

唐源,连宾,程建中. 贵州喀斯特地区碳酸盐岩表生古菌群落结构及多样性研究:以南江大峡谷为例 [J]. 中国岩溶, 2017, 36 (2):193-201.

DOI:10.11932/karst20170206

贵州喀斯特地区碳酸盐岩表生古菌群落 结构及多样性研究 ——以南江大峡谷为例

唐源¹,连宾²,程建中¹

(1. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室,贵阳 550081;

2. 南京师范大学生命科学学院,南京 210023)

摘要:为了研究贵州喀斯特地区碳酸盐岩表生古菌群落结构的多样性,应用 16S rDNA 文库技术,对采集于贵州南江大峡谷的白云岩和石灰岩样品进行基因文库的构建和限制性片段长度多态性(RFLP)分析。用限制性核酸内切酶 *Msp* I 对两个文库中分别随机挑选的 300 个阳性克隆子进行酶切分型,白云岩和石灰岩 16S rDNA 基因文库各得到 14 和 13 个基因型,其覆盖率分别为 95.4%和 91.3%,香农指数分别为 2.14 和 1.93。系统发育分析表明白云岩和石灰岩表生古菌克隆子全部归属于泉古菌门(Crenarchaeota),代表性克隆与 GenBank 数据库已有 16S rRNA 序列的相似性为 96%~100%,且最高相似性序列均来源于土壤及岩石环境的未可培养古菌序列。

关键词:白云岩;石灰岩;古菌;多样性;喀斯特

中图分类号:Q913;P642.25

文献标识码:A

文章编号:1001-4810(2017)02-0193-09

0 引 言

贵州地处喀斯特发育区之一的中国西南喀斯特区中心,境内出露碳酸盐岩面积达 $13 \times 10^4 \text{ km}^2$,占全省土地面积的 73%,是中国喀斯特地貌发育最典型的省份^[1-2]。碳酸盐岩生境特殊,具有干旱、贫营养、温度波动大等特点,对生存于其中的生物具有极大的挑战。但在岩石表面和裂隙中存在多种类型的生物,这在几个世纪前就受到研究者的关注。研究发现,岩石表面的微生物很少以单一物种形成单菌落的形式存在,通常它们会集体生长形成结构和功能复杂多样的微生物群体^[3]。Hose 等^[4]在一个喀斯特环境中检测出 19 种细菌,特别是硫化物氧化菌将地下水中的硫化氢、硫和硫化物氧化成硫酸,硫酸将石灰岩

表面转换成石膏,石膏被水溶解使洞穴扩大。Horath and Bachofen^[5]从阿尔卑斯山(Alps)的白云岩生环境中发现了蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、 α -变形菌门(Alpha-Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、绿屈挠菌科(Chloroflexaceae)的细菌,以及古生菌(Archaea)、变形虫(Amoeba)和绿藻(Green algae)等。Wong 等^[6]研究了裸露的白云岩悬崖上的微生物类群,发现真核生物主要类群为地衣共生菌[如共球藻属(*Trebouxia*)和 *Leptodontidium*],原核生物类群主要为蓝细菌门(Cyanobacteria)、 β -变形菌门(Beta-Proteobacteria)和泉古细菌(Crenarchaea)。碳酸盐岩环境特殊,依附于其生存的微生物却普遍且多样。贵州是典型的喀斯特地貌发育区,前期研究主

基金项目:国家自然科学基金项目(41503080);贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2014]2168 号);贵州省科技支撑计划项目农业攻关(黔科合 NY [2015]3001-1;NY[2013]3019);贵州省科技重大专项计划(黔科合重大专项字[2014]6015-2-1);中国科学院地球化学研究所领域前沿项目

第一作者简介:唐源(1984-),女,博士,主要从事生物地球化学研究。E-mail:tangyuan@vip.gyig.ac.cn.

通信作者:连宾(1964-),男,博士,研究员,主要从事生物地球化学研究。E-mail:bin2368@vip.163.com.

收稿日期:2016-06-30

要聚焦在碳酸盐岩石生环境中细菌和真菌类群及其对碳酸盐岩的风化作用方面^[7-8],对其古菌群落结构及多样性的研究尚未见相关报道。

古菌多生活在极端环境中,比如极地、热泉和盐碱湖等低温、高温、高盐、高酸碱度及厌氧环境^[9-10],因其在生物地球化学循环过程中起重要作用,已是目前生物地球化学研究的热点之一^[11]。目前仅有约1%~10%的古菌种类被培养出来^[12]。从热泉、热液喷孔、盐湖、高碱湖、瘤胃等典型的环境中也分离出了古菌^[13]。古菌几乎存在于所有环境中,且具有很高的丰度^[14]。目前所了解的古菌仅是古菌种类的极小部分。近年来,随着分子生物学技术的发展,古菌的研究范围逐步扩大到土壤、湖泊、河流、海洋、沼泽地等环境^[15-18],发现不但其丰度较高,而且可作为优势菌群存在,其在该环境生物地球化学循环过程中的作用不可忽视^[19-20]。目前鲜有关于碳酸盐岩环境中古菌多样性的专门研究,对该环境古菌群落及多样性的认识依然很薄弱。因此,本文以贵州典型喀斯特环境——南江大峡谷的两种主要碳酸盐岩(白云岩和石灰岩)为研究对象,采用构建克隆文库与限制片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)分析相结合的方法研究其表生古菌群落结构和多样性,以期为开发利用喀斯特环境的古菌资源以及阐明古菌在碳酸盐岩风化成土等生物地球化学循环过程中的作用奠定基础。

1 研究区概况

南江大峡谷(26°56'N, 106°58'E)位于贵州省贵阳市开阳县境内(图1),是一个典型的喀斯特大峡谷,被誉为“喀斯特生态博物馆”。该地属于亚热带季风气候,过去10年的年平均温度为14.8℃,最热月(7月)平均温度为23.2℃,最冷月(1月)平均温度为3.9℃。该地雨量充沛,一般年均降雨量在1200mm左右,一年四季阴雨天较多,月平均降雨量约为93.2mm,且多集中在雨季(3月末至9月底)^[7-8]。该地区碳酸盐岩大量出露,其风化壳上发育的土壤都是土层浅薄,无明显发生层次的非地带性土壤。

2 研究材料与方法

2.1 样品采集

在研究区内采集表面光秃,肉眼无法观察到生物的碳酸盐岩样品6份:3份白云岩(D1-D3)和3份石灰岩(L1-L3)样品,置于无菌袋中后,用冰盒运至

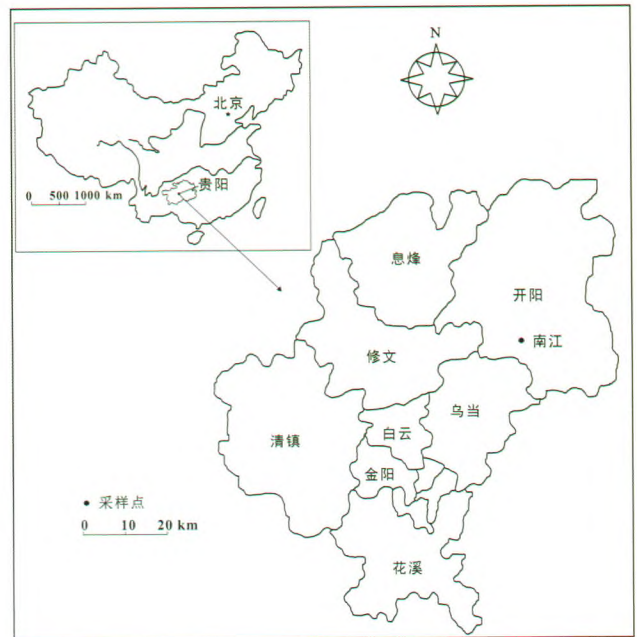


图1 采样点位置示意图

Fig. 1 Sketch map showing location of sampling sites

实验室于-80℃保存,用于进行DNA提取和后续分析。

2.2 XRD分析

岩石样品用玛瑙研钵研磨至200目,用日本理学公司的D/Max-2200型粉晶X-射线衍射仪(XRD)分析矿物组成。分析条件为CuK α 辐射,石墨单色滤波管电压40kV,管电流30mA,扫描速度:3°/min。采用K值法计算各矿物相的相对百分含量。分析测试工作由中国科学院地球化学研究所矿床国家重点实验室完成。

2.3 岩石样品总DNA提取

采用UltraClean™ soil DNA Isolation kit (Mo Bio, USA)提取岩石样品总DNA,重复3次,将3次重复的总DNA混合起来以减少DNA提取的随机性。

2.4 古菌16S rRNA基因的PCR扩增

采用古菌通用引物21F(5'-TTCCGGTT-GATCCYGCCGGA-3')和958R(5'-YCCG-GCGTTGAMTCCAATT-3')进行16S rRNA基因扩增。PCR反应体系为:10×PCR buffer 5μL, MgCl₂(25 mM) 4μL, Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.5μL, dNTP Mixture(各2.5 mM) 4μL,引物21F及958R(10 μM)各2μL,模板DNA 1μL,加dd H₂O至终体积50μL。

PCR反应条件为:在94℃条件下预变性5min,再94℃变性1min,在52℃下复性1min,在72℃

下延伸 2 min, 30 个循环, 最后以 72 °C 再延伸 10 min。以无菌水作为阴性对照, 重复 3 次。取 PCR 产物 5.0 μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像系统观察结果。

2.5 16S rRNA 基因文库的构建

取 5 μL 混合好的 DNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶上以 5 V/cm 电压梯度恒压电泳约 30 min, 采用凝胶成像系统观察结果并将目的条带(约 950 bp)用无菌小刀切下后, 使用 TIANGel Midi Purification Kit(天根, 北京)进行回收纯化。采用 pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, USA) 连接 PCR 产物, 连接产物转化至感受态细胞 *E. coli* JM109 (Promega, USA)。以氨苄青霉素(100 ug/mL)抗性和蓝白斑法筛选阳性克隆子。

2.6 限制性片段长度多态性分析

筛选出的阳性克隆子采用通用引物 T7(5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3') 和 SP6(5' - ACGATTTAGGTGACACTATAG - 3') 进行菌液 PCR, PCR 产物用限制性核酸内切酶 *Msp* I (TaKaRa, Japan) 完全酶切, 反应体系为 10 \times T buffer 1 μL , *Msp* I 5 U, 0.1% BSA 1 μL , PCR 产物 5 μL , 加 dd H₂O 至终体积 10 μL 。酶切反应于 37 °C 水浴 4 h, 65 °C 水浴 20 min 终止酶切反应。酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶在 5 V/cm 电压梯度恒压电泳约 30 min。凝胶成像系统成像后借助 PhotoShop 软件, 分析产物经酶切后的谱型, 计算每个谱型出现的频率, 将具有不同谱型的克隆子进行测序, 测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2.7 DNA 序列的系统发育分析

所获得的序列用 DNASTAR 软件比对, 相似性 $\geq 97\%$ 视为同一基因型(phyloptype), 选取 1 条代表序列进行后续分析。采用 Bellerophon^[21] 和 CHIMERA_CHECK^[22] 软件分析并去除嵌合体序列。将获得的有效序列运用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)程序在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)^[23] 中进行相似性比对。挑选相似性较高的目标序列, 与所获得的代表序列一起用 Clustal X Version 1.83^[24] 软件进行比对。在 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件中用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树^[25], 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[26], 自展值(bootstrap value)设置为 1 000 以评估系统进化树的拓扑结构稳定性。

2.8 统计分析

采用稀释曲线(Rarefaction Curve)评估所构建

的文库是否较好地反映了环境微生物多样性, 用“Analytic Rarefaction 1.3”软件进行 Rarefaction 在线分析(<http://www.uga.edu/strata/software/index.html>); 采用覆盖率 Coverage C^[27-28] 评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现程度, 用如下公式进行计算: $C=1-(n/N)$, 其中 n 为操作分类单位数(OTU), N 为所分析的克隆总数, C 为覆盖率; 采用香农指数 Shannon index (H)^[29] 评估文库所代表的环境微生物多样性程度, 计算公式如下: $H=-\sum p_i \ln p_i$, 其中 p_i 为第 i 个 OTU 所代表的克隆数除以所分析的克隆总数。

2.9 核苷酸序列登录号

将代表性序列提交 GenBank 数据库, 数据库登录号为 JF737808-JF737834。

3 结果与分析

3.1 XRD 分析

岩石样品经 XRD 鉴定矿物组成, 采用 K 值法计算各样品中矿物相对百分含量(表 1), 结果显示样品均为较纯的白云岩和石灰岩。

表 1 岩石样品的 XRD 分析结果(wt%)

Table 1 XRD analytic results of rock samples (wt%)

样品编号	方解石	白云石	石英	斜长石
D1	—	100.00	—	—
D2	—	98.86	—	1.14
D3	—	100.00	—	—
L1	97.94	1.72	0.34	—
L2	99.18	0.82	—	—
L3	99.25	0.75	—	—

3.2 古菌 16S rDNA 多样性指数

从白云岩(D1—D3)及石灰岩(L1—L3)每个样品中各挑取 100 个阳性克隆子, 构建白云岩及石灰岩古菌 16S rDNA 文库(各共 300 个克隆子)。再对其进行酶切分型, 得到 14(白云岩古菌 16S rDNA 文库)和 13(石灰岩古菌 16S rDNA 文库)个基因型。由稀释曲线可见(图 2), 在白云岩和石灰岩古菌 16S rDNA 文库中, 随着克隆子数目的增加, 检测到新的基因型的几率逐渐降低, 最后曲线趋于水平, 说明所分析的克隆数足以较好地反映岩石样品中古菌的多样性。白云岩和石灰岩 16SrDNA 文库的覆盖率(CoverageC)

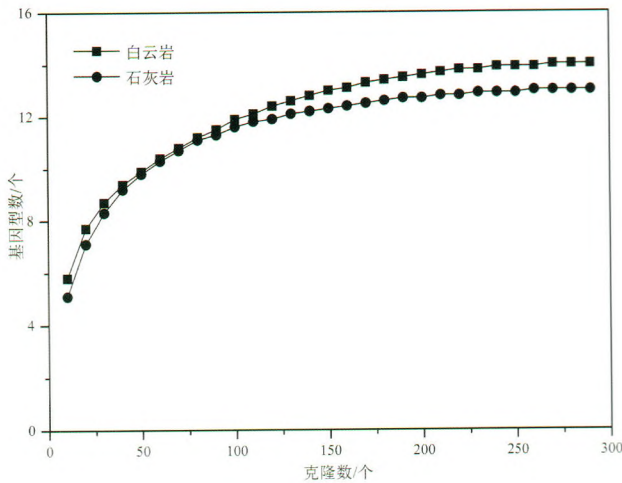


图2 白云岩和石灰岩表生古菌 16S rDNA 文库的稀释曲线
Fig. 2 Rarefaction curves generated for archaeal 16S rDNA genes in clone libraries from dolomite and limestone

分别为 95.4% 和 91.3%，反映了岩石样品中绝大部分的古菌多样性；白云岩 16S rDNA 文库的古菌多样性程度略高于石灰岩 16S rDNA 文库，其香农指数分别为 2.14 和 1.93。同时，与该环境的细菌和真菌多样性相比^[7-8]，古菌多样性程度相对较低。

3.3 白云岩表生古菌 16S rDNA 多样性分析

3.3.1 16S rDNA 序列比对结果

获得 14 个白云岩表生古菌 16S rDNA 克隆代表序列，与 GenBank 数据库比对获得最高相似序列(表 2)。这些序列与数据库中最相似序列的相似率为 96%~99%，仅 1 个序列相似率为 96%，其余序列相似率均 $\geq 97\%$ (表 2)。所有代表序列在数据库中的最相似序列均是未可培养古菌，表明白云岩 16S rDNA 文库中的古菌克隆都属于未可培养类群。

表 2 白云岩表生古菌 16S rDNA 文库代表序列分类表

Table 2 Phylogenetic classification of representative archaeal 16S rDNA sequences obtained from dolomite

基因型 (登录号)	所占比例/ % ^a	GenBank 上最相似序列(登录号)	相似度/ %
DOL-A3 (JF737808)	10.00	Uncultured crenarchaeote clone ArcC-s_cD08 (EU307029.1)	98.00
DOL-A5 (JF737809)	0.70	Uncultured archaeon clone sw-A398 (GQ302607)	99.00
DOL-A11 (JF737810)	12.70	Uncultured archaeon clone VA52 (FJ790535)	99.00
DOL-A12 (JF737811)	1.00	Uncultured archaeon clone TP-AM-A40 (HQ645143)	98.00
DOL-A29 (JF737812)	0.60	Uncultured crenarchaeote clone Ar183 (HQ141807)	99.00
DOL-A64 (JF737813)	20.00	Uncultured archaeon clone VA3 (FJ790533)	98.00
DOL-A69 (JF737814)	13.30	Uncultured archaeon clone TP-SL-A-7 (HQ738974)	99.00
DOL-A70 (JF737815)	1.30	Uncultured archaeon clone NR9_09_002 (HQ654831)	96.00
DOL-A74 (JF737816)	6.70	Uncultured compost archaeon clone 1A01 (DQ365050)	98.00
DOL-A77 (JF737817)	1.70	Uncultured archaeon clone MD3043A-31 (GQ926190)	98.00
DOL-A98 (JF737818)	1.30	Uncultured archaeon clone HDBA_SIPS648 (HM187461)	98.00
DOL-A100 (JF737819)	9.30	Uncultured archaeon clone IPZ23.1 (FJ957959)	97.00
DOL-A125 (JF737820)	0.70	Uncultured archaeon clone TP-SL-A-48 (HQ738997)	97.00
DOL-A146 (JF737821)	20.70	Uncultured archaeon clone 1PZ20.1 (FJ957957)	98.00

注：^a所占比例是指属于该基因型的克隆数占白云岩 16S rDNA 克隆文库总克隆数的百分比。

3.3.2 古菌 16S rDNA 系统发育分析

系统发育树结果(图 3)表明，来源于白云岩 16S rDNA 克隆文库的 14 个基因型均属于泉古菌门(Crenarchaeota)，未发现广古菌门(Euryarchaeota)、初古菌门(Korarchaeota)和纳米古菌门(Nanoarchaeota)。

白云岩 16S rDNA 克隆文库中有 20.7% 的克隆子属于基因型 DOL-A146，它与基因型 DOL-A100 在

数据库中的最相似序列均来源于若尔盖高原湿地土壤(GenBank 描述:FJ957957, FJ957959)。基因型 DOL-A5、DOL-A12、DOL-A69 和 DOL-A125 代表了白云岩 16S rDNA 克隆文库 15.7% 的克隆子，其在数据库中的相似率均高于 97%，且均来源于新疆疏勒河沿线永久冻结带土壤样本(GenBank 描述:GQ302607, HQ645143, HQ738974, HQ738997)。基因型 DOL-A3 代表了 10% 的克隆，它与一株不可培养泉古细菌克

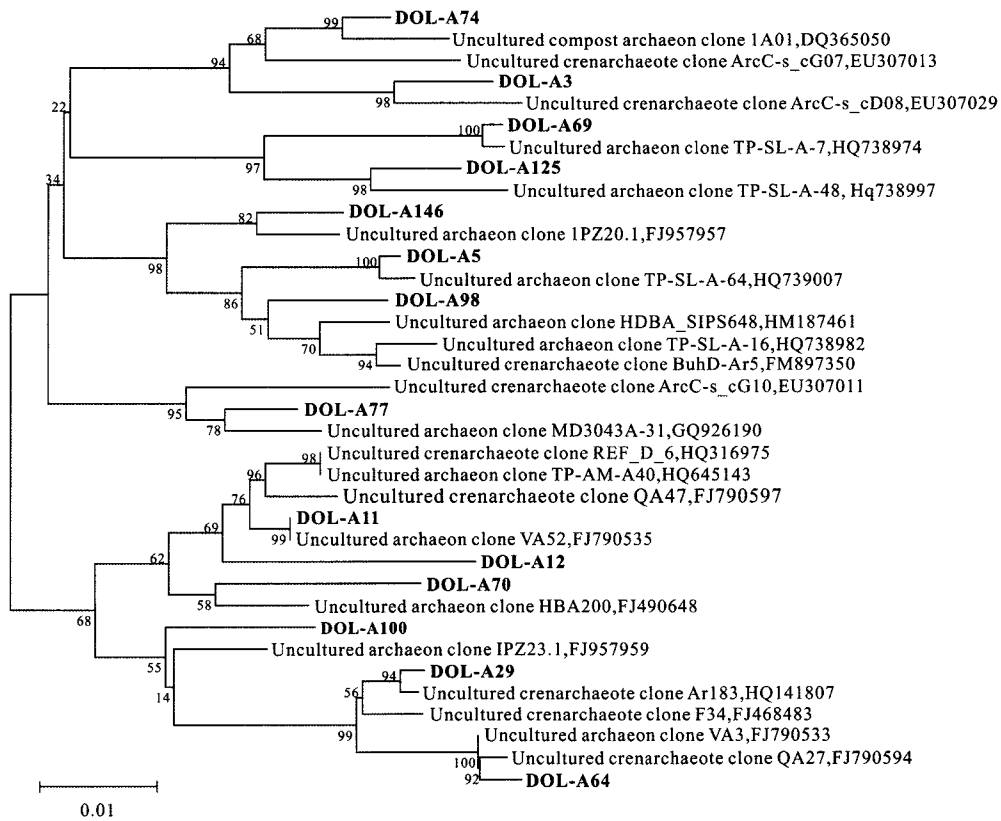


图 3 白云岩表生古菌 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic relationship based on 16S rDNA gene sequences of clones from dolomite (in bold type)

隆(EU307029)的相似率为 98%，来源于土壤团聚体^[30]。由此可见，白云岩 16S rDNA 克隆文库中的大部分克隆都属于分布于土壤环境的种类。

基因型 DOL-A64 和 DOL-A11 代表了文库 32.7% 的克隆子，其与数据库中最相似序列的相似率均高于 98%，来源于西藏沙漠环境的凝灰岩样品(GenBank 描述: FJ790533, FJ790535)。除了土壤和岩石环境，白云岩样品表生古菌克隆在数据库中的最相似序列克隆还来源于其他各种各样的环境，比如基因型 DOL-A70、DOL-A74 和 DOL-A77 在数据库中的最相似克隆分别来源于泥火山、堆肥和深海沉积物(GenBank 描述: HQ654831, DQ365050, GQ926190)。

3.4 石灰岩表生古菌 16S rDNA 多样性分析

3.4.1 16S rDNA 序列比对结果

13 个石灰岩表生古菌 16S rDNA 克隆代表序列，与 GenBank 数据库比对获得其最高相似序列(表 3)，其相似率为 96%~100%，有 10 个序列(82.7% 克隆)相似率≥97%，有 3 个序列(17.3% 克隆)序列相似率为 96%。所有代表序列在数据库中的最相似序列均是未可培养古菌，表明石灰岩 16S rDNA 文库

中的古菌克隆都属于未可培养类群。

3.4.2 古菌 16S rDNA 系统发育分析

系统发育树结果(图 4)表明，来源于石灰岩 16S rDNA 克隆文库的 13 个基因型均属于泉古菌门(Crenarchaeota)，这和白云岩表生古菌结果一致。

基因型 LIM-A57，代表了石灰岩文库 33.3% 的克隆数，和基因型 LIM-A76(2.3% 克隆)与数据库中最相似序列的相似率均为 97%，且都来源于若尔盖高原湿地土壤(GenBank 描述: FJ957962, FJ957957)。基因型 LIM-A123(26.7% 克隆)和 LIM-A81(3% 克隆)和数据库中最相似序列的相似率高达 99%，它们来源于青藏高原高海拔草地土壤(GenBank 描述: HQ645136, HQ645114)。基因型 LIM-A50、LIM-A51 和 LIM-A81 在数据库中的最相似序列都来源于新疆疏勒河沿线永久冻结带土壤样本(GenBank 描述: HQ738974, HQ739002, HQ645114)。基因型 LIM-A114 代表了 8% 的克隆，它在数据库中的最相似序列来源于土壤团聚体^[30]。另外，基因型 LIM-A88 和来源于农业土壤的克隆聚为一枝。

表 3 石灰岩表生古菌 16S rDNA 文库代表序列分类表

Table 3 Phylogenetic classification of representative archaeal 16S rDNA sequences obtained from limestone

基因型 (登录号)	所占比例/ % ^a	GenBank 上最相似序列 (登录号)	相似度/ %
LIM-A7 (JF737822)	2.70	Uncultured compost archaeon clone 1A12 (DQ365061)	98.00
LIM-A50 (JF737823)	0.60	Uncultured archaeon clone TP-SL-A-7 (HQ738974)	99.00
LIM-A51 (JF737824)	1.00	Uncultured archaeon clone TP-SL-A-57 (HQ739002)	96.00
LIM-A57 (JF737825)	33.30	Uncultured archaeon clone 2PZ8.1 (FJ957962)	97.00
LIM-A63 (JF737826)	6.70	Uncultured archaeon clone N8-E7 (FN691539)	97.00
LIM-A74 (JF737827)	8.30	Uncultured crenarchaeote clone A02-arc (GQ249641)	96.00
LIM-A76 (JF737828)	2.30	Uncultured archaeon clone 1PZ20.1 (FJ957957)	97.00
LIM-A81 (JF737829)	3.00	Uncultured archaeon clone TP-AM-A3 (HQ645114)	99.00
LIM-A88 (JF737830)	5.00	Uncultured archaeon clone W5P2-D12 (GQ871411)	100.00
LIM-A103 (JF737831)	0.70	Uncultured archaeon clone UMV3A164 (HM584831)	99.00
LIM-A114 (JF737832)	8.00	Uncultured crenarchaeote clone ArcC-s_cE12 (EU307019)	96.00
LIM-A123 (JF737833)	26.70	Uncultured archaeon clone TP-AM-A28 (HQ645136)	99.00
LIM-A136 (JF737834)	1.70	Uncultured crenarchaeote clone QA47 (FJ790597)	97.00

注:^a所占比例是指属于该基因型的克隆数占白云岩 16S rDNA 克隆文库总克隆数的百分比。

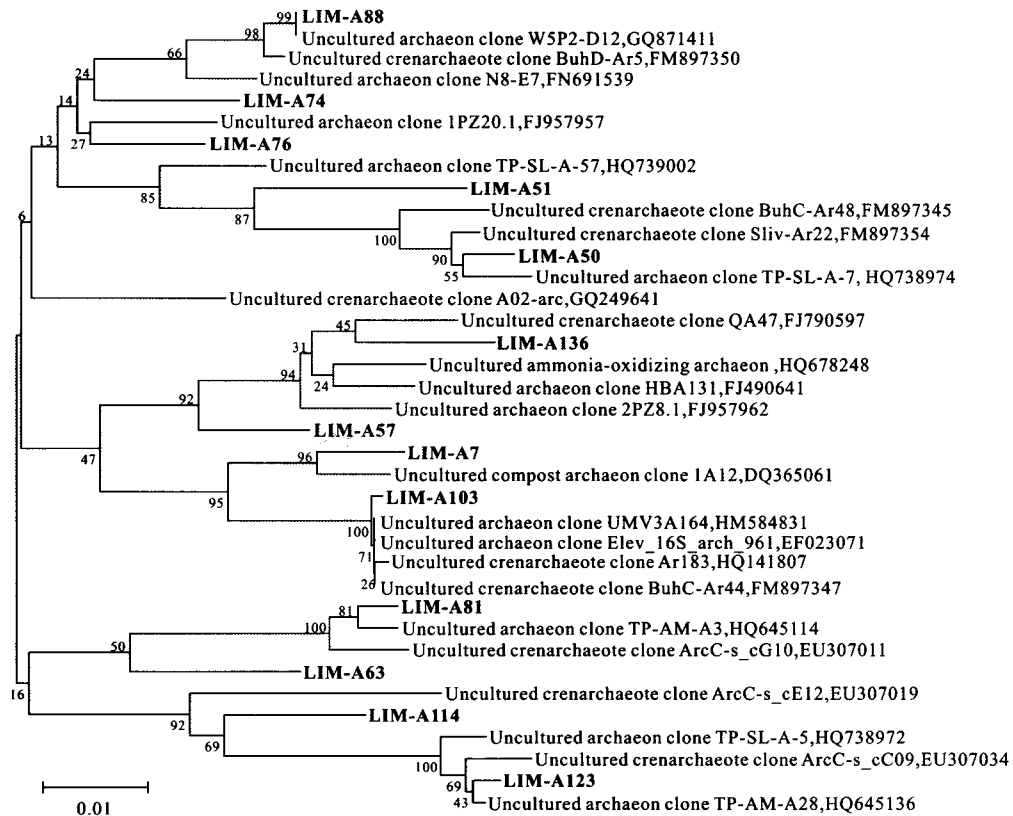


图 4 石灰岩表生古菌 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic relationship based on 16S rDNA gene sequences of clones from limestone (in bold type)

除了土壤环境,基因型 LIM-A136 和来源于西藏中部高海拔冻土带石英路面中的克隆子 (FJ790597) 聚为一枝 (GenBank 描述: FJ790597)。

基因型 LIM-A7 和 LIM-A103 在数据库中的最相似序列分别来源于堆肥和泥火山 (GenBank 描述: DQ365061, HM584831)。

4 结论与讨论

一直以来,微生物学家普遍认为古菌生活在一些极端环境中,比如高温、高酸碱度、高盐及厌氧环境等^[9-10]。但是,继1992年 Delong 等^[31]在海洋包括近海和沿岸海区首先发现存在丰富的海洋浮游古菌后,古菌在淡水和海洋系统^[19, 32-34]、土壤系统^[20, 35-37]、软体动物体内系统^[38-39]等环境中陆续被发现。本项研究结果表明,在贵州喀斯特地区的白云岩和石灰岩表生环境中也有古菌存在。

根据白云岩和石灰岩表生古菌多样性指数及稀释曲线可知,这两种环境中的古菌多样性程度都较低,且比细菌和真菌多样性程度低得多^[7-8],同时白云岩表生古菌多样性程度稍高于石灰岩,这和细菌以及真菌多样性的结果一致^[7-8]。

系统进化分析可见,白云岩和石灰岩表生古菌序列均属于泉古菌门(Crenarchaeota),未发现广古菌门(Euryarchaeota)、初古菌门(Korarchaeota)和纳米古菌门(Nanoarchaeota)的古菌序列。本研究所获得的古菌的同源序列全部是未可培养的,由于目前对未可培养的古菌分类比较混乱,因此本研究未对所获得的古菌作进一步的分类。白云岩和石灰岩表生古菌的同源序列大多来自于各种土壤环境(如若尔盖高原湿地土壤、新疆疏勒河沿线永久冻结带土壤和青藏高原高海拔草地土壤等)以及岩石环境(如凝灰岩和石英),表明白云岩和石灰岩表生古菌多是土壤和岩石环境中的古菌类型,也有少数古菌的同源序列来源于一些极端环境,如泥火山、堆肥和深海等。Horath and Bachofen^[5]研究阿尔卑斯山脉白云岩石生生物多样性时,古菌类群仅检测到泉古菌门,且最相似序列都是不可培养克隆;Wong 等^[6]研究裸露的白云岩悬崖上的微生物类群时也检测到泉古菌,未发现其他古菌类群。这些研究结论均与本项实验结果相符,说明泉古菌门在碳酸盐岩石生环境中普遍存在且为优势古菌类群。

泉古菌门是古菌域的一个重要组成部分,它处在整个原核生物系统发育树的底部。绝大多数的泉古菌为无机化能型微生物^[40-41],它们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^[41-42]。Leininger 等^[43]和 Francis 等^[44]发现泉古菌在陆地和海洋生态系统的氮物质循环中起着非常重要的作用。本研究发现,碳酸盐岩表生环境中,泉古菌亦为主要古菌类群,但其在喀斯特地区物质循环中的作用究竟

如何,尚待进一步探讨。

贵州喀斯特地区碳酸盐岩表生微生物多样性丰富,有自养微生物(如有固氮和光合作用的蓝细菌和非产氧光合的绿非硫细菌^[7]),也有异养微生物(如变形细菌、放线菌、酸杆菌、拟杆菌、厚壁菌和异养的真菌^[7-8]及泉古菌)。碳酸盐岩表生自养微生物能够固定空气中的碳素和氮素,成为岩石环境主要的初级产品生产者,为异养微生物的生存提供营养物质。但岩石环境数量庞大的异养类群仅靠自养微生物提供的营养物质生存是远远不够的,它们还通过拦截空气、雨水中偶尔带来的少量土粒和养料来维持生存。不同类群微生物相互协作和共生以留住微量水分和汲取有限的养料,进而维持生命活动和种群延续。一旦环境条件(如温度和湿度)变得适宜生长,则可迅速繁殖、蔓延,加速对矿物的风化,并进入岩石缝隙,扩大生存空间^[1, 45-46]。喀斯特地区碳酸盐岩表生微生物在碳酸盐岩风化成土这一漫长的地质演化过程中发挥了重要作用,但有关其表生古菌群落对岩石的风化作用及其与表生细菌、真菌的关系究竟如何,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 连宾. 碳酸盐岩风化成土过程中的微生物作用[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2010, 29(1): 52-56.
- [2] 张天汉, 代玉, 王智慧, 等. 贵州关岭县喀斯特峰丛石漠区苔藓群落生态特征[J]. 中国岩溶, 2014, 33(2): 192-200.
- [3] Gorbushina A A. Life on the rocks [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(7): 1613-1631.
- [4] Hose L D, Palmer A N, Palmer M V, et al. Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment [J]. Chemical Geology, 2000, 169(3/4): 399-423.
- [5] Horath T, Bachofen R. Molecular Characterization of an Endolithic Microbial Community in Dolomite Rock in the Central Alps (Switzerland) [J]. Microbial Ecology, 2009, 58(2): 290-306.
- [6] Wong F K Y, Lau M C Y, Lacap D C, et al. Endolithic Microbial Colonization of Limestone in a High-altitude Arid Environment [J]. Microbial Ecology, 2010, 59(4): 689-699.
- [7] Tang Y, Lian B. Diversity of endolithic fungal communities in dolomite and limestone rocks from Nanjiang Canyon in Guizhou karst area, China [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(6): 685-693.
- [8] Tang Y, Lian B, Dong H L, et al. Endolithic bacterial communities in dolomite and limestone rocks from the Nanjiang Canyon in Guizhou karst area (China) [J]. Geomicrobiology Journal, 2012, 29(3): 213-225.
- [9] Takai K, Moser D P, DeFlaun M, et al. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5750-5760.

- [10] 姜丽晶, 彭晓彤, 周怀阳, 等. 非培养手段分析珠江口淇澳岛海岸带沉积物中的古菌多样性[J]. 海洋学报, 2008, 30(4): 114-122.
- [11] 李曙光, 皮响丹, Zhang Chuan-lun. 古菌研究及其展望[J]. 中国科学技术大学学报, 2007, 37(8): 830-838.
- [12] Volkl P, Huber R, Drobner E, et al. Pyrobaculum-Aerophilum Sp-Nov. a Novel Nitrate-Reducing Hyperthermophilic Archaeum [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(9): 2918-2926.
- [13] Bonnie C, Sandy Y, Ken F. Archaeal habitats—from the extreme to the ordinary [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(2): 73-116.
- [14] Schleper C, Jurgens G, Jonscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(6): 479-488.
- [15] Galand P E, Lovejoy C, Vincent W F. Remarkably diverse and contrasting archaeal communities in a large arctic river and the coastal Arctic Ocean [J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006, 44(2): 115-126.
- [16] Herndl G J, Reinthaler T, Teira E, et al. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2303-2309.
- [17] Walsh D A, Papke R T, Doolittle W F. Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(10): 1655-1666.
- [18] Yan B, Hong K, Yu Z N. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones [J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(5): 566-571.
- [19] Beja O, Koonin E V, Aravind L, et al. Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 335-345.
- [20] Bintrim S B, Donohue T J, Handelsman J, et al. Molecular phylogeny of archaea from soil [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(1): 277-282.
- [21] Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments [J]. Bioinformatics, 2004, 20(14): 2317-2319.
- [22] Cole J R, Chai B, Marsh T L, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(1): 442-443.
- [23] Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic Local Alignment Search Tool [J]. Journal of Molecular biology, 1990, 215(3): 403-410.
- [24] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(25): 4876-4882.
- [25] Kimura M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide-Sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [26] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [27] Good I J. The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters [J]. Biometrika, 1953, 40(3-4): 237-264.
- [28] Shuang J L, Zhang X Y, Zhao Z Z, et al. Bacterial phylogenetic diversity in a Spartina marsh in China [J]. Ecological Engineering, 2009, 35(4): 529-535.
- [29] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities [J]. FEMS Microbial Ecology, 2003, 43(1): 1-11.
- [30] Hansel C M, Fendorf S, Jardine P M, et al. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1620-1633.
- [31] Delong E F. Archaea in Coastal Marine Environments [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [32] MacGregor B J, Moser D P, Alm E W, et al. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(3): 1178-1181.
- [33] Stein L Y, Jones G, Alexander B, et al. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir [J]. Fems Microbiology Ecology, 2002, 42(3): 431-440.
- [34] Stein L Y, La Duc M T, Grundl T J, et al. Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments [J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(1): 10-18.
- [35] Buckley D H, Graber J R, Schmidt T M. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4333-4339.
- [36] Jurgens G, Saano A. Diversity of soil Archaea in boreal forest before, and after clear-cutting and prescribed burning [J]. Fems Microbiology Ecology, 1999, 29(2): 205-213.
- [37] Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(9): 787-797.
- [38] Lee E Y, Lee H K, Lee Y K, et al. Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea [J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20(4/6): 299-304.
- [39] Margot H, Acebal C, Toril E, et al. Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus Axinella [J]. Marine Biology, 2002, 140(4): 739-745.
- [40] Dawson S C, DeLong E F, Pace N R. Phylogenetic and ecological perspectives on uncultured Crenarchaeota and Korarchaeota [C]. // Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The prokaryotes. New York: Springer, 2006; 281-289.
- [41] Spear J R, Walker J J, McCollom T M, et al. Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

- States of America, 2005, 102(7):2555-2560.
- [42] Stahl D A, de la Torre JR. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea [J]. Annual Review Microbiology, 2012, 66(4):83-101.
- [43] Leininger S, Urich T, Schloter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils [J]. Nature, 2006, 442(7104): 806-809.
- [44] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(41):14683-14688.
- [45] Lian B, Chen Y, Tang Y. Microbes on carbonate rocks and pedogenesis in karst regions [J]. Journal of Earth Science, 2010, 21(S1):293-296.
- [46] 连宾, 袁道先, 刘再华. 岩溶生态系统中微生物对岩溶作用影响的认识[J]. 科学通报, 2011, 56(26): 2158-2161.

Archaeal community structure and diversity of the carbonate rocks in karst regions, Guizhou: A case study of the Nanjiang canyon

TANG Yuan¹, LIAN Bin², CHENG Jianzhong¹

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550081, China;

2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract Guizhou is one of the three largest karst regions in the world where vast expanses of karst develop well. The carbonate rock area is $13 \times 10^4 \text{ km}^2$, covering 73% of total land surface area of the province. Carbonate rock is very challenging for organisms to live in it owing to its features, such as arid environment, nutritional deficiency, and great temperature fluctuations. However, there are various microorganisms on its surface and in its cracks, which play a crucial role in biogeochemical cycle. The Nanjiang canyon is a typical karst canyon, which is praised as "Karst Ecosystem Museum". It is located in Kaiyang County of Guizhou Province, southwestern China. And there are a lot of exposed carbonate rocks in this area. In order to study the archaeal diversity of carbonate rocks in Guizhou karst areas, we investigated the archaeal community structure in dolomite and limestone rocks from Nanjiang canyon using 16S rDNA gene clone libraries combined with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis. Genomic DNA of rock samples were collected using the UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit. PCR amplification of the archaeal 16S rRNA gene was performed using universal primers 27F and 958R. The PCR products were ligated into the pGEM-T Easy Vector System I and transformed into competent *E. coli* JM109 cells and then constructed the dolomite and limestone clone libraries. Randomly selected 300 positive clones from each clone library were identified by RFLP with restriction endonuclease *Msp* I. In total, 14 and 13 genotypes were obtained from dolomite and limestone clone libraries, respectively. The rarefaction curves indicate that the major part of the diversity in the clone libraries was covered. The coverage C values of dolomite and limestone clone libraries are 95.4% and 91.3%, and Shannon—Wiener indexes are 2.14 and 1.93, respectively. The diversity of indexes shows that the diversity of archaea is much lower than the bacterial and fungal diversity, and the archaeal diversity of dolomite is slightly higher than that of limestone. The phylogenetic analysis reveals that all clones from the two clone libraries are affiliated to the phylum Crenarchaeota. The similarities between the representative clone sequences from carbonate rocks and their closest sequences deposited in GenBank range from 96% to 100% and all of the matches are from uncultured archaeal clones. Meanwhile, most of the archaeal sequences are closely related to environmental clones from soil and rock environments.

Key words dolomite, limestone, archaea, diversity, karst

(编辑 黄晨晖)