



东太平洋多金属结核区两个站位深海沉积物细菌多样性

井晓欢, 王杏, 熊尚凌, 朱四东, 陈勇, 杨季芳*, 陈吉刚*

浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

摘要: 【目的】为了解东太平洋中国多金属结核勘探合同区西区2个站位(WBC1305和WBC1316A)深海沉积物细菌群多样性。【方法】直接提取环境样品总基因组, 通过PCR和TA克隆策略构建了2个站位6个层次16S rRNA基因文库, 对2个站位沉积物表层泥样中细菌多样性和群落结构特征进行分析, 并通过构建系统发育树, 进行系统发育学分析。【结果】2个站位6个文库共获得有效克隆533个, 其中472个克隆包括 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、硝化螺旋菌门、放线菌门、绿弯菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、迷踪菌门、芽单胞菌门、Hydrogenedentes、Chlorobi和Nitrospinae 16个细菌类群, 而另外61个克隆为不可分类细菌类群。【结论】结果表明 γ -变形菌纲和厚壁菌门分别是WBC1305和WBC1316A站位的优势种群; WBC1316A站位细菌群落结构更加丰富和复杂。

关键词: 多金属结核区, 深海沉积物, 细菌多样性

铁锰结核又称多金属结核, 主要分布于水深4000–6000 m的深海沉积物中, 其不但富含锰、铁, 还含有铜、钴、锌、镍等多种金属, 是1种潜在的矿产资源, 业已受到各国的广泛关注。虽然所有海洋都发现有结核, 其铁和锰储量可达 2×10^{14} kg, 但不同海区结核的金属组成及含量存在较大差异^[1]。目前发现有经济价值的多金属结核主要分布于太平洋中北部、南太平洋的秘鲁盆地以及北印度洋中部, 其中位于东太平洋的克拉

里昂-克利伯顿大断裂区(Clarion-Clipperton fracture zone, 简称CC区)在众多矿藏中藏量及含金量最为突出, 包括国际海底管理局批准我国具有专属勘探权和优先商业开采权的总面积为7.5万 km²的结核区。近年来矿产品价格高起, 大大激发了人们对深海多金属结核的开采兴趣。然而, 目前我们对控制海底结核形成与维持过程, 以及深海结核在支持周围生物圈中所发挥的作用知之甚少。这些知识的缺乏使得人们难以预测深

基金项目: 国际海域资源调查与开发“十二五”项目(DY125-15-R-03); 浙江省自然科学基金(LY12C01003); 浙江省重中之重学科创新基金(CX2014008)

*通信作者: 杨季芳, Tel: +86-574-88223016, E-mail: jfkwllq@163.com; 陈吉刚, Tel: +86-574-88223093, E-mail: genomic@163.com

收稿日期: 2015-12-01; 修回日期: 2016-01-19; 网络出版日期: 2016-03-11

海结核采集对海洋环境可能造成的影响^[1]。

虽然早在18世纪70年代就已发现海洋结核,但是海洋结核的形成机制仍然是一个未知的科学问题。海洋结核形成机制的早期研究重点为非生物成因。1984年, Kerr根据放射性测量数据推断海洋结核的形成速率为几个毫米/10⁶年^[2]。最近,新的测量技术表明几个毫米的海洋结核形成仅需10³年^[3]。随着人们对微生物在地球化学过程所发挥作用认知水平的增长,研究者开始将研究的重点转向研究生物过程是否参与了海洋结核的形成^[4]。研究者在海洋结核内外观察到微生物存在,为微生物参与结核形成提供了间接和直接的实验证据^[5-14]。类似于其它深海环境,目前我们对海洋结核区微生物的生理和代谢特征,以及它们对全球海洋金属化学的潜在影响的认识还很有限。

基于深海结核区特殊生境所蕴藏的丰富微生物资源,以及环境内微生物对多金属结核形成的潜在影响,对深海结核区微生物的研究已成为国际热点^[15]。近年来,依托大洋专项和环球航次等计划,国内多家实验室在深海结核区内微生物群落结构及多样性分析、菌株分离纯化与新物种分类和功能基因筛选等方面,开展了一系列开创性的研究工作^[16-23]。然而对于深海多金属结核区多变的生境,现有的研究结果还不能全面反映深海结核区不同区域内微生物多样性。因此需要扩大调查范围、进一步调查摸底。2013年10月,我国“海洋六号”调查船对中国东太平洋多金属结核合同区西区这一富含多金属结核的区域进行了密集采样。本研究通过构建16S rRNA基因文库,首次比较分析了中国东太平洋多金属结核合同区西区2个站位沉积物细菌多样性及群落结构特征,旨在补充完善该区域环境基线数据,揭示这一区域微生物在该环境中的生态作用和为挖掘新的微生物种质资源提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品采集

样品于2013年“海洋六号”29航次大洋科考期间,在位于CC区内的我国多金属结核合同区的西区采集,分别为WBC1305站位(154.266W, 10.017N, 水深5216 m)和WBC1316A站位(154.295W, 10.078N, 水深5193 m)。样品采集方式为抓斗采集,然后用长度为20 cm无菌PVC管(直径6 cm)垂直插取获得样品。样品于无菌环境中按1 cm厚度分割,保存于-20 °C冰箱备用。

1.2 主要试剂

16S rRNA扩增所用聚合酶TransTaq DNA Polymerase High Fidelity为北京全式金生物技术有限公司产品;沉积物总DNA提取试剂盒E.Z.N.A.TM Soil DNA Kit为OMEGA产品;PMD 18-T为TaKaRa大连公司产品;蛋白酶K为Merck公司产品;DNA胶回收试剂盒为Axygen公司产品;引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.3 沉积物总基因组DNA的提取

2个站位各采集3层泥样进行实验,第1层(PCA)为2-3 cm表层样品,第2层(PCB)为4-5 cm表层样品,第3层(PCC)为6-7 cm表层样品。各层中每厘米样品各取泥样1 g混合后进行总DNA的提取。DNA提取按E.Z.N.A.TM Soil DNA Kit说明书进行,提取的总DNA最后溶于50 μL TE (pH 8.0),保存于-40 °C冰箱中备用。

1.4 细菌16S rRNA基因PCR扩增、克隆和测序

以提取的总DNA为模板,使用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s, 53 °C 45 s, 72 °C 75 s, 72 °C 10 min, 30个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用DNA胶回收试剂盒进行纯化。将PCR纯化产物

连接至pMD18-T载体, 转化至*E. coli* DH5 α 感受态细胞, 以氨苄青霉素(100 μ g/mL)抗性筛选阳性克隆。随机挑取克隆子, 用pMD18-T载体通用引物M13-47 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')和RV-M (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3')对插入片段进行菌液PCR鉴定。PCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 25个循环。2个站位6个层次文库分别随机挑选100个阳性克隆子送上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.5 细菌种群多样性分析及系统发育树构建

采用Chimera软件去除嵌合体序列。Rdp-ii在线细菌分类软件Classifier (Version 2.10)分析有效序列可能代表的细菌种群。采用Mothur软件分析有效序列的不同分类单元(OTU), 并绘制文库稀释性曲线(Rarefaction), 分析文库的测序深度ACE指数和丰富度指数(*Chao1*)。以相似性大于97%定义为1个OTU。用香农-威纳(Shannon-Weiner)指数(*H'*)和Pielou均匀度指数(*J'*)分析16S rRNA克隆文库中序列的均匀性和多样性。BLASTn程序搜索OTU对应序列的高同源性序列, 并采用ClustalW程序进行多序列匹配排列, 然后通过MEGA 6.0程序^[24]中的Neighbor-Joining方法构建发育树。

2 结果和分析

2.1 2个站位细菌分类单元分析

通过对成功插入片段的克隆进行测序, 去除嵌合体后, 2个站位6个文库共获得533条有效序列(表1)。OTU归类分析结果显示, WBC1305站位和WBC1316A站位文库中分别含有114个和127个OTU。当对2个站位6个层次单独进行OUT归类时, 1305站位PCA、PCB和PCC层文库分别含有45、57和33个OTU, 1316A站位PCA、PCB和PCC层文库分别含有52、70和37个OTU。文库分析结果显示, WBC1305和WBC1316A站位PCB层的OTU数、ACE值、*Chao1*值、*H'*和*J'*值均高于同一站位其它两层, 说明2个站位PCB层的细菌多样性更高; WBC1316A站位各项指标均高于WBC1305站位, 说明WBC1316A站位细菌群落结构更加丰富和复杂。文库稀释曲线结果显示(图1), 2个站位6个文库的稀释曲线均在参照线下方, 且均有缓慢趋于平缓的趋势, 说明2个站位6个层次均趋于饱和, 文库可信度较高。此外, 2个站位PCC层稀释曲线均较同一站位其它两层的平缓, 进一步说明2个站位的PCC层文库已经达到饱和, 且细菌丰富度较低。

在Mothur软件对文库OTU进行聚类分析的基础上, 采用Venn Diagram Generator软件制作韦恩

表1. WBC1305和WBC1316A站位细菌多样性指数

Table 1. Diversity indices of the bacterial libraries from WBC1305 and WBC1316A

Stations	Library	No. of clones	No. of OTUs	<i>ACE</i>	<i>Chao1</i>	<i>H'</i>	<i>J'</i>
WBC1305	PCA (2-3 cm)	87	45	1415.2	1247.0	4.18	0.76
	PCB (4-5 cm)	85	57	3570.0	1785.0	4.99	0.86
	PCC (6-7 cm)	92	33	1364.7	1002.8	4.30	0.85
	6-7 cm	264	114	5121.5	6763.5	5.64	0.83
WBC1316A	PCA (2-3 cm)	88	52	718.7	1055.3	5.17	0.91
	PCB (4-5 cm)	84	70	1308.3	1656.0	5.97	0.97
	PCC (6-7 cm)	97	37	623.6	515.4	4.78	0.92
	2-7 cm	269	127	6995.4	5744.7	6.25	0.89

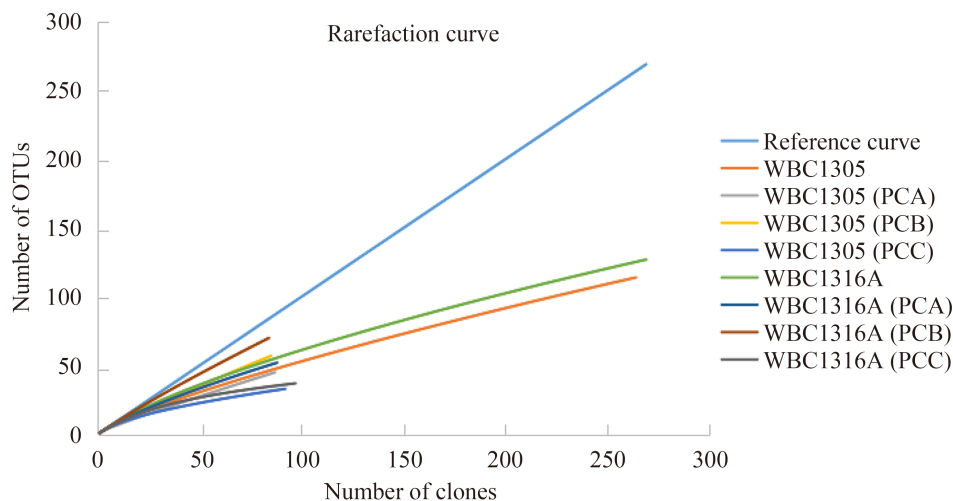


图 1. WBC1305和WBC1316A细菌克隆文库稀释性曲线

Figure 1. Rarefaction curve constructed for bacterial clone library from WBC1305 and WBC1316A.

图(图 2)。结果显示, WBC1305 站位文库与 WBC1316A 站位文库间具有 35 个相同的 OTU。此外, 同一站位 3 个层次之间也均存在共同的 OTU, 其中 WBC1305 站位 3 个层次之间只有 1 个共同的 OTU, 而 WBC1316A 站位 3 个层次之间有 8 个共同的 OTU。

2.2 2 个站位细菌种群分析

细菌分类软件 Classifier 分析表明(图 3), WBC1305 和 WBC1316A 站位 533 个有效克隆中, 能够确定分类地位的克隆为 472 个, 剩余 61 个克隆无法确定分类地位。可分类的 472 个克隆分布于酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、迷踪菌门(Elusimicrobia)、Hydrogenedentes、Chlorobi 和 Nitrospirae。其中, 迷踪菌门、Hydrogenedentes、Chlorobi 和 Nitrospirae 只出现于 WBC1316A 站位。分析发现, 变形菌门和厚壁菌门均是 2 个站位的优势种群。在 WBC1305 站位中, 隶属于变形菌门的克隆

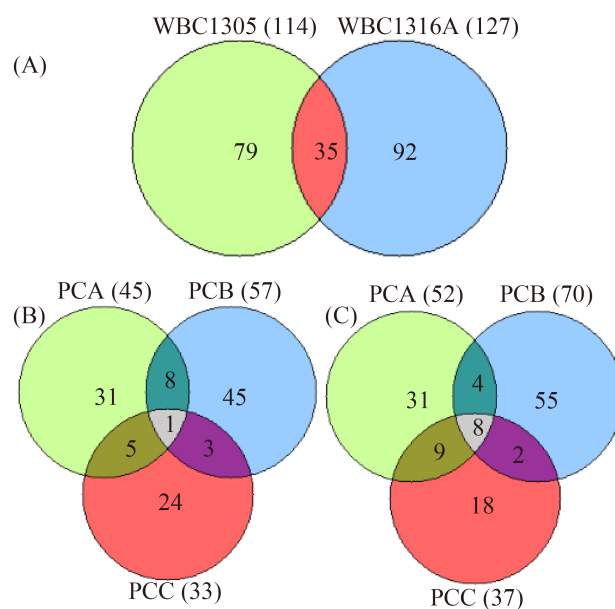


图 2. WBC1305 (A) 和 WBC1316A (B) 站位及 6 个层次 (C) OTU 分布

Figure 2. Venn diagrams showing the estimated OUT (97% sequence similarity) richness shared among bacterial communities from the six clone libraries. A: the two clone bacterial libraries WBC1305 and WBC1316A; B: the three clone bacterial libraries PCA, PCB and PCC of WBC1305; C: the three clone bacterial libraries PCA, PCB and PCC of WBC1316A. Numbers in the Venn diagrams indicate number of OTUs.

以45.67%占据优势地位, 其次为厚壁菌门, 占该文库总克隆的31.50%。对于WBC1316A站位, 厚壁菌门和变形菌门分别以49.06%和31.84%占据优势和次优势地位。其余可分类至门的克隆在2个站位中所占比例均低于5%。

Classifier 分类软件进一步分析表明, WBC1305和WBC1316A站位可分类的克隆分布于20个纲(图4), 其中Acidobacteria_Gp6、噬纤维菌纲(Cytophagia)和浮霉菌纲(Planctomycetia)为

WBC1305站位特有的纲, 而Acidobacteria_Gp26、厌氧绳菌纲(Anaerolineae)、黄杆菌纲(Flavobacteriia)、Ignavibacteria、硝化螺旋菌纲(Nitrospira)和鞘脂杆菌纲(Sphingobacteriia)为WBC1316A站位特有的纲。分析发现, WBC1305和WBC1316A站位中的优势纲存在差异, WBC1305优势菌纲为Gammaproteobacteria (31.89%), 其次为Bacilli (31.10%)和Alphaproteobacteria (9.06%), 而WBC1316A优势菌纲为Bacilli (49.06%), 其次为

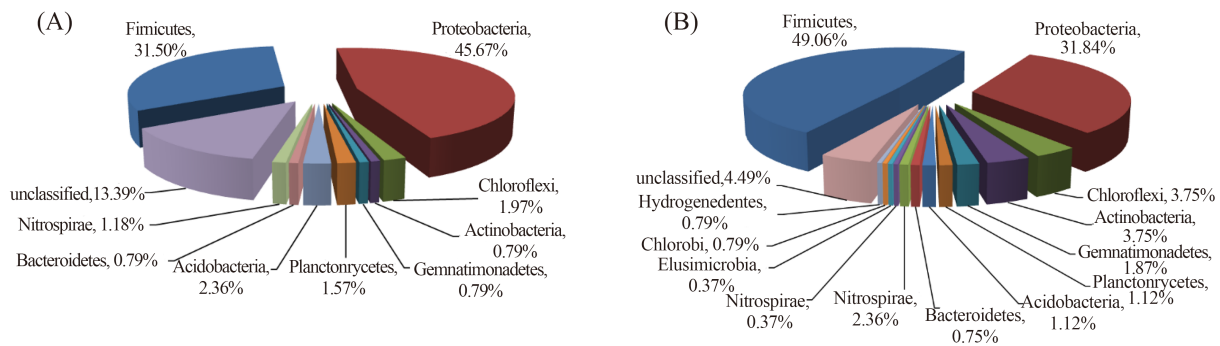


图3. WBC1305 (A) 和WBC1316A站位细菌16S rRNA (B) 基因文库中细菌门群落结构组成

Figure 3. Distribution of bacterial phylum phylogenetic groups from WBC1305 (A) and WBC1316A (B)

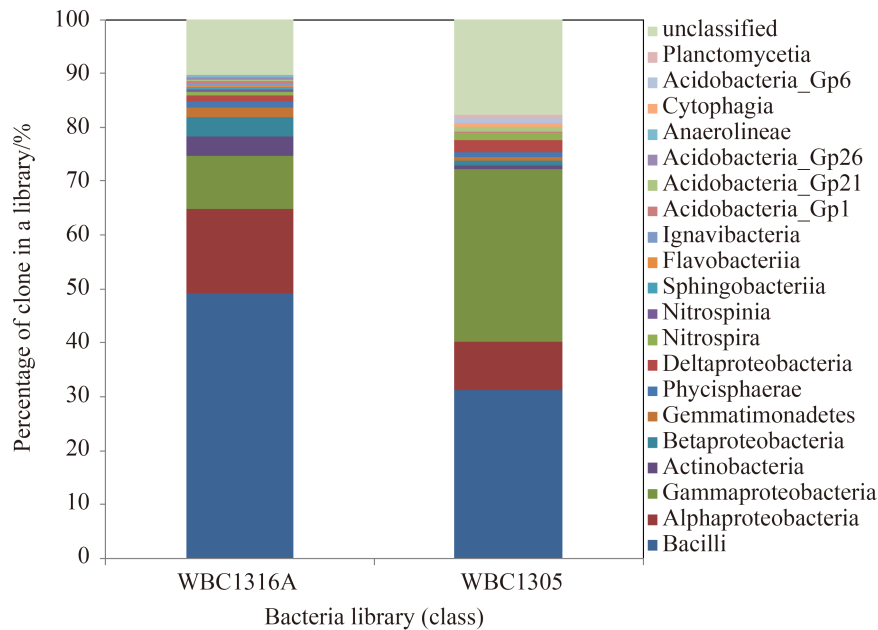


图4. WBC1305和WBC1316A站位细菌16S rRNA基因文库中细菌纲群落结构组成

Figure 4. Distribution of bacterial class phylogenetic groups from WBC1305 and WBC1316A.

Alphaproteobacteria (15.70%)和Gammaproteobacteria (9.74%) (图 5)。

2.3 2个站位文库克隆聚类分析

Classifier分类分析软件分析表明, WBC1305和WBC1316A站位中能够确定分类地位的OTU分别为82个和101个。分别选取可分类的OTU代表序列, BLASTn程序搜索高同源性序列, 然后通过MEGA 6.0程序中的Neighbor-Joining方法构建系统发育树(图 5-9)。

遗传系统发育树表明, 2个站位中共有113条序列46个OTU隶属 γ -变形菌纲(图 5), 其中WBC1305站位含87条序列27个OTU, 而WBC1316A站位含26条序列19个OTU。大部分OTU序列与可培养细菌同源性较低, 而与未可培养克隆具有较高同源性, 这些未可培养克隆来源于东太平洋结核区结核和沉积物、深海沉积物、近海沉积物、深海热液区、海水、海山、石油污染的沉积物和铜矿开采区土壤等环境, 其中尤以东太平洋结核区结核及其周围沉积物来源为主。系统发育树还显示, 5个OTU与*Shewanella* sp. JXH-311和*Shewanella* sp. JXH-202聚在一起。菌株JXH-311和JXH-202分别分离自WBC1305和WBC1316A站位, 均具有耐锰和锰氧化双重活性。此外, OTU29和OTU96分别与菌株*Thiopfundum hispidum* strain gps61和*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain ATCC 49840聚在一起。菌株gps61分离自Suiyo海山热液口, 是1株严格化能自养硫氧化细菌^[25], 而菌株ATCC 4984能够在疏水性有机复合物上形成生物膜^[26]。

遗传系统发育树表明, 2个站位中共有210条序列56个OTU隶属厚壁菌门(图 6), 其中WBC1305站位含76条序列20个OTU, 而WBC1316A站位含134条序列36个OTU。BLASTn同源搜索显示, 大部分细菌OTU (129/134) 与可培养细菌的同源性高

于97%。这些可培养物来源广泛, 来源涉及水体及沉积物、植物根系及根系结核、热泉、盐田、盐碱地、粪便、生物膜、奶制品、白酒、空间站、空气、沼液、堆肥、原油污染土壤和腌菜等各种环境, 但未见海底结核结壳及周围沉积物来源。

遗传系统发育树显示, 2个站位其余14个类群合计149条序列, 隶属于96个OUT (图 7-9)。16个类群中, 其OTU最多的类群为 α -变形菌纲(28个), 其次为绿弯菌门(13个OTU)和 δ -变形菌纲(10个OTU), 其它类群的OTU数均少于10个。BLASTn同源搜索显示, 这些类群中的大部分OTU与可培养细菌的同源性较低, 而与未可培养克隆具有较高同源性, 这些未可培养克隆来源包括东太平洋结核区结核和沉积物、深海沉积物、深海热液区、石油污染土壤、深海海水、海山、海底热液流、海底死火山口周围沉积物和洋壳, 其中尤以东太平洋结核区结核和沉积物来源为主。遗传发育树表明, 部分类群中OTU与具有特定性状的菌株具有较近亲缘关系, 如隶属 α -变形菌纲的OTU117和OTU20分别与趋磁细菌*Magnetospira thiophila* strain MMS-1和嗜盐嗜热菌*Oceanicella actignis* strain PRQ-67聚在一起(图 7); 隶属 γ -变形菌纲的2个OUT (OTU30和OTU54)和3个OUT (OTU 11、OTU 15、OTU 52)分别与氨氧化细菌*Nitrosospira multiformis* strain ATCC 25196^[27]和肽聚糖降解细菌*Delftia lacustris* strain 332^[28]聚在一起(图 7); 隶属绿弯菌门的OTU59与嗜热厌氧菌*Thermomarinilinea lacunofontalis* strain SW7聚在一起(图 8); 隶属酸杆菌门的OTU31与嗜热厌氧菌*Thermoanaerobaculum aquaticum* strain MP-01^[29]聚在一起(图 8); 隶属于放线菌门的OTU55与嗜热嗜酸铁离子还原细菌*Aciditerrimonas ferrireducens* strain IC-180^[30]聚在一起(图 9)。上述这些可培养细菌也与来自于深海热液口沉积物或东太平洋结核及周围沉积物的克隆子具有较近的亲缘关系。

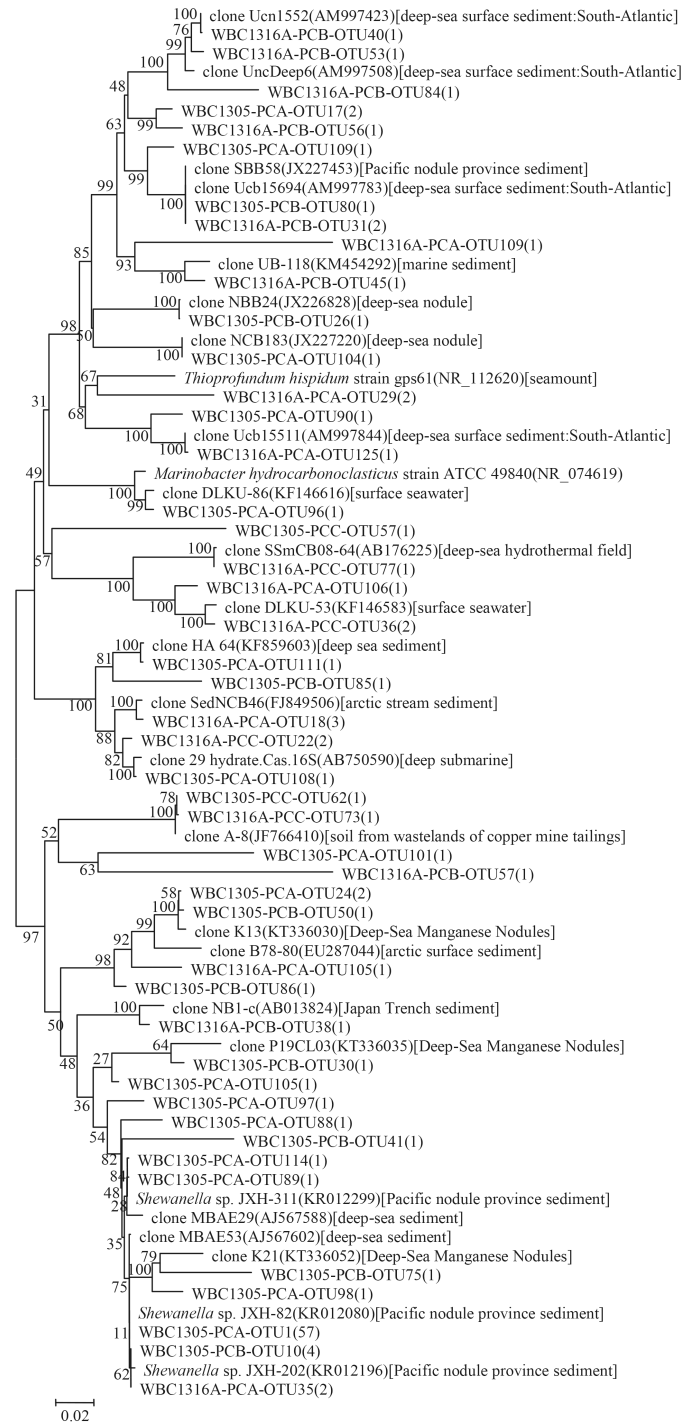


图 5. 16S rRNA基因克隆文库的系统发育树

Figure 5. Neighbor-Joining tree of bacterial 16S rRNA gene sequences assigned to Gamaproteobacteria from the six clone libraries. Clone named OTU were obtained in the present study, and numbers in parentheses followed OTU represented the total number clones contained in each OTU, the other numbers in parentheses indicate the GenBank accession numbers. Number at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The environments where close relatives were obtained from were given in square brackets. Bootstrap values <2% difference in sequence.

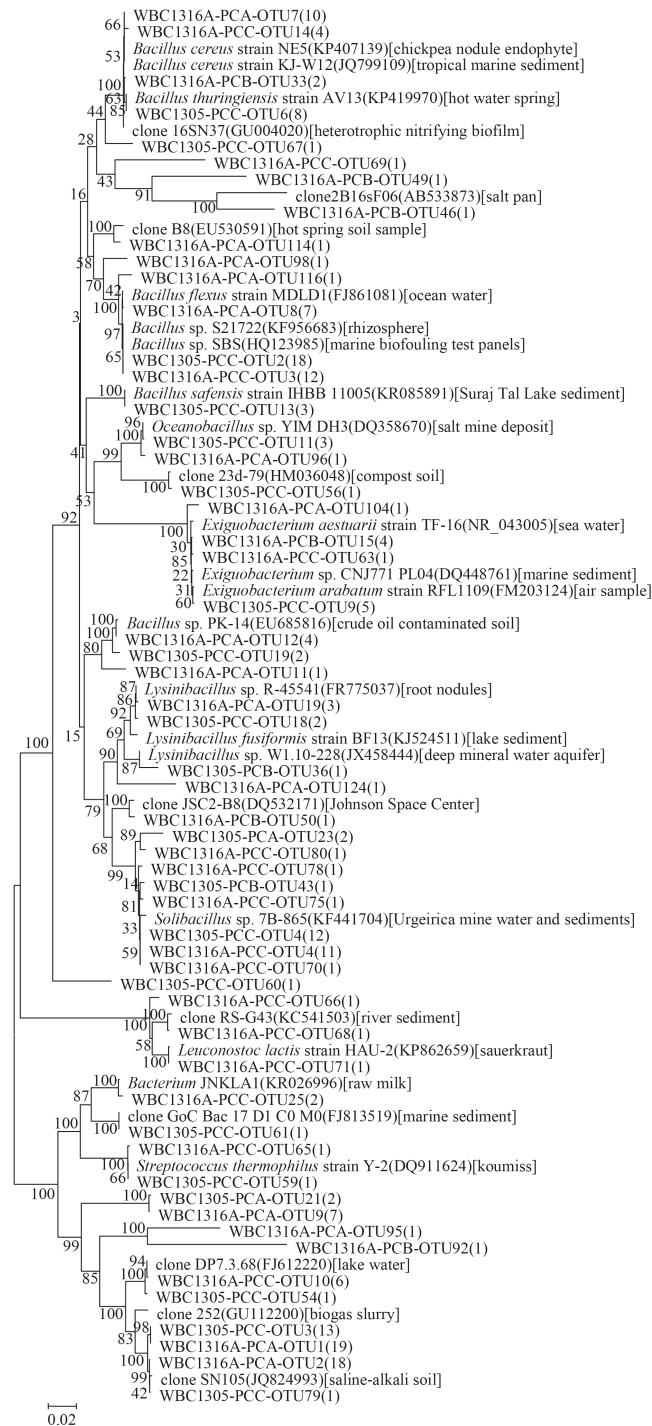


图 6. 16S rRNA基因克隆文库的系统发育树

Figure 6. Neighbor-Joining tree of bacterial 16S rRNA gene sequences assigned to Firmicutes from the six clone libraries. Clone named OTU were obtained in the present study, and numbers in parentheses followed OTU represented the total number clones contained in each OTU, the other numbers in parentheses indicate the GenBank accession numbers. Number at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The environments where close relatives were obtained from were given in square brackets. Bootstrap values <2% difference in sequence.

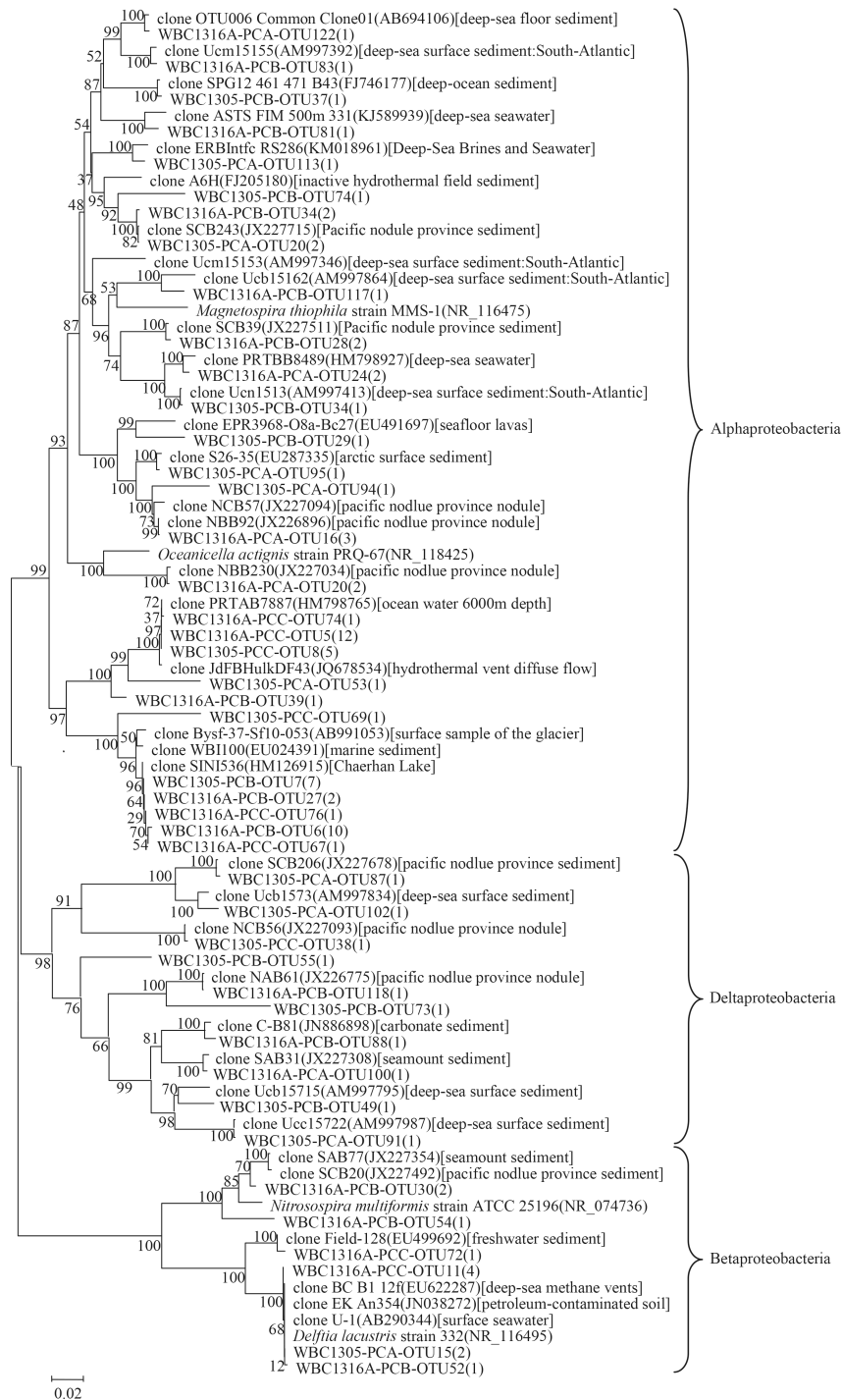


图 7. 16S rRNA基因克隆文库的系统发育树

Figure 7. Neighbor-Joining tree of bacterial 16S rRNA gene sequences assigned to Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, and Betaproteobacteria from the six clone libraries. Clone named OTU were obtained in the present study, and numbers in parentheses followed OTU represented the total number clones contained in each OTU, the other numbers in parentheses indicate the GenBank accession numbers. Number at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The environments where close relatives were obtained from were given in square brackets. Bootstrap values <2% difference in sequence.

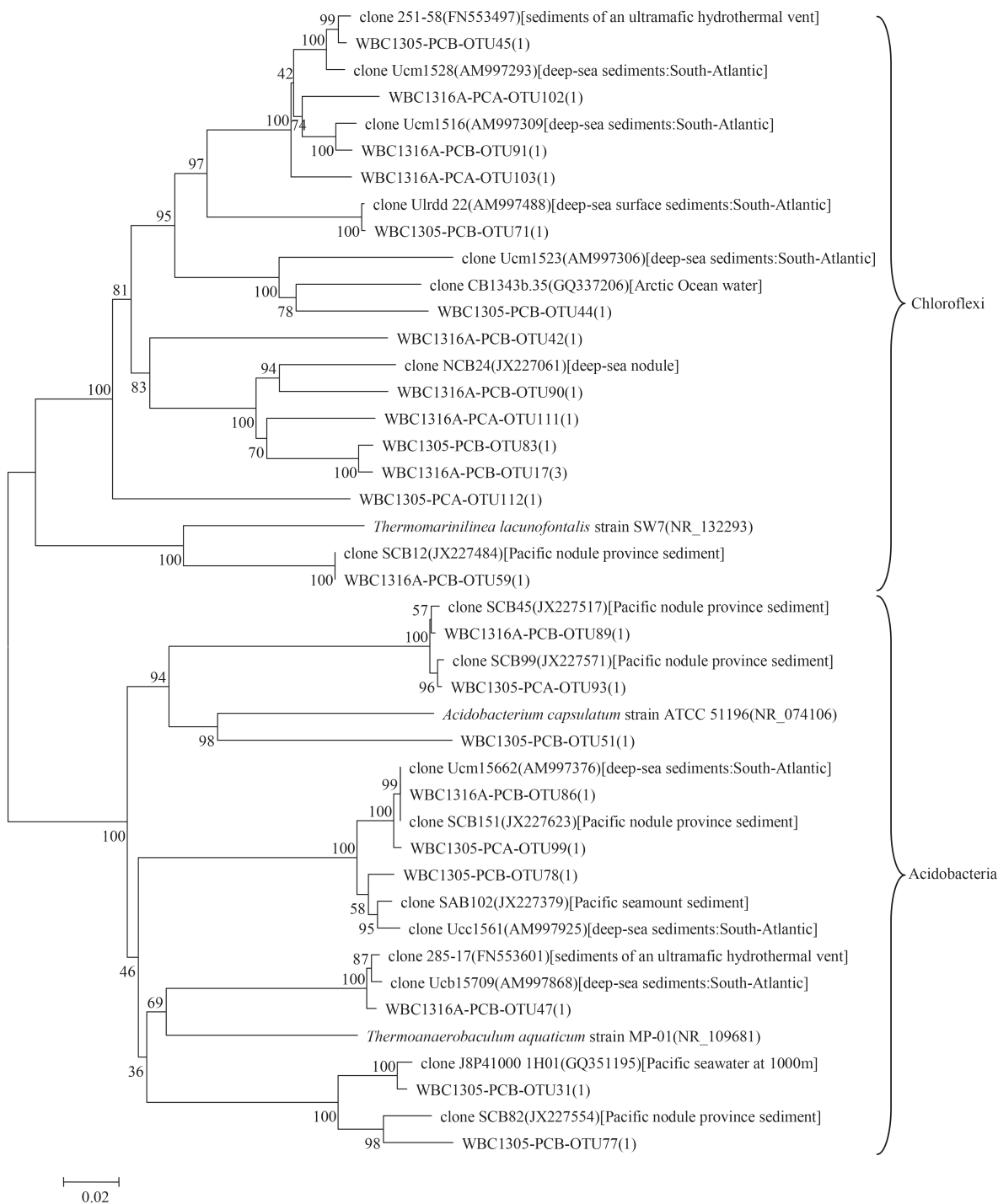


图 8. 16S rRNA基因克隆文库的系统发育树

Figure 8. Neighbor-Joining tree of bacterial 16S rRNA gene sequences assigned to Chloroflexi, and Acidobacteria from the six clone libraries. Clone named OTU were obtained in the present study, and numbers in parentheses followed OTU represented the total number clones contained in each OTU, the other numbers in parentheses indicate the GenBank accession numbers. Number at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The environments where close relatives were obtained from were given in square brackets. Bootstrap values <2% difference in sequence.

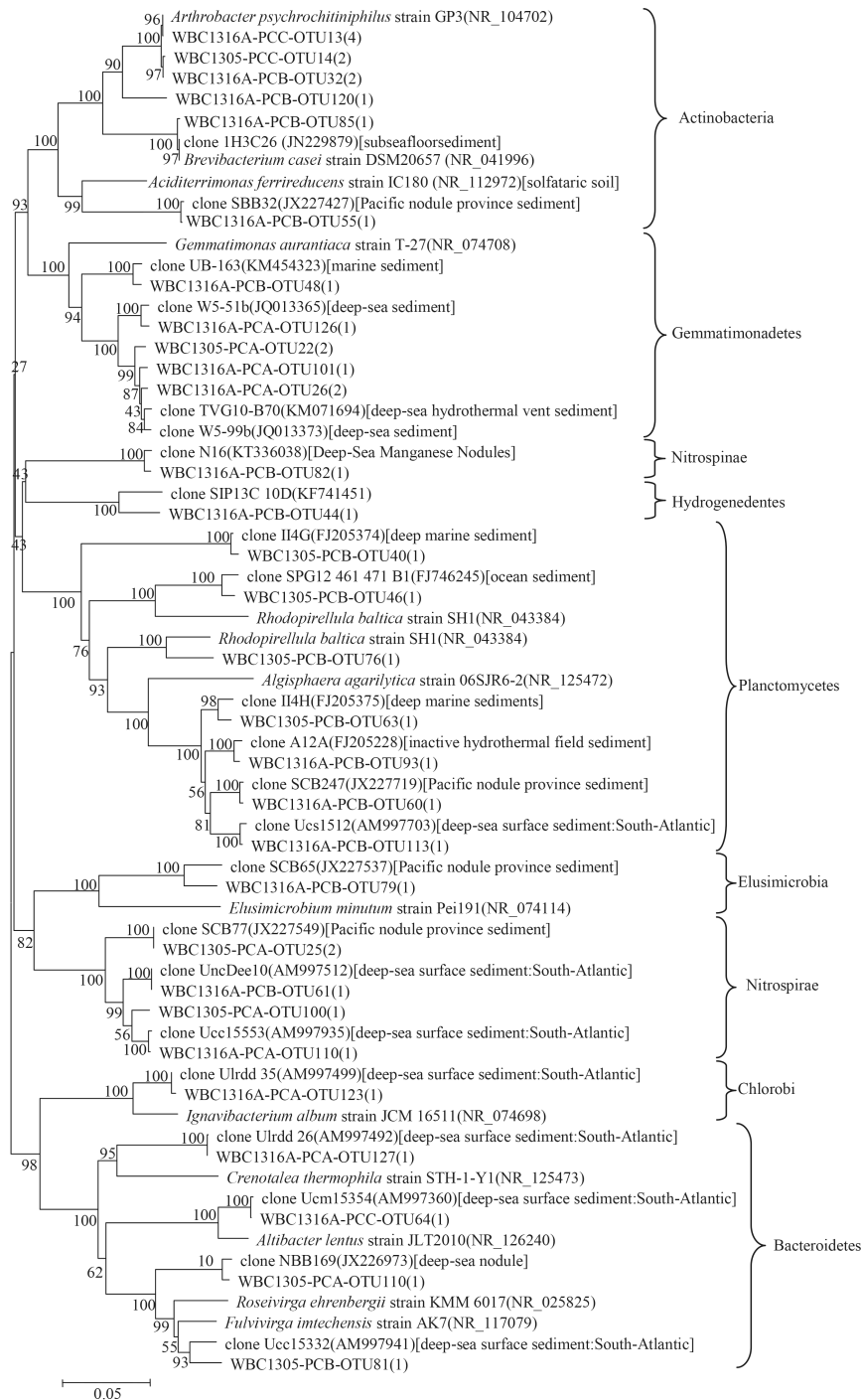


图 9. 16S rRNA基因克隆文库的系统发育树

Figure 9. Neighbor-Joining tree of bacterial 16S rRNA gene sequences assigned to the others bacterial phylum from the six clone libraries. Clone named OTU were obtained in the present study, and numbers in parentheses followed OTU represented the total number clones contained in each OTU, the other numbers in parentheses indicate the GenBank accession numbers. Number at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. The environments where close relatives were obtained from were given in square brackets. Bootstrap values <2% difference in sequence.

3 讨论

太平洋多金属结核区地处热带海域, 平均水深在4000 m以上, 除一般深海环境的高压、低温和黑暗等特点外, 多金属结核区还含有丰富的金属资源, 包括锰、铁、镍、钴和铜等几十种元素, 这些金属以结核的形式分布在深海沉积物的表面, 造就了该区域环境的特殊性。WBC1305和WBC1316A站位位于东太平洋中国多金属结核勘探合同区西区的详细勘探区, 该区域多金属结核资源丰富, 覆盖率达50%。目前尚无有关该区域细菌多样性的研究报道。本研究通过对2个站位的深海沉积物样品进行细菌多样性分析, 结果表明, 变形菌门均是2个站位的优势种群, 其中 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲是组成变形菌门的主要类群, 这一结果与东太平洋结核区其它站点的深海沉积物细菌多样性一致^[16-20]。由于众多适应海底环境的嗜冷菌和嗜压菌大都分布于 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲, 因此这2个纲往往是深海沉积物的优势种群^[31]。本研究还发现, 厚壁菌门也是2个站位的优势种群, 而该门细菌虽也存在于东太平洋其它站点, 但是该门并不是这些站位的优势菌群。厚壁菌门细菌在2个站位的高频率出现可能与2个站位独特的环境因素有关。序列比较及遗传进化树表明, 本实验中获得的隶属于厚壁菌门的大部分克隆与各种环境来源的细菌具有较近的亲缘关系, 这进一步说明厚壁菌门细菌的生理和代谢多样性赋予它们适应各种生境的能力^[32]。本研究中, 在2个站位还发现了东太平洋结核区其它站位未曾报道的细菌门, 包括Elusimicrobia、Hydrogenedentes、Ignavibacteriae和Nitrospinae。上述结果说明, 本研究的2个站位与东太平洋结核区其它站位的微生物群落结构存在较大差异。值得注意的是, 2个站位中发现一些与厌氧嗜热菌具有较高同源性的克隆, 这些克隆同样存在于太平洋结核区其它站位。通常这些厌氧嗜热菌主要分

布在陆地热泉, 此外在深海热液口沉积物也有它们的踪迹, 说明深海沉积物中的细菌多样性很可能还受其它因素影响, 而引入一些外源性的物种。2个站位中还存在着与硫氧化细菌、氨氧化细菌、参与生物膜形成的细菌和厌氧嗜热菌具有较高同源性的克隆, 这些克隆同时也存在于东太平洋结核及周围沉积物中, 说明这些克隆子所代表的细菌可能在深海结核区发挥某种功能。此外, 2个站位中除了隶属厚壁菌门的克隆外, 很多克隆与来源于南大洋沉积物的克隆有较高的同源性, 它们在系统进化树上聚在一起, 提示这些克隆来源的环境条件可能存在相似性。

以往对深海结核沉积物多样性的研究工作大都涉及地理位置较远站位间细菌多样性比较分析。本研究则是分析了地理位置十分接近站位间的细菌多样性的异同。实验结果显示, 2个站位的细菌群落虽然在大门类上十分类似, 但是2个站位各类群具体组成上仍存在差异。如在WBC1305站位中, γ -变形菌纲以31.89%的比例占据优势地位, 而在WBC1316A站位中, γ -变形菌纲所占比例仅为9.74%, 明显低于 α -变形菌纲在该站位中的比例(15.70%)。此外Elusimicrobia、Hydrogenedentes、Ignavibacteriae和Nitrospinae门中的细菌只存在于WBC1316A站位。这些数据说明, 对于深海结核区, 尽管站位间地理位置十分接近, 其地质环境可能类似, 但其站位间的细菌多样性仍存在差异。

由于少数种群是几乎所有环境样品中微生物群落的主要组成, 因此通过16S rRNA基因文库分析环境微生物的多样性能够很好的体现环境中的优势种群, 但是由于该技术的局限性, 那些环境中的稀有种群(含量<0.1%)往往会被遗漏^[33]。在本研究构建的6个文库中, 每个文库挑选了近100个克隆, 尽管这些克隆能够体现样品中主要的细菌种群, 但不可避免地会遗漏一些环境中的低丰度种群。因此, 要证明出现于深海结核区某一站位

的非优势种群是否是此站位的特有种群，还需要通过其它方法加以确认。

由于2个站位均富含铁锰结核，其中必定富含 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 等金属离子，因此生存在此环境的大部分微生物不但具有抗锰和抗铁活性，还可能参与了金属元素循环和铁锰结核的形成。众多研究表明，自然界中的锰氧化细菌在锰元素循环以及铁锰结核的形成中发挥了重要作用^[34-35]。本研究6个文库中的大部分序列与海洋结核、结壳、液热流、深海火山口沉积物、铜矿采集区土壤、植物根系土壤、洋壳及海底玄武岩来源的克隆存在较高同源性，而这些环境均富含金属离子，生存其中的微生物可能具备抗金属离子和金属离子氧化还原特性。此外，厚壁菌门在2个站位广泛存在，其中该门中的芽胞杆菌纲又是该门的优势种群。目前研究表明，芽胞杆菌不但有较强的环境适应能力，还是锰氧化细菌的主要类群，它们通过多种锰氧化机制在细胞或者芽胞表面形成锰氧化物多聚体^[36]。更为重要的是，2个站位中还存在着具有耐锰和锰氧化活性的2个菌株(*Shewanella* sp. JXH-311和*Shewanella* sp. JXH-202)具有较高同源性的克隆，以及与铁离子还原细菌*Aciditerrimonas ferrireducens* strain IC-180具有较高同源性的克隆。基于本研究所获得的细菌种群信息，建立未可培养细菌的培养技术策略，最大程度的获得多金属结核区微生物纯培养物，继而开展锰氧化细菌的锰耐受及氧化机制研究，可为阐明微生物在深海铁锰结核区元素循环及铁锰结核形成过程中所扮演的角色奠定基础。

致谢

分析样品来自大洋DY29-03航段，感谢参与该航段所有工作人员！感谢航段首席科学家、广州海洋地质调查局刘芳兰教授级高工，和广州海洋地质调查局邓希光教授级高工在深海样品采集上提供的指导和帮助！

actamicro@im.ac.cn

参考文献

- [1] Tully BJ, Heidelberg JF. Microbial communities associated with ferromanganese nodules and the surrounding sediments. *Frontier in Microbiology*, 2013, 4: 161.
- [2] Kerr RA. Manganese nodules grow by rain from above: the rain of plant and animal remains falling into the deep sea not only provides metals to nodules but also determines nodule growth rates and composition. *Science*, 1984, 223(4436): 576-577.
- [3] Boltenkov BS. Mechanisms of formation of deep-sea ferromanganese nodules: mathematical modeling and experimental results. *Geochemistry International*, 2012, 50(2): 125-132.
- [4] Ehrlich HL. Bacteriology of manganese nodules: I. Bacterial action on manganese in nodule enrichments. *Applied Microbiology*, 1963, 11(1): 15-19.
- [5] Xiao XQ, Guo SQ. Electron microscopic investigation on manganese minerals in the multi-metallic nodules from the Middle Pacific Ocean. *Acta Geologica Sinica*, 1992, 66(3): 219-226. (in Chinese)
萧绪琦, 郭世勤. 太平洋中部多金属结核中锰矿物的电镜研究. *地质学报*, 1992, 66(3): 219-226.
- [6] Yan BR, Zhang S, Hu DC. Genetic relation between microbial activity and the formation of polymetallic concretions in the Central Pacific Ocean. *Acta Geologica Sinica*, 1992, 66(2): 122-134. (in Chinese)
阎葆瑞, 张胜, 胡大春. 太平洋中部微生物与多金属结核的生成关系. *地质学报*, 1992, 66(2): 122-134.
- [7] Zhang FS, Bian LZ, Lin CY, Zhou LF, Du DA, Chen JL, Shen HT, Han XQ. Discovery of the spiral ultra-microfossils in pelagic manganese nodules and their significance. *Geological Journal of Universities*, 1995, 1(1): 109-116. (in Chinese)
张富生, 边立曾, 林承毅, 周旅复, 杜德安, 陈建林, 沈华悌, 韩喜球. 深海锰结核中螺旋状超微生物化石的发现及其意义. *高校地质学报*, 1995, 1(1): 109-116.
- [8] Lin CY, Bian LZ, Zhang FS, Zhou LF, Chen JL, Shen HT. Classification of the microbes and study of the beaded ultra-microfossils in pelagic manganese nodules. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41(16): 1364-1368.
林承毅, 边立曾, 张富生, 周旅复, 陈建林, 沈华悌. 深海锰结核中微生物的分类及串珠状超微生物化石的研究. *科学通报*, 1996, 41(9): 821-824.
- [9] Han XQ, Shen HT, Chen JL, Qian JC, Zhang FS, Lin CY, Bian

- LZ. Biogenesis and binary mineralization of organism and chemism of polymetallic nodules from Pacific Ocean. *Science in China (Series D)*, 1997, 40(6): 656–661.
- 韩喜球, 沈华悌, 陈建林, 钱江初, 张富生, 林承毅, 边立曾. 太平洋多金属结核的生物成因与生物-化学二元成矿机制初探. *中国科学(D辑)*, 1997, 27(4): 349–353.
- [10] Shi JX, Chen ZY, Yang JF, Hu XG. A study on bacterial abundance and its mineralization in iron-manganese nodule area of the Eastern Pacific Ocean. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1998, 29(5): 458–466. (in Chinese)
- 史君贤, 陈忠元, 杨季芳, 胡锡钢. 东太平洋铁锰结核区微生物的丰度及其成矿作用研究. *海洋与湖沼*, 1998, 29(5): 458–466.
- [11] Chen JL, Zhang FS, Lin CY, Shi JX, Shen HT, Wang JQ, Ma WL. Biogenesis study of manganese nodules from the Chinese Pioneer Area in the Pacific Ocean. *Acta Geologica Sinica*, 2001, 75(2): 228–233. (in Chinese)
- 陈建林, 张富生, 林承毅, 史君贤, 沈华悌, 王基庆, 马维林. 太平洋中国开辟区锰结核生物成因研究. *地质学报*, 2001, 75(2): 228–233.
- [12] Wang XH, Müller WEG. Marine biominerals: perspectives and challenges for polymetallic nodules and crusts. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(6): 375–383.
- [13] Wang XH, Schloßmacher U, Wiens M, Schröder HC, Müller WE. Biogenic origin of polymetallic nodules from the Clarion-Clipperton Zone in the Eastern Pacific Ocean: electron microscopic and EDX evidence. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(1): 99–108.
- [14] Wang XH, Schloßmacher U, Natalio F, Schröder HC, Wolf SE, Tremel W, Müller WEG. Evidence for biogenic processes during formation of ferromanganese crusts from the Pacific Ocean: implications of biologically induced mineralization. *Micron*, 2009, 40(5/6): 526–535.
- [15] Blöthe M, Wegorzewski A, Müller C, Simon F, Kuhn T, Schippers A. Manganese-cycling microbial communities inside deep-sea manganese nodules. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(13): 7692–7700.
- [16] Wang CS, Liao L, Xu HX, Xu XW, Wu M, Zhu LZ. Bacterial diversity in the sediment from polymetallic nodule fields of the Clarion-Clipperton Fracture Zone. *Journal of Microbiology*, 2010, 48(5): 573–585.
- [17] Xu MX, Wang FP, Meng J, Xiao X. Construction and preliminary analysis of a metagenomic library from a deep-sea sediment of east Pacific Nodule Province. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(3): 233–241.
- [18] Ye GB, Wang FP, Xiao X. Study of the microbial community structure of manganese nodule samples from China polymetal nodule province in the Eastern Pacific Ocean. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2010, 29(2): 218–227. (in Chinese)
- 叶光斌, 王风平, 肖湘. 东太平洋中国多金属结核区锰结核样品中微生物群落结构的研究. *台湾海峡*, 2010, 29(2): 218–227.
- [19] Xu MX, Wang P, Wang FP, Xiao X. Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific Nodule Province. *Biodiversity & Conservation*, 2005, 14(14): 3363–3380.
- [20] Wu YH, Liao L, Wang CS, Ma WL, Meng FX, Wu M, Xu XW. A comparison of microbial communities in deep-sea polymetallic nodules and the surrounding sediments in the Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2013, 79: 40–49.
- [21] Wang L, Liu Y, Wang YN, Dai XF, Zhang XH. *Celeribacter manganoxidans* sp. nov., a manganese-oxidizing bacterium isolated from deep-sea sediment of a polymetallic nodule province. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(11): 4180–4185.
- [22] Wu YH, Wu M, Wang CS, Wang XG, Yang JY, Oren A, Xu XW. *Microbacterium profundum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of polymetallic nodule environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(12): 2930–2934.
- [23] Lian MZ, Lin S, Zeng RY. Chitinase gene diversity at a deep sea station of the east Pacific nodule province. *Extremophiles*, 2007, 11(3): 463–467.
- [24] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2739.
- [25] Mori K, Suzuki KI, Urabe T, Sugihara M, Tanaka K, Hamada M, Hanada S. *Thiopropfundum hispidum* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of *Thioalkalispiraceae* fam. nov. in the order

- Chromatiales. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(10): 2412–2418.
- [26] Grimaud R, Ghiglione JF, Cagnon C, Lauga B, Vaysse PJ, Rodriguez-Blanco A, Mangenot S, Cruveiller S, Barbe V, Duran R, Wu LF, Talla E, Bonin P, Michotey V. Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(13): 3539–3540.
- [27] Norton JM, Klotz MG, Stein LY, Arp DJ, Bottomley PJ, Chain PS, Hauser LJ, Land ML, Larimer FW, Shin MW, Starkenburg SR. Complete genome sequence of *Nitrosospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(11): 3559–3572.
- [28] Jørgensen NO, Brandt KK, Nybroe O, Hansen M. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(9): 2195–2199.
- [29] Losey NA, Stevenson BS, Busse HJ, Damsté JS, Rijkstra WIC, Rudd S, Lawson PA. *Thermoanaerobaculum aquaticum* gen. nov., sp. nov., the first cultivated member of Acidobacteria subdivision 23, isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(11): 4149–4157.
- [30] Itoh T, Yamanoi K, Kudo T, Ohkuma M, Takashina T. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(6): 1281–1285.
- [31] Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DB, Martiny JB, Sogin M, Boetius A, Ramette A. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24570.
- [32] Hyun JH. Resource-limited heterotrophic prokaryote production and its potential environmental impact associated with Mn nodule exploitation in the northeast equatorial pacific. *Microbial Ecology*, 2006, 52(2): 244–252.
- [33] Fuhrman JA. Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 2009, 459(7244): 193–199.
- [34] Yang WH, Zhang Z, Zhang ZM, Chen H, Liu J, Ali M, Liu F, Li L. Population structure of manganese-oxidizing bacteria in stratified soils and properties of manganese oxide aggregates under manganese-complex medium enrichment. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73778.
- [35] Sujith PP, Mourya BS, Krishnamurthi S, Meena RM, Loka Bharathi PA. Mobilization of manganese by basalt associated Mn (II)-oxidizing bacteria from the Indian Ridge System. *Chemosphere*, 2014, 95: 486–495.
- [36] Butterfield CN, Soldatova AV, Lee SW, Spiro TG, Tebo BM. Mn (II, III) oxidation and MnO₂ mineralization by an expressed bacterial multicopper oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(29): 11731–11735.

Bacterial diversity in deep-sea sediments from two stations in the east Pacific polymetallic nodule province

Xiaohuan Jing, Xing Wang, Shangling Xiong, Sidong Zhu, Yong Chen, Jifang Yang^{*}, Jigang Chen^{*}

Faculty of Biological & Environmental Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] The objective of this study was to assess bacterial diversity in sediment samples from two stations (WBC1305 and WBC1316A) in the Pacific polymetallic nodule province. [Methods] The environmental total DNAs were extracted, and 6 bacterial 16S rRNA gene libraries were generated from 6 sediment layers. The Shannon diversity index and Simpson dominance index were calculated for each bacterial community and then compared. The bacterial community structure of each sediment sample was analyzed, and the results were used to construct phylogenetic trees. [Results] In total, 533 bacterial clones were obtained from 6 bacterial clone libraries. Among these 533 clones, 472 clones could be assigned to 16 phylogenetic groups (Acidobacteria, Actinobacteria, *Alpha*, *Beta*, *Delta*, *gamma*-Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Elusimicrobia, Hydrogenedentes, Chlorobi, and Nitrospinae), whereas the remaining 61 clones could not be classified into any known groups. [Conclusion] The bacterial communities in sediments from WBC1305 are dominated mainly by *gamma*-Proteobacteria and from WBC1316A by Firmicutes. In addition, the bacterial community structure at WBC1316A is more abundant and complex than that at WBC1305.

Keywords: polymetallic nodule province, deep-sea sediments, bacterial diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the COMRA program (DY125-15-R-03), by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY12C01003) and by the Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Modern Microbiology and Application (CX2014008)

^{*}Corresponding author. Jifang Yang, Tel: +86-574-88223016, E-mail: jfkwq@163.com; Jigang Chen, Tel: +86-574-88223093, E-mail: genomic@163.com

Received: 1 December 2015; Revised: 19 January 2016; Published online: 11 March 2016