

# 不同类型冰川雪坑中真核微生物多样性变化 与环境因子关系研究<sup>\*</sup>

马晓军<sup>1,2\*\*</sup> 刘 炜<sup>1</sup> 侯书贵<sup>2\*\*</sup> 陈 拓<sup>2</sup> 秦大河<sup>2</sup>

1. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000; 2. 中国科学院冰冻圈科学国家重点实验室, 兰州 730000

**摘要** 通过变性梯度凝胶电泳(DGGE), 对两个不同类型冰川雪坑中真核微生物的多样性进行比较分析, 并结合冰雪中 $\delta^{18}\text{O}$ 、可溶性离子等多项环境指标, 探讨了不同类型、不同深度冰川雪中真核微生物多样性的差异及其与环境因子关系. 结果表明, 东天山大陆性冰川和玉龙山海洋性冰川雪样中的真核微生物多样性显著不同, 玉龙山雪坑中真核微生物主要为 *Fungi* 和 *Cercozoan*; 东天山雪坑中真核微生物分属于 *Viridiplantae*, *Fungi*, *Cercozoan*, *Alveolata* 和 *Metazoa* 等 5 大类, 其中, *Viridiplantae* 为主要类群, *Fungi* 次之. 大陆性冰川表层雪和深层雪中优势真核微生物多样性差别较大, 但在海洋性冰川雪坑中, 这种变化较小. 不同类型冰川雪中真核微生物的这种差异与环境指标的变化明显相关, 实验证明, 环境与地域对冰雪中真核微生物的多样性有重要影响, 真核微生物同冰雪细菌一样, 可作为气候环境变化的指标.

**关键词** 大陆性冰川 海洋性冰川 真核微生物多样性 DGGE

玉龙雪山位于云南丽江北部, 属于横断山山系, 是中国最南端的一座雪山, 也是欧亚大陆距赤道最近的冰川区. 山上分布的 19 条现代冰川主要受来自印度洋强盛的西南季风气候控制. 玉龙雪山冰川积累、消融量大, 冰温较高, 底部滑动明显, 运动较快, 对气候变化十分敏感, 属于典型的海洋性冰川. 东天山(即天山东部)位于欧亚大陆中部, 四周被沙漠和戈壁包围, 植被覆盖面积小, 在典型大陆性气候条件下, 西风带在天山上空起着主导作用, 东天山冰川区属于内陆半干旱气候控制的大陆性冰川. 目前, 已进行了关于气候和环境对冰川影响及不同类型冰川差异的大量研究<sup>[1-3]</sup>. 但此前的研究大都在雪冰的无机化学方面, 对微生物的研究相对较少.

近年来, 冰雪微生物作为极端低温环境中的主要生命形式已成为生命现象多样性和气候环境变化等基础研究领域所关注的热点之一. Segawa<sup>[4]</sup> 等研究了 Tateyama 山雪中细菌群落结构和数量的季节变化. 刘勇勤等<sup>[5]</sup> 分析了珠穆朗玛峰地区东绒布冰川雪中微生物数量和菌群结构特征, 并指出不同层位雪中细菌群落变化揭示了不同时期气候环境的演变对微生物分布的影响. 研究结果表明冰雪细菌可作为环境气候变化的指标.

相对于冰雪中原核微生物研究而言, 对冰雪中真核微生物的研究更少. 冰川生态系统是一个独特的淡水生态系统, 其中不仅包括原核细菌, 还含有许多真核微生物, 如雪藻、真菌和一些低等动物<sup>[4, 6]</sup>. Takeuchi 等<sup>[6]</sup> 用光学显微镜对祁连山冰川冰尘洞进

2007-08-12 收稿, 2007-10-18 收修改稿

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(批准号: 40576001)、中国科学院百人计划、博士后基金(批准号: 2005038173)和中国科学院冰冻圈与环境联合重点实验室开放基金(批准号: 2005-02)资助项目

<sup>\*\*</sup> 通信作者: E-mail: xjma2005@hotmail.com; shugui@lzb.ac.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

行观察,发现了硅藻、真菌和轮虫等. Yoshimura<sup>[7]</sup>对尼泊尔的喜马拉雅的 Yala 冰川的雪藻群落分析后发现 11 种藻类,且雪藻群落结构在不同海拔也不相同. Buzzini 等<sup>[8]</sup>从意大利高山冰川下的沉积物中发现了许多可培养的酵母菌和一些丝状真菌. 然而,这些对真核冰雪微生物的研究大多数是基于形态学及生理学或是依靠培养手段. 由于冰雪微生物的特殊性,这些传统方法不能完整、直观地反映真核微生物的群落结构. 并且,对于真核微生物种群是否与气候环境变化相关,也知之甚少.

本文采用非培养的现代分子手段——变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术,对两个不同类型冰川雪坑中真核微生物的多样性进行比较分析. 并结合冰雪中  $\delta^{18}\text{O}$ 、可溶性离子等多项环境指标,探讨了不同类型、不同深度冰川雪中真核微生物多样性的差异及其与环境因子变化的关系,为揭示冰雪微生物与其生存环境之间的相互作用机理,更加合理地解释冰雪微生物和气候环境之间的关系提供了知识积累.

## 1 材料和方法

### 1.1 雪坑样品的采集

于 2005 年 7—8 月分别在东天山冰川区(43°03'N, 94°19'E, 海拔 4518 m)和玉龙雪山冰川区(27°06'N, 100°12'E, 海拔 4760 m,)各挖取一个 1.5 m 深的雪坑,在每个雪坑剖面 0—20, 20—50 和 50—80 cm 处各采雪样两份(表 1),一份装入 1 L 洁净灭菌的 Nalgene 瓶中,用于微生物分析;另一份装入预先清洗过的聚乙烯塑料小瓶中,用于雪样理化性质分析. 在野外及运输过程中样品一直处于冷冻状态保存. 采样时穿洁净服戴无菌手套进行所有操作.

### 1.2 雪样理化性质分析

样品由中国科学院寒区旱区环境与工程研究所冰芯实验室进行分析. 分别在 MAT-252 同位素质谱仪, AA 原子吸收光谱仪, Dinex2100 离子色谱仪上进行了  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  等项目的测定分析. 阳离子的测定误差低于 0.2%, 阴离子低于 0.1%,  $\delta^{18}\text{O}$  的测量误差低于 0.5‰.

### 1.3 总 DNA 的提取与 18S-PCR 扩增

将雪样从 -20 °C 冰箱中取出置于 4 °C 下缓慢融化,取融水约 200 mL,用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌 Millipore 微孔滤膜进行过滤,从滤膜上提取总 DNA,提取方法参照文献 [9]. 将灭菌水 200 mL 用上述同样方法处理,用作阴性对照. 选用引物 NS1-GC 和 NS2<sup>[10]</sup> 对 18S rDNA 进行扩增,扩增体系和条件见文献 [10]. 用超纯水和上述从灭菌水中提取的 DNA 做两个阴性对照. PCR 产物直接进行 DGGE 电泳.

### 1.4 DGGE、克隆及测序

使用 DCode<sup>TM</sup> 突变检测系统 (DCode Universal Mutation Detection System, Bio-Rad) 进行变性梯度凝胶电泳(DGGE). DGGE 电泳条件为:6%的聚丙烯酰胺(37.5:1),20%—45%的变性剂梯度(100%变性剂浓度为  $7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的尿素,40%的甲酰胺),85 V 恒定电压,60 °C 电泳 16 h,银染. 选择较亮的条带进行割胶回收<sup>[9]</sup>. 回收 DNA 进行二次扩增,条件同上. 将 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒(OMEGA)纯化后,连接克隆到 pGEM-T Easy (Promega)载体,并转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  的感受态细胞进行蓝白斑筛选,挑选阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司以通用引物 M13 进行测序.

### 1.5 序列比对及系统发育树的构建

将所有序列提交 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),用 Blast 软件在 GenBank 网站上进行相似性搜索,获取相近典型菌株的 18S rDNA 基因序列. 利用 ClustX 和 MEGA3.1 软件,将序列及其相似序列进行遗传关系研究,并用邻接法构建系统发育树状图.

本研究中得到的 18S rDNA 基因序列均已提交 GenBank 数据库,序列登录号为 EF408039—EF408050.

### 1.6 统计学分析

用 BandScan5.0 软件对 DGGE 胶图像中条带的位置和亮度进行处理,依据数字化结果,通过统计软件 PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past>) 计算多样性指数等. 用 SPSS10.0 软件以 Pearson 相关系数进行相关性分析.

## 2 结果

### 2.1 雪样的各项指标

表 1 所示, 不同冰川样品间  $\delta^{18}\text{O}$  的差异较显著, 玉龙山雪样  $\delta^{18}\text{O}$  的平均值为  $-6.226\text{‰}$ , 而东天山  $\delta^{18}\text{O}$  的平均值为  $-8.682\text{‰}$ . 同一冰川不同深度的三个雪样  $\delta^{18}\text{O}$  的差异不大, 但还是可以看到, 东天山不同深度雪样  $\delta^{18}\text{O}$  之间的变化相对于玉龙山样品明显, 尤其是样品 DTS-3 的  $\delta^{18}\text{O}$ , 与 DTS-2 相比变化幅度较大, 达到  $-1.144\text{‰}$ . 东天山雪样的各项阴阳离子浓度普遍高于玉龙雪山, 尤其以  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  和  $\text{NO}_3^-$  较为明显. 这可能由于东天山地区的冰川更接近植被和裸露的土壤, 而这些地区是大气传输颗粒的主要源区<sup>[11]</sup>. 但是也有例外, 如东天山样品 DTS-1 的  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度就明显低于玉龙雪山的 3 个样品.

表 1 东天山(DTS)和玉龙山(YL)地区冰川雪中微生物数量及环境指标的变化

项目	YL-1	YL-2	YL-3	DTS-1	DTS-2	DTS-3
样品深度/cm	0—20	20—50	50—80	0—20	20—50	50—80
$\delta^{18}\text{O}/\text{‰}$	-5.821	-6.273	-6.584	-8.764	-9.213	-8.069
$\text{Ca}^{2+}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	181.85	118.15	250.37	360.80	267.29	569.11
$\text{Mg}^{2+}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	32.75	26.33	31.83	100.79	48.01	165.18
$\text{K}^{+}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	19.88	12.65	19.04	20.65	18.11	46.09
$\text{Na}^{+}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	16.48	8.53	31.35	42.30	61.53	101.06
$\text{Cl}^{-}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	40.82	20.3441	36.3626	187.8642	96.1515	154.622
$\text{NO}_3^{-}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	75.7456	31.8713	33.6593	117.2279	130.9333	160.5696
$\text{SO}_4^{2-}/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	142.9652	112.2742	114.4497	88.7926	205.2896	147.2692

### 2.2 DGGE 结果及分析

图 1 为 DGGE 分析雪样中主要真核微生物 18S rDNA 片段的的结果, 阴性对照全部正常, 没有出现带. 玉龙雪山样品和东天山样品之间的差异比较大, 条带数目和亮带位置都明显不同. 玉龙雪山不同深度的 3 个样品之间没有明显变化, 但仔细观察, 仍然可以看到有些带只存在于 YL-3 中, 而 YL-1 和 YL-2 中也有一些 YL-3 中没有的带. 东天山的样品随深度变化相对较大, 3 个样品的带型在一定程度上都有不同. 尽管可以直观的看出样品之间的差异, 我们还是用软件对 DGGE 图谱进行聚类

分析(图 2)和多样性分析(表 2). 聚类分析是以 DGGE 图谱中条带之间的相似值为基础构建样品中真核微生物 DNA 结构相似关系的系统树状图, 结果表明真核微生物 DNA 结构之间的差异比较大, 其相似性指数较低(0—0.43). 6 个样品明显聚为两组, 直观的反映了两个冰川雪样真核微生物组成的不同. 多样性分析是以每个泳道中的条带数及相对亮度为基础计算的. 各项多样性指标表明东天山雪样的多样性要高于玉龙雪山. 样品 DTS-3 较为特殊, 其优势度明显高于其他样品, 相应的, 均度和 Simpson 指数也较低. 表明该样品中有些物种具有绝对优势.

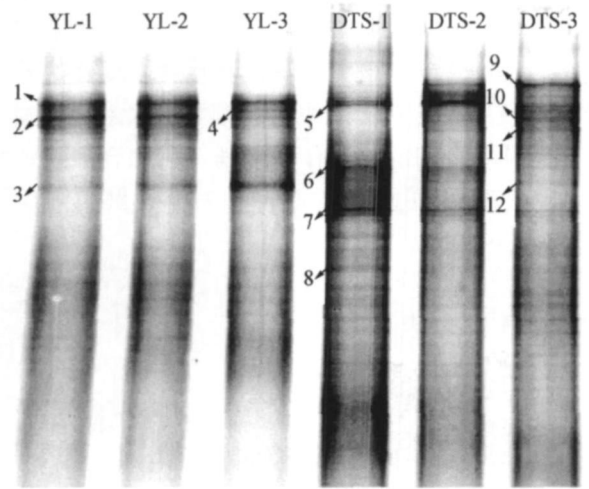


图 1 东天山和玉龙雪山地区不同深度冰川雪样微生物 PCR-DGGE 结果

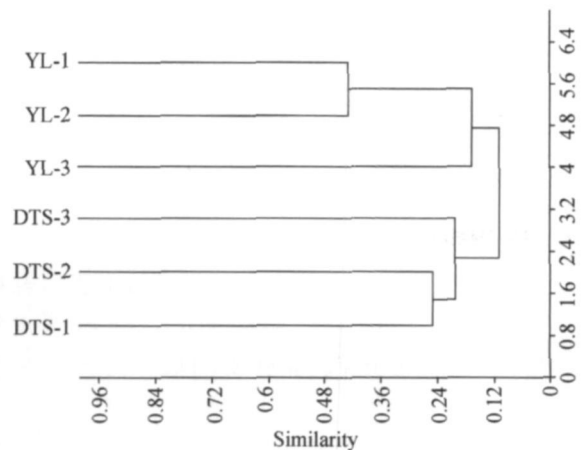


图 2 DGGE 图谱的聚类分析结果

表 2 东天山和玉龙雪山地区冰川雪样微生物 DGGE 多样性指标

项目	YL-1	YL-2	YL-3	DTS-1	DTS-2	DTS-3
种类	7	7	6	8	8	12
个体数	97	97	98	95	98	95
优势度	0.1807	0.392	0.2448	0.2067	0.1595	0.5499
Shannon	1.874	1.39	1.611	1.901	1.988	1.318
Simpson	0.8193	0.608	0.7552	0.7933	0.8405	0.4501
Evenness	0.9305	0.5734	0.8348	0.8369	0.9129	0.3112
Fisher-alpha	1.731	1.731	1.41	2.082	2.06	3.636
Berger Parker	0.2474	0.5876	0.3469	0.3158	0.2347	0.7263

### 2.3 克隆及系统发育树的构建

为了进一步分析两个冰川雪坑中真核微生物多样性,我们对图 1 中标记的 10 条较明显的带进行了割胶回收、测序(表 3)。根据测序结果,构建了系统发育树(图 3)。通过比对发现,东天山雪样中含丰富的真核微生物,包括 *Flagellate*, *Ciliate*, *Tardigrade*, *Chlorophyte* 和 *Bensingtonia yamatoana* 等,分属于 *Viridiplantae*, *Fungi*, *Cercozoan*, *Alveolata* 和 *Metazoa* 五大类。而玉龙雪山的真核微生物种类相对单一,仅有 *Fungi* 和 *Cercozoan* 两类。

表 3 东天山和玉龙雪山地区雪样 DGGE 回收条带比对结果

条带	编号及 GenBank 中的收录号	来源		GenBank 中最相近的物种(GenBank 中的序列号)	相似度 /%
		玉龙山	东天山		
1	YLEU-1	+		Uncultured Cercozoan	99
2	YLEU-2	+		Uncultured Cercozoan	99
3	YLEU-3	+		<i>Bensingtonia yamatoana</i>	100
4	YLEU-4	+		Soil flagellate AND24	98
5	TSEU-1		+	Uncultured ciliate	99
6	TSEU-2		+	uncultured chlorophyta	98
7	TSEU-3		+	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	99
8	TSEU-4		+	Uncultured Chlorophyta clone	99
9	TSEU-5		+	Uncultured tardigrade	99
10	TSEU-6		+	Uncultured Cercozoan	98
11	TSEU-7		+	<i>Bensingtonia yamatoana</i>	100
12	TSEU-8		+	<i>Bensingtonia yamatoana</i>	98

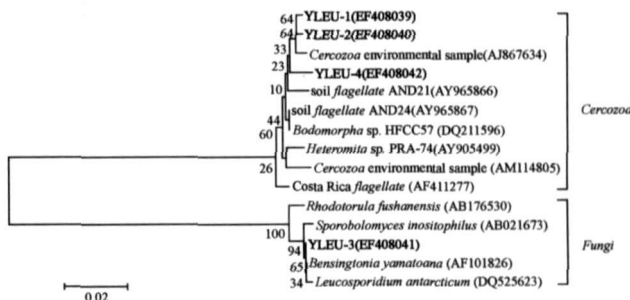


图 3 玉龙雪山地区雪样 DGGE 条带克隆部分 18S rDNA 基因序列的系统发育树

黑体编号表示本研究所得 18S rDNA, 括号内为 GenBank 收录号。

### 3 讨论

#### 3.1 不同类型冰川雪样的理化性质比较

东天山和玉龙雪山冰川雪样之间  $\delta^{18}O$  的差异较明显。在全球尺度下,降水中稳定同位素比率  $\delta^{18}O$  受气温控制,  $\delta^{18}O$  随纬度的增加而减小,随海拔高度的增加而降低<sup>[12]</sup>。两个采样点的海拔相差不大,但东天山的纬度大于玉龙雪山,因此,东天山雪样的  $\delta^{18}O$  的平均值低于玉龙雪山样品。且玉龙雪山夏季主要受西南季风控制,季风水汽由于直接来源于洋面的蒸发,所以稳定同位素含量相对较高<sup>[13]</sup>。玉龙雪山不同深度的 3 个雪样的  $\delta^{18}O$  差异不大,这是由于玉龙雪山正处于主要降水期。苏珍等<sup>[14]</sup>推测玉龙雪山冰川雪线(海拔 4800—5000 m)附近的降水应达到 2383—2590 mm,所以玉龙雪山的 3 个雪样(80 cm 雪样)可能来自同一次降水。而东天山冰川由于规模较小,每年的平均降雪量在 900 mm,最大可以达到 2000 mm,冰川表面的降雪也可能来自同一云团或水汽的凝结高度相差不大<sup>[1]</sup>。但是,与玉龙雪山 3 个样品之间  $\delta^{18}O$  的变化相比,东天山 3 个样品的  $\delta^{18}O$  变化相对较大。在东天山的 3 个样品中, DTS-3 的  $\delta^{18}O$  最高,且与 DTS-2 相比变化幅度较大。而且,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  在 DTS-3 中都出现峰值,这是融水下渗时所携带离子在这里聚集的结果<sup>[3]</sup>。由于采样时间为 8 月份,依然处于夏季。东天山冰川冰雪消融较强,融水下渗量大且深度深<sup>[15]</sup>。这不仅造成污化层的下移,同时也增加了下部污化层的强度。样品 DTS-3 可能正处于污化层位。然而,东天山冰川区位于我国西北干旱气候

区, 空气湿度相对较小, 和处于季风气候区的玉龙雪山冰川区相比, 冰川表面融化强度要小得多<sup>[1]</sup>, 因此, 尽管 YL-3 的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Na}^{+}$  浓度在玉龙山的 3

个样品中最高, 但其他指标并没有出现峰值, 说明其污化层可能还在下部.

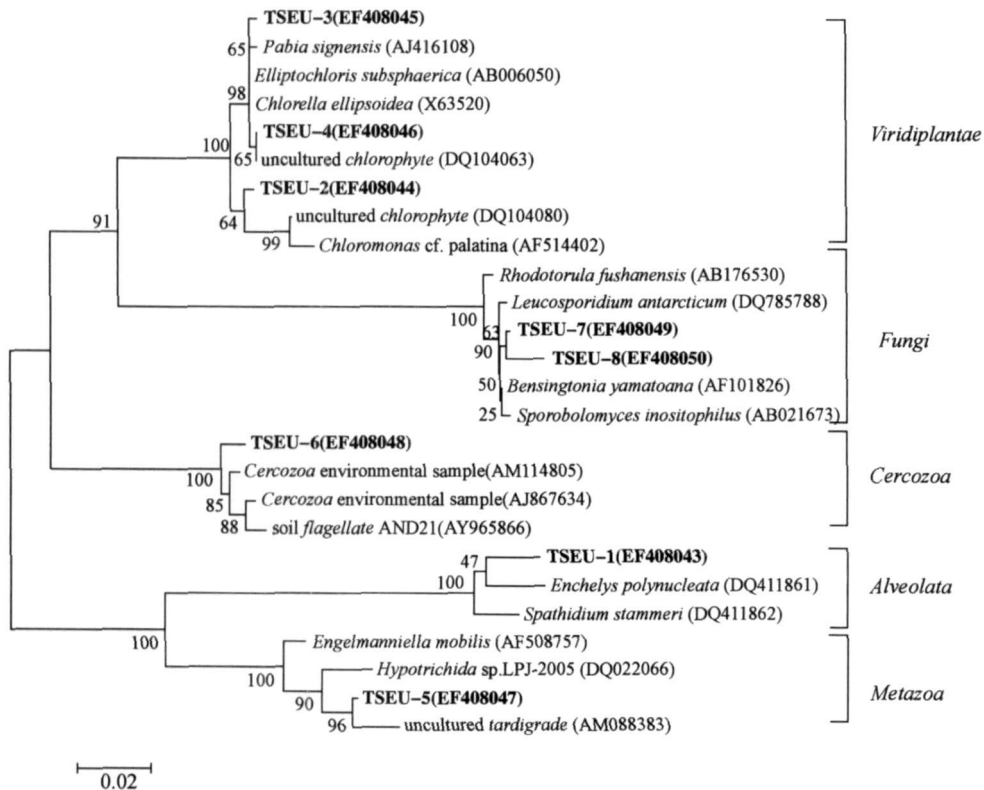


图 4 东天山地区雪样 DGGE 条带克隆部分 18S rDNA 基因序列的系统发育树

东天山雪样的阴阳离子浓度普遍高于玉龙雪山(表 1), 尤其是  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . 阴阳离子浓度可代表冰雪中粉尘的含量, 其中  $\text{Ca}^{2+}$  是最好的代替指标,  $\text{Mg}^{2+}$  次之<sup>[16]</sup>. 东天山地区的冰川更接近植被和裸露的土壤, 而这些地区是大气传输颗粒的主要源区<sup>[11]</sup>. 并且, 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和来自北冰洋的冷湿气流. 海洋性气团和干旱区的粉尘使得东天山冰川区有较复杂的源区环境. 而玉龙雪山的海洋性冰川受来自印度洋强盛的夏季风控制, 水汽主要来自西南方向的印度洋<sup>[17]</sup>, 因此, 相对东天山地区粉尘来源较单一. 另外, 在东天山冷干的气候条件下, 水分循环及积累率减少, 也使得粉尘含量增加<sup>[18]</sup>. 但是, 东天山样品 DTS-1 的  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度明显低于玉龙雪山的 3 个样品. Hoham 等<sup>[19]</sup> 报道  $\text{SO}_4^{2-}$  在有藻类的样品中的含量要低于无藻类的样品, 因

为藻类的生长要消耗营养. 而在玉龙雪山的样品中没有检测到藻类, 且 DTS-1 中藻类含量在东天山的 3 个样品中最多(图 1, 表 3). 这可能是 DTS-1 的  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度低于其他样品的原因.

### 3.2 不同类型冰川雪中真核微生物多样性的差异

从表 2 中可以看到, 东天山雪样的真核微生物种类和多样性要高于玉龙山, 这与雪样中的离子浓度结果一致. 其中以 Fisher-alpha 指标最为显著, Fisher-alpha 指数与粉尘替代指标  $\text{Ca}^{2+}$  ( $R=0.892$ ;  $P<0.05$ ),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $R=0.933$ ;  $P<0.01$ ),  $\text{K}^{+}$  ( $R=0.934$ ;  $P<0.01$ ),  $\text{Na}^{+}$  ( $R=0.891$ ;  $P<0.05$ ) 和  $\text{NO}_3^{-}$  ( $R=0.819$ ;  $P<0.05$ ) 的浓度呈显著正相关. 大气粉尘中含有大量微生物以及微生物赖以生长的营养物质, 这些物质不仅为微生物提供了生存的微生态环境, 而且还向冰川微生物提供了大量的碳源和能源, 使得那些适应于冰川上生活的微生物可以

得到充分的营养物质保障,能够在冰川上大量的生长和繁殖<sup>[20]</sup>。东天山冰川区的粉尘颗粒来源较复杂且含量高,因此,雪冰中真核微生物多样性也较高。

DGGE 分析结果也表明,东天山大陆性冰川和玉龙山海洋性冰川雪样中的真核微生物多样性显著不同(图 2)。由于东天山地区的雪山更接近植被和裸露的土壤,而这些地区是大气传输颗粒的主要源区。并且,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和来自北冰洋的冷湿气流。海洋性气团和干旱区的粉尘使得东天山冰川区有较复杂的源区环境。而玉龙雪山的海洋性冰川受来自印度洋强盛的夏季风控制,水汽主要来自西南方向的印度洋,因此,相对东天山地区粉尘来源较单一。另外,在东天山冷干的气候条件下,水分循环及积累率减少,也使得粉尘含量增加,从而导致东天山雪坑中真核微生物多样性明显高于玉龙雪山。东天山冰雪中的真核微生物包括 *Viridiplantae*, *Fungi*, *Cercozoan*, *Alveolata* 和 *Metazoa* 五大类,其中,藻类为主要类群,真菌次之(图 4)。而海洋性的玉龙山冰川的物种就显得相对较为匮乏,仅检测到 *Cercozoan* (75%) 和 *Fungi* 两类(图 3)。与其他冷环境中的真核微生物比较发现,大陆性的东天山冰川与南极冰川<sup>[21]</sup> 和北极冻土<sup>[22]</sup> 等冷环境相似,真核微生物物种较丰富。Christner 等<sup>[21]</sup> 对南极洲一个冰川冰尘洞的微生物多样性进行了研究,通过 18S rDNA 克隆文库的构建,发现该冰尘洞中含有 *Viridiplantae*, *Fungi*, *Alveolata* 和 *Metazoa* 四类真核微生物。真核微生物多样性的相似提示东天山和南极洲冰川可能处于相似的极端环境。但它们之间也存在差异,提示在不同气候环境下,真核微生物多样性受到温度、湿度、UV 辐射程度和营养水平等一系列环境条件的影响。Omelon 等<sup>[23]</sup> 指出北极和南极沙岩上的微生物多样性明显不同,并提出由于 pH、温度和水分的不同从而导致微生物代谢活性不同,但同时也指出,温度和湿度并不是控制这种变化的主要因素。

我们从东天山雪样中检测到 3 种藻类; Christner 等<sup>[21]</sup> 在南极冰尘洞中只发现 1 种藻类 *Chloromonas perforata*; 而 Takeuchi<sup>[24]</sup> 从智利的 Tyndall 冰川中发现 *Mesotaenium berggrenii*, *Cy-*

*lindrocystis bre' bissonii*, *Ancylonema sp.*, *Closterium sp.*, *Chloromonas sp.* 和 *Oscillatoriaceae cyanobacterium* 等 7 种雪藻,且这些藻类的空间分布不同。研究显示,在不同冰川表面,藻类的数量和群落结构随海拔、温度及光照等各种环境条件的不同而异<sup>[20, 24]</sup>。冰川生态系中,藻类和光合细菌是初级生产者,支持耐冷动物和异养细菌群落生长,真菌和异养细菌又可以降解藻类和其他动物为简单的有机物,为藻类的生长提供营养。因此,藻类的不同决定了冰川表面其他生物也随环境条件的不同而变化,生物指征的变化反映了气候环境条件的变化。在玉龙雪样中没有检测到藻类,可能由于藻类在样品中不是优势种群,在 DGGE 图谱中呈现出的条带较弱,克隆测序没有好的结果。Takeuchi<sup>[24, 25]</sup> 等在比较大陆性冰川 Gulkanna 和海洋性冰川 Worthington、Matanuska 的冰尘特点及雪藻类群时,同样发现大陆性冰川雪藻生物量要明显高于海洋性冰川。分析认为,这是因为海洋性冰川年降水较大,冰川末端海拔较低,所以冰川表面消融率较高,表面融水较多,而大量的融水将表面物质冲出冰川表面,所以藻类生物量和冰尘量较少。

从东天山和玉龙山雪样中检测到的真菌都属于 *Basidiomycete*。Buzzini 等<sup>[8]</sup> 从意大利高山冰川下的沉积物中发现了许多可培养的酵母菌和丝状真菌,其中以 *Basidiomycete* 居多。Ma 等<sup>[26]</sup> 直接从格陵兰冰芯融水中扩增测序,检测到 *Basidiomycete* 和 *Ascomycetes* 两类真菌,表明 *Basidiomycete* 可能比较适应冰雪这种低温环境。真菌能在低温下生存的生理、生态学机制非常复杂,还没有完全研究清楚,但已发现可能与真菌细胞内海藻糖的增加、低温活性酶的产生和冷逃避等有关<sup>[27]</sup>。

在玉龙山雪样中只发现了一类原生动物 *Cercozoan*, 而在东天山中发现了两类原生动物 *Cercozoan* 和 *Alveolata*, 以及一类后生动物 *Tardigrade*。表明东天山冰雪中的真核微生物多样性要比玉龙雪山复杂。在东天山雪样中发现的 *Tardigrade* 是俗称水熊虫的一类小型动物,主要生活在淡水的沉渣、潮湿土壤以及苔藓植物的水膜中,少数种类生活在海水的潮间。*Tardigrade* 被认为是生命力最强的动物,因为它们具有全部四种隐生性,即低湿隐生、低温隐生、变渗隐生及缺氧隐生,使其能够在

恶劣环境下停止所有新陈代谢。对这些耐冷真菌和低等动物的特殊生理适应机制及进化的研究将具有重要意义。可以说, 冰雪微生物的研究是丰富物种多样性、开发地球生物资源的重要途径和方法。

### 3.3 真核微生物多样性的深度变化

从图1可以看出, 玉龙山雪样真核微生物多样性随深度变化不大, 并且优势种群没有改变。但是, 从图2可以看出, 样品YL-3的真核微生物多样性相对与YL-1和YL-2的变化较为明显。采样季节(8月份)正好是冰雪消融季节, 由于海洋型冰川温度较高, 冰雪消融强, 融水下渗量大且深度深, 所以在下层雪中粉尘含量较高。表1显示YL-3的 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Na}^{+}$ 浓度在玉龙山的3个样品中最高。下渗的融水不仅带来了大量上层雪中的微生物, 同时带来了大量微生物生长需要的营养物质。因此, 深层雪样YL-3中的真核微生物的变化相对表、中层较大。

东天山雪样真核微生物多样性同雪样 $\delta^{18}\text{O}$ 一样, 深度变化都较为明显, 从图1中看到, 在DTS-1中较明显的带5、带6、带7和带8, 随着雪样深度增加而在不同程度上相对减弱, 在DTS-3中有的已完全消失。说明这些带代表的物种可能不能适应冰川低温、寡营养的条件, 在雪的逐渐沉积过程中逐渐减少, 有的甚至可能消失。这四条带的回收测序结果显示, 75%为藻类。Yoshimura等<sup>[7]</sup>指出, 光照条件是影响冰川表面藻类生物量的最重要的因素。藻类接受光照的多少取决于雪盖的厚度, 雪盖可使光照强度呈数量级减少。处于浅表层的DTS-1比深层的DTS-3光照充足, 因此, 藻类生物量较高。另一方面, 由于大量低等动物对藻类的消耗, 也使藻类生物量随雪的累积逐渐减少。带9、带10、带11和带12在DTS-3中为优势带, 但在DTS-2中比较弱, 在DTS-1中甚至看不到。我们推测是由于DTS-3正处于污化层, 该处含有大量营养物质使这些物种迅速繁殖。测序显示带9代表的是*Tardigrade*, 且这类低等动物在DTS-3中占有明显优势。这说明东天山冰川雪中真核微生物多样性发生显著变化, 优势种群已从表面的藻类转化为低等动物。由于东天山冰川雪中的物种较丰富, 其生态系统相对比玉龙山冰川雪复杂, 并且东天山冰川

表面消融较小, 所以, 在不同深度的雪样中, 东天山雪样中真核微生物多样性的变化明显大于玉龙山雪样。

综上所述, 由于气候不同, 海洋性冰川和大陆性冰川的真核微生物多样性显著不同。并且, 大陆性冰川表层雪和深层雪中优势真核微生物多样性差别较大, 但在海洋性冰川区变化很小。这种不同与环境指标的差异明显相关。实验表明, 冰雪中真核微生物同样可作为气候环境变化的指标。

致谢 研究样品由庙儿沟平顶冰川考察队和玉龙雪山冰川考察队采集, 特别感谢明镜博士; 同时感谢中国科学院寒区旱区环境与工程研究所冰冻圈与环境联合重点实验室和天山站的老师在样品分析中给予的方便。

### 参 考 文 献

- 1 何元庆, 庞洪喜, 卢爱刚, 等. 中国西部不同类型冰川区积雪及其融水径流中稳定同位素比率的时空变化及其气候效应. 冰川冻土, 2006, 28(1): 22-28
- 2 刘时银, 丁承建, 李 晶, 等. 中国西部冰川对近期气候变暖的响应. 第四纪研究, 2006, 26(005): 762-771
- 3 何元庆, 姚檀栋. 玉龙山温冰川浅冰芯记录现代指示意义. 冰川冻土, 2000, 22(003): 235-241
- 4 Segawa T, Miyamoto K, Ushida K, 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
- 5 刘勇勤, 姚檀栋, 康世昌, 等. 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. 科学通报, 2006, 51(11): 1287-1296
- 6 Takeuchi N, Matsuda Y, Sakai A, et al. A large amount of biogenic surface dust (Cryoconite) on a glacier in the Qilian Mountains, China. Bulletin of Glaciological Research, 2005, 22: 1-8
- 7 Yoshimura Y, Kohshima S, Ohtani S. A community of snow algae on a Himalayan Glacier; Change of Algal biomass and community structure with Altitude. Arctic and Alpine Research, 1997, 29(1): 126-137
- 8 Buzzini P, Turchetti B, Diolaiuti G, et al. Culturable yeasts in meltwaters draining from two glaciers in the Italian Alps. Annals of Glaciology, 2005, 40(1): 119-122
- 9 Diez B, Pedros-Alio C, Marsh TL, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity

- of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2942—2951
- 10 Marschner B, Neumann G, Kania A, et al. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil*, 2002, 246(2): 167—174
- 11 Prisco JC, Fritsen CH, Adams EE, et al. Perennial Antarctic lake ice: An Oasis for life in a Polar desert. *Science*, 1998, 280(5372): 2095—2098
- 12 Poage MA, Chamberlain CP. Empirical relationships between elevation and the stable isotope composition of precipitation and surface waters: Considerations for studies of paleoelevation change. *American Journal of Science*, 2001, 301: 1—15
- 13 庞洪喜, 何元庆, 张忠林. 季风降水  $\delta^{18}\text{O}$  与高空风速关系. *科学通报*, 2004, 49(009): 905—908
- 14 苏珍, 蒲建辰. 横断山冰川发育条件, 数量及形态特征. 见: 横断山冰川. 北京: 科学出版社 1996, 1—25
- 15 刘亚平, 侯书贵, 任贾文, 等. 东天山庙儿沟平顶冰川钻孔温度分布特征. *冰川冻土*, 2006, 28(5): 668—671
- 16 姚檀栋, 邬光剑, 蒲建辰, 等. 古里雅冰芯中钙离子与大气粉尘变化关系. *科学通报*, 2004, 49(9): 888—892
- 17 Yuanqing H, Tandong Y, Meixue Y. Contemporary significance of snow and ice indicated by the record in a shallow ice core from a temperate glacier in southwestern monsoon region. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2000, 22(3): 235—241
- 18 Christner BC. Incorporation of DNA and protein precursors into macromolecules by bacteria at  $-15^{\circ}\text{C}$ . *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6435—6438
- 19 Hoham RW, Yatsko CP, Germain L, et al. Recent discoveries of snow algae in upstate New York and Quebec Province and preliminary reports on related snow chemistry. *Proceedings 46th Annual Eastern Snow Conference*, 1989, 196—200
- 20 Takeuchi N. The altitudinal distribution of snow algae on an Alaska glacier (Gulkana Glacier in the Alaska Range). *Hydrological Processes*, 2001, 15(18): 3447—3459
- 21 Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, et al. Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environ Microbiol*, 2003, 5(5): 433—436
- 22 Lydolph MC, Jacobsen J, Arctander P, et al. Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(2): 1012—1017
- 23 Omelon CR, Pollard WH, Ferris FG. Environmental controls on microbial colonization of high Arctic cryptoendolithic habitats. *Polar Biology*, 2006, 30(1): 19—29
- 24 Takeuchi N, Kohshima S. A snow algal community on tyndall glacier in the Southern Patagonia icefield, Chile. *Arctic Antarctic and Alpine Research*, 2004, 36(1): 92—99
- 25 Takeuchi N, Kohshima S, Segawa T. Effect of cryoconite and snow algal communities on surface albedo on maritime glaciers in south Alaska. *Bulletin of Glaciological Research*, 2003, 20: 21—27
- 26 Ma LJ, Rogers SO, Catranis CM, et al. Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *Mycologia*, 2000, 92(2): 286—295
- 27 Robinson CH. Cold adaptation in arctic and antarctic fungi. *New Phytologist*, 2001, 151(2): 341—353