

## 研究报告

## 东洞庭湖冬季可培养细菌多样性

郭丽丽<sup>1</sup>, 易理东<sup>1</sup>, 刘旭晶<sup>1</sup>, 王康<sup>1</sup>, 石涛<sup>1</sup>, 徐罗<sup>1</sup>, 陈娜<sup>1</sup>, 张洋<sup>1</sup>, 符格意<sup>\*2</sup>

1 湖南文理学院生命与环境科学学院 水生动物重要疫病分子免疫技术湖南省重点实验室 常德市农业生物大分子研究中心, 湖南 常德 415000

2 自然资源部第二海洋研究所 海洋生态系统动力学实验室, 浙江 杭州 310012

郭丽丽, 易理东, 刘旭晶, 王康, 石涛, 徐罗, 陈娜, 张洋, 符格意. 东洞庭湖冬季可培养细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2049-2064.

GUO Lili, YI Lidong, LIU Xujing, WANG Kang, SHI Tao, XU Luo, CHEN Na, ZHANG Yang, FU Geyi. Diversity of cultivable bacteria from East Dongting Lake in winter[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2049-2064.

**摘要:** 【背景】东洞庭湖地理位置特殊, 物种资源丰富, 分布着多种具有独特生理生化特征的微生物。【目的】通过可培养方法, 获取具备重金属抗性和多环芳烃耐受能力的湖泊细菌资源, 并阐明其生理特征。【方法】本研究于2022年1月采集东洞庭湖5个不同地区的40份样品, 测定环境因子, 开展细菌的分离培养, 获得微生物菌株资源, 并进行相关性分析。【结果】共分离253株细菌, 包括210株重金属抗性菌, 43株多环芳烃耐受菌, 隶属于42个属, 其主要类群是假单胞菌属(*Pseudomonas*, 46.6%)、伪芽孢杆菌属(*Fictibacillus*, 7.5%)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*, 6.7%)和芽孢杆菌属(*Bacillus*, 5.1%)。通过复筛, 分别获得30株重金属高抗性细菌和7株多环芳烃高耐受能力细菌, 包括20株Mg<sup>2+</sup> (最大耐受浓度为500 mmol/L)、4株Mn<sup>2+</sup> (最大耐受浓度为500 mmol/L)、3株Ni<sup>2+</sup> (最大耐受浓度为30 mmol/L)和3株Zn<sup>2+</sup> (最大耐受浓度为25 mmol/L)抗性细菌; 5株萘(最大耐受浓度为0.04 g/mL)和2株菲(最大耐受浓度为0.02 g/mL)耐受菌, 其中包括2株潜在新菌株和1株潜在新属菌株。【结论】5个不同地区样品的细菌多样性存在差异, 其中月山、岳阳楼和君山均高于鹿角与南湖。结合环境因子数据分析, 发现温度、可溶性颗粒、电导率、溶解氧对样品的细菌群落组成影响较大, pH和盐度较小。本研究获得的具有较高重金属抗性和多环芳烃耐受菌数量较少, 可能与东洞庭湖污染防治较好有关。

**关键词:** 东洞庭湖; 可培养; 重金属抗性; 多环芳烃耐受; 细菌多样性

资助项目: 湖南文理学院博士科研启动项目(21BSQD26); 湖南文理学院创新创业教改项目(SCJG202204); 湖南省自然科学基金(2022JJ30420); 湖南省教育厅科学研究项目(22B0691)

This work was supported by the Scientific Research Project Initiating of Hunan University of Arts and Science (21BSQD26), the Innovation and Entrepreneurship Education Reform Project of Hunan University of Arts and Science (SCJG202204), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2022JJ30420), and the Scientific Research Project of Hunan Provincial Department of Education (22B0691).

\*Corresponding author. E-mail: fugy@sio.org.cn

Received: 2023-06-04; Accepted: 2023-09-21; Published online: 2024-04-24

## Diversity of cultivable bacteria from East Dongting Lake in winter

GUO Lili<sup>1</sup>, YI Lidong<sup>1</sup>, LIU Xujiang<sup>1</sup>, WANG Kang<sup>1</sup>, SHI Tao<sup>1</sup>, XU Luo<sup>1</sup>, CHEN Na<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, FU Geyi<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Hunan Provincial Key Laboratory for Molecular Immunity Technology of Aquatic Animal Diseases, Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule, College of Life and Environmental Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Marine Ecosystem Dynamics, Second Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Hangzhou 310012, Zhejiang, China

**Abstract:** [Background] East Dongting Lake occupies a special geographical location and harbors abundant species resources, including a variety of microorganisms with unique physiological and biochemical characteristics. [Objective] To obtain the bacterial resources with tolerance to heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by the culturable methods and clarify their physiological characteristics. [Method] Forty samples were collected from five different regions of East Dongting Lake in January 2022 for the measurement of environmental factors. The bacteria were isolated, microbial strain resources were obtained, and the correlations of bacteria with environmental factors were analyzed. [Results] A total of 253 bacterial strains were isolated, including 210 strains with tolerance to heavy metals and 43 strains with tolerance to PAHs. The strains belonged to 42 genera, which were dominated by *Pseudomonas* (46.6%), *Fictibacillus* (7.5%), *Pseudarthrobacter* (6.7%) and *Bacillus* (5.1%). After re-screening, 30 strains with strong tolerance to heavy metals and 7 strains with strong tolerance to PAHs were obtained. Specifically, 20, 4, 3 and 3 strains showed tolerance to  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , with the maximum tolerance concentrations (MTCs) of 500, 500, 30 and 25 mmol/L, respectively. 5 and 2 strains had tolerance to naphthalene and phenanthrene, with the MTCs of 0.04 g/mL and 0.02 g/mL, respectively. Two strains of potentially novel species and one strain of potentially novel genus were identified in this study. [Conclusion] The bacterial diversity varied among the samples from five regions, being higher in Yueshan, Yueyanglou, and Junshan than that in Lujiao and Nanhu. The temperature, total dissolved solids, electrical conductivity, and dissolved oxygen had the greatest influences on the composition of bacterial community, while pH and salinity had the least influences. The low number of strains with strong tolerance to heavy metals and PAHs in this study may be associated with the effective pollution control in East Dongting Lake.

**Keywords:** East Dongting Lake; cultivable; tolerance to heavy metals; tolerance to polycyclic aromatic hydrocarbons; bacterial diversity

湖泊是陆地水圈的重要组成部分, 参与自然界的

水分循环和物质循环, 在全球生物地球化学循环中占重要地位。一方面, 湖泊作为支

撑经济和社会发展的重要资源之一, 具有供水、调蓄洪水、调节气候、渔业、旅游等多种功能。另一方面, 因其位于内陆, 与陆地生态系统的

物质、能量、信息交换强烈,有利于维持区域生态系统平衡、元素循环和生物多样性等<sup>[1]</sup>。

洞庭湖是我国第二大淡水湖,在保障长江防洪安全、航运安全、生态安全及供水安全等方面发挥巨大作用。洞庭湖年内水位变幅大,洪枯水情突出,12月至次年2月为枯水期,5–9月为丰水期,其余为平水期<sup>[2]</sup>。目前,在湖泊水体共发现21个典型的淡水细菌门类,其中主要包括假单胞菌门(*Pseudomonadota*)、蓝细菌门(*Cyanobacteriota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、放线菌门(*Actinomycetota*)和疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)等<sup>[3]</sup>。一方面,细菌参与水环境中金属元素的转化与循环;另一方面,细菌作为有机化合物的主要分解者,通过将有机污染物(如碳、氮、磷、硫等有机营养物质)分解成无机化学成分,影响和调节水体的环境质量,实现水质的净化。研究湖泊环境中重金属抗性和多环芳烃降解细菌已逐步成为当今环境微生物学的前沿研究热点<sup>[1,3–4]</sup>。东洞庭湖是洞庭湖面积最大的区域,沿湖工业企业众多,该区域水质的理化性质研究较多,但是细菌群落多样性和功能的认识还十分有限,微生物重金属抗性和多环芳烃降解机制的研究较少,细菌生态学仍有待研究。

本研究前期通过采集东洞庭湖不同地区的样品,测定环境因子,开展重金属抗性和多环芳烃耐受细菌的分离培养,获得微生物资源,为后续研究东洞庭湖微生物生态学和对污染物的抗性机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

2022年1月沿东洞庭湖从入湖口到出湖口,在鹿角区、月山区、南湖区、岳阳楼区和君山

区5个区域,采集了20个不同站位的湖泊表层水和沿岸表层土壤共40份样品(表1),保存于含冰袋的保温箱内,当天运回实验室,于4℃冰箱保存用于后续细菌的分离培养。

#### 1.1.2 培养基

2216 固体培养基(g/L): peptone 5.00, yeast extract 1.00,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  12.60,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6.63,  $\text{CaCl}_2$  1.80, KCl 0.55,  $\text{NaHCO}_3$  0.16, KBr 0.08, 1 000× $\text{SrCl}_2$  母液 1.00 mL, 100×Ferric citrate 母液 10.00 mL, 1 000× $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  母液 1.00 mL, 1 000×微量元素母液 1.00 mL, 琼脂粉 20.00。其中, 1 000× $\text{SrCl}_2$  母液:  $\text{SrCl}_2$  34.00 g/L; 100×Ferric citrate 母液: Ferric citrate 10.00 g/L; 1 000× $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  母液:  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  40.00 g/L; 1 000×微量元素母液(g/L):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  22.00, NaF 2.40,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.60,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8.00。培养基配方参考德国菌种保藏中心网站(<https://www.dsmz.de/>)。

重金属抗性细菌初筛培养基: 向已灭菌的2216培养基分别加入 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (100 mmol/L)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (100 mmol/L)、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (100 mmol/L)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (100 mmol/L) 和  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (100 mmol/L) 储存液, 重金属离子终浓度分别为1.0、5.0、1.0、1.0、0.5 mmol/L。

液体无机盐培养基(g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.80,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20,  $\text{CaCl}_2$  0.05,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.07,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.00, NaCl 5.00。

多环芳烃耐受细菌初筛培养基: 利用少量乙腈分别溶解萘和菲, 加入已灭菌的液体无机盐培养基, 使其终浓度分别为0.32 mg/mL 和0.12 mg/mL。

复筛时, 重金属离子和多环芳烃的浓度如下:

- 1)  $\text{Cu}^{2+}$ : 5、10、15、20、25 mmol/L;
- 2)  $\text{Mg}^{2+}$ : 5、10、15、20、25、500、800、1 000、1 200、2 000 mmol/L;

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

样品编号 Sample No.	样品名 Sample name	日期 Date	时间 Time	经度 Longitude (E/(°))	纬度 Latitude (N/(°))	类型 Type
S1	LJ-W-I	2022-01-09	10:06 am	113.000 265	29.155 506	W
S2	LJ-S-I	2022-01-09	10:16 am	113.000 239	29.155 501	S
S3	LJ-W-II	2022-01-09	10:46 am	112.999 771	29.156 215	W
S4	LJ-S-II	2022-01-09	10:53 am	112.999 744	29.156 206	S
S5	LJ-W-III	2022-01-09	11:16 am	112.999 052	29.158 318	W
S6	LJ-S-III	2022-01-09	11:21 am	112.999 123	29.158 299	S
S7	YS-W-I	2022-01-09	12:50 am	113.063 147	29.339 815	W
S8	YS-S-I-A	2022-01-09	12:41 am	113.063 028	29.339 702	S
S9	YS-S-I-B	2022-01-09	13:02 pm	113.063 038	29.339 411	S
S10	YS-S-I-C	2022-01-09	13:05 pm	113.063 014	29.339 225	S
S11	YS-W-II	2022-01-09	13:30 pm	113.063 515	29.340 307	W
S12	YS-S-II-A	2022-01-09	13:37 pm	113.063 490	29.340 348	S
S13	YS-S-II-B	2022-01-09	13:43 pm	113.063 653	29.340 180	S
S14	YS-W-III	2022-01-09	13:40 pm	113.062 819	29.340 203	W
S15	YS-S-III-A	2022-01-09	13:55 pm	113.062 854	29.340 164	S
S16	YS-S-III-B	2022-01-09	14:05 pm	113.062 816	29.340 263	S
S17	NH-W-I	2022-01-09	16:35 pm	113.120 346	29.347 636	W
S18	NH-S-I	2022-01-09	16:47 pm	113.120 348	29.347 637	S
S19	NH-W-II	2022-01-09	16:54 pm	113.119 763	29.347 436	W
S20	NH-S-II	2022-01-09	17:05 pm	113.119 773	29.347 454	S
S21	NH-W-III	2022-01-09	17:10 pm	113.118 917	29.346 320	W
S22	NH-S-III	2022-01-09	17:11 pm	113.118 911	29.346 321	S
S23	NH-W-IV	2022-01-09	17:34 pm	113.116 114	29.343 267	W
S24	NH-S-IV	2022-01-09	17:35 pm	113.116 249	29.343 244	S
S25	YYL-W-I	2022-01-10	9:27 am	113.084 707	29.376 358	W
S26	YYL-S-I	2022-01-10	9:38 am	113.084 721	29.976 324	S
S27	YYL-W-II	2022-01-10	9:47 am	113.084 854	29.377 183	W
S28	YYL-S-II	2022-01-10	9:50 am	113.085 008	29.376 988	S
S29	YYL-W-III	2022-01-10	10:07 am	113.085 127	29.378 140	W
S30	YYL-S-III	2022-01-10	10:15 am	113.085 373	29.378 364	S
S31	JS-W-I	2022-01-10	13:50 pm	113.009 191	29.380 397	W
S32	JS-S-I	2022-01-10	14:10 pm	113.009 191	29.380 397	S
S33	JS-W-II	2022-01-10	13:55 pm	113.008 707	29.379 622	W
S34	JS-S-II	2022-01-10	14:05 pm	113.008 707	29.379 622	S
S35	JS-W-III	2022-01-10	14:05 pm	113.008 454	29.379 300	W
S36	JS-S-III	2022-01-10	14:30 pm	113.008 454	29.379 300	S
S37	JS-W-IV	2022-01-10	14:10 pm	113.008 211	29.378 925	W
S38	JS-S-IV	2022-01-10	14:35 pm	113.008 211	29.378 925	S
S39	JS-W-V	2022-01-10	14:15 pm	113.008 022	29.378 527	W
S40	JS-S-V	2022-01-10	14:50 pm	113.008 022	29.378 527	S

LJ: 鹿角; YS: 月山; NH: 南湖; YYL: 岳阳楼; JS: 君山; W: 表层水样品; S: 表层土壤样品

LJ: Lujiao; YS: Yueshan; NH: Nanhu; YYL: Yueyang Lou; JS: Junshan; W: Surface water samples; S: Surface soil samples.

3)  $\text{Mn}^{2+}$ : 10、20、30、40、50、100、200、300、500、1 000 mmol/L;

4)  $\text{Ni}^{2+}$ : 5、10、15、20、25、30、40、50、80、100 mmol/L;

5)  $\text{Zn}^{2+}$ : 5、10、15、20、25、50、80、100、200、300 mmol/L;

6) 萘: 0.80、1.60、4.80、8.00、16.00、25.00、33.30、41.70、50.00、58.30 mg/mL;

7) 菲: 0.09、0.18、0.27、0.36、0.72、5.56、11.11、16.67、22.22 mg/mL。

以上培养基使用高压灭菌锅于 121 °C 灭菌 30 min, 金属离子和多环芳烃母液经 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌滤膜过滤后再加入各培养基。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

2 $\times$ Taq PCR Master Mix, 北京博迈德基因技术有限公司; PCR 及电泳其他相关试剂, 擎科生物技术有限公司。高压灭菌锅, Wada Stainless Kogyo 公司; 恒温振荡器、恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪, 西安天隆科技有限公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 环境因子测定

利用水质检测仪现场测定水样的温度、盐度、pH、溶解氧(dissolved oxygen, DO)、电导率和可溶性颗粒(total dissolved solids, TDS)。

### 1.2.2 样品预处理

分离重金属抗性细菌前, 样品未进行预处理。分离多环芳烃耐受细菌前, 进行富集预处理, 过程如下: 首先配制不含有机碳源的液体无机盐培养基, 再分别将萘和菲溶解于少量乙腈中, 过滤灭菌后加入 30 mL 液体无机盐培养基, 使萘和菲终浓度分别为 0.32 mg/mL 和 0.12 mg/mL。向含有萘和菲的培养基中分别加入水样(1:10)和土样(1 g:30 mL), 于 30 °C 培养箱

静置避光富集 7 d, 再按照上述操作重复转接一次。

### 1.2.3 菌株分离、培养和保藏

分别取 0.1 mL 水样和 0.1 g 土壤样品于 0.9 mL 已灭菌的原位湖水进行梯度稀释, 将稀释倍数为  $10^{-2}$  的水样和  $10^{-3}$  的土壤样品分别涂布到含有 5 种不同金属离子的 2216 固体培养基表面。将多环芳烃耐受菌分离的前处理富集液体进行梯度稀释, 稀释为  $10^{-4}$  的液体分别涂布到分别含有 2 种不同多环芳烃为唯一碳源的液体无机盐固体培养基表面, 将平板置于 30 °C 培养箱中静置培养 20 d。

观察并记录各菌落的形态特征, 挑取单克隆于装有 3 mL 2216 的试管中, 利用恒温振荡器于 30 °C、180 r/min 培养至对数生长期(5 d 左右), 用 25% 甘油于 -80 °C 保藏。

### 1.2.4 菌株复筛

取待复筛菌株的甘油管, 将菌液接种于 2216 液体培养基, 于恒温振荡器 30 °C、180 r/min 培养 3 d。

分别配制含有金属离子和多环芳烃的复筛平板, 各接种 5  $\mu\text{L}$  新鲜菌液, 置于 30 °C 恒温培养箱, 分别静置培养 5 d 和 7 d, 观察并记录各平板上菌株的生长情况。根据以往文献, 本实验选择  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  耐受浓度分别达到 5、500、500、10、15 mmol/L 以上的为重金属离子高抗性菌株; 萘和菲耐受浓度分别达到 41.70、22.22 mg/mL 以上的为多环芳烃高耐受能力菌株<sup>[5]</sup>。

### 1.2.5 16S rRNA 基因序列信息分析

取 1 mL 新鲜菌液 12 000 r/min 离心 3 min 去除上清液, 再加入 50  $\mu\text{L}$  灭菌超纯水混匀, 采用水煮冰冻法提取 DNA, 再利用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rRNA

基因序列扩增<sup>[6]</sup>。

PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 11  $\mu$ L, 引物 27F 和 1492R (10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, DNA 模板 0.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1.25 min, 33 次循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。

利用凝胶成像仪观察 PCR 扩增效果, 将扩增成功的样品送至长沙擎科测序公司进行 16S rRNA 基因测序。获得测序结果后通过 BioEdit 软件去除两端序列<sup>[7]</sup>, 再利用 Eztaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)网站在线分析<sup>[8]</sup>, 确定菌株的分类地位, 并将序列提交至 GenBank。相似性小于或等于 97.0%的是疑似新种, 小于 95.0%的是疑似新属<sup>[3,9-10]</sup>。

### 1.2.6 系统进化分析

使用 CLUSTAL W 软件比对各菌株及最相近菌株的 16S rRNA 基因序列<sup>[11]</sup>, 使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树<sup>[12]</sup>, 选择木村双参数模型<sup>[13]</sup>, Bootstrap 值基于 1 000 次重复, 以 *Haloferax larsenii* JCM 13917<sup>T</sup> 为系外群, 通过邻接法 (neighbor-joining method, NJ)构建系发育树<sup>[14]</sup>, 再利用在线网站 TVBOT (<https://www.chiplot.online/tvbot.html>)展示圈图<sup>[15]</sup>。

### 1.2.7 多样性指数分析

香农指数  $H$  (Shannon 多样性指数)和 Margatef 丰富度指数( $D_{Me}$ )是对稀有物种敏感的指数。香农指数越大, 表示不确定性大, 这个群落中未知的因素越多, 即多样性高。Margatef 丰富度指数是通过检测某生态区域内生物多样性判断该区域污染程度。生物多样性越好, 污染越轻。与之相反, Shannon 均匀度指数( $E$ )和 Berger-Parker 优势度指数( $d$ )属于对富集种相对敏感的指数。多样性指数计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, D_{Me} = (S-1)/\ln S, E = H/\ln S, d = N_{\max}/N。$$

式中:  $S$  为样品中的 OTU;  $N_{\max}$ , 群落中数量最多的物种的个体数;  $N$ : 群落的全部个体数;  $P_i$ : 属于 OTU  $i$  的个体在全部个体数的比例<sup>[16-17]</sup>。

### 1.2.8 相关性分析

基于去趋势波动分析(detrended correspondence analysis, DCA)结果, 通过冗余分析(redundancy analysis, RDA)挖掘细菌群落结构与环境因子的相关性。RDA 二维图中带箭头的线段表示环境因子, 箭头与原点的连线长度越长, 说明相关性越大, 反之越小。样方点到环境因子的箭头投影长度表示样方内环境因子的影响值, 可反映该环境因子对样方群落组成的影响。箭头所处的象限表示环境因子与排序轴的正负相关性。将环境因子变量的射线延长, 样本垂直投影于射线上, 沿着变量箭头方向, 环境变量值增大。将环境因子数据和菌株信息上传至 OmicShare 网站(<https://www.omicshare.com/tools>)进行冗余分析。

## 2 结果与分析

通过可培养的方法在东洞庭湖 20 个站位的 40 份样品中分离到细菌 253 株, 隶属于 42 个属, 包括潜在新种 2 株和潜在新属 1 株, 见表 2。

表 2 分离的潜在新物种信息

Table 2 Information of novel species candidates

编号 No.	菌株名称 Strain name	最相似菌株 Most similar strain	相似性 Similarity (%)
1	NH-89	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 <sup>T</sup>	97.0
2	JS-23	<i>Janthinobacterium lividum</i> DSM 1522 <sup>T</sup>	95.7
3	LJ-F-7	<i>Hydrogenophaga carboriunda</i> YZ2 <sup>T</sup>	92.2

其中,菌株 NH-89 具有  $\text{Cu}^{2+}$  抗性,隶属于微杆菌属 (*Microbacterium*)。该属是微杆菌科 (*Microbacteriaceae*) 中最大的分类单元,广泛分布于淡水、海水、沉积物、土壤、活性污泥、临床标本等环境,呈革兰氏阳性,大多数严格需氧,少数是兼性厌氧,主要的呼吸醌是 MK-11、MK-12、MK-13 或 MK-14<sup>[18-19]</sup>,还可以产生类胡萝卜素和异黄酮等次级代谢产物。菌株 JS-23 具有  $\text{Mn}^{2+}$  抗性,隶属于紫色杆菌属 (*Janthinobacterium*),该属由 De Ley 等于 1978 年首次提出,通常分离于温和、寒冷地区的水样和土壤,主要的呼吸醌是 Q-8<sup>[20]</sup>。菌株 LJ-F-7 具有非耐受能力,隶属于丛毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*) 的食氢产水菌属 (*Hydrogenophaga*)。该属呈革兰氏阴性,需氧或兼性厌氧,分离来源包括水样、土壤、污泥、泥浆和堆肥等,包括化能异养菌,以及利用  $\text{H}_2$  氧化产生能量、以  $\text{CO}_2$  为碳源的化能无机自养

细菌<sup>[21]</sup>。

## 2.1 初筛结果

利用重金属选择培养基和含多环芳烃的无机盐培养基共分离 253 株菌,隶属于 42 个属。其中, $\gamma$ -变形菌纲 138 株 (*Gammaproteobacteria*, 54.5%),芽孢杆菌纲 47 株 (*Bacilli*, 18.6%),放线菌纲 41 株 (*Actinomycetia*, 16.2%), $\alpha$ -变形菌纲 13 株 (*Alphaproteobacteria*, 5.1%), $\beta$ -变形菌纲 12 株 (*Betaproteobacteria*, 4.7%),黄杆菌纲 2 株 (*Flavobacteriia*, 0.8%)。在目水平,主要包括假单胞菌目 (*Pseudomonadales*) 和芽孢杆菌目 (*Bacillales*) (表 3)。

### 2.1.1 细菌多样性分析结果

在属水平,主要类群包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、伪芽孢杆菌属 (*Fictibacillus*)、假节杆菌属 (*Pseudarthrobacter*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*),比例分别为 46.6%、7.5%、6.7% 和 5.1% (图 1)。

表 3 不同类群细菌的数量

Table 3 Numbers of different bacteria

纲 Class	目 Order	数量 Number	比例 Percentage (%)
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteriales</i>	5	2.0
	<i>Rhizobiales</i>	4	1.6
	<i>Rhodobacteriales</i>	1	0.4
	<i>Sphingomonadales</i>	3	1.2
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	12	4.7
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	7	2.8
	<i>Alteromonadales</i>	2	0.8
	<i>Enterobacteriales</i>	1	0.4
	<i>Lysobacteriales</i>	3	1.2
	<i>Moraxellales</i>	3	1.2
	<i>Pseudomonadales</i>	122	48.2
<i>Actinomycetia</i>	<i>Cellulomonadales</i>	1	0.4
	<i>Microbacteriales</i>	13	5.1
	<i>Micrococcales</i>	24	9.5
	<i>Mycobacteriales</i>	2	0.8
	<i>Propionibacteriales</i>	1	0.4
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	47	18.6
<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	2	0.8

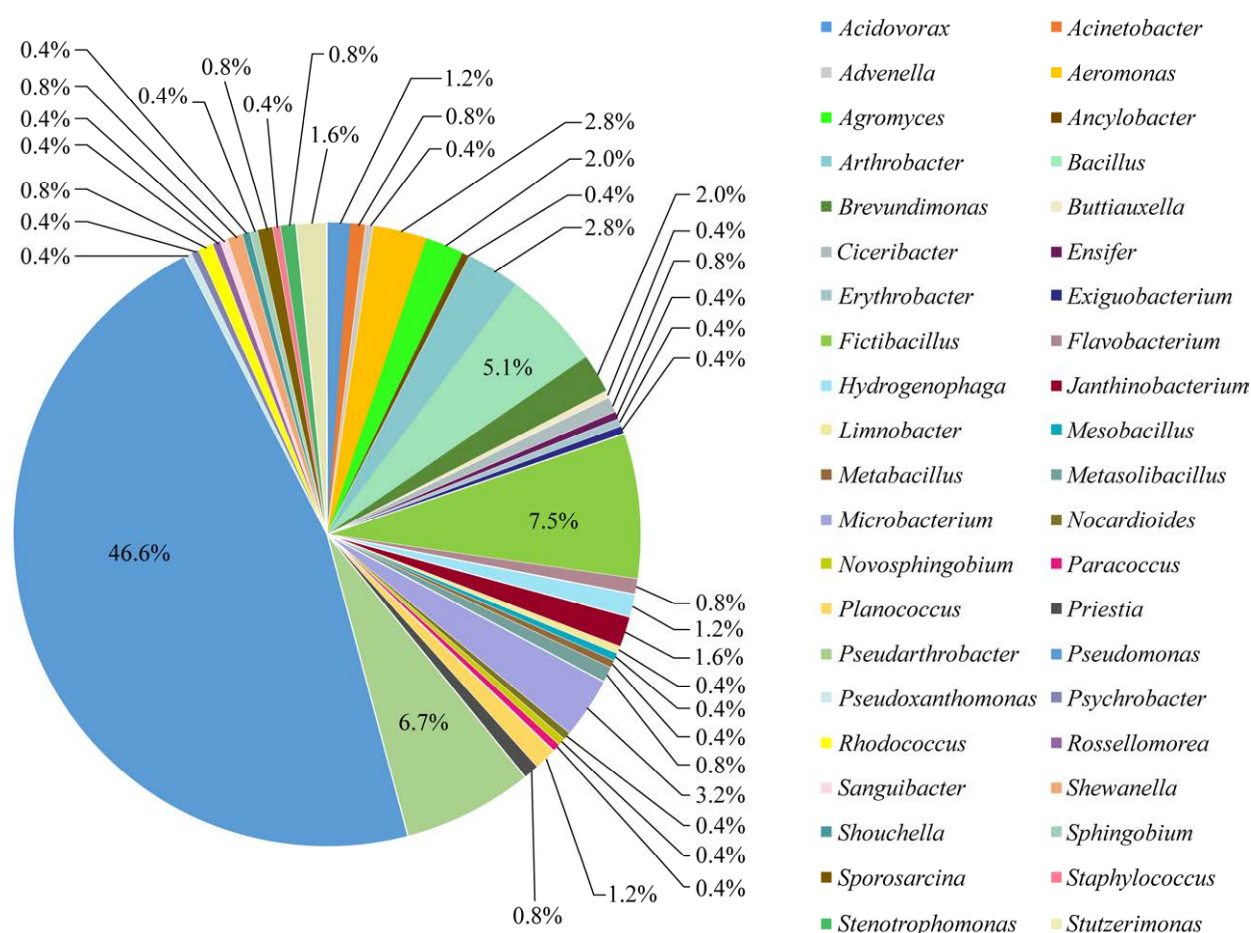


图 1 所分离细菌各属的比例

Figure 1 Percentage of different genera for bacteria.

在纲水平, 分离的细菌中  $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲、放线菌纲和芽孢杆菌纲在 5 个地区都广泛分布。 $\gamma$ -变形菌纲中假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)的假单胞菌属比例较大。不同区域细菌群落组成存在一定差异, 例如黄杆菌纲细菌仅出现在月山区和岳阳楼区(图 2A); 在属水平上, 不同位点的细菌类群也有较大差异, 岳阳楼区和君山区分离的细菌种类明显多于其他地区, 而鹿角区种类最少(图 2B)。

不同培养基分离的细菌, 主要类群不同(图 3)。本研究通过初筛共分离 210 株重金属抗性细菌, 分别包括 50、55、53、44、8 株的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  抗性细菌。43 株多环

芳烃耐受细菌, 分别包括 17 株蔡和 26 株菲耐受细菌。其中, 部分菌株(例如假单胞菌属)对各类金属离子均具有抗性、对蔡和菲具有耐受能力, 并且比例较大, 后续可用于复合功能菌株的研究。

### 2.1.2 系统发育分析结果

本研究基于 16S rRNA 基因序列进行系统进化分析, 利用邻接法构建的系统发育树结果显示, 分离的 253 个细菌与最相似的 120 个标准物种主要聚类在 6 个不同分支, 依次为  $\gamma$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲、 $\alpha$ -变形菌纲、放线菌纲、芽孢杆菌纲、黄杆菌纲。3 株潜在新物种与最相似菌株分别聚类在一起(图 4)。



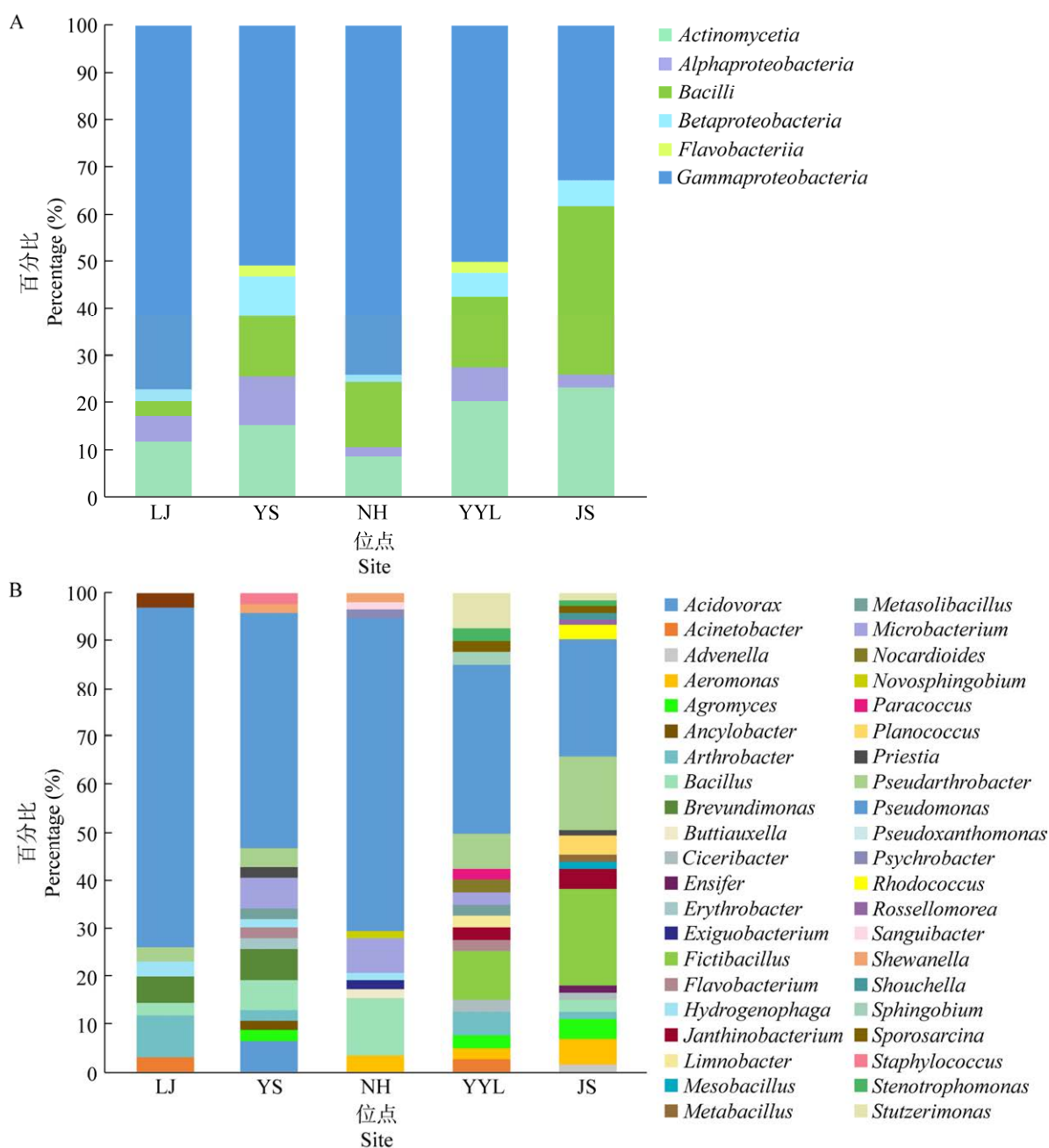


图 2 东洞庭湖不同采样区域分离的细菌各纲(A)和各属(B)的比例

Figure 2 Percentage of bacteria at class (A) and genus level (B) isolated from different sampling sites in East Dongting Lake.

### 2.1.3 多样性指数分析结果

不同站位的细菌多样性不同, 月山、岳阳楼和君山站位分离的细菌, 多样性指数( $H$ )、丰富度指数( $D_{Mg}$ )和均匀度指数( $E$ )都比较大,

鹿角和南湖分离的细菌以上数值都较小。结果表明, 月山、岳阳楼和君山区的细菌多样性丰富, 鹿角和南湖区的细菌多样性较差(表 4)。

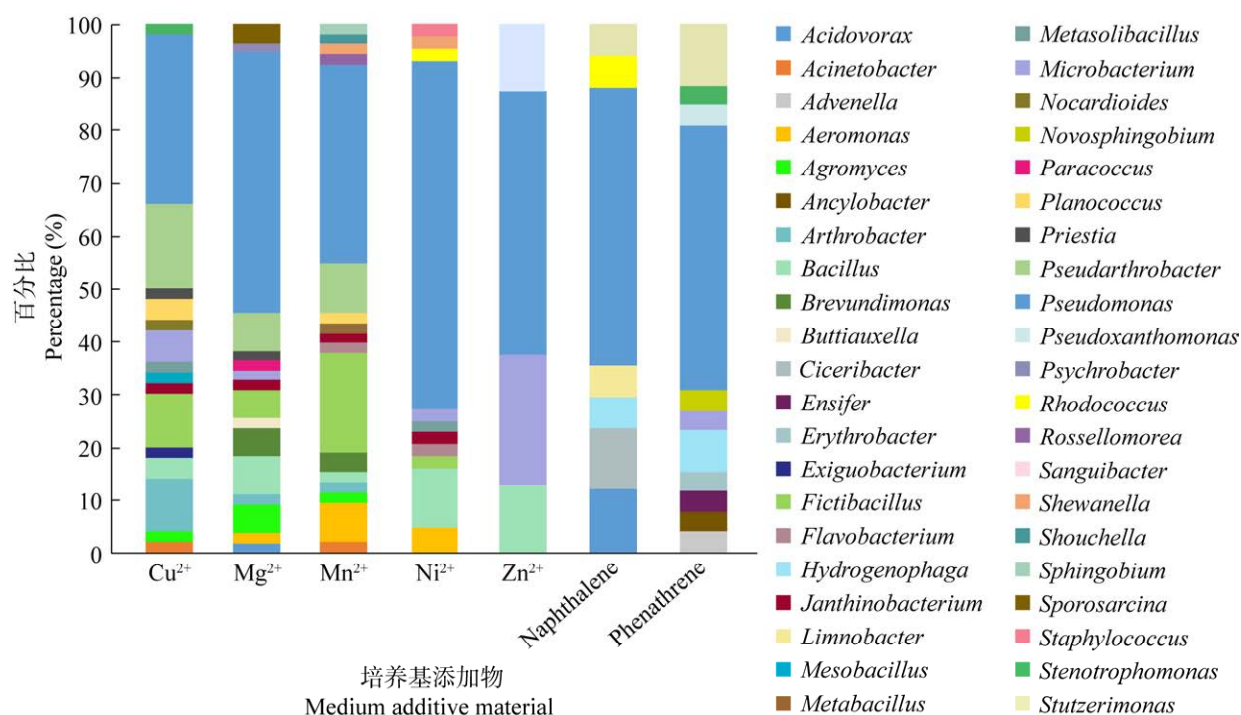


图3 不同培养基分离的细菌各属的比例

Figure 3 Percentage of bacteria isolated from different media.

#### 2.1.4 相关性分析结果

通过 RDA 分析,第一排序轴和第二排序轴对 5 个地区样品的解释量分别达到 88.36%和 6.84%。根据各环境因子与排序轴的夹角大小,可知对第一排序轴贡献值最大的环境因子是电导率、盐度(均呈正相关)和 pH (负相关),第二排序轴贡献值最大的是溶解氧(正相关)和温度(负相关)。根据箭头的长短,可知温度、可溶性颗粒、电导率、溶解氧对样品的细菌群落组成影响较大, pH 和盐度较小。环境因子溶解氧、电导率、盐度、温度之间大部分呈正相关关系,而与 pH、可溶性颗粒含量呈负相关。虽然部分样品分组相同(鹿角、月山、岳阳楼),但是在 RDA 图中距离较远,表明其菌群结构存在差异。结果显示, pH 对芽孢杆菌纲的影响较大,溶解氧、电导率、盐度和温度对  $\alpha$ -和  $\gamma$ -变形菌纲的影响较大,可溶性颗粒对放线菌纲和  $\beta$ -变

形菌纲的影响较大,见图 5。

#### 2.2 复筛结果

经过复筛,获得 30 株高重金属抗性细菌,7 株多环芳烃高耐受细菌。包括 20 株  $\text{Mg}^{2+}$ 、4 株  $\text{Mn}^{2+}$ 、3 株  $\text{Ni}^{2+}$ 和 3 株  $\text{Zn}^{2+}$ 抗性细菌,最大耐受浓度分别为 500、500、30 和 25 mmol/L,而  $\text{Cu}^{2+}$ 抗性菌在复筛时均未生长;5 株萘和 2 株菲耐受菌,最大耐受浓度分别为 0.04 g/mL 和 0.02 g/mL。萘耐受能力最大的菌株是 NH-N-6、NH-N-23、NH-N-24、YS-N-5 和 YYL-N-16,最相似菌株分别是 *Pseudomonas allopuntida* Kh7<sup>T</sup>、*Pseudomonas extremaustralis* 14-3<sup>T</sup>、*Pseudomonas gessardii* DSM 17152<sup>T</sup>、*Hydrogenophaga palleronii* NBRC 102513<sup>T</sup>和 *Stutzerimonas frequens* DNSP21<sup>T</sup>;菲耐受能力最大的菌株是 LJ-F-7 和 JS-F-5,最相似菌株分别是 *Hydrogenophaga carboriunda* YZ2<sup>T</sup>和 *Pseudomonas umsongensis* DSM 16611<sup>T</sup>。

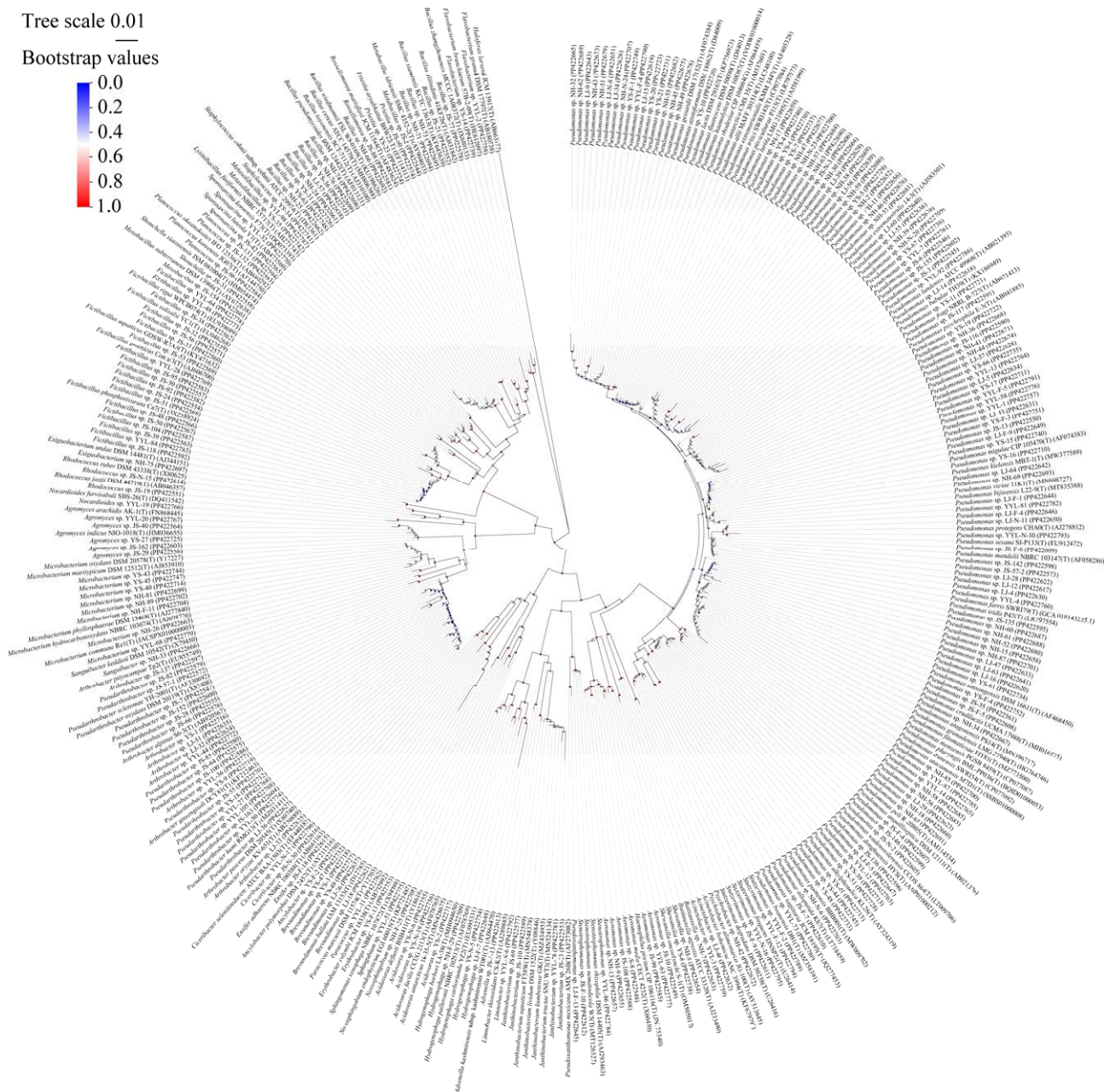


图 4 基于东洞庭湖可培养细菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 自展值基于 1 000 次重复, 分支点颜色深浅代表自展值的大小. 标尺 0.01 代表每个核苷酸位置 0.01 个取代, 分支长度代表进化距离. T 代表模式菌株, 括号内的数字代表 GenBank 登录号

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of culturable bacteria from East Dongting Lake. Bootstrap values based on 1 000 replications are shown at branch nodes. The depth of the color of the branching points represents the size of the bootstrap value. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. The length of branch represents the evolutionary distance. T represents the type strain. The numbers in brackets represent the GenBank accession numbers.



表 4 不同采样点分离细菌的多样性指数

Table 4 Index of bacterial diversity isolated from different sampling sites

Item	<i>H</i>	<i>D</i> <sub>Mg</sub>	<i>E</i>	<i>d</i>
1	1.12	1.97	0.54	0.71
2	2.01	3.90	0.72	0.49
3	1.32	2.46	0.55	0.66
4	2.43	4.88	0.82	0.35
5	2.41	4.66	0.79	0.25

1-5 分别代表 LJ、YS、NH、YYL、JS 位点的样品。H: 多样性指数; *D*<sub>Mg</sub>: 丰富度指数; *E*: 均匀度指数; *d*: 优势度指数

1-5 represent samples of site LJ, YS, NH, YYL, JS, respectively. *H*: diversity; *D*<sub>Mg</sub>: richness; *E*: evenness; *d*: dominance.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 讨论

本实验分离的细菌主要隶属于 4 个门, 其中假单胞菌门比例最大, 芽孢杆菌门(*Bacillota*)和放线菌门次之, 拟杆菌门最少。假单胞菌门在自然界中广泛分布, 在湿地、湖泊以及深海等环境中都属于优势类群<sup>[16]</sup>。该门细菌在有机物的分解和循环中具有重要作用, 可以去除水体中的磷, 将亚硝酸盐转化成硝酸盐<sup>[22]</sup>。现有研究表明, 不同环境假单胞菌门的优势亚群不同, 尤其是  $\gamma$ -变形菌纲, 是海洋和湖泊沉积物细菌群落的重要类群<sup>[23]</sup>。本研究  $\gamma$ -变形菌纲的比例最大, 可能与采集的近岸表层土壤样品数量较多有关。芽孢杆菌门多数为革兰氏阳性菌, 可以产生芽孢, 能够抵抗极端环境并且存活, 是污水中常检测到的典型厌氧细菌之一<sup>[24-25]</sup>。放线菌门在有机质分解和矿化过程中起重要作用, 并且具有产生多种次级代谢产物的能力, 是生物活性物质和药物开发的重要微生物来源<sup>[26]</sup>。拟杆菌门是湖泊水体中的主要细菌类群之一, 与许多哺乳动物和人类的肠道菌群有关, 是排泄物的有效指标。还可以降解烃类物质, 因此有

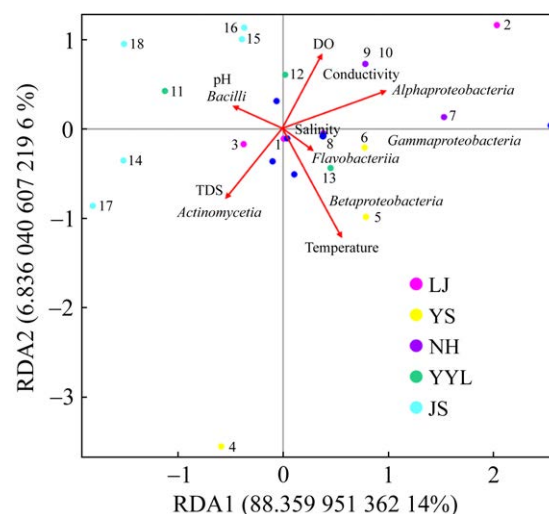


图 5 冗余分析结果 横向表示第一主成分, 纵向表示第二主成分, 括号中的百分比表示该主成分所能解释的样品方差, 深蓝色的圆点代表不同的细菌类群, 其他颜色的圆点代表不同分组的样品. 样品编号分别为: 1, LJ-W-I; 2, LJ-W-II; 3, LJ-W-III; 4, YS-W-I; 5, YS-W-II; 6, YS-W-III; 7, NH-W-I; 8, NH-W-II; 9, NH-W-III; 10, NH-W-IV; 11, YYL-W-I; 12, YYL-W-II; 13, YYL-W-III; 14, JS-W-I; 15, JS-W-II; 16, JS-W-III; 17, JS-W-IV; 18, JS-W-V. 不同的箭头分别代表不同的环境因子: Temperature, 温度; Salinity, 盐度; TDS, 可溶性颗粒; Conductivity, 电导率; DO, 溶解氧; pH, 酸碱度

Figure 5 Redundant analysis result. The first principal component is represented horizontally, and the second principal component is represented vertically. The percentage in parentheses represents the sample variance that can be explained by that principal component. The dark blue dots represent different bacterial groups, while other colored dots represent samples of different groups. The sample numbers were: 1, LJ-W-I; 2, LJ-W-II; 3, LJ-W-III; 4, YS-W-I; 5, YS-W-II; 6, YS-W-III; 7, NH-W-I; 8, NH-W-II; 9, NH-W-III; 10, NH-W-IV; 11, YYL-W-I; 12, YYL-W-II; 13, YL-W-III; 14, JS-W-I; 15, JS-W-II; 16, JS-W-III; 17, JS-W-IV; 18, JS-W-V. Different arrows represent different environmental factors. Temperature: Temperature; Salinity: Salinity; TDS: Total dissolved solids; Conductivity: Conductivity; DO: Dissolved oxygen; pH: Acidity and alkalinity.

用于石油污染区域的修复潜力,其丰度变化可作为判断原油污染程度的检测指标之一<sup>[27]</sup>。由于水体浮游细菌的群落结构和多样性与空间、时间、环境变量(如温度、pH 和营养物)有关,进而导致细菌群落结构的组成发生变化,因此在东洞庭湖的不同采样区域主要的细菌门类存在差异<sup>[28]</sup>。

在属水平,本研究分离的细菌隶属于假单胞菌属、伪芽孢杆菌属、假节杆菌属和芽孢杆菌属的比例较大。假单胞菌属数量最多,该属细菌在淡水环境广泛分布,可以在不同的环境条件下分解不同的有机化合物(例如多环芳烃),对多种重金属具有抗性,还可以作为生物膜处理回收电子垃圾等<sup>[5,29-31]</sup>。本研究中的采样点大多接近居民居住地,可能与细菌的环境适应性有关。伪芽孢杆菌属细菌呈革兰氏阳性,细胞呈杆状,可形成内生孢子,具有运动性,分离来源包括淡水、海洋沉积物、温泉、土壤、工业废料和金属矿石等<sup>[32]</sup>。假节杆菌属细菌分离来源多样,大部分的呼吸醌成分是 MK-9。极性脂组成主要包含二磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、二甘露糖基甘油酯和单半乳糖基二酰基甘油。主要的脂肪酸是 anteiso-C<sub>15:0</sub>、iso-C<sub>15:0</sub>、iso-C<sub>16:0</sub><sup>[33]</sup>。芽孢杆菌属细菌分离来源多样且代谢特殊,包括嗜盐、耐卤和嗜碱菌。一些细菌产生的酶可通过生物技术进行开发利用<sup>[25,34]</sup>。

虽然本研究细菌的主要类群与国内外其他湖泊相似<sup>[3]</sup>,但是与其他学者的结果存在一定差异。本实验从水样和土壤中共分离到 42 个属,13 个属为共有属,水样有 9 个特有属,土壤样品有 20 个特有属。孙霞等从洞庭湖水体及沉积物中共获得 94 株细菌,隶属于 4 个门 17 个属,优势菌门为假单胞菌门和芽孢杆菌门,优势属为不动杆菌属(*Acinetobacter*),只有 5 个属为共有属,水样有 8 个特有属,沉积物样品有 4 个特有属<sup>[35]</sup>。虽然本研究水样特有的食酸菌属

(*Acidovorax*)、土壤样品特有的剑菌属(*Ensifer*)以及两种不同类型样品的 2 个共有属(假单胞菌属和芽孢杆菌属)与孙霞等的实验结果一致,但是总体上细菌群落结构不同,可能与东洞庭湖采样位置不同有关。杨宇等从岳阳南湖采集表层水样,采用 16S rRNA 基因的扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)技术进行微生物多样性分析,发现优势菌是黄杆菌属(*Flavobacterium*, 22.4%)和假单胞菌属(11.2%)<sup>[36]</sup>。本研究南湖样品中的优势菌为假单胞菌属(15.0%)和芽孢杆菌属(2.8%),这可能与研究方法、采样点、年份和季节不同有关<sup>[37]</sup>。根据尹宇莹等和毕斌等研究,在空间分布上,各重金属元素的浓度表现为东洞庭湖>南洞庭湖>西洞庭湖<sup>[4,38]</sup>。本研究分离的 Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>抗性菌数量较多,而利用含 Zn<sup>2+</sup>的重金属选择培养基筛选出菌株较少,可能与样品的理化性质有关。

本研究仍然存在以下不足:(1) 分子生物学研究表明,地球上微生物种类非常丰富,细菌域分为大约 40 个门,而且多数微生物从环境样品中未能培养出来<sup>[39]</sup>。本实验分离的细菌隶属于 4 个门,由于纯培养方法相比非培养方法具有很大的局限性,可能有一些具有重要生态功能的菌株尚未分离出来。因此,后续可采用非培养技术,进一步分析多样性和代谢能力,为东洞庭湖细菌的群落结构组成提供更全面的参考。(2) 本实验分离的潜在新种比例较低,仅为 1.2%,可能是实验室培养条件有限,不能模拟自然环境。后续可以考虑改良培养基、加入生长因子、高通量培养、共培养等,获得更多的细菌新资源<sup>[40-42]</sup>。(3) 虽然实验前期培养了 634 株菌,但是仅获得 253 株细菌的 16S rRNA 基因序列信息,可能是水煮法提取 DNA 效率较低,后续可改为试剂盒提取。(4) 针对已获得的抗性菌,后续可进一步

筛选出具有最高重金属抗性和多环芳烃降解特性的菌株, 基于基因组测序和分析深入研究。

### 3.2 结论

本实验基于可培养方法共分离 253 株细菌, 隶属于 6 个纲 42 个属, 包括潜在新种菌株 2 株和潜在新属菌株 1 株。本研究分离的细菌, 在门水平, 包括假单胞菌门(64.4%)、芽孢杆菌门(18.6%)、放线菌门(16.2%)和拟杆菌门(0.8%)。纲水平上, 主要是  $\gamma$ -变形菌纲(54.5%)和芽孢杆菌纲(18.6%), 还包括放线菌纲(16.2%)、 $\alpha$ -变形菌纲(5.1%)、 $\beta$ -变形菌纲(4.7%)和黄杆菌纲(0.8%)。属水平上, 主要类群是假单胞菌属(46.6%)、伪芽孢杆菌属(7.5%)、假节杆菌属(6.7%)和芽孢杆菌属(5.1%)。通过相关性分析发现, 温度、可溶性颗粒、电导率、溶解氧对样品的细菌群落组成影响较大, pH 和盐度较小。经过复筛, 共分离 30 株具有较高的重金属抗性菌和 7 株多环芳烃高效耐受菌。

综上所述, 本研究有助于阐明东洞庭湖冬季不同区域细菌多样性组成, 可用于挖掘污染物治理的工程菌株。

### REFERENCES

- [1] 吴庆龙, 江和龙. 中国湖泊微生物组研究[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(3): 273-279.  
WU QL, JIANG HL. China Lake Microbiome Project[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2017, 32(3): 273-279 (in Chinese).
- [2] 张光贵. 洞庭湖水环境健康风险评价[J]. 湿地科学与管理, 2013, 9(4): 26-29.  
ZHANG GG. Health risk assessment of the water environment of Dongting Lake[J]. Wetland Science & Management, 2013, 9(4): 26-29 (in Chinese).
- [3] 任丽娟, 何聃, 邢鹏, 王毓菁, 吴庆龙. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 421-432.  
REN LJ, HE D, XING P, WANG YJ, WU QL. Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(4): 421-432 (in Chinese).
- [4] 尹宇莹, 彭高卓, 谢意南, 莫永涛, 李芬芳, 欧阳美凤, 黄代中. 洞庭湖表层沉积物中营养元素、重金属的污染特征与评价分析[J]. 环境化学, 2021, 40(8): 2399-2409.  
YIN YY, PENG GZ, XIE YN, MO YT, LI FF, OUYANG MF, HUANG DZ. Characteristics and risk assessment of nutrients and heavy metals pollution in sediments of Dongting Lake[J]. Environmental Chemistry, 2021, 40(8): 2399-2409 (in Chinese).
- [5] LIU SH, ZENG GM, NIU QY, LIU Y, ZHOU L, JIANG LH, TAN XF, XU P, ZHANG C, CHENG M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: a mini review[J]. Bioresource Technology, 2017, 224: 25-33.
- [6] CHENG H, ZHANG S, HUO YY, JIANG XW, ZHANG XQ, PAN J, ZHU XF, WU M. *Gilvimirinus polysaccharolyticus* sp. nov., an agar-digesting bacterium isolated from seaweed, and emended description of the genus *Gilvimirinus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt 2): 562-569.
- [7] HALL TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt[J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41(41): 95-98.
- [8] KIM OS, CHO YJ, LEE K, YOON SH, KIM M, NA H, PARK SC, JEON YS, LEE JH, YI H, WON S, CHUN J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt 3): 716-721.
- [9] STACKEBRANDT E, GOEBEL BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44(4): 846-849.
- [10] LUDWIG W, STRUNK O, KLUGBAUER S, KLUGBAUER N, WEIZENEGGER M, NEUMAIER J, BACHLEITNER M, SCHLEIFER KH. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review)[J]. Electrophoresis, 1998, 19(4): 554-568.
- [11] THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [12] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.

- [13] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [14] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [15] XIE JM, CHEN YR, CAI GJ, CAI RL, HU Z, WANG H. Tree visualization by one table (tvBOT): a web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W587-W592.
- [16] 吴月红, 韩正兵, 张心齐, 周亚东, 吴敏, 许学伟. 南极普里兹湾可培养浮游细菌群落结构研究[J]. *极地研究*, 2014, 26(2): 222-229.
- WU YH, HAN ZB, ZHANG XQ, ZHOU YD, WU M, XU XW. Community composition of Antarctic bacterioplankton isolated from the Prydz Bay, Antarctica[J]. *Chinese Journal of Polar Research*, 2014, 26(2): 222-229 (in Chinese).
- [17] 刘晓红, 李校, 彭志杰. 生物多样性计算方法的探讨[J]. *河北林果研究*, 2008, 23(2): 166-168.
- LIU XH, LI X, PENG ZJ. The discussion on calculation methods of biodiversity[J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2008, 23(2): 166-168 (in Chinese).
- [18] LEE SD, KIM IS. *Microbacterium tenebrionis* sp. nov. and *Microbacterium allomyrinae* sp. nov., isolated from larvae of *Tenebrio molitor* L. and *Allomyrina dichotoma*, respectively[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(3): 005729.
- [19] XIE FQ, NIU SW, LIN XH, PEI SX, JIANG L, TIAN Y, ZHANG GY. Description of *Microbacterium luteum* sp. nov., *Microbacterium cremeum* sp. nov., and *Microbacterium atlanticum* sp. nov., three novel C50 carotenoid producing bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(10): 886-897.
- [20] LU HB, DENG TC, CAI ZP, LIU FF, YANG XN, WANG YH, XU MY. *Janthinobacterium violaceinigrum* sp. nov., *Janthinobacterium aquaticum* sp. nov. and *Janthinobacterium rivuli* sp. nov., isolated from a subtropical stream in China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4): 2719-2725.
- [21] CHOI GM, LEE SY, KIM SY, WEE JH, IM WT. *Hydrogenophaga borbori* sp. nov., isolated from activated sludge[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(1): 555-561.
- [22] FARÍAS ME, CONTRERAS M, RASUK MC, KURTH D, FLORES MR, POIRÉ DG, NOVOA F, VISSCHER PT. Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama, Chile[J]. *Extremophiles*, 2014, 18(2): 311-329.
- [23] 张雨晴, 邵克强, 胡洋, 丁艳青, 张恩楼, 高光, 汤祥明. 岱海水体及沉积物细菌多样性及群落组成特征[J]. *湖泊科学*, 2022, 34(6): 2070-2082.
- ZHANG YQ, SHAO KQ, HU Y, DING YQ, ZHANG EL, GAO G, TANG XM. Bacterial diversity and community composition in lake water and sediment of Lake Daihai[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2022, 34(6): 2070-2082 (in Chinese).
- [24] SHU DT, HE YL, YUE H, WANG QY. Microbial structures and community functions of anaerobic sludge in six full-scale wastewater treatment plants as revealed by 454 high-throughput pyrosequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 163-172.
- [25] 张姜, 黄嘉丰, 李艳玲, 刘丹, 吴日帮, 廖斌强, 雷鸣, 肖潇, 武翠玲, 何海伦. 西南地区高山湖泊中可培养细菌多样性及其所产胞外活性物质的特性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(9): 2043-2054.
- ZHANG J, HUANG JF, LI YL, LIU D, WU RB, LIAO BQ, LEI M, XIAO X, WU CL, HE HL. Diversity of culturable bacteria and their extracellular active substance properties in alpine lakes of Southwest China[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(9): 2043-2054 (in Chinese).
- [26] 江红, 林如, 陈路劼, 林浩, 聂毅磊, 连云阳. 智利海洋沉积物中放线菌多样性[J]. *微生物学报*, 2010, 50(7): 862-869.
- JIANG H, LIN R, CHEN LJ, LIN H, NIE YL, LIAN YY. Actinobacterial diversity of marine sediment samples from Chile[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 862-869 (in Chinese).
- [27] 王敏, 张雨桐, 黄晨, 任杰辉, 万甜, 程文. 西安市景观湖泊水体细菌群落结构分析与代谢功能预测[J]. *环境科学*, 2023, 44(2): 847-856.
- WANG M, ZHANG YT, HUANG C, REN JH, WAN T, CHENG W. Bacterial community structure and the prediction of metabolic function in landscape lake water in Xi'an[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(2): 847-856 (in Chinese).
- [28] 曹新益, 徐慧敏, 王司辰, 黄睿, 沈烽, 何肖微, 余钟波, 赵大勇. 南京莫愁湖与紫霞湖浮游细菌群落结构的季节性变化及其与环境因子的关系[J]. *化学与生物工程*, 2016, 33(12): 19-26, 30.
- CAO XY, XU HM, WANG SC, HUANG R, SHEN F, HE XW, YU ZB, ZHAO DY. Seasonal variation of

- bacterioplankton community structure and its relationship with environmental factors of Mochou Lake and Zixia Lake in Nanjing[J]. Chemistry & Bioengineering, 2016, 33(12): 19-26, 30 (in Chinese).
- [29] BATRICH M, MASKERI L, SCHUBERT R, HO B, KOHOUT M, ABDELJABER M, ABUHASNA A, KHOLOKI M, PSIHOGIOS P, RAZZAQ T, SAWHNEY S, SIDDIQUI S, XOUBI E, COOPER A, HATZOPOULOS T, PUTONTI C. *Pseudomonas* diversity within urban freshwaters[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 195.
- [30] 王伟伟. 假单胞菌分解代谢芳香化合物的分子机理研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2019.
- WANG WW. Genomic and biochemical study of the catabolism of aromatic compounds by *Pseudomonas*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [31] 唐赞. *Pseudomonas* 生物膜的构建、产氰特性及其对电子垃圾贵金属的浸出作用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2021.
- TANG Y. Construction of *Pseudomonas* biofilm, cyanogen production characteristics and its leaching effect on precious metals from electronic waste[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2021 (in Chinese).
- [32] PAL D, BHARDWAJ A, KAUR N, SUDAN SK, BISHT B, KUMARI M, VYAS B, KRISHNAMURTHI S, MAYILRAJ S. *Fictibacillus aquaticus* sp. nov., isolated from downstream river water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(1): 160-164.
- [33] BUSSE HJ. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(1): 9-37.
- [34] SHIN B, PARK C, LEE BH, LEE KE, PARK W. *Bacillus miscanthi* sp. nov., a alkaliphilic bacterium from the rhizosphere of *Miscanthus sacchariflorus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(3): 1843-1849.
- [35] 孙霞, 刘扬, 王芳, 张虎, 毛淑敏, 亓翠英. 洞庭湖区可培养细菌群落结构及其空间分布特征[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(7): 13-19.
- SUN X, LIU Y, WANG F, ZHANG H, MAO SM, QI CY. Community structure and spatial distribution characteristics of culturable bacteria in Dongting Lake[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61(7): 13-19 (in Chinese).
- [36] 杨宇, 钱林, 代沁芸, 万民熙, 黄芝英, 师舞阳, 邱冠周. 湖南岳阳洞庭湖 3 个样点的表层水体细菌多样性研究[J]. 生命科学研究, 2008, 12(4): 333-339.
- YANG Y, QIAN L, DAI QY, WAN MX, HUANG ZY, SHI WY, QIU GZ. The diversity of surface aquatic bacteria from Lake Dongting in Yueyang, Hunan[J]. Life Science Research, 2008, 12(4): 333-339 (in Chinese).
- [37] 韩晶, 胡文革, 王艳萍, 武菲, 张晓红, 王翠华. 新疆艾比湖湿地博乐河入口处土壤细菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2244-2253.
- HAN J, HU WG, WANG YP, WU F, ZHANG XH, WANG CH. Bacterial diversity in Bole river entrance soil of Ebinur Lake wetland, Xinjiang by 16S rRNA gene sequence analysis[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2244-2253 (in Chinese).
- [38] 毕斌, 卢少勇, 于亚军, 任珊珊, 郭李凯, 刘晓晖. 湖泊沉积物重金属赋存形态研究进展[J]. 科技导报, 2016, 34(18): 162-169.
- BI B, LU SY, YU YJ, REN SS, GUO LK, LIU XH. Research progress on the speciation of heavy metals in lake sediments[J]. Science & Technology Review, 2016, 34(18): 162-169 (in Chinese).
- [39] STEVENSON BS, EICHORST SA, WERTZ JT, SCHMIDT TM, BREZNAK JA. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4748-4755.
- [40] CONNON SA, GIOVANNONI SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3878-3885.
- [41] STEINERT G, WHITFIELD S, TAYLOR MW, THOMS C, SCHUPP PJ. Application of diffusion growth chambers for the cultivation of marine sponge-associated bacteria[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(5): 594-603.
- [42] 李晓丹, 屈建航, 周佳, 张璐洁, 李海峰, 田海龙. 泥浸汁对太湖沉积物中的好氧可培养细菌多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 554-560.
- LI XD, QU JH, ZHOU J, ZHANG LJ, LI HF, TIAN HL. Effect of sediment extract on the culturable aerobic bacterial diversity in the sediments of Taihu Lake[J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 554-560 (in Chinese).