

祁连山天然气水合物赋存区钻孔细菌多样性*

武淑娇¹ 韩路¹ 吕杰^{1**} 董建英¹ 祝有海²

(¹北京化工大学, 北京 100029; ²中国地质科学院矿产资源研究所, 北京 100037)

摘要 分析了青海省祁连山冻土区天然气水合物赋存区 DK-6 钻孔的 4 个样品, 对岩心样品进行处理提取微生物总基因组, 采用 PCR 构建了细菌 16S rDNA 基因文库, 4 个文库包括 44 个 OTU, 其中有厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形杆菌门 (Proteobacteria) (包括 α -、 β -和 γ -变形杆菌亚群)、放线菌纲 (Actinobacteria) 和异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus) 5 类, 煤、泥岩、粉砂岩等不同岩性的微生物群落之间显示出较大的组成差异, 优势菌不同。细菌菌群多样性随采集点地质环境不同而有较明显的变化, 天然气水合物含量、水含量、有机质含量等环境因素对冻土区天然气水合物赋存区中细菌菌群有一定的影响。4 个样品中存在的微生物大部分可以代谢有机烃类, 在天然气水合物环境的特殊条件下, 外界环境因素制约了微生物的种类。

关键词 天然气水合物; 细菌多样性; 岩性; 烧失量; 16S rDNA

中图分类号 Q938 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)12-3221-07

Bacterial diversity in bore holes of gas hydrate-rich deposit districts in Qilian Mountains of Northwest China. WU Shu-jiao¹, HAN Lu¹, LÜ Jie^{1**}, DONG Jian-ying¹, ZHU You-hai² (¹Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; ²Institute of Mineral Resources, Chinese Academy of Geological Sciences, Beijing 100037, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(12): 3221–3227.

Abstract: In this study, four core samples were collected from the DK-6 bore holes of gas hydrate-rich deposit districts in the permafrost zone of Qilian Mountains, Qinghai Province of Northwest China, with the total bacterial genome in the samples analyzed. Four 16S rDNA gene libraries were created by PCR. There were 44 OTUs, including five categories, *i. e.*, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria (α -, β -, and γ -Proteobacteria), Actinobacteria, and Deinococcus-Thermus, in the four gene libraries. The microbial communities of different lithology showed a relatively large composition difference, and had different dominant species. Lithology played a certain decisive role to the growth of bacteria. Bore holes DK6-12 (117.5 m) and DK6-17 (161.9 m) were of mudstone, in which, *Alcaligenes xylosoxidans* was the dominant bacterium. K6-23 (194.6 m) was of fine sandstone, in which, a large number of *Spirosoma panaciterrae* was found in cloning sequences. DK6-25 (213 m) was of coal, with the highest abundance of *Pantoea ananatis*. Most of the microbes presented in the four samples could metabolize organic hydrocarbon. Our results indicated that in the gas hydrate-rich deposit districts in permafrost zone, environmental factors limited the diversity of microbes.

Key words: gas hydrate; bacterial diversity; lithology; ignition loss; 16S rDNA.

天然气水合物是在一定状态下稳定在笼形冰晶结构中的以甲烷等小分子烃类为主的一种气体混合物 (Benot *et al.*, 2004), 它是一种潜在的新型能源。天然气水合物分布广泛, 常存于陆域永久冻土带和

大陆边缘的海底沉积层中。据估计全球大约 27% 的陆地和 90% 的海域都含有天然气水合物 (武全萍和刘力健, 2010)。研究表明, 冻土区天然气水合物主要分布于俄罗斯、美国和加拿大等高纬度环北冰洋冻土区。我国祁连山冻土区地处青藏高原北缘, 以山地多年冻土为主, 连续冻土区的年平均地表地

* 中国地质调查局地质调查项目 (1212010818055) 资助。

** 通讯作者 E-mail: lyjie@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2012-03-18 接受日期: 2012-08-06

温为 $-2.4\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,冻土层厚度为 $50\sim 139\text{ m}$ (张永勤,2010)。祁连山冻土区天然气水合物的气体为有机成因,且以热解气成因为主。我国是天然气水合物资源大国,是世界第三冻土大国,冻土区总面积达 $2.15\times 10^6\text{ km}^2$ (卢振权等,2010)。2008年11月,我国在青海省祁连山南缘永久冻土带成功钻获了天然气水合物实物样品,这次发掘是我国首次在陆域发现天然气水合物,使我国成为世界上第1个在中低纬度冻土区发现天然气水合物的国家,也是继俄罗斯、加拿大和美国之后,通过钻探在陆域获得天然气水合物样品的第4个国家(陈声明等,2007)。

在环境中,微生物作为生态系统的生产者、消费者和分解者对环境物质和能量的循环、迁移、转化起着极其重要的作用。多年冻土区水合物的形成需要充足的烃类气体、地下水、适合的温度和压力4个基本条件,而这4个重要因素又与环境中的微生物分布紧密相关,作为冻土中微生物的主要营养物质,C含量和N含量直接对微生物的群落产生影响。虽然影响微生物活动的环境因子很多,但归纳起来可分为营养因子、理化因子两类(郑平,2002)。除了这些环境因子外,生物作用也是影响环境中微生物多样性的重要因素(周卫民等,2005)。因此,研究冻土区天然气水合物赋存区微生物与环境的关系对天然气水合物的稳定和逸散及微生物对碳循环的影响极其重要。

目前,对于冻土区天然气水合物地质微生物的研究还处于初始阶段,主要以海洋中的水合物为主。在冻土区天然气水合物赋存区有一定数量微生物存在,较多微生物可以在极端环境下存在,其通过调节自身的形态或代谢来适应抵抗恶劣环境(Marchant *et al.*, 2002; Miteva & Brenchley, 2005)。国际上关于冻土区天然气水合物的地质微生物研究主要集中在美国阿拉斯加北坡油田及加拿大马利克省,Colwell等(2011)仅对其水合物层和非水合物层微生物多样性进行了初步对比,在群落结构方面没有进行详细的分析。

截止到2011年底,本项目工程共开采了8个研究钻孔,施工期间多次钻获天然气水合物实物样品,本次研究样品采集于“祁连山冻土区天然气水合物科学钻探工程”中的DK-6钻孔。本次研究以祁连山冻土区天然气水合物DK-6钻孔的岩心样品为研究对象,通过对样品中微生物16S rDNA基因的分析,对样

品中各深度微生物群落结构进行了对比,初步分析了冻土带天然气水合物赋存区环境中细菌群落结构的特点,天然气水合物环境中环境条件如温度、岩性、深度以及含碳量对于细菌群落结构的影响,旨在分析天然气水合物环境下地质因素与微生物之间的关系,为我国天然气的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

岩芯样品均采自祁连山永久冻土区天然气水合物DK-6钻孔,钻孔位于青海木里煤田聚乎更矿区,坐标为 $99^{\circ}01'E-99^{\circ}15'E, 38^{\circ}04'N-38^{\circ}12'N$ 。采集时间为2010年8月6日—9月1日,使用绳索取芯钻进系统自表土至386 m处分段连续采集岩芯样品。采样过程保持样品无菌低温,整个采集周期结束后样品在干冰保温条件下运至实验室后置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。本研究选取4件样品(DK6-12、DK6-17、DK6-23和DK6-25)进行细菌群落以及含碳量分析,采样深度及岩性如图1所示。根据天然气水合物分布层选取DK6-12、DK6-17、DK6-23和DK6-25共4个样品进行分析。筛选此4个样品以期尽可能达到3个研究目的:(1)不同深度相同岩性中微生物分析对比;(2)不同岩性环境中微生物的对比;(3)水合物赋存层和非水合物层微生物群落结构的对比研究。岩芯样品DK6-12采自地下117.5 m处,为深灰色泥岩加少量煤层,其上下10 m处有天然气水合物赋存层。DK6-17样品是位于地下161.9 m处的深灰色泥岩,其上下2 m处为水合物赋存层。样品DK6-23是深灰色沙岩,采集自地下194.6 m处,此样品处于水合物富存区上层。DK6-25样品是黑色煤,位于地下213.0 m处,该样品距离下层水合物赋存层约20 m。

样品切割研磨处理在无菌室中进行。首先,采用微小荧光球示踪方法(王远亮等,2005),使用切割器Hydraulic Core Splitter(Sepor Inc., Wilmington, CA, USA)切掉表面受污染岩芯并将岩芯切割至体积 $<1\text{ cm}^3$ 。最后将内核部分于研磨机SPEX Certi-Prep 8500 Shatterbox(SPEX SPEX CertiPrep, Inc. Metuchen)中研磨为200目以下的微小颗粒。

1.2 细菌DNA提取及16S rDNA基因克隆文库的构建与测序

样品细菌DNA提取使用PowerMax Soil DNA Kit(Mo Bio Lab, Inc.)试剂盒,得到细菌DNA后

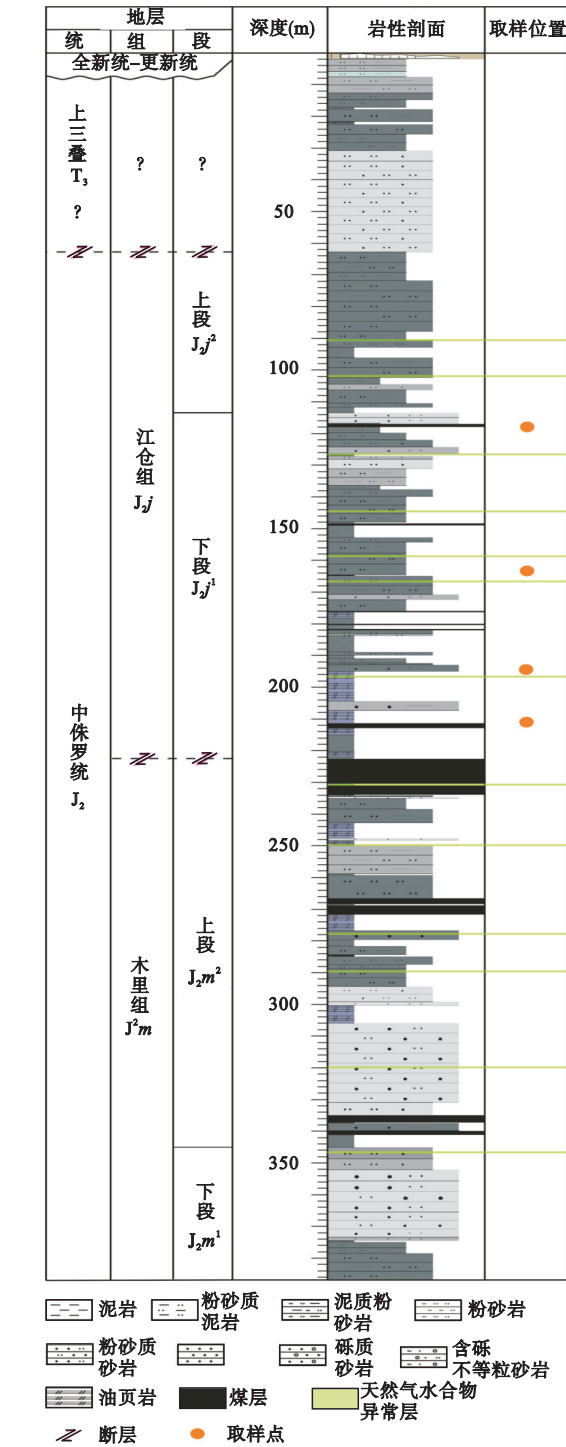


图1 DK-6 钻井样品采集示意图
Fig.1 Sample depth of DK-6 core chart

以其作为模板进行 PCR 扩增,PCR 引物为细菌 16S rDNA 通用引物(Bac27: AGAGTTTGATCMTGGCTC-CAC, Uni1492: TACGGYTACCTTGTACGACTT)。PCR 扩增体系:LA Taq(Takara) 0.5 μL,2×GC Buffer I 25 μL,dNTP 8 μL,引物各 1 μL,DNA 模板 1 μL,总体积 50 μL。反映参数为:预变性 95 ℃,5

min;变性 96 ℃,30 s;退火 52 ℃,40 s;延伸 72 ℃,1.5 min;35 个循环后 72 ℃,保温 10 min。

PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,转入 DH5α 感受态细胞(Takara),涂布于 Amp-Xgal/IPTG 抗性筛选平板,经蓝白斑筛选后 PCR 阳性验证获得阳性克隆子,阳性克隆子交由北京三博基因公司测序。

1.3 测序结果统计分析

测序获得的序列通过应用 Blast 程序与 Gen-Bank 数据库中的已有细菌 16S rDNA 序列进行比较分析。用 DNA-MAN 软件对序列归类,序列相似性>97% 的归为一个操作分类单元(OTU)。

1.4 细菌多样性与钻孔环境响应关系分析

测序鉴定结果与采集样品环境的一些地质参数进行对比,地质参数包括样品采集深度、岩石样品岩性鉴定以及岩石灼烧度的分析。烧失量的测定是将 1 g 烘干样品置于灼烧恒重的瓷坩埚中,在高温炉内 950 ℃灼烧 15 min 后冷却至室温再反复灼烧直到恒重测得。

2 结果与分析

2.1 样品岩性和烧失量

岩芯样品具有多种组成成分,由于其中的某些成分在一定温度条件下会发生挥发、燃烧以及分解等物理、化学过程,因此烧失量能够反映出样品中某些组成成分的含量。Luczak 等(1997)认为,烧失量测定是一种能够比较稳定而可靠地反映沉积物有机质和碳酸盐含量的研究方法;Cato 等(1977)认为,在一定条件下,可以用烧失量有效的估算出沉积物中有机碳的含量,而沉积环境中有机质,碳酸盐含量与微生物有着密切的关系。经测定样品 DK6-25 的烧失量最高,与其主要成分为煤有关。样品 DK6-23 的烧失量最少,说明此深度岩芯中有机质和碳酸盐的含量最低。

2.2 细菌多样性

DK6-12、DK6-17、DK6-23 和 DK6-25 4 件样品中共检测到 44 个操作分类单元(OTU),样品丰度相对较小,并且 OTU 种类数量随样品采集深度以及岩性的变化又有很大的差异,样品多样性也发生变化。

DK6-12 中,细菌分类如表 2 所示,变形杆菌门 Proteobacteria 为主要类群,克隆子比例为 90%,物种丰度较低,仅有 2 OTUs,分布于 α-和 β-变形杆菌亚群中,克隆子比例分别占 27% 和 63%。除此之外,其他 10 个细菌类群分别为厚壁菌门(Firmicutes)和

表 1 岩芯样品深度、岩性及烧失量
Table 1 Depth, lithology and loss on ignition of core samples

样品编号	深度(m)	岩性	烧失量(%)
DK6-12	117.5	深灰色泥岩夹少量煤层	19.9
DK6-17	161.9	深灰色泥岩	12.9
DK6-23	194.6	深灰色粉砂岩	4.4
DK6-25	213.0	煤	82.1

表 2 DK6-12(117.50 m) 细菌 16S rDNA 克隆子及分类
Table 2 Clones of bacterial 16S rDNA in core DK6-12 and their classification

克隆子编号	进化关系最相近的细菌	相似性 (%)	相对含量 (%)	分类
DK6-12-9	<i>Methylobacterium</i> sp.	99	27	α-Proteobacteria
DK6-12-1	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	100	63	β-Proteobacteria
DK6-12-30	<i>Geobacillus lituanicus</i>	99	3	Firmicutes
DK6-12-3	Uncultured bacterium	100	6	
DK6-12-51	<i>Hymenobacter</i> sp.	98	1	Bacteroidetes

拟杆菌门 (Bacteroidetes)。克隆子比例分别占 9% (分属于 2 OTUs) 和 1% (1 OTU)。

DK6-17 中,变形杆菌门 Proteobacteria 为主要类群,克隆子比例为 92%,物种丰度较低,仅有 3 OTUs,分布于 α-和 β-变形杆菌亚群中,克隆子比例分别占 27% (分属于 2 OTUs) 和 65%。除此之外,其他 6 个细菌类群分别为厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌纲 (Actinobacteria)。克隆子比例分别占 4% (分属于 2 OTUs)、1% (1 OTU) 和 1% (1 OTU),分类结果如表 3 所示。

DK6-23 中,物种丰度较高,有 14 OTUs,其分布如表 4 所示,拟杆菌门 (Bacteroidetes) 为主要类群,克隆子比例为 41% (1 OTU),其次含量较多的是变形杆菌门 Proteobacteria,分布于 α-、β-和 γ-变形杆菌亚群中,克隆子比例分别占 9% (分属于 3 OTUs)、6% (分属于 2 OTUs) 和 6% (分属于 2 OTUs)。除此

表 3 DK6-17(161.90 m) 细菌 16S rDNA 克隆子及分类
Table 3 Clones of bacterial 16S rDNA in core DK6-17 and their classification

克隆子编号	进化关系最相近的细菌	相似性 (%)	相对含量 (%)	分类
DK6-17-9	<i>Asticcacaulis excentricus</i>	98	1	α-Proteobacteria
DK6-17-45	<i>Methylobacterium</i> sp.	99	26	
DK6-17-1	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	100	65	β-Proteobacteria
DK6-17-34	<i>Geobacillus lituanicus</i>	99	1	Firmicutes
DK6-17-51	Uncultured bacterium	100	3	
DK6-17-14	<i>Hymenobacter</i> sp.	97	1	Bacteroidetes
DK6-17-78	<i>Arthrobacter scleromae</i>	100	1	Actinobacteria

之外,异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus) 的比例也较高,占 21% (分属于 2 OTUs)。其他 12 个克隆子分别为厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌纲 (Actinobacteria)。克隆子比例均为 6% (分属于 2 OTUs)。

DK6-25 中,物种丰度最高,有 18 OTUs (表 5),变形杆菌门 Proteobacteria 为主要类群,克隆子比例为 64%,分布于 α-和 γ-变形杆菌亚群中,克隆子比

表 4 DK6-23(194.6 m) 细菌 16S rDNA 克隆子及分类
Table 4 Clones of bacterial 16S rDNA in core DK6-23 and their classification

克隆子编号	进化关系最相近的细菌	相似性 (%)	相对含量 (%)	分类
DK6-23-33	<i>Sphingomonas mali</i>	99	3	α-Proteobacteria
DK6-23-35	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	99	3	
DK6-23-29	<i>Afipiaeno</i> sp.	99	3	
DK6-23-56	<i>Massilia aurea</i>	98	3	β-Proteobacteria
DK6-23-95	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99	3	
DK6-23-7	<i>Shigella flexneri</i>	98	3	γ-Proteobacteria
DK6-23-71	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	3	
DK6-23-76	<i>Bacillus carboniphilus</i>	98	3	Firmicutes
DK6-23-67	Uncultured bacterium	100	3	
DK6-23-4	<i>Spirosoma panaciterrae</i>	99	41	Bacteroidetes
DK6-23-73	<i>Corynebacterium</i> sp.	98	3	Actinobacteria
DK6-23-24	<i>Blastococcus saxosidens</i>	99	3	
DK6-23-7	<i>Deinococcus</i> sp.	99	14	Deinococcus-Thermus
DK6-23-5	<i>Meiothermus ruber</i>	98	7	

表 5 DK6-25(213 m) 细菌 16S rDNA 克隆子及分类
Table 5 Clones of bacterial 16S rDNA in core DK6-25 and their classification

克隆子编号	进化关系最相近的细菌	相似性 (%)	相对含量 (%)	分类
DK6-25-2	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	99	8	α-Proteobacteria
DK6-25-14	<i>Paracoccus</i> sp.	99	2	
DK6-25-26	<i>Ochrobactrum lupini</i>	99	2	
DK6-25-29	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	2	
DK6-25-4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	2	γ-Proteobacteria
DK6-25-9	<i>Methylophilus</i> sp.	100	16	
DK6-25-11	<i>Pantoea ananatis</i>	100	22	
DK6-25-36	<i>Shigella flexneri</i>	98	8	
DK6-25-97	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	99	2	
DK6-25-24	<i>Bacillus subtilis</i>	99	10	Firmicutes
DK6-25-80	Uncultured bacterium	100	2	
DK6-25-3	<i>Spirosoma panaciterrae</i>	98	2	Bacteroidetes
DK6-25-39	<i>Rothia mucilaginosa</i>	99	2	Actinobacteria
DK6-25-71	<i>Blastococcus saxosidens</i>	97	2	
DK6-25-72	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99	2	
DK6-25-35	<i>Corynebacterium mycetoides</i>	98	8	
DK6-25-13	<i>Cryobacterium</i> sp.	99	2	
DK6-25-67	<i>Deinococcus</i> sp.	98	2	Deinococcus-Thermus

例分别占 14% (分属于 4 OTUs) 和 50% (分属于 5 OTUs)。其次含量较多的是放线菌纲 (*Actinobacteria*), 占到 16% (分属于 5 OTUs), 其他 16 个细菌类群分别为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和异常球菌-栖热菌门 (*Deinococcus-Thermus*)。克隆子比例分别占 12% (分属于 2 OTUs)、2% (1 OTU) 和 2% (1 OTU)。

3 讨 论

3.1 冻土带天然气水合物环境中细菌结构的特点

DK-6 钻孔的 4 件样品的所有克隆子序列归类为 5 个主要的系统分类群: 变形杆菌门 (*Proteobacteria*, 分布于 α -、 β -和 γ -变形杆菌亚群中)、革兰氏阳性菌群包含了高 (G+C)% 的放线菌门 (*Actinobacteria*)、低 (G+C)% 的厚壁菌门 (*Firmicutes*)、CFB 菌群的拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 以及异常球菌-栖热菌门 (*Deinococcus-Thermus*)。DK6-12 (117.5 m) 和 DK6-17 (161.9 m) 都是泥岩样品, 群落结构相似而且 OTU 都较小, *Alcaligenes xylosoxidans* 是这 2 个样品的优势菌, 各占 63% 和 65%。*A. xylosoxidans* 由王鹏等 (2009) 发现于西太平洋暖池区深海沉积物, 并经性能测试发现该菌可耐盐耐冷。此菌株可耐高盐高金属离子。产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 可以改变环境的 pH 值, 并且该属内很多菌株具有转化砷酸盐和亚砷酸盐的能力, 同时它能够降解多种有机物。*Hymenobacter* sp. 由 Xu 等 (2009) 发现于水系沉积物中。DK6-23 (194.6 m) 为细砂岩样品, 在该样品所有克隆序列中发现了大量土壤环境细菌 *Spirosoma panaciterrae*, 占 41%, 它属于屈挠杆菌科 (*Flexibacteraceae*), 隶属于鞘脂杆菌纲 (*Sphingobacteria*), 其所包含的多个属细菌广泛分布于海洋沉积物及陆地岩层中 (Ten *et al.*, 2009)。DK6-25 (213 m) 为煤样品, *Pantoea ananatis* 丰度最高。泛菌属 (*Pantoea*) 是一种广泛存在于环境中的细菌, 在空气、海洋及岩石中均有发现, 但大部分均有致病性。研究中并未发现产甲烷细菌序列, 说明微生物成因不是祁连山冻土区天然气水合物的主要成因。本研究同时发现, 样品中存在大量的代谢有机物的微生物, 它们在此环境中对物质与能量转化起着极其重要的作用。

3.2 天然水合物赋存去环境中温度、深度、含 C 量对于细菌群落结构的影响

祁连山冻土区冻土以多年冻土为主, 连续冻土

区内的年平均低温为 $-2.4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 冻土层厚度为 50 ~ 139 m (祝有海等, 2010), DK6-12 和 DK6-17 由于受冻土层影响, 环境温度较低, 在此环境下 OTU 种类仅为 DK6-23 和 DK6-25 的 1/3 ~ 1/4。温度制约了微生物的生长条件, 而 DK6-12 和 DK6-17 中的优势菌 *Alcaligenes xylosoxidans* 生存能力极强, 该菌不仅可耐盐耐冷并且可以代谢降解多种有机物 (王鹏等, 2009), 在深灰色泥岩夹杂有薄煤层的环境中, 可以利用自身抗逆机制和环境中的有机成分存活下来并且成为此环境的优势菌。*Methylobacterium* sp. 是 DK6-12 和 DK6-17 样品中的第二大优势菌, 甲基营养菌 (*Methylobacterium*) 可以利用包含一个碳原子或者多个碳原子化合物中的甲基作为唯一碳源和能源生长的特质著称, 此类菌属在自然界中广泛存在, 其中不乏一些能够在低温环境下降解甲基有机物的菌种 (晁红军等, 2009)。甲基菌对开发单细胞蛋白和石油化学转化的生物催化能力具有很大潜力, 并且它们对自然界的碳素和氮素的循环起着重要的作用。在此环境中, 这些甲基菌的存在对于维持天然气水合物中甲烷的动态平衡和冻土环境的生态平衡具有重要意义。DK6-12 和 DK6-17 中未培养细菌相对含量较高, 据资料显示, 这些种类细菌多发现于低温岩层中, 具有嗜冷或者耐冷的特征 (冯虎元等, 2003)。本研究得到较多芽孢杆菌 (*Bacillus*) 序列, 芽孢杆菌含有内生孢子, 当环境不允许其生长时, 在自然界有抗逆性的休眠结构应该先输出较大的生存价值, 芽孢杆菌广泛的分布于土壤、水体和空气中, 与自然界物质转化、土壤肥力以及环境微生物密切相关。芽孢杆菌的生理特性很广, 可降解多种化合物, 并且可以生产抗生素, 具有固氮作用、铁离子的沉淀、硒和镁离子的氧化还原等。2 个样品中芽孢杆菌属中出现频率较高的是 *Hymenobacter* sp., 是典型的高原嗜冷菌, 此菌多在青藏高原低温环境下出现 (Zhang *et al.*, 2010)。

相对于前 2 个样品, DK6-23 和 DK6-25 的微生物多样性要丰富很多, 分别为 14 OTUs 和 18 OTUs, 多样性出现上升的原因, 一是由于地层较深, 取样点远离冻土层, 微生物受低温影响较小, 而低温条件下细菌的新陈代谢缓慢, 能够适应并生存在低温环境的微生物种类相对较少。OTU 上升的另一个原因是在后 2 个取样点处底层岩性不同, 导致作为微生物主要能量元素的 C、H、O、N 以及 S 和 P 等元素发生了变化, 同时岩石环境中的铁、铜等微量元素的变

化也直接制约了微生物的生长种类。

烧失量测定是一种能够比较稳定而可靠地反映沉积物有机质和碳酸盐含量的研究方法,而沉积环境中有机质、碳酸盐含量与微生物的存在有着密切的关系。在 DK6-12、DK6-17、DK6-23 和 DK6-25 4 个样品中,前 3 个样品烧失量均较低,最后 1 个样品烧失量比前 3 个样品显著增大,分析其岩性发现,除 DK6-25 样品之外,其他 3 个岩石样品主要化学成分均为 SiO_2 ,而且质地均较坚硬。采样时发现,DK6-23 岩芯样品的裂隙发育程度也较前 2 个样品多,并且 DK6-12、DK6-17 均为泥岩,DK6-23 为沙岩,而 K6-25 为煤,因此就岩石质地而言,DK6-25 含有有机质和碳酸盐较其他 3 个样品多,微生物含量较丰富。DK6-23 岩石质地相对疏松,由于裂隙的发育利于水分等物质在微环境中流通,所以其中的微生物含量也较 DK6-12 和 DK6-17 样品高。*Geobacillus lituanicus* 在 DK6-12 和 DK6-17 中均有出现,此菌属具有嗜热、兼性厌氧及降解烃类和产表面活性剂的特性(Christner *et al.*, 2000),但是在低温环境下也经常能够分离到此菌株(Fajardo & Nicholson, 2006)。根据 *Geobacillus* 属菌株的理化特性推测,在此环境中 *Geobacillus* 属与其他菌株存在共生关系,可为寄生菌株提供碳源及其他营养成分;并且微生物产生的表面活性物质可以降低界面能力,改变环境的湿润性,促进物质在微环境的流通,所以在低温寡营养的条件下能够出现相对多样性的微生物菌群。

3.3 细菌与冻土带天然气水合物的关系

有研究表明,祁连山冻土带天然气水合物的生成与微生物无关(卢振权等,2010)。但是,本研究发现了一些与天然气水合物中烃类物质代谢有关的微生物。

在 3 个样品中 DK6-25 中的微生物多样性最为丰富,其优势菌群有 *Pantoea ananatis*、*Methylophilus* sp. 和 *Bacillus subtilis*,其中甲基营养菌(*Methylobacterium*)在此环境中起到了重要的作用,此样品取样点地处煤层,并且离天然气水合物富集层较近,环境中有较多煤层气,这也是青藏高原冻土区形成天然气水合物的气源之一。样品中丰富的有机质能够满足甲基营养菌的生长,并且促进了 C1 化合物在此微环境的代谢循环,其代谢产物能够供给其他微生物生长。同时,甲基营养菌的存在是环境中富甲基有机质的一个重要标志。*P. ananatis* 和 *B. subtilis*

在其他样品中均有出现,它们同样具有耐低温耐寡营养的特质。*Pseudomonas fluorescens* 属于假单胞菌属,该属在土壤、淡水、海水环境中极为常见,在自然界物质转化中起着广泛且重要的作用。*Pseudomonas* 属的大多数细菌可将石油降解(韩如飏等,2002)。假单胞菌的营养要求低,绝大部分不需要生长因子,代谢类型多,生化能力活泼,使此菌能够适应不同的环境。目前,还有许多该属的菌株从低温环境中分离得到。而 *P. fluorescens* 具有好氧嗜冷的特性并且可以降解石油,它的活性在有机物质矿化方面具有重要的意义(Minna *et al.*, 2006)。

4 个样品中存在的微生物大部分可以代谢有机烃类,例如甲基营养菌,土芽孢杆菌属(*Geobacillus*),假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)以及泛菌属(*Pantoea*)等。有研究表明,细胞物质和细胞分泌物有着丰富的多糖、有机酸以及肽化合物,可对岩石表面起到改造作用(Hersman *et al.*, 1996; Lovely & Woodward, 1996; Banfield & Zhang, 2001)。在天然气水合物环境的特殊条件下,外界条件制约了微生物的种类,同时这些细菌的存在促进了环境中物质与能量的微循环利用。在以后的研究中,将对冻土区天然气水合物赋存区中微生物对天然气水合物的影响、微生物对此环境的改变和稳定性的影响以及天然气水合物环境中微生物之间的相互作用等进行更深入的研究。

参考文献

- 晁红军,宋修鹏,孙继华,等. 2009. 甲基营养菌的研究进展. 微生物学通报, **36**(11): 1727-1737.
- 陈声明,林海萍,张里钦. 2007. 微生物生态学导论. 北京:高等教育出版社.
- 冯虎元,马晓军,章高森,等. 2003. 青藏高原冻土微生物的初步研究// 第五届微生物生态学术研讨会论文集. 北京:气象出版社: 94-100.
- 韩如飏,闵航,程志强,等. 2002. 石油降解细菌的表型特性和系统发育分析. 生物多样性, **10**(2): 202-207.
- 卢振权,祝有海,张永勤,等. 2010. 青海省祁连山冻土区天然气水合物存在的主要证据. 现代地质, **24**(2): 329-336.
- 王鹏,肖湘,王风平,等. 2009. 西太平洋暖池区深海沉积物细菌群落结构分析. 同济大学学报, **30**(3): 404-409.
- 王远亮,夏颖,董海良,等. 2005. 中国大陆科学钻探(CCSN)地下岩石样品中的细菌群落分析. 岩石学报, **21**(2): 533-539.
- 武全泽,刘力健. 2010. 天然气水合物资源勘探开发技术研究进展. 化工科技, **18**(4): 58-62.

- 张永勤. 2010. 国外天然气水合物勘探现状及我国水合物勘探进展. 探矿工程, **37**(10): 1-8.
- 郑平. 2002. 环境微生物学. 浙江: 浙江大学出版社.
- 周卫民, 杨世忠, Nazina TN. 2005. *Geobacillus* 研究进展. 微生物学杂志, **25**(3): 46-49.
- 祝有海, 张永勤, 文怀军. 2010. 祁连山冻土区天气水合物极其基本特征. 地球学报, **31**(1): 8-16.
- Banfield JF, Zhang H. 2001. Nanoparticles in the environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **44**: 1-58.
- Benot B. 2004. Natural gas hydrates: Myths, facts and issues. *Comptes Rendus Geoscience*, **336**: 751-765.
- Cato I. 1977. Recent sedimentological and geochemical conditions and pollution problems in two marine areas in south western Sweden. Uppsala: Societas Upsaliensis pro Geologia Quaternaria.
- Christner BC, Mosley TE, Thompson LG, *et al.* 2000. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus*, **144**: 479-485.
- Colwell F, Schwartz A, Briggs B. 2011. Microbial community distribution in sediments from the Mount Elbert Gas Hydrate Stratigraphic Test Well, Alaska North Slope. *Marine and Petroleum Geology*, **28**: 404-410.
- Fajardo P, Nicholson W. 2006. *Bacillus* endospores isolated from granite: Close molecular relationships to globally distributed *Bacillus* spp. from endolithic and extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 2856-2863.
- Hersman LM, Aurice P, Sposito G. 1996. Iron acquisition from hydrous Fe(III)-oxides by an aerobic *Pseudomonas* sp. *Chemical Geology*, **132**: 25-31.
- Lovely DR, Woodward JC. 1996. Mechanisms for chelator stimulation of microbial Fe(III)-oxide reduction. *Chemical Geology*, **132**: 19-24.
- Luczak C, Janquin MA, Kupka A. 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, **345**: 87-94.
- Marchant R, Banat IM, Rahman TJ, *et al.* 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology*, **4**: 595-602.
- Minna MJ, German J, Kristina L, *et al.* 2006. Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*. *Environmental Pollution*, **139**: 244-257.
- Miteva VI, Brenchley JE. 2005. Detection and isolation of ultra small microorganisms from a 120000-year-old Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 7806-7818.
- Ten LN, Xu L, Jin FX, *et al.* 2009. *Spirosoma panaciterrae* sp. nov. isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**: 331-335.
- Zhang SH, Yang GL, Wang YT. 2010. Abundance and community of snow bacteria from three glaciers in the Tibetan Plateau. *Journal of Environmental Sciences*, **9**: 1413-1424.
-
- 作者简介 武淑娇, 1986年生, 女, 硕士研究生, 研究方向为地质微生物学. E-mail: bio_wushujiao@126.com
责任编辑 魏中青
-