

## 南海北部表层沉积物中原核微生物多样性

张浩<sup>1,3</sup>, 吴后波<sup>1\*</sup>, 王广华<sup>1</sup>, 向文洲<sup>1</sup>, 颜文<sup>2</sup>

中国科学院南海海洋研究所,<sup>1</sup> 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室,<sup>2</sup> 中国科学院边缘海地质重点实验室, 广州 510301

<sup>3</sup> 中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:** 【目的】为研究南海北部沉积物原核微生物的多样性和群落结构。【方法】从南海北部 XSCS13 站位表层沉积物中扩增古菌和细菌的 16S rDNA 并构建文库, 随机挑出阳性克隆子进行测序, 选出所有的 OTU 构建系统进化树, 进行系统发育学分析。【结果】多数克隆子来自于未培养原核微生物, 沉积物中的古菌分属 3 大门类: 泉古菌 (Crenarchaeota)、奇古菌 (Thaumarchaeota) 和 广古菌 (Euryarchaeota), 其中泉古菌 (Crenarchaeota) 为主要门类, 占 71%; 广古菌 (Euryarchaeota) 最少, 只有 3 个克隆子。泉古菌 (Crenarchaeota) 又以 MG I 为主要类群, 占 61%。细菌多样性明显高于古菌, 共 9 个门类: 变形杆菌 (Proteobacteria) (32.6%)、疣微菌 (Verrucomicrobia) (3.0%)、拟杆菌门 (Bacteroidete) (5.2%)、酸杆菌 (Acidobacteria) (4.4%)、绿弯菌 (Chloroflexi) (6.0%)、厚壁菌 (Firmicute) (3.7%)、浮霉菌 (Planctomycete) (5.2%)、芽单胞菌 (Gemmatimonadete) (11.1%)、放线细菌 (Actinobacteria) (4.4%)。变形杆菌为优势类群 (包括  $\alpha$ -Proteobacteria、 $\gamma$ -Proteobacteria 和  $\delta$ -Proteobacteria 3 个亚群), 其中  $\gamma$ -Proteobacteria 是 Proteobacteria 中的优势种群, 占 54.5%。另外所有原核微生物总共有超过 50% 的克隆子与硫酸盐的还原以及甲烷的形成相关。【结论】结果表明南海北部 XSCS13 站位表层沉积物中原核微生物的多样性非常丰富, 其中蕴含大量未知的微生物资源; 另外古菌和细菌群落结构表明该位点可能处于富含甲烷的冷泉活动区。

**关键词:** 南海北部, 微生物多样性, 16S rDNA, 深海沉积物

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013)09-0915-12

海洋沉积物是海洋的最主要组分之一, 它是地球岩石圈和生物圈之间各元素生物地球化学循环过程的中枢, 据估计, 海洋沉积物所蕴含的生物量占到地球总生物量的 1/10 至 1/3<sup>[1]</sup>。原核微生物是海洋生物资源的重要部分, 它不仅承担着海洋能量和物质循环的重要任务而且对海洋资源勘探、海洋环境调查以及探究生命起源有着重大的意义。原核微生物包括细菌 (Bacteria) 和古菌 (Archaea), 细菌种

类比较丰富, 主要有真细菌、蓝细菌、原绿菌、放线菌等; 古菌是一类发现较晚的原核微生物, 通常古菌包括 泉古菌门 (Crenarchaeota)、广古菌门 (Euryarchaeota)、纳古菌门 (Nanoarchaeota) 和初古菌门 (Korarchaeota), 近年有学者研究发现一个新的古菌门类——奇古菌门 (Thaumarchaeota)<sup>[2]</sup>。由于海底 99% 以上的微生物不可培养, 基于 16S rDNA 的分子生物技术成为研究海底微生物多样性不可替

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-GJ03); 海洋可再生能源专项资金 (GHME2011SW04)

\* 通信作者。E-mail: wuhoub@sesio.ac.cn

作者简介: 张浩 (1987 -), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要从事海洋环境与分子微生物学研究。

收稿日期: 2013-02-28; 修回日期: 2013-05-06

代的手段。

南海是西太平洋最大的一个边缘海,邻近西太平洋暖池区,其北部陆坡深水区处于陆、洋过渡壳上,具有较好的天然气水合物形成条件。广州海洋地质调查局 1999-2000 年在对西沙海槽区以及北部陆坡区的初步调查中发现了“拟海底反射层”,证明该海域可能存在潜在的冷泉活动区<sup>[3]</sup>。目前国内对深海冷泉环境微生物资源的研究还处于起步阶段,也没有从环境微生物群落结构的层面探究该处冷活动泉区存在的可能性的相关报道。作者通过构建沉积物中原核微生物 16S rDNA 基因文库和系统发育树来分析表层沉积物中原核微生物的多样性和群落结构,从而为该海域深海表层沉积物微生物资源的探究提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 沉积物样品的采集:**2012 年 5 月中国科学院南海海洋研究所“实验 1 号”科学考察船于南海北部西沙群岛海域抓斗取样,采样站位 XSCS13 (15° 54.898', 110° 38.758'), 水深 891.8m, 沉积物为黑色浆状淤泥,采集后 -20℃ 保存。

**1.1.2 主要仪器和试剂:**PCR 扩增仪、凝胶成像仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司),有机碳分析仪(TOC-V CSH,日本岛津公司),蛋白质自动分析仪(荷兰 SKALAR Primacs SN),Metrohm 790 Personal IC 离子色谱仪(瑞士万通中国有限公司),pH 测量仪、电泳仪(广州正一科技有限公司),DNA 回收纯化试剂盒、*Hha*I 和 *Hinf*I 内切酶、pMD18-T、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ (广州瑞真生物科技有限公司)。

**1.1.3 引物:**表 1 为本研究使用的引物。

表 1. 本研究使用的通用引物

Table 1. The universal primers in this paper

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
21F	TTCCGGTTGATCYGCCGGA	19
958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	19
27F	AGAGTTTGATCTGGCTCAG	20
1500R	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	20

Y = C or T; M = A or C.

### 1.2 样品环境化学指标的测定

常规化学指标的测定参照海底沉积物化学分析方法进行<sup>[4]</sup>,取 5g 的沉积物于 60℃ 烘箱中连续烘

烤 72h 后,通过计算沉积物的重量损失来测定沉积物样品的水含量;沉积物中总有机碳含量(TOC)用有机碳分析仪进行测定;沉积物中总氮含量(TN)用蛋白质自动分析仪进行测定。采用孔隙水测定法测定离子浓度,用超纯水把沉积物的孔隙水样品稀释 100 倍,再用离子色谱法测定 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 和 Cl<sup>-</sup> 的质量浓度。用 PH 测量仪测定沉积物孔隙水的 PH 值。

### 1.3 沉积物总 DNA 的提取和纯化

**1.3.1 DNA 的提取:**参照刘国辉等<sup>[5]</sup>的文献,用高盐法手动提取沉积物样品中的总 DNA。

**1.3.2 DNA 的纯化与回收:**在汪渊等<sup>[6]</sup>的文献提供的方法的基础上加以改进,具体步骤为:将需回收的 DNA 进行凝胶电泳,使目标片段与其他大小的片段分离;凝胶染色后,在紫外灯下用刀片切下含有目的 DNA 片段的胶条;将预处理过的透析袋一端封紧,并将透析袋装满 1 × TAE,然后将所切胶条放入透析袋中;倒掉多余的缓冲液(只留 500 μL 左右),夹紧另一端,注意袋内不能留有气泡;将含有胶条的透析袋放在 1 × TAE 电泳槽中,用 4-5 V/cm 的电压电泳 8 h 后调换透析袋方向继续电泳 1 min;打开透析袋,小心地将胶条周围的溶液转移到灭菌 EP 管中,然后用少量 1 × TE 冲洗胶条和透析袋内壁,将洗液一并吸入 EP 管中。

### 1.4 PCR 扩增

分别采用古菌 16S rDNA 通用引物(21F,958R)和细菌 16S rDNA 通用引物(27F,1500R)进行 PCR 扩增。古菌 PCR 条件:95℃ 3 min,94℃ 40 s,53℃ 45 s,72℃ 1.5 min,30 个循环;72℃ 10 min。细菌 PCR 条件:95℃ 3 min,94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。

### 1.5 16S rDNA 文库的构建和 RFLP 分析

将 PCR 扩增产物连接到 T-Vector,然后转化到(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  细胞里,进行蓝白斑筛选,通过菌落 PCR 筛选阳性克隆子。扩增的插入片段分别用 *Hha* I 和 *Hinf* I 两种内切酶进行完全酶切,用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测,分析两种酶切后条带的谱型,对不同的带型进行分类统计。典型的 RFLP 条带类型对应的克隆子 PCR 产物送到深圳华大基因公司测序。

### 1.6 系统发育学分析

根据带型数目的多少,从细菌和古菌文库中各

随机选取 150 个克隆子的阳性插入片段进行测序。运用 RDP 在线数据库中 CHECK\_CHIMERA 程序对得到的序列进行嵌合体检验, 剔除嵌合体序列, 用 Bioedit 软件对剩余的序列进行比对, 把相似性大于 97% 的序列定义为同一 OTU。从每个 OTU 里面选取一个克隆子, 应用 Blast 在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 中进行比对, 找出与目标序列相似的序列; 用 ClustalX (Version 1.83) 和 MEGA.5 构建系统进化树, 采用 Neighbor-Joining 建树方法, 建树结果进行 Bootstrap1000 次系统检验。计算文库覆盖率 (Coverage), 来评估文库的质量, 计算公式为:  $C = [1 - (n/N)] * 100$ ; (其中 n 代表不重复的克隆子数目, N 代表总的克隆子数目。) 将所得到的

16S rRNA 基因片段提交到 GenBank 数据库序列登录号码: KC747004-KC747128 以及 KF000350-KF000367。

## 2 结果

### 2.1 沉积物环境化学指标

南海北部西沙群岛海域 XSCS13 站位样品的环境化学相关指标如表 2 所示, 沉积物的 PH 值为 7.63, 含水量 (MC) 为 16.41% 之间,  $\text{NO}_3^-$  浓度为 17.47 mg/L,  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度为 1.05 g/L,  $\text{Cl}^-$  浓度为 11.33 g/L, 总有机碳含量 (TOC) 为 4.62 g/kg, 总氮 (TN) 含量为 0.58 g/kg, 碳氮比 (TOC/TN) 为 7.96。

表 2. XSCS13 站位表层沉积物环境化学指标

Table 2. Chemical measurements of surface sediment in XSCS13 station

PH	MC/%	$c(\text{Cl}^-) / (\text{g/L})$	$c(\text{NO}_3^-) / (\text{mg/L})$	$c(\text{SO}_4^{2-}) / (\text{g/L})$	TOC / (g/kg)	TN / (g/kg)	TOC/TN
7.63	16.41	11.33	17.47	1.05	4.62	0.58	7.96

### 2.2 16S rDNA 文库分析

从细菌和古菌每个文库各随机挑取 400 个阳性克隆子扩增产物进行酶切, 细菌 *Hha* I 酶切得到 48 个带型, *Hinf* I 酶切得到 62 个带型, 对两种酶切结果进行统计分析后共得到 73 个带型; 古菌 *Hha* I 酶切得到 32 个带型, *Hinf* I 酶切得到 22 个带型, 对两种酶切结果进行统计分析后共得到 45 个带型。每个文库按照带型的不同各挑出 150 个克隆子进行测序, 最后细菌文库得到 135 个有效克隆子, 分属 71 个 OTU, 古菌文库得到 123 个有效克隆子, 分属 52 个 OTU。计算得细菌的文库覆盖率为 82.25%, 古菌的文库覆盖率为 87%, 表明两个文库基本可以反映沉积物样品中微生物的多样性。

### 2.3 原核微生物多样性

**2.3.1 古菌多样性:** 古菌文库总共 123 个有效克隆子, 来自 3 个门类: 泉古菌 (Crenarchaeota)、广古菌 (Euryarchaeota)、奇古菌门 (Thaumarchaeota)。其中泉古菌有 87 个克隆子, 占文库的 71%; 奇古菌次之, 有 13 个克隆子; 广古菌最少, 仅有 3 个 OTU, 且都为同一种群。剩下 20 克隆子暂不能确定其分类地位 (Unclassified), 只有一个属于可培养的泉古菌。古菌系统发育树如图 1、图 2。

泉古菌 (Crenarchaeota) 的 87 个克隆子中有 1

个可培养, 来自于深海板状海绵共生体, 序列相似性为 94%。有 53 个克隆子属于 MG I, 占泉古菌总数的 61%, MBG-B 占 17%, MBG-A 只占 7%。泉古菌同源序列大部分来自深海沉积物, 其中有 13 条来自于南极洲深海沉积物 (序列相似性在 89% - 97% 之间), 8 条来自太平洋深海站底泥 (序列相似性均在 94% 以上), 来自日本海熊野盆地和东太平洋海隆的玄武岩的同源序列各有 2 条; 还有 1 条来自胡安德富卡海峡断层沉积物。另有一些不知名的泉生古菌, 序列相似性在 89% - 98% 之间。泉古菌中有 3 个 OTU (总共 7 个克隆子) 的 16S rDNA 序列与 1 株来自深海沉积物的非培养具有硝化作用的古菌 (FJ971122.1) 有 95% 以上相似性。

奇古菌 (Thaumarchaeota) 中有 8 个属于 MG I, 在 8 个 MG I 中有 5 条同源序列来自于热带南太平洋东部永久低氧带。奇古菌所有克隆子同源序列中有 11 条来自于热带南太平洋东部永久低氧带 (相似性在 84% - 97%), 占总数的 52.2%; 有 5 条来自太平洋东北部亚北极区的低含氧带; 另有 1 条来自于白令海峡沉积物, 序列相似性较低, 只有 87%。

广古菌 (Euryarchaeota) 数量较少, 只有 3 个克隆子, 且全部属于同一 OTU, 同源序列来自于热带大西洋的罗曼什断裂带, 属于嗜盐碱单孢菌属 (*Natronomona*) 相似性为 98%。

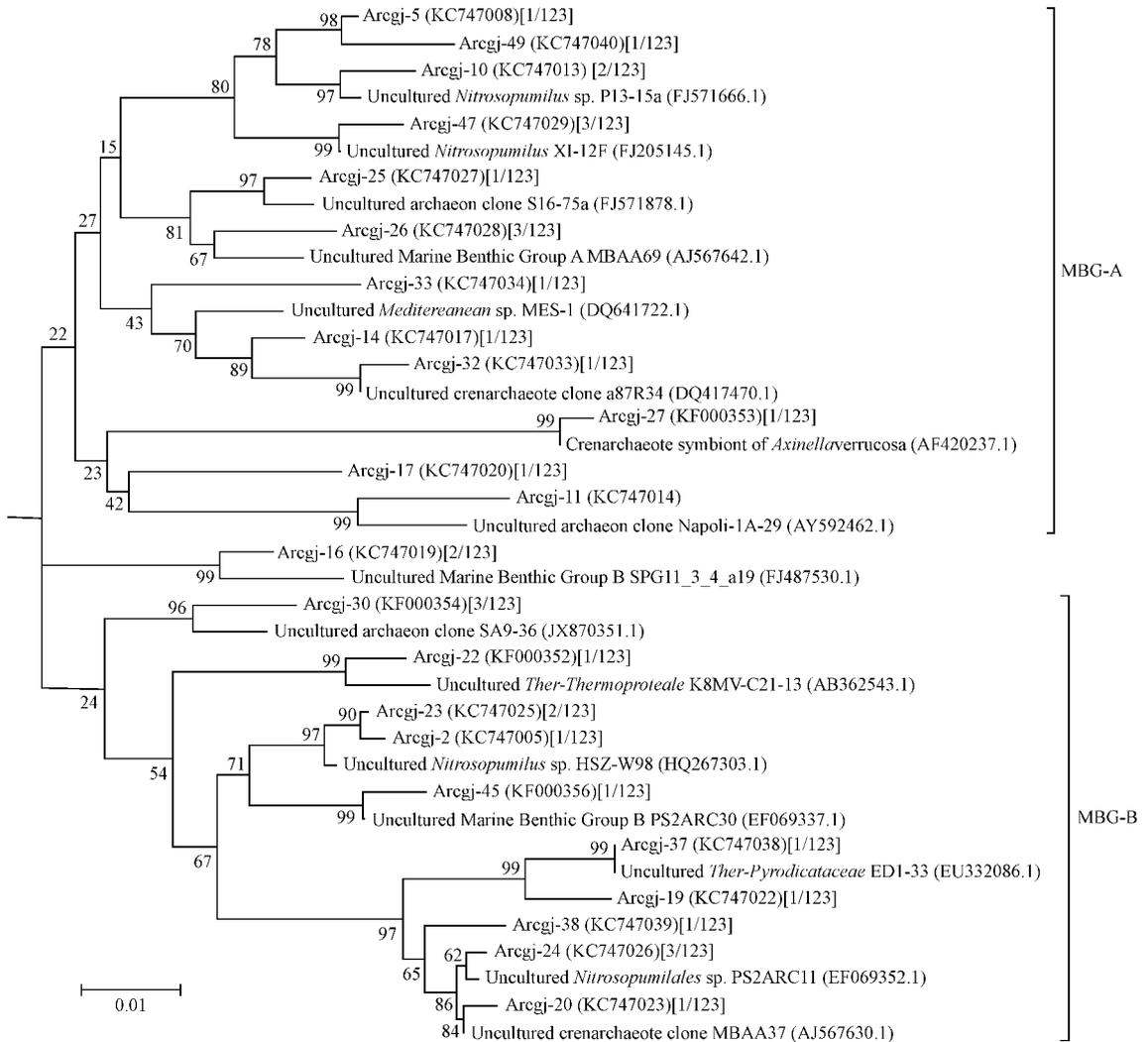


图 1. 南海北部表层沉积物古菌 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree of archaea 16S rDNA gene from the sediment of northern South China Sea. The tree was constructed by using the neighbor-joining method. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching point. The scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide site. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank and numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. "Arcgj-XX" is sequence name in this paper.

**2.3.2 细菌多样性:**细菌文库一共 135 个有效克隆子,包含 9 个门类。有 4 条序列来自于可培养菌株,其中 3 株是变形菌,1 株属于放线菌类。沉积物样品中优势菌为变形菌 (Proteobacteria),一共有 44 个克隆子(其中  $\alpha$  变形菌纲 13 个克隆子、 $\delta$  变形菌纲含 8 个克隆子、 $\gamma$  变形菌纲 23 个克隆子),占全部克隆子的 32.6%。疣微菌 (Verrucomicrobia) 4 个,占 3%、拟杆菌门 (Bacteroidete) 7 个,占 5.2%、酸杆菌 (Acidobacteria) 6 个,占 4.4%、绿弯菌 (Chloroflexi) 8 个,占 6%、厚壁菌 (Firmicute) 5 个,占 3.7%、浮霉菌 (Planctomycete) 7 个,占 5.2%、芽单胞菌

(Gemmatimonadete) 15 个,占 11.1%、放线菌 (Actinobacteria) 6 个,占 4.44%;另外,有 33 个克隆子未分类 (Unclassified),占总克隆子的 24.4%。细菌系统发育树如图 3、图 4。

变形菌门中仅发现 3 个纲, $\alpha$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  变形菌纲。其中优势种群为  $\gamma$ -Proteobacteria,一共 24 个克隆子,占总变形菌的 54.5%; $\alpha$ -Proteobacteria 次之,占总数的 25%; $\delta$ -Proteobacteria 占总数的 15.91%;另外有 2 个克隆子属于变形菌门,但具体分类地位暂不确定。 $\alpha$ -Proteobacteria 的 11 个克隆子均为不可培养菌株,相似性在 92% 至

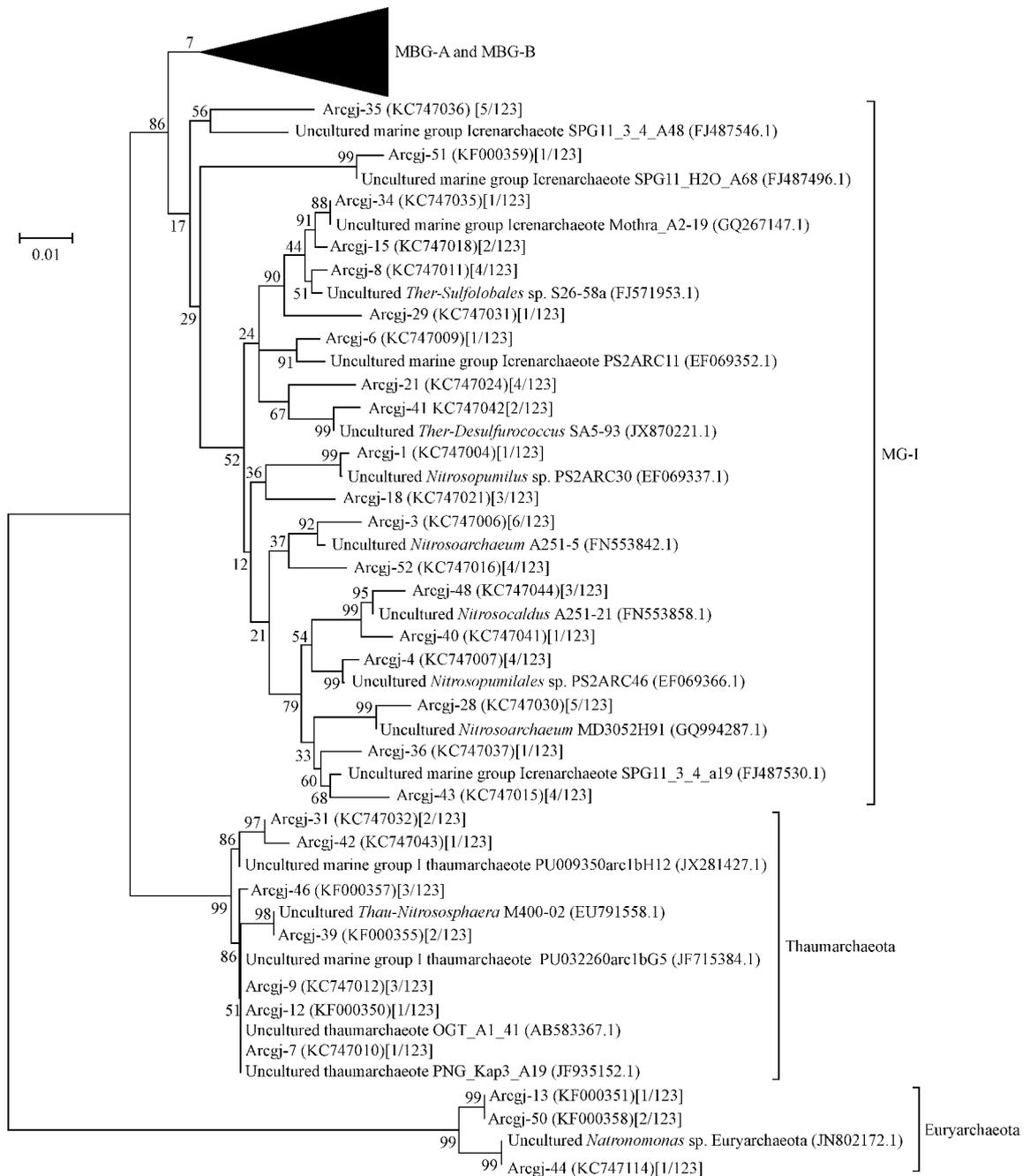


图 2. 南海北部表层沉积物古菌 16S rDNA 基因系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of archaea 16S rDNA gene from the sediment of northern South China Sea. The annotation was the same as in Figure 1.

99% 之间, 其中 6 个隶属于红螺菌目 (*Rhodospirillales*), 有 3 条同源序列来自于西班牙阿尔达米拉克 (相似性 95% 以上), 2 条同源序列来自于东地中海克里特岛南部边缘底泥 (相似度分别为 93% 和 95%), 另外还有 1 条来自于肯帕德湾的海滨土壤, 相似度达 97%。γ-Proteobacteria 的 24 个克隆子中有 2 个可培养, 1

株假单胞菌 (*Pseudomonas*) (94% 的相似性), 同源序列来自于从南极海洋底泥中分离出的萘降解菌株; 另 1 株隶属硫红螺旋菌属 (*Thiorhodospira*) (97% 的相似性)。在 22 个不可培养菌株的同源序列里面, 有 1 株菌属于外硫红螺旋菌科 (*Ectothiorhodospiraceae*), 来自于肯帕德湾的滨海土壤 (98% 的相似性); 另外 1 条属于

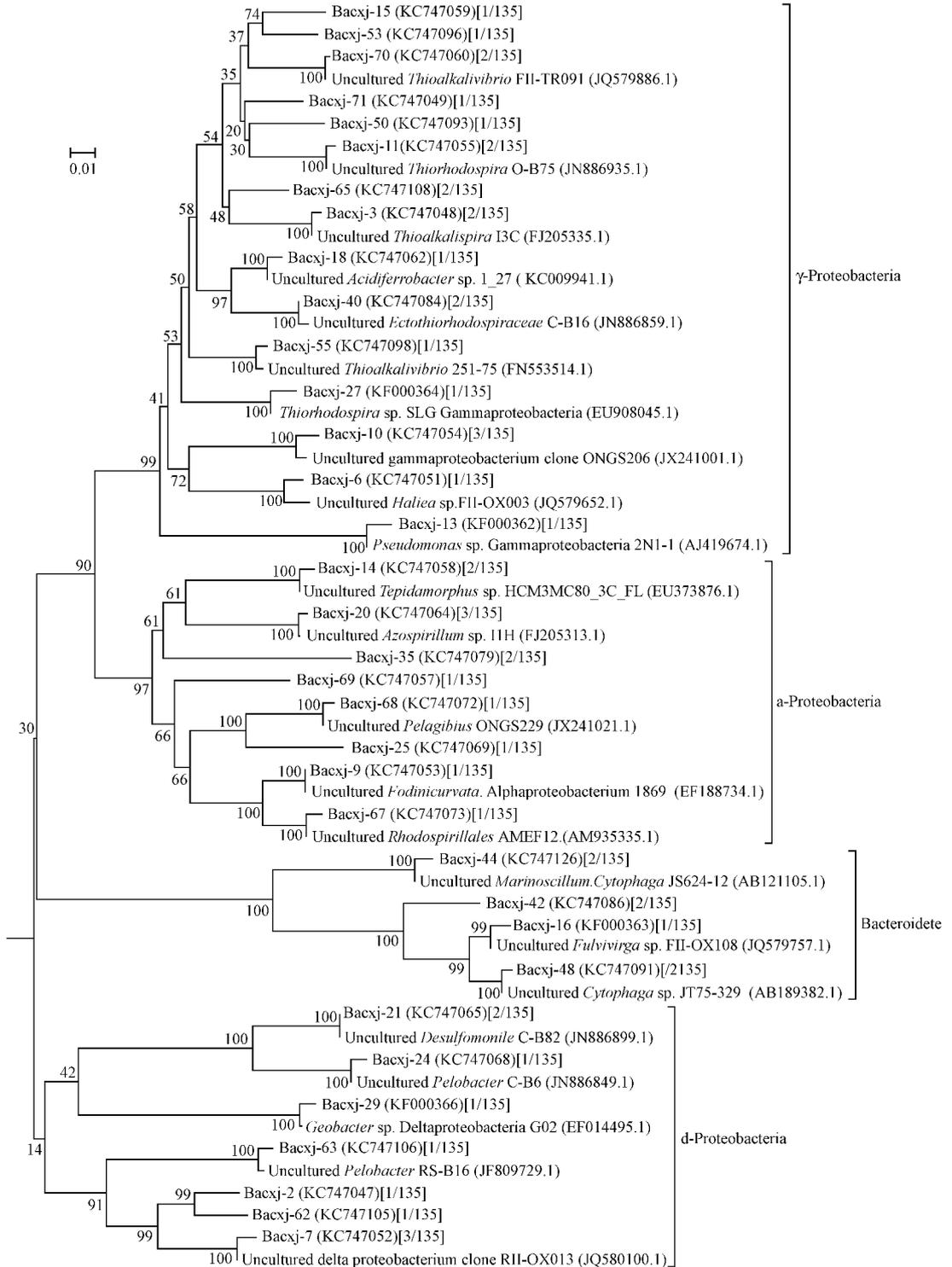


图 3. 南海北部表层沉积物细菌 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of bacterial 16S rDNA gene from the sediment of northern South China Sea. The annotation was the same as in Figure 1. "Bacxj-XX" is sequence name in this paper.

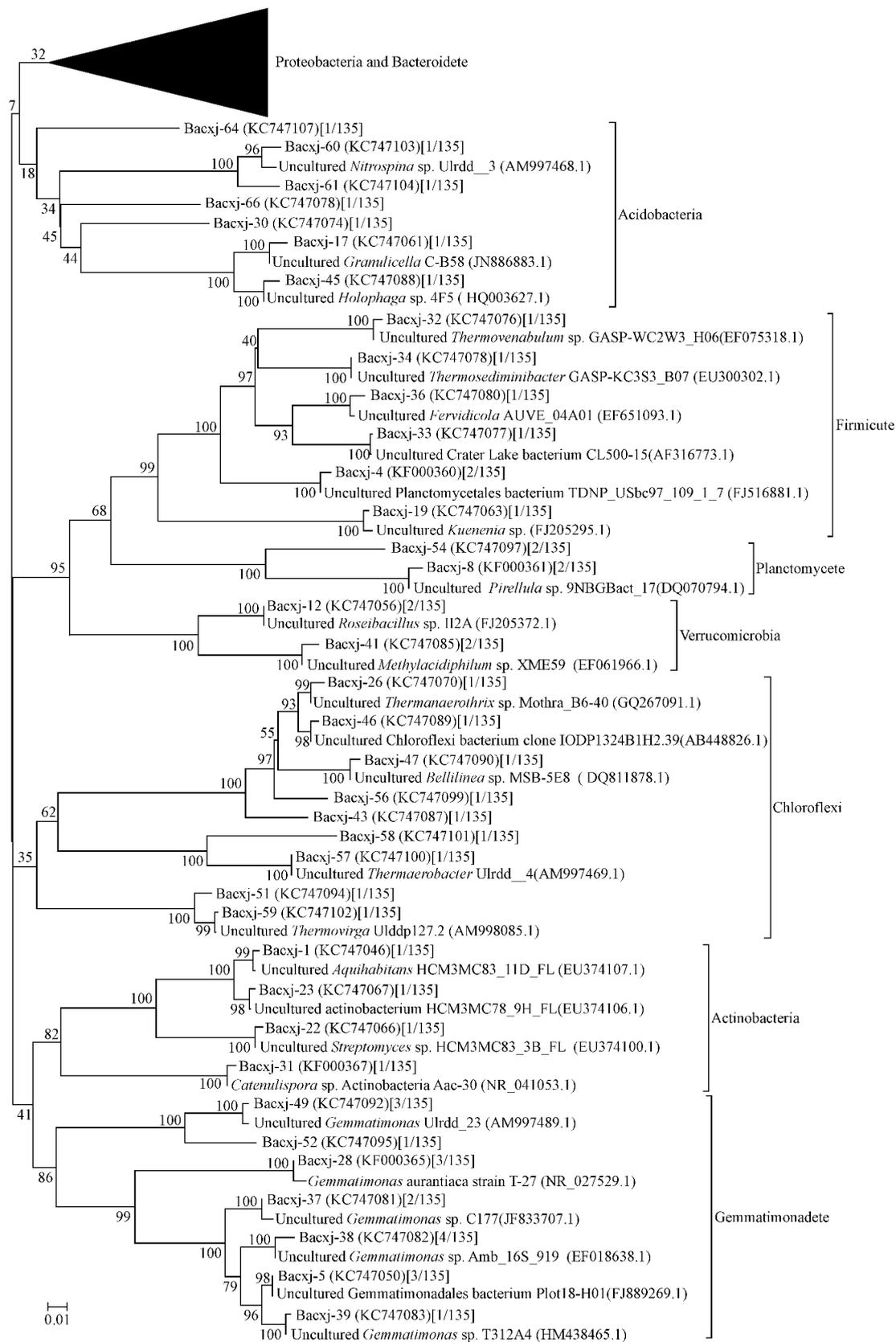


图 4. 南海北部表层沉积物细菌 16S rDNA 基因系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree of bacterial 16S rDNA gene from the sediment of northern South China Sea. The annotation was the same as in Figure 1. "Bacj-XX" is sequence name in this paper.

(*Thioalkalivibrio*) (相似度 95%), 来自于法属圭亚那海岸; 还有 2 条来自于西班牙加利西亚受石油污染的海洋底泥 (分别为 91% 和 94% 的相似性), 1 条来自于西南印度洋脊的半固结的碳酸盐岩 (相似性 96%)。δ-Proteobacteria 克隆子一共 10 个, 其中 1 个可培养菌, 其同源序列是地杆菌属 (*Geobacter*), 相似性为 93%。在不可培养的 9 株细菌的同源序列中, 2 条来自于来自西南印度洋脊的半固结的碳酸盐岩 (相似性都在 97% 以上), 2 条来自于西班牙加利西亚石油污染的海洋底泥。疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 的 4 个克隆子中有 2 条同源序列来自于中国厦门的红树林底泥。拟杆菌门 (*Bacteroidete*) 克隆子中同源序列有 2 条是噬细胞菌属 (*Cytophaga*), 分别来自于日本海 3100m 底泥沉积物和日本海沟冷泉沉积物, 另有 1 条来自西班牙加利西亚石油污染的海洋底泥。值得一提的是在发育树上 *Bacteroidete* 簇处于 δ-Proteobacteria 簇和 α-Proteobacteria 簇之间, 并且 *Bacteroidete* 簇中克隆子 Bacxj-16 的同源序列 (JQ579757.1) 与 δ-Proteobacteria 簇中 Bacxj-7 的同源序列 (JQ580100.1) 同来自于西班牙加利西亚受石油污染的海洋底泥, 显示了这 3 簇菌之间较近的亲缘关系。酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 共 6 个克隆子, 有 3 条同源序列来自于西班牙中部的浅水湖的缺氧底泥, 相似性均高于 96%; 另有 2 条来自西南印度洋脊的半固结的碳酸盐岩, 相似性分别为 98% 和 95%。绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 克隆子的同源序列中有 2 条来自于墨西哥海湾大陆坡的浊流沉积物, 且相似性都在 97% 以上。厚壁菌门 (*Firmicute*) 总共有 5 个克隆子, 其中 1 条同源序列来自与澳大利亚变性土, 2 条来自于西班牙加利西亚石油污染的海洋底泥, 都与硫代谢相关。浮霉菌门 (*Planctomycete*) 中有 1 株菌是小梨形菌属 (*Pirellula*), 序列相似性为 97%, 有 2 条同源序列来自于西班牙中部国家公园湿地, 相似性分别为 93% 和 96%。芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 一共有 15 个克隆子, 序列相似性均在 91% 至 99% 之间。放线菌门 (*Actinobacteria*) 共有 6 个克隆子, 有 1 株可培养菌属于棒杆菌亚目 (*Catenulispora*), 相似度为 96%。不可培养菌株的相似序列中有 3 条来自于东地中海克里特岛

南部边缘的底泥。

### 3 讨论和分析

#### 3.1 沉积物化学指标的分析

碳和氮在海洋物质和能量循环过程中尤为重要, 深海沉积物是大气中 CO<sub>2</sub> 的最终归宿之一, 也是微生物代谢的重要场所。而沉积物中氮的再生、释放和储藏过程不仅可调控海洋微生物的生长, 同时也影响着海洋的固碳能力。在海洋沉积物研究中, TOC/TN (碳氮比) 的大小常被作为判断有机碳来源的标准, 海洋自身有机物的碳氮比其极限值为 6.6, 而陆源有机物的碳氮比可达 20 以上<sup>[7]</sup>, 因此沉积物中碳氮比越低, 其海源有机物所占比例越高。从沉积物样品的碳氮比测定结果 (7.96) 来看, 其有机物还是以海源为主。另外沉积物样品中的 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度表明沉积物中可能存在大量能利用硫酸盐和硝酸盐的微生物。

#### 3.2 实验过程可行性与效率的分析

在 16S rDNA 文库的构建的整个过程中, DNA 提取、纯化和 PCR 扩增等步骤都影响着最后系统发育分析结果。本实验采用高盐法手动提取总 DNA, 片段大小在 20 kb 以上, 保证了 16S rDNA 扩增的完整性; 同时本实验中 DNA 的纯化则摒弃常规的试剂盒溶胶回收, 而采用笔者改良后的电透析洗脱法纯化回收 DNA, 这样既保证了总 DNA 的纯度又减少了 DNA 的机械损伤, 使实验结果更完整。PCR 循环数的设置可能是引起较大实验偏差的重要原因之一<sup>[8]</sup>, 前人的研究中采用的循环数从 25 到 33 不等<sup>[9-10]</sup>, 经过多次尝试, 发现高质量的模板用 30 个循环足以提供后续实验所需的 PCR 产物, 同时不会因为循环数太多而导致较大的实验偏差。采用 RFLP 和克隆文库相结合的方法研究微生物多样性, 既快速地对文库克隆子进行分型, 又减少测序量。RFLP 结果显示大多数古菌的酶切带型非常相似, 但是测序结果显示即使相同的酶切带型也能代表不同的 OTU (即序列相似性 < 97%) 只是亲缘关系很近, 基本都在同一个属。样品中古菌多样性相对于细菌确实要低很多, 且来自不同 OTU 的克隆子序列亲缘关系很近, 这虽然符合大多数研究中关于深海沉积物中古菌丰富度远远低于细菌的报道, 但笔者认为古菌引物的通用性偏低也可能造成实验结

果的局限性。在以往微生物分子生态学研究,对于 16S rDNA 克隆文库一般分析 50 - 100 个阳性克隆即可粗略反映环境样品中的优势微生物类群<sup>[11]</sup>。本研究中每个 16S rDNA 文库分析了 120 - 140 个克隆,覆盖率均超过 80%,虽然整体上可以反映出沉积物中大部分微生物群落的状况,但仍有 20% 左右的微生物漏掉,从侧面说明了沉积物中的原核微生物多样性很高。

### 3.3 原核生物群落结构的讨论

古菌和细菌总共 258 个有效克隆子,其中只有 5 个来自于可培养菌株,这证实了南海北部沉积物的微生物群落中大部分原核生物不可培养。5 个可培养微生物有 4 个来自细菌,只有 1 株来自古菌,反映了古菌相对于细菌菌株的可培养性更差。在 4 个可培养细菌中有 3 个是变形菌,符合变形菌在深海沉积物中的优势地位。最后,多个克隆子与亲缘关系最近的序列的相似度都在 89% 至 97% 之间,表明南海北部深海沉积物中还有众多潜在的新菌种有待进一步研究,体现了深海沉积物丰富的微生物资源。

**3.3.1 古菌多样性分析:**古菌总共 52 个 OTU 来自 3 个门类, Crenarchaeota, Thaumarchaeota 和 Euryarchaeota。国内外很多相关研究表明,古菌在海洋中的种类和数量分布极不平衡,一般而言古菌大量存在于海水中,而海洋沉积物中除极端环境外,古菌仅占 2.5% 至 8% 甚至更少<sup>[12]</sup>。DeLong 等通过对大西洋和太平洋不同水深的样品的系统进化分析,发现古菌的相对含量和水深呈正相关<sup>[13]</sup>,对比李涛(2008)等<sup>[14]</sup>对南海西沙海槽 3697m 深海表层沉积物微生物多样性研究结果,发现其古菌丰富度高于本实验结果,符合之前相关报道中深海古菌的分布特点。Crenarchaeota 中存在能够固定无机碳的类群<sup>[15]</sup>,其对无机碳的吸收随海水深度而增加<sup>[16]</sup>。本实验中泉古菌占古菌总数的 71%,其中一些泉古菌克隆子与深海能固定无机碳的泉古菌具有较高的 16S rDNA 序列相似性,加上沉积物中有机碳含量高,推测一些泉古菌可能参与环境中无机碳的固定和甲烷的形成。MG I 是 Crenarchaeota 中的主要类群,占总数的 61%。MG I 最初发现于海水环境,同样广泛分布于表层和次表层沉积物中,是甲烷丰富而不含水合物的沉积物中的主要类群<sup>[17]</sup>,其高比例存在表明该位点可能存在含量丰富的甲烷。另外在 MG I 亚群中相当一部分与能够利用硝酸盐的嗜中

温泉古菌具有较大的相似性(在 93% - 98% 之间),结合沉积物中较高的  $\text{NO}_3^-$  浓度,推测沉积物中可能含有能够利用硝酸盐的泉古菌类群,它们可能在中氮的循环过程中起重要作用。隶属 MG I 的海洋氢氧化古菌已经被分离纯化<sup>[18]</sup>,这一类具有硝化作用的古菌,广泛分布于沉积物表面低氧和低氮的环境中,在氮循环过程中起关键作用。从样品中得到的序列与硝化古菌有较高的相似性,说明该站位也存在氮的硝化过程。该站位得到的泉古菌序列占所得古菌序列的绝大部分,尤其是 I 型海洋泉古菌含量最为丰富,说明泉古菌是该站位的优势古菌,泉古菌可能在该站位的碳、氮元素生物化学循环中占有十分重要的地位。MBC-B 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发现此类群<sup>[19]</sup>,且在底部甲烷上涌流的上层硫酸盐还原带沉积物中含量丰富,MBC-B 类群可能参与硫酸盐还原和甲烷氧化的过程<sup>[20]</sup>,而硫化物作为主要能源物质对维持冷泉区原核微生物群落的稳定有重要作用。实验结果表明沉积物中可能存在大量的以硫化物为主要能源物质并能参与形成甲烷的菌群。

Thaumarchaeota 是近些年才被学者提出的一个新的类群,在进化关系上和 Crenarchaeota 很相近。实验结果显示 Thaumarchaeota 中大部分类群同样隶属于 MG I,并且进化树上的 Thaumarchaeota 簇与 Crenarchaeota 簇似有并列关系,更体现出了 Thaumarchaeota 与 Crenarchaeota 在进化上的亲缘性。李涛等(2008)<sup>[15]</sup>研究发现南海西沙海槽 3697m 深海表层沉积物中 Euryarchaeota 占古菌总量的 16.9%,而本实验 Euryarchaeota 含量很少,只有少数几个克隆子,结果对比再次证实深海沉积物中 Euryarchaeota 含量很少,并且随着海水的深度加深,其表层沉积物中 Euryarchaeota 的含量有一定程度的增加。

**3.3.2 细菌多样性分析:**沉积物中细菌的多样性非常丰富,覆盖 9 个门类,各门类细菌比例分布相对均衡,其中 Proteobacteria 为相对优势菌,占全部的 32.6%,这与国内外有关深海沉积物的微生物多样性的研究中所报道结果相一致<sup>[21]</sup>。许多研究表明变形菌是海洋表层沉积物中丰度最大的菌门,一般都超过细菌总含量的 50% 以上,同时  $\gamma$ -变形菌是海洋沉积物里变形菌中含量最多的一类<sup>[22]</sup>。实验结果表明 Proteobacteria 为优势类群(占总数的

32.6% ) , 其中存在大量的与硫化物以及氢气代谢相关的光合自养和化能自养类群。  $\gamma$ -Proteobacteria 是变形菌中的优势菌, 所占比例高达 54.5% , 其中绝大多数属于厌氧生长的假单胞菌, 这是因为特殊的高盐、高压和低温的深海环境选择性作用所致。在  $\gamma$ -变形菌中还发现两株可培养菌株, 其比例相对其他类群较高, 这也符合  $\gamma$ -变形菌在培养法中最常见的相关报道。  $\alpha$ -Proteobacteria 多分布在各种沉积物中, 包括海滨土壤、海岛边缘底泥和火山口, 推测此亚群在沉积物中可能以氧化还原硫化物作为主要的代谢方式。  $\delta$ -Proteobacteria 亚群严格厌氧, 大多为硫酸盐还原菌, 包括粘细菌和严格厌氧的部分类群, 如硫酸盐还原菌 (*Desulfovibrio*、*Desulfobacter*、*Desulfococcus*、*Desulfonema* 等), 主要存在于冷泉热液区域<sup>[23]</sup>, 与该亚群亲缘关系较近的细菌全部为硫酸盐还原菌, 因此沉积物中  $\delta$ -变形菌绝大部分属于硫酸盐还原菌。 KC747052 (3 个克隆子) 与西班牙加利西亚石油污染的海洋底泥未培养  $\delta$ -Proteobacteria 克隆有高同源性, 预示着沉积物中的  $\delta$ -Proteobacteria 可能与石油资源利用和降解有关, 对环境中的碳和硫循环起着重要作用。变形菌所有类群都参与微生物硫循环的地球化学过程, 而丰富的硫化物以及缺氧环境为这类化能营养微生物提供能量来源<sup>[24]</sup>。 *Acidobacteria* 是一类广泛分布的微生物, 在陆地海洋的各种环境中经常被发现, 其遗传多样性和代谢多样性从侧面证明其可能存在多种多样的功能。与本实验中发现的酸杆菌序列亲缘关系最近的序列来自于西班牙中部的浅水湖的缺氧底泥和西南印度洋脊的半固结的碳酸盐岩, 也证实酸杆菌能广泛分布于陆地淡水湖和深海环境中。 *Chloroflexi* 是 20 多年前才被认可的一个新的系统发育分支<sup>[25]</sup>, 以前的研究中表明, 绿弯菌主要生活在深海和一些湖泊中, 被认为在厌氧环境中起着重要作用, 是水合物较少而有机质丰富的沉积物中的主要类群, 因此绿弯菌的含量可以作为粗测沉积物中水合物含量的一个重要指标<sup>[26]</sup>。本实验中与绿弯菌 16S rDNA 亲缘关系最近的序列来自墨西哥海湾大陆坡的浊流沉积物, 与本研究样品的取样环境相似。 MG I 与 *Chloroflexi* 共同支持了样品沉积物中水合物含量少的观点。 *Firmicute* 中有 40% 的克隆子与硫代谢有关, 相似序列来自于油污染的水相或者天然气水合物区, 说明硫代谢是该区域物质代谢

的重要组成部分并且可能有烃类物质代谢。值得注意的是有 1 株 *Proteobacteria* (同源序列编号为 EF075318.1) 在发育树上与 *Firmicute* 聚成一簇, 这显示他们之间较近的进化关系。 *Actinobacteria* 是一种个体微小但是在海洋环境中广泛存在的微生物类群, 被认为在海洋环境中发挥着非常重要的作用。本实验结果中来自放线菌的克隆子总共有 6 个, 其中还有 1 株可培养的棒杆菌亚目 (*Catenulispora*), 也展现出了海底沉积物中丰富的微生物资源。

南海北部表层沉积物中细菌含量高, 门类相对齐全, 多样性丰富, 且各个门类的细菌群落相对均衡, 不存在压倒性优势菌群, 展示出了丰富的细菌多样性; 古菌多样性较低, 且泉古菌是绝对优势类群, 广古菌含量很少, 符合海洋表层沉积物古菌的分布特点。南海北部表层沉积物原核微生物丰富的多样性向我们展现了海洋中的巨大的微生物资源。另外, 本研究试图从沉积物中环境微生物的种类和群落构成的宏观视角来分析采样点冷泉活动区存在的可能性, 得到了一些线索。之前研究表明烃类物质的生成、储藏及降解都与微生物的各种物质代谢相关, 而本研究结果显示克隆子相似序列有很大一部分来自油污染的水相区, 说明该区域中可能有烃类物质的代谢; 此外还有超过 75% 的克隆子与硫、氮的代谢相关以及 50% 的克隆子与硫酸盐和硝酸盐的还原以及甲烷的生成有关, 古菌和细菌的群落结构暗示我们沉积物中可能含有丰富的烷类物质。种种结果分析表明采样点可能处于潜在的深海冷泉活动区。

## 参考文献

- [1] Parkes R, Cragg B, Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in seafloor sediments. *Hydrogeology Journal*, 2000, 8 (13) : 13-26.
- [2] Zhang L, He J. A novel archaeal phylum: Thaumarchaeota—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (4) : 411-421. (in Chinese)  
张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群——奇古菌门 (Thaumarchaeota). *微生物学报*, 2012, 52 (4) : 411-421.
- [3] Wang H, Liang J, Gong Y, Huang Y, Liu X, Sha Z. Estimation of the Heat Flow in the Northern of the South China Sea Based on the Seismic Data of Gas Hydrate. *Geoscience*, 2012, 19 (1) : 67-93. (in Chinese)

- 王宏斌, 梁劲, 龚跃华, 黄永祥, 刘学伟, 沙志彬. 基于天然气水合物地震数据计算南海北部陆坡海底热流. 现代地质, 2005, 19 (1) : 67-73.
- [4] Park SJ, Park BJ, Pham VH. Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the East Sea. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46 (3) : 244-249.
- [5] Liu G, Wu H, Li X, Yan W. Phylogenetic analysis of archaeal community from the sediment at location 501 at the east of Hainan island. *Marine Sciences*, 2011, 35 (2) : 86-91. (in Chinese)
- 刘国辉, 吴后波, 李翔. 海南岛东部 501 站位沉积物古细菌多样性研究. 海洋科学, 2011, 35 (2) , 86-91.
- [6] Wang Y, Gui S. Electroelution method for purification of DNA fragments. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 1996, 31 (6) : 11-33. (in Chinese)
- 汪渊, 桂淑玉. 电洗脱法纯化 DNA 片段. 安徽医科大学学报, 1996, 31 (6) : 11-33.
- [7] Meyers PA. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology*, 1994, 144 (4) : 289-302
- [8] Kerkhof L, Speck M. Ribosomal RNA gene dosage in marine bacteria. *Biology Biotechnology*, 1997, 6 (2) : 260
- [9] Urakawa H, Tsukamoto KK. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, 1999, 145 (6) : 3305-3315.
- [10] Lina L, Guenzennec J, Nichols P, Yanagibayashi M, Kato C. Microbial diversity in Nankai through sediment in 3843m. *Journal of Oceanography*, 1999, 55 (7) : 635-642.
- [11] Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (9) : 3982-3989.
- [12] Karner MB, DeLong EF, Karl DM. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001, 409 (11) : 507-510.
- [13] DeLong EF. Archaea in coastal marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (12) : 5685 - 5689
- [14] Li T, Wang P, Wang P. Microbial diversity in surface sediments of the Xisha Trough, the South China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (3) : 1167-1173. (in Chinese)
- 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, 2008, 28 (3) : 1167-1173.
- [15] Wuchter C, Schouten S, Boschker H. Bicarbonate uptake by marine crenarchaeota. *Microbiology Ecology*, 2003, 219 (7) : 203-207.
- [16] Gerhard JH, Thomas R, Eva T. Contribution of archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (13) : 2303-2309
- [17] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S. 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*, 2006, 103 (8) : 2815-2820.
- [18] Martin K, Anne EB, Jose R. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437 (13) : 543-546.
- [19] Srensen KB, Teske A. Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (7) : 4596-4603.
- [20] Biddle JF, Lipp JS, Leverd M. Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (10) : 3846-3851.
- [21] Ravenschlag K, Sahm K, Amann R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (16) : 387-395
- [22] Bowman JP, McCuaig RD. Biodiversity community structural shifts and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (13) : 2463-2483
- [23] Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A. Molecular phylogenetic analyses of reverse transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (22) : 277-286.
- [24] Zeng R, Zhao J, Zhang R. Bacterial community in sediment from the western Pacific warm pool and its relationship to environment. *Science in China Earth Sciences*, 2005, 48 (2) : 282-290.
- [25] Uthicke S, McGuire K. Bacterial communities in Great Barrier Reef calcareous sediments: Contrasting 16S rDNA libraries from near shore and outer shelf reefs. *Estuar Coast Shelves*, 2007, 72 (26) : 188-200.
- [26] Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiology Review*, 1987, 51 (22) : 221-271.

# Prokaryote diversity in the surface sediment of northern South China Sea

Hao Zhang<sup>1, 3</sup>, Houbo Wu<sup>1\*</sup>, Guanghua Wang<sup>1</sup>, Wenzhou Xiang<sup>1</sup>, Wen Yan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

<sup>2</sup> Key Lab of Marginal Sea Geology, South China Sea Institute and Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

<sup>3</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] In order to investigate the composition and diversity of prokaryotes in marine surface sediment from site XSCS13 at northern South China Sea. [Method] We extracted environment total DNA directly from the sediment and amplified 16S rRNA genes from the total DNA, thereby constructing 16S rRNA clone libraries of both archaea and bacteria. Then we selected positive clones randomly from the library and identified them by the method of restriction fragment length polymorphism (RFLP). After that, the unique RFLP pattern corresponded sequences were sequenced, BLAST and then constructed into a phylogenetic tree. [Results] Most of the clones were sequences from uncultured microbes. For the Archaea part: the community was mainly comprised of 3 phyla: Crenarchaeota, Thaumarchaeota and Euryarchaeota, among which Crenarchaeota was the dominant class with the percentage of 71%, while Euryarchaeota took the least with only 3 clones. The main group of Crenarchaeota was Marine Group I, taking 61% of all. For the bacteria part, all together 9 phyla were included: 32.6% of Proteobacteria, 3% of Verrucomicrobia, 5.2% of Bacteroidete, 4.44% of Acidobacteria, 6% of Chloroflexi, 3.7% of Firmicute, 5.2% of Planctomycete, 11.1% of Gemmatimonadete and 4.44% of Actinobacteria. Unlike archaea, there's no overwhelming preponderant phylum in bacterium, each phylum was relatively distributed in balanced proportions. Proteobacteria had 3 classes involved:  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria and  $\delta$ -Proteobacteria, and  $\gamma$ -Proteobacteria stood out with 54.5% of proportion. In addition, over half of all the clones were related to reduction reaction of sulfate and generation of methane. [Conclusion] The research indicated that prokaryote diversity in marine surface sediment from site XSCS13 at northern South China Sea was quite plentiful, and a great mass of abundant microbial resources still remained unknown. Furthermore, the community structure of archaea and bacteria showed that the sampling site may be in a cold spring area with abundant methane.

**Keywords:** northern South China Sea, microbial diversity, 16S rDNA, sediment

(本文责编:王晋芳)