

南极阿德雷岛地表沉积物中细菌多样性 及对环境的影响

张锐 林念炜 赵晶 曾润颖*

国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局海洋生物工程重点实验室, 厦门 361005;

朱仁斌 孙立广 刘晓东

中国科学技术大学, 合肥 230026

摘要 提取南极阿德雷岛沉积物柱状样各层次的总 DNA, 利用 PCR-RFLP 方法, 对沉积物中的细菌多样性及分布进行了研究, 并探讨了它与环境的关系. 结果表明, 沉积物中的细菌多样性丰富, 分属于 8 个类群, 以 CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacterioides*) 类群和 *Proteobacteria* 类群的 β - γ -亚群为主. 在 7 cm 左右深度的沉积物中, 可培养微生物和 16 S rDNA 序列多样性与其他深度的沉积物有明显不同, 推测与环境的变化有关. 同时还发现了大量与降解有机化合物相关的细菌, 表明阿德雷岛的微生物生态系统已经受到了人类活动的影响.

关键词 南极 地表沉积物 16 S rDNA 细菌多样性 环境变化

阿德雷岛位于南极半岛尖端附近的南设德兰群岛的乔治王岛, 与菲尔德斯半岛沙坝连接, 属亚南极区. 该岛为企鹅聚集地, 主要有金图企鹅、帽带企鹅、阿德雷企鹅等, 在繁殖期约有 11 000 只, 是国际南极科学研究委员会 (SCAR) 确定的特别生态保护区. 该区年降水量约 600~700 mm, 季节分布均匀, 以降雪为主, 夏季平均气温在 0℃ 以上. 沉积物主要来源于给水区风化剥蚀产物、苔藓地衣的残体以及企鹅粪便和残骨, 这为研究它们之间的联系提供了必要的材料. 阿德雷岛附近分布有中国长城站、俄罗斯别林斯高晋站和智利马尔什站 (图 1), 对研究人类活动对南极环境的影响具有重要的参考意义. 目前, 对该地区沉积物研究开展得十分有限, Sun 等^[1]研究了阿德雷岛沉积物中的元素特征和规律, 并据此提出了 3000 年来企鹅数量的变化模型. 微生物在南极相对简单脆弱的生态系统中扮演着比普通生态系统更为重要的角色, 微生物生态可以敏锐地反映整个南极生态系统的变化, 但是, 目前尚未见到有关该地区沉积物中微生物生态的报道.

近年来, 分子生物学手段在微生物生态研究方

面的应用越来越广泛^[2]. 传统的微生物生态研究的方法需要用合适的培养基从样品中分离出细菌的纯



图 1 阿德雷岛地理位置

图中 A 点为采样点

2003-01-27 收稿, 2003-05-06 收修改稿

* 联系人, E-mail: rainz@public.xm.fj.cn

培养, 鉴定种属, 然后研究菌株的生理生化特性、遗传特性及其与环境的关系. 由于样品采集、运输、保存和菌株分离方法的影响及微生物本身的生长规律, 可培养微生物在全部微生物中所占的比例只有0.5%左右^[3], 所以这种方法有很大的局限性. 利用分子生物学方法, 直接从样品中提取总DNA进行分析, 绕开了菌株分离这一瓶颈, 可以最大限度地获得相关微生物的遗传信息, 从而较为全面地分析整个样品所处地区的微生物生态^[2,4].

本文利用分子生物学方法, 直接提取环境样品中的总DNA, 通过PCR-RFLP方法研究了阿德雷岛沉积物中细菌的多样性, 初步探讨了南极阿德雷岛沉积物中细菌类群的分布规律及其与气候变化、人类活动影响之间的关系.

1 材料与方法

1.1 样品采集和处理

阿德雷岛沉积物柱状样于2001年中国第18次南极考察期间, 用经过清洁处理的PVC塑料管在南极阿德雷岛(62°13'S, 58°56'W)企鹅聚集区下小集水区采集(图1), 泥芯长约10 cm. 样品采集后保存于-20℃带回实验室, 在无菌超净台分装后, 保存于-70℃超低温冰箱. 沉积物表层为黄色薄土层(约1 mm), 随着深度的增加, 土质逐渐变软, 颜色由浅变深再变浅, 整个柱子有异味. 除底部外, 每1 cm分一层, 共分得9层. 去除样品的表层, 取内部土样进行实验分析.

1.2 可培养微生物统计

取1 g土样, 用无菌淡水和无菌南极海水按不同倍数稀释后分别涂布通用培养基LB(盐度约1%)和2216E(南极海水配制, 盐度约3.4%), 在4℃冰箱培养约10 d后统计平板上的菌落数目. 重复3次.

1.3 总DNA提取

采用土样DNA提取试剂盒(Soil DNA Isolation Kit, Mo Bio公司)提取, 每层取0.5 g沉积物, 按试剂盒说明书操作, 提取总DNA.

1.4 16S rDNA序列扩增

利用细菌16S rDNA的特异性引物^[5]: Eubac27 F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和Eubac1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 以每个层次的总DNA为模板扩增细菌的16S rDNA

序列. PCR反应参照文献[5]进行.

1.5 RFLP分析

将PCR产物(约1500 bp)克隆到pBluescript载体中, 通过蓝白筛选, 挑取白色克隆子, 用通用引物T3, T7进行菌落PCR, 以PCR产物为模板, 采用Eubac27 F和Eubac1492R进行二次PCR扩增, 对PCR产物进行双酶切(4碱基限制性内切酶Afa I和Msp I), 经3%琼脂糖电泳后分析电泳条带类型, 挑取不同谱型的克隆子进行测序, 测序引物为T3, T7, 357F(5'-TACGGGAGGCAGCAG-3')和1114R(5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 由上海生物工程公司完成.

1.6 序列分析与提交

将所得序列与EMBL数据库中的已有序列进行同源性比较(FASTA3程序), 采用Clustal W 1.81软件进行系统发育分析, 通过RDPII数据库进行验证. 本研究所有序列均已提交至GenBank数据库, 收录号见图2.

2 结果与分析

2.1 可培养微生物的计数

南极阿德雷岛沉积物中微生物的三次培养结果表明, 沉积物中的微生物数量比菲尔德斯半岛其他地区多^[6], 最多达到 1×10^7 个/g土样. 在整个柱状样中, 微生物数量从表层到深层逐渐减少, 而在第7 cm处的沉积物中出现反常, 即使用不经稀释的上清液培养也只能得到不足100个菌落, 明显比沉积物的其他深度少(图3).

2.2 16S rDNA序列扩增和RFLP分析

在9个层次的沉积物中共得到阳性克隆子921个, 经RFLP分析后, 得到约300个不同的谱型, 测序结果经DNAMAN软件比较同源性后共得到262个16S rDNA全序列. 各个深度沉积物的PCR-RFLP结果见表1. 在目前的微生物多样性的研究中, 一般通过分析50~100个阳性克隆子来研究环境样品中的优势微生物类群^[2,4,7], 因此, 本实验所得数据足以反映南极阿德雷岛地区优势细菌类群的生态多样性. 与可培养微生物统计结果相对应, 在距表层7 cm深度的沉积物中出现RFLP谱型和基因型数较少的异常现象.

0.02
|

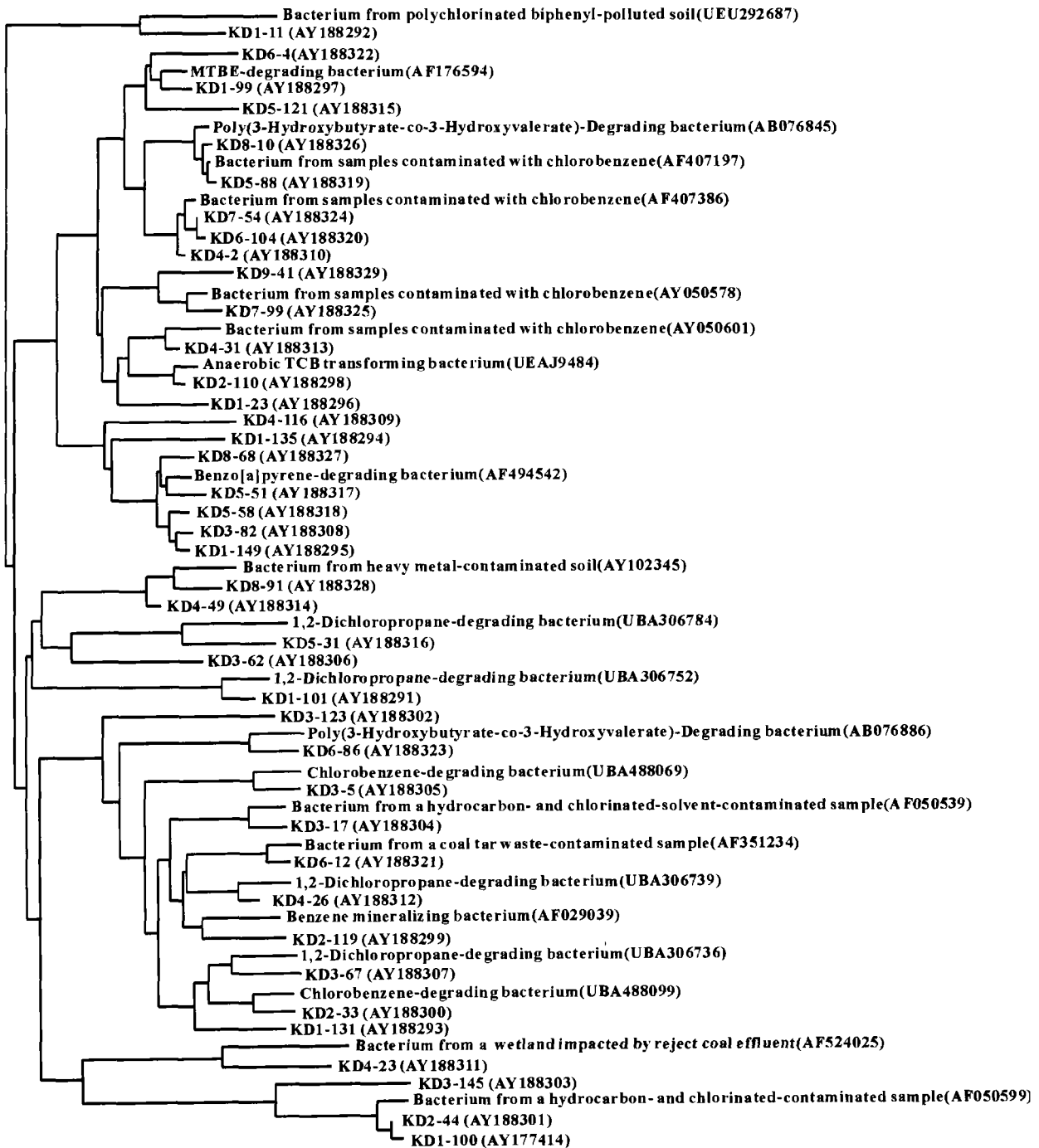


图 2 沉积物中可降解有机物的菌株的系统发育树

黑体编号表示本研究所得 16S rDNA 序列，“—”左边的数字表示深度(cm)，
右边的数字表示克隆子编号，括号内为 GenBank 收录号

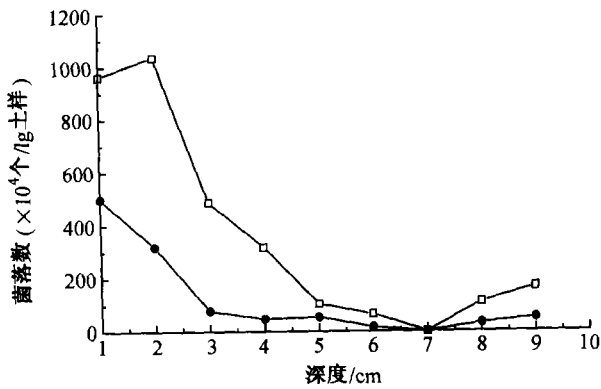


图3 可培养微生物计数

—●— LB培养基, —□— 2216E培养基.

表1 沉积物中16S rDNA序列的PCR-RFLP分析结果

深度/cm	PCR数	阳性克隆(阳性率%)	RFLP谱型数	基因型数
1	155	108(69.6)	32	28
2	145	108(74.5)	>35	35
3	145	105(72.4)	>35	31
4	123	82(66.7)	34	33
5	133	88(66.2)	30	27
6	145	110(75.9)	34	34
7	134	103(76.1)	26	22
8	141	88(62.4)	34	26
9	177	129(72.9)	34	26
总计	1298	921(70.9)	大约300	262

2.3 16S rDNA序列系统发育分析

同源性比较和系统发育分析的结果表明, 南极阿德雷岛沉积物上层(0~4 cm)的细菌多样性明显比深层丰富(表1). 细菌类群包括 *Proteobacteria* 类群的 α -, β -, γ -, δ -, ϵ -亚群, CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacterioides*)类群, 革兰氏阳性菌, 浮霉菌等. 其中 CFB 类群、 β -*Proteobacteria* 和 γ -*Proteobacteria* 亚群各占 23.7%, 22.9% 和 27.1%, 属优势类群. 在系统发育树中和 16S rDNA 序列最相近的菌株的同源性在 78.1% 到 99.7% 之间, 每个层次中的主要细菌类群见图 4, 在企鹅粪便沉积物中, γ -*Proteobacteria* 亚群的细菌从表层到底层逐渐增多, β -*Proteobacteria* 亚群和 CFB 类群的细菌则没有表现出明显的规律, 但两者在各层次沉积物中的分布却成反比关系. CFB 类群的细菌在第 7 cm 深度的沉积物中最少. 值得注意的是, 发现该地区有很多细菌都具有降解某些有机物的能力, 而这些有机残留物都是人类活动影响的结果, 见图 2.

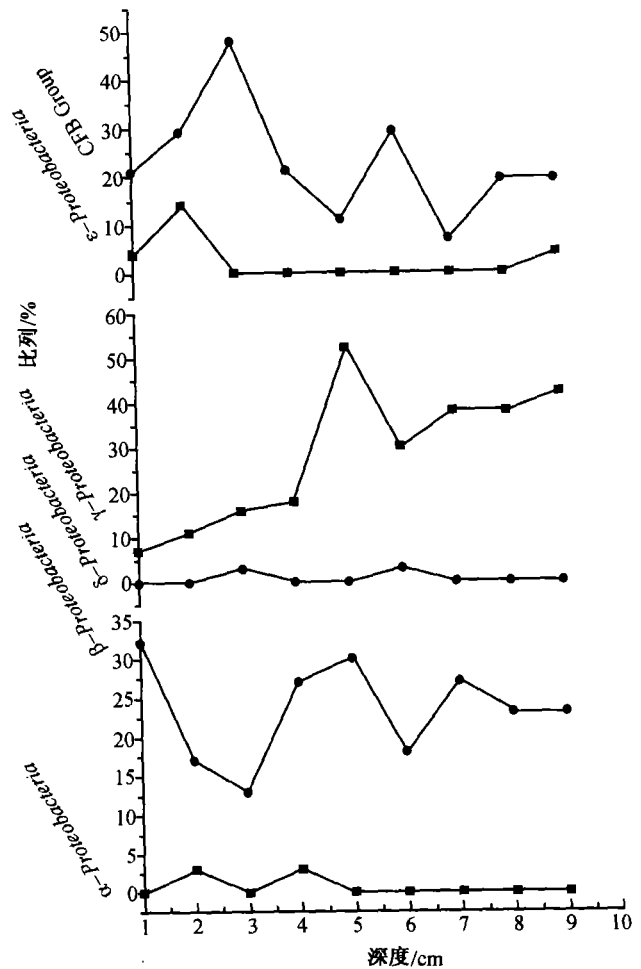


图4 沉积物中各主要细菌类群所占的比例及分布

3 讨论

与南极其他地区(海边^[8,9]、湖泊沉积物^[10,11]、冰川^[12]、海冰^[13]、考察站排污口^[14]等)微生物多样性的研究相比, 本研究由于采样地点的特殊性, 因此细菌多样性和上述地区有明显的不同. 企鹅粪便和苔藓残骸为该地区的生态系统提供了丰富的营养物质, 同时阿德雷岛在南极夏季的气温也适宜微生物的生长, 因此该地区沉积物中细菌的数量和多样性都比其他地区丰富. 序列同源性比较发现, 大部分 16S rDNA 序列(约占 65%)和数据库中菌株的最高同源性低于 85%, 现在一般认为, 细菌 16S rDNA 序列同源性低于 97% 即属于不同的种^[15]. 因此, 本研究发现了大量尚未报道的菌株的遗传信息.

南极阿德雷岛沉积物中以 CFB 类群和 β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* 亚群的细菌为主, 这三个类群, 特别是 CFB 类群的细菌与几丁质、氨基

酸、DNA、脂类和蛋白质等物质的降解紧密相关^[16]。这些有机物质的沉积会造成 CFB 类群细菌的增加^[17]。与其他自然沉积物相比,阿德雷岛沉积物中含有丰富的由企鹅粪便提供的几丁质等营养物质,因此可以 CFB 类群细菌作为指示类群,采用该类群特异的 16 S rDNA 序列设计探针,通过 DNA 杂交等手段研究该类群细菌在不同沉积物样品中的种类组成、数量及分布,进一步了解企鹅粪便沉积物内的微生物生态特征。

γ -Proteobacteria 亚群的细菌具有很强的适应性,它们在不同环境的生态系统中都有广泛的分布^[2,7,10],其中包括很多参与硫代谢,氮代谢和甲基代谢等厌氧细菌的种类。在我们的研究中也发现了类似的厌氧菌株,这也可以解释 γ -Proteobacteria 亚群细菌从表层到底层逐渐增多的现象。 β -Proteobacteria 亚群和 CFB 类群之间相互“拮抗”的关系则值得进一步的分析研究。

阿德雷岛沉积物柱状样的元素(S, P₂O₅, CaO, Zn 等)变化过程在距表层 7 cm 处有一突变点^[1],本研究则在相同深度的沉积物中发现可培养微生物的数量,细菌的 16 S rDNA RFLP 谱型数,基因型数和 CFB 类群细菌数量的异常。这些异常与不同土层中的营养物质含量、有机物含量、土壤酸碱度、土壤通气状况等因素有关,而在以企鹅粪便沉积为主的阿德雷岛地表沉积物中,这些因素都与企鹅的数量和分布紧密相关。因此,我们推测可能在第 7 cm 沉积物所处的地质年代中阿德雷岛的气候环境发生了较为剧烈的变化,导致与之紧密相关联的生态系统也发生变化,影响了企鹅数量和苔藓的分布,进而使以企鹅粪便和苔藓残体为主的沉积物中的微生物数量和组成发生异常。

从系统发育树中可以看出,占总数 15% 的菌株具有降解某些有机化合物的能力,包括甲苯、林丹(一种农药)、多氯化联苯(PCB)、1, 2-二氯丙烷、甲基叔丁基醚(MTBE)等。它们在所有的层次中均有分布,但从表层到底层逐渐减少,到第 9 cm 处只发现一株这样的细菌。很多研究已经在南极土壤和沉积物中检测到了上述有机化合物^[18,19],我们的研究则从微生物生态的角度证明了它们的存在和影响。从降解有机物的菌株所占的比例来看,该地区的有机物污染和石油残留物污染已经影响到了微生物的生态环境并产生了一定的后果。关于阿德雷岛和南极其他地区的沉积物或者土壤中重金属的污染

也有一些报道^[18,19],但本实验只发现了一株与重金属污染相关的菌株,可以推测虽然周围有众多活动频繁的考察站,但阿德雷岛的重金属污染可能还未严重影响到微生物生态系统。

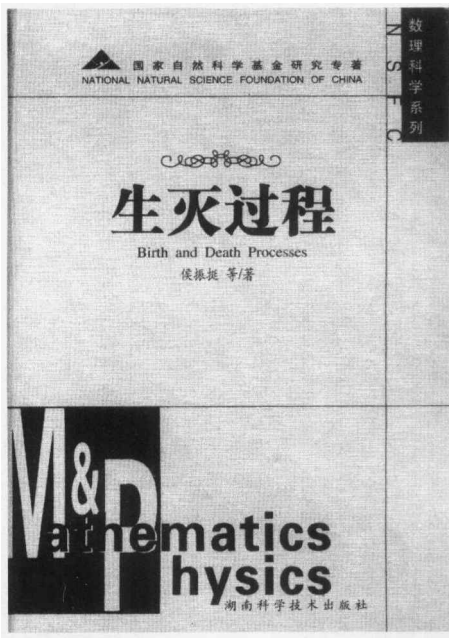
阿德雷岛的生态系统对自然环境的变化有很大的脆弱性和敏感性,关于该地区的地质、生态学、海洋学等学科的研究已经显示了阿德雷岛独特的科研价值,而且,阿德雷岛又处于三个科学考察站的包围之中,是南极受人类影响最强烈的地区之一^[18,19],这也为我们研究人类活动对南极地区生态系统的影响提供了对象。本研究采用了长约 10 cm 的沉积物柱状样,时间跨度大约 500 年^[1,20],属于阿德雷岛地区生态变化比较剧烈的时间跨度。我们获取了大量阿德雷岛沉积物中的细菌 16 S rDNA 信息并初步探讨了其对环境的响应,为下一步深入研究南极企鹅粪便沉积物中微生物多样性与环境变化、环境污染以及人类活动影响之间的关系提供了参考资料。

致谢 美国加州大学圣地亚哥分校 Scripps 海洋研究所的 Douglas H. Bartlett 教授提出了宝贵意见,中国科学技术大学极地环境研究室的汪建君博士协助采样并提出建议,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Sun L G, et al. A 3,000-year record of penguin populations. *Nature*, 2000, 407: 858
- 2 Spring S, et al. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: Molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(5): 573
- 3 Amann R I, et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143
- 4 Barns S M, et al. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5): 1609
- 5 DeLong E F. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12): 5685
- 6 刘大力,等. 南极长城站微生物区系调查. *生物多样性*, 1994, 2(2): 76
- 7 Ravenschlag K, et al. High bacteria diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(9): 3982
- 8 Murray A E, et al. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2585
- 9 Bruni V, et al. Psychrotrophic bacteria from a coastal station in the Ross sea (Terra Nova Bay, Antarctica). *New Microbiol*, 1999, 22

- (4): 357
- 10 Brambilla E, et al. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles*, 2001, 5(1): 23
 - 11 Bowman J P, et al. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Environ Microbiol*, 2000, 2(2): 227
 - 12 Karl D M, et al. Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. *Science*, 1999, 286(5447): 2144
 - 13 Gosink J J, et al. Biodiversity of gas vacuolate bacteria from Antarctic sea ice and water. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(9): 3486
 - 14 McFeters G A, et al. Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding a sewage outfall. *Water Res*, 1993, 27(4): 645
 - 15 Giovannoni S J, et al. Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes. In: Joint I eds. *Molecular Ecology of Aquatic Microbes*, Vol. G38, NATO ASI series. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 217~248
 - 16 O'Sullivan L A, et al. New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1): 201
 - 17 Rosselló-Mora R, et al. The response of the microbial community of marine sediments to organic carbon input under anaerobic conditions. *Syst Appl Microbiol*, 1999, 22(2): 237
 - 18 赵 焯, 等. 人类活动对南极乔治王岛菲尔德斯半岛环境的影响. *极地研究*, 1998, 10(4): 262
 - 19 陈 杰, 等. 人类活动对南极陆地生态系统的影响. *极地研究*, 2000, 12(1): 61
 - 20 赵 焯, 等. 南极菲尔德斯半岛苔藓泥炭层¹⁴C测年. *科学通报*, 1999, 44(12): 1342



国家自然科学基金研究专著

《生灭过程》侯振挺 等 著

湖南科学技术出版社 定价: 50.00 元

侯振挺教授及其学生潜心研究生灭过程多年, 本书是这些成果的总结. 前4章是关于马尔可夫过程的基础理论, 以后各章包括了生灭过程的定性理论, 含有限个瞬时态生灭过程的全部构造, 随机单调性, 转移函数的各种收敛性, 生灭过程的第一特征值, Kendall猜想等内容. 最后, 为了应用的需要, 还引入及初步讨论了半马式生灭过程.