

## 中国南海北部陆坡沉积物古菌多样性及丰度分析

范习贝<sup>1,2,3</sup> 梁前勇<sup>4</sup> 牛明杨<sup>1,2,3</sup> 余甜甜<sup>1,2,3</sup> 王寅熠<sup>1,2,3</sup> 王凤平<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(2. 上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(3. 上海交通大学 海洋工程国家重点实验室 上海 200240)

(4. 中国地质调查局广州海洋地质调查局 广东 广州 510760)

**摘要:**【目的】海洋沉积物中的古菌在全球生物地球化学循环中充当重要的角色,深入了解沉积物中古菌群落的结构及功能特征是探究海洋沉积物中古菌参与生物地球化学循环和生态学功能的基础。【方法】采用高通量测序技术,分别对南海北部陆坡不同海域(东部,西部和神狐海域的7个站位)沉积物中古菌 16S rRNA 基因进行 Illumina MiSeq 测序。【结果】中国南海北部陆坡沉积物中古菌的主要门类是 Bathyarchaeota、Thermoplasmata、Woese archaeota (DHVEG-6)、Thaumarchaeota (Marine Group I)、Lokiarchaeota 和 Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG),还存在少量的 AK8、Marine Benthic Group A 和 Terrestrial Hot Spring Crenarchaeota Group (THSCG)等。在潜在水合物区沉积物中还发现了甲烷代谢相关古菌(Anaerobic methanotrophic archaea, ANME)类群,主要为 ANME-1、ANME-2ab 和 ANME-2c 等。甲烷代谢古菌的分布特征也从甲烷代谢保守功能基因 *mcrA* (Methyl coenzyme-M reductase A)的扩增中得到了验证。利用定量 PCR 对南海沉积物中的细菌、古菌的 16S rRNA 基因和 *mcrA* 基因进行了定量,发现细菌 16S rRNA 基因拷贝数为  $10^5$ – $10^7$  copies/g (湿重),古菌 16S rRNA 基因拷贝数为  $10^5$ – $10^6$  copies/g (湿重),潜在水合物区 *mcrA* 基因拷贝数为  $10^3$ – $10^5$  copies/g (湿重)。【结论】揭示了中国南海北部陆坡沉积物中具有丰富的微生物资源,其中古菌种类多样且丰度较高,同时发现冷泉特征古菌群落,为深入认识和理解南海沉积物中微生物丰度和古菌多样性,以及解析古菌地球化学功能奠定基础。

**关键词:** 中国南海北部陆坡, 沉积物, 古菌多样性, 厌氧甲烷古菌, 深古菌门, *mcrA* 基因

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 41525011, 91228201, 91428308); National Special Project on Gas Hydrate of China (No. GZH201100311, DD20160217)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-21-34204378; E-mail: fengpingw@sjtu.edu.cn

**Received:** February 28, 2017; **Accepted:** May 05, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 41525011, 91228201, 91428308); 国家专项基金资助项目(No. GZH201100311, DD20160217)

**\*通讯作者:** Tel: 86-21-34204378; E-mail: fengpingw@sjtu.edu.cn

**收稿日期:** 2017-02-28; **接受日期:** 2017-05-05

## The diversity and richness of archaea in the northern continental slope of South China Sea

FAN Xi-Bei<sup>1,2,3</sup> LIANG Qian-Yong<sup>4</sup> NIU Ming-Yang<sup>1,2,3</sup> YU Tian-Tian<sup>1,2,3</sup>  
WANG Yin-Zhao<sup>1,2,3</sup> WANG Feng-Ping<sup>1,2,3\*</sup>

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(3. State Key Laboratory of Ocean Engineering, Ocean and Civil Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(4. Guangzhou Marine Geological Survey, China Geological Survey, Guangzhou, Guangdong 510760, China)

**Abstract:** [Objective] The archaea are recognized as key players participating in the global biogeochemical cycles in marine sediments. The knowledge upon community structure and metabolic functions of archaea is the basis to understand their potential contributions on the biogeochemical cycles globally. [Methods] Archaeal diversity in the sediments of three areas at the northern continental slope of SCS was surveyed using high-through sequencing for 16S rRNA gene. [Results] The major archaeal groups in the sediments was found to include Bathyarchaeota, Thermoplasmata, Woesearchaeota (DHVEG-6), Thaumarchaeota (Marine Group I), Lokiarchaeota and Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG), also with low abundant of AK8, Marine Benthic Group A and Terrestrial Hot Spring Crenarchaeota Group (THSCG). Anaerobic methane oxidation (AOM) microbes (Anaerobic methanotrophic archaea, ANME), mainly ANME-1, ANME-2ab and ANME-2c were also found in the potential gas hydrate zone. Methyl coenzyme-M reductase alpha subunit (*mcrA*) gene, which encodes the key enzyme in methane metabolism, was also recovered from these sites, implying potentially active methane cycling. Quantitative PCR results showed that the abundance for bacterial 16S rRNA gene, archaeal 16S rRNA gene and *mcrA* gene were  $10^5$ – $10^7$  copies/g (wet weight),  $10^5$ – $10^6$  copies/g (wet weight) and  $10^3$ – $10^5$  copies/g (wet weight), respectively. [Conclusion] These results revealed high diversity of archaea and rich microbial recourses in SCS sediments, layed the foundation for further analysis and understanding of archaeal mediated carbon cycling in the sediments of SCS.

**Keywords:** Northern continental slope of South China Sea (SCS), Sediments, Archaeal diversity, Anaerobic methanotrophic archaea, Bathyarchaeota, *mcrA* gene

海洋沉积物覆盖地球表面约 2/3, 广泛分布着活跃的微生物(细菌和古菌)。全球海洋沉积物的微生物数高达  $2.9 \times 10^{29}$  个细胞, 约等于海水微生物数量<sup>[1]</sup>。这些微生物参与海底碳元素的转化和其它生物地球化学循环<sup>[2]</sup>。自 Woese 在 1990 年<sup>[3]</sup>提出三域分类系统以来, 古菌作为一种独特的生命形式, 引发了科学家广泛的关注。早期古菌被认为是极端微生物, 仅存在于极端环境中, 后来更多的研究发现其生境广泛, 不仅包括一些极端环境例如盐湖、热泉等, 还包括土壤、淡水河、海水、沉积物等<sup>[4-5]</sup>。近年来随着高通量测序技术的发展, 自然界大量未培养古菌被发现<sup>[6-8]</sup>, 古菌系统进化树也在不断地

扩充和更新<sup>[9]</sup>。目前, 古菌类群可分为 3 个超级亚门: TACK、DPANN 和 Euryarchaeota 类群<sup>[10]</sup>, 其中, TACK 代表 Thaumarchaeota、Crenarchaeota、Bathyarchaeota<sup>[11]</sup>、Korarchaeota、Geoarchaeota<sup>[12]</sup>和 Aigarchaeota<sup>[7]</sup>等; DPANN 代表 Diapherotrites、Parvarchaeota、Aenigmarchaeota (DSEG) 和 Woesearchaeota (DHVEG-6)等, 还有更多的古菌新类群正在被不断发现。海洋沉积物中拥有大量古菌, 其中一些具有独特代谢功能例如厌氧甲烷氧化古菌(ANME), 仍还有许多古菌的生理和代谢功能未知, 认识和理解古菌的代谢和生态学功能需要我们首先对它们的分布和多样性进行调查和分析<sup>[13]</sup>。

南海又称“南中国海”,是世界上第三大边缘海,仅次于珊瑚海和阿拉伯海,为西太平洋的一部分。海域面积约 356 万 km<sup>2</sup>,平均水深约为 1 212 m,最深处为中部的深海平原,达 5 567 m 左右<sup>[14]</sup>。南海地处低纬度地域,属于热带深海,蕴藏着丰富的天然气水合物,具有重要的经济和政治意义。南海沉积物中含有丰富多样的微生物资源,探索南海沉积物中微生物的多样性和丰度对认识海洋沉积物元素循环具有重要的意义。随着全球气候变暖,二氧化碳(CO<sub>2</sub>)、甲烷(CH<sub>4</sub>)和其他温室气体的含量不断增加,导致极地冰川融化和海平面上升,显著影响全球降雨量及降雪量<sup>[15]</sup>,对全球生态系统造成严重威胁。海洋沉积物中蕴含丰富的天然气水合物(主要成分为 CH<sub>4</sub>),是一种新型的绿色能源,可作为煤、石油等传统能源的补充能源,但是其导致的温室效应约是同分子量 CO<sub>2</sub> 的 25 倍,分解和释放的少量 CH<sub>4</sub> 就能对地球表面的温度产生巨大的影响<sup>[16]</sup>。同时,海洋沉积物中甲烷厌氧氧化(Anaerobic oxidation of methane, AOM)过程是微生物介导代谢消耗甲烷的主要途径<sup>[17-18]</sup>,是减少海洋沉积物中 CH<sub>4</sub> 释放的重要过程,可以屏蔽 90%以上的甲烷释放<sup>[19]</sup>。目前,甲烷厌氧氧化菌(Anaerobic methanotrophic archaea, ANME)暂分为三类:ANME-1 (a, b, c) (Methanomicrobiales 和 Methanosarcinales 类群)、ANME-2 (a, b, c) (Methanosarcinales 的一个分支)以及 ANME-3 (Methanococcoides)<sup>[20-21]</sup>。另外,有报道显示 Bathyarchaeota 类群的部分古菌也具有氧化甲烷的潜在能力<sup>[22]</sup>,古菌 Syntrophoarchaeum 类群具有新的丁烷厌氧氧化途径<sup>[23]</sup>。甲烷代谢保守功能基因 *mcrA* (Methyl coenzyme-M reductase A)<sup>[24]</sup>作为研究甲烷代谢菌的功能基因,是由于其编码还原辅酶 M 存在于所有已知的甲烷产生菌和甲烷氧化菌中<sup>[25-26]</sup>。*mcrA* 基因的定量可以反映甲烷代谢类群的丰度。了解南海沉积物潜在水合物区厌氧甲烷氧化类群的多样性及丰度可以为评估南海沉积物中碳循环速率提供数据支持。

我国自 1998 年开始在南海进行天然气水合物

调查,并于 2007 年、2012 年、2015 年和 2016 年分别在南海北部陆坡进行了 4 次天然气水合物钻探,均获得天然气水合物样品,证明南海北部陆坡的东部、西部和神狐海域蕴含丰富的天然气水合物<sup>[27-29]</sup>。本研究选取 3 个海域海底表层沉积物样品,对其古菌类群进行研究,结合高通量测序的方法分析 16S rRNA 基因,同时运用定量 PCR 对南海 3 个海域的细菌和古菌数量进行定量。对南海深海沉积物中古菌群落结构特征的研究,是深入了解南海沉积物中古菌代谢与功能的重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和保存

搭载中国地质调查局广州海洋地质调查局 2013-2015 年的相关调查航次。采集样品为南海北部陆坡东部、西部和神狐海域潜在水合物区的表层沉积物样品。研究使用的 7 个沉积样品分别来自于南海北部陆坡东部海域的 DS07-2013、DS12-2013、DS16-2013、DS08-2014 和 DS16-2014 站位,南海北部陆坡西部海域的 QDN22-2015 站位和神狐海域的 CHB03-2014 站位。本次采集的样品(表 1)为陆坡边缘向深部延伸的位置。水深范围为 766 m-1 553 m (平均水深为 1 099 m)。采集深度范围为 226 cm-850 cm (平均采样深度为 469 cm)。采集方法有重力柱(Gravity core)和活塞柱(Piston core)两种。航次中样品的初步采集在甲板上,后期处理在无菌操作箱中进行。步骤如下:沉积柱的分样,前 1 m 每 5 cm 分割,1 m 后每 10 cm 分割。用 50 mL 的无菌离心管保藏于液氮罐中。航次结束后,用液氮罐运回实验室并转移到-80 °C,为后续进行微生物分子多样性分析做准备。

### 1.2 主要试剂和仪器

BSA 溶液,MP Biomedicals, LLC.; ExTaq 酶、pMD18-T 载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞、荧光染料 SYBR Green II, TaKaRa 公司; DNA 提取试剂盒 PowerSoil DNA Isolation Kit, 美国 MoBio 公司; 胶回收试剂盒 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle Pure Kit (200)、质粒

表 1 南海\*北部陆坡沉积物样品  
Table 1 Sediment samples at the northern continental slope of South China Sea\*

采样位点 Sites	深度 Depth (m)	样品深度 Sampling depth (cmbsf**)	采样方式 Sampling method
DS07-2013	766	350	Gravity core
DS12-2013	785	291	Gravity core
DS16-2013	1 302	226	Gravity core
DS08-2014	877	298	Gravity core
DS16-2014	1 007	453	Gravity core
CHB03-2014	1 553	812	Piston core
QDN22-2015	1 400	850	Piston core

Note: South China Sea\*: SCS; cmbsf\*\*: Centimeters below seafloor.

提取试剂盒, 美国 Omega 生物技术公司; 扩增引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。GeneAmp® PCR 系统 9700 PCR 仪、7500 Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 离心机 Pico17, 美国 Thermo Scientific 公司; 超净工作台 SW-CJ-2D, 苏州净化设备有限公司; DNA 浓度测定仪 Qubit 3.0 Fluorometer, 美国 Life Technologies 公司。

### 1.3 核酸提取和 PCR 扩增

沉积物样品约 0.5 g, 用 DNA 提取试剂盒提取环境样品总 DNA, 溶于灭菌的 50  $\mu$ L 蒸馏水中。提取操作步骤参照厂家说明书。保存于 -20  $^{\circ}$ C。

### 1.4 古菌 16S rRNA 基因高通量测序

对古菌的 16S rRNA 基因 V4 区进行 PCR 扩增, 设置 3 个平行, 引物为 Uni519F (5'-CAGYMGCCRC GGKAAHACC-3') 和 Arch806R (5'-GGACTACNSG GGTMTCTAAT-3'), 并加有 Barcode 标记。PCR 体系(50  $\mu$ L)为: 10 $\times$ ExTaq buffer ( $Mg^{2+}$  plus) 5  $\mu$ L, 0.1 mg/ $\mu$ L 的 BSA 溶液, 2.5 mmol/L dNTP mixture 4  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L ExTaq 酶 0.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L, DNA 1 ng, 用双蒸水补充至 50  $\mu$ L。PCR 条件: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。3 个平行的 PCR 产物混合, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳质量检验后, 用 2% 的琼脂糖切胶回收目的条带, 操作步骤见厂家说明书。用 Qubit 3.0 对胶纯化回收后的 DNA 测定。根据 Illumina 文库准备的步骤上机测序。

### 1.5 测序结果与分析

测序样品总数为 50 个, 其中南海北部陆坡东部海域的样品数 29 个, 南海北部陆坡西部海域的样品数 11 个, 神狐海域的样品数 10 个。测序 Reads 总量为 2 210 626。其中古菌的序列为 1 918 786, 占总量的 86.8%, 说明扩增的样品具有有效性和准确性。将非古菌序列去除, 不同的样品用不同的 Barcode 进行区分, 用 QIIME 软件<sup>[30]</sup>对原始数据去噪和修整处理, 同时去掉 Barcode、引物序列、嵌合体和不合格序列<sup>[31]</sup>。在进行下游分析之前对测序深度标准化(每个样品取 12 271 条序列), OTU (可分类操作单元)是基于 97% 的相似性划分的, 并在 QIIME 软件<sup>[32]</sup>上生成相应的表格。结果中删除了 OTU 中的单拷贝序列, 以去除噪音。序列在 QIIME 软件<sup>[32]</sup>上进行  $\alpha$  多样性分析。 $\alpha$  多样性用 Chao1 值、Shannon 指数和 Simpson 指数来评估, 其中, Chao1 值用来估计物种总量<sup>[33]</sup>, 平台期的 Chao1 值越大代表物种总量越多。用 Shannon 指数和 Simpson 指数来反映样品中微生物多样性, 指数值越大, 说明群落多样性越高。基于 OTU 计算每个样品中各个类群所占百分比, 及基于各个类群在总样品的平均数计算各个类群所占总样品的百分比。数据已上传到 NCBI 的 SRA 数据库, 序列登录号为 SRP104332。

### 1.6 甲烷代谢类群 *mcrA* 功能基因系统进化树的构建

对潜在水合物区 DS08-2014 站位次表层 (100 cm) 样品中 *mcrA* 基因构建克隆文库, 引物为 ME1 (5'-GCMATGTCARATHGGWATGTC-3') 和 ME2 (5'-TCATKGCRTAGTTDGGRTAGT-3')<sup>[34]</sup>, PCR 体系为: 10 $\times$ ExTaq buffer 5  $\mu$ L, BSA 溶液 4  $\mu$ L, dNTP mixture 4  $\mu$ L, ExTaq 酶 0.25  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的正、反向引物各 1  $\mu$ L, 100 ng 的 DNA 模板, 最后用适量的去离子水补充至 50  $\mu$ L。PCR 条件为: 98  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳质量检验后切胶回收。将扩增的长度约为 760 bp 的片段连接到 pMD18-T 载体上, 将质粒转化至大肠杆

菌 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞上, 经过含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基(g/L: 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0)的筛选以及菌落 PCR 的阳性克隆检验, 挑取 57 个阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

采用 ClustalW<sup>[35]</sup>软件比对序列; SeaView 软件<sup>[36]</sup>手动修整序列; 比对修整后的数据基于近似最大似然 (Approximately-maximum-likelihood) 系统进化树 FastTree 软件<sup>[37]</sup>分析; 用 MEGA 7.0<sup>[38]</sup>软件对系统进化树修饰。所产生的 *mcrA* 基因序列的代表序列提交至 GenBank 数据库, 并获得序列号(KY966976–KY966994)。

## 1.7 荧光定量 PCR (Real-time PCR)

**1.7.1 标准品的制备:** 用定量 PCR 的方法对南海陆坡沉积物 3 个海域 7 个站位(DS07-2013、DS08-2014、DS12-2013、DS16-2013、DS16-2014、CHB03-2014 和 QDN22-2015 站位)的沉积物中 16S rRNA 基因和潜在水合物区(DS08-2014、DS12-2013、DS16-2013 和 DS16-2014 站位)的 *mcrA* 基因进行定量分析。方法如下: 对古菌的 16S rRNA 基因进行扩增, 引物为 Arch21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') 和 Arch958R (5'-YCCGCGTTGAMTCCAATT-3')<sup>[39]</sup>; 对细菌的 16S rRNA 基因进行扩增, 引物为 Bac27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 Bac1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[40]</sup>; 对甲烷代谢菌的关键基因 *mcrA* 进行扩增, 引物为 mlas (5'-GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA-3') 和 *mcrA*-rev (5'-CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT-3')<sup>[41]</sup>, 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化和回收 PCR 产物, 连接到 pMD18-T 载体, 转移到 *Escherichia coli* 的 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 以氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)抗性和菌落 PCR 筛选阳性克隆子, 用质粒提取试剂盒回收阳性克隆质粒, 用 *EcoR* I 酶切质粒, 用 2% 的琼脂糖凝胶回收质粒, 作为标准品。

**1.7.2 标准曲线的构建:** 标准品经过 10 倍梯度稀释后用带有荧光染料(SYBR Green II)的试剂在荧光定量 PCR 仪上扩增, 每个样品 3 个重复, 构建标准曲线。其中, 转化效率在 95%–105%之间,  $R^2$  值在

0.99 以上, 且所有样品的溶解曲线中没有双峰出现。

**1.7.3 样品定量:** 将待测样品和 10 倍梯度稀释标准品( $10^1$ – $10^9$ / $\mu$ L)的 DNA 为模板同时进行 PCR 扩增, 得到并转换成待测样品的湿重每克的拷贝数。定量 PCR 的体系: SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>™</sup> II 10  $\mu$ L, ROX II 0.4  $\mu$ L, 扩增目的片段所用的引物(细菌 Bac341F/Bac519R<sup>[42-43]</sup>, 古菌 Uni519F/Arch908R<sup>[43-44]</sup> 和 *mcrA* 基因 mlas/*mcrA*-rev<sup>[41]</sup>)各 1  $\mu$ L, 取 1  $\mu$ L 原始 DNA, 用双蒸水补齐到 20  $\mu$ L。定量 PCR 反应的体系如下: 1  $\mu$ L 的 DNA 模板, 10  $\mu$ mol/L 的正反向引物各 1.2  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 的 SYBR Green II, 0.4  $\mu$ L 的 ROX, 最后将适量的 ddH<sub>2</sub>O 补充总体积至 20  $\mu$ L。PCR 的扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 15 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环。其中退火温度: 细菌为 58  $^{\circ}$ C, 古菌为 60  $^{\circ}$ C, *mcrA* 基因为 55  $^{\circ}$ C。

## 2 结果与分析

### 2.1 南海北部陆坡沉积物古菌主要类群

结合高通量测序, 对南海北部陆坡沉积物中古菌 16S rRNA 基因进行测序。基于 OTU 数、Chao1 值、Shannon 指数和 Simpson 指数来反映微生物  $\alpha$  多样性。对于南海北部陆坡沉积物 3 个海域 7 根柱子的 50 个样品, Chao1 值的变化范围为 90.77–118.37, 获得的 OTU 数变化范围为 88.2–113.1, Shannon 指数的变化范围为 1.48–5.73, Simpson 指数的变化范围为 0.31–0.97。在 7 根沉积柱中,  $\alpha$  多样性最高的为 DS1613\_195 (Chao1 值为 118.37), 而 DS0713\_270 的  $\alpha$  多样性最低(Chao1 值为 90.77)。

结果表明, 南海北部陆坡沉积物中古菌类群主要为: Bathyarchaeota、Thermoplasmata (Marine Benthic Group D)、Woese archaeota (DHVEG-6)、Thaumarchaeota (Marine Group I)、Lokiarchaeota (Marine Benthic Group B) 和 Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG), 所占比例依次是 36%、17%、16%、12%、11% 和 3%。除此之外, 还存在少量的 AK8、Marine Benthic Group A、Terrestrial Hot Spring Crenarchaeota Group (THSCG) 等, 所占比例小于 1%。每个站位古菌类群随深度变化情况如图 1 所示。

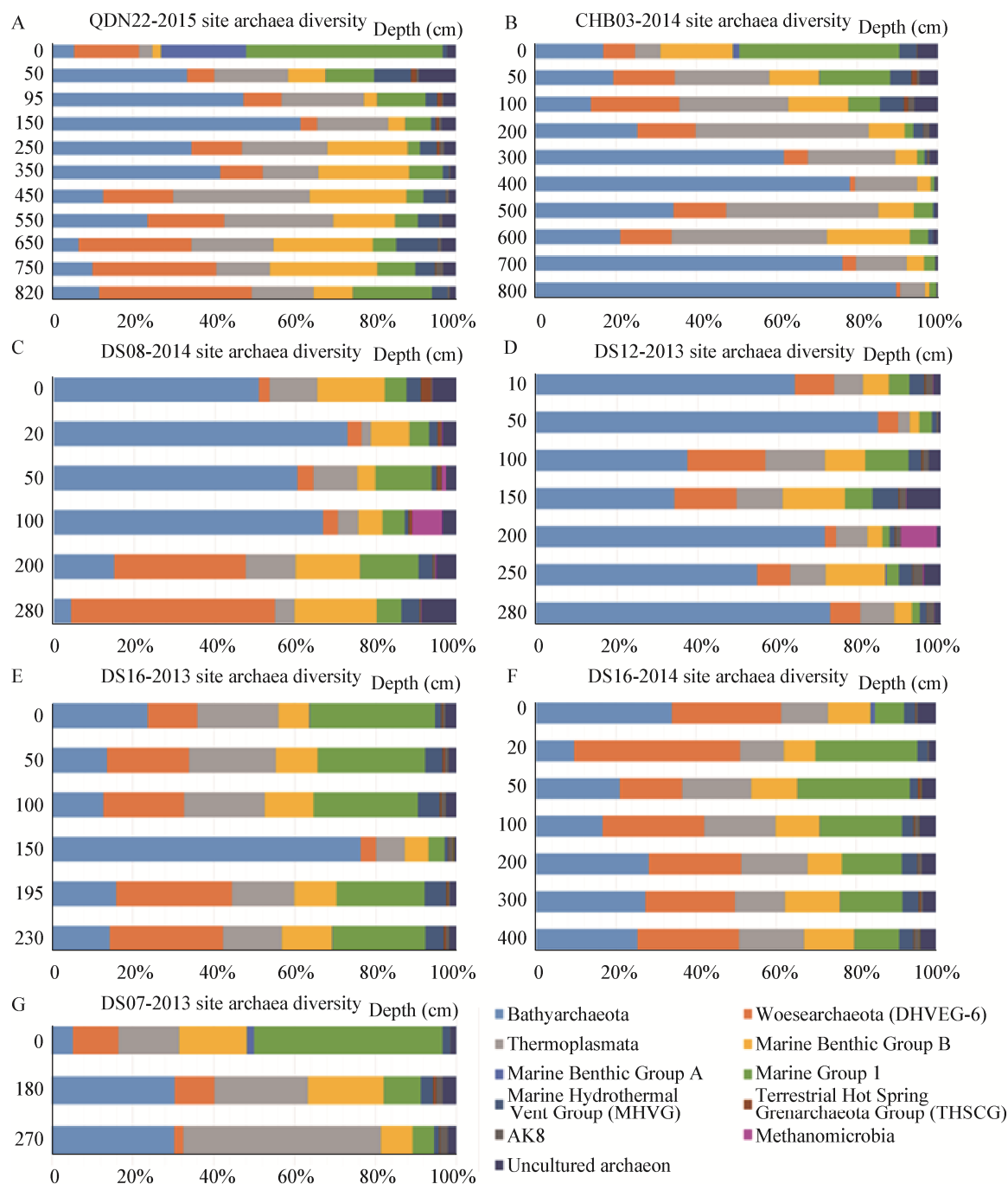


图1 南海北部陆坡沉积物7个站位古菌主要类群随深度变化情况

Figure 1 Seven sites sediment archaea diversity changing with deep increase at the northern slope of SCS

其中, Bathyarchaeota 是 QDN22-2015 站位(图 1A)、CHB03-2014 站位(图 1B)、DS08-2014 站位(图 1C)、DS12-2013 站位(图 1D)和 DS16-2013 站位(图 1E)的最主要古菌群落; Woesearchaeota (DHVEG-6)是 DS16-2014 站位(图 1F)的最主要古菌群落;

Thermoplasmata 是 DS07-2013 站位(图 1G)的最主要古菌群落。古菌 Bathyarchaeota 类群百分含量在次表层达到最大值,如 DS12-2013\_150 (76.2%, 古菌百分比)。Woesearchaeota (DHVEG-6)、Thermoplasmata、Lokiarchaeota 的百分比含量随深

度变化不明显,如 DS16-2013 站位和 DS16-2014 站位。DS08-2014 站位和 DS12-2013 站位的次表层中存在大量具有甲烷厌氧氧化菌的 ANME-1 类群,如 DS08-2014\_50 (0.96%)、DS08-2014\_100 (7.3%)和 DS12-2013\_200 (8.81%)。

主成分分析(Principal components analysis, PCA)是一种非约束性排序方法的统计学方法。基于 OTU 所占百分比的主成分分析(PCA)<sup>[45]</sup>,对中国南海北部陆坡沉积物中的古菌进行类群分析(图 2),可知在沉积物表层 Marine Group I 和 Marine Benthic Group A 类群含量较高,如 QDN22-2015\_0 (48.61%, 21.14%)、DS07-2013\_0 (46.52%, 1.83%)和 CHB03-2014\_0 (39.67%, 1.65%);在潜在水合物区 Methanomicobia 和 Bathyarchaeota 类群有较高含量,如 DS12-2013\_200 (8.81%, 71.33%)、

DS08-2014\_100 (7.30%, 66.76%)和 DS08-2014\_050 (0.96%, 60.35%)等。

对潜在水合物区 DS08-2014 站位的甲烷代谢类群进一步分析。构建 16S rRNA 基因系统进化树,可知 DS08-2014 站位的甲烷代谢类群为 ANME-1 (99.7%)和 ANME-2c (0.3%)。其中,ANME-1 是主要的甲烷代谢类群。同时基于 *mcrA* 基因克隆文库分析,挑取 DS08-2014 站位次表层(DS08-2014\_100, 57 条序列)甲烷代谢类群,构建系统进化树,可知 DS0814 站位的甲烷代谢类群为: ANME-1 (84.2%), ANME-2ab (10.5%)和 ANME-2c (5.3%) (图 3)。结合 16S rRNA 基因和 *mcrA* 基因的系统进化树,可知南海北部陆坡沉积物潜在水合物区 DS08-2014 站位的主要甲烷代谢类群为 ANME-1、少量 ANME-2ab 和 ANME-2c 类群。

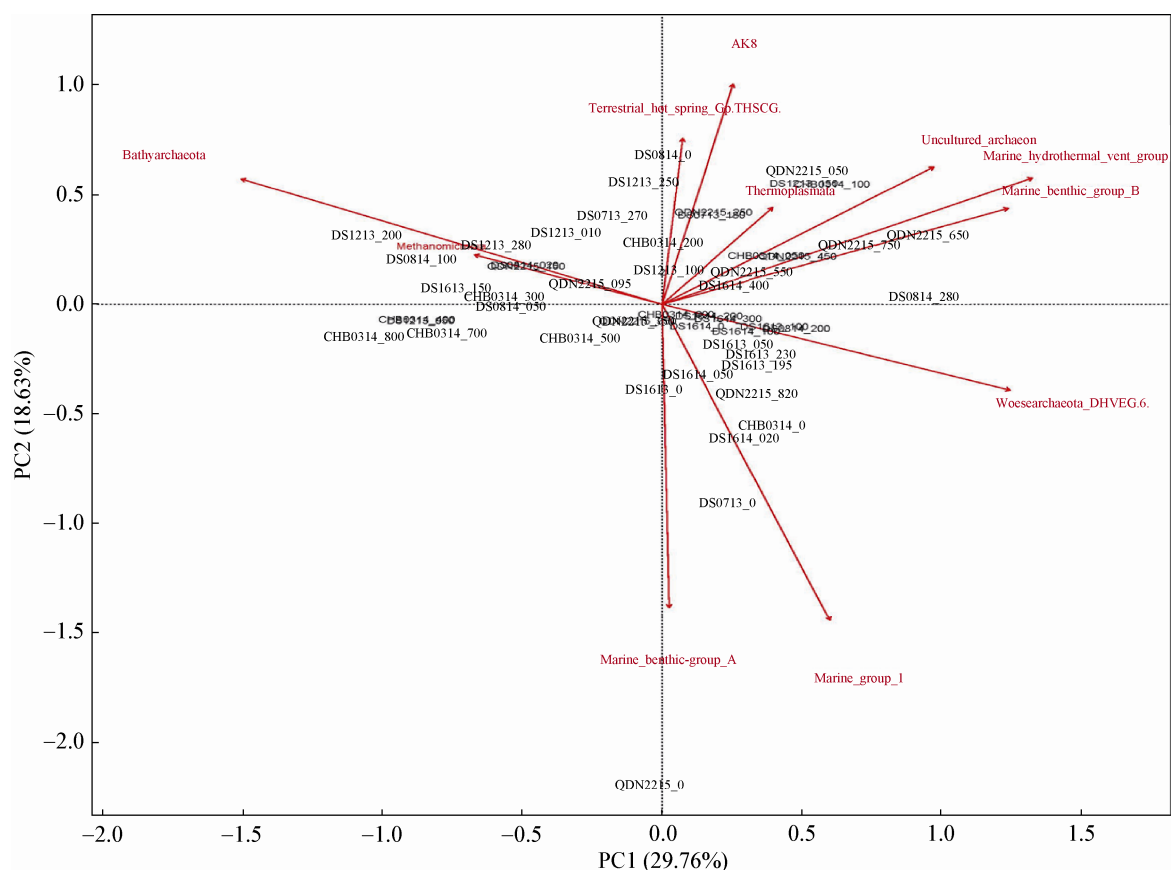


图 2 南海北部陆坡沉积物(7 个站位)基于 OTU 所占百分比的 PCA 分析  
Figure 2 PCA analysis based on OTU percent at the northern slope of SCS (7 sites)



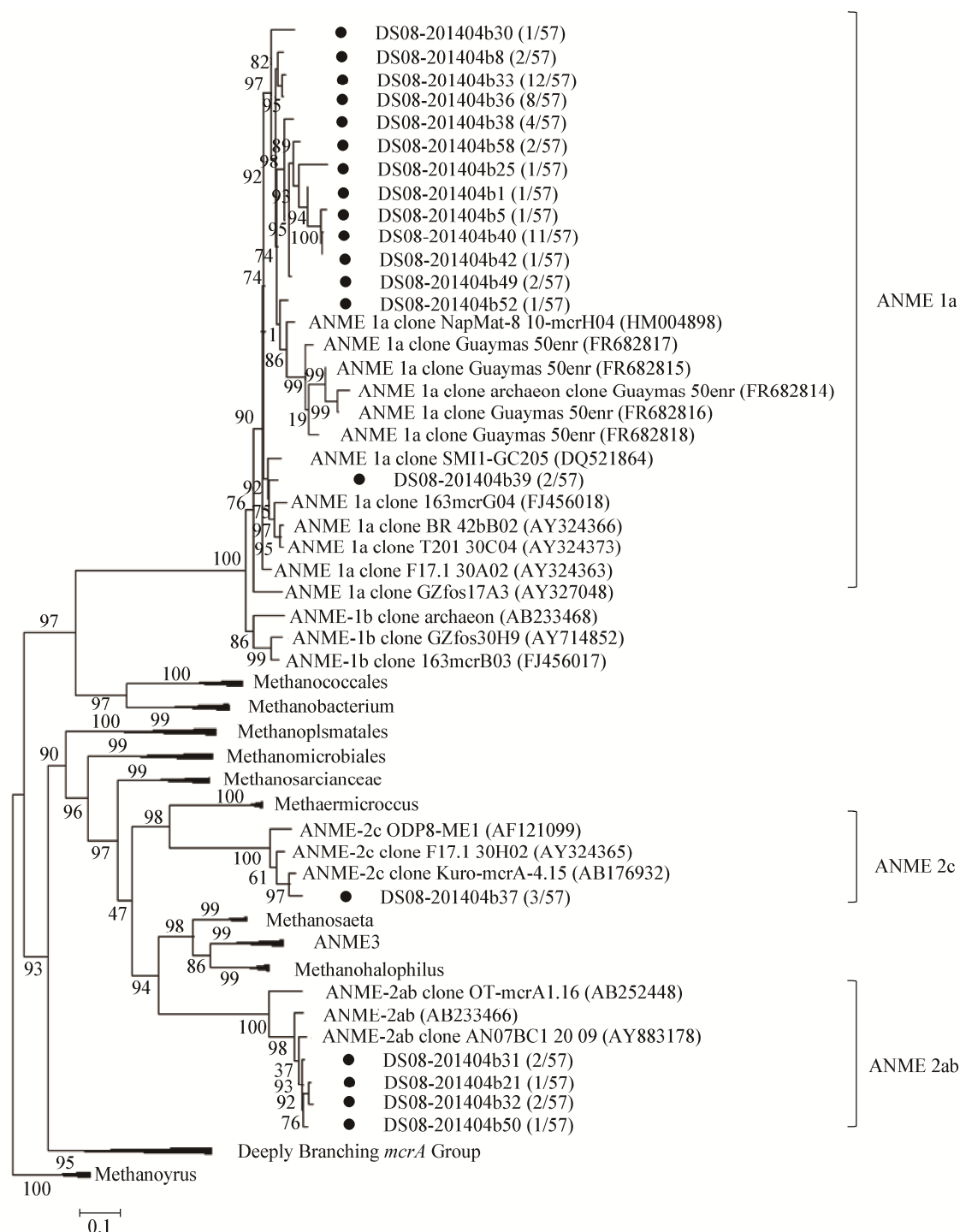


图3 潜在水合物区 DS08-2014 站位次表层(100 cm) *mcrA* 基因的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree showing the relationship of *mcrA* gene sequences derived from potential gas hydrate zone DS08-2014 site subsurface (100 cm) sediment

注: 基于最大似然算法, Bootstrap 值选自 1 000 重复, 黑点标志的序列为本实验数据, 最后的数字为序列的条数, 其余为参考序列, 参考序列选自 NCBI 数据库。

Note: Based on maximum likelihood analysis, numbers on branches are the supporting percentage by 1 000 replicates. Sequences retrieved in this study are marked by black circle, the last number is sequence's number, the other are get from NCBI database.



## 2.2 南海北部陆坡沉积物细菌、古菌和 *mcrA* 的丰度

采用荧光定量PCR的方法对来自3个海域的潜在水合物区(DS12-2013、DS16-2013、DS08-2014和DS16-2014 站位)(图4)和对照区(DS07-2013、CHB03-2014、QDN22-2015 站位)沉积物中的细菌和古菌的16S rRNA基因和*mcrA*基因进行定量分析,发现细菌16S rRNA基因的丰度范围为 $(5.52 \pm 0.38) \times 10^5 - (2.86 \pm 0.14) \times 10^7$  copies/g(湿重)。随着深度的增加,细菌16S rRNA基因的丰度趋

于减少。古菌16S rRNA基因的丰度相对于细菌低1-2个数量级,其丰度范围为 $(1.61 \pm 0.20) \times 10^4 - (6.72 \pm 0.73) \times 10^6$  copies/g(湿重)。整体而言,随着深度的增加,古菌的丰度趋于减少,但在某些层位出现陡增的情况,如DS12-2013\_100和DS16-2013\_150等。*mcrA*基因作为甲烷代谢菌的标记基因,其丰度可暗示潜在水合物的强弱。在潜在水合物区,*mcrA*基因的丰度范围为 $(1.03 \pm 0.16) \times 10^3 - (7.10 \pm 0.78) \times 10^5$  copies/g。其中,在DS08-2014 站位(图4A)从表层到深层均能检测到*mcrA*基因的存在,丰度变化范围为

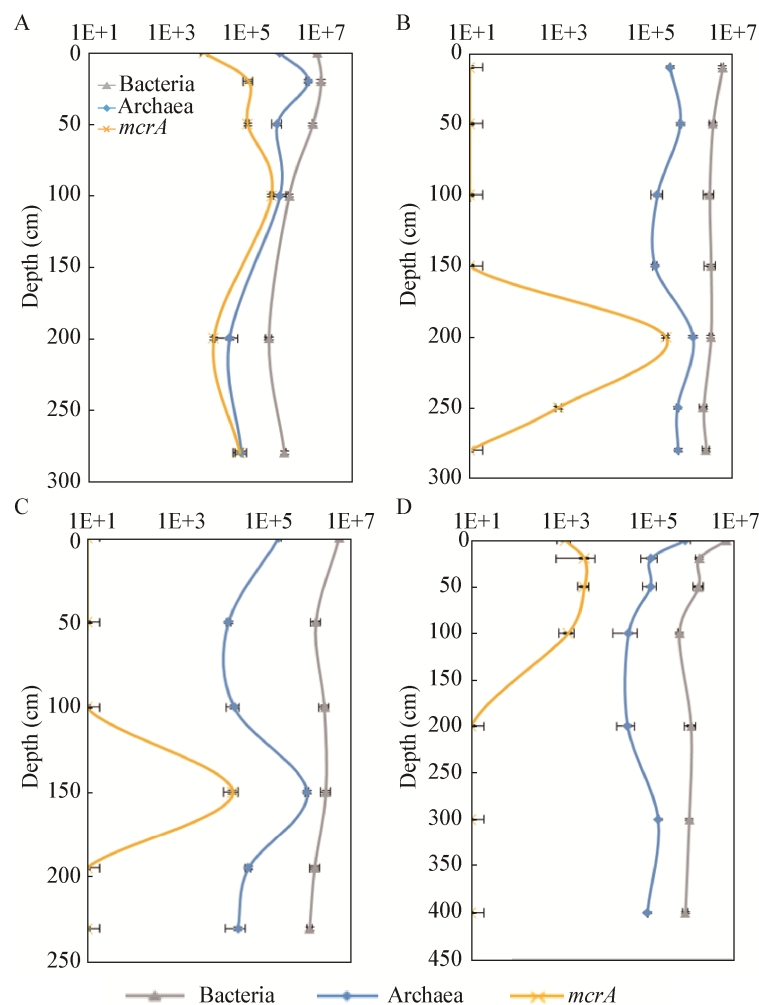


图4 潜在水合物区细菌、古菌和*mcrA*基因的定量数据

Figure 4 Quantification data of bacteria, archaea and *mcrA* gene in potential gas hydrate zone

注: A: DS08-2014 站位的微生物定量结果; B: DS12-2013 站位的微生物定量结果; C: DS16-2013 站位的微生物定量结果; D: DS16-2014 站位的微生物定量结果; 单位为 copies/g.

Note: A: DS08-2014 site microbial abundance; B: DS12-2013 site microbial abundance; C: DS16-2013 site microbial abundance; D: DS16-2014 site microbial abundance; Unit is copies/g.

$(1.15 \pm 0.20) \times 10^3 - (7.10 \pm 0.78) \times 10^5$  copies/g (湿重)。DS12-2013 站位(图 4B)和 DS16-2013 站位(图 4C)在次表层有 *mcrA* 基因的陡增, 最大值分别为  $(3.01 \pm 0.30) \times 10^5$  copies/g (湿重) 和  $(1.99 \pm 0.73) \times 10^4$  copies/g (湿重), DS16-2014 站位(图 4D)只有表层检测到 *mcrA* 基因, 丰度变化范围为  $(1.41 \pm 0.48) \times 10^3 - (3.82 \pm 0.29) \times 10^3$  copies/g (湿重), *mcrA* 基因的定量结果可提供间接证据证明该区域含有丰富的甲烷代谢类群。对照区没有检测到 *mcrA* 基因。

### 3 讨论

#### 3.1 南海北部陆坡沉积物古菌多样性

本研究调查了南海北部陆坡 3 个海域(东部、西部和神狐海域)沉积物中的古菌类群。采集了 7 个沉积柱共 50 个样品。结合高通量测序的方法, 可知南海北部陆坡沉积物覆盖了古菌的 3 大超级门: “TACK” 超级亚门, “DPANN” 超级亚门和 Euryarchaeota 门。其中, “TACK” 超级亚门主要为 Bathyarchaeota、Thaumarchaeota 类群, 而“DPANN” 超级亚门主要为 Woeseearchaeota (DHVEG-6)类群和少量 Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG)类群, Euryarchaeota 门主要为 Thermoplasmata (MBGD)类群和 Methanomicrobiales 类群(图 1)。

作为南海沉积物中的最主要类群, Bathyarchaeota 类群广泛存在于各种环境, 如深海沉积物、热泉、盐碱地等, 且至少可被分为 17 个亚群, 宏基因组学和单细胞测序的结果推测其具有分解蛋白质和降解苯环化合物的功能<sup>[11,46]</sup>。近些年的研究表明, Bathyarchaeota 类群可能具有自养产乙酸和参与甲烷代谢的功能, 是兼性异氧代谢类型<sup>[22,47]</sup>。在 Nankai Trough 水合物层位中也发现了大量的 Bathyarchaeota 类群, 并在 Bathyarchaeota 的基因组中发现了完整的甲烷代谢途径, 暗示其在甲烷代谢过程可能发挥作用<sup>[48]</sup>。本研究的潜在水合物区 DS08-2014 站位中, 特别是含有 ANME-1 类群的层位, Bathyarchaeota 类群均是古菌群落的主要组成成分(图 2), 推测 Bathyarchaeota 在潜在水合物区碳

循环中发挥着重要的作用。

南海北部陆坡 3 个海域沉积物中古菌的主要类群为“TACK”超级亚门的 Bathyarchaeota (36%), Euryarchaeota 的 Thermoplasmata (17%)和“DPANN”超级亚门的 Woeseearchaeota (16%), 而焦露等<sup>[49]</sup>在中国南海北部神狐海域沉积物古菌多样性研究表明, Euryarchaeota 的 Halobacteriales (42%)、“TACK”超级亚门的 Bathyarchaeota (25.1%)、“DPANN”超级亚门的 Woeseearchaeota (5.2%)为主要沉积物古菌类群, 与本研究的结果不同。分析其原因: 一方面是由测序方法和采集柱自身因素不同造成的。本研究采用的是高通量测序的方法, 比构建克隆文库方法<sup>[49]</sup>的测序能获得更大数据量, 更能反映原位的古菌类群的多样性和丰度信息, 特别是低丰度和特殊环境的沉积物样品。此外, 同一区域不同站位的微生物多样性受到多种因素的影响, 如化学参数, 是否为水合物区等因素。另一方面, 随着近些年来古菌的系统进化树不断的更新, 如新基因组的发现和 16S rRNA 基因测序结果的填补和归类<sup>[10,50-51]</sup>, 都是造成古菌多样性结果不同的原因。综上所述, 南海北部陆坡沉积物中的古菌类群主要参与碳元素的生物地球化学循环。沉积物中古菌类群的生理生态学意义正在逐渐被理解。

#### 3.2 南海北部陆坡沉积物微生物的丰度

南海北部陆坡沉积物(7 个站位)中细菌 16S rRNA 基因的丰度范围为  $10^5 - 10^7$  copies/g (湿重); 古菌的 16S rRNA 基因的丰度范围为  $10^3 - 10^6$  copies/g (湿重)。在潜在水合物区, *mcrA* 基因的丰度范围约  $10^3 - 10^5$  copies/g (湿重) (图 4)。本研究的结果显示细菌丰度在表层最高, 与其它南海沉积物中的微生物丰度变化相似<sup>[49,52]</sup>。海底沉积物表层的有机物含量相对较高, 为微生物的生长提供丰富的底物, 随着深度的增加, 有机物含量减少, 细菌丰度逐渐减少。古菌的丰度随着深度的变化波动较大, 推测与某些古菌类群独特的生理特性有关, 如潜在水合物区 DS08-2014 站位, 古菌丰度随深度变化波动较大, 同时检测到较高

的 *mcrA* 基因。结合 PCA 分析, *Methanomicrobia* 类群和 *Bathyarchaeota* 类群在 DS08-2014 站位具有较高的丰度(图 1 和 2), 暗示古菌在该站位的地球化学元素循环上起到重要作用。大部分样品中, 细菌 16S rRNA 基因拷贝数高出细菌 1–2 个数量级。部分层位中, 古菌和细菌的 16S rRNA 基因的丰度同处一个数量级, 如 DS08-2014\_100, 可能与细菌和古菌不同的代谢特征有关。对南海北部陆坡沉积物中细菌和古菌的 16S rRNA 基因和 *mcrA* 基因进行定量分析, 不仅为了解南海北部陆坡沉积物中微生物资源的储量提供基础信息, 且为后续深入研究古菌和细菌在参与全球海洋沉积物生物地球化学循环提供重要依据。值得一提的是, 本实验中古菌多样性的引物选用的是古菌 16S rRNA 基因 V4 区, 相比于全长和其它分区能降低古菌基因组内 16S rRNA 基因多样性造成的影响<sup>[53]</sup>, 但在对微生物的丰度分析时, 细菌的定量引物选用的是 16S rRNA 基因的 V3 区, 古菌的定量引物选用的是 16S rRNA 基因的 V4 区, 由于细菌和古菌基因组内存在 16S rRNA 基因的多样性, 因此对细菌和古菌的丰度分析存在高估, 且细菌的高估情况较古菌明显<sup>[53]</sup>。

### 3.3 南海北部陆坡沉积物 DS08-2014 站位的甲烷代谢类群

南海北部陆坡沉积物中潜在水合物区来源的 DS08-2014 站位含有丰富的甲烷代谢类群, 结合高通量测序结果和构建的克隆文库, 对 16S rRNA 基因和 *mcrA* 基因的系统进化树进行分析, 可知南海北部陆坡潜在水合物区 DS08-2014 站位的甲烷代谢类群主要为甲烷厌氧氧化古菌 ANME-1, 同时还存在少量 ANME-2ab 和 ANME-2c。同一海域 DS12-2013 站位也存在类似的甲烷代谢群落, 可见南海北部陆坡东部海域潜在水合物区沉积物中的主要甲烷类群为 ANME-1、ANME-2ab 和 ANME-2c 类群。相比李涛等<sup>[54]</sup>对南海南部陆坡表层沉积物的古菌多样性研究: 甲烷代谢类群主要是甲烷杆菌 (*Methanobacteriales*), 本研究南海北部陆坡沉积物

的甲烷代谢类群主要为 *Methanomicrobia* 纲的 ANME-1 类群。推测可能与垂直取样深度及古菌不同的生态位有关。综上所述, 南海北部陆坡沉积物中甲烷代谢类群的多样性为指示沉积物中甲烷厌氧氧化活动提供重要依据。

## 4 结论

本研究通过高通量测序的方法, 对中国南海北部陆坡 3 个海域(东部、西部和神狐海域)沉积物中微生物进行分析, 结合定量分析, 获得南海北部陆坡沉积物中古菌多样性和微生物丰度的基本数据。南海北部陆坡沉积物古菌的主要类群为: *Bathyarchaeota*、*Thermoplasmata*、*Woesearchaeota* (DHVEG-6)、*Thaumarchaeota* (Marine Group I)、*Lokiarchaeota* 和 Marine Hydrothermal Vent Group (MHVG)等。对含有丰富甲烷代谢类群的 DS08-2014 站位, 结合 16S rRNA 基因和 *mcrA* 基因的系统发育树进一步分析, 发现 ANME-1、ANME-2ab 和 ANME-2c 类群为南海北部陆坡东部海域潜在水合物区沉积物的甲烷代谢类群。为深入了解中国南海北部陆坡沉积物古菌多样性及甲烷代谢类群提供数据支持。

致谢: 感谢“海洋四号”船员协助采集样品。

## 参考文献

- [1] Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, et al. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(40): 16213-16216
- [2] D'hondt S, Jørgensen BB, Miller DJ, et al. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments[J]. *Science*, 2004, 306(5705): 2216-2221
- [3] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(12): 4576-4579
- [4] Auguet JC, Casamayor EO. A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(4): 1080-1086
- [5] Liu YC, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1): 171-189
- [6] Lipp JS, Morono Y, Inagaki F, et al. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments[J].

- Nature, 2008, 454(7207): 991-994
- [7] Guy L, Ettema TJG. The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(12): 580-587
- [8] Spang A, Hatzepichler R, Brochier-Armanet C, et al. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota[J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(8): 331-340
- [9] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter[J]. Nature, 2013, 499(7459): 431-437
- [10] Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al. A new view of the tree of life[J]. Nature Microbiology, 2016, 1(5): 16048
- [11] Meng J, Xu J, Qin D, et al. Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses[J]. The ISME Journal, 2014, 8(3): 650-659
- [12] Kozubal MA, Romine M, de Jennings R, et al. Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park[J]. The ISME Journal, 2013, 7(3): 622-634
- [13] Teske A. Archaea in deep marine subsurface sediments[A]//Kallmeyer J, Wagner D. Microbial Life of the Deep Biosphere[M]. Berlin, Germany: De Gruyter, 2014: 143-160
- [14] Groves DG, Hunt LM. Ocean world encyclopedia[M]. New York: McGraw-Hill, 1980
- [15] Boucher O, Friedlingstein P, Collins B, et al. The indirect global warming potential and global temperature change potential due to methane oxidation[J]. Environmental Research Letters, 2009, 4(4): 044007
- [16] Cho H, Hyun JH, You OR, et al. Microbial community structure associated with biogeochemical processes in the Sulfate-Methane Transition Zone (SMTZ) of gas-hydrate-bearing sediment of the Ulleung Basin, East Sea[J]. Geomicrobiology Journal, 2016, 34(3): 207-219
- [17] Niewöhner C, Hensen C, Kasten S, et al. Deep sulfate reduction completely mediated by anaerobic methane oxidation in sediments of the upwelling area off Namibia[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1998, 62(3): 455-464
- [18] Moore TS, Murray RW, Kurtz AC, et al. Anaerobic methane oxidation and the formation of dolomite[J]. Earth and Planetary Science Letters, 2004, 229(1/2): 141-154
- [19] Knittel K, Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63(1): 311-334
- [20] Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, et al. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis[J]. Genome Biology and Evolution, 2013, 5(10): 1769-1780
- [21] Fang XY, Li JB, Rui JP, et al. Research progress in biochemical pathways of methanogenesis[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(1): 1-9 (in Chinese)  
方晓瑜, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 产甲烷生化代谢途径研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 1-9
- [22] Evans PN, Parks DH, Chadwick GL, et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics[J]. Science, 2015, 350(6259): 434-438
- [23] Laso-Pérez R, Wegener G, Knittel K, et al. Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation[J]. Nature, 2016, 539(7629): 396-401
- [24] Friedrich MW. Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing *Archaea*[J]. Methods in Enzymology, 2005, 397: 428-442
- [25] Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, et al. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics[J]. Science, 2004, 305(5689): 1457-1462
- [26] Shima S, Krueger M, Weinert T, et al. Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically[J]. Nature, 2012, 481(7379): 98-101
- [27] Gong YH, Wu SG, Zhang GX, et al. Relation between gas hydrate and geologic structures in Dongsha islands sea area of South China Sea[J]. Marine Geology & Quaternary Geology, 2008, 28(1): 99-104 (in Chinese)  
龚跃华, 吴时国, 张光学, 等. 南海东沙海域天然气水合物与地质构造的关系[J]. 海洋地质与第四纪地质, 2008, 28(1): 99-104
- [28] Wu NY, Yang SX, Wang HB, et al. Gas-bearing fluid influx sub-system for gas hydrate geological system in Shenhu Area, Northern South China Sea[J]. Chinese Journal of Geophysics, 2009, 52(6): 1641-1650 (in Chinese)  
吴能友, 杨胜雄, 王宏斌, 等. 南海北部陆坡神狐海域天然气水合物成藏的流体运移体系[J]. 地球物理学报, 2009, 52(6): 1641-1650
- [29] Wu DD, Ye Y, Wu NY, et al. Early diagenesis records and chemical composition abnormalities in pore water for methane-seep in sediments from the southern Qiongdong Basin[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2009, 31(2): 86-96 (in Chinese)  
邬黛黛, 叶瑛, 吴能友, 等. 琼东南盆地与甲烷渗漏有关的早期成岩作用和孔隙水化学组分异常[J]. 海洋学报, 2009, 31(2): 86-96
- [30] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [31] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [32] Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, et al. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities[J]. Current Protocols in Microbiology, 2012. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01e05s27
- [33] Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11(4): 265-270
- [34] Hales BA, Edwards C, Ritchie DA, et al. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 668-675
- [35] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948
- [36] Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a

- multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, 27(2): 221-224
- [37] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9490
- [38] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874
- [39] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5685-5689
- [40] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703
- [41] Steinberg LM, Regan JM. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(21): 6663-6671
- [42] Ishii K, Fukui M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3753-3755
- [43] Ovreås L, Forney L, Daae FL, et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3367-3373
- [44] Jurgens G, Lindström K, Saano A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 803-805
- [45] Lai J S, Mi X C. Ordination analysis of Ecological data using Vegan package in R[J]. *Advances in Biodiversity Conservation and Research in China*, 2005: 332-343
- [46] Lloyd KG, Alperin MJ, Teske A. Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(9): 2548-2564
- [47] He Y, Li M, Perumal V, Feng X, Fang J, Xie J, Sievert S, Wang F. Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 1(6): 16035
- [48] Katayama T, Yoshioka H, Takahashi HA, et al. Changes in microbial communities associated with gas hydrates in subseafloor sediments from the Nankai Trough[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(8): fiw093
- [49] Jiao L, Su X, Chen F, et al. Microbial diversity in sediments of core HS-PC 500 from Shenhu Area, northern South China Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(7): 876-890 (in Chinese) 焦露, 苏新, 陈芳, 等. 南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2011, 51(7): 876-890
- [50] Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, et al. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling[J]. *Current Biology*, 2015, 25(6): 690-701
- [51] Ortiz Alvarez R, Casamayor EO. High occurrence of *Pacearchaeota* and *Woesearchaeota* (Archaea superphylum DPANN) in the surface waters of oligotrophic high altitude lakes[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 18(2): 210-217
- [52] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8): 2815-2820
- [53] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969
- [54] Li T, Wang P, Wang PX. Bacterial and archaeal diversity in surface sediment from the south slope of the South China Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(3): 323-329 (in Chinese) 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 323-329