

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(7):876–890; 4 July 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心微生物多样性

焦露^{1,2}, 苏新^{1,2*}, 陈芳³, 张勇^{1,2}, 蒋宏忱¹, 罗祎², 董海良^{1,2}

¹中国地质大学(北京), 地质微生物实验室, 北京 100083

²中国地质大学(北京), 海洋学院, 北京 100083

³广州海洋地质调查局实验中心, 广州 510760

摘要:【目的】本文研究南海北部陆坡神狐 HS-PC500 重力活塞岩心沉积物中微生物多样性。【方法】使用吡啶橙染色法计数沉积物中微生物丰度; 提取沉积物微生物总 DNA, 使用特异性引物扩增古菌及细菌 16S rRNA 基因序列; 对克隆文库进行系统发育分析。【结果】系统发育分析显示表层 PC500-1 (0–5 cm below sea floor, bsf) 古菌以 C3 为主要类群, 占该层总序列的 25.6%; 中层 PC500-6 (350–355 cm bsf) 和底层 PC500-11 (790–795 cm bsf) 古菌以 Marine Benthic Group (MBG)-B 为主要类群, 分别占该层总序列的 48.1% 和 38.9%。另有部分克隆序列属于 MBG-A、Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG)、*Thermoprotei*、NGC、*Halobacteriales*、MBG-E、South African Gold Mine Euryarchaeotic Group (SAGMEG)。表层细菌以变形菌 (*Proteobacteria*) 为主要类群, 占该层文库的 38.3%。中层和底层细菌以绿弯菌 (*Chloroflexi*) 和 JS1 为主要类群, 分别占该层文库的 28.1%、29.2% 和 39%、24.7%。另有部分克隆序列属于硝化螺旋菌 (*Nitrospirae*)、放线菌 (*Actinobacteria*)、酸杆菌 (*Acidobacteria*)、OP8、螺旋体菌 (*Spirochaetes*)、TM6、脱铁杆菌 (*Deferribacteres*)、浮霉菌 (*Plantomycete*)。【结论】结果显示, HS-PC500 岩心微生物丰度与甲烷浓度变化相吻合; 微生物丰度较低可能与较低的总有机碳量有关; 微生物多样性较高, 并且随深度的增加群落结构变化明显; 岩心中有关硫酸盐还原的微生物类群占优势, 说明微生物的硫代谢在该海区沉积物的物质循环过程中占有重要地位。

关键词: 16S rRNA, 微生物多样性, 天然气水合物, 神狐海域, 南海

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 07-0876-15

海洋沉积物覆盖了地球表面超过 2/3 的面积, 据估计海底沉积物中的原核生物生物量占全球原核生物生物量的 1/2–5/6, 占全球总生物量的 1/10–1/3^[1]。深海环境中的微生物在海洋生态系统的生物地化循环中发挥着重要的作用^[2]。目前国内外主要对原核生物开展了与天然气相关性的研究。诸多研究发现, 微生物与天然气水合物的主要关系表

现在两个方面: 提供生物成因来源气体; 对水合物或甲烷进行分解。这两个相反的方面涉及具有不同营养方式的微生物类群、以及它们的生命活动与微生物生态(包括地质的、理化的和生物的相互作用)等一系列复杂过程, 因此, 国内外研究者在利用微生物群落结构和标志类群识别沉积物中水合物等方面进行了大量研究^[3]。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB219502); 国土资源部公益性行业科研专项(200811014-02); 中国地质调查局基础调查项目(GZH200200203-02-01)

* 通信作者。Tel: +86-10-82335403; Fax: +86-10-82320065; E-mail: xsu@cugb.edu.cn

作者简介: 焦露(1987–), 女, 贵州人, 硕士研究生, 主要从事海洋地质微生物方面研究。E-mail: littlebunny7@163.com

收稿日期: 2010-12-21; **修回日期:** 2011-02-24

神狐海域位于南海北部陆坡中段,我国在该区的有关地质调查结果发现大量的指示天然气水合物存在的地球物理和地球化学等标志^[4]。该区域流体相对活跃,断层发育,有利于天然气水合物的发育;根据浅表层沉积物孔隙水地球化学特征分析,各种异常均暗示了沉积物深部存在着天然气水合物^[5]。2007年4月,我国首次在南海北部地区神狐海域进行了天然气水合物钻探实验并成功取得天然气水合物实物样品^[6]。此外,神狐海域海底热流介于 $74.0 - 78.0 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ 之间,平均热流值为 $76.2 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$,地温梯度为 $45 - 67.7^\circ\text{C}/\text{km}$,处于中-低范围。本文对 HS-PC500 岩心展开微生物研究,旨在获得对该区沉积物微生物多样性的了解,同时也期望获得有关微生物对下覆沉积物中甲烷渗漏或天然气水合物赋存反应的相关信息。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

FastDNA SPIN for Soil Kit (美国 MP BIO)、Agarose Gel DNA purification Kit Ver. 2.0 (日本 TaKaRa)、pGEM-T Easy Vector Systems (日本 TaKaRa)、Bio-Rad ALD1244 PCR 仪 (美国 Bio-Rad)、以及 Eppendorf 5417R 高速台式离心机 (德国 Eppendorf) 等。

1.2 样品采集和保存

本文所使用的 HS-PC500 样品是由广州海洋地质调查局“海洋四号”考察船于 2006 年在南海北部神狐海域 (水深 1230 m) 获得的重力活塞岩心,全长 7.9 m。航次中样品的初步分样和处理,均在无菌操作箱中进行,步骤如下: (1) 按 70 cm 采样间距,每个样品取上部 5 cm 全岩心段,切除外部沉积物。(2) 微生物计数的样品取 1 cm^3 加入到含 9 mL 经过滤 ($0.22 \mu\text{m}$) 和高压灭菌海水的无菌瓶中,加入终浓度为 4% (v/v) 的甲醛固定,置于 4°C 保存。(3) 微生物多样性分析样品用无菌袋密封并保存于液氮中,航次结束后,用于冰运至实验室置于 -80°C 冰箱。

本论文展示的是该岩心柱表层 (0 - 5 cm, 编号 PC500-1)、中层 (350 - 355 cm, 编号 PC500-6) 和底层 (790 - 795 cm, 编号 PC500-11) 3 个深度的古菌和细菌多样性分析结果。

1.3 微生物计数

沉积物中微生物丰度采用吖啶橙染色直接计数法 (Acridine orange direct counting, AODC), 具体方法见参考文献^[7]。

1.4 甲烷和总有机碳测试

顶空气甲烷浓度在航次中采用 HP5890 Series II GC 气相色谱仪分析^[7]。总有机碳量 (TOC) 含量在中国地质大学 (北京) 海洋学院化学实验室完成。实验方法参照土壤有机质的测定^[8], 略有修改。称取约 0.5 g 风干的沉积物样品, 加入 10 mL 浓度为 $1/6 \times 0.400 \text{ mol/L}$ 的重铬酸钾溶液和少量硫酸银, 于 175°C 加热 10 min 消解, 冷却后加入 5 mL 磷酸 (酸: 水 = 1 : 1), 以二苯胺磺酸钠为指示剂, 用 0.200 mol/L 的硫酸亚铁溶液滴定。使用经 500°C 灼烧 2 h 并研至 80 目的沉积物样品做空白。测量标准参照中华人民共和国国家标准“森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算”。

1.5 克隆文库构建和系统发育分析

在参考该岩心甲烷浓度变化和微生物计数结果基础上, 对 3 个深度的样品 (PC500-1, PC500-6 和 PC500-11) 进行微生物多样性分析。使用 FastDNA SPIN for soil kit (MP Biomedicals, Solon, USA) 试剂盒提取样品中的总 DNA, 方法参考使用说明。克隆文库构建和系统发育分析方法见参考文献^[9]。

1.6 DNA 序列在 GenBank 的登录号

此研究所测定的克隆序列均已提交至 GenBank 中, 古菌登录号为: HQ434905 - HQ434958; 细菌登录号为: HQ434767 - HQ434904。

2 结果和分析

2.1 AODC 及地球化学参数的变化特征

HS-PC500 岩心微生物丰度数据如表 1 所示; 甲烷的浓度在 $39.64 - 70.52 \text{ mg/L}$ 之间; 总有机碳量 (TOC) 在 $0.48\% - 0.75\%$ 之间。

2.2 饱和曲线与覆盖率分析

所测序列经筛选后得到 197 个有效古菌序列, 属于 54 个 OTU; 得到 280 个有效细菌序列, 属于 138 个 OTU。各文库覆盖率 $C = 1 - (n/N)$ (其中 n 为 OTU 中只出现一个克隆子的数目, N 为总序列数) 见表 2。饱和曲线见图 1。古菌饱和曲线趋于平缓, 可以认为所测定的古菌序列能够覆盖该环境古

菌的多样性;细菌的饱和曲线未趋于平缓,显示了该环境的细菌具有丰富的多样性。

表 1 南海北部神狐 HS-PC500 岩心微生物丰度数据

Table 1 Statistical data of microbial abundance from the core HS-PC500 from the South China Sea

Site	Depth(cm bsf)	Microbial abundance(10^5 /g)
HS-PC500-1	0	6.93
HS-PC500-2	70	4.24
HS-PC500-3	140	5.88
HS-PC500-4	210	5.95
HS-PC500-5	280	5.98
HS-PC500-6	350	5.84
HS-PC500-7	420	5.63
HS-PC500-8	490	6.38
HS-PC500-9	650	7.41
HS-PC500-10	720	9.63
HS-PC500-11	790	6.67

2.3 古菌 16S rRNA 基因文库分析

古菌 16S rRNA 序列系统发育树(图 2)显示,古菌序列同源序列大多数来源于海洋沉积物,分别属于泉古菌(*Crenarchaeota*)和广古菌(*Euryarchaeota*)两大类。其中 Marine Benthic Group (MBG)-B、Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG)、*Thermoprotei*、Novel Group Crenarchaeota (NGC)、MBG-A、C3 属于泉古菌; South African Gold Mine Euryarchaeotic Group (SAGMEG)、*Halobacteriales* 和 MBG-E 属于广古菌。

表 2 南海北部神狐 HS-PC500 古菌和细菌的 16S rRNA 克隆文库统计数据

Table 2 Statistical analyses of archaea and bacteria 16S rRNA clone libraries from the core HS-PC500 from the South China Sea

Domain	Clone library		Depth/ cm bsf	No. of clone sequenced		No. of OTU		Coverage/%
<i>Archaea</i>	PC500A	PC500-1	0 - 5	82	197	43	54	72.1
		PC500-6	350 - 355	79		8		97.5
		PC500-11	790 - 795	36		3		97.2
<i>Bacteria</i>	PC500B	PC500-1	0 - 5	114	280	75	138	71.5
		PC500-6	350 - 355	89		30		80.9
		PC500-11	790 - 795	77		33		80.5

泉古菌中包含了 139 个克隆序列,其中以 MBG-B 为主要类群,该类群最先发现于深海沉积物和热液口,目前发现 MBG-B 广泛存在于多种深海环境^[10],文库中共有 52 个克隆属于该类群,同源序列来源广泛,大部分克隆序列与发现于喀斯喀特边缘的序列同源性较高,其它同源序列来源于秘鲁大陆架沉积物^[10]和鄂霍克次海沉积物。共有 43 个克隆序列属于 C3(占总序列的 21.8%),同源序列主要来源于南海沉积物,相似性为 94% - 100%。共有

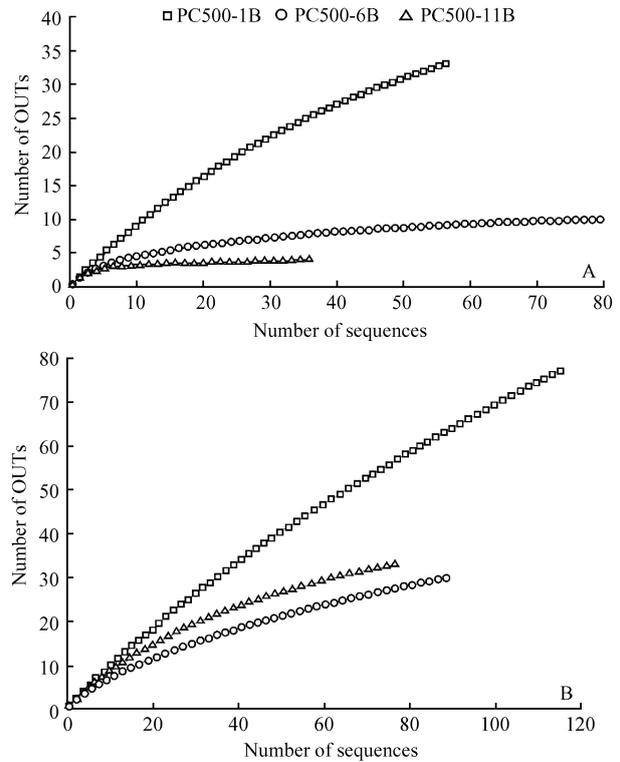


图 1 南海北部神狐 HS-PC500 岩心中古菌 16S rRNA 基因序列饱和曲线(A)与细菌 16S rRNA 基因序列饱和曲线(B)

Fig.1 Rarefaction curves analyses of the archaeal 16S rRNA gene (A) and bacterial 16S rRNA gene (B) from the core HS-PC500 from the South China Sea.

21 个克隆序列属于 *Thermoprotei* (占总序列的 10.7%),同源序列来源于胡安德富卡、南海、鄂霍克次海和墨西哥湾富含天然气水合物区沉积物,相似性为 97% - 99%。共有 13 个克隆序列属于 MBG-A(占总序列的 6.6%),同源序列来源于东太平洋隆起和南海沉积物,相似性为 96% - 99%。共有 8 个克隆序列属于 MCG(占总序列的 4.1%),同源序列来源于东地中海泥火山沉积、南海和秘鲁边缘沉积物,相似性为 99%。另有 2 个克隆序列属于

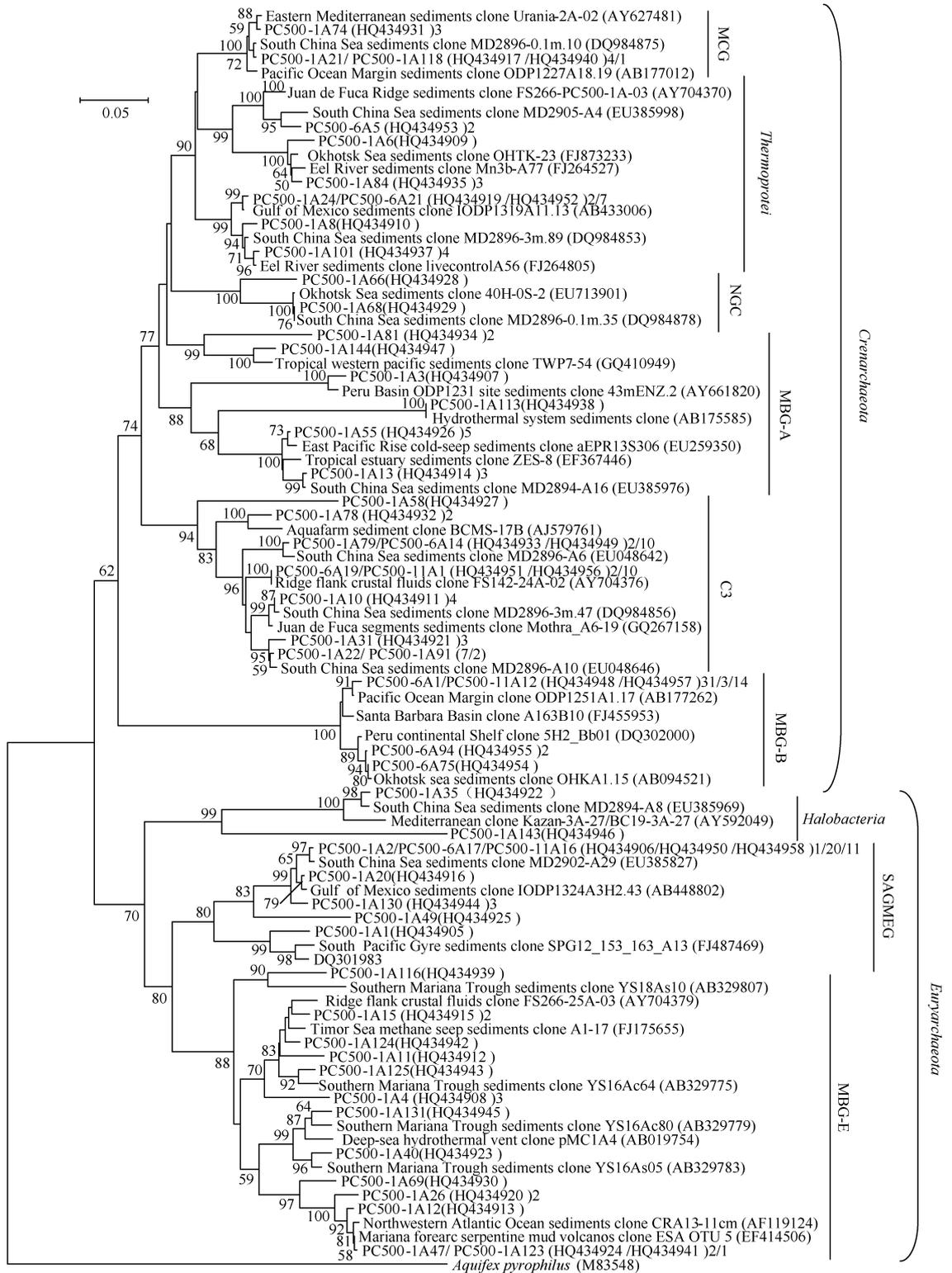


图 2 南海北部神狐 HS-PC500 岩心沉积物中古菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig.2 Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences (accession number from HQ434905 to HQ434958) of Archaea in the core HS-PC500 from the South China Sea. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide position; "PC500-XYYY" is sequence name in this paper; PC500-X represents sediment core number; "A" means archaea; "YY" is clones number. One representative clone type within each phylotype is shown and the number of clones within each phylotype is shown at the end (after the GenBank accession number). If there is only one clone sequence in a given phylotype, the number "1" is not shown.

NGC(占总序列的 1.0%),同源序列来源于鄂霍克次海、和南海沉积物,相似性为 97% - 99%。

广古菌中包含了 58 个克隆序列,其中 SAGMEG 是优势类群,共有 38 个克隆序列属于该类群(占总序列的 19.3%),同源序列来源于南海、墨西哥湾和南太平洋沉积物,相似性为 93% - 98%。共有 2 个克隆序列属于 *Halobacteriales* (占总序列的 1.0%),相似性为 93% - 98%。共有 18 个克隆序列属于 MBG-E(占总序列的 9.1%),同源序列来源广泛,均来自于不同的沉积环境,相似性在 91% - 98% 之间。

2.4 岩心总细菌 16S rRNA 基因文库分析

细菌 16S rRNA 序列系统发育树(图 3-A, B, C, D)显示,所得细菌序列可分为 14 个类群,各类群所占的序列的比例见图 5 和表 3。

细菌 16S rRNA 序列系统发育树(图 2-a, b, c, d)显示,所得细菌序列可分为 14 个类群。

其中,绿弯菌(*Chloroflexi*)是细菌文库中的优势类群,主要存在于深海和一些湖泊中,研究显示该类群在厌氧环境中起着目前所知的重要作用。本研究共有 68 个克隆序列属于绿弯菌(占总序列的 24.2%),同源序列来源广泛,分别源自喀斯喀特和秘鲁边缘、鄂霍克次海、南海、胡安德富卡、黄海北部和北白令海沉积物,相似性为 95% - 99%。

共有 55 个克隆序列属于浮霉菌(*Plantomycete*),占总序列的 19.6%,是细菌文库中第二大类群,同源序列源自东地中海泥火山、南太平洋等不同海域沉积物,相似性为 92% - 99%。

变形菌(*Proteobacteria*)是深海沉积物中的主要类群,因此该类群的代谢是深海沉积物中最主要的微生物活动。本研究中出现该类群的四个亚类群: α -、 β -、 γ -、 δ -*Proteobacteria*。其中 α -变形菌亚群占主要部分,有 32 个克隆序列属于该亚群(占总序列的 11.4%),同源序列大都源自深海沉积物中。另有 10 个克隆序列属于 β -变形菌(占总序列的 3.6%),3 个克隆序列属于 γ -变形菌(占总序列的 1.1%)。3 个克隆序列属于 δ -变形菌(占总序列的 1.1%)。

有 45 个克隆序列属于 JS1(占总序列的 16.0%),同源序列来源于秘鲁和喀斯喀特边缘以及泥火山沉积物,相似性为 97% - 98%。

其它少量克隆序列分属于:脱铁杆菌(*Deferribacteres*)、硝化螺旋菌(*Nitrospirae*)、放线菌

(*Actinobacteria*)、酸杆菌(*Acidobacteria*)、OP8、螺旋体菌(*Spirochaetes*)、TM6 和部分未分类克隆。

3 讨论

3.1 微生物细胞丰度与地化数据分析

根据 HS-PC500 岩芯微生物丰度、甲烷浓度与总有机碳量随深度变化图(图 4)可看出,微生物细胞丰度与甲烷浓度呈现基本相同的变化趋势,二者在表层含量均比较高,然后减少到最小值,后随深度的增加增至最大值。微生物丰度的变化范围在 4×10^5 - 9×10^5 细胞/g 之间。微生物丰度的变化范围在 4×10^5 - 9×10^5 细胞/g 之间,甲烷的浓度变化范围在 39.64 - 70.52 mg/L 之间。

南海沉积物中的微生物丰度与其它已知埋藏有天然气水合物的大洋边缘沉积物中的微生物丰度相似^[11-14],但是低于有天然气水合物埋藏的墨西哥湾沉积物^[15]。甲烷是有机小分子物质,能够给黑暗中生活的微生物提供丰度的营养物质。南海北部冷泉区沉积物中微生物丰度随不同站位和深度变化,其范围在 10^6 - 10^5 细胞/g 之间,并且来自甲烷高异常站位的微生物丰度大于甲烷浓度低的站位;在冷泉喷溢口区,同一岩心中微生物的丰度变化和甲烷浓度变化相吻合,甲烷浓度高,微生物丰度大,反之亦然^[7]。该结果跟本研究的结果很相似,表明了甲烷渗漏区沉积物中微生物对甲烷浓度的变化十分敏感。

海洋沉积物中微生物丰度还与沉积物总有机碳(TOC)的含量有关^[16]。海底沉积物表层有机质含量相对比较丰富,为微生物的生长繁殖提供充足的物质能量。深海沉积物中,富有机物沉积物总有机碳含量为 2 - 11 wt%,贫有机物沉积物总有机碳含量则低于 1%^[1]。浊流沉积和半远洋(近海)沉积物中有机碳浓度为 0.5% - 1%,而沉积物中富含有机碳是生物甲烷生成的必需条件之一,因此含天然气水合物的沉积物一般富含有机碳(TOC),有机碳含量在 0.5% 以上^[17]。本研究区的 TOC 含量为 0.48% - 0.75%,属于较低值范围,因此该岩心沉积物中的微生物细胞丰度较低可能与有机碳的含量低有关。

3.2 古菌多样性

MBG-B(或 Deep Sea Archaeal Group, DSAG)是

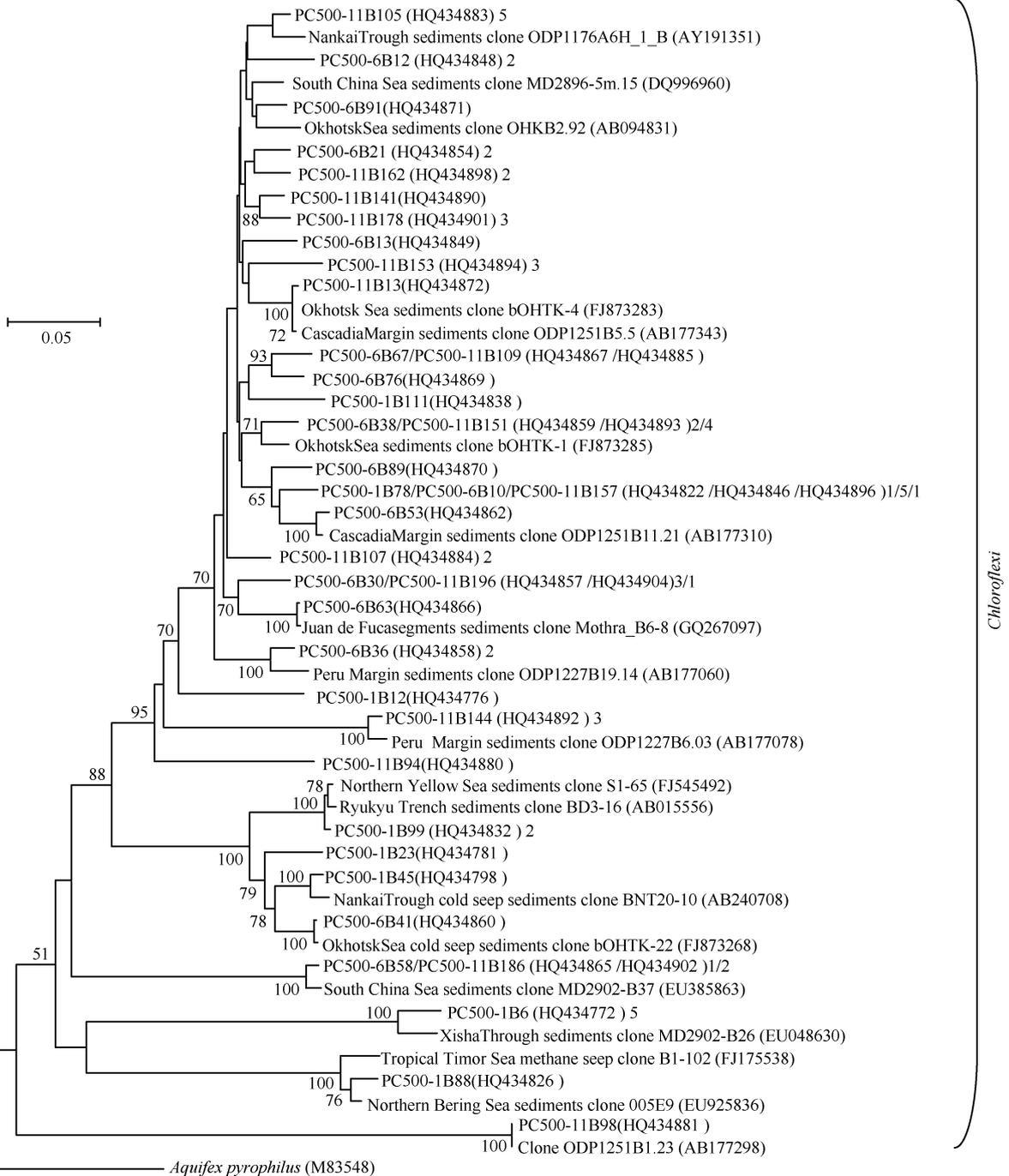


图 3-A 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心沉积物中绿弯菌 (*Chloroflexi*) 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 3-A Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of *Chloroflexi* in the core HS-PC500 from the South China Sea. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide position; "PC500-XBYY" is sequence name in this paper; PC500-X represents sediment core number; "B" means bacteria; "YY" is clones number. One representative clone type within each phylotype is shown and the number of clones within each phylotype is shown at the end (after the GenBank accession number). If there is only one clone sequence in a given phylotype, the number "1" is not shown.

本研究区的优势古菌类群,该类群最先发现于热液口深海沉积物,目前在深海海底沉积中均可发现,并

且在底部有甲烷上涌的上层硫酸盐还原带沉积物中含量丰富。该类群在秘鲁边缘和喀斯喀特古陆边缘

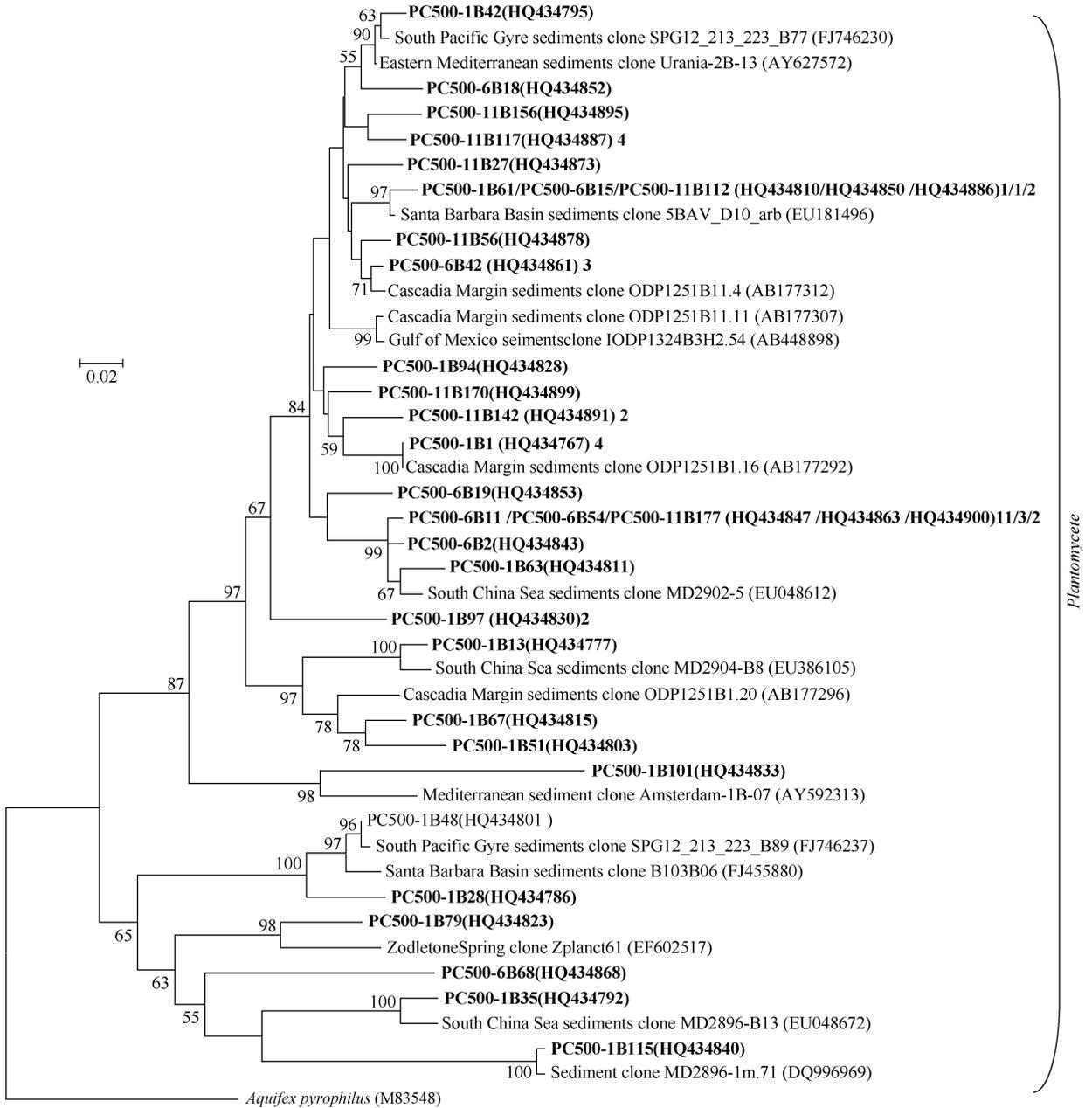


图 3-B 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心沉积物中浮霉菌 (*Plantomycete*) 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 3-B Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of Plantomycete in the core HS-PC500 from the South China Sea. The scale bar represents 0.02 substitution per nucleotide position; "PC500-XBYY" is sequence name in this paper; PC500-X represents sediment core number; "B" means bacteria; "YY" is clones number. One representative clone type within each phylotype is shown and the number of clones within each phylotype is shown at the end (after the GenBank accession number). If there is only one clone sequence in a given phylotype, the number "1" is not shown.

发现水合物的 1230、1245 和 1251 站位浅层沉积物为最主要的优势类群^[14],说明其可能在硫酸盐还原和甲烷氧化中起重要作用^[18-19]。Inagaki 等在研究秘鲁和赤道太平洋水合物钻探区含有天然气水合物沉积岩心表层样品时发现古菌类群几乎 100% 为

MBG-B,尽管在不含天然气水合物沉积岩心柱也发现了 MBG-B,但并不是优势古菌类群。在对南海的研究表明,南海南部陆坡不含天然气水合物沉积物 MBG-B 为其优势古菌类群之一^[1],神狐海域不含水合物的沉积物岩心 HS-373 表层样品有少量 MBG-B

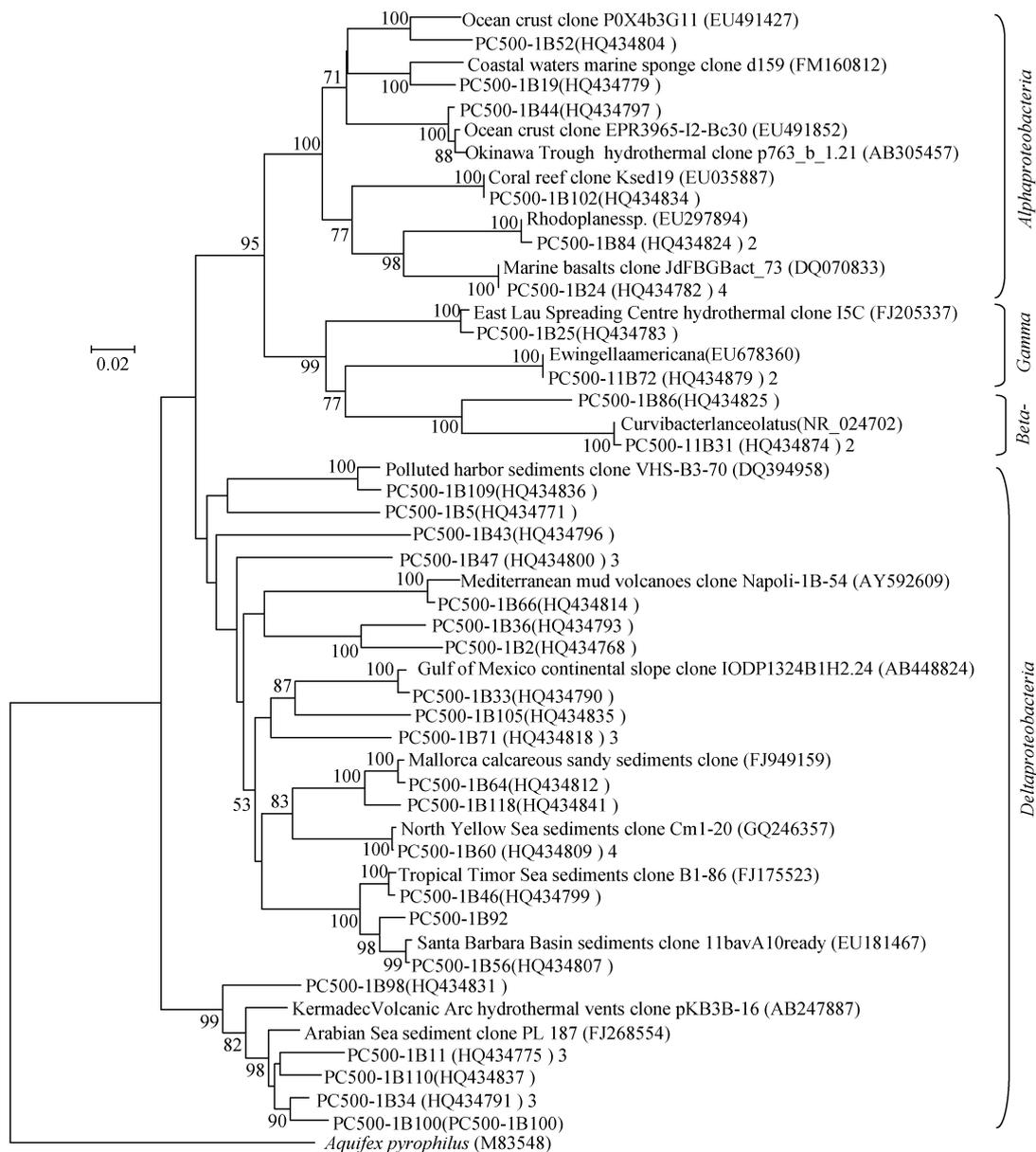


图 3-C 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心沉积物中变形菌 (*Proteobacteria*) 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 3-C Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of *Proteobacteria* in the core HS-PC500 from the South China Sea. The scale bar represents 0.02 substitution per nucleotide position; "PC500-XBYY" is sequence name in this paper; PC500-X represents sediment core number; "B" means bacteria; "YY" is clones number. One representative clone type within each phylotype is shown and the number of clones within each phylotype is shown at the end (after the GenBank accession number). If there is only one clone sequence in a given phylotype, the number "1" is not shown.

存在^[9],西沙海槽沉积物中富含甲烷,MBG-B 类群较少^[19]。这意味着 MBG-B 古菌种群的存在不能用来直接指示天然气水合物的存在,它与天然气水合物赋存之间的关系有待进一步研究。与喀斯喀特古陆边缘沉积物相似,文库中 350 cm 和 790 cm 深度发现的 MBG-B 类群共 51 个克隆同源序列均来源于含有水合物的沉积物。与神狐海域

HS-373 岩心表层样品情况一样,HS-PC500 表层未见该类群。

C3 是嗜热泉古菌中的一个类群,在许多低温的陆地和海洋环境均有发现^[20]。本研究中,C3 是第二大古菌类群,主要同源序列均来源于南海南部陆坡表层沉积物,在该处微生物主要参与硫和氮的生物地球化学循环^[1]。

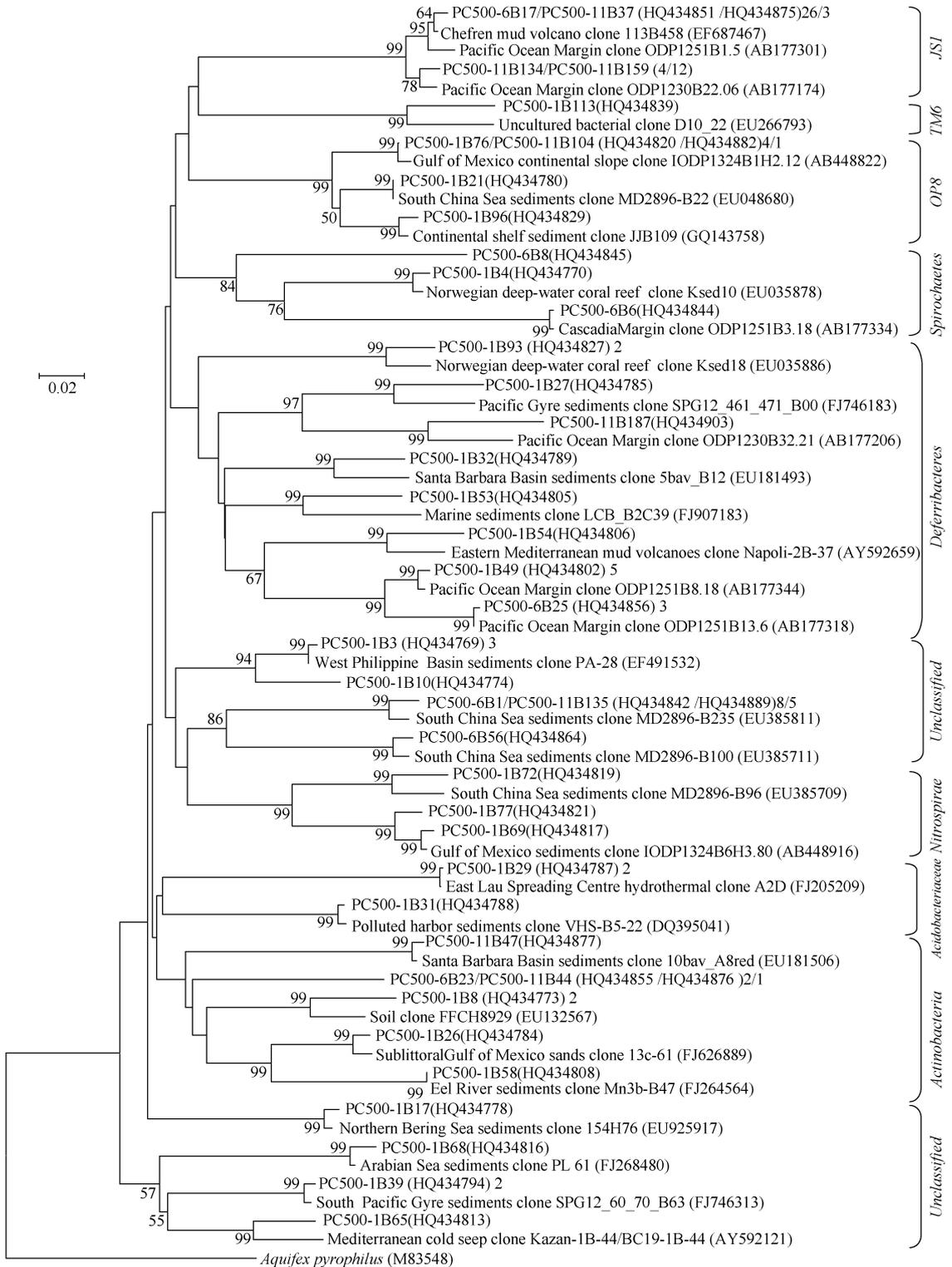


图 3-D 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心沉积物中其余细菌类群 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 3-D Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences of other bacteria clone sequences in the core HS-PC500 from the South China Sea. The scale bar represents 0.02 substitution per nucleotide position; "PC500-XBYY" is sequence name in this paper; PC500-X represents sediment core number; "B" means bacteria; "YY" is clones number. One representative clone type within each phylotype is shown and the number of clones within each phylotype is shown at the end (after the GenBank accession number). If there is only one clone sequence in a given phylotype, the number "1" is not shown.

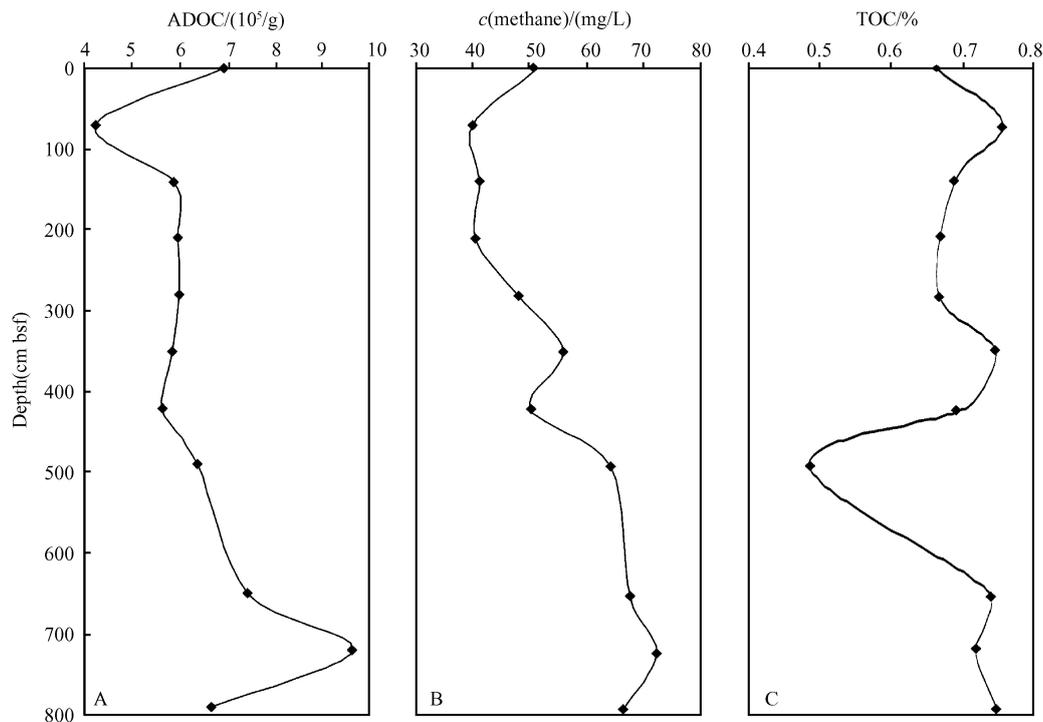


图 4 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心微生物丰度 (A)、甲烷浓度 (B) 与总有机碳量 (C) 垂向变化图

Fig.4 Depth profile of microbial abundance in the sediments as determined by AODC, methane concentration and total organic carbon concentration from the core HS-PC500 from the South China Sea.

HS-PC500 岩心中的每个深度均可见热变形菌 (*Thermoprotei*), 该类群为革兰氏阴性厌氧至兼性厌氧性, 化能自养, 最适生长温度 70 – 97°C, PH 介于 2.5 – 6.5 之间, 多存在与富含硫温度较高的水环境中, 之后在海洋沉积物中也陆续被发现^[21]。本研究所得到的 21 个克隆子的同源序列来源于鄂霍克次海富含甲烷的冷泉环境, 有天然气水合物埋藏的海盆^[11], 还与海洋中氨氧化古菌有关^[22]。

3.3 细菌多样性

通过对细菌 16S rRNA 序列进行的系统发育分析可知, HS-PC500 岩心沉积物中的细菌具有丰富的多样性, 有 23% 的序列与绿弯菌 (*Chloroflexi*) 的菌株具有较高的相似性, 可能代表这一地区的优势类群, 这与之前国内外有关海洋沉积物中微生物的多样性研究中所报道的最优势类群为变形菌的结果有所不同。

绿弯菌又称绿色非硫细菌, 该类群具有漫长的进化史, 并且种类繁多。该类群往往以巨大的数量生活于远洋深海及某些湖泊中, 除富含硫化物高温

热泉外, 活性污泥、海洋、盐和淡水等环境也有其生存^[23]。Morris^[24]等在一项对绿弯菌的研究中, 详细的分析了该类群在太平洋不同位置及不同深度的分布, 认为该类群主要分布于海洋的中层位置, 约占细菌总量的 10% 左右。尽管该类群在海洋环境中所占的比重很大, 但对其具体的功能仍没有透彻研究。Reed 等 2006 年在佛罗里达富含甲烷的冷泉环境的研究表明, 绿弯菌所占的比例随着深度的增加而增加 (和本研究区的情况类似), 指示了该类群在缺氧环境起着独特的重要作用^[25]。绿弯菌类群是水合物较少而有机质丰富沉积物中的主要类群, 不含水合物沉积物中发现此类群的频率远高于含水合物沉积物, 该类群可作为判断沉积物中是否含水合物的一个重要指标^[26], 是今后寻找海底水合物的一个辅助手段。

浮霉菌是本研究的第二大细菌类群, 同源序列主要来源于各大海域的沉积物。该类群常见于浅海沉积物, 在深海沉积物中丰度较低^[27]。该类群中部分类型为兼性好氧化能有机营养菌, 利用发酵或呼

吸作用生长;其它为严格厌氧自养菌,利用亚硝酸盐厌氧氧化氨,在海底厌氧环境下,推测该类群主要进行厌氧代谢,可能是氮的生物地球化学循环的主要类群^[1]。近几年研究发现,南海沉积物中浮霉菌是仅次于变形菌的第二大优势类群,在南沙海区为第三大优势类群,而太平洋边缘其它海区,如南开海槽、日本海槽、秘鲁大陆边缘和喀斯喀特古陆边缘,浮霉菌并非优势类群^[19](参考文献[19]及其引用文献),因此该类群占优势是否是南海特有现象还需进一步验证。

变形菌类群是海洋细菌中一个很大的类群,分为很多亚类群,该类群在海洋环境中普遍存在,并且不同海区沉积物中该类群的组成结构有很大差异。太平洋帕里西维拉海盆5010 m深处沉积物中 γ -变形菌和 α -变形菌为优势细菌种群^[28];东北太平洋结核合同区西区附近沉积物(5027 m)中 γ -变形菌也为最主要的细菌类群^[29];在南海西沙海槽沉积物中 β -变形菌占多数^[30],南海南沙海槽沉积物中 γ -变形菌和 β -变形菌占优势^[31],而日本海沟深海沉积物中是以 γ -变形菌为主,其次是 α -变形菌和 β -变形菌^[32]。这种微生物群落中优势类群的差异,有可能是沉积物的理化性质、地理位置以及气候条件等环境因素造成的^[33]。本研究中出现该类群的4个亚类群: α -、 β -、 γ -、 δ -*Proteobacteria*。其中 δ -变形菌占优势,占细菌文库的11%,并且仅在表层出现。该亚群属于有机化能营养菌,与硫代谢有关^[34],其中

绝大多数都属于硫酸盐还原细菌(SRB), δ -变形菌的大量出现说明硫化物的代谢在该海区沉积物的物质循环过程中可能占有重要地位。有10个克隆属于 α -变形菌,人们发现在陆地土壤环境以及海水中占优势的该亚类群在海洋沉积物中却发现得较少,甚至没有发现。还有少量的 β -变形菌和 γ -变形菌。Freitag等在研究海洋沉积物厌氧条件下氨代谢情况时发现, γ -变形菌在厌氧氨氧化过程中起着重要作用,因此,沉积物中存在的该亚类群可能与沉积物的碳、氮循环密切相关^[36]。

JS1类群最早发现于日本海沉积物中,然而该类群细菌尚未有可培养菌,因此对其新陈代谢等生理特征并不了解,目前为止,仅有通过葡萄糖代谢过程中稳定同位素变化间接证明了该类群是属于厌氧菌^[37]。JS1类群在秘鲁边缘海和喀斯喀特古陆边缘富含甲烷的沉积物中都有分布^[26],因此推测该类群可能在甲烷的消耗或产生中起到特殊作用。

3.4 不同深度微生物分类比较

如图5所示,随着垂向深度的变化,古菌类群的分布呈现明显差异。表层古菌类群丰富,以C3为主要类群,占该层总序列的25.6%,其它还发现了MBG-E、*Halobacteriales*、MBG-A、MCG、NGC这5种类群,在其它深度中并没有发现,而在其它深度发现的MBG-B类群,在表层样品中并未发现。随深度的增加,古菌多样性逐渐降低,MBG-B类群呈现明显

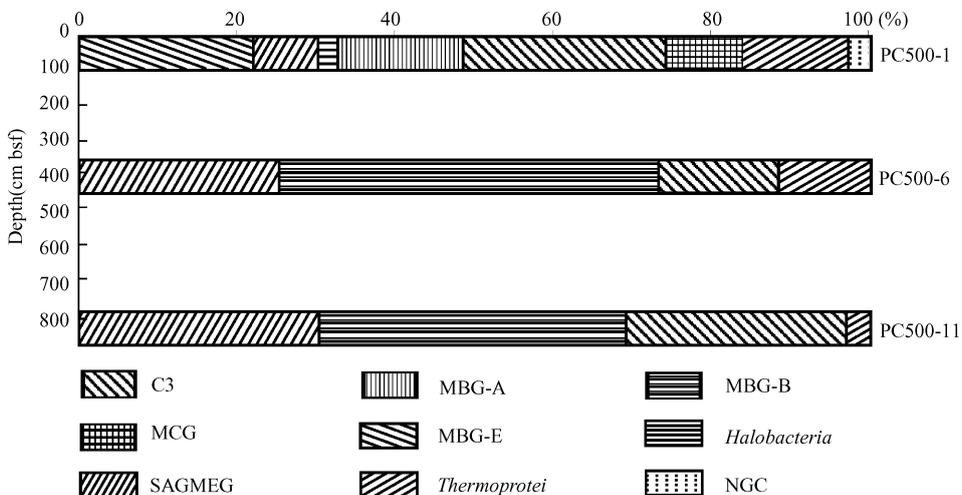


图5 南海北部陆坡神狐海域HS-PC500岩心中古菌类群在不同深度的分布图

的优势。

同古菌多样性变化趋势类似(图6),细菌多样性随深度增加也逐渐降低。表层以沉积物中普遍存在的变形菌为主,但该类群在350 cm没有发现,在

790 cm深度只发现有 β -变形菌和 γ -变形菌两个亚群的4个克隆序列。表层沉积物中没有发现螺旋体菌和JS1类群;随深度的增加,JS1和绿弯菌2大类群优势明显。

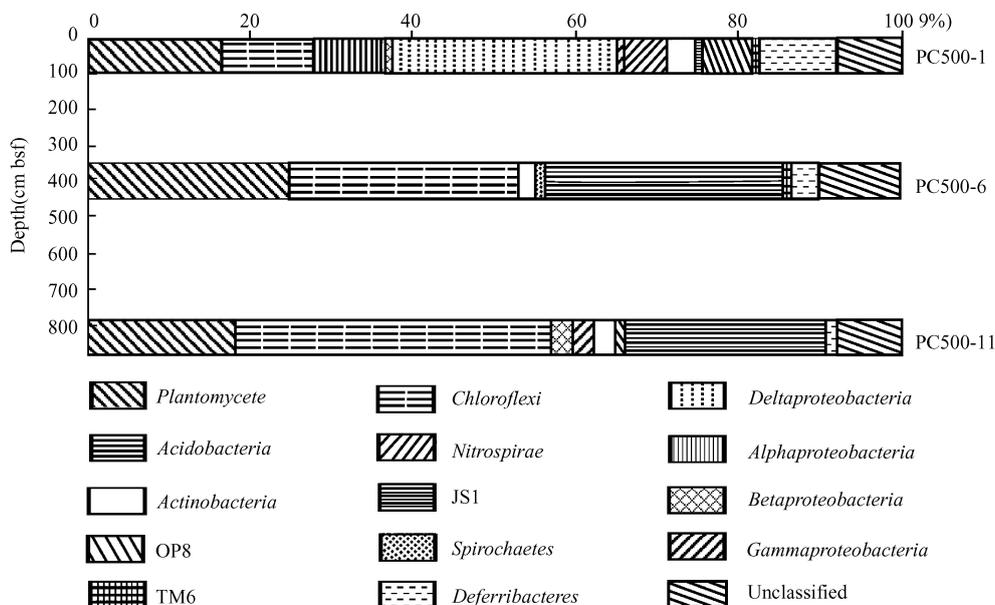


图6 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心中细菌类群在不同深度的分布图

Fig. 6 Depth patterns of the bacterial communities along three discrete layers for the core HS-PC500 from the South China Sea.

4 结论

HS-PC500 岩心来自南海北部陆坡神狐海域,微生物丰度与甲烷浓度具有很好的相关性,表明了该区沉积物中的微生物对甲烷浓度的变化十分敏感。该区域的微生物丰度较低,可能与较低的总有机碳含量有关。该研究区的微生物多样性丰富,具有一定的独特性,并且随深度的增加群落结构变化明显,多样性随深度增加逐渐降低。在该研究区出现的优势微生物类群不能用来直接指示天然气水合物的存在,只能作为寻找天然气水合物的辅助手段,如MBG-B类群以及绿弯菌类群。占有优势地位的几种微生物类群发现于硫酸盐-甲烷转化界面附近,这些类群可能与硫酸盐还原作用有关,说明微生物的硫代谢在该海区沉积物的物质循环过程中可能占有重要地位,但是没有发现和甲烷氧化作用有关的微生物类群。岩心中微生物多样性和地质环境的关系进一步的探讨还有待于建立在未来获得更多微生物和地质环境分析的基础上。

参考文献

- [1] 李涛,王鹏,汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(3):323-329.
- [2] 谢华,薛燕芬,赵爱民,李铁钢,马延和,曾艳. 太平洋帕里西维拉海盆细菌多样性的非培养的初步分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(1):1-5.
- [3] 苏新,陈芳,张勇,王媛媛,焦露,蒋宏忱,董海良. 海洋天然气水合物勘查和识别新技术:地质微生物技术. 现代地质 (*GEOSCIENCE*), 2010, 24(3):409-423.
- [4] 祝有海,张光学,卢振权,陈邦彦,吴必豪. 南海天然气水合物成矿条件与找矿前景. 石油学报 (*Acta Petrolei Sinica*), 2001, (5):6-12.
- [5] 吴能友,张海敏,杨胜雄,梁金强,王宏斌,苏新,卢振权,付少英,张光学,陆敬安. 南海神狐海域天然气水合物成藏系统初探. 天然气工业 (*Natural Gas Industry*), 2007, (9):1-6.
- [6] 杨涛,葛璐,杨红,吴能友,张光学,刘坚. 南海北部神狐海域浅表层沉积物中孔隙水的地球化学特征及

- 其对天然气水合物的指示意义. 科学通报 (*Chinese Science Bulletin*), 2009, 54(20):3231-3240.
- [7] 苏新, 陈芳, 魏士平, 张勇, 程思海, 陆红锋, 黄永祥. 南海北部冷泉区沉积物中微生物丰度与甲烷浓度变化关系的初步研究. 现代地质 (*Geoscience*), 2007, 21(1):101-104.
- [8] Webster G, John Parkes R, Cragg BA, Newberry CJ, Weightman AJ, Fry JC. Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep seafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58(1):65-85.
- [9] 张勇, 苏新, 陈芳, 蒋宏忱, 陆红峰, 周洋, 王媛媛. 南海北部陆坡神狐海域 HS-373PC 岩心表层沉积物古菌多样性. 海洋科学进展 (*Advances in Marine Science*), 2010, 28(3):318-324.
- [10] Sorensen KB, Teske A. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7):4596-4603.
- [11] Reed DW, Fujita Y, Delwiche ME, Blackwelder DB, Sheridan PP, Uchida T, Colwell FS. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8):3759-3770.
- [12] Inagaki F, Suzuki M, Takai K, Oida H, Sakamoto T, Aoki K, Nealson KH, Horikoshi K. Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12):7224-7235.
- [13] Schippers A, Neretin LN, Kallmeyer J, Ferdelman TG, Cragg BA, Parkes RJ, Jorgensen BB. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature*, 2005, 433(7028):861-864.
- [14] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever M, Lauer A, Suzuki M, Takai K, Delwiche M, Colwell FS, Nealson KH, Horikoshi K, D Hondt S, Jorgensen BB. 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 USA*, 2006, 103(8):2815-2820.
- [15] Lanoil BD, Sassen R, La Duc MT, Sweet ST, Nealson KH. Bacteria and archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11):5143-5153.
- [16] Parkes RJ, Cragg BA, Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in seafloor sediments: a review. *Hydrogeology Journal*, 2000, 8(1):11-28.
- [17] 苏新, 陈芳, 于兴河, 黄永祥. 南海陆坡中新世以来沉积物特性与气体水合物分布初探. 现代地质 (*Geoscience*), 2005, 19(1):1-13.
- [18] Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sorensen KB, Anderson R, Fredricks HF, Elvert M, Kelly TJ, Schrag DP, Sogin ML, Brenchley JE, Teske A, House CH, Hinrichs KU. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, 103(10):3846-3851.
- [19] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海西沙海槽表层沉积物微生物多样性. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2008, 28(3):1166-1173.
- [20] DeLong EF, Pace NR. Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology*, 2001, 50(4):470-478.
- [21] Heijs SK, Laverman AM, Forney LJ, Hardoim PR, Elsas Jdv. Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(3):362-377.
- [22] Park SJ, Park BJ, Rhee SK. Comparative analysis of archaeal 16S rRNA and amoA genes to estimate the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea in marine sediments. *Extremophiles*, 2008, 12(4):605-615.
- [23] 杨素萍, 林志华, 崔小华, 连建科, 赵春贵, 曲音波. 不产氧光合细菌的分类学进展. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(11):1562-1566.
- [24] Morris RM, Rappe MS, Urbach E, Connon SA, Giovannoni SJ. Prevalence of the *Chloroflexi*-Related SAR202 Bacterioplankton Cluster throughout the Mesopelagic Zone and Deep Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5):2836-2842.
- [25] Reed AJ, Lutz RA, Vetriani C. Vertical distribution and diversity of bacteria and archaea in sulfide and methane-rich cold seep sediments located at the base of the Florida Escarpment. *Extremophiles*, 2006, 10(3):199-211.
- [26] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever M, Lauer A, Suzuki M, Takai K, Delwiche M, Colwell FS. 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*, 2006, 103(8):2815.
- [27] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. *Marine Biotechnology*, 1999, 1(4):391-400.
- [28] Xu M, Wang P, Wang F, Xiao X. Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province. *Biodiversity and Conservation*, 2005, 14(14):3363-3380.
- [29] Xie H, Xue YF, Zhao AM, Li TG, YH. M. Preliminary research on bacterial diversity of Parece Vela Basin, Pacific Ocean by culture-independent method. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(1):1-5.
- [30] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海西沙海槽沉积物细菌多样性初步研究. *地球科学进展 (Advances in Earth Science)*, 2006, 21(10):1058-1062.
- [31] 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. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(3):274-287.
- [32] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8(5):659-677.
- [33] 邹扬, 曾胤新, 田蕴, 郑天凌. 白令海北部表层沉积物中细菌多样性的研究. *极地研究 (Chinese Journal of Polar Research)*, 2009, 21(1):15-24.
- [34] Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A, Kato C, Horikoshi K. Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(5):277-286.
- [35] Rochelle PA, Cragg BA, Fry JC, John Parkes R, Weightman AJ. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 15(1-2):215-225.
- [36] Freitag TE, Prosser JI. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3):1359-1371.
- [37] Webster G, Watt LC, Rinna J, Fry JC, Evershed RP, Parkes RJ, Weightman AJ. A comparison of stable - isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate - reducing marine sediment enrichment slurries. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(9):1575-1589.

Microbial diversity in sediments of core HS-PC 500 from Shenhu Area, northern South China Sea

Lu Jiao^{1,2}, Xin Su^{1,2*}, Fang Chen³, Yong Zhang^{1,2}, Hongchen Jiang¹, Yi Luo², Hailiang Dong¹

¹ Geomicrobiology Laboratory, Beijing 100083, China

² School of Ocean Sciences, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

³ Guangzhou Marine Geological Survey, Guangzhou 510760, China

Abstract: [**Objective**] We studied the microbial diversity in the sediments of different depth in a gravity piston core HS-PC500 from Shenhu Area, the northern of South China Sea. [**Methods**] Total DNA was extracted from the sedimental materials; the archaeal and bacterial 16S rRNA gene sequences were amplified. The clone libraries were used to analyze the microbial systematic development. [**Results**] Group C3 was the predominant archaeal group in the top layer(0 – 5 cm bsf) sediments, and the Marine Benthic Group (MBG)-B group became predominant with depth, reaching 38.9% and 62.5% in the middle (350 – 355 cm bsf) and bottom (790 – 795 cm bsf) sediments. Some belonged to MBG-A, Miscellaneous Crenarchaeotic Group(MCG), *Thermoprotei*, Novel Group Crenarchaeota(NGC), *Halobacteriales*, MBG-E, South African Gold Mine Euryarchaeotic Group(SAGMEG). *Proteobacteria* was the dominant bacterial group in the top of the core, but became minor deeper within the sediments. As depth increased, *Chloroflexi* and candidate division JS1 became the predominant groups and reached up to 28.1%, 29.2% and 39%, 24.7%. Other sequences respectively belonged to *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, candidate division OP8, *Spirochaetes*, candidate division TM6, *Deferribacteres* and *Plantomycete*. [**Conclusion**] Down-core variation in microbial abundance in sediments of HS-PC500 was consistent with the changes of methane concentration in the same core; the lower microbial abundance might be probably due to lower total organic carbon (TOC) in sediments; However, microbial diversity was relatively high and community structure varied apparently with depth; the community was dominated by clusters that was dominated in sulfate reduction condition, suggesting that microbial metabolization played very important role in the material cycle of marine sediments.

Keywords: 16S rRNA gene library, microbial diversity, gas hydrate, Shenhu Area, South China Sea

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major State Basic Research Development Program of China(2009CB219502), by the Non-profit Industry Financial Program of Ministry of Land and Resources of the PRC(200811014-02) and by the National Special Foundation(GZH200200203-02-01)

* Corresponding author. Tel: +86-10-82335403; Fax: +86-10-82320065; E-mail: xsu@cugb.edu.cn

Received: 21 December 2010/Revised: 24 February 2011