

中国百种杰出学术期刊  
中国精品科技期刊  
中国科协优秀期刊  
中国科学院优秀科技期刊  
新中国 60 年有影响力的期刊  
国家期刊奖

ISSN 1000-0933  
CN 11-2031/Q

# 生态学报

## Acta Ecologica Sinica

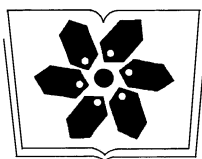
(Shengtai Xuebao)

第 30 卷 第 21 期  
Vol.30 No.21  
**2010**



中国生态学学会  
中国科学院生态环境研究中心  
科学出版社

主办  
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

# 生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 30 卷 第 21 期

2010 年 11 月 (半月刊)

## 目 次

|                                                  |                      |
|--------------------------------------------------|----------------------|
| 棉铃虫幼虫对人类呈味物质的取食反应·····                           | 李为争,付国需,王英慧,等 (5709) |
| 西藏拉萨机场周边风沙源空间分布及演变趋势·····                        | 李海东,沈渭寿,邹长新,等 (5716) |
| 新疆沙湾冷泉沉积物的细菌系统发育多样性·····                         | 曾 军,杨红梅,徐建华,等 (5728) |
| 应用鱼类完整性评价体系评价辽河流域健康·····                         | 裴雪姣,牛翠娟,高 欣,等 (5736) |
| 不同海拔天山云杉叶功能性状及其与土壤因子的关系·····                     | 张慧文,马剑英,孙 伟,等 (5747) |
| 滨河湿地不同植被对农业非点源氮污染的控制效果·····                      | 徐华山,赵同谦,贺玉晓,等 (5759) |
| 内蒙古温带荒漠草原能量平衡特征及其驱动因子·····                       | 阳伏林,周广胜 (5769)       |
| 南北样带温带区栎属树种功能性状对气象因子的响应·····                     | 冯秋红,史作民,董莉莉,等 (5781) |
| 伏牛山自然保护区物种多样性分布格局·····                           | 卢训令,胡 楠,丁圣彦,等 (5790) |
| 减弱 UV-B 辐射对烟草形态、光合及生理生化特性的影响 ·····               | 陈宗瑜,钟 楚,王 毅,等 (5799) |
| 川西亚高山针阔混交林乔木层生物量、生产力随海拔梯度的变化 ·····               | 刘彦春,张远东,刘世荣,等 (5810) |
| 三峡库区消落带水淹初期地上植被与土壤种子库的关系·····                    | 王晓荣,程瑞梅,肖文发,等 (5821) |
| 洞庭湖西岸区防护林土壤和植物营养元素含量特征·····                      | 柏方敏,田大伦,方 晰,等 (5832) |
| 择伐对阔叶红松林主要树种径向与纵向生长的影响·····                      | 蒋子涵,金光泽 (5843)       |
| 野鸭湖典型湿地植物光谱特征·····                               | 刘 克,赵文吉,郭逍宇,等 (5853) |
| 三种线性模型在杉木与马尾松地位指数相关关系研究中的比较·····                 | 朱光玉,吕 勇,林 辉,等 (5862) |
| 不同干扰类型下羊草种群的空间格局·····                            | 陈宝瑞,杨桂霞,张宏斌,等 (5868) |
| 基于 SWAT 模型的祁连山区最佳水源涵养植被模式研究——以石羊河上游杂木河流域为例 ····· | 王军德,李元红,李赞堂,等 (5875) |
| 2D 与 3D 景观指数测定山区植被景观格局变化对比分析 ·····               | 张志明,罗亲普,王文礼,等 (5886) |
| 基于投影寻踪的珠江三角洲景观生态安全评价 ·····                       | 高 杨,黄华梅,吴志峰 (5894)   |
| 海峡两岸 16 个沿海城市生态系统功能比较 ·····                      | 张小飞,王如松,李 锋,等 (5904) |
| 同安湾围(填)海生态系统服务损害的货币化预测评估 ·····                   | 王 萱,陈伟琪,张珞平,等 (5914) |
| 太阳辐射对玉米农田土壤呼吸作用的影响 ·····                         | 孙敬松,周广胜,韩广轩 (5925)   |
| 水分胁迫下 AM 真菌对沙打旺生长和抗旱性的影响·····                    | 郭辉娟,贺学礼 (5933)       |
| 宁夏南部旱区坡地不同粮草带比间作种植模式比较·····                      | 路海东,贾志宽,杨宝平,等 (5941) |
| 节节草生长对铜尾矿砂重金属形态转化和土壤酶活性的影响·····                  | 李 影,陈明林 (5949)       |
| 自然植物群落形成过程中铜尾矿废弃地氮素组分的变化 ·····                   | 安宗胜,詹 婧,孙庆业 (5958)   |
| 硅介导的水稻对二化螟幼虫钻蛀行为的影响 ·····                        | 韩永强,刘 川,侯茂林 (5967)   |
| 饥饿对转基因鲤与野生鲤生长竞争和性腺发育的影响·····                     | 刘春雷,常玉梅,梁利群,等 (5975) |
| <b>专论与综述</b>                                     |                      |
| 河流水质的景观组分阈值研究进展 ·····                            | 刘珍环,李 猷,彭 建 (5983)   |
| <b>研究简报</b>                                      |                      |
| 长期模拟增温对岷江冷杉幼苗生长与生物量分配的影响 ·····                   | 杨 兵,王进闯,张远彬 (5994)   |
| 环境因素对长额斗蟋翅型分化的影响 ·····                           | 曾 杨,朱道弘,赵吕权 (6001)   |

期刊基本参数:CN 11-2031/Q \* 1981 \* m \* 16 \* 300 \* zh \* P \* ¥70.00 \* 1510 \* 32 \* 2010-11

## 新疆沙湾冷泉沉积物的细菌系统发育多样性

曾 军<sup>1,2</sup>, 杨红梅<sup>1</sup>, 徐建华<sup>1,2</sup>, 吴江超<sup>1,3</sup>, 张 涛<sup>1</sup>, 孙 建<sup>1</sup>, 娄 恺<sup>1,\*</sup>

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆乌鲁木齐 830091; 2. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046;

3. 新疆农业大学食品科学与工程学院, 新疆乌鲁木齐 830001)

**摘要:** 为了解新疆沙湾冷泉沉积物的细菌群落组成与类群多样性, 利用免培养方法直接从沙湾冷泉沉积物中提取环境总 DNA, 构建细菌 16S rRNA 基因文库。对随机挑选的 241 个细菌阳性克隆子进行 *Hae* III 酶切分型得到 86 个可操作分类单元 (OTUs), 系统发育分析将其归为 11 个门: 放线菌门 (Actinobacteria), 酸杆菌门 (Acidobacteria), 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 绿菌门 (Chlorobi), 蓝细菌门 (Cyanobacteria), 厚壁菌门 (Firmicutes), 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes), 硝化螺旋菌门 (Nitrospirae), 变形菌门 (Proteobacteria), 浮霉菌门 (Planctomycetes), 疣微菌门 (Verrucomicrobia)。其中酸杆菌门和变形菌门为优势类群, 分别占细菌克隆文库的 48% 和 25%。超过 1/3 的 OTUs 序列与 GenBank 中已存序列具有较低相似性 (相似性小于 95%)。此外 20% 左右的克隆子与固氮细菌和硝酸盐氧化细菌相关。研究结果表明, 新疆沙湾冷泉沉积物中细菌种类丰富, 代谢类型多样而且存在大量未知类群。

**关键词:** 冷泉; 地下水生态系统; 细菌多样性; 免培养法

## Bacterial phylogenetic diversity of a cold spring sediment of Shawan, Xinjiang

ZENG Jun<sup>1,2</sup>, YANG Hongmei<sup>1</sup>, XU Jianhua<sup>1,2</sup>, WU Jiangchao<sup>1,3</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>, SUN Jian<sup>1</sup>, LOU Kai<sup>1,\*</sup>

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

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

3 College of Food Science of Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830001, China

**Abstract:** The bacterial composition and diversity in Xinjiang Shawan cold spring sediment were investigated by direct extracting environmental total DNA and constructing clone libraries of the 16S rRNA gene amplified with bacteria-specific primers. 241 bacterial clones were screened, which could be grouped into 86 Operational Taxonomic Units (OTUs), based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. These were divided into 11 phyla (Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Chlorobi, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Proteobacteria, Planctomycetes and Verrucomicrobia) by phylogenetic analysis. Of these, Acidobacteria and Proteobacteria were the most dominant, representing 48% and 25% of the total bacteria clone library, respectively. More than 1/3 of the total OTUs showed less than 95% of sequence identity with sequences deposited in GenBank database. In addition, nearly 20% of clones were related to nitrogen-fixing and nitrite-oxidizing bacteria. These results suggested that bacteria in the spring sediment were highly diverse in species richness and maybe existence of large number of unknown groups.

**Key Words:** cold spring; groundwater ecosystems; bacterial diversity; culture-independent method

地下水是生态系统中一个敏感的子系统, 是极其重要的环境因子, 地下水的变化往往会影响生态系统的天然平衡状态<sup>[1]</sup>。尽管地下水生态系统具有无光合作用、贫营养及相对恒定的低温等特点, 属于极端环境<sup>[2]</sup>, 但它为各类微生物提供了数量众多的异质生境, 地球上 6%—40% 的原核微生物栖息于其中<sup>[3]</sup>, 它们在

**基金项目:** 国家 973 计划前期研究专项 (2008CB417214); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题 (XJYS0203-2009-02)

**收稿日期:** 2009-10-18; **修订日期:** 2009-12-11

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

地下水系统的能量转换、物质循环、营养输送、元素形态的转化、聚集和迁移中起着极其重要的媒介作用<sup>[4]</sup>。虽然对地下水原核微生物的多样性、生态功能和含水层原位修复、微生物对地下水化学组分的影响等方面进行了研究<sup>[4-7]</sup>,但目前对多数地下水生态系统中的关键生物地球化学过程、微生物物种与功能多样性的了解仍显不足<sup>[3]</sup>。

泉是地下水的天然露头,冷泉是具有地下水特征、水温小于 20℃<sup>[8]</sup>的特殊地表水。国外学者对硫化物冷泉泉水、沉积物和菌藻席的微生物组成、多样性以及功能进行了研究,结果表明硫化物作为主要能源物质对维持冷泉原核微生物群落稳定起着重要作用<sup>[9-11]</sup>;对于不含硫化物的喀斯特冷泉,其细菌群落组成不受水文和季节性变化影响并存有喀斯特专有类群<sup>[12]</sup>。国内对冷泉微生物相关的研究未见报道。新疆沙湾冷泉温度全年保持在 5.5—7.5℃、泉水微咸<sup>[1]</sup>、不含硫化氢,是研究地下水微生物的天然材料。本研究以沙湾冷泉沉积物为研究对象,采用免培养法对其中的细菌群落结构及多样性进行了分析,为冷泉生态系统的深入研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集及理化性质分析

沙湾冷泉位于东经 85°22'35",北纬 43°50'30",海拔 1500m,泉水清澈透明,水质呈弱酸性 (pH 5.0),主要阳离子为  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$ ,阴离子为  $\text{SO}_4^{2-}$  和  $\text{HCO}_3^-$ 。2008 年 9 月 19 日在沙湾冷泉采集冷泉水和沉积物(表层 10cm)。样品装入无菌 50mL 离心管中,4h 之内于 4℃ 保存运回实验室。一部分样品直接用于环境总 DNA 的提取,其余部分于 -70℃ 冰箱长期保存。按照灌溉水盐分分析标准 (GB5084—85) 对沙湾冷泉水体中化学成分: $\text{CO}_3^{2-}$  和  $\text{HCO}_3^-$  采用硫酸滴定法测定; $\text{SO}_4^{2-}$  采用二氧化钡滴定法测定; $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  采用 EDTA 络合滴定法测定; $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  采用火焰光度计测定,总氮采用凯氏定氮法测定。

### 1.2 主要试剂和仪器

博大泰克凝胶纯化试剂盒;pMD18-T vector (TaKaRa,大连);*Hae* III 限制性内切酶 (TaKaRa,大连);PCR 纯化试剂盒 (生工,上海);PCR 扩增仪 (Eppendorf);电击杯 (Bio-Rad);电转化仪 (Bio-Rad);凝胶成像仪 (Bio-Rad);电泳仪 (Bio-Rad) 等。

### 1.3 环境总 DNA 提取及纯化

环境总 DNA 提取参照文献<sup>[13]</sup>报道的方法并根据沙湾冷泉样品特性稍作改动。具体如下:取 10g 沉积物液氮研磨后加入 13.5mL 提取缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, 100mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 8.0)) 和 10μL 蛋白酶 K (100mg/L) 37℃ 震荡 30min;之后加入 1.5mL 20% SDS 混匀,65℃ 水浴 2h,期间每 20min 混匀 1 次;液氮冷冻抽提 3 次后于 5000r/min 离心 10min,收集上清,加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 10000r/min 离心 10min 收集上清,重复此操作 2 次;上清液加入 0.6 倍体积的异丙醇 4℃ 过夜沉淀,12000r/min 离心收集沉淀,75% 乙醇洗涤 2—3 次,干燥,最后溶解于适量 TE 缓冲液。采用 0.8% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收总 DNA,以去除沉积物中腐殖酸、色素等杂质对后续 PCR 的影响<sup>[14-15]</sup>。

### 1.4 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因及克隆文库构建

用细菌 16S rRNA 基因通用引物<sup>[16-17]</sup>27F 和 1492R 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件及扩增体系参照文献<sup>[16]</sup>的方法。PCR 产物经纯化后与 pMD18-T 载体连接,连接产物电转化入 *E. coli* DH 5α 中。以氨苄青霉素 (100μg/mL) 抗性和蓝白斑法筛选阳性转化子。

### 1.5 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分型

挑取阳性克隆子用 T 载体通用引物 M13-47 和 M13-48 对插入片段进行菌液 PCR 扩增,扩增体系及条件参照文献<sup>[18]</sup>的方法。用限制性内切酶 *Hae* III 37℃ 过夜酶切 PCR 产物,酶切 PCR 产物进行 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。典型的 RFLP 条带类型对应的克隆子 PCR 产物送上海生工测序。

### 1.6 稀有度及覆盖率分析

利用 EstimateS 8.0 软件 (<http://viceroi.eeb.uconn.edu/estimateS>) 进行稀有度分析。运用公式  $C = 1 -$

$n/N$  计算文库覆盖率  $C$ ,  $N$  代表克隆文库库容量,  $n$  代表在克隆文库中仅出现 1 次的 OTU (operational taxonomic unit) 的数量。

1.7 系统发育分析及核酸序列收录号

运用 CHECK\_CHIMERA (<http://wdecn.nig.ac.jp/RDP/cgis/chimera>) 对测序所得的细菌 16S rRNA 基因序列进行嵌合子序列的检查和剔除, 之后在 GenBank 中进行比对, 调取出相似度较高的相关序列, 进行 CLUSTAL X 多重比对。使用 MEGA 4.0 中邻接法 (neighbor-joining method) 进行聚类分析和系统发育树的构建<sup>[19]</sup>。利用 RDP 8.1 (Ribosomal Database Project release 8.1), (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 进行归类。所得细菌 16S rRNA 基因序列均已提交 GenBank 数据库, 序列登录号为: GQ302523 至 GQ302594。

2 结果

2.1 沙湾冷泉水理化性质分析

沙湾冷泉水的物理化学指标测定结果表明, 沙湾冷泉水呈现酸性, 总矿化度小于 3 属于微碱水<sup>[1]</sup>, 主要优势阴阳离子为  $\text{SO}_4^{2-}$  和  $\text{Na}^+$  (表 1)。

表 1 沙湾冷泉水理化性质

Table 1 Physicochemical parameters of the waters from Shawan cold spring

| 温度<br>Temperature<br>/°C | pH  | 总氮 TN<br>/(g/L) | 样品浓度 Sample concentration /(g/L) |                  |               |                    |                    |                  |              |               |
|--------------------------|-----|-----------------|----------------------------------|------------------|---------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------|---------------|
|                          |     |                 | 主要阴离子 Main anions                |                  |               |                    | 主要阳离子 Main cations |                  |              |               |
|                          |     |                 | $\text{CO}_3^{2-}$               | $\text{HCO}_3^-$ | $\text{Cl}^-$ | $\text{SO}_4^{2-}$ | $\text{Ca}^{2+}$   | $\text{Mg}^{2+}$ | $\text{K}^+$ | $\text{Na}^+$ |
| 5.5—7.5                  | 5.0 | 4.490           | 0.0071                           | 0.1290           | 0.0226        | 0.2897             | 0.1148             | ND               | ND           | 1.6632        |

ND: 未检测到

2.2 稀有度分析结果

从稀有度曲线和文库覆盖率  $C = 93\%$  可以看出, 文库并未达到饱和, 但当克隆子个数 > 180 个后, 增幅趋于减缓 (图 1)。这表明虽然随着克隆子个数的增加, 细菌多样性仍会增加, 但是增幅却很小。因而 241 个克隆子已基本涵盖了此环境中绝大多数的细菌类群。

2.3 细菌 16S rRNA 基因克隆文库构建及系统发育分析

细菌克隆文库共转化出 630 个阳性克隆子, 随机挑选了 241 个阳性克隆子进行 *Hae* III 酶切分型, 得到 86 个 OTUs。

系统发育分析结果表明细菌文库 86 个 OTUs 归为 18 个亚群, 11 个门, 包括酸杆菌门 (Acidobacteria) (占细菌克隆文库的 48%), 变形菌门 (Proteobacteria) (25%), 蓝细菌门 (Cyanobacteria) (6%), 硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) (5%), 浮霉菌门 (Planctomycetes) (3%), 放线菌门 (Actinobacteria) (2%), 疣微菌门 (Verrucomicrobia) (2%), 厚壁菌门 (Firmicutes) (1%), 拟杆菌门 (Bacteroidetes) (<1%), 绿菌门 (Chlorobi) (<1%), 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) (<1%), Candidate division OD1 (<1%)。此外 4 个 OTUs (4%) 无论使用 RDP classifier 归类或是系统发育分支法都无法归类到已知的类群中 (图 2)。超过 1/3 的 OTUs 序列与 GenBank 中已存 16S rRNA 基因序列相似性小于 95% (表 2)。

酸杆菌门 (Acidobacteria) 为细菌文库优势菌群, 包括 31 个 OTUs, 进化分支分为 3 个大分支, RDP 归类为酸杆菌科中 8 个未培养类群 (Gp3, Gp4, Gp5, Gp6, Gp7, Gp17, Gp22 以及 Unknown)。其中 Gp4, Gp6 和 Gp7

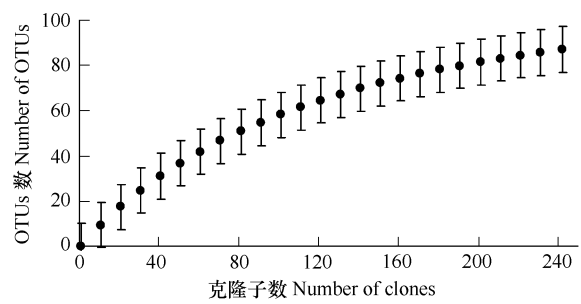
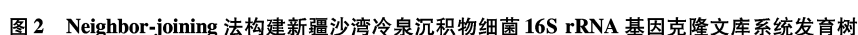


图 1 沙湾冷泉沉积物细菌克隆文库稀有度曲线

Fig. 1 Rarefaction curves for Shawan cold spring sediment-derived bacteria clone library. Error bars represent 95% confidence intervals

(●) OTUs (Operational Taxonomic Units)



Acidobacteria 酸杆菌门;  $\alpha$ -Proteobacteria  $\alpha$ -变形菌纲;  $\beta$ -Proteobacteria  $\beta$ -变形菌纲;  $\gamma$ -Proteobacteria  $\gamma$ -变形菌纲;  $\delta$ -Proteobacteria  $\delta$ -变形菌纲; Cyanobacteria 蓝细菌门; Nitrospirae 硝化螺旋菌门; Planctomycetes 浮霉菌门; Actinobacteria 放线菌门; Verrucomicrobia 疣微菌门; Firmicutes 厚壁菌门; Bacteroidetes 拟杆菌门; Chlorobi 绿菌门; Gemmatimonadetes 芽单胞菌门; OD1 Candidate division OD1; Unknown 未知

在酸杆菌门中占优势。Gp4 包括 7 个 OTUs 与 Unknown 类群构成第 2 个大分支,并且属于酸杆菌门中典型分布广泛的新类群<sup>[20]</sup>。Gp6 包括 8 个 OTUs 与 Gp3, Gp5 和 Gp17 进化距离上较近构成一个大分支,各分支之间相似率在 77%—83%,其中 Gp17 相似序列来自于 Pearl River 河口沉积物中,并且细菌多样性呈垂直分布(FJ517007)。Gp7 包括 6 个 OTUs 与 Gp22 进化距离较近构成第 3 个大分支,但与上述 2 个大分支进化距离较远,形成独立分支,其最相似序列来自西伯利亚多边形型冻土层<sup>[21]</sup>。

变形菌门(Proteobacteria)为细菌文库第二大优势菌群,包括 21 个 OTUs,分属于 4 个亚纲: $\alpha$ -Proteobacteria (8%), $\beta$ -Proteobacteria (7%), $\gamma$ -Proteobacteria (4%), $\delta$ -Proteobacteria (6%)。 $\alpha$ -变型菌纲( $\alpha$ -Proteobacteria)包括 9 个 OTUs,全部归类于根瘤菌目(Rhizobiales),其中克隆子 sw-xj62 (GQ302526)与 *Pedomicrobium manganicum* (X97691) 具有 98% 的相似性。sw-xj95 (GQ30252) 与 *Methylocystis* sp. (DQ852351) 具有 92% 的相似性。sw-xj111 (GQ302531) 与 *Azospirillum* sp. (AY118222) 具有 86% 的相似性。clone sw-xj175 (GQ302532) 与 *Bradyrhizobium elkanii* (AB110484) 具有 90% 的相似性,并且与其他 OTUs 进化距离最远。 $\beta$ -变型菌纲( $\beta$ -Proteobacteria)包括 6 个 OTUs, RDP 归类于红环菌科(Rhodocyclaceae)和亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae)。克隆子 sw-xj209 (GQ302537) 独立构成一个分支与纯培养菌 *Rubrivivax gelatinosus* (AB250625) 具有 98% 的相似性。此外,4 个克隆子(sw-xj69, sw-xj248, sw-xj275, sw-xj169) 紧密聚类在一起形成一个分支并且全部归属于硝化单胞菌科。 $\gamma$ -变型菌纲包括 3 个 OTUs, sw-xj119 (GQ302551) 和 sw-xj501 (GQ302553) 形成一个分支,与纯培养假单胞菌 *Pseudomonas moorei* (FM955889) 分别具有 83% 和 99% 的相似性, sw-xj121 独立聚类分支, RDP 归属于  $\gamma$ -变型菌纲( $\gamma$ -Proteobacteria) 中未培养类群,具体科属不详。 $\delta$ -变型菌纲( $\delta$ -Proteobacteria) 包括 3 个 OTUs, 进化分支分为 3 支,全部归属于黏球菌目(Myxococcales) 具体科属不详。sw-xj259 (GQ302548) 分歧明显,各分支间相似度低于 85%。

蓝细菌门(Cyanobacteria)为第三大类群,包括 5 个 OTUs, 紧密聚类在一起,全部归属于 Chloroplast 科 *Bacillariophyta* 属并且绝大多数 OTUs 与纯培养菌具有高相似性。克隆子 sw-xj3 (GQ302541) 与 *Amphiprora paludosa* (FJ002240) 具有 98.5% 相似性。sw-xj93 (GQ302532) 与 *Phaeodactylum tricornutum* (EF067920) 具有 97% 相似性。sw-xj112 (GQ302534) 与 *Synedra fragilaroides* (FJ002234) 具有 97% 的相似性。sw-xj229 ((GQ302544) 与 *Navicula phyllepta* (FJ002222) 具有 98% 的相似性。克隆子 sw-xj279 (GQ302545) 与上述 4 个 OTUs 进化距离最远并且独自形成一支,其最为相似的纯培养菌为 *Bacillaria paxillifer* (FJ002232) 并具有 90% 的相似性。

硝化螺旋菌门(Nitrospirae)为第四大类群,包括 3 个 OTUs,全部归类于硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)。其中克隆子 sw-xj11 (GQ302556) 和 sw-xj171 (GQ302557) 与 Green Bay 沉积物中的未培养菌 uncultured ferromanganoous micronodule bacterium (AF293010) 分别具有 99% 和 95% 的相似性(未发表,NCBI),并且也与纯培养菌 *Nitrospira* sp. (Y14644) 具有 96% 和 92% 的相似性。

浮霉菌门(Planctomycetes)包括 3 个 OTUs,进化分支为 3 支,sw-xj105 (GQ302559) 进化距离最远并独立分支,sw-xj213 (GQ302560) 和 sw-xj224 (GQ302561) 进化距离较近,分别归属于浮霉菌科(Planctomycetaceae), *Gemmata* 属,小梨形菌属(*Pirellula*) 和浮霉菌(*Planctomyces*) 属,但均没有最相似的纯培养菌。放线菌门(Actinobacteria) 包括两个 OTUs, sw-xj18 (GQ302554) 以及 sw-xj83 (GQ302523) 分属于红球菌科(Rubrobacteraceae) 和放线菌纲(Actinobacteria)。疣微菌门(Verrucomicrobia) 包括两个 OTUs,分属于 Verrucomicrobiales 目 Xiphinebacteriaceae 科和 Subdivision 3。厚壁菌门(Firmicutes) 只有 sw-xj149 (GQ302550) 一个 OTUs,其与纯培养菌 *Bacillus subtilis* (EU670049) 相似性达到 99%。拟杆菌门(Bacteroidetes) 包括 sw-xj136 (GQ302533) 一个 OTUs,其属于 Crenotrichaceae 科 *Terrimonas* 属。此外,文库还发现有绿菌门(Chlorobi) 和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes) 但它们所占比例较小,全部都与未培养菌具有高相似,具体归属不详。

### 3 讨论

与其它类型冷泉<sup>[9,11-12]</sup>及地下水<sup>[22]</sup>细菌多样性的研究结果相比,沙湾冷泉沉积物酸杆菌门(Acidobacteria)

表 2 新疆沙湾冷泉沉积物细菌 16S rRNA 序列比对结果

| Table 2 BLAST matches of bacteria 16S rRNA sequences identified in the Shawan cold spring of Xinjiang |                        |                                                                  |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 类 群<br>Taxonomic group                                                                                | 菌株登陆号<br>Accession No. | 最相似菌株及 GenBank 登陆号<br>Closest relative and GenBank Accession No. | 相似性<br>Identity/% |
| 酸杆菌门 Acidobacteria                                                                                    | GQ302568               | Uncultured Acidobacteriales bacterium g73-IR-91 (EU979109)       | 84                |
|                                                                                                       | GQ302588               | Uncultured Acidobacterium sp. Dolo-26 (AB257649)                 | 89                |
|                                                                                                       | GQ302571               | Uncultured Acidobacteriales bacterium g48-I-143 (EU979104)       | 89                |
|                                                                                                       | GQ302590               | Uncultured Acidobacteriales bacterium g71-M-52 (EU979112)        | 90                |
|                                                                                                       | GQ302589               | Uncultured Acidobacteriales bacterium Plot4-2C09 (EU449660)      | 91                |
|                                                                                                       | GQ302587               | Uncultured Acidobacteriales bacterium g48-MR-165 (EU979105)      | 92                |
| α-变形菌纲                                                                                                | GQ302531               | <i>Azospirillum</i> sp. (AY118222)                               | 86                |
| α-Proteobacteria                                                                                      | GQ302532               | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (AB110484)                         | 90                |
|                                                                                                       | GQ30252                | <i>Methylocystis</i> sp. (DQ852351)                              | 92                |
|                                                                                                       | GQ302530               | Endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC36 (AF069962)         | 92                |
|                                                                                                       | GQ302584               | Uncultured alpha proteobacterium clone i6 (DQ453806)             | 93                |
| β-变形菌纲                                                                                                | GQ302539               | <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (AB110484)                         | 87                |
| β-Proteobacteria                                                                                      | GQ302538               | Uncultured beta proteobacterium clone g62 (EU979071)             | 93                |
|                                                                                                       | GQ302534               | Uncultured Nitrosomonadaceae Elev_16S_1398 (EF020008)            | 95                |
| γ-变形菌纲 γ-Proteobacteria                                                                               | GQ302551               | Uncultured proteobacterium clone DS131 (DQ234214)                | 89                |
| δ-变形菌纲 δ-Proteobacteria                                                                               | GQ302547               | Uncultured delta proteobacterium ADK-BTe02-06 (EF520534)         | 91                |
|                                                                                                       | GQ302548               | Uncultured soil bacterium clone 1_C11 (EU589261)                 | 91                |
| 蓝细菌门 Cyanobacteria                                                                                    | GQ302545               | <i>Bacillaria paxillifer</i> (FJ002232)                          | 90                |
| 硝化螺旋菌门 Nitrospirae                                                                                    | GQ302557               | <i>Nitrospira</i> sp. (Y14644)                                   | 92                |
| 浮霉菌门 Planctomycetes                                                                                   | GQ302560               | Uncultured Planctomycetales bacterium clone EC118 (DQ889893)     | 89                |
| 放线菌门 Actinobacteria                                                                                   | GQ302554               | Uncultured Rubrobacteraceae bacterium clone Elev 1332 (EF019953) | 90                |
| 疣微菌门 Verrucomicrobia                                                                                  | GQ302562               | Uncultured Verrucomicrobia bacterium clone B6H (FJ205241)        | 86                |
|                                                                                                       | GQ302563               | Uncultured Verrucomicrobia bacterium Amb16S-1093 (EF018467)      | 95                |
| 厚壁菌门 Firmicutes                                                                                       | GQ302546               | Uncultured Firmicutes bacterium GASP-MA2W2-E10 (EF663241)        | 95                |
| 拟杆菌门 Bacteroidetes                                                                                    | GQ302533               | Uncultured Bacteroidetes bacterium clone g32 (EU979041)          | 95                |
| 绿菌门 Chlorobi                                                                                          | GQ302540               | Uncultured Chlorobi bacterium clone Cart-N2 (AY118151)           | 91                |
| 芽单胞菌门 Gemmatimonadetes                                                                                | GQ302555               | Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone AMK8 (AY913247)      | 88                |
| Candidate division 1 OD1                                                                              | GQ302617               | Uncultured candidate division OP11 bacterium clone BB35          | 83                |
| 未知 Unknown                                                                                            | GQ302611               | (AM167972)                                                       | 91                |
|                                                                                                       | GQ302616               | Uncultured candidate division OD1 bacterium Pav-OD12 (FJ482182)  | 92                |

占优势(48%),而阿尔卑斯山喀斯特冷泉水<sup>[12]</sup>和加拿大极地高盐冷泉沉积物中不存在此类群<sup>[11]</sup>,其主要原因可能是沙湾冷泉为酸性环境(表1)。本文酸杆菌门细菌多样较高并且16S rRNA 基因序列与 GenBank 中的纯培养标准菌株序列相似性都比较低,由于这一类群分布广泛,代谢类型多样,能够利用腐殖酸、硝酸盐、有机酸等作为电子受体。因此推测酸杆菌门中可能存在大量的自养新类群。

变形菌门(Proteobacteria)是沙湾冷泉沉积物中的第二大优势菌群,与极地冷泉<sup>[11]</sup>和喀斯特冷泉<sup>[12]</sup>研究结果相似。与硫化物冷泉<sup>[10-11]</sup>中硫氧化菌、硫酸盐还原菌占优势相比较,本研究中虽然变形菌门包含有四个亚纲(α-,β-,γ-,δ-),多样性较高,但并未检测到与硫化物或硫酸盐代谢相关的类群,这可能与沙湾冷泉不含H<sub>2</sub>S 有关。

本研究中的 α-变形菌纲全部克隆子都归属于根瘤菌目(Rhizobiales),因此推测这一类群可能与低温和寡营养生境中氮的分解和矿化有关,由于这类固氮功能类群的存在,所以推测其可能是此特殊环境中氮源供给的来源<sup>[23]</sup>。β-变形菌纲中除小部分属于红环菌科(Rhodocyclaceae)外,大多数克隆子都归类于亚硝化单胞菌科。而亚硝化单胞菌科细菌对硝酸盐氧化起重要作用,另外红环菌科中大部分的类群属于化能异养细菌,

该细菌能够脱氮、脱氯或者具有铁氧化功能。 $\delta$ -变形菌纲大部分类群都与硫代谢相关,但文库所得克隆子全部属于与硫代谢无关的黏球菌目(Myxococcales)。

此外,沙湾冷泉沉积物中还存有大量(占整个文库的10%)可利用硝酸盐的细菌类群如硝化螺旋菌门(Nitrospirae)中的硝化螺旋菌(*Nitrospira*),浮霉菌门(Planctomycetes)中亚硝酸盐厌氧氨氧化菌,以及疣微菌门(Verrucomicrobia)中的厌氧氨氧化类群。由于这些类群广泛分布于海底沉积物及冷泉<sup>[10]</sup>,并且是氮生物地球化学循环的主要类群<sup>[24]</sup>,因而推测变形菌门中的固氮作用和其它门中的硝酸盐氧化作用可能是此特殊环境中氮循环的主要类型,并且对于维持整个原核微生物群落的稳定性具有重要作用。这一结果也同沙湾冷泉中氮含量较高相吻合(表1)。另外根据沙湾冷泉水中 $\text{CO}_3^{2-}$ 含量远少于 $\text{HCO}_3^-$ 这一特点,推断该生境中可能还存在可利用无机碳作为能源的类群。

硫化物对于大多数的有氧光合微生物具有毒害作用<sup>[11]</sup>,大多数的蓝细菌对硫化物不具耐受性<sup>[10]</sup>。沙湾冷泉中蓝细菌含量较高,并且将近5%的克隆子与纯培养菌具有高相似性,因此可以推测蓝细菌很有可能也是此冷泉中重要的初级生产者之一。

值得注意的是系统发育树中Gp7类群在酸杆菌门中进化分歧明显,独立形成一支,而与此类群最相似序列是来自西伯利亚冻土带<sup>[21]</sup>,所以Gp7可能是高度适应了沙湾冷泉低温环境的特有类群。

沙湾冷泉沉积物中存在代谢多样化的细菌,很可能是维持此特殊生态系统中物质循环及微生物群落稳定性的重要因素。但利用免培养方法并不能完全、真实地反映环境微生物多样性,所以需要结合新的纯培养技术和分离方法来更全面真实的认识地下水生态系统微生物及其功能。

## References:

- [1] Shi X Y, Zhang Y X. Groundwater Hydrology. Beijing: Waterpub Press, 1997:1-30.
- [2] Danielopol D, Pospisil P, Rouch R. Biodiversity in groundwater: a large scale view. Trends in Ecology and Evolution, 2000, 15(6):223-224.
- [3] Griebler C, Lueder T. Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. Freshwater Biology, 2009, 54(4):1365-2427.
- [4] Li Z H, Zhang C Y, Zhang S, Yin M Y, Ma L N, Guo X H. Review on groundwater microbiology. South-to-North Water Transfer and Water Science & Technology, 2007, 5(5):1672-1683.
- [5] Hirsch P, Rades R. Microbial diversity in a groundwater aquifer in northern Germany. Microbiology, 1983, 24:183-200.
- [6] Humbert F, Dorigo U. Biodiversity and aquatic ecosystem functioning: a mini review. Aquatic Ecosystem Health and Management, 2005, 8(4):367-374.
- [7] Mouser J, Rizzo M. A multivariate statistical approach to spatial representation of groundwater contamination on using hydrochemistry and microbial community profiles. Environmental Science and Technology, 2005, 39(19):7551-7559.
- [8] Jiang F L, Li G R, Wang J H. Seismological geochemistry. Beijing: Seismological Press, 1989:25-29.
- [9] Moissl C, Rudolph C, Huber R. Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2):933-937.
- [10] Nancy N P, Dale T A, Wayne H P, Charles W G, Lyle G W. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(5):1532-1543.
- [11] Antonio C, Carlos R, Juan J S, Eduardo V, Martin W H. Spatial Dominance and inorganic carbon assimilation by conspicuous autotrophic biofilms in a physical and chemical gradient of a cold sulfurous spring: The role of differential ecological strategies. Microbial Ecology, 2005, 50(2):172-184.
- [12] Farnleitner A, Wilhartitz H, Ryzinska G, Kirschner A K T, Stadler H, Burtscher M M, Hornek R, Szewzyk U, Herndl G, Mach R L. Bacterial dynamics in spring water of alpine karst aquifers indicates the presence of stable autochthonous microbial endokarst communities. Environmental Microbiology, 2005, 7(8):1248-1259.
- [13] Zhou J, Bruns M, Tiedje J. DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2):316-322.
- [14] Martin L, Philippot L, Hallet S. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5):2354-2359.
- [15] Von W, Göbel F, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology, 1997, 21(3):213-229.

- [16] Reysenbach L, Giver L, Wickham G. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10):3417-3418.
- [17] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2):697-703.
- [18] Ma X L, Wang Y, Yang H M, Wang C L, Mao P H, Jin X, Chang W, Fang S J, Zhang P H, Lou K. The bacterial diversity from mud volcano in Xinjiang by culture-independent approach. *Acta Ecologica Sinica*, 200, 29(7):3722-3728.
- [19] Kimura M. 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.
- [20] Ludwig W, Bauer S H, Bauer M. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology*, 1997, 153(1):181-190.
- [21] Liebner S, Harder J, Wagner D. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, and Siberia. *Microbiology*, 2008, 11(3):195-202.
- [22] Barton A, Taylor R, Pace R. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment. *Geomicrobiology Journal*, 2004, 21(1):11-20.
- [23] Jonasson S, Havstrom M, Jensen M. In situ mineralization of nitrogen and phosphorus of arctic soils after perturbations simulating climate change. *Oecologia*, 1993, 95(2):179-186.
- [24] Li T, Wang P, Wang P X. Bacterial and archaeal diversity in surface sediment from the south slope of the South China Sea. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 48(3):323-329.

#### 参考文献:

- [1] 施鑫源, 张元禧. 地下水水文学. 北京: 中国水利水电出版社, 1997:1-30.
- [4] 李政红, 张翠云, 张胜, 殷密英, 马琳娜, 郭秀红. 地下水微生物学研究进展综述. *南水北调与水利科技*, 2007, 5(5):1672-1883.
- [8] 蒋凤亮, 李桂如, 王基化. 地震地球化学. 北京: 地震出版社, 1989:25-29.
- [18] 马小龙, 王芸, 杨红梅, 王纯利, 毛培宏, 金湘, 常玮, 房世杰, 张评浒, 娄恺. 新疆泥火山细菌遗传多样性. *生态学报*, 2009, 29(7):3722-3728.
- [24] 李涛, 王鹏, 汪品先. 南海南部陆坡表层沉积物细菌和古菌多样性. *微生物学报*, 2008, 48(3):323-329.

# 2008 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊★

(源于 2009 年版 CSTPCD 数据库)

| 排序<br>Order | 期刊 Journal                              | 总被引频次<br>Total citation | 排序<br>Order | 期刊 Journal       | 影响因子<br>Impact factor |
|-------------|-----------------------------------------|-------------------------|-------------|------------------|-----------------------|
| 1           | 生态学报                                    | 8956                    | 1           | 生态学报             | 1.669                 |
| 2           | 应用生态学报                                  | 7979                    | 2           | 植物生态学报           | 1.656                 |
| 3           | 植物生态学报                                  | 3742                    | 3           | 应用生态学报           | 1.632                 |
| 4           | 西北植物学报                                  | 3584                    | 4           | 生物多样性            | 1.474                 |
| 5           | JOURNAL OF INTEGRATIVE<br>PLANT BIOLOGY | 3460                    | 5           | 生态学杂志            | 1.276                 |
| 6           | 植物生理学通讯                                 | 3187                    | 6           | 植物学通报            | 1.058                 |
| 7           | 生态学杂志                                   | 3148                    | 7           | 西北植物学报           | 1.046                 |
| 8           | 遗传学报                                    | 2142                    | 8           | 植物生理与分子生物学<br>学报 | 1.034                 |
| 9           | 植物生理与分子生物学学报                            | 1855                    | 9           | 遗传学报             | 0.887                 |
| 10          | 昆虫学报                                    | 1580                    | 10          | 遗传               | 0.835                 |

★《生态学报》2008 年在核心版的 1868 种科技期刊排序中总被引频次 8956 次,全国排名第 2;影响因子 1.669,全国排名第 14;第 1~8 届连续 8 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

编辑部主任: 孔红梅

执行编辑: 刘天星 段 靖

生 态 学 报  
(SHENGTAI XUEBAO)  
(半月刊 1981 年 3 月创刊)  
第 30 卷 第 21 期 (2010 年 11 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA  
(Semimonthly, Started in 1981)  
Vol. 30 No. 21 2010

|               |                                                                                                                    |                 |                                                                                                                                                                                 |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 编 辑           | 《生态学报》编辑部<br>地址:北京海淀区双清路 18 号<br>邮政编码:100085<br>电话:(010)62941099<br>www.ecologica.cn<br>shengtaixuebao@rcees.ac.cn | Edited by       | Editorial board of<br>ACTA ECOLOGICA SINICA<br>Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China<br>Tel:(010)62941099<br>www.ecologica.cn<br>Shengtaixuebao@rcees.ac.cn |
| 主 编           | 冯宗炜                                                                                                                | Editor-in-chief | FENG Zong-Wei                                                                                                                                                                   |
| 主 管           | 中国科学技术协会                                                                                                           | Supervised by   | China Association for Science and Technology                                                                                                                                    |
| 主 办           | 中国生态学会<br>中国科学院生态环境研究中心<br>地址:北京海淀区双清路 18 号<br>邮政编码:100085                                                         | Sponsored by    | Ecological Society of China<br>Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS<br>Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China                                 |
| 出 版           | 科 学 出 版 社<br>地址:北京东黄城根北街 16 号<br>邮政编码:100717                                                                       | Published by    | Science Press<br>Add:16 Donghuangchenggen North Street,<br>Beijing 100717, China                                                                                                |
| 印 刷           | 北京北林印刷厂                                                                                                            | Printed by      | Beijing Bei Lin Printing House,<br>Beijing 100083, China                                                                                                                        |
| 发 行           | 科 学 出 版 社<br>地址:东黄城根北街 16 号<br>邮政编码:100717<br>电话:(010)64034563<br>E-mail:journal@cspg.net                          | Distributed by  | Science Press<br>Add:16 Donghuangchenggen North<br>Street, Beijing 100717, China<br>Tel:(010)64034563<br>E-mail:journal@cspg.net                                                |
| 订 购           | 全国各地邮局                                                                                                             | Domestic        | All Local Post Offices in China                                                                                                                                                 |
| 国外发行          | 中国国际图书贸易总公司<br>地址:北京 399 信箱<br>邮政编码:100044                                                                         | Foreign         | China International Book Trading<br>Corporation<br>Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China                                                                                      |
| 广告经营<br>许 可 证 | 京海工商广字第 8013 号                                                                                                     |                 |                                                                                                                                                                                 |



ISSN 1000-0933  
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元