

硃洲岛潮汐带牡蛎相关可培养细菌多样性

肖建青¹ 朱泓溢¹ 刘祝祥¹ 刘荷¹ 贺建武¹ 李洪军¹
钟小娟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)

摘要: 【目的】了解南海硃洲岛潮汐带香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)相关可培养细菌的多样性。【方法】应用纯培养法分离样品中的细菌(含放线菌),采用基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析方法研究这些分离菌株的生物多样性。【结果】用补充 0–25% (*W/V*) NaCl 的 MA、MH 和 NA 培养基从样品中分离到 102 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 74 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析。结果表明,这些菌株归为 38 个物种,属于 4 个大的系统发育类群 (*Gamma-Proteobacteria*, *Alpha-Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*) 的 16 个科、18 个属。大多数菌株属于 *Gamma-Proteobacteria* 亚门(45 株, 60.8%), 其余依次是 *Firmicutes* 门(12 株, 16.2%)、*Bacteroidetes* 门(11 株, 14.9%)和 *Alpha-Proteobacteria* 亚门(6 株, 8.1%)。大多数菌株与其系统发育关系最密切的有效发表种典型菌株之间(16S rRNA 基因序列相似性为 94.3%–99.8%)存在一定的遗传差异,其中 JSM 111069 可能代表 *Carnobacteriaceae* 科的潜在新属; 菌株 JSM 111039 和 JSM 111085 可能分别代表 *Bacillus* 属的两个新物种, 菌株 JSM 111020、JSM 111072 和 JSM 111090 可能分别代表 *Pseudoalteromonas*、*Proteus* 和 *Idiomarina* 属的新物种。【结论】南海硃洲岛潮汐带牡蛎中存在较为丰富的原核生物多样性,并潜藏着一定数量的微生物新类群(物种)。

关键词: 南海, 香港巨牡蛎, 纯培养法, 16S rRNA 基因, 系统发育分析, 细菌多样性

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970007); 国家重点基础研究发展计划项目(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项目(No. 201208Z01); 吉首大学项目(No. 11JDY060)

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

收稿日期: 2012-07-28; 接受日期: 2012-11-02

Biodiversity of culturable bacteria associated with *Crassostrea hongkongensis* from the tidal flat of Naozhou Island in the South China Sea

XIAO Jian-Qing¹ ZHU Hong-Yi¹ LIU Zhu-Xiang¹ LIU He¹ HE Jian-Wu¹
LI Hong-Jun¹ ZHONG Xiao-Juan¹ 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 and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: [Objective] To investigate the diversity of cultivable bacteria isolated from *Crassostrea hongkongensis* 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 conventional culture-dependent method, and then the isolated strains were investigated by using a phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences. [Results] We isolated 102 bacteria strains from the sample on a number of media [MA (marine agar 2216), MH (moderate halophilic medium agar), NA (nutrient agar)] supplemented with 0–25% (W/V) NaCl. On the basis of the results of some morphological, physiological and biochemical tests, we selected 74 strains to perform a further phylogenetic analysis. Our results showed that the 74 isolates represented 38 species, belonging to 18 genera (*Idiomarina*, *Morganella*, *Proteus*, *Halomonas*, *Paracoccus*, *Wohlfahrtiimonas*, *Marinobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Oceanimonas*, *Nitratireductor*, *Myroides*, *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Trichococcus*) of 16 families (Idiomarinaceae, Enterobacteriaceae, Halomonadaceae, Rhodobacteraceae, Xanthomonadaceae, Alteromonadaceae, Vibrionaceae, Pseudoalteromonadaceae, Shewanellaceae, Aeromonadaceae, Phyllobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterococcaceae, Carnobacteriaceae) in 4 phylogenetic groups (Gamma-Proteobacteria, Alpha-Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes). The most of isolates were within the subphylum Gamma-Proteobacteria (45 strains, 60.8%), followed by Firmicutes (12 strains, 16.2%), Bacteroidetes (11 strains, 14.9%) and Alpha-Proteobacteria (6 strains, 8.1%). The phylogenetic analysis results suggested that there were obvious genetic divergences between most isolates and their closest type strains (16S rRNA gene sequence similarities ranged from 94.3% to 99.8%). The results also showed that, out of the 74 isolates, at least 6 strains could represent potential new taxa. Strain JSM 111069 could represent a novel genus in the family Carnobacteriaceae. Strains JSM 111039 and JSM 111085 could represent two novel species of the genus *Bacillus*, and strains JSM 111020, JSM 111072 and JSM 111090 could represent three novel species within three characterized genera *Pseudoalteromonas*, *Proteus* and *Idiomarina*, respectively. [Conclusion] The

results presented above showed that there are abundant bacteria diversity in *Crassostrea hongkongensis* collected from the tidal flat of Naozhou Island in the South China Sea.

Keywords: The South China Sea, *Crassostrea hongkongensis*, Culture-dependent method, 16S rRNA gene, Phylogenetic analysis, Bacterial diversity

海洋约占地球表面积的 71%, 具有多种类型的生态环境(如高温、高压、高盐、低光照、高辐射等), 其中蕴藏了地球上 80%以上的物种^[1]。海洋微生物多样性研究是其开发和利用的前提, 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^[2-3]。海洋中各种无脊椎动物体内和体表相关微生物的分离培养和鉴定, 已成为海洋生物资源开发利用的重要领域^[4-5]。硃洲岛(20°52′-20°56′ N, 110°33′-110°38′ E)位于南海北部湛江市东南雷州湾海域, 岛内常年没有淡水河川注入沿海, 所受污染甚少, 具有南海岛屿的典型生态特点。本实验室对该岛海水、潮汐带沉积物和部分无脊椎动物中的微生物资源进行了初步探索, 发现该岛不仅具有较丰富的细菌多样性, 而且存在较多未被认识的新物种和生物活性菌株^[6-13]。牡蛎(Oyster)为软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、珍珠贝目(Pterioidea)、牡蛎科(Ostreidae)动物的总称^[14], 可以食用, 并具有抗疲劳、抗肿瘤、降血压、降血糖、增强免疫力和保肝等医疗保健作用^[15-17]。部分作者对牡蛎相关微生物资源进行了研究, 并分离鉴定了一批新的微生物类群(物种)^[18-23]。本文报道了有关南海硃洲岛海域潮汐带香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)中相关细菌多样性研究结果, 以为海洋微生物资源的深入研究、保护与利用提供实验依据。

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 Motic 公司(Moticam 2306); 细菌基因组 DNA 提取和纯化、16S rRNA 基因 PCR 扩增所用酶、引物和试剂同文献[24]。

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, H₂O 1 L, pH 7.5-7.8。复合盐 A 液: KCl 27.5, Na₂CO₃ 8.0, Ferric citrate 5.0, H₂O 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, H₂O 1 L。(2) 中度嗜盐培养基(Moderate halophilic medium agar, MH)^[25]: NaCl 81.0, MgCl₂ 7.0, MgSO₄ 9.6, KCl 2.0, CaCl₂ 0.36, 蛋白胨 5.0, 酵母膏 10.0, 葡萄糖 1.0, NaHCO₃ 0.06, NaBr 0.026, 琼脂 20.0, H₂O 1 L, pH 7.5。(3) 营养琼脂(Nutrient agar, NA)^[26]: 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, H₂O 1 L, pH 7.5。各培养基用于分离和耐盐实验时, 其 NaCl 含量根据实验需要变化, 用于分离的培养基中添加 100 mg/L 制霉菌素抑制真菌生长。

1.1.3 样品采集和处理: 样品于 2011 年 7 月采自我国南海雷州湾硃洲岛潮汐带, 按无菌操作要求, 用无菌塑料袋收集健康牡蛎样品, 冷冻后 48 h 内带回实验室进行处理。用灭菌海水将牡蛎样品表面洗净, 剪碎研匀, 取 10 g 置于盛有含 3.4% (W/V) NaCl 的 90 mL 灭菌盐水和玻璃珠的三角瓶中, 在摇床上 150 r/min、10 °C 条件下振荡 30 min, 制成匀浆悬浊液, 再用二层纱布过滤, 滤液经 10 倍梯度稀释后用于分离菌株。

1.2 菌株分离

以 MA、MH 和 NA 作为分离基础培养基, 制

成不同浓度(0、5%、10%、15%、20%、25%, *W/V*) NaCl 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。挑取分离平板上的单菌落进行四分体划线纯化(4–5 次), 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存备用。

1.3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

参照 Cui 等^[27]使用的方法进行基因组总 DNA 提取、16S rRNA 基因 PCR 扩增及序列测定, 所得序列提交 GenBank 注册; 在 NCBI 和 EzTaxon server^[28]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 软件进行多重序列比对^[29]; 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[30], 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、构建系统进化树^[31], 重复取样 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^[32]。

1.4 生物学特征

用添加不同浓度(0, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, *W/V*) NaCl 的相应培养基测定菌株对 NaCl 的耐受性; 形态特征和生理生化特征实验等参考文献^[33]所用方法进行。

2 结果

2.1 菌株的分离

经过分离纯化, 从本次采集的牡蛎样品中分离到 102 株细菌(含放线菌)纯培养物。从不同培养基分离效果来看, 以添加 5%–10% (*W/V*) NaCl 的 MA 和 MH 培养基分离效果较好, 菌落数量和菌落形态较为丰富; 而添加 15%–25% (*W/V*) NaCl 的培养基, 菌落形成单位低, 且菌落颜色单一。

2.2 类群多样性

综合分析菌落形态、显微形态、革兰氏染色及部分生理生化实验结果, 去除部分冗余菌株, 最终从 102 个分离菌株中选取 74 个代表性菌株测定 16S rRNA 基因序列, 进行系统发育多样性分析。这 74 个代表性菌株的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 注册, 获得序列号(Accession number) 为 JX220817–JX220890(表 1)。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析结果表明, 74 个分离菌株属于细菌域的 4 个大的系统发育类群 (Gamma-Proteobacteria, Alpha-proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes) 的 16 个科 (Idiomarinaceae, Enterobacteriaceae, Halomonadaceae, Rhodobacteraceae, Xanthomonadaceae, Alteromonadaceae, Vibrionaceae, Pseudoalteromonadaceae, Shewanellaceae, Aeromonadaceae, Phyllobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterococcaceae, Carnobacteriaceae)、18 个属 (*Idiomarina*, *Morganella*, *Proteus*, *Halomonas*, *Paracoccus*, *Wohlfahrtiimonas*, *Marinobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Oceanimonas*, *Nitratireductor*, *Myroides*, *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Trichococcus*) (表 1)。其中 Gamma-Proteobacteria 亚门菌株占优势(45 株, 60.8%), 其余依次是 Firmicutes 门(12 株, 16.2%)、Bacteroidetes 门(11 株, 14.9%) 和 Alpha-Proteobacteria 亚门(6 株, 8.1%) (表 1)。

2.3 物种和遗传多样性

根据系统发育分析结果, 采用 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 的菌株属于同一物种的归类原则^[34], 74 株菌可以归为 38 个物种(表 1 和图 1)。除了 10 株 (JSM 111006, JSM 111028, JSM 111038, JSM 111049, JSM 111050, JSM 111052, JSM 111053, JSM 111080, JSM 111081, JSM 111091) 与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100% 外(表 1), 其它分离菌株与其相关的有效发表种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性在 94.3%–99.8% 之间, 说

表 1 牡蛎可培养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 1 Phylogenetically closest neighbors of bacteria isolated from *Crassostrea hongkongensis* based on 16S rRNA gene sequence analysis

Phylogenetic groups/Family	Strain (Accession number)*	Closest type strain (Accession number)	Similarity (%)	NaCl range (%)
Gamma-Proteobacteria (45/74)				
Idiomarinaeaceae (5)	JSM 111018 (JX220817)	<i>Idiomarina sediminum</i> c121 ^T (EF212001)	99.2	0–10 (0–5)
	JSM 111025 (JX220818)	<i>Idiomarina sediminum</i> c121 ^T (EF212001)	99.4	0–10 (0–5)
	JSM 111086 (JX220819)	<i>Idiomarina sediminum</i> c121 ^T (EF212001)	99.2	0–15 (0–5)
	JSM 111090 (JX220820)	<i>Idiomarina zobellii</i> KMM 231 ^T (AF052741)	98.6	0–15 (2–5)
	JSM 111096 (JX220821)	<i>Idiomarina baltica</i> OS145 ^T (AJ440214)	99.8	0–25 (0–5)
Enterobacteriaceae (3)	JSM 111068 (JX220822)	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>sibonii</i> DSM 14850 ^T (DQ358146)	99.8	0–10 (0–5)
	JSM 111072 (JX220823)	<i>Proteus penneri</i> NCTC 12737 ^T (DQ885258)	98.9	0–10 (0–5)
	JSM 111078 (JX220824)	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 ^T (ACLE01000013)	99.8	0–10 (0–5)
Halomonadaceae (17)	JSM 111034 (JX220825)	<i>Halomonas johnsoniae</i> T68687 ^T (AM941399)	99.7	0–20 (0–5)
	JSM 111088 (JX220826)	<i>Halomonas johnsoniae</i> T68687 ^T (AM941399)	99.7	0–20 (0–5)
	JSM 111036 (JX220827)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.8	0–25 (0–10)
	JSM 111045 (JX220828)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.4	0–25 (0–10)
	JSM 111095 (JX220829)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.3	0–25 (5–10)
	JSM 111100 (JX220830)	<i>Halomonas salina</i> F8-11 ^T (AJ295145)	99.3	0–25 (5–10)
	JSM 111040 (JX220831)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.3	0–25 (0–10)
	JSM 111041 (JX220832)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.2	0–25 (5–10)
	JSM 111043 (JX220833)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.3	0–25 (5–10)
	JSM 111044 (JX220834)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.3	0–25 (5–10)
	JSM 111046 (JX220835)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.3	0–25 (0–5)
	JSM 111047 (JX220836)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.2	0–25 (0–5)
	JSM 111065 (JX220837)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.3	0–15 (0–5)
	JSM 111097 (JX220838)	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T (AM229317)	99.2	0–25 (0–10)
	JSM 111081 (JX220839)	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T (AF212218)	100	0–10 (0–5)
	JSM 111087 (JX220840)	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85 ^T (EF121853)	99.8	0–15 (0–5)
	JSM 111091 (JX220841)	<i>Halomonas venusta</i> DSM 4743 ^T (AJ306894)	100	0–20 (0–5)

(待续)

(续表)				
Xanthomonadaceae (1)	JSM 111004 (JX220843)	<i>Wohlfahrtiimonas chitiniclastica</i> S5 ^T (AM397063)	96.8	0-10 (0-2)
Alteromonadaceae (2)	JSM 111032 (JX220844)	<i>Marinobacter vinifirmus</i> FB1 ^T (DQ235263)	99.7	0-15 (0-5)
Vibrionaceae (2)	JSM 111033 (JX220845)	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MBIC1303 ^T AB019148)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111026 (JX220846)	<i>Vibrio diabolicus</i> HE800 ^T (X99762)	99.8	0-10 (0-5)
Pseudoalteromonadaceae (4)	JSM 111054 (JX220847)	<i>Vibrio mytili</i> CECT 632 ^T (X99761)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111020 (JX220848)	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> LMEB 39 ^T (FJ404721)	98.7	0-10 (0-5)
	JSM 111061 (JX220849)	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> LMEB 39 ^T (FJ404721)	99.0	0-10 (0-5)
	JSM 111062 (JX220850)	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> LMEB 39 ^T (FJ404721)	98.2	0-10 (0-5)
Shewanellaceae (4)	JSM 111079 (JX220851)	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> LMEB 39 ^T (FJ404721)	99.0	0-10 (0-5)
	JSM 111013 (JX220852)	<i>Shewanella upenei</i> 20-23R ^T (GQ260190)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111075 (JX220853)	<i>Shewanella upenei</i> 20-23R ^T (GQ260190)	99.5	0-10 (0-5)
	JSM 111080 (JX220854)	<i>Shewanella upenei</i> 20-23R ^T (GQ260190)	100	0-10 (0-5)
Aeromonadaceae (7)	JSM 111051 (JX220855)	<i>Shewanella haliotis</i> DW01 ^T (EF178282)	99.3	0-5 (0-5)
	JSM 111019 (JX220856)	<i>Oceanimonas baumannii</i> GB6 ^T (AF168367)	99.7	0-10 (0-5)
	JSM 111027 (JX220857)	<i>Oceanimonas baumannii</i> GB6 ^T (AF168367)	99.7	0-10 (0-5)
	JSM 111029 (JX220858)	<i>Oceanimonas baumannii</i> GB6 ^T (AF168367)	99.7	0-10 (0-5)
	JSM 111074 (JX220859)	<i>Oceanimonas baumannii</i> GB6 ^T (AF168367)	99.6	0-10 (0-5)
	JSM 111083 (JX220860)	<i>Oceanimonas baumannii</i> GB6 ^T (AF168367)	99.6	0-10 (0-5)
	JSM 111024 (JX220861)	<i>Oceanimonas smirnovii</i> 31-13 ^T (AY538714)	99.7	0-10 (2-5)
	JSM 111082 (JX220862)	<i>Oceanimonas smirnovii</i> 31-13 ^T (AY538714)	99.7	0-10 (0-5)
Alpha-Proteobacteria (6/74)				
Phyllobacteriaceae (5)	JSM 111021 (JX220863)	<i>Nitratireductor aquimarinus</i> CL-SC21 ^T (HQ176467)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111030 (JX220864)	<i>Nitratireductor aquimarinus</i> CL-SC21 ^T (HQ176467)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111063 (JX220865)	<i>Nitratireductor aquimarinus</i> CL-SC21 ^T (HQ176467)	99.7	0-10 (0-5)
	JSM 111064 (JX220866)	<i>Nitratireductor aquimarinus</i> CL-SC21 ^T (HQ176467)	99.4	0-10 (0-5)
	JSM 111076 (JX220867)	<i>Nitratireductor aquimarinus</i> CL-SC21 ^T (HQ176467)	99.8	0-10 (0-5)
Rhodobacteraceae (1)	JSM 111023 (JX220842)	<i>Paracoccus homiensis</i> DD-R11 ^T (DQ342239)	99.8	0-10 (0-5)
Bacteroidetes(11/74)				
Flavobacteriaceae (11)	JSM 111002 (JX220868)	<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 39352 ^T (AJ854059)	99.6	0-10 (0-5)

(待续)

				(续表)
	JSM 111005 (JX220869)	<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 39352 ^T (AJ854059)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111011 (JX220870)	<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 39352 ^T (AJ854059)	99.7	0-10 (0-5)
	JSM 111003 (JX220871)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	99.7	0-10 (0-5)
	JSM 111007 (JX220872)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111015 (JX220873)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	99.8	0-10 (0-5)
	JSM 111017 (JX220874)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	99.6	0-10 (0-5)
	JSM 111050 (JX220875)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	100	0-10 (0-5)
	JSM 111052 (JX220876)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	100	0-10 (0-5)
	JSM 111059 (JX220877)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	100	0-10 (0-5)
	JSM 111073 (JX220878)	<i>Myroides pelagicus</i> SM1 ^T (AB176662)	100	0-10 (0-5)
Firmicutes (12/74)				
Bacillaceae (7)				
	JSM 111006 (JX220879)	<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a ^T (AJ831841)	100	0-10 (0-5)
	JSM 111028 (JX220880)	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 ^T (AF483624)	100	0-10 (0-5)
	JSM 111038 (JX220881)	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513T (AY724690)	100	0-25 (5-10)
	JSM 111039 (JX220882)	<i>Bacillus barbaricus</i> V2-BIII-A2 ^T (AJ422145)	99.1	0-20 (0-5)
	JSM 111053 (JX220883)	<i>Bacillus rigui</i> WPCB074 ^T (EU939689)	100	0-10 (0-5)
	JSM 111085 (JX220884)	<i>Bacillus halmapalus</i> DSM 8723 ^T (X76447)	98.9	0-15 (2-5)
	JSM 111042 (JX220885)	<i>Virgibacillus chiguensis</i> NTU-101 ^T (EF101168)	98.9	0-25 (5-10)
Staphylococcaceae (3)				
	JSM 111094 (JX220886)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.8	0-25 (5-10)
	JSM 111099 (JX220887)	<i>Staphylococcus arlettae</i> ATCC 43957 ^T (AB009933)	99.8	0-25 (5-10)
	JSM 111101 (JX220888)	<i>Staphylococcus equorum</i> ATCC 43958 ^T (AB009939)	99.8	0-25 (5-10)
Enterococcaceae (1)				
	JSM 111049 (JX220889)	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T (AB012212)	100	0-10 (0-5)
Carnobacteriaceae (1)				
	JSM 111069 (JX220890)	<i>Trichococcus patagoniensis</i> PMagG1 ^T (AF394926)	94.3	0-10 (0-5)

明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关菌株之间存在较大的遗传差异。

16S rRNA 基因序列相似性比较分析结果显示, 74 个菌株中有 6 株与其系统发育关系最密切的有效发表种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列存在较大差异(表 1 和图 1 中菌号加粗的菌株), 可能代表新的分类单元(Potential new taxa)。其中菌株 JSM 111069 与其系统发育关系最密切的已知

物种典型菌株(*Trichococcus patagoniensis* PMagG1^T)的序列相似性只有 94.3%, 且在系统进化树上以显著是自展值(Bootstrap value, 98%)支持形成一个独立分支(图 1A), 极有可能代表 Carnobacteriaceae 科一个属一级的新分类单位。JSM 111039 与 *Bacillus barbaricus* V2-BIII-A2^T 系统发育关系最为密切, 序列相似性为 99.1%; JSM 111085 与 *Bacillus halmapalus* DSM 8723^T 最为密

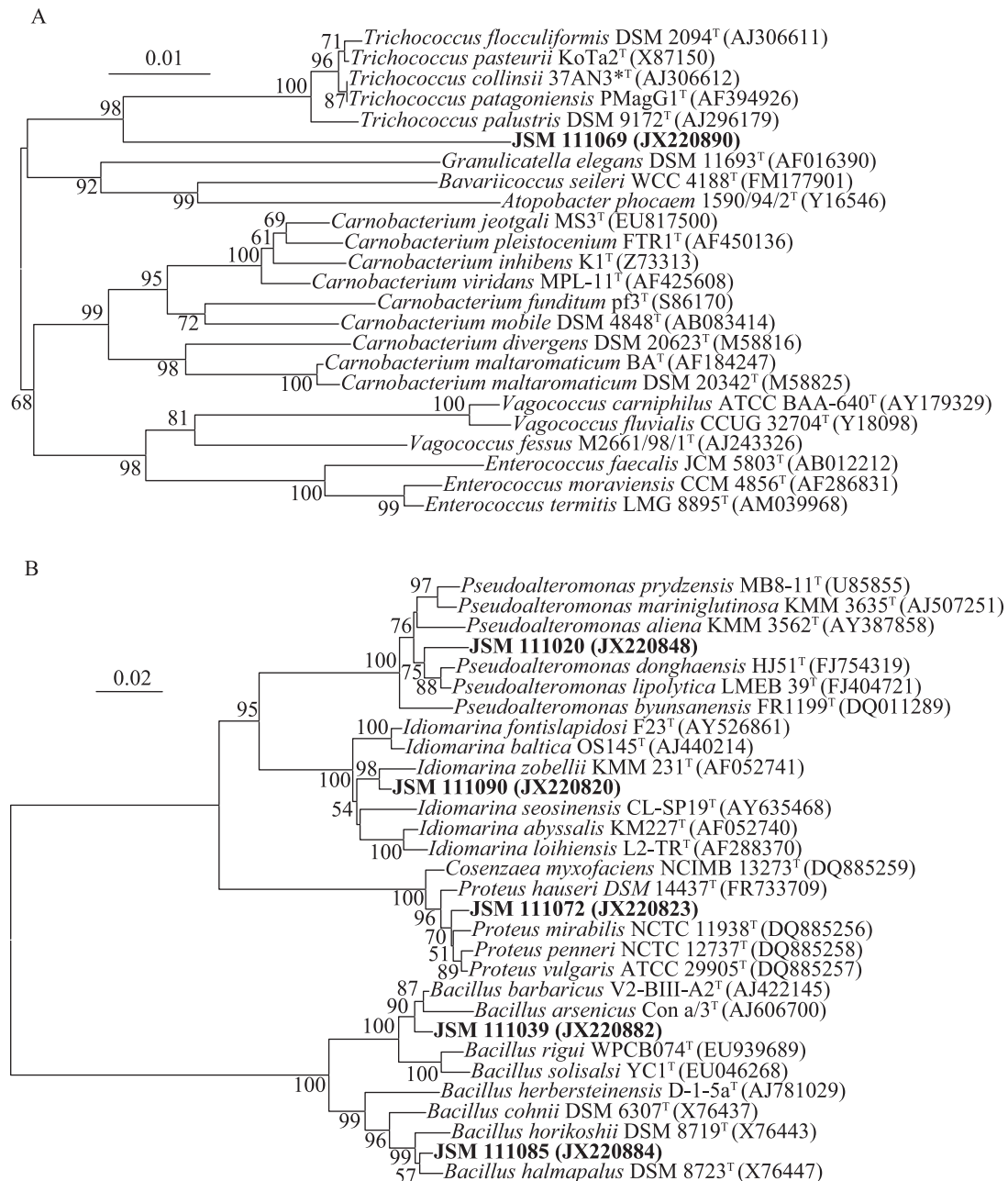


图 1 牡蛎相关可培养细菌潜在新类群的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequences of some strains (potential new taxa) from *Crassostrea hongkongensis*

注: 节点处的数值是基于邻接法分析 1 000 次的自展值(Bootstrap values), 只有高于 50%的在图中显示。

Note: Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) based on a Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled datasets.

切, 相似性为 98.9%。这 2 个菌株与其系统发育关系最为密切的已知物种典型菌株之间虽然序列相似性较高, 但在表型特征和化学分类特征等方面存在较大差异, 且在系统进化树上各自形成

独立亚分支(图 1B)。经多项分类(Polyphasic taxonomy)研究, 菌株 JSM 111039 和 JSM 111085 被建议代表 *Bacillus* 属的 2 个新种(其分类学结果另文发表)。菌株 JSM 111020、JSM 111072、JSM

111090 与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 98.7%、98.9%和 98.6%, 各自在系统进化树上形成独立亚分支(图 1B), 可能分别代表 *Pseudoalteromonas*、*Proteus* 和 *Idiomarina* 属的新

物种。最终要确定这些菌株的分类地位, 还需要综合形态特征、生理生化特性、细胞化学组分、G+C mol% 含量测定、系统发育分析结果和 DNA-DNA 分子杂交数据等研究结果(部分结果见表 2)。进一步的多项分类研究工作正在进行中。

表 2 分离自牡蛎的部分潜在新类群的部分生理生化特性
Table 2 Partial physiological and biochemical features of potential new taxa from *Crassostrea hongkongensis*

Characteristics	JSM 111020	JSM 111039	JSM 111069	JSM 111072	JSM 111085	JSM 111090
Colony colour	Creamy white	Pale yellow	Light yellow	Creamy white	Creamy white	Light yellow
Cell morphology	Rod	Rod	Coccus	Rod	Rod	Slightly curved rod
Gram staining	-	+	+	-	+	-
NaCl for growth (% <i>W/V</i>)						
Range	0-10	0-10	0-10	0-10	0-15	0-15
Optimum	5	0-5	1-3	0-5	2-5	2-5
Temperature for growth (°C)						
Range	5-40	15-45	5-40	5-40	10-45	5-40
Optimum	25-30	30	30	25-35	30-35	25-35
pH for growth						
Range	5-12	6-10	6-10	5-11	6-10	5-10
Optimum	8	8	7	6-8	7	7-8
Glucose fermentation	-	+	+	-	+	-
Glucose oxidation	-	+	+	-	+	-
H ₂ S production	-	+	-	-	+	-
Indole production	+	+	-	+	+	+
Facultatively anaerobic	+	-	+	+	-	+
Methyl-red test	-	+	-	+	+	-
Motility	+	+	-	+	+	+
Voges-Proskauer test	-	+	+	-	+	-
Nitrate reduction	+	-	+	+	-	+
Nitrite reduction	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of						
Casein	-	-	+	+	+	-
Cellulose	-	+	-	+	-	-
Gelatin	-	+	-	+	+	-
Starch	+	+	-	-	+	-
Tween 20	+	-	-	+	-	+
Tween 40	+	-	-	-	+	+
Tween 60	+	-	-	+	+	+
Tween 80	+	-	-	-	+	+
Urea	+	-	-	+	-	+

Note: +: Positive; -: Negative.

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法对南海硇洲岛潮汐带牡蛎样品中可培养细菌的多样性进行了研究,用于系统发育分析的 74 个代表性菌株分别归属于细菌域的 4 个大的系统发育类群 (Gamma-Proteobacteria, Alpha-Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes)、16 个科、18 个属,可以分为 38 个物种,大部分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 基因序列都存在一定差异,其中部分菌株代表潜在新分类单元(Potential new taxa)。

我们已经报道了对硇洲岛潮汐带海葵与海胆可培养细菌多样性的研究结果^[35-36],通过比较分析发现,这 3 类样品中细菌分布有各自的特点。牡蛎样品中优势细菌类群为 Proteobacteria 门(52 株, 68.9%),而海胆与海葵中细菌优势类群为 Firmicutes 门(菌株比例分别为 50.8%和 40.5%);牡蛎样品相关细菌类群多样性较高,如分离到一定比例的 Bacteroidetes 门和 Alpha-Proteobacteria 亚门菌株;从科的分布来看, Bacillaceae, Halomonadaceae, Staphylococcaceae, Vibrionaceae 科在 3 种动物中都存在,与其它海洋无脊椎动物相关细菌的常见类群相似^[37]。Planococcaceae、Nocardiopsaceae、Brevibacteriaceae、Dermabacteraceae、Pseudonocardiaceae 和 Streptomyetaceae 科在海葵与海胆中分离到,而 Rhodobacteraceae、Xanthomonadaceae、Idiomarinaceae、Shewanellaceae、Phyllobacteriaceae、Aeromonadaceae、Enterococcaceae、Carnobacteriaceae 和 Flavobacteriaceae 科只在牡蛎中发现。

以上结果揭示了牡蛎相关可培养细菌较丰富的遗传多样性、物种多样性和类群多样性,以及不同样品中存在的可培养微生物类群的不同分布特点。那么,牡蛎中可培养细菌菌株占样品中

实际分布菌株的比例如何?是否存在更高级的新分类单元?其相关微生物类群与宿主的生态关系如何?这些问题值得进一步研究。

参考文献

- [1] Tittensor DP, Mora C, Jetz W, et al. Global patterns and predictors of marine biodiversity across taxa[J]. Nature, 2010, 466(7310): 1098-1101.
- [2] 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.
- [3] Kolber, ZS, Plumley FG, Lang AS, et al. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean[J]. Science, 2001, 292(5526): 2492-2495.
- [4] 姜健, 范圣第, 杨宝灵, 等. 海洋动植物共附生微生物的分离和抗菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 65-68.
- [5] Jensen PR, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives[J]. Annual Review of Microbiology, 1994, 48(1): 559-584.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Chen YG, Zhang YQ, Huang HY, et al. *Halomonas zhanjiangensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sea urchin[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(11): 2888-2893.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 陈义光, 张晓蓉, 张丽, 等. 具抗菌活性海洋放线菌菌株 JMC 06001 的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 40–44.
- [13] 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.
- [14] 阙华勇, 刘晓, 王海艳, 等. 中国近海牡蛎系统分类研究的现状和对策[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 110–113.
- [15] Mendez LA, Castro CA, Casso RB, et al. Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*)[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(5): 447–450.
- [16] Tanaka K, Nishizono S, Kugino K, et al. Effects of dietary oyster extract on lipid metabolism, blood pressure, and blood glucose in SD rats, hypertensive rats, and diabetic rats[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006, 70(2): 462–470.
- [17] 李鹏, 李祺福, 石松林, 等. 牡蛎天然活性肽对人胃腺癌 BGC-823 细胞周期与基因表达的调控[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(3): 1–8.
- [18] Friedman CS, Beaman BL, Chun J, et al. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in pacific oysters[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998, 48(1): 237–246.
- [19] Lee YS, Baik KS, Park SY, et al. *Tenacibaculum crassostreae* sp. nov., isolated from the pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(7): 1609–1614.
- [20] Gomez-Gil B, Roque A, Rotllant G, et al. *Photobacterium swingsii* sp. nov., isolated from marine organisms[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(2): 315–319.
- [21] Macián MC, Ludwig W, Aznar R, et al. *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from mediterranean oysters[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(4): 1449–1456.
- [22] Macián MC, Ludwig W, Schleifer KH, et al. *Thalassomonas viridans* gen. nov., sp. nov., a novel marine γ -proteobacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(4): 1283–1289.
- [23] 张占会, 张其中, 李春勇, 等. 养殖近江牡蛎致病弧菌的分离与鉴定[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(6): 49–56.
- [24] 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[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 696–701.
- [25] 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.
- [26] Atlas RM. Handbook of Microbiological Media[M]. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [27] 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.
- [28] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2259–2261.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783–791.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 肖怀东, 陈义光, 刘祝祥, 等. 湛江硃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.
- [36] 黄苛, 张丽, 刘祝祥, 等. 硃洲岛海胆可培养细菌的多样性[J]. *微生物学报*, 2009, 49(11): 1424–1429.
- [37] Osinga R, Armstrong E, Burgess JG, et al. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering[J]. *Hydrobiologia*, 2001, 461(3): 55–62.
-

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。