

# 腾冲两热泉古菌多样性及系统发育的初步分析

宋兆齐<sup>1</sup> 陈经全<sup>1</sup> 职晓阳<sup>1</sup> 黄志勇<sup>2</sup> 张传伦<sup>2</sup> 李文均<sup>1\*</sup>

(1. 云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室 昆明 650091)

(2. Department of Marine Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA)

**摘要:** 通过构建 16S rRNA 基因片段的克隆文库对腾冲热海两温泉中泉古菌的多样性和系统发育关系进行了初步的研究。一共得到 18 个泉古菌克隆序列, 可分为 12 个 OTUs, 两温泉的克隆序列与已知 GenBank 上关系最近序列的平均相似性较低, 无名泉为 92.56%, 热爆区为 93%。从基于 16S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树来看, 74℃ 的无名泉样点中既有属于超高温环境类群的泉古菌, 同时又有属于和常温环境较接近的泉古菌; 45℃ 的热爆区样点的泉古菌, 相对来说更接近于常温类群。本次研究表明, 腾冲热泉与世界其它同类热泉之间的泉古菌类群存在着一定的差异; 而且两实验样点代表了超高温和高温环境泉古菌逐渐向常温过度的两个重要环境。

**关键词:** 泉古菌, 多样性, 系统发育, 16S rRNA 基因, 克隆文库, 热泉, 腾冲

## Crenarchaeal Diversity and Phylogenetic Analysis of Two Hot Springs in Tengchong

SONG Zhao-Qi<sup>1</sup> CHEN Jing-Quan<sup>1</sup> ZHI Xiao-Yang<sup>1</sup> HUANG Zhi-Yong<sup>2</sup>  
ZHANG Chuan-Lun<sup>2</sup> LI Wen-Jun<sup>1\*</sup>

(1. The Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

(2. Department of Marine Sciences, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA)

**Abstract:** The crenarchaeal diversity and phylogenesis of two hot springs in Tengchong were investigated and analyzed using the construction of 16S rRNA gene clone libraries. Total 18 crenarchaeal sequences were obtained and divided into 12 OTUs. The average similarities between the clone sequences from Wuming hot spring and Rebao hot spring and their closest sequences deposited in GenBank is 92.56% and 93%, respectively. Based on the phylogenetic tree constructed by using crenarchaeal 16S rRNA gene sequences, Wuming hot spring not only have hyperthermophilic crenarchaeal clusters but also have the crenarchaeal clusters that have close phylogenetic relationship with non-thermophilic crenarchaeota. And most of the crenarchaeota in Rebao spring distribute in normal temperature groups. This study showed that crenarchaeal clusters in Tengchong hot springs have some differences with other hot springs in the world, and these springs represent two important environments for investigating the evolutionary origin of the non-thermophilic

基金项目: 国家“973 项目”(No.2004CB719601); 国家自然科学基金(No.30600001); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-05-0821); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才基金(No. 2005PY01-12)

\* 通讯作者: Tel & Fax: 0871-5033335; ✉: wjli@ynu.edu.cn, liact@hotmail.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2007-07-30; 接受日期: 2007-09-12

Crenarchaeoone library.

**Keywords:** Crenarchaeota, Diversity, Phylogenesis, 16S rRNA gene, Clone library, Hot spring, Tengchong

上世纪 80 年代末, Woese 提出了著名的“三域学说”, 将整个生物界分为真细菌域(Bacteria)、古菌域(Archaea)和真核生物域(Eucaryota)3 个部分。相对于细菌域和真核生物域, 古菌领域的研究起步较晚, 还不算透彻。最新的NCBI Taxonomy Browser(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>)显示, 古菌域分为广古菌门(Euryarchaeota)、泉古菌门(Crenarchaeota)、初古菌门(Korarchaeota)和纳古菌门(Nanoarchaeota)。由于缺乏足够的纯培养物和 16S rRNA 基因序列信息, 目前初古菌门和纳古菌门的分类地位还不能完全确定<sup>[1]</sup>, 研究相对普遍的是泉古菌和广古菌两个门。

目前获得纯培养的泉古菌, 主要是从高温和超高温环境中分离出的。但随着免培养技术(Culture-independent techniques)和基于 16S rRNA 基因分子系统发育分析的不断进步和完善, 研究者们已经证实了非高温环境中普遍存在有泉古菌, 如: 土壤系统<sup>[2-4]</sup>、淡水和海洋系统<sup>[5-9]</sup>及软体动物体内系统<sup>[10,11]</sup>等。2005 年, Könneke 等人通过连续富集培养, 从常温海水环境中获得了 1 株泉古菌, 这是目前为止得到的唯一 1 株常温环境下的泉古菌纯培养物, 而且具有很强的氨氧化功能<sup>[12]</sup>。这些环境中, 泉古菌在种类上和数量上的优势以及其鲜明的生理代谢方式似乎都表明, 其在所处的生态系统中扮演着重要的角色<sup>[12-14]</sup>。

但是目前学者们对泉古菌的生态学研究最多的集中在高温、超高温环境(70℃)和常温环境(30℃), 对于两温度之间环境系统的研究还相对较少。而针对陆地热泉系统中泉古菌多样性的研究也主要集中在美国黄石公园<sup>[15,16]</sup>、冰岛<sup>[17,18]</sup>及意大利<sup>[19]</sup>等地区。国内有关这方面的报道还不多。

我国西南高原有众多热泉分布, 而且温度、pH 值以及水化学成分差异较大, 这为我们开展该环境微生物多样性研究提供了丰富和宝贵的资源。本研究针对云南腾冲热海国家地质公园内的两处温度差异较大的热泉(74℃和 45℃), 通过免培养法构建 16S rRNA 基因片段的克隆文库对其环境中泉古菌的多样性和系统发育关系进行了研究和分析, 有望

为以后国内热泉生态系统的深入研究打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:** 2006 年 4 月, 样品采自于腾冲热海国家地质公园内两温泉。样品采出后立刻放入干冰中黑暗保藏, 带回实验室后 -70℃ 黑暗保藏。运用 Hach® pH-meter equipped 测量样点的温度和 pH 值; 运用 eTrex GPS 测量样点所处的经纬度。

**1.1.2 主要仪器和试剂:** 溶菌酶和蛋白酶 K(Amresco); EX Taq 酶, 限制性内切酶 *Hha* I 和 *Hae* III(TaKaRa); DNA 胶回收试剂盒, T4 载体连接试剂盒(TaKaRa); eTrex GPS; Hach® pH-meter equipped。

### 1.2 环境总 DNA 的提取及泉古菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 特异性扩增

**1.2.1 环境总 DNA 的提取:** 提取方法主要参照 Zhou 等<sup>[20]</sup>的方法并根据样品特点做部分修改。采用胶回收试剂盒, 按照说明书, 对粗提 DNA 进行纯化。

**1.2.2 泉古菌 16S rRNA 基因片段的 PCR 特异性扩增:** 扩增引物为泉古菌特异性引物 Cren7F: 5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGACC-3' 和 Cren518R: 5'-GCTGGTWTACCGCGCGGCTGA-3'<sup>[21]</sup>, PCR 扩增程序为: 95℃ 5 min; 反应体系保持在 94℃ 加入 EX Taq 酶; 94℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 8min; 4℃ 保存。PCR 产物经胶回收试剂盒纯化备用。

### 1.3 克隆文库构建

纯化后的 PCR 产物通过连接试剂盒连接进 T4 载体, 将连接好的载体转化入 *E. coli* JM109 感受态细胞。随机挑取克隆, 采用特异引物 Cren7F 和 Cren518R 的 PCR 扩增进行插入片段的筛选。

### 1.4 扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析 (ARDRA)

将上一步得到的克隆插入片段的 PCR 产物纯化处理后, 使用 *Hha* 和 *Hae* 按照产品说明进行双酶切。取 10 μL 酶切产物进行 3 h 15% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 运用凝胶成像分析软件进行电泳图谱分析。根据分析结果, 选出相应的克隆送上海生

工生物工程有限公司(Sangon)进行测序。

### 1.5 基于 16S rRNA 基因片段序列的系统发育分析

运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP (Ribosomal Database Project) 在线数据库(<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi>)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。根据搜索结果并参照有关文献[15–19], 选取参照序列; 用 Clustal\_X 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 3.1 和 PHYLIP 软件构建系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 样点特征

无名泉样点(WM)温度为 74℃, pH 值为 7.5, 采集物为灰色沙石沉积物; 热爆区样点(RB)温度为 45℃, pH 值为 7.4, 采集物为绿色菌藻席。

### 2.2 环境总 DNA 的提取及 PCR 特异性扩增

采用改良的 Zhou 等<sup>[20]</sup>的方法, 从两热泉样品中都获得了DNA片段大小主要集中在 21 kb 左右。纯化后进行PCR扩增, 得到的产物通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后观察, 结果均为单一目的条带, 片段大小在 500 bp 左右, 这表明并无明显非特异性扩增现象出现。

### 2.3 克隆文库构建及 ARDRA 分析

扩增产物经转化后从每个样点的 LB 平板上随机挑出 70 个克隆, 采用特异引物 Cren7F 和 Cren518R 的 PCR 扩增, 进行插入片段的筛选后, 两样点共得到 127 个阳性克隆。通过 *Hha* 和 *Hae* 的双酶切, 将得到的阳性克隆进行 ARDRA 分析。经分析软件对酶切电泳图谱分析后, 共得到 11 种存在差异的酶切图谱类型。

### 2.4 基于 16S rRNA 基因片段序列的系统发育分析

主要挑出代表不同酶切图谱类型的克隆进行测序, 同时考虑内切酶本身的局限性, 增加了优势图谱类型的测序数量。共得到 18 个 DNA 序列, 其中热爆区得到 7 个, 无名泉得到 11 个, 运用 CHECK\_CHIMERA 程序在 RDP 在线数据库中对得到的序列进行嵌合体检验, 发现并无明显的嵌合体情况出现。通过 DOTUR 软件分析, 将得到的 18 个序列分成了 12 个 OTUs(可操作分类单元; 相似性大于 98%的可划为 1 个 OTU)。得到的序列在 GenBank 数据库中进行相似性搜索, 有 4 个 OTU 与已经有效发表的序列相似性较高( $\geq 95\%$ ), 其中 OTU7 和 OTU10 达到最高为 98%; 另外的 8 个 OTU 与有效发表的相似性较低( $< 95\%$ ), 其中 OTU6 最低为 84%。无名泉样点序列与已知序列的平均相似性为 92.56%, 热爆区样点为 93%(表 1)。

表 1 样点克隆的 DOTUR 软件和在线 BLAST 分析结果  
Table 1 Analytic results of crenarchaeal clones by DOTUR program and Blast

Clones No.	OTU No.	The Most Related Close Sequence	GenBank Accession No.	Similarity (%)	Average Similarity (%)
WM_1	OTU1	Uncultured crenarchaeote clone pSL17	U63339	95	92.56
WM_3	OTU2	Uncultured archaeon clone Hverd014N	DQ441506	94	
WM_10	OTU3	Uncultured crenarchaeote clone a87Y32	DQ417485	91	
WM_12	OTU4	Uncultured crenarchaeote clone a87Y32	DQ417485	92	
WM_13 WM_56	OTU5	Uncultured Desulfurococcales archaeon clone YNP_BP_A49	DQ243731	96	
WM-17	OTU6	Uncultured archaeon Arc.148	AF005763	84	93
WM-16	OTU7	Uncultured archaeon clone Hverd014N	DQ441506	98	
WM_27 WM_28	OTU8	Uncultured crenarchaeote clone a87Y32	DQ417485	91	
WM_38	OTU9	Uncultured crenarchaeote clone pSL17	U63339	92	
RB_14 RB_16 RB_21 RB_45	OTU10	Uncultured crenarchaeon clone FJQFA2	AM039531	98	
RB_46	OTU11	Uncultured crenarchaeote clone HAuD-LA33.	AB113633	87	
RB_62 RB_65	OTU12	Uncultured crenarchaeote clone D1Ru	DQ417488	94	

采用邻接法和最大简约法, 分别用MEGA 3.1和PHYLP 软件构建的系统发育树在树型上没有较大差别。从得到的系统发育树来看所有的 18 个序列都属于泉古菌门, 而树中的泉古菌序列又分化出两个庞大的支系。无名泉(WM)样点有 6 个是属于已经从高温环境广泛得到纯培养, 并且分类地位相对明确的热变形菌纲(Thermoprotei)这一大枝。热爆区(RB)样点则没有属于热变形菌纲的序列。泉古菌门的另一大支系主要由高温、中温和常温环境的免培养序列组成, 两个样点的序列在这一大枝都有分

布。其中热爆区样点的全部 7 个序列又相对集中分布在一个较小的类群中。

## 2.5 序列登录号(Accession number)

本次研究所得序列的 GenBank 登录号为: EU009502-EU009512, EU009514-EU009520。

## 3 讨论

基于 16S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树(图 1)显示: WM\_13 和 WM\_56 的进化位置位于除硫球菌目(Desulfurococcales)内的热网菌科

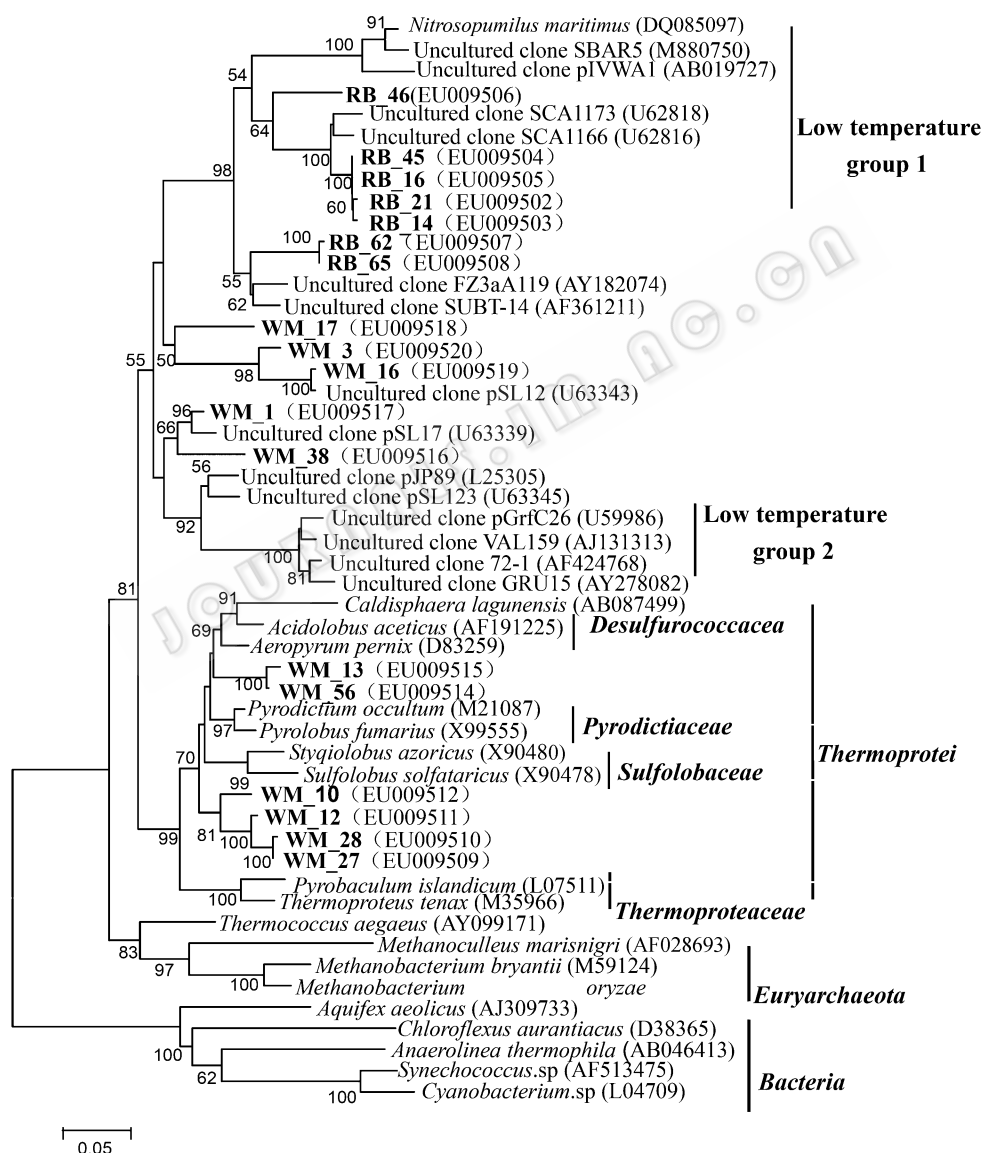


图 1 基于腾冲两热泉的 16S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of crenarchaeal environmental 16S rRNA gene sequences from WM and RB hot-springs. Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbour-joining analysis of 1000 resampled datasets.

(Pyrodictiaceae)与除硫球菌科(Desulfurococcaceae)之间,而且与它们存在着较大的距离(相似性在 93%左右),这表明其有可能代表一个分类地位较高的类群。WM\_10、WM\_12、WM\_28 和 WM\_27 在热变形菌目(Thermoproteales)和除硫球菌目之间,单独成枝,而且并没有已获得纯培养的古菌出现,其可能代表了一个分类地位更高的类群。

系统发育树的另一大分枝主要由高温、中温和常温环境的免培养序列组成,它又分化两个分枝,WM\_1 和 WM\_38 与美国黄石公园热泉中的环境克隆pSL17<sup>[15]</sup>的距离较近,处在这一分枝最末端的为常温环境克隆(Low temperature group 2); WM\_17、WM\_3 和 WM\_16 与pSL12 分布在同一枝上,pSL12 被认为是热泉环境中,较接近于常温泉古菌类群的代表克隆<sup>[1]</sup>。

热爆区的克隆分布相对比较集中, RB\_62 和 RB\_65 与冰岛热泉的环境克隆SUBT-14<sup>[17]</sup>、海洋热泉克隆FZ3aA119<sup>[22]</sup>聚在一枝。RB\_45、RB\_16、RB\_21 和 RB\_14 代表的OTU则和常温环境克隆SCA1173、SCA1166<sup>[2]</sup>处在同一类群, RB\_46 处在一个过度的位置,而另一小枝则由目前分离到的唯一一株常温泉古菌(*Nitrosopumilus maritimus*)和常温环境序列组成。

2001 年, Dawson和DeLong通过当时已有的泉古菌 16S rRNA 基因序列的系统发育分析,提出了常温环境泉古菌是从高温环境中逐步进化而来的观点<sup>[1]</sup>。从本次的 16S rRNA 基因片段的系统发育树上可以看出, 74℃ 的无名泉样点中既有属于超高温环境类群的泉古菌,同时又有属于和常温环境较接近的泉古菌; 45℃ 的热爆区样点的泉古菌,相对来说则更接近于常温类群。这一结果为他们的观点提供了更加丰富的证据。

从 Blast的结果来看,本次研究的样点克隆序列与已知 GenBank 上关系最近序列的平均相似性不高(无名泉为 92.56%,热爆区为 93%)(表 1)。具体来说,克隆 WM\_1 和 WM\_38 与美国黄石公园类似温度环境下的泉古菌克隆 pSL17 的相似性分别为 95%和 92%。这表明,即使环境相似的热泉,其包含的泉古菌类群之间也存在有一定的差异。

另外,从本次实验结果来看热爆区样点的OTU的数量并不多,主要有两方面原因:一是随机挑的克隆数只有 70 个,这可能不能完全覆盖样点的泉

古菌物种;二是国外学者已经证明陆地热泉环境本身的泉古菌物种就不是很丰富<sup>[23,24]</sup>。

总之,无论是常温环境,还是中、高温环境,即使是已经获得大量纯培养的热变形菌纲这一类群中,都存在有大量未知的泉古菌。它们之间的进化关系已经通过免培养技术得到初步证明,但这还需进一步得到纯培养的证据。2005 年, Leininger和Francis先后在Nature和PANS上发表论文,证明了这些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<sup>[13,14]</sup>,那么泉古菌在热泉生态系统的物质循环中又扮演着什么样的角色呢?这些都将会是今后关于热泉环境系统非常有意义的研究课题。

## 参 考 文 献

- [1] Dawson S, DeLong EF. Phylogenetic and ecological perspectives on uncultured Crenarchaeota and Korarchaeota. In: Falkow, S, Rosenberg E, Schleifer KH, *et al.* *The Prokaryotes*. vol. 3.7. New York: Springer, 2001, pp. 281–289.
- [2] Bintrim SB, Donohue TJ, Handelsman J, *et al.* Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(1): 277–282.
- [3] Jurgens G, Saano A. Diversity of soil Archaea by phylogeny, PCR-RFLP and DNA-hybridization of 16S rRNA in intact, clear-cut, and clear-cut followed by prescribed burning boreal forest. *FEMS Microb Ecol*, 1999, **29**(2): 205–213.
- [4] 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. *Environ Microbiol*, 2003, **5**(9): 787–797.
- [5] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(12): 5685–5689.
- [6] MacGregor BJ, Moser DP, Alm EW, *et al.* Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(3): 1178–1181.
- [7] Stein LY, La Duc MT, Grundl TJ, *et al.* Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ Microbiol*, 2001, **31**(1): 10–18.
- [8] Stein LY, Jones G, Alexander B, *et al.* Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, **42**(3): 431–440.
- [9] Beja O, Koonin EV, Aravind L, *et al.* Comparative genomic analysis of archaeal genotypic variants in a single population and in two different oceanic provinces. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 335–345.
- [10] Margot H, Acebal C, Toril E, *et al.* Consistent association

- of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axi-nella*. *Mar Biol*, 2002, **140**(4): 739–745.
- [11] Lee EY, Lee HK, Lee YK, *et al.* Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea. *Biomol Eng*, 2003, **20**(4-6): 299–304.
- [12] Könneke M, Bernhard A, de la Torre JR, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, **437**(7058): 543–546.
- [13] Leininger S, Urich T, Schlöter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, **442**(7104): 806–809.
- [14] Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, *et al.* Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(41): 14683–14688.
- [15] Susan M Barns, Ruth E Fundyga, Mattheew W Jefries, *et al.* Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(5): 1609–1613.
- [16] Susan M Barns, Charles F Delwicer, Jeffrey D Palmer, *et al.* Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(17): 9188–9193.
- [17] Marteinsson VT, Hauksdottir S, Hobel CF, *et al.* Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(9): 4242–4248.
- [18] Thomas Kvist, Birgitte K Ahring, Peter Westermann. Archaeal diversity in Icelandic hot springs. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **59**(1): 71–80.
- [19] Kvist T, Mengeweine A, Manzei S, *et al.* Diversity of thermophilic and non-thermophilic Crenarchaeota at 80 degrees C. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **244**(1): 61–68.
- [20] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316–322.
- [21] GB Slobodkina, AI Slobodkin, TP Tourova, *et al.* Detection of a Culturable Hyperthermophilic Archaeon of the Genus *Sulfolobococcus* in an Anaerobic Digestor Operated in a Thermophilic Regime. *Microbiology*, 2004, **73**(3): 616–620.
- [22] Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR, *et al.* Incidence and diversity of microorganisms within the walls of an active deep-sea sulfide chimney. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(6): 3580–3592.
- [23] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, *et al.* Novel diversity on level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol*, 1998, **180**(2): 366–376.
- [24] Spear JR, Walker JJ, McCollom TM, *et al.* Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(7): 2555–2560.

**编辑部公告****《微生物学通报》编辑部公告**

《微生物学通报》编辑部已随同中科院微生物研究所从北京海淀中关村搬迁至朝阳区大屯路中科院奥运村园区。

为加快稿件的审理过程,加强与审稿专家、作者及读者的互动和交流,本刊已从2007年7月5日起正式启用新版远程投稿及编辑系统。该系统能实现远程投稿、远程查稿、在线审稿、在线编辑等功能。欢迎广大作者、读者和审稿专家使用!今后,本刊所有来稿都将通过该系统进行管理,关于稿件的一切信息也都将通过网络告知作者。

如果您在使用过程中发现任何问题,请随时与我刊编辑部联系。

另,为减少稿件积压,进一步缩短出版周期,本刊从2008年起将刊期从双月刊变更为月刊,欢迎广大作者踊跃投稿!

临时通讯地址:北京朝阳区大屯路中科院微生物所《微生物学通报》编辑部(100101)

新的固定邮编地址确定后我们将及时公告

编辑部电话:010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

《微生物学通报》编辑部

2007-5-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>