

南海硃洲岛潮汐带栉江珧可培养细菌的系统发育多样性

刘荷¹ 朱泓溢¹ 肖建青^{1,3} 刘祝祥¹ 程金莲¹ 贺建武¹ 李文均² 陈义光^{1*}

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院 湖南 吉首 416000)

(2. 云南大学省微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室 云南 昆明 650091)

(3. 酒鬼酒股份有限公司 湖南 吉首 416000)

摘要:【目的】研究南海硃洲岛潮汐带栉江珧(*Atrina pectinata*)样品相关可培养细菌的多样性。

【方法】采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 法对样品中可培养细菌(含放线菌)的类群多样性、物种多样性和遗传多样性进行研究。【结果】用补充 0–25% (质量体积比) NaCl 的 MA、MH 和 NA 培养基从栉江珧样品中分离到 125 株细菌。在形态观察和部分生理生化实验结果的基础上去冗余, 选取 90 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 90 个分离菌株分属于 3 个大的系统发育类群(Gamma-proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria)、6 个科、10 个属, 可分为 33 个物种。优势类群为厚壁菌门(Firmicutes) (56 株, 62.2%) 和 γ -变形杆菌亚门(Gamma-proteobacteria) (31 株, 34.5%)。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 95.7%–99.9%), 其中有 5 株可能代表新的分类单元(Potential new taxa)。分析表明, 菌株 JSM 112024 可能代表了盐单胞菌科(Halomonadaceae)的一个属一级新分类单元; 菌株 JSM 112019、JSM 114045、JSM 114058 和 JSM 114083 可能分别代表盐弧菌属(*Salinivibrio*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)和枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)的新物种。【结论】湛江硃洲岛潮汐带栉江珧中存在较为丰富的可培养细菌物种多样性和系统发育多样性, 并潜藏着较多的新微生物类群(物种)。

关键词: 南海, 栉江珧, 可培养细菌, 16S rRNA 基因, 系统发育分析, 生物多样性

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970007, 31460004); 国家 973 计划项目(No. 2010CB833800); 湖南省重点学科建设项目(No. JSU071312Z01); 湖南省高校科技创新团队支持计划(No. 201208Z01)

*通讯作者: Tel: 86-743-8564416; Fax: 86-743-8560620; ✉: mchenjsu@aliyun.com

收稿日期: 2014-02-19; 接收日期: 2014-05-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-15

Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with *Atrina pectinata* collected from the tidal flat of Naozhou Island in the South China Sea

LIU He¹ ZHU Hong-Yi¹ XIAO Jian-Qing^{1,3} LIU Zhu-Xiang¹ CHENG Jin-Lian¹
HE Jian-Wu¹ LI Wen-Jun² CHEN Yi-Guang^{1*}

- (1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)
(2. Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)
(3. Jiugui Liquor Co. Ltd., Jishou, Hunan 416000, China)

Abstract: [Objective] To understand the diversity of cultivable bacteria associated with *Atrina pectinata* collected from the tidal flat of Naozhou Island (20°52'–20°56' N, 110°33'–110°38' E) in the South China Sea. [Methods] Bacteria strains were isolated from homogenates of the sample by using the conventional culture-dependent method and then investigated by using phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequence comparisons. [Results] We isolated 125 bacteria strains from the sample on MA (marine agar), MH (moderate halophilic medium agar) and NA (nutrient agar) supplemented with 0–25% (W/V) NaCl. Based on partial morphological, physiological and biochemical characteristics, out of them, 90 strains were selected and subjected to a molecular systematic study based on 16S rRNA gene sequences. The results showed that the 90 isolates were members of 10 genera (*Marinobacter*, *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Salinivibrio*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*) of 6 families (Alteromonadaceae, Halomonadaceae, Vibrionaceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae, Micrococcaceae) in 3 phylogenetic groups (Gamma-proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria). The most abundant and diverse isolates were within the phylum Firmicutes (56 strains, 62.2%) and the subphylum Gamma-proteobacteria (31 strains, 34.5%). The results of phylogenetic analyses suggested that there were obvious genetic divergences between most isolates and their closest related type strains (16S rRNA gene sequence similarities ranging from 95.7%–99.9%). The results also showed that, out of the 90 isolates, at least 5 JSM strains (112019, 112024, 114045, 114058, 114083) should represent potential new taxa. Strain JSM 112024 could represent a novel genus in the family *Halomonadaceae*, and strains JSM 112019, JSM 114045, JSM 114058 and JSM 114083 could represent four novel species with in 4 characterized genera *Salinivibrio*, *Bacillus*, *Halomonas* and *Virgibacillus*, respectively. [Conclusion] There are abundant bacterial species diversity and phylogenetic diversity in the *Atrina pectinata*.

Keywords: The South China Sea, *Atrina pectinata*, Cultivable bacteria, 16S rRNA gene, Phylogenetic analysis, Biodiversity

海洋微生物多样性研究有助于我们掌握该类生物资源的分布特征及其在整个海洋生态系统中的功能与作用,是保护和利用该类微生物资源的基础^[1]。海洋无脊椎动物的体表和体内存在大量独特的相关的共生(或附生)微生物(以下称相关微生物),其中一些相关微生物可能是某些海洋动物活性产物的真正生产者^[2]。中国南海是世界上第三大陆缘海,海洋微生物资源相当丰富。近年来本实验室在国家基金资助下,对南海雷州湾海域的硇洲岛

(20°52'–20°56'N, 110°33'–110°38'E)的多种生境(土壤、海水、潮汐带沉积物和部分无脊椎动物)中的部分微生物资源进行了研究,分离了较多的菌株^[3-5],发现有些菌株能产生抗菌活性物质^[6-7],并且多数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16S rRNA基因序列都有一定的差异,说明这些分离菌株具有较丰富的生物多样性,且蕴藏着较多新的微生物类群(物种)^[8-15]。栉江珧(*Atrina pectinata*)隶属于软体动物门(Mollusca)

瓣鳃纲(Lamellibranchia)贻贝目(Mytiloida)江珧科(Pinnidae)江珧属(*Atrina*)^[16], 营养价值较高, 是名贵的海产珍品。迄今为止, 有关栉江珧的研究多集中于形态学、资源生态学以及繁殖生物学领域^[17], 而其相关微生物研究未见文献报道。本文报道了基于纯培养法和 16S rRNA 基因序列的系统发育分析法对栉江珧中可培养细菌(含放线菌)的生物多样性的研究结果, 为进一步研究和利用南海无脊椎动物相关微生物资源提供实验依据和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂: PCR 仪购自 Bio-Rad 公司(PE 29600); 显微镜购自 Leica 公司(DM 3000)。引物由上海生工生物工程有限责任公司合成; 用于 DNA 提取及 16S rRNA 基因扩增的酶、试剂和仪器同文献[18]。

1.1.2 培养基(g/L): (1) MA 培养基(Marine agar 2216): NaCl 19.5, MgCl₂ 5.9, Na₂SO₄ 3.2, CaCl₂ 1.9, 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 复合盐 A 液 20 mL, 复合盐 B 液 1 mL, 琼脂 20.0, 去离子水 1 L, pH 7.5–7.8。复合盐 A 液: KCl 27.5, Na₂CO₃ 8.0, 柠檬酸铁 5.0, 去离子水 1 L; 复合盐 B 液: SrCl 34.0, KBr 80.0, H₃BO₃ 22.0, Na₂SiO₃ 4.0, (NH₄)₂SO₄ 1.6, Na₂HPO₄ 8.0, 去离子水 1 L。(2) 中度嗜盐培养基(Moderate halophilic medium agar, MH)^[19]: MgCl₂ 7.0, NaCl 81.0, MgSO₄ 9.6, KCl 2.0, CaCl₂ 0.36, NaHCO₃ 0.06, NaBr 0.026, 蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 葡萄糖 1.0, 琼脂 20.0, 去离子水 1 L, pH 7.5–7.8。(3) 营养琼脂(Nutrient agar, NA): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, 去离子水 1 L, pH 7.5。各培养基在用于分离和耐盐实验时, 添加的 NaCl 含量根据实验需要变化; 用于分离的培养基中添加 0.1 g/L 制霉菌素抑制真菌生长。

1.2 样品采集和菌株分离

1.2.1 样品来源及处理: 健康栉江珧样品于 2011 年 7 月采自我国广东省湛江市硇洲岛潮汐带, 按照

无菌操作要求, 于 48 h 内带回实验室进行处理。在超净工作台中用无菌海水将栉江珧样品表面洗净, 充分剪碎研匀后, 取 10 g 样品匀浆置于盛有含 3.4% (质量体积比) NaCl 的 90 mL 灭菌盐水和适量玻璃珠的三角瓶中, 在 150 r/min、10 °C 条件下振荡 30 min, 制成样品匀浆悬浊液, 再用两层纱布过滤, 滤液经 10 倍梯度稀释后用于分离菌株。

1.2.2 菌株分离及培养: 以 MA、MH 和 NA 作为分离基础培养基, 配制含 NaCl 为 0、5%、10%、15%、20% 和 25% (质量体积比) 的系列含盐平板。取 0.2 mL 一定浓度的样品匀浆稀释液涂布平板, 于 28 °C 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(4–5 次), 进行革兰氏染色后用光学显微镜检查纯度。所得纯培养物制成斜面、甘油管和冻干牛奶管保藏备用。

1.3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析

细菌基因组 DNA 提取、16S rRNA 基因 PCR 扩增、PCR 产物纯化和序列测定按 Cui 等^[20]使用的方法进行。采用细菌通用引物测序, 正向引物为 PA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 对应于 *Escherichia coli* 的 8–27f; 反向引物为 PB: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 对应于 *E. coli* 的 1523–1504r。先用正向引物测一个反应用于系统发育多样性分析; 对于初步判断为新分类单元(Potential new taxa)的代表性菌株, 进一步用反向引物测序, 拼接后深入分析物种的系统发育地位。得到的序列提交到公共数据库 GenBank 注册, 获得序列号(Accession number)。在 NCBI 和 EzTaxon-e server^[21]提供的公共数据库中进行序列同源性搜索, 调出相似性高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 ClustalX 进行多序列比对^[22]; 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型计算核苷酸差异值^[23], 采用 MEGA 4.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) 软件包中的邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析和构建系统进化树^[24], 重复计算 1 000 次进行自展值(Bootstrap value)

分析来评估系统发育树的拓扑结构稳定性^[25]。

1.4 生物学特征

用添加不同浓度 NaCl (0、5%、10%、15%、20%和 25%, 质量体积比)的 MA、MH 和 NA 琼脂平板进行菌株的 NaCl 耐受性;形态特征和生理生化特征实验参照文献^[26]所用方法进行。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

经过分离纯化,从本次采集的栉江珧样品中分离得到 125 株纯培养物。从不同培养基分离效果来看,以添加 5%–10% (质量体积比) NaCl 的 MA 和 MH 培养基分离到的菌落形成单位较高、菌落形态较丰富;而添加 15%–25% (质量体积比) NaCl 的各种培养基菌落形成单位较少,且菌落形态单一。

2.2 类群多样性

综合分析菌落形态、显微形态、耐盐实验及部分生理生化实验结果,去除部分冗余菌株,最终从 125 个分离菌株中选取 90 个代表性菌株,用正向引物 PA 测定 16S rRNA 基因前段序列,截取前 800 bp 左右用于系统发育多样性分析。这 90 个代表性菌株的 16S rRNA 基因部分序列提交 GenBank 注册,获得序列号依次为 JX220727–JX220816

(表 1)。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析的结果表明,90 个分离菌株分属于细菌域的 3 个大的系统发育类群(门或亚门)(Gamma-proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria)、6 个科 (Alteromonadaceae、Halomonadaceae、Vibrionaceae、Bacillaceae、Staphylococcaceae、Micrococcaceae)、10 个属 (*Marinobacter*、*Chromohalobacter*、*Halomonas*、*Salinivibrio*、*Vibrio*、*Bacillus*、*Halobacillus*、*Virgibacillus*、*Staphylococcus*、*Micrococcus*) (表 1)。其中厚壁菌门(Firmicutes)菌株占优势(56 株,62.2%),其次是 γ -变形杆菌亚门(Gamma-proteobacteria)(31 株,34.5%)。只分离到少量放线菌门(Actinobacteria)菌株(3 株,3.3%)。

2.3 物种多样性和遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97%的菌株归于同一物种计^[27],90 个分离菌株可以归为 33 个物种(表 1)。除了 22 株与相关有效发表种典型菌株的 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性在 95.7%–99.9%之间(表 1),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一定的遗传差异。

表 1 栉江珧可培养细菌与其关系最密切的典型菌株间的系统发育关系
Table 1 Phylogenetically closest neighbors of bacteria isolated from *Atrina pectinata* based on 16S rRNA gene sequence analysis

Phylum/Family	Strain (accession number)	Closest type strain (accession number)	Similarity (%)
Gamma-proteobacteria (31/90) Alteromonadaceae (3)	JSM 112006 (JX220727)	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303 ^T (AB019148)	99.5
	JSM 112005 (JX220728)	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T (EF028328)	100
	JSM 114008 (JX220729)	<i>Marinobacter salsuginis</i> SD-14B ^T (EF028328)	100
Halomonadaceae (13)	JSM 112024 (JX220730)	<i>Chromohalobacter israelensis</i> ATCC 43985 ^T (AJ295144)	95.7
	JSM 114058 (JX220731)	<i>Halomonas gudaonensis</i> SL014B-69 ^T (DQ421808)	98.9
	JSM 112016 (JX220732)	<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 ^T (AM941744)	99.4
	JSM 112023 (JX220733)	<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 ^T (AM941744)	99.4

(待续)

		(续表)	
	JSM 114095 (JX220734)	<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 ^T (AM941744)	99.4
	JSM 112009 (JX220735)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.6
	JSM 114021 (JX220736)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.5
	JSM 114028 (JX220737)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.2
	JSM 114051 (JX220738)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.5
	JSM 114062 (JX220739)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.6
	JSM 114067 (JX220740)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.5
	JSM 114078 (JX220741)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.5
Vibrionaceae (15)	JSM 114089 (JX220742)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.6
	JSM 112021 (JX220743)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 16359 ^T (AJ640132)	98.9
	JSM 114005 (JX220744)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	99.0
	JSM 114016 (JX220745)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	99.3
	JSM 114040 (JX220746)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	98.9
	JSM 114049 (JX220747)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	99.0
	JSM 114076 (JX220748)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	98.8
	JSM 114081 (JX220749)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	98.8
	JSM 114085 (JX220750)	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>vallismortis</i> DSM 8285 ^T (AF057016)	98.8
	JSM 114011 (JX220751)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	98.9
	JSM 114060 (JX220752)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	98.7
	JSM 114074 (JX220753)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	98.2
	JSM 114082 (JX220754)	<i>Salinivibrio proteolyticus</i> AF-2004 ^T (DQ092443)	98.7
	JSM 112019 (JX220755)	<i>Salinivibrio sharmensis</i> BAG ^T (AM279734)	98.8
	Firmicutes (56/90) Bacillaceae (16)	JSM 114037 (JX220756)	<i>Vibrio diabolicus</i> HE800 ^T (X99762)
JSM 114001 (JX220757)		<i>Vibrio nereis</i> ATCC 25917 ^T (X74716)	99.8
JSM 114080 (JX220758)		<i>Bacillus butanolivorans</i> K9 ^T (EF206294)	99.7
JSM 114006 (JX220759)		<i>Bacillus cibi</i> JG-30 ^T (AY550276)	100
JSM 114002 (JX220760)		<i>Bacillus herbersteinensis</i> D-1-5a ^T (AJ781029)	99.7
JSM 114041 (JX220761)		<i>Bacillus idriensis</i> SMC 4352-2 ^T (AY904033)	99.8
JSM 114045 (JX220762)		<i>Bacillus litoralis</i> SW-211 ^T (AY608605)	98.8

(待续)

			(续表)
	JSM 112008 (JX220763)	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 ^T (AY351395)	99.6
	JSM 112004 (JX220764)	<i>Halobacillus faecis</i> IGA7-4 ^T (AB243865)	99.9
	JSM 112007 (JX220765)	<i>Halobacillus faecis</i> IGA7-4 ^T (AB243865)	99.5
	JSM 112010 (JX220766)	<i>Halobacillus faecis</i> IGA7-4 ^T (AB243865)	99.9
	JSM 112011 (JX220767)	<i>Halobacillus faecis</i> IGA7-4 ^T (AB243865)	99.9
	JSM 112026 (JX220768)	<i>Halobacillus faecis</i> IGA7-4 ^T (AB243865)	99.9
	JSM 112003 (JX220769)	<i>Halobacillus faecis</i> IGA7-4 ^T (AB243865)	100
	JSM 114042 (JX220770)	<i>Virgibacillus halophilus</i> 5B73C ^T (AB243851)	99.7
	JSM 114083 (JX220771)	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> DSM 10037 ^T (AY543169)	97.6
	JSM 114015 (JX220772)	<i>Virgibacillus kekensis</i> YIM-kkny16 ^T (AY121439)	100
Staphylococcaceae (40)	JSM 114003 (JX220773)	<i>Virgibacillus salinus</i> XH-22 ^T (FM205010)	99.7
	JSM 114010 (JX220774)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	100
	JSM 114012 (JX220775)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114013 (JX220776)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114018 (JX220777)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114022 (JX220778)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.8
	JSM 114023 (JX220779)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.8
	JSM 114024 (JX220780)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114027 (JX220781)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114039 (JX220782)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114047 (JX220783)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114050 (JX220784)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114052 (JX220785)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114055 (JX220786)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114069 (JX220787)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114075 (JX220788)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 114084 (JX220789)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
JSM 114090 (JX220790)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9	
			(待续)

		(续表)	
	JSM 114093 (JX220791)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.9
	JSM 112017 (JX220792)	<i>Staphylococcus equorum</i> ATCC 43958 ^T (AB009939)	99.9
	JSM 114044 (JX220793)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T (L37605)	100
	JSM 114009 (JX220794)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 843 ^T (AB233327)	100
	JSM 114057 (JX220795)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 1227 ^T (AB233331)	99.9
	JSM 114061 (JX220796)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> GTC 15305 ^T (AP008934)	99.9
	JSM 114048 (JX220797)	<i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>succinus</i> AMG-D1 ^T (AF004220)	99.9
	JSM 114073 (JX220798)	<i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>succinus</i> AMG-D1 ^T (AF004220)	100
	JSM 114054 (JX220799)	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM 20345 ^T (AJ421446)	100
	JSM 114056 (JX220800)	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM 20345 ^T (AJ421446)	99.8
	JSM 114007 (JX220801)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114017 (JX220802)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114026 (JX220803)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	99.7
	JSM 114038 (JX220804)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114053 (JX220805)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114064 (JX220806)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114068 (JX220807)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	99.8
	JSM 114077 (JX220808)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114079 (JX220809)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114086 (JX220810)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114087 (JX220811)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114091 (JX220812)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
	JSM 114092 (JX220813)	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T (D83374)	100
Actinobacteria (3/90)			
Micrococcaceae (3)	JSM 112001 (JX220814)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (FJ214355)	99.7
	JSM 112015 (JX220815)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (FJ214355)	100
	JSM 113003 (JX220816)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (FJ214355)	99.8

Note: Strains marked in bold refer to potential new taxa.

在 90 株分离菌株中,有 5 株(JSM 112019、JSM 112024、JSM 114045、JSM 114058 和 JSM 114083)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 中字体加粗标注的菌株),且在表型特征上与其相关的典型菌株存在较大差异(结果另文发表),可能代表新的分类单元。进一步用反向引物 PB 对这些菌株进行序列测定,与用 PA 测定的前段拼接成 16S rRNA 基因全序列(序列号依次为 KJ685884–KJ685888),再进行详细的系统发育分析。结果表明,菌株 JSM 112024 的 16S rRNA 基因序列与已知物种的典型菌株差异较大,最近的是色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)的 *Chromohalobacter israelensis* ATCC 43985^T (95.7%),但菌株 JSM 112024 在系统进化树上与该属菌株没有聚在一起,而是在库什纳氏属(*Kushneria*)的外围形成一个独立的进化分支(图 1A)。这些结果提示,菌株 JSM 112024 可能代表盐单胞菌科(Halomonadaceae)的一个新属。菌株 JSM 112019、JSM 114045、JSM 114058 和 JSM 114083 分别与 *Salinivibrio sharmensis* BAG^T、*Bacillus litoralis* SW-211^T、*Halomonas gudaonensis* SL014B-69^T和 *Virgibacillus halodenitrificans* DSM 10037^T 系统发育关系最密切,它们之间的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 98.9%、98.6%、98.8%和 97.6%。虽然这 4 个菌株与其系统发育关系最密切的典型菌株的序列相似性高于 97%,但是它们在表型特征上与各自相关的典型菌株存在较大差异(结果另文发表),且在系统进化树上各自形成独立亚分支(图 1B),所以可能分别代表盐弧菌属(*Salinivibrio*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)和枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)的新种。当然,最终确定这些菌株的分类地位,还需要结合形态特征、生理生化特征和化学分类特征,以及它们与相应典型菌株基因组间的 DNA-DNA 杂交结果进行综合分析。

3 讨论

本研究采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析法对栉江珧相关可培养细菌的多样性进行了研究。用于系统发育分析的 90 个代表菌株归属于 3 个大的系统发育群、6 个科、10 个属,可以分为 33 个物种;大部分分离菌株与其系统发育关系最密切的菌株之间的 16S rRNA 基因序列有一定差异,其中有 5 株代表潜在的新分类单元(Potential new taxa)。这些结果揭示了栉江珧样品中存在较丰富的细菌多样性。

本实验室已经报道了硇洲岛潮汐带海葵、海胆和牡蛎相关可培养细菌多样性的研究结果^[3-5]。通过比较分析,这 4 种样品中细菌分布有各自的特点。栉江珧与海胆、海葵相关可培养细菌的类群多样性较为相似,都存在 3 个大系统发育类群菌株(Gamma-proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria),其中厚壁菌门(Firmicutes)为优势类群(菌株比例分别为 62.2%、50.8%和 40.5%);这 3 类样品中相关细菌也存在一定的类群差异分布,如栉江珧和海葵样品中第二大细菌类群是 γ -变形杆菌亚门(Gamma-proteobacteria)(34.5%),而海胆样品则为 Actinobacteria 门(26.5%)。牡蛎样品中优势细菌类群为变形杆菌门(Proteobacteria)(52 株,68.9%),且牡蛎样品相关细菌类群多样性相对较高,如分离到一定比例的拟杆菌门(Bacteroidetes)和 α -变形杆菌亚门(Alpha-proteobacteria)菌株^[5]。从科的分布看,微球菌科(Micrococcaceae)菌株只有在栉江珧样品中才分离到,盐单胞菌科(Halomonadaceae)和 Alteromonadaceae 科在栉江珧、海葵和牡蛎样品中出现,而弧菌科(Vibrionaceae)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)和葡萄球菌科(Staphylococcaceae)在所有样品中都分离到。从属的分布看,从栉江珧样品中分离到 2 个特有分布属(*Chromohalobacter* 和 *Micrococcus*),从海葵中分离到 4 个特有属(*Alteromonas*、*Oceanobacillus*、*Piscibacillus*、*Pseudonocardia*),从海胆样品中分离到 5 个特

有属(*Jeotgalibacillus*、*Jeotgalicoccus*、*Serratia*、*Sporosarcina*、*Streptomyces*)，而在牡蛎中分离到多达 11 个特有属(*Idiomarina*、*Morganella*、*Proteus*、*Paracoccus*、*Wohlfahrtiimonas*、*Shewanella*、*Oceanimonas*、*Nitratireductor*、*Myroides*、

Enterococcus、*Trichococcus*)。

本室在前期对海葵和海胆的共附生原核生物分离实验中，为了尽可能多地分离到具有不同营养需求的微生物类群，采用了较多种类的培养基(MA、ISP 2、NA、SWA、HAA)为基础培养基，

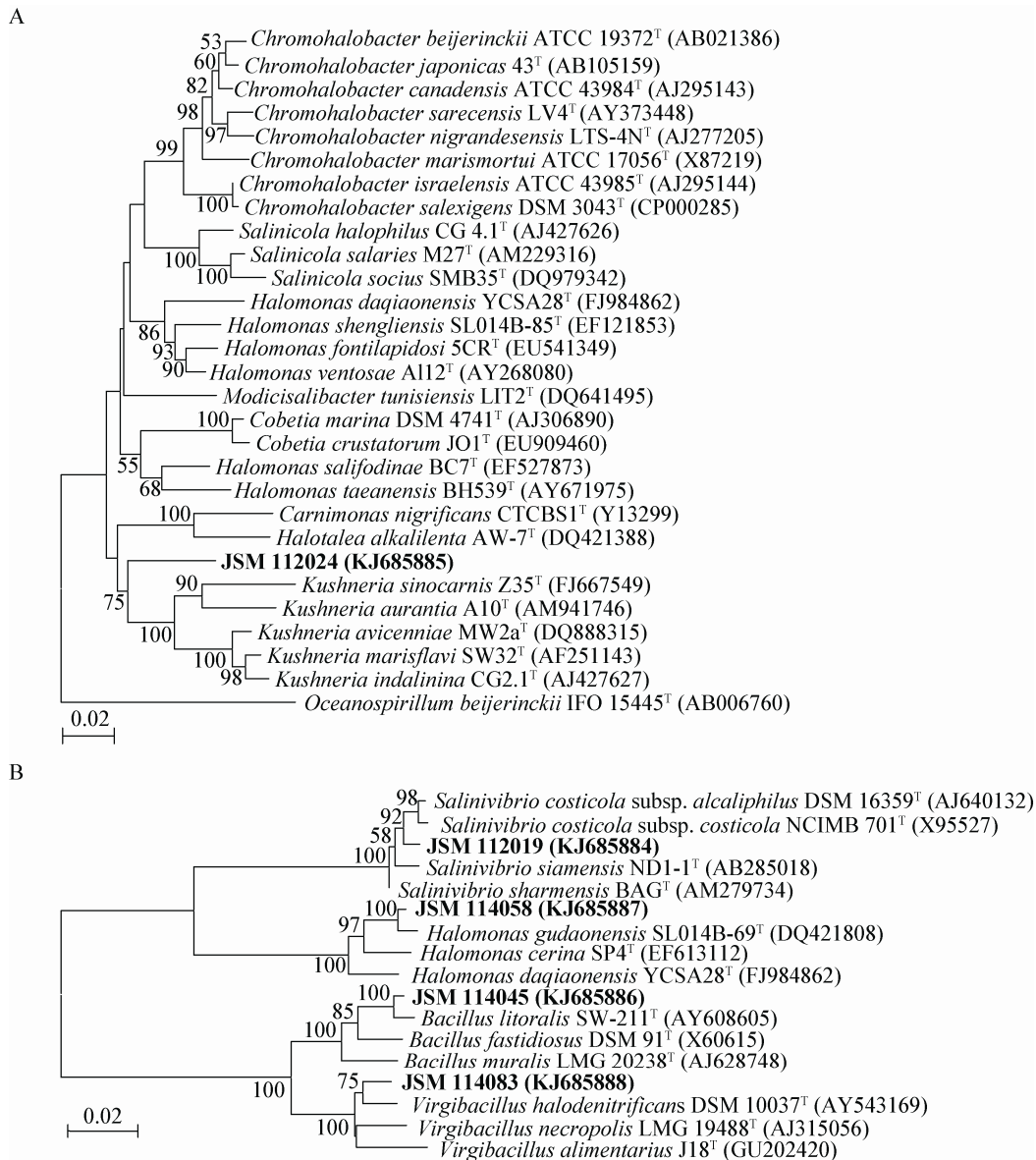


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的栉江珧相关可培养细菌中部分潜在新类群的系统发育树

Figure 1 Neighbor-Joining tree derived from the 16S rRNA gene sequences of some isolates (potential new taxa) from *Atrina pectinata* and their closely related taxa

注：节点处的数值是基于邻接法分析 1 000 次的自展值，只有高于 50% 的在图中显示；标尺表示每 100 个碱基位点 2 个变异。

Note: Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) based on a Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled datasets; Bar: 2 substitution per 100 nucleotides.

其中包括适合于放线菌生长的链霉菌计划 2#培养基(ISP 2)和腐殖酸培养基(HAA), 以及寡营养培养基海水琼脂(SWA)^[3-4]。但分离结果表明, 其中的 ISP 2、HAA 和 SWA 的分离效果不理想, 菌落形成单位少, 且菌落形态单一^[3-4]。基于这些分离结果, 后来在进行牡蛎^[5]和栉江珧的相关微生物分离时, 保留了分离效果较好的 MA 和 NA 培养基作为基础培养基继续使用, 并为了分离到更多的中度嗜盐菌, 增加了常用的中度嗜盐培养基(MH)^[19]为基础培养基之一, 取得了较好的分离效果。当然, 为了尽可能多地分离样品中的微生物, 反映可培养生物多样性的真实情况, 培养基和培养条件的设计一直是一个值得不断探讨的主要课题^[28-30]。

原核生物的 16S RNA 基因因为其广泛可比性(所有原核生物)、大小适中(约 1 500 bp)、进化缓慢但又有足够的变异(存在 9 个高可变区), 包含较丰富的进化信息量, 足以用于多样性和系统发育分析, 可以用于各级分类单元分析。自从 Woese 等^[31-32]把该基因序列用于原核生物系统发育关系分析以来, 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析方法已经成为原核生物多样性和系统分类学研究的标准方法之一^[27]。本课题组和其他研究人员近期把该方法用于不同环境细菌(含放线菌)的多样性研究, 取得了较好的研究结果^[3-5, 33-34]。然而, 随着研究的深入, 发现因为各类群生物单个基因组中不同的 16S rRNA 基因多拷贝数及其异质性特征等因素, 可能导致在不同类群原核生物的多样性和系统发育关系研究中造成多样性高估或系统发育关系分析偏差^[35-36]。因此, 进一步完善基于 16S rRNA 基因序列的分析方法, 并尝试把其他生物大分子信息和全基因组信息应用于系统发育关系研究, 对于更加准确地了解原核生物的多样性是很有必要的。

参 考 文 献

- [1] 李艳华, 张利平. 海洋微生物资源的开发与利用[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 113-114.
- [2] Jensen PR, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1994, 48(5): 559-584.
- [3] 肖怀东, 陈义光, 刘祝祥, 等. 湛江涠洲岛海葵相关可培养细菌系统发育多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 246-250.
- [4] 黄苛, 张丽, 刘祝祥, 等. 涠洲岛海胆可培养细菌的多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(11): 1424-1429.
- [5] 肖建青, 朱泓溢, 刘祝祥, 等. 涠洲岛潮汐带牡蛎相关可培养细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 939-950.
- [6] 黄苛, 刘祝祥, 陈奇辉, 等. 海胆相关菌株抗菌活性筛选及其生物学特性[J]. 海洋科学, 2011, 35(8): 25-31.
- [7] 刘祝祥, 黄苛, 肖怀东, 等. 黄海葵相关细菌抗菌活性菌株的筛选及其初步分类鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(6): 416-420.
- [8] Chen YG, Tang SK, Zhang YQ, et al. *Arthrobacter halodurans* sp. nov., a new halotolerant bacterium isolated from sea water[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, 96(1): 63-70.
- [9] Chen YG, Liu ZX, Zhang YQ, et al. *Halobacillus naozhouensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a sea anemone[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, 96(1): 99-107.
- [10] Chen YG, Xiao HD, Tang SK, et al. *Alteromonas halophila* sp. nov., a new moderately halophilic bacterium isolated from a sea anemone[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, 96(3): 259-266.
- [11] Chen YG, Zhang YQ, Shi JX, et al. *Jeotgalicoccus marinus* sp. nov., a marine bacterium isolated from a sea urchin[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1625-1629.
- [12] Chen YG, Wang YX, Zhang YQ, et al. *Nocardiopsis litoralis* sp. nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(11): 2708-2713.
- [13] Chen YG, Zhang YQ, Wang YX, et al. *Bacillus neizhouensis* sp. nov., a halophilic marine bacterium isolated from a sea anemone[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(12): 3035-3039.
- [14] Chen YG, Zhang YQ, He JW, et al. *Bacillus hemicentroti* sp. nov., a moderate halophile isolated from a sea urchin[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(12): 2950-2955.
- [15] Liu ZX, Chen J, Tang SK, et al. *Jeotgalicoccus nanhaiensis* sp. nov., isolated from intertidal sediment, and emended description of the genus *Jeotgalicoccus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(9): 2029-2034.
- [16] 梁象秋, 方纪祖, 杨和荃. 水生生物学(形态与分类)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [17] 任建峰, 杨爱国. 栉江珧研究现状及开发利用前景[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 84-88.

- [18] 陈义光, 李文均, 崔晓龙, 等. 具抗肿瘤活性放线菌菌株 YIM90022的分离和系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 696-701.
- [19] Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-Valera F, et al. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(9): 1959-1968.
- [20] Cui XL, Mao PH, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(2): 357-363.
- [21] Kim OS, Cho YJ, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 716-721.
- [22] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24(4): 4876-4882.
- [23] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [24] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [25] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-398.
- [27] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849.
- [28] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [29] Zinder SH. The future for culturing environmental organism: a golden era ahead?[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(1): 14-15.
- [30] Miteva VI, Sheridan PP, Brenchley JE. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 202-213.
- [31] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiological Reviews, 1987, 51(2): 221-271.
- [32] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [33] 张敬, 何伟宏, 唐蜀昆, 等. 云南干热环境可培养高温放线菌多样性及产纤维素酶活性评价[J]. 微生物学报, 2013, 40(6): 1109-1120.
- [34] 刘玉娟, 田新朋, 黄小芳, 等. 中国南海沉积环境可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2014, 41(4): 661-673.
- [35] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969.
- [36] Wright ADG. Phylogenetic relationships within the order *Halobacteriales* inferred from 16S rRNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(6): 1223-1227.