

东北太平洋深海沉积物细菌多样性

徐宏翔^{1,2}, 吴敏³, 王小谷^{1,2}, 杨俊毅^{1,2}, 王春生^{1,2,*}

(1. 国家海洋局 第二海洋研究所, 浙江 杭州 310012; 2. 国家海洋局 海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 浙江 杭州 310012; 3. 浙江大学, 浙江 杭州 310058)

摘要: 采用两种方法提取中国结核合同区东区沉积物不同层次总 DNA, 通过克隆测序构建了含有 79 个克隆子的细菌 16S rRNA 基因文库, 分析了该海域沉积物中细菌的多样性。79 个克隆在系统发育树中形成了 11 个大分支, 包括 Gamma proteobacteria (22.8%), Alpha proteobacteria (16.5%), Planctomycetacia (7.6%), Delta proteobacteria (6.3%), Nitrospira (6.3%), Actinobacteria (6.3%), Beta proteobacteria (5%), Acidobacteria (5.1%), Sphingobacteria (3.8%), Firmicutes (2.5%), Other bacteria (17.7%), 其中 Gamma proteobacteria 在总文库中所占比例最高, 该分支细菌在 0~2cm、4~6cm 层也是优势菌种。Gamma proteobacteria 中假单胞菌 (*Pseudomonas*) 为优势属 (22.2%)。各个层次中所含细菌类群有所不同, Alpha proteobacteria、Gamma proteobacteria、Delta proteobacteria、Planctomycetacia、Nitrospira、Actinobacteria 和 Acidobacteria 为三层样品共有类群。

关键词: 多金属结核合同区; 深海沉积物; 细菌多样性; 16S rRNA

文章编号: 1000-0933(2008)02-0479-07 中图分类号: Q16, Q178, Q938 文献标识码: A

Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean

XU Hong-Xiang^{1,2}, WU Min³, WANG Xiao-Gu^{1,2}, YANG Jun-Yi^{1,2}, WANG Chun-Sheng^{1,2,*}

1 Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012, China

2 Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, SOA, Hangzhou 310012, China

3 Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(2): 0479 ~ 0485.

Abstract: The development of culture-independent technique using nucleic acids has led to many new findings in studies of microbial ecology. The 16S rDNA sequencing method is one of the effectively used culture-independent techniques in recent years. In this study, 16S rDNA sequencing method was used to investigate the bacterial diversity in deep-sea sediment from Northeast Pacific polymetallic nodule province (145.3968 W, 8.3751 N, water depth of 5307m). Sediment samples were collected by a TV-multicorer and total DNA was extracted using two different methods (chemical method and DNA extracting kit method). After purification genomic DNA was amplified using the universal primers (27F and 1492R). PCR products (1.5kb) were recovered and cloned into pMD18-T vector (TaKaRa). Clones were randomly selected and sequenced. After the sequences were checked using the Chimera Check program of the RDP database, a bacterial 16S rDNA gene library of 79 clones was established. Phylogenetic analysis using Mega3.1 indicated that 79 clones can be divided into 11 phylotypes. Gamma proteobacteria (22.8%) and Alpha proteobacteria (16.5%) were the dominant

基金项目: 中国大洋矿产资源研究开发协会专项基金资助项目 (DYXM115-01-3-01; DYXM115-01-3-02)

收稿日期: 2006-11-29; **修订日期:** 2007-05-09

作者简介: 徐宏翔 (1982 ~), 男, 浙江杭州人, 硕士生, 主要从事环境微生物生态学, E-mail: jingjzhy@zuaa.zju.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wang-sio@163.com

致谢: 感谢浙江大学生命科学学院极端微生物实验室许学伟老师和吴月红博士的实验指导。

Foundation item: The project was financially supported by China Ocean Mineral Resources R & D Association (COMRA) Special Foundation (No. DYXM115-01-3-01; DYXM115-01-3-02)

Received date: 2006-11-29; **Accepted date:** 2007-05-09

Biography: XU Hong-Xiang, Master candidate, mainly engaged in environmental microbial ecology, E-mail: jingjzhy@zuaa.zju.edu.cn

components of the sediment bacterial community, followed by Planctomycetacia (7.6%), Delta proteobacteria (6.3%), Nitrospira (6.3%), Actinobacteria (6.3%), Beta proteobacteria (5%), Acidobacteria (5.1%), Sphingobacteria (3.8%), Firmicutes (2.5%) and Other bacteria (17.7%). Gamma proteobacteria also dominated at layer 0–2cm and 4–6cm. Different layers had different types of bacteria, but Alpha proteobacteria, Gamma proteobacteria, Delta proteobacteria, Planctomycetacia, Nitrospira, Actinobacteria and Acidobacteria appeared in all layers. *Pseudomonas* is common in many different deep-sea environments. In this study, it accounted for 22.2% of total Gamma proteobacteria.

Key Words: polymetallic nodule province; deep-sea sediment; bacterial diversity; 16S rRNA gene analysis

海洋是一个巨大的微生物宝库。但目前已分离培养的海洋微生物较少,约占微生物总量的0.001%~15%^[1],传统的培养法很难准确全面地反映海洋微生物多样性及微生物生态系统结构和功能。随着分子生物学的迅速发展,一种快速简捷有效的方法——非培养方法研究微生物多样性日渐成熟。国内外学者所采用的非培养方法主要包括两大类,一类不需要PCR扩增,如:荧光原位杂交(FISH);另一类则基于PCR,常用的方法包括16S rDNA测序法、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、16S rDNA扩增片段长度多态性(RFLP)、16S rDNA扩增片段限制性酶切分析(ARDRA)等^[2]。其中16S rRNA基因克隆测序的方法应用广泛。

中国太平洋多金属结核合同区面积 $7.5 \times 10^4 \text{ km}^2$,分东、西两区。这两个区域虽同属结核区,却具有明显不同的海底理化环境特征^[3,4]。东、西区巨型和小型底栖生物的种类组成和丰度存在着较大差异^[5,6]。徐美香等对我国多金属结核合同区西区附近的微生物多样性进行了研究,非培养结果显示该区细菌分属于六大类,其中Gamma Proteobacteria是该区的优势种^[7],但有关东区微生物多样性的研究尚未见报道。本文采用16S rDNA测序法,通过16S rRNA基因克隆测序,构建系统发育树,研究了结核合同区东区的细菌多样性,旨在初步了解该区域的细菌种类和组成情况,为东北太平洋多金属结核区基因流和环境参照区选区研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集

本文分析所用的深海沉积物样品是由“大洋一号”船于2005年8月用电视多管沉积物采样器在我国多金属结核合同区的东区ES0502站(145.3968°W, 8.3751°N,水深5307m)所采集,沉积物类型为硅质粘土^①。样品采集后,10cm以上沉积物芯样以1cm为单位分成10个子样,分装于灭菌的10ml样品管中,-20℃保存,直到用于实验室分析。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白酶K(Sangon),溶菌酶(Haotian),pMD18-T vector (TaKaRa),PCR仪(PTC-100 Bio-RAD),分光光度计(Ultrospec 2100 Pro),Qiagen DNA胶回收试剂盒(Qiagen),FastDNA Spin Kit for soil(Qgene),引物由上海生工合成,测序由浙江大学生命科学院完成。

1.3 沉积物样品总DNA的提取和纯化

DNA提取实验前,先将样品放于4℃下结冻过夜。将样品分成3层:0~2cm层(0~1cm,1~2cm两层混合);4~6cm层(4~5cm,5~6cm两层混合);8~10cm层(8~9cm,9~10cm两层混合)。样品提取方法有两种:方法一,采用Bio101试剂盒提取,具体步骤参照产品说明书;方法二,参照文献^[8]的提取方法加以一定的改进。具体为:称取1g沉积物样品(湿重),加入2ml DNA提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 100 mmol/L Na₂-EDTA (pH=8.0), 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH=8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB),液氮和沸水反复冻融3次,加入溶菌酶至终浓50 mg/ml,37℃,120 r/min反应1h,加入蛋白酶K至终浓100

① 王春生,马维林,李振韶,等. DY105-17B航次现场报告,2005

mg/ml, 37°C, 120 r/min 反应 1h, 加 SDS 至终浓 2%, 60°C 反应 1h, 12,000 × g 离心 1min, 取上清。沉淀重复抽提一次, 具体为加入 1ml DNA 提取缓冲液和 200μl 20% SDS, 60°C 反应 10min 后 12,000 × g 离心 1min, 取上清。合并两次抽提所得上清, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 沉淀 1h, 16,000 × g 离心 30min, 沉淀用 70% 乙醇洗 1 次, 室温下晾干后用 50μl TE 溶解沉淀。第一种方法提取的粗 DNA 用 Bio101 试剂盒纯化, 第二种方法提取的粗 DNA 用 Qiagen 试剂盒纯化, 具体步骤按产品说明书。

1.4 PCR 扩增和产物割胶回收

将两种方法提到的 DNA 分别进行 PCR。50μl 反应体系中含有 5μl 10 × Buffer, 0.2 mmol/L 4 × dNTPs, 20 pmol/L 引物, 1U TaqDNA 聚合酶。PCR 反应条件: 94°C, 5min; 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 75s; 30 个循环, 72°C 延伸 7min。扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[9]。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 并用 Qiagen DNA 胶回收试剂盒回收产物, 混合相同层次回收产物。

1.5 克隆和测序

PCR 回收产物与 pMD18-T vector (TaKaRa) 在 16°C 连接 6h, 转化到 *E. coli* TOP10 感受态细胞, 蓝白斑筛选法挑取阳性克隆子, 抽质粒, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小, 将含有合适大小插入片段的克隆送测。测序工作由浙江大学生命科学院技术中心完成。测序引物为 M13。

1.6 序列分析

得到的序列首先在 RDP 数据库中检测嵌合体, 去除嵌合体后的剩余序列通过 Fasta 程序在网上数据库中搜索高同源序列, 所得序列和原序列用 MEGA3.1 中的 ClustalW 程序进行多序列匹配排列, 然后通过 MEGA3.1 程序中 Neighbor-Joining 方法, 采用 Kimura 双参数计算模型, 对 Proteobacteria 和其它类别细菌分别构建系统发育树, bootstrap 值设定为 1000。

1.7 数据库存取号

16S rRNA 基因序列登陆到 GenBank 核酸数据库中。ESA2、ESA3、ESA9、ESB5、ESB20、ESC3、ESC13、ESC15、ESA8、ESA26、ESA4、ESA5、ESA7、ESA12、ESA15、ESA20、ESB3、ESB10、ESB11、ESB21、ESB23、ESB25、ESC9、ESC12、ESC14、ESC20、ESA1、ESA6、ESA13、ESA16、ESA27、ESB8、ESB12、ESB14、ESB26、ESC4、ESC8、ESC11、ESA11、ESA23、ESA25、ESB1、ESB6、ESC16、ESA14、ESA28、ESB9、ESC1、ESA10、ESA21、ESC7、ESC21、ESC17、ESC28、ESA19、ESA30、ESB2、ESC23、ESC10、ESA17、ESB18、ESC18、ESC19 的存取号依次为 EF061160- EF061222。

2 结果

2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

从 1g 湿样中提得了 400ng 左右的环境总 DNA, 大小集中在 23kb 左右。两种方法提取的 DNA 经纯化后均能顺利扩增, 扩增产物大小约 1.5kb, 条带单一, 表明扩增效果较好。

2.2 细菌 16s rDNA 测序和系统发育分析

每层选取 30 个含正确插入片断的克隆送测, 返回的序列经 RDP 数据库分析, 去除嵌合体后, 0~2cm 层、4~6cm 层、8~10cm 层有效序列分别为 30、21 条和 28 条, 大小在 500bp 左右。将相似性大于或等于 98% 的克隆序列归为同一个分类单元^[10], 对 Proteobacteria 和其它类别细菌分别构建系统发育树(图 1、图 2), 79 个克隆在系统发育树中形成了 11 个大分支, 包括 Gamma proteobacteria (22.8%), Alpha proteobacteria (16.5%), Planctomycetacia (7.6%), Delta proteobacteria (6.3%), Nitrospira (6.3%), Actinobacteria (6.3%), Beta proteobacteria (5%), Acidobacteria (5.1%), Sphingobacteria (3.8%), Firmicutes (2.5%), Other bacteria (17.7%) (图 3), 其中 Gamma proteobacteria 所占比例最高, 该分支细菌在 0~2cm、4~6cm 层也是优势菌种, 它在这 2 层中所占比例分别为: 30% 和 28.6% (图 3、图 4)。

Alpha proteobacteria、Gamma proteobacteria、Delta proteobacteria、Planctomycetacia、Nitrospira、Actinobacteria

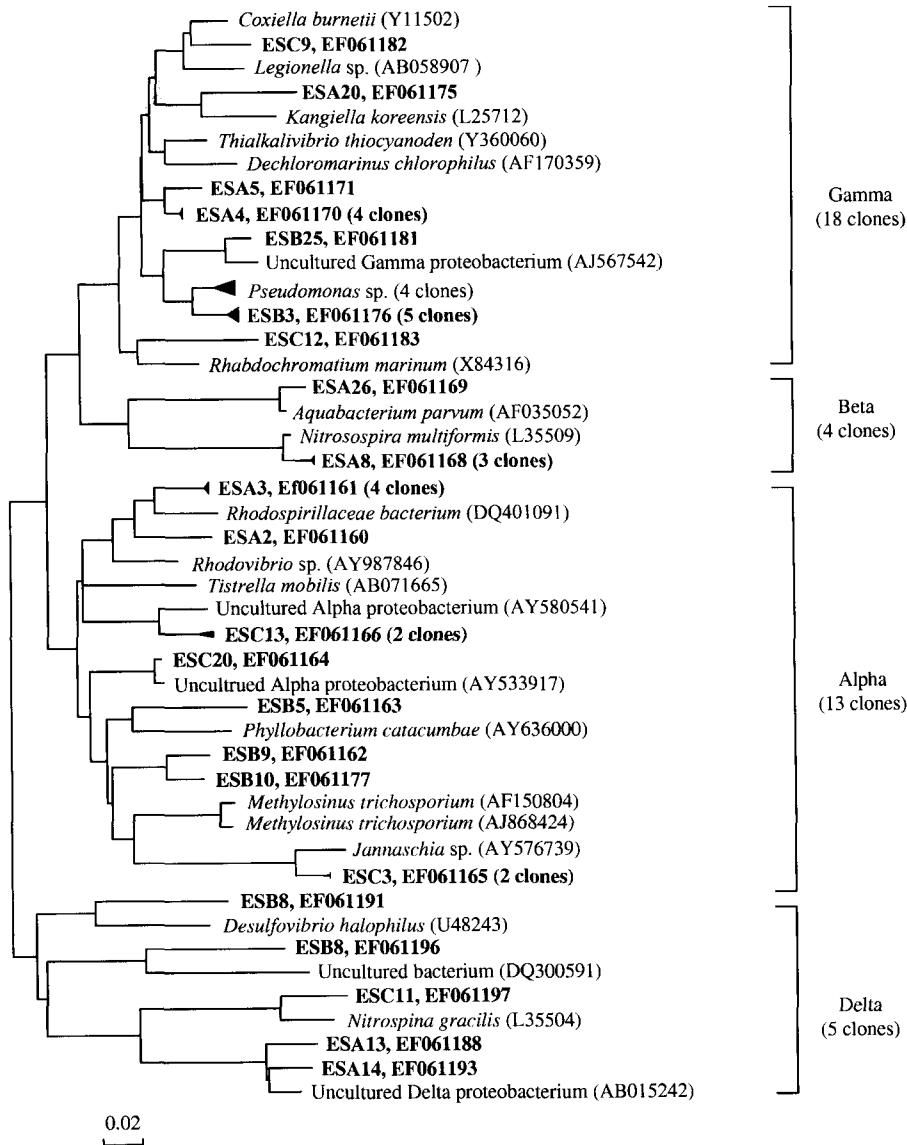


图1 根据细菌 16S rRNA 基因序列构建的 Proteobacteria 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Proteobacteria according to 16S rRNA gene sequences

和 Acidobacteria 为 3 层样品共有类群,另外 0~2cm 层不含 Sphingobacteria、Firmicutes 类群细菌,4~6cm 层不含 Beta proteobacteria、Sphingobacteria 和 Firmicutes 类群细菌。Alpha proteobacteria 所占的百分比随深度增加而增加,它在各层中所占比例分别为:10%、19%、21.4%;Gamma proteobacteria 和 Acidobacteria 则随深度增加而与下降,Gamma proteobacteria 在各层中所占比例分别为:30%、28.6%、10.7%,Acidobacteria 在各层中所占比例分别为:6.7%、4.8%、3.6% (图 4)。

3 讨论

在 16S rDNA 测序法整个过程中,DNA 提取、纯化和 PCR 扩增等步骤的操作都影响着最后系统发育分析结果^[11]。为了减少这些方面造成的偏差,做了一些改进。采用两种独立的方法提取和纯化 DNA:一种为常规提取方法,用 Qiagen 试剂盒纯化粗提产物;另一种用专门为土壤和沉积物样品设计的 Bio101 试剂盒提取和纯化。两种方法得到 DNA 分别进行 PCR 扩增,混合回收产物作为下一步实验的模板,以减少 DNA 提取对最终结果造成的误差。PCR 循环数的设置可能是引起较大实验偏差的重要原因之一^[12],前人的研究中采用的循环数从 25~33 不等^[13~15],经过多次尝试,发现高质量的模板用 30 个循环足以提供后续实验所需 DNA 模板,

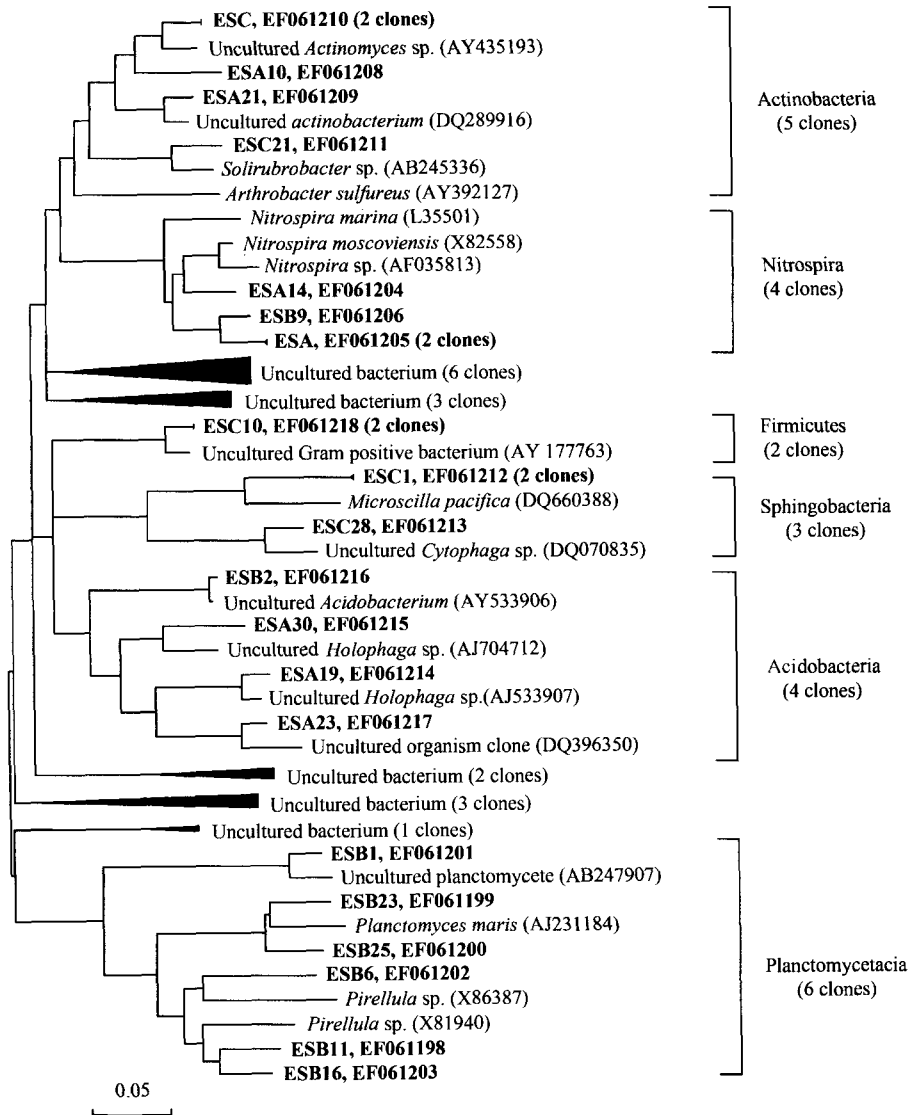


图2 根据细菌 16s rRNA 基因序列构建的其它分支细菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of other bacteria according to 16s rRNA gene sequences

同时不会因为循环数太多而导致较大实验偏差。

本实验所用的沉积物样品为电视多管采样器采集,该样品基本无扰动,较好地保持了海底沉积物的原状,将它分成3层进行实验,自上而下分别为:0~2cm层、4~6cm层、8~10cm层。序列比对结果显示10cm以表层沉积物所含微生物的种类因深度不同而有所变化。曾润颖等在研究西太平洋“暖池”区沉积物细菌群落时也发现了类似的现象,他们以3cm为单位将表层沉积物分成4层分别进行研究,测序结果显示不同层次样品有各自不同的 δ 变形杆菌、 ϵ 变形杆菌和CFB类群细菌^[16]。因此认为在研究沉积物微生物多样性时,有必要分层进行研究,然后对各层数据进行综合分析,以便更准确地描述当地微生物实际状况。

深海环境孕育了大量极端环境微生物,如嗜冷菌、嗜压菌,它们隶属 γ 变形杆菌纲,往往为深海沉积物的优势种群。日本Sagami湾沉积物(1159m)中 γ 变形杆菌和高GC革兰氏阳性菌为优势物种^[13];Nankai海脊—冷渗口沉积物(3843m)中 γ 变形杆菌占优^[14];太平洋帕里西维拉海盆5010m深处沉积物中 γ 变形杆菌和 α 变形杆菌为优势细菌种群^[17];东北太平洋结核合同区西区附近沉积物(5027m)中 γ 变形杆菌也为最主要的细菌类群^[7]。研究表明,东北太平洋深海海区ES0502站, γ 变形杆菌纲细菌在总细菌中的丰度最高(22.8%),其次为Alpha proteobacteria(16.5%),这与以往一些其它深海域的报道类似。然而,除ESA7等4

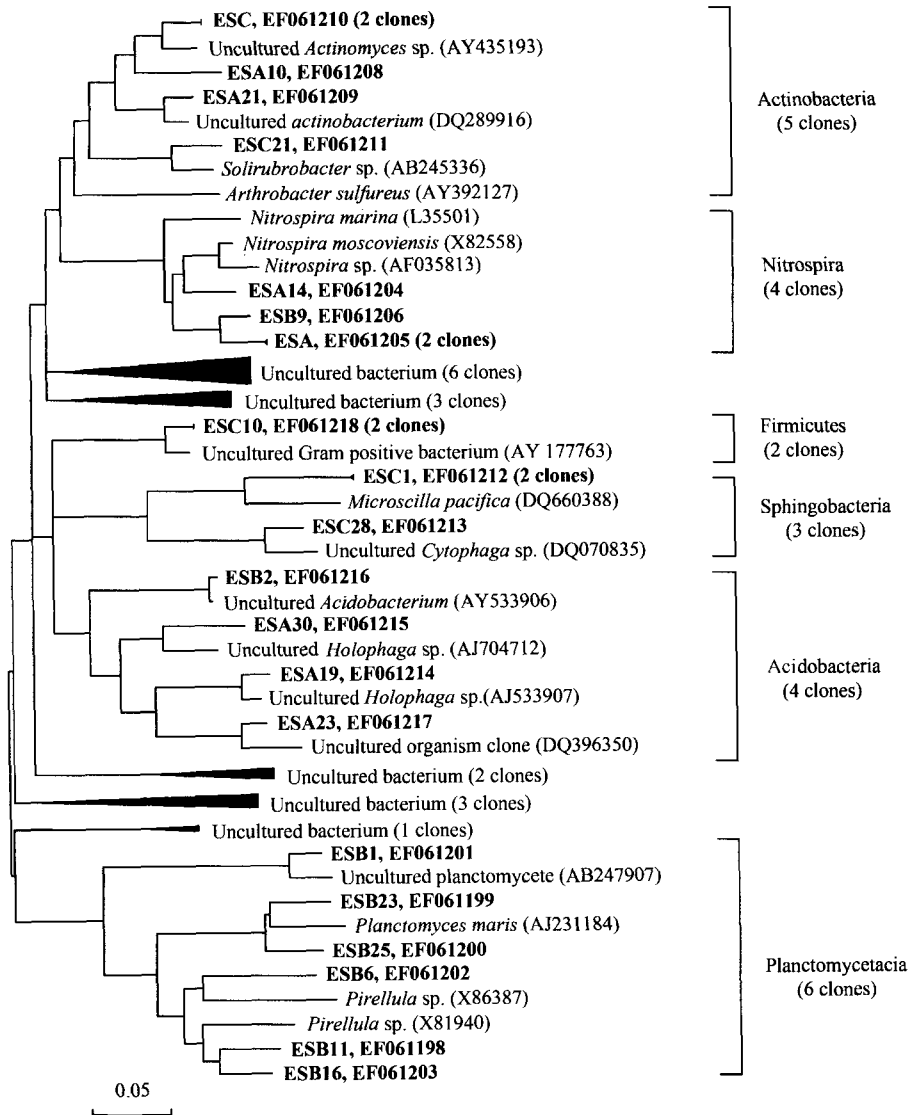


图2 根据细菌 16s rRNA 基因序列构建的其它分支细菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of other bacteria according to 16s rRNA gene sequences

同时不会因为循环数太多而导致较大实验偏差。

本实验所用的沉积物样品为电视多管采样器采集,该样品基本无扰动,较好地保持了海底沉积物的原状,将它分成3层进行实验,自上而下分别为:0~2cm层、4~6cm层、8~10cm层。序列比对结果显示10cm以表层沉积物所含微生物的种类因深度不同而有所变化。曾润颖等在研究西太平洋“暖池”区沉积物细菌群落时也发现了类似的现象,他们以3cm为单位将表层沉积物分成4层分别进行研究,测序结果显示不同层次样品有各自不同的 δ 变形杆菌、 ϵ 变形杆菌和CFB类群细菌^[16]。因此认为在研究沉积物微生物多样性时,有必要分层进行研究,然后对各层数据进行综合分析,以便更准确地描述当地微生物实际状况。

深海环境孕育了大量极端环境微生物,如嗜冷菌、嗜压菌,它们隶属 γ 变形杆菌纲,往往为深海沉积物的优势种群。日本Sagami湾沉积物(1159m)中 γ 变形杆菌和高GC革兰氏阳性菌为优势物种^[13];Nankai海脊—冷渗口沉积物(3843m)中 γ 变形杆菌占优^[14];太平洋帕里西维拉海盆5010m深处沉积物中 γ 变形杆菌和 α 变形杆菌为优势细菌种群^[17];东北太平洋结核合同区西区附近沉积物(5027m)中 γ 变形杆菌也为最主要的细菌类群^[7]。研究表明,东北太平洋深海海区ES0502站, γ 变形杆菌纲细菌在总细菌中的丰度最高(22.8%),其次为Alpha proteobacteria(16.5%),这与以往一些其它深海域的报道类似。然而,除ESA7等4

条序列与已报道的假单胞菌属相关序列有较高相似性外(97%),其余序列与标准菌种的相关序列相似性较低(低于91%),对这些细菌生理特性的深入研究需建立在后续培养的基础上。

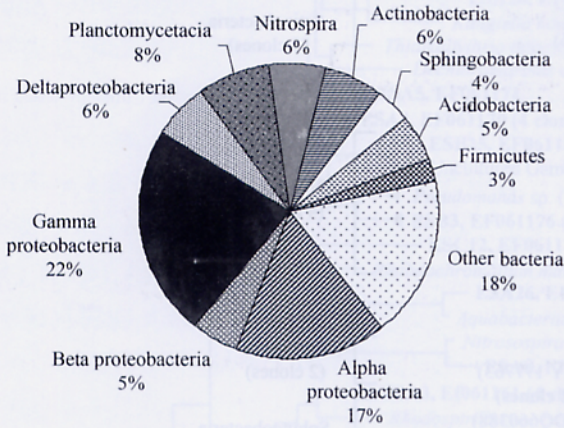


图3 各分支细菌在总细菌中所占比例

Fig. 3 The proportion of each phylotypes in total bacteria

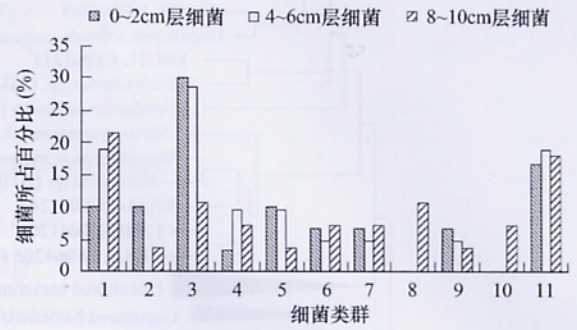


图4 各分支细菌在各层样品中的分布

Fig. 4 The distribution of each phylotypes on each layer

1: Alpha proteobacteria; 2: Beta proteobacteria; 3: Gamma proteobacteria; 4: Delta proteobacteria; 5: Planctomycetacia; 6: Nitrospira; 7: Actinobacteria; 8: Sphingobacteria; 9: Acidobacteria; 10: Firmicutes; 11: unidentified bacteria

假单胞菌属为 γ 变形杆菌纲下一个重要分支,其中有一些为嗜压种群^[18],假单胞菌的一个显著特点是营养要求简单,可利用多种有机物做为碳源和产能电子供体^[19],它是深海普遍存在的菌属^[7,13,14,18],并且在一些海区占据优势^[20]。本研究中的假单胞菌占总 γ 变形杆菌的22.2%,为优势属,它们与Yanagibayashi等分离自日本海沟沉积物的嗜冷嗜压菌有较高相似性(97%)^[18]。此外,ESA27、ESB2、ESB12、ESB20与来自其它海域的非培养序列相似性大于98%,这说明深海细菌在种属上的相似性。ESA26所代表的序列与分离来自德国饮用水的16S rDNA序列相似性为98%^[21],表明这类细菌分布的广泛性。

各分支中有一些序列与已知16S rDNA序列的相似性小于90%。另外,有17.7%的细菌为其它细菌,它们与GenBank数据库中同源序列相似性也在90%以下,同时在系统发育树中难以确定它们的分类地位,这些细菌可能是结核合同区东区新的细菌分类单元,反映了该区具有独特的细菌组成,要认识它们还需要发展合适的培养方法以获得它们。

References:

- [1] Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, *et al.* Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature (London)*, 1990, 345: 60-63.
- [2] Ursula Dorigo, Laurence Volatier, Jean-Francois Humbert. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 2005, 39: 2207-2218.
- [3] Ni J Y, Zhou H Y, Pan J M, *et al.* Geochemical characteristics of sediments from the COMRA Registered Pioneer Area (CRPA), northeast equatorial Pacific Ocean. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, 23(6): 94-100.
- [4] Zhou H Y, Wang C S. Interannual variability of deep-sea ecosystems and environmental impact assessment of potential seabed mining. In: *Prospects for international collaboration in marine environmental research to enhance understanding of the deep sea environment*. International Seabed Authority, Kingston, Jamaica, 2006, 149-157.
- [5] Wang C S, Lu D D. Application of deep ocean photo and video tow system in deep-sea megafaunal studies. Beijing: China Ocean Press, 2002. 14: 74-81.
- [6] Gao A G, Wang C S, Yang J Y, *et al.* Distribution of deep-sea meiobenthos of the eastern and western portions of the COMRA's Pioneer Area. *Donghai Marine Science*, 2002, 20(1): 28-35.
- [7] Xu M X, Wang P, Wang F P, *et al.* Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province. *Biodiversity and Conservation*, 2005, 14: 3363-3380.
- [8] Krsek M, Wellington E M H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of*

Microbiological Methods, 1999, 39: 1–16.

- [9] Gordon Webster, Carole J. Newberry, *et al.* Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 155–164.
- [10] Devereux R, He S H, Doyle C L, *et al.* Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3609–3619.
- [11] Julia R. de Liphaya, Christiane Enzinger, *et al.* Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1607–1614.
- [12] Kerkhof L, Speck M. Ribosomal RNA gene dosage in marine bacteria. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1997, 6: 260–267.
- [13] Hidetoshi Urakawa, Kumiko Kita-Tsukamoto and Kouichi Ohwada. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16s rRNA gene analysis. *Microbiology*, 1999, 145: 3305–3315.
- [14] Lina Li, Jean Guenzenec, Peter Nichols, *et al.* Miki Yanagibayashi and Chiaki Kato. Microbial diversity in Nankai Trough Sediments at a Depth of 3843m. *Journal of Oceanography*, 1999, 55: 635–642.
- [15] Katrin Ravenschlag, Kerstin Sahn, Jakob Pernthaler, *et al.* High Bacterial Diversity in Permanently Cold Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 3982–3989.
- [16] Zeng R Y, Zhao J, Zhang R, *et al.* Relationships of Bacteria community and environment in the Western Pacific Warm Pool area. *Science in China, Ser. D*, 2004, 34 (3): 265–271.
- [17] Xie H, Xue Y F, Zhao A M, *et al.* Preliminary research on bacterial diversity of Parece vela Basin Pacific Ocean by culture-independent method. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45: 1–5.
- [18] Yanagibayashi M, Nogi Y, Li L, *et al.* Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 170 (1): 271–279.
- [19] Madigan M T, Martinko J M, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms*. 8th ed. Englewood Cliffs NJ: Prentice-Hall, 1997. 871–875.
- [20] Delong E F, Franks D G, Yayanos A A. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2105–2108.
- [21] Kalmbach S, Manz W, Wecke J, *et al.* *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst Evol Microbiol*, 1999, 49(2): 769–777.

参考文献:

- [5] 王春生, 陆斗定. 深拖照相和摄像系统在深海巨型底栖动物研究中的应用. 见: 中国海洋学文集. 北京: 海洋出版社, 2002. 14: 75–82.
- [6] 高爱根, 王春生, 杨俊毅, 等. 中国多金属结核开辟区东、西两小区小型底栖动物的空间分布. *东海海洋*, 2002, 20 (1): 28–35.
- [16] 曾润颖, 赵晶, 张锐, 等. 西太平洋“暖池”区沉积物中的细菌类群及其与环境的关系. *中国科学, D辑: 地球科学*, 2004, 34 (3): 265–271.
- [17] 谢华, 薛燕芬, 赵爱民, 等. 太平洋帕里西维拉海盆细菌多样性的非培养的初步分析. *微生物学报*, 2005, 45: 1–5.