

海绵和海鞘中可培养放线菌的分离与多样性比较

杨琪^{1,3,4}, 信艳娟², Christopher FRANCO^{3,4}, 柯才焕¹, 张卫^{1,2,3,4}

(1. 厦门大学 海洋与地球学院, 福建 厦门 361005; 2. 中国科学院 大连化学物理研究所海洋生物产品工程实验室, 大连 116023; 3. Flinders Centre for Marine Bioproducts Development; 4. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Flinders University, Adelaide, South Australia, 5042, Australia)

摘要: 在相同的分离培养条件下, 为比较地域差别较大的福建海域海绵动物(山海绵 *Mycale* sp.和网架海绵 *Stylissa* sp.)和南海海域海鞘动物(皱瘤海鞘 *Styela plicata* 和乳突皮海鞘 *Molgula manhattensis*)之间可培养放线菌多样性的差异, 作者采用 5 种放线菌分离培养基和 1 种细菌通用培养基, 对海绵和海鞘中的放线菌进行分离培养。采用 16S rRNA 基因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。共获得可培养放线菌 198 株, 其中从海绵中分离到 87 株放线菌, 从海鞘中分离到 111 株放线菌。RFLP 分析表现为 38 种不同的图谱类型。16S rRNA 基因序列分析表明, 从海绵中分离到的放线菌包括 6 个放线菌属, 其中有 2 株菌的 16S rRNA 基因序列与最相近的菌株相似性低于 97%, 可能是潜在的新菌株; 从海鞘中分离到的放线菌包括 7 个放线菌属, 有 8 株可能是潜在的新菌株。比较海绵和海鞘中可培养放线菌的多样性发现, 从海绵中分离到的放线菌, 除节细菌(*Arthrobacter*)以外, 均包括在海鞘分离的放线菌属中。海鞘相关放线菌多样性水平不容忽视, 是除海绵之外另一获得新型放线菌资源以及药用天然活性产物的重要来源。

关键词: 山海绵(*Mycale* sp.); 皱瘤海鞘(*Styela plicata*); 放线菌; RFLP; 16S rRNA 基因

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)07-0053-10

随着陆栖微生物在抗生素、酶、酶抑制剂和多糖等生物活性物质方面的大规模开发和应用, 通过寻找新种属或特殊性状的微生物来开发新型天然活性物质的难度越来越大。近年来研发重点转向了前景更为广阔而研发较少的海洋微生物资源, 并成为海洋生物技术开发的主要内容。作为海洋微生物资源开发的前提, 海洋微生物多样性的研究得到了迅速发展^[1]。

海绵动物是迄今已知海洋天然产物的最大来源。由于海绵的底栖过滤性摄食和选择性消化等生理特性, 其体内蕴藏了丰富的微生物, 同时海绵中分离得到的丰富天然产物有许多是由其共生微生物产生的^[2]。目前海绵相关微生物多样性和活性产物的研究已经获得了很多成果。与活跃的海绵相关微生物研究相比较, 同属于滤食性海洋无脊椎动物的海鞘动物, 虽然已从其体内发现了多种生理活性物质^[3], 但是其相关微生物多样性的研究仍处于起步阶段, 研究报道极少。放线菌是一大类有生理活性的次级代谢产物的生产者, 目前所使用的抗生素中, 70%是由放线菌产生, 并且来源于海洋微生物的活性物质中有一半以上来自放线菌^[4]。

因此, 真正全面认识海鞘相关放线菌的多样性,

将海绵相关放线菌多样性研究方法应用于海鞘, 比较两种动物相关放线菌多样性水平之间的差异, 获得更多的放线菌资源并加以开发应用, 是一个很有价值的研究课题。作者选取地域差别较大的中国福建东山湾海域的海绵(山海绵和网架海绵)和中国海南陵水海域的海鞘(皱瘤海鞘和乳突皮海鞘)为研究对象, 比较不同种属之间及不同物种之间相关放线菌多样性差异和特异性关系, 验证海鞘具有高的相关放线菌多样性及存在种属间差异的理论假说, 证明海鞘可作为除海绵之外另一个极具潜力的海洋放线菌和天然活性产物的来源。

1 材料和方法

1.1 样品采集

海绵活体样本采自福建古雷东山湾附近海域潮

收稿日期: 2012-08-09; 修回日期: 2012-09-25

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费资助项目(No.201305016)

作者简介: 杨琪(1986-), 女, 理学硕士, 主要从事海绵相关放线菌多样性和活性物质研究, E-mail: qi.yang@flinders.edu.au; 通信作者: 张卫, E-mail: wei.zhang@flinders.edu.au

间带, 经鉴定为山海绵科(Mycalidae)的山海绵属(*Mycale* sp.)(图 1-A)和网架海绵科(Dictyonellidae)的网架海绵属(*Stylissa* sp.)(图 1-B)。海鞘活体样本采自海南陵水县附近水域, 经鉴定为皱瘤海鞘(*Styela plicata*)(图 1-C)和乳突皮海鞘(*Molgula manhattensis*)(图 1-D)。

1.2 培养基和试剂

根据文献[5]报道, 选择 4 种有效放线菌分离培养

基进行改良, 制备 M1-M4, 另选用放线菌通用培养基高氏一号和细菌通用培养基 2216E, 成分见表 1。

Taq DNA 聚合酶, HhaI(10 U/μL)由 BioLabs 提供; DNA 纯化试剂盒由 Mo BIO 提供; DNA Marker 由 TakaRa 提供; 16S rRNA 基因扩增引物 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 765R (5'-CTGT TGGCTCCCCACGCTTTC-3'), 704F (5'-GTAGCG GTGAAATGCGTA-3')和 1492R (5'-CGGCTACCTT GTTACGAC-3') 由 GeneWorks 提供。

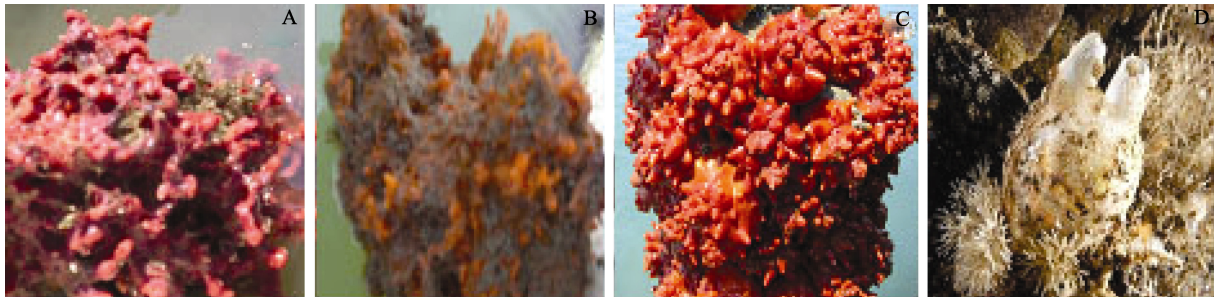


图 1 海绵和海鞘样品照片

Fig. 1 Photos of sponges and ascidians

A. 山海绵; B. 网架海绵; C. 皱瘤海鞘; D. 乳突皮海鞘

A. *Mycale* sp.; B. *Stylissa* sp.; C. *Styela plicata*; D. *Molgula manhattensis*

表 1 海绵和海鞘放线菌分离培养基及其成分^[5]

Tab.1 Composition of six different kinds of media used for the isolation of actinomycetes from marine sponges and ascidians

培养基	成分
M1	可溶性淀粉 10.0 g; 酵母膏 4.0 g; 蛋白胨 2.0 g; 琼脂 18.0 g; NaCl 20.0 g; 蒸馏水 1.0 L; 自然 pH
M2	甘油 (100%) 6.0 mL; 精氨酸 1.0 g; K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 1.0 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g; 琼脂 18.0 g; NaCl 20.0 g; 蒸馏水 1.0 L; 自然 pH
M3	蛋白胨 2.0 g; L-天门冬酰胺 0.1 g; 丙酸钠 4.0 g; K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 0.05 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g; 琼脂 15.0 g; NaCl 20.0 g; 蒸馏水 1.0 L; pH 7.0
M4	甘油 (100%) 5.0 g; 蛋白胨 2.0 g; L-天门冬酰胺 0.1 g; 丙酸钠 4.0 g; K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 0.5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g; 琼脂 15.0 g; NaCl 20.0 g; 蒸馏水 1.0 L; pH 7.0
高氏一号	可溶性淀粉 20.0 g; KNO ₃ 1.0 g; K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 0.5 g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g; FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g; agar 18.0 g; NaCl 20.0 g; 蒸馏水 1.0 L; pH 7.2~7.4
2216E	胰蛋白胨 5.0 g; 酵母膏 1.0 g; FePO ₄ 0.01 g; 琼脂 18.0 g; NaCl 20.0 g; 蒸馏水 1.0 L; pH 7.6~7.8

注: 培养基 1-4 和高氏一号中添加终质量浓度为 40 mg/L 的奈啉酮酸和终质量浓度为 100 mg/L 的 K₂Cr₂O₇, 用于抑制快速生长的革兰氏阴性细菌和真菌。培养基 2216E 中添加终质量浓度为 25 mg/L 的制霉菌素来抑制真菌的生长

1.3 海绵和海鞘中放线菌的分离、纯化和保藏

将样品在无菌条件下切块, 洗涤, 除去表面附着的海水中微生物和其他杂质; 称量样品 5.0 g 加入 5 mL 无菌海水研成匀浆, 为 0 #菌液。取 1 mL 0#菌液加入 9 mL 无菌海水制成 1 #菌液, 同样方法制备 2 #菌液。分别取上述菌液 200 μL 涂布培养基平板, 每种浓度的菌液涂 3 个平板; 置于 28℃ 培养箱中倒

置培养 7 天左右, 观察菌落生长情况。当出现放线菌菌落后, 挑取单菌落划线, 重复分离直至获得纯化菌株。挑取纯化单菌落加入装有 1.8 mL 20%甘油水溶液的冻存管中, -80℃ 保藏。

1.4 基因组 DNA 提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

取纯化放线菌菌株 2~3 环, 采用改良细菌基因

组 DNA 提取方法提取放线菌基因组 DNA^[6]。用两对引物 27F 和 765R、704F 和 1492R 分别扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μ L): 5 μ L 10 \times ThermoPol Buffer, 1 μ L dNTPs(各 10 mmol/L), 1 μ L 引物 27F(704F)和 1 μ L 765R(1492R)(20 μ mol/L), 2 μ L 模板 DNA(200 ng), 1 μ L TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L)和 39 μ L 的纯水。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min, 52 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 延伸 10 min; 以 20 $^{\circ}$ C 终止反应。

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

16S rRNA 基因扩增产物在限制性内切酶 HhaI 作用下于 37 $^{\circ}$ C 反应 16 h, 进行琼脂糖凝胶电泳。同时 16S rRNA 基因扩增产物经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 MEGA5.1 构建系统发育树。

2 结果

2.1 菌株分离

根据菌落形态特征以及菌株基丝、气丝的形态特征, 可判断用 6 种有效的分离培养基从山海绵和网架海绵中分别分离出放线菌 51 株和 36 株, 共计 87 株; 从皱瘤海鞘和乳突皮海鞘中分别分离得到放

线菌 80 株和 31 株, 共计 111 株(表 2)。

表 2 海绵和海鞘在不同培养基中分离得到的放线菌数量
Tab. 2 The number of actinobacteria isolated from sponges and ascidians in different isolation media

培养基	分离出的放线菌数(株)			
	山海绵	网架海绵	皱瘤海鞘	乳突皮海鞘
M1	9	6	13	7
M2	11	11	18	9
M3	8	5	12	4
M4	9	8	14	3
高氏 1 号	9	5	15	6
2216E	5	1	8	2
合计	51	36	80	31

2.2 RFLP 分析

将 198 株放线菌的 16S rRNA 基因进行 HhaI-RFLP 分析。结果表明, 198 株菌可分成 38 个 RFLP 图谱类型(部分代表带型见图 2-A 和图 2-B), 有效的 RFLP 分组能将菌株初步归类, 为选择代表性菌株进行测序提供依据。结合 RFLP 带型和测序结果绘制表 3 和表 4。

2.3 16S rRNA 基因序列分析

将测得的序列信息分别输入 GenBank 中比较, 进行属一级的归类, 并构建系统发育树(图 3~图 6)。

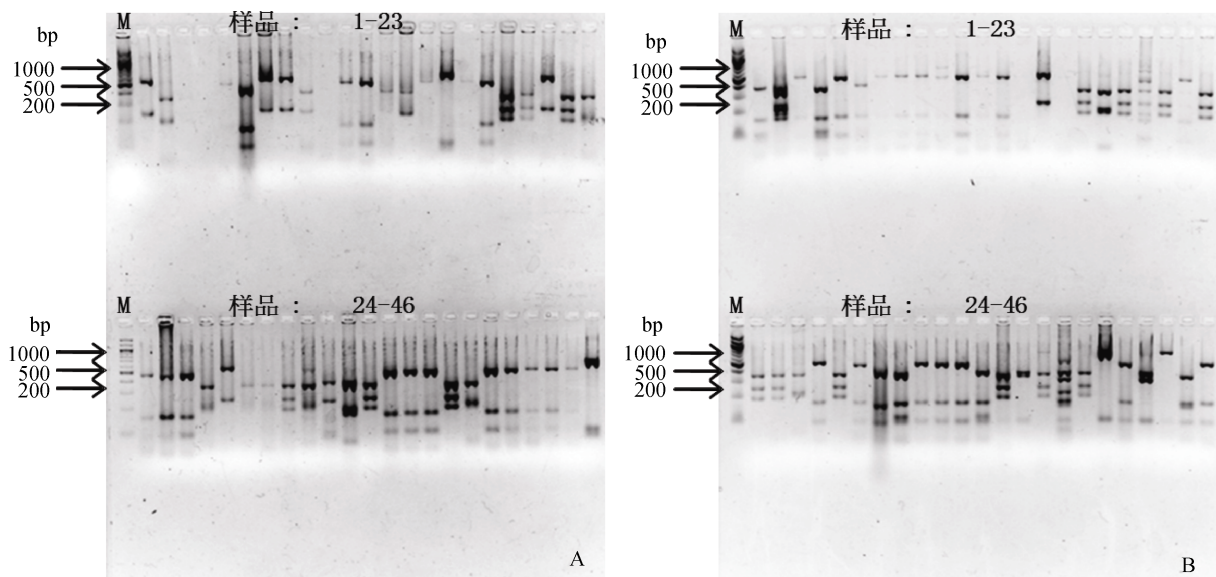


图 2 网架海绵和皱瘤海鞘部分相关放线菌 16S rRNA 基因的 RFLP 代表性结果

Fig. 2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of some representative actinobacteria isolated from marine sponge *Styliassa* sp. and marine ascidian *Styela plicata*

A. 网架海绵; B. 皱瘤海鞘; M. DNA Marker 100bp; 编号 1~46 为样品编号
A. *Styliassa* sp.; B. *Styela plicata*; M. DNA Marker 100 bp; No.1-46 are sample numbers

表 3 海绵相关放线菌 16S rRNA 基因的序列分析和 RFLP 分析

Tab. 3 Sequence and RFLP analysis of 16S rRNA gene of actinobacteria from marine sponges *Mycale* sp. and *Stylissa* sp.

菌株编号	收录编号	RFLP 组号	最相近属/种 (收录编号)	比对结果 (%)	菌株来源
M-1-68	JX463482	3	微杆菌属 (<i>Microbacterium esteraromaticum</i>) (NR_026468.1)	92	山海绵属
M-1-83	JX463486	7	链霉菌属 (<i>Streptomyces exfoliates</i>) (NR_041229.1)	99	山海绵属
M-2-14	JX463502	10	链霉菌属 (<i>S. misionensis</i>) (NR_044138.1)	99	网架海绵属
M-2-46	JX463506	10	链霉菌属 (<i>S. daghestanicus</i>) (NR_043816.1)	98	网架海绵属
M-1-91	JX463487	11	链霉菌属 (<i>S. albidoflavus</i>) (NR_041095.1)	99	山海绵属
M-1-4	JX463491	13	链霉菌属 (<i>S. odorifer</i>) (NR_026535.1)	99	山海绵属
M-1-37	JX463479	14	微杆菌属 (<i>Microbacterium esteraromaticum</i>) (NR_026468.1)	99	山海绵属
M-1-14	JX463475	16	链霉菌属 (<i>S. hainanensis</i>) (NR_042561.1)	99	山海绵属
M-1-53	JX463480	17	节细菌属 (<i>Arthrobacter koreensis</i>) (NR_025665.1)	99	山海绵属
M-2-11	JX463501	22	链霉菌属 (<i>S. flocculus</i>) (NR_041100.1)	98	网架海绵属
M-1-19	JX463494	24	链霉菌属 (<i>S. variabilis</i>) (NR_043840.1)	99	山海绵属
M-1-20	JX463495	24	链霉菌属 (<i>S. anthocyanicus</i>) (NR_041168.1)	99	山海绵属
M-1-26	JX463496	24	链霉菌属 (<i>S. sampsonii</i>) (NR_025870.1)	98	山海绵属
M-1-28	JX463497	24	链霉菌属 (<i>S. althioticus</i>) (NR_043359.1)	98	山海绵属
M-2-53	JX463490	24	链霉菌属 (<i>S. griseorubens</i>) (NR_041066.1)	99	网架海绵属
M-1-30	JX463498	26	戈登氏菌属 (<i>Gordonia terra</i>) (NR_041061.1)	98	山海绵属
M-2-25	JX463488	27	链霉菌属 (<i>S. speibonae</i>) (NR_025212.1)	99	网架海绵属
M-2-55	JX463489	27	短杆菌属 (<i>Brevibacterium iodinum</i>) (NR_026241.1)	98	网架海绵属
M-1-5	JX463492	29	拟诺卡氏菌属 (<i>Nocardiopsis alba</i>) (NR_026340.1)	99	山海绵属
M-2-42	JX463505	30	链霉菌属 (<i>S. cacaoi</i> subsp. <i>Cacaoi</i>) (NR_041061.1)	99	网架海绵属
M-1-17	JX463493	33	拟诺卡氏菌属 (<i>N. exhalans</i>) (NR_028017.1)	97	山海绵属
M-1-17 ²	JX463508	33	拟诺卡氏菌属 (<i>Nocardiopsis alba</i>) (NR_044906.1)	99	山海绵属
M-2-24	JX463503	33	链霉菌属 (<i>S. drozdowiczii</i>) (NR_041424.1)	98	网架海绵属

表 4 海鞘相关放线菌 16S rRNA 基因的序列分析和 RFLP 分析

Tab.4 Sequence and RFLP analysis of 16S rRNA gene of actinobacteria from marine ascidians *Styela plicata* and *M. manhattensis*

菌株编号	收录编号	RFLP 组号	最相近属/种 (收录编号)	比对结果 (%)	菌属来源
Q-2-55	JX463458	5	链霉菌属 (<i>S. exfoliatus</i>) (NR_041229.1)	93	乳突皮海鞘
Q-2-56	JX463446	6	链霉菌属 (<i>S. albidoflavus</i>) (NR_041095.1)	92	乳突皮海鞘
Q-1-119	JX463455	9	链霉菌属 (<i>S. aurantiogriseus</i>) (NR_041081.1)	94	皱瘤海鞘
Q-1-1192	JX463518	9	链霉菌属 (<i>S. pseudogriseolus</i>) (NR_043835.1)	98	皱瘤海鞘
Q-1-96	JX463435	10	链霉菌属 (<i>S. exfoliates</i>) (NR_041229.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-107	JX463436	10	链霉菌属 (<i>S. albolongus</i>) (NR_041144.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-114	JX463472	10	链霉菌属 (<i>S. xiamenensis</i>) (NR_044035.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-122*	JX463438	10	链霉菌属 (<i>S. ramulosus</i>) (NR_043503.1)	98	皱瘤海鞘
Q-2-49	JX463445	10	链霉菌属 (<i>S. misionensis</i>) (NR_044138.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-86	JX463432	11	链霉菌属 (<i>S. yogyakartensis</i>) (NR_041416.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-118	JX463437	11	链霉菌属 (<i>S. malaysiensis</i>) (NR_041410.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-54	JX463449	12	链霉菌属 (<i>S. malaysiensis</i>) (NR_041410.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-99	JX463452	12	链霉菌属 (<i>S. schleiferi</i>) (NR_044936.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-30	JX463448	18	链霉菌属 (<i>S. heliomycini</i>) (NR_041197.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-116	JX463454	19	链霉菌属 (<i>S. albolongus</i>) (NR_041144.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-106	JX463453	20	链霉菌属 (<i>S. flocculus</i>) (NR_041100.1)	97	皱瘤海鞘
Q-1-97	JX463451	21	戈登氏菌属 (<i>Gordonia terrae</i>) (NR_037022.1)	99	皱瘤海鞘

续表

菌株编号	收录编号	RFLP 组号	最相近属/种 (收录编号)	比对结果(%)	菌属来源
Q-1-53	JX463429	23	链霉菌属 (<i>S. griseoaurantiacus</i>) (NR_041186.1)	99	皱瘤海鞘
Q-2-13	JX463443	23	小单孢菌属 (<i>Micromonospora carbonacea</i>) (NR_037043.1)	99	乳突皮海鞘
Q-2-29	JX463474	23	链霉菌属 (<i>S. exfoliatus</i>) (NR_041229.1)	98	乳突皮海鞘
Q-1-37	JX463467	26	戈登氏菌属 (<i>G. terrae</i>) (NR_037022.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-45	JX463468	27	短杆菌属 (<i>Brevibacterium iodinum</i>) (NR_026241.1)	96	皱瘤海鞘
Q-1-452	JX463513	27	短杆菌属 (<i>B. permense</i>) (NR_025732.1)	98	皱瘤海鞘
Q-1-95	JX463516	27	红球均属 (<i>Rhodococcus equi</i>) (NR_041910.1)	96	皱瘤海鞘
Q-1-90	JX463450	32	拟诺卡氏菌属 (<i>Nocardiopsis trehalosi</i>) (NR_024958.1)	97	皱瘤海鞘
Q-1-902	JX463515	32	拟诺卡氏菌属 (<i>N. baichengensis</i>) (NR_043033.1)	98	皱瘤海鞘
Q-2-1	JX463441	34	链霉菌属 (<i>S. exfoliatus</i>) (NR_041229.1)	99	乳突皮海鞘
Q-2-20	JX463444	34	链霉菌属 (<i>S. griseoflavus</i>) (NR_042291.1)	99	乳突皮海鞘
Q-1-47	JX463469	35	链霉菌属 (<i>S. malaysiensis</i>) (NR_041410.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-50	JX463470	35	链霉菌属 (<i>S. thermodiastaticus</i>) (NR_036816.1)	97	皱瘤海鞘
Q-1-502	JX463514	35	链霉菌属 (<i>S. mexicanus</i>) (NR_041429.1)	99	皱瘤海鞘
Q-1-98	JX463471	36	链霉菌属 (<i>S. carpaticus</i>) (NR_043814.1)	98	皱瘤海鞘

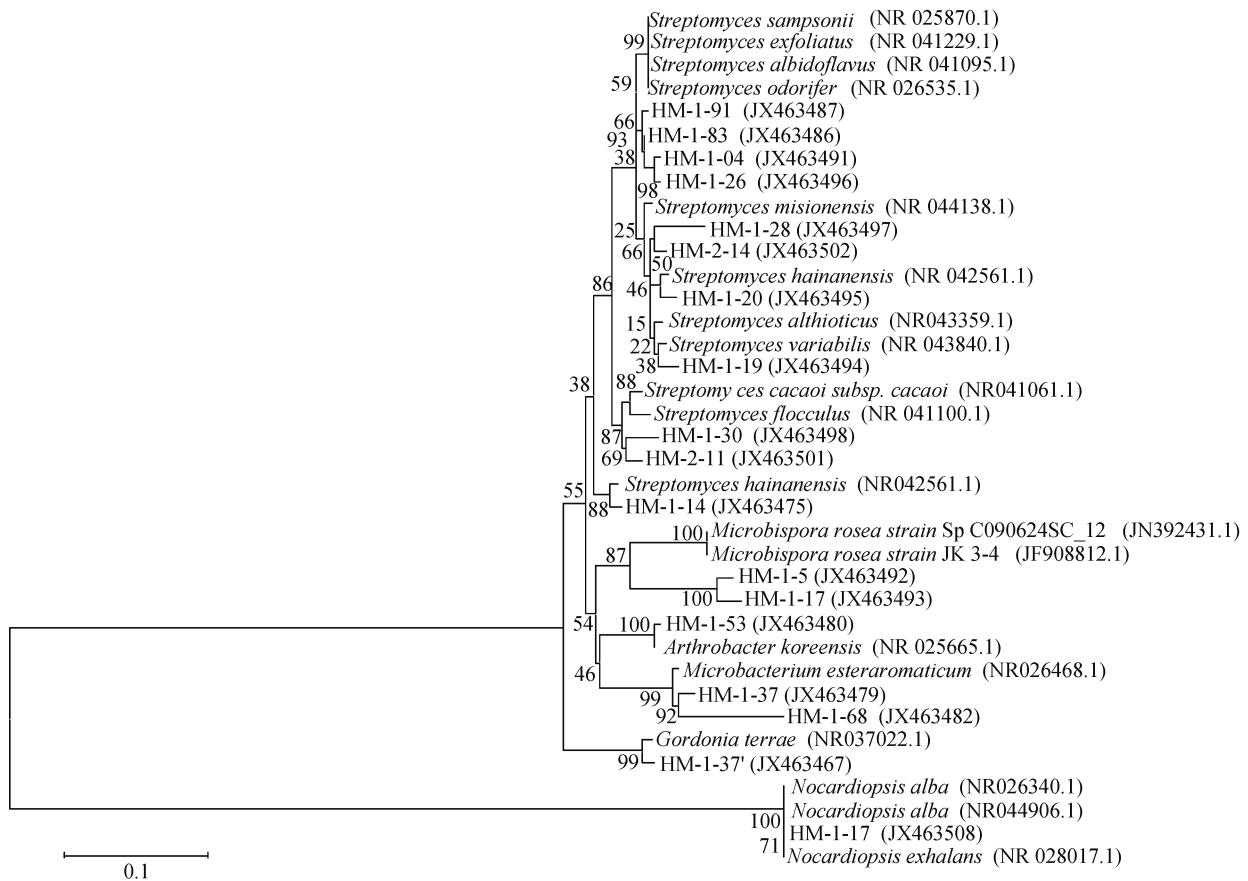


图 3 山海绵放线菌 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic representation of actinobacteria associated with *Mycale* sp. and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rRNA gene sequences

菌株 *Microbispora rosea* SpC 090624S C 和 *Microbispora rosea* JK 3-4 用于外缘对照。每个分支前的数据表示分析程序提供的比对相似百分率
Microbispora rosea strain SpC 090624S C and *Microbispora rosea* strain JK 3-4 were used as outgroups. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap

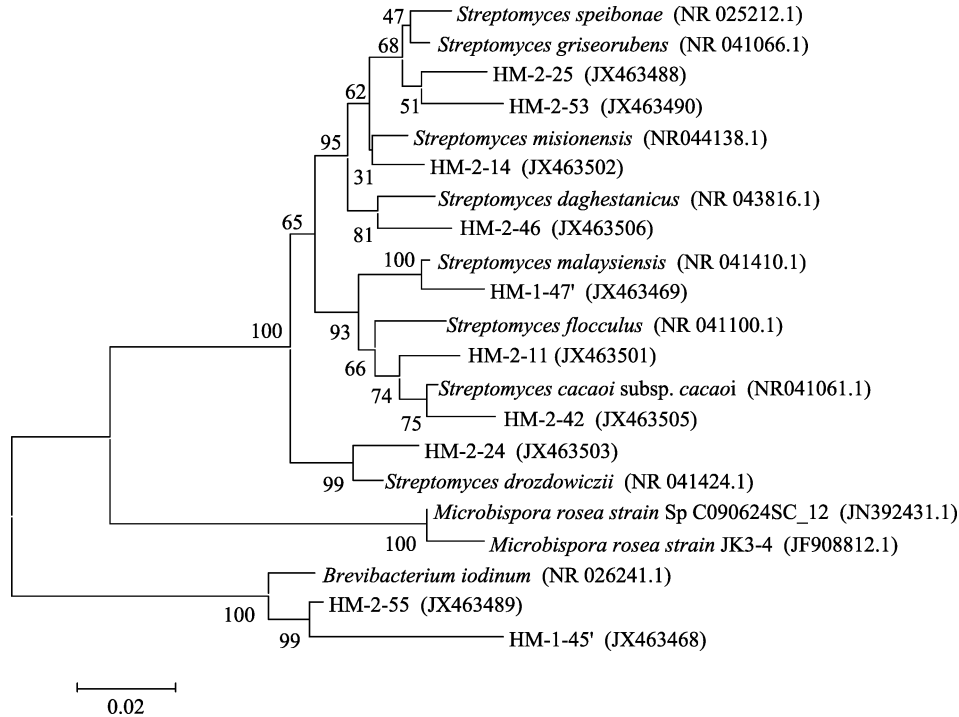


图4 网架海绵放线菌 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic representation of actinobacteria associated with *Styliassa* sp. and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rRNA gene sequences

菌株 *Microbispora rosea* SpC 090624S C 和 *Microbispora rosea* JK 3-4 用于外缘对照。每个分支前的数据表示分析程序提供的比对相似百分率 *Microbispora rosea* strain SpC 090624S C and *Microbispora rosea* strain JK 3-4 were used as outgroups. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap

测序结果表明, 55 株代表性放线菌(从典型 RFLP 带型和各种属独有带型组中挑选)中有 12 株属于稀有放线菌, 其他属于链霉菌, 该菌属在 4 个样品中都表现出丰富的种类。12 株稀有放线菌分属以下 7 个属: 拟诺卡氏菌、戈登菌、微杆菌、短杆菌、红球菌、小单孢菌和节细菌。其中山海绵中得到拟诺卡氏菌、节细菌、戈登菌和微杆菌属, 网架海绵中得到短杆菌; 皱瘤海鞘中得到拟诺卡氏菌、戈登菌、微杆菌、短杆菌和红球菌, 乳突皮海鞘中得到小单孢菌。

3 讨论

微生物与海鞘共生的现象能够使海鞘产生具有活性的次级代谢产物, 有很多是具有价值的药用化合物^[7-9], 表现出抗肿瘤、抗病毒、抗微生物等生理活性, 以抗肿瘤活性最为引人注目^[3]。但至今, 除证实海鞘有共生蓝藻细菌外^[10], 其相关微生物的研究并不多。文献中应用培养方法获得了一种海鞘的微生物群落信息以及一些分离菌株^[11-13]。但由于培养分离方法的局限性, 只能检测到存在于特定生存环

境中的少数微生物^[14-15]。利用 DGGE、克隆和 16S rRNA 基因测序等分子手段分析微生物群落, 发现似螺原体细菌在乳突皮海鞘的生殖腺中大量存在^[16]。但文献中对海鞘相关放线菌的报道极少。

本研究探讨了海鞘中相关放线菌的多样性, 是目前为止极少数海鞘相关微生物多样性报道中专门针对放线菌的研究。Menezes 等^[17]用 7 种添加营养丰富的人工海水并减少碳源的分离培养基从海鞘 *Didemnum* sp. 中分离出 3 个放线菌属: 短小杆菌、微球菌和戈登菌。从海鞘 *Didemnum Ligulum* 中分离出 4 个放线菌属: 短小杆菌、节细菌、短杆菌和诺卡氏菌。而本研究从皱瘤海鞘中分离出 6 个放线菌属, 从乳突皮海鞘中得到 2 个放线菌属, 可初步验证海鞘具有高的放线菌多样性, 且存在显著的种属间差异, 其中皱瘤海鞘相关放线菌的多样性是目前为止海鞘个体中可培养放线菌多样性最高的研究结果。可见分离培养结合 16S rRNA 基因测序的方法能很好的揭示海鞘相关放线菌的多样性, 并且所选用的 6 种分离培养基能够有效分离海鞘中相关放线菌, 优于其他研究中的分离培养基。

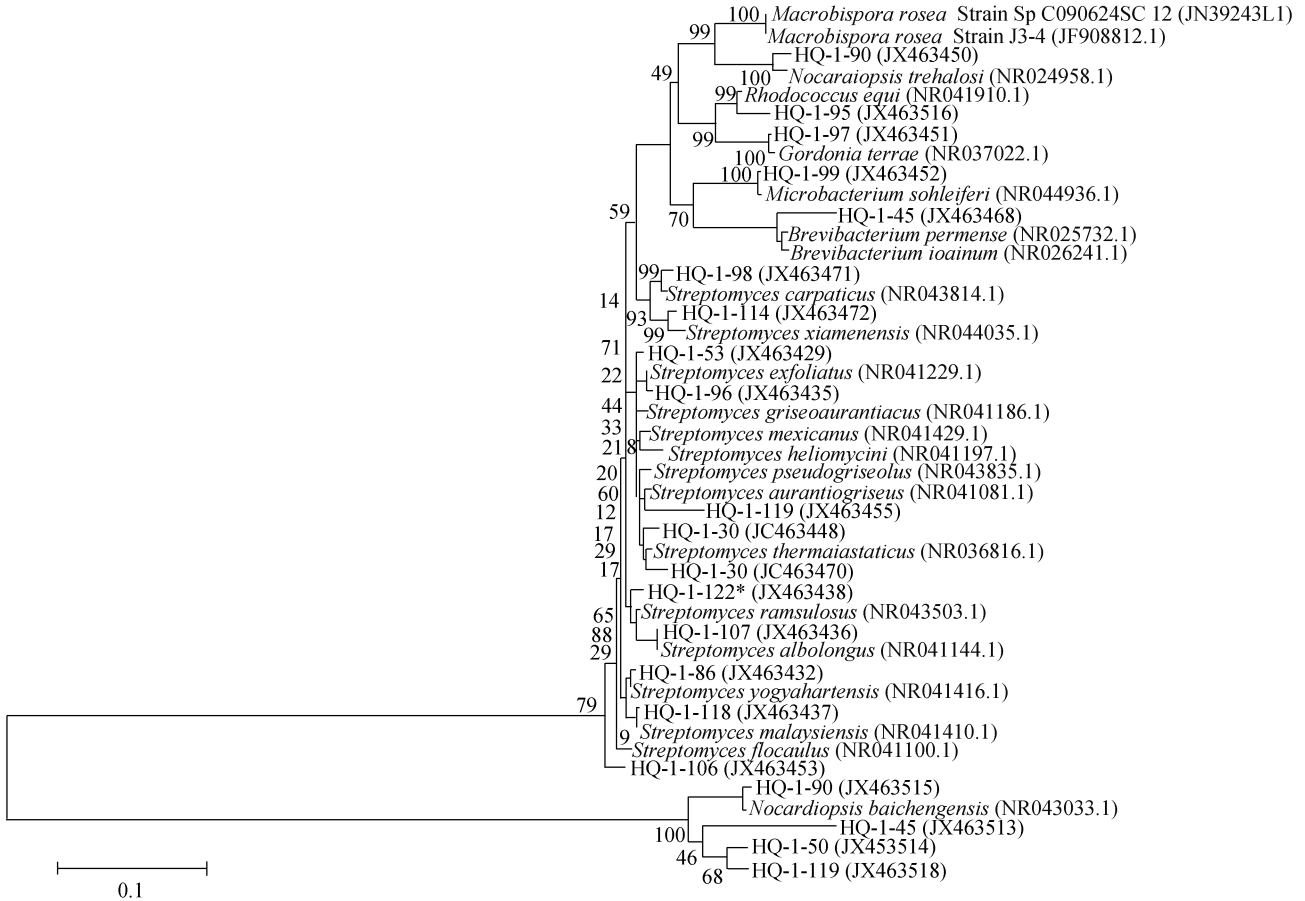


图 5 皱瘤海鞘放线菌 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic representation of actinobacteria associated with *Styela plicata* and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rRNA gene sequences

菌株 *Microbispora rosea* SpC 090624S C 和 *Microbispora rosea* JK 3-4 用于外缘对照。每个分支前的数据表示分析程序提供的比对相似百分率 *Microbispora rosea* strain SpC 090624S C 和 *Microbispora rosea* strain JK 3-4 were used as outgroups. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap

海绵来源的放线菌多样性研究已经广泛开展, 目前已分离出纤维菌属(*Cellulosimicrobium*)、酸微菌属(*Acidimicrobium*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、疣胞菌属(*Verrucosipora*)等 22 个属^[18]。张海涛等^[19]用 16S rRNA 基因扩增和 RFLP 及测序分析相结合的方法从大连海域繁茂膜海绵中分离出 7 个放线菌属。信艳娟等从大连海域繁茂膜海绵中筛选放线菌 9 个属^[2], 是目前多样性最高的研究结果。本研究从山海绵中分离出 5 个放线菌属, 网架海绵中分离出 2 个放线菌属, 虽然数量并不是最多, 但可表明海绵相关放线菌高的多样性水平。进而与海鞘相关放线菌多样性平行对比, 证明海鞘中具有丰富的放线菌资源, 在本研究中还表现出高于海绵来源的放线菌多样性, 是一种很有潜力的放线菌来源。同时, 海鞘中发现 8 种可能的新放线菌菌株, 数量上远高于在海绵(2 种)中的发现。

比较海绵之间、海鞘之间相关放线菌多样性, 可

发现无论数量上还是多样性水平上都存在显著性差异(表 3 和表 4)。这可能与其生长环境和生理结构的差异有密切关联。质地松软, 滤水系统发达, 生活于潮间带的山海绵比质地坚硬、骨针结构多的网架海绵更易富集海水中的微生物, 同时表面粗糙的皱瘤海鞘则比表皮光滑透明的乳突皮海鞘容易积累微生物, 因而表现出更高的可培养放线菌多样性。但是, 更重要的原因是研究手段的局限性, 分离培养手段无法获得稀有的难培养的种类。高浓度的营养物质可能比较适合生长速度快且对高浓度营养物质有适应能力的放线菌, 但对生长速度较慢的放线菌则可能有抑制作用^[20-21]。特别是放线菌可以“活的非可培养”状态存在^[22], 这更增加了培养难度。因此, 基于目前使用的分离培养方法并不能全面准确的反映海绵和海鞘中放线菌的多样性信息, 仍需应用新的分子多样性研究与培养相结合的方法进一步深入研究。

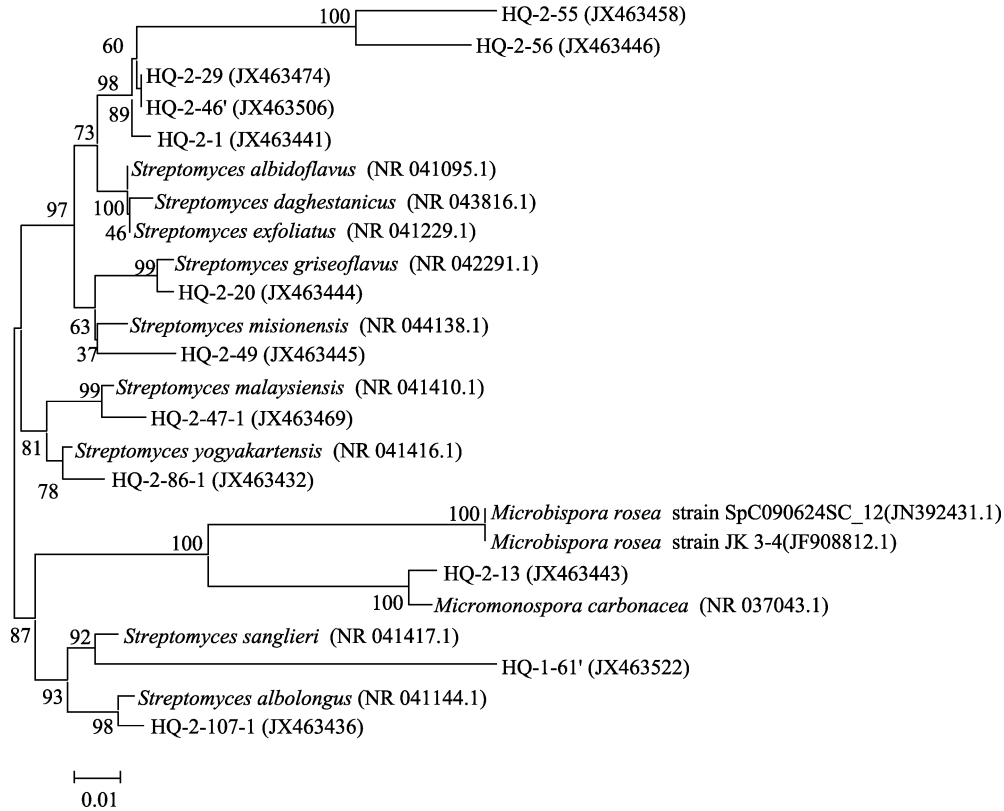


图 6 乳突皮海鞘放线菌 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 6 Neighbor-joining phylogenetic representation of actinobacteria associated with *M. manhattensis* and their closest NCBI (BLASTn) relatives based on 16S rRNA gene sequences

菌株 *Microbispora rosea* SpC 090624S C 和 *Microbispora rosea* JK 3-4 用于外缘对照。每个分支前的数据表示分析程序提供的比对相似百分率

Microbispora rosea strain SpC 090624S C and *Microbispora rosea* strain JK 3-4 were used as outgroups. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap

Li 等^[23]和 Webster 等^[24]都利用添加海绵组织提取液的放线菌培养基, 成功分离到稀有放线菌以及先前没有分到的菌株。这也为今后的分离培养研究提供了可选择的思路。同时也需结合分子生物学的研究手段从基因角度分析, 与分离培养方法互为补充, 提供分子信息指导, 以期获得更全面更准确的海绵和海鞘相关放线菌多样性信息, 真正验证海鞘相关放线菌的多样性及其特有的新菌种资源。

4 结语

作者用 6 种有效的分离培养基从两种海绵和两种海鞘中分别分离出 87 株和 111 株放线菌, 其中有 10 株为潜在的新菌株, 为海洋放线菌的开发利用提供了潜在的新资源。与海绵中分离得到的 6 个放线菌属和 2 个可能的新菌株相比, 从海鞘中分离到了 7 个放线菌属和 8 个可能的新株。表明海鞘具有较高的放线菌多样性水平, 是除海绵之外另一个极具潜

力的海洋放线菌来源, 可成为开发海洋未知放线菌菌株以及海洋天然活性产物的新方向和储备资源。

参考文献:

- [1] 李越中, 陈琦. 海洋微生物资源多样性[J]. 生物工程进展, 1998, 18(4): 34-40.
- [2] 信艳娟, 吴佩春, 邓麦村, 等. 繁茂膜海绵中可培养稀有放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 859-866.
- [3] 耿越, 张薛, 赵相轩. 海鞘类天然物的最新研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(6):73-78.
- [4] Takahashi Y, Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds[J]. Gen Appl Microbiol, 2003, 49: 141-154.
- [5] Zhang H T, Lee Y K, Zhang W, et al. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S

- rRNA gene-RFLP analysis[J]. Anton Leeuw, 2006, 90: 159-169.
- [6] Lee Y K, Kim H W, Liu C L, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials[J]. J Microbiol Meth, 2003, 52: 245-250.
- [7] Pisut D P, Pawlik J R. Anti-predatory chemical defenses of ascidians: secondary metabolites or inorganic acids?[J]. Exp Mar Biol Ecol, 2002, 270: 203-214.
- [8] Moss C, Green D H, Pérez B, et al. Intracellular bacteria associated with the ascidian *Esteinascidia turbinata*: phylogenetic and in situ hybridization analysis[J]. Mar Biol, 2003, 143: 99-110.
- [9] Ramasamy M S, Murugan A. Chemical defense in ascidians *Eudistoma viride* and *Didemnum psammathodes* in Tuticorn, southeast coast of India: bacterial epibiosis and fouling deterrent activity[J]. Indian J Mar Sci, 2003, 32: 337-339.
- [10] Hirose E, Maruyama T, Cheng L, et al. Intra- and extracellular distribution of photosynthetic prokaryotes, *Prochloron* sp. in a colonial ascidian: ultrastructural and quantitative studies[J]. Symbiosis, 1998, 25, 301-310.
- [11] Olgin Uribe G, Abou Mansour E, Boulander A, et al. 6-bromoindole-3-carbaldehyde form and *Acinetobacter* sp. bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murrayi*[J]. Chem Ecol, 1996, 23, 2507-2521.
- [12] Wahl M. Bacterial epibiosis on Bahamian and Pacific ascidians[J]. Exp Mar Biol Ecol, 1995, 191, 239-255.
- [13] Romanenko L A, Shumann P, Rhode M, et al. *Halomonsa halocynthiae* sp. nov. isolated from the marine ascidian *Halocynthia auranticum*. Int[J]. Syst Evol Microbiol, 2002, 52: 1767-1772.
- [14] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev, 1995, 59: 143-169.
- [15] Head I M, Saunders J R, Pickup R W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms[J]. Microb Ecol, 1998, 35: 1-21.
- [16] Elia T, Mary C, Stefan M, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with ascidians in Eel Pond (Woods Hole, Massachusetts, USA)[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 342: 138-146.
- [17] Menezes CBA, Bonugli-Santos RC. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state, Brazil[J]. Microbiol Res, 2010, 165: 466-482.
- [18] Taylor M W, Mohamed N M, Enticknap J J, et al. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2007, 71: 295-347.
- [19] 张海涛, 靳艳, 虞星炬, 等. 16S rDNA-RFLP 分析繁茂膜海绵可培养放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 828-831.
- [20] 岳秀娟, 余利岩. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 77-81.
- [21] 张晓华. 海洋微生物学[C]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007, 332-333.
- [22] 薛超波, 王国良, 金珊, 等. 海洋微生物多样性研究进展[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(3): 377-384.
- [23] Li Z Y, Liu Y. Marine sponge *Craniella australiensis* associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active actinomycetes screening, phylogenetic analysis[J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 43: 410-416.
- [24] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 434-444.

Comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria associated with marine sponges and ascidians in six isolation media

YANG Qi^{1,3,4}, XIN Yan-juan², Christopher FRANCO^{3,4}, KE Cai-huan¹, ZHANG Wei^{1,2,3,4}

(1. College of Ocean and Earth, Xiamen University, Xiamen 361005; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023; 3. Flinders Centre for Marine Bioproducts Development; 4. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Flinders University, Adelaide, South Australia, 5042, Australia)

Received: Aug.,9,2012

Key words: sponge; ascidian; actinobacteria; RFLP; 16S rRNA gene

Abstract: The diversity of culturable actinobacteria was investigated and compared between two sponges (*Mycale* sp. and *Stylissa* sp.) collected from Fujian province and two ascidians (*Styela plicata* and *Molgula manhattensis*) collected from Hainan province under the same isolation condition. Five actinobacteria selective isolation media and one general bacteria isolation medium were selected to isolate and culture actinobacteria from both sponges and ascidians. The phylogenetic affiliation of the actinobacterial isolates was assessed using a combination of 16S rRNA gene amplification-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and 16S rRNA gene sequencing. A total of 198 purified actinobacteria were cultivated, including 87 from sponges and 111 from ascidians. There are 38 different RFLP patterns and the phylogenetic analysis based on sequencing results reveal a high and distinctive diversity of actinobacteria associated with these two sponge species and two ascidian species, including six and seven actinomycetes genera, respectively. The BLAST results show that two actinobacterial isolates derived from sponges are probably novel strains whose similarity are lower than 97%, whereas there are eight isolates from ascidians regarded as potential novel actinobacteria. Comparing the diversity of actinobacteria associated with sponges and ascidians, most genera from sponge are also found in ascidians except *Arthrobacter*. The diversity of ascidian-associated actinobacteria is high and cannot be underestimated. Together with sponges, ascidians are also excellent and promising sources for novel marine actinobacteria currently under exploited for the discovery of new bioactive marine natural products.

(本文编辑: 谭雪静)