

## 智利海洋沉积物中放线菌多样性

江红, 林如, 陈路劫, 林浩, 聂毅磊, 连云阳\*

[福建省微生物研究所, 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007]

**摘要:**【目的】认识智利海洋沉积物中放线菌的多样性。【方法】分别采用选择性分离培养和非培养的基于16S rRNA 基因序列系统发育分析方法,对来自智利南部海域海洋沉积物中放线菌多样性进行研究。采用6种选择性分离培养基分离放线菌;利用放线菌特异性引物对样品总DNA进行16S rRNA 基因序列扩增并构建了16S rRNA 基因克隆文库。分别挑选不同培养特征的22株放线菌和59个基因克隆进行16S rRNA 基因序列的系统进化分析;测定分离的放线菌对海水的依赖性及产生抗菌活性化合物的能力。【结果】共分离到328株放线菌;挑选的22株放线菌分别属于小单孢菌属、多形孢菌属、链霉菌属、迪茨氏菌属、气微菌属和短状杆菌属;挑取的59个克隆属于40个分类单元,其中60%分类单元属于放线菌门放线菌亚纲、酸微菌亚纲和红色杆菌亚纲,另外40%的分类单元在放线菌内形成几个独立的进化分支,有可能代表放线菌新类群。22株放线菌有19株具有抗菌活性,50%的生长依赖海水的放线菌也具有抗菌活性。【结论】智利海域沉积物存在丰富的放线菌系统发育多样性并能产生活性次级代谢产物,而且还蕴藏丰富的新类型的放线菌资源。

**关键词:** 海洋; 放线菌多样性; 系统发育

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0862-08

海洋环境是一个巨大的未经广泛开发的新微生物的重要来源,海洋环境特殊,决定了微生物种类的多样性和特殊性。海洋微生物特别是放线菌具有产生新生物活性代谢物质的能力<sup>[1-2]</sup>。近几年,陆地微生物来源的新生物活性物质发现的速率明显减慢,在放线菌中抗生素重复发现的概率已达到99%,必须从不同于陆地环境的海洋寻找新的菌源<sup>[2]</sup>。海洋是新生物活性物质“未经开发的处女地”,从海洋微生物中发现新化合物的比例相对较大。近年来陆续报道了一些来自海洋的放线菌特别是新属、新种产生了许多结构新颖的生物活性次级代谢产物<sup>[3-7]</sup>。因此,在筛选土壤微生物方法和经验的基础上,模拟海洋环境条件分离的海洋微生物,

可能成为微生物新药筛选的一个重要菌源。

智利海域海洋沉积物放线菌研究未见正式报道,本研究分别采用非培养的分子生物学的方法和选择性分离培养的方法对智利南部海域海洋沉积物进行放线菌多样性研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品:**6份智利海洋沉积物样品(表1)由英国纽卡斯尔大学 M. Goodfellow 教授提供。海泥样品2006年11月采集自智利南部,采样后样品立即置于无菌封口袋并保存于室温环境,后样品空运至英国保存于4℃冰箱。

基金项目:国家“十一五”科技重大专项(2009ZX09302-004);福建省重点项目(2009R10003-1)

通信作者:Tel: +86-591-83475544; E-mail: jianghong709@yahoo.com.cn, ylylian@tom.com

作者简介:江红(1965-),女,福州人,博士、副研究员,主要从事微生物资源及新药筛选。

收稿日期:2010-02-24;修回日期:2010-04-15

表 1 6 个智利海洋沉积物样品来源及 pH

Table 1 The source and pH of 6 Chilean marine sediments

sample	place	sites	depth	suffix	pH
1	Estero Castro	42. 30. 2' S, 73. 45. 7' W	15 m	ec	6. 8
2	Canal Lemuy	42. 31. 8' S, 73. 45. 7' W	60 m	cl	7. 4
3	Golfo Corcovado	42. 43. 8' S, 73. 23. 5' W	138 m	gc1	7. 2
4	Golfo Corcovado	42. 53. 2' S, 73. 09. 0' W	200 m	gc2	7. 3
5	Canal Queilen	43. 00. 0' S, 73. 30. 0' W	91 m	cq	7. 0
6	Bahia Tic Toc	43. 32. 0' S, 72. 52. 0' W	20 m	btu	6. 6

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 菌株基因组 DNA 提取试剂盒 (Gen Elute™ Bacterial Genomic Kits, Sigma 公司, 美国), PCR 产物纯化试剂盒 (ExoSAP-IT, USB 公司, 美国), TOPO 克隆试剂盒 (Invitrogen 公司, 英国), Taq 聚合酶 (BioTaq polymerase, Bioline 公司, 英国), 人造海水 (Instant Ocean Synthetic Sea Salt, Aquarium Systems 公司, 美国。33.3 克海盐溶于 1 L 去离子水配制成 1 L 100% 海水, 16.5 克海盐溶于 1 L 去离子水配制成 1 L 50% 海水)。基因组 DNA 快速提取仪 (Ultra-Turax T25 homogenizer, 德国), PCR 扩增仪 (Biometa Tgradient Thermocycler, 德国)。

## 1.2 选择性分离

采用改进的分散差速离心<sup>[8]</sup>的方法进行海洋沉积物样品预处理。处理后各海泥样品稀释液 100  $\mu$ L 分别涂布于 6 种选择性分离培养基: Starch-Casein (SC) agar<sup>[9]</sup>; Raffinose-Histidine (RH) agar<sup>[10]</sup>; SM1 agar<sup>[11]</sup>; SM3 agar<sup>[11]</sup>; M1 agar<sup>[12]</sup>; Humic acid vitamins (HV) agar<sup>[13]</sup>; GYE agar<sup>[14]</sup>。培养基用 100% 海水配制, 灭菌后, 添加制霉菌素、萘啶酮酸和放线菌菌酮至终浓度分别为 50、10 和 10  $\mu$ g/mL。分离平板倒置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 3-5 周。

## 1.3 海水对放线菌生长的影响

配制海水燕麦琼脂和非海水燕麦琼脂培养基, 制备琼脂平板, 将菌株同时接种于两种平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2 周观察菌株生长状况。

## 1.4 菌株 16S rRNA 基因分析

**1.4.1 DNA 提取:** 菌株基因组 DNA 采用 Sigma 公司的试剂盒提取, 得到的 DNA 样品储存于 -20 $^{\circ}$ C。

**1.4.2 PCR 扩增:** 采用细菌通用引物 27 F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 和 1525 R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')<sup>[15]</sup> 进行菌种基因组 DNA 样品 16S rRNA 基因 PCR 扩增, PCR 反应条件参照 Chun 和 Goodfellow 的方法<sup>[16]</sup>。

**1.4.3 PCR 产物纯化和测序:** 16S rRNA 基因 PCR 产物纯化后的样品送韩国 Macrogen 公司进行序列测定。

**1.4.4 系统发育分析:** 用 BLAST 软件在 NCBI 的 GenBank 进行序列比对并搜索相近菌株的序列, 用 CLUSTAL-X 软件<sup>[17]</sup> 进行比对, 生成的比对文件用 TREECON 软件<sup>[18]</sup>, 邻接法<sup>[19]</sup> 进行系统进化分析, 拓扑分析为 1000 次重复取样的结果。

## 1.5 克隆文库构建及系统发育分析

**1.5.1 土壤总 DNA 提取:** 按 Griffiths<sup>[20]</sup> 的方法提取沉积物样品中的微生物总 DNA。

**1.5.2 PCR 扩增:** 采用巢式 PCR (Nested PCR) 的方法<sup>[21]</sup>, 第一次 PCR 使用通用引物 27F 和 1525R 对样品总 DNA 进行 PCR 扩增, 二次 PCR 采用放线菌特异性引物 AcF (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTG-3') 和 AcR (5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3') 以第一次 PCR 产物稀释液作为模板进行扩增, PCR 反应条件参照 Stach 等的方法进行<sup>[22]</sup>, 扩增片段大小 640 bp。

**1.5.3 TOPO 克隆和测序:** 上述 PCR 产物采用 TOPO 克隆试剂盒连接于质粒 PCR 2.1-TOPOs, 连接后转化试剂盒自带的基因工程大肠杆菌 (*E. coli* DH5 $\alpha$ -T1) 进行 PCR 产物文库构建。挑取克隆子进行插入序列的 PCR 扩增和测序。

**1.5.4 系统发育分析:** 分析方法同 1.4.4。克隆序列的相似性大于 99% 的归于同一个分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)<sup>[21]</sup>。

## 1.6 生物学活性测定

取一铂环放线菌斜面培养物接入种子培养基 [可溶性淀粉 1.5%, 葡萄糖 0.5%, 蛋白胨 0.5%, 酵母粉 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.05%, NaCl 0.05%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, 50% 海水 1 L, pH 7.5] 32 $^{\circ}$ C, 240 r/min 振荡培养 48 h。5% 移种量转入发酵培养基 A (甘露糖 2%, 黄豆粉 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, 50% 海水 1 L, pH 7.5) 或发酵培养基 B (燕麦 2%, 微量盐溶液 1.0 mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, 50% 海水 1 L, pH 7.5) 32 $^{\circ}$ C, 240 r/min 振荡培养 96-120 h。取 10 mL 发酵液同等体积丙酮浸泡提取 2 次, 合并

离心上清液浓缩至干,用 1 mL 甲醇溶解制成发酵提取物样品。采用琼脂平板纸片扩散法测定放线菌发酵物对 *Escherichia coli* ATCC0111, *Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Candida albicans* CPCC360003, *Aspergillus niger* R330 和 *Rhodotorula glutinis* CPCC360002 的抗菌活性。

## 2 结果

### 2.1 选择性筛选

使用 6 种选择性分离培养基从 6 份智利海洋沉积物样品中分离得到 328 株放线菌。SC, SM3 和 RH 三种分离培养基的放线菌数目明显多于其他分离培养基。从样品 *bt* 分离到的放线菌数目最多,其次是样品 *cl*、*ec* 和 *gc2*,而从样品 *gc1* 和 *cq* 分离到的放线菌数目极少。

根据这些放线菌菌株的形态培养特征初步将其归于 10 个类群,从每个类群中选取代表菌株共 22 株。显微形态观察:大部分菌株基内菌丝细长有分隔、菌丝多分支,单个孢子着生于孢子梗上,孢子圆形到卵圆形,孢子外壁光滑或有瘤状突起,无气生菌丝,具有小单孢菌的形态特征;一些菌株基内菌丝分枝发达、无横隔、不断裂、孢子成链,有气生菌丝,具有链霉菌形态特征;还有另外一些菌株则不具有小单孢菌和链霉菌的形态特征。

### 2.2 海水对部分放线菌菌株生长的影响

检测了 190 株分离到的放线菌(含下述的 22 株菌)生长对海水的需求,结果共有 47 株放线菌在海水配制的燕麦培养基上生长良好,在自来水配制的燕麦培养基中不生长,具有海洋放线菌的特性。下述 22 株菌只有 3 株生长需要海水。

### 2.3 16S rRNA 基因多样性分析

从不同培养特征的 10 个类群中挑取 22 株菌种进行 16S rRNA 基因序列分析(图 1)。其中 2 株为链霉菌,其余分别属于稀有放线菌的 5 个属:小单孢菌属 *Micromonospora* (16 株),多形孢菌属 *Polymorphospora* (1 株)、迪茨氏菌属 *Dietzia* (1 株)、气微菌属 *Aeromicrobium* (1 株)和短状杆菌属 *Brachybacterium* (1 株)。

16 株属于小单孢菌属的菌种具有小单孢菌的多样性,它们在进化树上形成至少 9 个分散独立的进化分支,至少代表 9 个不同的进化类群。其中分属 3 个群的 5 株小单孢菌的 16S rRNA 基因序列与小单孢菌属已知种的相似性小于 99% (数据未列)。小单孢菌属内不同种之间的 16S rRNA 基因序列相

似性高,均在 98.0% - 99.9% 之间,两个亚种 *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora* 和 *Micromonospora echinospora* subsp. *ferruginea* 之间的 16S rRNA 基因序列相似性甚至达到 99.6%<sup>[23-28]</sup>。Kasai 等 2000 年报道小单孢菌属的种之间的相似性高达 99.3%,两个种之间的 DNA-DNA 同源性依然小于 70%<sup>[25]</sup>,提示在小单孢菌属中,种间 16S rRNA 基因序列相似性不高于 99.3% 的很可能为新种。Stach 等也报道了菌种间相似性小于 99%,即意味着菌株间 DNA-DNA 同源性小于 70%,两菌株属于不同的“种”<sup>[21]</sup>。据此初步推断这 9 个小单孢菌进化群中可能存在 3 个潜在小单孢菌新种。

除了小单孢菌属菌株外,还从智利海洋沉积物样品分离到其他稀有放线菌属的菌株。菌株 JH68 属于目前分离数目极为稀少的放线菌多形孢菌属 (*Polymorphospora*),它与该属唯一模式菌种 *Polymorphospora rubra* DSM 44947<sup>T</sup> 的 16SrRNA 基因序列相似性仅 98.4%,新种可能性比较大。此外 JH111 和 JH107 分别与气微菌属模式菌种 *Aeromicrobium marinum* 和短状杆菌属 *Brachybacterium faecium* 16SrRNA 基因序列最相似,相似性均为 98.4%,潜在新种可能性比较大。

对从 190 株分离到的放线菌中检测到的 47 株依赖海水生长的放线菌也进行了 16S rRNA 基因序列分析,结果显示这些放线菌均属于小单孢菌属。

### 2.4 非培养放线菌多样性分析

选择可培养放线菌最多的 *bt* 样品进行非培养放线菌多样性分析。获得 59 个不同的 16S rRNA 基因片段序列,将这些序列同 GenBank 数据库中已知有效序列进行比对,以 99.0% 相似性为标准划分不同分类单元(OTU),得到 40 个 OTUs。数据分析显示这些序列同属于放线菌纲类群,分布在放线菌亚纲 (*Actinobacteridae*)、酸微菌亚纲 (*Acidimicrobidae*) 和红色杆菌亚纲 (*Rubrobacteridae*)。40 个 OTUs 中 14 个属于放线菌亚纲,酸微菌亚纲 9 个,红色杆菌亚纲 1 个,总共 24 个占 60%。其余 40% 的 OTUs 与有效发表的所有类群无较近的亲缘关系。

对这些测序克隆进行 16S rRNA 基因序列相似性分析,结果显示克隆序列 H41 与 *Verrucosipora gifhornensis* DSM 44337<sup>T</sup> 相似性 99.4%; H1 与 *Microcella putealis* CV-2<sup>T</sup> 相似性 98.6%; H22、H25、H27、H51、H26 与 *Rhodococcus kyotonensis* DS472<sup>T</sup> 相似性 99.0% 以上; H33 与 *Dietzia maris* DSM 43672<sup>T</sup> 相似性 99.8%。H5、H8、H34、H37、H48、H39、H40、

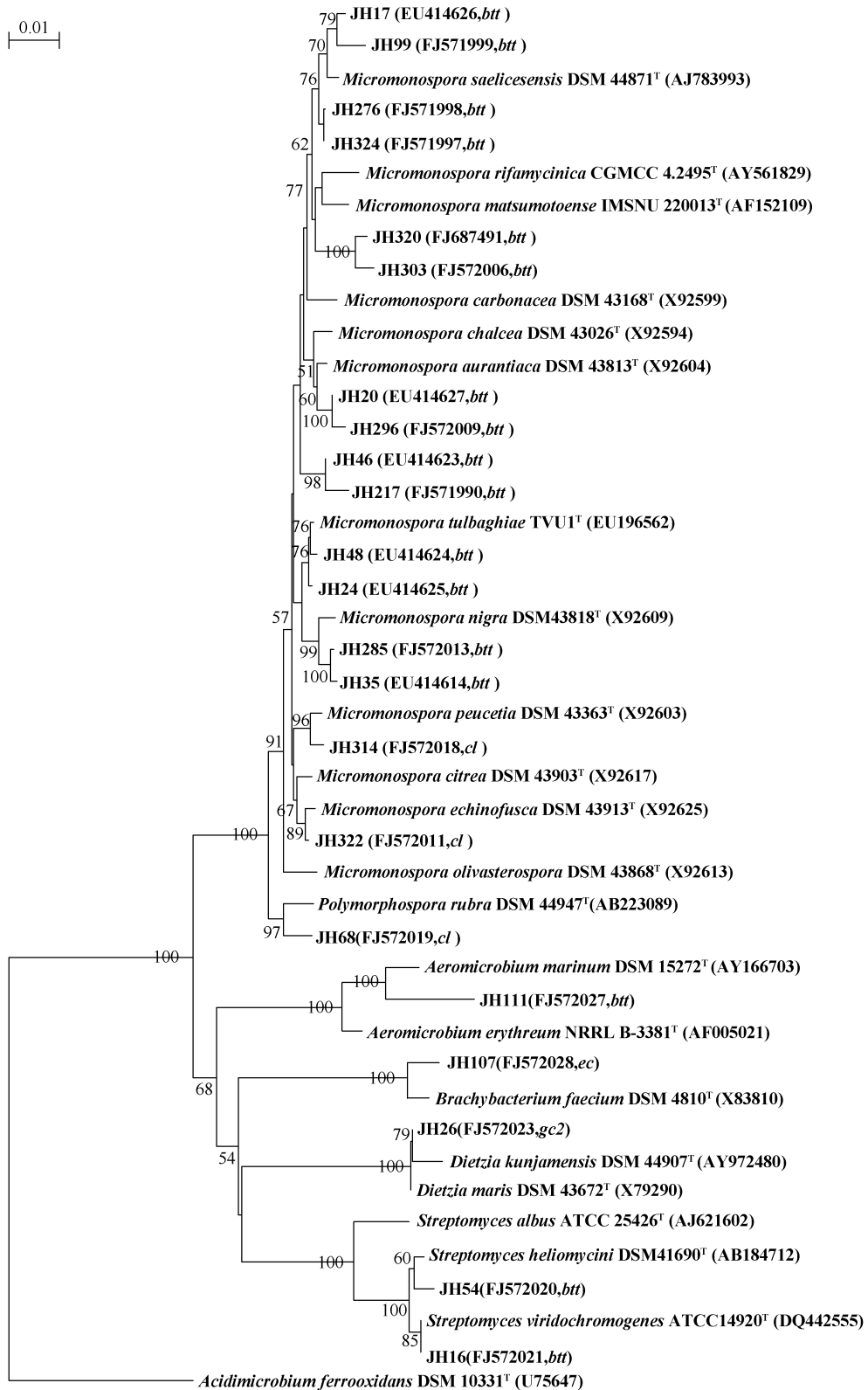


图 1 智利海洋沉积物样品 22 株菌种与放线菌相关菌种构建的基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences showing relationships between the isolates and reference strains of actinomycetes. The numbers in the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a neighbour-joining analysis of 1000 resampled datasets; only values above 50% are given. The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position.

H43 和 H44 与 *Ilumatobacter fluminis* YM22 - 133<sup>T</sup> 相似性 97.0% 以上。其他大部分克隆序列与已知放

线菌有效种的相似性均低于 97%，即约 70% 的克隆序列可能代表着新的放线菌类群。放线菌亚纲

(*Actinobacteridae*) 的 14 个 OTUs 只有 9 个 OTUs 分别属于小单孢菌亚目 (*Micromonosporineae*), 微球菌亚目 (*Micrococccineae*), 棒杆菌亚目 (*Corynebacterineae*) 的 4 个科中, 包括小单孢菌科 (*Micromonosporaceae*)、微球菌科 (*Microbacteriaceae*)、迪茨氏菌科 (*Dietziaceae*) 和诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*), 另外 5 个 OTUs 与放线菌

亚纲内有效发表的种无较近的亲缘关系。酸微菌亚纲 (*Acidimicrobidae*) 的 9 个 OTUs 属于酸微菌亚目 (*Acidimicrobineae*) 酸微菌科 (*Acidimicrobiaceae*) 和 *Iamiaceae* 科; 还有 1 个 OTU 属于红色杆菌亚纲 (图 2)。以上结果显示智利海洋沉积物中存在着丰富的放线菌种群多样性。

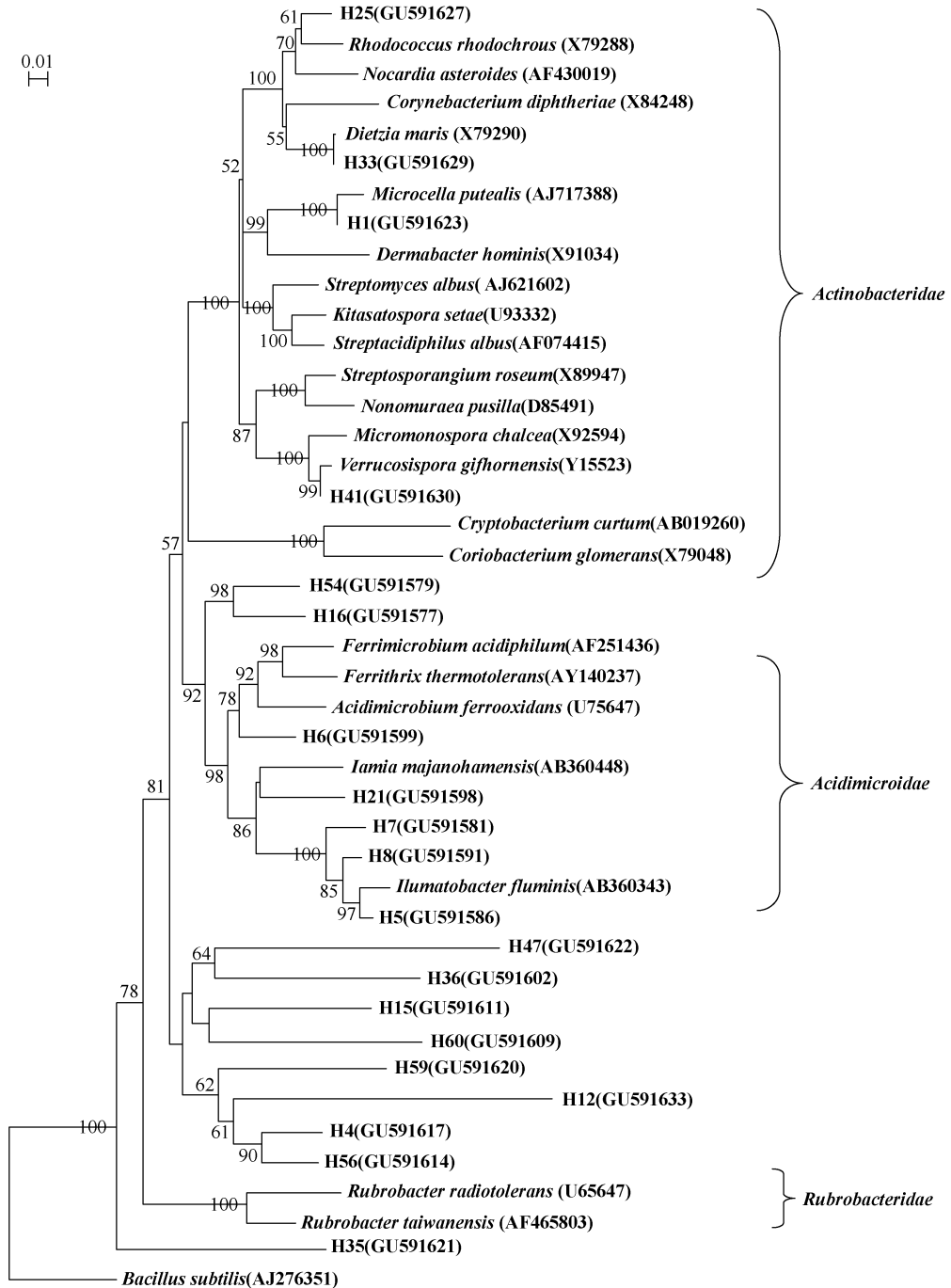


图 2 智利海洋沉积物样品部分克隆序列与放线菌已知相关种构建的 16S 基因序列系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among actinobacterial 16S rRNA gene sequences (partial clone sequences, 640bp) obtained from Chilean marine sediments and their closely related sequences download from GenBank. All of bootstrap values over 50% are shown based on Neighbour-joining analyses of 1000 resamples data sets. Bar, 0.01 sequence divergence.

## 2.5 生物学活性测定

检测了生长需要海水的 47 株小单孢菌产生活性次级代谢产物的能力,发现超过 50% 的菌种能产生抗革兰氏阳性细菌的活性物质(表 2)。对 10 个类群 22 株放线菌也进行了抗菌活性测定,结果 19 株(86%) 菌具有抗革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌或抗真菌的活性(数据未列)。这 19 株具有抗菌活性的菌株是小单孢菌属、链霉菌属和多形孢菌属的菌种。

表 2 47 株海水依赖放线菌的抗菌作用

Table 2 Antibacterial activity of 47 sea-water dependant actinomycetes

Target organism	Number of strains with antibacterial activity	Percent of total/%
<i>Escherichia coli</i> ATCC0111	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	14	30
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	23	49
<i>Candida albicans</i> CPC360003	0	0
<i>Aspergillus niger</i> R330	0	0
<i>Rhodotorula glutinis</i> CPC360002	0	0

## 3 讨论

选择性分离培养结果显示智利海洋沉积物样品富含放线菌尤其是小单孢菌。小单孢菌属菌种仅次于链霉菌属菌种产生了大量的活性次级代谢产物<sup>[1]</sup>。以往报道从海洋环境可以分离到链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、野野村氏菌属(*Nonomurea*)、疣孢菌属(*Verrucospora*)、和红球菌属(*Rhodococcus*)等<sup>[28-30]</sup>。我们的实验分离到了以往能够从海泥中得到的链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、短状杆菌属(*Brachybacterium*)和迪茨氏菌属(*Dietzia*)菌种,还分离到未见从海泥中得到的多形孢菌属(*Polymorphospora*)的菌种。16S rRNA 基因序列分析结果提示我们所获得的 5 个稀有放线菌属中有 4 个属的代表菌株可能存在潜在新种,新种的鉴别结果有待进一步的基因组 DNA-DNA 杂交证明。

16 株小单孢菌 16S rRNA 基因序列系统进化分析表明智利海泥中的小单孢菌呈现菌种的多样性,在系统进行树上形成的 9 个进化分支至少代表 9 个种并可能存在 3 个潜在新种。由于微生物次级代谢产物具有“种”的特异性<sup>[31]</sup>,不同的种产生不同的次级代谢产物,可以推测这些来自智利海泥的小单孢菌具有产生次级代谢产物多样性的能力。

本实验分离到 47 株只在海水配制的燕麦培养基中生长,在自来水配制的燕麦培养基中不能生长的放线菌,经 16S rRNA 序列系统进化分析它们虽然不是最近报道的依赖海水生长的海洋专有的嗜盐产孢菌属(*Salinispora*)<sup>[32]</sup>而是小单孢菌属,但是值得注意的是这些具有海洋放线菌的特性菌种有一半具有抗菌活性。嗜盐产孢菌属和 *Marinispora* 属都是最近报道的专属于海洋的稀有放线菌,这两个属的所有菌株的生长依赖海水,从两个属的菌种均已分离到许多结构新颖的新生物活性物质<sup>[6-7]</sup>。我们期望从这 47 株海水依赖小单孢菌中获得新活性代谢产物。

菌株 JH68 属于极为稀少的放线菌多形孢菌属(*Polymorphospora*),目前该属只有一个模式菌种。16S rRNA 基因序列登记于 GenBank 的一共只有 6 株菌,分别来自红树林、植物内生菌和植物根瘤,从海洋沉积物中分离到该属菌种还是首次,说明从不同于陆地的海洋环境中获取新的微生物物种的潜力极大。

非培养方法的分析结果表明,来自智利海洋沉积物的样品中富含未被培养的放线菌,且克隆到序列与放线菌纲已知种的相似性大部分低于 97%,说明海泥中不乏新的微生物物种。59 个 OTUs 中仅 9 个 OTUs 属于放线菌的 4 个科:小单孢菌科(*Micromonosporaceae*)、微球菌科(*Microbacteriaceae*)、迪茨氏菌科(*Dietziaceae*)和诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*)。这些结果与选择性分离得到的纯培养物的菌种多样性明显不同,而且令人意外的是没有得到从选择性分离培养基中可以大量分离到的小单孢菌和链霉菌的克隆,这可能与克隆库规模较小有关。非培养分析的结果显示海洋沉积物样品中的大部分放线菌用本研究采用的选择性分离方法还无法分离到。非培养技术调查显示该地区海洋环境放线菌多样性,为进一步资源开发提供必要依据。

由于大量的放线菌还未能通过现有的选择性分离方法获得纯培养物,所以提出新思路,设计新的选择性分离方法,分离目前还未能培养的海洋放线菌,是海洋放线菌多样性研究、海洋放线菌药物研发利用的重要研究方向。对于已经分离到的海洋来源的放线菌,一方面要优化培养条件刺激微生物产生多种生物活性的次级代谢产物,另一方面可以直接从基因入手,通过基因筛选来针对性地获得结构和活性新颖的次级代谢产物。

**致谢** 本论文得到英国纽卡斯尔大学 Mike Goodfellow 教授的指导以及 Amanda L. Jones 博士的帮助, 特此致谢。

## 参考文献

- [ 1 ] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1):1-26.
- [ 2 ] Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(11): 491-499.
- [ 3 ] Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Report*, 2008, 25(1):35-94.
- [ 4 ] Fiedler HP, Bruntner C, Riedlinger J, Bull AT, Knutsen G, Goodfellow M, Jones A, Maldonado L, Pathom-aree W, Beil W, Schneider K, Keller S, Süßmuth RD. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds Isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosipora*. *The Journal of Antibiotics*, 2008, 61(3):158-163.
- [ 5 ] Schultz AW, Oh DC, Carney JR, Williamson RT, Udvary DW, Jensen PR, Gould SJ, Fenical W, Moore BS. Biosynthesis and structures of Cyclomarins and Cyclomazones, prenylated cyclic peptides of marine *Actinobacterial* origin. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(13):4505-4514.
- [ 6 ] Asolkar RN, Kirkland TN, Jensen PR, Fenical W. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(1):37-39.
- [ 7 ] Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Marinisporolides, polyene-polyol macrolides from a marine actinomycete of the new genus *Marinispora*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(2):675-84.
- [ 8 ] Hopkins DW, MacNaughton SJ, O' Donnell AG. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1991, 23(3): 217-225.
- [ 9 ] Küster E, Williams ST. Selection of media for isolation of *Sreptomycetes*. *Nature*, 1964, 202: 928-929.
- [10] Vickers JC, Williams ST, Ross GW. A taxonomic approach to selective isolation of streptomycetes from soil. //Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Yakoleff V. *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. 1<sup>st</sup> ed. London: Academic Press, 1984.
- [11] Tan GYA, Ward AC, Goodfellow M. Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29(7):557-569.
- [12] Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10):5005-5011.
- [13] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(5): 501-509.
- [14] Gordon, RE, Mihm JM. Identification of *Nocardia caviae* nov. comb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1962, 98(3):628-636.
- [15] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. //Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. 1<sup>st</sup> ed. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, 1991.
- [16] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(2): 240-245.
- [17] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL -X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [18] Van de Peer Y, De Wachter R. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, 1994, 10(5): 569-570.
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [20] Griffiths RI, Whiteley AS, O' Donnell AG, Bailey MJ. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5488-5491.
- [21] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(13): 6189-6200.
- [22] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 828-841.
- [23] Koch C, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Stackebrandt E. 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(3):765-768.
- [24] Koch C, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E. Intra-generic relationships of the actinomycete genus *Micromonospora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(3):383-387.
- [25] Kasai H, Tamura T, Harayama S. Intra-generic relationships among *Micromonospora* species deduced from gyrB-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1):127-134.

- [26] Zhao H, Kassama Y, Young M, Kell DB, Goodacre R. Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (11): 6619-6627.
- [27] Thawai C, Tanasupawat S, Itoh T, Suwanborirux K, Suzuki K, Kudo T. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 417-422.
- [28] Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7520-7529.
- [29] Ward AC, Bora N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9 (3): 279-286.
- [30] Maldonado LA, Stach JE, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, 94(2): 289-298.
- [31] Jensen PR, Williams PG, Oh DC, Zeigler L, Fenical W. Species-specific secondary metabolite production in marine *Actinomycetes* of the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1146-1152.
- [32] Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(5): 1759-1766.

## Actinobacterial diversity of marine sediment samples from Chile

Hong Jiang, Ru Lin, Lujie Chen, Hao Lin, Yilei Nie, Yunyang Lian\*

(Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] The aim of this study was to investigate actinobacterial diversity in Chilean marine sediments. [ **Methods** ] Actinobacterial diversity in these sediments was investigated by selective isolation method, culture-independent method and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Six selective media were used to isolate actinomycetes from sediment samples. The primers for the class *Actinobacteria* were used for Actinobacterial 16S rRNA gene amplification and then a clone library was constructed for the sediment sample *btt*. Twenty-two strains with different culture characteristics and 59 clones from sample *btt* were selected for 16S rRNA gene sequences analysis. To determine requirement for seawater each strain was grown on oatmeal agar prepared with deionized water and with seawater, respectively. Strains were screened for antibiotic activity against bacteria and fungi. [ **Results** ] In total 328 actinomycetes were obtained. Twenty-two strains which were selected belonged to *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Polymorphospora*, *Aeromicrobium* and *Brachybacterium*. Fifty-nine clones (40 OTUs) were sequenced, and 60% OTUs belonged to *Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae* and *Rubroacteridae*. The other 40% OTUs, which formed several distinct clades in phylogenetic tree among phylum *Actinobacteria* may represent new taxonomical groups. 50% of the 47 sea water dependant strains and nineteen strains out of the above 22 strains exhibited antimicrobial activity. [ **Conclusion** ] There was abundant actinobacterial diversity in the marine sediments of Chile, and the result implied that there were large numbers of unknown actinobacterial groups in the sediments. Actinomycetes from Chilean marine sediments had the potential of producing bioactive secondary metabolites.

**Keywords:** marine; actinobacterial diversity; phylogenetic analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National 11<sup>th</sup> Five-Year Plan Major Scientific and Technological Issues (2009ZX9302-004) and the Fujian Key Scientific Project (2009R10003-1)

\* Corresponding author. Tel: +86-591-83475544; E-mail: jianghong709@yahoo.com.cn, yllian@tom.com

Received: 24 February 2010/Revised: 15 April 2010