

# 一株分离自太平洋卡罗琳深海海山水域 NX-5<sup>T</sup> 菌株的多相分类鉴定

刘 杰<sup>1</sup>, 薛文萍<sup>1</sup>, 王玉璟<sup>1</sup>, 袁嘉琳<sup>1</sup>, 王 龙<sup>1</sup>, 张德超<sup>2,3,4</sup>

(1. 青岛科技大学 海洋科学与生物工程学院生物工程系, 山东 青岛 266042; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学中心, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 黄杆菌种类多、分布广, 但从深海海山环境中发现黄杆菌新物种的报道还没有。2017年我们从西太平洋卡罗琳深海海山水域分离到一株细菌 XN-5<sup>T</sup>, 经 16S rRNA 基因序列测定表明, 该菌与黄杆菌属(*Flavobacterium*)内系统发育关系最近模式菌株 *F.degerlachei* LMG 21915<sup>T</sup>、*F.frigoris* LMG 21922<sup>T</sup> 之间的相似性分别为 97.5%和 97.8%。本研究采用形态学观察、生理生化特征、遗传特征、脂肪酸和极性脂测定等方法, 对该菌株进行了详细的多相分类鉴定。结果表明, XN-5<sup>T</sup> 菌株在 16S rRNA 基因系统发育、生长温度、淀粉、酪蛋白水解、硝酸盐还原, 产  $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 同化 L-阿拉伯糖、D-甘露醇、N-乙酰-氨基葡萄糖、葡萄糖酸钾, 发酵蔗糖、阿拉伯糖, 以及脂肪酸、极性脂组成等方面, 均与相近模式菌株有所差异。综合多相分类鉴定数据, 我们判定 XN-5<sup>T</sup> 菌株为 *Flavobacterium* 属内的一个新种, 命名为 *Flavobacterium pacifica* sp. nov.

**关键词:** 太平洋卡罗琳海山; 黄杆菌属; 多相分类

中图分类号: Q346

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2022)11-0047-08

DOI: 10.11759/hyxx20201229002

黄杆菌属(*Flavobacterium*)是拟杆菌门(Bacteroidetes)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)中的一个成员, 1923年建立以来, 先后由 Bernardet 等<sup>[1]</sup>、Dong 等<sup>[2]</sup>、Kang 等<sup>[3]</sup>和 Kuo 等<sup>[4]</sup>等人进行了校正分类和新种补充。该属细菌的特征为好氧、革兰氏阴性、杆状、不运动或滑行运动、黄色菌落; 具有甲基萘醌类、磷脂酰乙醇胺等极性脂质; DNA G+C 摩尔百分比为 30%~52%<sup>[5]</sup>。该属成员分布较广, 并已经从海洋(如海水<sup>[6-8]</sup>、海洋藻类<sup>[9-11]</sup>、海洋沉积物<sup>[12-13]</sup>)和南极<sup>[14-18]</sup>等环境中分离出来。2017年, 我们从热带西太平洋深海海山水域中分离到一株黄杆菌 XN-5<sup>T</sup>。经初步 16S rRNA 基因序列分析, 该菌与关系最近模式菌株 *Flavobacterium frigoris* 和 *Flavobacterium degerlachei* 的序列相似性分别为 97.8%和 97.5%。在此基础上, 本研究采用包括传统形态特征、生理生化表型特征、脂肪酸和极性脂等化学特征、以及全基因组信息在内的多相分类途径, 对该菌株进行了详细的种水平上的分类鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与菌株分离

样品为从热带西太平洋卡罗琳深海海山(10°48'N,

140°18'E, 水深 525 m)周围收集的海水(“科学号”科考船 2017 年海山航次)。现场取 100  $\mu$ L 海水无菌操作涂布在海水琼脂 2216E (MA, Difco)平板培养基上, 并在 20  $^{\circ}$ C 孵育 2 周; 挑取单菌落在 MA 平板上划线纯化并镜检合格, 作为后续实验菌株, 命名为 XN-5<sup>T</sup> 菌株。XN-5<sup>T</sup> 菌株可在 LB 上 20  $^{\circ}$ C 常规培养, 并保藏于-80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱中(含 10%脱脂牛奶的菌悬液)。另外, 从 CGMCC 保藏中心购买模式菌株 *Flavobacterium frigoris* CGMCC1.9174<sup>T</sup> 和 *Flavobacterium degerlachei* CGMCC 1.9173<sup>T</sup><sup>[14]</sup>作为本实验参比菌株, 其培养、保藏条件同上。

### 1.2 16S rRNA 基因系统发育

XN-5<sup>T</sup> 菌株的 DNA 提取与纯化参考 Sambrook 和 Russell<sup>[19]</sup>描述。16S rRNA 基因的 PCR 扩增、克隆和

收稿日期: 2020-12-29; 修回日期: 2021-01-24

基金项目: 国家科技部基础性资源调查项目(2017FY100804)

[Foundation: the Science & Technology Basic Resources Investigation Program of China, No. 2017FY100804]

作者简介: 刘杰(1963—), 男, 博士, 硕士生导师, 主要从事环境微生物资源、多样性与应用研究, E-mail: jieliu1301@sina.com.cn; 张德超(1978—), 通信作者, E-mail: zhangdechao@qdio.ac.cn

测序按照 Zhang 等人<sup>[20]</sup>的方案进行。采用 EzTaxon-e 数据库<sup>[21]</sup>对 16S rRNA 基因序列进行序列比对。将 XN-5<sup>T</sup> 的序列与下载的相关模式菌株序列, 使用 MEGA version 7.0 软件<sup>[22]</sup>中的 Clustal W 程序进行多序列比对, 然后用 MEGA version 7.0 的邻位连接 (NJ)<sup>[23]</sup>、最大似然 (ML) 和最大简约 (MP) 算法构建系统发育树。对于 NJ、ML 和 MP 算法通过 Kimura 双参数模型<sup>[24]</sup>计算遗传距离。最后通过基于 1 000 次重复的 Bootstrap 分析, 对 3 种方法生成的系统发育树进行评估。

### 1.3 表型特征测定

革兰氏染色检测采用试剂盒 (Bio Merieux Gramstain)。按照东秀珠等<sup>[25]</sup>方法进行硝酸盐还原、吲哚生产、柠檬酸、甲基红和 Voges-Proskauer 实验。酪蛋白、淀粉、吐温 60、吐温 80、羧甲基纤维素、海藻酸、琼脂和甲壳素的降解在 MA 固体平板上添加适当底物进行测试。用无菌海水中制备 DNAase 琼脂进行 DNA 水解试验。厌氧性生长检测采用厌氧瓶, 并在 MA 中添加 20 mmol/L 硝酸钠 (NaNO<sub>3</sub>) 和 10 mmol/L 亚硝酸钠 (NaNO<sub>2</sub>), 25 °C 孵育 7 d。

使用 API 20E、API 20NE 和 API ZYM 试剂盒 (法国 bioMérieux), 在 20 °C 条件下进行生化特性和酶活性测定。API ZYM 测试条在 20 °C 下接种 4 h 后进行分析, API 20E 和 API 20NE 测试条在 20 °C 下接种 7 d 后进行分析。另外, 对 XN-5<sup>T</sup> 菌株进行 4~50 °C 的生长温度范围测试; 同时对其进行系列梯度的耐盐性 (0~10% NaCl) 与 pH (4.0~11.0) 生长范围测试。

### 1.4 脂肪酸、呼吸醌、极性脂分析

将 XN-5<sup>T</sup> 菌株和两个参比菌株 *Flavobacterium frigidis* CGMCC1.9174<sup>T</sup> 和 *Flavobacterium degerlachei* CGMCC 1.9173<sup>T</sup> 分别在 TSA (胰蛋白胨 15.0 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000 mL) 平板上 20 °C 培养 4 d 后, 从 TSA 平板刮取菌体。脂肪酸的提取和准备工作是根据全自动细菌鉴定系统中的标准方法 (MIDI, version 6.1)<sup>[26]</sup>, 并使用数据库 TSBA40 进行脂肪酸组分识别。另外, 根据 Collins<sup>[27]</sup> 方案提取呼吸醌, 并用高效液相色谱 (HPLC) 分析; 采用甲醇-氯仿法抽提总脂, 采用 Tindall<sup>[28-29]</sup> 方法双向薄层层析分析极性脂成分。

### 1.5 全基因组分析

XN-5<sup>T</sup> 菌株的基因组测序利用北京诺华基因生物信息技术有限公司的 Illumina NovaSeq PE150 测序平台进行, 筛选每个数据集的 reads, 并使用 SOAP denovo 组装高质量的配对末端 reads。将组装好的基因组框架图序列上传到 NCBI 数据库。

使用全基因组序列, 在 GGDC 网络服务器 (<http://ggdc.dsmz.de/>) 中计算 XN-5<sup>T</sup> 与模式菌株的 DNA-DNA 杂交值 *is*DDH (*in silico* DNA-DNA hybridization), 以 70% 的相似性作为细菌物种边界的标准阈值。在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools>) 网站, 计算 XN-5<sup>T</sup> 与模式菌株的平均核苷酸一致性 (ANI), 建议菌种边界的 95% 为阈值。基因组 DNA 的 G+C 百分比从全基因组序列中测得。

## 2 结果与分析

### 2.1 16S rRNA 基因测序结果与系统发育分析

XN-5<sup>T</sup> 菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank/EMBL/DDBJ, 获得序列号为 MK956925。经序列比对后, 用 neighbour-joining (NJ) 和 maximum-likelihood (ML) 法构建系统发育进化树。

从图 1 进化树可以看到, 在 *Flavobacterium* 属内, XN-5<sup>T</sup> 菌株与 *F.degerlachei* LMG 21915<sup>T</sup>、*F.frigidis* LMG21922<sup>T</sup>、*F.sinopsychrotolerans* 0533<sup>T</sup>、*F.urumqiense* Sr25<sup>T</sup>、*F.xinjiangense* AS1.2749<sup>T</sup> 聚为一簇, 其中与 *F.degerlachei* LMG 21915<sup>T</sup>、*F.frigidis* LMG21922<sup>T</sup> 关系最近, 16S rRNA 基因序列相似性最高, 分别为 97.5% 和 97.8%。

### 2.2 表型与生理生化特征结果

在电镜 (JEM-1400, JEOL) 下观察 (图 2), XN-5<sup>T</sup> 菌株个体为短杆状、无鞭毛, 长 0.8~1.7 μm、宽 0.3~0.5 μm, 25 °C 在 PYG 培养基 (蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 葡萄糖 1 g, 琼脂 18 g) 上生长 4 d 后, 菌落呈黄色, 表面光滑, 整体凸起的圆形。

经测定, 菌株 XN-5<sup>T</sup> 为需氧型细菌, 生长不需要 Na<sup>+</sup>。在 PYG 培养基上温度生长范围是 4~30 °C, 最适生长温度是在 20~25 °C, 在 40 °C 菌株不生长。实验显示, 其耐盐范围是 0~4.5% (w/v) NaCl, 最适生长范围是 0~1% (w/v) NaCl。pH 生长范围是 6~9, 最适生长范围是 7~8。

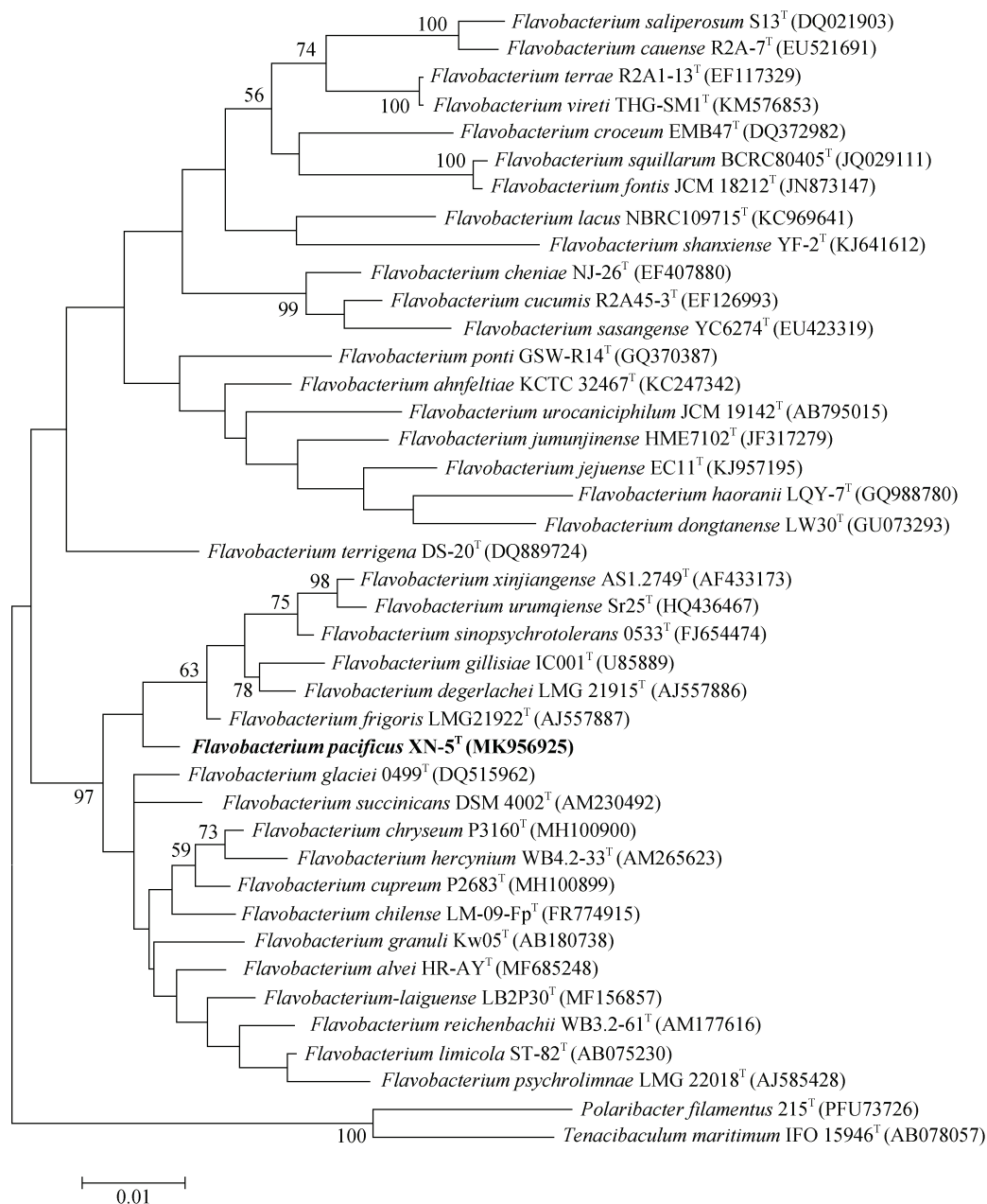


图1 XN-5<sup>T</sup>菌株基于16S rRNA基因序列的邻接法系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of strain XN-5<sup>T</sup>

经测试, XN-5<sup>T</sup>菌株为革兰氏染色阴性、过氧化氢酶阳性且氧化酶阳性。XN-5<sup>T</sup>菌株能水解七叶苷,但不能水解吐温 60、吐温 80、酪蛋白、羧甲基纤维素、几丁质、淀粉、尿素、海藻酸盐和 DNA; 硝酸还原、甲基红、3-羟基丁酮实验和吲哚产生均为阴性。

在 API ZYM 体系中, 碱性磷酸酶、酯酶(C4)、酯酶脂肪酶(C8)、亮氨酸芳基胺酶、缬氨酸芳基胺酶、酸性磷酸酶、茶酚-AS-双磷酸水解酶、N-乙酰-D-氨基葡萄糖实验阳性; 在 API 20NE 和 20E 系统中, 胱

氨酸芳基胺酶、β-半乳糖苷酶和 β-葡萄糖醛酸酶弱阳性, 同化 D-葡萄糖、D-甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖和 D-麦芽糖, 蔗糖发酵实验均为阳性; 脂肪酶(C14)、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、α-甘露糖苷酶和 α-岩藻糖苷酶检测阴性。色氨酸脱氨酶、精氨酸二水解酶、赖氨酸二水解酶、鸟氨酸二水解酶、H<sub>2</sub>S 的产生、葡萄糖酸钾、癸酸、己二酸、苹果酸、柠檬酸三钠和苯乙酸的同化、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蜜二糖和杏仁苷的发酵均为阴性。

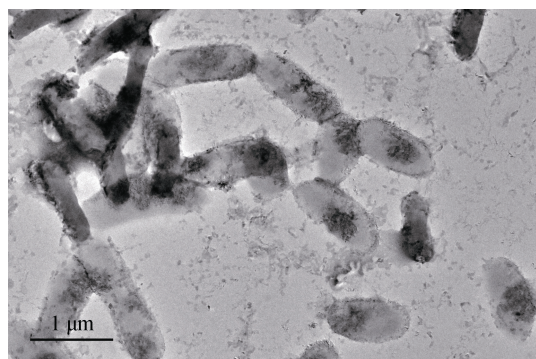


图2 XN-5<sup>T</sup> 菌体细胞的透射电镜观察(25 °C、LB 中培养)  
Fig. 2 Cells of strain XN-5<sup>T</sup> grown at 25 °C on LB as visualized by transmission electron microscopy

表 1 显示, XN-5<sup>T</sup> 菌株在生长温度、淀粉与酪蛋白水解、硝酸盐还原, 产  $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 同化 L-阿拉伯糖、D-甘露醇、N-乙酰-氨基葡萄糖、葡萄糖酸钾, 以及利用蔗糖、阿拉伯糖产酸等生理生化特征方面, 均与参比菌株 *F. degerlachei* 和 *F. frigoris* 有明显差异。

### 2.3 脂肪酸测定结果

XN-5<sup>T</sup> 菌株与参比菌株主要脂肪酸成分及摩尔百分比见表 2。

表 2 数据显示, 主要细胞脂肪酸为 iso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>15:0</sub> 和综合特征 3 (包括 C<sub>16:1 $\omega$ 7c</sub> 和/或 C<sub>16:1 $\omega$ 6c</sub>)。

表 1 XN-5<sup>T</sup> 菌株与参比菌株 *F. degerlachei* 和 *F. frigoris* 的主要差别特征

Tab. 1 Main characteristics of strain XN-5<sup>T</sup> compared to the reference strains *F. degerlachei* and *F. frigoris*

特征	XN-5 <sup>T</sup>	<i>F. degerlachei</i> CGMCC 1.9173 <sup>T</sup>	<i>F. frigoris</i> CGMCC 1.9174 <sup>T</sup>
生长在 30 °C	+	-	-
水解:			
淀粉	-	+	-
酪蛋白	-	-	+
硝酸盐还原	-	-	+
酶活性(API ZYM):			
$\alpha$ -半乳糖苷酶	+	-	-
$\alpha$ -葡萄糖苷酶	-	+	+
$\beta$ -葡萄糖苷酶	-	+	-
同化:			
L-阿拉伯糖	-	-	+
D-甘露醇	-	-	+
N-乙酰氨基葡萄糖	+	+	-
葡萄糖酸钾	-	-	+
产酸:			
蔗糖	+	-	-
阿拉伯糖	-	+	-

注: +反应阳性, -反应阴性

### 2.4 极性脂和醌类测试结果

图 3 显示的是菌株 XN-5<sup>T</sup> 与 2 个参比菌株的极性脂双向薄层层析图。从图中可以看出, XN-5<sup>T</sup> 菌株的极性脂主要包含磷脂酰乙醇胺(PE), 3 个未知的氨基脂(AL1-3), 1 种不确定的糖脂(GL)和 4 种未知的极性脂(L1-4)。

另外, 经测定菌株 XN-5<sup>T</sup> 的醌主要由甲基萘醌 MK-6 组成。

### 2.5 全基因组测试结果

XN-5<sup>T</sup> 菌株的基因组测试结果表明(DDBJ/ENA/GenBank 登录号为 VOGZ00000000), 其 DNA G+C 百分比为 34.5%。其与系统发育关系最近的两个模式菌株 *F. frigoris* CGMCC 1.9174<sup>T</sup> 和 *F. degerlachei* CGMCC 1.9173<sup>T</sup> 的平均核苷酸一致性(ANI)分别是 83.35% 和 78.77%, 远低于细菌物种边界建议的 95% 阈值(Yoon<sup>[30]</sup>); 另外, XN-5<sup>T</sup> 菌株与上述两个模式菌株



表 2 XN-5<sup>T</sup> 与参比菌株 *F. degerlachei* 和 *F. frigoris* 的脂肪酸组分与摩尔百分比比较

Tab. 2 Cellular fatty acid compositions of strain XN-5<sup>T</sup> and reference strains *F. degerlachei* 和 *F. frigoris*

脂肪酸	XN-5 <sup>T</sup>	<i>F. degerlachei</i> CGMCC 1.9173 <sup>T</sup>	<i>F. frigoris</i> CGMCC 1.9174 <sup>T</sup>
<b>饱和性</b>			
C <sub>14:0</sub>	Tr	1.3	1.1
C <sub>16:0</sub>	1.0	3.8	2.6
<b>羟基化</b>			
iso-C <sub>12:0</sub> 3-OH	Tr	Tr	Tr
iso-C <sub>14:0</sub> 3-OH	Tr	ND	ND
iso-C <sub>15:0</sub> 3-OH	9.3	3.7	5.1
C <sub>15:0</sub> 2-OH	1.4	1.0	1.0
C <sub>15:0</sub> 3-OH	ND	1.7	1.8
iso-C <sub>16:0</sub> 3-OH	4.0	2.6	3.5
C <sub>16:0</sub> 2-OH	Tr	Tr	Tr
C <sub>16:0</sub> 3-OH	1.7	5.0	2.4
iso-C <sub>17:0</sub> 3-OH	8.7	3.8	3.6
C <sub>17:0</sub> 2-OH	1.6	1.5	1.4
C <sub>17:0</sub> 3-OH	Tr	Tr	Tr
<b>分支</b>			
anteiso-C <sub>13:0</sub>	Tr	Tr	Tr
iso-C <sub>15:0</sub>	14.5	7.0	14.2
anteiso-C <sub>15:0</sub>	12.4	17.1	25.0
iso-C <sub>16:0</sub>	Tr	1.2	1.5
iso-C <sub>17:0</sub>	Tr	0.2	0.3
anteiso-C <sub>17:0</sub>	Tr	Tr	Tr
<b>不饱和性</b>			
C <sub>14:1</sub> ω5c	Tr	Tr	Tr
C <sub>15:1</sub> ω6c	6.3	3.2	8.9
iso-C <sub>15:1</sub> G	3.7	2.8	3.6
iso-C <sub>16:1</sub> H	1.5	Tr	Tr
C <sub>17:1</sub> ω8c	1.6	Tr	Tr
C <sub>17:1</sub> ω6c	3.4	3.3	1.7
anteiso-C <sub>17:1</sub> ω9c	5.1	ND	ND
C <sub>18:1</sub> ω9c	Tr	Tr	Tr
<b>综合特征</b>			
2	Tr	1.1	Tr
3	12.1	30.3	14.6
9	4.8	1.3	1.5

注: 所有菌株中脂肪酸总量小于 1% 的脂肪酸没有显示出来。Tr, 痕迹(<1%); ND, 没有检测到。综合特征是两种或三种脂肪酸, 在 MIDI 系统中不能被 GLC 分离。综合特征 2 包含 iso-C<sub>16:1</sub> 和/或 C<sub>14:0</sub> 3-OH; 综合特征 3 包含 C<sub>16:1</sub>ω7c 和/或 C<sub>16:1</sub>ω6c; 综合特征 9 包含 iso-C<sub>17:1</sub>ω9c 和/或 C<sub>16:0</sub> 10-methyl。

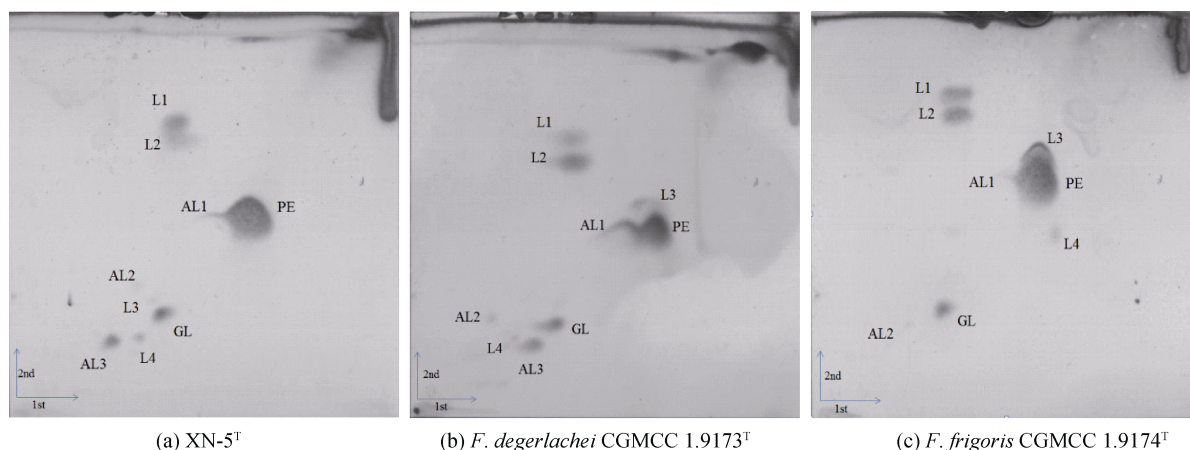


图3 XN-5<sup>T</sup>与参比菌株的极性脂双向薄层层析图

Fig. 3 Two-dimensional TLC of polar lipids from strain XN-5<sup>T</sup> and the two reference strains

注: PE, 磷脂酰乙醇胺; AL1-3, 氨基脂; GL, 未识别的糖脂; L1-4, 未识别的极性脂

的 DNA-DNA 杂交值 isDDH 分别是 30.80% 和 22.40%, 也远低于细菌物种边界的建议 70% 阈值 (Meier-Kolthoff<sup>[31]</sup>)。

### 3 讨论

黄杆菌种类比较多, 分布比较广。除一般陆地环境外, 目前已从海洋和南极等极端环境中分离出来, 但从深海海山环境中发现黄杆菌新物种的报道还没有。

此次我们针对从西太平洋卡罗琳深海海山水域分离到的 XN-5<sup>T</sup> 菌株, 与黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 内系统发育关系最近的模式菌株 *F. degerlachei* LMG 21915<sup>T</sup>、*F. frigidis* LMG 21922<sup>T</sup> 之间的相似性分别为 97.5% 和 97.8%。该菌为革兰氏染色阴性、氧化阳性、过氧化阳性、无鞭毛的短杆菌; 其菌落呈黄色、光滑、凸起、周边圆形; 该菌可在含 0~4.5% (w/v) NaCl 的培养基中生长 (最适 0~1%), 生长温度为 4~30 °C (最适为 20~25 °C), 生长 pH 为 6.0~9.0 (最适为 pH 7.0~8.0); 其主要细胞脂肪酸为 iso-C<sub>15:0</sub>、anteiso-C<sub>15:0</sub>、C<sub>16:1ω7c</sub> 和/或 C<sub>16:1ω6c</sub>, 极性脂主要有磷脂酰乙醇胺、3 种未知氨基脂和一种不确定的糖脂。醌类主要组成是甲基萘醌 MK-6, 该菌株 DNA 的 G+C 摩尔百分比 34.5%, 与 *F. frigidis* CGMCC 1.9174<sup>T</sup> 和 *F. degerlachei* CGMCC 1.9173<sup>T</sup> 的 ANI 和 isDDH 也都远低于建议的细菌物种边界阈值。

### 4 结论

根据以上多相分类测试数据及分析, 这株分离

自西太平洋卡罗琳深海海山水的 XN-5<sup>T</sup> 菌株为黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 内的一个新种, 并命名为 *Flavobacterium pacifica* sp. nov.。现该菌株已保藏于中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC 1.17114<sup>T</sup>) 和韩国典型菌种保藏中心 (KCTC 72435<sup>T</sup>) 菌种保藏中心。

#### 参考文献:

- [1] BERNARDET J F, SEGERS P, VANCANNEYT M, et al. Cutting a Gordian Knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. Nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978)[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46: 128-148.
- [2] DONG K, CHEN F, DU Y, et al. *Flavobacterium ensiense* sp. nov., isolated from soil, and emended descriptions of the genus *Flavobacterium* and *Flavobacterium cauense*, *Flavobacterium saliperosum* and *Flavobacterium suncheonense*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63: 886-892.
- [3] KANG J Y, CHUN J, JAHNG K Y. *Flavobacterium aciduliphilum* sp. nov., isolated from freshwater, and emended description of the genus *Flavobacterium*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63: 1633-1638.
- [4] KUO I, SAW J, KAPAN D D, et al. *Flavobacterium akiainvivens* sp. nov., from decaying wood of *Wikstroemia oahuensis*, Hawai'i, and emended description of the genus *Flavobacterium*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63: 3280-3286.
- [5] BERNARDET J F, BOWMAN J P, BERGEY G H, et al.

- Genus I. *Flavobacterium*(1923) In Whitman W. (editor) Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 2011.
- [6] LI D D, LIU C, ZHANG Y Q, et al. *Flavobacterium arcticum* sp. nov., isolated from Arctic seawater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 67: 1070-1074.
- [7] NUPUR B V, SRINIVAS T N, KUMAR P A, *Flavobacterium nitratireducens* sp. nov., an amyolytic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from coastal surface seawater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63: 2490-2496.
- [8] YOON J H, PARK S, KANG S J, et al, *Flavobacterium ponti* sp. nov., isolated from seawater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 81-85.
- [9] MIYASHITA M, FUJIMURA S, NAKAGAWA Y, et al. *Flavobacterium algicola* sp. nov., isolated from marine algae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60: 344-348.
- [10] NEDASHKOVSKAYA O I, BALABANOVA L A, ZHUKOVA N V, et al. *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov., a new marine polysaccharide-degrading bacterium isolated from a Pacific red alga[J]. Archives of Microbiology, 2014, 196(10): 745-752.
- [11] PARK S H, KIM J Y, KIM Y J, et al. *Flavobacterium jejuensis* sp. nov., isolated from marine brown alga *Ecklonia cava*[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53: 756-761.
- [12] KAUR I, KAUR C, KHAN F, et al. *Flavobacterium rakeshii* sp. nov., isolated from marine sediment, and emended description of *Flavobacterium beibuense*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 2897-2902.
- [13] BAE S S, KIM M R, JUNG Y, et al. *Flavobacterium sediminis* sp. nov., a starch-degrading bacterium isolated from tidal flat sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68: 3886-3891.
- [14] VAN Y S, VANDECANDELAERE I, MERGAERT J, et al. *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov. and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 85-92.
- [15] YI H, OH H M, LEE J H, et al. *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 637-641.
- [16] YI H, CHUN J. *Flavobacterium weaverense* sp. nov. and *Flavobacterium segetis* sp. nov., novel psychrophiles isolated from the Antarctic[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1239-1244.
- [17] REN Q, YU M, LI Y, et al. *Flavobacterium ovatum* sp. nov., a marine bacterium isolated from an Antarctic intertidal sandy beach[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68: 795-800.
- [18] KRALOVE S, SVEC P, BUSSE H J, et al. *Flavobacterium chryseum* sp. nov. and *Flavobacterium psychroterrae* sp. nov., novel environmental bacteria isolated from Antarctica[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68: 3132-3139.
- [19] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring member of the family Oxalobacteraceae isolated from alpine glacier cryocoonite[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 2186-2190.
- [20] ZHANG D C, SCHINNER F, MARGESIN R. *Pedobacter bauzanensis* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60: 2592-2595.
- [21] KIM O S, CHO Y J, LEE K, et al. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 716-721.
- [22] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [23] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [24] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120.
- [25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.  
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Manual for identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [26] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.  
XU Lihua, LI Wenjun, LIU Zhiheng, et al. Systematics of actinomycetes[M]. Beijing: Science Press, 2007.

- [27] COLLINS M D. Distribution of menaquinones in Actinomycetes and Corynebacteria[J]. *Journal of General Microbiology*, 1977, 100(2): 221-230.
- [28] TINDALL B J. Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 66: 199-202.
- [29] TINDALL B J. A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1990, 13: 128-130.
- [30] YOON S H, HA S M, KWON S, et al. Introducing Ez-Bio Cloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67: 1613-1617.
- [31] MEIER K. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60-74.

## Polyphasic taxonomy of strain NX-5<sup>T</sup> isolated from the Caroline Seamount waters in the Pacific Ocean

LIU Jie<sup>1</sup>, XUE Wen-ping<sup>1</sup>, WANG Yu-jing<sup>1</sup>, YUAN Jia-lin<sup>1</sup>, WANG Long<sup>1</sup>, ZHANG De-chao<sup>2, 3, 4</sup>

(1. Department of Bioengineering, College of Marine Sciences and Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Received:** Dec. 29, 2020

**Key words:** Caroline Seamounts in the Pacific Ocean; *Flavobacterium*; polyphasic taxonomy

**Abstract:** *Flavobacterium* spp. are abundant with a wide distribution. However, new species of *Flavobacterium* have not been reported from the deep-sea seamount environment. In 2017, we isolated bacterial strain XN-5<sup>T</sup> from the Caroline Seamount waters of the Western Pacific Ocean. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequencing showed that strain XN-5<sup>T</sup> had the highest 16S rRNA gene sequence similarities with the type strains of *F. frigoris* LMG 21922<sup>T</sup> (97.8%) and *F. degerlachei* LMG 21915<sup>T</sup> (97.5%). In this study, we carried out polyphasic taxonomy of strain XN-5<sup>T</sup>, including morphological observations, physiological and biochemical characteristics, genetic characteristics, fatty acids, and polar lipids. The results showed that strain XN-5<sup>T</sup> differed in many characteristics from the reference strains, including phylogeny of the 16S rRNA gene, growing temperature, hydrolysis of starch and casein, the nitrate reduction reaction,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, assimilation of L-arabinose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine and potassium gluconate, fermentation of sucrose and arabinose, and polar lipid and fatty acid composition. Based on the polyphasic taxonomy data, we determined that strain XN-5<sup>T</sup> is a new species of *Flavobacterium* that we called *Flavobacterium pacifica* sp. nov.

(本文编辑: 杨 悦)