

涠洲岛 2 种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌多样性

陈金妮¹, 梁甲元^{*1,2,3}, 余克服^{1,2,3}, 俞小鹏¹, 葛瑞琪¹, 覃良云¹, 许勇前¹

1 广西大学海洋学院, 广西 南宁 530004

2 广西南海珊瑚礁研究重点实验室, 广西 南宁 530004

3 广西大学珊瑚礁研究中心, 广西 南宁 530004

陈金妮, 梁甲元, 余克服, 俞小鹏, 葛瑞琪, 覃良云, 许勇前. 涠洲岛 2 种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 909-923.

CHEN Jinni, LIANG Jiayuan, YU Kefu, YU Xiaopeng, GE Ruiqi, QIN Liangyun, XU Yongqian. Diversity of potential heat-tolerant bacteria associated with two species of scleractinian corals in Weizhou Island[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 909-923.

摘要:【背景】珊瑚适应环境的能力与机体内共附生细菌有关, 然而, 这些细菌在珊瑚宿主适应环境变化过程中所起的作用尚不清楚。对珊瑚共附生细菌进行纯培养, 探究其生物功能和生态作用, 是解析珊瑚宿主环境适应机理的重要途径。【目的】研究热耐受性不同的 2 种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌多样性和功能, 为理解珊瑚适应环境的能力提供新的认识。【方法】从涠洲岛选取 2 种热耐受性差异显著的霜鹿角珊瑚(*Acropora pruinosa*)和丛生盔形珊瑚(*Galaxea fascicularis*)为研究对象, 采用 2216E、海水 R₂A 和海水 GYP 这 3 种琼脂培养基, 于 32 °C (珊瑚热耐受阈值)培养条件下对珊瑚共附生潜在耐热细菌进行分离培养, 对分离菌株进行 16S rRNA 基因测序和序列相似性分析。选取代表菌株进行热耐受性检验, 并利用平板对峙法进行抗菌活性检测。【结果】2 种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌的多样性存在显著差异。从热敏型的霜鹿角珊瑚中获得 44 株细菌, 隶属于 4 个门 22 个属, 其中弧菌属(*Vibrio*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和 *Tenacibaculum* 为优势属; 从热耐受性强的丛生盔形珊瑚中获得 28 株细菌, 隶属于 3 个门 11 个属, 其中弧菌属、假交替单胞菌属和鲁杰氏菌属(*Rugeria*)为优势属。此外, 分离菌株中有 17 株菌与 16S rRNA 基因序列相似性低于 98.65%, 可能代表潜在的新分类单元。细菌热耐受性试验研究中, 在 26–37 °C 温度范围内, 细菌生长速率均在 34 °C 时最大, 温度高于大多数海洋细菌的最适生长温度和珊瑚白化阈值, 表明分离获得的细菌具有一定的耐热性。来源于丛生盔形珊瑚的 2 株鲁杰氏菌对珊瑚潜在病原弧菌具有抑制作用, 而来自霜鹿角珊瑚 *Tenacibaculum* 的 3 株细菌对弧菌的抑制作

资助项目: 国家自然科学基金(42090041, 42030502); 广西壮族自治区自然科学基金(2018GXNSFAA281328, AD17129063, AA17204074)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42090041, 42030502) and the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2018GXNSFAA281328, AD17129063, AA17204074).

*Corresponding author. E-mail: jyliang@gxu.edu.cn

Received: 2022-04-06; Accepted: 2022-09-25; Published online: 2022-11-11

用不明显。【结论】2种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌具有丰富的多样性，而且蕴含着不少潜在新类群。另外，条件致病菌弧菌作为优势类群，但来源于热耐受性强的珊瑚共附生细菌对其有一定的拮抗作用。因此，本研究推测珊瑚的耐热特性与体内共生细菌对致病菌的抑制作用有关。

关键词：珊瑚礁；共附生细菌；纯培养；热胁迫；弧菌

Diversity of potential heat-tolerant bacteria associated with two species of scleractinian corals in Weizhou Island

CHEN Jinni¹, LIANG Jiayuan^{*1,2,3}, YU Kefu^{1,2,3}, YU Xiaopeng¹, GE Ruiqi¹, QIN Liangyun¹, XU Yongqian¹

1 School of Marine Sciences, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Guangxi Key Laboratory on the Study of Coral Reefs in the South China Sea, Nanning 530004, Guangxi, China

3 Coral Reef Research Center of China, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: [Background] The environmental resilience of scleractinian corals is related to the associated bacteria. However, it is unclear how these bacteria adapt to the environmental changes. Studying the biological and ecological roles of these bacteria isolated via pure culture method is a fundamental approach to decipher the environment adaptation mechanism of corals. **[Objective]** To study the diversity and function of the heat-tolerant bacteria associated with two species of corals and further provide new insights into the environmental resilience of scleractinian corals. **[Methods]** We used three media, 2216E, seawater GYP, and seawater R₂A agar, to isolate the heat-tolerant bacteria associated with two coral species (*Acropora pruinosa* and *Galaxea fascicularis*) with significant differences in heat tolerance from Weizhou Island, Beibu Gulf at 32 °C (heat tolerance threshold of corals). The 16S rRNA gene sequencing and sequence similarity analysis were then performed for the isolated bacteria. Predominant strains were selected and tested for the heat tolerance, and their antibacterial activity was analyzed by the plate confrontation method. **[Results]** The diversity of the potential heat-tolerant bacteria showed significant difference between the two coral species. A total of 44 strains of potential heat-tolerant bacteria belonging to 22 genera of 4 phyla were isolated from *A. pruinosa*, among which *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, and *Tenacibaculum* were predominant. A total of 28 heat-tolerant bacterial strains belonging to 11 genera of 3 phyla were isolated from *G. fascicularis*, among which *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, and *Rugeria* were predominant. Among the isolated bacteria, 17 strains shared the 16S rRNA gene sequence similarity below 98.65%, which might be new taxa. The growth conditions of bacteria were studied at 26–37 °C, which showed the optimal growth temperature was 34 °C, higher than the optimal growth temperature of most marine bacteria and coral bleaching threshold, indicating that the isolated bacteria had potential heat resilience. Two strains of *Rugeria* had an inhibitory effect on *Vibrio*, a potential pathogen associated with coral diseases, and 3 strains of *Tenacibaculum* did not exert significantly inhibitory activity. **[Conclusion]** The diversity of bacteria associated with *A. pruinosa* and *G. fascicularis* is high and

needs to be further researched. Although the opportunistic pathogen *Vibrio* was the predominant genus, the bacteria associated with *G. fascicularis* had an inhibitory effect on it. Based on the above results, we hypothesized that the heat resilience of scleractinian corals was related to the inhibitory effect of the coral-associated bacteria on pathogenic bacteria.

Keywords: coral reefs; associated bacteria; pure culture; heat stress; *Vibrio*

珊瑚与共附生微生物(包括虫黄藻、细菌、古菌、真菌和病毒等)以共生功能体(holobiont)的形式存在^[1-2]。其中,细菌的多样性最高^[3],在共生体的能量供应、物质循环和免疫应答等方面发挥重要作用^[4-5]。与珊瑚宿主相比,细菌繁殖周期短,新陈代谢旺盛,在热胁迫中表现出较强的适应能力^[6]。此外,珊瑚适应环境的能力与细菌密切相关^[7-9],珊瑚宿主在高温条件下通过改变微生物群落以适应高温环境。例如,Ziegler 等^[6]将不同生境中的风信子鹿角珊瑚(*Acropora hyacinthus*)进行交叉移植,17 个月后将 *A. hyacinthus* 进行短期的热胁迫,结果显示,从适温稳定环境中移植到高温多变环境中的珊瑚白化程度更低,这可能是由于珊瑚从高温多变的环境中吸收了帮助其提高热耐受性的微生物。全球变暖背景下,不同珊瑚物种对热胁迫敏感性存在显著差异,认为分枝形态的珊瑚比块状珊瑚更容易发生白化、死亡^[10-11],这种差异可能与珊瑚共附生细菌多样性有关^[6,12]。例如,Liang 等^[13]利用高通量测序技术对南海块状珊瑚和枝状珊瑚共附生细菌多样性调查发现,珊瑚对共附生细菌的选择具有偏好性,这可能与其热/冷耐受性差异有关。同样,Yu 等^[14]的研究也指出,共附生细菌群落组成和核心菌群的差异可能影响十字牡丹珊瑚(*Pavona decussata*)和霜鹿角珊瑚对高温的适应性差异。然而高通量测序技术无法确定特定细菌类群的生态功能。因此,需要传统的培养技术对珊瑚共附生细菌进行分离与鉴定,为研究细菌在珊瑚宿主

适应环境变化过程中的作用提供科学依据。

对珊瑚共附生细菌进行纯培养有助于深入研究细菌的功能及生态作用。以珊瑚益生菌 *Endozoicomonas* 属为例,该菌能参与宿主内蛋白质和碳水化合物的运输和循环^[15],并增强虫黄藻对白化病原体感染的抵抗力^[16]。Ding 等^[17]利用纯培养技术从珊瑚体内分离出的细菌 *Endozoicomonas montiporae* CL-33,被证实应在应激条件下可能通过预防线粒体功能障碍与促进糖原异生的方式增强珊瑚的环境适应性。目前,能被分离培养的珊瑚共附生细菌类群主要集中在变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和放线菌门(*Actinobacteria*)等^[18]。此外,分离具有特定功能的菌株有助于理解珊瑚宿主与共附生微生物的关系^[19]。珊瑚属于窄温性刺胞动物,其最适生长的海水表层温度(sea surface temperature, SST)为 25–29 °C,当 SST 高于珊瑚可以承受的上限温度 1–2 °C 时,珊瑚共生体系遭到破坏从而出现热白化现象^[20]。基于此,我们以珊瑚热耐受阈值 32 °C 作为筛选条件,对珊瑚共附生潜在耐热细菌进行分离、鉴定。

涠洲岛位于南海北部,被认为是全球气候变化背景下珊瑚的潜在避难所^[21]。20 世纪 80 年代以前涠洲岛珊瑚礁发育良好,生物多样性丰富。然而,由于气候变化和人为活动的影响,涠洲岛珊瑚礁生态系统近几十年呈现衰退的趋势,珊瑚群落结构也发生变化,热敏型的枝状

珊瑚(鹿角珊瑚和蔷薇珊瑚等)被热耐受性强的块状珊瑚(滨珊瑚、扁脑珊瑚、蜂巢珊瑚和菊花珊瑚等)取代^[22]。因此,研究涠洲岛块状珊瑚和枝状珊瑚之间的热耐受差异,对研究影响珊瑚耐受性的关键因素及珊瑚礁生态系统在未来气候变化背景下的潜在适应性提供重要的见解。然而,目前未有研究利用纯培养的技术揭示珊瑚热耐受性差异与共附生细菌的关系,对细菌的生态功能也缺乏清晰的认识。

本研究选择北部湾涠洲岛珊瑚礁热敏型的霜鹿角珊瑚和热耐受性强的丛生盔形珊瑚为研究对象,采用3种培养基(2216E、海水GYP和海水R₂A琼脂培养基),在热压32℃培养条件下,对珊瑚共附生潜在耐热细菌进行分离、培养与鉴定,并分析其多样性。另外,选取代表菌株进行热耐受性检验和抗菌活性测定,进而从微生物拮抗作用方面推理珊瑚对环境耐受性的微生态机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

涠洲岛(21°00'N, 109°00'E)位于南海北部

相对高纬度的亚热带海区,该海域年平均气温为22.6℃,最低和最高的月平均气温分别出现在1月(15.3℃)和7月(28.9℃),年平均降水量为1380.2mm,年平均海面温度为24.62℃,年平均盐度为31.9‰,海水透明度为3.0–10.0m;海水pH值为8.00–8.23^[23]。涠洲岛的气候属性和良好的水文条件,为珊瑚及礁栖生物提供良好的栖息地。

在北部湾涠洲岛珊瑚礁区采集霜鹿角珊瑚和丛生盔形珊瑚各1块(图1),个体大小约为20cm×20cm。将采集的珊瑚样品打包后于24h内运送至广西大学珊瑚礁养殖中心的养殖缸内,调节水温至26℃,2h后珊瑚触手慢慢恢复伸展,待珊瑚状态稳定后进行下一步实验。

1.1.2 菌株

溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*) ATCC BAA-450和欧文斯氏弧菌(*Vibrio owensii*) LMG 25443为本实验室保存,热耐受性试验研究和抗菌活性测定研究中的代表菌株为本实验分离获得。

1.1.3 培养基、主要试剂和仪器

2216E琼脂培养基和海水R₂A琼脂培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;其

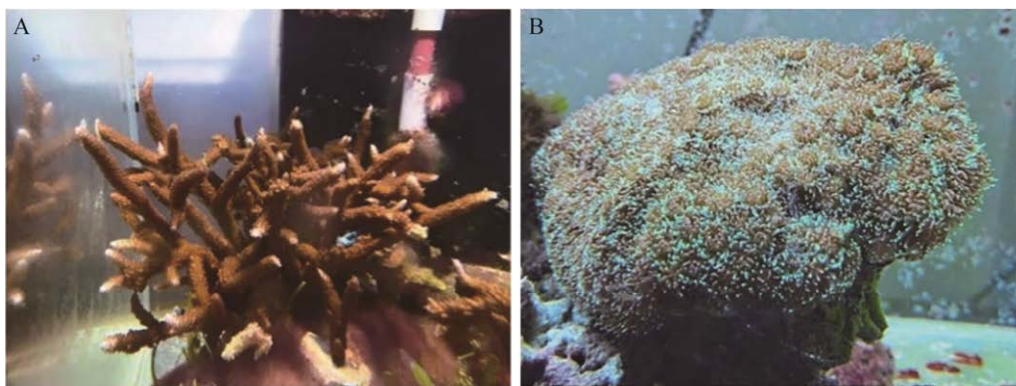


图1 热耐受性不同的2种造礁珊瑚 A: 霜鹿角珊瑚. B: 丛生盔形珊瑚

Figure 1 Two species of scleractinian corals with different heat tolerance. A: *Acropora pruinosa*. B: *Galaxea fascicularis*.

中海水 R₂A 琼脂培养基参照文献[2]使用海水溶解。GYP 琼脂培养基按照参考文献[2]配制。

PCR 相关试剂, 宝生物工程(大连)有限公司; 细菌 16S rRNA 基因扩增引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。隔水式电热恒温培养箱, 上海龙跃仪器设备有限公司; 气浴恒温恒速振荡器, 常州国宇仪器制造有限公司; PCR 仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离与纯化

分别取 1 cm×1 cm 大小的两种珊瑚样品各 3 份, 放入干净灭菌的离心管中。在超净工作台将珊瑚样品用无菌海水冲洗 3–5 遍, 洗去残留海水。往离心管中加入 1 mL 无菌海水, 用研磨杵和剪刀将珊瑚剪碎研磨, 离心管振荡涡旋 2 min, 静置 3–5 min。用移液枪吸取同种珊瑚的上清液混合, 将混合液稀释后取 200 μL 分别涂布到配制好的 2216E、海水 GYP 和海水 R₂A 琼脂平板中, 每种培养基设置 5 个生物学重复。涂布好的平板转移到 32 °C 的培养箱, 倒置培养 3–5 d。从平板上挑取大小、形态和颜色等不同的菌落划线纯化, 纯化后的菌株接种到海洋 2216E 液体培养基中, 于 32 °C、160 r/min 的振荡器中培养 1 d, 液体浑浊后, 按照 1:1 (体积比)加入含 40% (质量体积分数)灭菌甘油溶液于–80 °C 保藏备用。

1.2.2 细菌 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增和测定

细菌 DNA 模板的制备参考徐帅良^[2]描述的方法进行。用无菌牙签挑取适量菌落于 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 超纯水, 在 100 °C 沸水中煮 10 min, 8 000 r/min 离心 5 min 后的上清液即为 PCR 模板。16S rRNA 基因扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC

TT-3')进行。PCR 反应体系(40 μL): DNA 模板 (20 ng/μL) 1 μL, 2×Taq PCR Master Mix 20 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 补足 40 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 57 °C 50 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后, 取 2 μL PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 电泳结果用凝胶成像仪观察, 选取条带清晰的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 16S rRNA 基因序列分析与系统发育树构建

16S rRNA 基因测序结果导入到 DNA Star 8 软件检查 DNA 峰图, 去除峰图杂乱的碱基后, 将两端序列进行拼接, 获得的有效序列在 NCBI 数据库 BLAST 模块和 EzBioCloud 进行比对, 根据相似度较高的序列确定菌株的分类地位。将测序拼接好的菌株序列和相似性较高的参考菌株序列导入 MEGA 7.0 软件, 使用 Clustal W 模块进行多重比对, 根据 Kimura 2-parameter 模型计算进化距离, 基于近邻相接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.2.4 菌株核苷酸序列登录号

测序获得的细菌 16S rRNA 基因序列提交到国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmdec.cn/>)数据库中, 登录号为 NMDCN0001006–NMDCN0001009, NMDCN000100A–NMDCN000100V, NMDCN00010P0–NMDCN00010P9, NMDCN00010PA–NMDCN00010PV, NMDCN00010Q0–NMDCN00010Q9, NMDCN00010QA–NMDCN00010QD。

1.2.5 细菌热耐受性试验

选择假交替单胞菌 AR010、弧菌 GE004、鲁杰氏菌 GE010 和 *Tenacibaculum* AE008 共 4 株细菌为研究对象, 采用单因素试验方法对

细菌进行热耐受性检验。将待测细菌接种到 2216E 液体培养基中, 做好标记后分别放置在温度为 26、29、32、34、37 °C 和转速为 160 r/min 的条件下培养, 每个样品设置 3 个生物学重复。在培养的第 3、6、12、24、36、48、60 和 84 h, 每种细菌取 200 μ L 菌液加入到 96 孔细胞培养板, 使用多功能酶标仪测定菌液在 600 nm 处的吸光度值。

1.2.6 细菌抗菌活性测定

采用平板对峙法测定细菌抗菌活性, 具体步骤参照蒋庆茹等^[24]方法稍作修改。首先, 将鲁杰氏菌属和 *Tenacibaculum* 属代表菌株、溶珊瑚弧菌和欧文斯氏弧菌分别接种在 2216E 液体培养基中, 在 32 °C、160 r/min 条件下振荡培养至菌液 OD_{600} 值为 0.6 左右。按 1% 的接种量将指示菌接种到灭菌温度下降至 55 °C 左右的 2216E 固体培养基中, 充分混匀后倒板, 冷却凝固即可获得测试平板。将无菌圆形滤纸(直径 6 mm)置于测试平板, 吸取 20 μ L 目的菌液滴到滤纸上, 对照组加 20 μ L 浓度为 1 mg/mL 的氨苄(ampicillin)和链霉素(streptomycin)混合液, 每组设置 3 个重复。32 °C 恒温培养 24 h 以上, 观察抑菌情况。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化结果

使用 3 种培养基, 在 32 °C 条件下, 从 2 种珊瑚样品中共分离到 72 株珊瑚共附生潜在耐热细菌, 其中 44 株来源于霜鹿角珊瑚, 28 株来源于丛生盔形珊瑚。菌落颜色多样, 有乳白色、黄色和紫色等。

2.2 分离细菌的多样性及系统发育树分析

经过 16S rRNA 基因序列比对, 霜鹿角珊瑚来源的 44 株细菌隶属于 4 个门 22 个属 33 个种(表 1)。4 个门分别为变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和酸杆菌门。其中, 变形菌门有 12 个属 19 个种, 拟杆菌门有 8 个属 11 个种, 厚壁菌门有 1 个属 2 个种, 酸杆菌门仅有 1 个属 1 个种。系统发育树结果显示 44 株细菌聚类于变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和酸杆菌门(图 2)。

丛生盔形珊瑚来源的 28 株细菌隶属于 3 个门 11 个属和 20 个种(表 1)。3 个门分别为变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门。其中, 变形菌门有 8 个属 17 个种, 厚壁菌门有 2 个属 2 个种, 拟杆菌门仅分离到 1 个属 1 个种。系统发育树结果显示 28 株细菌聚类于变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门(图 3)。

表 1 两种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 1 Comparison of 16S rRNA gene sequences of potential heat-tolerant bacteria associated with two species of scleractinian corals

代表菌株 Representative isolate	属 Genus	相似菌种 Closest strains	GenBank 登录号 GenBank accession No.	分离来源 Origin of isolates	相似性 Similarity (%)
				A G	
GE002	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio owensii</i>	NR_117424	2	99.78
GG005		<i>Vibrio tubiashii</i>	NR_118093	3 1	99.34
AE014		<i>Vibrio profundii</i>	NR_164983	1	99.64
GE008		<i>Vibrio maritimus</i>	NR_117551	1	98.89
AR007		<i>Vibrio hepatarius</i>	NR_025491	1	99.49
GE004		<i>Vibrio alginolyticus</i>	NR_113781	3	99.71
AE005		<i>Vibrio coralliilyticus</i>	NR_117892	1	99.36
AG006	<i>Kordia</i>	<i>Kordia jejudonensis</i>	NR_126287	1	97.70

(待续)

(续表 1)

代表菌株 Representative isolate	属 Genus	相似菌种 Closest strains	GenBank 登录号 GenBank accession No.	分离来源 Origin of isolates		相似性 Similarity (%)
				A	G	
AE011	<i>Shimia</i>	<i>Shimia marina</i>	NR_043300	1		98.67
AE006	<i>Olleya</i>	<i>Olleya algicola</i>	NR_157624	2		100.00
GG001	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus iocasae</i>	NR_158045	1	2	99.93
AG007		<i>Bacillus kochii</i>	NR_117050	1		99.63
GE010	<i>Ruegeria</i>	<i>Ruegeria conchae</i>	NR_109062		3	99.92
GG008		<i>Ruegeria profundii</i>	NR_159175		1	99.53
AE009		<i>Ruegeria arenilitoris</i>	NR_109635	2	1	99.23
AR001	<i>Pleionea</i>	<i>Pleionea mediterranea</i>	NR_135696	1		100.00
GR006	<i>Amphritea</i>	<i>Amphritea spongicola</i>	NR_135881		1	98.00
AE004	<i>Lacinutrix</i>	<i>Lacinutrix venerupis</i>	NR_145942	1		96.86
AE001	<i>Lewinella</i>	<i>Lewinella cohaerens</i>	NR_112672	2		96.69
AG004	<i>Altibacter</i>	<i>Altibacter lentus</i>	NR_126240	2		94.85
AR015	<i>Aquimarina</i>	<i>Aquimarina litoralis</i>	NR_116703	1		99.93
AG003	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	NR_025218	1		97.48
GR003	<i>Alteromonas</i>	<i>Alteromonas oceani</i>	NR_159349		1	99.92
AR016		<i>Alteromonas australica</i>	NR_116737	1		98.89
GR004		<i>Alteromonas macleodii</i>	NR_037127		1	99.70
AR004	<i>Oceanicaulis</i>	<i>Oceanicaulis stylophorae</i>	NR_108907	1		98.63
AE010	<i>Tritonibacter</i>	<i>Epibacterium mobile</i>	NR_115921	1		99.92
AR005	<i>Robiginitalea</i>	<i>Robiginitalea myxolifaciens</i>	NR_041514	1		99.48
AE002	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter longus</i>	NR_041889	3		100.00
GE006	<i>Halobacillus</i>	<i>Halobacillus dabanensis</i>	NR_042860		1	100.00
AE013	<i>Marinomonas</i>	<i>Marinomonas atlantica</i>	NR_151936	1		100.00
AE012	<i>Thalassotalea</i>	<i>Thalassotalea euphylliae</i>	NR_153727	1		97.66
GG007		<i>Thalassotalea litorea</i>	NR_157659		1	92.98
AG008	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum jejuense</i>	NR_116704	2		98.36
AE008		<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	NR_024736	1		99.93
AR012		<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	NR_025229	1		99.79
AR008		<i>Tenacibaculum holothuriorum</i>	NR_145845	2		97.88
GR008	<i>Flammeovirga</i>	<i>Flammeovirga aprica</i>	NR_041394		1	98.81
GR009	<i>Microbulbifer</i>	<i>Microbulbifer variabilis</i>	NR_041021		1	99.04
GE011		<i>Microbulbifer echini</i>	NR_156859		1	99.04
GG004	<i>Thalassomonas</i>	<i>Thalassomonas viridans</i>	NR_104564		1	99.00
AG011	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i>	NR_126232	1		99.93
GE001		<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	NR_026223		1	99.93
AR011		<i>Pseudoalteromonas marina</i>	NR_042981	1		99.93
AR013		<i>Pseudoalteromonas spiralis</i>	NR_114801	1		99.93
AR010		<i>Pseudoalteromonas piratica</i>	NR_157758	1		99.85
AG012		<i>Pseudoalteromonas phenolica</i>	NR_113299	1	1	100.00
GE005		<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	NR_026221		3	99.63
AG005	<i>Acanthopleuribacter</i>	<i>Acanthopleuribacter pedis</i>	NR_041599	2		95.48

A: 霜鹿角珊瑚. G: 丛生盔形珊瑚

A: *Acropora pruinosa*. G: *Galaxea fascicularis*.

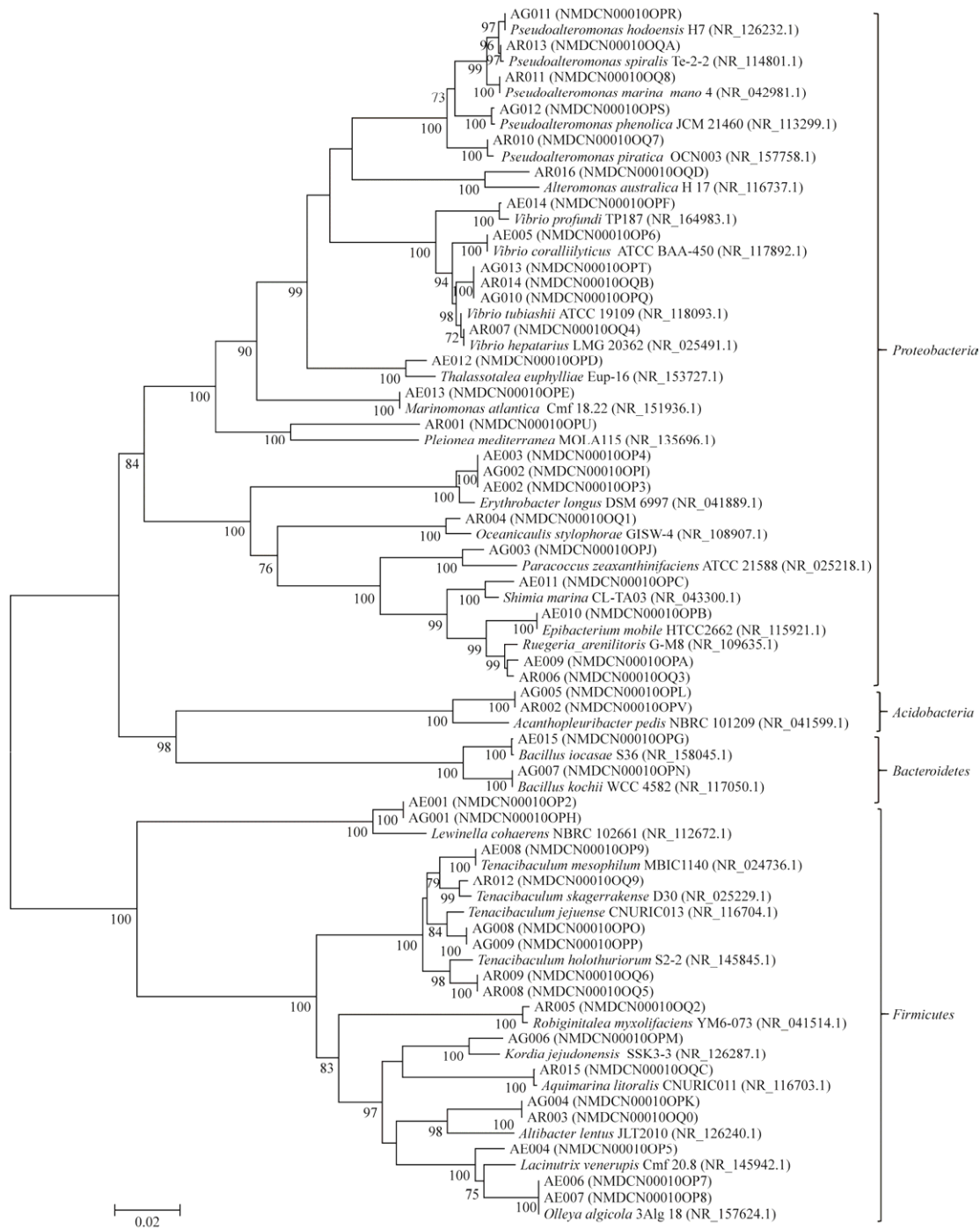


图 2 霜鹿角珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 相似菌株括号中的序号: GenBank 登录号; 本实验分离菌株括号中的序号: 国家微生物科学数据中心序列号; 分支点数值: 进化树 bootstrap 值; 标尺刻度 0.02: 序列差异的分支长度. 下同

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of potential heat-tolerant bacteria associated with *Acropora pruinosa*. Closest strains accession number in GenBank; Isolates from this experiment accession number in national microbiology data center; Values at branch nodes represent bootstrap value; Bar=0.02 is nucleotide divergence. The same below.

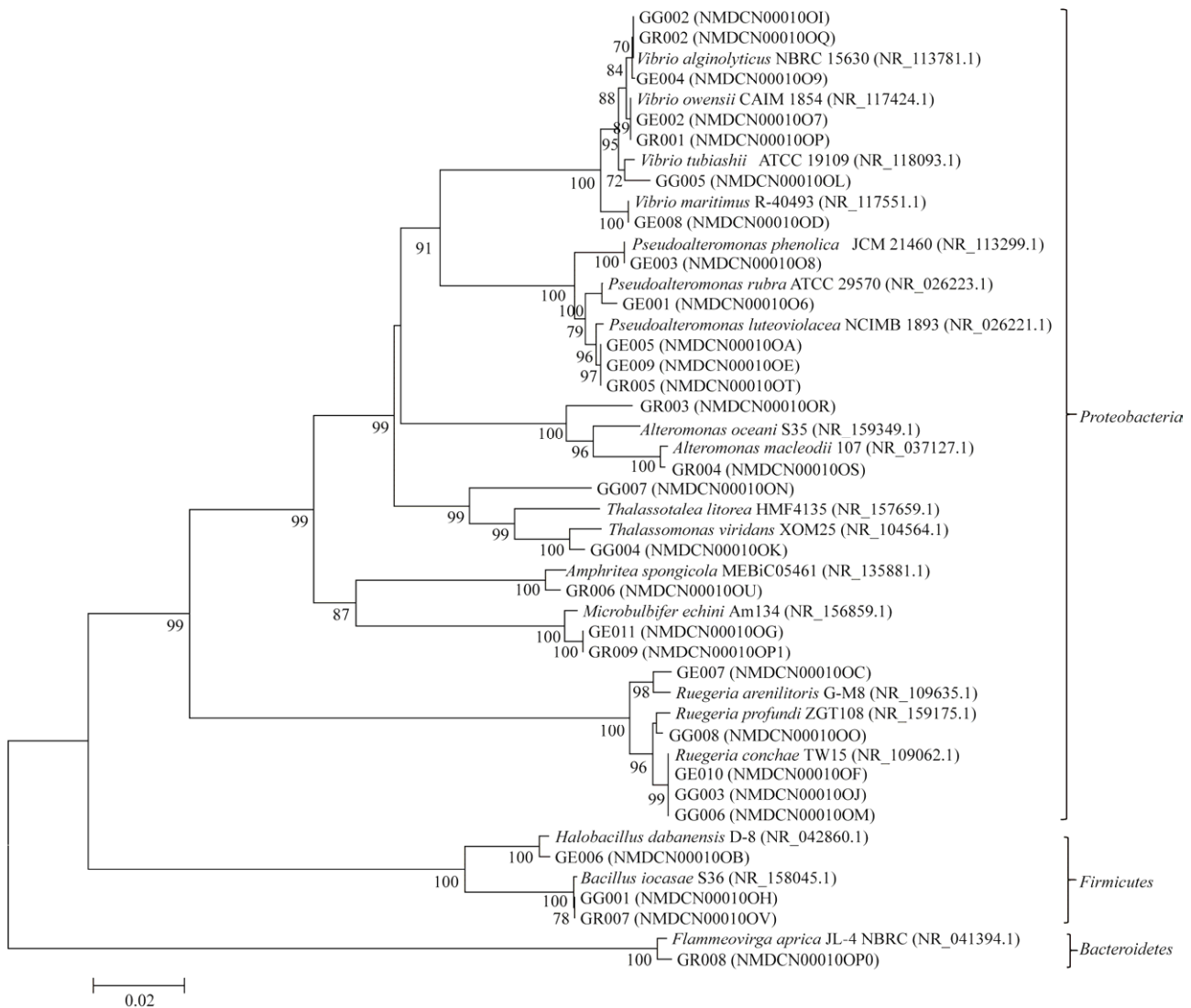


图 3 丛生盔形珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences potential heat-tolerant bacteria associated with *Galaxea fascicularis*.

16S rRNA 基因序列比对结果相似性若小于 98.65%，则认为该菌株为潜在新种^[25]。在本研究中，分离菌中有 17 株细菌比对结果相似性小于 98.65%，可能是 12 个潜在的新分类单元，占细菌总数的 23.61%，其中 2 株来源于丛生盔形珊瑚、15 株从霜鹿角珊瑚获得，同时，包含 3 株细菌与最相似模式菌株的相似度小于 95%，可能代表 2 个潜在的新属^[26] (表 1)。

2.3 两种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌多样性差异分析

在属分类学水平上统计 2 种造礁珊瑚共附生可培养耐热型细菌共有和独有的细菌类型 (图 4, 图 5)。结果表明 2 种珊瑚可培养细菌组成存在差异，霜鹿角珊瑚和丛生盔形珊瑚均分离到的属有 6 个，分别为弧菌属、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、鲁杰

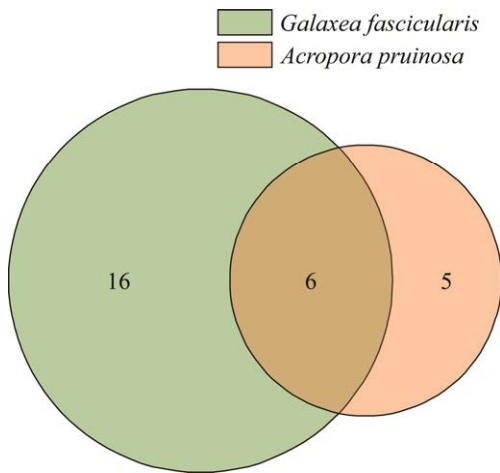


图 4 属水平上 2 种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌 Venn 图

Figure 4 Venn diagram of the potential heat-tolerant bacteria associated with two species of scleractinian corals based on genus level.

氏菌属、假交替单胞菌属和 *Thalassotalea* 属。仅从丛生盔形珊瑚分离到的属有 5 个，分别为产微球茎菌属(*Microbulbifer*)、喜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、*Amphritea*、*Thalassomonas* 和

Flammeovirga。仅从霜鹿角珊瑚分离到的属有 16 个，分别为有副球菌属(*Paracoccus*)、海单胞菌属(*Marinomonas*)、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、石鳖杆菌属(*Acanthopleuribacter*)、*Tenacibaculum*、*Altibacter*、*Aquimarina*、*Kordia*、*Lacinutrix*、*Lewinella*、*Oceanicaulis*、*Pleionea*、*Robiginitalea*、*Shimia*、*Tritonibacter* 属和 *Olleya*。此外，霜鹿角珊瑚共附生可培养耐热型细菌的优势属为弧菌属(13.63%)、*Tenacibaculum* (13.63%)和假交替单胞菌属(11.36%)；丛生盔形珊瑚优势属为弧菌属(25.00%)、假交替单胞菌属(17.85%)和鲁杰氏菌属(17.85%)。

2.4 细菌热耐受性试验结果

梯度升温试验结果表明，随着温度升高，4 株测试菌株的生长速率随温度升高呈现先升高后下降趋势。在 26–37 °C 温度范围内，4 株细菌的生长速率在 34 °C 时最快(图 6)。

2.5 细菌抗菌活性试验结果

距离目的菌株 1 mm 内指示菌不生长即视

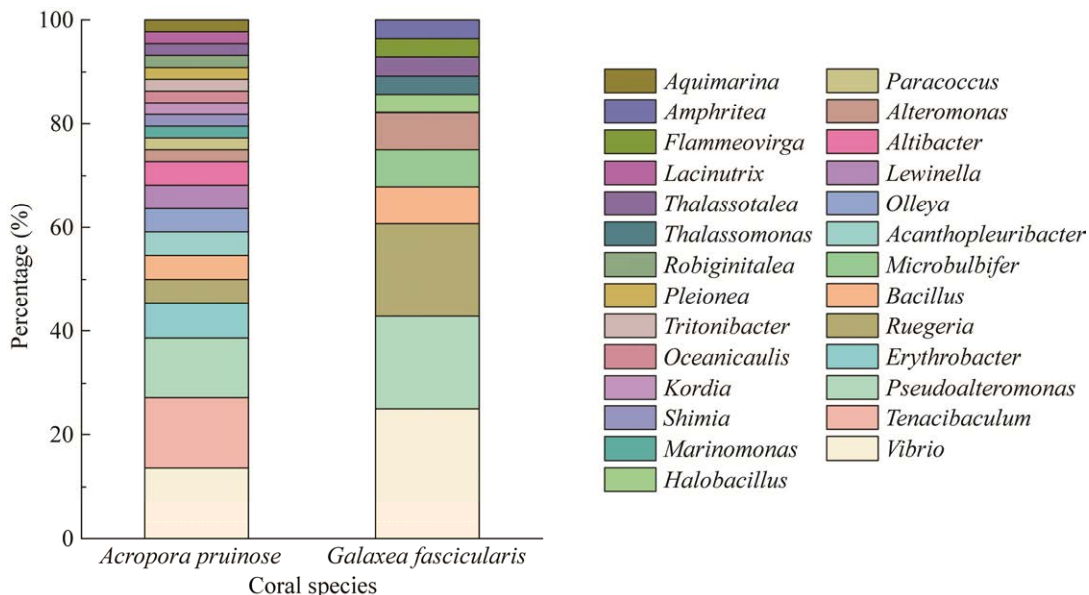


图 5 属水平上 2 种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌分布柱状图

Figure 5 The histogram of the potential heat-tolerant bacteria associated with two species of scleractinian corals based on genus level.

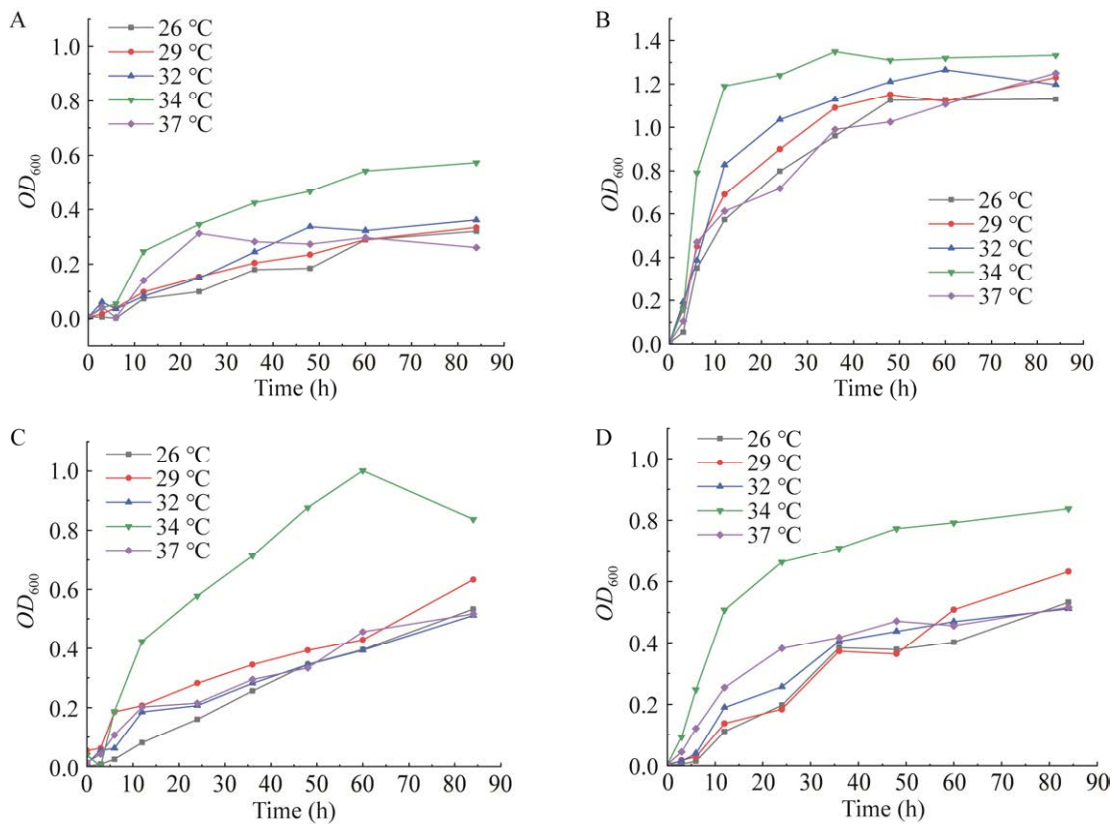


图 6 不同温度下 4 株细菌的生长情况 A: 假交替单胞菌 AR010. B: 弧菌 GE004. C: 鲁杰氏菌 GE010. D: *Tenacibaculum* 属 AE008

Figure 6 Growth condition of 4 predominant genera bacteria in different incubation temperatures. A: *Pseudoalteromonas* sp. AR010. B: *Vibrio* sp. GE004. C: *Ruegeria* sp. GE010. D: *Tenacibaculum* sp. AE008.

为目的菌株对指示菌具有抑制活性^[27]。抗菌试验结果显示, 鲁杰氏属的 2 株细菌表现出对 1 种或 2 种指示菌株产生抑菌活性, 而 *Tenacibaculum* 属 3 株细菌对 2 种病原菌抑菌效果不明显(表 2, 图 7)。其中, 菌株 GE007 对溶珊瑚弧菌和欧文斯弧菌均有抑制作用, 菌株 GG006 对溶珊瑚弧菌具有抑制作用。

3 讨论

3.1 两种造礁珊瑚共附生可培养潜在耐热细菌多样性

高通量测序技术为珊瑚宿主适应环境能力差异与共附生细菌关系的研究提供了相关证

据^[12-14], 但该技术难以对微生物的生理生化特性、环境胁迫效应以及不同类群的相互作用进行有效的试验研究, 对珊瑚共附生细菌的生态功能仍然缺乏清晰的认识。要深入解析细菌的功能仍需传统培养技术获得单个微生物菌株进行探索。

本研究基于纯培养技术, 在热压条件下, 对热耐受性不同的 2 种造礁珊瑚共附生潜在耐热细菌进行多样性分析, 共分离到 72 株细菌, 其中, 霜鹿角珊瑚分离获得的细菌有 4 个门 22 个属 33 个种, 弧菌属、假交替单胞菌属和 *Tenacibaculum* 属为优势属。丛生盔形珊瑚分离获得的细菌有 3 个门 11 个属 20 个种, 弧菌属、

表2 细菌的抗菌情况

Table 2 Inhibition effect of tested strains

属 Genus	菌株编号 Strain No.	溶珊瑚弧菌 <i>Vibrio</i> <i>coralliilyticus</i>	欧文斯氏弧菌 <i>Vibrio owensii</i>
<i>Ruegeria</i>	GE007	+	+
	GG006	+	-
	GG008	-	-
<i>Tenacibaculum</i>	AE008	-	-
	AR008	-	-
	AR012	-	-

+: 具有拮抗作用; -: 无拮抗作用

+: With antagonistic activity; -: No antagonistic activity.

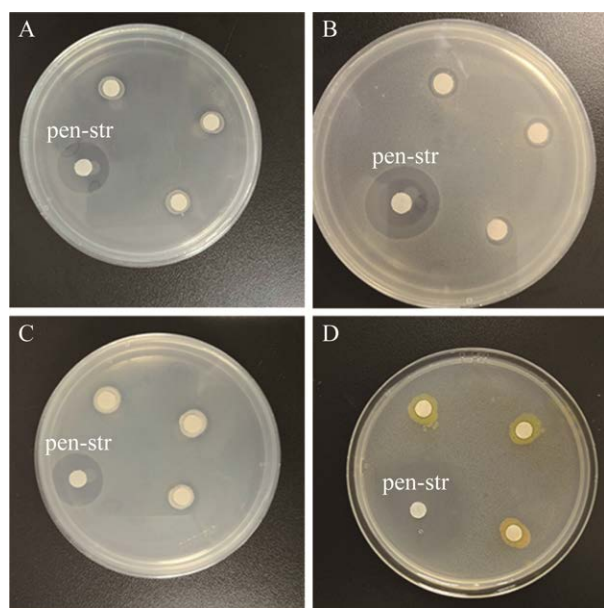


图7 细菌抑制效果图 A: 鲁杰氏菌 GE007 对溶珊瑚弧菌的拮抗作用. B: 鲁杰氏菌 GE007 对欧文斯氏弧菌的拮抗作用. C: 鲁杰氏菌 GG006 对溶珊瑚弧菌的拮抗作用. D: *Tenacibaculum* sp. AE008 对溶珊瑚弧菌的拮抗作用

Figure 7 The picture of the antimicrobial effect of the tested strain. A: The inhibitory effect of *Ruegeria* sp. GE007 on *Vibrio coralliilyticus*. B: The inhibitory effect of *Ruegeria* sp. GE007 on *Vibrio owensii*. C: The inhibitory effect of *Ruegeria* sp. GG006 on *Vibrio coralliilyticus*. D: The inhibitory effect of *Tenacibaculum* sp. AE008 on *Vibrio coralliilyticus*.

假交替单胞菌属和鲁杰氏菌属为优势属。表明霜鹿角珊瑚和丛生盔形珊瑚可培养细菌的组成和丰度存在显著差异。在 26–37 °C 温度范围内, 优势属的代表菌株生长速率在 34 °C 时最大, 温度高于大多数海洋细菌的最适生长温度和珊瑚白化阈值, 表明分离获得的细菌具有一定的耐热性。除优势类群外, 其他属菌株数量较少, 其原因可能是珊瑚共生功能体组分复杂, 各类群之间存在互惠共生关系, 纯培养阻断了它们之间的信息交流; 其次, 珊瑚共生功能体微环境复杂, 生态位多样且专一化, 且前实验室条件无法完全模拟珊瑚微生物生长所必需的环境^[28-29]。

3.2 珊瑚共附生细菌特殊类群或与珊瑚耐热性有关

在珊瑚共生体中, 不同的细菌类群有各自的生物学功能, 有的细菌通过参与养分循环和免疫保护等协助珊瑚适应环境; 相反地, 有的细菌类群则对珊瑚宿主构成致病威胁^[3,6]。例如, 鲁杰氏菌属细菌被认为是一种潜在的珊瑚益生菌, 能够产生抑制弧菌生长的抗生素^[30-31]。然而, 在热应力条件下, 珊瑚共生体的机会主义细菌快速增长, 威胁珊瑚共生体的稳定^[32]。以弧菌为例, 溶珊瑚弧菌被认为是一种温度依赖性病原, 在高温条件下可造成鹿角杯形珊瑚 (*Pocillopora damicornis*) 白化、死亡^[33-34]。欧文斯氏弧菌能诱导造礁珊瑚 *Montipora capitata* 出现慢性白化综合征 (white syndrome), 威胁珊瑚礁生存^[35]。此外, 鉴于 *Tenacibaculum* 属细菌与鱼类疾病的相关性, Smith 等^[36] 的研究将 *Tenacibaculum* sp. 细菌列为珊瑚病变和组织坏死的新潜在致病因子。

拮抗细菌对致病菌作用假设的机制认为, 抗病细菌可以产生抗菌活性物, 从而控制珊瑚潜在病原体数量, 增强宿主适应环境能力^[37]。此外, Shnit-Orland 等^[38] 的研究证明, 来自块状珊

瑚粘液的可培养细菌抗菌活性高于枝状珊瑚粘液的细菌。在本研究中, 来源于丛生盔形珊瑚的鲁杰氏菌属 2 株细菌对 1 种或 2 种潜在病原弧菌具有抑制作用, 而来自霜鹿角珊瑚 *Tenacibaculum* 属的 3 株细菌对 2 种指示菌抑制作用不明显。实验结果与 Miura 等^[30]从丛生盔形珊瑚分离到的 *Ruegeria* sp. 菌株能够抑制溶珊瑚弧菌结果相似。来源于丛生盔形珊瑚的鲁杰氏菌属细菌对弧菌产生抑制作用, 表明珊瑚共附生潜在耐热细菌可能通过保护珊瑚免受病原体感染的方式, 增强块状珊瑚应对热胁迫的适应性。来源于霜鹿角珊瑚的 *Tenacibaculum* 属细菌对弧菌抑制作用不明显, 并且 *Tenacibaculum* 属被列为新型潜在致病因子, 说明枝状珊瑚在热胁迫过程中会增加感染疾病的风险, 降低其环境适应能力。因此, 我们推测在热应力条件下, 块状珊瑚中的潜在耐热细菌可能通过抵御珊瑚致病菌的方式提高宿主环境适应能力。

3.3 珊瑚共附生菌种资源积累

造礁珊瑚是一个极大的微生物种质资源库。本研究积累了大量的珊瑚共附生细菌菌种资源, 包括弧菌属、假交替单胞菌属、鲁杰氏菌属和 *Tenacibaculum* 等, 这些细菌与珊瑚宿主关系密切^[13,36,39-40], 为后续研究其在珊瑚适应环境过程中所起的作用奠定了基础。

另外, 本研究分离得到的菌株 AG004 和 AR003 与 *Altibacter lentus* 序列相似性为 94.85%, 菌株 GG007 与 *Thalassotalea litorea* 序列相似性为 92.98%, 这 3 株细菌可能是潜在的新属。菌株 AG006、AE004、AE001、AG001、GR006、AG003、AR004、AE012、AG008、AG009、AR008、AR009、AR002 和 AG005 与亲缘关系最近的模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性均小于 98.65%, 可能为潜在的新种。本研究分离到的潜在新种或新属资源为后续的

细菌新物种的多相分类鉴定提供了基础。

4 结论

本文基于纯培养手段对 2 种热耐受性差异显著的造礁珊瑚共附生潜在耐热细菌进行多样性分析, 研究表明, 丛生盔形珊瑚和霜鹿角珊瑚共附生潜在耐热细菌多样性存在差异, 并且包含不少潜在新分类单元; 其次, 在热胁迫环境中, 条件致病菌弧菌大量繁殖, 而块状珊瑚的潜在耐热细菌对其有一定的拮抗作用。因此, 本研究推测珊瑚的耐热特性与体内共生细菌对致病菌的抑制作用有关。

虽然珊瑚耐热特性可能与体内共生细菌对致病菌的抑制作用有关, 但由于珊瑚共生体与宿主关系的复杂性, 珊瑚适应环境差异背后的分子机制仍然不确定。此外, 本研究对鲁杰氏菌属的细菌对弧菌的拮抗作用只进行初步分析, 其活性物质为何种物质及其拮抗机理、实际作用等多种问题都有待今后进一步分析。

REFERENCES

- [1] van OPPEN MJH, BLACKALL LL. Coral microbiome dynamics, functions and design in a changing world[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(9): 557-567.
- [2] 徐帅良. 滨珊瑚共附生细菌多样性及其纯培养研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2020.
XU SL. Diversity of *Porites* associated bacteria and its pure culture study[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2020 (in Chinese).
- [3] ROSENBERG E, KOREN O, RESHEF L, EFRONY R, ZILBER-ROSENBERG I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(5): 355-362.
- [4] PERNICE M, RAINA JB, RÄDECKER N, CÁRDENAS A, POGOREUTZ C, VOOLSTRA CR. Down to the bone: the role of overlooked endolithic microbiomes in reef coral health[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(2): 325-334.
- [5] ROSENBERG E, KUSHMARO A, KRAMARSKY-WINTER E, BANIN E, YOSSI L. The role of microorganisms in coral bleaching[J]. *The ISME*

- Journal, 2009, 3(2): 139-146.
- [6] ZIEGLER M, SENECA FO, YUM LK, PALUMBI SR, VOOLSTRA CR. Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14213.
- [7] QIN ZJ, YU KF, LIANG JY, YAO QC, CHEN B. Significant changes in microbial communities associated with reef corals in the southern South China Sea during the 2015/2016 global-scale coral bleaching event[J]. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2020, 125(7): e2019JC015579.
- [8] YU XP, YU KF, LIAO ZH, CHEN B, DENG CQ, YU JY, YAO QC, QIN ZJ, LIANG JY. Seasonal fluctuations in symbiotic bacteria and their role in environmental adaptation of the scleractinian coral *Acropora pruinosa* in high-latitude coral reef area of the South China Sea[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 792: 148438.
- [9] ZIEGLER M, GRUPSTRA CGB, BARRETO MM, EATON M, BAOMAR J, ZUBIER K, AL-SOFYANI A, TURKI AJ, ORMOND R, VOOLSTRA CR. Coral bacterial community structure responds to environmental change in a host-specific manner[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3092.
- [10] 李淑, 余克服, 施祺, 陈天然, 赵美霞, 严宏强. 海南岛鹿回头石珊瑚对高温响应行为的实验研究[J]. *热带地理*, 2008, 28(6): 534-539.
- LI S, YU KF, SHI Q, CHEN TR, ZHAO MX, YAN HQ. Experimental study of stony coral response to the high temperature in luhuitou of Hainan Island[J]. *Tropical Geography*, 2008, 28(6): 534-539 (in Chinese).
- [11] EDWARDS AJ, CLARK S, ZAHIR H, RAJASURIYA A, NASEER A, RUBENS J. Coral bleaching and mortality on artificial and natural reefs in Maldives in 1998, sea surface temperature anomalies and initial recovery[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(1): 7-15.
- [12] 骆雯雯, 梁甲元, 余克服, 邓传奇, 葛瑞琪, 苏宏飞, 王英辉. 涠洲岛两种石珊瑚在高温胁迫下共生细菌群落结构变化特征[J]. *广西科学*, 2019, 26(3): 299-307.
- LUO WW, LIANG JY, YU KF, DENG CQ, GE RQ, SU HF, WANG YH. Characteristics of symbiotic bacterial community structure changes in two species of stony corals in Weizhou Island under high temperature stress[J]. *Guangxi Sciences*, 2019, 26(3): 299-307 (in Chinese).
- [13] LIANG JY, YU KF, WANG YH, HUANG XY, HUANG W, QIN ZJ, PAN ZL, YAO QC, WANG WH, WU ZC. Distinct bacterial communities associated with massive and branching scleractinian corals and potential linkages to coral susceptibility to thermal or cold stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 979.
- [14] YU XP, YU KF, LIAO ZH, LIANG JY, DENG CQ, HUANG W, HUANG YH. Potential molecular traits underlying environmental tolerance of *Pavona decussata* and *Acropora pruinosa* in Weizhou Island, northern South China Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 156: 111199.
- [15] NEAVE MJ, APPRILL A, FERRIER-PAGÈS C, VOOLSTRA CR. Diversity and function of prevalent symbiotic marine bacteria in the genus *Endozoicomonas*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8315-8324.
- [16] PANTOS O, BONGAERTS P, DENNIS PG, TYSON GW, HOEGH-GULDBERG O. Habitat-specific environmental conditions primarily control the microbiomes of the coral *Seriatopora hystrix*[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(9): 1916-1927.
- [17] DING JY, SHIU JH, CHEN WM, CHIANG YR, TANG SL. Genomic insight into the host-endosymbiont relationship of *Endozoicomonas montiporae* CL-33(T) with its coral host[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 251.
- [18] SWEET M, VILLELA H, KELLER-COSTA T, COSTA R, ROMANO S, BOURNE DG, CÁRDENAS A, HUGGETT MJ, KERWIN AH, KUEK F, MEDINA M, MEYER JL, MÜLLER M, POLLOCK FJ, RAPPÉ MS, SERE M, SHARP KH, VOOLSTRA CR, ZACCARDI N, ZIEGLER M, et al. Insights into the cultured bacterial fraction of corals[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e0124920.
- [19] SHNIT-ORLAND M, SIVAN A, KUSHMARO A. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 64(4): 851-859.
- [20] STRYCHAR KB, COATES M, SAMMARCO PW. Loss of *Symbiodinium* from bleached Australian scleractinian corals (*Acropora hyacinthus*, *Favites complanata* and *Porites solida*)[J]. *Marine and Freshwater Research*, 2004, 55(2): 135.
- [21] YU WJ, WANG WH, YU KF, WANG YH, HUANG XY, HUANG RY, LIAO ZH, XU SD, CHEN XY. Rapid decline of a relatively high latitude coral assemblage at Weizhou Island, northern South China Sea[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2019, 28(14): 3925-3949.
- [22] 王文欢. 近 30 年来北部湾涠洲岛造礁石珊瑚群落演变及影响因素[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2017.
- WANG WH. Evolvement and influential factors of

- coral community over past three decades in Weizhou Island reef, Beibu Gulf[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2017 (in Chinese).
- [23] 汤超莲, 周雄, 郑兆勇, 莫少华, 唐旺先. 未来海平面上升对涠洲岛珊瑚礁的可能影响[J]. 热带地理, 2013, 33(2): 119-123, 140.
TANG CL, ZHOU X, ZHENG ZY, MO SH, TANG WX. Possible effects of sea level rise in the future on the coral reef in Weizhou Island[J]. Tropical Geography, 2013, 33(2): 119-123, 140 (in Chinese).
- [24] 蒋庆茹, 柯才焕, 虞晋晋, 赵晶. 杂色鲍肠道益生菌的分离和鉴定[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2012, 51(4): 782-788.
JIANG QR, KE CH, YU JJ, ZHAO J. Isolation and characterisation of putative probiotics from *Haliotis diversicolor*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2012, 51(4): 782-788 (in Chinese).
- [25] 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[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [26] TINDALL BJ, ROSSELLÓ-MÓRA R, BUSSE HJ, LUDWIG W, KÄMPFER P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(Pt 1): 249-266.
- [27] 武志华, 李娜, 马秀枝, 董晔, 郭子文, 刘惠荣. 大兴安岭地区粘细菌资源的多样性及其生物活性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 266-283.
WU ZH, LI N, MA XZ, DONG Y, GUO ZW, LIU HR. Diversity and bioactivities of myxobacteria in Daxing'an mountains[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 266-283 (in Chinese).
- [28] 刘阳, 赖其良, 陈华, 王建宁, 余志伟, 王丽萍, 邵宗泽. 东山湾软珊瑚共附生可培养细菌的多样性和产酶活性鉴定[J]. 应用海洋学学报, 2013, 32(3): 396-403.
LIU Y, LAI QL, CHEN H, WANG JN, YU ZW, WANG LP, SHAO ZZ. Phylogenetic diversity analysis and enzyme activity identification of cultured symbiotic bacteria of soft coral in Dongshan Bay[J]. Journal of Applied Oceanography, 2013, 32(3): 396-403 (in Chinese).
- [29] AMANN R, LUDWIG W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(5): 555-565.
- [30] MIURA N, MOTONE K, TAKAGI T, ABURAYA S, WATANABE S, AOKI W, UEDA M. *Ruegeria* sp. strains isolated from the reef-building coral *Galaxea fascicularis* inhibit growth of the temperature-dependent pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. Marine Biotechnology, 2019, 21(1): 1-8.
- [31] RUA CPJ, TRINDADE-SILVA AE, APPOLINARIO LR, VENAS TM, GARCIA GD, CARVALHO LS, LIMA A, KRUGER R, PEREIRA RC, BERLINCK RGS, VALLE RAB, THOMPSON CC, THOMPSON F. Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*[J]. PeerJ, 2014, 2: e419.
- [32] RITCHIE KB. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria[J]. Marine Ecology Progress Series, 2006, 322: 1-14.
- [33] BEN-HAIM Y, ROSENBERG E. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*[J]. Marine Biology, 2002, 141(1): 47-55.
- [34] BEN-HAIM Y, ZICHERMAN-KEREN M, ROSENBERG E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4236-4242.
- [35] USHIJIMA B, SMITH A, AEBY GS, CALLAHAN SM. *Vibrio owensii* induces the tissue loss disease *Montipora* white syndrome in the Hawaiian reef coral *Montipora capitata*[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46717.
- [36] SMITH D, LEARY P, CRAGGS J, BYTHELL J, SWEET M. Microbial communities associated with healthy and white syndrome-affected *Echinopora lamellosa* in aquaria and experimental treatment with the antibiotic ampicillin[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121780.
- [37] RESHEF L, KOREN O, LOYA Y, ZILBER-ROSENBERG I, ROSENBERG E. The coral probiotic hypothesis[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(12): 2068-2073.
- [38] SHNIT-ORLAND M, KUSHMARO A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 67(3): 371-380.
- [39] 黄昕琦, 蔡中华, 林光辉, 周进. 群体感应信号对“藻-菌”关系的调节作用[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(4): 708-717.
HUANG XQ, CAI ZH, LIN GH, ZHOU J. Quorum sensing modulating algae-bacteria interactions[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016, 22(4): 708-717 (in Chinese).
- [40] NISSIMOV J, ROSENBERG E, MUNN CB. Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 292(2): 210-215.