

深海原生动物多样性研究进展

Progress in the biodiversity of protozoa in the deep-sea environment

陈旭森, 徐奎栋

(中国科学院海洋研究所 海洋生物分类与系统演化实验室, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q178.533 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)10-0119-08
doi: 10.11759/hyhx20131223001

1 引言

原生动物是一大类单细胞真核生物的统称, 其中自由生活的主要类群包括异养鞭毛虫、纤毛虫和肉足虫(有孔虫和放射虫为代表); 它们是生物圈中数量最为庞大的吞噬营养类群, 部分种类具有内共生藻类或功能性叶绿体而进行兼性营养。在水环境中, 不论是浮游或是底栖生活的原生动物, 其生命过程与水体和底质的环境存在着密切的联系; 并且通过各种营养关系与其他生物共同联结成为一个有机整体。同时, 原生动物的基础研究也为探索真核生物系统进化提供了重要素材。

回顾原生动物 300 多年的研究历史: 从基础的形态分类、系统发育研究, 逐步拓展至对其生态功能、新陈代谢方式和真核细胞进化模式的探索中^[1]。现生的原生动物中, 自由生活的约有 2 万余种^[2], 其中一半以上来自海洋^[3]。近 30 年来, 我国对于海洋原生动物的研究侧重于物种多样性、分子多样性、群落结构以及时空变化等方面。样品采集范围集中于潮间带、河口湿地、较特殊的养殖水体和红树林生境以及近海等。在近岸海域已发现自由生活的原生动物约 3000 种, 其中鞭毛虫 20 余科 40 余属 300 余种、有孔虫 120 余科 400 余属约 1500 种、放射虫近 60 科 240 属 500 余种、纤毛虫近百科 200 余属 700 余种^[4-7]。然而, 我国对于深海的物种多样性研究仅在大型动物和细菌、古菌等方面有所开展, 针对原生动物多样性的调查尚属空白。

深海, 通常是指深度大于 1000m 的海洋, 占据了全球海洋总面积的 75%, 环境特征多为黑暗、低温(多低于 4℃)、高压和寡营养等, 这样的极端环境常

被视为“生命禁区”。然而, 深海中的一些特殊地貌, 譬如海山区、深海盆地、热液喷口、冷泉等, 由于特殊的水文条件(泰勒环流等)和环境因子(乏氧、高盐、硫化、富含甲烷等), 往往造就出独特的生态价值, 因而成为生物多样性研究的热点区域^[8-9]。国际上, 随着研究理论与技术的提高, 人们对于深海原生动物多样性已有初步认识和研究方法的拓展。开展深海原生动物多样性研究, 全面了解该生境内原生动物主要形态功能类群的物种组成, 发现处于真核生物演化分支重要节点的代表生物, 阐明其特有的生命现象和生命过程以及驱动其变化的主要环境因子, 进而深入探索原生动物在深海环境的生态功能, 已成为当今海洋微生物研究的主流方向, 具有十分重要的意义。

1.1 生态功能

在海洋生态系统中, 水体和底质中自由生活的原生动物具有十分重要的生态功能; 它们通过直接或间接作用, 调节水体中微生物的群落结构和新陈代谢。例如: 异养和兼性自养的浮游原生动物, 其群落结构的时空演替在很大程度上影响着海洋生物圈中碳的动态平衡^[1]; 同时作为细菌、单胞藻的摄食者和小型浮游动物的饵料来源, 以纤毛虫为主要功能类群的异养原生动物源源不断地从微生物类群

收稿日期: 2013-12-21; 修回日期: 2014-03-26

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类, XDA11030201);

中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-Z-5)

作者简介: 陈旭森(1984-), 女, 山东青岛人, 博士, 从事纤毛虫原生动物学形态分类与系统发育研究, 电话: 0532-82898785, E-mail: chenxumiao.ouc@gmail.com; 徐奎栋, 通信作者, 电话: 0532-82898776, E-mail: kxu@qdio.ac.cn

向更高营养级传递物质和能量,是海洋浮游和底栖微食物网不可替代的组成部分^[10-14]。

大洋中浮游生有孔虫和放射虫,死亡后沉积海底形成的软泥,占据了现代海底三分之一以上的面积^[15-16]。它们的种群消长与深海中有有机碳通量和沉降模式显著相关^[17-19],多被应用于海洋深部水团变化规律和海洋表层初级生产力的研究^[20]。

在深海中,除上述重要生态功能外,在一些极端环境下原生动物的常常发挥着更为独特的生态学作用。例如:在热液喷口^[21]和冷泉^[22],活跃着一些特殊的原生动物(以眼虫、纤毛虫和有孔虫为主),它们通过在细胞表面或内部共生的产甲烷细菌、硫化细菌等,将极端生境内的特殊化合物转化成细胞能够直接利用的营养物质^[23]。此外,许多原生动物在深海沉积物中以包囊的形式存在,它们的丰度和群落结构在一定程度上能够对长期的环境变化起到指示作用^[24]。

因此,开展深海原生动物多样性的研究,对不同的功能类群进行更深入、细致的划分,在一定程度上可为探寻其在深海浮游、底栖以及一些极端环境下(寡营养、乏氧、高盐、热液喷口、冷泉等)微生物种群消长规律和在生态系统中的功能与作用奠定基础,也为了解深海生态系统的组成和如何响应环境长期变化的机制提供可行的方式。

1.2 模式生物与进化节点

原生动物的很多类群在进化过程中拥有不同的生命周期、营养方式、能动性以及细胞分化类别^[25]。尽管仅为单细胞结构,但它们在外形、运动方式、表面结构的分化和特化等方面,均表现出极高的多样性。特殊类群可通过独特的方式来进行遗传物质的传递、表达和新陈代谢等等。一些能够建立纯培养的原生动物,已成为遗传学、细胞学和分子生物学研究的重要模式生物^[26-28]。

从基因信息分析的证据来看,真核生物可能是某种古菌与细菌共生、异种结合的基因融合体。有科学家通过比较物质能量新陈代谢的生物化学过程,认为真核生物的起源,很可能需要在乏氧的海洋环境中进行^[29]。深海中热液喷口附近的生化环境(温度可达 400°C, pH 为 3~8,并具有特殊的化合物)与生命起源之前的海洋非常相似^[30-33]。同时,亦有分子进化的证据表明:在这种极端环境下生存的嗜热微生物(细菌和原生生物)极有可能是现存生物的共同祖先^[34-35]。

因此,作为生物界系统进化上两大跨越(即原核到真核、单细胞到多细胞)极其重要的节点代表类群,在深海极端环境(寡营养、乏氧、高盐、硫化等)下进行原生动物的多样性研究,极有可能发现并获取一些在系统进化过程中的代表模式生物。

2 物种多样性研究进展

由于研究手段的限制、缺乏有经验的分类学家等原因,深海原生动物的物种多样性研究很少。20 世纪 90 年代初首先在日本和欧美国家展开,采集不同深度的水体和底层沉积物,依赖常规的形态学研究手段进行多样性调查,涉及的区域范围主要集中在地中海、太平洋和大西洋的局部深海海域。

2.1 研究手段

原生动物个体微小且细胞特化程度高,具有多样化的表面和深层结构。19 世纪末,人们对原生动物的认识主要依赖于光学显微镜下的观察和细胞学染色技术。20 世纪中,电子显微镜的发明使人们对原生动物的超微结构有所了解,从而使形态学鉴定所参考的特征更为细致、全面。

基于培养模式的形态学研究方法,能够十分准确、可靠地完成物种鉴定;完成样品中物种多样性的定性分析。不足之处在于:(1)操作过程中,无法培养、个体数目过少的许多种类易被忽视;(2)适宜的条件会促使样品中原先以休眠包囊形式存在的种类萌发、大量增殖甚至形成优势种。因此,这样的分析方法,对样品所包含的物种数目、丰富度、存活状态等信息无法给出全面、综合的考量。

当研究侧重原生动物的多样性、群落结构和时空变化规律等生态学分析时,需要在样品采集后进行快速固定,后再分离、染色,既能进行物种鉴定,又能较为保真地还原样品的本来面目(区分活动/休眠状态、保持丰度不变等),从而较全面、准确地进行海洋原生动物多样性和区系结构的分析。但采用固定样品进行生态学研究的方法,也有其局限性:(1)对其中处于休眠状态的虫体,由于缺乏相关的基础研究资料尚无法直接进行准确的鉴定;(2)对于个体数目极少的种类,也无法提供足够的检测敏感度。

深入而准确的形态鉴定,往往需要原生动物活体状态下的特征,因此常局限于能够培养或在样品采集后数日仍能保持生存和一定丰度的种类,极多的类群远远达不到这样的要求,就极容易被遗漏掉。

即使舍弃活体特征,固定后的样品进行种类鉴定和计数,仍旧非常容易将一些低丰度的物种忽略掉。因此,经典、传统的分类学研究方法,即便能非常准确地完成物种鉴定,在深海极端生境原生动物种多样性的探索中,尚无法完全发挥作用。

2.2 研究概况

作为西北太平洋最大的边缘海——日本海,日本学者从1991年起对其内的Sagami湾(1450m深)开展为期3年的底栖有孔虫调查,共鉴定来自40属的76种有孔虫,发现有孔虫群落在底泥中垂直迁移,主要的生态驱动因子是氧化还原层的厚度^[36]。在这份工作中,物种多样性的研究虽不够完善,但为生态学的探索奠定了重要基础。

1993年,德国学者对地中海东部的Ionian海盆(最深处4617m)进行底栖原生动物的摸底调查,使用3种培养基(麦粒、酵母、热带鱼饵料)对样品中的原生动物进行促萌发和后续培养,共获得鞭毛虫87种、无壳阿米巴12种、纤毛虫35种,其中58%为近海的常见种类^[37]。这是一份较为系统的工作,尝试了多种培养基,对18个站位的108个样品进行了为期8天的观察,工作量大且对鉴定人员的专业素质要求高,为日后深海原生动物多样性研究的开展提供了重要参考。

1995~1998年,美国学者对东太平洋4个深海热液喷口(深度为2000~2550m)进行鞭毛虫多样性的调查,使用酵母浸出液进行培养,采用光镜和电镜共同观察,共分离出9种鞭毛虫的18个种群,并结合核糖体小亚基基因序列分析、构建系统关系树,对它们的进化关系进行探讨^[38]。上述2份研究均应用基于培养模式的形态学手段来进行,对深海较特殊环境下原生动物的群落结构有了初步了解。

Buck等^[22]在加州Monterey海湾的深海冷泉区域(深903m)采集表层1cm的沉积物,经戊二醛固定后进行扫描电镜和透射电镜观察,发现多种眼虫的体表共生着大量行化能自养的细菌,原生动物和细菌通过代谢方式的互利共同生活在富含硫化氢的极端环境下。如前所述,对样品先进行固定处理再分析,在一定程度上能够反映其原位生活状态。

基于经典分类学手段对深海原生动物物种多样性的研究目前在国际间较为罕见,除研究手段本身局限外,更主要的问题在于缺乏有经验的原生动物分类学家,无法在短时间内快速处理和准确鉴定样

品,而分类学专业人员的培养,不仅要经历非常细致、严谨、枯燥的科研训练,更需要长时间刻苦的实践工作和经验的积累以减少主观认识造成的偏差。相较于此,能够流程化处理的分子生物学技术手段,可在短期内完成人员培训,开展的工作更为广泛和全面。

3 分子多样性研究进展

研究方法的提高,为科研探索造就更有力的武器、提供更广阔的平台,进而带来快速发展。近30年,分子生物学技术的应用,开辟出原生动物分子系统与进化研究的新领域。以基因测序为基础,研究深海原生动物的分子多样性,大大提高了人们探索海洋原生动物的分辨率和准确度。

3.1 研究手段

现代分子多样性研究方法,无须进行任何培养而直接分析环境样品中某段标记基因(通常选取较为保守的核糖体小亚基基因的部分可变区域),通过序列信息的比对和聚类分析,进而显示其中原生动物的群落结构。这不仅弥补了基于培养模式的形态学研究所遗失的大量信息(无法培养的种类,多样性和丰度等定量信息),也大大提高了检测的分辨率和敏感度,将环境中个体数量极少、处于休眠状态等难以通过形态学研究手段发现和鉴定的种类揭示出来。

技术较为成熟、应用比较广泛的分子多样性研究方法有:分子指纹图谱分析和结合一代测序技术(Sanger测序)的克隆文库构建。结合生物统计软件对分子指纹图谱进行分析,可以为评价原生动物的多样性和群落结构组成提供更多的参考依据^[39]。这种方法存在的主要问题是:(1)仅仅适用于分析较短的DNA链,其获得的序列信息虽能明显区别出不同类群的相对丰度,但所包含的系统分类信息不够全面,且无法提供准确的分类阶元信息;(2)若出现同种内不同个体基因序列的细小差异,就可能出现多个条带来自同一种的错误信息;或者来自不同种类的扩增条带恰好无法分开,导致同一条带包含多个分类阶元等,而结合一代测序技术的克隆文库构建,工作量巨大:每个样品,研究人员需要对成百上千的菌斑进行转化和培养,费时费力,其获取的信息量已被新技术远远超越。

高通量测序技术(即二代测序技术)能够同时完成几十万到几百万条DNA序列的测定,为海量的环

境样品分析提供更为迅速、准确、高通量的分析平台;实验操作简单、工作周期短,需要投入大量精力用于数据分析。常用的测序方法包括:454 焦磷酸测序(454 pyrosequencing)、Illumina 测序、大规模平行签名测序(massively parallel signature sequencing, MPSS)、聚合酶克隆测序(polony sequencing)、离子半导体测序(ion semiconductor sequencing)、DNA 纳米球测序(DNA nanoball sequencing)等。在对加勒比海 Cariaco 海盆中深海沉积物进行的原生动物分子多样性研究中,研究者将 454 焦磷酸测序技术与构建克隆文库的方法做了对比,结果发现:在亚门/纲/目级阶元上,454 焦磷酸测序技术具有更高的分辨率,进而能更详尽、细致、全面地揭示群落结构的组成和变化^[40]。

然而,高新技术在开发和应用的过程中,也为科研探索带来一定程度的困扰:譬如通过高通量测序技术获取的宏基因组信息,应用不同方法对其进行数据分析,往往会得到相差甚远的结果^[41],而测序的误差很可能会过分放大物种的多样性^[42]等,这些问题需通过分析方法的优化、计算模型的筛选来修正^[43]。

3.2 研究概况

深海的生物多样性研究,由于现场取样、高保真要求、分析方法分辨率等诸多方面的限制,难以应用传统的形态学研究方法,分子手段能弥补这样的不足。全球范围内,应用分子技术对深海原生动物的多样性研究已经较为成熟,对原生动物的微环境至全球尺度下的分布模式、与环境理化/生物因子之间相互作用的规律等研究均提供了可靠的基础信息。目前,全球范围内开展原生动物分子多样性研究的深海区域主要有:极地海域、太平洋局部、地中海、墨西哥湾和加勒比海。

在南极附近海域,研究者分别选取 250、500、2000 和 3000m 4 个层面的水样对微生物进行克隆文库构建,得到的序列经系统分析表明:其原生动物的多样性极其丰富;不同水层物种多样化的模式并无明显的差别^[44]。应用同样的方法,在太平洋西北部日本海 Sagami 湾内的冷泉区域,亦发现活跃着大量的、多样化的纤毛虫,种类涵盖 8 个纲级阶元和一些未知类群,它们在底栖微食物网中发挥着重要的作用^[45]。

在地中海东部新发现的一个缺氧、高盐(盐度

348)海盆(深度 3258m)——Thetis 的真核微生物多样性调查表明:缺氧的卤水层中,生存着大量原生生物;无论在盐跃层还是卤水层中,纤毛虫和鞭毛虫的物种数目均占据较大的比例;而盐跃层和卤水层中的原生动物群落结构呈现显著差异^[46]。在地中海东部的两个高盐缺氧海盆(Bannock 和 Discovery)开展的多样性调查也得到了相似的结果:发现多种多样的原生生物,其中一些类群很可能代表新的阶元;且在不同水层,原生物群落结构特征表现出明显差异^[47]。

通过构建克隆文库,对墨西哥西北部 Guaymas 海盆内热泉沉积物中纤毛虫原生动物的多样性和分布模式进行的研究发现:(1)此处生存的纤毛虫物种非常丰富,在 548 条序列中共检出 156 个 OUT (operational taxonomic units);(2)在不同环境条件下,纤毛虫的分布模式与细菌有着很高的一致性,但二者与环境因子的相关性并不高;(3)此处丰度较高的纤毛虫,也同样出现在其他的热泉、深海和缺氧的微环境中,在全球具有广布性^[48]。然而,在距离并不遥远的加勒比海、世界上最大的缺氧海盆 Cariaco 中,研究者却有不同发现:不同的水层,生存着相异的原生生物类群,极有可能在特殊的环境胁迫下形成独立的进化单元^[49]。

这些工作,应用不同的分析手段,且采样地点多样化,不仅在了解深海原生动物分子多样性方面获得开拓性的进展,而且在对其分布模式与环境因子之间的关系、全球尺度下的分布格局,以及特殊环境下能否形成独立的进化单元也做出深入的分析和探讨,大大推动了我们对于深海环境中多样化的原生动物在微生物生态系统中复杂的结构与功能的了解。

4 多样性研究热点

自由生活的原生动物广泛存在于土壤、淡水、半咸水至海洋生境,甚至是极地的冻土、深海的高盐/缺氧盆地/热液/冷泉等极端环境中,“Everything is everywhere, but, the environment selects”^[50]这一观点在得到大量认可的同时,也受到激烈的反驳。全球范围内,原生动物的分布格局是以扩散作用为主导的全球性分布吗?当微生物的扩散被阻滞,特殊环境下,是否能够形成完全独立、以环境因子为主导的限定性地理分布进化单元,进而衍生出限定性地理分布的物种?这些是学者们长期争论不休的焦点问

题。在深海环境下,地理分布格局和新奇种类的出现将成为深海原生动物的多样性研究的热点。

4.1 地理分布格局

生物在地球上的分布模式,综合反映了时间长河里生物在扩散过程中机遇与挑战并存、生存与灭亡交战的复杂相互作用^[51]。研究原生动物的多样性和地理分布的领域内,多年来存在着激烈的争论: Fenchel等^[52]认为微生物的全球分布模式取决于其庞大的种群而非特定的分类群,其多样性在局部尺度下远远超过大型生物,而在全球尺度上则恰恰相反,即微生物具有区域上的高多样性,在全球范围内多样性则相对较低,以纤毛虫为例,Finlay^[53]认为世界上的纤毛虫可能仅有 3000 种左右。而 Nanney^[54]和 Foissner 等^[55]则表达出与此大相径庭的观点:认为微生物在一定程度上表现出限定性的地理分布特征,存在一定数量的“旗舰种”仅存在于极少数的地理分区,同时, Foissner 学派认为纤毛虫的物种多样性相较于 Fenchel 和 Finlay 提出的 3000 种高出 1 个甚至 2 个数量级。

在过去二三十年不断深入的原生动物分类学研究中,随着研究涉及的地理范围扩大,越来越多的新物种被发现;然而对于海洋这个广阔无边的生命摇篮,当前的诸多新发现极可能只是冰山一角。俄国学者^[56]选取来自多于 350 个地点的 1342 种底栖纤毛虫数据,以分析 17 个地理分区内海洋底栖纤毛虫的多样性和地理分布格局。结果表明: 25%的种来自唯一的地理分区, 18%的种是广布的(出现于半数以上的地理分区,跨越两个半球); 仅有 5%~7%的物种具有地理局限性; 某一特定地理分区内的纤毛虫多样性与分区面积或是海岸线的长度均无明显线性关系,而是更多地取决于是否有研究者专注于此,同时与盐度呈负相关。由此可见,“广布”或“限定性分布”可能都是原生动物地理分布格局的常态,这与采样所涉及小生境复杂多元的环境因子相关。就目前研究而言,阻挡我们探索原生动物的多样性和地理分布格局的主要因素在于严重的采样不足和数据缺乏。

Patterson 于 2009 年在 Science 上发表关于微生物全球分布格局的综述文章^[51], 简略而系统地回顾人们对该问题近 200 年的探索历史, 并且结合“稀有生物圈”假说(rare biosphere, 即生物圈是由个体数目少但生物多样性高的类群组成)^[57]将微生物的分布特点归纳为 2 种模式: (1)每个生境内都存在着

大量的微生物生态位,它们共同组成非常复杂、多样化和活跃的群落结构; (2)仅有少数种类保持着活跃的新陈代谢,而其余的处于休眠状态,扩散至其他每个生境中。这一观点能够较好地解释目前的许多发现,并且陆续得到一些新研究结果的验证。

应用基于核糖体小亚基(SSU rRNA)基因构建的分子多样性研究体系,国外学者在对深海微生物多样性的研究中,在不同环境均能发现普遍存在的原生物种类。但是,因地理化学条件的隔离,它们在不同环境中呈现出群落结构模式的显著不同。对加勒比海 Cariaco 海盆的研究发现,理化环境不同(含氧、低氧、乏氧/硫化等)的各个站位,生存着特有的原生物类群。结合系统关系和群落结构/丰度的多元分析表明:地理位置、季节和地球化学参数的梯度变化是原生物在 Cariaco 海盆分布的主要限定性因素;即使在距离很近的站位间,仍存在着各自特异的原生物群落,这在一定程度上造就了物种的分化和形成^[49]。地中海东部的 Bannock、Discovery 这两个高盐乏氧海盆,极端的生存条件使其被视为生命禁区,然而人们在这里发现了多种多样的原生物,其中大部分的序列与普通生境来源的呈现出较大分化,形成十分独特的进化支系,且在高盐水层和普通海水-高盐水交界层,分别表现出不同的原生物群落结构特征,在物种组成上与上覆的普通海水层具有很低的相似性。因此,很可能是该水域的生物地球化学条件对原生物施加了特有的物种选择压力,进而形成地理格局限制造成的独立进化分支单元^[47]。

不得不承认的是,现有的分析技术尚无法精准地反应出样品中绝对的物种数目和丰度,科学家们只能通过大胆的假设和严密的逻辑来逐步探索、推敲,接近更真实的描述,而在这漫长过程中,严肃的理论争议和快速的技术发展,是推动人们探求真理的重要力量。

4.2 特殊-极端环境中新奇类群的出现

浩瀚海洋孕育无数生命,万丈深渊下蕴藏着神秘、新奇的原生动物类群。目前的原生动物系统学研究毫无疑问缺失了若干具有生态学、进化系统学关键意义的类群,亟待获取更多新类群的可靠信息去修正现有观点,对原生动物重要类群的起源和进化进行更加深入的探索和揭秘^[58]。

深海环境特殊(多样的地貌特征、独特的水文环境、极端的化学环境因子等),造就了独特的生物多

样性。近年的原生动多样性调查(如地中海、加勒比海等),发现许多新奇的原生动物,分子系统学分析表明它们与现有的已知类群表现出纲级^[59]、甚至界级^[60]水平的巨大差异。然而,即便是得到大量代表新阶元的部分序列信息,由于形态学研究手段的限制,针对这些特殊类群仍鲜有基于经典分类学的细致描述。迄今,仅有一份此类工作,即应用荧光探针原位杂交和扫描电镜相结合的方法,对 Cariaco 海盆的一种纤毛虫原生动物建立新的纲级阶元^[59, 61]。潜在的未知类群,将成为未来 10 年甚至更长时间,国际间海洋原生动多样性研究的重点之一。

5 我国未来研究展望

我国的原生动多样性研究起步较晚,通过近二三十年国内诸多学者的不懈努力,在近岸水体的原生动多样性研究、近海浮游和底栖微小型生物生态调查等方面已达到国际领先水平,但对深远海的特殊和极端生境(海山、海盆,缺氧、高盐的深海等)原生动多样性的研究尚处在空白阶段。随着研究技术的发展,国际上的研究者们不断开拓原生生物样品采集的地理范围(由土壤、淡水至近海、深海甚至各种极端环境)、尝试多种多样的研究方法(传统分类学-促包囊萌发和培养、克隆文库构建、宏基因组测序等),在为原生动全球尺度下分布格局研究积累着更丰富资料的同时,也大大拓展了对新奇、潜伏种类的认识^[62];更为探索深海生态系统中微生物的多样性与生态功能打开一扇门。

探索深海中的原生动多样性,存在诸多限制因素:现场取样难,样品保存、分离和后续处理的高保真要求高,分析手段的高分辨率、敏感度和误差规避等。此外,如徐奎栋^[63]所述,基于经典的分类学手段对原生生物物种多样性的准确评估,受限于多方面的因素:(1)缺乏有经验的分类学家;(2)采样不足,尚有许多未涉及的生境;(3)常见种多处于休眠模式(几乎不可能鉴定),而稀有种丰度低且难于培养。但与此同时,国外学者在太平洋北部、地中海和加勒比海的原生动分子多样性研究,在采样设备的制造和使用、样品的收集和处理、后续实验操作以及数据处理等方面,都已积累大量经验,值得我们学习和借鉴。

如前所述,物种多样性和分子多样性的研究手段各有所长,需将二者有机结合以达成互补。将荧光原位杂交技术改进并与扫描电镜技术相结合来进行原生动多样性的研究,就是一个很好的例子。这种

方法,在样品采集的初级阶段,同时收集分别用于分子多样性分析和荧光原位杂交-扫描电镜观察的双份样品。通过分子手段得到代表特殊、新奇类群的序列信息,据此合成 rRNA 探针、绑定荧光基团进行原位杂交,找到特殊、新奇种类位置并通过扫描电镜观察,从而准确刻画其形态特征^[59]。

积极开展我国的深远海生物多样性调查,并与国际领先团队进行学术交流、共同开发探索未知新领域,对我国未来研究海洋原生动多样性组成、分布格局、环境响应机制及生态功能等方面具有巨大的推动作用。在这一过程中,我国也将摸索出海洋生物多样性研究的宝贵经验,培养出新一代探索海洋微生物多样性的综合性研究团队,为深远海生态系统的开发和利用奠定重要基础。

参考文献:

- [1] Hausmann K, Hülsmann N, Radek R. Protistology [M]. 3rd Edition. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 2003.
- [2] 宋微波, 徐奎栋, 施心路, 等. 原生动物种学专论 [M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999: 1-362.
- [3] Appeltans W, Ahyong S T, Anderson G, et al. The magnitude of global marine species diversity [J]. Current Biology, 2012, 22: 2189-2202.
- [4] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布 [M]. 北京: 海洋出版社, 2008: 1-1191.
- [5] 黄宗国, 林茂. 中国海洋物种和图集 [M]. 北京: 海洋出版社, 2012: 1-1380.
- [6] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 1-1267.
- [7] 宋微波, Warren A, 胡晓钟. 中国黄渤海的自由生纤毛虫 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1-518.
- [8] Clark M R, Schlacher T A, Rowden A A, et al. Science priorities for seamounts: research links to conservation and management [J]. PLoS ONE, 2012, 7: e29232.
- [9] De Forges B R, Koslow J A, Poore G C B. Diversity and endemism of the benthic seamount fauna in the southwest Pacific [J]. Nature, 2000, 405: 944-947.
- [10] Azam F, Fenchel T, Field J G, et al. The ecological role of water-column microbes in the sea [J]. Marine Ecology Progress Series, 1983, 10: 257-263.
- [11] Kuipers B R, De Wilde P A W J, et al. Energy flow in a

- tidal flat ecosystem [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1981, 5: 215-221.
- [12] Porter K G, Sherr E B, Sherr BF. Protozoa in planktonic food webs [J]. *Journal of Protozoology*, 1985, 32: 409-415.
- [13] Sherr E B, Sherr B F. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81, 293-308.
- [14] Taylor G T. The role of pelagic heterotrophic protozoa in nutrient cycling: a review [J]. *Ann Inst Océanogr (Paris)*, 1982, 58: 227-241.
- [15] 郑守仪, 谭智源. 有孔虫和放射虫的研究 [J]. *海洋科学*, 1979, S1: 74-75.
- [16] 谭智源. 海洋领域放射虫研究五十年 [J]. *微体古生物学报*, 2007, 24: 374-384.
- [17] Corliss B H. Microhabitats of benthic foraminifera within deep-sea sediments [J]. *Nature*, 1985, 314: 435-438.
- [18] Corliss B H, Brown C W, Sun X, et al. Deep-sea benthic diversity linked to seasonality of pelagic productivity [J]. *Deep-Sea Research I*, 2009, 56: 835-841.
- [19] Lampitt R S, Salter I, Johns D. Radiolaria: major exporters of organic carbon to the deep ocean [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2009, 23: GB1010.
- [20] 张江勇, 汪品先. 深海研究中的底栖有孔虫: 回顾与展望 [J]. *地球科学进展*, 2004, 19: 545-551.
- [21] Kouris A, Juniper S K, Frébourg G, et al. Protozoan-bacterial symbiosis in a deep-sea hydrothermal vent foraminiferal ciliate (*Folliculinopsis* sp.) from the Juan de Fuca Ridge [J]. *Marine Ecology*, 2007, 28: 63-71.
- [22] Buck K R, Barry J P, Simpson A G B. Monterey Bay cold seep biota: Euglenozoa with chemoautotrophic bacterial epibionts [J]. *European Journal of Protistology*, 2000, 36: 117-126.
- [23] Buck K R, Bernhard J M. Protistan-Prokaryotic symbioses in deep-sea sulfidic sediments [C]// Seckbach J. *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Kluwer Academic Publishers, 2002: 509-517.
- [24] Dale B, Dale A L, Jansen F. Dinoflagellate cysts as environmental indicators in surface sediments from the Congo deep-sea fan and adjacent regions [J]. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2002, 185: 309-338.
- [25] Simonite T. Protists push animals aside in rule revamp [J]. *Nature*, 2009, 438: 8-9.
- [26] Kruger K, Grabowski P J, Zaug A J, et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena* [J]. *Cell*, 1982, 31: 147-157.
- [27] Greider C W, Blackburn E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts [J]. *Cell*, 1985, 43: 405-413.
- [28] 熊杰, 陆星亦, 陆钰明, 等. 四膜虫基因表达数据库: 四膜虫全基因组基因表达芯片和协同表达分析的数据资源 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 1087-1089.
- [29] Martin W, Müller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote [J]. *Nature*, 1998, 392: 37-41.
- [30] Cody G D, Boctor N Z, Filley T R, et al. Primordial carbonylated iron-sulfur compounds and the synthesis of pyruvate [J]. *Science*, 2000, 25: 1337-1340.
- [31] Horikoshi K. Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1: 291-295.
- [32] Kennish M J. (ed.) *Practical Handbook of Marine Science 2nd edn* [M]. USA: CRC Press, 1994: 236-237.
- [33] Van Dover C L. *The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents* [M]. USA: Princeton University Press, 2000: 1-352.
- [34] Pace N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere [J]. *Science*, 1997, 276: 734-740.
- [35] Rothschild L J, Mancinelli R L. Life in extreme environments [J]. *Nature*, 2001, 409: 1092-1101.
- [36] Kitazato H, Ohga T. Seasonal changes in deep-sea benthic foraminiferal populations: results of long-term observations at Sagami Bay, Japan [J]. *Biogeochemical Processes and Ocean Flux in the Western Pacific*, 1995: 331-342.
- [37] Hausmann K, Hülsmann N, Polianski I, et al. Composition of benthic protozoan communities along a depth transect in the eastern Mediterranean Sea [J]. *Deep-Sea Research*, 2002, 49: 1959-1970.
- [38] Atkins M S, Teske A P, Anderson O R. A survey of flagellate diversity at four deep-sea hydrothermal vents in the Eastern Pacific Ocean using structural and molecular approaches [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2000, 47: 400-411.
- [39] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecol-

- ogy [J]. *Molecular microbial ecology manual*, 2004, 1 and 2: 743-760.
- [40] Edgcomb V, Orsi W, Bunge J, et al. Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2011, 5, 1344-1356.
- [41] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457: 480-484.
- [42] Quince C, Lanzén A, Curtis T P, et al. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data [J]. *Nature Methods*, 2009, 6: 639-641.
- [43] Reeder J, Knight R. The 'rare biosphere': a reality check [J]. *Nature Methods*, 2009, 6: 636-637.
- [44] López-García P, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C, et al. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton [J]. *Nature*, 2001, 409: 603-607.
- [45] Takishita K, Dadizoe N, Yoshida T, et al. Molecular evidence that phylogenetically diverged ciliates are active in microbial mats of deep-sea cold-seep sediment [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2010, 57: 76-86.
- [46] Stock A, Breiner H, Pachiadaki M, et al. Microbial eukaryote life in the new hypersaline deep-sea basin Thetis [J]. *Extremophiles*, 2012, 16: 21-34.
- [47] Edgcomb V, Orsi W, Leslin C, et al. Protistan community patterns within the brine and halocline of deep hypersaline anoxic basins in the eastern Mediterranean Sea [J]. *Extremophiles*, 2009, 13: 151-167.
- [48] Coyne K J, Countway P D, Pilditch C A, et al. Diversity and distributional patterns of ciliates in Guaymas basin hydrothermal vent sediments [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2013, 60: 433-447.
- [49] Orsi W, Edgcomb V, Jeon S, et al. Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. II. Habitat specialization [J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2011, 5: 1357-1373.
- [50] Baas Becking L G M. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde [M]. The Hague, the Netherlands: W. P. Van Stockum & Zoon (in Dutch), 1934: 1-263.
- [51] Patterson D J. Seeing the big picture on microbe distribution [J]. *Science*, 2009, 325: 1506-1507.
- [52] Fenchel T, Finlay B J. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity [J]. *BioScience*, 2004, 54: 777-784.
- [53] Finlay B J. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species [J]. *Science*, 2002, 296: 1061-1063.
- [54] Nanney D L. No trivial pursuit [J]. *BioScience*, 2004, 54: 720-721.
- [55] Foissner W. Biogeography and dispersal of microorganisms: a review emphasizing protists [J]. *Acta Protozoologica*, 2006, 45: 111-136.
- [56] Azovsky A, Mazei Y. Do microbes have macroecology? Large-scale patterns in the diversity and distribution of marine benthic ciliates [J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2013, 22: 163-172.
- [57] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere" [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2006, 103: 12115-12120.
- [58] Baldauf S L. The deep roots of Eukaryotes [J]. *Science*, 2003, 300: 1703-1706.
- [59] Orsi W, Edgcomb V, Faria J, et al. Class Cariatotrichea, a novel ciliate taxon from the anoxic Cariaco Basin, Venezuela [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 1425-1433.
- [60] Dawson S C, Pace N R. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 8324-8329.
- [61] Stoeck T, Taylor G T, Epstein S S. Novel eukaryotes from the permanently anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 5656-5663.
- [62] Wit R, Bouvier T. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8: 755-758.
- [63] 徐奎栋. 海洋微型底栖生物的多样性与地理分布 [J]. *生物多样性*, 2011, 19: 661-675.

(本文编辑: 梁德海)