

# 南海冷泉区贻贝(*Bathymodiolus platifrons*)附生菌的分离培养与多样性分析

郭文捷<sup>1,2,3</sup>, 赵 瑾<sup>2,3</sup>, 齐宏涛<sup>1</sup>, 姜 鹏<sup>2,3</sup>, 李富超<sup>2,3</sup>, 李荣贵<sup>1</sup>

(1. 青岛大学 生命科学学院分子生物学实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院海洋研究所 海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 以采集后适应培养 0~24 h 以及添加甲烷和硫化钠培养 24~240 h 的南海冷泉区深海贻贝(*Bathymodiolus platifrons*)为材料, 取其鳃部, 分析附生菌的多样性与适应性变化状况。共分离鉴定出贻贝附生菌 270 株, 对菌株的 16S rDNA 进行聚类分析, 结果表明所分离菌株主要分布在 4 个门, 21 个属, 其中变形菌的数量最多且多样性高。分析发现原位新采集的贻贝鳃部附生菌的多样性较高, 6 h 后附生菌的多样性明显降低。分别添加甲烷和硫化钠对深海贻贝进行培养, 甲烷组与碳代谢有关的假单胞菌的数量逐渐增多, 且在甲烷组 240 h 中发现 2 株食烷菌属菌株。硫化钠组的芽孢杆菌属所占比例升高。此外还发现 4 株潜在的新种。本研究实现了深海冷泉区贻贝的实验室培养, 并对贻贝鳃部附生菌群结构进行了分析, 丰富了海洋极端环境微生物资源库, 并为深入解析贻贝与其附生菌之间的相互作用关系奠定了基础。

**关键词:** 南海; 冷泉区; 贻贝; 附生菌; 多样性

中图分类号: Q938

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)02-0089-07

DOI: 10.11759/hyxx20160930003

冷泉(cold seep)是由于海底天然气渗漏, 富含水、碳氢化合物(甲烷和石油)、硫化氢等化合物的流体在大陆边缘海底喷溢形成<sup>[1]</sup>, 海底冷泉的温度与周边海水温度相近。对深海冷泉生态系统的研究是继 20 世纪末对热液生态系统研究热潮以来的又一个重要领域<sup>[2]</sup>。冷泉区繁衍着管状蠕虫、蛤类、贻贝类、海星、海胆、海虾、珊瑚等生物<sup>[3]</sup>。这些生物的体内和体表存在大量的微生物, 微生物与宿主之间具有高度相互依赖的共附生关系<sup>[4]</sup>。共附生微生物参与宿主的物质吸收和能量代谢过程, 可为宿主提供营养物质或清除宿主体内的有害代谢产物<sup>[5]</sup>, 具有多种特殊的功能基因和酶, 是一种很有潜力的生物资源。

贻贝是深海冷泉区广泛分布的海洋无脊椎动物, 属于软体动物门, 双壳纲。目前有人对贻贝内共生菌进行了研究。Duperron 等<sup>[6]</sup>利用 16S rRNA 基因测序和系统发育分析以及 FISH 的方法对墨西哥湾冷泉区贻贝 *Bathymodiolus* 内共生菌进行多样性分析, 结果表明贻贝内共生菌主要包括硫氧化菌和甲烷氧化菌。这些共生菌可以将环境中的硫化物和甲烷转化为贻贝所需要的营养物质<sup>[7-9]</sup>。但目前对贻贝附生菌的研究尚为空白, 对于共生菌群落结构与化学环境

之间的关系以及响应机制也缺乏针对性的研究。

本研究首先实现了深海冷泉贻贝的实验室培养, 并对其鳃部附生菌进行了分离纯化, 通过 16S rDNA 序列分析, 对分离得到的附生菌进行了多样性分析。进一步将所采集的贻贝置于不同的化学刺激条件下, 分析附生菌群落结构的变化规律。为深入解析贻贝与其附生菌之间的相互作用关系, 以及对深海新基因、新化合物的开发利用奠定了基础<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集和处理

样品于 2014 年 4 月“科学”号冷泉调查航次获得, 由“发现”号 ROV 采集。采样点位于台湾西南

收稿日期: 2016-09-30; 修回日期: 2017-01-06

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA11030404); 国家自然科学基金(31300365)

[Foundation: Special Fund for Strategic Leading Science and Technology Chinese Academy of Sciences, No.XDA11030404; National Natural Science Foundation of China, No.31300365]

作者简介: 郭文捷(1991-), 女, 山东聊城人, 硕士, 主要从事深海极端环境微生物群落多样性研究, 电话: 17854299753, E-mail: 17854299753@163.com。通信作者: 李富超, 053282898500, lifuchao@qdio.ac.cn

的南海冷泉区(22°06'57.144"N, 119°17'6.580"E), 水深 1 113 m(图 1<sup>[10]</sup>)。贻贝取回甲板后, 放入过滤海水中, 适应 0、6、12、24 h 后分别取贻贝的鳃。适应 24 h 后开展现场培养实验。现场培养实验分为甲烷组和硫化钠组。其中甲烷实验组每天充甲烷 0.5 h, 用过滤海水培养; 硫化钠实验组母液质量浓度为 25 g/L, 蠕动泵按 50 μL/min 添加。对照组直接用过滤海水培养。现场培养 24、72 和 240 h 分别取贻贝的鳃。本研究中深海冷泉区贻贝为深海偏顶蛤(*Bathymodiolus platifrons*)<sup>[10]</sup>。

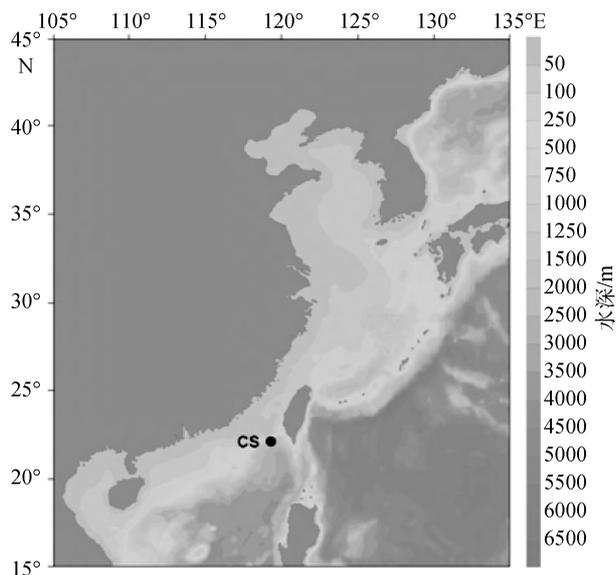


图 1 样品采集点示意图<sup>[10]</sup>  
Fig. 1 Sampling locations<sup>[10]</sup>

## 1.2 菌株的分离与培养

在厌氧培养箱中将冻存管中贻贝的鳃用灭菌海水 200 μL 洗涤 5 次, 然后分别取 50 μL 均匀涂布在 2216E、HM、142-A、M1 四种海水培养基上, 培养基配方见表 1。然后置于 28℃ 恒温培养箱培养 1~7 d。挑取不同形态单菌落至对应的固体平板, 划线纯化、保种。

## 1.3 DNA 提取及 16S rDNA 序列聚类分析

DNA 提取采用的是 CTAB 法<sup>[11]</sup>进行总 DNA 提取。16S rDNA 的扩增参照 Li 等<sup>[12]</sup>的方法, 所用引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCA-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: Dream Taq Green PCR Master Mix(2x)(Thermo 公司), 20 μL; 引物 27F(10 μmol/L)、1 492R(10 μmol/L), 各 2 μL; 模板, 2 μL; dd H<sub>2</sub>O 补足 40 μL 体系。PCR 反

表 1 培养基的组成

Tab. 1 Composition of the medium

培养基	培养基组分	含量(g/L)
2216E (pH7.6~7.8)	胰蛋白胨	5.00
	酵母膏	1.00
	柠檬酸铁	0.10
HM (pH 7.8)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.30
	KCl	0.30
	CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.05
	乙酸钠	1.00
	酵母膏	0.10
142-A (pH 7.2)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
	CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.42
	KCl	0.64
	NaHCO <sub>3</sub>	0.05
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
M1	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5.00
	可溶性淀粉	10.00
	酵母膏	1.00
	胰蛋白胨	2.00

应程序: 预变性 94℃ 10 min; 之后为 30 个循环: 变性 94℃ 50 s, 退火 55℃ 50 s, 延伸 72℃ 1 min 30 s, 最后 72℃, 5 min。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海桑尼进行 16S rDNA 序列测定。将得到的序列在 NCBI 的 GenBank 数据库进行 Blast 比对。将 GenBank 中获得的海洋来源的海水、沉积物以及鱼、珊瑚等动物的高同源性序列作为参考序列。然后利用 Clustal X 软件<sup>[13]</sup>进行比对分析, 截齐后应用 MEGA 4.0<sup>[14]</sup>软件, 采用邻位相接法<sup>[15]</sup>(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 进行菌株的聚类及系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 贻贝附生菌多样性的分析

本研究共分离得到 270 株纯培养的深海贻贝附生细菌(表 2)。经 16S rDNA 序列聚类分析, 如图 2 所示, 所分离的菌株分属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)4 个门, 21 个属。

在门水平上, 变形菌门的菌株在分离菌株中占大部分(243 株, 90%)。其次是厚壁菌门(21 株, 8%), 放线菌门(3 株, 1%), 拟杆菌门(3 株, 1%)。Lampert 等<sup>[16]</sup>对珊瑚 *Fungia scutaria* 可培养的共附生菌多样性的研究中, 共分离得到 24 株细菌, 其中 γ-变形菌

表 2 深海贻贝附生菌的信息表

Tab. 2 Strain information on epiphytic bacteria of deep-sea mussels

处理组	培养基	菌种编号
适应 0 h	2216E	CS001、CS118~CS123
	HM	CS017、CS021、CS025、CS029、CS080、CS129、CS134、CS140
	142-A	CS083
	M1	CS053、CS055
适应 6 h	2216E	CS201~CS219、CS221~CS228
	HM	CS231、CS239、CS248、CS250
	M1	CS261、CS274、CS288
适应 12 h	2216E	CS431
	HM	CS415
	142-A	CS395、CS399
	M1	CS350、CS693、CS681~CS716
适应 24 h	2216E	CS477~CS488
	142-A	CS620
	M1	CS732
甲烷组 24 h	2216E	CS517、CS528
	HM	CS553、CS554、CS562、CS564、CS594、CS595、CS598
	142-A	CS622
	M1	CS717~CS728
甲烷组 72 h	2216E	CS441、CS445、CS449、CS451、CS452
	HM	CS465
	142-A	CS650、CS652、CS653
	M1	CSA085
甲烷组 240 h	2216E	CSA003、CSA004、CSA006、CSA007、CSA167、CSA015、CSA172~CSA174、CSA185
	HM	CSA054、CSA055、CSA057、CSA064
	142-A	CSA017、CSA028、CSA155
	M1	CSA014、CSA097、CSA082、CSA101、CSA103、CSA106、CSA108、CSA110、CSA115、CSA207、CSA209
硫化钠组 24 h	2216E	CS502、CS511
	HM	CS577~CS580、CS585~CS588
	142-A	CS637、CS639、CS641~CS644、CS650、CS652、CS653
硫化钠组 72 h	2216E	CS453~CS464
	HM	CS549、CS551
	142-A	CS663
硫化钠组 240 h	2216E	CSA023、CSA051、CSA052
	HM	CSA132、CSA079、CSA229
	142-A	CSA021、CSA050
	M1	CSA025、CSA038、CSA043、CSA098
对照组 24 h	2216E	CS489~CS500
	HM	CS565、CS574
	142-A	CS629~CS636
对照组 72 h	2216E	CS531
	HM	CS601~CS607、CS609、CS11、CS612
	142-A	CS669、CS670、CS678
对照组 240 h	2216E	CSA005、CSA176、CSA182、CSA194、CSA197、CSA198
	HM	CSA070、CSA060、CSA061、CSA069、CSA071、CSA077、CSA118、CSA124、CSA221~CSA223、CSA225、CSA233
	142-A	CSA036、CSA046~CSA048、CSA141
	M1	CSA084、CSA091、CSA104、CSA113

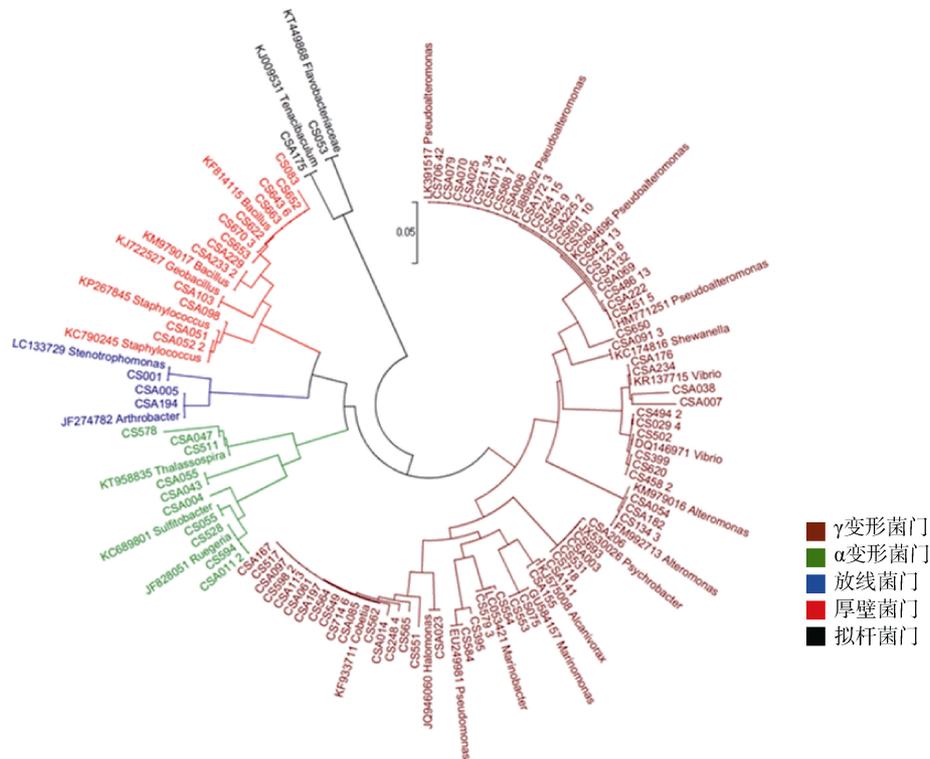


图 2 贻贝附生菌的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of mussel epiphytic bacteria

注: 菌种编号后的数字代表同一处理组同一培养基分离的菌株数目, 只分离到一株的, “1” 省略

Note: The figure behind the strain ID indicates the number of bacteria strains isolated from the same sample by using the same medium. When there is only one strain isolated, “1” is omitted

占 35%, 是珊瑚共附生菌的优势类群。Webster 等<sup>[17]</sup>对海绵 *Rhopaloeides odorabile* 的 34 株相关共附生菌的研究中, 发现  $\gamma$ -变形菌占 41%。陈忠等<sup>[3]</sup>对海胆可培养的共附生微生物多样性的研究中, 共分离到 31 个菌株, 其中  $\gamma$ -变形菌占分离菌株的大部分(20 株, 65%)。本研究结果也表明  $\gamma$ -变形菌是贻贝附生菌的优势类群, 这与其他海洋无脊椎动物的共附生细菌具有相似之处。

在属的水平上, 假交替单胞菌属占比例最高。假交替单胞菌属能够生存在贫营养的海洋环境中, 在多数情况下它们附生于海鞘、甲壳动物、珊瑚、无脊椎动物幼虫等表面。这种附生关系有助于我们研究微生物与宿主之间相互作用的机制<sup>[18]</sup>。

在所分离的菌株中, 发现有 4 个菌株(CS083、CS395、CS578、CS650)的 16S rDNA 序列与 GeneBank 中已有序列比对的相似性低于 97%, 可能是新种(图 2)。在这 4 个潜在新种中, CS083 分离自适应性培养 0 h 组, 属于厚壁菌门, 与分离自海洋细菌的 *Bacillus* sp. B20Ydz-xm 的 16S rDNA 部分序列相似度最高, 相似性为 96%, 可能是芽孢杆菌属的一个潜在新种。

CS395、CS578 和 CS650 均属于变形菌门。其中 CS395 是分离自适应性培养 12 h 组, 与来自珊瑚中 *Pseudomonas* sp.PmeaMuc1 的 16S rDNA 部分序列相似度为 96%; CS578 是分离自现场培养实验中硫化钠 24 h 组, 与从海水中分离出的 *Thalassospira* sp.anaA.si.2 的 16S rDNA 部分序列相似度为 93%; CS650 菌株是分离自现场培养实验中甲烷 72 h 组, 它与分离自海洋细菌中的 *Pseudoalteromonas* sp. ERGCD 的 16S rDNA 部分序列相似度为 97%。后续, 我们将参照 Colwell 提出的多相分类学<sup>[19]</sup>方法对这 4 株潜在新种进行物种鉴定, 并分析其生态功能及与贻贝之间的相互作用关系。

## 2.2 适应性培养过程中贻贝附生菌群落结构的变化

将深海冷泉区采集的贻贝在实验室可控条件下进行培养。原位新鲜采集的贻贝的鳃部附生菌多样性较高, 所占比例最多的门为变形菌门, 所占比例最多的属为假交替单胞菌属。适应性培养 6 h 后, 贻贝的鳃部附生菌的多样性明显降低(图 3)。

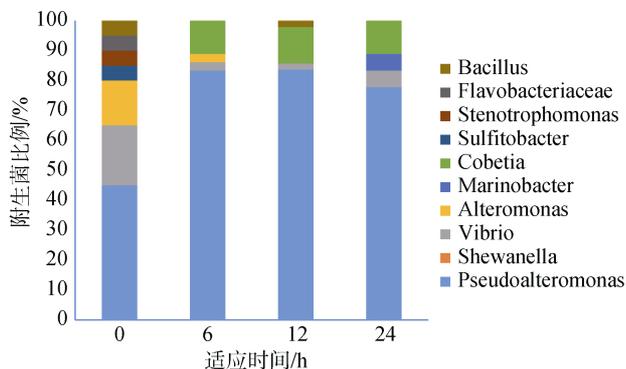


图 3 适应 0~24h 贻贝附生菌的多样性分析

Fig. 3 Analysis of the diversity of epiphytic bacteria in mussel *in situ*

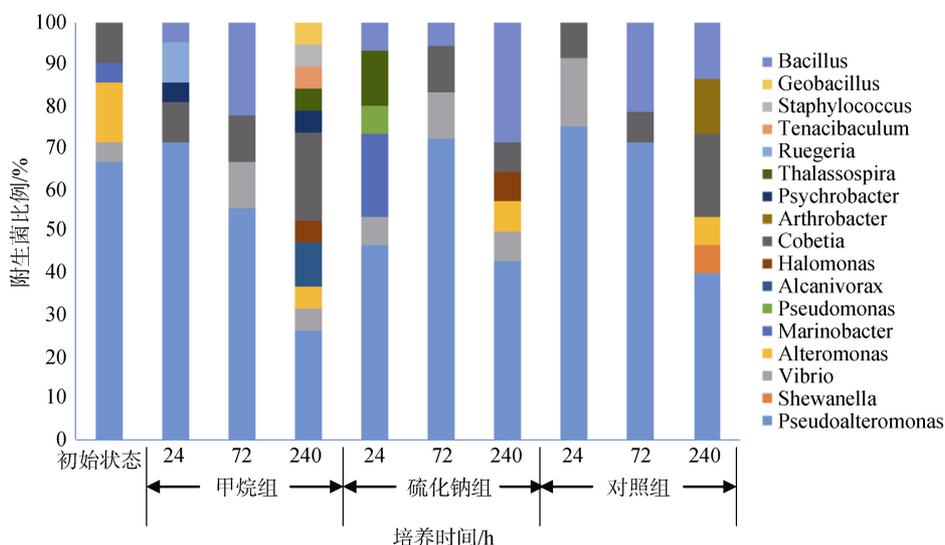


图 4 培养 0~240 h 贻贝附生菌的多样性分析

Fig. 4 Analysis of the diversity of epiphytic bacteria in mussels cultured under different chemical conditions for 10 days

### 3 结论

本研究对南海冷泉区贻贝鳃中附生菌进行分离培养与鉴定,初步的实验结果显示贻贝附生菌包括 4 个门 21 个属,附生菌多样性高。其中变形菌门在所有门类中所占比例最高。在适应培养过程中,原位新鲜采集的贻贝的鳃部附生菌多样性较高,培养 6 h 后,贻贝的鳃部附生菌的多样性明显降低。现场培养过程中,随着甲烷处理时间的延长,与碳分解过程相关的假单胞菌属的比例增多。在硫化钠处理组 24~240 h,海科贝特氏菌属和芽孢杆菌属的数量逐渐增多,而且芽孢杆菌属在硫化钠 240 h 组达到最多。另外,本研究纯化得到了 2 株可开发用于治理海洋石油污染的食烷菌属菌株,并发现了 4 株潜在的深海微生物新种,为深海极端环境微生物新资源的

现场培养实验的甲烷组中,随着甲烷处理时间的延长,假交替单胞菌属所占比例逐渐减少,而与碳分解过程相关的假单胞菌属的比例逐渐增多<sup>[20-21]</sup>。在甲烷组 240 h 中发现 2 株食烷菌属的菌株,该属能够以直链和支链的烷烃为唯一的碳源和能源,该属是海洋专性烷烃降解菌,可以用于治理海洋中的石油污染<sup>[22]</sup>。在硫化钠组 24~240 h,海科贝特氏菌属(*Cobetia*)和芽孢杆菌属的数量逐渐增多,而且芽孢杆菌属在硫化钠 240 h 组达到最多,芽孢杆菌通过自养亚硝化和自养反硝化的脱氮作用,将含氮有机物转化成贻贝吸收利用的小分子物质,从而促进贻贝的生长与繁殖<sup>[23]</sup>(图 4)。

发掘和利用奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] 周琦, 陈建华, 张命桥, 等. 冷泉碳酸盐岩研究进展及成矿意义[J]. 贵州科学, 2007(S1): 103-110.  
Zhou Qi, Chen Jianhua, Zhang Mingqiao, et al. The advances in study and metallogenic significance of cold seep carbonates[J]. GuiZhou Science, 2007(S1): 103-110.

[2] Zhang C, Li P, Jiang C, et al. Geomicrobiology and biogeo-chemistry of gas hydrates and cold seeps[J]. Chemical Geology, 2004, 205(3-4): 187-194.

[3] 陈忠, 杨华平, 黄奇瑜, 等. 海底甲烷冷泉特征与冷泉生态系统的群落结构[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(6): 73-82.  
Chen Zhong, Yang Huaping, Huang Qiyu, et al. Characteristics of cold seeps and structures of chemoauto-synthesis-based communities in seep sediments[J]. Journal

- of Tropical Oceanography, 2007, 26(6): 73-82.
- [4] 苗婷婷, 邢翔, 杜宗军, 等. 柄海鞘共附生细菌的分离培养与系统发育多样性研究[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(1): 111-118.  
Miao Tingting, Xing Xiang, Du Zongjun, et al. Isolation and phylogenetic analysis of associated bacteria from the *Styela clava*. [J]. Advances in Marine Science, 2012, 30(1): 111-118.
- [5] Hentschel U, Schmid M. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(3): 305-312.
- [6] Duperron S, Sibuet M, Gregor M, et al. Diversity, relative abundance and metabolic potential of bacterial endosymbionts in three *Bathymodiolus* mussel species from cold seeps in the Gulf of Mexico[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(6): 1423-1438.
- [7] Detree C, Chabenat A, Lallier F H, et al. Multiple I-type lysozymes in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and their role in symbiotic Plasticity[J]. PLoS ONE, 2016, 11(2): e0148988.
- [8] Nelson D C, Hagen K D, Edwards D B, et al. The gill symbiont of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium[J]. Mar Biol, 1995, 121(3): 487-495.
- [9] Distel D L, Cavanaugh C M. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbiosis in marine bivalves[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176: 1932-1938.
- [10] 郑平, 王敏晓, 李超伦, 等. 热液和冷泉无脊椎动物基因组大小测定及比较[J]. 海洋学报, 2016, 38(6): 41-50.  
Zheng Ping, Wang Minxiao, Li Chaolun, et al. Survey of genome size in 10 invertebrates from hydrothermal vent and cold seep[J]. Chinese Journal of Oceanography, 2016, 38(6): 41-50.
- [11] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [12] Li WJ, Xu P, Schumann P, et al. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1424-1428.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.
- [15] 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.
- [16] Lampert Y, Kelman D, Dubinsky Z, et al. Diversity of culturable bacteria in the mucus of the Red Sea coral *Fungia scutaria* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 58: 99-108
- [17] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 434-444.
- [18] 席宇, 朱大恒, 刘红涛, 等. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108-112.  
Xi Yu, Zhu Daheng, Liu Hongtao, et al. Advances on *Pseudoalteromonas* species and their extracellular bioactive compounds[J]. Microbiology, 2005, 32(3): 108-112.
- [19] Colwell R R. Polyphasic Taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species[J]. J Bacteriol, 1970, 104: 410-433.
- [20] Head I M, Jones D M, Roling W F. Marine microorganisms make a meal of oil[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(3): 173-182.
- [21] 谭周进, 肖罗, 谢丙炎, 等. 假单胞菌的微生态调节作用[J]. 核农学报, 2004, 18(1): 72-76.  
Tan Zhoujin, Xiao Luo, Xie Bingyan, et al. Microecological functions of Pseudomonad[J]. Acta Agric Nucleat Sinica, 2004, 18(1): 72-76.
- [22] 吴业辉, 邵宗泽. 海洋烷烃降解菌 *Alcanivorax* sp. A-11-3 的分离鉴定及其降解酶基因研究[J]. 台湾海峡, 2008, 27(4): 427-434.  
Wu Yehui, Shao Zongze. Isolation and identification of a novel alkane-degrading bacterial species *Alcanivorax* sp. A-11-3 and alkane hydroxylase gene detection[J]. Journal of Oceanography In Taiwan Strait, 2008, 27(4): 427-434.
- [23] 王文娟, 孙冬岩, 孙笑非, 等. 芽孢杆菌对养殖水体调节作用的研究[J]. 饲料研究, 2011(8): 73-74.  
Wang Wenjuan, Sun Dongyan, Sun Xiaofei, et al. The study of the regulation effect of *Bacillus* on aquaculture water[J]. Feed Research, 2011(8): 73-74.

# Isolation and phylogenetic analysis of epiphytic bacteria from mussels collected from the cold seep

GUO Wen-jie<sup>1, 2, 3</sup>, ZHAO Jin<sup>2, 3</sup>, QI Hong-tao<sup>1</sup>, JIANG Peng<sup>2, 3</sup>, LI Fu-chao<sup>2, 3</sup>,  
LI Rong-gui<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Molecular Biology, College of Life Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory of Marine Biology and Biotechnology, National Laboratory of Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

**Received:** Sep.30, 2016

**Key words:** South China Sea; cold seep; mussel; epiphytic bacteria; diversity

**Abstract:** Epiphytic bacteria play an important role in substance absorption and metabolism of mussels. Gills of mussels in different experimental groups were collected at different times, and the epiphytic bacteria were cultured and separated. A total of 270 strains were obtained. Four strains, which might be new species, were discovered. The diversity of epiphytic bacteria decreased sharply in 6 h sterile-seawater cultivation. In the methane treatment group, the number of *Pseudomonas* increased gradually. In the group treated with Na<sub>2</sub>S, *Bacillus* associated with sulfur circulation increased gradually. It is important to study the interaction between mussels and epiphytic bacteria and to explore the biological resources in extreme deep sea environments.

(本文编辑: 张培新)