

海洋微生物培养新技术的研究进展

New culture approaches of marine microorganisms

张秀明, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q93.335

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)06-0099-06

海洋占地球表面的 70% 以上, 海洋微生物生活于海洋这一特殊的生境中, 演化出了许多独特的代谢能力, 能产生大量陆地微生物所不具备的天然活性物质^[1]。在过去的 20 年间, 从陆生微生物(如土壤放线菌等)中发现新型生物活性物质(如新型抗生素)的速度越来越慢, 人们越来越多地把目光集中在海洋微生物上(例如海洋放线菌、蓝细菌和黏细菌等), 希望从中发现新型生物活性分子。Pommier 等^[2]构建了世界上 9 个主要近岸海区海洋浮游微生物的 16S rDNA 克隆文库, 发现不同海区的微生物丰度和种类都存在较大的差异。要对海洋微生物的生理特性进行深入了解, 或者要了解基因组中某些基因表达产物的代谢途径, 必须对海洋微生物进行培养。然而, 目前大多数海洋微生物尚不能被培养, 其产生的天然产物就无法筛选, 极大地限制了海洋微生物的应用。在细菌域的 53 个门(按照环境 16S rDNA 序列划分)中, 只有 27 个门中含有已被培养的微生物, 而另外的 26 个门仅知道其 16S rDNA 序列。到目前为止, 仅发现 5 个门, 即放线菌门、拟杆菌门、蓝细菌门、变形菌门和厚壁菌门中的一些种类能够产生生物活性物质, 而这 5 个门中已培养和报道的种类占所有已培养和报道的细菌种类的 95%^[3]。据统计(截至 2008 年 7 月), 目前仅有约 8 500 种细菌被培养和正式报道。因此, 需要大力开发海洋微生物培养新技术, 尽可能多地培养海洋微生物。

1 大多数海洋微生物不能获得纯培养的原因

基于 16S rDNA 序列分析的研究方法显示, 海洋中的绝大多数微生物都未获得纯培养^[4]。Kogure 等^[5]用直接活菌镜检计数法(direct viable count, DVC)发现海水中 90% 以上的细菌都是活的, 但是在培养基平板上却仅有少数的细菌(0.01%~0.1%)能形成可见的菌落。大多数海洋微生物不能获得纯培养的原因可能是多方面的。

1.1 实验室的纯培养破坏了微生物细胞之间的交流

许多海洋微生物与其他海洋生物/微生物处于共生状态, 或其生长受周围其他海洋生物/微生物代谢产物以及一些其他生长因子的影响, 离开原生态环境则难以生长。如: 铁是所有微生物的一种必需元素, 而实际上海水中的铁浓度非常低($<0.4 \mu\text{mol/L}$), 并且只有极少数海洋细菌能够产生从环境中获取铁的铁载体(siderophores), 这是一种小分子量铁螯合化合物。Guan 等^[6]发现, 当向含低浓度铁(含 $0.1 \mu\text{mol/L Fe(III)}$)的培养基中加入外源的铁载体和 C8-HSL(辛酰基高丝氨酸环内酯)时, 原本在低浓度铁培养基上不能生长的海洋细菌也能形成菌落。这说明本身不能产生铁载体的海洋细菌在其他能产生铁载体的细菌存在的情况下也能从环境中获取铁, 这是微生物之间的一种共生关系。另外, 在饥饿状态下大多数微生物基因表达所涉及的 cAMP、与大多数革兰氏阴性菌的密度感应系统(quorum sensing)密切相关的酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactones, HSLs)分子等都可能是细胞之间沟通的信号分子^[6-9]。最近, 人们又发现一种光合细菌——沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)密度感应系统的信号分子是 p-coumaroyl-HSL^[10]。

实验室对海洋微生物的纯培养破坏了微生物之间的这种共生状态, 微生物之间的信息交流被阻断, 生长必需的信号分子和生长因子缺乏, 如许多海洋细菌离不开藻类分泌的生长因子和维生素^[11], 表现为不可培养。

收稿日期: 2008-10-14; 修回日期: 2009-01-10

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA09Z434)

作者简介: 张秀明(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋微生物学, E-mail: saduzxm12345@163.com; 张晓华, 通信作者, 博士, 教授, 从事海洋微生物学研究, 电话: 0532-82032767. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

1.2 培养条件与原生态环境差别太大

常规的海洋微生物培养基,其营养物质浓度远远高于微生物生长的自然环境。由于自然界中微生物数量庞大,其可利用的营养物质极其匮乏,多数处于“寡营养”状态^[12]。常规纯培养对这种认识不充分,高浓度的营养物质可能比较适合于那些生长速度快且对高浓度营养物质有抵抗能力的微生物,但是对那些生长速度较慢的微生物可能有抑制作用^[13]。对这些微生物提供营养成分丰富的培养基反而会成为阻碍其复苏的重要因素,甚至会出现底物加速死亡(Substrate accelerated death)现象。

同时,实验室培养无法完全模拟海洋环境,传统的平板培养和液体震荡培养方式与微生物的原始生活环境差距太大,所设定的生长温度也不一定是微生物最适的生长温度,所以在自然界中可以生长繁殖的微生物,在纯培养中生长条件得不到满足,从而导致了微生物的不可培养性^[14]。

1.3 氧化胁迫引起细胞损伤

当海洋中的微生物从自然环境突然转入人为环境时,一些对新环境适应能力较强或生长较快的微生物很快形成肉眼可见的菌落,这些生长快的微生物会产生大量过氧化物、自由基和超氧化物,这些物质的存在使那些适应能力较差或生长较慢的微生物细胞受到损伤,从而不能生长^[8]。

1.4 生长缓慢的微生物被忽视

海洋环境中的很多微生物都聚集生长,它们之间有共生、互生、寄生、拮抗等多种复杂的关系,当把它们从处于生态环境平衡的自然环境中突然转入人为的环境条件中培养时,原来的平衡状态可能会被破坏,适合生长的微生物由于生长速度快而占据优势地位,它们对营养成分的大量摄取使生长缓慢的微生物得不到充足的营养而生长受到限制。在培养基平板上,一个菌落中细胞的数目至少为 10^5 个才能用肉眼观察到,而那些生长速度较慢、其生长达不到高密度的细菌种类,在培养基上用肉眼是看不到菌落的^[3],从而导致这些微生物的生长不被发觉,表现为“不可培养”。

1.5 活的非可培养(viable but nonculturable state, VBNC)状态细菌的存在

细菌的 VBNC 状态,是指某些细菌处于不良环境条件下,其整个细胞常缩小成球形,用常规培养基在常规条件下培养时不能使其繁殖,但它们仍然具有代谢活性。这时细菌呈休眠状态,是细菌的一种特殊存活形式。自从徐怀恕等(1982)首次报道了细

菌的 VBNC 状态以后,这一领域的研究工作进展迅速,已陆续有大量不同细菌在不利的环境条件下能进入 VBNC 状态的研究报道。由于许多海洋细菌经常处于 VBNC 状态,而常规的高营养培养基与其原生态环境差别太大,使之难以恢复生长状态。

由于上述的种种原因,大多数海洋微生物尚未被培养。近年来,不采用培养手段,而利用分子生物学技术和手段,例如宏基因组学(Metagenomics)的方法来获取海洋不可培养微生物的基因资源已逐渐成为一大研究热点领域。

2 目前对未培养微生物的主要研究手段

在过去的 20 年间,一些分子技术如 rDNA 测序、荧光原位杂交(FISH)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)、限制性片段长度多态性(RFLP)和末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)技术,已经广泛地应用于环境微生物多样性的研究中。这些方法迅速,并容易操作,而且允许同时进行多样本分析,但是它们并不能直接说明环境中微生物的特性和功能。为了解决这个问题,又发展了可以预测环境中微生物的功能但不需要对微生物进行纯培养的方法。其中之一就是将 FISH 和微放射自显影(microautoradiography)结合起来,称为 FISH-MAR 或 MICRO-FISH。它的目的是在单细胞水平上,将具有放射性标记的底物的代谢途径与系统信息联系起来,但这种方法受到能被放射性同位素标记的底物的限制。其他技术用稳定碳同位素标记的底物,能与生长细胞中的成分结合到一起,如脂肪酸和 DNA,这些被同位素标记的成分最终被重新获取并分析。这些方法能够直接洞察环境中微生物的功能。

同时,近年来的研究也肯定了宏基因组(Metagenomics)在筛选活性物质方面的巨大潜力。宏基因组是指某一特定的环境中全部微生物的总 DNA。宏基因组技术是将样品中的总 DNA 提取出来后,用核酸内切酶进行部分消化,再与质粒、黏粒、细菌人工染色体等载体连接,转入宿主细胞,构建成宏基因组文库,再筛选新的活性物质或基因^[3]。

虽然在目前的海洋微生物培养方面,来自基因组的信息还不是一个主要的因素,但它已经被用来为生活在不同环境中的微生物的分离培养设计不同的培养策略^[15,16]。Béja 等^[17]通过对尚未培养的海洋变形杆菌的 BAC 基因文库进行研究,发现该类菌具有编码视紫红质的基因片段。视紫红质是光营养过程中不可或缺的化学物质,据此设想增加光照可

提高该菌的可培养性,而进一步的实验结果验证了该假设的正确性^[18,19]。Gomez-Consarnau 等^[20]对含有编码视紫红质基因片段的海洋细菌——黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)增加光照,也促进了该菌的生长。

但是,要获得对微生物生理学的全面了解,或者研究散落在整个基因组中的基因的代谢途径,还是需要微生物进行纯培养,因此探讨培养微生物的新技术仍然是非常有必要的。

3 近年发展的海洋微生物培养新方法

3.1 向培养基中添加微生物生长所必需的成分

在培养基中加入微生物相互作用的信号分子就可简单地模拟微生物间的相互作用,满足微生物生长繁殖的要求。Burns 等^[21]发现,如果向培养基中加入酰基高丝氨酸内酯、cAMP 或 ATP 等信号分子能促使细菌得到培养。其中与革兰氏阴性菌多种基因调控有关的 cAMP 是最有效的信号分子,10 $\mu\text{mol/L}$ cAMP 可使 10% 的微生物细胞(用显微镜直接计数法计算微生物细胞的总数)培养出来。然而,用加有 cAMP 的培养基培养出来的细菌如果不继续添加信号分子,则不能生长。Kashefi 等^[22]根据嗜高热微生物利用 Fe(III)作为终端电子受体这一高度保守的特性,在培养基中添加非常微量的 Fe(III)氧化物,能提高嗜高热微生物的可培养性。

3.2 降低培养过程中的毒害作用

为了降低培养过程中优势菌种代谢所产生的过氧化物、自由基和一些拮抗物质的毒害作用,可以在培养基中添加对这些毒性成分具有降解能力的物质,如丙酮酸钠、甜菜碱、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶等^[8]。SOD 和丙酮酸钠的代谢产物 HADH、 H^+ 可与超氧化物结合,从而降低了超氧化物对细胞的损害作用。甜菜碱(三甲氨基乙内酯)的三个甲基中有两个可以被超氧化物或自由基氧化,从而减少超氧化物或自由基对细胞的毒害^[23]。同时,充足的氧气有时也是毒性氧产生的原因之一,减少培养环境中的氧分压也可减弱毒性氧的影响^[24]。

3.3 稀释培养法

海洋微生物目前获得纯继培养的不到 1%,这是由于海洋环境中主要是寡营养微生物,而在实验室培养时,培养基的营养物浓度远远高于微生物生长的自然环境。为了克服该缺陷,Button 等^[25]从概率论的角度提出一个崭新的方法,即稀释培养法(Dilution culture)。Button 等先将海洋微生物群落计数

后再进行稀释,然后接种于灭菌海水中进行培养。培养 9 周后用流式细胞仪检测,发现微生物细胞的密度可达到 10^4 个/mL,细胞的倍增时间为一天到一周。作者用这种方法发现 60% 的海洋细菌是活的,并认为用传统的培养方法得到低存活率的主要原因是大多数海洋细菌在达到可见的混浊度之前就到达了稳定期。传统的培养方法中营养物质的添加刺激了某些微生物的生长,但是却抑制了大多数微生物的生长。Schut 等^[26]应用稀释培养法在实验室环境下也培养出了典型海洋细菌。

将常规微生物培养基进行稀释,使营养物浓度降低,也能增加可培养微生物的数量。Eilers 等^[27]用稀释的培养基培养出新的海洋浮游细菌。Janssen 等^[28]用稀释的液体培养基研究土壤中微生物的可培养性,并将培养时间延长到至少 10 周,培养出以前未被培养的新菌种,即酸杆菌门(Acidobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia)的一些新成员。

3.4 高通量培养法

Connon 等^[29]在稀释培养法的基础上提出高通量培养法(High-throughput culturing, HTC)。他们将样品密度稀释至 10^3 个/mL 后,采用 48 孔细胞培养板分离培养微生物。通过这种方法可使样品中 14% 的细胞培养出来,远远高于传统微生物培养技术所培养的微生物数量。在培养出的微生物中,有 4 种独特的种类属于以前未被培养的海洋变形菌门(Proteobacteria)进化枝,即 SAR11, OM43, SAR92 和 OM60/OM241 进化枝。Rappé 等^[30]在高通量培养法的基础上,结合 FISH 技术,在培养出的微生物中有针对性地检测出 SAR11 进化枝海洋细菌,并对其扩大培养,已得到 11 个菌株,把它们定名为“新月型菌”,这是已知最小的营自由生活的生物之一,菌体大小只有 $0.01 \mu\text{m}^3$ 。这种方法能有效地提高海洋微生物的可培养性。Cho 等^[31]采用高通量培养法从太平洋的近岸和深海中培养出 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)中的 44 株新菌。

3.5 扩散盒培养法

这种培养方法是模拟海洋微生物生长的自然环境。Kaeberlein 等^[32]设计了一种培养装置名为扩散盒(diffusion chamber)。该扩散盒由一个环状的不锈钢垫圈和两侧胶连的 $0.1 \mu\text{m}$ 滤膜组成。将海洋微生物样品加至封闭的扩散盒中,在模拟采样点环境条件的玻璃缸中进行培养。扩散盒的膜可使化学物质在盒内和环境之间进行交换,但是细胞却不能自由移动。尽管用这种方法没有培养出新的微生物种类,但是在扩散盒中培养 1 周后却得到大量形态

各异的菌落。获得的菌株在人工合成的固体培养基中不能生长,但是在其他微生物的存在下却能形成菌落。这种培养方法能较大幅度地模拟微生物所处的自然环境,由于化学物质可以自由穿过薄膜,可保证微生物群落间作用的存在,提高了微生物的可培养性。

3.6 微囊包埋法

微囊包埋法是海洋微生物的另一种高通量分离培养技术。Zengler 等^[33]将海水和土壤样品中的微生物先进行类似稀释培养法的稀释过程,然后将稀释到一定浓度的菌液与融化的琼脂糖混合,制成包埋单个微生物细胞的琼脂糖微囊,然后将微囊装入凝胶柱内,使培养液连续通过凝胶柱进行流态培养。凝胶柱进口端用 $0.1\ \mu\text{m}$ 滤膜封住,防止细菌的进入而污染凝胶柱;出口端用 $8\ \mu\text{m}$ 滤膜封住,防止微囊随培养液流出。高通量培养技术一般采用微孔板结合以流式细胞仪检测,这样就可以增加细胞检测的灵敏度,缩短低生长率细胞的培养时间。

该技术的主要优点是:(1) 尽管每个细胞被单独包埋,但是来自环境的所有被包埋的细胞都在一起培养,这在一定程度上模拟了自然环境,而且由于微囊的孔径较大,代谢产物和一些其他分子(如信号分子)可以互相交换,这些由其他微生物产生的可以扩散的分子可以增加微生物的可培养性。(2) 微囊是在一个开放的、连续补充营养的系统中,而不是在一个封闭的系统中,这也模拟了大多数自然环境的开放条件。(3) 这种培养方法不仅能够高通量的分离和培养微生物,而且能够很容易地进行下游的扩大培养。长出的微菌落可用于接种,进行扩大培养。(4) 该分离培养技术可使大量的微生物获得纯培养。经典的海洋微生物的分离培养方法是将海洋环境中的微生物混合培养后再分离单菌落,最终只能得到少数几种微生物的纯培养;该方法是将海洋环境中的单一微生物分离后再进行培养,最终使大量的微生物获得纯培养。美国 Diversa 公司利用该方法对海洋微生物进行培养,培养出一些以前未被培养的新菌种。但是由于该方法建立的时间较短,在技术上还存在一些问题,如所用的包埋基质是琼脂糖,机械强度低、透性差,而且在包埋时需加热溶解,而许多微生物对热敏感。另外,其培养条件和原生态环境仍有较大差别^[13]。

3.7 针对放线菌的培养法

众所周知,革兰氏阳性的放线菌是获取抗生素的重要来源,但以上介绍的微生物培养的各种新技术都没有专门针对分离纯化放线菌类。为了更有效

地从环境中获得更多种类的放线菌,Gavrish 等^[34]根据放线菌独特的长菌丝以及能穿透固体培养基的特性提出了一种专门筛选放线菌的新方法。Gavrish 等将两片具有半透性的膜分别上下封在中间装有灭菌琼脂的塑料容器上,下层膜的孔径是 $0.2\sim 0.6\ \mu\text{m}$,上层膜的孔径是 $0.03\ \mu\text{m}$,将装置置于土壤中,细丝状的微生物就会选择性地刺入装置并长成菌落。将下层膜的孔径减少至 $0.2\ \mu\text{m}$ 就能限制真菌菌丝的刺入生长。将该装置在室温黑暗条件下培养 $14\sim 21\ \text{d}$,再将中间的琼脂在显微镜下观察就可将长出的单菌落挑出、纯化。与常规的平板培养法相比,这种方法培养出大量细丝状的放线菌类,多样性也大大提高。最重要的是,这种培养方法使一些非常罕见的放线菌类得到了纯培养。对海洋放线菌的分离,也同样可参照该方法。

3.8 根据微生物自身特性的培养方法

海洋微生物中一些迄今未获得纯培养的进化枝具有与众不同的代谢途径,可以根据其独特的代谢途径将这些微生物培养出来。例如,Konneke 等^[35]发现海洋泉古菌门(Crenarchaeota)的古菌可以氧化铵来产生能量,从而采取了通过抗生素排除其他海洋微生物并在培养基中添加铵的培养策略,最终获得了海岸亚硝化侏儒菌(*Nitrosopumilus maritimus*) SCM-1 的纯培养,这是海洋泉古菌门 I 组(Group I Marine Crenarchaeota)的古菌第一次获得纯培养。Morris 等^[36]发现 SAR202 进化枝可以氧化卤代化合物(halogenated compounds),SAR202 属于绿屈挠菌门(Chloroflexi),生活在海洋真光层以下,迄今为止该进化枝还没有培养出海洋种类。

4 结论和展望

由于海洋微生物无论是其物种类群,还是新陈代谢途径、生理生化反应与产物等,都存在着丰富的新颖性和多样性,与陆生微生物存在较大的差异,因而蕴藏的新资源更为丰富和多样化。在过去的 100 多年里,人们从陆生微生物的代谢产物中分离纯化了大量的活性物质,仅抗生素就有几千种。但是,近年来,人们已经越来越难以从已知的微生物中分离到新物质了,越来越难以适应社会发展的需要了,而海洋中蕴藏的巨大的生物资源已经引起了人们的高度重视。虽然目前海洋中只有不到 1% 的微生物被培养出来,但可培养本身并不是细菌细胞的特性,在一定程度上微生物能否被培养取决于是否找到适宜的方法。在以上论述的各种方法中,模拟自然环境条件、维持微生物种群间的相互关系是提高海洋微

生物可培养性的关键。因此,提高海洋微生物可培养性方法的研究应该主要围绕这一方面,进行改进和发展。在发展海洋微生物培养技术的同时,应该结合分子生物学技术,使两种方法相辅相成,更好的提高微生物的可培养性。

参考文献:

- [1] Jensen P R, Williams P G, Zeigler L, *et al.* Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2007, 73: 1 146-1 152.
- [2] Pommier T, Canbäck B, Riemann L, *et al.* Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton [J]. **Mol Ecol**, 2007, 16: 867-880 .
- [3] Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity [J]. **Nature Reviews**, 2004,2: 141-150.
- [4] Rappé M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority [J]. **Annu Rev Microbiol**, 2003, 57: 369-394.
- [5] Kogure K, Simidu U, Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria [J]. **Can J Microbiol**, 1979, 25: 425-420.
- [6] Guan L L, Onuki H I, Kamino K. Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 2 797-2 803.
- [7] Guan L L, Kamino K. Bacterial response to siderophore and quorum-sensing chemical signals in the seawater microbial community [J]. **BMC Microbiology**, 2001, 1: 27.
- [8] Bruns A, Heribert C, JÉrg O. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central baltic sea [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 3 978-3 987.
- [9] Swem L R, Swem D L, Wingreen N S, *et al.* Deducing receptor signaling parameters from in vivo analysis: LuxN/AI-1 quorum sensing in *Vibrio harveyi* [J]. **Cell**, 2008,134: 461-473.
- [10] Schaefer A L, Greenberg E P, Oliver C M, *et al.* A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals [J]. **Nature**, 2008, 454: 595-599.
- [11] Atlas R M. Principles of Microbiology [M]. Boston: McGraw-Hill. 1995, 525-528.
- [12] Cavicchioli R, Ostrowski M, Fegatella F, *et al.* Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*) [J]. **Microb Eco**, 2003, 45: 203-217.
- [13] 张晓华. 海洋微生物学 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007. 332-333.
- [14] 郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施 [J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 504- 507.
- [15] Renesto P, Crapoulet N, Ogata H, *et al.* Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whippelii* [J]. **Lancet**, 2003, 362: 447-449.
- [16] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. **Nature**, 2004, 428: 37-43.
- [17] BÉjÀ O, Aravind L, Koonin E V, *et al.* Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea [J]. **Science**, 2000, 289: 1 902-1 906.
- [18] BÉjÀ O, Spudich E N, Spudich J L, *et al.* Proteorhodopsin phototrophy in the ocean [J]. **Nature**, 2001, 411: 786-789.
- [19] Schwalbach M S, Brown M, Fuhrman J A. Impact of light on marine bacterioplankton community structure [J]. **Aquat Microb Ecol**, 2005, 39: 235-245.
- [20] Gómez-Consarnau L, González J M, Goll-Liadó, M, *et al.* Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine *Flavobacteria* [J]. **Nature**, 2007, 445: 210-213.
- [21] Bruns A, Nübel U, Cypionka H, *et al.* Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69: 1 980-1 989.
- [22] Kashef I K, Holmes D E, Reysenbach A L, *et al.* Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. Nov [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68(4): 1 735-1 742.
- [23] 岳秀娟, 余利岩. 自然界中难分离培养微生物的分离和应用 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 77-81.
- [24] Stevenson B S, Eichorst S A, Wertz J T, *et al.* New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 4 748- 4 755.
- [25] Button D K, Schut F, Quang P, *et al.* Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 59: 881-891.
- [26] Schut F, de Vries E J, Gottschal J C, *et al.* Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 59: 2 150-2 161.
- [27] Eilers H, Pernthaler J, Glockner F O, *et al.* Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 3 044-3 051.

- [28] Janssen P H, Yates P S, Grinton B E, *et al.* Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 2 391-2 396.
- [29] Cannon S A, Giovannoni S J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 3 878-3 885.
- [30] Rappé M S, Cannon S A, Vergin K L, *et al.* Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade [J]. **Nature**, 2002, 418: 630-633.
- [31] Cho J C, Giovannoni S J. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gamma*proteobacteria [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 432-440.
- [32] Kaeberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment [J]. **Science**, 2002, 296: 1 127- 1 129.
- [33] Zengler K, Toledo G, Rappé M S, *et al.* Cultivating the uncultured [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2002, 26: 15 681-15 686.
- [34] Gavriš E, Bollmann A, Epstein S, *et al.* A trap for in situ cultivation of filamentous Actinobacteria [J]. **J Microbiol Methods**, 2008, 72: 257-262.
- [35] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon [J]. **Nature**, 2005, 437: 543-546.
- [36] Morris R M, Rappé M S, Urbach E, *et al.* Prevalence of the *Chloroflexi* related SAR202 bacterioplankton cluster throughout the mesopelagic zone and deep ocean [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 2 836-2 842.

(本文编辑:张培新)

《海洋科学》杂志 2009 年征订启事

《海洋科学》是由中国科学院主管、中国科学院海洋研究所主办、科学出版社出版的学术性期刊,是中国自然科学核心期刊、华东地区优秀期刊、山东省优秀期刊。本刊以密切联系生产实际、服务于我国现代化建设为宗旨,及时、快速报道海洋学及其分支学科的新成果、新理论、新观点、新工艺及新进展等,对重大科研和应用性研究成果予以优先报道。

主要刊载内容有:海洋生物、海洋水产生产、海洋活性物质提取、海洋环境保护、海洋物理、物理海洋、海洋地质、海洋化学、海洋工程、海洋仪器研制等方面的学术论文、研究报告、研究简报、专题综述、学术讨论和争鸣、学术动态以及新产品介绍(有偿刊登)等。

本刊为月刊,每月 9 日出版,大 16 开,96 页,每册定价 30 元,全年订价 360.00 元。本刊国内外公开发行(ISSN1000-3096; CN37-1151/P;国内邮发代号:2-655;国外发行代号:M6666)。全国各地邮局均可订阅。欢迎各科研机构、高等院校、生产厂家和从事该领域的科技人员踊跃订阅。邮局订阅不便者可直接向本刊编辑部订购。

《海洋科学》编辑部地址:山东省青岛市南海路 7 号 266071

电话及传真:0532-82898755

Email:MSJ@ms.qdio.ac.cn