

## 南海北部巴士海峡深海沉积物中细菌多样性分析\*

孙慧敏<sup>1,2</sup>, 戴世赬<sup>1,2</sup>, 王广华<sup>1,2</sup>, 谢练武<sup>1,2</sup>, 李翔<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋生物可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中科院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 从南海北部巴士海峡深海沉积物中提取到高质量的总DNA, 通过TA克隆构建了含有23个可操作分类单元(OTU)的16S rRNA基因文库, 选择各OTU中代表性克隆子进行测序与系统发育分析, 结果表明, 南海北部巴士海峡深海沉积物中细菌在系统进化树中至少分属于9个类群: 其中放线菌 *Actinobacteria*, 变形细菌 *Proteobacteria*, 和浮霉菌 *Planctomycetes* 为优势种; 其他细菌如疣微菌 *Verrucomicrobia*, 鞘脂杆菌 *Sphingobacteria*, 硝化螺旋菌门 (*Nitrospira*), 绿弯菌 *Chloroflexi*, 厚壁菌 *Firmicute*, 酸杆菌 *Acidobacteria* 等为非优势种群; 另外有两个克隆子属于未知种群。在所获得的23个代表克隆子序列中, 有11个序列与已知细菌的同源性 $\leq 95\%$ , 占到了所有序列的48%。这一结果说明在南海北部巴士海峡海区具有非常丰富的微生物多样性, 这一海区蕴含着大量未知的微生物资源, 因而值得进行进一步的研究探索。

**关键词:** 南海; 深海沉积物; 细菌多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0041-06

## Phylogenetic diversity analysis of bacteria in the deep-sea sediments from the Bashi Channel by 16S rDNA BLAST

SUN Hui-min<sup>1,2</sup>, DAI Shi-kun<sup>1,2</sup>, WANG Guang-hua<sup>1,2</sup>, XIE Lian-wu<sup>1,2</sup>, LI Xiang<sup>1</sup>

(1. Key laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract:** Using modified DNA extraction and purification method, high-quality environmental DNA was obtained from deep-sea sediments of the Bashi Channel in the northern South China Sea. Diversity of eubacteria was studied by PCR, ARDRA and sequence analysis of 16S rDNA and compared with the published sequences in the GenBank. Based on the ARDRA profile generated, 118 clones from the 16S rDNA library were divided into 23 operational taxonomic units (OTUs). Phylogenetic analysis showed that the representative clones of the 23 OTUs fell into nine groups: *Actinobacteria* (26%), *Proteobacteria* (22%), *Planctomycetes* (18%), *Verrucomicrobia* (4.5%), *Sphingobacteria* (4.5%), *Nitrospira* (4.5%), *Chloroflexi* (5%), *Firmicutes* (4.5%), and *Acidobacteria* (4.5%), respectively. Among the 23 clones, there was no clone being identical to the known 16S rDNA sequences in the Ribosomal Database Project small subunit RNA database. In this clone library, 11 clones had less than 95% similarity to rDNA sequences retrieved from the DNA databases. The results suggested that bacterial population in the Bashi Channel of the northern South China Sea is very diverse in phylogeny and there are the massive unknown microorganism deserve further studying and exploration as valuable resources.

**Key words:** South China Sea; deep-sea sediment; bacteria diversity

海洋蕴藏着丰富的资源, 与人类的生存和社会发展息息相关, 研究海洋, 开发海洋已经成为解决当今世界面临的人口, 资源与环境三大问题的重要

途径。地球表面有超过50%的面积被深海大洋所覆盖, 据报道, 深海沉积物中的微生物总量占到了全球生物总量的10%以上<sup>[1]</sup>。然而由于深海低温, 高

收稿日期: 2008-05-13; 修订日期: 2009-04-15。刘学东编辑

基金项目: 国家“973”计划项目(2010CB833801), 广东省科技计划项目(2008A030203004)和中科院引进国外杰出人才项目(百人计划)

作者简介: 孙慧敏(1984—), 女, 山东省临沂市人, 海洋生物学硕士, 研究方向为海洋生物多样性与海洋药物。

通讯作者: 李翔, 研究员, E-mail: lixiang@scsio.ac.cn

\*致谢: 样品在中国科学院南海海洋所南海北部公开航次中采集, 感谢陆钧老师和南海海洋所船队对采样、实验工作的大力协助。

压的独特环境,以及其他一些未知的原因,在目前的条件下,这些微生物中只有 0.001%到 1%可以被培养,因此仅靠传统的微生物培养方法,还不能完全模拟深海环境下微生物的生源生态来探讨深海沉积物中的微生物区系组成及其多样性分布特点,更无从谈起深海微生物资源的有效利用。在过去的近 20 年里,基于 16S rRNA 的分子生物学方法由于不依赖于微生物培养而正在被广泛地应用到深海沉积物中微生物群体的研究中。目前的研究表明,用 DNA 分析技术所揭示的环境样品中的微生物多样性比可培养微生物的多样性要高得多<sup>[2,3]</sup>。

巴士海峡位于西太平洋南中国海,是中国台湾岛与菲律宾巴坦群岛之间的海峡和连通太平洋与南中国海的重要国际水道,也是西太平洋一个具有重要战略意义的海域。巴士海峡还是一个地震多发区,是西北太平洋的大浪区之一,属热带海洋性气候。目前关于南海深海沉积物的研究主要集中在南沙海区,对南海北部巴士海峡附近海区的研究尚未见报道。本文通过构建 16S rRNA 基因文库,对采集于巴士海峡深海沉积物样品的细菌多样性进行了初步的分析和探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

本文研究的沉积物样品是由中国科学院南海海洋所“实验 3 号”科学考察船于 2006 年 9 月中科院南海北部公开航次中采自南海北部巴士海峡附近海区 2730m 深的 E307 采样位点的表层沉积物。采集的样品立即放置在 -20℃ 冰箱中封存,直至用于试验。

### 1.2 引物

基因组扩增引物使用细菌通用 PCR 引物, 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3')和 1500R(5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC- 3'); 16S rDNA 文库所用的 Takara 的 pMD18-T 载体,扩增引物为 M4:(5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')和 RV:(5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')。上述引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

### 1.3 沉积物中 DNA 的提取与纯化

沉积物中的微生物总 DNA 的提取采用的是 SDS-酚氯仿抽提法<sup>[4]</sup>的改进方法。具体步骤为:称取 5 g 深海沉积物样品,加入 5 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH 8.0 磷酸缓冲液,旋涡振荡 1 min。加入溶菌酶 (100 mg·mL<sup>-1</sup>) 125 μL,使终浓度为 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>,同时加入 EDTA(0.5 mol·L<sup>-1</sup>) 200 μL,室温振荡 15 min,放

置冰箱 30 min,加 1500 μL 10% SDS 振荡处理 15 min,离心,分装 EP 管,9000 rpm,离心 25 min,取上清。加酚-氯仿-异戊醇(1:1 体积),抽提 1 次,9000 rpm,离心 25 min,取上层液体(下层为酚-氯仿-异戊醇,中间为沉淀下的蛋白质等杂质)。加 0.6 倍体积的异丙醇,室温放置 1 h,离心,收集沉淀。70% 乙醇清洗 2 次,200 μL TE 溶解,得到粗提的 DNA。

将粗提的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,然后紫外灯下把 DNA 区域切下,然后再使用的 Takara 公司的凝胶回收试剂盒进行纯化,详细步骤参照说明书。

### 1.4 16S rDNA 全长序列的 PCR 扩增纯化以及文库的构建

采用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3')和 1500R(5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC- 3')进行 PCR 扩增,PCR 的反应条件为:95℃ 预变性 2 min,然后 94℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 2 min,循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。用 Takara 公司的凝胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化,然后将回收得到的产物克隆到 Takara 公司的 PMD18-T 载体上,并转化到 DH5α 感受态细胞中,接种到含有 X-gal 和氨苄青霉素的 LB 培养基上,37℃ 过夜培养 12 h 左右,挑取具有氨苄青霉素抗性的白色转化子,构建 E307 沉积物样品的 16S rDNA 文库。

### 1.5 ARDRA 酶切分型与 16S rDNA 序列测定

对文库中的白色转化子做菌落 PCR,进一步筛选阳性克隆子,然后用 Taq I 进行 ARDRA 分析,筛选得到不同的多态性序列,再对照编号摇菌,提取质粒,送去广州拓普公司进行 DNA 序列测定。

### 1.6 进化树的构建及系统发育分析

将测序得到的序列,用 Blast 程序对照 GenBank 数据库中所有的序列进行比对,找到与这些序列最为接近的细菌的 16S rDNA 部分序列,确定其大致的分类地位,然后用 Clustal X 进行序列比对分析,再用 MEGA 软件(版本 4.1)构建系统进化树,自举值为 1000。

## 2 结果

### 2.1 DNA 的提取与纯化

本文中采用 SDS-酚氯仿抽提法的改进方法来提取总 DNA,经电泳发现条带出现一定拖尾,但是主带还是较亮的。另外粗提的 DNA 因为含有腐殖酸,重金属等杂质,故而呈浅褐色,这些杂质在后面经

试剂盒纯化回收后基本消除, 纯化后的 DNA 因为去除了 PCR 反应中的抑制因子, 可以直接进行 PCR 扩增。

### 2.2 文库的构建及 Taq I 酶切图谱分析

从文库中挑取白色菌落 240 个, 通过菌落 PCR 法进行插入片段检测, 阳性率为 85%。挑取阳性克隆 118 个进行 Taq I 酶切和 ARDRA 分析(图 1), 得到 23 个 OTU, 每种挑选一个 16S rDNA 克隆产物进行 DNA 序列测定, 从中得到有效序列 23 个。

### 2.3 代表序列的系统进化关系分析

利用 BLAST 程序与 GenBank 基因库中相关序列比对的结果见表 1。

结果表明测定的南海北部巴士海峡海区沉积物中的 23 个有效的 16S rDNA 序列具有非常丰富的

多样性, 涵盖了放线菌门(Actinobacteria), 变形细菌门(Proteobacteria), 浮霉菌门(Planctomycetes), 疣微菌门(Verrucomicrobia), 鞘脂杆菌门(Sphingobacteria), 硝化螺旋菌门(Nitrospira), 绿弯菌门(Chloroflexi), 厚壁菌门(Firmicutes), 酸杆菌门(Acidobacteria)共九个门, 其中放线菌(高 G+C 革兰氏阳性细菌), 变形细菌和浮霉菌为优势群落。放线菌序列共有 6 个, 占总测序序列的 26%; 变形细菌 5 个, 占 22%, 其中包含了  $\alpha$ (1 个)、 $\beta$ (1 个)、 $\gamma$ (3 个)三个亚门; 浮霉菌 4 个, 占 18%, 此外; 疣微菌, 鞘脂杆菌, 硝化螺旋菌, 绿弯菌(绿非硫细菌), 厚壁菌(低 G+C 革兰氏阳性细菌), 酸杆菌等类群各 1 个序列, 占 4.5%; 另外还有两个分类地位没有明确的序列, 占到了 9%。由克隆子的亲缘关系(表 1)可知: Actinobacteria 中的 4 个克隆子与沉积物样品来源的细菌亲缘关系相近, 另外 MSE307-293 与来自地中海东部深海火山口附近的一株不可培养的未知细菌(AY592559)有 99%的相似性。Proteobacteria 中有 3 个克隆子与海洋环境克隆子亲缘关系相近, 其中克隆子 MSE307-315 与来自深海沉积物中的不可培养的细菌(AB015571)亲缘关系最为相近。Planctomycetes 有 2 个克隆子与来自东太平洋的深海沉积物中的细菌亲缘关系相近。Nitrospira 和 Acidobacteria 的各一个克隆子分别与来自太平洋和



图 1 部分克隆子的 Taq I 酶切图谱  
1-15: 15 个具有 Taq I 酶切图谱带型的典型克隆; M: DL2000  
Fig. 1 Taq I Macrorestriction Map of partial clone

表 1 南海北部巴士海峡海区 b 克隆的序列分析

Tab. 1 16S rDNA sequence analysis in the northern South China Sea

克隆编号	近缘细菌及其同源性比率	近缘序列来源	系统类群
MSE307-252	<i>Microbacterium chocolatum</i> (EF197991)99%		Actinobacteria
MSE307-350	<i>Brachybacterium</i> sp. (EU196468)99%	深海沉积物中	Actinobacteria
MSE307-293	Uncultured actinobacterium (EF061210)97%	太平洋深海结核区	Actinobacteria
MSE307-294	Uncultured actinobacterium (AY307861)97%	巴西热带河口沉积物中	Actinobacteria
MSE307-305	Uncultured actinobacterium (DQ828204)95%	土壤中	Actinobacteria
MSE307-340	<i>Brachybacterium</i> sp. (DQ643203)99%	深海沉积物中	Actinobacteria
MSE307-290	<i>Moraxella</i> sp. (AY162144)99%	水体中	$\gamma$ -Proteobacterium
MSE307-360	Uncultured gamma proteobacterium (AM422907)95%	海绵共附生的细菌	$\gamma$ -Proteobacterium
MSE307-315	Uncultured gamma proteobacterium (AB015571)99%	深海沉积物中	$\gamma$ -Proteobacterium
MSE307-196	Uncultured alpha proteobacterium (DQ446093)99%	与珊瑚共附生的细菌	$\alpha$ -Proteobacterium
MSE307-359	<i>Achromobacter</i> sp. (EU275167)99%	茶园土壤	$\beta$ -Proteobacterium
MSE307-289	Uncultured planctomycete (EF491452)95%	东太平洋的深海沉积物中	Planctomycetales
MSE307-223	Uncultured planctomycete (AY711194)96%	盐土沼泽地中	Planctomycetales
MSE307-211	Uncultured Planctomycetales (AM406813)91%	利用厌氧氨氧化废水处理池中	Planctomycetales
MSE307-325	Uncultured planctomycete (DQ070799) 88%	东太平洋海底隆起中	Planctomycetales
MSE307-348	Uncultured Nitrospira sp.( EF061207)97%	太平洋深海结核区	Nitrospira
MSE307-337	Uncultured Firmicutes (EU043851)88%	土壤中	Firmicutes
MSE307-343	Uncultured Sphingobacteria (AY711020)90%	盐土沼泽地中	Sphingobacteria
MSE307-341	Uncultured Acidobacteria (EF597689)95%	地中海深海沉积物中	Acidobacteria
MSE307-217	Uncultured Verrucomicrobia (DQ446121)95%	珊瑚共附生的细菌	Verrucomicrobia
MSE307-205	Uncultured Chloroflexi (AF529110)91%	被三氯乙烯污染的水体中	Chloroflexi
MSE307-233	Uncultured bacterium (DQ351751)97%	被重金属污染的海底沉积物	未知
MSE307-356	Uncultured bacterium (AB305474)89%	冲绳岛附近海槽的热泉沉积物	未知

地中海的深海沉积物的细菌的亲缘关系相近,另外 MSE307-348 克隆子还与来自日本冲绳岛南部的热泉区的一株不可培养的细菌(AB305470)有较高的同源性。其他克隆子则与一些来自海绵和珊瑚的共附

生细菌,陆生土壤以及生物反应器中的细菌亲缘关系最为相近。对所有测定的 23 个克隆子进行的聚类分析表明,两个分类地位不明的克隆子中的 MSE307-356 被归入了 *Planctomycetes* 类群(图 2), 它

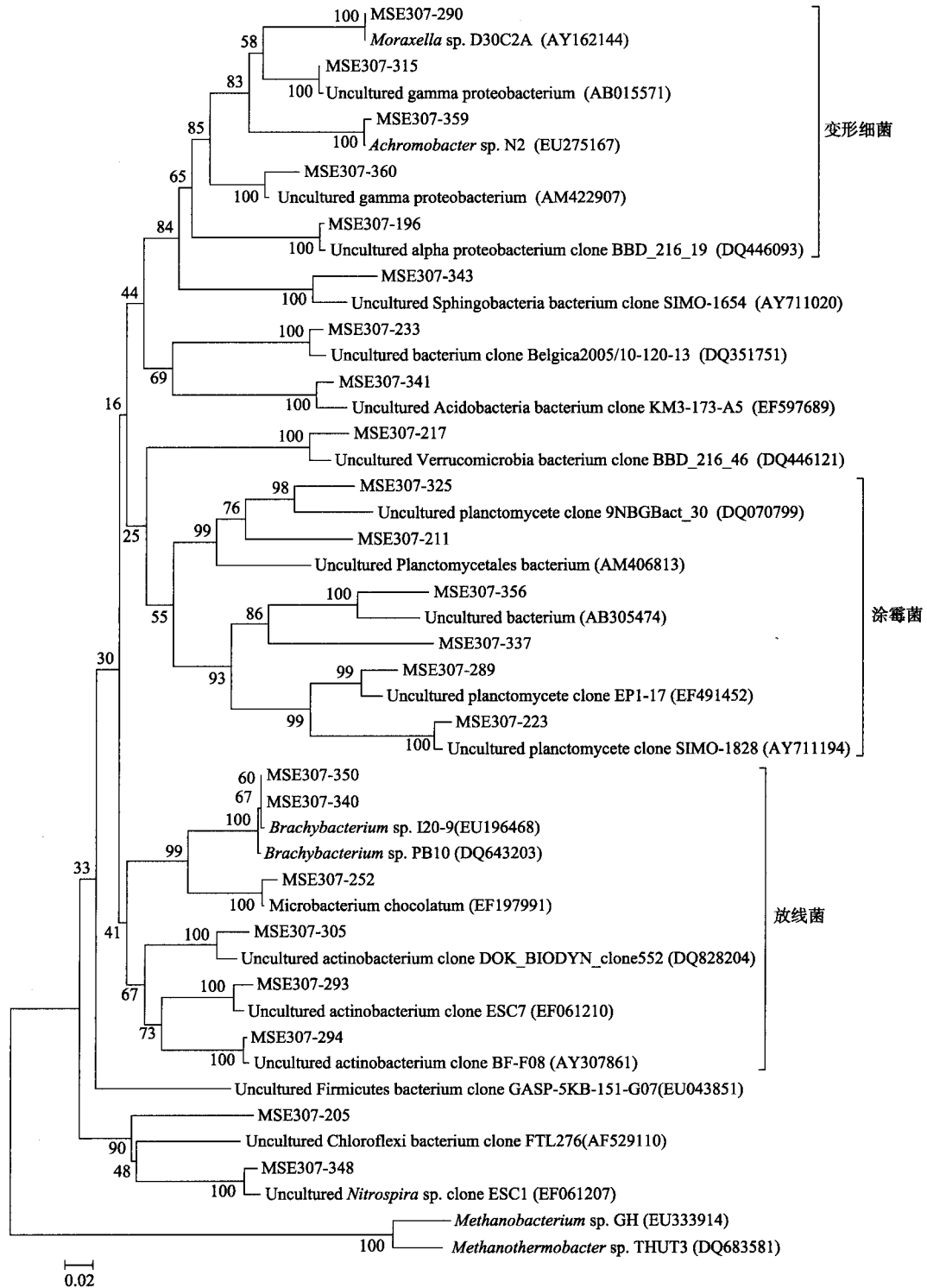


图 2 南海北部巴士海峡海区沉积物中 16S rDNA 序列的系统进化树<sup>1)</sup>

Fig. 2 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences in the deep-sea sediments from the Bashi Channel<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 本文采用的是 Neighbor-joining 法构建 NJ 树, 以古细菌 *Methanobacterium sp. GH* 和 *Methanothermobacter sp. THUT3* 为外类群, MSE - XXX 代表本文中获得的序列号, MSE 为样品编号, XXX 为克隆子编号, 括号中的名称为 GeneBank 中的序列号。

与日本冲绳岛附近海槽的热泉沉积物的一个细菌序列(AB305474)有较高的同源性。与 MSE307-337 最为相近的分类地位明确的是一株 *Firmicutes* 类群的细菌(EU043851), 但同源性只有 88%, 而与其同源性最高的是一株来自太平洋边缘的沉积物中的不可培养的细菌(AB177252), 在聚类分析中, 它和 AB177252 被自动的划归到 *Planctomycetes* 类群(图 2), 但它与 *Planctomycetes* 细菌的 16S rDNA 序列之间的差异很大, 我们推测可能存在这样一类与现在发现的 *Planctomycetes* 类群有差别的细菌。

挑取每门细菌的代表序列 1—2 个构建系统发育树如图 2 所示。

### 3 讨论

#### 3.1 沉积物中总 DNA 提取、纯化和 PCR 扩增

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的结果<sup>[6]</sup>, 为减少这方面的误差, 我们在试验中进行了一些改进: DNA 提取采用的是 SDS-酚氯仿抽提法的改进方法, 获得了长度可达 20-40 kbp 的 DNA 片断; 本实验使用的是 Takara 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒, 多次尝试后发现, 以纯化后的总 DNA 作为模板扩增时将其稀释到 50 倍扩增效果最佳。此外, Kreader 等<sup>[7]</sup>认为在 PCR 反应体系中加入 BSA 或者 gp32 蛋白, 可以明显减少抑制物的抑制作用。另外 Hansen 等<sup>[8]</sup>还发现 16S rDNA 模板的侧翼序列也会干扰 PCR 反应的进行造成偏好性扩增, 一方面可以通过改变引物解决由此引起的偏好性扩增, 本实验中通过的是减少 PCR 循环数来减少 PCR 过程中偏好性。

#### 3.2 细菌 16S rDNA 文库的构建

南海海域面积辽阔, 蕴含的丰富的生物资源, 近些年来已经有对于南海海底沉积物细菌多样性的报道, 但这些报道多集中在南海南部, 西沙群岛等海域, 对于南海北部巴士海峡海区海底沉积物的报道还属首次。该样品采自深海-2730 米, 受陆生微生物的影响较小, 因而可以准确地反映出该海区的微生物群落的多样性。

本文通过构建 16S rDNA 文库进行分子分析。针对文库的大量阳性克隆, 我们通过 ARDRA 分析进行初步分型, 在尽可能保证全面的同时减少了测序克隆子的数量。选用不同的限制性内切酶分型效果有显著差异, 我们需要一种酶切位点特异性较高的酶。根据以往的实验发现 Taq I 能有效区分不同属的细菌, 特别是放线菌<sup>[9]</sup>, 因此用于本实验。

测序得到的细菌的有效序列, 经过与 GenBank 文库的比对, 得到了与数据库中同源性最接近的 23 个细菌的序列, 相似性最高为 99%, 最低为 88%, 其中有 11 个序列与发表在基因文库中的序列的同源性  $\leq 95\%$ , 占到了所有序列的 48%。值得注意的是, GenBank 中这 23 个对应序列中有 18 个属于通过分子生物学手段得到的不可培养的细菌的序列, 占到了所有序列的 78%, 只有 5 个为可培养得到的, 这些不可培养的细菌(包括两个没有明确分类地位的序列), 大多来自于海洋环境, 这一方面表明文库的细菌多样性非常高, 另一方面也表明该海区沉积物中可能蕴含着丰富的未被培养的微生物资源, 因而可以在优化难培养微生物的培养条件及检测手段方面进一步的摸索。

本研究表明南海北部巴士海峡海区沉积物中微生物的最大类群是 *Actinobacteria*, 占到了所有测序克隆子的 26%, 这与之前国内外有关海洋沉积物中微生物的多样性研究中所报道的最大类群为 *Proteobacteria* 的结果有所不同。*Proteobacteria* 类群是海洋细菌中一个很大的类群, 同时作为深海沉积物的一个主要类群<sup>[10]</sup>, 不同海区深海沉积物中的 *Proteobacteria* 类群的结构也有很大差异, 太平洋帕里西维拉海盆 5010m 深处沉积物中  $\gamma$  变形杆菌和  $\alpha$  变形杆菌为优势细菌种群<sup>[11]</sup>; 东北太平洋结核合同区西区附近沉积物(5027m)中  $\gamma$  变形杆菌也为最主要的细菌类群<sup>[12]</sup>; 在南海西沙海槽沉积物中以  $\delta$ -*Proteobacterium* 占多数<sup>[13]</sup>, 南海南沙海槽沉积物中以  $\gamma$ -*Proteobacterium* 和  $\beta$ -*Proteobacterium* 占优势<sup>[14]</sup>, 而日本海沟深海沉积物中是以  $\gamma$ -*Proteobacterium* 为主, 其次是  $\alpha$ -*Proteobacterium* 和  $\delta$ -*Proteobacterium*<sup>[10,15]</sup>, 本文研究表明, 从该沉积物样品中测序获得的 16S rDNA 序列中的次优势类群是 *Proteobacteria* 类群, 并且涵盖了  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\lambda$  三个亚门, 其中以  $\gamma$ -*Proteobacterium* 占多数, 在陆地土壤环境和海水中占优势的  $\alpha$ -*Proteobacterium* 在海洋沉积物中很少甚至没有发现, 本文的 5 个这一类群的克隆子中有 1 个属于  $\alpha$ -*Proteobacterium* 类群, 可能原因是本海区距离台湾岛比较近, 受到了陆生环境的影响。

*Planctomycetales* 在本文的细菌群落中也占到了很大比例, 这个类群一般在浅海沉积物中较多分布, 在南海西沙海槽沉积物中这个类群也占了很高比例<sup>[13]</sup>, 原因可能为浅海来源的细菌因为洋流等原因(巴士海峡海区属于西北太平洋的大浪区, 并且有太平洋最强的海流—黑潮经过), 在深海区沉积下

来。值得注意的是,在海洋沉积物中经常发现的革兰氏阳性细菌(包括6个高G+C的 *Actinobacteria* 和1个低G+C的 *Firmicutes*) 在本文所测定的23个序列中出现了7个,所占比例很大,6个 *Actinobacteria* 中有3个同样来自太平洋等地的深海沉积物样品,这说明了 *Actinobacteria* 在深海沉积物中应该是广泛分布的,这与之前相关文献报道的,这一类群的细菌在深海沉积物中的丰度比较低<sup>[13]</sup>,多在近海和浅海沉积物中发现<sup>[16,17,18,19]</sup>的结果有所不同,尤其是在同属南海的南沙海区未发现明显与革兰氏阳性细菌相关的序列<sup>[20]</sup>,另外关于从海洋中发现的革兰氏阳性细菌的真正来源,也还有待于进一步的探讨。我们还发现,其中1个克隆子与来自盐土沼泽地的一株 *Sphingobacteria* 菌同源性最高,目前国内外关于这类细菌的文献很少,曾在韩国 Jeju 的海滩沉积物中被分离出来一株属于 *Saprospiraceae* 科的

该纲的菌株,本文是首次在南海深海沉积物中发现该类群。

#### 4 结语

本文通过构建南海北部巴士海峡海区沉积物的16S rDNA 文库,获得的序列在门一级的分类地位上与之之前国内外对不同海域沉积物研究的相关报道有很大不同,在南海其他海域的沉积物中很少出现的 *Actinobacteria* 是本文细菌群落的最大类群,原因还有待进一步研究探讨。我们在这一海区获得的23个16S rDNA 序列中有12个序列与发表在基因文库中的序列的同源性 $\leq 95\%$ ,占到了所有序列的52%,这些细菌在属种水平已经完全不同,另外,占到所获得全部序列78%的那些是通过分子学手段得到的不可培养的细菌的序列,这些都表明在这一海区蕴含着目前无法估计的未知微生物资源。

#### 参考文献

- [1] PARKES R J, CRAGG B A, Bale S J, et al. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments [J]. *Nature*, 1994, 371: 410-413.
- [2] BRAMBILLA E. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica [J]. *Extremophiles*, 2001, 5(1): 23-33.
- [3] TORSVIK V. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 64(1): 53-62.
- [4] 徐晓宇, 闵航, 刘和等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. *农业技术学报*, 2005, 13 (3): 377-381.
- [5] 薛廷耀. 海洋细菌学 [M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [6] JULIA R. DE LIP THAYA, Christiane Enzinger, et al. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1607-1614.
- [7] KREADER C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovineserum albumin or T4 gene 32 protein [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1996, 62: 1102-1106.
- [8] HANSEN M C, TOLKERNIELSEN T, GIVSKOV M, et al. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 26: 141-149.
- [9] JIANG S M, SUN W, CHEN M J, et al. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 92(4): 405-416.
- [10] LI L, KATO C, HORIKOSHI K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench[J]. *Marine Biotechnology (NY)*, 1999, 1(4): 391-400.
- [11] XUM X, WANG P, WANG F P, et al. Microbial diversity at a deep2sea station of the Pacific nodule province[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2005, 14: 3363-3380.
- [12] XIE H, XUE Y F, ZHAO A M, et al. Preliminary research on bacterial diversity of Parece vela Basin Pacific Ocean by culture2independentmethod[J]. *ActaMicrobiologica Sinica*, 2005, 45: 1-5.
- [13] 李涛, 王鹏, 汪品先等. 南海西沙海槽沉积物细菌多样性初步研究[J]. *地球科学进展*, 2006, 21: 1058-1062.
- [14] 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 [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 274-287.
- [15] LI L, KATO C, HORIKOSHI K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths [J]. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8(5): 659-677.
- [16] LOBET-BROSSA E. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1998, 64(7): 2691-2696.
- [17] GRAY J P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1996, 62(11): 4049-4059.
- [18] URAKAWA H. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis[J]. *Microbiology*, 1999, 145: 3305-3315.
- [19] RAVENSCHLAG K. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65(9): 3982-3989.
- [20] 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[J]. *自然科学进展*, 2002, 12: 479-484.