

新疆断裂带含硫冷泉泉水细菌群落结构多样性

李慧^{1,2}, 曾军¹, 高小其³, 杨红梅¹, 张涛¹, 杨晓芳³, 孙建¹, 娄恺^{1*}

¹新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091

²石河子大学生命科学学院, 石河子 832003

³新疆维吾尔自治区地震局, 乌鲁木齐 830011

摘要:【目的】为了解新疆断裂带含硫冷泉泉水中细菌群落结构的组成和物种多样性。【方法】采用免培养法直接从冷泉水中提取环境总 DNA, 采用细菌通用引物对泉水中细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 构建 16S rRNA 基因克隆文库。使用限制性内切酶 *Hae* III 对随机挑选的阳性克隆子进行限制性片段长度多态性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), 选出具有不同酶切图谱的序列进行测序、BLAST 比对和构建 16S rRNA 基因系统发育树。【结果】共从细菌 16S rRNA 基因文库中筛选了 228 个阳性克隆, RFLP 分型得到 33 个不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Unites, OTUs), 覆盖度 (Coverage C) 为 92%。BLAST 比对、RDP 归类及系统发育分析将这 33 个 OTUs 归为: 变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。变形菌门为绝对优势类群, 占整个细菌克隆文库的 98%, 其中 20% 左右的类群与硫化物代谢相关的光合自养和化能自养类群纯培养菌具有高的相似性 (>97%)。此外, 还发现大量类群 (总文库的 64%, 其中 57% 为军团菌属 *Legionella* spp., 类群) 与 GenBank 中已存细菌 16S rRNA 基因相似性小于 96%。【结论】新疆断裂带含硫冷泉泉水中细菌类群的多样性较低, 但可能存在大量潜在细菌新种和新分类。另外, 该泉水可能是潜在的新军团菌病传播源, 因而可能对下游人畜健康存在潜在威胁。

关键词: 新疆断裂带, 含硫冷泉, 细菌多样性, 16S rRNA 基因文库, 系统发育树

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)05-0595-08

地震断裂带是指岩层在地壳运动产生的应力作用下使某些局部地带发生破裂, 产生相对移动而形成的裂隙, 是地球内部气体和化学元素的主要迁移通道, 也是岩石圈和大气圈进行物质、能量、信息交换的重要地点^[1]。断裂带处往往也是地下水排泄的通道, 一些来自于地球内部深层的气体经断裂处涌入地下水中, 排出地表形成泉。因而多用于监测

泉水中地球化学元素的变化来对地壳运动的强度以及地震进行监测和预测^[2–4], 但是这种特殊环境中与微生物相关的研究国内外却鲜有报道。位于新疆乌鲁木齐柳树沟—红雁池地震断裂带上的 10 号泉是我国地震台网监测基本水化一类观测台也是乌鲁木齐地区最重要的地下流体综合观测泉^[5]。由于该泉泉水温度常年稳定在 12℃ 左右, 以及泉水中富

基金项目: 新疆特殊环境微生物实验室开放课题 (XJYS0203-2008-02)

* 通信作者。Tel: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 李慧 (1985–) 女, 河南人, 硕士研究生, 主要从事特殊环境微生物研究。E-mail: l.h.1112@163.com

收稿日期: 2010-12-02; **修回日期:** 2010-01-21

含高浓度的硫化物,因而它属于硫化物冷泉^[5-6]。

近年来国外学者对含硫冷泉中微生物进行了系统的研究,发现了大量的硫代谢相关的独特类群,如 Christian 等人利用原位培养法在德国一含硫冷泉泉水得到了一株广域古菌纯培养菌,并发现大量未培养嗜冷古菌新类群,利用免培养法发现了白色念珠状菌席是由丝状硫发菌属 (*Thiothrix* spp.) 细菌与嗜冷广古菌所组成的共生体^[7]。Anita Chaudhary 等人对美国密歇根州的一含硫冷泉中原核微生物多样性进行研究,结果发现 ϵ -变形菌纲的一些硫代谢细菌对当地地下含水层化学和喀斯特地貌的形成可能起重要作用^[8]。Nancy 等人对加拿大极地高盐含硫冷泉中原核微生物多样性的研究发现硫化物的代谢对维持微生物群落稳定起着主要作用^[9-10]。国内目前对含硫冷泉泉水中微生物相关的研究还尚未见报道,仅有曾军等人对新疆沙湾一不含硫冷泉沉积物中细菌和古菌多样性进行了研究^[11-12]。由于新疆 10 号冷泉位于地震断裂带上,泉水受各种地球化学元素的影响,那么该泉中的微生物群落组成以及多样性与上述非地震断裂带中含硫冷泉中微生物组成是否相似,是否存在除硫代谢外的其他新的代谢类型等问题值得研究。

因此,本文采用构建细菌 16S rRNA 基因文库法对新疆乌鲁木齐 10 号冷泉泉水中细菌群落组成和多样性进行了分析。为研究断裂带泉水中生物地球化学处理、微生物对断裂带上化学元素变化的响应及地震等研究提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料:采样地为新疆乌鲁木齐南部的柳树沟—红雁池断裂带上的 10 号冷泉 (E87°37'、N43°42'),海拔高度为 1055 米。该泉承压性能良好、水量丰富,水流量为流量约 1.7 L/s、动态稳定、水温常年保持在 12℃ 左右并且年变化甚微,pH 值为 7.9,属于弱碱性矿化水,并且在泉口有浓重的臭鸡蛋气味。2009 年 10 月 12 日对该泉泉水进行无菌采样 (1 L),低温 (4℃) 运回实验室并立即处理。

1.1.2 主要试剂和仪器:PCR 扩增仪 (Eppendoff, 德国),凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国),PCR 纯化试剂盒 (生工,上海),离心机,PCR 引物,*Hae* III 限制性

内切酶 (TaKaRa, 大连),pGM-T (TaKaRa, 大连) 载体,*E. coli* DH 5 α 感受态细胞等。

1.2 泉水理化性质的测定

水中溶解气体测试采用气相色谱法 (SP-2305 型气相色谱仪),硫化物测量采用碘量法分析,汞采用 XG-4 型测汞仪测定,水氨采用 FD-125 型室内氨钨分析仪测定,电导率采用 DDS-11A 型电导率仪观测。具体方法见文献^[2]。

1.3 泉水环境总 DNA 的提取

参照 Shaheen 等报道的方法^[13]对泉水水体总 DNA 进行提取,但稍有改动,具体如下:泉水样品首先使用 0.22 μ m 无菌微孔滤膜进行过滤,接着将滤膜放入 50 mL 无菌离心管中,加入 3 mL GTE buffer 进行洗脱。然后向上述 GTE 洗脱液中加入溶菌酶 (10 mg/mL) 300 μ L 至终浓度为 1 mg/mL;37℃ 水浴 2 h,液体转移至新离心管,加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 30 μ L 至终浓度为 0.2 mg/mL,加入浓度为 20% 的 SDS 50 μ L 和 5 mol/L 的 NaCl 40 μ L;53℃ 水浴 2 h;用等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, V/V) 抽提,4496 \times g 离心 5 min;取上清加入 2/3 体积的氯仿抽提,4496 \times g 离心 5 min;取上清再加入 0.6 倍的异丙醇,4℃ 过夜;7992 \times g 离心 20 min;弃上清,用预冷的 70% 乙醇清洗 1 次,倒置凉干;加入 30 μ L TE 缓冲液 -20℃ 保存。

1.4 PCR 扩增 16S rRNA 基因

使用细菌通用引物 27F^[14] 和 1429R^[15] 对泉水中细菌 16S rRNA 基因进行扩增;PCR 反应体系 (50 μ L):2 \times Premix Taq (含 Taq 酶 2.5 U) 25 μ L,上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L,模板 DNA (100 ng) 1 μ L,ddH₂O 22 μ L。PCR 扩增程序为:95℃ 4 min;94℃ 30 s,53℃ 40 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃ 7 min。以无菌水为空白作为阴性对照,做 2 个 PCR 扩增平行实验。

1.5 16S rRNA 基因文库的构建

扩增的 16S rRNA 基因经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带 (1.5 kb) 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化和回收,并与 pMD19-T Vector 载体连接,经化学法转化到 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞中。以氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 抗性和菌液 PCR 电泳检测来筛选阳性转化子。阳性转化子的 PCR 检测使用 T 载体通用引物 M13F-47 和 M13R-48 对插入片段进行扩增。PCR 扩增条件:95℃ 4 min;94℃ 40 s,55℃

40 s,72℃ 1.5 min,共 30 个循环;72℃ 7 min。阳性克隆片段大小为 1.7 kb 左右(目的片段 1.5 kb,载体两端片段长 0.2 kb)。

1.6 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP) 分型

利用限制性内切酶 *Hae* III 对所筛选的阳性克隆的菌落 PCR 产物进行酶切^[16]。酶切体系(20 μL):菌落 PCR 产物 17.5 μL,*Hae* III 0.5 μL、10 mol/L Buffer 2 μL。37℃ 恒温过夜。酶切产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。典型的 RFLP 条带类型对应的克隆子 PCR 产物送到上海生工测序。

1.7 数据统计和分析

为了检测所选取的克隆数目是否具有代表性或者是否涵盖了整个环境绝大部分类群。利用 EstimateS 8.0 软件(<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>)对文库进行稀有度分析。运用 Coverage C 对克隆文库进行评价,使用公式 $C = 1 - n/N$ (N 代表克隆文库库容量, n 代表在克隆文库中仅出现一次的 OTU 的数量)。C 值理论上表示 16S rRNA 基因克隆文库中所包含的微生物种类(OTU)占样品

中全部微生物种类的比例。

1.8 系统发育树构建和核酸序列收录号

运用 CHECK-CHIMERA 在线工具(<http://rdp8.cme.msl.edu/cgis/chimera.cgi>)进行嵌合体检查和剔除。使用 BLAST 搜索程序从 GenBank 数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列,MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件进行比对,用邻接法 (Neighbor-Joining method) 聚类分析和构建系统进化树^[17]。本实验中所得到的细菌 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank 数据库,收录号分别为: HQ115535 至 HQ115567。

2 结果

2.1 新疆乌鲁木齐 10 号冷泉水理化性质分析

新疆乌鲁木齐 10 号冷泉水水化学属于 SO4—HCO3—Cl—Na 型水。pH 为 7.9,为弱碱性矿化水,电导率为 1.33 mS/cm,泉水受一些地球内部化学元素影响如 He、Rn、H₂S、N₂、CH₄ 等气体(表 1)。

表 1 新疆乌鲁木齐 10 号冷泉水理化性质

Table 1 Physicochemical parameters of the waters from the No. 10 cold spring

pH	T/℃	Conductivity/ (mS/cm)	Elements	Gases				anions			
			Hg/(ng/L)	He/%	Ar/%	N ₂ /%	Rn/(Bq/L)	CO ₂ /mg/L	CH ₄ /mg/L	HS ⁻ /(mg/L)	F ⁻ /(mg/L)
7.9	11.4	1.33	20	0.007	1.32	87.7	27.8	8.87	0.16	1.96	2.08

2.2 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

由图 1-A 中可以看出所提取的总 DNA 片段基本都大于 23 kb,并且较为完整无明显降解适合于后续 PCR 扩增。细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果如图 1-B 所示,目的片段大小都为 1500 bp,并且特异性很高适合后续操作。

2.3 16S rRNA 基因克隆文库 RFLP 分型

从细菌 16S rRNA 基因文库中随机选择了 228 个阳性克隆,进行菌落 PCR 扩增。扩增产物用限制性内切酶 *Hae* III 进行酶切分型。得到 33 个基因型。部分酶切图谱检测结果如图 2 所示,克隆子酶切条带均小于 1500 bp,因而认为酶切较为充分,并且分辨率很高。

2.4 基因文库的细菌稀有度及多样性分析

克隆文库的覆盖率 C = 92%,稀有度曲线可以看出文库基本已达到饱和,当酶切 120 个克隆时文

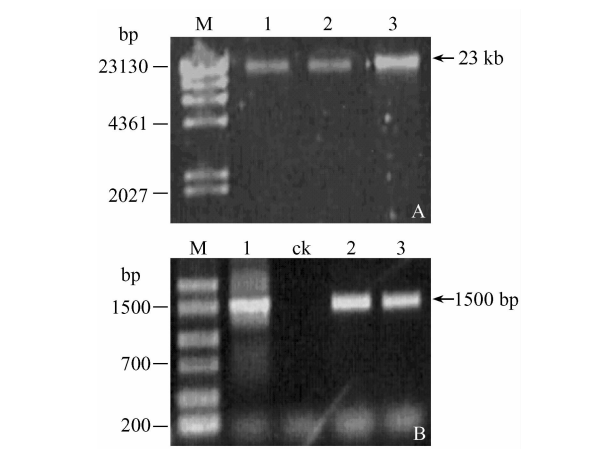


图 1 冷泉样品提取的总 DNA (A) 和样品中细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增的结果 (B)

Fig.1 Total DNA extracted from the No.10 cold spring sample (A) and bacterial 16S rRNA gene amplified by PCR (B). A: M; Lambda DNA Marker; Lane 1-3: total DNA of the cold spring sample. B: M; Marker V, Lane 1-3: bacterial 16S rRNA gene products.

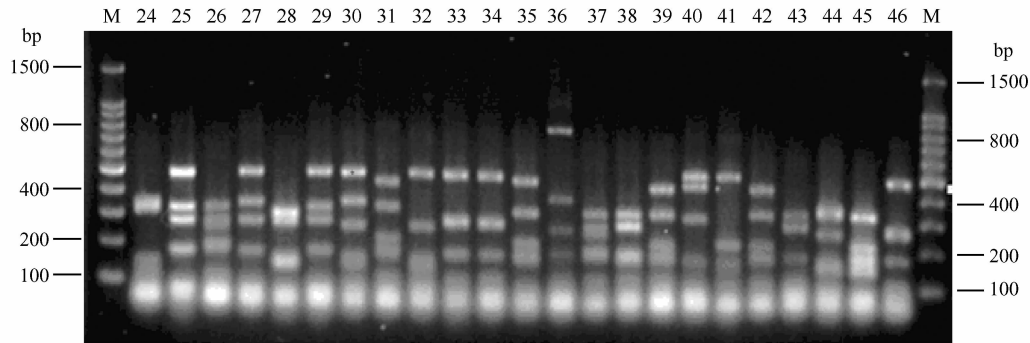


图2 部分细菌阳性克隆子的 *Hae* III 酶切图谱

Fig.2 *Hae* III restriction patterns of some amplified 16S rRNA genes. M: 100bp DNA ladder; Lane 24-46: Positive clones.

库已进入平稳期(图3),并且 OTUs 数随着酶切克隆数的增加而小幅增加,表明 228 个细菌克隆子文库已基本涵盖了此环境中绝大多数的细菌类群。

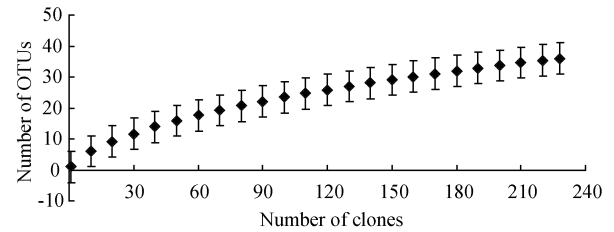


图3 10 号冷泉水细菌克隆文库稀有度曲线

Fig.3 Rarefaction curves for the No. 10 cold spring bacteria clone library. Error bars represent 95% confidence intervals.

2.5 细菌 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

通过对随机挑选的 228 个阳性克隆子进行 *Hae* III 酶切分型,共得到 33 个 OTUs。通过 CHECK-CHIMERA 程序进行嵌合体检验,均不为嵌合序列。

BLAST 比对、RDP 归类及系统发育分析将这 33 个 OTUs 归为细菌域的 3 个门,14 个属包括:变形菌门(Proteobacteria)(约占细菌克隆文库的 98%,包括 11 个属),拟杆菌门(Bacteroidetes)(<2%,包括 2 个属),厚壁菌门(Firmicutes)(<1%,包括 1 个属)。2 个分属于 α -变形菌纲和 β -变形菌纲的 OTUs(HQ115561 和 HQ115560)无论是通过 RDP 归类和系统发育分析均无法将它们归类到已知的类群中。另外,绝大多数 OTUs 序列(14 个,占文库的 33%)与 GenBank 中已存纯培养细菌 16S rRNA 基因序列相似性大于 97%,但仍有近 1/3 的 OTUs(占文库的 64%)序列相似性小于 95%(表 2)。

变形菌门:变形菌门(Proteobacteria)为细菌克隆文库最优势菌群,包括 30 个 OTUs。分别属于 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)(包含 2 个 OTUs),

β -变形菌纲(Betaproteobacteria)(包含 14 个 OTUs), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)(包含 13 个 OTUs), ϵ -变形菌纲(Epsilonproteobacteria)(包含 1 个 OTUs)。 β -变形菌纲和 γ -变形菌纲为优势类群,约占整个变形菌门的 98%,整个克隆文库的 96%。 β -变形菌纲包含 14 个 OTUs 系统发育分析归为 3 个分支 5 个属。分别为分支 1(包含丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)和未定科)包含 3 个属。*Roseateles* 属占优势包含 5 个 OTUs。其中克隆子 cs-11(HQ115548)与从污水处理系统中的污泥里纯培养菌 *Pelomonas saccharophila* (FJ513082)有 97% 的相似性。克隆 cs-28 (HQ115557)和 cs-40 (HQ115549)与纯培养菌 *Roseateles depolymerans* 具有较高的相似性,序列相似性分别为 97% 和 98%。噬氢菌属(*Hydrogenophaga* spp.)包含 3 个 OTUs,克隆子 cs-27 (HQ115554)与 Arsenite-oxidizing bacterium (AY027499)有 95% 的相似性。克隆子 cs-30(HQ115555)和 cs-62 (HQ115556)与纯培养菌 *Hydrogenophaga* sp. 分别具有 99% 和 98% 的相似性。*Aquabacterium* 属包含 1 个克隆子为 cs-21 (HQ115552),与纯培养的 *Aquabacterium parvum* (NR024874)具有 99% 的相似性。克隆子 cs-38 (HQ115559)在系统发育树上独立构成一个分支,RDP 归类为产碱菌科(Alcaligenaceae)无色杆菌属(*Achromobacter* spp.),与纯培养的 *Achromobacter xylosoxidans* (AF511516)具有 98% 的相似性。第 3 个分支嗜氢菌科(Hydrogenophilaceae)包含硫杆菌属(*Thiobacillus* spp.)(包含 4 个 OTUs)。其中 cs-60(HQ115564)与从 Khoito-Gol 含硫泉中得到的硫氧化细菌 *Thiobacillus sajanensis* (DQ390445)具有 98% 的相似性。cs-18 (HQ115550)与免培养

Uncultured Thiobacillus sp. (AY082471) 具有 97% 的相似性。 γ -变形菌纲包含 13 个 OTUs, 进化分支分为 5 支。克隆子 cs-39 (HQ115560) 独立形成一个分支, RDP 归类于 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria), 但具体的目科属不详, 只与纯培养的 *Thiomicrospira* sp. (AJ404732) 有 86% 的相似性。其它 12 个 OTUs 分属于 4 个科 4 属。其中军团菌科军团菌属是优势

菌群, 占 γ -变形菌纲 71%, 占整个克隆文库的 57%, 共包含 6 个 OTUs, 并且 OTU 之间相似性均大于 95% 但与该属纯培养菌相似均低于 97%。如克隆子 cs-1 (HQ115535) 与纯培养菌 *Legionella gresilensis* (NR028744) 有 94% 的相似性。克隆子 cs-4 (HQ115536)、cs-17 (HQ115538) 和 cs-46 (HQ115540) 与 *Legionella pneumophila* 序列相似性

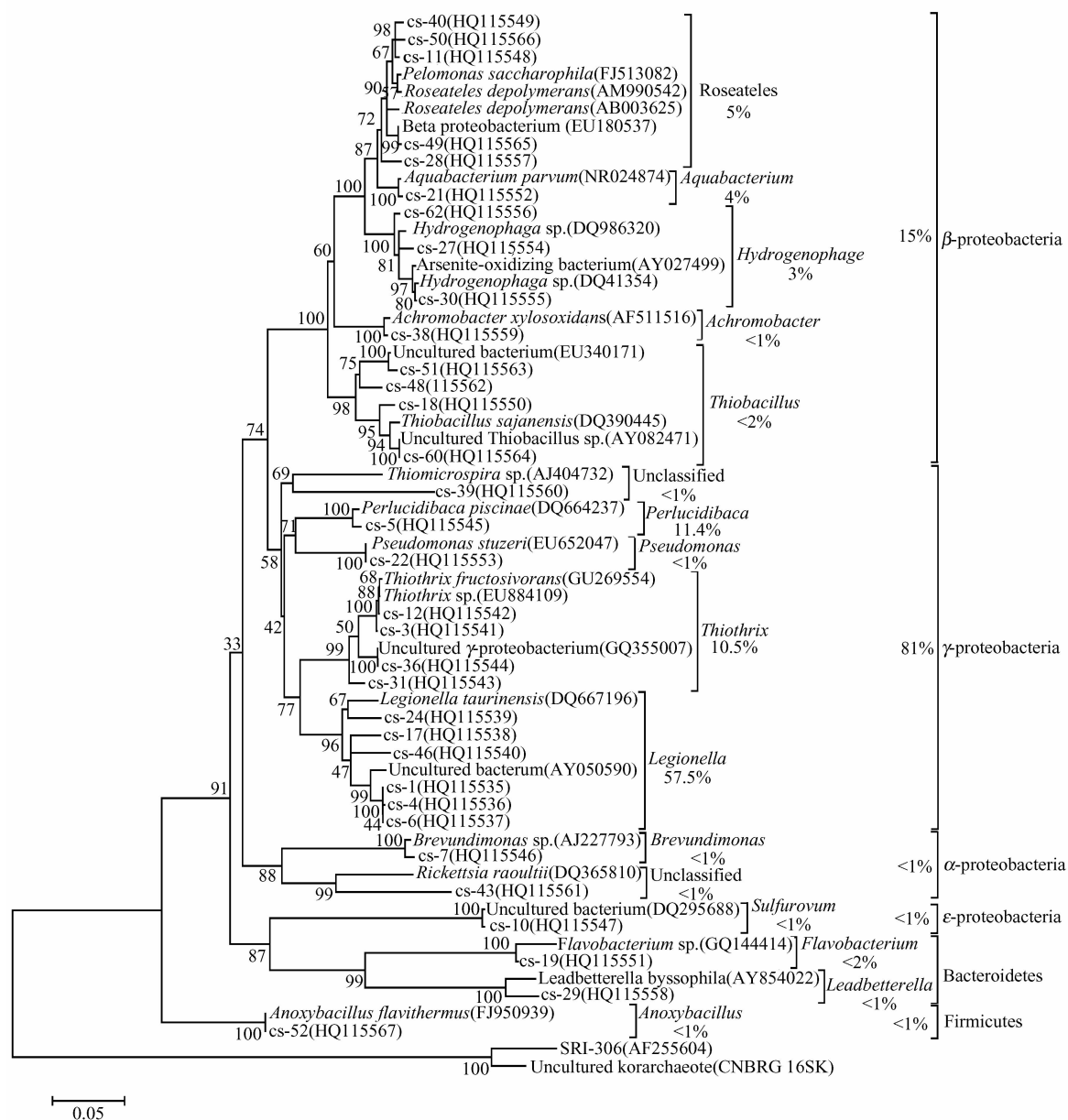


图 4 Neighbor-joining 法构建新疆 10 号冷泉水细菌 16S rRNA 基因克隆文库系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic relationships of the 33 bacterial 16S rRNA gene sequences obtained from the bacterial clone library of the No. 10 cold spring, urumqi Xinjiang. Numbers on the nodes are the bootstrap values based on 1000 replicates. SRI-306 (AF255604) and Uncultured korarchaeote (CNBRG16SK) was used as the outgroup. The scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position.

分别为 94%、92% 和 91%, 但克隆子之间相似均大于 95%。克隆子 cs-3、12、31 和 36 (登录号为: HQ115541-HQ115544) 聚类在一起形成一个分支, 全部归属于硫发菌科硫发菌属 (*Thiothrix* spp.)。克隆子 cs-3 (HQ115541) 与纯培养 *Thiothrix fructosivorans* (GU269554) 有 99% 的相似性。克隆子 cs-12 (HQ115542) 与 *Thiothrix* sp. (EU884109) 有 99% 的相似性。克隆子 cs-31 (HQ115543) 和 cs-36 (HQ115544) 与该门中免培养类群分别具有 95% 和 99% 相似性。克隆子 cs-5 (HQ115545) 单独形成一个分支, 属于莫拉菌科 (Moraxellaceae) *Perlucidibaca* 属, 与从淡水中的 *Perlucidibaca piscinae* (DQ664237) 具有 98% 的相似性。另一个分支由克隆子 cs-22 形成, 与含硫温泉中得到的 *Pseudomonas stutzeri* (EU652047) 具有 100% 的相似性。 α -变形菌纲包含 2 个 OTUs, 并且各自独立分支。克隆子 cs-7 (HQ115546) 属于柄杆菌科 (Caulobacteraceae) 短波单胞菌属 (*Brevundimonas* spp.), 与 *Brevundimonas* sp. (AJ227793) 有 98% 的相似性。而克隆子 cs-43 (HQ115561) 具体的目科属不详 (RDP 归类), 与纯培养菌 *Rickettsia raoultii* (DQ365810) 具有 86% 的相似性。 ϵ -变形菌纲 (Epsilonproteobacteria) 仅包含 1 个 OTUs, 克隆子 cs-10 (HQ115547) RDP 归类将其归于螺杆菌科 (Helicobacteraceae) *Sulfurovum* 属, 与免培养的该门类群具有 99% 相似性。拟杆菌门包含 2 个 OTUs, 代表性克隆子为: cs-19 (HQ115551) 和 cs-29 (HQ115558)。分别属于黄杆菌科 (Flavobacteriaceae) 黄杆菌属 (*Flavobacterium* spp.) 和屈挠杆菌科 (Flexibacteraceae) *Leadbetterella* 属。克隆子 cs-19 与纯培养的 *Flavobacterium* sp. (GQ144414) 有 96% 的相似性。克隆子 cs-29 与从棉花废料堆肥中分离的 *Leadbetterella byssophila* (AY854022) 有 93% 的相似性。

厚壁菌门 (Firmicutes): 厚壁菌门包含 1 个 OTUs, 代表性克隆子为 cs-52 (HQ115567), 属于芽孢杆菌科 (Bacillaceae) *Anoxybacillus* 属, 与纯培养的嗜热细菌 *Anoxybacillus flavithermus* (FJ950739) 具有 99% 的相似性。

3 讨论

新疆乌鲁木齐 10 号冷泉由于处于地震断裂带

处, 泉水时常受到地球内部各种化学元素的影响, 其中一些化学元素如 CO_2 、 H_2 、 N_2 等能够作为潜在的电子受体, H_2S 、 CH_4 等作为电子供体, 因此这些化学物质的存在为微生物多种形式的自养和异养代谢类型提供可能^[9]。本文对其泉水中细菌多样性的研究结果也证实了这一点, 并且发现变形菌门细菌为绝对优势类群 (总量的 98%), 而其中存在大量的与硫化物以及氢气代谢相关的光合自养和化能自养类群 (如硫杆菌属、噬氢菌属、硫发菌属和 *Sulfurovum*)。这一结果与加拿大极地高盐含硫冷泉和美国密歇根含硫冷泉泉水中该类群占优势相一致, 但具体亚纲及类群结构却有所不同。例如, 在极地冷泉中包含有该门 5 个亚纲 (α -、 β -、 γ -、 δ -、 ϵ -变形菌纲), 其中 δ -变形菌纲占优势, 在密歇根冷泉中 δ -和 ϵ -变形菌纲占优势。但在 10 号冷泉中却未检测到 δ -亚纲类群, 而 ϵ -变形菌纲类群却只占总量的 <1%。另外, 该门中细菌具体分类也与含硫冷泉或者其他含硫环境中的有所不同, 如在极地冷泉中硫代谢类群高达整个文库的 76%, 密歇根冷泉中 40% 左右^[9,18], 而本文中仅发现三个硫氧化群 (硫杆菌属、硫发菌属和 *Sulfurovum*, 占整个文库的 13%), 但并未发现硫酸盐还原菌。可能的原因是硫酸盐还原菌可能存在于沉积物或菌席中, 它们将水体中的硫酸盐还原, 产生硫化氢, 这也与泉水中硫酸盐含量较低而硫化氢含量较高相吻合, 因而这一类群也与喀斯特地貌的形成有一定关系^[18]。

军团菌属 (*Legionella*) 是 10 号冷泉细菌第一大类群 (占整个文库的 57%), 而这一类群也是首次在含硫化物冷泉中发现。那么其是否与 10 号冷泉泉水起源有关系, 目前还尚不清楚。新疆乌鲁木齐 10 号冷泉泉水来自泉区东南的博格达山区的大气降水和高山积雪融水, 它们循环于不同深度, 然后到达泉区^[4], 在此过程中有可能会携带一些陆地或空气微生物类群。因此泉水中存在的军团属细菌是该泉水的土著细菌还是外来的细菌类群, 还有待进一步的分析研究。值得注意的是本文所发现的军团菌克隆子序列与 GeneBank 中纯培养菌相似性均低于 97%, 说明在此环境中可能存在大量的军团菌新种, 而军团菌属细菌是一种具有高度爆发流行性的呼吸道感染的致病菌^[19], 是引起军团菌病的重要病原体^[20]。因此这些军团菌新类群是否是新的病原菌是否会给下游人畜健康造成威胁有待继续研究。

另外,在这些细菌 16S rRNA 基因序列中,cs-52 与纯培养的嗜热细菌具有较高的相似性,而这些嗜热细菌迄今为止多在温泉中发现。但也曾有报道在南极洲冰层湖泊的厚冰中也发现过嗜热细菌。由于乌鲁木齐 10 号泉处于地震断裂带上,冰冷的地下水有可能受地球深层热液区水流的影响、交汇从而可能将一部分嗜热微生物带入冷泉中,因此该序列的发现可能能够为地震检测研究提供一定的参考。

冷泉属于地下水生态系统,而其也被认为是一种极端环境。一些研究表明,从地下水中分离得到的一些类群可以降解在它们生存环境中不存在的一些异质性物质,具有潜在的应用于污染物治理的价值。本文采用免培养法对乌鲁木齐 10 号冷泉细菌的研究发现了大量的新类群(总量的 64%),由于该泉处于地震断裂带上,受地球各种化学元素的影响,因而很有可能存在一些新的代谢类型,因此该泉可能是一个潜在的新菌种资源宝库。

参考文献

- [1] 蒋凤亮,李桂如,王基化. 地震地球化学. 北京:地震出版社,1989.
- [2] 高小其,陈华静,杨又陵,李志海,许秋龙. 2004 年 12 月 26 日印尼 8.7 级强震新疆地区的同震效应. 地震地磁观测与研究 (*Seismological and Geomagnetic Observation and Research*), 2006, 27: 40-46.
- [3] Cinzia F, Alessandro A, Rocco F, Sergio G, Mariano V. Geochemical monitoring of ground waters (1998-2001) at Vesuvius volcano (Italy). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 2004, 133: 81-104.
- [4] 高小其,许秋龙,王道,李艳萍,李新勇,崔勇. 地下流体中强震源兆场兆及强震(群)远场兆特征的研究. 山西地震 (*Earthquake Research in Shanxi*), 2002, 2: 14-19.
- [5] 高小其,许秋龙,张学敏,李艳萍,卢静芳,崔勇. 乌鲁木齐 10 号泉流体综合观测及映震灵敏性初析. 内陆地震 (*Inland Earthquake*), 2000, 14(3): 243-251.
- [6] 崔勇,兰陵. 乌鲁木齐地区水汞空白值较高原因分析. 内陆地震 (*Inland Earthquake*), 2001, 15(4): 360-365.
- [7] Christian R, Gerhard W. Natural communities of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 2336-2344.
- [8] Andreas, Ines Wilhartitz. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1248-1259.
- [9] Nancy NP, Dale TA, Wayne HP, Charles WG, Lyle GW. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(5): 1532-1543.
- [10] Nancy NP, Charles W. Greer, Dale T. Andersen, Stefanie Tille. Heterotrophic and Autotrophic Microbial Populations in Cold Perennial Springs of the High Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(22): 6898-6907.
- [11] Jun Zeng, Hong mei Yang, Kai Lou. Prokaryotic diversity of a non-sulfide, low-salt cold spring sediment of Shawan County, China. *Journal of Basic Microbiology*, 2010, 50(5): 484-493.
- [12] 曾军,杨红梅,吴江超,徐建华,张涛,孙建,娄恺. 新疆沙湾冷泉沉积物中免培养古菌多样性初步研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(5): 574-579.
- [13] Shaheen BH, Nasreen B, James TH. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda Lake in california. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 1030-1042.
- [14] Reysenbach L, Giver L, Wickham G. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3417-3418.
- [15] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 697-703.
- [16] 徐建华,杨红梅,曾军,李智,娄恺. 新疆玛纳斯热气泉免培养土壤细菌多样性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(5): 568-573.
- [17] Kimura MA. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [18] Anita Chaudhary, Sheridan Kidd Haack, Joseph W. Duris, Terence L. Marsh. Bacterial and archaeal phylogenetic diversity of a cold sulfur-rich spring on the shoreline of Lake Erie, Michigan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15): 5025-5036.

- [19] 李涛. 军团菌的研究进展. 中外健康文摘 (*World Health Digest Medical Periodical*), 2008 , 5(1) : 7-8.
- [20] 赵利伟, 胡朝晖, 宣瑞红等. 聚合酶链反应-酶切分型

鉴定广州地区环境水源军团菌. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(11) : 1532-1536.

Bacterial community structure and diversity in a cold sulfur spring in Xinjiang faulting zone

Hui Li^{1,2}, Jun Zeng¹, Xiaoqi Gao³, Hongmei Yang¹, Tao Zhang¹, Xiaofang Yang³, Jian Sun¹, Kai Lou^{1*}

¹Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agriculture Science, Urumqi 830091, China

²College of Life Science of Shihezi University, Shihezi 832003, China

³Seismological Bureau of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830011, China

Abstract: [**Objective**] In order to investigate composition and diversity of bacterial in a cold sulfur spring in Xinjiang faulting zone. [**Methods**] Environmental total DNA was directly extracted from the water of the No. 10 cold sulfur spring. The 16S rRNA genes were amplified from the total DNA by PCR with bacteria-specific primers and construction a clone library. Positive clones were randomly selected from the library and identified by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The unique RFLP pattern corresponded sequences were sequenced, BLAST and then constructed phylogenetic tree. [**Result**] In total, 228 positive clones were screened and grouped into 33 Operational Taxonomic Units (OTUs). The clone coverage C value was 92%. 33 Operational Taxonomic Units were divided into 3 phyla with Blast analysis and RDP classifier: Proteobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes. Proteobacteria (98%) was the absolutely dominant group, of which 20% of the clones were highly related to the known photoautotrophic and chemoautotrophic bacteria (> 97% sequence similarity). Besides, 64% of the clones showed less than 96% of sequence similarity with sequence deposited in GenBank database, of them 54% sequences were affiliated to genus *Legionella* spp. [**Conclusion**] Bacterial diversity in No. 10 cold sulfur spring was low, but maybe have a diversity of novel species and lineages. In addition, large number of novel species of *Legionella* were detected in the spring water may suggest the water potentially a source of Legionnaires disease and may constitute a menace to the health of human and livestock that lived down the spring.

Keywords: Xinjiang faulting zone, sulfur cold spring, bacterial diversity, 16S rRNA genes clone library, Phylogenetic tree

(本文责编: 张晓丽)