深海热液喷口金属硫化物中甲烷菌的多样性研究

王淑芳^{1,2},陈 月¹,钱媛媛¹

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要:对两个来自太平洋洋脊胡安·德富卡的两个热液烟囱的金属硫化物 4136-2 和 4148-B1 进行甲烷菌 甲基辅酶 M 还原酶的编码基因 mcrA 的序列扩增,构建克隆文库并进行分子进化分析。结果表明在这 个甲烷富集的热液喷口周围含有丰富的甲烷产生菌,没有任何甲烷氧化菌存在。两个硫化物样品的甲 烷产生菌种类完全不同。在 4136-2 硫化物中的甲烷产生菌都与热液口的高温环境有关系,主要属于甲 烷球菌目的甲烷暖球菌(Methanocaldococcus),少部分属于甲烷火菌目甲烷嗜高热菌属的坎氏甲烷嗜高 热菌(Methanopyrus kandleri)。与这两个属的可分离菌株的氨基酸同源性为 89%~97%,核苷酸同源性高 达 92%~100%。4148-B1 硫化物中发现的一类疑似甲基辅酶 M 还原酶的编码序列,它们与已知的甲烷 菌 mcrA 序列核苷酸同源性为 69%~72%,氨基酸同源性仅为 43%~47%。这可能是由于 4148-B1 来自于 正在喷发的超高温热液喷口相关。由于与已发表的甲烷菌克隆子或菌株同源性较低,有可能是热液口 特有的以前未发现的甲烷菌。

关键词: 胡安·德富卡; 金属硫化物; 甲烷产生菌; mcrA 中图分类号: Q93.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)06-0031-08

20 世纪 70 年代,科学家在东太平洋深海区发现 的海底热液口及其周围生机盎然的生物群。这是生 命科学史上一次具有深远意义的重大发现,也是人 类认识自然的一大进步。研究热液口环境下的微生 物群落结构对探索生命起源具有重要的基础研究意 义。

在太平洋洋脊胡安 · 德富卡(Juan de Fuca Ridge, JDF)热液场 Endeavour 部分,甲烷浓度高达 1.8~3.4 mmol/L,二氧化碳浓度高达 11.6~18.2 mmol/L,氢气 浓度高达 50 mmol/L^[1]。远远高于 EPR、SJdF 和 Guanymas 的热液口。在东太平洋样脊一次爆发过程 中,"A"烟囱口中的氢气从 25 mmol/kg 升高到 45 mmol/kg,甲烷的浓度从 0.13 mmol/kg 升高到 0.19 mmol/kg^[2]。Gorda 热液喷发后的甲烷浓度达到背景 海水的 16 倍,浓度从 2 nmol/L 到 100 nmol/L,与其 他热液场稳定的热液口环境中的浓度相似^[3]。热液流 体一般含有 2~20 mmol/kg 的二氧化碳。另外在非常 热的流体中还检测到约为 300 mmol/kg 的二氧化 碳^[4, 5]。丰富的甲烷含量为甲烷氧化菌的生命活动提 供必要的物质能量,丰富的氢和二氧化碳为甲烷产 生菌的生命活动提供必要的物质和能量。生物可以 利用这些气体作为能源维持生长和代谢活动^[6]。

Endeavour 热液系统最重要的特点是热液流体 具有高浓度的甲烷和氨根离子^[7]。热液流体中甲烷的 碳同位素组成最高而且出现在海底系统中没有沉积 物覆盖的位置,同时这些同位素数据与高达背景值 900 倍的甲烷含量相呼应,说明 Endeavour 热液场海 底有丰富的甲烷产生菌^[8]。能够利用二氧化碳产生甲 烷的超嗜热的甲烷菌已经从东太平洋脊(EPR)13°N, 21°N^[9-11]和胡安·德富卡热液场的 Main Endeavour 附近的热液烟囱中分离得到^[12]。本文采用甲烷菌的 甲基辅酶 M 还原酶 亚单位编码基因(*mcr*A)作为分 子标记检测甲烷产生古菌和甲烷氧化古菌在胡 安·德富卡热液烟囱的金属硫化物 4148-B1 及 4136-2 中甲烷循环中发挥的作用。

基金项目: 淮海工学院引进人才基金项目(KQ09021)

Marine Sciences / Vol. 36, No. 6 / 2012

收稿日期: 2011-06-25; 修回日期: 2011-12-11

作者简介: 王淑芳(1976-), 女, 河北安国人, 讲师, 博士。从事微生物资 源研究。电话: 0518-85895427, E-mail: wangshufang2001@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基与试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a 为本实验室 保存; pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公 司(TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.); 氨苄青 霉素 (Amp)购自南京创瑞公司; PCR 引物由上海英 俊生物技术有限公司合成; DNA 回收试剂盒购自上 海生工公司的; 培养基配制参照 Maniatis 等^[13]的分 子克隆方法。

1.2 采样点特征描述及金属硫化物岩石 样品的采集

本试验所用样品是 2005 年秋季、由中国和美国 两国科学家在胡安·德富卡洋脊(Juan de Fuca Ridge 或 JDF) 热液区由 Atlantis/Alvin 科考船采集的热液烟 囱样品。采样喷口位点如图1所示。样品4148是在 Main Endeavour 热液场(MEF)采集的一个正在喷发 的烟囱体、可以清晰地观察到热液通道的内中外各 层, 以及各层矿物不同的颜色, 中心温度估计超过 350 。烟囱结构在超净工作台把烟囱体从烟囱通道 到外壁分成三层、4148-B1 是烟囱的最外层、估计温 度在 100 。硫化物样品 4136-2 采自 MEF 北面的 Clam Bed 热液场。Clam Bed 热液场是一个大的热液 弥散流活动场。这里观察到有微生物席、螃蟹和管 状蠕虫的存在,但没有发现以前这里的标志性生物 贻贝(Clam), 探测器显示此处最高温度是 29.2 。采 集的硫化物样品迅速冷却, 放入 - 20 冰箱保存直 到进行 DNA 提取。在保存过程中没有发现样品有外 观的变化。

1.3 金属硫化物样品中总 DNA 的提取

硫化物岩石样品用已灭菌的凿子和小刀从大的 样品上分离下来,用研钵研磨。DNA 的提取方法参 照 zhou 等^[14]的方法。30 mL 的离心管加入 5g 样品 和 13.5 mL DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl [pH 8.0], 100 mmol/L EDTA 钠盐[pH8.0], 100 mmol/L 磷 酸钠 [pH 8.0], 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB)和 100µL 蛋白酶 K(10 g/L)在 37 温浴 30 min。再加入 1.5 mL 20% SDS,在 65 温浴 2 h,温浴过程中每隔 15~20 min 混匀一次。温浴结束离心并收集上清,加入氯仿/ 异戊醇(24:1)进行抽提两次。收集上清,加入 2/3 体 积的异丙醇进行 DNA 沉淀,离心得到的沉淀就是 DNA 的粗提物。用 1%的琼脂糖检测提取的总 DNA 的大小。粗提物用上海生工的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒纯化。纯化后的 DNA 放入 - 80 冰箱保存。

1.4 mcrA 基因 PCR 扩增

*mcr*A 扩增参照前人的方法^[15]用通用引物 ME1 (5'-GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC-3')和 ME2 (5'-TCA TKG CRT AGT TDG GRT AGT-3')扩增环境 基因组的 *mcr* 基因。反映程序如下: 94 变性 3 min; 再接 94 40 s, 49 1 min, 72 1 min, 35 个循环; 最 后 72 延伸 10 min。扩增反应体系:DNA (约 20~50 ng/μL) 1 μL, Taq 聚合酶 Buffer(10×)5μL,dNTP(20 mmol/L) 4 μL,引物(10 pmol/uL)各 1 μL, Mg²⁺(25 mmol/L)3~5 μL, Taq 酶(1U/μL) 3μL, 补水至 50 μL。 扩增 2~3 管重复,产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 并回收。

1.5 mcrA基因的文库构建及阳性菌筛选

对 PCR 产物进行胶回收以纯化 mcrA 基因片段, 然后用 pMD18-T 克隆试剂盒(TaKaRa)按照操作说明 连接到 pMD18-T 载体并转化到 DH5 大肠杆菌感受 态细胞,从而构建 mcrA 基因的克隆文库。37 培养 12~16 h 后,用 pMD18-T 载体的通用引物 UPI (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3')和 UPII(5'-TT-GGGTAACGCCAGGGT-3')进行菌落 PCR,检测插 入片段大小。检测到插入片段在 960 bp 左右的克隆 子为阳性。随机挑选不同数目的克隆子进行测序。 测序数目根据多样性指数的计算结果进行,以文库 的库容(Coverage)^[16]达到 85%以上为标准。

1.6 mcrA 阳性克隆子测序及序列分析

引物 M13+/-的 PCR 产物用 Applied Biosystems 3730xl 测序仪进行序列核苷酸测序。核苷酸序列用 DNAMAN 6.0 蛋白翻译功能翻译成氨基酸序列。氨 基酸序列和核苷酸序列在 NCBI 上的网上数据库进 行同源序列比对,查找同源性最高的克隆子和菌株 并对所有氨基酸序列用 ClustalX 1.83 进行比对。最 终截取 78 个序列的 173 个氨基酸用 Mega 3.1(http:// www.megasoftware.net/index.html)进行分子进化树的 构建,并以 1000 次的步长和临位法进行计算。 Dotur^[17](http://www.plantpath.wisc.edu/fac/joh/dotur. html)用来做稀释曲线和 Chao1 非参数丰度度评估及 西普森指数(Simpson)和香农指数(Shanoon index)。库 容(Coverage)用 Good^[16]的计算公式进行手工计算。 最小分类操作单元(OTUs)用来定义不同的克隆子群,



4148烟囱通道结构

本文以古菌 mcrA 氨基酸大于等于 98%作为分类最小分类操作单元的标准。

2 结果

2.1 甲烷菌甲基辅酶 M 编码基因 mcrA 的 文库构建

采用 mcrA 的通用引物 ME1 和 ME2 对来源于热液

口的两个金属硫化物岩石中提取的环境总 DNA 进行 PCR 扩增,得到约 760 bp 的片段。克隆到 DH5 菌株 后,4136-2 随机挑选 34 个阳性克隆子,4148-B1 随机挑 选 27 个阳性克隆子,将获得的 61 个克隆子进行测序。

2.2 甲烷菌甲基辅酶 M 编码基因 mcrA 序列分析及多样性评估

获得的 61 个氨基酸序列在 NCBI(http://www.

图 1 Endeavour 段 Main Endeavour 热液场采样喷口和样品图 Fig. 1 Hydrothermal field vent and sample of the endeavour segment main endeavour

ncbi.nlm.nih.gov/)中进行比对, 搜索最同源的克隆子 和可培养菌株, 结果如表 1。61 个序列中的 43 个氨 基酸序列与甲烷古菌甲烷辅酶 M 的 亚基同源, 同 源性在 43%~97%之间。同时这 43 个序列的核苷酸 序列与已发表的甲烷甲基辅酶 M 的序列的同源性达 到 69%~100%。另外 18 个序列最同序列不是甲烷古 菌的 mcrA 蛋白, 说明在扩增过程中出现了比较严重 的非特异性扩增。在胡安·德富卡热液口的金属硫 化物中甲烷菌都属于广古菌中的甲烷产生菌。4136-2 文 库 中 97.06% 的 甲 烷 菌 来 自 在 甲 烷 球 菌 (*Methanococcales*), 2.94%甲烷菌来自甲烷嗜高热菌 (*Methanopyrales*)。4148-B1 与已知的克隆子及可培 养菌株氨基酸同源性只有 43%~47%,核苷酸同源性 为 69%~72%,属于未知的甲烷古菌。

表1 胡安·德富卡热液口甲烷菌 mcrA 序列 NCBI 数据库比对分析

Tab. 1 Analysis of mcrA sequences from JDF vent						
多样性类型 ^a	GenBank 中最同源序列	相似度(%)	同源菌株或克隆子			
Methanococcales						
4136-2-1(28)	F64405	97	Methanocaldococcus jannaschii			
4136-2-14(1)	X07793	89	Methanococcus voltae			
4136-2-24(2)	L77117	97	Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661			
4136-2-20(2)	L77117	97	Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661			
Methanopyrales						
4136-2-8(1)	AE010358	95	Methanopyrus kandleri AV19			
Unknown McrA						
4148-B1-3(8)	AF525515	47	Priest Pot hypereutrophic lake			
4148-B1-59(1)	NC_007681	43	Methanosphaera stadtmanae DSM 3091			

注: a. 括号内为此种多样性类型的克隆子个数

本试验采用自动分析软件 Dotur 对两个硫化物 岩石中的的甲烷古菌进行多样性评估,结果如表 2。 Shannon-Wiener 指数, Simpson's 指数以及 Chao 1^[18-19] 无偏估计,文库覆盖率等几个指数用来评估构建的 文库的多样性,以评估文库对取样位点甲烷古菌多 样性的反应程度。43 个 mcrA 序列以 98%的氨基酸 同源性分为 7 个 OUTs,两个 OTUs 来自 4148-B1,5 个 OTUs 来自 4136-2。4136-2 和 4148-B1mcrA 基因 构建的克隆文库覆盖率分别为 94.1%和 88.9%, Shannon-Wiener 指数分别为 0.68 和 0.78, Chao1 无偏 估计值为 5.33 和 2.00。这表明在胡安·德富卡热液 口甲烷菌的多样性并不丰富,试验中构建的两个文 库得到的 7 个 OTUs 完全可以代表这两个位点的甲 烷古菌的多样性分布。比较而言,4148-B1 文库的 H' 及 1/D 较 4136-2 大, 表明 4148-B1 文库的多样性较 4136-2 丰富。稀释曲线(Rarefaction curves)分析(图 2)支持以上结果。





多样性的稀释曲线

表 2 胡安・德富卡热液口甲烷菌 *mcr*A 基因克隆文库的多样性评估 Tab. 2 Measurement of *mcr*A clone library from JDF vent

样品	Ν	C.(%) ^a	OUTs	Chao1 ^d	H'^{b}	1/D ^c			
4136-2	34	94.1	5	5.33	0.68	1.43			
4148-B1	9	88.9	2	2.00	0.78	2.86			

注: a.覆盖率数值越大,表明所建克隆文库越能真实的反映该环境古菌多样性特征; b. H' Shannon-Wiener 指数,数值越大表明克 隆文库所含克隆子多样性越高; c.1/D Simpson's 指数的倒数值,数值越大表明克隆文库所含克隆子多样性越高;d.Chao1 无偏估计物种 的丰富度

2.3 甲烷菌甲基辅酶 M 编码基因 mcrA 系统进化分析

NCBI 比对结果为甲烷古菌 mcrA 的 43 个序列, 用 MAGE 3.1 构建分子进化树,如图 3 所示。4136-2 的 mcrA 序列与已分离的嗜热菌有最大同源关系,在 89%~97%。与克隆子的同源性较菌株低,在 70%~72%。4136-2 硫化物中的甲烷菌群落 97.06%来 自在甲烷球菌(Methanococcales), 2.94%来自甲烷嗜 高热菌(Methanopyrales)。4148-B1 序列没有找到氨 基酸同源性超过 47%的 mcrA 序列。核苷酸比对可以 找到同源性在 69%~72%的同源序列,说明这些克隆 子序列属于甲烷菌的甲基辅酶 M 的编码基因。多样 性类型 4136-2-8 与 Methanopyrus kandleri^[20](GenBank 序列号: AE010358)有最大同源关系,同源性为 95%。 多样性类型 4136-2-14 与 Methanococcus voltae^[21](GenBank 序列号: X07793)有最近同源关系, 同源性为 89%。与这两个序列同源关系最近的克隆 子是来源于酸性泥炭的克隆子 FinME 09^[22]



图 3 胡安·德富卡热液口甲烷菌 mcrA 基因编码的氨基酸的系统发育树

Fig. 3 Phylogentic tree of mcrA gene from JDF vent

系统发育树采用邻接法构建;粗体为本研究中获得的甲烷菌 mcrA 基因的克隆子,命名为 4136-2 和 4148-B1 分别表示克隆子来自于硫 化物样品 4136-2 和 4148-B1;分支上的数值代表经 1000 次计算后的置信度值;比例标尺代表氨基酸 5%的置换概率

The tree was constructed by Neighbor-Joining Method; the bold ones were got in this study, names 4136-2 and 4148-B1 expressing clones from sulfide rock 4136-2 and 4148-B1, respectively; the values on the branches expressing 1000 bootstrap and the scale expressing 5% exchange rate

Marine Sciences / Vol. 36, No. 6 / 2012

(GenBank 序列号: DQ099689), 同源性分别为 71%和 70%。4136-2-1 与 Methanocaldococcus jannaschii ^[23](GenBank 序列号: F64405)的同源性为 97%。 4136-2-20 和 4136-2-24 与 Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661 [23](GenBank 序列号: L77117)有最 大同源关系,同源性分别为93%和97%。与这三个序 列最同源的克隆子 novmer4^[24](GenBank 序列号: AF525516)来自富营养湖, 与三个序列的同源性在 71%~72%间。样品 4148-B1 的 mcrA 序列 4148-B1-3 与来源于富营养湖的克隆子 novmcr2^[24](GenBank 序 列号: AF525515)同源关系最近,为 47%。与之同源 关系最近的菌株是嗜热菌 Methanopyrus kandleri AV19^[25](GenBank 序列号: AM114193)氨基酸同源性 为 43%, 核苷酸同源性为 72%。另一类型克隆子 4148-B1-59 与来源于富含甲烷的水稻土壤的克隆子 RC-I^[25](GenBank 序列号: NC 009464) 及 Methanosphaera stadtmanae DSM 3091 [26](GenBank 序列号: NC 007681)的氨基酸同源性最高,都是 43%。核苷酸比对时、与 RC-I 的同源性为 69%。

3 分析与讨论

3.1 热液口金属硫化物甲烷菌类型分析

甲烷菌甲基辅酶 M 编码基因 mcrA 序列的系统 发育树分析已经表明在胡安·德富卡热液场热液口 硫化物岩石中甲烷古菌的类型比较丰富,存在不同 类型的甲烷产生菌及一类未知的甲烷菌。温度较低 的硫化物 4136-2 中的甲烷产生菌与已分离培养的甲 烷产生菌有最近的同源关系。说明胡安·德富卡热 液口与其他热液口一样,其附近环境中甲烷菌是热 液口附近比较常见的菌种。但热液通道外壁的硫化 物 4148-B1 距离喷口较近,其中的甲烷菌与已知的 菌完全不同。

甲烷产生菌是一类绝对厌氧菌, 是产生甲烷的 生物来源^[27]。甲烷球菌(*Methanococcales*)生活在中 温、嗜热或极端嗜热的环境中, 通过还原 CO₂和水生 成甲烷产生能量供其活动^[28]。胡安·德富卡热液场 周围环境含有丰富的二氧化碳和氢气, 为甲烷产生 菌的代谢和活动提供物质和能量^[6, 29-30]。本试验中克 隆子数最大的一个多样性类型 4136-2-1(占总数的 82.4%)的 97%的同源菌株 *Methanocaldococcus jannaschii*(GenBank 序列号: F64405)最初分离自太平洋 EPR 热液场的白烟囱附近的沉积物中, 发表在 《Science》杂志上。另外一类多样性类型属于甲烷 火菌(Methanopyrus)。与本试验中得到的序列最近亲 缘关系的甲烷火菌是 Methanopyrus kandleri AV19(GenBank序列号: AE010358)。它是一株超嗜热 菌,分离自加利福尼亚海湾二氧化碳和氢气丰富的 黑烟囱中,与其他产甲烷生物一样还原二氧化碳和 水生成甲烷。

3.2 金属硫化物岩石中甲烷菌类型与环境的 关系

4136-2 和 4148-B1 两个金属硫化物样品的甲烷 菌甲基辅酶 M 编码基因 mcrA 反映的甲烷菌类型反 映了胡安·德富卡热液口的甲烷菌的类型和变化。 4136-2 样品中得到的甲烷菌全部是甲烷产生古菌, 且与高温来源的甲烷球菌及甲烷火菌有最近的同源 关系。这反映了4136-2 样品采集自热液喷口附近,并 且喷口附近含有丰富的二氧化碳和氢气,这与胡 安·德富卡的文献资料报道的相同。4148-B1 样品的 克隆子虽然与已知的克隆子序列同源性不高,但也 与热液口或水稻田等甲烷丰富的环境相关。其中一 类与嗜热菌的核苷酸同源性达到 72%,氨基酸同源 性为 47%。由于序列很新,更多的研究需要继续。

致谢:本试验是在国家海洋局第三海洋研究所海洋生物 遗传资源重点实验室完成。实验期间受到实验室各位老师 的指导,在此表示感谢。

参考文献:

- Childress C, Fisher R. The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses, Oceanogr[J]. Mar Biol Annu Rev, 1992,30: 337-441.
- [2] Lilley M D, Olson E J. Methane and hydrogen in active hydrothermal systems[J]. Annu Gold Conf, 2001, 11: 3682.
- [3] Lilley M D. Real-time mapping of hydrothermal plumes on the endeavour segment of the Juan de Fuca[J]. Eos Trans Am Geophys Union, 1995,76: 420.
- [4] Lilley M D, Lupton J E, Damm K L V. Volatiles in the 9±N hydrothermal system: a comparison of 1991 and 1992 data[J]. Eos Trans Am Geophys Union, Fall Meet Suppl, 1992. 73(43): 524.
- [5] Butterfield D A, Massoth G J. Geochemistry of the North Cleft Segment vent fluids-temporal changes in chlorinity and their possible relation to recent volcanism[J]. J Geophys Res, 1994, 99: 4951-4968.

海洋科学 / 2012 年 / 第 36 卷 / 第 6 期

- [6] McCollom T M. Geochemical constraints on primary productivity in submarine hydrothermal vent plumes[J]. Deep-Sea Res I, 2000, 47: 85-101.
- [7] Lilley M D. Anomalous CH₄ and NH₄⁺ concentrations at an unsedimented mid-ocean-ridge hydrothermal system[J]. Nature, 1993, 364: 45-47.
- [8] Lilley M D. Anomalous CH₄ and NH₄⁺ concentrations at an unsedimented mid-ocean-ridge hydrothermal system[J]. Nature, 1993, 346: 45-47.
- [9] Jones W J, Paynter M J B, Gupta R. Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment[J]. Arch Microbiol, 1983,153: 91-97.
- [10] Jeanthon C. Methanococcus vulcanius sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of Methanococcus sp. DSM 4213T as Methanococcus fervens sp. nov[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 583-589.
- [11] Jeanthon C. Methanococcus infernus sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 913-919.
- [12] Summit M. Ecology, physiology, and phylogeny of subseafloor thermophiles from mid-ocean ridge environments[M]. Seattle :University of Washington, 2000.
- [13] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning:A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1982: 440-468.
- [14] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2): 316-322.
- [15] Hales B A. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 1996,62(2): 668-675.
- [16] Good I L. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40: 237-264.
- [17] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [18] Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scand J Stat, 1984, 11:

265-270.

- [19] Chao A, Lee S M. Estimationg the number of classes via sample coverage[J]. J Am Stat Assoc, 1992, 87: 210-217.
- [20] Slesarev A I. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(7): 4644-4649.
- [21] Klein A. Comparative analysis of genes encoding methyl coenzyme M reductase in methanogenic bacteria[J]. Mol Gen Genet, 1988, 213(2-3): 409-420.
- [22] Metje M, Frenzel P. Effect of temperature on anaerobic ethanol oxidation and methanogenesis in acidic peat from a northern wetland[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(12): p. 8191-8200.
- [23] Bult C J. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*[J]. Science, 1996, 273(5278): 1058-1073.
- [24] Earl J. Analysis of methanogen diversity in a hypereutrophic lake using PCR-RFLP analysis of mcr sequences[J]. Microb Ecol, 2003, 46(2): 270-278.
- [25] Erkel C. Genome of rice cluster I archaea—the key methane producers in the rice rhizosphere[J]. Science, 2006, 313(5785): 370-372.
- [26] Fricke W F. The Genome sequence of methanosphaera stadtmanae reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis[J]. J Bacteriol, 2006, 188(2): 642-658.
- [27] Singh N. Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005,55: 2531-2538.
- [28] Euzeby J P, Tindall B J. Nomenclatural type of orders: corrections necessary according to rules 15 and 21a of the bacteriological code (1990 Revision), and designation of appropriate nomenclatural types of classes and subclasses[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 725-727.
- [29] McCollom T M, Shock E L. Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems[J]. Geochim Cosmochim Acta, 1997,61(20): 4375-4391.
- [30] Delaney J R. The quantum event of oceanic crustal accretion: Impacts of diking at mid-ocean ridges[J]. Science, 1998, 281(5374): 222-230.

Studies on the biodiversity of methanogens from hydrothermal vent chimney

WANG Shu-fang^{1,2}, CHEN Yue¹, QIAN Yuan-yuan¹

(1. Huaihai Institute Technology, Oceanography Institute, Lianyungang 222005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biotechnology in Jiangsu Province, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Received: Jun., 25, 2011

Key words: juan de fuca (JDF); sulfide; methogen; mcrA

Abstract: The chimney sulfides (named 4136-2 and 4148-B1) obtained from Juan de Fuca Ridge were used as samples, aiming at *mcr*A gene amplification, clone library construction and phylogenetic tree analysis. The results showed that there were only CH_4 production microbes but no CH_4 oxidation microbes in the samples and the species in the two sulfides were different. The methanogen from 4136-2 sulfide rock were linked to a high temperature environment. These methanogen belong to *Methanocaldococcus* and *Methanopyrus kandleri*. The similarities of protein sequences between 4136-2 clones and isolated *Methanocaldococcus* and *Methanopyrus kandleri* strains were from 89% to 97%, and The similarities of mucleotide sequences between 4136-2 clones and isolated *Methanocaldococcus* and *Methanopyrus kandleri* strains were from 92% to 100%. The *mcr*A sequences from 4148-B1 sulfide rock had low identities with sequences deposited in GenBank. The similarities of mucleotide sequences identities of mucleotide sequences were form 43% to 37%. This also linked to its super high temperature environment and may suggest there were un-discovered methanogen living in the vent.

(本文编辑:梁德海)