 5 min; 10°C 10 min。

两次 PCR 产物分别进行 1.0% 和 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测和切胶回收, 并利用 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量, 按照 1:1 等量混合后测序, DNA 样品浓度取 10 ng, 上机测序浓度选 20 pmol。

1.3.4 高通量测序数据分析

采用 Mothur (V1.30.1) 和 QIIME (V1.8.0) 软件处理分析高通量测序数据。通过 Barcode 区分样品序列, 并对样品中质量值 <20 的序列做质控过滤。然后使用 USEARCH (V5.2.236) 和 UCHIME (V4.2.40) 去除 PCR 预处理过程中非特异性扩增序列和嵌合体, 将具有代表性的优质序列进行 BLASTn 比对。将所有序列按照序列间的距离进行聚类, 以 97% 以上的相似序列作为划分阈值, 进行归类分析并生成可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 并利用 Mothur (V1.30.1) 软件进行 α 多样性指数, 其中有估算物种丰度的 Chao1 和 ACE 指数, 以及估算菌群多样性的 Shannon 和 Simpson 指数, 以及表示样品检出与未检出概率的 Coverage 指数, 基于分类学信息在各个水平上进行海星群落结构的统计分析。

2 结果与分析

2.1 序列拼接质控与 OTU 聚类分析

经 16S rRNA 基因高通量测序后, 得到海星共附生细菌的原始序列为 64 175 条, 质控拼接后得到共附生细菌的优质序列为 61 922 条; 真菌 ITS rRNA 测序共得到 72 884 条, 经质控、去嵌合体、拼接后得到的优质序列为 71 196 条; 在 97% 的相似水平下, 对海星进行 OTU 聚类分析, 得到共附生细菌的 OTU 为 2 384 个, 共附生真菌的 OTU 为 529 个 (表 1)。

表 1 海星体内共附生细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 区域高通量测序基本信息

Table 1 Basic information on high-throughput sequencing of 16S rRNA gene and ITS region of symbiotic and epiphytic bacteria in starfish

基因 Gene	原始序列 Number of raw tags	优质序列 Number of filtered tags	聚类数目 Number of OTUs	不同分类阶元分类单元数目 Number of meta taxon of different classification order				
				门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
16S rRNA	64 175	61 922	2 384	5	11	16	26	30
ITS rRNA	72 884	71 196	529	5	10	15	25	30

2.2 微生物稀释曲线及 α 多样性分析

利用 Mothur 软件做稀释曲线的分析,用于验证测序的数据是否可以反映样品物种的多样性,并间接反映物种丰富度。根据 97%水平下 OTU 的丰度信息,使用稀释曲线和 Shannon 指数曲线对海星共附生细菌和真菌多样性进行评估。结合图 1 和图 2 可以看出,16S rRNA 基因测序的 OTU 稀释曲线随着测序量的深入在不断地增加,而 Shannon 指数曲线也在不断地上升,但在序列数目>30 000 条左右时,Shannon 指数稀释曲线已经进入了平台期。说明尽管随着测序量的继续增加或许有新的物种出现,但在此测序水平的基础上,样品中微生物的多样性将不会继续增加。同理,从 ITS rRNA 测序的稀释曲线来看,曲线呈现先加速升高后缓慢升高的趋势,而 Shannon 指数曲线刚开始也在不断上升,但在测序序列数>30 000 时就已进入饱和状态,即测序量足以覆盖海星样品的大多数真菌类群。因此,本实验测序量合理,可涵盖海星样品中的物种总数及共附生微生物的群落组成。

α 多样性指数分析是衡量和反映样品微生物群落的丰度和多样性,由表 2 可知,细菌的 Chao1 指数(44 097.02)和 ACE 指数(99 316.63)均大于真菌的 Chao1 指数(2 340.54)和 ACE 指数(6 336.96),说明样品中细菌群落的丰度要大于真菌群落的丰度;其次,16S rRNA 基因 Shannon 指数也高于 ITS rRNA 的 Shannon 指数,也可说明共附生细菌的群落多样性要高于真菌;就两者 Coverage 指数而言,两指数值均大于 0.95,说明样品的序列基本上都被检出,则测序结果可反映海星样品的真实情况。

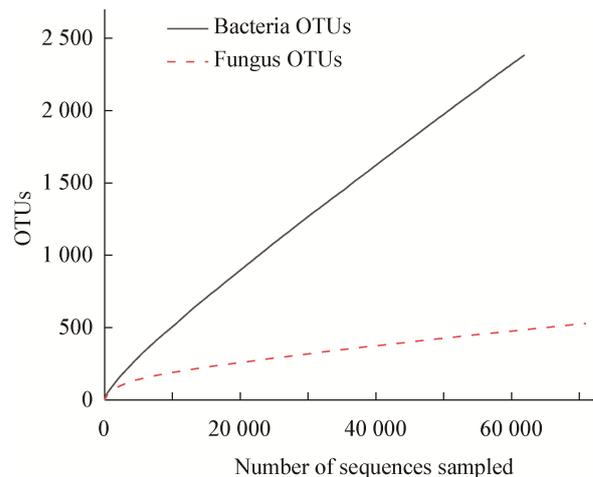


图 1 海星体内共附生细菌和真菌观测物种数稀释曲线
Figure 1 Observation of species dilution curve of symbiotic bacteria and fungi in starfish

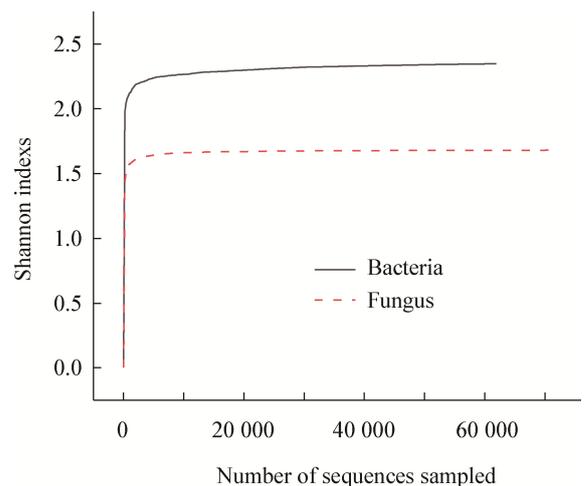


图 2 海星体内共附生细菌和真菌香农指数稀释曲线
Figure 2 Shannon index dilution curve of symbiotic bacteria and fungi in starfish

表 2 海星体内共附生细菌和真菌多样性指数计

Table 2 Diversity index of symbiotic bacteria and fungi in starfish

Region	Chao1 index	ACE index	Shannon index	Coverage	Simpson index
16S rRNA	44 097.02	99 316.63	2.35	0.97	0.31
ITS rRNA	2 340.54	6 336.96	1.68	1.00	0.40

2.3 海星样品细菌、真菌群落在各个水平上的分类比较

2.3.1 海星共附生微生物在门水平上的相对分布

海星样品在门分类水平上的微生物群落组成见图 3。经高通量测序的 16S rRNA 基因共检测出 5 个细菌菌门, 分别属于变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和梭杆菌门(*Fusobacteria*), 其中变形菌门和厚壁菌门的细菌属于优势菌, 其丰度分别占总数的 77.37%和 18.67%。海星样品共注释到真菌 ITS rRNA 序列的 5 个门, 分别是子囊菌门(*Ascomycota*)、霉菌门(*Fungi*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、被孢菌门(*Mortierellomycota*)和罗兹菌门(*Rozellomycota*), 其中子囊菌门所占比例最大(92.33%), 次之的霉菌门占比为 1.41%, 罗兹菌门仅占 0.07%。

2.3.2 海星共附生微生物在纲水平上的相对分布

在纲分类水平上(图 4), 海星样品细菌隶属于 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、芽孢杆菌纲(*Bacilli*)、 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)和拟杆菌纲(*Bacteroidia*)等 11 个纲。其中, γ -变形菌纲为优势菌纲, 占总比例的 65.99%; 其次是芽孢菌纲和 α -变形菌纲, 分别占总比例的 17.9%和 6.09%。经高通量测序, 海星样品共注释到的真菌 10 个纲中, 酵母菌纲(*Saccharomycetes*)、粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)和座囊菌纲(*Dothideomycetes*)为优势菌纲, 分别占真菌纲总含量的 86.99%、2.2%和 1.8%。

2.3.3 海星共附生微生物在目水平上的相对分布

在目分类水平上(图 5), 海星样品在细菌纲的水平下共检测到假单胞菌目(*Pseudomonadales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*)、交替单胞菌目(*Alteromonadales*)、

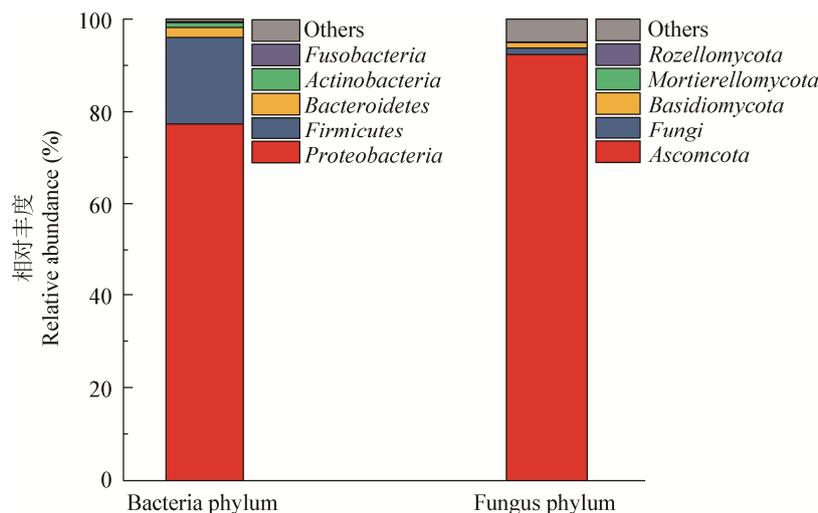


图 3 海星样品中细菌和真菌在门分类阶元上的菌群分布图

Figure 3 Microbial community distribution of bacteria and fungi in starfish samples at phylum level

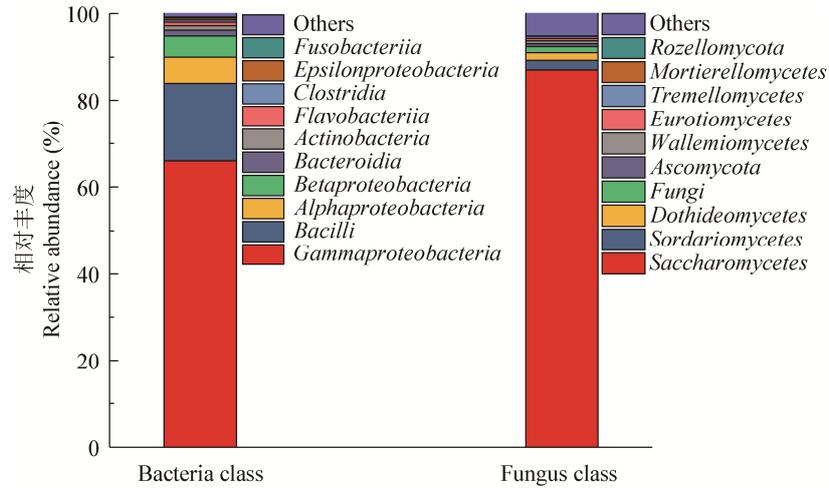


图 4 海星样品中细菌和真菌在纲分类阶元上的菌群分布图

Figure 4 Flora distribution of bacteria and fungi in starfish samples at class classification level

伯克霍尔德里菌目 (*Burkholderiales*)、根瘤菌目 (*Rhizobiales*)、弧菌目 (*Vibrionales*) 等共计 16 个菌目。其中, 假单胞菌目、乳杆菌目、交替单胞菌目所占细菌丰度相对较高, 所占比例依次为 57.31%、17.84% 和 6.97%, 其余 13 个菌目共占总比例的 16.34%。海星真菌共注释到了 15 个目, 其中, 酵母

菌目 (*Saccharomycetales*) 以 86.99% 的含量占绝对的优势, 其次是格孢菌目 (*Pleosporales*)、丰度含量相同的肉座菌目 (*Hypocreales*) 和未确定目的 *Fungi*, 其相对丰度分别为 1.46%、1.14% 和 1.14%, 该 4 个目中真菌丰度累积超过 91.00%, 剩余 6 个真菌丰度仅占 3.12%。

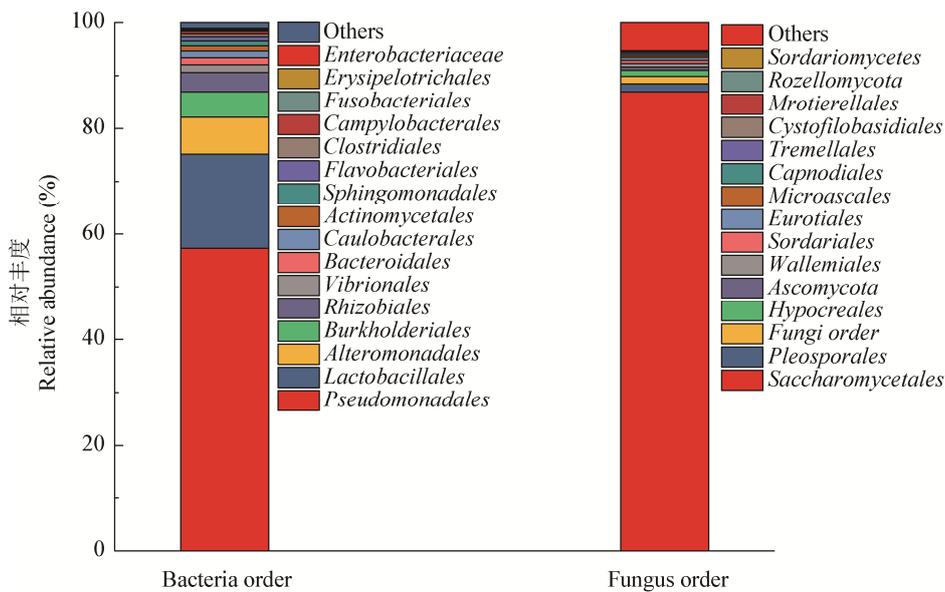


图 5 海星样品中细菌和真菌在目分类阶元上的菌群分布图

Figure 5 Flora distribution of bacteria and fungi in starfish samples at order

2.3.4 海星共附生微生物在科水平上的相对分布

在科分类水平上(表 3), 海星样品中的细菌隶属于 26 个科, 其中丰度超过 10% 的仅有 2 个科, 分别是莫拉菌科(*Moraxellaceae*) (53.90%)和链球菌科(*Streptococcaceae*) (16.71%)。海星样品经测序共检测到真菌 25 个科, 其中仅毕赤酵母菌科(*Pichiaceae*)的丰度含量最高, 为 83.99%, 酵母菌科(*Saccharomycetales*)占 2.04%次之, 其余科的丰度含量均低于 2%, 其中包括丰度含量为 1.41%的 Fungi 和丰度含量为 1.36%的小双腔菌科(*Didymellaceae*), 以及低于 1%的其他 21 个菌科等。

2.3.5 海星共附生微生物在属水平上的相对分布

在属分类水平上(表 3), 海星样品分别注释到 30 个属的细菌和 30 个属的真菌。其中细菌的菌属包含有丰度优势的嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*) (53.54%)、乳球菌属(*Lactococcus*) (16.67%)和丰度百分含量在 1%–10%的希瓦氏菌属(*Shewanella*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、*Parvibaculum* (红菌科下未确定的属)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、苯基杆菌(*Phenylobacterium*)、*Prolixibacter*, 以及低于 1%的其他菌属。通过高通量测序检测到的真菌优势菌属为占总丰度含量 83.99%的毕赤酵母属(*Pichia*), 以及 2.04%和 1.41%的假丝酵母(*Candida*)和未确定真菌属(*Fungi*)等。

表 3 海星在科和属分类水平上的相对丰度排名前 12 的共附生细菌和真菌

Table 3 Relative abundance of the top 12 symbiotic bacteria and fungi in the phylum of the family and genus of starfish

细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
科 Family	属 Genus	科 Family	属 Genus
莫拉菌科	嗜冷杆菌属	毕赤酵母菌科	毕赤酵母菌属
<i>Moraxellaceae</i> (53.9%)	<i>Psychrobacter</i> (53.54%)	<i>Pichiaceae</i> (83.99%)	<i>Pichia</i> (83.99%)
链球菌科	乳球菌属	酵母菌科	假丝酵母属
<i>Streptococcaceae</i> (16.71%)	<i>Lactococcus</i> (16.67%)	<i>Saccharomycetales</i> (2.04%)	<i>Candida</i> (2.04%)
希瓦氏菌科	希瓦氏菌属	小双腔菌科	未确定的真菌属
<i>Shewanellaceae</i> (5.8%)	<i>Shewanella</i> (5.8%)	<i>Didymellaceae</i> (1.36%)	Unidentified fungus genus (1.41%)
丛毛单胞菌科	噬氢菌属	未确定的真菌科	子囊菌属
<i>Comamonadaceae</i> (4.55%)	<i>Hydrogenophaga</i> (4.49%)	Unidentified fungi family (1.41%)	<i>Ascomycota</i> (0.67%)
假单胞菌科	假单胞菌属	子囊菌科	节担菌属
<i>Pseudomonadaceae</i> (3.41%)	<i>Pseudomonas</i> (3.34%)	<i>Ascomycota</i> family (0.67%)	<i>Wallemia</i> (0.62%)
红菌科	食清洁剂细小棒菌	节担菌科	镰孢菌属
<i>Rhodobiaceae</i> (1.69%)	<i>Parvibaculum</i> (1.69%)	<i>Wallemiaceae</i> (0.62%)	<i>Fusarium</i> (0.59%)
叶杆菌科	中慢生根瘤菌属	丛赤壳科	亚隔孢壳属
<i>Phyllobacteriaceae</i> (1.5%)	<i>Mesorhizobium</i> (1.49%)	Nectriaceae (0.59%)	<i>Didymella</i> (0.56%)
弧菌科	苯基杆菌属	毛壳菌科	异壳二孢属
<i>Vibrionaceae</i> (1.46%)	<i>Phenylobacteriu</i> (1.17%)	<i>Chaetomiaceae</i> (0.45%)	<i>Neoascochyta</i> (0.41%)
拟杆菌目未确定科	<i>Prolixibacter</i> (1.14%)	曲霉科	梅奇酵母属
<i>Prolixibacteracea</i> (1.14%)		<i>Aspergillaceae</i> (0.45%)	<i>Metschnikowia</i> (0.37%)
肠球菌科	肠球菌属	海壳科	附球菌属
<i>Enterococcaceae</i> (1.06%)	<i>Enterococcus</i> (1.02%)	<i>Halosphaeriaceae</i> (0.36%)	<i>Epicoccum</i> (0.36%)
黄杆菌科	漠河杆菌属	酵母菌科	酵母菌属
<i>Flavobacteriaceae</i> (0.77%)	<i>Moheibacter</i> (0.55%)	<i>Saccharomycetales</i> family (0.32%)	<i>Saccharomycetales</i> genus (0.32%)
乳杆菌科	乳杆菌属	虫草菌科	拟青霉属
<i>Lactobacillaceae</i> (0.06%)	<i>Lactobacillus</i> (0.06%)	<i>Cordycipitaceae</i> (0.28%)	<i>Simplicillium</i> (0.28%)

3 讨论与结论

微生物广泛存在于不同的环境中,它们依靠宿主提供的空间和营养维持着自身的生存^[21]。海洋作为生命起源最早的地方,为微生物的生存和生长提供了一个纯天然的生存环境,并以其自身的优势孕育着数以万计的生物种群。生活在海洋中的棘皮类动物——海星体内生存着大量的微生物,由于长期生存在高盐、高压、少光照、缺氧等特殊环境,导致他们的生理结构和代谢物与陆地生物有所不同,是值得开发和研究的资源^[22];有研究报道海星肠道微生物的种群密度为 $(8.65 \pm 0.63) \times 10^3$ CFU/mL^[23],但通过传统的分离方法很难真实反映其微生物种群结构与多样性。然而 α 多样性指数是衡量和反映样品微生物群落多样性和物种丰富度的综合指标,其中Chao1指数和ACE指数代表物种的丰度,两指数的大小与物种丰度具有正相关的关系,Shannon、Simpson、Coverage指数均代表微生物群落的多样性,数值越高表明群落的多样性越高^[24]。本研究通过Illumina MiSeq高通量测序技术的非培养方法来解析硃洲岛海星样品中共附生细菌和真菌的 α 多样性,从而可以更加准确地揭示海星共附生微生物的群落多样性及物种丰富度。

通过对细菌16S rRNA基因V3-V4的测定,共注释到5个门11个纲15个目26个科30个属,说明海星中蕴藏着极其丰富的微生物资源。Ivanova等^[25]通过传统的分离技术从骑士章海星(*Stellaster equestris*)中分离到一株硫酸杆菌的新种*Sulfitobacter delicatus*,经过测定该菌具有降解明胶的能力,但不能降解甲壳素及酪蛋白;Zhang等^[26]从三亚一个不明身份的海星中分离到一株革兰氏阴性杆菌*Lutimaribacter marinistellae* SF-12^T,该菌与*Lutimaribacter litoralis* KU5D5^T和*Rhodobacteraceae*的16S rRNA基因序列相似性分别为95.92%和95.9%,根据化学分类和系统发育树的分析得出该菌属于*Lutimaribacter*上一个新的物种,这为海星共附生微生物新种群的发现开启了新的篇章;关于

本次对海星高通量测序细菌属水平上的分析表明,嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)以占比53.54%的优势高于其他菌属,推测可能由于海星常常游走于温度较低的海域深处和砂质海底的缘故,使得其体内富集了一些嗜冷和较耐冷微生物;除了属水平的嗜冷杆菌外,还检测出常用于乳制品发酵的乳球菌属(*Lactococcus*)^[27]以及具有降解染料功能的希瓦氏菌属(*Shewanella*)^[28]。通过Illumina MiSeq高通量测序技术不仅可以更好地揭示海星共附生微生物的种群结构,而且还可作为今后从事海星可培养水平微生物的分离工作者提供一定的理论导向。

基于OTU聚类分析的结果,表明海星样品中的真菌分属于5个门10个纲15个目25个科30个属。其中子囊菌门(*Ascomycota*)和酵母纲(*Saccharomycetes*)分别以92.33%和86.99%的含量占据绝对优势;在属水平上,毕赤酵母菌属(*Pichia*)和假丝酵母属(*Candida*)分别以83.99%和2.04%的占比位居首位和次位,张铎和孟召雷两个团队在菌种筛选的过程中分别筛选到了具有降解柠檬酸能力的毕赤酵母菌属(*Pichia*)和产丙酮酸能力的假丝酵母属(*Candida*)^[29-30],但是关于海星中的酵母菌属还未曾有人报道;李厚金等^[31]从长棘海星的内组织中分离得到一株共附生真菌(*Trichoderma erinaceum*),经核磁共振和质谱鉴定了该菌产生的Trichodermaerin A和Trichodermaerin B为两个新化合物。通过高通量测序结果设计不同的分离策略,从而可以获得海星中不同种类的共附生微生物,继而不断挖掘其生物活性。

REFERENCES

- [1] Huang K, Zhang L, Liu ZX, et al. Diversity of culturable bacteria associated with the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* from Naozhou Island[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(11): 1424-1429 (in Chinese)
黄奇, 张丽, 刘祝祥, 等. 硃洲岛海胆可培养细菌的多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(11): 1424-1429
- [2] Liu Y, Shi W, An JY, et al. Diversity of antimicrobial bacteria associated with *Siganus fuscescens* from Naozhou island in Zhanjiang, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(5): 582-588 (in Chinese)

- 刘颖, 时威, 安俊莹, 等. 硃洲岛褐蓝子鱼肠道抗菌活性菌株的分离及多样性[J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 582-588
- [3] Tian LY, Hou XX, Tong CQ, et al. Separation and identification of chemical constituents from starfish *Asterias amurensis* Lutken[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(6): 650-653 (in Chinese)
田丽冉, 侯秀秀, 佟长青, 等. 多棘海盘车化学成分的分离与鉴定[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(6): 650-653
- [4] Zhang YF, Xu Y, Fang W, et al. *Pseudoruegeria marinistellae* sp. nov., isolated from an unidentified starfish in Sanya, China[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(2): 187-194
- [5] Chen N, Wang X, Liu B, et al. Research progress on the chemical constituents of starfish[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2019, 38(2): 39-53 (in Chinese)
陈宁, 王雪, 刘冰, 等. 海星化学成分的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(2): 39-53
- [6] Wang WH. New bioactive compounds from the Starfish *Certonaroda semiregularis*[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Pharmaceutical University, 2003 (in Chinese)
王伟红. 赤海星中生物活性化学成分的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学博士学位论文, 2003
- [7] Wang WH, Jang HJ, Hong JK, et al. New cytotoxic sulfated saponins from the Starfish *Certonaroda semiregularis*[J]. Archives of Pharmacal Research, 2005, 28(3): 285-289
- [8] Xu DH, Huang SL, Xu SB. Starfish sterol protects anisodine treated mice from impairment of learning and memory[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2000, 14(2): 121-124 (in Chinese)
许东晖, 黄世亮, 许实波. 海星甾醇保护樟柳碱处理的小鼠免致学习记忆障碍[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(2): 121-124
- [9] Ohba M, Imasho M, Fujii T. ChemInform abstract: synthetic studies on the starfish alkaloid imbricatine. Construction of an ent-imbricatine framework[J]. ChemInform, 1999, 30(30): 1-2
- [10] Inagaki M, Isobe R, Kawano Y, et al. Isolation and structure of three new Ceramides from the starfish *Acanthaster planci*[J]. European Journal of Organic Chemistry, 1998, 1998(1): 129-131
- [11] Tsai YH, Chao SM, Lin GT, et al. Tetrodotoxins of the starfish *Astropecten vappa* collected from western Taiwan[J]. Fisheries Science, 2004, 70(5): 930-932
- [12] Chen X, Zhang XK, Song XF, et al. Screening and preliminary research of endophytic bacteria in starfish with antimicrobial activity[J]. Journal of Yunnan Nationalities University (Natural Sciences Edition), 2008, 17(3): 238-240 (in Chinese)
陈详, 张小葵, 宋效飞, 等. 具抑菌活性海星内生细菌的筛选及初步研究[J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2008, 17(3): 238-240
- [13] Liu W, Liang WL, Xie ZL, et al. Isolation, identification and diversity of fungi associated with *Acanthaster planci* collected from the South China Sea[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2015, 54(1): 84-88,95 (in Chinese)
刘威, 梁婉玲, 谢中梁, 等. 南海长棘海星共附生真菌的分离鉴定及多样性分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2015, 54(1): 84-88,95
- [14] He J, Xie L, Chen MF, et al. Comparison of two different stinky tofu brines microbial diversity with 454 high-throughput techniques[J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(4): 46-52 (in Chinese)
贺静, 谢靓, 陈森芬, 等. 454 高通量技术比较两种不同臭豆腐卤水中微生物多样性[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(4): 46-52
- [15] Gu JS, Hou J, He GQ. Diversity of bacteria in stinky tofu by high-throughput sequencing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(3): 250-255 (in Chinese)
谷静思, 侯娟, 何国庆. 高通量测序分析臭豆腐中的细菌菌种多样性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 250-255
- [16] Aregbe AY, Mu TH, Sun HN. Effect of different pretreatment on the microbial diversity of fermented potato revealed by high-throughput sequencing[J]. Food Chemistry, 2019, 290: 125-134
- [17] Bai FR, Yao L, Tian HX, et al. Fungal diversity in fermented Menhai Pu-erh tea using high throughput sequencing and culture isolation[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(12): 43-51 (in Chinese)
白飞荣, 姚粟, 田海霞, 等. 基于高通量测序和可培养方法的勐海发酵普洱茶真菌多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 43-51
- [18] Gao QK, Jiao LS, Du HC, et al. High-throughput sequencing analysis of microbial community diversity of hairtail from different waters during chilled storage[J]. Food Science, 2018, 39(18): 127-132 (in Chinese)
高乾坤, 焦琳舒, 杜贺超, 等. 高通量测序分析不同产地带鱼冷藏时微生物群落多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 127-132
- [19] Yang CY, Li Y, Zhou B, et al. Illumina sequencing-based analysis of free-living bacterial community dynamics during an *Akashiwo sanguine* bloom in Xiamen sea, China[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8476
- [20] Fu YJ, Zhang JL, Hou XQ. Comparative analysis of fungi diversity in rhizospheric and non-rhizospheric soil from *Cyrtopodium macranthum* estimated via high-throughput sequencing[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(2): 253-259 (in Chinese)
付亚娟, 张江丽, 侯晓强. 大花杓兰根际与非根际土壤真菌多样性的高通量测序分析[J]. 西北农业学报, 2019, 28(2): 253-259
- [21] Wang W. Study on the diversity and inhibition activity of sponge *Pseudoceratina* sp. associated bacteria from Xie Yang island[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2018 (in Chinese)
王伟. 斜阳岛海绵 *Pseudoceratina* sp. 共附生细菌的多样性及抑菌活性研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2018
- [22] Miao TT, Xing X, Du ZJ, et al. Isolation and phylogenetic

- analysis of associated bacteria from the *Styela clava*[J]. *Advances in Marine Science*, 2012, 30(1): 111-118 (in Chinese)
苗婷婷, 邢翔, 杜宗军, 等. 柄海鞘共附生细菌的分离培养与系统发育多样性研究[J]. *海洋科学进展*, 2012, 30(1): 111-118
- [23] Kim CH, Go HJ, Oh HY, et al. Identification of a novel antimicrobial peptide from the sea star *Patiria pectinifera*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 86: 203-213
- [24] Gao J, Liu M, Wu DD, et al. Analysis of diversity of flora in sourdough by high-throughput sequencing and effect of the flora on the quality of steamed bread[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2019, 34(7): 13-19 (in Chinese)
高静, 刘敏, 吴丹丹, 等. 基于高通量测序分析老面中菌群多样性及其对馒头品质的影响[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(7): 13-19
- [25] Ivanova EP, Gorshkova NM, Sawabe T, et al. *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster equestris*) and sea grass (*Zostera marina*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(2): 475-480
- [26] Zhang YF, Tang PP, Xu Y, et al. *Lutimaribacter marinistellae* sp. nov., isolated from a starfish[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(9): 3675-3680
- [27] Guo LD, Liu Q, Jiang LQ, et al. Isolation and properties of *Lactococcuslactis* strain from kefir grains[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 121-125 (in Chinese)
国立东, 刘倩, 江柳青, 等. 开菲尔粒中一株乳酸乳球菌的分离及性能研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(9): 121-125
- [28] Xu MY, Guo J, Zhong XY, et al. A broad spectrum decoloration *Shewanella* new species — *Shewanella cinica*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 561-566 (in Chinese)
许玫英, 郭俊, 钟小燕, 等. 一个降解染料的希瓦氏菌新种——中国希瓦氏菌[J]. *微生物学报*, 2004, 44(5): 561-566
- [29] Zhang D, Mao Y, Mao J, et al. Study on isolation and identification of reducing citric acid strains[J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(5): 3-7,13 (in Chinese)
张铎, 毛勇, 毛健, 等. 降柠檬酸菌株的筛选及鉴定[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 3-7,13
- [30] Meng ZL, Chi ZM, Tang W. Yeasts from the ocean and their characteristics studying elementarily[J]. *Liquor Making*, 2004, 31(5): 32-34 (in Chinese)
孟召雷, 池振明, 唐伟. 从海洋中分离到的酵母菌及其特性初探[J]. *酿酒*, 2004, 31(5): 32-34
- [31] Li HJ, Xie ZL, Lan WJ, et al. Terpene metabolites of marine fungi *Trichoderma erinaceum*[C]. Shanghai: Shanghai Hans Publishing House, 2012: 321 (in Chinese)
李厚金, 谢中梁, 蓝文健, 等. 海洋真菌 *Trichoderma erinaceum* 的萜类代谢产物[C]. 上海: 上海汉斯出版社, 2012: 321