文章编号：1000-0240(2011)02-0436-06

不同深度冻土微生物数量特征及其与土壤理化性质的关系

王 鹭[1]， 董小培[2]， 张 威[3]， 章高森[3]， 刘光琇[3]*， 冯虎元[1]

(1. 兰州大学 生命科学学院，甘肃 兰州 730000；2. 巩义市第二高级中学，河南 郑州 451200；
3. 中国科学院 寒区旱区环境与工程研究所 沙漠与沙漠化重点实验室，甘肃 兰州 730000)

摘 要：分别以乌鲁木齐河源区不同层位深坑冻土样品为研究材料，利用荧光显微计数技术、寡营养恢复培养技术等研究了微生物数量特征及其与土壤理化参数的关联度. 结果表明：可培养细菌数量与冻土深度、土壤含水量、总 C 和总 N 含量都成显著的正相关，与 pH 值呈显著负相关. 而且，可培养细菌数及其在细胞总数中所占比值随冻土深度的增加而下降，表明深坑样冻土中可培养细菌数量与冻土的理化性质和其沉积年代密切相关.

关键词：冻土微生物；可培养细菌；理化性质；相关性

中图分类号：Q938.1+3 **文献标识码**：A

0 引言

地球上，大约有 26%的陆地生态系统为多年冻土区，然而对其生命迹象的生物学研究，尤其是微生物学的研究相对较少[1]. 尽管早在 19 世纪末 20 世纪初，科学家在西伯利亚和远东研究猛犸象时，已经知道冻土中存在可培养的微生物[2]，然而，在随后近一个世纪几乎没有什么重大突破. 20 世纪 90 年代以来，对极端环境条件下生命特征和适应机制的研究引起世界各地的重视：美国国家自然科学基金委员会从 1997 年专门启动了“极端环境生命”的多学科综合的研究项目；欧盟于 1996 年结束了一个为期三年的极端微生物的预研项目“极端微生物的生物科技”时代，又在 1997 年启动了一个耗资 700 万欧元的计划“Extremophiles as Cell Factory”[3]；日本对极端环境中微生物资源的研究一直很积极，并在 1997 年开始创办刊名直接为“极端微生物”(Extremophiles)的期刊. 这些项目的开展和专门期刊的出现，大大促进了冻土微生物的研究.

微生物的种群结构、遗传进化对环境条件有较强的敏感性[4-13]，研究冻土中的微生物分布、遗传变异和自然选择对恢复过去历史的气候环境变化有重要意义[14-15]. 因此，加强冻土微生物这一重要遗传资源的认识、保护、开发和持续利用，可以弥补该领域研究的空白，对于我国西部生态环境建设、提高我国科技的国际地位、迎接 21 世纪的挑战具有深远的意义.

冻土微生物为什么能够长期经受寒冷生境的考验而生存，若温度低于细胞质冰点，还会使细胞形成冰晶体对细胞结构造成严重损坏，这些问题无时无刻制约着生活在冻土环境中的低温微生物的生存. 但在自然条件下，冻土微生物和冻土环境之间形成了一系列相互适应的理化过程，表现出极其顽强的生命力. 通过对不同深度冻土样品中微生物的数量分析研究，探讨冻土微生物数量与土壤理化性质的关系，为阐明乌鲁木齐河源区土壤微生物生存的可适环境条件提供科学信息.

1 材料和方法

1.1 研究区域概况和样品采集

乌鲁木齐河源区位于天山中部喀拉乌成山脉北

收稿日期：2010-10-06；修订日期：2011-02-22

基金项目：国家自然科学基金项目(30770329；30800154；40971034)；中国博士后科学基金项目(20080430794)资助

作者简介：王鹭(1985－)，女，湖北当阳人，2007 年毕业于兰州大学，现为兰州大学在读硕士研究生，主要从事环境微生物研究.

* 通讯作者：刘光琇，E-mail：liugx@lzb.ac.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

坡，西起天格尔峰，东到望峰道班附近，包括罗卜道沟、琼萨尔萨依沟等 4 条支谷在内，海拔均在 3 000 m 以上. 在此海拔以下，发育着季节冻土. 连续 6 a 的地温观测结果表明，多年冻土厚度随海拔的上升而增大，年平均地温由海拔 3 348 m 的 −0.7 ℃降到海拔 3 900 m 的 −4.9 ℃. 年温度变化层厚度在 10～18 m[16−17].

多年冻土芯取样：选取在新冰期和末次冰期都有冰川发育，现在气温约为 −5.4 ℃的大西沟气象站附近(海拔 3 586 m，43° 06′584″ N，86° 50′301″ E)，钻孔取直径为 13 cm 的冻土芯样品，分段连续取样，取样总深度为 200 cm. 样品装入已就地浸泡乙醇灼烧灭菌的土壤盒中，迅速保存于冰柜，在低温下运回实验室，储存于 −20 ℃备用.

1.2　土壤理化性质分析

样品带回后立即进行土壤理化性质分析. 其中，含水量通过烘干法测定，pH 用酸度计(PHBJ-260，上海雷磁仪器厂)来分析水/土(1∶1，质量比)混合物，全 C 和全 N 在 CHNS-analyser(Elementar Vario EL，Elementar Analysensysteme GmbH，Hanau，Germany)上以 1 800 ℃供氧高温燃烧法测定(兰州大学分析测试中心).

1.3　微生物培养和计数

将冻土样品从 −20 ℃冰箱中取出置于 4 ℃下解冻，在超净台中取 2 g 土样，置于一灭菌处理的装有 18 mL 生理盐水(0.85%)和玻璃珠的三角瓶中，250 r·min^{-1}震摇 15 min，用梯度稀释法对悬液进行稀释，分别取稀释浓度为 10^{-3}、10^{-4}的土壤悬液 200 μL 涂布到寡营养培养基 PYGV 平板上，于 25 ℃下避光培养，每个样品的每个梯度都做 3 个平行，培养的平板 7 d 后统可培养细菌数量.

取约 0.5 g 冻土样品按质量比用无菌生理盐水(0.85%)稀释到 10^{-1} g·mL^{-1}，同时加入数粒无菌玻璃珠，置摇床 250 r·min^{-1}(rmp)振摇 30 min，取 1mL 悬液加入到 9 mL 无菌生理盐水中进行梯度稀释，直至 10^{-4} g·mL^{-1}. 将 10mL 稀释液过滤浓缩于 0.22 μm 无菌的 Millipore 微孔滤膜(全部过滤仪器已灭菌). 沉积于膜上的微生物细胞用 SYBR Gold 荧光染料(1.5×)于暗处染色 15 min，然后用 OLIMPUS(BX51TRF)荧光显微镜进行观察计数[18]. 计数时，每份样品至少计数 30 个随机选择的视野，计算细胞数的平均值(cell·g^{-1}). 依下列公式计算冻土样品中细胞总数：

$$E = X \times S_1/S_2 \times 1/V \times 10^4 \qquad (1)$$

式中：E 为样品中细胞总数(cell·g^{-1})；X 为 30 个视野细菌总数的平均值(cell)；S_1 为滤膜面积(mm^2)；S_2 为显微镜的视野面积(mm^2)；V 为过滤样品的体积(mL).

2　结果与讨论

从图 1 可以看出，本样点可培养细菌数量在 2.00×10^4 CFU·g^{-1}～6.00×10^5 CFU·g^{-1}之间变化，类似于南极冻土区(0～10^5)和西伯利亚冻土区(0～10^8)的情况，但高于加拿大高纬度冻土区(10^1～10^3)可培养细菌数[19−22]. 相关分析显示，可培养细菌数与含水量、总 C、总 N 含量、深度和 pH 值二者之间均有较好的相关性(表 1)：可培养细菌数与含水量($r=0.854$，$p<0.01$)、总 C($r=0.837$，$p<0.01$)、总 N($r=0.821$，$p<0.01$)呈显著正相关；与冻土深度($r=-0.700$，$p<0.01$)、pH 值($r=-0.782$，$p<0.01$)呈显著负相关. 冻土深度与 pH 值($r=0.715$，$p<0.01$)呈显著正相关；含水量与总 C($r=0.947$，$p<0.01$)、总 N($r=0.943$，$p<0.01$)呈显著正相关，与 pH 值($r=-0.574$，$p<0.01$)呈显著负相关；pH 值与总 C($r=-0.579$，p

表 1　可培养细菌数量与土壤理化因子间相关性分析

Table 1　Correlation between cultivable bacteria and physicochemical indexes

	含水量		总 C 含量		总 N 含量		pH 值		深度	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
可培养细菌数	0.854**	0.000	0.837**	0.000	0.821**	0.000	−0.781**	0.000	−0.700**	0.001
含水量			0.947**	0.000	0.943**	0.000	−0.574**	0.008	−0.442	0.051
总 C 含量					0.994**	0.000	−0.579**	0.007	−0.442	0.051
总 N 含量							−0.603**	0.004	−0.449*	0.047
pH 值									0.715**	0.000

注：**为 $P<0.01$，极显著相关；*为 $P<0.05$，显著相关.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

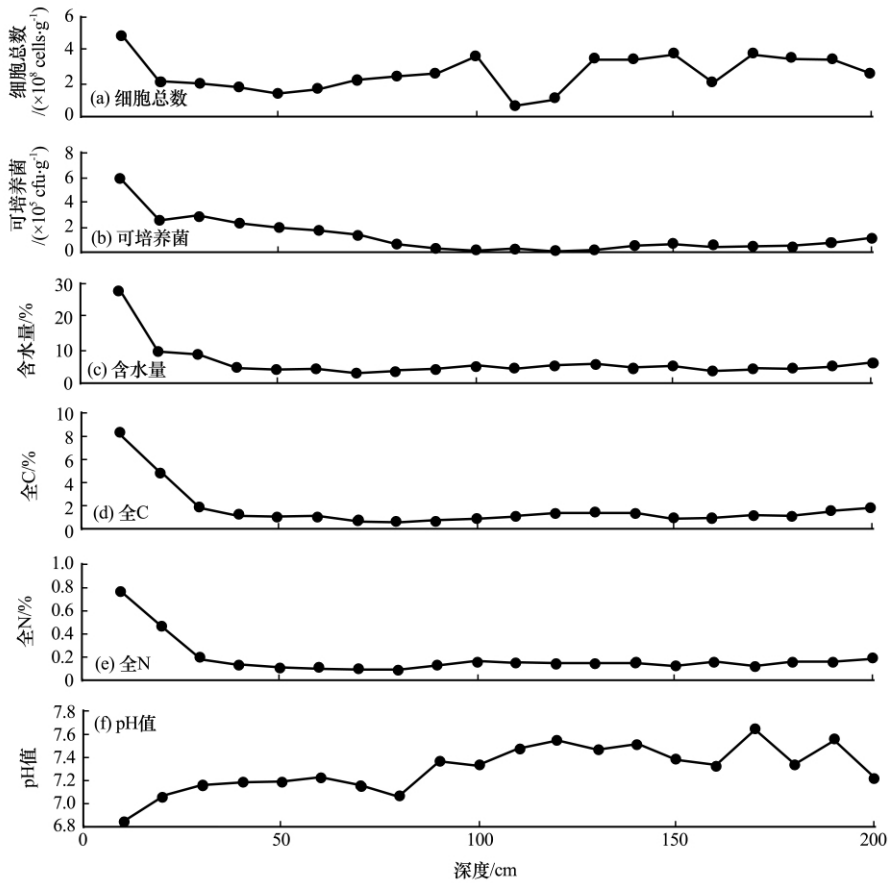

图 1 深坑样品各数据分析

Fig. 1 Soil parameters changing with depths

<0.01)、总 N($r=-0.603$，$p<0.01$)呈显著负相关；总 C 与总 N($r=0.994$，$p<0.01$)呈显著正相关.

冻土中的液态水膜太薄而不能包藏微生物或使微生物细胞在其中迁移，所以液态水膜是冻土微生物生存栖息地的关键组成部分. 这些水膜可能由于能够保护有生命的细菌，被认为是微生物生长的“营养培养基”[23]，当周围的水结冻时营养物质可能集中在这些薄膜中[24]. 这些水膜也可以使营养物质和代谢终产物进行大量转换，如果在细胞中没有发生这些大规模的转换，细胞可能最终会死于饥饿和毒素的累积. 因此，液态水作为冻土中细菌生长的一个重要限制因素，它的含量直接决定了细菌的数量和生命活力，可培养细菌数量与含水量成显著正相关.

作为冻土中微生物的主要营养物质，C 含量[25]和 N 含量[26]直接对微生物的群落产生影响. 而土壤微生物作为生态系统的重要组成部分，参与土壤 C、N 元素的循环过程和土壤矿物质的矿化过程，又对有机物质的分解转化、养分的转化和供应起着重要的主导作用[27-28]. 我们的实验结果表明：可培养细菌的数量与 C、N 含量的显著正相关性正是微生物与 C、N 相互作用的结果.

图 2 可以看出：可培养细菌数占细胞总数的比值在表层约 50～60 cm 处普遍较大，60～70 cm 处出现过渡，再往下普遍较小. 总体来讲，可培养细菌数占细胞总数的比值随着冻土深度的增加呈下降

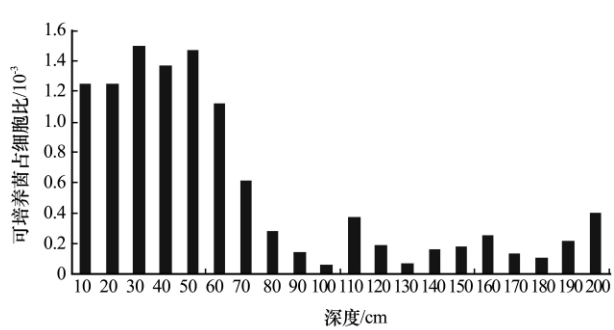

图 2 深坑样品中可培养细菌数占细胞总数的比值

Fig. 2 The ratio of cultivable bacteria to total cell number at different depths

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

趋势. 从冻土中恢复培养细胞的能力似乎与冻土的温度无关，而是依赖于冻土的深度，可培养细菌数及其在细胞总数中所占比值随冻土深度的增加而下降(图 2). 这可能是由于低温、干燥、缺乏营养物和地磁辐射等环境对它们的选择作用所致[4－6]. 可见，微生物能够在冰冻区保持活力是有时间上限的.

另外，冻融循环也是影响微生物生命力的因素之一. 有研究表明，冻土层越深，冻土年龄越大[18]. 章高森[29]对青藏高原多年冻土的分析表明，可培养细菌的数量随着冻土年龄的增加而减少；在低温恢复培养的过程中，发现在温度升高冻土消融过程中，可培养细菌的数量增加而多样性却逐渐减少. 白玉[30]以天山冻土冻融界面样品为材料的冻融实验表明，在一系列冻融处理中，冻融循环次数不断增加，天山冻土样品中的细菌多样性也随之减少. 显而易见，冻土层越深，冻融循环的几率就越多，微生物生命力就越弱.

有机酸在细菌趋化，养分的吸收，减轻缺氧，改善土壤结构和金属净化这些活动中作为主要动力[31－34]. 其中，趋化性是细菌适应外界化学环境变化而作出的行为反应，是一种寻找碳源和氮源的优势[35]. 图 1 表明，pH 值随冻土深度增加而增加，冻土中 pH 值主要是由有机酸含量来决定的，说明冻土有机酸含量在不断下降. 研究表明，虽然有少量的有机酸是通过大气沉降和林冠穿透进入了土壤，大部分土壤中的有机酸是来源于根分泌物的溶解和土壤微生物的释放[36]. 可见，随着冻土冻土深度的增加，本身逐渐远离地表和植物根际，微生物活力下降，有机酸的供给越来越少，pH 值增加直接影响了细菌的水平[37]. 因此，有机酸不仅可以改善细菌生长的环境，还可以直接促进细菌对碳源和氮源的利用，进而调控微生物的生命活力和可培养细菌的数量.

3　结论

冻土微生物能够适应寒冷生境而生存，是因为在自然条件下，冻土微生物和冻土环境之间形成了一系列相互适应的理化过程：首先表现在深坑样品随着坑深度的增加，冻土的含水量、总 C、N 含量都在减少，而 pH 值在增加，冻土微生物的生命力显得越脆弱，可培养细菌的数量就越少，即：可培养细菌数与含水量、总 C、总 N 呈显著正相关，与冻土深度、pH 值呈显著负相关. 可见，微生物能够在冰冻区保持活力与冻土的理化性质息息相关，随冻土的理化性质演变而变化.

参考文献(References)：

[1] Steven B, Leveille R, Pollard W, *et al*. Microbial ecology and biodiversity in permafrost[J]. Extremophiles, 2006, **10**(4): 259－267.

[2] Omelyansky V L. Bakteriologicheskoe issledovanie Sanga mamonta Prilegayushchei pochvy (Bacteriological investigation of the Sanga mammoth and surrounding soil)[J]. Arkhiv Biologicheskikh Nauk, 1911, **16**:335－340.

[3] Aguilar A, Ingemansson T, Magnien E. Extremophile microorganisms as cell factories: support from the European Union [J]. Extremophiles, 1998, **2**(3): 367－373.

[4] Gilichinsky D A, Khlebnikova G M, Zvyagintsev D G, *et al*. Microbiology of sedimentary materials in the permafrost zone [J]. International Geology Review, 1989, **31**(8): 847－858.

[5] Gilichinsky D A, Vorobyova E, Erokhina L G, *et al*. Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost[J]. Advances in Space Research, 1992, **12**: 255－263.

[6] Khlebnikova G M, Gilichinsky D A, Fedorov-Davydov D G, *et al*. Quantitative evaluation of microorganisms in permafrost deposits and buried soils[J]. Translated from Mikrobiologiya, 1990, **59**: 148－155.

[7] Bakermans C, Tsapin A I, Souza-Egipsy V, *et al*. Reproduction and metabolism at －10 ℃ of bacteria isolated from Siberian permafrost[J]. Environmental Microbiology, 2003, **5**(4): 321－326.

[8] Panikov N S, Flanagan P W, Oechel W C, *et al*. Microbial activity in soils frozen to below －39 ℃[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, **38**(4): 785－794.

[9] Rivkina E M, Laurinavichius K, McGrath J, *et al*. Microbial life in permafrost[J]. Advances in Space Research, 2006, **33**(8): 1215－1221.

[10] Rivkina E M, Shcherbakova V, Laurinavichius K, *et al*. Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **61**(1): 1－15.

[11] Wagner D, Lipski A, Embacher A, *et al*. Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: effects of microbial community structure and organic matter quality[J]. Environmental Microbiology, 2005, **7**(10): 1582－1592.

[12] Ganzert L, Jurgens G, Munster U, *et al*. Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **59**(2): 476－488.

[13] Morozova D, Mohlmann D, Wagner D. Survival of methanogenic archaea from Siberian Permafrost under simulated martian thermal conditions [J]. Origins of Life and Evolution of Biospheres, 2007, **37**(2): 189－200.

[14] Willerslev E, Hansen A J, Binladen J, *et al*. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments[J]. Science, 2003, **300**: 791－795.

[15] Lydolph M C, Jacobsen J, Arctander P, *et al*. Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(2): 1012－1017.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[16] Liu Guangxiu, Hu Changqin, Zhang Jingpu, *et al*. Microbial communities in permafrost of the Tibetan Plateau and their significance[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2001, **23**(4): 419－422. [**刘光琇, 胡昌勤, 张靖溥, 等. 青藏高原多年冻土微生物的分离分析及其意义**[J]. **冰川冻土**, 2001, **23**(4): 419－422.]

[17] Ju Yuanjiang, Liu Gennian. Climate and environment changes inferred from pollen records since 4000 a BP in the headwaters of the Ürümqi River, Tianshan [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2004, **26**(2):166－170. [**鞠远江, 刘耕年. 孢粉记录揭示的** 4000a BP **来乌鲁木齐河源区气候环境变化**[J]. **冰川冻土**, 2004, **26**(2): 166－170.]

[18]Amato P, Hennebelle R, Magand O, *et al*. Bacterial characterization of the snow cover at Spitsbergen, Svalbard [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **59**(2): 255－264.

[19] Cowan D A, Russell N, Mamais A, *et al*. Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass[J]. Extremophiles, 2002, **6**: 431－436.

[20] Rivkina E, Gilichinsky D, Wagener S, *et al*. Biogeochemical activity of anaerobic microorganisms from buried permafrost sediments[J]. Geomicrobiol Journal, 1998, **15**: 187－193.

[21] Gilichinsky D. Encyclopedia of Environmental Microbiology [M]. New York, Wiley, 2002: 2367－2385.

[22] Steven B, Briggs G, McKay C P, *et al*. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods[J]. FEMS Microbiol Ecology, 2007, **59**(2):513－523.

[23] Bitton G. Encyclopedia of environmental microbiology [M]. New York, Wiley, 2002: 2367－2385.

[24] Deming J. Psychrophiles and polar regions [J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, **5**(1): 301－309.

[25] Zak D R, Grigal D R, Gleeson S, *et al*. Carbon and nitrogen cycling during old-field succession: constraints on plant and microbial biomass[J]. Biogeochemistry, 1990, **11**:111－129.

[26] Zak D R, Tilman D, Parmenter R R, *et al*. Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental scale study [J]. Ecology, 1994, **75**: 2333－2347.

[27] Jenkinson D S, Andrew S P S, Lynch J M, *et al*. The turnover of the organic carbon and nitrogen in soil[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 1990, **329**: 361－368.

[28] Jiang Peikun, Zhou Guomo. Changes in soil microbial biomass carbon and nitrogen under eroded red soil by vegetation recovery[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2003, **17**(1): 112－114. [**姜培坤, 周国模. 侵蚀型红壤植被被恢复后土壤微生物量碳、氮的演变**[J]. **水土保持学报**, 2003, **17**(1): 112－114.]

[29] Zhang Gaosen. Microbial Diversity in the Qinghai-Tibet Plateau Permafrost Region and Its Potential Applications [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007. [**章高森. 青藏高原多年冻土区微生物多样性及其潜在应用的研究**[D]. **兰州: 兰州大学**, 2007.]

[30] Bai Yu. Phylogenetic Diversity and Growth Characteristics of Microorganisms from Alpine Frozen Soil in the Tianshan Mountains [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007. [**白玉. 天山冻土微生物的系统多样性分析及生长特性的研究**[D]. **兰州: 兰州大学**, 2007.]

[31] Barbour W M, Hattermann D R, Stacey G. Chemotaxis of Bradyrhizobium japonicum to soybean exudates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, **57**(9): 2635－2639.

[32] Grierson P F. Organic-acids in the rhizosphere of Banksia integrifolia L. f.[J]. Plant and Soil, 1992, **144**: 259－265.

[33] Ryan P R, Delhaize E, Randall P J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum are highly correlated in wheat [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1995, **22**(4): 531－536.

[34] Xia J H, Roberts J K. Improved cytoplasmic pH regulation, increased lactate efflux, and reduced cytoplasmic lactate levels are biochemical traits expressed in root-tips of whole maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment[J]. Plant Physiology, 1994, **105**: 651－657.

[35] Jiang Jiandong, Zhang Ruifu, He Jian, *et al*. Bacterial chemotaxis to environmental pollutants and it's significance in bioremediation[J]. Acta Ecologica Sinca, 2005, **25**(7): 1764－1771. [**蒋建东, 张瑞福, 何健, 等. 细菌对环境污染物的趋化性及其在生物修复中的作用**[J]. **生态学报**, 2005, **25**(7): 1764－1771.]

[36] Millet M, Wortham H, Sanusi A. Low molecular weight organic acids in fogwater in an urban area: Strasbourg (France) [J]. Science of the Total Environment, 1997, **206**(1): 57－65.

[37] Jones D L, Prabowo A M, Kochian L V. Aluminum-organic acid interactions in acid soils. 2. Influence of solid-phase sorption on organic acid-Al complexation and Al rhizotoxicity[J]. Plant Soil, 1996, **182**:229－237.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Quantitative Characters of Microorganisms in Permafrost at Different Depths and Their Relation to Soil Physicochemical Properties

WANG Lu[1], DONG Xiao-pei[2], ZHANG Wei[3], ZHANG Gao-sen[3], LIU Guang-xiu[3], Feng Hu-yuan[1]

(1. *School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou Gansu* 730000, *China*; 2. *Gongyi Second Senior High School, Zhengzhou Henan* 451200, *China*; 3. *Key Laboratory of Desert and Desertification, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou Gansu* 730000, *China*)

Abstract: The microorganisms in permafrost could live in cold environment through the coadapted physicochemical process, which exists between microorganisms in permafrost and permafrost environment. In this paper, the relation between microbial number and soil physicochemical properties of permafrost at different depths at the headwaters of the Ürümqi River is analyzed by using fluorescence microscopy counting and oligo-culture techniques. Totally, 20 samples from a 200-cm permafrost core were used as study materials. It is found that the number of cultivable bacteria has a significant positive correlation with soil water content, total carbon and total nitrogen concentrations, and a significant negative correlation with pH value. Meanwhile, the ratio of cultivable bacteria to total cell number decreases with depth. The results demonstrate that the number of cultivable bacteria in permafrost is closely correlated with soil physicochemical properties and depositional age.

Key words: microorganisms in permafrost; cultivable bacteria; physicochemical properties; correlation

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net