

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(5):568-573; 4 May 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

新疆玛纳斯热气泉免培养土壤细菌多样性分析

徐建华^{1,2}, 杨红梅², 曾军^{1,2}, 李智^{1,2}, 娄恺^{2*}

(¹ 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

(² 新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要:【目的】了解新疆玛纳斯热气泉土壤免培养细菌群落组成及多样性。【方法】采用免培养法直接从土壤样品中提取总 DNA, 利用细菌通用引物对土壤总 DNA 进行 16S rDNA 扩增, 构建细菌 16S rDNA 文库。使用 *Hae* III 限制性内切酶对阳性克隆进行限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP), 挑选具有不同酶切图谱的克隆进行测序、比对并构建 16S rDNA 系统发育树。【结果】从土壤细菌 16S rDNA 文库中随机挑选了 170 个阳性克隆, 共得到 29 个不同的分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。系统发育分析归为 6 个门: 酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和浮霉菌门 (Planctomycetes)。其中厚壁菌门 (Firmicutes) 为绝对优势类群, 占整个细菌文库的 71%。29 个 OTUs 中有 14 条序列与 GenBank 中相关序列的相似性低于 97% (序列长度约 1.5 kb), 占序列总数的 48%。【结论】热气泉土壤细菌种群多样性较低, 但存在大量潜在细菌新种。

关键词: 细菌多样性; 16S rDNA; 热气泉; 地下煤火; 限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 05-0568-06

地下煤火是指在自然条件下, 赋存于地下的煤体与空气接触后, 发生一系列化学反应, 从氧化自燃到剧烈燃烧后形成的具有一定规模、并对环境产生一定影响的煤自燃现象^[1]。热气泉是指地下煤火加热煤层上覆和周边含水层, 由岩层节理、裂隙、断裂处或煤层燃烧坍塌所形成的孔洞中, 喷出含放射性氡和各种元素水蒸汽的热汽释放口^[2-3]。热气泉气体温度高 (60-300℃), 成分复杂 (CO、CO₂、C₂H₄、C₂H₆、C₂H₈、NO_x), 伴随着气体上升至地表的冷却过程中, 其中溶解的化学成分沉积于周围土壤中, 硫、铵、硝酸盐浓度增加^[4], 地表土壤温度升高, 局部形成高氡、高温、高湿微环境^[3]。

地下煤火区主要分布于中国、美国、印度、俄罗

斯及印度尼西亚等地, 为保护环境及煤炭资源, 各国均进行了有效治理, 因此热气泉数量及分布区逐年减少, 相关研究主要集中在地下煤火的地质学、探测、信息提取及防灭火方法^[1]。对其上覆土壤的微生物研究, 国外缺乏系统性, 国内无相关报道。

新疆现有的地下煤田火区已有上千年的发展史^[1]。早在 20 世纪 30-40 年代, 我国地质学家袁复礼、黄汲清等就曾对新疆侏罗纪煤层的自燃现象有过研究, 指出其自燃产物主要是矽砂和硫磺, 另外还有明矾和雄黄^[1]。千年的地下煤火构成了稳定的选择压力, 引发其上覆土壤微生物群落演替, 推动种群的持续进化, 是微生物多样性的独特研究模型。为此, 本文采集新疆玛纳斯火烧洼热气泉土壤样品,

基金项目: 国家“973 项目”前期研究专项 (2008CB417214); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题 (XJYS0203-2007-04)

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

作者简介: 徐建华 (1984-), 男, 硕士研究生, 湖北随州人, 主要从事嗜热微生物研究。E-mail: hbxbj1984@126.com

收稿日期: 2009-11-10; 修回日期: 2010-01-14

直接提取土壤总 DNA, 通过构建细菌 16S rDNA 文库, 分析其群落组成, 为全面而深入研究高温、高湿环境微生物的适应性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 2008 年 8 月, 在新疆玛纳斯火烧洼热气泉 (43°49'16" ~ N, 86°12'01" ~ E) 采集土壤样品。采样点海拔 1655 m, 洞内温度 65℃。采样铲沿热气泉内表面四周均匀采集 0-5 cm 土壤, 均匀混合后装入无菌聚乙烯袋, 避光, 存放 -20℃ 冰箱备用。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 试剂、*Hae* III 限制性内切酶、pUC18-T 均购自大连宝生公司。PCR 扩增仪 (Eppendorf, 德国), 离心机 Eppendorf 5417R (Eppendorf, 德国)。

1.2 土壤细菌群落 16S rDNA 基因文库的构建

1.2.1 土壤总 DNA 提取与纯化: 总 DNA 提取采用玻璃珠-SDS 结合法^[5-8], 用 0.8% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收。

1.2.2 细菌 16S rDNA PCR 扩增: 用细菌 16S rDNA 通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGGHTA CCTTGTTACGACTT-3' 进行扩增。PCR 扩增反应体系: 2 × PCR mix (含 *Taq* 酶 2.5 U/25 μL) 25 μL, 上下游引物 (10 pmol/L) 1.5 μL, 模板 (土壤 DNA) 10 ng, 无菌 ddH₂O 补足 50 μL。PCR 条件: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 53℃ 40 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 7 min。

1.2.3 细菌 16S rDNA 克隆文库的构建及阳性克隆的筛选: PCR 产物经胶纯化后与 pUC18-T 载体连接, 连接产物化学法转化入 *E. coil* DH5α 感受态细胞, 以氨苄青霉素 (100 μg/mL) 抗性和菌液 PCR 电泳检测, 阳性克隆为大小 1.7 kb 的 DNA 片段 (16S rDNA 片段约 1.5 kb, 载体两端约 0.2 kb)。

1.3 RFLP 分析

1.3.1 RFLP 分型: 挑取阳性克隆子用 T 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段进行菌液 PCR 扩增, *Hae* III 酶切。酶切体系: PCR 产物 17.5 μL, 2 × M buffer 2.0 μL, *Hae* III 0.5 μL。37℃ 酶切过夜。酶切 PCR 产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测并分型。

1.3.2 克隆文库分析: 绘制稀有度曲线, 以 Coverage C 评价构建的克隆文库库容 ($C = 1 - n/N$)。N 代表 16S rDNA 克隆文库的库容, n 代表在 16S

rDNA 克隆文库仅出现一次的 OTU 数量)。计算 Shannon-Wiener index (H') ($H' = - \sum_{i=1}^N P_i \ln P_i$, $P_i = n_i/N$, N 为分析文库克隆总数, n_i 为第 i 个 OTU 所代表的克隆数)。

1.4 系统发育分析及核酸序列收录号

根据 RFLP 分型结果, 挑选代表性克隆送上海生工测序。运用 CHECK_CHIMERA 在线工具 (<http://rdp8.cme.msl.edu/cgi/chimera.cgi>) 进行嵌合体检查和剔除。在 GenBank 中搜索调取出具有高相似度的序列, 利用 MEGA4.0 软件进行比对、邻接法 (Neighbor-joining method) 聚类分析和系统发育树的构建^[9]。所得细菌 16S rDNA 序列均已提交 GenBank 数据库, 序列登录号: GU113027-GU113056。

2 结果

2.1 16S rDNA 克隆文库的 RFLP 分型

从土壤细菌 16S rDNA 文库中随机挑选了 170 个阳性克隆, 进行 *Hae* III 酶切分型, 得到 42 个基因型 (图 1)。

2.2 克隆文库覆盖率分析

以 42 个 OTUs 和克隆子数绘制稀有度曲线。从稀有度曲线看, 曲线未明显达到饱和 (图 2), OTU 随着克隆子数的增加而增加, 但增幅较小, 文库的覆盖率为 90.59%, 表明 170 个细菌克隆子的文库基本涵盖了本环境中大部分的细菌类群。Shannon-Wiener 指数 $H' = 1.46$ 。

2.3 细菌 16S rDNA 系统发育学分析

对 RFLP 分型的 42 个基因型的代表克隆子测序 (约 1.7 kb), 去载体后简并 (序列相似性 $\geq 97\%$ 归为同一个 OTU) 为 29 个 OTUs。系统发育分析归为 6 个门: 酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和浮霉菌门 (Planctomycetes) (图 3)。其中厚壁菌门 (Firmicutes) 为绝对优势类群, 占整个细菌文库的 71%, 其次是变形菌门, 占克隆总数的 9.41%; 酸杆菌门占克隆总数的 8.82%, 其余各门所占比例较少 (表 1)。

2.3.1 厚壁菌门 (Firmicutes): 厚壁菌门包括 8 个 OTUs。5 个归属于芽孢杆菌科 (Bacillaceae), 均与纯培养 *Bacillus* 属序列相似, 代表性克隆子 Hswb-2、10、21、29 和 106, 相似性 92% - 99%, 为该文库的优

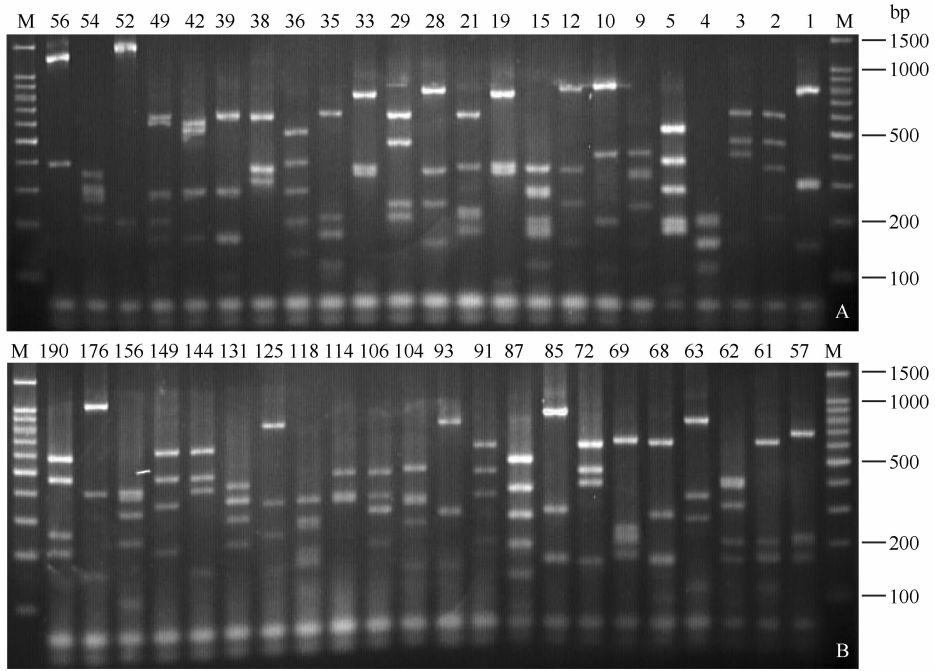


图1 细菌 16S rDNA 克隆文库 RFLP 分析

Fig. 1 RFLP analysis of 16S rDNA clone library.

M: 100bp DNA ladder; 1-190: the bands of 16S rDNA restricted by *Hae* III.

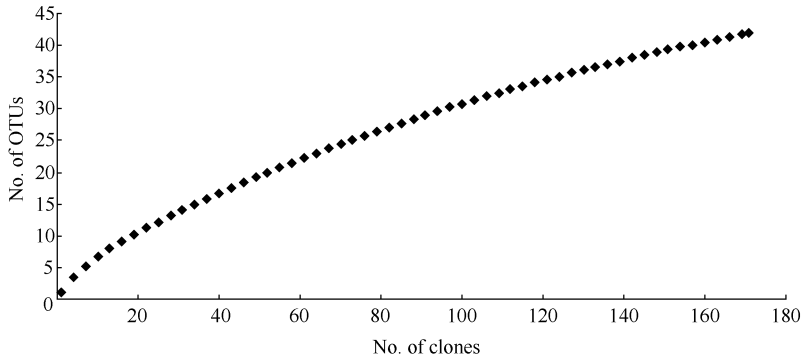


图2 细菌 16S rDNA 克隆文库稀有度曲线(克隆分型相似性 $\geq 97\%$)

Fig. 2 Rarefaction curves generated for 16S rDNA in clone libraries.

Clones were grouped into phylotypes at a level of sequence similarity $\geq 97\%$.

表1 热气球土壤细菌 16S rDNA 基因克隆文库序列分析结果

Table 1 The sequences analysis results of bacterial 16S rDNA genes clone library from the hot gas spring soil			
Bacterial division	No. of Clones	Percent of Total/%	OTU*
Firmicutes			
Bacillaceae	118	69.41	5
Paenibacillaceae	4	2.35	3
Proteobacteria			
Betaproteobacteria	12	7.06	5
Gammaproteobacteria	4	2.35	2
Acidobacteria	15	8.82	6
Bacteroidetes	9	5.29	4
Planctomycetes	3	1.76	1
Actinobacteria	1	0.58	1
Unidentified	4	2.35	2
Total	170	100	29

* An identical type was defined as an OTU with $\geq 97\%$ similarity.

势菌群,占整个克隆的 69%。3 个归属于类芽孢杆菌科 (Paenibacillaceae), 2 个与纯培养的 *Paenibacillus* 相近,序列相似性 89%、93%,代表性克隆子 Hswb-42 和 54;1 个与免培养的 *Paenibacillus* 相近,序列相似性 94%,代表性克隆子 Hswb-131。

2.3.2 变形菌门 (Proteobacteria):变形菌门中包含 7 个 OTUs,分属于 β -和 γ -两个亚纲,高相似序列均来自免培养细菌文库。 β -变形菌纲包括 5 个 OTUs,相似性 90% - 99%,代表性克隆子 Hswb-1、12、63、85 和 104; γ -变形菌纲包括 2 个 OTUs,相似性分别为 96%、99%,代表性克隆子 Hswb-57 和 69,为文库的另一优势菌群。

2.3.3 酸杆菌门 (Acidobacteria): 酸杆菌门包含 6 个 OTUs, 均与免培养该门类群相似, 相似性 98% - 99%, 代表性克隆子 Hswb-9、39、52、56、93 和 190。其中 Hswb-9 与来源于奥地利阿尔卑斯山脉热矿泉环境序列 (登录号: AM902634) 相似性较高。

2.3.4 拟杆菌门 (Bacteroidetes): 拟杆菌门包含 4 个 OTUs。3 个与纯培养该门类群相似, 相似性均为

97%, 代表性克隆子 Hswb-5、15 和 36。1 个与免培养该门类群相似, 相似性 97%, 代表性克隆子 Hswb-118。

2.3.5 浮霉菌门 (Planctomycetes): 浮霉菌门文库中包含 1 个 OTUs, 与免培养该门类群相似, 相似性 97%。代表性克隆 Hswb-19 与来源于地热土壤环境序列 (登录号: AF391976、AF465657) 相似性较高。

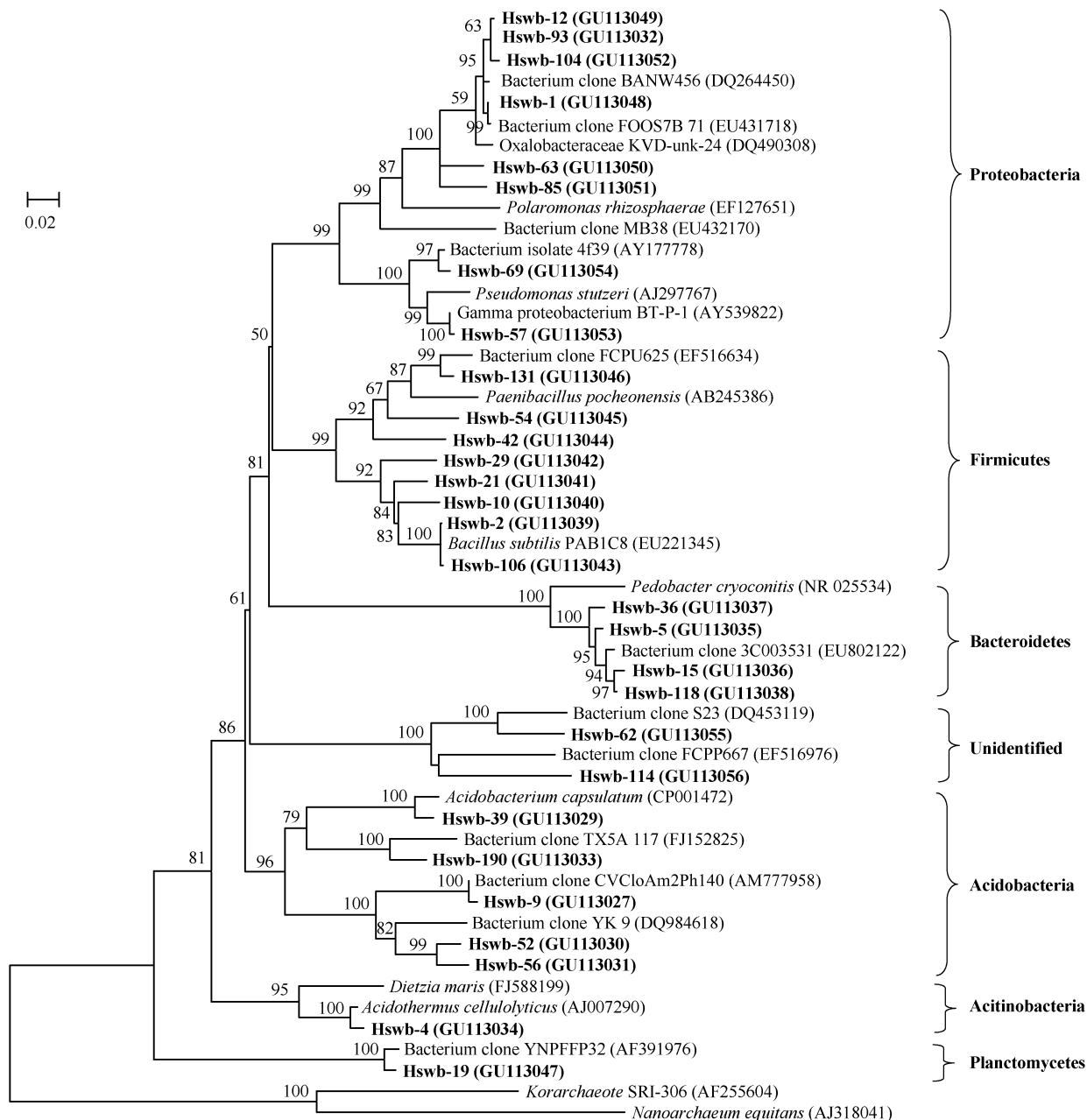


图3 新疆热气泉土壤细菌克隆 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 29 representative OTUs from a 16S rDNA gene clone library of the soils in the hot gas vent, Xinjiang (An OTU was defined as a group of sequences with $\geq 97\%$ similarity). Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence using the Neighbor-Joining method (Saitou&Nei, 1987). Numbers at branching points refer to bootstrap values (1000 replicates; only values above 50% are shown). "Hswb" refers to the clone. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences. The sequences of *Nanoarchaeum equitans* (AJ318041) and *Korarchaeote* SRI-306 (AF255604) were used as outgroup. Bar, 2% sequence divergence.

2.3.6 放线菌门 (Actinobacteria):放线菌门文库中包含 1 个 OTU, 与 *Acidothermus cellulolyticus* (登录号: CP000481) 相似, 相似性 98%, 代表性克隆子 Hswb-4。

2.3.7 未确定分类 (Unidentified):未确定分类包含 2 个 OTUs, 与其相似的序列均来自克隆文库, 且未确定其分类地位, 相似性分别为 87% 和 91%, 代表性克隆子 Hswb-62 和 114。

3 讨论

通过构建并分析细菌 16S rDNA 克隆文库, 明确了热气球土壤细菌群落特征, 以厚壁菌门细菌占绝对优势 (71%)。这与 Rochelle 等人以南极 Erebus Mountain Tramway Ridge 热矿土微生物为研究对象的结果相同, 厚壁菌门为其细菌文库中的优势种群^[10]。美国黄石国家公园 Norris Geyser 盆地的地热土壤细菌优势种群为酸杆菌门^[11], 与本研究结果不同, 原因在于前者热源为火山活动, 后者为地下煤火燃烧, 两者所形成的土壤环境不同。此外, 还有变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、浮霉菌门和放线菌门中部分种群栖息于热气球土壤中, 种群组成与其它地热土壤细菌的类似^[11-12]。

多样性指数是反映群落结构特征的重要指标^[13]。本研究的土壤细菌 Shannon-Wiener 指数均低于西北黄土高原柠条种植区^[13]、红树林^[14]和澳洲亚热带森林土壤^[15]的相应数值, 主要是热气球土壤高温、高湿的极端微环境使然。Tobin-Janzen 等人采用末端限制性酶切片长度多态性分析 (T-RFLP) 方法的研究结果也表明, 地下煤火上覆土壤微生物多样性随采样点温度的升高而降低, 与土壤 pH、土壤湿度、无机氮含量和总硫等无关^[16]。且该热气球细菌文库中有 14 条序列与 GenBank 中相关序列的相似性低于 97% (序列长度约 1.5 kb), 占序列总数的 48%, 表明新疆玛纳斯热气球土壤存在大量潜在细菌新物种。

另外值得注意的是, 在本研究的热气球土壤与南极热矿土^[10]、美国黄石国家公园温泉^[17]及太平洋海隆深海热液区沉淀物^[18]中, 均有隶属于浮霉菌门的克隆序列, 这表明该门的部分类群具有耐高温、生态适应强的特点。从该门分类信息看, 存在一个未分离培养且与厌氧氨氧化菌相关的科, 本研究克隆文库中隶属于浮霉菌门序列可能归入该科, 并在

地热土壤氮循环中起重要作用, 也有研究表明嗜热硫代谢菌、氮循环菌富集于地下煤火上覆土壤中^[4]。

新疆是我国煤田火灾最严重的省区, 自 20 世纪 80 年代以来, 国家已累计投入上亿元资金进行煤田灭火, 预计到 2015 年新疆所有煤田火区将全部实现灭火。彼时, 热气球这一独特的地质遗迹也会随之消失。因此, 本文所构建的新疆玛纳斯热气球土壤细菌文库, 在保存热气球细菌基因资源的同时, 也为今后的深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 张建民, 管海燕, 曹代勇, 等. 中国地下煤火研究与治理. 北京: 煤炭工业出版社, 2008.
- [2] 吴继尧, 姚华, 郑玉建. 新疆热气球调查分析. 新疆医学院学报 (*Acta Academiae Medicinae Xin Jiang*). 1994, 17(2): 93-96.
- [3] 新疆地方志编纂委员会. 新疆通志·地质矿产志. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1997.
- [4] Dion P, Nautiyal CS. *Microbiology of Extreme Soils*. Germany, 2008.
- [5] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied And Environmental Microbiology*, 1996, 62: 316-322.
- [6] 张瑞福, 曹慧, 崔忠利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43(2): 276-281.
- [7] 杜涛, 黄小毛, 侯明生, 等. 从土壤中提取 DNA 用于 PCR 扩增. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2003, 30(6): 1-5.
- [8] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 提取. *农业环境科学学报 (Journal of Agro-Environment Science)*, 2005, 24(5): 854-860.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007, 24: 1596-1599.
- [10] Rochelle M S. *Microbial Biodiversity of Thermophilic Communities in Hot Mineral Soils of Tramway Ridge, Mt. Erebus, Antarctica*. The University of Waikato. The paper of Master's Degree. 2007.
- [11] Norris TB, Wraith JM, Castenholz RW, et al. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Applied And Environmental Microbiology*, 2002, 68: 6300-6309.

- [12] Yeager CM, Northup DE, Grow CC, et al. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Applied And Environmental Microbiology*, 2005, 71: 2713-2722.
- [13] 张薇, 胡跃高, 黄国和, 等. 西北黄土高原柠条种植区土壤微生物多样性分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(5): 751-756.
- [14] 阎冰. 红树林土壤细菌和古菌的 16S rDNA 多样性研究. 华中农业大学博士论文, 2007.
- [15] He J, Xu Zh, Jane Hughes. Molecular bacterial diversity of a forest soil under residue management regimes in subtropical Australia. *Microbiological Ecology*, 2006, 55: 38-47.
- [16] Tobin-Janzen T, Shade A, Marshall L, et al. Nitrogen changes and domain bacteria ribotype diversity in soils overlying the Centralia, Pennsylvania underground coal mine fire. *Soil science*, 2005, 170(3): 191-201.
- [17] Philip H, Christian P, Karen LH, et al. Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(2): 366-376.
- [18] 刘欣, 邵宗泽. 东太平洋海隆深海热液区沉淀物微生物多样性的研究. *台湾海峡 (Journal of Oceanography in Taiwan Strait)*. 2008, 27(3): 271-277.

Bacterial diversity in a hot gas spring soil of MaNasi County, Xinjiang by culture-independent approach

Jianhua Xu^{1,2}, Hongmei Yang², Jun Zeng^{1,2}, Zhi Li^{1,2}, Kai Lou^{2*}

(¹College of Life Science and Biotechnology of XinJiang University, Urumqi 830046, China)

(²Institute of Microbiology, XinJiang Academy of Agriculture Science, Urumqi 830091, China)

Abstract: [**Objective**] In order to investigate bacteria diversity in a hot gas spring soil of MaNasi county, Xinjiang. [**Methods**] Total DNA were directly extracted from the soil of a hot gas spring from Xinjiang. 16S rDNA were amplified directly from purified DNA by PCR with universally bacteria-specific rDNA primers and cloned. Positive clones were identified by restriction fragment length polymorphism (RFLP), and unique rDNA types clones were sequenced, analysed and then constructed phylogenetic tree. [**Results**] Twenty-nine operational taxonomic units (OTU) from 170 positive clones were found belonging to 6 phyla: Firmicutes, Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinobacteria. Firmicutes (71%) was the absolutely dominant components of the soil bacterial community. 14 sequences (about 1.5 kb) from 29 OTUs showed less affiliation with known taxa (<97% sequence similarity). [**Conclusion**] Soil bacterial diversity is low in the hot gas spring soil, but exit a large number of new unknown taxon in this environment.

Keywords: bacterial diversity; 16S rDNA; hot gas spring; underground coal mine fire; restriction fragment length polymorphism (RFLP)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of National Programs for Fundamental Research and Development (2008CB417214) and the Open Project of the Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment (XJYS0203-2007-04)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail. tsinghua. edu. cn

Received: 10 November 2009/ Revised: 14 January 2010