

柄海鞘共附生细菌的分离培养与系统发育多样性研究*

苗婷婷, 邢 翔, 杜宗军, 陈冠军*

(山东大学 威海分校 海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要:通过纯培养和 16S rRNA 基因序列的相似性比对,并构建系统发育树对威海海域柄海鞘共附生细菌的多样性进行了研究。用 2216E 培养基从柄海鞘样品中分离到 78 株细菌,通过形态学特征和 TCBS 培养基选择性筛选后,选取 30 株具有代表性的菌株进行了 16S rRNA 基因测序和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明,30 株菌株分别属于细菌域的 4 个系统发育类群(Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Gro-teobacteria)的 11 个科,11 个属。根据 16S rRNA 基因序列,大多数菌株与其系统发育关系最密切的模式菌株之间存在一定的遗传差异(16S rRNA 基因序列相似性为 91.82% ~ 98.93%)。其中菌株 HQW7, HQYD1, HQWD4, HQE1 和 HQE2 与相关模式菌株的 16S rRNA 基因最高相似度仅分别为 91.82%, 92.51%, 92.99%, 93.52%, 93.87%, 这 5 株菌可能代表新的分类单元。威海海域柄海鞘共附生细菌存在着较为丰富的物种多样性和系统发育多样性,并可能存在新的物种。

关键词:柄海鞘;共附生细菌;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:1671-6647(2012)01-0111-08

海洋中的微生物分布非常广泛,有的自由生活在海水中,有的存在于海底沉淀物或海泥的表面,还有一部分与海洋动植物处于共生、共栖、寄生或附生的关系。共附生细菌可能在清除宿主代谢废物^[1]和为宿主提供生物活性物质^[2-4]等方面扮演着重要角色。由于共附生菌长期与宿主共进化,往往拥有特殊的代谢途径,故很有可能产生结构全新的生理活性物质,为研究与开发微生物制品和微生物药物提供了宝贵的源头线索,因此许多研究者对于利用共附生海洋微生物作为天然生物制品的来源产生相当大的兴趣^[5]。从海洋生物分离出的具有重要生物功能的次级代谢产物,也往往是由附生于其上的微生物产生的。在许多情况下,若要得到大量宿主用于生产药物是非常困难的,这也是其商业化生产的障碍。而细菌则不同,大规模的培养就可以保证共生菌稳定的生产量^[6]。而且微生物具有生长周期短、代谢易于控制、菌种易于选育等优势,因此共生微生物资源的利用和开发应无来源之忧。因此,从共附生细菌中分离生物活性物质就能够越过这个障碍,免除了从自然环境中收获大量宿主的需要。这样,既保护了环境也降低了商业化生产的成本。

海洋无脊椎动物的体表和体内存在着大量的微生物,它们与海洋无脊椎动物之间存在着高度特异性的共附生关系。目前,海洋无脊椎动物的研究对象主要集中在海绵、海葵、珊瑚和一些肠腔动物。Kennedy 等^[7]对海葵共附生细菌区系以及具有抗菌活性的细菌进行了研究。Xie 等^[8]指出从海葵、贻贝等分离到的活性菌株数高于从其他动物中分离的活性菌数。郑立等^[9]的研究证明了无脊椎动物体表的共附生细菌对于赤潮藻具有抑制作用。近几年,在海鞘中也发现了许多结构新颖、活性独特的化合物^[10-12],引起了许多研究人员的高度重视,已经逐渐成了海洋天然产物化学研究的热点,海鞘也成了除海绵之外人类获取有显著生理

* 收稿日期:2011-04-15

资助项目:国家自然科学基金重点项目——渤海中南部底栖生物生产过程与生物多样性集成研究(40730847);山东大学自主创新基金项目——海洋微生物的资源采集及其次生代谢产物研究(IIFSDU)

作者简介:苗婷婷(1988-),女,山东济宁人,研究生,主要从事海洋生物学方面研究。E-mail:miaotingting456@163.com

* 通讯作者,教授,博士生导师,主要从事纤维素的微生物降解、微生物生理生化及酶学方面研究。E-mail:guanjuan@sdu.edu.cn

(王佳实 编辑)

活性物质的重要海洋生物资源。由于海洋生物中的许多活性化合物是由其共附生微生物代谢产生的,因此采集海鞘共附生微生物资源,研究其系统发育多样性,将可以为海洋活性化合物开发提供新的源头资料。

本研究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威海近海海域柄海鞘中可培养共附生细菌的系统发育多样性的研究结果,以期对相关微生物资源的研究、保护、开发和利用打下一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂

PCR 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,PCR 常规操作试剂和酶均购自生工生物工程(上海)有限公司。DNA Marker 购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 培养基

2216E 海洋细菌培养基:蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,柠檬酸铁 0.01 g,琼脂 15~18 g,陈海水 1 L,0.1g/L NaOH 调 pH 值至 7.2~7.6,121 °C,20 min 灭菌。

TCBS 培养基:成品 TCBS(北京 陆桥)培养基加入 0.02 g/L 的 NaCl,煮沸后倒平板。

1.2 样品的采集与菌株的分离

1.2.1 样品采集

柄海鞘(*Styela clava*)样品于 2009-09 采自山东威海近海(37°37'14"N,122°01'05"E)。采到的柄海鞘立即保存到装有海水的标本袋里,密封(防止柄海鞘与空气直接接触),迅速带回实验室。在实验室超净工作台中及时处理。

1.2.2 样品处理

将采集的柄海鞘用无菌海水反复冲洗表面后,在超净工作台中解剖,分别取其胃肠消化系统、咽部和生殖腺称重,用无菌海水冲洗后研磨成浆,用无菌海水按照 10^{-1} 到 10^{-6} 的比例进行梯度稀释。取柄海鞘体腔液 500 μ L,用无菌海水按照 10^{-1} 到 10^{-6} 的比例进行梯度稀释。在 2216E^[12] 固体培养基上涂布接种,每个板接种 0.1 mL,在 25 °C 下培养 3~5 d。用相同的培养条件分离纯化所得的菌株。

1.2.3 菌株的分离纯化与筛选

挑取平板上的单菌落,在 2216E 平板上进行划线分离,菌种达到纯培养以后,在 -70 °C 冰箱进行菌种的长期保藏。将纯培养物接种到 TCBS 培养基上进一步观察其生长状况。

1.3 细菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

1.3.1 细菌 DNA 的抽提

按照 DNA 柱式抽提试剂盒的相关说明操作进行抽提,0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3.2 细菌 16S rRNA 基因的扩增

利用 50 ng/ μ L 的 DNA 作为模板对 16S rRNA 基因进行扩增,PCR 引物为通用引物:正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3';反向引物 1492R:5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGAC-3'。PCR 反应体系:模板,1 μ L;正,反引物各 1 μ L;2 \times PCR Mix Kit,25 μ L;Taq 酶,1 μ L;ddH₂O,21 μ L。PCR 反应条件:94 °C 预变性 6 min;94 °C 变性 45 s,55 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环;最后 72 °C 温育 8 min。PCR 产物经电泳检测后直接送至测序公司进行测序或进行克隆后测序。

根据测序结果,运用 Blast 程序与数据库中已存在的细菌 16S rRNA 基因序列进行相似性比较分析;序

列的比对及系统发育分析采用 MEGA(4.0)软件。

1.4 Shannon-winner 多样性指数

本研究采用 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株属于不同物种的归类原则^[13],采用 Shannon-winner 指数(H)和均匀度指数(E)估算多样性。

$$H = -\sum_{i=1}^i (p_i)(\log_2 P_i) \quad (1)$$

$$E = H/\log_2 S \quad (2)$$

式中, S 为菌种数; P_i 为第 i 种的多度比例, $P_i = n_i/N$; n 为第 i 种的菌株数; N 为所有菌株数的总和。

2 结果与分析

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划线分离纯化,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 78 株纯培养物,其中 55 株细菌能够在 TCBS 培养基上生长。TCBS 培养基,即硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基,主要用于弧菌科细菌的分离培养。能够在 TCBS 培养基上生长说明本次试验中的 55 株细菌属于弧菌科。

2.2 柄海鞘相关微生物类群的多样性

通过菌落形态、细胞显微形态观察以及 TCBS 培养基培养实验结果去冗余,最终从 78 株纯培养物中选择 30 株(其中有 7 株为能够在 TCBS 培养基上生长的菌株)并进行测序和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。16S rRNA 基因 PCR 扩增后电泳结果见图 1,基因片段大小约为 1 500 bp。30 株分离菌株的 16S rRNA 基因序列提交 GeneBank 数据库进行注册,获得注册号为 JF721968~JF721997。

一般认为,根据 16S rRNA 基因序列,菌株间同源性在 93%~95%,可以认为属于不同的属^[14];同源性大于 95%,可以认为属于同一属;16S rRNA 序列同源性大于 97%,可以认为属于同一个种。基于 16S rRNA 基因的系统发育分析见图 2(系统发育树)。

16S rRNA 基因序列分析表明,30 个分离菌株属于细菌域的 4 个系统发育类群(表 1):放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌纲(Proteobacteria),其中包括 11 个科(Alteromonadaceae, Bacillaceae, Flammeovirgaceae, Flavobacteriaceae, Halomonadaceae, Micrococcaceae, Pseudomonadaceae, Psychromonadaceae, Shewanellaceae, Staphylococcaceae, Vibrionaceae)、11 个属(*Agarivorans*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flammeovirga*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Tenacibaculum*, *Pseudomonas*, *Psychromonas*, *Vibrio*)。其中,变形菌纲菌株都属于 γ -变形菌纲,占分离菌株的绝大部分比例(22 株,73.3%),其次是 Bacteroidetes 菌门(4 株,13.3%),Firmicutes 菌门(3 株,10%),Actinobacteria 菌门(1 株,3.3%)。

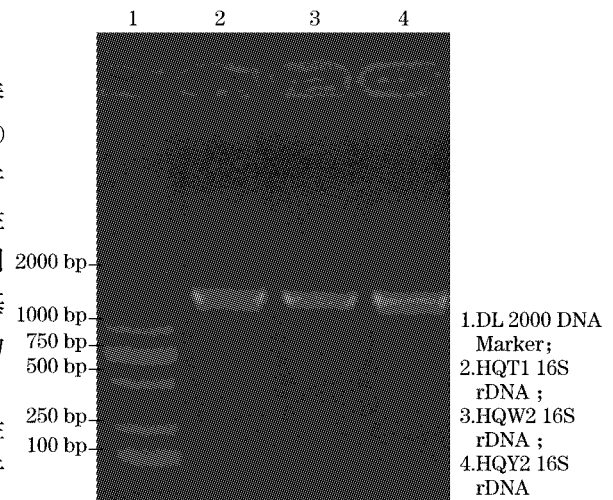


图 1 16S rRNA 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of 16S rRNA gene

表 1 柄海鞘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 Closest phylogenetic neighbors of strains isolated from *Styela clava* based on 16S rRNA sequence analysis

系统发育类群/科	菌株编号(收录号)	相近模式菌株(收录号)	相似度/%
Actinobacteria(1/30)			
Micrococcaceae(1)	HQF19(JF721985)	<i>Arthrobacter agilis</i> ATCC 966T(X80748)	99.05
Bacteroidetes(4/30)			
Cytophagaceae(1)	HQYD1(JF721990)	<i>Cytophaga fermentans</i> ATCC 19072T(M58766)	92.51
Flammeovirgaceae(2)	HQWD4(JF721983)	<i>Flammeovirga aprica</i> ATCC 23126T (AB247553)	92.99
	HQSC5(JF721981)	<i>Flammeovirga kamogawensis</i> JCM 23196T(AB251933)	98.93
Flavobacteriaceae(1)	HQSC1(JF721996)	<i>Tenacibaculum adriaticum</i> JCM 14633T (AM412314)	97.32
Firmicutes(3/30)			
Bacillaceae(2)	HQYC1(JF721989)	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> JCM 11807T(AF541966)	99.27
	HQYC2(JF721984)	<i>Bacillus maris flavi</i> JCM 11544T(AF483624)	98.50
Staphylococcaceae(1)	HQY2(JF721986)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970T(X66100)	99.04
Proteobacteria(22/30)			
Alteromonadaceae(1)	HQWB1(JF721993)	<i>Agarivorans albus</i> JCM 21469T(AB076561)	95.86
Hahellaceae(2)	HQE1(JF721991)	<i>Endozoicimonas elysicola</i> JCM 21568T(AB196667)	93.52
	HQE2(JF721992)	<i>Endozoicimonas elysicola</i> JCM 21568T(AB196667)	93.87
Halomonadaceae(1)	HQSC3(JF721988)	<i>Halomonas alimentaria</i> DSM 15356T(AF211860)	99.75
Pseudomonadaceae(1)	HQW10(JF721980)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588T(AF094748)	98.08
Psychromonadaceae(1)	HQF5(JF721975)	<i>Psychromonas arctica</i> CECT 5674T(AF374385)	100.00
Shewanellaceae(9)	HQF14(JF721982)	<i>Shewanella livingstonensis</i> LMG 19866T(AJ300834)	95.57
	HQWB9(JF721997)	<i>Shewanella loihica</i> DSM 17748T(DQ286387)	100.00
	HQF2(JF721973)	<i>Shewanella vesiculosa</i> CECT 7339T(AM980877)	99.88
	HQF3(JF721974)	<i>Shewanella vesiculosa</i> CECT 7339T(AM980877)	99.76
	HQF11(JF721976)	<i>Shewanella vesiculosa</i> CECT 7339T(AM980877)	99.88
	HQF16(JF721977)	<i>Shewanella vesiculosa</i> CECT 7339T(AM980877)	99.88
	HQF17(J F721978)	<i>Shewanella vesiculosa</i> CECT 7339T(AM980877)	99.76
	HQF18(JF721979)	<i>Shewanella vesiculosa</i> CECT 7339T(AM980877)	99.88
	HQW2 (JF721972)	<i>Shewanella waksmanii</i> ATCC BAA-643T(AY170366)	99.50
	Vibrionaceae(7)	HQSB3(JF721987)	<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749T(X56576)
HQSB7(JF721971)		<i>Vibrio brasiliensis</i> LMG 20546T(AJ316172)	96.66
HQSB2(JF721970)		<i>Vibrio hepatarius</i> LMG 20362T(AJ345063)	94.62
HQYB6(JF721995)		<i>Vibrio hepatarius</i> LMG 20362T(AJ345063)	96.69
HQWB6(JF721994)		<i>Vibrio neptunius</i> LMG 20536T(AJ316171)	99.17
HQW7(JF721969)		<i>Vibrio pectenicida</i> ATCC 700783T(Y13830)	91.82
HQT1(JF721968)		<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 33125T(AJ515230)	96.32

注:表中加粗字体代表新的分类单元

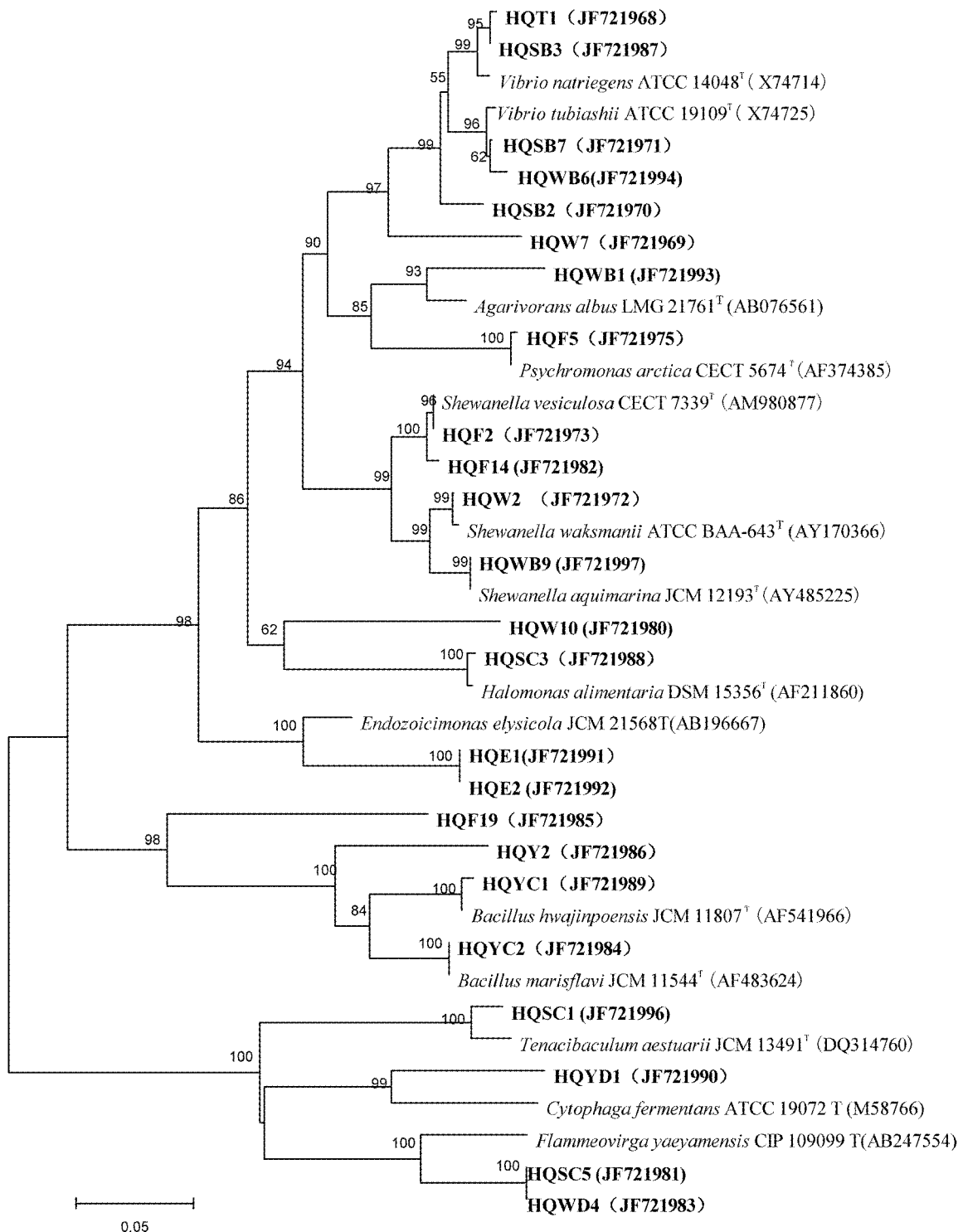


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的柄海鞘共附生可培养细菌的系统发育树

Fig. 2 Neighbor-Joining tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among strains isolated from *Styela clava* and related taxa

2.3 物种与遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株是属于不同物种的归类原则, 30 个分离菌株可以归为 23 个物种。柄海鞘相关可培养细菌的 Shannon-winner 多样性指数(H)为 4.26, 均匀度指数(E)为 0.97, 表明其具有较高的物种多样性和均匀度。除了 2 株(HQF5 和 HQWB9)分别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), 部分分离菌株与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性在 91.82%~98.93% 之间, 说明部分菌株与其系统发育关系密切的相关菌株之间存在一定的遗传差异。

值得指出的是, 菌株 HQW7、HQYD1、HQWD4、HQE1 和 HQE2 与模式菌株的 16S rRNA 基因序列存在较大差异, 最高相似度仅分别为 91.82%, 92.51%, 92.99%, 93.52%, 93.87%, 这 5 株菌可能代表新的分类单元。目前这些细菌的新种鉴定工作正在进行中。

3 讨论

本研究采用细菌纯培养以及基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对威海海域柄海鞘的共附生细菌的多样性进行了研究。本次试验共获得 78 株纯培养物, 通过 TCBS 培养基的选择性筛选可知, 柄海鞘共附生细菌中有很高比例的菌株属于弧菌属(55 株, 70.5%)。作为近海河口环境中的微生物区系的主要成员, 弧菌广泛分布于半咸水、河口、海洋的水体和沉积物中。弧菌在海洋环境中占据优势地位, 除在营养物的循环中起着非常重要的作用外, 弧菌还是鱼、虾、软体动物肠道内可培养细菌种的优势菌群, 在消化和营养方面可能起着非常重要的作用^[15-16]。于德华等^[17]在调查研究青岛近岸不同环境中的海洋弧菌时发现, 在海水、沉积物、鱼类和藻类等海洋生物表面, 弧菌科都是优势种群, 在鱼体表面甚至达到 83.1%, 在工业污染区沉积物中也占 39.5%, 其它环境中都达到 50% 左右甚至更多。在无污染海域, 弧菌属在细菌区系中的比例为 10%~14%, 在海水养殖密集区的比例在 6%~7.5% 之间, 在鱼体表面达 47.7%, 在工业污染区的比例为 2.6%~5%。本次试验结果与此相符。

Webster 等^[18]研究了海绵(*Rhopaloeides odorabile*)共附生细菌的系统发育多样性, 在他们分离并测序的 34 株细菌中, 放线菌门菌株占 30%, γ -变形菌纲菌株占 41%。Huang 等^[19]在调查硃洲海域马粪海胆可培养细菌多样性时发现, 厚壁菌门菌(58.8%)是其中占优势的微生物类群, 其次是 γ -变形菌纲(26.5%)。Xiao 等^[20]发现海葵中可培养细菌中厚壁菌门也是优势菌群, 占所分离细菌总数的 40.5%, γ -变形菌纲菌株占 33.3%。本研究结果也表明 γ -变形菌纲是柄海鞘共附生细菌的优势菌群, 这与其它海洋无脊椎动物具有相似之处。

用于系统发育分析的 30 株菌归属 4 个系统发育群 11 个科 11 个属, 可以分为 23 个物种, 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 91.82%~98.93%), 且发现 5 株菌 HQW7、HQYD1、HQWD4、HQE1 和 HQE2 与模式菌株的 16S rRNA 基因相似度较低, 可能代表新的分类单元。上述结果揭示了柄海鞘可培养细菌的多样性。

参考文献(References):

- [1] WILKINSON C R. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges[J]. Marine Biology, 1978, 49: 161-167.
- [2] UNSON M D, HOLLAND N D, FAULKNER D J. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue[J]. Marine Biology, 1994, 119: 1-11.
- [3] SCHMIDT E W, OBRAZTSOVA A Y, DAVIDSON S K, et al. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -teobacterium, "*Candidatus* Entotheonella palauensis"[J]. Marine Biology, 2000, 136: 969-977.

- [4] 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* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(3): 305-312.
- [5] JOERN P. Metabolites from symbiotic bacteria [J]. Nat. Prod. Rep., 2004, 21: 519-538.
- [6] HILL R T. Microbes from marine sponges, a treasure trove of biodiversity for natural products discovery [M] // Bull A T. Microbial diversity and bioprospecting. Washington, D. C. : American Society for Microbiology, 2004: 177-190.
- [7] KENNEDY J, BAKER P, PIPER C, et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters [J]. Mar. Biotechnol., 2009, 11: 384-396.
- [8] XIE X Q, LIN H P, YAN B, et al. Screening of cytotoxic activity of marine animal symbiotic and epiphyte microorganisms against B16 tumor cell [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006, 25(6): 26-30.
- [9] ZHENG L, HAN X T, YAN X J, et al. A preliminary study on algicidal activity of marine bacteria associated with marine organism [J]. Advances in Marine Science, 2006, 25(4): 511-519. 郑立, 韩笑天, 严小军等, 海洋生物共栖细菌抑藻活性的初步研究 [J]. 海洋科学进展, 2006, 25(4): 511-519.
- [10] RYUICHI S, STROH J G, SULLIN D W, et al. Seven new didemnins from the marine tunicate *Trididemnum solidum* [J]. Journal of the American Chemical Society, 1995, 117(3): 3734-3736.
- [11] MCDONALD L A, SWERSEY J C, IRELAND C M, et al. Botryllamide A-D, new brominated tyrosine derivatives from styelid ascidians of the genus *Botryllus* [J]. Tetrahedron, 1995, 51(18): 5237-5240.
- [12] WILLIAMS A B, JACOBS R S. A marine natural product, patellamide D, reverses multidrug resistance in a human leukemic cell line [J]. Cancer Letters, 1993, 71(1-3): 97-102.
- [13] STACKEBRANDT E, COEBEL B M. 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 and Evolutionary Microbiology, 1994, 44: 846-849.
- [14] LIU Y, HUANG X H, HE P Q, et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of cultivable bacteria from India Ocean hydrothermal vents [J]. Advances in Marine Science, 2009, 27(4): 193-200. 刘艳, 黄晓航, 何培青, 等. 印度洋深海热液区可培养细菌的分子鉴定与系统发育分析 [J]. 海洋科学进展, 2009, 27(4): 193-200.
- [15] MOSS S, LEAMASTER B R, SWEENEY J N. Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* Reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water [J]. World Aquac. Soc., 2000, 31: 255-263.
- [16] SAWABE T, SUGIMURA I, OHTSUKA M, et al. *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discushannai* [J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1998, 48: 573-580.
- [17] YU D H. The Investigation of marine vibrios in different environment around Qingdao and the rapid detection of pathogenic *Vbrio anguillarum* by PCR amplification [D] 于德华. 青岛近岸不同环境中海洋弧菌的检测及用 PCR 方法快速检测病原鳃弧菌 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [18] WEBSTER N S, WILSON K J, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 434-444.
- [19] HUANG K, ZHANG L, ZIU Z X, et al. Diversity of culturable bacteria associated with the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* from Naozhou Island [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 49(11): 1424-1429.
- [20] XIAO H, CHEN Y, LIU Z, et al. Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with a sea anemone from coast of the Naozhou island in Zhanjiang, China [J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2009, 49(2): 246-250.

Isolation and Phylogenetic Analysis of Associated Bacteria From the *Styela clava*

MIAO Ting-ting, XING Xiang, DU Zong-jun, CHEN Guan-jun
(Marine college of Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract: Associated bacteria were isolated from *Styela clava* collected from the coast of Weihai, China. They were cultured by using conventional culture-dependent method and investigated by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. The 78 isolates were selected from samples on marine 2216 medium (Difco). Based on morphological characters and weather growing on TCBS selective medium, we selected 30 strains for molecular phylogenetic study using 16S rRNA gene sequences. Our results showed that 30 isolates were members of 11 genera of 11 families in 4 major phylogenetic groups (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria). Most of the strains had certain genetic differences between the closely known type strains (16S rRNA gene sequence similarity were 95.57%~99.88%). The lower similarity suggested that at least 5 strains represented new species. The results presented above showed that there were abundant species diversity and phylogenetic diversity of bacteria isolated from *Styela clava*.

Key words: *Styela clava*; associated bacteria; 16S rRNA gene; phylogenetic analysis; bacterial diversity

Received: April 15, 2011