

浙江苍南近海沉积物细菌物种多样性

霍颖异¹, 许学伟^{2,3}, 王春生^{2,3}, 杨俊毅^{2,3}, 吴敏^{1,*}

(1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058; 2. 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 杭州 310012
3. 国家海洋局第二海洋研究所, 杭州 310012)

摘要:针对浙江苍南大渔湾近海海底沉积物样品(东经 120°34'28.6", 北纬 27°19'57.3"), 采用非培养法构建分子文库, 并结合纯培养法分离培养海洋微生物, 基于克隆子和分离菌株的 16S rRNA 基因序列, 开展系统发育学研究, 分析近海沉积物细菌群落结构及多样性。序列分析结果表明, 文库克隆子主要属于 δ -变形杆菌纲(*Deltaproteobacteria*) 和 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*), 部分序列与已报道物种的相似性较低, 表明浙江苍南近海环境样品具有较好的微生物多样性, 蕴藏着大量未知细菌物种资源。研究还分离获得细菌 79 株, 丰富了近海微生物资源库。分子鉴定结果表明, 这些菌株主要属于 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*) 和芽孢杆菌纲(*Bacilli*)。通过非培养和可培养数据结合发现, 浙江苍南近海沉积物中的细菌优势类群为 δ -变形杆菌和 γ -变形杆菌。

关键词:苍南大渔湾; 沉积物; 细菌; 多样性

文章编号: 1000-0933(2008)10-5166-07 中图分类号: Q178, Q938 文献标识码: A

Bacterial diversity of the sediment from Cangnan Large Fishing Bay

HUO Ying-Yi¹, XU Xue-Wei^{2,3}, WANG Chun-Sheng^{2,3}, YANG Jun-Yi^{2,3}, WU Min^{1,*}

1 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2 Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China

3 Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(10): 5166 ~ 5172.

Abstract: Bacterial community and diversity in marine sediment from Cangnan Large Fishing Bay (27°19'57.3"N, 120°34'28.6"E) were investigated by combining culture-independent with culture-dependent methods. By the culture-independent method, DNA was extracted directly from the environment. Molecular library containing bacterial 16S rRNA gene was constructed. 25 clones were selected and the cloned 16S rRNA gene fragments were sequenced. Finally, 18 sequences were phylogenetically analyzed based on the 16S rRNA gene. The sequenced clones fell into five phylums of the domain *Bacteria*: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroglexi*, *Nitrospirae* and *Acidobacteria*, and most of them shared relatively low similarity with described bacteria. The results revealed that the library was dominated by *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* of *Proteobacteria*. By the culture-dependent method, 79 bacteria strains were isolated. The 16S rRNA gene sequences were determined and analyzed. Most of the isolates were closely related to described bacteria, and fell into three lineages;

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(2004CB719604-3); 浙江省科技重大资助项目(2006C13053); 我国近海海洋生物与生态调查研究资助项目(908-ZC-I-02)

收稿日期: 2007-06-24; 修订日期: 2008-05-12

作者简介: 霍颖异(1984 ~), 女, 蒙古族, 内蒙古通辽人, 硕士生, 主要从事微生物资源开发工作. E-mail: yingyihuo@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wumin@zju.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2004CB719604-3); Key Project of Zhejiang Science and Technology (No. 2006C13053); Chinese Offshore Investigation and Assessment (908-ZC-I-02)

Received date: 2007-06-24; Accepted date: 2008-05-12

Biography: HUO Ying-Yi, Master candidate, mainly engaged in microbiology. E-mail: yingyihuo@gmail.com

Alphaproteobacteria and *Gammaproteobacteria* of *Proteobacteria*, and *Bacilli* of *Firmicutes*. However, some sequences showed low affiliation with the sequences from described species (less than 97%), suggesting the presence of some novel taxa. The sequences from culture-independent and culture-dependent methods were assigned to operational taxonomic units (OTUs) based on sequence analysis. Subsequent analysis using Shannon index indicated that the bacterial diversity from the culture-independent method was significantly higher than that from the culture-dependent method. Integrated the results of culture-independent with culture-dependent methods, the *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* were the dominant bacterial groups in sediment from Cangnan Large Fishing Bay.

Key Words: Cangnan Large Fishing Bay; sediment; bacterial diversity; culture-dependent; culture-independent

近年来国内已有一些研究调查黄渤海^[1]、东海^[2]和南海^[3]等近岸海区海底沉积物中微生物资源和种群多样性。但采用非培养与可培养相结合方法分析近海环境微生物群落结构及物种多样性的工作较少。浙江省海域面积 26km²,海岸线 6486km,是我国海岸线较长的省之一^[4],拥有丰富的近海微生物资源,目前关于浙江沿海沉积物微生物多样性的报道也较少。

研究结合非培养和可培养方法,调查浙江省温州市苍南大渔湾海底沉积物的细菌群落组成,分析物种多样性,在丰富海洋细菌资源的同时,初步探讨海洋细菌群落在生态系统中的作用,对近海细菌资源开发具有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 样品采集

2006年8月,采用小型多管取样器,从浙江省温州市苍南县大渔湾(东经 120°34'28.6",北纬 27°19'57.3")采集海底沉积物样品一份。子样品现场分装,短期 4℃ 阴暗保存,运抵实验室后立即开展相关工作。

1.2 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增

环境样品总 DNA 的提取参照 Zhou^[5]的方法。

PCR 扩增引物为 27bf:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';和 1492br:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。50 μl 反应体系为 10 × buffer 5 μl, dNTPs 0.5 μl, Primer 27bf 1 μl, Primer 1492br 1 μl, H₂O 41 μl, 模板 DNA 1 μl, Taq 酶 (TaKaRa) 0.5 μl。PCR 反应条件为 50 μl 反应体系加入 50 ng DNA 模板, 33 个循环;变性 94 °C, 45 s;退火 55 °C, 45 s;延伸 72 °C, 90 s。

1.3 重组子筛选及测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒、(TaKaRa) 纯化后,连接 pMD-18T (TaKaRa) 载体,转化 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞。经蓝白斑筛选、质粒抽提和电泳检测,以质粒 DNA 为模板,PCR 扩增检测插入片断大小。将含有合适片断大小的质粒转化入 *E. coli* DH5α 后,送上海生物芯片有限公司纯化并测定 DNA 序列,引物为 M13 双向测序,测定的序列长度大于 500 bp。

1.4 16S rRNA 基因序列分析

将获得的 16S rRNA 基因(16S rDNA)序列通过 GenBank 数据库进行 BLASTn 比对,得到与其相似性较高的序列。采用 Mega3.1 软件中 Clustal W 程序进行多序列匹配排列后,使用 neighbor-joining 算法构建系统发育树。非培养获得的 16S rDNA 序列,先输入 Ribosomal Database Project 中采用 CHECK-CHIMERA 程序分析检查嵌合体,再以相同方法比对和建树。

1.5 菌株的分离和纯化

分别采用 ZoBell 2216E^[6]、HM^[7] 和 APA 3 种培养基分离纯化海洋微生物。APA 培养基配方:NaCl 20.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 1.0 g, 酵母抽提物 5.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 定容至 800 mL, pH 7.0; Na₂CO₃ 10.00 g, 定容至 200 ml;分别灭菌后混匀。取沉积物样品约 0.5 g, 放入装有 3 ml 的培养基盐溶液中。

振荡 5 min 后,静置使其自然沉降,取上清梯度稀释并涂布平板。每个梯度涂布 3 块平板,分别置于 4℃、25℃ 和 37℃ 培养。待长出明显菌落后,挑单菌落并反复划线纯化菌株。

1.6 分离纯化菌株的分子鉴定

采用菌液 PCR 法扩增纯培养物 16S rDNA 序列,引物为 27bf 和 1492br,方法同 1.2。PCR 产物直接送上海生物芯片有限公司纯化并进行 DNA 序列测定,测序引物为 27bf,测定的序列长度大于 500 bp。测定的序列采用 BLASTn 进行比对。相似性低于 97% 的序列,采用 27bf 和 1492br 重新进行测定。重新测定后的序列长度大于 1300 bp,为 16S rDNA 序列长度的 90% 以上。

1.7 近海细菌多样性分析

根据 BLASTn 比对和系统发育分析结果,将获得的 16S rRNA 序列进行归类,定义不同纲的序列作为不同分类单元,采用 Shannon 多样性指数进行多样性分析和比较。

2 结果与讨论

2.1 海洋沉积物总 DNA 提取及 16S rRNA 基因扩增

从海洋沉积物样品中提取获得总 DNA,电泳显示 DNA 片段大小约 21 kb,片段较完整。通过细菌 16S rDNA 特异性 PCR 扩增,电泳获得单一条带,大小约 1.5 kb。

2.2 非培养 16S rDNA 序列比对与分析

从分子文库中选择 25 个含正确插入片段的克隆测序,返回的序列经 RDP 数据库分析,去除嵌合体后获得有效序列 18 个。分析结果表明,它们分别属于变形杆菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*) 5 个类群,其中变形杆菌门(*Proteobacteria*)的 δ -变形杆菌纲(*Deltaproteobacteria*)和 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*)数量较多。

获得的大部分序列与 GenBank 数据库中的序列相似性为高于 95%,但与已被鉴定命名的物种序列相似性较低,仅为 80% ~ 95% (图 1)。例如,克隆子 C26 与分离自地中海的 α -变形杆菌纲下 *Thalassospira lucentensis* 序列相似性最高(87%);克隆子 C19 与高温条件下可分解聚 3-羟基丁酸酯的 β -变形杆菌纲下 *Schlegelella thermodepolymerans* 序列相似性最高(89%)^[8];克隆子 C05、C07 和 C24 分别与兼性厌氧光合细菌(80%)、厌氧梭菌纲细菌(87%)和硝化细菌(81%)序列相似性最高;而克隆子 C49 与亚硝化螺旋菌属的专性化能自养硝化细菌 *Nitrosospira* sp. Nsp57 有较高相似性(97%)。

δ -变形杆菌纲在非培养细菌中占较高比例。其中克隆子 C36 与脱硫微菌属下 *Desulfomicrobium norvegicum* 的序列相似。脱硫微菌属菌株为严格厌氧的硫酸盐还原菌,普遍具有还原有毒重金属离子 Cr^{6+} 的能力^[9],在环境净化和污染治理方面发挥作用。克隆子 C01 与 *Geothermobacter ehrlichii* 的序列相似。该菌严格厌氧,是一种 Fe^{3+} 还原微生物,在海洋和淡水沉积物中生物高分子分解和矿石生成等方面起着重要作用^[10]。克隆子 C45 与厌氧硫酸盐还原菌 *Desulfosarcina variabilis* 的序列相似。克隆子 C06 和 C30 与硝化细菌 *Nitrosospina gracilis* 的序列相似度分别为 90% 和 91%,该菌是一种严格的海洋化能自养细菌,可将亚硝酸盐转化为硝酸盐^[11]。

2.3 近海细菌菌株的分离及分子鉴定

采用多种不同的培养条件从样品中分离纯化获得 79 株细菌。分子鉴定结果表明,这些菌株分别属于 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*, 2 株,2.5%)、 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*, 54 株,68.4%)和厚壁菌门(*Firmicutes*, 23 株,29.1%) 3 个类群(表 1)。 α -变形杆菌纲菌株分属于劳氏菌属(*Loktanella*)和赤杆菌属(*Erythrobacter*); γ -变形杆菌纲菌株归属于海杆菌属(*Marinobacter*),假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*),盐单胞菌属(*Halomonas*),弧菌属(*Vibrio*),假单胞菌属(*Pseudomonas*),盐碱湖生菌属(*Nitricola*),海细菌属(*Marinobacterium*),产微球茎菌属(*Microbulbifer*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*);而厚壁菌门菌株归属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)和海栖芽孢杆菌属(*Marinibacillus*)。

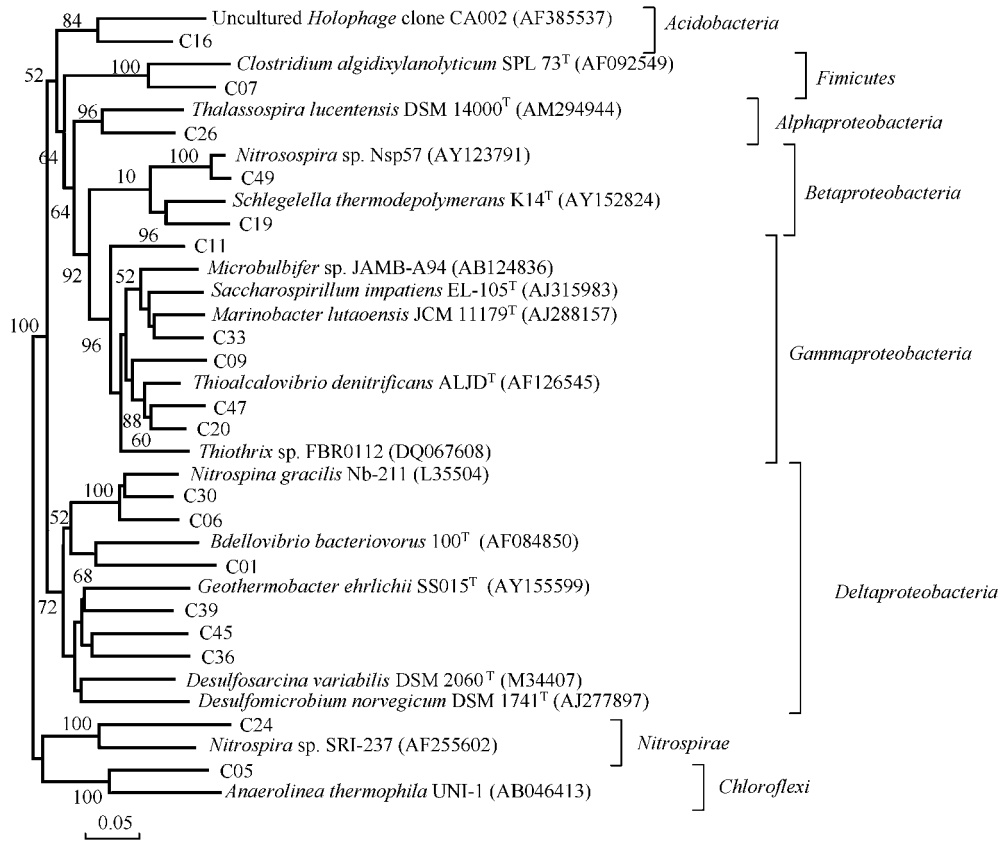


图 1 苍南大渔湾海洋沉积物非培养细菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of uncultured clones from the sediment of Cangnan Large Fishing Bay. The tree was constructed by the neighbor-joining method. "C" refers to the clone. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences. Bootstrap values are shown at each branch points, and values > 50 % are shown. Scale bar indicates 5 % sequence divergence

表 1 非培养和纯培养近海细菌各类群数量及多样性指数

Table 1 Numbers of cultured and uncultured marine bacteria and diversity indices

门 Phylum	纲 Class	纯培养 culture-dependent		非培养 culture-independent	
		菌株数目(个) No. of strains	比例(%) Proportion (%)	克隆数目(个) No. of clones	比例(%) Proportion (%)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	2	2.5	1	5.6
	Betaproteobacteria	—	—	2	11.1
	Gammaproteobacteria	54	68.4	5	27.8
	Deltaproteobacteria	—	—	6	33.3
Firmicutes	Bacilli / Clostridia	23	29.1	1	5.6
Chloroflexi	Anaerolineae	—	—	1	5.6
Nitrospirae	Nitrospira	—	—	1	5.6
Acidobacteria	Acidobacteria	—	—	1	5.6
总数 Total		79	100	18	100
Shannon 多样性指数 (H')		0.712		1.769	
Shannon index (H')		0.712		1.769	

Shannon 多样性指数计算公式^[12] Formula for Shannon index^[12]: $H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$; S: 样品中的 OTU 数目 The number of OTUs in the sample,

P_i: 属于 OTU i 的个体在全个体中的比例 The proportion of strains or clones in the ith OTU

基于分离菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育分析(图 2, 3)表明,大多数菌株与之前分离自海洋或其他

环境的物种相似性很高(>97%)。但研究也发现一些菌株与已报道标准菌株间的相似度较低。例如,菌株 CN46 和 CN71 与 *Marinobacter pelagius* (97%), CN74 与 *Marinobacter lipolyticus* (96%), CN44 与 *Marinobacterium litorale* (94%), CN47 与 *Marinobacterium stanieri* (97%), CN85 与 *Microbulbifer maritimus* (95%), CN64 与 *Bacillus bogoriensis* (94%), CN77 与 *Bacillus acidicola* (95%), CN40 与 *Marinibacillus campisalis* (96%), CN62 与 *Halobacillus litoralis* (95%), 它们可能代表一些新的分类单元。

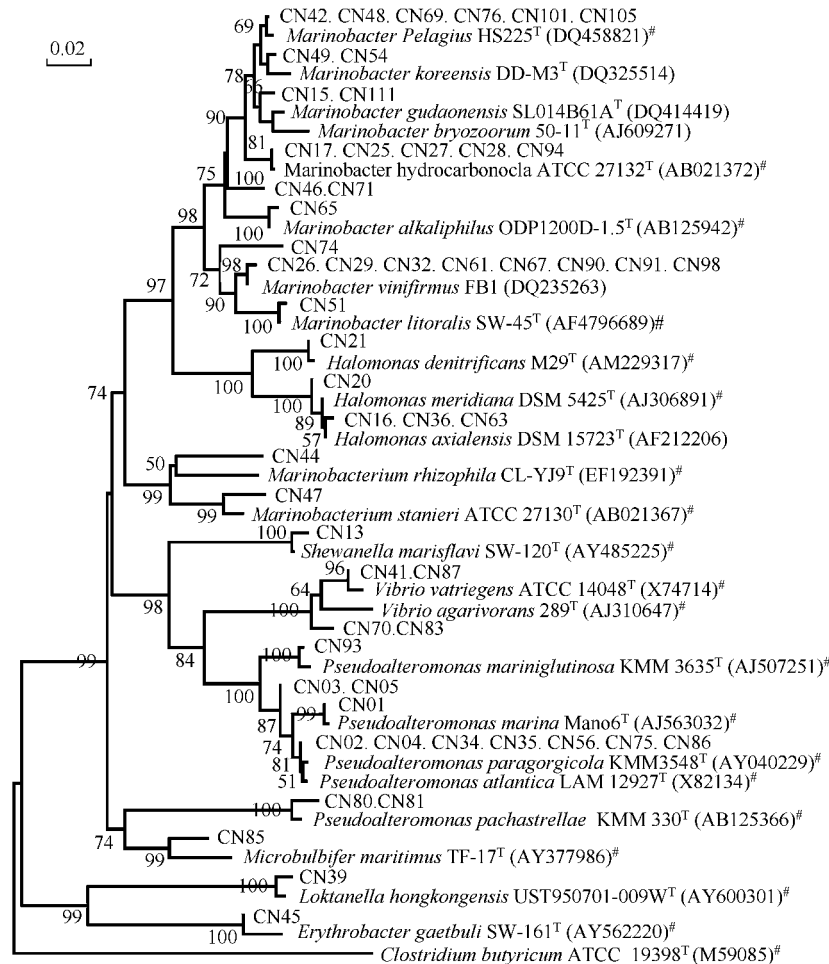


图2 苍南大渔湾海洋沉积物可培养变形杆菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of *Proteobacteria* strains from the sediment of Cangnan Large Fishing Bay; The tree was constructed by the neighbor-joining method, with *Clostridium butyricum* as the out group. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences. Bootstrap values are shown at each branch points, and values > 50% are shown; Scale bar indicates 2% sequence divergence; “#” refers to the type strain was isolated from marine environment

2.4 近海细菌多样性分析

定义属于不同纲的序列为不同分类单元(OTU),采用 Shannon 多样性指数进行多样性计算(表1)。非培养结果显示以 δ -变形杆菌(*Deltaproteobacteria*)和 γ -变形杆菌(*Gammaproteobacteria*)为优势类群的 8 个分类群。而可培养方法获得的菌株只涵盖变形杆菌门(*Proteobacteria*)的 α -变形杆菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*),以及厚壁菌门(*Firmicutes*)的芽孢杆菌纲(*Bacilli*)。结果表明,非培养显现的微生物多样性要明显高于可培养结果。这主要是由于纯培养技术的单一营养结构,与自然生境中离子和营养成分的多元性,以及生物协同代谢等方面差距明显,使众多微生物难以培养^[13],造成了可培养方法在反映微生物群落结构方面的不足。其次,厌氧细菌在非培养结果中占有较大比例,包括 δ -变形杆菌纲、梭菌纲、厌氧绳菌纲、酸杆菌纲和 α -变形杆菌纲中红螺菌目,共 7 个克隆。非培养结果显示在海底溶氧量相对较低的条件

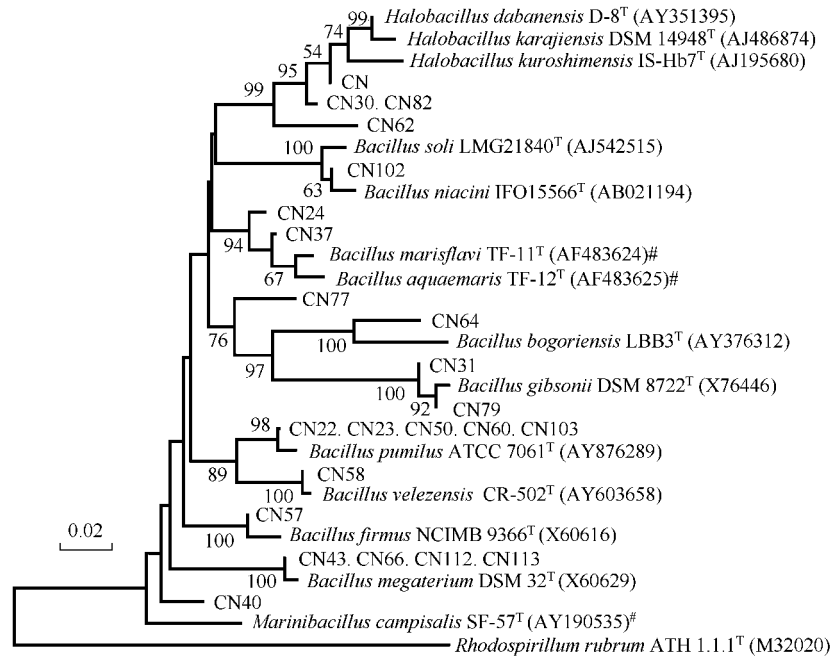


图3 苍南大渔湾海洋沉积物可培养厚壁菌门细菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences of *Firmicutes* strains from the sediment of Cangnan Large Fishing Bay

The tree was constructed by the neighbor-joining method, with *Rhodospirillum rubrum* as the out group; The numbers in parentheses are accession numbers of sequences; Bootstrap values are shown at each branch points, and values > 50 % are shown; Scale bar indicates 2% sequence divergence; “#” refers to the type strain was isolated from marine environment

下,厌氧细菌是细菌群落的重要组成部分。而我们采用好氧培养手段分离菌株,未能获得厌氧菌株,也是造成非培养结果多样性要明显高于可培养结果的原因之一。然而,可培养结果却可以作为对非培养结果中好氧和兼性厌氧细菌类群的验证和补充,如它们在海杆菌属(*Marinobacter*)和产微球茎菌属(*Microbulbifer*)的重叠,并且可培养也得到了非培养未能获得的种属菌株。

综合非培养和可培养的结果,可以发现苍南大渔湾海底沉积物(东经 120°34′28.6″,北纬 27°19′57.3″)具有丰富的细菌多样性,以 δ -变形杆菌和 γ -变形杆菌为优势类群。这一结果与其他已报道的近岸海洋沉积物细菌多样性研究结果有所差异。Gray 等^[14]采用非培养方法对英国 Eagle 湾的表层沉积物进行了多样性分析,结果表明沉积物中有 6 个主要类群,分别是 α -变形杆菌、 δ -变形杆菌、 γ -变形杆菌、高 GC 含量革兰氏阳性菌、梭菌(*Clostridia*)类群和浮霉菌(*Planctomyces*)类群。Llobet-Brossa 等^[15]采用 FISH 研究了德国 Wadden 海沉积物的微生物群落组成,发现拟杆菌(*Cytophaga-Flavobacterium*)是主要类群,其次是硫酸盐还原菌,其他类群含量均较低。Urakawa 等^[16]基于 16S rDNA 文库,采用 ARDRA 和 RFLP 方法研究了日本 Sagami 湾和 Tokyo 湾沉积物的微生物多样性,主要为 γ -变形杆菌和革兰氏阳性菌,还有 δ -变形杆菌、 ϵ -变形杆菌和疣微菌(*Verrucomicrobia*),而没有 α -变形杆菌。由此可见,不同地区近海沉积物中细菌群落结构有一定差别。原因可能是,近海毗邻陆地,受陆地和人类活动影响较大,容易形成截然不同的微生物群落结构。

此外,一些与研究非培养细菌相似度较高的菌株,能在氮硫循环、生物高分子分解和矿石产生等方面发挥重要作用。例如,*Geothermobacter* spp. 是一类 Fe^{3+} 还原微生物^[10];硝化细菌 *Nitrosospira* spp. 和 *Nitrospina* spp. 可进行硝化反应^[11]; *Desulfomicrobium* spp. 和 *Desulfosarcina* spp. 是硫酸盐还原菌,其中 *Desulfomicrobium norvegicum* 还具有还原重金属 Cr^{6+} 的能力^[9]。表明海底沉积物细菌在海洋生态系统的生物地球化学循环中发挥重要作用。

3 结论

3.1 浙江苍南近海沉积物(东经 120°34′28.6″,北纬 27°19′57.3″)中细菌优势类群为 δ -变形杆菌纲和 γ -变形

杆菌纲细菌。

3.2 通过对浙江苍南大渔湾近海细菌物种群结构和物种多样性研究,分离获得多株特色细菌,发现多个新的分类单元,表明浙江近海沉积物中蕴藏着大量微生物资源。

3.3 虽然 16S rRNA 基因序列是分类学研究过程中的重要的指标,但确定特色菌株分类地位,还需要更多数据支持。而要深入了解一类细菌在海洋生态系统中的功能,仍需发展合适的培养方法获取纯培养菌株,开展生理学等研究工作。

References:

- [1] Wang S J, Hu J C, Xue D L. Study of marine microbial resources in Huanghai, Bohai and Liaoning offshore of China. *Journal of Jinzhou Normal College*, 2001, 22(1): 1-5.
- [2] Song Z G, Xu Q Z, Lu X A, *et al.* A primary study on population biodiversity of marine microorganisms from East China Sea. *Microbiology*, 2006, 33(1): 63-67.
- [3] Dai X, Zhou H, Chen Y Q, *et al.* A preliminary study on the diversity of bacteria in the South China Sea Sediments as determined by 16S rRNA gene analysis. *Progress in Natural Science*, 2002, 12(5): 479-484.
- [4] Zhejiang Province Statistical Bureau. Current situation and problems of maritime economic development for Zhejiang Province. *China National Conditions and Strength*, 2007, 5: 63-64.
- [5] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 316-322.
- [6] ZoBell C E. Studies on marine bacteria I: The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res*, 1941, 4: 42-75.
- [7] Ventosa A, Quesada E, Rodriguez-valera, *et al.* Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol*, 1982, 128: 1959-1968.
- [8] Elbanna K, Lütke-Eversloh T, Van Trappen S, *et al.* *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1165-1168.
- [9] Michel C, Brugna M, Aubert C, *et al.* Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55(1): 95-100.
- [10] Kashafi K, Holmes D E, Baross J A, *et al.* Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ethrichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the *Geobacteraceae* from the "Bag City" hydrothermal vent. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 69(5): 2985-2993.
- [11] Watson S W, Waterbury J B. Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp.. *Arch Microbiol*, 1971, 77(3): 203-230.
- [12] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, *et al.* Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43(1): 1-11.
- [13] Ye J Y, Luo G Y. Ecological interpretation and related strategies for low culturability of microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(3): 478-482.
- [14] Gray J P, Herwig R P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(11): 4049-4059.
- [15] Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2691-2696.
- [16] 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. *Microbiology*, 1999, 145, 3305-3315.

参考文献:

- [1] 王书锦, 胡江春, 薛德林, 等. 中国黄、渤海、辽宁近海地区海洋微生物资源的研究. *锦州师范学院学报*, 2001, 22(1): 1-5.
- [2] 宋志刚, 许强芝, 鲁心安, 等. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 63-67.
- [3] 戴欣, 周惠, 陈月琴, 等. 中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rDNA 多样性的初步研究. *自然科学进展*, 2002, 12(5): 479-484.
- [4] 浙江省统计局. 浙江海洋经济发展现状及问题. *中国国情国力*, 2007, 5: 63-64.
- [13] 叶姜瑜, 罗固源. 微生物可培养性低的生态学释因与对策. *微生物学报*, 2005, 45(3): 478-482.