

## 俄罗斯堪察加地区热泉及其周边生境的泉古菌多样性

宋兆齐<sup>1,2</sup>, 王莉<sup>1</sup>, 陈金全<sup>2</sup>, 周恩民<sup>2</sup>, 张传伦<sup>3,4</sup>, 李文均<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>商丘师范学院生命科学学院, 河南省高校生物质降解与气化工程技术研究中心, 商丘 476000

<sup>2</sup>云南大学云南省微生物研究所, 西南微生物多样性教育部重点实验室, 昆明 650091

<sup>3</sup>同济大学海洋学院, 海洋地质国家重点实验室, 上海 200092

<sup>4</sup>Department of Marine Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

**摘要:** 【目的】泉古菌为陆地热泉系统的主要古菌类群, 可能在自然界生源元素的地球化学循环中发挥着重要作用。本研究旨在揭示俄罗斯堪察加地区热泉以及热泉周边区域的泉古菌多样性, 同时基于之前已获得的我国云南地区热泉数据, 比较两地区泉古菌群落差异。【方法】通过构建 16S rRNA 基因片段克隆文库获得序列信息和丰度, 随后进行物种多样性、系统发育和群落结构差异分析。【结果】高温热泉 Burlyashi Liza (BSL, 89°C) 中的泉古菌全部属于热变形菌纲 (*Thermoprotei*) 内的物种。中温热泉 TF Vent 2 (TFV, 49°C) 的群落结构主要由不确定的热变形菌纲类群、不确定的泉古菌类群、高温水环境泉古菌类群 II (HWCG-II) 和奇古菌下的 Group1. 1b 类群组成。热泉周边常温环境的主要物种与热泉环境的代表性克隆 pJP41 一起聚成一个较大的遗传分枝。Jackknife 聚类树和主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 的结果显示: 温度相似的样点, 其泉古菌群落结构相对来说更为相似。【结论】俄罗斯堪察加地区与我国云南地区热泉中的泉古菌存在着一定程度上的不同。陆地热泉系统影响着其周边环境的泉古菌类群。热泉中泉古菌群落结构受温度的明显影响。

**关键词:** 陆地热泉, 周边生境, 泉古菌, 群落差异, 堪察加地区, 云南省

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 06-0569-08

陆地热泉具有区别于普通环境的高温、缺氧和物化背景复杂的特征, 更接近地球早期环境, 同时又与常温环境隔绝, 因而形成一种独特又封闭的生态系统。该系统在全球广泛分布, 不同地区的热泉之间由于其它类型生态系统的阻断而形成地理隔离。因此, 对热泉中的微生物开展研究, 有助于人们解答生命起源与进化、环境适应机制和生物地理等基础理论问题<sup>[1]</sup>。

泉古菌门 (*Crenarchaeota*) 为古菌域一个重要组成部分, 它处在整个原核生物系统发育树的底部<sup>[2]</sup>。在分子生态学方法创建之前, 人们对泉古菌的认识仅限于高温和超高温环境中得到的纯培养菌株<sup>[3]</sup>。随着宏基因组技术的建立和广泛应用, 学者相继发现大量新的未培养遗传类群<sup>[3-4]</sup>, 同时也已证明各种常温环境中存在着丰富的泉古菌<sup>[3]</sup>。最近的研究建议将常温泉古菌定义为一个独立的门——奇古菌门 (*Thaumarchaeota*), 这一门内的氨

基金项目: 科技部国际合作重点项目 (2013DFA31980); National Science Foundation, USA (MCB-0348180)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-871-65033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn

作者简介: 宋兆齐 (1979-), 男, 河南新乡人, 讲师, 博士, 主要从事微生物生态学研究。E-mail: xiaozhou\_1979@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-02-02; 修回日期: 2013-03-20

氧化古菌可催化氨氧化过程<sup>[5-6]</sup>。目前的研究结果表明,无论是高温泉古菌还是常温泉古菌(奇古菌),其绝大多数物种为无机化能型微生物<sup>[3,7]</sup>,这些古菌可能在自然界生源元素的地球化学循环中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。而陆地热泉富含来自地球内部的无机矿物质,因此孕育了丰富的泉古菌。

近些年,笔者所在的课题组与相关合作单位对我国西部地区热泉中古菌及其功能类群多样性开展了系列研究,获得以下发现:(1)云南和西藏热泉中古菌的主体由泉古菌门的物种组成<sup>[9]</sup>,同时发现了相当数量的奇古菌<sup>[10-11]</sup>;(2)这些泉古菌(包括奇古菌)的群落结构受温度的显著影响<sup>[12-13]</sup>;(3)云南和西藏地区中的古菌多样性和美国黄石地区存在明显不同,即存在各自独立的进化类群<sup>[9]</sup>。基于这些发现,本文尝试回答以下两个问题:(1)除黄石之外,全球其它地热活动区的泉古菌和云南地区存在怎样的差异?(2)由于不断喷涌,热泉对周边的非高温生境的环境化学背景存在一定影响,而这一影响是否会体现在泉古菌的群落组成上?

为此,我们选择实验室保藏的俄罗斯堪察加半岛(Kamchatka)地热活动区内的两处热泉和3处周边土壤样品为研究对象,通过构建16S rRNA基因片段克隆文库及系统发育分析,调查了该地区的泉古菌多样性。另外,通过Fast UniFrac的系列分析,揭示了云南和堪察加地区的泉古菌群落结构差异及其环境影响因素。

## 1 材料和方法

### 1.1 样点描述和样品采集

堪察加半岛位于俄罗斯远东地区,是全球地热活动强烈的区域之一。本次研究样点集中在Uzon Caldera区域,具体地点为54°29'N/160°00'E附近。选取了2处温度差异明显的热泉和3处热泉周边土壤样品为研究对象。温度和pH值的测量采用Hach® pH-meter equipped进行。将样品取出后立即置于50 mL无菌的离心管中并4℃环境下黑暗放置,实验室内-80℃环境保藏。

### 1.2 主要仪器和试剂

Ultra Clean Mega DNA soil kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, 美国); EX Taq酶,限制性内切酶HhaI和HaeIII, DNA胶回收试剂

盒, T4载体连接试剂盒(TaKaRa, 大连); Hach® pH-meter equipped。

### 1.3 环境总DNA提取

称取5-10 g样品,采用Ultra Clean Mega DNA soil kit,并按说明书进行环境DNA的提取。

### 1.4 泉古菌16S rRNA基因片段克隆文库的构建

采用引物Cren 7F: 5'-TTCCGTTGATCCYGCC GGACC-3'和Cren 518R: 5'-GCTGTTWTTACCGC GGCGCTGA-3'<sup>[14]</sup>进行泉古菌16S rRNA基因的特异性PCR扩增。扩增条件按照参考文献[12]中的方法进行。

扩增产物经纯化后通过连接试剂盒连接进T4载体,随后将其转入*E. coli* JM109感受态细胞内。随机挑取克隆,采用特异引物Cren7F和Cren518R进行插入片段的阳性筛选。

### 1.5 泉古菌16S rRNA基因系统发育分析

采用限制性内切酶Hha I和Hae III对特异性扩增片段进行双酶切,具体操作参照文献[12]进行。针对每个样点,挑选出各酶切电泳图谱的代表性克隆,送上海生工(Sangon)进行序列测定。

运用Mallard1.02软件进行嵌合体检验。通过DOTUR1.53<sup>[15]</sup>软件进行可操作分类单元(OTU)的划分,利用BLAST程序将获得的序列在GenBank数据库中相似性比对。根据比对结果挑选相近序列,同时加入之前发表的云南热泉泉古菌代表序列<sup>[12]</sup>,采用Maximum Composite Likelihood模型计算进化距离,通过邻接法,运用MEGA 5.1<sup>[16]</sup>软件构建系统发育树。

### 1.6 多样性分析

基于OTU的丰度,运用SPADE<sup>[17]</sup>软件计算各文库的丰富度(Species richness),覆盖率(Coverage),香农指数(Shannon index),辛普森指数(Simpson's index)。通过在线的Fast UniFrac<sup>[18]</sup>(<http://bmf2.colorado.edu/fastunifrac>)计算样点间群落结构的差异。

## 2 结果和分析

### 2.1 样点特征

所采热泉样品为细沙粒状的沉积物,土壤样品为黑色湿土。研究样点的温度差异显著,两处热泉分别代表了高温和中温环境类型,土壤样点在15℃

以下。所有样点为酸性或弱酸性类型(表1)。

表1. 本次研究的样点信息

Sample	Sample type	T/°C	pH
Burlyashi Liza (BSL)	sediments	89	6.1
TF Vent 2 (TFV)	sediments	49	5.9
Soil orange field (SOF)	soils	<15	<4
Soil Near camp (SNC)	soils	<15	<4
Soil Near Jenn's Vent (SNV)	soils	<15	<4

表2. 本次研究的样点的泉古菌物种多样性

Table 2. Ecological estimates of sequence diversity for crenarchaeotal communities in investigated samples

Community	No. clones	No. OTUs		Coverage /%		Richness (ACE)		Shannons index (Chao & Shen)		Inverse of simpson index (MLE)		Avg. BLAST identity for all phylotypes /%
		98%	95%	98%	95%	98%	95%	98%	95%	98%	95%	
BSL	90	7	7	100	100	7.0	7.0	1.7	1.7	4.9	4.9	98
TFV	102	8	7	99	99	8.3	7.4	1.7	1.6	4.6	4.1	96.4
SOF	47	11	8	94	96	16	8.9	2.3	1.6	8.4	3.1	97.3
SNC	48	13	8	92	96	17	9.1	2.4	1.7	6.8	3.4	96.6
SNV	39	6	4	97	97	6.6	5.0	1.6	1.0	4.2	2.3	97.6

### 2.3 16S rRNA 基因系统发育分析

从系统发育树看,本研究所得序列涵盖了丰富的泉古菌遗传类群。具体包括:热变形菌纲(*Thermoprotei*)、pJ41类群(pJP-related group)、高温水环境泉古菌类群I和II(HWCG-I & II),和奇古菌。最近的研究建议将HWCG-I确定为一个独立的门,即*Aigarchaeota*<sup>[19]</sup>。各类群下的OTUs又分布于不同的遗传分枝之上(图1)。就样点而言,pJP-related group在3个周边土壤样品的比例是64%–92%,为绝对的优势类群。与这些土壤样点不同的是,超高温热泉BSL中的泉古菌全部由热变形菌纲(*Thermoprotei*)内的硫化叶菌目(*Sulfolobales*)、除硫球菌目(*Desulfurococcales*)和热变形菌目(*Thermoproteales*)组成,分别占到了整个群落的2%、64%和33%。而中温热泉TFV的群落结构又与高温热泉和土壤存在明显差异,其主要由Unidentified *Thermoprotei* group, Unidentified crenarchaeal group, HWCG-I和奇古菌下的Group1.1b组成,分别占到整个群落的25%、28%、39%和7%(图2)。

本次研究所得序列的GenBank收录号为:GU075795–GU075809(高温和中温热泉样点),KC522651–KC522680(周边土壤样点)。

### 2.4 样点间群落结构差异

本研究得到的33个OTUs中有21个(占所有

### 2.2 泉古菌物种多样性

所有5个文库共得到326个有效克隆,分别以98%和95%的划分标准,共分为33和25个OTUs。各样点包含的OTU数量见表2。样点的香农指数和辛普森指数的倒数分别在1.6–2.4和4.2–8.4之间(98%的OTU划分标准)。各样点OTUs与NCBI数据库中已知序列的平均相似性在96%–98%(表2)。

克隆总数的61%)为单一样点独有。超高温热泉BSL和中温热泉TFV的绝大多数OTUs为独有克隆。而3处土壤样点中的OTUs大多为相互共有。通过Fast UniFrac在线进行的假设性检验结果显示:高温、中温热泉以及土壤环境的泉古菌群落结构存显著差异( $P < 0.01$ ),群落相似程度在14%以下。3处土壤样点内部的差异并不显著( $P > 0.05$ ),群落相似程度在41%以上。基于Jackknife的聚类分析结果见图2。

为了比较不同地区间泉古菌群落结构的差异,我们将之前获得的云南腾冲8处热泉(具体样点信息见参考文献[12])的泉古菌数据和本次所得的数据联合进行分析。Jackknife和主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)两种聚类的结果一致显示:除云南中温热泉SRQ(水热爆炸区)外,其它所有样点的泉古菌群落结构严格按照温度划分为高温(84°C–96°C)、中温(77°C–44°C)和常温(<15°C)3大类(图3)。

## 3 讨论

目前为止,除了最近获得的几株具有氨氧化功能的奇古菌纯培养物<sup>[8]</sup>以外,其它泉古菌均为嗜高温或嗜酸菌株,其最适生长温度范围分别为80°C–90°C或65°C–70°C,这些高温泉古菌全部来自热变

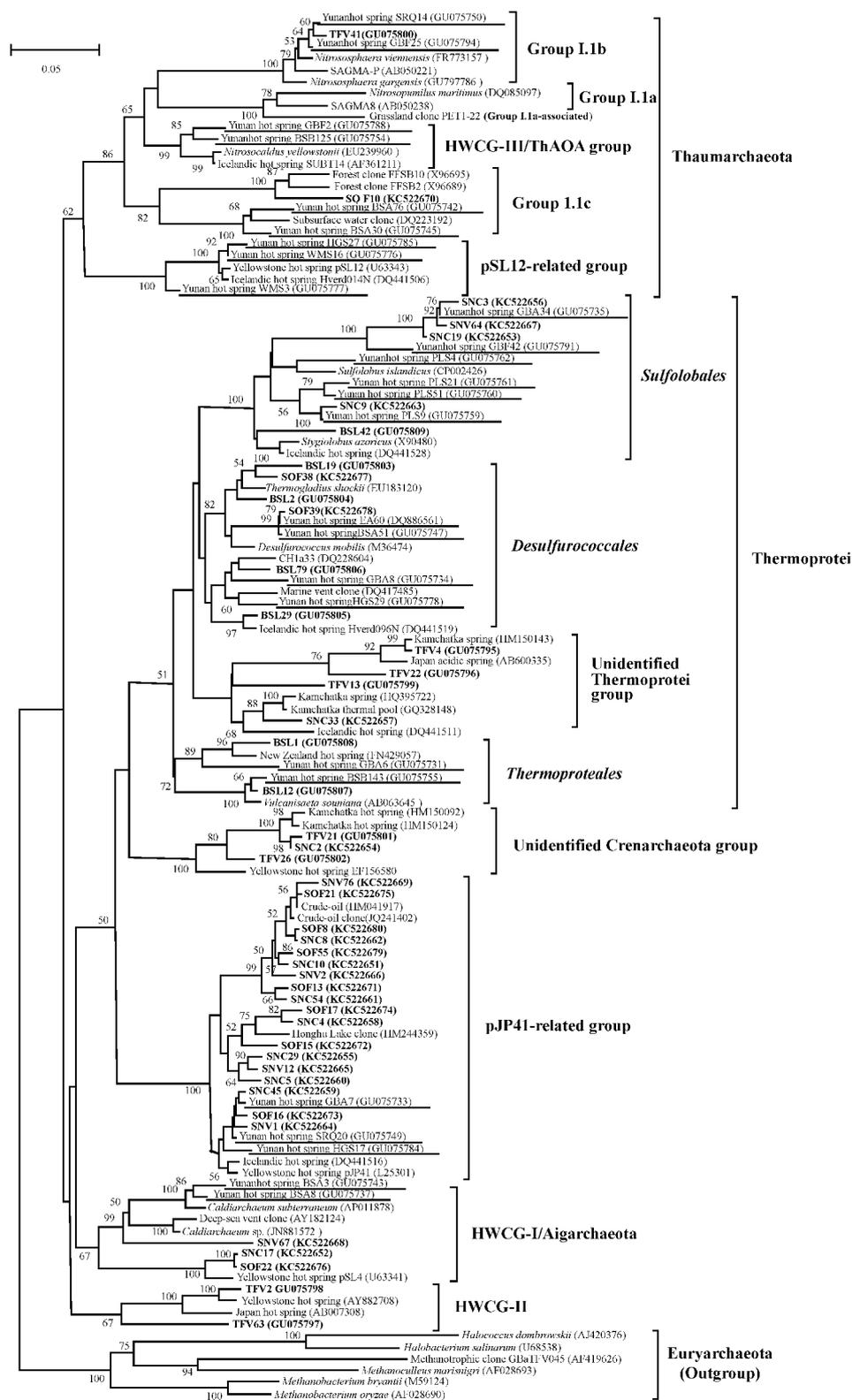


图 1. 泉古菌 16S rRNA 基因片段的 NJ 系统发育树

Figure 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of Crenarchaeotal 16S rRNA gene sequences. Numbers in the parentheses indicate the GenBank accession numbers; Numbers at branch points are percentage bootstrap (values based on 1000 replicates); Bar 0.05 corresponds to 5% levels of the sequence divergence. Sequences marked with overstriking and underlines represent the clones obtained in this study and previous study in Yunnan, respectively.

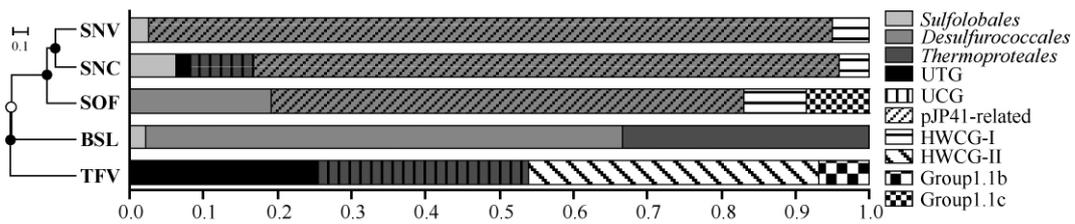


图 2. 本次研究样点的泉古菌群落组成

Figure 2. Crenarchaeal community structure in investigated samples. UTG represents unidentified Thermoprotei group, UCG represents unidentified crenarchaeal group. Left dendrogram represent Fast UniFrac metric tree showing difference of community structure in investigated samples. Circles represent Jackknife support for the monophyly at that node. Solid circles, >90%; open circles, >50%.

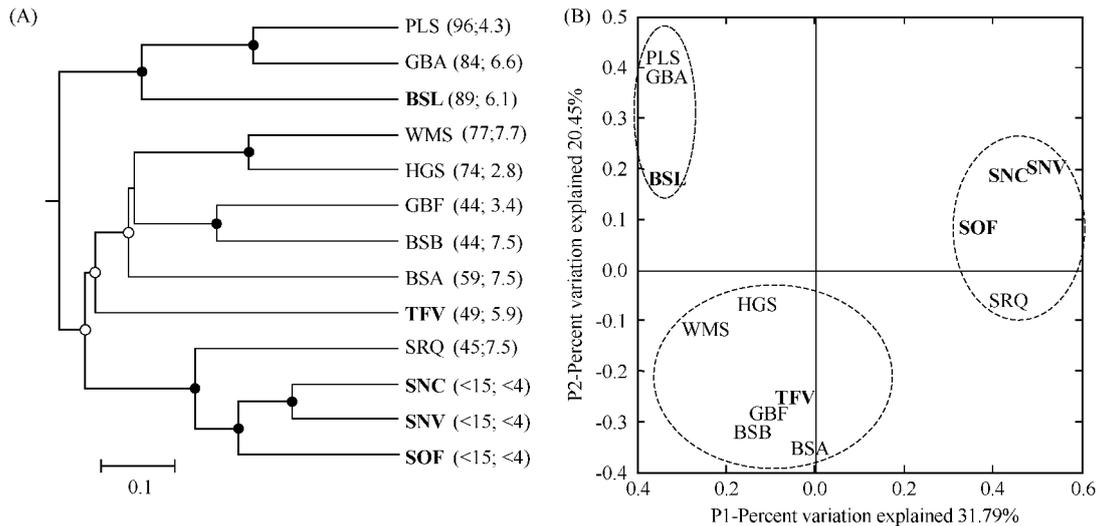


图 3. 堪察加和云南地区热泉中泉古菌群落相似性分析结果

Figure 3. Similarities of crenarchaeal community structure among Kamchatka and Yunnan samples. A: The Fast UniFrac metric tree; Numbers in the parentheses represent temperature and pH value. Circles represent Jackknife support for the monophyly at that node. Solid circles, >90%; open circles, >50%. B: PCoA analysis.

形菌纲<sup>[3]</sup>。本次研究中,有 16 个 OTUs (占总 OTU 的 48%, 总克隆的 40%), 归属于该纲。其中高温热泉 BSL 全部由热变形菌纲的物种组成, 这与我们之前研究的云南类似样点珍珠泉(温度: 96°C, pH: 4.3) 和大滚锅(温度: 84°C, pH: 6.6) 的结果一致<sup>[12]</sup>。此外, 通过系统发育分析, 我们发现了一个不确定的热变形菌纲类群 (Unidentified Thermoprotei group), 其全部由免培养序列组成, 从进化位置和遗传距离来看(图 1), 应为一个和热变形菌目、除硫球菌目和硫化叶菌目平行的类群。这表明即便是热变形菌纲, 其依然存在着还无法获得纯培养的大遗传分歧。根据参照序列的 GenBank 信息, 除了堪察加地区以外, 这一分歧还在日本和冰岛地区发现, 而目前在云南地区还没有被探测到。

针对氨氧化功能基因 *amoA* 的多样性研究已经

证明: 奇古菌内的物种在包括云南地区在内的全球热泉中广泛分布<sup>[10, 20]</sup>。但是本次研究的堪察加地区的两处热泉中, 仅发现了 TFV41 这一个奇古菌的 OTU (图 1), 一个合理的解释是: 先前的 *amoA* 基因定量 PCR 的结果已经表明该地区热泉的奇古菌维持一个较低的丰度<sup>[21]</sup>, 而这可能导致本次研究无法探测到相应的 16S rRNA 基因序列。然而有意思的是, 本次调查的 3 处热泉周边常温土壤, 同样仅发现 1 条奇古菌的代表序列 SOF10 (图 1), 这和普通土壤环境中, 奇古菌为古菌绝对优势类群的情况截然不同<sup>[8, 22-24]</sup>。相反, 这些调查样点, 其绝大部分的 OTUs 与热泉环境的代表性克隆 pJP41 一起聚成一个较大的遗传类群。这说明热泉周边生态系统和热泉内部的泉古菌群落结构更为相似, 类似的现象也存在于冰岛的地热活动区<sup>[25]</sup>。这些结果证明了, 陆

地温泉系统对其周边环境的泉古菌存在着显著的影响。另外,对于温泉环境克隆 pJP41 代表的类群,其最早于 1994 年在美国黄石热泉“Bsidian Pool”中被发现,为泉古菌中较原始的分枝<sup>[4]</sup>。后续的富集培养实验表明该类群为中度嗜热,嗜中性或偏碱性,依赖硫元素进行无机化能型营养<sup>[14]</sup>。云南地区的研究结果证实该类群可在 84 – 44℃ 的热泉环境下存在<sup>[12]</sup>。然而本次研究的土壤样品为常温且酸性的环境,这说明了该泉古菌类群的部分物种对温度和 pH 存在较强的环境适应性。

本次研究中,我们将得到的数据与先前云南地区相关研究结果联合,进行了泉古菌群落结构的差异分析。Jackknife 聚类树和 PCoA 分析的结果显示:温度相似的样点,其泉古菌群落结构相对来说更为相似。这表明热泉及其周边区域的生态系统中,温度对其泉古菌群落结构存在明显的影响。这与我们之前单独基于云南热泉的研究结果保持一致。然而从 Jackknife 聚类树的枝长以及群落相似程度的计算结果来看(图 3-A),即使温度相似的样点聚为同一大类,它们之间的群落结构依然有着较大的差异。造成这种差异的原因可归结为:由于热泉中的无机离子丰富而多样<sup>[7,26]</sup>,即使温度接近,它们之间的化学背景依然存在着较大的差异,而这种差异导致了无机化能型的泉古菌在温度相同的热泉间依然存在不同的群落结构。因此,温度似乎只在最上游控制着泉古菌遗传类群的环境分布。另外,堪察加地区的高温和中温环境热泉分别与其所对应温度类群中的云南热泉互相独立(图 3-A),这说明相同的温度区域内,云南和堪察加的热泉中泉古菌类群也存在显著不同,这种不同可能是由上面提到的两地区热泉化学背景的差异造成的,也可能是由于地区间地理隔离而引起的。

本次的群落差异分析还发现,pH 值似乎与热泉及其周边区域的泉古菌群落结构没有明显的对应性,这又与普通土壤环境存在明显不同。最近的研究显示,普通土壤环境的 pH 值支配了其环境下古菌种群的分布<sup>[27-28]</sup>。这可能是由于,普通土壤环境相对于陆地热泉,其温度变化不大,该系统内的泉古菌(或奇古菌)在适应常温环境后,对不同的 pH 值产生了特定的应答,从而形成了不同的遗传类群。

总之,本次研究表明了俄罗斯堪察加地区与我国的云南地区热泉中的泉古菌存在着一定程度上的

不同。陆地热泉本身影响着其周边环境的泉古菌类群。至于这种影响是否也存在于细菌或真菌等其它微生物中,还需相关研究证明。另外通过分析发现,本次研究的俄罗斯热泉以及我们前期调查过的云南热泉的泉古菌群落受温度的明显影响,而似乎与 pH 值没有明显的相关性。

## 参考文献

- [1] Gold T. The deep, hot biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89 (13) :6045-6049.
- [2] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87 (12) :4576-4579.
- [3] Dawson S, DeLong EF, Pace NR. Phylogenetic and ecological perspectives on uncultured Crenarchaeota and Korarchaeota. // Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. vol 3. 3<sup>rd</sup> eds. New York: Springer, 2006: 281-289.
- [4] Barns SM, Fundyga RE, Jeffries MW, Pace NR. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91 (5) :1609-1613.
- [5] Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6 (3) :245-252.
- [6] Zhang L, He J. 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.
- [7] Spear JR, Walker JJ, McCollom TM. Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (7) :2555-2560.
- [8] Stahl DA, de la Torre JR. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea. *Annual Review Microbiology*, 2012, 66:83-101.
- [9] Song Z, Wang F, Zhi X, Chen J, Zhou E, Liang F, Xiao X, Tang S, Jiang H, Zhang CL, Dong H, Li W. Bacterial and archaeal diversities in Yunnan and Tibetan

- hot springs, China. *Environmental Microbiology*, 2013, doi: 10.1111/1462-2920.12025.
- [10] Zhang CL, Ye Q, Huang Z, Li W, Chen J, Song Z, Zhao W, Bagwell C, Inskip WP, Ross C, Gao L, Wiegel J, Romanek CS, Shock EL, Hedlund BP. Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(20):6417-6426.
- [11] Jiang H, Huang Q, Dong H, Wang P, Wang F, Li W, Zhang CL. RNA-based investigation of ammonia-oxidizing archaea in hot springs of Yunnan Province, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13):4538-2541.
- [12] Song Z, Chen J, Jiang HC, Zhou EM, Tang SK, Zhi XY, Zhang L, Zhang CL, Li W. Diversity of Crenarchaeota in terrestrial hot springs in Tengchong, China. *Extremophiles*, 2010, 14(3):287-96.
- [13] Song Z, Chen J, Zhi X, Huang Z, Zhang C, Li W. Crenarchaeal diversity and phylogenetic analysis of two Hot Springs in Tengchong. *Microbiology China*, 2008, 35(3):372-377. (in Chinese)  
宋兆齐, 陈经全, 职晓阳, 黄志勇, 张传伦, 李文均. 腾冲两热泉泉古菌多样性及系统发育的初步分析. *微生物学通报*, 2008, 35(3):372-377.
- [14] Perevalova A, Tatiana A, Kolganova V, Birkeland NK, Christa S, Bonch-Osmolovskaya EA, Alexander VL. Distribution of Crenarchaeota representatives in terrestrial hot springs of Russia and Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(24):7620-7628.
- [15] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3):1501-1506.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10):2731-2739.
- [17] National Tsing Hua University, TAIWAN. Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation). <http://chao.stat.nthu.edu.tw>. 2010.
- [18] Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME Journal*, 2010, 4(1):17-27.
- [19] Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J, Kazama H, Chee GJ, Hattori M, Kanai A, Atomi H, Takai K, Takami H. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(8):3204-3223.
- [20] Reigstad LJ, Richter A, Daims H, Urich T, Schwark L & Schleper C. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2):167-174.
- [21] Zhao W, Song Z, Jiang H, Li W, Mou X, Christopher SR, Juergen W, Dong H, Zhang CL. Ammonia-oxidizing Archaea in Kamchatka Hot Springs. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28:149-159.
- [22] Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104):806-809.
- [23] Zhang LM, Offre PR, He JZ, Verhamme DT, Nicol GW, Prosser JI. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40):17240-17245.
- [24] Pratscher J, Dumont MG, Conrad R. Ammonia oxidation coupled to CO<sub>2</sub> fixation by archaea and bacteria in an agricultural soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10):4170-4175.
- [25] Kvist T, Ahring BK, Westermann P. Archaeal diversity in Icelandic hot springs. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59(1):71-80.
- [26] Meyer-Dombard DR, Shock EL, Amend JP. Geomicrobiology in Yellowstone Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology*, 2005, 3:211-227.
- [27] Lehtovirta-Morley LE, Stoecker K, Vileinskas A, Prosser JI, Nicol GW. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(38):15892-15897.
- [28] Gubry-Rangin C, Hai B, Quince C, Engel M, Thomson BC, James P, Schloter M, Griffiths RI, Prosser JI, Nicol GW. Niche specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(52):21206-21211.

# Diversity of Crenarchaeota in terrestrial hot springs and their surrounding environments in Kamchatka, Russia

Zhaoqi Song<sup>1,2</sup>, Li Wang<sup>1</sup>, Jinqun Chen<sup>2</sup>, Enmin Zhou<sup>2</sup>, Chuanlun Zhang<sup>3,4</sup>, Wenjun Li<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Engineering Technology Research Center of Biomass Degradation and Gasification, University of Henan Province, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

<sup>3</sup> State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China

<sup>4</sup> Department of Marine Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

**Abstract:** [Objective] *Crenarchaeota* is a major archaeal lineage in terrestrial hot springs and important in biogeochemical cycles of life-essential elements. In this study, we investigated the diversity of *Crenarchaeota* in hot springs and the surrounding environments in Kamchatka, Russia. In addition, we compared crenarchaeotal community structures in Kamchatka, Russia and Yunnan province, China. [Methods] Crenarchaeal 16S rRNA gene clone libraries were constructed and the sequences and abundances of representational clone were obtained. Phylogenetic analysis was then performed and the community structures in different samples were compared. [Results] The high temperature spring Burlyashi Liza (BSL, 89°C) comprised *Thermoprotei*. The moderate temperature spring TF Vent 2 (TFV, 49°C) harbored unidentified *Thermoprotei* group, unidentified crenarchaeal group, HWCG-II (hot water crenarchaeotal group II), and Group1.1b (one thaumarchaeotal subgroup). Most of sequences that obtained from surrounding environments (<15°C) are closely with the representational clone pJP from a Yellowstone hot spring. Jackknife cluster and Principal coordinates analysis (PCoA) showed that the samples have more similarity in crenarchaeal communities at similar temperatures. [Conclusion] The diversities of *Crenarchaeota* in Kamchatka hot springs are somewhat different from those in Yunnan province. Terrestrial hot springs obviously affect the crenarchaeotal communities in surrounding environments. Temperature is the major factor controlling the community structure in terrestrial hot springs.

**Keywords:** terrestrial hot spring, surrounding environments, crenarchaeota, community structure, kamchatka, Yunnan province

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the Key Project of International Cooperation of China Ministry of Science & Technology (MOST) (2013DFA31980) and by the National Science Foundation, USA (MCB-0348180)

\* Corresponding author. Tel: +86-871-65033335; E-mail: wjli@ynu.edu.cn

Received: 2 February 2013 / Revised: 20 March 2013