



南海 Formosa 冷泉区沉积物微生物多样性与分布规律研究

孙瑜¹, 牛明杨², 刘俏³, 庄光超^{3*}, 王风平^{1*}

1 上海交通大学海洋学院, 上海 200240

2 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

3 中国海洋大学深海圈层与地球系统前沿科学中心和海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100

孙瑜, 牛明杨, 刘俏, 庄光超, 王风平. 南海 Formosa 冷泉区沉积物微生物多样性与分布规律研究. 微生物学报, 2022, 62(6): 2001–2020.

Sun Yu, Niu Mingyang, Liu Qiao, Zhuang Guangchao, Wang Fengping. Diversity and distribution of microorganisms in the sediment of Formosa cold seep in South China Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2001–2020.

摘要:【目的】当前对全球冷泉生态系统微生物生态学研究显示,冷泉生态系统中主要微生物类群为参与甲烷代谢的微生物,它们的分布差异与所处冷泉区生物地球化学环境密切相关。但在冷泉区内也存在环境因子截然不同的生境,尚缺乏比较冷泉区内小尺度生境间微生物多样性和分布规律的研究。本研究旨在分析南海 Formosa 冷泉区内不同生境间微生物多样性差异,完善和理解不同环境因子对冷泉内微生物群落结构的影响。【方法】对采集自南海 Formosa 冷泉区不同生境(黑色菌席区、白色菌席区和碳酸盐岩区)沉积物样本中古菌和细菌 16S rRNA 基因进行测序,结合环境因子,比较微生物多样性差异,分析环境因子对微生物分布的影响。【结果】发现在 Formosa 冷泉内的不同生境中,甲烷厌氧氧化古菌(anaerobic methanotrophic archaea, ANME)是主要古菌类群,占古菌总体相对丰度超过 70%;在菌席区 ANME-1b 和 ANME-2a/b 是主要 ANME 亚群,碳酸盐岩区则是 ANME-1b。硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)和硫氧化菌(sulfur-oxidizing bacteria,

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0310800); 国家自然科学基金(4200060101, 42076031); 中国博士后科学基金(2018M642001); 山东省泰山学者工程(tsqn201909057); “科学号”高端用户项目(KEXUE2019GZ06)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC0310800), by the National Natural Science Foundation of China (4200060101, 42076031), by the China Postdoctoral Science Foundation (2018M642001), by the Taishan Scholar Project of Shandong Province (tsqn201909057) and by the Senior User Project of RV KEXUE (KEXUE2019GZ06)

*Corresponding authors. E-mail: ZHUANG Guangchao, zgc@ouc.edu.cn; WANG Fengping, fengpingw@sytu.edu.cn

Received: 6 May 2022; Revised: 27 May 2022; Published online: 2 June 2022

SOB)是冷泉各生境内细菌的最主要类群,二者均占细菌总体相对丰度的20%以上,其中*Desulfosarcinaceae*占SRB的50%以上,*Sulfurovaceae*和*Sulfurimonadaceae*共占SOB的90%以上;其他占细菌类群超过10%的还有*Gammaproteobacteria*和*Chloroflexi*。通过对甲烷代谢保守功能基因*mcrA* (methyl coenzyme-M reductase alpha subunit)、硫酸盐还原保守基因*dsrA* (dissimilatory sulfite reductase alpha subunit)的定量PCR结果发现*mcrA*基因拷贝数为 10^9 – 10^{10} copies/g (湿重),*dsrA*基因拷贝数为 10^8 – 10^9 copies/g (湿重),均高于非冷泉对照区沉积物1–2个数量级。群落分析结果显示冷泉区不同生境间的群落结构存在显著差异,且多因素分析的结果显示不同生境中微生物多样性和分布与甲烷、硫化氢、硫酸盐以及溶解性无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)浓度显著相关。

【结论】本研究通过对冷泉区内菌席区和碳酸盐岩区异质性生境的微生物多样性进行分析,发现主要的微生物类群均为参与甲烷(厌氧甲烷氧化)和硫(硫酸盐还原、硫氧化)代谢的微生物,但不同生境中微生物多样性和分布差异明显,主要受控于甲烷、硫酸盐、硫化氢和DIC等环境因子。

关键词: 冷泉; 沉积物; 生境差异; 微生物多样性

Diversity and distribution of microorganisms in the sediment of Formosa cold seep in South China Sea

SUN Yu¹, NIU Mingyang², LIU Qiao³, ZHUANG Guangchao^{3*}, WANG Fengping^{1*}

¹ School of Oceanography, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² School of Life Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

³ Frontiers Science Center for Deep Ocean Multispheres and Earth System, and Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

Abstract: [Objective] Global survey on microbial diversity of cold seep ecosystem pointed out that cold seeps had developed specific types of microorganisms, the main groups were microorganisms involved in methane metabolism, and their distribution were closely linked to the biogeochemical characteristics of the certain cold seep. However, different environmental conditions and small-scale habitats may present inside the cold seep, and studies comparing the microbial diversity and distribution between small-scale habitats in cold seep were lacking. The purpose of this study was to analyze the differences in microbial diversity among different habitats in the Formosa cold seep of South China Sea, and to improve and understand the impact of different environmental factors on the microbial community structure inside cold seep. **[Methods]** Sediment samples were collected from different habitats including microbial mat area and carbonate rock area from the Formosa cold seep of South China Sea. 16S rRNA genes of archaea and bacteria were sequenced and analyzed. Combined with environmental factors, we compared differences in microbial diversity, and analyzed the impact of environment factors on microbial distribution. **[Results]** We found that in different habitats in the Formosa cold seep, anaerobic methanotrophic archaea (ANME) was the major archaeal group, accounting for more than 70% of the total relative abundance of archaea; ANME-1b and ANME-2a/b

became the main ANME subgroups in microbial mat area, ANME-1b was dominant in the carbonate rock area. Sulfate-reducing bacteria (SRB) and sulfur-oxidizing bacteria (SOB) were the main groups of bacteria in each habitat of cold seep, and they both accounted for more than 20% of the total relative abundance of bacteria. Among them, *Desulfosarcinaceae* accounted for more than 50% of the SRB, and *Sulfurovaceae* and *Sulfurimonadaceae* together accounted for more than 90% of the SOB; other taxa accounting for more than 10% of the bacteria were *Gammaproteobacteria* and *Chloroflexi*. The quantitative PCR results of the conserved methane metabolism gene *mcrA* (methyl coenzyme-M reductase alpha subunit) and the sulfate reduction conserved gene *dsrA* (dissimilatory sulfite reductase alpha subunit) showed that the copy number of *mcrA* gene was 10^9 – 10^{10} copies/g (wet weight), and the copy number of *dsrA* gene was 10^8 – 10^9 copies/g (wet weight), which were 10–100 times higher than those of the control area located outside the cold seep. The results of community analysis showed that there were significant differences in community structure among different habitats, and the results of multivariate analysis showed that the diversity and distribution of microorganisms in different habitats were significantly associated with the concentration of methane, hydrogen sulfide, sulfate, and dissolved inorganic carbon (DIC). **[Conclusion]** This research analyzed the microbial diversity of the heterogeneous habitats including the microbial mat area and the carbonate rock area in the Formosa cold seep. We found that the main microbial groups were involved in methane (anaerobic methane oxidation) and sulfur (sulfate reduction, sulfur oxidation) metabolism cycle, however, the diversity and distribution of microorganisms in different habitats were significantly different, mainly controlled by environmental factors such as methane, sulfate, hydrogen sulfide and DIC.

Keywords: cold seep; sediment; habitat difference; microbial diversity

冷泉(cold seep)是指富含大量甲烷等碳氢化合物的流体从深部向海底沉积物表面渗漏或喷发形成的地质构造,多分布于大陆架边缘和板块交界处^[1],是典型的化能合成生态系统。目前已在全球发现数百个冷泉^[2],其中在我国南海的神狐、台西南和琼东南等海域均有发现^[3]。冷泉生态系统因其特殊性(不依赖表层光合系统)以及富含大量的温室气体甲烷,从20世纪80年代被发现以来一直是研究的热点区域^[4]。在冷泉沉积物中具有高丰度且不同功能的化能自养型微生物群落^[5],它们驱动着冷泉内的碳、氮、硫元素循环过程。其中最主要的是甲烷厌氧氧化过程(anaerobic oxidation of methane, AOM)和伴随同时进行的硫酸盐还原过程(sulfate reduction, SR),由厌氧甲烷氧化古

菌(anaerobic methanotrophic archaea, ANME)和硫酸盐还原细菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)共同完成,ANME通常与SRB类群形成共生体(consortia),进而参与碳和硫元素循环,可消耗掉来自海洋沉积物中超过90%的甲烷^[6],是天然的甲烷屏障。

相较于海洋中普通沉积物环境,冷泉内微生物群落结构的多样性相对较低,主要为参与甲烷代谢的微生物类群^[7]。通过对分布于全球的23个冷泉沉积物微生物多样性的汇总研究,发现冷泉中的主要代表性类群包括厌氧甲烷氧化古菌 ANME、好氧甲烷代谢细菌(methylococcales)、硫酸盐还原菌 SRB 和硫氧化菌 SOB (sulfur-oxidizing bacteria, SOB)^[8]。虽然冷泉内微生物类群在其他环境中也有发现,

但丰度却明显高于热液和沿岸沉积物等其他环境^[6]。此外,各冷泉位点的主要微生物类群仍存在差异^[9],例如在墨西哥湾位点,ANME-1b是主要微生物类群并主要分布在沉积物中的甲烷-硫酸盐带交界处^[10];在甲烷浓度较高的水合物脊区,主要微生物类群是ANME-2和*Desulfosarcina-Desulfococcus*类群^[11];在黑海沉积物菌席区,主要类群是ANME-1a和ANME-1b^[8]。对冷泉微生物分布特征的相关研究也在不断完善,早期研究曾认为水深等地理分布条件的差异是影响冷泉微生物分布的重要因素^[12]。但对主要微生物类群例如SRB分布的研究发现,其分布与甲烷和硫酸根离子的通量有关^[13],随着研究范围和样本数量的扩大,在新西兰附近冷泉的研究显示电子受体,尤其是氧气的可利用性是影响微生物多样性的主要驱动因子^[14];在地中海冷泉的研究则发现,不同位点的甲烷和硫酸盐浓度差异通过影响主要微生物过程影响了微生物的分布^[15];同时还发现,其他的微生物类群如*Chloroflexi*也会随主要类群一同相应环境因子的变化^[16]。通过对全球范围内的研究结果显示,原位的环境差异,例如沉积物深度和不同的可利用电子受体造成了不同冷泉间微生物的分布差异^[8],这也是目前较为认可的结论。但冷泉是复杂且异质性很强的生态系统,冷泉内存在有菌席区、碳酸盐岩区等不同的生境,环境因子存在差异,这些生境中微生物群落的多样性和分布可能存在差异,研究不同生境的微生物多样性和分布,可以在已有的全球范围内冷泉微生物类群和分布的宏观认识的基础上,进行有力的补充和完善。

Formosa冷泉位于南海北部陆坡,是南海目前仍然活跃的2个冷泉之一^[17],早前对该冷泉位点的多样性分析的结果表明,*Proteobacteria*、*Bacteroidetes*和*Chloroflexi*是细菌的主要类群,

*Euryarchaeota*和*Crenarchaeota*是古菌的主要类群^[18]。Formosa冷泉内有菌席区、贻贝区、碳酸盐岩区等多种环境条件不同的生境^[19],通过早期对Formosa冷泉的地质勘查,发现冷泉内部存在菌席区以及被贻贝或碳酸盐岩石覆盖的大片区域^[18,20],生境类型多样。

为了探究微生物在Formosa冷泉不同生境间的分布差异情况,本研究选取了在Formosa冷泉菌席和碳酸盐岩区采集的插管柱状沉积物样本,进行16S rRNA基因扩增子高通量测序和古菌、细菌16S rRNA基因以及主要功能基因的定量实验,结合甲烷、硫酸盐等主要环境因子的测定结果,尝试回答以下科学问题:(1)冷泉区内部不同生境微生物分布规律是什么?主要的功能微生物类群(如ANME)是否具有分布差异?(2)影响和控制微生物类群分布的主要环境因子有哪些?

1 材料与方法

1.1 样本的采集和地球化学参数测定

本研究样本于2020年5月-6月采集自台西南盆地Formosa冷泉区域,由“科学”号科考船搭载的“发现”号ROV(remote operated vehicle)采集了4根插管柱状沉积物样本。取样点涵盖了冷泉内的主要生境,包括菌席区、碳酸盐岩区沉积物,以及冷泉外部(无甲烷渗漏区)沉积物。其中菌席区取样点包括黑色菌席和白色菌席覆盖的区域,菌席区可观察到甲烷气泡冒出且样本具有刺激性气味(硫化氢气体挥发),根据测得的甲烷浓度变化范围大小,将黑色菌席区命名为高甲烷浓度菌席区(mat with high methane concentration, Mat_HM),白色菌席区命名为低甲烷浓度菌席区(mat with low methane concentration, Mat_LM)。碳酸盐岩区取样点(carbonate)有大块的碳酸盐,且无甲烷渗漏。最

后在无甲烷渗漏区域(control)采集了 1 根插管柱状沉积物样本, 作为对照(样品信息见表 1)。

沉积物样本回收到甲板后, 在实验室按照 2 cm 一层进行分样。沉积物中甲烷浓度的测定, 使用切除顶端的 5 mL 注射器, 取 2 mL 沉积物注入含有 3 mL 2 mol/L 氢氧化钠的顶空瓶中, 用橡胶塞和铝盖加固进行密封, 常温保存。孔隙水样品按照 2 cm 间隔用 Rhizon (Rhizosphere, Holland)进行抽取, 取 1 mL 孔隙水加入含有 1 mL 20%醋酸锌溶液的试剂瓶中, 4 °C 保存进行后续的定量检测; 取 5 mL 孔隙水, -20 °C 保存用于后续阴阳离子的检测; 取 5 mL 孔隙水, 用注射器加入至提前用氮气吹扫的顶空瓶中, 加铝盖密封后-20 °C 保存用于溶解无机碳(dissolved inorganic carbon, DIC)的测定。

在船上低温冷库中, 用切除顶端的 5 mL 注射器, 按照划定的层位抽取沉积物样本装入 15 mL 离心管, 置于液氮罐中保存, 航次结束后用干冰运输回实验室, 转移至-80 °C 超低温冰箱保存, 用于后续 DNA 提取实验。

1.2 环境因子测定

沉积物中甲烷浓度的检测是从样品瓶中抽取 500 μ L 顶空至装有 HayeSep 色谱柱和火焰电离检测器(FID)的 SRI 气相色谱仪中完成。 SO_4^{2-} 离子浓度由 Dionex ICS-900 离子色谱仪测定, SO_4^{2-} 浓度测定前用超纯水进行 500 倍稀释, 4.5 mmol/L Na_2CO_3 和 0.8 mmol/L NaHCO_3 混合

溶液与 11 mmol/L 硫酸作为 SO_4^{2-} 的洗脱液, Ion Pac AS23-type 柱用于阴离子检测^[21], 测试精度 $\pm 2\%$ 。 NH_4^+ 离子的测定采用靛酚蓝法^[22], 由 Unico V1850 型可见分光光度计测定。取 1 mL 孔隙水样品中加入 0.05 mL 苯酚-硝普钠溶液和 0.05 mL NaClO 碱性溶液, 混匀后反应 1 h, 于 630 nm 波长处进行比色测定, 测试精度为 $\pm 1.8\%$ 。DIC 和 $\text{DIC}-\delta^{13}\text{C}$ 值的检测通过 IsoPrime 100 连续流动比同位素质谱仪(CF-IRMS)测定, 事先用 0.5 mL 孔隙水样本与纯磷酸在 40 °C 下反应 5 h 收集产生的二氧化碳^[21], DIC 浓度的测试精度优于 2%, $\text{DIC}-\delta^{13}\text{C}$ 值为 VPDB 标准, 精度优于 0.1%。硫化氢的检测方法为哈希法^[23], 硫化氢在用醋酸锌溶液固定为沉淀后与显色剂甲基蓝反应显蓝色, 样本测定前用超纯水稀释 100 倍, 取 1 mL 于比色皿用 DR 5000 分光光度计在 670 nm 测定样本光长进行标定。

1.3 环境 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增

本实验中所有样本环境 DNA 的提取均采用 Power Soil Kit 试剂盒(MoBio Laboratories)进行提取, 有以下改进: (1) 取 0.25–0.30 g 沉积物样品, 装入装有玻璃砂的离心管, 加入试剂盒中的 C1 试剂, 先在涡旋仪上振荡 1 min, 档位设置为 5 档。增加这一步骤的主要目的是将沉积物和试剂溶液充分混合。(2) 放入细胞破碎机中对细胞进行打碎, 频率为 70 Hz, 运行时间为 30 s, 运行 3 次, 每次间隔 120 s。目的是

表 1 本研究中采集的 Formosa 冷泉沉积物样本信息

Table 1 Sediment samples at Formosa cold seep in this study

Sample ID	Habitat	Methane concentration/(mmol/L)	Water depth/m	Sample length/cm	Sample number
D239	Control	n.d.	1 168	18	8
D231-4	Mat_HM	0–6	1 224	18	9
D244-1	Mat_LM	0–2	1 218	18	9
D244-3	Carbonate	n.d.	1 197	9	3

n.d.=not detected.

将沉积物中的细胞充分破碎,使细胞中的 DNA 释放到溶液中便于后续的分选与收集。

对细菌和古菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,引物是扩增 16S rRNA 基因 V4 区通用引物,选用 5'端带有特异识别序列(barcode)的 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[24], PCR 体系(50 μ L)为: 10 \times ExTaq buffer (Mg²⁺ plus) 5 μ L, 25 mg/mL 的 BSA 溶液 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs mixture 4 μ L, 5 U/ μ L ExTaq 酶(TaKaRa) 0.5 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1.5 μ L, DNA 模板 2 μ L,去离子水 30.5 μ L。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。其中每个样本设置 3 组平行重复。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳(110 V 电压, 40 min)和 Qubit 荧光计进行质量和浓度检测合格后,通过胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit (Omega)对电泳结果回收并纯化。纯化后的目的片段 PCR 产物送至派森诺生物公司,质检合格后建库,利用 NovaSeq (pair-end 2 \times 250 bp)平台进高通量测序。

1.4 16S rRNA 基因和功能基因定量检测

对古菌 16S rRNA 基因进行扩增,引物为 Arch21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3')和 Arch958R (5'-YCCGCGTTGAMTCCAATT-3')^[25];对细菌的 16S rRNA 基因进行扩增,引物为 Bac27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 Bac1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[26];对甲烷代谢菌关键基因 *mcrA* 进行扩增,引物为 mlas (5'-GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3')和 *mcrA* rev (5'-CGTTCATBGC GTAGTTVGGRTAGT-3')^[27];对硫酸盐还原菌关键基因 *dsrA* 进行扩增,引物为 *dsr-1F* (5'-ACSCAYTGGAARCAACG-3')和 *dsr-4F* (5'-GTGTARCAAGTTDCCRC A-3')^[28];对甲烷好氧氧化关键基因 *pmoA* 基因

进行扩增,引物为 A189F (5'-GGNGACTGGG ACTTCTGG-3')和 mb661R (5'-CCGGMGCAAC GTCYTTACC-3')^[29];对产物进行纯化,转移到移到 *Escherichia coli* 的 DH5 α 感受态细胞中,以氨苄青霉素(100 μ g/mL)抗性和菌落 PCR 筛选阳性克隆子,用质粒提取试剂盒(Omega)回收阳性克隆质粒,去离子水梯度稀释后作为后续 qPCR 反应的标准曲线。

qPCR 的体系如下: SYBR[®] Premix ExTaq[™] II (TaKaRa) 10 μ L, ROX I 0.4 μ L, 扩增目的片段所用的引物[古菌 Uni519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAA-3')/Arch908R (5'-CCC GCCAATT CCTTTAAGTT-3')^[30], 细菌 Bac341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')/Bac519R (5'-GWATT ACCGCGGCKGCTG-3')^[31], *mcrA* 基因 mlas/*mcrA*-rev^[27], *dsrA* 基因 *dsrF* (5'-ACSCACTGGA AGCACGGCGG-3')/*dsrR* (5'-GTGGMRCCGTG CAKRTTGG-3')^[28], *pmoA* 基因 A189F/mb661R^[29]]各 1 μ L, 加入 1 μ L 原始 DNA, 用去离子水补至 20 μ L。PCR 的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。其中退火温度: 古菌为 60 $^{\circ}$ C, 细菌为 56 $^{\circ}$ C, *mcrA* 基因为 55 $^{\circ}$ C, *dsrA* 基因为 59 $^{\circ}$ C, *pmoA* 基因为 55 $^{\circ}$ C。最后得到的标准曲线相关系数 R^2 在 0.99 以上, 扩增效率为 90%–110%。

1.5 测序结果处理和统计分析

利用利用 QIIME2 (2020.11)^[32]的 cutadapt 插件,对合格的双端测序文件通过特异性序列(barcode)对序列进行拆分(demultiplexing),同时去除序列中的引物、barcode 和 adapter 序列,利用 DADA2 插件去除嵌合体序列,得到以 ASV (amplicon sequence variants)为单元的特征表以及 ASV 序列,对 29 个样本序列数进行归一化(本研究中测序深度选为所有样本中序列数最低值 34 628)。依据 16S rRNA 数据库 SILVA138,

使用 classifier-sklearn 插件进行物种注释。利用 feature-table 插件的 filter-seqs 方法将代表序列过滤为只包含古菌和细菌的序列, 并分别绘制古菌和细菌类群的相对丰度柱状图。利用 ASV 表后续在 R 软件(<https://www.r-project.org/>)上进行相关的 α 多样性和 β 多样性分析, 样本的 α 多样性用 Richness 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数来评估, 分析使用“vegan”^[33]和“picante”^[34]程序包完成; 样本的 β 多样性水平用“vegan”程序包的“vegdist”函数^[32]计算 Bray-Curtis 距离矩阵, 并使用“vegan”^[33]和“ape”^[35]程序包进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)评估。多因素分析采用 RDA (redundancy analysis)分析方法, 使用“vegan”程序包“dbrda”函数^[33]计算环境因子与样本微生物多样性 Bray-Curtis 距离的相关性, 环境因子矩阵的变量包括甲烷浓度、硫酸根离子浓度、硫化氢浓度、铵根离子浓度和溶解无机碳(DIC)浓度, 用“car”程序包的“vif”函数^[36]检查确保了环境变量之间不存在共线性, 对环境因子矩阵进行了标准化(z-scoring)处理。

2 结果与分析

2.1 环境因子测定与 16S rRNA 基因和功能基因的丰度定量

对照区 D239 的样本均未检测到甲烷浓度, 硫酸盐浓度保持在 20 mmol/L 左右, 随深度无明显变化趋势且未检测到硫化氢浓度。铵根离子浓度范围是 40–160 $\mu\text{mol/L}$, 随沉积物深度先增加后减少, 在 6 cmbsf 处发生转变。DIC 浓度为 5–10 mmol/L, DIC 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围是 -10‰ – 15‰ , DIC 浓度和同位素分馏比随沉积物深度增加无明显变化趋势(图 1)。黑色菌席区的样本 D231-4 甲烷浓度随深度呈现先增加后减少的趋势, 在 6 cmbsf 处甲烷浓度达到最大值

6 mmol/L, 在 10 cmbsf 深处迅速降低; 硫酸盐浓度变化随深度增加呈现递减趋势, 从 2 cmbsf 处的 9 mmol/L 递减到 8 cmbsf 处消耗殆尽, 且硫化氢浓度随沉积物深度增加, 在 8 cmbsf 处达到最大值约 15 mmol/L。铵根离子浓度随深度增加呈现递减趋势, 变化范围为 20–120 $\mu\text{mol/L}$ 。DIC 浓度基本维持在 20 mmol/L, DIC 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 -20‰ – 30‰ (图 1)。白色菌席区样本 D244-1 同样能检测甲烷浓度随沉积物深度增加呈现先增加后减少的趋势, 在沉积物 6 cmbsf 处达到最大值约 2 mmol/L, 明显低于黑色菌席区; 硫酸盐浓度随深度增加而明显降低, 从表层的 3 mmol/L 到 8 cmbsf 处降到接近于 0, 硫化氢浓度则随深度增加而先增加后减少, 在 8 cmbsf 处浓度最高达到 18 mmol/L, 但 8 cmbsf 以下虽然未检测到硫酸盐浓度, 但仍能检测到 10 mmol/L 左右的硫化氢浓度。铵根离子浓度随深度增加递减, 浓度变化范围为 20–200 $\mu\text{mol/L}$ 。DIC 浓度维持在 20 mmol/L, DIC 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围为 -25‰ – 30‰ , 随深度增加而降低(图 1)。碳酸盐岩区样本 D244-3 未检测到甲烷浓度和硫化氢浓度, 且硫酸盐浓度稳定在 25 mmol/L 左右, 随深度无明显变化, 该结果与对照区结果接近。铵根离子浓度的变化范围为 50–100 $\mu\text{mol/L}$, 随深度增加而增加。DIC 浓度低于 10 mmol/L, 且 DIC 的 $\delta^{13}\text{C}$ 值范围为 -15‰ – 20‰ (图 1)。

基于对古菌和细菌细胞内 16S rRNA 基因拷贝数的研究(古菌单个细胞内平均 16S rRNA 基因拷贝数为 1.7, 细菌则为 4.7)^[37], 我们将细菌和古菌的 16S rRNA 基因定量结果转化为了细胞数目, 单位为 cells/g (湿重)。对照区古菌细胞数变化范围为 5×10^8 – 3×10^9 cells/g, 细菌细胞数则均少于 1×10^9 cells/g, 细菌和古菌细胞数均随沉积物深度增加而递减, 在沉积物表层古

菌细胞数是细菌的 2–3 倍, 但 8 cm 以下层位二者细胞数接近(图 2)。黑色菌席区细菌和古菌的生物量约为 10^9 – 10^{10} cells/g (湿重), 是对照区的 10 倍, 且细菌细胞数是古菌细胞数的 2–3 倍,

二者细胞数均随深度减少; *mcrA* 基因拷贝数为 10^9 – 10^{10} copies/g (湿重), 在 SMTZ 层(8 cmbsf 附近)丰度达到最大值。*dsrA* 基因拷贝数为 10^8 – 10^9 copies/g (湿重), 随深度增加拷贝数减

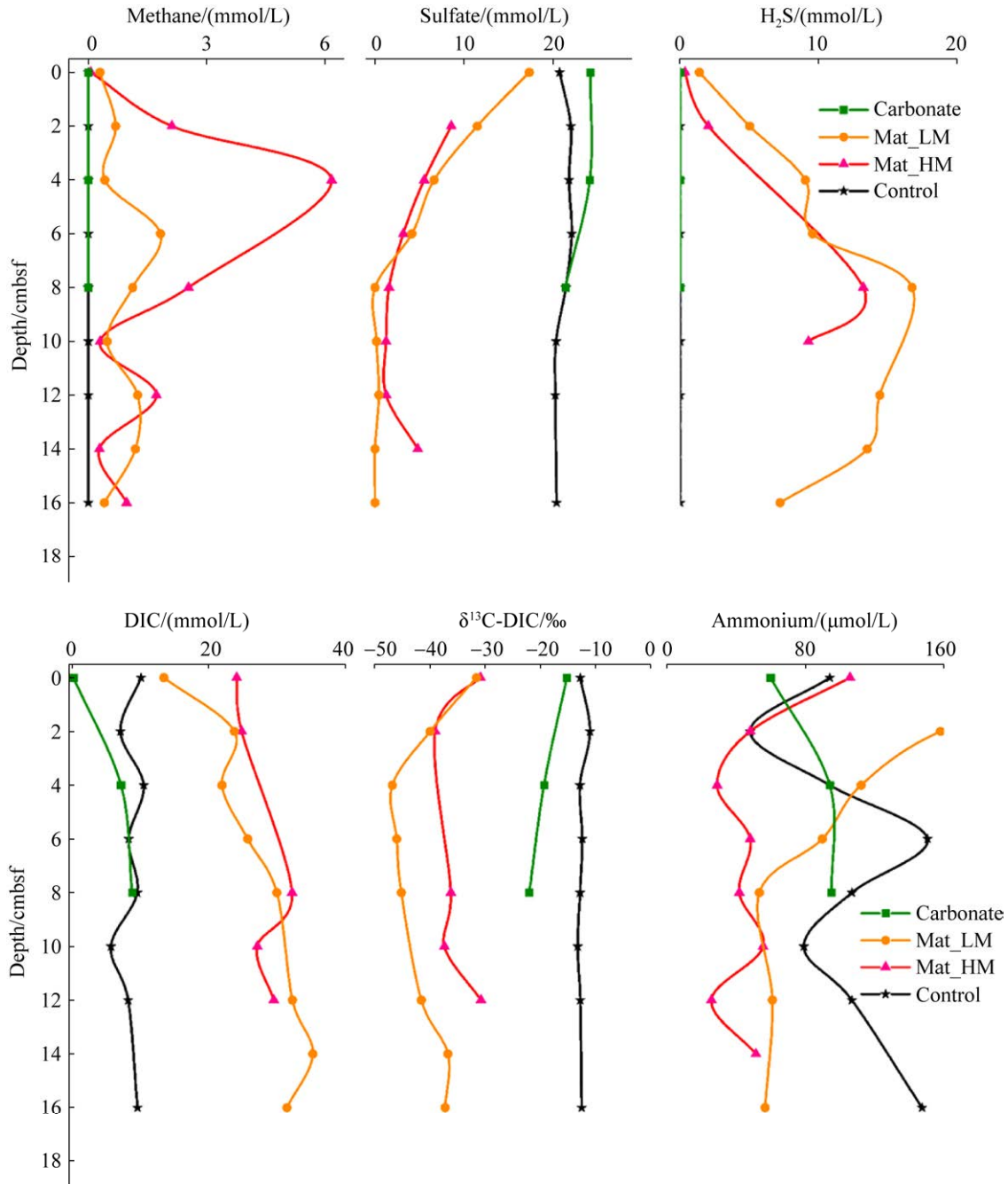


图 1 Formosa 冷泉 4 个位点沉积物样本环境因子

Figure 1 Environmental parameters of four sites sediment samples at Formosa cold seep.

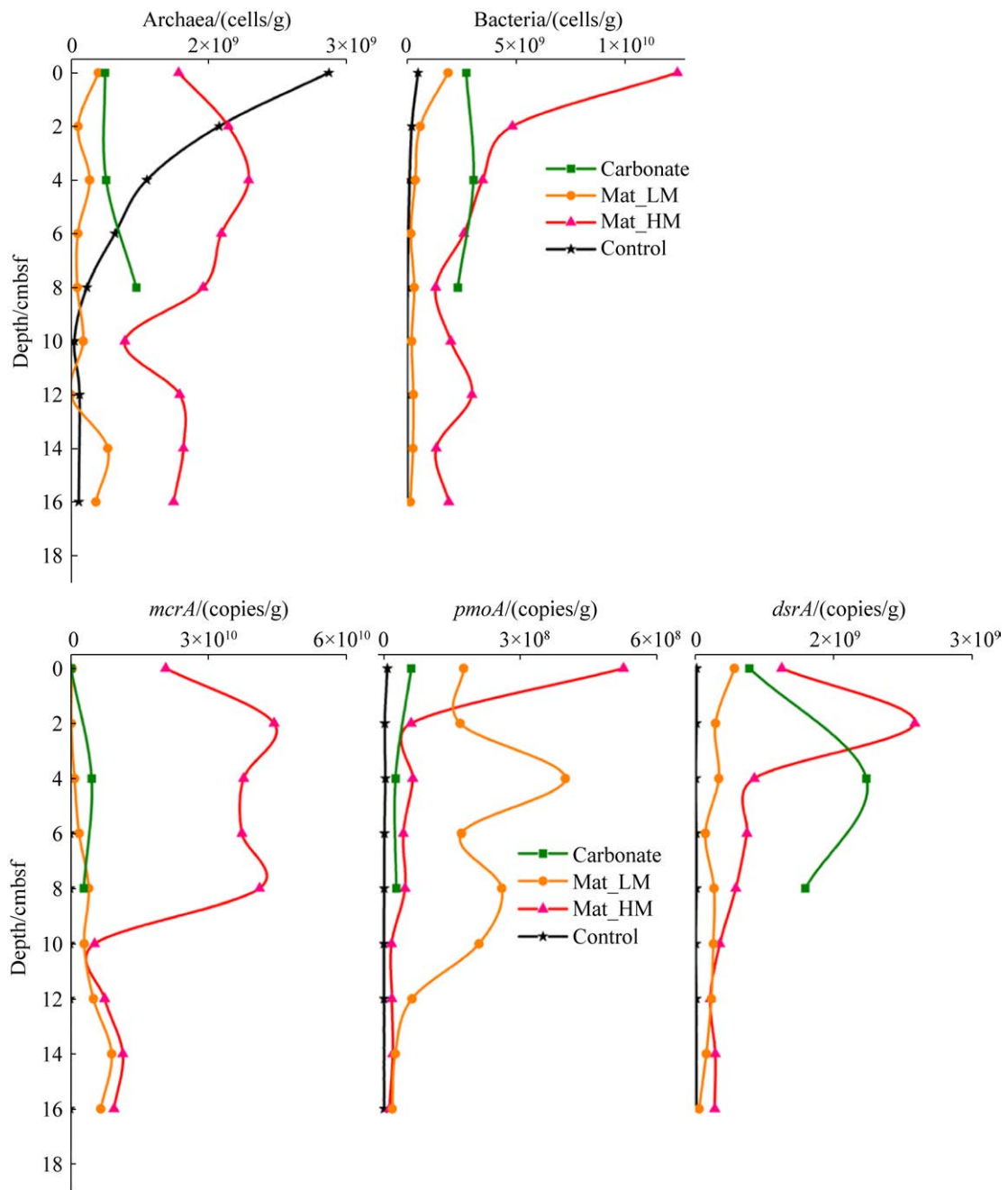


图 2 Formosa 冷泉 4 个位点古菌、细菌和功能基因的定量数据

Figure 2 Quantification data of archaea, bacteria and functional genes of four sites sediment samples at Formosa cold seep.

少。*pmoA* 基因拷贝数为 10^7 – 10^8 copies/g (湿重), 表层沉积物中丰度最高。各层位古菌、细菌的细胞数以及功能基因的拷贝数均明显高于对照区的定量结果(图 2)。白色菌席区细菌和古菌的生

物量约为 10^9 – 10^{10} cells/g (湿重), 表层沉积物中细菌细胞数明显大于古菌, 但细胞数均随深度增加而递减, 且二者细胞数接近; *mcrA* 基因拷贝数为 10^9 – 10^{10} copies/g (湿重), 且丰度随深度增

加而增加; *dsrA* 基因拷贝数为 10^8 – 10^9 copies/g (湿重), 丰度随深度增加而递减; *pmoA* 基因拷贝数为 10^7 – 10^8 copies/g (湿重), 与黑色菌席区的定量结果接近, 微生物细胞数和功能基因定量结果均明显高于对照区的定量结果(图 2)。碳酸盐岩区细菌和古菌的生物量约为 10^9 cells/g (湿重) 略低于菌席区, 但 *mcrA* 基因拷贝数 [10^9 copies/g (湿重)]、*dsrA* 基因拷贝数 [10^8 copies/g (湿重)] 和 *pmoA* 基因拷贝数 [10^7 copies/g (湿重)] 均明显高于对照区(图 2)。

2.2 不同生境微生物多样性

测序样本共计 29 个, 其中非冷泉对照区(编号 D239-1) 8 个, 冷泉黑色菌席区(编号 D231-4) 9 个, 冷泉白色菌席区(编号 D244-1) 9 个, 冷泉碳酸盐岩区(编号 D244-3) 3 个。合格总序列为 2 143 394 条, 去除嵌合体后测序 Reads 总量 2 057 378 条, 占比为 85.56%–97.41% (表 2), 其中古菌 358 481 条, 划分为 875 个 ASV; 细菌 1 701 519 条, 划分为 4 674 个 ASV。

对于包括古菌和细菌在内的群落整体水平, 我们基于 Richness 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数比较样本 α 多样性(图 3)。根据 Richness 指数, 对照区(control)的丰富度最低, 白色菌席区(Mat_LM)微生物丰富度最高, 整体上与对照区相比冷泉沉积物有较高微生物丰富度; Shannon 指数和 Simpson 指数的计算结果则显示, 对照区与其他位点的样本有显著差异, 微生物类群多样化程度最高的是对照区(control), 最低的是碳酸盐岩区(carbonate), α 多样性呈现对照区>白色菌席区>黑色菌席区>碳酸盐岩区的趋势。

不同生境微生物类群相对丰度如图 4 所示, 从古菌组成来看, 黑色菌席区(D231-4)主要的古菌类群是 ANME, 且具有如下的变化趋势: 在表层和次表层硫酸盐浓度较高的环境,

表 2 本研究中各样本测序量信息

Table 2 Sequencing information of each sample in this study

Sample ID	Total count	Feature count	Percentage/%
D239-1	38 217	36 158	94.61
D239-2	43 350	41 140	94.90
D239-3	44 804	43 111	96.22
D239-4	50 897	48 581	95.45
D239-5	51 103	45 533	89.10
D239-6	50 742	48 652	95.88
D239-7	48 181	41 224	85.56
D239-8	37 598	34 628	92.10
D231_4-1	55 737	52 978	95.05
D231_4-2	57 438	54 658	95.16
D231_4-3	59 380	56 862	95.76
D231_4-4	64 896	62 573	96.42
D231_4-5	62 089	59 016	95.05
D231_4-6	61 227	58 368	95.33
D231_4-7	62 672	59 833	95.47
D231_4-8	63 570	60 970	95.91
D231_4-9	63 105	60 474	95.83
D244_1-1	84 749	82 240	97.04
D244_1-2	137 299	132 919	96.81
D244_1-3	112 417	109 438	97.35
D244_1-4	109 813	106 980	97.42
D244_1-5	100 801	98 170	97.39
D244_1-6	111 603	108 288	97.03
D244_1-7	93 592	90 429	96.62
D244_1-8	99 578	96 571	96.98
D244_1-9	86 325	83 787	97.06
D244_3-1	94 772	92 317	97.41
D244_3-2	102 891	99 948	97.14
D244_3-3	94 548	91 532	96.81
Total	2 143 394	2 057 378	95.97

ANME-2a/b 和 ANME-2c 是主要类群, 分别占古菌类群的 30%和 20%左右; 相对丰度随深度增加递减; ANME-1b 则相对丰度随深度增加而增加, 在底层硫酸盐耗尽的环境中成为优势古菌物种, 占古菌整体百分比超过 50%; 细菌类群则主要是参与硫氧化的 *Campylobacteria* 类

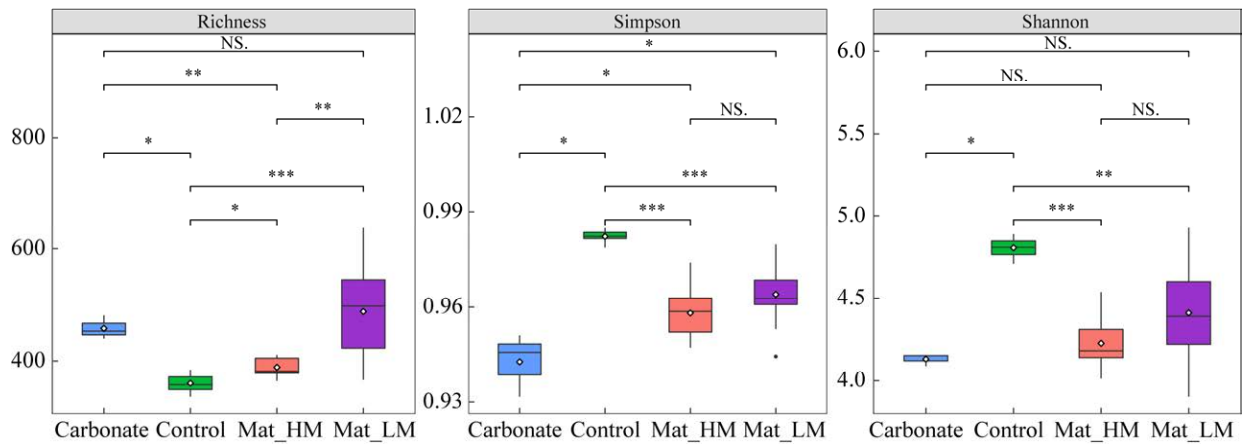


图 3 Formosa 冷泉不同生境 4 个位点的 α 多样性指数(Richness、Shannon 和 Simpson 指数)

Figure 3 Alpha index of four sites sediment samples at Formosa cold seep (Richness, Shannon and Simpson index). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; NS.: no significance.

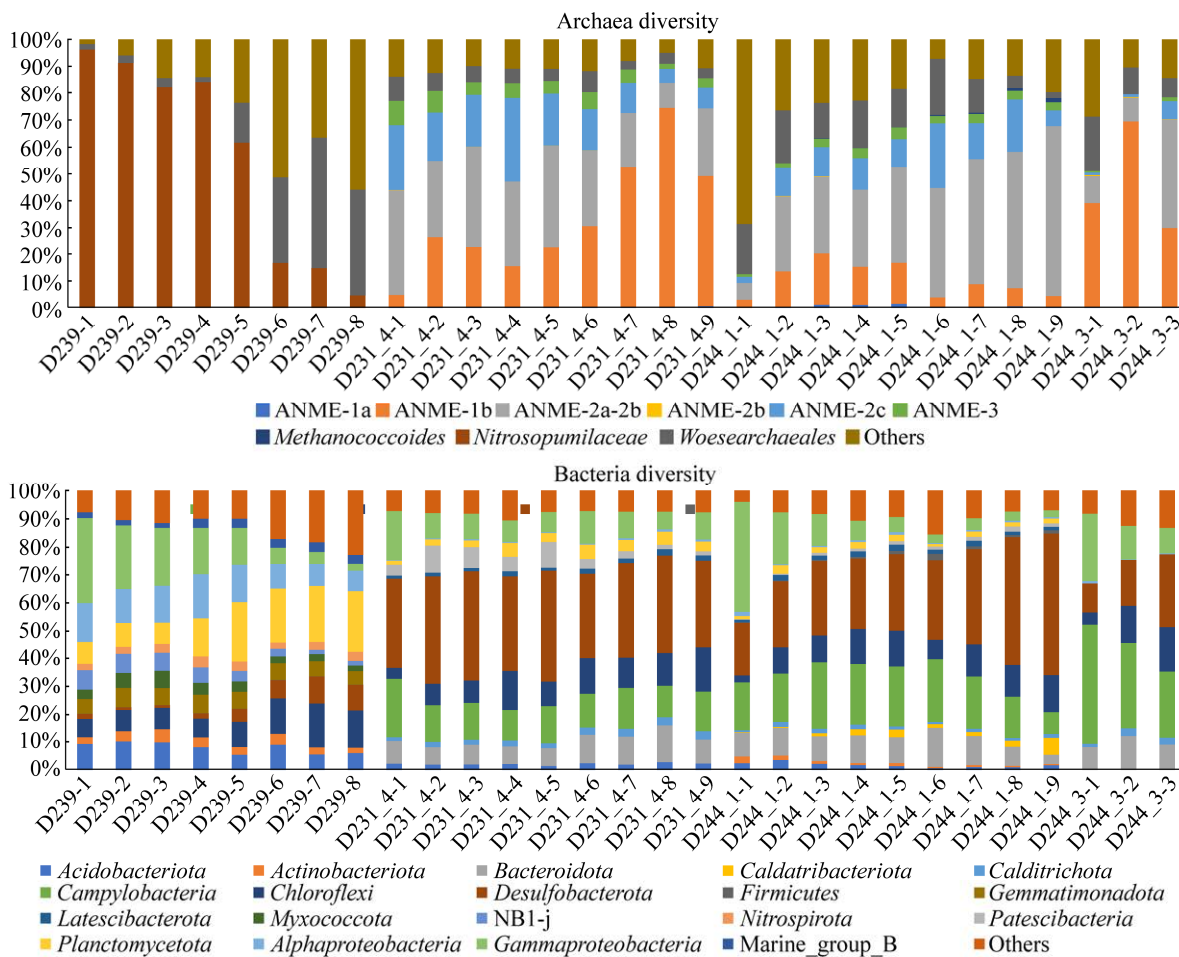


图 4 Formosa 冷泉 4 个位点样本中古菌细菌类群变化情况

Figure 4 Four sites sediment samples archaea and bacteria diversity changes at Formosa cold seep. The sample number increases with depth, '1' refers to 0–2 cmbsf, '2' refers to 2–4 cmbsf, and so on.

群和参与硫酸盐还原的 *Desulfobacterota* 类群, 这 2 类微生物在各沉积物各个层位的相对丰度均超过了 20%; *Gammaproteobacteria* 类群同样丰度较高且主要集中于浅层沉积物, 占细菌类群的 10% 左右。

在白色菌席区(D244-1), ANME-2a/b 是优势古菌类群, 且相对丰度随深度增加而增加, 最高占古菌类群百分比超过 50%; ANME-2c 相对丰度变化随深度变化较小, 相对丰度在 5% 左右, 而 ANME-1b 和 *Woeseearchaeales* 类群则主要分布在表层和次表层, 底层沉积物中则有少量产甲烷菌 *Methanococcoides* 的存在; 在表层发现 *Gammaproteobacteria* 的相对丰度超过 30%, 而主要的细菌优势种还是 *Desulfobacterota* 和 *Campylobacteria*, 其中 *Desulfobacterota* 类群相对随深度有明显增加趋势, 最高占细菌类群百分比达到 50%, 而 *Campylobacteria* 相对丰度维持在 10% 左右。

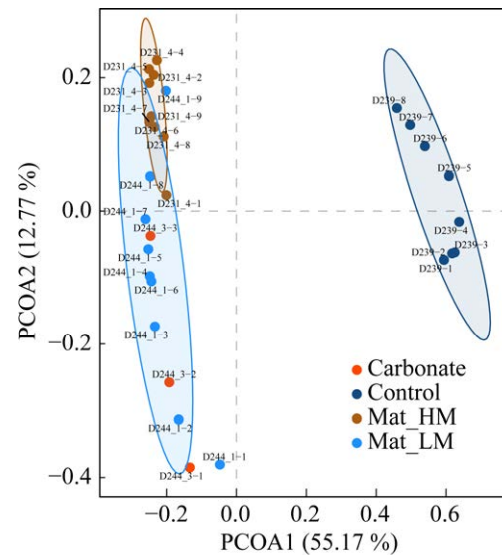
碳酸盐岩石区(D244-3)的优势古菌类群是 ANME-1b, 在次表层相对丰度可达到 70%, 表层有高丰度的 *Woeseearchaeales*, 而底层则是 ANME-2a/b 丰度最高, 占古菌百分比在 30% 左右; 细菌主要类群中 *Campylobacteria* 相对丰度随深度增加而增大, 从 10% 增加到 25% 左右, *Desulfobacterota* 和 *Gammaproteobacteria* 的相对丰度则随深度增加而递减。

对照区(D239)无甲烷、硫化氢和硫酸盐浓度的变化, 科水平上主要古菌类群是 *Nitrosopumilaceae*, 在 50% 以上的层位所占比例能够达到 70% 以上, 在底层主要的古菌类群则是 *Woeseearchaeales*, 占古菌相对丰度为 30%–50%, 未发现 ANME 类群; 细菌则主要由 *Planctomycetota* 和 *Proteobacteria* 组成, *Planctomycetota* 占细菌相对丰度随深度增加而增加, 最高达到 20%; *Proteobacteria* 相对丰度随深度增加而递减, 最

高超过 30%, *Proteobacteria* 中的主要亚群是 *Alphaproteobacteria* 和 *Gammaproteobacteria*。

2.3 不同生境间微生物群落结构差异分析

群落的 β 多样性反映比较不同样品中微生物群落组成的差异。本研究基于 Bray-Curtis 距离对 4 种不同生境样本进行主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA), 所有样本沿水平方向聚集为 2 簇 (PERMANOVA 检验 $R^2=0.58$, $P=0.001$), 如图 5 所示, 冷泉区样



Pairs	R^2	P -value	p.adjusted
Control vs Mat_LM	0.552 876 5	0.001	0.002 0
Control vs Mat_HM	0.345 521 6	0.001	0.002 0
Control vs Carbonate	0.445 817 8	0.006	0.009 0
Mat_LM vs Mat_HM	0.506 829 8	0.001	0.002 0
Mat_LM vs Carbonate	0.430 099 1	0.008	0.009 6
Mat_HM vs Carbonate	0.203 340 0	0.060	0.060 0

图 5 Formosa 冷泉不同生境 4 个位点样本基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析, 附表为组间差异显著性检验结果

Figure 5 PCoA analysis based on Bray-Curtis distance of four sites sediment samples at Formosa cold seep, the attached table showed the results of Adonis significance test between groups. Dots represent samples from different sites, colors represent different habitat, and ellipses represent different clusters.

本聚集在左侧, 右侧是对照区样本, 水平坐标轴对样本间整体差异贡献了 55.17% 的解释度。在冷泉样本中, 不同生境样本沿垂直方向分布, 黑色菌席区单独聚为一簇, 而白色菌席区与碳酸盐岩区无显著差别, 纵坐标轴贡献了 12.77% 的解释度。划分的 3 个聚类单元分别是黑色菌席区、白色菌席区和碳酸盐岩区、对照区。不同生境的微生物群落多样性和组成具有明显差异。水平坐标轴贡献 55.17% 的解释度, 而纵坐标轴贡献了 12.77% 的解释度。

2.4 环境因子与微生物多样性之间的关系

结合原位甲烷、硫酸根离子、铵根离子、硫化氢的浓度变化, 基于 Bray-Curtis 矩阵进行了基于距离矩阵的 RDA 分析(图 6)。在主要的微生物类群中, ANME 各亚群与硫酸根和铵根呈正相关, 与甲烷、硫化氢和 DIC 呈负相关; SRB 的 SEEP-SRB1、SEEP-SRB2 和 *Desulfatiglans* 亚群与硫酸根、铵根离子呈正相关, 与甲烷、硫化氢和 DIC 呈负相关; 硫氧化菌的 *Sulfurovum* 和 *Sulfurimonas* 亚群则和甲烷浓度呈正相关, 与其他环境因子均呈负相关; *Chloflexi* 的 *Anaerolineaceae* 亚群与硫酸根、铵根离子浓度呈正相关, 与甲烷、DIC 和硫化氢呈负相关; *Gammaproteobacteria* 的 *Woeseiaceae* 亚群与硫化氢、甲烷和 DIC 呈正相关, 与硫酸根和铵根离子呈负相关, 也是主要类群中唯一和硫化氢呈正相关的类群(表 3)。

第一坐标轴能够解释 33.62% 的全部变量对不同生境类群的影响, DIC 和硫化氢沿第一坐标轴将冷泉区样本和对照区样本分开; 第二坐标轴能够解释 6.46% 全部变量对不同生境类群组成的影响, 甲烷、硫酸根和铵根沿第二坐标轴将冷泉区内 3 种不同生境的样本分开。

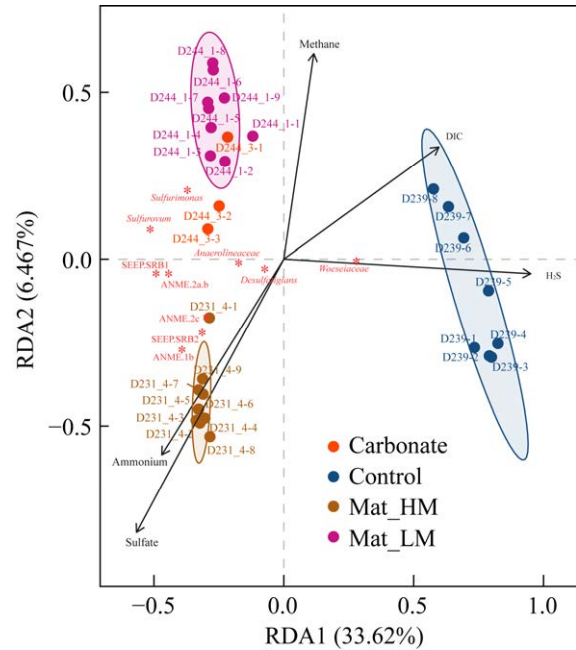


图 6 Formosa 冷泉不同生境 4 个位点样本的 RDA 分析

Figure 6 Redundancy analysis of four sites sediment samples at Formosa cold seep. Dots represent samples from different sites, colors represent different habitat, and asterisks represent major microbial taxa.

表 3 环境因子 ANOVA 相关性检测结果

Table 3 ANOVA correlation test results of environmental factors

Item	Df	Variance	F	P (>F)
Methane	1	0.029 684	2.809 6	0.046
Sulfate	1	0.053 423	5.056 5	0.006
Ammonium	1	0.044 253	4.188 5	0.016
DIC	1	0.028 601	2.707 1	0.047
H ₂ S	1	0.075 164	7.114 2	0.002
Residual	23	0.243 004		

P<0.01: extremely significant; 0.01<P<0.05: significant; P>0.05: no significance.

3 讨论

3.1 冷泉不同生境间主要微生物类群与分布差异

通过对全球冷泉的综合调查研究, ANME 类群是冷泉环境的特征类群之一^[8], 在本研究

样本中对照区未发现 ANME 类群, 菌席区和碳酸盐岩区发现的 ANME 亚群包括 ANME-1a、ANME-1b、ANME-2a/b、ANME-2c、ANME-3, 且 ANME 是古菌的最主要类群, 同时 ANME 类群在不同生境间的分布存在差异。黑色菌席区主要的 ANME 类群是 ANME-1b、ANME-2a/b 和 ANME-2c, 随深度增加 ANME-1b 类群的相对丰度不断增加, 在缺乏硫酸盐的底层沉积物中占古菌百分比达到 50%–70% (图 4), 这一现象在其他冷泉环境中已有发现^[38–40], ANME-1 之所以在硫酸盐耗尽的底层富集, 有研究推测其能够通过甲烷氧化过程的逆反应进行产甲烷过程^[41–43], 还有研究推测其能够在缺乏硫酸盐的环境单独进行甲烷氧化过程^[42,44–46]。白色菌席区主要 ANME 类群是 ANME-2a/b 和 ANME-2c, 且 ANME-2a/b 亚群的相对丰度随沉积物深度增加而增加, 在底层硫酸盐消耗殆尽的环境中占古菌相对丰度仍能达到 50% (图 4), 之前的研究得出的结论普遍认为 ANME-1 主要分布于底层, 硫化氢浓度较高的环境, 而 ANME-2a/b 倾向分布于硫酸盐浓度较高的沉积物表层^[44], 上述现象与该结论不完全相符的原因可能是因为在大型生物扰动造成的表层沉积物掉落现象^[47]。碳酸盐岩的形成与 AOM 作用有关^[48–49], 在对美国沿岸冷泉位点的碳酸盐岩区微生物类群进行的调查发现, ANME-2 是主要的 ANME 亚群, 但 ANME-1 在测得 AOM 速率相对较低的样本中相对丰度更高^[50], 本研究中碳酸盐岩区的主要 ANME 类群是 ANME-1b 和 ANME-2a/b (图 4), 证明 ANME 类群在 AOM 速率不同的碳酸盐岩区样本中主要亚群存在差异。已有研究表明 ANME-2a/b 是不同冷泉间分布最为广泛的 ANME 类群^[8], 本研究中 ANME-2a/b 同样在不同生境内都成为 ANME 类群的优势种。此外之前的研究的主要结果认为冷泉内古菌数量相

对较少^[11], 但本研究中例如白色菌席区, 古菌数量在沉积物底层可以达到并超过细菌数目, 并且在冷泉内尤其是甲烷浓度较高的菌席区, ANME 类群是绝对的优势类群, 与之前对该冷泉微生物多样性研究的结论存在差异^[18], 结合产甲烷过程和甲烷厌氧氧化过程关键基因 *mcrA* 的定量分析结果, *mcrA* 基因拷贝数在冷泉区样本的丰度明显高于外部对照区, 整体趋势随深度增加丰度增加, 且 ANME 类群整体相对丰度同样随深度增加而逐渐增加。

SRB 类群在冷泉环境中常与 ANME 类群共生进行 AOM 作用^[51–52]。对地中海冷泉位点的研究发现 SRB 类群是细菌的主要类群之一, 相对丰度的变化与原位硫酸根的含量显著相关^[16]。SRB 类群在对照区占细菌类群的相对丰度 < 5%, 并不是主要细菌类群。而对于本研究中冷泉区的生境位点, SRB 类群中的 *Desulfobacterota* 是细菌的主要类群, 且和 *Campilobacterota* 中的硫氧化菌类群在绝大部分沉积物样本中相对丰度均在 20% 以上 (图 4), 说明硫循环是冷泉中活跃且重要的元素循环过程, 参与硫循环的微生物类群通过直接或间接参与其他微生物过程联系了其他代谢^[53]。同时硫酸盐还原过程关键基因 *dsrA* 基因的定量结果显示 (图 2), 除了在浅层沉积物中丰度较高外, 在深层沉积物中仍能检测到相对高丰度的 *dsrA* 基因, 但在深层往往难以检测到硫酸盐浓度, 对该现象的解释之一是沉积物底层存在铁锰参与的硫氧化过程, 但产生的硫酸盐不断被消耗, 因此难以被检测到^[54]。近年来对 SRB 和 SOB 类群的功能研究不断深入, 发现一些 SRB 类群有固碳、固氮和反硝化的潜能, 一些 SOB 类群能同化乙酸盐和反硝化^[53,55]。本研究中 SRB 和 SOB 类群在绝大部分沉积物中是细菌主要类群, 且部分环境中硫酸盐被消耗殆尽, 推测硫代谢细菌直接或

间接参与了其他微生物过程, 推测不同生境的环境因子差异可能是激发其不同代谢潜能的关键条件, 也说明上述类群的分布并非单一受硫酸盐和硫化氢的影响。

之前研究发现 *Gammaproteobacteria* 中有部分甲烷好氧化类群^[56-58], 而根据微生物多样性结果, 在沉积物浅层样本均可发现较高丰度的上述类群(图 4), 我们同时对甲烷好氧化过程的关键基因 *pmoA* 进行了定量(图 2), 发现 *pmoA* 基因的拷贝数也是表层最高, 并随着深度增加递减, 且拷贝数显著低于 *mcrA* 基因拷贝数, 说明浅层沉积物中存在一定浓度的氧气, 甲烷好氧化细菌可以进行好氧甲烷氧化过程。

3.2 冷泉不同生境间影响微生物分布的环境因子

结合组间检验的结果, 冷泉区内菌席区和碳酸盐岩区样本均相对于对照区样本具有更高的丰富度(图 3), 说明微生物种类更多, 符合冷泉是“生命绿洲”的认识; 结合 Shannon 和 Simpson 指数的结果, 对照区沉积物多样化程度较高, 冷泉区尤其是碳酸盐岩区的多样化程度低, 说明在冷泉不同生境内微生物类群由少数几个微生物类群占主导, 其中覆盖了大量碳酸盐岩的生境微生物多样化程度最低。

在之前分析影响全球冷泉微生物分布的研究中, 发现影响冷泉内微生物分布的环境因子包括: 原位温度、甲烷浓度、硫酸盐浓度、沉积物深度和氧化还原电势等因素^[8,11,59]。对南海另一活跃冷泉海马冷泉的研究结果表明, ANME-1b 亚群和 DIC 呈正相关, 与硫酸盐呈负相关; 而 ANME-2a/b 则与硫酸盐呈显著正相关, 与 DIC 呈负相关, 得出的结论是 ANME-1 主要分布于底层, 硫化氢浓度较高的环境, 而 ANME-2a/b 倾向分布于硫酸盐浓度较高的沉积

物表层^[44]。本研究的 RDA 多因素分析结果显示, 不同生境间的甲烷、DIC、硫化氢、硫酸根和铵根离子与微生物类群的分布显著相关(图 6), ANOVA 检验(表 3)表明甲烷($P<0.05$)、硫酸根离子($P<0.01$)、铵根离子($P<0.05$)、DIC ($P<0.05$)和硫化氢($P<0.01$)是与微生物群落显著相关的环境因子。与已有的结论进行对比发现, 在冷泉不同生境间, 冷泉内富含烷烃和硫化氢的流体对微生物群落的构建具有显著影响, 造成了微生物丰富度和多样性上的差异^[9]; 但同时不同生境间其中, 存在差异的环境因子众多, 本研究得出的结论认为不同生境间的微生物群落结构差异与甲烷、硫化氢、硫酸盐以及 DIC 等众多环境因子显著相关。此外通过对相关环境因子的测定结果, 甲烷的有无和变化趋势在不同生境间明显不同(图 1), 其中碳酸盐岩区未检测到甲烷, 而在检测到明显甲烷浓度的菌席区, 黑色菌席区和白色菌席区的甲烷浓度变化范围也存在高低之分, 因此推测在 Formosa 冷泉不同生境间与微生物分布最显著相关的环境因子是甲烷。

3.3 本研究结果总结

冷泉内具有独特的微生物类群结构, 以 ANME、SRB 和 SOB 等类群为主要微生物类群^[8]。本研究则发现 Formosa 冷泉内 3 种主要生境(黑色菌席区、白色菌席区、碳酸盐岩区)中主要古菌类群为 ANME, 主要细菌类群为 SRB 和 SOB。

冷泉环境中微生物丰富度较高, 但群落结构多样性的 Shannon 指数较低^[7]。Formosa 冷泉内 3 种主要生境的生物丰富度高于对照区, 计算 Shannon 和 Simpson 指数发现多样性呈现对照区>白色菌席区>黑色菌席区>碳酸盐岩区的趋势。

在全球水合物区和菌席区等冷泉环境的研究发现,冷泉代表性微生物类群之一的 ANME 类群的丰度和主要亚群存在差异^[8-10];之前的研究得出的结论普遍认为 ANME-1 主要分布于硫化氢浓度较高的环境,而 ANME-2a/b 倾向分布于硫酸盐浓度较高的沉积物,ANME-2c 常在富含水合物的高甲烷环境富集^[8,44]。Formosa 冷泉内黑色菌席区主要的 ANME 类群是 ANME-1b、ANME-2a/b 和 ANME-2c,白色菌席区主要 ANME 类群是 ANME-2a/b 和 ANME-2c,碳酸盐岩区的主要 ANME 类群是 ANME-1b 和 ANME-2a/b;且上述生境中 *mcrA* 基因的丰度也远高于对照区。

SRB 类群在冷泉环境通常与 ANME 类群形成共生体完成甲烷厌氧氧化-硫酸盐还原过程^[6],且相对丰度与硫酸盐浓度显著相关^[16];SOB 类群在 Formosa 冷泉沉积物表层发现具有高丰度^[60]。SRB 和 SOB 类群是 Formosa 冷泉生境内细菌的主要类群,其中 *Desulfosarcinaceae* 占 SRB 的 50%以上,*Sulfurovaceae* 和 *Sulfurimonadaceae* 共占 SOB 的 90%以上。*dsrA* 基因在上述生境内的丰度远高于对照区,且 SRB 和 SOB 类群在低硫酸盐环境中同样具有较高丰度。

冷泉是强异质性的环境,造成全球不同冷泉位点间微生物群落结构差异的主要影响因子包括沉积物深度^[8]、可利用电子受体(如氧气^[8,14])、甲烷和硫酸盐浓度^[15]等环境条件。Formosa 冷泉内 3 种主要生境间环境条件同样存在异质性,微生物群落结构具有明显差异,且微生物群落结构差异与甲烷、硫化氢、硫酸盐以及 DIC 等众多环境因子显著相关。

4 结论

本研究通过高通量测序的方法,对台西南冷泉内主要 3 种生境和外部对照区沉积物中微

生物群落组成和结构进行分析,结合对古菌、细菌类群和主要功能基因(*mcrA*、*dsrA*)的定量结果,发现 Formosa 冷泉不同生境中的微生物分布具有显著差异,冷泉内部菌席区主要古菌类是 ANME 的 ANME-2a/b 亚群和 ANME-1b 亚群,细菌类群则以 SRB 和 SOB 类群为主;碳酸盐岩区与虽然未检测到甲烷,但与菌席区的主要微生物类群类似,甲烷代谢相关类群具有较高丰度,说明冷泉内部还是以甲烷和硫代谢过程为主。通过多因素分析,确定造成微生物分布差异的是甲烷、硫酸盐和硫化氢等环境因子的联合作用。本研究通过对 Formosa 冷泉内小尺度上不同生境微生物多样性进行研究,进一步完善和拓展了对冷泉区微生物分布特点和规律的认识。冷泉内不同生境微生物分布的显著性差异也指示在未来的冷泉生态系统研究中,需要更细致关注小尺度生境内主要微生物类群的生态位和功能差异,并综合评估其在冷泉生态系统及地球元素循环中的功能和效应。

致谢

感谢“科学号”科考船相关人员协助采集样品;感谢上海交通大学章陶亮博士、王景博士和梁乐文同学在本文修改过程中提出的宝贵建议。

参考文献

- [1] Boetius A, Wenzhöfer F. Seafloor oxygen consumption fueled by methane from cold seeps. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 725–734.
- [2] Suess E. Marine Cold Seeps: Background and Recent Advances.//Heinz Wilkes. *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate*. Cham: Springer, 2018: 1–21.
- [3] Liang QY, Hu Y, Feng D, Peckmann J, Chen LY, Yang SX, Liang JQ, Tao J, Chen DF. Authigenic carbonates from newly discovered active cold seeps on the northwestern slope of the South China Sea: constraints on fluid sources, formation environments, and seepage

- dynamics. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2017, 124: 31–41.
- [4] Paull CK, Hecker B, Commeau R, Freeman-Lynde RP, Neumann C, Corso WP, Golubic S, Hook JE, Sikes E, Curray J. Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science*, 1984, 226(4677): 965–967.
- [5] Judd A, Hovland M. Seabed fluid flow: the impact on geology, biology and the marine environment. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- [6] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 311–334.
- [7] Levin LA. Ecology of cold seep sediment: interactions of fauna with flow, chemistry and microbes. *Oceanography & Marine Biology*, 2005, 43: 1–46.
- [8] Ruff SE, Biddle JF, Teske AP, Knittel K, Boetius A, Ramette A. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome. *PNAS*, 2015, 112(13): 4015–4020.
- [9] Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais JC, Cambon-Bonavita MA, Godfroy A, Toffin L. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *The ISME Journal*, 2013, 7(8): 1595–1608.
- [10] Lloyd KG, Lapham L, Teske A. An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b Archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7218–7230.
- [11] Knittel K, Losekann T, Boetius A, Kort R, Amann R. Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 467–479.
- [12] Arakawa S, Sato T, Yoshida Y, Usami R, Kato C. Comparison of the microbial diversity in cold-seep sediments from different depths in the Nankai Trough. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 52(1): 47–54.
- [13] Knittel K, Boetius A, Lemke A, Eilers H, Lochte K, Pfannkuche O, Linke P, Amann R. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal*, 2003, 20(4): 269–294.
- [14] Ruff SE, Arnds J, Knittel K, Amann R, Wegener G, Ramette A, Boetius A. Microbial communities of deep-sea methane seeps at Hikurangi continental margin (New Zealand). *PLoS One*, 2013, 8(9): e72627.
- [15] Heijs SK, Laverman AM, Forney LJ, Hardoim PR, Van Elsas JD. Comparison of deep-sea sediment microbial communities in the Eastern Mediterranean. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(3): 362–377.
- [16] Pop Ristova P, Wenzhofer F, Ramette A, Felden J, Boetius A. Spatial scales of bacterial community diversity at cold seeps (Eastern Mediterranean Sea). 2015, *The ISME Journal*, 9: 1306–1318.
- [17] Feng D, Qiu JW, Hu Y, Peckmann J, Guan HX, Tong HP, Chen C, Chen JX, Gong SG, Li N, Chen DF. Cold seep systems in the South China Sea: an overview. *Journal of Asian Earth Sciences*, 2018, 168: 3–16.
- [18] Yong Z, Xin S, Fang C, Yuanyuan W, Lu J, Hailiang D, Yongyang H, Hongchen J. Microbial diversity in cold seep sediments from the northern South China Sea. *Geoscience Frontiers*, 2012(3): 301–316.
- [19] Stادنitskaia A, Nadezhkin D, Abbas B, Blinova V, Ivanov MK, Sinninghe DJS. Carbonate formation by anaerobic oxidation of methane: evidence from lipid biomarker and fossil 16S rDNA. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2008, 72(7): 1824–1836.
- [20] Feng D, Cheng M, Kiel S, Qiu JW, Yang QH, Zhou HY, Peng YB, Chen DF. Using Bathymodiolus tissue stable carbon, nitrogen and sulfur isotopes to infer biogeochemical process at a cold seep in the South China Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2015, 104: 52–59.
- [21] Hu Y, Feng D, Liang QY, Xia Z, Chen LY, Chen DF. Impact of anaerobic oxidation of methane on the geochemical cycle of redox-sensitive elements at cold-seep sites of the northern South China Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2015, 122: 84–94.
- [22] Zhuang, GC, Xu L, Liang Q, Fan X, Xia Z, Joye SB, Wang F. Biogeochemistry, microbial activity, and diversity in surface and subsurface deep-sea sediments of South China Sea. *Limnology and Oceanography*, 2019, 64: 2252–2270.
- [23] Reese BK, Finneran DW, Mills HJ, Zhu MX, Morse JW. Examination and refinement of the determination of aqueous hydrogen sulfide by the methylene blue

- method. *Aquatic Geochemistry*, 2011, 17(4/5): 567–582.
- [24] Andrzej T, Marion H, Poole PS. Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples. *Microbiome*, 2018, 6(1): 110.
- [25] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *PNAS*, 1992, 89(12): 5685–5689.
- [26] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [27] Steinberg LM, Regan JM. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic Fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21): 6663–6671.
- [28] Klein M, Friedrich M, Roger AJ, Hugenholtz P, Fishbain S, Abicht H, Blackall LL, Stahl DA, Wagner M. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 6028–6035.
- [29] Li F, Yang GB, Peng YF, Wang GQ, Qin SQ, Song YT, Fang K, Wang J, Yu JC, Liu L, Zhang DY, Chen KL, Zhou GY, Yang YH. Warming effects on methane fluxes differ between two alpine grasslands with contrasting soil water status. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2020, 290: 107–988.
- [30] Jurgens G, Lindström K, Saano A. Novel group within the kingdom *Crenarchaeota* from boreal forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 803–805.
- [31] Ishii K, Fukui M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3753–3755.
- [32] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvall C, Edwards CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS 2nd, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *National Biotechnology*, 2019, 37: 852–857.
- [33] Oksanen J, Guillaume BF, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin RP, O'Hara BR, Simpson LG, Solymos P, Stevens HHM, Szoecs E, Wagner H. *Vegan: Community Ecology Package*, 2013.
- [34] Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, Blomberg SP, Webb CO. *Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology*. *Bioinformatics*, 2010, 26(11): 1463–1464.
- [35] Paradis E, Schliep K. *Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R*. *Bioinformatics*, 2018, 35(3): 526–528.
- [36] Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression, Third Edition*. Thousand Oaks CA: Sage, 2016.
- [37] Hoshino T, Inagaki F. Abundance and distribution of archaea in the subseafloor sedimentary biosphere. *The ISME Journal*, 2019, 13(1): 227–231.
- [38] Yanagawa K, Sunamura M, Lever MA, Morono Y, Hiruta A, Ishizaki O, Matsumoto R, Urabe T, Inagaki F. Niche separation of methanotrophic archaea (ANME-1 and-2) in methane-seep sediments of the eastern Japan Sea offshore joetsu. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28(2): 118–129.
- [39] Lloyd KG, Alperin MJ, Teske A. Environmental evidence for net methane production and oxidation in

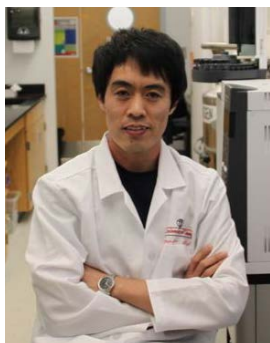
- putative anaerobic methanotrophic (ANME) archaea. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(9): 2548–2564.
- [40] Jagersma CG, Meulepas RJW, Timmers PHA, Szperl A, Lens PNL, Stams AJM. Enrichment of ANME-1 from Eckernförde Bay sediment on thiosulfate, methane and short-chain fatty acids. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157(4): 482–489.
- [41] Bertram S, Blumenberg M, Michaelis W, Siegert M, Krüger M, Seifert R. Methanogenic capabilities of ANME-archaea deduced from (13) C-labelling approaches. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(8): 2384–2393.
- [42] Stokke R, Roalkvam I, Lanzen A, Haflidason H, Steen IH. Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of an ANME-1-dominated community in marine cold seep sediments. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(5): 1333–1346.
- [43] Wang FP, Zhang Y, Chen Y, He Y, Qi J, Hinrichs KU, Zhang XX, Xiao X, Boon N. Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electrontransporting pathways. *The ISME Journal*, 2014, 8: 1069–1078.
- [44] Niu M, Fan X, Zhuang G, Liang Q, Wang F. Methane-metabolizing microbial communities in sediments of the Haima cold seep area, northwest slope of the South China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(9): fix101.
- [45] Maignien L, Parkes RJ, Cragg B, Niemann H, Knittel K, Coulon S, Akhmetzhanov A, Boon N. Anaerobic oxidation of methane in hypersaline cold seep sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(1): 214–231.
- [46] Timmers PH, Welte CU, Koehorst JJ, Plugge CM, Jetten MS, Stams AJ. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea. *Archaea*, 2017, 2017: 1654237.
- [47] Deng L, Bölsterli D, Kristensen E, Meile C, Su CC, Bernasconi SM, Seidenkrantz MS, Glombitza C, Lagostina L, Han X, Jørgensen BB, Røy H, Lever MA. Macrofaunal control of microbial community structure in continental margin sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(27): 15911–15922.
- [48] Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG, De Long EF. Methaneconsuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature*, 1999, 398: 802–805.
- [49] Suess E. Marine cold seeps and their manifestations: geological control, biogeochemical criteria and environmental conditions. *International Journal of Earth Sciences*, 2014, 103(7): 1889–1916.
- [50] Marlow JJ, Hoer D, Jungbluth SP, Reynard LM, Gartman A, Chavez MS, El-Naggar MY, Tuross N, Orphan VJ, Girguis PR. Carbonate-hosted microbial communities are prolific and pervasive methane oxidizers at geologically diverse marine methane seep sites. *PNAS*, 2021, 118(25): e2006857118.
- [51] Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *PNAS*, 2002, 99(11): 7663–7668.
- [52] Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sørensen KB, Anderson R, Fredricks HF, Elvert M, Kelly TJ, Schrag DP. Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *PNAS*, 2006, 103: 3846–3851.
- [53] Li WL, Dong X, Lu R, Zhou YL, Zheng PF, Feng D, Wang Y. Microbial ecology of sulfur cycling near the sulfate-methane transition of deep-sea cold seep sediments. *Environmental Microbiology*, 2021, 23: 6844–6858.
- [54] Blazejak A, Schippers A. Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *AprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 253.
- [55] Nunoura T, Takaki Y, Shimamura S, Kakuta J, Kazama H, Hirai M, Masui N, Tomaru H, Morono Y, Imachi H. Variance and potential niche separation of microbial communities in subseafloor sediments off Shimokita Peninsula, Japan. *Environmental Microbiology*, 2016, 18: 1889–1906.
- [56] McDonald IR, Murrell JC. The particulate methane monooxygenase gene *pmoA* and its use as a functional gene probe for methanotrophs. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 156(2): 205–210.
- [57] Tavormina PL, Ussler W, Orphan VJ. Planktonic and sediment-associated aerobic methanotrophs in two seep systems along the North American Margin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(13): 3985–3995.
- [58] Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated

and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Frontier in Microbiology*, 2015, 15(6): 1346.

- [59] Timmers PHA, Widjaja-Greefkes HCA, Ramiro-Garcia J, Plugge CM, Stams AJM. Growth and activity of ANME clades with different sulfate and sulfide concentrations in the presence of methane. *Frontiers in*

Microbiology, 2015, 6: 988.

- [60] Sun QL, Zhang J, Wang MX, Cao L, Du ZF, Sun YY, Liu SQ, Li CL, Sun Li. High-throughput sequencing reveals a potentially novel *Sulfurovum* species dominating the microbial communities of the seawater-sediment interface of a deep-sea cold seep in South China Sea. *Microorganisms*, 2020, 8: 687.



庄光超，教授，主要从事海洋生物地球化学和地质微生物学研究。通过结合地球化学、同位素示踪以及分子生物学等方法，进而揭示海洋生态系统中甲烷以及其它小分子化合物的产生、代谢和生物地球化学循环，探索微生物和元素循环之间的相互作用。相关研究成果已在 *Geochimica et Cosmochimica Acta*、*Global Biogeochemical Cycles*、*Geophysical Research Letters*、*Environmental Microbiology*、*Limnology and Oceanography* 等一流地学、微生物学期刊上发表。多次参与载人深潜以及大洋钻探等国际合作航次，研究区域包括大洋、河口、湿地、深海沉积环境，以及高盐、冷泉、热液、天然气水合物区、深海生物圈等极端生态环境。担任十多个地学、微生物学等国际期刊的审稿人。



王凤平，上海交通大学特聘教授、国家自然科学基金委杰出青年基金获得者，“周集中微生物生态学突出贡献”奖获得者。长期专注于海洋深部生物圈研究，曾三次作为载人深潜科学家深潜海底科考，在国际上引领了海洋深部古菌生态/地球化学功能的研究。发现并命名了一个目前被国际学术界广泛接受的新古菌门——“深古菌”门(*Bathyarchaeota*)，发现其是海洋中新的未知“木质素降解者”，为深入理解海洋碳循环机制做出了贡献。目前担任国际微生物生态学会(ISME)大使(Ambassador)和国际董事(International Board)，欧洲海洋科学钻探(ECORD)科学装置委员会委员，综合大洋钻探计划(IODP)中国科学委员会委员，中国古生物学会地球生物学会副理事长，中国地质微生物专业委员会副主任，多个国际学术期刊 *Frontiers in Marine Sciences*、*Applied and Environmental Microbiology* 等副主编或编委，为推动中国地

质生物学学科发展和提升学科国际影响力贡献了力量。