

深海沉积物样品中古菌的 16S rDNA 分析*

徐美香^{1,2} 王风平^{2,3} 肖湘^{2,3**}

1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; 2. 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005;
3. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

摘要 利用多管采样器, 在太平洋西经 177°42'20", 北纬 10°35'06" 的位置上, 从水深 5774 m 的海底获得深海沉积物样本, 现场提取 DNA 进行保存. 以此 DNA 为模板, 利用古菌 16S rDNA 特异引物扩增出样品中古菌的 16S rDNA, 将扩增所得的 16S rDNA 进行克隆, 建立了该样品中古菌的 16S rDNA 文库. 对 16S rDNA 扩增片段进行了 RFLP 分析和序列分析, 结果表明这些古菌在系统进化树上的位置靠近, 属于 Crenarchaeota 中的 I 类海洋古菌类群.

关键词 深海 沉积物 古菌 16S rDNA

古菌兼具细菌和真核生物的某些特性, 古菌和细菌同属原核生物, 但是在分类地位上, 古菌和真核生物亲缘关系反而更近^[1]. 许多古菌能在超高温、高酸碱度、高盐及厌氧环境等极端环境中生活, 具有独特的细胞结构和酶作用方式^[1]. 古菌主要可分为两大类: 广古生菌 (Euryarchaeota) 和泉古生菌 (Crenarchaeota), 除此之外, 还存在一类迄今不能在实验室培养的超嗜热古菌——古生古生菌 (Korarchaeota)^[1]. Euryarchaeota 是结构松散的一组, 主要包括严格厌氧的产甲烷菌、嗜盐菌和部分极端嗜热菌^[1, 2]; Crenarchaeota 主要包括嗜酸嗜热菌或利用硫作为氧化还原代谢物的超嗜热的硫代谢古菌^[1, 2]; Korarchaeota 这类古菌的共同特征是其 16S rDNA 序列与陆地热泉古菌具有高度的相似性^[1, 2], 在系统发育中位于比前述两类古菌更原始的位置^[1].

目前, 绝大多数古菌还不能在实验室纯化培养, 能培养的古菌不仅数量少, 并且往往也非典型种^[3], 因而建立在微生物分离培养技术基础上的传统微生物鉴定、分类方法对自然界古菌的多样性分析存在着极大的偏差, 导致长期以来人们一直认为古菌的分布仅限于一些高温、高盐等极端环境中, 且种类有限. 继 1992 年 DeLong 等在海洋包括近海和沿岸海区中首先发现存在丰富的海洋浮游古菌

后^[3], 古菌在多种普通生态环境中如淡水湖^[4], 林中土壤^[5]等地陆续被发现, 改变了古菌只存在于极端环境中的论断, 成为了近代海洋生态学发展的三大里程碑之一. 建立在微生物核糖体小亚基 (16S rDNA) 序列分析基础上的分子系统发育分析方法可以最大可能性揭示自然环境状态下的微生物类别和组成, 揭示不同生物之间的系统进化关系, 已经成为微生物生态研究领域最重要的研究手段之一. 目前国际上通过 16S rDNA 来研究古菌和其他生物系统进化关系的热潮方兴未艾, 我国在这一方面的工作刚起步, 基本属于空白.

热带海洋对全球气候变化的驱动作用正日益受到关注, 这种驱动的一个重要表现是对碳循环的影响^[6]. 在研究热带海洋对生物圈物质循环, 特别是对碳循环的影响时, 深海微生物的生物地球化学作用是其中一个关键环节. 虽然近年来在研究近海海底微生物群落参与碳、硫循环的工作已取得了一系列的成绩, 但是在超过地球表面 50% 的深海区域中, 有关深海微生物特别是古菌的作用, 迄今为止还不甚明了^[2, 7~9]. 由于古菌对极端环境的特殊适应性, 在极端环境中甚至以优势种大量存在, 它在深海生物圈中的作用不言而喻, 因此在研究深海微生物时对古菌的研究尤其重要.

研究深海古菌在地球物质循环中的位置和作用

2002-12-23 收稿, 2003-02-24 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划 (批准号: G20000078500) 和中国大洋专项基金 (批准号: 4-2-1) 资助项目

** 联系人, E-mail: xxwfp@public.xm.fj.cn

的基础是充分了解深海沉积物中古菌群体的结构组成、分布和相互关系。在本研究中,我们从中太平洋近赤道区的一个站点(西经 177°42'20", 北纬 10°35'06")现场提取并保存了深海沉积物样品中的 DNA; 构建了这些环境样品中古菌的 16S rDNA 文库。通过对 16S rDNA 的 RFLP 和序列分析, 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, 此项工作的完成为全面开展深海生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 材料

本实验研究的中太平洋近赤道区的一个站点(西经 177°42'20", 北纬 10°35'06")MP 样品是由执行 DY105-11 航次大洋任务的大洋一号科学考察船利用多管采样器从水深 5774 m 的太平洋海底采集上来的深海沉积物。

1.2 深海泥样中微生物的富集和 DNA 的提取

(1) 配制人工海水(每升含 3.0 g NaCl, 0.7 g KCl, 5.3 g MgSO₄·7H₂O, 10.8 g MgCl₂·6H₂O, 1.0 g CaSO₄·2H₂O)并灭菌, 以人工海水悬浮深海沉积物中的微生物, 离心收集该微生物后, 利用 MO BIO 公司生产的土壤 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

(2) 采用经改进的深海微生物 DNA 提取法^[10], 取适量的深海沉积物(10 g 以上), 用经灭菌处理的适量人工海水(20 mL 以上)悬浮洗涤后, 于 4℃, 153 g 离心 5 min, 收集上清液并冰浴, 共重复 3 次; 将 3 次所得上清液于 4℃, 15300 g 离心 30 min 以沉淀富集样品中的微生物; 将收集到的菌体重悬于裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA(pH 8.0)中, 溶菌酶 15 mg/mL), 于 37℃ 轻摇温浴 1 h; 随后加入 SDS 和 Tris-HCl(pH 8.0)溶液至终浓度分别为 1% 和 100 mmol/L。同时保持溶液中的 NaCl 浓度不小于 100 mmol/L。将此混合液于室温下放置 5 min, 然后令其在液氮中冻结, 再于 65℃ 水浴锅溶解, 如此反复冻融 3 次; 最后加入 10 mol/L 乙酸胺至终浓度为 2.5 mol/L, 于 4℃, 4350 g 离心 10 min, 收集上清液。在上清液中加入 2.5 倍体积的 100% 预冷乙醇和终浓度为 20 μg/mL 的糖元(或终浓度为 3.5 μg/mL 的葡聚糖蓝, 购自 Sigma), 然后于 -70℃ 放置 2 h 以

上。将此混合液于 4℃, 17400 g 离心 30 min, 小心去除上清液, DNA 沉淀用 70% 乙醇洗涤后烘干, 溶于适量的 TE 缓冲液中, 于 -20℃ 存放。根据不同用途, 对此 DNA 样品进一步处理纯化。

1.3 PCR 扩增

根据文献[3]资料, 由上海生工生物工程技术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: TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA

Arch958R: YCC GGC GTT GAM TCC AAT T

(Y 为 C 或 T; M 为 A 或 C)

PCR 扩增按常规进行。扩增体系为 50 μL, 其中 10 × PCR 扩增缓冲液 5 μL, dNTPs 4 μL (2 mmol/L), 两种引物各 0.5 μL (10 μmol/L), Taq 酶 2 U, 以及适量模板。PCR 条件为 95℃ 变性 1 min, 60℃ 复性 40 s, 72℃ 延伸 100 s, 共 35 个循环, 最后在 72℃ 再延伸 10 min。

1.4 16S rDNA 文库的构建

利用上海生工公司生产的 UNIQ-5 PCR 产物纯化试剂盒纯化深海 DNA 样品中扩增出来的所有古菌 16S rDNA, 根据 Promega 公司生产的 pGEM-T 载体手册上的方案将回收所得的 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体上, 并转化到 XL-Blue 感受态细胞中, 于 37℃ 培养 20 h 左右; 初筛出所有的白色克隆, 经菌落 PCR 再次鉴定筛选出所有阳性克隆。

1.5 16S rDNA 的 RFLP 分析

在各个阳性克隆子的古菌 16S rDNA PCR 扩增产物中加入 2 倍体积的 100% 乙醇和终浓度为 2.5 mol/L 的乙酸胺溶液, 以纯化回收古菌的 16S rDNA 片段。将回收得到的古菌 16S rDNA 用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Afa* I 分别进行双酶切和单酶切, 然后在 5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 以了解各样品中所含古菌的类型和异同。

1.6 16S rDNA 序列测定与系统进化关系的分析

阳性克隆中的古菌 16S rDNA 由上海生工公司进行测序, 所得序列在 RDP(ribosomal database project)^[11]中先利用 CHECK-CHIMERA 进行序列有效性验证, 剔除无用序列, 将剩余序列进行 SEQUENCE-MATCH, 找出 RDP 库中相关序列, 用 PHYLIP-INTERFACE 进行分析并构建了相应系统进化树; 同时在 NCBI 上利用 Blast 搜索 GenBank,

EMBL, DDBJ 和 PDB 上的所有序列, 找出相关序列, 确定样品中所含古菌所属的种类范畴; 结合这两部分搜索结果和 PHYLIP-INTERFACE 构建的进化树, 挑选其中的部分序列, 利用 DNAMAN (version 5.1, Lynnon BioSoft) 软件进行分析, 利用邻接法构建了系统发育树.

2 结果

2.1 样品的采集与 DNA 提取方法的比较

利用多管取样器从深海获得的样品和取样管一起直接送到船上的无菌室进行样品分离. 在船上用土壤 DNA 提取试剂盒现场提取的 DNA 获得量非常少, 大约 1 g 深海沉积物只能获得 4~8 ng DNA. 在所用样品相同的情况下, 采用液氮冻融的提取方法能获得较高浓度的 DNA (见图 1), 1 g 深海沉积物可以获得大约 200 ng DNA, DNA 片段大于 21 kb,

而且酶切效果也不错, 可用于深海微生物 DNA 随机基因文库构建. 但后者操作较为复杂, 获得的 DNA 由于微量腐殖质酸的干扰, PCR 效果不稳定, 因此在本研究中仍然采用前一种方法提取 DNA 作为 PCR 模板.

2.2 古菌 16S rDNA 文库的构建和 16S rDNA 的 RFLP 分析

取 DNA 约 20 ng 为模板, 利用古菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 扩增结果如图 2. 得到的扩增产物为约 900 bp 的片段 (位于 27~958 bp 处), 是样品中所含各种古菌 16S rDNA 的扩增混合物. 将此 PCR 扩增产物回收并克隆到 pGEM-T 载体上. 经过筛选, 结果显示 (见图 3), 这些克隆中含有相关的古菌 16S rDNA 片段. 通过上述一系列筛选和鉴定, 最终构建了深海沉积物样品 MP 系列中的古菌 16S rDNA 文库.



图 1 深海沉积物样品总 DNA 提取部分结果

M, DNA 标志; 1, 土壤 DNA 提取试剂盒提取的 DNA;
2, 液氮冻融法提取的深海样品 DNA

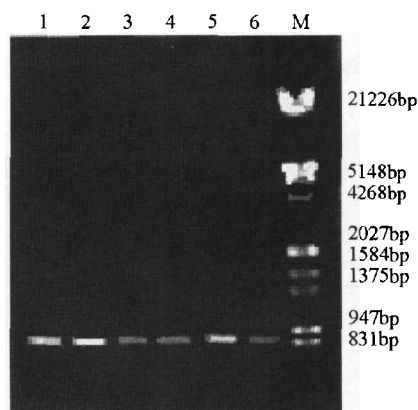


图 2 深海沉积物样品中古菌 16S rDNA 片段的扩增

M, DNA 标志; 1~6, 深海沉积物样品 MP 中 PCR
扩增所获古菌 16S rDNA 混合物

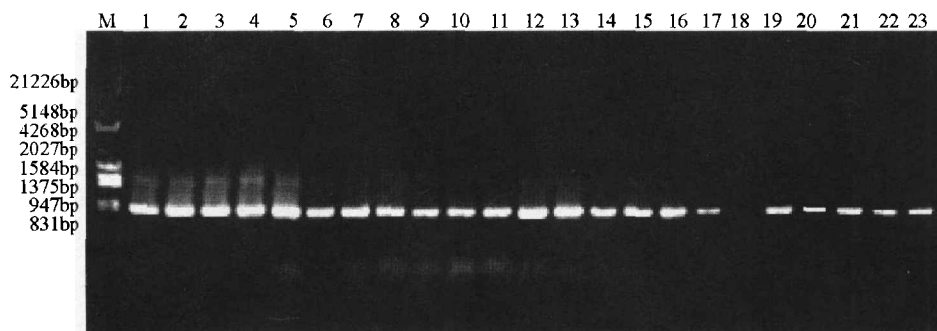


图 3 深海沉积物样品中古菌 16S rDNA 文库部分克隆 PCR 鉴定结果

M, DNA 标志; 1~17 和 19~23 为阳性克隆扩增结果; 18 为阴性对照 (以 pGEM-T 载体为模板, 无扩增片段)

将阳性克隆子中古菌 16S rDNA 片段的 PCR 产物回收, 以 *Rsa* I 和 *Msp* I 分别进行双酶解和单酶解, 结果发现双酶切和单酶切结果差别不大. 深海沉积物 MP 系列中的古菌 16S rDNA 通过 RFLP 分析, 属于至少 3 个不同的类型(见图 4).

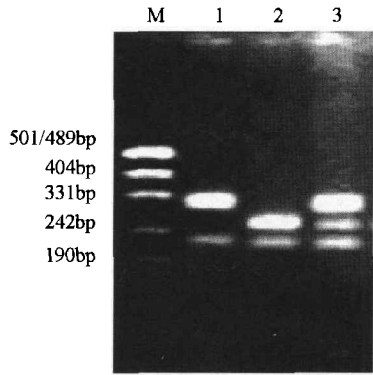


图 4 深海沉积物样品中部分古细菌 16S rDNA 经 *Rsa* I 酶切分析结果
M, DNA 标志; 1~3 示 3 种类型的 RFLP 结果

2.3 古菌 16S rDNA 的序列测定和系统进化分析

根据古菌 16S rDNA RFLP 分析结果, 按一定比例随机选取 3 种不同类型的古菌 16S rDNA 阳性克隆共 26 个进行测序. 将所得序列先在 RDP 库中进行 CHECK-CHIMERA, 共获得 22 个有效序列. 利用 DNAMAN 软件进行了初步分析, 结果如图 5. 一般而言, 当古菌 16S rDNA 同源性达到 98% 或以上时, 可以将这些古菌划分为同一个种. 根据这个标准, 以图中黑体标出的菌株为代表, MP 系列中这 3 种 RFLP 类型 22 个古菌 16S rDNA 克隆可以分成 8 个种: (1) 3 MP8-A, 该种类型克隆占测序克隆的 50%, 其中类型 I 有 3 株(1 MP1-A, 2 MP1-A, 3 MP1-A), 类型 II 有 4 株(9 MP4-A, 12 MP4-A, 6 MP6-A, 16 MP6-A), 类型 III 有 4 株(3 MP8-A, 9 MP1-A, 2 MP8-A, 15 MP6-A); (2) 5 MP11-A, 占测序克隆的 22.7%; 其中类型 I 有 4 株(1 MP4-A, 8 MP4-A, 5 MP7-A, 19 MP7-A), 类型 III 有 1 株(5 MP11-A); (3) 11 MP1-A, 属于类型 I; (4) 21 MP1-A, 属于类型 II; (5) 5 MP4-A, 属于类型 I; (6) 8 MP6-A, 属于类型 III; (7) 12 MP6-A, 属于类型 I; (8) 7 MP7-A, 属于类型 II. (3)~(8) 类型的克隆都只有一个, 分别占测序克隆的 4.5%.

将这 22 个序列与 RDP 库中所有已收集的古菌 16S rDNA 序列进行序列配对比较分析, 找出相关古菌, 初步构建了样品中古菌的系统发育树, 分析

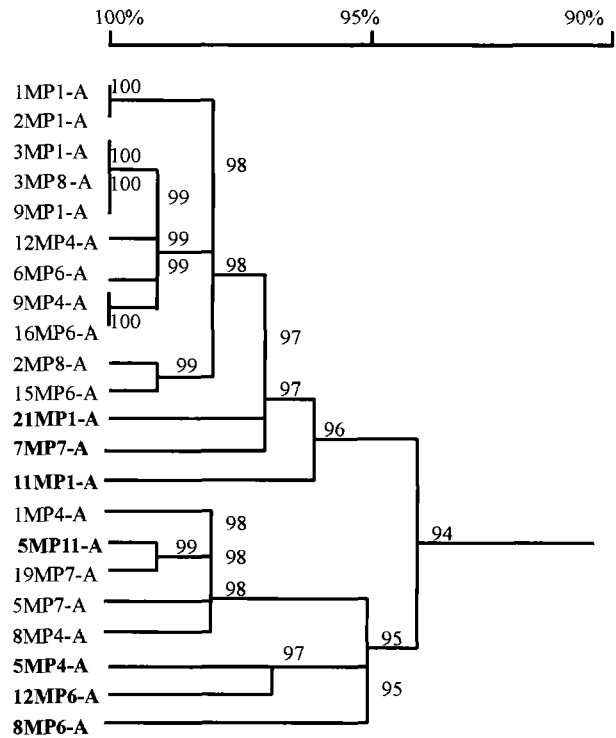


图 5 深海沉积物样品 MP 系列中古菌 16S rDNA 序列同源性比较结果示意图

图中 22 个序列所代表的菌株根据 RFLP 结果可划分为 3 种类型, 这 3 种类型根据序列同源性比较结果可分为 8 种菌株, 其中黑体字部分的菌株分别为各不同种古菌的代表菌株

了样品中古菌的系统进化地位. 然后结合在 GenBank, EMBL, DDBJ 和 PDB 中的搜索结果, 利用 DNAMAN 中相关分析软件分析比较了样品 MP 系列中古菌与其他检索到的古菌^[2~5,7,11~16]之间的关系. 以样品中各个种的代表菌株 11 MP1-A, 21 MP1-A, 5 MP4-A, 8 MP6-A, 12 MP6-A, 7 MP7-A, 3 MP8-A 和 5 MP11-A 为代表, 并根据同源性比较结果从数据库中挑选出属于 nonthermophilic Crenarchaeota marine group I 中的相关古菌, 同时挑选了细菌及 Euryarchaeota 中的若干 16S rDNA 克隆子为外类群(out-group), 共同参与系统进化树的构建^[7,16], 建立了样品中古菌之间及其与其他古菌、细菌之间的系统发育树(图 6). 从进化树可看出从 MP 样品中克隆到的古菌 16S rDNA 克隆在进化地位上靠近 Crenarchaeal marine group I 中其他古菌, 具有相同起源, 都属于 nonthermophilic Crenarchaeal marine group I 这一类群, 而且此类群在进化地位上比 Euryarchaeota 处于更先进的水平. 根据 16S rDNA 序列变化差异, 从分子水平上进行分析所得的结论表明古菌和细菌虽然都属于原核生物, 但在进化地位上具有不同起源.

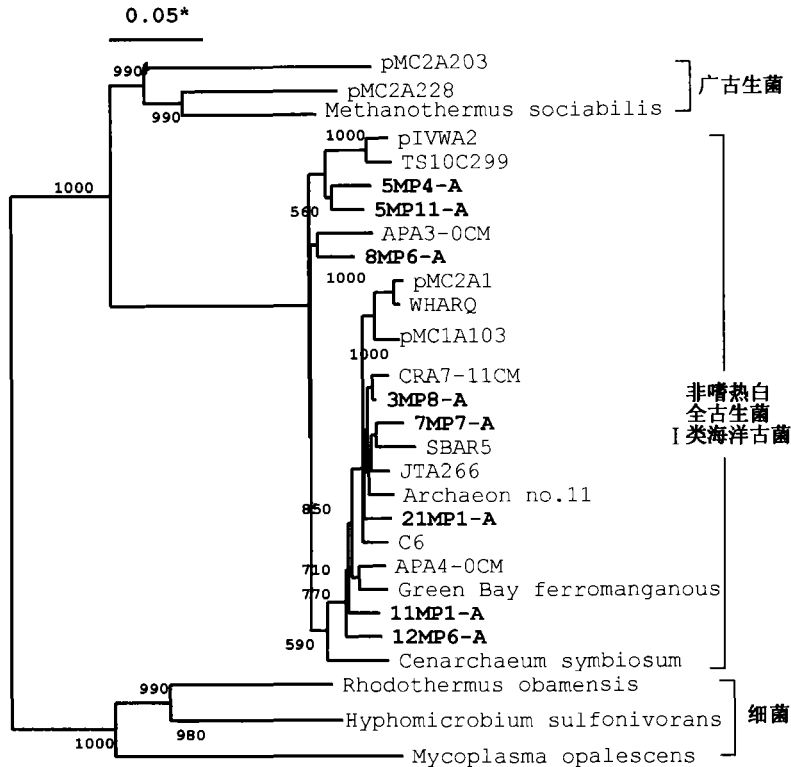


图6 深海沉积物样品 MP 系列中古菌 16S rDNA 克隆与其他相关古菌 16S rDNA 克隆子之间的系统发育树

本系统发育树是根据已测定的古菌 16S rDNA 序列之间的同源性比较结果, 以邻接法 (neighbor-joining) 构建而成, 用于反映古菌彼此间的系统进化关系, 本系统发育树 bootstrapping 值经 1000 次测算而得. *, 以此线长为单位代表核苷酸 5% 的置换概率; CRA7-11 cm (AF119126), 大西洋西北部 2600 m 左右的深海沉积物中的古菌 16S rDNA 克隆子; JTA266 (AB015278), 日本海湾寒流区 (Cold-Seep Area) 最深处沉积物中古菌 16S rDNA 克隆子; pMC1A103 (AB019725), 取自日本 Myojin Knoll 附近 1338 m, 温度达 100 °C 热液区出口处的样品中无法培养古菌的 16S rDNA 克隆子; pMC2A1 (AB019723), 取自日本 Myojin Knoll 附近 1330 m, 温度达 180 °C 热液区出口处的样品中无法培养的古菌的 16S rDNA 克隆子; PIVWA2 (AB019730), 取自日本 Iheya Basin 处深达 972 m, 温度达 300 °C 的热泉中的样品 (温度达 100 °C) 中古菌的 16S rDNA 克隆子; Cenarchaeum symbiosum (U51469), 寄生在海洋海绵体组织中的嗜寒性泉生古菌, 可在 10 °C 生长, 多种功能性基因已确定; TS10C299 (AF052946), 荷兰 NORTH SEA TS10 站点处海水样品中的无法培养的古菌 16S rDNA 克隆子; C6 (U71112), 海洋环境样品中尚未鉴定的 Group I 海洋古菌; WHARQ (M88079), WHARQ, 海洋环境样品中浮游古菌的 16S rDNA 克隆子; Green Bay ferromanganous micronodule archaeon ARC12 (AF293019), Green Bay 淡水样品中无法培养的古菌 16S rDNA 克隆子; SBAR5 (M88075), Santa Barbara 海峡中的浮游古菌 16S rDNA 克隆子; Archaeon no. 11 (D87349), Mariana 海沟 11 000 m 深处沉积物中无法培养的古菌; APA3-0CM (AF119136), CRA7-11 cm (AF119126) 和 APA4-0CM (AF119138), 从大西洋沉积物中克隆到的无法培养的古菌 16S rDNA 克隆子; pMC2A228 (AB019735) 和 pMC2A203 (AB019737), 取自日本 Myojin Knoll 附近 1338 m, 温度达 180 °C 深海热液区处深海样品中的无法培养的 Euryarchaeota 16S rDNA 克隆子, Methanothermus sociabilis (AF095273), euryarchaeota 16S rDNA 克隆子; Rhodothermus obamensis (AF217493), Hyphomicrobium sulfonivorans (AF538931) 和 Mycoplasma opalescens (AF538961), 细菌 16S rDNA 克隆子

3 讨论

本研究选取了位于“西太平洋暖池”区和中国多金属结核合同区中间太平洋中部一个位点的深海沉积物样品进行实验。“西太平洋暖池”在东南亚-新几内亚地区, 位于三大板块相互高速汇聚的接合部. 该地区由于地质构造运动, 生物多样性十分明显. 中国多金属结核合同区是我国与国际海底管理

局签订的具有深海多金属结核优先开采权的水域, 面积约 9×10^{14} km², 我国在享受优先开采权的同时, 也承担了保护生物多样性的义务. 对中太平洋这个站点古菌多样性分布的研究, 不仅可作为基本参照阐述西太平洋地质构造运动对生物多样性形成的作用以及我国前期 10 余年矿产资源调查研究对东太平洋生物多样性的影响, 而且这个站点 (西经 177°42'20", 北纬 10°35'06") 也是目前国际大洋钻探

和深海生物多样性研究的一个空白点, 本研究结果有助于促进对全球古菌多态性分布和功能地了解。

一般在对 16S rDNA 进行 RFLP 研究时, 所采用的限制性内切酶通常为识别位点为 4 bp 的限制性内切酶, 如 *Msp* I (即 *Hpa* II), *Afa* I (即 *Rsa* I) 和 *Hae* III 等, 本研究中, 最初我们采用了 *Msp* I 和 *Afa* I 这两种酶分别对古菌 16S rDNA 进行双酶切, 电泳发现不同样品双酶切带型区别不大。随后我们随机挑选了若干个克隆进行测序, 利用 DNAMAN 软件对所得 16S rDNA 序列进行了酶切结果分析和酶切模型模拟, 发现用 *Afa* I 进行单酶切所得的带型更有利于不同样品的区分, 因此我们就选择了 *Afa* I 对古菌的 16S rDNA 进行 RFLP 研究。最终根据 RFLP 结果, 我们从 MP 系列样品古菌 16S rDNA 克隆子中, 挑选了一定数量的克隆进行了测序。

我们通过 16S rDNA 序列分析等方法对西经 177°42'20", 北纬 10°35'06", 水深 5774 m 的站点的深海沉积物中古菌的群体结构和组成进行了研究。结果表明该站点的古菌属于 nonthermophilic Crenarchaeota marine group I 这一类群。有报道指出海洋中表层古菌大部分属于 Euryarchaeota 这一大类, 而深海及深海沉积物中的古菌则大部分属于 Crenarchaeota 这一大类^[15,16], 本研究结果再次证实了这种观点。从本文构建的系统进化树中可以看出, 同属于 marine group I 的古菌品种丰富多彩, 来源各不相同, 有的来自淡水湖, 有的来自湖沼, 有的来自近海岸海水, 有的来自深海沉积物, 有的来自海域寒流区, 而有的又来自海洋热液区。但这些来源各不相同的古菌都属于 nonthermophilic Crenarchaeota, 这说明古菌其实分布非常广泛, 不仅可适应极端环境, 也可以在普通环境中大量存在。热液区样品中的古菌并非全部都是嗜热古菌; 而可能是耐热古菌, 可在高温下也可在低温下生存; 本文研究的样品取样点水温大约在 2℃, 能在此低温环境中生存的古细菌应该至少可以说是耐低温古菌, 但这些古菌 16S rDNA 和同属于 marine group I, 生活在温度高达 100℃ 以上的热液区非嗜热古菌 pMC1A103^[7] 和 pMC2A1^[7] 的 16S rDNA 具有相当高的同源关系, 这说明亲缘关系很近的古菌其温度敏感性有很大差异, 也从侧面反映了低温古菌可能源自于嗜热古菌^[2]。

致谢 感谢日本海洋科学与技术中心(JAM-STECC: Japan Marine Science & Technology Center)加藤千明(Chiaki Kato)教授在 DNA 提取方面给予的帮助。

参 考 文 献

- 1 Michael T M, et al. *Biology of Microorganisms*. 8th ed. Prentice-Hall: Inc Simon & Schuster/A Viacom Company, 1997
- 2 Vetriani C, et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(10): 4375
- 3 DeLong E F. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5685
- 4 Macgregor B J, et al. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(3): 1178
- 5 Jurgens G, et al. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from Boreal forest soil. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(2): 803
- 6 汪品先. 气候演变中的冰和碳. *地学前缘*, 2002, 9(1): 85
- 7 Takai K, et al. Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 1999, 152(4): 1285
- 8 Nogi Y, et al. Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosi* sp nov, A new barophilic bacterial isolate. *Extremophiles*, 1999, 3(1): 71
- 9 Riebesell U, et al. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, 2000, 407(6802): 364
- 10 Herrick J B, et al. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 687
- 11 Bonnie L, et al. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(1): 173
- 12 McInerney J O, et al. Phylogenetic analysis of group I marine archaeal rRNA sequences emphasizes the hidden diversity within the primary group. *Archaea. Proc R Soc Lond (B), Biol Sci* 1997, 264(1388): 1663
- 13 Preston C M, et al. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen nov sp. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(13): 6241
- 14 Li L, et al. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area. The Japan Trench. *Biotechnol*, 1999, 1(4): 391
- 15 Massana R, et al. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(1): 50
- 16 Bidle K A, et al. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microb Lett*, 1999, 177: 101