

## 云南洱源牛街热泉原核微生物多样性分析

孙盼, 顾淳, 任菲, 戴欣\*, 董志扬\*

(中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**【目的】通过分析富含高分子有机物的云南洱源牛街热泉原核微生物 16S rRNA 基因克隆文库, 丰富对高温热泉原核微生物多样性的认识, 为进一步开发和利用该热泉微生物资源奠定基础。【方法】构建洱源牛街高温热泉原核微生物 16S rRNA 基因克隆文库, 通过测序和序列相似性比对以及聚类分析研究该热泉原核微生物的多样性。【结果】该热泉原核微生物以细菌为主, 包括变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 等在内的约 10 个细菌类群, 其中变形菌门中的  $\beta$ -变形菌纲 ( $\beta$ -*Proteobacteria*) 为优势菌群, 其次为拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿菌门 (*Chlorobi*); 古菌的生物量和丰度较细菌少, 分属广古菌 (*Euryarchaeota*) 和泉古菌 (*Crenarchaeota*) 两个类群, 以广古菌为优势类群。

**关键词:** 16S rRNA 基因; 原核微生物多样性; 高温微生物; 热泉

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1510-09

高温热泉是自然界中一种独特的生态系统。由于它与地球早期的环境比较接近, 对其中的微生物进行研究有助于认识生命的起源和进化<sup>[1]</sup>; 另一方面, 热泉中的微生物具有耐热的生理特性, 使其成为各种高温酶的潜在来源而具有较高的应用价值<sup>[2]</sup>。因此, 高温热泉一直是国内外研究的热点之一。与其他环境微生物多样性的研究类似, 对高温热泉微生物的认识也主要采用传统的分离培养方法和 20 世纪 80 年代发展的 16S rRNA 基因多样性分析方法。目前利用传统的分离培养方法已经从美国黄石国家公园、云南腾冲、冰岛等地诸多热泉中分离到一些新的微生物属种。如 1969 年从美国黄石公园蘑菇泉中分离得到的嗜热细菌 *Thermus aquaticus*<sup>[3]</sup> (分子生物学广泛使用的 *Taq* DNA 聚合酶最早就是从该菌中获得的), 从云南腾冲热泉中分离得到的硫化叶菌 *Sulfolobus tengchongensis*<sup>[4]</sup>, 从冰岛热泉中分离得到的氢氧化细菌 *Hydrogenophilus islandicus*<sup>[5]</sup>,

它们都不同程度地增加了我们对热泉微生物多样性的了解。基于 16S rRNA 基因多样性的研究证实, 与自然界中超过 99% 的微生物尚未获得分离培养的情况一致<sup>[6]</sup>, 高温热泉中也存在大量未培养微生物。如对美国黄石公园 Obsidian Pool 热泉的 16S rRNA 基因多样性分析, 发现其中有 54 个新的未培养细菌种属、36 个新的未培养古菌种属<sup>[7]</sup>, 对黄石公园其他多处热泉<sup>[7-9]</sup>、印尼热泉<sup>[10]</sup>、西藏热泉菌藻席<sup>[11]</sup>等的研究也都得到了相似的结果。由此可见, 16S rRNA 基因多样性分析极大的丰富和扩展了我们对热泉微生物多样性的认识。

我国云南地区有丰富的热泉资源, 其中洱源牛街热泉位于云南省洱源县牛街村的村民居住地, 为中性高钙高氟热泉。由于居民长期在该热泉中屠宰牲畜, 使热泉中高分子有机物含量非常丰富, 从而成为能够降解和利用这些高分子有机物的高温微生物的天然富集地, 也成为分离获得高温降解菌、降解

**基金项目:** 国家“863 计划”重点课题 (2007AA100604); 中国科学院知识创新工程重大项目 (KSCX1-YW-11B1); 北京市自然科学基金重点项目 (5081001)

\* 通讯作者。戴欣, Tel: +86-10-64807418, E-mail: daixin@im.ac.cn; 董志扬, Tel: +86-10-64807337, E-mail: dongzy@im.ac.cn

**作者简介:** 孙盼 (1984-), 女, 陕西人, 硕士研究生, 研究方向为酶分子生物学。E-mail: sunpan\_1@163.com

**收稿日期:** 2010-04-30; **修回日期:** 2010-06-12

酶/酶系及基因的新来源。本研究旨在分析这一特殊热泉中细菌、古菌 16S rRNA 基因多样性,为丰富我们对高温热泉原核微生物多样性的认识,指导我们从中分离获得新的微生物资源奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:**2008年7月,样品采自云南洱源牛街热泉(北纬 26.6040',东经 99.5649')。热泉水温 58℃,pH 为 7.0,富含钙、氟。采集热泉上清水样,使用 Millipore 公司的 7kDa 浓缩滤膜浓缩后置于无菌离心管,密封,4℃ 运回实验室后 -80℃ 保存。

**1.1.2 主要仪器和试剂:**7KD 浓缩滤膜购自 Millipore 公司;土壤 DNA 提取试剂盒为 MO BIO 公司的 UltraClean™ Mega Soil DNA Isolation Kit;Taq 酶、DNA 纯化试剂盒购自 TIANGEN;T4 连接酶、pGEM-T 载体购自 Promega;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5a 细胞为实验室保存。

### 1.2 样品总 DNA 的提取以及 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

**1.2.1 样品总 DNA 的提取:**使用 MO BIO UltraClean™ Mega Soil DNA Kit,根据其说明书提取样品总 DNA。

**1.2.2 微生物 16S rRNA 基因片段的特异性扩增:**细菌通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'和 1492R:5'-ACGGCTACCTGTTACGACT-3';古菌通用引物 A571F:5'-GCYTAAAGSRICCGTAGC-3'和 UA1204R:5'-TTMGGGGCATRCIKACCT-3'(M = C/A, R = A/g, Y = C/T, S = G/C)。PCR 扩增程序为:95℃ 5 min;95℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min 30 sec,30 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并经 DNA 纯化试剂盒纯化。

### 1.3 16S rRNA 基因克隆文库的构建

纯化后的 PCR 产物连接 pGEM-T 载体,转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(50 mg/L)的 IPTG/X-gal 平板上 37℃ 培养过夜。挑取白斑菌落提取质粒,利用质粒酶切法进行筛选,对阳性克隆的插入片段进行测序。

### 1.4 基于 16S rRNA 基因片段的微生物多样性分析

使用 RDP (Ribosomal Database Project) 的 CHECK—CHIMERA 程序 (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgi/chimera.cgi>) 分析并去除嵌合序列。将得

到的有效序列用 Bioedit 软件进行排序 (Alignment) 并获得相似性矩阵,相似性 ≥97% 的序列被认为是相同的分类单元 (OTU, operational taxonomic unit) 并用其中一个序列作为代表<sup>[12]</sup>,每个 OTU 代表序列提交 GenBank 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 并获得该数据库的收录号;对每一个代表序列进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 相似性比对,根据比对结果选取参照序列<sup>[13]</sup>,用 Clustal X1.83 进行排序, TREECON 软件构建系统发育树 (Jukes-Cantor 参数模型计算进化距离,邻接法 Neighbor-Joining 构建系统进化树)。

本研究获得的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 收录号为 HM184913-HM184988。

## 2 结果和讨论

### 2.1 热泉微生物元基因组 DNA 的提取与原核微生物 16S rRNA 基因扩增

7 kDa 滤膜过滤浓缩水样,可得到病毒,真细菌,古细菌等微生物。使用 MO BIO 公司的 Ultra-Clean® Mega Soil DNA Isolation Kit 对热泉浓缩水样进行 DNA 的直接提取。从每毫升浓缩水样中可提取约 1-2 μg 的 DNA,电泳结果表明提取获得了长度大于 10 kb 的 DNA 片段(图 1)。将总 DNA 分别采用细菌和古菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示,细菌的扩增产物为 1500 bp 左右的单一条带,古菌的扩增产物为 650 bp 左右的单一条带,说明 DNA 样品纯度较好且 PCR 扩增的特异性良好,满足建库要求。

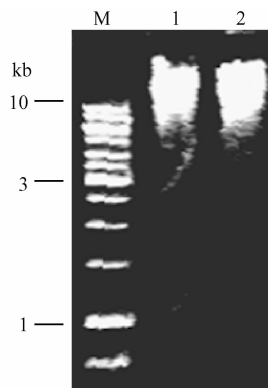


图 1 洱源热泉总 DNA

Fig. 1 Total DNA extracted from Eryuan hot spring. M: 1kb DNA marker; 1 and 2: meta-DNA sample.

实验发现,提取的总 DNA 进行细菌 16S rRNA 基因扩增时,需要对 DNA 模板进行 50 倍稀释,而在进行古菌 16S rRNA 基因扩增时,必须以原始浓度

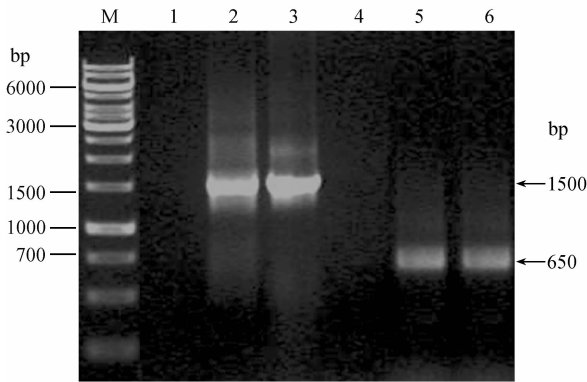


图2 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR amplification of 16S rRNA genes. M: 1kb DNA marker; 1,4: negative control (water as template); 2,5: positive control (bacteria; *E. coli*; archaea; *S. solfataricus* P2); 3,6: bacterial and archaeal 16S rRNA gene PCR products amplified from Eryuan hot spring DNA.

的 DNA 模板进行扩增,这一现象间接说明洱源热泉中细菌的生物量比古菌的高。同样的环境中,古菌的生物量较细菌少的情况,在包括高酸、高盐、高温等极端环境在内的很多环境中都存在,可能是与细菌相比,古菌需要更多的能量去维持代谢<sup>[14]</sup>。

## 2.2 16S rRNA 基因克隆文库的构建及测序

纯化后的 PCR 扩增产物通过连接转化分别构建细菌和古菌 16S rRNA 基因克隆文库,从文库中各随机挑取 200 个阳性克隆测序并保存。得到细菌 16S rRNA 基因序列 112 条,古菌 16S rRNA 基因序列 84 条,将这 196 条序列运用 CHECK-CHIMERA 程序进行嵌合体检验,发现其中 11 条为嵌合序列剔除,其余的 185 条用于后续分析。

## 2.3 基于 16S rRNA 基因序列的原核微生物多样性分析

通过序列之间的相似性比对发现,得到的 108 条细菌的序列可归属为 58 个不同的 OTU,76 条古菌序列可归属为 18 个不同的 OTU。

**2.3.1 16S rRNA 基因序列的相似性分析:**将代表 58 个细菌和 18 个古菌 OTU 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 相似性比对,结果见表 1,表 2。

由表 1 可见,洱源热泉的细菌优势克隆为 bac1 (13 条原始序列)和 bac17(11 条原始序列)所代表微生物。其中与 bac1 最相似的是同样来自热泉的 uncultured bacterium clone VS-6 (FM994916),它们的相似性为 93.36%;与 bac17 最相似细菌为 *Leptotrichia goodfellowii* LB57 (NR\_025649),但它们的相似性仅为 84.42%。表明洱源热泉的优势细菌

都是目前未知的新物种。此外,在洱源热泉细菌的 58 个 OTU 中,与已知微生物相似性  $\geq 97\%$  的有 17 个,占总数的 29.3%,而其余超过 70% 的克隆所代表的 OTU 与已知微生物的相似性都小于 97%,可见热泉中绝大多数的细菌为新物种。在这些细菌 16S rRNA 基因序列中,bac33、bac57、bac106 的序列与来自动物粪便或动物器官的细菌存在较高的相似性,这些代表中温微生物的序列,究竟是采样时带来的污染还是中温微生物生活在高温环境中的“亲戚”,则有待进一步分析。

古菌 16S rRNA 基因序列的相似性比对结果(表 2)表明,该热泉的优势克隆为产甲烷古菌,其中克隆 Arc1 (8 条)、Arc 2 (16 条)、Arc4 (12 条)和 Arc5 (4 条)分别与产甲烷菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus delta H* (AY196660)、*Methanobrevibacter gottschalkii strain PG* (U55239)、*Methano-linea tarda NOBI-1* (NR\_028163) 和 *Methanobrevibacter ruminantium M1* (AY196666) 相似性大于 97%,而这四株产甲烷菌中,除了热自养甲烷杆菌(*Methanothermobacter thermautotrophicus delta H*)分离自高温气田外,其他三株均来源于动物的粪便或瘤胃<sup>[15]</sup>。其余 36 个克隆所代表的 14 个 OTU 则与目前已培养的微生物相似性较低(82% - 94.81%),如 Arc13 所代表的 7 个克隆,其最相似的序列是来自盐湖的未培养古菌 16S rRNA 基因,但相似性也只有 91.49%,表明洱源热泉中同样存在很多古菌新物种。

**2.3.2 基于 16S rRNA 基因的聚类分析:**运用 TREECON 软件构建的洱源热泉原核微生物 16S rRNA 基因系统发育树见图 3,图 4 和图 5。并根据聚类树分析该热泉微生物的类群归属,通过 Microsoft excel 绘制统计图(图 6,图 7)。

由图 3、图 4 和图 6 可见,洱源热泉的细菌多样性丰富,主要包括以下类群:变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)、绿菌门(*Chlorobi*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、脱铁硫杆菌门(*Deferribacteres*)、纤维杆菌门(*Fibrobacteres*)、团菌门(*Dictyoglomi*)以及热孢菌门(*Thermotogae*),其中主要菌群为变形菌门(37.6%),其次为拟杆菌门/绿菌门(22.9%)。对归属到变形菌门的 OTU 的进一步分析表明(图 4), $\beta$ -变形菌纲( $\beta$ -*Proteobacteria*)为其中的优势类群,占细菌总类群的 22.9%、变形菌纲的 60.1%。此前对美国黄石国家公园的 coffee pot

表 1 细菌 16S rRNA 基因序列 BLAST 相似性分析

Table 1 The BLAST results of the bacterial 16S rRNA gene sequences retrieved from Eryuan hot spring

Clone No.	The closest relatives (the GenBank accession Number)	Identity (%)	Sources of the closest relatives
Bac1	Uncultured bacterium clone VS-6 (FM994916)	93.36	hot spring Mizinka
Bac2	<i>Tepidimonas ignava</i> DMS12034 (NR_025041)	97.02	Hot spring
Bac3	<i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132 (AY854022)	93.81	Cotton-waste compost
Bac5	<i>Tepidimonas ignava</i> DMS12034 (NR_025041)	99.53	Hot spring
Bac7	<i>Tepidimonas taiwanensis</i> (AY845054)	96.27	Hot spring
Bac8	<i>Flavobacterium terrigena</i> DS-20 (DQ889724)	96.65	Soil
Bac10	Uncultured bacterium Z-51 (FJ901107)	99.93	Oil field
Bac13	Uncultured bacterium clone WM67 (DQ133928)	93.31	Stream
Bac14	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> NBRC 101217 (AB364234)	97.72	Hot spring
Bac17	<i>Leptotrichia goodfellowii</i> LB57 (NR_025649)	84.42	Human
Bac18	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1 (DQ386264)	93.96	Groundwater
Bac19	<i>Spirochaeta xylanolyticus</i> (AY735097)	98.20	Hot spring
Bac20	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone Skagenf36 (DQ640669)	94.02	Plant
Bac25	Uncultured bacterium clone p-240-a5 (AF371909)	95.99	Swine intestine
Bac27	Uncultured bacterium clone GZ_aaa03h02 (EU470295)	88.40	Feces
Bac33	Uncultured bacterium clone p-1497-b5 (AF371789)	99.37	Swine intestine
Bac34	Uncultured bacterium clone LD_Ba_Top_B21	94.47	Soil
Bac36	<i>Thiofaba tepidiphila</i> NBRC 103218 (AB304258)	97.65	Hot spring
Bac37	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i> LMG 4025 (AY468448)	98.26	Marine mud
Bac38	<i>Thermomonas hydrothermalis</i> SGM-6 (NR_025265)	99.93	Hot spring
Bac41	Uncultured bacterium clone VS-6 (FM994916)	93.16	Hot spring
Bac43	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> TH-1 (NR_024663)	95.52	Hot spring
Bac44	<i>Thermomonas hydrothermalis</i> SGM-6 (NR_025265)	86.77	Hot spring
Bac46	<i>Caloramator viterbiensis</i> Strain JW/MS-VS5 (NR_025044)	99.00	Hot spring
Bac47	Uncultured bacterium clone J1 (AY526509)	95.47	Thermophilic anaerobic sludge
Bac50	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> JW/VK-KG4 (AF510985)	99.60	Hot spring
Bac52	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> TH-1 (NR_024663)	99.25	Hot spring
Bac54	<i>Ferribacterium</i> sp. CBS-2 (EF222229)	92.18	Hot spring
Bac57	<i>Lactobacillus amylovorus</i> (EF120373)	99.80	Porcine intestine and faeces
Bac59	Uncultured candidate division OP11 bacterium (AF445690)	84.14	Hot spring
Bac62	<i>Chromatium</i> sp. RW (AF384210)	90.23	Hot spring
Bac65	<i>Thiofaba tepidiphila</i> (AB304258)	95.05	Hot spring
Bac67	Candidate division OP8 clone OPB95 (AF027060)	98.70	Hot spring
Bac69	Uncultured Fusobacterium sp. (FM242289)	82.27	Unpolished environment sample
Bac74	Uncultured synthetic wastewater bacterium tmbr15-22 (AF309815)	94.60	Wastewater
Bac75	<i>Caloramator viterbiensis</i> Strain JW/MS-VS5	94.56	Hot spring
Bac76	Uncultured <i>Tepidimonas</i> sp. clone HB2 (EF648016)	96.30	Aerobic activated sludge
Bac80	Uncultured bacterium clone PC06110_B7 (EU101143)	95.45	Cave waters
Bac81	Uncultured bacterium clone 1103200823272 (EU842466)	89.53	Bovine rumen
Bac84	<i>Tepidimonas</i> sp. AA1 (AM042693)	89.53	Hot spring
Bac85	Uncultured synthetic wastewater bacterium (AF309815)	85.04	Wastewater
Bac87	Uncultured bacterium clone Z53M62B	87.31	Phreatic sinkhole
Bac90	Uncultured bacterium clone RRH_aaa04c03	94.40	Mammals gut
Bac94 (2)	Uncultured bacterium clone MO75	97.99	Hot spring
Bac95	Uncultured bacterium (DQ129265)	91.71	Coastal estuarine mud
Bac96	Uncultured bacterium (FJ437850)	89.16	Green lake
Bac97	Uncultured bacterium clone RT_aai12f04 (EU778629)	96.83	Gut microbes
Bac98	Uncultured bacterium (AM406496)	93.33	Human faecal
Bac99	Uncultured bacterium (EU800238)	77.59	Ocean
Bac100	Flavobacteriaceae bacterium ECP37 (EU360966)	91.14	A heavy metal contaminated soil
Bac101	Uncultured bacterium clone Hswb-21 (GU113041)	94.45	Soil
Bac102	<i>Brevibacillus thermoruber</i> (AY196006)	92.23	Hot spring
Bac103	Uncultured synthetic wastewater bacterium tmbr15-22 (AF309815)	98.28	Wastewater
Bac104	Uncultured bacterium clone TDB60 (FJ793179)	99.50	Hot spring
Bac105	<i>Tepidimonas</i> sp. AA1 (AM042693)	94.94	Hot spring
Bac106	<i>Lactobacillus amylovorus</i> strain LAB31 (EF120373)	100	Porcine intestine and faeces
Bac107	Bacterium enrichment culture clone R4-60B (GU196222)	88.59	Soil
Bac108	Uncultured bacterium (FM994915)	95.93	Hot spring

表 2 古菌 16S rRNA 基因序列 BLAST 相似性分析

Table 2 The BLAST results of archaeal 16S rRNA gene sequences retrieved from Eryuan hot spring

Clone No.	The closest relatives (the GenBank accession Number)	Identity( % )	Sources of the closest relatives
Arc1	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> delta H ( AY196660 )	99. 24	High temprature gas reservoir
Arc 2	<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i> strain PG ( U55239 )	98. 62	Feces of humans and other animals
Arc3	Uncultured archaeon clone AK20 ( AY555819 )	97. 83	Hot spring
Arc4	<i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1 ( NR_028163 )	99. 53	Hot spring
Arc5	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> M1 ( AY196666 )	98. 91	Aminal feces
Arc6	<i>Methanobrevibacter</i> sp. LRSD2 ( AB026912 )	82. 35	Anaerobic digested sludge
Arc7	Uncultured archaeon clone 060329	95. 24	Gut
Arc8	Uncultured archaeon clone AK21 ( AY555820 )	97. 20	Hot spring
Arc9	<i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1 ( NR_028163 )	94. 81	Anaerobic digested sludge
Arc10	<i>Crenarchaeote</i> SRI-298 ( AF255608 )	94. 78	Hot spring
Arc11	Uncultured euryarchaeote MERTZ_21 CM_297 ( AF424536 )	90. 77	Sediment
Arc12	Uncultured euryarchaeote gene ( AB119624 )	86. 98	Sediment
Arc13	Uncultured archaeon ( EU329805 )	91. 49	Hypersaline lake
Arc87	Uncultured methanogenic archaeon ( EU284782 )	88. 33	Rumen
Arc91	Uncultured crenarchaeote clone CWCN2 ( AY940180 )	97. 82	Soil
Arc95	Uncultured Thermoplasmatales archaeon ( EU731600 )	95. 60	Hypersaline microbial mat
Arc96	Uncultured euryarchaeote MERTZ_21 CM_297 ( AF424536 )	90. 98	Sediment
Arc139	Uncultured Crenarchaeotes clone QEED1AF121 ( CU917135 )	92. 43	Anaerobic digester

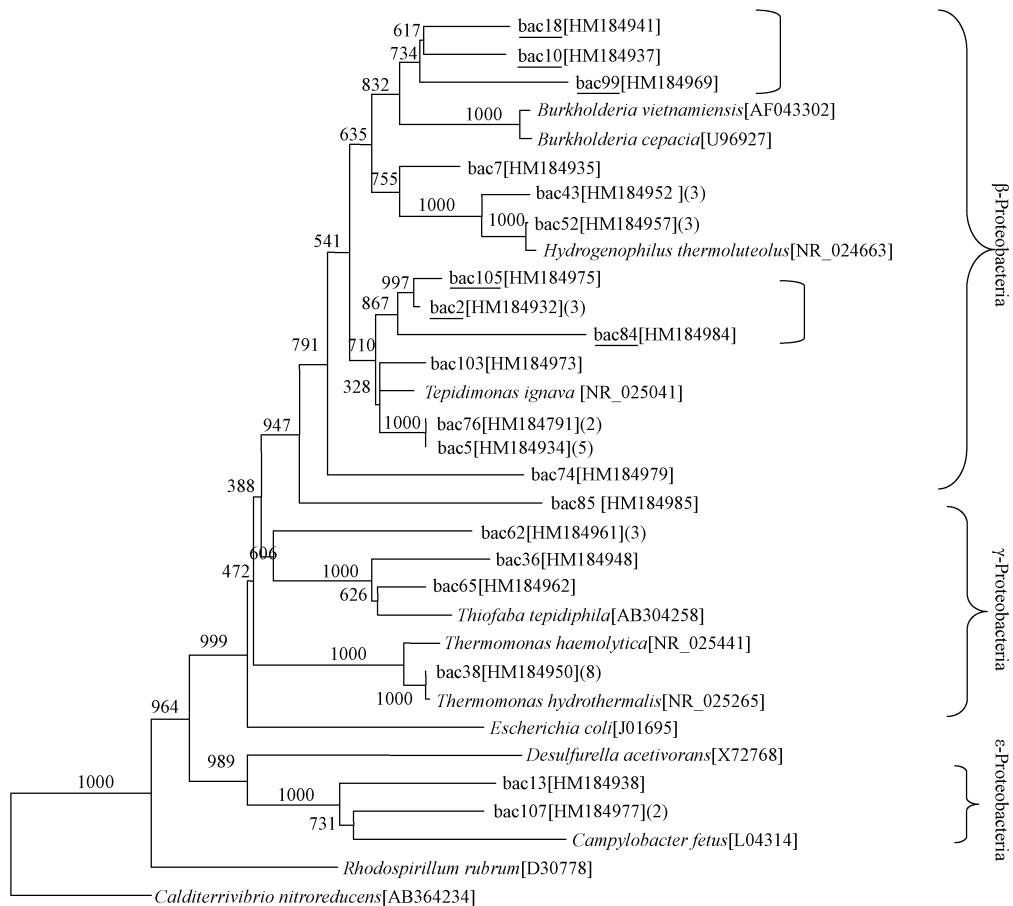


图 3 基于细菌 16S rRNA 基因序列的洱源牛街热泉变形菌门细菌系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of Proteobacteria in Eryuan Niujie hot spring based on the 16S rRNA gene sequences. The numbers at the nodes indicate bootstrap values (1000 resamplings); The numbers in the round brackets following the accession number indicate the numbers of sequences of this OTU. *Calditerrivibrio nitroreducens* [AB364234] is used as outgroup, clones underlined in this diagram cluster new groups.

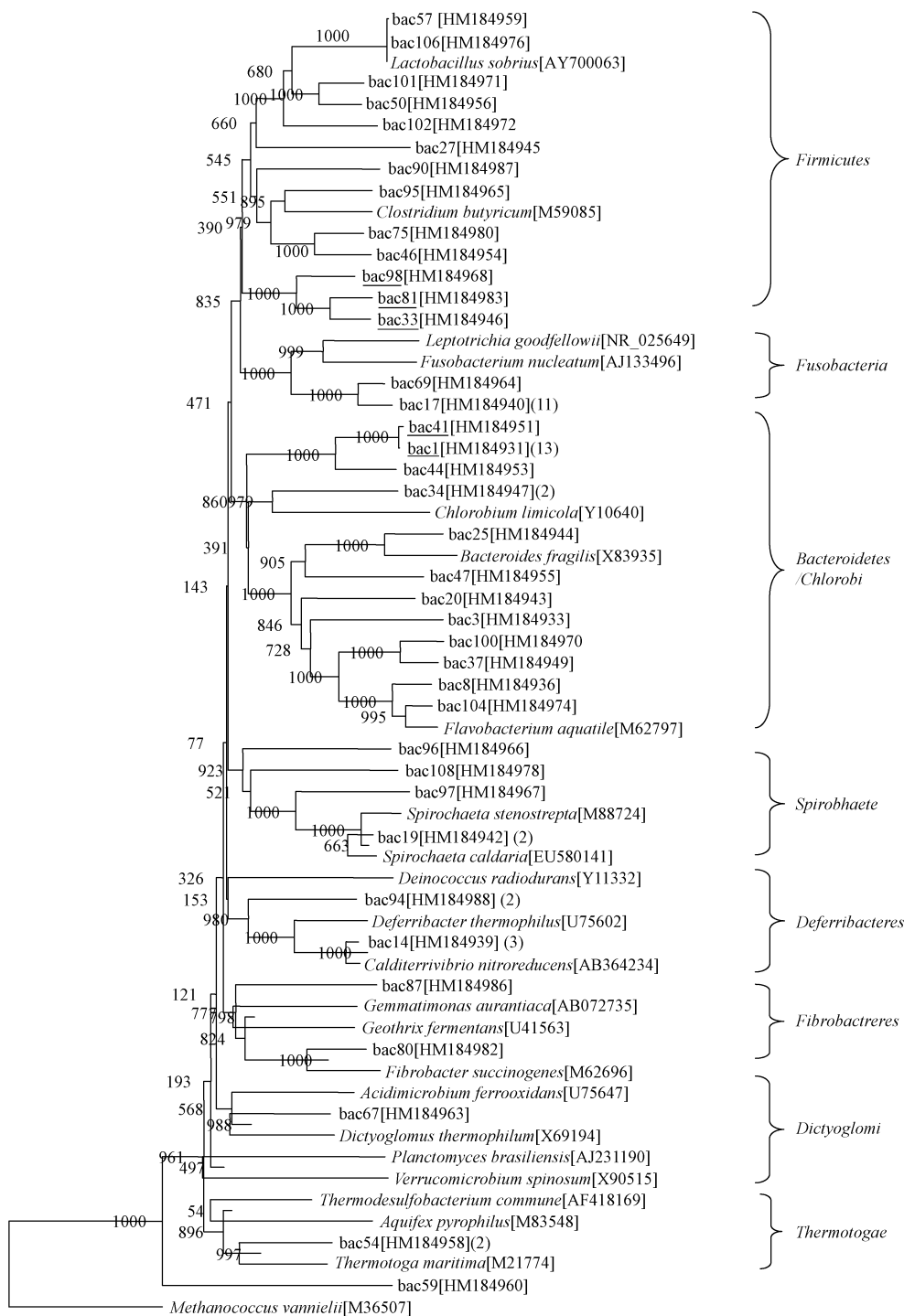


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的洱源牛街热泉 (除变形菌门外) 细菌系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of bacteria (except *Proteobacteria*) in Eryuan Niujie hot spring based on the 16S rRNA gene sequences. The numbers at the nodes indicates bootstrap values (1000 resamplings); The numbers in the round brackets following the accession number indicates the numbers of sequences of this OTU. *Methanococcus vannielii* [M36507] is used as outgroup, clones underlined in this diagram cluster new groups.

热泉 (水温 39°C - 74°C, pH5.8 - 6.9)<sup>[8]</sup>、Obsidian Pool 热泉 (水温 74°C, pH6.7 - 7.6)<sup>[9]</sup> 等多处高温热泉细菌 16S rRNA 基因多样性的研究表明, coffee pot 热泉中主要为放线菌门 (*Actinobacteria*)、产水菌门 (*Aquificae*)、变形菌门、厚壁菌门和栖热恐

球菌 (*Deinococcus-Thermus*) 等微生物类群; Obsidian Pool 热泉主要是产水菌门、变形菌门、团菌门、热孢菌门、栖热恐球菌和热脱铁硫杆菌 (*Thermodesulfobacterium*) 等类群。与洱源热泉不同的是, 这两处热泉的优势菌群均为产水菌门, 在其他一些高温、中性

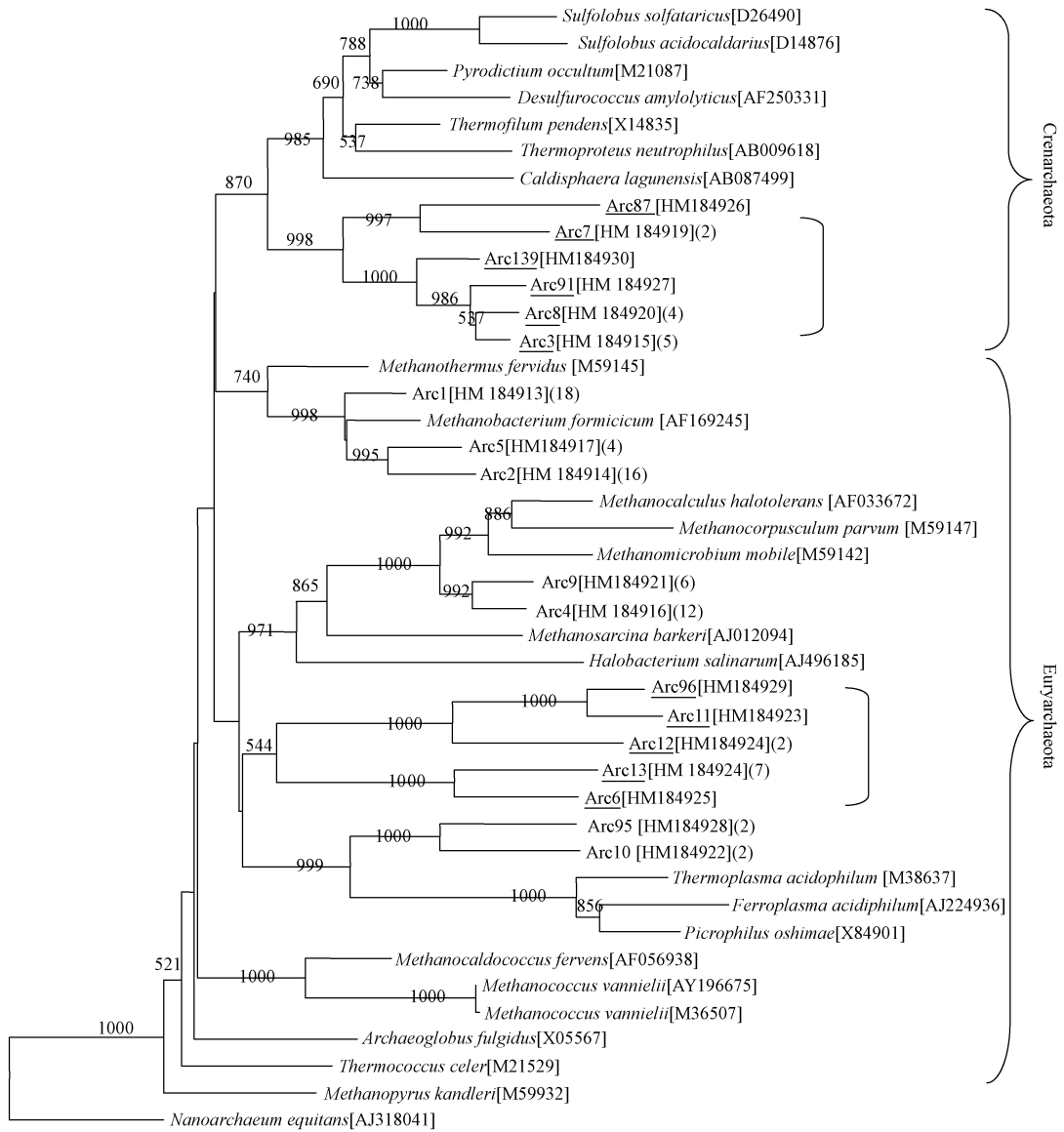


图 5 基于 16S rRNA 基因序列的洱源牛街热泉古菌系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of archaea in Eryuan Niujie hot spring based on the 16S rRNA gene sequences. The numbers at the nodes indicates bootstrap values (1000 resamplings); The numbers in the round brackets following the accession number indicates the numbers of sequences of this OTU. *Nanoarchaeum equitans* [AJ318041] is used as outgroup, clones underlined in this diagram cluster new groups.

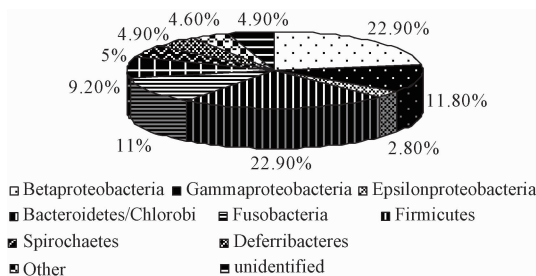


图 6 洱源牛街热泉细菌多样性和类群分布

Fig. 6 Diversity and distribution of phylotypes based on the bacterial 16S rRNA genes retrieved from Eryuan Niujie hot spring, Pie wedges indicate the percentages of each taxon in the library.

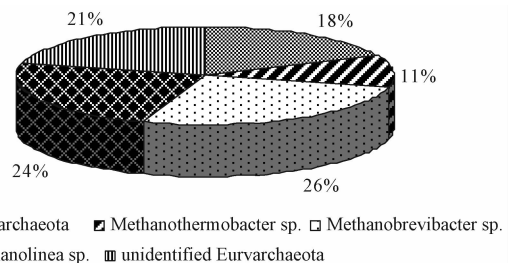


图 7 洱源牛街热泉古菌多样性及类群分布

Fig. 7 Diversity and distribution of phylotypes based on the archaeal 16S rRNA genes retrieved from Eryuan Niujie hot spring, Pie wedges indicate the percentages of each taxon in the library.

热泉中也都曾发现产水菌门为优势菌群<sup>[16]</sup>, 而洱源热泉却以  $\beta$ -变形菌纲优势菌群, 且未发现产水菌门细菌的存在。此外, 细菌聚类树中存在不能归属到已知类群的独立分支(图 3、图 4 中下划线标记的 OTU 形成的分支), 它们与已知细菌的 16S rRNA 基因序列相似性较低(77.59% - 94.94%)(表 1), 这些分支很可能代表未知的细菌新类群。

对古菌 16S rRNA 基因多样性的分析结果(图 5, 图 7)表明, 洱源热泉古菌的多样性少于细菌, 主要归属广古菌(Euryarchaeota)和泉古菌(Crenarchaeota)两个类群, 其中广古菌占 81.6%。此前的研究发现, 美国黄石公园的热泉<sup>[9]</sup>、印尼热泉<sup>[10]</sup>均以泉古菌为古菌的主要类群, 国内研究较多的腾冲热泉也以泉古菌为主<sup>[17]</sup>, 洱源热泉中泉古菌却只占古菌群落的 20% 左右, 其余均为广古菌类群, 且主要是产甲烷古菌。此外由图 5 可见, 洱源热泉中六个泉古菌 16S rRNA 基因序列形成了一个独立的分支, 广古菌中的 Arc96 等代表的 5 个 OTU 也与其它广古菌相距较远, 形成的独立分支(图 5 中下划线标记); 这些分支中约 75% 的序列与已知微生物 16S rRNA 基因相似性小于 97%, 可能代表热泉古菌的新类群。

综上所述, 洱源热泉与其它热泉在细菌和古菌的群落组成和多样性上都存在很大差别, 并且存在很多可能的微生物新类群和新物种, 这一方面与热泉的温度、pH 有关, 另一方面也与热泉的地理位置、其中的硫元素、氟元素、其他矿物元素以及有机物的含量有关<sup>[18]</sup>。导致这些差别的最主要原因目前尚不清楚, 但可以肯定的是, 在云南洱源热泉这一天然高分子有机物高温降解微生物的富集地中存在的这些未被人类认识的原核微生物新类群, 它们作为微生物资源, 具有较明显的理论研究价值和应用前景。目前我们采用分离培养的方法已经从洱源热泉样品中获得热自养产甲烷菌(结果未发表), 而古菌 16S rRNA 基因序列中发现的来自瘤胃的产甲烷古菌, 提示我们瘤胃液的添加可能有利于富集获得洱源热泉中的古菌, 我们后续的实验结果已证实, 瘤胃液确实能促进洱源热泉中古菌的生长(结果未发表)。这些与肠道微生物相似的 16S rRNA 基因序列所代表的物种, 究竟是因当地人屠宰清洗牲畜带入的微生物残骸, 还是长期以来已适应热泉环境而生活在其中的微生物, 都有待于进一步探讨。我们将继续对这一样品进行更深入研究, 以充分认识和开发其丰富的微生物资源。

**致谢** 感谢中国科学院微生物研究所黄力研究员、何永志老师、朱雅新老师以及昆明理工大学生物工程技术研究中心林连兵副教授对我们工作的指导、支持和协助。

## 参考文献

- [ 1 ] Cavichioli R. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2002, 2 (3): 281-292.
- [ 2 ] Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion Chemical Biology*, 2001, 5: 144-151.
- [ 3 ] Brock FD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 1969, 98(1):289-297.
- [ 4 ] Xiang XY, Dong XZ, Huang L. *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China. *Extremophiles*, 2003, 7(6): 493-498.
- [ 5 ] Vésteinsdóttir H, Reynisdóttir DB, Orlygsson J. *Hydrogenophilus islandicus* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen oxidizing bacterium isolated from an Icelandic hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, published March 12, 2010 as doi: 10.1099/ij.s.0.023572-0.
- [ 6 ] Amman R, Ludwig IW, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143-169.
- [ 7 ] Meyer-Dombard DR, Shock EL, Amend JP. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology*, 2005, 33: 211-227.
- [ 8 ] Hall JR, Mitchell KR, Jackson-Weaver O, Kooser AS, Cron BR, Crossey LJ, Takacs-Vesbach CD. Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15):4910-4922.
- [ 9 ] Blank CE, Cady SL, Pace NR. Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5123-5135.
- [ 10 ] Aditiawati P, Yohandini H, Madayanti F, Akhmaloka. Microbial diversity of acidic hot spring (Kawah Hujan B) in geothermal field of Kamojang area, west Java-Indonesia. *The Open Microbiology Journal*, 2009, 3:58-66.



- [11] Lau MC, Aitchison JC, Pointing SB. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles*, 2009, 13(1):139-149.
- [12] McCaig AE, Glover LA, Prosser JI. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1721-1730.
- [13] Marteinsson VT, Hauksdóttir S, Hobel CF, Kristmannsdóttir H, Hreggvidsson GO, Kristjánsson JK. Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9):4242-4248.
- [14] Aller JY, Kemp PF. Are archaea inherently less diverse than bacteria in the same environments? *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1): 74-87.
- [15] Ufnar JA, Wang SY, Ufnar DF, Ellender RD. *Methanobrevibacter ruminantium* as an Indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 7118-7121.
- [16] Hirayama H., Takai K, Inagaki F, Yamato Y, Suzuki M, Neelson KH, Horikoshi K. Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles*, 2005, 9(2): 169-184.
- [17] 宋兆齐, 陈经全, 职晓阳, 黄志勇, 张传伦, 李文均. 腾冲两热泉古菌多样性及系统发育的初步分析. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2008, 35(3): 372-377.
- [18] Stout LM, Blake RE, Greenwood JP, Martini AM, Rose EC. Microbial diversity of boron-rich volcanic hot springs of St. Lucia, Lesser Antilles. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(3): 402-412.

## Prokaryotic microbial phylogenetic diversity of “Eryuan Niujie” hot spring in Yunnan province, China

Pan Sun, Chun Gu, Fei Ren, Xin Dai\*, Zhiyang Dong\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We analyzed the prokaryotic microbial diversity of Eryuan Niujie hot spring, in Yunnan Province, to enrich our knowledge about thermo-stable microbes. [ **Method** ] We constructed bacterial and archaeal 16S rRNA gene libraries, analyzed the sequences and constructed phylogenetic trees to learn the prokaryotic microbial diversity. [ **Result** ] The majority of the prokaryotic microbes in this hot spring were bacteria, while  $\beta$ -*Proteobacteria* was the most abundant, next were *Bacteroidetes* and *Chlorobi*; the abundance and diversity of archaea were both less than that of bacteria, including Euryarchaeota and Crenarchaeota, while Euryarchaeota was the most abundant.

**Keywords:** 16S rRNA; prokaryotic microbial diversity; thermophile; hot spring

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA100604), by the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (KSCX1-YW-11B1) and by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (5081001)

\* Corresponding authors. Xin Dai, Tel/Fax: +86-10-64807418, E-mail: daixin@im.ac.cn; Zhiyang Dong, Tel/Fax: +86-10-64807337, E-mail: dongzy@im.ac.cn

Received: 30 April 2010/ Revised: 12 June 2010