

硃洲岛海胆可培养细菌的多样性

黄苛¹, 张丽¹, 刘祝祥¹, 陈奇辉¹, 彭清忠¹, 李文均², 崔晓龙², 陈义光^{1,2*}

(¹吉首大学, 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 生物资源与环境科学学院, 吉首 416000)

(²云南大学, 云南省微生物研究所, 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091)

摘要:【目的】研究南海硃洲岛马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)可培养细菌多样性。【方法】采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对样品中细菌(含放线菌)多样性进行研究。【结果】用补充 0~2.0 mol/L NaCl 的 MA、ISP 2、NA、SWA 和 HAA 培养基从海胆样品中分离到 106 株细菌菌株, 根据形态观察和部分生理生化实验结果去冗余, 选取 34 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明, 这些分离菌株代表 21 个物种, 属于 3 个大的系统发育类群(Firmicutes, Actinobacteria, Gamma-Proteobacteria)的 10 个科、17 个属。多数菌株属于 Firmicutes 门(21 株, 58.8%)和 Actinobacteria 门(9 株, 26.5%)。大多数菌株与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株之间存在一定的遗传差异(16S rRNA 基因序列相似性为 99.6%~99.9%), 其中至少有 5 个菌株(JSM 076033, JSM 076056, JSM 076093, JSM 078063 和 JSM 078169)代表潜在的新分类单元(potential new taxa)。【结论】研究结果表明, 南海硃洲岛海胆中存在较为丰富的细菌多样性, 并且潜藏着较多的新的微生物类群(物种)。

关键词: 马粪海胆; 可培养细菌; 16S rRNA 基因; 系统发育分析; 多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1424-06

海洋环境的多样性和特殊性造就了海洋生物的多样性和特殊性, 其中海洋微生物种类就多达 100 万种以上, 而目前所研究和鉴定过的海洋微生物还占不到海洋微生物总量的 5%, 被筛选的海洋微生物代谢产物仅约为 1%^[1]。硃洲岛(20°52'N~20°56'N, 110°33'E~110°38'E)处于南海北部雷州湾, 临近湛江市, 具有南海岛屿的典型生态特点, 可以作为南海岛屿微生物多样性研究的代表岛屿。近年来本实验室对该岛多种生境(土壤、潮汐带沉积物、海水和部分无脊椎动物)中的微生物资源进行了调查研究, 发现该岛具有较高的细菌多样性, 并蕴藏着较多的新类群, 且有较高比例菌株能产生抗菌活性物质, 部分研究结果已经陆续发表^[2-8]。海胆(sea urchin)为

棘皮动物门(Echinodermata)海胆纲(Echinoidea)动物的总称, 其营养丰富, 在医药、食品和保健方面具有很高的应用价值^[9], 且非常适合微生物附生或共生, 其中具有不少新的微生物类群, 如 Nedashkovskaya 等从采集自日本海的中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)中分离到 5 个新种^[10-14], 我们也从硃洲岛潮汐带采集的马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)中分离到 3 个新种^[6-8]。本文报道了硃洲岛潮汐带采集的马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)中可培养细菌多样性的研究结果, 以期对相关微生物资源的研究、保护、开发和利用提供一定的理论依据和实践指导。

基金项目: 国家自然科学基金(30970007); 国际合作重大项目(2007DFB31620); 湖南省重点学科建设项目(JSS2009Z01); 吉首大学项目(jsdxkyzz200811, 08JDY017)

* 通信作者。Tel: +86-743-8564416; Fax: +86-743-8565323; E-mail: mchenjsu@yahoo.com.cn

作者简介: 黄苛(1983-), 男, 湖南溆浦人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与生态; E-mail: hkl1520@163.com

收稿日期: 2009-05-04; **修回日期:** 2009-08-09

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂: PCR 仪系 BIO-RAD 公司 (PE 29600); 细菌基因组 DNA 提取和纯化、16S rRNA 基因 PCR 扩增所用酶、引物和试剂同文献^[15]。MA (marine agar 2216) 培养基购自 Difco 公司;

1.1.2 培养基: (1) 营养琼脂 (nutrient agar, NA): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL, pH 7.5; (2) ISP 2 琼脂 (International *Streptomyces* Projects medium 2 agar)^[16]: 蛋白胨 4 g, 酵母膏 4 g, 麦芽膏 5 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL, pH 7.2; (3) 海水琼脂 (sea-water agar, SWA): 琼脂 20 g, 海水 1000 mL, pH 7.5; (4) 腐植酸琼脂 (humic acid agar, HAA): 腐植酸 10 g, 水 1000 mL, pH 7.5。复合盐 A 液: KCl 27.5 g, Na₂CO₃ 8 g, Ferric Citrate 5 g, 水 1000 mL; 复合盐 B 液: SrCl 34 g, KBr 80 g, H₃BO₃ 22 g, Na₂SiO₃ 4 g, (NH₄)₂SO₄ 1.6 g, Na₂HPO₄ 8 g, 水 1000 mL。

1.2 样品采集

1.2.1 样品来源: 马粪海胆样品于 2007 年 5 月采自我国南海雷州湾硃洲岛潮汐带, 按无菌操作要求, 用无菌塑料袋收集海胆样品, 样品冷冻后 24 小时内带回实验室后进行微生物分离培养。

1.2.2 样品处理: 用灭菌海水将海胆样品表面洗净, 置超净工作台上风干后, 研碎样品, 取 10 g 置于盛有 90 mL 灭菌海水和玻璃珠的三角瓶中, 在摇床上 150 rpm 振荡 30 min, 制成样品匀浆悬浮液。

1.3 菌株分离

以 MA、ISP 2、NA、SWA 和 HAA 等作为分离基础培养基, 分别添加复合盐 A 液 20 mL/L 和复合盐 B 液 1 mL/L, 并制成分别含 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mol/L NaCl 的系列平板。取 0.2 mL 一定浓度的样品匀浆稀释液涂布平板, 于 28℃ 培养。7~28 d 后挑取单菌落用相应的培养基进行四分体划线纯化, 所得纯培养物制成冻干牛奶管, 同时接种于相应的斜面培养基, 保藏于 4℃ 备用。

1.4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析

基因组 DNA 的提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增、PCR 产物纯化和序列测定按 Cui 等^[17] 使用的方法进行。扩增和测序用一对细菌通用引物: 正向引物 PA(8-27f: 5'-AGAGTTTGTAT CCTGGCTCAG-3') 和反向引物 PB(1523-1504r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC GCA-3')。所得序列提交 GenBank 注册, 获取序列

号。然后用 Blast 搜索程序从 GenBank/EMBL/DBJ 中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 CLUSTAL_X 进行序列多重比对^[18], 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[19], 用 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行聚类分析和系统进化树构建^[20]。重复取样 1000 次进行自展值 (bootstrap value) 分析以评估系统进化树的拓扑结构稳定性^[21]。

1.5 Shannon-winner 多样性指数

本文采用 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株属于不同物种的归类原则^[22], 采用 Shannon-winner 指数 (H) 和均匀度指数 (E) 估算多样性^[23]。

$$H = - \sum_{i=1}^i (p_i) (\log_2 p_i);$$

$$E = H / \log_2 S;$$

式中 S 为菌种数; P_i 为第 i 种的多度比例; $P_i = n_i / N$; n_i 是第 i 种的菌株数; N 是所有菌株数的总和。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离

根据菌落大小、形态、颜色等特征, 挑取分离平板上的单菌落进行四分体划线纯化, 最终从本次采集的样品中分离到 106 株细菌 (含放线菌) 菌株。从不同培养基分离效果来看, 以添加 0.5~1.5 mol/L NaCl 的 MA 和 NA 培养基分离到的菌落最多, 菌落形态较丰富, 而不添加 NaCl 和添加 2.0 mol/L NaCl 的 MA 和 ISP 2 培养基, 及添加 0.5~2.0 mol/L NaCl 的 SWA 和 HAA 培养基, 菌落形成单位少, 且菌落形态单一。

2.2 类群多样性

通过菌落形态、细胞显微形态及部分生理生化实验结果去冗余, 最终从 106 个分离菌株中选取 34 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。主要结果见表 1。结果表明, 34 个分离菌株属于细菌域的 3 个大的系统发育类群 (Firmicutes, Actinobacteria, Gamma-Proteobacteria) 的 10 个科 (Bacillaceae, Brevibacteriaceae, Dermabacteraceae, Enterobacteriaceae, Haloanaerobiaceae, Nocardiopsaceae, Planococcaceae, Staphylococcaceae, Streptomyetaceae, Vibriionaceae)、17 个属 (*Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Halobacillus*, *Halomonas*,

Jeotgalibacillus, *Jeotgalicoccus*, *Nocardiopsis*, *Virgibacillus*)。多数菌株属于 Firmicutes 门(20 株, 58.8%), 其次是 Actinobacteria 门(9 株, 26.5%)和 Gamma-Proteobacteria 亚门(5 株, 14.7%)。

表 1 海胆可培养细菌与其系统发育关系最密切的典型菌株间的系统发育关系

Table 1 Phylogenetic closest neighbors of strains isolated from a sea urchin as determined based on 16S rRNA gene sequence analysis

Phylogenetic groups \ Family	Strain (accession number)*	Closest type strain (accession number)	Similarity/%
Gamma-Proteobacteria(5/34)			
Vibrionaceae (3)	JSM 075048 (FJ477390)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	99.7
	JSM 075080 (FJ477394)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	99.7
	JSM 076063 (FJ477410)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	100.0
Enterobacteriaceae (1)	JSM 076077 (FJ477411)	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1 ^T (EU036987)	99.7
Haloanaerobiaceae (1)	JSM 078169 (FJ429198)	<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 ^T (AJ306893)	97.0
Firmicutes (20/34)			
Staphylococcaceae (5)	JSM 075070 (FJ477393)	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>Linens</i> RP29 ^T (AF527483)	99.7
	JSM 076003 (FJ477397)	<i>Salinicoccus roseus</i> DSM 5351 ^T (X94559)	99.6
	JSM 076012 (FJ477399)	<i>Salinicoccus roseus</i> DSM 5351 ^T (X94559)	99.6
	JSM 076102 (FJ477417)	<i>Salinicoccus roseus</i> DSM 5351 ^T (X94559)	99.0
	JSM 076033 (EU583727)	<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i> YKJ-101 ^T (AY028925)	95.9
Bacillaceae (12)	JSM 076009 (FJ477398)	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> DSM 10037 ^T (AY543169)	99.7
	JSM 076053 (FJ477407)	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> DSM 10037 ^T (AY543169)	100
	JSM 076038 (FJ477404)	<i>Virgibacillus dokdonensis</i> DSW-10 ^T (AY822043)	99.8
	JSM 076002 (FJ477396)	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404 ^T (AJ310149)	99.7
	JSM 076062 (FJ477409)	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404 ^T (AJ310149)	99.6
	JSM 076017 (FJ477400)	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> IS-Hb7 ^T (AB195680)	99.5
	JSM 076022 (FJ477401)	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> IS-Hb7 ^T (AB195680)	99.8
	JSM 076029-1 (FJ477402)	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> IS-Hb7 ^T (AB195680)	99.6
	JSM 076099 (FJ477415)	<i>Halobacillus yeomjeoni</i> MSS-402 ^T (AY881246)	97.1
	JSM 076056 (EU583728)	<i>Pontibacillus chungwhensis</i> BH 030062 ^T (AY553296)	96.6
	JSM 076093 (FJ477414)	<i>Bacillus huajinpoensis</i> SW-72 ^T (AF541966)	97.3
	JSM 076100 (FJ477416)	<i>Jeotgalibacillus alimentarius</i> YKJ-13 ^T (AF281158)	100
Planococcaceae (3)	JSM 076045-1 (FJ477405)	<i>Planococcus maritimus</i> KCCM 41587 ^T (AF500007)	99.5
	JSM 076050 (FJ477406)	<i>Planococcus maritimus</i> KCCM 41587 ^T (AF500007)	99.5
	JSM 078063 (FJ425906)	<i>Sporosarcina antarctica</i> N-05 ^T (EF154512)	98.4
Actinobacteria (9/34)			
Nocardiopsaceae (3)	JSM 071588 (FJ477387)	<i>Nocardiopsis aegyptia</i> DSM 44442 ^T (AJ539401)	99.2
	JSM 075017 (FJ477388)	<i>Nocardiopsis kunsanensis</i> HA-9 ^T (AF195412)	99.6
	JSM 075056 (FJ477392)	<i>Nocardiopsis kunsanensis</i> HA-9 ^T (AF195412)	99.6
Brevibacteriaceae (2)	JSM 075051 (FJ477391)	<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20657 ^T (AJ251418)	100
	JSM 076054 (FJ477408)	<i>Brevibacterium casei</i> DSM 20657 ^T (AJ251418)	99.7
Dermabacteraceae (3)	JSM 075038 (FJ477389)	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> DSM 46341 ^T (AJ415377)	99.2
	JSM 075084 (FJ477395)	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> DSM 46341 ^T (AJ415377)	99.8
	JSM 076082 (FJ477412)	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> DSM 46341 ^T (AJ415377)	100
Streptomycetaceae (1)	JSM 076088 (FJ477413)	<i>Streptomyces cacaioi</i> subsp. <i>cacaioi</i> NBRC 12748 ^T (AB184115)	100

* Strains marked in bolds indicate potential new taxa

2.3 物种与遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株是属于不同物种的归类原则^[22], 34 个分离菌株可以归为 21 个物种(表 1 和图 1)。Shannon-winner 多样性指数(H)为 4.24, 均匀度指数(E)为 0.97, 表明海胆相关可培养细菌具有较高的物种多样性和均匀度。除了 7 株(JSM 076053、076100、076063、075051、076082、076088)分别与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100% 外(表 1), 其它分离菌株与其相关的已知物种的典型菌株的的 16S rRNA 基因序列相似性在 95.9% ~ 99.8% 之间,

说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关菌株之间存在较大的遗传差异。

值得指出的是, 34 个菌株中有 5 株与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列存在较大差异(表 1 和图 1 中菌号加粗的菌株)。其中 JSM 076033、JSM 076056 和 JSM 078169 分别与 *Jeotgalicoccus halotolerans* JCM 11198^T、*Pontibacillus chungwhensis* BH 030062^T 和 *Halomonas variabilis* DSM 3051^T 系统发育关系最密切(图 1), 它们之间的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 95.9%、96.6% 和 97.0%。经多相分类(polyphasic taxonomy)

后确定它们分别代表了 *Jeotgalicoccus*、*Pontibacillus* 和 *Halomonas* 属的新种, 被分别命名为 *Jeotgalicoccus marinus*、*Pontibacillus halophilus* 和 *Halomonas zhanjiangensis*^[6-8]。菌株 JSM 076093 和 JSM 078063 与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性虽然高于 97% (分别为 97.4% 和 98.0%), 但是它们在形态特征和部分生理

生化特征上与各自相关的典型菌株却存在一定的差异, 可能分别代表 *Bacillus* 和 *Sporosarcina* 属的新种。要最终确定这两个菌株的分类地位, 还需要综合形态特征、生理生化特征、细胞化学特征、以及与典型菌株基因组间的 DNA-DNA 同源性分析等研究结果。这些多相分类工作正在进行中。

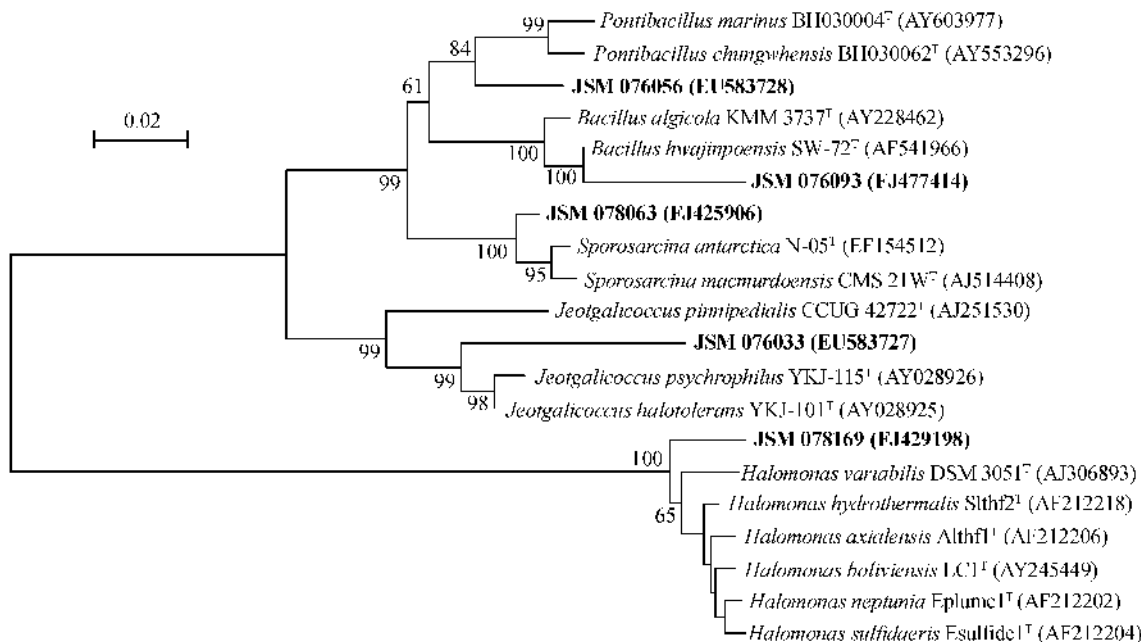


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的海胆相关可培养细菌中 5 个潜在新类群的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among five strains (potential new taxa) isolated from a sea urchin and their closely related taxa. Numbers at nodes indicate bootstrap values (> 50%) based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. Bar, 2 substitutions per 100 nucleotides.

3 讨论

本文采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对碓洲岛潮汐带海胆样品中可培养细菌的多样性进行了研究。用于系统发育分析的 34 株菌分别归属于 3 个大的系统发育群、10 个科、17 个属, 可以分为 21 个物种。大部分菌株与其系统发育关系最密切的已知物种典型菌株之间的 16S rRNA 基因序列都有一定差异。这些结果揭示了海胆相关可培养微生物较丰富的系统发育多样性、遗传多样性和物种多样性。其中有 3 株 (JSM 076033、JSM 076056、JSM 078169) 已经确定它们分别代表了 3 个已知属的 3 个新种^[6-8], 这与 Nedashkovskaya 等^[10-14] 从中间球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 中分离的新种完全属于不同的属, 说明海胆相关微生物中可能还存在很多未发现的新类群 (物种), 并可能存在一定的地理分布特征。

我们已经报道了对碓洲岛潮汐带海葵可培养细菌多样性的研究结果^[4]。通过比较分析发现, 海胆与海葵相关可培养细菌的三大系统发育类群一致, Firmicutes 门为两者最大的系统发育类群 (菌株比例分别为 50.8% 和 40.5%), 但海胆样品第二大系统发育类群为 Actinobacteria 门 (26.5%), 而海葵样品则为 Gamma-Proteobacteria 亚门 (33.3%); 从科的分布看, Enterobacteriaceae 和 Streptomycetaceae 科菌株只在海胆样品中出现, 而 Alteromonadaceae, Pseudonocardiaceae 和 Pseudoalteromonadaceae 科菌株只分离于海葵; 从属的分布分析, *Jeotgalibacillus*, *Jeotgalicoccus*, *Serratia*, *Sporosarcina* 和 *Streptomyces* 属菌株只从海胆样品中分离到, 而 *Alteromonas*, *Oceanobacillus*, *Piscibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudonocardia* 和 *Vibrio* 属则只从海葵中分离到。为何采自相同生境的海胆和海葵中的可培养细菌类群结存在较大差异, 其具体分布规律和机理还有待于

进一步探讨。

据文献报道, Alpha-Proterbacteria 亚门菌株是海水中的优势类群, 与海洋无脊椎动物中的优势微生物类群存在差异^[24]。碓洲岛潮汐带无脊椎动物相关微生物与其周围其他生境中的微生物的关系如何? 是否存在一定的分布规律? 可培养细菌菌株占样品中实际分布菌株的比例如何? 是否存在更高级的新的分类单元? 为了解决这些问题, 更全面的了解南海微生物, 除了进一步加强纯培养研究外, 应该应用 DGGE 分析、荧光原位杂交和样品宏基因组分析等免培养分析技术进行更深入研究。

参考文献

- [1] Bernan VS, Greenstein M, Maiese WM. Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advances in Applied Microbiology*, 1997, 43: 57 – 90.
- [2] 陈义光, 张晓蓉, 张丽, 等. 具抗菌活性海洋放线菌菌株 JMC 06001 的分离和鉴定. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35(1): 40 – 44.
- [3] 肖怀东, 张晓蓉, 刘祝祥, 等. 海洋放线菌 JMC 06001 发酵培养基优化及抑菌物质性质的初步研究. *中国海洋药物杂志 (Chinese Journal of Marine Drugs)*, 2007, 26(4): 32 – 36.
- [4] 肖怀东, 陈义光, 刘祝祥, 等. 湛江碓洲岛海葵相关可培养细菌系统发育多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(2): 246 – 250.
- [5] Chen YG, Zhang YQ, Huang K, et al. *Pigmentiphaga litoralis* sp. nov., a facultatively anaerobic bacterium isolated from a tidal flat sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 521 – 525.
- [6] Chen YG, Zhang YQ, Xiao HD, et al. *Pontibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea urchin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 1635 – 1639.
- [7] Chen YG, Zhang YQ, Shi JX, et al. *Jeotgalicoccus marinus* sp. nov., a marine bacterium isolated from sea urchin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 1625 – 1629.
- [8] Chen YG, Zhang YQ, Huang HY, et al. *Halomonas zhanjiangensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from sea urchin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009 (in press).
- [9] 王冬, 王政乾, 田红伟, 等. 海胆的研究进展及其应用现状. *中国海洋药物杂志 (Chinese Journal of Marine Drugs)*, 2006, 25(4): 52 – 54.
- [10] Nedashkovskaya OI, Kim SB, Lysenko AM, et al. *Salagentibacter mishustinae* sp. nov., isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 235 – 238.
- [11] Nedashkovskaya OI, Kim SB, Lysenko AM, et al. *Gramella echinicola* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 391 – 394.
- [12] Nedashkovskaya OI, Kim SB, Lysenko AM, et al. *Roseivirga echinicomitans* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, and emended description of the genus *Roseivirga*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1797 – 1800.
- [13] Nedashkovskaya OI, Kim SB, Vancanneyt M, et al. *Echinicola pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel flexibacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 953 – 958.
- [14] Nedashkovskaya OI, Kim SB, Kwak J, et al. *Mariniflexile gromovii* gen. nov., sp. nov., a gliding bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1635 – 1638.
- [15] 陈义光, 李文均, 崔晓龙, 等. 具抗肿瘤活性放线菌菌株 YIM 90022 的分离和系统发育分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(5): 696 – 701.
- [16] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16: 313 – 340.
- [17] Cui XL, Mao P, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 357 – 363.
- [18] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4): 4876 – 4882.
- [19] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111 – 120.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406 – 425.

- [21] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39: 783 – 791.
- [22] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44: 846 – 849.
- [23] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨. 南京林业大学学报(自然科学版)[*Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*], 2003, 27(5): 30 – 34.
- [24] Lee JH, Shin HH, Lee DS, et al. Bacterial diversity of culturable isolates from seawater and marine coral, *Plexauridae* sp., near Mun-Sum, Cheju-Island. *Journal of Microbiology*, 1999, 37(4): 193 – 199.

Diversity of culturable bacteria associated with the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* from Naozhou Island

Ke Huang¹, Li Zhang¹, Zhuxiang Liu¹, Qihui Chen¹, Qingzhong Peng¹, Wenjun Li², Xiaolong Cui², Yiguang Chen^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization of Hunan Province, College of Biological Resource and Environment Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

(²Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: [Objective] To investigate the diversity of culturable bacteria isolated from the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* collected from a tidal flat of Naozhou Island (20°52'N ~ 20°56'N 110°33'E ~ 110°38'E), Leizhou Bay, South China Sea, China. [Methods] Bacteria were isolated from the sample by using conventional culture-dependent method and then investigated by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. [Results] We isolated 106 bacterial strains from the sample on media (Difco marine 2216, International *Streptomyces* Project medium 2, nutrient, sea water and humic acid agars) supplemented with 0 ~ 2 mol/L NaCl. On the basis of morphological, physiological and biochemical characteristics, we selected 34 strains to perform a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Our results showed that 34 isolates represented 21 species, belonging to 17 genera (*Alteromonas*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Nocardiosis*, *Oceanobacillus*, *Piscibacillus*, *Planococcus*, *Pontibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudonocardia*, *Salinicoccus*, *Salinivibrio*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Virgibacillus*) of 10 families (Alteromonadaceae, Bacillaceae, Brevibacteriaceae, Dermabacteraceae, Halomonadaceae, Planococcaceae, Pseudoalteromonadaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiosaceae, Staphylococcaceae, Vibrionaceae) in three phylogenetic groups (Actinobacteria, Firmicutes, Gamma-Proteobacteria). The most abundant and diverse isolates were within the phylum Firmicutes (58.8%) and the subphylum Gamma-Proteobacteria (26.5%). The phylogenetic distance matrix results suggested that there were obvious genetic divergences between most isolates and their closely related type strains (16S rRNA gene sequence similarities ranged from 99.6 to 99.9%), and that, out of 34 isolates, at least 5 strains (JSM 076033, JSM 076056, JSM 076093, JSM 078063, JSM 078169) could represent 5 potential new species within 5 characterized genera (*Jeotgalicoccus*, *Pontibacillus*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Sporosarcina*), in which the descriptions of 3 novel species [*Jeotgalicoccus marinus* (type strain, JSM 076033), *Pontibacillus halophilus* (JSM 076056), *Halomonas zhanjiangensis* (JSM 078169)] have been published in IJSEM (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*). [Conclusion] The results presented above showed that there are abundant bacterial diversity in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* collected from Naozhou Island.

Keywords: *Hemicentrotus pulcherrimus*; cultivable bacteria; 16S rRNA gene; phylogenetic analysis; bacterial diversity

(本文责编 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970007), the Key Projects of International Cooperation (2007DFB31620), Construct Program of the Key Discipline in Hunan Province (JSS2009Z01) and Jishou University (jsdxkyz200811, 08JDY017)

* Corresponding author. Tel: +86-743-8564416; Fax: +86-743-8565323; E-mail: mchenjsu@yahoo.com.cn

Received: 4 May 2009/Revised: 9 August 2009