



南极恩克斯堡岛土壤中可培养细菌多样性

张雨欣^{1,2} 罗玮² 俞勇² 曾胤新² 赵文玉³ 李会荣^{*2}

1 大理大学药学与化学学院 云南 大理 671000

2 自然资源部中国极地研究中心 上海 200136

3 长沙理工大学化学与食品工程学院 湖南 长沙 410114

摘要:【背景】南极地区环境苛刻植被稀少,无冰区面积约占其总面积的 0.4%,但是土壤中存在丰富的微生物群落,对于极地微生物资源仍需要进一步挖掘。【目的】获得南极恩克斯堡岛土壤中可培养细菌多样性信息。【方法】对来源于南极恩克斯堡岛的 5 个土壤样品采用直接涂布、微好氧富集和有氧富集后涂布 3 种方法进行细菌分离培养。【结果】共获得 144 株可培养细菌,分布于 5 门 30 个属。这些菌株来自变形菌门(*Proteobacteria*, 38.9%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 34.0%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, 22.2%)、异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*, 3.5%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 1.4%)等。不同土壤样品中可培养细菌多样性存在差异。企鹅粪土中 *Bacillus* 是主要属类; *Pseudomonas*、*Streptomyces* 在植被覆盖区土壤中是优势菌属; *Psychrobacter* 在湖水边土壤中是优势属类, *Flavobacterium*、*Chryseobacterium* 仅从该样品中分离得到; 放线菌门类在干燥土壤样中占优势, *Pseudarthrobacter*、*Rhodococcus*、*Microbacterium* 等属仅从这类干燥样品中分离出。经 16S rRNA 基因序列对比发现,有 2 株菌为潜在新种。【结论】南极恩克斯堡岛土壤中存在可开发利用的菌种资源,本文为研究该地细菌多样性提供一定的基础数据。

关键词: 可培养, 细菌多样性, 分离, 南极

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1406903); National Natural Science Foundation of China (91851201); Key Research and Development Program of Hunan Province (2018SK2011)

***Corresponding author:** E-mail: lihuirong@pric.org.cn

Received: 13-12-2019; **Accepted:** 24-03-2020; **Published online:** 16-04-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1406903); 国家自然科学基金(91851201); 湖南省重点研发计划(2018SK2011)

***通信作者:** E-mail: lihuirong@pric.org.cn

收稿日期: 2019-12-13; 接受日期: 2020-03-24; 网络首发日期: 2020-04-16

Culturable bacterial diversity in soils of Inexpressible Island, Antarctica

ZHANG Yu-Xin^{1,2} LUO Wei² YU Yong² ZENG Yin-Xin² ZHAO Wen-Yu³
LI Hui-Rong^{*2}

1 College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

2 Polar Research Institute of China, Ministry of Natural Resources, Shanghai 200136, China

3 School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China

Abstract: [Background] The environment in Antarctic is harsh and few plants coverage. The ice-free area only accounts for 0.4% of the total area, but accompanied with abundant microbial communities in the soil. Polar microbial resources need to be further explored. **[Objective]** This study was to obtain information on the diversity of culturable bacteria in soils from Inexpressible Island, Antarctica. **[Methods]** We isolated bacteria in the five soil samples from Inexpressible Island, Antarctica. Three different cultivation methods were applied, including directly spreading, microaerobic enrichment and aerobic enrichment method. **[Results]** A total of 144 culturable bacteria were obtained. These culturable bacteria belonged to 30 genera, and divided into 5 phyla, which consisted of *Proteobacteria* (38.9%), *Actinobacteria* (34.0%), *Firmicutes* (22.2%), *Deinococcus-Thermus* (3.5%) and *Bacteroidetes* (1.4%). Diversity of culturable bacteria in different soil samples was different. *Bacillus* dominated in soil from Penguin activity area. *Pseudomonas* and *Streptomyces* dominated in soil from mosses and lichens coverage area. *Psychrobacter* dominated in lakeside soil, with *Flavobacterium* and *Chryseobacterium* were isolated only in this sample. Actinobacteria were dominant in dry soils, such as *Pseudarthrobacter*, *Rhodococcus* and *Microbacterium* were isolated only from dry soil samples. It was suggested that 2 isolates were found to be potential novel species for their low 16S rRNA gene sequence similarity. **[Conclusion]** There are exploitable bacterial resources in the soil of Inexpressible Island, Antarctica. This paper also provides some basic data for the study of bacterial diversity in this area.

Keywords: Culturable, Bacterial diversity, Isolation, Antarctica

长期以来, 南极地区一直被认为是地处偏远并保持着原始纯净的环境^[1]。该环境的典型特征是极度寒冷、干旱、大幅度温度波动、反复冻融和土壤含盐量高等, 这些恶劣的条件对动植物的生存极为不利^[2]。一般来说, 极端环境和简单的食物网会造成生物量和生物多样性降低^[3], 但近年来许多研究表明在南极冰层、土壤或湖水等生境发现的生物多样性和丰富度都超出预期^[4-5], 而且在极地发现的许多微生物由于特殊的环境因素都具有一些独特的性质。

南极恩克斯堡岛(Inexpressible Island)又称难言岛, 地处维多利亚地(Victoria Land)北部, 罗斯海特拉诺瓦湾南部, 面积约 50 km², 呈棱形从北向

南延伸, 基部的侵入岩类型主要是石英二长岩及石英二长闪长岩^[6]。维多利亚地的土壤类型多样, 整个地区的纬度梯度为 8°, 处于极地高原和海岸之间, 该地土壤受到温度变化和降水的影响。维多利亚地北部低海拔海岸的土壤比南部干谷地更为发达, 具有广泛的苔藓层, 有海盐输入以及海鸟和企鹅产生的粪便, 因此该地区土壤中有机质含量高^[7-8]。海岸地区的粪土类型与大陆其他矿质土壤有区别, 微生物群落结构和丰度都存在差异^[9]。

尽管从环境中通过纯培养可获得的微生物少于 1%^[10], 但对于微生物菌株资源的开发利用来说, 分离培养技术是不可或缺的。如研究东南极菲尔德斯半岛和北极苔原等地土壤可培养细菌多

多样性时, 通过直接稀释土壤样品涂布多种不同培养基平板, 或对样品进行不同前处理等方法, 获得了一定数量的潜在新种, 也提供了筛选出具有新活性物质菌株的可能^[11-12]。同时, 可分离培养的细菌在一定程度上反映了微生物分布具有普遍性。为了获得更多的可培养菌株, 研究者们尝试了不同的培养方法, 如微生物富集培养、模拟微生物生长的天然环境的原位培养等^[13-14]。

不同区域之间和区域内的细菌群落存在差异, 随气候和土壤理化条件改变都会发生变化。对于极地还有许多未知的微生物等待发掘, 而对维多利亚地区土壤微生物群落多样性的研究主要运用了分子生物学方法。Lee 等^[15]运用 454 焦磷酸测序方法研究麦克多干谷地区的微生物群落组成, 结果显示细菌在门水平上主要包括 *Actinobacteria*、*Proteobacteria*、*Acidobacteria*、*Firmicutes*、*Deinococcus-Thermus*、*Bacteroidetes* 和 *Gemmatimonadetes* 等; Niederberger 等^[3]运用限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析方法分析维多利亚地北部 4 个不同地方土壤中微生物群落组成, 构建 16S rRNA 基因克隆文库发现 *Deinococcus-Thermus* 和 *Bacteroidetes* 主要在干燥、低营养度土壤中存在, 而 *Verrucomicrobia*、*Gammaproteobacteria* 中黄单胞菌属仅在高湿度土壤中发现; Aislabie 等^[9]研究罗斯海地区鸟类粪土细菌群落组成, 通过细菌 16S rRNA 基因的 RFLP 分析方法发现, 企鹅聚集地的土壤中是 *Firmicutes*、*Gammaproteobacteria* 中的 *Psychrobacter* 为优势类群, 而 *Actinobacteria* 和 *Gammaproteobacteria* 中的 *Rhodanobacter*、*Dokdonella* 等属在非企鹅聚集地占主导地位。

本文以传统培养方法为主, 采用不同培养方法对来自南极恩克斯堡岛的 5 个土壤样本进行细菌分离培养, 以获得更多分离株, 并通过 16S rRNA 基因序列分析获得可分离株多样性, 旨在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依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

中国第 34 次南极科学考察期间, 5 份土壤样品采集自恩克斯堡岛 (74.83°–70.95°S, 163.58°–163.76°E), 位于维多利亚地北部、特拉诺瓦湾南部。在 5 个采样点分别用无菌小铲除去表层土壤及小石子, 挖取 50–100 g 样品装入无菌采样袋中, 冷冻黑暗运输至国内实验室, 实验前存储在 -20 °C 冰箱。采集点位置、采样时间及理化性质见表 1。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

16S rRNA 基因扩增的引物、酶和试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 旋涡振荡器, Scientific Industries 公司; 水平电泳仪, Bio-Rad 公司。

参照文献配制 NA 培养基^[16]、R2A 培养基^[17]和 2216E 培养基^[18], 1/10 NA 和 1/10 2216E 培养基是将上述培养基成分减量为 1/10 配制。富集液配方^[19] (g/L): 蛋白胨 0.2, 酵母粉 0.2, NH₄Cl 1.0, MgSO₄·H₂O 0.2, CH₃COONa 2.0, 丙酮酸钠 1.25, EDTA 1.0, KH₂PO₄ 0.2, NaHCO₃ 1.0, 去离子水 1 L。

1.3 样品分离培养方法

1.3.1 直接涂布培养

无菌条件下, 称取 1 g 土壤样品加入分装有 9 mL 无菌生理盐水的试管中, 在旋涡振荡器上充分振荡 5 min, 使试管中的土壤不沉在底部呈混匀状态, 系列稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 三个浓度梯度, 每个梯度分别取 100 μL 涂布到 1.2 中的 5 种培养基平板上。置于 15 °C 培养箱培养 15 d, 挑取菌落形态有差异的单菌落进行平板划线纯化。

表 1 恩克斯堡岛采样点位置及土壤理化性质

Table 1 Geographical coordinates and geochemical parameters of soil samples from Inexpressible Island

样品 Sample	采样日期 Date	地理位置 Geographical coordinates	土壤类型 Soil type	湿度 Moisture (%)	总有机碳 TOC ($\mu\text{g/g}$)	总有机氮 TON ($\mu\text{g/g}$)	铵盐 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g/g}$)	硅酸盐 $\text{SiO}_4^{2-}\text{-Si}$ ($\mu\text{g/g}$)	硝酸盐 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{g/g}$)	磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ($\mu\text{g/g}$)	亚硝酸盐 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ($\mu\text{g/g}$)	pH
InS2	20180201	74.901 81°S, 163.724 23°E	Penguin activity area	0.60	12.246	0.006 6	138.212 06	14.050 4	4.099 06	4.850 26	3.263 4	6.35
InS3	20180201	74.909 88°S, 163.714 52°E	Vegetation coverage	4.00	0.132 4	0.026	83.835 08	3.941 84	0.841 26	37.702 51	0.344 4	7.04
InS4	20180201	74.896 71°S, 163.724 74°E	Freshwater lake	2.20	0.573 6	0.044 5	98.371 14	4.341 68	4.219 6	31.445 47	0.086 66	6.81
InS5	20180201	74.906 83°S, 163.727 04°E	Typical geological landform	1.00	0.105 7	0.019 7	49.144 9	4.260 76	0.782 46	29.437 29	0.234 78	7.35
InS6	20180201	74.915 78°S, 163.710 59°E	Rare biological background	0.00	0.154 8	0.023 5	17.958 64	5.902 68	0.601 72	16.788 67	0.073 92	7.71

1.3.2 微好氧富集后涂布培养

称取 5 g 土壤, 加入装有 2/3 灭菌富集液的 100 mL 蓝盖瓶中, 用灭菌富集液将剩余 1/3 体积补满, 形成微厌氧环境。15 °C 静置富集培养, 15、30、45 和 60 d 后分别开瓶, 取 1 mL 培养物系列稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个梯度后涂布于 R2A 培养基平板。置于 15 °C 培养 7–15 d, 挑取形态有差异菌落在 R2A 平板上进行划线纯化。

1.3.3 有氧富集涂布培养

称取 3 g 土壤样品, 加入装有 100 mL 无菌富集液的 300 mL 锥形瓶中, 有氧条件下在 15 °C、150 r/min 摇床培养, 10、20、30 d 后分别开瓶, 取 1 mL 培养物稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个浓度梯度后涂布于 R2A 培养基平板, 置于 15 °C 培养 7–15 d, 挑取形态有差异菌落在 R2A 平板上进行划线纯化。

1.4 菌株保藏、细菌 16S rRNA 基因测序及其分析

1.4.1 菌株纯化及鉴定

对于在 15 °C 培养箱中培养后平板上长出的细菌菌落, 根据菌落大小、颜色和形态等特征进行描述, 挑取形态差异较大的菌落进行划线纯化、编号。将纯化后的单菌落接种至液体培养基, 15 °C、150 r/min 培养 5–7 d 后, 取菌液保存在 20% 甘油管中, 保藏于 -20 °C。同时取菌液约

20 μL 于 0.2 mL 离心管中, 煮沸 10 min 后, 25 °C 下 5 000 r/min 离心 3 min, 取上清 2 μL 作为 PCR 模板; 无法煮沸获得菌体 DNA 的菌株培养物, 采用小量细菌基因组快速提取试剂盒提取细菌 DNA, 取 1–2 μL 作为模板, 对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。16S rRNA 基因通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGCTT-3')^[20]。PCR 反应体系 (25 μL): 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTPs Mix (2.5 mmol/L) 0.5 μL , 引物 27F 和 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , BSA (20 mg/mL) 0.5 μL , *rTaq* 酶 (5 U/ μL) 0.5 μL , DNA 模板 2 μL , 无菌去离子水 18 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经胶回收试剂盒纯化后, 连接到 pMD18-T 载体上, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经复苏培养后涂布至含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基上, 37 °C 培养过夜, 挑取白色克隆子, 用 T 载体通用引物 M13⁺ (5'-GTAAAACGACG GCCAG-3') 和 M13⁻ (5'-CAGGAAACAGCTATGA C-3') 检测得到阳性克隆。4 °C 保存, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4.2 系统发育分析

将所测定的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 比对, 获得相似性较高

的相关模式菌株 16S rRNA 基因序列, 使用 ClusterX 1.83 和 MEGA 6.0 分析并构建系统发育树。将分离菌株的 16S rRNA 基因序列批量提交上传至 NCBI 数据库, 每个样品中分离得到的重复菌株仅选取一个序列上传, 获得登录号为 MN315387–MN315460。

2 结果与分析

2.1 可培养细菌的多样性及系统发育分析

前期实验采用直接涂布法, 挑取平板上颜色、形状、透明度等方面有差异的菌落, 进行划线纯化及测序, 发现在 3 种平板上分离得到的菌属个数为 R2A (14 个) > NA (10 个) > 2216E (5 个), 后期富集培养涂布选用 R2A 平板。

5 份土壤样品中共分离得到 144 株可培养细菌, 对分离菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增、测序和序列比对, 发现这些菌株来自 5 个门, 分布在 30 个属 52 个种(表 2)。如图 1 显示, 最多的是变形菌门 56 株, 达到总分离株的 38.9%; 其次是放线菌门 49 株, 占比 34.0%; 厚壁菌门 32 株, 占总数的 22.2%; 异常球菌-栖热菌门 5 株, 占总数的 3.5%; 拟杆菌门最少, 仅有 2 株, 占总数的 1.4%。将 16S rRNA 基因测序结果在 EzTaxon 数据库中比对获得参考序列, 应用 MEGA 6.0 软件绘制系统发育树, 得到进化树如图 2 所示。从系统发育分析的结果可以看出, 放线菌门中最多的是链霉菌属(*Streptomyces*) 14 株, 其次是节杆菌属

表 2 不同样品分离细菌数目及多样性

Table 2 The number and diversity of bacteria isolated from soil samples

样品	分离株数目	属/种数目	潜在新种数目
Sample	The number of isolates	The number of genera/species	The number of potential novel strains
InS2	20	10/14	1
InS3	46	16/18	0
InS4	36	12/16	0
InS5	20	13/15	0
InS6	22	9/10	1

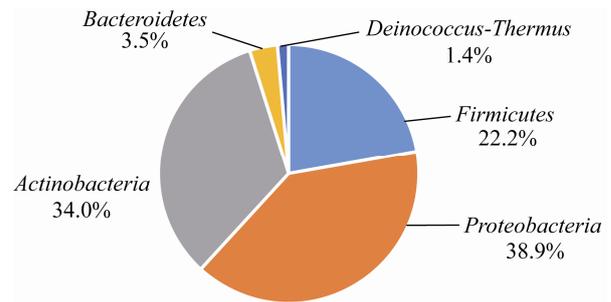


图 1 分离菌株在门水平上分布

Figure 1 The distribution of bacterial isolates at phylum level

(*Arthrobacter*) 7 株, 最少的类谷氨酸杆菌属(*Paeniglutamicibacter*)、库克菌属(*Kocuria*)和韩国生工属(*Kribbella*)各 1 株。变形菌门中分别有 α 、 β 和 γ 三个亚门, α 变形菌亚门最多的是 *Aureimonas*, 有 7 株; β 变形菌类只有贪噬菌属(*Variovorax*); γ 变形菌亚门中最多的是嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*) (22 株), 其次是假单胞菌属(*Pseudomonas*) (15 株)。对 144 株菌株测序时发现, 有 2 株菌(1 株属于变形菌门, 1 株属于放线菌门)的 16S rRNA 基因序列相似度均小于 97%, 可以认为是潜在新种^[21]。这两株潜在新种的菌株鉴定工作正在进行中。

2.2 不同培养方法在同种平板获得可培养细菌的多样性

为了使可培养细菌的多样性增加, 本实验用了 3 种方法, 分别是直接涂布培养、微好氧富集和有氧富集在不同时间段涂布培养。3 种方式在 R2A 平板上分离到的可培养细菌的种类有区别。直接涂布法分离得到 11 个属, 独有 7 个属; 有氧富集分离得到 9 个属, 独有 5 个属; 微好氧富集独有 2 个属, 分别是 *Paeniglutamicibacter* 和 *Acinetobacter*。上述结果说明在 R2A 平板上, 有氧富集和无氧富集均获得特有属, 有氧富集涂布与直接涂布法共有的属 4 个, 包括 *Staphylococcus*、*Rhodococcus*、*Pseudarthrobacte* 和 *Arthrobacter*, 微好氧富集获得可培养细菌种类少(图 3)。

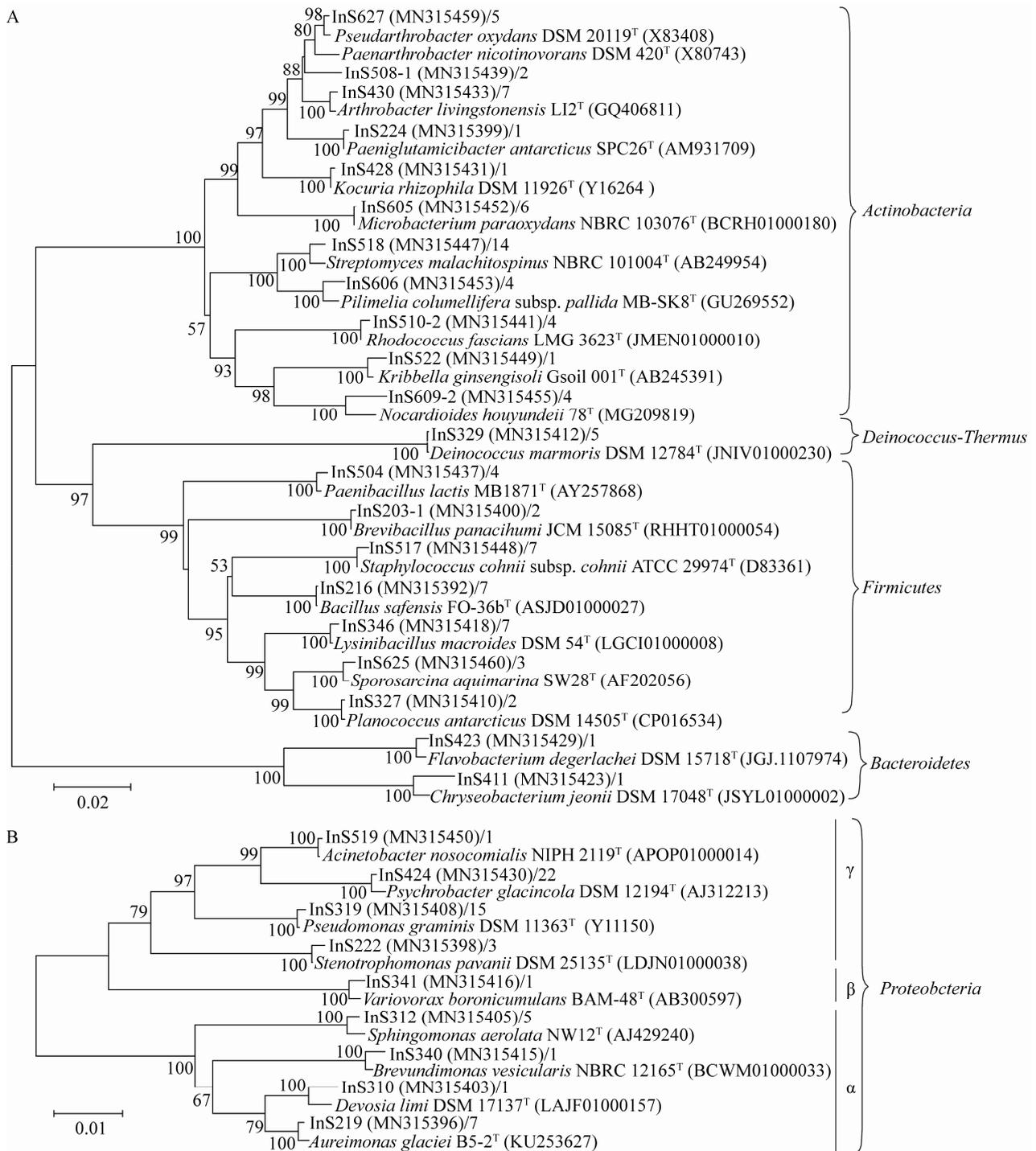


图 2 分离菌株 16S rRNA 基因序列与标准株序列采用邻接法构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic dendrogram of bacterial 16S rRNA gene sequences were inferred using neighbor-joining analysis

注: 括号中是 16S rRNA 基因序登录号; 斜线后是在属水平分类上相同的分离株数目; 分支上数字表示 Bootstrap 值; 标尺表示每个核苷酸序列位置中碱基替换数. A: 放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和异常球菌-栖热菌门; B: 变形菌门.

Note: GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in the parentheses; The number of the same strains at genus level are given after slash; Numbers at the branch points indicated the bootstrap value; Scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. A: Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Deinococcus-Thermus; B: Proteobacteria.

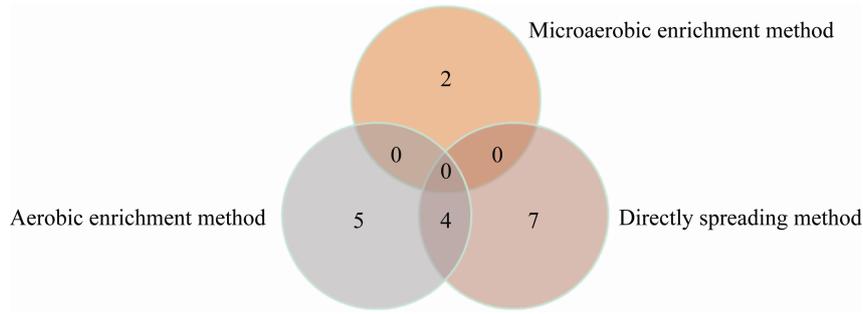


图3 3种培养方法在R2A培养基上得到细菌在属水平数目韦恩图

Figure 3 Venn diagram of the number of bacterial genera among three culture methods using R2A medium

2.3 不同采样点间可培养细菌多样性的区别

在门水平上, 所有菌株中变形菌门细菌最多(38.9%), 其次是放线菌(34.0%)。拟杆菌门细菌仅在 InS4 样品中出现, InS6 样品中没有分离得到异常球菌-栖热菌门(图4)。

在属水平上, 5个样品分离培养出的菌株有30个属, 其中占比最大的属为 γ 变形菌亚门的 *Psychrobacter*, 在样品 InS2、InS3、InS4 中均分离得到, 而且是 InS4 中的优势类群。厚壁菌门的 *Bacillus*、*Lysinibacillus* 和 γ 变形菌门中的 *Pseudomonas* 及异常球菌-栖热菌门的 *Deinococcus* 在4个样品中都有分布。

从图5可以看到, 不同采样地分离得到的可培

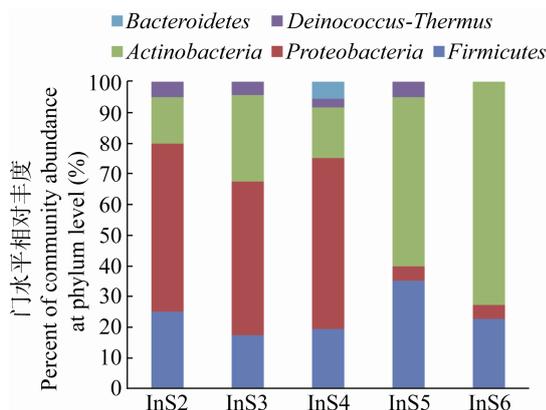


图4 可培养细菌在门水平上分布柱状图

Figure 4 The community structure of isolated bacteria in 5 different soils at phylum level

养细菌在属水平上有差异。InS2 采样点是典型动物企鹅的活动区域, 土壤中有企鹅粪便, 碳和氮素含量都很高。 *Bacillus* 是其优势属, *Stenotrophomonas* 和 *Sphingomonas* 也较多, 其中 *Stenotrophomonas pavanii* 和 *Paeniglutamicibacter antarcticus* 是该样品中的特有种类。InS3 样品在植被覆盖区域, 分离出的菌株中变形菌门的细菌较多, 达到48.9%, 分离得到的细菌多样性在5个样品中最好, 分布在16个属, 该样品中的优势属是 *Streptomyces* 和 *Pseudomonas*, 主要是 *Pseudomonas graminis* 和 *Streptomyces fildesensis*。InS4 样品来自淡水湖边缘的土壤, 土壤较为湿润, *Chryseobacterium*、*Flavobacterium* 和 *Kocuria* 是该样品的特有属, 包括 *Flavobacterium degerlachei*、*Chryseobacterium jeonii* 和 *Kocuria rhizophila* 菌。InS5 样品采集于典型的地质地貌区, 分离菌株分布在12个属, 特有属有 *Acinetobacter* 和 *Kribbella*, 分别是 *Acinetobacter nosocomialis* 和 *Kribbella ginsengisoli* 菌。InS6 样品的采样点极其干燥, 是生物稀少的本底区, 样品中有较多砂砾, 分离菌株中的放线菌门细菌丰度很高, 约占72.7%。 *Microbacterium*、*Pilimelia*、*Nocardioideis* 在 InS6 样品中分离株较多, 主要有 *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida*、*Microbacterium paraoxydans* 和 *Nocardioideis houyundeii*。

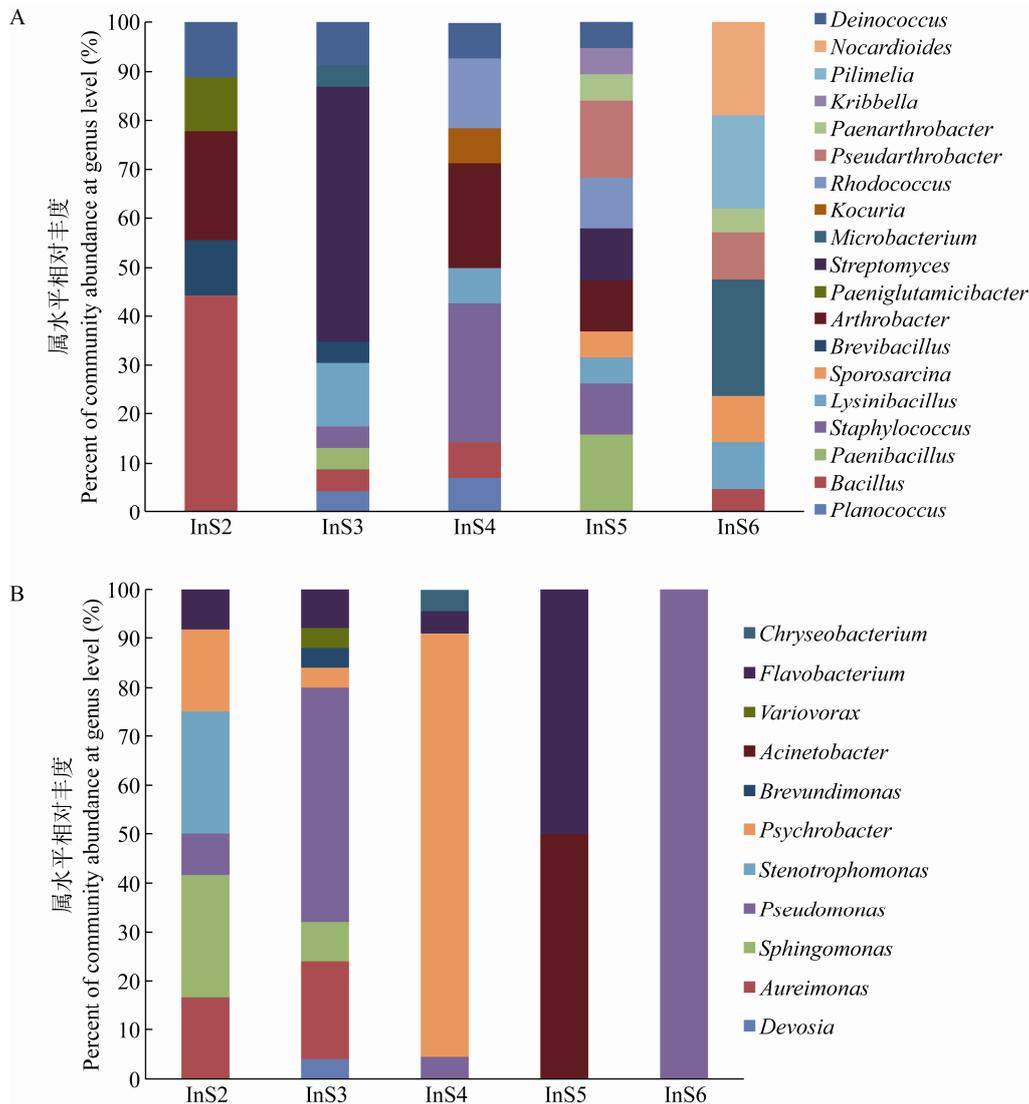


图 5 可培养细菌在属水平上的分布柱状图

Figure 5 The community structure of isolated bacteria at genus level

注: A: 厚壁菌门、异常球菌-栖热菌门和放线菌门中的属; B: 变形菌门和拟杆菌门中的属。

Note: A: The genus in Firmicutes, Deinococcus-Thermus and Actinobacteria; B: The genus in Proteobacteria and Bacteroidetes.

3 讨论与结论

本研究对来自南极维多利亚地北部恩克斯堡岛的 5 个土壤样品主要进行了可培养细菌分离培养, 进一步了解维多利亚地在不同地区土壤微生物多样性。我们从所有样品中共分离得到 144 株细菌, 经 16S rRNA 基因序列测定比对后发现, 这些菌株分布在 Actinobacteria、Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes 和 Deinococcus-Thermus,

这与以往对南极维多利亚地的不同性质土壤微生物多样性研究结果基本一致。Adams 等^[22]对维多利亚地不同类型土壤中细菌进行了分类, 他们发现干冷地带的矿质土在门水平上主要是 Actinobacteria、Proteobacteria、Firmicutes 和 Bacteroidetes, 而鸟类粪土中主要是 Firmicutes。Aislabie 等^[23]对来自维多利亚地 2 个不同区域的 4 个土壤样品运用分离培养和分子生物学方法研究

土壤中的优势细菌, 其样品含水量低, 总碳和氮量均不高, 磷含量较高, 他们的分离培养结果显示土壤中主要有 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria* 和 *Proteobacteria* 门类。我们的实验结果也显示出不同类型土壤在门、属水平上组成有差异, 企鹅粪土土壤中主要是 *Firmicutes* 和 *Proteobacteria*, 在含水量较高的土壤中主要是 *Proteobacteria*, 而干燥的土壤中主要是 *Actinobacteria*。土壤中 *Proteobacteria* 较多可能是其中有许多属类可以利用不同有机物。

本研究结果显示不同样品之间在属水平上有一定差异。InS2 样品采于企鹅活动区域, 该样品地土壤呈酸性, 总碳量和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量在所有样品中最高。企鹅等海鸟类的粪便不仅是维持该地有机碳和氮含量高的原因之一, 还会使土壤的 pH 值降低^[24]。从 InS2 样品中分离得到的菌株中 *Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 门类占比较大, 其中相对优势属是厚壁菌门中的 *Bacillus*, 因为芽孢杆菌可以产生抵御环境压力的芽孢, 可以存在于动物肠道中, 在鸟类粪土中且有机质丰富的地方这类细菌更容易出现^[9,25]。此外, 该样品中分离出的 *Gammaproteobacteria* 是变形菌门中的主要类群, *Stenotrophomonas*、*Pseudomonas*、*Psychrobacter* 均有检出, 其中 *Stenotrophomonas* 是该样品的特有属。 *Stenotrophomonas pavanii* 在以往研究中被发现是内生固氮菌^[26]。用有氧富集法分离得到 *Paeniglutamicibacter antarcticus*, 该菌属于严格需氧类型, 在南极海洋沉积物中被分离出^[27]。InS3 样品来自于植物覆盖区域土壤, 土壤湿度达到 4%, 氮和磷元素都比较丰富, 这两种元素在植物体内参与合成多种化合物。该样品中分离得到细菌的优势属是变形菌门中的 *Pseudomonas* 和放线菌门中 *Streptomyces*。 *Pseudomonas* 属类中有常见的根际植物促生菌, 还有的具有较强的解磷能力, 促进植被吸收磷养分, 有利于植物生长, 对

于 P 元素在植物土壤生态的循环也承担了一定作用^[28-29]。在 InS3 样品分离得到的 *Pseudomonas* 属类中, 有较多的菌是 *Pseudomonas graminis*, 该菌曾在草场中被分离出^[30], 而 *Streptomyces* 属中主要分离出的是 *Streptomyces fildesensis*, 该菌也曾在南极土壤中被分离得到^[31], 而且链霉菌作为放线菌, 大多可以产抗生素, 对提高植物抗病性等方面都有一定作用^[32], 可见土壤中优势菌群与土壤类型有关。InS4 样品是湖水边缘土壤, 该样品中的优势属为 *Psychrobacter*, 特有属是 *Chryseobacterium*、*Flavobacterium* 等。 *Psychrobacter* 是一种在极冷环境中常见的细菌, 在极地土壤、冰层等地均有发现^[33-34]。 *Flavobacterium degerlachei*、*Chryseobacterium jeonii* 属于 Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) 菌群(现为 *Bacteroidetes*), 在淡水和海洋系统中都非常丰富, 有研究认为该类细菌在寒冷水体中对有机物有吸收或降解作用^[35-36], 土壤中发现的这类细菌可能来自于湖水。InS5 样品土壤采于典型地貌区, InS6 样品来自于生物稀少的本底区, 这两个土壤样品 pH 均偏碱性, 土壤湿度低, 有机质含量也较低, InS6 样品极其干燥, 含水量为零。两个样品分离出的细菌中放线菌门占比大, 有研究表明放线菌门在干燥和低营养的土壤中占据优势^[37]。两个样品中均分离出 *Pseudarthrobacter*, 该属类具有耐干燥特点^[38-39]。

在本研究得到的分离可培养细菌中有两株潜在新种, 一株为 *Sphingomonas* sp. (菌株名称为 InS209-1, 登录号 MN315391) 属于变形菌门, 另一株 *Nocardioides* sp. (菌株名称为 InS609-2, 登录号 MN315455) 属于放线菌门。 *Sphingomonas* 这类耐冷细菌在南极空气中、冻土区均被分离出, 在降解有机物污染方面已被研究^[40-42]。放线菌门细菌能够在极地的干燥、寒冷土壤中存在, *Nocardioides* 属类细菌在治理环境污染方面也有应

用^[43-44]。极地的特殊环境赋予了微生物多种特性, 还有发现新种的潜力, 有许多微生物资源等待挖掘。

5 个样品采样地不同, 从培养结果可以发现其群落结构有一定差异, 尤其是 InS2 样品与其他样品的区别更大, 这与采样地环境有关系。本实验采用分离培养方法分析南极恩克斯堡岛中细菌多样性, 可培养细菌在一定程度上反映了该地的优势菌群, 而且在分离得到的菌株中放线菌占总分离株的 34.0%。放线菌是产生抗生素的重要来源, 不同地理位置和土壤条件都可能使放线菌有更多的理化性质。本实验中的一株属于放线菌的潜在新种 InS609-2, 在新种鉴定过程中发现, 该菌株对一定浓度的青霉素、卡那霉素、氨基西林、四环素和氯霉素等均有抗药性。其他分离菌株待进一步做抗菌活性测定, 在南极恩克斯堡岛土壤中放线菌占比大因而具有潜在研究价值。实验中采用的培养方法和条件、人为操作等因素都会影响可培养细菌的分离结果, 由于分离培养方法相比非培养方法具有很大的局限性, 后续对于极地土壤的细菌分离也可考虑采用改良寡营养培养基等, 用更低温条件以获得更多菌种资源。

致谢: 感谢中国第 34 次南极科学考察队。其中中国科技大学高月嵩博士执行了现场采样, 自然资源部第一海洋研究所王能飞副研究员提供了土壤理化参数, 在此特别致谢。

REFERENCES

- [1] Wall DH. Biodiversity and ecosystem functioning in terrestrial habitats of Antarctica[J]. *Antarctic Science*, 2005, 17(4): 523-531
- [2] Cowan DA, Tow LA. Endangered Antarctic environments[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 649-690
- [3] Niederberger TD, McDonald IR, Hacker AL, et al. Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(7): 1713-1724
- [4] Foght J, Aislabie J, Turner S, et al. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from Two Southern Hemisphere Glaciers[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(4): 329-340
- [5] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica[J]. *Extremophiles*, 2001, 5(1): 23-33
- [6] Wang W, Hu JM, Chen H, et al. LA-ICP-MS zircon U-Pb ages and geological constraint of intrusive rocks from the Inexpressible Island, Northern Victoria Land, Antarctica[J]. *Geological Bulletin of China*, 2014, 33(12): 2023-2031 (in Chinese)
王伟, 胡健民, 陈虹, 等. 南极北维多利亚地难言岛侵入岩 LA-ICP-MS 锆石 U-Pb 年龄及其地质意义[J]. *地质通报*, 2014, 33(12): 2023-2031
- [7] Barrett JE, Virginia RA, Hopkins DW, et al. Terrestrial ecosystem processes of Victoria Land, Antarctica[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(10): 3019-3034
- [8] Hofstee EH, Balks MR, Petchey F, et al. Soils of Seabee Hook, Cape Hallett, northern Victoria Land, Antarctica[J]. *Antarctic Science*, 2006, 18(4): 473-486
- [9] Aislabie J, Jordan S, Ayton J, et al. Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(1): 21-36
- [10] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143-169
- [11] Liu CY, Cong BL, Wang NF, et al. 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)
刘春影, 丛柏林, 王能飞, 等. 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
- [12] He RH, Du ZJ, Yu Y, et al. Isolation of antibacterial and culturable bacteria from Arctic tundra soils[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1050-1062 (in Chinese)
贺瑞含, 杜宗军, 俞勇, 等. 北极苔原土壤中可培养细菌的分离及其抗菌活性测定[J]. *微生物学报*, 2019, 59(6): 1050-1062
- [13] González JM, Whitman WB, Hodson RE, et al. Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities: an example from a lignin enrichment culture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(12): 4433-4440
- [14] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "Uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1127-1129

- [15] Lee CK, Barbier BA, Bottos EM, et al. The Inter-Valley soil comparative survey: the ecology of Dry Valley edaphic microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1046-1057
- [16] Chen TS. *Manufacture and Application of Microbial Culture Medium*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 179-184 (in Chinese)
陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 179-184
- [17] Zhou N, Jiang CY, Liu SJ. Cultivation of microorganisms from environments: nutrient level of the culture medium is of great importance[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1075-1081 (in Chinese)
周楠, 姜成英, 刘双江. 从环境中分离培养微生物: 培养基营养水平至关重要[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1075-1081
- [18] ZoBell CE. Studies on marine bacteria. I. the cultural requirements of heterotrophic aerobes[J]. *Journal of Marine Research*, 1941, 4: 42-75
- [19] Mu DS, Liang QY, Wang XM, et al. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing[J]. *Microbiome*, 2018, 6: 230
- [20] Bosshard PP, Santini Y, Grütter D, et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(2): 173-182
- [21] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(4): 846-849
- [22] Adams BJ, Bardgett RD, Ayres E, et al. Diversity and distribution of Victoria Land biota[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(10): 3003-3018
- [23] Aislabie JM, Chhour KL, Saul DJ, et al. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(10): 3041-3056
- [24] Simas FNB, Schaefer CEGR, Melo VF, et al. Ornithogenic cryosols from Maritime Antarctica: phosphatization as a soil forming process[J]. *Geoderma*, 2007, 138(3/4): 191-203
- [25] Sun FQ, Wang BJ, Li GY, et al. Diversity of bacteria isolated from the South China Sea sediments[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1578-1587 (in Chinese)
孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 等. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1578-1587
- [26] Ramos PL, van Trappen S, Thompson FL, et al. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(4): 926-931
- [27] Pindi PK, Manorama R, Begum Z, et al. *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from an Antarctic marine sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(10): 2263-2266
- [28] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(4/5): 319-339
- [29] Kloepper JW, Leong J, Teintze M, et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Nature*, 1980, 286(5776): 885-886
- [30] Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, et al. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(1): 297-308
- [31] Li J, Tian XP, Zhu TJ, et al. *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from Antarctic soil[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2011, 100(4): 537-543
- [32] Kim YC, Leveau J, McSpadden GBB, et al. The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1548-1555
- [33] Bowman JP, Cavanagh J, Austin JJ, et al. Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(4): 841-848
- [34] Zeng YX, Yu Y, Liu Y, et al. *Psychrobacter glaciei* sp. nov., isolated from the ice core of an Arctic glacier[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(4): 1792-1798
- [35] Höfle MG. Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of nonindigenous bacteria as revealed by low-molecular-weight-RNA analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(10): 3387-3394
- [36] Bernardet JF, Segers P, Vancanneyt M, et al. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978)[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 128-148
- [37] Niederberger TD, Sohm JA, Gunderson TE, et al. Microbial community composition of transiently wetted Antarctic Dry Valley soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 9
- [38] Busse HJ. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu*

- lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(1): 9-37
- [39] SantaCruz-Calvo L, González-López J, Manzanera M. *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(11): 4174-4180
- [40] Piao AL, Feng XM, Nogi Y, et al. *Sphingomonas qilianensis* sp. nov., isolated from surface soil in the permafrost region of Qilian Mountains, China[J]. Current Microbiology, 2016, 72(4): 363-369
- [41] Busse HJ, Denner EBM, Buczolits S, et al. *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(5): 1253-1260
- [42] Lin SY, Shen FT, Lai WA, et al. *Sphingomonas formosensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from agricultural soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(7): 1581-1586
- [43] Schippers A, Schumann P, Spröer C. *Nocardioides oleivorans* sp. nov., a novel crude-oil-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(4): 1501-1504
- [44] Mattes TE, Coleman NV, Spain JC, et al. Physiological and molecular genetic analyses of vinyl chloride and ethene biodegradation in *Nocardioides* sp. strain JS614[J]. Archives of Microbiology, 2005, 183(2): 95-106

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定，计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体)，不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下，希望作者参照执行。

时间：日用 d；小时用 h；分钟用 min；秒用 s 等表示。

溶液浓度：用 mol/L，不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度：用 r/min，不用 rpm。

蒸汽压力：用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度：用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量：蛋白质用 Da 或 kD，核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位：物理量符号采用斜体，单位用正体并用括号括起，例如：*t* (h) (表示时间，单位是小时)。带数值的计量单位：除长度计量单位和%不能省略外，短线、顿号和±号前的其他相同单位可省略。例如：20 cm×0.3 cm；20%–30%；20–30 °C；1–3 d；4、5、6 g/L。