

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5): 582–588; 4 May 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.013

硃洲岛褐蓝子鱼肠道抗菌活性菌株的分离及多样性

刘颖¹, 时威², 安俊莹¹, 赵鸭美³, 叶日英¹, 徐春厚^{4*}

¹广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088

²广东环凯微生物科技技术有限公司, 广东 广州 510663

³浙江湖州环境科技创新中心, 浙江 湖州 313028

⁴广东海洋大学农学院, 广东 湛江 524088

摘要 【目的】了解广东湛江硃洲岛褐蓝子鱼 (*Siganus fuscescen*) 肠道抗菌物质产生菌的多样性。【方法】采用传统的分离方法与牛津杯扩散法对褐蓝子鱼肠道菌进行分离纯化与抗菌活性测定, 运用 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对抗菌活性菌株进行多样性分析。【结果】根据形态观察和部分生理生化实验去冗余, 从褐蓝子鱼肠道样品中分离到 68 株细菌, 其中抗菌活性菌株 19 株, 占分离株的 27.9%。19 株不同种类的活性菌株分属于细菌域的放线杆菌门 (Actinobacteria)、变形杆菌门 (Proteobacteria) 与厚壁菌门 (Firmicutes) 的 11 个科、12 个属。多数菌株属于厚壁菌门 (8 株, 42.1%), 其次是变形杆菌门 (7 株, 36.8%) 和放线杆菌门 (4 株, 21.1%)。大多数抗菌活性菌株与其系统发育关系最密切的已知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 96.2%–99.9%), 其中有 4 株代表潜在的新种。【结论】广东湛江硃洲岛褐蓝子鱼肠道中存在较为丰富的细菌抗菌物质产生菌, 并蕴藏着较多的微生物新类群。

关键词: 褐蓝子鱼, 抗菌活性, 16S rRNA 基因, 多样性

中图分类号: Q938 文章编号: 0001-6209(2014)05-0582-07

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, 据统计微生物种类可能达到 500–1000 万种, 占据了海洋生命总数的 98% 之多。海洋环境中的微生物不仅在种类上丰富, 而且在基因组和功能上同样具有多样性^[1–2]。近年来, 已不断地从海洋微生物中发现了具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等药理活性物质, 使其成为药物开发利用研究的热点^[3–4]。硃洲岛 (20° 52′ N–20° 56′ N, 10° 33′ E–110° 38′ E) 处于南海北部雷州湾, 临近广东省湛江市, 具有南海岛屿的典型生态特点。2007 年至 2009

年期间, 李文均研究团队先后对该岛多种生境 (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^[5–6]。褐蓝子鱼 (*Siganus fuscescens*) 为蓝子鱼科蓝子鱼属的鱼类, 分布于日本、菲律宾、印度尼西亚、琉球群岛、澳大利亚、台湾岛以及中国南海、黄渤海等海域。本研究对从广东湛江硃洲岛采集的褐蓝子鱼的肠道进行微生物分离与抗菌活性评价, 并采用基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对抗菌活性菌的系统发育多

基金项目: 广东省科学技术厅项目 (2010B020313002, S2011010000328, 粤科规划字 [2009]198 号)

* 通信作者。Tel: +86-759-2383292; Fax: +86-759-2383249; E-mail: xuchunhou@sina.com

作者简介: 刘颖 (1966–), 女, 黑龙江人, 博士, 研究方向是海洋微生物资源及代谢产物研究。E-mail: liuyingxk@sina.com

收稿日期: 2013-09-08; 修回日期: 2013-12-15

样性进行研究, 以期对相关微生物资源的研究、开发和利用提供一定的理论依据和实践指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 指示菌: 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) CMCC44817、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CMCC 26003、白色念珠菌 (*Candida albicans*) CMCC 98001、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) ATCC 19115、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CMCC 63501、副溶血性弧菌 (*Vibrio Parahemolyticus*) ATCC 17802。

1.1.2 培养基: 改良营养琼脂培养基 (NA): 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 葡萄糖 1 g, $ZnSO_4$ 1 g, Na_2SiO_4 1 g, $MnSO_4$ 0.01 g, $CuSO_4$ 0.15 g, $Co(NO_3)_3$ 0.1 g, CH_3COONa 5 g, 琼脂 15 g, 50% 海水 1000 mL; 改良 TSA 培养基: 胰蛋白胨 15 g, 大豆胨 5 g, $ZnSO_4$ 1 g, Na_2SiO_4 1 g, $MnSO_4$ 0.01 g, $CuSO_4$ 0.15 g, $Co(NO_3)_3$ 0.1 g, CH_3COONa 5 g, 琼脂 15 g, 50% 海水 1000 mL; Marine Agar 2216 (MA 2216): 购自 Difco 公司; 沙氏葡萄糖琼脂培养基与胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂培养基: 购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 样品采集与处理

褐蓝子鱼 (*Siganus fuscescens*) 采集于广东湛江硃洲岛, 加氧保活 2 h 内运输至实验室进行微生物分离培养。用灭菌海水将鱼样品表面清洗干净, 置超净工作台 (SW-CJ-2FD) 中风干, 在无菌条件下取出肠道并剪碎, 称取 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 r/min 振荡 30 min, 制成样品匀浆悬浮液。

1.3 菌株分离与发酵上清液制备

以改良 NA、TSA 和 MA 2216 培养基作为分离培养基, 吸取 0.1 mL 一定浓度的样品稀释液涂布于平板, 28℃ 培养 2-5 d。对挑取的单菌落再进行反复分离纯化, 根据菌落形态及镜检结果进行去重。对纯化后的分离菌株挑取 1-2 环接种到 100 mL 去琼脂的相应分离培养基的液体培养基中培养 3 d, 发酵液以 $13523 \times g$ 离心力离心 15 min (SIGMA 2-16K 台式高速冷冻离心机, SIGMA, 德国), 收集上清液进行抑菌试验。

1.4 抗菌活性测定

采用牛津杯扩散法^[7]测定发酵上清液抗菌活性, 指示菌 *E. coli*、*S. aureus* 与 *B. subtilis* 采用 NA 培养基, *V. parahemolyticus* 采用含 3% 氯化钠的营养琼脂培养基, *L. monocytogenes* 采用胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂培养基, 5 种细菌指示菌均在 37℃ 培养 24 h; *C. albicans* 采用沙氏葡萄糖琼脂培养基, 30℃ 培养 36 h。用生理盐水将培养好的指示菌斜面细胞洗下并制成 10^5 CFU/mL 菌悬液。取 1 mL 稀释的指示菌悬液加到 100 mL 冷却至 50℃ 左右的相应指示菌琼脂培养基中, 摇匀, 立即倒入摆有灭过菌的牛津杯的平皿中, 待凝固后, 用镊子拔出牛津杯。在牛津杯的每孔中加入 250 μ L 待测发酵上清液, 放在 3-4℃ 冰箱预先扩散 24 h, 然后将 5 种指示菌是细菌的放在 37℃ 培养 24 h, 是白色念珠菌的放在 30℃ 培养 48 h, 观察是否有抑菌圈及其大小, 每个待测发酵上清液重复测定 3 次。

1.5 活性菌株的 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

基因组 DNA 的提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增 (Mastercycle Gradient PCR 仪, Eppendorf, 德国)、PCR 产物纯化按 Nakajima^[8] 的方法。扩增和测序用细菌通用引物 (Eubac 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Eubac1492R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 产物寄送上海英骏生物技术有限公司广州实验室进行测序。测序结果采用 NCBI-BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 下载相似性高的相关菌株的模式菌株序列, 用 MEGA 5.0 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^[9]。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^[10]。

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 68 株菌株。从不同培养基分离效果来看, MA 2216 培养基分离到的菌落形成单位最高, 菌落形态较丰富, 改良 NA 菌落形成单位少, 且菌落形态单一。

2.2 抗菌活性菌株的筛选与评价

对分离到的 68 株菌株进行 6 种指示菌抗菌活性筛选,见表 1,结果发现有 19 株菌的发酵产物具有不同程度的抗菌活性,占受试菌株的 27.9%,其中对 *L. monocytogenes* 与 *B. subtili* 的抗菌活性菌株数最高,

各为 15 株,均占总分离菌株数的 22.1%,依次是 *S. aureus* (20.6%)、*E. coli* (14.7%)、*V. parahemolyticus* (11.8%)、*C. albicans* (8.7%)。另外,菌株 ZJHD3-06、ZJHD7-14、ZJHD8-10 对 6 种指示菌均有不同程度的抗菌活性,表现出良好的抗菌谱。

表 1. 19 株活性菌株发酵上清液抑菌活性

Table 1. Anti-bacterial activity of fermentation supernatant for 19 strains

| test bacteria | <i>L. monocytogenes</i> | <i>B. subtili</i> | <i>S. aureus</i> | <i>V. parahemolyticu</i> | <i>E. coli</i> | <i>C. albicans</i> |
|---------------------|-------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|----------------|--------------------|
| ZJHD1-26 | + | ++ | ++ | +++ | ++ | - |
| ZJHD1-43 | +++ | + | + | - | + | - |
| ZJHD1-70 | +++ | ++ | - | + | + | + |
| ZJHD2-24 | + | + | + | ++ | - | - |
| ZJHD2-30 | ++ | ++ | - | - | + | - |
| ZJHD2-31 | +++ | + | +++ | +++ | - | - |
| ZJHD2-43 | +++ | + | ++ | - | - | - |
| ZJHD2-57 | ++ | + | + | - | - | - |
| ZJHD2-58 | - | - | - | - | - | - |
| ZJHD3-06 | +++ | ++ | + | ++ | + | ++ |
| ZJHD3-12 | + | + | + | - | ++ | ++ |
| ZJHD3-34 | ++ | - | + | - | - | - |
| ZJHD5-03 | ++ | + | + | - | - | - |
| ZJHD5-19 | - | + | - | + | +++ | + |
| M26 | ++ | + | ++ | - | - | - |
| ZJHD5-23 | - | - | - | - | - | - |
| ZJHD5-32 | - | - | ++ | - | + | - |
| ZJHD7-14 | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ZJHD8-10 | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| activated stain No. | 15 | 15 | 14 | 8 | 10 | 6 |

+ + +: inhibition zone diameters > 20 mm; + +: inhibition zone diameters: 15 - 20 mm; +: inhibition zone diameters: < 15 mm; -: no anti-bacterial activity.

2.3 褐蓝子鱼抗菌活性细菌类群多样性

采用 Blast 搜索软件从 GenBank 和 EzTaxon 等公共数据库中进行相似性搜索,调出相似性最高菌株的 16S rRNA 基因序列,结果见表 2。结果表明,19 株抗菌活性菌株分属于细菌域的放线杆菌门 (Actinobacteria)、变形杆菌门 (Proteobacteria) 与厚壁菌门 (Firmicutes) 的 11 个科 (Micrococcaceae, Dermabacteraceae, Brevibacteriaceae, Moraxellaceae, Rhodobacteraceae, Halomonadaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Staphylococcaceae) 12 个属 (*Rothia*, *Micrococcus*, *Brachy bacterium*, *Brevibacterium*, *Psychrobacte*, *Paracoccus*, *Cobetia*, *Citrobacter*, *Pseudomona*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*)。其中 Firmicutes 门菌株所占活性菌数的比例最大 42.1% (8 株),其次

是 Proteobacteria 门 36.8% (7 株) 和 Actinobacteria 门 21.1% (4 株)。

2.4 活性菌株的种类与遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株是属于不同种类的微生物的归类原则^[11],19 株抗菌活性菌株可以归为 19 种不同种类的细菌(表 2)。除菌株 ZJHD2-57、ZJHD3-12、ZJHD1-26、ZJHD1-43、ZJHD5-32、ZJHD8-10 与其系统发育关系最密切的典型菌株菌株的 16S rRNA 基因序列 100% 相似外,其它 13 株抗菌活性菌株与其最密切有效发表种典型菌的序列相似性在 96.2% - 99.9% 之间,说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的典型菌株间存在一定的遗传差异。值得注意的是,菌株 ZJHD2-31、ZJHD5-23、ZJHD2-58 与 M26 与其系统发育关系最密切的已知种类的典型菌株的 16S rRNA 基因序

列存在较大差异(表 2 和图 1 中菌号加粗的菌株), 其中菌株 M26 与 *Paracoccus alcaliphilus* JCM 7364^T (D32238) 系统发育关系最密切, 两者的 16S rRNA 基因序列相似性为 98.1%。经多相分类鉴定, 菌株 M26 代表 *Paracoccus* 属的新种, 并已公开发表^[12]。菌株 ZJHD2-23、ZJHD2-31、ZJHD2-58 分别与

Brachybacterium nesterenkovi JCM 11648^T ((X91033)、*Rothia nasimurium* CCUG 35957^T (AJ131121)、*Paracoccus isopora* SW-3^T (FJ593906) 16S rRNA 基因序列相似性最近, 相似性分别为 98.0%、98.4% 与 96.3%, 可能分别代表 *Rothia* 和 *Paracoccus* 属的新种, 它们的多相鉴定正在进行中。

表 2. 抗菌活性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 2. phylogenetic relationships between antibacterial activity strains and their phylogenetic relationships most closely typical strain

| phylogenetic group | family | strain (accession number) | closest type strain (accession number) | similarity /% | |
|------------------------|------------------------|--------------------------------|---|---|-------|
| Actinobacteria | Microbacteriaceae | ZJHD2-31 (KF585025) | <i>Rothia nasimurium</i> CCUG 35957 ^T (AJ131121) | 98.4 | |
| | | ZJHD5-49 (KF585026) | <i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (FJ214355) | 99.8 | |
| | Dermabacteraceae | ZJHD5-23 (KF601586) | <i>Brachybacterium nesterenkovi</i> JCM 11648 ^T ((X91033) | 98.0 | |
| | Brevibacteriaceae | ZJHD5-03 (KF585027) | <i>Brevibacterium iodinum</i> DSM 20626 ^T (X83813) | 99.5 | |
| | Proteobacteria | Moraxellaceae | ZJHD2-24 (KF585028) | <i>Psychrobacter celer</i> SW-238 ^T (AY842259) | 99.4 |
| ZJHD2-30 (KF585029) | | | <i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 ^T (AJ313425) | 99.9 | |
| Rhodobacteraceae | | ZJHD2-58 (KF585030) | <i>Paracoccus isopora</i> SW-3 ^T (FJ593906) | 96.3 | |
| Halomonadaceae | | M26 ^T (JX398976) | <i>Paracoccus alcaliphilus</i> JCM 7364 ^T (D32238) | 98.1 | |
| | | ZJHD2-57 (KF585031) | <i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T (AJ306890) | 100.0 | |
| Enterobacteriaceae | | ZJHD2-43 (KF585032) | <i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039 ^T (AJ233408) | 99.1 | |
| Pseudomonadaceae | | ZJHD3-42 (KF585033) | <i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC 17751 ^T (EU103629) | 100.0 | |
| Firmicutes | | Bacillaceae | ZJHD1-26 (KF585034) | <i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 ^T (EU194897) | 100.0 |
| | | | ZJHD1-43 (KF585035) | <i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T (AF234854) | 100.0 |
| | | | ZJHD1-70 (KF585036) | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii DSM15029 ^T (AF074970) | 99.9 |
| | ZJHD3-06 (KF585041) | | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. plantarum FZB42 ^T (CP000560) | 99.8 | |
| | ZJHD5-32 (KF585037) | | <i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a ^T (AJ831841) | 100.0 | |
| | Lactobacillaceae | | ZJHD7-44 (KF585038) | <i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558 ^T (D79211) | 99.9 |
| | | | ZJHD8-40 (KF585039) | <i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. torquens JCM 1166 ^T (AJ575741) | 100.0 |
| | Staphylococcaceae | ZJHD3-34 (KF585040) | <i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933) | 99.9 | |

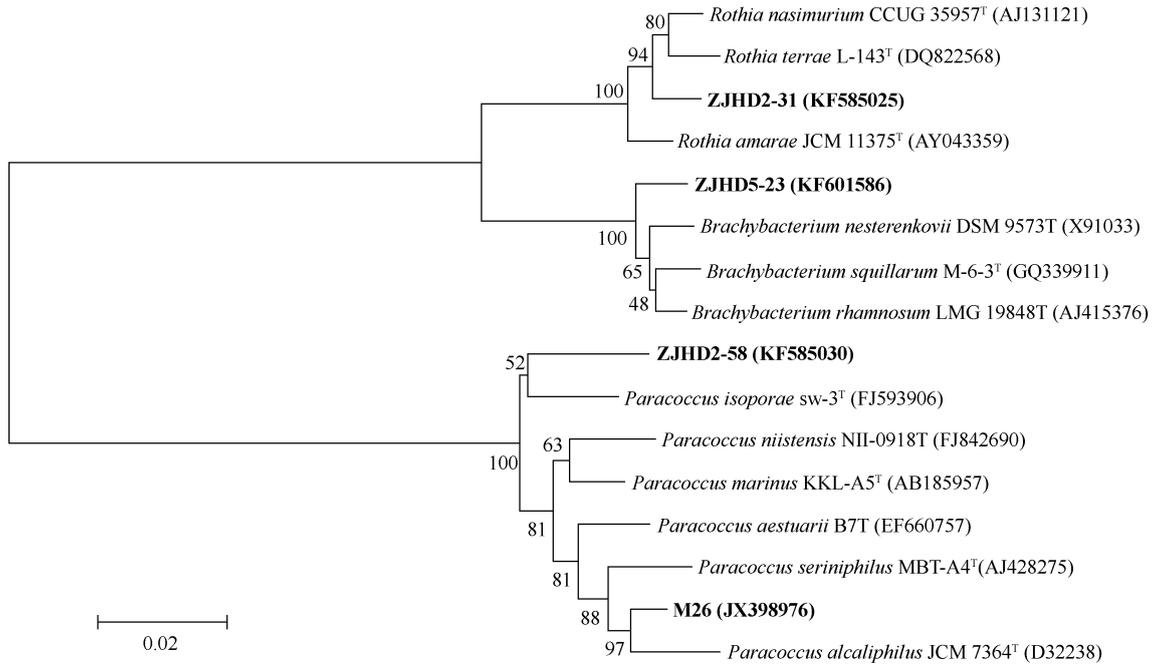


图 1. 基于 16S rRNA 基因序列构建的褐蓝子鱼抗菌活性菌 4 株潜在新种的系统发育树

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree of four potential new taxa isolated from *Siganus fuscescens* and their relatives. The numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The numbers at branch points indicate bootstrap percentages (based on 1000 replicates). Bar, 2 % sequence divergence.

3 讨论

海洋无脊椎动物一直是结构新颖天然化合物的重要来源,包括萜烯、聚酮化合物、多肽类、生物碱类等多种化学结构类型^[13]。仅 2009 年就有 1011 个新化合物是从海洋环境中获得,其中接近一半来源于无脊椎动物^[14]。尽管这些无脊椎动物是药物获得的良好资源,但像海绵等大多数无脊椎动物本身是稀缺的,通过大量的捕获来获得活性物质必将引起物种的灭绝,所以很难真正实现大量开发与应用。运用微生物学、分子生物学、化学等多种技术揭示,许多动植物中的生物活性物质的真正生产者实际上是与之共附生的微生物产生的^[15-16]。因此,从海洋动植物中分离产生活性物质共附生微生物成为一个有效的策略。Anand^[17]对从马纳尔湾 4 种海绵中分离到 75 株共附生细菌进行抗菌活性测定,发现 16 株菌(21.3%)具有不同程度的抗菌活性;从美国西雅图鱼中获得 21 株共附生菌,其中 9 株(42.9%)具有不同程度的抗菌活性,显示出较高的抗菌活性,并且活性菌株归为 3 个门

(Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes), Actinobacteria 为优势类群^[18]。本研究从湛江硇洲岛褐蓝子鱼肠道样品中分离到 68 株菌株,其中活性菌株 19 株,占分离株的 27.9%。这 19 株抗菌活性菌株也归属于 Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes 这 3 个门,但 Firmicutes 为优势类群。

海洋微生物是新化合物的巨大宝库,这些有前景的微生物天然产物常常来源于如海绵、海鞘等与之共附生的微生物,它们的代谢物结构不易确定,但往往是令人兴奋的物质,这与它们所共附生的微生物种类的多样及特殊性存在一定的关系^[19]。本研究从硇洲岛褐蓝子鱼肠道获得的 19 株抗菌活性菌株,分属于 3 个大门 10 个科 12 个属,表现出微生物的多样性,并且有 4 株菌可能代表新种。李文均课题组^{5-6]}对湛江硇洲岛海胆与海葵的 34 株与 42 株可培养细菌 16S rRNA 基因序列分析,发现分别有 5 株与 6 株为潜在的新种。这些研究表明湛江海洋动植物共附生微生物存在新种资源的机率较大,这为获得结构新颖、作用独特的化合物提供了有效的资源,这一点值得进一步关注与开发。

参考文献

- [1] Michelle RR , Paul RA , Alan DB , Sean FB , Trudy HG , Mark R L , Kara AL , Berkley AL , Ian AM , Charles M , Choi LT , Michael G , Marcia SO , Jon CJH , Robert MG. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66(6) : 2541-2547.
- [2] Andreas S , Rishali G , Christopher DR , Fadia I , Edward FD , Richard CH. Sponge-associated bacteria are thought to produce many novel bioactive compounds , including polyketides. PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005 , 71(8) : 4840-4849.
- [3] Marlene H , Karen V , Javiera N , Andrea B , Felipe M , Pamela U , Ivanna A , Renato C , Aurelio SM , José D , María JD , Inmaculada V. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial , antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiol & Biotechnol* , 2013 , DOI 10.1007/s11274-013-1418-x.
- [4] Proksch P , Edrada RA , Ebel R. Drugs from the seas current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2002 , 59 (2-3) : 125-134.
- [5] Huang K , Zhang L , Liu Z , Chen Q , Peng Q , Li W , Cui X , Chen Y. Diversity of culturable bacteria associated with the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* from Naozhou Island. *Acta Microbiologica Sinica* , 2009 , 49 (11) : 1421-1429. (in Chinese)
黄苛 , 张丽 , 刘祝祥 , 陈奇辉 , 彭清忠 , 李文均 , 崔晓龙 , 陈义光. 硃洲岛海胆可培养细菌的多样性. *微生物学报* , 2009 , 49 (11) : 1421-1429.
- [6] Xiao H , Chen Y , Liu Z , Huang K , Li W , Cui X , Zhang L , Yi L. Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with a sea anemone from coast of the Naozhou Island in Zhanjiang , China. *Acta Microbiologica Sinica* , 2009 , 49(2) : 246-250. (in Chinese)
肖怀东 , 陈义光 , 刘祝祥 , 黄苛 , 李文均 , 崔晓龙 , 张丽 , 易浪波. 湛江硃洲岛海葵相关可养细菌系统发育多样性. *微生物学报* , 2009 , 49(2) : 246-250.
- [7] Liu D , Li L , Yang X , Liang S. Determination of the probiotic by oxford plate assay system. *Food Research and Development* , 2006 , 27(3) : 110-111. (in Chinese)
刘冬梅 , 李理 , 杨晓泉 , 梁世中. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力. *食品研究与开发* , 2006 , 27(3) : 110-111.
- [8] Nakajima Y , Kitpreechavanich V , Suzuki KI , Kudo T. *Microbispora corallina* sp. nov. , a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 1999 , 49: 1761-1767.
- [9] Tamura K , Peterson D , Peterson N , Stecher G , Nei M , Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood , evolutionary distance , and maximum parsimony methods. *Biology and Evolution* , 2011 , 28: 273-2731.
- [10] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* , 1985 , 39: 783-791.
- [11] 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.
- [12] Ying L , Qing YX , Kui H , Lei L , Ya MZ , Yi LT , Jun YA , Ping PZ , Chun HX. *Paracoccus siganidrum* sp. nov. , isolated from fish gastrointestinal tract. *Antonie van Leeuwenhoek* , 2013 , 103: 1133-1139.
- [13] Houssen WE , Jaspars M. Isolation of marine natural products. *Methods in Molecular Biology* , 2012 , 864: 367-392.
- [14] Blunt JW , Copp BR , Munro MHG , Northcote PT , Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports* , 2011 , 28: 196-268.
- [15] Radjasa OK , Vaske YM , Navarro G , Vervoort HC , Tenney K , Linington RG , Crews P. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associates. *Bioorganic Medicinal Chemistry* , 2011 , 19: 6658-6674.
- [16] Gulder TAM , Moore BS. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Current Opinion in Microbiology* , 2009 , 12: 252-260.
- [17] Ananda T , Bhat A W , Shouche YS , Roy U , Siddharth J , Sarma SP. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research* , 2006 , 161: 252-262.
- [18] Sanchez LM , Wong WR , Riener RM , Schulze CJ , Linington RG. Examining the fish microbiome: vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the

discovery of unique marine natural products. *PloS One* , 2012 7(5) :1-10.

[19] Simmons TL , Coates RC , Benjamin RC , Niclas E , David G , Eduardo E , Pieter CD , William HG. Biosynthetic

origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. *PNAS* , 2008 , 105 (12) : 4587-4594.

Diversity of antimicrobial bacteria associated with *Siganus fuscescens* from Naozhou island in Zhanjiang , China

Ying Liu¹ , Wei Shi² , Junying An¹ , Yamei Zhao³ , Riying Ye¹ , Chunhou Xu^{4*}

¹ College of Food Science , Guangdong Ocean University , Zhanjiang 524088 , Guangdong Province , China

² Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co. Ltd. , Guangzhou , 510663 , Guangdong Province , China

³ Huzhou Enviromental Science and Technology Innovation Center , Huzhou 313028 , Zhejiang Province , China

⁴ College of Agriculture , Guangdong Ocean University , Zhanjiang 524088 , Guangdong Province , China

Abstract [Objective] Marine bacteria are a rich source of potentially useful antimicrobial molecules. The purpose of the study is to explore the diversity of bacteria with antimicrobial activity isolated from *Siganus fuscescens* gastrointestinal tract collected from Naozhou Island (20° 52' N – 20° 56' N 110° 33' E – 110° 38' E) , Leizhou Bay , South China Sea. **[Methods]** We isolated bacteria from the gastrointestinal tract of fish sample using classical culturing technique , and determined antimicrobial activities of the isolates by Oxford cup method. We investigated diversity of antimicrobial isolates using phylogenetic comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. **[Results]** According to the results of morphological observation and part of physiological and biochemical experiments , we isolated 68 strains from fish gastrointestinal tract. Among them , 19 strains with antimicrobial activities were acquired (27.9 % of the isolates) and represented 19 different species , belonging to 12 genera (*Rothia* , *Micrococcus* , *Brachybacterium* , *Brevibacterium* , *Psychrobacter* , *Paracoccus* , *Cobetia* , *Citrobacter* , *Pseudomonas* , *Bacillus* , *Lactobacillus* and *Staphylococcus*) of 11 families (Microbacteriaceae , Dermabacteraceae , Brevibacteriaceae , Moraxellaceae , Rhodobacteraceae , Halomonadaceae , Enterobacteriaceae , Pseudomonadaceae , Bacillaceae , Lactobacillaceae and Staphylococcaceae) in three phyla (Actinobacteria , Proteobacteria and Firmicutes) . Eight strains (42.1 %) , 7 strains (36.8 %) and 4 strains (21.1 %) were belonging to the phylum Firmicutes , Proteobacteria and Actinobacteria , respectively. The phylogenetic distance matrix results suggested that there were obvious genetic divergences between the majority of strains with antimicrobial activity and their phylogenetically most closely related typical strain , due to 16S rRNA gene sequences similarities ranging from 96.2 to 99.9 % . In addition , 4 strains (ZJHD2-31 , ZJHD5-23 , ZJHD2-58 and M26) could represent potential new species , and identification of the novel strain M26 has been published in Antonie van Leeuwenhoek. **[Conclusion]** There are abundant diversity for bacteria with antimicrobial activity and potentially more new species of microorganism in *Siganus fuscescens* gastrointestinal tract collected from Naozhou Island. .

Keywords: *Siganus fuscescens* , anti-microbial activity , 16S rRNA gene , bacterial diversity

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the Guangdong Provincial Department of Science and Technology (2010B020313002 , S2011010000328 , [2009]198)

* Corresponding author. Tel: +86-759-2383292; Fax: +86-759-2383249; E-mail: xuchunhou@sina.com

Received: 8 September 2013 / Revised: 15 December 2013