青藏高原湖泊沉积物硫酸盐还原菌种群分布

杨 渐^{1,2,5},蒋宏忱²,孙永娟¹,吴 耿²,侯卫国⁴,董海良^{2,4},赖忠平^{1,3}

(1. 中国科学院青海盐湖研究所,青海 西宁 810008;

2. 中国地质大学(武汉),生物地质与环境地质国家重点实验室,湖北 武汉 430074;

3. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所,甘肃 兰州 730000;

4. 中国地质大学(北京),生物地质与环境地质国家重点实验室,北京 100083;

5. 中国科学院大学,北京 100049)

摘 要:采用聚合酶链式反应(PCR, Polymerase Chain Reaction)、变性梯度凝胶电泳(DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 与实时荧光定量聚合酶链式反应(Q-PCR, Quantitative PCR) 相结合的综合分析技 术,研究了青藏高原洱海、青海湖、尕海1、尕海2、小柴旦湖沉积物硫酸盐还原菌多样性及丰度。研究结果 显示,5个盐湖沉积物中 dsrB(编码亚硫酸还原酶β亚基,为硫酸盐还原菌所共有)基因的丰度为每克沉积 物1.71×10⁸~1.55×10⁹拷贝,与盐度无明显相关性;所获得的 dsrB基因序列分属于3个科: Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae 和 Peptococcaceae。其中, Desulfobacteraceae 科是主要类群。硫酸盐还原菌多样性 (DGGE 结果) 与盐度呈现出负相关性。故在所研究的盐湖中,盐度可能不是影响硫酸盐还原菌种群分布的 唯一因素,可能还受其它未知环境因素的影响,有待于进一步研究。

关键词: dsrB 基因; DGGE; 硫酸盐还原菌; 青藏高原湖泊

文献标识码: A

中图分类号: Q939.99

文章编号:1008-858X(2013)01-0007-07

引 言

硫循环是地球化学元素循环中重要的组成 部分。主要有两大微生物代谢过程参与推动自 然硫循环,硫氧化和硫酸盐还原过程,而执行这 两个过程分别是硫氧化菌群与硫酸盐还原菌 群^[1]。硫酸盐还原菌可将亚硫酸盐还原菌 群^[1]。硫酸盐还原菌可将亚硫酸盐还原为硫 化氢,这个代谢过程可能矿化了光合浮游生物 所固定有机碳的 32% ~ 35%^[2]。Leloup 等通 过对黑海沉积物中硫酸盐还原的研究推断认 为 在黑海表层沉积物中 硫酸盐还原主导着有 机碳矿化过程^[3]。Scholten 等通过对美国加里 福利亚州 Mono Lake 的研究表明,在高盐环境 中依赖硫酸盐还原发生的甲烷氧化过程只有硫 酸盐还原菌的参与^[4]。硫酸盐还原过程主要 受环境中硫酸盐的浓度控制,加大硫酸盐的输 入可以加速还原过程,但同时又影响其他元素 (如碳、氮、磷、铁等)循环^[5]。

Beijerinck 于 1895 年首次发现了硫酸盐还 原菌^[6],之后针对其系统进化及生态功能等又有 大量的研究。传统的分离培养技术首先对其生 理生化进行研究。大量的研究表明硫酸盐还原 菌的最适盐度为 10%,培养的盐度上限为 24%^[7]。根据 Oren 的观点,由于硫酸盐还原代 谢的高能量需求,对于完全氧化者来说,硫酸盐

收稿日期: 2012-03-09; 修回日期: 2012-11-14

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(41002123);国家自然科学基金重点项目(41030211);国家自然科学基金创 新群体项目(41121001)

作者简介:杨渐(1987 -)硕士研究生,主要研究方向地质微生物学。

通信作者: 赖忠平。E – mail: zplai@ isl. ac. cn 或 zplai@ yahoo. com. cn。蒋宏忱。E – mail: hongchen. jiang@ gmail. com。

还原的盐度上限是 13% ,而对于不完全氧化者, 盐度也不能超过 25%^[8]。然而,相关研究显示 硫酸盐还原代谢仍能在盐度大于 25% 的盐湖环 境中发生^[1,7]。也许存在一些硫酸盐还原菌种 群具有特殊的渗透适应机制,抑或这些菌群的微 观生存环境处于低盐状态^[3]。大量的研究致力 于探索此类菌群在环境中的分布以及其对环境 地球化学过程的影响。不过,至今尚无针对青藏 高原盐湖中此类菌群分布的研究。

青藏高原是地球上最高的高原,被喻为世 界屋脊。在此区域内有几千个大大小小的湖 泊,其中大部分是盐湖^[9]。由于独特的地理环 境和地质构造,造就了区域内盐湖显著的盐度 差异(0.1~426.3g/L)^[10]。然而,我们对此区 域内盐湖硫酸盐还原菌群分布知之尚少。故本 文将运用 PCR-DGGE 分析技术对本区域内 6 个湖泊沉积物硫酸盐还原菌的多样性进行研 究,并借助 Q-PCR 对其丰度进行定量分析,旨 在了解其沉积物中硫酸盐还原菌的多样性分布 及丰度变化,以及其种群对盐度的响应。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

FastDNA SPIN for Soil Kit (美国 MP BIO)、 Agarose Gel DNA purification Kit Ver. 2. 0(日本 TaKaRa)、pGEM-T Easy Vector Systems (日本 TaKaRa)、Bio-Rad ALD1244 PCR 仪(美国 Bio-Rad)、Bio-Rad Dcode[™] DGGE 仪(美国 Bio-Rad)、7500 Real Time PCR System(美国 Applied Biosystems) 以及 Eppendorf 5417R 高速台 式离心机(德国 Eppendorf)等。

1.2 样品的采集和保存

本文所使用的样品是 2011 年 7 月在青藏 高原采集的湖泊沉积物及湖水。样品采集使用 无菌的金属勺掘取表层沉积物并用 1.5mL 的 灭菌离心管分装,采集过程均带手套操作,避免 污染。水样品使用无菌的 50mL 离心管采集。 沉积物样品采集后迅速放入干冰中保存并运送 至中国地质大学(北京) 地质微生物实验室保 存于-80℃冰箱。水样品低温保存并送至中国 科学院青海盐湖所进行阴阳离子浓度测试。样 点信息及地球化学参数信息如表1所示。

1.3 现场参数测试及阴阳离子浓度测试

Hach kit 用于现场湖水参数测试,等离子 发射光谱仪用于阴阳离子的浓度测试。湖水理 化参数如表1及表2所示。

1.4 样品 DNA 的提取及 PCR 扩增

选取 6 个湖泊沉积物样品用于提取 DNA, FastDNA SPIN Kit for soil 试剂盒用于 DNA 提 取,所有操作均参照试剂盒使用说明书。硫酸 盐还原过程的关键基因(*dsrB* 基因) 被用作 PCR 扩增的目标基因,即编码亚硫酸盐还原成 硫化氢的关键酶基因^[11]。引物 DSRp 2060F: CAACATCGTYCAYACCCAGG^[12]与 DSR4: GTG-TAGCAGTTACCGCA^[13]用于扩增 *dsrB* 基因片 段。理想的扩增长度是 350bp 左右。由于需要 进一步进行变性梯度凝胶电泳分析,在引物 DSRp 2060F 的 5' 端加上一个 40 bp 的 GC 夹 子^[14]。PCR 反应条件参照参考相关文献^[12]。

1.5 变性梯度凝胶电泳分析及 dsrB 基因片段 分析

Bio-Rad Dcode[™] DGGE 仪用于变性梯度凝 胶电泳(DGGE) 分析,聚丙烯酰胺胶的浓度为 8%,变性梯度采用 40% ~70% 的变性剂浓度 (尿素和去离子甲酰胺)。在 100V 的电压下电 泳 14h。然后染色照相。用无菌的手术解剖刀 割下条带,放入 1.5mL 的无菌离心管中,加入 75 µL 的无菌去离子水并捣碎。然后存放于 4℃冰箱中过夜。第 2 天用不带 GC 夹子的引 物 DSRp 2060F 和 DSR4 再次进行 PCR 扩增, 然后直接将 PCR 扩增产物送至测试中心测序, 测序引物为 DSRp 2060F。如果测序结果不理 想 则采用克隆后再进行测序。克隆的方法参 照相关文献^[15]。

所得序列均要翻译成氨基酸序列并在基因 库中进行比对,并选取参考序列。然后将参考 序列与样品序列放在一起在 MEGA 5 中用邻接 点法构建系统发育树^[16]。

1.6 荧光定量分析(Q-PCR)

7500 Real Time PCR System 用于定量分 析,引物 DSRp 2060(不含 GC 夹子)和 DSR4 用 于样品的定量扩增。所采 6 个盐湖沉积物样品 用于定量分析。SYBR Premix Ex Taq[™](日本 TaKaRa)试剂用于荧光定量 PCR 扩增。所有 操作均按操作说明进行。扩增条件是 95 ℃ 预 变性 30 s,然后直接进行 40 个循环 PCR 扩增 (95℃变性 5 s,55 ℃ 退火 34 s,72℃延伸50 s)。

1.7 DNA 序列在 Gene Bank 中登录号

本研究获得的所有序列均已提交至 Gen-Bank 其登录号为: JQ742047 - JQ742076。

- 2 结果与分析
- 2.1 地球化学参数测试结果

6个盐湖的盐度范围: 0.99~307.6 g/L。

2.2 DGGE 分析结果及 dsrB 序列分析

变性凝胶梯度电泳分析结果如图1所示,

共有 45 个 DGGE 条带被切割下来。从图 1 中 DGGE 条带的数量可以看出硫酸盐还原菌的多 样性随盐度的增加而减少。由于在凝胶成像过 程中紫外线破坏了条带中的 DNA 故只获得了 30 个 DGGE 条带的测序结果 相应的 DGGE 条 带在图1中均作有标记。达布逊湖在 DGGE 图 中可以看到明显的一条带,但由于割胶过程中 紫外照射,DNA可能遭到破坏,PCR再次扩增 并未成功,故未从东达布逊湖沉积物样品中获 得 DGGE 条带测序结果。将获得的 30 个序列 翻译成氨基酸序列 并在 GeneBank 数据库中进 行比对,并选取相似性最高的参考序列构建系 统进化树。构建系统进化树所用的参考序列均 是已培养的硫酸盐还原菌。系统进化树如图 2 所示。所有翻译的 dsrB 氨基酸序列分别归属 于3个科:脱硫杆菌科(Desulfobacteraceae)、 Desulfobulbaceae、消化球菌科(Peptococcaceae); 同源序列的相似菌株有: Desulfotignum balticum, Desulfatibacillum aliphaticivorans, Desulfobacterium anilini、Desulfofustis glycolicus 及 Desulfotomaculum carboxydivorans 等。

2.3 荧光定量分析结果

含有dsrB基因片段的克隆子质粒用于标

	Table 1 Sampling sites and Hach kit data								mg/L	
湖泊	GPS 位点	$_{\rm pH}$	S^{2} -	NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-	Si ^{4 +}	碱度	Fe^{2} +	SO_4^2
洱 海	36°34´N/100°44´E	9.43	0.11	0	0	0.03	1.25	340	0.13	>80
青海湖	36°38′N/100°7′E	9.14	0.04	0	0.02	0.1	0.93	>400	0	>80
尕海1	36°58′N/100°36′E	8.88	0.11	0	0	0.07	1.4	360	0.16	>80
尕海2	37°8′N/97°35′E	8.37	0.01	2	0.03	0	>2.20	>400	0.03	>80
小柴旦湖	37°29´N/95°26´E	8.43	0.05	0	0.04	0.17	0.33	>400	0.09	>80
达布逊湖	37°5′N/95°7′E	6.96	0.17	3	0.02	0.77	1.37	260	0.08	>80

表1 样点信息及现场参数测试

Table 2 Geochemical data of lake water								mg/L		
采样点	K *	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	SO_4^2	Cl -	CO_{3}^{2}	HCO ₃	NO_3^-	盐度/(g/L)
洱 海	9.04	218.8	19.97	68.49	117.9	231.1	46.6	268.5	< 0.01	1.0
青海湖	269.2	3 993	17.65	824.1	2 188	5 626	405	854.1	< 0.01	14.2
尕海1	613	9 384	22.76	1 467	6 058	13 035	515	824.1	0.01	31.9
尕海2	452.9	26 770	392	4 097	10 790	41 059	113	312.2	< 0.01	84
小柴旦湖	920	54 691	625	2 588.66	28 735	72 063	366	380.1	< 0.01	160.4
达布逊湖	2 163	77 950	1 711	24 700	4 462	196 232	0	359.6	9.91	307.6



图 1 变性凝胶梯度电泳分析图

注: 测序成功的 DGGE 条带用白色圆圈和数字标注



准曲线的制作,选用浓度为10¹~10⁷ dsrB 基因拷贝数量级的质粒制作标准曲线。定 量结果显示 5 个盐湖沉积物中 dsrB 基因拷贝 数在每克沉积物中10⁸ 个左右,如图3 所示。 东达布逊盐湖沉积物样品没有探测到荧光信 号,可能由于 dsrB 基因浓度太低,超出仪器的 探测范围。

3 讨论

3.1 硫酸盐还原菌的定量分析

dsrB基因荧光定量分析显示,所采盐湖样 品中,每克沉积物 dsrB基因丰度为 1.71×10⁸~1.55×10⁹个拷贝。已有研究表 明,在某些 Desulfovibrio 种群中 dsr基因在基因 组中不仅有一个拷贝^[17]。所以,实验测定的 dsrB基因丰度高于实际环境中硫酸盐还原菌的 丰度。根据图3定量结果显示,dsrB基因丰度 最高值出现在尕海2(盐度84.0g/L)而不是淡 水湖洱海;但是淡水湖洱海的dsrB丰度都是高 于其它盐湖的。可以看出盐度并不是唯一影响 dsrB基因丰度的因素。已有相关研究表明,硫 酸盐的浓度是控制硫酸盐还原效率的重要因素 增加硫酸盐的浓度可能加速硫酸盐还原过 程^[5],所以硫酸盐还原菌的丰度可能受硫酸盐 浓度影响。

3.2 硫酸盐还原菌的多样性

本研究所得的 dsrB 序列只分布于 3 个科: Desulfobacteraceae、 Desulfobulbaceae、 Peptococcaceae Desulfobacteraceae 科是主要分布菌群; 与 这些序列相似性较高的可培养菌株主要有以下 4 个: Desulfatibacillum aliphaticivorans、 Desulfotignum balticum、 Desulfofustis glycolicus、 Desulfotomaculum carboxydivorans; 然而大部序列并没 有高度相似的可培养菌株 dsrB 序列做参照, 暗 示这些盐湖中可能存在新的硫酸盐还原菌种 群。

系统进化树分析显示 Desulfobacteraceae 科 的硫酸盐还原菌在 5 个盐湖沉积物中均有分 布。然而, Desulfobacteraceae 科被认为是完全 氧化类群的代表^[1]。根据 Oren 的观点^[8],完全 氧化菌群的盐度上限为 130g/L,故此类菌群不 应出现在小柴旦盐湖(盐度 160.4g/L)沉积物 中。相似的结果也出现在 Foti 等的研究中,



图 2 dsrB 基因序列系统进化树

注: 邻接进化树采用 Poisson 模型构建 树中只显示大于 50%的 Bootstrap 值(1000 个重复运算)。本研究所得的 DGGE 序 列 并经过翻译之后所得的氨基酸序列在进化树中均加粗表示 例如 QHLS-dsrB_DGGE_20 指代亚硫酸还原酶 β 亚基氨基 酸序列翻译于第 20 号 DGGE 条带序列 其序列来自青海湖沉积物。所有 DGGE 条带数字编号均来自图 1。另外 XCDLS、 GHL1S、GHL2S 和 EHLS 分别指代的是小柴旦湖沉积物、尕海 1 沉积物(青海湖附近)、尕海 2 及洱海

Fig. 2 Neighbor-joining tree showing the phylogenenetic relationships of the dsrB gene sequences

Foti 等认为也许存在一些硫酸盐还原菌种群具 有特殊的渗透适应机制,抑或这些菌群的微观 生存环境处于低盐状态^[1]。

另外,在尕海2沉积物中得到一条序列与 Desulfotomaculum carboxydivorans的 dsrB 基因具 有相似性。已有研究表明 D. carboxydivorans 菌 株能在 100% 的一氧化碳环境中生长; 当环境 中有硫酸盐存在时, 它可将一氧化碳转化为氢 气和二氧化碳,部分氢气用于硫酸盐还原过程; 当在没有硫酸盐的情况下,它就将一氧化碳完 全转化为氢气和二氧化碳^[18]。此类菌株在青 藏高原盐湖中的发现,暗示着盐湖环境中可能 也存在一氧化碳氧化的过程。下一步我们将对 青藏高原不同盐度盐湖中一氧化碳氧化菌群进 行多样性调查,并探究其对全球碳循环的重要 意义。



图 3 荧光定量分析的 dsrB 基因拷贝数

Fig. 3 Q-PCR-based abundance of the *dsrB* genes in sediment samples

4 结 论

本文对青藏高原盐湖硫酸盐还原菌多样性 做了初步的研究。研究结果显示,盐度对硫酸 盐还原菌的多样性有一定的影响,然而它对 *dsrB* 基因的丰度的影响并不明显。故在盐湖条 件下,影响硫酸盐还原菌的丰度及多样性分布 的因素并不只有盐度,可能还受其它环境因素 影响,有待于进一步研究。相关研究结果为此 区域湖泊环境评价提供了可借鉴的实验数据基 础。

参考文献:

- [1] Foti M ,Sorokin D Y ,Lomans B ,et al. Diversity , activity , and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes [J]. Applied and Environmental Microbiology , 2007 ,73 (7): 2093 – 2100.
- [2] Oremland R S ,Dowdle P R , Hoeft S , et al. Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake , California [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta , 2000 64 (18): 3073 – 3084.
- [3] Leloup J, Loy A, Knab N J, et al. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea [J]. Environmental Microbiology, 2007 9(1):131-142.
- [4] Scholten J Joye S ,Hollibaugh J et al. Molecular analysis of the sulfate reducing and archaeal community in a meromictic Soda lake(Mono Lake ,California) by targeting 16S rRNA , mcrA , apsA , and dsrAB genes [J]. Microbial Ecology , 2005 50 (1): 29 – 39.
- [5] Holmer M , Storkholm P. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: a review [J]. Freshwater Biology ,

2001 46 (4):431 -451.

- [6] Butlin K R ,Adams M E ,Thomas M. The isolation and cultivation of sulphate-reducing bacteria [J]. Journal of General Microbiology ,1949 3(1): 46 – 59.
- [7] Kjeldsen K U "Loy A Jakobsen T F *et al.* Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment "Great Salt Lake (Utah) [J]. FEMS Microbiology Ecology 2007 60(2): 287 - 298.
- [8] Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews ,1999 ,63 (2): 334 – 348.
- [9] Dong H. Microbial life in extreme environments: linking geological and microbiological processes links between geological processes [C]//Dilek Y ,Furnes H ,Muehlenbachs K , eds. Microbial Activities & Evolution of Life , Springer Netherlands 2008: 237 – 280.
- [10] 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.
- [11] Klein M M, Friedrich M, Roger A J *et al.* Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes [J]. Journal of Bacteriology , 2001 ,183 (20): 6028 – 6035.
- [12] Geets J, Borremans B, Diels L, et al. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods ,2006 , 66(2):194-205.
- [13] Wagner M ,Roger A J ,Flax J L *et al.* Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration [J]. Journal of Bacteriology , 1998 ,180 (11): 2975 – 2982.
- [14] Muyzer G de Waal E C. Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology , 1993 59(3):695 – 700.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Kondo R Nedwell D B , Purdy K J *et al.* Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR [J]. Geomicrobiology Journal , 2004 21(3):145 – 157.

[18] Parshina S N , Sipma J , Nakashimada Y ,et al. Desulfotomaculum carboxydivorans sp. nov. ,a novel sulfate-reducing bacterium capable of growth at 100% CO[J]. Interna-

tional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005 55(5):2159-2165.

Abundance and Diversity of Sulfate-reducing Bacteria in Qinghai-Tibetan Lakes

YANG Jian^{1 2 5} JIANG Hong-chen² SUN Yong-juan¹ ,WU Geng² ,HOU Wei-guo⁴ , DONG Hai-Jiang^{2 4} LAI Zhong-ping^{1 3}

(1. Oinghai Institute of Salt Lakes, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences,

Wuhan ,430074 , China; 3. Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute , Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

4. State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology , China University of Geosciences,

Beijing , 100083 , China;

5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The abundance and diversity of sulfate-reducing bacteria in sediments collected from six lakes (Erhai Lake, Qinghai Lake, Gahail Lake, Gahai2 Lake, Xiaochaidan Lake, and East Dabsan Lake) on Qinghai-Tibet Plateau were investigated by using an integrated approach including polymerase chain reaction(PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and quantitative PCR (qPCR). The results show that the dsrB gene (encoding for β -subunit of the dissimilatory sulfite reductase) abundance in the studied saline lakes ranges from 1.71×10^8 to 1.55×10^9 copies per gram of sediments , which did not show apparent relationship with salinity; The retrieved DGGE band sequences were affiliated with Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae and Peptococcaceae, and Desulfobacteraceae sequences were dominant. The DGGE-based dsrB gene diversity decreased as salinity increase. Taken together salinity may not be the sole factor controlling the abundance and diversity of sulfate reducing bacteria in Qinghai-Tibetan lakes, but other unknown environmental factors may contribute, which awaits further investigation. Key words: dsrB gene; DGGE; Sulfate-reducing bacteria; Qinghai-Tibetan lakes