# 西菲律宾海比科尔陆架深海沉积物古菌多样性研究

格根塔娜1, 萨仁高娃2, 于心科2, 李铁刚2, 周伟光1

(1.内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2.中国科学院 海洋研究所, 海洋地 质与环境重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:通过构建16S rRNA 基因文库,对西太平洋西菲律宾海东板比科尔陆架5个不同层位沉积物样品中的古菌的多样性进行了研究,并获得了465个有效克隆63个 OTUs (Operational Taxonomic Units)。 通过16S rRNA 序列与 GenBank 已知序列的同源性比较及构建系统进化树的结果显示,古菌序列分别 来自泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota),以 Marine Benthic Group B(MBGB)、Marine Group I(MGI)、Miscellaneous Crenarchaeotic Group(MCG)和 Marine Benthic Group D(MBGD)为主。少量序列 为 Marine Hydrothermal Vent Group(MHVG)。研究结果表明,该垂直分布的5个不同层位的沉积物样品 仅有5个古菌类群,古菌群落多样性并不高,且5个层位中的优势古菌类群稍有差异。研究结果揭示 了比科尔陆架深海古菌垂向分布特征、为今后大范围自然海区古菌生态学研究提供科学参考。

关键词: 西太平洋; 沉积物; 古菌; 多样性 中图分类号: Q16 文献标识码: A

海洋约占地球表面积的 70%左右,而深海沉积 物覆盖了地球表层的 50%以上,由于巨大的广度和 深度,海底沉积物和上部洋壳是地球上最大的生态 系统之一。海洋生态环境独特,具有高盐、高压、低 温、营养贫乏和光照强度变化大等特点<sup>[1]</sup>,因此在这 种复杂的独特的海洋环境下生存的大量微生物为适 应环境,在物种类型、代谢类型、功能基因组成和生 态功能上具有多样性。

深海微生物主要包括古菌和细菌这两类原核生物, 占了全球生物圈原核生物总数的 70%<sup>[2]</sup>,同时占有 1/10~1/3 的地球总生物量<sup>[3]</sup>。其中,古菌(Archaea)又分 为泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota)两个 界<sup>[4]</sup>,前者包括极端嗜热菌、产甲烷菌、嗜盐菌;后 者有极端嗜热型古菌、硫酸盐还原型古菌等。古菌 在地球上分布广泛,不仅仅只存在于一些高温、高盐 等极端环境,还在包括湖泊、开放大洋、热泉以及沉 积物,温和的海洋水域中,极地海洋水域中<sup>[5-8]</sup>,发 现古菌都广泛地存在。但 Britschgi<sup>[9]</sup>在 1991 年, Delong<sup>[5-6]</sup>在 1992 年、1994 年的研究均表明,古菌的 绝大多数种难以纯化培养,即使能培养的也往往是 非典型的种属。传统的微生物学方法由于需要纯化 培养,就无法对古菌进行定性分析。目前所报道分离 成功的古菌几乎都是在极端环境条件下生存的古

4

文章编号: 1000-3096(2011)11-0004-07

菌<sup>[10-13]</sup>。近几年来,随着分子生物学的发展,分子生物学方法在分类上的应用日益广泛,特别是 PCR 扩增和 16S rRNA 基因序列同源性比较的应用。利用分子生物学方法研究深海微生物,发现在深海环境中微生物的种类数目要比传统的分离培养方法分离到的种类要广泛得多。通过 16S rRNA 基因核酸序列分析和系统进化分析研究微生物的多样性和分布情况能够比较全面地反映环境中微生物群落的结构,已广泛应用于土壤、海洋、湖泊等多种生态系统中,已取得良好成效<sup>[14-15]</sup>。因此通过比较古菌 16S rRNA 序列的最大相似性,揭示它们之间及与真核生物之间的进化关系,为古菌的形态、生理生化特性、生态作用的研究奠定基础。

本文利用 16S rRNA 技术对西太平洋西菲律宾 海比科尔陆架深海沉积物中古菌多样性作了系统发 育分析,研究了深海沉积物中古菌的种群结构及其 相互间的进化关系,此项工作的完成为开展深海生

海洋科学 / 2011 年 / 第 35 卷 / 第 11 期

收稿日期: 2010-02-01; 修回日期: 2011-07-21

基金项目:中国科学院知识创新工程领域前沿项目(MGE2008KG06); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-JC201, KZCX2-YW-211-03)

作者简介:格根塔娜(1982-),女,蒙古族,内蒙古呼伦贝尔人,硕士研究生,海洋地质微生物研究,电话: 0532-82898835, E-mail: x.tn2008@163.com;于心科,通信作者,电话: 0532-82896726, E-mail: geomicrobiology@126.com

物圈在物质循环中作用的研究提供了前提。

### 1 材料与方法

#### 1.1 沉积物样品的采集

比科尔陆架(Bicol shelf)样品来自西太平洋西菲律 宾海东板 MD06-3052 岩心(14°48.60′N, 123°29.40′E), 水深 703 m。该岩心是由法国极地研究所 Marion Dufresne 号科学考察船于 2006 年 6 月 12 日借助中 法合作航次 Marco Polo 2, 利用国际上独一无二的 calypso 重力活塞取心器采集。工作人员在船上立即 对沉积物进行分样并冷冻于-20℃,回到实验室后保 存于-80℃。

#### 1.2 主要试剂

土壤 DNA 快速提取试剂盒(FastDNA Spin Kit for Soil, QBIOgene, USA)、华舜胶回收试剂盒、 pMD-19T Vector (TaKaRa)、*Escherichia colibacillus* TOP10 感受态细胞、凝胶成像仪(BIO-RAD)、限制 性内切酶 Hha I 和 Msp I (TaKaRa)、核酸提取仪 Fast PrepTM FP120(Thermo Electron Corp, USA)、 DYY-6C 型电泳仪、TP-600 型 PCR 仪 (TaKaRa)。

#### 1.3 沉积物样品中总 DNA 的提取

从西太平洋菲律宾海东板比科尔陆架 MD06-3052 站位的沉积物柱状样选取 5 个不同层位样品。样品 H, V, Z, J, R 分别对应于 0.05, 1, 3, 5, 6 m 深度的沉积 物样品。沉积物样品基因组 DNA 的提取均采用土壤 DNA 快速提取试剂盒及 Fast PrepTM FP120 核酸提 取仪进行提取。各沉积物样品均取 0.4 g 泥样按照试 剂盒的操作步骤提取 DNA。提取的基因组 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。将得到的 DNA 溶液 分装到多个离心管中,短期使用的于4 ℃保存,长期 储存的于 - 80 ℃放置。

#### 1.4 PCR 扩增

用提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 古菌 16S rRNA 基因的扩增引物为 Arch 21F (TTCCGGTTGATCC-YGCCGGA)和 Arch 958R (YCCGCGTTGAM TCCA-ATT)。PCR 反应体系(终体积 12.5 µL)为 10×Taq buffer with KCl 1.25µL, 1.5µmol/L MgCl<sub>2</sub> 1µL, 100 µmol/L dNTP 1µL, 每个引物浓度为 1 µmol/L 1µL, BSA 1µL, Taq 酶 0.2 µL 以及梯度浓度的模板。PCR 条件为 94℃ 变性 1 min, 55℃复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。扩增产 物通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。选取最适条带的模板浓度进行平行样扩增。

#### 1.5 基因文库的构建

采用上海华舜生物技术公司的胶回收试剂盒回 收纯化沉积物样品中扩增出来的所有古菌 16S rRNA, 根据 TaKaRa 公司生产的 pMD19–T 载体手册上的方 案将回收到的 PCR 产物连接到 pMD19–T 载体上,经 转化后涂在 LB 板上培养并初筛出阳性克隆。用水煮 法快速提取细胞中的基因组 DNA,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 pMD19-T 载体引物 RV-M (5'-GAGCGGATAAC-AATTTCACACAGG-3')和 M13-D (5'-AGGGTTTTC-CCAGTCACGACG-3')。 PCR 条件为 94 ℃变性 45 s, 58 ℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min 20 s, 共 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。

#### 1.6 RFLP 分析

将上述片断大小正确的 PCR 产物分别用 Msp I 和 Hha I (MBI, USA)两种限制性内切酶进行酶切。酶 切反应于 37℃过夜。酶切产物用 3%的琼脂糖凝胶 (Akeaibao, Spain)在 0.5×TBE 缓冲液中进行电泳。分 析产物酶切后的图谱, 计算每种酶切 RFLP 带型的出 现频率, 将不同 RFLP 带型的克隆子进行测序。

#### 1.7 古菌 16S rRNA 序列分析

将测序成功的所有基因序列分别与 NCBI Gen-Bank 数据库中 nucleotide blast 程序(http://www.ncbi. nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)进行比对,搜索与数据库 中最相似的核苷酸序列。根据搜索结果并参照有关 文献选取参照序列。将古菌 16S rRNA 序列中,序列 同源性不小于 97%时,定义为一种 OTUs(Operation Taxonomic Units),并从 NCBI GenBank 数据库中比 对的最相似序列用 Clustal X(version 1.8)软件对齐, 截齐后的序列通过邻接法和最大简约法,运用 DNASTAR 和 MEGA4 程序构建系统进化树,并递交 GenBank,获取序列登录号。本研究所得到的 GenBank 序列号为: GQ994250~GQ994363。

#### 2 结果

### 2.1 古菌 16S rRNA 多样性指数及稀释曲线 分析

本文从 MD06-3052 站位的 5 个文库得到具有正 确插入片段的克隆共 465 个(去掉杂合子后), 每个层

位的样品 91~96 个克隆不等(表 1)。对具有不同谱型 的 114 个克隆进行测序。测序成功的基因序列与 NCBI GenBank 数据库中 nucleotide blast 程序进行比对,搜 索与数据库中最相似的核苷酸序列。根据这些古菌 的 16S rRNA 序列之间的相似性比较,通过 Dotur 软 件在氨基酸 97%相似度水平上归类后共得到 63 个 OTUs。

从表1可看出,所构建的5个古菌16S rRNA 克隆 文库包含了78.01%~95.60%的古菌多样性。其中深层 (样品 J)的覆盖率最高,达 95.60%;上层(样品 V)的覆 盖率最低,为78.01%。由所获得的不同16S rRNA 基 因型数目可知,在整个柱状样中,MD3052V 层深海 沉积物中微生物的多样性相对较高,深层中相对较 低。小尺度上呈现出随深度增加而多样性减少的趋 势。

通过计算多样性指数 Shannon-Wiene index  $(H_{\text{shannon}})^{[16]}$ 、辛普森指数 Simpson index  $(H_{\text{simpson}}$ 或 1/D)和均匀度(*E*)来评估文库所代表的环境微生物群 落多样性。上述指数的计算公式依次为:

$$H_{\text{shannon}} = -\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{S_i}{N} \ln \frac{S_i}{N}$$
,  $H_{\text{simpson}} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} S_i(S_i - 1)}{N(N - 1)}$ ,  
 $E = \frac{H_{\text{shannon}}}{\ln S_{\text{obs}}}$ ,  $N$  是单个文库中序列总数,  $S_i$ 是 OTU<sub>i</sub>  
包含的序列数,  $S_{\text{obs}}$ 是单个文库中 OTU 的个数。从表  
1 我们可看出,深层沉积物中上述三项指数相对较低,  
在表层 MD3052V(1 m)中该三项指数相对较高,也说  
明了深层环境中多样性相对较低,优势菌突出。

表1 深海沉积物古菌 16S rRNA 克隆文库分析

Tab. 1	Analyses of	16S rRNA	clone	libraries	of the	archaea	in	deep	sea	sediments
--------	-------------	----------	-------	-----------	--------	---------	----	------	-----	-----------

文库	克隆数 (个)	OTUs (个)	RFLP 带型数 (个)	覆盖率 (%)	Н	1/D	Ε
MD3052H	93	28	41	79.57	2.59	8.73	0.880
MD3052V	91	36	50	78.01	2.97	12.8	0.991
MD3050Z	94	24	31	86.17	2.31	6.32	0.901
MD3052J	91	9	13	95.60	1.11	2.09	0.801
MD3052R	96	13	16	91.67	1.04	1.67	0.500

注: \*覆盖率的计算方法: (1 - n/N) × 100, n 是只出现一次的 OTUs 数, N 是总克隆数

另外从古菌 16S rRNA 基因克隆文库的稀释曲 线(图 1)可以看出, MD3052V(1 m)的斜率较高, MD3052J 的斜率较低, 趋于平缓, 这一结果进一步 证明了该环境中深层的优势菌突出, 接近饱和这一 结果。



图 1 古菌 16S rRNA 基因文库稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of 16S rRNA clone libraries of the archaea

#### 2.2 古菌 16S rRNA 系统进化分析

据表 2 显示, 古菌 16S rRNA 基因序列主要来 自泉古菌, 占 92.9%。泉古菌又分为 4 个类群, 主要 为 Marine Benthic Group B (MBGB) (58.7%), Miscellaneous Crenarchaeothic Group (MCG) (20%), Marine Group I (MGI) (13.5%)和仅少量的 Marine Hyolrothermal Vent Group (MHVG) (0.65%); 且 MBGB 随着沉积物的深入而增多的趋势。广古菌则以 Marine Benthic Group D (MBGD) (7.1%)为主。

根据已测定的古菌 16S rRNA 序列之间的同源 性比较构建系统发育树(图 2),反映古菌彼此间的系 统进化关系。系统进化分析表明该沉积物古菌群落 的多样性较低。在 5 个不同层位样品所构建的文库 中共有 12 个 OTUs(代表 273 个克隆)属于 MBGB。 无论是从数量还是多样性上看, MBGB 均广泛分布 于 MD3052 站位深层沉积物的各个层位。MCG 在 V(1m)层中占主要优势, MGI则在表层中占优势。

MBGB 也称为 DSAG (Deep-Sea Archaeal Group), 最初发现于深海沉积物和热液口<sup>[17-18]</sup>。事实上该类 群广泛分布于多种深海环境,如大西洋深海沉积 物、海底泥火山、黑海碳酸盐壳、贫有机物的深海 海盆以及大陆边缘有机物丰富含甲烷或甲烷水合 物的沉积物, 是秘鲁边缘 1230 站位甲烷-硫酸盐转 换带中古菌的优势类群<sup>[3,18-22]</sup>。从本文构建的系统 进化树中可以看出, 同属于 MBGB 的古菌同源性序 列主要来源于 4 种环境, 即太平洋深海、鄂霍次克 海、加利福尼亚州圣巴巴拉盆地大陆边缘沉积物和 冷泉环境。

表 2 沉积物古菌 16S rRNA 基因文库克隆系统发育归属关系 Tab. 2 Analyses of the archaeal 16S rRNA gene clone libraries from sediments of the West Pacific Ocean

	米理		类群数量(个)						
示机及自	大叶	MD3052H	MD3052V	MD3052Z	MD3052J	MD3052R			
泉古菌	MBGB	29	23	47	84	90			
	MCG	11	42	32	5	3			
	MGI	49	7	3	1	3			
	MHVG	0	0	2	1	0			
广古菌	MBGD	4	19	10	0	0			
总计	-	93	91	94	91	96			

MCG 广泛存在于多种陆地和海洋环境,在海水和沉积物中均有大量分布<sup>[17,20,23-25]</sup>。本文中其同源性序列来源于太平洋深海、加利福尼亚州圣巴巴拉盆地大陆边缘。

MGI 发现于海水中<sup>[5]</sup>, 是海水中古菌的主要类 群<sup>[4,6-7]</sup>。本文中其同源性序列主要来源于韩国的海绵 共生的古菌, Nankai 海槽、地中海、鄂霍次克海、冷 泉环境中的古菌。

MBGD 最初发现于大西洋陆坡和新英格兰离岸 深海平原<sup>[18]</sup>。本文中其同源性序列来源环境同 MBGB 相同,主要来自太平洋深海、鄂霍次克海、 加利福尼亚州圣巴巴拉盆地大陆边缘沉积物和冷泉 环境。

#### 2.3 聚类分析

本文利用 PRIMER 6.0 软件创建 Principal Component Analysis(PCA)聚类图(图 3)。从图 3 可以 看出 MD3052R 和 MD3052J 聚在一起,而它们属深 层位沉积物,古菌多样性相对来说不高,优势菌群 较为突出。

#### 3 讨论

本文以 PCR 技术为基础的构建基因文库的方法 对西太平洋菲律宾东板比科尔陆架 5 个不同层位的 沉积物古菌多样性进行了研究。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。基因文库分 析方法研究生物多样性能够获得大量目的基因的序 列信息,可以详细地揭示样本中的微生物多样性直 至种的水平。得到的序列信息亦可以作为建立特异 性寡核苷酸探针的基础,为原位杂交等方法提供依 据。尽管他有其缺点(如:样品总 DNA 的提取效率偏 差;PCR 过程中产生的偏差;挑取克隆的随机性), 但到目前,这种方法广泛用于深海微生物多样性研 究,特别是通过 16S rRNA 基因文库反映微生物群落 结构的研究,这种方法也广泛用于古菌功能基因多 样性研究。以 16S rRNA 基因为研究对象的现代分子 生物学方法,把对微生物多样性的研究推进到一个 新的时代。

古菌 16S rRNA 基因文库分析表明,西太平洋菲 律宾东板比科尔陆架泥质区在 6 m 深度沉积物范围 内,古菌多样性不高,仅有 5 种古菌类群。序列来自 两大类,泉古菌和广古菌,以泉古菌为主。有报道指 出海洋中古菌主要为泉古菌门,仅有小部分广古菌 门种类<sup>[4]</sup>。本文做出的结果符合上述观点。该区泉古 菌又以 MBGB 为主。各个层位中的优势类群又稍有 不同,MCG 在 V(1 m)层位中较为优势,MGI 则在表 层 H(0.05 m)中占优势,随着沉积物的深入,MBGB 占优势地位,接近饱和,其他古菌类群则逐渐减少。 导致这一结果的原因可能是沉积物中的古菌群落结 构受海域和菌群的适应性所影响。此区沉积物古菌 的同源序列大部分来自太平洋深海、鄂霍次克海、

#### 研究报告 REPORTS

			Crenarchaeota
	100 MD3052H83 Korea marine sponges,Ar18-8(AY192638)		
	MD3052H92		
	mD3052H11 mMD3052H1.MD3052H8.MD3052H17		
	Nankai Trough cold-seep sediments.ANT20-18(AB240743)		
	mD3052/43,MD3052/44,MD3052/H15,MD3052/H5		
	Easten Mediterranean deep sea sediments,Urania-1A-O1(AY627426) MG I	1	
	Narkai Trough cold-seep sediments.ANT33-05(AB240745)		
	F M03052H10,M03052H71,M03052H73,M03052H19,M03052H91,M03052H38,M03052V53 F Ridge flank crustal fluids,FS274-7A-03(AY869691)		
	MD3052H7 MD3052Z6 MD3052H28 MD3052R56		
	<ul> <li>Barens Sea Kaakon Mosby muo voicano, HMMVPog-39(AUS/9520)</li> <li>MD3052H21</li> </ul>		
	Okhotsk Sea cold seep sediments.25H-0S-28(EU713886) MD3052 118 MD3052723		
	Okhotsk Sea cold sea sediments,25H-OS-10(EU713868)		
	MD3052264 MD3052298	1	
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments.ODP1227A17.06(AB177004)		
	M03052H5		
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1251A5.19(AB177287)     MD3052299		
	MD3052H42		
	100 Cold seep sediments.Hyd24-Arch07b(AJ578114)		
	MD3052V77 Okhotsk Sea cold sea sediments 25H-05-27 (FU713885)		
┫	<sup>31</sup> MD3052J23 MD3052J26 MD3052J94		MBGB
	100 ► Okhotsk Sea cold sea sediments,25H-0S-22(EU713880)		
	<ul> <li>Barents Sea Kaakon Mosby mud voicano,HMMVPog-37(AJ579318)</li> </ul>		
	MD3052R18 MD3052R11,MD3052H72,MD3052Z53		
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1251A1.17(AB177262) MD3052V27 MD3052H20		
	California Santa Barbara Basin continental margin sulfate-methane transition zone sediments.A050A04(FJ45	55914)	
	MD3052H66,MD3052V6,MD3052H2 V Okhotsk Sea cold sea sediments,25H-0S-25(EU713883)		
		Ĺ	
	MD3052H62,MD3052V67		
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1230A33.24(AB177120) MD3052Z2		
	millionsee		
	MD3052V95 MD3052V13 MD3052V21 MD3052V58		
l	MD3052V28,MD3052V28		
	MD3052193,MD305229,MD3052210,MD3052210,MD3052210,MD3052210,MD3052210,MD3052210		
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1251A1.8(AB177267)     Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1227A18.21(AB177014)		
	MD3052J101		
	100052H30		
	California Santa Barbara Basin continental margin sulfate-methane transition zone sediments.A050D07(FJ455     MD3052V71.MD3052V81	5927)	MCG
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1227A19.23(AB177020)	I `	
	MD3052H35		
	10 MD3052V23 10 MD3052H16,MD3052V44,MD3052H26,MD3052H43		
	III and the second	928)	
	Okhotsk Sea cold sea sediments,OHKA1.5(AB094517)		
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1251A3.21(AB177283)		
	MD3052V37 101 California Santa Barbara Basin continental margin sulfate-methane transition zone sediments,A103A03(FJ455929	9)	
	MD3052Z11 Deep marine subsurface sediments 1H5 E10(DQ301992)		
	100 MD3052V32.MD3052V78		
	Cantoma Santa Barbara Basin continental margin surface-methane transition zone sediments,AUSUU4(P.345	5920)	
	California Santa Barbara Basin continental margin sulfate-methane transition zone sediments.A050D11(FJ45)	5919)	
	Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments,ODP1251A17.13(AB177274)	I	
	Deep marine subsurface sediments.3H5_M06(DQ301971)		Euryarchaeota
- 17	MD3052V39		
	California Santa Barbara Basin continental margin sulfate-methane transition zone sediments.A050A12(	FJ455920)	
	California Santa Barbara Basin continental margin sulfate-methane transition zone sediments A103H07(F-	J455936)	
	MD3052V59 Okhotsk Sea cold sea sediments 25H-0S-31(EU713889)		
	52 MD3052V64		
	MD3052H22		
	Okhotsk Sea cold sea sediments.25H-0S-1(EU713859)     U     Okhotsk Sea cold sea sediments.25H-0S-28(EU713886)		MRCD
	MD3052H84,MD3052V68,MD3052V4		mbob
	M03052V83,M03052Z30,M03052V52		
	I III L Pacific Ocean Cascadia Margin methane hydrate-bearing sediments.ODP1251A3.9(AB177285) IIII P MD3052V15		
	Cokhotsk Sea cold sea sediments.25H-0S-2(EU713860)		
	Salt Marsh Sediments.SAT_3F2(FJ655683)		
	MD3052V22 Okhotsk Sea cold sea sediments,25H-0S-37(EU713895)		
	7 MD3052V79 7 Pacific Ocean Cascadia Marcin methane hydrate-bearing settiments ODP1244A5 5/AB (77353)		
	MD3052V9		
_	Camorna cana barbara basin constentia margin sutate-methane transion zone sediments,A125H04 (t     Thermotoga maritima,strain SL7 (AJ401017)	- 2400344)	•

图 2 比科尔陆架深海沉积物中古菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the archaeal 16S rRNA gene sequences recovered from the Bicol shelf mud wedge 置信度值大于 70%的标在相应分支的节点上(经过 100 次计算)

Bootstrap values greater than 70% (based on 100 bootstrap resamplings) were shown near the nodes

海洋科学 / 2011 年 / 第 35 卷 / 第 11 期





加利福尼亚州圣巴巴拉盆地过渡区大陆边缘、地中 海、Nankai 海槽、韩国海绵共生的古菌, 冷泉环境。 另外, 古菌群落垂向分布结构总体没有显著差异, 只在小尺度上有些不同。

根据 PCA 聚类分析结果显示 MD06-3052 站位 J(5 m)、R(6 m)层位沉积物的古菌 16S rRNA 基因序 列最为相似聚在一起(图 3)。MBGB 在这两层中占的 比例也较大,将近饱和状态,是这两层位中的优势 菌群。另外根据多样性指数及稀释曲线,也可诠释上 述结果。

本文的研究结果揭示了比科尔陆架深海古菌垂 向分布特征,为今后大范围自然海区古菌生态学研 究提供科学参考。且西太平洋海域深海沉积物古菌 多样性的研究对了解深海环境特点、开发和利用深 海微生物资源提供了重要的理论依据和基础。

#### 参考文献:

- [1] 陈秀兰,张玉忠,高培基.深海微生物研究进展[J]. 海洋科学,2004,28(1):61-66.
- [2] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: The unseen majority [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95: 6578-6583.
- [3] Parkes R J, Webster G, Cragg B A, et al. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time[J]. Nature, 2005, 436: 390-394.
- [4] Karner M B, DeLong E F, Karl D M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean[J]. Nature, 2001, 409: 507-510.

- [5] Delong E F. Archaea in coastal marine environments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5685-5689.
- [6] Delong E F, Wu K Y, Prezdin B B, et al. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton [J]. Nature, 1994, 371: 695-697.
- [7] Fuhrman J A, Ouverney C C. Marine microbial diversity studied via 16S RNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native archaea with fluorescent single cell probes[J]. Aquatic Ecology, 1998, 32: 3-15.
- [8] Pearson A, Huang Z, Ingalls A E, et al. Non-marine crenarchaeol in Nevada hot springs[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5229-5237.
- [9] Britschgi T B, Giovannoni S J. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 1707-1713.
- [10] Itoh T, Suzuki K, Sanchez P C, et al. Caldisphaera lagunensis gen. Nov. sp. Nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53: 1149-1154.
- [11] Volkl P, Huber R, Drobner E, et al. Pyrobaculum aerophilum sp. Nov., a novelnitrate-reducing hyperthermophilic archaeum [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 2918-2926.
- [12] Nakagawa S, Takai K, Horikoshi K, et al. Aeropyrum camini sp. Nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54: 329-335.
- [13] Prokofeva M I, Miroshnichenko M L, Kostrikina N A, et al. Acidilobus aceticus gen. Nov, sp. Nov., a novel anaerobic thermoacidophilic archaeon from continental hot vents in Kamchatka [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 2001-2008.
- [14] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177.
- [15] Kormas K A, Tivey M K, Von Damm K, et al. Bacterial and archaeal phylotypes associated with distinct mineralogical layers of a white smoker spire from a deep-sea hydrothermal vent site (9 degrees N, East Pacific Rise) [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(5): 909-920.

Marine Sciences / Vol. 35, No. 11 / 2011

- [16] Krebs C J. Ecologieal Methodology [M]. 2thed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, 1998.
- [17] Takai K, Horikoshi K. Diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments[J]. Genetics, 1999, 152: 1285-1297.
- [18] Vetriani C, Jannasch H W, MacGregor B J, et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(10): 4375-4384.
- [19] Sørensen K B, Lauer A, Teske A. Archaeal phylotypes in a metal-rich, low-activity deep subsurface sediment[J]. Geobiology, 2004, 2: 151-161.
- [20] Knittel K, Losekann T, Boetius A, et al. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 467–479.
- [21] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in

methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific ocean margin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 2815-2820.

- [22] Biddle J F, Lipp J S, Lever M A, et al. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 3846-3851.
- [23] Coolen M J L, Cypionka H, Sass A M, et al. Ongoing modification of Mediterranean sapropels mediated by prokaryotes[J]. Science, 2002, 296: 2407-2410.
- [24] Takai K, Moser D P, DeFlaun M, et al. Archaeal diversity in waters from deep South African Gold Mine[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 5750-5760.
- [25] Inagaki F, Suzuki M, Takai K, et al. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 7224-7235.

# The diversity of archaea in deep-sea sediments from the West Philippine Sea Bicol shelf

## Gegentana<sup>1</sup>, Sarengaowa<sup>2</sup>, LI Tie-gang<sup>2</sup>, ZHOU Wei-guang<sup>2</sup>, YU Xin-ke<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine of Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Key Laboratory of Marine Geology and Environment, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Received:** Feb., 1, 2010 **Key words:** the West Pacific Ocean; deep-sea sediments; archaea; diversity

**Abstract:** The archaeal diversity and phylogenesis of the sediments samples from the Bicol shelf of the West Philippine Sea for the West Pacific Ocean were analyzed by the 16S rRNA gene clone library method. Totally 465 cloning sequences were obtained and divided into 63 OTUs. Phylogenetic analysis showed that the archaeal sequences were from Crenarchaeota and Euryarchaeota. The majority of the archaeal phylotypes were Marine Benthic Group B (MBGB), Marine Group I (MGI), Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), and Marine Benthic Group D. A few sequences fell into Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG). The results indicated that the sediment samples of five different layers contained only five groups of archaea. Achaeal community diversity was low, and dominant archaea had some differences in each layers.

(本文编辑:刘珊珊)