

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(2):262-269; 4 February 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

大连渤海老虎滩海域沉积物可培养放线菌的多样性

林灵^{1,2#}, 谭亿^{1,3#}, 陈菲菲^{1,3}, 周红霞¹, 王以光¹, 赫卫清^{1*}, 王勇^{3,4*}

¹中国医学科学院北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

²东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

³中国医药集团四川抗菌素工业研究所生物部, 成都 610052

⁴中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室, 上海 200032

摘要:【目的】研究大连渤海老虎滩海域可培养放线菌的多样性。【方法】利用5种不同的培养基分离、培养海洋沉积物中的放线菌,并用16S rRNA基因序列对部分放线菌株进行系统发育分析。【结果】根据菌落表型共分离到1215株放线菌。选择271株具有代表性的菌株进行16S rRNA分析,结果表明,251株(92.26%)属于放线菌门,覆盖11个科,15个属;其余20株属于厚壁门和变形菌门;有7株为潜在的新种。【结论】大连渤海老虎滩海域的沉积物中存在较为丰富的放线菌和新种资源,这些菌株为将来开发新的微生物代谢产物奠定了基础。

关键词: 大连渤海,可培养放线菌,系统发育,多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0262-08

海洋独特的环境特点如低温、低营养、高压、高盐度等造就海洋微生物自有的代谢方式和代谢产物。早在1946年,Zobell就从海水、海藻以及海泥中分离得到了多种放线菌^[1]。近年来,随着分子生物学技术的发展,越来越多的海洋放线菌被发现,许多源于海洋放线菌的次级代谢产物也被鉴定出具有抗肿瘤^[2],抗菌^[3],抗疟^[4],杀虫功能^[5]以及酶抑制剂^[6]等生物活性功能。2002年,Mincer TJ等人首次发现了海洋特有的放线菌属“*Salinispora*”^[7],自此改变了人们原来对海洋放线菌的误解,认为其只是陆生放线菌的孢子流入海洋所产生。接着新型海洋放线菌属“*Demequina*”^[8],”*Marinispora*”^[9],”*Solwaraspora*”^[10]也相继被发现。海洋放线菌的多

样性是代谢产物多样性的基础。Oh DC等从*Salinispora pacifica*中分离得到cyanosporasides A和B, chloro-和cyano-cyclopenta [a] indene glycosides^[11];Buchanan GO等从*Salinispora tropica*中分离得到sporolides A和B^[12]。另外,*Salinispora*菌株还可以产生arenimycin^[13],salinisporamycin^[14],salinosporamide A-C^[15]等生物活性物质。海洋环境将成为开发新型放线菌以及新药筛选的重要资源。

本研究通过纯培养和基于16S rRNA基因序列的系统发育分析对大连渤海老虎滩海域采集的海洋沉积物进行放线菌的多样性研究,旨在获得更多的海洋可培养放线菌资源,为今后开发新的生物活性物质奠定基础。

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(IMBF20060202)

* 通信作者。Tel: +86-10-83157099; E-mail: heweiqing1977@yahoo.com.cn, wy021@yahoo.com.cn

作者简介: #并列第一作者。林灵(1985-),重庆人,博士研究生,主要从事微生物药学及生化学研究。谭亿(1985-),四川人,硕士研究生,主要从事微生物药学及生化学研究。

收稿日期: 2010-07-17; **修回日期:** 2010-11-15

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂: PCR 仪 (BIO-RAD 公司), LA-Taq 酶购自 TaKaRa 公司; chitin (Sigma); polyvinylpyrrolidone (Andybio); 放线菌酮 (Andybio), 萘啶酮酸 (Amersco); 其他生化试剂均为国产分析纯。

1.1.2 培养基: 设计的 5 种培养基组成见表 1。

表 1 海洋微生物的分离培养基及其组分

Table 1 Composition of five different media used for the isolation of marine microbes

Medium	Formula
1	10 g glucose, 10 g yeast extract, 20 g agar in 1 L of distilled water
2	1.5 g chitin, 2.0 g K ₂ HPO ₄ , 0.5 g KCl, 1.0 g KH ₂ PO ₄ , 0.1 g CaCl ₂ , 0.7 g MgSO ₄ , 0.5 g yeast powder, 0.5 g NaCl, 20 g agar in 1 L of distilled water
3	0.3 g L-arginine, 1.0 g glucose, 1.0 g glycerol, 0.3 g K ₂ PO ₄ , 0.2 g MgSO ₄ , 0.3 g NaCl, 20 g agar in 1 L of distilled water
4	0.8 g CaSO ₄ , 0.33 g Ca (NO ₃) ₂ , 0.7 g MgSO ₄ , 0.025 g K ₂ SO ₄ , 0.005 g KH ₂ PO ₄ , 0.2 g NaHCO ₃ , 0.001 g FeCl ₃ , 0.01 g glucose, 0.005 g yeast extract, 20 g agar in 1 L of distilled water
5	1 g casein, 1 g soluble starch, 0.2 g K ₂ HPO ₄ , 0.2 g MgSO ₄ , 20 g agar in 1 L of distilled water

All media were adjusted to a final pH 7.0.

1.2 样品采集

1.2.1 样品来源: 海洋沉积物样品 (附着有海生植物的海沙泥) 于 2008 年采自我国渤海海域大连老虎滩海区 (经度 121 度、纬度 38 度) 深度 30 - 100 m 处, 共 5 份。采样后样品立即置于无菌封口袋密封并保存于室温环境, 带回实验室后于 4℃ 冰箱保存。

1.2.2 样品处理: 5 份海洋沉积物样品混合后于室温下风干 3 周后, 取 0.5 g 样品置于 4 mL 无菌水中, 震荡后用无菌棉花过滤, 滤液于 55℃ 下加热 6 min, 于 28℃ 振荡培养 1 h 后, 再以 1000 r/min 离心 10 min, 取上清。

1.3 菌株分离

海洋沉积物样品混合处理后上清液分别涂布于表 1 所列的 5 种培养基上。为抑制真菌及细菌生长, 在 1 号分离培养基中加入放线菌酮 100 mg/L, 利福霉素 5 mg/L; 1 号培养基分离菌的操作: 将 0.45 μm 膜加在培养基上, 200 μL 土壤上清液涂布

于膜上, 28℃ 生长 3 - 5 d, 揭去膜, 再生长 7 - 10 d。在 2 - 5 号培养基中加入放线菌酮 100 mg/L, 萘啶酮酸 50 mg/L。取 200 μL 上清液涂布平板, 于 28℃ 培养, 7 d 左右挑取单菌落用相应的培养基进行划线后, 于 28℃ 培养 7 d, 重复这一过程 3 - 5 次, 对菌株进行纯化。所得纯培养物于 20% 甘油水溶液保存, -70℃ 放置备用。

1.4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析

1.4.1 菌株总 DNA 的提取: 菌株总 DNA 的提取采用微波法^[16]。

1.4.2 16S rRNA PCR 扩增: PCR 扩增模板为上述提取的总 DNA, 引物为细菌通用的 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。反应程序为: 96℃ 预变性 1 min; 每个循环中在 96℃ 下变性 30 s, 50℃ 下退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 25 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.4.3 测序与系统发育分析: PCR 产物于中美泰和生物技术有限公司测序。利用 RDP 在线程序 Check-Chimera 对测序所获得的 16S rRNA 序列片段进行嵌合体检验, 对无嵌合体序列提交 GenBank 注册, 获取序列号。将 16S rRNA 序列用 NCBI 数据库的 Blast-n 程序与数据库中进行相似性比对搜索, 选择参比序列, 用 Clustal X (Version 1.8) 进行序列多重比对, 再应用 MEGA 3.1 程序以邻近法 (Neighbor-joining) 方法构建系统发育树。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。定义菌的 16S rRNA 序列相似性低于 98% 作为不同的分类操作单元 (OTU, Operational taxonomic unit), 序列的相似性大于或等于 98%, 则归于同一个 OTU 标准计算^[17]。

1.5 物种多样性指数分析

多样性指数分析采用 SPADE 软件 (Species prediction and diversity estimation [http://chao.stat.nthu.edu.tw]), 稀有度曲线分析采用 Analytic Rarefaction version 1.3 软件 (www.uga.edu/strata/software/Software.html)。

2 结果

2.1 菌株的分离

使用表 1 中设计的 5 种分离培养基, 根据放线菌的菌落特征分离表型为放线菌的菌株, 共分离 1215 株, 其中 3 号和 5 号培养基分离得到的菌株数

最多,分别为 424 株和 368 株;2 号培养基共分离 263 株;而 1 号和 4 号培养基出菌率较少,分别为 57 株和 104 株。根据菌落外观、形态、气生菌丝、孢子丝和基内菌丝颜色和分泌色素等表观的培养特征初步排除重复去冗余,从各种培养基选择代表性菌株共 271 株进行 16S rDNA 分析,其中 3 号和 5 号培养基分别为 88 株和 145 株;2 号培养基 8 株;1 号和 4 号培养基分别选择 18 株和 12 株。

2.2 类群多样性

271 株菌进行 16S rRNA 测序分析,结果表明 3 号和 5 号培养基分离菌株的多样性最为丰富,分别含有放线菌门的 11 个属和 9 个属的菌株;2 号培养基分离菌株,覆盖放线菌门的 3 个属;1 号和 4 号分离的菌属比较单一,只分离到 *Streptomyces* 和 *Micromonospora* 2 个属的放线菌,不同培养基分离菌属多样性示意图见图 1。

以序列相似性大于或等于 98% 划分为一个 OTU 的标准进行分析,共生成了 55 个 OTUs,主要包括 3 大菌群 (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria)。其中 40 OTUs 属于放线菌门,覆盖 11 个科 (Actinosynnemataceae, Dietziaceae, Glycomycetaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae, Streptosporangiaceae, Thermomonosporaceae), 15 个属 (*Saccharothrix*, *Dietzia*, *Glycomyces*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Verrucosispora*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Prauseria*, *Streptomyces*, *Nonomuraea*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*), 其余

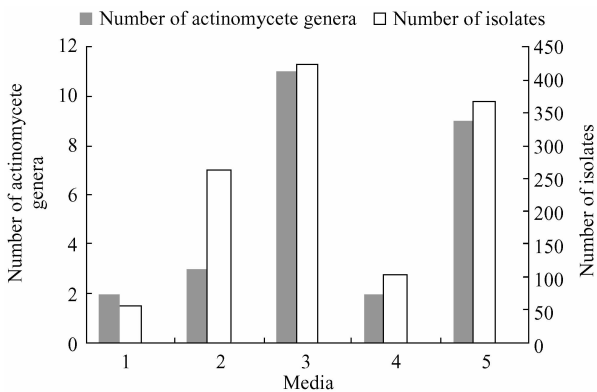


图 1 不同培养基分离得到的放线菌的菌属数

Fig. 1 The number of Actinomycete genera isolated from the five different media.

15 OTUs 属于厚壁门和变形菌门,包括 10 个科和 12 个属,详细见表 2。55 OTUs 中 13 OTUs (23.6%) 与其相关的已知典型菌株的 16S rRNA 序列相似性为 100%,其它 42 OTUs (76.4%) 与其相关的已知典型菌株的序列相似性在 85% - 99% 之间,说明大部分菌株与其系统发育关系最为密切的相关菌株之间存在较大的遗传差异。尤其值得注意的是,菌株 3-166, 3-117, 3-435, 5-186-2 与已知典型菌株的相似性小于 98%,分别为 97.0%, 96.3%, 97.4%, 86.2%。预示着它们很有可能为 *Streptomyces*, *Cohnella*, *Shimazuella*, *Rickettsiella* 属的新种。

Kasai 等研究发现小单孢菌属的种之间的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.3%, 2 个种之间的 DNA-DNA 同源性依然小于 70% [18]。意味着在小单孢菌属中,种间 16S rRNA 基因序列相似性不高于 99.3% 的很可能为新种。我们共分离得到 53 株小单孢菌属的细菌,按照 16S rRNA 序列相似性大于或等于 98% 划分为一个 OTU 的标准进行分析,可生成了 6 个 OTUs;按照 16S rRNA 序列相似性大于或等于 99% 划分为一个 OTU 的标准进行分析,则可生成 12 个 OTUs。将这 12 个代表菌株的 16S rRNA 在 NCBI 数据库中用 Blastn 进行比对分析,发现 5-9 (HM755719), 5-171 (HM755720), 3-134 (HM467155) 分别与 *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora aurantiaca*, *Micromonospora echinospora* 同源性为 98.9%, 98.9%, 98.4%, 均小于 99.3%,其中 5-9 与 5-171 相互之间的同源性只有 97.0%,据此初步推断这 3 株可能为小单孢属的新菌种。

55 个 OTUs 与 GenBank 数据库中已知序列菌株的系统发育关系如图 2 所示。

2.3 多样性指数分析

通过统计学方法,用 Analytic Rarefaction 1.3 对海洋放线菌 (40 OTUs) 绘制 Rarefaction curve (图 3)。从 Rarefaction curve 图看来,稀释曲线还没有达到平台期,但该曲线已有向平稳发展的趋势。使用 SPADE 软件分析多样性指数,结果如表 3。在可信区间为 95% 的情况下,样品覆盖率 (C) 为 91.2%,样品的物种丰度 (Species richness) 为 92.9, Shannon index 为 2.921, Simpson index 为 0.1051。

表 2 55 OTUs 所代表的菌株

Table 2 List of isolates representing the 55 OTUs

Phylogenetic group		Representative isolate	No. Of strains	Nearest type strain (accession no.)	Sequence identity/%
Phylum	family	(accession no.)	in OTU		
Actinobacteria	Actinosynnemataceae	5-133 (HM467170)	1	<i>Saccharothrix texasensis</i> (AF350247)	99
	Dietziaceae	3-149 (HM467171)	1	<i>Dietzia kunjamensis</i> (FJ468332)	100
	Glycomycetaceae	3-338 (HM467177)	1	<i>Glycomyces mongolensis</i> (EU741118)	99
	Micrococccaceae	5-229-E1 (HM467182)	1	<i>Arthrobacter ramosus</i> (NR_026193)	99
		3-166-2 (HM755721)	1	<i>Micrococcus luteus</i> (FJ816022)	100
	Micromonosporaceae	2-82 (HM467154)	30	<i>Micromonospora aurantiaca</i> (FJ547135)	99
		3-134 (HM467155)	11	<i>Micromonospora echinospora</i> (EU379278)	98
		3-133 (HM467156)	1	<i>Verrucosipora gifhornensis</i> (AB546292)	99
		1-40 (HM467157)	6	<i>Micromonospora chaiyaphunensis</i> (FJ486503)	99
		5-300-2 (HM467158)	4	<i>Micromonospora chokoriensis</i> (AB241454)	99
		5-297 (HM467159)	1	<i>Micromonospora carbonacea</i> (EU274365)	99
		5-11-3 (HM755722)	1	<i>Mycobacterium austroafricanum</i> (NR_026284)	100
	Nocardiaceae	3-162 (HM467160)	9	<i>Nocardia sienata</i> (GQ853066)	99
		3-376-1 (HM467161)	1	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> (AB546298)	100
		5-44-2 (HM467179)	1	<i>Rhodococcus globerulus</i> (GU332596)	100
	Pseudonocardiaceae	3-425 (HM467184)	7	<i>Prauseria hordei</i> (Y07680)	100
	Streptomycetaceae	3-344 (HM467144)	12	<i>Streptomyces aureofaciens</i> (AB326923)	100
		1-2 (HM467140)	1	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> (FJ217193)	99
		5-320 (HM467136)	49	<i>Streptomyces griseorubens</i> (EU841556)	99
		5-14 (HM467133)	1	<i>Streptomyces flavoviridis</i> (GQ985452)	98
		5-191 (HM467134)	1	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> (EU593727)	98
		5-18 (HM467135)	3	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> (EU593645)	99
		5-17 (HM467137)	47	<i>Streptomyces sampsonii</i> (GU238264)	99
		3-202 (HM467146)	1	<i>Streptomyces rubrolavendulae</i> (GU227348)	99
		3-376-2 (HM467151)	1	<i>Streptomyces panayensis</i> (FJ883752)	99
		5-275 (HM467141)	3	<i>Streptomyces scabiei</i> (HM018077)	100
		5-194 (HM467152)	1	<i>Streptomyces hawaiiensis</i> (EU624140)	99
		5-157 (HM467147)	1	<i>Streptomyces prasinus</i> (DQ026658)	99
		3-229 (HM467138)	1	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> (EU741199)	98
		5-216 (HM467149)	2	<i>Streptomyces glauciniger</i> (AY314782)	99
		5-340 (HM467143)	3	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> (FJ481069)	98
		5-68 (HM467144)	5	<i>Streptomyces radiopugnans</i> (FJ486333)	98
3-145 (HM467150)		16	<i>Streptomyces chunguhensis</i> (AY382292)	99	
3-419 (HM467148)		18	<i>Streptomyces anulatus</i> (EU647478)	99	
5-76 (HM467142)		1	<i>Streptomyces lateritius</i> (AB184145)	99	
3-127 (HM467153)		1	<i>Streptomyces geldanamycininus</i> (DQ334781)	100	
3-166 (HM467139)	1	<i>Streptomyces specialis</i> (AM934703)	97		
Streptosporangiaceae	3-193 (HM467172)	2	<i>Nonomurea ferruginea</i> (NR_025996)	98	
	5-322 (HM467185)	1	<i>Streptosporangium koreanum</i> (FJ486407)	100	
Thermomonosporaceae	3-196 (HM467173)	2	<i>Actinomadura viridis</i> (AJ420141)	99	
Firmicutes	Bacillaceae	5-314 (HM467163)	2	<i>Bacillus aquimaris</i> (EU231635)	100
		5-54 (HM467166)	2	<i>Bacillus circulans</i> (FN393823)	99
	5-187 (HM467183)	1	<i>Bacillus marisflavi</i> (FJ554665)	100	
	3-56-2 (HM467178)	1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (GQ202135)	99	
	Paenibacillaceae	3-117 (HM467176)	1	<i>Cohnella phaseoli</i> (EU014872)	96
Thermoactinomycetaceae	3-435 (HM467167)	3	<i>Shimazuella kribbensis</i> (AB049939)	97	
Proteobacteria	Brucellaceae	5-52 (HM467165)	1	<i>Mycoplana ramosa</i> (EU022308)	98
		5-231 (HM467175)	2	<i>Mycoplana sp.</i> (GQ199732)	98
	Coxiellaceae	5-186-2 (HM467180)	1	<i>Rickettsiella popilliae</i> (EU180598)	86
	Hyphomicrobiaceae	4-54 (HM467169)	1	<i>Filomicrobium insigne</i> (EF117253)	99
	Phyllobacteriaceae	5-215-E1 (M467181)	1	<i>Phyllobacterium brassicacearum</i> (AY785319)	99
	Pseudomonadaceae	5-302 (HM467162)	1	<i>Pseudomonas borbori</i> (AM114531)	99
	Rhizobiaceae	4-48 (HM467168)	1	<i>Ensifer adhaerens</i> (GQ383904)	100
		5-177 (HM467174)	1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (FJ715815)	99
	Rhodospirillaceae	5-305 (HM467164)	1	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (AB510913)	99

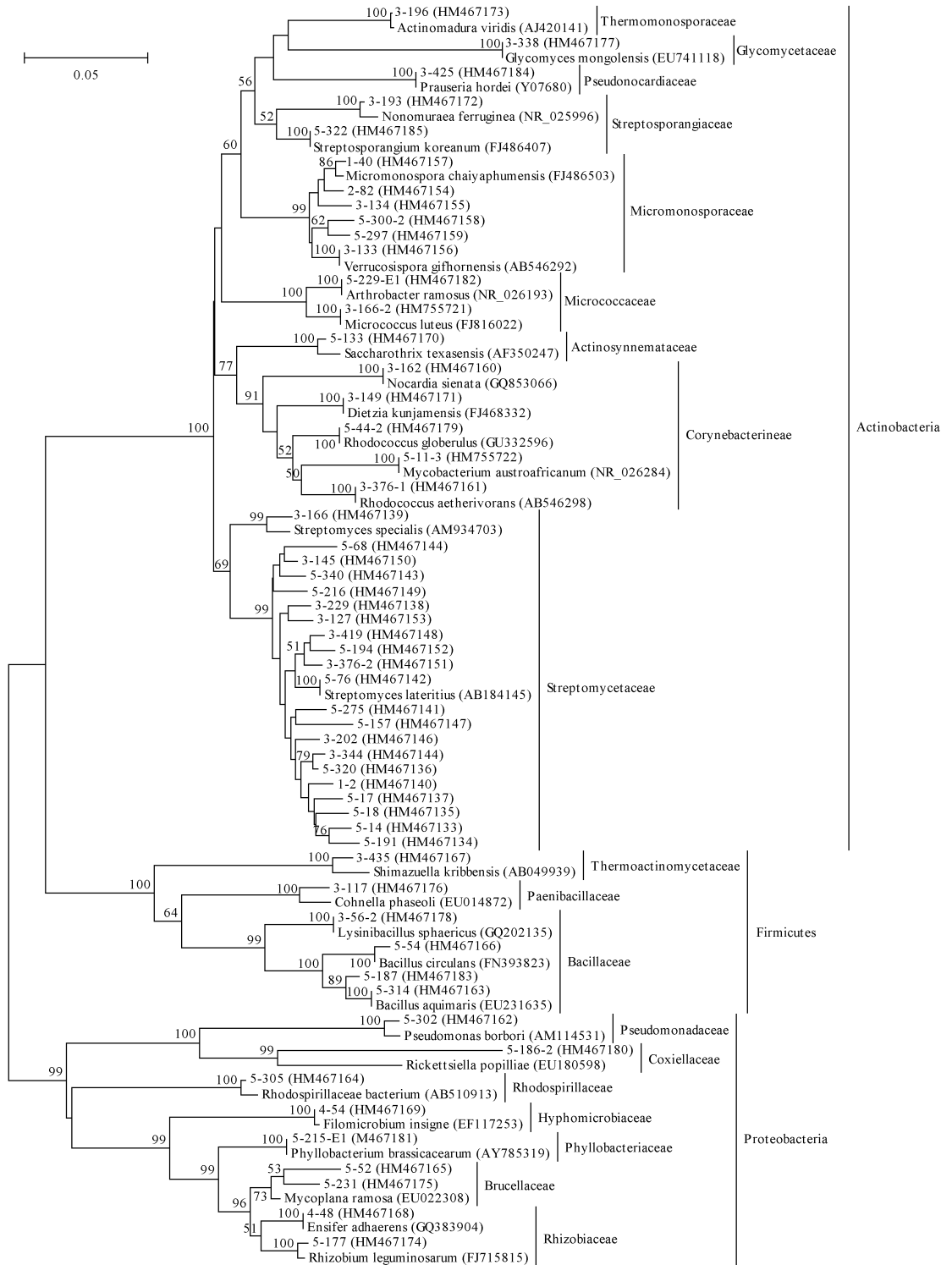


图 2 55 OTUs 代表菌株的 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of partial 16S rRNA gene sequences of typical strains from every 55 OTUs. Bootstrap values (50 are shown (for 1000 iterations). The scale bar represents 5% nucleotide sequence difference.

表3 多样性指数分析
Table 3 Diversity Index

Sample	No. of OTUs	C	Species Richness		Shannon Index		SIMPSON Index	
			ACE	95% CIs	Chao&Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Marine sediment	40	0.912	92.9	(60.6, 175.7)	2.921	(2.601, 3.242)	0.1051	(0.0625, 0.1478)

C: Estimated Sample Coverage; ACE: Abundance-based Coverage Estimator; CIs: Confidence Interval; Chao&Shen: based on Horvitz-Thompson Estimator and Sample Coverage method; MLE: Maximum Likelihood Estimator.

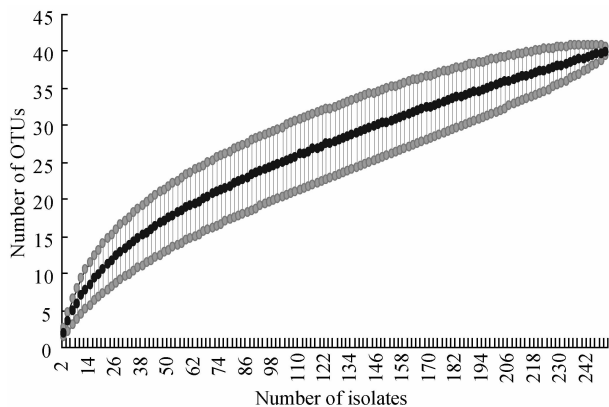


图3 渤海海洋可培养放线菌稀有度曲线

Fig. 3 Rarefaction curve for OTUs of culturable Actinomycetes isolated from Bohai.

3 讨论

海洋具有丰富的物种资源,极具开发潜力。Gray JS 的研究表明海洋沉积物的物种丰富度远大于海岸沉积物^[19],几乎可以与热带雨林相媲美^[20]。2009年,Maldonado LA^[21]等人利用已知的17种培养基对墨西哥海湾沉积物的放线菌进行分离培养,得到了12个不同属的海洋放线菌,进一步证实了海洋放线菌的多样性。

对海洋可培养放线菌资源多样性的研究关键在于样品的处理以及培养基的选择。2005年,Maldonado LA^[22]将分散差速离心(Dispersion and Differential Centrifugation, DDC)方法用于海洋沉积物的处理,分离得到的放线菌数量约为常规振荡处理的5倍。同年,Janssen PR^[23]等使用了8种方法处理海洋沉积物样品,69%的新型放线菌是将样品过夜干燥压碎后,用无菌的泡沫块直接在琼脂平板上涂压获得,25%的新型放线菌是将干燥的样品稀释后进行热处理获得。分离培养基的设计也是获得多样性菌种资源的关键。Gontang EA^[24]等通过设计了11种培养基对Palau的海洋沉积物细菌进行分离,共获得了18个不同科目的放线菌以及4个不

同科目的芽孢杆菌,极具生物多样性。其中70%的菌群集中在A4-A6三种培养基。

我们采用了将样品风干后进行稀释、过滤、热处理的方法进行样品处理,共设计了5种具有代表性的培养基。其中3号和5号培养基分离的菌株数量最多,且放线菌的种属也最为丰富。3号培养基以精氨酸,葡萄糖,甘油为能量来源;5号培养基以可溶性淀粉为碳源,酪蛋白为氮源,这两种培养基比较适合于放线菌的培养,故获得多样性较为丰富的海洋放线菌。1号为较易利用的氮/碳源且其含量较高的培养基,比较适合于一般细菌的生长,本研究采用加0.45 μm 过滤膜方式,在培养初期将易于生长的细菌或菌丝体除去,以便富集孢子类菌如小单孢菌属的分离,结果小单孢菌的检出率占其总菌落数的12.3%,而2,3,4,5号培养基小单孢菌的检出率分别为0.4%,5.0%,1.0%,6.3%,证明1号培养基采用过滤膜是一种有效的选择性分离小单孢菌的方式。2号培养基以几丁质做为唯一碳源。几丁质是比较难以利用的碳源,本研究只筛选到少数可以利用几丁质生长的链霉菌属、小单孢菌属和诺卡式菌属,且出现菌株重复率较高。4号培养基为寡营养培养基,分离得到的海洋细菌较少,菌种比较单一。

本实验设计主要倾向于分离应用价值比较高的放线菌类,同时为了增加检测到放线菌类新种的可能性,我们采用细菌通用引物检测16S rRNA序列,结果显示92.6%的分离菌株为期望的放线菌,且分属于11个不同的科,15个不同的放线菌属,显示了我国大连渤海老虎滩海域放线菌资源的生物多样性。271株代表菌株中有10株属于厚壁门,10株属于变形菌门,共覆盖10个科,11个属。绝大部分菌株的16S rRNA序列与已知典型菌株具有一定的差异,尤其是菌株3-166,3-117,3-435,5-186-2分别与*Streptomyces specialis*, *Cohnella phaseoli*, *Shimazuella kribbensis*, *Rickettsiella popilliae* 菌株的同源性小于

98% ,分别为 97.0% ,96.3% ,97.4% ,86.2% ;5-9, 5-171, 3-134 分别与 *Micromonospora aurantiaca* ,*Micromonospora aurantiaca* ,*Micromonospora echinospora* 同源率为 98.9% ,98.9% ,98.4% ,小于 99.3% ,预示着这 7 株菌可能为潜在的新菌种。

海洋环境占据地球总面积的 70.8% ,蕴含着丰富的微生物资源,但就目前来说,海洋分离到的放线菌的属数也就占放线菌总属数的 10% ,也就意味着还有许多待开发的海洋放线菌。本文的结果揭示了我国大连渤海老虎滩海域微生物多样性,为今后开发新型天然产物及工业用酶创造了条件。

参考文献

- [1] Zobell CE. Marine microbiology: A monograph on hydrobacteriology. *Chronica Botanica Co.* ,1946 ,240.
- [2] Bultel-Poncé VV, Debitus C, Berge JP, Cerceau C, Guyot M. Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Biotechnology* , 1998, 6(4) :233-236.
- [3] Charan RD, Schlingmann G, Janso J, Bernan V, Feng X, Carter GT. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora sp.*. *Journal of Natural Products*. 2004, 67(8) :1431-3.
- [4] Maskey RP, Helmke E, Kayser O, Fiebig HH, Maier A, Busche A, Laatsch H. Anti-cancer and Antibacterial Trioxacarcins with High Anti-malaria Activity from a Marine Streptomycete and their Absolute Stereochemistry. *The Journal of Antibiotics* , 2004, 57 (12) ,771-779.
- [5] Xiong L, Li J, Kong F. *Streptomyces sp.* 173, an insecticidal micro-organism from marine. *Letters in Applied Microbiology* ,2004, 38(1) :32-37.
- [6] Imada C. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* ,2005, 87(1) :59-63.
- [7] 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, Oct, 68 (10) : 5005-11.
- [8] Yi H, Schumann P, Chun J. *Demequina aestuarii* gen. nov. , sp. nov. , a novel actinomycete of the suborder Micrococccineae, and reclassification of *Cellulomonas fermentans* Bagnara et al. 1985 as *Actinotalea fermentans* gen. nov. , comb. nov. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2007, 57:151-156.
- [9] Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "marinispora". *Journal of the American Chemical Society* ,2006, 128(5) :1622-1632.
- [10] 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.
- [11] Oh DC, Williams PG, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Cyanosporasides A and B, chloro- and cyanocyclopenta [a] indene glycosides from the marine actinomycete " *Salinispora pacifica* ". *Organic Letters* , 2006, 8(6) :1021-1024.
- [12] Buchanan GO, Williams PG, Feling RH, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Sporolides A and B; structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Organic Letters* ,2005, 7 (13) :2731-2734.
- [13] 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.
- [14] Matsuda S, Adachi K, Matsuo Y, Nukina M, Shizuri Y. Salinisporamycin, a novel metabolite from *Salinispora arenicola*. *The Journal of Antibiotics* ,2009, 62(9) :519-526.
- [15] Williams PG, Buchanan GO, Feling RH, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. New cytotoxic salinosporamides from the marine Actinomycete *Salinispora tropica*. *The Journal of Organic Chemistry* ,2005, 70(16) :6196-6203.
- [16] 徐平,李文均,徐丽华,姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报 (*Microbiology, China*) , 2003, 30(4) :82-84.
- [17] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* ,2003, 69:6189-6200.
- [18] Kasai H, Tamura T, Harayama S. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from gyrB-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2000, 50(1) :127-134.

- [19] Gray John S. Species richness of marine soft sediments. *Marine ecology Progress series*, (2002) 244:285-297.
- [20] Poore GCB, Wdson CDF. Marine species richness. *Nature*. 1993, 361:597-598.
- [21] Maldonado LA, Fragozo-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana ET. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009, 95:111-120.
- [22] Maldonado LA, Stach JE, Pathom-aree W, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005, 87(1):11-18.
- [23] Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*. 2005, 7(7):1039-1048.
- [24] Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10):3272-3282.

Diversity of culturable actinomycetes in Sea deposit of Tiger beach at Bohai bay, Dalian, China

Ling Lin^{1,2#}, Yi Tan^{1,3#}, Feifei Chen^{1,3}, Hongxia Zhou¹, Yiguang Wang¹,
Weiqing He^{1*}, Yong Wang^{3,4*}

¹Key Lab of Antibiotics Biotechnology, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China

²Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin 150030, China

³Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Department of Biology, Chengdu 610052, China

⁴Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: [**Objective**] To study the diversity of culturable actinomycetes isolated from the sea deposit of Tiger beach at Bohai bay, Dalian, China. [**Methods**] By using five different media strains we isolated actinomycetes strains from the sea deposit of Tiger beach at Bohai bay, Dalian, China. Partial 16S rRNA sequences were carried out to characterize the diversity of culturable actinomycetes. [**Results**] A total of 1215 colonies with phenotypical actinomycetes were isolated, of which 271 were classified by 16S rRNA phylogenetic analysis. The data showed that 251 strains were homologous with Actinobacteria (92.26%) including 15 genera of 11 families, and the remaining 20 strains were possible members of the phylum Firmicutes and Proteobacteria. There were 7 strains (3-166, 3-117, 3-435, 5-186-2, 5-9, 5-171, 3-134) to be preliminarily identified as unreported species. [**Conclusion**] A high diversity of culturable actinomycetes both in terms of the number of species and phylogenetic composition was presented from the sea deposit of Tiger beach in Bohai bay.

Keywords: Bohai, culturable actinomycetes, phylogeny, diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (IMBF20060202)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-83157099; E-mail: heweiqing1977@yahoo.com.cn, wy021@yahoo.com.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 17 June 2010 / Revised: 15 November 2010