

南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析

孙风芹[#], 汪保江[#], 李光玉, 刘秀片, 杜雅萍, 赖其良, 邵宗泽^{*}

(国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传重点实验室, 厦门 361005)

摘要:【目的】为了从南沙海域中分离获得微生物菌种资源,【方法】本文通过沉积物采样、可培养菌分离及 16S rRNA 鉴定,【结果】从 22 个站点的沉积物样品中获得 349 株细菌,分属于 87 个种。发现产芽孢细菌分布最广,并在 10 个站点的分离株中占多数;它们是 *Bacillus*, *Halobacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Pontibacillus* 和 *Thalassobacillus*。其中芽孢杆菌 (*Bacillus*) 无论在数量上还是种类上都最多,分别属于 34 种,其中有 8 个可能的新种。此外, γ -Proteobacteria 是分离率较高的另一亚群;其中,假单胞菌 (*Pseudomonas*),海杆菌 (*Marinobacter*),食烷菌 (*Alcanivorax*) 属的细菌最多。统计还发现,在深度 750~2000 m 之间,低 GC 含量的细菌最丰富,而深度 2000 m 以下,分离株则全部为 γ -Proteobacteria。【结论】南沙沉积物可培养微生物中产芽孢细菌及 γ -Proteobacteria 比较丰富;其中,产芽孢细菌的多样性最高,具有进一步研究开发价值。

关键词: 南海南沙; 海洋细菌; 生物资源; 生物多样性; 产芽孢菌; 芽孢杆菌

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 12-1578-10

近年来,通过直接测序发现海洋环境中大量的以前从未发现的海洋微生物,然而它们在环境中的作用却鲜为人知^[1]。即便在当今的“基因组学”时代,菌株的分离培养仍然是海洋微生物研究的重要内容^[2],这对研究和利用这些微生物是非常必要的。

南沙群岛是在我国南海诸岛中位置最南、岛屿最多,其广阔的水域是我国唯一接近赤道的热带海区,是世界上公认的海洋资源最丰富的地区之一。在微生物资源调查方面,前人通过培养和文库构建等方法对有关站点进行了微生物多样性的分析。戴欣等发现在两个站点中可培养的好氧异氧细菌主要是芽孢杆菌;但通过 16S rRNA 文库构建发现,在测序的 12 个克隆子中,主要是未培养的变形细菌 (Proteobacteria),分类地位不明确^[3]。在同一课题组的另外一篇报道中,发现在南沙海区沉积物细菌 16S rRNA 文库的 70 个克隆子中有 5 个为芽孢杆菌^[4]。

相对于南沙的广阔水域和多变的生境,这些研究结果还不能完全反映南沙海域中的微生物资源多样性。因此需要扩大范围、进一步的调查摸底。2007 年 5~6 月,中国科学院“实验三号”调查船对这一海域进行了大面积采样。通过原位样品涂布培养、富集筛选以及菌群的分子生态分析,发现并分离获得了大量的菌种资源。本文是对 22 个站点共 37 个沉积物样品的稀释平板分离结果的初步总结。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 沉积物采样 样品为 2007 年 5-6 月“实验三号”综合航次所采,位于南沙美济礁及附近海域。包括 22 个站点 37 个样品,水深从 12 m 到 2589 m (表 1)。采样设备为箱式沉积物采样器,每个站点的沉积物样品取样 1~2 个,一般为表层约 5 cm,或加采一个表

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAB19B02); 国家自然科技资源平台项目(2005DKA21209); 国家自然科学基金(30670051)

^{*}通讯作者。Tel: +86-592-2195321. Fax: +86-592-2085376. E-mail: shaozz@163.com

作者简介: [#]并列第一作者。孙风芹 (1962-), 女, 山东人, 主要从事海洋微生物资源工作, E-mail: fq.sun@163.com;

汪保江 (1978-), 男, 湖北人, 主要从事海洋微生物鉴定工作, E-mail: wangcell@163.com

收稿日期: 2008-07-25; 修回日期: 2008-09-23

表 1 用于细菌分离的南沙沉积物采样站点及样品描述
Table 1 Marine sediment samples of 22 sampling sites from Nansha area

| No. | Sampling sites | Sample No. | Depth/m | Sample descriptions |
|-----|------------------|--------------|---------|--|
| 1 | NS2007_X | NH1, 55 | 12 | Coral sands in a lagoon |
| 2 | NS2007_Q02 | NH36, 44 | 36 | Grey granules with shell debris |
| 3 | NS2007_35 | NH3, 12 | 100 | Brown granules with shell debris |
| 4 | NS2007_34 | NH29 | 105 | Brown grayish granules with shell debris |
| 5 | NS2007_36 | NH31, 35 | 121 | Brown granules with shell debris |
| 6 | NS2007_37 | NH9, 38 | 145 | Dark brown granules |
| 7 | NS2007_31 | NH52 | 157 | Dark brown granules |
| 8 | NS2007_29 | NH15, 50 | 181 | Grey mud |
| 9 | NS2007_33 | NH23, 45 | 188 | Brown granules with shell debris |
| 10 | NS2007_Q8 | NH7, 8 | 756 | Grey to white mud, fine |
| 11 | NS2007_46 | NH24, 39, 41 | 1081 | Yellow to grey fine mud |
| 12 | NS2007_mj03(202) | NH13 | 1100 | Yellow mud containing sand |
| 13 | NS2007_Q7 | NH21, 53 | 1184 | Grey mud, fine |
| 14 | NS2007_mj02(201) | NH2 | 1280 | Yellow mud containing coarse sand |
| 15 | NS2007_204 | NH19 | 1467 | Yellowish mud |
| 16 | NS2007_301 | NH18, 47 | 1550 | / |
| 17 | NS2007_47 | NH5 | 1609 | Grayish mud |
| 18 | NS2007_302 | NH4, 11, 56 | 1738 | Yellowish mud |
| 19 | NS2007_41 | NH16 | 1865 | Brown mud |
| 20 | NS2007_19 | NH28 | 2150 | Yellow mud |
| 21 | NS2007_8 | NH6, 26 | 2152 | Dark grey fine mud |
| 22 | NS2007_22 | NH33 | 2589 | Dark grey fine mud |

层下约 20 cm。同一站点样品,若颜色外观有较明显差别则分别采样。沉积物样品无菌采集后于 4 °C 保存,2007 年 7 月开始实验室菌株分离。具体样品编号和水深见表 1。

1.1.2 M2 平板固体培养基: 1000 mL 天然海水中: 醋酸钠 5 g, 胰蛋白胨 0.5 g, 酵母提取物 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 蔗糖 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 柠檬酸三钠 0.05 g, 苹果酸 0.05 g, 酒石酸钾钠 0.05 g, 硝酸铵 1 g, 氯化铵 0.2 g, 琼脂 1.5%, pH 7.6。培养基组成由本实验室设计,以醋酸盐为主要碳源,并添加少量其他有机酸和糖作补充碳源。

1.1.3 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司;引物由上海 Sangon 公司和成;PCR 产物纯化试剂盒购自上海赛百盛基因技术有限公司;PCR 仪为 ALD-1244 型,购自 BIO-RAD 公司;凝胶成像分析仪 Alpha-22 及成像软件 AlphaEase 4.1.0 购自 Alpha Innotech 公司;恒温振荡摇床和恒温培养箱购自上海分析仪器制造有限公司。

1.2 菌株的分离培养

取 0.5 g 沉积物样品,用 5 mL 无菌海水悬浮,取上清用无菌海水稀释至 $10^3 \sim 10^6$ 倍。取 100 μ L 涂布到固体 M2 平板。放于 25 °C 培养箱中培养 10~14 d。挑取不同形态菌落,划线分离、纯化。

1.3 细菌 DNA 提取及系统进化分析

单菌的 DNA 提取方法参照文献^[5],16S rRNA 扩

增参照文献^[6],PCR 产物纯化采用 Tiangen 普通 DNA 产物纯化试剂盒(DP204-03),测序由 ABI3730 测序仪完成。

测序引物为:5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCA GC-3';测序长度为 700 bp 左右。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析。

1.4 菌株保藏

所有菌株保藏于中国海洋微生物菌种保藏中心(<http://www.mccc.org.cn>)。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离、鉴定

经过 M2 培养基平板培养,从 22 个站点中的 37 个底泥样品,分离得到 349 株细菌,并获得 600~800 bp 的 16S rRNA 序列信息。将分离自不同站点但序列相同的暂视为一株,序列分析及站点分布见表 2。不同站点的微生物组成差异较大。有的站点的分离株中全部是产芽孢细菌(如 NH2、5、18、19、24 与 47),有的站点中芽孢菌占绝大多数(如 NH7、8、11、39 与 53),而有的站点则没有分离得到,如 NH44 的 26 个分离株(8 个属 18 种不同序列)中没有一个是产芽孢菌。在所有分离菌株中,占比例最高的是芽孢杆菌(*Bacillus*)属的细菌,种类多样、后有详述。下面是其他属按分离率高低的描述。

表2 南沙沉积物细菌的分离鉴定
Table 2 Bacterial isolation and identification from sediments of Nansha areas

| Isolates No.# | Closely related bacteria from NCBI | Homology (bp/bp, %) | Sample No. |
|---------------|---|---------------------|---|
| NH55I | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (D88005) | 784/807 (97.2) | NH55 |
| NH53R1 | <i>Agrococcus jenensis</i> (AM410679) | 764/777 (98) | NH53 |
| NH38N | <i>Alcanivorax borkumensis</i> (Y12579) | 803/816 (98) | NH28, 38 |
| NH38G1 | <i>Alcanivorax venustensis</i> (AF328762) | 784/784 (100) | NH9, 56, 38 |
| NH15F | <i>Alcanivorax venustensis</i> (AF328762) | 778/786 (98) | NH15, 23, 28, 45 |
| NH55O | <i>Algoriphagus winogradskyi</i> (AJ575263) | 600/608 (98) | NH55 |
| NH44O | <i>Arenibacter echinorum</i> (EF536748) | 710/735 (96) | NH36, 44 |
| NH44N | <i>Arenibacter echinorum</i> (EF536748) | 756/774 (97) | NH44 |
| NH38L | <i>Aurantimonas coralicida</i> (AY065627) | 720/720 (100) | NH38 |
| NH19B | <i>Bacillus acidicola</i> (AF547209) | 772/786 (98) | NH19 |
| NH53A1 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (X60605) | 781/796 (98.1) | NH8, 3, 53 |
| NH21U | <i>Bacillus asahii</i> (AB109209) | 773/788 (98) | NH8, 21 |
| NH21H | <i>Bacillus badius</i> (X77790) | 761/784 (97.1) | NH21 |
| NH53Q1 | <i>Bacillus barbaricus</i> (AJ422145) | 792/795 (99) | NH8, 39, 53 |
| NH8J1 | <i>Bacillus circulans</i> (AY724690) | 727/738 (98) | NH8 |
| NH53P2 | <i>Bacillus circulans</i> (AY724690) | 791/799 (98) | NH53 |
| NH11D | <i>Bacillus decolorationis</i> (AJ315075) | 775/783 (98) | NH24, 11 |
| NH39C | <i>Bacillus endophyticus</i> (AF295302) | 731/732 (99) | NH39 |
| NH7L1 | <i>Bacillus firmus</i> (D16268) | 723/737 (98) | NH7 |
| NH21G | <i>Bacillus firmus</i> (D16268) | 783/797 (98.2) | NH21 |
| NH8K | <i>Bacillus firmus</i> (D16268) | 795/797 (99) | NH8K, 24, 55 |
| NH11I | <i>Bacillus foraminis</i> (AJ717382) | 726/737 (98) | NH11 |
| NH11J-B79 | <i>Bacillus foraminis</i> (AJ717382) | 766/784 (97) | NH11, |
| NH2B | <i>Bacillus fusiformis</i> (L14013) | 743/778 (95.5) | NH7, 21, 53, 2 |
| NH3D1-1 | <i>Bacillus halodenitrificans</i> (AY543169) | 796/796 (100) | NH3, |
| NH13F | <i>Bacillus hwajinpoensis</i> (AF541966) | 774/783 (98) | NH13 |
| NH21L1 | <i>Bacillus indicus</i> (AJ583158) | 784/785 (99) | NH21 |
| NH19F | <i>Bacillus koguryoae</i> (AY904033) | 784/784 (100) | NH8, 19F, 53 |
| NH39Q | <i>Bacillus licheniformis</i> (CP000002) | 746/747(99) | NH8, 39 |
| NH21M1 | <i>Bacillus litoralis</i> (AY608605) | 659/670 (98) | NH21 |
| NH21Z | <i>Bacillus litoralis</i> (AY608605) | 782/784 (99) | NH21 |
| NH16L | <i>Bacillus longisporus</i> (AJ223991) | 759/786 (96), | NH16 |
| NH24A1 | <i>Bacillus longisporus</i> (AJ223991) | 545/561 (97.2) | NH24 |
| NH7B | <i>Bacillus macauensis</i> (AY373018) | 731/737 (99) | NH7 |
| NH5B | <i>Bacillus macauensis</i> (AY373018) | 778/783 (99) | NH21, 8, 5 |
| NH16C | <i>Bacillus marinus</i> (AJ237708) | 784/784 (100) | NH53, 2, 15, 16, 5, 7, 8, 21, 47, 39, 24, 23, 19, 13, 23 |
| NH16N | <i>Bacillus marinus</i> (AJ237708) | 782/785 (99) | NH7, 8, 16, 47 |
| NH11C-B86 | <i>Bacillus marisflavi</i> (AF483624) | 798/798 (100) | NH11, 55, 21 |
| NH8N1-2 | <i>Bacillus megaterium</i> (D16273) | 776/778 (99.7) | NH5, 8, 3 |
| NH19C | <i>Bacillus methanolicus</i> (AB112729) | 767/786 (97) | NH19 |
| NH53H | <i>Bacillus niabensis</i> (AY998119) | 801/809 (99) | NH53 |
| NH19E | <i>Bacillus novalis</i> (AJ542512) | 781/784 (99) | NH5, 21, 19 |
| NH53L | <i>Bacillus psychrodurans</i> (AJ277984) | 784/798 (98.2) | NH36, 53 |
| NH18E1-619 | <i>Bacillus pumilus</i> (AY456263) | 770/776 (99.2) | NH18 |
| NH53M1 | <i>Bacillus selenatarsenatis</i> (AB262082) | 790/797 (99) | NH8, 24, 47, 55, 53 |
| NH21X | <i>Bacillus simplex</i> (AB363738) | 784/784 (100) | NH21 |
| NH5F | <i>Bacillus sphaericus</i> (L14010) | 741/778 (95.2) | NH5 |
| NH21F1 | <i>Bacillus sphaericus</i> (L14010) | 773/797 (97) | NH21, 53, 21 |
| NH53O1 | <i>Bacillus thuringiensis</i> (AB426479) | 783/783 (100) | NH8, 24, 53 |
| NH23B | <i>Bizionia paragorgiae</i> (AY651070) | 723/723 (100) | NH23 |
| NH2C | <i>Brevibacillus choshinensis</i> (AB112713) | 780/782(99.7) | NH2 |
| NH18A | <i>Cobetia marina</i> (AJ306890) | 781/783 (99.7) | NH1, 28, 41, 50, 18 |
| NH35F | <i>Cyclobacterium marinum</i> (AY533665) | 735/736 (99) | NH35 |
| NH1I | <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> (DQ019166) | 794/797 (99) | NH1 |
| NH7T | <i>Halobacillus blutaparonensis</i> (DQ058358) | 734/736 (99) | NH7, 8, 39 |
| NH16K | <i>Halobacillus puertoriconensis</i> (DQ888316) | 779/783 (99) | NH16 |

续表 2

| Isolates No.# | Closely related bacteria from NCBI | Homology (bp/bp, %) | Sample No. |
|---------------|--|---------------------|---|
| NH19D | <i>Halobacillus yeomjeoni</i> (AY881246) | 783/783 (100) | NH8, 19, 24, 5 |
| NH1C | <i>Halomonas aquamarina</i> (AJ306888) | 767/770 (99.6) | NH1, 15, 28, 29, 33, 35, 45, 50, 56, 3, 38, 9, 26, 31, 38 |
| NH38E | <i>Halomonas aquamarina</i> (AJ306888) | 731/738 (99) | NH38 |
| NH44M | <i>Halomonas boliviensis</i> (AY245449) | 744/746 (99) | NH44 |
| NH45C | <i>Halomonas sulfidaeris</i> (AF212204) | 745/746 (99) | NH9, 38, 45 |
| NH1E | <i>Idiomarina loihiensis</i> (AF288370) | 791/796 (99) | NH1, 44 |
| NH12D | <i>Idiomarina salinarum</i> (EF486355) | 720/739 (97) | NH12, 15, 50 |
| NH33K | <i>Idiomarina salinarum</i> (EF486355) | 796/816 (97) | NH33, 55 |
| NH55T | <i>Idiomarina seosinensis</i> (AY635468) | 722/733 (98) | NH55 |
| NH38B1 | <i>Joostella marina</i> (EF660761) | 772/772 (100) | NH38 |
| NH3A | <i>Marinobacter alkaliphilus</i> (AB125942) | 782/783 (99) | NH3 |
| NH6E-3 | <i>Marinobacter alkaliphilus</i> (AB125942) | 779/785 (99) | NH6, 3, 9, 31, 38 |
| NH55C | <i>Marinobacter bryozoanae</i> (AJ609271) | 800/815 (98) | NH55 |
| NH11H1 | <i>Marinobacter flavimaris</i> (AY517632) | 794/795 (99) | NH11 |
| NH36C | <i>Marinobacter flavimaris</i> (AY517632) | 731/746(98) | NH36 |
| NH28A | <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (Y16735) | 733/734 (99) | NH28 |
| NH4A | <i>Marinobacter lipolyticus</i> (AY147906) | 793/796 (99) | NH4 |
| NH44D | <i>Marinobacter marinus</i> (AF479689) | 744/746 (99) | NH44 |
| NH44E | <i>Marinobacter maritimus</i> (AJ704395) | 742/746 (99) | NH44 |
| NH39E | <i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198) | 726/728(99.7) | NH8, 16, 39 |
| NH39O | <i>Paenibacillus lautus</i> (AB073188) | 744/745 (99.9) | NH39 |
| NH8T | <i>Paenibacillus polymyxa</i> (D16276) | 756/778 (97.2) | NH8 |
| NH44C | <i>Phaeobacter inhibens</i> (AY177712) | 697/724 (96) | NH44 |
| NH52F | <i>Phaeobacter inhibens</i> (AY177712) | 759/788 (96) | NH52 |
| NH11E-B76 | <i>Pontibacillus marinus</i> (AY603977) | 770/795 (96) | NH11 |
| NH1F | <i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> (DQ011289) | 774/783 (98) | NH1 |
| NH6B | <i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i> (DQ011289) | 769/783 (98) | NH6 |
| NH36D-2 | <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> (AF082562) | 778/781 (99) | NH1, 23, 44, 3, 12 |
| NH23Q-2 | <i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419) | 708/734(96) | NH23 |
| NH45I1 | <i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419) | 749/777(96.4) | NH35, 45 |
| NH44J | <i>Pseudomonas denitrificans</i> (AB021419) | 725/746(97.2) | NH44 |
| NH23C | <i>Pseudomonas pachastrellae</i> (AB125366) | 728/735 (99) | NH23 |
| NH33B | <i>Pseudomonas pertucinogena</i> (AB021380) | 726/750 (96) | NH33 |
| NH45A | <i>Pseudomonas pertucinogena</i> (AB021380) | 778/814(95.6) | NH35, 45 |
| NH38F1A | <i>Pseudomonas stutzeri</i> (AF094748) | 777/782 (99) | NH12, 35, 38 |
| NH3D | <i>Pseudomonas stutzeri</i> (AF094748) | 773/783 (98.7) | NH12, 3, 53 |
| NH1A | <i>Psychrobacter celer</i> (AY842259) | 782/783 (99) | NH1 |
| NH36G2 | <i>Rheinheimera aquimaris</i> (EF076757) | 743/747 (99) | NH36, 44 |
| NH55K | <i>Rheinheimera aquimaris</i> (EF076757) | 813/813 (100) | NH55 |
| NH7V | <i>Rhodococcus ruber</i> (X80625) | 714/714 (100) | NH7 |
| NH52E | <i>Roseovarius aestuarii</i> (EU156066) | 759/796 (95) | NH52 |
| NH38D1 | <i>Salegentibacter mishustinae</i> (AY576653) | 776/776 (100) | NH35, 38 |
| NH9B | <i>Salegentibacter salinus</i> (EF486353) | 789/789 (100) | NH9 |
| NH13C | <i>Salinispora arenicola</i> (AY040619) | 755/756 (99), | NH13 |
| NH35C | <i>Shewanella kaireitica</i> (AB094598) | 742/748 (99) | NH35 |
| NH38C | <i>Shewanella woodyi</i> (AF003549) | 740/747 (99) | NH38 |
| NH36E | <i>Sulfitobacter delicatus</i> (AY180103) | 713/720 (99) | NH36 |
| NH21I1 | <i>Sulfitobacter pontiacus</i> (Y13155) | 767/769 (99) | NH21 |
| NH7A1 | <i>Thalassobacillus devorans</i> (AJ717299) | 731/736 (99) | NH7 |
| NH35E | <i>Vibrio calviensis</i> (AF118021) | 788/799 (98) | NH35 |
| NH12E | <i>Vibrio cyclitrophicus</i> (AM162656) | 731/734 (99) | NH12 |
| NH6HJ | <i>Vibrio natriegens</i> (X74714) | 781/783 (99) | NH6 |
| NH45G | <i>Vibrio splendidus</i> (AJ515229) | 781/783 (99) | NH15, 23, 38, 45 |
| NH29B | <i>Vibrio splendidus</i> (AJ515229) | 778/784 (99) | NH29 |

Isolates No. consist of No. of sample and running number of A-Z. NH is the abbreviation of the South China Sea.

盐单胞菌 (*Halomonas*) 是除 *Bacillus* 之外的分离率最高的细菌。盐单胞菌(包括 *Cobetia* 属)通过形态筛选并测序, 获得 30 株不同来源的单菌。它们来自 19 个样品, 分别属于 5 个种(表 2); 其中, 与海水盐单胞菌 (*Halomonas aquamarina*) 16S rRNA 序列同源性在 99% 的占多数, 共 21 株, 分离自 15 个样品。

假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属的细菌在本调查中也是常见分离株。经形态筛选并测序, 获得 14 株来自 9 个样品的单菌, 共有 8 种不同序列(表 2)。其中, 与报道菌 16S rRNA 序列同源性在 97% 以下(含 97%) 的有 7 株; 97% 以上的也有 7 株, 其中 6 株与施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 同源性在 99%~100% 之间, 是出现频率最高的一类假单胞菌(表 2)。

海杆菌 (*Marinobacter*) 菌株的出现频率及多样性也比较高。从 11 个样品中, 经平板形态筛选并测序分析, 共获得属于 9 个种的 13 株。其中, *Marinobacter alkaliphilus* (~99%) 分布较为广泛, 在 4 个站点中都有发现。

食烷菌 (*Alcanivorax*) 属的细菌是海洋专性的烷烃降解菌, 易出现在石油污染的海洋环境。一般认为在干净的环境中, 这类专性降解菌的丰度是常规手段检测不到的^[7]。但是在南沙沉积物中也常分离到; 经形态筛选并测序得到 10 个不同的菌株, 它们来自 7 个样品, 分别属于 3 个不同的种(目前该属共有 6 个种)。其中, 与 *Alcanivorax venustensis* 相似的占多数, 16S rRNA 同源性在 98%~100% 之间, 共 7 株, 分离自 5 个不同的站点。它们的存在表明南沙海域沉积物中有浓度较高烃类存在。

除了以上出现频率较高的菌以外, 还分离得到了其他 20 个属的细菌: *Pseudoalteromonas* (测序 7 株, 分离自 7 个样品, 有 2 个种 3 种不同序列) *Shewanella* (2 株, 2 个站点, 2 种序列), *Vibrio* (8 株, 8 个站点, 有 4 个种, 5 种序列), *Rheinheimera* (3 株, 3 个站点, 2 种序列), *Idiomarina* (8 株, 7 个站点, 4 种序列), *Achromobacter* (1 株), *Salegentibacter* (3 株, 3 个站点, 3 种序列), *Bizionia* (1 株), *Joostella* (1 株), *Arenibacter* (3 株 2 个站点 2 种序列), *Cyclobacterium* (1 株), *Algoriphagus* (1 株), *Sulfitobacter* (2 株, 2 个站点, 2 种序列), *Roseovarius* (1 株), *Phaeobacter* (2 株, 2 个站点, 2 种序列), *Aurantimonas* (1 株), *Rhodococcus* (1 株), *Salinispora* (1 株), *Micrococcus* (3 株, 3 个站点, 序列相同) 和 *Agrococcus* (1 株)。

虽然每个属内的菌株数量不多, 但是反映了该海域微生物资源的多样性。其中, 多数属于近年来鉴定的新种, 也有多株菌的 16S rRNA 序列与已报道模式菌相似性较低, 同源性在 95%~97% 之间, 可能是新种。这些菌的种属分布及同源性分析见表 2。

2.2 可培养菌的系统进化分析

通过 16S rRNA 系统进化分析发现, 所有可培养菌聚类于 6 个大的类群(图 1)。110 个不同序列中 Proteobacteria 和产芽孢菌占据了细菌多样性的主要地位, 达到了 44.5% (49/110) 和 43.6% (48/110), 产芽孢菌的多样性下面有专门的分析。对于非产芽孢菌: 变形菌类, 其中 42 个序列为 γ -Proteobacteria (占 38.2%); 6 个 α -Proteobacteria (占 5.5%), 1 个 β -Proteobacteria 占 (0.9%); 其次是 Bacteroidetes, 有 8 类序列, 占到总数的 7.3% (8/110); 再次是 Actinobacteria, 有 3.7% (4/110)。分析发现, 许多可能的新种(16S rRNA 序列相似性 < 97%) 分散于进化树的多个不同分枝, 反映了南海菌种资源的丰富性和新颖性。

γ -Proteobacteria 亚群在细菌属水平上的多样性最为丰富, 含有 11 个不同的属, 其中以 *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Marinobacter* 和 *Alcanivorax* 为主。也发现多个可能新种, 其中 NH12D 和 NH33K 菌株与最近的模式菌 *Idiomarina salinarum* (EF486355) 16S rRNA 相似性只有 97.4% 和 97.5%。菌株 NH23Q-2, NH451I, NH44J 与最近的模式菌 *Pseudomonas denitrificans* (AB021419) 16S rRNA 相似性只有 96%, 96.4% 和 97.2%。NH45A 和 NH33B 与模式菌 *Pseudomonas pertucinogena* (AB021380) 16S rRNA 相似性只有 95.6% 和 96%。

β -Proteobacteria 只含有 1 个分离株, 与最近的模式菌 *Achromobacter xylosoxidans* (D88005) 的 16S rRNA 相似性只有 97.2%。

Bacteroidetes (CFB) 类群虽然只有 8 个不同的菌株被分离到, 但是属于 6 个不同的属。其中, NH44O, NH44N 与模式菌株 *Arenibacter echinorum* (EF536748) 16S rRNA 序列同源性分别只有 96.6% 和 97.6%。

α -Proteobacteria 亚群菌株也不多, 有 6 个不同序列的菌株组成, 但分属于 4 个不同的属。其中包含两个可能的新种: 菌株 NH52E 和 NH44C, 它们分别与模式菌株 *Roseovarius aestuarii* (EU156066) 和 *Phaeobacter inhibens* (AY177712) 的 16S rRNA 序列相似性只有 95.4% 和 96.3%。

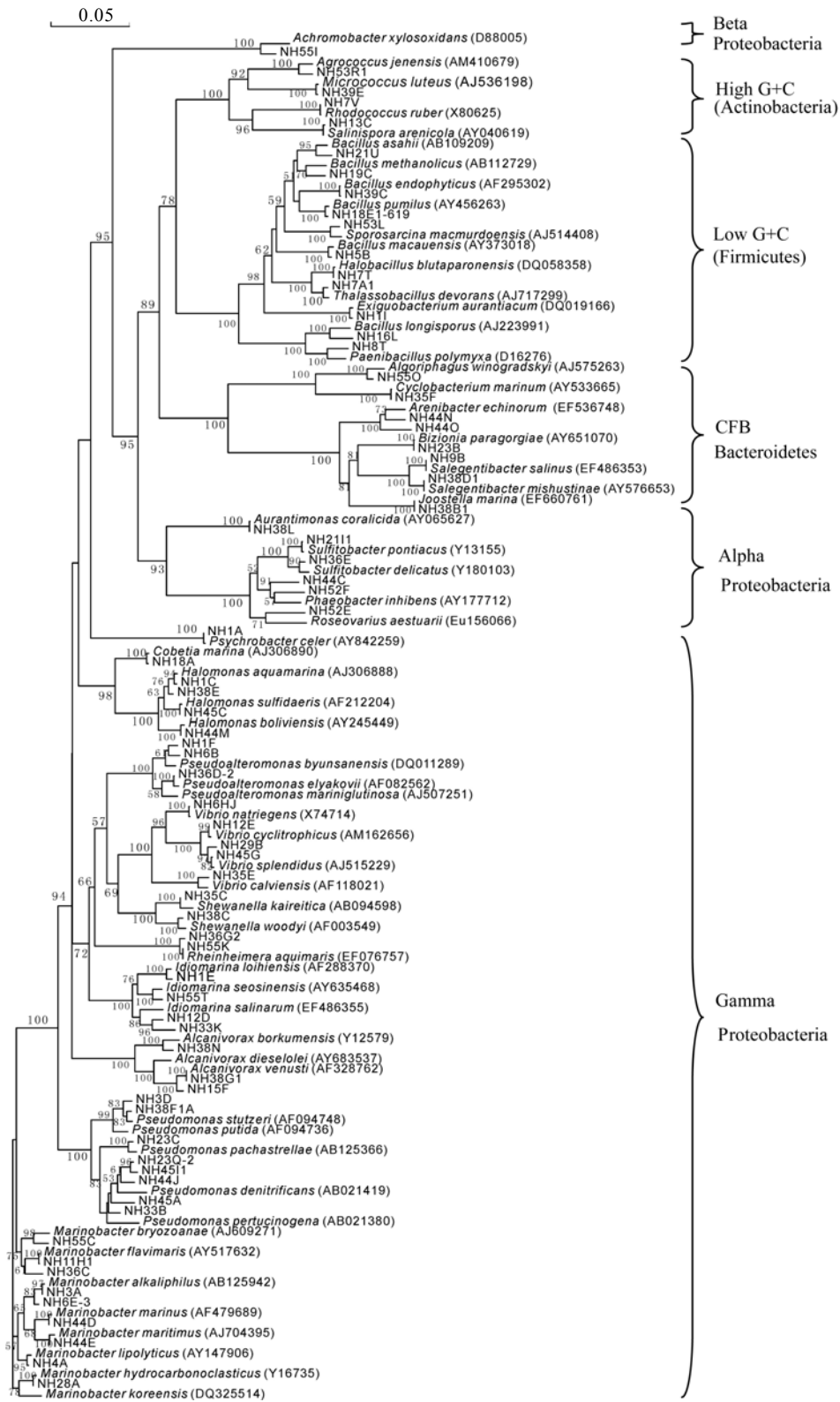


图 1 南沙沉积物可培养细菌的 16S rRNA 的系统进化分析

Fig. 1 Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences of Nansha isolates and other related species. Bootstrap values above 50% are shown (1000 resamplings) at the branching points. Numbers in parentheses represent accession numbers of the sequences in GenBank. The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position.

2.3 产芽孢细菌的多样性分析

从不同站点中共分离并测序得到 102 株产芽孢细菌,属于 6 个属 41 种(同源性在 98%以下暂作新种统计),其进化关系见图 2(图 1 中所示为部分代表菌)。在这个 Firmicutes (Low G+C) 类群含有 7 个不同的属,其中 *Bacillus* 属最多,共有 89 株、40 个不同序列,属于 33 个种(表 2)。其中,分布最广的是 *Bacillus marinus*,在 19 个样品中都有分离得到。*Bacillus* 属的细菌是所有分离菌种单个属中种水平上多样性最丰富的。此外,*Halobacillus* 属的细菌出现频率也较高;其他产芽孢细菌,包括 *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Pontibacillus* 和 *Thalassobacillus* 也有分离得到。

此外,还有 7 个是可能的新种。它们是菌株 NH8T,与模式菌 *Paenibacillus polymyxa* (D16276) 的 16S rRNA 序列相似性为 97.2%;菌株 NH16L,与模式菌 *Bacillus longisporus* (AJ223991) 的 16S rRNA 序列相似性为 96.6%;菌株 NH2B,与模式菌 *Bacillus*

fusiformis (L14013) 的 16S rRNA 序列相似性为 95.5%;菌株 NH5F,与模式菌 *Bacillus sphaericus* (L14010) 的 16S rRNA 序列相似性为 95.2%;菌株 NH21H,与模式菌 *Bacillus badius* (X77790) 的 16S rRNA 序列相似性为 97.1%;菌株 NH11EB76,与模式菌 *Pontibacillus marinus* (AY603977) 的 16S rRNA 序列相似性为 96.8%;菌株 NH19C,与模式菌 *Bacillus methanolicus* (AB112729) 16S rRNA 序列相似性 97.6%。

在 22 个站点中,有 10 个站点分离株半数以上为芽孢杆菌。以站点 NS2007_Q8 的表层样品 NH8 为例,该样品共分离并测序 28 株,序列不同的有 18 株,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)占多数(14 个),多样性非常丰富,共有 14 个不同的种(表 3)。另外 4 株菌,除一株为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*),其它 3 株也都是产芽孢细菌,分别是 *Paenibacillus polymyxa* (97.2%), *Halobacillus yeomjeoni* (100%), *Halobacillus blutaparonensis* (99%)。

表 3 表层沉积物样品(NH8)中的细菌分离菌株
Table 3 Isolates from surface sediment (NH8) of sampling site NS2007_Q8

| Isolates No. | Closely related bacteria from NCBI | Homolgy(bp/bp, %) |
|--------------|--|-------------------|
| NH8A1 | <i>Bacillus marinus</i> (AJ237708) | 784/784 (100) |
| NH8L1 | <i>Bacillus marinus</i> (AJ237708) | 782/785 (99) |
| NH8B1 | <i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198) | 726/728(99.7) |
| NH8T | <i>Paenibacillus polymyxa</i> (D16276) | 756/778 (97.2) |
| NH8C1 | <i>Halobacillus yeomjeoni</i> (AY881246) | 783/783 (100) |
| NH8G | <i>Halobacillus blutaparonensis</i> (DQ058358) | 734/736 (99) |
| NH8A | <i>Bacillus macauensis</i> (AY373018) | 778/783 (99) |
| NH8B | <i>Bacillus barbaricus</i> (AJ422145) | 792/795 (99) |
| NH8V(1) | <i>Bacillus megaterium</i> (D16273) | 776/778 (99.7) |
| NH8H | <i>Bacillus cereus</i> (AJ969107) | 783/783 (100) |
| NH8J1 | <i>Bacillus circulans</i> (AY724690) | 727/738 (98) |
| NH8K | <i>Bacillus firmus</i> (D16268) | 795/797 (99) |
| NH8W | <i>Bacillus selenatarsenatis</i> (AB262082) | 790/797 (99) |
| NH8O | <i>Bacillus licheniformis</i> (CP000002) | 746/747(99) |
| NH8R | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (X60605) | 781/796 (98.1) |
| NH8M | <i>Bacillus koguryoae</i> (AY904033) | 784/784 (100) |
| NH8Y | <i>Bacillus asahii</i> (AB109209) | 773/788 (98) |
| NH8N1-2 | <i>Bacillus megaterium</i> (D16273) | 776/778 (99.7) |

2.4 不同水深条件下的细菌分布

通过比较不同深度下沉积物中的可培养细菌的多样性,发现在属的水平上的分布有一定规律性(图 3)。浅海沉积物样品多样性最高,例如 1 号站点(深度 12 m),16 株分离菌就包含有 11 个不同的属。在 12 m 到 1000 m 区域(1~10 号站位),分离菌在属水平上的多样性基本上是随深度呈递减趋势的,由 12 m 的 11 属,递减到 756 m 的 6 属(4,7 号站位的样品,由于分离菌的数目太少,分别只有 3 株和 2 株,不作

为统计的依据)。此后,随着深度的增加,分离菌在属水平上一直保持了较低的多样性水平,均<5 属。但是 750~1200 m(10~13 站位)的区域值得注意,在这一区间,分离菌在属水平上虽然呈现了较低的水平,但种水平的多样性却异常丰富,分别包含 19、14、23 个种(12 号站位例外,因为只有 3 株分离菌),而且其中大部分为产芽孢菌株,高达 75.5%(37/49)。总之,可培养细菌在水深<1200 m 时多样性较高;随着深度增加,多样性明显降低(图 3)。

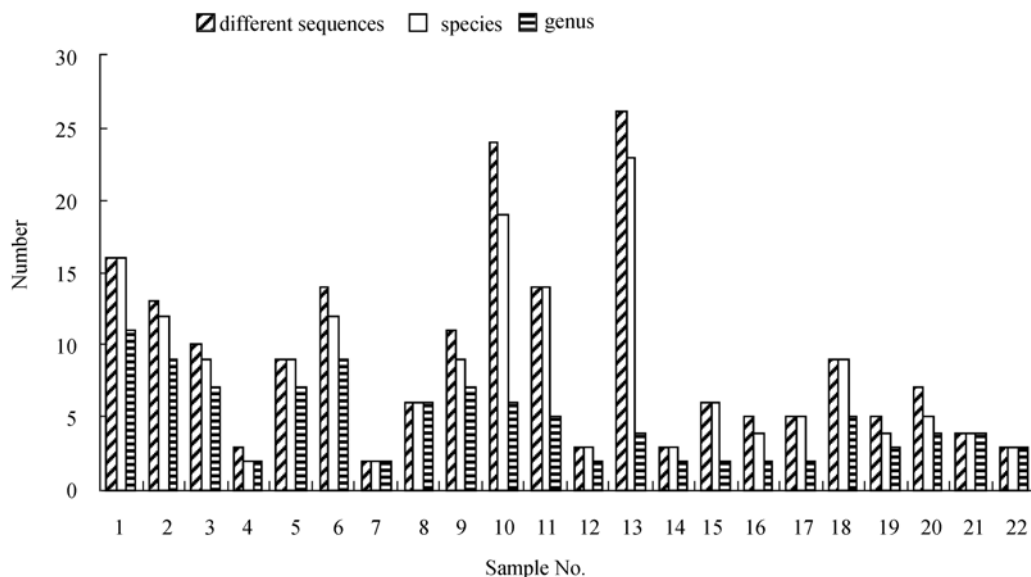


图3 南沙海域沉积物可培养细菌随水深分布的种群变化

Fig.3 Distribution of bacteria at different depths of Nansha sediments. Isolates were grouped at levels of 16S rRNA sequence, species and genus. X axis: depths from 12 m to 2589 m; 1-22 were corresponding to the serial numbers of sampling sites in Table 1. Y axis: group number.

统计还发现,在 750~2000 m 的沉积物中,低 G+C 含量的菌占优势,其中大部分是 *Bacillus* 类菌。在 2000~3000 m 深海沉积物样品中,分离株多属于 γ -proteobacteria (*Idiomarina*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* 和 *Vibrio*)。这与李会荣等的报道类似,他们发现在大西洋和太平洋深海沉积物中 γ -proteobacteria 是主要的可培养菌^[8]。

3 讨论

为了解南沙海域沉积物中微生物资源的特征,并分离获得这些微生物菌种资源,本研究通过多站点采样,从沉积物样品中获得了大量海洋细菌。结果发现,有的站点中芽孢杆菌占可培养菌的绝大多数,并与其他多种产芽孢的细菌。在同一站点的少量样品中发现如此种类繁多的产芽孢细菌非常少见。

本研究组在 2004 年南海深海沉积物样品中也发现了几种芽孢杆菌^[9],但种类与本研究差别较大,也没有如此丰富。大陆架海域中的微生物可能有些与陆地微生物有渊源。但是,本调查发现,枯草芽孢杆菌和腊样芽孢杆菌这类陆地常见的芽孢杆菌在南沙沉积物中非常少见。*Bacillus* 属的细菌一般为好氧异养细菌,它们的出现表明该环境中有机质比较丰富。与本文结果类似, Gontang 等发现芽孢杆菌在西太平洋群岛 (7°30'N, 134°30'E) 0~500 m 潮间带沉积物中也是一类优势的可培养菌,在 189 个代表菌株中占 34.4%^[10]。但芽孢杆菌在大洋环境中出现频率较低。

假单胞菌在各种陆地环境中都比较常见。我们近来在南极土壤乃至深海沉积物中也有发现,并且与多环芳烃降解有关,或直接参与了降解过程^[11,12]。此次从南沙沉积物中发现的假单胞菌种类较多,且有一些可能的新种。它们在南沙环境中的作用尚不清楚。

食烷菌属(*Alcanivorax*)目前报道有 6 个种,其中一个是本课题组分离自渤海湾的柴油食烷菌 *B-5* (*Alcanivorax dieselolei*)^[13]。它在各大洋、厦门近海以及南海水体或沉积物中也有分离到。本文中分离到了多株食烷菌,属于已报到的其他 3 个种。但是没有分离得到与 *A. dieselolei* 近缘的菌株。*Alcanivorax* 在多个站点的样品中都有发现。例如,浅海环境 (145 m~188 m) 的站点 NH9、NH38、NH15、NH23 和 NH45;深海环境 (1738 m~2150 m) 的站点 NH56 和 NH28。食烷菌是降解烷烃的专性海洋细菌 (obligate alkane degrading marine bacteria)^[7]。它们的出现是否与南沙海底油藏有一定关系,尚不能明确。通过定量分析该类菌的丰度与沉积物中烷烃的含量可能会得出更可信的结论。

本文获得的菌株中有多种是近两年从海洋环境中刚刚分离报道的。如 *Marinobacter vinifirmus*, *Rheinheimera aquimaris*, *Pontibacillus chungwhensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus yunchengensis* 以及 *Bacillus selenatarsenatis*。它们对海洋环境的影响及有关应用研究尚无任何报道。

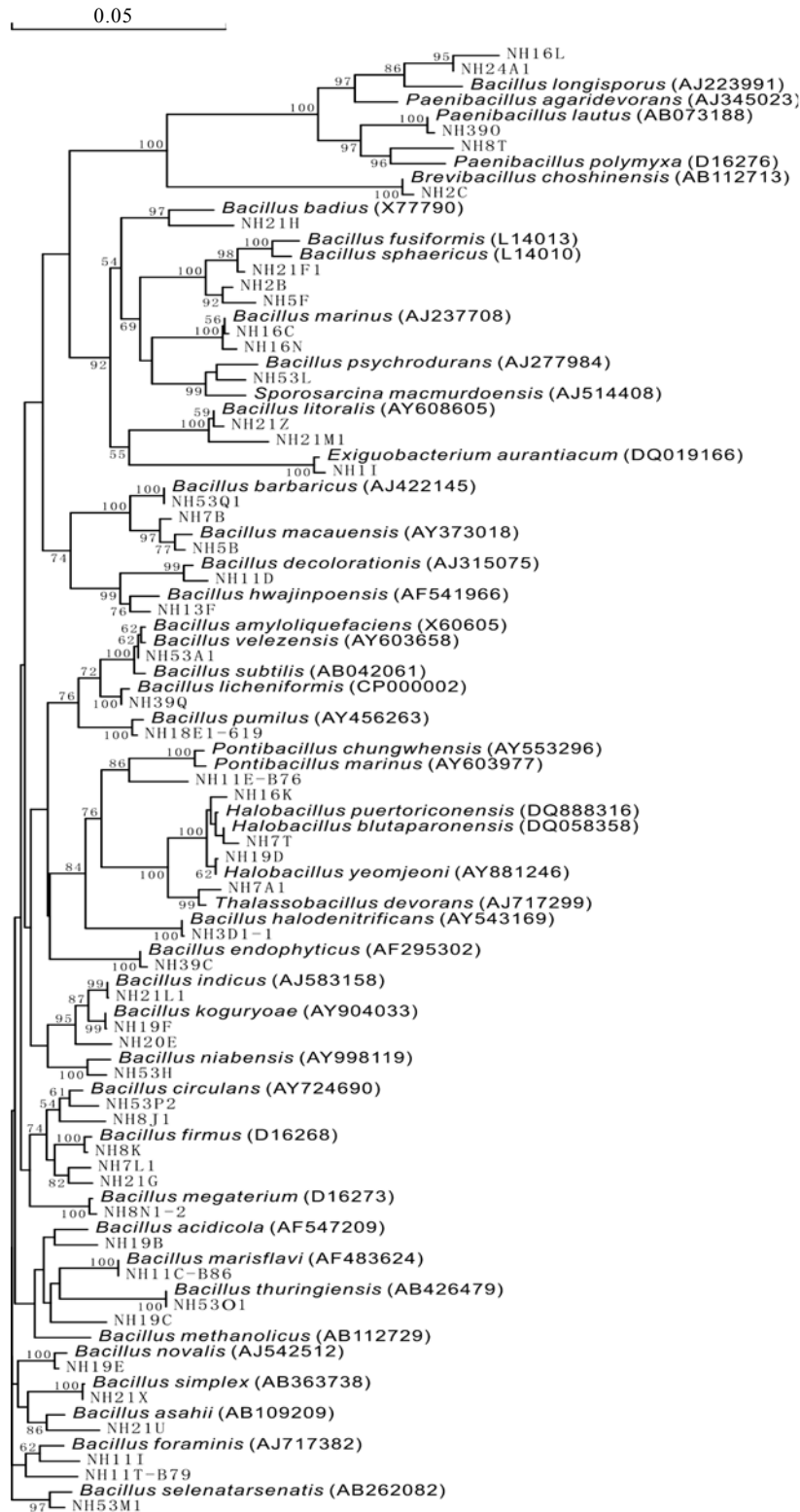


图 2 南沙海域沉积物中产芽孢菌的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of spore-forming bacteria from sediments of Nansha. The phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method. Bootstrap values above 50% are shown (1000 resamplings) at the branching points. Numbers in parentheses represent accession numbers of the sequences in GenBank. The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position.

南沙独特的生态环境蕴藏着丰富的细菌种质资源。限于培养条件, 本文所获菌株可能是南沙微生物资源的冰山一角。通过优化培养基、改变培养条件将获得更多的可培养菌; 而通过分子生态分析将对原位微生物多样性获得更全面的了解。尽管如此, 南海沉积物中芽孢菌的多样性和丰富性是可以肯定的。本文所获结果将有助于人们深入认识和开发这一特殊海域的微生物资源。

参 考 文 献

- [1] Azam F, Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 782–791.
- [2] Giovannoni S, Stingl U. The importance of culturing bacterio-plankton in the ‘omics’ age. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 820–826.
- [3] 戴欣, 周惠, 陈月琴, 等. 中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rRNA 多样性的初步研究. *自然科学进展*, 2002, 12: 479–484.
- [4] 许飞, 戴欣, 陈月琴, 等. 南沙海区沉积物中细菌和古细菌 16S rRNA 多样性的研究. *海洋与湖沼*, 2004, 35: 89–94.
- [5] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998, pp13–50.
- [6] Murray AE, Hollibaugh JT, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterio-plankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA fragments. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(7): 2676–2680.
- [7] Head IM, Jones DM, Røling WFM. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 173–182.
- [8] 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. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(2): 177–183.
- [9] 刘真, 邵宗泽. 南海深海沉积物烷烃降解菌的富集分离与多样性分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(5): 869–873.
- [10] Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 3272–3282.
- [11] Ma YF, Wang L, Shao ZZ. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environ Microbiol*, 2006, 8: 455–465.
- [12] Cui ZS, Lai QL, Dong CM, et al. Biodiversity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Deep Sea Sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environ Microbiol*, 2008, 10: 1948–1963.
- [13] Liu C, Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *Intern J System Evolution Microbiol*, 2005, 55: 1181–86.

Diversity of bacteria isolated from the South China Sea sediments

Fengqin Sun[#], Baojiang Wang[#], Guangyu Li, Xiupian Liu, Yaping Du, Qiliang Lai, Zongze Shao^{*}

(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] To isolate bacteria from Nansha area of South China sea, [Methods] Sediment samples of 22 sites were used. Bacterial isolation was conducted on plates of marine medium, followed by 16S rRNA identification and phylogenetic analysis. [Results] In total 349 bacteria were obtained, belonging to 87 species. Analyses of 16S rRNA sequence showed that *Bacillus* and other spore-forming bacteria occupied the majority of isolates in 10 sites. *Bacillus* was the most abundant bacterium and of high diversity; with 34 species and 8 possible novel species. *Halobacillus* also occurred frequently while other spore-forming bacteria including *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Pontibacillus* and *Thalassobacillus* were also found, but less occurred in this area. In addition to these low-G+C-content bacteria, γ -Proteobacteria were the second subgroup of high occurrence, among which *Pseudomonas*, *Marinobacter* and *Alcanivorax* were relatively abundant. Generally, isolates of 750-2000m deep mainly consist of low-G+C-content bacteria, while mainly composed of gamma-Proteobacteria when the depth is over 2000m. [Conclusion] Marine sediments of South China Sea are rich in spore-forming bacteria, which deserve further study and exploitation.

Keywords: South China Sea; marine bacteria; biodiversity; *Bacillus*; spore-forming bacteria

Supported by supported by the National Key Technology R&D Program of China (2006BAB19B02), the National Infrastructure of Natural Resources for Science the Technology Program of China (2005DKA21209) and the National Natural Science Foundation of China (30670051)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 25 July 2008/ Revised: 23 September 2008