

# 西太平洋“暖池”区沉积物中的细菌类群 及其与环境的关系\*

曾润颖\*\* 赵 晶 张 锐 林念炜

(国家海洋局海洋生物工程重点实验室, 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

**摘要** 提取西太平洋“暖池”区海底沉积物柱状样不同层次样品的总 DNA, 构建沉积物中的细菌 16S rDNA 克隆文库, 通过 PCR-RFLP 分析与序列测定, 对沉积物中的细菌类群及其与环境的关系进行了分析. 结果表明, 该海区沉积物中的细菌分别属于 8 个主要类群, 其中紫细菌 (*Proteobacteria*) 的  $\gamma$ -亚群为各个层次中的优势菌群, 而科尔韦尔氏菌属 (*Colwellia*) 为优势种属;  $\alpha$ -亚群也均有分布; 而  $\beta$ -亚群分布很少. 不同深度之间细菌类群的区别主要在于  $\delta$ -,  $\epsilon$ -紫细菌亚群和 CFB 类群 (*Cytophaga / Flexibacteria / Bacteroides*), 它们在沉积物中的分布均呈现随深度增加而减少的趋势. 系统发育分析表明, 在各个深度沉积物中各有 18%~30% 的细菌与甲烷代谢相关, 15%~25% 的细菌与硫代谢相关, 说明甲烷代谢和硫代谢在该海区的深海物质能量循环中占据着重要地位.

**关键词** 西太平洋“暖池” 沉积物 微生物多样性 碳循环 硫循环

随着深海“热液”生物群的发现, 越来越多的研究表明在超过地球表面 50% 的深海区域中存在着强烈而独特的生物地球化学过程, 而深海微生物的作用正是这些过程中的关键环节. 由表层海洋生物光合作用产生的有机碳只有少量能够到达深海, 因此, 深海生物圈的物质能量循环更多地依赖各种具有不同代谢类型的微生物, 包括硫氧化还原、甲烷氧化、甲烷生成微生物等. 目前, 各种深海环境中的微生物多

样性研究已经开展得十分广泛<sup>[1-5]</sup>. 随着研究的深入, 人们发现深海微生物在整个海洋环境系统中具有不可忽视的作用. 以主要温室气体之一的甲烷为例, 约 90% 的海洋甲烷循环过程发生在深海沉积物中, 由全球海底沉积物所产生的甲烷中的碳含量比地球表面的生物以及陆地泥土含碳量的总和高 4~8 倍, 而微生物在深海甲烷的生成与消耗过程中起着非常重要的作用<sup>[6]</sup>. 因此, 近年来深海微生物的研究越来越多地

2003-03-21 收稿

\* 国家重点基础研究专项经费资助项目(批准号: G2000078500)

\*\* E-mail: [rainz@public.xm.fj.cn](mailto:rainz@public.xm.fj.cn)

聚焦于微生物在深海生态系统的碳、硫、氮等物质循环中的作用。在一些特殊的海底区域,例如“热液”(hydrothermal vents)区,“冷泉”(cold seep)区中的微生物多样性及其与环境相互关系的研究开展得尤为广泛<sup>[7-11]</sup>,研究结果表明深海微生物对整个海洋环境的物质和能量循环具有重要的作用。

西太平洋“暖池”位于从太平洋西部到印度洋东部的赤道两侧,长期年平均表层水温超过 28℃,是海气相互作用最为强烈的热带海区,也是全球大气环流的能源区。近年来的研究表明,该海区与南方涛动、厄尔尼诺等现象密切相关,在调节全球气候方面起着举足轻重的作用<sup>[12,13]</sup>。同时,西太平洋“暖池”也是生物类群较多、代谢旺盛、物质循环较快的海区,该海区对现代水文循环、全球气候变迁以及生物圈物质循环有着重要的影响。因此,对海底微生物多样性进行调查,分析它们与环境的关系,将有助于全面了解“暖池”区在全球气候变化中的作用。

我们采集了西太平洋“暖池”区海底沉积物柱状样,提取各层次沉积物中的总 DNA,构建这些样品中的细菌 16S rDNA 克隆文库。通过 16S rDNA 序列的比较,对“暖池”区海底沉积物中的细菌类群进行了分析,并对该区深海物质能量循环特征进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

海底沉积物于 2001 年 10~11 月间采自“西太平洋暖池”海域(WP0102, 7°59'24" N, 142°30'00" E, 水深 1901 m),用多管采样器采集,样品为灰白色沙质沉积物。样品采集后立即在超净台中以 3 cm 为一层进行分样,于 -20℃ 下保存带回实验室,进一步在超净台内切除表层,取样品的中心部分进行下一步实验。

### 1.2 主要试剂

DNA 纯化树脂及微型吸附柱为 Promega 公司产品; *Ex Taq* DNA 聚合酶、*MspI* 和 *RsaI* 等核酸工具酶均购自 Takara 公司; 蛋白酶 K, 溶菌酶及 RNase A 等主要试剂购自 Sigma 公司。引物合成及 DNA 测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.3 沉积物样品总 DNA 的提取

根据文献<sup>[14]</sup>的方法加以改进。取 2 g 沉积物泥土样品(湿重),加入 2.5 mL DNA 抽提缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0), 100 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA (pH=8.0), 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH=8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB)和 proteinase K(终浓度 200 μg/mL),于摇床中水平振荡(37℃, 225 r/min)30 min 后,加入 1 mL TE 缓冲液和溶菌酶(终浓度 1 mg/mL),继续振荡 2 h,再加入 1.5 mL 20%(w/v)SDS 和酸洗的 PVPP(终浓度 2%),65℃ 水浴 2 h,6000×g 离心 10 min,将上清液移入新的离心管。往沉淀中加入 DNA 抽提缓冲液及 20%(w/v)SDS,65℃ 水浴 10 min,6000×g 离心 10 min,此步骤重复两次。收集 3 次抽提的上清液于同一离心管中,加入 RNase A(终浓度 200 μg/mL),在 37℃ 下作用 30 min,加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液轻轻混匀,15000×g 离心 15 min,将上层水相移入新的离心管,加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇,于 -20℃ 中放置 1 h。在 4℃,12000×g 条件下离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇洗两次,溶解于 50 μL TE 缓冲液,即得 DNA 粗提液。

### 1.4 总 DNA 的纯化

在粗提 DNA 溶液中加入 200 μL DNA 纯化树脂,充分混匀,室温放置 20 min 后,转移到微型吸附柱中,2000×g 离心 5 min,用洗涤液清洗两次,换一干净的离心管后再用 80% 乙醇清洗两次,每次均经 2000×g 离心 5 min 除去洗涤液或乙醇。最后再换一干净的离心管,加入 50 μL 无菌水,70℃ 水浴 5 min,10000×g 离心 5 min,滤液即为纯化后的 DNA,于 -20℃ 保存。

### 1.5 16S rDNA 克隆文库的构建

样品中细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-G-3')和 1492R(5'-GGTACCTGTTACGACTT-3')<sup>[15]</sup>进行。PCR 反应条件为:95℃,1.5 min; 55℃,1.5 min; 72℃,1.5 min; 循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。

每个样品同时作 5 个 PCR 反应,将所有产物混合起来以减少 PCR 反应中的随机性偏差。PCR 产物经低熔点琼脂糖电泳回收纯化后克隆到 pBluescript 质粒载

体上, 并转化 *E. coli* TOP10F' 感受态细胞<sup>[16]</sup>. 通过蓝白筛选初筛出阳性克隆, 并通过菌落PCR对初筛的克隆进行插入片段大小的验证, 所用引物为 T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG 3') 和 T3(5' AT-TAACCTCACTAAAG 3'). PCR反应条件为: 95 °C, 1 min; 51 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 循环 30 次, 72 °C 延伸 10 min. 文库用 LB 培养基(含 15% 甘油和 100 μg/mL 氨苄青霉素)于 -80 °C 超低温冰箱中保存.

### 1.6 RFLP 分析与序列测定

采用 T7 和 T3 引物对克隆进行菌落 PCR, 以菌落 PCR 产物为模板, 采用引物 27F 和 1492R 进行二次 PCR 反应. 用限制性内切酶 *RsaI* 和 *MspI* 对二次 PCR 产物进行完全酶解, 经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 分析比较酶切片段的长度和数目从而对转化子进行鉴定. 经 RFLP 分析后, 对具有不同酶切图谱的克隆进行测序. 测序采用 T7 和 T3 以及引物 357F(5' TACGGGAGGCAGCAG 3') 和 1114R(5' GGGTTGC-GCTCGTTGC 3') 进行, 测序结果用 DNAMAN (Version 5.0) 软件拼接并去除两端的载体序列, 得到了约 1.5 kb 的 16S rDNA 序列.

### 1.7 序列分析

将所测定的 16S rDNA 序列与两个数据库中的已知序列进行相似性比较分析, 所用的数据库为 EMBL(European Molecular Biology Laboratory, <http://www.ebi.ac.uk>) 和 RDP II (Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu>) 数据库. 系统发育分析采用 Clustal W 1.81 软件进行.

## 2 结果

### 2.1 细菌 16S rDNA 克隆文库分析

西太平洋“暖池”区 WP0102 站位的沉积物柱状样共分 4 层, 样品 A, B, C, D 分别对应于 0~3 cm, 4~6 cm, 7~9 cm 和 10~12 cm 深度的沉积物. 对这 4 层沉积物分别构建细菌 16S rDNA 克隆文库. 从每个文库中随机挑取 100 个克隆进行 PCR-RFLP 分析, 对具有不同谱型的克隆进行测序. 以覆盖率( $C$ )来评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现, 计算公式为

$$C = [1 - (n_1/N)] \times 100\%$$

其中,  $N$  代表所分析的克隆数,  $n_1$  代表具有不重复序列的克隆数(16S rDNA 序列 >97% 为重复序列)<sup>[17]</sup>. 4 个层次的细菌 16S rDNA 克隆文库的分析结果见表 1.

表 1 深海沉积物细菌 16S rDNA 克隆文库分析结果

样品	挑取的克隆数	阳性率 /%	$N$	不同 16S rDNA 基因型数目	$n_1$	$C/\%$
A	100	79	79	33	27	65.8
B	100	81	81	34	25	69.1
C	100	84	84	20	18	78.6
D	100	75	75	19	8	89.3

所构建的 4 个细菌 16S rDNA 克隆文库包含了 65.8%~89.3% 的细菌多样性, 其中最深层(样品 D)的覆盖率最高, 达 89.3%; 上层(样品 A)的覆盖率最低, 为 65.8%. 由所获得的不同 16S rDNA 基因型数目可知, 在整个柱状样中, 表层深海沉积物中微生物的多样性较高, 深层中较低, 呈现随深度增加而减少的趋势.

### 2.2 深海不同深度沉积物中细菌类群分析

将基因型不同的 106 个克隆进行测序, 获得长度约为 1.5 kb 的 16S rDNA 序列. 将这些序列与 EMBL 和 RDP II 数据库中的已知序列进行相似性比较, 得到同样的结果. 在 106 个 16S rDNA 序列中有 104 个分别属于细菌域(*Bacteria*)的 8 个主要类群, 另有 2 个与数据库中的已知序列同源性很低, 并且根据系统发育分析结果仍无法确定其所属类群(表 2).

在同一层次中, 紫细菌(*Proteobacteria*)类群的  $\gamma$ -亚群均占据优势, 在 36.4%~52.6% 之间,  $\alpha$ -亚群也都有分布, 而  $\beta$ -亚群分布很少. 不同深度沉积物之间细菌类群的区别主要在于  $\delta$ -,  $\epsilon$ -紫细菌亚群和 CFB 类群, 这三个类群的细菌数在沉积物中均呈现随深度的增加而减少的趋势. 此外, 还发现少量的浮霉状菌属(*Planctomycete*)和革兰氏阳性细菌.

一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 属于不同的种, 同源性小于 95%, 则属于不同的属<sup>[18]</sup>. 通过与 EMBL 数据库的比较, 所测定的 106 个 16S rDNA 序列分属于 24 个不同的菌属, 与 RDP II 数据库的比较也得到一致的结果. 在 B, C 和 D 3 个样品中, 属于科尔韦尔氏菌属(*Colwellia*)的克隆最多,

表 2 不同层次柱状深海沉积物样品中微生物 16S rDNA 序列分析结果

样品	紫细菌 ( <i>Proteobacteria</i> )					浮霉菌 ( <i>Planctomycete</i> )	革兰氏阳性	CFB类群 <sup>a)</sup>	未知	总计
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$					
A	4	0	12	5	6	0	1	5	0	33
B	6	3	15	6	0	3	0	0	1	34
C	3	1	11	1	2	0	1	0	1	20
D	5	1	10	1	0	0	1	1	0	19
总计	18	5	48	13	8	3	3	6	2	106

a) CFB 类群包括噬纤维菌/屈扰杆菌/拟杆菌群(*Cytophaga/Flexibacteria/Bacteroides*)

为优势菌属, 样品 A 中的最优势菌属为 CFB 类群的噬纤维菌属(*Cytophaga*)(表 3).

表 3 不同层次柱状深海沉积物样品中主要细菌类型分析

样品	最优势菌属 及所占比例/%	与甲基代谢	与硫代谢	与氮代谢
		相关的菌属 /%	相关的菌属 /%	相关的菌 属/%
A	噬纤维菌(15.15)	18.2	18.2	6.1
B	科尔韦氏菌(33.33)	23.5	23.5	2.9
C	科尔韦氏菌(23.08)	30.0	25.0	0
D	科尔韦氏菌(26.31)	21.0	15.8	0

除了这两类菌属之外, 所占比例较大的分别是与 C, S 和 N 等物质的代谢相关的一些菌属, 它们在各个层次所有克隆中所占的比例见表 3. 在该站位中, 与甲基代谢和硫代谢相关的细菌在各个层次中都普遍存在, 从垂直尺度比较, 这两类细菌在样品 B 和 C, 即 4~9 cm 这个深度的沉积物中较多. 此外, 与氮代谢相关的菌属只在 6 cm 以上的沉积物中才有分布, 而且随着沉积物深度的加深而递减.

### 2.3 深海不同代谢类型细菌的系统发育分析

根据 16S rDNA 序列相似性比较结果, 选取各个层次中与甲基代谢、硫代谢相关的克隆分别构建系统发育树(图 1(a), (b)), 其中的参照菌株为与这些克隆具有最大同源性的细菌. 系统发育树采用邻接法构建.

在与甲基代谢相关的克隆中, 除了 A-32 克隆外, 其余均属于甲烷营养菌. 甲烷营养菌分为两个类型: 类型 I/X 属于  $\gamma$ -紫细菌亚群, 主要分布于甲烷浓度较低、结合氮与铜较多的地方; 类型 II 属于  $\alpha$ -和  $\beta$ -紫细菌亚群, 主要分布于甲烷浓度相对较高、结合氮和铜相对较少的环境中<sup>[19,20]</sup>. 这两个类型的甲烷营养菌在我们的研究结果中均有发现, 其中属于 II 型甲烷营养菌的克隆相对较多(12/23), 主要分布在 6 cm 以上

的沉积物中, 而 6 cm 以下的沉积物中主要分布着 I/X 型甲烷营养菌(图 1(a)).

与 S 代谢相关的克隆属于紫细菌的 4 个不同的亚群(图 1(b)). 其中  $\delta$ -亚群的最多, 其次是  $\epsilon$ -亚群和  $\gamma$ -亚群. 几乎所有的  $\delta$ -紫细菌亚群都属于硫酸盐还原细菌, 该类细菌在全球海洋沉积物硫循环中占据重要地位<sup>[21]</sup>. 本实验中属于  $\delta$ -亚群的克隆大部分属于无法培养的细菌, 与它们同源性最近的菌属均分离自“冷泉”区域, 说明这些微生物在海洋沉积物中有普遍的分布. 除了  $\delta$ -亚群的硫酸盐还原细菌之外, 在各个层次中都有硫化细菌存在, 分别属于  $\epsilon$ -、 $\gamma$ - 和  $\alpha$ -紫细菌亚群.

### 3 讨论

即使在普通环境中, 能用现有技术培养的微生物也仅占微生物总种群数的 0.01%~10%<sup>[22]</sup>, 而深海可培养微生物所占的比例更少. 因此, 现在的环境微生物生态研究普遍采用基于微生物 16S rRNA 基因序列分析的方法进行. 本实验对沉积物的总 DNA 直接进行分析, 避免了人工培养所造成的偏差, 能够较好地评估样品中的微生物多样性. 在实验过程中采取了一系列的措施防止污染: 包括沉积物采集、现场分样和保存、沉积物总 DNA 提取、PCR-RFLP 等在内的所有实验过程都在无菌超净台内进行; 仅取沉积物样品的中心部分进行实验分析, 防止采样过程中可能产生的污染; 通过各种阴性对照实验以保证 PCR 等实验结果的可靠性.

所提取的 DNA 总量表明该站位 4 个不同层次沉积物中的生物量随着深度的增加而略有减少. RFLP 分析结果表明, 浅层(0~6 cm)沉积物中微生物的多样性比深层(6 cm 以下)沉积物高(表 2). 在该海区沉积

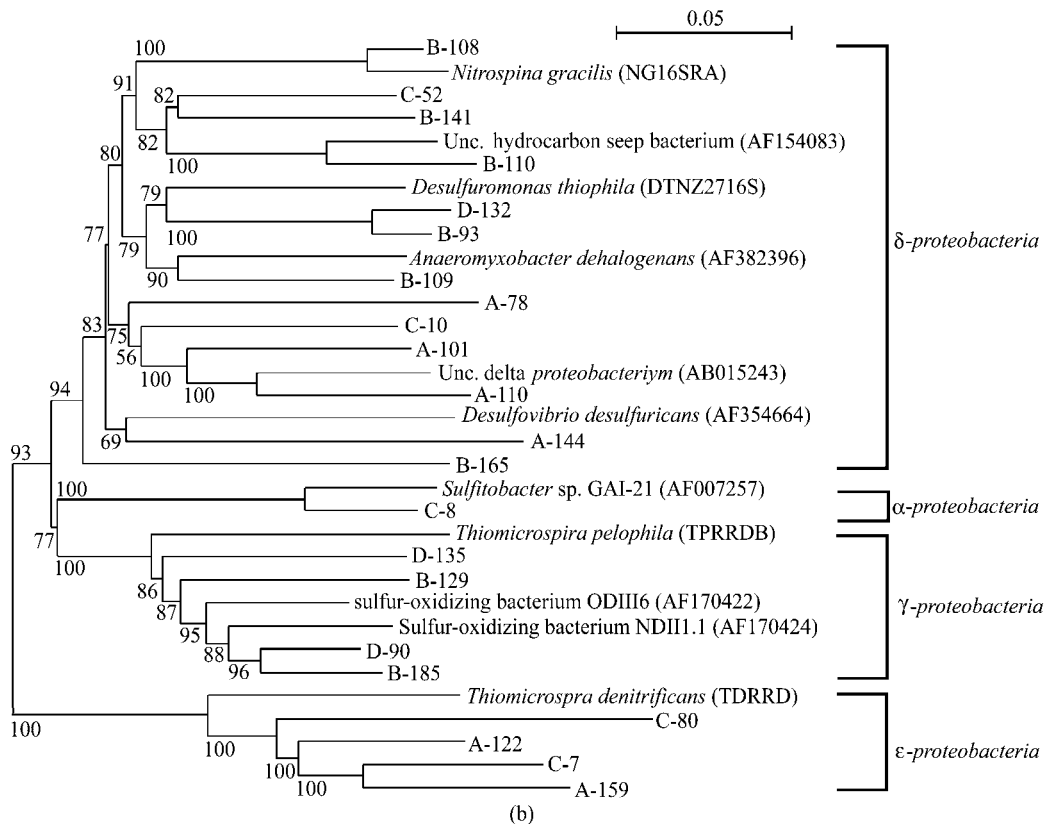
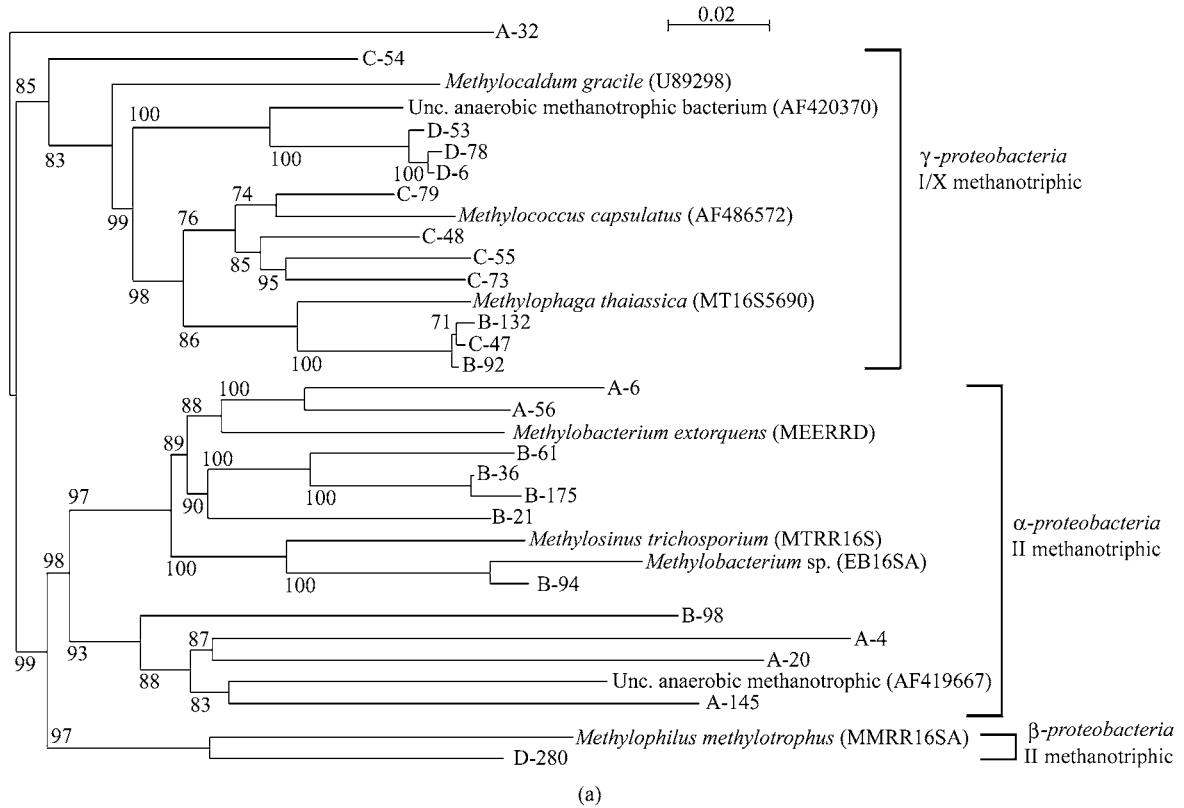


图 1 与甲基代谢相关细菌(a)和硫代谢相关细菌(b)的系统发育树

各分支上的数值代表经 100 次计算后的置信度值；本研究中的克隆用黑体表示，第一个字母代表样品编号；参照菌株引自 EMBL 数据库，括号内为该菌株在数据库中的编号；Unc. 代表“无法培养的”

物中, 科尔韦氏菌属不仅在 $\gamma$ -紫细菌亚群中, 而且在总细菌类群中都占据最大比例, 该属的大部分种都是嗜压菌<sup>[23]</sup>, 但是在现有的深海沉积物微生物多样性研究报道中尚未发现该菌属为优势菌属. 在其他海区的研究报告中, 假单胞菌属(*Pseudomonas*, 属于 $\gamma$ -紫细菌亚群)为普遍存在的菌属<sup>[1,3,24,25]</sup>, 并且在一些海区占据优势<sup>[24]</sup>, 但是在本研究中却没有得到属于假单胞菌的克隆. 这些现象可能与西太平洋“暖池”区的物质能量循环特点有关, 值得进一步研究.

CFB类群的细菌能够利用纤维素、几丁质、DNA、脂类和蛋白质等物质, 这些有机物质的吸收和利用是深海碳循环的重要部分<sup>[26]</sup>, 它们在海底的沉积会造成CFB类群细菌含量的明显增加<sup>[27]</sup>. 我们发现, “暖池”区海底表层(0~3 cm)沉积物中含有丰富的CFB类群的细菌, 而在深层沉积物中分布很少. 其原因可能是由于“暖池”区水温较高, 生物类群较多, 代谢旺盛, 物质循环较快, 因此沉积物表层中含有丰富的从上层海洋中沉降下来的有机质, 从而导致该类群细菌在表层沉积物中的大量存在.

在深海沉积物的碳、硫循环中, 甲烷的产生与消耗、硫酸盐的还原、硫化物的氧化是重要组成部分, 它们能够释放出甲烷、二氧化碳和硫化氢等温室气体, 对上层海水乃至全球气候的变化都具有重要的影响<sup>[10]</sup>, 而微生物在这些过程中起着重要的作用. 在本研究中, 与碳、硫代谢相关的菌属在各个深度中都有大量分布, 所占比例均在总细菌种群的 15%~30%之间, 并且在 4~9 cm深度中特别丰富(表 3), 表明碳与硫的代谢在该站位的物质能量循环中具有重要地位. 在 4 个层次中, 与甲基代谢相关的克隆约占总数的 18%~30%(表 3), 并且绝大部分为甲烷营养菌(图 1(a)). 甲烷营养菌仅分布于有稳定甲烷资源的地方<sup>[20]</sup>, 而且在其他的深海研究中, 仅在甲烷资源丰富的海区沉积物中发现甲烷营养菌的大量存在<sup>[6,19,20,28,29]</sup>, 由此可以推断该站点沉积物中存在着丰富而稳定的甲烷资源.

$\delta$ -和 $\epsilon$ -紫细菌亚群属于有机化能营养菌, 绝大多数种都与硫的氧化还原相关. 它们在深海“热液”区和“冷泉”区中为优势菌群<sup>[4,7]</sup>, 在其他海区中则分布较少. 本实验通过随机克隆所得到的克隆中, 属于这两

个类群的克隆约占总数的 20%, 说明它们在该海区中并非少数菌群, 因此硫化物的代谢在该海区沉积物的物质循环中占据重要地位.

现有研究认为, 深海沉积物中硫酸盐还原菌与甲烷营养菌的作用是相互耦联的<sup>[10,24]</sup>, 我们绘制了海底甲烷与硫酸盐循环的简单示意图(图 2). 在本实验中发现约 12%的克隆属于硫酸盐还原细菌( $\delta$ -紫细菌亚群). 从分布的深度来看, 它们和II型甲烷营养菌都主要分布于 6 cm以上的沉积物中(表 2, 图 1(a)), 表明在 6 cm以上的沉积物中甲烷与硫酸盐的代谢比较旺盛. 图 2 所示循环中的硫氧化细菌在本实验中也有发现, 它们分属于 $\gamma$ -和 $\epsilon$ -紫细菌亚群. 这些关键的细菌类群共同参与了海底沉积物中的甲烷与硫酸盐的代谢循环.

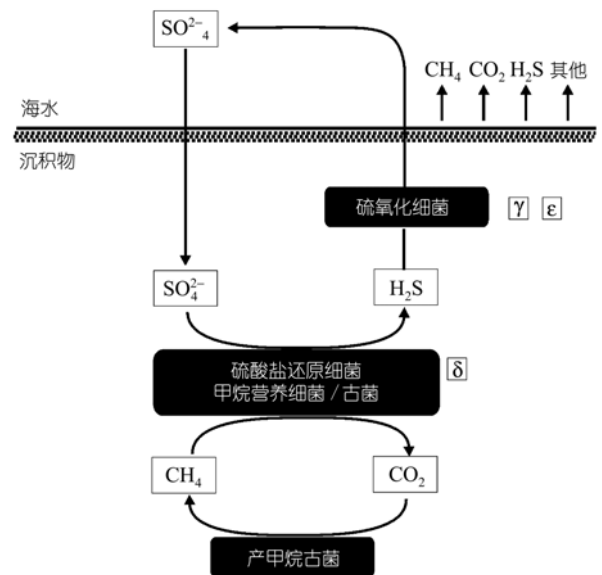


图 2 沉积物中硫酸盐与甲烷循环简图

本研究结果表明, 在西太平洋“暖池”区海底沉积物的物质和能量循环中, 由微生物完成的甲烷代谢和硫化物代谢占据着重要的地位. “暖池”区海水温度较高, 海洋生物的代谢旺盛, 导致海底沉积物中硫酸盐、溶解的有机物质和有机微粒浓度较高, 因此该代谢特征体现了微生物对环境的响应. 同时, 现有研究表明, 深海微生物的各种代谢活动也影响着整个海洋环境的物质和能量循环<sup>[7-11]</sup>, 因此“暖池”区海底

微生物群的代谢作用反过来也可能是影响该区平均水温变化, 进而影响气候变化的一个重要因素。

致谢 日本海洋科学与技术中心加藤千明(Chiaki Kato)教授和本实验室叶德赞研究员在研究工作中给予指导, 作者在此一并致谢。

### 参 考 文 献

- López-García P, López-López A, Moreira D, et al. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic polar front. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 36: 193~202 [\[DOI\]](#)
- Moyer C L, Dobbs F C, Karl D M. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 871~879
- Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodivers Conserv*, 1999, 8: 659~677 [\[DOI\]](#)
- Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A, et al. Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(5): 277~286 [\[DOI\]](#)
- Sass A M, Sass H, Coolen M J, et al. Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 5392~5402 [\[DOI\]](#)
- D'Hondt S, Rutherford S, Spivack A J. Metabolic activity of subsurface life in deep-sea sediments. *Science*, 2002, 295: 2067~2070 [\[DOI\]](#)
- Longnecker K, Reysenbach A L. Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of  $\epsilon$ -proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 35: 287~293 [\[DOI\]](#)
- Boschker H T S, Nold S C, Wellsbury P, et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$  labeling of biomarkers. *Nature*, 1998, 392: 801~805 [\[DOI\]](#)
- Takai K, Komatsu T, Inagaki F, et al. Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3618~3629 [\[DOI\]](#)
- Orphan V J, Hinrichs K U, Ussler W III, et al. Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 1922~1934 [\[DOI\]](#)
- Inagaki F, Takai K, Komatsu T, et al. Archaeology of Archaea: geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea subseafloor environment. *Extremophiles*, 2001, 5: 385~392 [\[DOI\]](#)
- 汪品先. 冰期旋回中西太平洋边缘海的季节性与暖池的多变性. *中国科学, D 辑*, 1998, 28(1): 1~6
- 李崇银, 穆明权. 东亚冬季风-暖池状况-ENSO 循环的关系. *科学通报*, 2000, 45(7): 678~685
- Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 316~322
- Delong E F. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5685~5689
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等著. 分子克隆实验指南(第二版). 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 34~48, 318~324
- Giovannoni S J, Mullins T D, Field K G. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes. In: Joint I, ed. *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*. NATO ASI series, Vol. G38. Berlin: Springer-Verlag Press, 1995. 217~248
- 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
- Gulledge J, Ahmad A, Stuedler P A, et al. Family- and genus-level 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for ecological studies of methanotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4726~4733 [\[DOI\]](#)
- Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*, 1996, 60: 439~471
- Ravenschlag K, Sahn K, Knoblauch C, et al. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3592~3602 [\[DOI\]](#)
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143~169
- 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
- Horikoshi K, Tsujii K. *Extremophiles in deep-sea environments*. Tokyo: Springer-Verlag, 1999. 84~85
- Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 505~518 [\[DOI\]](#)
- O'Sullivan L A, Weightman A J, Fry J C. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 201~210 [\[DOI\]](#)
- Rosselló-Mora R, Thamdrup B, Schaefer H, et al. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst Appl Microbiol*, 1999, 22: 237~248
- VanDover C L, German C R, Speer K G, et al. Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. *Science*, 2002, 295: 1253~1257 [\[DOI\]](#)
- 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 Microbiol Lett*, 1999, 177: 101~108 [\[DOI\]](#)