

深海微生物研究进展

Progress in deep-sea microbiology

陈秀兰, 张玉忠, 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)01-0061-06

海洋占地球表面的 70% 以上, 虽然与陆地的某些生态环境相比, 海水, 尤其是深海, 营养相对贫乏, 微生物活动不是十分剧烈, 但从海水表面到 108 600 m 深的海底淤泥中都存在着微生物。近年来, 海洋微生物的研究日益被重视, 对海洋微生物的生态调查、生理和遗传特征以及开发利用都有许多研究^[1-3]。深海是一个特殊的生态环境, 这里永久低温(火山口除外)、高压、黑暗。对深海微生物的研究不仅有助于了解生命的起源, 而且可以了解各种极端微生物的生活特性, 有助于对深海微生物资源的开发利用。

1 深海生态环境的特征

深海一般指 1 000 m 以下的海洋, 占地球海洋总体积的 75%。海洋的平均深度为 3 800 m, 最深的海沟为 11 000 m, 而 6 000 m 以下的深海只占海洋总体积的 0.1%, 因此地球上绝大部分的深海都为 1 000 ~ 6 000 m 深。深海生态环境具有如下特征:

1.1 高压

由于地球引力的作用, 每下降 10 m, 压力就增加 1 个大气压。因此生长在 5 000 m 深度的生物, 必须能耐受 500 个大气压的压力。

1.2 低温

除了海底火山口及其附近的地方, 深海的温度一般始终保持在 $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内(少数例外, 如 Sulu 海的海底温度为 $9.8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 地中海的海底温度为 $13.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), 有人称之为世界上最大的冷藏箱。在这里生存的生物必须能耐受低温。但在海底火山口上及其附近的地方, 温度高达 $100\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 400\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在这里生活着世界上最嗜热的微生物。

1.3 黑暗

在 1 000 m 以下的深海, 完全没有太阳光, 这里仅有的光线是少量的生物发光和同位素产生的射线。因

此在深海没有进行光合作用的生物存在。

1.4 有机物含量低

由于光线只能到达水深 300 m, 因此光合作用也只能在 300 m 以上的海水中进行。据估计, 海洋中光合作用产生的有机物 95% 在 300 m 以上被消耗。在深度 300 ~ 1200 m 的海域内, 4% 的有机物被分解掉, 只有 1% 的光合作用产物可达 1 200 m 以下的深海和海底。

1.5 盐度

深海的大部分地方的盐度同海水一样为 30 左右。生活在深海的生物均能耐受 30 以下的盐度。

总之, 深海环境一般为高压、低温、黑暗、高盐、寡营养。生活在这种特殊环境下的微生物必然有特殊的生理代谢机制。

2 深海微生物的研究方法

由于深海的特殊环境及微生物生长代谢的特殊性, 对深海微生物的研究从取样到培养都有其特殊性。归纳起来深海微生物的研究有以下几种方法。

收稿日期: 2002-06-26; 修回日期: 2002-08-30

基金项目: 国家 863 计划海洋生物技术主题青年基金、国家自然科学基金、教育部科技计划、霍英东教育基金会青年教师基金资助项目。

作者简介: 陈秀兰(1966-), 女, 山东栖霞人, 博士, 讲师, 目前在研项目主要为国家 863 计划课题, E-mail: cxl0423@sina.com.cn; 高培基, 通讯联系人, 电话: 0531-8364429, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn, Fax: 0531-8565610

2.1 原位研究

在 80 年代之前,由于在实验室内保持高压的技术还未发展起来,因此研究深海微生物代谢机制主要采用原位研究方法。主要是比较深海微生物在深海和在实验室 1 个大气压低温条件下的生长对 C、N 的利用,转化速率等。将玻片等装置置入海底进行原位培养是研究深海微生物种类常用的方法。在原位研究中“free vehicle”是最有用的工具。利用该装置主要研究了深海微生物在 LB 培养基上的生长状况,微生物的碳氮代谢,对置入海底不同深度的同位素标记的有机底物的转化利用,对置入的各种不同底物的分解速率等。原位研究目前仍是深海微生物研究的常用方法^[4]。

2.2 分离培养

虽然原位研究在研究深海微生物的生长及代谢状况上取得了一定的进展,但是原位研究不能观察微生物生长的动态过程。因此随着高压恒化技术的发展,对深海微生物的实验室研究越来越多。在实验室内对从深海采集的样品在常压和高压下进行分离培养,不仅可以了解深海中存在的微生物种类而且可以随时观察温度和压力对深海微生物的影响。实验室内分离培养是目前研究深海微生物最常用的方法,也是对深海微生物进行开发利用的基础^[5]。

2.3 分子生物学方法

尽管从深海取得的样品目前能够在实验室内进行高压低温培养,但由于目前培养技术的限制和对深海微生物的了解不充分,许多深海微生物不可培养,特别是寡营养微生物。因此,传统的分离培养方法在深海微生物种类调查中不可避免地漏掉一些种类。近几年来,随着分子生物学的发展,分子生物方法在分类上的应用日益广泛,特别是 PCR 扩增和 16S DNA 序列同源性比较的应用。利用分子生物学方法研究深海微生物发现在深海环境中微生物的种类数目要比传统的分离培养方法分离到的种类要广泛得多,而且大多数种类是不可培养的和没有鉴定的^[6-9]。因此,利用分子生物方法研究深海微生物对发现新的微生物种类特别重要。尽管利用分子生物学方法可以得到更多的生物多样性,传统的分离培养方法仍有重要的意义。因为调查深海微生物多样性的目的之一是为了开发利用,而要利用某种微生物资源,首先必须是可培养的。

3 深海微生物多样性

深海中微生物种类和数量之多超乎人们的想象,在深海海水中存在着各种微型浮游微生物,海底沉积物中微生物的种类更为广泛^[10]。Takami 等通过平板培养在 10 898 m 深的海底沉积物中发现其中的微生物包括放线菌、真菌、非极端菌和各种极端菌如嗜碱菌、嗜热菌、嗜压菌、嗜冷菌等,通过 16S rDNA 同源序列比较发现其中的微生物种类远比培养出来的多。由于深海绝大部分处于低温,可以肯定,在这里生长的微生物大多为嗜冷或耐冷的。在 2 500~6 500 m 深的海底沉积物中,分离的微生物可以证实这一点,其中大多为嗜冷的,在 20 °C 以上不能生长。例如菌株 DB67 在 1 个大气压 10 °C 以上则不能生长,但在高压下,其生长温度则要高一些。

深海中无论是海水还是沉积物中,古菌的种类和数量都很多,深海中古菌主要包括嗜盐古菌、嗜热酸古菌、产甲烷古菌三大组群。深海中细菌包括化能自养菌和化能异养菌两大类,化能自养菌通过氧化还原无机底物获得能量,转化二氧化碳形成有机分子,是深海中的初级生产者,对生物和地球化学过程中还原元素的循环起关键作用。根据氧化底物不同,深海化能自养菌主要包括三大类群:硝化细菌,氧化 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ 或 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$, 在深海氮循环中起重要作用。氧化还原型无机硫化物的细菌,这类菌在火山口附近广泛分布,包括许多分类上相距很远的细菌。甲烷氧化细菌主要分布在海底沉积物上层,其所利用的底物甲烷由沉积物深层生物厌氧产生。深海中化能异养菌包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。对深海革兰氏阳性菌的研究报道比较少,有证据表明在海底沉积物中存在着革兰氏阳性菌。对深海革兰氏阴性菌的研究较多,大多为假单胞菌科和弧菌科的菌^[11-13]。

放线菌在深海细菌中占的比例较少,研究也较少。在海洋中分离得到的放线菌是否来自于陆地还很难肯定。但目前已知 *Dietzia maris* 和 *Rhodococcus marinonascens* 确实是海洋中存在的放线菌,并非来自陆地。Moran 等报道他们从海底沉积物中分离的链霉菌种类占将近 4%,并且认为它们不是来自陆地。在太平洋水域中分离的可培养放线菌还不到分离细菌总量的 1%。

病毒也是海洋微生物的重要成员之一。研究发现

深海中病毒的含量较低,病毒与细菌的比例也明显低于其他地方。有的沉积物中甚至没有发现病毒。深海中病毒含量低的原因目前还不清楚,可能与压力、低温、细菌生长缓慢等因素有关^[14,15]。

与海底的永久低温环境相反,在海底火山口及其附近存在着一个由高温(400℃)到低温(30℃)的环境。在这个环境中存在着适应各类温度的微生物^[13,16]。有的最适生长温度为25℃,有的最适生长温度达100℃,在海底火山口分离到的微生物甚至能在250℃下生长。由于火山口附近富含还原型硫化物,因此在这里生长的细菌大部分为硫氧化菌,如硫杆菌属(*Thiobacillus*)、硫微螺菌属(*Thiomicrospira*)、发硫菌属(*Thiothrix*)和贝日阿托氏菌属(*Beggiatoa*)等。除硫化物之外,火山口附近还富含C、Mg、Mn、Fe、Ca等元素,因此除了硫氧化菌之外,还有一些其他类型的化能自养菌。对火山口附近的微生物生态调查表明,这里主要有六大类微生物:(1)以铁锰氧化物为能源的细菌群。(2)长杆状的*Hyphomonas hyphomicrobium*型细菌广泛存在。(3)蓝细菌状的丝状体经常被观察到。它们很难与*Calothrix*在形态上相区分,一些含有异型胞。它们可能就是化能合成的蓝细菌。(4)在这里有15%的细菌含有大量的细胞质膜系统。这些有机体根据形态被鉴定为I型甲基营养菌。(5)在所有被调查的火山口区,*Thiothrix*或*Leucothrix*类的附着丝状体都被普遍观察到。(6)*Beggiatoa*类的非附着型丝状体首先在人工放置于火山口的石板上发现。在一个火山口样品中,一种厌氧的螺旋体首先在显微镜下观察到,尔后被分离出来。总之,在海底火山口附近存在着大量的微生物,近几年来,分子生物学方法研究火山口样品表明,在这里存在的微生物种类比目前实验室分离出来的要多得多。因此,还有更多的微生物种类有待于我们去分离研究,这要依赖于分离培养技术的进一步提高。

在海底不仅存在各类微生物,也存在很多种原生动物和后生无脊椎动物。深海微生物与海底后生动物存在着各种类型的共生关系。目前已知至少双壳纲、钙质海绵纲、珊瑚纲、环节动物纲、多毛纲、甲壳纲与海参等7个纲的动物具有共生菌。与这些动物共生的微生物也是种类繁多。据报道与海绵(*Ceratoporella nicholsoni*)共生的有80种细菌,生物量占海绵中质近60%,而且这些细菌不存在于周围的海水中。与*Polysyneton athostrotun*共生的有60株细菌,其中包括17株放线菌。与寡毛类动物*Olavius loisae*共生的有

一种 γ -proteobacterium和一种螺旋体。与太平洋火山蠕虫和甲壳类动物共生的菌有异养的也有化能自养的,有可培养的抗重金属菌株,也有不可培养的丝状 ϵ -Proteobacterium。而在中大西洋Ridge火山口附近,附生于贝类*Rimicaris exoculata*上的主要是一种 ϵ -Proteobacterium。这些与动物共生的菌大部分还不能分离纯化培养,目前只有与海绵共生的少数菌得到分离培养。这些与菌共生的动物大多数发现于海底火山口附近。在这里,化能自养菌是初级生产者,它们固定能量为共生动物提供能量,形成一个简单的食物链^[17]。

4 深海微生物的嗜压与耐压特征及其机制

随着海水的加深,深海的静水压越来越大。因此生活在深海的微生物均为嗜压或耐压微生物。嗜压菌是指最适生长压力大于40 MPa的细菌,耐压菌是指最适生长压力小于40 MPa,在1个大气压下能正常生长的细菌^[18]。嗜压或耐压是深海微生物的显著特征。Kato等分离到多株嗜压与耐压菌,它们的生活深度与嗜压特征如表1所示。

对深海菌的嗜压与耐压机制目前还不十分清楚。对深海菌的膜脂饱和度的研究表明,随着生长压力的增加,这些菌的膜脂饱和度也在增加^[23]。随着生活深度的增加,细菌的世代时间也趋于增加。Michels等^[24]报道深海嗜热嗜压菌*Methanococcus jannaschii*产生嗜压的蛋白酶,当压力增至500个大气压时,酶的热稳定性提高2.7倍,酶催化反应速率提高3.4。Bartlett等将嗜压菌SS9研制成一个研究压力对细菌影响的遗传模型。他们发现SS9的外膜蛋白ompH的合成量受压力调节。ompH是一种孔蛋白,形成有机分子穿过外膜进入胞质的通道。嗜压菌DB6705的一个受高压激活的启动子已被克隆到*Escherichia coli*中,其所表达的基因序列与ompH启动子相同。在*E. coli*转化子和DB6705中,基因的表达都是在转录水平上受高压诱导。在这个启动子下游,有两个ORF被认为是受压力调节的操纵子,它们在高压下表达,在70 MPa下表达量最大,不能在1个大气压下生长的*E. coli*细胞中表达。这些压力调节的操纵子在许多深海细菌中具有高度保守的序列,因此,它们可能在深海细菌适应深海压力方面起着重要的作用^[25]。另外,从耐压菌DSS12中鉴定出另外一个压力调节操纵子^[26]。这些研究为深入了解嗜压菌的压力

表 1 已分离到的部分嗜压菌与耐压菌的特征

菌株	最适生长特征		来源	深度(m)	参考文献
	压力(Mpa)	温度(°C)			
高度嗜压菌					
DB5501	50	10	Suruga Bay	2 485	[19]
DB6101	50	10	Ryukyu Trench	5 110	[19]
DB6705	50	10	Japan Trench	6 356	[19]
DB6906	50	10	Japan Trench	6 269	[19]
DB172F	70	10	Izu - Binin Trench	6 499	[20]
DB172R	60	10	Izu - Binin Trench	6 499	[20]
中度嗜压菌					
DSS12	30	8	Ruykyu Trench	5 110	[19]
DSJ4	10	10	Ruykyu Trench	5 110	[21]
耐压菌					
Dsk1	0.1	10	Japan Trench	6 356	[19]
Dsk25	0.1	35	Japan Trench	6 500	[22]

调节机制奠定了基础。

5 深海微生物的开发利用

深海微生物种类繁多,是一笔宝贵的资源。但由于对深海微生物资源的研究起步较晚,而且由于条件和技术的限制,能够分离培养的种类较少,这大大限制了对深海微生物的开发利用。目前对深海微生物的开发利用基本上处于应用研究阶段,主要集中在生物活性代谢产物和新酶开发两个方面。

5.1 生物活性代谢产物

由于深海特殊的环境导致深海微生物代谢途径有可能不同于其他环境中的微生物,因此深海微生物有可能是生物活性代谢产物的重要资源。海洋苔藓动物 *Bugula neritina* 产生的抗癌药 bryostatin 已获专利^[27]。其他无脊椎动物如珊瑚、海鞘、海绵等均已被证实能产生新的有用的化学药物,有的已经进入临床试验。有越来越多的证据表明海洋细菌能合成新的有效化合物如抗生素、抗病毒、抗癌以及有其他药理活性。海洋古菌也是新的次级代谢产物的重要资源。对海洋共生菌的次级代谢产物的研究也较多。Flowers^[28] 等用密度梯度离心的方法将 *Oscillatoria spongelliae* 与其共生的海绵 *Dysidea herbacea* 分开,并且证明这种共生菌产生新的次级代谢产物 chlorodiketopiperazines。利用同样的方法,该研究小组^[29] 证明海绵 *Halichoncha* sp. 细胞不是共生菌产生的一种细胞毒素碱 haliclonacyclamine^[29]。海绵与其共生菌的分离已取得

一定的进展,但是目前绝大多数的共生菌与其寄主还无法分离培养,因而难以确定有效次级代谢产物到底是谁产生的,这极大地限制了对这些有效化合物的应用研究。无论是自由生长菌还是共生菌,其有效次级代谢产物的产量都很低。由于这些化合物结构复杂,采用化学合成往往很困难,而且成本高,因此要开发利用这些次级代谢产物,首先要分离培养生产这些次级代谢产物的菌株,确定稳定的培养方法,优化发酵工艺,从而提高次级代谢产物的产量。

5.2 酶

对海洋微生物产生的酶已有很多研究。海洋细菌和古菌产生的酶常常具有特殊的性质,特别是在极端环境下的活性和稳定性^[30,31]。从 6 500 m 深的海底沉积物中分离到的 *Sporosarcina* sp. Strain DSK25 产生的碱性丝氨酸蛋白酶活性在 60 MPa 下比在 1 个大气压提高了近 1 倍。而且升压可以提高深海细菌某些酶的产酶量^[32]。深海极端嗜热菌 *Methanococcus jannaschii* 产生的蛋白酶的最适催化温度为 116 °C, 130 °C 下仍有活性,是目前已知最耐热的蛋白酶,而且该酶活性和热稳定性随压力提高而升高。实验表明升压可以提高海洋嗜热菌的 DNA 多聚酶的稳定性^[33]。另外从深海分离到了一些细菌和酵母能够分解原油,多聚芳香环碳水化合物以及胆固醇等。

深海适冷微生物产生的适冷酶在食品、皮革加工、洗涤剂 and 生物医药等行业具有应用价值。从南极海水中分离到的 *Alteromonas haloplantis* 产生的适冷

α -淀粉酶已被详细研究^[26]。本文作者^[34]从 1 855 m 深的海底沉积物中分离的适冷菌 *Pseudomonas* sp. SM9913 产生的蛋白酶具有适冷性,最适酶活温度为 30~35 °C。这些适冷酶在食品、皮革加工、洗涤剂 and 生物医药等行业具有很好的应用前景。

6 展望

从目前的研究结果可以肯定深海具有丰富的微生物资源,但由于我们对海洋微生物的特殊营养要求和培养条件了解不多,使得能在实验室培养的种类还较少,据估计只有 5% 左右。深海微生物培养所要求的特殊条件如高压、高温或低温以及特殊的营养要求,目前世界大多数实验室难以达到,这极大地限制了对深海微生物资源的研究开发和利用。对一些深海细菌如 *Sphingomonas* sp. Strain PB2256 和 *Cycloclastiscus oliogotrophus* 的基因组全序列测定有助于了解深海细菌的各种特性,以增加深海细菌的可培养性。

人类对药物需要越来越迫切,新药的研究也越来越热。海洋微生物特别是深海微生物产生的有效次级代谢产物正成为人们开发新药的新的资源。而目前海洋微生物代谢产物被筛选的仅为 1% 左右,因此大量的海洋微生物次级代谢产物有待于人们去研究。

深海中存在着各种各样的极端菌如嗜热菌、嗜冷菌、嗜酸菌、嗜碱菌、嗜压菌、嗜盐菌等。它们是各种极端酶的产生菌,因此深海微生物是分离纯化各种极端酶的重要资源。对这些极端菌产生的极端酶进行分离纯化和性质研究,可以丰富我们所研究的酶的种类,进一步了解生物酶的结构和功能,对极端酶进行开发利用。

参考文献:

[1] Jacobs D K, Lindberg D R. Oxygen and evolutionary patterns in the sea: onshore/ offshore trends and recent recruitment of deep-sea faunas[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 9 396-9 401.

[2] Price P B. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(3): 1 247-1 251.

[3] Rex M A, Stuart C T, Coyne G. Latitudinal gradients of species richness in the deep-sea benthos of the North Atlantic[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 4 082-4 085.

[4] Reysenbach A-L, Longnecker K, Kirshtein J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth

chamber deployed at a mid-Atlantic Ridge Hydrothermal vent[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2000, 66(9): 3 798-3 806.

[5] Wirsén C O, Molyneux S J. A study of deep-sea natural microbial populations and barophilic pure cultures using a high-pressure chemostat[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1999, 65(12): 5 314-5 321.

[6] Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1998, 64(7): 2 691-2 696.

[7] Ravenschlag K, Sahn K, Amann R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments(Svalbard)[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2001, 67(1): 387-395.

[8] Schleper C, Delong E F, Preston C M, et al. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*[J]. *J Bacteri*, 1998, 180(19): 5 003-5 009.

[9] Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2000, 66(11): 5 066-5 072.

[10] Vetriani C, Jannasch H W, Macgregor B J, et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1999, 65(10): 4 375-4 384.

[11] 李越中, 陈琦. 海洋微生物资源多样性生物工程进展[J]. 1998, 18(4): 34-40.

[12] Massana R, Murray A E, Preston C M, et al. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1997, 63(1): 50-56.

[13] Takai K, Horikoshi K. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments[J]. *Genetics*, 1999, 152: 1 285-1 297.

[14] Danovaro R, Serresi M. Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediment of the eastern Mediterranean[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2000, 66(5): 1 857-1 861.

[15] Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects[J]. *Nature*, 1999, 399: 541-548.

- [16] Campbell B J, Jeanthon C, Kostka J E, *et al.* Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the *Proteobacteria* enriched from *Alvinella pompejana* and Deep – sea hydrothermal vents [J]. **Appl Envir Microbiol**, 2001, **67**(10): 4 566 – 4 572.
- [17] Bull A T, Ward A C, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift[J]. **Micro Mol Bio Rev**, 2000, **64**(3): 573 – 606.
- [18] Horikoshi K. Barophiles: deep – sea microorganisms adapted to an extreme environment[J]. **Curr Opin Microbiol**, 1998, **1**: 291 – 295.
- [19] Kato C, Sato T, Horikoshi K. Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep – sea mud samples[J]. **Biodiv Conserv**, 1995, **4**: 1 – 9.
- [20] Kato C, Masui N, Horikoshi K. Properties of obligatory barophilic bacteria isolated from a sample of deep – sea sediment from the Izu – Bonin trench[J]. **J Mar Biotechnol**, 1996, **4**: 96 – 99.
- [21] Li L, Kato C, Horikoshi K. Distribution of the pressure regulated operons in deep – sea bacteria[J]. **FEMS Micro – biol Lett**, 1998, **159**: 159 – 166.
- [22] Kato Chiaki, Inoue Akira, Horikoshi Koki. Isolating and characterizing deep – sea marine microorganisms[J]. **Tibtech**, 1996, **14**: 6 – 12.
- [23] Allen E E, Facciotti D, Bartlett D H. Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep – sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature[J]. **Appl Envir Microbiol**, 1999, **65**(4): 1 710 – 1 719.
- [24] Michels P C, Clark D S. Pressure – enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep – sea methanogen[J]. **Appl Envir Microbiol**, 1997, **63**: 3 985 – 3 991.
- [25] Kato C, Smorawska M, Sato T, *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of a pressure – regulated promoter region from a barophilic bacterium strain DB6705 [J]. **J Mar Biotechnol**, 1995, **2**: 125 – 129.
- [26] Kato C, Ikegami A, Smorawska M, *et al.* Structure of genes in a pressure – regulated operon and adjacent regions from a barotolerant bacterium strain DSS12[J]. **J Mar Biotechnol**, 1996, **5**: 210 – 218.
- [27] Davidson S K, Haygood M G. Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produced different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont “ *candidates endobugula sertula.* ” [J]. **Biol Bull**, 1999, **196**: 273 – 280.
- [28] Flowers A E, Garson M J, Webb R I, *et al.* Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyocerid sponge *Dysdea herbaacea*[J]. **Cell Tissue Res**, 1998, **292**: 597 – 607.
- [29] Garson M J, Flowers A E, Webb R I, *et al.* A sponge/ dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp. : cellular origin of cytotoxic alkaloids by Percoll density gradient fractionation[J]. **Cell Tissue Res**, 1998, **293**: 365 – 373.
- [30] Ikeuchi H, Kunugi S, Oda K. Activity and stability of a neutral protease from *Vibrio* sp. (*Vimelysin*) in a pressure – temperature gradient[J]. **Eur J Biochem**, 2000, **267**: 979 – 983.
- [31] Xu Y, Zhang Y F, Liang Z Y, *et al.* Aspartate carbanoyl – transferase from a psychrophilic deep – sea bacterium, *Vibrio* strain 2693: properties of the enzyme, genetic organization and synthesis in *Escherichia coli*[J]. **Microbiol**, 1998, **144**: 1 435 – 1 441.
- [32] Kobayashi H, Takaki Y, Kobata K, *et al.* Characterization of α – maltotetrahydrolase produced by a *Pseudomonas* sp. MS300 isolated from the deepest site of the Mariana Trench[J]. **Extremophiles**, 1998, **2**: 401 – 408.
- [33] Summit M, Scott B, Nielson K, *et al.* Pressure enhances thermal stability of DNA polymerase from three thermophilic organism[J]. **Extremophiles**, 1998, **2**: 339 – 345.
- [34] 陈秀兰, 张玉忠, 王运涛, 等. 深海适冷菌 *Pseudomonas* sp. SM9913 产生的低温蛋白酶[J]. **海洋科学**, 2000, **25** (1): 4 – 8.

(本文编辑 刘珊珊)