



研究报告

珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌多样性及抗紫外辐射能力

田茂^{1,2,3} 张威^{*1,2} 章高森^{1,2} 胡召富⁴ 汪文强⁵ 于雪^{1,2,3} 刘阳^{2,3,4}

1 中国科学院西北生态环境资源研究院 沙漠与沙漠化重点实验室 甘肃 兰州 730000

2 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室 甘肃 兰州 730000

3 中国科学院大学 北京 100049

4 中国科学院西北生态环境资源研究院 冰冻圈科学国家重点实验室 甘肃 兰州 730000

5 兰州大学生命科学学院 甘肃 兰州 730000

摘要:【背景】珠穆朗玛峰地区具有寒冷低温、强辐射等极端环境条件,珠穆朗玛峰北坡石生微生物研究未见报道。【目的】针对珠穆朗玛峰北坡石生微生物开展研究,阐明珠穆朗玛峰北坡石生生境中可培养细菌多样性,开发珠穆朗玛峰北坡抗紫外辐射菌株资源。【方法】通过可培养法、16S rRNA 基因序列分析方法以及紫外辐射筛选对珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌多样性以及抗紫外辐射能力进行研究。【结果】从珠穆朗玛峰北坡石生生境中共分离获得 52 株石生细菌,归类为放线菌门(*Actinobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*),其中放线菌门和变形菌门为优势菌门,鞘脂单胞菌属、节杆菌属、链霉菌属为优势菌属,有 2 株菌为潜在新种。从已分离鉴定菌株中筛选出了 2 株抗紫外辐射能力较高的菌株,分别是芽孢杆菌属菌株 ZFBP4009 和链霉菌属菌株 ZFBP1009。【结论】珠穆朗玛峰北坡石生环境蕴含多样性丰富的石生细菌,所分离菌株抗紫外辐射能力突出,为揭示相关极端环境下微生物的分布特征及极端环境微生物资源开发提供了数据支持及菌株资源。

关键词: 珠穆朗玛峰北坡, 可培养石生细菌, 多样性, 抗紫外辐射能力

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31870479); Science and Technology Project of Gansu Province (20YF3WA007, 20JR5RA548); The Second Tibetan Plateau Scientific Expedition and Research Program (2019QZKK0605)

***Corresponding author:** Tel: 86-931-4967584; E-mail: ziaoshen@163.com

Received: 09-09-2020; **Accepted:** 19-11-2020; **Published online:** 15-01-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31870479); 甘肃省科技计划(20YF3WA007, 20JR5RA548); 第二次青藏高原综合考察研究项目(2019QZKK0605)

***通信作者:** Tel: 0931-4967584; E-mail: ziaoshen@163.com

收稿日期: 2020-09-09; **接受日期:** 2020-11-19; **网络首发日期:** 2021-01-15

Diversity and ability of resistance to ultraviolet radiation of culturable lithophilous bacteria on the north slope of Mount Everest

TIAN Mao^{1,2,3} ZHANG Wei^{*1,2} ZHANG Gaosen^{1,2} HU Zhaofu⁴ WANG Wenqiang⁵
YU Xue^{1,2,3} LIU Yang^{2,3,4}

1 Key Laboratory of Desert and Desertification; Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

2 Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 State Key Laboratory of Cryospheric Science; Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

5 School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China

Abstract: [Background] The Mount Everest area has extreme environmental conditions such as cold, low temperature and high doses of radiation. There is no report on the study of lithophilous microorganisms on the northern slope of Mount Everest. **[Objective]** To carry out research on the lithophilous microorganisms on the north slope of Mount Everest, clarify the diversity of culturable bacteria from the lithophilous habitat on the northern slope of Mount Everest, and develop resources of anti-ultraviolet radiation strains on the northern slope of Mount Everest. **[Methods]** The culturable method, 16S rRNA gene sequence analysis method and ultraviolet radiation were used to study the diversity of culturable lithophilous bacteria on the northern slope of Mount Everest and the ability of resistance to ultraviolet radiation. **[Results]** A total of 52 lithophilous bacteria were isolated from the lithophilous habitat on the north slope of Mount Everest, which were classified as *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Bacteroidetes*. *Actinobacteria* and *Proteobacteria* are the dominant bacteria phyla, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, and *Streptomyces* are the dominant bacterial genera, two strains are potential new species. Two strains with higher resistance to ultraviolet radiation were selected from the isolated and identified strains, namely *Bacillus* ZFBP4009 and *Streptomyces* ZFBP1009. **[Conclusion]** The lithophilous environment on the north slope of Mount Everest contains rich diversity of lithophilous bacteria, and the isolated strains have outstanding the ability of resistance to ultraviolet radiation, which provides data support and strain resources for revealing the distribution characteristics of microorganisms in related extreme environments and the development of extreme environment microbial resources.

Keywords: north slope of Mount Everest, culturable lithophilous bacteria, diversity, resistance to ultraviolet radiation

珠穆朗玛峰位于中国西藏自治区西南隅,北纬 27°59'17"、东经 86°55'31",地处喜马拉雅山脉中段,是世界最高峰,也是珠穆朗玛国家级自然保护区的核心部分^[1-2]。独一无二的海拔高度使珠穆朗玛峰具有寒冷低温、寡营养、强辐射等特点,同时,敏感脆弱的环境使其成为环境变迁和气候变化的敏感区^[3-6]。

微生物在全球化学循环中起着重要的作用,对土壤生态系统结构和功能维持至关重要^[3],石

生微生物生活在岩石表面或者内部,在全球分布广泛,容易适应极端环境,对石质文物保护、地外生命探索以及陆地化学物质循环等方面有着重要指导意义,按照其定殖部位可以分为石内生微生物(Endolithic Microorganism)、石表生微生物(Epilithic Microorganism)和石下生微生物(Hypolithic Microorganism),而石内生微生物又分为石隙生微生物(Chasmoendolithic Microorganism)、石隐生微生物(Cryptoendolithic

Microorganism) 和 石 髓 生 微 生 物 (Euendolithic Microorganism)^[7]。现有石生微生物研究主要集中在低海拔区域, 而高海拔区域的分布特征未见研究, 已有部分研究对珠穆朗玛峰北坡冰川及土壤微生物开展了群落特征研究, 结果表明珠穆朗玛峰北坡表层雪、冰川融水和冰塔林的细菌群落特征以 β -变形菌门和拟杆菌门细菌为主^[4]。珠穆朗玛峰北坡低海拔地区和永久雪线以上的土壤微生物物种多样性和微生物量均随海拔升高明显降低^[3]。开展珠穆朗玛峰北坡石生微生物的研究, 可以系统阐明该特殊生境下生态系统的组成, 同时也为阐明石生微生物的地理分布格局提供数据支撑, 然而相关研究未见报道。

在珠穆朗玛峰北坡这种极端生境中生存的微生物具备特殊的适应机制。其中, 抗辐射微生物是一类生存能力极强的生物, 分布于世界各地, 适应范围广, 能生存于干燥、严寒等极端胁迫环境下, 在环境修复、生物医药、基因工程等方面具有重要的应用价值, 同时也是研究生命起源的重要资源^[8]。在珠穆朗玛峰北坡地区这一极端环境中研究可培养石生细菌的抗紫外辐射能力, 可以阐明微生物生态机制, 并为这一特殊环境下微生物资源的开发提供依据。

本研究采用可培养、形态学和 16S rRNA 基因序列分析方法对珠穆朗玛峰北坡石生细菌多样性及分布特征进行研究, 同时对可培养石生细菌进行抗紫外辐射能力筛选, 以此来探讨珠穆朗玛峰北坡石生细菌多样性及其分布特征, 并对珠穆朗玛峰北坡可培养抗紫外细菌资源进行开发, 以期为之后的石生细菌研究提供科学依据和种质资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019 年 5 月在珠穆朗玛峰北坡地区 2 个采样点(86°56'38.92"E, 28°02'08.55"N; 86°50'58.90"E, 28°08'07.31"N)进行了样品采集工作。采样时, 依据观察在海拔 6 338 m 采集了石隙生(Chasmoendolithic)

样品 1, 在海拔 5 161 m 采集了石隙生样品 2、石下生(Hypolithic)样品 3 和石下生样品 4 (图 1)。将采集的样品装入无菌袋, 低温保存并运输至实验室后放入-20 °C 冰箱保存, 进行微生物可培养实验。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

胰蛋白胨、酵母提取物, 赛默飞世尔科技公司; 琼脂, 兰杰柯生物科技有限公司; 氯化钠, 天津市百世化工有限公司; *Taq* DNA 聚合酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, OMEGA 公司。电热恒温培养箱、恒温振荡培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 立式蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

选用 3 种不同的培养基: R₂A 琼脂培养基(R₂A)、Luria-Bertani 培养基(LB)和胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB), 培养基配方参考德国菌种保藏中心(<https://www.dsmz.de>)。

1.3 细菌分离培养

将样品准备好后放入超净工作台, 石隙生样品需用无菌小锤子和无菌镊子撬开, 然后在超净工作台中对石隙生样品和石下生样品进行清洗, 用无菌棉签蘸取无菌生理盐水将石头上的细菌附着物清洗至装有无菌玻璃珠的 50 mL 无菌离心管(内置 40 mL 生理盐水)中, 用振荡器充分振荡 20 min。然后将菌液用无菌生理盐水进行梯度稀释, 得到 5 个浓度梯度的稀释液, 分别是 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 。将不同浓度稀释液吸取 200 μ L 至 R₂A、LB 和 TSB 固体培养基上进行涂布, 每个培养基、每个浓度梯度做 3 个平行实验, 置于 15 °C 培养箱培养 7 d。

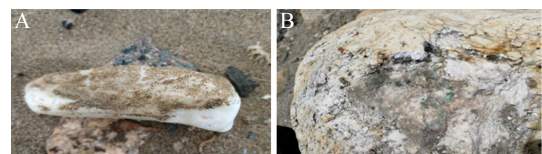


图 1 石生微生物示意图

Figure 1 Schematic diagram of lithophilous microorganisms

注: A: 石下生; B: 石隙生

Note: A: Hypolithic; B: Chasmoendolithic

1.4 菌株分离纯化、保藏及菌落形态描述

在 15 °C 培养箱中培养后,挑取平板上生长的所有形态、颜色不同的单菌落,在新平板上进行划线纯化、编号并记录菌落形态特征。将纯化后的菌株用冻存管保存在保种液(20%甘油)中,放于-80 °C 超低温冰箱保存。通过观察培养基上的纯培养菌落记录其菌落形态。

1.5 可培养细菌的 16S rRNA 基因 PCR 扩增以及序列测定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后,利用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增细菌的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系参照文献[9],PCR 反应条件参照文献[10]。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,将所有不同带谱的 16S rRNA 基因 PCR 产物送至北京擎科生物科技有限公司西安分公司进行序列测定,序列提交至 GenBank。

1.6 序列比对及系统发育树的构建

将已测定的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud (www.ezbiocloud.net)网站中进行比对,下载最相似序列。比对结果利用 MEGA 7.0.14 软件,采用最大似然法构建系统发育树。

1.7 菌株抗紫外辐射能力测定

将要筛选的 52 株可培养菌株以及阴性和阳性对照菌株接种到 R₂A 液体培养基中制备菌悬液 ($0.5 \leq OD_{600} \leq 1.0$),进行梯度稀释后取稀释到 10^{-4} 的菌悬液 100 μ L 涂布 R₂A 固体培养基,放入紫外箱中用 UV-C 分别辐照 50 s 和 100 s,辐照强度分别为 100 J/m² 和 300 J/m²,同时将未辐照过的 10^{-4} 菌液取 100 μ L 涂布 R₂A 固体培养基作为对照,每个菌株做 3 个重复,培养 7 d 后进行计数,计算菌株存活率。存活率计算方式为经过辐照以后 3 个平板上的菌落数量平均值除以未经辐照的 3 个平板上的菌落数量平均值。

菌株存活率(%)=(辐照后菌落数量平均值/未辐照菌落数量平均值)×100。

2 结果与分析

2.1 可培养石生细菌多样性及分布特征

通过菌株纯化筛选获得了 169 株菌,通过形态比较和 16S rRNA 基因测定及序列比对分析,最终得到 52 株不同的菌株,其 16S rRNA 基因序列登录号分别为 MT951310-MT951325、MT951326-MT951359、MT982650 和 MT982675。如图 2 系统发育树所示,珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌分属于 4 个门,分别是放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*)。其中,放线菌门和变形菌门为优势菌门。

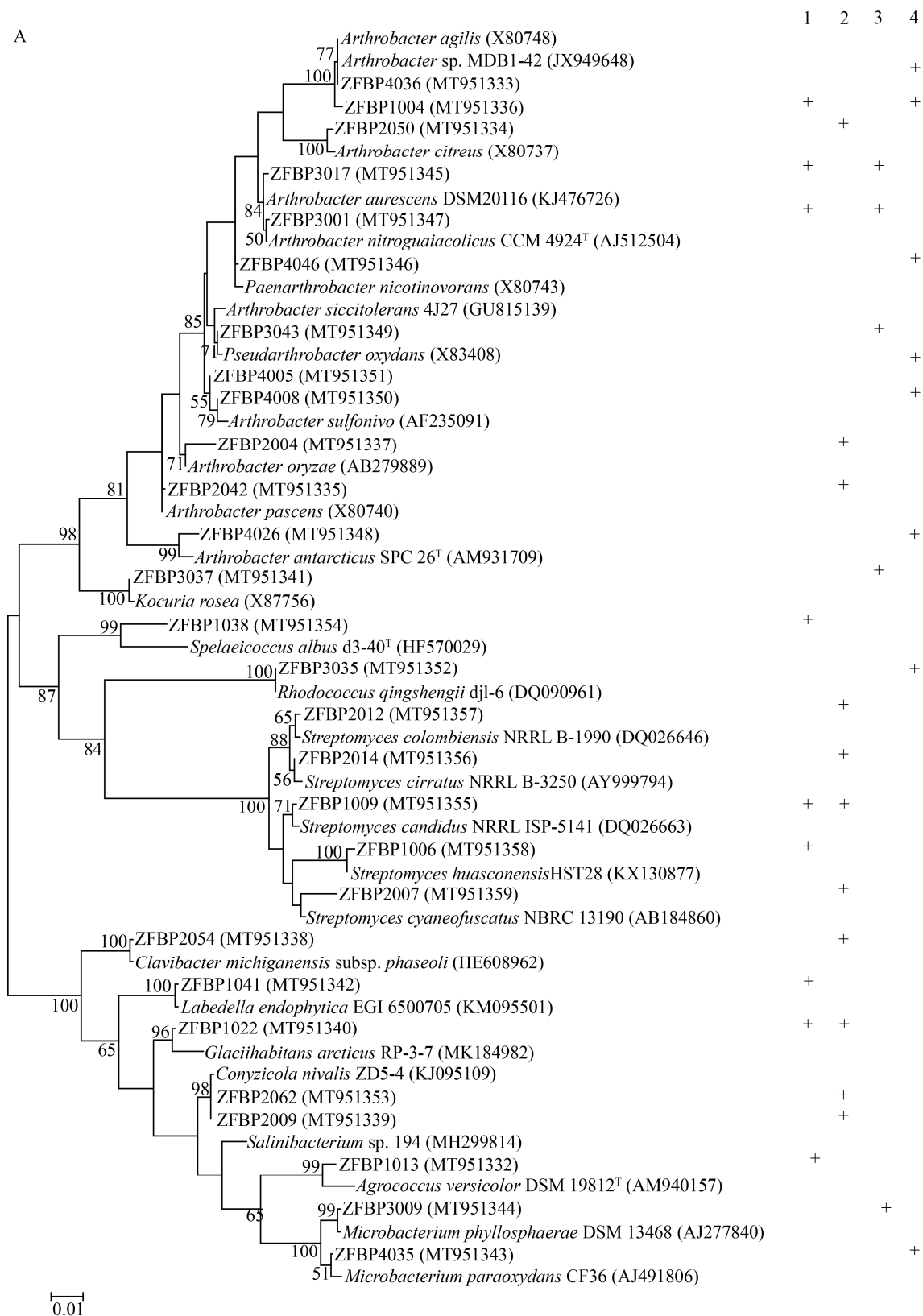
珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌分属于 28 个属,其中以鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属。

通过序列比对分析,结果显示,泥球菌属(*Spelaicoccus*)菌株 ZFBP1038 的 16S rRNA 基因序列与最相似模式菌株的相似度为 96.02%;鞘脂单胞菌属菌株 ZFBP2030 的 16S rRNA 基因序列与最相似模式菌株的相似度为 97.30%,均为疑似新种(图 2A)。

珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌在 4 份石生样品中分布存在差异,分布较广的为放线菌门中的节杆菌属(图 2A)、变形菌门中的假单胞菌属(图 2B)以及厚壁菌门中的芽孢杆菌属(图 2C)。其中,节杆菌属和芽孢杆菌属在所有样品中均有分布,假单胞菌属在样品 1、3、4 中均有分布。

2.2 不同生境可培养石生细菌多样性和物种丰度

所有已鉴定的 52 株菌中,石隙生菌株有 25 株,石下生菌株有 27 株。在门水平上,如图 3A 所示,石隙生菌株分属于 3 个门,分别是放线菌门、变形菌门和厚壁菌门,优势菌门为放线菌门,次优势菌门为变形菌门;石下生菌株分属于 4 个门,分别是放线菌门、变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门,优势菌门为放线菌门,次优势菌门为厚壁菌门。



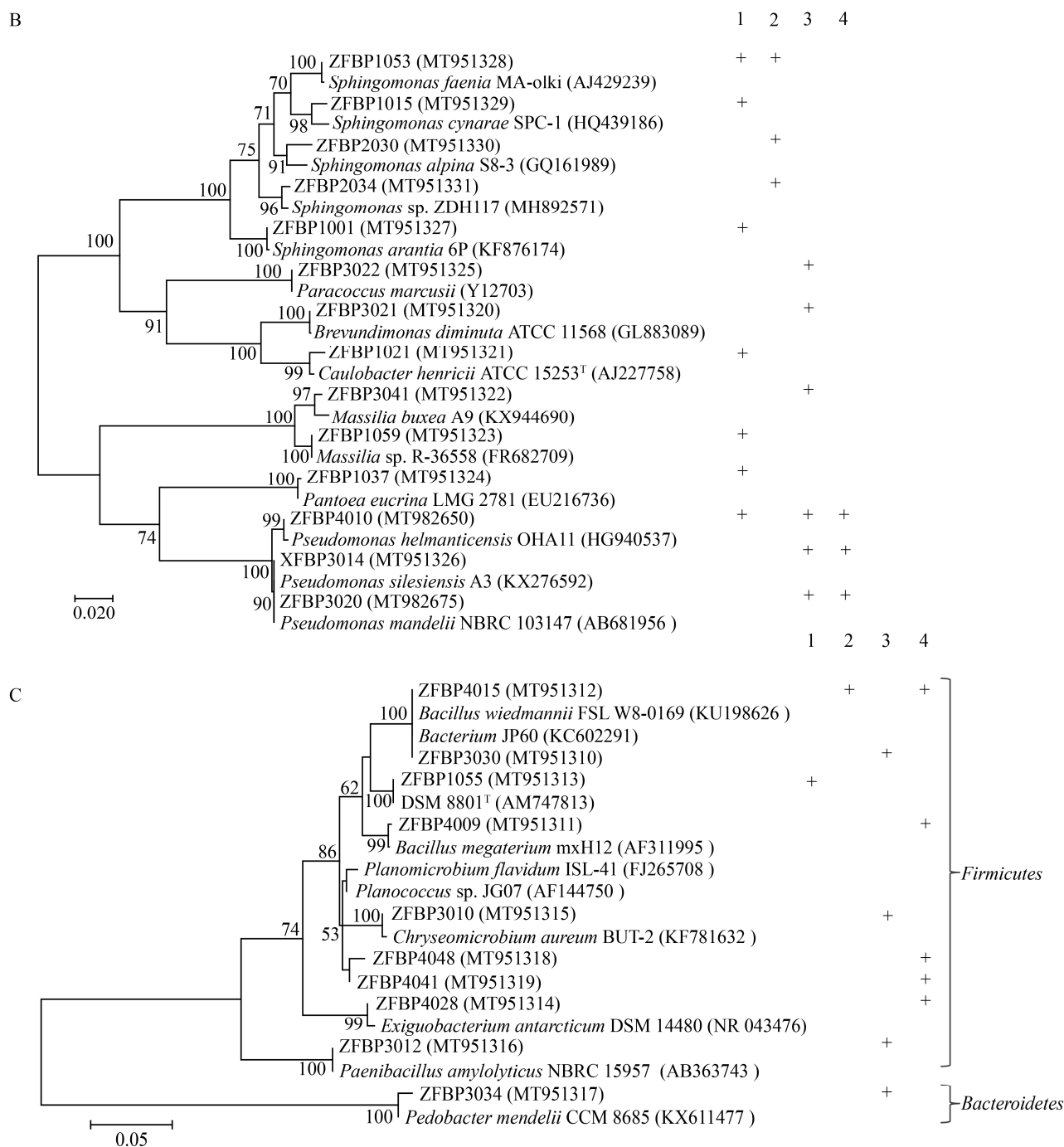


图2 可培养石生细菌基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of culturable lithophilous bacteria based on 16S rRNA gene sequences

注：系统发育树采用最大似然法构建，A：放线菌门；B：变形菌门；C：厚壁菌门和拟杆菌门。分支节点数值表示 Bootstrap 值 (1 000 次重复的百分比)；标尺代表遗传变异系数；括号中的序号为 GenBank 登录号。1：石隙生样品 1；2：石隙生样品 2；3：石下生样品 3；4：石下生样品 4；+表示同一菌株在 4 个样品中的分布情况

Note: Phylogenetic trees were constructed by Maximum Likelihood method, A: Actinobacteria; B: Proteobacteria; C: Firmicutes and Bacteroidetes. The bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch nodes; The scale represents the coefficient of genetic variation; Numbers in parentheses represent the accession number of the sequence in GenBank. 1: Chasmoendolithic sample 1; 2: Chasmoendolithic sample 2; 3: Hypolithic sample 3; Hypolithic sample 4; + represents the distribution of the same strain in 4 samples

在属水平上, 如图 3B 所示, 石隙生生境中共有 14 个属, 鞘脂单胞菌属、链霉菌属和节杆菌属菌株在石隙生生境中占绝对优势, 属于优势属, 分别有 5、5 和 4 株可培养石隙生菌株; 石下生生境中共有 17 个属, 石下生菌株则以潘氏杆菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属和假杆菌属的菌株为主, 每个属均有 3 株可培养石下生菌株。2 种生境下, 可培养石生细菌无论是门水平还是属水平的多样性均是石下生生境略高于石隙生生境。

2.3 不同海拔可培养石隙生细菌多样性和物种丰度

在所有已鉴定的菌株中, 石隙生菌株共 25 株, 海拔 6 338 m 共有 14 株, 海拔 5 161 m 共

有 11 株。在门水平上, 如图 4A 所示, 海拔 6 338 m 石隙生菌株分属于 3 个门, 分别是变形菌门、厚壁菌门和放线菌门, 优势门为放线菌门, 共有 7 株石隙生菌株; 海拔 5 161 m 石隙生菌株分属于 2 个门, 分别是变形菌门和放线菌门, 优势门为放线菌门, 共有 9 株石隙生菌株。

在属水平上, 如图 4B 所示, 海拔 6 338 m 石隙生菌株共有 11 个属, 分别是土壤球菌属 (*Agrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、嗜盐菌属 (*Glaciihabitans*)、拉贝德拉属(*Labedella*)、泥球菌属(*Spelaicoccus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、柄杆菌属(*Caulobacter*)、马赛菌属(*Massilia*)、泛生菌属(*Pantoea*)和鞘脂单胞菌

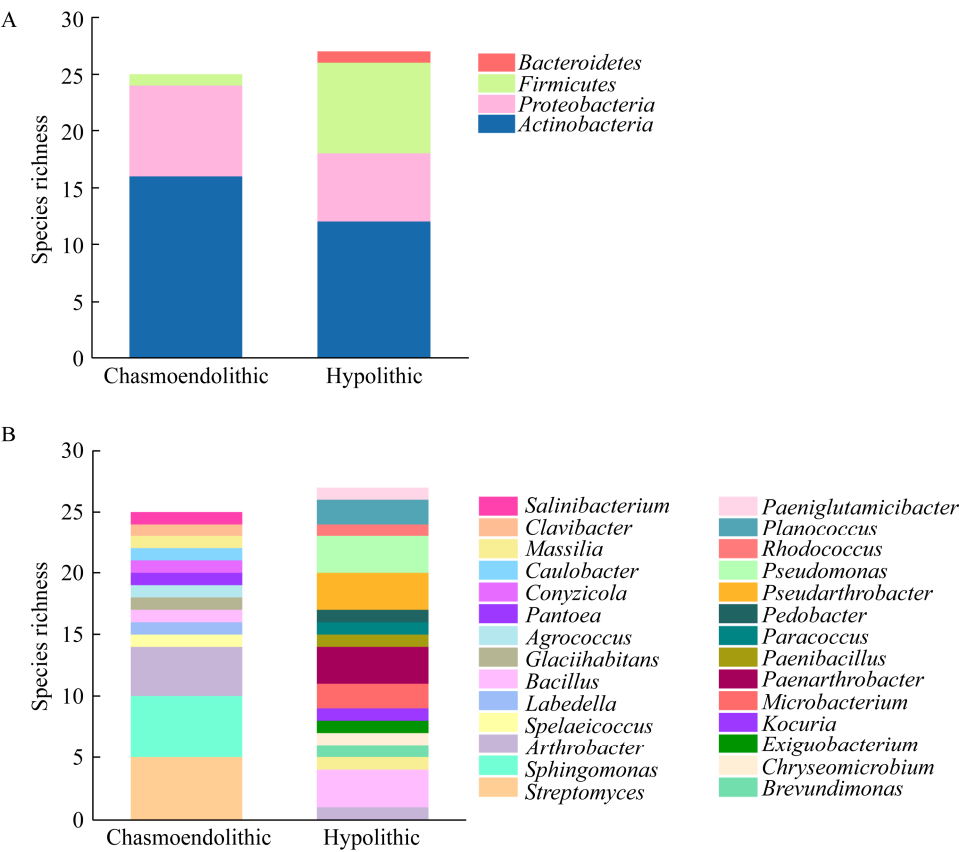


图 3 不同生境可培养石生细菌的物种丰度
Figure 3 Species richness of culturable lithophilous bacteria in different habitats
注: A: 门水平; B: 属水平
Note: A: Phyla level; B: Genus level

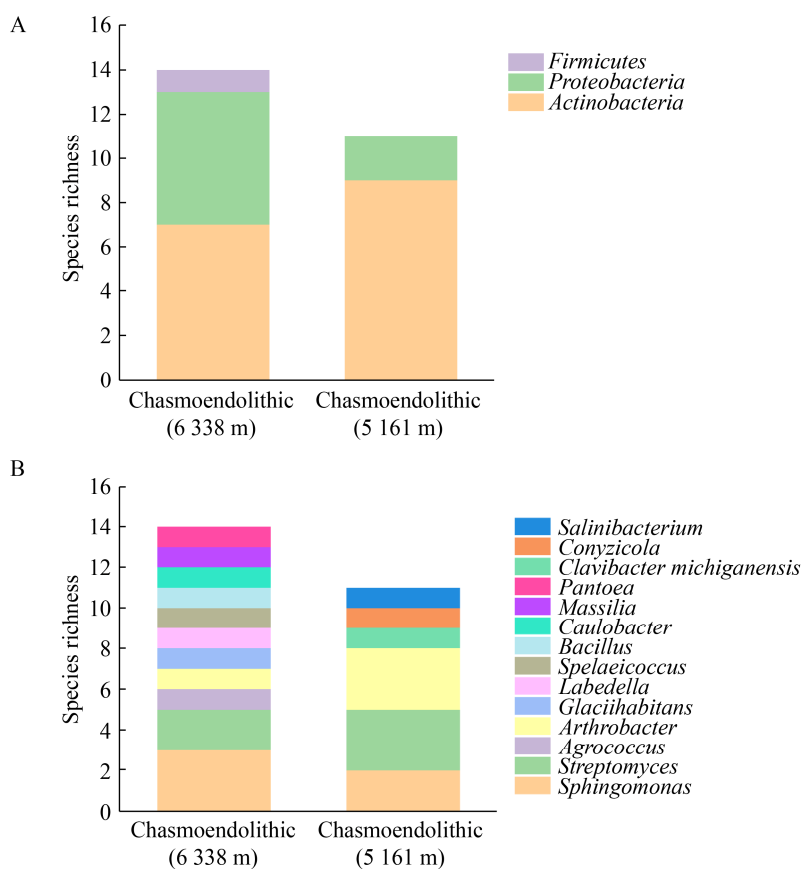


图4 不同海拔可培养石隙生细菌的物种丰度

Figure 4 Species richness of culturable chasmoendolithic bacteria at different elevations

注: A: 门水平; B: 属水平

Note: A: Phyla level; B: Genus level

属 (*Sphingomonas*), 优势属为鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*), 共有 3 株石隙生菌株; 海拔 5161 m 石隙生菌株共有 6 个属, 分别是节杆菌属 (*Arthrobacter*)、密歇根棒状杆菌属 (*Clavibacter michiganensis*)、盐杆菌属 (*Salinibacterium*)、*Conyzicola*、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*), 优势属为节杆菌属 (*Arthrobacter*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*), 每个属均有 3 株石隙生菌株。总的来说, 可培养石隙生细菌无论是在门水平还是属水平, 均是高海拔多样性(6338 m)略高于低海拔多样性(5161 m)。

2.4 可培养石生细菌产色素比例

珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌大多数能够产色素, 可培养得到的 52 株细菌中, 有 40 株能够

产色素, 产色素比例为 76.9%, 主要的色素颜色为黄色、橙色(图 5)。

2.5 可培养石生细菌抗紫外辐射能力

采用 UV-C 对可培养石生细菌进行了抗紫外辐射能力筛选, 辐射强度分别为 100 J/m^2 和 300 J/m^2 , 选用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 作为阴性对照, 选用耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 作为阳性对照。经过 100 J/m^2 紫外辐照后发现, 共有 32 株菌抗紫外辐射存活率高于阴性对照, 存活率最高的菌株为 ZFBP1009, 达到 47%, 而且有 10 株菌的抗紫外辐射存活率显著高于阳性对照 ($P < 0.05$) (图 6A)。经过 300 J/m^2 紫外辐照后发现, 抗紫外辐射存活率高于阳性对照的仅剩 5 株 ($P < 0.05$), 存活率最高的菌株为 ZFBP4009, 共有

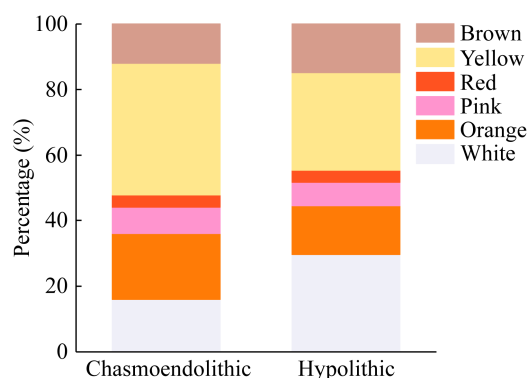


图5 可培养石生细菌产色素比例

Figure 5 Percentage of pigment produced by cultivable lithophilous bacteria

10 菌株的抗紫外辐射存活率高于大肠杆菌(图 6B)。辐照后无论是 100 J/m^2 还是 300 J/m^2 , 菌株 ZFBP4009 和 ZFBP1009 的抗紫外辐射存活率都远高于阳性对照。

3 讨论与结论

珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌主要归类于 4 个门, 分别为放线菌门、变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门。已有研究表明, 南极菲尔德斯半岛可培养细菌优势菌门为变形菌门和放线菌门^[11]; 智利阿塔卡马沙漠石生微生物群落主要为蓝细菌、芽单胞菌和放线菌^[12]; 墨西哥南部玛雅考古遗址的主要石生细菌群落为放线菌门和变形菌门^[13]; 我国河西走廊黑戈壁可培养细菌优势菌门为放线菌门和厚壁菌门^[14], 昆仑山垭口不同深度土壤可培养细菌优势菌门为放线菌门^[15], 七一冰川、老虎沟 12 号冰川、岗什卡冰川和宁缠河 3 号冰川前缘裸岩石隙生可培养细菌的研究归类为放线菌门、厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门^[9]。本研究结果显示, 变形菌门和放线菌门为石生可培养细菌的优势菌门, 这 and 不同极端环境中的可培养细菌研究结果基本一致。

研究区域可培养石隙生细菌和石下生细菌分别归类为 14 个属和 17 个属, 芽孢杆菌属、节杆菌属和马赛菌属在石隙生生境和石下生生境中均存

在, 其余各属均只存在于一种生境中。在珠穆朗玛峰这种极端高海拔环境中, 可培养石生细菌仍然具有很高的多样性, 主要是由于石头为微生物群落提供了一个避免胁迫影响的理想庇护场所^[16], 保持了一定的湿度和避免极度干旱; 另外, 岩石本身被认为是一个低营养环境, 在这种环境中岩石矿物组成对微生物群落结构的作用不容忽视^[12]。石隙生生境中的优势属为链霉菌属, 其能够产生抗干燥和耐热的孢子, 有利于在不利环境下长期存活^[17], 相比于石下生具有一定湿度的环境^[18], 石隙生环境相对干燥, 更有利于链霉菌属的生长。石隙生生境中属于优势属的链霉菌能够产生多种次级代谢物质, 具有很强的抗生素生产潜力, 也被用来当作天然产物生产的底盘生物^[19-20]。目前对于链霉菌的研究范围在不同环境中不断扩大, 尤其是从各种极端环境中进行的筛选分离^[21], 从珠穆朗玛峰北坡筛选分离可培养石生细菌, 有利于开发特殊环境中的链霉菌资源。石下生生境中的优势属芽孢杆菌在各种环境中广泛分布, 由于其抑制植物病原体的能力而被广泛用作农业领域的生物防治剂^[22], 而且芽孢杆菌分泌的黏性物质对于结皮的形成起着重要的作用^[23]。研究区域可培养石隙生细菌无论是在门水平还是属水平上, 均表现出了高海拔多样性略大于低海拔的趋势(图 4), 表明微生物多样性随海拔变化趋势受所在生境差异影响而表现出不同规律。Wang 等^[24]研究发现细菌丰富度随着海拔增高而增加, 原因可能与碳供应增加有关, 与本研究结果相似。张丹丹等^[3]研究发现土壤细菌多样性随海拔增加而降低, 与本研究结果相反。也有研究指出, 土壤细菌的多样性通常与海拔无关, 在多样性上没有明显的海拔梯度, 细菌表现出的生物地理模式与动植物有着根本的不同, 并不遵循大生物体的海拔多样性模式^[25-26], 说明微生物多样性在不同生境中随着海拔分布存在一定差异性, 存在微生物多样性随着海拔增加升高、降低

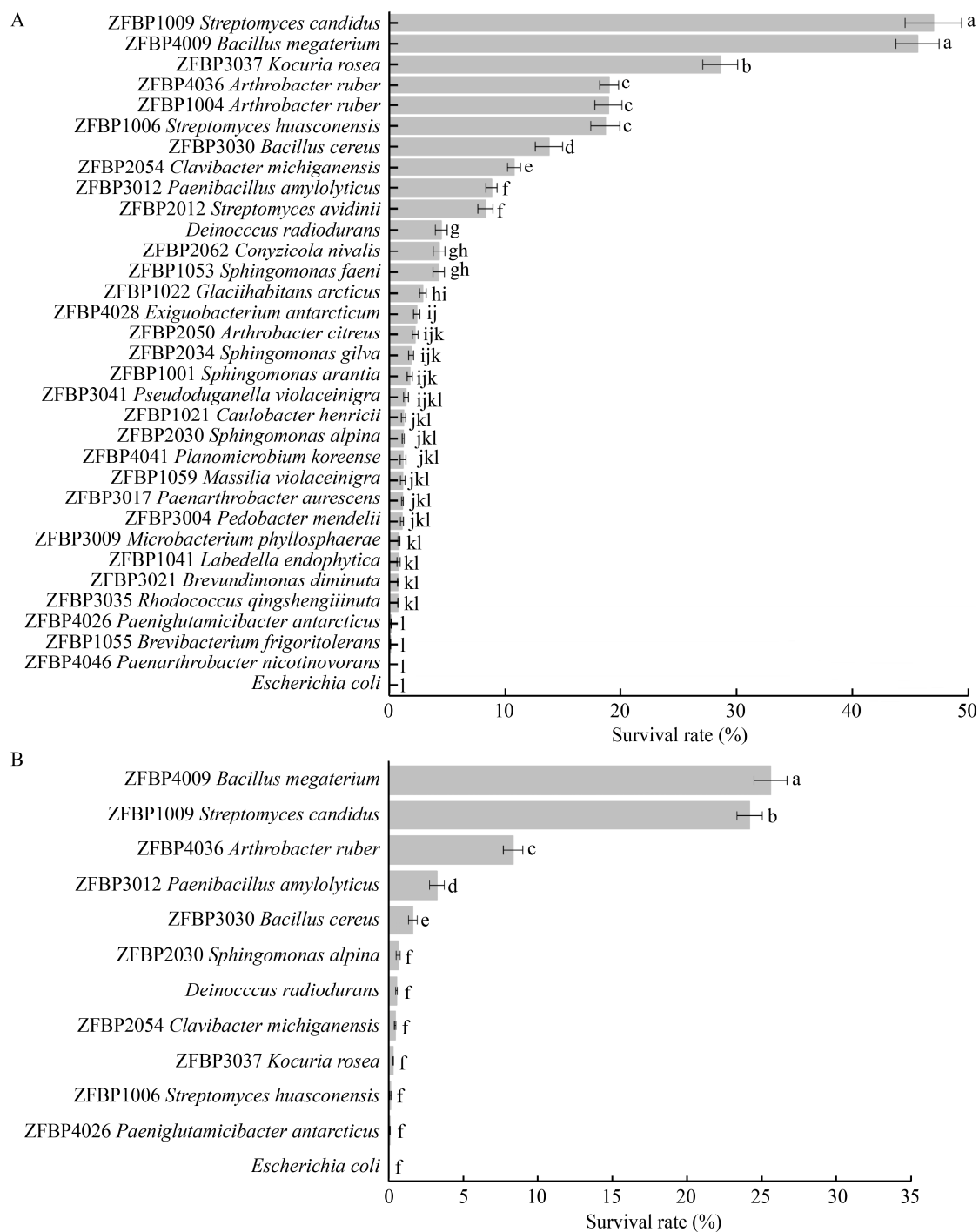


图 6 珠穆朗玛峰北坡部分可培养石生菌株抗紫外辐射存活率

Figure 6 Survival rate of anti-ultraviolet radiation of partial cultivable lithophilous strains on the north slope of Mount Everest

注：A：菌株在 100 J/m² 紫外辐射强度下的存活率；B：菌株在 300 J/m² 紫外辐射强度下的存活率。*Deinococcus radiodurans* 表示阳性对照；*Escherichia coli* 表示阴性对照。不同小写字母之间代表差异显著 ($P < 0.05$)

Note: A: The survival rate of the strain at 100 J/m² UV radiation intensity; B: The survival rate of the strain at 300 J/m² UV radiation intensity. *Deinococcus radiodurans* represents the positive control; *Escherichia coli* represents the negative control. Different lowercase letters represent significant statistical differences ($P < 0.05$)

和无明显趋势等多种情况。本研究结果可能是由于珠穆朗玛峰北坡高海拔相比低海拔环境中营养物质更少, 有研究表明微生物常年处在寡营养条件下反而有利于微生物生长, 营养多了会产生肥岛效应, 反而降低了微生物多样性^[27]。

从珠穆朗玛峰分离到的可培养石生细菌有 76.9% 可以产色素, 已有研究发现, 扎当冰川、绒布冰川和玉珠峰冰川菌落产色素的比例分别为 61%、85% 和 89%^[28], 说明在高海拔的极端环境下细菌普遍具有较高的产色素能力, 并且细菌产生的色素能够成为合成染料的替代品, 具有生长迅速、易于加工和不受天气影响的优势^[29]。已有研究表明, 从公园湖岸分离的抗紫外辐射的短杆菌为橙红色^[30], 从戈壁土壤分离的抗紫外辐射球菌为橙红色^[31], 从伊朗放射性现场分离的抗紫外球菌为黄色^[32]。本研究中筛选到的抗辐射菌株大部分也能产生色素, 表明色素对于菌株的抗辐射能力起到了至关重要的作用。据报道, 色素与细菌的抗逆性具有重要的联系^[33], 菌体产生的色素对细菌具有明显的辐射保护功能^[34-35], 主要体现在类胡萝卜素高效的自由基清除能力、防止自由基对菌体的氧化损伤^[36-37]以及色素直接吸收屏蔽紫外辐射^[28]。另外, 可培养石生细菌之所以能在高辐射强度下产生高的存活率, 除了色素的保护作用外, 高效的 DNA 损伤修复系统^[38]、特殊的细胞壁结构^[39]以及抗氧化防御系统^[40]也发挥了相应的作用。

在珠穆朗玛峰北坡这种极端环境中生长的微生物长期受到强辐射的影响。在 300 J/m² 辐射强度下对珠穆朗玛峰北坡可培养石生细菌进行筛选, 发现可培养石生细菌表现出了较高的抗紫外辐射能力; 筛选出了 5 株抗紫外辐射能力高的菌株, 其中抗紫外辐射能力最高的菌株是芽孢杆菌属 ZFBP4009, 抗紫外辐射存活率达到 25.57%。智利阿塔卡马沙漠微生物紫外辐射研究发现, 抗辐射能力最好的菌株 S3.300-2 比大肠杆菌高出 10 倍, 在 0-300 J/m² 辐射范围下, 抗辐射能力略

低于耐辐射奇球菌^[41], 而本研究中, 抗紫外辐射能力最好的芽孢杆菌属菌株 ZFBP4009 比耐辐射奇球菌高出 50 倍, 抗紫外辐射能力远远高于菌株 S3.300-2, 这是由于芽孢杆菌能产生抗逆芽孢, 具有很强的生存适应能力^[42]。因此, 珠穆朗玛峰北坡这种强辐射极端环境中孕育了高抗紫外辐射能力的物种, 是一个可以筛选高抗紫外辐射能力菌株资源的理想场地。

致谢: 感谢第二次青藏高原综合科学考察珠峰科考队各位老师采样过程中提供的帮助和指导。

REFERENCES

- [1] Jenkins MD, Drever JI, Reider RG, Buchanan T. Chemical composition of fresh snow on Mount Everest[J]. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 1987, 92(D9): 10999-11002
- [2] Tian Y, Hu HJ, Yang XD. The highest peak in the world Mount Everest[J]. *Forest & Humankind*, 2014(10): 70-81 (in Chinese)
田园, 胡慧建, 杨旭东. 世界最高峰珠穆朗玛峰[J]. *森林与人类*, 2014(10): 70-81
- [3] Zhang DD, Zhang LM, Shen JP, Wang M. Soil bacterial and fungal community succession along an altitude gradient on Mount Everest[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(7): 2247-2261 (in Chinese)
张丹丹, 张丽梅, 沈菊培, 旺姆. 珠穆朗玛峰不同海拔梯度上土壤细菌和真菌群落变化特征[J]. *生态学报*, 2018, 38(7): 2247-2261
- [4] Liu YQ, Yao TD, Kang SC, Jiao NZ, Zeng YH, Huang SJ, Luo TW. Characteristics of bacterial communities in main habitats above 6000 m on the northern slope of Mount Everest[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(13): 1542-1547 (in Chinese)
刘勇勤, 姚檀栋, 康世昌, 焦念志, 曾永辉, 黄思军, 骆庭伟. 珠穆朗玛峰北坡 6000m 以上主要生境细菌群落特征[J]. *科学通报*, 2007, 52(13): 1542-1547
- [5] Yang XG, Qin DH, Zhang TJ, Kang SC, Qin X. Characteristics of the air temperature and humidity on the north slope of Mt Qomolangma[J]. *Acta Meteorologica Sinica*, 2012, 70(4): 855-866 (in Chinese)
杨兴国, 秦大河, 张廷军, 康世昌, 秦翔. 珠穆朗玛峰北坡地区气温和湿度变化特征[J]. *气象学报*, 2012, 70(4): 855-866
- [6] Guo JP, Xue HX, Ma ZY, Deng MJ, Wang PX, Chu D. Study on vertical structure of several meteorological elements in Mount Qomolangma Region[J]. *Plateau Meteorology*, 2013, 32(6): 1568-1579 (in Chinese)

- 郭建平, 薛红喜, 马兆岩, 邓敏君, 王鹏祥, 除多. 珠穆朗玛峰地区若干气象要素的垂直特征[J]. 高原气象, 2013, 32(6): 1568-1579
- [7] Wu MH, Zhang GS, Chen T, Liu GX, Zhang W. Advance in lithophilous microorganisms[J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(4): 64-73 (in Chinese)
吴明辉, 章高森, 陈拓, 刘光琇, 张威. 石生微生物研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(4): 64-73
- [8] Zhou NY. Radioresistant melanin-producing yeast-like fungi[J]. Microbiology China, 2012, 39(5): 722-723 (in Chinese)
周宁一. 耐辐射的产黑色素酵母状真菌[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 722-723
- [9] Wu MH. Structures and functions of lithobiotic microorganisms communities in Qinghai-Tibet Plateau Regions[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Institute of Eco-Environmental Resources, Chinese Academy of Sciences, 2018 (in Chinese)
吴明辉. 青藏高原地区石生微生物群落结构和功能研究[D]. 兰州: 中国科学院西北生态环境资源研究院硕士学位论文, 2018
- [10] Zhang W, Zhang GS, Liu GX, Wang L, Dong XP, Yue J, Li XR, An LZ. Characteristics of cultivable microbial community number and structure at the southeast edge of Tengger Desert[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(2): 567-577 (in Chinese)
张威, 章高森, 刘光琇, 王鹭, 董小培, 岳君, 李新荣, 安黎哲. 腾格里沙漠东南缘可培养微生物群落数量与结构特征[J]. 生态学报, 2012, 32(2): 567-577
- [11] Liu CY, Cong BL, Wang NF, Wang B, Yin XF, Liu F. Biodiversity, physiological and biochemical identification of culturable microorganisms from the soil of Fildes Peninsula, Antarctica[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2016, 38(6): 69-81 (in Chinese)
刘春影, 丛柏林, 王能飞, 王波, 尹晓斐, 刘峰. 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] DiRuggiero J, Wierzbos J, Robinson CK, Souterre T, Ravel J, Artieda O, Souza-Egipsy V, Ascaso C. Microbial colonisation of chasmoendolithic habitats in the hyper-arid zone of the Atacama Desert[J]. Biogeosciences, 2013, 10(4): 2439-2450
- [13] McNamara CJ, Perry IV TD, Bearce KA, Hernandez-Duque G, Mitchell R. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site[J]. Microbial Ecology, 2006, 51(1): 51-64
- [14] Zhang ZQ, Zhang BL, Zhang W, Liu GX, Chen T, Liu Y, Chen JW, Tian M. Distribution characteristics and anti-radiation activity of culturable bacteria in black Gobi ecosystem of the Hexi Corridor[J]. Journal of Desert Research, 2020, 40(4): 52-62 (in Chinese)
张振清, 张昂林, 张威, 刘光琇, 陈拓, 刘阳, 陈警伟, 田茂. 河西走廊黑戈壁生态系统中可培养细菌分布特征及抗辐射活性[J]. 中国沙漠, 2020, 40(4): 52-62
- [15] Zhang BG, Liu XJ, Wu QB, Liu GX, Chen T, Zhang W, Zhang GS, Wu XK, Deng YS. Research of the soil bacteria community characteristics at different depths in Kunlun Mountains Pass, Tibetan Plateau[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2016, 38(3): 776-784 (in Chinese)
张宝贵, 刘晓娇, 吴青柏, 刘光琇, 陈拓, 张威, 章高森, 伍修锐, 邓友生. 青藏高原昆仑山垭口不同深度土壤可培养细菌群落特征研究[J]. 冰川冻土, 2016, 38(3): 776-784
- [16] Benardini JN, Sawyer J, Venkateswaran K, Nicholson WL. Spore UV and acceleration resistance of endolithic *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia[J]. Astrobiology, 2003, 3(4): 709-717
- [17] Liang YP, Zong ZF, Ma Q. Inhibiting and promoting effect on plants of six strains endophytic actinomycetes isolated from wild plants[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2007, 35(7): 131-136 (in Chinese)
梁亚萍, 宗兆锋, 马强. 6 株野生植物内生放线菌防病促生作用的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(7): 131-136
- [18] De Los Ríos A, Grube M, Sancho LG, Ascaso C. Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(2): 386-395
- [19] Liu R, Deng ZX, Liu TG. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 74-84
- [20] Ikeda H, Shin-Ya K, Omura S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(2): 233-250
- [21] Dai FP, Li SW. Progress on the secondary metabolites and applications of *Streptomyces*[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(3): 30-35 (in Chinese)
代芳平, 李师翁. 链霉菌次级代谢物及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(3): 30-35
- [22] Kim SY, Lee SY, Weon HY, Sang MK, Song J. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 241: 112-115
- [23] Zhang YM, Wang XQ. Summary on formation and developmental characteristics of biological soil crusts in desert areas[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(16): 4484-4492 (in Chinese)
张元明, 王雪芹. 荒漠地表生物土壤结皮形成与演替特征概述[J]. 生态学报, 2010, 30(16): 4484-4492
- [24] Wang JJ, Soininen J, Zhang Y, Wang BX, Yang XD, Shen J.

- Contrasting patterns in elevational diversity between microorganisms and macroorganisms[J]. *Journal of Biogeography*, 2011, 38(3): 595-603
- [25] Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, Rapp JM, Silman MR, Knight R. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals[J]. *Ecology*, 2011, 92(4): 797-804
- [26] Shen CC, Liang WJ, Shi Y, Lin XG, Zhang HY, Wu X, Xie G, Chain P, Grogan P, Chu HY. Contrasting elevational diversity patterns between eukaryotic soil microbes and plants[J]. *Ecology*, 2014, 95(11): 3190-3202
- [27] Li WY, Li HY, Sun WW, Ji XL, Wei YL. Diversity of culturable low-temperature bacteria in vertical climate zones of Mingyong glacier[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(5): 2070-2077 (in Chinese)
- 李文玉, 李浩宇, 孙万万, 季秀玲, 魏云林. 明永冰川垂直气候带中可培养低温细菌多样性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(5): 2070-2077
- [28] Shen L. Research of the physiological and ecological characteristics of culturable bacteria from ice and snow environments, Tibetan Plateau[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese)
- 沈亮. 青藏高原冰雪极端环境中可培养细菌生理生态特征研究[D]. 北京: 中国科学院青藏高原研究所博士学位论文, 2015
- [29] Rao MPN, Xiao M, Li WJ. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1113
- [30] Lü X, Xing RY, Zhou XB, Liu QM, Zheng H. Isolation and characterization of a novel radiation-resistant rod-shaped bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(3): 301-307 (in Chinese)
- 吕星, 邢瑞云, 周绪斌, 刘琼明, 郑晖. 一种短杆状耐辐射菌的分离与鉴定[J]. *微生物学报*, 2003, 43(3): 301-307
- [31] Tang R, Yuan ML, Wu J, Chen M, Zhang W, Lin M. Isolation and identification of an irradiation-resistant bacterium strain of *Kocuria*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(2): 276-280 (in Chinese)
- 唐然, 袁梦龙, 吴菁, 陈明, 张维, 林敏. 一株耐辐射克氏菌的分离与鉴定[J]. *核农学报*, 2010, 24(2): 276-280
- [32] Mirzaie A, Mehrabadi JF, Amirmozafari N, Nejadstatti T. Isolation and characterization of a new gamma and UV radiation resistant bacterium from soil samples of an Iranian radioactive site and analysis of its pigment[J]. *Microbiology*, 2015, 84(3): 449-452
- [33] Liu Y, Gao JP, Xu CH. Progresses in the study on light harvesting pigment protein complexes and reaction centers from purple bacteria[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(6): 567-574 (in Chinese)
- 刘源, 高金鹏, 徐春和. 紫细菌捕光色素蛋白复合体及光化学反应中心的研究进展[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(6): 567-574
- [34] Yang Q, Zhang JX, Zhu SQ, Fan CP, Zhang LZ, Fang CX. Study on the radiation-resistant substance of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Journal of Analytical Science*, 2004, 20(5): 465-467 (in Chinese)
- 杨桥, 张俊祥, 朱石桥, 范成鹏, 张珞珍, 方呈祥. 耐辐射奇球菌抗辐射物质的研究[J]. *分析科学学报*, 2004, 20(5): 465-467
- [35] Cox MM, Battista JR. *Deinococcus radiodurans*: the consummate survivor[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(11): 882-892
- [36] Yang Q, Zhang XL, Zhang L, Dai J, Zhang JX, Jiao BH. Effects of carotenoids on the radioresistance of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36(6): 715-721 (in Chinese)
- 杨桥, 张晓玲, 张磊, 代俊, 张俊祥, 焦炳华. 类胡萝卜素在耐辐射奇球菌辐射抗性中的作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(6): 715-721
- [37] Fraser PD, Bramley PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(3): 228-265
- [38] Minton KW. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. *Mutation Research/DNA Repair*, 1996, 363(1): 1-7
- [39] Rothfuss H, Lara JC, Schmid AK, Lidstrom ME. Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1[J]. *Microbiology*, 2006, 152(9): 2779-2787
- [40] Zhao ZC, Zhang YX, Zhou ZF, Zhang W, Chen M. Research progress on resistance and tolerance mechanisms against oxidative stress of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Current Biotechnology*, 2013, 3(2): 109-114 (in Chinese)
- 赵忠朝, 张玉秀, 周正富, 张维, 陈明. 耐辐射异常球菌抗氧化保护机制的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2013, 3(2): 109-114
- [41] Paulino-Lima IG, Azua-Bustos A, Vicuña R, González-Silva C, Salas L, Teixeira L, Rosado A, Da Costa Leitao AA, Lage C. Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama desert, Chile[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 65(2): 325-335
- [42] Xie YL, Ma LZ, Xu ZW, Du Z, Gao XW. Molecular identification of *Bacillus* strains isolated from extreme dry-sand environment in Qinghai Chaidamu region and its lipopeptide compound analysis[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(8): 1079-1086 (in Chinese)
- 谢永丽, 马莉贞, 徐志伟, 杜卓, 高学文. 青海柴达木极端干旱沙地分离芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性分析[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1079-1086