

## 研究报告

## 基于高通量测序研究青藏高原茶卡盐湖微生物多样性

张欣<sup>1</sup> 刘静<sup>1</sup> 沈国平<sup>1</sup> 龙启福<sup>1</sup> 韩睿<sup>2</sup> 朱德锐<sup>1\*</sup>

(1. 青海大学医学院基础医学研究中心 青海 西宁 810016)

(2. 青海大学农林科学院 青海 西宁 810016)

**摘要:**【目的】茶卡盐湖(Chaka Salt Lake, CSL)是青藏高原有名的天然结晶盐湖, 具有独特的石盐盐湖矿床, 盛产青盐。盐湖卤水环境中存在丰富的嗜盐菌资源和潜在的新种, 细菌和古菌的群落结构特征和物种多样性尚不明确。【方法】采用 Illumina 高通量测序平台对茶卡盐湖水和底泥混合物中的细菌和古菌群落进行 16S rRNA 基因(V3–V5 区)高通量测序, 检测 4 个样本的群落结构差异和微生物多样性。【结果】获得细菌和古菌总有效序列分别为 117 192 和 110 571 条。结果分析表明细菌和古菌的物种注释(Operational taxonomic unit, OTU)数目分别为 421 和 317, 获得分类地位明确的细菌种类为 14 门 28 纲 170 属, 古菌为 5 门 4 纲 34 属。细菌的优势类群是厚壁菌门(Firmicutes), 所占比例为 68.37%, 其次为变形菌门 Proteobacteria (20.49%); 优势种属依次为芽孢杆菌属 *Bacillus* (41.94%)、海洋芽孢杆菌属 *Oceanobacillus* (8.03%)、假单胞菌属 *Pseudomonas* (7.67%)、盐厌氧菌属 *Halanaerobium* (7.42%)和乳球菌属 *Lactococcus* (7.38%); 古菌的优势类群以广古菌门(Euryarchaeota)盐杆菌纲(Halobacteria)为主, 优势菌是 *Halonotius* (17.21%)和盐红菌属 *Halorubrum* (16.23%)。【结论】揭示了茶卡盐湖中细菌和古菌的群落结构及物种多样性, 为嗜盐菌的开发及后续微生物资源的挖掘提供了理论依据。

**关键词:** 茶卡盐湖, 细菌, 古菌, 高通量测序, 微生物多样性

## Illumina-based sequencing analysis of microbial community composition in Chaka Salt Lake in Qinghai-Tibet Plateau

ZHANG Xin<sup>1</sup> LIU Jing<sup>1</sup> SHEN Guo-Ping<sup>1</sup> LONG Qi-Fu<sup>1</sup> HAN Rui<sup>2</sup> ZHU De-Rui<sup>1\*</sup>

(1. Center for Basic Medical Research, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

(2. Academy of Agriculture and Forestry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

**Abstract:** [Objective] Chaka Salt Lake is a famous natural and crystal salt lake on the Qinghai-Tibet Plateau, having unique halite deposits and abounding in edible salt. There are abundant halophilic bacteria resources and potential species in the salt lake environment. The community structure and species diversity of bacteria and archaea remains unknown. [Methods] Microbial community and

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31560039); Science and Technology Plan Projects of Qinghai Province (No. 2015ZJY23, 2015ZJ929Q)

\*Corresponding author: Tel: 86-971-6104062; E-mail: zhuderui2005@126.com

Received: October 19, 2016; Accepted: February 20, 2017; Published online (www.cnki.net): March 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31560039); 青海省科技计划项目(No. 2015ZJY23, 2015ZJ929Q)

\*通讯作者: Tel: 86-971-6104062; E-mail: zhuderui2005@126.com

收稿日期: 2016-10-19; 接受日期: 2017-02-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-03-16

diversity of water and sediment mixture samples were investigated by the 16S rRNA V3–V5 region gene based on an Illumina high-throughput sequencing platform. **[Results]** Totally 117 192 and 110 571 valid sequences of bacterial and archaeal 16S rRNA gene were generated respectively in this study. Results showed that the species annotation OTU (Operational taxonomic unit) numbers of bacteria and archaea were 421 and 317, respectively, belonging to definite taxonomic bacteria of 14 phylum 28 classes 170 genera and classified archaea of 5 phylum 4 classes 34 genera. Bacterial dominant groups were Firmicutes (68.37%), followed by Proteobacteria (20.49%). The bacterial dominant populations were *Bacillus* (41.94%), *Oceanobacillus* (8.03%), *Pseudomonas* (7.67%), *Halanaerobium* (7.42%) and *Lactococcus* (7.38%) in turn. Furthermore, archaeal dominant group was Halobacteria in the Euryarchaeota, and dominant archaea populations were *Halonotius* (17.21%) and *Halorubrum* (16.23%). **[Conclusion]** This study revealed the community structure and the species diversity of bacteria and archaea in Chaka Salt Lake. These results could provide significant theoretical references for the exploitation and utilization of microbial resource.

**Keywords:** Chaka Salt Lake, Bacteria, Archaea, High-throughput sequencing, Microbial diversity

我国的盐湖资源丰富, 大小盐湖共计 1 500 多个, 主要分布于新疆、青藏高原、内蒙古及其周边地区<sup>[1]</sup>。其中, 青藏高原柴达木盆地(平均海拔为 4 000 m)是高原湖泊聚集最密集的地区, 分布着地球上面积最大( $2 \times 10^6 \text{ km}^2$ )、数量最多以及盐碱湖集中的特色高原盐湖群, 如达布逊湖、托素湖、可鲁克湖、伊克柴达木湖、苏干湖、尕斯库勒湖、巴嘎柴达木湖、茶卡盐湖以及柯柯盐湖等。盐湖作为高盐浓度的特殊环境, 水体中栖息着大量的极端嗜盐微生物<sup>[2]</sup>, 然而不同的盐湖又具有不同的水化学性质和自然环境条件, 以此制约微生物的物种多样性和种质资源分布<sup>[3]</sup>。因此, 全面了解我国西部盐湖的微生物群落多样性及结构特征, 对盐湖资源的开发和合理利用具有重要的实际意义。

茶卡盐湖( $99^\circ 04' 41.67'' \text{E}$ ,  $36^\circ 45' 0.05'' \text{N}$ )位于我国西部的柴达木盆地, 平均海拔为 3 017 m, 属于天然结晶盐湖, 湖水总矿化度达 322.4 g/L, 是青藏高原重要的固液相石盐矿床之一。柴丽红等<sup>[4]</sup>采用 DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)法和纯培养法对茶卡盐湖底泥及水样进行菌株分离, 获得纯培养菌株 16 株, 并利用 DGGE 和 ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)结合分析了 12 株菌的系统发育关系。虽然分离培养技术有利于微生物资源的开发及利用, 但仅通过传统纯培养技术只能获得 1%左右甚至更低的可培养微生物, 对于认识环境微生物

的多样性及群落结构是远远不够的<sup>[5]</sup>。高通量测序技术具有低成本、高通量和高准确度等优势, 应用广泛, 已成为当前研究环境微生物多样性及群落结构差异的重要技术手段<sup>[6-7]</sup>。针对茶卡盐湖细菌和古菌群落结构及多样性的相关研究尚有不足, 本研究采用高通量测序技术分析茶卡盐湖微生物的群落结构, 旨在系统了解盐湖水体和底泥中细菌和古菌的多样性, 从而为后续极端环境微生物资源的挖掘及嗜盐菌的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及处理

采样地点: 青海省海西州乌兰县茶卡镇茶卡盐湖(海拔为 3 017 m); 采样时间: 2015 年 7 月下旬; 样点位置: 盐湖景区入口边缘区样点 CSL1 ( $99^\circ 5' 17.840 4'' \text{E}$ ,  $36^\circ 45' 23.385 0'' \text{N}$ ), 盐湖景区西侧深水样点 CSL2 ( $99^\circ 5' 9.934 8'' \text{E}$ ,  $36^\circ 45' 15.865 2'' \text{N}$ ), 盐湖景区东侧深水样点 CSL3 ( $99^\circ 6' 5.169 6'' \text{E}$ ,  $36^\circ 44' 48.875 4'' \text{N}$ )和莫河盐场深水样点 CSL4 ( $99^\circ 10' 22.976 4'' \text{E}$ ,  $36^\circ 42' 53.294 4'' \text{N}$ ), 取样点间距大于 100 m; 样品采集深度为 20 cm, 样品为茶卡盐湖水样和底泥混合物, 浑浊状态。检测水体温度为  $21.2\text{--}22.6^\circ \text{C}$ , 氧含量为 1.54–1.58 mg/L。样本储存于  $4^\circ \text{C}$  车载冰箱, 并立即运回实验室进行操作。各样本的理化性质测定( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 等)由上海微谱化工技术公司完成, 离子检测标准参照离

子色谱分析方法通则(JY/T 020-1996)。

## 1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit),上海赛百盛公司;微量检测仪 Microplate Reader,美国 MD 公司;引物合成,上海美吉生物公司;TransStart Fastpfu DNA Polymerase (TransGen AP221-02),北京全式金生物公司;AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒,AXYGEN 公司。QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司; ICS-1600 型离子色谱仪,美国戴安公司; MiSeq PE300 测序平台,美国 Illumina 公司; GeneAmp® 9700 型 PCR 仪,美国 ABI 公司。

## 1.3 DNA 的提取与 PCR 扩增

将采集的茶卡盐湖 4 个样品(水样与底泥混合物)进行 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜真空抽滤,将滤膜剪碎放入 DNA 试剂盒,参照试剂盒步骤提取基因组 DNA,2.0%琼脂糖凝胶电泳分析样本 DNA 的完整性。采用微量检测仪 Microplate Reader 分析 DNA 的质量纯度,合格样品的总 DNA 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。采用细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区和古菌 16S rRNA 基因 V3-V5 区进行 PCR 扩增,细菌引物为 338F (5'-ACT CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACT ACHVGGGTWTCTAAT-3');古菌引物为 344F (5'-AC GGGGYGCAGCAGCGCGA-3')和 915R (5'-GTGCT CCCCCGCCAATTCCT-3')。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): 5 $\times$ FastPfu buffer 4  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物(浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.8  $\mu\text{L}$ , TransStart FastPfu DNA Polymerase 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补充至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 细菌和古菌分别为 27 和 32 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。每个样本 3 个重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,采用 DNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, Tris-HCl 洗脱。PCR 产物采用蓝色荧光定量系统进行定量检测,按照每个样本的测序量要求相应比例的混合,委托上海美吉生物有限公司进行高通量测序。

## 1.4 测序数据优化处理

MiSeq PE300 测序平台获得双端序列数据,每个样本的数据量为两三万条序列。为了保证后续生物信息分析的准确性,对测序数据进行质量控制。基于 PE reads 之间的 Overlap 关系,将成对的 Reads 拼接成一条序列,同时对 Reads 的质量和 Merge 的效果进行质控过滤。根据序列首尾两端的 Barcode 和引物序列特征筛选有效序列,并校正序列方向。利用 Trimmomatic 和 FLASH 软件平台筛选拼接序列,过滤 Read 尾部质量值 20 以下的碱基,Overlap 区允许的错配率低于 0.2, Barcode 错配数为 0,最大引物错配数为 2。

## 1.5 群落结构与多样性分析

采用 Usearch (version 7.1)软件进行数据处理,基于 97%相似度水平筛选 OTU,然后根据各样品 OTU 与 Silva 数据库的相似性比对结果进行优势物种的 OTU picking 和物种注释分析,将所得结果采用 Graphpad Prism 5 软件绘制群落结构组分图(门 Phylum、纲 Class 与属 Genus 水平)。根据分类学统计结果分析微生物的群落结构、物种组成比例及丰度,绘制 Rank-Abundance 曲线<sup>[8]</sup>,以此反映样本所含物种的丰富度和均匀度。利用 Mothur 软件进行多样性指数(Alpha-diversity)、Chao1、ACE、香农指数(Shannon)和辛普森指数(Simpson)等计算分析。

## 1.6 样品间相似性聚类分析

基于茶卡盐湖的细菌和古菌代表性序列数计算并绘制热图(Heatmap)<sup>[9]</sup>,反映各样本在不同分类水平上群落组成的相似性和差异性。采用 R 语言 Vegan 包进行 Vegdist 距离计算和 Hclust 聚类分析,距离算法采用 Bray-Curtis 法,聚类方法为 Complete。

## 1.7 环境因子相关性分析

基于水质离子特征数据和 OTU 注释数据 (Species 和 Sample 数据, 97%相似度),采用多元直接梯度回归法分析菌群与环境因子之间的相关性。采用 R 软件语言 Vegan 包进行典范对应分析(Canonical correlation analyses, CCA)和作图, Bioenv 函数判断环境因子与样本群落分布差异的最大相关系数 Pearson, Permutest 判断 CCA 分析的显著性。

## 1.8 序列登录号

本研究所序列均已提交至 GenBank 数据库中, 细菌 BioSample 登录号为 SAMN04376877–SAMN049376880, 古菌 BioSample 登录号为 SAMN05356250–SAMN05356253。

## 2 结果与分析

### 2.1 高通量测序数据优化分析

通过 MiSeq 测序平台对茶卡盐湖 4 个水体生境样本的 16S rRNA 基因 V3–V5 区进行微生物多样性检测分析, 分别获得细菌总优化序列 117 192 条和古菌 110 571 条, 碱基平均长度分别为 449 bp 和 268 bp。利用 Mothur 软件做 Rarefaction 分析, 制作稀释曲线(图 1)。由图 1 可知, 随着测序序列数目的增加, 测序样本的曲线基本趋向平稳, 表明测序数据量渐近合理。其中, 样品 CSL2/3/4 来源于相似的盐湖深水区水样, 细菌和古菌的测序深度可以覆盖样品中微生物的数量。样品 CSL1 来源盐湖边缘区域, OTU 数量显著多于 CSL2/3/4, 可能因为采样地点位于盐湖边缘区, 易受到降水、外界土壤微生物以及人类活动等因素的影响所致。

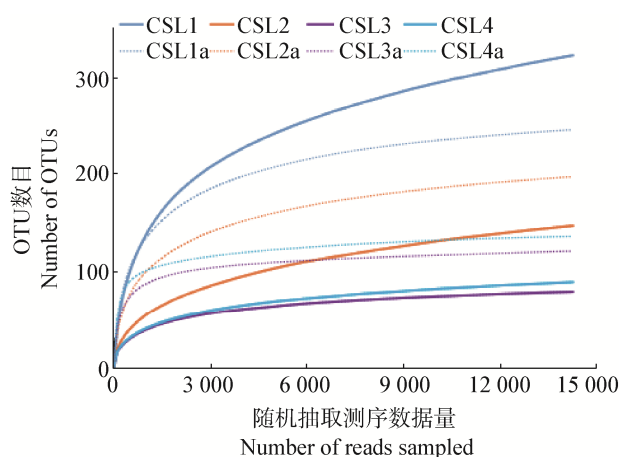


图 1 细菌和古菌稀释性曲线

Figure 1 Rarefaction curve of bacterial and archaeal sample

注: CSL1/2/3/4 代表细菌稀释性曲线; CSL1a/2a/3a/4a 代表古菌稀释性曲线。

Note: CSL1/2/3/4 represent rarefaction curve of bacteria; CSL1a/2a/3a/4a represent rarefaction curve of archaea.

### 2.2 茶卡盐湖主要微生物群落分布

在 Silva 数据库<sup>[10]</sup>进行相似性比对, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法进行 97%相似水平的 OTU 序列分类, 获得细菌 OTU 421 个和古菌 OTU 317 个。根据分类学注释结果, 分别在门 Phylum、纲 Class 和属 Genus 水平下进行样品物种丰度的统计分析(图 2)。从图 2A 可知, 茶卡盐湖细菌门类群多集中于厚壁菌门 Firmicutes (68.37%)、变形菌门 Proteobacteria (20.49%)和拟杆菌门 Bacteroidetes (8.46%), 而放线菌门 Actinobacteria (1.25%)、其它及未分类细菌所占比例相对较少(0.49%和 0.94%)。通过纲分类层次(图 2B)统计分析, 表明茶卡盐湖以芽孢杆菌纲 Bacilli (60.45%)为主, 其次为  $\gamma$ -Proteobacteria (17.26%)、梭菌纲 Clostridia (7.91%)和纤维粘菌纲 Cytophagia (5.20%), 其他所占比例相对较少。通过种属分类水平上的统计分析(图 2C), 确定茶卡盐湖的优势种群是芽孢杆菌属 *Bacillus* (41.94%)、海洋芽孢杆菌属 *Oceanobacillus* (8.03%)和假单胞菌属 *Pseudomonas* (7.67%), 然而因 CSL1 采样地点为盐湖边缘区, 相对于盐湖深水区 CSL2/3/4 而言, 更易受淡水补给、周边土壤微生物渗透及人为因素等外界条件的干扰, 致使优势细菌种群的丰度比例有所差异。

从图 2D 可知, 茶卡盐湖古菌类群多集中于广古菌门 Euryarchaeota (96.50%)以及部分 Unclassified archaea (2.16%)。通过纲分类层次(图 2E)统计, 表明茶卡盐湖古菌以盐杆菌纲 Halobacteria (94.57%)为主, 而甲烷杆菌纲 Methanobacteria (0.77%)、甲烷微菌纲 Methanomicrobia (0.72%)和热源体纲 Thermoplasmata (0.43%)等相对较少。从属分类水平(图 2F)分析, 表明丰度较高且 4 个样品均有分布的主要属类群有 *Halonotius* (17.21%)、*Halorubrum* (16.23%)、盐盒菌属 *Haloarcula* (8.34%)、*Halapricum* (6.37%)、*Halovenus*、*Halobellus*、*Halorubellus*、嗜盐碱单胞菌属 *Natronomonas*、盐盘菌属 *Haloplanus*、*Halomicroarcula*、嗜盐球菌属 *Halococcus*、*Halolamina*、盐棍菌属 *Halorhabdus*、盐筒菌属

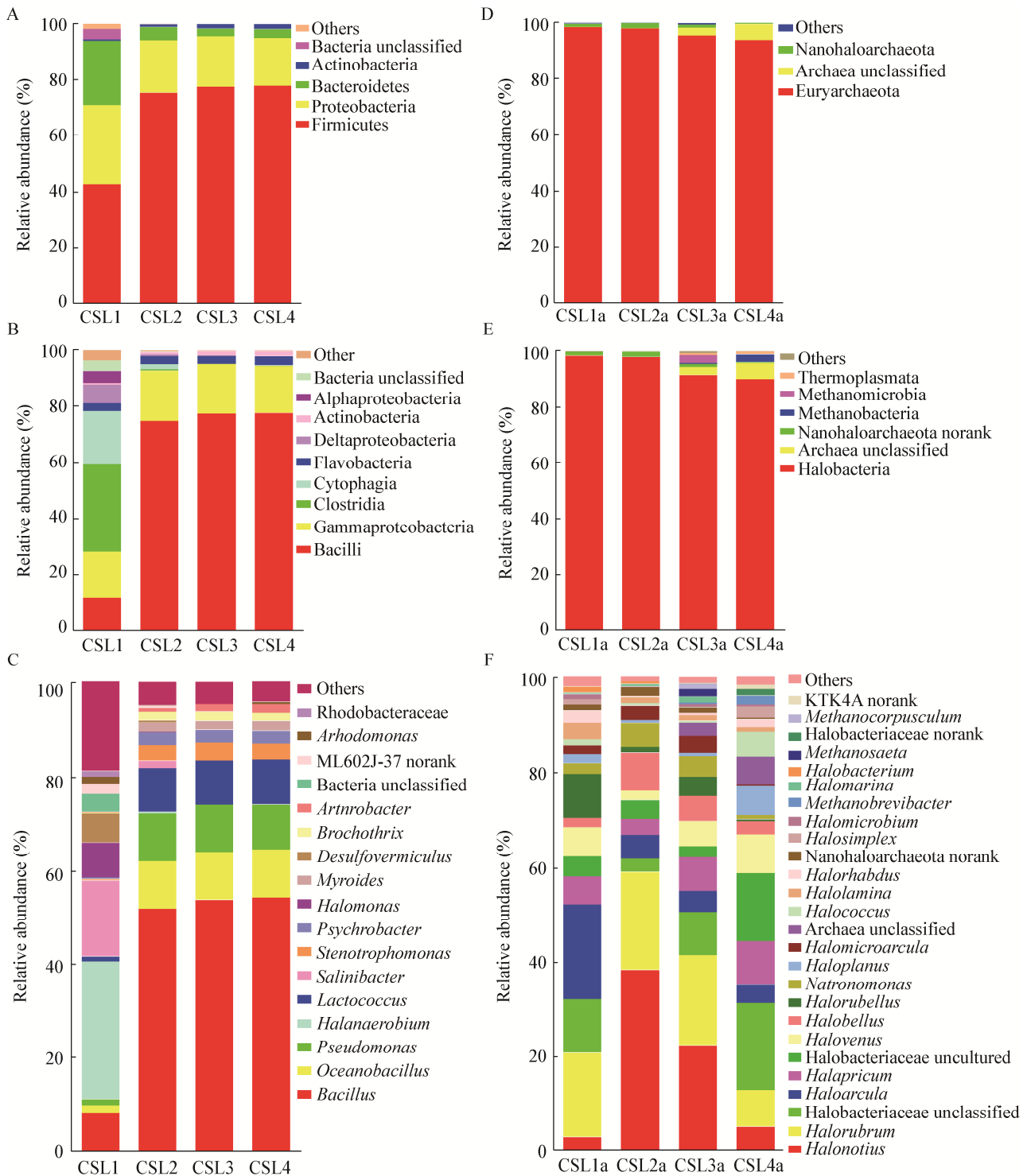


图 2 茶卡盐湖微生物分类学水平的相对丰度统计分析

Figure 2 Statistical analysis of relative abundance at the microbial taxonomic levels of Chaka Salt Lake

注：A：细菌门分类；B：细菌纲分类；C：细菌属分类；D：古菌门分类；E：古菌纲分类；F：古菌属分类。

Note: A: Bacteria phylum; B: Bacteria class; C: Bacteria genus; D: Archaea phylum; E: Archaea class; F: Archaea genus.

*Halosimplex*、盐微菌属 *Halomicrobium*、*Nanohaloarchaeota* 和盐杆菌科(*Halobacteriaceae*)中未确定分类地位的属等。其中 CSL1a 的优势菌为盐盒菌属 *Haloarcula*，占到 20.04%；CSL2a 和 CSL3a 的优势种群为 *Halonotius*，所占比例分别为 38.27% 和 22.30%；CSL4a 的优势菌为 *Halobacteriaceae* 中未确定分类地位的属，比例为 18.39%。有些类群仅在特定的样品中出现，如 CSL1a 和 CSL2a 特有的菌群为盐杆菌属 *Halobacterium*，CSL3a 和 CSL4a 出现特有的候选 KTK4A norank 等，但这些特有菌群的相对丰度通常较低。此外，尚存在大量未确定分类地位(*Unclassified*)和未纯培养(*Uncultured*)的古菌类群，两者占比例分别为 12.57%和 6.25%。

2.3 茶卡盐湖微生物多样性分析

将高通量测序结果进行比对，获得分类学地位明确的细菌有 14 门 28 纲 170 属，古菌有 5 门 4 纲 34 属，未确定分类地位(*Unclassified*)的细菌和古菌共计有 10 门 24 纲 90 属。此外，盐湖生境中还存在部分未指定分类(*Unassigned*)的微生物，至少在分类学上还未归属于细菌或古菌。利用 *Mothur* 软件进行多样性指数(*Alpha-diversity*)统计分析(表 1)，表明多样性测序结果覆盖率均在 99.57%以上，数据有效可靠。从整体来看，茶卡盐湖边缘区样点 CSL1 的细菌 OTU 丰富度、物种总数与群落多样性指数明显高于古菌，同时也高于盐湖中心深水样点

CSL2/3/4。对比分析盐湖中心深水样 CSL2/3/4，表明受中心区域饱和盐度的影响，古菌的群落种类多样性、OTU 丰富度和物种总数均显著高于细菌。

2.4 茶卡盐湖微生物丰度及相似性聚类分析

根据 *Usearch* 软件分析每个有效序列 OTU 所占的丰度比例绘制 Heatmap，结果如图 3 所示。细菌聚类分析显示(图 3A)，聚集分支丰度由高到低依次为 *Firmicutes* (*Bacilli* 纲中的 *Bacillus*、*Oceanobacillus*、*Lactococcus* 及 *Clostridia* 纲中的 *Halanaerobium*)、*Proteobacteria* ( $\gamma$ -*Proteobacteria* 纲中的 *Pseudomonas*、*Stenotrophomonas*、*Psychrobacter* 及 *Halomonas*)和 *Bacteroidetes* (*Cytophagia* 纲中的 *Salinibacter* 和 *Flavobacteria* 纲中的 *Myroides*)；而古菌的高丰度聚类分支集中在 *Euryarchaeota* (*Halobacteria* 纲中的 *Halonotius*、*Halorubrum*、*Haloarcula*、*Halapricum* 和 *Halovenus* 等) (图 3B)，且物种丰度明显低于细菌。此外，茶卡盐湖 CSL1/2/3/4 四个样品聚类为 2 簇，其中 CSL2/3/4 聚为一簇，说明 3 个样本具有相似性，而 CSL1 单独为一簇。聚类结果显示 CSL2/3/4 的细菌丰度分布相似，但 CSL1 细菌的种类和数量均多于 CSL2/3/4。各样品的古菌聚类以 CSL1 和 CSL4 聚为一簇，而 CSL2 和 CSL3 聚为一簇，表明 CSL1 与 CSL4 样本具有相似性，CSL2 与 CSL3 具有相似性，但与细菌分布规律相比，优势度明显，组间差异相对较小。

表 1 茶卡盐湖微生物多样性统计分析								
Table 1 Statistical analysis of microbial diversity in the Chaka Salt Lake								
分类	样本	有效读数	OTU	Shannon	Simpson	Coverage	Ace 指数	Chao1 指数
Classification	Sample	Effective reads					Ace index	Chao1 index
细菌	CSL1	32 762	363	3.84	0.054	99.57	535	513
	Bacteria							
	CSL2	27 707	170	2.56	0.140	99.77	228	223
	CSL3	31 365	86	2.39	0.152	99.93	98	110
古菌	CSL4	25 358	100	2.40	0.153	99.89	126	133
	CSL1a	28 204	245	4.01	0.045	99.80	260	263
	Archaea							
	CSL2a	26 057	197	3.41	0.078	99.77	219	222
	CSL3a	35 526	121	3.76	0.042	99.90	132	141
	CSL4a	20 784	136	4.22	0.021	99.93	144	140

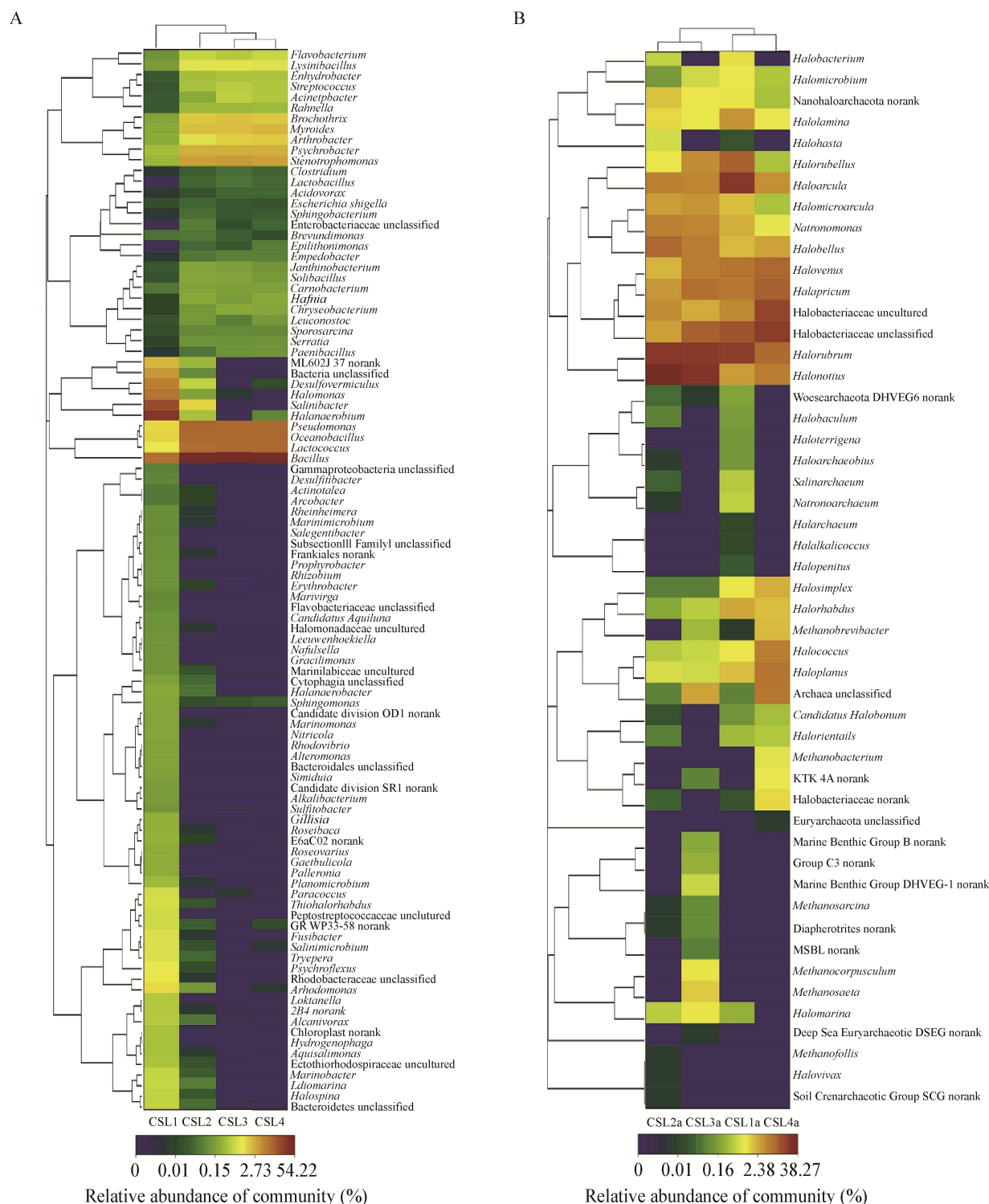


图3 茶卡盐湖属分类水平下的多样本热图与相似性分析

Figure 3 Microbial community heatmap analysis and multiple samples similarity tree at the genus level

注：A：细菌属分类水平；B：古菌属分类水平。

Note: A: Bacterial community at the genus level; B: Archaeal community at the genus level.



2.5 茶卡盐湖环境因子 CCA 分析

采用离子色谱法分析 4 个样本的离子特征参数(表 2), 表明茶卡盐湖中心区域总盐度为 315.81–322.40 g/L, pH 7.20–7.81, 属于极端盐湖。依据离子浓度特征常数结合盐湖水化学类型标准, 茶卡盐湖以  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  为主要离子, 属于硫酸镁亚型盐湖。就水体的有机碳和有机氮而

言, 盐湖边缘区样本 CSL1 的营养度要高于盐湖中心区域 CSL2/3/4, 而 pH 以及各离子浓度相对偏低。

基于水质离子特征测定数据和 Species-sample 丰度数据, 采用多元直接梯度回归分析采样点、菌群与环境因子之间关系, 并构建典范对应 CCA 分析(图 4)。结果表明: 样本 CSL1 与 CSL2/3/4 的总有机碳源(Total organic carbon, TOC)和总有机氮

表 2 茶卡盐湖样本环境化学特征分析											
Table 2 Characteristic analysis of environmental chemistry in the Chaka Salt Lake											
样本 Sample	矿化度 Total salinity (g/L)	有机碳 TOC (%)	有机氮 TN (%)	离子特征参数 Ion characteristic parameters (g/L)							
				pH	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cl}^-$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{CO}_3^{2-}$
CSL1	210.12	8.2	1.23	7.20	81.75	2.62	7.89	0.32	107.34	10.24	0.15
CSL2	322.45	4.5	0.28	7.72	106.39	3.25	12.41	0.42	183.46	21.58	0.25
CSL3	315.81	4.6	0.25	7.81	105.23	3.47	12.51	0.42	187.71	23.63	0.20
CSL4	322.17	4.4	0.30	7.75	107.46	3.19	12.24	0.49	187.63	20.10	0.22

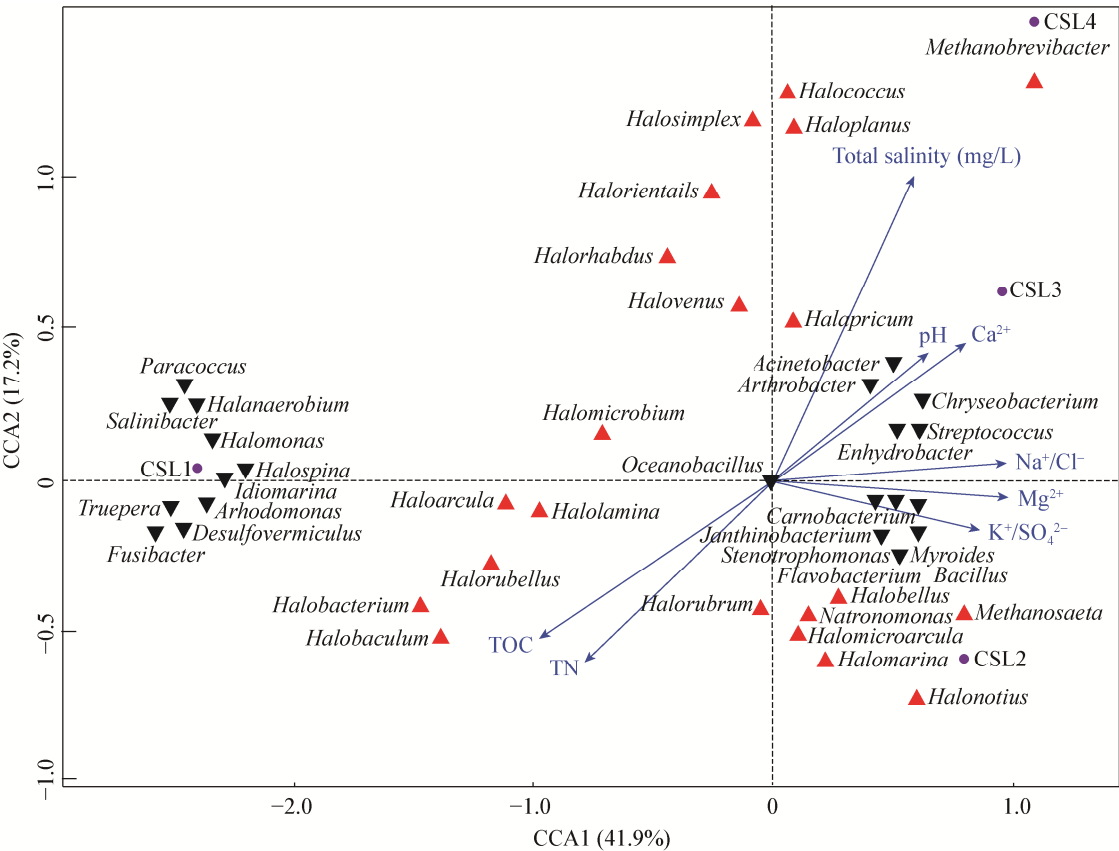


图 4 茶卡盐湖微生物信息 CCA 分析

Figure 4 Canonical correspondence analysis of species information in the Chaka Salt Lake

注: ●: 各样本组; ▼: 细菌物种; ▲: 古菌物种; 箭头: 环境因子。

Note: Round dots (●): Different samples; Upper triangles (▼): Bacteria species; Down triangles (▲): Archaea species; Arrows: Environmental factors.



(Total nitrogen, TN)的属性值因采样点差异而有所不同,但 CSL2/3/4 组与总盐度(Total salinity, TS)、 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ 浓度和 pH 的属性值相似,对样本的影响程度相当。茶卡盐湖 CSL1 样本中细菌优势菌属 *Desulfovermiculus*、*Halomonas*、*Halanaerobium*、*Paracoccus* 及 *Arhodomonas* 属群与 TOC 和 TN 因子明显呈正相关,而 CSL2/3/4 样本中的 *Acinetobacter*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Chryseobacteriu*、*Enhydrobacter*、*Stenotrophomonas* 及 *Flavobacterium* 等细菌属群与 TS、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ 浓度和 pH 等环境因子呈明显正相关,尤其是总盐度的制约影响。

通过分析古菌与环境因子的制约关系,发现 CSL1 样本中的 *Haloarcula*、*Halobacterium*、*Halolamina*、*Halomicrobium*、*Halobaculum* 和 *Halorubellus* 属群与 TOC 和 TN 因子明显呈正相关; CSL2 中的 *Methanosaeta*、*Natronomonas*、*Halomicroarcula* 和 *Halomarina* 等属群与  $\text{K}^+/\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度等环境因子呈正相关; CSL3/4 中的 *Methanobrevibacter*、*Halococcus*、*Haloplanus*、*Halapricum*、*Halosimplex*、*Halorientails* 及 *Halovenus* 属群与 TS 和 pH 因子呈正相关,且总盐度 TS 为主要制约因子,由此表明盐湖古菌的属群分布受到诸多因素的综合制约影响,且针对不同类群,其制约因素有所差异。

### 3 讨论

#### 3.1 茶卡盐湖微生物优势类群

大量研究发现,盐湖细菌类群多以 Proteobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、酸杆菌门 Acidobacteria 和 Actinobacteria 等为主<sup>[11-12]</sup>,但因各个盐湖水质化学特征差异,在群落结构和优势类群比例方面均有不同。张彦茹<sup>[13]</sup>在研究内蒙古桑根达来盐碱湖(pH 9.39,盐度为 69.7 g/L)、达各淖盐湖(pH 9.20,盐度为 100.0 g/L)、扎格斯台淖盐湖(pH 9.05,盐度为 13.5 g/L)中的细菌群落时发现这些盐湖中主要以 Proteobacteria、Actinobacteria 为主,而 Actinobacteria 只有在富含钾盐及 pH 偏碱性的盐湖中方可被检出;Zaitseva 等<sup>[14]</sup>研究外贝加尔咸水

湖 Beloe (pH 9.00–11.00,盐度为 308.0 g/L)微生物群落结构结果显示,Proteobacteria、Bacteroidetes 和 Firmicutes 为其主要优势菌门;杨丽等<sup>[15]</sup>对内蒙古姆州诺尔盐湖(硫酸盐型硫酸钠亚型盐湖,NaCl 浓度为 63.2 g/L)卤水样品进行研究,发现优势菌门为 Proteobacteria 和 Bacteroidetes;时玉等<sup>[16]</sup>对青藏高原盐湖水阿翁错湖(盐度为 87.1 g/L)的研究显示,Proteobacteria、Actinobacteria 和 Firmicutes 为主要分布类群,而 Cyanobacteria 和栖热菌门 Deinococcus-Thermus 为其特有菌门。本研究中茶卡盐湖总盐度为 322.4 g/L, pH 7.80,水体沉淀盐晶和盐华。细菌类群多集中于 Firmicutes (68.37%)、Proteobacteria (20.49%)、Bacteroidetes (8.46%)和 Actinobacteria (1.25%),与上述同类高盐环境相比,优势类群基本一致,仅丰度比例各有不同,反映出不同地区盐环境对微生物群落组成的制约影响。此外,本研究中也检出少量 Actinobacteria,可能与盐湖的微碱性相关。

湖泊中的大多数古菌都属于 Euryarchaeota 和泉古菌门 Crenarchaeota,但是在目或属的水平上,不同湖泊中的种类是不一致的<sup>[17]</sup>。如朱莉等<sup>[18]</sup>采用免培养法对新疆顿巴斯他乌盐湖(pH 8.80,盐度为 97.7 g/L)沉积物古菌组成进行研究,结果显示古菌类群多集中于 Euryarchaeota (92.0%)和 Crenarchaeota (8.0%)。邵冠军<sup>[19]</sup>对艾比湖(pH 8.60,盐度为 44.2 g/L)的古菌多样性进行研究,发现古菌类群多集中在 Euryarchaeota (96.6%),其次为纳古菌门 Nanohaloarchaeota (1.1%)。本研究中,茶卡盐湖古菌类群多集中于 Euryarchaeota (96.5%),而 Crenarchaeota 未被检出,且有未确定分类地位的古菌门(Archaeaunclassified, 2.16%)和 Nanohaloarchaeota (1.13%),与相关研究报道一致。

#### 3.2 茶卡盐湖微生物优势种群

我国青海、新疆、内蒙古等西部地区的盐湖细菌优势种群多以 *Bacillus*、*Halomonas*、喜盐芽孢杆菌属 *Halobacillus* 和硝化球菌属 *Nitrococcus* 等为主<sup>[15,20-21]</sup>。因不同盐湖的形成过程、盐分组成及气

候特征差异,致使优势种群组成存在差异。内蒙古姆州诺尔盐湖<sup>[15]</sup>(pH 7.00,盐度为 63.16 g/L)优势菌属有 *Nitrococcus* (8.29%)、*Halomonas* (2.64%)和海杆菌属 *Marinobacter* (1.86%);新疆罗布泊盐湖<sup>[22]</sup>(pH 7.50–10.00,盐度为 229.78–689.03 g/L)的优势菌属依次为 *Halomonas* (30.55%)、色盐杆菌属 *Chromohalobacter* (20.37%)和 *Halobacillus* (18.51%)等。本研究获得茶卡盐湖(pH 7.8,盐度为 322.4 g/L)的细菌共计 170 个属,与内蒙古姆州诺尔盐湖、新疆罗布泊盐湖相比较,优势类群明显差异,以 *Bacillus* (41.94%)为主,其次为 *Oceanobacillus* (8.03%)。*Bacillus* 作为茶卡盐湖细菌的第一优势类群,属于革兰阳性菌,好氧或兼性厌氧,具有能够产生对不利条件具有特殊抵抗力的芽孢等特点。Sylvan 等<sup>[23]</sup>、Hong 等<sup>[24]</sup>、Lei 等<sup>[25]</sup>、Bagheri 等<sup>[26]</sup>和 Chen 等<sup>[27]</sup>曾在高盐(碱)环境中筛选获得大量的 *Bacillus* 新种,由此说明 *Bacillus* 对高盐环境具有适应生存能力。*Oceanobacillus* 作为第二大优势类群,属海洋微生物类群范畴,大多数在海洋环境中被检出,如 Kim 等<sup>[28]</sup>研究韩国东海微生物时检出 *Oceanobacillus profundus* 的新种;郁聪<sup>[29]</sup>采用多相分类法对南太平洋环流区表层、底层海水及地层沉积物分离出的菌株进行研究,发现有 5 株 *Oceanobacillus* 的新种。我国盐湖研究中关于 *Oceanobacillus* 的报道较少(如青海湖<sup>[3]</sup>),这类微生物在嗜盐或嗜盐碱生理生化、代谢功能和遗传基因表达等方面发生改变,从而适应盐(碱)环境得以生存,可能与青藏高原盐湖地质的历史演变有关<sup>[3]</sup>。

嗜盐古菌是极端环境中的微生物常见类群之一,目前已报道的盐湖古菌优势种群有 *Halorubrum*、*Haloterrigena*、*Natrinema*、*Haloarcula* 和 *Halonotius* 等<sup>[21,30]</sup>。崔恒林等<sup>[30]</sup>采用富集培养和菌种分离的方法研究新疆艾比湖(pH 8.09,盐度为 112.4 g/L)和艾丁湖(pH 7.49,盐度为 336.47 g/L)的嗜盐古菌多样性,结果表明 *Natrinema* (39.3%)、*Haloterrigena* (25%)和 *Halorubrum* (19.6%)在两湖中均有分布且属于优势菌属。Xu 等<sup>[31]</sup>在研究新疆

阿牙克库木盐湖(盐度为 157.4 g/L)可培养嗜盐古细菌时,结果显示优势菌属是 *Halorubrum* 和 *Natrinema*,丰度比例分别为 47%和 24%。王璐<sup>[32]</sup>采用非培养技术对连云港地区盐水环境中古菌多样性进行研究,结果表明 *Halorubrum* (53.56%)、*Halonotius* (22.22%)为优势菌属。本研究中,茶卡盐湖古菌的优势菌属依次为 *Halonotius* (17.21%)、*Halorubrum* (16.23%)、*Haloarcula* (8.34%)、*Halapricum* (6.37%)、*Halovenus*、*Halobellus* 和 *Halorubellus*,均属于盐杆菌科,对比分析表明不同盐湖因环境化学特征各异,致使优势种群的群落分布和丰度比例有所差异。

### 3.3 茶卡盐湖微生物多样性

在极端(如高盐、强碱或盐碱等)环境下,微生物多样性呈现偏低态势<sup>[16]</sup>。在盐度接近饱和的极端盐湖中,古菌是主要的嗜盐微生物菌群,而细菌只占很少一部分<sup>[33]</sup>。本研究利用高通量测序平台全面检测获得茶卡盐湖中心区域样本细菌 OTU 为 86–170 (覆盖度 99.57%–99.93%),古菌 OTU 为 121–197 (覆盖度 99.70%–99.93%)。多样性分析数据表明单个样本中古菌 OTU 丰富度、可观察物种和分布均匀度均明显高于细菌,生物种群信息量呈增大趋势,与相关报道相一致<sup>[4]</sup>。对比新疆赛里木咸水湖(盐度为 27.14 g/L)和柴窝堡咸水湖(盐度为 43.84 g/L)<sup>[34]</sup>、内蒙古桑根达来盐碱湖(盐度为 69.70 g/L)、扎格斯台淖盐湖(盐度为 13.50 g/L)和达各淖盐湖(盐度为 100.00 g/L)<sup>[13]</sup>、陕西花马池(盐度为 108.50 g/L)和苟池(盐度为 156.77 g/L)<sup>[2]</sup>及柴达木盆地达布逊盐湖(盐度为 371.05 g/L)<sup>[5]</sup>,发现随着盐度的增加,细菌 OTU 数量呈减少趋势,而古菌则相反。此外,我们还发现采样点的水环境盐浓度的变化影响微生物多样性的差异,如在盐浓度较低的盐湖边缘区域,可能因为淡水的补给流入,周边土壤微生物的侵入以及牧区牛羊或生产生活造成碳氮源营养物质的汇集,致使微生物的种类结构趋于复杂,多样性(Shannon 3.84–4.01)及丰度也趋高。

### 3.4 茶卡盐湖环境因子影响

通常, 盐湖微生物群落结构及多样性受到季节、温度、盐度、有机物比例以及水体富营养状况等多种因素的制约影响, 其中盐度或矿化度是决定细菌群落结构的主要因素。盐湖细菌多样性可随湖泊盐度的变化而变化, 而古菌群落结构则受多种环境因素的综合影响<sup>[17,35]</sup>。李璐等<sup>[35]</sup>研究内蒙古巴丹吉林沙漠盐湖(pH 10.00 以上, 盐度为 165–397 g/L)细菌群落和环境因子的相关性, 发现总盐度与菌群结构呈最大正相关, 相关系数高达 0.98。Wu 等<sup>[36]</sup>对青藏高原 16 个不同的盐浓度湖泊进行研究, 发现盐度是影响湖泊中细菌群落组成和丰度的主要环境因子, Proteobacteria 中不同纲分类细菌的相对丰度随含盐量的变化而改变。

本研究中, 细菌的分布与环境因子之间的关系比较明显, TS 是 CSL2/3/4 饱和盐度样本细菌群落结构差异的主要因素, 对于  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和 pH 等单因素而言, 细菌 *Acinetobacter*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Chryseobacterium*、*Enhydrobacter*、*Stenotrophomonas* 和 *Flavobacterium* 类群的制约影响程度基本一致。环境中 TN 和 TOC 是中盐度样本 CSL1 的细菌群落差异制约因素, 尤以 *Desulfovermiculus*、*Halomonas*、*Halanaerobium*、*Paracoccus* 和 *Arhodomonas* 属群的分布差异明显。此外, 古菌群落因不同样本的物化参数差异而呈现明显的分布差异, 如 CSL1 中的 *Haloarcula*、*Halobacterium*、*Halolamina*、*Halomicrobium*、*Halobaculum* 与 *Halorubellus* 属群受制于 TN 和 TOC; CSL2 中的 *Natronomonas*、*Halomicroarcula*、*Halomarina* 及甲烷微菌纲中的 *Methanosaeta* 属与  $\text{K}^+/\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  等环境因子有关; CSL3/4 中 Halobacteriaceae 种属(*Halococcus*、*Haloplanus*、*Halapricum*、*Halosimplex* 和 *Halorientails* 等)的分布受制于 TS 的影响。

### 3.5 盐湖微生物多样性研究

目前, 分子生物学手段如基于分子杂交技术的荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization,

FISH), 基于 PCR 技术的 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 与 T-RFLP、DGGE 与 TGGE (Temperature gradient gel electrophoresis) 以及 16S rRNA 基因保守区高通量测序等技术已广泛应用于湖泊生态系统中微生物多样性的研究<sup>[37]</sup>。其中 16S rRNA 基因高通量测序技术体系成熟、成本低廉, 被广泛应用于揭示盐湖中微生物群落结构及多样性<sup>[38]</sup>, 但很少有研究者能考虑到细菌和古菌 16S rRNA 基因内不同可变区的基因差异性对测序结果的影响<sup>[39]</sup>。有文献报道<sup>[40]</sup>: 基因差异性可能导致基于 16S rRNA 基因检测微生物多样性的方法存在类似 OTU 数目偏高等问题, 从而使可靠性受到质疑。为了更全面、更深入地研究这一问题, Hong 等<sup>[41]</sup>和 Lee 等<sup>[42]</sup>研究发现, 当在 97% 水平下定义 OTU 时, 测序区选择细菌 V4–V5 区产生的误差值最小 (3%), V3 区 (5.2%) 次之, 而古菌的不同可变区差异不大, 此为测序区域的选择提供了可信性参考依据。此外, 研究还发现 Firmicutes 和 Proteobacteria 类群受基因差异性影响较大, 而古菌 Crenarchaeota 类群几乎不受影响, 这可能与它们的 16S rRNA 基因区域的结构不同有关<sup>[40]</sup>。因此, 针对微生物 16S rRNA 基因结构的复杂性, 需运用多种分子生物学手段相结合的方法研究微生物生态系统、种群群落及多样性, 这势必会成为未来的研究趋势。

综上所述, 茶卡盐湖生境中的细菌多以 Firmicutes、Proteobacteria 和 Bacteroidetes 为主, 而古菌类群多集中于 Euryarchaeota (96.5%), 但仍存在大量未知的微生物, 其中包括未指定分类、未确定门或科属分类地位的微生物, 尚需深入研究。总体而言, 盐湖中心区域的古菌群落种类多样性、OTU 丰富度和物种总数均显著高于细菌, 不同属类群的群落分布受到盐湖总盐度、有机氮与有机碳以及各种离子浓度的综合制约影响, 其中总盐度是细菌群落组成和丰度制约的主要因素。借助高通量测序技术, 我们初步研究青藏高原茶卡盐湖的细菌和古菌多样性, 为微生物资源的挖掘和开发利用提供了一定的参考依据。

## 参考文献

- [1] Zheng MP. On saline lakes of China[J]. Mineral Deposits, 2001, 20(2): 181-189 (in Chinese)  
郑绵平. 论中国盐湖[J]. 矿床地质, 2001, 20(2): 181-189
- [2] Cao LF, Yin TT, Yuan ZY, et al. Analysis of the microbial community composition of Huama Lake and Gou Lake in Shannxi Province based on high-throughput sequencing[J]. Letters in Biotechnology, 2016, 27(3): 374-380 (in Chinese)  
曹露芬, 殷婷婷, 袁振亚, 等. 基于高通量测序的陕西花马池和苟池微生物群落多样性分析[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(3): 374-380
- [3] Zhu DR, Liu J, Han R, et al. Population diversity and phylogeny of halophiles in the Qinghai Lake[J]. Biodiversity Science, 2012, 20(4): 495-504 (in Chinese)  
朱德锐, 刘建, 韩睿, 等. 青海湖嗜盐微生物系统发育与种群多样性[J]. 生物多样性, 2012, 20(4): 495-504
- [4] Chai LH, Cui XL, Peng Q, et al. Bacterial diversity of two salt lakes in Qinghai[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(3): 271-275 (in Chinese)  
柴丽红, 崔晓龙, 彭谦, 等. 青海两盐湖细菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(3): 271-275
- [5] Zhao WY, Yang J, Dong HL, et al. Microbial diversity in the hypersaline Dabuxun Lake in Qaidam Basin, China[J]. Earth and Environment, 2013, 41(4): 398-405 (in Chinese)  
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
- [6] Wu LY, Wen CQ, Qin YJ, et al. Phasing amplicon sequencing on Illumina MiSeq for robust environmental microbial community analysis[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 125
- [7] You J, Wu G, Ren FP, et al. Microbial community dynamics in Baolige oilfield during MEOR treatment, revealed by Illumina MiSeq sequencing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1469-1478
- [8] Bates ST, Clemente JC, Flores GE, et al. Global biogeography of highly diverse protistan communities in soil[J]. The ISME Journal, 2012, 7(3): 652-659
- [9] Jami E, Israel A, Kotser A, et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood[J]. The ISME Journal, 2013, 7(6): 1069-1079
- [10] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): 590-596
- [11] Ventosa A, Fernández AB, León MJ, et al. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments[J]. Extremophiles, 2014, 18(5): 811-824
- [12] Ghai R, Pašić L, Fernández AB, et al. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments[J]. Scientific Reports, 2011, 1: 135
- [13] Zhang YR. Bacterial diversity of Haloalkaline Lakes in desert Hunshandake in Inner Mongolia[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2011 (in Chinese)  
张彦茹. 内蒙古浑善达克盐碱湖细菌多样性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2011
- [14] Zaitseva SV, Abidueva EY, Namsaraev BB, et al. Microbial community of the bottom sediments of the Brackish Lake Beloe (Transbaikial Region)[J]. Microbiology, 2014, 83(6): 861-868
- [15] Yang L, Yin TT, Yin X, et al. Analysis on the bacterial community composition of Muzhou Nuor Salt Lake in Inner Mongolia based on high-throughput sequencing[J]. Sichuan Environment, 2015, 34(6): 34-38 (in Chinese)  
杨丽, 殷婷婷, 尹馨, 等. 基于高通量测序的内蒙古姆州诺尔盐湖细菌群落组成分析[J]. 四川环境, 2015, 34(6): 34-38
- [16] Shi Y, Sun HB, Liu YQ, et al. Vertical distribution of bacterial community in sediments of freshwater lake Puma Yumco and saline lake AWongco on the Tibetan Plateau[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2379-2387 (in Chinese)  
时玉, 孙怀博, 刘勇勤, 等. 青藏高原淡水湖普莫雍错和盐水湖阿翁错湖底沉积物中细菌群落的垂直分布[J]. 微生物学报, 2014, 41(11): 2379-2387
- [17] Gong SJ, Wu L, Li SG. Studying on lake microbial diversity[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(4): 54-57 (in Chinese)  
龚世杰, 吴兰, 李思光. 湖泊微生物多样性研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 54-57
- [18] Zhu L, Yang HM, Wang Y, et al. Archaeal diversity in sediment of Dunbasitawu salt lake Xinjiang, China, estimated by 16S rRNA gene sequence analyses[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 769-775 (in Chinese)  
朱莉, 杨红梅, 王芸, 等. 新疆顿巴斯他乌盐湖沉积物免培养古菌多样性[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 769-775
- [19] Shao GJ. Study on Biodiversity of Actinomycetes and Arch Aea in the Sediments of Ebinur Lake[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2015 (in Chinese)  
邵冠军. 艾比湖湖底沉积物中放线菌和古菌菌群多样性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2015
- [20] Li M, Guo J, Shi ZG, et al. Bacterial community structure in lakes on the Northeastern Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(5): 750-758 (in Chinese)  
李明, 郭嘉, 石正国, 等. 春季青藏高原东北部湖泊细菌种类组成[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 750-758
- [21] Xu XW, Wu M, Dilber T, et al. Halophilic archaea diversity of Aibi Lake and Yiwu Lake in Xinjiang[J]. Biodiversity Science, 2006, 14(4): 359-362 (in Chinese)  
许学伟, 吴敏, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性[J]. 生物多样性, 2006, 14(4): 359-362
- [22] Luo M, Han J, Jiang PA, et al. Diversity of culturable halophilic bacteria isolated from Lop Nur region in Xinjiang[J]. Biodiversity Science, 2009, 17(3): 288-295 (in Chinese)  
罗明, 韩剑, 蒋平安, 等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐细菌多样性[J]. 生物多样性, 2009, 17(3): 288-295
- [23] Sylvan JB, Hoffman CL, Momper LM, et al. *Bacillus rigiliprofundi* sp. nov., an endospore-forming, Mn-oxidizing, moderately halophilic bacterium isolated from deep subsurface basaltic crust[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(6): 1992-1998

- [24] Hong SW, Kwon SW, Kim SJ, et al. *Bacillus oryzaecorticis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from rice husks[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(8): 2786-2791
- [25] Lei ZC, Qiu P, Ye RY, et al. *Bacillus shacheensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkali soil[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2014, 60(3): 101-105
- [26] Bagheri M, Didari M, Amoozegar MA, et al. *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(4): 811-816
- [27] Chen YG, Zhang YQ, He JW, et al. *Bacillus hemicentroti* sp. nov., a moderate halophile isolated from a sea urchin[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(12): 2950-2955
- [28] Kim YG, Choi DH, Hyun S, et al. *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(2): 409-413
- [29] Yu C. Taxonomic analysis and related research of *Oceanobacillus pacificus* sp. nov. and other five novel bacteria from the South Pacific Gyre[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)  
郁聪. 太平洋海洋杆菌(*Oceanobacillus pacificus* sp. nov.)等5株南太平洋新菌的分类鉴定及相关特性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014
- [30] Cui HL, Yang Y, Dilber T, et al. Biodiversity of halophilic archaea isolated from two salt lakes in Xin-jiang rejon of China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(2): 171-176 (in Chinese)  
崔恒林, 杨勇, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 新疆两盐湖可培养嗜盐古菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 171-176
- [31] Xu XW, Wu M, Wu YH, et al. Culturable halophilic archaeal diversity of Ayakekumu salt lake located in Xinjiang, China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(8): 3119-3123
- [32] Wang L. Diversity of halophilic archaea isolated from different hypersaline lakes and salt fields[D]. Xuzhou: Master's Thesis of Jiangsu Normal University, 2014 (in Chinese)  
王璐. 不同盐湖、盐田之间嗜盐古菌多样性比较[D]. 徐州: 江苏师范大学硕士学位论文, 2014
- [33] Pašić L, Bartual SG, Ulrih NP, et al. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 54(3): 491-498
- [34] Deng LJ, Lou K, Zeng J, et al. Archaea diversity in water of two typical brackish lakes in Xinjiang[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(21): 6811-6818 (in Chinese)  
邓丽娟, 娄恺, 曾军, 等. 新疆两典型微咸水湖水体免培养古菌多样性[J]. 生态学报, 2012, 32(21): 6811-6818
- [35] Li L, Hao CB, Wang LH, et al. Microbial diversity of salt lakes in Badain Jaran desert[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(4): 412-424 (in Chinese)  
李璐, 郝春博, 王丽华, 等. 巴丹吉林沙漠盐湖微生物多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(4): 412-424
- [36] Wu QL, 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
- [37] Li GQ, Xue LG, Mo TL, et al. New progress of research methods for microbial diversity in lake sediment[J]. Journal of Lanzhou Jiaotong University, 2015, 34(6): 12-16 (in Chinese)  
李国强, 薛林贵, 莫天录, 等. 湖泊沉积物微生物多样性研究方法的新进展[J]. 兰州交通大学学报, 2015, 34(6): 12-16
- [38] Wang XC, Yang ZR, Wang M, et al. High-throughput sequencing technology and its application[J]. China Biotechnology, 2012, 32(1): 109-114 (in Chinese)  
王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 109-114
- [39] Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 278-288
- [40] Sun DL, Jiang X, Wu QLL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [41] Hong PY, Wheeler E, Cann IKO, et al. Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing[J]. The ISME Journal, 2011, 5(9): 1461-1470
- [42] Lee OO, Wang Y, Yang JK, et al. Pyrosequencing reveals highly diverse and species-specific microbial communities in sponges from the Red Sea[J]. The ISME Journal, 2011, 5(4): 650-664