

祁连山七一冰川及融水中细菌多样性的研究

谢君¹, 王宁练^{1*}, 陈亮², 李全莲¹, 贺建桥¹, 蒋熹¹, 武小波¹

(1. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所冰冻圈科学国家重点实验室, 兰州 730000; 2. 中国科学院大气物理研究所, 北京 100029)

摘要:通过荧光显微镜测定细菌密度, 利用分离培养和16S rDNA序列分析细菌种类多样性, 对祁连山七一冰川雪及融水中的细菌数量和多样性进行了研究. 结果表明, 七一冰川雪及融水中微生物总数为 $10^3 \sim 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可培养细菌数为 $0 \sim 600 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. 恢复出的 22 株不同种类的细菌隶属于 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 和 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria* 共 6 个类群, 其中 *Bacteroidetes* 占总类群的 80%, 为优势类群; *Pedobacter* 和 *Pseudomonas* 属为优势菌, 占可培养细菌数量的 90%. 与青藏高原、南北极冰雪中微生物的比较分析发现 *Pantoea*、*Providencia*、*Terrabacter* 及 *Aerococcus* 这 4 个属和 *Oxalobacteraceae* 细菌是七一冰川的地方种类, 在其它低温环境中未被发现.

关键词:七一冰川; 细菌数量; 细菌多样性

中图分类号: X172; X131.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)09-2735-06

Bacterial Diversity Recovered from Qiyi Glacier and Runoff, Qilian Mts.

XIE Jun¹, WANG Ning-lian¹, CHEN Liang², LI Quan-lian¹, HE Jian-qiao¹, JIANG Xi¹, WU Xiao-bo¹

(1. State Key Laboratory of Cryospheric Science, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 2. Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China)

Abstract: Abundance and species diversity of bacteria were investigated respectively by epifluorescence microscope, the culture method and the analysis of 16S rDNA genes, with snow and runoff samples from Qiyi Glacier in the Qilian Mts. According to the results, the total microbial cells and bacterial CFU range from 10^3 to $10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0-600 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The 16S rDNA gene of 22 bacterial isolates recovered from snow and runoff samples belong to following groups: *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and α , β , γ -*Proteobacteria*. Based on their 16S rRNA sequences, *Bacteroidetes* forms the largest cluster in terms of abundance (80% of all isolates) and *Pedobacter* and *Pseudomonas* form the dominant genera in terms of abundance (90% of all isolates). Compared with bacteria revealed from ice and snow in Qinghai-Tibet Plateau, South Pole and North Pole which have been reported, the bacteria belonging to *Pantoea*, *Providencia*, *Terrabacter*, *Aerococcus* and *Oxalobacteraceae* are especially exist in Qiyi Glacier as far as we know.

Key words: Qiyi Glacier; bacterial abundance; bacterial diversity

青藏高原是中低纬度冰川研究的热点地区. 祁连山位于青藏高原东北边缘, 发育着众多的冰川, 是河西走廊水资源的主要源地. 由于其紧邻内陆干旱半干旱地区, 在区域水循环和气候环境研究中具有重要意义, 是中国最早钻取冰芯进行古气候环境研究的地区^[1,2]. 七一冰川(39.5°N, 97.5°E)位于祁连山走廊南山北坡, 属于亚大陆型冰川, 是我国研究较早的冰川, 先后进行了冰川物理化学、水文、气候等多方面的观测研究^[3-9], 发现七一冰川对环境的变化非常敏感.

冰川中存在着种类繁多的微生物. 近年来, 在世界各地的冰川表面及深层冰芯中, 发现了大量的微生物, 如在青藏高原慕士塔格及普若刚日冰芯中发现了大量的细菌^[10-13]; 在马尔冰芯中发现了放线菌和细菌^[14-16]; 在格陵兰冰芯发现真菌、藻类、原生生物、细菌^[17-19]. 目前关于冰川微生物的研究, 以深层冰芯中微生物的研究较多^[16,20,21], 对冰川表面雪及

雪坑中微生物的研究进行的较少^[22-26]. 七一冰川微生物方面的研究进行的很少, Takeuch 等^[27]对七一冰川表面微生物与冰尘形成的关系及对冰川表面辐射的影响做了研究, 而七一冰川雪冰及融水中的微生物群落组成一直缺乏研究. 在最近数 10 年, 受全球变暖大环境影响, 七一冰川处于严重的物质亏损阶段^[3], 冰川融水对下游干旱区的生态和社会发展具有重要的影响. 研究这个时期的雪冰及融水中微生物的组成具有重要的现实意义. 本实验以七一冰川不同海拔高度的雪样及融水样为研究对象, 对其微生物总数和可培养细菌的量及种属组成进行了

收稿日期: 2008-10-20; 修订日期: 2008-12-08

基金项目: 中国科学院创新团队国际合作伙伴计划项目(CXTD-Z2005-2); 国家杰出青年科学基金项目(40525001); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB422003); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-310)

作者简介: 谢君(1981~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为冰川雪冰微生物, E-mail: xiejun@lzb.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: nlwang@lzb.ac.cn

分析,以进一步揭示冰川微生物与环境气候的关系.

1 材料与方法

1.1 样品采集

2008年6月在七一冰川(39.5°N, 97.5°E)表面不同海拔高度共采集了6个表面雪样,海拔高度分别为4330、4380、4470、4600、4710和4830 m;同时在七一冰川的不同位点采集了3个融水样,海拔高度分别为3930、4330和4380 m.无菌方式进行样品采集,将样品分装入预先经高温灭菌的密封硬塑料瓶,以低温方式运回实验室并置-20℃冷库中贮存.

1.2 细菌总数测定

细菌总数计数参考文献[28]的方法进行.取10 mL冰芯融水用2.5%戊二醛固定后过滤于0.22 μm硝酸纤维素滤膜,2.5 × SYBR Gold(Molecular Probes, Eugene, OR)于暗处染色15 min后,用Olympus BX51显微镜计细菌总数,每个样计10个视野取平均值.

1.3 细菌的分离培养

将40 mL雪样融水及冰川融水过滤到0.22 μm无菌Millipore微孔滤膜上,将滤膜悬浮在2 mL 0.9%的生理盐水中,充分振荡以悬浮细菌细胞,然后取200 μL涂布在固体培养基R2A和LB表面进行培养.挑取具有明显不同形态的菌落,用划线培养的方法继续在R2A和LB培养基上纯化.所有培养均在4℃和25℃温度下进行.培养2~15周后,统计每个平板上出现的菌落数,并计算其平均值.

1.4 恢复出的细菌16S rDNA基因序列分析

16S rDNA基因扩增反应直接用纯化的单菌落进行.用无菌牙签挑取纯单菌落到20 μL无菌去离子水中,96℃处理10 min使细胞裂解.PCR引物为8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')及1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').扩增体系:1 × PCR缓冲液(MBI),2.5 mmol/L MgCl₂ (MBI),正反向引物各0.2 μmol/L,0.2 mmol/L dNTP,1 U Taq DNA聚合酶(MBI),1 μL上述细胞裂解液用作DNA模板,总反应体系25 μL.同时用*E. coli* V517的染色体DNA做阳性对照,用无菌去离子水代替DNA模板用作PCR反应的阴性对照.扩增条件:94℃预变性1 min;94℃变性1 min,58℃复性1 min,72℃延伸1.5 min,共30个循环;72℃延伸10 min.PCR产物用1.0% (质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测.将10 μL纯化后的16S rDNA PCR产物分别用15 U限制性核酸内切酶Hae III和Alu I于37℃酶切3 h.酶切产物用3%

(质量分数)琼脂糖凝胶电泳分析.将具有不同ARDRA(amplified rRNA restriction analysis)带谱的DNA样品送至北京奥科生物技术有限责任公司进行测序.测序使用引物27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'),517F(5'-CCA GCA GCC GCG GTA AT-3')和907F(5'-AAA CTC AAA TGA ATT GAC GGG-3'),以及ABI Prism 3730XL96型毛细管测序仪.

1.5 序列的网上数据库比对分析及系统发育树构建

将每一个16S rDNA基因序列通过Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)与数据库的SSU rRNA序列进行相似序列搜索,根据最相似序列确定其系统发育地位.用Clust X(Thompson, 1997)对序列进行对位排序,MEGA3.1(molecular evolutionary genetics analysis)计算遗传距离,邻结法(Neighbor-joining)构建系统发育树状图.

本研究所获得的所有序列均已提交到GenBank数据库,序列登录号为:FJ165479-FJ165500.

2 结果与讨论

2.1 七一冰川不同海拔高度表层雪及融水中微生物数量的差异

已有的研究表明,不同冰川雪冰中微生物数量存在着明显的差异.老虎沟12号冰川雪坑^[29,30]内的微生物总数和可培养细菌数量分别为 $258.6 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $103.3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$;东绒布冰川雪坑^[29,30]的微生物总数和可培养细菌数量分别为 $6.7 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $8.4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$;海螺沟2号冰川雪坑^[29,30]的微生物总数和可培养细菌数量分别为 $110.8 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $63.8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$.

七一冰川雪中微生物总量为 $9.1 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,可培养细菌的量为 $126.9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$;七一冰川融水中微生物总量为 $42.0 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$,可培养细菌的量为 $271.8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图1).结合已有的研究结果可以看出,七一冰川雪中微生物总量及可培养细菌的量皆高于其它冰川,且远高于极地冰川中的细菌量(南极Taylor Dome, $0 \sim 10 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10^2 \sim 10^3 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$; Dyer Plateau, $0 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; Siple Station, $2 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; 北极Dye2, $1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[31].一方面,这可能与使用的培养基及培养条件的不同有关;另一方面,由于七一冰川靠近人类活动源区且周围多牧场,所以微生物的来源更为丰富.

同时,从图1可以看出,七一冰川雪样中微生物总量[图1(b)]与可培养细菌数量[图1(a)]呈现出了较好的对应关系,微生物总量较多的样中可培养

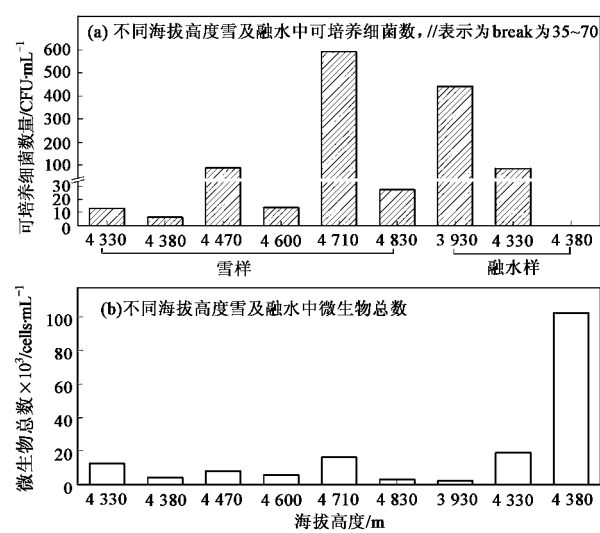


图1 微生物总数、可培养细菌数与对应的海拔高度图

Fig.1 Microbial numbers and the corresponding altitudes

细菌也较多;而融水样中微生物总量[图 1(b)]与可培养细菌数量[图 1(a)]没有呈现出相关性,这可能与培养基的选择及培养条件有关,融水中的部分细菌不能用固体培养基 R2A 和 LB 恢复出来.其中融

表 1 七一冰川雪及融水中可培养菌株的16S rDNA比对结果

Table 1 Blast result of 16S rDNA of the culturable bacteria of Qiye Glacial snow and runoff					
序列名	GenBank 登录号	科、属	序列名	GenBank 登录号	科、属
qy1	FJ165479	Micromonospora	qy12	FJ165490	Micrococcus
qy2	FJ165480	Unclassified	qy13	FJ165491	Oxalobacteraceae
qy3	FJ165481	Pseudomonas	qy14	FJ165492	Pseudomonas
qy4	FJ165482	Micrococcus	qy15	FJ165493	Pseudomonas
qy5	FJ165483	Pseudomonas	qy16	FJ165494	Pedobacter
qy6	FJ165484	Bacillus	qy17	FJ165495	Aerococcus
qy7	FJ165485	Pseudomonas	qy18	FJ165496	Massilia
qy8	FJ165486	Pantoea	qy19	FJ165497	Arthrobacter
qy9	FJ165487	Providencia	qy20	FJ165498	Leifsonia
qy10	FJ165488	Bacillus	qy21	FJ165499	Brevundimonas
qy11	FJ165489	Terrabacter	qy22	FJ165500	Oxalobacteraceae

本研究以所有菌株 1 kb 左右的 16S rDNA 序列和数据库中已有的相似序列建立了七一冰川雪及融水中可培养细菌类群的发育树(图 2).由图 2 可以看出七一冰川雪及融水中可培养细菌具有丰富的多样性,主要由 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 和 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria* 这 6 个类群组成,共包含 *Bacillus*、*Micromonospora*、*Pseudomonas*、*Micrococcus*、*Pantoea*、*Providencia*、*Terrabacter*、*Arthrobacter*、*Pedobacter*、*Aerococcus*、*Massilia*、*Leifsonia* 和 *Brevundimonas* 这 13 个属及 3 个未分属(属于 β 变形菌纲),其中 *Bacteroidetes* 占总类群成分的 80%,为优势类群(图 2).

水样中的微生物总数随着海拔高度的增加而出现明显的增加趋势[图 1(b)],这可能与 3 个样品采集的地点有关:海拔 3 930 m 处是冰川下游的融水样,流速较快,使得融水中微生物浓度较低;海拔 4 330 m 处是冰川末端的冰积湖,湖水不断得到冰川融水的补给且流速较慢,微生物浓度较高;海拔 4 380 m 处是冰川表面的湖水样,湖水面积较小,由于夏季冰川表面的冰雪融化速度较快,周围融水的不断渗入使得湖水中的微生物浓度达到了一个很高的水平,显著高于海拔 3 930 m 和海拔 4 330 m 处融水样中的微生物浓度.

2.2 七一冰川雪及融水中可培养细菌的多样性分析

从七一冰川雪及融水中共恢复出 22 株不同的菌株,登记序列号为:FJ165479-FJ165500(见表 1).其中冰川融水中共恢复出 5 株菌株(菌株序列名为:qy2、qy3、qy7、qy15、qy19),其余菌株均从冰川表层雪中分离得到的.由于序列号为 qy3、qy6、qy11、qy18、qy19 的菌株测定的只有 3'端较短的部分序列,其它序列测定的均为 5'端,因此无法将它们一起进行系统发育分析,故建立了 2 个系统发育树(见图 2).

七一冰川雪及融水中共恢复出 13 个不同属的细菌和 3 个未分属(属于 β -变形菌纲)(见表 1),隶属于 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 和 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria* 这 6 个类群.冰川融水中共恢复出 5 株菌株(菌株序列名为:qy2、qy3、qy7、qy15、qy19),属于 β -*Proteobacteria*(未分属、1 株); γ -*Proteobacteria* 中的 *Pseudomonas*(3 株);*Firmicutes* 中的 *Arthrobacter*(1 株).冰川雪中恢复出的细菌包括: α -*proteobacteria* 中的 *Brevundimonas*(1 株); β -*proteobacteria* 中的 *Oxalobacteraceae*(3 株); γ -*Proteobacteria* 中的 *Pantoea*(1 株)、*Pseudomonas*(2 株)和 *Providencia*(1 株);*Bacteroidetes* 中的 *Pedobacter*(1 株);*Actinobacteria* 中

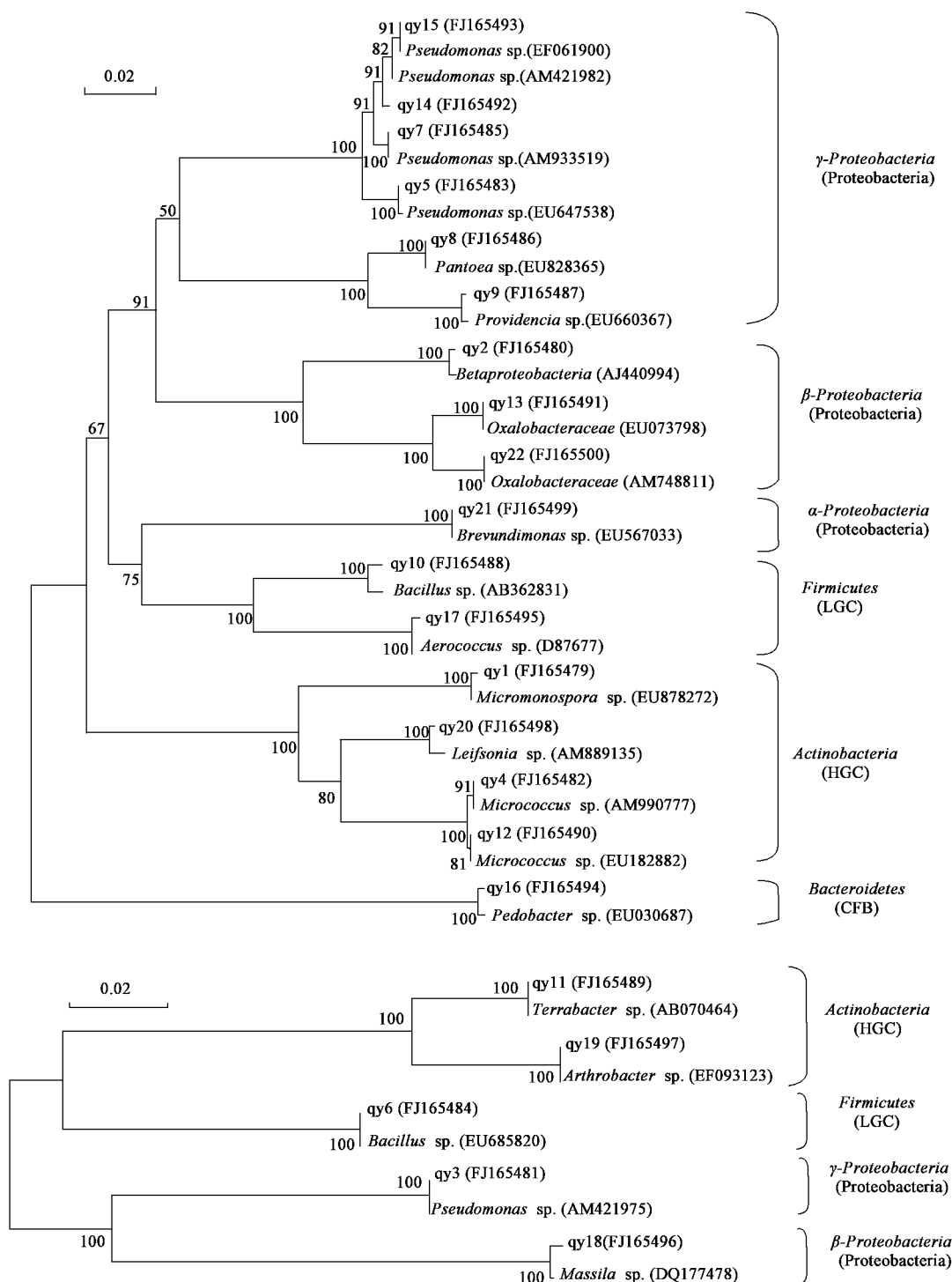


图2 七一冰川雪及融水中可培养细菌16S rDNA基因序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic dendrogram of partial 16S rDNA sequences from Qivi glacial snow and runoff isolates and their closest phylogenetic relatives

的 *Micrococcus* (2 株)、*Micromonospora* (1 株)、*Terrabacter* (1 株)、*Leifsonia* (1 株); *Firmicutes* 中的 *Bacillus* (2 株)、*Aerococcus* (1 株) (图 2). 分离菌株中, *Proteobacteria* 类中属的种类最多, 而 HGC、LGC 类和 CFB 类中, *Pedobacter*、*Bacillus*、*Arthrobacter*、

Brevundimona 和 *Pseudomonas* 属的细菌在七一冰川雪及融水中的可培养菌株中为优势种类,在数量上占可培养细菌的 90% 以上. *Bacillus*、*Brevundimonas*、*Micrococcus*、*Arthrobacter* 和 *Pseudomonas* 这 5 个属在极地及其他一些中低纬度冰川中都有分布;

Pedobacter 及 *Leifsonia* 属在其他低温环境下也有分布,但是分布不是很广;而 *Pantoea*、*Providencia*、*Terrabacter* 及 *Aerococcus* 这 4 个属和 *Oxalobacteraceae* 的细菌在其它冰川微生物的研究中鲜见报道,它们受地理环境条件的影响,可能是地方类群的细菌.这些生存在低温环境下的微生物有其特殊的生理和结构适应机制,如 *Bacillus* 属的细菌能在多种极端环境下形成芽孢而存活^[31,32], *Arthrobacter* 属的细菌在寡营养条件下能靠缩小细胞体积来抵抗恶劣环境^[19].

结合已有的雪坑和冰芯的细菌类群研究结果,笔者发现从七一冰川雪及融水中恢复出的细菌与青藏高原其它冰川雪冰中恢复出的细菌多样性存在着异同.张淑红^[29]的研究表明:东绒布冰川雪坑细菌由 β -*Proteobacteria*、*Actinobacteria* 和 *Firmicutes* 这 3 个类群组成;海螺沟 2 号冰川雪坑细菌由 α -*Proteobacteria*、 β -*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes* 和其它真细菌 6 个类群组成;老虎沟 12 号冰川雪坑细菌由 α 、 β -*Proteobacteria*、*Actinobacteria* 和 *Bacteroidetes* 这 4 个类群组成.而其它冰川冰芯微生物研究表明:马兰和普若刚日冰芯的主要菌群分别为 CFB 和 HGC (高 G + C% 细菌)^[13,21];慕士塔格冰芯的细菌类群包括 α 、 γ -*Proteobacteria*、CFB 和 HGC (高 G + C% 细菌)等^[11];东绒布冰芯^[33]的细菌类群由 *Firmicutes*、*Actinobacteria*、*Proteobacteria* 和 *Deinococcus-Thermus* 等不同的组分组成.归结起来,青藏高原冰川雪冰细菌主要由 *Actinobacteria*、*Firmicutes*、 α 、 β 、 γ 、 λ -*Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 和 *Deinococcus-Thermus* 等 8 大类群所组成.其中 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 和 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria* 为多数冰川雪冰的共有类群.而本研究中的七一冰川雪及融水中可培养细菌主要由 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 和 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria* 这 6 个类群组成,与其它冰川微生物的研究结果一致.分离出的多数菌株与分离自其它冰川、冻土、冰湖及海冰等寒冷生境的菌株在遗传关系上相近,而 *Pantoea*、*Providencia*、*Terrabacter* 及 *Aerococcus* 这 4 个属和 *Oxalobacteraceae* 科的细菌在其它冰川微生物的研究中未见报道:菌株 qy8 (*Pantoea* sp.)与豌豆上的细菌病原体 (EU828365)相似性为 100%;菌株 qy9 (*Providencia* sp.)与印度马纳尔湾珊瑚上的细菌 (EU660367)相似性 100%;菌株 qy11 (*Terrabacter* sp.)与一些有机物的降解菌 (AB070464)序列相似;菌株 qy13

(*Oxalobacteraceae*)与从煤炭层中分离的菌株 (EU073798)相似度达 100%;菌株 qy17 (*Aerococcus* sp.)与乳酸菌 (D87677)的序列相似度达 100%;菌株 qy18 (*Oxalobacteraceae*; *Massilia* sp.)与青藏高原永久冻土中分离出来的细菌 (DQ177478)的序列相似度达 100%.这些菌株的多样性说明七一冰川细菌来源复杂,这与七一冰川所处的地理位置关系密切.七一冰川 (39.5°N, 97.5°E) 位于祁连山走廊南山北坡,属于亚大陆型冰川,春(秋)季水汽来源于附近的内陆蒸发或干燥的西风气流在经过黑海、里海和咸海等相对温暖的水体时的快速蒸发;而夏季水汽来源主要受季风控制,除少数降水日有来自西部的少量水汽输送外,都来自东南(中国东南季风区)和南部(南亚),北部基本没有水汽输送^[34].这些水汽不仅携带来源区的海洋性细菌,在运输过程中也携带来自冻土、湖泊、沙漠等的细菌.复杂的水汽来源为七一冰川带来了种类繁多的微生物资源;同时,七一冰川周围多植被覆盖,且离人类居住点较近受人类活动影响较大,这也对七一冰川的微生物资源造成了一定的影响.

3 结论

七一冰川微生物的研究有其重要意义.从七一冰川雪及融水中分离出来的 20 种细菌分别属于 HGC、 α 、 β 、 γ -*proteobacteria*、CFB 和 LGC 共 4 大类的 13 个属及 3 个未分属(属于 β -变形菌纲),其中 *Bacteroidetes* 占总类群成分的 80%,为优势类群, *Pedobacter*、*Bacillus*、*Arthrobacter*、*Brevundimona* 和 *Pseudomonas* 等属的细菌为优势种类,为七一冰川雪及融水的优势属.而从七一冰川雪及融水中分离到的 *Pantoea*、*Providencia*、*Terrabacter* 及 *Aerococcus* 这 4 个属和 *Oxalobacteraceae* 科的细菌在其它冰川中未分离到,可能为七一冰川的地方种类.七一冰川特殊的地理位置及复杂的周边环境决定了其微生物的多样性和特殊性.对七一冰川微生物的研究,必将有助于冰川微生物与环境关系的深入研究.

参考文献:

- [1] Thompson L G, Thompson E M, Davis M E, et al. Holocene-Late Pleistocene climatic ice core records from Qinghai-Tibetan Plateau [J]. Science, 1989, 246: 474-477.
- [2] 姚檀栋,谢自楚,武筱舸,等. 敦德冰帽中的小冰期气候记录 [J]. 中国科学 B 辑, 1990, 11: 1196-1201.
- [3] 蒲建辰. 七一冰川最新物质平衡观测结果 [J]. 冰川冻土, 2005, 27(2): 199-204.

- [4] Fujita K, Sakai A, Matsuda Y, *et al.* Topographical survey of July 1st Glacier in Qilian Mountains, China[J]. Bull Glaciol Res, 2006, **23**: 63-67.
- [5] Sakai A, Matsuda Y, Fujita K, *et al.* Meteorological observation at July 1st Glacier in northwest China from 2002 to 2005[J]. Bull Glaciol Res, 2006, **23**: 23-32.
- [6] Sakai A, Matsuda Y, Fujita K, *et al.* Hydrological observations at July 1st Glacier in northwest China from 2002 to 2004[J]. Bull Glaciol Res, 2006, **23**: 33-39.
- [7] 陈亮, 段克勤, 王宁练, 等. 祁连山七一冰川消融期间的能量平衡特征[J]. 冰川冻土, 2007, **29**(6): 882-888.
- [8] 武小波, 李全莲, 宋高举, 等. 祁连山七一冰川融水化学组成及演化特征[J]. 环境科学, 2008, **29**(3): 613-618.
- [9] 周石砾, 中尾正义, 坂井亚规子, 等. 祁连山七一冰川积雪和大气降水中的氢氧稳定同位素变化[J]. 科学通报, 2007, **52**(18): 2187-2193.
- [10] Xiang S, Yao T, An L, *et al.* 16S rRNA Sequences and Differences in Bacteria Isolated Muztag Ata Glacier at Increasing Depths[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**: 4619-4627.
- [11] 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[J]. 中国科学, 2005, **35**(3): 252-262.
- [12] Zhang X, Yao T, An L, *et al.* A study on Vertical profile of Bacterial DNA Structure in Puruogangri Ice Core by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis[J]. Ann of Glaciol, 2006, **43**: 160-166.
- [13] Zhang X F, Yao T D, Tian L D, *et al.* Phylogenetic and Physiological Diversity of Bacteria Isolated from Puruogangri Ice Core[J]. Microb Ecol, 2008, **55**: 476-488.
- [14] Zhang X, Ma X, Yao T. Diversity of 16S rDNA and environmental factor influencing microorganism in MaLan ice core[J]. Chin Science Bull, 2003, **48**: 1146-1151.
- [15] Zhang X, Yao T, Ma X. Microorganism in a high Altitude Glacier Ice in Tibet, China[J]. Folia Microbiol, 2002, **47**: 241-245.
- [16] 张晓君, 姚檀栋, 马晓君, 等. 马兰冰川: 一支深冰芯中微生物特征的分析[J]. 中国科学, 2001, **31**: 295-299.
- [17] Willerslev E, Hansen A J, Christensen B, *et al.* Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice[J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, **96**(14): 8017-8021.
- [18] Miteva V I, Sheridan P P, Brenchley J E. Phylogenetic and Physiological Diversity of Microorganisms Isolated from a Deep Greenland Glacier Ice Core[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**: 202-213.
- [19] Miteva V I, Brenchley J E. Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120, 000-year-old Greenland glacier ice core [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, **71**(12): 7806-7818.
- [20] Christner B C, Mosley-Thompson E, Thompson L G, *et al.* Bacterial recovery from ancient glacial ice[J]. Environ Microbiol, 2003, **5**(5): 433-436.
- [21] 姚檀栋, 向述荣, 马晓军. 马兰和普若刚日冰芯记录的微生物学特征[J]. 第四纪研究, 2003, **23**(2): 193-199.
- [22] 张淑红, 侯书贵, 秦大河. 青藏高原冰川雪冰微生物研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, **13**(4): 592-596.
- [23] 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[J]. 科学通报, 2006, **51**(11): 1287-1296.
- [24] Liu Y, Yao T, Kang S, *et al.* Seasonal variation of snow microbial community structure in the East Rongbuk glacier, Mt. Everest[J]. Chin Sci Bull, 2006, **51**(12): 1476-1486.
- [25] Liu Y Q, Yao T D, Kang S C, *et al.* Microbial community structure in major habitats above 6000 m on Mount Everest[J]. Chin Sci Bull, 2007, **52**(13): 1542-1547.
- [26] 刘炜, 马晓军, 侯书贵, 等. 东天山地区庙儿沟雪坑中微生物多样性、群落结构与环境关系研究[J]. 微生物学报, 2007, **47**(6): 1019-1026.
- [27] Takeuchi N, Matsuda Y, Sakai A, *et al.* A large amount of biogenic surface dust (cryoconite) on a glacier in the Qilian Mountains, China [J]. Bull Glaciol Res, 2005, **22**: 1-8.
- [28] Weinbauer M G, Beckmann C, Hofle M G. Utility of Green Fluorescent Nucleic Acid Dyes and Aluminum Oxide Membrane Filters for Rapid Epifluorescence Enumeration of Soil and Sediment Bacteria[J]. Appl Environ Microbiol 1998, **64**(12): 5000-5003.
- [29] 张淑红. 青藏高原冰川雪冰内细菌与环境关系的初步研究[D]. 兰州: 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 2007. 57-59.
- [30] 张淑红, 侯书贵, 秦翔, 等. 青藏高原冰川雪细菌与气候环境的关系[J]. 环境科学研究, 2007, **20**(5): 39-44.
- [31] Christner B C, Mosley-Thompson E, Thompson L G, *et al.* Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice[J]. Icarus, 2000, **144**(2): 479-485.
- [32] Fajardo P, Nicholson W. Bacillus Endospores Isolated from Granite: Close Molecular Relationships to Globally Distributed *Bacillus* spp. from Endolithic and Extreme Environments [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, **72**(4): 2856-2863.
- [33] Zhang S H, Hou S G, Ma X J, *et al.* Culturable bacteria in Himalayan ice in response to atmospheric circulation[J]. Biogeosciences, 2007, **3**: 765-778.
- [34] Zhou S, Nakawo M, Hashimoto S, *et al.* The effect of refreezing on the isotopic composition of melting snowpack[J]. Hydrol Proc, 2007, **22**: 873-882.