

海洋微生物多样性及其分子生态学研究进展

李祎^{1,2} 郑伟^{1,2} 郑天凌^{1,2*}

(1. 厦门大学 滨海湿地生态系统教育部重点实验室 生命科学学院 福建 厦门 361005)

(2. 厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室 福建 厦门 361005)

摘要: 海洋微生物多样性的深入研究将有助于微生物资源更好的开发和利用, 海洋微生物多样性有很大的研究价值和研究空间。海洋中大多数微生物处于未可培养状态, 在分子生态学基础上对海洋未可培养微生物进行研究是当今微生物多样性研究的主要方向。近年来相关研究进展迅速, 研究方法不断更新。主要从分子生态学角度对微生物多样性研究现状进行概述并详细分析探讨了相关的研究方法, 而且从分子生态学海洋微生物多样性研究相结合的层面, 对本领域的研究进行展望。旨在为海洋微生物多样性的研究及海洋资源的可持续开发与利用提供参考。

关键词: 海洋微生物, 微生物多样性, 分子生态学

Advances in research of marine microbial diversity and molecular ecology

LI Yi^{1,2} ZHENG Wei^{1,2} ZHENG Tian-Ling^{1,2*}

(1. *Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China*)

(2. *State Key Laboratory for Marine Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China*)

Abstract: The study on marine microbial diversity is highly valuable and promising, and will

基金项目: 国家自然科学基金重点项目、面上项目(No. 40930847, 31070442); 福建省自然科学基金项目(No. 2012J01150); 海洋公益性行业科研专项经费资助项目(No. 201305016, 201305041, 201305022)

*通讯作者: Tel: 86-592-2183217; Fax: 86-592-2184528; ✉: microzh@xmu.edu.cn

收稿日期: 2012-06-20; 接受日期: 2012-08-24

greatly improve the exploitation and utilization of microbial resources. Since the vast majority of marine microbe are unculturable, the molecular biology becomes the main way in the study of marine microbial diversity. Recently, the research strategy and technology develops fast, and this paper summarized the researches of marine microbial diversity based on molecular biology and compared different research methods. Besides, it envisioned the future of marine microbial diversity study based on the progress of this field and molecular ecology technology. This paper is valuable for the further study on marine microbial diversity as well as the exploitation and utilization of marine microbial resource.

Keywords: Marine microorganisms, Microbial diversity, Molecular ecology

人类生存在一个被海洋覆盖的星球, 海洋占地球总面积的 71%, 全部水源的 97% 都在海洋之中^[1]。海洋中的微生物包括细菌、真菌、放线菌及病毒等, 提供地球近一半的初级生产力, 影响气候变化^[2], 参与物质和能量循环^[3], 并且为现代工业生产提供了重要的药物资源和酶资源^[4]。开展海洋微生物多样性的研究对于了解微生物的生态功能和开发微生物资源有着十分积极的作用。海洋微生物多样性的研究一直是国内外学者研究的热点^[5-7]。海洋环境中绝大多数微生物都是处于未可培养的状态^[5], 近年来研究者对于未可培养微生物的研究大多是从分子生态学的角度出发, 对其进行研究。海洋分子生态学作为一门新兴学科, 将现代分子生物学技术与传统生态学理念有机结合, 成为海洋环境微生物多样性研究的有力武器, 有助于深化人们对于海洋微生物资源的认识。作者从海洋分子生态学的角度, 结合多种现代分子生物学技术对海洋微生物多样性做一综述、评析及展望。

1 海洋微生物多样性

海洋微生物多样性是指所有海洋微生物种类、种内遗传变异和它们的生存环境的总称^[6]。海洋微生物与海洋环境有着密切的关系, 影响着其他海洋生物的生长, 参与海洋生态循环, 对海

洋生态系统的稳定有着重要作用。

1.1 海洋微生物的生态功能

海洋微生物种类丰富、数量庞大, 并且赋有复杂而重要的生态功能。微生物无时不在参与着海洋碳、氮、磷、硫等的生物地球化学过程。Dyhrman 等^[7]研究认为海洋微生物群落能在磷浓度不断变化的海水中很好的生存, 微生物对磷的代谢利用及磷的循环有促进作用; Hutchins 等^[8]研究表明微生物群落能在含高浓度 CO₂ 的海水中生存, 并参与了营养循环。海洋微生物对于海洋其他生物的生存代谢有重要的作用。Schirmer 等^[9]研究在微生物中找到与海绵相关的聚酮合酶基因簇。这些功能基因的发现是在微生物多样性探索的基础上实现的。微生物群落对海洋生态环境的稳定有调控作用, 不同微生物群落结构有所差异, 其所起的作用也不尽相同。海洋微生物对于海洋环境的保护和污染物的治理有重要的作用。Lu 等^[10]在深海石油富集区域发现具有降解石油的功能微生物, 并证实海洋微生物群落能高效降解石油等污染物。此外, 研究表明微生物对有害赤潮藻有重要的调控作用^[11]。随着赤潮危害的加重, 寻找一种有效调控赤潮的手段成为当务之急^[12]。Anderson 等^[13]发现微生物能够杀死藻细胞。郑天凌等^[14]研究发现微生物对赤潮藻的生长有重要的影响, 微生物多样性对于赤潮的调控有

不可忽视的作用^[15]。这些研究成果为开展赤潮的微生物防治奠定了理论基础。显然对于海洋微生物物种多样性、基因多样性和生态功能的深化研究有利于海洋资源的开发,是众多研究学者感兴趣的方向所在^[16-17]。

在广阔的海洋中,微生物的资源丰富,我们可以从海洋环境中获得大量微生物菌株^[18]并将其应用到实践中去。迄今为止,笔者已发现并保存了 300 多株溶藻功能微生物,其中多以链霉菌属和变形菌门(Proteobacteria)中的 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)为主(部分菌株电镜照片如图 1 所示)。其中首次发现 3 株对有害赤潮藻——塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)有抑制或者杀灭作用的微生物:放线菌门短杆菌属(*Brevibacterium*)的抑藻菌株 BS01,变形菌门盐单胞菌属(*Halomonas*)的抑藻菌株 DH74 和 DH77, *Idiomarina* 属的抑藻菌株 SP96、DHQ16 和 DHY11。但是这些被分离培养的微生物只是浩瀚的海洋微生物资源中很小一部分,大约 99% 的海洋微生物处于未可培养的地位,尚未被开发利用。学者们通过不断的努力,在实验室条件下实现了部分未可培养微生物的纯培养。Nichols 等^[19]发现一些短肽类小的信号分子阻断了未可培养

微生物群落在体外的生长, Kaeberlein 等^[20]在模拟自然的环境下,使得未可培养微生物在人工设计的扩散室里面生长并得到了纯培养。但是这些方法受很多条件的限制,通用性不强。目前国际上通常采用分子生态学的研究方法,对未可培养微生物资源进行探索,这种方法更为方便、实用,对于微生物资源的开发与利用有很好的指导作用。

1.2 不同海洋生境微生物多样性的研究

海洋生境指海洋生物的个体、种群或群落生活地域的环境,根据其特征大致可以分为:近海、远海及极地生境。海洋微生物在不同的海洋生境具有各自不同的特征及功能,根据不同的海洋生境对海洋微生物进行研究,对于海洋微生物的开发和利用有重要的意义。

1.2.1 近海海洋微生物多样性研究:近海是距离陆地较近的海域。由于人类活动的影响,海水会受到有机物的污染,海洋微生物因此获得了大量的营养物质,近海海洋微生物的密度较大洋大,大量的微生物资源值得人们去研究和开发。Williams 等^[21]研究认为近海海洋中有大量的微生物资源可以作为潜在的药物来源,蓝细菌和放线菌所分泌的大量化合物是治疗肿瘤和传染病良

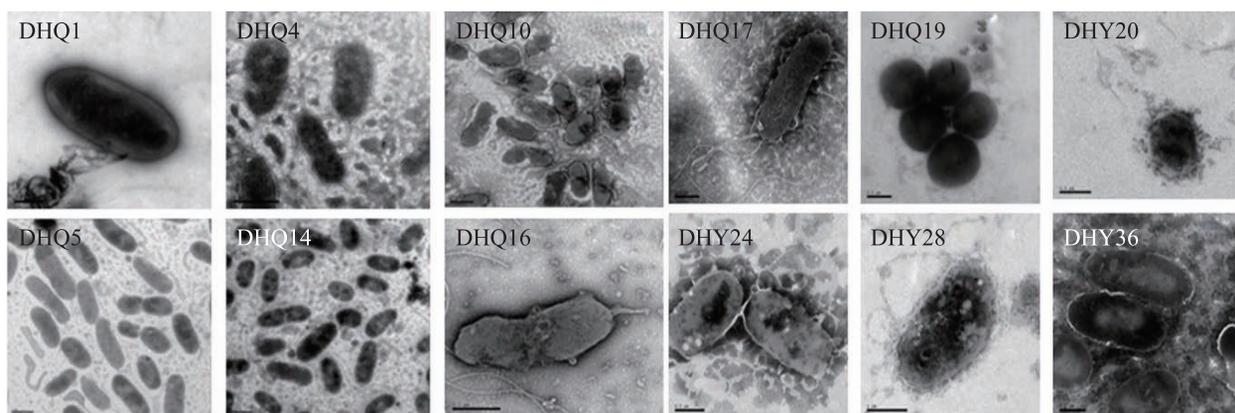


图 1 海洋溶藻功能细菌
Fig. 1 Marine algicidal bacteria

好的选择。Bai 等^[22]从厦门近海分离出一株能高效杀灭产毒塔玛亚历山大藻的放线菌 BS01, 研究表明海洋放线菌是潜在的抑杀藻微生物, 对于有毒赤潮藻的调控有重要作用。对近海海洋微生物多样性的研究有利于对微生物群落结构了解, 有助于功能微生物的发现和微生物资源的开发。

1.2.2 深海微生物多样性研究: 深海通常指 1 000 m 以下的海洋, 占到海洋总面积的 3/4。深海及深海沉积物中的微生物生存面临高压、低温、黑暗及低营养水平等几个主要极端环境^[23], 这种恶劣的环境使得深海中的生物量较少, 微生物占深海生物的大部分, 极端的环境也阻止了人们研究的步伐。不过近年来随着科学技术的进步, 人们对于深海微生物的研究正在逐步展开。1989 年 Bartlett 等^[24]首次在深海细菌中发现与静水压力相关的基因。Bidle 等^[25]利用 RNA 随机引物 PCR (RAP-PCR)对深海光合细菌野生型和 DNA 结合蛋白 ToxR 突变型的两种深海细菌进行研究, 发现在不同压力下该光合细菌不能通过 ToxR 的激活或者抑制来进行预测。Nakasone 等^[26]通过对深海细菌 DSS12 在不同压力下, 压力调控启动子的上游顺式作用元件的研究, 发现在不同压力下不同的 DNA 结合因子能够识别压力调控元件的上游区域。深海有很多功能独特的微生物, 深海微生物资源的开发与利用可望创造出巨大的价值。本课题组 Hong 等^[27]对赤道太平洋深海海底沉积物中的氨氧化细菌多样性进行研究, 研究表明主要的氨氧化细菌都在低温海域, 但是在西太平洋暖池附近的氨氧化细菌形成了独特的分支, 通过 qPCR 技术研究表明每克沉积物中氨氧化还原酶的含量在 3.98×10^3 – 1.17×10^4 拷贝数的范围内。结果说明该独特分支的存在正是对特殊栖息环境以及氮素还原现象的适应。

1.2.3 极地微生物多样性研究: 极地包括南极和北极, 常年被冰雪所覆盖, 自然条件恶劣, 生物

难以生存。但是极地环境有大量的微生物存在, 人们对极地的开发利用受很多因素的制约, 对于极地微生物的了解还非常有限。近年来随着先进航海技术及采样工具的应用, 人们对极地环境的研究也取得一定成果。Murray 等^[28]研究结果表明极地海洋微生物在海洋生态环境及生态系统功能发挥中起着重要的作用, 海洋细菌的群落组成显示着海冰融化与浮游植物的生长周期, 通过对极地海洋环境微生物的多样性进行研究, 发现 *Polaribacter irgensii* 及 γ -Proteobacteria 在极地海洋微生物群落中处于优势地位, 并且发现这些微生物具有独特的功能使得它们能够在高纬度且寒冷的极地环境生存。本课题组 Zeng 等^[29–30]对白令海北部海域浮游细菌进行研究, 通过对不同采样深度的样品进行分析, 发现不同的站位细菌群落结构差别较大; 放线菌(*Actinobacteria*) 在表层和深层区域均占优势地位, α 变形杆菌在表层海水是重要的细菌菌群; 并分离出 232 株异养细菌, 主要包括 γ 变形杆菌、放线菌和厚壁菌(*Firmicutes*)。研究表明放线菌是白令海区域最主要的细菌菌群, 与其他已知的极地细菌群落结构有较大差别。在分离的细菌中 81% 表现出胞外蛋白水解酶活性, 说明极地环境的细菌不仅丰度高且生态功能多样, 能够应用于资源的开发与应用。此外本课题组邹扬等^[31]还对白令海表层沉积物样品进行多样性分析, 结果表明细菌群落结构多样, 有主要 10 个类群, 该研究对于北冰洋地区细菌多样性有了深切的了解。

2 海洋微生物群落多样性的分子生态研究

海洋微生物在海洋环境中是以群落的形式存在的, 利用分子生物学的方法根据遗传信息的差别可将它们分为不同的类群, 从而对海洋微生物, 尤其是未可培养的微生物资源进行探索和开

发。分子生态学方法^[32]是从分子水平研究生物大分子的结构与功能从而阐明生命现象本质的科学,以核酸和蛋白质等生物大分子的结构及其在遗传信息和细胞信息传递中的作用为研究对象,用于微生物遗传信息的分析及微生物多样性的研究。

2.1 分子标记技术

分子标记技术是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,能反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段^[33]。分子标记种类有很多,第一代分子标记以限制性片段长度多态性(RFLP)为代表,是基于酶切位点多态性开发的分子标记。第二代分子标记以简单重复序列分析(SSR)为代表,是基于简单重复序列的多态性。第二代分子标记通过引物的特殊设计,能够扩增 DNA 上相应位置的序列,根据它们的多态性,进行下一步分析。第三代分子标记以单核苷酸多态性(SNP)为代表,是基于高通量测序为基础的新一代分子标记技术^[34]。

2.1.1 限制性片段长度多态性分析(RFLP): 限制性片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)是指基因型之间限制性片段长度的差异,这种差异是由限制性酶切位点上碱基的插入、缺失、重排或点突变所引起的。由于 RFLP 的高度重复性以及微生物群落结构和动态的精确研究,常被用于微生物多样性研究^[35]。RFLP 通常与聚合酶链式反应(PCR)联合起来应用于微生物多样性研究,不同微生物的遗传信息中都含有一定的保守区域(如 16S rRNA 基因),利用基因片段两端的保守区域可扩增出特异片段,这些片段中间部分为高度可变区,利用限制性内切酶处理片段,经电泳分析可得不同的酶切图谱。该技术可与 16S rRNA 基因文库结合起来,对海洋微生物多样性进行研究。Lefebvre 等^[36]利用 RFLP 对生活污水中微

生物的多样性进行研究来找寻微生物能源细胞(Microbial fuel cell)并结合克隆文库进行验证,发现 β 变形杆菌丰度最高,是具有较高产能潜力的种群。本课题组采用 PCR-RFLP 技术,并结合 16S rRNA 基因文库对一株产毒的塔玛亚历山大藻藻际细菌的多样性进行研究,发现所有的细菌基因型分属 2 个细菌类群:变形细菌门和拟杆菌门,两者在延滞期、指数后期和稳定期所占比例不同,这些细菌可能在赤潮的生消过程中起着重要的调控作用。利用 RFLP 来研究微生物藻际细菌多样性既准确又便捷,该研究对于微生物在微藻生消过程中所起的作用以及探寻新的微生物资源具有重要的指导意义^[37]。RFLP 可以较好地应用于海洋微生物多样性的研究,并发掘、研究与开发微生物资源。

2.1.2 简单重复序列标记(SSR)和单核苷酸多态性(SNP): 简单重复序列标记(Simple sequence repeat, SSR)和单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)都是近年来发展起来的分子标记技术。SSR 将这部分的 DNA 片段克隆、测序,然后人工合成引物进行 PCR 扩增,从而将单个微卫星位点扩增出来^[38]。由于单个微卫星位点重复单元在数量上的变异,个体的扩增产物在长度上的变化就产生长度的多态性。SNP 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。与 RFLP 相比,这两种技术重复数目变化很大,能揭示比 RFLP 高得多的多态性。其信息量大,有利于大数据量的分析。

SSR 和 SNP 自身的特性决定了它们更适合于对复杂性状与疾病的遗传解剖以及基于环境群体的基因水平上的多样性研究^[39]等,不同微生物种群的保守区域不同,其扩增产物在长度上就表现出差别。在以往的研究中,这两种技术常被用于人类疾病研究、植物、真菌多样性分析,在微生物多样性的研究中应用的较少。由于海洋微生

物在数量和种类上都是巨大的,对于它们的研究需要获取更多的信息才能使研究成果更加精确,相对于 RFLP 来说,SSR 和 SNP 在数量巨大的海洋微生物多样性研究上应用有很大潜力。因此在高通量测序基础上的新一代分子标记,更加适合于海洋微生物多样性研究。Singh 等^[40]利用 SSR 技术和微卫星对禾谷镰刀菌的多样性进行研究,通过对各种核苷酸重复序列的 1 705 个 SSRs 的比较确定该菌的进化地位。SSR 在多样性、进化、基因组图谱及群体遗传等方面都是非常有效的研究方法。

2.1.3 3 种分子标记技术的比较: RFLP、SSR、SNP 3 种分子标记技术分别代表不同类型的分子标记,三者之间有联系也有区别。RFLP 在海洋微生物多样性研究中应用的比较广泛,但是其信息量比较低,当环境中微生物丰度较高时应用起来就受到限制;SSR、SNP 虽然在微生物研究中应用不多,然而其在微生物多样性应用的前景非常广阔,主要是其丰富的信息量可以对环境中的微生物多样性进行分析,结合高通量测序技术的应用,能较好地应用在微生物多样性的研究中(表 1)。

2.2 变性梯度凝胶电泳(DGGE)和温度梯度凝胶电泳(TGGE)

不同的微生物其 DNA 的碱基组成不同。在

变性剂梯度或者温度梯度下,不同的 DNA 在不同时间开始解链,由于解链的 DNA 运动能力大大下降,不同的双链 DNA 才得以区分开。根据这样的原理,在变性剂梯度或者温度梯度下不同的 DNA 在电泳的过程中分开,而同一种微生物的 DNA 条带就在同一水平直线上。

由于变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)和温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)均是采用以上的原理进行研究的,本部分着重介绍 DGGE 用于微生物多样性的研究。DGGE 最初是由 Lerman 等^[41]于 20 世纪 80 年代初期发明的,Muyzer 等^[42]在 1993 首次将其应用于微生物多样性研究。在以往的研究中,该项技术被广泛应用于环境微生物多样性的研究。当 DGGE 用于研究微生物多样性时,需要与 PCR 扩增技术结合起来,并将条带进行测序,通过进化树分析即可获得微生物的群落结构信息。Ding 等^[43]通过 DGGE 技术对深海低温热液硫化物烟囱内的细菌及古细菌的群落多样性研究,从而为深海微生物多样性特征及微生物资源开发提供了有用的信息。Wang 等^[44]首次对不同温度下产油微藻藻际细菌多样性进行研究,这对产油微藻的研究及产油率的提高都有重要的理论意义。

表 1 3 种分子标记技术的比较
Table 1 The comparison of three molecular marker technology

分子标记 Molecular markers	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	微生物多样性的研究 The study of microbial diversity
RFLP	遍布低拷贝编码序列,并且非常稳定	遍布低拷贝编码序列,并且非常稳定	需要在 PCR 基础上,并借助于克隆文库,信息量小
SSR	数量丰富,覆盖整个基因组,揭示的多态性高,具有多等位基因的特性,提供的信息量高	重复性较差,容易造成假阳性	信息量高,对于微生物多样性研究方便,但容易造成误差
SNP	高度稳定,数量多,分布广泛,筛查快速,规模化	SNP 二等位基因性,须对大量的 SNP 进行基因分型	信息量大且稳定,适合大量物种的多样性研究

本课题组刘慧杰博士等^[45]利用 DGGE 研究红树林地区 PAH (多环芳烃)降解菌群落结构研究, 结果表明 PAH 的降解率跟细菌群落结构以及 PAH 类型都有密切的关系, 细菌群落结构的研究对于 PAH 污染的生物修复也有重要作用。笔者对厦门海域赤潮生消过程中细菌多样性变化进行研究, 发现细菌多样性随着赤潮生消呈现先升高后降低的趋势(表 2), 赤潮站位的细菌多样性要高于非赤潮站位, 再次证明了细菌与赤潮藻的紧密关系, 确定了赤潮期间海水中的关键菌群并且对细菌菌群结构与环境因子的相关性进行分析,

为以后赤潮的研究提供了重要的理论依据。并且通过对 DGGE 条带测序分析, 研究了在赤潮生消过程中不同阶段占主成分的细菌菌群(图 2), 研究表明在在赤潮开始阶段噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)为优势菌群, 而在赤潮消退阶段则以假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)为主。以往的研究^[46-47]认为 *Pseudoalteromonas* 和 *Pseudomonas* 两个属的细菌有很好的抑杀藻能力, 当这两种细菌占优势的时候, 可能对赤潮藻有抑杀作用, 使得其数量下降, 最终赤潮消失。

表 2 赤潮生消过程中(1-6 d)细菌香农-威列多样性指数变化
Table 2 Changes of the Shannon-Weaver diversity index during the bloom

站位 Sites	第 1 天 The first day	第 2 天 The second day	第 3 天 The third day	第 4 天 The forth day	第 5 天 The fifth day	第 6 天 The sixth day
A1	3.19	3.21	3.59	3.38	3.23	3.12
H2	3.14	3.56	3.38	3.31	3.26	3.11
A2	3.35	3.28	3.33	3.26	3.32	3.21

注: 香农-威列多样性指数代表细菌多样性高低, 指数越大表示多样性越高。A1、H2: 是赤潮站位; A2: 非赤潮站位。

Note: The Shannon-Weaver diversity index represents bacterial diversity, the high index shows great diversity. A1, H2: Bloom sites; A2: Non-bloom site.

DGGE 虽然常用于微生物多样性研究, 但是 DGGE 技术仍存在一些不足, DGGE 技术本身的欠缺及人为操作的失误只能将环境中丰度较高微生物的遗传信息检测出来, 而丰度相对较低的微生物往往被遗漏, 所以 DGGE 只能对环境中占优势的微生物多样性进行研究。并且一些生境里面的微生物种类过于丰富, 将会造成 DGGE 条带不能很好地区分开, 其不太适合于 DGGE 进行多样性研究。在这种状况下, 新的分析技术——宏基因组学技术便应运而生。

2.3 宏基因组学(Metagenomics)技术

宏基因组(Metagenome)是指生境中全部微生物遗传物质的总和。它包含了可培养和未可培养微生物的基因, 目前主要指环境样品中细菌和

真菌的基因组总和。而宏基因组学(Metagenomics)就是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象, 以测序分析为研究手段, 以功能基因筛选为目的的一门学科, 主要研究从环境样品获得的基因组中所包含的微生物遗传组成及其群落功能, 避免了传统微生物学基于纯培养研究的限制, 为充分认识和开发利用未可培养微生物、并从完整的群落水平上认识微生物的活动提供了可能^[48]。用于微生物多样性研究的宏基因组学技术是以高通量测序技术为主, 可以将环境中所有微生物的遗传信息展示出来, 再通过软件分析, 从而对环境中的微生物群落多样性有更深刻的了解。目前高通量测序技术所采用的是 454 测序、Solexa 测序、SOLiD 测序为代

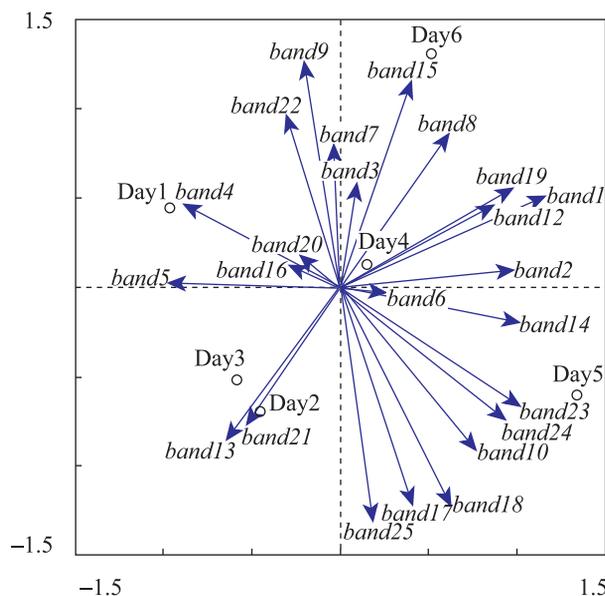


图2 赤潮站位 A1 在第 1–6 天内细菌群落结构变化的主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of dynamics of bacterial community during the six days in bloom site A1 (the bands in the picture have been sequenced)

表的第二代测序技术。

2.3.1 454 测序是采用焦硫酸测序法：该技术是罗氏公司推出的能通过大规模测序及合成的方法产生大量中间长度的 DNA 读取片段^[49]。它的平均读长为 400 bp，每个循环能产生 400–600 Mb 序列，总耗时 7.5 h 左右。经过最近的升级，454 测序长度已能达到 1 kb^[50]，是进行环境基因组测序的理想平台。但是 454 测序不经过克隆，该技术不能保证测序的精度，所以在进行数据分析的时候要将目标序列多样性与错误信息区分开。

2.3.2 Solexa 测序：该技术是由 Illumina 公司在 454 之后推出的测序方式，Solexa 测序首先要提取 DNA，然后将其破碎至 100–200 bp 大小，再将接头连接到片段上，经 PCR 扩增后将已加入接头的 DNA 片段绑定在含有接头的芯片上，经反应将不同片段扩增。在下一步反应中，4 种荧光标记的染料应用边合成边测序^[51]。Solexa 的优势在于测序通量大，成本低，但因为序列相对较短，会

增加后继序列拼接组装等分析的难度和计算量。

2.3.3 SOLiD 测序：该技术是以 4 色荧光标记寡核苷酸的连续连接反应为基础，而没有采用传统的边合成边测序技术。连接反应没有 DNA 聚合酶合成过程中常有的错配问题，而 SOLiD 特有的“双碱基编码技术”通过两个碱基来对应一个荧光信号而不是传统的一个碱基对应一个荧光信号，这样每一个位点都会被检测 2 次，出错率明显降低^[52]。这样设计上的优势使得 SOLiD 在系统准确性上大大领先于其它平台。

高通量测序技术被广泛应用于环境样品的研究中去。Campbell 等^[53]通过 454 测序技术研究 9 个独立的恒化器在 5 个时间段内微生物的多样性及技术的重复性，从而研究在一个稳定的恒化器内不同氮、磷限制下病毒对其共生的异养细菌捕食作用。结果表明微生物多样性的重复性很好，Proteobacteria 是丰度最大的类群，Cyanobacteria 只占 20%，*Sulfitobacter* 是最主要的属，在磷限制条件下 *Pseudomonas* 是最独特种群。这些结果表明营养盐对细菌群落的影响与病毒对细菌多样性的影响是相反的。Bhaya 等^[54]利用比较基因组和宏基因组学对黄石温泉两种蓝细菌进行研究，比较基因组学结果表明这两种细菌基因片段的含量有很大一部分相同，但是在氮、磷利用途径上有较大差别；宏基因组学结果表明 *Synechococcus* 所在的温度越低其丰度越高，不同的温度可能导致较大的生态响应。也证明了一部分独特的物种与 *Synechococcus* OS-B 有明显紧密的关系，并且含有能够吸收还原性亚铁离子的基因。宏基因组的研究不仅适用于单株菌的研究，而且可以应用到环境中，对微生物多样性的调查及微生物资源的应用与开发有重要的作用。利用宏基因组技术对微生物多样性进行分析，是当今最为准确和快速的方法之一，由于其信息量巨大，需要借助生物信息手段对测序结果进行分析。

3 海洋微生物功能多样性的分子生态学研究

在海洋中有丰富的微生物资源, 不同微生物种群都有各自独特的功能。海洋微生物时刻参与着海洋环境的氮、磷、硫等的循环, 能够降解海洋有机污染物以及有效地调控赤潮等海洋灾害的发生, 对海洋环境有重要的影响。不同功能的微生物形成了不同的微生物群落, 构成了微生物功能的多样性。以往研究者对于功能微生物进行大量的开发与研究: Byrne 等^[55]通过对深海热液口附近的厌氧氨氧化细菌群落的研究, 发现在特殊生境的微生物多样性与其他环境不同, 并发现可能是氨氧化细菌新分支的存在; Thamdrup 等^[56]对海洋沉积物中的厌氧氨氧化细菌进行研究, 发现厌氧氨氧化细菌能将 NH_4 和 NO_2 还原成 N_2 , 在两个实验区域厌氧氨氧化细菌分别提供了总 N_2 产量的 24% 和 67%, 是海洋环境中 N_2 的主要贡献者。Arulazhagan 等^[57]从高盐度环境中分离到能降解海洋有毒污染物——多环芳烃(PAH)的耐盐菌群, 在加入 30 g/L 的 NaCl 后能在 4 d 内降解 95% 以上的多环芳烃, 而在加入 60 g/L 的 NaCl 后, 在 4 d 内只能降解 74% 以上的多环芳烃。Wang 等^[58]研究了有毒赤潮藻塔玛亚历山大藻的藻际细菌, 将藻际细菌富集培养后, 藻际细菌可以将藻细胞裂解并在 14 h 内全部死亡, 在此过程中细菌丰度和胞外酶活性上升了 50–100 倍。这些功能微生物时刻参与着海洋环境的保护以及生态平衡的维护, 微生物功能多样性的研究, 对于微生物资源的开发有重要的作用, 对于功能微生物的研究可以从代谢标记示踪、功能基因定量和功能基因芯片进行展开。

3.1 稳定同位素标记技术(SIP)和荧光原位杂交技术(FISH)

稳定同位素(Stable isotope probing, SIP)是指

在元素周期表中, 原子序数相同中子数不同, 化学性质基本相同且不具有放射性的元素。稳定同位素标记技术是将标记有稳定同位素的营养底物加入到微生物生存的环境中去, 如果微生物能利用其底物, 提取这些微生物的核酸, 将标记与未标记 SIP 的核酸经过密度梯度离心后, 从而将标记有稳定同位素的功能微生物进行分离^[59]。SIP 可以了解未可培养微生物的代谢途径, 对于了解微生物群落独特的功能有十分重要的作用。Gallagher 等^[60]利用 SIP 对反硝化菌代谢苯甲酸的途径进行调查, 对 ^{13}C 标记的载体 DNA 进行研究从而大大缩短了研究时间, 通过 21 d 的研究对苯甲酸反硝化菌的数量变化有了明确的了解。结果表明, SIP 可以用于微生物数量变化及功能的研究。在研究中还可以将 SIP 与基因芯片和宏基因组结合起来, 该技术在微生物多样性研究及微生物资源开发方面将会更有可操作性。与 SIP 作用原理相似的技术还有荧光原位杂交技术(Fluorescent in situ hybridization, FISH)。荧光原位杂交技术是以荧光标记取代同位素标记而形成的一种新的原位杂交方法, 根据已知微生物不同分类级别上种群特异的 DNA 序列, 以利用荧光标记的特异寡聚核苷酸片段作为探针, 与环境基因组中 DNA 分子杂交^[61], 用于对该特异微生物种群的丰度以及特殊功能基因的检测。

3.2 实时荧光定量 PCR (qPCR)

实时荧光定量 PCR 技术(Real-time quantitative PCR, qPCR)是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[62]。该技术利用荧光染料对 DNA 进行标记, 在进行 PCR 的过程中每经过一次循环, 荧光都会有一定的累积直至达到荧光阈值, 这个过程经历的循环数(C_t 值)是与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 根据标准曲线可以确定目

的基因的拷贝数。实时荧光定量 PCR 可以根据功能微生物群落功能基因来确定它在环境中的表达量,从而来对环境中的某些功能基因进行调查和定量。Conradie 等^[63]通过 qPCR 对环境中的产毒及不产毒两类微囊藻进行调查,研究微囊藻产毒基因 *mcyE* 和 *mcyB* 与环境因子的相关性,结果表明温度对微囊藻产毒素有很大的影响,温度越高,产毒微囊藻藻株就越多,合成的微囊藻毒素就越多。实时荧光定量 PCR 可以对环境中微生物的功能基因进行定量分析,该技术在环境样品的研究中应用十分广泛。

qPCR 从基因水平上对微生物的功能基因进行定量,可以从量上对微生物功能基因的表达量进行测定,该方法应用十分普遍,但是应用的关键是对于功能基因引物的设计。不同的环境样品不同的功能基因就需要重新设计引物,这样也就给该方法在应用上带来一定的局限性。然而新型的快速、准确的功能基因芯片技术的出现就解决了这一难题。

3.3 功能基因芯片

基因芯片技术在最近几年发展迅速,其优势在于体积小、信息量大、快速简便并且精确,基因芯片也可以用于环境中微生物多样性的研究。在其基础上研制开发的功能基因芯片优势在于剔除了基因芯片上与研究对象无关的基因。功能分类基因芯片包括了那些与研究对象有确定关系的基因或者是具有特殊功能的基因。功能基因芯片的应用对于快速、准确的研究微生物功能多样性有重要作用。Kanto 等^[64]利用特异的基因芯片研究玫瑰分枝杆菌中对海洋表层硫循环起重要作用的基因——DMSP (Dimethylsulfoniopropionate)相关基因的转录,设计的芯片包含 1 578 个探针对应环境中不同玫瑰分枝杆菌类群的 431 个基因。结果表明在赤潮最严重时期尽管有 DMSP 相关物质的增多,但是 DMSP 相关基因

的转录量仍是减少的;DMSPd (Dissolved dimethylsulfoniopropionate)的含量与玫瑰分枝杆菌的丰度有关,而与赤潮过程中产生的不稳定有机硫或者碳物质无关。功能基因芯片是环境样品研究经常采用的研究方法^[65-66],基因芯片的最大优点在于其高通量测序方法的应用,传统的测序经历多次实验而且自动化程度低,因而每次实验之间是存在系统误差的。基因芯片可以克服这个缺点,众多基因的探针标记、杂交等过程是在一次实验过程中完成的,而且自动化程度高、数据客观可靠。随着功能基因芯片技术的不断成熟,越来越多的环境微生物样品利用功能基因芯片进行科学研究,该技术的成熟与发展更有利于海洋微生物多样性的研究。

4 展望

海洋微生物对于海洋及人类的生活有重大的影响。已有研究表明^[67],微生物可以分泌多种高强度的生物活性物质,这些丰富多样、新颖独特的海洋微生物是发现新材料、新功能、新基因、新机制的理想资源,微生物资源能广泛应用于医疗、食品、卫生、环境保护等各个领域。海洋微生物多样性的研究对于微生物资源的开发利用具有强大的推动作用,深入地了解海洋微生物多样性才能更好的开发和利用微生物资源,创造出更大的价值。海洋微生物包括可培养微生物和未可培养微生物,对于可培养微生物的研究在很早就已经开展^[68]。然而海洋微生物中绝大多数还是未可培养微生物,对于海洋未可培养微生物的研究才刚刚展开,未可培养微生物的开发与利用是海洋微生物多样性研究的重中之重,借助海洋分子生态学的研究手段从分子水平上深入、透彻地开展不同海洋生境微生物的研究,将会为人类在基因、细胞、个体和群落水平上利用和调控海洋微生物提供理论依据,对于维持海洋生态平衡和

保护海洋环境有至关重要的作用。

回顾已经取得的研究成果, 结合当代研究手段, 展望未来研究前景, 海洋微生物多样性的研究还须从以下几个方面研究:

(1) 从不同海洋生境中继续分离功能海洋微生物, 用于丰富海洋微生物资源以及开发微生物功能的多样性并从分子水平、蛋白水平对所得的微生物进行研究;

(2) 从功能基因角度深入研究功能微生物的作用机理, 从转录组学、蛋白组学、代谢组学角度出发对其作用过程进行全面研究;

(3) 将多种研究手段结合起来进行微生物多样性研究, 因为任何一种研究方法都有各自的弊端, 多种方法的联合使用可以弥补单一技术的缺点和不足;

(4) 从微生物个体出发研究微生物群体效应, 以及在不同环境压力下微生物群体变化规律;

(5) 海洋微生物参与全球碳、氮、磷、硫等元素的循环, 找寻微生物多样性与全球化的关系;

(6) 对海洋微生物功能继续进行深入研究, 从而加大海洋微生物在海洋灾害预警及污染治理等方面应用潜力的开发。

参 考 文 献

- [1] Barnes RSK, Hughes RN. An Introduction to Marine Ecology[M]. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 1999: 1-3.
- [2] Azam F, Worden AZ. Microbes, molecules, and marine ecosystems[J]. Science, 2004, 303(5664): 1622-1624.
- [3] Simmons TL, Coates RC, Clark BR, et al. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(12): 4587-4594.
- [4] Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles[J]. Nature, 2004, 437(7057): 349-355.
- [5] Arakaki A, Shibusawa M, Hosokawa M, et al. Preparation of genomic DNA from a single species of uncultured magnetotactic bacterium by multiple-displacement amplification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(5): 1480-1485.
- [6] 孙昌魁, 冯静, 马桂荣. 海洋微生物多样性的研究进展[J]. 生命科学, 2001, 13(3): 97-99.
- [7] Dyhrman SNT, Ammerman JW, Mooy V, et al. Microbes and the marine phosphorus cycle[J]. Oceanography, 2007, 20(2): 110-116.
- [8] Hutchins DA, Mulholland MR, Fu FX. Nutrient cycles and marine microbes in a CO₂-enriched ocean[J]. Oceanography, 2009, 22(4): 128-145.
- [9] Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4840-4849.
- [10] Lu Z, Deng Y, van Nostrand JD, et al. Microbial gene functions enriched in the deepwater horizon deep-sea oil plume[J]. The ISME Journal, 2011, 6(2): 451-460.
- [11] Rodríguez GR, Villasante S, do Carme García-Negro M. Are red tides affecting economically the commercialization of the Galician (NW Spain) mussel farming?[J]. Marine Policy, 2011, 35(2): 252-257.
- [12] 苏建强, 郑天凌, 俞志明, 等. 海洋细菌对赤潮藻生长及其产毒量的影响[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 44-49.
- [13] Anderson DM. Turning back the harmful red tide[J]. Nature, 1997, 388(6642): 513-514.
- [14] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 291-295.
- [15] 曹晓星, 苏建强, 郑天凌, 等. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用[J]. 海洋科学, 2007, 31(5): 63-69.
- [16] 袁军, 赖其良, 郑天凌, 等. 深海多环芳烃降解

- 菌新鞘氨醇杆菌 H25的降解特性及降解基因[J]. 微生物学报, 2008, 48(9): 1208–1213.
- [17] 蔡亚萍, 苏建强, 谢忠, 等. 南海海域几丁质降解菌的筛选及其特性研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(S2): 259–263.
- [18] Wang BJ, Sun FQ, Du YP, et al. *Meridianimaribacter flavus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from marine sediment of the South China Sea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 121–127.
- [19] Nichols D, Lewis K, Orjala J, et al. Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow *in vitro*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4889–4897.
- [20] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127–1129.
- [21] Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(1): 45–52.
- [22] Bai SJ, Huang LP, Su JQ, et al. Algicidal effects of a novel marine actinomycete on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(6): 1774–1781.
- [23] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115–12120.
- [24] Bartlett D, Wright M, Yayanos AA, et al. Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium[J]. *Nature*, 1989, 342(6249): 572–574.
- [25] Bidle KA, Bartlett DH. RNA arbitrarily primed PCR survey of genes regulated by ToxR in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1688–1693.
- [26] Nakasone K, Ikegami A, Kato C, et al. Analysis of *cis*-elements upstream of the pressure-regulated operon in the deep-sea barophilic bacterium *Shewanella violacea* strain DSS12[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 176(2): 351–356.
- [27] Hong YG, Yin B, Zheng TL. Diversity and abundance of anammox bacterial community in the deep-ocean surface sediment from equatorial Pacific[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1233–1241.
- [28] Murray AE, Grzymski JJ. Diversity and genomics of antarctic marine micro-organisms[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007, 362(1488): 2259–2271.
- [29] Zeng YX, Zou Y, Grebmeier JM, et al. Culture-independent and-dependent methods to investigate the diversity of planktonic bacteria in the northern Bering Sea[J]. *Polar Biology*, 2012, 35(1): 117–129.
- [30] Zeng YX, Zou Y, Chen B, et al. Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea[J]. *Polar Biology*, 2011, 34(6): 907–919.
- [31] 邹扬, 曾胤新, 田蕴, 等. 白令海北部表层沉积物中细菌多样性的研究[J]. *极地研究*, 2009, 21(1): 15–24.
- [32] Tautz D, Ellegren H, Weigel D. Next generation molecular ecology[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(S1): 1–3.
- [33] 熊娟, 阎澜, 姜远英. DNA 分子标记在念珠菌遗传多样性中的应用[J]. *中国真菌学杂志*, 2012, 6(5): 312–315.
- [34] Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 278–288.
- [35] Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(1): 39–50.
- [36] Lefebvre O, Ha Nguyen TT, Al-Mamun A, et al. T-RFLP reveals high β -Proteobacteria diversity in microbial fuel cells enriched with domestic wastewater[J]. *Journal of Applied Microbiology*,

- 2010, 109(3): 839–850.
- [37] 杨小茹, 苏建强, 郑小伟, 等. 基于分子技术的 1 株产毒藻藻际细菌多样性分析[J]. 环境科学, 2009, 30(1): 271–279.
- [38] Grube M, Cardinale M, de Castro JV Jr, et al. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses[J]. The ISME Journal, 2009, 3(9): 1105–1115.
- [39] Foster JT, Allan GJ, Chan AP, et al. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*)[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 13.
- [40] Singh R, Sheoran S, Sharma P, et al. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) dynamics in fungus *Fusarium graminearum*[J]. Bioinformation, 2011, 5(10): 402–404.
- [41] Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, et al. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(1): 232–236.
- [42] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695–700.
- [43] Ding X, Peng XJ, Peng XT, et al. Diversity of bacteria and archaea in the deep-sea low-temperature hydrothermal sulfide chimney of the Northeastern Pacific Ocean[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(2): 337–345.
- [44] Wang H, Laughinghouse HD IV, Anderson MA, et al. Novel bacterial isolate from permian groundwater, capable of aggregating potential biofuel-producing microalga *nannochloropsis oceanica* IMET1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(5): 1445–1453.
- [45] Liu HJ, Yang CY, Tian Y, et al. Using population dynamics analysis by DGGE to design the bacterial consortium isolated from mangrove sediments for biodegradation of PAHs[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2011, 65(2): 269–275.
- [46] Wang BX, Yang XR, Zhou YY, et al. A marine bacterium producing protein with algicidal activity against *Alexandrium tamarense*[J]. Harmful Algae, 2012, 13: 83–88.
- [47] 黄姿, 李春强, 于晓玲, 等. 一株溶藻细菌 (*Pseudoalteromonas* sp.) 的分离鉴定及溶藻活性初探[J]. 海洋技术, 2008, 27(3): 56–60.
- [48] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学 (Metagenomics) 的研究现状和发展趋势[J]. 环境科学学报, 2008, 28(2): 209–218.
- [49] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature, 2005, 437(7057): 376–380.
- [50] 刘万飞, 王西亮, 赵宇慧, 等. 基于第二代测序技术的细菌基因组与转录组研究策略简介[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1705–1714.
- [51] Luo CW, Tsementzi D, Kyrpides N, et al. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample[J]. PloS One, 2012, 7(2): e30087.
- [52] Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1794–1805.
- [53] Campbell CE. The effects of nutrient limitation and cyanophage on heterotrophic microbial diversity[D]. Knoxville: University of Tennessee, 2012.
- [54] Bhaya D, Grossman AR, Steunou AS, et al. Population level functional diversity in a microbial community revealed by comparative genomic and metagenomic analyses[J]. The ISME Journal, 2007, 1(8): 703–713.
- [55] Byrne N, Strous M, Crépeau V, et al. Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents[J]. The ISME Journal, 2008, 3(1): 117–123.
- [56] Thamdrup B, Dalsgaard T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments[J]. Applied and

- Environmental Microbiology, 2002, 68(3): 1312–1318.
- [57] Arulazhagan P, Vasudevan N, Yeom IT. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2010, 7(4): 639–652.
- [58] Wang X, Li ZJ, Su JQ, et al. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere[J]. Biological Control, 2010, 52(2): 123–130.
- [59] Dumont MG, Murrell JC. Stable isotope probing-linking microbial identity to function[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(6): 499–504.
- [60] Gallagher E, McGuinness L, Phelps C, et al. ¹³C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5192–5196.
- [61] Wagner M, Nielsen PH, Loy A, et al. Linking microbial community structure with function: fluorescence *in situ* hybridization-microautoradiography and isotope arrays[J]. Current Opinion In Biotechnology, 2006, 17(1): 83–91.
- [62] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 34(3): 597–601.
- [63] Conradie KR, Barnard S. The dynamics of toxic *Microcystis* strains and microcystin production in two hypertrophic South African reservoirs[J]. Harmful Algae, 2012, doi: 10.1016/j.hal.2012.03.006.
- [64] Rinta-Kanto JM, Bürgmann H, Gifford SM, et al. Analysis of sulfur-related transcription by *Roseobacter* communities using a taxon-specific functional gene microarray[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(2): 453–467.
- [65] Xiong JB, Wu LY, Tu SX, et al. Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and the rhizosphere of the arsenic-hyperaccumulating plant *Pteris vittata* L.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7277–7284.
- [66] Liang YT, Van Nostrand JD, Deng Y, et al. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China[J]. The ISME Journal, 2010, 5(3): 403–413.
- [67] Okami Y. Marine microorganisms as a source of bioactive agents[J]. Microbial Ecology, 1986, 12(1): 65–78.
- [68] Davidson BS. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1995, 6(3): 284–291.