

发光细菌 PB-P3.9 的鉴定与 *gyrB*、*luxA* 基因系统发育分析

周明霞¹, 陈勇喆¹, 王 辉², 陈 智², 邓 乐^{1,*}

(1.微生物分子生物学省部共建国家重点实验室培育基地, 湖南师范大学, 湖南 长沙 410081;

2.长沙市畜禽水产品质量检测中心, 湖南 长沙 410013)

摘 要: 平板划线分离法从猪肉上分离得到一株发光细菌 PB-P3.9, 依据细菌 DNA 促旋酶 B 亚基基因(*gyrB*)、荧光素酶 A 基因(*luxA*)序列比对及构建系统发育树鉴定其种属, 并探讨其来源。扩增 *gyrB*、*luxA* 基因并测序, 两个基因序列比对结果与发光杆菌属的明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)分别有 99%、98% 的序列相似性, 结合其生物学特性, 确定 PB-P3.9 为一株明亮发光杆菌。根据 GenBank 数据库中明亮发光杆菌标准菌株 *gyrB*、*luxA* 基因序列, 采用距离法构建系统发育树, 表明 PB-P3.9 株与标准菌株 NCIMB 1279 有最近亲缘关系, 结合其生长条件, 拟确定此发光细菌 PB-P3.9 来源于海洋深海鱼或中层海水浮游生物。

关键词: 发光细菌; 明亮发光杆菌; *gyrB* 基因; *luxA* 基因; 系统发育分析

Identification and Phylogenetic Analysis Based on *gyrB* and *luxA* of *Photobacterium* PB-P3.9

ZHOU Ming-xia¹, CHEN Yong-zhe¹, WANG Hui², CHEN Zhi², DENG Le^{1,*}

(1.The Co-construction Laboratory of Microbial Molecular Biology of Province Department and Ministry of Science and Technology, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Quality Inspection Center for Livestock, Poultry and Aquatic Products of Changsha, Changsha 410013, China)

Abstract: *Photobacterium* strain named PB-P3.9 was isolated from pork by streak plate method. Phylogenetic analysis based on the *gyrB* and *luxA* genes was performed. This strain was identified as *Photobacterium phosphoreum* according to its biological properties and sequence analysis. The *gyrB* and *luxA* genes revealed 99% and 98% homology when compared with standard strains. Phylogenetic tree construction based on the standard *gyrB* and *luxA* gene sequences published in GenBank was carried out using MEGA4.1 software package by neighbor-joining method. The results showed that this strain had the highest similarity with the standard strain NCIMB1279. Based on their similarities in phylogenetic tree and the growth conditions, it is possible that the isolated strain comes from a marine deep-sea fish such as NCIMB1279, NCIMB1275, NCIMB7 or ATCC11040T, or a middle-level seawater plankton.

Key words: *Photobacterium*; *Photobacterium phosphoreum*; *gyrB* gene; *luxA* gene; phylogenetic analysis

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0220-05

发光细菌(*Luminous bacteria*)是一类在正常的生理条件下能够发射可见荧光的细菌。已经命名的发光细菌中, 霍乱弧菌(*Vibrio cholerea*)和青海弧菌(*Vibrio qinghaiensis*)为淡水发光细菌, 光杆菌属(*Photorhabdus*)均为陆生发光细菌, 其余皆为海洋发光细菌^[1]。细菌的发光是由细菌荧光酶催化的代谢过程形

成, 表达荧光酶的基因称为 *lux* 基因, 目前, 所有已发现的发光细菌都存在 *lux* 基因^[2]。由于其独特的生理特性, 发光细菌有着巨大的应用价值, 在环境监测中作为测定环境中毒物的指标。我国常用的 3 种发光细菌为: 明亮发光杆菌、费氏弧菌、青海弧菌。其中明亮发光杆菌在文献[3]中被使用。

收稿日期: 2010-11-30

基金项目: 长沙市政府专项基金项目(100304)

作者简介: 周明霞(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物技术。E-mail: zhoushuang999@yahoo.com.cn

* 通信作者: 邓乐(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为现代微生物技术。E-mail: dengle@hunnu.edu.cn

传统的发光细菌分类与鉴定均以表型特征和生理生化实验结果为基础,20世纪70年代以来,化学分析和核酸分析引入细菌分类,直接和间接比较信息分子(DNA、RNA和蛋白质)的序列,根据序列的不同作为线索,使细菌种系群的划分建立在更为客观的基础上^[2]。本实验拟扩增 *gyrB* 基因和 *luxA* 基因,并测序,所测序列提交到 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 Blast 搜索比对,并构建系统发育树,对从冻猪肉上分离的一株发光细菌 PB-3.9 进行种属鉴定及其来源分析。其中 *gyrB* 基因为单拷贝管家基因,编码细菌 DNA 促旋酶的 B 亚基单位。*gyrB* 基因序列长度约 1.2~1.4kb,平均替换率为每 100 万年变化 0.7%~0.8%,比 16S rDNA 的每 5000 万年变化 1% 的速率要快,且不发生水平转移,并普遍存在于各种细菌中,满足了作为系统发育分析靶基因的要求,近年来正逐渐成为研究者欢迎的近缘种鉴别的新靶标^[4-7]。*lux* 基因作为发光细菌的一类特有基因,对 *lux* 基因进行同源性比对可以显著提高菌种鉴定的准确性。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

菌株自夜晚发光的猪肉样品(长沙家乐福超市)分离得到,暂命名为 PB-P3.9。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司;PCR 试剂盒、DNA Marker、引物 上海生工生物工程技术服务有限公司;DNA 凝胶电泳回收试剂盒 广州东盛生物科技有限公司;肉汁蛋白胨培养基等试剂均采用分析纯级。

1.2 仪器与设备

LS55 荧光仪 上海天美科学仪器有限公司;共聚焦荧光显微镜、JEM-1230 型透射电子显微镜 日本电子株式会社;Ds-fil 型光学显微镜 日本 Nikon 公司;PL 203 型电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司;101-I 型电热鼓风干燥箱 上海圣欣科学仪器有限公司;HWS-150 恒温恒湿培养箱 上海森信实验仪器有限公司;HVE-50 型全自动高压灭菌锅 日本 Hiayama 公司;离心机、PCR 仪 德国 Eppendorf 公司;HH-2 数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;WD-9403C 型紫外透射反射仪、DYY-III-6B 型稳压稳流电泳仪 北京市六一仪器厂;DNA 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 发光细菌的分离与纯化

暗室中,挑取样品猪肉上的发光亮点,接种普通肉汁蛋白胨固体平板培养基上,18℃ 恒温培养。18~

24h 后将平板置于暗室中,挑取发光菌落,平板划线法纯化。在暗处,纯培养的发光细菌发出明亮的蓝绿光。

1.3.2 发光细菌的生物学特性分析

电镜负染色法观察菌体形态^[8]。共聚焦荧光显微镜检测和荧光仪扫描分析菌株光学性质^[9]。革兰氏染色、各种糖发酵实验、赖氨酸脱羧酶实验、尿素酶实验等生化实验以及在不同温度、pH 值、氯化钠浓度等条件下培养,对菌株生理生化特性进行检测^[10]。

1.3.3 发光细菌的分子鉴定

1.3.3.1 DNA 模板制备

普通肉质蛋白胨液体培养 18~24h,取 2~3mL 细菌菌液,按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书上的步骤操作,制备 PCR 用的 DNA 模板。

1.3.3.2 *gyrB* 基因扩增与测序

上游引物^[11]: 5'-GAAGTTATCATGACGGTACTTC-3';
下游引物^[11]: 5'-AGCGTACGAATGTGAGAACC-3'。

反应体系(50μL): 5μL 10×Ex buffer、5μL 2mmol/L dNTP、2μL 100μmol/L 引物、5μL DNA、2μL Ex Taq DNA 聚合酶、3μL 25mmol/L MgCl₂、26μL ddH₂O。

PCR 扩增程序: 95℃ 变性 2min; 94℃ 20s、48℃ 15s、72℃ 90s,共 35 个循环;72℃ 延伸 7min。PCR 产物用 DNA 凝胶电泳回收试剂盒纯化后,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3.3.3 *luxA* 基因扩增与测序

上游引物^[12]: 5'-CTTTTAGATCCAATGTCAAAAGGCCG-3';
下游引物: 5'-TCAGAACCATTTCGCTTCAAATCCAAC-3'。

反应体系(50μL): 5μL 10×Ex buffer、5μL 2mmol/L dNTP、2μL 100μmol/L 引物、5μL DNA、2μL Ex Taq DNA 聚合酶、4μL 25mmol/L MgCl₂、25μL ddH₂O。

PCR 扩增程序: 95℃ 变性 2min; 94℃ 20s、50℃ 15s、72℃ 60s,共 35 个循环;72℃ 延伸 7min。PCR 产物用 DNA 凝胶电泳回收试剂盒纯化后,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3.3.4 序列比对分析

测得的 *gyrB* 基因和 *luxA* 基因序列提交到 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 Blast 搜索比对。

1.3.3.5 *gyrB*、*luxA* 基因系统发育分析

从 NCBI GenBank 数据库下载明亮发光杆菌标准菌株 *gyrB*、*luxA* 基因序列,采用邻位连接(neighbor-joining)法分别构建 *gyrB* 和 *luxA* 的系统发育树^[13-15],分析所分离发光细菌与标准菌株的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 发光细菌的生物学特性

经纯培养的发光细菌编号为 PB-P3.9, 在昏暗处发出明亮的蓝绿光(图 1), 肉汁蛋白胨固体培养基上呈现近灰白色, 圆形, 边缘整齐, 稍隆起, 表面光滑的菌落形态。革兰氏染色阴性(图 2)。电镜负染色观察菌体呈球杆形(图 3), 无鞭毛, 菌体大小 $(1.5\sim2.5\mu\text{m})\times(1.0\sim2.0)\mu\text{m}$, 单个或成对生长。钠离子为生长必需, 最适生长含盐量 2%~3%。生长 pH 值范围 5~8.5。与《伯杰细菌鉴定手册》^[10]中发光杆菌属(*Photobacterium* Beijerinck 1889, 401)的特征描述一致。发光细菌 PB-P3.9 的生化鉴定结果和生物学特性见表 1, 与发光杆菌属(*Photobacterium*)发光细菌的分类特征进行比较, 发光细菌 PB-P3.9 与明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)的特性最为相似。



图 1 发光细菌 PB-P3.9 的纯培养
Fig.1 Pure culture of strain PB-P3.9

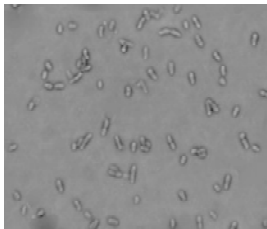


图 2 发光细菌 PB-P3.9 革兰氏染色照片
Fig.2 Gram's staining of strain PB-P3.9

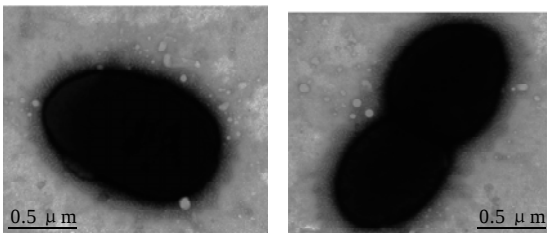


图 3 发光细菌 PB-P3.9 电镜负染色照片($\times 50000$)
Fig.3 Electron micrographs of negatively stained strain PB-P3.9 ($\times 50000$)

表 1 发光杆菌属(*Photobacterium*)发光细菌的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical properties of *Photobacterium*

特性	发光杆菌属(<i>Photobacterium</i>)发光细菌的分类特性				
	<i>Photobacterium angustum</i> ^[2]	<i>Photobacterium leiognathi</i> ^[2]	<i>Photobacterium kishitanii</i> ^[2]	<i>Photobacterium phosphoreum</i> ^[2]	发光细菌 PB-P3.9
在固体培养基上的侧生鞭毛	—	—	—	—	—
在固体培养基上游动	—	—	—	—	—
赖氨酸脱羧酶			+	—	+
精氨酸水解酶			+	—	+
硝酸盐还原	D	+	+	+	+
利用葡萄糖产气	—	—		+	+
4	80	—		+	+
生长 30	+	+		D	D
温度/℃ 35	+	+		—	—
40	—	—		—	—
葡萄糖	+	+		+	+
蔗糖	D	—		—	—
物质 乳糖	+	+		+	—
利用 麦芽糖	D	—		+	+
果糖	+	+		+	+
甘油	+	+		+	+

注: +, 正反应; —, 负反应; D, 正反应菌株 11%~89%; 数值代表正反应菌株的百分数。

2.2 发光细菌的光谱特性

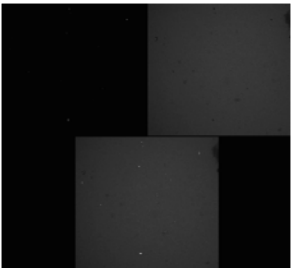
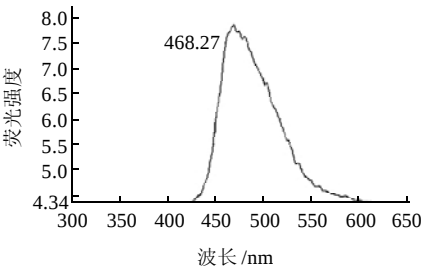


图 4 发光细菌 PB-P3.9 共聚焦显微镜照片($\times 40$)
Fig.4 Confocal laser scanning micrograph of strain PB-P3.9 ($\times 40$)



添加 3% NaCl 溶液培养。
图 5 发光细菌 PB-P3.9 的活细胞生物发光光谱
Fig.5 Bioluminescence spectrum of living cells of strain PB-P3.9

共聚焦显微镜观察为菌体自发光(图 4)。经 24h 培养的菌液, 3000r/min 离心 3min, 去掉上清液, 添加 3%NaCl 溶液制成细菌悬液, 充分摇匀, 室温条件下(20℃)用 LS55 荧光仪测定活菌生物发光光谱, 扫描范围为

300~700nm, 扫描速度 1500nm/min。扫描结果: 最大发射光波长 468nm, 半峰高宽 68nm(图 5), 与明亮发光杆菌的发光光谱特性相似^[9]。

2.3 发光细菌的分子鉴定

用质量分数 1.0% 的琼脂糖凝胶(溴化乙锭染色), 对 *gyrB*、*luxA* 基因扩增产物作电泳检测, 180V 稳定电压, 电泳 40min, 通过凝胶成像分析系统观察, 确定并切下目的条带凝胶, 用 DNA 凝胶电泳回收试剂盒回收目的基因。目的基因送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。最终所测 *gyrB* 基因全长 1200bp, *luxA* 基因全长 690bp。 *gyrB*、*luxA* 基因序列分别提交到 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 Blast 搜索比对。比对结果表明, 发光细菌 PB-P3.9 株 *gyrB* 基因序列与标准菌株 *P.phosphoreum* NCIMB(1279、188、1275、7、395)、*P.phosphoreum* FS-(2.2、2.1、4.1、5.1、5.2、2.3)、*P.phosphoreum* AK-3 均有 99% 的序列相似性。*luxA* 基因序列与 *P.phosphoreum* NCIMB(1279、1275、7、395)、*P.phosphoreum* FS-(2.2、2.1、3.1、4.2、5.1、5.2)、*P.phosphoreum* ATCC 11040 均有 98% 的序列相似性。提交序列到 GenBank, 获得发光细菌 PB-P3.9 的 *gyrB* 基因登录号 JF261184、*luxA* 基因登录号 JF261183。

2.4 *gyrB*、*luxA* 基因系统发育分析

下载 NCBI GenBank 数据库中发光杆菌属标准菌株的 *gyrB*、*luxA* 基因序列^[10-11]。构建系统发育树的 *gyrB* 核苷酸序列, 包括分离株 PB-P3.9 与 7 条来自 GenBank 的相关序列(表 2)。构建系统发育树的 *luxA* 核苷酸序列, 包括分离株 PB-P3.9 与 7 条来自 GenBank 的相关序列(表 2)。采用 MEGA4.1 软件包中邻位连接 (neighbor-joining) 法分别构建 *gyrB* 和 *luxA* 的系统发育树(图 6、7)。*gyrB* 基因和 *luxA* 基因所构建的发育树结果一致, 分离株 PB-P3.9 与发光杆菌属中的明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)聚成一簇, 并与标准菌株 *P.phosphoreum* NCIMB1279 有最近亲缘关系。

表 2 发光杆菌属标准菌株

Table 2 Details of standard *Photobacterium* strains

菌株编号	菌株来源	<i>luxA</i> 登录号	<i>gyrB</i> 登录号	年份
NCIMB 1279	symbiotic with deep-sea fishes	EF415627.1	EF415526.1	2007
NCIMB1275	symbiotic with deep-sea fishes	EF415624.1	EF415523.1	2007
ATCC51760	symbiotic with deep-sea fishes		AY455878.1	2009
ATCC35080	symbiotic with deep-sea fishes	EF415629.1	EF415508.1	2007
NCIMB844	symbiotic with deep-sea fishes	AY341064.2		2007
NCIMB12839	acropoma hanadai light organ	AY849528.1		2007
NCIMB13481	spoiled cod fillet		AY849479.1	2007
NCIMB70	symbiotic with deep-sea fishes	EF415619.1	EF415518.1	2007
ATCC11040	symbiotic with deep-sea fishes	DQ988873.2	AY455875.1	2009
PB-P3.9	frozen pork	JF261183	JF261184	2011

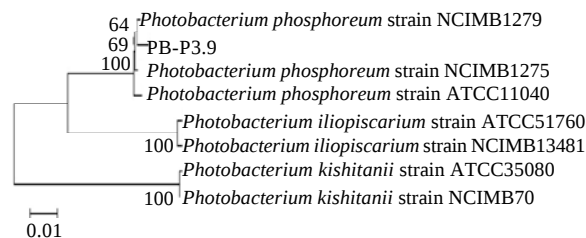


图 6 基于 *gyrB* 基因构建的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree based on the *gyrB* sequence

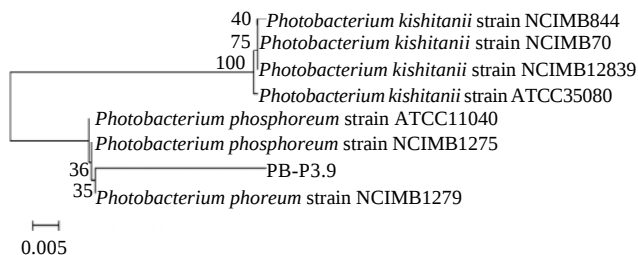


图 7 基于 *luxA* 基因构建的系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree based on the *luxA* sequence

3 结 论

结合生物学特性、光谱特性、*gyrB*、*luxA* 基因序列比对, 确定发光细菌 PB-P3.9 为明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)。 *gyrB*、*luxA* 基因系统发育分析结果显示, 该发光菌株与标准菌株 *P. phosphoreum* NCIMB 1279 亲缘关系最近, 后者是与深海鱼类^[11,16](长尾鳕科鱼类和后肛鲑科鱼类^[17])共生的一种发光细菌, 或者寄生于中层海水水域的浮游生物内。说明从发光猪肉上分离得到的这株发光细菌 PB-P3.9 来自海洋。推测在运输途中, 冻猪肉接触到带有发光细菌的海水并被污染所致。

4 讨 论

本实验所鉴定菌株为发光细菌, 由于发光细菌一些特有的生物学特性, 根据《伯杰细菌鉴定手册》^[10], 用传统的发光细菌分类与鉴定方法能准确将其鉴定到属水平^[12]。在细菌的菌种鉴定中, 16S rDNA 序列分析法是基础方法之一, 几乎可以对所有的细菌进行属水平上的鉴定^[6,18]。然而, 由于 16S rDNA 的高度保守性, 对相似率极高的近缘种无法做进一步的区分^[6,19]。 *gyrB* 基因因为单拷贝基因, 普遍存在于各种细菌中, 不显现频繁的水平转移, 具备了作为系统发育分析靶基因的条件, 由于 *gyrB* 作为蛋白编码基因, 其所固有遗传密码子的兼并性使得 DNA 序列可以发生较多的变异而不改变氨基酸序列, 这就使得 *gyrB* 基因序列在区分和鉴定细菌近缘种方面, 比非蛋白编码基因 16S rDNA 具有更高的分辨率, 因此适用于菌种间的区别和鉴定^[4-7,20-21]。例如,

Dauga^[22]在利用 *gyrB* 基因比较肠杆菌科(Enterobacteriaceae)不同属的系统进化关系时发现,与 16S rRNA 相比, *gyrB* 序列比较适用于属内或属间关系的比较分析。近年来, *gyrB* 基因在细菌的系统发育和鉴定细菌亲缘种方面得到了广泛应用,在建立的细菌鉴定与分类数据库(identification and classification of bacteria, ICB)中,可提供关于 *gyrB* 序列的数据^[5]。另外 *lux* 基因作为发光细菌的一类特有基因,对其进行同源性比对可以显著提高菌种鉴定的准确性。*gyrB*、*luxA* 基因序列比对以及结果分析,其基因扩增产物单一,容易快速、准确测序,可以准确鉴定出发光细菌的种属;通过 *gyrB*、*luxA* 基因系统发育分析,能确定发光细菌种间亲缘关系,并能显著提高种间水平鉴定的分辨率。

参考文献:

- [1] DUNLAP P V, KITA-TSUKAMOTO K. Luminous bacteria in the prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria[M]. 3rd ed. New York: Springer, 2006: 863-892.
- [2] 朱文杰,郑天凌,李伟民. 发光细菌与环境毒性检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
- [3] 国家环境保护总局,水和废水检测分析方法编委会. 水和废水检测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 729-736.
- [4] KASAI H, WATANABE K, GASTEIGE R, et al. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria[J]. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform, 1998(9): 13-21.
- [5] 安然,易图永,肖启明,等. *gyrB* 基因在细菌分类和检测中的应用[J]. 江西农业学报, 2010, 22(4): 18-20.
- [6] 李献梅,王小芬,杨洪岩,等. 促旋酶(*gyrase*)B亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706.
- [7] LADUC M T, SATOMI M, AGATA N, et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthraciscereus thuringiensis* group[J]. Microbiol Meth, 2004, 56(3): 383-394.
- [8] 米琴,安燕,郝微,等. 青海湖发光细菌的分离鉴定及电镜观察[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2008(4): 58-63.
- [9] 朱文杰,何学民,杨颐康. 海洋发光细菌的生物发光光谱[J]. 发光学报, 1986, 7(1): 127-131.
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京: 科学出版社, 1984: 488-490.
- [11] AST J C, CLEENWERCK I, ENGELBEEN K, et al. *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 2073-2078.
- [12] DUNLAP P V, AST J C. Genomic and phylogenetic characterization of luminous bacteria symbiotic with the deep-sea fish *Chlorophthalmus albatrossis*(Aulopiformes: Chlorophthalmidae)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 930-939.
- [13] AST J C, DUNLAP P V. Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(10): 1641-1654.
- [14] AST J C, DUNLAP P V. Phylogenetic analysis of the *lux* operon distinguishes two evolutionarily distinct clades of *Photobacterium leiognathi*[J]. Arch Microbiol, 2004, 181: 352-361.
- [15] KAEDING A J, AST J C, PEARCE M M, et al. Phylogenetic diversity and cosymbiosis in the bioluminescent symbioses of "*Photobacterium mandapamensis*"[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3173-3182.
- [16] BUDSBERG K J, WIMPÉE C F, BRADDOCK J F. Isolation and identification of *Photobacterium phosphoreum* from an unexpected niche: migrating salmon[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(11): 6938-6942.
- [17] RUBY E G, GREENBERG E P, HASTINGS J W. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1980, 39(2): 302-306.
- [18] WARD D W, WELLER R, BASTESON M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345: 63-65.
- [19] WANG Liting, LEE F, TAI Chunju, et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group[J]. Int J Syst Evol Micr, 2007, 57: 1846-1850.
- [20] SUSUMU Y, MINORU W, KUMIKO K T, et al. *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 1438-1442.
- [21] CHIU H H, CHOU H H, JEAN W D, et al. Isolation and characterization of marine luminous bacteria from shallow coastal waters of Taiwan[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2007, 40: 14-23.
- [22] DAUGA C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of enterobacteriaceae: a model molecular systematic studies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52 (2): 531-547.