

# 海底天然气水合物的微生物成因及识别

## The microbial genesis of submarine gas hydrate and its microbiological indication

吴后波<sup>1</sup>, 苏晓波<sup>1</sup>, 颜文<sup>2,3</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所 LED 实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院广州天然气水合物研究中心, 广东 广州 510070; 3. 中国科学院边缘海重点实验室, 广东 广州 510301)

中图分类号: P618.130.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)03-0096-05

当前, 天然气水合物作为一种未来新型能源在国际上备受关注, 世界上已直接或间接发现了天然气水合物 116 处, 其中海洋就有 85 处(包括中国南海北部陆坡、南沙海槽和东海陆坡), 直接采集到天然气水合物样品有 23 处。据估算, 全球天然气水合物中蕴藏的天然气总量约  $(1.8 \sim 2.1) \times 10^{16} \text{ m}^3$ <sup>[1]</sup>, 资源总量是全球所有已知常规矿物燃料总和的 2 倍。对天然气水合物研究受到如此高度关注的主要原因, 一是由于它是一种潜力巨大、前景诱人的超级能源; 二是天然气水合物的形成与演化是全球气候变化和海底地质灾害的潜在诱发因素, 对海洋生态环境也会产生重大影响<sup>[2]</sup>。所以, 无论从寻找战略储备能源的角度看, 还是从防治灾害和维护人类生存环境的角度看, 对天然气水合物的研究均具有重要意义。

海底天然气水合物形成与赋存条件特殊, 迄今除了海底钻探和海底沉积物获得少量海底天然气水合物样品外, 世界各地绝大多数天然气水合物的分布主要是通过天然气水合物的地质、地球物理、地球化学以及生物学等识别标志来判别的。目前, 针对海底天然气水合物的微生物成因及其微生物识别标志的研究还相当肤浅, 作者简要介绍了国内外有关该方面的研究进展。

### 1 海底天然气水合物的形成条件和成因类型

海底形成天然气水合物主要受温度、压力、气体成分与含量等 3 个因素的控制。(1) 温度不能太高, 海底的温度是  $2 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 适合天然气水合物的形成, 高于  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  就分解; (2) 压力要足够大, 在 0 时只需要  $3.03 \times 10^6 \text{ Pa}$  就可形成天然气水合物, 海水深度每增加 10 m, 压力就增加  $1.01 \times 10^5 \text{ Pa}$ , 因此, 海水深 300 m 就可达到  $3.03 \times 10^6 \text{ Pa}$ , 海水越深压力越大,

天然气水合物就越稳定; (3) 要有足量的甲烷气源, 甲烷在水中的溶解度很低, 一般为每体积水中只能溶解 0.045 体积的甲烷<sup>[3]</sup>, 而要形成天然气水合物, 必需是水合物笼状结构中 90% 以上被甲烷气占据<sup>[4]</sup>, 即 1 体积的水中要容纳大于 150 体积的甲烷气, 因此要形成海底天然气水合物, 必须要有足量的甲烷气来源。除此之外, 还必须要有充足的使天然气水合物形成的有利的流体载体的输导系统和供应, 因此地质条件是水合物形成的重要控制条件。

海底天然气水合物的气体成分通常以甲烷气 ( $\text{CH}_4$ ) 为主 ( $> 99\%$ ), 就甲烷的成因而言, 可将天然气划分为生物成因气、热成因气和非生物成因气等 3 类。

生物成因气主要是指微生物在缺氧环境下, 分解埋于地层深处大量地质时期的动植物遗骸等有机物产生的天然气, 也称为菌解气。生物成因的甲烷气通常形成于天然气水合物稳定区带中, 其水合物形成速度慢且范围较广。

热成因气的形成方式与石油相似, 沉积有机质随着沉积物的埋深增大而温度升高, 其长链有机化合物断裂、分解形成天然气。热成因的甲烷气比生物成因的甲烷气更具有富集性, 通常形成于沉积盆地较深部, 并通过盆地卤水向上迁移至高孔隙度、高渗透率的浅部天然气水合物稳定区的沉积物中。它们一般在断裂带附近形成小丘, 或从断裂带开始向外蔓延, 并且很好的圈闭且阻止更多的甲烷逸散到地表。

收稿日期: 2007-09-03; 修回日期: 2007-12-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-211-03)。

作者简介: 吴后波 (1967-), 男, 湖北洪湖人, 副研究员, 博士, 主要从事海洋环境与分子微生物学研究, 电话: 020-89023162, E-mail: wuhoubo@scsio.ac.cn.

非生物成因天然气系指地球内部迄今仍保存的地球原始烃类气体,或地壳内部经无机化学过程产生的烃类气体。

不同成因的甲烷气具有完全不同的碳同位素组成。Bernard 等<sup>[5]</sup>曾用烃类气体成分  $R$  值及甲烷碳同位素组成来判断甲烷来源。微生物成因甲烷气的  $R$  值比较高 ( $> 1000$ ), 碳同位素比值  $^{13}C$  很低, 一般为  $-90\text{‰} \sim -55\text{‰}$ ; 热成因甲烷气的  $R$  值比较低 ( $< 100$ ),  $^{13}C$  值较高, 一般为  $-55\text{‰} \sim -29\text{‰}$ 。

## 2 生物成因甲烷气产生的微生物机制

海洋深处及海底微生物产生甲烷气, 主要有以下 2 个途径: (1) 厌氧细菌通过直接分解埋于地层深处的动植物遗骸等有机物而产生甲烷气。在这种产甲烷过程中存在种类繁多、关系复杂的微生物区系, 参与甲烷产生的微生物总体上可分为 2 大类, 即包括硫酸盐还原菌 (Sulphate-reducing bacteria, SRB)、硝酸盐还原菌 (Nitrate-reducing bacteria, NRB) 等在内的非产甲烷菌 (non-methanogen) 和产甲烷菌 (methanogen)。甲烷的产生是一个复杂而连续的微生物学过程, 是这个微生物区系中各种微生物相互平衡、协同作用的结果。这两大类微生物的相互关系包括: 非产甲烷细菌和产甲烷细菌之间的相互关系; 非产甲烷细菌之间的相互关系; 产甲烷细菌之间的相互关系。其中非产甲烷细菌和产甲烷细菌之间的相互关系最为重要, 非产甲烷菌将动植物遗骸等有机底物等进行厌氧消化, 为产甲烷菌提供了生长和代谢所需的碳源和能源, 非产甲烷细菌和产甲烷细菌相互依赖, 互为对方创造良好的环境和条件。产甲烷细菌通过乙酸发酵途径产生甲烷气。(2) 自养产甲烷菌还原  $CO_2$  形成甲烷气。海洋环境中产甲烷气主要以  $CO_2$  还原途径为主。海底产甲烷菌的  $CO_2$  底物有两个来源: 1)  $CO_2$  来源于有机质降解。埋于地层深处的动植物遗骸等有机质先被氧化为  $CO_2$ , 又由产甲烷细菌还原为甲烷。这种方式产生甲烷气也须由两种或以上的微生物协同完成。有机质为什么不直接由微生物降解为甲烷, 而要先氧化为  $CO_2$ , 又由产甲烷细菌还原为甲烷, 这种曲折的过程很令人费解<sup>[6]</sup>。2)  $CO_2$  来源于洋底的火山热液-喷溢系统。产甲烷细菌生长的温度范围非常宽, 它可以生活在近于冰点的南极湖泊中, 也可以栖息在  $110^\circ C$  的深海火山热液喷孔<sup>[7]</sup>, 在现代火山-热液喷孔中发现了多种高温自养甲烷菌<sup>[8]</sup>, 在天然气水合物矿床中也发现有中高温的自养甲烷杆菌<sup>[9]</sup>。

$D_{CH_4}$  值 (甲烷氢同位素值) 被用来区别以上 2 个主要的微生物产甲烷途径<sup>[10]</sup>。由  $CO_2$  还原作用

产生的甲烷中氢只来源于周围的水, 其  $D_{CH_4}$  值大于  $-250\text{‰} SMOW$  (standard mean ocean water), 代表值近于  $-191\text{‰} \pm 19\text{‰}$ <sup>[11]</sup>; 而乙酸发酵产生的甲烷中  $3/4$  的氢来源于有机质, 只有  $1/4$  的氢来源于水, 其  $D_{CH_4}$  值小于  $-250\text{‰} SMOW$ , 介于  $-355\text{‰}$  和  $-290\text{‰}$  之间。

## 3 海底天然气水合物的生态环境效应

由于海底天然气水合物的形成与赋存条件的特异性, 其形成后对周围的生物群落必将产生独特的影响, 从而在其周围形成独特的生物群落特征。

### 3.1 海底天然气水合物形成对其周围微生物生态的影响

微生物通过产甲烷作用参与了甲烷水合物的形成, 同时, 微生物在厌氧条件下还可以氧化甲烷水合物晶体中的甲烷气<sup>[12]</sup> 以及海底天然气渗漏系统中的甲烷气<sup>[9, 13~15]</sup>, 微生物的这种氧化作用对甲烷气及  $CO_2$  的全球循环以及成岩过程影响非常大。因此, 微生物群落的组成对甲烷水合物的稳定性、组成及晶体结构的影响非常重要。

为了证明微生物细胞与水合物晶体有直接的接触, 并证明水合物晶体内存在微生物细胞, Lanoil 等<sup>[16]</sup> 对墨西哥湾的天然气水合物样品进行了详细的微生物学分析。他们用 DNA 染液将天然气水合物样品 DAPI 染色后在荧光显微镜下观察, 发现天然气水合物样品里存在微生物细胞, 密度可达  $1.0 \times 10^6$  个/mL。利用分子生物学方法对天然气水合物样品里的微生物进行分类鉴定, 发现细菌的群落组成复杂, 绝大多数细菌属于紫色细菌群 (Proteobacteria)、放线菌群 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 的细菌, 其中  $33\% \sim 35\%$  的细菌属于放线菌群和厚壁菌门的细菌。天然气水合物样品里的古细菌群落组成相对简单, 几乎所有古细菌都属于产甲烷古细菌, 特别是鬃毛甲烷菌属 (*Methanoseta*)。

天然气水合物晶体里的微生物群落不仅生命活动旺盛, 而且它们的生命活动并不局限于天然气水合物晶体内, 它们还可以自由地与周围的沉积物环境进行各种物质交换。甲烷水合物渗透性强, 天然气水合物晶体中水分子间的空穴 (晶穴) 大小为  $100 \sim 400$  nm, 而且晶穴占整个晶体的  $25\% \sim 40\%$ <sup>[17]</sup>, 这样就有利于微生物赖以生存的底物如硫酸盐及其代谢产物亚硫酸盐等非常容易地进出天然气水合物晶体, 有的晶穴甚至大到可以让微生物细胞自由进出。微生物在天然气水合物晶体内主要进行 2 种类型的代谢活动: (1) 厌氧甲烷氧化作用 (anaerobic meth-

ane oxidation, AOM), AOM 是发生在缺氧环境下以微生物为媒介的甲烷氧化作用,通常与硫酸盐的还原作用(Sulfate Reduction, SR)同时发生, AOM 在全球甲烷的收支平衡中极为重要,并通过其将碳循环和硫循环联系起来。微生物的 AOM 活动不仅可以改变天然气水合物中气体的组成,影响天然气水合物的稳定性,而且还可以改变天然气水合物的地球化学特性以及沉积物的成岩过程。微生物的 AOM 活动通常需要多种细菌的协同作用<sup>[15, 18, 19]</sup>。AOM 活动的机理目前还不完全清楚,但存在两种假说,一种为单一硫酸盐还原细菌说,另一种是不同细菌共生体说。类脂类生物标志化合物及单分子碳同位素分析特征表明微生物为非单一有机质来源,古细菌 16S rRNA 基因分析也证实 AOM 古细菌具有多种来源,Boetius 等<sup>[13]</sup>和 Orphan 等<sup>[20]</sup>在显微镜下找到了以甲烷古细菌为中心外部被硫酸盐还原细菌包围的细菌共生体,为共生体假说提供了直接的依据。(2) 非甲烷的碳水化合物氧化。天然气水合物晶体中的很多细菌都可以进行这种非甲烷的碳水化合物氧化作用<sup>[21]</sup>,特别是对脂肪族和芳香族的碳水化合物,天然气水合物晶体中的细菌通过这种非甲烷碳水化合物氧化作用影响着天然气水合物晶体中碳水化合物向周围环境的释放<sup>[22, 23]</sup>。

海底天然气水合物在一定的温压条件下,即在天然气水合物稳定带内可以稳定存在,如果脱离天然气水合物稳定带天然气水合物就会分解为甲烷气和水,甲烷气在海底水压下以一种爆炸式的破裂方式从海底地层泄露出来,在海底表面形成“梅花坑”地貌(深 10 m、直径 100 m),同时还伴随着一系列的物理、化学及生物作用过程,形成与海底天然气渗漏相关的、与海底天然气水合物伴生的冷泉碳酸盐岩。

6 400 m 深的日本海沟陆坡冷泉环境中生长着 *Calyptogenia* 群落,该环境大多数古细菌的 16S rRNA 序列属于嗜泉古菌,显示出与海洋古菌群 1 的 rRNA 高度相似<sup>[6]</sup>。此外,从沉积物中获得的一个与布氏拟甲烷球菌(*Methanococoides burtonii*)相关的序列属于广域古菌<sup>[24]</sup>。

科学家在冷泉碳酸盐岩中还发现了微生物化石,这进一步证明了微生物细胞与天然气水合物稳定带水合物晶体有直接的接触,并证明天然气水合物稳定带水合物晶体里存在微生物细胞。东沙群岛海域海底冷泉碳酸盐岩形态类似于烟囱,主要由方解石、伊利石、石英、黄铁矿等矿物组成。方解石保存了细菌丝状体形态,丝状体直径小于 0.5  $\mu\text{m}$ 。通过扫描电镜观察,在碳酸盐岩断裂面上发现了直径小于 0.3  $\mu\text{m}$  的细菌,同时在碳酸盐岩的外表层观察

到薄层外壳(厚 0.5  $\mu\text{m}$ ),显示出细菌形态特征。此外,在光学显微镜下可观察到黄铁矿集合体内保存了直径小于 0.1  $\mu\text{m}$  的棒状和卵形纳米细菌。在碳酸盐岩中保存的细菌化石证明了碳酸盐岩是海底天然气渗漏系统中细菌对甲烷气氧化的产物。

### 3.2 海底天然气水合物形成对其周围大型生物生态的影响

随着海洋高技术的发展,借助海底电视、遥控观测器(ROV)和深潜器等先进工具,在海底“梅花坑”内可以观察到与水合物相关的化学自养生物群落<sup>[25]</sup>,这些自养生物群落主要包括以 *Beggiatoa* 为主要种属的厌氧菌、贻贝类和蚌类等深海双壳类生物,管蠕虫及冰蠕虫,以大量壳长为 20 ~ 30 cm 的巨型贝类遗体为主,形成了一种特殊的以溢出天然气为“食物”的生物群落,因有大量冷甲烷气泡溢出,故又称“冷生物群落溢气口”。1984 年首次在墨西哥湾发现这类生物,目前在日本南海海槽、美国俄勒冈外海及大西洋布莱克海脊等地均见到类似现象<sup>[26]</sup>,而在“梅花坑”以外的地区则难见到此类生物。此外,科学家发现在海底天然气水合物的周围同样栖息着一些特有的蠕虫动物,通常在这样深的海底是没有底栖生物生存的。

## 4 海底天然气水合物的生物判别标志

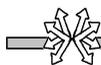
选择培养与海底天然气水合物形成密切相关的微生物,是海底天然气水合物现场分析调查的重要辅助手段之一。但是由于目前分离培养技术的限制,加上对许多海洋细菌的营养要求、培养条件等知之甚少,因此未能有效的对许多已知类群的海洋细菌进行分离培养,导致应用常规的分离培养方法无法全面反映海洋微生物的资源状况<sup>[27]</sup>,即使是在普通环境中,可培养的微生物也仅占微生物总种群数的 0.01% ~ 10%<sup>[28]</sup>,而可培养的微生物所占比例则更少。而且对微生物进行选择培养时往往加入了浓度远高于自然状况的营养物质,其结果是在新的选择压力下群落结构通常会发生变化,适应富营养条件的菌种成为优势种,取代了自然条件下的优势种。

近年来,分子生物学技术开始广泛应用于微生物群落结构分析,且发展非常迅速。研究的焦点集中在具有保守序列的 16S rDNA 上。研究方法包括分子杂交法<sup>[29]</sup>、聚合酶链式反应法(PCR)<sup>[30]</sup>、克隆基因文库分析法<sup>[31]</sup>,以及采用基因指纹图谱技术的单链构象多态性法(SSCP)<sup>[32]</sup>、变性梯度凝胶电泳法(DGGE)<sup>[30]</sup>、温度梯度凝胶电泳法(TGGE)<sup>[33]</sup>、限制性酶切片段长度多态性法(RFLP)<sup>[34]</sup>、限制性酶切末端

片段长度多态性法 (T-RFLP)<sup>[35]</sup> 等, 具有很高的灵敏性, 与传统的培养方法或其它不依赖培养技术的方法相比显示出明显的优越性, 推动了微生物多样性研究的快速发展。因此, 针对重点采样区域, 通过微生物群落和多样性分析, 研制出特定细菌的 DNA 探针 (DNA probe), 为人们在现场通过特定的微生物群落特征及特定的细菌生物标志 (biomarker) 来探测天然气水合物的存在提供了极大的可能和非常有用的工具。

**参考文献:**

- [1] Kvenvolden K A. Gas hydrate as a potential energy resource-A review of their methane content[A]. In Howell, D.G. (ed): The Future of Energy Gases, USGS Professional Paper 1570 [C]. London: Academic Press, 1993, 555-561.
- [2] Macdonald G. Role of methane clathrates on past and future climate[J]. **Climatic Change**, 1990, 16:247-281.
- [3] Yamao M, Alcauskas J, Crozier T. Solubility of methane in distilled water and sea water[J]. **Journal of Chemical and Engineering Data**, 1976, 21:78-80.
- [4] Sloan E D. Clathrate Hydrates of Natural Gas [M]. New York: Marcel Dekker Press, 1990.
- [5] Bernard B, Brooks J M, Sackett W M. A geochemical model for characterization of hydrocarbon gas sources in marine sediments[A]. In: Proceeding 9th Annual Offshore Technology Conference [C]. Houston: Offshore Technology Conference, 1977, 435-438.
- [6] 狄永军, 郭正俯, 李凯明, 等. 天然气水合物成因探讨 [J]. **地球科学进展**, 2003, 18(1): 138-142.
- [7] Cavicchioli R, Thomas T. Extremophiles[A]. In: Lederberg J, Alexander M, Hull R, et al (eds). Encyclopedia of Microbiology (2<sup>nd</sup>) [C]. London: Academic Press, 2000, 3:317-337.
- [8] Sowers K R. Methanogenesis[A]. In: Lederberg J, Alexander M, Hull R, et al (eds). Encyclopedia of Microbiology (2<sup>nd</sup>) [C]. London: Academic Press, 2000, 2:204-225.
- [9] Marchesi J R, Weightman A J, Cragg B A, et al. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis [J]. **FEMS Microbiol Ecol**, 2001, 34:221-228.
- [10] Schoell M. The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins [J]. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 1980, 44(5): 649-661.
- [11] Whiticar M J, Faber E, Schoell M. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation-isotope evidence[J]. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 1986, 50(5): 693-709.
- [12] Sassen R, MacDonald I R, Guinasso N L J, et al. Bacterial methane oxidation in sea-floor gas hydrate: significance to life in extreme environments[J]. **Geology**, 1998, 26:851-854.
- [13] Boetius A, Ravenschlag K, Schubert C J, et al. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane[J]. **Nature**, 2000, 407: 623-625.
- [14] Thiel V, Peckmann J, Seifert R, et al. Highly isotopically depleted isoprenoids: molecular markers for ancient methane venting[J]. **Geochim Cosmochim Acta**, 1999, 63:3 959-3 966.
- [15] Valentine D L, Reeburgh W S. New perspectives on anaerobic methane oxidation [J]. **Environ Microbiol**, 2000, 2:477-484.
- [16] Lanoil B D, Sassen R, Myron T, et al. Neelson. *Bacteria and Archaea* physically associated with Gulf of Mexico Gas Hydrates[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001, 67(11): 5 143-5 153.
- [17] Kuhs W F, Klapproth A, Gotthardt F, et al. The formation of meso- and macroporous gas hydrates[J]. **Geophys Res Lett**, 2000, 27:2 929-2 932.
- [18] Hoehler T M, Alperin M J, Albert D B, et al. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium[J]. **Global Biogeochem Cycles**, 1994, 8:451-463.
- [19] Thomsen T R, Finster K, Ramsing N B. Biogeochemical and molecular signatures of anaerobic methane oxidation in a marine sediment[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67:1 646-1 656.
- [20] Orphan V J, House C H, Hinrichs K, et al. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments [J]. **Microbiology**, 2002, 99(11): 7 663-7 668.
- [21] Balows A, Truber H G, Dworkin M, et al. The Prokaryotes [M]. New York: Springer-Verlag Press, 1992.
- [22] Brooks J M, Cox H B, Bryant W R, et al. Association of gas hydrates and oil seepage in the Gulf of Mexico [J]. **Org Geochem**, 1986, 10:221-234.
- [23] Kennicutt M C, Brooks J M, Denoux G J. Leakage of deep, reservoired petroleum to the near surface of the Gulf of Mexico continental slope [J]. **Mar Chem**, 1988, 24:39-59.
- [24] Li L, Kato C, Horikoshi K. Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area [J]. **The Japan Trench Marine Biotechnology**, 1999,



- 1:391-400.
- [25] Tyler P A , German C R , Ramirez-Liodra E , *et al.* Understanding the biogeography of chemosynthetic ecosystems[J]. **Oceanologica Acta** , 2003 , 25 :227-241.
- [26] 于晓果,李家彪. 天然气水合物分解及其生态环境效应研究进展[J]. **地球科学进展** ,2004 ,19(6) :947-954.
- [27] Boivin-Jahns V , Bianchi A , Ruimy R , *et al.* Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1995 , **61** (9) : 3 400-3 406.
- [28] Amann R I , Ludwig W , Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. **Microbiol Rev** , 1995 , 59 :143-169.
- [29] Bach H J , Errampalli D , Leung K T , *et al.* Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization [J]. **Appl Environ Microbiol** ,1999 , 65 :3 226-3 228.
- [30] Murray A E , Hollibaugh J T , Orrego C. Polygenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16s rDNA fragments [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1996 , 62 :2 676-2 680.
- [31] Rondon M R , August P R , Bettermann A D , *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms[J]. **Appl Environ Microbiol** , 2000 , 66 : 2 541-2 547.
- [32] Lee D H , Zo Y G , Kim S.J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-conformation polymorphism[J]. **Appl Environ Microbiol** , 1996 , 62 :3 112-3 220.
- [33] Felske A , Akkermans A D L. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints[J]. **Appl Environ Microbiol** , 1998 64 :4 581-4 587.
- [34] Acinas S , Rodriguez-Valera F , Pedro-Alio C. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA [J]. **FEMS Microbiol Ecol** , 1997 , 24 :27-40.
- [35] Liu Wen-Tso , Marsh T , Cheng H , *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1997 , 63 : 4 516-4 522.