

西藏那曲地区夏季降水中生物冰核的分布特征

杜鹏瑞,杜睿*,路则栋,梁宗敏 (中国科学院大学资源与环境学院,北京 100049)

摘要: 于 2013 年 6~10 月在高海拔的西藏那曲地区采集雨水样品,共获得 6 月份和 7 月份两个有效样品.通过液滴冻结实验,对雨水样品中大于 0.22 μm 的气溶胶颗粒物的冰核活性进行检测,同时对不同处理(原样雨水、滤液、添加蛋白变性剂、加热煮沸)的雨水样品的冻结温度进行检测.结果显示,6 月份和 7 月份原样雨水样品的平均冻结温度分别为-13.3 $^{\circ}\text{C}$ 和-8.7 $^{\circ}\text{C}$.在-10 $^{\circ}\text{C}$ 以上,雨水样品中存在对蛋白变性剂和加热敏感的生物冰核,但不同月份雨水中的生物冰核对雨水液滴的冻结所起的贡献不同.7 月份雨水样品中的高效生物冰核对液滴在较高温度下冻结起到主要的催化作用,而 6 月份雨水样品中的生物冰核对液滴冻结未起到显著作用.经 0.22 μm 滤膜过滤的雨水滤液样品中,仍然存在高效生物冰核,但目前尚未确定其主要成分.通过对雨水样品中细菌 16S rRNA 基因和真菌 rRNA 内转录间隔区及 5.8S rRNA 的 ITS1-5.8S-ITS2 基因进行克隆测序分析,获得西藏那曲地区夏季 6 月份和 7 月份雨水样品中细菌和真菌的群落组成.发现微生物群落组成中包含了具有高效生物冰核活性的假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌和镰刀菌属(*Fusarium*)真菌.

关键词: 雨水;生物冰核;细菌;真菌;分布特征

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6293(2015)07-1998-09

Distribution of biological ice nuclei in the summer precipitations of Naqu in Tibet. DU Peng-rui, DU Rui*, LU Ze-dong, LIANG Zong-min (College of Resource and Environment, University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China). *China Environmental Science*, 2015,35(7): 1998~2006

Abstract: Precipitation sampling was took at Naqu of Tibet from June to October, 2013. Only two valid rainwater samples in June and July were got. With the experiments of droplets freezing, the average frozen temperature of droplets embedded with particulate matters ($>0.22\mu\text{m}$) of rainwater samples were tested. Meanwhile, the activity of ice nuclei in the original rainwater, filtered rainwater, rainwater added with protein denaturants, boiled rainwater had also been tested. The results indicated that the average freezing temperatures of original rainwater droplets in June and July were -13.3°C and -8.7°C , respectively. As for samples with the average freezing temperatures above -10°C , it can be concluded that there were some biological ice nuclei in the original rainwater, which were sensitive to the protein denaturants and boiling. However, their nucleation activities were different for these two months. The biological ice nuclei played a major role in the freezing of droplets in July, but not in the June. The filtered rainwater still contained efficient biological ice nuclei, but the compositions were still unknown. Using the cloning and sequencing technology, the bacteria 16S rRNA gene and the fungi ITS1-5.8S-ITS2 gene that covered the two internal transcribed spacer and 5.8S rRNA gene were analyzed. The results indicated that the bacterial genus of *Pseudomonas* and the fungal genus of *Fusarium* were recovered in the rainwater and they were supposed to be two types of efficient biological ice nuclei.

Key words: rainwater; biological ice nuclei; bacteria; fungi; distribution

青藏高原作为中国最大的高原,也是全球最高的高原,被誉为“世界屋脊”和“第三极”,经全球热力学和动力学的输送,该地区的降雨和降雪的变化,会影响到全球大气循环和水循环过程^[1-2].大气中的气溶胶粒子可以作为云凝结核(CCN)和冰核(IN)影响太阳光的辐射以及云的形成^[3-5],进而影响到降水过程.大气和云层中的水汽和液态小水滴可通过同质核化和异质核化两

种途径形成初始的冰晶.同质核化以水分子构成的集合体为中心,通常在温度低于 -35°C 或 300%水汽过饱和度条件下才能冻结形成冰晶^[6-7].在真实大气环境中,同质核化并不容易发生.在温度高于 -35°C 时,必须有冰核的存在,水汽和过冷液

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41175135)

* 责任作者,副教授, ruidu@ucas.ac.cn

滴才更易形成冰晶^[8-9],即异质核化.能作为冰核的主要气溶胶粒子有矿物沙尘^[10-11],烟尘^[12],结晶的盐粒子^[13-14],以及生物粒子.而在这几种冰核之中,生物气溶胶粒子在较高温度 -2°C ^[15-16]下就能催化液滴形成冰晶,因此被认为是自然界中最有效的冰核.

生物气溶胶粒子包括细菌、真菌及其孢子、病毒、花粉以及动植物残片等.已有的研究表明,每年大约有 1000Tg 的生物气溶胶粒子进入大气^[17],细菌有 0.4~28.1Tg,真菌有 8~186Tg.细菌气溶胶粒子的直径在 $1\mu\text{m}$ 左右,真菌气溶胶粒子的直径在 $2\sim 10\mu\text{m}$ ^[18],这对于其作为冰核催化小液滴形成冰晶非常有利.目前,国内外已分离出并得到普遍认可的具有冰核活性的细菌主要分布于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*),具有冰核活性的真菌主要是镰刀菌属(*Fusarium*)真菌和一些共生的地衣真菌^[15, 19-22].对于其他属的细菌和真菌而言,基本不具备高效生物冰核活性.我国科研人员自 20 世纪 80 年代开始对生物冰核的种类及其作用机理进行研究,目前已经从植物、昆虫和土壤中分离出多株冰核活性细菌、真菌^[21, 23].已有的研究多侧重生物冰核对植物造成的霜冻灾害,以及利用其特性进行促冻杀虫和人工造雪,但对于生物冰核在大气降水过程中的作用,则研究得相对较少^[24-26].

生物冰核是一类可以在 -10°C 以上较温暖的条件下催化过冷却水形成冰晶^[27]的粒子.1957 年法国气象学家在云室实验中,首次发现霉菌孢子可以作为冰核催化液滴形成冰晶,之后 Schelltt 等^[28]指出大气中部分冰核可能是由生物引起的.自此,越来越多的生物冰核从大气颗粒物、云滴和雪中分离出来^[18,29].在液滴冻结实验中,生物冰核使全部液滴冻结的平均温度在 -10°C 以上,而已知的非生物高效冰核则在 -10°C 以下.但并非所有的生物气溶胶粒子都可以作为生物冰核.已知的大多数细菌和真菌并不能在 -10°C 以上催化液滴冻结,因此不能被称为生物冰核,而只能够作为生物类的普通冰核存在于大气中.即使已经被证明具有冰核活性的细菌和真菌等生物冰核,由

于菌体浓度和生长环境等条件的影响,导致在 -10°C 以上不能催化液滴冻结,未能表现出生物冰核效应^[30-31].科学家们已经从云层、雨水和霜冻植物等众多环境样品中分离出生物冰核.一些学者认为生物冰核分布广泛,数量众多,在大气降水形成过程中发挥着重要作用^[29,32-35],但也有学者对此持不同观点,认为生物冰核在降水过程中的作用非常微弱^[36-37].生物冰核高效的核化机制已经被研究确认:冰核生物含有冰核基因,其表达形成的冰核蛋白具有高效的成冰活性^[38].但由于无法确认真实大气环境中是否有足够数量的生物冰核来激发催化冰晶的形成,使生物冰核在成云和降水过程中的贡献大小成为了当前生物气溶胶研究中争论的焦点之一.

国内关于青藏高原地区降雪、冻土、冰芯以及其中的微生物群落多样性与当地环境及气候变化适应关系的研究较多^[39-42],但尚未有关于生物冰核在当地降水过程中作用的研究.本研究通过对西藏那曲地区夏季雨水的液滴冻结温度 and 其所含的冰核数量进行检测,同时对雨水中的微生物群落组成进行分析,以此来探究生物冰核在西藏夏季雨水中的分布特征和变化,进而探讨其在雨水形成过程中可能的贡献.

1 材料与方法

1.1 采样点介绍

降水样品的采集地点位于中国科学院青藏高原研究所那曲生态环境综合观测研究站.该站位于那曲县罗玛镇,地处唐古拉山脉与念青唐古拉山脉之间的那曲河流域,海拔 4450m.该地区气候类型为高原亚寒带季风半湿润气候,下垫面为高寒草甸.年平均气温 -2.1°C ,全年降水大约 400mm,多集中在 6~9 月,年平均相对湿度 51%.

1.2 降水样品的采集与过滤

雨水样品采集使用的是容积为 3L 的玻璃烧杯,为了增加接雨面积,专门制作了直径为烧杯直径 2 倍的不锈钢接雨器,在接雨时加装在烧杯口部.在降雨之前,用无菌去离子水对烧杯、不锈钢接雨器以及过滤雨水时要用到的过滤装置进行充分清洗,然后包裹上医用无纺布,在 121°C 高温

条件下灭菌 20min.降雨开始后,将多个加装不锈钢接雨器的玻璃烧杯置于空旷区域收集雨水.由于该地域空旷,常年大风,为保障实验所需雨水量,雨水样品是实验采样月份中多次收集雨水的混合.每次收集样品时间不超过 12h,所接雨水立即放入 4℃冰箱密封保存.降水样品采集时间为 2013 年 6~10 月,但由于 8 月、9 月和 10 月降水较少且受到大风影响,收集的雨水不足以做相关实验,因此只得到 6 月和 7 月两个有效的雨水样品,编号分别为 XZ6 和 XZ7.采用真空抽滤泵(津腾公司)和硝酸纤维素膜(孔径 0.22 μm ,直径 47mm, Millipore USA)对雨水样品进行过滤,每张滤膜过滤雨水量为 500mL,每个月份的雨水样品共过滤两张滤膜.随即即将滤膜弯曲装入无菌的 50mL 离心管中,保存于冰箱-20℃冷冻室,以备后续分析测试.另外,分别取原样雨水和过滤后的雨水滤液装入无菌的 50mL 离心管中,保存于 4℃冰箱,以备后续分析.

1.3 样品处理

1.3.1 雨水和滤膜上颗粒物的处理 从-20℃冰箱中取出装有硝酸纤维素滤膜的 50mL 离心管,向其中加入灭菌的去离子水 30mL,淹没滤膜.用无菌玻璃棒轻划滤膜,使其上面的颗粒物进入去离子水中,再加入 20mL 无菌去离子水到离心管中,盖上盖子后振荡离心管,尽可能使膜上的所有颗粒物被重新洗入去离子水中.与原样雨水相比,该处理使雨水中大于 0.22 μm 的颗粒物(过滤时被截流在滤膜上)的浓度提高了约 10 倍.分别取 3 管原样雨水(A1,A2,A3),3 管过滤后的雨水滤液(B1,B2,B3),3 管洗膜的雨水颗粒物重悬液(C1,C2,C3),每管 10mL,分为 A,B,C 三组.分别向第二组样品 A2,B2,C2 中加入 200 μL 的苯酚+氯仿+异戊醇(比例为 25:24:1)的混合溶液,目的是使溶液中的蛋白质变性.对第三组样品 A3,B3,C3 进行水浴加热,在 100℃条件下水浴 5min,使蛋白质在高温条件下变性失活.根据生物冰核的高效冰核活性来源于冰核蛋白的机理,样品中所含的生物冰核经上述两种处理后会失去其部分或全部的高效核化活性.

1.3.2 雨水中微生物 DNA 的提取与测序 从

-20℃冷冻室中取出滤膜,在超净工作台中用剪刀将滤膜剪碎,盛于无菌的培养皿中.用无菌镊子夹取剪碎的滤膜装入 FastDNA SPIN Kit for soil(MP Biomedicals USA)提供的离心管中,然后按照试剂盒说明进行微生物总 DNA 的提取.DNA 提取成功后,以 DNA 为模板,采用细菌通用引物 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492r(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'),扩增细菌 16S rRNA 基因片断.采用真菌通用引物 ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-C-3'),扩增真菌 rRNA 上的 ITS1-5.8S-ITS2 基因片断.PCR 反应条件及后续的克隆转化与测序等相关实验详见文献[43].

1.4 雨水中生物冰核的检测

采用中国气象科学研究院杨绍忠等^[44-45]所研制的冻结核含量检测装置对雨水液滴的冻结温度和雨水中的冰核数量进行检测.按照装置使用说明,先用丙酮清洗实验台上每个感应件的表面,然后滴加憎水胶膜(防止不同组次实验的相互污染并维持一个相对干净的本底),待其挥发蒸干后形成一个边缘明显的圆斑.使用移液枪在圆斑上滴加 10 μL 的小液滴,盖上实验台盖子,按照 2℃/min 的速率进行均匀降温.从 0℃开始,传感器和检测器开始记录数据,每有一个液滴冻结,就会记录一个信号,最后会得出各个温度下冻结液滴的个数.每个样品进行 5 次重复测试,使测试结果中的有效数据保持在 200 个以上,从而保障实验测试结果的科学性.在对雨水各个处理样品进行检测的同时,采用娃哈哈瓶装纯净水作为对照,检测其平均冻结温度.

1.5 数据处理

1.5.1 冰核数据处理 根据 Vali^[46]的研究,在每个温度下冻结的液滴个数确定后,可以根据这些数据计算出测试样品的平均冻结温度以及每个温度下累积的冰核数.本文采用公式 $K(\theta)=[\ln(N_0)-\ln N(\theta)]/V$ 对雨水中各个温度下累积冰核的浓度进行计算.式中: $K(\theta)$ 是待测溶液液滴中冻结核的累积浓度; $N(\theta)$ 是当温度为 θ 时,待测液滴中尚未冻结的液滴数量; N_0 则是待测液滴的总数

量; V 是单个液滴的体积, cm^3 。

1.5.2 测序数据处理 测序得到 16S rRNA 序列和 ITS1-5.8S-ITS2 序列,采用 Mallard 软件对其中的嵌合体进行检测去除.剩余序列采用 Mothur(www.mothur.org/)软件,细菌按照相似性不小于 97% 的序列划分为同一个 OTU (Operational Taxonomic Units)的原则进行分类,真菌按照相似性不小于 99% 的序列划分为同一个 OTU 的原则进行分类,同时给出每个 OTU 的代表序列和每个样品(XZ6, XZ7)的群落多样性指数(Shannon's diversity indices, H),物种丰度(species richness, Chao1),稀有度曲线(rarefaction curves)与覆盖率(coverage).将得到的每一个 OTU 的代表序列放到 Genbank 中的 NCBI Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中进行比对,如果代表序列与数据库中的参比序列相似度达到 97% 以上,在分类学上就归为同一个属,因此可以根据数据库中相似序列的种属分类确定每个 OTU 中序列的分类归属。

2 结果与讨论

2.1 生物冰核检测

根据生物冰核的定义^[27],以温度高于 -10°C 时液滴冻结来判断生物冰核的存在.两个月份原样雨水样品 A1 的平均冻结温度分别是 -13.3°C 和 -8.7°C (图 1).因此可以确定 7 月份雨水样品中存在生物冰核,且其在雨水液滴冻结中起到主要作用.雨水滤液样品 B1 与 A1 相比,平均冻结温度有微小降低.两个月份 B1 的平均冻结温度分别是 -14.4°C 和 -10.3°C .作为对照的娃哈哈瓶装纯净水的平均冻结温度为 -17.5°C 和 -17.7°C ,低于滤液 B1.滤液 B1 是 A1 经过 $0.22\mu\text{m}$ 的硝酸纤维素滤膜过滤得到的,其中的生物与非生物冰核都有所减少,但 7 月份雨水滤液样品 B1 的平均冻结温度依然接近 -10°C ,远高于纯净水的 -17°C .由于生物冰核能在较高温度下催化液滴冻结的机理^[38,47-51]是其具有冰核基因,冰核基因经过转录、翻译和加工后,在细胞膜表面形成具有一定结构的冰核蛋白^[50,52-53],因此 7 月份滤液 B1 的平均冻结温度接近 -10°C ,可能是因为过滤过程中

一部分冰核蛋白脱离菌体进入滤液或滤液中含有类似于冰核蛋白且具有高效核化活性的未知物质.洗膜的颗粒物悬浮液 C1 与 A1 相比,平均冻结温度提高到 -9.4°C 和 -8.0°C ,显示雨水颗粒物中的确存在高效冰核.生物冰核效应与生物冰核的浓度有很大的关系^[30],只有生物冰核达到一定浓度后,才能使液滴的平均冻结温度达到 -10°C 以上.C1 处理对雨水中大于 $0.22\mu\text{m}$ 的颗粒物浓度进行了 10 倍左右的浓缩,同时已知的非生物冰核使液滴冻结的平均温度均在 -10°C 以下,因此冻结温度的显著增高可能是生物冰核浓度增加引起的.大气中的微生物一般多黏附在颗粒物表面,雨水中大于 $0.22\mu\text{m}$ 的颗粒物的浓度提高,会使生物冰核的浓度同时得到提高,从而生物冰核效应增强,液滴的平均冻结温度升高.杨绍忠等^[44]采用相同的冻结核检测装置,测得北京地区的冰雹融化水和雨水的平均冻结温度在 -12.1°C 到 -16.17°C ,其结果与本研究 6 月份雨水样品的平均冻结温度接近,但明显与低于 7 月份雨水的平均冻结温度.王亚玲等^[30]采用 *Pseudomonas syringae* 冰核细菌菌悬液进行实验,菌液浓度高于 10^5cells/mL 时,液滴的平均冻结温度高达 -5°C ,但菌液浓度降低时,其平均冻结温度明显降低,低于 -10°C .6 月份雨水样品 A1 与 C1 的差异,就是由于生物冰核浓度的不同引起的。

添加蛋白变性剂(苯酚、氯仿、异戊醇混合液)的第二组样品 A2,B2,C2 和加热煮沸处理的第三组样品 A3,B3,C3 中的冰核蛋白因蛋白变性剂和受热发生变性,从而抑制生物冰核的核化活性,与未做相应处理的样品相比,加入蛋白变性剂和加热煮沸降低了液滴的平均冻结温度.由于非生物类冰核对蛋白变性剂和加热不敏感,因此西藏夏季雨水样品中一定存在生物冰核.当它们经过蛋白变性剂和加热处理后,其核化活性受到破坏或者抑制,造成了液滴平均冻结温度的降低.与雨水样品 C1 相比,进行蛋白变性处理的雨水样品 C2,C3 的液滴平均冻结温度降低了 $0.3\sim 3.3^{\circ}\text{C}$,但均高于做相同蛋白变性处理的雨水样品 A2,A3 的平均冻结温度.这可能是因为蛋白变性剂和加热处理并未完全抑制生物冰核的活性.表

1 给出了蛋白变性剂和加热煮沸处理对生物冰核的破坏程度.7 月份雨水样品 C2,C3 的平均冻结温度依然在-10℃以上,6 月份雨水样品中的 C2 的平均冻结温度也接近-10℃,这再次表明经处理后部分生物冰核仍保持活性.

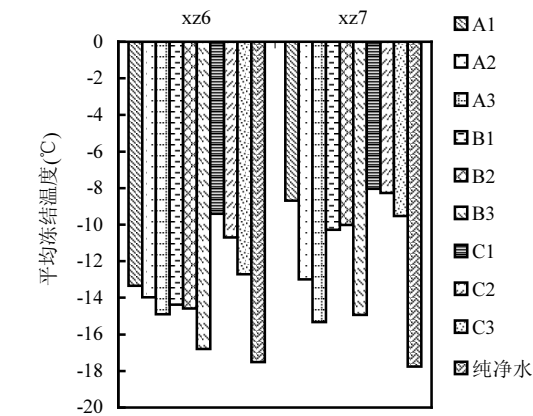


图 1 不同处理的雨水样品的平均冻结温度
Fig.1 Average freezing temperatures of rain water under different treatments

图 2 显示,当温度降到-10℃时,不同处理样品测试液滴中所检测到的累积冰核数目.假定在这个温度下累积的冰核都是生物冰核,则两个月份的原样雨水样品 A1 中都存在生物冰核,但它们的平均冻结温度却存在较大的差异,6 月份为-13.3℃,在-10℃以下,7 月份为-8.7℃,在-10℃以上.这是因为 6 月份雨水样品中所含生物冰核数量较少,对浸润模式下液滴的全部冻结所起的作用不大.7 月份雨水样品中含有大量的生物冰核,液滴冻结主要由其催化引起.这也证明了由于生物冰核浓度大小的差异,使得生物气溶胶在大气降雨过程中的贡献存在较多的不确定性.由表 1 可知,除 7 月份雨水颗粒物浓缩样品的加热处理 C3 外,其他测试样品的加热处理都使生物冰核在-10℃的累积量减少 85%以上.蛋白变性剂对生物冰核的影响差异较大.在-10℃条件下,生物冰核的减少量在 3.44%到 87.05%之间变化.

值得注意的是,与雨水样品 B1 相比,雨水样品 B2 和 B3 的平均冻结温度以及在-10℃累积的冰核数目都有所降低.7 月份雨水样品中的 B3 比

B1 的平均冻结温度降低了 4.6℃,6 月份雨水样品中的 B3 在-10℃累积的冰核数目比 B1 减少了 100%.由于经过孔径为 0.22um 的硝酸纤维素膜过滤,B1 中含有完整的且具有高效冰核活性的细菌和真菌的比例很低,但其在-10℃以上仍显示有冰核的存在.加入蛋白变性剂和加热煮沸处理后,B2 和 B3 在-10℃的冰核数减少.因此,可以推测滤液 B1 中对蛋白变性剂和加热煮沸处理敏感的冰核具有一定的生物活性,它或是冰核蛋白及其残片,或是病毒,亦或是目前还未认知的某种新的生物冰核. Christner 等^[29,32]分别采用蛋白酶及加热处理对雨水和雪水中的生物冰核进行处理,其实验结果显示,加入蛋白酶破坏冰核蛋白后,各样品在-9℃以上累积冰核的减少量在 25%~64%,而进行加热处理使蛋白变性后,各样品在-9℃累积冰核的减少量在 69%~100%,这与本研究结果基本类似.

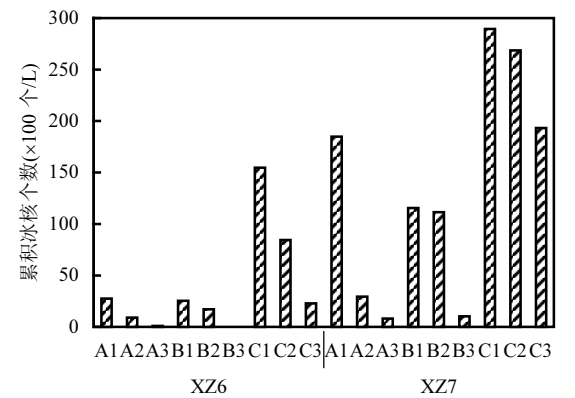


图 2 在温度-10℃时的累积冰核数
Fig.2 Cumulative number of Ice Nuclei at the temperature of -10℃

综合以上结果,同时根据生物冰核的定义,可以认定那曲地区夏季降雨中确实存在生物冰核,但这部分生物冰核是来自于降水形成过程中的云内清除还是来自于云下清除尚不确定.如果来自于云内清除过程,生物冰核就可能在降水的形成过程中起到一定的作用,但如果来自于云下清除过程,则无法确定其在降水形成过程中的影响,另外一种可能则是两种过程并存.

表 1 蛋白变性剂和加热煮沸对生物冰核活性的影响(%)
Table 1 The effects of Protein Denaturants and Boiling on the activities of Biological Ice Nuclei (%)

蛋白变性剂/煮沸	对 A1 的影响		对 B1 的影响		对 C1 的影响	
	A2 ^a	A3 ^b	B2 ^a	B3 ^b	C2 ^a	C3 ^b
XZ6	-67.98	-96.92	-32.97	-100.00	-45.43	-85.24
XZ7	-84.05	-95.69	-3.44	-91.09	-7.17	-33.21

注: a 表示加入蛋白变性剂的处理A2(B2,C2)与未做相应处理的A1(B1,C1)相比,在温度-10℃时累积冰核的减少量;b 表示加热煮沸处理A3(B3,C3)与未做相应处理的A1(B1,C1)相比,在温度-10℃时累积冰核的减少量

表 2 克隆文库各项指标评估
Table 2 Assessment for indicators of the clone libraries

样品	克隆数	OTU	覆盖率(%)	Chao1 指数	Shannon 指数
XZB6	56	21	77	41(26~94)	2.54(2.24~2.82)
XZB7	129	33	81	183(80~514)	2.46(2.21~2.71)
XZF6	59	7	92	12(8~39)	0.57(0.26~0.89)
XZF7	66	13	88	20(14~47)	1.55(1.24~1.86)

2.2 测序基因文库指标分析

对雨水中微生物的基因测序结果进行去杂、去嵌合体后,细菌 16S rRNA 基因序列构成的克隆文库为:XZB6(56 个有效克隆子),XZB7(129 个有效克隆子),真菌 ITS1-5.8S-ITS2 基因序列构成的克隆文库为:XZF6(59 个有效克隆子),XZF7(66 个有效克隆子).表 2 给出 4 个克隆文库的基本指标数据,样品测序结果的覆盖率在 77%~92%,已能够覆盖样品中主要的细菌和真菌种群.7 月份雨水中细菌的物种丰度(Chao1 指数)是 6 月份雨水中的 4 倍,7 月份雨水中真菌的物种丰度是 6 月份雨水中的 2 倍左右,由此可见,西藏 6 月份与 7 月份的雨水样品中物种数目存在较大差异,7 月份雨水中的细菌和真菌物种数明显高于 6 月份雨水.两个月份中,细菌群落的多样性指数(Shannon 指数)差异不大,但真菌的群落多样性指数有明显的差异,这与群落中物种的数目和每个物种所占比例有关,6 月份雨水中的真菌大多属于同一类.由于大气中的微生物主要来自于地面植被、土壤和人为的排放,因此以上群落的差异可能是由于降雨前人为活动(如放牧)或自然活动(风)的影响,也可能是由于地面植被不同生长阶段的变化.另外,降雨形成过程涉及到大气循环以及其中物质的传输与变化,这也会引起群落组成的差异

2.3 群落结构组成

2.3.1 细菌群落结构分析 将克隆文库中每个 OTU 的代表序列放入 NCBI 中进行 Blast 比对的结果显示,共得到 14 个属的细菌(图 3).6 月份雨水样品中的细菌主要属于变形菌门和放线菌门,分别占 89.3%和 8.9%.7 月份雨水样品中的细菌包括三个门,所占比例分别为变形菌门占 58.1%,放线菌门占 3.8%,厚壁菌门占 32.5%.两个月份的雨水样品中,有一种共同的优势属细菌,即 β 变形菌纲的 *Massilia* 属,它在两个月份中的比例分别为 37.2%和 67.8%.另外,6 月份雨水样品中的优势菌属还有 γ 变形菌纲的 *Acinetobacter* 属(12.5%)和放线菌门的 *Arthrobacter* 属(8.9%).7 月份雨水样品中的优势属还有 β 变形菌纲的 *Variovorax* 属(7.8%)和厚壁菌门的 *Exiguobacterium* 属(32.6%).与生物冰核相关的 *Pseudomonas* 属细菌却仅在 6 月份的雨水样品中发现,而且所占比例非常低,仅占细菌克隆总数的 1.8%.

2.3.2 真菌群落结构分析 图 4 显示,6 月份雨水样品中能明确分类到属的真菌仅有两种,分别是担子菌门的隐球菌属(*Cryptococcus*)和子囊菌门的短梗霉属(*Aureobasidium*),隐球菌属占有绝对的优势,所占比例为 94.9%.7 月份雨水样品中的真菌种类相对丰富,共有 9 个属的真菌被确定出来,分别为子囊菌门的茎点霉属(*Phoma*),地丝

菌属(*Geomyces*),德巴利氏酵母属(*Fusarium*),镰刀菌属(*Fusarium*),担子菌门的鬼伞属(*Coprinopsis*),白冬孢酵母属(*Leucosporidium*),隐球菌属(*Cryptococcus*),黑粉菌属(*Ustilago*),另外还鉴定出一种非真菌门类而属于绿藻门的蕨藻属(*Caulerpa*).隐球菌属(*Cryptococcus*)真菌在7月份的雨水样品中依然属于优势菌属,但所占比例降低到36.4%.另一种地丝菌属(*Geomyces*)真菌比它更加丰富,所占比例是45.5%.在两个月份的雨水样品中,仅在7月份发现与生物冰核相关的镰刀菌属(*Fusarium*)真菌,所占比例为3.0%.

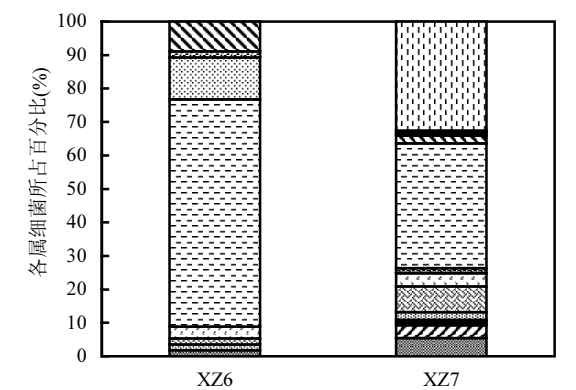
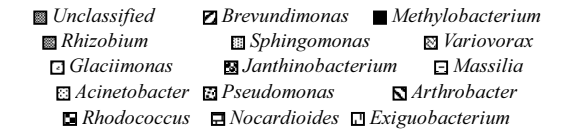


图3 细菌群落结构组成(属水平)

Fig.3 Bacterial community structures (the level of genus)



2.3.3 与其他生境条件微生物群落组成的比较
同一个地区,不同生境条件下,微生物的群落组成会有不同,这些差异能够反应出不同生境的独特环境条件以及功能.青藏高原地区降水中的微生物群落组成与本地区的冰川、湖泊、土壤中的微生物群落组成存在一定的相似性和差异性.在门的分类水平上,青藏高原地区广泛存在放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门的细菌^[54-57],不同生境的相似性较高,但在属水平上的差异却很明显.例如,那木错湖水中的*Hydrogenophaga*属细菌占有绝对的优势^[55],而在雪样中,*Sphingomonas*属和*Polaromonas*属细菌较为常见^[56].虽然雨水中的

各属细菌在青藏高原其他生境中均有所发现,但在群落组成和优势物种等方面的差异仍然较大^[56,58-59].土壤、湖泊以及积雪中的微生物与当地环境的关系非常紧密,所反映出的变化趋势更侧重长期效应,而本研究采集的降水样品中的微生物可能是随着大气环流从其他地方输送而来,也有可能再次被输送到其它区域.因此降水中微生物的组成很可能与当地其他环境中微生物群落存在较大的差异.

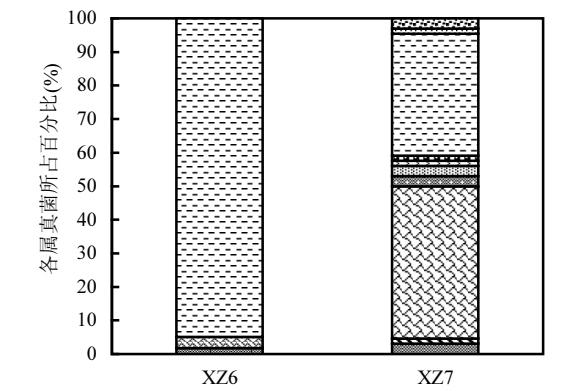
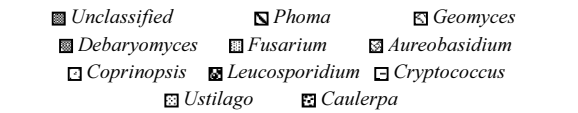


图4 真菌群落结构组成(属水平)

Fig.4 Fungal community structures (the level of genus)



2.4 微生物群落组成与液滴冻结的关系

6月份和7月份雨水样品中的微生物群落组成表明,6月份雨水样品中存在与生物冰核相关的假单胞菌属(*Pseudomona*)细菌,7月份雨水样品中存在与生物冰核相关的镰刀菌属(*Fusarium*)真菌,但两者在群落中所占的比例都较低.除上述两种生物冰核外,尚未发现其它已得到公认的生物冰核种类.根据液滴冻结实验数据,蛋白变性剂和加热处理使雨水原液A1在-10℃累积冰核数减少,因此我们确定两次雨水样品中都存在生物冰核.但其对全部液滴的冻结所起的作用有所差异,7月份A1的平均冻结温度为-8.7℃,生物冰核在雨水液滴冻结中起主要作用,6月份雨水液滴冻结平均温度为-13.3℃,冻结过程中起主要作用的是非生物冰核.本研究使用的克隆测序技术

能够分析得出优势菌群,当生物冰核在大气环境中不占优势时,可能检测不到全部种类的冰核生物。此外,冰核细菌不同变种之间的冰核活性存在较大差异,很难根据测序数据在种水平上对细菌、真菌等生物冰核进行鉴定。即使鉴定出具有冰核活性的细菌种类,因其冰核活性的表达受到许多外界条件的制约,只有满足这些条件,比如需要低温诱导冰核蛋白的表达,需要一定的生物冰核浓度等,才能在 -10°C 以上起到冰核催化作用。因此,在研究生物冰核的分布及其作用时,可以通过测序或培养的方法寻找具有生物冰核活性的微生物,但更重要的是通过冻结温度的测试来鉴定生物冰核的存在及其作用强度。

3 结论

3.1 西藏那曲地区,夏季 6 月份和 7 月份的雨水样品中都存在生物冰核。6 月份原样雨水中生物冰核的量较少,在全部液滴冻结中未起到主要作用。7 月份原样雨水中生物冰核的量较大,对全部液滴冻结起到了主要作用。

3.2 西藏那曲地区夏季不同月份雨水中生物群落组成存在差异。两个月份的雨水中共发现 3 个门类 14 个属的细菌,3 个门类 10 个属的真菌。夏季雨水样品中发现含有生物冰核的假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌和镰刀菌属(*Fusarium*)真菌。雨水液滴冻结检测结果显示,雨水中的生物气溶胶具有一定的高效冰核活性。

3.3 经 $0.22\mu\text{m}$ 过滤得到的雨水滤液中依然存在生物冰核,但其成分尚未得到确定,还需在以后的研究中进一步探明其属性。

3.4 雨水中检测到的生物冰核来自于云内清除还是云下清除存在不确定性,生物冰核在大气降水形成过程中所做贡献的大小还有待商榷。

参考文献:

- [1] Wu G X, Liu Y M, Wang T M, et al. The influence of mechanical and thermal forcing by the Tibetan Plateau on Asian climate [J]. *J. Hydrometeorol.*, 2007,8(4):770-789.
- [2] Lau W K M, Kim M K, Kim K M, et al. Enhanced surface warming and accelerated snow melt in the Himalayas and Tibetan Plateau induced by absorbing aerosols [J]. *Environ. Res. Lett.*, 2010,5(2):302-307.
- [3] Khain A P. Notes on state-of-the-art investigations of aerosol effects on precipitation: a critical review [J]. *Environ. Res. Lett.*, 2009,4(1):62-82.
- [4] Chen Q, Yin Y, Jin L J, et al. The effect of aerosol layers on convective cloud microphysics and precipitation [J]. *Atmos. Res.*, 2011,101(1/2):327-340.
- [5] 杨慧玲,肖 辉,洪延超.气溶胶对云宏观特性和降水影响的研究进展 [J]. *气候与环境研究*, 2011,16(4):525-542.
- [6] Murray B, Broadley S, Wilson T, et al. Kinetics of the homogeneous freezing of water [J]. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2010,12(35):10380-10387.
- [7] Riechers B, Wittbracht F, Hütten A, et al. The homogeneous ice nucleation rate of water droplets produced in a microfluidic device and the role of temperature uncertainty [J]. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2013,15(16):5873-5887.
- [8] Murray B, Broadley S, Wilson T, et al. Heterogeneous freezing of water droplets containing kaolinite particles [J]. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2011,11(9):4191-4207.
- [9] 杨 磊,银 燕,杨绍忠,等.南京地区冬季大气冰核特征及其与气溶胶关系的研究 [J]. *大气科学*, 2013,37(5):983-993.
- [10] Pruppacher H R, Klett J D, Wang P K. Microphysics of clouds and precipitation [J]. *Aerosol Sci. Technol.*, 1998,28:381-382.
- [11] Hung H-M, Malinowski A, Martin S T. Kinetics of heterogeneous ice nucleation on the surfaces of mineral dust cores inserted into aqueous ammonium sulfate particles [J]. *J. Phys. Chem. A*, 2003,107(9):1296-1306.
- [12] Kärcher B, Möhler O, Demott P J, et al. Insights into the role of soot aerosols in cirrus cloud formation [J]. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2007,7(16):4203-4227.
- [13] Martin S T. Phase transformations of the ternary system $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}$ and the implications for cirrus cloud formation [J]. *Geophysical research letters*, 1998,25(10):1657-1660.
- [14] Abbatt J P D, Benz S, Cziczo D J, et al. Solid ammonium sulfate aerosols as ice nuclei: A pathway for cirrus cloud formation [J]. *Science*, 2006,313(5794):1770-1773.
- [15] Maki L R, Galyan E L, Chang-Chien M M, et al. Ice nucleation induced by *pseudomonas syringae* [J]. *Applied Microbiology*, 1974,28(3):456-459.
- [16] Yankofsky S A, Levin Z, Bertold T, et al. Some Basic Characteristics of Bacterial Freezing Nuclei [J]. *J. Appl. Meteorol.*, 1981,20(9):1013-1019.
- [17] Jaenicke R. Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere [J]. *Science*, 2005,308(5718):73.
- [18] Despr S V R, Huffman J A, Burrows S M, et al. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review [J]. *Tellus B*, 2012,64:145-153.
- [19] Pouleur S, Richard C, Martin J G, et al. Ice Nucleation Activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992,58(9):2960-2964.
- [20] 孙福在.我国生物冰核研究进展 [J]. *中国农业科学*, 1996,29(5):62-68.
- [21] 孙福在,赵廷昌,张 敏,等.冰核真菌的冰核活性及其种类鉴定 [J]. *菌物系统*, 1999,18(2):149-153.
- [22] Morris C, Georgakopoulos D, Sands D. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation [C]//EDP sciences,

- 2004,121:87-103.
- [23] 孙福在,韦建福,朱 红.我国冰核活性细菌的优势种类调查与研究 [J]. 生态学报,1996,(6):618-622.
- [24] 冯玉香,何维勋.生物冰核与灾害防御的研究进展 [J]. 中国农业气象,2003,24(1):15-18.
- [25] 谢 翔,王 玉,刘汉林,等.冰核细菌及冰核基因的应用研究进展 [J]. 生物技术通报,2006,(S1):109-112.
- [26] 杜 睿,王亚玲,梁宗敏.细菌气溶胶在大气冰核化过程中作用的研究进展 [J]. 中国环境科学,2013,33(1):30-42.
- [27] Maki L, Willoughby K. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei [J]. J. Appl. Meteorol., 1978,17(7):1049-1053.
- [28] Schenell R, VALI G. Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation [J]. Nature, 1972,236:163-165.
- [29] Christner B C, Morris C E, Foreman C M, et al. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall [J]. Science, 2008,319(5867):1214.
- [30] 王亚玲,杜 睿,梁宗敏,等.冰核细菌 *Pseudomonas syringae* 是否可以影响大气的冰核化过程 [J]. 科学通报,2012,57(25):2413-2418.
- [31] Spracklen D, Heald C. The contribution of fungal spores and bacteria to regional and global aerosol number and ice nucleation immersion freezing rates [J]. Atmospheric Chemistry and Physics Discussions, 2013,13(12):32459-32481.
- [32] Christner B C, Cair R, Morris C E, et al. Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008,105(48):18854-18859.
- [33] MöHLER O, Georgakopoulos D, Morris C, et al. Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions [J]. Biogeosciences, 2008,5(5):1425-1435.
- [34] Pratt K A, Demott P J, French J R, et al. In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals [J]. Nat. Geosci., 2009, 2(6):397-400.
- [35] Huffman J A, Prenni A J, Demott P J, et al. High concentrations of biological aerosol particles and ice nuclei during and after rain [J]. Atmospheric Chemistry and Physics, 2013,13(13):6151-6164.
- [36] Hoose C, Kristjansson J, Burrows S M. How important is biological ice nucleation in clouds on a global scale? [J]. Environ. Res. Lett., 2010,5(2):275-295.
- [37] Sesartic A, Lohmann U, Storelvmo T. Modelling the impact of fungal spore ice nuclei on clouds and precipitation [J]. Environ. Res. Lett., 2013,8(1):3865-3879.
- [38] Orser C, Staskawicz B J, Panopoulos N J, et al. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli* [J]. Journal of bacteriology, 1985,164(1):359-366.
- [39] 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,(5):39-44.
- [40] Liu Y, Yao T, Jiao N, et al. Seasonal dynamics of the bacterial community in Lake Namco, the largest Tibetan lake [J]. Geomicrobiology Journal, 2013,30(1):17-28.
- [41] Liu Y, Yao T, Jiao N, et al. Salinity impact on bacterial community composition in five high-altitude lakes from the Tibetan plateau, Western China [J]. Geomicrobiology Journal, 2013,30(5):462-469.
- [42] 谢 君,王宁练,蒲健辰,等.青藏高原北部冰川雪中细菌多样性的研究 [J]. 冰川冻土,2009,31(2):342-349.
- [43] 梁宗敏,杜 睿,杜鹏瑞,等.北京大气降水中细菌气溶胶的多样性研究 [J]. 中国环境科学,2014,34(2):317-323.
- [44] 杨绍忠,鄧大雄.改进的人工增雨水滴冻结实验装置 [J]. 气象科技,2006,33(5):451-455.
- [45] 杨绍忠,鄧大雄.一个检测水中冻结核含量的新装置 [J]. 气象学报,2008,65(6):976-982.
- [46] Vali G. Quantitative evaluation of experimental results an the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids [J]. Journal of the Atmospheric Sciences, 1971,28(3):402-409.
- [47] Govindarajan A G, Lindow S E. Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and in vitro [J]. The Journal of biological chemistry, 1988,263(19):9333-9338.
- [48] Kozloff L M, Turner M A, Arellano F, et al. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria [J]. J. Bacteriol., 1991,173(6):2053-2060.
- [49] Turner M A, Arellano F, Kozloff L M. Components of ice nucleation structures of bacteria [J]. J. Bacteriol., 1991,173(20):6515-6527.
- [50] Kajava A V, Lindow S E. A model of the three-dimensional structure of ice nucleation proteins [J]. J. Molecul. Boil., 1993,232(3):709-717.
- [51] Gurian-Sherman D, Lindow S E. Differential Effects of Growth Temperature on Ice Nuclei Active at Different Temperatures That Are Produced by Cells of *Pseudomonas syringae* [J]. Cryobiology, 1995,32(2):129-138.
- [52] Li J K, Lee T C. Bacterial Ice Nucleation and Its Potential Application in the Food-Industry [J]. Trends Food Sci. Tech., 1995,6(8):259-265.
- [53] Graether S P, Jia Z. Modeling *Pseudomonas syringae* Ice-Nucleation Protein as a β -Helical Protein [J]. Biophysical journal, 2001,80(3):1169-1173.
- [54] 向述荣,姚檀栋,陈 勇,等.冰川微生物菌群分布的研究概况及其前景 [J]. 生态学报,2006,(9):3098-3107.
- [55] 刘晓波,康世昌,刘勇勤,等.青藏高原纳木错湖细菌群落特征及其与高山湖泊的对比 [J]. 冰川冻土,2008,(6):1041-1047.
- [56] Liu Y, Yao T, Jiao N, et al. Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers [J]. Extremophiles, 2009,13(3):411-423.
- [57] 郭慧娟.培养与非培养方法对青藏高原土壤细菌多样性的研究 [D]. 保定:河北农业大学,2011.
- [58] 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.
- [59] Yao T, Xiang S, Zhang X, et al. Microorganisms in the Malan ice core and their relation to climatic and environmental changes [J]. Global Biogeochemical Cycles, 2006,20(1):368.

致谢: 真诚感谢中国科学院青藏高原研究所那曲生态环境综合观测研究站的全体工作人员在采样过程中所提供的帮助。

作者简介: 杜鹏瑞(1988-),男,河南郑州人,中国科学院大学博士研究生,主要从事生物气溶胶研究。