

青藏高原北部湖泊沉积物中基于不同碳源可培养细菌多样性

刘文, 杨渐, 吴耿, 张国敬, 蒋宏忱

(中国地质大学(武汉), 生物地质环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘要:前人研究显示微生物群落对有机碳源的利用具有选择性,但是纯菌株对碳源利用的选择性却不甚明了。此外,在盐湖环境中微生物出于能量的考虑可能选择性利用有机碳源以抵抗盐度渗透压。因此,盐度可能间接地影响微生物对有机碳源的利用。然而,目前类似的相关研究较少。采用单碳源纯培养技术、16S rRNA 基因序列分析和相关统计方法,研究了青藏高原北部6个湖泊(洱海、青海湖、托素湖、尕斯库勒湖1、尕斯库勒湖2、小柴旦湖)沉积物中基于不同碳源可培养细菌多样性及其与盐度的响应关系。采用7种不同类型的单碳源(甲酸钠、乙酸钠、丙酮酸钠、乳酸钠、葡萄糖、纤维素、混合氨基酸)进行培养筛选。共获得10个细菌分类群的75株纯培养菌株,它们分属于 γ -变形菌纲的气单胞菌属(*Aeromonas*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、 β -变形菌纲的脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*)以及芽孢杆菌纲的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)和游动球菌属(*Planococcus*)。其中,盐单胞菌属菌株可利用研究中使用的所有碳源类型,说明这类细菌具有广泛碳代谢途径,可能潜在参与了青藏高原北部湖泊碳循环过程。研究发现所得纯菌株对不同碳链长度碳源的利用具有选择性,即随着盐度增高,某些菌株偏向利用结构更加复杂的碳源。总之,盐度不仅影响着纯培养细菌群落多样性,而且还影响着细菌对碳源类型的选择。

关键词:青藏高原湖泊;沉积物;可培养细菌;碳源利用;多样性;盐度

中图分类号:P532

文献标识码:A

文章编号:1008-858X(2016)02-0092-10

引言

湖泊是内陆水生系统的重要组成部分,且在全球元素地球化学循环过程中发挥着极其重要作用^[1-2]。在湖泊生境中,微生物是推动生源元素(比如碳、氮和硫等)循环的重要引擎^[3]。因此,研究湖泊微生物群落特征有助于进一步理解微生物在元素生物地球化学循环过程的作用。前人研究显示不同气候和水文条件对湖泊有机碳组成具有显著影响^[4],并可能进而导致湖泊微生物群落组成差异^[5-11]。近年来,大量室内模拟实验证实不同类型有机碳源

物质对微生物群落组成具有选择性^[12-15]。这些文献主要根据不同类型碳源富集产物研究微生物群落组成差异,然而对于纯菌株利用不同碳源的情况则很少涉及。此外,前人研究大多集中于低盐环境(比如海洋),而针对高盐环境(比如内陆盐湖)的相关研究相对较少。咸(盐)湖约占陆地湖泊系统总面积的一半,四分之三的咸(盐)湖位于内流汇水区域,因而通常具有较高含量的有机碳^[16]。前人研究发现,在咸(盐)湖中广泛存在着与碳循环紧密相关的微生物功能群^[17-21],而且其群落结构主要受到盐度影响^[22]。因此,咸(盐)湖是研究盐度如何影响微生物利用碳源的理想环境。

收稿日期:2015-12-28;修回日期:2016-01-19

基金项目:国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(41422208)

作者简介:刘文(1989-),男,博士研究生,主要研究方向为地质微生物学。Email:wliu711@gmail.com。

通信作者:蒋宏忱。Email:jiangh@cug.edu.cn。

青藏高原被喻为“世界的屋脊”和“第三极”。由于其独特的地理环境和地质构造条件,该区域内咸(盐)湖广泛发育^[23],湖泊盐度范围 0.1~426.3 g/L^[24]。另外,青藏高原湖泊远离工业污染和人类活动干扰,因此该地区湖泊是研究微生物利用碳源及其盐度响应关系的理想场地。本文针对青藏高原北部 6 个不同盐度湖泊(洱海、青海湖、托素湖、尕斯库勒湖 1、尕斯库勒湖 2 和小柴旦湖)的沉积物样品,使用自然环境中可能存在的多种小分子有机物(甲酸钠、乙酸钠、丙酮酸钠、乳酸钠、葡萄糖、纤维素和混合氨基酸)进行微生物单碳源培养富集分离实验,并研究微生物纯培养体对碳源利用的选择性及其与盐度的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Bio-Rad T100™ PCR 仪(美国 Bio-Rad);Bio-Rad GelDoc XR 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad);艾比根™细菌 DNA 提取试剂盒(中国艾比根);便携式 SX711 pH 计(上海三信仪表)和 ICS 600 型离子色谱仪(美国 Thermo Fishier)。

1.2 样品采集与保存

本文所使用的培养样品来自于 2013 年 9 月在青海省采集的 6 个湖泊(洱海、青海湖、托素湖、尕斯库勒湖 1、尕斯库勒湖 2 和小柴旦湖)沉积物。样品采集使用无菌金属勺掘取湖泊表层沉积物分装于 50 mL 无菌离心管中。湖泊原位水样使用 0.22 μm 孔径聚碳酸酯膜(英国 Whatman)过滤并收集滤液,用于阴、阳离子浓度分析。

1.3 理化参数测试

湖泊 pH 采用便携式 SX711 pH 计(上海三信仪表)原位测定。湖泊水样送至中国地质大学(武汉)地质微生物实验室,使用 ICS 600 型离子色谱仪(美国 Thermo Fishier)测定主要阴阳离子(F^- 、 Cl^- 、 NO_2^- 、 SO_4^{2-} 、 Br^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+})浓度,最后将主要离子浓

度求和作为湖泊盐度。

1.4 单碳源富集培养及菌株分离纯化

首先,根据室内测试获得的湖水阴阳离子浓度,调配人工湖水;配置微量元素溶液,成分如下。 $(NH_4)_2SO_4$ 2.64 g, KH_2PO_4 2.38 g, K_2HPO_4 5.65 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.006 4 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 1 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.007 9 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 5 g。加入 1 L 人工湖水溶解后用 Tris-base 调 pH 至对应的湖泊 pH 值,分装后高温高压灭菌;不同类型的碳源除纤维素溶液采用高温高压灭菌备用外,其余 6 种碳源(甲酸钠、乙酸钠、丙酮酸钠、乳酸钠、葡萄糖和混合氨基酸)储存溶液使用 0.22 μm 孔径聚碳酸酯膜(英国 Whatman)过滤除菌备用。然后,在超净工作台中,分别将不同碳源溶液分别加入到对应人工湖水,使碳源终浓度为 0.8%,制备成总体积为 100 mL 的人工湖水液体富集培养基。最后,分别称取 6 个湖泊沉积物各 5 g 加入到上述添加了不同碳源的人工湖水富集培养基,160 r/min,15 °C 培养 72 h。富集培养完成后,用无菌人工湖水将富集培养液梯度稀释 10^3 、 10^4 和 10^5 倍,分别取 100 μL 上述稀释液涂布于单碳源固体培养基上,于 15 °C 恒温培养箱中倒置培养 72 h,培养期间每隔 12 h 观察其生长情况。挑取颜色、形态、大小等特征各不相同的单菌落转接于对应的单碳源空白固体培养基上,并在相同条件下培养。

1.5 纯培养菌株种属鉴定及进化分析

纯培养菌株使用 AntGene DNA 提取试剂盒提取总 DNA,所有操作均参照使用说明书。使用细菌通用引物 27F:5' - AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG - 3' 与 1492R:5' - TACGGCTAC-CTTGTACGACTT - 3' 对菌株的 16S rRNA 基因进行扩增,PCR 反应条件参考相关文献^[25]。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(美国 Axygen)试剂盒纯化回收。最后,将 PCR 产物送至测序公司,使用引物 27F 进行测序。另外,测序所得序列经 BioEdit 软件^[26]剪切后,使用 DOTUR 软件^[27]对所得序列按 97% 的序列相似性

划分分类操作单元(OTU)^[28]。然后,每个 OTU 选取一个代表性序列,于 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中进行比对,同时选取同源相似性最高的参考序列。最后,合并上述代表性序列和参考序列使用生物学软件 MEGA5.2^[29] 构建邻接点系统发育树。

1.6 DNA 序列在 GeneBank 中登录号

本研究所得序列均已提交至 GeneBank 数

据库中,登录号为 KU353564 ~ KU353576。

2 结果与分析

2.1 地球化学参数测试结果

采样的 6 个湖泊 pH 范围为 8.0 ~ 9.0,盐度范围为 1.2 ~ 72.1 g/L,主要离子浓度如表 1 所示。

表 1 采样点信息及地球化学参数

Table 1 Geographic and Geochemical parameters of lake water

采样点信息	洱海	青海湖	托素湖	尕海 1	尕海 2	小柴旦湖
湖面积/km ²	5.0	4 400.0	165.9	47.2	35.0	71.5
GPS 位点(N/E)	36°34.1' / 100°44.3'	36°38.0' / 100°6.9'	37°11.6' / 96°53.3'	36°58.1' / 100°35.9'	37°7.8' / 97°46.9'	37°28.8' / 95°26.2'
pH	8.5	9.0	8.0	8.5	8.0	8.0
盐度/(g·L ⁻¹)	1.2	9.7	23.5	26.4	70.5	72.1
Na ⁺ /(mg·L ⁻¹)	160.4	2 399.8	5 446.8	6 961.9	18 311.9	20 840.9
K ⁺ /(mg·L ⁻¹)	11.4	128.8	198.2	452	416.6	515.9
Mg ²⁺ /(mg·L ⁻¹)	74.1	656.1	1 839.4	1 361.7	3 736.3	1 781.7
Ca ²⁺ /(mg·L ⁻¹)	13.9	24.8	46.3	34.8	432.3	609.4
Cl ⁻ /(mg·L ⁻¹)	445.4	4 575	10 240.2	12 539	37 717.8	33 939.1
SO ₄ ²⁻ /(mg·L ⁻¹)	187.7	1 681.6	5 393.4	79.2	9 739.6	14 254.9

表 2 OTU 代表性序列在 GenBank 中的比对结果

Table 2 Results of sequence alignment in GenBank of representative sequence of each OTU

	相似菌株	相似性	分类地位
OTU1 (KU353564)	<i>Aeromonas encheleia</i> , NR_118042	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; Aeromonas
OTU2 (KU353565)	<i>Shewanella putrefaciens</i> , KC607527	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Shewanellaceae; Shewanella
OTU3 (KU353566)	<i>Dechloromonas hortensis</i> , NR_042819	99%	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Dechloromonas
OTU4 (KU353567)	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> , DQ298026	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas
OTU5 (KU353568)	<i>Planococcus rifietoensis</i> , JQ684232	99%	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planococcus
OTU6 (KU353569)	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> , KJ401068	100%	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillales Family XII. Incertae Sedis; Exiguobacterium
OTU7 (KU353570)	<i>Vibrio metschnikovii</i> , KJ401069	100%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio
OTU8 (KU353571)	<i>Halomonas boliviensis</i> , KC689808	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; Halomonas
OTU9 (KU353572)	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> , HM130919	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Pseudoalteromonadaceae; Pseudoalteromonas
OTU10 (KU353573)	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> , DQ537517	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Pseudoalteromonadaceae; Pseudoalteromonas
OTU11 (KU353574)	<i>Vibrio alginolyticus</i> , KC954169	99%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio
OTU12 (KU353575)	<i>Bacillus pumilus</i> , KF049124	100%	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus
OTU13 (KU353576)	<i>Halomonas ventosae</i> , AB617544	100%	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; Halomonas

2.2 纯培养菌株多样性

用不同碳源富集培养后,共分离得到 75 株纯培养菌株,使用 DOTUR 软件对所得菌株 16S rRNA 基因序列按 97% 的相似性划分 OTU^[28]后,共得到 13 个 OTU (OTU1 - 13),分属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*)、游动球菌属 (*Planococcus*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、弧菌属 (*Vibrio*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacil-*

lus) 共 10 个属,见表 2、表 3 和图 1。从咸(盐)湖沉积物分离获得大量盐单胞菌属 (*Halomonas*) 菌株(占总菌株数的 44%)。另外,聚类分析显示,淡水湖泊(洱海)和咸(盐)湖(青海湖、托素湖、尕海 1、尕海 2 和小柴旦湖)可培养细菌类型具有显著差异(图 2)。比如,咸(盐)湖主要以游动球菌属 (*Planococcus*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*)、弧菌属 (*Vibrio*) 和假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 菌株为主;而淡水湖泊则主要以气单胞菌属 (*Aeromonas*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 和脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*) 菌株为主(表 3)。

表 3 分离获得纯菌株的分类学地位
Table 3 Taxonomy of strains isolated from lake sediments in this study

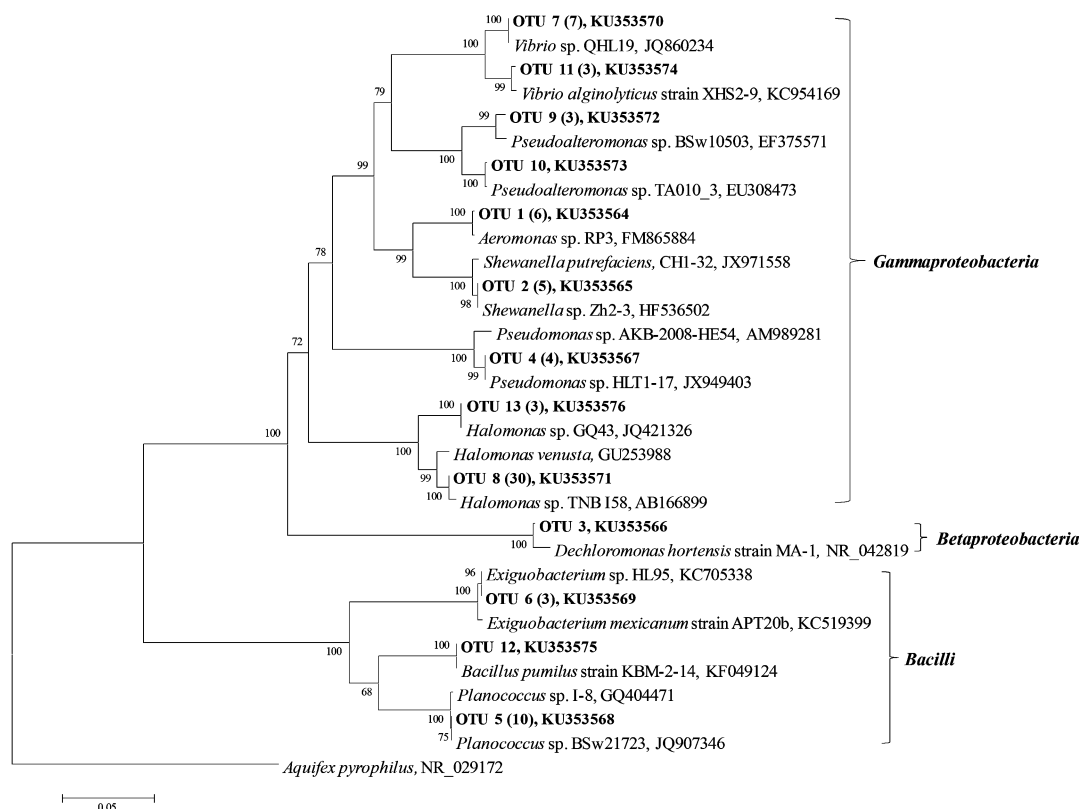
湖 泊	分类学地位
洱 海	<i>Pseudomonas</i> (1)、 <i>Aeromonas</i> (6)、 <i>Shewanella</i> (5)、 <i>Dechloromonas</i> (1)
青海湖	<i>Pseudomonas</i> (3)、 <i>Halomonas</i> (4)、 <i>Exiguobacterium</i> (2)、 <i>Pseudoalteromonas</i> (2)、 <i>Vibrio</i> (3)、 <i>Planococcus</i> (4)
托素湖	<i>Halomonas</i> (3)、 <i>Exiguobacterium</i> (1)
尕海 1	<i>Planococcus</i> (3)、 <i>Halomonas</i> (12)、 <i>Pseudoalteromonas</i> (1)、 <i>Vibrio</i> (1)
尕海 2	<i>Planococcus</i> (1)、 <i>Halomonas</i> (3)、 <i>Pseudoalteromonas</i> (1)、 <i>Vibrio</i> (3)
小柴旦湖	<i>Planococcus</i> (3)、 <i>Halomonas</i> (11)、 <i>Bacillus</i> (1)

括号中的数字表示属于该属的菌株种类数

2.3 纯菌株碳源选择性

本次实验分离所得的盐单胞菌属 (*Halomonas*) 菌株在除淡水外的不同盐度下,可利用实验采用的所有 7 种碳源;游动球菌属 (*Planococcus*) 和弧菌属 (*Vibrio*) 菌株可利用 6 种碳源;假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 菌株可利用 4 种碳源;单胞菌属 (*Aeromonas*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 菌株可利用 3 种碳源;而脱氯单胞菌属 (*Dechloromonas*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 菌株则仅可利用一种碳源(表 4)。在所采用的 7 种碳源中,乳酸钠和葡萄糖最容易被利用,甲酸钠则较难被利用(表 4)。另外,根据菌株利用碳源类型的情况

进行聚类分析发现,利用相似碳链长度碳源的细菌类型更加相似(图 3)。例如甲酸钠、乙酸钠和乳酸钠聚类成一支;纤维素和葡萄糖聚类成一支;而氨基酸混合物和丙酮酸聚类成一支。此外,聚类分析还发现有些属的菌株对碳源利用有相似的偏好。例如,*Pseudomonas* 与 *Planococcus*, *Halomonas* 与 *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* 与 *Dechloromonas* 等(图 4)。除此之外,不同属菌株在不同盐度条件下利用的碳源类型具有差异性(表 5,表 6)。以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和游动球菌属 (*Planococcus*) 为例,随盐度升高,盐单胞菌属 (*Halomonas*) 菌株所能利用的碳源种类增加,而游动球菌属 (*Planococcus*) 菌株则是利用碳源的类型发生替变,且更偏向利用结构更加复杂的碳源。



每个 OTU 中选取一个代表性序列作为目标序列,每个 OTU 所代表的菌株数标注于括号中(若仅代表一株,则“1”省略);参比序列为与目标序列相似度最高的代表性序列;选取 *Aquifex pyrophilus* 的 16S rRNA 基因序列作为系统发育树的根

图 1 邻接点法构建纯菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 1 Phylogeny of the obtained partial 16S rRNA gene sequences in this study

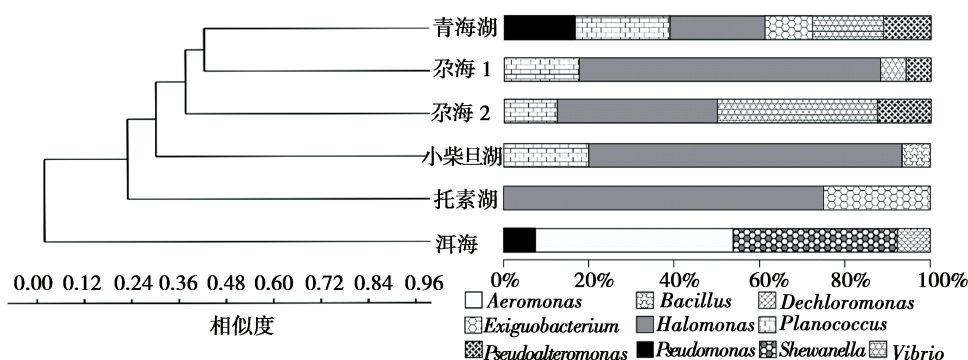


图 2 不同湖泊培养所得菌株的聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis of strains isolated from different lakes

3 讨论

3.1 咸(盐)湖沉积物中的细菌碳源选择性

前人研究表明,在淡水湖泊中,溶解有机碳

(DOC)成分上的差异会导致微生物群落结构的不同^[30],说明微生物对不同碳源的利用有选择性。研究显示,这种选择性同样存在于盐湖当中,且相似碳链长度碳源所培养出的微生物种类组成相似,潜在地说明碳链长度可能影响微生物对有机碳的利用。微生物对碳链长度选

表 4 分离所得各属菌株碳源利用信息
Table 4 Carbon substrates utilization by strains of different genus

	甲酸钠	乙酸钠	丙酮酸钠	乳酸钠	葡萄糖	纤维素	混合氨基酸
<i>Halomonas</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Planococcus</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>Vibrio</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>Shewanella</i>	+	+	-	+	-	-	+
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-	+	+	+	-
<i>Aeromonas</i>	-	+	-	+	+	-	-
<i>Exiguobacterium</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>Pseudoalteromonas</i>	-	-	+	-	-	+	+
<i>Dechloromonas</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	+	-	-

“+”表示可利用,“-”表示不可利用

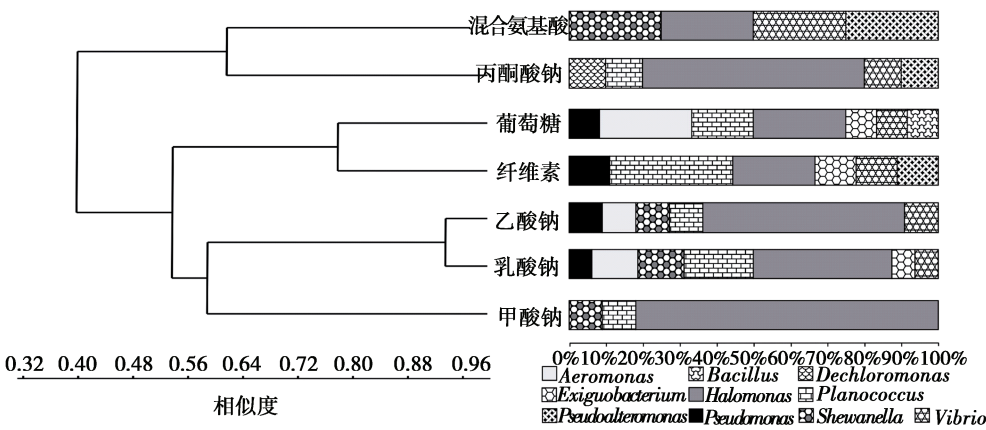


图 3 单碳源培养所得菌株及其聚类分析结果
Fig. 3 Cluster analysis of strains isolated by using distinct sole carbon cultivation

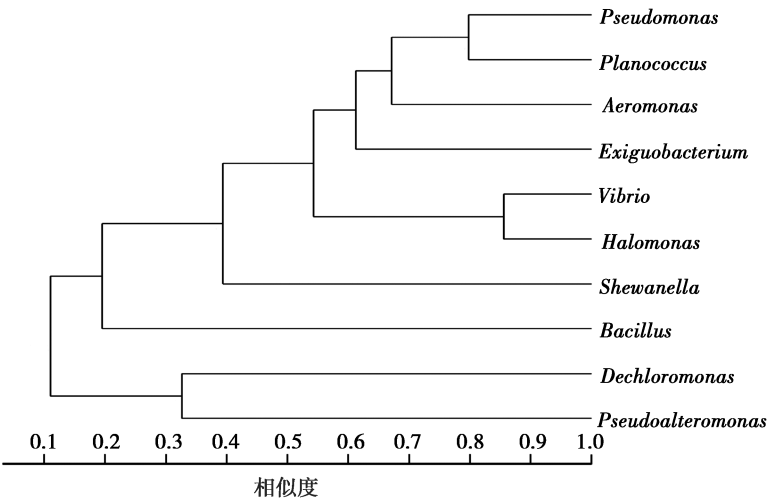


图 4 不同属菌株对碳源利用的聚类分析
Fig. 4 Cluster analysis of carbon substrates utilization by distinct genera

表 5 盐单胞菌属 (*Halomonas*) 菌株碳源利用信息Table 5 Carbon substrates utilization by strains of *Halomonas*

	盐单胞菌属 (<i>Halomonas</i>)						
	甲酸钠	乙酸钠	丙酮酸钠	乳酸钠	葡萄糖	纤维素	混合氨基酸
青海湖 (9.7) *	+	-	+	+	-	-	-
托素湖 (23.5)	+	+	-	-	-	+	-
尕斯库勒湖 (26.4)	+	+	+	+	+	+	-
尕斯库勒湖 (70.5)	+	+	+	-	-	-	-
小柴旦湖 (72.1)	+	+	+	+	+	-	+

“+”表示可利用,“-”表示不可利用;()内数字表示湖泊盐度,单位 g/L;表 6 同

表 6 游动球菌属 (*Planococcus*) 菌株碳源利用信息Table 6 Carbon substrates utilization by strains of *Planococcus*

	游动球菌属 (<i>Planococcus</i>)						
	甲酸钠	乙酸钠	丙酮酸钠	乳酸钠	葡萄糖	纤维素	混合氨基酸
青海湖 (9.7)	+	-	-	+	-	+	-
尕斯库勒湖 (26.4)	-	+	-	+	-	+	-
尕斯库勒湖 (70.5)	-	-	-	-	+	-	-
小柴旦湖 (72.1)	-	-	+	-	+	+	-

择的主要原因可能是由于其生理代谢功能限制^[31]。此外,造成不同属菌株对碳源利用具有相似偏好的原因可能是由于它们拥有相似的有机碳代谢途径。

3.2 盐度对细菌多样性和碳源利用的影响

前人大量研究显示盐度是影响微生物群落组成的重要因素,但在本次研究中,托素湖样品微生物群落组成同盐度与其相似的尕斯库勒湖 1 有较大差别,说明盐度不是影响微生物群落组成的唯一因素,其它环境因素(比如湖泊的营养状况)也有可能影响微生物群落多样性^[32-34]。前人研究还认为,在青藏高原湖泊中, β -变形菌纲多分布于淡水或较低盐浓度环境中, γ -变形菌纲则分布于盐水或超盐水环境中^[35-37]。然而,本次研究从淡水湖泊(洱海)中分离得到的 13 株纯培养细菌中,仅有一株属于 β -变形菌纲,其余 12 株均属于 γ -变形菌纲。这种情况可能是由于这些菌株受到微观生存环境条件影响,亦或是由于青藏高原特有的环境条件使得 γ -变形菌纲的细菌广泛适应淡水或较低盐度的环境。另外,盐度不仅塑造了湖泊中微生物群落结构,同时也影响了其代谢功能和活性,

进而造成其生理特征迥异^[38-41],并最终导致其对碳源利用的选择性。从能量角度考虑,特别是高盐度环境,小分子碳源物质更容易被利用且能耗低,但是本次研究发现游动球菌属(*Planococcus*)却选择利用更长碳链的有机碳。这一现象与前人研究结果相似,即对于某些微生物类群来说,二糖或低聚糖比单糖更容易利用^[42-47]。

盐单胞菌属(*Halomonas*)广泛分布于咸(盐)湖,主要与其适应盐度生长的生理特性有关^[48-49]。该类细菌还能利用多种碳源生长,说明该类细菌为适应高盐环境进化产生许多特殊代谢途径以抵抗盐度渗透压^[50-51]。同时,也暗示它们在青藏高原盐湖碳循环过程中发挥着重要作用。然而,芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株所能利用的碳源种类相对较少,可能与高盐度对其造成的生存压力有关^[51]。此外,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、游动球菌属(*Planococcus*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的菌株在特定盐度下能以纤维素为唯一碳源生长,这使得其在生态系统中相较于其它微生物类群拥有更强的竞争优势以及更重要的地位^[52-54]。

4 结 论

生理代谢差异可能是微生物对青藏高原北部湖泊沉积物有机碳源选择性利用的主要原因,因此不同微生物类群对湖泊碳循环的贡献各有不同。盐度影响着微生物利用碳源的选择性并进而对碳循环过程产生影响。本次研究成果可为评价微生物群落对碳循环过程的影响提供科学依据。

参考文献:

- [1] Cole J J, Prairie Y T, Caraco N F, *et al.* Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget [J]. *Ecosystems*, 2007, 10 (1): 172 – 185.
- [2] Finlay J C, Small G E, Sterner R W. Human influences on nitrogen removal in lakes [J]. *Science*, 2013, 342 (6155): 247 – 250.
- [3] Sorokin D Y, Berben T, Melton E D, *et al.* Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes [J]. *Extremophiles*, 2014, 18 (5): 791 – 809.
- [4] Kellerman A M, Dittmar T, Kothawala D N, *et al.* Chemodiversity of dissolved organic matter in lakes driven by climate and hydrology [J]. *Nature Communications*, 2014, 5:3804.
- [5] Crump B C, Kling G W, Bahr M, *et al.* Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (4): 2253 – 2268.
- [6] Haukka K, Heikkinen E, Kairesalo T, *et al.* Effect of humic material on the bacterioplankton community composition in boreal lakes and mesocosms [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (5): 620 – 630.
- [7] Kritzberg E S, Langenheder S, Lindström E S. Influence of dissolved organic matter source on lake bacterioplankton structure and function-implications for seasonal dynamics of community composition [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56 (3): 406 – 417.
- [8] Nelson C E. Phenology of high-elevation pelagic bacteria: the roles of meteorologic variability, catchment inputs and thermal stratification in structuring communities [J]. *The ISME Journal*, 2009, 3 (1): 13 – 30.
- [9] Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, *et al.* Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (7): 3701 – 3709.
- [10] Judd K E, Crump B C, Kling G W. Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition [J]. *Ecology*, 2006, 87 (8): 2068 – 2079.
- [11] Lindström E S. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content [J]. *Microbial Ecology*, 2000, 40 (2): 104 – 113.
- [12] Cottrell M T, Kirchman D L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low-and high-molecular-weight dissolved organic matter [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (4): 1692 – 1697.
- [13] Sharma A K, Becker J W, Ottesen E A, *et al.* Distinct dissolved organic matter sources induce rapid transcriptional responses in coexisting populations of *Prochlorococcus*, *Pelagibacter* and the OM60 clade [J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16 (9): 2815 – 2830.
- [14] Landa M, Cottrell M, Kirchman D, *et al.* Phylogenetic and structural response of heterotrophic bacteria to dissolved organic matter of different chemical composition in a continuous culture study [J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16 (6): 1668 – 1681.
- [15] Dinasquet J, Kragh T, Schröter M L, *et al.* Functional and compositional succession of bacterioplankton in response to a gradient in bioavailable dissolved organic carbon [J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15 (9): 2616 – 2628.
- [16] Williams W D. What future for saline lakes? [J]. *Environment; Science and Policy for Sustainable Development*, 1996, 38 (9): 12 – 39.
- [17] Jiang H, Dong H, Yu B, *et al.* Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, Northwestern China [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26 (3): 199 – 211.
- [18] Jiang H, Deng S, Huang Q, *et al.* Response of aerobic anoxygenic phototrophic bacterial diversity to environment conditions in saline lakes and Daotang River on the Tibetan Plateau, NW China [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2010, 27 (5): 400 – 408.
- [19] Yang J, Jiang H, Dong H, *et al.* Diversity of carbon monoxide-oxidizing bacteria in five lakes on the Qinghai-Tibet Plateau, China [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30 (8): 758 – 767.
- [20] 赵婉雨, 杨渐, 董海良, 等. 柴达木盆地达布逊盐湖微生物多样性研究 [J]. *地球与环境*, 2013, 41 (4): 398 – 405.
- [21] Yang J, Jiang H, Wu G, *et al.* Co-occurrence of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing and anaerobic ammonia oxidizing bacteria in two Qinghai – Tibetan saline lakes [J]. *Frontiers of Earth Science*, 2012, 6 (4): 383 – 391.
- [22] Jiang H, Dong H, Yu B, *et al.* Microbial response to salin-

- ity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (10): 2603–2621.
- [23] Dong H. Microbial life in extreme environments: Linking geological and microbiological processes, in *Links Between Geological Processes, Microbial Activities&Evolution of Life* [M]. Springer, 2008; 237–280.
- [24] Jiang H, Huang Q, Deng S, *et al.* Planktonic actinobacterial diversity along a salinity gradient of a river and five lakes on the Tibetan Plateau[J]. *Extremophiles*, 2010, 14 (4): 367–376.
- [25] Jiang H, Dong H, Zhang G, *et al.* Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3832–3845.
- [26] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95–98.
- [27] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1501–1506.
- [28] Jiao N, Zhang Y, Zeng Y, *et al.* Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (12): 3091–3099.
- [29] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10): 2731–2739.
- [30] Jones S E, Newton R J, McMahon K D. Evidence for structuring of bacterial community composition by organic carbon source in temperate lakes[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(9): 2463–2472.
- [31] Madigan M T, Martinko J M, Parker J, *et al.* *Brock biology of microorganisms* [M]. Prentice Hall: Pearson Education Inc., 1997.
- [32] Landa M, Blain S, Christaki U, *et al.* Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(1): 39–50.
- [33] Langenheder S, Lindström E S, Tranvik L J. Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 212–220.
- [34] Teira E, Gasol J M, Aranguren-Gassis M, *et al.* Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(4): 906–917.
- [35] Wu Q L, Zwart G, Schauer M, *et al.* Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (8): 5478–5485.
- [36] Liu Y, Yao T, Jiao N, *et al.* Salinity impact on bacterial community composition in five high-altitude lakes from the Tibetan plateau, Western China[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(5): 462–469.
- [37] Xing P, Hahn M W, Wu Q L. Low taxon richness of bacterioplankton in high-altitude lakes of the eastern Tibetan Plateau, with a predominance of Bacteroidetes and *Synechococcus* spp [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(22): 7017–7025.
- [38] del Giorgio P A, Bouvier T C. Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient [J]. *Limnology and Oceanography*, 2002, 47(2): 471–486.
- [39] Painchaud J, Theriault J C, Legendre L. Assessment of salinity-related mortality of freshwater bacteria in the saint lawrence estuary[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1): 205–208.
- [40] Blackburn N, Hagstrm, Wikner J, *et al.* Rapid determination of bacterial abundance, biovolume, morphology, and growth by neural network-based image analysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (9): 3246–3255.
- [41] Langenheder S, Kisand V, Wikner J, *et al.* Salinity as a structuring factor for the composition and performance of bacterioplankton degrading riverine DOC [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 45(2): 189–202.
- [42] Palframan R J, Gibson G R, Rastall R A. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut [J]. *Current issues in intestinal microbiology*, 2003, 4 (2): 71–75.
- [43] Gibson G, Wang X. Bifidogenic properties of different types of fructo – oligosaccharides[J]. *Food Microbiology*, 1994, 11 (6): 491–498.
- [44] Rada V, Bartoňová J, Vlková E. Specific growth rate of bifidobacteria cultured on different sugars[J]. *Folia Microbiologica*, 2002, 47(5): 477–480.
- [45] Hopkins M, Cummings J, Macfarlane G. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 85 (2): 381–386.
- [46] Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacteri-*

- um animalis DN-173 010 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70 (4): 1923-1930.
- [47] Kim T B, Song S H, Kang S C, *et al.* Quantitative comparison of lactose and glucose utilization in *Bifidobacterium longum* cultures [J]. Biotechnology Progress, 2003, 19 (2): 672-675.
- [48] Xu Y, Miao L, Li X C, *et al.* Antibacterial and antilarval activity of deep-sea bacteria from sediments of the West Pacific Ocean [J]. Biofouling, 2007, 23 (2): 131-137.
- [49] Cui Z, Lai Q, Dong C, *et al.* Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic ridge [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10 (8): 2138-2149.
- [50] Alva V A, Peyton B M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity [J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37 (19): 4397-4402.
- [51] Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63 (2): 334-348.
- [52] Béguin P, Aubert J P. The biological degradation of cellulose [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13 (1): 25-58.
- [53] Eriksson K E L, Blanchette R A, Ander P. Biodegradation of cellulose, in Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components [M]. Springer, 1990: 89-180.
- [54] Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, *et al.* Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview [J]. International Microbiology, 2002, 5 (2): 53-63.

Diversity of Cultivable Bacteria Based on Different Carbon Sources in the Sediments of Lakes on Northern Qinghai-Tibet Plateau

LIU Wen¹, YANG Jian¹, WU Geng¹, ZHANG Guojing¹, JIANG Hongchen¹

(1. State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan, 430074, China)

Abstract: Bacterial community structure was influenced by the composition of dissolved organic carbon (DOC), selective utilization of distinct carbon substrates can be observed for different bacterial taxa. However, selective utilization of distinct carbon substrates on pure strains and its response to salinity are still rare. Here, we investigated the diversity of cultivable bacteria and their response to salinity and carbon substrates in sediments from six lakes (Erhai Lake, Qinghai Lake, Tuosu Lake, Gahai Lake 1, Gahai Lake 2, Xiaochaikan Lake, salinity range from 1 to 72 g/L) in northern Qinghai-Tibet Plateau by using single carbon substrate cultivation and polymerase chain reaction-based phylogenetic analyses. Seven carbon substrates (e. g. sodium formate, sodium acetate, sodium pyruvate, sodium lactate, glucose, cellulose and amino acids mixture) were used for enrichment cultivation. The obtained bacterial strains are affiliated with ten bacterial genera, e. g. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Dechloromonas*, *Planococcus*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* and *Bacillus*. The strains within *Halomonas* can utilize all the seven tested carbon substrates, indicating that they possess extensive carbon metabolic pathways and are capable of mediating carbon cycling in the studied lakes. The obtained bacterial strains employ carbon sources of different carbon length differently as salinity increases; certain bacterial strains prefer more complex carbon sources in response to salinity increase. In summary, salinity not only affects the cultivable bacterial diversity but also utilization of carbon substrates in the sediments of lakes in northern Qinghai-Tibet Plateau.

Key words: Qinghai-Tibet Plateau lakes; Sediments; Cultivable bacteria; Carbon substrates utilization; Diversity; Salinity