

氧气对生物早期降解影响的实验模拟 ——以小型鱼类肠道微生物降解为例

王 伟¹⁾ 叶法丞¹⁾ 尚庆华²⁾ 刘 静¹⁾ 盖永华¹⁾ 刘欣春¹⁾ 曹长群¹⁾ 陈孝政¹⁾

1) 中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008, weiwang@nigpas.ac.cn;

2) 中国科学院古脊椎动物与古人类研究所, 北京 100044

提要 一般研究中,通常将类似澄江动物群或关岭动物群为代表的生物软体印痕化石保存归因为与缺氧环境等有关的特异条件。本文关注到通常与化石降解和埋藏有关的缺氧环境推测并没有表达机理和成立条件;生物体内自身携带大量的微生物可能对生物的降解作用需要得到重视。为证实水体中氧气含量与生物非矿化组织印痕保存间的关系,本文通过设计条件控制(太湖银鱼, 30℃, 无菌纯净水、无外界微生物)进行有氧和缺氧环境的对比实验。该条件下的模拟对比实验研究证实:1)总体来说生物降解过程在有氧和缺氧环境下具有相似的降解速度;2)两者的降解实验在前期有短暂的差异,而 144 小时(6 天)后有氧和无氧环境具有基本一致的降解速度和程度,其中较多样本 6 天后在缺氧环境的降解速度略高于有氧环境,短时间(6 天)的降解差异是否会造成矿化差异有待研究;3)生物体本身携带的以肠道微生物为主的好氧和兼性厌氧微生物,足以使生物以蛋白质为代表的器官结构产生相似的破坏性降解,在本研究中是主要的降解因素;4)实验中所检出的生物体肠道内普遍存在的兼性厌氧微生物,可能是导致有氧和缺氧环境具有相似降解过程的主要原因;5)生物降解过程早期由于蛋白质的降解,微环境趋向于弱碱性而非一般推测的酸性;6)在实验设定条件下的有氧环境和缺氧环境对化石的形成和保存的早期过程相似,其他理化条件下的降解过程和结论需要进一步实验证实。

关键词 生物降解 实验模拟 微生物 缺氧环境 化石特异保存 澄江动物群 关岭动物群

1 引言

以软体或非矿化组织印痕或立体保存为代表的化石特异保存,通常被认为是与特殊的保存条件有关,其中之一是与缺氧环境有关。这一观点在教科书上被广泛表述,如“氧化环境中有机质容易腐烂,而还原条件下有机质容易保存”(杜远生、童金南, 1998);再如:“在氧气存在时,降解通常较快,而随着降解的进行氧气逐渐消耗完以后,所处的厌氧环境会让降解速度下降,特别是复杂有机物往往难以在缺氧环境下降解”(Allison, 2001);Stewart 和 Rothwell(1993)推测认为,较深水中植物可以较好地保存,是因为保存条件变为缺氧环境。这些观点在国内外教科书中的“集体”表述,使“缺氧或还原环境有

助于化石的特异保存”成为共识。当然,Allison (1988)的实验则半定性地发现,快速埋藏及其相应的还原环境并不有助于生物非矿化组织的特异保存,其研究设计方案和实验结果不足以说明有氧和缺氧之间的相互关系和降解的过程及机理。以澄江动物群为代表的 BST(布尔吉斯页岩型特异保存“Burgess shale type largerstatten”的简称)的特异保存也并不单独指向缺氧环境(Babcock *et al.*, 2001),而可能还有其他原因,如快速埋藏(Babcock *et al.*, 2001; Allison, 1988; Zhu *et al.*, 2005)。因此,我们需要了解缺氧环境到底是否起到关键作用,是共同作用还是其他原因等等,就需要了解缺氧环境的作用程度或实际影响,特别是缺氧环境有利于保存化石软体印痕的具体条件和背景。

早期生命不同组织或器官的降解和埋藏的讨

收稿日期: 2011-04-11

论,对化石形态所表达的解剖学意义非常重要(Morris and Robison, 1986; Briggs, 2003, 2010; Sansom and Gabbott, 2010),如Gaines等(2008)认为布尔吉斯页岩和澄江帽天山页岩保存了重要的生物解剖学信息,很多非矿化组织的生物细节在化石中的保存信息(或称BST)(Lin and Briggs, 2010; Lin *et al.*, 2010; Allison and Briggs, 1993; Allison and Brett, 1995; Bottjer *et al.*, 2000; Orr *et al.*, 2003; Gaines *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010),为深入了解古生物特征、演化及其生态环境细节等提供了更加详尽的依据(Babcock *et al.*, 2001)。以BST为代表的特异埋藏库的埋藏原因的讨论和推测研究非常丰富,如快速埋藏(Allison, 1988; Zhu *et al.*, 2005)、缺氧环境(Babcock *et al.*, 2001; Gaines *et al.*, 2005)、埋藏地理环境如河口环境等(Jin *et al.*, 1991; Moore and Lieberman, 2009);各种矿物如粘土矿物、磷酸盐化、硅酸盐化、黄铁矿化等等的指示意义(Butterfield, 2003; Lin, 2006; Butterfield *et al.*, 2007),如Jin等(1991)根据澄江动物群保存围岩的不同粘土矿物的组成,提出可能与正常溶氧量的河口或三角洲前缘等环境有关。

随着新的技术手段的普及,常规的物质组成的研究手段越来越多地得到应用,如对化石表面的元素或矿物组成的研究等等(Zhu *et al.*, 2005; 蔡耀平等, 2006; Lin *et al.*, 2010),但这类研究中需要充分考虑更多的降解-矿化过程和微环境因素,如生物不同器官组织在化石化过程中的选择性矿化问题等等。要了解这些问题,实验模拟方法显然具有优势,因而越来越得到关注,使得例如降解和早期成岩过程或化石化的实验模拟成为研究的重点(Briggs and Kear, 1993b, 1994; Hof *et al.*, 1997; Sagemann *et al.*, 1999; 陈孝政等, 2007; Chen *et al.*, 2009; 邓辉等, 2010)。如近期有实验研究认为生物体不同器官的降解可以形成不同的自生矿物(Butterfield, 2002; McNamara *et al.*, 2006, 2009)。由于大量的分析设备可以对多种标志物进行较准确的定量研究,在近期研究中,降解过程中的有机标志物等产物的检测分析使用相对活跃(Briggs and Kear, 1993a, b; Briggs *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005, Gupta *et al.*, 2006, 2009),如现代节肢动物为材料的降解实验,及几丁质降解的研究中,常以分子生物标志物的检测分析数据作为研究对象(Briggs and Kear, 1993b, 1994; Hof *et al.*, 1997; Sagemann *et al.*, 1999)。而对比BST的澄江动物群,三叠纪的关岭

动物群等(孙作玉等, 2004; 王立亭等, 2001; 汪啸风等, 2009; 王尚彦等, 2005)的特异保存的讨论研究中实验对比方法的报道则相对较少,有些软体印痕同样代表更有意义的生物解剖学特征,深入的研究同样需要实验模拟来做必要的条件证实。利用现代生物样本的不同器官的降解实验研究明显取得了很有意义的进展(McNamara *et al.*, 2009; Sansom *et al.*, 2010),并可以提供有意义的借鉴。尽管有推测认为缺氧环境有利于有机物的保存,但对于化石所表达的生物学意义,以软组织形态的保存为代表的器官形态的解剖学意义,和生物体一般有机物或分子碎片的保存是不同的,而我们应该更关心的是前者的降解和保存环境,也就是说,降解过程中的最早阶段,亦即蛋白质为主的器官的早期降解阶段。换句话说,相对于有机物的降解所代表的化学降解,与非矿化组织或软体组织密切相关的蛋白质组织及器官以及微生物为代表的降解过程的了解,更加有助于我们认识其解剖学和分类学的意义。

尽管现有的观察和推测为研究化石特异埋藏提供了很多值得借鉴的成果,而通过参照的现代环境对比条件和控制,来了解降解和矿化过程的实验实证方法,可以了解化石形成的过程、类型和保存程度及化石的形成条件等提供可以实验模拟和第三方验证的资料和数据。对化石中生物解剖结构的认识和理解,需要基于对化石保存过程及保存过程中解剖结构的改变的认识。不同理化条件下生物软组织的降解过程和步骤,以及最终的保存状态等特征是否会发生变化,有可能通过有条件控制的实验进行逐步证实。虽然影响生物降解的因素可能会有很多,但首先通过对简化的条件控制,如单独改变温度、水介质、水体溶氧量等的简单过程的模拟实验,才能为最终通过综合各种简单因素的控制条件,以及可能的综合条件控制的复杂过程的认识提供基础。相对来说有关化石保存过程中水体含氧量与降解速度和降解程度的关系,实验条件设计相对简单,但对已有的理论和推测可以提供实证建议,使其更有说服力。正如Kristensen等(1995)通过对硅藻和麦秸的降解实验认为,这些材料的降解速度与有氧和无氧并没有关系,而与其物质组成有关。缺氧环境到底是否与BST等的保存有关,一直存在争论(Jin *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 2003; Moore and Lieberman, 2009),如Babcock等(2001)发现并不是所有的BST都与缺氧环境有关。本研究试图通过逐步设定有条件的实验控制,及在某一或某些设定

的条件下,了解生物软组织的降解过程中与氧气存在与否的关系,为“缺氧条件下有助于生物软组织保存”的推测提供依据,抑或为这一推测或观点的成立提供前提条件和适用范围。而了解人工控制的缺氧环境(包括设计水体溶氧量远低于地表自然环境作为模拟缺氧环境),和正常开放环境(大气联通)之间的对比,可以为定性或半定量地了解氧对于降解条件的影响提供实证依据,并以此对降解的中间过程和步骤有所了解。

2 实验目的及设计

利用现代生物的降解实验(Briggs, 1995; Raff *et al.*, 2008; 陈孝政等, 2007; Chen *et al.*, 2009; 邓辉等, 2010)是目前了解化石保存条件和环境的常用手段,通常被用到的材料很多,如虾类(Plotnick, 1986; Briggs and Kear, 1994); 多毛类(Briggs and Kear, 1993a); 代表性节肢动物(Gupta *et al.*, 2006); 蛙类(McNamara *et al.*, 2009); 七鳃鳗和盲鳗(Sansom and Gabbott, 2010; Sansom *et al.*, 2010)以及鸟类(Davis and Briggs, 1998)等等。

本研究主要目的是为了了解所选择的生物样本(如脊椎动物的鱼类),在设定的条件下(本研究设定 30°C)、在纯水中的降解速度与水体含氧量是否有关。即通过实验了解在设定的理化条件下,在有氧和缺氧环境中所选择的生物样本的降解速度及其过程是否存在差异,特别是生物非矿化组织结构在这两种条件下的降解程度和过程。本文只讨论在设计条件下的实验结果,即:本研究设定的 30°C、灭菌 Millipore 纯水环境、无外界微生物影响(移除非样本生物自身来源),以及对比:a)大气环境,b)厌氧培养箱(气体介质的超低氧气环境:O₂含量<5ppmv,远小于显生宙地球表面最低大气含氧量)中的降解特征和过程。作为实验方法,所有的结论和结果只有在设定的前提条件下成立,实验结果并不支持在设定条件之外也有类似的结果和结论。选择有氧和无氧(大气环境和厌氧培养箱)这两个端点的条件,而不是选择其他的中间过程,主要考虑到端点条件控制有利于预测中间条件的可能结果(在没有更多实验实证之前,端点条件的结论未必适用于中间条件的结果)。

2.1 控制条件及设计目的

(1)含氧与缺氧条件对比,样本的对比实验在恒

温培养箱(赛福智能光照培养箱,产地:宁波;空气介质:大气,O₂含量~210 000 ppmv)和厌氧培养箱(Don Whitley Scientific mini MAC Anaerobic Workstation,产地:英国,标称 O₂含量<5 ppmv)中进行。目的是了解相同样本在有氧和缺氧环境下降解结果和过程的差异。

(2)鉴于微生物在生物降解,特别是软组织(非矿化组织)保存中的重要作用(Whitman *et al.*, 1998; Sogin *et al.*, 2006),为了便于研究观察,本实验设计关注微生物在有氧和缺氧状态下的降解差异。因此,为便于有效控制实验速度,方便观察和过程研究,参考一般微生物的最佳繁殖条件,本实验设计温度为 30°C。本设定在自然环境中并不具有普遍意义,但有助于实验研究的简化和观察的方便。

(3)由于生物降解时环境微生物不尽相同,不同的微生物群落对生物相关组织的降解结果也不尽相同,复杂的微生物种类组成不利于了解设定条件的影响结果的研究,因此本研究的设计控制条件之一是试图了解生物样本本身携带的微生物(主要指肠道微生物)对生物体软组织或非矿化组织降解的影响。同时需要说明的前提是:a)在不同生物体携带微生物在本研究设计材料和降解条件下的影响尚未认识之前,本研究的结果只表示本设计材料的降解特征,不代表其他生物体内携带的微生物也有相同的降解特征。b)由于本研究设定的理化条件,除了气体介质包括含氧量不同以外,其他条件均一致,因此假定造成两者差异或类同的因素是由于空气介质的含氧量不同所致。c)在尚未得到其他因素可能对两者的降解有影响的实际证据之前,本研究设定在:常压、30°C、无氧纯水、无外界微生物等条件之外,不考虑未知因素对降解的控制和影响。

(4)为除去外界微生物对生物体降解的影响,本研究使用广谱抗菌素(氨苄: Ampicillin 50 μg/mL)进行处理。处理方法为如下:冰冻的银鱼样品(太湖短吻银鱼, *Neosalanx tangkahkeii taihuensis* Chen, 鲱形目鲑鳟亚银鱼科)常温下放入 Millipore 纯水中解冻,解冻后挑出外表完整的银鱼放入烧杯中。用 Millipore 纯水反复清洗鱼表面 5 遍,用灭菌镊子轻轻取出放入灭菌的烧杯中,并用灭菌水清洗 5 遍以上;然后放入 50 μg/mL 氨苄(Ampicillin)水溶液中 4°C 12 小时。氨苄处理后的银鱼用 4°C 的无菌水清洗 5 遍以上,尽量洗去并稀释样品表面的抗生素残留。处理后的银鱼尽快放入不同介质含氧量的实验环境的 10 mL 试管中开始实验内容。本研究选择

氨苄是因为它可以快速降解,在去除外界微生物的同时不会影响样本的生物组成,特别是不会造成蛋白质等器官主要构架物质的变性。这种清除外界微生物影响,并且不破坏生物组织的方法在生物学和医学研究中已经得到较为广泛的应用(Walsh *et al.*, 1991; Anderl *et al.*, 2000; Wessel *et al.*, 2002; 任红梅等, 2010)。

(5)平行样本设计及其意义:尽管本设计实验研究中选择大小基本一致的样本(太湖银鱼),但每个个体体内所携带的微生物种类和多少没有确切的依据,样本生存时的实际健康状况也无法确切认识,因此,本研究进行平行样本研究,即每种条件为3组独立样本,以保证了解降解过程的一般性规律。

2.2 实验步骤及内容

(1)实验材料和环境:市售新鲜速冻太湖短吻银鱼,产地:安徽巢湖,长3.5—3.6 cm。灭菌及脱氧的2次蒸馏水(Millipore 纯水 121℃灭菌 30min);广谱抗菌素(氨苄钠盐: Ampicillin-Sigma, 50 μg/mL)。

实验环境:普通恒温培养箱(赛福智能光照培养箱)、厌氧培养箱(Don Whitley Scientific mini MAC Anaerobic Workstation, O₂含量<5 ppmv)。

(2)实验分析方法及设备:数控连续扫描紫外分光光度计(1800PC 紫外分光光度计,上海美谱达)用于分析测定不同样本溶出液,在不同波长的透光率或吸光度,以半定量或定性地了解微生物繁殖浓度(580 nm 测定 OD 值),以及小分子肽或蛋白质片段的浓度(220—280 nm 附近)。每个分析结果都是在扣除脱氧二次蒸馏水背景后所得的透光率曲线(秦宗会等, 2003; 倪一等, 2004, 王乐新等, 2007)。

(3)实验步骤:1 完整的太湖银鱼用无菌水洗5遍,每次1000 mL,滤干水,用灭菌后的镊子轻轻放入50 μg/ml Ampicillin 溶液中,4℃12小时。取出经过氨苄浸泡的银鱼,放入灭菌的烧杯中用4℃无菌水清洗5遍以上,以稀释氨苄浓度。用灭菌的镊子取出置于加有脱氧灭菌的 Millipore 纯水的离心管中,分别放置在30℃的恒温培养箱和厌氧培养箱中进行降解反应。

(4)平行样品:鉴于样品本身大小基本相当(表面完整,长度3.5—3.6 cm),选取120枚经过表面灭菌处理的银鱼样本,置于10 ml 已经装好8 mL 灭菌的 Millipore 纯水中的离心管中,恒温培养箱和厌氧培养箱中各放60个样品。特定时间每次同时从

两个培养箱中取出3个样品为一组进行分析和观察。

(5)微生物鉴定步骤和结果:来自厌氧和有氧条件下的银鱼降解液,分离的13株细菌总DNA用 TransGen 的 Easy Pure Genomic DNA Extraction Kit 提取。细菌基因组DNA为模板PCR扩增16S rDNA,扩增引物设计为BF(5'-3'): AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG, BR(5'-3'): TACCTTG-TTACGACTTCACCC,引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR反应体系选用20 μL 反应体系,条件:94℃10 min;94℃45 s,60℃60 s,72℃70 s,20个循环;72℃10 min。PCR产物纯化、测序由北京华大公司完成。分离出的微生物至少5种,均属于肠道寄生微生物,肠杆菌属,兼性厌氧。将菌株的16S rDNA 序列输入 GenBank 核酸序列数据库进行比对,初步BLAST的结果几株分离的杆状细菌都属于变形菌亚门(Proteobacteria),有嗜麦芽寡养(窄食)单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.),阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),泛菌属(*Pantoea* sp.)等。

3 实验结果

1.1 不同时间下降解过程中溶出有机物浓度变化

根据上述实验,本研究对溶出有机物进行吸光度分析,以了解微生物降解作用程度的浊度变化和以有机大分子为代表的溶出有机物,随时间等条件改变的变化特征。

(1)有机溶出物的透光率。插图1和插图2表明不同时间下所取出的样本的透光率随时间的变化。很明显,随着时间的推移,无论有氧环境或是缺氧环境,溶液中的透光率都明显快速增加,说明生物体内携带的微生物在本研究设计的控制条件下,对生物体有机物的降解作用具有相似的速度。以波长280 nm左右为代表的大分子有机物的吸光区间,如258 nm附近的吸收峰由苯丙氨酸产生,275 nm附近的吸收峰由酪氨酸引起,280 nm附近的吸收峰由色氨酸产生,这三种芳香族氨基酸均含有共轭双键,受到紫外光的照射而产生π跃迁。所以样品在280 nm附近的吸收峰主要由蛋白质中的芳香族氨基酸所产生。实验发现,无论在有氧环境还是在无氧环境中,有机大分子透光率都快速地下降,说明有氧环境或无氧环境中,生物降解过程所产生的这些

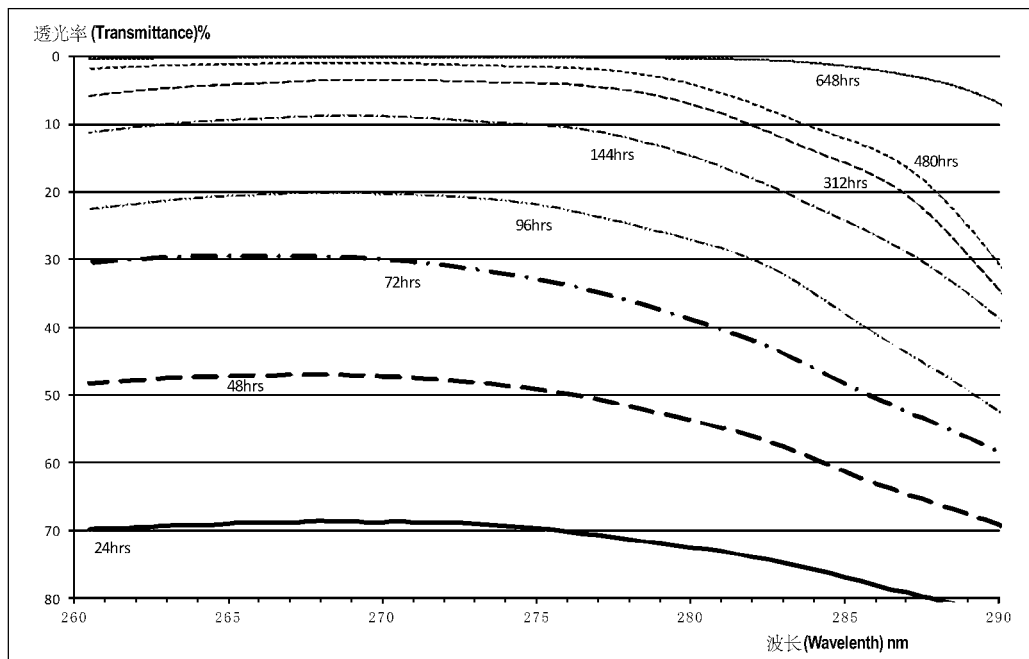


插图1 无氧环境(厌氧环境)中太湖银鱼降解产物的透光率随时间的变化

Transmittance-wavelength scanning of decay products under anoxic conditions at 30°C by UV-Vis spectrophotometer from 24 to 648 hours

不同间隔时间(小时)下,太湖银鱼(*Neosalanx tangkahkeii taihuensis* Chen)在缺氧环境中平行样品降解实验溶液透光率的变化($\lambda=260-290\text{ nm}$ 为部分典型氨基酸的透光率测定波长范围,每一条线对应数值为平行样品均值,分析结果已扣除本底)。分析结果数值表明,72小时后生物氨基酸溶出明显增加,144小时后溶液变得非常浑浊,降解产物浓度相当高(以10%透光率为对比条件)。由于后期的吸光度值太高,所测的数据不准确,故以观察对比为主;约300小时后,样品基本完全破裂。外观观察发现,对比有氧或开放环境实验,缺氧环境的后期降解程度快于有氧环境。

Surface's microbes removed whole body species of small fish *Neosalanx tangkahkeii taihuensis* Chen specimens of comparable size were sunk into double distilled water of 10 ml tubes, and all tubes were put inside of anaerobic incubator. Transmittance of the decayed solutions from the tubes were measured at range of $\lambda=260-290\text{ nm}$ (for analysis of amino acids). Each transmittance curve was based on the average of three parallel sample tubes from which a blank control tube of H_2O was deducted. The decreasing transmittance reflected the increase in concentration of the amino acids released from the decaying fish into aqueous solution, the rate of increase of concentration increasing relatively quickly in the first 72 hours, and after 6 days (144 hours), transmittance decreased to 10%, the solution appeared visibly turbid to the naked eye and the samples were considerably decayed. These results after 144 hours compare with those under oxic conditions after 72 hours, reflecting an initially slower rate of decay under anoxic conditions. In both oxic and anoxic conditions, by about 300 hours nearly all the fish samples became deformed and broken, and fragments including muscle tissue were released from the bodies as they began to disintegrate. General observation showed however that both the concentration of debris and the deformation of the fish were somewhat greater under the anoxic conditions than the oxic ones during the subsequent period. Analysis of the microbiological composition of the solutions showed that certain dominant microbe species occurred in the anoxic conditions whereas under oxic conditions there was a mixed microbial community without any particular dominant species. This may explain why the decay rate was faster after 300 hours in the anoxic environment.

有机大分子均大量的进入溶液,并且具有相似的速度。

(2)pH值的变化。通常情况下,生物刚刚死亡,生物自身酶首先开始参与降解过程,生物体内酶参与的降解把肌肉内的糖原等氧化成乳酸和磷酸,会出现很短时间如不同条件下有数十分钟或数小时不等的pH的下降,这一观点在本研究的拟合曲线

中也有可能体现,即实验开始阶段($t=0$)时曲线的截距分别为4.5和4.8的弱酸性。但以微生物为主的降解作用开始后,即对蛋白质降解开始以后,由于产生大量 NH_3 ,使溶液中的pH快速上升。pH的上升说明此时的降解过程以蛋白质的降解为主,相似的研究报道也出现在对现代生物(盲鳗和七鳃鳗)降解的对比研究中(Sansom and Gabbott, 2010)。

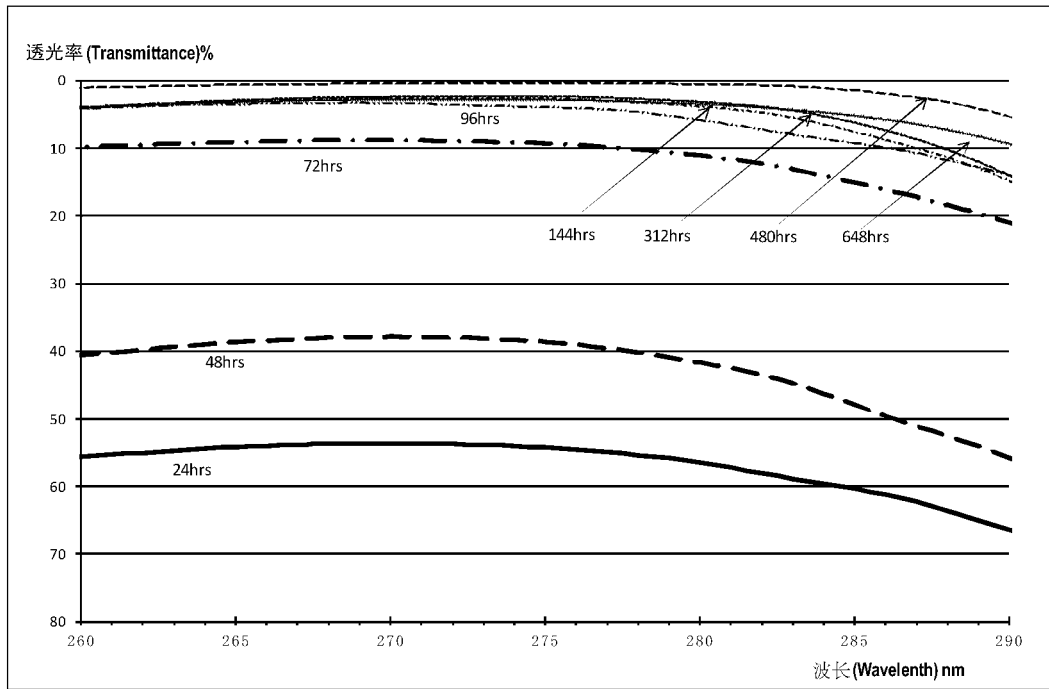


插图2 开放环境(有氧环境)中太湖银鱼降解产物的透光率随时间的变化

Transmittance-wavelength scanning of decay products under oxic conditions
at 30°C by UV-Vis spectrophotometer from 24 to 648 hours

不同间隔时间(小时)下,开放环境(有氧环境)中太湖银鱼(*Neosalanx tangkahkeii taihuensis* Chen)平行样品降解实验溶液透光率的变化($\lambda=260-290\text{ nm}$ 为部分典型氨基酸的透光率测定波长范围,每一条线对应数值为平行样品均值。分析结果已扣除本底)。分析结果数值表明,48小时后生物氨基酸溶出明显增加,72小时后溶液变得非常浑浊,降解产物浓度相当高(以10%透光率为对比条件)。由于后期的吸光度值太高,所测的数据不准确,故以观察对比为主;约300小时后,样品基本完全破裂。外观观察发现,对比有氧或开放环境实验,缺氧环境的后期降解程度快于有氧环境。

Transmittance from oxic decay was particularly marked between 48 and 72 hours after the start, and decreased remarkably quickly to 10%, after only 3 days (72 hours), when the oxic samples too had become deeply decayed as for the anoxic samples but in that case only after 144 hours. As mentioned previously the results for both oxic and anoxic conditions were comparable at about 300 hours, but general observation indicated that subsequent deformation and disintegration of the fish bodies was greater in the anoxic conditions.

3.2 有氧环境和无氧环境的差异

当然,有氧环境和无氧环境两者的差异也是明显的,主要在以下方面:

(1)不同环境中透光率的差异:有氧环境中透光率在前72 hrs就达到10%,而无氧环境则要在144 hrs才到,说明两者降解速度的差异在72 hrs左右。到10%以后,微生物总量基本相当,两者具有相似的降解结果并渐趋接近,降解产物的测量分析数据即产物的吸光度值和时间之间是对数关系。

(2)pH值的变化。有氧环境和无氧环境具有相似的启动时间,只是二者的差异有约72 hrs的时间先后,亦即72 hrs后两者的pH呈接近线性上升,并具有微生物繁殖所特有的对数关系。至于pH值绝对变化,即无氧环境的pH值明显低于有氧环境,

初步推测主要是因为无氧环境的气体介质以二氧化碳10%,氢气10%,氮气80%组成,正是由于厌氧培养箱的 CO_2 浓度(100 000 ppm)远高于大气环境的380 ppm,相对来说厌氧培养箱环境是一个偏酸性的环境。同时,生物体后期降解产生的 NH_3 可能被高浓度的 CO_2 中和导致pH的总体偏低,但真正的原因尚需进一步的实验研究。

(3)实验结果有待深入研究的问题:1)溶出物的分子结构及物质组成未及研究,但不影响对降解过程的认识;2)缺氧环境气体介质中的 CO_2 对微生物的繁殖条件甚至降解过程影响有待进一步研究。可能的实验证据是:二者的初始水体由于环境介质气体不同所致的pH有差异,但相对有氧环境,后期缺氧环境中降解速度并未加快是否也是由于 CO_2 影响,目前尚无条件证实。

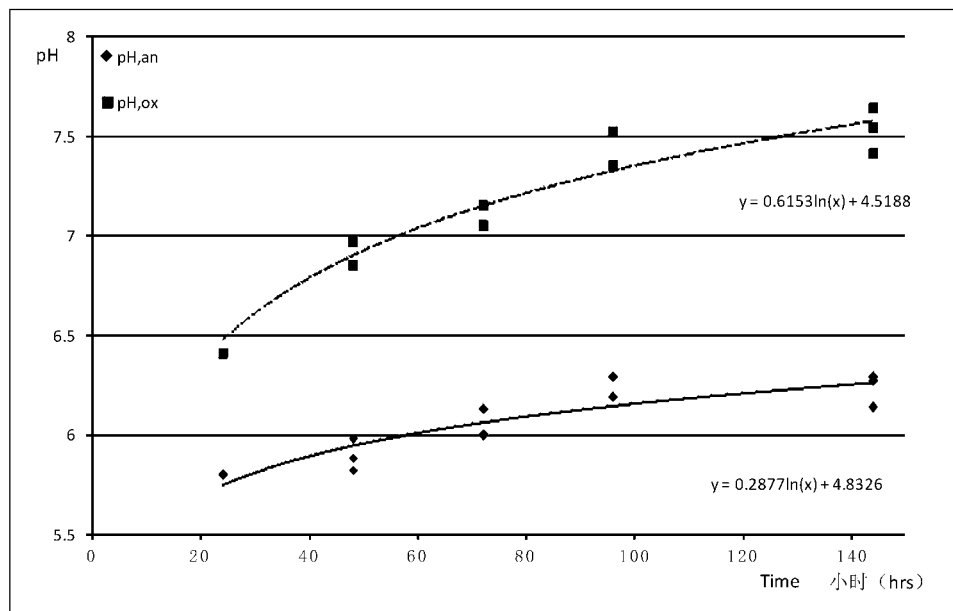


插图 3 有氧环境(pH,ox)和无氧环境(pH,an)的 pH 随时间的变化

Decay history and pH in oxie and anoxic condition

本图表明样本生物降解的微环境的酸度并不随降解的进行而使微环境趋向酸性,相反地是更加变得趋向碱性,这个变化的趋势和速度跟一般微生物繁殖的对数规律基本一致。有氧环境总体的 pH 高于缺氧环境是因为厌氧培养箱的气体介质中有大量的 CO₂ 气体而使整体环境呈现酸化。拟合曲线表明,降解开始阶段(t=0)二者具有相似的微环境酸度(4.5 和 4.8),24 小时后由于蛋白质降解的氨释放使环境逐渐向碱性转变。

The pH-decay history curve illustrates the increases in pH with duration of decay history, showing that it rose in both oxie and anoxic experimental conditions. Such increases of pH with decay are unusual for microbial decay but have also been reported by Sansom and Gabbott (2010) during decay of Lamprey and Hagfish. The lower value in the anoxic conditions was caused by the anaerobic incubator filled with higher concentration of CO₂. Time-fitting curves show that the samples had a similarly low pH condition inside fish body's microenvironment at the start of the decay process (t=0): oxie to 4.5, anoxic to 4.8, and then changed rapidly to alkaline environment suggested as ammonia releasing from their protein decay by 24 hours later.

3.3 微生物鉴定结果

在有氧和无氧环境中均分离出一致的微生物至少 5 种,都属于肠道寄生微生物,肠杆菌属,兼性厌氧(Anderl *et al.*, 2000)。初步 BLAST 的结果,几株分离的杆状细菌都属于变形菌亚门(Proteobacteria),包括:嗜麦芽寡养(窄食)单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.),阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),泛菌属(*Pantoea* sp.)等。由于这些微生物均可以在有氧和缺氧环境中生存繁殖,本文认为这些好氧和兼性厌氧微生物的存在,是导致无论在有氧环境还是缺氧环境中,研究样本的降解过程具有相似性的原因。

4 讨论

4.1 缺氧环境的定义和标志

所谓缺氧环境,在沉积学以及现代环境研究中并不是一个完全一致的概念,沉积学研究中通常会把黑色页岩或自生黄铁矿等的出现作为地层沉积环境是缺氧环境的证据。常见的缺氧证据包括黑色页岩、盆地沉积、富含有机质地层、自生黄铁矿,抑或常常表示为还原环境的矿物、生标化合物或元素组合等等(Stewart and Rothwell, 1993; 王立亭等, 2001; 王尚彦等, 2005; 汪啸风等, 2009)。现代环境研究中缺氧环境在很大程度上以数值化为特征,如根据水体溶氧量(DO; Dissolved Oxygen, mg/L 或 $\mu\text{mol/l}$)或低氧环境的其他水化学数值指标进行分带,但如何分带仍有争论。不过基本一致的观点即缺氧带或还原带(Anoxic Zone)是以 H₂S 带高度富集为特征,并认为该带一般只存在微生物。

不同的研究报告有不同的分带观点,如根据含氧环境分为 2 个带:含氧带和缺氧带(Oxic Zone 和 Anoxic Zone, Neretin *et al.*, 2001),或 3 个带(Oxic

Zone, Suboxic Zone 和 Anoxic zone, Lam *et al.*, 2007; Diaz and Rosenberg, 2008), 也有分成 4 个带的 (Euphotic Zone, Oxycline Zone, Suboxic Zone, Anoxic Zone, Oguz *et al.*, 2000)。我们通常说的还原带 (Anoxic Zone) 在现代研究中对实际溶氧量尚有不同定义, 但基本一致的是: H_2S 带和溶氧量低于检出限。现代电化学设备一般水体溶氧量的检测方法的检测限大都高于 $1-5 \mu\text{mol/l}$, 如果水体含氧量通常低于 $1-5 \mu\text{mol/l}$ (Lam, 2007) 或 $< 3 \mu\text{mol/l}$ (Kononov, 2003), 通常表达为 $0 \mu\text{mol/l}$, 但一般会说明该值仅指低于检测限 (Oguz *et al.*, 2001; Kononov, 2003; Glazer *et al.*, 2006; Lam, 2007)。近期为了进一步了解超低水体溶氧量的特征, 有时用古细菌的氨氧化能力 (Lam, 2007)、硫同位素、Mn (II, III, IV) (Kononov, 2003) 的转化、以及 N、S 离子间的浓度转换等等进行探索 (Oguz *et al.*, 2001; Galzer, 2006; Yakushev *et al.*, 2007)。

除了数值标志以外, 现代环境研究中也以标志物进行定义的, 如现代底栖有孔虫的不同物种具有不同的耐缺氧生存能力 (Hypoxia Tolerance), 有的物种可以在正常溶氧量环境中生存 ($2-10 \text{ mg/L}$), 而有些则可以到一般生物难以生存的常常被认为是缺氧条件的环境中生存 ($< 0.5 \text{ g/L}$) (Kaiho, 1994)。该方法可以作为半定量了解缺氧环境的对比参数, 但是否可以应用到地球早期环境尚需要深入研究。

同现代环境研究的数值化分带成果相比, 有关化石保存特征的研究中并没有缺氧环境和缺氧带的数值定义, 或者地层理化指标的数字定义, 如黑色页岩中有机质或碳含量、自生黄铁矿带 Fe_2S 含量或丰度等等。而通过了解“缺氧环境有利于化石保存”的限制条件, 比如在何种前提条件下该观点成立的实验模拟, 并通过实验模拟了解缺氧环境对于生物非矿化组织矿化的机理, 同样有助于逐步理解缺氧环境与化石保存条件之间的关系。

4.2 缺氧环境定义的可能数值标志

认为在缺氧环境中可以更加有效地保存生物的软组织或非矿化组织的观点, 常常是基于这些特异保存与黑色页岩的共存性, 但是黑色页岩是否具有缺氧环境指示意义 (Schlanger and Jenkyns, 1976; Demaison and Moore, 1980), 在现代沉积学界争议颇多, 如认为缺氧并不是形成黑色页岩的主要原因, 而高的初级生产力应该更为重要 (Pedersen and

Calvert, 1990), 或者是其他如大气缺氧 (Meyer and Kump, 2008) 等也可能与地史中的黑色页岩有关。水体溶氧量在沉积物表面, 到沉积物浅层内, 溶氧量的变化则更加明显 (Revsbech *et al.*, 1980; Pischchedda *et al.*, 2008)。参照在现代研究中的缺氧环境的理化数字定义, 在探讨黑色页岩是否就是缺氧环境, 以及何种程度的缺氧环境时, 如何选择和利用黑色页岩地层的理化指标的数值化定义, 或根据黑色页岩的分类数值定义对应的古环境缺氧状态, 将有助于准确了解古环境的缺氧环境的数字意义。

缺氧环境的数值化定义中, 除了 DO 以及其他水化学物质浓度数值之外, 在有些研究中会用到氧化还原电位 (ORP 或 Eh) 来表达环境的氧化还原特征, 或是表达某一环境中相对的氧化还原状态 (Pischchedda *et al.*, 2008, Wright *et al.*, 1987, Bai, 1995)。现代环境研究中常用 ORP (或 Eh) 来表示水体的化学需氧量或水体易被氧化物质的多少。另一种可能的指标是 Fe、Ce、Mo 等 (Wright *et al.*, 1987; Bai, 1995) 的不同价态来表达环境的氧化还原条件。

现代生态学研究中的某些生物痕迹指标同样值得参照, 如有些环境中 (如沉积面之下) 的溶氧量通常会低于水体表面正常生物活动的区域, 但并非绝对缺氧。在一般生物的耐缺氧程度之下 (Bickler and Buck, 2007) 依然可以有大量生物生存, 如洞穴生物等生存繁殖 (Rosenberg *et al.*, 1991)。某种生物的耐缺氧程度之下是否可以认定为缺氧环境, 目前尚无这方面的值得信服的定义。有些低需氧量的生物可以在溶氧量比较低, 甚至被现代环境研究中定义为缺氧的环境中正常生存 (Kaiho, 1994), 更何况以微生物为代表的生物降解主力通常具有更大的耐缺氧程度, 甚至需要在无氧环境中才能生存。

4.3 不同溶氧量环境中降解速度的对比及对矿化的影响

除了需要准确了解缺氧环境的数值定义之外, 生物的非矿化组织能否保存为化石的重要机理是生物器官的降解速度和矿化速度之间的平衡。分别研究降解和矿化的动力学过程 (速度) 将有助于了解生物形成化石的过程。而在设定的理化条件下, 一般认为以理化过程为主的矿化过程基本一致, 那么影响降解速度过程的主要是生物特别是微生物作用过程。毫无疑问, 降解过程的不同阶段所产生的生物遗体周围的微环境中的理化条件的变化及其对矿化

过程的影响,则需要完成上述模拟之后进一步了解。

(1)由于微生物在生物体内和自然环境中广泛存在,微生物的作用和影响无处不在(Whitman *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 1995; Sogin *et al.*, 2006)。作为地球生物圈的主要成员,微生物在生物圈中起着举足轻重的作用,是生物降解的主要力量。微生物产生的酶可以将蛋白质、淀粉、纤维素甚至几丁质等分解或降解成小分子,其中大部分是可以在水中溶解的有机物质,如一些氨基酸和糖类等。微生物对化石保存的影响不但在上述降解过程的研究中得到进一步的重视,在研究化石的形态学和解剖学等方面,也越来越得到关注(Sansom *et al.*, 2010; Briggs, 2010; 陈孝政等, 2007; Chen *et al.*, 2009),因而对生物降解和矿化的研究,需要仔细研究和考虑微生物这一自然界降解的主要力量的影响。

(2)几乎所有的生物体都有各种各样的自身携带的微生物,这些微生物通常参与生物本身的代谢过程等生存活动,如共生、寄生互生和拮抗等等,而动物肠道则是微生物共生的主要场所。尽管自然环境中微生物种类繁多、复杂,但一般肠道共生微生物更加常见。由于某种特殊的生存环境,生物的这些自身携带的微生物种类大都以好氧和兼性厌氧为主,它们在不同溶氧量的降解环境中生存和繁殖。因此,了解这些生物自身携带的微生物对生物降解的动力学过程,特别是可能对生物非矿化组织的特异保存的影响就显得具有普遍意义。由于动物几乎毫无例外地携带有微生物,不管外界是否存在微生物,生物自身携带的微生物的降解作用就具有必然性,因此考虑生物体内微生物的降解过程和影响,比研究外界微生物对生物样本降解的影响更加重要。

作者发现,正是由于生物肠道的微生物具有好氧和兼性厌氧的特征,即既可以在有氧环境中生存繁殖,也可以在缺氧环境中生存繁殖,它们的动力学过程以及通常认为缺氧环境有利于化石保存的推测,是本研究实验的基本设计思想之一。也正是由于样本生物共生微生物的生存环境的特点,使得无论生物体在有氧还是缺氧环境中,体内自身携带的微生物均能参与降解作用,并成为参与甚至主导该研究样本降解的关键因素。至于是否因为有氧环境可能致使样本在有氧环境中降解速度比无氧环境要慢,或是因为氧气对以微生物为主的降解作用起到某种非生物的抑制作用,抑或是其他因素,还需要进一步的实验证实。实验过程中排除了有氧环境中外

界微生物的影响,主要基于:1)两者有相同的微生物种类检出,2)实验环境及器具设备在开始前均经过紫外线照射和高温灭菌处理。

(3)尽管微生物参与降解的过程是无所不在的,但不同的微生物有不同的生存繁殖条件,它们降解的对象也不相同,其降解产物也不一致,在不同的条件下也会有不同的降解速度。对于一般的以不同类型的蛋白质为主的生物非矿化组织降解的微生物,多数微生物(如有些菌群)的活跃温度在 20—40℃,其中大部分微生物在较低温度下的降解能力会变得很慢,如常见的肠道微生物酵母菌等,这就是为什么本研究的设计温度以 30℃ 为参考条件的原因。需要说明的是 30℃ 条件下的降解过程并不能说明其他温度条件下具有相同或相似的降解过程,如本研究降解产物中检出的微生物就有不同的最佳繁殖温度,如克雷伯氏菌属一般是在 37℃,而阴沟肠杆菌则在 30℃ (Barnes *et al.*, 2003)。好氧或兼性厌氧微生物,在生物体内广泛存在,是研究样本降解实验中出现有氧环境和缺氧环境的降解具有相当或类似速度的主要原因,而在检出的几种微生物中,基本上具有好氧、厌氧兼性的生存繁殖能力也证实了这一可能。

5 结 论

1)在设定 30℃ 条件下,气体介质的含氧量及与之相互平衡的溶液中溶解氧的多少,不决定研究样本(太湖银鱼)在矿化时间阶段的降解速度,或与特异保存之间的关系不明显。

2)生物内部携带的微生物可以在降解中起到重要的作用。

3)同较小分子有机物等的降解相比,以蛋白质为主的生物软体构架的降解,对于认识非矿化组织的细节保存及对化石的分类和解剖学意义更加重要。

4)在设定条件下,缺氧环境和大气环境与特异保存没有明显联系,本设定条件之外的环境或中间环境中是否也有类似的降解过程,需要进一步实验实证,但本研究的结论及其对应的设定条件可以提供参考依据。

5)在没有更多的实验研究的前提下,本研究的结论并不否认“缺氧环境有助于化石保存”的推测,仅仅为这一观点提供一种一般性的修正及前提条件。

致谢 本研究得到国家自然科学基金的资助, 在研究过程中经常得到杨群研究员领导的分子古生物研究小组的支持。中三叠世动物群和环境的野外考察期间得到王立亭研究员的协助并在讨论中获得有意义的重要信息。

参考文献 (References)

- Allison P, 1988. The role of anoxia in the decay and mineralization of proteinaceous macro-fossils. *Paleobiology*, **14**, 139—154.
- Allison P, 2001. Fossilization processes. In: Briggs D, Crowther P (eds.), *Palaeobiology II*. Oxford: Blackwell Science. 1—270.
- Allison P, Brett C, 1995. In situ benthos and paleo-oxygenation in the Middle Cambrian Burgess Shale, British Columbia, Canada. *Geology*, **23**(12), 1079—1082.
- Allison P, Briggs D, 1993. Burgess Shale biotas: burrowed away? *Lethaia*, **26**, 184—185.
- Anderl J, Franklin M, Stewart P, 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**(7), 1818—1824.
- Babcock L, Zhang W, Leslie S, 2001. The Chengjiang biota: record of the Early Cambrian diversification of life and clues to exceptional preservation of fossils. *GSA Today*, **11**(2), 4—9.
- Bai S, 1995. High Resolution Correlation, Milankovitch Cyclicality, and Nickel Event: Evidence from the Devonian of South China. Beijing: Peking University Press. 1—62.
- Barnes B, Wiederhold N, Micek S, Polish L, Ritchie D, 2003. Enterobacter cloacae Ventriculitis successfully treated with Cefepime and Gentamicin: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*, **23**(4), 537—42.
- Bickler P E, Buck L T, 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology*, **269**, 145—70.
- Bottjer D, Hagadorn J, Dornbos S, 2000. The Cambrian substrate revolution. *GSA Today*, **10**(9), 1—7.
- Briggs D, 1995. Experimental taphonomy. Tenth Anniversary Theme Issue (Dec.). *Palaios*, **10**(6), 539—550.
- Briggs D, 2003. The role of decay and mineralization in the preservation of soft-bodied fossils. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **31**, 275—301.
- Briggs D, 2010. Palaeontology: Decay distorts ancestry. 1. *Nature*, **463**(7282), 741—743.
- Briggs D, Kear A, 1993a. Decay and preservation of polychaetes: taphonomic thresholds in soft-bodied organisms. *Paleobiology*, **19**(1), 107—135.
- Briggs D, Kear A, 1993b. Fossilization of soft tissue in the laboratory. *Science*, **259**(5100), 1439—1442.
- Briggs D, Kear A, 1994. Decay and mineralization of shrimps. *Palaios*, **9**, 431—456.
- Butterfield N, 2002. Leaneohilia guts and the interpretation of three-dimensional structures in Burgess Shale-type fossils. *Paleobiology*, **28**(1), 155—171.
- Butterfield N, 2003. Exceptional fossil preservation and the Cambrian explosion. *Integrative and Comparative Biology*, **43**, 166—177.
- Butterfield N, Balthasar U, Wilson L, 2007. Fossil diagenesis in the Burgess Shale. *Palaeontology*, **50**, 537—543.
- Cai Yao-ping (蔡耀平), Hua Hong (华洪), 2006. Pyritization in the Gaojiashan Biota. *Chinese Science Bulletin (科学通报)*, **51**(20), 2402—2409 (in Chinese).
- Chen Xiao-zheng (陈孝政), Wang Wei (王伟), Liu Xin-chun (刘欣春), Xu Hong-he (徐洪河), Liu Xiao-lei (刘小雷), Meng Fan-wei (孟凡威), Cheng Jin-hui (程金辉), 2007. Experimental simulation on microbial silicification. *Acta Micropalaeontologica Sinica (微体古生物学报)*, **24**(3), 261—266 (in Chinese).
- Chen X Z, Wang W, Shang Q H, Lou Y, Liu X C, Cao C Q, Wang Y, 2009. Experimental evidence for eukaryotic fossil preservation: onion skin cells in silica solution. *Precambrian Research*, **170**(3-4), 223—230.
- Davis P, Briggs D, 1998. The impact of decay and disarticulation on the preservation of fossil birds. *Palaios*, **13**(1), 3—13.
- Demaison G, Moore G, 1980. Anoxic environments and oil source bed genesis. *AAPG Bulletin*, **64**(8), 1179—1209.
- Deng Hui (邓辉), Hua Hong (华洪), Hui Wei (惠威), 2010. Decay and disarticulation experiments of three arthropod species. *Acta Palaeontologica Sinica (古生物学报)*, **49**(3), 409—412 (in Chinese with English abstract).
- Diaz R, Rosenberg R, 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, **321**(5891), 926—929.
- Du Yuan-sheng (杜远生), Tong Jin-nan (童金南), 1988. Introduction to Paleontology and Historical Geology. Wuhan: China University of Geosciences Press. 1—212 (in Chinese).
- Gaines R, Briggs D, Zhao Yuan-long, 2008. Cambrian Burgess Shale-type deposits share a common mode of fossilization. *Geology*, **36**(10), 755—758.
- Gaines R, Kennedy M, Droser M, 2005. A new hypothesis for organic preservation of Burgess Shale taxa in the middle Cambrian Wheeler Formation, House Range, Utah. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **220**(1-2), 193—205.
- Glazer B T, Luther G W, Konovalov S K, Friederich G E, Trouwborst R E, Romanov A S, 2006. Spatial and temporal variability of the Black Sea suboxic zone. *Deep-Sea Research Part II*, **53**(17-19), 1756—1768.
- Gupta N, Cody G, Tetlie O, Briggs D, Summons R, 2009. Rapid incorporation of lipids into macromolecules during experimental decay of invertebrates: Initiation of geopolymer formation. *Organic Geochemistry*, **40**, 589—594.
- Gupta N, Michels R, Briggs D, Evershed R, Pancost R, 2006. The organic preservation of fossil arthropods: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society B*, **273**, 2777—2783.
- Hof C, Briggs D, 1997. Decay and mineralization of mantis shrimps

- (Stomatopoda:Crustacea): a key to their fossil record. *Palaios*, **12**, 420—438.
- Hu Shi-xue, Zhu Mao-yan, Steiner M, Luo Hui-lin, Zhao Fang-chen, Liu Qi. 2010. Biodiversity and taphonomy of the Early Cambrian Guanshan biota, eastern Yunnan. *Science China (Earth Sciences)*, **53**(12): 1765—1773.
- Jin Y, Wang H, Wang W. 1991. Palaeoecological aspects of brachiopods from Chiungchussu Formation of Early Cambrian age, Eastern Yunnan, China. *In*: Jin Y G, Wang J G, Xu S H (eds.), *Palaeoecology of China*. Nanjing: Nanjing University Press. 25—47.
- Kaiho K. 1994. Benthic foraminiferal dissolved-oxygen index and dissolved-oxygen levels in the modern ocean. *Geology*, **22**(8): 719—722.
- Konovalov S K, Luther III G W, Friederich G E. 2003. Lateral injection of oxygen with the Bosphorus plume-fingers of oxidizing potential in the Black Sea. *Limnology and Oceanography*, **48**(6): 2369—2376.
- Kristensen E, Ahmed S, Devol A. 1995. Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediment: Which is fastest. *Limnology and Oceanography*, **40**(8): 1430—1437.
- Lam P, Jensen M M, Lavik G. 2007. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(17): 7104—7109.
- Lin J. 2006. Taphonomy of naraoiids (Arthropoda) from the Middle Cambrian Kaili Biota, Guizhou Province, South China. *Palaios*, **21**, 15—25.
- Lin J, Briggs D. 2010. Burgess shale-type preservation: a comparison of naraoiids (Arthropoda) from three Cambrian localities. *Palaios*, **25**, 463—467.
- Lin J, Zhao Y, Rahman I, Xiao S, Wang Y. 2010. Bioturbation in Burgess Shale-type Lagerstätten—Case study of trace fossil-body fossil association from the Kaili Biota (Cambrian Series 3), Guizhou, China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **292**, 245—256.
- McNamara M, Orr P, Kearns S, Alcalá L, Anadón P, Mollá E. 2009. Soft-tissue preservation in Miocene frogs from Libros, Spain: insights into the genesis of decay microenvironments. *Palaios*, **24**(2): 104—117.
- McNamara M, Orr P, Kearns S, Alcalá L, Anadón P, Peñalver-Mollá E. 2006. High-fidelity organic preservation of bone marrow in ca. 10 Ma amphibians. *Geology*, **34**(8): 641—644.
- Meyer K, Kump L. 2008. Oceanic euxinia in earth history: causes and consequences. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **36**: 251—288.
- Moore R, Lieberman B. 2009. Preservation of early and Middle Cambrian soft-bodied arthropods from the Pioche Shale, Nevada, USA. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **277**: 57—62.
- Morris C S, Robison R A. 1986. Middle Cambrian priapulids and other soft-bodied fossils from Utah and Spain. *The University of Kansas Paleontological Contributions*, **117**: 1—22.
- Neretin L N, Böttcher M E, Volkov I I. 2001. A sulfur budget for the Black Sea anoxic zone. *Deep-Sea Research(I)*, **48**: 2569—2593.
- Ni Yi (倪一), Huang Mei-zhen (黄梅珍), Yuan Bo (袁波), Zhao Hai-ying (赵海鹰), Dou Xiao-ming (窦晓鸣). 2004. Development and current status of UV-VIS Spectrophotometer. *Modern Scientific Instruments (现代科学仪器)*, **3**: 3—11 (in Chinese).
- Oguz T, Ducklow H W, Malanotte R P. 2000. Modeling distinct vertical biogeochemical structure of the Black Sea: Dynamical coupling of the oxic, suboxic, and anoxic layers. *Global Biogeochemical Cycles*, **14**(4): 1331—1352.
- Oguz T, Murray J W, Callahan A E. 2001. Modeling redox cycling across the suboxic-anoxic interface zone in the Black Sea. *Deep Sea Research(I; Oceanographic Research Papers)*, **48**(3): 761—787.
- Orr P, Benton M, Briggs D. 2003. Post-Cambrian closure of the deep-water slope-basin taphonomic window. *Geology*, **31**(9): 769—772.
- Pedersen T, Calvert S. 1990. Anoxia vs productivity: what controls the formation of organic-carbon-rich sediments and sedimentary rocks? *AAPG Bulletin*, **74**(4): 454—466.
- Pischedda L, Poggiale J, Cuny P, Gilbert F. 2008. Imaging oxygen distribution in marine sediments. The importance of bioturbation and sediment heterogeneity. *Acta Biotheoretica*, **56**(1—2): 123—135.
- Plotnick R. 1986. Taphonomy of a modern shrimp: Implications for the Arthropod fossil record. *Palaios*, **1**(3): 286—293.
- Powell W, Johnston P, Collom C. 2003. Geochemical evidence for oxygenated bottom waters during deposition of fossiliferous strata of the Burgess Shale Formation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **201**: 249—268.
- Qin Zong-hui (秦宗会), Liu Shao-pu (刘绍璞), Jiang Hong (江虹). 2003. Spectrophotometric determination of protein with Ethyl Eosin. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)* (西南师范大学学报, 自然科学版), **28**(2): 258—262 (in Chinese).
- Raff E, Schollaert K, Nelson D, Donoghue P. 2008. Embryo fossilization is a biological process mediated by microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(49): 19360—19365.
- Ren Hong-mei (任红梅), He Zhi (何智), Yang De-ying (杨德英), Yang Guang-you (杨光友), Gu Xiao-bin (古小彬). 2010. Isolation, identification and pathogenicity of causative pathogen for muscular ulcer in *monopterus albus*. *Acta Hydrobiologica Sinica (水生生物学报)*, **34**(6): 1106—1112 (in Chinese).
- Revsbech N, Sorensen J, Blackburn T, Lomholt J. 1980. Distribution of oxygen in marine sediments measured with microelectrodes. *Limnology and Oceanography*, **25**(3): 403—411.
- Rosenberg R, Hellman B, Johansson B. 1991. Hypoxic tolerance of marine benthic fauna. *Marine Ecology Progress Series*, **79**: 127—131.
- Sagemann J, Bale S, Briggs D, Parkes R. 1999. Controls on the for-

- mation of authigenic minerals in association with decaying organic matter: an experimental approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**(7-8); 1083-1095.
- Sansom R, Gabbott S. 2010. Non-random decay of chordate characters causes bias in fossil interpretation. *Nature*, **463**; 797-800.
- Sansom R, Gabbott S, Purnell M. 2010. Decay of vertebrate characters in hagfish and lamprey (Cyclostomata) and the implications for the vertebrate fossil record. *Proceedings of the Royal Society B*, **278**(1709); 1150-1157.
- Schlanger S, Jenkyns H. 1976. Cretaceous oceanic anoxic events: causes and consequences. *Geologie en Mijnbouw. Netherlands Journal of Geosciences*, **55**(3-4); 179-184.
- Sogin M, Morrison H, Huber J, Welch D, Huse S, Neal P, Arrieta J, Herndl G. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(32); 12115-12120.
- Stewart W, Rothwell G. 1993. *Paleobotany and the Evolution of Plants*. 2nd ed. New York USA; Cambridge University Press. 1-535.
- Sun Zuo-yu (孙作玉), Hao Wei-cheng (郝维城), Jiang Da-Yong (江大勇), 2004. Elementary discussion of taphonomic environment of Guanling Fauna, Guizhou Province, China. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* (北京大学学报, 自然科学版), **40**(6); 864-871 (in Chinese with English abstract).
- Walsh P, Blackwelder P, Gill K, Danulat E, Mommsen T. 1991. Carbonate deposits in marine fish intestines: A new source of biomineralization. *Limnology and Oceanography*, **36**(6); 1227-1232.
- Wang Le-xin (王乐新), Zhao Zhi-min (赵志敏), Xin Yu-jun (辛玉军), Guo Lin-feng (郭林峰), Guo Xin (郭昕), Chen Yang (陈阳). 2007. Experimentation research on absorption spectrum of normal and abnormal serum. *Applied Laser (应用激光)*, **27**(4); 333-337 (in Chinese with English abstract).
- Wang Li-ting, Li Jin-ling, Wang Xin-jin, Li Chun, Wu Tian-zhuang, Liu Jun. 2001. Biostratigraphy of Triassic marine reptiles in southwest Guizhou and its adjacent area. *Acta Geologica Sinica*, **75**(4); 349-353.
- Wang Shang-yan (王尚彦), Wang Min (王敏), Liu Jia-ren (刘家仁), 2005. Petrographic microfacies and environmental implications on the bearing horizons of Guanling Biota. *Guizhou Geology (贵州地质)*, **22**(1); 42-45 (in Chinese with English abstract).
- Wang Xiao-feng (汪啸风), Chen Xiao-hong (陈孝红), Cheng Long (程龙), Wang Chuan-shang (王传尚), Bachmann G H, Sander M, Hagdorn H. 2009. Sedimentary and palaeoecological environments of the Guanling and related biotas. *Acta Palaeontologica Sinica (古生物学报)*, **48**(3); 509-526 (in Chinese with English abstract).
- Wessel G, Conner S, Berg L. 2002. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, **129**; 4315-4325.
- Whitman W, Coleman D, Wiebe W. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(12); 6578-6583.
- Wright J, Schrader H, Holser W T. 1987. Paleoredox variations in ancient oceans recorded by rare earth elements on fossil Apatite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **51**; 631-644.
- Yakushev E V, Pollehne F, Jost G, Kuznetsov I. 2007. Analysis of the water column oxic/anoxic interface in the Black and Baltic seas with a numerical model. *Marine Chemistry*, **107**(3); 388-410.
- Yang H, Huang Y, Leng Q, LePage B, Williams C. 2005. Biomolecular preservation of Tertiary *Metasequoia* Fossil Lagerstätten revealed by comparative pyrolysis analysis. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **134**; 237-256.
- Zhu M, Babcock L, Steiner M. 2005. Fossilization modes in the Chengjiang Lagerstätte (Cambrian of China): testing the roles of organic preservation and diagenetic alteration in exceptional preservation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **220**; 31-46.

EXPERIMENTAL DECAY AS A GUIDE TO UNDERSTANDING SOFT-TISSUE PALAEOZOOLOGICAL PRESERVATION — AN EXAMPLE FROM SMALL FISH INTESTINAL MICROBES

WANG Wei¹⁾, YE Fa-cheng¹⁾, SHANG Qing-hua²⁾, LIU Jing¹⁾, GAI Yong-hua¹⁾,
LIU Xin-chun¹⁾, CAO Chang-qun¹⁾ and CHEN Xiao-zheng¹⁾

1) Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, weiwang@nigpas.ac.cn;

2) Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044

Key words Anoxic/oxic, decay, fossilization, intestinal microbes, softbody preservation, Chengjiang fauna, Guanling fauna

Abstract

The fossil record of non-biomineralized organisms, as in the Chengjiang fauna (Burgess Shale type preservation) and Guanling fauna (lagerstatte), provides extremely important evidence to understand the anatomy of early animal life. It is widely believed that their preservation condition resulted from anoxic environments of deposition. However although the decay process in animals is clearly related to the physico-chemical conditions of depositional setting, it is also related to microbes, especially to intestinal ones. This research reports experiments to compare oxic and anoxic decay of a small fish under controlled conditions at 30°C. The experiments demonstrated that the speed of decay was fairly similar during several days between the oxic and anoxic conditions, but was faster in the oxic environment during the first 6 days, after which time it became similar in both environments

and subsequently became faster in anoxic conditions. The main decay microbes were *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea* sp. (identified by 16 Sr DNA BLAST) in most living animals and appear to play a major role in protein decay. The widespread occurrence of facultative anaerobes in the intestines of animals is sufficient to explain the broad similarity of results in the experiments between anoxic and oxic conditions. Notably the pH of both of these microenvironments rose in the duration of the experiments, in contrast to the general idea of increasing acidity through microbial activity, but is consistent with other experimental studies of decay amongst fish. The interaction and balance between decay and soft-body mineralization involved in fossilization requests additional experimentation, especially regarding an examination of physico-chemical conditions including in particular the materials and structures in the microenvironment of animal external and internal surface.