

# 环境对甲烷渗漏区海洋沉积物微生物生长特性的影响

魏雪芹<sup>1,2,3\*</sup>, 梁钧玮<sup>1</sup>, 高一爻<sup>1</sup>, 应杰桐<sup>1</sup>, 江帅<sup>1</sup>

1 宁波工程学院 材料与化学工程学院, 浙江 宁波

2 天津大学浙江研究院, 浙江 宁波

3 中国科学院广州能源研究所, 广东 广州

魏雪芹, 梁钧玮, 高一爻, 应杰桐, 江帅. 环境对甲烷渗漏区海洋沉积物微生物生长特性的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2718-2735.

WEI Xueqin, LIANG Junwei, GAO Yiyao, YING Jielü, JIANG Shuai. Environmental factors influence the microbial growth characteristics in marine sediments of methane leakage areas[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(6): 2718-2735.

**摘要:** 【目的】从研究区域自然环境中获得目标微生物富集体并建立纯培养, 完善甲烷渗漏区生物地球化学基础研究的关键环节, 为其他未知微生物的富集与培养提供思路和借鉴。【方法】对甲烷渗漏区域海洋沉积物微生物进行分离和培养, 提炼一套较为完善的海洋微生物实验方法, 包括微生物样品现场处理、厌氧培养基配制与灭菌、微生物富集培养与分离等。利用微生物高通量测序技术进行基因测序与菌群鉴定, 并设置不同的实验条件和实验周期, 开展微生物活体培养实验。短期实验(1.5 d)采用单因子变量方法研究环境因素(光照、培养基浓度、温度、酸碱度)对微生物的影响; 中期实验(22 d)验证短期实验结果, 并确定更适宜的培养条件; 长期实验(250 d以上)通过对微生物实时定量追踪, 进一步研究微生物富集体在特定条件下的生长状况和活性表达。【结果】短期培养中, 厌氧污泥菌液在自然光照下活性显著提升(17 h 达峰值, 铁浓度 16.7 mg/L, 约为初始浓度 4 倍), 黑暗环境则延长其缓冲期(0-15 h), 而海洋底泥菌液在黑暗环境中活性更优(14 h/35 h 出现高值), 且在酸碱环境(pH 5.0/9.0)后期活性高于中性(铁浓度分别约为 4.3 mg/L vs. 11.1 mg/L)。中期培养阶段, 厌氧污泥菌液在 4 °C+酸性条件下活性稳定(铁浓度降幅仅为 20%), 而海洋底泥菌液偏好较高温度及碱性环境(pH 9.0 适应后活性提升)。全局分析显示, 前 15 天为温度适应期, 此后温度成为关键调控因子。长期培养中, 厌氧污泥菌液活性呈周期性波动(每 50 d 更换培养基引发先降后升), 但 150 d 后出现不可逆衰减; 海洋底泥菌液则表现出强适应性(高压下 117-145 d 活性达峰值, 推测生长周期约为 130 d), 且在室压下维持锯齿状稳定活性(铁浓度 3.0-10.4 mg/L)。【结论】厌氧污泥微生物对光照和培养基浓度敏感, 短期光照促进活性, 但长期抑制, 黑暗及 100% 浓度培养基更适其生长(4 °C 酸性环境, 15 d 生长周期); 而海洋底泥微生物在黑暗+100% 培养基、高温碱性环境下适应性更强, 虽短期活性受光照影响小, 但需约 130 d 生

资助项目: 天津大学浙江研究院专项基金(ZITJU2024-ZYHY004)

This work was supported by the Specialty Fund of Zhejiang Institute of Tianjin University (ZITJU2024-ZYHT004).

\*Corresponding author. E-mail: wxq163673@163.com

Received: 2025-04-15; Accepted: 2025-05-14; Published online: 2025-05-21

长周期, 其高压环境适应性显著影响生长进程。

关键词: 甲烷渗漏区; 厌氧微生物; 微生物培养实验

## Environmental factors influence the microbial growth characteristics in marine sediments of methane leakage areas

WEI Xueqin<sup>1,2,3\*</sup>, LIANG Junwei<sup>1</sup>, GAO Yiyao<sup>1</sup>, YING Jielü<sup>1</sup>, JIANG Shuai<sup>1</sup>

1 College of Materials and Chemical Engineering, Ningbo University of Technology, Ningbo, Zhejiang, China

2 Zhejiang Institute of Tianjin University, Ningbo, Zhejiang, China

3 Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, China

**Abstract: [Objective]** To obtain the enriched groups of target microorganisms from the natural environment of the study area and establish the pure culture, improve the key link of the basic research on bio-geochemistry in methane leakage areas, and provide ideas and references for the enrichment and culture of other unknown microorganisms. **[Methods]** Microorganisms in marine sediments from methane leakage areas were isolated and cultured, and a sound experimental methodology for marine microorganisms was refined, including on-site treatment of microbial samples, preparation and sterilization of anaerobic culture media, and enrichment, culture, and isolation of microorganisms. High-throughput sequencing of microorganisms was conducted for gene sequencing and microbial identification, and different experimental conditions and experimental cycles were designed for *in vivo* microbial culture experiments. The short-term experiment (1.5 d) was conducted with the single factor method to study the effects of environmental factors (light, medium concentration, temperature, and pH) on microorganisms. The medium-term experiment (22 d) verified the results of the short-term experiment and determined the more suitable culture conditions. The long-term experiment (more than 250 d) was carried out to further study the growth status and activity of enriched microbial groups under specific conditions by real-time quantitative tracking of microorganisms. **[Results]** In the short-term culture, the activity of anaerobic sludge microbial suspension significantly increased under natural light (reached the peak at the time point of 17 h, with the iron concentration of 16.7 mg/L, four times the initial value), while the buffer period was prolonged in the dark environment (0–15 h). The activity of marine sediment microbial suspension was better in the dark environment (with high values at time points of 14 h/35 h), and the activity in the acid/base environment (pH 5.0/9.0) was higher than that in the neutral environment (iron concentrations of 4.3 mg/L vs. 11.1 mg/L, respectively). In the medium-term culture, the activity of anaerobic sludge microbial suspension was stable under 4 °C and acid conditions (with the decrease of only 20% in iron concentration), while the marine sediment microbial suspension preferred higher temperature and alkaline environment (with the activity increased after adaptation to pH 9.0). The global analysis showed that the first 15 days

were the temperature adaptation period, and then temperature became the key regulatory factor. In the long-term culture, the activity of anaerobic sludge microbial suspension fluctuated periodically (first decreasing and then increasing after change of the culture medium every 50 days), while it declined irreversibly after 150 d. The marine sediment microbial suspension showed strong adaptability (with the activity peaked on days 117–145 under high pressure and the estimated doubling cycle of about 130 d) and maintained serrated stable activity under room pressure (iron concentration of 3.0–10.4 mg/L). **[Conclusion]** Anaerobic sludge microorganisms are sensitive to light and medium concentration. Their activity is improved by short-term light but inhibited by long-term light. Dark environment and 100% concentration medium are more suitable for growth of anaerobic sludge microorganisms (4 °C, acidic environment, doubling cycle of 15 d). However, marine sediment microorganisms under the dark+100% medium and high temperature+alkaline environment conditions demonstrate stronger adaptability. Although their short-term activity is less affected by light, it takes about 130 days to double, and the adaptability to the high pressure environment significantly affects the growth process.

**Keywords:** methane leakage areas; anaerobic microorganisms; microbial culture experiments

海洋是地球上最大的生态系统，蕴藏着巨大的微生物量。海洋微生物研究始于 19 世纪中叶，描述性的调查研究始于 19 世纪末期<sup>[1]</sup>。随着深海样品采集技术的逐步进步和分子生物学技术的迅猛发展，科学家在微生物菌群鉴定、功能预测等方面取得了巨大突破。研究证明，海底生物圈中仍存在众多未培养、系统发育途径未知的微生物。20 世纪引入的 Illumina 高通量 DNA 测序技术，通过建立微生物基因组序列数据库，使微生物研究逐渐形成体系，也极大地丰富了海洋微生物的研究范围和内容<sup>[2]</sup>。近年来，我国研究人员对来自世界各地的海洋微生物多样性进行了调查，包括墨西哥湾、南开海槽、西沙海域、北大西洋、太平洋和中国南海等。结果显示，尽管不同海域来源的微生物在物种组成、代谢类型、功能基因组成和生态功能上有所区别，但绝大多数海洋微生物具有较为一致的特征，包括<sup>[3-5]</sup>：较强的适应性；生长传代需消耗外界营养，如钠、钾、钙、镁、磷、铁、氮等(化能自养微生物除外)；大部分海洋微生物的代谢类型属于兼性厌氧或严格厌氧，与低氧或无氧的海洋环境相适应；与一般微生物相比，海洋微生物实验培养生长缓慢，倍增或

传代时间较长，菌落也相对较小。

尽管高通量测序技术为分析微生物群落信息提供了便利，但分离培养微生物实验仍然是微生物学研究中的重要环节，对于深入理解特定微生物群落的生态学、生理学和遗传学等具有重要意义。然而，目前在实验室条件下，大量微生物种类仍难以被培养。截至目前，能够在实验室条件下培养的海洋微生物不到其微生物总数的 1%<sup>[6]</sup>。通过传统的微生物分离培养方法获得的海洋微生物，不能完全指示海洋微生物多样性及其所代表的真实类群，因此阻碍了特异性微生物富集体的进一步研究。开展典型地区海洋微生物培养实验研究，有助于加深对生命本质的认识，也为开发特殊海洋环境的微生物酶等提供指导和借鉴。微生物实验研究在深入理解生命奥秘、生物地球化学循环、疾病预防与控制、资源利用与生物技术应用等诸多方面，具有重要的科学价值<sup>[7]</sup>。由于海水中生物和非生物之间频繁的物质和能量交换，海水表层，特别是厘米级别表层沉积物中微生物的特性，常用于指示当地生物地球化学环境的重要信息<sup>[8]</sup>。近年来，人们逐渐意识到沉积物和水体的分界面(sediment-water interface, SWI)及海底的

边界层(benthic boundary layer, BBL)中的微生物数量、分布及其活动在生物地球化学过程中的重要性<sup>[1,6]</sup>。

本研究对甲烷渗漏区表层沉积物样品进行处理,通过海洋微生物前处理实验,在微生物多样性研究的基础上,对具备实验室培养条件的样品开展微生物培养实验。通过提炼实验方法,建立了微生物培养方法体系,同时研究了短期、中期、长期等不同培养周期内微生物富集体的生长状况及影响机制。本研究揭示了来自甲烷渗漏区的海洋微生物在特定实验环境中的生长规律和特点,以期富集培养微生物提供重要参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品采集

样品编号 A1、C1-C4 来自西非和几内亚湾甲烷渗漏区,由魏雪芹于 2020 年 1 月随“竺可

桢号”船(中国大洋 57 航次第四航段)海上科学考察时获得。样品编号 B1-B6 来自中国南海北部甲烷渗漏区,由上海大学陈学萍科研团队经多次传代富集培养所得,具有一定的富集培养基础。具体信息见表 1 和表 2。

### 1.2 样品现场处理

CTD 水样中的微生物分别用 0.45  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜进行两级过滤,约每 5 L 水样制备 1 个水样微生物样品,并将滤膜置于无菌冻存管中,待分离培养。C1-C4 样品制样时,先去除样品表面沉积物以防止污染,再采用无菌采样器采集靠近重力柱内部、未被污染的沉积物,置于无菌离心管或无菌袋内,并于 4  $^{\circ}\text{C}$  和 -20  $^{\circ}\text{C}$  分别保存。4  $^{\circ}\text{C}$  保存的样品用于微生物培养实验,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存的样品用于分离提取 DNA,进行微生物高通量测序和菌群鉴定<sup>[9-10]</sup>。

### 1.3 样品微生物高通量测序

在开展微生物培养实验之前,先对样品进

表1 样品编号信息统计

Table 1 Statistics of sample number information

Sample name	Sample number	Source	Sample type	Remarks
1-CTD01 (conductivity, temperature, depth)	A1	Sampling at sea	CTD water sample	Raw untreated sample
2-sediment 1	B1	Shanghai University	Anaerobic sludge bacterial liquid	Enrichment culture of several generations of samples
3-sludy	B2	Shanghai University	Marine sediment bacterial liquid	Enrichment culture of several generations of samples
4-sediment 2	B3	Shanghai University	Hai1#	Enrichment culture of several generations of samples
5-sediment 3	B4	Shanghai University	Anaerobic sludge bacterial liquid	Enrichment culture of several generations of samples
6-sediment 4	B5	Shanghai University	Hai1#	Enrichment culture of several generations of samples
7-pot1	B6	Shanghai University	Marine sediment bacterial liquid	Enrichment culture of several generations of samples
1-GC04	C1	Gulf of Guinea	Muddy sediment sample	Raw untreated sample
2-GC08	C2	Gulf of Guinea	Muddy sediment sample	Raw untreated sample
3-GC07	C3	Gulf of Guinea	Muddy sediment sample	Raw untreated sample
4-GC12	C4	Gulf of Guinea	Muddy sediment sample	Raw untreated sample

表2 取样点信息

Table 2 Detailed information of the sampling sites

Sample number	Longitude	Latitude	Water depth (m)
B1, B4	115°03'36"E	19°28'48"N	1 560
B3, B5	115°34'12"E	19°36'00"N	1 240
B2, B6	114°27'00"E	19°31'12"N	805
A1	5°24'18"E	3°34'31"N	1 400
C1	3°34'15"N	5°24'30"E	1 377
C2	27°52'50"S	13°24'53"E	2 464
C3	2°29'27"N	4°30'57"E	3 654
C4	5°00'20"N	2°47'35"E	3 423

行高通量测序, 以获得各样品的菌群信息。A1、B1–B6 样品直接采用水样测微生物高通量测序方法, 该方法已较为成熟, 此处不再赘述。沉积物中的微生物 DNA 提取实验由上海美吉生物医药科技有限公司开展。参照 DNeasy PowerSoil® Pro Kits (Qiagen 公司) 使用说明书提取 DNA。为了减少使用不同程序可能引起的偏差, 所有批次的 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增和测序均使用相同的程序, 在同一实验室、同一时间段进行。设置阴性对照实验, 用 5 mL Milli-Q 水 (Millipore 公司) 代替沉积物。为减少实验误差, 对每个样本做 3 次重复抽提, 并将获得的 DNA 充分混合均匀。样品相关数据见表 3。

对符合要求可进一步实验的样品通过 PCR 进行 16S rRNA 基因扩增和测序。扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 高变区, 引物对选用 338F (5'-ACTCCTACGGGCGGACGCA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'); 扩增古菌 16S rRNA 基因 V4–V5 区, 引物对选用 524F10extF (5'-TGYCAGCCGCCGCGTAA-3') 和 Arch-958RmodR (5'-YCCGGCGTTGAVTCCA ATT-3')<sup>[11–12]</sup>。PCR 由上海美吉生物医药科技有限公司完成。同时对 DNA 提取的阴性对照组进行 PCR 扩增, 以评估实验污染。

为了避免过度放大, 运行时根据 DNA 浓度

表3 样品相关数据

Table 3 Sample related data

Sample name	Sample number	Concentration (ng/L)
1-CTD01	A1	Low
2-sediment 1	B1	Low
3-sludy	B2	0.10
4-sediment 2	B3	Low
5-sediment 3	B4	Low
6-sediment 4	B5	0.10
7-pot1	B6	0.12
1-GC04	C1	0.23
2-GC08	C2	0.13
3-GC07	C3	0.13
4-GC12	C4	0.10

将 PCR 循环次数设为 27–37 次, 并在初步 PCR 结果的基础上监测 PCR 扩增的趋势曲线。质检时剔除长度较短、质量较低的序列, 挑出合格样品, 在 Illumina 平台上进行 PCR 扩增。采用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的完整性和分散性, 检测参数设置为 1% 琼脂糖凝胶, 电压 5 V/cm, 检测时间 20 min。将提取的基因片段映射到 SILVA 数据库 (<http://www.arb-silva.de>) 进行分类归属。在 Illumina MiSeq PE300 平台上使用两端模式生成测序文库并对文库进行测序<sup>[13]</sup>。通过基于 16S rRNA 基因的 Illumina 测序研究细菌和古菌物种群落组成, 原始数据存入 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 获得登录号分别为 PRJNA716136 和 PRJNA716149。

#### 1.4 无菌厌氧培养基组成与配制

根据微生物群落组成和采集环境, 实验采用的培养基为 2216E 厌氧+特定厌氧组合培养基。2216E 厌氧培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母浸出粉 1.0, 氯化钠 19.45, L-半胱氨酸盐 0.01, 刃天青 0.001。特定厌氧培养基(g/L): 乙二胺四乙酸二钠 0.01, 四水合氯化锰 0.5, 六水合氯化钴 0.25, 氯化锌 1.3, 氯化铜 0.1, 无水氯化铝 0.1, 硼酸 0.1, 二水钼酸钠 0.25, 六水氯化镍 0.25, 钨酸钠 0.25, 氯化铵 1.604 7, 磷酸二氢

钠 1.560 1, 氯化钾 1.118 3, 氯化钠 5.854 4, 柠檬酸铁 2.204 5, 乳酸钠 0.7 mL。

特定厌氧培养基组分及浓度的确定, 充分考虑了微生物样品的群落组成和采样环境信息, 包括甲烷和氢气等气体浓度、总有机碳(total organic carbon, TOC)浓度、阴离子( $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ )、阳离子( $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ )等信息。此外, 微生物多样性与环境因子之间的相关性分析也是确定本研究微生物培养实验特定培养基的重要依据<sup>[14-15]</sup>。为进一步保障培养基的中性环境, 培养基配制完成后, 使用 1.0 mol/L 浓度的 HCl 或 1.0–5.0 mol/L 浓度的 NaOH 调节培养基酸碱度至中性(pH 约 7.6)。由于所有菌液均来自厌氧环境, 因此全实验过程严格执行无菌和厌氧操作。为减小实验误差, 配好的培养基须立即分装至顶空厌氧培养瓶中, 并持续通入氮气, 与瓶内空气进行气体置换后, 迅速盖紧丁基橡胶塞瓶盖密封。

## 1.5 微生物富集培养与分离实验

取 1 mL 沉积物样品, 加入高压蒸汽灭菌处理的陈海水稀释, 制成浓度梯度为  $10^{-1}$  的样品稀释液, 振荡均匀, 备用。在厌氧条件下, 将微生物稀释液样品置于与样品采集地相同的 4 °C、0.1 MPa 环境下, 接种到特定厌氧培养基上富集培养(4 °C、80 r/min 培养 10 min)。取富集后的微生物样品厌氧涂布于 2216E 培养基, 选取菌落数在 50–100 个之间的培养基平板进行分离培养。

经多次富集与分离培养后, 取 2 mL 微生物菌液接种至 50 mL 特定厌氧培养基中, 充入甲烷气体, 重复培养多次, 以获得纯度较高的微生物菌液。

## 1.6 不同周期的微生物培养实验

### 1.6.1 短期培养实验

短期培养实验采用单因子变量方法, 设置多组实验, 研究短期光照、培养基组成、温度及酸碱度等 4 个环境因素对微生物菌群的影响。

默认条件: 黑暗避光、100% 培养基、室温、pH 值 7.0。实验全周期: 36 h, 取样间隔 3 h。光照对比: 设 3 组, 分别为自然光照、黑暗避光、一定光照(超净工作台照明灯持续照明, 功率 20 W)。培养基浓度对比: 设 3 组, 分别为 100%、75%、50%。温度对比: 设 3 组, 分别为 4 °C、45 °C 和室温(自然环境中, 温度随环境温度变化)。酸碱度对比: 设 3 组, pH 分别为 5.0、7.0、9.0。具体实验分组如表 4 所示。

取 100 mL 顶空厌氧培养瓶, 加入 60 mL 培养基, 采用高压蒸汽灭菌(0.1 MPa, 20 min)后备用。用高纯氮气吹扫 20–30 min, 置换气体。取 5 mL 富集体菌液转移至培养瓶中, 注入 10 mL 甲烷。取 2 mL 培养基原液代替菌液, 作为空白对照组。2 h 预培养后, 每隔 3 h 取 0.8 mL 培养上清液, 10 000 r/min 离心 5 min 后, 采用邻菲罗啉显色法以及分光光度计测定  $\text{Fe}^{2+}$  浓度, 时间跨度设置为 36 h。为减少实验误差, 针对同一个分析条件同时开展 3 组平行实验, 且每组实验开展 2 轮, 取实验平均值进行统计, 本研究共有样本量 75 个。

### 1.6.2 中期培养实验

根据培养周期不同, 反应体系的配制与短期培养略有调整。中期培养实验在 100 mL 顶空厌氧培养瓶中进行, 培养体系包括 5 mL 富集体菌液、60 mL 柠檬酸铁培养基和 10 mL 甲烷(纯度 99.9%)。光照、培养基浓度、温度、pH 等实验条件设置与短期实验相同, 实验周期为 22 d, 取样间隔 6–7 d。

### 1.6.3 长期培养实验

探究不同菌液微生物(海洋底泥、厌氧污泥)在特定条件下的生长, 并对不同压力(常压 0.1 MPa 和高压 5.0 MPa)海洋底泥微生物长期生长及活性进行实时追踪。

常压长期和高压长期实验分别在 250 mL 顶空厌氧培养瓶和特制高压反应釜中进行(釜体积 250 mL)。长期培养实验体系组成为: 15 mL 富集体菌液、180 mL 特定柠檬酸铁培养基和

表4 实验设置

Table 4 Experimental setup

Number	Bacterial fluid	Light conditions	Medium concentration (%)	<i>T</i> /°C	pH	Remarks
Comparison 1: Sludy+light	1 Sludy	Natural light	100	Room temperature	7.0	Default condition
	2 Sludy	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	
	3 Sludy	A certain amount of light	100	Room temperature	7.0	
Comparison 2: Sludy+medium composition	4 Sludy	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	Default condition
	5 Sludy	Keep away from light in the dark	75	Room temperature	7.0	
	6 Sludy	Keep away from light in the dark	50	Room temperature	7.0	
Comparison 3: Sediments+light	7 Sediments	Natural light	100	Room temperature	7.0	Default condition
	8 Sediments	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	
	9 Sediments	A certain amount of light	100	Room temperature	7.0	
Comparison 4: Sediments+medium composition	10 Sediments	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	Default condition
	11 Sediments	Keep away from light in the dark	75	Room temperature	7.0	
	12 Sediments	Keep away from light in the dark	50	Room temperature	7.0	
Comparison 5: Sludy+temperature	13 Sludy	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	Default condition
	14 Sludy	Keep away from light in the dark	100	45	7.0	
	15 Sludy	Keep away from light in the dark	100	4	7.0	
Comparison 6: Sludy+pH	16 Sludy	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	5.0	Default condition
	17 Sludy	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	
	18 Sludy	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	9.0	
Comparison 7: Sediments+temperature	19 Sediments	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	Default condition
	20 Sediments	Keep away from light in the dark	100	45	7.0	
	21 Sediments	Keep away from light in the dark	100	4	7.0	
Contrast 8: Sediments+pH	22 Sediments	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	9.0	Default condition
	23 Sediments	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	
	24 Sediments	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	5.0	
Contrast 9: Default blank group	25 Blank group	Keep away from light in the dark	100	Room temperature	7.0	Blank

30 mL 甲烷(纯度 99.9%)。实验条件参照前述设置,且每种菌液设置 3 组平行实验,取平均值以减小实验误差。长期培养实验周期设置为 255 d, 取样间隔 6–7 d。为保证菌液正常生长,长期实验需每隔 50 d 向培养环境气相置换氮气

和甲烷,液相置换 20 mL 新鲜培养基。培养基更换前后,取液体样品,监测二价铁离子浓度。更换培养基后,通过补加柠檬酸铁溶液(浓度约 10 mmol/L)控制培养体系柠檬酸铁浓度与初始状态相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 原始样品微生物菌群鉴定结果

PCR 扩增后, 分析和鉴定样品微生物物种组成, 结果如图 1 所示。分析样品微生物群落组成, 在门分类水平上, 样品微生物优势菌群差异较大(图 1)。来自西非和几内亚湾甲烷渗漏区的 A1、C1-C4 样品微生物菌群以变形菌门(*Proteobacteria*)和泉古菌门(*Crenarchaeota*)为优势菌群, 而来自南海甲烷渗漏区的 B1-B6 样品微生物以广古菌门(*Euryarchaeota*)为优势菌群。

利用二维可视化的 PCoA 图进一步分析样品微生物群落的相似度和差异度, 结果见图 2。样品  $\beta$  多样性分析揭示, 所有样品中古菌比细菌更加分散, 且来自不同海域样品的微生物群落显著性差异较大。结合本研究设计的目的和更有针对性地开展微生物培养实验, 筛选出微生物群落组成更相似、群落组成差异也较小的 B1-B6 样品开展后续微生物富集培养与分离实验, 并结合高通量测序结果, 选择样品中的厌氧污泥菌液(B2)和海洋底泥菌液(B5、B6)作为实验对象。

### 2.2 富集培养后样品微生物群落组成与功能预测

采用高通量测序技术分析富集培养后样品的微生物群落组成, 实验操作方法与 1.3 节一致。样品的群落组成分析结果如图 3 所示。在目分类学水平上, 样品细菌中铁还原菌丰度高, 包括梭菌属(*Clostridium*)、地杆菌属(*Geobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、希瓦氏菌(*Shewanella*), 同时存在丰度高且与甲烷代谢相关的古菌群落, 如甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、类甲烷杆菌属(*Methanobacteroides*) (图 3)。

通过 PICRUST 对操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)丰度表进行标准化, 对 OTU 进行 COG 功能注释, 获得 OTU 在同源基因组簇(clusters of orthologous groups, COG)功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。进一步开展 PICRUST 菌群功能预测分析表明(图 4), 该地区微生物主要功能包括产甲烷、乙酸还原、甲基营养型、光营养和铁呼吸功能等。通过母液培养、传代以及纯化等, 获得了以柠檬酸铁和甲烷为营养物质的菌液, 并以此为基础分别开展短、中、长期的微生物活体培

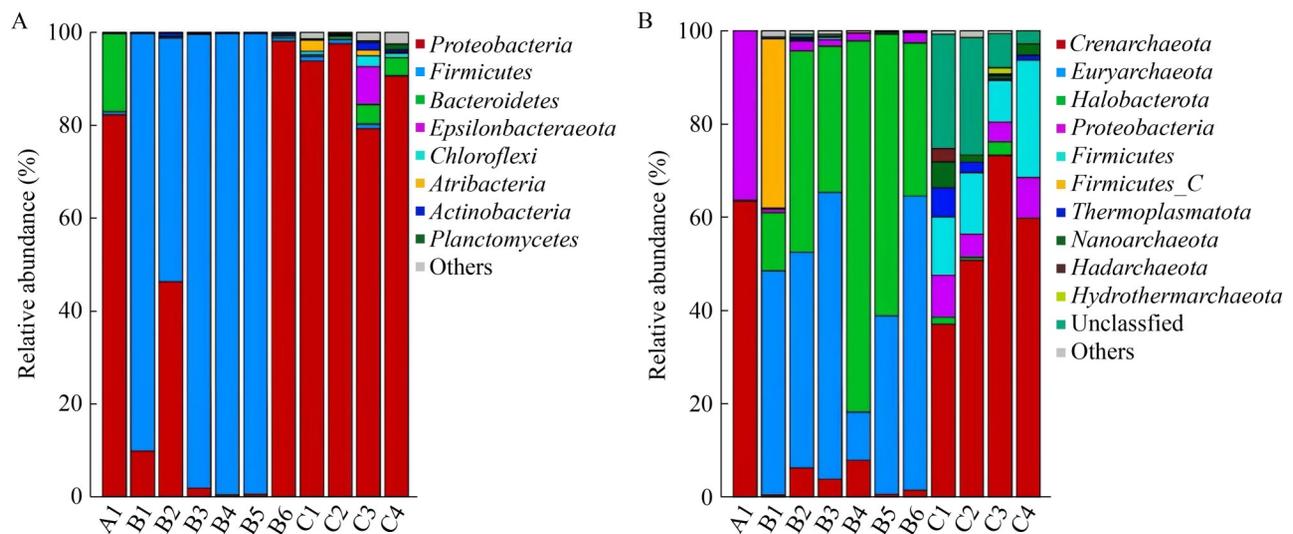


图1 样品微生物群落组成。A: 细菌; B: 古菌。

Figure 1 Sample microbial community composition. A: Bacteria; B: Archaea.

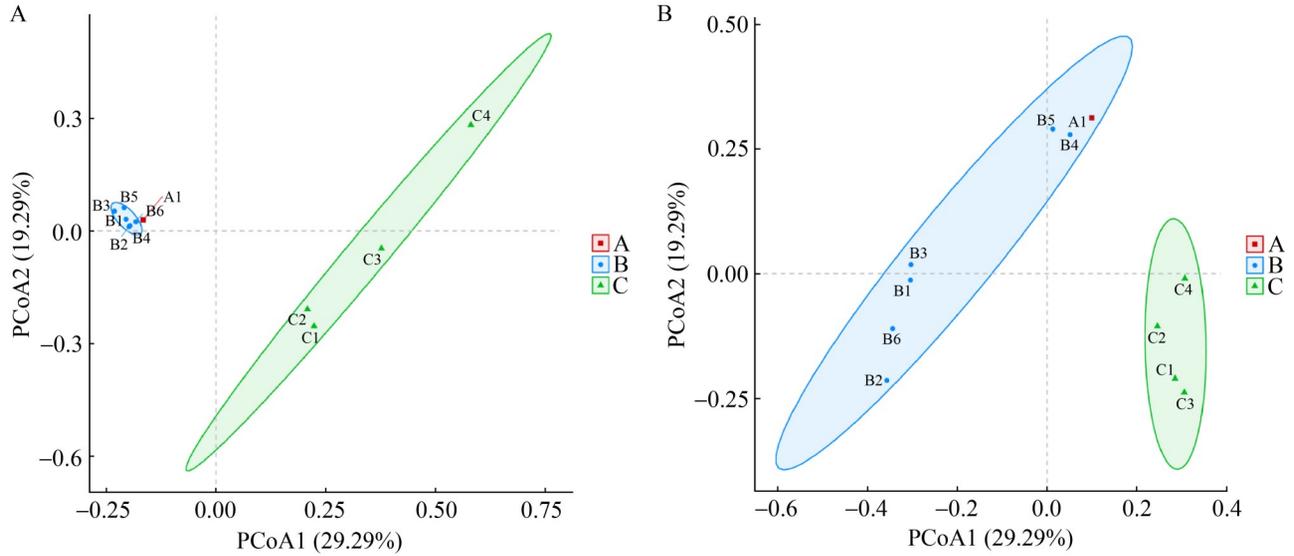


图2 样品PCoA图和 $\beta$ 多样性分析。A: 细菌; B: 古菌。

Figure 2 Sample PCoA and beta diversity analysis. A: Bacteria; B: Archaea.

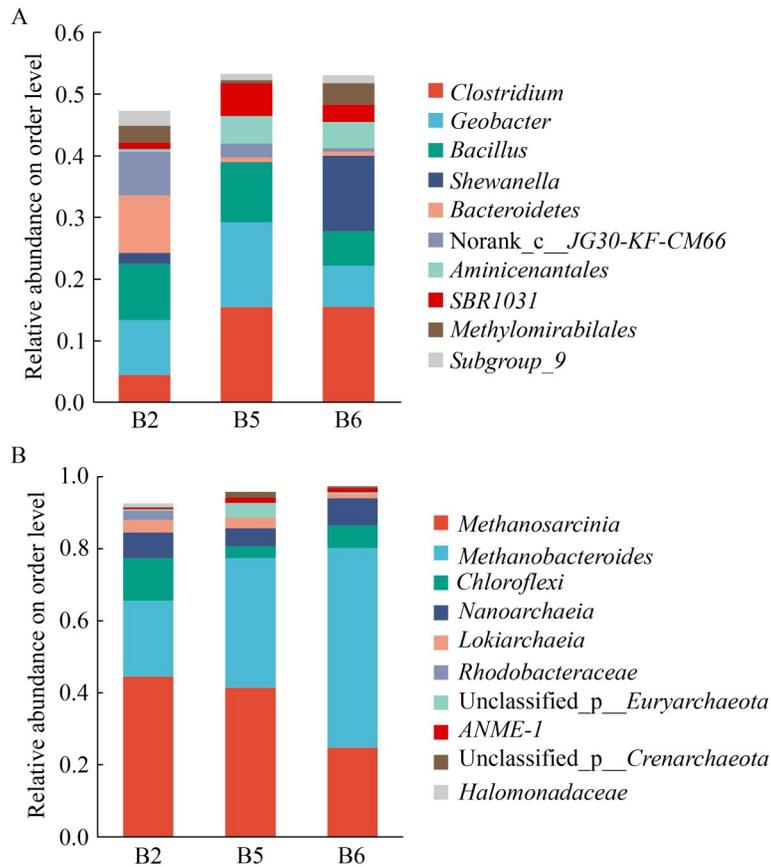


图3 富集培养微生物群落组成。A: 细菌; B: 古菌。

Figure 3 Enrichment of microbial community composition in cultured samples. A: Bacteria; B: Archaea.

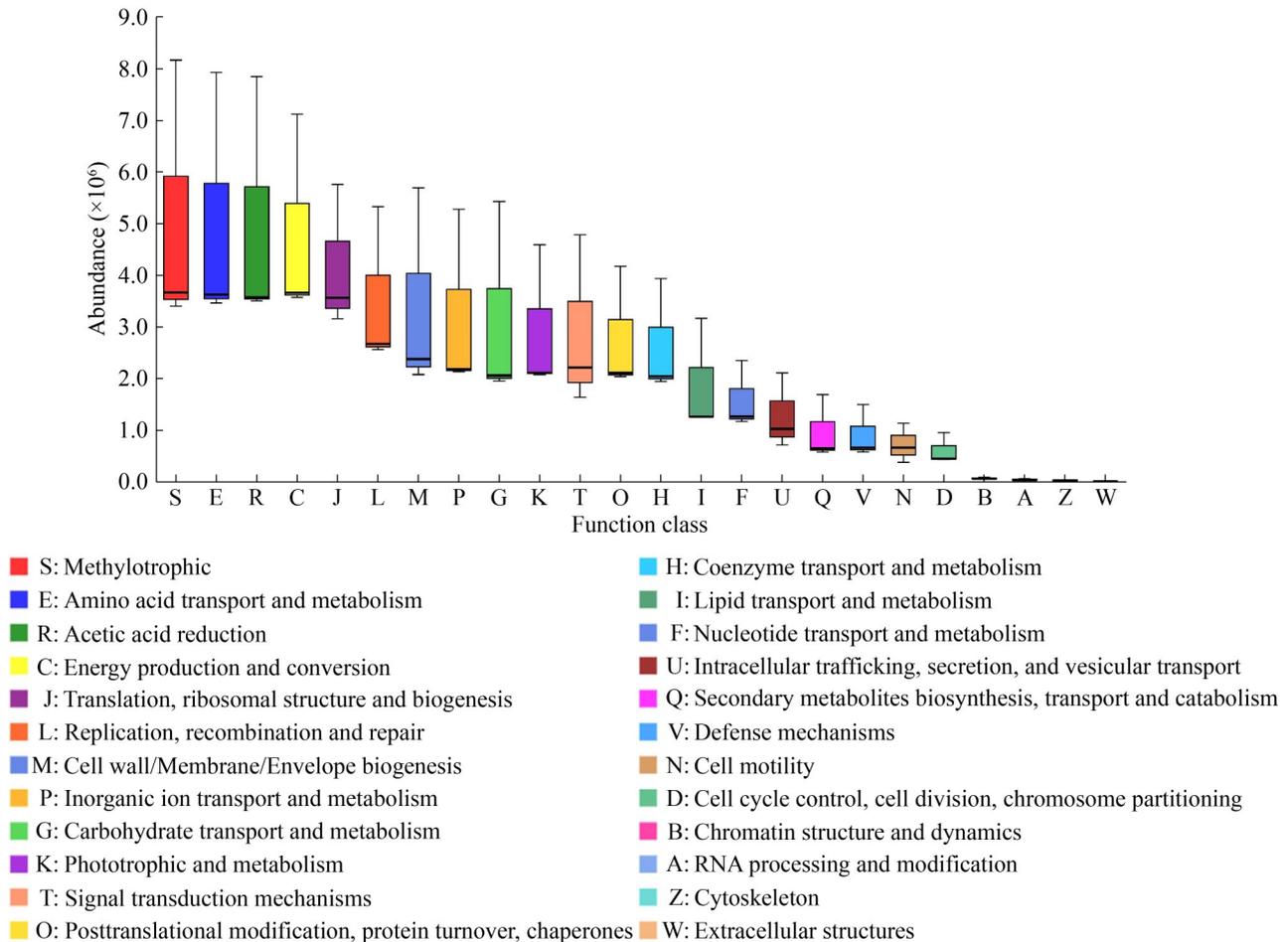


图4 富集培养微生物菌群功能预测

Figure 4 Functional prediction of enriched and cultured microbial flora.

养实验。实验时，以培养体系内二价铁离子浓度变化作为微生物富集体活性和生长状态的指征。对照实验为空白样培养基。

## 2.3 短期培养实验结果分析

### 2.3.1 光照条件优化结果

如图 5 所示，厌氧污泥菌液进入新环境的缓冲期约为 0–15 h。随后，菌液开始稳步生长。在不同光照条件下，厌氧污泥菌液微生物呈现相似的生长趋势。

海洋底泥菌液对光照反应的敏感性弱于厌氧污泥菌液。在一定光照条件下，微生物活性在 29 h 时上升，32 h 时恢复不活跃。在黑暗避光环境中，14 h 和 35 h 时活性出现较高值。

两种菌液对比发现，厌氧污泥菌液对光照条件反应更敏感。在一定光照条件下，菌液活性在培养 17 h 时达到最高值。

### 2.3.2 培养基浓度条件优化结果

如图 6 所示，厌氧污泥菌液在所有浓度培养基中均表现出较明显的生长活性。在培养的各个时间段，厌氧污泥菌液的活性在 100% 浓度培养基中最大，在 50% 浓度培养基中最小。短期培养的后期，75% 浓度培养基中的菌液活性和生长速度明显加快，尤其是在后期很可能超越 100% 培养基。

海洋底泥菌液在 100% 浓度培养基中的活性最高。除培养时段的中后期出现差别外，在

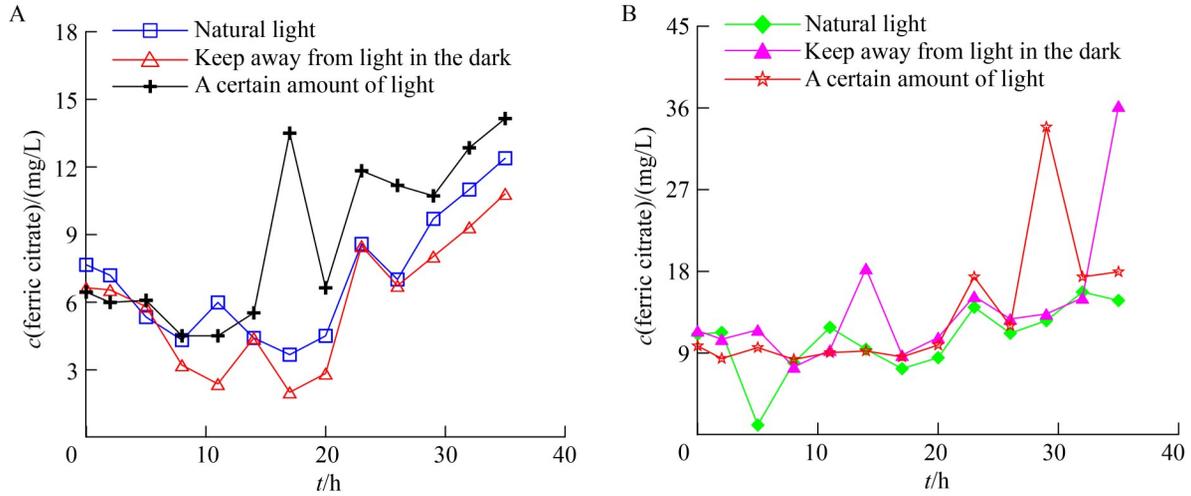


图5 光照对微生物短期培养的影响

Figure 5 Effect of light on short-term culture of microorganisms. A: Sludge; B: Sediments.

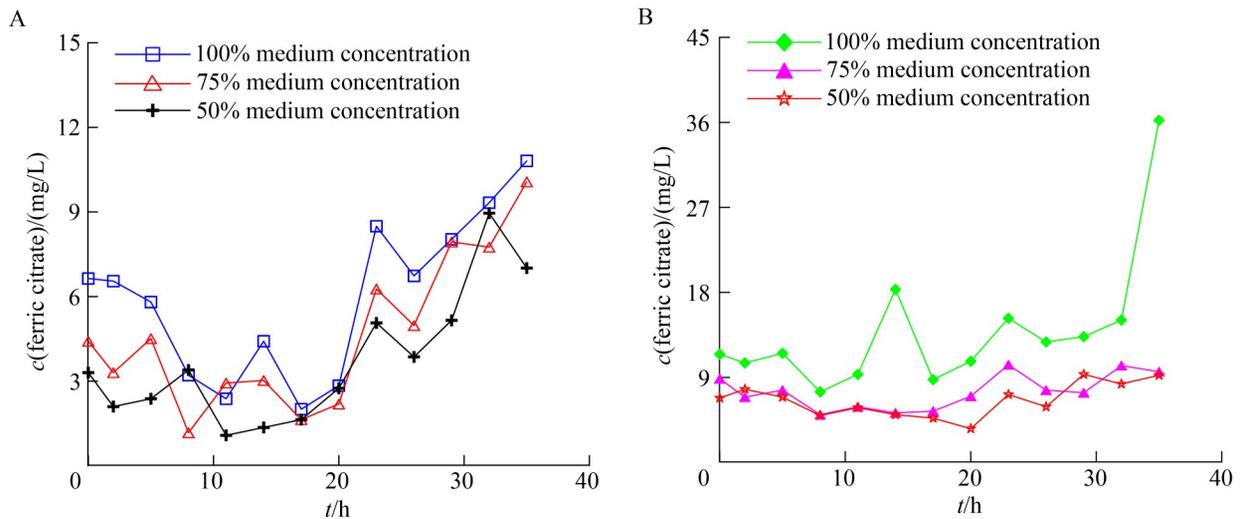


图6 培养基浓度对微生物短期培养的影响

Figure 6 Effect of medium concentration on short-term microbial culture. A: Sludge; B: Sediments.

75% 和 50% 浓度培养基中其生长状况较为一致。在短期培养至 17–26 h 时，75% 浓度培养基的生长略高于 50% 浓度。35 h 时 100% 浓度培养基海洋底泥菌液活性明显提高。

### 2.3.3 温度条件优化结果

如图 7 所示，厌氧污泥菌液面对温度变化，首先出现短暂适应和缓冲期，9 h 前微生物菌液活性均下降。对比不同温度，4 °C 条件

下菌液反应最强烈，17 h 铁离子最高浓度为 16.7 mg/L，约为初始浓度的 4 倍，23 h 时第二次活跃，约为初始浓度的 3 倍。45 °C 条件下，厌氧污泥菌液仅出现 1 次较强烈的反应，20 h 时铁离子最高浓度为 18.0 mg/L，约为初始浓度的 2.8 倍。

海洋底泥菌液在室温下活性较为平稳，在 4 °C 和 45 °C 活性较高。培养 23 h 后，4 °C 环境更适合海洋底泥菌液微生物的活性表达，在

26 h 和 29 h 时间段, 二价铁离子的平均浓度约为 22.9 mg/L, 是初始浓度的 4.6 倍。

### 2.3.4 酸碱度条件优化结果

如图 8 所示, pH 值为 5.0、7.0 和 9.0 分别对应酸性、中性和碱性环境。在不同的酸碱环境中接种微生物菌液, 发现中性环境中初始二价铁浓度值约为 11.1 mg/L, 而酸性和碱性环境的初始二价铁浓度均较低(约为 4.3 mg/L)。培养

至 17 h 时, 所有体系内的微生物活性达到最高值。

海洋底泥菌液在不同 pH 值中的活性无明显区别, 均呈锯齿状变化, 在 8–17 h 和 23–32 h 出现明显的活性增强。

## 2.4 中期培养实验结果分析

### 2.4.1 光照条件优化结果

厌氧污泥菌液在所有光照条件下, 其活性

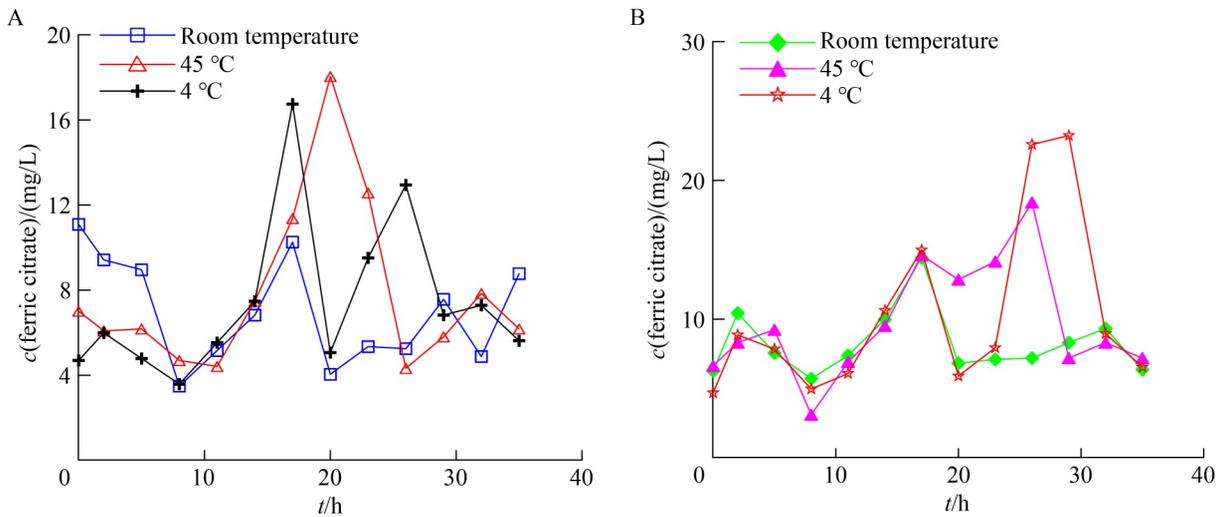


图7 温度对微生物短期培养的影响

Figure 7 Effect of temperature on short-term culture of microorganisms. A: Slurry; B: Sediments.

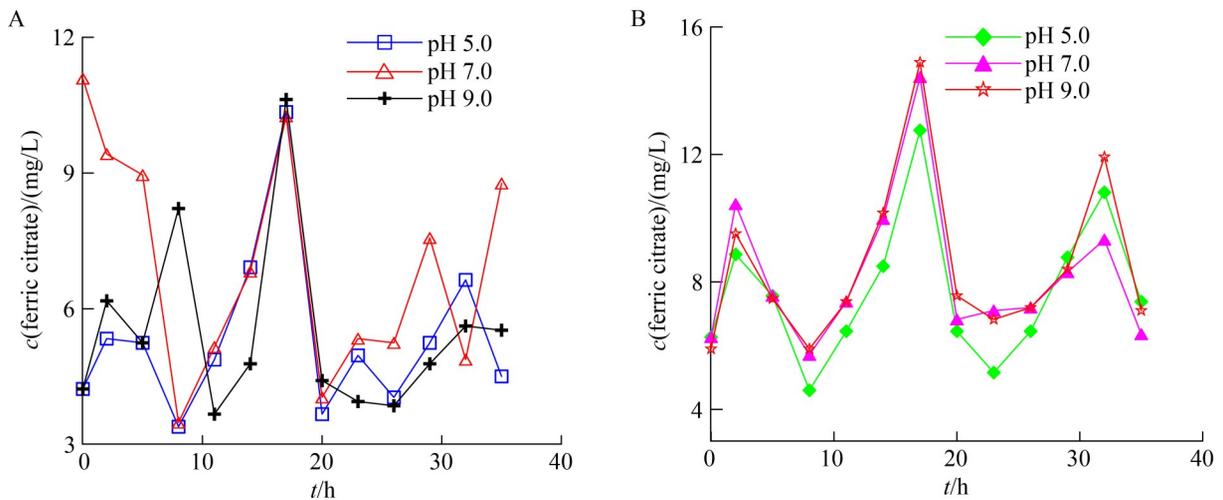
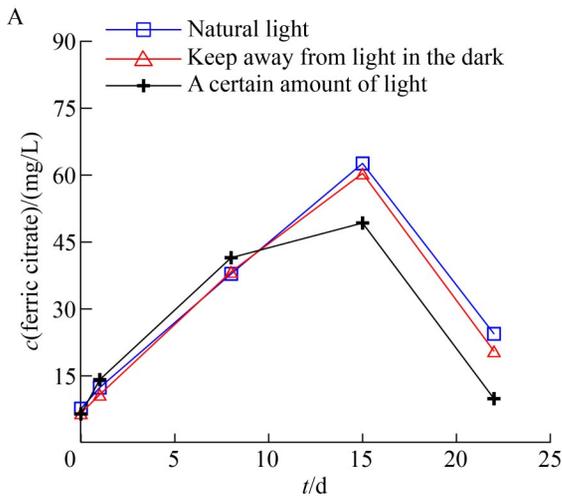


图8 pH对微生物短期培养的影响

Figure 8 Effect of pH on short-term microbial culture. A: Slurry; B: Sediments.

均呈现先增大后下降的趋势(图 9)。在 0–8 d 内, 一定光照条件更有利于厌氧污泥菌液的活性表达。在后半段, 自然光照和黑暗避光条件下厌氧污泥菌液的活性较为一致, 均高于一定光照条件。

海洋底泥菌液在黑暗避光条件下其活性高于其他光照环境, 且在 3 种光照环境中, 海洋底泥菌液的活性均有较大幅度的提高。



## 2.4.2 培养基浓度条件优化结果

如图 10 所示, 8 d 后, 厌氧污泥菌液在 50% 浓度的培养基中的活性大于在 75% 浓度培养基中的活性。15 d 后, 所有浓度培养基的厌氧污泥菌液活性都逐渐降低。100% 浓度培养基中海洋底泥菌液活性明显增强。

## 2.4.3 温度条件优化结果

如图 11 所示, 所有样品在前 15 天内各温度

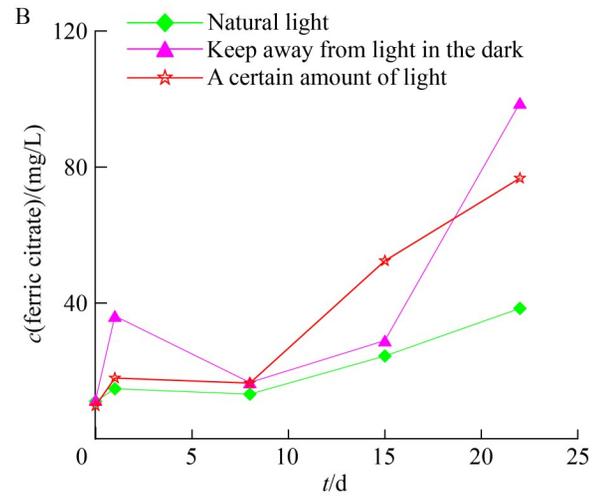


图9 光照条件对微生物中期培养的影响

Figure 9 Effect of light conditions on medium-term culture of microorganisms. A: Slurry; B: Sediments.

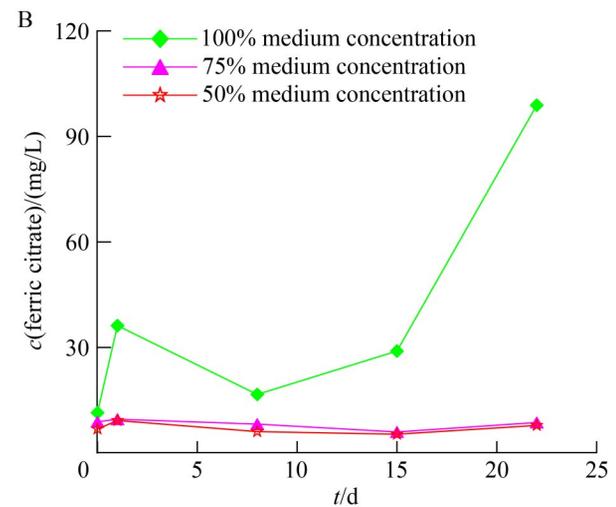
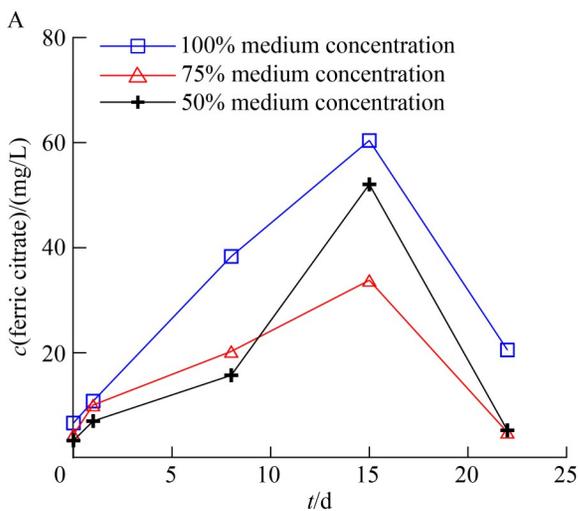


图10 培养基浓度对微生物中期培养的影响

Figure 10 Effect of medium concentration on medium-term culture of microorganisms. A: Slurry; B: Sediments.

下活性都处于较低水平。厌氧污泥菌液在室温条件下的培养, 其初始培养体系浓度为 11.1 mg/L, 培养结束时的浓度为 4.7 mg/L, 下降幅度高达 60%。在 4 °C 环境中, 二价铁离子初始浓度为 4.6 mg/L, 最终为 3.7 mg/L, 下降幅度仅为 20%。对于中期培养的海洋底泥菌液, 较高温度似乎更有利于微生物的生长。

#### 2.4.4 酸碱度条件优化结果

如图 12 所示, 在酸性和中性环境中, 厌氧污泥的活性先下降后上升, 说明厌氧污泥在适应相应的 pH 环境后, 表达了较高的活性。在碱

性环境中, 厌氧污泥的活性先升高后降低。15 d 后, 碱性环境和中性环境中的海洋底泥菌液也适应了环境变化。

## 2.5 长期培养实验结果分析

### 2.5.1 不同菌液培养优化结果

如图 13 所示, 长期培养实验表明, 厌氧污泥菌液和海洋底泥菌液微生物的生长曲线均呈现锯齿状。

厌氧污泥菌液活性在培养的第 0、53、109、150 天均先降低后增高。每隔 50 d 更换顶空气和培养基, 可能营养条件改变促进了反应。新

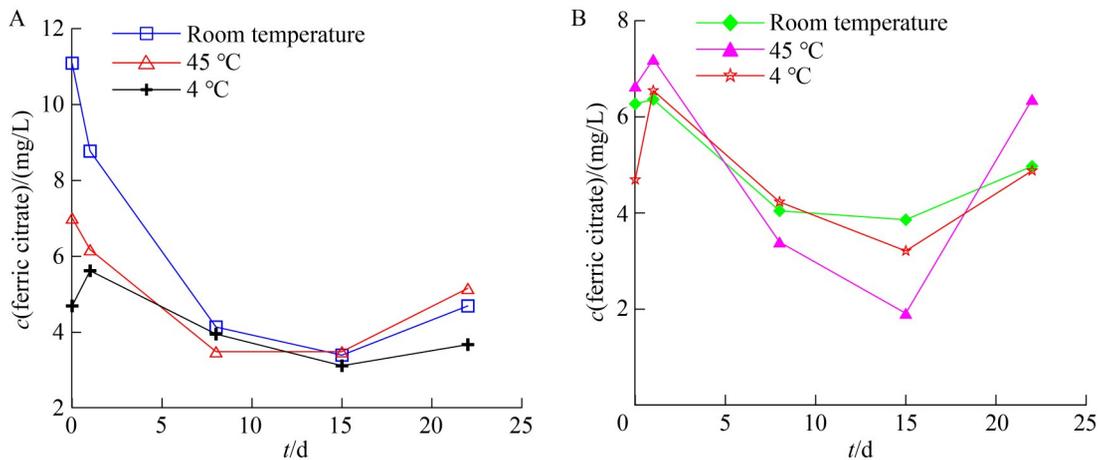


图11 温度对微生物中期培养的影响

Figure 11 Effect of temperature on medium-term culture of microorganisms. A: Sludge; B: Sediments.

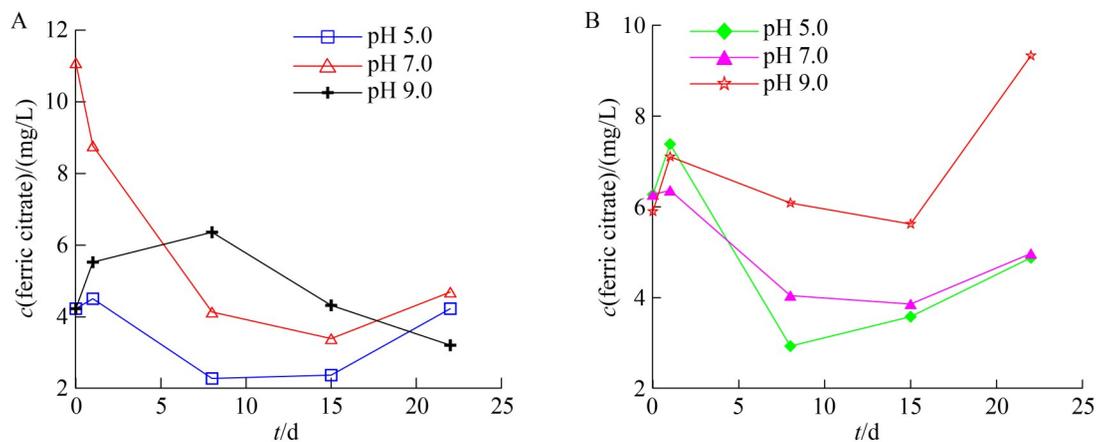


图12 pH对微生物中期培养的影响

Figure 12 Effect of pH on medium-term culture of microorganisms. A: Sludge; B: Sediments.

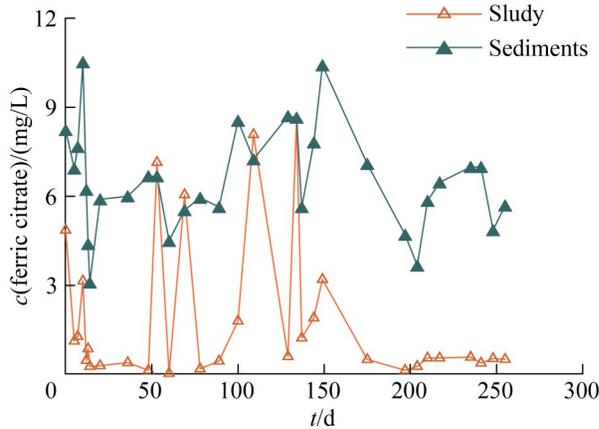


图13 不同菌液的微生物长期培养实验

Figure 13 Long term culture of microorganisms in different bacterial solutions.

鲜培养基加入使二价铁离子浓度上升，微生物活性短期提高后下降。

长期培养 150 d 后，微生物活性显著下降。200 d 更换新鲜培养基后，微生物活性无明显提高，可能菌液已处于低活性或死亡状态。海洋底泥菌液的微生物活性变化趋势与厌氧污泥相反，每次更换培养基后活性呈现较低值，推测有短暂休眠期。适应体系环境后，微生物活性增强，200 d 后完全适应反应体系变化，更换新鲜培养基后立即出现活性提高。

### 2.5.2 不同压力

如图 14 所示，在不同的压力条件下，海洋底泥菌液微生物的活性差距较大。在 0.1 MPa 大气压力下，海洋底泥菌液微生物长期培养的生长曲线呈锯齿状变化，二价铁离子浓度为 3.0–10.4 mg/L，即该菌液微生物在室内大气压环境下无明显的死亡或倍增现象。在 5.0 MPa 高压环境下，海洋底泥菌液微生物在 117–145 d 活性较高。考虑到海洋微生物较慢的生长速度和较长的生长周期，估算该菌液富集体的最佳生长周期为 130 d 左右。培养 180 d 后，0.5 MPa 高压环境下微生物几乎未生长，而 0.1 MPa 大气压力下微生物菌液在更换培养基后出现新一轮的生长。

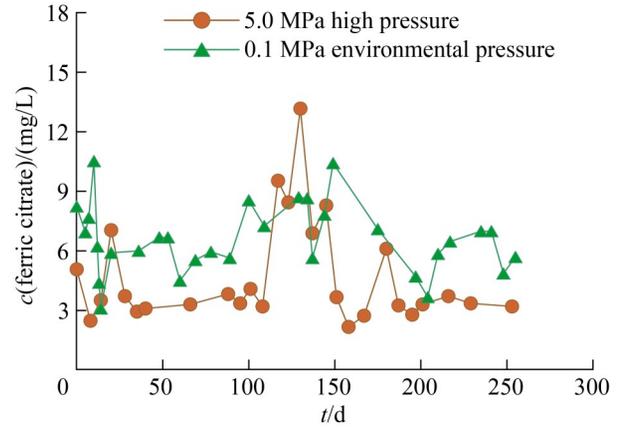


图14 不同压力条件下微生物长期培养实验

Figure 14 Long term culture of microorganisms under different pressures.

## 3 讨论

### 3.1 短期培养实验揭示样品对培养条件的偏好性

#### 3.1.1 光照条件

短期培养实验中，2 种菌液在不同光照条件下均表现出一定的活性，但光照条件对 2 种菌液的影响差异较大。在自然光照下，厌氧污泥菌液的活性显著提升(17 h 达峰值，铁浓度 16.7 mg/L，约为初始浓度的 4 倍)，而黑暗环境则延长了其缓冲期(0–15 h)，表明自然光照条件有利于厌氧污泥菌液的生长和活性表达，而黑暗环境则不利于其生长。相比之下海洋底泥菌液对光照的偏好性不明显，在黑暗环境中活性更优(14 h 和 35 h 出现高值)，而在自然光照条件下几乎停止生长。

#### 3.1.2 培养基浓度条件

培养基组分浓度是限制厌氧污泥菌液微生物活性的重要因素<sup>[16]</sup>，实验结果表明，75% 浓度培养基的营养物质已能满足厌氧污泥菌液微生物的生长需求，而 100% 高浓度培养基在培养后期对菌液的促进作用不大，甚至可能在一定程度上限制菌群的生长。

相比之下，较高浓度的营养物质在一定时

间内更有利于海洋底泥菌液的生长。在 35 h 时, 海洋底泥菌液的微生物繁殖进入指数期, 高浓度培养基为微生物的繁衍提供了充足的营养, 而其他浓度的培养基则可能限制了海洋底泥微生物的活性和生长。因此, 在进行中、长期微生物培养实验时, 建议选用 100% 浓度培养基。

### 3.1.3 温度条件

图 7 表明, 低温环境(4 °C)更适合厌氧污泥菌液的生长, 而海洋底泥菌液对温度条件不敏感, 需要进一步开展中期实验进行研究。

### 3.1.4 酸碱度条件

短期培养后期, 中性环境(pH 7.0)更适合厌氧污泥菌液的活性表达, 其活性明显高于其他环境。然而酸碱环境(pH 5.0 和 9.0)后期的活性高于中性环境(铁浓度分别约为 4.3 mg/L vs. 11.1 mg/L), 表明酸碱度是限制海洋底泥菌液微生物活性的重要因素之一<sup>[17]</sup>。

综合对比发现, 相对于海洋底泥菌液, 厌氧污泥微生物对光照、培养基浓度变化更敏感, 中性、4 °C 环境更适合厌氧污泥微生物生长。4 °C 环境下 2 种微生物最活跃, 室温环境下最稳定, 表明温度设置对 2 种微生物活性影响较大, 在中期培养实验中仍是不可忽略的因素。

## 3.2 中期培养实验进一步验证短期培养实验

### 3.2.1 光照条件

中期培养实验结果与短期培养实验结果一致, 短时间内一定光照条件更有利于厌氧污泥菌液的活性表达, 可能是由于菌液富集体内嗜光微生物在该时期生长迅速<sup>[17]</sup>。然而在培养后期, 昼夜交替的光照环境以及全程黑暗避光环境比一定光照更有利于微生物活性, 说明光照逐渐成为限制厌氧污泥菌液活性的因素。图 9 显示, 海洋底泥菌液在整个培养期间一直呈现增长趋势, 且后期趋势明显, 说明 22 d 的中期培养尚未达到海洋底泥菌液富集体微生物的生长周期, 微生物在此过程中一直处于较活跃的

生长状态。

### 3.2.2 培养基浓度条件

中期培养实验结果与短期培养结果类似, 高浓度的营养物质在一定时间内更有利于厌氧污泥菌液微生物的生长。在培养后期, 培养基浓度不再是影响厌氧污泥菌液活性的主要因素。对于海洋底泥菌液, 中期培养实验结果进一步验证了短期培养实验的猜想, 因此进行海洋底泥菌液培养时建议选用 100% 浓度培养基<sup>[16]</sup>。

### 3.2.3 温度条件

前 15 天是中期培养的温度适应期, 此后 2 种菌液微生物的活性有了较大提高, 说明温度是关键调控因子。在室温环境中, 厌氧污泥菌液微生物的活性最弱, 而在 4 °C 环境中菌液微生物的活性最强, 这与短期培养实验的结论一致, 表明低温更适合厌氧污泥菌液的培养。

### 3.2.4 酸碱度条件

pH 对中期培养的厌氧污泥菌液影响较大。酸性环境更有利于厌氧污泥菌液的生长, 而碱性环境在前期抑制了厌氧污泥菌液的活性。相比之下 pH 值为 9.0 的碱性环境在培养后期更有利于海洋底泥菌液的培养。

中期培养阶段, 温度、pH 是影响两菌液微生物活性的重要因素。厌氧污泥菌液在 4 °C+酸性条件下活性稳定(铁浓度降幅仅为 20%), 而海洋底泥菌液偏好较高温度及碱性环境(pH 9.0 适应后活性提升)。光照、培养基浓度对厌氧污泥微生物影响相对较小, 100% 浓度培养基更适合厌氧污泥微生物, 黑暗避光+100% 浓度培养基更适合海洋底泥微生物。15 d 是厌氧污泥微生物的生长倍增时间, 22 d 未达到海洋底泥微生物倍增时间, 整个中期培养实验中一直处于较活跃生长状态。

## 3.3 长期培养实验实时追踪样品生长特性及生长周期

长期培养实验对微生物菌液的生长状态进

行实时追踪, 并通过中期实验筛选出的条件加速微生物的富集培养。长期培养实验中, 厌氧污泥菌液活性呈周期性波动(每 50 d 更换培养基引发先降后升), 但 150 d 后出现不可逆衰减。相比之下, 海洋底泥菌液表现出更强的适应性(高压下 117–145 d 活性达峰值, 推测生长周期约为 130 d), 且在室压下维持锯齿状稳定活性(铁浓度 3.0–10.4 mg/L)。因此, 海洋底泥菌液在实验方案下的适应性高于厌氧污泥菌液, 更适合进行更长时间的人工培养。在高压环境下, 即使更换新鲜培养基也未再出现较高的微生物活性表达, 说明高压环境可能会加速微生物的生长和消亡进程<sup>[7]</sup>。

## 4 结论

本研究通过微生物活体培养实验, 探讨了多环境因素对微生物特征的影响, 并为研究不同区域样品差异性的作用机制提供了线索。实验设计包括短期、中期和长期培养, 通过设置不同培养条件(光照、培养基组成、温度和 pH 梯度), 采用单因子变量方法, 研究环境因素对微生物的影响。中期培养实验验证了短期实验的猜想和结论, 并探讨了不同微生物富集体的适宜培养条件。主要结论如下。

(1) 厌氧污泥微生物对光照和培养基浓度变化更敏感。一定光照有利于厌氧污泥菌液短期活性表达, 但长期可能限制其活性; 黑暗避光环境对 2 种菌液长期有益, 与菌液来源的真实环境一致; 光照对海洋底泥菌液生长影响不显著, 短期培养后期黑暗避光条件下活性更高。

(2) 培养基组分浓度是限制厌氧污泥菌液微生物活性的重要因素。高浓度营养物质在一定时间内有利, 但长期可能抑制菌群生长。100% 浓度培养基更适合厌氧污泥微生物, 而黑暗避光+100% 浓度培养基更适合海洋底泥微生物。

(3) pH 对微生物生长有一定影响。4 °C+酸性条件适合厌氧污泥微生物生长, 而较高温度+碱性环境更有利于海洋底泥微生物培养。

(4) 15 d 是厌氧污泥微生物的生长周期; 22 d 未达到海洋底泥微生物生长周期, 一直处于较活跃生长状态。长期培养实验证实, 海洋底泥菌液适应性更高, 最佳生长周期约 130 d, 高压环境影响微生物生长或消亡进程。

## 作者贡献声明

魏雪芹: 方法论, 数据收集与监管, 数据分析, 获取基金, 撰写文章, 执行调研; 梁钧玮: 数据收集与监管、验证、完成及呈现; 高一爻: 监督管理, 数据验证、完成及呈现; 应杰桐、江帅: 编辑、撰写、审阅文章。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] BEULIG F, SCHUBERT F, ADHIKARI RR, GLOMBITZA C, HEUER VB, HINRICHS KU, HOMOLA KL, INAGAKI F, JØRGENSEN BB, KALLMEYER J, KRAUSE SJE, MORONO Y, SAUVAGE J, SPIVACK AJ, TREUDE T. Rapid metabolism fosters microbial survival in the deep, hot subseafloor biosphere[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 312.
- [2] RAVEN MR, KEIL RG, WEBB SM. Microbial sulfate reduction and organic sulfur formation in sinking marine particles[J]. *Science*, 2021, 371(6525): 178-181.
- [3] NEWBERRY CJ, WEBSTER G, CRAGG BA, PARKES RJ, WEIGHTMAN AJ, FRY JC. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3): 274-287.
- [4] WAKEHAM SG, CANUEL EA, LERBERG EJ, MASON P, SAMPERE TP, BIANCHI TS. Partitioning of organic matter in continental margin sediments among density fractions[J]. *Marine Chemistry*, 2009, 115(3/4): 211-225.
- [5] AOKI M, EHARA M, SAITO Y, YOSHIOKA H, MIYAZAKI M, SAITO Y, MIYASHITA A, KAWAKAMI S, YAMAGUCHI T, OHASHI A, NUNOURA T, KEN TK, IMACHI H. A long-term cultivation of an anaerobic methane-oxidizing microbial community from deep-sea methane-seep sediment using a continuous-flow bioreactor[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105356.
- [6] ZHOU Z, ZHANG CJ, LIU PF, FU L, LASO-PÉREZ R, YANG L, BAI LP, LI J, YANG M, LIN JZ, WANG WD, WEGENER G, LI M, CHENG L. Non-syntrophic

- methanogenic hydrocarbon degradation by an archaeal species[J]. *Nature*, 2021, 601(7892): 257-262.
- [7] KORBEL KL, RUTLIDGE H, HOSE GC, EBERHARD SM, ANDERSEN MS. Dynamics of microbiotic patterns reveal surface water groundwater interactions in intermittent and perennial streams[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 811: 152380.
- [8] HE ZF, XU SY, ZHAO YH, PAN XL. Methane emissions from aqueous sediments are influenced by complex interactions among microbes and environmental factors: a modeling study[J]. *Water Research*, 2019, 166: 115086.
- [9] SU ZG, DAI TJ, TANG YS, TAO YL, HUANG B, MU QL, WEN DH. Sediment bacterial community structures and their predicted functions implied the impacts from natural processes and anthropogenic activities in coastal area[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 131: 481-495.
- [10] TYNE RL, BARRY PH, LAWSON M, BYRNE DJ, WARR O, XIE H, HILLEGONDS DJ, FORMOLO M, SUMMERS ZM, SKINNER B, EILER JM, BALLENTINE CJ. Rapid microbial methanogenesis during CO<sub>2</sub> storage in hydrocarbon reservoirs[J]. *Nature*, 2021, 600(7890): 670-674.
- [11] 范习贝, 梁前勇, 牛明杨, 余甜甜, 王寅熠, 王风平. 中国南海北部陆坡沉积物古菌多样性及丰度分析[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1589-1601.  
FAN XB, LIANG QY, NIU MY, YU TT, WANG YZ, WANG FP. The diversity and richness of Archaea in the northern continental slope of South China Sea[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(7): 1589-1601 (in Chinese).
- [12] HOSHINO T, DOI H, URAMOTO GI, WÖRMER L, ADHIKARI RR, XIAO N, MORONO Y, D'HONDT S, HINRICHS KU, INAGAKI F. Global diversity of microbial communities in marine sediment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(44): 27587-27597.
- [13] MOLARI M, JANSSEN F, VONNAHME TR, WENZHÖFER F, BOETIUS A. The contribution of microbial communities in polymetallic nodules to the diversity of the deep-sea microbiome of the Peru Basin (4 130–4 198 m depth)[J]. *Biogeosciences*, 2020, 17(12): 3203-3222.
- [14] WEI XQ, YU J, CHEN XP, YE T, LIU LH, JIN GR, ZHAI MY, CAI MG. Variability of microbial community structure distribution in marine shallow surface sediments in Shenhu area[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2021, 38(10): 934-945.
- [15] WEI XQ, LIU LH, CHEN XP, JIN GR, LIU L, CAI MG, QIU ZY. Microbial diversity in marine sediments of two hydrocarbon reservoir areas in the eastern Atlantic Ocean[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2022, 88: 109-122.
- [16] HE QX, YU LP, LI JB, HE D, CAI XX, CAI M, ZHOU SG. Electron shuttles enhance anaerobic oxidation of methane coupled to iron(III) reduction[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 664-672.
- [17] CAI C, LEU AO, XIE GJ, GUO JH, FENG YX, ZHAO JX, TYSON GW. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(8): 1929-1939.