

南极普利兹湾夏季海冰不同层次细菌丰度及多样性

马吉飞^{1,2}, 杜宗军², 罗玮¹, 俞勇¹, 曾胤新¹, 陈波¹, 李会荣^{1*}

¹ 国家海洋局极地科学重点实验室, 中国极地研究中心, 上海 200136

² 山东大学威海分校海洋学院, 威海 264209

摘要: 【目的】为了解南极普利兹湾夏季海冰不同层次中细菌群落丰度及组成。【方法】利用荧光原位杂交技术对海冰不同层次中细菌进行定量研究, 通过构建 16S rRNA 基因文库对海冰不同层次中细菌进行多样性分析, 并结合环境因子进行相关性分析。【结果】荧光原位杂交结果表明, 细菌占海冰总细胞数比例随着海冰层次下降呈现上升趋势, 初步推断可能受海冰中总有机碳, 总有机氮以及磷酸盐影响所致。16S rRNA 基因文库分析结果表明, 上、中、底 3 个海冰分层样品获得的 16S rRNA 基因序列归属于 γ -变形细菌纲 (γ -*Proteobacteria*), α -变形细菌纲 (α -*Proteobacteria*) 以及拟杆菌门 (*Bacteroidetes*), 多数 16S rRNA 基因序列与分离培养自海洋环境、南北极海冰菌株的 16S rRNA 基因序列相似性较高 (90%–99%); 在海冰底部样品中未检测到拟杆菌门; 海冰不同层次中, 细菌组成呈现些微的差异性, 可能由铵离子在海冰不同层次的分布造成。【结论】海冰底部细菌数量最丰富。在海冰中, γ -变形细菌纲为优势类群。

关键词: 南极, 普利兹湾, 细菌, 16S rRNA, 丰度, 多样性

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 02-0185-12

海冰在南北极分布范围广, 具有高的生物生产力, 是极地生态系统的重要组成部分^[1], 也是极地区域有代表性的、具有复杂物理化学性质的生态环境, 占地球表面的 13%^[2], 对全球能量收支平衡和极地海洋与大气的相互作用具有重大影响^[3]。海冰内部温度在 0–35℃ 内变动, 为海洋生物提供了地球上最为寒冷的栖息地^[4]。与淡水冰不同, 海冰是个半固体矩阵, 冰晶间弥漫着大小不等、充满卤水的孔、道网络, 在海冰内部形成了微生物赖以生存的不同温度、盐度和营养盐浓度的微生境, 这些充满卤水的孔道可变性非常高, 这主要是由气温和积雪层决定的^[2]。在海冰中存在着由游离病毒、细菌、古

菌、藻类等组成的海冰微生物群落 (SIMCO), 其中细菌和藻类是海冰微生物群落的重要组成部分^[5]。虽需耐受海冰内部的极端环境, 但海冰微生物群落仍具有很高的新陈代谢活性, 其单位生产力可为极地海域提供大约 10%–30% 的初级产量。此外, 海冰细菌还作为分解者参与物质循环与转化, 在极地海洋生态系统中扮演重要角色。

研究表明, 细菌在海冰之中仅占很少的一部分^[3], 但在特定的时间段之内, 海冰细菌将在海冰内部占据优势。异养菌是海冰微环境内部的主要类群^[5], 海冰内部微环境 20%–30% 的物质通过这些异养菌进行循环^[6]。南北极细菌的种群多样性被

基金项目: 国家自然科学基金 (40876097, 41076131, 40806073); 南北极环境综合考察与评估专项 (CHINARE2012-02-01)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-58717207; E-mail: lihuirong@pric.gov.cn

作者简介: 马吉飞 (1986–), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 从事海洋微生物多样性研究。E-mail: jifeima007@163.com

收稿日期: 2012-07-17; **修回日期:** 2012-10-26

证实具有高度的相似性,但是北极种群的多样性通常高于南极^[7]。通过传统培养方法和不依赖培养的分子生物学技术,科研工作者发现南北极海冰中的细菌主要分布于四个主要的类群: γ -变形细菌纲(γ -Proteobacteria), α -变形细菌纲(α -Proteobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes)及革兰氏阳性种群^[7-8]。Brinkmeyer等人(2003)研究表明,南极海冰样品与16S rRNA基因克隆有很高的重叠率(closely overlapping),基于荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术发现细菌丰度占总细胞数的95%^[7]。Li(2005)等人通过DGGE方法研究发现北极加拿大海盆区域海冰细菌主要类群为 α -proteobacteria, γ -proteobacteria,Bacteroidetes,并推测Bacteroidetes可能是底层海冰的代表性类群^[9]。Collins(2010)等人发现北极非底层海冰内细菌以 α -proteobacteria为主要类群,但在某些位点未检测到 α -proteobacteria^[10]。Cowie(2011)等基于定量PCR技术发现南极底层海冰细菌丰度在 $0.35 - 24 \times 10^4$ copie/mL,占总细胞数的93% - 96%^[11]。

在本研究中,通过荧光原位杂交以及DAPI染

色技术对海冰不同层次的细菌丰度进行研究,并且通过构建16S rRNA基因文库的方法研究南极普利兹湾海冰分层样品中细菌的系统发育多样性,同时运用相关软件对细菌丰度、多样性和各种环境因子进行相关性分析,从而对海冰不同层次细菌的丰度以及多样性分布进行整体性分析。迄今为止,对于南北极海冰细菌丰度及多样性的研究多集中在底层海冰,未有对不同层次海冰细菌丰度以及多样性的相关报道,因此,本研究不仅弥补当前研究的不足,也为研究细菌在海冰系统中的生态功能提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:5个位点的海冰样品于第26次南极科学考察期间,在普利兹湾采集的海冰冰芯(表1)。样品采集方法参照文献^[9], -20°C 保存,黑暗冷冻运输。另外钻取冰芯一根,测量冰芯温度,分段样品敲碎,直接黑暗融化,用于理化性质分析,结果见表2。

表1 冰芯采集位置与分层

Table 1 Ice core collection stations and sections

Stations	Date	Longitude	Latitude	Length of ice core/cm	Sections/cm
I01	2009-12-09	76°26'589"E	69°17'500"S	167	Top:0-20 Middle:76-96 Bottom:161-167
I02	2009-12-09	76°26'756"E	69°17'572"S	168	Top:0-20 Middle:75-94 Bottom:158-168
I03	2009-12-09	76°26'750"E	69°17'564"S	168	Top:0-20 Middle:74-94 Bottom:158-168
I04	2009-12-14	76°27'368"E	69°19'774"S	183	Top:0-20 Middle:83-103 Bottom:172-183
I05	2009-12-14	76°27'308"E	69°19'774"S	191	Top:0-20 Middle:80-100 Bottom:181-191

表 2 海冰部分理化性质

Table 2 Physical and chemical characteristics of sea ice

Stations	Sections	$T_m /$ °C	Salinity / ‰	$c(\text{TOC}) /$ (mg/L)	$c(\text{TON}) /$ (mg/mL)	$c(\text{Chl a}) /$ (mg/L)	$c(\text{PO}_4^{3-}) /$ (mg/L)	$c(\text{SiO}_4^{3-}) /$ (mg/L)	$c(\text{NH}_4^+) /$ (mg/L)	$c(\text{NO}_3^- +$ $\text{NO}_2^-) /$ (mg/L)
I01	I01T	-2.7	7.1	2.213	0.5013	0.264	20.34	234.88	255.55	11.55
	I01M	-2.0	4.1	1.434	0.4729	0.150	47.72	105.46	61.6	10.42
	I01B	-1.45	5.3	7.989	2.117	8.142	395.88	293.35	489.67	704.67
I02	I02T	-2.3	7.1	1.509	0.471	3.513	177.41	78.58	217.95	15.05
	I02M	-1.9	4.2	1.033	0.253	0.117	14.73	130.25	ND	10.53
	I02B	-1.6	6.8	7.074	1.692	7.499	289.76	384.11	73.79	513.33
I03	I03T	-2.4	7.4	1.332	0.294	0.892	38.49	79.57	ND	9.87
	I03M	-2.5	3.7	0.781	0.167	0.103	13.64	114.13	40.2	8.87
	I03B	-1.0	6.1	8.452	1.824	7.095	353.78	397.46	ND	376.73
I04	I04T	-1.5	4.6	0.953	0.322	0.311	12.03	14.17	103.23	3.33
	I04M	-1.9	3.8	1.442	0.229	7.466	6.78	83.95	120.93	9.59
	I04B	-1.1	7.9	11.4	3.078	8.885	603.55	823.18	387.89	622.58
I05	I05T	-1.8	3	1.162	0.279	0.845	166.54	120.44	394.34	7.56
	I05M	-2.3	4.5	0.923	0.302	1.405	20.18	124.93	274.61	6.81
	I05B	-1.7	7.6	10.99	2.592	5.473	180.6	322.77	884.83	14.89

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, 日本); pMD18-T (TaKaRa, 日本); 柱式胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司); 96 孔多梯度 PCR 仪 (ABI, 美国); 小型台式高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国); Gel Doc 凝胶成像系统 (Bio-Rad)

1.2 荧光原位杂交 (FISH) 计数

将 5 个位点的样品全部进行 FISH 试验, 采用 Cy3 标记的细菌探针 Eub338 (5'-GCWGCCWCCC GTAGGWT-3'), 探针由上海生工生物工程有限公司合成。杂交方法参照文献^[12], 杂交结束后于 Nikon 80i 荧光显微镜下镜检拍照 (激发光波长为 515 nm, 发射光波长为 570 nm), 至少 20 个视野。实验室培养的菌株作为正对照。计算公式: (视野菌体个数/视野面积) × 滤膜过滤面积/样品过滤体积, 单位为 cell/mL。

1.3 DNA 提取

参考 Li (2005) 等人^[9] 的方法进行海冰样品 DNA 抽提, -20°C 保存。

1.4 PCR 扩增及 ARDRA 分析

选取 I02 位点样品进行细菌 16S rRNA 基因文库构建, 参照 Bosshard 等^[13] 的方法进行 16S rRNA 基因 PCR。合并 2-3 次 PCR 产物, 经柱式胶回收试剂盒纯化, pMD18-T 载体连接及转化, 蓝白斑筛选。挑取白斑, 采用 T 载体通用引物 M13 + (5'-GTA AAACGACGCCAG -3') 和 M13-(5'-CAGGAAACA GCTATGAC -3') 进行扩增, 琼脂糖电

泳检测插入片段的大小, 将含有合适片段大小的样品用限制性内切酶 *Alu* I 进行 ARDRA 分析, 排除重复序列, 将不同序列测序。测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.5 系统发育树构建

测序获得的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 每条序列与 BLAST 获得 2 条相似性较高的序列应用 CLUSTALX1.8 进行匹配比对, 然后用 MEGA4 软件构建系统发育树。研究获得序列已提交 GenBank, 登录号为 JQ753095 至 JQ753235。

1.6 OTUs 丰度分析

为进行丰度的比较和种群内部的比较, 将细菌 16S rRNA 基因序列相似性 ≥97% 视为一个种系型, 计算采用软件 EstimateS (version8)。每个克隆序列都被当作一个样品序列, 每个样品的 OTUs 丰度计算, 都用非参数估计值 Chao 1^[14]。使用最合适的回归分析来计算点在 95% 置信区间的值^[15]。

1.7 相关性分析

应用 SPSS Statistics17 进行相关性分析, 分别将细菌的种系型及丰度与各理化性质数据进行相关性分析。

2 结果

2.1 荧光原位杂交 (FISH) 分析

采用 DAPI 染色方法对海冰中细胞总数进行计数 (图 1-B), 结果表明, 海冰样品中细胞总数在

$1.97 \times 10^5 - 1.8 \times 10^6$ cells /cm³ 之间,5 个位点上层,中层及底层海冰微浮游生物总量平均值分别为 $(8.84 \pm 0.66) \times 10^5$, $(2.78 \pm 1.02) \times 10^5$, $(9.26 \pm 4.4) \times 10^5$ 。I02 和 I03 站位总细胞数量分布特性一致,从高到低依次为上,底,中,其余站位海冰底层的总细胞数量相对上、中层较高。采用 cy3 标记的探针分别对各层次海冰细菌进行定量,结果表明(图 1-A),海冰中细菌数量在 $0.92 \times 10^5 - 1.22 \times 10^6$ cells/cm³

之间,各海冰层次平均值分别为 $(2.1 \pm 0.578) \times 10^5$, $(1.3 \pm 0.435) \times 10^5$, $(6.91 \pm 4.01) \times 10^5$, 平均丰度所占总细胞数的比例分别为 23.7%, 58.3% 和 93.4%,通过图表可以看出(图 1-A),5 个不同位点 3 个海冰层次样品的细菌丰度从低到高依次为中层,上层,底层,细菌在海冰内部的分布呈现一定的层次性,海冰底层海冰样品的丰度都为最高,占细胞总数一半以上(55.9% - 83.56%)。

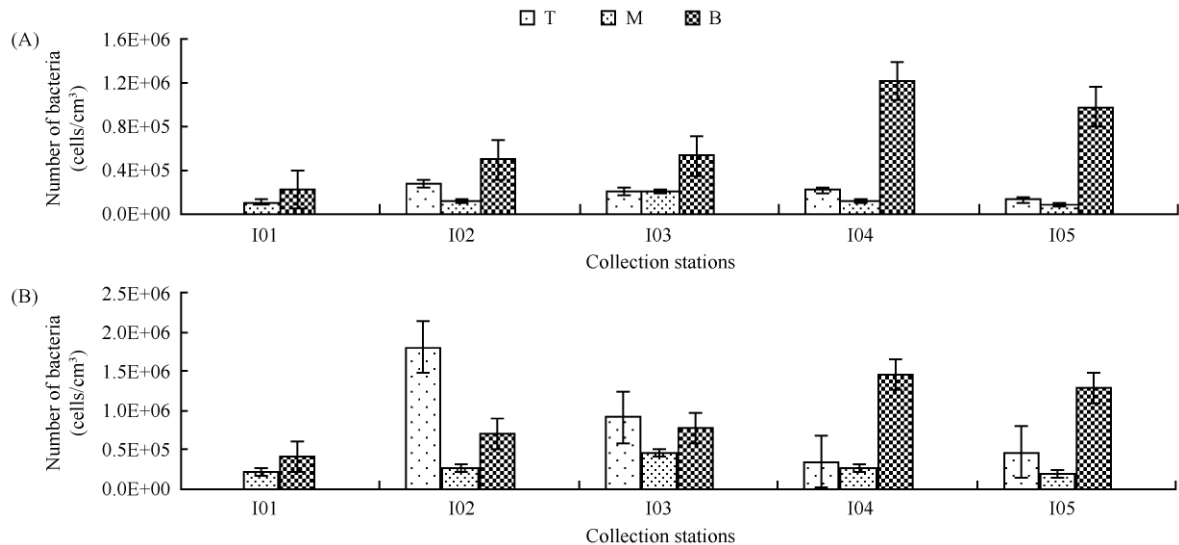


图 1 FISH 和 DAPI 计数结果

Fig. 1 The result of FISH and DAPI. A: FISH; B: DAPI. T, M and B: respectively represent the top, middle, and bottom section of sea ice core.

2.2 相关性分析结果

由下表可以看出,细菌的多样性(种系型)与铵离子呈现显著的正相关, $r = 1.000$, 表明铵离子可能是影响细菌在海冰不同层次多样性分布的重要因素。由于本次细菌丰度试验 I01 位点缺少上层海冰数据,故仅将剩余 4 个位点做细菌丰度的相关性分析。由表 3 可以看出, I02 位点的细菌丰度与叶绿素 a 以及铵离子的浓度呈现显著性相关,分别为 $r = 0.992$ ($P = 0.008$ 叶绿素 a) 和 $r = -1.000$ (铵离子); I03 位点各层次细菌的数量分别与海冰温度, TOC, TON 以及磷酸盐的浓度呈现显著的正相关,分别为 $r = 0.999$ ($P = 0.032$), $r = 0.999$ ($P = 0.035$), $r = 0.998$ ($P = 0.0037$) 和 $r = 0.998$ ($P = 0.035$); I04 位点细菌的丰度分别与 TON 以及磷酸盐的浓度呈现显著的正相关;而 I05 位点则与 TOC, TON 以及硅酸盐的浓度呈现显著的正相关,分别为 $r = 1$ ($P = 0.015$), $r = 0.999$ ($P = 0.034$) 和 $r = 0.998$ ($P =$

0.040)。

2.3 细菌特异性 PCR 扩增

通过细菌特异性引物进行 PCR 扩增得到细菌 16S rRNA 基因全长序列,片段大小约为 1.5kb,扩增所产生片段均为单一条带,表明扩增产物无明显非特异性扩增现象。

2.4 细菌 16S rRNA 基因文库分析

构建 I02T、I02M、I02B 样品 16S rRNA 基因文库,分别挑取 144 个白斑,经 T 载体 PCR 扩增检测,获得阳性克隆(104、80、73),随后经过 ARDRA 排重以及测序,分别获得 86、53、67 条可用 16S rRNA 基因全长序列,与 GenBank 中已有的序列相似性在 90% - 100% 之间。获得序列主要分布于 γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria 和 Bacteroidetes, 其中 γ -Proteobacteria 为优势类群,系统发育树见图 2 (A: I02T、B: I02M 和 C: I02B)。

表3 海冰细菌多样性及丰度与环境因子间的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between the physicochemical parameters and the bacterial diversity and abundance within the sea ice

		T_m	Salinity	TOC	TON	Chl a	PO_4^{3-}	SiO_4^{3-}	NH_4^+	$NO_3^- + NO_2^-$
Diversity I02	Correlation	-.984	.347	-.656	-.602	-.304	-.157	-.811	1.000**	-.703
	Significance	.113	.774	.544	.589	.803	.899	.398	.	.504
FISH I02	Correlation	.514	.754	.938	.960	.999*	.979	.834	-1.000**	.914
	Significance	.656	.456	.225	.181	.033	.130	.372	.	.266
I03	Correlation	.999*	.179	.999*	.998*	.996	.998*	.994	ND	1.000**
	Significance	.032	.885	.035	.037	.059	.035	.070	.	.005
I04	Correlation	.904	.995	.992	.999*	.562	.997*	.987	.991	.996
	Significance	.281	.066	.078	.034	.620	.047	.102	.087	.058
I05	Correlation	.662	.932	1.000*	.999*	.988	.603	.998*	.990	.999*
	Significance	.539	.235	.015	.034	.099	.588	.040	.090	.025

** significant correlation at 0.01 level (double side); * significant correlation at 0.05 level (double side).

2.4.1 I02T: 海冰上层样品序列长度在 1424 - 1522bp 之间, 经 BLAST 比对, 与数据库中已知序列相似性为 95% - 99%, 属于 γ -*Proteobacteria* (71)、 α -*Proteobacteria* (9) 和 *Bacteroidetes* (6), 其中 γ -*Proteobacteria* 为绝对优势类群, 占全部序列 84.3%。

通过序列比对, 多数序列都能分类到属的水平, 与分离培养自海洋环境尤其是极地海洋环境的细菌具有相当高的序列相似性。如 γ -变形菌亚纲分布于假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 和噬甲基菌属 (*Methylophaga*) 等 7 个属, 34 条属于假交替单胞菌属序列与来自于海洋环境的分离株序列相似性最高, 其中 12 条序列与北冰洋加拿大海盆海冰中的细菌 BSi20339 (DQ537497) 的 16S rRNA 基因序列相近, 此菌能够产生脂肪酶和蛋白酶并且具有降解几丁质的能力, 可能参与南极浮游植物碎屑的降解以及磷虾和桡足动物等碎屑的矿化^[16]。序列 I02T7 和 I02T94 与分离自白令海海水中的科尔韦氏菌 (*Colwellia*) Bsw20968 (GU166136) 序列相似性最高, 此菌属多分离自南极或深海环境, 迄今获得的可培养菌株都属于嗜冷菌和耐冷菌^[17]。 α -变形菌纲中的序列分属于亚硫酸杆菌属 (*Sulfitobacter*) 和玫瑰杆菌属 (*Rosebacter*), 归属于 *Sulfitobacter* 的克隆序列中有 6 条与源于海洋环境的序列亲缘关系最近, 此菌属有亚硫酸盐氧化功能^[17], 可能与南极海冰内部硫代谢有密切的关系。在拟杆菌门中, 3 条序列属于 *Polaribacter*, 相近序列全部来自极地海水, 此属在南北极海冰中含量较为丰富^[10], 菌内部脂肪酸含量较高, 可更好的适应南北极持续的低温的环境。

2.4.2 I02M: 中层样品共获得 53 条克隆序列, 经 BLAST 比对, 与数据库中的已知序列相似性为 93% - 99%, 分别属于 γ -*Proteobacteria* (44)、 α -*Proteobacteria* (8) 和 *Bacteroidetes* (1), 其中 γ -*Proteobacteria* 为绝对优

势类群, 占全部序列 83%。通过序列比对, 多数序列都能分类到属的水平, 且与分离培养自海洋环境尤其是极地海洋环境的细菌具有相当高的序列相似性。如 γ -变形菌亚纲 16S rRNA 基因序列分布于假交替单胞菌、科尔韦氏菌等 7 个属, 假交替单胞菌属的 19 条序列全部与来源于海洋环境的分离株序列相似性最高, 其中 10 条序列与本实验在北极海水样品中分离到的 BSw20104 (EU365600) 和 BCw012 (FJ889600) 基因序列相似性最高; 属于科尔韦氏菌 10 条序列分别与本实验室从白令海海水和北极海水中分离到的 BSw20188 (EU365586) 和 BSw20736 (GU166126) 未培养序列相近, 相似性在 97% - 99% 之间; α -*Proteobacteria* 菌纲中的序列, 全部来源于海洋环境, 如属于亚硫酸杆菌属的 I02M109 与源于黄海沉积物中未培养细菌 B13S-1 (EU617818) 亲缘关系最近。*Bacteroidetes* 中唯一的 1 条序列与白令海峡表层海水的克隆序列 DBS1h1 (GQ984357) 序列相似性最高。

2.4.3 I02B: 海冰底层样品共获得 67 条克隆序列, 与数据库中的已知序列的相似性为 95% - 99%, 分布于 γ -*Proteobacteria* (64)、 α -*Proteobacteria* (3) 菌群, 底层海冰样品并未检测到 *Bacteroidetes*。 γ -*Proteobacteria* 为绝对优势类群, 占全部序列 95.5%。全部 γ -*Proteobacteria* 16S rRNA 基因序列都能分类到属的水平, 分布于假交替单胞菌、噬甲基菌等 4 个属, 假交替单胞菌为优势菌属, 有 37 条此属的序列与北冰洋加拿大海盆海冰中分离到的细菌 BSi20339 (DQ537497) 序列相似性最高; 属于 *Thalassolituus* 的克隆 I02B77 与来源于活性污泥的 XJ137 (EF648167) 序列相似性为 95%, 该菌为专性解烃菌。 α -*Proteobacteria* 菌纲中, 所有序列与分离培养自海洋环境中的克隆相似性最高, 如 *Sulfitobacter* 属的克隆 I02B12, 与来自中国南海的克

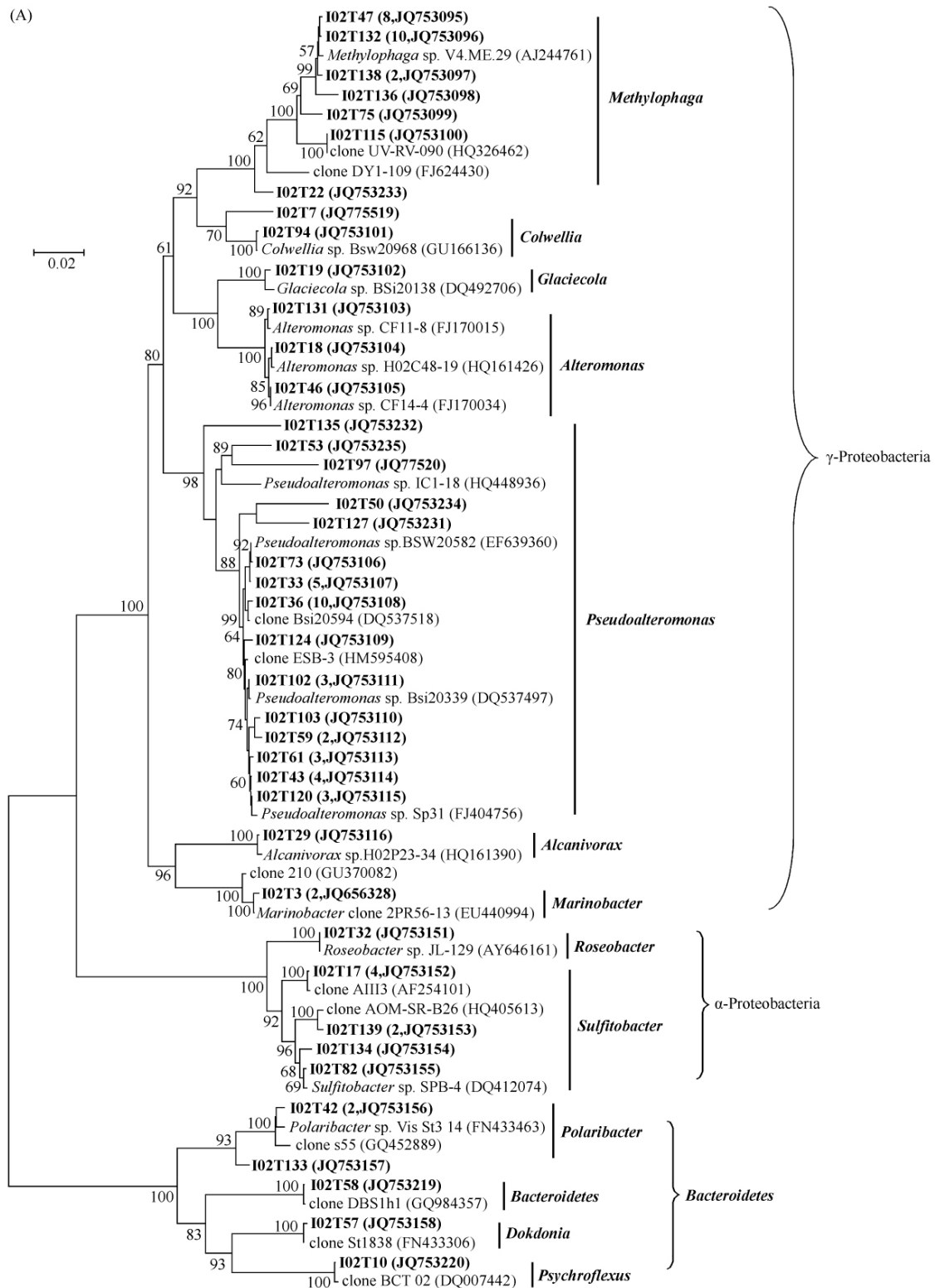
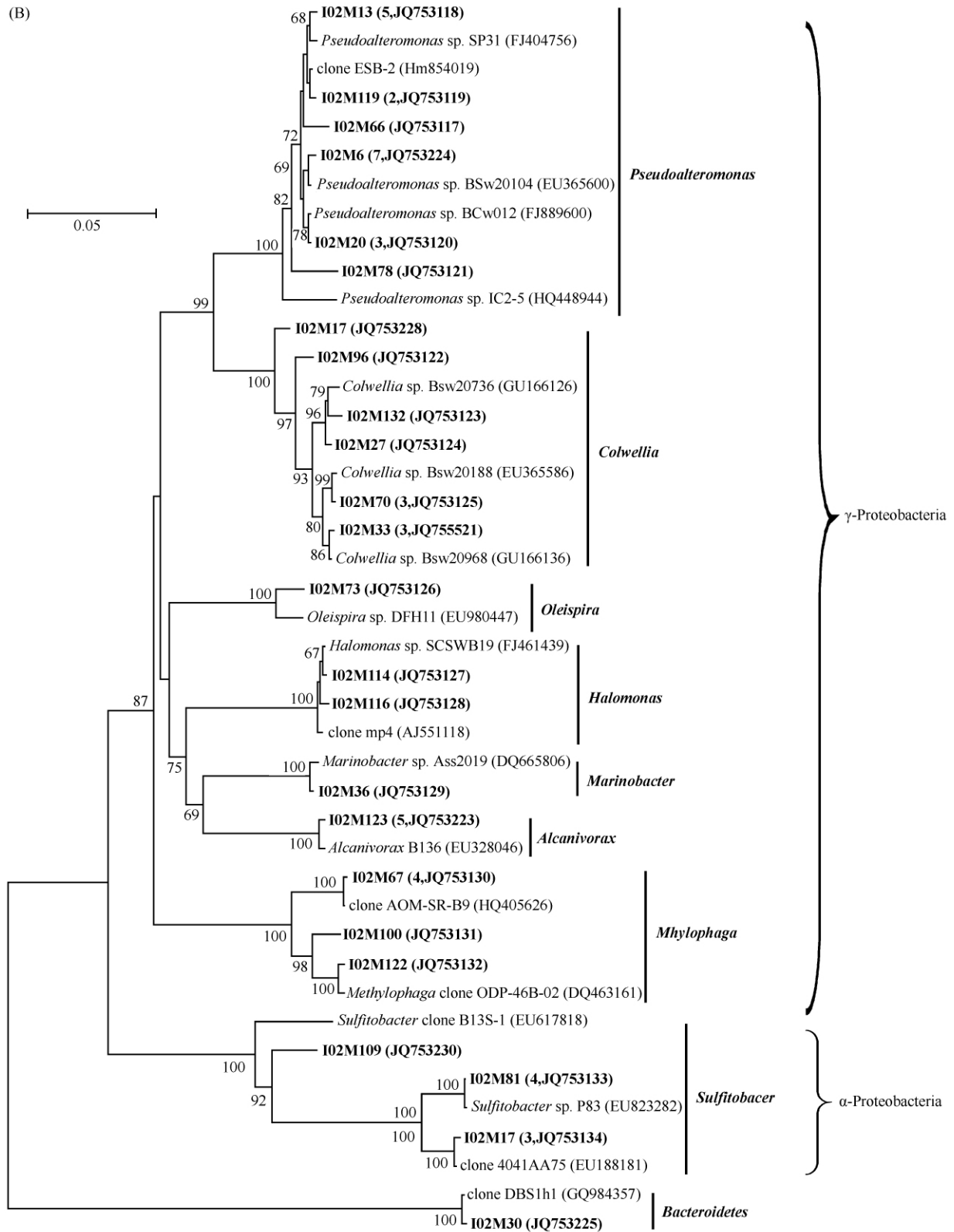
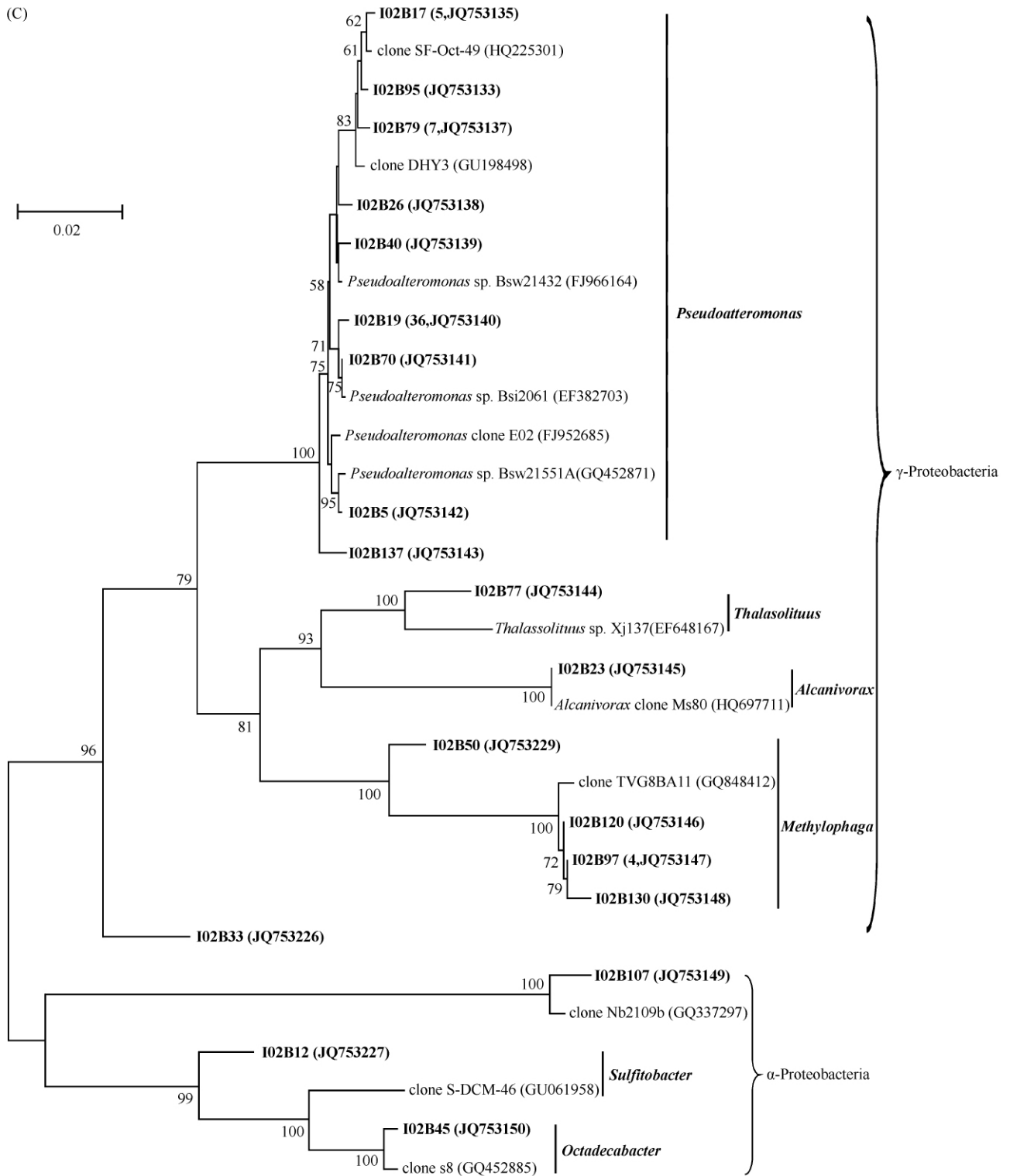


图 2 南极普利兹湾夏季海冰样品细菌 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of bacterial 16S rRNA gene sequences obtained from sea ice clone libraries. The trees were constructed by using Jukes-Cantor distances and the neighbor-joining method. Bootstrap support values over 55% (1000 replicates) are shown. The numbers in parentheses are the number of closely related sequences with similarity >99% in the same library and accession numbers of sequences. Scale bars indicate the estimated numbers of base changes per nucleotide sequence position. A, top section, I02T; B, middle section, I02M; C, bottom section, I02B.



续图 2



续图 2

隆 S-DCM-46 (GU061958) 相似度为 98%; 克隆 I02B45 与来源于白令海表层海水克隆 s8 (GQ452885) 亲缘关系最近, 相似度高达 99%, 属于十八碳烯酸杆菌属 (*Octadecabacter*), 此菌属通常生长在较低的温度环境。

2.4.4 基因文库的 OTUs 丰度估算: 根据细菌 16S rRNA 基因序列相似性 $\geq 97\%$ 归为一个种系型, 采用软件 EstimateS 对南极普利兹湾海冰样品基因文库

进行 OTU 丰度和样品覆盖范围分析 (图 3)。结果表明, I02T 所代表的上层海冰具有最高 OTU 估算值, 包含有 138 OTUs (95% CIs, 72 和 330), I02M, I02BOUT 估算值分别为 36 OTUs (95% CIs, 22 和 93), 47 OTUs (95% CIs, 21 和 136)。95% CIs 对于 I02M 和 I02B 来讲重叠率较高, 因此在采样次数中物种丰度并没有显著的差异。香农指数分别为 1.67 (I02T), 1.78 (I02M), 0.82 (I02B)。

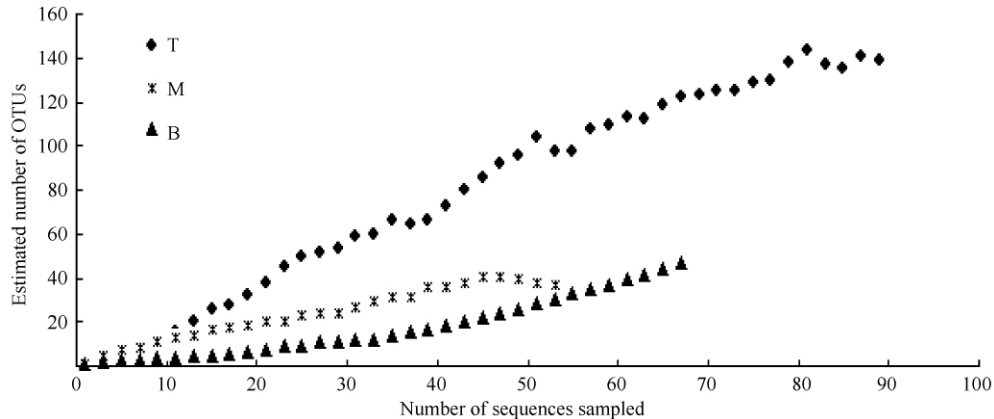


图3 细菌 16S rRNA 基因文库 OTU 估算曲线

Fig. 3 OTUs estimate curves derived from bacterial 16S rRNA gene clone libraries data. T, M and B: respectively represent the top, middle, and bottom layer of sea ice samples.

3 讨论

通过比较, 海冰样品中细胞总数除站位 2 和 3 外, 海冰底层的总细胞数量相对上、中层较高。Laurion 等 (1995) 估算海冰冰芯底部细菌生物量时, 发现 78% 的细菌生物量聚集在最底部 5mm 处^[18]。Wells 和 Deming (2003) 报道在加拿大北极 the Northwest Passage 表层海水中, 总细胞数在 $1.23 - 6.56 \times 10^5$ cells/mL 之间, 与本研究基本一致^[19]。采用 cy3 标记的探针分别对海冰分层细菌进行 FISH 计数, 结果表明, 各层次细菌的平均数量占总细胞数的比例随着海冰层次的下降而增加, 底层细菌丰度最高, 占细胞总数一半以上 (55.97% - 83.56%)。Helmke 和 Weyland (1995) 对南极威德尔海冰下水研究, 发现冰下水含细菌量为 $0.4 - 2 \times 10^5$ cells/mL^[20], Brinkmeyer (2003) 等人研究南北极海冰中细菌丰度时发现两个北极海冰样品中细菌的数量在分别为 3.61×10^5 cells/mL 和 4.56×10^5 cells/mL, 占细胞总数的 95% 左右, 南极海冰样品由

于较高的藻类浓度其细菌的数量要比北极的高出一个数量级, 两个样品分别为 2.11×10^6 和 1.12×10^6 cells/mL, 其研究显示南北极海冰样品细菌所占比例在 93% - 96% 之间^[7], Church (2003) 在研究南极半岛夏季表层海水时也得出相似结论^[21]。通过与其他样品比较, 不同样品以及取样位点, 细菌丰度也有差异, 本研究中细菌在海冰不同层次的分布呈现一定的层次性, 其中底层海冰细菌丰度最高, 中层海冰样品最低; 此外, 通过相关性分析表明各位点细菌的丰度分别于与多种环境因子呈现显著的相关性, 其中 TOC, TON 以及磷酸盐对于海冰不同层次细菌数量的影响最为显著, 初步推断可能是由于这几种环境因子造成海冰细菌数量呈现层次性分布。

本研究通过构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法来对南极普利兹湾海冰不同层次样品中细菌的多样性进行系统发育分析。结果表明, 3 个层次海冰样品序列主要分布于 γ -变形细菌纲, α -变形细菌纲和拟杆菌门, 其中 γ -变形细菌纲为绝对的优势菌株。多数序列与已培养功能菌株相似性最高, 由此推测, 海冰内部的细菌可能大部分都具有生物活性,

参与海冰内部生物地化循环。Brown (2001) 在研究南极和北极海冰样品微生物多样性时得出与本研究类似的结果,其拟杆菌门含量也相对较低,仅占 0% - 7% [8],并发现少量高 G + C 革兰氏阳性菌株。Groudieva (2004) [22] 对北极海冰细菌多样性的研究结果显示, γ -变形细菌纲为优势菌群,拟杆菌门和 α -变形细菌纲所占比例都很小。研究表明, γ -变形细菌纲不仅在海冰中占有优势,在其他海洋环境如沉积物中都占有主导地位 [23-24],由此可以推断 γ -变形细菌纲菌群可以利用多种碳源迅速生长,并且主要为能够在海洋环境中占有主导地位的化能异养菌 [25]。在本次研究结果中并没有检测到高 G + C 革兰氏阳性等菌群,种群多样性较低,初步分析可能是由于海冰形成时间较短 [4],海冰内部理化性质的限制以及对物种的选择 [12] 等因素使得海冰内部种群多样性较低,以至于低于检出界限;此外,不同区域海冰由于地理位置以及各种理化性质不同,细菌多样性也存在一定的差异。

通过对不同层次海冰进行系统发育分析,3 个海冰层次的优势菌群全部为 γ -变形细菌纲,只有 I02B 没有检测到拟杆菌门序列。Brinkmeyer 等 (2003) 研究显示 γ -变形细菌纲中优势属为 *Colwellia* 和 *Glaciecola*,同时其明确阐明南极海冰中 *Marinobacter* 含量很少 [17]。南北极海冰中的 α -变形细菌纲, *Rosebacter* 为优势属, *Octadecabacter* 较为少见 [4-17],本次研究中 3 个层次海冰样品 α -变形细菌纲都以 *Sulfitobacter* 为主,只有上层海冰检测到 *Rosebacter*,但也有研究显示 *Sulfitobacter* 为 α -变形细菌纲中的主要菌属 [8]。南极海冰中的拟杆菌门含量很少,主要集中在 *Polaribacter* [7],在本次研究中属于拟杆菌门的序列中, I02T 分布于 *Polaribacter*、*Bacteroidete* 等 4 个种属,在 I02M 中只有一条属于此菌群的序列。在本次研究中, I02T 和 I02M 多样性分布基本一致,其多样性要高于底层海冰,与 I02B 差异较大,菌群多样性根据其所处的不同层次的海冰也有所不同,基本呈现一定的层次性,通过各层次海冰细菌的种系型数量与各种理化因子的相关性分析表明,海冰各层次细菌的种系型数量与铵离子的浓度呈现显著的正相关,表明细菌在南极海冰不同层次的分布特性可能是由铵离子造成。

本研究对南极夏季海冰不同分层细菌的多样性和丰度进行了较为全面的研究,但对海冰细菌的代

谢活性以及生态功能仍然所知甚少。随着 454 高通量测序技术的发展,已广泛运用于土壤、海洋、活性淤泥等环境微生物生态研究,大量新的微生物种群和新的基因得以发现。把 454 高通量测序技术引入海冰微生物群落解析,将更快的获得更多、更详尽的微生物多样性信息,大大加速南北极海冰微生物生态学的发展;宏转录组学是在宏基因组学之后兴起的一门新学科,将此技术应用于南北极海冰细菌的研究,可以发现大量传统分子生物学方法不能检测到的微生物资源,从而对海冰细菌种群结构多样性及各种因素对其代谢的影响进行分析,进而为探索海冰细菌群落的生态功能提供理论支撑;此外,也可对某些生物地化循环关键酶基因的扩增来探求海冰微生物的生态作用,为进一步研究海冰细菌的生态功能奠定坚实的理论基础;因此,将多种分子生物学技术应用于极地海冰微生物种群结构及生态功能的研究,将是未来南北极微生物研究的下一个热点。

致谢 此项工作是由国家财政部资助,国家海洋局极地考察办公室组织实施的中国第 26 次南极考察项目的一部分,参加此项工作的单位是中国极地研究中心、国家海洋局第一研究所、国家海洋局第二研究所等,在此表示感谢。感谢 26 次南极考察期间雪龙船船员以及采集样品的相关工作人员,特别要感谢中国极地研究中心的白晓歌、吴荣荣以及浙江万里学院熊尚凌等为我们提供海冰样品以及详细的各种理化性质数据。

参考文献

- [1] Grossmann S, Dieckmann G. Bacterial standing stock, activity, and carbon production during formation and growth of sea ice in the Weddell Sea, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60 (8): 2746-2753.
- [2] Thomas DN, Dieckmann GS. Antarctic sea ice—a habitat for extremophiles. *Science*, 2002, 295 (5555): 641.
- [3] Legendre L, Ackley SF, Dieckmann GS, Gulliksen B. Ecology of sea ice biota. *Polar Biology*, 1992, 12 (3): 417-427.
- [4] Junge K, Krembs C, Deming J. A microscopic approach to investigate bacteria under in situ conditions in sea-ice samples. *Annals of Glaciology*, 2001, 33 (1): 304-310.
- [5] Mock T, Thomas DN. Recent advances in sea ice

- microbiology. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (5) : 605-619.
- [6] Staley JT, Gosink JJ. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 1999, 53 (2) : 189-215.
- [7] Brinkmeyer R, Knitte K, Jürgens J, Weyland H, Amann R, Helmke E. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (11) : 6610-6619.
- [8] Brown MV, Bowman JP. A molecular phylogenetic survey of sea ice microbial communities (SIMCO). *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35 (3) : 267-275.
- [9] Li H, Yu Y, Zeng Y, Chen B. Molecular genetic diversity of bacteria in the bottom section of arctic sea ice from the Canada Basin. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 153 ~ 161
- [10] Collins R. E, Rocap G, Deming JW. Persistence of bacterial and archaeal communities in sea ice through an Arctic winter. *Environmental Microbiology*, 2010, 12 (7) : 1828-1841.
- [11] Cowin R, Mass E, Ryan K. Archaeal diversity revealed in Antarctic sea ice. *Antarctic Science*, 2011, 23 (6) , 531-536.
- [12] Junge K, Eicken H, Deming JW. Bacterial activity at -2 to -20 C in Arctic wintertime sea ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 550-557.
- [13] Bosshard PP, Santini Y, Grütter D, Stettler R, Bachofen R. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31 (2) : 173-182.
- [14] Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 1987, 783-791.
- [15] Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BM. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (10) : 4399-4406.
- [16] Yu Y, Li H, Zeng Y, Chen B. Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, Canada Basin. *Polar Biology*, 2009, 32 (10) : p. 1539-1547.
- [17] Wei Y, Wang P. A preliminary study of microbial diversity of the top sediment from the MD06-3047. *Advances in Earths Science*, 2010, 25 (2) : p. 212-219. (in Chinese)
魏玉利, 王鹏. 黑潮源区沉积物微生物多样性初步研究. *地球科学进展*, 2010, 25 (2) : p. 212-219.
- [18] Laurion I, Demers S, Vezina AF. The microbial food web associated with the ice algal assemblage: biomass and bacterivory of nanoflagellate protozoans in resolute passage. *Marine Ecology progress series*, 1995, 120 (1) : 77-87.
- [19] Wells LE, Deming JW. Abundance of bacteria, the Cytophaga-Flavobacterium cluster and archaea in cold oligotrophic waters and nepheloid layers of the northwest passage, Canadian Archipelago. *Aquatic Microbial Ecology*, 2003, 31 (1) : 19-31.
- [20] Helmke E, Weyland H. Bacteria in sea ice and underlying water of the eastern Weddell Sea in midwinter. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 1995, 117 (1) : 269-287.
- [21] Church, M. J, DeLong HW, Ducklow HW, Karner MB, Preston CM, Karl DM. Abundance and distribution of planktonic archaea and bacteria in the waters west of the Antarctic Peninsula. *Limnology and Oceanography*, 2003, 48 (5) : 1893-1902.
- [22] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, Royter M. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles*, 2004, 8 (6) : 475-488.
- [13] Li L, Kato C, Horikoshi K. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation*, 1999, 8 (5) : 659-677.
- [24] Zeng R, Zhao J, Zhang R, Lin N. Bacterial community in sediment from the western Pacific Warm Pool and its relationship to environment. *China Environ. Earth Sciences*, 2005, 48 : 282-290.
- [25] Li H, Yu Y, Zeng Y, Chen B. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean. *Extremophiles*, 2009, 13 (2) : 233-246.

Bacterial diversity within different sections of summer sea-ice samples from the Prydz Bay, Antarctica

Jifei Ma^{1,2}, Zongjun Du², Wei Luo¹, Yong Yu¹, Yixin Zeng¹, Bo Chen¹,
Huirong Li^{1*}

¹SOA Key Laboratory for Polar Science, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China

²Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China

Abstract: [Objective] In order to assess bacterial abundance and diversity within three different sections of summer sea-ice samples collected from the Prydz Bay, Antarctica. [Methods] Fluorescence *in situ* hybridization was applied to determine the proportions of *Bacteria* in sea-ice. Bacterial community composition within sea ice was analyzed by 16S rRNA gene clone library construction. Correlation analysis was performed between the physicochemical parameters and the bacterial diversity and abundance within sea ice. [Results] The result of fluorescence *in situ* hybridization shows that bacteria were abundant in the bottom section, and the concentration of total organic carbon, total organic nitrogen and phosphate may be the main factors for bacterial abundance. In bacterial 16S rRNA gene libraries of sea-ice, nearly complete 16S rRNA gene sequences were grouped into three distinct lineages of *Bacteria* (γ -*Proteobacteria*, α -*Proteobacteria* and *Bacteroidetes*). Most clone sequences were related to cultured bacterial isolates from the marine environment, arctic and Antarctic sea-ice with high similarity. The member of *Bacteroidetes* was not detected in the bottom section of sea-ice. The bacterial communities within sea-ice were little heterogeneous at the genus-level between different sections, and the concentration of NH_4^+ may cause this distribution. [Conclusion] The number of bacteria was abundant in the bottom section of sea-ice. Gamma-proteobacteria was the dominant bacterial lineage in sea-ice.

Keywords: Antarctic, Prydz Bay, bacteria, 16S rRNA, abundance, diversity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (40876097, 41076131, 40806073) and by the Chinese Polar Environment Comprehensive Investigation & Assessment Programmes (CHINARE2012-02-01)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-58717207; E-mail: lihuirong@pric.gov.cn

Received: 17 July 2012/Revised: 26 October 2012

《微生物学报》EndNote Style

EndNote 文献管理软件能够帮助科研人员更好地进行学术研究、学习以及论文的撰写,这已经被越来越多的人熟悉、接受。为了方便作者写作与投稿,我们编制了“《微生物学报》EndNote Style”文件。利用 EndNote 轻松调取收集的文献,自动按照《微生物学报》的格式生成论文的参考文献。

1. 建议作者在投稿本刊时使用“《微生物学报》EndNote Style”文件,这会让您在写作过程中更加轻松快乐。请到本刊网站的“下载专区”中获取这个文件。

2. 将“《微生物学报》EndNote Style”文件下载后,复制到 EndNote 安装文件夹下面的 Style 子目录中。

3. 在使用 EndNote 文献管理软件插入文献后,投稿前,请用 EndNote 软件的“Convert to Plain Text”功能,将文章中的参考文献转化成 Plain Text 格式,以便于编辑修改。【注:本刊的这个文件是在 EndNote X5 环境下编制的,因此无法在低于 X5 版本的环境打开和使用。】

4. 因本刊是中文期刊,需要作者对 3 处手工调节。具体写法参见本刊网站“投稿须知”中的“参考文献”。

(1) 西文刊名:2009 年开始西文刊名需要全拼,为的是保证刊名的书写准确。

(2) 非英文的期刊:以尊重原始语种为主,2012 年底开始采用双语表述。先英文文献后原文文献,并在英文文献的后面标出“语种”。

(3) 译著:需要给出外国作者的原姓名。

致谢:“《微生物学报》EndNote Style”是在本刊副主编、中国军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥先生的建议下开始的,杨老师实验室的崔玉军博士按照《微生物学报》的要求编辑了该文件。在此,谨向他们表示衷心地感谢!