

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (7): 859–866; 4 July 2009
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

繁茂膜海绵中可培养稀有放线菌的多样性

信艳娟^{1,2}, 吴佩春¹, 邓麦村², 张卫^{1*}

〔中国科学院大连化学物理研究所, 海洋生物产品工程组, 大连 116023〕

〔中国科学院研究生院, 北京 100049〕

摘要: 【目的】本文旨在尝试改进分离培养方法从大连海域繁茂膜海绵中筛选稀有放线菌, 并对其多样性进行研究。【方法】根据繁茂膜海绵元素组成配制微量元素溶液, 加入到放线菌分离培养基中, 同时将部分培养基稀释成寡营养培养基, 结合富集培养法, 对繁茂膜海绵中放线菌进行分离培养。采用 16S rDNA 的限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 分析和序列分析, 揭示其多样性。【结果】共获得可培养放线菌 59 株, 通过形态、颜色观察, 将其归为 27 个类群。RFLP 分析表现为 15 种不同的图谱类型。16S rDNA 序列分析表明: 它们分别属于放线菌的 10 个属, 其中布劳氏菌属 (*Prauseria*) 和糖单胞菌属 (*Saccharomonospora*) 是首次报道从海绵中分离培养。【结论】改进的分离培养基适合于繁茂膜海绵中稀有放线菌的分离培养, 进一步揭示了该海绵中丰富的稀有放线菌, 同样的方法有可能应用于其他海绵放线菌的分离培养。

关键词: 繁茂膜海绵; RFLP; 多样性; 放线菌

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0859-08

放线菌是一类具有重大实用价值的微生物, 在抗生素生产和酶制剂产业中具有很重要的地位^[1]。目前发现的 12000 种微生物来源的生物活性物质中, 有 70% 是由放线菌产生的。由于几十年来长时间的开发, 从陆栖微生物找到新活性物质的几率越来越小, 筛选的难度越来越大。因此, 开发生态环境及物种多样性有别于陆地的海洋微生物资源成为当前的研究热点。

海绵属于动物界多孔动物门 (Porifera), 是迄今为止已知海洋天然产物的最大来源。由于海绵底栖过滤性摄食和消化选择性等生理特性, 其体内蕴藏了丰富的微生物。越来越多的研究表明: 从海绵中分离得到的天然产物有些是由其共生微生物产生的^[2]。分子生物学方法研究揭示海绵中存在大量的微生物资源, 然而可以被分离并成功培养的微生物

却仅占整个海绵微生物群落的 0.1%^[3-6]。这是因为现有的分离培养技术还不能满足对海绵微生物分离培养的要求, 尤其是稀有放线菌必须用具有高度选择性的分离条件才能分离获得。因此, 改进和设计新的分离培养方法是海绵放线菌资源开发中的重大课题。繁茂膜海绵在大连海域广泛分布, 在过去的研究中我们发现繁茂膜海绵具有很多活性天然产物^[7]。应用分子生物学方法对繁茂膜海绵微生物多样性分析表明, 该海绵中存在着丰富的微生物资源^[8-9], 尤其是发现了大量的稀有放线菌和一些未鉴定的新菌类群^[10], 这些海绵微生物大部分至今尚未得到分离和纯培养。为此, 本研究针对稀有放线菌的生长特性和繁茂膜海绵微量元素组成分析对分离培养基进行了改进, 旨在获得更多的可培养稀有放线菌资源, 并对其多样性进行研究。

基金项目: 国家 973 项目 (2003CB7106001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

作者简介: 信艳娟 (1971-), 女, 辽宁人, 博士研究生, 研究方向为海绵微生物多样性。E-mail: xinyanjuan@dicp.ac.cn

收稿日期: 2009-03-06; 修回日期: 2009-04-27

1 材料和方法

1.1 样品的采集

在大连地区潮间带海域采集新鲜的繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perlevis*), 采到的海绵样品立即放入装有海水的塑料袋中, 避免与空气接触。海绵种属由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定为: 寻常海绵纲 (Demospongiae), 软海绵目 (Halichondrida), 膜海绵科 (Hymeniacidonidae), 膜海绵属 (*Hymeniacidon*), 繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perlevis*)。

1.2 培养基和试剂

7种改进的选择分离培养基组成见表1, 均为在各种放线菌分离培养基的基础上添加一定量的微量

元素进行改进, 这些微量元素是根据繁茂膜海绵元素组成^[4] Na_2SiSO_3 , 5 mmol/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mmol/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5 mmol/L; $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$, 0.2 mmol/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L; MgSO_4 , 1 mmol/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mmol/L; TiCl_3 , 0.5 mmol/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mmol/L, 用 0.1 mol/L HCl 溶解上述微量元素), 先配制成微量元素溶液, 再加入培养基中。

TaKaRa *LA TaqE*, *Hha* I (40 U/ μL), DNA 凝胶纯化试剂盒, DNA Marker 均购自大连宝生物公司。16S rDNA 扩增引物 F8 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3') 由大连宝生物公司合成。

表 1 繁茂膜海绵放线菌分离培养基及其成分

Table 1 Composition of seven different media used for the isolation of actinomycetes from marine sponge *H. perlevis*

Medium	Formula*	Reference
HVG	0.5 g humic acid, 0.5 g MgSO_4 , 1.7 g KCl, 0.02 g CaCl_2 , 0.5 g Na_2HPO_4 , 18 g gellan gum, 2 mL composite vitamin (0.5 mg/mL), 1 mL trace element solution, 20 g NaCl and 1 L of distilled water	[1]
HVA	0.5 g humic acid, 0.5 g MgSO_4 , 1.7 g KCl, 0.02 g CaCl_2 , 0.5 g Na_2HPO_4 , 18 g agar, 2 mL composite vitamin (0.5 mg/mL), 1 mL trace element solution, 20 g NaCl and 1 L of distilled water	[2]
CV	4 g coal dust, 1 mL trace elements solution, 2 mL composite vitamin (0.5 mg/mL), 18 g agar, 20 g NaCl and 1 L of distilled water	This study
G2V	0.5 g peptone, 0.25 g tryptone, 1 g glucose, 2 mL composite vitamin (0.5 mg/ml), 1 mL trace element solution, 20 g NaCl, 18 g agar, and 1 L of distilled water	This study
CHV	5 mL colloidal chitin, 2 mL composite vitamin (0.5 mg/mL), 1 mL trace element solution, 18 g agar, and 1 L of natural seawater	This study
SH	18 g agar, 1 mL trace elements solution, and 1 L of natural seawater	[3]
MIV	1 g soluble starch, 0.4 g yeast extract, 0.2 g peptone, 2 mL composite vitamin (0.5 mg/mL), 18 g agar, 1 mL trace elements solution, and 1 L of natural seawater	This study

* All the media except those prepared in seawater were adjusted to a final pH 7.0.

1.3 海绵放线菌的分离、纯化和保藏

取采集的海绵样品, 用无菌手术刀切成小块, 在烧杯中用无菌海水将样品块洗涤 3~5 次, 以除去样品表面附着的微生物和其它杂质; 再将海绵样品于室温干燥后研成粉末, 放入干燥箱 80℃ 烘干, 1 h 后取出样品凉至室温; 每 200 mg 粉末样品中加入 2 mL 含有 0.1% 脱脂奶粉的 10 mmol/L 的 MOPS, 混匀, 于 27℃ 振荡箱中培养 1 h 后, 再 1000 × g 离心 10 min, 取上清。取 200 μL 上清涂布培养基平板; 另取 10 mL 上清加入装有 100 mL HVG 液体培养基的三角烧瓶中, 将三角烧瓶置于 250 r/min 振荡培养箱中, 28℃ 振荡富集培养 24 h; 取富集培养液 0.5 mL, 加入装有 4.5 mL 无菌海水的试管中涡旋混匀, 再进行系列稀释作为备用菌液; 分别取上述备用菌液 200 μL 涂布培养基平板, 每个备用菌液涂 5~10 个平板; 将平板置于 28℃ 培养箱中倒置培养, 观察菌株生长情况。当平板上出现放线菌菌落后, 挑取单菌落在新

的培养基平板上划线; 划线后的平板再置于 28℃ 培养箱中倒置培养 7 d 左右, 挑取单菌落继续在新的培养基平板上划线培养, 重复这一过程 3~5 次, 对菌株进行纯化, 直到菌落完全一致; 挑取纯化后的单菌落接种在装有液体培养基的试管中, 将试管置于 250 r/min 振荡培养箱中, 28℃ 振荡培养 72 h 左右, 取 200 μL 菌液加入装有 1.8 mL 20% 甘油水溶液的冻存管中, -70℃ 放置保存备用。

1.4 基因组 DNA 提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增

将纯化放线菌菌株在 TSB 培养基上进行试管规模培养 3 d 左右后, 采用改良细菌基因组 DNA 提取方法提取放线菌基因组 DNA^[5]。根据细菌 16S rDNA 保守序列^[6-17], 合成引物: F8 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') 和 R1492 (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC3')。PCR 反应体系 (50 μL): 25 μL 2 × G + C 缓冲液 (Mg^{2+} plus), 8 μL dNTP 混合物 (2.5 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL 引物 F8 和 R1492 (20 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 模板 DNA,

0.5 μL *LA Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 和 13.5 μL 的纯水。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。

1.5 16S rDNA 的限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 和序列分析

16S rDNA 扩增产物在限制性内切酶 *Hha* I 作用下于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h, 然后进行琼脂糖凝胶电泳。同时 16S rDNA 扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后进行测序分析。测序结果与 NCBI 的 GenBank 进行 Blast 比对, 用序列分析软件 Phydit 构建系统发育树^[8]。

2 结果

2.1 菌株分离

使用 7 种不同的改进培养基, 从繁茂膜海绵样品中共分离获得放线菌 59 株, 根据基丝、气丝的形态特征及可溶性色素颜色, 将其归为 27 个类群。从每个类群中各挑选一代表菌株进行 RFLP 分析和测

序分析。

2.2 RFLP 分析

将 27 株海绵放线菌的 16S rDNA 进行 *Hha* I 的 RFLP 分析。结果表明, 27 株菌可分为 15 种不同的图谱类型 (图 1), 除带型 B、C、D、M、N 均属于链霉菌属外, 其余带型 A、E、F、H、J、K、L、G、I、O 分别属于稀有放线菌属 (见表 2)。

2.3 16S rDNA 序列分析

将测得的 27 个序列信息分别输入 GenBank 中进行比较, 对 27 个样品进行属一级的归类, 并构建系统发育树 (图 2)。结果表明, 挑选的 27 株放线菌中, 有 15 株属于稀有放线菌, 其他属于链霉菌。15 株稀有放线菌分属 9 个属: 拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、纤维单胞菌属 (*Cellulosimicrobium*)、戈登菌属 (*Gordonia*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、布劳氏菌属 (*Prauseria*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、糖单胞菌属 (*Saccharomonospora*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)。

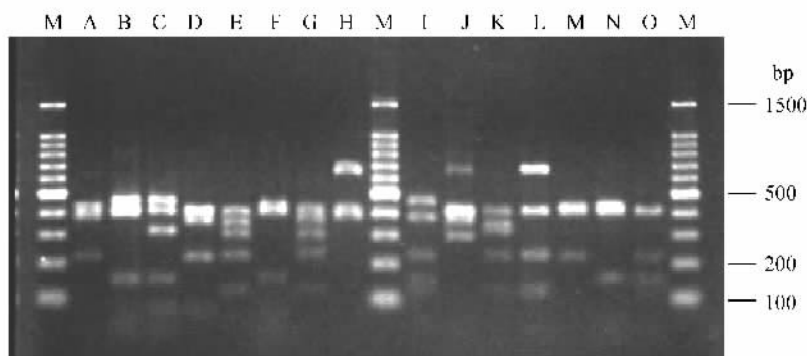


图 1 限制性片段长度多态性分析

Fig. 1 Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. M: DNA Marker 100 bp;

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O are different samples selected.

3 讨论

本文在前期工作的基础上^[9], 根据分子生物学对放线菌多样性研究信息^[10]的指导, 改进了分离培养基, 模拟海绵微量元素组成, 以繁茂膜海绵元素组成^[4]配制微量元素溶液, 加入放线菌分离培养基中, 并将部分培养基成分稀释成寡营养培养基。同时在样品预处理方面, 采用了干燥处理和富集培养相结合, 以 HVG 为基础培养基进行富集培养^[11]。从繁茂膜海绵中分离获得了 9 个属的稀有放线菌。结果表明, 改进的分离培养方法适合于繁茂膜海绵稀有放线菌的分离, 揭示了该海绵中可培养稀有放线菌的多样性。

我们研究组先前采用多种放线菌分离培养基从繁茂膜海绵中分离到 6 个属的稀有放线菌^[9]。与前期的实验结果相比, 除了红球菌和异壁放线菌两个属外, 分离到了其余 4 个属的放线菌, 同时又分离到纤维单胞菌、戈登菌、布劳氏菌、假诺卡氏菌、糖单胞菌、微杆菌 5 个新属。上海交通大学的李志勇等^[10]将海绵组织提取液加入到人工海水培养基中, 成功的从澳大利亚厚皮海绵 (*Cranilla australiensis*) 中分离到了 23 株放线菌, 其中稀有放线菌为 12 株。Webster 等^[5]在研究海绵微生物多样性时, 通过在海洋放线菌培养基中添加海绵提取物, 成功的分离到了先前从该海绵中没有分到的放线菌。他们的共同之处是在培养基中填加了海绵组织提取液, 获得了

较好的放线菌分离结果。韦荣编等^[1]采用各种分离培养基从东海海绵中分离到 19 株放线菌,他们的方法与本研究组的前期工作相似,将陆生和海洋放线菌分离培养基应用到了海绵放线菌的分离中。与他们的分离方法相比,本研究根据繁茂膜海绵元素

组成^[4]配制微量元素溶液,加入到放线菌分离培养基中,实验结果与国内外其他研究海绵放线菌多样性的结果相比,是目前所知的从任何一种海绵中分离到的种属最多的可培养放线菌(表 3)。

表 2 繁茂膜海绵可培养放线菌 16S rDNA 序列和 RFLP 分析

Table 2 RFLP analysis and sequence homology of 16S rDNA of actinomycetes from marine sponge *H. perlevis*

Isolate codes	Accession No.	RFLP group	The most similar species (Accession No.)	Identity/%	Selective medium
C-8	EU554272	N	<i>Streptomyces</i> sp. EU214921)	99	CV
C-20	EU554273	B	<i>Streptomyces</i> sp. EU368808)	99	CV
G2-6	EU554294	B	<i>S. gougerotii</i> (AB249982)	99	G2V
HVA3	EU554295	B	<i>Streptomyces</i> sp. EU43781)	100	HVA
HVG6	EU554296	B	<i>S. purpurascens</i> (AM268327)	99	HVG
HVG29	EU554303	B	<i>S. microflavus</i> EU273548)	99	HVG
HVG40	EU554304	B	<i>S. microflavus</i> EU273548)	99	HVG
J-29	EU554303	B	<i>Streptomyces</i> sp. EU384254)	98	CHV
HVG7	EU554297	M	<i>Streptomyces</i> sp. AY754726)	99	HVG
HVG19	EU554300	C	<i>Streptomyces</i> sp. EU368815)	99	HVG
M1-10	EU554310	C	<i>Streptomyces</i> sp. EU384265)	98	M1V
HVG23	EU554302	D	<i>Streptomyces</i> sp. DQ994708)	99	HVG
763	EU554269	F	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (AJ784811)	98	CHV
SH-4	EU554313	F	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (AY114178)	99	SH
HVG22B	EU554301	J	<i>Gordonia terrae</i> (AB355992)	99	HVG
HVG16	EU554299	A	<i>Nocardia cummidelens</i> (AF277202)	99	HVG
J-1	EU554306	H	<i>N. cyriaciageorgica</i> (EF127500)	99	CHV
J-14	EU554307	K	<i>Nocardioopsis</i> sp. EU257253)	99	CHV
C-18	EU554275	K	<i>N. antarctica</i> (X97885)	100	CV
C-21	EU554278	K	<i>Nocardioopsis</i> sp. (AY336509)	98	CV
C-22	EU554271	K	<i>N. listeri</i> (X97887)	98	CV
G2-3	EU554293	L	<i>Prauseria</i> sp. EU368816)	99	G2V
C-6	EU554274	E	<i>Pseudonocardia</i> sp. (AY974787)	99	CV
SH-2	EU554314	E	<i>Pseudonocardia autotrophica</i> (AJ252824)	100	SH
M1-8	EU554309	G	<i>Saccharomonospora azurea</i> (Z38024)	99	M1V
HVG49	EU554305	I	<i>Micromonospora</i> sp. EU437818)	99	HVG
HVG9	EU554298	O	<i>Microbacterium oxydans</i> (EU086800)	99	HVG

海绵由于其独特的生理结构和复杂的生存环境,使其与体内的微生物形成了一个小的生态环境,海绵与体内的微生物存在着互利共生关系。研究表明,海绵元素组成和含量在海绵体内均起着重要的功能,某些活性物质的产生同体内的元素组成与含量密切相关,有些甚至可能是体内微生物的营养来源^[4]。基于这些特点,本文以添加海绵元素组成成分改进了分离培养基,获得较好的分离结果。

分子生物学方法从基因角度分析环境中的微生物,与培养分离的方法研究可培养微生物互为补充,丰富了人们对环境微生物多样性的了解,同时也为

微生物的分离培养提供了分子信息指导。李志勇等^[6,28]采用分子生物学方法,对我国南海的细薄星芒海绵、皱皮软海绵、贪婪偏海绵、澳大利亚厚皮海绵体内细菌多样性进行了研究,结果显示每种海绵体内都含有丰富多样的细菌,大部分属于未培养细菌。徐君怡等^[8]采用分子生物学方法构建了繁茂膜海绵中细菌 16S rDNA 克隆,对其遗传多样性进行了分析,发现海绵中相关细菌主要归类于紫硫细菌门(Proteobacteria)中的 α -亚门、 γ -亚门和放线菌门(Actinobacteria)等类群,其中放线菌占总克隆文库的 5%。郭鹏飞等^[9]采用海绵组织离散、细胞分离的方

法, 构建了细胞内微生物的 16S rDNA 克隆。与徐君怡等研磨直接提取海绵组织 DNA 所得海绵组织中总微生物多样性相比, 海绵细胞内存在丰富的浮霉菌群 (23%), 但没有发现放线菌类群的存在。分析原因, 可能是分子生物学方法中所应用的引物是细

菌通用引物, 放线菌在自然界中不是优势种群, 海绵中也是这样, 同时因为他们生长缓慢, 加之含量太少。因此, 直接应用细菌通用引物来分析海绵中放线菌的多样性可能会有偏颇。

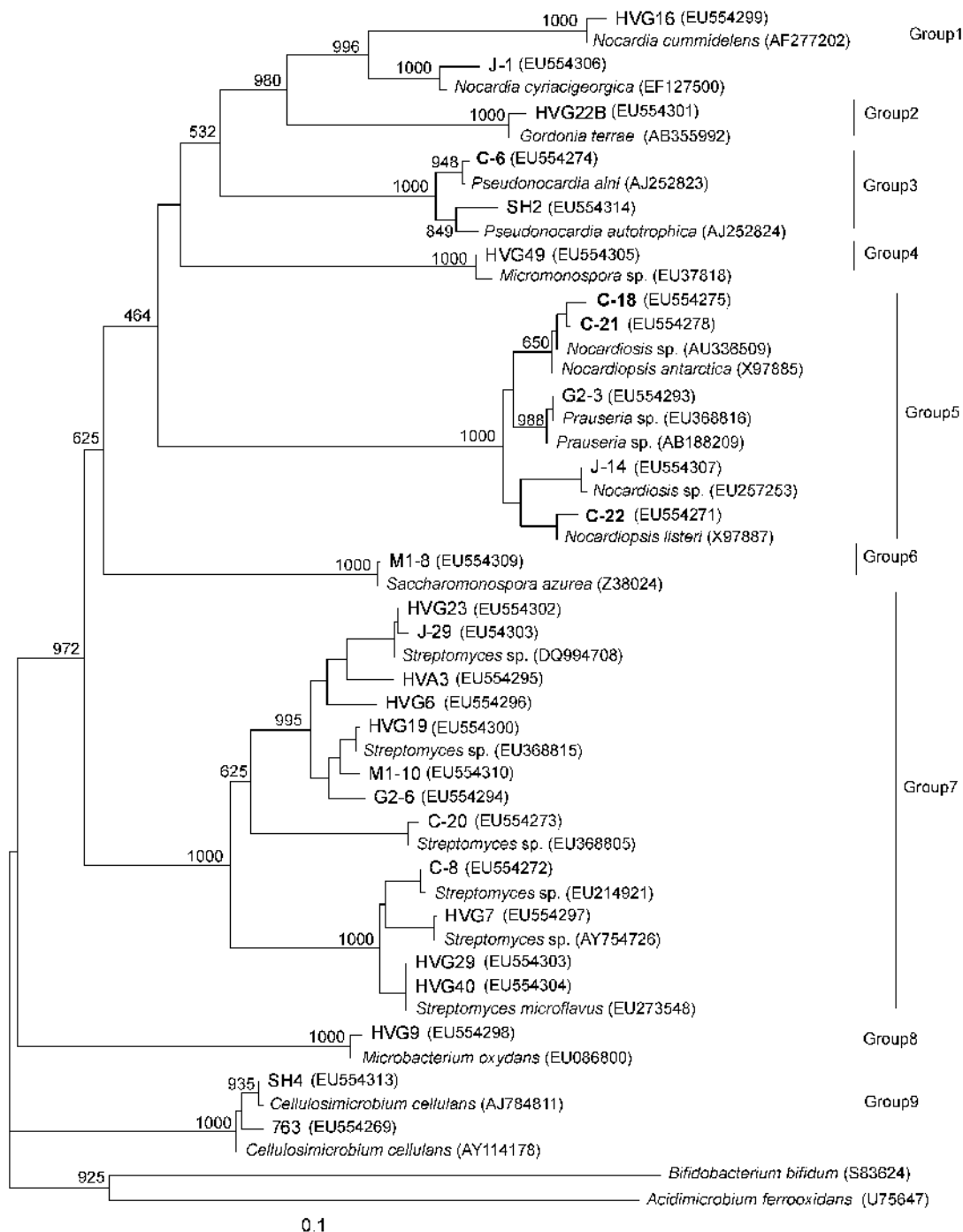


图 2 放线菌 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic representation of cultured actinomycetes and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rDNA gene sequences. Bootstrap values calculated from 1000 resamplings using neighbor joining are shown at the respective nodes when the calculated values were 50% or greater. *Bifidobacterium bifidum* (S83624) and *Acidimicrobium ferrooxidans* (U75647) were used as outgroups. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 10% sequence divergence.

表 3 多种海绵中可培养放线菌属多样性比较

Table 3 Diversity comparison of culturable actinomycetes genera isolated from different marine sponges

Marine sponges	Source of sponge	Diversity of genera	Reference
<i>Hymeniacidon perlevis</i>	Yellow Sea at Dalian, China	10	This study
<i>Hymeniacidon perlevis</i>	Yellow Sea at Dalian, China	7	[9]
<i>Xestospongia muta</i>	Conch Reef, Key Largo, Florida	3	[4]
<i>Rhopaloeides odorabile</i>	Great Barrier Reef, Australia	3	[8]
<i>Iotrochota</i> sp.	South China Sea	3	[22]
<i>Haliclona</i> sp.	South China Sea	4	[3]
<i>Pseudoceratina clavata</i>	Heron Island Research Station	3	[24]
<i>Rhabdastrella globostellata</i>	Heron Island Research Station	2	[24]
<i>Stelletta tenuis</i>	South China Sea	2	[25]
<i>Cranilla australiensis</i>	South China Sea	2	[25]
<i>Halichondria rugosa</i>	South China Sea	1	[25]
<i>Reniocalina</i> sp.	South China Sea	1	[25]
<i>Axinella</i> sp.	South China Sea	3	[25]
<i>Suberites zeteki</i>	Rainbow Marina in Pear Harbor	3	[26]
<i>Aplysina aerophoba</i>	Banyuls sur Mer	2	[27]

本课题组进一步采用了巢氏 PCR 法,用放线菌特异性引物构建了该海绵放线菌的 16S rDNA 克隆文库,发现繁茂膜海绵中存在着丰富的稀有放线菌资源和一些未鉴定的新放线菌类群^[10]。其中微球菌、鱼孢菌、棒杆菌、丙酸杆菌、酸微菌是用以前的分离培养方法未能获得纯培养的稀有放线菌属,它们在海绵中大量存在,酸微菌属是优势菌群,占总克隆数的 30% 左右。通过这一分子生物学信息的指导,本文针对繁茂膜海绵中稀有放线菌的特性改进了分离培养方法,获得了较高多样性的稀有放线菌资源。这些结果表明,分子生物学方法是对培养方法的有力补充。然而分子生物学方法的局限性在于,得到的微生物仅以基因的形式存在,不能获得这些微生物的纯培养,使得一些有意义微生物的应用受到了限制。因此,根据不同的生态环境,改进分离培养基、设计新的培养方法,是实现海绵放线菌的分离,开发海绵微生物资源的重要技术。

综上,本文根据繁茂膜海绵元素组成配制微量元素溶液,加入放线菌选择分离培养基中,从繁茂膜海绵中分离获得了 9 个属的可培养稀有放线菌。与国内外其他研究海绵放线菌多样性的结果相比,是目前所知从海绵中分离到的种属最多的可培养放线菌,其中布劳氏菌属和糖单胞菌属是首次报道从海绵中分离。该方法可能对其他海绵中可培养放线菌的分离具有重要指导意义。

参考文献

- [1] Takahashi Y, Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2003, 49: 141 – 154.
- [2] Taylor MW, Mohamed NM, Enticknap JJ, et al. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2007, 71: 295 – 347.
- [3] Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 434 – 444.
- [4] Montalvo NF, Mohamed NM, Enticknap JJ, et al. Novel actinobacteria from marine sponge. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87: 29 – 36.
- [5] Hentschel U, Hopke J, Horn M, et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 4431 – 4440.
- [6] Li ZY, He LM, Wu J, et al. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 329: 75 – 85.
- [7] Xue S, Zhang HT, Wu PC, et al. Study on bioactivity of extracts from marine sponges in Chinese Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 298: 71 – 78.

- [8] 徐君怡, 靳艳, 虞星炬, 等. 黄海繁茂膜海绵中微生物多样性的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44: 576 – 579.
- [9] 郭鹏飞, 靳艳, 孙黎明, 等. 繁茂膜海绵细胞内微生物多样性的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46: 875 – 878.
- [10] Xin YJ, Huang JY, Deng MC, et al. Culture-independent nested PCR method reveals high diversity of actinobacteria associated with the marine sponges *Hymeniacidon perleve* and *Sponge* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, 94: 533 – 542.
- [11] Suzuki S, Okuda T, Komatsubara S. Selective isolation and distribution of Sporichthya strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1930 – 1935.
- [12] Hayakawa M, Nonomura H. Humic-acid vitamins agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65: 501 – 509.
- [13] Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinobacteria taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 5005 – 5011.
- [14] 赵权宇, 邓麦村, 曲传宇, 等. 两种黄海潮间带海绵的元素与氨基酸成分分析. 海洋科学 (*Marine Sciences*), 2004, 28: 27 – 31.
- [15] Lee YK, Kim HW, Liu CL, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52: 245 – 250.
- [16] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *The Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 697 – 703.
- [17] Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, et al. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3417 – 3418.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406 – 425.
- [19] Zhang HT, Lee YK, Zhang W, et al. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 90: 159 – 169.
- [20] Li ZY, Liu Y. Marine sponge *Craniella australiensis*-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active actinomycetes screening, phylogenetic analysis. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43: 410 – 416.
- [21] 韦荣编, 闫斌伦, 李富超, 等. 海绵 *Hymeniacidon corticata* 共附生微生物代谢产物生物活性的初步研究. 中国海洋药物杂志 (*Chinese Journal Marine Drugs*), 2008, 27: 29 – 32.
- [22] Jiang SM, Li X, Zhang L, et al. Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Marine Biology*, 2008, 153: 945 – 952.
- [23] Jiang SM, Sun W, Chen MJ, et al. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 92: 405 – 416.
- [24] Lafi FF, Garson MJ, Fuerst JA. Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clavata* and *Rhabdastrella globostellata*) from the Great Barrier Reef display similar phylogenetic diversity. *Microbial Ecology*, 2005, 50: 213 – 220.
- [25] Zhang HT, Zhang W, Jin Y, et al. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinomycetes isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, 93: 241 – 248.
- [26] Zhu P, Li Q, Wang G. Unique microbial signatures of the alien Hawaiian marine sponge *Suberites zeteki*. *Microbial Ecology*, 2008, 55: 406 – 414.
- [27] Hentschel U, Schmid M, Wagner M, et al. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35: 305 – 312.
- [28] Li ZY, He LM, Miao XL. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Current Microbiology*, 2007, 55: 465 – 472.

Phylogenetic diversity of the culturable rare actinomycetes in marine sponge *Hymeniacidon perlevis* by improved isolation media

Yanjuan Xin^{1,2}, Peichun Wu¹, Maicun Deng², Wei Zhang^{1*}

¹ Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China)

² Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: **Objective]** Based on the molecular diversity information, seven actinomycete-selective culture media and isolation conditions were modified to isolate and cultivate diverse rare actinomycetes from *Hymeniacidon perlevis*. **Methods]** Modified, selective cultivation and enrichment media were used, with the addition of an elemental solution of simulating the elemental composition of marine sponge *H. perlevis*. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of 16S rDNA sequence was used to reveal the diversity of culturable rare actinomycetes. **Results]** A total of 59 actinomycete strains were isolated from the marine sponge *H. perlevis*. A total of 27 representative actinomycetes were selected according to their morphological feature, color and pigments. They gave 15 different RFLP patterns after digesting their PCR products of 16s rDNA with *Hha* I. The results showed that these isolates belonged to 10 genera: *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Cellulosimicrobium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Prauseria*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora* and *Microbacterium*. **Conclusion]** The modified isolation media and selective cultivation procedures are highly effective in the recovery of culturable actinomycetes from the marine sponge *H. perlevis*, resulting in the highest diversity of culturable rare actinomycetes from any sponges.

Keywords: *Hymeniacidon perlevis*; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); diversity; actinomycetes; 16S rDNA

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716001)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

Received: 6 March 2009/Revised: 27 April 2009

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问: 我想知道我的稿件的处理状态, 如何查询?

答: 您可以登录主页: journals.im.ac.cn/actamicrocn, 在“作者稿件查询”处, 输入您的用户名、密码, 即可查询到稿件状态; 如有问题, 您也可以通过 e-mail 询问, 请注意务必要提示稿件编号, 编辑部在收到您的来信会及时给予回复。

问: 我想尽早得到审稿结果, 或者提前发表, 有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法?

答: 在给作者发送的“受理通知”中, 我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- ① 在作者向我刊投稿之前, 应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章, 并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以, 作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部, 以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复, 5~7 个月之内刊出。
- ② 如要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊编委会讨论并通过后, 可予提前刊出, 无需另加任何费用。

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分两种情况,

- ① 如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- ② 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再提交本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。