



青藏高原察尔汗盐湖地区可培养中度嗜盐菌的群落结构与多样性

沈硕^{1,2,3*}

¹青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016

²青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

³青海大学青藏高原生物技术教育部重点实验室, 青海 西宁 810016

摘要: 【目的】研究青海察尔汗盐湖地区的可培养中度嗜盐菌的群落结构及多样性。【方法】采用多种选择性培养基进行中度嗜盐菌的分离、培养;通过 16S rRNA 基因序列扩增、测定,根据序列信息,进行系统进化树构建、群落结构组成分析及多样性指数计算。【结果】从察尔汗盐湖卤水及淤泥中分离到中度嗜盐菌 421 株,合并重复菌株后共 83 株中度嗜盐菌。菌株 16S rRNA 基因序列信息显示,4 株中度嗜盐菌为潜在的新分类单元。83 株嗜盐细菌分布于 3 个门的 6 个科 16 个属。其中 *Bacillus* 属、*Oceanobacillus* 属和 *Halomonas* 属为优势属。多样性结果显示,水样中的菌株多样性高于泥样,而泥样中的菌株优势度高于水样。【结论】察尔汗盐湖中度嗜盐菌具有丰富的遗传多样性,种群种类丰富,优势菌群集中,该盐湖地区存在可分离培养的中度嗜盐菌的疑似新物种。

关键词: 察尔汗盐湖, 中度嗜盐菌, 分离, 群落结构, 多样性

察尔汗盐湖位于海西蒙古族藏族自治州格尔木市都兰县境内柴达木盆地中东部,地理坐标为 93°42′-96°14′E, 36°37′-37°12′N^[1]。该盐湖是典型的大陆性干旱气候,具有年降水量稀少、蒸发量大、日照时间长、辐射力强、昼夜温差大、多风的特点^[2]。盐湖矿区东西长 168 km,南北宽 20-40 km,面积 5856 km²,自东向西依地质特征分为霍布逊、察尔汗、达布逊及别勒滩 4 个连续的区段^[3]。该盐湖是我国最大的可溶性钾镁盐生产基地,也是仅

次于美国大盐湖的世界第二大盐湖。察尔汗盐湖是世界罕见的具有工业价值的大型第四纪内陆盐湖之一。它是一个以液体钾矿为主,杂卤石、软钾镁矾等为次^[4]。

目前,国内外有关盐湖中嗜盐菌的研究报道主要涉及到新菌种的发现、多相分类学的鉴定及菌株同源进化关系方面的研究^[5-10]。有关青海省境内的盐湖地区嗜盐菌的研究主要集中在柯柯盐湖、茶卡盐湖及青海湖这 3 个区域。柴丽红研究

基金项目: 中科院西部之光人才培养计划项目(2014); 青藏高原教育部重点实验室开放基金项目

*通信作者。Tel: +86-971-5310129; Fax: +86-971-5311193; E-mail: fjjzss@126.com

收稿日期: 2016-06-07; 修回日期: 2016-10-17; 网络出版日期: 2016-11-04

小组成员应用 DGGE 法对柯柯盐湖和茶卡盐湖样品中分离到的细菌进行多样性差异分析。同时, 还对柯柯盐湖中分离到的 16 株细菌进行了 ARDRA 筛选及初步的系统发育分析, 得到的信息对进一步研究该环境中的微生物多样性具有很重要的指导意义^[11]。姜怡研究小组成员从茶卡盐湖和柯柯盐湖采集的土样中分离到嗜盐放线菌, 此外, 还有研究人员从茶卡盐湖、柯柯盐湖及青海湖中分离到诺卡氏菌属嗜盐菌菌株^[12-13]。

以上针对青海省境内嗜盐菌的研究均未涉及到察尔汗盐湖地区的微生物资源。由于察尔汗盐湖地域辽阔, 环境气候条件特殊, 其中必然蕴藏着丰富的极端环境微生物资源, 因此是研究嗜盐微生物的理想场所。同时, 由于察尔汗盐湖地区地理位置偏远, 自然环境恶劣, 交通、生活和研究条件特别艰苦, 尤其是研究人员还有可能面临着高原反应的考验, 因此致使该地区的盐湖资源开发程度较低, 有些嗜盐微生物资源至今尚未开发。这就形成了该研究领域的空白, 亟待开发。

本研究通过分离可培养的中度嗜盐菌菌株, 并对其 16S rRNA 序列进行系统发育及多样性分析, 揭示察尔汗盐湖地区中度嗜盐菌的多样性规律及群落结构特征, 从而为发现新颖的微生物资

源, 为全面、深度地开发具有生防活性的功能性菌株奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品: 2013 年 7 月, 采用 GPS 定位取样点, 于青海省海西州察尔汗盐湖地区采集盐湖卤水和盐湖湖泥样品(表 1)。盐湖卤水盐浓度 45%, pH 为 8.4, 采样温度 25 °C。水样与泥样采集后放在无菌的收集瓶里, 样品采集完带回实验室立即处理。

1.1.2 培养基: 选择 8 种选择性培养基进行嗜盐菌菌株的分离。

(1) 放线菌 ISP5 培养基: 酵母膏 5 g, 甘油 10 g, L-天门冬酰胺 1 g, K₂HPO₄ 1 g, KNO₃ 5 g, MgCl₂·6H₂O 50 g, 微量盐(FeSO₄·7H₂O 0.2 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, 蒸馏水 100 mL) 1 mL, 琼脂粉 12 g, 加入蒸馏水定容至 1000 mL, pH 7.2-7.4。(2) 放线菌淀粉酪素培养基: 淀粉 10 g, 水解酪素 0.3 g, KNO₃ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, K₂HPO₄ 2 g, CaCO₃ 0.02 g, FeSO₄·7H₂O 10 mg, NaCl 50 g, 琼脂粉 12 g, 加入蒸馏水定容至 1000 mL, pH 7.2-7.4。(3) 放线菌改良淀粉酪

表 1. 采样地点信息

Table 1. Information of sampling sites

Sampling site	Sample	Longitude	Latitude	Altitude/m
CHA01	Water	E 95°12'58.7"	N 36°46'8.6"	2681
CHA01	Mud	E 95°12'58.7"	N 36°46'8.6"	2681
CHA02	Mud	E 95°16'29.2"	N 36°47'4.2"	2678
CHA03	Water	E 95°18'9.0"	N 36°48'41.0"	2675
CHA03	Mud	E 95°18'9.0"	N 36°48'41.0"	2675
CHA04	Mud	E 95°18'8.1"	N 36°48'41.0"	2676
CHA05	Water	E 95°18'6.6"	N 36°48'42.1"	2676
CHA05	Mud	E 95°18'6.6"	N 36°48'42.1"	2676
CHA06	Water	E 95°18'6.7"	N 36°48'42.2"	2678

素培养基：葡萄糖 10 g，水解酪素 0.3 g，KNO₃ 2 g，MgSO₄·7H₂O 0.05 g，K₂HPO₄ 2 g，CaCl₂·2H₂O 1 g，FeSO₄·7H₂O 10 mg，NaCl 50 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水至定容 1000 mL，pH 7.2–7.4。(4) CM 改良培养基：水解酪素 7.5 g，酵母膏 10 g，柠檬酸三钠 3 g，MgSO₄·7H₂O 20 g，KCl 2 g，FeSO₄·7H₂O 0.05 g，NaCl 30 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 1000 mL，pH 7.2–7.4。(5) ATCC213 改良培养基：MgSO₄·7H₂O 10 g，CaCl₂·2H₂O 0.2 g，KCl 5 g，蛋白胨 2.5 g，酵母膏 10 g，NaCl 40 g，琼脂粉 12 g，蒸馏水至 1000 mL，pH 7.2–7.4。(6) M-3 培养基：水解酪素 7.5 g，酵母膏 10 g，柠檬酸三钠 3 g，MgSO₄·7H₂O 20 g，KCl 2 g，FeSO₄·7H₂O 0.36 g，MnCl₂·4H₂O 0.36 mg，NaCl 30 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 900 mL，pH 9.5。高压灭菌后，温度降到 55 °C 时，加入灭菌的 Na₂CO₃ 母液 100 mL。(7) APA 培养基：NaCl 50 g，KH₂PO₄ 2 g，MgSO₄·7H₂O 1 g，蛋白胨 5 g，酵母膏 5 g，葡萄糖 1 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 800 mL，pH 10。高压灭菌后，温度降到 55 °C 时，加入灭菌的质量体积浓度为 5% 的 Na₂CO₃ 母液 200 mL。(8) RM 培养基：NaCl 50 g，无水 MgSO₄ 9.7 g，柠檬酸钠 3.0 g，KCl 2.0 g，无水 CaCl₂ 0.2 g，细菌蛋白胨 10.0 g，酵母抽提物 2.0 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 1000 mL，pH 7.5。

1.2 样品的前处理

水样前处理：为提高实验的可行性，实验先对水样中的菌体进行富集：将滤膜分别装入滤器中，进行 121 °C 灭菌 30 min，干燥。在无菌条件下，将水样混匀，用装有 0.22 μm 孔径的滤膜的滤器过滤，在滤膜上富集菌体。用于富集的水样量达到 30 mL 时，取下滤膜，放入装有 3 mL 无菌水的玻璃试管中，为 10⁻¹ 水样。振荡，并放置片

刻。之后，将 10⁻¹ 水样依次梯度稀释为 10⁻² 水样及 10⁻³ 水样，备用。

泥样前处理：取适量泥样，风干。称取 10 g 处理好的泥样，加入 90 mL 无菌水，放入已灭菌好的装有玻璃球的三角瓶内，充分振荡 30 min，静置，吸取上清液，此上清液为 10⁻¹ 土样。之后，将 10⁻¹ 泥样依次梯度稀释为 10⁻² 土样及 10⁻³ 土样，备用^[14]。

1.3 嗜盐菌的分离、纯化及保存

吸取 200 μL 上述各样品，均匀涂布于培养基平板上，分别于培养箱中 28 °C 和 37 °C 静置培养，每天观察培养情况。待培养基平板上有菌落出现时，挑取单一菌落，接种于新的培养基平板上。

将平板纯化好的菌株接种至固体培养基斜面，进行斜面划线，待培养出菌体，加入无菌液体石蜡于 4 °C 下恒温保存^[14]。

1.4 嗜盐菌菌株 16S rRNA 基因组提取与测序

菌株 16S rDNA 提取按照上海生工生物工程(上海)股份有限公司的柱式细菌 DNA 提取试剂盒的程序操作。PCR 扩增体系：10×Buffer 2.5 μL，模板 DNA 1 μL，*Taq* 酶(5 U/μL) 0.2 μL，dNTPs (2.5 mmol/μL) 2 μL，引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG G-3')和引物 P1541(5'-AAGGAGGTGGTGATCCA GCCGA-3') (10 pmol/μL) 各 1 μL，补水至 25 μL。反应条件为：94 °C 5 min；94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 80 s，共 30 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测，回收产物送至派森诺测序。

1.5 构建系统发育树

选择代表性菌株的 16S rRNA 序列，将结果提交至 EzTaxon 网站(<http://www.eztaxon.org>)与有效描述菌株的 16S rRNA 序列相比对，初步判定菌株的分类地位。根据比对结果，通过 Mega 5.0 软件

进行系统发育树的构建^[15]。

1.6 中度嗜盐菌群落结构多样性分析

定义以 16S rDNA 基因序列相似性低于 97% 作为不同的操作分类单元(OTU)。采用 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数、Shannon 均匀度指数和 Berger-Parker 优势度指数进行嗜盐菌菌株的多样性分析和比较^[16]。

2 结果和分析

2.1 中度嗜盐菌的分离结果

从 15 份盐湖卤水与湖泥样品中共分离、纯化得到 421 株嗜盐菌菌株。分离自卤水样品的菌株共 315 株, 分离自湖泥样品的菌株共 106 株; 8 种分离培养基中, 从培养基 E (ATCC213 改良培养基) 中获得菌株 190 株, 数量最多。其次分别为培养基 D (CM 改良培养基), 共分离到菌株 91 株。从培养基 H (RM 培养基) 中分离到菌株 88 株(表 2)。

2.2 中度嗜盐菌的系统发育与多样性分析

选取 83 株具有代表性的中度嗜盐菌菌株进行

16S rRNA 基因序列分析, 结果显示, 大部分嗜盐菌菌株与其同属内近缘菌间的 16S rRNA 基因序列相似性都在 98.73%–100.00% 之间(图 1, 2)。但有 4 株嗜盐菌菌株均与 Bacillaceae 科近缘菌间 16S rRNA 基因序列相似性较低, 分别为: 菌株 S95 与 *Bacillus solimangrovi* (GH2-4) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 96.79%, 菌株 S115 与 *Ornithinibacillus contaminans* (CCUG 53201) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 97.98%, 菌株 S165 与 *Bacillus alcalophilus* (DSM 485) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 97.30%, 菌株 S181 与 *Ornithinibacillus contaminans* (CCUG 53201) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 95.34%。这 4 株菌株为潜在的新属或新种, 还需做进一步的研究确定其分类地位。

从盐湖卤水和盐湖湖泥中分离的中度嗜盐菌中选取 83 株具有代表性的菌株, 经过 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树的构建, 结果显示, 83 株菌株归属于 Firmicutes、Proteobacteria 和 Actinobacteria 三大类(图 1, 2)。

表 2. 不同的察尔汗盐湖样品和培养基中分离中度嗜盐菌菌株数量

Table 2. The number of the moderate halophiles isolated from different Qrhan Salt Lake samples and culture media

Moderate halophiles isolated from different samples			Moderate halophiles isolated from different culture media		
Sample No.	Sample	Strain number	Media No.	Media	Strain number
1	Water	195	1	A	2
2	Mud	38	2	B	0
3	Mud	8	3	C	0
4	Water	43	4	D	91
5	Mud	21	5	E	190
6	Mud	6	6	F	29
7	Water	66	7	G	21
8	Mud	33	8	H	88
9	Water	11			
Total		421			421



图 1. 察尔汗盐湖可培养细菌 16S rRNA 基因序列 Firmicutes 和 Actinobacteria 门的 NJ 系统发育树

Figure 1. Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships of culturable bacteria from Qrhan Salt Lake based on 16S rRNA gene sequences for Firmicutes and Actinobacteria. The tree rooted was constructed by Neighbor-Joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicated the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each strain name are accession numbers of 16S rRNA gene sequences in GenBank. Bar 0.02 at the bottom is the sequence divergence.

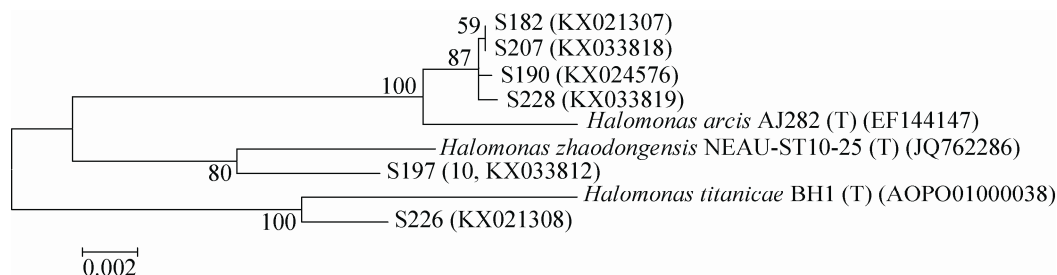


图 2. 察尔汗盐湖可培养细菌 16S rRNA 基因序列 Proteobacteria 门的 NJ 系统发育树

Figure 2. Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic relationships of culturable bacteria from Qrhan Salt Lake based on 16S rRNA gene sequences for Proteobacteria. The tree rooted was constructed by Neighbor-Joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicated the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each strain name are accession numbers of 16S rRNA gene sequences in GenBank. Bar 0.002 at the bottom is the sequence digergence.

Firmicutes 门包括 *Bacillus*、*Gracilibacillus*、*Paraliobacillus*、*Halobacillus*、*Bacillus_g26*、*Bacillus_g6*、*Virgibacillus*、*Ornithinibacillus*、*Oceanobacillus*、*Terribacillus*、*Staphylococcus* 和 *Fictibacillus* 12 个不同的属。Actinobacteria 门包括 *Streptomyces*、*Kocuria* 和 *Micrococcus* 3 个不同的属(图 1, 表 3)。Proteobacteria 门只包括 *Halomonas* 一个属(图 2, 表 3)。

在属水平上, 水样中的优势属分别为来自 Firmicutes 门的 *Bacillus* 属、*Oceanobacillus* 属和 Proteobacteria 门的 *Halomonas* 属, 分别包含菌株 20、15 和 10 株。而泥样中的优势属则为来自 Firmicutes 门的 *Bacillus* 属, 包含菌株 10 株(表 3)。

多样性指数值计算结果显示(表 4), 盐湖水样和泥样的多样性指数 Shnnon-wiener 和 Margalef 具有明显的差异, 说明盐湖水样中分离到的菌株多样性和丰富度明显高于盐湖湖泥样品中分离到的菌株。而水样和泥样的均匀度指数 Shannon Eveness 差异不明显, 说明这两种样品来源中分离到的菌株均匀度没有明显的差异。泥样的优势度指数 Berger-Parker dominance Index 明显高于水样和总样, 说明泥样中分离到的嗜盐菌优势度明显。

表 3. 察尔汗盐湖可培养嗜盐菌菌株在属水平上的相对丰度

Table 3. Relative abundance of culturable bacteria in the genus level in Qrhan Salt Lake

Phylum	Genus	Strain number	
		Water sample	Mud sample
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>	1	2
	<i>Fictibacillus</i>	0	1
	<i>Bacillus</i>	1	0
	<i>Terribacillus</i>	2	0
	<i>Oceanobacillus</i>	15	2
	<i>Ornithinibacillus</i>	2	0
	<i>Virgibacillus</i>	2	0
	<i>Bacillus_g6</i>	1	0
	<i>Bacillus_g26</i>	0	1
	<i>Halobacillus</i>	2	0
	<i>Paraliobacillus</i>	1	0
	<i>Gracilibacillus</i>	2	0
Proteobacteria	<i>Halomonas</i>	10	5
	<i>Streptomyces</i>	0	1
Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	0	1
	<i>Micrococcus</i>	1	0

表 4. 主要中度嗜盐菌多样性指数值

Table 4. The Indexes of biodiversity of main moderate halophilic bacteria

Sample	Number of isolates	Shannon-wiener Index (H')	Margalef Index (D_{Mg})	Shannon Evenness (E)	Berger-Parker dominance Index (d)
Water part	60	3.571	4.622	1.192	0.246
Mud part	23	2.644	2.870	1.148	0.435
Total	83	3.647	5.417	1.133	0.226

3 讨论

中国湖泊总面积约有一半是盐湖, 主要集中于内蒙古、西藏、青海和新疆, 山西、河北、宁夏、吉林、甘肃等省区也有一部分盐湖^[17]。因此, 国内外有关盐湖地区嗜盐微生物的研究很大一部分是由我国研究人员来完成的。目前, 我国研究人员对新疆盐湖地区的嗜盐菌研究的最多。研究人员从新疆艾比盐湖和艾丁盐湖中分离到了 86 株嗜盐古菌, 并进行了多样性的分析^[9]。另一研究小组对达坂城盐湖地区的嗜盐菌数量、分类及多样性进行了全面的分析。结果表明, 盐度、样品的性质及采样的位置均对微生物的含量具有一定的影响, 发现土样中的微生物含量最丰富^[18-20]。还有研究人员对新疆伊吾湖和哈密地区的盐湖嗜盐微生物进行了分离, 发现了一部分嗜盐放线菌^[16,21]。

本文从 15 份采自青海省察尔汗盐湖地区的卤水与湖泥样品中共分离、纯化得到 421 株菌株, 大部分菌株为细菌, 少数为真菌。其中, 分离自卤水样品的菌株共 315 株, 分离自湖泥样品的菌株共 106 株, 这说明分离自水样的菌株数量远远大于分离自泥样的菌株数量。原因可能是本文中的水样样品经过富集处理后进行菌株分离, 同时分离的嗜盐菌菌株全部为中度嗜盐菌菌株。而泥样的采集点距离钾肥厂距离很近, 盐度较高, 可能其中含有的边缘极端和极端嗜盐菌菌株比中度嗜盐菌数量要多。下一步可以采集这部分样品进

行边缘极端和极端嗜盐菌菌株的分离, 从而开发更多的极端环境嗜盐菌的资源。

另外, 有研究人员从内蒙古锡林浩特地区 3 个盐湖中分离得到 165 株嗜盐菌, 并进行了 ARDRA 分析及系统发育树的建立。同时研究人员对分离到的 60 多株嗜盐菌进行了产脂肪酶菌种的筛选及鉴定^[22-23]。王柏玲还从吉兰泰盐湖中分离到 1 株海杆菌属(*Marinobacter*)中度嗜盐菌, 并进行了多相分类学的鉴定^[24]。此外, 研究人员还从舟山地区分离到大量的中度嗜盐菌, 表明菌株的形态和菌落的颜色呈现多样性, 并对其进行了系统发育分析^[25-26]。为了开发察尔汗盐湖地区的嗜盐微生物资源, 本文从分离到的中度嗜盐菌菌株中选择了 83 株具有代表性的细菌菌株进行了系统发育分析, 结果发现有 4 株嗜盐菌菌株均与 Bacillaceae 科近缘菌间 16S rRNA 基因序列相似性较低, 有可能为潜在的新属或新种。这就说明察尔汗盐湖这个未被开发的地区将成为发现新颖的微生物菌种资源及新颖微生物来源的天然产物的发源地。

通过系统发育树及进化关系的比对, 我们发现水样和泥样的优势门均为 Firmicutes 门。而在在属水平上, 水样中的优势属有 3 个, 分别为来自 Firmicutes 门的 *Bacillus* 属、*Oceanobacillus* 属和 Proteobacteria 门的 *Halomonas* 属。而泥样中的优势属仅有 1 个, 为来自 Firmicutes 门的 *Bacillus* 属。两种样品中相同的优势属均为 *Bacillus* 属。结合多样性指数结果分析发现, 水样中的菌株多样

性高于泥样, 而泥样中的菌株优势度高于水样。目前, 越来越多的研究人员采用非培养方法在宏基因组方面来分析微生物的群落结构与多样性, 研究表明通过 DGGE、ARDRA 和高通量测序等方法能够发现更多的非培养微生物类群, 尤其是高通量测序手段, 能够在整体微生物群落水平分析物种遗传多样性。本文中采用可培养的方法培养出的所有嗜盐菌菌株数量及种类相比非培养微生物种类要少, 不一定反映该地区中度嗜盐菌菌群结构的全貌, 如泥样中应有一部分厌氧菌的存在^[27-30]。另外, 作为优势菌属, *Bacillus* 属与 4 株潜在的新菌株同属于 Bacillaceae 科, 而该科中的部分属尤其是 *Bacillus* 属是典型的具有高生物活性的属, 在工业上对污水处理可以发挥很好的作用, 在农业上具有高杀虫活性^[31-33]。

因此, 下一步我们一方面要对察尔汗盐湖地区的微生物资源系统发育及群落结构多样性结合非培养的方式, 进行更深入的发掘, 另一方面将进行 *Bacillus* 属与 4 株潜在的新菌株的生防活性的筛选, 功能性菌株的开发以及活性新颖的天然产物的发现与合成等方面的研究, 从而完善察尔汗盐湖地区微生物资源的信息, 保护该地区的环境, 同时开发具有重要应用价值的微生物与天然产物资源。

参 考 文 献

- [1] 祁贵明, 王发科, 贺海成, 官辉, 李海凤, 李月高. 气象条件对察尔汗盐田卤水蒸发的影响分析. 青海科技, 2008, 15(5): 30-32.
- [2] 杜佩英, 史忠录. 察尔汗盐湖资源开发存在的问题初探. 中国新技术新产品, 2010, (19): 215.
- [3] Zhang ZG, Li BX. Salt karst research of Qarhan Salt Lake in Qinghai province. *Journal of Salt Lake Research*, 2008, 16(3): 19-24. (in Chinese)
张兆广, 李百贤. 青海省察尔汗盐湖盐溶研究. 盐湖研究, 2008, 16(3): 19-24.
- [4] Li CB, Zhang XC. Status quo of development of potassium resource in Cha-er-han Salt Lake in Qinghai. *Modern Mining*, 2009, (2): 16-19. (in Chinese)
李承宝, 张秀春. 青海察尔汗盐湖钾资源开发现状. 现代矿业, 2009, (2): 16-19.
- [5] Lim JM, Jeon CO, Kim CJ. *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(12): 2903-2908.
- [6] Usami R, Echigo A, Fukushima T, Mizuki T, Yoshida Y, Kamekura M. *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(4): 770-774.
- [7] Liebgott PP, Joseph M, Fardeau ML, Cayol JL, Falsen E, Chamkh F, Qatibi AI, Labat M. *Clostridiisalibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(1): 61-67.
- [8] Antunes A, Rainey FA, Wanner G, Taborda M, Pätzold J, Nobre MF, da Costa MS, Huber R. A New lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(10): 3580-3587.
- [9] Borsodi AK, Márialigeti K, Szabó G, Palatinszky M, Pollák B, Kéki Z, Kovács AL, Schumann P, Tóth EM. *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(4): 845-851.
- [10] 赵泽孝. 极端环境下某些细菌的分离及多相分类初步研究. 第三军医大学硕士学位论文, 2004.
- [11] Chai LH, Wang T, Li QY, Cui XL, Peng Q, Xu LH, Jiang CL. Assessment of the bacterial community in the two adjacent lakes, Qinghai, by DGGE. *Journal of Biology*, 2003, 20(1): 13-14, 19. (in Chinese)
柴丽红, 王涛, 李沁元, 崔晓龙, 彭谦, 徐丽华, 姜成林. 应用 DGGE 法对青海相邻两盐湖中细菌多样性的快速检测. 生物学杂志, 2003, 20(1): 13-14, 19.
- [12] Chai LH, Wang T, Cui XL, Peng Q, Xu LH, Jiang CL. A primary study of 16 strains in Keke Salt Lake by ARDRA and phylogenetic analysis. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2003, 25(6): 541-544. (in Chinese)
柴丽红, 王涛, 崔晓龙, 彭谦, 徐丽华, 姜成林. 青海柯柯盐湖 16 株细菌的 ARDRA 筛选及系统发育初步分析. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25(6): 541-544.
- [13] Jiang Y, Li WJ, Xu P, Tang SK, Xu LH, Zhang YQ, Zhang YG, Zhang LP. Study on diversity of actinomycetes under salt

- and alkaline environments. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(2): 191–195. (in Chinese)
- 姜怡, 李文均, 徐平, 唐蜀昆, 徐丽华, 张玉琴, 张永光, 张利平. 盐碱环境放线菌多样性研究. *微生物学报*, 2006, 46(2): 191–195.
- [14] Shen S, Wang J. Isolation, petrification and inhibitory activity against plant pathogenic fungi of halophilic strains from Qinghai Salt Lake. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(1): 79–81, 88. (in Chinese)
- 沈硕, 王舰. 青海盐湖地区嗜盐菌的分离纯化及抑制植物病原菌的活性初探. *广东农业科学*, 2013, 40(1): 79–81, 88.
- [15] Sun HM, Wei YZ, Fang XM, Yu LY, Zhang YQ. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Huperzia serrata*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 614–628. (in Chinese)
- 孙红敏, 魏玉珍, 方晓梅, 余利岩, 张玉琴. 蛇足石杉内生细菌多样性. *微生物学报*, 2016, 56(4): 614–628.
- [16] Xu XW, Wu M, Dilbar T, Gulibahaer A. Halophilic archaea diversity of Aibi Lake and Yiwu Lake in Xinjiang. *Biodiversity Science*, 2006, 14(4): 359–362. (in Chinese)
- 许学伟, 吴敏, 迪丽拜尔·托乎提, 古丽巴哈尔·阿巴拜克利. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性. *生物多样性*, 2006, 14(4): 359–362.
- [17] Zhao W. The current research status and prospectives of organisms in Chinese Saline Lakes. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(5): 439–443. (in Chinese)
- 赵文. 中国盐湖生物的研究现状及展望. *大连水产学院学报*, 2009, 24(5): 439–443.
- [18] Liu HQ, Che HJ. The numerical disposal of halophilic microbiology from Dabancheng Saline Lake in Xinjiang. *Journal of Xinjiang Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2006, 25(3): 103–105, 111. (in Chinese)
- 刘会强, 车海军. 新疆达坂城盐湖嗜盐微生物数量分布的研究. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 25(3): 103–105, 111.
- [19] Liu HQ, Zhao CM, Huang RH. The classification research of moderately halophilic bacteria from Dabancheng Saline Lake in Xinjiang. *Journal of Xinjiang Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2007, 26(3): 146–149, 159. (in Chinese)
- 刘会强, 赵春梅, 黄瑞虎. 新疆达坂城盐湖中度嗜盐菌的分类研究. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 26(3): 146–149, 159.
- [20] Liu HQ, Lv JJ. The 16S rDNA sequence research of moderately halophilic bacteria from Dabancheng Saline Lake in Xinjiang. *Journal of Xinjiang Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2008, 27(4): 46–50. (in Chinese)
- 刘会强, 吕建江. 新疆达坂城盐湖中度嗜盐菌的 16S rDNA 序列研究. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 27(4): 46–50.
- [21] 曹兰兰. 新疆哈密地区盐湖放线菌多样性及多相分类研究. 新疆农业大学硕士学位论文, 2009.
- [22] Pan HL, Zhou C, Wang HL, Xue YF, Ma YH. Diversity of halophilic archaea in hypersaline lakes of Inner Mongolia, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(1): 1–6. (in Chinese)
- 潘海莲, 周成, 王红蕾, 薛燕芬, 马延和. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究. *微生物学报*, 2006, 46(1): 1–6.
- [23] 赵艳辉. 产脂肪酶嗜盐菌的鉴定、产酶条件及耐盐机理的初步研究. 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [24] 王柏玲. 一株中度嗜盐菌的分离、鉴定及系统发育分析. 东北师范大学硕士学位论文, 2009.
- [25] 白雪冬. 一株嗜盐菌新种的分离鉴定与特性研究. 西南交通大学硕士学位论文, 2009.
- [26] Zhou XH, Wang Y, Wu M. Isolation anti exopolysaccharids screening of halophiles from Zhoushan Islands. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2007, 34(3): 335–339. (in Chinese)
- 周旭华, 王勇, 吴敏. 舟山地区嗜盐菌的分离和产胞外多糖菌株的筛选. *浙江大学学报(理学版)*, 2007, 34(3): 335–339.
- [27] Fan HP, Xue YF, Zeng Y, Zhou PJ, Ma YH. Archaeal diversity of Zabuye Lake in Tibet analyzed by culture-independent approach. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(4): 401–408. (in Chinese)
- 范华鹏, 薛燕芬, 曾艳, 周培瑾, 马延和. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析. *微生物学报*, 2003, 43(4): 401–408.
- [28] Chen M, Zhao LP. Biodiversity of bacterial isolates on three different media from coking wastewater treatment system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(3): 366–371. (in Chinese)
- 陈敏, 赵立平. 焦化废水处理系统中不同培养基分离的细菌种群多样性. *微生物学报*, 2003, 43(3): 366–371.
- [29] Zhao S, Zhou N, Zhao ZY, Zhang K, Tian CY. Endophytic bacterial diversity and dynamics in root of *Salicornia europaea* estimated via high throughput sequencing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(6): 1000–1008. (in Chinese)
- 赵帅, 周娜, 赵振勇, 张科, 田长彦. 基于高通量测序分析盐角草根内共生细菌多样性及动态规律. *微生物学报*, 2016, 56(6): 1000–1008.
- [30] Xia WW, Jia ZJ. Comparative analysis of soil microbial communities by pyrosequencing and DGGE. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(12): 1489–1499. (in Chinese)
- 夏围围, 贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价. *微生物学报*, 2014, 54(12): 1489–1499.
- [31] Zhang H, Li PJ, Hu XM, Wang X, Verkhovzina VA. Study on bioremediation of oil-contaminated surface water by using immobilized *Bacillus* sp. *China Water & Wastewater*, 2007,

- 23(7): 28–31. (in Chinese)
- 张辉, 李培军, 胡筱敏, 王新, Verkhovina VA. 固定化芽孢杆菌修复油污染地表水研究. 中国给水排水, 2007, 23(7): 28–31.
- [32] Jin ZX, Wu WQ, Zhang Z. The starch of dioscorea zingibernis effects to α -amylase activity in *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(4): 23–24, 45. (in Chinese)
- 金志雄, 吴文琴, 张珍. 盾叶薯蓣淀粉对枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶活性的影响. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 23–24, 45.
- [33] Liu XH. Applied research and development of *Bacillus*. *Journal of Shangqiu Teachers College*, 2005, 21(5): 135–137. (in Chinese)
- 刘秀花. 芽孢杆菌的应用研究及进展. 商丘师范学院学报, 2005, 21(5): 135–137.

Community structure and diversity of culturable moderate halophilic bacteria isolated from Qrhan Salt Lake on Qinghai-Tibet Plateau

Shuo Shen^{1,2,3*}

¹ Academy of agriculture and forestry sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai Province, China

² State key laboratory of plateau ecology and agriculture, Qinghai university, Xining 810016, Qinghai Province, China

³ The Qinghai-Tibet Plateau Biotechnology Key Laboratory of Ministry of Education, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai Province, China

Abstract: [Objective] I studied the community structure and diversity of culturable moderate halophilic bacteria isolated from Qrhan Salt Lake. [Methods] I isolated and cultured the moderate halophilic bacteria on different selective media. After the 16S rRNA gene sequences was amplified and measured, I constructed the phylogenetic tree, analyzed the community structure and calculated the diversity indexes according to the 16S rRNA gene information. [Results] A total of 421 moderate halophilic bacteria were isolated from water and mud samples in Qrhan Salt Lake. The 16S rRNA gene information showed that 4 potential novel species belonged to the family *Bacillaceae*. Eighty-three model strains belonged to 3 phylurms 6 families 16 genus. Among them, *Bacillus* sp., *Oceanobacillus* sp. and *Halomonas* sp. were dominant species. Diversity analysis showed that the diversity of strains isolated from water sample was higher than that from mud sample, but the dominance degree of strains isolated from mud sample was higher than that from water sample. [Conclusion] The genetic diversity of moderate halophilic bacteria isolated from Qrhan Salt Lake was abundant. Also, there were dominant and novel species of culturable moderate halophilic bacteria in this lake.

Keywords: Qrhan Salt Lake, moderate halophilic bacteria, community structure, diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by “The Western Light” Cultivation Plan of Chinese Academy of Sciences (2014) and by the Foundation of Key Laboratory of the Qinghai-Tibet Plateau Biotechnology, Ministry of Education

*Corresponding author. Tel: +86-971-5310129; Fax: +86-971-5311193; E-mail: fjfzss@126.com

Received: 7 June 2016; Revised: 17 October 2016; Published online: 4 November 2016