

九龙江口海岸带沉积物甲烷相关古菌群落结构及多样性研究

许可¹, 陈金全² (1. 厦门大学生命科学院, 福建厦门 361005; 2. 云南大学工程技术研究院, 云南昆明 650091)

摘要 [目的] 针对河口环境的甲烷产生相关微生物展开调查, 了解其多样性及群落结构组成、变化。[方法] 采用克隆文库技术, 分析九龙江河口沉积物样品, 调查甲烷产生相关微生物的多样性及分布情况。[结果] 九龙江沉积物含有清晰的甲烷硫酸盐过渡区。克隆文库分析结果显示主要是 *Methanosaeta*, *Methanomicrobiales* 和 *Methanomarcinales/ANME*。*Methanomarcinales/ANME* 是主要类群(41%), 且以甲烷氧化菌 ANME-2a 为主。*Methanosaeta* 和 *Methanomicrobiales* 分别占 27% 和 28%。[结论] 在九龙江河口沉积物中, 乙酸利用型和氢气利用型甲烷产生是主要的甲烷产生途径。

关键词 产甲烷生物; 甲烷生成; 厌氧甲烷氧化。

中图分类号 S181.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2012)26-12752-02

Stratified Communities and Diversity of Methanogen in Sediments of Jiulong River Estuary

XU Ke et al. (School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract [Objective] To investigate the diversity and distribution of methanogen in the sediments of Jiulong River estuary. [Method] Based on clone library analysis, the diversity and distribution of methanogen communities in sediments of Jiulong River estuary were investigated. [Result] The majority of obtained sequences in clone library were assigned mainly to *Methanosaeta*, *Methanomicrobiales* and *Methanomarcinales/ANME*. The sequences of *Methanomarcinales/ANME* were the most dominant group (41% of total sequences) and composed largely of ANME-2a. In addition, *Methanosaeta* and *Methanomicrobiales* accounted for 27% and 28% of all sequences. [Conclusion] Acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenesis were the main methanogenic pathway in Jiulong River estuary sediments.

Key words Methanogen; Methanogenesis; Anaerobic methane oxidation

甲烷是重要的温室气体, 对全球变暖效应的贡献率约 20%^[1-2]。地球上大部分的甲烷是由生物代谢产生的, 主要是由产甲烷古菌^[3]在厌氧环境下利用小分子有机物生成甲烷。海洋沉积物中蕴藏着地球上大部分甲烷, 每年产生 75 ~ 320 Tg 甲烷。然而, 只有 5 ~ 20 Tg 甲烷从海洋沉积物中逃逸。这主要是由于沉积物中存在甲烷厌氧氧化现象, 即甲烷的氧化与硫酸盐的还原偶联使得甲烷氧化成 CO₂ 和水。目前, 对于甲烷产生和厌氧甲烷氧化的研究主要集中在深海、冷泉、大陆边缘、湖泊、潮汐沉积物和热液口环境, 并且主要通过古菌通用引物进行检测。这些环境中产甲烷微生物只占古菌的很小部分, 因此结果无法涵盖所有的产甲烷菌群^[4-6]。近年, 针对产甲烷菌特异的 16S rRNA 引物被报道^[7-8]。这为真实反映沉积物中产甲烷古菌群落的结构情况提供了有效的技术手段。河口是陆地和海洋的重要连接处, 以有机沉积物而闻名。这些有机物来源于陆地或人类(如城市生活污水排放等)。有研究表明, 河口向海洋排放了大量的甲烷^[9]。九龙江河口位于我国南部的福建省热带地区, 是我国南部最大的河口系统之一, 全长 285 km, 面积 14 741 km²^[10]。笔者采用 16S rRNA 克隆文库的方法调查了九龙江河口的产甲烷菌群结构及多样性, 同时通过对不同深度甲烷古菌群落的结构变化, 提出潜在的甲烷产生代谢途径。

1 材料与方法

1.1 沉积物采集和描述 命名为 JL08 的 1.5 m 沉积物通过重力柱从我国福建省九龙江口(24°24'48.6" N, 117°56'30.5" E)处采集。沉积物按每 3 cm 分成一个层位, 现场分装后带

回实验室后在 -20 °C 保存, 备用。

1.2 构建克隆文库和 DNA 测序 沉积物样品的总 DNA 通过 SDS-based DNA 抽提法^[11]进行提取。引物 355F (3'-CAG-GCGCGAAAACCTTAC-5') 和 1068R (3'-ATGCTTCACAG-TACGAAC-5') 早先是针对特定的目标成员, 即 *Methanomarcinales* 和 *Methanomicrobiales*。利用这对特异引物, 分别从上层 SMTZ 区域(31 ~ 34 cm)、中层(71 ~ 74 cm)和下层区域(151 ~ 154 cm)中扩增产甲烷菌群的 16S rRNA。采用 50 μl PCR 反应体系进行扩增, 具体为: 10 ~ 100 ng 沉积物 DNA, 10 × 反应液, 200 μmol/L dNTP, 每条引物 10 μmol, 1.5 mmol/L MgCl₂ 和 5 U *Taq* 酶。阴性对照为水。整个 PCR 反应在 T3-PCR 仪(Biometra, 德国)中进行。设定 30 个循环, 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 72 °C 10 min。PCR 产物跑胶检测。通过 TAcloning kit(TaKaRa)构建克隆文库。这个过程严格按照说明书操作。16S rRNA 阳性片段的克隆随机挑取测序。

1.3 九龙江沉积物甲烷相关古菌 16S rRNA 文库分析 利用 Chimera-Check 软件, 分析已获得的甲烷相关古菌 16S rRNA 序列。序列同源性超过 97% 认为是同一个 OTU(Operation taxonomic Unites)。通过 MEGA 5.0 软件, 采用邻接法^[12]进行 bootstrap(1 000 拷贝)系统发育分析。古菌 16S rRNA 基因同源性不小于 97% 时定义为一种 OUT。覆盖率(C)通过以下公式计算:

$$C = 1 - (n_1/N)$$

式中 n_1 为在克隆文库中出现的总次数; N 为总克隆数。

通过 Krebs 等的公式^[13]计算 Shannon-Wiener 指数和平均数。

1.4 序列收录号 将这次试验获得的序列上传到 NCBI GeneBank 数据库中。Accession number 为 JQ866664-

基金项目 国家自然科学基金项目(51168046)。

作者简介 许可(1983-), 男, 江西上饶人, 博士研究生, 研究方向: 生物, E-mail: xuke1983amze@163.com。

收稿日期 2012-07-04

JQ866685。

2 结果与分析

2.1 硫酸盐和甲烷浓度 从图 1 可以看出,在九龙江河口沉积物中,硫酸盐浓度在沉积物样品 16 cm 处最高,在沉积物表层只有 5.8 mmol/L。这可能是由于受潮汐的影响。在 86 cm 以下的样品中硫酸盐浓度则少于 2.0 mmol/L。甲烷浓度在 60 cm 以上少于 2.3 μmol/L,然而 61 cm 以下浓度逐渐增加,并在 91 cm 处达到最大值(5.8 μmol/L)。由此可见,九龙江沉积物在 60~86 cm 范围内呈现一个非常清晰的 SMZ。与大多数地区的河口和海洋沉积物类似,甲烷含量呈扩散分布,厌氧甲烷氧化(AOM)和甲烷产生达到很好的平衡。

2.2 九龙江口沉积物甲烷相关古菌的系统发育分析 通过 16S rRNA 甲烷产生菌特异引物的扩增,构建 3 个克隆文库。随机挑取 146 个克隆子进行测序,发现 20 个具有代表性的 OTU。从表 1 可以看出,文库的覆盖率达 80%~95%;样品中 16S rRNA 基因序列多样性不高。从图 2 可以看出,大部分古菌序列分布在湖泊、海洋沉积物以及甲烷产生的腐殖质中的未培养 3 个古菌类群(*Methanosaeta*, *Methanomicrobiales* 和 *Methanomsarcinales/ANME*) 有最高的同源性。

表 1 不同类群的古菌在不同深度沉积物中的分布情况及多样性 %

甲烷产生菌	M33 (31~34cm)	M66 (71~74 cm)	M151 (151~154 cm)
鬃毛甲烷菌类群	55.0	15.0	17.0
甲烷微生物类群	37.5	33.3	14.9
甲烷球菌类群	0	2.1	0
甲烷八叠球菌类群	7.5	48.3	59.6
ANME-2	5.0	46.7	53.2
其他	2.5	1.7	6.4
未知类群	0	1.7	2.1
覆盖率//%	95	92.0	80.0
香农指数	1.7	2.0	1.8
均匀度	0.6	0.6	0.5

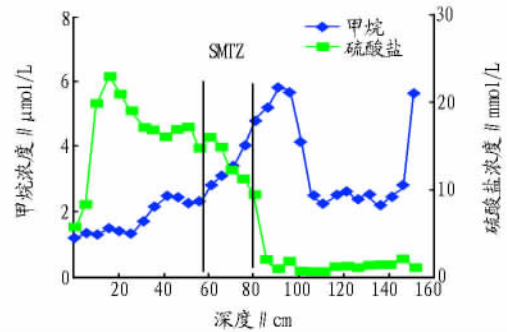


图 1 不同深度沉积物中甲烷与硫酸盐浓度变化

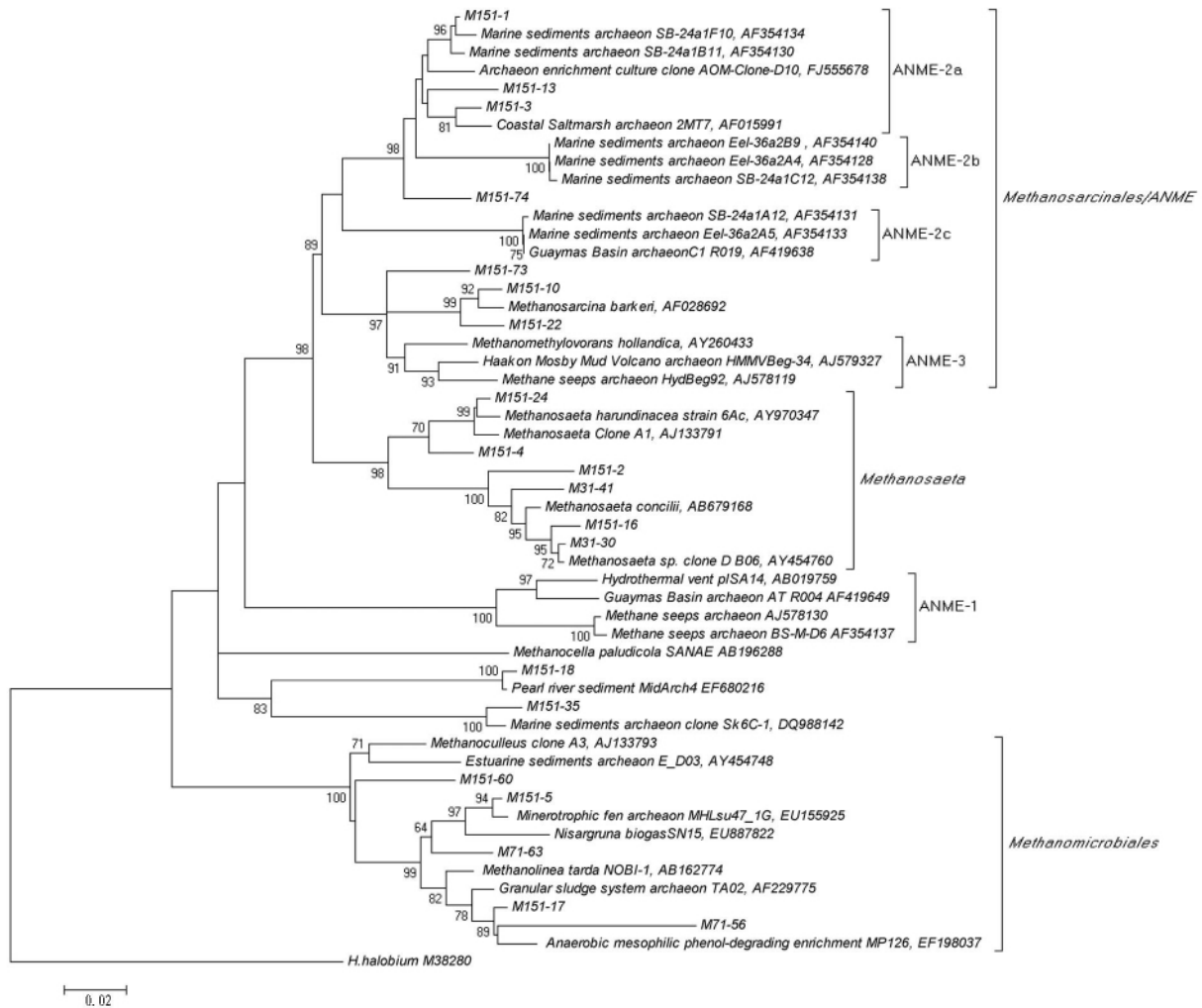


图 2 九龙江口海岸带沉积物甲烷相关古菌 16S rRNA 基因的系统发育树

(下转第 12760 页)

- TIR-domain adapters in *Danio rerio* [J]. *Mol Immunol* 2004 40: 759 - 771.
- [19] WU X Y, XIANG L X, HUANG L, et al. Characterization, expression and evolution analysis of Toll-like receptor 1 gene in pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) [J]. *Immunogenetics* 2008 35: 215 - 225.
- [20] 夏永娟, 黄威权, 姜国良. 鳃弧菌感染牙鲆的组织学和免疫组织化学观察[J]. *海洋科学* 2000 24(10): 41 - 43.

- [21] WU X Y, XIANG L X, HUANG L, et al. Characterization, expression and evolution analysis of Toll-like receptor 1 gene in pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) [J]. *International Journal of Immunogenetics* 2008 35: 215 - 225.
- [22] 叶曼玉, 刘利平, 戴习林, 等. 凡纳滨对虾 Toll 样受体基因 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. *上海水产大学学报* 2008 17(3): 263 - 267.

(上接第 12753 页)

Methanomsarcinales/ANME 是最主要的产甲烷古菌类群, 占总序列的 41%, 主要由甲烷氧化菌 ANME-2a 组成。迄今为止, ANME-2a 分布在不同的环境中, 如冷泉、泥火山、深海沉积物、深海热泉、海岸沉积物, 主要负责厌氧甲烷氧化^[2]。M151-3 是最主要的 OTU 类型, 占总序列的 32%, 与来源于厌氧甲烷氧化富集的克隆子 AOM-Clone-E10 的同源性最高, 达 97%^[14]。由此可见, *Methanomsarcinales/ANME* 的主导地位应该与甲烷氧化古菌有关。

Methanomicrobiales 类群占测序总克隆子数的 28%。其中, M151-5 与从甲烷污泥中分离出的 *Methanoregula formicica* 有 95% 的同源性, 并且占总克隆子数的 12%^[15]。克隆子 M151-17 与从甲烷消化污泥中分离出的 *Methanolinea tarda NOBI-1* 有 97% 的同源性^[16], 占总序列的 8%。克隆子 M151-60 与从我国胜利油田^[17] 分离出的 *Methanoculleus receptaculi* 有 95% 的同源性, 占总序列的 7%。*Methanosaeta* 种群分布在所有层位, 占总序列的 27%。*Methanosaeta* 克隆子 M151-17 与从甲烷消化污泥中分离出的 *Methanolinea tarda NOBI-1* 有 97% 的同源性, 占总序列的 8%。克隆子 M151-24 和 M151-4 与 *Methanosaeta concilii* 有 95% ~ 97% 的同源性^[18]。克隆子 (M31-30, M31-41, M151-2 和 M151-16) 与从 UASB reactor^[19] 分离得到的只在醋酸盐中生长的 *Methanosaeta harundinacea* strain 6Ac 有 95% ~ 98% 的同源性。此外, 克隆子 M33-30 占总克隆子数的比例最高, 为总序列的 12%。

Methanomsarcinales/ANME 是珠江口沉积物中的主要类群, 且主要由甲烷氧化古菌 ANME-2a 组成。这表明甲烷氧化作用在珠江口沉积物甲烷代谢中占主导地位。甲烷产生主要分为乙酸利用型、氢利用型、甲基利用型甲烷产生。研究表明, 由于受高浓度硫酸盐的影响, 氢利用型甲烷产生在海洋环境中普遍存在。相反, 当硫酸盐浓度较低时, 乙酸利用型占淡水环境甲烷产生的 70%^[20-21]。在河口环境中, 甲烷产生菌主要由 *Methanosaeta* 和 *Methanomicrobiales* 类群组成, 且比例相近。*Methanomicrobiales* 和 *Methanosaeta* 类群的主导地位表明, 乙酸利用型、氢利用型是九龙江河口沉积物中主要的甲烷代谢途径。九龙江河口沉积物的调查结果体现了淡水环境和海水环境之间过渡区的甲烷代谢特性。

3 结论

利用克隆文库, 调查了九龙江河口甲烷产生菌的分布和多样性。结果表明, *Methanomsarcinales/ANME* 类群占主导地位, 并且 ANME-2a 主要负责厌氧甲烷氧化。乙酸利用型、氢利用型是九龙江口沉积物的主要甲烷产生途径。该研究为在河口环境下研究甲烷循环和甲烷生成提供了科学依据。

参考文献

- [1] KVENVOLDEN K A. Methane hydrate-A major reservoir of carbon in the shallow geosphere? [J]. *Chem Geol* 1988 71: 41 - 51.
- [2] KNITTEL K, BOETIUS A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process [J]. *Annu Rev Microbiol* 2009 63: 311 - 334.
- [3] VALENTINE D L. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review [J]. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002, 81: 271 - 282.
- [4] ORPHAN V J, HOUSE C H, HINRICHS K U, et al. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis [J]. *Science* 2001 293: 484 - 487.
- [5] HARRISON B K, ZHANG H, BERELSON W, et al. Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California) [J]. *Appl Environ Microbiol* 2009 75: 1487 - 1499.
- [6] JIANG L, ZHENG Y, CHEN J, et al. Stratification of Archaeal communities in shallow sediments of the Pearl River Estuary, Southern China [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011 99: 739 - 751.
- [7] BANNING N, BROCK F, FRY J C, et al. Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment [J]. *Environ Microbiol* 2005 7: 947 - 960.
- [8] PARKES R J, CRAGG B A, BANNING N, et al. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark) [J]. *Environ Microbiol*, 2007 9: 1146 - 1161.
- [9] SHALINI A, RAMESH R, PURVAJA R, et al. Spatial and temporal distribution of methane in an extensive shallow estuary, south India [J]. *Earth Syst Sci* 2006 115: 451 - 460.
- [10] SONG C, WENZHUO L, AIYU X, et al. Transfer of organic matter in Jiulong Jiang Estuarine waters [J]. *Cruises Oceanogr Taiwan Strait*, 1998, 17: 180 - 184.
- [11] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol* 1996 62: 316 - 322.
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol* 2007, 24: 1596 - 1599.
- [13] KREB C J, ELZINGA C, SALZER D, WILLOUGHBY J, et al. Ecological methodology [M]. New York: Harper & Row, 1989.
- [14] JAGERSMA G C, MEULEPAS R J W, GIETELING J, et al. Microbial diversity and community structure of a highly active anaerobic methane-oxidizing sulfate-reducing enrichment [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11: 3223 - 3232.
- [15] YASHIRO Y, SAKAI S, EHARA M, et al. *Methanoregula formicica* sp. a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011 61: 53 - 59.
- [16] IMACHI H, SAKAI S, SEKIGUCHI Y, et al. *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58: 294 - 301.
- [17] CHENG L, QIU T L, LI X, et al. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China [J]. *FEMS Microbiol Lett* 2008 285: 65 - 71.
- [18] MORI K, JINO T, SUZUKI K, et al. Aceticlastic and NaCl-requiring *Methanogen "Methanosaeta pelagica"* sp. nov., isolated from Marine Tidal Flat Sediment [J]. *Appl Environ Microbiol* 2012 78: 3416 - 3423.
- [19] MA K, LIU X, DONG X. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor [J]. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006 56: 127 - 131.
- [20] CONRAD R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments [J]. *FEMS Microbiol Ecol* 1999 28: 193 - 202.
- [21] KOTSYURBENKO R, CHIN J, GLAGOLEV V, et al. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog [J]. *Environ Microbiol* 2004 6: 1159 - 1173.