黑潮源区沉积物古菌多样性调查及研究

景天爽[1,2)]，于心科[1)]，李铁刚[1)]，萨仁高娃[1)]，杨再宝[1,2)]

1）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；

2）中国科学院研究生院，北京，100049

内容提要：为了研究西太平洋黑潮源区不同深度沉积物中古菌群落结构的多样性，应用16S rDNA文库技术，对IMAGES XIV航次采集的岩芯MD06-3047进行基因文库的构建和分析，得到260个克隆，经分析处理后得到56个OTUs(Operational Taxonomic Units)。基于16S rRNA序列的同源性比较，绘制系统进化树，进行统计学分析。研究结果显示，西太平洋黑潮源区的本哈姆高原(Benham Rise)沉积物中有丰富多样的古菌群落，在1m内的沉积物中分布着9种古菌类群。古菌序列归属于泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota)，并以泉古菌为主(占总序列的91.5%)。其中，泉古菌包含MGI、MBG-B、MCG和UCII-b 4个类群，并且主要由MGI构成(占总序列的40.8%)，而广古菌包含MBG-D、SAGMEG、DHVEG、MBG-E和VAL III 5个类群，各类群所占总序列比例均较低(占总序列的0.4%～5.4%之间)。研究结果对于理解西太平洋黑潮源区沉积物中古菌多样性有重要意义，并为今后研究古菌群落与环境之间的关系提供科学依据。

关键词：西太平洋黑潮源区；沉积物；古菌多样性；16S rDNA文库

黑潮(Kuroshio)是世界大洋中规模最大的两大西边界流之一，在其自南向北流动的过程中将低纬度大量的物质、水汽、热量和动能向东亚中高纬度输送，从而对东亚的气候产生深远影响(Hsueh et al.，1996；Hirose et al.，1999)。黑潮起源于菲律宾以东海域，流经吕宋海峡，沿台湾以东进入东海，在东海大陆坡向东北方向流动，通过日本南部的吐噶喇海峡进入日本以南海域，并最终汇入北太平洋环流(王铮等，2007；李铁刚等，2009)。黑潮源区位于菲律宾的吕宋岛以东海域，东临北赤道流、南接西太平洋暖池，处于边缘海与热带大洋的过渡区域(图1)，在此区域黑潮具有流量大、流速强、高温高盐等特征，近几年来受到诸多学者的广泛关注(Yuan Y et al.，1998；Johns et al.，2001；赵京涛等，2008)。

古菌作为海洋微生物中的一个大类群，广泛存在于各类海洋环境中，尤其在深海极端环境中更以优势种大量存在(Massana et al.，1997；徐美香等，2003)，并且古菌群落还可作为特定地质环境标志物来指示地质环境变迁和海洋地球化学特征(Inagaki F et al.，2001)。由此可见，古菌在海底深部生物圈中具有极其重要的作用。因此，在研究黑潮源区沉积物时，开展对古菌的研究尤为关键。

现代分子生物学技术迅速发展，许多的分子生物学方法和技术被广泛应用于地质学研究的领域。由于具有易于测序、易于比较分析等特点，DNA提供的信息代表着生物体之间最本质的进化关系。同时，作为生物进化史上计时器的rDNA，由于其具有高度的保守性，其序列的相似程度就可以反映生物体在系统发育上的关系(徐美香等，2003；Li S et al.，2007)。16S rDNA技术，正是建立在微生物核糖体小亚基(16S rDNA)序列分析基础上的研究方法，它可以最大可能性地揭示不同生物之间的系统进化关系。限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism，RFLP)是利用可以识别特定DNA片段(4bp～6bp)的限制性核酸内切酶消化DNA，从而获得不同长度的DNA片段，以实现DNA的多态性分析(臧红梅等，2007)。目前，16S rDNA技术和RFLP分析方法已经成为微生物生态研究领域最重要的研究手段

注：本文为中国科学院知识创新工程重要方向项目(编号 YW-JC201、KZCX2-YW-155)资助的成果。

收稿日期：2012-03-02；改回日期：2012-08-16；责任编辑：黄敏。

作者简介：景天爽，女，1986年生。硕士研究生，主要从事海洋地质微生物学研究。Email：happyday1011@163.com。通讯作者：于心科，研究员，主要从事海洋地质微生物学研究。Email：xyu@qdio.ac.cn。

(徐美香等，2003)，该方法被广泛应用于古菌的研究当中，从而解决了诸多瓶颈问题，对于研究大多数难于培养的古菌具有深刻的意义，对古菌的多样性和系统分类等问题的研究也具有巨大的推动作用。

古菌具有独特的代谢方式，并且在海洋生态系统中扮演着重要角色，研究古菌的基础是研究古菌的群落组成、环境分布等特征。本研究利用 16S rDNA 技术分析西太平洋黑潮源区沉积物中的古菌，构建这些环境样品当中古菌的 16S rDNA 文库。经过对 16S rDNA 序列和 RFLP 条带的分析及系统进化树的绘制，分析该海域中古菌的群落特征及其与环境的相互关系，丰富了黑潮源区古菌种群结构的研究记录，为进一步揭示黑潮源区古菌与环境间相互关系、探讨黑潮源区古菌群落多样性提供了基础资料。

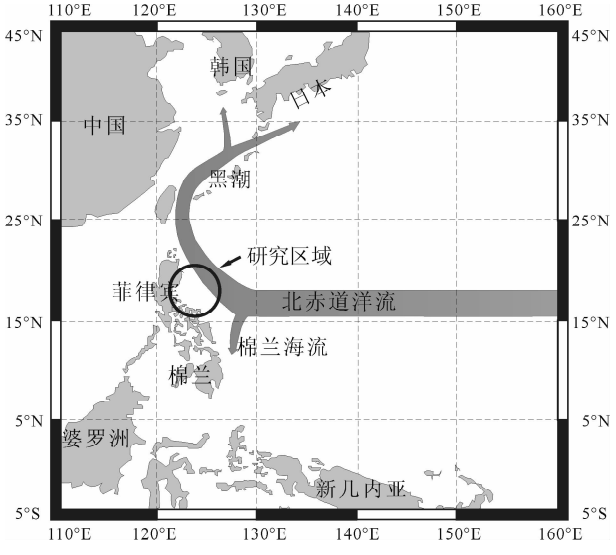

图 1 西太平洋黑潮流域及本研究区域

Fig. 1 The Kuroshio basin and the investigative region in Western Pacific

1 材料及方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集

本文研究的 MD06-3047 孔岩芯取自西太平洋本哈姆高原(Benham Rise)处，位于吕宋岛的东面，地处黑潮源区，水深 2510m，地理坐标为 17°00.4419′N、124°47.9328′E。该岩芯是由法国极地研究所的 R/V Marion Dufresne 号科学考察船用 Casq 取样器于 2006 年 6 月 17 日借助中法合作航次 Marco Polo 2 IMAGES XIV 取得。实验用样品全部取自岩芯，样品采集均按照无菌操作的要求进行，采集后置于无菌袋中保存于－20℃下，运到实验室后保存于－80℃下。

研究的沉积物样品位于此岩芯的 3 个不同深度，分别是：MD3047Y(0.1 mbsf，meters below seafloor)、MD3047(0.7 mbsf)和 MD3047X(1 mbsf)。该样品上层沉积物中总有机碳和总有机氮含量分别为 0.266%和 0.026%，它的成分主要是粉砂和粘土，分别占 56.4%和 43.6%(Dang H et al.，2008)。

1.1.2 主要仪器和试剂

凝胶成像仪(BIO-RAD)、TP-600 型 PCR 仪(TaKaRa)、DYY-6C 型电泳仪、限制性内切酶 Hha I 和 Msp I(TaKaRa)、Gel Extraction Mini Kit 胶回收试剂盒、pMD-19T Vector(TaKaRa)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品基因组 DNA 的提取

本研究采用土壤 DNA 快速提取试剂盒(QBIOgene，USA)及 Fast Prep™ FP120(Thermo Electron Corp，USA)核酸提取仪对 3 个沉积物样品中的基因组 DNA 进行提取。而后将提取所得的基因组 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，并将提取到的 DNA 溶液分装到几个离心管中，根据用途的不同对该 DNA 进行相应的处理，短期使用的－20℃保存，长期保存的则置于－80℃下。

1.2.2 PCR 产物扩增

以提取的 DNA 为模板，采用由上海生工生物工程技术服务有限公司合成的古菌 16S rDNA 通用引物

Arch21F：5’-TTC CGG TTG ATC CYG CCG CCG GA-3’；

Arch958R：5’-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3’

(Y 为 C 或 T，M 为 A 或 C)进行 PCR 扩增。

由于 Arch21F 和 Arch958R 是对古菌进行 PCR 扩增的常用通用引物，并且其完全满足对于古菌序列的测序要求，因此本实验选择以上两种通用引物作为 PCR 扩增引物。

PCR 扩增体系为 25μL，反应体系为 10×Taq buffer、100μmol/L dNTP、1.5μmol/L $MgCl_2$，引物浓度各为 0.1μmol/L 和 1.5 UTaq DNA 聚合酶(MBI，USA)。PCR 水补至 25μL，无菌去离子水作 PCR 反应的阴性对照。

PCR 反应条件为 95℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 90s，运行 35 个循环，最后在 72℃下再延

伸 10min。反应完成后 PCR 产物通过 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检验。D2000(Novagen,USA)用来做标准的分子量标记。

1.2.3　16S rDNA 文库的构建

将获得的 16S rRNA 产物经上海华舜生物技术公司的胶回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit)进行纯化回收处理。纯化后的产物根据 pMD19-T simple vector 连接试剂盒(Takara,Japan)说明书中的方案,将回收所得的 PCR 产物连接到载体上,存放在 4℃下,连接 6～8h。将连接到载体上的 DNA 片段转化到大肠杆菌感受态细胞 E. coli TOP10 中,于 37℃培养 12h 左右,经过蓝白斑筛选转化,初步筛选阳性克隆。

1.2.4　16S rDNA 文库的 RFLP 分析

用水煮法快速提取被筛选的阳性克隆的基因 DNA(De Medici et al., 2003),将 pMD19-T 载体引物:

RV-M:5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3';

M13-D:5'-AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG-3'

作为 PCR 反应引物,以检测筛选的克隆是否为所需的阳性克隆及检测插入的片断大小是否合适。

pMD19-T 载体是一种高效克隆 PCR 产物的专用载体,使用它不仅可以大大提高 PCR 产物的连接和克隆效率,而且克隆后更易进行克隆体的蓝白斑筛选。因此,本实验选择利用 pMD19-T 载体作为 PCR 的反应引物。

对于片断大小正确的 PCR 产物,分别用 Msp I 和 Hha I(MBI,USA)两种限制性内切酶对其进行酶切。酶切反应于 37℃下,进行 12h 左右。酶切产物用 3%的琼脂糖凝胶(Akeaibao,Spain)后,在 65V 电压下和 0.5×TBE 缓冲液中进行电泳。待电泳完毕,用 ImageMasterVDS 凝胶成像系统(Pharmacia Biotech,USA)对其进行成像,根据凝胶图像选择不同的 RFLP 带型进行测序。

1.3　系统进化及统计学分析

测序获得的序列,后经 Dotur 软件做 3%的基因切除,对于序列相似性大于或等于 97%的序列,则被归类到同一操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)当中(Schloss et al., 2005),并且系统进化树分析和统计学分析均在此基础上进行。

1.3.1　系统进化分析

将测序获得的所有古菌 16S rRNA 序列提交到在线杂合子检测系统(http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi)以检测其是否为杂合子序列。经过检测的非杂合子序列运用 BLAST 程序将获得的序列在 NCBI 数据库(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)中进行相似性搜索。根据搜索结果选取相似度最高并有相关参照文献的序列作为参考序列(Altschul et al., 1997),获取该序列的有关信息用于构建系统发育树。采用 Clustal X (Version 1.8)对序列进行比对分析。运用 MAGA4 软件,采用 Phylogeny 程序的 Neighbor-Joining 建树方法,构建系统进化树(图 2)。

1.3.2　统计学分析

基因文库的多样性覆盖百分率通过下式公式计算

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

式中:n_i 指每个 16S rDNA 文库中只包含 1 个克隆的 OTU 数(97%基因切除之后);N 指每个基因文库的克隆总数(Mullins et al., 1995)。百分率越高表明文库多样性覆盖率越高。

通过 Dotur 软件来完成文库序列多样性指数的分析(Hill et al., 2003)。本文所采用的多样性指标有香农威纳指数(Shannon - Wiener,H)、辛普森指数(Simpson,$1/D$)、均匀度(evenness,E),其中香农威纳指数和辛普森指数可由软件直接算得,均匀度 E 的计算公式如下:

$$E=\frac{H}{\ln S_{obs}}$$

式中:H 为香农威纳指数;S_{obs} 为单一文库中 OTU 的个数。

1.3.3　基因序列的提交

将测序得到的古菌 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中,获取古菌的核酸序列号。本研究所测 56 个 16S rDNA 序列已提交到 GenBank,注册登陆号为:JQ327875～JQ327930。

2　结果

2.1　古菌 16S rDNA 文库分析

2.1.1　古菌 16S rDNA 文库的统计学分析

本实验选取 MD3047 站位共 3 个层位的沉积物样品进行研究,通过 DNA 提取、PCR 扩增等分子生物学手段分别构建了 3 个不同深度层位的古菌 16S rRNA 基因文库,其名称从上到下依次为 MD3047Y

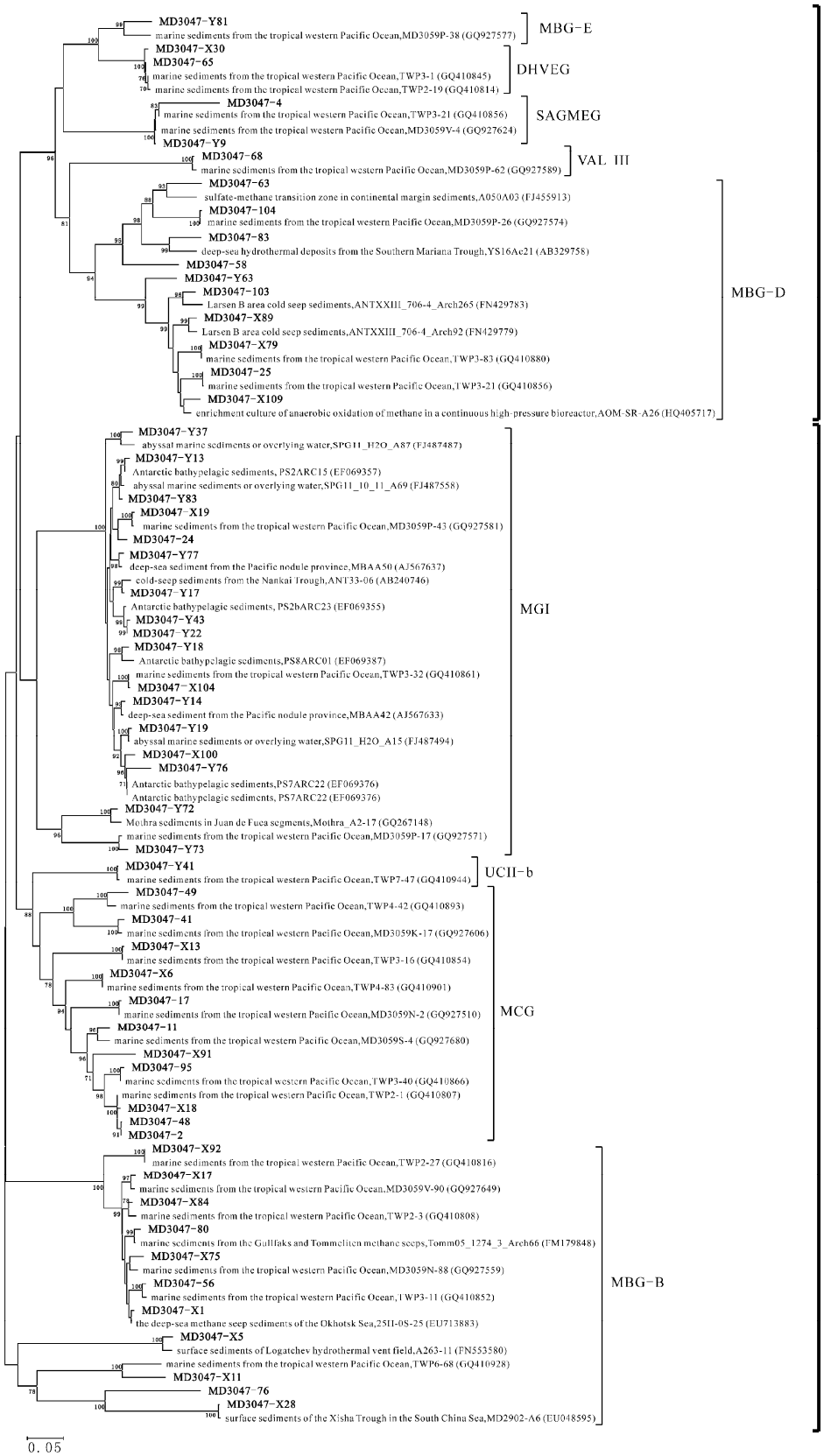

图 2 西太平洋黑潮源区古菌 16S rRNA 基因序列系统发育树，置信度值大于 70%的标在相应分支的节点上(经过 100 次计算)

Fig. 2 Phylogenetic tree of the archaeal 16S rRNA gene sequences recovered from the Source Area of Kuroshio in Western Pacific, bootstrap values greater than 70% (based on 100 bootstrap resamplings) were shown

(0. 1mbsf)、MD3047 (0. 7mbsf)、MD3047X (1mbsf)。经筛选得到 260 个有效克隆,去除杂合子后获得 97 个 RFLP 带型,测序后的序列经 Dotur 软件在核酸 97%相似度水平上归类后共得到 56 个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)。

2.1.2　覆盖率和多样性指数分析

根据克隆文库的统计学分析可知(表 1),文库 MD3047Y 和文库 MD3047X 样品的统计覆盖率都较高,因此本研究构建的古菌 16S rDNA 文库基本能够真实地反映环境中古菌群落的结构特征。文库 MD3047 统计覆盖率(74. 2%)最低,香农威纳指数(H)、辛普森指数($1/D$)和均匀度(E)都相应较高,说明 MD06-3047 站位 0. 7m 处沉积物与其他层沉积物相比具有更高的古菌多样性。文库 MD3047X 具有较高的统计覆盖率(88. 2%),香农威纳指数(H)、辛普森指数($1/D$)和均匀度(E)相应较低,表明 MD06-3047 站位 1m 处沉积物古菌多样性较低。

2.2　古菌 16S rRNA 分析

本研究的古菌多样性较高,并且 16S rDNA 文库种群均属于泉古菌(Crenarchaeota)和广古菌(Euryarchaeota)两大类(图 2)。

泉古菌包含 238 个克隆,占总序列的 91. 5%,共包含 4 个类群,按所占比例由高到低依次为:Marine Group I (MGI)共 106 个克隆,占总序列的 40. 8%;Marine Benthic Group B (MBG-B)共 88 个克隆,占总序列的 33. 8%;Marine Crenarchaeotic Group (MCG)共 42 个克隆,占总序列的 16. 2%和 UCII-b 共 2 个克隆,占总序列的 0. 8%(图 3a)。

广古菌包含 22 个克隆,占总序列的 8. 5%,共有 5 个类群,按所占比例由高到低依次为:Marine Benthic Group D (MBG-D)共 14 个克隆,占总序列的 5. 4%;South African Gold Mine Euryarchaeotic Group (SAGMEG)共 4 个克隆,占总序列的 1. 5%;Deep Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotic Group (DHVEG)共 2 个克隆,占总序列的 0. 8%;Marine Benthic Group E (MBG-E)和 VAL III 均为 1 个克隆,占总序列的 0. 4%(图 3a)。

MGI 最初发现于海水环境中(DeLong, 1992),为海水中古菌的主要类群(Fuhrman et al., 1998; Karner et al., 2001),并且在深层水中分布较为广泛(Herndl et al., 2005; DeLong et al., 2006)。最近研究表明某些 MGI 类群在氮的生物地球化学循环中起着重要作用(Wuchter et al., 2006)。MGI 是中国南海北部海底沉积物中的优势类群,在 3 个不同层位沉积物中的比例分别是 100%、83%和 78. 6%(Liao L et al., 2009)。在 1000 m 深的马里亚纳海、太平洋的 Snaat Barbaar 海峡、西太平洋暖池核心区沉积物等多种环境都有存在。如图 3(b)所示,MGI 在不同的层位中广泛存在,共有 106 个克隆,占整个文库中的 40. 8%。在表层 MD3047Y 文库中 MGI 所占比例最高,达 94. 8%;在中层 MD3047 文库中 MGI 所占比例最低,为 3. 2%。如系统发育树(图 2)所示,其同源序列主要来自于南冰洋的深海沉积物(Brandt et al., 2007)。

MBG-B 又称 Deep-Sea Archaeal Group (DSAG),最早发现于深海沉积物和热液口环境中(Takai et al., 1999),目前研究表明该类群广泛分布于多种深海环境中(Sϕrensen et al., 2006),包括深海沉积物、海底火山、海洋碳酸盐壳、缺乏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。MBG-B 是秘鲁边缘 1230 站位甲烷-硫酸盐转换带中古菌的优势类群(Inagaki et al., 2006)。在本研究中,MBG-B 在各层均有分布,并且在垂直分布上呈数量逐渐变大的趋势,所占比例由表层到深层依次为 1. 0%、25. 8%和 69. 6%。它的同源序列主要来自于鄂霍次克海的深海沉积物(Dang H et al., 2009)。

MCG 最先发现于海水环境中(DeLong, 1992),广泛存在于各种海洋及陆地环境,并且在海水和沉积物中均有大量分布(Takai et al., 1999, 2001a, 2001b; Coolen et al., 2002; Inagaki F et al., 2003; Knittel et al., 2005)。MCG 是秘鲁边缘 1227 和 1229 站位、地中海腐殖质、鄂霍次克海近

表 1　西太平洋黑潮源区古菌 16S rRNA 基因克隆文库分析

Table 1　Analyses of 16S rRNA gene clone libraries from the Source Area of Kuroshio in Western Pacific

文库	克隆数	RFLP 带型数	OTU 数	覆盖率 C (%)	香农-威纳指数(H)	辛普森指数($1/D$)	均匀度(E)
MD3047Y	96	28	20	86.5%	2.87	31.5	0.96
MD3047	62	32	26	74.2%	3.17	62.0	0.97
MD3047X	102	37	22	88.2%	2.88	20.8	0.93

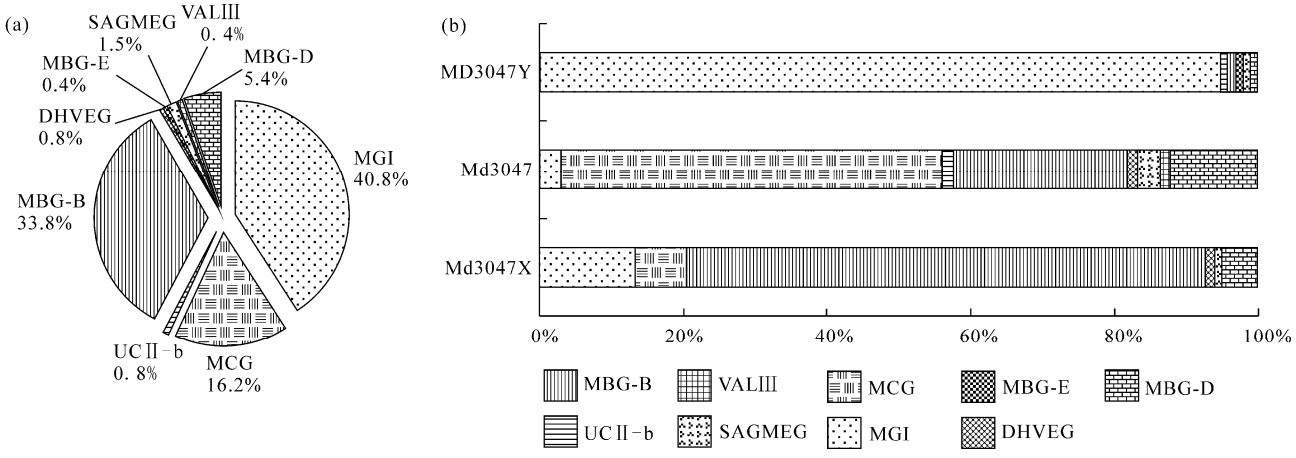

图 3 西太平洋黑潮源区古菌群落的多样性分析(a)及其在各文库中的分布情况(b)

Fig. 3 Diversity (a) and distribution (b) of archaeal communities in the Source Area of Kuroshio in Western Pacific

岸火山灰沉积物以及 Nankai 海槽等环境中古菌的优势菌群(Coolen et al., 2002; Reed et al., 2002)。在本研究中,MCG 在中层 MD3047 文库分布最为广泛,在其他两层中分布均较少,其同源序列主要来自于热带西太平洋的沉积物中(Zhang W et al., 2010)。

MBG-D 最初发现于大西洋陆坡和新英格兰离岸深海平原(Vetriani et al., 1999),在南极辐合带(Antarctic Polar Front)3000 m 深水中发现过该类菌(López-García et al., 2001),西太平洋沉积物表层(王峰等, 2010)也发现过该类菌。虽然在表层发现较少,但在太平洋表层中曾发现过该类古菌(DeLong et al., 2006),并且 Galand(Galand et al., 2009)发现 MBG-D 为北极中心的大西洋深水的优势类群(占总序列的 40%以上)。如图 3(b)所示,MBG-D 在各层均有分布,但含量均较少,其同源序列也主要来自于热带西太平洋的沉积物中(Zhang W et al., 2010)。

以上 4 个类群作为本研究中的优势菌属在各文库均有分布。除此之外,本研究中 UCII-b、DHVEG、MBG-E、SAGMEG 和 VAL III 这 5 类菌群均出现较少,共占总克隆数的 3.8%,并且主要分布在最表层 MD3047Y 和中层 MD3047 中,在低层 MD3047X 中或有少许出现。

3 讨论

MD06-3047(17°00.4419′N,124°47.9328′E)站位的地理位置十分特殊。它位于西菲律宾海盆的最西端、菲律宾吕宋岛东面的本哈姆高原处,地处黑潮源区。西菲律宾海具有典型的海洋性气候特征,也是全世界热带气旋活动最频繁的海区之一。因此,该区沉积物不仅包含了黑潮流系本身演化的信息,而且蕴含了东亚季风以及西太平洋暖池的演化信息(孙晗杰, 2011)。

本文以西太平洋黑潮源区 MD06-3047 孔的海底沉积物为研究样品,以其中的古菌为研究对象。应用 16S rDNA 序列分析技术、统计学分析和系统进化树分析,实现了对古菌序列的初步研究。应用非培养技术分析深海极端环境中古菌群落结构特征,并利用网上 BLAST 程序比对最高同源序列构建了系统发育树,以了解这些古菌在该海区的分布情况。分析古菌的克隆文库可以更好地对古菌的群落结构、生态意义及其在不同海洋生态系统中的栖息环境进行分析和研究(Stein et al., 1996; Béjà et al., 2001; DeLong et al., 2006)。

首先,综合 16S rDNA 文库分析、统计学分析和系统进化树分析,研究发现源于西太平洋黑潮源区本哈姆高原的古菌序列主要来自泉古菌,且以 MGI 为主(图 3a)。曾有研究指出,海底及海底沉积物中的古菌主要为泉古菌,仅有小部分广古菌门种类(Karner et al., 2001),本研究结果再次证实了该观点。与此同时,西太平洋黑潮源区本哈姆高原的古菌多样性较高,多达 9 种,并且各层菌种类群均较多,由表层到底层古菌类群依次为 6 种、8 种和 6 种(图 3b)。

其次,由群落结构的垂向分布来看,MGI、MBG-B 和 MBG-D 等作为该地区的优势菌群在各个层位当中都有分布。随着沉积物的深入,优势菌种由 MGI 转变为 MCG,最后底层以 MBG-B 作为主要类群占据主导地位。各层除优势菌种外,其他

古菌类群所占比例均偏低。

最后,通过与 GenBank 中相似度较高(88%以上)的同源序列对比,以分析西太平洋黑潮源区深海沉积物中古菌的群落结构,最终发现本研究的 16S rDNA 序列的同源序列大部分来自于西太平洋的苏禄海(王剑飞等, 2010)和比科尔岛大陆架的热带区(Zhang W et al., 2010)(图 2),并且这两个研究区域均属于黑潮源区范围,这也说明研究结果真实可靠。同时也可以看出,该海域沉积物中的古菌种群丰富多样,同源序列来源也各不相同。但这些来源不一且生活环境迥异的古菌,都属于泉古菌和广古菌两个类群。这说明不论是在不同层位的纵向分布上,还是不同海域的横向分布上,古菌的分布都非常广泛。

古菌作为一种古老的生命形态,长期参与着海洋生理生化作用。随着地质生态环境的变迁和古菌群落从适应到繁衍的更迭,古菌与环境彼此影响着。这样,从侧面而言古菌种群的差异就指示着地质生态环境的异同,这又回归到本研究立意当中,即依靠对地质环境的认识,采集沉积物,了解该地域古菌群落结构,分析地质生态环境的情况。

4　结论

本实验应用 RFLP 技术与 16S rRNA 基因文库分析相结合的方法对西太平洋黑潮源区的本哈姆高原沉积物中古菌的多样性及群落结构进行研究。应用统计学方法和系统进化树分析对核酸序列及数据进行研究表明,西太平洋黑潮源区的本哈姆高原拥有丰富多样的古菌类群,共包含了 9 个不同的种群,其中泉古菌占优势,并伴以少量的广古菌类群。泉古菌包括 MGI、MBG-B、MCG 和 UCII-b 4 个类群,并以 MGI 为优势类群;广古生菌包括 MBG-D、SAGMEG、DHVEG、MBG-E 和 VAL III 5 个类群,其中 MBG-D 是优势类群。本次研究结果揭示了西太平洋黑潮源区的本哈姆高原古菌群落多样性和垂直分布特征,为今后大范围的调查和研究深海海底古菌群落及其与环境之间的关系提供了科学依据。

参　考　文　献

李铁刚,常凤鸣. 2009. 冲绳海槽古海洋学. 北京: 海洋出版社, 10～14.

孙晗杰. 2011. 西菲律宾海 2.36Ma 以来古海洋学研究. 中国科学院海洋研究所博士论文, 11～12.

王峰,萨仁高娃,李铁刚,马学恩,于心科. 2010. 西太平洋深海沉积物古菌多样性垂直分布. 地质学报, 84(08): 1105～1111.

王剑飞,萨仁高娃,李铁刚,申之义,于心科. 2010. 苏禄海深海沉积物古菌群落结构多样性研究. 地球科学进展, 25(07): 766～774.

王铮,侯一筠,乐肯堂,胡珀. 2007. 源区黑潮研究进展. 海洋科学集刊, 48(00): 35～41.

徐美香,王风平,肖湘. 2003. 深海沉积物样品中古菌的 16s rDNA 分析. 自然科学进展, 13 (06): 598～603.

臧红梅,樊景凤,王斌,周一兵. 2007. 海洋微生物多样性的研究进展. 中国生物学文摘, 21 (009): 30～30.

赵京涛,常凤鸣,李铁刚,南青云,李青. 2008. 近 190ka BP 以来菲律宾海黑潮源区的碳酸盐旋回及其控制因素. 岩石学报, 24 (06): 1401～1410.

Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997. Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25 (17): 3389～3402.

Béjà O, Spudich E N, Spudich J L, Leclerc M, DeLong E F. 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. Nature, 411 (6839): 786～789.

Brandt A, Gooday A J, Brandao S N, Brix S, Brökeland W, Cedhagen T, Choudhury M, Cornelius N, Danis B, De Mesel I. 2007. First insights into the biodiversity and biogeography of the southern ocean deep sea. Nature, 447 (7142): 307～311.

Coolen M J L, Cypionka H, Sass A M, Sass H, Overmann J. 2002. Ongoing modification of mediterranean pleistocene sapropels mediated by prokaryotes. Science, 296 (5577): 2407～2410.

Dang H, Luan X, Zhao J, Li J. 2009. Diverse and novel nifh and nifh-like gene sequences in the deep-sea methane seep sediments of the okhotsk sea. Applied and Environmental Microbiology, 75 (7): 2238～2245.

Dang H, Zhang X, Sun J, Li T, Zhang Z, Yang G. 2008. Diversity and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing crenarchaeota in response to estuarine and environmental gradients in the Changjiang estuary and east china sea. Microbiology, 154 (7): 2084～2095.

De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with sybr green i real-time pcr to detect salmonella enterica serotype enteritidis in poultry. Applied and Environmental Microbiology, 69 (6): 3456～3461.

DeLong. 1992. Archaea in coastal marine environments. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89 (12): 5685～5689.

DeLong, Preston C M, Mincer T, Rich V, Hallam S J, Frigaard N U, Martinez A, Sullivan M B, Edwards R, Brito B R, Chisholm S W, Karl D M. 2006. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean′s interior. Science, 311 (5760): 496～503.

Fuhrman J A, Ouverney C C. 1998. Marine microbial diversity studied via 16s rRNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native archaea with fluorescent single cell probes. Aquatic Ecology, 32 (1): 3～15.

Galand P E, Casamayor E O, Kirchman D L, Potvin M, Lovejoy C. 2009. Unique archaeal assemblages in the arctic ocean unveiled by massively parallel tag sequencing. The ISME journal, 3 (7): 860～869.

Herndl G J, Reinthaler T, Teira E, van Aken H, Veth C, Pernthaler A, Pernthaler J. 2005. Contribution of archaea to total prokaryotic production in the deep atlantic ocean. Applied and Environmental Microbiology, 71 (5): 2303～2309.

Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, Moffett B F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiology Ecology, 43 (1): 1～11.

Hirose N, Lee H C, Yoon J H. 1999. Surface heat flux in the east china sea and the yellow sea. Journal of Physical Oceanography, 29 (3): 401～417.

Hsueh Y, Lie H J, Ichikawa H. 1996. On the branching of the kuroshio west of kyushu. J. Geophys. Res., 101 (C2): 3851～3857.

Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever M, Lauer A, Suzuki M, Takai K, Delwiche M, Colwell F S. 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the pacific ocean margin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (8): 2815～2820.

Inagaki F, Suzuki M, Takai K, Oida H, Sakamoto T, Aoki K, Nealson K H, Horikoshi K. 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of okhotsk. Applied and Environmental Microbiology, 69 (12): 7224～7235.

Inagaki F, Takai K, Komatsu T, Kanamatsu T, Fujioka K, Horikoshi K. 2001. Archaeology of archaea: Geomicrobiological record of pleistocene thermal events concealed in a deep-sea subseafloor environment. Extremophiles, 5 (6): 385～392.

Johns W E, Lee T N, Zhang D, Zantopp R, Liu C T, Yang Y. 2001. The kuroshio east of taiwan: moored transport observations from the woce pcm-1 array. Journal of Physical Oceanography, 31 (4): 1031～1053.

Karner M B, DeLong E F, Karl D M. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the pacific ocean. Nature, 409 (6819): 507～510.

Knittel K, Lösekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. 2005. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. Applied and Environmental Microbiology, 71 (1): 467～479.

López-García P, Moreira D, López-López A, Rodríguez-Valera F. 2001. A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. Environmental microbiology, 3 (1): 72～78.

Li S, PI Y, ZHANG C. 2007. The study of archaea: A review and perspectives. Journal of university of science and technology of China, 37 (8): 830～838.

Liao L, Xu X W, Wu M, Huang W D, Oren A. 2009. Bacterial and archaeal communities in the surface sediment from the northern slope of the south china sea. Journal of Zhejiang University (Science B: An International Biomedicine, Biochemistry & Biotechnology Journal), 10(12): 890～901.

Massana R, Murray A E, Preston C M, Delong E F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the santa barbara channel. Appl Environ Microbiol, 63 (1): 50～56.

Mullins T D, Britschgi T B, Krest R L, Giovannoni S J. 1995. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in atlantic and pacific bacterioplankton communities. Limonology And Oceanography, 40:148～158.

Reed D W, Fujita Y, Delwiche M E, Blackwelder D B, Sheridan P P, Uchida T, Colwell F S. 2002. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. Applied and Environmental Microbiology, 68 (8): 3759～3770.

Sørensen K B, Teske A. 2006. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. Applied and Environmental Microbiology, 72 (7): 4596～4603.

Schloss P D, Handelsman J. 2005. Introducing dotur, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Applied and Environmental Microbiology, 71 (3): 1501～1506.

Stein J L, Marsh T L, Wu K Y, Shizuya H, DeLong E F. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. Journal of Bacteriology, 178 (3): 591～599.

Takai K, Horikoshi K. 1999. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. Genetics, 152 (4): 1285～1297.

Takai K, Komatsu T, Inagaki F, Horikoshi K. 2001a. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. Applied and Environmental Microbiology, 67 (8): 3618～3629.

Takai K, Moser D P, DeFlaun M, Onstott T C, Fredrickson J K. 2001b. Archaeal diversity in waters from deep south african gold mines. Applied and Environmental Microbiology, 67 (12): 5750～5760.

Vetriani C, Jannasch H W, MacGregor B J, Stahl D A, Reysenbach A L. 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. Applied and Environmental Microbiology, 65 (10): 4375～4384.

Wuchter C, Abbas B, Coolen M J L, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl G J, Middelburg J J, Schouten S, Sinninghe Damsté J S. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 (33): 12317～12322.

Yuan Y, Kaneko A, Su J, Zhu X, Liu Y, Gohda N, Chen H. 1998. The kuroshio east of taiwan and in the east china sea and the currents east of ryukyu islands during early summer of 1996. Journal of Oceanography, 54 (3): 217～226.

Zhang W, Saren G, Li T, Yu X, Zhang L. 2010. Diversity and community structure of archaea in deep subsurface sediments from the tropical western pacific. Current Microbiology, 60 (6): 439～445.

Diversity of Archaea in the Sediments from the Source Area of Kuroshio

JING Tianshuang[1,2)], YU Xinke[1)], LI Tiegang[1)], SAREN Gaowa[1)], YANG Zaibao[1,2)]

1) *Key Laboratory of Marine Geology and Environment, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong*, 266071; 2) *Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing*, 100049

Abstract

To study the archaeal diversity of deep-sea sediments from the Source Area of Kuroshio in Western Pacific, the MD06-3047 sediment core collected by the IMAGES XIV cruise was used to built a genetic base through 16S rDNAanalysis. 260 archaeal 16S rDNA clones were obtained and after examination, a total of 56 OTUs were yielded. Phylogenetic results show that the sediments from Benham Rise contain a variety of thearchaea and nine groups have been identified within 1 meter of sediments. Archaea belongs to Crenarchaeota and Euryarchaeota, with Crenarchaeota accounting for 91.5% of total archaeal clones. Crenarchaeota consists of four groups (MGI, MBG-B, MCG and UCII-b), and is dominated by MGI (40.8% of total archaeal clones). And Euryarchaeota containsfive archaealphylotypes, which all take up tiny percentage (0.4%～5.4%) of total archaeal clones. The results have important implications for understanding of archaeal community in deep-sea sediments from the source area of Kuroshio in Western Pacific and provide a scientific basis for the future study on the relationship between archaea and environment.

Key words: Kuroshio; sediments; biodiversity of archaea; 16S rDNA clone libraries