

东天山地区庙儿沟雪坑中微生物多样性、 群落结构与环境关系研究

刘 炜¹, 马晓军^{1, 2*}, 候书贵², 陈 拓², 秦大河²

(¹兰州大学生命科学学院 兰州 730000) (²中国科学院冰冻圈与环境联合重点实验室 兰州 730000)

摘 要 通过荧光计数、恢复培养和变形梯度凝胶电泳(DGGE), 分析了东天山地区庙儿沟不同深度积雪中的可培养细菌数量、多样性及其群落结构。结果表明, 东天山地区冰雪微生物数量和多样性指数与气候环境替代指标钙离子、镁离子、氯离子等具有相关性。该地区雪坑中细菌隶属于 4 个不同系统发育群: *proteobacteria* (α - β - γ -), CFB, HGC 和 LGC, 其中 CFB 类和 *proteobacteria* 类为主要类群。与青藏高原、南北极冰雪中微生物的比较分析发现 *Paracoccus* 和 *Aquasalina* 属是该地区的特殊微生物类群。直接培养和 DGGE 分析发现不同深度雪坑中微生物数量和群落结构都有明显的变化。结果表明, 由于东天山地区的特殊地理位置, 该地区冰雪微生物具有其特殊性。

关键词: 东天山庙儿沟冰川; 微生物群落结构; DGGE

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-1019-08

环境对生物结构和组成的影响已经引起科学界的普遍关注。近年来, 冰雪微生物作为极端低温环境中的主要生命形式已成为生命现象多样性和气候环境变化等基础研究领域所关注的热点之一。Mueller 等^[1]认为一些细菌的生理特性如产芽孢、具有色素等能使这些种属在零度以下的环境中具有活性。Amato 等^[2]指出从极地和非极地冰川、湖泊等冷环境中分离出的细菌种属, 按丰度递减的顺序一般分属于 *Proteobacteria* 类(主要是 α -*proteobacteria*, β -*proteobacteria* 和 γ -*proteobacteria*), *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*(CFB)类和低 G + C LGC 及高 G + C HGC 革兰氏阳性菌类。以往对极地和山地冰雪微生物的研究结果显示, 北极海冰中细菌数量较高, 达 1×10^5 cell/mL^[3]; 南极的 Vostok 湖中细菌含量较低, 不到 1×10^3 cell/mL^[4]; 冰川雪、极地和高山湖泊的微生物含量居中^[2, 5, 6]。研究显示, 细菌数量在冰芯剖面上的分布是不均一的, 呈波动性变化^[7]。而且随着冰芯深度的变化, 细菌的种类及结构出现一定的变化, 说明冰芯不同层面微生物的数量和种类组成反映了冰芯沉积年代的气候环境条件和特殊事件的变化, 进一步表明冰川是一个长期的、按年代保存的微生物的储存库^[8]。

相对于深冰芯微生物研究而言, 对表面雪层和浅雪(冰)芯中的微生物研究较少。与深冰芯研究比较而言, 浅冰芯和表面雪层的研究更有意义, 这是因为对深冰芯资料的合理解释必须建立在对现代气候环境的充分认识之上, 而且人类活动对地球环境产生重要影响也仅仅是近 200 年来的事情。另外, 浅冰芯研究所获得的气候环境记录分辨率更高, 年代更准确。Carpenter 等^[9]研究了南极表面雪和粒雪中微生物的分布情况, 发现极地浮雪和粒雪中微生物总数约为 $2 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ /mL, 应用 FISH 实验检测到南极表面雪样中存在较多的真细菌。16S rDNA 分析显示南极雪样中分离的细菌主要属于 *Deinococcus* 属, 这与南极 McMurdo Dry Valleys 的无冰区土壤中分离的微生物相似, 说明这些雪样中的微生物主要来源于南极的内陆环境。目前, 我国冰雪微生物的研究主要集中在青藏高原。张晓君等^[10]研究了青藏高原马兰冰芯细菌菌群结构变化与环境的的关系。刘勇勤等^[11]研究了珠穆朗玛峰地区东绒布冰川雪中微生物群落及其季节变化。与青藏高原不同, 新疆东天山地区冰川主要受西风环流影响, 属于内陆半干旱气候控制的亚大陆型冰川^[12]。然而, 对于东天山地区冰雪微生物的研究尚属空白。本文

基金项目: 国家自然科学基金(40576001); 中国博士后科学基金项目(2005038173); 中国科学院冰冻圈与环境联合重点实验室开放基金项目(2005-12)

* 通讯作者。Tel 86-931-8912560; Fax 86-931-8912561; E-mail: xjma2005@hotmail.com

作者简介: 刘 炜(1983 -), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 主要从事极端环境微生物生态研究。E-mail: vivienne83@gmail.com

收稿日期: 2007-03-08; 接受日期: 2007-03-22; 修回日期: 2007-07-08

采用传统的纯培养方法和现代分子手段(RFLP、DGGE),首次对天山最东段的庙儿沟平顶冰川不同深度雪中微生物的群落结构和多样性进行报道。并结合冰雪中 $\delta^{18}\text{O}$ 、可溶性离子等多项环境指标,探讨了细菌的群落数量与结构的深度变化及其环境意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 :Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pGEM-T Easy 载体来自 Promega ;PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega ;限制性核酸内切酶 *Hae* III 和 *Hin*6 I 来自 MBI-Fermenta。DCode™ 突变检测系统(DCode Universal Mutation Detection System)购自 Bio-Rad ,使用的荧光显微镜为 OLIMPUS(BX51TRF)。

1.1.2 雪样采集 :于 2005 年 8 月份在庙儿沟平顶冰川顶部海拔 4518m(94°19'E 43°03'N)处挖取一个 1m 深的雪坑,在该雪坑剖面 0cm ~ 20cm(标记为 DTS-1)、20cm ~ 50cm(DTS-2)和 50cm ~ 80cm(DTS-3)各采雪样两份,一份分装入 1L 洁净灭菌的 Nalgene 瓶中,用于微生物分析;另一份装入预先清洗过的聚乙烯塑料小瓶中,用于雪样理化性质分析。在野外及运输过程中样品一直处于冷冻状态保存。采样时穿洁净服戴无菌手套进行所有操作。

1.2 雪样理化性质分析

样品在中国科学院寒区旱区环境与工程研究所冰芯实验室进行 $\delta^{18}\text{O}$ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 、 NO_3^{-} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^{-} 等项目的测定分析。阳离子的测定误差低于 0.2%,阴离子低于 0.1%, $\delta^{18}\text{O}$ 的测量误差低于 0.5‰。

1.3 微生物总数的测定

将雪样从 -20℃ 冰箱中取出置于 4℃ 下缓慢融化,取 50mL 用 DAPI(4',6'-diamino-2-phenylindole)荧光染料染色后观察计数^[2]。

1.4 菌株分离及鉴定

1.4.1 细菌的分离培养 :取雪样融水约 300mL 过滤于 0.22μm 无菌 Millipore 微孔滤膜上。将滤膜悬浮于 1.5mL 的 PBS 磷酸缓冲液中,充分振荡以重悬细菌细胞,再将悬浮液 10 倍稀释后取 100μL 涂布于寡营养固体培养基 R2A 表面。每个样品涂五个平行,20℃ 培养 2 ~ 15 周后,统计每个平板上出现的菌落数,并计算其平均值。采用划线法将平板上具有明显不同形态的菌落在 R2A 和新鲜的 20% 的 LB 培养基上纯化。将灭菌水 300mL 用上述同样方法处

理,用作阴性对照。

1.4.2 16S rDNA 的扩增 :根据菌落色素、形态等特点挑取每个样品培养细菌的代表菌落,在新鲜的 R2A 培养基悬浮培养,以提取雪样细菌菌株基因组 DNA,方法参照文献作相应修改^[13]。选用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 的扩增,扩增体系及条件参照文献^[14]。用大肠杆菌(*Escherichia coli*)染色体 DNA 做阳性对照,用灭菌的超纯水做阴性对照。

1.4.3 RFLP(限制性片段长度多态性)分析及序列测定 :将 10μL 纯化后的 16S rDNA PCR 产物分别用 5U 限制性核酸内切酶 *Hae* III 和 *Hin*6 I 于 37℃ 酶切 16h,以 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析酶切带型。对具有不同 RFLP 带谱的 DNA 样品送至上海生工生物工程有限公司测序。获得序列通过嵌合子检测程序 CHIMERA-CHECK^[15]检测是否为嵌合子序列。

1.5 变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

1.5.1 总 DNA 的提取与 PCR 扩增 :取雪样融水约 200mL,用 0.22μm 无菌 Millipore 微孔滤膜进行过滤。采用 SDS 法从滤膜上提取总 DNA,每张膜用 0.5mL 抽提液提取两次,具体参照文献^[16]。选用引物 GC-341F 和 534R 对 16S rDNA V3 可变区进行扩增,扩增体系及条件参照文献^[17]。

1.5.2 DGGE 分析及目的片段的克隆 :DGGE 电泳条件为 :8% 的聚丙烯凝胶(37.5:1),20% ~ 50% 的变性剂梯度(100% 变性剂浓度为 7mol/L 的尿素,40% 的甲酰胺),120V 恒定电压,60℃ 电泳 3.5h,银染。选择较亮的条带进行割胶回收^[18]。回收 DNA 进行二次扩增,条件同 1.5.1。将 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒纯化后,连接克隆到 pGEM-T Easy 载体,并转入 *E. coli* DH5α 的感受态细胞进行蓝白斑筛选,挑选阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司以通用引物 M13 进行测序。

1.6 数据分析

1.6.1 序列比对及系统发育树的构建 :将所有序列提交 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。用 Blast 软件在 GenBank 网站上进行相似性搜索,获取相近典型菌株的 16S rRNA 基因序列。利用 ClustX 和 MEGA3.1 软件,将序列及其相似序列进行遗传关系研究,并用邻接法构建系统发育树状图。

1.6.2 统计学分析 :用 BandScan5.0 软件对 DGGE 胶图像中条带的位置和亮度进行处理,依据数字化结果,通过统计软件 PAST(<http://folk.uio.no/hammer/past>)计算多样性指数等。用 SPSS10.0 软件

以 Spearman 相关系数进行相关性分析。

本研究得到的 16S rRNA 基因序列均已提交 GenBank 数据库 ,序列登录号为 EF103199-EF103245。

2 结果

2.1 细菌数量及雪样环境指标

细菌数量和雪样的各项指标如表 1 所示。微生

表 1 东天山地区冰川雪中微生物数量及环境指标的变化

Table 1 The change of bacterial abundance and the environment index in the snow samples from east Tianshan Mountains

| Item | DTS-1 | DTS-2 | DTS-3 |
|---|----------|----------|----------|
| Sample depth (cm) | 0 ~ 20 | 20 ~ 50 | 50 ~ 80 |
| Bacterial abundance (10 ⁴ cells/mL) | 1.03 | 1.32 | 1.74 |
| Cultured bacteria amounts (10 ² CFU/mL) | 1.18 | 2.31 | 4.96 |
| δ ¹⁸ O ‰) | - 8.764 | - 9.213 | - 8.069 |
| Ca ²⁺ | 360.80 | 267.29 | 569.11 |
| Mg ²⁺ | 100.79 | 48.01 | 165.18 |
| K ⁺ | 20.65 | 18.11 | 46.09 |
| Na ⁺ | 42.30 | 61.53 | 101.06 |
| Cl ⁻ | 187.8642 | 96.1515 | 154.622 |
| NO ₃ ⁻ | 117.2279 | 130.9333 | 160.5696 |
| SO ₄ ²⁻ | 88.7926 | 205.2896 | 147.2692 |

物总数和可培养细菌数量随雪样深度的变化呈现出相同的趋势。50cm ~ 80cm 处积雪的细菌数量最多 ,近表层 0 ~ 20cm 处积雪的细菌数量最少。可培养细菌数量少于微生物总数的 3 %。雪样中稳定同位素比率(δ¹⁸ O)变化不大。微生物总数与 Na⁺ (R = 1.00 ;P < 0.01)和 NO₃⁻ (R = 1.00 ;P < 0.01)的浓度呈显著正相关。

2.2 可培养细菌的结果

从不同样品的培养平板上依据菌落形态、菌落颜色等挑选出不同菌落 ,对纯培养通过镜检、Gram 染色最后得到 21 株细菌 ,用同样方法处理的阴性对照上没有长菌 ,说明实验结果可靠。对所得菌株的 16S rDNA PCR 产物进行 RFLP 酶切分析后得到 7 种带型 ,通过测序得到这 7 株菌的 16S rDNA 基因序列 ,序列通过嵌合子检测验证均为正常 16S rDNA 基因序列。其中一株属于 *Comamonadaceae* 科 ,未定属 ,可能代表新的属。其它分属于 *Arthrobacter*、*Microbacterium*、*Bacillus*、*Paracoccus*、*Sphingomonas* 这 5 个属。可培养细菌的种类在 3 个样品之间没有差异。图 1 为根据这些序列构建的系统发育树。由图可见 ,可培养细菌可分为高 G + C (HGC)、低 G + C

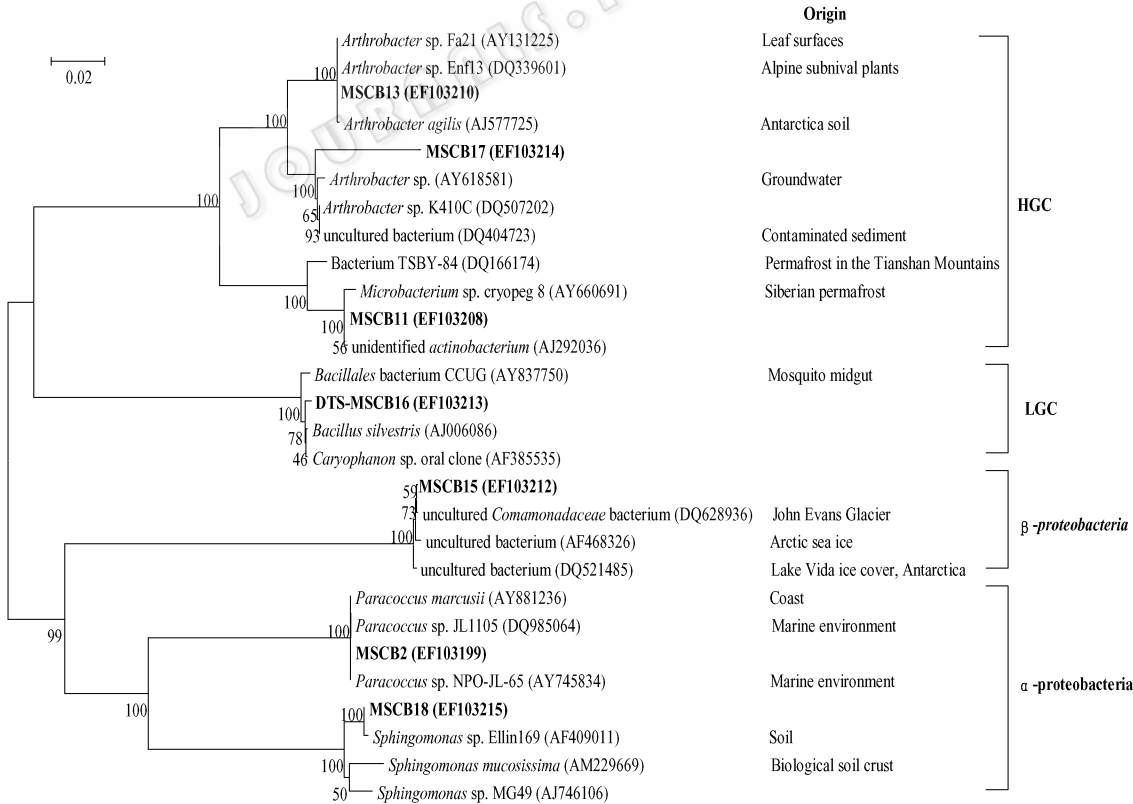


图 1 东天山地区冰川雪样中可培养细菌 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic analysis of isolated bacterial 16S rDNA from east Tianshan Mountains snow samples. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar 2% sequence divergence.

(LGC) 和 *Proteobacteria* 3 个类群 , HGC 和 *Proteobacteria* 是东天山积雪区可培养细菌的主要类群。 GenBank 数据库中的 Blast 结果显示东天山地区雪中微生物的一些种属与其它冰冻圈中微生物有很好的同源性。

这 7 株菌均可在 4℃ 生长 , 但最适生长温度在 16℃ ~ 23℃ 之间 , 最适生长 pH 在 6.5 ~ 7.5 之间 , 有 5 株具有色素。

2.3 DGGE 分析结果

DGGE 是一种相对快速准确的检测细菌群落的指纹技术。 根据 DGGE 的原理 , 每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位(Operational taxonomic unit , OTU) 相对映。 图 2 为 DGGE 结果 , 可以看到不同深度雪样微生物群落结构存在一定程度的差异性。 用同样方法处理的阴性对照正常 , 没有出现带。 根据带型分析计算得到的多样性指标见表 2。

为了进一步分析东天山地区庙儿沟冰川雪坑中微生物的群落结构和多样性 , 我们对图 2 中标记的 14 条较明显的带进行了割胶回收、测序(表 3)。 根据测序结果 , 构建了系统发育树(图 3)。 通过比对发现 , 用 DGGE 方法得到的细菌种群多于可培养方

法获得的 , 它们分属于 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria*、HGC、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB)。 其中 , CFB 类是珠峰地区冰雪细菌中主要类群 , 占总数的 50% ; 其次为 β -*Proteobacteria* 类 , 占 29% ; α -*Proteobacteria*、 γ -*Proteobacteria* 和 HGC 类各占 7%。

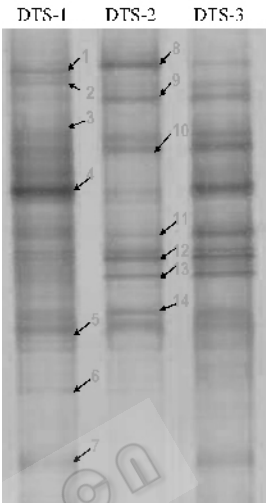


图 2 东天山地区不同深度冰川雪样微生物 PCR-DGGE 结果

Fig.2 Bacterial profiles of different deep snow sample from east Tianshan Mountains by PCR-DGGE.

表 2 东天山地区冰川雪样微生物 DGGE 多样性指标

| Table 2 The diversity index from DGGE analysis of east Tianshan Mountains snow sample | | | | | | | |
|---|------|-------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|
| No. | Taxa | Individuals | Dominance (D) | Evenness (E) | Shannon (H) | Simpson (S) | Fisher's alpha |
| DTS-1 | 24 | 89 | 0.1468 | 0.6977 | 2.818 | 0.8532 | 10.79 |
| DTS-2 | 17 | 91 | 0.1454 | 0.7183 | 2.502 | 0.8546 | 6.165 |
| DTS-3 | 21 | 94 | 0.1121 | 0.6939 | 2.679 | 0.8879 | 8.397 |

表 3 东天山地区雪样 DGGE 回收条带比对结果

| Table 3 The blast result of band sequence extracted from DGGE gel | | | | | | |
|---|------------------------------------|-------------------|-------|-------|---|---------------|
| Band site ^a | Band No. (GenBank accession No.) | Lane ^b | | | Closest related species in the 16S rDNA sequence database | Similarity /% |
| | | DTS-1 | DTS-2 | DTS-3 | | |
| 1 | MSUB96 (EF103245) | + | | | <i>Aquasalina asiatica</i> | 100 |
| 2 | MSUB95 (EF103244) | + | | | <i>Paracoccus</i> sp. ZY-2006h | 100 |
| 3 | MSUB94 (EF103243) | + | + | + | <i>Cytophagales bacterium</i> | 98 |
| 4 | MSUB83 (EF103238) | + | + | + | <i>Cytophagales bacterium</i> | 99 |
| 5 | MSUB78 (EF103234) | + | + | + | <i>Beta proteobacterium</i> | 97 |
| 6 | MSUB77 (EF103233) | + | + | | <i>Beta proteobacterium</i> BP-5 | 98 |
| 7 | MSUB76 (EF103232) | + | | + | <i>Hymenobacter</i> sp. PB17 | 96 |
| 8 | MSUB68-YT (EF103225) | | + | + | <i>Beta proteobacterium</i> | 98 |
| 9 | MSUB85 (EF103240) | + | + | + | <i>Actinobacterium</i> | 93 |
| 10 | MSUB84 (EF103239) | + | + | + | <i>Cytophagales bacterium</i> | 98 |
| 11 | MSUB82 (EF103237) | + | + | + | <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> | 96 |
| 12 | MSUB81 (EF103236) | + | + | + | <i>Flavobacterium</i> sp. | 100% |
| 13 | MSUB80-YT (EF103235) | | + | + | <i>Beta proteobacterium</i> KITT58 | 97% |
| 14 | MSUB70-YT (EF103227) | + | + | + | <i>Cytophagales bacterium</i> | 99% |

^a Band site number as indicated on Fig.2 ; ^b + ' means have band.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

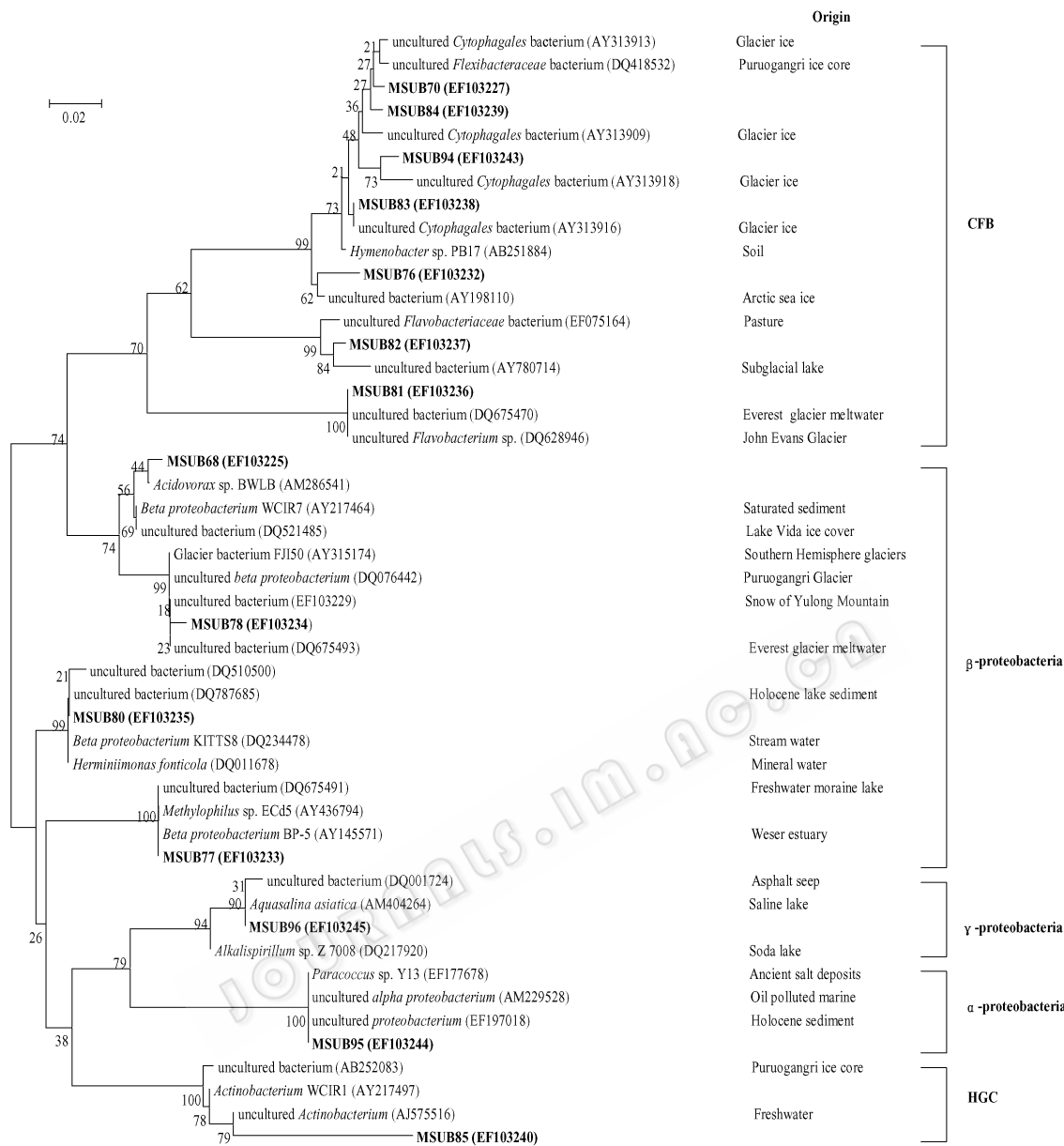


图 3 东天山地区雪样 DGGE 条带克隆部分 16S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic analysis of partial 16S rDNA from DGGE clones of east Tianshan Mountains snow samples. The annotation was the same as in Fig. 1.

3 讨论

3.1 东天山雪坑中细菌含量及其与深度变化关系

东天山地区庙儿沟冰川雪中细菌数量在 1.03×10^4 cell/mL 到 1.73×10^4 cell/mL 之间,远远高于南极雪的细菌含量(3.14×10^3 cell/mL)^[9],这与 Christner 等^[19]提出的中、低纬度地区冰芯微生物数量高于极地冰芯结果一致。与珠峰地区东绒布冰川雪样研究结果^[11]比较发现,东天山冰川雪细菌数量低于其夏季积雪细菌数量(2.3×10^4 cell/mL),但高于冬季积雪细菌数(6.9×10^3 cell/mL)。珠峰位于青

藏高原西南部,夏季南亚季风从印度洋带来大量水汽,且途经印度、尼泊尔等大量植被覆盖的地区,带来大量的细菌,潮湿且温暖的气候又使得大量细菌随气团传输并存活,沉降到冰川后又易于在雪面繁殖,因此珠峰夏季积雪的细菌较多,冬季珠峰主要受干燥的西风影响,这期间,珠峰地区极少雨雪,因此沉降在雪中的微生物就相对较少。与之不同,东天山地区处于我国西北干旱气候区域,虽然同冬季珠峰一样,受西风控制,干旱少雨,但是西风气流带来的北大西洋的水汽和来自北冰洋的冷湿气流,使东天山地区冰雪微生物数量高于冬季珠峰积雪。

由表 1 可以看到,微生物总数和可培养细菌数量都随雪样深度变化而不同。本研究发现雪样中微生物总数与 Na^+ ($R = 1.00$; $P < 0.01$) 和 NO_3^- ($R = 1.00$; $P < 0.01$) 的浓度呈显著正相关,提示雪中微生物数量与环境理化因素有关。已有研究表明, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Na^+ 等离子浓度可代表冰雪中粉尘的含量^[20], 大气粉尘中含有大量微生物以及微生物赖以生长的营养物质,这些物质不仅为微生物提供了生存的微生态环境,而且还向冰川微生物提供了大量的碳源和能源,使得那些适应于冰川上生活的微生物可以得到充分的营养物质保障,能够在冰川上大量的生长和繁殖^[21]。采样时间为八月份,依然处于夏季。夏季积累区表层温度主要受暖季太阳辐射、大气热力作用和融水活动的影响。据考察期间气温观测,庙儿沟平顶冰川海拔 4518m 处日温平均大于 0°C , 冰雪消融强,融水下渗量大且深度深^[22]。这不仅使由大气粉尘形成的污化层剧烈下移,同时也增加了下部污化层的强度。DTS-3 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 浓度在 3 个样品中都是最高,尤其是 Ca^{2+} 浓度远远高于其它两个样品。而 Ca^{2+} 是最好的粉尘含量替代指标^[20], 这表明样品 DTS-3 粉尘的含量最高,很可能正处于污化层层位。另外位于 50cm ~ 80cm 深的细菌对于冷环境已有所适应,并启动了一系列耐低温机制,因此, DTS-3 的细菌数量最多。样品 DTS-1 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 浓度比 DTS-2 高,但是微生物数量却低,这可能是因为上层雪受到紫外线照射最强,而紫外线的辐射对细菌数目有较大的影响。另外在夏季剧变期,消融量超过积累量,融水下渗有时可以穿过几个年层,甚至达到冰川冰表面。微生物随着融水进行迁移,结果导致雪层上部的微生物数量减少。以上表明除粉尘之外还有其它因素影响冰雪微生物的含量,例如微生物沉降时冰川表面的融水、温度及光照等环境因素。

3.2 东天山地区不同深度雪坑中细菌群落结构和多样性分析

东天山地区冰雪微生物具有丰富的多样性。通过恢复培养的方法得到的细菌分属于 *Comamonadaceae* 科(未分属)和 *Arthrobacter*、*Bacillus*、*Sphingomonas*、*Microbacterium*、*Paracoccus* 这 5 个属, 归为 HGC、LGC、 β -proteobacteria 和 α -proteobacteria 4 个类群。从格陵兰、青藏高原古里雅、青藏高原马兰、玻利维亚 Sajama 和南极冰芯样品中也培养出 *Arthrobacter* sp.、*Bacillus* sp.、*Sphingomonas* sp.、*Microbacterium* sp. 的细菌^[10, 19]。说明这些种类的菌

株可能存在一系列抗冻机制或生理特性,使其适应并长期生存在寒冷的环境。已报道的青藏高原、南极、北极、格陵兰冰雪微生物种类中并没有 *Paracoccus* 属,而我们获得的该属菌株 MSCB2,在遗传关系上与来自海洋环境的菌株十分相近,相似度高达 99%,提示该菌可能来自北大西洋或北冰洋水汽。

这些可培养菌均可在 4°C 生长,但是最适生长温度却在 $16^\circ\text{C} \sim 23^\circ\text{C}$ 之间。它们的最适生长 pH 在 6.5 ~ 7.5 之间, R2A 培养基的 pH(7.2)正好在这个范围内。表明只有那些适合培养基条件及培养温度的细菌才能从冰雪中恢复出来。因此,我们采用 DGGE 指纹图谱更全面、更真实地反映环境样品中微生物群落的结构和多样性。东天山地区冰雪微生物多样性较高,平均 Shannon 指数(H)达 2.666。青藏高原东绒布冰川冬季积雪的多样性指数($H = 2.253$)^[11]与我们的结果相近,表明东天山地区冰雪微生物的多样性主要受西风急流的影响。此外,海盐离子 Cl^- 与样品的多样性指数 Shannon($R = 1.00$; $P < 0.01$) 和 Fisher's alpha($R = 1.00$; $P < 0.01$) 有很好的正相关,提示来自海洋的水汽对其多样性也有一定影响。

冰雪中细菌的种类也是多种因素的综合,而水汽和尘埃的源区及传输途径是决定细菌种类的最重要的影响因素。根据 $\delta^{18}\text{O}$ 测定结果,推测这些雪样可能来自同一云团^[12],因此,图 2 显示的这 3 个不同深度雪样的群落结构并没有显著变化。但是由于不同细菌对极端环境,如低温、缺氧、强辐射等的适应能力也影响雪中的细菌的种类。所以,从图 2、表 3 中我们仍然能发现它们之间存在一定的差异性。DTS-1、DTS-2 和 DTS-3 的个体数依次增加,这与前面计数结果一致。尽管 DTS-1 的细菌数量最少,但是其种类在 3 个样品中是最丰富的,通过 DGGE 共检测到 24 种,其多样性指数也最高。这可能是因为微生物随水汽和粉尘沉降到冰川表面后,一些细菌不能适应冰川低温、寡营养的条件,在雪的逐渐沉积过程中消失。从图 2、表 3 中我们可以得到证实,带 1、带 2 仅存在于 DTS-1 中;带 6 在 DTS-1 中较明显,但在 DTS-2 中就比较弱,在 DTS-3 中已完全消失,表明这些带代表的菌株在明显减少,甚至可能消失。而带 4 和带 7 在 DTS-1 和 DTS-3 中为优势带,但在 DTS-2 中很弱,甚至看不到,这表明可能有一些种属的细菌在适应环境的过程中大量死亡,但一些耐受个体存活,在适应环境或重新获得营养后大量增殖。

带 8、带 9、带 12 和带 13 在 DTS-1 中比较弱,在 DTS-2 和 DTS-3 中却非常明显,我们推测,一方面可能是由于一些细菌非常适应冰雪环境,沉降后便大量增殖;另一方面由于 DTS-1 的样品优势度($D = 0.1468$)较高,所以在 PCR 扩增时,这些非优势菌的 DNA 所占比例就相对较少。

DGGE 条带回收序列分属于 HGC, α , β , γ -*proteobacteria* 和 CFB。其中 CFB 类群为优势菌群,与青藏高原和南极北极冰芯微生物研究结果一致,这可能由于 CFB 类群的细菌较适应低营养环境,且具有分解复合有机化合物的能力。这些序列没有属于 LGC 类的,属于 HGC 类的也只有一种,然而在可培养的细菌中分离得到了 LGC 和 HGC 类细菌,其中 HGC 类细菌还是可培养细菌中的主要类群,占 43%,表明 DGGE 方法也具有局限性。原因分析包括两个方面:一方面,这两类细菌在样品中不是优势种群,在 DGGE 图谱中呈现出的条带较弱,没有割取;另一方面, HGC 和 LGC 细菌都是革兰氏阳性细菌,它们的细胞壁较厚,可能有的具有芽孢,致使在总 DNA 提取时,这些菌的 DNA 没有完全释放。另外, Ellis^[14]等人研究显示培养后土壤样品 DGGE 图谱的多样性要明显高于直接提取的。由于冰雪微生物的生存环境特殊,因此,对其群落结构和多样性的研究需要将传统培养和分子手段相结合。

由图 3 可见, DGGE 获得的克隆序列隶属于 *Hymenobacter*, *Cytophaga*, *Paracoccus*, *Methylophilus*, *Flavobacterium*, *Acidovorax*, *Aquasalina* 等属,还有两个未分属,分别属于放线菌纲和 β -变形菌纲。大部分序列在遗传关系上相近于分离自其它冰川、冻土、冰湖及海冰等永久冷生境的菌株。还有一些序列与盐碱地、远古沉积物及污染样品中微生物的基因序列有较高同源性,提示极端环境微生物可能存在一些类似的生理生化特性。可以说,冰雪微生物的研究是丰富物种多样性、开发地球生物资源的重要途径和方法。尽管青藏高原冬季与东天山地区一样,都受到西风环流的控制,但在已有的青藏高原和极地冰雪微生物的报道中并没有发现 *Paracoccus*, *Aquasalina* 这两个属。其中 *Aquasalina* 属在临近日本海的 Tateyama 高山积雪中也有分布,推测东天山地区的该属细菌也是由北大西洋水汽带来。由于天山的特殊地理位置,来自北大西洋的气团对该地区影响较为明显。因此,东天山地区冰雪微生物具有特殊性,对这一特殊生态系统的微生物多样性、特殊生理适应机制及微生物进化的研究将具有重要

意义。

致谢 研究样品由庙儿沟平顶冰川考察队采集,特别感谢明镜博士的协助,同时感谢中国科学院寒区旱区环境与工程研究所冰冻圈与环境联合重点实验室和天山站的老师们在样品分析中给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] Mueller DR, Vincent WF, Bonilla S, et al. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 2005 **53**: 73–87.
- [2] Amato P, Hennebel R, Magand O, et al. Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007 **59**: 255–264.
- [3] Junge K, Eicken H, Deming JW. Bacterial Activity at -2 to -20 degrees C in Arctic wintertime sea ice. *Appl Environ Microbiol*, 2004 **70**: 550–557.
- [4] Price PB, Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 **101**: 4631–4636.
- [5] Foght J, Aislabie J, Turner S, et al. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two Southern Hemisphere glaciers. *Microb Ecol* 2004 **47**: 329–340.
- [6] Pearce DA, van der Gast CJ, Lawley B, et al. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiol Ecol* 2003 **45**: 59–70.
- [7] 向述荣, 姚檀栋, 安黎哲, 等. 慕士塔格冰芯可培养细菌的数量分布和主要菌群结构随深度的变化. 中国科学(D辑), 地球科学 2005 **35**(3): 252–262.
- [8] Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, et al. Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environ Microbiol*, 2003 **5**(5): 433–436.
- [9] Carpenter EJ, Lin S, Capone DG. Bacterial activity in South Pole snow. *Appl Environ Microbiol* 2000 **66**(10): 4514–4517.
- [10] 张晓君, 马晓军, 姚檀栋, 等. 马兰冰芯 16S rDNA 的多样性与影响冰芯中微生物的环境因素. 科学通报, 2003 **48**(9): 947–951.
- [11] 刘勇勤, 姚檀栋, 康世昌, 等. 珠穆朗玛峰地区东绒布冰川冰雪微生物群落及其季节变化. 科学通报, 2006 **51**(11): 1287–1296.
- [12] 何元庆, 庞洪喜, 卢爱刚, 等. 中国西部不同类型冰川区积雪及其融水径流中稳定同位素比率的时空变化及其气候效应. 冰川冻土 2006 **28**(1): 22–28.
- [13] Ciapini A, Dei R, Sacco C, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of *Aeromonas* isolates. *Annals of Microbiology*, 2002 **52**(3): 339–352.
- [14] Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, et al. Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Appl Environ Microbiol* 2002,

- [15] Maidak BL , Cole JR , Lilburn TG , *et al.* . The RDP-II (Ribosomal Database Project) . *Nucleic Acids Res* 2001 **29** (1) :173 – 174 .
- [16] Zhou J , Bruns MA , Tiedje JM . DNA recovery from soils of diverse composition . *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62** (2) 316 – 322 .
- [17] Ellis RJ , Morgan P , Weightman AJ , *et al.* . Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil . *Appl Environ Microbiol* ,2003 **69** (6) 3223 – 3230 .
- [18] Díez B , Pedros-Alíó C , Marsh TL , *et al.* . Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picocukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques . *Appl Environ Microbiol* 2001 **67** (7) :2942 – 2951 .
- [19] Christner BC , Mosley-Thompson E , Thompson LG , *et al.* . Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice . *Icarus* , 2000 **144** (2) 479 – 485 .
- [20] 姚檀栋 , 邬光剑 , 蒲建辰 , 等 . 古里雅冰芯中钙离子与大气粉尘变化关系 . *科学通报* ,2004 **49** (9) 888 – 892 .
- [21] Segawa T , Miyamoto K , Ushida K , *et al.* . Seasonal change in bacterial flora and biomass in mountain snow from the Tateyama Mountains Japan analyzed by 16S rRNA gene sequencing and real-time PCR . *Appl Environ Microbiol* 2005 **71** (1) :123 – 130 .
- [22] 刘亚平 , 侯书贵 , 任贾文 , 等 . 东天山庙儿沟平顶冰川钻孔温度分布特征 . *冰川冻土* 2006 **28** (5) 668 – 671 .

Study on microbial diversity and community in Miaogou snow of East Tianshan Mountains and their relation to climatic and environmental changes

LIU Wei¹ , MA Xiao-jun^{1,2*} , HOU Shu-gui² , CHEN Tuo² , QIN Da-he²

(¹ School of Life Science , Lanzhou University , Lanzhou 730000 , China)

(² Laboratory of Cryosphere and Environment , Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute , Chinese Academy of Sciences , Lanzhou 730000 , China)

Abstract : The different depth snow samples were collected from the Miaogou glacier in East Tianshan Mountains regions , China . Total bacteria counts were established by 4' , 6- diamino-2-phenylindole (DAPI) . Both culture-dependent and culture-independent methods , denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) , were used to examine the bacterial diversity and community structure . The microbial abundance and diversity index have a close relationship with mineral particle concentration . These mineral particles , such as Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cl^- etc , are good indicators of climate and environment . The 16S rDNA gene both of cultured bacteria and DGGE band sequenced belong to following groups : *proteobacteria* (α - , β - , γ -) , *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) , High GC and Low GC . Among these , *Proteobacteria* and CFB are dominant groups . Compare with bacteria revealed from ice and snow in Qinghai-Tibet Plateau , South Pole and North Pole which have been reported , *Paracoccus* sp . and *Aquasalina* sp . are especially exist in this study area as far as we know . The microbial abundance and community structure are all changed obviously in different depth snow samples . It indicates that the snow bacteria community is influenced by many factors . The results show that because the special geographical position of the East Tianshan Mountains , microorganism in ice and snow of this area has its particularity .

Keywords : Miaogou glacier , East Tianshan Mountains ; microbial community structure ; DGGE