

黄河三角洲泥质沉积区表层沉积物古菌分布特征

王 涛¹, 萨仁高娃², 李铁刚², 马学恩¹, 春 梅¹, 于心科²

(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: 通过古菌 16S rDNA 基因文库技术, 在黄河三角洲泥质沉积区 6 个站位共获得 568 个克隆, 经处理得到 73 个 OUTs(Operational Taxonomic Units), 在此基础上进行系统进化树以及统计学分析。结果显示, 在本次研究的 6 个站位的表层沉积物中, 古菌序列均来自于泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota): 其中以 Marine Crenarchaeotic Group I(MGI)为主, 仅含少量的 Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), Marine Benthic Group B(MBGB)等其他种属。研究结果表明, 6 个不同站位的沉积物中只有 5 个古菌类群, 群落分布较为均匀, 多样性不高。研究结果揭示了黄河三角洲表层沉积物中古菌横向分布特征, 并为今后在黄海区域开展古菌生态学研究提供了数据信息, 特别是在当前古菌研究主要集中在深海区域的背景下, 对相应的近海区域古菌研究具有一定的参考意义。

关键词: 黄河三角洲; 表层沉积物; 古菌; 多样性

中图分类号: Q16

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)10-0005-08

随着人类对生命起源的不断探索, 占地球面积 71% 的海洋早已成为研究的热点。作为地球生态系统最为重要的组成部分, 它自身不仅含有各种丰富的资源, 而且在地球的碳循环和氧含量中也起着不可替代的作用。海洋生态环境独特, 具有盐度高, 深层海域高压、低温、低营养和光照强度变化大等特点, 加之其他极端环境的存在, 生活在这一复杂环境中的海洋微生物为适应相应的环境条件, 在物种类型、代谢类型、功能基因组成和生态功能上就具有多样性。海洋微生物种类繁多, 据统计约 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$ 种, 迄今最多只了解了其总量的 1%, 甚至更少^[1]。

在科学研究手段的不断发展和改进过程中, 海洋生态学研究取得了很大的突破, 人们对海洋微生物的分布及多样性有了更加深刻的认识。20 世纪 90 年代海洋浮游古菌的发现与确认改写了早期认为古菌只存在于极端环境的论断, 对于古菌的认识和研究, 都被大大地拓宽了。这三大发现更是被称为新近海洋生态学发展的三大里程碑^[2-3]。

古菌(Archaea)于 1977 年被首次当作一种生命形态来看待, 当时它们只是作为细菌中一个独特的子分支(subset), 因而被称作为古细菌(Archaeobacteria)。古菌与细菌虽同属于原核生物, 但因它们之间有明确的区别, 所以两者均有独立的世系——域

(Domain)——古菌域和细菌域。但随着科学家们对古菌认识的加深, Woese 于 1990 年正式提出了古菌、细菌、真核生物的三域分界学说^[4]。古菌的自身的特性使其能够生存于海洋的极端环境以及超微型浮游生物中, 而超微型浮游生物又被广泛认为是海洋环境的重要组成部分, 因此, 古菌在地球生态环境中的地位十分重要^[5-7]。

随着现代分子生物学的不断发展, 许多创新方法与技术被广泛应用于古菌研究领域, 对古菌的系统分类、多样性等研究起到了巨大的推动作用。在研究古菌的分子生物学方法中, 16S rDNA 文库分析是最为常用方法之一: 16S rDNA 分子大小适中, 在分子生物技术易于操作, 大量已知微生物的 DNA 及 16S rDNA 序列都被测定并输入国际基因数据库, 研究结果易于参照比较; 由于 rDNA 有高度的保守性, 通过比较各类原核生物的基因序列的差异, 可以绘制各类原核生物的系统进化树, 以了解生物在

收稿日期: 2010-11-02; 修回日期: 2012-07-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-JC201)

作者简介: 王涛(1983-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 主要从事海洋地质微生物学研究, E-mail: emilwang@163.com, 电话: 13465831998; 于心科, 通信作者, 电话: 0532-82898533, E-mail: geo-microbiology@126.com

系统发育上的亲缘关系。目前, 16S rDNA 文库分析技术已经成为微生物生态研究领域最重要的研究手段^[8], 特别是对于大多数难以培养的古菌具有深刻意义。

目前国内对古菌的研究主要集中在海洋极端环境和一些能培养类群上, 而古菌分布的广泛性研究偏少, 且目前调查手段普遍采用传统方法, 调查区域过小, 具有一定的局限性。本文古菌 16S rDNA 基因文库技术, 试研究黄河三角洲的泥质沉积区表层沉积物中古菌的群落特征及其与周围环境的联系, 为今后在黄河三角洲及黄海区域开展古菌生态学研究提供了数据信息, 特别是在当前古菌研究主要集中在深海区域的背景下, 对相应的近海区域古菌研究也具有一定的参考意义。

1 材料及方法

1.1 样品来源及采集

本文的研究材料来自黄河三角洲近海岸泥质区, 6 个基因文库的采样区域沿山东半岛展开(HSZ-P: 36°57.43'N, 123°99.91'E; HSZ-Q: 38°14.70'N, 122°89.47'E; HSZ-R: 38°23.69'N, 122°19.03'E; HSZ-W: 37°63.93'N, 121°80.83'E; HSZ-S: 35°47.57'N, 120°41.95'E; HSZ-T: 36°80.10'N, 122°70.08'E), 表层沉积物是由中国科学院科学三号于 2009 年 7 月的黄、渤海公益调查活动中借助表层沉积物采样器采集。样品采集过程均在无菌条件下进行, 采集完毕后, 将样品装入无菌袋中, 保存于-20℃下, 返航后, 将样品存放于-80℃。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

本研究采用土壤 DNA 快速提取试剂盒(FastDNA Spin Kit for Soil, QBIogene, USA)及 Fast PrepTM FP120(Thermo Electron Corp, USA)核酸提取仪对 6 个不同站位的泥样沉积物进行提取。提取实验完毕后, 取适量基因组 DNA 用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 以确认是否提取成功。将得到的 DNA 溶液用不同的离心管进行分装, 以免在实验过程中被全部污染。将后续实验使用的样品保存于-20℃, 其余样品存放于-80℃。

1.2.2 PCR 技术扩增

PCR 扩增体系为 100 μmol/L dNTP、1.5 μmol/L MgCl₂、1×Taq buffer、0.1 μmol/L 引物、2~5 μL 基因组 DNA 作为 PCR 模板、32 ng/μLBSA

(Sigma)、1.5 U Taq DNA 聚合酶(MBI, USA), 反应体系终体积为 12.5 μL。为了获得目的片段, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成了两条扩增古菌 16S rDNA 部分片段的通用引物:

Arch21F (TTCCGGTTGATCCYGCCGGA) 和 Arch 958R (YCCGCGTTGAMTCCAATT)^[12]。其中, Y 和 M 为可变碱基, 其中, Y 为 C 或 T, M 为 A 或 C。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min, 变性 95℃ 30 s, 复性 55℃ 30 s, 延伸 72℃ 90 s, 30 个循环, 最后 72℃再延伸 10 min。完成后进行凝胶电泳检测, 根据电泳图选取合适梯度进行平行样扩增。

1.2.3 基因文库构建

将扩增产物经胶回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit)进行纯化, 采用 TaKaRa 公司生产的 pMD19-T 载体进行产物连接, 置于 4℃, 6~8 h, 可过夜。将连接产物转化于感受态细胞内, 用不同浓度涂在带有 Amp 抗性 LB 板上于 37℃恒温培养箱中培养 12~16 h, 初筛阳性克隆。利用水煮法快速提取细胞中的基因组 DNA^[9]。更换反应体系中的引物, 相应换为 pMD19-T 载体引物: RV-M (5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3')和 M13-D (5'-AGGGTTT-TCCCAGTCACGACG-3'), PCR 反应条件相应改为: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 45 s, 58℃复性 60 s, 72℃延伸 80 s, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。

1.2.4 基因文库的 RFLP 分析

将筛选好的阳性克隆产物用 *Msp* I 和 *Hha* I (MBI, USA)两种限制性内切酶进行双酶切。酶切反应需在 37℃下进行 12~13 h。其产物用 3%的琼脂糖凝胶(Akeabao, Spain)进行电泳, 用 ImageMaster VDS 凝胶成像系统 (Pharmacia Biotech, USA)凝胶成像后, 根据凝胶图像划分不同的 RFLP 带型, 选取相对应无重复的阳性克隆进行 DNA 测序。

1.3 系统进化及统计学分析

1.3.1 系统进化分析

将测序后的所有古菌 16S rDNA 序列按库分别提交到在线杂合子检测程序, 检测其是否为杂合子序列 (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>)。非杂合子序列在 NCBI GenBank 数据库中应用 BLASTN 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行比对, 找到最相似序列, 为构建系统进化树做准备。

1.3.2 统计学分析

基因文库中多样性覆盖率 *C*(%)的统计结果由公

式 $C(\%) = [1 - (n/N)] \times 100$ 计算得出, 其中 n 指每个 16S rDNA 文库中只包含一个克隆的 OTUs 数, 而 N 指每个基因文库的克隆总数^[10]。根据 DOTUR 结果计算各个基因文库的香农-威纳(Shannon-Wiener) (H')、辛普森(Simpson) (D)和均匀度(J')等多多样性指数^[11]。将 rarefaction 数据处理后绘制 6 个基因库的稀释度曲线和数据统计图表以得到更清晰的结果。

1.4 在 GenBank 注册 16S rDNA 序列

本研究所测 113 个 16S rDNA 序列已提交到 GenBank, 注册号为: HQ267235-HQ267347, NCBI 研究人员通过检测系统认为本次研究提交的 116 个序列中有 3 个不符合其认定, 故数量上较统计数据少 3 个。

2 结果

2.1 古菌 16S rDNA 文库分析

本次研究选择了 6 个不同站位的表层沉积物芯样来构建 16S rDNA 文库。共筛选出 568 个阳性克隆, 得到了 116 个 RFLP 带型(已除去杂合子)。经过测序处理, 用 DOTUR 软件进行 3% 的 cut off 后, OUTs 总数为 77 个。经计算, 6 个基因文库的样品覆盖率普遍

较高(介于 83%~93%之间, 表 1)。综合 6 个基因文库的比较发现, 文库 HSZ-P(Z2)统计的覆盖率较低, 而其 H' , D 及 J' 综合相比均较高(表 1), 这些信息结合稀释度曲线能有效地表明该站位的古菌多样性相对于其他 5 个站位是较高的。文库 HSZK-T(Z8)具有较高的覆盖率, H' , D , J' (表 1), 表明该站位的古菌多样性相对较低。如 6 个古菌基因文库的稀释曲线所示(图 1), 当各文库克隆数渐近于 100 时, 稀释曲线逐渐趋于平缓, 说明本研究建立的 16S rDNA 文库能够反映古菌群落的基本结构。

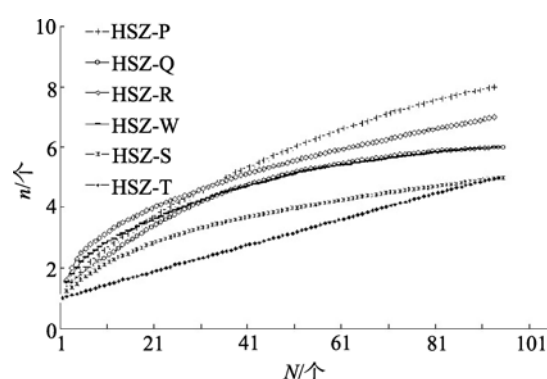


图 1 古菌 16S rDNA 克隆文库稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of archaeal 16S rDNA clones

表 1 古菌 16S rDNA 克隆文库分析

Tab. 1 Analyses of the archaeal 16S rDNA clones libraries

文库	N (个)	RFLP 带型数 (个)	n (个)	$C(\%)$	H'	D	J'
HSZ-P(Z2)	94	20	13	86	1.62	30.4	1.19
HSZ-Q(Z3)	95	18	12	90	1.48	40.0	1.18
HSZ-R(Z4)	93	13	11	89	1.41	35.6	1.18
HSZ-S(Z7)	95	15	11	91	1.27	18.0	1.08
HSZ-T(Z8)	96	29	17	93	1.01	30.0	1.07
HSZ-W(Z6)	95	21	13	89	1.27	28.2	1.12

2.2 古菌 16S rDNA 序列分析

研究中所有古菌 16S rDNA 序列均来自两个大类: 泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota), 其中 97.2% 为泉古菌(图 2)。泉古菌又分为 3 个类群: 主要为 Marine Crenarchaeotic Group I(MGI)(88.8%), 仅少量 Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) (7.3%)和 Marine Benthic Group B (MBGB)(1.1%) (图 2); 广古菌(2.8%)分为两个类群: 分别是, Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotic Group(TMEG)(2.3%)和

Marine Benthic Group D(MBGD)(0.5%)(图 2)。

综合 6 个基因文库进行比较, 我们可以发现, 随着样品采集地点(HSZ-T—HSZ-R)离海岸由近至远, 古菌种类有渐增的趋势, 相应地, 其他菌类在各基因文库所占比重也相对明显增大(图 2)。本次研究共构建了 6 个 16S rDNA 文库, 其中 60 个 OTUs(代表 505 个克隆)均属于 MGI, 可见无论在数量还是多样性上, MGI 均广泛分布于 6 个不同的 16S rDNA 文库中, 并占有绝对的比重(表 2)。MGI 最早发现于海水中^[12], 是海水中古菌的主要类群^[13-15], 也广泛分布

于沉积物中。本次研究中的 MGI 的同源序列多来自与韩国济州岛边缘海域、美国江河流域以及太平洋

浅海沉积物, 个别序列会对上深海区域, 如鄂霍次克海冷泉环境(图 3)。

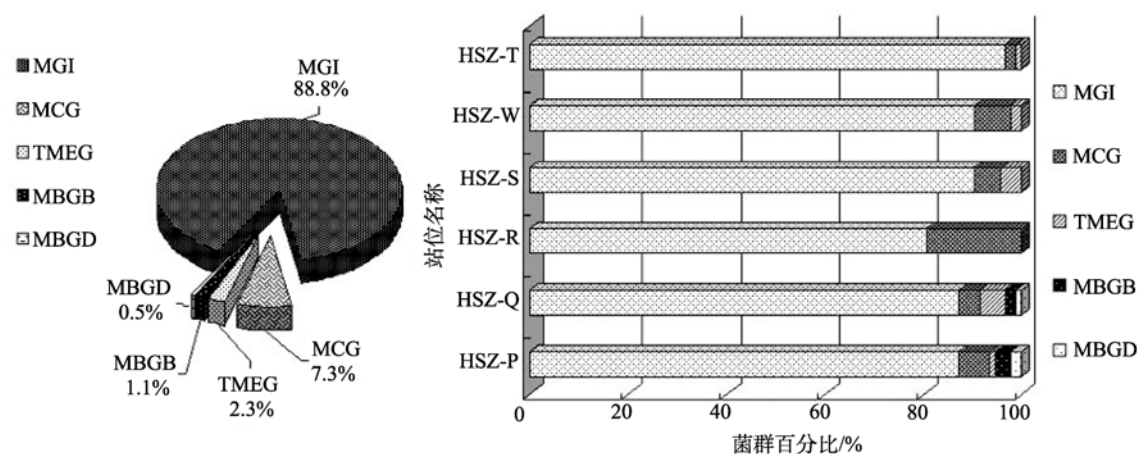


图 2 沉积物中古菌群落的多样性分析及其在各文库中的分布情况

Fig. 2 Diversity and distribution of archaeal communities in surface sediments

表 2 古菌 16S rDNA 文库克隆系统发育归属关系

Tab. 2 Phylogenetic affiliations of archaeal 16S rDNA clone libraries

系统发育类群		类群数量(个)					
		HSZ-P	HSZ-Q	HSZ-R	HSZ-S	HSZ-W	HSZ-T
广古菌	MBGD	2	1	ND	ND	ND	ND
	TMEG	1	5	ND	4	2	1
泉古菌	DSAG/MBGB	3	2	ND	ND	ND	ND
	MCG	6	4	18	5	7	2
	MGI	82	83	75	86	86	93
合 计		94	95	93	95	95	96

注: ND 表示未探测到

泉古菌中, MCG 在 6 个站位均有分布。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^[16-17,23]。MBGB 也称 Deep-Sea Archaeal Group(DSAG), 最早发现于深海沉积物和热液口环境中^[16], 是鄂霍次克海近岸黏土沉积物中的优势类群^[17]。随着研究手段不断发展, 发现该类群也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^[19-21,22]。在本研究中 MBGB 分布并不广泛, 只在 HSZ-P(Z2)和 HSZ-Q(Z3)检测到, 数量很少。

TMEG 广泛分布于陆地和淡水环境, 在海底沉积物中也有分布, 如秘鲁边缘 1231 站位^[19,23]。TMEG 在除了 HSZ-R(Z4)的其他站位均有分布, 且在基因文库中的数量也仅次于 MGI 和 MCG。其同源序列(相

似度 97%~99%)分别来自于江河流域以及鄂霍次克海, 两者的共同点是均来自于沉积物中。MBGD: 也称 MG-III (Marine Group III), 是热原体目 (Thermoplasmatales)中的一个重要进化分枝。MBGD 最初发现于大西洋陆坡和新英格兰离岸深海平原^[18,22]。该类群古菌可能仅生活于深海沉积物中, 在海水及近岸的沉积物中极少发现。本次研究中, 离海岸相对较近的站位中均没有检测到 MBGD 的存在, 且 MBGD 的分布范围较小, 其数量也为最少, 在 568 个克隆中, 仅仅检测到 3 个克隆序列属于 MBGD(表 2)。

3 讨论

本文以黄河三角洲泥质沉积区 6 个不同站位的表层沉积物中的古菌作为研究对象, 应用成熟的 16S rDNA 序列分析技术, 结合传统的统计学分析

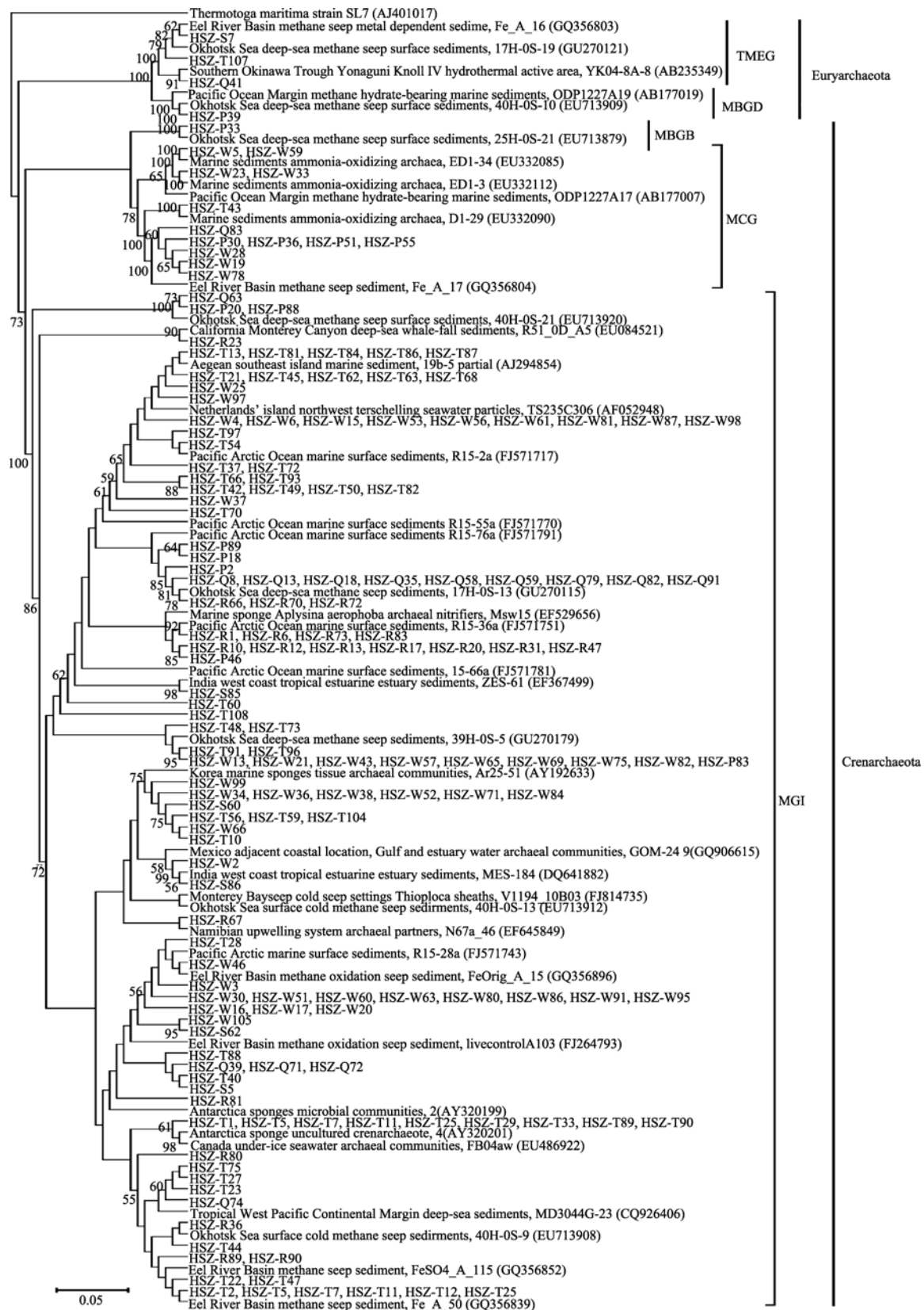


图3 黄海沉积物中古菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the archaeal 16S rRNA gene sequences recovered from the Yellow River

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 more than 70% (based on 100 bootstrap resamplings) were shown.

和系统进化分析,对获得 DNA 序列进行处理统计。由于绝大部分古菌的不可培养性,采用这些非培养技术能够较好地评估沉积样品中古菌的多样性。测序后,通过与网上序列的同源比对构建系统进化树,可以较为准确地反应样品采集区域的古菌种类及其分布情况。尽管分子生物学方法也有其缺点(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),但这些方法已经是绕过传统培养对特定区域进行目的性研究的最佳手段。

为了更加准确地研究古菌的多样性,还采用传统的统计学方法如香农威纳、辛普森等多样性指数以及绘制系统进化树进行分析,结果表明研究区域中 6 个站位的古菌多样性较低,仅检测到 5 种类群。MGI 这种常见古菌为研究区域的优势菌群,且在各个基因文库分布较为均匀,克隆数随着采样站位离海岸距离的拉大而相对减少。MCG 为该次研究的第二大古菌类群,其各个文库的分布与 MGI 基本相似,而这两类古菌是海洋中分布范围最广的类群。在本次研究中,广古菌的克隆数仅占总克隆数的 3.7%,TMEG 是其优势菌群,并在 5 个文库中有分布。究其原因,推断认为沉积物中的古菌群落结构可能受海域和菌群自身的适应性所影响。就表层而言,其具有沉积时间较晚和沉积于浅表等特点,且由于研究区域处于黄河入海口附近,沉积物的迁移沉积过程中,一些河口的古菌也随之迁移沉积,并逐渐适应新迁移的环境^[24],以致研究结果与本实验室以前的深海古菌研究有较大差异(古菌种类与深海相比较少,多样性偏低),从而间接证明了表层沉积物中微生物的群落结构异于深层沉积物。也有研究表明近海沉积物中微生物群落相当稳定,受季节变化的影响很小,这种相对稳定是因为优势群落在全年普遍存在,且比例很大^[25-26]。

通过网上比对,发现本次研究中 16S rDNA 序列与其在 GenBank 中的同源序列的相似度基本在 90% 以上(介于 93%~99%)。为进一步减小古菌归类的误差,应用 Dotur 软件处理序列后得到确切 OUT 数,发现研究区域古菌的同源序列多来自于韩国济州岛附近海域、河口流域以及太平洋海域的表层沉积物。

综合对 16S rDNA 进行分析后发现,来源于黄海近海岸表层沉积物的古菌序列主要出自于泉古菌,它的克隆数为总克隆数的 96.3%,且以 MGI 为主(占总克隆数的 88.8%)。MGI 是海水中古菌的主要类群^[14,15],也广泛分布于沉积物中。本研究古菌均来自

于沉积样品中,也间接佐证了类似观点。有研究表明,MGI 中的某些类群参与氨氧化过程,在海洋氮的生物地球化学循环中起着主要的作用^[27]。山东半岛河海入海口众多,大量泥质沉积物被冲刷入海;加之人类活动的污染,导致黄海近海海域氮富集,推测这可能也是 MGI 菌类偏多的一大因素。MCG 也是本次研究的主要古菌类群之一,广泛存在于多种陆地和海洋环境,是秘鲁边缘 1227 和 1229 站位、鄂霍次克海近岸火山灰沉积物以及 Nankai 海槽等环境中古菌的优势菌群^[17,28]。本次研究所获得的古菌种类均来自于泉古菌和广古菌,有报道指出,海洋中古菌主要为泉古菌,仅有小部分广古菌^[15]。对比以往深海古菌研究结果,本次研究中泉古菌所占比重相较广古菌更大;从古菌多样性上来说相对偏少。古菌的同源序列多来自于江河流域,以及沉积物当中;部分古菌因采样地点原因,与韩国济州岛海域古菌有很高的同源性;此外,有相当数量的同源序列是具有金属依赖性的——本次研究采样地点在山东半岛近海岸的黄海海域内,由于处于江河入海口附近,自然环境复杂,加之近海海域的金属污染,故推测这一现象可能与该海域特征有极大关联。

虽然本次研究检测到的古菌种类偏少,但还是可以认识到古菌这种生物类群的分布是及其广泛的,它并不是只能存在于极端的海洋环境中,不论是不同层位的纵向分布上,还是不同海域的横向分布上;不论是江河流域近,还是深海冷泉热液,我们都可以发现它的存在,这种古老的生命形态长期存在并参与着海洋生理生化作用,与海洋环境相互影响。

4 小结

通过对黄河三角洲泥质沉积区古菌的研究,综合应用 RFLP 技术、16S rRNA 基因文库技术以及统计学等方法进行分析,发现山东半岛的黄海近海海域的古菌类群并不丰富,本次研究只检测到包括 MGI 在内的 5 种古菌类群,与深海古菌有较高的多样性相比,存在着明显差异。6 个基因文库的对比也表明,古菌类群在研究区域的横向分布上也没有显著的差异,只是随着离海岸距离的拉大,除 MGI 外其他古菌的克隆数有所增加,但个数相对总体克隆数而言并不算多,这样的统计结果可能与环境、水深、沉积物的理化特征有关。此外,通过网上序列比对和系统发育树的构建,发现研究区域部分古菌的同源序列与甲烷厌氧氧化、金属依赖性古菌相似度

很高,这也可能反映了该区域的环境特征。这些研究结果不仅说明了黄河三角洲泥质区古菌垂向分布特征,也为今后在黄海区域开展古菌生态学及相关环境研究提供了数据信息。

参考文献:

- [1] Dunlop P V. New insights on marine bacterial diversity molecular techniques complement Culturing[J]. *Oceanus*, 1995, 389(2): 6-19.
- [2] Fuhrman J A, Davis A A. Widespread archaea and novel bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1997, 150: 275-285.
- [3] Ovreas L, Fomey L, Daae F L, et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR—amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63: 3367-3373.
- [4] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. Toward a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria and eucarya [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 4576-4579.
- [5] Kyrpides N C, Woese C R. Archaeal translation initiation revisited: The initiation factor 2 and eukaryotic initiation factor 2B a-b-d subunit families[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3726-3730.
- [6] Massana R, Murray A E, Preston C M, et al. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(1): 50-56.
- [7] Murray A E, Preston C M, Massana R, et al. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2585-2595.
- [8] Xu Meixiang, Wang fengping, Xiao Xiang. Analysis of archaeal 16S rDNA from deep-sea sediments samples[J]. *Progress in Natural Science*, 2003, 6: 598-599.
- [9] De Medici D, Croci L, Delibato E, et al. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 3456-3461.
- [10] Mullins T D, Britschgi T B, Krest R L, et al. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities[J]. *Limnol Oceanogr*, 1995, 40: 148-158.
- [11] Hill T C, Walsh K A, Harris J A, et al. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 1-11.
- [12] Delong E F. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [13] 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.
- [14] Delong E F, Wu K Y, Prezelin B B, et al. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton[J]. *Nature*, 1994, 371: 695-697.
- [15] 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.
- [16] Takai K, Horikoshi K. Diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments[J]. *Genetics*, 1999, 152: 1285-1297.
- [17] Inagaki F, Suzuki M, Takai K, et al. Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the Sea of Okhotsk[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 7224-7235.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Sørensen K B, Lauer A, Teske A. Archaeal phylotypes in a metal-rich, low-activity deep subsurface sediment of the Peru Basin, ODP Leg 201, Site 1231[J]. *Geobiology*, 2004, 2: 151-161.
- [21] 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.
- [22] Vetriani C, Jannasch H W, MacGregor B J, et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65

- (10): 4375-4384.
- [23] 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.
- [24] 张林宝, 李铁刚, 党宏月, 等. 东海内陆架泥质区沉积物古菌群落垂向分布特征[J]. 地球科学, 2010, 35(2): 257-258.
- [25] Pringault O, Duran R, Jacquet S, et al. Temporal variations of microbial activity and diversity in marine tropical sediments(New Caledonia Lagoon)[J]. Microb Eco1, 2008, 55: 247-258.
- [26] Pereira M G, Latchford J W, Mudge S M. The use of terminal restriction fragment length polymorphism (rT-RFLP) for the characterisation of microbial communities in marine sediments[J]. Geomicrobio, 2006, 23: 247-251.
- [27] Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, et al. Archaeal nitrification in the ocean[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 12317-12322.
- [28] Reed D W, Fujita Y, Delwiche M E, et al. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3759-3770.

Diversity of archaea communities in mud wedge sediments from the Yellow River Delta

WANG tao¹, Sarengaowa², LI Tie-gang², MA Xue-en¹, CHUN Mei¹, YU Xin-ke²

(1. College of Animal Science and Medicine, 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: Nov., 2, 2010

Key words: the Yellow River Delta; marine sediment; Archaea; diversity

Abstract: Archaeal 16S rDNA clone libraries were constructed from sediments of different location to elucidate the distribution and diversity of archaea in the Yellow River Delta coastal mud wedge of the Bohai Sea and the Yellow Sea. A total of 568 archaeal 16S rDNA clones were examined and a total of 73 OTUs were obtained. Phylogenetic and statistic analysis showed that the archaeal diversity in the collected samples was low. 16S rDNA sequences are within phylums of Crenarchaeota and Euryarchaeota, respectively. The majority of archaeal phylotypes were Marine Crenarchaeotic Group I(MGI), others included Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), Marine Benthic Group B (MBGB), et al. This research has provided very important information, which is very helpful to our understanding archaeal community and environment of the Yellow River Delta.

(本文编辑: 刘珊珊)