

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 31120101151292

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

福建沿海海绵 *Mycale* sp. 共附生微生物多样性及其抑菌活性研究

Phylogenetic Diversity and Antibacterial Activity of Bacteria
Associated with Marine Sponge *Mycale* sp. from the Coast of
Fujian, China

苏培

指导教师姓名: 赵晶 副教授

专业名称: 海洋生物技术

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

二零一三年五月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 文献综述	1
1.1 海绵简介	1
1.1.1 海绵组织结构.....	2
1.1.2 海绵分布及其生活习性.....	2
1.1.3 海绵中天然产物.....	3
1.2 海绵共附生微生物	4
1.2.1 海绵共附生微生物概念.....	5
1.2.2 海绵共附生微生物的分布及其作用.....	5
1.2.3 海绵共附生微生物的传递方式.....	6
1.2.4 海绵共附生微生物多样性.....	9
1.3 海绵及其共附生微生物活性物质	10
1.3.1 海绵活性物质.....	10
1.3.2 海绵共附生微生物与活性物质.....	11
1.3.3 海绵共附生微生物分离技术.....	12
1.3.4 海绵共附生微生物活性物质筛选方法.....	16
1.4 山海绵 (<i>Mycale</i> sp.) 的研究背景及现状.....	20
1.4.1 山海绵属活性物质.....	20
1.4.2 山海绵属共附生微生物研究.....	21
1.5 研究目的和意义	21
1.5.1 研究目的.....	21
1.5.2 研究计划.....	22
参考文献	23
第二章 山海绵(<i>Mycale</i> sp.)中可培养微生物分离及其抑菌活性研究	

.....	30
2.1 微生物的分离	30
2.1.1 实验材料及仪器.....	30
2.1.2 实验方法.....	32
2.1.3 结果与讨论.....	33
2.1.4 小结.....	35
2.2 可培养微生物多样性分析	36
2.2.1 实验材料.....	36
2.2.2 实验方法.....	37
2.2.3 结果.....	40
2.2.4 讨论.....	49
2.2.5 小结.....	51
2.3 可培养微生物次级代谢产物功能基因多样性研究	52
2.3.1 实验材料.....	52
2.3.2 实验方法.....	53
2.3.3 结果.....	56
2.3.4 讨论.....	65
2.3.5 小结.....	67
2.4 山海绵(<i>Mycale</i> sp.)可培养微生物抑菌活性研究.....	68
2.4.1 实验材料.....	68
2.4.2 抑菌活性筛选方法.....	69
2.4.3 抑菌筛选结果.....	70
2.4.4 讨论.....	74
2.4.5 小结.....	75
参考文献	76
第三章 山海绵(<i>Mycale</i> sp.)中 HNS054 菌株鉴定及抑菌活性产物的分	
离提纯.....	80
3.1 HNS054 菌株的鉴定及抑菌活性的研究	80

3.1.1 材料和方法.....	80
3.1.2 HNS054 菌株鉴定结果.....	85
3.1.3 HNS054 菌株抑菌活性研究.....	89
3.1.4 讨论.....	91
3.1.5 小结.....	93
3.2 链霉菌 HNS054 菌株抑菌活性产物的分离提纯.....	94
3.2.1 实验材料.....	94
3.2.2 实验方法.....	95
3.2.3 实验结果.....	97
3.2.4 小结.....	100
参考文献.....	101
第四章 山海绵(<i>Mycale</i> sp.) 幼体与成体中共附生微生物的分子生态学	103
4.1 实验材料及仪器.....	103
4.1.1 样品采集.....	103
4.1.2 试剂和仪器.....	104
4.2 实验方法.....	104
4.2.1 样品前处理.....	104
4.2.2 山海绵成体、幼体及环境样品基因组 DNA 提取.....	105
4.2.3 PCR 扩增海绵微生物 16S rDNA 序列.....	106
4.2.4 山海绵成体、幼体及环境中微生物 16S rDNA-RFLP 分析.....	106
4.2.5 GenBank 序列号申请.....	106
4.2.6 海绵成体、幼体以及环境样品 16S rDNA 系统发育分析.....	106
4.3 实验结果.....	107
4.3.1 DNA 提取结果.....	107
4.3.2 PCR 扩增结果.....	107
4.3.3 16S rDNA-RFLP 分析结果.....	108
4.3.4 系统发育分析.....	108
4.4 讨论.....	121

4.5 小结	124
参考文献	126
第五章 总结	127
展望与不足	129
附录 I.....	130
附录 II	136
附录III	137
感谢	140

厦门大学博硕士学位论文摘要

Contents

ABSTRACT in Chinese	I
ABSTRACT in English	III
Chapter 1 Literature Review	1
1.1 Introduction of sponges	1
1.1.1 Sponge tissue structure	2
1.1.2 Distribution and life habit of sponges.....	2
1.1.3 Nature products in sponges.....	3
1.2 Microorganism associated with sponges	4
1.2.1 The concept of Sponge-Microbe.....	5
1.2.2 The distribution and function of Sponge-Microbe.....	5
1.2.3 The Transmission of Sponge-Microbe.....	6
1.2.4 Diversity of Microorganisms from Sponges.....	9
1.3 Nature product from Sponge and Sponge-associated Microbe	10
1.3.1 Bioactive product from Marine Sponge-Microbe.....	11
1.3.2 The relationship of bioactive compounds and Sponge-associated Microbe	11
1.3.3 Isolation from Sponge-Microbe.....	12
1.3.4 The screening of bioactive compounds from Sponge-associated Microbe .	17
1.4 Research Background of <i>Mycale</i> sp	20
1.4.1 The bioactive product of genus <i>Mycale</i>	20
1.4.2 The bioactive product from Microorganism associated with <i>Mycale</i>	21
1.5 Research significance and aim	21
1.5.1 Research significance.....	21
1.5.2 Research objective	22
References	23
Chapter 2 Isolation and Antibacteria Activity of Microorganism	

associated with <i>Mycale</i> sp.	30
2.1 Isolation Microorganism from associated with <i>Mycale</i> sp.	30
2.1.1 Material.....	30
2.1.2 Methods.....	32
2.1.3 Results and Discussion.....	33
2.1.4 Conclusion.....	35
2.2 Diversity of Cultivable bacteria associated with Sponge	36
2.2.1 Material.....	36
2.2.2 Methods.....	37
2.2.3 Results.....	40
2.2.4 Discussion.....	49
2.2.5 Conclusion.....	51
2.3 The Diversity of Nature products genes from Cultivable bacteria with <i>Mycale</i> sp.	52
2.3.1 Material.....	52
2.3.2 Methods.....	53
2.3.3 Results.....	56
2.3.4 Discussion.....	65
2.3.5 Conclusion.....	67
2.4 The antibacteria activity of Cultivable bacteria from <i>Mycale</i> sp.	68
2.4.1 Materials.....	68
2.4.2 Methods.....	69
2.4.3 Results.....	70
2.4.4 Discussion.....	74
2.4.5 Conculion.....	75
References	76
Chapter 3 The identification and antibacteria product isolated from Strain HNS054 with <i>Mycale</i> sp.	79
3.1 The identification and antibacteria activity of Strain HNS054	79

3.1.1 Material and Methods	79
3.1.2 Identification of HNS054.....	84
3.1.3 Antibacteria activity of strain HNS054.....	88
3.1.4 Discussion.....	90
3.1.5 Conclution.....	92
3.2 The isolation of bioactive product from strain HNS054.....	93
3.2.1 Material	93
3.2.2 Methods	94
3.2.3 Results.....	96
3.2.4 Conclution.....	99
References.....	100
Chapter 4 Diversity of microorganism associated with larva and adult of <i>Mycale</i> sp.	101
4.1 Material.....	101
4.1.1 Sample collection.....	101
4.1.2 Reagents and Equipments.....	102
4.2 Methods.....	102
4.2.1 Preparation of samples.....	102
4.2.2 DNA extraction from microorganism associated with larva, adults and environmental sample	103
4.2.3 16S rDNA amplification	104
4.2.4 16S rDNA-RFLP enzyme screening.....	104
4.2.5 GenBank accession numbers application.....	104
4.2.6 16S rDNA Phylogenetic Analysis.....	104
4.3 Results	105
4.3.1 DNA extraction	105
4.3.2 16S rDNA PCR results.....	105
4.3.3 16S rDNA-RFLP analysis.....	106
4.3.4 Phylogenetic Analysis.....	106

4.4 Discussion.....	119
4.5 Conclusion.....	122
References.....	123
Chapter 5 Summary	124
Outlook and Shortage.....	126
Appendix I	127
Appendix II	133
AppendixIII.....	134
Acknowledgements	137

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

海绵是一类古老的多细胞后生动物,是海洋天然产物最主要的来源之一。目前,越来越多直接或间接的证据表明活性化合物是由海绵内微生物产生或相关的。因此,挖掘海绵共生微生物资源寻找活性化合物已成为世界各国竞相研究的热点。山海绵属(*Mycale*)主要分布在中国东南沿海,是福建沿海海域药源海绵的优势种群。本研究以 *Mycale* sp. 为研究对象,对其可培养共附生微生物进行多样性研究,对分离得到的微生物进行发酵培养,生物活性筛选,次级代谢产物 PKS 和 NRPS 功能基因多样性调查,以期寻找和发现有价值的活性化合物或信息。同时利用微生物分子生态学技术,对海绵成体、幼体以及环境微生物群落进行调查,在揭示不同生长阶段山海绵共附生微生物群落结构差异,探究海绵微生物分布及传递方式,为后续理论及应用研究奠定理论基础。

从 *Mycale* sp.中共分离得到 51 株可培养细菌,16S rDNA 系统发育分析表明它们分别属于放线菌门(*Actinobacteria*, 16 株)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 2 株)、 γ -变形菌门(*γ -Proteobacteria*, 12 株)、 α -变形菌门(*α -Proteobacteria*, 5 株)和厚壁菌门(*Firmicutes*, 15 株),部分微生物是首次在海绵中发现。对这 51 株细菌进行抑菌活性筛选发现其中 20 株具有抑菌活性,他们分别属于放线菌门(*Actinobacteria*, 9 株)、 γ -变形菌门(*γ -Proteobacteria*, 7 株)和芽孢杆菌属(*Bacillus*, 4 株)。其中一株放线菌 HNS054 利用多基因联合技术被鉴定为 *Streptomyces labedae*,同时对多种病原菌具有抑制活性,特别是革兰氏阳性菌(*Staphylococcus aureus* MTCC 1430, *Bacillus subtilis* MTCC 441),对其发酵产物进行分离提纯,得到一些分子量在 1000 以下的活性化合物。

功能基因筛选显示共有 21 株细菌分别拥有 NRPS 基因或者 PKS 基因。其中三株拟诺卡氏菌属(HNS051, 55, 58)和两株芽孢杆菌(HNS004, 015)则含有 PKS/NRPS 杂合基因。BLAST 结果显示 PKS-KS 域共分属于四大类群,包括放线菌门(*Actinobacteria*, 7 株), α -变形菌门(*α -Proteobacteria*, 3 株),蓝藻细菌(*Cyanobacteria*, 2 株)和厚壁菌门(*Firmicutes*, 1 株)。其中大部分细菌的 KS 域氨基酸序列都与 GenBank 中 I 型 KS 域具有 80 %以上的同源性,而 *Nocardiopsis* sp. HNS048 与 *Burkholderia gladioli* 的 II 型 KS 域具有 77 %同源性,

Streptomyces microflavus HNS049 则与 *S. globisporus* C-1027 的 NRPS-I 型 PKS 融合蛋白基因具有 94 % 同源性。*Nocardiopsis dassonvillei* HNS051, HNS055 和 HNS058 的 PKS 基因与 *Verrucospora maris* AB-18-032 的模块化聚酮化合物基因显示 69 % 的相似度。NRPS 比对结果显示 8 株菌的 NRPS-A 域共分为 3 大类群, 分别是 γ -变形菌门 (γ -*Proteobacteria*, 1 株)、放线菌门 (*Actinobacteria*, 6 株) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*, 1 株)。*Nocardia cyriacigeorgica* HNS052 的 NRPS-A 域与 *Rhodococcus opacus* 显示 54 % 同源性, 暗示 HNS052 可能含有新颖的 NRPS 基因信息。以上结果表明 *Mycale* sp. 含有多多样性丰富的共附生微生物及基因资源, 为后续活性化合物的开发提供了来源。

利用 16S rDNA-RFLP 对山海绵成体、幼体以及环境中微生物进行多样性分析, 发现山海绵 (*Mycale* sp.) 成体和幼体中有 8 个微生物类群, 变形菌门 (α , β , γ -*Proteobacteria*), 绿湾菌门 (*Chloroflexi*), 放线菌门 (*Actinobacteria*), 浮霉菌门 (*Planctomycetes*), 蓝细菌 (*Cyanobacterium*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*); 环境中仅发现, 变形菌门 (α , γ -*Proteobacteria*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)。海绵成体中共附生微生物的多样性高于幼体, 而海绵中微生物多样性明显高于其生存的水环境。除 α , γ -*Proteobacteria* 外, 其余 5 个类群在海绵中较为丰富。其中, 一株归属于 β -*Proteobacteria* 的不可培养的细菌, 在海绵成体和幼体之间均大量存在, 而水环境中未检测到, 推测其为海绵特有的共生菌。

关键词: 山海绵; 共附生微生物; 多样性; 抑菌活性; NRPS/PKS 基因; 垂直传递

Abstract

Marine sponge *Mycale* sp. is the potential source of natural bioactive products. Accumulating evidences indicate that the origin of bioactive compounds in marine sponges may be symbiotic microorganisms, or a cooperative interaction between sponges and associated microorganisms. *Mycale* sp. is widespread in the coastal region of Fujian sea area, and is a dominant marine sponge species. So, mining the resource of sponge-associated microorganisms and seeking the bioactive product, have become the research focus. The aim of this study was to confirm whether microbes were present in *Mycale* sp., to investigate the diversity of NRPSs and PKSs genes from all isolates, and to determine the potentially useful antimicrobial activities produced by sponge-associated bacteria. For the first time, 51 bacterial strains were isolated from *Mycale*.sp. Phylogenetic analysis of 16S rDNA gene showed that they belong to *Actinobacteria* (16 strains), *Bacteroidetes* (2 strains), γ -*Proteobacteria*(12 strains), α -*Proteobacteria* (5 strains) and *Firmicute* (15 strains). Twenty isolates with antimicrobial activities were mainly clustered within the group of *Actinobacteria*(9 strains), γ -*Proteobacteria* (7 strains) and *Bacillus* (4 strains). Among these isolates, strain HNS054 which showed 99 % similarities with *Streptomyces labedae* exhibited the strongest antimicrobial activities against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* MTCC 1430, *Bacillus subtilis* MTCC 441) and *Vibrio* species. The screening of functional genes revealed that 8 *Actinobacteria* species with antimicrobial activities possessed NRPS-A or PKS-KS domains, especially genus of *Nocardiopsis* in *Actinobacteria* contain KS as well as A domain. The amplified ketosynthase (KS) domains were clustered into 4 phyla, including *Actinobacteria* (7/13), α -*Proteobacteria* (3/13), *Cyanobacteria* (2/13) and *Firmicutes* (1/13). Most of the KS domain AA sequences had high homology (>80 %) to type I ketosynthase, but the KS domain of *Nocardiopsis* sp. HNS048 has 77 % similarities to type II KS domain of *Burkholderia gladioli*. The KS domain of *S. microflavus* HNS049 showed 94 % similarly to NRPS-type-I PKS fusion protein gene from *Streptomyces globisporus*

C-1027. Meanwhile, the KS domain from *N. dassonvillei* HNS051, HNS055 and HNS058 showed 69 % similarity to modular polyketide synthase gene from *Verrucosispora maris* AB-18-032. A domains of 8 isolates were grouped into 3 phyla, γ -Proteobacteria (1/8), Actinobacteria (6/8) and Firmicutes (1/8). The NRPS-A gene of strain HNS052 identified as *Nocardia cyriacigeorgica* showed 54 % similarities to *Rhodococcus opacus*. It implied that HNS052 could have novel NRPS gene information. Analysis of 16S rDNA-RFLP confirmed that diverse microorganism existed in adults *Mycale* sp., including α , β , γ -Proteobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Planctomycetes, Cyanobacterium, but the low diversity in larva and marine environment. Except α and γ -Proteobacteria, other phyla were abundant in *Mycale* sp. Among these bacteria, an uncultured bacterium clustered within β -Proteobacteria existed in larva and adults of *Mycale* sp. It indicated it could be the real symbiotic microorganism of sponge *Mycale* sp.

Keywords: *Mycale* sp.; symbiotic bacteria; diversity; PKS/ NRPS gene; antibacterial activity; vertical-transmission

第一章 文献综述

1.1 海绵简介

海绵 (marine sponge) 是较为古老的多细胞无脊椎动物, 在地球上已经存在 7-8 亿年, 它在海洋生态系统中占有重要的地位, 在海洋生态系统中占有重要的位置, 约占海洋生物总量的 1/15。海绵广泛分布在热带以及温带海域, 从潮间带到数千米的海底都有海绵的身影^[1,2]。海绵主要分为四大纲: 钙质海绵纲 (*Calcarea*), 寻常海绵纲 (*Demospongiae*), 硬骨海绵纲 (*Sclerospongiae*) 和 六放海绵纲 (*Hexactinellida*)。在众多海绵中以寻常海绵纲 (*Demospongiae*) 最为常见。估计, 目前全世界约有 15000 种海绵, 而实际的多样性可能比这还要高^[3]。已发现的海绵形态多样, 小的只有几厘米, 而大的则有几米长, 一些海绵常常附着在坚硬的基质上生长, 成薄层状; 另外还有树枝状, 伞状, 桶状等多种形态。海绵在颜色上也呈现多样性, 常见的有, 褐色, 黄色, 红色, 紫色以及白色等。图 1.1 展示了本实验室从南中国海采集的常见海绵种类的形态。

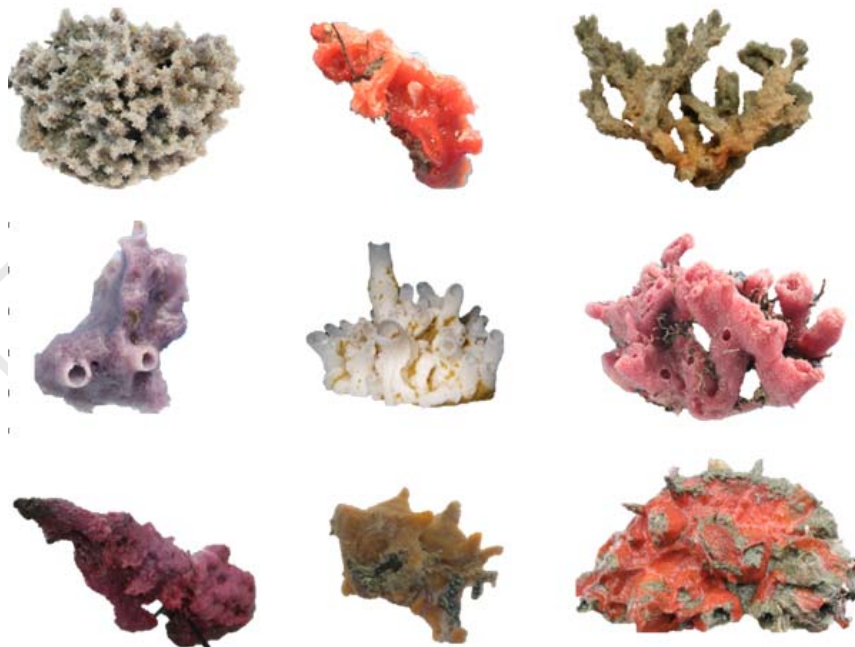


图 1.1 采集自南中国海海绵种类的形态

Fig.1.1 The morphology of sponge from South China Sea

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫