

研究报告

分离自印度洋深海沉积物的部分链霉菌分离株多位点序列分析

姜钊¹ 职晓阳¹ 李文均^{1,2*}

(1. 云南大学 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

(2. 中山大学生命科学学院 广东 广州 510275)

摘要:【目的】采用多位点序列分析方法,研究印度洋 3 000 m 以下深海沉积物中分离得到的 16S rRNA 基因比对高度相似的链霉菌菌株的种间系统发育关系,同时探讨各管家基因及多基因聚类分析后的种间区分能力。【方法】以分离自印度洋深海沉积物的 7 株 *Streptomyces albidoflavus*, 11 株 *Streptomyces cavourensis*, 16 株 *Streptomyces pratensis* 为研究对象,以 16S rRNA、*atpD*、*recA* 和 *rpoB* 基因片段为标记,通过 PCR 扩增、测序,获得序列。同时从 NCBI 上下载 5 株 *S. pratensis* 上述 4 个基因的序列,将所有序列在 MLST 网站进行比对,并构建系统进化树进行比较。【结果】*S. pratensis* 各菌株种内比较发现,16S rRNA 基因构建的系统进化树中相同基因型的菌株没有聚在一起,系统进化树不稳定,区分度不高。其余 3 个构建的系统进化树稳定,菌株的聚类关系与 MLST 数据库得到的基因型一致。同时,多基因聚类分析后将菌株分为 6 个类群。在 3 个种的种间多位点序列比较中,除区分度明显增加、进化树更加稳定以外,还发现 *recA* 基因进化上比较特殊的菌株。【结论】多位点序列分析将实验菌株分为很多不同的类型,成功地将所分离的链霉菌进行了更细的分类,同时也找到部分菌株在个别基因上差异较大。此方法可以用于相近种的快速鉴定。

关键词: 链霉菌,管家基因,多位点序列分析

Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Streptomyces* strains isolated from the Indian Ocean sediment samples

JIANG Zhao¹ ZHI Xiao-Yang¹ LI Wen-Jun^{1,2*}

(1. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study was to apply multilocus sequence analysis (MLSA) to evaluate the phylogenetic relationship among highly similar strains of the genus *Streptomyces*

Foundation item: National Basic Research Program of China (No. 2010CB833801)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-871-65033335; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

Received: November 18, 2015; **Accepted:** February 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 25, 2016
基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2010CB833801)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-871-65033335; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-18; **接受日期:** 2016-02-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-25

isolated from the Indian Ocean sediment samples under the depth of 3 000 m, based on 16S rRNA, *atpD*, *recA* and *rpoB* genes, and to further explore the potential of isolated *Streptomyces* species.

[Methods] We cultured 7 strains of *Streptomyces albidoflavus*, 11 strains of *Streptomyces cavourensis*, 16 strains of *Streptomyces pratensis* isolated from the Indian Ocean deep-sea sediments. We used PCR amplification and sequenced the genes 16S rRNA, *atpD*, *recA* and *rpoB* from these strains and also downloaded 5 strains sequences of *S. pratensis* from NCBI. We used all sequences to find the gene types in MLST web site and to build the phylogenetic trees for comparison. **[Results]** After comparison of *S. pratensis*, the same genotype strains were not clustered together in phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, the tree was not stable and degree of differentiation was also low, the phylogenetic trees based on *atpD*, *recA*, *rpoB* genes were relatively stable. Strains in the phylogenetic tree based on multiple gene cluster analysis divided into six groups. In Multilocus sequence analysis of the three *Streptomyces*, the degree of differentiation increased and the phylogenetic tree was more stable and also found some special strains of *recA* gene. **[Conclusion]** Multilocus sequence analysis can divide experimental strains into different types and some strains have large differences in individual gene (*recA* gene). Multilocus sequence analysis is suitable for classification and identification of some closely related species.

Keywords: *Streptomyces*, Housekeeping genes, Multilocus sequence analysis

海洋是地球系统中最重要的重要组成部分，是微生物生存的天堂，微生物不仅进行光合作用扮演初级生产者的角色，为大型生物提供营养；同时，海洋微生物扮演着分解者的角色，为海洋植物提供无机营养，从而维持整个海洋生态系统良性可持续的循环^[1]。海洋微生物驱动了物质和能量的循环利用，维持了地球生物圈的稳定、完整和可持续循环^[2]。海洋微生物多样性极为丰富，估计物种超过两亿种，生物碳总量达到 9 000 万 t^[3]，仅沉积环境原核微生物就达到 10³⁰ 个细胞^[4]。

在海洋环境中，链霉菌属(*Streptomyces*)是常见的一类放线菌。它是一类具有丝状分枝细胞的革兰氏阳性细菌，具有复杂的发育分化过程，形态分化的同时伴随着复杂的生理变化和大量次级代谢产物的生成。此外，链霉菌能产生胞外酶、抗生素等多种次级代谢产物，由链霉菌产生的抗生素占自然界已知抗生素总比的 70%^[5]。除抗生素以外，该属产生的代谢物还包括抗肿瘤剂、免疫抑制剂、杀虫剂^[6]、胞外水解酶、几丁质酶，如淀粉酶、果胶酶、纤维素酶、木聚糖酶和蛋白酶等^[7]，也从中发现毒素、不饱和脂肪酸、类胡萝卜素等^[8]。

正因为链霉菌次级代谢途径能产生众多次级代谢物，几十年来，对链霉菌的大量筛选及生理

研究工作受到广泛重视。但是，链霉菌在形态学、生理生化、生物化学上有很大不同，在种、属水平上，16S rRNA 基因相似性在多大程度才能比较妥当区分尚无公认的标准。目前一些分类学家认为 DNA 相似性在 70%以上、G+C mol%相差小于 5%为同一种。16S rRNA 基因序列和 DNA-DNA 杂交比较的结果显示：70%的 DNA-DNA 匹配性对应于约 97%的 16S rRNA 基因相似性^[9]，然而目前链霉菌新资源的发现中很多 16S rRNA 基因相似性达到 99%及以上水平，仍然在生理生化及分子水平上存在很大差异，从而被鉴定为新种。鉴于链霉菌资源的重要性，精确而简洁的分类显得格外重要。试验中选取了从印度洋部分深海沉积物样点分离到的 16S rRNA 基因相似性达到 99%以上的 3 个种的链霉菌菌株进行多位点序列分析比较 (MLSA)。旨在对分离到的链霉菌进行更精确的分析，为下游次级代谢产物的分析提供更多链霉菌资源，也为深海链霉菌的分析提供更多的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品：实验菌株是从印度洋深海沉积物分离的 16S rRNA 基因相似性达到 99%以上的链霉菌菌株，菌株保藏于本实验室。

1.1.2 培养基: 实验中所有的链霉菌培养采用 ISP 2 培养基(g/L), 酵母粉 4.0, 葡萄糖 4.0, 麦芽粉 4.0, 复合维生素 1.0 mL, 琼脂 15.0, pH 7.2。复合维生素: 维生素 B1、维生素 B2、烟酸、维生素 B、泛酸钙、肌醇、对氨基苯甲酸 0.50, 维生素 H 0.25。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌菌体收集: 将菌株在 ISP 2 固体培养基上进行活化, 挑取菌体接种于 ISP 2 液体培养基, 28 °C、180 r/min 培养 3–5 d 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体备用。

1.2.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序: 菌株 DNA 采用酶解法提取^[10], 实验选取 16S rRNA、*atpD*、*rpoB* 和 *recA* 四个基因为研究对象。除 16S rRNA 基因以外的其它 3 个基因均为单拷贝基因, 无遗传连锁, 在细菌的基础代谢中行使不同的功能。*atpD* 基因编码 F_0F_1 -ATP 合成酶的 B 亚基; *rpoB* 基因编码 RNA 聚合酶 B 亚基; *recA* 基因编码重组酶 A。各基因扩增引物^[11]见表 1。

扩增体系: 10×Buffer (Mg^{2+} 2.5 mmol/L) 5.0 μ L, 正向引物(0.25 μ mol/L) 1.0 μ L, 反向引物(0.25 μ mol/L) 1.0 μ L, dNTPs mix (100 μ mol/L) 4.0 μ L, DNA 1.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(0.3 U/ μ L) 0.5 μ L, 用 ddH₂O 补至 50 μ L。扩增条件: 95 °C

5 min; 95 °C 30 s, 16S rRNA 55 °C (*atpD* 63 °C, *recA* 60 °C, *rpoB* 65 °C) 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送上海生工生物有限公司测序, 测序后的基因序列用 SeqMan 进行拼接, 获得每一个基因的完整序列, 在 MLST 数据库中的链霉菌数据库进行基因的匹配比对 (<http://pubmlst.org/streptomyces/>)。

1.2.3 系统进化树的构建: 完整的 16S rRNA 基因序列利用 EzBioCloud BLAST (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)服务器进行相似性分析^[12], 确定菌株基本类型和相似率。系统进化树的构建采用 ClustalX 软件进行多序列比对^[13], 比对结果通过 MEGA 5.0^[14]进行系统发育进化树的构建, 构建方法同时采用邻近法、最大简约法和最大似然法, 采用双参数模型(Two-parameter model), 通过自展分析(Boot strapping)进行系统发育树的评估, 自展数据集为 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 基因型比对结果

测序结果中将 16S rRNA 相似性与 *S. albidoflavus* 达到 99% 以上的 7 株菌, 与 *S. cavourensis* 相似性达到 99% 以上的 11 株菌, 与 *S. pratensis* 相似性达到 99% 以上的 16 株菌, 以及从 NCBI 数据库下载的和 *S. pratensis* 相似性高于 99% 的 5 株菌(ch24、ch2、w25、Cald93、C4.1868), 一共 39 株菌的 16S rRNA、*atpD*、*recA*、*rpoB* 4 个基因序列上传到 MLST 数据库得到各基因类型(表 2)。

由表 2 可知 *S. albidoflavus* 16S rRNA 相似性达到 99% 以上的 7 株菌的各基因类型一致, 同时结合生长形态可以确定为同一株菌。与 *S. cavourensis* 16S rRNA 相似性达到 99% 以上的 11 株菌, 16S rRNA 和 *recA* 基因类型各有两种, 其它两个基因的基因类型只有一种, 可见在这 11 株菌中 *atpD* 和 *rpoB* 基因的差异不大。与 *S. pratensis* 16S rRNA 相似性达到 99% 以上的 21 株菌的 *atpD* 基因有 5 种类型, 16S rRNA、*recA* 和 *rpoB* 基因各有 4 种类

表 1 4 个基因的扩增及测序引物
Table 1 The primers used for amplification and sequencing of 4 genes

基因 Genes	引物序列 Sequence (5'→3')
16S rRNA	PA CAGAGTTTGATCCTGGCT PB AGGAGGTGATCCAGCCGCA
<i>atpD</i>	<i>atpD</i> F GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGG TGTTCAACACC <i>atpD</i> R GTGAAGTGTCTGGCGACGTGGGTGT TCTGGGACAGGAA
<i>recA</i>	<i>recA</i> F CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCA ATTC <i>recA</i> R GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGA AGTTGCG
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> F GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCG AGGC <i>rpoB</i> R CCTCGTAGTTGTGACCCTCCACGGC ATGA

表 2 链霉菌各基因的基因类型
Table 2 The gene types of *Streptomyces* strains

菌株号 Strains number	相似菌株 Similar strains	16S rRNA 相似率 16S rRNA similarity rate (%)	基因类型 Gene types			
			16S rRNA	<i>atpD</i> (A)	<i>recA</i> (B)	<i>rpoB</i> (C)
YIM M12110	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.43	38	5	5	28
YIM M12121	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.71	38	5	5	28
YIM M12134	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.22	38	5	5	28
YIM M12150	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.72	38	5	5	28
YIM M12218	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.72	38	5	5	28
YIM M12262	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.58	38	5	5	28
YIM M12264	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.71	38	5	5	28
YIM M12006	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.72	33	94	96	35
YIM M12022	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.45	33	94	96	35
YIM M12024	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.27	33	94	96	35
YIM M12086	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.50	86	94	96	35
YIM M12089	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.79	86	94	96	35
YIM M12101	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.93	33	94	96	35
YIM M12172	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.79	33	94	96	35
YIM M12233	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.67	33	94	96	35
YIM M12284	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.57	86	94	96	35
YIM M12299	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.51	86	94	5	35
YIM M12123	<i>Streptomyces cavourensis</i>	99.45	33	94	96	35
YIM M12003	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	22	23
YIM M12009	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	5	23
YIM M12011	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.67	77	9	97	8
YIM M12012	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.85	77	9	97	8
YIM M12023	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	22	23
YIM M12052	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	22	23
YIM M12061	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.62	4	97	22	23
YIM M12076	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	25	22	23
YIM M12087	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	22	23
YIM M12092	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	22	23
YIM M12108	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	97	22	23
YIM M12117	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.63	4	97	22	23
YIM M12138	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.85	77	9	97	8
YIM M12183	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.05	33	94	96	35
YIM M12361	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	4	25	22	23
YIM M12121-1	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.81	77	9	97	8
ch24	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.93	15	38	36	38
ch2	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.54	15	38	36	38
W25	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.51	15	38	36	38
Cald 193	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.42	15	38	36	38
C4.1868	<i>Streptomyces pratensis</i>	99.84	15	38	36	38

型。多基因聚类分析后, *S. albidoflavus* 所有菌株的 4 个基因类型相同, *S. cavourensis* 各菌株分为 3 种类型, *S. pratensis* 各菌株分为 6 种类型。由此可见多基因分析增加了链霉菌种间的区分度。

2.2 *S. pratensis* 菌株间基因进化分析

将 21 株与 *S. pratensis* 16S rRNA 基因相似性在

99%以上的菌株各基因序列及多基因拼接序列构建系统进化树(图 1, 文章中只展示 NJ 树)。

从 21 株 *S. pratensis* 菌株基于 16S rRNA 基因构建的 NJ 进化树(图 1A)可以看出, 除菌株 YIM M12183 等以外, 大部分菌株的 16S rRNA 基因差异性极小, 基本上聚在一支, 很多一致性差异为

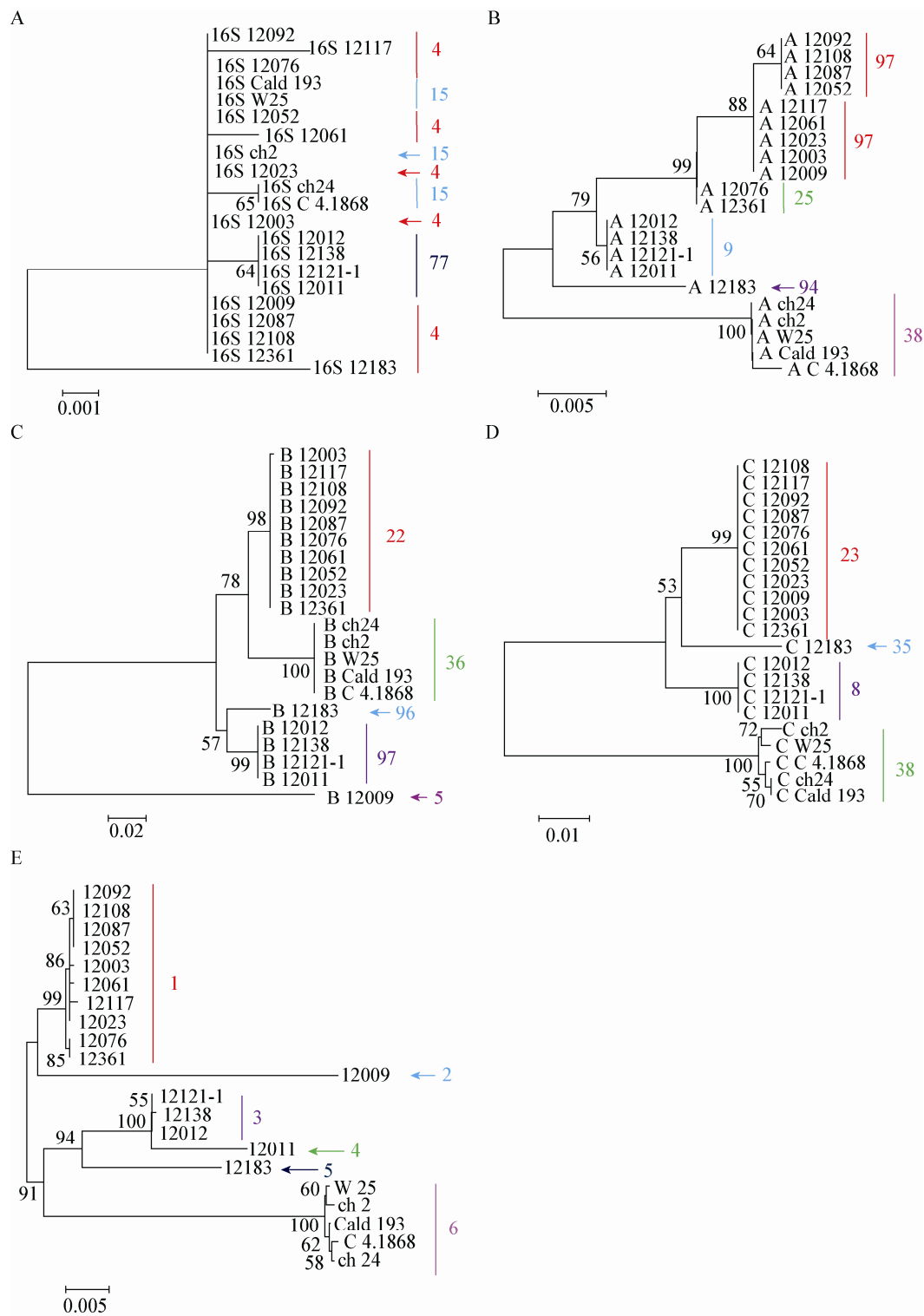


图 1 21 株 *S. pratensis* 菌株基于 16S rRNA、*atpD*、*recA*、*rpoB* 及多基因分析进化树(NJ)与基因类型比对图

Figure 1 The comparative representation of *S. pratensis* strains by phylogenetic trees (NJ) and gene types based on 16S rRNA, *atpD*, *recA*, *rpoB* genes and multiple gene cluster analysis

Note: A: 16S rRNA; B: *atpD*; C: *recA*; D: *rpoB*; E: Multiple gene cluster analysis.

0, ML、MP 和 NJ 树也有很大差异。NJ 树的自举值大多数在 50% 以下, 同一基因类型菌株不聚集在一起(NJ 树中彩色标出), 16S rRNA 构建的系统进化树不稳定。以 *atpD* 基因所构建的系统进化树(图 1B)可以看出, 在 NJ 树中所有菌株分类聚集, 其中 YIM M12183 单独聚为一支, 其余的菌株聚为 5 支, 将 21 株菌分为明显的 6 个类群, 相同基因型的菌株聚在一起(NJ 树中彩色标注), ML、MP 和 NJ 树还有一定差异, 但相对 16S rRNA 基因的系统进化树明显稳定。以 *recA* 基因所构建的系统进化树(图 1C)及 *rpoB* 基因所构建的系统进化树(图 1D)中也可以看出相同的聚类现象。结果能明显发现, 除 16S rRNA 基因以外的 3 个管家基因在此类群的区分上有明显的优势。多基因聚类分析后(图 1E), 原本很难区分的 21 株链霉菌分出明显的 6 支, YIM M12009 单独一支、YIM M12183 单独一支、YIM M12011 单独一支、从 NCBI 中下载的 5 株菌一支, YIM M12121-1、12138、12012、12011 聚在一支, 其余在一支, 并且与 4 个基因的基因类型相符合。与此同时, 多基因聚类分析所构建的系统进化树每一支的自举值都高于 50%, MP 及 ML 树与 NJ 树相符合, 最终将 21 株 16S rRNA 基因高度相似的菌株分为了 6 个类群, 这也表明了多位点序列分析所构建的系统进化树更加稳定、可靠, 同时更好地区分本次所分离得到的 16S rRNA 基因高度相似的链霉菌 *S. pratensis* 类群。

2.3 3 个种菌株间基因进化分析

选取菌种分离时得到的 16S rRNA 相似性在 99% 以上的 3 个种共 32 株的链霉菌进行各基因的系统进化树构建, 分别是 16S rRNA 相似性与 *S. albidoflavus* 达到 99% 以上的 7 株菌, 与 *S. cavourensis* 相似性达到 99% 以上的 11 株菌, 与 *S. pratensis* 相似性达到 99% 以上的 14 株菌, 构建系统进化树(图 2, 文中只展示 NJ 树)。

在 16S rRNA 基因构建的系统进化树中(图 2A)可以明显看出, 3 个种聚集成 3 个类群, 区分度很低, 系统进化树也不稳定, 构建 MP 和 ML 树比对, 3 种

树形差异较大。在 *atpD*、*recA*、*rpoB* 基因构建的系统进化树上, 各菌株之间的进化关系表现得更细, 进化树的自举值也显著提高, 进化关系相比 16S rRNA 基因更稳定。多基因聚类分析后(图 2E), 所选的 3 个类群菌株, *S. pratensis* 菌株聚为 4 类; *S. cavourensis* 聚为 3 类; *S. albidoflavus* 类群除了在 *atpD* 基因构建的系统进化树中稍有区分外, 其余的系统进化树中没有明显区分, 也证实所选的 7 株 *S. albidoflavus* 菌株为同一株菌, ML、MP、NJ 树相比较更加稳定, 自举值大多数大于 50%。多种菌株间的多基因聚类分析除系统进化更稳定, 菌株之间的分辨率更高以外, 还可以发现部分菌株的基因差异较大, 如 YIM M12009 的 *recA* 基因。同时还发现菌株 YIM M12299 和 *S. albidoflavus* 聚群, 这也反映了 *S. cavourensis* 类群和 *S. albidoflavus* 类群有着更近的进化关系, 这也体现出 *recA* 基因在进化分析上的价值。所以, 多位点序列分析法在链霉菌的比较分析中, 不仅增加了链霉菌种间及种内的区分度, 获得更多的链霉菌资源, 同时利用此方法也能更好地确定链霉菌的系统进化关系。

3 讨论

海洋微生物研究极为重要, 不仅在于元素循环、物质转化和能量流动的海洋学意义, 也在于它对人类的健康和生存环境的积极贡献^[15]。其次, 能够在减少 CO₂ 排放量、节能以及实现资源的可持续发展与利用方面发挥积极作用, 同时是物种演化的重要引擎。

在海洋环境中, 深海暗环境中的微生物起着极为重要的作用, 但由于分离难度大, 所以相对研究较少。本实验室通过对印度洋部分深海沉积物(3 000–6 000 m)样品的细菌分离得到了近 100 株链霉菌, 但大部分链霉菌经过 16S rRNA 比对属于同一个物种, 重复率较高。鉴于链霉菌研究及利用价值, 提高分辨率、更细地划分类群得到更多的链霉菌资源成为急需解决的问题。试验中选择前期分离到的 16S rRNA 基因难以分辨的 3 个类群近

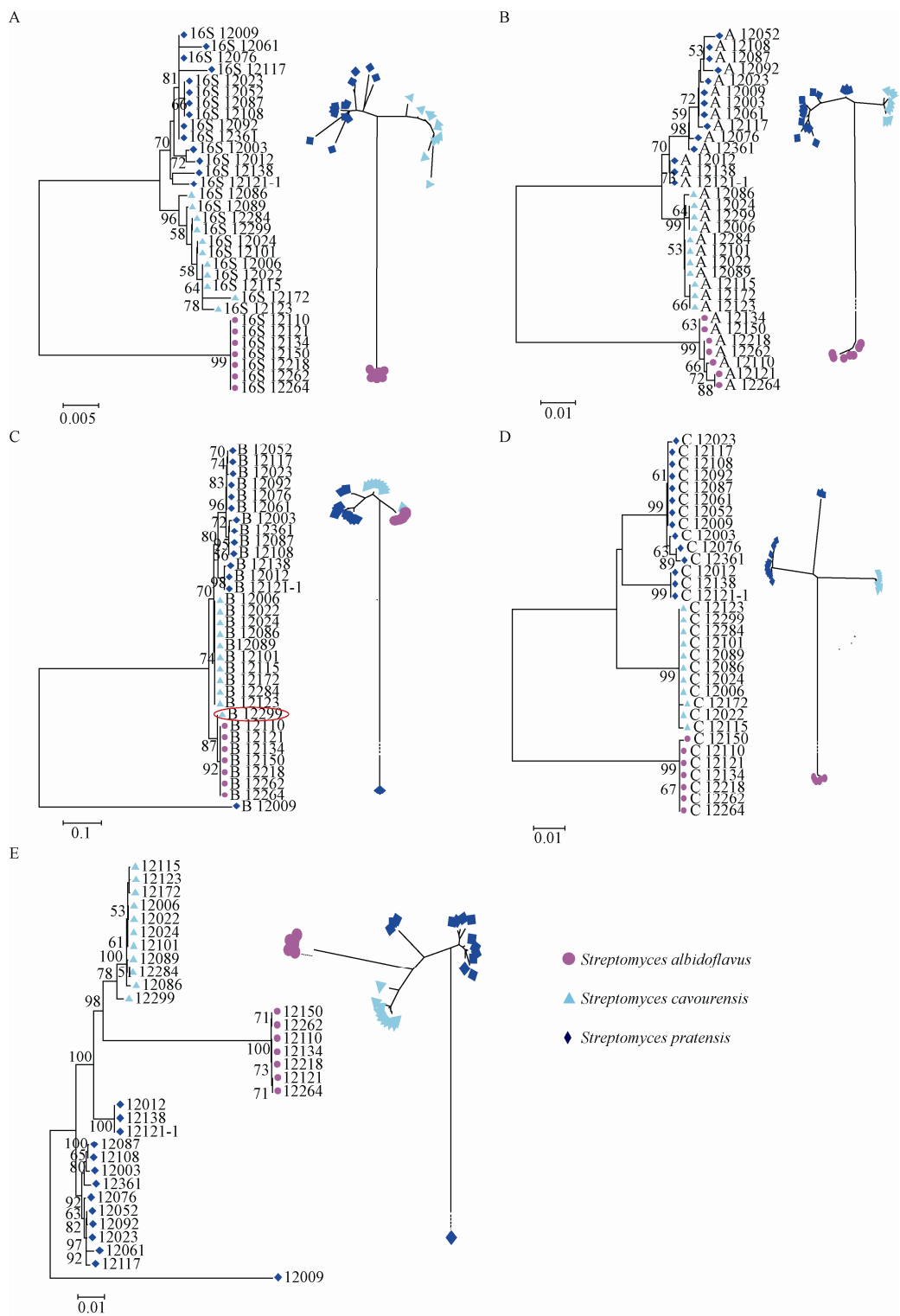


图 2 32 株 *S. pratensis*、*S. cavourensis*、*S. albidoflavus* 菌株基于 16S rRNA、*atpD*、*recA*、*rpoB* 及多基因分析分子进化树图(NJ)

Figure 2 The comparative representation of *S. pratensis*, *S. cavourensis*, *S. albidoflavus* strains by phylogenetic trees (NJ) based on 16S rRNA, *atpD*, *recA*, *rpoB* genes and multiple gene cluster analysis

Note: A: 16S rRNA; B: *atpD*; C: *recA*; D: *rpoB*; E: Multiple gene cluster analysis.

40 株链霉菌进行多位点序列分析,最终将这些菌株划分为更多的类群,为后续天然产物的分离等试验提供了保障,同时发现了 YIM M12009 这样某个基因变化较大的菌株以及 YIM M12299 的 *recA* 基因特殊进化关系,这也为各菌株进化和生态学分析提供了材料。同时这一分析也说明不同的管家基因对不同物种的分辨率有较大差异,所以选择多个管家基因同时进行分析更加科学和具有明显优势。另一方面,16S rRNA 基因分子鉴定作为微生物系统发生和生态学研究的黄金标准,在很多研究中报道,16S rRNA 基因内存在基因内异质性,这对原核微生物多样性的估计有偏差。有研究者对 2 013 个细菌和古菌的完整基因组进行研究,发现其中 952 个基因组(585 个物种)的 16S rRNA 基因存在基因内的异质性,尤其在极端环境来源的微生物中,16S rRNA 基因存在着更高的分歧^[16]。16S rRNA 基因只是细菌众多保守基因中的一个,存在种内变异性和基因组内操纵子间的异源性,因此单独使用该基因来反映菌株间的亲缘关系可能会出现偏差和误导^[17-18]。为减少这种偏差以及更准确地进行微生物系统发生和生态学研究,越来越多的分类学家尝试用其它看家基因作为分子分类的依据,来弥补或替代 16S rRNA 单个基因的基因多样性,因此综合多个看家基因的系统进化分析已经受到关注并逐渐兴起^[19-20]。

参 考 文 献

- [1] Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 349-355
- [2] Dang HY, Li TG, Zeng ZG, et al. Microbiological studies on subseafloor deep biosphere in deep sea extreme environments[J]. *Studia Marina Sinica*, 2006, 47: 41-60 (in Chinese)
党宏月, 李铁刚, 曾志刚, 等. 深海极端环境深部生物圈微生物学研究综述[J]. *海洋科学集刊*, 2006, 47: 41-60
- [3] Lipp JS, morono Y, Lnagaki F, et al. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments[J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 991-994
- [4] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(12): 6578-6583
- [5] Liu ZH. Modern Microbiology[M]. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
刘志恒. 现代微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [6] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147
- [7] Thompson CJ, Fink D, Nguyen LD. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence[J]. *Genome Biology*, 2002, 3: reviews 1020.1
- [8] Osawa R, Koga T. An investigation of aquatic bacteria capable of utilizing chitin as the sole source of nutrients[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 21(5): 288-291
- [9] Stackebrandt E, Goebel BM. 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 Bacteriology*, 1994, 44(4): 846-849
- [10] 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
- [11] Guo YP, Huang Y. Design and validation of primers for housekeeping genes of streptomycetes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6): 1080-1083 (in Chinese)
郭银平, 黄英. 链霉菌看家基因引物的设计与验证[J]. *微生物学报*, 2007, 47(6): 1080-1083
- [12] 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
- [13] 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
- [14] 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*, 2001, 28(10): 2731-2739
- [15] Bowler C, Karl DM, Colwell RR. Microbial oceanography in a sea of opportunity[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 180-184
- [16] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [17] Cilia V, Lafay B, Christen R. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, 13(3): 451-461
- [18] Anderson AS, Wellington EMH. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(3): 797-814
- [19] Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(3): 1043-1047
- [20] Devulder G, de Mont clos MP, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 293-302