DOI: 10.5846/stxb201805081021

刘金波,孔维栋,王君波,刘晓波,张国帅,康世昌.纳木错湖水体固碳微生物数量、群落结构及其驱动因子研究.生态学报,2019,39(8): - . Liu J B,Kong W D,Wang J B,Liu X B,Zhang G S,Kang S C.Abundance, community structure, and the driving factors of Carbon fixing microorganisms in the Nam Co Lake .Acta Ecologica Sinica,2019,39(8): - .

纳木错湖水体固碳微生物数量、群落结构及其驱动因 子研究

刘金波^{1,3},孔维栋^{1,*},王君波²,刘晓波¹,张国帅²,康世昌² 1中国科学院青藏高原研究所,高寒生态学与生物多样性重点实验室,北京 100101

2 中国科学院青藏高原研究所,青藏高原环境变化与地表过程重点实验室,北京 100101

3 西南医科大学附属医院,肝胆外科,泸州 646000

摘要:湖泊是微生物固碳的主要生态系统之一,但青藏高原湖泊水体固碳微生物群落的研究还罕见报道。以纳木错为例,采用 定量 PCR 和克隆文库方法,研究湖水中 cbbL ID 基因丰度和固碳微生物群落组成,并分析其与环境参数的关系。结果显示:纳 木错湖水中存在较高丰度的 cbbL ID 类型固碳微生物,从表层到底层呈增加趋势,T2 点底层达到最高值(6.37×10⁸拷贝 L⁻¹湖 水)。cbbL ID 类型固碳微生物共分四个类群,即不等鞭毛类(Stramenopiles),定鞭藻纲(Haptophyceae),蓝藻(Cyanobacteria)和 隐藻门(Cryptophyta)。其中占主要的是 Stramenopiles 和 Haptophyceae。Stramenopiles 类群的多样性较高(含 7 个纲,13 个科), 其它类群只有 1 个科。相关性分析表明 Stramenopiles 和 Haptophyceae 出现频率存在显著的负相关关系(P<0.01)。谢水深度和 pH 与湖水 cbbL ID 基因丰度显著相关(P<0.05,P<0.01)。叶绿素含量与 Stramenopiles 和 Haptophyceae 出现频率显著相关(P<0.01)。

关键词:纳木错;固碳;微生物;群落结构;驱动因子

Abundance, community structure, and the driving factors of Carbon fixing microorganisms in the Nam Co Lake

LIU Jinbo^{1,3}, KONG Weidong^{1,*}, WANG Junbo², LIU Xiaobao¹, ZHANG Guoshuai², KANG Shichang²

1 Key Laboratory of Alpine Ecology and Biodiversity, Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Key Laboratory of Tibetan Environment Changes and Land Surface Processes, Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Department of Hepatobiliary Surgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, 646000, China

Abstract: Lakes are one of the main ecosystems for carbon fixation; however, the microbial community for carbon fixation in the lakes of the Tibetan Plateau have rarely been reported. In this study, the Nam Co Lake was chosen to study the abundance of *cbbL* ID genes and their composition using quantitative PCR and a clone library method. We also discuss their relationship with environmental parameters. The results showed that there was a high abundance of the *cbbL* ID gene in the Nam Co Lake, and there was an increasing trend from the surface to the bottom, and the highest amount was in the bottom sample of T2 (6.37×10^8 copies $\cdot L^{-1}$ water). The community was mainly composed of Stramenopiles and Haptophyceae, and a few Cyanobacteria and Cryptophyta appeared on individual layers. The Stramenopiles group had a higher diversity (including 7 classes and 13 families) than that of the other groups, and there was only 1 family of another taxa. A

收稿日期:2018-05-08; 网络出版日期:2018-00-00

基金项目:国家自然科学基金面上项目(41471054);中国科学院百人计划项目(KZZD-EW-TZ-14)

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wdkong@itpcas.ac.cn

correlation analysis showed there was a significant negative correlation (P < 0.01) of the occurrence frequency of Stramenopiles and Haptophyceae. Water depth and pH had a significant correlation with *cbbL* ID gene abundance (P < 0.05, P < 0.01, respectively). Chlorophyll content had a significant correlation with the occurrence frequency of Stramenopiles and Haptophyceae.

Key Words: Nam Co Lake; carbon fixation; microorganism; community structure; driving factor

湖泊是驱动水体地球元素循环和生态系统运行的关键系统之一,是地球表层系统碳循环的主要场所。微 生物是驱动湖泊碳循环的关键,微生物组成研究对揭示其结构与功能至关重要。然而,我国在湖泊碳循环微 生物驱动机制方面的研究还处于起步阶段^[1]。

在自然界中,微生物有多种 CO₂固定途径,包括卡尔文循环途径,厌氧乙酰辅酶 A 途径、还原性三羧酸循 环途径、3-羟基丙酸途径、3-羟基丙酮/4-羟基丁酸循环途径、琥珀酰辅酶 A 途径、草酰乙酸盐途径、嘧啶和嘌 呤核苷酸途径等^[2-3]。其中,卡尔文循环(CBB)途径广泛存在于真核藻类和自养原核细菌中^[4-5]。核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)是 CBB 途径中的一个关键的酶,它催化 CO₂固定到生物圈的第一步反应。 RubisCO 酶含有大小两个亚基,最保守的位点位于大亚基。功能基因 *cbbL* 编码 RubisCO 酶的大亚基,可分成 4 种类型(form I—IV),其中,form I 是自养微生物中最主要的类群。Form I RubisCO 可以进一步被分为不同 的类型 forms IA,IB,IC 和 ID^[6]。*cbbL* 基因已经被广泛用于系统发育生物标志物来研究不同环境条件下自养 微生物的群落结构和多样性^[7-11]。

尽管前人利用 RubisCO 基因调查了许多不同生境类型的固碳微生物群落多样性,但是在高寒湖泊环境中进行的研究相对较少。目前,南极湖泊中的微生物群落结构及其在元素地球化学循环的作用已取得一些重要进展^[9-10, 12-15]。在一个永久冰覆盖的南极湖泊中,含 *cbbL* ID RubisCO 基因的微生物是主要的固碳微生物类群^[9]。青藏高原是世界上面积最大且海拔最高的高原,该区域气候独特,湖泊广泛发育,数量大和类型多。此外,这些湖泊受人为活动影响相对较小,有利于研究自然状态下湖泊微生物群落组成及其对环境的响应。但作为世界第三极的青藏高原湖泊中微生物生态学研究还处于起步阶段,目前主要是研究湖泊水和沉积物中细菌及古菌群落结构^[16],以及环境因素(例如,pH、盐度、碱度和地理距离等)对细菌、古菌、以及真核生物群落结构和多样性的影响^[17-21]。但是,湖水中哪些微生物参与固碳作用的研究还罕见报道。青藏高原湖水固碳微生物群落组成和多样性还不清楚。因此,研究青藏高原湖水固碳微生物群落特征具有重要的生态学

本研究以青藏高原纳木错为例,研究湖水中固碳基因丰度、群落组成,并初步探讨其驱动因子。

1 研究区域与方法

1.1 纳木错概况

纳木错位于藏北高原东南部,西藏自治区当雄和班戈县境内,介于 30°30′—30°35′N,90°16′—91°03′E 之间。湖水主要依赖位于其南缘的念青唐古拉山脉冰雪融化补给。纳木错湖面海拔 4718 m,总面积为 1982 km^{2[22]}。是我国第二大咸水湖,也是世界上海拔最高的咸水湖,纳木错湖地区基本不受人为影响,纳木错湖水 深超过 90 m^[23]。

1.2 样品采集以及水质参数测定

2012年9月在纳木错湖从东到西的方向上分别采集4个样点的水柱样本,分别标记为TO(N:30°47.782′, E:90°58.133′),T1(N:30°47.031′,E:90°49.473′),T2(N:30°44.573′,E90°45.317′)和T3(N:30°38.025′, E:90°28.634′),采样位置如图1所示。根据每个位置湖水深度,水样用采水器直接采集,分层取表层到最底 层,并用1L无菌广口瓶保存,每层水样3次重复,采集后置于冰盒中带回纳木错野外综合观测实验站。在实 验室采用 0.45 μm 孔径滤膜进行过滤,所用装置为六联过 滤器(Millipore,美国)。过滤完毕带有水体微生物的滤膜 保存在 5 mL 无菌冻存管中(Corning,美国),置于-80℃冰 箱中冻存备用。采集水样的同时,利用美国哈希公司生产 的 Hydrolab DS5 多参数水质仪在野外工作现场对垂直剖 面上的水质数据进行采集^[24]。

1.3 样本总 DNA 提取及基因丰度检测

分别取滤膜在无菌操作台上剪碎,之后采用 DNA 提 取试剂盒(MP)进行总 DNA 提取。DNA 浓度和质量采用 Nanodrop 2000(Thermo,英国)进行测定。采用引物 *cbbL* ID-F(5'-GAT GAT GAR AAY ATT AAC TC-3')和 *cbbL* ID-R(5'-ATT TGD CCA CAG TGD ATA CCA-3')^[4]对样本



图 1 纳木错采样位置示意图 Fig.1 Nam Co sampling sketch map T0:终端 0, Terminal 0; T1:终端 1, Terminal 1; T2:终端 2, Terminal 2;T3:终端 3, Terminal 3

cbbL ID 基因丰度进行定量 PCR 检测。采用绝对定量法,以含有目标片段的质粒 10 倍稀释做为标准曲线。 所有定量 PCR 均采用荧光标记法,所用试剂为 SYBRGreenII(宝生物,大连),所用仪器为 LightCycler [®] 480 system(Roche,美国)。反应体系为 20 μL,包括 10 μL SYBR 预混液(Takara,大连),10—20 ng DNA,0.6 μM 上/下游引物。扩增条件为,95℃预变性 2 min,之后是 35 个循环的定量 PCR。94℃变性 30 s,退火温度 52℃, 在 72℃收集荧光信号,检测结果用定量 PCR 仪专用分析软件进行计算。同时对 cbbL IA/B^[25]以及 cbbL IC^[26] 基因丰度进行检测,检测方法相同,cbbL IA/B 的退火温度为 54℃;cbbL IC 的退火温度为 52℃。

1.4 样本克隆文库及测序分析

根据基因丰度的结果,对丰度较高的 cbbL ID 基因进行克隆文库构建和系统发育分析。选取水深度较深 且代表湖水面积较大的 T2(0 m,5 m,20 m,60 m,80 m 和底层)和 T3(0 m,5 m,10 m,20 m,40 m 和底层)水样 进行克隆文库构建和测序。每层水样 3 次重复分别采用 cbbL ID-F/R 引物进行 PCR 扩增,扩增条件同定量 PCR。3 个重复产物混合进行凝胶电泳检测,采用胶回收试剂盒(Axygen)对 PCR 产物进行切胶纯化。将切胶 纯化的 PCR 产物采用 PEGM-T 载体连接试剂盒(Promega)转到 DH-5α 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选,每个 样本选取阳性克隆 35—70 个送北京华大基因有限公司进行测序。

1.5 数据统计分析与作图

不同深度及不同样点间 ID 类固碳微生物数量 ANOVA 显著性检验(P<0.05),湖水理化性质与固碳微生物数量以及不同类群出现频率之间 Pearson 相关性分析采用 SPSS 18.0 进行。基因丰度及理化性质图采用 Sigma Plot 10.0 绘制。克隆文库测序覆盖度用公式 C=1-n/N 计算(其中 C 为覆盖度,即 Coverage,n 为文库中 只出现一次的克隆数量,N 为该文库克隆总数)。测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对。采用 mothur^[27]以97% 相似性进行可操作分类单元(OTU)划分,选取代表 OTU 采用 MEGA5^[28]构建系统发育树。构建系统进化树 时,送代运算 1000 次。固碳微生物类群在湖水不同深度出现频率,按每个层中该物种的克隆数占该水层总克 隆数的比例计算。

1.6 基因序列号

用于构建系统发育树的代表 OTU 序列均已提交至 NCBI 的 GenBank 数据库中,检索号分别为 MH557362—MH557411。

2 结果与分析

2.1 纳木错湖水中固碳微生物数量

纳木错湖水中,固碳基因 *cbbL* ID 的丰度最高,所有样本中 *cbbL* ID 基因丰度在 2.46×10⁷—6.37×10⁸拷贝 L⁻¹湖水(图 2);*cbbL* I/B 基因丰度在 7.59×10⁶—3.96×10⁷拷贝 L⁻¹湖水之间,仅次于 *cbbL* ID 基因(图 2);*cbbL*

IC 基因的丰度最低,大部分基因丰度在 5.16×10⁴—1.17×10⁶拷贝 L⁻¹湖水之间,但最底层的基因丰度均高于 1.0×10⁷拷贝 L⁻¹湖水(图 2)。以固碳基因丰度最高的 *cbbL* ID 为例,丰度从表层到底层有增加的趋势,尤其是 在水深大于 60 m 以及水和底泥交界面的底层最高。T0,T2 和 T3 点的最底层基因丰度显著高于上层(P< 0.05)。成对比较表明,T0 点和 T1 与 T2 点之间基因丰度差异显著,其它样点之间无显著差异(P<0.05)。



Fig.2 *cbbL* ID, IA/B and IC gene copy number in Nam Co lake water T0.T1, T2和T3代表从东到西4个水样剖面采样点,所有数据为平均值±Se(n=3)

2.2 ID 类固碳微生物群落组成

选取湖泊中心区域水深较深的 T2(6 层)和西部湖面积较大的 T3(6 层)代表样品进行克隆文库和测序, 并构建系统发育树。所有样本测序共得到有效序列 535 条,去除相似性高的同一序列后,得到单一序列 275 条,经过 OTU 划分,共得到代表 OTU 序列 50 条。每个样本克隆文库的饱和度均在 81.8%—96.6%之间(表 1),测序数量接近饱和,能够代表基因文库所有 ID 功能基因的类型。系统发育分析显示(图 3),纳木错湖水 中含 *cbbL* ID 基因的微生物可划分为4个类群,其中不等鞭毛类(Stramenopiles)占主要地位,除了在 T2 点 60 m 水深出现频率较低外(25%),其它深度均较高,最高达到 100%,在相同深度 T3 点水样中的出现频率高于 T2 点。第二大类是定鞭藻纲(Haptophyceae),其在 T2 点 60 m 水深出现频率最高(75%),其它样点较低,最低 的为 0%,在相同深度 T3 点水样中的出现频率低于 T2 点。蓝藻(Cyanobacteria)出现频率较低,且只在 T2 点 80 m 水样中检测到;隐藻门(Cryptophyta)只在 T3 点 0 m 和 40 m 水层检测到(表 1)。

5



图 3 纳木错湖水 cbbL ID 群落系统发育树

Fig.3 *cbbL* ID community phylogenetic tree of Nam Co lake water

系统发育树中 OTU 序列名称为位点+深度+克隆编号+NCBI 编号

http://www.ecologica.cn

表 1	纳木错湖水 cbbL ID	类群在不同深度出现频率
-----	---------------	-------------

Table 1 Occurrence frequency of *cbbL* ID group in Nam Co lake water at different depths

深度	覆盖度/%	蓝藻/%	隐藻门/%	定鞭藻纲/%	不等鞭毛类/%
Depth	Coverage	Cyanobacteria	Cryptophyta	Haptophyceae	Stramenopiles
0 m(T3)	94.12	0.00	2.08	10.42	87.50
5 m(T3)	97.06	0.00	0.00	6.06	93.94
10 m(T3)	82.35	0.00	0.00	8.82	91.18
20 m(T3)	94.12	0.00	0.00	0.00	100.00
40 m(T3)	83.82	0.00	6.25	0.00	93.75
底层(T3)	92.65	0.00	0.00	0.00	100.00
0 m(T2)	98.53	0.00	0.00	45.45	54.55
5 m(T2)	98.53	0.00	0.00	21.43	78.57
20 m(T2)	98.53	0.00	0.00	55.56	44.44
60 m(T2)	97.06	0.00	0.00	75.00	25.00
80 m(T2)	95.59	5.56	0.00	33.33	61.11
底层(T2)	91.18	0.00	0.00	5.00	95.00

T3:终端 3, Terminal 3; T2:终端 2, Terminal 2

2.3 ID 类固碳微生物多样性

根据代表 OTU 最相近的物种进行归类,主要类群的 Stramenopiles 的多样性最高,其它 3 类的多样性低 (表 2)。Stramenopiles 包括 44 个代表 OTU,归属于 7 个纲。分别是属于硅藻门(Bacillariophyta)的硅藻纲 (Bacillariophyceae), 脆杆藻纲(Fragilariophyceae)和圆筛藻纲(Coscinodiscophyceae),以及金藻纲 (Chrysophyceae),黄群藻纲(Synurophyceae),真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)和硅鞭藻纲(Dictyochophyceae)。 其中硅藻纲下包括 4 个已知科:长曲壳藻科(Achnanthidiaceae),硅藻科(Bacillariaceae),Catenulaceae 和双菱 藻科(Surirellaceae)和1 个未定科的类群;金藻纲下包括 3 个已知科:单鞭金藻科(Chromulinaceae),金囊藻科 (Chrysocapsaceae)和锥囊藻科(Dinobryaceae);其它 5 个纲只有 1 个科。总计 13 个科。Haptophyceae 共有 3 个代表 OTU,属于金色藻科(Chrysochromulinaceae)。Cyanobacteria 有 1 个代表 OTU,属于聚球藻科 (Synechococcaceae)。另外 2 个代表 OTU 与 Cryptophyta 的 Geminigeraceae 相似度最大。

此外,属于 Stramenopiles 的 44 条序列中,占绝对优势的是 Fragilariaceae,共 14 个代表 OTU,占该类的 31. 8%;纳木错湖水中 Fragilariaceae 的最相似种 Fragilaria crotonensis(KF959640)分离自法国的湖泊^[29],相似性 为99%。其次是 Bacillariaceae,共7个代表 OTU,占该类的 15.9%;纳木错湖水中 Bacillariaceae 的最相似种是 Nitzschia cf. pusilla (HF675119),这个种曾经在淡水中被分离到^[30],和分离自西班牙河水的 Nitzschia draveillensis(KC736605)^[31],相似性均为98%。第三位的是 Stephanodiscaceae,共5个代表 OTU,占该类的 11.4%。纳木错湖水中 Stephanodiscaceae 的最相似种是 Stephanodiscus sp.(JQ217354),相似性为 99%;和来源 与美国 Lake Erie 的 Stephanodiscus sp. FHTC11(DQ514825)^[32],相似性为 99%。Surirellaceae,共有 3 个代表 OTU,占该类的 6.8%。纳木错湖水中 Surirellaceae 的最近似种是 Surirella brebissonii(KX120621)^[33],相似性为 99%。Monodopsidaceae,共有3个代表OTU,占该类的6.8%。纳木错湖水中 Monodopsidaceae 的最近似种是淡 水来源的 Nannochloropsis sp. MDL3-4(DQ977732)^[34],相似性为 99%。Dictyochophyceae 纲的一个未知科,有 3 个代表 OTU, 占该类的 6.8%。纳木错湖水中该科的最近似种是分离自日本 brackish pond 的 Helicopedinella tricostata(AB097409)^[35],相似性为 98%。Catenulaceae 只有 1 个代表 OTU, 占该类的 2.3%。纳木错湖水中 Catenulaceae 的最近似种是 Amphora indistincta(KJ463463)^[36],相似性为 99%。在 2 个采样点的 12 个克隆文 库中.5个主要科的相对比例如图4所示,其中占主要的Fragilariaceae 在所有克隆文库中均有分布。在T3点 水样中的相对比例略高于 T2 点相同深度水样。除底层外,均是主要类群。而底层则主要是以 Stephanodiscaceae 占绝对优势。

Genbank 号

相似度/%

92

96

93

AM701775

KP899713

KP899713

Division	Class	Family	OTU ID	Identities	Accession
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Achnanthidiaceae	T2-D-8	92	KT 943613
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Bacillariaceae	T3-40m-35	98	HF675119
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Bacillariaceae	T3-5m-63/ T2-DD-22	97/96	HF675068
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Bacillariaceae	T3-10m-11/T3-40m-40	98	KC736605
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Bacillariaceae	T3-20m-49	94	KC736605
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Bacillariaceae	T3-40m-25	95	HF675067
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Catenulaceae	T2-DD-14	99	KJ463463
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Surirellaceae	T3-10m-18	99	KX120621
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Surirellaceae	T3-60m-67	98	JX032961
Stramenopiles	Bacillariophyceae	Surirellaceae	T3-60m-29	95	KX120655
Stramenopiles	Bacillariophyceae	—	T3-40m-22	94	KY693719
Stramenopiles	Coscinodiscophyceae	Stephanodiscaceae	T3-0m-18	99	JQ217354
Stramenopiles	Coscinodiscophyceae	Stephanodiscaceae	T3-0m-49/ T2-D-9	99/97	DQ514825
Stramenopiles	Coscinodiscophyceae	Stephanodiscaceae	T3-60m-3/T2-60m-3	96	DQ514825
Stramenopiles	Chrysophyceae	Chromulinaceae	T3-0m-65	89	KJ877675
Stramenopiles	Chrysophyceae	Chrysocapsaceae	T3-10m-12	89	EF165148
Stramenopiles	Chrysophyceae	Dinobryaceae	T3-0m-34	86	EF165156
Stramenopiles	Dictyochophyceae	_	T3-20m-59	98	AB097409
Stramenopiles	Dictyochophyceae	—	T3-10m-44	86	AB097409
Stramenopiles	Dictyochophyceae	—	T3-40m-27	86	HQ710601
Stramenopiles	Eustigmatophyceae	Monodopsidaceae	T3-10m-70/ T2-80m-26	99/98	DQ977732
Stramenopiles	Eustigmatophyceae	Monodopsidaceae	T3-40m-68	91	DQ977732
Stramenopiles	Fragilariophycidae	Fragilariaceae	T2-80m-14/T3-0m-21	99	KF959640
Stramenopiles	Fragilariophycidae	Fragilariaceae	T3-5m-59/T2-80m-33/T3-10m-23	96	KF959640
Stramenopiles	Fragilariophycidae	Fragilariaceae	T2-DD-35/ T2-0m-58	95/92	KF959640
Stramenopiles	Fragilariophycidae	Fragilariaceae	T2-80m-4/T3-0m-10	95	AB430674
Stramenopiles	Fragilariophycidae	Fragilariaceae	T3-60m-41/T3-20m-44	94	AB430674
Stramenopiles	Fragilariophyceae	Fragilariaceae	T3-10m-24	96	HQ912451
Stramenopiles	Fragilariophyceae	Fragilariaceae	T3-60m-21/ T3-60m-28	99/93	HQ828199
Stramenopiles	Synurophyceae	Mallomonadaceae	T3-10m-45	89	JX946355
Stramenopiles	Synurophyceae	Mallomonadaceae	T2-80m-16/T3-0m-64	88	KM590889
	Haptophyceae	Chrysochromulinaceae	T2-80m-1/T3-0m-11	99	MG520331
			T2-5m-44	92	MG520331

表 2 纳木错 cbbL ID 基因 OTU 分类及其最相似序列 Table 2 Nam Co lake cbbL ID gene OTU classification and their nearest sequences

OTU 编号

2.4 纳木错湖水基本理化性质及其与 ID 类固碳微生物群落的相关性

Svnechococcaceae

Geminigeraceae

纳木错水质比较均一,各个监测点理化性质差异不大。本研究以湖水最深处T2点为例,基本理化性质如 图 5 所示,水温在表层(0-15 m)较高,在 20 m 以下较低,溶解氧在表层 0-20 m 有增加趋势,之后下降。pH 从表层到下层呈下降趋势,叶绿素的含量在表层和底层都很低,在 60 m 深处有一个峰值。电导率在表层到底 层变化不大,环境光从表层到底层有下降趋势。相关分析表明 cbbL ID 基因丰度与水深(r=0.718,P<0.05)和 pH(r=-0.760, P<0.01)有显著相关。不等鞭毛类(Stramenopiles)和定鞭藻纲(Haptophyceae)出现频率均与叶 绿素含量显著相关,其中不等鞭毛类(Stramenopiles)是负相关(r = -0.894, P < 0.01), 而定鞭藻纲

T2-80m-18

T3-0m-20

T3-40m-47

类

Cyanobacteria

Cryptophyta

纲

科

(Haptophyceae)是正相关(*r*=0.910,*P*<0.01)。不等鞭毛 类(Stramenopiles)和定鞭藻纲(Haptophyceae)出现频率显 著负相关(*r*=-0.994,*P*<0.01)。

3 讨论

3.1 固碳微生物主要类群 Stramenopiles

本研究中不等鞭毛类(Stramenopiles)是优势固碳微生物类群,在所有水层样品中出现,除 T2 点 60 m 出现频率较低外,其它水层均高于 40%,最大的达到 100%(表 1)。 本研究结果与前人研究结果相似,例如,太湖中 Stramenopiles 是主要的真核生物类群之一,其出现频率约为 22%^[37],此出现频率远低于纳木错湖大部分水层,与 T2 点 60 m 接近。两个湖泊的维度接近,但其它环境因子差 异较大,纳木错地区海拔大于 4800 m,紫外线辐射较强,且 温度低;而太湖位于我国东部低海拔地区,海拔低,紫外线 和辐射较纳木错弱,且温度高于纳木错地区;此外,纳木错 水来源主要是冰川融水,且人为影响比较小,湖水寡营 养^[38-39];而太湖地区水来源多,并受人类活动影响较大,湖 水营养盐含量较高^[40]。这可能是两个湖中都存在 Stramenopiles,但出现频率差异较大的主要原因。相反,在





Fig 4 Relative abundance of OTUs within the five main Families of Stramenopiles in the clone libraries

橫坐标为每个克隆文库,克隆文库名字为采样点-深度,如 T3—0m代表T3采样点,0m水样的克隆文库,DD代表最下 面一层水样。图中5个科分别是硅藻科(Bacillariaceae),脆杆 藻科(Fragilariaceae),单珠微藻科(Monodopsidaceae),圆筛藻 科(stephanodiscaceae)和双菱藻科(Surirellaceae)

永久冰雪覆盖的南极湖泊中, Stramenopiles 被报道是主要的固碳微生物类群,且其出现频率与 Haptophyceae 的出现频率之间存在此消彼长的关系^[9,15],这个结果与本研究得到的结果一致。虽然两个湖地理位置差异较大,但都是极端环境,属于高寒地区,且受人为因素影响小。其中南极的 Bonney 湖处于永久冰川覆盖环境下,能反映此环境下原始情况。而纳木错湖的结果与其基本一致,从另一个方面验证了纳木错湖水受到人为因素影响小。此外, Stramenopiles 还在非洲碱湖纳库鲁^[41],波罗的海^[42],和洞里萨湖^[43],以及 Salzkammergut 地区到 Low Tauern 地区不同海拔的高山湖泊^[44],坦噶尼喀湖^[45]中被检测到。但其出现频率差异很大,其中在非洲碱湖纳库鲁只检测到一个克隆^[41],在波罗的海检测到 4—10%^[42],在洞里萨湖可以达到 10⁵ L⁻¹水^[43]。在不同海拔的高山湖泊中, Chrysophyceae 占 14.6%,其它 Stramenopiles 占 9.6%^[44]。坦噶尼喀湖中Stramenopiles 占 35%^[45]。说明, Stramenopiles 是湖泊中广泛分布的类群,且耐受极端环境,是重要的固碳微生物类群。

3.2 固碳微生物主要类群 Haptophyceae

本研究发现,Haptophyceae 的出现频率仅次于 Stramenopiles。纳木错湖中代表 OTU 最相近的是淡水来源 的 *Chrysochromulina parva*(MG520331),相似度为 99%。在本研究中,其出现频率在 T2 点 60 m 处最多,并且 与叶绿素含量有关。这个种在中国最早在武汉东湖被发现^[46]。此种在冬季出现,春末消失,高的种群密度在 水温为 6—8℃时形成^[46]。说明此种比较耐寒,与纳木错地区条件类似。*Chrysochromulina parva* 是世界广泛 分布的种类,生长在寒带、温带、热带和亚热带地区的湖泊、水库、池塘和河流中,湖泊中发现的占多数^[46]。最 近,有研究报道在加拿大安大略湖中此类群被一种病毒所侵染^[47]。*Chrysochromulina parva* 是南安第斯湖中重 要的类群^[48-50]。夏季的几个月里,在寡营养的南安第斯湖中观察到了一种独特的深层叶绿素的发展。最深 的叶绿素位于共光区的极限附近,刚好低于金属离子的上限^[49]。此外,有研究报道在梅洛米茨湖中存在暗碳 固定^[51]。Haptophytes 主要是单细胞水生生物,主要是海洋光合作用真核生物,淡水中的研究较少^[52]。然而, 在一些湖中的小型真核生物,主要的克隆最相近的是 *Chrysochromulina parva^[53-54]*。在一个寡营养亚高山湖泊







中,单细胞淡水蓝藻 Synechococcus 和混合营养的鞭毛藻类(Chrysochromulina parva 为主要类群)被证明是与湖 泊功能相关的类群^[55]。以上 Chrysochromulina parva 为主要类群的大部分湖泊基本上都是寡营养的,可见 Chrysochromulina parva 在寡营养淡水环境中具有重要的生态位,在淡水生态系统碳固定中起重要作用。

3.3 固碳微生物群落驱动因子

纳木错湖泊中存在大量的固碳微生物,其中 ID 类 *cbbL* 基因丰度最高且与湖水深度和 pH 显著相关。本研究结果与在南极冰下湖中结果相似^[9]。这些结果说明,湖水深度和 pH 对固碳基因丰度有影响。类似的, pH 被发现是调控湖水中需氧的不产氧光养细菌的多样性和群落结构的潜在因子^[20]。有研究报道,湖水中真核生物的遗传多样性与湖水营养状态有关^[37,56]。沿海拔梯度高山湖泊的原生生物多样性差异受到多个因素的影响,其中 pH 和营养浓度是最重要的^[44]。此外,纳木错湖水中不等鞭毛类(Stramenopiles)的出现频率与叶绿素含量显著相关,这与在南极冰下湖的结果一致^[9]。有研究报道色素组成是影响不等鞭毛类(Stramenopiles)生态演替的关键因子之一^[57]。在本研究中,采集一个时间点的水样,纳木错湖中Stramenopiles占绝对优势,Haptophyceae只在 T2 点 60 m 的出现频率较高。而在 Bonney 两个采样时间点中,6

2

0

20

40

60

80

100

0

0

20

40

60

80

大深 Water depth/m

m(ELB)和10 m(WLB)的水样,一个时间点是 Stramenopiles 占绝对优势,而另一个时间点是 Haptophyceae 占绝对优势;而13 m的水样,2个时间点均以 Haptophyceae 占绝对优势^[9]。其原因是在不同的时间点和采样点,水体的环境因素发生改变,影响了两者出现频率。在本研究中,两种固碳微生物类群的出现频率与水体中叶绿素含量显著相关,在叶绿素含量出现峰值的60 m 水样中,Haptophyceae 的出现频率最高(75%),而其它 层则以 Stramenopiles 为优势类群(表1)。在 Bonney 湖中,13 m 也是叶绿素含量出现峰值的水层^[9]。这进一步说明,叶绿素含量是调控两者在湖水中出现频率的主要环境因子。

4 结论

在纳木错湖水中存在丰度较高的含 cbbL ID 基因的固碳微生物,从表层到底部有增加的趋势,T2 底层达 到最高值(6.37×10⁸拷贝 L⁻¹湖水)。T0,T2 和 T3 点的最底层基因丰度显著高于上层(P<0.05)。成对比较表 明,T0 和 T1 与 T2 之间差异显著,其它样点之间无显著差异(P<0.05)。含 cbbL ID 基因固碳微生物群落组成 主要是不等鞭毛类(Stramenopiles)和定鞭藻纲(Haptophyceae),以及个别层出现少量的蓝藻(Cyanobacteria) 和隐藻门(Cryptophyta)。Stramenopiles 具有较高的多样性,包括 7 个纲和 13 个科。其它类群只有 1 个科。 Stramenopiles 中占主要的是 Fragilariaceae,占该类群的 31.8%;其次是 Bacillariaceae,占该类群的 15.9%;第三 位的是 Stephanodiscaceae,占该类群的 11.4%。其它科的比例均小于 10%。相关分析表明,不等鞭毛类 (Stramenopiles)和定鞭藻纲(Haptophyceae)出现频率之间存在显著的负相关关系。湖水深度和 pH 与 cbbL ID 基因丰度显著相关。叶绿素含量与不等鞭毛类(Stramenopiles)和触丝藻纲(Haptophyceae)出现频率显著相 关。表明纳木错湖水中的 cbbL ID 基因丰度较高,群落组成大类较单一,但 Stramenopiles 类多样性高。影响基 因丰度的主要因素是湖水深度和 pH,影响群落组成的主要因素是叶绿素含量。

致谢:感谢王明达和杨瑞敏在湖泊采样和湖水理化性质测定中的帮助,并感谢纳木错多圈层综合观测研究站 相关工作人员在采样过程中提供的帮助。

参考文献(References):

- [1] 吴庆龙, 江和龙. 中国湖泊微生物组研究. 中国科学院院刊, 2017, 32(3): 273-279.
- Berg I A. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77 (6): 1925-1936.
- [3] Long X E, Yao H Y, Wang J, Huang Y, Singh B K, Zhu Y G. Community structure and soil pH determine chemoautotrophic carbon dioxide fixation in drained paddy soils. Environmental Science & Technology, 2015, 49(12): 7152-7160.
- [4] Paul J H, Alfreider A, Wawrik B. Micro- and macrodiversity in *rbcL* sequences in ambient phytoplankton populations from the southeastern Gulf of Mexico. Marine Ecology Progress Series, 2000, 198: 9-18.
- [5] Kovaleva O L, Tourova T P, Muyzer G, Kolganova T V, Sorokin D Y. Diversity of RuBisCO and ATP citrate lyase genes in soda lake sediments. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 75(1): 37-47.
- [6] Tabita F R, Satagopan S, Hanson T E, Kreel N E, Scott S S. Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(7): 1515-1524.
- [7] Elsaied H E, Kimura H, Naganuma T. Composition of archaeal, bacterial, and eukaryal RuBisCO genotypes in three Western Pacific arc hydrothermal vent systems. Extremophiles, 2007, 11(1): 191-202.
- [8] John D E, Wang Z H A, Liu X W, Byrne R H, Corredor J E, López J M, Cabrera A, Bronk D A, Tabita F R, Paul J H. Phytoplankton carbon fixation gene (RuBisCO) transcripts and air-sea CO₂ flux in the Mississippi River plume. The ISME Journal, 2007, 1(6): 517-531.
- [9] Kong W D, Ream D C, Priscu J C, Morgan-Kiss R M. Diversity and expression of RubisCO genes in a perennially ice-covered Antarctic lake during the polar night transition. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4358-4366.
- [10] Kong W D, Dolhi JM, Chiuchiolo A, Priscu J, Morgan-Kiss R M. Evidence of form II RubisCO (*cbbM*) in a perennially ice-covered Antarctic lake. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 82(2): 491-500.
- [11] Yuan H Z, Ge T D, Chen C Y, O'Donnell A G, Wu J S. Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon. Applied and

Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2328-2336.

- [12] Priscu J C, Fritsen C H, Adams E E, Giovannoni S J, Paerl H W, McKay C P, Doran P T, Gordon D A, Lanoil B D, Pinckney J L. Perennial Antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert. Science, 1998, 280(5372): 2095-2098.
- [13] Priscu J C, Tulaczyk S, Studinger M, Kennicutt II M C, Christner B C, Foreman C M. Antarctic subglacial water: origin, evolution and ecology// Vincent W, Laybourn-Parry J, eds. Polar Lakes and Rivers: Limnology of Arctic and Antarctic Aquatic Ecosystems. Oxford: Oxford University Press, 2008: 119-135.
- [14] Mikucki J A, Pearson A, Johnston D T, Turchyn A V, Farquhar J, Schrag D P, Anbar A D, Priscu J C, Lee P A. A contemporary microbially maintained subglacial ferrous "Ocean". Science, 2009, 324(5925): 397-400.
- [15] Bielewicz S, Bell E, Kong W D, Friedberg I, Priscu J C, Morgan-Kiss R M. Protist diversity in a permanently ice-covered Antarctic Lake during the polar night transition. The ISME Journal, 2011, 5(9): 1559-1564.
- [16] Jiang H C, Dong H L, Yu B S, Lv G, Deng S C, Berzins N, Dai M H. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in Qinghai Lake, northwestern China. Geomicrobiology Journal, 2009, 26(3): 199-211.
- [17] Xiong J B, Liu Y Q, Lin X G, Zhang H Y, Zeng J, Hou J Z, Yang Y P, Yao T D, Knight R, Chu H Y. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. Environmental Microbiology, 2012, 14(9): 2457-2466.
- [18] Wu Q L, Hahn M W. High predictability of the seasonal dynamics of a species like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. Environmental Microbiology, 2006, 8(9): 1660-1666.
- [19] Wu Q L, Chatzinotas A, Wang J J, Boenigk J. Genetic diversity of eukaryotic plankton assemblages in eastern Tibetan lakes differing by their salinity and altitude. Microbial Ecology, 2009, 58(3): 569-581.
- [20] Jiang H C, Dong H L, Yu B S, Lv G, Deng S C, Wu Y J, Dai M G, Jiao N Z. Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 67(2): 268-278.
- [21] Zhang R, Wu Q L, Piceno Y M, Desantis T Z, Saunders F M, Andersen G L, Liu W T. Diversity of bacterioplankton in contrasting Tibetan lakes revealed by high-density microarray and clone library analysis. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 86(2): 277-287.
- [22] 鲁安新,姚檀栋,王丽红,刘时银,郭治龙.青藏高原典型冰川和湖泊变化遥感研究.冰川冻土,2005,27(6):783-792.
- [23] Wang J B, Zhu L P, Daut G, Ju J T, Lin X, Wang Y, Zhen X L. Investigation of bathymetry and water quality of Lake Nam Co, the largest lake on the central Tibetan Plateau, China. Limnology, 2009, 10(2): 149-158.
- [24] 王君波,朱立平, Daut G, 鞠建廷,林晓,汪勇, 甄晓林. 西藏纳木错水深分布及现代湖沼学特征初步分析. 湖泊科学, 2009, 21(1): 128-134.
- [25] Corredor J E, Wawrik B, Paul J H, Tran H, Kerkhof L, López J M, Dieppa A, Cárdenas O. Geochemical rate-RNA integration study: ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene transcription and photosynthetic capacity of planktonic photoautotrophs. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5459-5468.
- [26] Alfreider A, Vogt C, Geiger-Kaiser M, Psenner R. Distribution and diversity of autotrophic bacteria in groundwater systems based on the analysis of RubisCO genotypes. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(2): 140-150.
- [27] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, Van Horn D J, Weber C F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [28] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology And Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [29] Larras F, Keck F, Montuelle B, Rimet F, Bouchez A. Linking Diatom Sensitivity to Herbicides to Phylogeny: A Step Forward for Biomonitoring? Environmental Science & Technology, 2014, 48(3): 1921-1930.
- [30] Abou-Shanab R A I, Hwang J H, Cho Y, Min B, Jeon B H. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. Applied Energy, 2011, 88(10): 3300-3306.
- [31] Kermarrec L, Franc A, Rimet F, Chaumeil P, Humbert J F, Bouchez A. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. Molecular Ecology Resources, 2013, 13(4): 607-619.
- [32] Alverson A J, Jansen R K, Theriot E C. Bridging the rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 45(1): 193-210.
- [33] Ruck E C, Nakov T, Alverson A J, Theriot E C. Phylogeny, ecology, morphological evolution, and reclassification of the diatom orders Surirellales and Rhopalodiales. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2016, 103: 155-171.
- [34] Fawley K P, Fawley M W. Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of New Taxa. Protist, 2007, 158(3): 325-336.

- [35] Sekiguchi H, Kawachi M, Nakayama T, Inouye I. A taxonomic re-evaluation of the Pedinellales (Dictyochophyceae), based on morphological, behavioural and molecular data. Phycologia, 2003, 42(2): 165-182.
- [36] Stepanek J G, Kociolek J P. Molecular phylogeny of Amphora sensu lato (Bacillariophyta): An investigation into the monophyly and classification of the amphoroid diatoms. Protist, 2014, 165(2): 177-195.
- [37] Chen M J, Chen F Z, Yu Y, Ji J, Kong F X. Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China. Microbial Ecology, 2008, 56(3): 572-583.
- [38] 丁宁, 王陈园, 常海霞. 三大高原湖泊常见无机离子色谱分析研究. 绿色科技, 2017(24): 56-58.
- [39] 刘晓波, 康世昌, 刘勇勤, 韩文武. 青藏高原纳木错湖细菌群落特征及其与高山湖泊的对比. 冰川冻土, 2008, 30(6): 1041-1047.
- [40] 狄贞珍,张洪,单保庆.太湖内源营养盐负荷状况及其对上覆水水质的影响.环境科学学报,2015,35(12):3872-3882.
- [41] Luo W, Kotut K, Krienitz L. Hidden diversity of eukaryotic plankton in the soda lake Nakuru, Kenya, during a phase of low salinity revealed by a SSU rRNA gene clone library. Hydrobiologia, 2013, 702(1): 95-103.
- [42] Stock A, Jürgens K, Bunge J, Stoeck T. Protistan diversity in suboxic and anoxic waters of the Gotland Deep (Baltic Sea) as revealed by 18S rRNA clone libraries. Aquatic Microbial Ecology, 2009, 55(3): 267-284.
- [43] Ohtaka A, Watanabe R, Im S, Chhay R, Tsukawaki S. Spatial and seasonal changes of net plankton and zoobenthos in Lake Tonle Sap, Cambodia. Limnology, 2010, 11(1): 85-94.
- [44] Grossmann L, Jensen M, Pandey R V, Jost S, Bass D, Psenner R, Boenigk J. Molecular investigation of protistan diversity along an elevation transect of alpine lakes. Aquatic Microbial Ecology, 2016, 78(1): 25-37.
- [45] Anne-Laure T, Stephane S, Vanessa B, Danny S, Jean-Pierre D, Ramon M. Molecular characterisation of the small-eukaryote community in a tropical Great Lake (Lake Tanganyika, East Africa). Aquatic Microbial Ecology, 2011, 62(2): 177-190.
- [46] 魏印心. 中国新记录——小金色藻在武汉东湖的季节消长. 水生生物学报, 1996, 20(4): 317-321.
- [47] Mirza S F, Staniewski M A, Short C M, Long A M, Chaban Y V, Short S M. Isolation and characterization of a virus infecting the freshwater algae Chrysochromulina parva. Virology, 2015, 486: 105-115.
- [48] Queimaliños C P. Some physical and biological factors affecting a spring-summer phytoplankton dynamics in a shallow, temperate lake of South Andes (Argentina). Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 1997, 82(2); 147-160.
- [49] Queimaliños C P, Modenutti B E, Balseiro E G. Symbiotic association of the ciliate Ophrydium naumanni with Chlorella causing a deep chlorophyll a maximum in an oligotrophic South Andes lake. Journal of Plankton Research, 1999, 21(1): 167-178.
- [50] Modenutti B E, Balseiro E G, Queimaliños C P, Suárez D A A, Diéguez M C, Albariño R J. Structure and dynamics of food webs in Andean lakes. Lakes & Reservoirs: Research and Management, 1998, 3(3/4): 179-186.
- [51] Camacho A, Erez J, Chicote A, Florín M, Squires M M, Lehmann C, Backofen R. Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. Aquatic Sciences, 2001, 63(1): 91-106.
- [52] Simon M, López-García P, Moreira D, Jardillier L. New haptophyte lineages and multiple independent colonizations of freshwater ecosystems. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(2): 322-332.
- [53] Richards T A, Vepritskiy A A, Gouliamova D E, Nierzwicki-Bauer S A. The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. Environmental Microbiology, 2005, 7(9): 1413-1425.
- [54] Lepère C, Domaizon I, Debroas D. Unexpected importance of potential parasites in the composition of the freshwater small-eukaryote community. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 2940-2949.
- [55] Callieri C, Caravati E, Morabito G, Oggioni A. The unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus* and mixotrophic flagellates: evidence for a functional association in an oligotrophic, subalpine lake. Freshwater Biology, 2006, 51(2): 263-273.
- [56] Zhao B Y, Chen M J, Sun Y, Yang J X, Chen F Z. Genetic diversity of picoeukaryotes in eight lakes differing in trophic status. Canadian Journal of Microbiology, 2011, 57(2): 115-126.
- [57] Sassenhagen I, Rengefors K, Richardson T L, Pinckney J L. Pigment composition and photoacclimation as keys to the ecological success of Gonyostomum semen (Raphidophyceae, Stramenopiles). Journal of Phycology, 2014, 50(6): 1146-1154.