

中国南海沉积环境可培养细菌多样性研究

刘玉娟^{1,2} 田新朋¹ 黄小芳^{1,2} 龙丽娟¹ 张偲^{1*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘 要:【目的】探索海洋沉积环境中可培养细菌的多样性。【方法】采用纯培养分离及 16S rRNA 基因序列鉴定的方法,对我国南海海域 20 个沉积物样品进行细菌多样性分析。【结果】共获得 200 株细菌,分属于 47 个属,99 个种。经系统进化分析,可培养菌株主要分布于 4 个类群:厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),优势类群为 Firmicutes,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)所占比例为 55.6%;而 Actinobacteria 和 Bacteroidetes 两个类群获得菌株较少;在 Firmicutes 和 Actinobacteria 两个类群中发现 8 个潜在新种和 3 个潜在新属级类群。【结论】初步研究结果表明,南海海洋沉积环境可培养微生物资源丰富,新物种资源多样;其中,芽孢杆菌为海洋沉积环境中的优势类群,随着样品深度的增加,细菌多样性呈现递减的趋势,深度可能是影响细菌多样性的一个重要因素;其次,分离培养基和分离方法直接关系到样品中可培养微生物多样性的发现,有待深入研究。

关键词: 南海, 沉积环境, 细菌, 可培养多样性, 潜在新物种

Diversity of cultivable bacteria isolated from marine sediment environments in South China Sea

LIU Yu-Juan^{1,2} TIAN Xin-Peng¹ HUANG Xiao-Fang^{1,2} LONG Li-Juan¹ ZHANG Si^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] Investigating the diversity of the cultivable bacteria in marine sediment environments. [Methods] Twenty sediment samples collected from South China Sea were used for bacterial diversity research by using the culture dependent method and 16S rRNA gene sequencing. [Results] Total of 200 strains were obtained, which belong to 47 genera and 99 species and spread in four phyla: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes. The predominant group is phylum Firmicutes, in which genus *Bacillus* takes a great proportion of 55.6%. A few strains in phyla Actinobacteria and Bacteroidetes were also obtained. Eight potential new species and 3 potential new genera were discovered in phyla Firmicutes and Actinobacteria. [Conclusion] The preliminary study

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41276004, 41230962, 40906075); 中国科学院重要方向性项目(No. KSCX2-EW-G-12)

*通讯作者: Tel: 86-20-89023103; 信箱: zhsimd@scsio.ac.cn

收稿日期: 2013-04-15; 接受日期: 2013-05-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

indicates that genus *Bacillus* is the dominant group in sediment environments of South China Sea and bacterial diversity showed a decreasing trend with the increase of sampling depth. Sampling depth maybe is one of the important factors to influence the distribution of bacteria. Diversity of bacteria and novel bio-resources in the sediment environments are very abundant and need to be further researched. Isolating methods and isolation media are the crucial factors to recover the microorganisms inhabiting the sediment environments.

Keywords: South China Sea, Sediment environment, Bacteria, Cultivable diversity, Potential new species

海洋是生命的发源地,其中蕴藏了大量的微生物。据估计,海洋微生物多达 0.1–2.0 亿种,且生物多样性极其丰富,包括病毒、古菌、细菌、真核生物四大类群^[1]。海洋微生物不仅在海洋环境的物质循环、能量流动^[2]、生态平衡^[3]和环境净化^[4]方面承担着重要的角色,而且是各种结构新颖活性物质的巨大资源库^[5]。海洋沉积环境低温、高压、寡营养和无光照等极端特点,孕育了该环境下特殊生理特性微生物类群。因此,开展海洋沉积环境中微生物资源及其多样性研究是海洋微生物从资源走向应用的关键。

自 20 世纪 90 年代以来,学者们通过分子方法研究海洋沉积环境微生物多样性的报道日益增多,涉及海洋环境非常广泛,包括热带^[6]、亚热带^[7]、温带^[8]、寒带海域^[9]及海底“热液”^[10]、“冷泉”^[11]及重金属结核区环境^[12]等,发现了大量特殊的微生物类群如绿色非硫细菌 (Green non-sulfur bacteria)^[10]、产甲烷真菌^[11]等。分子生物学技术的发展虽然为海洋微生物多样性的研究带来了极大便利,并较准确反映出环境中微生物的多样性信息,但如何获得大量应用潜力较大的纯培养菌株这一“瓶颈”问题仍未得到解决。纯培养菌株仍然是现阶段微生物工业开发的重要资源,也是当前海洋经济发展重要的特色资源。本研究以中国南海沉积环境为对象,采用传统的纯培养分离方式,在获得大量纯培养菌株的基础上,对 20 个不同深度的沉积环境样品中的细菌多样性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 沉积物样品: 本次实验 20 个沉积物样品,

来自 2010 年和 2011 年中国科学院南海海洋研究所南海多个航次,深度 95–3 932 m,其中 95–717 m、1 031–1 946 m、2 134–3 023 m、3 415–3 932 m 的样品各 5 个。采用抓斗、箱式取样方法获得,表层约 5 cm 作为取样区域,–20 °C 保存。

1.1.2 分离培养基: 分离培养基为改良的海洋细菌培养基 Zobell 2216E^[13](蛋白胨 5.0 g,酵母膏 1.0 g,磷酸高铁 0.1 g,琼脂 15.0 g,海水 500 mL,自来水 500 mL, pH 7.6)。

1.1.3 实验试剂及仪器: *Taq* DNA 聚合酶(上海生工);细菌通用 PCR 引物由华大基因合成;小型台式高速离心机及 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司;凝胶成像系统(Gel Logic 212 PRO);水浴摇床购自金坛市晶波实验仪器厂;恒温培养箱买自广东省医疗器械厂。

1.2 菌株的分离、纯化及保藏

称取 2 g 沉积物样品至 18 mL 无菌海水中,28 °C 摇匀 20 min,取 100 μ L 至分离培养基,涂布,置于 28 °C 恒温培养箱培养约 15 d。挑取不同形态单菌落至改良营养琼脂(蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3 g,海水 500 mL,自来水 500 mL, pH 7.4)平板,划线纯化、保藏。

1.3 DNA 的提取及 PCR 扩增

DNA 的提取及 16S rRNA 基因的扩增参照 Li 等的方法^[14],通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'),PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送至华大基因进行 16S rRNA 基因序列测定。先测一个反应 1–750 bp

(V1-V4)初步判断菌株的种属情况,如果低于 98% 的相似性,然后测反向序列拼接后约 1 430 bp 进行深入分析物种的系统发育地位。

1.4 系统进化分析

将 16S rRNA 基因序列导入 Ez Taxon-e^[15]进行 BLAST 比对,调取每条序列最相近菌株 16S rRNA 基因序列,通过软件包 Clustal X^[16]进行比对分析,应用 MEGA 5.0^[17]软件,采用邻位相接法^[18](Neighbour-Joining)构建系统发育进化树,进行菌株的聚类及系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 细菌多样性

共分离得到 200 株细菌,经 16S rRNA 基因序列比对分析,以 98%的 16S rRNA 基因序列相似性作为原核微生物物种的界限^[19],合并相似性 98% 以上的菌株为同一个种后,共得到与 99 个已知物种相近的不同序列,它们分属于 4 个门,47 个属(见表 1、2 和 3,注:表 2 和表 3 中 99 个菌株的 16S rRNA 基因序列登录号为 KC893944-KC894041 和 KC160501)。图 1 为每个属选取一个最相似种菌株

表 1 四个门所含属级分类单元 Table 1 Genera distributed in each of the four phyla			
厚壁菌门 Firmicutes	变形菌门 Proteobacteria	放线菌门 Actinobacteria	拟杆菌门 Bacteroidetes
<i>Aerococcus</i> (1, 3 023 m)	<i>Alcaligenes</i> (3, 3 932 m)	<i>Gordonia</i> (1, 1 860 m)	<i>Salegentibacter</i> (1, 2 918 m)
<i>Bacillus</i> (88, 3 928 m)	<i>Alcanivorax</i> (3, 3 932 m)	<i>Kocuria</i> (2, 95 m)	
<i>Fontibacillus</i> (1, 1 640 m)	<i>Alteromonas</i> (1, 3 928 m)	<i>Microbacterium</i> (1, 1 946 m)	
<i>Halobacillus</i> (3, 3 739 m)	<i>Brevundimonas</i> (1, 1 031 m)	<i>Micrococcus</i> (1, 1 031 m)	
<i>Jeotgalibacillus</i> (3, 3 928 m)	<i>Cobetia</i> (1, 95 m)	<i>Micromonospora</i> (10, 3 739 m)	
<i>Lysinibacillus</i> (1, 157 m)	<i>Erythrobacter</i> (13, 3 739 m)	<i>Nocardia</i> (1, 3 023 m)	
<i>Planifilum</i> (1, 1 312 m)	<i>Halomonas</i> (5, 3 415 m)	<i>Rhodococcus</i> (1, 2 918 m)	
<i>Ornithinibacillus</i> (5, 2 460 m)	<i>Luteimonas</i> (1, 1 312 m)	<i>Saccharomonospora</i> (1, 181 m)	
<i>Paenibacillus</i> (7, 3 928 m)	<i>Marinobacter</i> (2, 1 312 m)	<i>Salinibacterium</i> (1, 157 m)	
<i>Planococcus</i> (6, 3 932 m)	<i>Ochrobactrum</i> (1, 1 946 m)	<i>Salinispora</i> (1, 1 640 m)	
<i>Planomicrobium</i> (4, 1 031 m)	<i>Paracoccus</i> (2, 1 946 m)	<i>Streptomyces</i> (3, 3 928 m)	
<i>Pontibacillus</i> (1, 95 m)	<i>Pseudoalteromonas</i> (1, 157 m)	<i>Verrucosispora</i> (2, 3 415 m)	
<i>Solibacillus</i> (1, 157 m)	<i>Pseudomonas</i> (6, 3 932 m)		
<i>Sporosarcina</i> (1, 3 928 m)	<i>Roseomonas</i> (1, 1 312 m)		
<i>Staphylococcus</i> (1, 1 860 m)	<i>Ruegeria</i> (1, 95 m)		
<i>Virgibacillus</i> (1, 3 928 m)	<i>Serratia</i> (5, 3 415 m)		
	<i>Vibrio</i> (3, 181 m)		
	<i>Yangia</i> (1, 1 860 m)		

注: 括号中数字分别表示各个属中菌株数目及分离得到该属样品的最大深度。
Note: The numbers in each bracket represent the number of stains in every genus and maximum depth of the samples from which we discovered the genus, respectively.

表 2 89 个细菌物种的 16S rRNA 基因序列 BLAST 比对结果
Table 2 BLAST results of 16S rRNA gene sequences of 89 bacterial species

菌株号 Strain number	16S rRNA 基因最相似菌种名称 Name of strain having the highest 16S rRNA gene similarity	最高相似度 The highest similarity (%)	菌株号 Strain number	16S rRNA 基因最相似菌种名称 Name of strain having the highest 16S rRNA gene similarity	最高相似度 The highest similarity (%)
SCSIO 04132	<i>Aerococcus urinaequi</i> IFO 12173 ^T	99.90	SCSIO 04308	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 ^T	99.60
SCSIO 04630	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> IAM12369 ^T	99.30	SCSIO 04613	<i>Luteimonas aestuarii</i> B9 ^T	98.30
SCSIO 04561	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B-5 ^T	100	SCSIO 04315	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41 ^T	100
SCSIO 04629	<i>Alteromonas macleodii</i> DSM 6062 ^T	99.60	SCSIO 04320	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19 ^T	99.20
SCSIO 04122	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 ^T	99.90	SCSIO 04705	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T	99.50
SCSIO 04189	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T	99.89	SCSIO 04592	<i>Micromonospora coxensis</i> 2-30-b/28 ^T	99.70
SCSIO 04219	<i>Bacillus asahii</i> MA001 ^T	97.10	SCSIO 04596	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837 ^T	99.60
SCSIO 04560	<i>Bacillus aurantiacus</i> K1-5 ^T	96.90	SCSIO 04581	<i>Micromonospora siamensis</i> TT2-4 ^T	98.60
SCSIO 04118	<i>Bacillus barbaricus</i> V2-BIII-A2 ^T	100	SCSIO 04169	<i>Nocardia grenadensis</i> GW5-5797 ^T	100
SCSIO 04190	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	99.90	SCSIO 04701	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> CCUG30717 ^T	100
SCSIO 04177	<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831 ^T	97.70	SCSIO 04134	<i>Ornithinibacillus bavariensis</i> WSBC 24001 ^T	99.00
SCSIO 04203	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 ^T	100	SCSIO 04277	<i>Ornithinibacillus scapharcae</i> TW25 ^T	99.40
SCSIO 04155	<i>Bacillus fortis</i> R-6514 ^T	98.90	SCSIO 04300	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23 ^T	99.00
SCSIO 04564	<i>Bacillus galli</i> BFLP-1 ^T	97.10	SCSIO 04114	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439 ^T	100
SCSIO 04207	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719 ^T	99.10	SCSIO 04100	<i>Paenibacillus lautus</i> NRRL NRS-666 ^T	98.60
SCSIO 04230	<i>Bacillus idriensis</i> SMC 4352-2 ^T	99.90	SCSIO 04162	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> XIL14 ^T	99.30
SCSIO 04165	<i>Bacillus indicus</i> Sd/3 ^T	98.80	SCSIO 04200	<i>Paracoccus homiensis</i> DD-R11 ^T	98.70
SCSIO 04611	<i>Bacillus infantis</i> SMC 4352-1 ^T	99.90	SCSIO 04312	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> ATCC 21588 ^T	98.90
SCSIO 04529	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	99.70	SCSIO 04304	<i>Planococcus plakortidis</i> S/ASP6(II) ^T	100
SCSIO 04617	<i>Bacillus methanolicus</i> NCIMB 13113 ^T	95.90	SCSIO 04329	<i>Planococcus rifiatoensis</i> M8 ^T	99.90
SCSIO 04239	<i>Bacillus nanhaiensis</i> JSM 082006 ^T	99.60	SCSIO 04541	<i>Planomicrobium chinense</i> DX3-12 ^T	99.20
SCSIO 04215	<i>Bacillus nealsonii</i> DSM 15077 ^T	98.10	SCSIO 04552	<i>Pontibacillus yanchengensis</i> Y32 ^T	97.80
SCSIO 04286	<i>Bacillus niabensis</i> 4T19 ^T	98.30	SCSIO 04301	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> LMEB 39 ^T	100
SCSIO 04153	<i>Bacillus rigui</i> WPCB074 ^T	98.10	SCSIO 04519	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	99.50
SCSIO 04150	<i>Bacillus safensis</i> ATCC 7061 ^T	100	SCSIO 04568	<i>Pseudomonas xinjiangensis</i> S3-3 ^T	99.60
SCSIO 04267	<i>Bacillus subterraneus</i> DSM 13966 ^T	99.80	SCSIO 04227	<i>Rhodococcus qingshengii</i> dj1-6 ^T	100
SCSIO 04188	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC ^T	99.80	SCSIO 04684	<i>Roseomonas aestuarii</i> JC17 ^T	99.90
SCSIO 04210	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB 3610 ^T	99.80	SCSIO 04266	<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> ITI-1157 ^T	97.80

(待续)

			(续表)		
SCSIO 04276	<i>Bacillus thermolactis</i> R-6488 ^T	99.40	SCSIO 04271	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017 ^T	100
SCSIO 04265	<i>Bacillus thioparans</i> BMP-1 ^T	99.80	SCSIO 04536	<i>Salagentibacter mishustinae</i> KMM 6049 ^T	99.50
SCSIO 04297	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 ^T	98.20	SCSIO 04318	<i>Salinibacterium amurskyense</i> KMM 3673 ^T	100
SCSIO 04574	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 ^T	100	SCSIO 04337	<i>Salinispora tropica</i> CNB-440 ^T	99.10
SCSIO 04313	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T	99.60	SCSIO 04139	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1 ^T	100
SCSIO 04330	<i>Erythrobacter citreus</i> RE35F/1 ^T	99.40	SCSIO 04289	<i>Solibacillus silvestris</i> HR3-23 ^T	99.00
SCSIO 04225	<i>Erythrobacter flavus</i> SW-46 ^T	100	SCSIO 04128	<i>Sporosarcina luteola</i> Y1 ^T	100
SCSIO 04665	<i>Erythrobacter pelagi</i> UST081027-248 ^T	100	SCSIO 04349	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 ^T	100
SCSIO 04539	<i>Erythrobacter vulgaris</i> 022 2-10 ^T	100	SCSIO 04264	<i>Streptomyces sanyensis</i> GIMN4.003 ^T	98.90
SCSIO 04249	<i>Gordonia terrae</i> DSM 43249 ^T	99.50	SCSIO 04582	<i>Streptomyces violascens</i> ISP 5183 ^T	99.50
SCSIO 04659	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> IS-Hb7 ^T	99.70	SCSIO 04268	<i>Streptomyces viridodiataticus</i> NBRC 13106 ^T	100
SCSIO 04661	<i>Halobacillus salinus</i> HSL-3 ^T	98.30	SCSIO 04593	<i>Verrucosispora gifhornensis</i> DSM 44337 ^T	100
SCSIO 04110	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404 ^T	99.70	SCSIO 04285	<i>Vibrio azureus</i> LC2-005 ^T	98.60
SCSIO 04327	<i>Halomonas aquamarina</i> DSM 30161 ^T	99.40	SCSIO 04305	<i>Vibrio communis</i> R-40496 ^T	99.50
SCSIO 04328	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	99.80	SCSIO 04565	<i>Vibrio marinus</i> R-40493 ^T	97.80
SCSIO 04303	<i>Halomonas venusta</i> DSM 4743 ^T	99.90	SCSIO 04217	<i>Yangia pacifica</i> DX5-10 ^T	99.40
SCSIO 04343	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T	100			

表 3 10 个潜在新物种的 16S rRNA 基因序列 BLAST 比对结果				
Table 3 BLAST results of 16S rRNA gene sequences of 10 potential new species				
潜在新物种菌株号 Strains of new candidates	样品深度 Depth (m)	16S rRNA 基因最相似菌株名称 The highest-similarity species	最高相似度 Highest similarity (%)	序列登录号 GenBank accession No.
SCSIO 04116	2 134	<i>Microbacterium hatanonis</i> JCM 14558 ^T	97.4 (35/1 335 bp)	KC894000
SCSIO 04123	3 023	<i>Paenibacillus tarimensis</i> SA-7-6 ^T	95.9 (56/1 352 bp)	KC894011
SCSIO 04143	3 928	<i>Ornithinibacillus contaminans</i> CCUG 53201 ^T	97.3 (33/1 208 bp)	KC894005
SCSIO 04235	1 312	<i>Bacillus cibi</i> JG-30 ^T	97.8 (30/1 370 bp)	KC893972
SCSIO 04236	1 312	<i>Bacillus cibi</i> JG-30 ^T	96.6 (46/1 365 bp)	KC893975
SCSIO 04344*	1 640	<i>Fontibacillus aquaticus</i> GPTSA19 ^T	93.9 (79/1 309 bp)	KC893983
SCSIO 04524	3 415	<i>Bacillus carboniphilus</i> JCM 9731 ^T	94.7 (76/1 431 bp)	KC160501
SCSIO 04527*	1 312	<i>Melghirimyces algeriensis</i> NariEX ^T	95.3 (64/1 359 bp)	KC894002
SCSIO 04534	3 928	<i>Paenibacillus barengoltzii</i> SAFN-016 ^T	94.8 (69/1 339 bp)	KC894013
SCSIO 04151*	3 928	<i>Jeotgalibacillus soli</i> JSM 081008 ^T	95.5 (63/1 390 bp)	KC893991

注：括号中数字表示潜在新物种与其 16S rRNA 基因序列最相近菌株序列比对的差异碱基数目与碱基总数。*：潜在新属级菌株。
Note: The numbers in each bracket represent the number of different and total nucleotide bases between the two 16S rRNA gene sequences of potential new species and their nearest neighbours. *: New genera candidates.

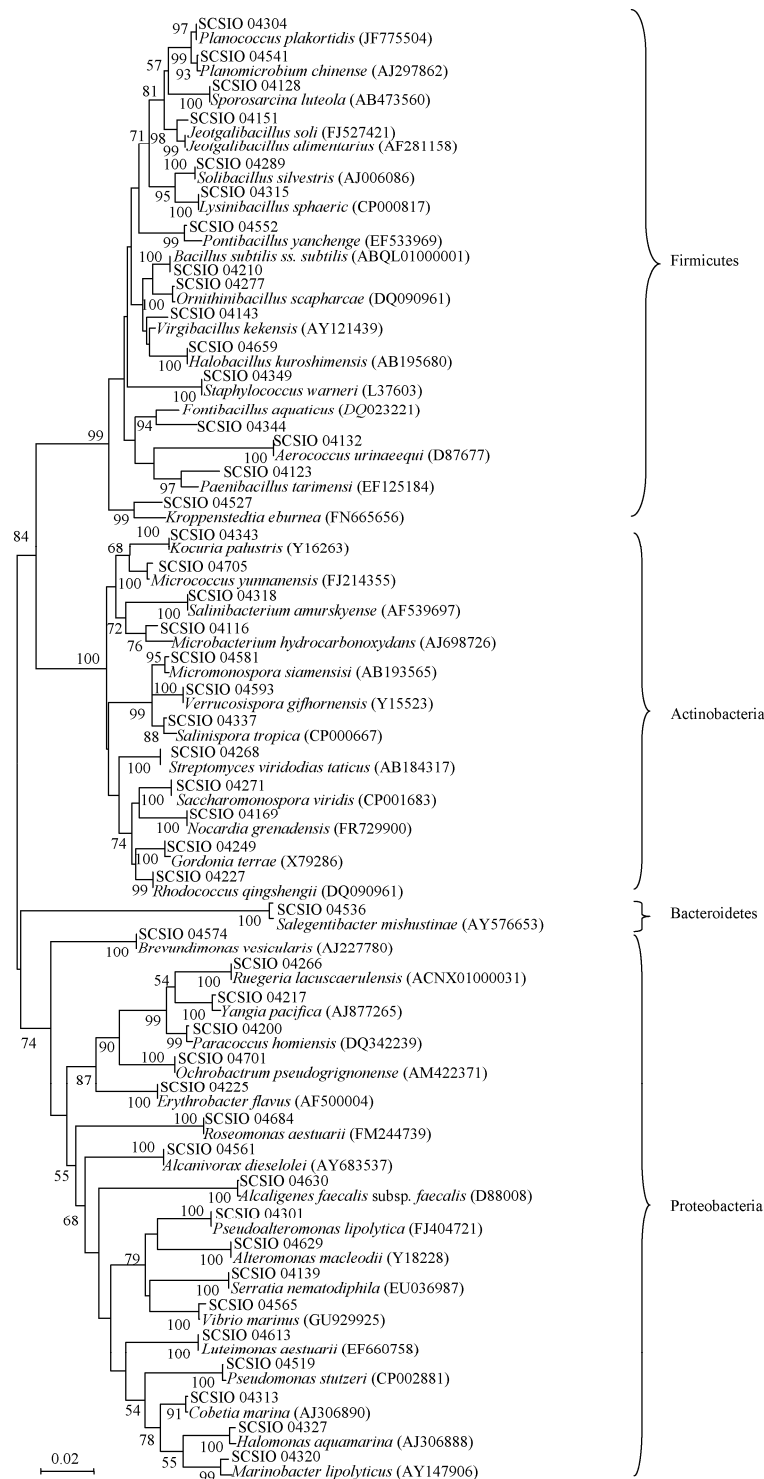


图1 海洋沉积物中细菌 16S rRNA 基因序列系统进化分析

Figure 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (700 bp, V1-V4) of sediment isolates and related species

Note: The tree was constructed with Kimura 2-parameter model and complete deletion treatment for gaps/missing Data. Numbers in brackets are GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences for each strains. Numbers at each branch point indicate the percentage supported by bootstrap values based on 1 000 replications. Bootstrap values>50% are shown at branching points. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树。通过系统进化分析,我们可以明显看出可培养菌株聚类于厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)四大类群。

2.1.1 厚壁菌门(Firmicutes): 该类群共 18 个属, 54 个种, 占有所有分离获得物种数量的 54.5%, 是本研究中发现的优势类群。其中, 产芽孢菌是最大的一个类群, 包含了 9 个属, 且本研究获得的潜在新物种多数为产芽孢菌新种。芽孢杆菌属(*Bacillus*) 有 88 株菌, 分布在 30 个种中, 是产芽孢类群实现纯培养频率最高的属级类群之一。我国的孙风芹等^[20]对南沙沉积物细菌多样性研究也得到了类似的结果。但是有研究表明, 海洋沉积环境仅有极少数量的孢子, 大多数菌株是处于营养生长状态的细胞^[21]。因此, 是由于芽孢杆菌可以形成孢子来抵御不良环境的这一特性, 或是由于其本身在环境中比例较大, 还是实验室中分离培养基对芽孢杆菌的选择性较强, 是哪些原因使其比其他物种更容易在实验室得到纯培养, 仍需要深入研究。

2.1.2 变形菌门(Proteobacteria): 该类群中共发现 15 个属, 28 个种, 占有所有获得物种数量的 28.3%。它们分布在 3 个亚纲, α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria, 发现菌株数量的比例分别为 39.2%、5.4% 和 54.9%。可见, γ -Proteobacteria 为优势类群, 这与其他海域沉积环境微生物多样性的研究得出的结论相同^[7,22]。但部分研究人员采用纯培养方法对南海南沙沉积环境微生物多样性研究结果显示优势类群为 Proteobacteria^[20], 与本研究 Proteobacteria 为第二优势类群存在一定差异。其原因可能与培养基的选择性、样品、培养条件的差异等有关。

α -Proteobacteria 是陆地^[23]及海水环境^[24]的优势类群, 在海洋沉积环境较少发现^[25-26], 因此被认为是近岸或浅海沉积环境的特征类群。本研究发现该类群中 20 株细菌, 其中 15 株来自于水深超过 1 000 m 的沉积环境, 这与前期研究结果有

较大差异。但也有文献报道^[27], 在日本深海 1 159–6 379 m 水深的 7 个沉积物中, 发现 α -Proteobacteria 为第二大优势类群。在 α -Proteobacteria 类群中获得纯培养频率较高的是赤杆菌属(*Erythrobacter*), 共发现 4 个种的 13 株菌。赤杆菌是一类光合细菌, 营养方式为兼性异养, 是海洋初级生产力重要组成部分^[28]。目前发现赤杆菌新物种均分离自海洋环境, 多数从浅层海水获得^[29-30], 在南海的浅海沉积物中也发现一株新种^[31]。而本研究在深海 1 860–3 739 m 环境发现了大量的赤杆菌属菌株, 它们是受到物理迁移(风、潮汐等)的影响, 使其从近海卷入到深海, 还是本身即为深海沉积环境中的土著类群, 仍需要发现更多的证据。

β -Proteobacteria 是本次研究发现的 Proteobacteria 中最小的类群, 仅有 3 株菌与 *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* (IAM12369^T) 16S rRNA 基因序列相似度为 99.5%。产碱杆菌属(*Alcaligenes*)多存在于水、土壤、动物肠道^[32]等, 也是海洋环境的常见类群。 β -Proteobacteria 在淡水^[33]及陆地环境^[34]广泛分布, 甚至在一些污染严重的河流环境占据优势地位, 可能与污染物降解有关^[35]。该类群在海水中丰度也较大^[36], 如北冰洋海域中的氢氧化菌类群在不同深度海水中广泛存在^[37], 但 β -Proteobacteria 在海洋沉积环境中所占比例却很小^[20,27]。

γ -Proteobacteria 为深海沉积环境中的优势类群, 该类群不乏一些特殊生理功能菌株, 我们从深度在 3 700 m 以上的 3 个样品中分离得到食烷菌属(*Alcanivorax*) 3 株菌, 它们与 *Alcanivorax dieselolei* (B-5^T)相似度均为 100%。同时, 我们还在 1 312–3 932 m 水深的沉积环境中发现 6 株假单胞菌(*Pseudomonas*), 分属于 4 个种。食烷菌是海洋专性烷烃降解菌, 假单胞菌同样能参与深海多种有机碳的分解, 它们在清除海洋污染、维持海洋生态平衡方面均发挥着重要作用^[38-39]。这些菌株与深海沉积环境中营养源之间的关系, 特别是与深海油储或

污染是否存在一定联系,尚待进一步研究。

2.1.3 放线菌门(Actinobacteria): 此类群包含 12 个属, 16 个种, 占有获得物种数量的 16.2%, 其中小单胞菌(*Micromonospora*)和链霉菌(*Streptomyces*)较为丰富, 分别发现 5 个种的 10 个菌株和 3 个种的 3 个菌株。小单胞菌属是小单胞菌亚目的代表属, 是抗生素的重要来源。而链霉菌不仅是抗生素的最大来源类群, 也可以分解多种难降解物质如木质素、乳胶等, 在土壤矿化中起重要作用。据报道至 2010 年海洋环境发现的放线菌共 50 个属^[40], 本研究仅获得其中 12 个属, 因此, 今后仍需要改进海洋放线菌分离方法, 以获得更多稀有放线菌资源。

2.1.4 拟杆菌门(Bacteroidetes): 此类群仅发现一株, 与分离自日本海胆的 *Salegentibacter mishustinae* (KMM 6049^T) 16S rRNA 基因序列相似度为 99.4%。需盐杆菌属(*Salegentibacter*)为中度嗜盐或耐盐类群, 可在 0–20% (质量体积比) 的盐浓度下生长, 最佳生长盐度为 5%^[41]。目前共发现 5 个种, 均分离自海洋或盐湖高盐环境。Bacteroidetes 类群广泛存在于各种水体环境中^[42]。在海水中为优势类群, 在南冰洋(Antarctic Ocean)表层海水中 Bacteroidetes 类群的 *Cytophaga-Flavobacterium* cluster 所占比例高达 72%^[43]。近年来, 该类群中一些来自海洋沉积环境的新物种被报道^[44–45], 但研究人员采用分子生物学方法却很少能检测到 Bacteroidetes 类群存在^[8]。因此, 该类群在海洋沉积环境的丰度仍待进一步确定。

2.2 不同深度样品细菌多样性比较

为了便于统计分析, 将 20 个沉积物样品按深度分为四类, 编号为 A、B、C、D, 样品深度分别为 95–717 m、1 031–1 946 m、2 134–3 023 m 和 3 415–3 932 m。从各类样品分离到菌株数分别为 49、61、47、43 株, 去掉相似性 98% 以上的 16S rRNA 基因序列后, 包含的种数分别为 45、41、35、28 个, 属级分类单元个数分别为 28、21、15、10 个。初步的研究结果表明随着深度的增加, 细菌多样性

呈现递减的趋势。其原因可能与不同深度沉积环境的营养成分多寡、温度高低、光照条件、静水压大小等有关, 海洋的垂直深度决定着生命过程中理化因子的分布, 因此深度可能是影响细菌多样性的一个关键因素。

在 4 个深度区域样品中发现的微生物菌株中, 数量最多的类群均为 Firmicutes (图 2), 它在 4 个深度区域环境所占比例分别为 A (59.2%)、B (52.5%)、C (68.1%) 及 D (69.8%)。Firmicutes 中数量比例最高的是芽孢杆菌, 在 4 类不同深度沉积物样品中均为优势类群, 分别占 51.0%、37.7%、63.8% 和 65.1%。变形菌门(Proteobacteria)为第二大优势类群, 在深度 1 031–1 946 m 区域比例最大, 达到 34.4%。Actinobacteria 在各个深度范围比例都较小, 均少于 20%。Bacteroidetes 仅包含 1 株细菌, 分离自深度 2 918 m 的南海沉积物样品。

本次实验分离得到的 47 个属中, 有些属从四类样品中都被分离到, 部分属则只在某类样品中被分到。如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、小单胞菌属(*Micromonospora*)、动性球菌属(*Planococcus*) 4 个属存在于 95–3 932 m

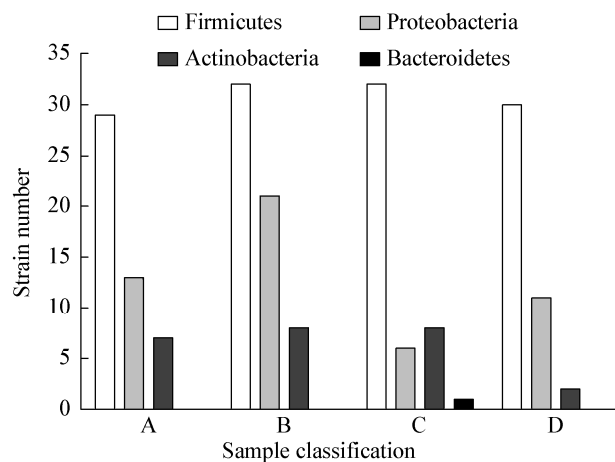


图 2 各类沉积物样品不同类群细菌菌株数目

Figure 2 Strain number of different bacteria groups isolated from four groups of sediment samples

Note: A: 95–717 m; B: 1 031–1 946 m; C: 2 143–3 023 m; D: 3 415–3 932 m.

深的四类样品中; 科贝特氏属(*Cobetia*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、海芽孢杆菌属(*Pontibacillus*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、鲁杰氏菌属(*Ruegeria*)、糖单胞菌属(*Saccharomonospora*)、*Salinibacterium* 属、*Solibacillus* 属、弧菌属(*Vibrio*)仅从浅海 95–717 m 样品中分离得到; 短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、藤黄单胞菌属(*Luteimonas*)、细杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、副球菌属(*Paracoccus*)、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)、盐水孢菌属(*Salinispora*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、杨氏菌属(*Yangia*) 11 个属仅存在于 1 031–1 946 m 深度区域; 气球菌属(*Aerococcus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、需盐杆菌属(*Salegentibacter*)只在 2 134–3 023 m 区域分离得到; 产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)、枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)则只在 3 415–3 932 m 的深海区分得。目前的文献显示, 以上各属均有菌株从海洋环境发现。其中, *Alcanivorax* 属 6 个种中的 5 个, *Alteromonas* 属 8 个种中的 7 个, *Salegentibacter* 属 7 个种中的 6 个, *Erythrobacter* 属、*Pseudoalteromonas* 属、*Salinispora* 属、*Yangia* 属所有菌株均是从海洋环境发现, 而其他各属仅部分菌株在海洋环境发现。此外, 以上很多属是陆生环境中常见的类群, 虽然这些属仅在某一深度样品中被分离发现, 但理论上讲, 它们应该能适应从海洋表层(0 m)也即是陆地环境至本研究所发现的这一深度范围中各种环境。以上实验结果不能完全代表海洋沉积物中物种分布的普遍规律, 但是可以为我们更好地进行多样性研究提供参考。

2.3 潜在新物种信息

本研究以 98% 作为区分两个原核物种的“金标准”^[19], 即菌株 16S rRNA 基因序列最大相似度低于 98% 的为潜在新物种。在 200 菌株中, 共有 10 个潜在新种菌株(SCSIO 04142、SCSIO 04151、

SCSIO 04316 相互之间 16S rRNA 基因全序列相似度均在 99% 以上, 故认为同一物种), 其中包括 3 个潜在新属级分类单元(SCSIO 04151、SCSIO 04344 和 SCSIO 04527), 其分离信息及系统进化关系见表 2 和图 3。

在 10 个潜在新物种中, 9 个属于 Firmicutes 门, 仅 1 个属于 Actinobacteria 门, 未发现 Proteobacteria 门和 Bacteroidetes 门类群的新物种。其中菌株 SCSIO 04142、SCSIO 04151、SCSIO 04316 三株菌与最相似菌株 *Jeotgalibacillus soli* (JSM 081008^T) 16S rRNA 基因全序列(1 360–1 400 bp)相似度为 95.5%, 系统发育树虽然与 *J. soli* (JSM 081008^T) 聚成稳定的分支, 但它们又独自形成一个亚支。因此初步认为它们为 Firmicutes 的一个潜在新属。菌株 SCSIO 04527 与 *Melghirimyces algeriensis* (NariEX^T) 的相似性为 95.3%, 且形成独立分支, 因此为高温放线菌科(Thermoactinomycetaceae)一个潜在新属。另外, 菌株 SCSIO 04344 的 16S rRNA 基因全序列(1 311 bp)最高相似性仅为 93.9%, 且形成独立分支, 因此也为潜在新属级分类单元。

SCSIO 04235、SCSIO 04236 与最相似菌株 *Bacillus cibi* (JG-30^T) 16S rRNA 基因序列相似度分别为 97.8% 和 96.6%, 与 *Bacillus* 属物种聚为一支, 它们之间的相似性为 97.9%, 故以 98% 的“金标准”初步判断它们可能是 *Bacillus* 属两个潜在新种。同样, 菌株 SCSIO 04524 也被认为是 *Bacillus* 属潜在新种。菌株 SCSIO 04143 为 *Virgibacillus* 属潜在新种; 菌株 SCSIO 04123、SCSIO 04534 为类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)两个潜在新种; 菌株 SCSIO 04116 与微杆菌属(*Microbacterium*)物种 16S rRNA 基因全序列的最高相似性为 97.4%, 是本研究中唯一一个放线菌潜在新种。

本研究中, 菌株 SCSIO 04524、SCSIO 04151、SCSIO 04534 的多相分类鉴定工作已经全部完成, 研究成果待发表。

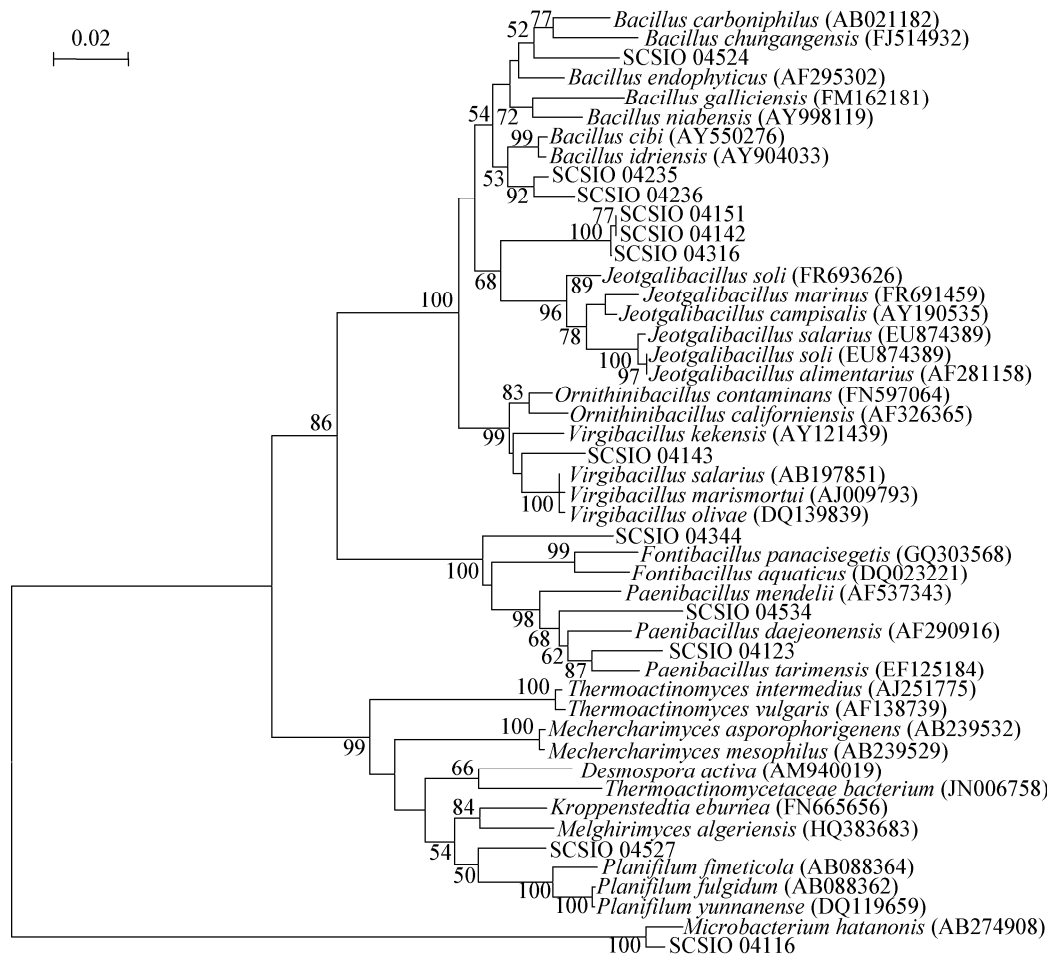


图3 潜在新物种 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 3 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1 300–1 450 bp) of new candidates and their related species

Note: The tree was constructed with Kimura 2-parameter model and complete deletion treatment for gaps/missing Data. Numbers in brackets are GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences for each strains. Numbers at each branch point indicate the percentage supported by bootstrap values based on 1 000 replications. Bootstrap values>50% are shown at branching points. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

3 讨论

本研究以探索海洋沉积环境中可培养细菌多样性为目的, 获得了丰富的微生物类群。获得的 99 个已知细菌物种中, 有 19 个分离自海洋环境(包括海水、沉积物、海洋动物等), 如菌株 *Yangia pacifica* (DX5-10^T) 和 *Halobacillus kuroshimensis* (IS-Hb7^T) 分别从海洋沉积物及海底岩石分离得到, 最适生长盐度分别为 5% 和 6%, 符合很多海洋微生物轻度嗜盐的特点^[46-47]。对于这些海洋专性生长

菌株, 我们可以进一步探究其适应于海洋环境的生理特性。菌株 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (ATCC 21588^T) 最初从海洋环境发现^[48], 近年来也从其他环境如空气分离得到^[49], 对于这些不同来源的同种菌株, 它们的生理特性、遗传机制是否存在较大差别, 需要深入研究。

本次研究得到的潜在新物种数目较多, 占菌株总数的 6.0%。进一步分析发现, 它们都分离自深度超过 1 000 m 的沉积物样品, 表明深海环境中新

种资源较为丰富。本研究发现的新物种类群较单一, 多为产芽孢菌类群, 因此, 下一步工作应该在菌株的分离方法和特殊类群的选择性分离方法增加力量, 发掘更多稀有及难培养微生物类群。

其次, 目前赤杆菌仅在浅海海水及沉积物发现, 可能与它营自营养生活有关, 这类细菌部分能够产生菌绿素 a 和类胡萝卜素, 但不依赖光能而只将其作为辅助能量来源, 且生活在有氧环境中, 称作好氧不产氧光养细菌(Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, AAnPB)^[50-51]。它们一般仅存在于“Upper ocean”环境, 在海洋系统中同时担当“生产者”和“分解者”的重要角色。但是本研究中在 121–3 739 m 都发现赤杆菌的存在, 这与前期研究结果有较大偏差, 该类群是否在深海真实存在或是否是因样品采集过程中受到表层海水污染仍待进一步验证。

深海是一个环境极其“恶劣”的生命极限区域, 长期的微生物进化与适应, 使其在遗传物质、生理代谢、细胞结构等多个层面上显示出与陆生微生物明显的差异, 因此深海是一个孕育新物种、新基因、新化合物、新机制等良好场所。目前深海的这种特征正在逐步被证明。本实验室在近几年的积累中也发现、鉴定并发表了 10 多个海洋来源的新物种和 4 个新属级类群, 并从芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[52]、链霉菌属(*Streptomyces*)^[53]、新属 *Marinactinospora*^[54]、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)^[55]菌株中分离到结构新颖的具有抗菌活性的化合物, 并且成功克隆表达了海洋来源的蛋白酶^[56]、纤维素酶基因^[57], 一些新化合物的合成机制也得以阐明^[58]。深海环境营养极其贫乏, 因此其中微生物对营养的竞争将比陆生微生物更加激烈, 能否通过酶解利用其它微生物不能利用的物质以及抑制环境中其它微生物的生长成为它们生存的关键。因此, 对于本研究中发现和保藏的微生物菌株, 需要进一步对其进行产酶及抗生活性的筛选, 为上述研究提供高质量的菌株资源。

最后, 任何可培养方法都具有一定的选择性, 这直接影响到采集样品中微生物获得纯培养的几率, 从而直接影响对样品或自然环境中微生物多样性的判断。因此, 纯培养多样性具有明显的局限性, 然而目前免培养分子方法虽然获得大量纯培养无法检测到的数据, 但通用引物的偏好, 基因组中 16S rRNA 基因的多拷贝及其异质性特征, 实验条件稳定性等仍然给结果增添了很大的变数, 导致很多纯培养获得数据而免培养无法检测到。因此, 只有在不断改进传统分离方法的基础上, 结合分子生物学技术进行指导和补充, 才能获得更加准确的海洋沉积环境微生物多样性信息。

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(5): 34-40.
- [2] Azam F, Fenchel T, Field J, et al. The ecological role of water-column microbes in the sea[J]. Marine Ecology Progress Series, 1983, 10(3): 257-263.
- [3] 郑天凌, 薛雄志, 李福东. 海洋微生物在生态环境中的作用[J]. 海洋科学, 1994(3): 35-37.
- [4] 刘慧玲, 杨世平, 黄翔鹤, 等. 高效降解有机物和促藻生长菌株的分离和筛选[J]. 台湾海峡, 2009, 28(3): 349-354.
- [5] Jensen PR, Williams PG, Oh DC, et al. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1146-1152.
- [6] 许飞, 戴欣, 陈月琴, 等. 南沙海区沉积物中细菌和古细菌 16S rDNA 多样性的研究[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 89-94.
- [7] Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis[J]. Microbiology, 1999, 145(11): 3305-3315.
- [8] Xu HX, Wu M, Wang XG, et al. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(2): 479-485.
- [9] 李会荣, 俞勇, 曾胤新, 等. 北极太平洋扇区海洋沉积物细菌多样性的系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 177-183.
- [10] Alain K, Olagnon M, Desbruyères D, et al. Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42(3): 463-476.
- [11] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the

- Japan Trench[J]. Marine Biotechnology, 1999, 1(4): 391-400.
- [12] 张海艳. 东太平洋金属结核区微生物多样性分析[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2006.
- [13] ZoBell CE. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes[J]. Journal of Marine Research, 1941, 4: 42-75.
- [14] Li WJ, Xu P, Schumann P, et al. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1424-1428.
- [15] Kim OS, Cho YJ, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 716-721.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [19] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 33(4): 152.
- [20] 孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 等. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1578-1587.
- [21] Rüger H. Benthic studies of the northwest African upwelling region: psychrophilic and psychrotrophic bacterial communities from areas with different upwelling intensities[J]. Marine Ecology Progress Series, 1989, 57: 45-52.
- [22] 谢华, 薛燕芬, 赵爱民, 等. 太平洋帕里西维拉海盆细菌多样性的非培养的初步分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(1): 1-5.
- [23] Zhou J, Davey ME, Figueras JB, et al. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA[J]. Microbiology, 1997, 143(12): 3913-3919.
- [24] González JM, Moran MA. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(11): 4237-4242.
- [25] Gray JP, Herwig RP. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4049-4059.
- [26] Cifuentes A, Antón J, Benlloch S, et al. Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1715-1719.
- [27] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths[J]. Biodiversity and Conservation, 1999, 8(5): 659-677.
- [28] Kobližek M, Bějá O, Bidigare RR, et al. Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean[J]. Archives of Microbiology, 2003, 180(5): 327-338.
- [29] Shiba T, Simidu U. *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll *a*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1982, 32(2): 211-217.
- [30] Yoon JH, Kang KH, Oh TK, et al. *Erythrobacter aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(6): 1981-1985.
- [31] Xu M, Xin Y, Yu Y, et al. *Erythrobacter nanhaisediminis* sp. nov., isolated from marine sediment of the South China Sea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(9): 2215-2220.
- [32] 范昕建. 产碱杆菌感染[J]. 中国实用内科杂志, 1999, 19(2): 73-74.
- [33] Crump BC, Armbrust EV, Baross JA. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 3192-3204.
- [34] Borneman J, Skroch PW, O'Sullivan KM, et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 1935-1943.
- [35] Brümmer I, Felske A, Wagner-Döbler I. Diversity and seasonal variability of β -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4463-4473.
- [36] Uphoff H, Felske A, Fehr W, et al. The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: a molecular screening of marine isolates[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(3): 249-258.
- [37] Bano N, Hollibaugh JT. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in the Arctic Ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 1960-1969.
- [38] Head IM, Jones DM, Röling WF. Marine microorganisms make a meal of oil[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(3): 173-182.
- [39] 谭周进, 肖罗, 谢丙炎, 等. 假单胞菌的微生态调节作用[J]. 核农学报, 2004, 18(1): 72-76.
- [40] Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 98(2): 119-142.
- [41] McCammon SA, Bowman JP. Taxonomy of Antarctic Flavobacterium species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov., and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and

- reclassification of [*Flavobacterium*] *salegens* as *Salegentibacter salegens* gen. nov., comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(3): 1055-1063.
- [42] Reichenbach H, Dworkin M. The order Cytophagales[J]. The Prokaryotes, 1992, 2: 3631-3675.
- [43] Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3721-3726.
- [44] Humphry DR, George A, Black GW, et al. *Flavobacterium frigidarium* sp. nov., an aerobic, psychrophilic, xylanolytic and laminarinolytic bacterium from Antarctica[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(4): 1235-1243.
- [45] Xu Y, Tian XP, Liu YJ, et al. *Sinomicrobium oceani* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from marine sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(3): 1045-1050.
- [46] Dai X, Wang BJ, Yang QX, et al. *Yangia pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel member of the Roseobacter clade from coastal sediment of the East China Sea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(3): 529-533.
- [47] Hua NP, Kanekiyo A, Fujikura K, et al. *Halobacillus profundus* sp. nov. and *Halobacillus kuroshimensis* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a deep-sea methane cold seep[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(6): 1243-1249.
- [48] Berry A, Janssens D, Hübner M, et al. *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 231-238.
- [49] 段魏魏. 新疆沙尘暴源区塔克拉玛干沙漠空气微生物多样性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2011.
- [50] Eiler A. Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7431-7437.
- [51] Sato-Takabe Y, Hamasaki K, Suzuki K. Photosynthetic characteristics of marine aerobic anoxygenic phototrophic bacteria *Roseobacter* and *Erythrobacter* strains[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(5): 331-341.
- [52] Gao CH, Tian XP, Qi SH, et al. Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(4): 191-193.
- [53] Niu S, Li S, Chen Y, et al. Lobophorins E and F, new spirotetronate antibiotics from a South China Sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 01127[J]. The Journal of Antibiotics, 2011, 64(11): 711-716.
- [54] Wang F, Tian X, Huang C, et al. Marinactinones A–C, new γ -pyrones from marine actinomycete *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00606[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 64(2): 189-192.
- [55] Li S, Tian X, Niu S, et al. Pseudonocardins A–C, new diazaanthraquinone derivatives from a deep-sea actinomycete *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299[J]. Marine Drugs, 2011, 9(8): 1428-1439.
- [56] Yang J, Li J, Mai Z, et al. Purification, characterization, and gene cloning of a cold-adapted thermolysin-like protease from *Halobacillus* sp. SCSIO 20089[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(6): 628-632. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.12.013.
- [57] Mai Z, Yang J, Tian X, et al. Gene cloning and characterization of a novel salt-tolerant and glucose-enhanced β -glucosidase from a marine *Streptomyces* sp. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(5): 1512-1522.
- [58] Xiao Y, Li S, Niu S, et al. Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a tailoring dihalogenase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 133(4): 1092-1105.