

Isolation and Identification Cultivable Microbes from the Antarctic Krill (*Euphausia superba*) and Other Antarctic Samples

Lingzhi Li^{1,2}, Xiaoqing Tian^{2,3*}, Yingying Tang², Chengqi Fan^{1,2}, Yanan Lu^{1,2}

¹Key Laboratory of Oceanic and Polar Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai

²East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai

³Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, Shanghai

Email: tianxq@ecsf.ac.cn

Received: Feb. 7th, 2018; accepted: Feb. 21st, 2018; published: Feb. 28th, 2018

Abstract

In order to explore the diversity of cultivable microbes from the Antarctic krill (*Euphausia superba*) and other Antarctic organisms, different samples, including holothurians, sponges, corals, squids, asteroideans, sea urchins and sediment, were collected in the 33rd Chinese Antarctic scientific expedition. Bacteria and fungus from samples were identified by 16S rDNA and themicrobes from the Antarctic krill were analyzed by high-throughput sequencing technology. Ultimately, a total of 21 strains of bacteria were isolated according to the colony characteristics, such as size, color, shape. No fungi were found which maybe because the samples were stored for too long time. Among them, there were 3 phylum 12 genera of 14 bacteria strains, including the *Proteobacteria* 4 strains, *Firmicutes* 8 strains and *Actinobacteria* 2 strains. The majority of *Firmicutes* was *Bacillus* sp. which has 6 strains. The similarity of 14 strains of bacteria was more than 98% according to the NCBI Blast retrieval system which show they were known strains. At the same time, the result of high-throughput sequencing on the Antarctic krill which were kept in the RNA preservation solution was not obtained. The study shows that there were abundant of microorganism in Antarctic, and that can survive in ordinary environments. At the same time, cultivable microbial species which were obtained by framework trawl were enriched. This paper laid a basis for study of polar microorganism resources utilization.

Keywords

Euphausia superba, Cultivable Microorganism, 16S rDNA, Framework Trawl

*通讯作者。

南极大磷虾等南极不同样品来源的可培养微生物的分离鉴定

李灵智^{1,2}, 田晓清^{2,3*}, 唐莹莹², 樊成奇^{1,2}, 陆亚男^{1,2}

¹农业部远洋与极地渔业创新重点实验室, 上海

²中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海

³农业部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海

Email: tianxq@ecsf.ac.cn

收稿日期: 2018年2月7日; 录用日期: 2018年2月21日; 发布日期: 2018年2月28日

摘要

为了探索南极大磷虾等南极不同生物来源可培养微生物的多样性。本研究对中国第33次南极科学考察采集的多个站位的南极大磷虾, 以及海参、海绵、珊瑚、鱿鱼、海星、海胆、底泥等样品进行了细菌、真菌的分离培养, 然后进一步开展16S rDNA鉴定和高通量测序分析。最终根据菌落大小、颜色、形态等特征的不同, 共分离获得21株细菌, 并未分离到真菌, 可能样品保藏时间过久的原因。经鉴定得到3个门12个属的14株细菌, 其中变形菌门(*Proteobacteria*) 4株, 厚壁菌门(*Firmicutes*) 8株, 放线菌门(*Actinobacteria*) 2株。厚壁菌门(*Firmicutes*)中属芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)最多, 有6株。通过NCBI的Blast检索系统比对, 发现14株细菌的相似度均达到98%以上, 推测这14株都是已知种属。同时, 对RNA保存液保存的各个站点采集到的南极大磷虾中的微生物进行了高通量测序, 遗憾没有得出结论。本次研究显示, 南极地区具有丰富的微生物资源, 并且大部分微生物也可以在普通环境生存。同时, 丰富了框架拖网的生物来源的共附生可培养微生物的种类, 为极地微生物资源的利用研究奠定了基础。

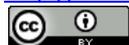
关键词

南极大磷虾, 可培养微生物, 16S rDNA, 框架拖网

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

南极位于地球的最南端, 由陆地和海洋两部分构成, 除在短暂的夏季部分地区有冰雪融化以外, 其余地区终年被冰雪覆盖, 气候酷寒干燥、强光辐射, 是地球上最冷最干的地区[1] [2]。由于南极地区的特殊自然环境, 使生存于其中的微生物必然具有其特殊的生理特点和化学多样性[3], 因此各国的微生物学家相继在极地进行了大量的研究工作, 证明了极地微生物在基础研究和开发应用方面具有广阔的前景。我国自行组建的极地微生物学调研起始于上世纪 80 年代初, 迄今 30 余年来, 中国极地微生物学研究取得了丰硕的成果, 在土壤、空气、水体等中分离鉴定到假单胞菌、链霉菌、青霉菌等多种原核或真核的微生物菌株[4]。这些菌株代谢产物发现具有抗肿瘤[5]、杀虫[6]、多种酶活性[7] [8]等。南极大磷虾

(*Euphausia superba*), 是一种生活在南极洲水域的海洋浮游甲壳类生物, 资源丰富, 据统计全球资源总量至少有 6.5~10 亿吨[9]。对于当前国内外海洋生物资源, 尤其是传统海洋生物资源日趋衰退, 如何有效、充分得利用这一丰富的海洋生物资源, 是摆在目前的首要问题。我国学者利用高通量测序的手段, 分析了 2015 年 6 月采集的冷冻南极磷虾中细菌菌群结构, 发现可培养细菌仅占总细菌菌群的 1.10% [10]; 而本团队在南极磷虾中分离得到假单胞菌[11], 利用 LCTOF MS 测试分析发现具有很好的化学多样性; 南极普里兹湾的沉积物中分离得到的 4 株真菌也具有很好地的蛋白磷酸酶活性, 这在细胞内的信号转导、细胞循环、次生代谢产物及底物的转化过程中起着非常重要的作用[3]。因此, 南极地区被认为是个潜在、重要的微生物资源库, 可能是产生新型生物活性物质和先导化合物菌株的潜在种源地[12]。

本次研究选择中国第 33 次南极科学考察船框架拖网的以南极大磷虾为主的渔获物为研究目标, 进行了细菌和真菌的分离培养, 并通过 16S rDNA 鉴定分析和菌落大小、颜色、形态等特征鉴定获得微生物。通过本次研究丰富了框架拖网获得的南极大磷虾等生物来源的共附生可培养微生物的种类, 为极地微生物资源的利用研究奠定了基础。

2. 实验材料与方法

2.1. 样品采集站位信息

本文样品的采集由 2017 年 4 月的第 33 次南极考察船采用框架拖网的手段获得的, 详细信息见表 1。图 1 为各个采样点分布图。南极大磷虾样品编号为站点编号, 其他 1 号为红色海参, 2 号为黑色海绵, 3 号为黑色珊瑚, 4 号为灰色海绵, 5 号为灰色海绵, 6 号为灰色海绵, 7 号为鱿鱼, 8 号为粉红海星, 9 号为底泥, 10 号为海胆, 11 号为底泥。采集到的样品-20℃冷冻保存, 其中南极大磷虾样品分别用甘油和 RNA 保存液保存; 10 号样品是甘油保存, 其他的样品冰冻保存。

Table 1. The sampling point in the 33rd Chinese Antarctic scientific expedition

表 1. 第 33 次南极科考期间采样点以及相关信息

编号	当地日期	站位	拖网起始位置	拖网结束位置	拖网时间	样品种类
1	20170111	D1-7	62°14'43"S 56°40'35"W	62°14'45"S 56°39'33"W	04:41~05:01	南极磷虾; (杂 5, 块 6)灰海绵; 7 鱿鱼
2	20161230	D2-4	62°16'23"S 53°29'58"W	61°17'33"S 53°30'01"W	10:20~10:43	1 红色海参; 2 黑色海绵; 4 灰色海绵; 10 海胆
3	20161231	DA-8	60°19'16"S 50°47'36"W	60°19'30"S 50°46'10"W	17:06~17:27	南极磷虾
4	20161228	D3-8	60°27'38"S 49°01'33"W	60°28'41"S 49°01'00"W	02:08~02:28	南极磷虾
5	20170101	DA-13	60°09'55"S 47°23'14"W	60°10'00"S 47°24'15"W	14:51~15:12	南极磷虾; 3 黑色珊瑚; 8 粉红海星
6	20170102	DB-6	61°48'36"S 45°54'32"W	61°49'26"S 45°54'22"W	03:02~03:22	南极磷虾; 9,11 底泥
7	20170102	D3-12	62°32'23"S 48°17'52"W	62°32'21"S 48°18'55"W	20:44~21:04	南极磷虾

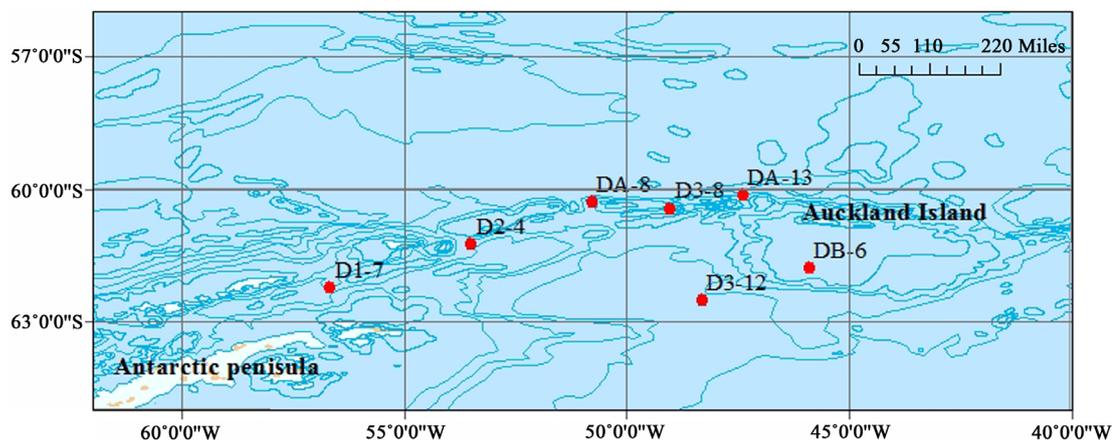


Figure 1. Distribution of sampling points
图 1. 采样点分布图

2.2. 分离培养基

1) 细菌培养基[13]

2216 E 培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 琼脂 18 g, 陈海水 1000 mL, 121°C (98.1 kPa) 高压灭菌 20 min, 30°C 培养 7 d。

2) 真菌培养基[14]

土豆培养基(PDA): 土豆 200 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 17 g, 陈海水 1000 mL, 121°C 下高压湿热灭菌 20 min, 28°C 培养 10 d。

察氏培养基: 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 20 g, 陈海水 1000 mL, 加热溶解, 分装后 121°C 灭菌 20 min, 28°C 培养 10 d。

马丁氏培养基: KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 15 g, 陈海水 1000 ml, 28°C 培养 10 d。

真菌分离过程中分别加入抗生素: 青霉素、链霉素、氯霉素各 30 μ g/ml。

2.3. 可培养菌株的筛选纯化及保种

1) 磷虾样品、海参、海绵、珊瑚、鱿鱼、海星、海胆:

用无菌水冲洗干净, 再用无菌剪刀剪碎, 用无菌海水稀释, 将预处理后的样品悬液系列稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 分别取 100 μ L 涂布在各种培养基平板, 细菌于 30°C 培养 7 d, 真菌于 28°C 培养 10 d。然后, 挑取不同颜色、形态的菌落进行划线纯化, 最后获得纯种分别用对应的试管斜面保存于 4°C 冰箱和 30% 甘油菌液用冻干管保存于 -80°C 超低温冰箱备用。

2) 沉积物样品:

用无菌刀、勺刮去表层沉积物, 用无菌海水系列稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 分别取 100 μ L 涂布在各种培养基平板, 细菌于 30°C 培养 7 d, 真菌于 28°C 培养 10 d。然后, 根据菌落形态、色素、干燥等特征, 挑取形态差异较大的菌株进行划线纯化。挑取纯化后的单菌落, 分别在 4°C 下用培养基斜面和 -80°C 下用 30% 甘油保种。

2.4. 可培养共附生菌 16SrDNA 的鉴定

1) 细菌基因组 DNA 的制备: 将已生长到对数期的斜面菌落, 接种到 5 mL 2216 液体培养基中, 置

于摇床 28℃ 培养 3~5 d, 根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取目标基因组 DNA。

2) 引物设计: 海洋细菌 16S rDNA 基因扩增选用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增[15]。

3) PCR 扩增体系为 50 μL: 2 × Taq PCR MasterMix 25 μL, 引物各 1 μL, 模板 DNA 3 μL, 重蒸水 20 μL。扩增程序: 94 程序预变性 5 min, 94 n 变性 30 s, 56 s 退火 30 s, 72 s 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 s 延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

4) DNA 测序: 委托上海美吉生物公司完成测序。获得的 16S rDNA 基因序列提交 GenBank 用 BLAST 软件与已知序列进行对比。

将菌株的 16SrDNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行序列同源性分析。

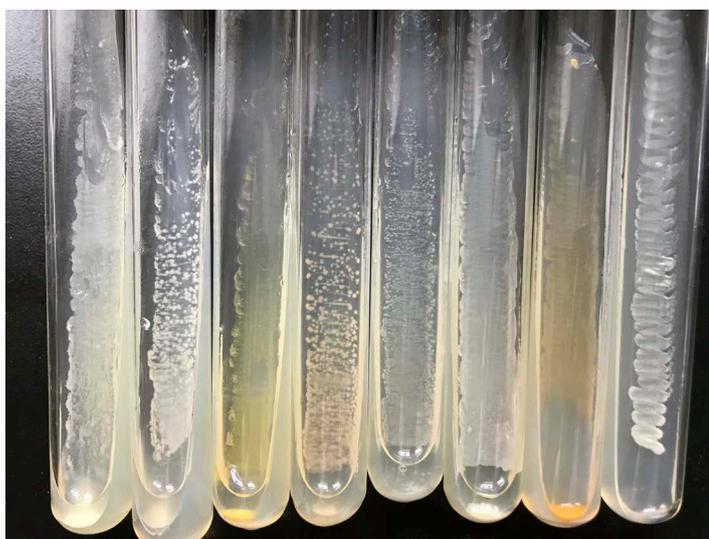
2.5. 南极大磷虾中细菌菌群结构分析

RNA 保存液保存的南极大磷虾样品, 委托上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序分析。

3. 结果

3.1. 可培养菌株的分子鉴定

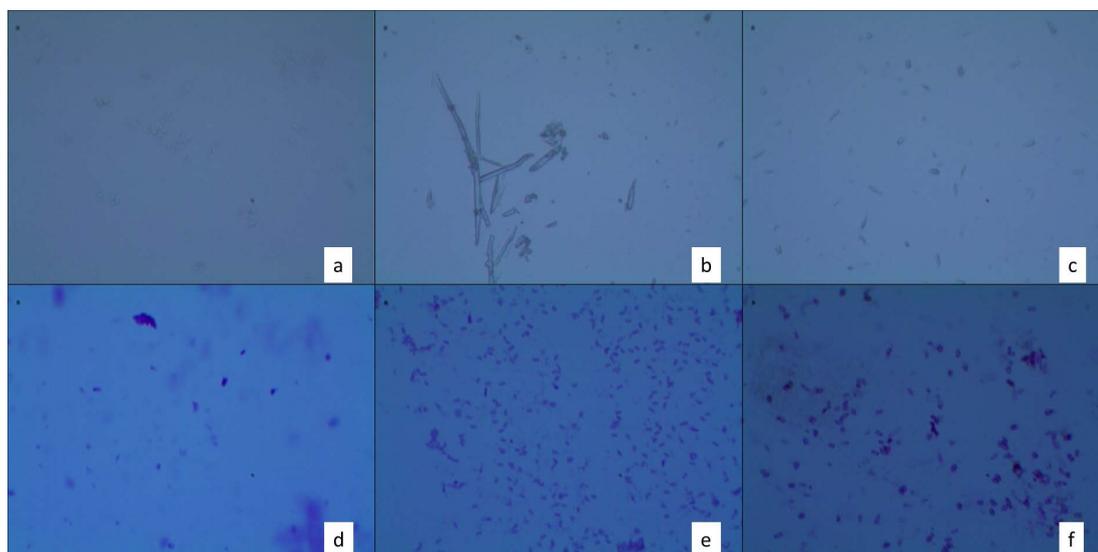
从第 33 次南极科考船带回来的生物样品中分离的微生物, 根据菌落大小、颜色、形态等特征的不同, 共分离获得 21 株细菌, 并未分离到真菌, 可能样品保藏时间过久的原因。分别进行 16SrDNA 鉴定, 共鉴定得到 3 个门 12 个属的 14 株细菌, 具体见表 2。14 株细菌中变形菌门(*Proteobacteria*) 4 株, 厚壁菌门(*Firmicutes*) 8 株, 放线菌门(*Actinobacteria*) 2 株。厚壁菌门(*Firmicutes*) 中属芽孢杆菌属最多, 有 6 株。从 DA-8 和 DA-13 两个站点的南极大磷虾样品中分别获得微球菌属(*Micrococcus*) 1 株和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*) 1 株。部分细菌菌落图和显微照片(显微镜: 上海光学仪器一厂, XSP-44X.9 型)见图 2 和图 3。一般 16SrDNA 序列相似性小于 98% 则可认为属于潜在新种, 14 株细菌的相似度均达到 98% 以上, 推测这 14 株都是已知种属。



注: 从左至右分别为 1-1,1-3,2-1,2-4,2-5,4-1,10-4,DA-8 细菌菌落图片。

Figure 2. Photos of Bacteria colony

图 2. 部分细菌的菌落照片



注: a, b, c 分别为菌株 DA-8, DA-13, 4-1 在 40 倍下的照片, d, e, f 分别为 2-5, 1-3, 1-1 经结晶紫染色后 100 倍下的照片。

Figure 3. Microphotographs of bacteria colony

图 3. 部分细菌显微照片

Table 2. The identified result of cultivable bacteria

表 2. 南极部分生物可培养细菌的分离鉴定

Rank	相似性最高模式菌株 Hit strain name	属名 Taxonomy	注册号 Accession	相似度 Similarity(%)
1-1	<i>Bacillus butanolivorans</i> DSM 18926(T)	<i>Bacillus</i>	LGYA01000001	99.653
1-3	<i>Bacillus rhizosphaerae</i> SC-N012(T)	<i>Bacillus_g6</i>	FJ233848	99.51
2-1	<i>Erythrobacter citreus</i> RE35F/1(T)	<i>Erythrobacter</i>	AF118020	99.27
1-2/2-3	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578(T)	<i>Microbacterium</i>	Y17227	99.57
2-4	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8(T)	<i>Halobacillus</i>	AY351395	98.96
2-5	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831(T)	<i>Oceanobacillus</i>	BA000028	99.72
4-1	<i>Bacillus anthracis</i> Ames(T)	<i>Bacillus</i>	AE016879	99.65
5-1	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> ATCC 12856(T)	<i>Aneurinibacillus</i>	KE952670	98.38
9-1	<i>Loktanella salsilacus</i> DSM 16199(T)	<i>Loktanella</i>	jgi.1058898	99.85
11-1	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7(T)	<i>Psychrobacter</i>	AJ313425	99.86
11-4	<i>Planococcus rifietoensis</i> M8(T)	<i>Planococcus</i>	CP013659	99.65
11-6	<i>Planococcus maritimus</i> 13DSM 17275(T)	<i>Planococcus</i>	CP016538	99.24
DA-8	<i>Micrococcus aloeverae</i> AE-6(T)	<i>Micrococcus</i>	KF524364	99.71
DA-13	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> ATCC 700518(T)	<i>Pseudoalteromonas</i>	JWIG01000030	99.86

3.2. 不同生物来源的细菌分离的比较

本次研究在灰色海绵(4)、灰色海绵(5)和底泥(9)中各分离鉴定了 1 株细菌, 南极磷虾中分离鉴定了 2 株细菌, 红色海参(1)中分离鉴定了 3 株细菌, 黑色海绵(2)和底泥(11)中分离鉴定的细菌种属最多, 各 4 株, 其他生物材料中未分离到可培养的微生物。

D2-4 和 DB-6 两个采样点, 分别分离得到 8 株和 5 株菌。这两个采样点, 分别靠近南瑟德兰群岛和南奥克尼群岛。可能受人类生活影响比较大, 分离得到菌落数多于其他采样点。

3.3. 南极大磷虾中细菌菌群结构分析

本次实验的委托检测机构-上海美吉生物医药科技有限公司, 未得到南极大磷虾中细菌菌群结构分析的结果。

4. 讨论

本次研究在南极磷虾样品中仅分离鉴定了 2 株菌, 分别为微球菌属(*Micrococcus*)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)。另外, RNA 保存液保存的样品, 未得出高通量测序的结果。问题可能出在提取宏基因组 DNA 这个关键问题上[16]: 可尝试采用匀浆的方式把微生物分散到缓冲液中, 再把匀浆液中的微生物通过过滤的方式分离出来。本团队[17]成员杨桥曾参加第 29 次极地科学考察, 分离获得南极磷虾共附生微生物 133 株, 其中 7% 为未知种。与之前报道的相比, 在细菌门类水平方面存在差别。另外, 在所有样品中真菌没有分离到, 这可能是由样品处理的及时性、取样地点等因素造成的。本研究的样品均来自第 33 次南极科考的雪龙号, 样品采集到实验室分离时间比较长, 另一方面可以考虑在培养和分离的手段上继续改进。

近年来对样品中的微生物初步调查研究大多采用分子生物学技术, 如高通量测序等, 这种方法能够获取较为全面的微生物信息, 而传统的人工培养方法因受到培养基成分和培养条件等限制而较少应用[18]。但是开发南极, 利用南极的关键是获得可培养的功能菌株, 所以传统培养方法获得的微生物不但能够反映生态环境特征的类群, 可以更好地了解样品中处于活体状态的优势菌种类群[19], 还可以为开发利用南极微生物资源奠定基础。

基金项目

中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2016HY-ZD0903)。

参考文献 (References)

- [1] 刘春影, 丛柏林, 王能飞, 等. 南极菲尔德斯半岛可培养土壤微生物多样性及理化性质鉴定[J]. 海洋学报, 2016, 38(6): 69-81.
- [2] 张波涛, 缪锦来, 李光友, 等. 极地微生物活性物质研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 58-63.
- [3] 黄金昌, 田晓清, 樊成奇, 等. 4 株南极真菌的形态学和分子鉴定及其中 3 株的蛋白磷酸酶、脂肪酸成分分析[J]. 海洋渔业, 2017, 39(5): 562-570.
- [4] 陈皓文, 高爱国. 中国极地微生物学调查研究进展[J]. 极地研究, 2005, 17(4): 299-307.
- [5] 王泽君, 戚长箐, 陈文君, 等. 南极土壤放线菌产生的抗肿瘤抗生素 C 3905A 的分离与鉴别[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(5): 388-391.
- [6] 叶萱. 南极真菌: 有潜力作为新颖微生物杀虫、表面活性剂[J]. 世界农药, 2015, 37(3): 37-38.
- [7] 曾胤新, 蔡明宏, 陈波, 等. 一株产蛋白酶南极耐冷细菌的筛选及研究[J]. 生物技术, 2001, 11(2): 17-20.
- [8] 俞勇, 李会荣, 陈波, 等. 低温脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其部分酶学性质[J]. 高技术通讯, 2003, 13(10): 89-93.

- [9] Sun, J.N. and Mao, X.Z. (2016) An Environmental Friendly Process for Antarctic Krill (*Euphausia superba*) Utilization Using Fermentation Technology. *Journal of Cleaner Production*, **127**, 618-623.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.020>
- [10] 王成, 杨桥, 马丽艳, 等. 南极海洋假单胞菌 *Pseudomonas* sp. NJ-013 的化学成分[J]. 海洋渔业, 2014, 36(4): 350-356.
- [11] 江艳华, 姚琳, 李风铃, 等. 基于高通量测序的冷冻南极磷虾中细菌菌群结构分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2840-2845.
- [12] 朱天骄, 朱伟明, 顾谦群. 南极微生物的分离及抗肿瘤活性筛选[C]//第三届海洋生物高技术论坛. 厦门, 2005: 19-23.
- [13] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [14] 徐丽华, 娄恺, 张华, 等. 微生物资源学[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [15] 朱凤玲. 海洋细菌新属种的分类鉴定及解磷菌解磷特性的分析[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2011.
- [16] 黄循柳, 黄仕杰, 郭丽琼, 等. 宏基因组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1058-1066.
- [17] 苑丽东. 南极大磷虾共附生菌的物种多样性及其代谢产物研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- [18] 王桢, 李阳, 车帅, 等. 北极海洋沉积物中可培养细菌及其多样性分析[J]. 海洋学报, 2014, 36(10): 116-123.
- [19] Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, P.H., *et al.* (2002) Cultivation of Globally Distributed Soil Bacteria from Phylogenetic Lineages Previously Only Detected in Cultivation Independent Surveys. *Environmental Microbiology*, **4**, 654-666.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2324-7967, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ije@hanspub.org