

南海西沙海槽表层沉积物微生物多样性

李 涛, 王 鹏, 汪品先

(同济大学海洋地质国家重点实验室, 上海 200092)

摘要:利用非培养的分子技术研究了西沙海槽表层沉积物中的微生物群落。沉积物中扩增的古菌 16S rDNA 序列分属两大类: 泉古生菌 (Crenarchaeota) 和 广古生菌 (Euryarchaeota)。以 Marine Crenarchaeotic Group I (古菌 16S rDNA 文库的 49.2%) 和 Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group (16.9%) 为主要类群; 其余为 Marine Benthic Group B (9.7%)、Marine Benthic Group A (4%)、Marine Benthic Group D (1.6%)、Novel Euryarchaeotic Group (0.8%) 和 C3 (0.8%)。细菌克隆子多样性明显高于古菌, 16S rDNA 序列分别来自变形杆菌 (Proteobacteria) (细菌 16S rDNA 文库的 30.5%)、浮霉菌 (Planctomycetes) (20.3%)、放线菌 (Actinobacteria) (14.4%)、厚壁菌 (Firmicutes) (15.3%)、屈挠杆菌 (Chloroflexi) (8.5%)、酸杆菌 (Acidobacteria) (3.4%)、candidate division OP8 (2.5%)、拟杆菌/绿菌 (Bacteroidetes/Chlorobi) (1.7%) 和疣微菌 (Verrucomicrobia) (1.7%)。变形杆菌为优势类群 (包括 Alpha-和 Delta-Proteobacteria 亚群)。多数克隆子为未培养细菌和古菌。结果表明南海表层沉积物中蕴含大量未知的微生物资源。

关键词: 西沙海槽; 微生物多样性; 16S rDNA; 沉积物

文章编号: 1000-0933(2008)03-1166-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Microbial diversity in surface sediments of the Xisha Trough, the South China Sea

LI Tao, WANG Peng, WANG Pin-Xian

State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(3): 1166 ~ 1173.

Abstract: Microbial communities were obtained from surface sediments of the Xisha Trough using cultured-independent technique. The characterization of the 16S rDNA gene amplified from the sediments indicated that archaeal clones could be grouped into the Euryarchaeota and Crenarchaeota domains respectively. Two archaeal assemblages, the Marine Crenarchaeotic Group I (49.2% of the total archaeal clones) and the Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group (16.9%), were the most dominant archaeal 16S rDNA gene components in sediments. The remaining sequences were related to members of the Marine Benthic Group B (9.7%), Marine Benthic Group A (4%), Marine Benthic Group D (1.6%), Novel Euryarchaeotic Group (0.8%) and C3 (0.8%). The bacteria clones exhibited greater diversity than the archaeal clones, with the 16S rDNA gene sequences from members of the Proteobacteria (30.5% of the total bacterial clones),

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (2007CB815904); 国家自然科学基金资助项目 (40510487, 40606032); 同济大学青年优秀人才培养行动计划资助项目 (2006KJ056)

收稿日期: 2007-07-24; **修订日期:** 2007-12-29

作者简介: 李涛 (1980 ~), 男, 湖北监利人, 博士生, 主要从事地质微生物研究工作. E-mail: lukelitao80@163.com

致谢: 感谢 IMAGES 147 航次 MARCO 航段所有工作人员!

Foundation item: The project was financially supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (No. 2007CB815904); National Natural Science Foundation of China (No. 40510487, 40606032); Program for Young Excellent Talents in Tongji University (No. 2006KJ056)

Received date: 2007-07-24; **Accepted date:** 2007-12-29

Biography: LI Tao, Ph. D. candidate, mainly engaged in geomicrobiology. E-mail: lukelitao80@163.com

Planctomycetes (20.3%), Actinobacteria (14.4%), Firmicutes (15.3%), Chloroflexi (8.5%), Acidobacteria (3.4%), candidate division OP8 (2.5%), Bacterioidetes/Chlorobi (1.7%) and Verrucomicrobia (1.7%). Most of these lineages represented uncultured and undescribed groups of bacteria and archaea. The results suggest that a vast amount of microbial resource in the surface sediment of the South China Sea is yet to know.

Key Words: Xisha trough; microbial diversity; 16S rDNA; sediment

海底沉积物中蕴藏着巨大的生物量,可能占全球生物量的 1/10 ~ 1/3,原核生物量的 65%^[1,2]。然而,微生物代谢活动却很低^[3],这种特殊生境对于全球物质循环有多大作用,目前还不知晓。尽管深海热液口是海底微生物研究的热点区域,但对边缘海沉积物中的微生物也进行了大量研究。在过去的 10a 里,大洋钻探计划(ODP)多个航次调查了太平洋边缘海域沉积物中细菌和古菌的多样性,包括日本海^[4]、Woodlark 海盆(180 航次)^[5]、Nanki 海槽(190 航次)^[6]、秘鲁边缘(201 航次)^[7]、卡斯卡底古陆边缘(146 航次)^[7,8]。此外,其他研究小组对鄂霍次克海^[9]、地中海等海域^[10]也进行了微生物群落的研究。然而,由于海底 99% 以上的微生物不可培养,使得基于 16S rDNA 的分子生物技术一直以来都是调查海底沉积物中微生物多样性的不可替代的手段。

南海是西太平洋的边缘海,邻近西太平洋暖池区。目前,对南海南沙海区表层沉积物中细菌和古菌多样性有了一些初步的研究,结果表明南海沉积物中微生物与其他海域沉积物有相似处^[11],也存在差异^[12],不过这些结果反映的微生物多样性较简单。本文利用 16S rDNA-RFLP 技术研究了西沙海槽表层沉积物的微生物群落,共挑取了 200 多个细菌和古菌克隆子,从中分析出 29 种细菌系统发育型(phylogroup)和 18 种古菌系统发育型。系统发育分析表明沉积物中细菌多样性丰富,而古菌多样性相对较低。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2005 年 5 月 15 日 ~ 6 月 8 日 IMAGES147 航次获得的深海表层沉积物样品(海水沉积物界面以下约 0.1 m),采样点位于南海西沙海槽(17°57.70'N, 114°57.33'E)。采用无扰动箱式采泥器采集水深 3697m 的深海盆地沉积物柱 MD05-2902,样品于 -20℃ 下保存,运回实验室后储存于 -80℃。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取与纯化

DNA 提取采用改进后的 Zhou 抽提法(Zhou protocol)^[13]:约 5g 沉积物样品(湿重)中加入 13.5ml 抽提缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA (pH8.0), 100mmol/L 磷酸钠 (pH8.0), 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB),并加入 100μl 蛋白酶 K, 37℃, 225 r/min, 30min;加入 1.5ml 20% SDS, 65℃ 水浴 2h;离心,上清液中加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),离心并收集上层水相;加入等体积氯仿重复萃取 1 次;等体积异丙醇进行沉淀,70% 冰乙醇洗涤后用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)纯化。

1.2.2 16S rDNA PCR 扩增、克隆与 RFLP 分析

采用细菌 16S rDNA 通用引物(27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; M 为 A 或 C)和古菌 16S rDNA 通用引物(21F: 5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG CCG GA-3'; 958R: 5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3'; Y 为 C 或 T, M 同上)进行 PCR 扩增。PCR 体系(50μl): 10 × PCR 扩增缓冲液 5μl (不含 Mg⁺⁺), dNTPs 1μl (10mmol/L), 引物 1μl (6μmol/L), Mg⁺⁺ 3μl (25mmol/L) 以及适量 Taq 聚合酶和 DNA 模板。细菌 16S rDNA 扩增反应条件: 95℃ 3min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1.5min, 35 个循环; 72℃ 10min。采用降落 PCR(touch down PCR) 扩增古菌 16S rDNA: 95℃ 3min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 10 个循环 10 次, 每循环 1 次, 复性温度降低 0.2℃; 94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min。

PCR 扩增得到的片断克隆到 pMD-18T (TaKaRa) 载体上,转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选转化子,挑取阳性转化子,重新扩增插入片断,得到的模板 DNA 用于限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析。模板 DNA 被内切酶 *Msp* I (Fermentas) 切割,通过 3% 凝胶电泳,分析带型,挑选不同带型克隆子测序 (上海英骏生物技术有限公司)。

1.2.3 测序与系统发育分析

将序列提交到 RDP II (ribosomal database project) 数据库,利用在线工具 CHECK-CHIMERA 检验;应用 BLASTN 程序 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 搜索相似性序列,进行系统发育分析。采用 ClustalX (Version 1.8) 对序列进行比对分析,通过 PAUP (Version 4.0b10)^[14] 构建系统发育树,采用 Neighbor-Joining 建树方法,选择 Jukes-Cantor 进化距离。

1.2.4 数据库接受号 (Accession number)

16S rDNA 序列在 Genbank 核苷酸数据库中的接受号为 EU048590-EU048636。

2 结果

119 个细菌克隆子和 124 个古菌克隆子的测序序列分别构成了细菌和古菌文库。细菌文库包含 29 种系统发育型,古菌文库中有 18 种系统发育型 (序列相似性低于 98%)。利用 SPADE (Species Prediction and Diversity Estimation) 软件^[15] 对细菌和古菌多样性测度进行估算,在 95% 置信区间内细菌和古菌物种丰度 (species richness) (ACE-1 算法) 分别为 32 ± 3 和 22 ± 5 , Shannon 指数分别为 3.087 ± 0.068 和 2.312 ± 0.085 (最大似然估计),细菌明显比古菌多样性丰富。细菌和古菌文库覆盖度 (Coverage) 分别高达 0.95 和 0.96,表明库容 (library size) 是足够的。物种丰度的估算表明可能遗漏了少于 1/5 的细菌和 1/3 的古菌。

2.1 细菌 16S rDNA 文库分析

细菌文库可划分出 8 个类群 (图 1),多数克隆子为变形杆菌 (Proteobacteria) (30.5%)、浮霉菌 (Planctomycetes) (20.3%)、放线菌 (Actinobacteria) (14.4%)、厚壁菌 (Firmicutes) (15.3%) 和屈挠杆菌 (Chloroflexi) (8.5%),余下分别是酸杆菌 (Acidobacteria) (3.4%)、candidate division OP8 (2.5%)、拟杆菌/绿菌 (Bacterioidetes/Chlorobi) (1.7%) 和疣微菌 (Verrucomicrobia) (1.7%)。1.8% 克隆子不能确定分类位置 (2 种系统发育型)。

Proteobacteria 仅发现两个亚群: Alpha-和 Delta-Proteobacteria 亚群,分别占细菌文库的 11% 和 19.5%。Alpha-Proteobacteria 中同源序列来自未培养和可培养细菌,未培养细菌 2 条同源序列来自西太平洋暖池区沉积物 (92% ~ 96% 相似性),1 条来自南极永久冰盖湖水 (91% 相似性);可培养细菌来自浅海蠕虫 *Inanidrillus makropetalos* 的共生菌 (90% 相似性)、星状菌属细菌 *Stella humosa* (91% 相似性) 和海水中未定种红螺菌科 (Rhodospirillaceae) 细菌 (93% 序列相似)。Delta-Proteobacteria 未培养细菌均来自深海沉积物 (93% ~ 96% 相似性),包括西太平洋暖池区、日本海槽、巴伦支海冷泉区和秘鲁边缘;可培养细菌 (83% ~ 89% 相似性) 分别属于脱硫叶菌属 (*Desulfobulbus*)、土杆菌属 (*Geobacter*)、脱硫念珠菌属 (*Desulfomonile*) 和 *Desulfatibacillum* 属。

Actinobacteria、Acidobacteria、OP8、Bacterioidetes/Chlorobi 和 Verrucomicrobia 5 个类群均未检索到已培养细菌,同源序列都来自海洋沉积物。Acidobacteria 同源序列来自大西洋大洋中脊热液沉积物 (86% 相似性); Actinobacteria 2 条同源序列分别来自大西洋大洋中脊热液沉积物和地中海冷泉区沉积物 (93% ~ 95% 相似性); OP8 和 Bacterioidetes/Chlorobi 同源序列都来自秘鲁边缘深海沉积物 (89% ~ 98% 相似性); Verrucomicrobia 同源序列来自苏格兰海岸沉积物 (92% 相似性)。

Firmicutes 类群与产甲烷淤泥中的好热厌氧杆菌 *Moorella thermoacetica* 有较远的亲缘关系 (82% 相似性), 同源性最高的序列来自大西洋大洋中脊热液沉积物 (98% 相似性)。Chloroflexi 类群与来自地中海冷泉区深海沉积物未培养细菌有很高同源性 (99% 相似性),可能与克隆子 MD2902-B4 为同一个种;与深部火成岩含水层未培养细菌和海滨沉积物中培养细菌 *Dehalococcoides* sp. 的有较远的亲缘关系 (79% 相似性)。

Planctomycetes 类群可划分 3 簇,第 1 簇来自海洋沉积物,包括秘鲁边缘深海沉积物、Forearc 海盆含甲烷

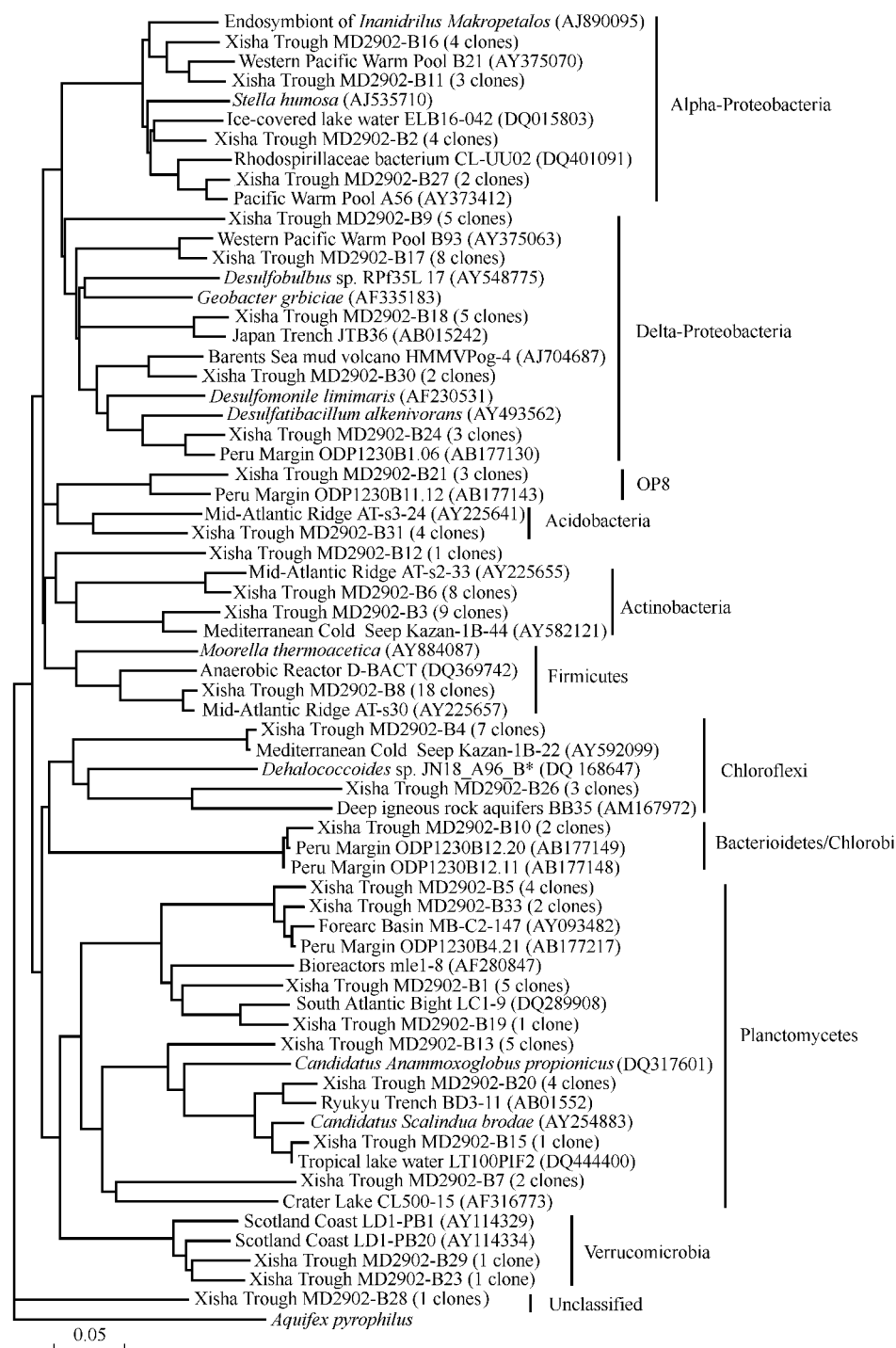


图1 基于16S rDNA序列的西沙海槽细菌多样性系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the Xisha Trough bacteria diversity based on 16S rDNA sequences

“MD2902-Bxx” is sequence name in this paper; MD2902 represents sediment core number; “B” means bacteria; “xx” is clones number; The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide position

水合物沉积物和南大西洋陆架沉积物,有很高的同源性(93% ~ 97% 相似性),第2簇主要为可培养细菌,与可培养细菌有相对高的同源性(85% ~ 96% 相似性),第3簇与发现序列同源性很差(78% 相似性),暂不知来源。

2.2 古菌 16S rDNA 文库分析

古菌文库分别来自两个大类(图2): 泉古生菌(Crenarchaeota)和广古生菌(Euryarchaeota), 以泉古生菌(克隆子库的63.2%)为主。泉古生菌有4个类群, 以 Marine Crenarchaeotic Group I (MG I) (49.2%) 为主, 其他为 Marine Benthic Group B (MBGB) (9.7%)、Marine Benthic Group A (MBGA) (4%) 和 C3 (0.8%)。MBGB 又分为2个亚群(B-1, B-2), 分别占古菌文库的5.7%和4%。广古生菌有3个类群, 主要是 Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group (TMEG) (16.9%), 仅少量 Marine Benthic Group D (MBGD) (1.6%) 和新类群 Novel Euryarchaeotic Group (NEG) (0.8%)。17%的克隆子不能确定分类位置(1种系统发育型)。

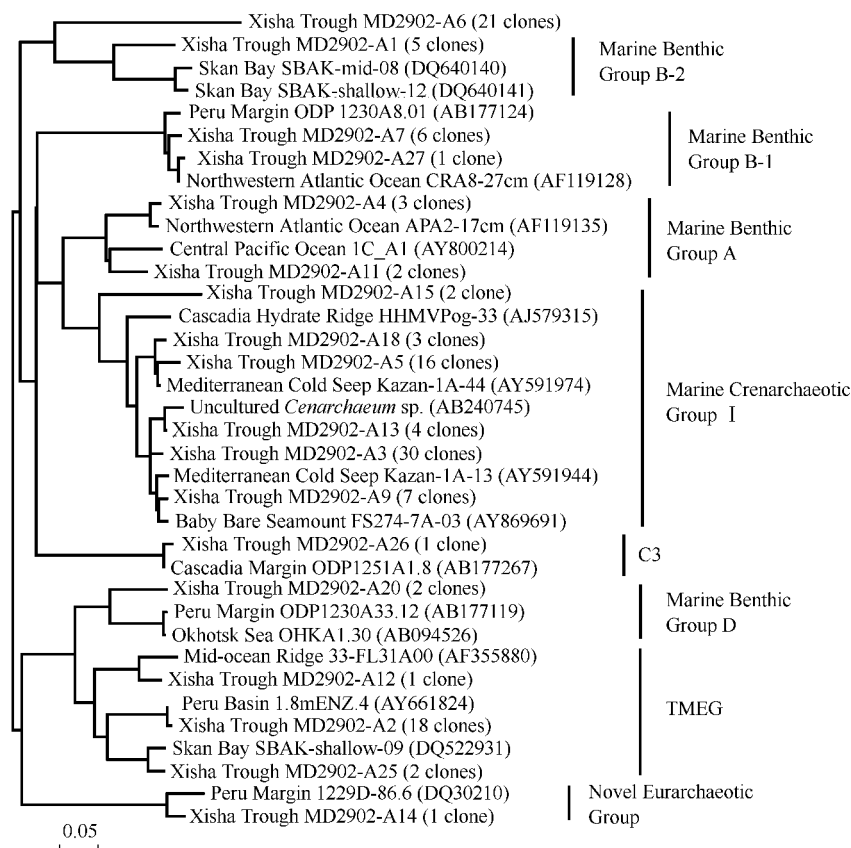


图2 基于16S rDNA序列的西沙海槽古菌多样性系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the Xisha Trough archaeal diversity based on 16S rDNA

TMEG: Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; "MD2902-Axx" is sequence name in this paper; MD2902 represents sediment core number; "A" means archaea; "xx" is clones number. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide position

古菌文库未检索到已培养类型,全部同源序列来自海洋沉积物。Marine Benthic Group B 亚群 B-1 同源序列来自深海沉积物(秘鲁边缘和西北大西洋), 同源性较高(96% ~ 98% 相似性); 亚群 B-2 同源序列来自浅海沉积物(Skan 海湾), 同源性较低(85% 相似性)。Marine Benthic A 同源序列分别来自西北大西洋和中太平洋大洋沉积物(89% ~ 98% 相似性)。MG I 同源序列同源性都很高(97% ~ 98% 相似性), 全部来自甲烷、水合物丰富的区域, 包括卡斯卡底古陆水合物脊、地中海冷泉泥火山和 Baby Bare 海山热液流。C3 同源序列来自卡斯卡底古陆边缘深海沉积物, 与克隆子 MD2902-A26 可能是同一个种(99% 相似性)。Marine Benthic Group D 2 条同源序列分别来自卡斯卡底古陆边缘和鄂霍次克海深海沉积物(87% 相似性)。TMEG 在深海和浅海沉积物中均有分布, 同源序列分别来自大洋中脊、秘鲁海盆、Skan 海湾(92% ~ 98% 相似性)。广古生菌新类群同源序列来自秘鲁边缘深海沉积物, 同源性较低(85% 相似性)。

3 讨论

海底表层沉积物中因为不断有新的有机物补充,为微生物提供了丰富的物质和能量,因此微生物多样性最丰富,微生物活动也非常活跃^[5]。

3.1 细菌多样性

Proteobacteria 类群是海洋沉积物中细菌的优势类群。不同地点近表层沉积物中 Proteobacteria 类群占细菌文库的比例相差较大,变化幅度从最低约 20% 到最高 95%。如卡斯卡底古陆边缘次表层沉积物中此类群占细菌文库高达 95%^[16];日本海槽表层沉积物中此类群占细菌文库 78% ~ 92%^[17,18];Guaymas 海盆表层沉积物类群占细菌文库 45% ~ 63%^[19];Nankai 海槽 1173 站位近表层沉积物(1mbsf,海底表层以下 1m)类群占细菌文库 25%^[6];而 1176 站位次表层沉积物(4.15mbsf)类群占细菌文库 22%^[20];秘鲁边缘次表层深海沉积物(6.7mbsf)类群占细菌文库 38%^[21];本文西沙海槽表层沉积物此类群占细菌文库 30.5%。因此,可以断定 Proteobacteria 类群在细菌文库中的百分比可能与地理位置并无直接的关系。本文西沙海槽表层沉积物 Proteobacteria 类群包含 Alpha-和 Delta-Proteobacteria 亚群,以 Delta-Proteobacteria 亚群占优势(约 2/3),这与南沙海区结果一致^[11]。西沙海槽表层沉积物未发现 Gamma-Proteobacteria 亚群,而该亚群曾发现于次表层沉积物(6mbsf)中^[22],因此类群组成可能与沉积物取样深度有关,而沉积物的岩石学特征(如粒度、孔隙度、矿物组成、沉积速率等)和地球化学指标(孔隙水化学性质、甲烷含量等)可能是主要的影响因素^[7],如鄂霍次克海近表层沉积物泥质层以 Alpha-和 Delta-Proteobacteria 亚群为最主要的优势群,火山灰层以 Alpha-和 Gamma-Proteobacteria 亚群占多数^[9]。

Alpha-Proteobacteria 亚群广泛生活在多种海洋环境中^[23],包括表层和深层海水、海底沉积物、深海热液口,此亚群在沉积物中可能以氧化还原态的硫化合物作为主要的代谢类型。Delta-Proteobacteria 亚群严格厌氧,大多为硫酸盐还原菌^[24],该亚群亲缘关系较近的已培养细菌全部为硫酸盐还原菌。因此,西沙海槽沉积物中 Delta-Proteobacteria 亚群全部属于硫酸盐还原菌。总之,Proteobacteria 类群所有类型均参与微生物硫循环地球化学过程,而丰富的硫化合物以及缺氧环境为这类化能有机营养或化能无机营养微生物提供能量来源。

Actinobacteria、Planctomycete、Firmicutes 和 candidate division OP8 这 4 个类群也经常出现在海底沉积物中,不过数量较少。南海沉积物中浮霉菌是仅次于 Proteobacteria 的第二大优势类群,在南沙海区为第三大优势类群^[11],而太平洋边缘其他海区,如 Nankai 海槽^[6]、日本海槽^[17,18]、秘鲁大陆边缘^[7,21]和卡斯卡底古陆边缘^[7],浮霉菌并非优势类群,是否是南海特有现象还需进一步验证。放线菌和疣微菌很少出现在海底沉积物中,推断是通过海水与表层沉积物的相互作用而进入沉积物中,西沙海槽浊流发育,在表层以下 6m 沉积物中也发现大量放线菌^[22]。

Acidobacteria 类群中大部分属于未培养类型,但通过分子生物学的手段在活性淤泥和海洋沉积物中发现该类群。该类群在海底热液沉积物^[24]和热泉附近地热丰富的土壤^[25]中数量较多,而在深海沉积物中还未发现该类群,可能大部分为嗜热类型。西沙海槽沉积物发现的类群与大洋中脊热液沉积物亲缘关系较远,表明该类群也有小部分适冷类型。

Chloroflexi 类群是水合物较少而有机质丰富沉积物中的主要类群,不含水合物沉积物中发现此类群的频率远高于含水合物沉积物,Chloroflexi 的有无可以作为判断沉积物中是否含水合物的一个重要指标^[7],是今后寻找海底水合物的一个辅助手段。

3.2 古菌多样性

MG I (或 Marine Crenarchaeotic Group, MCG) 类群是西沙海槽表层沉积物的优势类群,其次是 TMEG,以 MBGB 和 MBGA 和 MBGD 为代表的深海类群则较少。MG I 常发现于海洋和陆地环境,在海洋环境中,广泛分布于表层和次表层沉积物中,是甲烷丰富而不含水合物沉积物的主要类群^[7],太平洋近赤道某站位表层沉积物全部古菌属于该类群^[26],秘鲁边缘 1227 站位表层沉积物中该类群占约 90%^[7]。TMEG 也广泛生活于陆

地、淡水和海洋沉积物中^[27,28],此类群尚无已培养类型,还不清楚生理学特征,可能是多种代谢类型混杂的类群。

MBGB(或 Deep Sea Archaeal Group, DSAG) 最先发现于热液口深海沉积物,目前在深海海底沉积中均发现此类群^[28],且在底部甲烷上涌流的上层硫酸盐还原带沉积物中含量丰富,该类群在秘鲁边缘和卡斯卡底古陆边缘发现水合物的 1230、1245 和 1251 站位表层沉积物为最主要的优势类群^[7],可能在硫酸盐还原和甲烷氧化中起重要作用^[29]。

因此,可大致推断西沙海槽表层沉积物微生物群落以硫酸盐还原-甲烷氧化代谢为主要代谢类型,这与西沙海区沉积物中富含甲烷有关。由于西沙海槽浊流作用,沉积物中很可能混杂了一些主要生活于海水的微生物类型。

References:

- [1] Parkes R J, Cragg B A, Bale S J, *et al.* Deep bacterial biosphere in Pacific ocean sediments. *Nature*, 1994, 371: 410—413.
- [2] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 6578—6583.
- [3] D'Hondt S, Jørgensen B B, Miller D J, *et al.* Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science*, 2004, 306: 2216—2221.
- [4] Rochelle P A, Cragg B A, Fry J C, *et al.* Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 15: 215—226.
- [5] Wellsbury P, Mather I, Parkes R J N. Geomicrobiology of seep, low organic carbon sediments in the Woodlark basin, Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42: 59—70.
- [6] Newberry C J, Webster G, Cragg B A, *et al.* Diversity of prokaryotes and Methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 274—287.
- [7] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, *et al.* Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean margin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(8): 2815—2820.
- [8] Bidle K A, Kastner M, Bartlett D H. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892b). *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 177: 101—108.
- [9] Inagaki F, Suzuki M, Takai K, *et al.* Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7224—7235.
- [10] Heijs S K, Haese R R, Wielen P W J V D, *et al.* Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microbial Ecology*, 2007, 53: 384—389.
- [11] Xu F, Dai X, Chen Y Q, *et al.* Phylogenetic diversity of bacteria and archaea in the Nansha marine sediment, as determined by 16S rDNA analysis. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35: 89—94.
- [12] Dai X, Zhou H, Chen Y Q, *et al.* A preliminary study on 16S rDNA diversity of bacteria in the Nansha marine sediment, the South China Sea. *Progress in Natural Science*, 2002, 12(5): 479—484.
- [13] Zhou J Z, Davery E, Figure J B. Phylogenetic diversity of a bacterial community determined from Siberian tundra soil DNA. *Microbiology*, 1997, 143: 3913—3919.
- [14] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0, Sunderland, Massachusetts: Sinauer associates, 1999.
- [15] Chao A, Shen T J. Program SPADE (Species Prediction and Diversity Estimation). Program and user's guide published at <http://chao.stat.nthu.edu.tw>.
- [16] Marchesi J R, Weightman A J, Cragg B A, *et al.* Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 34: 221—228.
- [17] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8: 659—677.
- [18] Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A, *et al.* Molecular phylogenetic analyses of reversetranscribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(5): 277—286.
- [19] Teske A, Hinrichs K U, Edgcomb V, *et al.* Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1994—2007.
- [20] Kormas K A, Smith D C, Edgcomb V, *et al.* Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai trough sediments (ODP Leg 190, site 1176). *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 45: 115—125.

- [21] Webster G, Parkes R J, Cragg B A, *et al.* Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru margin. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58(1): 65 — 85.
- [22] Li T, Wang P, Wang P X. A preliminary study on the diversity of bacteria in the Xisha trough sediment, the South China Sea. *Advances in Earth Science*, 2006, 21(10): 1058 — 1062.
- [23] Nercessian O, Fouquet Y, Pierre C, *et al.* Diversity of bacteria and archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the rainbow vent field on the mid-Atlantic ridge. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(5): 698 — 714.
- [24] López-García P, Duperron S, Philippot P, *et al.* Bacterial diversity in hydrothermal sediment and Epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the mid-Atlantic ridge. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 961 — 976.
- [25] Norris T B, Wraith J M, Castenholz R W, *et al.* Soil microvial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 6300 — 6309.
- [26] Xu M X, Wang F P, Xiao X. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rDNA in deep-sea sediment. *Progress in Natural Science*, 2003, 13(6): 589 — 603.
- [27] Takai K, Moser D P, DeFlaun M, *et al.* Archaeal diversity in waters from deep south African gold mines. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5750 — 5760.
- [28] Sørensen K B, Teske A. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4596 — 4603.
- [29] Biddle J F, Lipp J S, Leverd M A, *et al.* Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(10): 3846 — 3851.

参考文献:

- [11] 许飞, 戴欣, 陈月琴, 等. 南沙海区沉积物中细菌和古细菌 16S rDNA 多样性的研究. *海洋与湖沼*, 2004, 35(1): 89 ~ 94.
- [12] 戴欣, 周惠, 陈月琴, 等. 中国南海南沙海区沉积物中细菌 16S rDNA 多样性的初步研究. *自然科学进展*, 2002, 12(5): 479 ~ 484.
- [22] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海西沙海槽沉积物细菌多样性初步研究. *地球科学进展*, 2006, 21(10): 1058 ~ 1062.
- [26] 徐美香, 王凤平, 肖湘. 深海沉积物样品中古菌的 16S rDNA 分析. *自然科学进展*, 2003, 13(6): 589 ~ 603.