

新疆乌鲁木齐 10 号冷泉古菌群落结构多样性

李萍^{1,2}, 曾军², 祖丽皮亚·玉努斯¹, 高小其³, 董秀黄^{1,2}, 薛娟^{2,4}, 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新疆维吾尔自治区地震局, 乌鲁木齐 830011

⁴新疆石河子大学生命科学学院, 石河子 832003

摘要: 【目的】探究新疆地震断裂带含硫冷泉泉水古菌群落组成及多样性。【方法】利用酶解法直接从冷泉泉水样品中提取环境总 DNA, 采用古菌通用引物对 16S rRNA 基因进行扩增, 构建 16S rRNA 基因克隆文库, 通过 *Alu I* 和 *Afa I* 两种限制性内切酶对随机挑选的 115 个阳性克隆子进行酶切分型, 将不同酶切带型对应的克隆子送样测序, 测序结果与 GenBank 序列进行比对并构建 16S rRNA 基因系统发育树。【结果】古菌克隆文库中共得到 44 个不同的酶切带型, BLAST 序列比对和系统发育分析将它们划分于广古菌门 (Euryarchaeota, 94.78%) 和奇古菌门 (Thaumarchaeota, 4.35%)。奇古菌门克隆与 *Nitrosopumilus* sp 序列相似性达到了 93%; 而广古菌门类群较为多样, 其中, 42.61% 的克隆子属于 RC-V cluster, 20.87% 与 13.91% 的克隆子分别属于 LDS cluster 和 Methanomicrobiales, 4.35% 的克隆子与甲烷厌氧氧化相关的类群 (ANME-1a-FW) 具有较高的相似性。另外, 13.05% 的克隆子属于广古菌门中的未知类群。【结论】乌鲁木齐 10 号泉水体中广古菌类群多样, 可能蕴藏有大量潜在的古菌新类群。

关键词: 含硫冷泉, 古菌, 16S rRNA 基因克隆文库, 断裂带

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 03-0230-11

地下水是世界上最大的淡水水库, 占地球上所有可利用淡水资源的 97% (不包括冰川和冰帽), 同时也是全球水文循环的重要组成部分^[1-2]。泉为地下水在地表的天然露头, 其不但具有地下水的寡营养、缺乏新鲜速效有机碳和营养物的输入以及光合作用等特征, 而且其也属于地表流动水与地下水系统的生态交错区^[3]。此外, 由于大多数泉的起源与一些大的山脉相关, 某种程度上泉也可以被认为是一种生态联通体^[4]。因此, 泉是地下水微生物研究的理想材料。

冷泉是相对于热泉而言 (前者温度低于 20°C, 后者温度大于 45°C), 其属于一种极端环境^[5]。但相关研究表明, 微生物在冷泉环境中不但类群丰富多样, 存在大量嗜冷新物种, 而且对于该特殊环境的微生物组成和稳定性都起到重要的作用。如一些学者对德国和土耳其两个含硫化物冷泉中生长的念珠状菌藻席 (strings-of-pearls) 的微生物组成进行了研究, 发现了一种广泛分布于土壤生态系统的非产甲烷古菌新类群并且命名为 SM1 类群^[6]。进一步的对水体进行原位培养, 发现了大量的嗜冷不可培养泉古菌新

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究发展项目 (201216145)

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

作者简介: 李萍 (1987-), 女, 新疆人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物多样性研究。E-mail: 15276702381@163.com

收稿日期: 2012-11-16; 修回日期: 2013-01-08

类群^[7]。Chaudhary 等人对密歇根一含硫冷泉泉水和白色菌藻席的微生物组成进行了研究, 同样发现了上述嗜冷泉古菌, 其推测这些嗜冷不可培养泉古菌类群是一些含硫环境中重要的微生物组成部分^[8]。Nancy 等人对加拿大北极圈的两个含硫, 高盐四季长流冷泉中原核生物多样性进行了研究发现硫代谢对于维持该特殊环境中微生物的生态系统的稳定性起到主要作用, 并且发现了一些泉古菌和嗜盐广古菌类群与参与硫代谢古菌具有高的相似性, 因此推测这些微生物也依赖于硫代谢来获取能量^[9]。国内对冷泉中微生物的相关研究绝大多数集中在非含硫化物冷泉。如曾军等人在新疆沙湾一低盐, 不含硫化物冷泉沉积物中仅检测到泉古菌类群, 但也发现约 40% 古菌类群与在上述含硫化物冷泉中发现的嗜冷不可培养泉古菌具有高的相似性^[10]。Li 等人对中国青藏高原两个冷泉原核生物多样性的研究发现了泉古菌为最优势类群, 并且发现了最近新划分的奇古菌门类群^[11]。目前, 仅有胡蓉等人利用 DGGE 技术对新疆乌鲁木齐 10 号含硫冷泉中古菌对水文地球化学元素变化的响应进行了初步的研究, 但具体古菌类群信息不明^[12]。因此对于含硫化物冷泉中古菌的组成以及多样性, 需要进一步的研究。

因而, 本研究选取国家地震台网监测下的基本水化 I 类台一新疆乌鲁木齐 10 号含硫冷泉 (E87°37'、N43°42') 为研究材料。由于该冷泉起源于新疆博格达山区, 并且渗流路径较长, 循环于地下深处, 故受到外部气象影响很小, 因此其水体常年保持在 12℃ 左右, pH 值 7.9 左右而且年变化甚微^[13]。另外, 泉水流经新疆乌鲁木齐南部柳树沟一红雁池断裂带, 地球内部深层的气体 (如 H₂, CH₄, F, Rn, H₂S, Ar, N₂, CO₂ 等) 和热液通过断裂带上涌与泉水混合, 因而水中携带有大量可以反映地球内部活动 (地震) 的水文地球化学信息。因此, 本文通过构建古菌 16S rRNA 基因克隆文库法对乌鲁木齐 10 号含硫冷泉中古菌组成及其多样性进行研究, 为探讨含硫冷泉中特有类群的研究以及为微生物与地震胁迫之间的相关性研究提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集及处理: 乌鲁木齐 10 号泉海拔

1055 m, 泉水涌出口具有浓重的硫化氢气味, 泉水水流量为 4 - 7 L/S, 矿化度 1.034 g/L, 属于 HCO₃-SO₄-Cl-Na 型弱碱性矿化水^[14]。2011 年 9 月 2 日、8 日、13 日、18 日、23 日、29 日每隔 5 天, 每次采集泉水 2L, 共计 12 L。每次采集的样品于 2 h 之内 4℃ 保存运回实验室, 立即使用孔径 0.22 μm 的无菌微孔滤膜收集菌体, 随后将滤膜置于 50 mL 无菌聚丙烯离心管, 加入 8 mL GTE 缓冲液 (100 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)^[15], 后于 -20℃ 保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 扩增仪 (Eppendorf, 德国)、PCR 纯化试剂盒 (生工, 上海)、凝胶成像仪 (Bio-Rad)、电泳仪 (Bio-Rad)、pMD18-T vector (TaKaRa, 大连)、Alu I 限制性内切酶 (TaKaRa, 大连)、Afa I 限制性内切酶 (TaKaRa, 大连) 等。

1.1.3 10 项地球化学指标测定: 采用 SP-2305 型气相色谱仪分别对水中溶解的氩、氮、甲烷、二氧化碳、氦、氟进行测定。硫化物采用碘量法分析、水汞测试采用 XG-4 型测汞仪、水氨测试采用 FD-425 型室内氧钽分析器, 流量采用三角堰法, 上述具体方法见文献 [16]。

1.2 环境样品总 DNA 的提取及古菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增

环境样品总 DNA 的提取参照文献^[17]报道的方法。采用古菌通用引物 109F (5'-ACKGCTCAGTACACGT-3') 和 934R (5'-GTGCTCCCCGCCAATT CCT-3') 扩增古菌 16S rRNA 部分基因。PCR 反应条件: 95℃, 6 min; 95℃, 1 min, 59℃, 45 s, 72℃, 1 min 30 s, 10 个循环; 95℃, 45 s, 53℃, 45 s, 72℃, 1 min 30 s, 25 个循环; 72℃, 10 min。以无菌水为空白作为阴性对照, 做 3 个平行实验。

1.3 16S rRNA 基因文库的构建

扩增的 3 个平行的 PCR 产物经混合在一起后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的条带 (800 bp) 用无菌小刀切下后, 使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化和回收, 并与 pMD18-T Vector 载体连接, 连接产物经热激法转化到 *E. coli* DH 5α 感受态细胞中。以氨苄青霉素 (100 μg/mL) 抗性筛选阳性转化子^[18]。

1.4 限制性酶切片段长度多态性分析

筛选出的阳性克隆子用 T 载体的通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入的片段进行菌液 PCR, 扩

增体系和反应条件参照文献^[19]的方法,用限制性内切酶 *Alu* I 将 PCR 产物 37℃ 过夜酶切,酶切产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。所得到的酶切带型图谱,在 GIS 凝胶分析软件辅助下进行人工比较分析,把相同酶切带型对应的克隆再用 *Afa* I 限制性内切酶水浴消化,再把所有得到的酶切带型用 GIS 凝胶分析软件辅助下进行人工比较分析,当第二次得到的酶切电泳图谱仍相同时,则可认为它们具有相同的基因型,每一个基因型称为一个可操作分类单元 (OTUs, Operational Taxonomic Units) 或者唯一基因型。将不同的酶切电泳带型所对应克隆子的 PCR 产物送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.5 数据统计分析

运用 CONTIG、DNAMAN 等软件对测序结果进行整理、分析。利用 Estimate S 8.0 软件对文库进行稀有度曲线分析。运用 Coverage C 对克隆文库进行评价,使用公式 $C = 1 - n \cdot N^{-1}$ (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, N 代表克隆文库总的库容量, n 代表在克

隆文库中仅出现一次的 OTU 数量。

1.6 系统发育树构建和核酸序列收录号

采用 CHECK-CHIMERA (<http://rdp8.cme.msll.edu/cgis/chimera.cgi>) 在线工具进行嵌合体检查和剔除,使用 BLAST 搜索程序从 GenBank 数据库选出相似性较高的相关序列。用 RDP 8.1 (Ribosomal Database Project release 8.1) (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 进行在线归类。使用 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^[20]。

所得古菌 16S rRNA 基因序列均已提交 GenBank 数据库,序列登录号为: JQ724806-JQ724823; JQ724831-JQ724839; JQ724841-JQ724845; JQ724848-JQ724851; JQ724853-JQ724855。

2 结果和分析

2.1 乌鲁木齐 10 号泉理化性质分析

理化性质见表 1。

表 1 乌鲁木齐 10 号泉理化性质

Table 1 Physicochemical parameters of the water from the No. 10 sulfur cold spring in Urumqi

Elements (ng/L)	Gases						c (Anions) / (mg/L)	
Hg	He (%)	Ar (%)	N ₂ (%)	Rn (Bq/L)	CO ₂ (mg/L)	CH ₄ (mg/L)	HS ⁻	F ⁻
28	0.002	1.66	87.5	28.6	10.28	0.145	1.63	2.59

2.2 乌鲁木齐 10 号泉水体古菌 16S rDNA 文库分析

从克隆文库中随机挑取 115 个阳性克隆子,采用 *Alu* I 和 *Afa* I 两种限制性内切酶进行酶切。经分析软件以及在人工的辅助下,对酶切电泳图谱分析后,共得到 44 种不同的酶切电泳带型 (OTUs)。如其稀有度曲线所示 (图 1),由 *Alu* I 酶切所得到的稀有度曲线可以看出,当克隆子数大于 100 时,曲线已趋于平缓 (图 1),其覆盖率 $C = 88\%$,将得到的相同的酶切带型的克隆子再采用 *Afa* I 酶切,得到的稀有度曲线表明,当克隆子数接近于 80 时,曲线则趋于平缓,其覆盖率 $C = 96\%$,由此表明,该文库的库容已基本达到饱和状态,115 个克隆子已几乎涵盖了该生境下的绝大部分古菌类群,能够基本反映微生物的多样性。

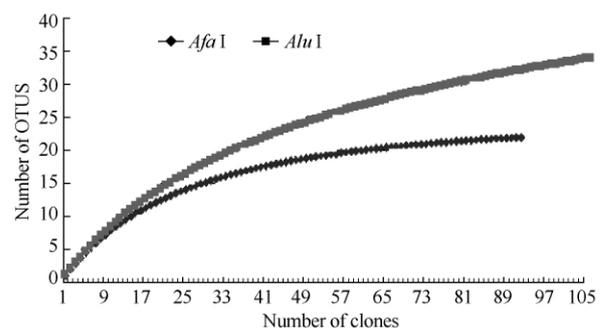


图 1 乌鲁木齐 10 号含硫冷泉水体古菌克隆文库稀有度曲线 (*Alu* I 和 *Afa* I)

Fig. 1 Rarefaction curve for No. 10 cold sulfur Spring water-derived in Urumqi Archaeal clone library. Error bars represent 95% confidence intervals.

2.3 古菌 16S rRNA 系统进化分析

古菌 16S rRNA 基因文库随机挑取的 115 个克

隆子进行酶切分型得到 44 个古菌类群, 并且其相应的序列全都不是嵌合子序列。在 GenBank 数据库中对其进行 BLAST 比对, 并根据其 16S rRNA 基因克隆文库的系统发育分析及其 RDP 归类, 将乌鲁木齐 10 号泉水体古菌 16S rRNA 基因文库归为两个类群, 广古菌门 (Euryarchaeota) 和奇古菌门 (Thaumarchaeota)。其中, 广古菌门是该文库中的优势类群, 占整个文库的 94.78%, 奇古菌门仅占文库的 4.35%。然而, 克隆子 LQ143 (JQ724851)、LQ84 (JQ724833)、LQ65 (JQ724826)、LQ18 (JQ724812)、LQ37 (JQ724817) 无论是通过 RDP 归类还是系统发育分析均无法将它们归入已知的类群中 (表 2)。

广古菌门 (Euryarchaeota), 共包括 42 个基因型, 分为五个分支 (图 2)。克隆子 LQ145 (JQ724853) 和 LQ46 (JQ724822) 为一个分支 (占广古菌门的 4.59%), 其高序列相似性菌株分别来自于泥火山和全新世沉积物中免培养的 ANME-1a-FW (freshwater) 类群 (AB554239), (HQ916507), 分别具有 98% 的相似性。克隆子 LQ42 (JQ724819)、LQ108 (JQ724838) 等 4 个基因型构成一个大的分支并且归属于 Methanomicrobiales (14.68%)。其中克隆子 LQ108 (JQ724838) 与 LQ42 (JQ724819) 构成一个分支并且分别与一酸性沼泽中免培养的 Methanomicrobiales E2 类群中的克隆子 (FJ822573) 序列和油砂岩储层中免培养的 *Methanoregula. sp* 序列相似性达到 99% 和 98%。克隆子 LQ152 (JQ724855) 和 LQ50 (JQ724823) 构成一个分支, 且分别与 Kivu 湖中免培养广古菌 (JN853719), (JN853610) 具有 97% 和 98% 的序列相似性。以 LQ126 (JQ724844)、LQ115 (JQ724841) 等为代表的 12 个基因型构成一个分支 (29.36%)。除克隆子 LQ84 (JQ724833) 的进化距离最远, 属于广古菌门中未知类群, 其余克隆子归类于 LDS Cluster。克隆子 LQ115 (JQ724841) 和 LQ87 (JQ724834) 与 Mackenzie 河中 LDS Cluster 类群 (DQ310440) 的序列相似性分别达到 94% 和 92%。另外克隆子 LQ60 (JQ724825) 同 Mackenzie 河中 LDS Cluster 类群 (DQ310419) 具有 98% 的序列相似性。克隆子 LQ3 (JQ724807) 与来自于 High Arctic 湖中免培养 LDS Cluster (EU782017) 序列相似性较高, 为 87%。克隆子

LQ18 (JQ724812)、LQ117 (JQ724847) 等 20 个基因型构成了广古菌门最大的一个分支 (44.95%), 系统发育分支分为两个小分支。其中, 克隆子 LQ21、LQ89 等聚为一支, 其它克隆子组成另一分支。克隆子 LQ10 (JQ724810) 与高温厌氧油气藏中广古菌 (JN836407) 的进化地位相近, 序列相似性为 97%。LQ81 (JQ724835) 的最高相似性序列 (98%) 来自于厌氧含硫化物环境中。克隆子 LQ29 (JQ724815)、LQ122 (JQ724843) 和 LQ45 (JQ724821) 同 Mackenzie 河中 RC-V cluster (DQ310454) 序列相似性分别为 94%、88%、89%。克隆子 LQ27 (JQ724814) 和 LQ14 (JQ724811) 与黄石湖中 RC-V Cluster (JF262368), (JF262400), 序列相似性分别为 87%, 84%。克隆子 LQ18 (JQ724812) 和 LQ65 (JQ724826) 与其他序列分歧明显单独聚为第四支, 属于广古菌门中的未知分类。LQ8 (JQ724808) 和 LQ37 (JQ724817) 构成广古菌的第 5 个分支 (3.67%)。克隆子 LQ37 (JQ724817) 属于未知类群, 而克隆子 LQ8 (JQ724808) 与 Mothra 沉积物中嗜盐菌目 (GQ267141) 具有 87% 的相似性。

奇古菌门 (Thaumarchaeota) 仅包括一个基因型, 占整个文库的 4.35%。克隆子 LQ134 (JQ724848) 与海岸沙丘中 *Nitrosopumilus sp.* (HQ331116) 具有 93% 的序列相似性, 且与 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 (JQ346765) 的序列相似性达到 92%。

3 讨论

本研究通过构建乌鲁木齐 10 号泉古菌 16S rRNA 基因克隆文库, 系统发育分析结果显示所有古菌序列全部归属于两个门: 广古菌门 (Euryarchaeota) 和奇古菌门 (Thaumarchaeota), 前者是绝对优势类群 (94.78%)。该结果与胡蓉^[12] 等通过变性凝胶电泳 (DGGE) 对该泉水中古菌群落结构的研究一致的。另外, 本研究中检测出最近新划分的奇古菌门类群, 并且与该门中纯培养的氨氧化古菌 *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 具有 92% 的相似性。这一结果与 Li 等人对青藏高原两冷泉中的检测结果相似, 但本研究中得到的优势类群是广古菌门 (Euryarchaeota), 且未检测到泉古菌门, 而青藏高

表 2 乌鲁木齐 10 号泉水体古菌群落 16S rDNA 克隆文库结果

Table 2 The cloning results of 16S rDNA clone library from No. 10 cold sulfur Spring water-derived in Urumqi

Archaeal division	Representative clones		Quantity	Percent of Total/%	Closest relatives archaea in NCBI	GenBank accession no.	Identity/%	Phylum
	No. of Clones	accession number						
ANME-1a-FW	LQ46	JQ724822	5	4.35	ANME-1a-FW	HQ916507	98	
	LQ145	JQ724853			ANME-1a-FW	AB554239	98	
	LQ42	JQ724819			<i>Methanoregula</i> . sp	FJ822573	98	
Methanomicrobiales	LQ108	JQ724838	16	13.91	<i>Methanomicrobiales</i> E2	JF789587	99	
	LQ50	JQ724823			Uncultured euryarchaeote	JN853610	88	
	LQ152	JQ724855			Uncultured euryarchaeote	JN853719	97	
Unkown I	LQ84	JQ724833	8	6.96	Uncultured archaeon	EU750878	85	
	LQ115	JQ724841	2		LDS cluster	DQ310440	94	
	LQ87	JQ724834	1		LDS cluster	DQ310440	92	
	LQ60	JQ724825	3		LDS cluster	DQ310419	98	
	LQ3	JQ724807	1		LDS cluster	EU782017	87	
LDS Cluster	LQ9	JQ724809	2		Uncultured archaeon	EF014560.	91	Euryarchaeota
	LQ126	JQ724844	5	20.87	Uncultured archaeon	DQ841227	91	
	LQ105	JQ724837	3		Uncultured euryarchaeote	GU257154	88	
	LQ138	JQ724850	2		Uncultured euryarchaeote	GU256995	91	
	LQ43	JQ724820	3		Uncultured euryarchaeote	AJ867621	91	
	LQ147	JQ724854	1		Uncultured euryarchaeote	GU257031	85	
	LQ59	JQ724824	1		Uncultured archaeon	DQ310419	96	
	LQ10	JQ724810	1		Uncultured euryarchaeote	JN836407	97	
	LQ21	JQ724813	1		RC-V cluster	DQ310463	94	
	LQ89	JQ724835	2		Uncultured archaeon	EF014584	89	
	LQ34	JQ724816	1		Uncultured archaeon	JF431553	88	
	LQ137	JQ724849	1		Uncultured archaeon	FR820763	85	
	LQ129	JQ724845	2		Uncultured archaeon	FR820768	91	
	LQ113	JQ724839	4		Uncultured euryarchaeote	GU256996	92	
	LQ90	JQ724836	6		Uncultured archaeon	DQ310386	95	
	LQ29	JQ724815	6		RC-V cluster	DQ310454	94	
	RC-V Cluster	LQ45	JQ724821	3	42.61	RC-V cluster	DQ310454	
LQ122		JQ724843	1		RC-V cluster	DQ310454	88	
LQ72		JQ724828	1		Uncultured archaeon	DQ146754	87	
LQ69		JQ724827	2		Uncultured archaeon	EU750888	89	
LQ117		JQ724847	4		Uncultured euryarchaeote	JF262391	94	
LQ1		JQ724806	2		Uncultured euryarchaeote	HM598506	88	
LQ81		JQ724831	2		Uncultured thermoplasmatales	AJ306410	98	
LQ27		JQ724814	1		RC-V cluster	JF262368	87	
LQ14		JQ724811	4		RC-V cluster	JF262400	84	
LQ41		JQ724818	2		Uncultured archaeon	EU750838	90	
Unkown II	LQ82	JQ724832	3		Uncultured euryarchaeote	DQ417464	94	
	LQ18	JQ724812	1	2.61	Uncultured archaeon	AJ867622	85	
	LQ65	JQ724826	2		Uncultured euryarchaeote	AJ867622	86	
Halobacteriales	LQ8	JQ724808	1	0.87	Uncultured halobacteriales	GQ267141	87	
Unkown III	LQ37	JQ724817	3	2.61	Uncultured archaeon	FJ755717	90	
Nitrosopumilus	LQ134	JQ724848	5	4.35	<i>Nitrosopumilus</i> . sp	HQ331116	93	Thaumarchaeota
Unkown IV	LQ143	JQ724851	1	0.87	Uncultured archaeon	AB301876.	85	Unkown
Total	44		115	100				

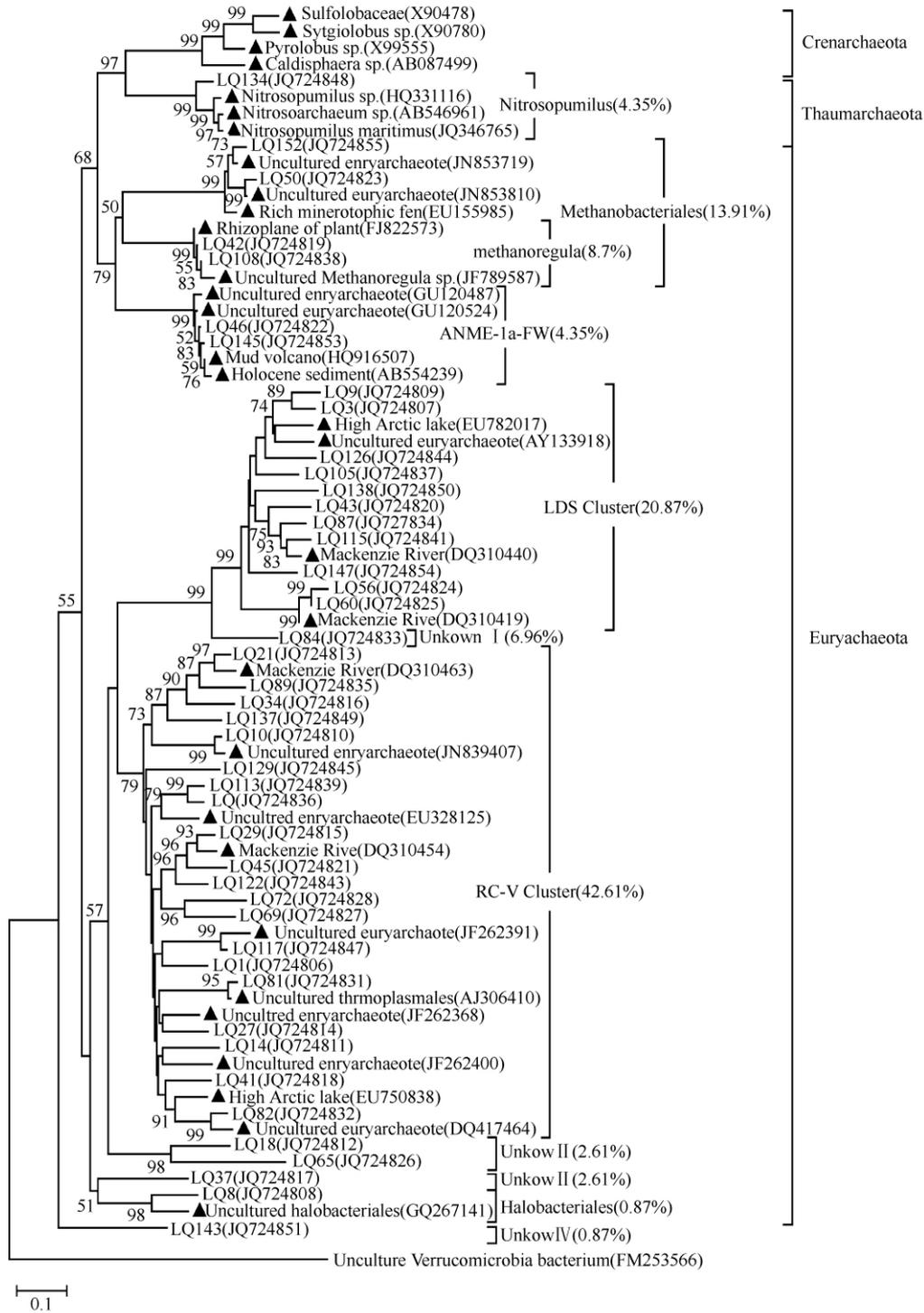


图 2 Neighbor-joining 法构建乌鲁木齐 10 号泉泉水古菌 16S rRNA 部分序列系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial archaeal 16S rRNA sequences amplified from the No. 10 cold sulfur spring water. 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 the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. refers to Clones detected in this study are indicated with "LQ". The numbers in parentheses are accession numbers of sequences. Sequences with "▲" represented standard strains.

原两冷泉中泉古菌门为优势类群但并未检测到广古菌门^[11]。另外,该结果也与德国^[7]、美国密歇根的含硫化物冷泉^[8]、加拿大极地硫磺冷泉^[9]中泉古菌门占优势这一结论不同。可能的原因是由于奇古菌门原本是从泉古菌中新划分出来的一个门,其序列相似性与泉古菌门往往还混杂在一起。如本文对克隆子 LQ134 (JQ724848) 进行 BLAST 比对时采用了两种不同比对方法,一是排除所有环境样品只与纯培养菌株比较,结果发现其与 *Nitrosopumilus. sp* (AB546961) 相似性达到了 93%,系统发育树上更可以直观的看出其划分到奇古菌门的自展值 (bootstrap value) 都大于 94%。而对 LQ134 序列进行不排除环境样品序列比对时,其与风穴中发现的免培养泉古菌 (AY217533) 的序列相似性达到 97%,归属于泉古菌门。因此,本研究选择第一种方法所得出的结果,将其划分为奇古菌门。奇古菌门是迄今为止发现的唯一一类同时参与自然界中碳、氮元素循环的古菌^[21]。本研究发现乌鲁木齐 10 号泉中有一些奇古菌克隆子与海岸沙丘中 *Nitrosopumilus. sp* 具有较高的 16S rRNA 基因相似性 (93%),研究表明, *Nitrosopumilus* 属于氨氧化古菌 (AOA),其能够催化氨氧化获取能量进行自身生长^[22],并且其也是贫营养生态环境中硝化过程的重要驱动者^[23]。因此推测该类群对乌鲁木齐 10 号泉的氮素循环可能起着重要作用。

值得注意的是,在这些古菌 16S rRNA 基因序列中,大多数序列 (63.48%) 属于 LDS 和 RC-V Clusters。这是首次在冷泉生态系统中检测到这些序列。LDS Clusters 最初发现于河水沉积物中^[24]。RC-V Clusters 序列的成员最早来源于稻田土壤中^[25]。最近研究发现,LDS 和 RC-V Clusters 系统发育类型多样,并且存在于各类环境中^[26],例如, Arctic river^[27]、A temperate Lake^[23]、Mono Lake^[28] 等,这表明其具有多种代谢以及生理学特征,但他们所拥有的生态学功能仍然是未知的,有待于进一步研究^[29]。

另外,甲烷生成过程在多种生态系统碳循环中起着关键作用。该过程是通过各种产甲烷古菌调节的,主要是广古菌门中的 6 个目: Methanobacteriales、Methanococcales、Methanomicrobiales、Methanosarcinales、Methanopyrales、Methanocellales^[30]。本文中探测到 Methanomicrobiales (13.91%),它们可能对该

生境下的碳循环做出一定贡献。此外,E2 类群是 Methanobacteriales 的新类群,在贫营养的泥炭地古菌群落中占有重要的部分^[31-32],在本研究中检测到 4.34% 的克隆子 (LQ42; JQ724819) 属于该类群,这可能与更适应生活在寡营养的环境中^[33] 有关。因此可以反映出乌鲁木齐 10 号泉水体处于厌氧状态,并且泉水水体的理化指标中也检测到了甲烷气体,那么具体这一气体来自与地下深层还是来自于这一类群以及这两个来源各自对该气体的贡献率有多大值得进一步的研究,并且这对于更好地评估地壳运动具有重要意义。

ANME-1 已经被分成 ANME-1a 和 ANME-1b^[34]。Takeuchi^[35] 等最早在陆地淡水环境中发现这一亚群,并且取名为“ANME-1a-FW (freshwater)”,其对于淡水栖息环境中的甲烷的厌氧氧化起着重要作用。随后 ANME-1a 又在其他一些陆地淡水环境中发现,如新西兰陆地表面的沉积物^[36]、日本的关东平原^[37]、南非低盐的地下水^[38] 等。本研究检测到占整个文库 4.59% 的克隆子 LQ145 (JQ724853)、LQ46 (JQ724822) 与 ANME-1a-FW 古菌具有很高的序列相似性 (98%)。由于该泉水中含有 CH₄ 气体,推测该类群可能参与了泉水中甲烷的厌氧氧化,并且对于这一寡营养环境中碳循环具有重要作用。另外,由于甲烷在该泉水中是监测地壳运动的一个重要指标,而这一类群的活性和厌氧氧化效率对于准确评估地壳运动具有重要的影响,因而非常值得对其进一步研究。

此外,本研究中还发现了少量的 (0.89%) 嗜盐菌目克隆子 (JQ724808)。以往的研究也表明嗜盐菌不仅限于盐湖、死海、盐场^[39] 等高盐环境中,也存在于一些低盐环境中,如 Elshahed^[40] 等从需氧、嗜常温、硫磺泉中分离出与硫还原相关的嗜盐古菌,其推测可能的原因是泉水蒸发,从而造成泉水水分减少盐度增加。乌鲁木齐 10 号泉水体深循环于地表下,蒸发作用对其影响较小,那么为何存在嗜盐古菌,以及这些嗜盐古菌是否与硫代谢相关则有待于进一步探讨。

另外,本研究还发现了一些与厌氧含硫环境中热原体目克隆子具有很高相似性的序列 (JQ724831; 98%)。可能的原因是由于乌鲁木齐 10 号泉位于地震断裂带上,由于地下深层热液从断裂带上涌与流经冷水相混合,一些栖息于热液中的微

生物可能被带入到泉水中,因而被检测到。另外,在低温环境中发现可能的嗜热微生物也并非首次,如过去的一些研究也表明该目古菌也曾一些低温环境中发现。如,李慧^[41]等人对乌鲁木齐 10 号泉水体的细菌多样性的研究也同样发现了与纯培养的嗜热细菌具有高的序列相似性的克隆子。

值得一提的是,文本中探测到的古菌类群,几乎均为未培养类群。近年来,有很多的国内外学者已采用纯培养的方法对嗜盐古菌的多样性^[42,43,40]、耐盐性以及功能酶进行研究^[42]; Hinsby 等^[44]使用 PM1 培养基,分离得到甲烷微菌目中 E1-9c 菌株(ATCC no. BAA1556:DSM no. 19958),经研究表明,该菌株对 Na₂S 浓度具有很高的敏感性。因此,今后研究中应结合可培养方法充分发掘新的种属,了解其生理生化特性,明确这些类群在该极端环境中所发挥的作用。

该泉自 1982 年开始至今,新疆地震局就对其地球水文化学变化进行了监测,大量的数据与地震的响应关系证明,该泉水理化指标对中强及以上地震(>4.5 级)响应性较好,但是对于有感地震或者地震的响应较弱^[45]。由于微生物对生活的环境变化反应较水文理化因子更为迅速,因此其对水文化学变化响应更为敏感。如本实验室前期的研究表明该泉水中细菌对如硫化氢,甲烷,水汞等地球水文化学元素的响应很敏感^[46,12]。此外,该泉水中细菌对有感地震也具有明显的响应作用^[47]。因此,古菌对地球水文化学元素的变化以及对地震的响应值得进一步研究。

参考文献

- [1] Gibert J, Deharveng L. Subterranean ecosystems: a truncated functional biodiversity. *Bioscience*, 2002, 52 (6):473-481.
- [2] Danielopol DL, Griebler C, Gunatilaka A, Notenboom J. Present state and future prospects for groundwater ecosystems. *Environmental Conservation*, 2003, 30 (26):104-130.
- [3] Griebler C, Lueder T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 2009, 54 (4):1365-2427.
- [4] Wall FD, Blackburn TH, Brussaard L, Htuchings P, Palmer MA. Linking biodiversity and ecosystem functioning of soils and sediments. *Ambiology*, 1997, 26 (8):556-562.
- [5] Danielopo DL, Pospisil P, Rouch R. Biodiversity in groundwater: a large scale view. *Trends in Ecology and Evolution*, 2000, 15 (6): 223-224.
- [6] Ruth H, Christine M, Thomas A, Christian Rudolph, Robert Huber. 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 (1):192-199.
- [7] Marcus K, Christian R, Christine M, Robert Huber. A cold-loving crenarchaeon is a substantial part of a novel microbial community in cold sulphidic marsh water. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57 (1):55-66.
- [8] Chaudhary A, Haaack SK, Duris JW, March TL. 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.
- [9] Nancy NP, Dale TA, Wayne HP, Charel WG, Lyle GW. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the canadianhigh arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (5): 1532-1543.
- [10] Zeng J, Yang HM, Wu JC, Xu JH, Zhang T, Sun J, Lou K. Uncultured archaeal in cold spring sediment of Shawan, Xinjiang, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (5): 574-579. (in Chinese)
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*, 2010, 50 (5): 574-579.
- [11] Li GY, Jiang HC, Hou WG, Wang shang, Huang LQ, Ren HL, Deng SH, Dong HL. Microbial diversity in two cold spring on the Qing hai-Tibetan Plateau. *Geoscience Frontiers*, 2012, 3 (3):317-325.
- [12] Hu R, Zeng J, Gao XQ, Duan WW, Yang XF, Lou K. Respond of Archaeal Community to Hydrogeochemical Elements Changes in the No. Ten Cold Spring of Urumqi in Seismic Fault Zone in Xinjiang. *Xin Jiang Agricultural Sciences*, 2011, 48 (3): 551-556. (in Chinese)
胡蓉, 曾军, 高小其, 段魏魏, 杨晓芳, 娄恺. 乌鲁木齐地震断裂带泉水古菌群落对水文地球化学元素的响应. *新疆农业科学*, 2011, 48 (3): 551-556.
- [13] Wu JC, Zhang T, Sun J, Shi YW. Functional Diversity of Microbial Community in Seismic Fault Belt Spring of Xinjiang. *Xin Jiang Agricultural Sciences*, 2010, 47 (5):1052-1056. (in Chinese)
吴江超, 张涛, 孙建, 史应武. 新疆地震断裂带泉水

- 微生物群落结构功能多样性. 新疆农业科学, 2010, 47(5):1052-1056.
- [14] Cui Y, Lan L. Analysis on cause of high mercury contained in distilled water in Urumqi area. *Inland Earthquake*, 2001, 15(4):360-365. (in Chinese)
崔勇, 兰陵. 乌鲁木齐地区汞空白值较高原因分析. 内陆地震, 2001, 15(4):360-365.
- [15] Xu LM, Wan QH, Wang D. DNA extraction from formalin-fixed tissues and genetic diversity of Bai Ji. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(3):272-278. (in Chinese)
许黎美, 万秋红, 王丁. 福尔马林固定白暨豚标本DNA提取及其遗传多样性的初步研究. 水生生物学报, 2005, 29(3):272-278.
- [16] Cui Y, Dilixiati K. Analysis on three long-term trending anomalies of methane in Urumqi No. 10 spring. *Inland Earthquake*, 2004, 18(4):371-375. (in Chinese)
崔勇, 地里夏提·克优木. 乌鲁木齐10号泉溶解气甲烷的3次长趋势异常变化的分析. 内陆地震, 2004, 18(4):371-375.
- [17] Shaheen B H, Nasreen B, James T H. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda Lake in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2):1030-1042.
- [18] Xu JH, Yang HM, Zeng J, Li Z, Lou K. Bacterial diversity in a hot gas spring soil of MaNasi County Xinjiang by culture-independent approach. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(5):568-573. (in Chinese)
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, 2010, 50(5):568-573.
- [19] Fan HP, Xue YF, Zeng Y, Zhou PJ, Ma YH. Archaeal Diversity of Zabuye Lake in Tibet Analyzed by Culture-independent Approach. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(4):401-408. (in Chinese)
范华鹏, 薛燕芬, 曾艳, 周培谨, 马延和. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析. 微生物学报, 2003, 43(4):401-408.
- [20] Kimura MA. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2):111-120.
- [21] Zhang LM, He JZ. A novel archaeal phylum: Thaumarchaeota—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(4):411-421. (in Chinese)
张丽梅, 贺纪正. 一个新的古菌类群—奇古菌门 (Thaumarchaeota). 微生物学报, 2012, 52(4):411-421.
- [22] Konneke M, Bernhard AE, Torre JR, Jose R, Christopher B, Walker JB, David AS. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(1038):543-546.
- [23] Martens HW, Berube PM, Urakawa H, Jose R, David AS. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria. *Nature*, 2009, 461(7266):976-979.
- [24] Glissman K, Chin KJ, Casper P, Conrad R. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature. *Microbial Ecology*, 2004, 48(3):389-399.
- [25] Grosskopf R, Stubner S, Liesack W. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12):4983-4989.
- [26] Galand PE, Lovejoy C, Vincent W F. Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 2006, 44(5):115-126.
- [27] Galand PE, Lovejoy C, Pouliot. Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: a stamukhi lake and its source waters. *Limnology Oceanography*, 2008, 53(2):813-823.
- [28] Scholten JCM, Joye SB, Hollibaugh JT, Murrell JC. Molecular analysis of the sulfate reducing and archaeal community in a meromictic soda lake (Mono Lake, California) by targeting 16S rRNA, mcrA, apsA, and dsrAB genes. *Microbial Ecology*, 2005, 50(1):29-39.
- [29] Pouliot J, Galand PE, Lovejoy C, Warwick FV. Vertical structure of archaeal communities and the distribution of ammonia monooxygenase gene variants in two meromictic High Arctic lakes. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(3):687-699.
- [30] Antony CM, Murrell CJ, Shouche SY. Molecular diversity of methanogens and identification of *Methanobolus* sp. as active methylotrophic archaea in Lonar crater lake sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 51(1):43-51.
- [31] Galand PE, Fritze H, Conrad R, Yrjala K. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic Archaea in

- three boreal peatland ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (4) :2195-2198.
- [32] Steinberg LM, Regan JM. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (21) :6663-6671.
- [33] Quiroz CH, Yavitt BJ, Zinder HS, Thies JE. Diversity and Community Structure of Archaea Inhabiting the Rhizoplane of Two Contrasting Plants from an Acidic Bog. *Microbial Ecology*, 2010, 59 (4) :757-767.
- [34] Teske A, Hinrichs KU, Edgcomb V, Gomez VA, Kysela D, Sylva SP, Sogin ML, Jannasch WH. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (4) :1994-2007.
- [35] Takeuchi M, Yoshika H, Seo Y, Tanbe S, Tamaki H, Kamagata Y, Takahashi HA, Lgari S, Mayumi D, Sakata S. A distinct freshwater-adapted subgroup of ANME-1 dominates active archaeal communities in terrestrial subsurfaces in Japan. *Environmental microbiology*, 2011, 13 (12) :3206-3218.
- [36] Fry JC, Horsfield B, Sykes R, Cragg BA, Heywood C, Kim GT, Mangelsdorf K, Midenhall DC, Rinna J, Vieth A, Zink, K, Weightman AJ, Parkes J. Prokaryotic populations and activities in an interbedded coal deposit, including a previously deeply buried section (1.6 - 2.3 km) above ~150 Ma basement rock. *Geomicrobiology*, 2009, 26 (3) : 163-178.
- [37] Takeuchi M, Komai T, Hanada S, Tanabe TS, Miyachi U, Nakazawa T, Kimura K, Kamagata Y. Bacterial and archaeal 16S rRNA genes in Late Pleistocene to Holocene muddy sediments from the Kanto Plain of Japan. *Geomicrobiology*, 2009, 26 (2) : 104-118.
- [38] Gihring TM, Moser DP, Lin LH, Davidson TC, Morgan OL, Milleson M, Kieft TL, Trimarro DL. The distribution of microbial taxa in the subsurface water of the Kalahari Shield, South Africa. *Geomicrobiology*, 2006, 23 (6) : 415-430.
- [39] Munson MA, Nedwel BD, Embley MT. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12) :4729-4733.
- [40] Elshahed MS, Najjar FZ, Roe BA, Oren A, Thomas AD, Krumholz RL. Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic archaea in a low-salt, sulfide and sulfur-rich Spring. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (4) :2230-2239.
- [41] Li H, Zeng J, Gao XQ, Yang HM, Zhang T, Yang XF, Sun J, Lou K. Bacterial community structure and diversity in a cold sulfur spring in Xinjiang faulting zone. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (5) :595-602. (in Chinese)
李慧, 曾军, 高小其, 杨红梅, 张涛, 杨晓芳, 孙建, 娄恺. 新疆断裂带含硫冷泉水细菌群落结构多样性. 微生物学报. 2011, 51 (5) :595-602.
- [42] Liu BB, Tang SK, Ming H, He ST, Nie GX, Guan TW, Zhang LL, Li WJ. Biodiversity and functional enzymes of cultured halophilic archaeon in Lop Nur region. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (9) :1222-1231. (in Chinese)
刘冰冰, 唐蜀昆, 明红, 何松涛, 聂国兴, 关统伟, 张利莉, 李文均. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选. 微生物学报, 2011, 51 (9) : 1222-1231.
- [43] Xu XW, Wu M, Tohty D, Ababaikeli G. Halophilic archaea diversity of Aibi Lake and Yiwu Lake in Xinjiang. *Biodiversity Science*, 2006, 14 (4) :359-362. (in Chinese)
许学伟, 吴敏, 迪丽拜尔·托乎提, 古丽巴哈尔·阿巴拜克利. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性. 生物多样性, 2006, 14 (4) :359-362.
- [44] Hinsby CQ, Yashior E, Yavitt JB, Zinder S H. Characterization of the archaeal community in a Minerotrophic Fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (7) :2059-2068.
- [45] Gao XQ, Xu QL, Zhang XM, Li YP, Lu JF, Cui Y. Preliminary analysis on synthetic fluid observation of urumqi spring no. 10 and ITS earthquake-reflecting sensitivity. *Inland Earthquake*, 2000, 14 (3) :243-251. (in Chinese)
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, 2000, 14 (3) :243-251.
- [46] Wu JC, Gao XQ, Zeng J, Xu JH, Yang XF, Lou K. The bacterial community structures in Xinjiang fault belt spring analyzed by PCR-DGGE. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31 (2) :0506-0512. (in Chinese)
吴江超, 高小其, 曾军, 徐建华, 杨晓芳, 娄恺. 新疆断裂带泉水中细菌群落结构的 PCR-DGGE 分析. 生态学报, 2011, 31 (2) :506-512.

[47] Zhang Q, Zeng J, Lou K, Li S, Yang XF, Wu ZF, Gao XQ. Seismic response of bacterial community structures at No. 10 Spring in Urumqi. *Acta seismologica sinica*, 2012, 34 (5) :706-715. (in Chinese)

张强, 曾军, 娄恺, 李珊, 杨晓芳, 吴尊风, 高小其. 乌鲁木齐 10 号泉水体细菌群落对地震的响应. *地震学报*, 2012, 34 (5) :706-715.

Archaeal community structure and diversity in Urumqi No. 10 cold sulfur Spring analyzed by culture-independent approach

Ping Li^{1,2}, Jun Zeng², Yunus Zulipiya¹, Xiaoqi Gao³, Xiuhuang Dong^{1,2}, Juan Xue^{2,4}, Kai Lou^{2*}

¹ College of Life Science and Technology of Xinjiang University, Urumqi 830046, China

² Institute of Microbiology, Xinjiang, Academy of Agriculture Science, Urumqi 830091, China

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

Abstract: [Objective] We explored the composition and diversity of archaea in a cold sulfur spring water in Xinjiang earthquake fault zone. [Methods] Environmental total DNA was extracted directly with enzymatic lysis method from a cold sulfur spring water. We constructed clone library of 16S rRNA gene amplified with archaeal-specific primers. A total of 115 positive clones were selected randomly from the library and identified by restriction length polymorphism (RFLP) with enzyme *Alu* I and *Afa* I. The unique RFLP patterns corresponded clones were selected for sequencing, BLAST alignment and constructing 16S rRNA gene phylogenetic tree. [Results] In total, 44 operational taxonomic units (OTUs) were determined from the library. BLAST and phylogenetic analysis indicated that these OTUs were affiliated with Euryarchaeota (94.78%) and Thaumarchaeota (4.35%). Only one Thaumarchaeotal clone was detected and most related to the genus *Nitrosopumilus* with 93% similarity. Euryarchaeotal clones were abundant and diverse. Of them, 42.61% of clones belonged to RC-V cluster; 13.91% of clones, 20.87% of clones were classified into LDS cluster and Methanomicrobiales respectively; 4.35% of clones had high similarity with ANME-1a-FW, which were involved in Anaerobic oxidation of methane (AOM). In addition, we also detected some (13.05%) unknown Euryarchaeotal clones. [Conclusion] Euryarchaeota in the environment were diverse, and possibly with a large fraction of potential novel species.

Keywords: sulfur cold spring, archaea, 16S rRNA genes clones library, Earthquake fault zone

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the High Technology Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (201216145)

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

Received: 16 November 2012 / Revised: 8 January 2013