

## 西藏羊八井废弃地热热井的细菌多样性

陈彬<sup>1</sup>, 马超<sup>1</sup>, 周世宁<sup>2</sup>, 卜海涛<sup>1</sup>, 蒋思萍<sup>1\*</sup>, 李晖<sup>1</sup>, 尼珍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 西藏高原生物研究所, 拉萨 850001)

(<sup>2</sup> 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

**摘要** 【目的】旨在研究羊八井热田两废弃地热热井沉积物及热水中的细菌多样性。【方法】采用非培养分子分析技术分别构建了热井 A 沉积物 A 样、水样 A 以及热井 B 沉积物 B 样总 DNA 的 16S rRNA 基因文库, 并对每个文库中随机挑选的克隆子进行扩增 rDNA 限制性酶切片段分析 (amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), 分别选取文库中不同分类单元的阳性克隆子进行测序, 将所得到的数据与国际基因数据库 GenBank 的序列进行相似性比较并构建系统发育树。【结果】热井 A 和热井 B 的细菌类群大多为典型的嗜热细菌, 均以变形菌 (Proteobacteria) 为优势类群 (在热井 A 沉积物 A 中为 41.08%、在水样 A 中为 38.00%, 以及在热井 B 的沉积物 B 中为 42.57%, 下同), 以恐球菌-栖热菌 (*Deinococcus-Thermus*) 为亚优势类群 (10.71%、20.00%、21.30%); 此外两热井沉积物中均发现热泉中比较少见的且为亚优势类群的酸杆菌 (*Acidobacteria*) (在热井 A 沉积物 A 中为 16.07%、在热井 B 的沉积物 B 中为 19.15%), 热井 A 沉积物中第三个亚优势类群为壁厚菌门 (Firmicutes) 的真杆菌 (*Eubacterium* sp.) (14.28%), 水样 A 中则没有检测到酸杆菌, 而以产水菌门 (Aquificae) 的产氢杆菌属 (*Hydrogenobacter*) 为另一亚优势类群 (16.00%)。此外两热井中均检测到绿弯菌 (*Chloroflexi*)、蓝藻 (*Cyanobacteria*) 以及噬纤维菌-屈挠杆菌-拟杆菌群 (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, CFB group) 等类群的细菌。【结论】通过与文献比较分析, 发现羊八井热田中细菌类群大多为典型的嗜热细菌, 如恐球菌-栖热菌、产水菌、绿弯菌、蓝藻以及 candidate division OP 类群的微生物等; 但是尚有一些不常见的细菌类群如弧菌 (*Vibrio* sp.)、*Bacteriovorax* sp.、未培养的酸杆菌和 *Holophaga* (uncultured *Holophaga/Acidobacterium*) 和未确定的疣微菌 (Unidentified *Verrucomicrobium*) 等, 羊八井热田地热的开发变迁和地下冷热水交融可能与细菌类群的复杂性有关。

关键词: 热井; 沉积物; 16S rRNA 基因文库; 系统发育分析

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)02-0217-10

地热热泉或地热出口常见的主要的嗜热细菌有产水菌目 (Aquificales)、热袍菌目 (Thermotogales)、栖热菌目 (Thermales)、热脱硫杆菌目 (Thermodesulfobacteriales)、绿弯菌目 (Chloroflexales)、绿菌目 (Chlorobiales)、蓝藻纲 (Cyanobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 以及革兰氏阳性菌 (Gram-positive bacteria) 等细菌类群<sup>[1]</sup>。热泉的温度、pH 值

和化学组成对微生物类群在热泉中的分布存在着不同程度的影响, 并且这些因素的影响是相互关联的, 如 pH 值及化学组成两因素是密切相关的, 深刻影响着微生物类群的分布, 温度则直接影响着热泉微生物的多样性<sup>[2]</sup>。早在 20 世纪 80 年代就有国内学者研究热泉微生物的多样性, 他们发现在同一个热泉中 86℃~92℃ 的范围的区域生活着大量的细丝

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-891-6827620; E-mail: jiangsiping2003@yahoo.com.cn

作者简介: 陈彬 (1977-), 男, 广东南雄人, 硕士研究生, 主要从事极端微生物和植物内生菌的研究。E-mail: chenyanishan@126.com

收稿日期: 2008-06-25; 修回日期: 2008-10-21

状和棒状的非光合作用细菌,在 68°C ~ 72°C 范围的区域发现了典型的蓝藻-绿弯菌门类群的微生物,而在低于 60°C 的区域细菌的多样性迅速丰富了起来,发现其主要的类群是细丝状的蓝绿藻<sup>[3]</sup>。

我们尝试运用不依赖培养(cultured-independent)的分子分析技术,构建 16S rRNA 基因文库,对西藏羊八井两眼废弃弱酸性热井的沉积物和水样进行了细菌多样性的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品的采集和处理** 无菌操作采取沉积物样品和水样,编号后即时放入盛有低温冷冻冰袋的保温箱中,回来马上放入 -40°C 冰箱保存待用。

**1.1.2 实验试剂和仪器** : *Taq* 酶(TaKaRa 公司), dNTP(TaKaRa 公司), pMD18-T vector(TaKaRa 公司), 均贮存于 -20°C 冰箱;凝胶电泳琼脂糖(西班牙 Biowest),  $\lambda$  DNA/*Hind* III Marker(50 次)(Tiangen 公司), D2000 DNA Marker(Tiangen 公司), 胶回收试剂盒(Omega 公司), *Hae* III 内切酶(TaKaRa 公司), *Bsh* 1236 I 内切酶(Fermentas 公司), 克隆使用的工程菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5a(实验室保藏), 电泳仪(北京六一仪器厂), 凝胶成像分析系统(syngene 公司), 温度梯度 PCR 仪(德国 Biometra) 等。

### 1.2 样品总 DNA 的提取及纯化

样品总 DNA 的提取方法采用的是中山大学生命科学学院周世宁教授课题组<sup>[4]</sup>的方法。分别称取 2.0 g 沉积物用于提取总 DNA, 提取后的总 DNA 用 0.7% 琼脂糖凝胶进行电泳并用胶回收试剂盒割胶回收, 置于 -20°C 保存备用。取 A 水样 2 L 在 22000 r/min 高速离心后收集沉淀物, 也用上述方法进行总 DNA 的提取。

### 1.3 16S rRNA 基因的扩增及克隆文库的构建

16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增采用的引物为 U515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 U1406R<sup>[5]</sup> (5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3'), PCR 反应体系采用 50  $\mu$ L 体系, 加入 1  $\mu$ L DMSO 作为 DNA 模板变性辅助剂, 加入模板 0.5  $\mu$ L, 30 个循环。反应条件为 94°C 变性 50 s; 54°C 50 s; 72°C 延伸 90 s。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 并割胶回收。使用 pMD18-T vector 进行连接反应, 并转化到 *E. coli* DH5a 中, 涂布得到长有克隆的氨苄平板, 置 4°C 冰箱保存。

### 1.4 16S rRNA 基因阳性克隆的检出、扩增 rDNA 限制性酶切片段分析(ARDRA)及测序

随机挑取克隆子用 M13 引物进行菌落 PCR 扩增反应, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测出阳性克隆子。PCR 采用 25  $\mu$ L 体系, 加入模板 1.0  $\mu$ L, 30 个循环。反应条件为 94°C 50 s; 54°C 50 s; 72°C 90 s。

从沉积物 A 样、A 水样以及沉积物 B 样的克隆文库中分别挑取 135、137 和 116 个阳性克隆子, 用 *Hae* III 内切酶和 *Bsh* 1236 I 内切酶分别做扩增 rDNA 限制性酶切片段分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA), 得到的电泳图谱用 Gel-pro Analyzer 软件进行分析分类, 每种不同酶切电泳谱型作为一个分类操作单元(Operational Taxonomic Units, OTUs), 选取相应的克隆子送广州拓谱基因技术有限公司测序。

### 1.5 16S rRNA 基因文库的分析

构建羊八井两眼热井的 16S rRNA 基因文库目的是为了反映两眼热井中的细菌的种类与数量, 因此采用覆盖率(Coverage, C)来反映文库的库容, 并用 Shannon-Wiener index(*H'*)反映细菌的多样性<sup>[6-7]</sup>。Coverage C 计算公式为:  $C = 1 - n_1/N$ , *N* 代表分析的有效 16S rRNA 基因克隆数, *n*<sub>1</sub> 则代表在 16S rRNA 基因文库中仅出现过一次的 OUT 的数量。

### 1.6 序列筛选检验和比对分析以及构建系统发育树

在 NCBI 网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)运用 VecScreen 在线检验工具去除载体序列, 并运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP(Ribosomal Database Project)在线数据库中(<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi>)对序列进行嵌合体检验。运用 BLAST 程序将获得的序列在 GenBank 数据库中进行相似性搜索。选取相似性较高的为参照序列, 用 Clustal\_X1.8 程序进行比对; 采用 Kimura\_2 参数模型计算进化距离, 通过邻接法和最大简约法, 运用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。经重复取样 1000 次, 进行 bootstrap 值分析, 最后得到可信度最高的一棵。

### 1.7 核酸序列注册登录号

共 153 个 16S rRNA 基因序列已经提交到 GenBank 数据库, 登录号分别为 yang-A 系列的 EU815067 ~ EU815122, yang-W 系列的 EU815123 ~ EU815172 以及 yang-B 系列的 EU815173 ~ EU815179、EU815182、EU815190 及 EU815192 ~ EU815222。

## 2 结果和分析

### 2.1 16S rRNA 基因克隆文库的分析

用覆盖率(C)来评估所构建的文库的细菌多样性。热井 A 和 B 样品中细菌 16S rRNA 基因克隆文库的覆盖率分析结果如表 1。分析结果表明所构建

的 3 个 16S rRNA 基因克隆文库均包含了 81% 以上的细菌多样性,其中热井 B 沉积物文库的覆盖率最高,达到 85.4%,热井 A 沉积物文库的覆盖率最低,为 81.3%。H' 值以热井水样 16S rRNA 基因克隆文库的为最高,达 3.10,热井 B 沉积物 B 样 16S rRNA 基因克隆文库的 H' 值最低,为 2.79。

表 1 羊八井两热井细菌 16S rRNA 基因文库分析结果

Table 1 Analysis of bacterial 16S rRNA gene library constructed from two thermal vents samples in Yangbajing

Samples	Sum of clones analyzed by ARDRA	Rate of positive clones/%	N	<sup>a</sup> OTUs	C/%	H'
Sediment A	135	83.0	112	33(21)	81.3	2.89
Water sample A	137	89.8	123	37(20)	83.7	3.10
Sediment B	116	82.8	96	28(14)	85.4	2.79

<sup>a</sup>OTUs: The number in bracket in OTUs list shows the sum of OTUs which appeared just one time in analysis by ARDRA.

### 2.2 样品中细菌的类群分析

通过在 NCBI 上进行 16S rRNA 基因序列的比对,得到克隆子最相似的 16S rRNA 基因序列及其所在的属。结果表明,热井 A 供检测的克隆子多样性要比热井 B 供检测的克隆子的多样性丰富。热井 A 共检测出与细菌域 16 个类群相似的 106 个克隆子。从热井 B 的沉积物 B 样中检测出与 10 个细菌类群相似的共 47 个克隆子,多样性要稍微少一些。

从细菌的类群多样性的分类统计结果中可以看到(表 2)热井 A 和热井 B 中细菌类群的多样性及优势类群细菌以及其丰度既有相似的地方又有明显的差别。相同的是热井 A 和热井 B 中均以变形菌

为优势类群,而均以恐球菌-栖热菌(*Deinococcus-Thermus*)和酸杆菌(*Acidobacteria*)为亚优势类群。不同的是热井 B 中只检测出一种热井 A 中未检测出的类群拟杆菌(*Bacteroidetes*),而热井 A 中则检测出七种热井 B 中未检测出的类群,分别为:candidate division OP10 类群、candidate division OP11 类群、非培养革兰氏阳性菌(Gram-positive bacterium)、产水菌(*Aquificae*)、真杆菌(*Eubacterium* sp.)、放线菌(*Actinobacteria*)、疣微菌(*Verrucomicrobia*)。就热井 A 本身,沉积物 A 样中和水样 A 中的细菌的多样性及优势类群及其丰度也是不尽相同的,同样是以变形菌门(*Proteobacterium*)作为被检测出的优势菌群,但

表 2 热井 A 沉积物 A 样、水样 A 及热井 B 沉积物 B 样被测序克隆子的细菌类群统计

Table 2 Bacteria communities of analyzed clones from sediment sample A, water sample A from thermal vent A and of sediment sample B from thermal vent B

Affiliation	Sediment A from thermal vent A		Water Sample from thermal vent A		Sediment B from thermal vent B	
	Sum Of Clones	Abundance/%	Sum Of Clones	Abundance/%	Sum Of Clones	Abundance/%
$\alpha$ -Proteobacterium	-	-	2	4.00	1	2.13
$\beta$ -Proteobacterium	1	1.79	5	10.00	6	12.78
$\gamma$ -Proteobacterium	8	14.29	10	20.00	1	2.13
$\delta$ -Proteobacterium	14	25.00	2	4.00	12	25.53
Candidate division OP10	2	3.57	-	-	-	-
candidate division OP11	-	-	1	2.00	-	-
<i>Deinococcus-Thermus</i>	6	10.71	10	20.00	10	21.30
<i>Acidobacteria</i>	9	16.07	-	-	9	19.15
Gram-positive bacterium	1	1.79	-	-	-	-
<i>Aquificae</i>	1	1.79	8	16.00	-	-
<i>Chloroflexi</i>	4	7.14	3	6.00	2	4.23
<i>Firmicutes</i>	8	14.28	3	6.00	-	-
<i>Actinobacteria</i>	-	-	1	2.00	-	-
<i>Verrucomicrobia</i>	-	-	1	2.00	-	-
<i>Bacteroidetes</i>	-	-	-	-	2	4.23
<i>Cyanobacteria</i>	-	-	1	2.00	3	6.39
CFB group	2	3.57	3	6.00	1	2.13

是在沉积物 A 样中  $\delta$ -变形菌( *$\delta$ - Proteobacterium*)又是其中的优势菌群, $\gamma$ -变形菌( *$\gamma$ - Proteobacterium*)次之,在水样 A 中则  $\gamma$ -变形菌为其中的优势菌群, $\beta$ -变形菌( *$\beta$ - Proteobacterium*)次之。沉积物 A 样中被检测出的类群中亚优势类群分别为栖热菌(*Thermus*)、酸杆菌(*Acidobacteria*)和真杆菌(*Eubacterium* sp.)绿弯菌(*Chloroflexi*)的也有不少;水样 A 中被检测出的菌群中亚优势类群分别为栖热菌属和产水菌门的产氢杆菌属(*Hydrogenobacter*);绿弯菌、壁厚菌门(*Firmicutes*)的真杆菌属(*Eubacterium* sp.)和 CFB 类群(*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, CFB group)也有不少。沉积物 A 样中检测出最相似类群的 3 个类群是水样 A 中未检测到的,分别为 candidate division OP10 类群、酸杆菌和非培养革兰氏阳性菌;而  $\alpha$ -变形菌、candidate division OP11、放线菌、疣微菌和蓝藻等类群却只在水样 A 中检测到,而在沉积物 A 样中未检测到。

### 2.3 沉积物 A 样、和水样 A 以及沉积物 B 样 16S rRNA 基因系统发育树构建

采用 MEGA4.0 软件构建系统发育树。3 个样品的 16S rRNA 基因克隆文库均统一以古菌 16S rRNA 基因序列作为外群,7 个古菌序列的登录号分别为 Y16382、AB077217、AF176347、AF419639、AF227643、AB019733 和 AB007307。热井 A 沉积物 A 样、水样 A 以及热井 B 沉积物 B 样的系统发育分析分别如上图 1、图 2 和图 3。其中热井 A 沉积物 A 样、水样 A 以及热井 B 沉积物 B 样系统发育分析所用的序列数目分别为 92、95 和 83 条。

从热井 A 沉积物 A 样和水样 A 细菌的 16S rRNA 基因系统发育分析的 Neighbor-Joining 树可以看出,由于出自同一热泉,细菌的主要类群比较接近。表现出的序列归属与序列比对分析统计分类的结果具有较好的一致性。水样 A 的克隆 yang-W106 实际上归属 candidate division OP11 类群,但其与 Uncultured candidate division OP11 bacterium clone MVP-74(DQ676382)的相似度仅有 88%。

热井 B 沉积物 B 细菌的 16S rRNA 基因系统发育分析的 Neighbor-Joining 树比较奇特,本应归属于  $\gamma$ -变形菌( *$\gamma$ - Proteobacterium*)类群的克隆子 yang-B38 和本应归属于绿弯菌(*Chloroflexi*)类群的克隆子 yang-B47 却在 Neighbor-Joining 树上归属于恐球菌-栖热菌(*Deinococcus-Thermus*)类群,yang-B18 本应归

属于  $\gamma$ -变形菌( *$\gamma$ - Proteobacterium*)却在 Neighbor-Joining 树上归属于 candidate division OD1。虽说 yang-B47 与 Uncultured *Chloroflexi* bacterium clone 312 (AY485299)的相似度仅有 86%,但是 yang-B38 与 Uncultured *gamma proteobacterium* clone OM2\_E3 (DQ513928)相似度高达 96%,yang-B18 亦与 Uncultured *delta proteobacterium* clone SM2F11 (AF445733)相似度高达 97%,因此相似度的巨大差异造成克隆子归属错位显然是矛盾的,造成的归属错位也许与进化距离算法,跨类群的丰富程度等诸多因素有关。

## 3 讨论

### 3.1 羊八井两废弃热井中的细菌类群多样性

从覆盖率分析上看,C 值均超过 81%,可以认为基本反映所属环境中细菌的多样性情况,H'值反映的是环境中物种数量和丰度的一个多样性指数,H'值越高则环境中微生物的多样性也就越丰富。综合 C 值和 H'值来看,显然热井 A 中的细菌类群多样性要比热井 B 中的丰富一些。

### 3.2 羊八井两废弃热井中的细菌类群的分布及特征

研究表明羊八井废弃热井中的细菌类群大多数是典型的栖热细菌:绿弯菌(*Chloroflexi*)、蓝藻(*Cyanobacteria*)、产水菌(*Aquificae*)、恐球菌-栖热菌(*Deinococcus-Thermus*)以及 candidate division OP 系列等。

蓝藻(*Cyanobacteria*)常常伴随着绿弯菌(*Chloroflexi*)在热泉中存在,丝状厌氧的绿弯菌常常与蓝藻形成各种各样颜色的条带<sup>[8]</sup>。本研究在两热泉中均发现有蓝藻和绿弯菌,且绿弯菌在热井 A 中比在热井 B 中要丰富一些,而蓝藻在热井 B 中要比在热井 A 中丰富一些。温度是热泉中蓝藻门类群微生物结构的主要决定因子,蓝藻门类群微生物模态的多样性随着温度的升高而下降,在热泉中水化学(pH、碱度及氨浓度)因素表现得很不重要<sup>[9]</sup>。本研究热井 A 只在水样 A 中检测出 *Synechococcus lividus*(相似度 97%)的蓝藻门的克隆子 yang-W133,沉积物中没有检测到,而在热井 B 中则检测出 2 个颤藻目 *Leptolyngbya* sp. 的克隆子 yang-B66 和 yang-B71(相似度分别为 94%和 98%)和一个 Uncultured *cyanobacterium* 克隆子 yang-B50(相似度 82%)。显然

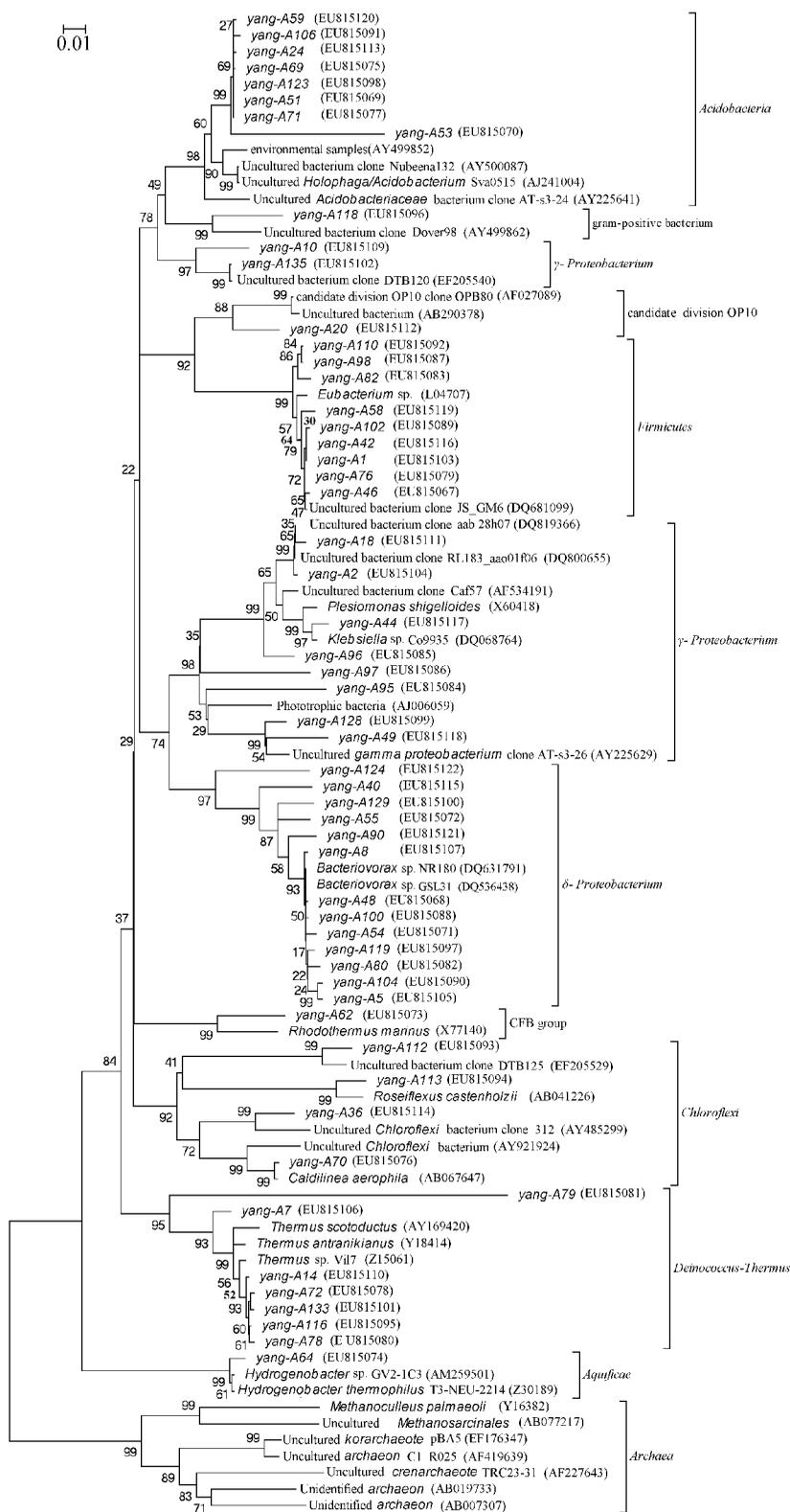
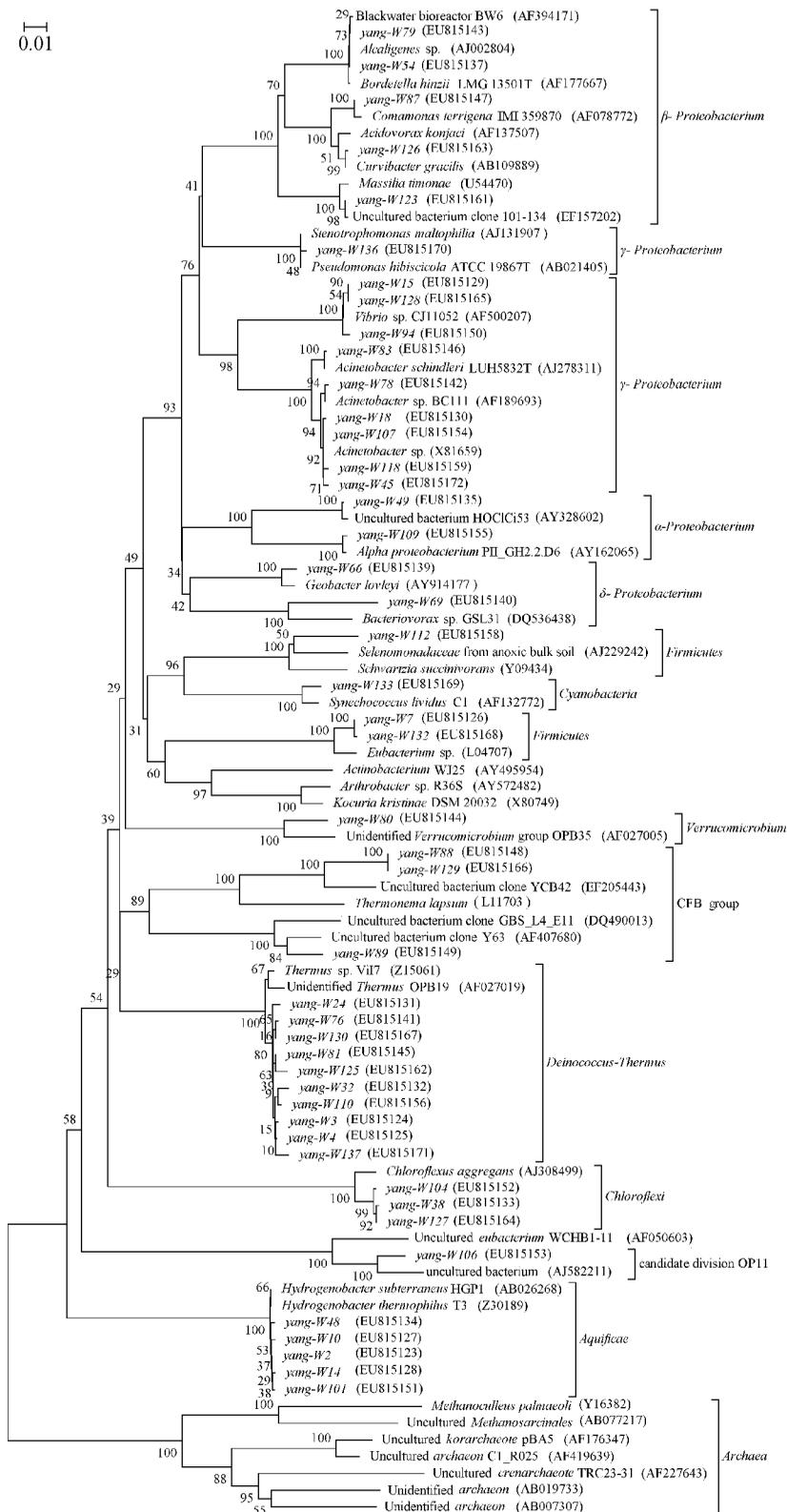


Fig. 1 热井 A 沉积物 A 样品的 16S rRNA 基因系统发育分析

Fig. 1 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences (accession number from EU815067 to EU815122) of bacteria in sediment A from thermal vent A and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. The tree was rooted by using several Archaea 16S rRNA gene sequences. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.



12 热井 A 水样 A 的 16S rRNA 基因系统发育分析

Fig.2 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences ( accession number from EU815123 to EU815172 ) of bacteria in water sample A from thermal vent A and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. The tree was rooted by using several Archaea 16S rRNA gene sequences. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.



3 热井 B 沉积物 B 样品的 16S rRNA 基因系统发育分析

Fig.3 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences (accession number : EU815173- EU815179 , EU81582- EU81590 , EU815192- EU815222 ) of bacteria in sediment B from thermal vent B and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. The tree was rooted by using several Archaea 16S rRNA gene sequences. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

是由于热井 B 的温度要低一些,因而 Cyanobacteria 多样性要好一些,但却没有检测到高温下的 *Synechococcus lividus* 和 *Synechococcus* sp.<sup>[9]</sup> 蓝藻在两热井中的分布特征恰好印证了热井 A 温度比热井 B 温度高这一事实。

超嗜热微生物是指那些不能在 60℃ 以下生长的微生物,最极端的超嗜热微生物甚至不能在 90℃ 以下生长<sup>[10-11]</sup>。产水菌(*Aquificae*)是超嗜热微生物中唯独不属于古菌域的两个类群之一,另一个不属于古菌域的类群是热袍菌门(*Thermotogae*)的某些微生物<sup>[12]</sup>。Nakagawa Tatsunori 和 Fukui Manabu 在弱碱性热泉中发现产水菌(*Aquificae*)、热脱硫杆菌(*Thermodesulfobacteria*)和栖热菌(*Thermus*)类群是 66℃ 以上区域的主要微生物类群<sup>[13]</sup>。本研究中,检测到的产水菌门类群主要是 *Hydrogenobacter* 属的细菌,在高温的热井 A 水样中占有一定的优势,而在较低温度的热井 B 中则没有检测到。

非培养酸杆菌门(*Acidobacteria*)类群的细菌在热泉中并不多见,酸杆菌(*Acidobacteria*)是最新发现的一种能进行光合作用的细菌域的门,该类群来自广泛的不同的栖息地,包括热泉、土壤、酸性矿物排出物和海洋等,多数的生长环境的 pH < 6.0<sup>[14-16]</sup>。美国黄石国家公园的 Obsidian Pool 热泉中就发现有酸杆菌,在地热活动发生而升温至 60℃ 的树林里的酸性土壤中也发现占有显著优势的酸杆菌<sup>[17-19]</sup>。泰国的 pH 6.5、55℃ 的富含硫化物的 Bor Khlueng 热泉中及我国西藏自治区 Daggai Tso 热田都存在酸杆菌<sup>[20-21]</sup>。本研究中,热井 A 和 B 的沉积物中均检测出不少酸杆菌门的克隆子,都为仅次于变形菌门的亚优势类群。

变形菌(*Proteobacteria*)在热泉中还是比较常见的,主要涉及  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  几个纲。变形菌类群及其多样性也因热泉沉积物或水的化学成分、pH 以及温度的不同而有显著差别。美国黄石国家公园 Obsidian Pool 热泉和中国云南腾冲热海眼镜泉均检测出丰富的  $\beta$ 、 $\delta$  和  $\alpha$ 、 $\beta$  纲的变形菌<sup>[14-22]</sup>。本研究中,无论是热井 A 还是热井 B,无论是热井 A 中的沉积物还是水样,均检测出超过总数三分之一强的变形菌门类群的克隆子。值得注意的是,热井 A 和 B 沉积物中均检测出以 *Bacteriovorax* sp. 为优势的  $\delta$ -*Proteobacteria*,而在热泉沉积物中关于 *Bacteriovorax* sp. 类群的细菌的报导还比较少,国内仅有一例报

导<sup>[23]</sup>。

### 3.3 关于羊八井热田及采样点的环境状况与细菌群落多样性

本研究中的西藏羊八井废弃热井,地处羊八井地热电站附近,南北均有不少地热开发时钻探的井,北面山沟曾有硫磺矿开采。采样点 A 与采样点 B 分别为羊八井地热电站的 304 号井和 303 号井,304 号井在 303 号井东面,两采样点相距约 600 m,海拔相近,均 4360 m 左右<sup>[24]</sup>。采样点 304(热井 A)处水温 85℃,pH 约 6.0,由于海拔高气压低而热水沸腾,水池沉积物表面有薄薄一层泥黄色沉淀(似硫华),沉积物主要以土黄色泥沙为主,沸泉池内没有微生物席形成,池出口处及外流的小沟渠里有绿色的微生物席形成,采样点 303(热井 B)处水温 67℃,pH 约 6.0,沉积物泥沙中有少部分黑色的泥状物,热井池里有灰色的絮状物形成。两热泉的水均呈弱酸性。羊八井地热田深、浅层热水都是 HCO<sub>3</sub>-Cl-Na 类型,具有相同的 B/Cl 比值,说明深层热水上升通道中与冷水相混而形成了浅层热水,浅层热储内普遍存在着水岩交换反应,对热水的化学组成有一定影响。羊八井地热开发始于上世纪 80 年代,20 世纪 90 年代末的热水 pH 值仍为碱性(pH 值 8.1 ~ 8.2)<sup>[24]</sup>,如今我们实地测得的 304、303 号井附近的热泉的 pH 值均呈弱酸性(pH 值 5.5 ~ 6.0),说明深层热水流经浅层时被浅层冷水大量的中和及稀释,乃至变成弱酸性。热泉水上升过程中与冷水形成的交换是一个很复杂的过程。本研究中的两处热泉均地处羊八井热田北端中尼公路北侧,整个热田地势北高南低,北面是念青唐古拉山脉的雪山,雪山对热田地下水的补给起到很重要的作用,羊八井地热电站 20 年来的开发,使得热田某些钻探井出口的热水温度下降,pH 值下降<sup>[24]</sup>。冷热地下水的交融及土壤岩石的相互作用以及温度的下降,为热泉细菌类群的多样性提供了复杂的条件。

羊八井热井中细菌域的微生物类群非常丰富,涉及的门类比较宽广。研究中的热井 A 和热井 B 沉积物中的细菌类群比较相似。羊八井地热的开采以及地下冷热水交融等各种因素使得热井细菌生长环境在变化,形成了细菌类群分布与国外报导的其它热泉相比,有所差异的情况。其原因需要进一步探究。

致谢 该项目得到了西藏自治区科技厅重点科研项目的立项和资助,在此表示衷心的感谢。实验中得到了温崇庆、李慧贤以及肖凯的热心帮助,在此一并表示衷心的感谢!

## 参考文献

- [ 1 ] Anna-Louise R , Sherry LC. Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends in Microbiology* , 2001 9( 2 ) :79 – 86.
- [ 2 ] Jayanti M , Richard WB , Dean GE , et al. Effects of Abiotic Factors on the Phylogenetic Diversity of Bacterial Communities in Acidic Thermal Springs. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 73 :2612 – 2623.
- [ 3 ] Zhang Y. Thermophilic microorganisms in the hot springs of Tengchong geothermal area , West Yunnan , China. *Geothermics* , 1986 , 15( 3 ) :347 – 358.
- [ 4 ] Lai XT , Zeng XF , Fang S , et al. Denaturing gradient gel electrophoresis ( DGGE ) analysis of bacterial community composition in deep-sea sediments of the South China Sea. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 2006 22 :1337 – 1345.
- [ 5 ] Baker GC , Smith JJ , Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 2003 55 :541 – 555.
- [ 6 ] Molles MC. Ecologie : concepts and application( 影印版 ). 北京 科学出版社 2000.
- [ 7 ] Good IL. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* , 1953 40 : 237 – 264.
- [ 8 ] Hanada S. Filamentous Anoxygenic Phototrophs in Hot Spring. *Microbes and Environments* . 2003 18( 2 ) :51 – 61.
- [ 9 ] Sompong U , Hawkins PR , Besley C , et al. The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot spring in northern Thailand. *FEMS Microbiology Ecology* , 2005 52 :365 – 376.
- [ 10 ] Blochl E , Rachel R , Burggraf S , et al. *Pyrolobus funarii* , gen. and sp. nov. , represents a novel group of archaea , extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* , 1997 1 :14 – 21.
- [ 11 ] Woese CR , Kandler O , Wheelis ML. Toward 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.
- [ 12 ] Stetter KO. Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiology Review* , 1996 18 :149 – 158.
- [ 13 ] Nakagawa T , Fukui M. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. *Journal of General Applied Microbiology* , 2002 48 :211 – 222.
- [ 14 ] Hugenholtz P , Goebel BM , Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* , 1998 , 180 :4765 – 4774.
- [ 15 ] Sait M , Davis KER , Janssen PH. Effect of pH on Isolation and Distribution of Members of Subdivision 1 of the Phylum *Acidobacteria* Occurring in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 72 :1852 – 1857.
- [ 16 ] Jason R. Coloring in the tree of life. *Trends in Microbiology* , 2008 , 16( 2 ) :41 – 43.
- [ 17 ] Philip H , Christian P , Karen LH , et al. Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology* , 1998 180 :366 – 376.
- [ 18 ] Barns SM , Takala SL , Kuske CR. Wide Distribution and Diversity of Members of the Bacterial Kingdom *Acidobacterium* in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 65 :1731 – 1737.
- [ 19 ] 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.
- [ 20 ] Pattanop K , Supavadee C , Kusol P , et al. Diversity and abundance of *Bacteria* and *Archaea* in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. *Journal of Basic Microbiology* , 2004 , 44 :430 – 444.
- [ 21 ] Lua CY , Jing H , Jonathan CA et al. Highly diverse community structure in a remote central Tibetan geothermal spring does not display monotonic variation to thermal stress. *FEMS Microbiology Ecology* , 2006 57 :80 – 91.
- [ 22 ] 张东华 , 李沁元 , 刘杨 , 等. 腾冲热海眼镜泉粉红色菌藻席的细菌组成分析. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2004 44 :820 – 823.
- [ 23 ] 肖凯 , 曹理想 , 陆勇军 , 等. 广东金山温泉沉积物中原核与真核微生物多样性初步分析. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ) , 2008 48( 6 ) :717 – 724.
- [ 24 ] 赵平 , 金建 , 张海政 , 等. 西藏羊八井地热田热水的化学组成. 地质科学( *Scientia Geologica Sinica* ) , 1998 33 : 61 – 72.

## Bacterial diversity of disused thermal vents in Tibetan Yangbajing Region

Bin Chen<sup>1</sup>, Chao Ma<sup>1</sup>, Shining Zhou<sup>2</sup>, Haitao Bu<sup>1</sup>, Siping Jiang<sup>1\*</sup>, Hui Li<sup>1</sup>, Nizhen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Tibetan Plateau Institute of Biology, Lhasa 850001, China)

(<sup>2</sup> State Key Laboratory for Biocontrol, College of Life Sciences, Sun Yat-sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract [ Objective ]** To study the bacterial diversity in sediment and water from two disused thermal vents in Yangbajing, Tibet, China. **[ Methods ]** We constructed 16S rRNA gene libraries of the total DNA from three samples. Sediment sample A and water sample A were from thermal vent A. Sediment sample B was from thermal vent B. Positive clones from the libraries were analyzed randomly by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Positive clones' sequences of every Operational Taxonomic Units from libraries were determined, and sequence data were submitted to GenBank and contrasted to those known sequences. Phylogenetic trees were built up by using MEGA4.0 program. **[ Results ]** Most of bacteria communities of the two thermal vents were typical thermophilic inhabitants, the predominant *proteobacteria* communities were found in thermal vent A and thermal vent B (ratios in sediment A, water sample A and sediment B were 41.08%, 38.00% and 42.57%). One of the sub-predominant bacteria communities, *Deinococcus-Thermus*, was found in thermal vent A and thermal vent B (ratios in sediment A, water sample A and sediment B were 10.71%, 20.00% and 21.30%). Moreover, one of the sub-predominant bacteria communities, *Acidobacteria* that was rarely found in hot springs or thermal vents, was present both in sediments of thermal vent A and B (16.07%, 19.15%). The third sub-predominant community in sediment of thermal vent A was *Eubacterium* sp. (14.28%), belonging to phylum *Firmicutes* whereas no *Acidobacteria* was found in water sample A. Instead, *Hydrogenobacter*, belonging to phylum *Aquificae*, was another sub-predominant community (16.00%) in water sample A. In addition, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria* and CFB group (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*) were detected in both thermal vents. **[ Conclusion ]** Compared with and contrasted to the references, we found that bacteria communities in Yangbajing thermal field were similar to that in some hot springs and thermal vents around the world but slightly abnormal. Some bacteria communities in thermal vent A and thermal vent B were not very popular, such as *Vibrio* sp., *Bacteriovorax* sp., *Holophaga/Acidobacterium*, *Verrucomicrobium*.

**Keywords:** thermal vent; sediment; 16S rRNA gene library; phylogenetic analysis

(本文责编: 张晓丽)

\* Corresponding author. Tel: +86-891-6837620; E-mail: jiangsiping2003@yahoo.com.cn

Received: 25 June 2008/ Revised: 21 October 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于署名

问:我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表,如果想在作者和单位方面增、减新的内容,并且修改作者及单位署名顺序是否可以?是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答:可以变更,但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。