



东南极达尔克冰川-183 m 深处冰层融水细菌多样性研究

刘梦泽¹, 崔鸿鹏¹, 李冰², 官达³, 范晓鹏³, 徐健⁴, 荆晓艳⁴, 王琛⁴, 蒋宏忱^{1*}

- 1 中国地质大学(北京)海洋学院, 北京 100083
- 2 中国地质大学(北京)工程技术学院, 北京 100083
- 3 吉林大学极地研究中心, 吉林 长春 130061
- 4 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

刘梦泽, 崔鸿鹏, 李冰, 官达, 范晓鹏, 徐健, 荆晓艳, 王琛, 蒋宏忱. 东南极达尔克冰川-183 m 深处冰层融水细菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1864-1875.

LIU Mengze, CUI Hongpeng, LI Bing, GONG Da, FAN Xiaopeng, XU Jian, JING Xiaoyan, WANG Chen, JIANG Hongchen. Bacterial diversity in the meltwater at -183 m depth of the Dalk Glacier in eastern Antarctica[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1864-1875.

摘要:【目的】目前对于南极冰层微生物研究较少, 而且研究手段多为纯培养和高通量测序, 对于其中的微生物群落多样性仍知之甚少。本研究拟研究东南极达尔克冰川冰层中微生物群落组成。【方法】采用纯培养法、单细胞分选和高通量测序 3 种方法对东南极达尔克冰川冰层微生物进行研究, 探究该生境中微生物的群落组成。【结果】从达尔克冰川中分离出 10 门 19 纲 94 属。其中, 变形菌门(*Proteobacteria*)为优势菌门, α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)为优势纲, 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为优势属, 结果显示冰层中存在较为丰富的微生物多样性。其中, 纯培养法分离出 25 株细菌。单细胞分选方法分离得到 24 株细菌。高通量测序共得到 55 183 条序列, 聚类出 116 个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。3 种研究方法得出的优势种群不尽相同。通过单细胞分选和纯培养法共获得 7 株细菌, 它们与数据库最近源 16S rRNA 基因序列的相似度小于 98.65%, 其中有 2 株菌株与最近源 16S rRNA 基因序列的相似度小于 95.00%, 推测可能有 2 个潜在新属, 5 个潜在新种。【结论】本研究通过纯培养法、单细胞分选以及高通量测序 3 种

资助项目: 国家自然科学基金专项项目极地基础科学前沿项目(41941005)

This work was supported by the Polar Frontiers in Basic Science Project of the National Natural Science Foundation of China (41941005).

*Corresponding author. Tel: +86-10-82322162, E-mail: jiangh@cugb.edu.cn

Received: 2024-03-24; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-05-28

方法对东南极达尔克冰川冰层微生物多样性进行研究, 该生境中细菌多样性复杂。对比 3 种方法, 其各有优势和局限性。这意味着结合使用多种研究方法研究微生物多样性, 可获得更加全面的微生物群落组成。研究结果可为挖掘南极微生物资源提供数据基础。

关键词: 达尔克冰川; 细菌多样性; 培养; 单细胞分选; 高通量测序

Bacterial diversity in the meltwater at -183 m depth of the Dalk Glacier in eastern Antarctica

LIU Mengze¹, CUI Hongpeng¹, LI Bing², GONG Da³, FAN Xiaopeng³, XU Jian⁴, JING Xiaoyan⁴, WANG Chen⁴, JIANG Hongchen^{1*}

1 School of Ocean Sciences, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

2 School of Engineering and Technology, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

3 Polar Research Centre, Jilin University, Changchun 130061, Jilin, China

4 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

Abstract: [Objective] Currently, there are few studies on microorganisms in Antarctic ice cores, and the available studies mostly employ the pure culture and high-throughput sequencing methods, with limited knowledge about the microbial diversity. We studied the microbial community composition of the meltwater at -183 m depth of the Dalk Glacier in eastern Antarctica, aiming to provide a reference for the development of extremophiles in Antarctica. **[Methods]** We employed the culture, single-cell sorting, and high-throughput sequencing methods to study the microbial community composition in the meltwater at -183 m depth of the Dalk Glacier. **[Results]** We obtained bacterial isolates belonging to 94 genera, 19 orders of 10 phyla, in which *Proteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, and *Sphingomonas* were the dominant phylum, order, and genus, respectively. This result indicated high microbial diversity in the meltwater. The culture, single-cell sorting, and high-throughput sequencing yielded 25 bacterial strains, 24 bacterial strains, and 55 183 sequences (116 operational taxonomic units), respectively. The dominant taxa were different among the three methods. By the culture and single-cell sorting methods, we identified 7 bacterial strains with the 16S rRNA gene identity less than 98.65% compared with their closest relatives in GenBank, of which two strains had the identity less than 95.00% identity. Accordingly, we inferred that there may be two potential new genera and five potential new species. **[Conclusion]** We studied the microbial diversity in the meltwater of the Dalk Glacier in eastern Antarctica by using the culture, single-cell sorting, and high-throughput sequencing method and discovered rich bacterial species in the meltwater. Each method has its own advantages and limitations. This means that when studying microbial diversity, more comprehensive information about the composition of the microbial community

can be obtained by combining different methods. The results of this study can serve as a reference for further research on the genetic resources in Antarctica.

Keywords: Dalk Glacier; bacterial diversity; culture; single-cell sorting; high-throughput sequencing

南极位于地球的最南端,由南极洲及其周围海域组成,涵盖南极大陆及周边岛屿和海域,是地球上海拔最高的大陆。其终年被冰雪覆盖,气候寒冷、寡营养、干旱、有强光辐射,是地球上最干冷的地区^[1]。呈自西向东流动的南极绕极流(Antarctic circumpolar current, ACC)将南极及其周边海域与外界系统隔离开来,使南极洲保持巨大的冰原,从而形成了南极生态系统自身的特异性^[2-3]。由于南极特殊的地理位置和气候特征,仅极少数的微生物能够适应这种环境,生存于其中的微生物也具备了独特的生理生化特性,这些微生物可以通过调节自身的机制以在这种特殊的环境中生存^[4-5],其独特的适应机制会直接或间接地影响南极,甚至是全球的生态系统。

长期以来,南极地区因其独特的地理位置,一直被认为保持着原始的环境^[6]。南极冰川是全球水文循环的重要构成部分^[7],南极冰川中存在着古老的微生物,记载着历史过程中相应的古气候和古环境信息。东南极拉斯曼丘陵是南极大陆沿海少数夏季无冰区之一,该地区气候复杂多变,其东侧的达尔克冰川为距离中山站最近的冰川,邻接埃默里冰架,自南向北注入普利兹湾,达尔克冰川流域起源于南极冰盖内部,是典型的冰盖溢出型冰川,受季节影响,其末端会随着冰川的不断前移而崩塌,冰崩产生的大量浮冰和冰山控制着区域气候的变化^[8-12]。冰川微生物的群落结构、遗传进化和生态功能也可为地球生命演化和地外生命探索提供指示意义和线索(如雪球地球时期)^[13-14]。因此,研究东南极达尔克冰川微生物具有重要的科学意义。

目前南极微生物研究多集中在土壤、湖泊、海洋和沉积物^[1,15-18],对于冰层的研究较少,而且研究手段多为纯培养和高通量测序。传统的分离培养方法主要是指可培养微生物的分离纯化,根据观察微生物菌落的大小、形状和排列方式,以及其生理生化性质等初步鉴定微生物的分类地位^[19]。随着分子生物学技术的迅速发展和应用,不可培养的微生物的基因组信息可以通过分子生物学技术被辨别,并计算丰度,更全面地了解微生物的群落状态^[20]。目前微生物多样性研究中最常用的分子生物学技术有限制片段长度多态性分析^[21]、变性梯度凝胶电泳、构建基因克隆文库、高通量测序技术等。现代分子生物学技术中的单细胞测序技术是近几年飞速发展的一门技术,它可以帮助我们深入研究细胞的结构和功能,从单细胞水平了解整个群体的异质性分布,解析微生物在复杂的自然界环境中的状态^[22]。

本研究采用了纯培养法、单细胞分选和高通量测序 3 种方法对东南极达尔克冰川冰层微生物进行研究,展示了不同研究方法下东南极达尔克冰层微生物的多样性,这一结果为 3 种研究方法的组合,以增强对南极地区微生物多样性的认识,同时也为开发和利用新的菌种资源提供重要的参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

本研究样品为中国第 38 次南极科学考察期间采集于东南极达尔克冰川(69°28'S, 76°20'E)的冰层融水样品,深度为-183 m,采用无污染热融

探测器进行冰层融水采集, 具体方法见文献[23], 融水样品采集后 -20°C 保存。航次结束后用干冰运回中国地质大学(北京)地质微生物实验室, 并转移至 -80°C 超低温冰箱保存, 用于后续 DNA 提取实验。

1.2 纯培养法

1.2.1 培养基

R2A 培养基: 酵母浸出粉 0.25 g, 酪蛋白水解物 0.25 g, 可溶性淀粉 0.25 g, 无水硫酸镁 0.012 g, 琼脂 10.0 g, 蛋白胨 0.25 g, 葡萄糖 0.25 g, 磷酸氢二钾 0.15 g, 丙酮酸钠 0.15 g, 纯化水 500 mL。采用 R2A 培养基对达尔克冰川冰样中的可培养细菌进行分离培养。

1.2.2 细菌的分离培养

将样品放入 4°C 冰箱进行解冻, 样品解冻后量取 10 mL, 稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 系列浓度, 各取 150 μL 采用平板涂布法分别涂布于 R2A 培养基平板上, 10°C 培养 7 d 后, 挑取生长良好且形态差异较大的菌落进一步划线培养, 得到纯化的单菌落。

1.2.3 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增

挑取纯化后的单菌落于纯化水中, 取 1 mL 菌液于离心管中, 7 500 r/min 离心 2 min 后, 用无菌蒸馏水清洗以去除 R2A 培养基。使用 FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals 公司), 参照说明书提取菌株基因组 DNA。引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。以菌株基因组 DNA 为模板, 对 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 (25 μL): $10\times Ex Taq$ Buffer (Mg^{2+} plus) 2.5 μL , BSA 液 (20 mg/mL) 0.5 μL , dNTP Mix (2.5 nmol/L) 2.0 μL , *rTaq* 酶 (5 U/ μL) 0.5 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , DNA 模板 1.0 μL , 去离子水 17.5 μL 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性

30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 90 s, 30 个循环; 72°C 终延伸 10 min。设置 3 组平行重复。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (130 V 电压, 25 min) 后, 在紫外灯下切取所需 DNA 条带的凝胶, 使用 DNA Gel Extraction Kit (AxyPrep 公司) 对凝胶进行纯化回收。纯化后的目的片段送至安诺优达基因科技(北京)有限公司进行 16S rRNA 基因测序。

1.3 单细胞分选技术

1.3.1 单细胞分选和全基因组扩增

本研究采用微流控单细胞捕获技术 (EasySort Lego 单细胞微液滴分选系统) 对单细胞进行分离。使用单细胞全基因组扩增试剂盒, 采用多重置换扩增 (multiple displacement amplification, MDA) 技术对单细胞进行全基因组扩增。

1.3.2 PCR 扩增和测序

对单细胞 MDA 产物进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增, 具体 PCR 体系和条件详见 1.2.3, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (130 V 电压, 25 min) 后, 在紫外灯下切取需要的 DNA 条带的凝胶, 使用 DNA Gel Extraction Kit (AxyPrep 公司) 对凝胶进行纯化回收。纯化后的目的片段送至安诺优达基因科技(北京)有限公司进行 16S rRNA 基因测序。

1.4 菌株鉴定及系统发育分析

将纯培养法和单细胞的测序结果提交至 NCBI 和 EzBioCloud 在线数据库进行比对, 获得与目的菌株 16S rRNA 基因最相似的细菌种属。参考 Kim 等^[24]的研究结果, 16S rRNA 基因序列 98.65% 的相似度可作为区分两个物种的临界值。另外 Yarza 等^[25]综合多种分类鉴定方法证实可以将 95.00% 的序列相似度作为属的临界值, 即两株菌的 16S rRNA 基因序列相似性低于 95% 时, 则可把待测菌株作为新属描述。

基于 EzBioCloud 和 NCBI 数据库比对结果, 下载与样品 16S rRNA 基因序列相似度较高的序列作为参比序列, 采用 MEGA 的邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树。

1.5 高通量测序分析方法

1.5.1 DNA 提取和 PCR 扩增

取 200 mL 样品经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 将滤膜及过滤物在无菌条件下剪成 1–2 mm 的碎屑。根据 FastDNA SPIN 试剂盒 (MP Biomedicals 公司) 说明书的步骤提取 DNA。使用 NanoDrop 分光光度计 (ThermoFisher Scientific 公司) 测定 DNA 浓度及纯度。采用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 具体 PCR 体系和条件详见 1.2.3, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (130 V 电压, 25 min) 后, 在紫外灯下切取需要的 DNA 条带的凝胶, 使用 DNA Gel Extraction Kit (AxyPrep 公司) 对凝胶进行纯化回收。

1.5.2 测序和数据处理

纯化后的目的片段送至上海美吉生物医药科技有限公司, 质检合格后建库, 利用 MiSeq Illumina 平台进行高通量测序。使用 QIIME (v1.9.1) 软件处理高通量测序结果, 对测序数据进行去除 barcode 和引物以及低质量序列过滤等优化序列操作。使用 Usearch (v.11.0.667) 软件对优化后的序列数据在 97% 的相似水平上进行相似性聚类, 并对比细菌数据库, 在去除测序错误和嵌合体后, 对序列进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 划分, 如果序列彼此的相似程度大于 97% (种水平) 就可使其成为一个 OTU, 每一个 OTU 都代表一个有可能鉴别出的物种。通过 OTU 划分从而获得数量较少的 OTUs。

1.6 序列登录号

本研究纯培养和高通量测序获得的所有原始序列均已上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 登录号为 PRJNA1090395; 单细胞测序获得的原始序列上传至 NODE (National Omics Data Encyclopedia, <https://www.biosino.org/node/>), 登录号为 OEP005153。

2 结果与分析

2.1 细菌群落结构特征

2.1.1 纯培养法

通过涂布及平板划线培养, 根据菌落形态学特征^[24-25]从 -183 m 的冰层融水样品中共分离获得 25 株细菌, 通过肉眼观察可知培养基中的菌落形态不同, 颜色各异。经 16S rRNA 基因序列鉴定及系统发育分析, 这 25 株细菌分属于 3 门 4 纲 5 属 15 种。在门分类水平上, 变形菌门为优势菌门 (*Proteobacteria*), 占比 80%, 其次是厚壁菌门 (*Firmicutes*) 占比 12%, 放线菌门 (*Actinobacteria*) 占比 8%。在纲分类水平上, α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*) 为优势纲占比 68%, β -变形菌纲 (*Betaproteobacteria*) 和芽孢杆菌纲 (*Bacilli*) 均占比 12%, 放线菌纲 (*Actinobacteria*) 占比 8%。在属分类水平上, 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 为优势属, 占比 44%, 其次是甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 占比 24%, 紫色杆菌属 (*Janthinobacterium*) 和伪芽孢杆菌属 (*Fictibacillus*) 均占比 12%, 链霉菌属 (*Streptomyces*) 占比 8%。

根据 16S rRNA 基因序列比对结果, 使用 MEGA-X 软件构建系统发育树, 得到分离培养的 25 株细菌的进化关系 (图 1)。其中 3IY2 与其最相似物种的 16S rRNA 基因相似度为 85.03%, 低于 95.00%, 根据分类标准^[24-25], 推测其为鞘氨醇单胞菌科的潜在新属。

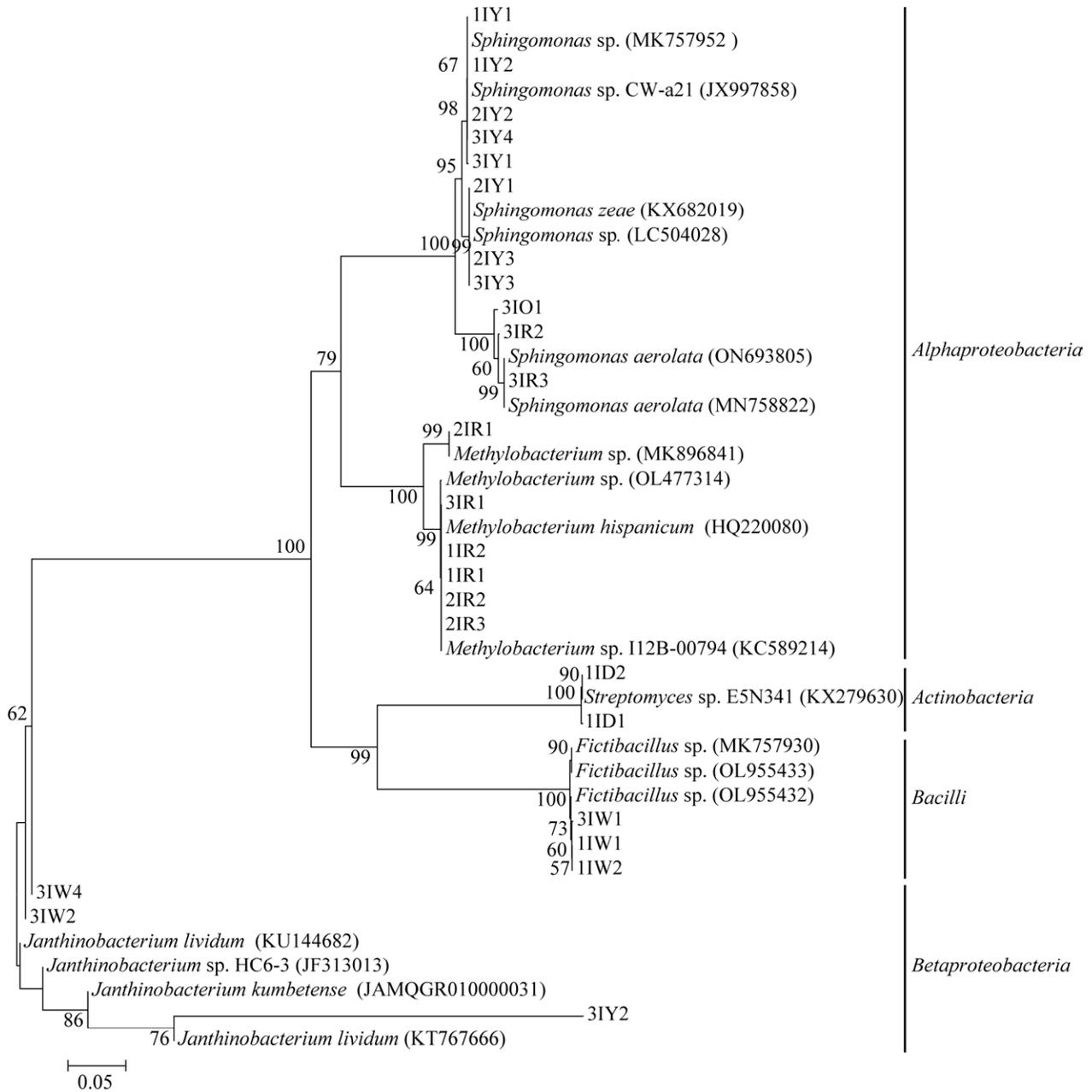


图 1 可培养细菌 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from the isolated bacterial strains.

2.1.2 单细胞分选方法

通过单细胞分选方法从冰层融水样品中分离得到的 24 株细菌分属于 2 门 5 纲 9 目 10 科 12 属 16 种，优势菌门为变形菌门 (*Proteobacteria*) 占比 91.6%，其次为厚壁菌门 (*Firmicutes*, 8.4%)，优势菌纲为 β -变形菌纲

(*Betaproteobacteria*) 占比 50.0%，属于 α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*)、 γ -变形菌纲 (*Gammaproteobacteria*) 的单细胞数占比分别为 25.0% 和 16.6%，而属于芽孢杆菌纲 (*Bacilli*) 和噬几丁质菌纲 (*Chitinophagia*) 的单细胞数占比均为 4.2%。在属分类水平上，以弯钩菌属

(*Curvibacter*)为优势属, 占比 29.17%, 其次为水杆菌属(*Undibacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)、鞘脂菌属(*Sphingobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、嗜甲基菌属(*Methylophilus*)、紫色杆菌属(*Janthinobacterium*)、好热厌氧小杆菌属(*Thermoanaerobacterium*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。

根据 16S rRNA 基因序列比对结果, 使用 MEGA-X 软件构建系统发育树(图 2)。其中 E5、E26、E45、E134、EN1 和 E119 在 NCBI 和 EzBioCloud 上的比对分析结果显示相似度低于 98.65%, 其中 E45 比对相似度为 87.36%, 低于 95.00%, 结合其在发育树中的分类地位, 推测

有 1 株菌为潜在新属, 5 株菌为潜在新种。

2.1.3 高通量测序技术

利用高通量测序技术分析冰层(-183 m)融水细菌的群落组成, 经数据处理后, 共得到 55 183 条序列, 聚类出 116 个 OTUs。

在样品中测出的众多微生物中, 由于许多物种含量过少, 在图中难以体现, 因此在群落组成分析中, 将相对丰度小于 1.00% 的物种归为其他类(others)。

达尔克冰川冰层(-183 m)融水样品中主要的细菌门类为变形菌门(*Proteobacteria*, 80.86%)和放线菌门(*Actinobacteria*, 11.24%), 其次细菌门为绿弯菌门(*Chloroflexi*, 5.26%)和酸杆菌门(*Acidobacteria*, 1.24%), 拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 0.68%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 0.53%)、*Deinococcota*

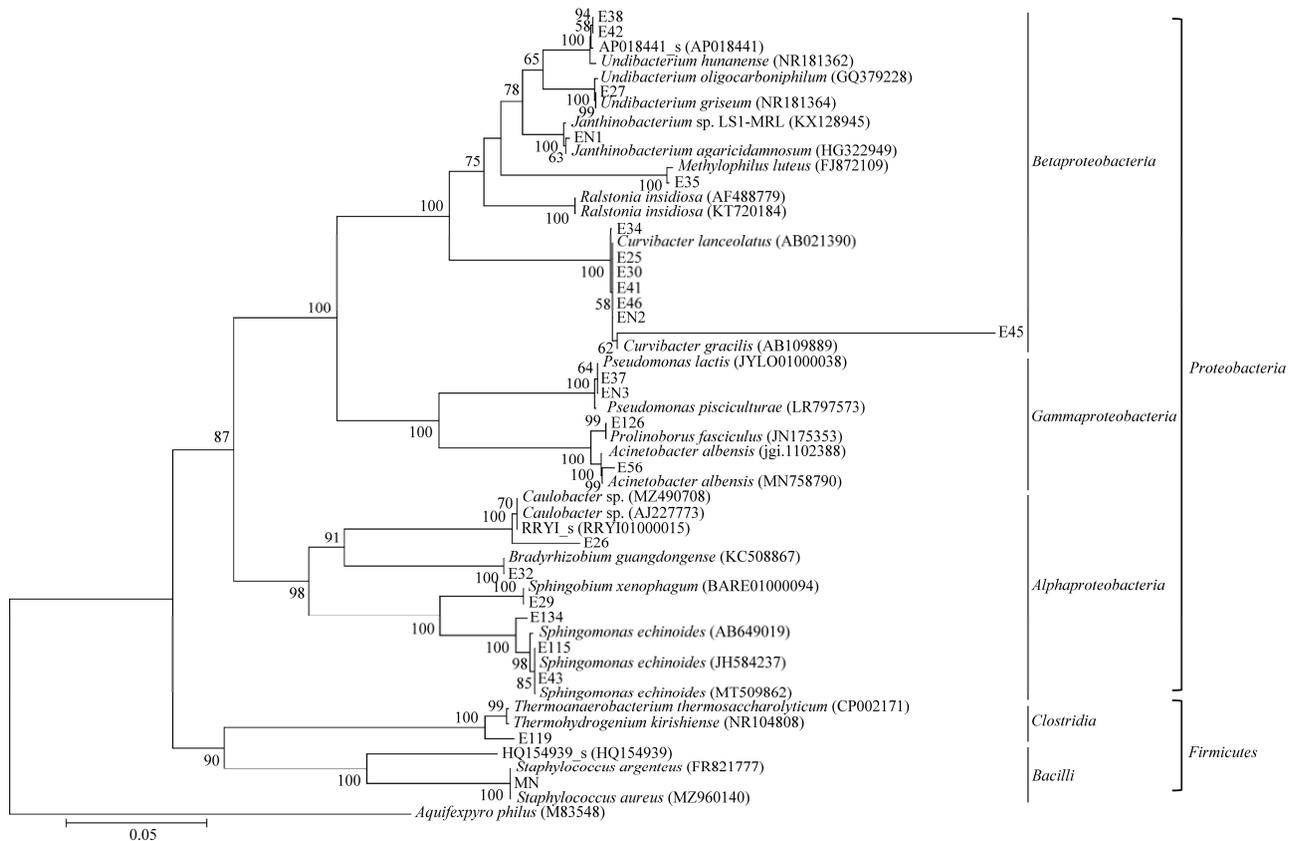


图 2 基于单细胞分选方法的细菌 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene sequences based on the single-cell sorting method.

(0.17%)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*, 0.01%)、*Patescibacteria* (0.002%) 和疣微菌门(*Verrucomicrobia*, 0.002%)的占比皆小于 1.00%; 未分类细菌算入 others, 占比 1.40%。

冰层-183 m 处的细菌种类主要为 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*, 46.63%)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*, 21.17%)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*, 13.06%), 其次为嗜邻聚杆菌纲(*Vicinamibacteria*, 1.14%)、酸微菌纲(*Acidimicrobiia*, 2.75%)、放线菌纲(*Actinobacteria*, 7.40%)、绿弯菌纲(*Chloroflexia*, 1.75%)、OLB14 (3.51%)。其中 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)中主要包括鞘氨醇单胞菌目(*Sphingomonadales*, 36.16%)、生丝微菌目(*Hyphomicrobiales*, 6.65%)、柄杆菌目(*Caulobacteriales*, 3.47%); β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)主要包括伯克霍尔德氏菌目(*Burkholderiales*, 21.17%); γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)主要包括假单胞菌目(*Pseudomonadales*, 12.82%); 放线菌纲(*Actinobacteria*)主要包括丙酸杆菌目(*Propionibacteriales*, 4.92%)和小单孢菌目(*Micromonosporales*, 1.50%); 绿弯菌纲(*Chloroflexia*)主要包括一个可分类的热微菌目(*Thermomicrobiales*, 1.75%); 嗜邻聚杆菌纲(*Vicinamibacteria*)主要包括嗜邻聚杆菌目(*Vicinamibacteriales*, 1.14%); 酸微菌纲(*Acidimicrobiia*)主要包括酸微菌目(*Acidimicrobiales*, 2.75%); OLB14 包括一个未分类的新目。此外, 占比较少的未分类细菌(others)占比为 4.17%。

2.2 微生物多样性比较

本研究利用 3 种不同的微生物研究方法对东南极达尔克冰川-183 m 处的冰层样品进行研究, 不同方法得出的优势种群不尽相同。在门分

类水平上, 3 种方法指示的优势菌门均为变形菌门(*Proteobacteria*), 占比超过 80%。3 种方法均分离出变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*), 高通量测序和纯培养法还分离出共同的放线菌门(*Actinobacteria*)。在目分类水平上, 鞘氨醇单胞菌目(*Sphingomonadales*)、伯克霍尔德氏菌目(*Burkholderiales*)和芽孢杆菌目(*Bacillales*)在 3 种方法中皆有出现, 除去这 3 个目, 单细胞分选与高通量测序方法共同分离出柄杆菌目(*Caulobacteriales*)、假单胞菌目(*Pseudomonadales*)和生丝微菌目(*Hyphomicrobiales*)。在属的分类水平上(图 3、图 4), 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)在 3 种方法中皆有体现, 除鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)外, 纯培养法与单细胞分选方法共同分离出紫色杆菌属(*Janthinobacterium*), 纯培养法与高通量测序方法共同分离出伪芽孢杆菌属(*Fictibacillus*)和链霉菌属(*Streptomyces*), 高通量测序方法与单细胞分选方法共同分离出慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*) (表 1)。

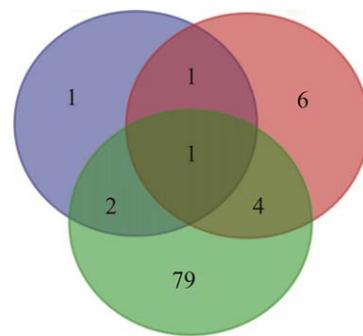


图 3 三种研究方法的细菌 Venn 图(属分类水平) 蓝色: 纯培养法; 红色: 单细胞分选方法; 绿色: 高通量测序方法

Figure 3 Venn diagrams showing bacteria retrieved by three research methods (at the genus level). Blue: Cultivation method; Red: Single-cell method; Green: High-throughput sequencing method.

表 1 三种研究方法中的共有属

Table 1 Shared genera of microorganisms retrieved by three research methods

Methods	Shared genera of microorganisms
1&2&3	<i>Sphingomonas</i>
1&2	<i>Janthinobacterium</i>
1&3	<i>Streptomyces</i> <i>Fictibacillus</i>
2&3	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Caulobacter</i>

1: Cultivation; 2: Single-cell sorting; 3: High-throughput sequencing.

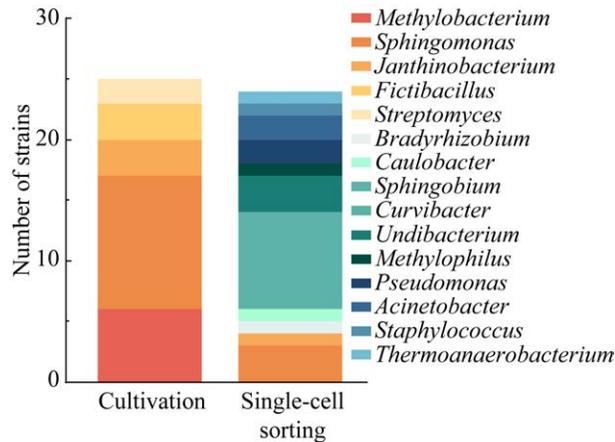


图 4 纯培养法和单细胞分选得到的微生物属水平群落结构

Figure 4 Genus-level community structure of microorganisms isolated from cultivation and single-cell sorting.

3 讨论

本研究利用纯培养、高通量测序和单细胞分选 3 种方法相结合,对达尔克冰川-183 m 深的冰层细菌群落和多样性进行了分析。综合来看,从达尔克冰川中分离出 10 门 19 纲 94 属,其中变形菌门(*Proteobacteria*)为优势菌门, α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)为优势纲,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为优势属,结果显示冰芯中存在着较为丰富的微生物多样性。对比南极其他地

区冰川,Segawa 等对东南极的 Yamato 和 Mizuho 冰川冰芯进行研究,其中 Yamato 冰芯中 γ -变形菌(*Gammaproteobacteria*, 46%)为优势类群, Mizuho 冰层中则厚壁菌门(*Firmicutes*, 47%)占比较多^[26]。Vostok 的基底冰中包含着大量细菌,其中变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是主要类群,其次是放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和其他门。变形菌门中 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)占比最多,为优势菌纲^[27]。Tallaksenvarden Nunatak 冰芯中,变形菌门(*Proteobacteria*)占比最多,其次是厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)^[28]。这与我们研究所得出的结果不完全相同,变形菌门(*Proteobacteria*)为大部分冰川的优势菌门,本次研究中占比 5.26% 的绿弯菌门(*Chloroflexi*)在其他冰川占比很小,虽群落结果不完全一致,但是假单胞菌目(*Pseudomonadales*)、伯克霍尔氏菌目(*Burkholderiales*)、黄杆菌目(*Flavobacteriales*)、鞘氨醇单胞菌目(*Sphingomonadales*)等在这些冰川中也均有发现。推测可能是受冰川地理位置、采集深度、研究方法等因素的影响,导致细菌群落结构有较大的差异。

任何一种微生物多样性研究手段都有其自身的优势和局限性。对比 3 种研究方法,传统的纯培养法可以分离出样品中可培养的细菌,更全面地了解微生物特定的理化功能,但是由于自然界的大部分微生物不可培养,而且传统的分离培养方法具有一定的局限性,无法完全反映自然状态下微生物群落的真实情况^[29];单细胞分选方法可以无选择性抓取样品中的活细胞,一定程度上解决了不可培养微生物的个体研究问题,但是可能由于该技术处于发展阶段,在抓取细胞数量上还无法定量,并不能完全覆盖样品中的所有活性细胞。高通量测序几乎覆盖了所有类群,是细

菌群落结构分析最常用的方法,但是对比之下,仍有部分类群未被测出,其以 DNA 作为检测基础,无法区分死菌与活菌。相较于总体群落结构数据,高通量数据在目、科、属几个水平上均有所差异,说明仍有部分含量较少的类群高通量测序方法不能覆盖。

4 结论和展望

本研究采用 3 种不同的微生物研究方法对东南极达尔克冰川-183 m 冰层微生物进行研究,测序结果覆盖 10 门 19 纲 43 目 65 科 94 属,展现了较为丰富的微生物多样性。在门分类水平上,变形菌门(*Proteobacteria*)占比最大,为优势菌门,其中的 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)为优势类群,鞘氨醇单胞菌目(*Sphingomonadales*)和伯克霍尔德里氏菌目(*Burkholderiales*)两个类群是目水平上的主要细菌类群。可能是受到采样地点、季节等因素的影响,也可能与用不同方法获得菌株有关,本研究展示的南极细菌多样性与前人文章中有所不同。

利用纯培养法和单细胞分选方法从东南极达尔克冰川冰层样品中共获得 7 株菌株与模式菌株的 16S rRNA 基因序列的相似度小于 98.65%,其中有 2 株菌株与模式菌株的 16S rRNA 基因序列的相似度小于 95.00%,结合系统发育树中的分类地位,推测可能有 2 个潜在新属和 5 个潜在新种。研究揭示了东南极达尔克冰川地区蕴藏着大量的微生物未知物种的资源,其细菌展现出丰富的多样性和复杂性,具有巨大的潜在价值,为进一步探究东南极微生物资源提供了参考。

此外,本研究通过纯培养法、单细胞分选以及高通量测序法对东南极达尔克冰川冰芯微生物多样性进行研究。结果表明 3 种方法各有优势

和局限性,但通过综合运用多种研究方法,有助于对微生物群落构成获得更全面认识。

本研究对东南极达尔克冰川-183 m 冰层的细菌多样性进行了初步的分析,得到了部分结论,但仍存在一些不足与局限性:纯培养只选择了 R2A 一种培养基;单细胞分选技术仍处在发展阶段,其在抓取效率等方面还可以进一步优化。因此,在后续对东南极达尔克冰川微生物的多样性研究可以采用多种分离培养基,以获得多样性更高的微生物类群;优化单细胞分选技术,从单细胞全基因组层面进行深入分析,更加全面了解东南极达尔克冰川微生物多样性。

参考文献

- [1] 刘春影,丛柏林,王能飞,王波,尹晓斐,刘峰. 南极菲尔德斯半岛可培养土壤微生物多样性及理化性质鉴定[J]. 海洋学报, 2016, 38(6): 69-81.
LIU CY, CONG BL, WANG NF, WANG B, YIN XF, LIU F. Biodiversity, physiological and biochemical identification of culturable microorganisms from the soil of Fildes Peninsula, Antarctica[J]. Haiyang Xuebao, 2016, 38(6): 69-81 (in Chinese).
- [2] 陈红霞,林丽娜,潘增弟. 南极绕极流研究进展综述[J]. 极地研究, 2017, 29(2): 183-193.
CHEN HX, LIN LN, PAN ZD. An overview of Antarctic circumpolar current research[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2017, 29(2): 183-193 (in Chinese).
- [3] 朱国平,王敏. 南极海洋生物肠道微生物研究进展[J]. 生态学报, 2021, 41(21): 8320-8330.
ZHU GP, WANG M. Gut microbes of Antarctic marine organism: a review[J]. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(21): 8320-8330 (in Chinese).
- [4] 王飞,丛柏林,张朝晖,杨黄浩. 南极罗斯海沉积物中可培养菌株的分离及胞外水解酶活性检测[J]. 极地研究, 2020, 32(1): 68-81.
WANG F, CONG BL, ZHANG ZH, YANG HH. Isolation of culturable strains from Antarctic Ross Sea sediments and study of extracellular hydrolase activity[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2020, 32(1): 68-81 (in Chinese).

- [5] 郑洲, 缪锦来, 李光友. 南极微生物中特殊酶类的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(4): 49-55.
ZHENG Z, MIAO JL, LI GY. Progress in the study of peculiar enzymes of Antarctic microorganisms[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2005, 24(4): 49-55 (in Chinese).
- [6] WALL DH. Biodiversity and ecosystem functioning in terrestrial habitats of *Antarctica*[J]. Antarctic Science, 2005, 17(4): 523-531.
- [7] OHMURA A, BOETTCHER M. Climate on the equilibrium line altitudes of glaciers: theoretical background behind Ahlmann's P/T diagram[J]. Journal of Glaciology, 2018, 64(245): 489-505.
- [8] ARMOUR KC, MARSHALL J, SCOTT JR, DONOHOE A, NEWSOM ER. Southern Ocean warming delayed by circumpolar upwelling and equatorward transport[J]. Nature Geoscience, 2016, 9: 549-554.
- [9] JAWAK SD, LUIS AJ. Applications of WorldView-2 satellite data for extraction of polar spatial information and DEM of Larsemann Hills, East Antarctica[C]//Intelligent Information Technology Application Association. 2011 International Conference on Fuzzy Systems and Neural Computing (FSNC 2011). Hong Kong: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2011: 148-151.
- [10] RIGNOT E. Mass balance of East Antarctic glaciers and ice shelves from satellite data[J]. Annals of Glaciology, 2002, 34: 217-227.
- [11] RIGNOT E, BAMBER JL, van den BROEKE MR, DAVIS C, LI Y, van de BERG WJ, van MEIJGAARD E. Recent Antarctic ice mass loss from radar interferometry and regional climate modelling[J]. Nature Geoscience, 2008, 1: 106-110.
- [12] 璩榆桐, 程晓, 刘岩. 基于 Landsat-8 的东南极达尔克冰川季节性表面消融信息提取[J]. 极地研究, 2020, 32(2): 164-176.
QU YT, CHENG X, LIU Y. Extraction of seasonal surface ablation zones in the Dalk Glacier (Antarctica) based on landsat-8 images[J]. Chinese Journal of Polar Research, 2020, 32(2): 164-176 (in Chinese).
- [13] 赵卓丽, 李冰, 蒋宏忱. 南极冰下水生态系统微生物与生源元素循环研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(6): 2165-2187.
ZHAO ZL, LI B, JIANG HC. Research progress of microbes and related biogenic element cycle in Antarctic subglacial ecosystems[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(6): 2165-2187 (in Chinese).
- [14] JONES RM, GOORDIAL JM, ORCUTT BN. Low energy subsurface environments as extraterrestrial analogs[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1605.
- [15] 翟万营, 汪倩, 王佳华, 陈良标. 南极中山站附近海水微生物多样性和宏基因组分析[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(1): 288-297.
ZHAI WY, WANG Q, WANG JH, CHEN LB. Microbial diversity and metagenomic analysis of seawater microorganism near Zhongshan Station, Antarctica[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(1): 288-297 (in Chinese).
- [16] 林敬. 极地海洋沉积物中可培养细菌多样性研究及新种鉴定[D]. 青岛: 青岛科技大学硕士学位论文, 2020.
LIN J. The diversity of culturable bacteria and identification of novel isolates in polar marine sediments[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University of Science & Technology, 2020 (in Chinese).
- [17] 范启连, 田琛, 吕永新, 张宇, 肖湘. 南极纳尔逊冰川土壤中微生物的群落结构及其代谢特征研究[J]. 应用海洋学学报, 2023, 42(2): 187-194.
FAN QL, TIAN C, LÜ YX, ZHANG Y, XIAO X. Characterization of microbial community structure and metabolism in soil of Nelson Glacier, Antarctica[J]. Journal of Applied Oceanography, 2023, 42(2): 187-194 (in Chinese).
- [18] 丁新彪, 丛柏林, 张扬, 靳永轩, 祝茜, 王能飞, 黄晓航. 南极普里兹湾及邻近海域沉积物微生物多样性与生理生化研究[J]. 海洋科学进展, 2014, 32(2): 209-218.
DING XB, CONG BL, ZHANG Y, JIN YX, ZHU Q, WANG NF, HUANG XH. Biodiversity, physiological and biochemical characteristics of microorganisms in the sediments surface from the Prydz Bay, Antarctica[J]. Advances in Marine Science, 2014, 32(2): 209-218 (in Chinese).
- [19] 丁慧. 南极菲尔德斯半岛土壤微生物多样性的初步分析[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文, 2015.
DING H. Structural analysis on microbial community in Fildes Peninsula[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University, 2015 (in Chinese).
- [20] 王能飞. 南北极近岸土壤微生物群落的结构分析: 以南极菲尔德斯半岛和北极新奥尔松地区为例[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2014.

- WANG NF. Structural analysis of soil microbial communities in the coastal areas of the North and South Poles: a case study of Fildes Peninsula in Antarctica and New Ohlson in the Arctic[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [21] NIEDERBERGER TD, MCDONALD IR, HACKER AL, SOO RM, BARRETT JE, WALL DH, CARY SC. Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(7): 1713-1724.
- [22] 陈子熙, 陈磊, 张卫文. 单细胞尺度下的微生物学研究: 意义与方法[J]. *微生物学报*, 2017, 57(6): 920-931. CHEN ZX, CHEN L, ZHANG WW. Microbiology at single-cell scale: significance and approaches[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 920-931 (in Chinese).
- [23] SUN YH, LI B, FAN XP, LI YS, LI GP, YU HB, LI HZ, WANG DL, ZHANG N, GONG D, WANG RS, LI YZ, TALALAY PG. Brief communication: new sonde to unravel the mystery of polar subglacial lakes[J]. *The Cryosphere*, 2023, 17(3): 1089-1095.
- [24] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 346-351.
- [25] YARZA P, RICHTER M, PEPLIES J, EUZEBY J, AMANN R, SCHLEIFER KH, LUDWIG W, GLÖCKNER FO, ROSSELLÓ-MÓRA R. The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(4): 241-250.
- [26] SEGAWA T, USHIDA K, NARITA H, KANDA H, KOHSHIMA S. Bacterial communities in two Antarctic ice cores analyzed by 16S rRNA gene sequencing analysis[J]. *Polar Science*, 2010, 4(2): 215-227.
- [27] GURA C, ROGERS SO. Metatranscriptomic and metagenomic analysis of biological diversity in subglacial Lake Vostok (Antarctica)[J]. *Biology*, 2020, 9(3): 55.
- [28] SHIVAJI S, BEGUM Z, RAO SSSN, VISHNU VARDHAN REDDY PV, MANASA P, SAILAJA B, PRATHIBA MS, THAMBAN M, KRISHNAN KP, SINGH SM, SRINIVAS TNR. Antarctic ice core samples: culturable bacterial diversity[J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164(1): 70-82.
- [29] 许文涛, 郭星, 罗云波, 黄昆仑. 微生物菌群多样性分析方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2009, 30(7): 258-265. XU WT, GUO X, LUO YB, HUANG KL. Research progress on analysis methods of diversity of microbial flora[J]. *Food Science*, 2009, 30(7): 258-265 (in Chinese).