

太平洋多金属结核区深海沉积物细菌多样性分析

张文杰, 张心齐, 应意, 许学伟, 吴敏*
(浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 从太平洋多金属结核区东区两个站点沉积物中直接提取环境总基因组, 通过 PCR 及 TA 克隆分别构建了 16S rRNA 基因文库。经序列分析结果表明, 两个文库共 93 个克隆分属 13 个类群, 包括 α 变形菌纲, β 变形菌纲, γ 变形菌纲, δ 变形菌纲, 浮霉菌门, 酸杆菌门, 噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌群, 硝化螺旋菌门, 放线菌门, 绿弯菌门, 厚壁菌门, 异常球菌-栖热菌门和 OP11 类群。其中, γ 变形菌纲的细菌在两个站点沉积物中都是优势种群, 变形菌纲, 浮霉菌门, 放线菌门, 噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌群, 硝化螺旋菌门是两个站点共有的细菌类群。DOTUR 和 LIBSHUFF 数据分析结果表明, 两个站点的沉积物均具有丰富的细菌多样性, 并且物种组成具有显著性差异。

关键词: 多金属结核区; 深海沉积物; 细菌多样性; 16S rRNA 基因

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:**

Zhang Wenjie, Zhang Xinqi, Ying Yi, Xu Xuwei, Wu Min*. (*College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

Analysis of Bacterial diversity in deep-sea sediments from Pacific polymetallic nodule province.
Journal of Zhejiang University (Science Edition)

Abstract: The environmental total DNAs were directly extracted from two sediment samples from Pacific polymetallic nodule province (112.9503°W, 11.8849°N, water depth of 4160m; 145.3514°W, 8.3740°N, water depth of 5257m). Two bacterial 16S rRNA gene libraries were generated using PCR and TA cloning. Phylogenetic results indicated that 93 clones could be divided into 13 phylotypes, including Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB), Nitrospira, Actinobacteria, Chloroflex, Firmicutes, Deinococcus-Thermus and candidate division OP11. 16S rDNA sequences from members of Gammaproteobacteria dominated two sediments samples. Proteobacteria (Alpha-, Gamma-, Beta-, Delta-), Planctomycetes, Acidobacteria, CFB, Nitrospira appeared in two sediments samples. DOTUR and LIBSHUFF statistics of 16S rDNA gene sequences from the two libraries revealed major differences, indicating a high richness in the sediment bacterial communities and considerable variability in bacterial community composition among regions.

Key Words: Polymetallic nodule province; deep-sea sediments; bacterial diversity; 16S rRNA

收稿日期:

基金项目: 耐辐射嗜盐古生菌中DNA修复机制研究(973项目子课题), 核辐射污染环境微生物资源的开发利用(863子课题), 富盐有机废水处理及回用技术(浙江省重大科技专项).

作者简介: 张文杰(1982-), 男, 浙江杭州, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究. Tel: 0571-88206134-8411, E-mail: jord-1002@163.com.

通讯作者: 吴敏. Tel: 0571-88206261, E-mail: wumin@zju.edu.cn.

深海是指海洋水深 1000 米以下的部分, 占海洋总体积的 75%^[1]。深海具有高压、低温和低营养水平等特点。深海微生物在整个海洋生态系统的生物地化循环中起着重要的作用, 同时由于深海微生物所处的特殊环境, 使其在工业生产上蕴含着潜在的利用价值。所以研究深海微生物的多样性, 有助于深入地掌握深海微生物的分布特征及其在整个海洋生态系统中的功能与作用, 对于开发利用深海微生物资源具有重要的意义^[2]。

目前通过分离培养的方法获得的深海微生物较少, 比如部分嗜冷菌和嗜压菌。一般认为, 传统培养方法仅能获得 0.1-10%的微生物种类^[3], 而且很难全面地反映环境微生物多样性及其生态系统结构和功能。近年来, 随着分子生物学的迅猛发展, 采用非培养方法 (culture-independent method)^[4]及相关技术使人们能够对环境微生物的多样性进行更准确的分析。其中基于PCR的 16S rDNA测序法应用最为广泛。

中国太平洋多金属结核区面积 $7.5 \times 10^4 \text{ km}^2$, 分为东区和西区。这两个区域都属结核区, 但海底理化环境特征有着明显的区别^[5]。本文采用 16S rDNA测序法, 应用 MEGA, DOTUR和LIBSHUFF软件分析比较了结核合同区东区两个站点沉积物的细菌多样性, 旨在初步了解该区域不同站点间的细菌组成和分布情况。

1 材料和方法

1.1 样品采集

实验所用的深海沉积物样品由“大洋一号”科考船于 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所采集, 分别为: EP2005-04 站 (112.9503°W, 11.8849°N, 水深 4160m), 沉积物类型为硅质粘土; ES0505 站 (145.3514°W, 8.3740°N, 水深 5257m), 沉积物类型为钙硅质粘土。样品采集后, 分装于无菌的 10 ml 样品管中, -20°C 保存。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白酶 K (Merck), 溶菌酶 (Sigma), pMD 18-T vector (TaKaRa), PCR 仪 (PTC-100 Bio-RAD), DNA 胶回收试剂盒 (Axygen), 高速冷冻离心机 (Beckman J-25), 台式冷冻离心机 (Eppendorf), 分光光度计 (Ultrospec 2100 Pro), 引物由上海生工合成。

1.3 环境总基因组 DNA 的提取

采用改进后的Zhou提取法^[6]: 1g沉积物样品 (湿重) 加入 10ml脱腐缓冲液^[7], 60°C水浴 5min, 3000g离心 5min, 弃上清, 重复洗涤一次。加入 4.5ml DNA抽提缓冲液 (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM Na₂EDTA (pH 8.0), 100mM Na₃PO₄ (pH 8.0), 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB), 水平放于摇床中振荡 (37°C, 90rpm), 30min, 加入溶菌酶至终浓 5mg/ml, 继续振荡 30min, 加入 0.5ml 20% SDS, 65°C保温 30min; 冷却至室温, 加入 25 μl 蛋白酶K (20mg/ml), 37°C水浴保温 2h。6000g离心 10min, 将上清液转移入新的离心管, 沉淀重复抽提 2 次, 步骤为: 往沉淀中加入 1.9ml DNA抽提缓冲液及 0.1ml 20% SDS, 65°C水浴 10min, 6000g离心 5min。合并上清液, 加入等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提后再加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 重复抽提一次, 以 0.6 倍体积的异丙醇沉淀DNA (冰浴 1h), 16,000g离心 20min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤两次, 真空干燥后用 500μl TE溶解。简单纯化后-20°C保存备用。

1.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增、克隆和测序

将提取的 DNA 作为 PCR 扩增的模板, 使用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μl): 5 μl 10×PCR Buffer, 3 μl MgCl₂(25 mmol/l), 0.5 μl dNTP Mixtures(10 mmol/l), 1 μl引物(4 μmol/l), Taq DNA聚合酶 1U。PCR反应条件: 95

℃ 10 min; 94℃ 45s, 50℃ 45s, 72℃ 75s, 30 个循环; 72℃ 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果, 并用DNA胶回收试剂盒纯化目标产物。

采用 pMD18-T vector Kit 进行连接, 以 *E. coli* TOP10 为宿主, 蓝白斑方法筛选阳性转化子, 快速提取质粒, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小, 将含有正确插入片段的克隆子送测。测序由国家人类基因组南方研究中心完成。

1.5 构建系统发育树、

得到的序列首先提交到RDP II 数据库, 利用在线检测工具CHECK-CHIMERA检测嵌合体, 去除嵌合体后的有效序列通过GenBank的BLASTN程序搜索高同源序列, 采用 ClustalW 程序进行多序列匹配排列, 然后通过MEGA 4.0 程序中的Neighbor-Joining方法, 采用Jukes-Cantor计算模型, 对变性菌纲和其它类别的细菌分别构建系统发育树, bootstrap值设定为 1000。利用PHYLIP软件包中的DNADIST程序计算距离矩阵, 利用DOTUR软件^[8]生成稀释曲线 (Rarefaction curves) 及比较分析两个站点的细菌种群多样性, 通过LIBSHUFF软件^[9]来比较 16S rDNA克隆文库间的差异性。

1.6 数据库存取号(Accession number)

16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸数据库中的登陆号为 EU675763-EU675845。

2 结果

2.1 总基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

从 1g 深海沉积物中分别获得了约 450 ng (EP2005-04)和 420 ng (ES0505)的环境总 DNA, 大小约 23 kb。通过脱腐缓冲液^[7]的前裂解洗脱所提取的DNA, 经简单纯化就能顺利进行PCR扩增, 所得到的DNA产物为单一条带, 片段大小约为 1.5 kb。

2.2 细菌 16S rDNA 系统发育分析

每个站点随机选取 50 个含正确插入片断的克隆子测序, 经 CHECK-CHIMERA 分析去除嵌合体后, EP2005-04 站和 ES0505 站的有效序列数分别为 46 和 47, 有效长度均大于 1350 bp。

针对变形菌门(proteobacteria)和其它类群细菌分别构建系统发育树(图 1、图 2), 结果显示, 93 个克隆分属于 13 个类群, 多数属于 α 变形菌纲(Alphaproteobacteria), γ 变形菌纲 (Gammaproteobacteria), δ 变形菌纲 (Deltaproteobacteria), 浮霉菌门 (Planctomycetes)和酸杆菌门(Acidobacteria), 其余分别属于噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌群 (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes, CFB), 硝化螺旋菌门(Nitrospira), β 变形菌纲(Betaproteobacteria), 放线菌门(Actinobacteria), 绿弯菌门(Chloroflexi), 厚壁菌门 (Firmicutes), 异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)和candidate division OP11^[10], 还有 8 个克隆不能确定系统发育地位(Unclassified A-E)。其中 22 个序列与已知的可培养细菌 16S rDNA序列有较高的同源性(表 1), 其他大多数序列与来自海洋沉积物的非培养序列同源性最高, 个别序列与其他环境非培序列同源性最高, 而与已知的可培养细菌序列同源性很低。

从变形菌纲的系统发育树中发现太平洋多金属结合区沉积物中变形菌纲类群包括 4 个亚群: Alpha、Beta、Gamma 和 Delta 亚群。其中 γ 变形菌纲类细菌在两个站点都是优势种群, 其在 EP2005-04 和 ES0505 两个文库的有效序列中所占的比例分别为: 21.7%和 27.7%。有 9 个有效序列分属于军团菌目(Legionellales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、黄色单胞菌目(Xanthomonadales)和肠杆菌目(Enterobacteriales), 其他序列分属于非培养方法获得的克隆。 α 变形菌纲在两个文库的有效序列中所占的比例是: 10.9%和 14.9%, 有 7 个有效序列分属于红

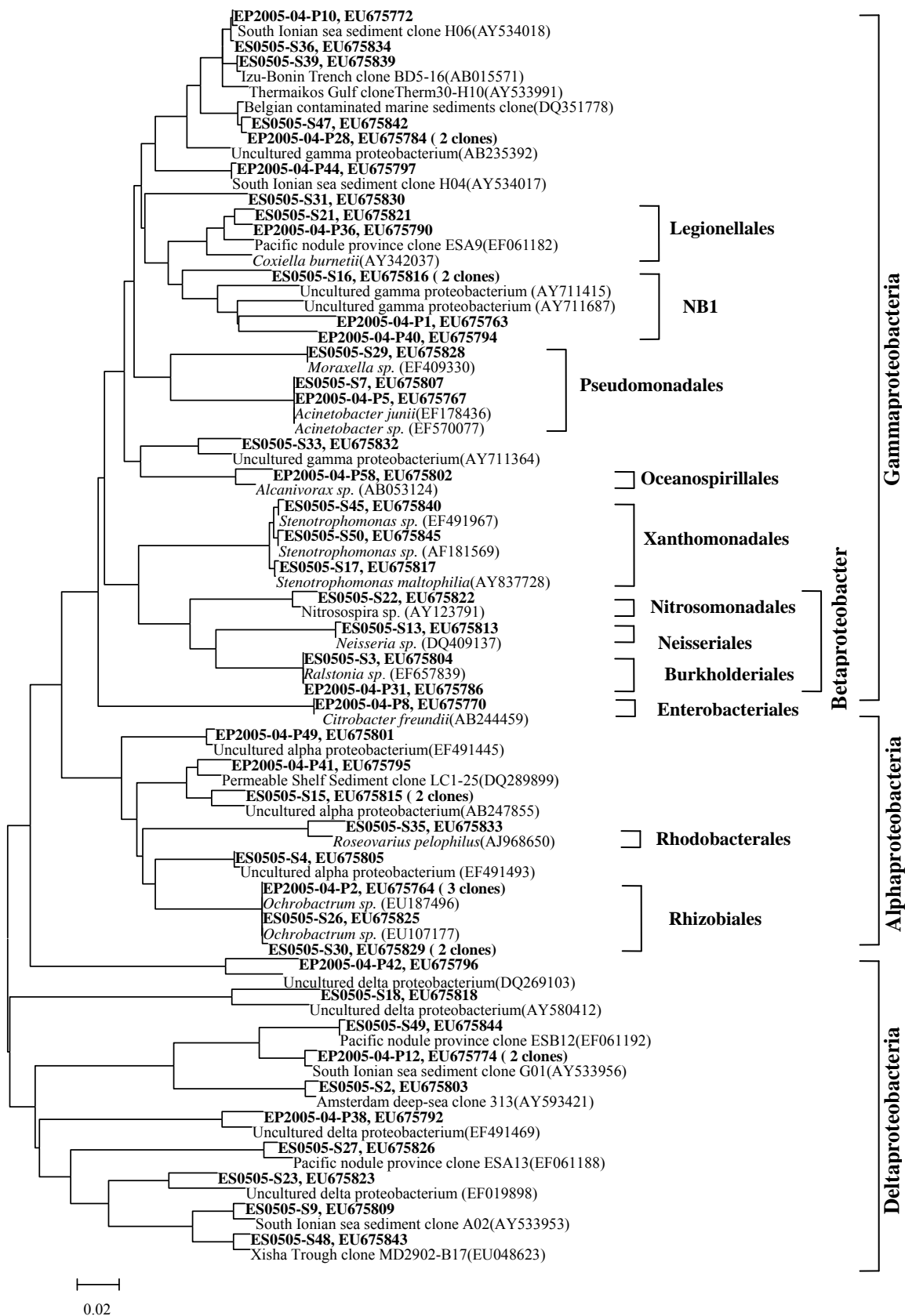


图 1 基于细菌 16S rRNA 序列的太平洋多金属结核区变形菌纲的系统发育树

Fig 1 Phylogenetic tree reconstructed from 16S rRNA sequences of Proteobacteria from Pacific polymetallic nodule province EP2005-04 (P) and ES0505 (S)

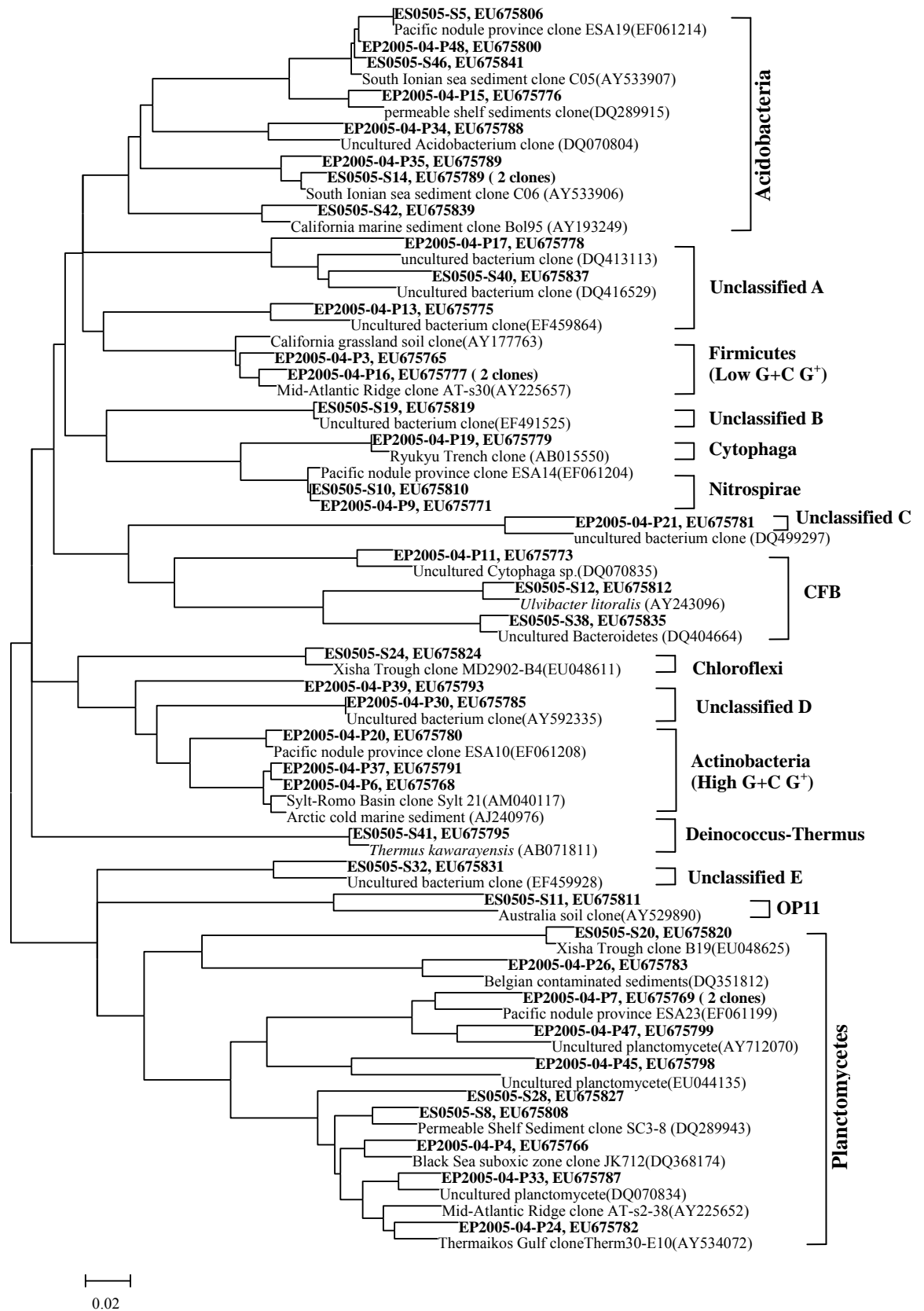


图 2 基于细菌 16S rRNA 序列的太平洋多金属结核区其他类群细菌的系统发育树
 Fig 2 Phylogenetic tree reconstructed from 16S rRNA sequences of other bacteria from Pacific polymetallic nodule province EP2005-04 (P) and ES0505 (S)

杆菌目(Rhodobacterales)和根瘤菌目(Rhizobiales)。β变形菌纲在两个文库的有效序列中所占的比例是：2.2%和 6.4%，且全部与可培养的细菌有较高的序列相似性，分属于亚硝化单胞菌目(Nitrosomonadales)、奈瑟菌目(Neisseriales)和伯克氏菌目(Burkholderiales)。δ变形菌纲在两个文库的有效序列中所占的比例是：8.7%和 14.9%，且全部序列分属于非培养方法获得的克隆。

根据其他类群细菌的系统发育树，可以将其他类群细菌分为浮霉菌门、酸杆菌门、CFB、硝化螺旋菌门、放线菌门(High G+C G⁺)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Low G+C G⁺)、异常球菌-栖热菌门和candidate division OP11。其中在EP2005-04 和ES0505 两个文库的有效序列中浮霉菌门(17.4%和 6.4%)和酸杆菌门(8.7%和 10.6%)所占比例相对较高，除了 2 个有效序列分属于拟杆菌门和异常球菌-栖热菌门，剩余其他类群细菌来自非培养方法获得的克隆。

表 1 太平洋多金属结核区沉积物部分细菌 16S rDNA 序列分析结果

Table 1 Partial bacteria 16S rDNA phylotype affiliations from the sediments of Pacific polymetallic nodule province province EP2005-04 (P) and ES0505 (S)

Representative clone of clone group	GenBank No.	Numbers of total clones	Nearest phylogenetic relative	Similarity%
Alpha proteobacteria				
P2	EU675764	3	<i>Ochrobactrum</i> sp. X-16	100%
S26	EU675825	1	<i>Ochrobactrum</i> sp. LS 16S	100%
S30	EU675829	2	<i>Ochrobactrum</i> sp. X-16	99%
S35	EU675833	1	<i>Roseovarius pelophilus</i> strain G5IIT	96%
Beta proteobacteria				
P31	EU675786	1	<i>Ralstonia</i> sp. 9RC-10	100%
S3	EU675804	1	<i>Ralstonia</i> sp. 9RC-10	100%
S13	EU675813	1	<i>Neisseria</i> sp. J01	99%
S22	EU675822	1	<i>Nitrosospira</i> sp. Nsp57	98%
Gamma proteobacteria				
P5	EU675767	1	<i>Acinetobacter</i> sp. w2	100%
P8	EU675770	1	<i>Citrobacter freundii</i> , strain:C3-1	100%
P36	EU675790	1	<i>Coxiella burnetii</i> strain VR145	94%
P58	EU675802	1	<i>Alcanivorax</i> sp. Mho1	94%
S7	EU675807	1	<i>Acinetobacter junii</i> strain 2R11	100%
S17	EU675817	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%
S29	EU675828	1	<i>Moraxella</i> sp. 'Morax. M1'	100%
S45	EU675840	1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. OS17	99%
S50	EU675845	1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. JRL-2	99%
Bacteroidetes				
S12	EU675812	1	<i>Ulvibacter litoralis</i> strain KMM 3912	94%
Deinococcus-Thermus				
S41	EU675838	1	<i>Thermus kawarayensis</i>	97%

2.3 细菌 16S rDNA 文库多样性分析

根据EP2005-04 和ES0505 两个站点分别获得的 16S rDNA序列，对序列之间的相似性比较，将具有大于 97%相似性的克隆序列归于同一个操作分类单元(OTU)^[8]，都为 40 个。通过DOTUR软件生成稀释曲线（图 3），并得出两个站点的多样性指数值（表 2）。分析结果表明：（1）EP2005-04 站的Chao1 和ACE丰富度指数值均大于ES0505 站，说明前者的细菌多样性高于后者；（2）EP2005-04 的Shannon-Weaver多样性指数值略高于ES0505 站，Simpson优势度指数值略低于ES0505 站，说明EP2005-04 站的细菌多样性程度略高于EP2005-04 站；（3）两站点稀释曲线均接近于 1:1 参考线，该线

是在假定每个克隆都分属一个OUT前提下所得出的直线。同时两个站点在文库克隆数分别是 46 和 47 的基础上，可分别划分为 40 个OTU，说明两个站点都具有较高的多样性，而ES0505 站的稀释曲线要比EP2005-04 站先趋于平缓，说明前者的种群多样性略逊于后者，这与多样性指数所反映的结果一致。

表 2 太平洋多金属结核区沉积物细菌多样性指数值
Table 2 Measures of bacterial diversity from the sediments of Pacific polymetallic nodule province at 0.05 evolutionary distance

	Formula	EP2005-04	ES0505
Bias-corrected Chao1	文献 ^[8,11]	179.2	115.5
Abundance-base Coverage Estimator (ACE)	文献 ^[8,11]	188.6	124.0
Shannon index (H')	$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$	3.59	3.56
Simpson index (D)	$D = 1 - \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$	0.0087	0.0102

S , the number of OTUs in the samples; N , total number of clones in the samples; n_i , the number of clones in an OUT; P_i , the proportion of clones in the i th species.

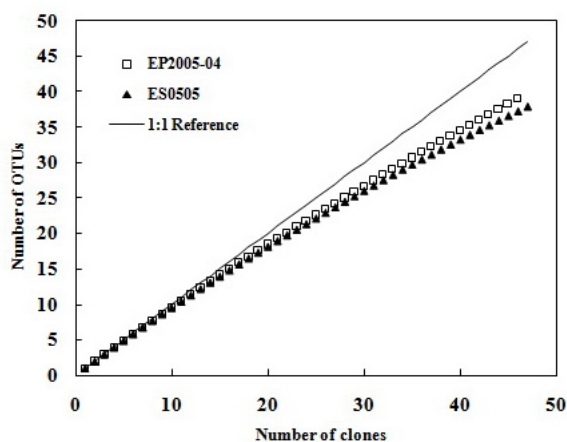


图 3 太平洋多金属结核区沉积物细菌 16S rDNA 序列稀释曲线
Fig. 3 Rarefaction curves using bacteria 16S rDNA sequences from the sediments of Pacific polymetallic nodule province at 0.05 evolutionary distance

为了比较两个站点克隆文库间是否存在显著性差异，应用LIBSHUFF软件进行数据分析^[9]（图 4），得出了同源覆盖率曲线(Homologous coverage curve)，异源覆盖率曲线(Heterologous coverage curve)，两曲线间的差异曲线 ΔC ，以及描述 ΔC 显著性的参数 P ，结果表明，两个站点的细菌种群组成有着显著性的差异（ $P=0.001$ ）。

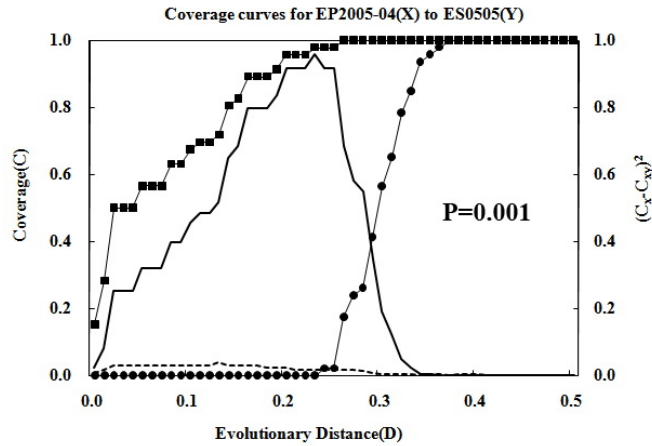


图 4 太平洋多金属结核区 EP2005-04 站和 ES0505 站细菌 16S rDNA 文库 LIBSHUFF 分析

Fig. 4 LIBSHUFF analysis of bacterial 16S rDNA from EP2005-04 (X) compared to ES0505 (Y) clone libraries

同源覆盖率曲线(Homologous coverage curve, ■) $C_x=1-(N_x/n)$, 异源覆盖率曲线(Heterologous coverage curve, ●) $C_{xy}=1-(N_{xy}/n)$, 两曲线差异 $\Delta C=(C_x-C_{xy})^2$, ΔC 的显著性通过 P 描述。n 为 X 文库的克隆数, N_x 表示在 X 文库中独特(unique)的序列数, N_{xy} 表示 X 文库中那些在 Y 文库中没有的序列的数目, N_x 和 N_{xy} 取决于进化距离(D)。实线表示在不同进化距离(D)下的 ΔC or $(C_x-C_{xy})^2$, 虚线代表随机化样品的 $\Delta C(P=0.05)$ 。

3 讨论

针对太平洋多金属结核区两个站点的深海沉积物样品进行细菌多样性分析, 结果表明, γ 变形菌纲类细菌在这两个沉积物样品中均为优势类群, 这一结论与分布于太平洋其他位点的深海沉积物细菌多样性报道一致^[12-15]。徐美香等^[12]发现我国多金属结核区西区深海沉积物的细菌分属于六个大类, 其中 γ 变形菌纲是该区的优势细菌类群, 而徐宏翔等^[15]对该结核区东区 ES0502 站深海沉积物不同层次的细菌系统发育分析表明, γ 变形菌纲是该站点的优势细菌类群。国内外对于深海多金属结核区细菌多样性的研究报道较少, 本研究中各类群细菌具体组成上与国内外该结核区的研究报道有所不同。其中 S29、P5 和 S7 克隆分别归属于 γ 变形菌纲中假单胞菌目的 *Moraxella* (莫拉菌属) 和 *Acinetobacter* (不动杆菌属)。以往的研究表明, 假单胞菌属为 γ 变形菌纲中一个重要的分支, 并且普遍存在于深海中^[14-16], 而从深海环境中发现莫拉菌属和不动杆菌属的报道并不多。S17、S45、S50 克隆归属于 γ 变形菌纲中黄色单胞菌目的 *Stenotrophomonas* 属, 有报道指出, 这种类似于假单胞菌的细菌从太平洋深海无脊椎动物中分离得到, 且对这些无脊椎动物有致病性^[17]。S36、S39、S47、P10、P28 和 P44 克隆与来自其它海洋沉积物^[14,18,19]的克隆序列相似性大于 98%, 这说明这些细菌在深海沉积物分布的广泛性。S16、P1 和 P40 克隆在 γ 变形菌纲系统发育树 (图 1) 中聚集成一个簇 (NB1), 它们与已知 16S rDNA 序列的相似性在 87-90%, 推测这类细菌可能是代表 γ 变形菌纲下的未知物种。

α 变形菌纲类细菌在海洋环境中分布比较广泛^[20], 包括海水、深海沉积物、深海热液口等。本研究中 P2、S26、S30 克隆分属于 α 变形菌纲下的 *Ochrobactrum* (苍白杆菌属), 该属细菌通常出现在土壤中, 有的寄生在植物根部, 有报道有些能降解海洋中的多环芳烃(PAHs), 该类细菌在海洋环境中可能起到降解污染物的作用。 β 变形菌纲类细菌通常所占比例较少, 本研究在构建系统发育树时, 发现它和 γ 变形菌纲聚集在同一个分支中, 可能这些 β 变形菌纲类细菌与 γ 变形菌纲有较近的亲缘关系。 δ 变形菌纲类细菌大多数为硫酸盐还原菌^[21], 然而本研究中除了 S42 克隆与可培养的硫酸盐还原菌较远的亲缘关系 (81% 相似性), 其他细菌克隆都是分属非培序列, 其中部

分序列与已知 16S rDNA 序列同源性低于 90%，由此说明这些细菌可能是 δ 变形菌纲在结合区东区新的分支。其他细菌类群中，浮霉菌门和酸杆菌门的比例较高，但都是非培分支。酸杆菌门类群主要分布在深海热液口沉积物^[21]和热泉周边土壤中^[22]，本研究所发现的该类细菌大多数与东地中海南爱奥尼亚深海沉积物^[18]中的同类细菌亲缘关系较近（95-97%相似性），说明该类群在深海沉积物中确有分布。浮霉菌门类群在本研究中的同源序列来源较广，其中 P7 和 P47 克隆与可培养浮霉菌有相对高的同源性（88%和 91%相似性），说明深海环境中的该类群微生物的可培养化仍待进一步研究。

α 变形菌纲， γ 变形菌纲， β 变形菌纲， δ 变形菌纲，浮霉菌门，酸杆菌门，CFB，硝化螺旋菌门是太平洋多金属结合区两个站点共有的细菌类群。放线菌门(High G+C G⁺)和厚壁菌门(Low G+C G⁺)类细菌仅在 EP2005-04 站点发现，而绿弯菌门，异常球菌-栖热菌门和 OP11 类细菌仅在 ES0505 站点发现。此外，浮霉菌门类细菌在两个站点的种群丰度相差较大，其在 EP2005-04 站和 ES0505 站的有效序列中所占的比例分别为：17.4%和 6.4%。造成这种差异的可能原因之一是沉积物的性质。虽然两个站点同属于太平洋多金属结核区东区，但由于结核区地质环境的复杂多变，采样点位置的不同会使两个沉积物样品的物化性质有所差别，因此其细菌组成也会有所不同，说明微生态构成对环境的适应性。值得注意的是，ES0505 站中得到的 S41 克隆与 Kurosawa 等^[23]分离自日本热泉的嗜热菌 *Thermus kawarayensis* 有较高相似性(97%)。通常 *Thermus* 属细菌主要分布在陆地热泉，在深海热液口沉积物中也有报道，说明深海沉积物中的细菌多样性可能还受其他因素的影响，而引入一些外源性的物种。

应用 LIBSHUFF 软件分析得出两个站点间的细菌种群组成存在显著性差异，这一结果同时体现在不同站点的系统发育树上，其拓扑结构间的差异同样十分明显。LIBSHUFF 能很好的对文库间的重叠率进行检测，但是 Stach 等^[24]人提出它对系统发育分类并不敏感，也就是说当两个种群组成相近的文库进行 LIBSHUFF 数据分析时，它可能会得出两个文库构建自同一群落 (identical community, P=1.00) 的结论。尽管本研究中从两个站点挑取的克隆数不多，但通过 LIBSHUFF 数据分析能明显说明两站点克隆文库间存在的不同，即两站点间的细菌种群组成存在显著性差异。

致谢

感谢国家海洋局第二海洋研究所提供实验样品及相关信息。

参考文献 (Reference) :

- [1] JANNASCH H W, TAYLOR C D. Deep-sea microbiology [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1984, 38: 487-514.
- [2] YAYANOS A A. Microbiology to 10,500 meters in the deep-sea [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 777-805.
- [3] HEAD I M, SAUNDERS J R, PICKUP R W. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms [J]. *Microbial Ecology*. 1998, 35: 1-21.
- [4] DAVID M W, RONALD W, MARY M B. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community [J]. *Nature*, 1990, 345: 63-65.
- [5] ZHOU Huaiyang, WANG Chunsheng. **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** [M]. Kingston, Jamaica: International Seabed Authority, 2006: 149-157.
- [6] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 316-322.
- [7] FORTIN N, BEAUMIER D, LEE K, et al. Soil washing improves the recovery of total community DNA from

- polluted and high organic content sediments [J]. **J Microbiol Methods**, 2004, 56(2): 181-191.
- [8] SCHLOSS P D, HANDELSMAN J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness [J]. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [9] SINGLETON D R, FURLONG M A, RATHBUN S L, et al. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001, 67: 4374-4376.
- [10] HUGENHOLTZ P, PITULLE C, HERSHBERGER K L, et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring [J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, 180(2): 366-376.
- [11] CHAO A, MA M C, YANG M C K. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates [J]. **Biometrika**, 1993, 80(1):193-201.
- [12] XU Meixiang, WANG Peng, WANG Fengping, et al. Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province [J]. **Biodiversity and Conservation**, 2005, 14: 3363-3380.
- [13] 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[J]. **微生物学报**, 2005, 45: 1-5.
- XIE Hua, XUE Yanfen, ZHAO Aimin, et al. Preliminary research on bacterial diversity of Parece vela Basin Pacific Ocean by culture-independent method [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2005, 45: 1-5.
- [14] LI L, KATO C, HORIKOSHI K, Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. **Biodiversity and Conservation** [J], 1999b, 8:659-677.
- [15] 徐宏翔, 吴敏, 王小谷等. 东北太平洋深海沉积物细菌多样性分析[J]. **生态学报**, 2008, 28(2): 479-485.
- XU Hongxiang, WU Min, WANG XiaoGu, et al. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean [J]. **Acta Ecologica Sinica**, 2008, 28(2): 479-485.
- [16] URAKAWA H, KUMIKO K, OHWADA K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay, Japan, as determined by 16s rRNA gene analysis [J]. **Microbiology**, 1999, 145: 3305-3315.
- [17] ROMANENKO L A, UCHINO M, TANAKA N. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates [J]. **Arch Microbiol.** 2008, 189(4): 337-344.
- [18] POLYMENAKOU P N, BERTILSSON S, TSELEPIDES A. Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA [J]. **Microb. Ecol.**, 2005, 50 (3): 447-462.
- [19] GILLAN,D C, PERNET P. Adherent bacteria in heavy metal contaminated marine sediments [J]. **Biofouling**, 2007, 23 (1-2), 1-13.
- [20] NERCESSIAN O, FOUQUET Y, PIERRE C. Diversity of Bacteria and Archaea associated with a carbonate-rich metalliferous sediment sample from the Rainbow vent field on the Mid-Atlantic Ridge [J]. **Environmental Microbiology**. 2005, 7 (5): 698-714.
- [21] LOPEZ-GARCIA P, DUPERRON S, PHILIPPOT P. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the mid-Atlantic ridge [J]. **Environmental Microbiology**, 2003, 5(10): 961-976.
- [22] NORRIS T B, WRAITH J M, CASTENHOLZ R W. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68(12): 6300-9.
- [23] KUROSAWA N, ITOH Y H, ITOH T. *Thermus kawarayensis* sp. nov., a new member of the genus *Thermus*, isolated from Japanese hot springs [J]. **Extremophiles**, 2005, 9 (1): 81-84.
- [24] STACH JEM, MALDONADO L A, MASSON D G. Statistical approaches for estimating actino-bacterial diversity in marine sediments [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69: 6189-6200.