

新疆沙湾冷泉沉积物中免培养古菌多样性初步研究

曾军^{1,2}, 杨红梅², 吴江超^{1,3}, 徐建华^{1,2}, 张涛², 孙建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研究所, 乌鲁木齐 830091)

(³ 新疆农业大学食品科学与工程学院, 乌鲁木齐 830001)

摘要:【目的】了解新疆沙湾冷泉沉积物的古菌组成及多样性。【方法】采用免培养法,液氮研磨提取冷泉沉积物总 DNA,使用古菌通用引物进行 16S rRNA 基因扩增,构建 16S rRNA 基因文库。对阳性克隆进行 *Hha* I 限制性酶切分型,选出具有不同酶切图谱的序列进行测序,将所得序列与 GenBank 数据库中序列比对并构建 16S rRNA 基因系统发育树。【结果】从冷泉沉积物古菌 16S rRNA 基因文库中随机挑选了 121 个阳性克隆,共得到 22 个不同的可操作分类单元,BLAST 结果表明全部克隆子归属于泉古菌门(Crenarchaeote)中免培养类群。系统发育分析归类为 Soil-Freshwater-subsurface group 和 Marine group I,2 个亚群并且各占整个文库的 50%。其中 40% 左右的克隆子与具有无机碳和硝酸盐同化能力的泉古菌有高的相似性。此外还发现 40% 的克隆子与低温泉古菌类群具有很高的相似性。【结论】新疆沙湾冷泉沉积物中古菌类群多样性较低,但存有大量高度适应此低温、贫营养环境的泉古菌类群。

关键词: 冷泉;地下水;古菌多样性;16S rRNA 同源性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0574-06

地下水是水资源的重要组成部分,在我国干旱与半干旱地区,地下水往往是主要的,有时甚至是唯一的生活以及工农业生产供水水源^[1]。地下水环境为极端生境^[2],尽管缺乏光照、难以获得有机碳等营养物质,但却是各类微生物的栖息地^[3]。冷泉是具有地下水特征、水温小于 20℃^[4] 的特殊地表水,是研究地下水微生物的独特材料。

古菌(Archaea)过去一段时间来多指那些只生长在高温、高盐等特殊环境中的类群^[5-6],但随着 16S rRNA 基因作为分子标记的广泛应用,发现古菌也广泛存在于低温环境中,如极地海洋^[7]、高山^[8]

等。近 10 年来对陆地冷泉古菌的研究,国外学者主要围绕德国一硫磺冷泉中的念珠状菌席展开,利用荧光原位杂交技术发现这种菌席是由丝状细菌和一种广域古菌构成的互利共生体^[9-10];对泉水原位培养,获得了一株嗜冷广域古菌新种^[11]并且发现大量无法纯培养的新嗜冷泉古菌^[12]。此外,有研究表明加拿大极地硫磺冷泉中的一些低温泉古菌参与了硫化物代谢^[13]。因此硫化物对含硫冷泉中原核微生物群落组成和稳定性起到主要作用。但是,与国外高硫化物或高盐冷泉相比,新疆沙湾冷泉不含硫化物、低盐,那么这种缺乏硫化物作为能源物质的

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(XJYS0203-2009-02)

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

作者简介: 曾军(1982-),男,新疆人,硕士研究生,主要从事微生物生态研究。E-mail: leo924.student@sina.com

收稿日期: 2009-11-07; **修回日期:** 2010-01-11

冷泉,古菌类群组成又是如何?与此相关的研究国内外均未见报道。本文通过构建 16S rRNA 基因文库对新疆沙湾冷泉沉积物古菌的组成及多样性进行分析,为深入研究冷泉生态系统的功能微生物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集及理化性质分析:沙湾冷泉(43°50'30 N, 085°22'35 E)海拔 1500 m,泉水清澈透明,全年温度保持在 5.5 - 7.5°C 之间,水质呈弱酸性(pH 5.0),主要阳离子为 Na⁺ 和 Ca²⁺,阴离子为 SO₄²⁻ 和 HCO₃⁻,不含硫化氢。2007 年 5 月 18 日和 2008 年 9 月 19 日先后两次在沙湾冷泉采集冷泉沉积物(表层 10 cm)。样品装入无菌 50 mL 离心管中,4 h 之内于 4°C 保存运回实验室。一部分样品直接用于环境总 DNA 的提取,其余部分于 -70°C 冰箱长期保存。

按照灌溉水盐分分析标准(GB5084-85)对沙湾冷泉水体中化学成分:CO₃²⁻ 和 HCO₃⁻ 采用硫酸滴定法测定;SO₄²⁻ 采用二氧化钡滴定法测定;Ca²⁺, Mg²⁺ 采用 EDTA 络合滴定法测定;K⁺, Na⁺ 采用火焰光度计测定,总氮采用凯氏定氮法测定。

1.1.2 主要试剂和仪器:博大泰克凝胶纯化试剂盒、pMD18-T vector (TaKaRa, 大连)、*Hae* III 限制性内切酶(TaKaRa, 大连)、PCR 纯化试剂盒(生工, 上海)、PCR 扩增仪(Eppendoff, 德国)、电击杯(Bio-Rad, 美国)、电转化仪(Bio-Rad)、凝胶成像仪(Bio-Rad)、电泳仪(Bio-Rad)等。

1.2 环境总 DNA 提取及纯化

总 DNA 提取参照文献[14]报道的方法并根据沙湾冷泉样品特性稍作改动。采用 0.8% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收总 DNA^[15],以去除沉积物中腐殖酸、色素等杂质对后续 PCR 的影响^[16]。

1.3 PCR 扩增古菌 16S rRNA 基因及克隆文库构建

采用 21F (5'-YGGTTGATCCTGCCRG-3') 和 958R (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'), 扩增古菌

16S rRNA 部分基因。PCR 反应条件及扩增体系参照文献[17]。PCR 产物经纯化后与 pMD18-T 载体连接,连接产物电转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α 中。以氨苄青霉素(100 μ g/mL)抗性和蓝白斑法筛选阳性转化子。

1.4 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, 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,扩增体系及条件参照文献[18]的方法。用限制性内切酶 *Hha* I, 37°C 过夜酶切 PCR 产物,酶切 PCR 产物进行 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。每个不同的酶切电泳带型作为一个可操作分类单元 (Operational Taxonomic Units OTUs),其对应的克隆子 PCR 产物送上海生工测序。

1.5 稀有度及覆盖率分析

利用 EstimateS 8.0 软件 (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimateS>) 进行稀有度分析。运用公式 $C = 1 - n/N$ 计算文库覆盖率 C , 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。

1.6 系统发育分析及核酸序列收录号

运用 CHECK_CHIMERA (<http://wdecn.nig.ac.jp/RDP/cgis/chimera>) 对测序所得的古菌 16S rRNA 基因序列进行嵌合子序列的检查和剔除,之后在 GenBank 中进行比对,选择相似度较高的相关序列,进行 CLUSTAL X 多重比对。使用 MEGA 4.0 中邻接法 (neighbor-joining method) 进行聚类分析和系统发育树的构建^[19]。利用 RDP 8.1 (Ribosomal Database Project release 8.1) (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 在线进行归类。所得古菌 16S rRNA 基因序列均已提交 GenBank 数据库,序列登录号:GQ302595 至 GQ302616。

2 结果和分析

2.1 沙湾冷泉水理化性质分析

沙湾冷泉水的物理化学指标测定结果表明,沙湾冷泉水呈现酸性,总矿化度小于 3 属于微咸水^[1],主要优势阴阳离子为 SO₄²⁻ 和 Na⁺ (表 1)。

表 1 沙湾冷泉泉水理化性质

Table 1 Physicochemical parameters of the water from shawan cold spring

Temp/°C	pH	Total Nitrogen/ (g/L)	c(Sample)/(g/L)							
			Main anions				Main cations			
			CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺
5.5 - 7.5	5.0	4.490	0.0071	0.1290	0.0226	0.2897	0.1148	ND	ND	1.6632

ND: Not Detected, 未检测到

2.2 稀有度分析结果

从稀有度曲线和文库覆盖率 $C = 96\%$ 可以看出, 文库已很接近饱和, 当序列数大于 80 个后曲线变得

平缓(图 1)。这表明虽然随着序列数的增加古菌多样性还会增加, 但是增幅非常小, 因此认为 121 个古菌克隆子已涵盖了此环境中绝大多数的古菌类群。

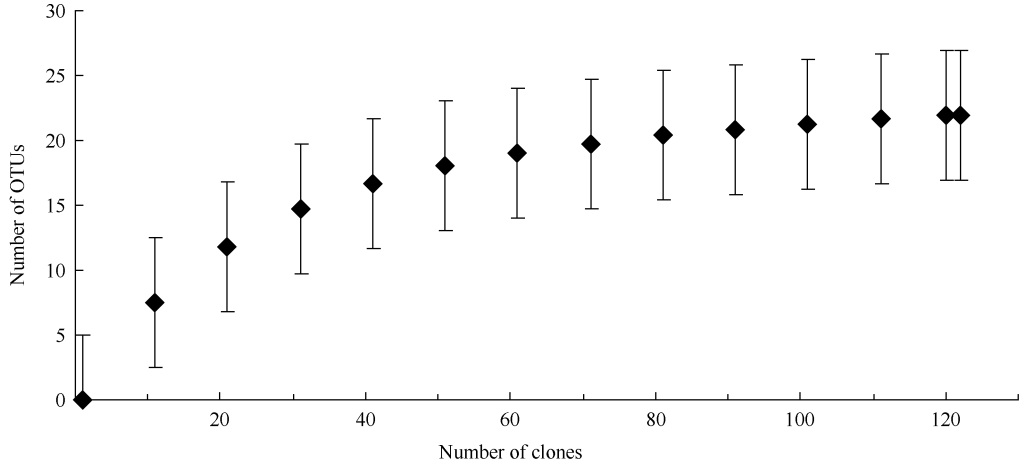


图 1 沙湾冷泉沉积物古菌克隆文库稀有度曲线

Fig. 1 Rarefaction curve for shawan cold spring sediment-derived Archaeal clone library. Error bars represent 95% confidence intervals.

2.3 古菌 16S rRNA 基因克隆文库构建及系统发育分析结果

古菌 16S rRNA 基因文库共转化出 508 个阳性克隆子, 随机挑选了 121 个进行 *Hha* I 酶切分型得到 22 个不同的酶切电泳带型 (OTUs), 并且其相应的序列全都不为嵌合子序列。BLAST 序列比对表明其全部归属于泉古菌门 (Crenarchaeota), 系统发育分析和 RDP 归类法, 归为 2 个亚群 Group I 和 II 并且各占整个古菌文库的 50% (图 2)。Group I 包括 12 个基因型归类于 Soil-Freshwater-Subsurface group, 系统发育分支为三支。克隆子 sw-A342 (GQ302602) 独立分支与另外两个分支分歧明显, 其为一淡水免培养泉古菌 uncultured archaeon (AF227640) 具有 91% 的序列相似性。其余两个分支间序列相似性较高并且紧密聚集在一起, 其中克隆子 sw-A348 (GQ302603) 和 sw-A398 (GQ302607) 与匈牙利一中温热泉中具有氮循环作用的免培养泉古菌 uncultured crenarchaeota

(AJ227941)^[20] 分别具有 98% 和 99% 的相似性。Group II 包括 10 个基因型, 系统发育聚类为 6 个分支, 各个分支间分歧明显, 归类于 Marine group I。其中克隆子 sw-A272 (GQ302595) 与其他分支进化距离最远, 并且与深海沉积物中的泉古菌 uncultured crenarchaeota (FJ784298) 最为相似 (93%)。另外克隆子 sw-A349 (GQ302604)、sw-A248 (GQ302597) 和 sw-A320 (GQ302600) 也都独自构成一个进化分支, 高序列相似性菌株来自于南非超深金矿和南极深海沉积物中免培养泉古菌 (DQ133425), (DQ190067) 和 (EU910613) 分别具有 93%、99% 和 95% 的相似性 (未发表, NCBI)。此外虽然克隆子 sw-A373 (GQ302606)、sw-A88 (GQ302590) 和 sw-A412 (GQ302610) 聚为一支, sw-A447 (GQ302614)、sw-A407 (GQ302609) 和 sw-A433 (GQ302612) 聚类为另一支, 但这两个分支间序列相似性很高 (96% - 97%)。其中克隆子 sw-A447 (GQ302614) 与德国 Sippenauer Moor 硫磺冷泉水中

发现的新嗜冷泉古菌克隆子 uncultured 性^[12]。

crenarchaeota (AM055706) 具有 99% 的序列相似

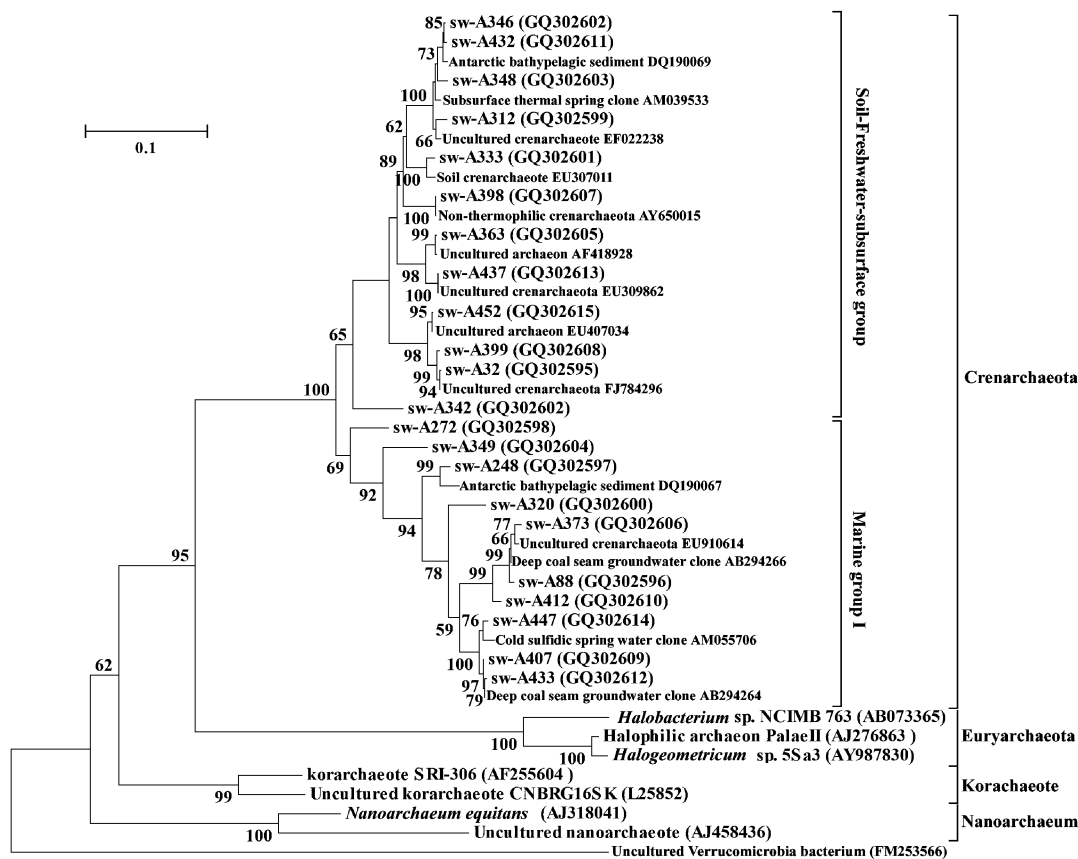


图2 Neighbor-joining 法构建新疆沙湾冷泉沉积物古菌 16S rRNA 部分序列系统发育树

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial archaeal 16S rRNA sequences (accession number from GQ302595 to GQ302616) amplified from Xinjiang Shawan cold spring sediment samples. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 sample date sets. Uncultured Verrucomicrobia bacterium (FM253566) was used as the outgroup sequence. The scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

3 讨论

泉古菌门 (Crenarchaeota) 中存有能够固定无机碳的类群^[21], 其对无机碳的吸收随海水深度而增加, 并且在海洋中部及深部的丰富度甚至超过了细菌^[22]。本文研究发现沙湾冷泉沉积物中一些泉古菌克隆子与深海能固定无机碳的泉古菌具有较高的 16S rRNA 基因相似性, 由于沙湾冷泉水中含有相对较高的无机碳, 因此推测它们可能参与此生境中的碳循环。另外由于亚群 Group I 中绝大部分类群 (占整个文库的 47%) 与能够利用硝酸盐的免培养嗜中温泉古菌类群具有大于 97% 的相似性^[20], 加之泉水中较高的硝酸盐含量, 因此推测沙湾冷泉中可能存在大量能够利用硝酸盐的泉古菌类群, 并且

它们可能对此环境中氮的循环起重要作用。

值得注意的是, 虽然新嗜冷泉古菌类群最早是通过原位培养发现于德国硫磺冷泉中^[12], 但尚未见有研究表明其和硫代谢相关, 此外相似类群也大量分布在其它不含硫环境中^[7]。沙湾冷泉中存在着大量 (40%) 与新嗜冷泉古菌类群具有高相似类群 (16S rRNA 基因序列相似度为 96% - 99%) 的研究结果表明, 该类群很可能是冷泉或其它低温类型水体的特有种并且不参与硫代谢。

另外沙湾冷泉沉积物中仅检测到泉古菌一门, 这可能与沙湾冷泉的理化性质有关。因为该泉水含盐量低, 属于微咸水 (表 1), 沉积物基本由砂石粒组成, 颗粒之间较为松散, 沉积层较薄, 透气性好, 所以不适于如嗜盐古菌、甲烷氧化菌等广域古菌^[13,23] 的

生存。由于不含硫化物,沙湾冷泉中泉古菌类群都不参与硫化物代谢而这一结果与其他含硫冷泉水和沉积物中泉古菌参与硫化物代谢不同^[13]。

目前,研究者仅获得了一株低温泉古菌门的纯培养菌^[24],新的原位培养技术只是证实德国硫磺冷泉中存有大量新低温泉古菌,但并未得到纯培养物^[12]。虽然沙湾冷泉沉积物中可能存在着大量低温泉古菌,由于尚未得到纯培养菌株,所以它们的生理生化特性和在此环境中所起的功能不详。因此如何得到这些新类群的纯培养物值得进一步研究。

参考文献

- [1] 施鑫源,张元禧. 地下水水文学. 北京:中国水利水电出版社,1997.
- [2] Danielopol D, Pospisil P, Rouch R, et al. Biodiversity in groundwater: a large scale view. *Trends in Ecology and Evolution*, 2000, 15:223 -224.
- [3] Griebler C, Lueder T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 2008, 10: 1365 -2427.
- [4] 蒋凤亮,李桂如,王基化. 地震地球化学. 北京:地震出版社, 1989.
- [5] Stetter KO. Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 18:149-158.
- [6] Wose C, Kandler O. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria and Eucarya. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87:4576-4579.
- [7] Murray E, Preston C, Massana R, et al. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 25 85-2595.
- [8] Auguet JC, Casamayor EO. A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(4):1080 -1086.
- [9] 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, 67:2336-23 44.
- [10] Christian R, Christine M, Ruth H, et al. Ecology and microbial structures of archaeal/bacterial strings-of-pearls communities and archaeal relatives thriving in cold sul? dic springs. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 50:1-11.
- [11] Ruth H, Christine M, Thomas A, et al. New insights into the lifestyle of the cold-loving SM1 euryarchaeon: natural growth as a monospecies biofilm in the subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:192-199.
- [12] Marcus K, Christian R, Christine M, et al. A cold-loving crenarchaeon is a substantial part of a novel microbial community in cold sulphidic marsh water. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57:55-66.
- [13] Nancy NP, Dale TA, Wayne HP, et al. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the canadianhigh arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 5:1532-1543.
- [14] Zhou J, Bruns M, Tiedje J. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:316-322.
- [15] 陈彬,马超,周世宁,等. 西藏羊八井废弃地热热井的细菌多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009,49:217-226.
- [16] Von W, G? bel F, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 21:213-229.
- [17] Nasreen B, Shomari R, Briana R, et al. Phylogenetic composition of arctic ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:781- 789.
- [18] 马小龙,王芸,杨红梅,等. 新疆泥火山细菌多样性. *生态学报 (Acta Ecologica Sinica)*, 2009, 29: 3722-3728.
- [19] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16:111-120.
- [20] Treusch H, Leininger S, Kletzin A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 12:1985-1995.

- [21] Wuchter C, Schouten S, Boschker H, et al. Bicarbonate uptake by marine crenarchaeota. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 219:203-207.
- [22] Gerhard JH, Thomas R, Eva T, et al. Contribution of archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71:2303-2309.
- [23] Sørensen B, Teske A. Satisfied communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72:4596-4603.
- [24] Schleper C, DeLong F, Preston M. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180:5003-5009.

Uncultured archaeal diversity in cold spring sediment of Shawan, Xinjiang, China

Jun Zeng^{1,2}, Hongmei Yang², Jiangchao Wu^{2,3}, Jianhua Xu^{1,2}, Tao Zhang², Jian Sun², Kai Lou^{2*}

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

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

(³College of Food Science of XinJiang Agriculture University, Urumqi 830000, China)

Abstract: [**Objective**] We surveyed the composition and diversity of archaea in Xinjiang Shawan cold spring sediment. [**Methods**] We studied the archaeal diversity in the cold spring sediment by direct extracting environmental DNA with liquid nitrogen grinding method and constructing clone libraries of 16S rRNA gene amplified with archaeal-specific primers. Amplified 16S rRNA gene fragments were analyzed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and the unique RFLP patterns were selected for sequencing, alignment and constructing 16S rRNA gene phylogenetic tree. [**Results**] A total of 121 positive clones were randomly screened from the library and 22 Operational Taxonomic Units (OTUs) were determined. BLAST analysis indicated that all OTUs were affiliated with the phylum Crenarchaeota. Phylogenetic analysis classified them into two subgroups of Soil-Freshwater-subsurface group, and Marine group I and represented 50% of total clones, respectively. Of them, clones with the potential to assimilate nitrate accounted for 40% of the total archaeal clones. In addition, 40% of clones were related to the cold-loving Crenarchaeota. [**Conclusion**] These results suggested that the spring sediment harbors a low diversity of archaea, however, a large fraction of Crenarchaeota indigenous species might exist and well adapted to the cold and oligotrophic environment.

Keywords: cold spring; groundwater; archaea; 16S rRNA homogeneity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 973 Pre-research Program of Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2008CB417214) and the Open Project of the Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment (XJYS0203-2009-02)

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

Received: 7 November 2009/ Revised: 11 January 2010