

西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析

范华鹏 薛燕芬 曾 艳 周培瑾 马延和*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 采用非培养技术,直接从西藏扎布耶茶卡盐碱湖样品中提取微生物总 DNA。以样品总 DNA 为模板,PCR 扩增湖中古菌的 16S rDNA 序列。扩增产物经过克隆并随机挑选 60 个克隆进行测序得到它们的 16S rDNA 部分序列,大部分序列与嗜盐碱古菌的 16S rDNA 相近。在系统发育树上,部分克隆与已知古菌属归于同一分支,主要分布在嗜盐菌科的 *Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Natronobacterium*、*Natronomonas*、*Natrinema*、*Halorubrum*、*Haloterrigena* 和 *Halorhabdus* 等 8 个嗜盐古菌属中,也有一些克隆形成了独立的分支。它们共同显示出扎布耶茶卡湖中的古菌具有丰富的多样性。

关键词 盐碱湖,古菌多样性,非培养技术

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)04-0401-08

盐碱湖是自然界中一类高盐度碱性环境^[1],它们大多为内陆湖泊,可以形成相对封闭的微生物生态系统。湖中微生物由藻类、蓝细菌、好氧细菌、厌氧细菌以及古菌等多种微生物类群组成^[2,3]。其中的古菌类群是盐碱湖微生物的重要组成部分,它们适应了高盐碱环境,大多属于化能有机营养类型,可以分解利用多种有机物,参与湖中多种物质的循环与能量的传递过程。因此研究盐碱湖中古菌的多样性对于完整地理解盐碱湖生态系统功能、开发利用极端环境微生物资源具有重要的意义。

目前对于古菌多样性研究较为系统的盐碱湖只有东非的 Magadi 盐碱湖,已经从中发现了 *Natronobacterium*^[4]、*Natronococcus*^[5]和 *Natrialba*^[6]等多个嗜盐碱古菌属。总的来说,对于盐碱湖古菌多样性的认识仍只是处于起步阶段,需要不断引进新的技术来进行分析研究。基于 16S rDNA 序列分析的非培养技术为揭示自然环境中微生物种类和遗传多样性开辟了一条全新的途径^[7]。这种方法已经被广泛应用到海洋^[8]、土壤^[9]、高温^[10]及高盐^[11]等环境的微生物多样性研究中,并发现了多种新的细菌与古菌类群。利用非培养技术,在东非的 Magadi 盐碱湖中发现了两类尚未培养的新古菌类群^[12]。

我国西藏扎布耶茶卡盐碱湖具有高盐、高碱、高海拔以及富含锂元素等独特的地质特点,湖中蕴藏着丰富的微生物资源,但目前对于湖中微生物的多样性缺乏起码的认识。本文报道了通过非培养技术直接获得并分析扎布耶茶卡湖中古菌的 16S rDNA 序列,研究湖中古菌类群生物多样性的结果。这项研究为丰富我们对于盐碱湖微生物多样性的认识,开发利用我国盐碱湖丰富的微生物资源奠定基础。

基金项目:中国科学院知识创新资助项目(KSCX2-2-01-03)

* 通讯作者。Tel 86-10-62627951;Fax 86-10-62651577;Email:Mayh@sun.im.ac.cn

作者简介:范华鹏(1977-)男,天津人,在读硕士生,主要从事极端环境微生物方向的研究。E-mail:fhp_dragon@sina.com

收稿日期:2002-10-29,修回日期:2002-12-31

1 材料和方法

1.1 主要材料

透析袋(D45mm)和 DNA 快速纯化回收试剂盒 ,均购自鼎国生物技术公司 ;*Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。

1.2 样品采集

样品采自西藏扎布耶茶卡盐碱湖 ,包括湖边泥土样、湖中卤水以及湖底泥样。采样时间为 2000 年 9 月 样品采集后在 4℃ 下保藏。扎布耶茶卡湖位于东经 84°05′、北纬 31°20′、海拔 4421 米 ,湖水盐度高于 25% , pH 值 9.40 ~ 9.46^[13]。

1.3 总 DNA 的提取和纯化

称取 10 ~ 15g 盐碱湖样品与 10mL TE 缓冲液加入透析袋(D45mm)中 4℃ 透析 24h 去除样品中的盐份。脱盐后的样品依照 Barns 提供的冻融方法裂解细胞并提取微生物总 DNA^[14] ,并使用 Seghal 和 Gibbons 嗜盐菌培养基^[15] 平板检测裂解效果。使用 DNA 快速纯化回收试剂盒纯化 DNA 样品。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增

根据古菌 16S rDNA 保守序列^[16] ,合成一对古菌特异性引物 :正向引物 25F(5′-CTGCTTGATCTGCCAG-3′) ;反向引物 915R(5′-CTGCTCCCCGCCAATTCCT-3′)。PCR 反应体系为 50μL ,包括 5μL 10 × Buffer 2mmol/L MgCl₂ 0.2mmol/L 4 × dNTPs 20pmol/L 古菌引物 25F 与 915R 0.2μg 模板 DNA 1.5U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增条件 :95℃ 预变性 5min ; 95℃ 45s 45℃ 45s 72℃ 90s 30 个循环 ,72℃ 补齐 10min。

1.5 克隆和转化

PCR 扩增产物使用 DNA 快速纯化回收试剂盒进行纯化 ,再与 pGEM-T 载体连接 ,连接产物转入感受态细胞 *Escherichia coli* DH5α。

1.6 DNA 测序和序列分析

随机从转化子中挑取 60 个克隆进行测序 ,测序工作由上海基康生物技术公司完成 ,测序引物为古菌引物 915R。根据 GenBank、EMBL、DDBJ 等数据库中相关 16S rDNA 序列 ,与所测定的 16S rDNA 序列比较分析 ,采用 Clustal X 1.8 软件进行多序列匹配排列^[17] ,再使用 Treecon(1.3b)和 PHYLIP v 3.57 软件构建系统发育树^[18]。根据所得到的序列结果进一步分析扎布耶茶卡湖古菌的多样性。

1.7 数据库接受号(Accession number)

扎布耶茶卡湖获得 16S rDNA 序列 ZB A1 ~ A69 ,在 GenBank 核酸数据库中存取号为 AF505660 ~ AF505719。 *Uncultured haloarchaeon* MSP1、8、9、11、12、14、16、17、22、23、41 依次为 AB012049 ~ AB012059。其他相关菌株的数据库存取号如下 :*Haloarchaeon* str. T1.6 AJ270240 , *Haloferax* sp. D1227 AF069950 , *Natronorubrum* sp. Tenzan-10 AB046927 , *Natrinema* sp. R-fish AF367370 , *Haloterrigena thermotolerans* AF115478 , *Halorubrum trapanicum* AF027738 , *Natronococcus amylolyticus* D43628 , *Natronococcus xinjiangense* AF251285 , *Natronobacterium* sp. C231 AB045012 , *Methanospirillum hungatei* M60880 , *Haloarcula vallismortis* D50851 , *Halogeometricum borinquense* AF002984 , *Halobaculum gomorrense* U37444 , *Halorubrum*

saccharovorum AB003405 , *Natronorubrum bangense* Y14028 , *Haloterrigena turkmenicus* AB004878 , *Natrinema versiforme* AB023426 , *Halorubrum tibetense* AF435111 , *Haloarchaeon* str. T1.3 AJ270242 , *Halorubrum vacuolatum* D87972 , *Halorubrum lacusprofundi* AB003406 , *Haloarchaeon* str. PW1. 1 AJ270248 , *Natronomonas pharaonis* D87971 , *Halorhabdus utahensis* AF071880。

2 结果

2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

平板检测的结果是无菌落产生 ,证明盐碱湖样品经过反复冻融后细胞已经完全裂解。图 1 为盐碱湖样品中微生物总 DNA 提取结果 ,第 2、3 泳道的 DNA 片段比较完整 ,片段大小主要集中在 21kb 左右。该结果表明上述微生物总 DNA 提取方法适用于盐碱湖样品。图 2 所示为古菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果 ,第 2 泳道为纯化后的 PCR 扩增产物。PCR 扩增所产生的 DNA 片段为单一条带 ,片段大小约为 900bp ,表明扩增产物无明显非特异性扩增现象。

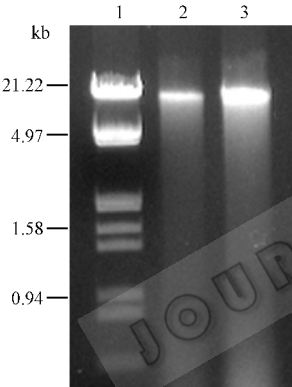


图 1 盐碱湖微生物总 DNA

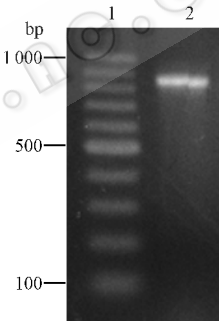


图 2 古菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

Fig.1 Total DNA extracted from Soda Lake
1. λ DNA/*Hind*Ⅲ + *Eco*R Ⅰ ;
2~3.Total DNA of environmental samples.

Fig.2 PCR amplification of total DNA with archaeal 16S rDNA primer
1. 100bp DNA step ladder ;
2. Purified PCR production of archaeal 16S rDNA.

2.2 古菌 16S rDNA 测序

随机挑取克隆 ,共测得 60 个古菌的 16S rDNA 部分序列。这些序列的大小为 650 ~ 700bp ,位置在 16S rDNA 的 250 到 915 位点之间。根据这些古菌 16S rDNA 序列之间的相似性比较 ,表 1 将具有高度相似性的克隆序列分别划分为多个不同的组 ,如克隆 A6、A24、A45、A46 与 A47 序列具有高度的相似性 ,被划分为同一个组。再将这些不同组的 16S rDNA 克隆序列与已发表的古菌序列进行相似性比较 ,结果显示 ,在总体上可将扎布耶茶卡湖古菌分为嗜盐碱古菌、中性嗜盐古菌和其它类古菌 3 种类群。嗜盐碱古菌类群包括表 1 中所列出的 4 个嗜盐碱古菌属 *Natronobacterium*、*Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Natronomonas* 以及 *Halorubrum* 属中与嗜盐碱古菌 *Halorubrum vacuolatum*^[19]和 *Halorubrum tibetense*(分离自扎布耶茶卡湖 ,尚未发表)相似性较近的古菌。共有 20 个克隆序列属于这

一类群 ,占克隆总数的 48.3%。中性嗜盐古菌类群主要包括表 1 中的嗜盐古菌属 *Halorhabdus*、*Haloterrigena*、*Natrinema* 以及 *Halorubrum* 属中与 *Halorubrum lacusprofundi* 有高相似性的古菌。共 18 个克隆序列属于这一类群 ,占总数的 30%。剩余的 13 个克隆序列划分为第 3 类群 ,其中 A1、A42 和 A52 与尚未定属的嗜盐古菌 *Haloarchaeon* str. T1.6^[20] 的相似性最高为 94.35% ,其余 10 个克隆(A49 ,A61 ,A44 , A62 ,A12 ,A14 ,A22 ,A53 ,A4 ,A23) 与已报道的可培养古菌 16S rDNA 序列相似性都不高于 90%。

表 1 60 个古菌 16S rDNA 克隆序列的类群分布情况及其与已发表菌株相似性比较

Table 1 Group distribution of 60 cloned sequences of archaeal 16S rDNA and similarity analysis with related strains			
Group distribution of archaea	Most similary group	Similarity/%	Percentage/%
(1) Haloalkaliphilic genera :			
<i>Natronobacterium</i>			3.3
A66	<i>Natronobacterium</i> sp. C231	95.48	
A16	<i>Natronobacterium</i> sp. C231	92.46	
<i>Natronococcus</i>			1.7
A58	<i>Natronococcus amylolyticus</i>	96.23	
<i>Natronorubrum</i>			8.3
A6 ,A24 ,A45 ,A46 ,A47	<i>Natronorubrum</i> sp. Tenzan-10	95.29	
<i>Natronomonas</i>			6.7
A20	<i>Natronomonas pharaonis</i>	97.92	
A27 ,A65	<i>Natronomonas pharaonis</i>	95.48	
A41	<i>Natronomonas pharaonis</i>	92.46	
(2) Neutral halophilic genera :			
<i>Natrinema</i>			10.0
A13	<i>Natrinema versiforme</i> XF10	93.76	
A39 ,A63	<i>Natrinema versiforme</i> XF10	97.55	
A2 ,A10 ,A33	<i>Natrinema</i> sp. R-fish	95.42	
<i>Haloterrigena</i>			5.0
A9	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	93.33	
A25 ,A26	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	94.20	
<i>Halorhabdus</i>			3.3
A51	<i>Halorhabdus utahensis</i>	93.97	
A68	<i>Halorhabdus utahensis</i>	92.09	
<i>Halorubrum</i>			40.0
A15 ;A7 ,A17 ,A18 ;			
A31 ,A32 ; A5 , A69 ,	<i>Halorubrum vacuolatum</i>	91.88 ~ 95.66	
A67 ; A8 , A35			
A40 , A56 ; A3 , A11 ,	<i>Halorubrum tibetense</i>	93.22 ~ 99.20	
A21 ; A30			
A34 , A37 ,A38 ; A54 ,	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	92.27 ~ 93.03	
A57 ,A43 ,A36			
(3) Other groups :			
Unknown haloarchaeon			5.0
A1 , A42 ; A52	<i>Haloarchaeon</i> str. T1.6	93.82 ~ 94.35	
Other halophilic groups			16.7
A49	<i>Haloarchaeon</i> str. PW1.1	90.00	
A61	<i>Haloarchaeon</i> str. PW1.1	87.94	
A44	Uncultured <i>haloarchaeon</i> MSP9/12 22/ 11 , 16 ,17	93.03	
A62	Uncultured <i>haloarchaeon</i> MSP9/12 22/ 11 , 16 ,17	95.48	
A12	Uncultured <i>haloarchaeon</i> MSP9/12 22/ 11 , 16 ,17	88.88	
A14	Uncultured <i>haloarchaeon</i> MSP9/12 22/ 11 , 16 ,17	85.68	
A22	Uncultured <i>haloarchaeon</i> MSP9/12 22/ 11 , 16 ,17	88.38	
A53	Uncultured <i>haloarchaeon</i> MSP8 , MSP41	85.90	
A4 ,A23	<i>Halorhabdus utahensis</i>	89.64	

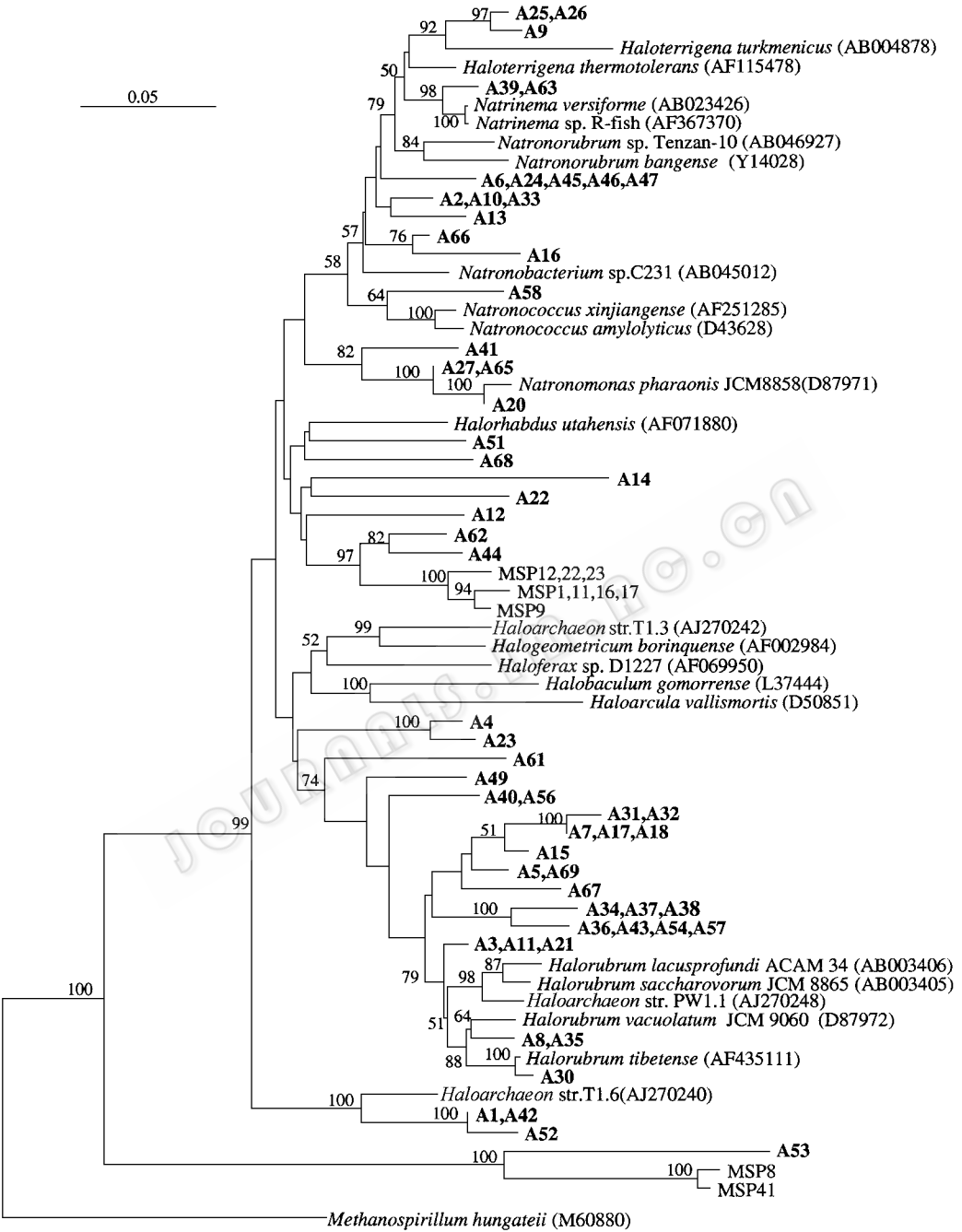


图 3 以 16S rDNA 序列为基础的扎布耶茶卡盐碱湖古菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the Archaea in Zabuye Lake based on 16S rDNA sequences

Evolutionary distances were calculated by the method with Kimura (1980) two-parameter calculation model and the topology was inferred by the neighbor-joining method based on bootstrap analysis of 100 replicates.

Bar 0.05 substitution per nucleotide.

2. 3 系统发育分析

根据所获得的 60 个 16S rDNA 克隆序列构建古菌系统发育树(图 3)。在系统发育树上,大部分克隆为已知古菌属相近的分支,克隆序列 A9、A25、A26 和 *Haloterrigena* 嗜盐菌属可以认为是一单元,与该属中的菌株 *Haloterrigena turkmenicus* 相似性分别为 93.3% ~ 94.2%; A2、A10、A13、A33、A39、A63 和 *Natrinema* 嗜盐菌属组成发育树上的一个类群,分别与 *Natrinema* sp. R-fish 和分离自新疆艾比盐湖的 *Natrinema versiforme* XF10^[21] 两株菌相似性最高(93.7% ~ 97.5%); A6、A24、A45、A46、A47 和 *Natronorubrum* 嗜盐菌属形成最相近的分支,与 *Natronorubrum* sp. Tenzan-10 的相似性最高(95.3%); A16、A66 与 *Natronobacterium* sp. C231 相似性最高(92.5% ~ 95.5%); 克隆序列 A58 与新疆艾丁湖分离菌株 *Natronococcus xinjiangense* 的相似性最高(96.2%); A20、A27、A41、A65 与 *Natronomonas pharaonis* 相似性最高,分别为 92.5% ~ 97.9%; A51、A68 与菌株 *Halorhabdus utahensis*^[22] 相似性最高(92.2% ~ 94.0%)。在该系统发育树上,24 个克隆序列形成了 *Halorubrum* 嗜盐古菌属相近的分支,其中 A30 与 *Halorubrum tibetense* 相似性最高(99%); 而 A8、A35 与东非 Magadi 盐碱湖中获得的菌株 *Halorubrum vacuolatum* 相似性最高(96%)。此外,还有 10 个克隆序列(A4、A12、A14、A22、A23、A44、A49、A53、A61、A62)在系统发育树上形成了独立的分支:其中 A44、A62 与东非 Magadi 盐碱湖新近报道的非培养古菌类群(MSP9, 12, 16, 17)有较高的相似性(93.3% ~ 95.5%),而 A14 和 A22 形成了单独的类群,A12 和 A53 的分支也分别具有独立性。

3 讨论

PCR 扩增片段为古菌的 16S rDNA 部分序列,位置在 250 到 915 之间。Winker 等^[23]的研究表明古菌的 16S rDNA 共 49 个高度保守区,其中在位点 250 ~ 915 之间的序列共有 23 个;此外,位点 500 ~ 545 的范围为 rRNA 功能区具有高度的保守性。因此,范围在 250 ~ 915 的古菌 16S rDNA 部分序列具有较高的保守性,可以比较准确地说明嗜盐古菌在系统进化树上的进化关系。同时,60 个克隆是以随机的方式挑取的,目的是为了保证所获得的信息可以更加客观真实地说明盐碱湖中古菌的组成种类与各类群所占的比例。

通过对盐碱湖古菌 16S rDNA 克隆序列所进行的系统发育分析可知扎布耶茶卡湖中古菌具有丰富多样性,它们主要分布在 *Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Natronobacterium*、*Natronomonas*、*Natrinema*、*Halorubrum*、*Haloterrigena* 和 *Halorhabdus* 等 8 个嗜盐古菌属中(嗜盐古菌类群中已经发表的有效属共 15 个^[24])。其中,除 A30、A8 和 A35 以外,归于 *Halorubrum* 属的另 21 个克隆序列(见表 1)与该属已报道菌株的进化关系较远,为 *Halorubrum* 属向其它嗜盐古菌属的过渡类群,这些克隆丰富了原有的嗜盐古菌系统发育树;从数量上分析可知 *Halorubrum* 嗜盐菌属相近的克隆序列出现的频率最高,可能代表 *Halorubrum* 古菌是湖中嗜盐古菌的优势菌群。以上结果反映了扎布耶茶卡湖中古菌多样性分布的独特特征。

除此之外,部分克隆序列(A4、A12、A14、A22、A23、A44、A49、A53、A61、A62)在系统发育树上所处位置明显区别于已报道的嗜盐古菌属,它们代表了多个独特的古菌类群。其中,克隆序列 A44、A62 与 Grant 在东非 Magadi 盐碱湖所发现的新古菌类群 Uncultured

haloarchaeon MSP9, MSP16, MSP23^[12](通过非培养技术获得)的相似性范围为 93.3% 到 95.48% ,而与其它已报道古菌的相似性都低于 90% ,因此可以认为扎布耶茶卡湖中存在着与 Magadi 盐碱湖相近的尚未培养古菌类群。克隆序列 A53 不属于任何已知的嗜盐古菌属(相似性低于 80%) ,其所代表的分支在古菌系统发育树上首次发现 ,与 Magadi 盐碱湖的非培养古菌类群 Uncultured *haloarchaeon* MSP8 ,A41 有最大相似性 ,但仅为 85.9% ,这可能代表了扎布耶茶卡湖中存在着尚未被认识的古菌新类型。克隆序列 A4 , A23 , A12 , A14 , A22 , A49 , A61 也是区别于已知嗜盐古菌中的几个独立类群 ,在系统进化树上位于多个已知嗜盐古菌属之间 ,与上述克隆序列共同代表了湖中古菌新的类群组成。

西藏扎布耶茶卡湖与东非 Magadi 盐碱湖进行比较可以发现两个盐碱湖中都包括 *Natronobacterium* 属和 *Natronococcus* 属嗜盐碱古菌 ,以及 *Halorubrum vacuolatum* 有高同源性的嗜盐碱古菌 ,这反映了两个盐碱湖中微生物在种类上的相似性 ,同时 ,扎布耶茶卡湖中所发现的 *Haloterrigena* 与 *Halorhabdus* 属的嗜盐古菌在 Magadi 盐碱湖中还尚无报道 ,这种差异反映了不同盐碱湖在微生物分布上的各自特色。总之 ,通过以古菌 16S rDNA 序列分析为基础的非培养技术分析显示 ,从扎布耶茶卡湖中发现了比预期更为丰富的古菌类群 ,并较全面地认识了扎布耶茶卡盐碱湖古菌的组成情况 ,为进一步研究我国盐碱湖微生物生态系统提供了重要的数据信息。

参 考 文 献

- [1] Grant W D , Tindall B J . The alkaline saline environment . In : Herbert R A , *et al.* ed. *Microbes in Extreme Environments* . London : Academy Press , 1986 . 25 ~ 54 .
- [2] Horikoshi K , Grant W D . Halophiles . In : *Extremophiles microbial life in extreme environments* . New York : John Wiley & Sons , Inc . , 1998 . 93 ~ 109 .
- [3] Oren A . Ecology of extremely halophilic microorganisms . In : Vreeland R H , *et al.* ed. *The Biology of Halophilic Bacteria* . Boca Taton : CRC Press , 1993 . 25 ~ 53 .
- [4] Tindall B J , Ross H N M , Grant W D . *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov. , two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria . *Syst Appl Microbiol* , 1984 , 5 : 41 ~ 57 .
- [5] McGenity T J , Grant W D . The haloalkaliphilic archaeon (archaeobacterium) *Natronococcus occultus* represents a distinct lineage within the *Halobacteriales* , most closely related to the other haloalkaliphilic lineage (*Natronobacterium*) . *Syst Appl Microbiol* , 1993 , 16 : 239 ~ 243 .
- [6] Kamekura M , Upasani V , Ventosa A , *et al.* Diversity of alkaliphilic halobacteria : proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum* , *Natronobacterium magadii* and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum* , *Natrialba* and *Natronomonas* gen. nov. , respectively , as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov. , *Natrialba magadii* comb. nov. , and *Natronomonas pharaonis* comb. nov. , Respectively . *Int J Syst Bacteriol* , 1997 , 47 (3) : 853 ~ 857 .
- [7] Pace N R , Stahl D A , Lane D J , *et al.* The analysis of natural microbial population by ribosomal RNA sequence . *Advances in Microbial Ecology* , 1986 , 9 : 1 ~ 55 .
- [8] Kato C , Li L , Tamaoka J . Molecular analyses of the sediment of the 11000-m deep Mariana Trench . *Extremophiles* , 1997 , 1 : 117 ~ 123 .
- [9] Borneman J , Skroch P W . Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin . *Appl Environ Microbiol* , 1996 , 62 : 1935 ~ 1943 .
- [10] Reysenbach A L , Ehringer M , Hershberger K . Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs , Yellowstone National Park : another environment where the *Aquificales* and " Korarchaeota " coexist . *Extremophiles* , 2000 , 4 : 61 ~ 67 .
- [11] Benlloch S , Acinas S G . Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct amplification of 16S rDNA . *Hydrobiologia* , 1996 , 329 : 19 ~ 31 .
- [12] Grant S , Grant W D , Jones B E , *et al.* Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern . *Extremophiles* , 1999 , 3 : 139 ~ 145 .

- [13] Holland H D , Smith G I , Jannasch H W , *et al.* Lake Zabuye and the climatic history of the Tibetan Plateau. *D Geowissenschaften* , 1991 , **2** : 37 ~ 45.
- [14] Barns S M , Fundyga R E , Jeffries M W , *et al.* Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci* , 1994 , **93** : 1609 ~ 1613.
- [15] Seghal S N , Gibbons N E. Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum* . *Can J Microbiol* , 1960 , **6** : 165 ~ 169.
- [16] Robb F T , Place A R , Sower K R , *et al.* 16S and 23S rRNA-like Primers. In : Shiladitya D , *et al.* ed. Archaea , A Laboratory Manual. Halophiles. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1995. 269 ~ 271.
- [17] Thompson J D , Higgins D G , Gibson T J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* , 1994 , **22** : 4673 ~ 4680.
- [18] Van de Peer Y , De Wachter R. TREECON for Windows : a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* , 1994 , **10** : 569 ~ 570.
- [19] Mwatha W E , Grant W D. *Natronobacterium vacuolata* sp. nov. , a Haloalkaliphilic Archaeon Isolated from Lake Magadi , Kenya. *Int J Syst Bacteriol* , 1993 , **43** : 401 ~ 404.
- [20] McGenity T J , Gemmell R T , Grant W D. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* , 2000 , **2** : 243 ~ 250.
- [21] Xin H , Itoh T , Zhou P , *et al.* *Natrinema versiforme* sp. nov. , an extremely halophilic archaeon from Aibi saltlake , Xinjiang , China. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2000 , **50** : 1297 ~ 1303.
- [22] Wain M , Tindall B J , Ingvorsen K. *Halorhabdus utahensis* gen. nov. , sp. nov. , an aerobic , extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake , Utah. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2000 , **50** : 183 ~ 190.
- [23] Winker S , Woese C R. A definition of the domains archaea , bacteria and eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst Appl Microbiol* , 1991 , **14** : 305 ~ 310.
- [24] Grant W D , Kamekura M , McGenity T J , *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York : Springer-Verlag Press , 2001. **1** : 294 ~ 334.

Archaeal Diversity of Zabuye Lake in Tibet Analyzed by Culture-independent Approach

Fan Huapeng Xue Yanfen Zeng Yan Zhou Peijin Ma Yanhe^{*}
(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Abstract : With culture-independent approach , microbial DNA was directly extracted from samples of Zabuye saline soda lake . Using the microbial DNA as template , archaeal 16S rDNAs were amplified by PCR . Amplified products were cloned and sequenced . 60 different cloned partial sequences , most of which were related to haloalkaliphilic archaeon , were acquired . In the phylogenetic tree , some clones of Zabuye lake belonged to Genus *Natronobacterium* , *Natrinema* , *Natronococcus* , *Natronorubrum* , *Natronomonas* , *Halorubrum* , *Haloterrigena* , *Halorhabdus* in Family *Halobacteriaceae* . Other clones represent some novel groups . All of them show prolific archaeal diversity of Zabuye lake .

Key words Saline soda lake , Archaeal diversity , Culture-independent approach

Foundation item : Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences(KSCX2-01-03)

^{*} Corresponding author. Tel 86-10-62627951 Fax 86-10-62651577 E-mail Mayh@sun.im.ac.cn

Received date : 10-29-2002