

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

刘勇勤^① 姚檀栋^{①②} 康世昌^{①②} 焦念志^③ 曾永辉^③ 史扬^③ 骆庭伟^②
井哲帆^② 黄思军^③

① 中国科学院青藏高原研究所, 北京 100085; ② 中国科学院冰冻圈与环境联合重点实验室, 兰州 730000;

③ 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005. E-mail: yqliu@itpcas.ac.cn

摘要 通过流式细胞计数和构建环境样品 16S rRNA 基因的克隆文库, 分析了珠穆朗玛峰地区东绒布冰川冰雪微生物数量和菌群结构特征及其与季节变化的关系. 珠峰地区冰雪微生物的 16S rRNA 基因序列分属于 α , β , γ 变形菌纲, 放线菌门, 厚壁菌门, CFB, 蓝细菌, 真核质体, 待定门 TM7 共 9 大类, 以 γ -变形菌纲为主要类群, 其中 *Acinetobacter* 和 *Leclercia* 属是整个菌群中的优势属. 微生物的数量和菌群结构具有明显的季节特征, 夏季微生物的数量高于冬季; 菌群结构具有一些共有属种的同时, 在夏、冬季雪中具有各自特有的属种, 共有属种推测是青藏高原局地源的微生物, 序列同源性分析结果表明, 夏季较多细菌属种与海洋环境相关, 冬季细菌则具有更强的耐冷性. 微生物明显的季节变化可能是受珠峰地区夏季和冬季不同水汽来源的影响.

关键词 珠穆朗玛峰 东绒布冰川 微生物群落结构 季节变化

珠穆朗玛峰(简称珠峰)因独特的自然地理条件和复杂的地质构造, 为世界各地的科学工作者所瞩目. 珠峰地区在我国、东亚乃至全球气候环境变化中起着非常重要的作用, 在该地区已进行了大量的冰川和雪冰化学研究, 恢复了百年以来珠峰地区气候环境信息和人类活动的影响等^[1~6]. 但此前的研究大都集中在雪冰的无机化学方面, 对微生物的研究相当少.

1975 年, 中国科学院珠峰地区科学考察队曾对珠峰地区的真菌和藻类进行了考察^[7,8]. 熊克娟等人^[9]对喜马拉雅山希夏邦马峰的雪样进行分离培养, 从 2 个样品中分离出生存于寒冷条件下的酵母菌, 菌数分别为 6.9×10^6 和 17.9×10^6 细胞/mL. Baghela 等人^[10]研究了喜马拉雅山位于印度的第二大冰川 Gangotri 中耐低温生长的蛋白水解细菌. Yoshitaka 等人^[11]对喜马拉雅山南坡 Yala 冰川中雪藻的生物量及群落结构随海拔高度的变化进行了研究. 近年来, 在青藏高原开展了冰芯中微生物与气候环境关系的研究. 姚檀栋等人^[12~14]研究了青藏高原马兰冰芯细菌菌群结构变化与环境的关系, 指出冰芯细菌优势类群的垂直分布反映了微生物对不同时期环境变化的响应, 细菌数量与氧同位素记录的温度变化负相关. 向述荣等人^[15]对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研究表明, 细菌数量与沙

尘输送有密切的对应关系, 不动杆菌和 *Actinobacteria* 菌群可作为主要指示菌来反映微生物对冰川环境条件的响应.

珠峰北坡地区微生物的研究尚属空白, 在 2005 年 4~6 月中国科学院第 4 次珠穆朗玛峰地区科学考察活动中, 我们对东绒布冰川 6500 m 惹普拉垭口处的冰雪微生物进行了研究. 本文首次报道了珠峰地区冰雪细菌数量及群落结构. 在本研究中, 用流式细胞仪检测了细菌数量, 利用分子生物学技术构建了冰雪微生物环境样品的 16S rRNA 基因文库, 并结合冰雪中可溶性离子、重金属元素等多项环境指标, 探讨了细菌的群落数量与结构的季节变化及其环境意义.

1 材料与方 法

(i) 雪坑样品的采集及实验室分析. 2005 年 4 月 28 日在珠峰东绒布冰川惹普拉垭口(海拔 6520 m)挖取 1 个 1.7 m 深的雪坑(图 1), 该雪坑剖面上每隔 15 cm 采取微生物雪样, 分装入 1 L 洁净灭菌的 Nalgene 瓶中, 在野外及运输过程中样品一直处于冷冻状态保存. 同时在雪坑剖面上每隔 5 cm 采取雪样, 检测其稳定氧同位素比率、主要可溶性离子及重金属元素的含量, 样品装入预先清洗过的聚乙烯塑料小瓶中, 冷冻保存. 采样时垭口温度为 -11.6°C . 穿洁净服戴无菌手套进行所有操作.

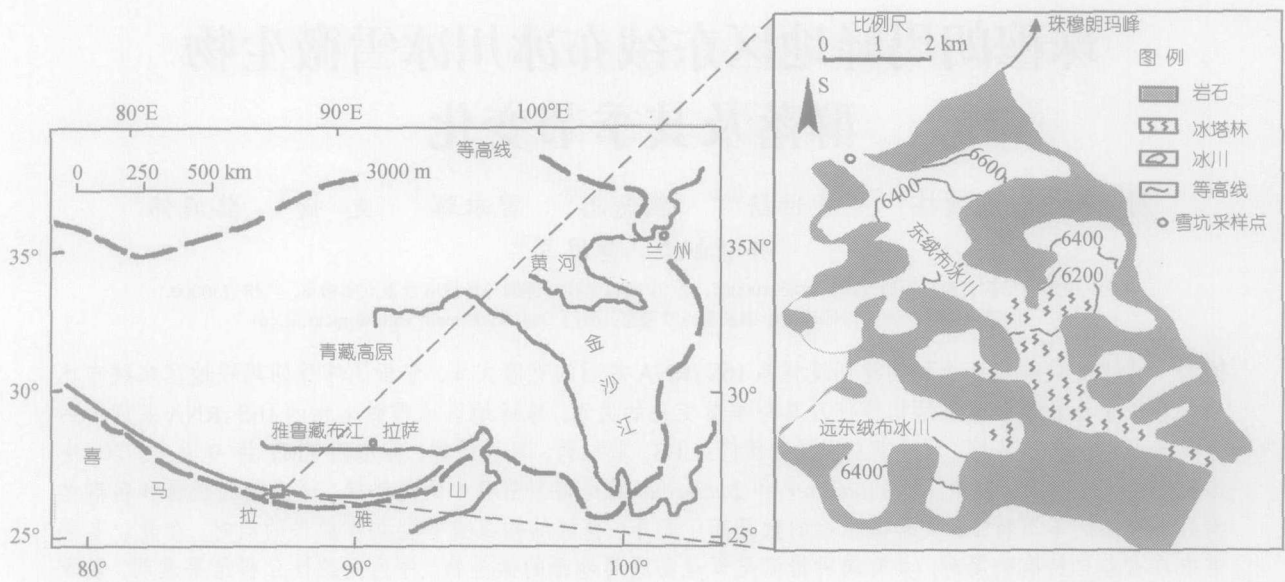


图1 珠峰地区东绒布冰川6500 m微生物采样位置图

微生物的数量在厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室用流式细胞仪(Beckman Coulter 公司, 型号 Epics Altra II)检测. 稳定氧同位素比率在中国科学院寒区旱区环境与工程研究所冰芯实验室由 MAT-252 质谱仪测定. 主要可溶性阳离子(Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ , Na^+)和阴离子(PO_4^{3-} , NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-})由中国科学院青藏高原研究所环境与过程实验室 Dionex 2000 及 2500 型离子色谱仪测定. 重金属元素在中国科学院南京土壤研究所土壤与环境分析测试中心用原子荧光光谱仪 AF-160AF-2500 和等离子发射光谱仪(ICP)测得.

(ii) 环境 DNA 样品的提取及 16S rRNA 基因的扩增. 对雪坑剖面上 6 个样品提取 DNA, 并进行 16S rRNA 基因扩增和构建基因克隆文库. 所有试剂均为新鲜配置, 高压灭菌或过滤除菌.

将雪样从 -20°C 冰箱中取出置于 4°C 下缓慢融化, 将约 1 L 融水用 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌 Millipore 微孔滤膜过滤. 将膜放入离心管中, 加入 GTE 缓冲液(50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris, 25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0))及溶菌酶(终浓度 1 mg/mL), 37°C 水浴 2 h 后将液体转入新的离心管, 加入 10% 的 SDS, 10 μL 蛋白酶 K (终浓度 0.2 mg/mL), 5 mol/L 的 NaCl, 53°C 水浴后加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 离心后取上清加入 2/3 体积的氯仿:异戊醇, 离心后加入异丙醇置于 -20°C 过夜沉淀. 取出后高速离心,

弃上清, 加入 70% 预冷的乙醇清洗, 弃上清室温下风干后加入 TE 缓冲液将 DNA 溶解, -20°C 下保存.

以细菌通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCTGGCT-CAG-3')和 1392r (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3')对样品进行扩增. PCR 反应体系(30 μL)含: 1 μL DNA 模板, 3 μL 缓冲液, 1.8 μL dNTP, 正反向引物各 0.5 μL 和 0.2 μL La Taq DNA 聚合酶(宝生物工程大连有限公司). PCR 扩增条件是: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min. 将灭菌水用同样方法过膜后提取 DNA 并扩增, 用作阴性对照.

(iii) 16S rRNA 基因克隆文库的构建及筛选. 将 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒(宝生物工程大连有限公司)纯化后, 连接克隆到 pMD18-T 载体(宝生物工程大连有限公司), 并转入 *E. coli* DH5 α 中, 建立 6 个层位雪中细菌的 16S rRNA 基因文库.

在每个基因文库中随机挑取 75~100 个克隆以 M13 正反向引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖胶中电泳, 确定阳性克隆. 将 15 μL 阳性克隆的 PCR 产物分别用 *Hha* I 和 *Afa* I 酶进行酶切, 以 3% 的琼脂糖凝胶电泳分析限制性酶切带型. 将不同的克隆根据这两组酶的酶切带型结果进行归类, 每种带型中挑选一个克隆测序. 所有测序在上海英骏生物技术有限公司 ABI 3730 测序仪上完成. 同时根据文库酶切分型的结果计算克隆文库的覆盖率

(Coverage)并进行多样性分析;覆盖率计算公式为 $Coverage = [1 - (\text{带型仅出现一次的克隆子数} / \text{总克隆数})] \times 100\%$ ^[16];多样性指数包括带型、克隆数、优势度、Simpson 指数、Shannon 指数及 Evenness 指数,均通过统计软件 PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past>) 计算得到。

(iv) 16S rRNA 基因序列的比较及系统发育树的构建。 所获得序列首先通过嵌合子检测程序 CHIMERA_CHECK^[17]检测是否为嵌合子序列。 然后在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 和 Ribosomal Database Project 9.0 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu>)中与已知细菌的 16S rRNA 基因序列进行比较,选取最同源的序列进行序列归属分析和构建系统发育树。 将序列连同参比序列用 ClustalX 1.80 进行碱基序列的多重比对,比对结果用 Phylyp 3.63 软件包的 DNADIST 程序进行 Kimura 2.0 校正并计算进化距离,序列的归属使用软件 DOTUR 按 0.03 (97%的一致性)的标准在属的水平上进行确定,同时

用 Phylyp 软件包中的 NEIGHBOR 程序构建邻接法进化树, SEQBOOT 程序用于添加 Bootstrap 值(100 次),古菌 *Methanothermobacter feravidus* 的 16S rDNA 序列用作外类群(outgroup)。

本研究中得到的 16S rRNA 基因序列均已提交 GenBank 数据库,序列登录号为 DQ323081~DQ323115。

2 结果

2.1 雪坑 $\delta^{18}O$ 的测定及季节的划分

青藏高原南部降水中稳定同位素比率($\delta^{18}O$)具有明显的季节变化^[18-20],夏季降水主要受西南季风的影响, $\delta^{18}O$ 值为低值,冬季降水主要由西风带输送而来, $\delta^{18}O$ 值为高值。 根据珠峰地区雪中 $\delta^{18}O$ 值的特征(图 2),对雪坑进行了季节划分。 本次研究的雪坑 1.7 m 的积雪代表了 2 个季节旋回, $\delta^{18}O$ 峰值区(62~98 cm, 158~170 cm)代表冬半年沉积,低值区(0~62 cm, 98~158 cm)代表夏半年沉积。 本次野外考察时发现绒布冰川上没有 2004~2005 年度冬季积雪, $\delta^{18}O$ 值也表

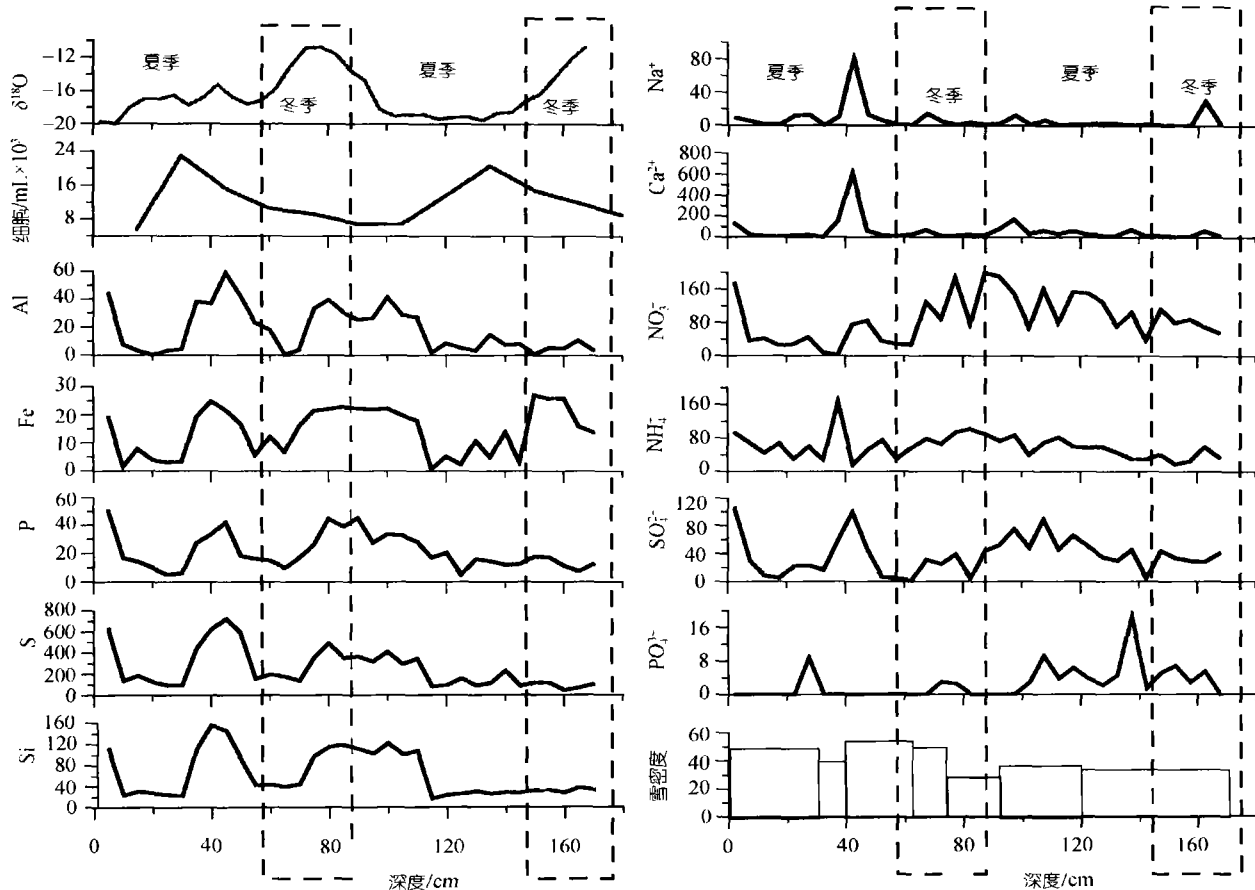


图 2 珠峰地区东绒布冰川雪坑中氧同位素比率、微生物数量、雪密度、主要可溶性离子和金属元素随深度的变化

现出这一特征,因此该雪坑缺失 2004~2005 年度冬半年 $\delta^{18}\text{O}$ 较高值,应该在冬半年为高值的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等可溶性离子也表现出相同的结果,但重金属元素却在雪坑上部有高值,则说明了尽管 2004~2005 年的冬半年降水很少,溶于水的可溶性离子含量低,但由于冬半年的干沉降作用,总元素(如 Ca , Mg 等)还是出现了较高值。

2.2 细菌丰度

珠峰地区雪样用流式细胞仪检测的细菌个数为 $5.7 \times 10^3 \sim 2.3 \times 10^4$ 细胞/mL, 15~30 cm 处夏季积雪中的细菌数最大,次之是 120~135 cm 处的夏季雪。近表层 0~15 cm 的细菌数最少(5.7×10^3 细胞/mL), 60~105 cm 处冬季雪的细菌数为次低值(6.9×10^3 细胞/mL)。

2.3 冰雪微生物的 16S rRNA 的克隆文库及序列分析

我们构建了珠峰地区东绒布冰川冰雪微生物的 16S rRNA 的克隆文库,共检测得到 229 个克隆子,用同样方法处理的阴性对照没有出现亮带,说明实验结果可靠。所得到的 6 个克隆文库覆盖率均达到 80% 以上,表明挑取的克隆子数量已足够能反映出群落结构的面貌。所得克隆子经两种内切酶的酶切筛选共得到 35 种带型,通过测序得到 35 条 16S rRNA 基因序列,序列通过嵌合子检测程序验证表明均为正常的 16S rRNA 基因序列。它们分属于 α , β , γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB), Cyanobacteria, Eukaryotic chloroplast 和 TM7 candidate phylum, 共 9 大类 31 个属, 9 个为未定属,可能代表新的属,结果列于表 1, 图 3

表 1 珠峰地区东绒布冰川细菌 16S rRNA 序列^{a)}

克隆号	GenBank 序列号	分类	属	各层位中数量					
				RBL-3	RBL-4	RBL-5	RBL-7	RBL-9	RBL-10
RBL4-63	DQ323098	α	<i>Stappia</i>		1				1
RBL9-34	DQ323114	α	<i>Ruegeria</i>						2
RBL10-69	DQ323088	α	<i>Sphingomonas</i>					2	
RBL5-32	DQ323101	α	<i>Sphingomonas</i>			1			
RBL7-59	DQ323111	α	<i>Afiplia</i>				1		
RBL5-30	DQ323100	α	<i>Roseobacter</i>			2			
RBL9-51	DQ323115	β	<i>Rhodoferrax</i>					1	
RBL10-97	DQ323089	β	unclassified						1
RBL7-22	DQ323104	β	<i>Curvibacter</i>				2		
RBL7-37	DQ323105	β	<i>Polaromonas</i>				1		
RBL5-15	DQ323099	β	<i>Acidovorax</i>			3		12	
RBL10-37	DQ323087	γ	<i>Yersinia</i>						3
RBL3-8	DQ323091	γ	unclassified	1	1				
RBL3-90	DQ323093	γ	unclassified	1					
RBL3-96	DQ323094	γ	unclassified	3					
RBL10-17	DQ323082	γ	unclassified	1	1			1	1
RBL10-30	DQ323086	γ	unclassified						1
RBL7-44	DQ323107	γ	<i>Rhodanobacter</i>				1		
RBL5-44	DQ323102	γ	<i>Alteromonas</i>			1			
RBL10-19	DQ323083	γ	<i>Enterobacter</i>	3	1				5
RBL4-101	DQ323095	γ	unclassified	1	2	1			
RBL10-20	DQ323084	γ	<i>Leclercia</i>	13	13	10	5		15
RBL10-26	DQ323085	γ	<i>Acinetobacter</i>	7	22	14	2	1	4
RBL7-20	DQ323103	γ	<i>Acinetobacter</i>				5	6	
RBL9-29	DQ323113	γ	<i>Acinetobacter</i>					1	
RBL7-47	DQ323109	Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>				1		
RBL7-45	DQ323108	Actinobacteria	<i>Kocuria</i>				1	8	
RBL4-31	DQ323097	Firmicutes	<i>Anoxybacillus</i>	6	3	5	4		4
RBL10-15	DQ323081	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i>						1
RBL3-9	DQ323092	CFB	<i>Flectobacillus</i>	1					
RBL7-38	DQ323106	CFB	<i>Flavobacterium</i>				2		
RBL7-58	DQ323110	Cyanobacteria	<i>Synechococcus</i>				9		
RBL3-13	DQ323090	Cyanobacteria	<i>Chamaesiphon</i>	1		4			
RBL4-22	DQ323096	Eukaryotic chloroplast			1				
RBL7-9	DQ323112	TM7 candidate phylum					1		

a) α , α -Proteobacteria; β , β -Proteobacteria; γ , γ -Proteobacteria

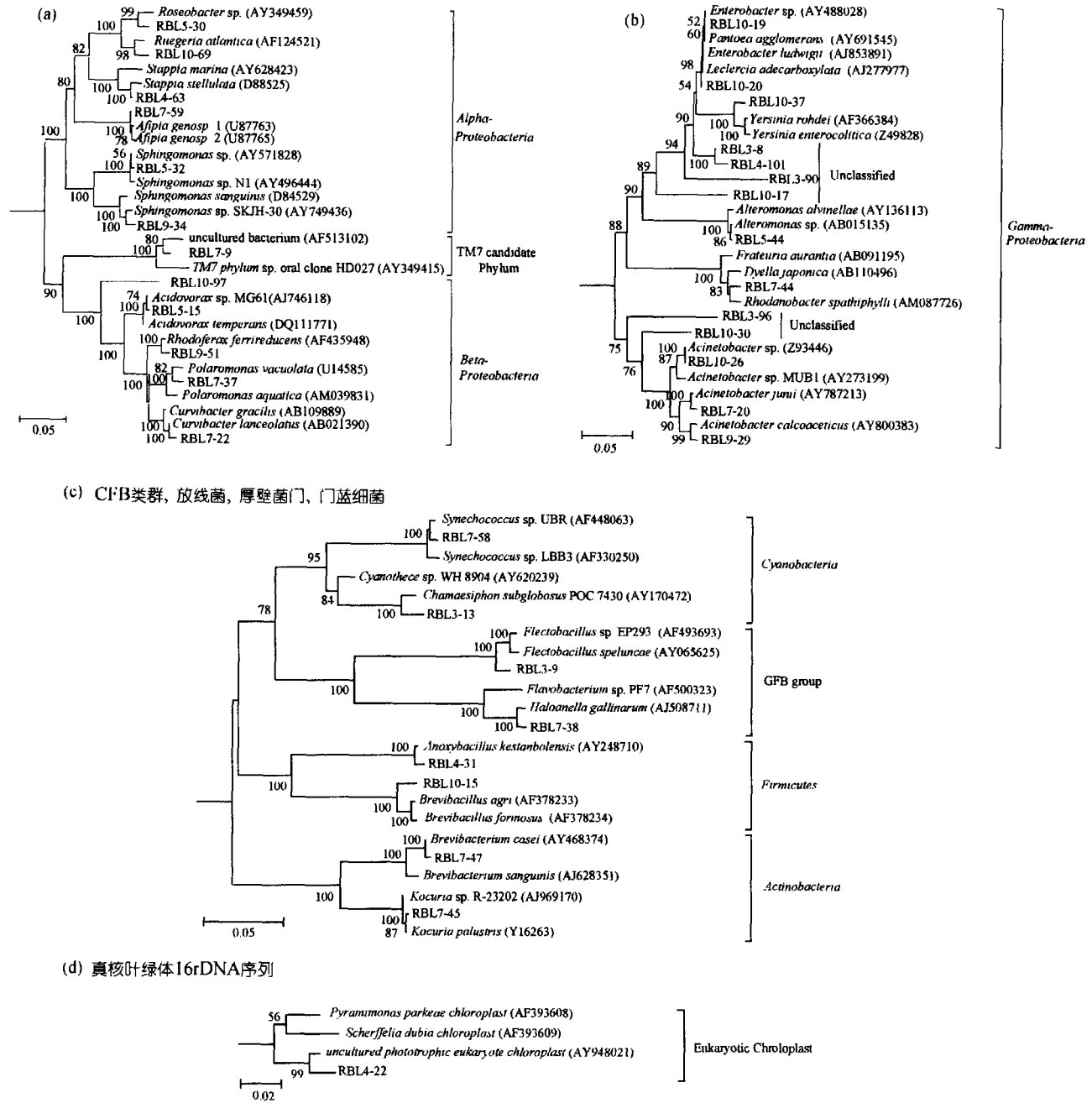


图 3 珠穆朗玛峰地区东绒布冰川冰雪微生物群落 16S rRNA 基因序列的系统发育树

采用邻接法(neighbor-joining)构建得到, 外类群(outgroup)为古菌 *Methanothermus fervidus* 的 16S rRNA 基因序列。标尺代表核苷酸替代率, 分枝上的数值为自举值(Bootstrap, 100 次), Unclassified 代表未能确定到属的水平序列。(a) α -变形菌纲, β -变形菌纲, 待定门 TM7;

(b) γ -变形菌纲; (c) CFB 类群, 放线菌门, 厚壁菌门, 蓝细菌; (d) 真核叶绿体 16S rDNA 序列

为根据这些序列构建的系统进化树。由图表可见, γ -Proteobacteria 是珠峰地区冰雪细菌中主要类群, 占总数的 64%; Firmicutes 占总数的 10%, β -Proteobacteria 占总数的 9%, Cyanobacteria 占总数的 6%, α -Proteobacteria 和 Actinobacteria 各占总数的 4%, 其他

类占总数的 3%。 γ -Proteobacteria 中有 14 个属, 其中 *Acinetobacter* 和 *Leclercia* 所占数量最多, 分别为 42% 和 38%。 Firmicutes 的 2 个属中 *Anoxybacillus* 占了 96%。 β -Proteobacteria 中有 14 个属, 其中 *Acidovorax* 占了 75%。 这 3 大类都是以 1~2 个属在数量上占绝对优势。

Cyanobacteria 有 2 个属, α -Proteobacteria 有 5 个属, CFB 类群有 2 个属, 这 3 类中各属数量基本相当.

GenBank 数据库中的 Blast 结果显示珠峰地区雪中微生物的一些属种与其他冰冻圈中微生物有很好的同源性, 根据 0.03 的标准使用 DOTUR 软件进行聚类分析, 发现了 5 个珠峰地区的序列在属的水平上与南北极和青藏高原的嗜冷(耐冷)菌有很好的相似性(表 2).

3 讨论

3.1 细菌数量的季节变化及其环境意义

(i) 细菌数量的季节变化. 珠峰东绒布冰川雪坑剖面细菌数量随深度的变化如图 2 所示. 细菌数量具有明显的季节特征, 夏季沉积的雪中的细菌量远远大于冬季积雪, 夏季高值(2.3×10^4 细胞/mL)是冬季低值(6.9×10^3 细胞/mL)近 4 倍. 雪中的细菌主要是外来的, 数量受两方面的因素影响, 一是湿沉降和干沉降, 即水汽和粉尘中携带细菌数量的多少, 二是细菌沉积后在冰川上的存活机率和繁殖的速率. 夏季温度较冬季高, 空气湿度也大, 更适于细菌存活, 湿沉降及干沉降中附着的细菌也较多, 降落后细菌在雪面上存活和繁殖的可能性也较冬天高, 因此夏季沉积雪中的细菌也较多. 研究表明, 玻利维亚 Sajama 冰芯中 12 ka 湿冷气候时沉积的细菌量要大于现代干冷气候时的细菌量^[21]. Liu 等人^[22]认为湿冷的气候可增加植被的密度, 产生更多的可携带细菌的有机颗粒, 如花粉等, 而且湿冷的气候可以减少细菌脱水,

增加了存活的机率. 珠峰地区的水汽来源在夏、冬季迥然不同, 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, 将会带来大量的细菌, 潮湿且温暖的气候又使得大量细菌随气团传输并存活, 沉降到冰川后又可能在雪面繁殖, 这二个方面的作用使得夏季雪中有较多的细菌. 日本 Tateyama 山海拔 2450 m 处雪中细菌生物量研究表明, *Cryobacterium psychrophilum* 等在夏季(3~10 月)快速生长^[23]. 青藏高原马兰冰芯中细菌数高值与冷期相对应^[12,13], 历史时期的冷期与暖期是长时间尺度上相对冷暖的概念, 与现代夏、冬季温度差是不一样的. 珠峰、马兰所处位置不同, 马兰冰芯地处高原北部, 其周围以沙漠和戈壁为主, 冷期时大量的粉尘携带来较多的细菌, 冰芯中相对应层位的细菌数也较高.

(ii) 细菌数量与雪层物化特性的关系. 细菌数量与雪层物理性质关系不大, 和雪密度没有直接的相关. 在 40~50 cm 处细菌数量最高值, 雪密度为 39 kg/m^3 , 但在 75~95 cm 处, 雪密度为 33 kg/m^3 , 细菌数却是雪坑中的最低值. 在 50~75 和 95~120 cm 处细菌数相当, 但雪密度却分别为 52 和 35 kg/m^3 .

图 2 列出了可溶性离子 Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+ 及 Al, Fe, P, Si 随深度的变化曲线. 在 PO_4^{3-} , NO_3^- , NH_4^+ 高值时, 即营养相对丰富的时期, 细菌数并没出现相应的高值, 细菌数与其他离子和元素的相关性也不显著, 说明雪的化学性质不是决定细菌量的主导因素.

表 2 珠峰地区东绒布冰川与其他冰冻环境中细菌的相似性比较

珠峰雪中细菌	其他细菌 GenBank 序列号	冰冻环境	相似性
RBL9-34	AF479378	南极 Taylor Dome 冰川冰	98%
RBL9-51	AJ440986	南极湖	98%
	AY315172	冰川冰及冰川沉积物	99%
RBL7-37	AY315177	冰川冰及冰川沉积物	99%
RBL7-22	AY315181	冰川冰及冰川沉积物	99%
RBL3-16	AF076162	南极永久湖冰	98%
RBL7-44	AY218596	南极沉积物	96%
RBL10-19	AY439272	北极格陵兰冰芯	94%
RBL10-20	AY439272	北极格陵兰冰芯	95%
RBL5-32	AF395036	南极 Vostok 湖增生冰	96%
RBL3-13	AF076162	南极湖冰	98%
RBL7-45	AY439260	北极格陵兰冰芯	99%
RBL7-59	AY169423	北极格陵兰冰芯	96%

3.2 细菌群落结构与季节的关系

雪坑中 6 个层位的细菌有不同的群落结构(表 3), *γ-Proteobacteria* 存在于 6 个层位中, *Firmicutes* 和 *β-Proteobacteria* 出现在 5 个层位中, 其他类则在不同层位各有分布, 这种群落结构的不同与马兰及慕士塔格冰芯中不同深度的细菌层状性分布特征相似^[13,15], 说明雪层中微生物对不同环境变化的反映.

表 4 列出了不同层位克隆文库的多样性指数, 多样性最高的层位是冬季沉积的 RBL-7, 夏季沉积的 RBL-4 中细菌的多样性最低. RBL-7 (冬季雪)的细菌数(6963 细胞/m³)是 6 个层位中最低的, 但多样性却最高, 夏季沉积的 RBL-9 中细菌数(20689 细胞/m³)是 RBL-7 的 2.97 倍, 是 6 个层位中最高的, 但多样性却很低, Shannon 的值远远低于 RBL-7. 和数量一样, 冰雪中细菌的种类也是多种因素的综合. 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, 冬半年西风急流由干旱区带来的细菌与夏季海洋性季风带来的细菌在种类上会有很大的区别. 另一方面, 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. 夏季雪细菌数量比冬季高, 但多样性低于冬季可能是受

上述多方面的影响.

珠峰地区细菌的群落结构有明显的季节性差异, 显现冬、夏季两种群落面貌. 9 个属仅在冬季积雪中出现; 7 个属和 7 个未定属仅存在于夏季; 7 个属和 1 个未定属为冬夏季共有属; 其中 *Acinetobacter*, *Leclercia* 和 *Anoxybacillus* 属是 3 个主要的共有的属, 在数量上也是优势属, 属于这 3 个属的克隆占总量的 61%.

Acinetobacter 属广泛存在于土壤和水环境中, 估计淡水中每升含量超过 10⁵, 在土壤中存在的 *Acinetobacter* 可降解多种复合化合物, 如卤化芳香族物质、酚、多氯联苯(PCB)¹⁾. 由于该属在环境中的多种来源和较高的数量, 较多能被气团携带并随雪沉积, 因而在冬夏季雪的 6 个层位中均有分布, 并且是数量最多的属. 该属也分布在全球其他冰雪环境中, 在南极 Taylor Dome 冰芯中分离获得 *Acinetobacter calcoacetice* 纯种^[21], RBL9-11 与此纯种的同源性达到 98%.

Leclercia 属是肠菌的一种, 在水、植物、食品、病人的唾液、血液、伤口等多种环境中均有分布¹⁾, 从印度油田储存油泥 100 多年的坑里分离出 *Leclercia adecarboxylata* 纯种^[24], 发现能降解 2~3 个苯环的多

表 3 珠峰地区东绒布冰川各大类细菌在雪层中的分布^{a)}

	Act	α	β	γ	CFB	Cyano	Firm	Eukar	TM7
RBL-3				30	1	1	6		
RBL-4		1		40			3	1	
RBL-5		3	3	26		4	5		
RBL-7	2	1	3	13	2	9	4		1
RBL-9	8	2	13	9					
RBL-10		3	1	29			5		
所占比例	4.37%	4.37%	8.73%	64.19%	1.31%	6.11%	10.04%	0.44%	0.44%

a) Act, *Actinobacteria*; α, *α-Proteobacteria*; β, *β-Proteobacteria*; γ, *γ-Proteobacteria*; Cyano, *Cyanobacteria*; Firm, *Firmicutes*; Eukar, *Eukaryotic chloroplast*; TM7, *TM7 candidate phylum*

表 4 珠峰地区东绒布冰川细菌 RFLP 多样性指数

	RBL-3	RBL-4	RBL-5	RBL-7	RBL-9	RBL-10
带型	11	9	9	13	8	11
克隆数	38	45	41	35	32	38
覆盖率	84.2%	88.8%	92.6%	82.8%	87.5%	86.8%
优势度	0.1925	0.3314	0.21	0.1347	0.2461	0.2078
Shannon 指数	1.945	1.45	1.805	2.253	1.635	1.942
Simpson 指数	0.8075	0.6686	0.79	0.8653	0.7539	0.7922
Evenness 指数	0.636	0.4739	0.6756	0.7322	0.641	0.6337

1) The Prokaryotes. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

环芳烃从而引起人们的重视. *Leclercia* 属数量在珠峰地区菌群中位列第2, 在冬夏季的5个层位均有分布, 北极格陵兰冰芯中也分离到与来自人类及动物粪便相似的序列^[25], 该属在雪中的大量存在可能与青藏高原及珠峰地区的家畜主要为牦牛有关, 而且牦牛也是珠峰高海拔区登山活动中主要的运输工具, 其活动范围可到位于6500 m的珠峰登山前进营地. 同时, 在广大的藏区, 牛粪作为主要的燃料在庭院中晒干并贮存, 使得青藏高原及珠峰地区有丰富的肠菌生境, 推测 *Leclercia* 属可能来自大量的牦牛粪, 也可能是风尘带来土壤中附着的. 虽然在北极格陵兰冰芯、南极土壤、青藏高原马兰冰芯中都分离出可降解复合有机化合物的细菌, 如CFB类群的细菌^[13,14,25,26], 但珠峰雪中2个具有降解功能的属种在数量上占总数的一半(51%), 此外还存在同样具降解复杂芳香族有机物的CFB类群的细菌, 这一现象值得深入研究. Xie 等人^[27]在喜马拉雅山7000 m达索普冰芯中检出了源于石油残余物的有机质, 表明这一偏远的、处于对流层中上部的地区已受到人类活动有机质的污染, 污染源主要来自中东地区和印度. 对本研究同一雪坑的雪样 POPs 研究结果也表明, 各个层位中都存在多环芳烃, 含量与北极和阿尔卑斯山区相当(未发表, 王小萍私人交流). 珠峰冰雪微生物群落中主要种群具降解功能, 说明微生物表现了与其他环境参数一致的信息, 但这是否是生物对环境的反应及其之间的关系, 还有待进一步的研究.

Anoxybacillus 属在5个层位中都有分布, 占总数的10%. *Anoxybacillus* 分布于热泉口, 是喜温菌, 可产生孢子^[28]. 北极格陵兰冰芯中1-17与1-43序列与冰岛地热系统中获得的喜温菌 *Thermus scotoductus* 同源相似^[25], 说明极冷环境下也可能存在随气团搬运的非嗜冷和耐冷菌种. 珠峰雪中 *Anoxybacillus* 属的菌种可能来自青藏高原上众多的热泉.

冬夏两季共有的属除前面所述的3个属外, 还有 α -*Proteobacteria* 中的 *Sphingomonas* 属. β -*Proteobacteria* 中 *Acidovorax* 属. γ -*Proteobacteria* 中1个未定属. *Cyanobacteria* 类的 *Chamaesiphon* 属. *Sphingomonas* 属中的种较大部分细菌能经受辐射与脱水, 能在恶劣的条件下生存, 因此能随气团传输; 在南极土壤、南极 Vostok 冰芯和植物中都有分布^[29,30]. *Acidovorax* 是一种植物病原细菌, 有些纯种从盐沼中分离^[31]. *Cyanobacteria* 是含叶绿素能进行放氧型光合作用的

原核生物, 有强的抵抗力, 可在贫瘠沙滩荒岩上生长, 称为“先锋生物”, 在沙漠、南极冰、热泉等多种极端环境中出现^[24].

在夏季出现的14个属中含 α -*Proteobacteria* 中的 *Stappia* 和 *Ruegeria* 属; β -*Proteobacteria* 中 *Rhodoferrax* 属和1个未定属; γ -*Proteobacteria* 中 *Yersinia* 和 *Enterobacter* 属及5个未定属; *Firmicute* 类的 *Brevibacillus*, CFB类群的 *Flectobacillus* 以及一个和 *Eukaryotic chloroplast* 相关的克隆. *Ruegeria atlantica* 为海洋菌种, 可降解由海洋浮游植物生产的生源气体二甲基硫(DMS)及其前身二甲基硫丙酸(DMSP)^[32]. *Stappia* 是将海洋性土壤杆菌属(*Agrobacterium*)划出的一个新属, *Stappia stellulata* 为 *Stappia* 的模式种, *Stappia marina* 分离自潮间带. 研究表明, 所有的 *Stappia* 种都可氧化 CO, 具有 CO dehydrogenase (coxL)基因^[33]. *Rhodoferrax ferrireducens* 是一种从海湾表层沉积物中分离出来能还原 Fe(III)的细菌, 即使在4°C时仍能生长并还原 Fe(III)^[34]. 这些属都与海洋环境相关. 珠峰地区夏季水汽是由南亚季风从孟加拉湾和阿拉伯海带来, 水汽及降水凝结核都可能是细菌的附着体, 夏季雪中细菌也相应地呈现一种“海洋性面貌”.

Eukaryotic chloroplast 是来源于藻类的16S rRNA 基因序列^[35], 指示该地区冰雪中可能含有雪藻. Yoshitaka 等人^[11]的研究表明, 喜马拉雅山南坡5430 m冰川雪藻数量为 0.9×10^3 细胞/mL, 喜马拉雅山北坡6350 m的雪藻尚待进一步研究. 本研究的 RBL4-22 序列是首次从冰雪样品构建的16S rRNA 克隆文库中获得的和藻类相关的16S rRNA 基因序列.

在冬季出现的9个属中, 有 α -*Proteobacteria* 中 *Afipia*, *Roseobacter* 属; β -*Proteobacteria* 中 *Curvibacter*, *Ploaromonas* 属; γ -*Proteobacteria* 中 *Rhodanobacter* 和 *Alteromonas* 属; *Actinobacteria* 中 *Brevibacterium* 属; CFB类群的 *Flavobacterium* 属; *Cyanobacteria* 中 *Synechococcus* 属; *Candidate phylum TM7* 大类. *Afipia* 属分离自猫抓病病人口腔, 后来从医院水系中获得^[36]. *Roseobacter* 属由好氧的海洋性细菌组成, 对全球大洋中 *Roseobacter* 细菌进行研究发现在两极海区中数量最高^[37]. *Polaromonas vacuolata* 为分离自南极 Pamler 半岛海水中嗜寒的气泡非自氧细菌^[38]. *Alteromonas* 为异养、耐冷、轻-中度嗜盐菌, 存在于海水和海冰中, 从南极海中也分离出该属种, 有的纯种

生存于深海热液口^[24,39]. *Candidate division* TM7 是由一些特有的环境序列构成的新的细菌分支, 序列有来自泥炭沼泽的 1 个序列、成熟森林土壤的 2 条序列及矿石冶炼炉的 7 条序列^[40]. 本研究在冰雪环境获得该序列, 拓宽了该类序列的可能生境. *Flavobacterium* 在青藏高原的马尔冰芯、古里雅冰芯中都存在^[13,21]. 冬季雪中微生物与海洋和陆地多种环境相关, 这可能与珠峰地区冬季大气环流有关, 冬季西风急流从干旱半干旱区带来大量陆源尘埃, 同时也带来北大西洋的水汽. 海洋性气团和干旱区的粉尘, 使得冬季有比夏季更复杂的源区环境, 细菌的多样性也高. 冬季雪中的细菌普遍比仅在夏季出现的属显示更强的耐冷性, 这可能是因为冬季较低的温度, 在传输过程对细菌进行了筛选, 只有那些耐冷的菌种才能抵抗严寒, 随降雪沉积于冰川.

4 结论

珠峰地区冰雪中含有丰富的微生物, 这些微生物可能来自海洋陆地等多种环境, 呈现出较高的多样性. 细菌的数量与群落具有明显的季节特征. 夏季雪中细菌量要大于冬季. 珠峰地区冰雪中细菌具丰富的多样性, 35 个 16S rRNA 序列分属 α , β , γ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *CFB*, *Cyanobacteria*, *Eukaryotic chloroplast*, *Candidate phylum* TM7 共 9 大类, 以 γ -*Proteobacteria* 为主, 其中 *Acinetobacter* 和 *Leclercia* 属是整个菌群中的优势属, 占总数的 51%. 珠峰地区夏、冬季雪中细菌具不同的群落结构, 夏、冬季雪中的细菌在有共有属种的同时, 又具有不同的属种. 共有属种以 *Acinetobacter* 和 *Leclercia* 属为主, 可能是青藏高原局地源的菌种, 夏季较多细菌属种与海洋环境相关, 冬季细菌则与海洋和陆地多种环境相关, 并具有更强的耐冷性. 多项环境指标与微生物群落的综合研究表明, 雪的物理性质和营养物质不是微生物数量的决定性因素. 细菌数量和群落结构的季节差异, 是受珠峰地区夏、冬两季大气环流和气候特征的影响.

致谢 本工作受国家重点基础研究发展计划(编号: 2005CB422004)、国家自然科学基金(批准号: 40401054, 40121101)、中国科学院知识创新项目(批准号: KZCX3-SW-339)及“百人计划”项目资助.

参 考 文 献

1 Qin D, Mayewski P A, Wake C P, et al. Evidence for recent climate change from ice cores in the central Himalayas. *Ann Glaciol*, 2000,

31: 153—158
 2 Qin D, Hou S, Zhang D, et al. Preliminary results from the chemical records of an 80.4 m ice core recovered from East Rongbuk Glacier, Qomolangma (Mount Everest). *Ann Glaciol*, 2002, 35: 278—284
 3 任贾文, 秦大河, 康世昌, 等. 喜马拉雅山中段冰川变化及气候暖干化特征. *科学通报*, 2003, 48(23): 2478—2483
 4 侯书贵, 秦大河, Wake C P, 等. 珠穆朗玛峰地区冰川净积累量变化的冰芯记录及其气候意义. *科学通报*, 1999, 44(21): 2336—2342
 5 Kang S, Qin D, Mayewski P A, et al. Climatic and environmental records from the Far East Rongbuk ice core, Mt. Qomolangma (Everest). *Episodes*, 2001, 24(3): 176—181
 6 Kang S, Mayewski P A, Qin D, et al. Twentieth century increase of atmospheric ammonia recorded in Mt. Everest ice core. *J Geophys Res*, 2002, 107(D21), 10.1029/2001JD001413, 4595, ACL13-1-ACL13-9
 7 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏藻类. 北京: 科学出版社, 1992. 509
 8 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏真菌. 北京: 科学出版社, 1992. 226
 9 熊克娟, 汤显春, 谢树成. 西藏雪层中酵母菌的分离鉴定. *微生物学杂志*, 1999, 19(2), 58—62
 10 Baghela V S, Tripathia R D, Ramtekeb P W, et al. Psychrotrophic proteolytic bacteria from cold environment of Gangotri glacier, Western Himalaya, India. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36: 654—659
 11 Yoshitaka Y, Shiro K, Shuji O. A community of snow algae on a Himalayan glacier: change of algal biomass and community structure with altitude. *Arct Alp Res*, 1997, 29(1): 126—137
 12 姚檀栋, 向述荣, 张晓君, 等. 马尔和普若岗日冰芯记录的微生物学特征. *第四纪研究*, 2003, 23: 193—199
 13 向述荣, 姚檀栋, 安黎哲, 等. 马尔冰芯细菌群落结构变化与气候环境的关系. *科学通报*, 2004, 49(17): 1762—1769
 14 张晓君, 马晓军, 姚檀栋, 等. 马尔冰芯 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
 15 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
 16 Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: What 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 47: 161—177
 17 Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G, et al. The RDP- II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 173—174
 18 Tian L, Yao T, Schuster P F, et al. $\delta^{18}\text{O}$ concentrations in recent precipitation and ice cores on the Tibetan Plateau. *J Geophys Res*, 2003, 108(D9): 4293—4302
 19 Tian L, Yao T, Zhang X. $\delta^{18}\text{O}$ in precipitation and moisture sources upon the Tibetan Plateau. *Cryosphere*, 1996, 21: 33—39
 20 田立德, 姚檀栋, White J W, 等. 喜马拉雅山中段高过量氘与西风带水汽输送有关. *科学通报*, 2005, 50(7): 669—773

- 21 Christner B C, Mosley-Thompson E, Thompson L G, et al. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus*, 2000, 144(2): 479—485
- 22 Liu K, Yao Z, Thompson L G. A pollen record of Holocene climate changes from the Dunde ice cap, Qinghai-Tibetan Plateau. *Geology*, 1998, 26: 135—138
- 23 Takabiro S, Koji M, Kazunari U, 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
- 24 Sarma P M, Bhattacharya D, Krishnan S. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(5): 3163—3166
- 25 Peter P S, Miteva V I, Brenchley J E. Phylogenetic analysis of anaerobic psychrophilic enrichment cultures obtained from a greenland glacier ice core. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(4): 2153—2160
- 26 David J S, Jackie M A, Caroline E B, et al. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 53: 141—155
- 27 Xie S C, Yao T D, Kang S C, et al. Geochemical analyses of a Himalayan snowpit profile: Implications for atmospheric pollution and climate. *Organic Geochem*, 2000, 31: 15—23
- 28 Belduz A O, Dulger S, Demirbag Z. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1315—1320
- 29 Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis* on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 1405—1417
- 30 Hans J B, Ewald B M, Denner S B. *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*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1253—1260
- 31 Gardan L, Dauga C, Prior P. *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 235—246
- 32 Moran M A, González J M, Kiene R P. Linking a bacterial taxon to sulfur cycling in the sea: studies of the marine *Roseobacter* Group. *Geomicrobiol J*, 2003, 20: 375—388
- 33 Kim B C, Park J R, Bae J W, et al. *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56: 75—79
- 34 Finneran K T, Johnsen C V, Lovley D R. *Rhodeferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of $Fe(III)$. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 669—673
- 35 Crump B C, Hobbie J E. Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnol Oceanogr*, 2005, 50(6): 1718—1729
- 36 Brenner D J, Hollis D G, Moss C W, et al. Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 2450—2460
- 37 Selje N, Simon M, Brinkhoff T. A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature*, 2004, 427(29): 445—448
- 38 Irgens R L, Gosink J J, Staley J. *Polaromonas vacuolata* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, marine, gas vacuolate bacterium from Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1996, 46(3): 822—826
- 39 Raguene G, Peres A, Ruimy R, et al. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J Appl Bacteriol*, 1997, 82: 422—430
- 40 Hugenholtz P, Tyson G W, Webb R I. Investigation of *Candidatus Division TM7*, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 411—419

(2005-12-28 收稿, 2006-04-17 接受)