

# 祁连山冻土区天然气水合物DK-2钻孔微生物群落

韩路<sup>1</sup>, 武淑娇<sup>1</sup>, 李建华<sup>1</sup>, 吕杰<sup>1</sup>, 祝有海<sup>2</sup>

HAN Lu<sup>1</sup>, WU Shu-jiao<sup>1</sup>, LI Jian-hua<sup>1</sup>, LÜ Jie<sup>1</sup>, ZHU You-hai<sup>2</sup>

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

1. *Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;*

2. *Institute of Mineral Resources, Chinese Academy of Geological Sciences, Beijing 100037, China*

**摘要:**对青海省祁连山永久冻土区天然气水合物DK-2钻孔的11件样品进行分析,通过微生物群落分析来探寻水合物层样品与非水合物层样品的差别。在11件样品中均发现了细菌16S rDNA,未检测到海洋天然气水合物地区常见的古菌16S rDNA、*mcrA*( $\gamma$ ), *pmoA*、*mmoX*和*mxoF*。分析得到的细菌16S rDNA分属5个门,包括变形杆菌门、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和异常球菌-栖热菌门,随着样品深度的增加,细菌多样性有降低的趋势。对非水合物层样品DK2-19和水合物层样品DK2-25进行细菌系统发育树分析,发现这2个样品群落结构相差较大。水合物层样品与非水合物层样品细菌群落对比后发现,水合物层样品中 $\gamma$ -变形杆菌的比例低于非水合物层样品中 $\gamma$ -变形杆菌的比例,而*Arthrobacter*属多发现于非水合物层的样品中。

**关键词:**祁连山冻土区; 天然气水合物; 微生物群落;  $\gamma$ -变形杆菌; *Arthrobacter*

**中图分类号:** P618.13; Q93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-2552(2011)12-1874-09

**Han L, Wu S J, Li J H, Lü J, Zhu Y H. Microbial community in DK-2 gas hydrate borehole, Qilian Mountain permafrost. *Geological Bulletin of China*, 2011, 30(12):1874-1882**

**Abstract:** Eleven cores from DK-2 gas hydrate borehole in Qilian Mountain permafrost, located in the north of the Tibetan Plateau, were investigated to find out the difference between gas hydrate samples and non-gas hydrate samples by microbial community analysis. Of all the genes often found in marine gas hydrate samples, i.e., bacterial and archaeal 16S rDNA, *mcrA*( $\gamma$ ), *pmoA*, *mmoX* and *mxoF*, bacterial 16S rDNA could be observed in all of the eleven samples, resulting in the detection of a great quantity of bacterial sequences belonging to 5 phylums, i.e., *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Deinococcus-Thermus*. The bacterial diversity decreases with the increasing depth. A study of gas hydrate sample DK2-19 and non-gas hydrate sample DK2-25 selected for phylogenetic analysis and diversity comparison shows that the two samples are remarkably different from each other. A comparison between gas hydrate samples and non-gas hydrate samples show that the percentage of  $\gamma$ -*Proteobacteria* in gas hydrate samples is lower than that in non-gas hydrate samples, and *Arthrobacter* could be found mainly in non-gas hydrate samples.

**Key words:** Qilian Mountain permafrost; natural gas hydrate; microbial community;  $\gamma$ -*Proteobacteria*; *Arthrobacter*

在过去的几十年中,对地球生物圈的研究已经从陆地和海洋扩展到深层地下与洋底。Whitman等<sup>[1]</sup>的研究表明,超过90%的原核生物生存在地下,微生物以群落的形式存在于地下环境中,微生物群落是

地球生物化学循环的主要驱动者<sup>[2]</sup>。地下微生物对于地下环境中的元素循环,矿物质形成和变迁,地下水的演化等地球化学过程起着重要作用。尤其是石油和天然气,由于本身就是许多微生物赖以生存的

收稿日期:2011-08-31;修订日期:2011-10-25

资助项目:中国地质调查局地质调查项目《青藏高原冻土带天然气水合物调查评价》(编号:1212010818055)

作者简介:韩路(1986-),男,在读硕士,专业方向为微生物学。E-mail:hanlu009@163.com

通讯作者:吕杰(1969-),男,硕士生导师,从事极端环境微生物研究。E-mail:lyjie@mail.buct.edu.cn

物质或某些微生物代谢的产物,其生成、聚集、保存的过程和动态平衡的维持,都与微生物作用有着密切的关系。地质微生物作用与油气资源的生成、保存、破坏、开采和勘探的各个环节都有着密切的联系<sup>[9]</sup>。

2008 年 11 月至 2009 年 10 月,中国地质调查局分别在青海祁连山木里地区天然气水合物科学钻探试验井 DK-1、DK-2 和 DK-3 多个层位中发现天然气水合物实物样品,并在 DK-4 孔发现一系列与天然气水合物有关的异常标志,从而证实中国冻土区存在天然气水合物,这是中国冻土区首次发现天然气水合物,同时也是世界中纬度高山冻土区首次发现天然气水合物,具有重要的科学意义和经济意义<sup>[4]</sup>。天然气水合物科学钻探工程也为探索青藏高原地下深部微生物和冻土区天然气水合物地质微生物提供了难得的机会。

现在有关地质微生物对天然气水合物作用的研究主要限于海上天然气水合物,研究内容主要包括微生物对天然气水合物中甲烷形成的作用和微生物对甲烷的氧化作用(AOM)<sup>[5-8]</sup>。国际上对冻土区天然气水合物的地质微生物研究尚处于初始阶段,目前只有 Colwell 等<sup>[9]</sup>对美国冻土区天然气水合物开展了地质微生物研究,他们仅使用 T-RFLP 法对水合物层和非水合物层岩心的微生物类群进行了对比,指出这 2 种微生物群有所不同,但未对其群落结构进行深入的分析。中国是世界上少有的几个拥有冻土区天然气水合物资源潜力的国家之一,尽早深入开展冻土区天然气水合物地质微生物学的研究,将使中国在国际天然气水合物研究开发方面争得领先地位。

本研究以祁连山冻土区天然气水合物 DK-2 钻孔的岩心样品为研究对象,研究内容包括细菌、古菌 16S rDNA,以及与甲烷代谢有关的基因 *mcrA* ( , )、*pmoA*、*mmoX*、*mxsF* 的检测<sup>[10]</sup>,以调查 DK-2 钻井岩心微生物结构特征,为进一步了解冻土区天然气水合物中微生物的地球化学作用积累资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集和预处理

岩心样品均采自祁连山永久冻土区天然气水合物 DK-2 钻孔。利用绳索取心钻进系统,自表土至

629.19m 处分段连续采集岩心样品。采样时均使用一次性无菌手套,待岩心提出孔外便立即采样,将样品放入无菌密封袋中密封,冷冻保存,干冰条件下运至实验室后置于-70℃冰箱中保存。本研究选取 11 件样品进行微生物群落分析,采样深度如图 1 所示。

样品处理在无菌室中进行。首先,采用微小荧光球示踪方法<sup>[11]</sup>,利用岩石切割器(Hydrasplit PS-10)反复切割去除岩心表皮层,将原重 1~1.5kg 的样品切至重约 0.2kg,确保岩心内核部分不受污染,然后切碎岩心内核部分。最后将内核部分置于罐式研磨机(SPEX SamplePrep 8515)中研磨。

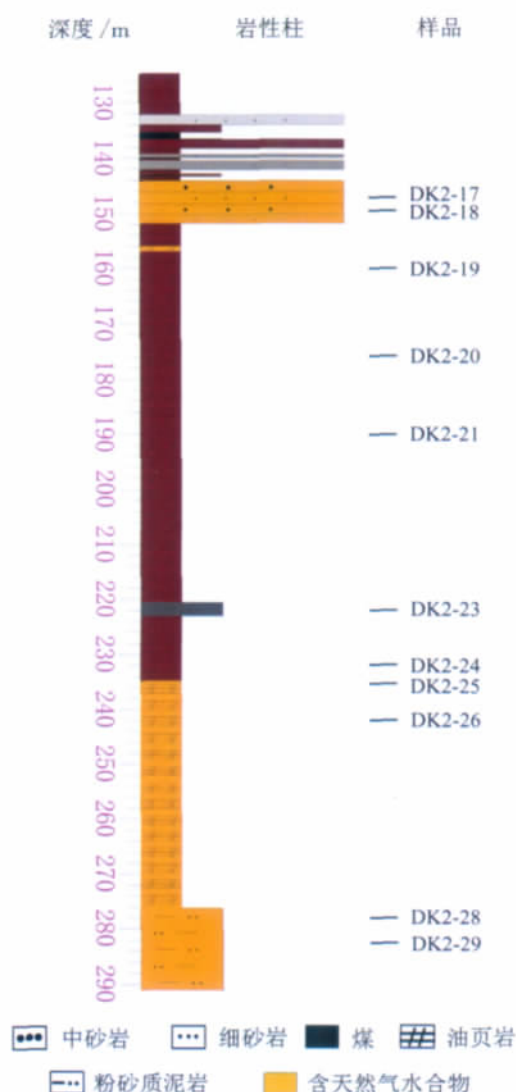


图 1 采样深度图

Fig. 1 Sampling depths

1.2 DNA 的提取和细菌、古菌 16S rDNA 和 5 种功能基因扩增

取 10g 处理过的样品进行 DNA 提取，提取使用 PowerMax Soil DNA Kit(Mo Bio Lab, Inc.)。以岩心样品 DNA 为模板，分别采用细菌 16S rDNA、古菌 16S rDNA、*mcrA* ( , )、*pmoA*、*mmoX* 和 *mx-aF* 引物(表 1)进行 PCR 扩增。聚合酶链式反应 PCR 体系:LA Taq(Takara)0.5μL,2×GC Buffer 25μL,dNTP 8μL,引物各 1μL,DNA 模板 1μL,总体积 50μL。细菌 16S rDNA PCR 扩增的反应条件为预变性 94℃,5min;变性 96℃,30s;退火 52℃,30s;延伸 72℃,50s;34 个循环后 72℃保温 10min。古菌 16S rDNA、*mx-aF* 和 *mcrA* 的 PCR 扩增条件为预变性 94℃,5min;变性 96℃,30s;退火 50℃,40s;延伸 72℃,50s;38 个循环后 72℃保温 10min。*pmoA* 和 *mmoX* 的 PCR 扩增条件为预变性 94℃,5min;变性 96℃,30s;退火 47℃,30s;延伸 72℃,50s;34 个循环后 72℃保温 10min。

1.3 克隆文库构建、阳性克隆筛选及其序列测定

PCR 产物经纯化后，与 pMD18-T 载体连接，菌 DH5α 感受态细胞(Takara)，经蓝白斑筛选后 PCR 阳性验证，获得阳性克隆，交由三博基因公司测序。

1.4 16S rDNA 基因序列比较及其系统发育树构建  
将获得的序列登录 GenBank 数据库，应用 Blasm 程序与数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行比较分析。最后采用 ClustalX (Version 2.0)对序列进行对比分析并构建系统发育树，建树采用 Neighbor-Joining 方法。

2 结果分析

2.1 各基因 PCR 扩增的结果

将 11 件样品的 DNA 分别对上述 6 个基因进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,11 件样品中都存在大量的细菌 16S rDNA,而其它基因都未检测出。本研究也尝试选用其它相关引物和 PCR 反应体系，结果同样表明这 11 件样品中只含有细菌 16S rDNA，不含古菌 16S rDNA 和与甲烷代谢有关的基因 *mcrA* ( , )、*pmoA*、*mmoX*、*mx-aF*。本文着重对大量出现的细菌 16S rDNA 基因进行分析。

2.2 深度与细菌多样性的关系

对 11 件样品细菌 16S rRNA 基因克隆文库中随机挑取的 100 个阳性克隆子进行测序，然后与 NCBI 数据库对比。依据核酸相似度大于等于 97% 定义为 1 个 OTU<sup>[11]</sup>,则 OTU 的数量便可直观地反

表 1 本研究中 PCR 扩增所用到的引物及其序列<sup>[10]</sup>  
Table 1 Oligonucleotide sequences of PCR primers used in this study

目标基因	引物名称	引物序列
细菌 16S rDNA	Bac349f	5'-AGGCAGCAGTDRGGAAT-3'
	Uni806r	5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'
古菌 16S rDNA	Arc349f	5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3'
	Arc806r	5'-GGACTACVSGGTATCTAAT-3'
辅酶 M 甲基还原酶( <i>mcrA</i> )	ME1f	5'-CGMATGTCARATHGGWATGTC-3'
	ME2r	5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3'
	AOM39f	5'-GCTGTGTAGCAGGAGAGTCA-3'
	AOM40r	5'-GATTATCAGGTCACGCTCAC-3'
颗粒型甲烷单加氧酶( <i>pmoA</i> )	A189f	5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3'
	A682r	5'-GAASGCNGAGAAGAASGC-3'
可溶型甲烷单加氧酶( <i>mmoX</i> )	mmo882f	5'-GGCTCCAAGTTCAAGGTCGAGC-3'
	mmo1403r	5'-TGGACTCGTAGCGCTCCGGCTCG-3'
甲醇脱氢酶( <i>mx-aF</i> )	mx-a1003f	5'-GCGGCACCAACTGGGGCTGGT-3'
	mx-a1561r	5'-GGGCAGCATGAAGGGCTCCC-3'

注: D = A、T 或 G; H = A、T 或 C; K = T 或 G; N = A、T、C 或 G; M = C 或 A; R = A 或 G;  
S = G 或 C; V = A、C 或 G; W = A 或 T; Y = C 或 T

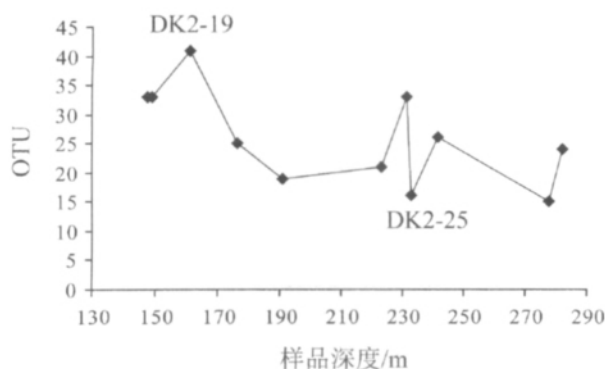


图2 OTU与样品深度的关系

Fig. 2 The relationship between OTU and sampling depths

映样品细菌群落的多样性。OTU与样品深度的关系如图2所示。

### 2.3 细菌16S rRNA系统的发育

11件样品的克隆子序列在系统进化树上聚类为2个主要的系统分类群,即革兰氏阴性菌群变形杆菌门和革兰氏阳性菌群。其中变形杆菌门(*Proteobacteria*)分布于 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -和 $\delta$ -变形杆菌亚群中;革兰氏阳性菌群包含了高(G+C)mol%的放线菌门(*Actinobacteria*)、低(G+C)mol%的厚壁菌门(*Firmicutes*)、CFB菌群的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)。笔者选取非水合物层样DK2-19(油页岩)和水合物层样品DK2-25(油页岩)做进一步分析。

DK2-19(161.20m,非水合物层样品)为油页岩样品,测得的所有序列分属41个OTU,其中有35%的序列归类为变形杆菌,其中 $\gamma$ -变形杆菌亚群的*Pseudomonas migulae*在该样品所有序列中丰度最高,达18%。*Pseudomonas migulae*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。目前还有许多该属菌株从低温环境中分离得到。而*Pseudomonas migulae*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<sup>[12]</sup>。在 $\delta$ -变形杆菌亚群中,另有3条序列与*Acinetobacter lwoffii*的相似度达99%,Seung等<sup>[13]</sup>在土壤环境中分离*Acinetobacter lwoffii*。样品中有5%的序列归类为 $\alpha$ -变形杆菌亚群,该菌群为土壤环境和海水环境中的优势类群<sup>[14]</sup>,克隆的序列包括:*Methylobacterium populi*、*Hyphomicrobium facile* subsp. tol-

erans和*Ochrobactrum anthropi*。*Methylobacterium*在自然环境中分布的范围很广,主要分布在土壤中<sup>[15]</sup>。*Hyphomicrobium facile* subsp. tolerans曾由Noah等<sup>[16]</sup>发现于土壤环境中。*Ochrobactrum anthropi*分布在土壤环境中<sup>[17]</sup>。 $\beta$ -变形杆菌亚群和 $\delta$ -变形杆菌亚群丰度都为4%, $\delta$ -变形杆菌亚群中的3个序列都与未培养微生物有关,其中DK2-19-42和DK2-19-82都与一株未培养的 $\delta$ -变形杆菌有关。样品中有12%的序列归类为放线菌门,其中DK2-19-96与*Arthrobacter agilis*相似度达99%。*Arthrobacter agilis*由Fadwa等<sup>[18]</sup>分离于碳酸盐岩样品中,也曾由Fong等<sup>[19]</sup>分离于南极海冰中。DK2-19-1与*Kocuria rosea*的相似度达99%。*Kocuria rosea*是一种适应能力极强的微生物,可以从土壤、淡水、海洋沉积物等多种自然环境中分离得到<sup>[20]</sup>。有19%的序列归类为厚壁菌门,其中*Bacillus niabensis*曾由孙凤芹等<sup>[21]</sup>分离于南海南沙海域沉积物中。在该样品中,拟杆菌门丰度也较高,为34%。在该样品克隆的序列中有10%归类为*Spirosoma panaciterrae*。*Spirosoma panaciterrae*曾由Leonid等<sup>[22]</sup>分离于农田土壤中,丰度较高,是该样品的第二优势菌。异常球菌-栖热菌门的丰度最低,只包括极端耐辐射菌*Deinococcus* sp.,该菌曾由Arjan等<sup>[23]</sup>发现于撒哈拉沙漠中。

样品DK2-19细菌系统发育树见图3。

DK2-25(235.80m,水合物层样品)也为油页岩样品,采自于天然气水合物层。该样品的多样性低于DK2-19,OTU仅为16。变形杆菌门占25%,包括 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -三个亚群。其中8%的序列归类为 $\alpha$ -变形杆菌亚群,包括*Bradyrhizobium elkanii*和*Methylobacterium populi*。*Bradyrhizobium elkanii*曾由Fernando等<sup>[24]</sup>分离于巴西萨凡纳土壤中。14%的序列归类为 $\beta$ -变形杆菌亚群,其中*Hydrogenophilus hirschii*由Rudiger等<sup>[25]</sup>分离于美国黄石国家公园,该菌可在低浓度氧气、高浓度氢气和二氧化碳条件下生存。*Burkholderia tropica*曾由杨大群<sup>[26]</sup>发现于天山冻土区。另外,在 $\beta$ -亚群中还出现了一种只能以一碳甲基化合物作为能量来源的细菌*Methylophilus leisingeri*<sup>[27]</sup>。而 $\gamma$ -变形杆菌亚群只占3%。在样品中有5%的序列归类为放线菌门,其中*Blastococcus saxobidens*由Oscar等<sup>[28]</sup>发现于岩石样品中。有16%的序列归类为厚壁菌门,包括分离于碱性铝铁矿中的*Bacillus* sp.和1株未培养的细菌。拟杆菌门仅占



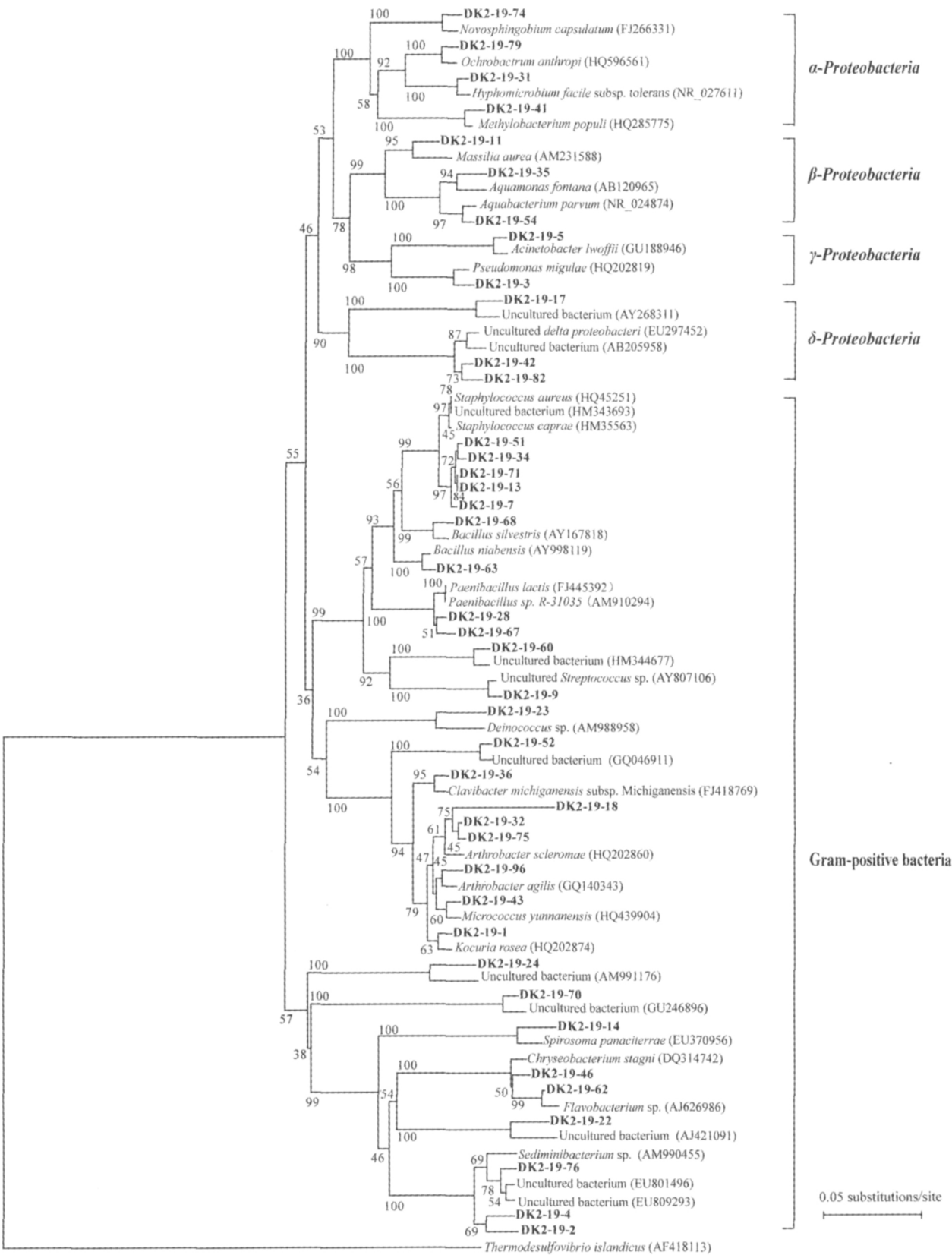


图3 DK2-19 细菌系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic diversity analyses of bacteria in DK2-19 with 16S rDNA

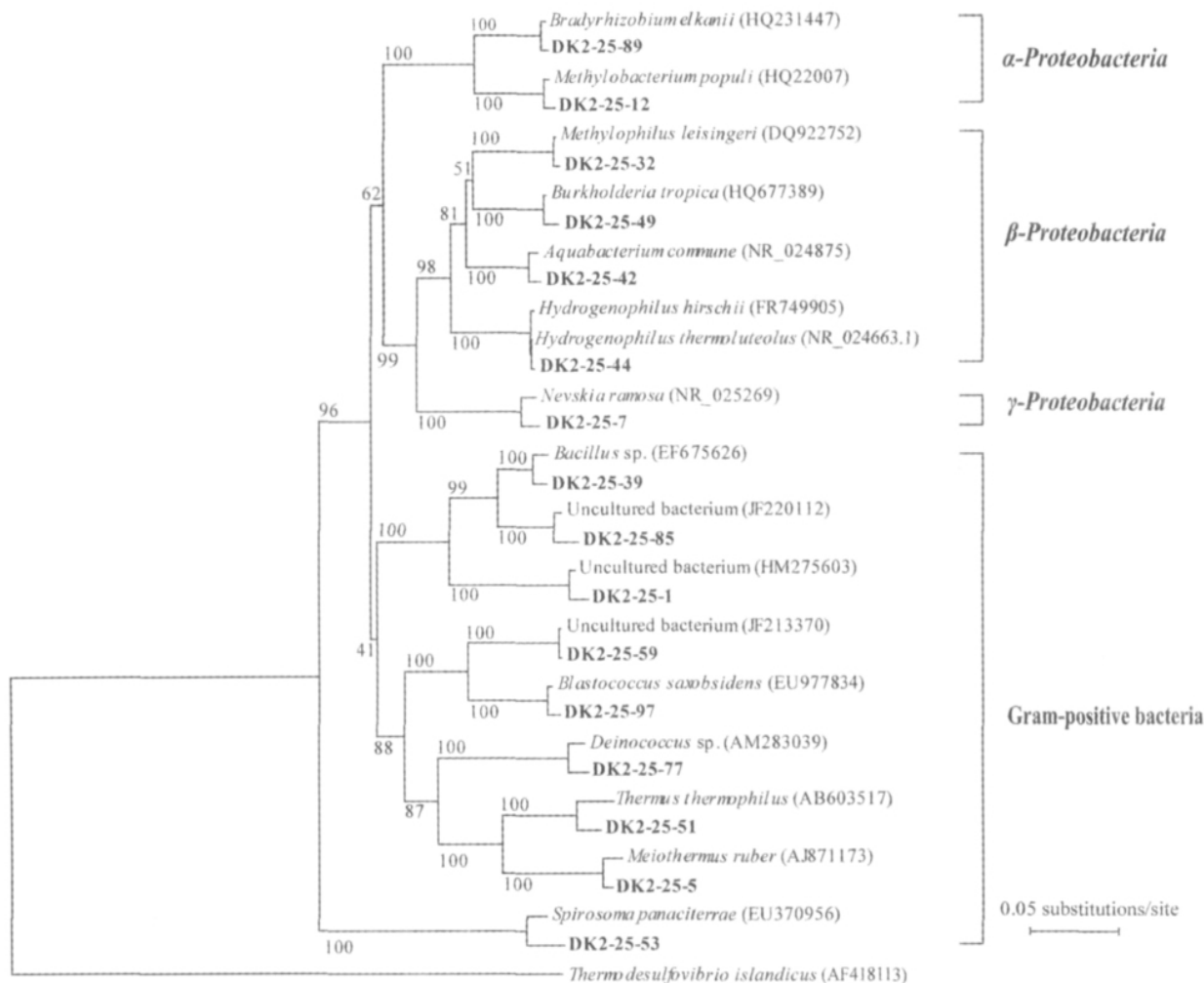


图 4 DK2-25 细菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic diversity analyses of bacteria in DK2-25 with 16S rDNA

3%, 仅有一个 OTU, 为 *Spirosoma panaciterrae*。而异常球菌-栖热菌门的丰度非常高, 达 51%。其中 *Deinococcus* sp. 含量最高, *Meiothermus ruber* 由 Tatsunobu 等<sup>[29]</sup>分离于日本阪神地区的土壤中。

样品 DK2-25 细菌系统发育树见图 4。

### 3 讨 论

将非水合物样品 DK2-19 与水合物样品 DK2-25 对比发现, 这 2 个样品岩性相同, 它们含相同的菌群和菌种, 例如 *Methylobacterium populi*, *Spirosoma panaciterrae* 和 *Deinococcus* sp.。*Deinococcus* sp. 是一种极端耐辐射的细菌, 其特性就是能够忍耐极干燥环境和高强度辐射。有文献报道, 南极发现的耐

辐射细菌可能和该细菌有关<sup>[30]</sup>。这几个菌种也都在其它的样品中被发现, 说明它们可能是 DK-2 钻井的特征菌群。由图 5 可知, 2 个样品群落结构相差较大。其中 DK2-19 中拟杆菌门和  $\gamma$ -变形杆菌亚群的丰度分别为 34% 和 22%, 为该样品的优势菌群。而在 DK2-25 中这 2 种菌群都只有 3%, 差别较大。在 DK2-19 中发现大量的石油降解菌 *Pseudomonas migulae*, 在 DK2-25 中却未发现 *Pseudomonas migulae*, 这可能与天然气水合物对一些微生物活性的抑制有关<sup>[9]</sup>。

深海天然气水合物的研究表明<sup>[31]</sup>, 微生物对天然气水合物的作用主要包括提供甲烷的生物成因和参与甲烷的厌氧氧化(AOM)过程。其中产甲烷的微

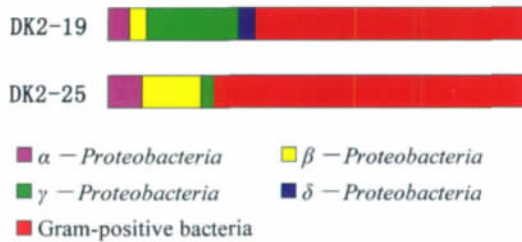


图5 DK2-19 与 DK2-25 细菌群落结构对比

Fig. 5 Comparison between DK2-19 and DK2-25 in bacterial community

生物主要为产甲烷古菌,参与反应的反应式主要为  $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ 。AOM 过程包括硫酸盐还原细菌(SRB, sulfate reducing bacteria)和甲烷厌氧氧化古菌(ANME, Anaerobic Methanotrophs)2类微生物,参与反应的反应式为  $2\text{CH}_4 + 2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 2\text{HS}^- + 2\text{H}_2\text{O}$ 。ANME 却含有编码甲烷生成的最后一步反应的重要酶的基因 *mcrA* (编码辅酶 M 甲基还原酶),而 *mcrA* 是研究甲烷厌氧氧化的指示分子并且用于甲烷厌氧氧化古菌归类分析<sup>[32]</sup>。AOM 过程重要的基因包括 *pmoA* (编码颗粒型甲烷单加氧酶)、*mmoX* (编码可溶型甲烷单加氧酶)和 *mxoF* (编码甲醇脱氢酶),*pmoA* 和 *mmoX* 是甲烷氧化生成甲醇过程的关键基因,*mxoF* 是甲醇氧化过程的重要基因<sup>[33-35]</sup>。本研究在祁连山冻土区天然气水合物 DK-2 钻井 11 件样品细菌群落分析中未发现 SRB 菌群,说明祁连山冻土区天然气水合物中不存在依据反应式  $2\text{CH}_4 + 2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 2\text{HS}^- + 2\text{H}_2\text{O}$  的甲烷消耗。古菌 16Sr DNA 与甲烷代谢有关的功能基因检测结果也进一步证明,祁连山冻土区天然气水合物中不存在 AOM。但在本研究中却发现了大量的以一碳 C1 化合物为能源、碳源的 *Methylobacterium populi* 及少量的 *Methylophilus leisingeri*,尽管没有文献说明 *Methylobacterium populi* 与 *Methylophilus leisingeri* 是否可以直接利用甲烷,但这 2 种甲基菌对甲烷的氧化产物甲醇甲酸等的利用<sup>[27]</sup>,足以说明这些菌对甲烷的氧化必有促进作用。换言之,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,乃至冻土环境的生态平衡具有重要意义。另外,古菌 16Sr DNA 与甲烷代谢有关的功能基因的检测结果也说明,微生物成因不可能是祁连山冻土区天然气

水合物的主要成因,与卢振权等<sup>[36]</sup>的祁连山天然气水合物热成因分析结果吻合。因此,冻土区天然气水合物的微生物群落呈现了其独有的特征。

从细菌 OTU 与样品深度的关系(图 2)可看出,随着样品深度的增加,细菌多样性整体有降低的趋势,但波动较大。微生物能够在冰冻区保持活力与冻土的理化性质息息相关<sup>[37]</sup>。微生物以 C、H、O、N、S、P 等元素为主要的能量物质,不同环境的微生物对各个元素的存在形式与含量要求不同,土壤环境中物质元素结构决定着该环境中微生物的群落结构。出现细菌 OTU 与样品深度关系的规律性的原因可能是,在地下环境中随着深度的增加,物质的流通性变差、能量交换变缓慢、能量结构变得单一,结果群落的多样性较浅层低。

群落结构总体上是对环境条件的生态适应,即一定的环境条件决定一定的群落结构。因此也不难解释在地质构造复杂的 DK-2 钻井中微生物多样性波动较大的现象(图 2)。DK2-25(235.80m)采自于天然气水合物层与非水合物层的交界处,该样品中的微生物既要适应 DK-2 钻孔的大环境条件,又要满足在高浓度甲烷条件下生存。这种条件对细菌的生存要求较高,细菌的多样性则较低。所发现的细菌或者是天然气水合物与非水合物共有的细菌,如 *Bacillus*、*Methylobacterium*、*Aquabacterium*、*Deinococcus*、*Thermus*、*Meiothermus* 等,或者是 DK2-25 特有的细菌,如甲基营养菌 *Methylophilus leisingeri*。*Methylophilus leisingeri* 是能够利用甲基化合物作为唯一的能源和碳源生长的微生物。在甲基营养菌的 C1 代谢过程中,共有 100 多个基因参与,它们属于一系列特殊的代谢模式,包括甲醇氧化、胺氧化、甲醛氧化、甲酸氧化、丝氨酸循环等。该菌的发现说明 DK2-25 中可能有 C1 化合物代谢的存在,对天然气水合物层与非水合物层 2 层之间的含 C 化合物的物质交换起到了重要作用。

对比水合物层样品(DK2-17、18、25、26、28、29)与非水合物层样品(DK2-19、20、21、23、24)的细菌群落结构发现:①水合物层样品中  $\gamma$ -变形杆菌亚群的比例小于非水合物层,其中 *Stenotrophomonas* 和 *Nevskia* 两个属只发现于水合物层样品中, *Moraxella*、*Shigella* 和 *Proteus* 主要发现于非水合物层;②放线菌门的 *Arthrobacter* 属多发现于非水合物层样品中,而水合物层样品中只有 DK2-25 发现该

属菌种。这2点是水合物层样品和非水合物层样品最显著的区别,这些区别主要由不同菌群对水合物层中甲烷适应能力不同所致。而且,水合物层样品 DK2-17 和 DK2-18 属于 144.4~152.0m 层段的水合物层,该层水合物含有 CO<sub>2</sub>,而 DK2-25、26、28 和 29 属于 235.0~291.3m 层段的水合物层<sup>[38]</sup>,两层的细菌种类也有很大差别。 $\gamma$ -变形杆菌亚群的 *Psychrobacter* 和 *Acinetobacter* 两个属多发现于 144.4~152.0m 层段的水合物层中,而放线菌门的 *Blastococcus saxosidens* 等只发现于 235.0~291.3m 层段的水合物层中。

另外,在 DK2-19 与 DK2-20 两个样品油页岩中都发现了大量 *Pseudomonas migulae*,据文献报道,*Pseudomonas* 属的大多数细菌可以降解石油<sup>[39]</sup>。据此推测,该菌可能与油页岩中有机质的转化有关。而 144.4~152.0m 和 156.3~156.6m 层段的水合物层含有的 CO<sub>2</sub>,是否是 *Pseudomonas migulae* 降解油页岩中的有机质产生的 CO<sub>2</sub> 上溢,加之砂岩孔隙度大且含有较高量的水,在特定的压力温度条件下形成的,需要模拟分析油页岩中特定有机质含量条件下 *Pseudomonas migulae* 的代谢机制来进行解释。

#### 4 结 论

本文利用非培养的分子生物学技术,对祁连山冻土区天然气水合物 DK-2 钻孔微生物群落进行了分析,发现了大量的细菌,种群数量丰富,主要分布于岩石土壤和低温的环境中,并且随着深度的增加,细菌多样性有降低的趋势。研究表明,在祁连山冻土区,天然气水合物层中  $\gamma$ -变形杆菌与节杆菌属(*Arthrobacter*)的比例高于非水合物层,而且微生物成因不是天然气水合物的主要成因,甲烷的消耗不存在 AOM 过程,这与深海天然气水合物有较大的差别。

致谢:在研究过程中,中国地质科学院矿产资源研究所卢振权和王平康同志多次提出宝贵的建议,在此表示衷心的感谢。

#### 参考文献

[1] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: the unseen majority [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 6578–6583.  
[2] 刘开朗,王加启,卜登攀,等.环境微生物群落结构与功能多样性研究方法[J].生态学报,2010,30(4):1074–1080.

[3] 王万春,陶明信.地质微生物作用与油气资源[J].地质通报,2005,24(10/11):1022–1026.  
[4] 祝有海,张永勤,文怀军,等.祁连山冻土区天然气水合物及其基本特征[J].地球学报,2010,31(1):7–16.  
[5] Parkes R J, Cragg B A, Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review[J]. Hydrogeological Journal, 2000, 8(1): 11–28.  
[6] Kotelnikova S. Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface[J]. Earth-Science Reviews, 2002, 58: 367–395.  
[7] Boetius A, Suess E. Hydrate Ridge: a natural laboratory for the study of microbial life fueled by methane from near-surface gas hydrates[J]. Chemical Geology, 2004, 205: 291–310.  
[8] Battistuzzi F U, Feijao A, Hedges S B. A genomic time scale of prokaryote evolution: insights into the origin of Methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land BMC[J]. Evolutionary Biology, 2004, 4: 44.  
[9] Colwell F, Schwartz A, Briggs B. Microbial community distribution in sediments from the Mount Elbert Gas Hydrate Stratigraphic Test Well, Alaska North Slope[J]. Marine and Petroleum Geology, 2011, 28: 404–410.  
[10] Fumio Inagaki, Urumu Tsunogai, Masae Suzuki, et al. Characterization of C1-Metabolizing Prokaryotic Communities in Methane Seep Habitats at the Kuroshima Knoll, Southern Ryukyu Arc, by Analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxrF*, *mcrA*, and 16S rRNA Genes [J]. Applied And Environmental Microbiology, 2004, 70 (12): 7445–7455.  
[11] 王远亮,夏颖,董海良,等.中国大陆科学钻探(CCSN)地下岩石样品中的细菌群落分析[J].岩石学报,2005,21(2):533–539.  
[12] Minna M Jussila, German Jurgens, Kristina Lindström, et al. Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*[J]. Environmental Pollution, 2006, 139(2): 244–257.  
[13] Seung II Kim, Soo-Jung Kim, Myung Hee Nam, et al. Proteome Analysis of Aniline-Induced Proteins in *Acinetobacter lwoffii* K24 [J]. Biomedical and Life Sciences, 44:61–66.  
[14] Heike E, Jakob P, Amann R, et al. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the north sea[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66: 3044–3051.  
[15] 王洵.新型甲基杆菌的分离筛选和鉴定及生理生化特性的研究[D].中国科学技术大学硕士学位论文,2007.  
[16] Noah Fierer, Jason A, Jackson, et al. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(7): 4117–4120.  
[17] Adrien Kettaneh, Francois-Xavier Weill, Isabelle Poilane, et al. Septic Shock Caused by *Ochrobactrum anthropi* in an Otherwise Healthy Host[J]. J. Clin. Microbiol., 2003, 41(3): 1339–1341.  
[18] Fadwa Jroundi, Antonia Fernández-Vivas, Carlos Rodríguez-Navarro, et al. Bioconservation of Deteriorated Monumental Calcarenite Stone and Identification of Bacteria with Carbonatogenic Activity[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(1): 39–54.  
[19] Fong N J C, Burgess M L, Barrowand K D, et al. Carotenoid accu-



- mulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001,56(5/6):750–756.
- [20]Stackebrandt E, Koch E, Gvozdiak O, et al. Taxonomic dissection of the genus Micrococcus: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995,45(4): 682–692.
- [21]孙凤芹,汪保江,李光玉,等.南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J].微生物学报, 2008,48(12): 1578–1587.
- [22]Leonid N Ten, Jin -Li Xu, Feng -Xie Jin, et al. *Spirosoma panaciterrae* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(2):331–335.
- [23]Arjan de Groot, Virginie Chapon, Pascale Servant, et al. *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55:2441–2446.
- [24]Fernando Gomes Barcellos, Pamela Menna, Jesiane Stefania da Silva Batista, et al. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs Sinorhizobium (Ensifer) fredii and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007,73(8):2635–2643.
- [25]Rudiger Stohr, Arne waberski, Werner Liesack, et al. *Hydrogenophilus hirschi* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing beta-proteobacterium isolated from Yellowstone National Park[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001,51:481–488.
- [26]杨大群.天山冷环境中微生物系统多样性及分布特征的研究[D].兰州大学博士学位论文 2008.
- [27]宋修鹏,武波,申佩弘,等.甲基营养菌 *Methylobacterium* sp. MB200 中部分一碳代谢相关基因的定位及 *mtaA* 和 *mtdB* 基因的克隆研究[J].中国生物工程杂志, 2011,31(2):50–55.
- [28]Oscar Salazar, Aranzazu Valverde, Olga Genilloud. Real -Time PCR for the Detection and Quantification of *Geodermatophilaceae* from Stone Samples and Identification of New Members of the Genus *Blastococcus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006,72(1):346–352.
- [29]Tatsunobu Matsui, Yukie Yamada, Hideki Mitsuya, et al. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009,82(5):941–950.
- [30]Peter Hirscha, Claudia A Gallikowskia, Jörg Sieberta, et al. *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., Low Temperature and Draught-tolerating, UV-resistant Bacteria from Continental Antarctica [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004,6(15):636–645.
- [31]苏新,陈芳,张勇,等.海洋天然气水合物勘查和识别新技术:地质微生物技术[J].现代地质, 2010,24(3):409–423.
- [32]张林宝.鄂霍次克海天然气水合物区与东海内陆架泥质区沉积物古菌多样性研究[D].中科院海洋研究所硕士学位论文, 2009.
- [33]Hallam S J, Girguis P R, Preston C M, et al. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003,69: 5483–5491.
- [34]McDonald L R, Kenna E M, Murrell J C. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995,61:116–121.
- [35]Murrell J C, Gilbert B, McDonald I R. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase[J]. Arch. Microbiol., 2000,173: 325–332.
- [36]卢振权,祝有海,张永勤,等.青海祁连山冻土区天然气水合物的气体成因研究[J].现代地质, 2010,24(3):581–588.
- [37]王鹭,董小培,张威,等.不同深度冻土微生物数量特征及其与土壤理化性质的关系[J].冰川冻土, 2011,33(2):436–441.
- [38]卢振权,祝有海,张永勤.青海省祁连山冻土区天然气水合物基本地质特征[J].矿床地质, 2010,29(1):182–191.
- [39]韩如旻,闵航,程志强,等.石油降解细菌的表型特性和系统发育分析[J].生物多样性, 2002,10(2):202–207.