微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2):246-250;4 February 2009
ISSN 0001-6209;CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

# 湛江硇洲岛海葵相关可培养细菌系统发育多样性

肖怀东[1],陈义光[1,2*],刘祝祥[1],黄苛[1],李文均[2],崔晓龙[2],张丽[1],易浪波[1]
([1]植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室,吉首大学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】了解湛江硇洲岛海葵样品中相关可培养细菌的多样性。【方法】运用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对样品中可培养细菌多样性进行研究。【结果】用补充 0~2.0 mol/L NaCl 的 MA、ISP 2、NA、SWA 和 HAA 培养基从海葵样品中分离到 126 株细菌,通过形态观察和部分生理生化实验去冗余,选取 42 株具有代表性的菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明,42 个分离菌株可分为 25 个物种,属于 3 个大的系统发育类群(Firmicutes,Gamma-Proteobacteria,Actinobacteria)、11 个科、18 个属。多数菌株属于 Firmicutes 门(17 株,40.5%)和 Gamma-Proteobacteria 亚门(14 株,33.3%)。这些分离菌株中,至少有 6 个菌株可能代表 6 个不同属的 6 个新物种:JSM 071004、JSM 071068、JSM 071073、JSM 072002、JSM 073008 和 JSM 073097 分别代表 *Bacillus*、*Halobacillus*、*Piscibacillus*、*Pontibacillus*、*Alteromonas* 和 *Nocardiopsis* 属的新物种。【结论】从以上结果可以看出,湛江硇洲岛海葵中存在较为丰富的微生物物种多样性和系统发育多样性,并且潜藏着较多的新的微生物类群(物种)。

**关键词**:海葵;可培养细菌;16S rRNA 基因;系统发育分析;细菌多样性
**中图分类号**:Q938.1 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2009)02-0246-05

海洋无脊椎动物的体表和体内存在大量微生物,它们与海洋无脊椎动物之间存在着高度特异的共附生(共生或附生)关系[1]。研究表明,一些共附生微生物(相关微生物)可能是某些海洋动物天然活性物质的真正生产者[2]。因此研究海洋动物相关微生物对海洋生物资源开发利用具有重要意义。海葵能够产生多种生物活性物质,有些已成为潜在的抗菌、抗癌和治疗心衰的药物[3-5],但海葵相关微生物资源研究目前只有零星报道[6-9]。谢新强等[6]和郑忠辉等[7]从海葵中分离到具有抗肿瘤或抗菌活性的微生物菌株;蒋亭等[8]报道了黄海葵附生真菌的化学成分分离和结构解析;Wang 等[9]从一个患病的海葵里分离到一个微生物新种 *Tenacibaculum aiptasiae*。然而,海葵相关微生物包括哪些优势类群?其系统发育关系与分类地位如何?这些问题都有待研究。本文报道了采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对湛江硇洲岛潮汐带海葵中可培养细菌的系统发育多样性的研究结果,以期为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。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器:引物由北京三博远志生物

基金项目:国家自然科学基金(30460004,30660004);国家"863 计划"(2007AA021306);吉首大学项目(jsdxkyzz200811,07JDPHE148,07JDPHE150,07JDPHE151,07JDPHE153)

* 通信作者。Tel:+86-743-8564416;Fax:+86-743-8565323;E-mail:nchenjsu@yahoo.com.cn
作者简介:肖怀东(1982-),男,湖南人,硕士研究生,研究方向为微生物资源与生态。E-mail:xiaohuaidong@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-08-01;修回日期:2008-11-15

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

有限责任公司合成；PCR 仪系 BIO-RAD 公司(PE 29600)；其它试剂和仪器同文献[10]。

**1.1.2 培养基**：MA(marine agar 2216)购自 Difco 公司；营养琼脂培养基(NA)：牛肉膏 3 g，蛋白胨 10 g，NaCl 5 g，琼脂 20 g，水 1000 mL，pH7.5；改良的 ISP 2 琼脂培养基[11]：蛋白胨 4 g，酵母膏 4 g，麦芽膏 5 g，琼脂 20 g，水 1000 mL，pH7.2；海水琼脂培养基(SWA)：琼脂 20 g，海水 1000 mL，pH7.5；腐植酸琼脂培养基(HAA)：腐植酸 10 g，水 1000 mL，pH7.5。复合盐 A 液：KCl 27.5 g，$Na_2CO_3$ 8 g，$Fe_4$Citrate 5 g，水 1000 mL；复合盐 B 液：SrCl 34 g，KBr 80 g，$H_3BO_3$ 22 g，$Na_2SiO_3$ 4 g，$(NH_4)_2SO_4$ 1.6 g，$Na_2HPO_4$ 8 g，水 1000 mL。

### 1.2 样品的采集与菌株的分离

**1.2.1 样品采集与处理**：海葵样品于 2007 年 5 月采自广东省湛江市硇洲岛海域潮汐带(20°85 N ~ 20°95′ N，110°54′ E ~ 110°65′ E)。用无菌水将海葵样品表面洗净，充分研碎，取 10 g 海葵组织匀浆置于盛有 90 mL 无菌水和玻璃株的三角瓶中，在摇床上 120 r/min振荡 60 min，双层纱布过滤，滤液用于菌株分离。

**1.2.2 菌株的分离与培养**：以 MA、改良的 ISP 2 琼脂培养基、NA、SWA 和 HAA 等作为分离基础培养基培养基，分别添加复合盐 A 液 20 mL/L 和复合盐 B 液 1 mL/L(MA 除外)，并添加 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mol/L NaCl，倒平板。取 0.2 mL 一定浓度的样品稀释液涂布平板，于 28℃培养 7 ~ 28 d。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。

### 1.3 基于 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 扩增和序列测定按 Cui 等[12]使用的方法进行。根据测序结果，用 BLAST 搜索程序从 GenBank 等公共数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列。序列比对、相似性计算、进化距离矩阵估算、聚类分析、系统进化树的构建和系统进化树的拓扑结构稳定性分析评估参照文献[10]所用方法进行。

## 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，用显微观察法检查纯化情况，最终从本次采集的样品中分离到 126 株纯培养物。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 ~ 2.0 mol/LNaCl 的 SWA 和 HAA 培养基，菌落形成单位少，且菌落形态单一。

### 2.2 海葵相关细菌的类群多样性

通过菌落特征和显微形态观察，及耐盐实验等部分生理生化实验结果去重复，最终从 126 个分离菌株中选取 42 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。这 42 个分离菌株的 16S rRNA 基因序列提交 NCBI 进行注册，注册号为 EU583724 ~ EU583726 和 EU925597 ~ EU925639。用 Blast 搜索软件从 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等公共数据库中进行相似性搜索，调出相似性最高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列，并调出相关属有效发表种的典型菌株的有效序列，用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和系统进化树构建等系统发育分析，主要结果见图 1。

结果表明，42 个分离菌株属于细菌域的 3 个大的系统发育类群(Actinobacteria，Firmicutes，Gamma-Proteobacteria)、11 个科(Alteromonadaceae，Bacillaceae，Brevibacteriaceae，Dermabacteraceae，Halomonadaceae，Planococcaceae，Pseudoalteromonadaceae，Pseudonocardiaceae，Nocardiopsaceae，Staphylococcaceae，Vibrionaceae)、18 个属(*Alteromonas*，*Bacillus*，*Brachybacterium*，*Brevibacterium*，*Halobacillus*，*Halomonas*，*Nocardiopsis*，*Oceanobacillus*，*Piscibacillus*，*Planococcus*，*Pontibacillus*，*Pseudoalteromonas*，*Pseudonocardia*，*Salinicoccus*，*Salinivibrio*，*Staphylococcus*，*Vibrio*，*Virgibacillus*)。其中 Firmicutes 门菌株所占比例最大(17 株，40.5%)，其次是 Gamma-Proteobacteria 亚门(14 株，33.3%)和 Actinobacteria 门(11 株，26.2%)。

### 2.3 海葵相关细菌的物种与遗传多样性

在 18 个属中，按 16S rRNA 基因序列相似性小于 97%的菌株归为不同物种计[13]，42 个分离菌株可以归为 25 个物种。除了 JSM 073093、JSM 073118、JSM 073116、JSM 073088 与相关有效发表种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%外，其它分离菌株与其相关有效发表种典型菌株的序列相似

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

性在 94.8%～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之间存在较大的遗传差异。值得指出的是，42 个株菌中有 6 株的 16S rRNA 基因序列与相关有效发表种的典型菌株的序列存在较大差异(图 1 中黑体字体标注菌株)，可能各自代表了 6 个已知属的 6 个新物种。其中菌株 JSM 071004、JSM 072002 和 JSM 073097 经多相分类(polyphasic taxonomy)已经被确定其分别代表了 3 个属的新种，分别被命名为 *Bacillus neizhouensis*，*Pontibacillus litoralis* 和 *Nocardiopsis litoralis*。有关论文已经向 IJSEM(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*)投稿。另外菌株 JSM 071068、JSM 071073 和 JSM 073008 与其系统发育关系最密切的已知物种间存在较大差异，可能分别代表了 *Halobacillus*、*Piscibacillus* 和 *Alteromonas* 属的新种。这些菌株的多相分类工作正在进行中。

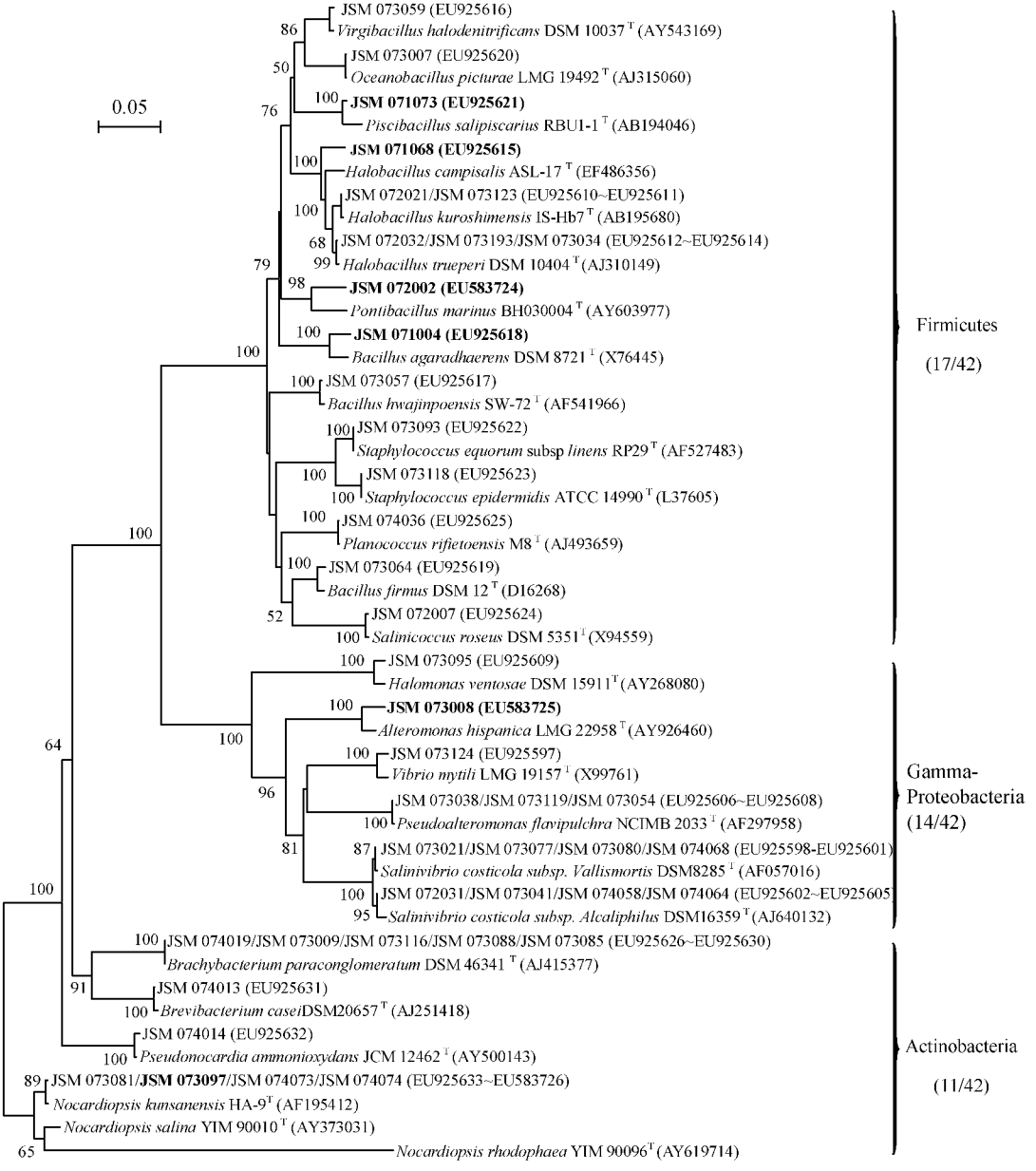



**图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的海葵相关可培养细菌的系统发育树**

Fig.1 Neighbor-Joining tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among strains isolated from a sea anemone and related taxa. Numbers at nodes indicate the bootstrap values (>50%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. Strains in bold type were potential novel species. Bar, 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

## 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海葵相关可培养细菌的多样性进行研究。用于系统发育分析的 42 个代表株菌归属于 3 个大的系统发育群、11 个科、18 个属，可以分为 25 个物种，其中至少有 6 株可能代表新种。而且，大部分分离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。这些结果揭示了海葵相关可培养微生物较丰富的多样性。

已有报道，在太平洋和大西洋海域中 Gamma-Proteobacteria 亚群是占优势的微生物类群[14]。Hentschel 等利用 16S rRNA 基因特异性探针对地中海海绵 *A. aerophoba* 进行杂交时，也发现 Gamma-Proteobacteria 类群的微生物在海绵组织中大量存在[15]。本文的结果表明 Gamma-Proteobacteria 亚群也是海葵中的优势微生物类群之一。此外，研究还表明，Alteromonadaceae，Bacillaceae，Dermabacteraceae，Pseudoalteromonadaceae，Staphylococcaceae 和 Vibrionaceae 科的菌株是海洋无脊椎动物相关细菌的常见类群[16-18]。本研究在海葵样品中均分离到了较多的这些类群的菌株，这些结果表明海葵相关的细菌类群组成与其它海洋无脊椎动物具有相似之处。

## 参考文献


[1] Jensen PR, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annual Reviews in Microbiology*, 1994, 48: 559 – 584.

[2] Juntongjin K. TTX and its derivatives originated from marine bacteria. *Journal of Marine Biotechnology*, 1993, 1: 93 – 96.

[3] Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (*Actiniaria*). *FEMS Microbiology and Immunology*, 1992, 5: 121 – 129.

[4] Kelso GJ, Blumenthal KM. Identification and character of novel sodium channel toxins from the sea anemone Anthepleura xanthogrammica. *Taxicon*, 1998, 36: 41 – 51.

[5] Minagawa S, Ishida M, Shimakura K, et al. Isolation and amino acid sequences of two kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura aff. xanthogrammica*. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B, Biochemistry & Molecular Biology)*, 1997, 118B: 381 – 386.

[6] 谢新强，林海鹏，阎冰，等. 海洋动物共附生微生物抗 B16 肿瘤细胞活性菌株的筛选. 中国海洋药物杂志 (*Chinese Journal of Marine Drugs*), 2006, 25: 26 – 30.

[7] 郑忠辉，陈连兴，黄耀坚，等. 厦门海区潮间带海洋动植物共附生微生物的抗菌活性. 台湾海峡 (*Journal of oceanography in taiwan strait*), 1998, 17: 439 – 444.

[8] 蒋亭，田黎，李果，等. 黄海葵附生真菌 *Penicillium thomii* 的化学成分. 药学学报 (*Acta Pharmaceutica Sinica*), 2002, 37: 271 – 274.

[9] Wang JT, Chou YJ, Chou JH, et al. *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 761 – 766.

[10] 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: 696 – 701.

[11] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces species*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16: 313 – 340.

[12] 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.

[13] 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 Bacteriology*, 1994, 44: 846 – 849.

[14] Osinga R, Armstrong E, Burgess JG, et al. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, 2001, 461: 55 – 62.

[15] 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.

[16] Jiang S, Sun W, Chen M, et al. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2007, 92: 405 – 416.

[17] Beleneva IA, Zhukova NV, Lan HL, et al. Taxonomic composition of bacteria associated with cultivated mollusks *Crassostrea lugubris* and *Perna viridis* and with the water of the Gulf of Nha Trang Lagoon, Vietnam. *Microbiology*, 2007, 76: 220 – 228.

[18] Guisande YA, Montes M, Farto R, et al. A set of tests for the phenotypic identifications of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusk production. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23: 599 – 609.


© 中国科学院微生物研究所 版权所有 http://journals.im.ac.cn

# Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with a sea anemone from coast of the Naozhou island in Zhanjiang, China

Huaidong Xiao[1], Yiguang Chen[1,2*], Zhuxiang Liu[1], Ke Huang[1], Wenjun Li[2], Xiaolong Cui[2], Li Zhang[1], Langbo Yi[1]
([1]Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization, Hunan Province, College of Biological Resource and Environment Science, Jishou University, Jishou 416000, China)
([2]The Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract**: **[Objective]** To understand the diversity of cultivable bacteria isolated from a sea anemone collected from the coastal water of the Naozhou island in the Leizhou Bay on South China Sea. **[Methods]** Bacteria were isolated from a sea anemone by using conventional culture-dependent method and investigated by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. **[Results]** We isolated 126 bacteria strains from the sample on marine agar 2216 (Difco), International *Streotomyces* Project medium 2 agar, nutrient agar, sea water agar and humic acid agar supplemented with 0-2 mol/L NaCl. Based on partial morphological, physiological and biochemical characteristics, we selected 42 strains for molecular systematic study based on 16S rRNA gene sequences. Our results showed that 42 isolates were members of eighteen genera (*Alteromonas*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Nocardiopsis*, *Oceanobacillus*, *Piscibacillus*, *Planococcus*, *Pontibacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudonocardia*, *Salinicoccus*, *Salinivibrio*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Virgibacillus*) of eleven families (Alteromonadaceae, Bacillaceae, Brevibacteriaceae, Dermabacteraceae, Halomonadaceae, Planococcaceae, Pseudoalteromonadaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiopsaceae, Staphylococcaceae, Vibrionaceae) in three major phylogenetic groups (Actinobacteria, Firmicutes, Gamma-Proteobacteria). The most abundant and diverse isolates were within the phylum Firmicutes (40.5%) and the subphylum Gamma-Proteobacteria (33.3%). The phylogenetic distance matrix results suggested that, out of 42 isolates, 37 were different strains of 19 known species, and that at least 6 strains represented 6 new species within 6 characterized genera. **[Conclusion]** The results presented above showed that there were abundant species diversity and phylogenetic diversity of bacteria isolated from the sea anemone.

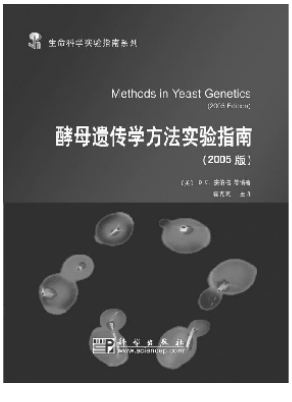
**Keywords**: sea anemone; cultivable bacteria; 16s rRNA gene; phylogenetic analysis; bacterial diversity

**(本文责编 张晓丽)**

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30460004, 30660004), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021306) and the Jishou University (jsdxkyzz200811, 07JDPHE148, 07JDPHE150, 07JDPHE151, 07JDPHE153)

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

Received: 1 August 2008/ Revised: 15 November 2008




## 科学出版社新书推介(2008-12)

**酵母遗传学方法实验指南(2005 版)(译)**
**(美)D.C.安伯格 等编著 霍克克 主译**
978-7-03-022605-1 ¥56.00 2008 年 12 月 出版
**内容简介** 本书作为冷泉港实验室出版社的经典酵母实验教程的第二版,收录了酵母研究中最常用的减数分裂作图、转化、基因置换等实验,以及酵母蛋白抽提、活体染色、RNA 分离等 28 种技术方法。文字简洁明了,内容全面而详细,兼顾经典和前沿,是该领域的权威之作。

适合于大学院校、科研单位的教师、学生及研究人员作为实验指导书,亦可供从事酵母相关生物制品行业的科技人员参考。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn