

胶州湾海域表层沉积物细菌多样性

刘欣^{1,2}, 肖天¹, 张文燕^{1,3}, 董逸^{1,2}, 岳海东¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要: 采用 16S rDNA 文库结合 PCR-RFLP 分析的手段, 对胶州湾 4 个站位沉积物中的细菌多样性和群落特征研究分析。结果表明, 沉积物中细菌种类丰富, 最多包含分布于 14 个已知门类的细菌, 和一些未被认知的序列; 各站位沉积物中优势菌群均为变形菌门和酸杆菌门, 其中 γ -和 δ -变形菌纲为变形菌门中的绝对优势类群, 在 4 个文库序列中平均占 42%和 16.75%; 此外, 拟杆菌门、浮霉菌门和放线菌门的种类也较为大量存在。各细菌种群有较明显空间分布差异, 可能与不同区域胶州湾环境条件相关。

关键词: 沉积物; 细菌群落; 16S rDNA 多样性; 胶州湾

中图分类号: P736.21

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)10-0001-06

海洋沉积物是地球上最复杂的微生物栖息地, 海洋沉积物中微生物在沉积环境和上覆水生态系统的能量与物质流动以及营养循环中都扮演着重要的角色^[1,2]。对海洋沉积物中细菌的结构以及多样性的认识, 有利于了解整个海湾生态系统的特点, 并可以评价生态系统的环境状况。随着 PCR 技术的广泛应用和微生物基因组保守序列信息的解析, 以环境总 DNA 为模板, 直接进行微生物多样性和组成的研究, 成为分析微生物多样性的有效手段^[3]。

胶州湾生态监测站是中国生态系统研究网络 (CERN) 长期系统观察站之一, 是我国重要的海洋生态系统国家野外调查观察研究站, 胶州湾也是我国有较长期研究资料的典型海湾^[4]。以往对于胶州湾沉积物从底栖动物、化学分析等方面积累了大量的研究数据, 而对沉积物中微生物多样性的调查有限, 且多采用传统方法, 从分子水平进行的描述很少, 无法反映胶州湾沉积物细菌群落的生态状况^[5,6]。本课题组利用 PCR-DGGE 技术对胶州湾 10 个不同站位、4 个季度的表层沉积物样品细菌群落进行研究分析, 发现胶州湾 A5、B2、D1 和 D7 共 4 个站位的菌群结构各有代表性。因此, 本实验采集 A5、B2、D1 和 D7 共 4 个典型站位的沉积物样品, 通过构建细菌 16S rDNA 文库, 并结合限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析, 研究胶州湾沉积物中细菌的种类组成、优势菌群等的群落结构和分布特点, 有助于深层次理解该海域沉积物的生态系统结构和功能, 也为近海微生物资源及生态环境的研究提供基础理论。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于 2009 年 8 月在胶州湾海域 4 个不同站位 (A5、B2、D1 和 D7 站) 采集表层沉积物样品 (图 1)。其中 A5 站位于娄山河和李村河入海口附近; B2 站位于湾内远离污染区; D1 站位于湾口处; D7 站位于湾口外

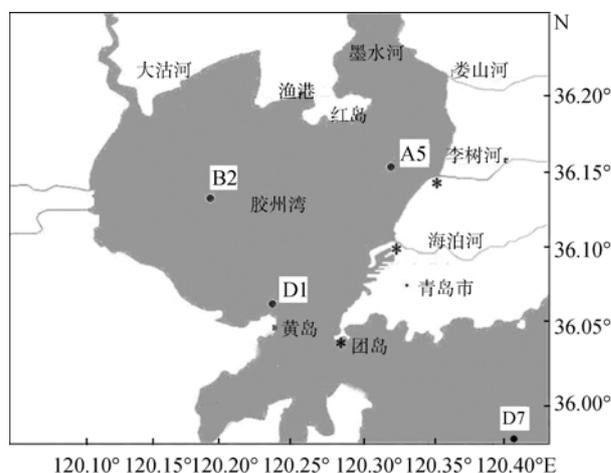


图 1 胶州湾采样各站位图

Fig. 1 The four sampling stations in Jiaozhou Bay

收稿日期: 2010-02-10; 修回日期: 2010-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770234, 30910103914); 山东省科技发展计划项目(2006GG2205023)

作者简介: 刘欣(1980-), 女, 辽宁本溪人, 博士研究生, 主要从事海洋微生物多样性研究工作, 电话: 0532-82898714, E-mail: liuxina-touc@sina.com

侧靠近外海海域。采用抓斗式采泥器采集沉积物样品,将表层(0~5 cm)沉积物置于灭菌管中,于-80℃冻存。

1.2 细菌总基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

DNA 提取采用改进后的 Zhou 抽提法^[7]:约 5g 沉积物样品(湿质量)中加入 13.5 mL 抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA(pH 8.0), 100 mmol/L 磷酸钾(pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB),并加入 100 μ L 蛋白酶 K, 37℃, 温浴 30min; 加入 1.5 mL 20% SDS, 65℃水浴 2 h; 离心, 上清液中加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 离心并收集上层水相; 加等体积异丙醇进行沉淀, 70% 冰乙醇洗涤后, 最终溶解于 2 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0) 中, 取 5 μ L DNA 溶液琼脂糖电泳检测。

以总 DNA 为模板, 采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGA CTT-3'; M 为 A 或 C。扩增体系为: 总体积 25 μ L, 其中包括 2.5 μ L 的 10 \times buffer(含 Mg²⁺), 2 μ L 的 dNTP (2.5 mmol/L), 约 30 ng 的总 DNA 溶液, 引物 1 和引物 2 各 0.5 μ L(20 pmol/L), 0.3 μ L 的 Taq 聚合酶, 双蒸水补齐。扩增程序: 95℃预变性 5 min, 之后 30 个循环(每个循环为: 94℃变性 30 s, 50℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min), 后 72℃延伸 10 min。产物经 1%琼脂糖电泳检测。采用胶回收试剂盒(宝生物, 大连)纯化 PCR 产物。

1.3 细菌 16S rDNA 克隆文库的构建与 RFLP 分析

将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T(宝生物, 大连)载体并转化至感受态细胞 *E. coli* DH 5 α 中, 蓝白斑筛选。4 个样品分别建立文库, 各文库随机挑选 170 个克隆, 通过菌体 PCR 方法用 pMD18-T 载体通用引物 RV-M: 5'-GAGCGGATAATTCACACAGG-3' 与 M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGA-3' 扩增阳性克隆子插入片段。PCR 产物用 *Hha* I 和 *Msp* I 二种限制性内切酶进行酶切。

1.4 16S rDNA 序列测定与文库统计分析

酶切片段通过 3%凝胶电泳分析带型, 挑选不同带型克隆子双向测序, 后进行序列拼接及载体序列的去除(南京金斯瑞生物技术有限公司)。将序列提交到 RDP II (ribosomal database project) 数据库, 利用在线工具 CHECK-CHIMERA 检验除去嵌合体; 采用

Dotour 进行文库内序列比对, 将相似性 97% 的序列归为同一个操作分类单元(OUT, Operational Taxonomic Unit)。将得到序列用 BLASTN 程序(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)搜索相似性序列。

以覆盖率 Coverage C^[8]评估所建文库对环境生物多样性的体现, 公式: $C = [1 - n1/N] \times 100\%$, 式中 N 为文库阳性克隆数, $n1$ 为文库中仅有 1 个克隆的 OTU 数。采用香农-威纳指数 Shannon-Wiener index (H')^[9] 评估文库所代表的环境微生物多样性, 公式: $H' = -\sum P_i \ln P_i$, $P_i = n_i/N$, 式中, N 为所分析克隆总数, n_i 为第 i 个 OTU 的克隆数。采用 Chaol 物种多样性指数 (S)^[10] 预测环境中微生物的种类, 公式: $S = S_{obs} + F^2/2(F_2+1) - F_1F_2/2(F_2+1)^2$, 式中, S_{obs} 指文库观察到的 OUT 数, F_1 为仅有 1 个克隆的 OUT 数, F_2 为有 2 个克隆的 OUT 数。

2 结果

2.1 细菌 16S rDNA 基因片段的文库分析

分别对 4 个样品得到的细菌 16S rDNA 基因构建文库, 阳性克隆筛选后分别进行 *Hha* I 和 *Msp* I 限制性内切酶的酶切, 4 个文库包含 614 个不同的 RFLP 分型, 将不同分型的细菌 16S rDNA 片段双向测序, 将上下游序列进行拼接, 614 个克隆共获得 592 条片段长度均在 1200bp 以上的序列, 有利于进一步的遗传分析。进一步将所测序列通过 RDP 在线比较, 排除了 22 条荒谬序列与 Chimera 序列。根据 97% 的相似度标准归类后, 4 个文库中共获得 347 种操作分类单元(OTUs)。其中 260 个 OTUs 只存在于一个 16S rDNA 基因文库中, 占文库比例的 75%, 初步显示胶州湾沉积物细菌物种多样性丰富。站点 A5 中的 OTUs 数量最少, 为 91 个; 站点 D7 中的 OTUs 数量最多, 为 128 个; 只包含一个克隆的 OTUs 在 4 个站点(A5、B2、D1 和 D7)文库中的比例分别为 52.3%、65.5%、54.8% 和 78.3%, 显示 B2 和 D7 站点具有较高细菌多样性。每个文库的有效克隆数在 143~155 个之间。

2.2 菌群多样性分析

以计算 Coverage C 来评估所构建的文库对环境生物多样性的体现, 通过计算多样性指数 Shannon-Wiener index (H') 和物种丰富度指数 (S) 来评估文库所代表的环境微生物多样性, 各多样性指数的分析结果都表明沉积物细菌多样性程度高(表 1)。

4个克隆文库的细菌多样性覆盖百分率发现,虽然本实验的分析是基于每个文库 143~155 个有效克隆,但是各沉积物样品的文库覆盖率(C%)总体仍然不高,

4个文库里包含了 22.4%~47.7%的胶州湾沉积物细菌多样性,表明胶州湾海洋沉积物细菌的多样性远高于实验所调查的范围。

表 1 4个克隆文库的多样性评估

Tab. 1 Analysis of the four bacteria clone libraries

样本	H'	J	有效克隆数 (个)	C (%)	S_{ACE}	S
A5	3.736372458	0.828306103	149	47.6510	397.66	391.3
B2	4.606335267	0.974393353	145	35.1724	489.91	449.23
D1	3.843272362	0.845921858	155	45.8065	675	675
D7	4.790722207	0.990579602	143	22.3776	589.69	562.07

由表 1 分析结果显示,4个站位沉积物中细菌群落的 H' 都很高,平均值为 4.2, B2 站位和 D7 站位菌群的香浓指数值较高,分别为 4.61 和 4.79; A5 站和 D1 站菌群的香浓指数值明显较低,分别为 3.74 和 3.84。

2.3 16S rDNA 序列分析

将所有 OTUs 进行 BLAST 后发现,大多数序列与当前数据库中的细菌 16S rDNA 基因序列相似性大于 90%。其中,相似性>95%的有 79%的序列,相似性为 90%~95%的有 19%的序列,仅在 B2 和 D7 两站文库中存在某些无法确定分类位置的序列。根据 Blastn 结果,4个文库所得细菌共包含 14 个门类,分别为变形菌门(Proteobacteria)(包括 γ -、 δ -、 α -、 ϵ -和 θ -变形菌纲)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、螺旋体门(Spirochaetes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)和异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)。A5 和 D1 站沉积物细菌均分布于 11 个已知门类; B2 和 D7 站沉积物细菌均分布于 13 个门类。

4个样品所建克隆文库的细菌组成见图 2。由图 2 可见,属于 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲和酸杆菌门的克隆是胶州湾沉积物中存在的主要优势细菌类群;此外,拟杆菌门、浮霉菌门、 α -变形菌纲、放线菌门和疣微菌门的类群在 4 个站位所构建的文库中也普遍存在,且数量比例相对较大;其余各类群则以很小比例分布于各站。

各站位主要菌群的空间分布差异大,两个最主

要的类群 γ -变形菌纲和 δ -变形菌纲的空间分布差异明显。 γ -变形菌纲相关克隆在每个库中的丰度都最大,在 D1 站所占比例最高,占克隆总数的 57%;在 A5 站次之(52%);而在 B2 和 D1 站分别为 36%和 23%。 δ -变形菌纲相关克隆在 D1 站比例最低,仅为 5%,在 A5、B2 和 D7 站分别占文库克隆总数的 20%、23%和 19%。酸杆菌门相关克隆在 A5、B2 和 D1 站分布均匀,占比例均为 9%,但在 D7 站最多,占总克隆的 17%。

除上述主要优势类群之外,拟杆菌门、浮霉菌门和放线菌门空间分布特征均为 A5 站分布少, D7 站分布较多。其克隆数在 A5 站文库中所占比例分别为 3%、2%和 2%;克隆数在 D7 站文库中所占比例分别为 15%、10%和 5%。 α -变形菌纲的克隆在 B2 站位比例较少(仅占 2%),其在其余 3 个站位所占克隆数的比例均大于 4%。疣微菌门克隆在 4 个文库中的百分比相差不大,均为 3%左右。

其余各细菌类群在 4 个不同站位所占的 OTUs 比例均很少,且某些所占比例较小的细菌类群空间分布上存在特异性。例如,螺旋体门与芽单胞菌门细菌仅在 3 个站位的文库中存在,在 A5 站没有发现;梭杆菌门细菌在 D1 站没有发现;绿弯菌门和硝化螺旋菌门分别只发现存在于 A5 和 D7 站文库中; ϵ -变形菌纲只在 A5 和 B2 站文库中发现; β -变形菌纲细菌也只在 B2 和 D1 两个站位文库中发现;异常球菌-栖热菌门只存在于 D1 站文库中等。

3 讨论

3.1 细菌群落多样性

采用 RFLP 和克隆文库相结合的方法对胶州湾沉积物细菌多样性进行了调查,研究中将文库中序

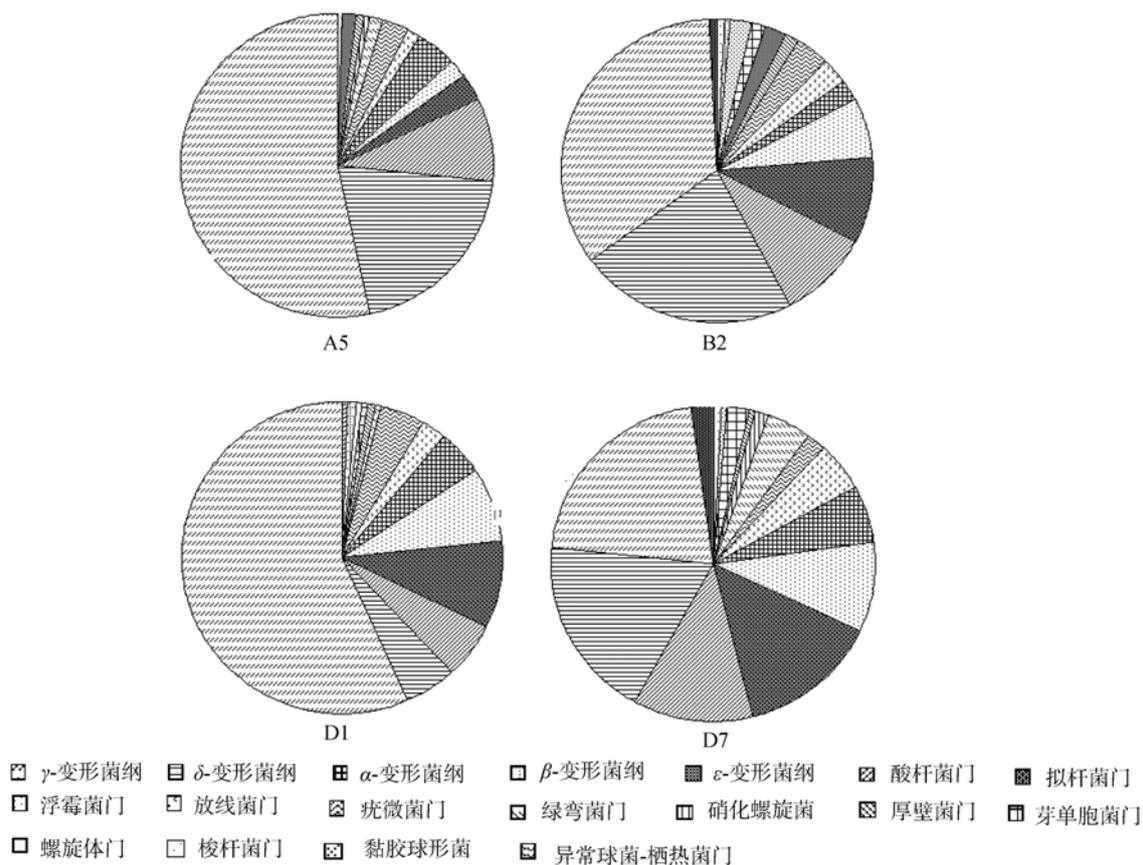


图2 A5、B2、D1 和 D7 站位的沉积物菌群组成
Fig. 2 Composition of clone libraries for stations A5, B2, D1 and D7

列相似性>97%的克隆归为同一 OUT。该方法既快速准确地对文库内细菌种类进行分型, 又减少测序量。RFLP 结果表明, 各文库中多数 OTUs 由单个克隆产生。在以往微生物分子生态学研究, 对于 16S rDNA 克隆文库一般分析 50~100 个阳性克隆即可反映环境样品中的优势微生物类群^[11]。本研究中, 虽然每个 16S rDNA 文库分析了 143~155 个克隆, 但覆盖率仅在 22.38%到 47.65%, 表现了胶州湾沉积物细菌的多样性相当丰富。

很多实验证明, 由于沉积物样品和土壤样品的复杂性, 其中的菌群多样性远远高于水体等其他环境样品中微生物的多样性, 沉积物和土壤样品中菌群微生物多样性所能够达到的范围一直以来备受争议^[12]。本实验结果所得的文库覆盖率数值较低, 说明想要覆盖沉积物样品中所有 OTUs 还需分析大量的克隆。近来有对土壤的模拟仿真实验表明^[13,14], 在阿拉斯加北部森林土壤中, 每克土壤样品至少含有 2 000 到 5 000 个 OTUs, 每个样品至少需要分析

18 000 个克隆才能全面描述土壤中菌群结构的多样性, 但是本实验目的并非需要覆盖样品中的全部 OTUs, 只能是在有限采样的基础上, 对胶州湾各站沉积物样品的细菌群落做整体水平的评估。Rosenberg 等也认为, 不完全采样并不影响对微生物群落结构的系统发育分析^[15], 本实验中菌群在不同站位时空分布较明显, 也说明只要分析适当克隆数可以达到分析各微生物菌群结构之间差异的目的。

3.2 沉积物中主要细菌类群多样性

对我国对近岸海域沉积物微生物多样性的研究报道较少, 戴欣等^[16]和白洁等^[17]应用 16S rDNA 序列分析方法分别对南沙海区沉积物和黄海西北部沉积物中的微生物多样性进行了初步探索。结果表明, 沉积物中菌群分别来自 4 个和 10 个门类; 肖慧^[18]构建 16S rDNA 文库研究了青岛、威海海域夏、冬两季表层沉积物细菌多样性, 发现夏季沉积物菌群最多包括 6 个门类; 其他一些近海沉积物所包含菌群多数也不超过 10 个门类。李友训^[19]采用细菌 16S rDNA

的 V3 和 V4 区对胶州湾部分站位沉积物细菌多样性进行了初步研究,发现 13 个门类的存在;而本实验结果表明胶州湾沉积物细菌包括最多 14 个门类。由此可见,与其他近岸区域沉积物相比较,胶州湾细菌类群相当丰富,多样性较高。

属于 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲和酸杆菌门的克隆是胶州湾沉积物中存在的主要优势细菌类群。变形菌门类群是浅海沉积物中的主要类群^[20],该类群的代谢是海洋沉积物中最主要的细菌活动。本研究 4 个站位沉积物样品的大部分 16S rDNA 序列属于该类群,且优势类群是 δ -和 γ -变形菌纲,这与国内外有关海洋沉积物中微生物多样性的报道一致^[21,22]。变形菌门中 α -、 β -、 γ -、 δ -和 ϵ -变形菌在胶州湾各站也均普遍存在,并且每一门内有许多系统发育类型的存在,表明了胶州湾环境相对复杂,能满足不同代谢类型变形细菌的生存。酸杆菌门在 4 个站位沉积物样品均有发现且大量存在,目前对酸杆菌的研究较少,此类菌群一般主要是外界环境所引入,发现于陆地环境,胶州湾沉积物受陆地影响较大,检测到的酸杆菌门可能为陆源菌。此外,酸杆菌门类群一般也认为是生活在金属污染区域等酸性较强的环境中^[23],酸杆菌门在胶州湾沉积物中的普遍存在说明胶州湾的环境可能存在受某些酸化影响的倾向。

Gray 等^[24]采用非培养方法对英国 Eagle 湾表层沉积物进行多样性分析,表明沉积物中有 6 个主要类群,分别是 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 γ -变形菌纲、梭菌门和浮霉菌门。Llobet-Brossa 等^[25]研究了德国 Wadden 海沉积物微生物群落组成,发现拟杆菌门是主要类群,其他类群含量较低。Urakawa 等^[26]基于 16S rDNA 文库和 RFLP 方法研究日本 Sagami 湾和 Tokyo 湾沉积物的微生物多样性,主要为 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲、 ϵ -变形菌纲和疣微菌,没有 α -变形菌纲。Zhang 等^[27]对污染海港沉积物细菌多样性进行研究,发现细菌优势类群为变形菌门、厚壁菌门、酸杆菌门和拟杆菌门等。可见不同地区近海沉积物中细菌群落结构有一定差别。可能是近海毗邻陆地,受陆地和人类活动影响较大,容易形成截然不同的微生物群落结构。

3.3 细菌分布与环境特点

沉积物的环境和菌群的类型之间是互相选择的^[27],沉积物样品的微生物群落组成存在差别,这种差别可能与地理位置相关,不同的水团也更容易受

到环境的影响。Bowman 等^[28]研究发现,在富营养化严重的水域中 δ -变形菌类群的数量有增多趋势。而在对东地中海^[29]不同沉积物进行研究,发现疣微菌门在污染的沉积物中缺失。本研究中 δ -变形菌纲在 D1 站分布尤少,这可能与 D1 站样品基质的特殊性有关,也很可能是由于 D1 站水流量大,水体交换速率高,污染程度相对小的原因所导致;而疣微菌门在 D1 站分布较多也暗示了 D1 站环境的污染程度相对较轻。放线菌属于高 G + C 革兰氏阳性菌,本研究在胶州湾沉积物样品中发现较多放线菌的存在,与 Ravenschlag^[11]、张海艳^[30]等的研究结果相一致,说明放线菌具有较好的环境适应性,常见于近海海洋沉积物中。浮霉菌门广泛存在于海洋沉积物中,本研究表明该菌在胶州湾沉积物中也是比较优势的类群,与国外研究一致^[29,31]。浮霉菌主要为厌氧菌类群,本实验中在 D7 站浮霉菌门在各群落中所占的比例最大,而在 A5 站所占比例最小。这可能由于 D7 站水较深,沉积物处于相对贫氧的状态,利于浮霉菌类生存。而 A5 站位于李村河口等附近,陆源污染物排放量大,耗氧相对也较大,但浮霉菌分布却较少,这种结果可能由于采样季节夏季温度高,环境中个别细菌类群大量繁殖,对其他类菌群造成一定掩盖作用。以往的研究认为, α -变形菌纲细菌在陆地土壤环境和海水中占优势,但在海洋沉积物中极少^[26],本研究在 4 个站位沉积物中均检测到了该类群的普遍存在,这一类群也可能是由沿岸陆上河流将部分泥沙带入海区长期形成所致。在 B2 站位该类菌所占比例最少,这可能由于该站位于湾内深水区,且受人类活动和河流注入影响很小,此处水质良好。

克隆文库分析结果还表明存在某些细菌类群的分布具有站位特异性,提示我们不同站位可能具有特殊的环境类型存在。对这些站位特异性细菌的进一步研究对揭示不同环境中的特殊生态系统有重要意义。通过 16S rDNA 分析还发现,具有较低 16S rDNA 序列相似性(< 97 %)的序列(共 142 个)可能代表着新的细菌种类,与基因库中 16S rDNA 表现较大差异的克隆子序列的存在,表明胶州湾海洋沉积物生态系统中仍然蕴藏着无法估量的资源,还需要进一步探索和研究。

参考文献:

- [1] 宋金明. 海洋沉积物中的生物种群在生源物质循环中的功能[J]. 海洋科学, 2000, 24(4): 22-26.

- [2] 吕晓霞, 宋金明, 袁华茂, 等. 南黄海表层沉积物中氮的潜在生态学功能[J]. *生态学报*, 2004, **24**(8): 1 635-1 643.
- [3] Nocker A, Burr M, Camper A K. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review [J]. *Microb Ecol*, 2007, **54**: 276-289.
- [4] 孙松, 张永山, 吴玉霖, 等. 胶州湾初级生产力周年变化[J]. *海洋与湖沼*, 2005, **36**(6): 481-486.
- [5] 李玉, 俞志明, 曹西华, 等. 重金属在胶州湾表层沉积物中的分布与富集[J]. *海洋与湖沼*, 2005, **36**(6): 580-589.
- [6] Dai J, Song J, Li X, *et al.* Environmental changes reflected by sedimentary geochemistry in recent hundred years of Jiaozhou Bay, North China [J]. *Environ Pollut*, 2007, **145**: 656-667.
- [7] Zhou J, Bruns M, Tiedje J. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316-322
- [8] Good I. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. *Biometrika*, 1953, **40**(34): 237-264.
- [9] Krebs C. *Ecological methodology* [M]. New York: Harper & Row. 1989.
- [10] Chao A. Estimating population size for sparse data in capture-recapture experiments[J]. *Biometrics*, 1989, **45**(2): 427-438.
- [11] Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J, *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 3 982-3 989.
- [12] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. *Science*, 2005, **309**(5739): 1 387-1 390.
- [13] Schloss P, Handelsman J. Toward a census of bacteria in soil[J]. *Plos Comput Biol*, 2006, **2**(7): 786-793.
- [14] Roesch L, Fulthorpe R, Riva A, *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity[J]. *ISME J*, 2007, **1**(4): 283-290.
- [15] M. S. Rosenberg, S. Kumar. Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference[J]. *P Natl A Sci*, 2001, **98**: 10 751-10 756.
- [16] 戴欣, 周惠, 蔡创华, 等. 海洋沉积物中特有细菌类群的初步探讨[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2001, **40**(6): 51-54.
- [17] 白洁, 李海艳, 张健, 等. 黄海西北部沉积物中细菌群落 16S rDNA 多样性解析[J]. *中国环境科学*, 2009, **29**(12): 1 277-1 284.
- [18] 肖慧, 张艳, 张喆, 等. 青岛、威海水域夏冬季表层沉积物细菌多样性的初步研究[J]. *中国海洋大学学报*, **39**(4): 641-646.
- [19] 李友训, 胶州湾和东太平洋海隆(~13N)沉积物微生物多样性研究(D). 博士学位论文, 青岛: 中国科学院海洋研究所.
- [20] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold sea area, the Japan Trench[J]. *Mar Biotechnol*, 1999, **a**(1): 391-400.
- [21] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep sea sediments from different depths[J]. *Biodivers Conserv*, 1999, **b**(8): 659-677.
- [22] J Gray J P, Herwig R P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(11): 4 049-4 059.
- [23] Barns S, Cain E, Sommerville L, *et al.* Acidobacteria phylum sequences in uranium contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(9): 3 113-3 116.
- [24] Gray J P, Herwig R P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (11): 4 049-4 059.
- [25] Llobet-Brossa E, Rosselló-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (7): 2 691-2 696.
- [26] Urakawa H, Kita Tsukamota K, Ohwada K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis[J]. *Microbiology*, 1999, **145**(11): 3 305-3 315.
- [27] Zhang W, Ki J S, Qian P Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA [J]. *Estuar Coast Shelf S*, 2008, **76**(3): 668-681.
- [28] Bowman J, Mccuaig R. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(5): 2 463-2 483.
- [29] Hunter E M, Mills H J, Kostka J E. Microbial community diversity associated with carbon and nitrogen cycling in Permeable Shelf sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 5 689-5 701.
- [30] 张海艳, 王风平. 东太平洋结核区细菌调查及鉴定 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2006, **45**(增刊): 267-271.
- [31] Freitag T E, Prosser J I. Community structure of ammoniaoxidizing bacteria within anoxic marine sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1 359-1 371.

(下转第 27 页)