

新疆泥火山细菌遗传多样性

马小龙^{1,2}, 王 芸¹, 杨红梅¹, 王纯利², 毛培宏³, 金 湘³, 常 玮¹,
房世杰¹, 张评汧⁴, 娄 恺^{1,*}

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆乌鲁木齐 830091; 2. 新疆农业大学资源与环境学院, 新疆乌鲁木齐 830052
3. 新疆大学物理科学与技术学院离子束生物技术中心, 新疆乌鲁木齐 830008; 4. 中国药科大学新药筛选中心, 江苏南京 210038)

摘要: 为了解新疆乌苏泥火山细菌多样性, 从泥火山泥浆样品中直接提取总 DNA, 构建了含 150 个有效转化子的泥火山细菌 16S rDNA 基因文库, 转化子经菌液 PCR 及 *Hae* III 酶切后获得 16 个不同带型, 克隆测序结果表明, 其分属于 16 个不同的分类单元。一部分序列与已知细菌类群的 16S rDNA 序列相似性较高, 归属变形菌门(*Proteobacteria*), 厚壁菌门(*Firmicutes*), 梭杆菌门(*Fusobacteria*), 放线菌门(*Actinobacteria*); 另外一部分序列与已知细菌类群的 16S rDNA 序列同源性较低, 可能代表新的分类单位。研究结果显示, 泥火山环境中微生物种群丰富, 值得进一步研究。

关键词: 泥火山; 微生物多样性; 非培养方法; 系统发育

文章编号: 1000-0933(2009)07-3722-07 中图分类号: Q143 文献标识码: A

The bacterial diversity from mud volcano in Xinjiang by culture-independent approach

MA Xiao-Long^{1,2}, WANG Yun¹, YANG Hong-Mei¹, WNAG Chun-Li², MAO Pei-Hong³, JING Xiang³, CHANG Wei¹, FANG Shi-Jie¹, ZHANG Ping-Hu⁴, LOU Kai^{1,*}

1 Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi Xinjiang 830091, China

2 College of Resource and Environment, Xinjiang Agriculture University, Urumqi Xinjiang, 830052, China

3 Institute of Ion Beam Biotechnology, College of Physics Science and Technology, Xinjiang University 830008, China 4 New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(7): 3722 ~ 3728.

Abstract: In this study, the mixed environmental genomic DNA was isolated directly from the mud volcano soil in Usu county of Xinjiang. The 16S rRNA genes were amplified with bacterial universal primers and cloned into the pGEM-T Easy Vector to construct a 16S rRNA clone library. The total 150 clones were selected by amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) using restriction enzymes *Hae* III. Of these, 16 restriction fragment length polymorphism (RFLP) types were used for sequencing. A part of these sequences were closely related to the phylum: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* and *Actinobacteria* (>97% sequence similarity), while another portion showed less affiliation with known taxa (<97% sequence similarity) and might represent novel taxa. The results indicated that the mud volcano in Usu county of Xinjiang is rich in microbial species, which is worth further studying.

Key Words: Mud volcano; Microbial diversity; Culture-independent method; Phylogeny

泥火山又称假火山或凉火山, 是夹带着水、泥、砂和岩屑的地下天然气, 在压力作用下不断喷出地表所

基金项目: 973 计划前期研究专项资助项目(2008CB417214); 国家科技基础条件平台资助项目(2005DKA21201-12); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题资助项目(XJYS0203-2005-01); 新疆农科院青年科技创新基金资助项目(2007Q07)

收稿日期: 2008-04-11; 修订日期: 2008-10-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

堆成的泥丘,其外型多为锥状小丘或者是盆穴状,它们是在特定的地质条件下形成的罕见自然地质景观。

近 30a 来,国外学者在海底泥火山的性质、结构模式和动力学等方面进行了广泛研究,对其地质、地球物理、生物地球化学以及微生物与甲烷的关系也有报道^[1~5]。有关陆地泥火山微生物群落的组成和功能方面的研究相对较少,主要集中在利用可培养及非培养法、脂质生物标记、16S rDNA 和系统进化分析及放射性示踪等技术揭示微生物多样性^[6~10]。

国内泥火山主要分布在青藏^[11]、台湾^[12]、新疆^[13]等地,研究领域为陆地泥火山地质年代^[14]、分布、构造及与地震活动的关系^[15]等方面,有关微生物的研究未有报道。新疆乌苏泥火山群是目前中国发现的最大泥火山群,作为罕见的地质遗迹,它是干旱区生态环境的重要组成部分,是影响微生物多样性的基本要素。本文利用非培养技术首次对新疆乌苏泥火山中的细菌多样性进行了分析研究,结果显示泥火山环境中非培养微生物种群丰富,对其中可培养微生物及其功能应进行深入研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg;PCR 引物、TaqDNA 聚合酶和 pGEM_TEasy Vector 载体购自 TaKaRa 公司;凝胶成像系统 GK-330C 购自美国联合生物科技有限公司。

1.2 样品采集及化学成分的测定

采样地点位于新疆乌苏市四棵树河中游地区(44°11'00"N,84°23'20"E),海拔高度 1276m。采集距泥火山口深度为 5、10、15cm 处的泥水混合样品,装入无菌 50ml 聚丙烯锥形离心管,车载冰箱 4℃ 保存运回实验室。

按照森林土壤水溶性盐分分析标准(GB7871-87)测定泥火山中化学成分:CO₃²⁻ 和 HCO₃⁻ 离子采用双指示剂中和滴定法测定,Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 离子采用 EDTA 络合滴定法测定,Na⁺ 和 K⁺ 离子采用火焰光度计法测定,Cl⁻ 和 SO₄²⁻ 离子采用离子色谱法测定,土壤全盐含量采用计算法获得。

1.3 总 DNA 的提取

参考国内外相关报道^[16,17],根据新疆泥火山样品本身特性,采用了如下方法:取 1g 样品于 1.5ml EP 管中,加 500μl TE,并加入灭菌的少量细玻璃珠,剧烈震荡使样品均匀;加入 10μl 溶菌酶(25mg/ml),37℃ 水浴 1h,期间每 10min 混匀 1 次;再加入 50μl(20%) SDS,20μl(5%) CTAB,5μl(20 mg/ml) 蛋白酶 K,55℃ 水浴 1h,期间每 20min 混匀 1 次;12000r/min 离心 10min,收集上清;加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿各抽提一次;加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠溶液(pH5.2),2 倍体积的无水乙醇,冰上放置 1h 以上;12000 r/min 离心 10min 后收集沉淀,最后以 75% 乙醇洗涤 2~3 次,干燥,溶解于适量的 TE 缓冲液。

1.4 PCR 扩增 16S rDNA

用细菌 16S rDNA 通用引物(正向引物:8-27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物:1429-1445R, 5'-TTAAGGATGCTGATGCCGCA-3')^[18]进行扩增。反应条件为:95℃ 5 min;95℃ 45 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 5 min。

1.5 16S rDNA 基因文库的构建

16S rDNA 扩增后将 1.5kb 的条带用 PCR 产物纯化试剂盒回收和纯化,与 pGEM_TEasy Vector 载体连接,转化 *E. coli* DH 5α 感受态细胞。以氨苄青霉素(100μg/ml)抗性和蓝白斑筛选阳性转化子。

1.6 菌液 PCR

选择阳性转化子进行扩增,通用引物的选择同 1.4。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 45 s,53℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 5 min,通过电泳进一步验证外源插入片段应大约为 1.7kb 左右。

1.7 酶切分析

取 5μl 的 16S rDNA 的菌液 PCR 产物,分别加入 1μl *Hae* III、2μl 相应的 10× Buffer 和 12μl 去离子水,使反应体系为 20μl。37℃ 恒温 2~3 h。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 PCR-RFLP 图谱分析

酶切完成后,用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳对图谱进行鉴定,对于带型相同的,认为其来源于同一细菌 16S

rDNA PCR-RFLP 基因型。对同一基因型的克隆数进行统计,并计算其基因型频率。基因型频率的计算公式为:基因型频率 = 基因型克隆数/总克隆数 × 100%^[19]。

1.9 测序与系统发育分析与核酸序列收录号

菌液 PCR 测序部分由上海生工生物工程(Biotechnology Limited Company of Shanghai)协助完成;系统发育树的构建:用 Blast 搜索程序从 GenBank 中调出相似性较高的相关菌株的 16SrRNA 基因序列,用 CLUSTALX 进行多重序列比对^[20],用 MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包采用邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析和系统进化树构建^[21]。本研究得到的序列已提交 GenBank,这些序列在 GenBank 中的收录号为 EU531777-EU531788,EU647514-EU647519。

2 结果

2.1 泥火山样品的物化分析

泥火山土壤样品的化学组分测定结果表明,阳离子 Na⁺,Ca²⁺ 及阴离子 HCO₃⁻ 和 Cl⁻ 浓度较高(表 1)。

表 1 新疆乌苏泥火山主要离子组成

Table 1 Composition of main ion of mud volcano in Usu county, Xinjiang

样品浓度 Sample concentration/(g/L)							
主要阳离子 Main cations				主要阴离子 Main anions			
Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
0.0242	ND	0.0008	1.493	0.7755	3.1573	2.9721	1.3465

ND: 未检测到 Not determined

2.2 泥火山样品总 DNA 的提取和 16S rDNA 扩增

为了尽可能反映泥火山微生物多样性,分别采集了距泥火山口深度为 5、10、15cm 处的泥浆样品,标记为 1,2,3 号样,每个深度的样品总 DNA 提取与扩增如图 1 (A 和 B)。

2.3 阳性转化子的筛选与酶切分析

从所构建的 16S rDNA 基因文库中共选择了 150 个阳性克隆,经菌液 PCR 后,再用六碱基限制性内切酶 *Hae* III 对大约 1.7kb 的插入片段(包括载体片段)进行酶切,电泳结果表明主要有 16 个不同的条带(图 2),其中 1~5 为 1 号样中获得的阳性克隆,6~10 为 2 号样中获得的阳性克隆,11~16 为 3 号样中获得的阳性克隆。

2.4 酶切后基因型频率分析

对于 150 个含有细菌 16S rDNA 片段的阳性克隆,经 PCR-RFLP 分析表明共有 16 种基因型。其中,EU531787 具有最高的基因型频率(11.54%),其次为 EU647514, EU647517, EU531778,基因型频率在 9.23%~10.77% 之间,其余 12 个基因型频率不超过 9%(图 3)。

2.5 系统发育分析

选择 16S rDNA 不同酶切带型所对应的阳性克隆进行测序,序列比对表明它们主要分属于变形菌门(Proteobacteria),厚壁菌门(Firmicutes),梭杆菌门(Fusobacteria),放线菌门(Actinobacteria)(表 2),由所获得的 16S rDNA 序列构建细菌系统发育树(图 4)。

泥火山细菌 16S rRNA 基因文库中的 4 个克隆与已鉴定的可培养细菌 16SrDNA 序列同源性达到 99% 以

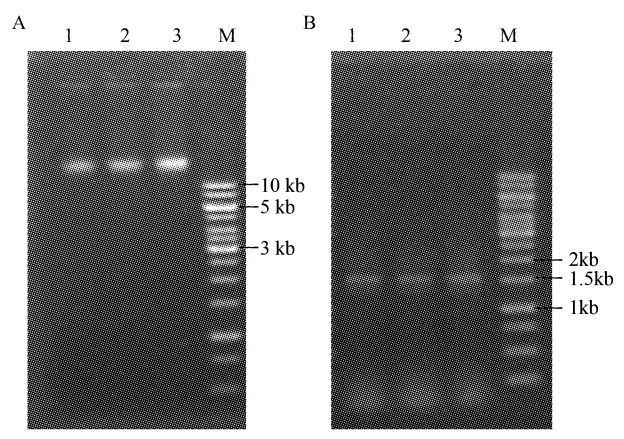
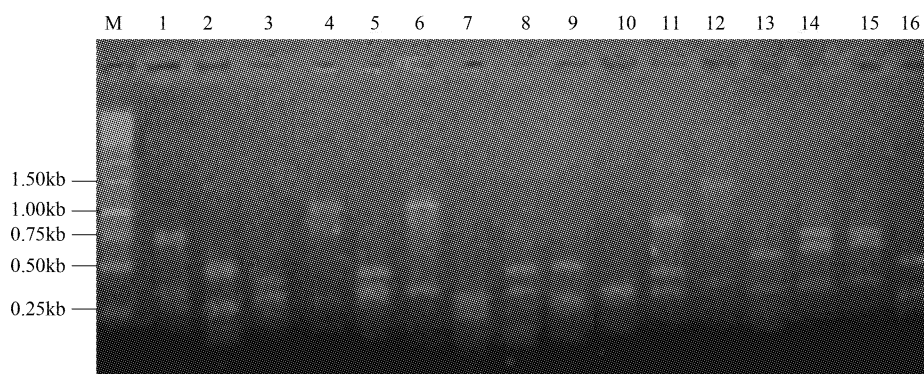


图 1 新疆泥火山样品总 DNA(A) 和 16S rDNA 的扩增结果(B)
Fig.1 Total DNA (A) of Xinjiang mud volcanos samples and the results of 16S rDNA (B) amplification
A: 1,2,3 总 DNA; M, 分子量标记; B: 1,2,3 16S rDNA 的扩增产物; M, 分子量标记 A: 1,2,3 Total DNA; M 10kb ladder; B: 1, 2,3 PCR products of 16S rDNA; M,10kb ladder

图2 新疆泥火山样品部分阳性克隆的 *Hae* III 酶切图谱Fig.2 Partial positive clones of Xinjiang mud volcanos samples digested with *Hae* III

M, 分子量标记; M, Marker. 1, EU647516; 2, EU531788; 3, EU647517; 4, EU531779; 5, EU531785; 6, EU531781; 7, EU531778; 8, EU531783; 9, EU531787; 10, EU647519; 11, EU531786; 12, EU531780; 13, EU647514; 14, EU531782; 15, EU647515; 16, EU647518

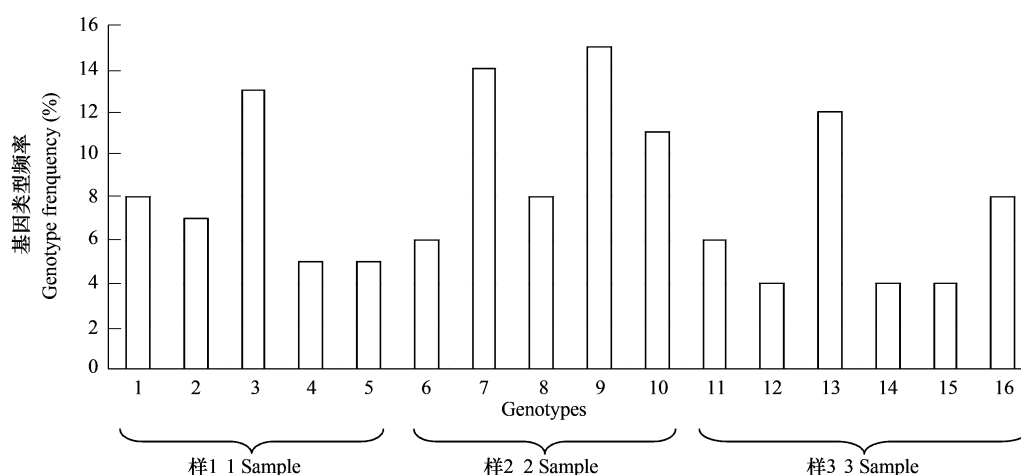


图3 新疆泥火山样品细菌克隆 16S rDNA 基因型频率

Fig.3 The 16S rDNA genotypes frequencies of bacterial clone from the Xinjiang mud volcanos samples

1; EU647516; 2; EU531788; 3; EU647517; 4; EU531779; 5; EU531785; 6; EU531781; 7; EU531778; 8; EU531783; 9; EU531787; 10; EU647519; 11; EU531786; 12; EU531780; 13; EU647514; 14; EU531782; 15; EU647515; 16; EU647518

上,3个与已报道的非培养或未鉴定菌株的同源性达到98%以上,7个和已报道的细菌16S rDNA序列相似小于97%。EU531779、EU531780、EU531786、EU531788与相似菌株的16S rDNA序列同源性均在90%~97%之间;EU531782、EU531785及EU647515与相似菌株的16S rDNA序列的相似性小于90%,说明泥火山环境存有潜在的新的分类单位。

变形菌门(Proteobacteria)

(1) α -变形菌纲(Alpha-proteobacteria) EU647515, EU647514与反硝化生物反应器中分离到的*Paracoccus ferrooxidans*(AY954687)16SrDNA序列相似性为88.47%,99.25%,EU647517与生物膜中分离到的非培养Uncultured Alpha-proteobacteria(AJ619068)16SrDNA序列相似性为100%。

(2) β -变形菌纲(Beta-proteobacteria) EU531785与污染沉积物中分离到的Uncultured bacterium(DQ404864)^[22]16SrDNA序列相似性分别为87.16%,EU531781与黄色奈瑟菌*Neisseria elongata*(AJ239303)16SrDNA序列相似性为100%。

(3) γ -变形菌纲(Gamma-proteobacteria) EU531782与非培养Uncultured *Haemophilus* sp. (AM419957)

16SrDNA 序列相似性为 86.35%。

(4) δ -变形菌纲(Delta-proteobacteria) EU531779, EU531783, EU531787 与碱湖中分离到的非培养 Delta-proteobacteria(DQ206407) 16SrDNA 序列相似性分别为 96.65%, 97.27%^[23], 100%。

表 2 新疆泥火山样品部分 16S rDNA 序列分析结果

Table 2 Phylogenetic affiliations of 16S rDNA clone sequences from the Xinjiang mud volcanos samples

菌株 Strain (基因登录号 accession number)	总计克隆数 Number of total clones	最相似菌株 Closet identified relative (基因登录号 accession number)	相似性 Similarity(%)
EU531778	14	<i>Streptococcus mitis</i> (AJ295848)	100
EU531779	5	Uncultured delta proteobacterium(DQ206407)	96.65
EU531780	4	<i>Streptococcus mitis</i> (AJ295848)	91.71
EU531781	6	<i>Neisseria elongata</i> (AJ239303)	100
EU531782	4	Uncultured <i>Haemophilus</i> sp.(AM419957)	86.35
EU531783	8	Uncultured Delta-proteobacteria(DQ206407)	97.27
EU531785	5	Uncultured bacterium(DQ404864)	87.16
EU531786	6	<i>Streptococcus mitis</i> (AJ295848)	96.87
EU531787	15	Uncultured Delta-proteobacteria(DQ206407)	100
EU531788	7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (AJ717377)	93.73
EU647514	12	<i>Paracoccus ferrooxidans</i> (AY954687)	99.25
EU647515	4	<i>Paracoccus ferrooxidans</i> (AY954687)	88.47
EU647516	8	<i>Fusobacterium periodonticum</i> (AJ810271)	100
EU647517	13	Uncultured Alpha-proteobacteria(AJ619068)	100
EU647518	8	Uncultured forest soil bacterium(AY913406)	98.27
EU647519	11	<i>Propionibacterium</i> sp.(AM410900)	100

厚壁菌门(Firmicutes)

芽孢杆菌纲(Bacilli) EU531788 与碱性地下水中分离到的 *Staphylococcus epidermidis*(AJ717377)^[24] 16SrDNA 序列相似性分别为 93.73%。梭菌纲(Clostridia) EU531778, EU531786, EU531780 与兼性厌氧轻型链球菌 *Streptococcus mitis*(AJ295848) 16SrDNA 序列相似性分别为 100%, 96.87%, 91.71%。

梭杆菌门(Fusobacteria)

梭杆菌纲(Fusobacteria) EU647516 与专性厌氧牙周梭杆菌 *Fusobacterium periodonticum*(AJ810271) 16SrDNA 序列相似性为 100%。

放线菌门(Actinobacteria)

放线菌纲(Actinobacteria) EU647519 与深海中分离的厌氧菌 *Propionibacterium* sp.(AM410900) 16SrDNA 序列相似性为 100%。

非培养细菌(Uncultured bacterium)

EU647518 与森林土壤中分离到的非培养细菌(AY913406) 16SrDNA 序列相似性为 98.27%。

对于已测序的 16 株菌结果,其中变形菌门为 9 株,厚壁菌门为 4 株,梭杆菌门、放线菌门非培养细菌各为 1 株。

3 讨论

通过对样品的离子浓度的测定发现,新疆泥火山离子测定值中的高浓度离子与意大利 San Biagio-Belpasso 泥火山离子测定值中的高浓度离子的类型相同^[10],可能与土壤的构成组分有关。

从 3 个样品的基因型频率分析可知,2 号样的基因型频率最高,其次为 1 号样,3 号样最低,这表明新疆泥火山微生物在垂直高度的分布具有生态学差异。

在所构建的含 150 个有效转化子的泥火山细菌 16S rRNA 基因文库中,从一号样中获得的克隆 EU531783

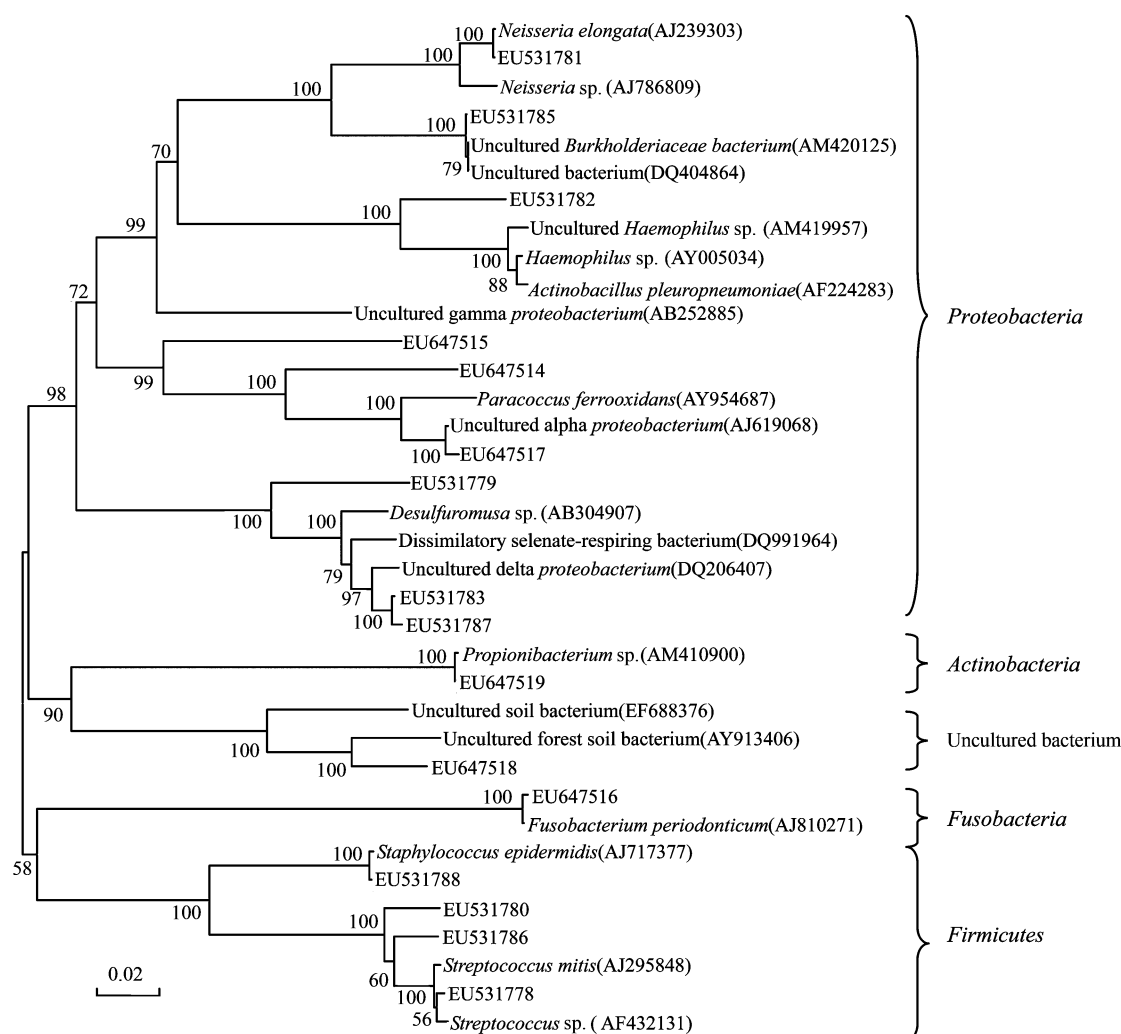


图4 Neighbor-joining 法构建新疆泥火山样品细菌克隆 16S rDNA 部分序列系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial 16S rDNA clones sequence from the Xinjiang mud volcanos samples

及 EU531788 与从碱性环境中分离到菌株的 16SrDNA 序列相似性分别为 97.27% ,93.73% ,可推断出泥火山表层属碱性环境,与实测数据吻合;EU531780,EU531786 为 3 号样中得到的转化子,它与从厌氧环境中分离到的菌株相似性很高,表明在距泥火山口 15cm 深处可能存在着大量的厌氧微生物。

国外 4 个泥火山(陆地及海底各两个)的非培养细菌主要属于变形菌门,其次是放线菌门、厚壁菌门等^[7-10],新疆泥火山中变形菌门为优势类群,结果与其相似,推测变形菌门可能是泥火山环境中非培养细菌的优势种群。此外本实验所得克隆 EU647516 序列为丙酸杆菌属,意大利 San Biagio-Belpasso 泥火山中也有此属存在^[10],其原因与这两座泥火山中高浓度离子的类型相同有关。国外泥火山非培养细菌中的脱硫杆菌属出现频率高,本研究未获得此属,这与泥火山样品基因文库克隆的序列分析及比对的总量较少有关;另一方面,新疆泥火山非培养细菌中有梭杆菌门,而国外未有报道,可能是新疆泥火山所处的干旱生境,导致微生物组成类群存在差异。

本研究结果表明,新疆泥火山可能存在大量的未知微生物,从资源利用角度出发,应提出新思路,设计新的培养基及分离程序,进一步研究可培养微生物及其功能。

References:

- [1] Milkov A V, Vogt P R, Crane K, et al. Geological, geochemical and microbial processes at the hydrate-bearing Haakon Mosby mud volcano. Chem

- Geol, 2004, 205:347—366.
- [2] Dimitrov L I. Mud volcanoes-the most important pathway for degassing deeply buried sediments. *Earth Sci Rev*, 2002, 59:49—76.
- [3] Sassen R, Milkov A V, Roberts H H, *et al.* Geochemical evidence of rapid hydrocarbon venting from a seafloor-piercing mud diapir, Gulf of Mexico continental shelf. *Mar Geol*, 2003, 198: 319—329.
- [4] Hovland M, Hill A, Stokes D. The structure and geomorphology of the Dashgil mud volcano. *Azerbaijan. Geomorphology*, 1997, 21:1—15.
- [5] Boetius A, Ravenschlag K, Schubert C J, *et al.* A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 2004, 407:623—626.
- [6] Heijs S K, Sinninghe Damste J S, Forney L J. Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54:47—56.
- [7] Martinez R J, Mills H J, *et al.* Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol*, 2006, 8:1783—1796.
- [8] Losekann T, Knittel K, Nadalig T, *et al.* Diversity and Abundance of Aerobic and Anaerobic Methane Oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 3348—3362.
- [9] Alain K, Holler T, Musat F, *et al.* Microbiological investigation of methane and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(4):574—590.
- [10] Yakimov M M, Giuliano L, Crisafi E, *et al.* Microbial community of saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environ Microbiol*, 2002, 4:249—256.
- [11] Hu D S, Zhang J H. Initial discussion of mud volcano in the Tibetan plateau Kekexili area Mazhangcuoqin lakefront Goujiu mainai ditch. *Arid land Geography*, 1998, 9(3):13—17.
- [12] Tsanyao F Y, Yang G H, Fu C C. Composition and exhalation flux of gases from mud volcanoes in Taiwan. *Environmental Geology*, 2004, 46:1003—1011.
- [13] Wang D, Li M W, L M, *et al.* Preliminary study of mud volcano eruptive in Xinjiang Dushanzi. *Seismic Geology*, 1997, 3(1):14—19.
- [14] Zhan J Z, Gan Z P. The pollen spores in the effluxion of Xinjiang Dushanzi mud volcano. *Xinjiang Petroleum Geology*, 1998, 19(1):57—59.
- [15] Wang D. Mud volcano and earthquake of north tianshan area in Xinjing. *Inland Earthquake*, 2000, 14(4):350—353.
- [16] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57:1070—1074.
- [17] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 4715—4724.
- [18] Johnson J L. Similarity analysis of rRNAs. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology, 1994:683—700.
- [19] Lei J L. Molecular ecology study of microorganisms of vegetables and soils ecosystem. *Zhejiang University Doctor Thesis*, 2006. 24.
- [20] Thompson J D, Gibson T J, Lewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4):876—488.
- [21] Kimura M A. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16:111—120.
- [22] Abulencia C B, Wyborski D L, Garcia J A, *et al.* Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(5):3291—3301.
- [23] Hollibaugh J T, Budinoff C, Hollibaugh R A, *et al.* Sulfide oxidation coupled to arsenate reduction by a diverse microbial community in a soda lake. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3):2043—2049.
- [24] Tiago I, Chung A P, Verissimo A. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12):7378—7387.

参考文献:

- [11] 胡东生, 张华京. 青藏高原可可西里地区玛章错钦湖畔苟纠麦尕沟的泥火山锥议. *干旱区地理*, 1998, 9(3):13~17.
- [13] 王道, 李茂玮, 李猛, 等. 新疆独山子泥火山喷发的初步研究. *地震地质*, 1997, 3(1):14~19.
- [14] 詹家祯, 甘振波. 新疆独山子泥火山溢出物中的孢子花粉. *新疆石油地质*, 1998, 19(1):57~59.
- [15] 王道. 新疆北天山地区泥火山与地震. *内陆地震*, 2000, 14(4):350~353.
- [19] 雷娟利. 蔬菜土壤生态系统微生物分子生态学研究. *浙江大学博士学位论文*, 2006:24.