

会仙湿地底泥可培养微生物*

阮楚晋¹, 潘丽霏¹, 刘洁¹, 刘祎¹, 肖咪云¹, 陆祖军^{1,2,3}

- (1. 广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541004;
2. 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541004;
3. 广西高校野生动植物生态学重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘要: 利用平板涂布法分离会仙湿地底泥可培养原核微生物, 共获得 65 个分离株, 基于细菌 16S rRNA 基因序列的相似性和系统聚类分析显示, 它们分属 4 个门, 12 个属, 24 个种, 包括厚壁菌门的芽孢杆菌属 *Bacillus*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、*Fictibacillus* 属、*Lysinibacillus* 属和肠球菌属 *Enterococcus*; 放线菌门的链霉菌属 *Streptomyces* 和红球菌属 *Rhodococcus*; 变形菌门的假单胞菌属 *Pseudomonas*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、泛菌属 *Pantoea*、代尔夫特菌属 *Delftia* 以及拟杆菌门的金黄杆菌属 *Chryseobacterium*。分离株中芽孢杆菌属的菌株占 53.85%, 为优势菌群, 其在有机物含量高的条件下会大量繁殖, 与湿地富营养化特征相吻合; 分离的微生物中含 10 株 4 种条件致病性菌, 占分离株的 15.38%, 有机耐菌株 30 株 12 种, 占 46.15%, 表明该生态环境已被人为活动严重影响。此外, 还分离获得对农药五氯硝基苯 (PCNB) 耐受性在 300 mg/L 以上的菌株 1 株, 它们的出现与当地农药与化肥的滥用有着直接关系。

关键词: 会仙湿地; 可培养细菌; 多样性; 富营养化; 耐药性

中图分类号: Q93 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2018) 01-0021-08

Cultured bacteria from the sediment in the Huixian wetland

RUAN Chujin¹, PAN Lifei¹, LIU Jie¹, LIU Yi¹, XIAO Miyun¹, LU Zujun^{1,2,3}

- (1. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;
2. Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection (Guangxi Normal University), Ministry of Education, Guilin 541004, China;
3. Key Ecological Laboratory of Wild Animal and Plant Species of Guangxi Colleges and Universities, Guilin 541004, China)

Abstract: Culturable bacteria in the sediment of Huixian wetland were isolated by dilution plate coating method and analyzed with 16S rRNA gene sequences. The results showed that total 65 isolates, subordinate to 4 phylums, 12 genera, 24 species, were obtained. These strains belonged to five genera (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus* and *Enterococcus*) in Firmicutes, two genera (*Streptomyces* and *Rhodococcus*) in Actinobacteria, four genera (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea* and *Delftia*) in Proteobacteria and one genus (*Chryseobacterium*) in Bacteroidetes. The predominant microflora is *Bacillus* sp. strains, occupying 53.85% of the all the isolates, which conforms to the fact that Huixian wetlands are becoming eutrophic. Totally four kinds of conditional pathogenic bacteria are detected,

* 收稿日期: 2017-04-28

基金项目: 广西科技开发项目 (14124004-3-8); 广西自然科学基金面上项目 (2013GXNSFAA019059)

作者简介: 阮楚晋 (1993 年生), 男; 研究方向: 微生物学; E-mail: Chujin_Ruan@aliyun.com

通信作者: 陆祖军 (1963 年生), 男; 研究方向: 微生物学; E-mail: luzujun2002@aliyun.com

accounting 15.38% of the isolate, indicating that the ecological environment has been negatively affected by the human activity. There is another one bacteria strain tolerant to PCNB in 300 mg/L or more, and 30 isolates from 12 Genus have arsenic tolerance. This appearance might have direct relationship with local pesticide and fertilizer abuse.

Key words: Huixian wetland; culturable bacteria; diversity; eutrophication; drug resistance

湿地具保持水源、净化水质、蓄洪抗旱、维护生物多样性等重要的环境调节功能和生态效益,也蕴含丰富的微生物资源^[1]。广西会仙湿地是中国最大的岩溶湿地之一,其地貌独特,是广西热带、亚热带岩溶峰林地貌最大、最有研究价值的典型湿地。由于人类活动的增加,农药的滥用和生活污水的随意排放,导致该湿地富营养化和污染加剧^[2-3]。蓝运华、江绍峰等^[4-5]研究表明农药百草枯质量分数高于 120 $\mu\text{g/g}$ 抑制会仙湿地底泥微生物代谢活性,并通过测定在百草枯作用下 22 $^{\circ}\text{C}$ 时会仙湿地微生物生长周期各个阶段的代谢热发现出现 2 个产热指数期,表明同一群落微生物改变了体内一些重要酶的转录和表达。余丽娟等^[6]研究该湿地的细菌菌落总数、大肠菌群数和粪大肠菌群数的季节变化动态,表明夏季较其他三季相比在以上 3 个方面均有明显增长趋势。但尚未见对该湿地底泥微生物多样性的报导,而揭示该湿地的微生物多样性特征,对其生态修复有重要的指导意义。本论文采用传统纯培养的方法分离获得了会仙湿地底泥样品中的微生物,测定和分析分离菌株的 16S rRNA 基因序列,初步揭示该湿地底泥中的可培养微生物的群落组成特点和它们的重金属抗性,结合该底泥样品中高质量浓度五氯硝基苯耐药性菌株的分离分析,探讨它们对环境污染状态的指示意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 2015 年 10 月利用底泥采样器按《湖泊富营养化调查规范》^[7]进行采集样品,采集点为会仙湿地睦洞湖泊(110 $^{\circ}\text{E}$ 25 $^{\circ}\text{N}$)东南西北四个角离岸 2 m 处及中央位置 5 个区域中水流速度缓慢的沟渠底泥各 5 份,每份质量约 500 g,剔除杂物和 2 mm 以上的沙砾,以四分法将 5 份样品等量缩为一份质量 500 g 的土样^[8]。采样过程中用无菌手套取出样品并去除样品外围可能污染的部分,放至无菌袋中。当日运回实验室后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.1.2 培养基 LB 培养基: 5 g/L Tryptone、2.5 g/L Yeast extract、5 g/L NaCl、12 g/L Agar; 高氏

一号培养基: 20 g/L 可溶性淀粉、1 g/L KNO_3 、0.5 g/L NaCl、0.5 g/L K_2HPO_4 、0.5 g/L MgSO_4 、0.01 g/L FeSO_4 、12 g/L Agar。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离 菌株的分离主要参照苏进进^[9]的相关方法进行,以无菌磷酸盐缓冲生理盐水(8.0 g/L NaCl、0.2 g/L KCl、1.15 g/L Na_2HPO_4 、0.2 g/L KH_2PO_4 , pH 7.3)悬浮 2 g 湿泥,28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 振荡 40 min, 10^{-1} 和 10^{-2} 梯度稀释后取 50 μL 涂布固体培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 ~ 5 d 后,根据涂布后肉眼观察平板菌落表面形态、菌落边缘形态、菌落隆起形态、透明度等菌落特征,尽可能挑选有差异的菌落于 LB 和高氏一号培养基中扩繁,平板划线法纯化获得纯菌。

1.2.2 菌株 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增 菌株 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增参照 TANG Y W 等^[10]的实验方法。取 0.5 mL 纯菌液至 1.5 mL 离心管中,沸水水煮 15 min 后液氮速冻,重复 3 次。悬浮液 12 000 r/min 离心 5 min,取 1 μL 上清液作为模板;以 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') 为引物进行 16S rRNA 基因的扩增;PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; PCR 产物经 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳检测,回收和纯化 1 500 bp 的 DNA 片段,送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.3 菌株 16S rRNA 基因序列分析 将得到的 16S rRNA 基因序列用 DNAMAN 软件进行排序并获得相似性矩阵,相似性 $\geq 97\%$ 的序列被认为来自相同分类单元 (OTU, operational taxonomic unit)^[11],用其中一个序列和菌株作为代表提交 GenBank 数据库并获得该数据库的收录号 (MF289499 ~ MF289521),将每一个序列进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 相似性比对,根据比对结果选取参照序列,用 Clustal X1.83 进行排序, mega 5.0^[12] 软件基于 NJ 法构建会仙湿地分离菌株的系统发育树。

1.2.4 有机砷耐受性检测 在所分离菌株的培养

基中加入 100、200、500 mg/L 对氨基苯胂酸, 验证菌株对有机砷耐受度。

1.2.5 耐 PCNB 菌种的富集、驯化 用 9 mL 丙酮溶解 0.01 g PCNB, 滴加 1 mL 吐温作为增溶剂, 配成 PCNB 质量浓度为 1 g/L 的母液, 再量取 PCNB 母液加入到 100 mL 液体 LB 培养基中, 使得培养液中五氯硝基苯的质量浓度为 10 mg/L, 取底泥样品 10 g 接入到含有 PCNB 的液体 LB 培养基的三角瓶中, 30 °C 震荡培养一周后取 1 mL 菌液接种到新的培养基中, 7 d 为一个转接周期, 按 10、20、50、100、200 mg/L 梯度依次提高培养液中五氯硝基苯的含量, 经过一定时间的富集培养之后从液体培养基中取样涂布在含 PCNB 质量浓度为 300 mg/L 的固体 LB 培养基平板内, 挑取单菌落进行多次划线纯化菌株。

1.2.6 PCNB 含量检测 丙酮-石油醚萃取, 磺化法处理, 气相色谱法测定。进样口温度为 250 °C, 色谱-质谱接口温度为 280 °C, 离子源温度为 250 °C, 四极杆温度 150 °C; 色谱升温程序: 初始温度 80 °C, 保持 1 min, 以 30 °C/min 的速率升至 210 °C, 保持 10 min; 载气为氦气, 流量为 1.0 mL/min, 不分流进样, 进样量为 1 μL。

2 结果和讨论

2.1 分离菌株多样性分析

分离共获得 65 株细菌纯培养物, 分属于 24 个不同的 OTUs。对这些菌株的 16S rRNA 基因序列的相似性分析结果 (表 1) 表明, 它们与已知菌株相似性均大于 97%, 其中 43 株菌的 16S rRNA 基因序列与厚壁菌门 Firmicutes 的芽孢杆菌属 *Bacillus*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、*Fictibacillus* 属、*Lysinibacillus* 属和肠球菌属 *Enterococcus* 中的菌株最相似, 相似性 97.29% ~ 100%; 10 株与放线菌门 Actinobacteria 的链霉菌属 *Streptomyces*、红球菌属 *Rhodococcus* 中的菌株最相似, 相似性 99.03% ~ 100%; 7 株与变形菌门 Proteobacteria 假单胞菌属 *Pseudomonas*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、泛菌属 *Pantoea*、代尔夫特菌属 *Delftia* 的菌株最相似, 相似性 98.87% ~ 100%; 5 株与拟杆菌门 Bacteroidetes 的金黄杆菌属 *Chryseobacterium* 最相似, 它们的相似性均为 99.48%。

基于 16S rRNA 基因的系统聚类分析表明, 会

仙湿地底泥中可培养微生物中最优势的细菌为芽孢杆菌 *Bacillus* (35 株, 占 53.85%), 其次是链霉菌 *Streptomyces* (7 株, 占 10.77%) 和金黄杆菌 *Chryseobacterium* (5 株, 占 7.69%), 它们占有分离株的 72.31%。

实验结果显示厚壁菌门主要是芽孢杆菌 *Bacillus* 占会仙湿地可培养原核微生物分离株的 53.85%, 已有的研究表明, 大部分芽孢杆菌在有机物含量高的条件下会大量繁殖^[13]; 菌株 LB D14 的 16S rRNA 基因与 *Fictibacillus phosphorivorans* Ca7T^T (JX258924) 的相似性为 99.86%, 后者最先从富含磷元素的样品中分离出, 具有嗜酸除磷的特性^[14]; 菌株 GS D8 的 16S rRNA 基因与 *Delftia lacustris* DSM21246^T (EU888308) 的相似性为 99.93%, 后者为肽聚糖降解菌, 从富营养化的环境中分离出^[15]; 采样时我们也观察到的水面疯长水葫芦, 由此推测, 会仙湿地水体富营养化, 与之前蓝运华^[2]等报道相一致。值得注意的是, 可培养的细菌中不少种类与条件致病菌的 16S rRNA 基因具有较高的相似性, 如菌株 LB A9 与 *Bacillus anthracis* ATCC 14578^T (AB190217) 的相似性为 99.85%, 后者可引起吸入性炭疽热^[16]; 菌株 LB D3 与 *Bacillus cereus* ATCC14579^T (AE016877) 的相似性 100.00%, 后者可引起腹泻或呕吐的食物中毒症状^[17]; 菌株 GS A2 与 *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC434^T (JALV01000036) 的相似性为 100%, 后者也可能引起血流感染^[18]; 菌株 ZYE A18 与能引起败血症的 *Pantoea brenneri* LMG5343^T (EU216735)^[19] 的相似性为 100.00%, 而在已有的其它湿地底泥细菌多样性的文献报道中鲜有此类条件致病菌的报道, 提示人为活动已经严重的影响了会仙湿地的原生态环境。另外, 从该湿地底泥中也分离出一些具有特殊性能的细菌, 如与菌株 GS 39 16S rRNA 基因相似性最高的 *Streptomyces harbiniensis* NEAU-Da3^T (相似性 99.78%) 为具抗肿瘤活性的好氧菌, 并能分解尿素^[20]; 与菌株 ZYE C14 相似性最高的 *Rhodococcus aetherivorans* 10bc312^T (AF447391) (相似性为 99.03%) 是甲基叔丁基醚降解菌^[21]; 菌株 Cu2 (与 *Delftia tsuruhatensis* T7^T (AB075017) 的同源性为 98.87%) 能对聚苯二甲酸乙二醇酯进行同化^[22], 这些菌出现与当地农药化肥的滥用有着直接的关系。

表 1 会仙湿地底泥分离的可培养细菌 16s rRNA 基因序列相似性比较结果
Table 1 Homologous comparison results based on the comparison of the 16S rRNA sequences of bacteria isolated from the sediment of Huixian wetland

Phylum	Genus	No. of isolates	Cloest type strain (accession number)	Number	Identities/%	
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	LB B10	<i>Bacillus indicus</i> LMG 22858T (JGVU01000003)	10	99.49	
		LB A9	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578T (AB190217)	5	99.85	
		LB D8	<i>Bacillus koreensis</i> BR 030T (AY667496)	1	99.93	
		LB D11	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11T (AF483624)	2	99.86	
		LB D3	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579T (AE016877)	3	100.00	
		LB B21	<i>Bacillus safensis</i> FO-36bT (ASJD01000027)	2	99.24	
		ZYE C12	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W 22T (EF114313)	3	98.60	
		ZYE C16	<i>Bacillus indicus</i> LMG 22858T (JGVU01000003)	1	97.29	
		LB A5	<i>Bacillus manliponensis</i> BLA-6T (FJ416490)	6	100.00	
		ZYE C7	<i>Bacillus drentensis</i> LMG 21831T (AJ542506)	1	99.93	
		LB D13	<i>Paenibacillus barcinonensis</i> BP-23T (AJ716019)	1	98.28	
		LB 311	<i>Paenibacillus agaridevorans</i> DSM1355T (AJ345023)	2	99.07	
		LB D14	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i> Ca7TT (JX258924)	4	99.86	
		Firmicutes	<i>Lysinibacillus</i>	LB B19	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> KCTC 3346T (AUOZ01000024)	1
W2	<i>Enterococcus faecium</i> CGMCC 1.2136T AJKH01000109			1	100.00	
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>			GS 39	<i>Streptomyces harbinensis</i> NEAU-Da3T (JQ750974)	3
		GS 28	<i>Streptomyces spongiae</i> Sp080513SC-24T (AB498741)	4	100.00	
Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i>	ZYE C14	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> 10bc312T (AF447391)	3	99.03	
		GS D8	<i>Delftia lacustris</i> DSM21246T (EU888308)	2	99.93	
	Cu2	<i>Delftia tsuruhatensis</i> T7T (AB075017)	1	98.87		
	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	LB B9	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP105259T (AF072688)	2	99.93
			GS A2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MTCC434T (JALV01000036)	1	100.00
	Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	ZYE A18	<i>Pantoea brenneri</i> LMG5343T (EU216735)	1	100.00
Bacteroidetes			<i>Chryseobacterium</i>	LB C12	<i>Chryseobacterium gambrii</i> 5-1St1aT (AM232810)	5

2.2 有机砷耐受性分析

在 24 个属的 65 个分离株中, 有 12 个属 30 株菌耐受对氨基苯砷酸, 其耐受性均在 100 mg/L 及以上 (表 2)。在 *Bacillus* 中, 具有耐受性的菌株占该属分离株总数的 29.41%。对氨基苯砷酸属于芳香族氨基化合物, 具有抗菌、抑菌的特点^[23], 是一种全合成抗菌剂, 常被添加到饲料中, 用于医治家禽细菌感染。会仙湿地有机砷耐受菌的出现从某种程度上说明会仙湿地环境正受到的污染, 也说明了人类活动对湿地生态环境的影响。由结果可见, 有机砷抗性具有菌株特异性。已有的有机砷抗性菌隶属 8 个属, 分别是芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、*Fictibacillus* 属、*Lysinibacillus* 属、红球菌属、泛菌属、代尔夫特菌属、金黄杆菌属, 这些属中只有部分菌株表现抗性, 且耐收质量浓度在不同菌株中存

在一定差异。目前有报道芽孢杆菌能够对砷进行生物积累^[24], 这些耐受菌株的分离, 可能在日后用于湿地生态修复和环境污染治理中。

2.3 耐 PCNB 菌种分离

分离出一株对 PCNB 具有强耐受性的菌株 W2, 耐受质量浓度 300 mg/L 以上 PCNB, 经 16S 序列比对, 其与屎肠球菌属 *Enterococcus faecium* CGMCC1.2136^T (AJKH01000109) 菌株的相似度为 100%。用全扫描质谱方式对含 PCNB 培养基中的菌株代谢产物进行了检测, 结果如图 2、图 3 所示。根据气相色谱-质谱仪对样品检测的结果与质谱谱图数据库进行数据分析, 最高的色谱峰与五氯硝基苯的匹配度为 99.99%, 其对五氯硝基苯无降解作用。

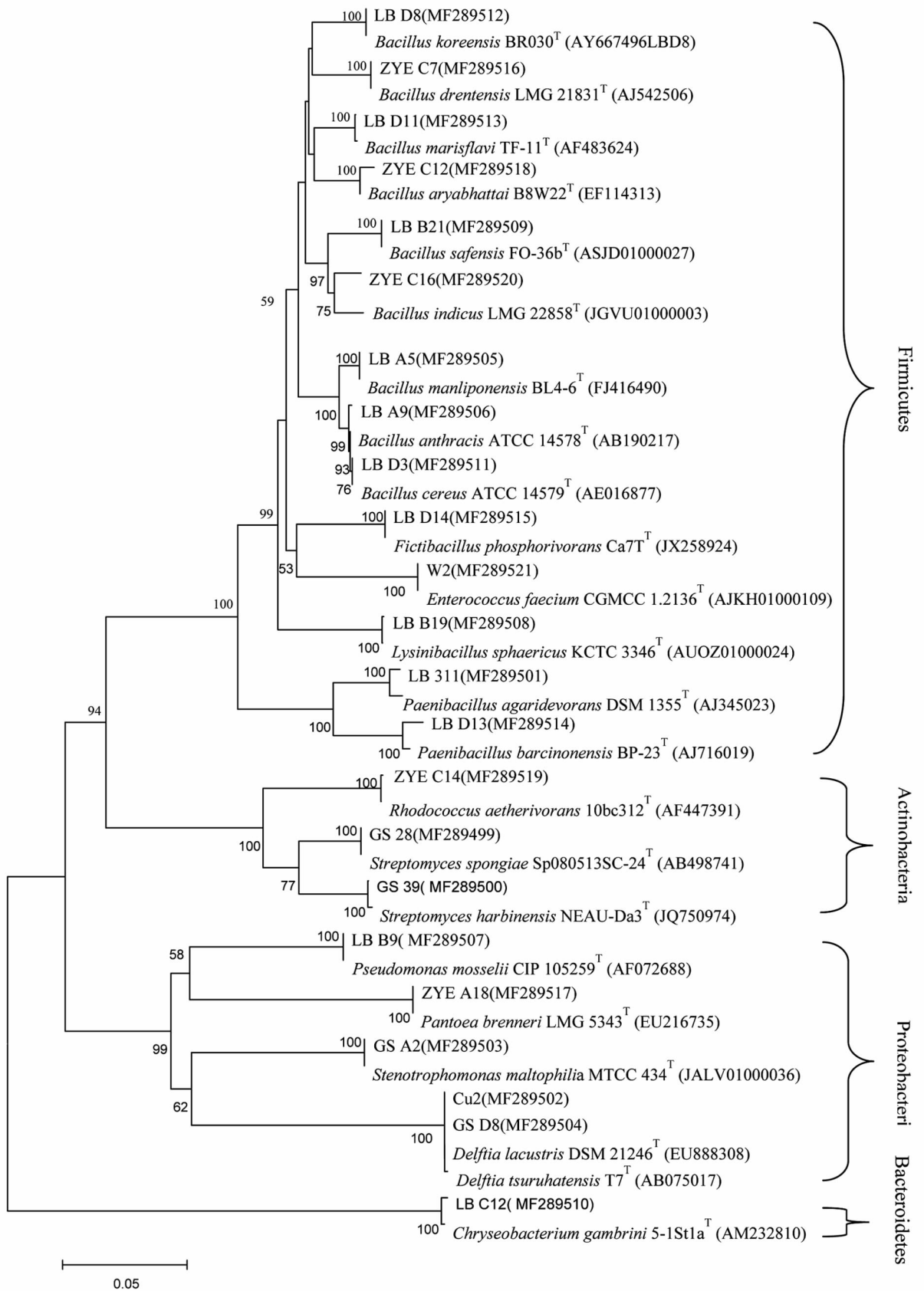


图 1 基于会仙湿地底泥可培养原核微生物 16S rRNA 基因序列的系统聚类树

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram based on the comparison of the 16S rRNA sequences of microbes isolated from the sediment of Huixian wetland

- Guilin: Guangxi Normal University, 2008.
- [2] 文云峰. 会仙岩溶湿地水体富营养化现状及对策研究[D]. 桂林: 广西大学, 2013.
WEN Y F. Rairy karst wetland eutrophication situation and countermeasure research[D]. Guilin: Guangxi University, 2013.
- [3] 徐广平, 沈育伊, 何成新, 等. 桂林会仙岩溶湿地不同富营养化水体水葫芦营养成分研究[J]. 中国农学通报, 2012, 26: 262 – 266.
XU G P, SHEN Y Y, HE C X, et al. Determinations of nutrient chemical components in eichhornia crassipes stems-leaf from different eutrophic waters in Huixian karst wet lands, Guilin, China[J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2012, 26: 262 – 266.
- [4] 蓝运华, 江绍锋, 龚有丽, 等. 会仙湿地水体百草枯污染及其固定/转化率[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2014(4): 142 – 151.
LAN Y H, JIANG S F, GONG Y L, et al. Pollution and fixed/transformed ratio of paraquat in water of Huixian wetland[J]. Journal of Guangxi Normal University(Natural Science Edition), 2014(4): 142 – 151.
- [5] 江绍锋, 蓝运华, 夏樱花, 等. Cu^{2+} 胁迫下湿地微生物热代谢活性及 Cu^{2+} 的固定/转化率[J]. 生态与农村环境学报, 2014(3): 358 – 363.
JIANG S F, LAN Y H, XIA Y H, et al. Thermal metabolic activity and fixation/transformation of Cu^{2+} of microbes in wetland soils under Cu^{2+} stress[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2014(3): 358 – 363.
- [6] 余丽娟, 杨必俊. 桂林会仙湿地水体细菌学研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2015(1): 159 – 164.
YU L J, YANG B J. Investigation of total bacteria, total coliform and fecal coliforms on Huixian wetland in Guilin, China[J]. Journal of Guangxi Normal University(Natural Science Edition), 2015(1): 159 – 164.
- [7] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 46 – 83.
JING X C, TU Q Y. Standard for investigation of eutrophication in lakes[M]. Beijing: China Environmental Press, 1990: 46 – 83.
- [8] 张修峰, 何文珊, 陆健健. 温州三垌湿地底泥氮、磷含量及其对水质的影响[J]. 湿地科学, 2004, 2(3): 192 – 196.
ZHANG Y F, HE W S, LU J J. Content of nitrogen and phosphorus in the bottom mud of Wenzhou Sanyang wetland and its effects on water quality[J]. Wetland Science, 2004, 2(3): 192 – 196.
- [9] 苏进进, 张玉琴, 孙莹, 等. 可可西里土壤样品中细菌多样性的分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1131 – 1140.
SU J J, ZHANG Y Q, SUN Y, et al. Diversity of culturable and unculturable bacteria in soil samples from Hoh Xil, China[J]. Microbiology China, 2011, 38(7): 1131 – 1140.
- [10] TANG Y W, NICOLE M E, MARLENE K H, et al. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual semic pathogenic gram-negative bacilli[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36: 3674 – 3679.
- [11] MCCAIG A E, GLOVER L A, PROSSER J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1721 – 1730.
- [12] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 – 2739.
- [13] 郑莹, 霍颖异. 浙江镇海潮间带沉积物中可培养微生物初步研究[J]. 海洋学研究, 2012, 30(4): 65 – 71.
ZHENG Y, HUO Y Y. A preliminary study of the culturable microorganisms in tidal flat sediment from Zhenhai, Zhejiang Province[J]. Journal of Marine Sciences, 2012, 30(4): 65 – 71.
- [14] GLAESER S P, DOTT W, BUSSE H J, et al. *Fictibacillus phosphorivorans* gen. nov. sp. nov. and proposal to reclassify *Bacillus arsenicus*, *Bacillus barbaricus*, *Bacillus macauensis*, *Bacillus nanhaiensis*, *Bacillus rigui*, *Bacillus solisalsi* and *Bacillus gelatini* in the genus *Fictibacillus*[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 8): 2934.
- [15] JORGENSEN N O, BRANDT K K, NYBROE O, et al. *Delftia lacustris* sp. nov. a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 9): 2195.
- [16] SHIVAJI S, SURESH K, CHATURVEDI P, et al. *Bacillus arsenicus* sp. nov. an arsenic-resistant bacterium isolated from a siderite concretion in West Bengal, India[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2005, 55(Pt 3): 1123.
- [17] IVANOVA N, SOROKIN A, ANDERSON I, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*[J]. Nature, 2003, 423(6935): 87.

- [18] LOONEY W J, NARITA M, MÜHLEMANN K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2009, 9(5):312.
- [19] BRADY C L, CLEENWERCK I, VENTER S N, et al. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov. *Pantoea eucrina* sp. nov. *Pantoea breneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov. and transfer of *Pectobacterium cyripedii* (Hori)[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(Pt 10):2430.
- [20] LIU C X, WANG X J, ZHAO J W, et al. *Streptomyces harbinensis* sp. nov. an endophytic, ikarugamycin-producing actinomycete isolated from soybean root [Glycine max (L.) Merr][J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(10):3579 – 84.
- [21] GOODFELLOW M, JONES A L, MALDONADO L A, et al. *Rhodococcus aetherivorans* sp. nov. a new species that contains methyl t-butyl ether-degrading actinomycetes[J]. *Systematic & Applied Microbiology*, 2004, 27(1):61 – 65.
- [22] SHIGEMATSU T, YUMIHARA K, UEDA Y, et al. *Delfia tsuruhatensis* sp. nov. a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5):1479 – 1483.
- [23] 朱聪英, 周仲儿. 饲料中对氨基苯甲酸测定方法初探[J]. *中国饲料*, 1993(11):23 – 23.
ZHU C Y, ZHOU Z E. Preliminary study on determination of amino benzene in fodder[J]. *China Feed*, 1993(11):23 – 23.
- [24] 郭盾. 高耐砷菌株的筛选及其除砷性能初步研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.
GUO D. Preliminary study on filtration of high-arsenic-tolerant strains and the characteristics for arsenic removal[D]. Kunming: Yunnan University, 2015.
- [25] 姚杰. 临床分离肠球菌的耐药性分析及相关耐药机制的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
YAO J. Study on antimicrobial resistance analyse and molecular mechanisms of related resistance gene in clinical isolates of *Enterococcus*[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2011.
- [26] 王豫平, 王慕云. 肠球菌耐药性研究及对策[J]. *广西医学*, 2002(1):59 – 61.
WANG Y P, WANG M Y. Study on drug resistance on *Enterococcus* and the strategy [J]. *Guangxi Medical Journal*, 2002(1):59 – 61.
- [27] 王文. 宁夏地区肠球菌耐药性分析及其耐药机制研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2014.
WANF W. The analysis of drug resistance and research on resistance mechanisms of isolates of *Enterococcus* in Ningxia [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2014.
- [28] MORANDI S, CREMONESI P, POVOLO M, et al. *Enterococcus lactis* sp. nov. from Italian raw milk cheeses. [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(8):1992 – 6.
- [29] 蓝运华. 会仙湿地底泥及微生物对常用几种有毒物质净化能力的研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2015.
LAN Y H. A study on the degradation capacity of sediment and microbe in it from Huixian wetland against several common toxicants[D]. Guilin: Guangxi normal university, 2015.
- [30] 王玉军, 赵晓松, 孙安娜, 等. 五氯硝基苯降解菌生长特性及降解活性[J]. *吉林农业大学学报*, 2002(6):62 – 64.
WANG Y J, ZHAO X S, SUN A N, et al. Growth characteristics and degradation activity of pentachloronitrobenzene degrading bacteria[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2002(6):62 – 64.
- [31] 王莹. 有机氯农药—五氯硝基苯农药废水的辐射降解研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006.
WANG Y. The study of radiation degradation on organochlorine pesticide-pentachloronitrobenzene (PCNB) wastewater[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2006.