

基于高通量测序研究锦屏极深岩层微生物多样性

李雪丹^{1,2}, 徐 绯¹, 王 璨^{1,3}, 徐 恒¹
(1. 四川大学生命科学学院 四川省环境保护土壤生态保护与污染防治重点实验室, 成都 610064;
2. 安阳工学院 生物与食品工程学院, 安阳 455000;
3. 西南交通大学, 成都 610064)

摘 要: 本研究旨在探索中国锦屏地下原始极深环境中极端微生物群落结构及功能. 本研究采用高通量测序技术对锦屏极深环境中 4 个岩石样品和 7 个水样中存在的微生物群落进行了研究, 共获得 732 477 条高质量序列(Clean tags), 可聚类到 1 318 个有效 OTUs, 各样品菌群之间存在一定差异, 但其优势菌门一致, 为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*). 采用 PICRUSt 分析了样品菌群对应的基因功能, 结果表明涉及碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、辅助因子和维生素代谢等基因功能的丰度最高. 结果表明锦屏地下原始极深环境中微生物群落复杂, 但主要菌群相对稳定.

关键词: 微生物多样性; 16s rDNA; 极端环境微生物

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.016004

Research on microbial diversity in the Deep Strata of JinPing based on high-throughput sequencing

LI Xue-Dan^{1,2}, XU Fei¹, WANG Can^{1,3}, XU Heng¹
(1. Sichuan Key Laboratory of Soil Ecology Protection and Pollution Control,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;
2. School of Biotechnology and Food Science, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, China;
3. Southwest Jiaotong University, Chengdu 610064, China)

Abstract: This study aims to explore the composition and function of the microbial community of the deep strata in Jinping. The high-throughput sequencing was used to investigate the microbial diversity and the microbial populations in the deep strata of Jinping. A total of 732,477 clean tags were obtained and clustered to 1,318 effective OTUs based on 97% sequence similarity. Though there were certain differences among the microbiota of each samples. The dominant bacteria in phylum remained the same, which are *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. PICRUSt analysis was performed to show that abundance of the functional genes highly involved in Carbohydrate metabolism, Amino acid metabolism, Energy metabolism and Metabolism of cofactors and vitamins. The research reveals that the phylogenetic diversity of the microbial communities in the deep strata of Jinping is complex, but the main microbial communities are relatively stable.

Keywords: Microbial diversity, 16s rDNA, Extremophile

收稿日期: 2020-06-22
基金项目: 中央高校基本科研项目(SCU2016C002)
作者简介: 李雪丹(1990—), 女, 河南安阳人, 博士研究生, 研究方向为资源微生物学. E-mail: lixuedan091009@163.com
通讯作者: 徐恒. E-mail: xuheng@scu.edu.cn

1 引言

2010 年 12 月 12 日,清华大学和二滩水电开发有限公司共同建设的中国首个极深地下实验室——“中国锦屏地下实验室”(CJPL)投入使用. 该地下实验室位于四川雅砻江锦屏水电站,实验室上层山体岩石厚度达 2 400 多米^[1]. 锦屏地下实验室的宇宙线通量相当于地面宇宙线通量的亿分之一甚至更小. CJPL 是目前世界上岩石覆盖最深的地下实验室,是世界上最好的超低本底实验室. 岩层极端微生物是 CJPL 自然区域的重要组成部分,研究岩层极端微生物资源,探索这些极端微生物的生命代谢对探索人类起源、寻找外太空生命具有重要意义.

极端微生物指在一般生物无法生存的极端环境中能够生存的微生物. 极端微生物由于其特有的遗传物质、生理生化响应和代谢途径对生命科学的研究具有重大意义. Dylan Chivian 等在南非地下金矿 2.8 km 发现一种新物种细菌,因其生存环境类似土星六号卫星,所以命名此细菌为“大胆旅行者(The bold traveller)”,不同于其他生物体,具有生活在完全隔离环境中的能力,该菌生活环境处于极端状态:60 ℃、黑暗无光、无氧、无有机物、单一物种、与世隔绝;研究推测出该菌完整的代谢途径:能量来自周围岩石铀的衰变,碳来自 CO₂ 及周围岩石 CO₃²⁻,氮来自 H⁺ 与岩石反应形成的 NH₃,磷来自岩石磷酸盐氧化还原形成的 PO₄³⁻,该研究结果已发表在《Science》上^[2]. 2014 年 Kōnneke 等研究表明氨氧化古菌(泉古菌门和奇古菌门)通过改变羟基丙酸/羟基丁酸循环,使其代谢过程发生变化,促使该途径的能量效率远高于其他自养途径,促使氨氧化古菌能够在低营养环境下茁壮成长^[3]. 2015 年日本学者在《Science》报导:在海底 1.5~2.5 km,温度 40~60 ℃的地层中发现细菌并成功培养,每立方厘米沉积物中菌细胞数约 10~10 000 个,其中煤层处最丰富,分析显示这些微生物类似森林土壤细菌(包括产甲烷菌),推测千万年前因地质构造随森林一同埋入海底的土壤土著菌仍存活,它们以海底埋藏的森林为能源,是天然气形成的主要原因,此次发现微生物深度刷新了新记录,成为世界最深^[4]. 同年 Reitschuler 等研究了阿尔卑斯山一个无人活动痕迹洞穴表面的月奶石沉积物中微生物群落,发现一种能耐

受低温和营养匮乏的古细菌群落,优势菌株在亲缘上与氨氧化古菌接近,其可能在黑暗洞穴中仅靠氧化环境中的氨获得生存能量^[5]. 大量研究表明,在岩石、沉淀物、高温泉水等极端环境中存在大量极端微生物,其数量和种类超出人类想象.

传统的微生物研究方法,如显微镜观察微生物形态、平板计数法、微生物纯种分离和生理生化反应鉴定微生物等存在很大的局限性. 越来越多的研究表明:环境中可分离培养的微生物种类所占比例不到微生物种类总数的 1%,其中 99% 以上的微生物极难培养或不可培养^[6-8]. 用传统的微生物研究方法仅能对环境中极少数的微生物种类进行研究,不能代表环境中复杂的微生物群体. 极端环境,盐湖(盐度)、热泉(高温)、冰川及冻土(低温)、酸性尾矿水(极酸)、碱湖(强碱)、深海(高压、贫营养、缺氧、少光等)、地下深部(无光、缺氧、高压、高温、高盐、高辐射、贫营养等)、沙漠(缺水、紫外辐射强烈、贫营养等)等中的微生物因生活条件苛刻、生长周期长等原因更难用传统方法研究. 基于非培养基础的分子生物学方法可以通过从环境样品中直接提取微生物的 DNA,快速、系统地对环境样品中微生物组成、结构和多样性分析,较为全面、真实的反映微生物的状态. 16S rDNA 序列总长度为 1 540 bp,基因序列长短适中,结构中即有保守区域又有变异区域^[9],是最常用的生物标记物,广泛用于细菌的分类、系统进化和多样性研究中.

由于“中国锦屏地下实验室”(CJPL)位于地下 2 400 多米,其极深的自然条件提供了完美的“洁净本底”. 本研究对 CJPL 原始极深环境中极端微生物资源进行研究,为后续研究其能量溯源提供研究基础. 本研究可向人类提供现在不完全了解的基因库,而且在生物学理论上也有极大意义,对于推动生物科学,探索新的可开发生物资源有着重要意义.

2 材料与方法

2.1 材料

采样地点为 2014 年启动建设的“中国锦屏地下实验室”第 IV 组实验洞 8[#] 洞,轴线方位角 N58° W,距离地表 2 400 m. 2016 年 12 月共采样 11 个用于分析微生物多样性,其中 4 个岩石样品(3.1 m 处碎石 S1,5 m 处碎石 S2,钻井附近对照样碎石 S3,东北角 60° 方位碎石 S4),7 个洞内水样

(东北角 60°方位水样 W1, 泉眼处 (1. 2. 3) 水样 W2a、W2b、W2c, 洞内水池水样 W3, 气泡状岩石渗水样 W4, 洞池气泡附近水样 W5), 见图 1. 采用岩芯钻机采集岩石样品后装入无菌采样袋, 岩壁缝隙渗透水样收集至无菌采用瓶中, 立即放入液氮中保存运输至实验室.



图 1 样品采集位置

Fig. 1 The location of sample collection

2.2 方法

2.2.1 DNA 提取与纯化 岩石样品表面消毒后于无菌环境下取出岩心用于总 DNA 提取, 将岩心用无菌水浸泡, 浸泡水用 0.22 μm 滤膜过滤. 水样在超净台用 0.22 μm 滤膜进行过滤, 采用 CTAB 法进行 DNA 提取. 将提取的 DNA 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测序.

2.2.2 高通量测序 提取样品总 DNA 后, 根据细菌 V3 + V4 区设计得到引物 (F: 5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCAG-3', R: 5'-GGACTA CHVGGGTWTCTAAT-3'), 合并引物接头, 进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化、定量和均一化合成测序文库, 对建好的文库进行质检, 质检合格后在 Illumina MiSeq 2500 平台进行测序.

2.2.3 测序数据过滤及拼接 根据 PE reads 之间的 Overlap 关系, 将测序所得的双端序列数据拼接 (Merge) 成一条序列 Tags, 同时对 Reads 质量和 Merge 效果进行质控过滤. 首先, 使用 FLASH v1.2.7 软件, 通过 Overlap 对每个样品的 Reads 进行拼接, 得到的拼接序列即原始 Tags 数据. 其次, 使用 Trimmomatic v0.33 软件, 对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤, 得到高质量的 Tags 数据. 再使用 UCHIME v4.2 软件, 鉴定并去除嵌合体序列, 得到最终有效数据.

2.2.4 OTU (Operational Taxonomic Unit) 分析 利用 QIIME 软件中的 UCLUST 对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类、获得 OTU, 并基于 Silva 分类学数据库 (Release128, <http://www.arb-silva.de>) 对 OTU 进行分类学注释.

2.2.5 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性反映的是单个样品内部的物种多样性, 使用 Mothur 软件, 对样品 Alpha 多样性指数进行评估. 用计算群落丰度的 Chao1 和 Ace 指数和计算群落多样性的 Shannon 和 Simpson 指数作为 Alpha 多样性的衡量指标^[10].

2.2.6 Beta 多样性分析 Beta 多样性用来比较不同样品在物种多样性方面存在的差异大小. 基于 Binary accard、Bray curtis、(Un)weighted unifrac (限细菌) 多种算法呈现物种多样性矩阵^[11]. 基于 R 语言平台绘制样本主成分分析 (PCA)、主坐标分析 (PCoA) 以及环境因子与样本组成相关性分析 (RDA/CCA).

3 结果

3.1 基因组 DNA 提取与测序数据分析

样品宏基因组提取后, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, NanoDrop 检测 DNA 纯度和浓度. 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示样品均有目标条带出现, DNA 完整性较好. NanoDrop 结果显示样品浓度和纯度符合送样测序要求. 对样品 DNA 进行建库并在 Illumina MiSeq 2500 平台进行测序, 结果如表 1 所示: 11 个样品测序共获得 879 756 对 Reads, 双端 Reads 拼接、过滤后共产生 732 477 条 Clean tags, 平均每个样品产生 79 978 条 Clean tags; 样品的测序质量均较高, Q20 值在大于 96%, Q30 值在 94% 以上; 所有样品中细菌的 GC 含量均高于 50%, S1 细菌的 GC 含量最高 (56.83%). Shannon 多样性指数稀释曲线趋于平坦, 表明测序数据量足够大, 增加数据量并不会增加 OTU, 见图 2. 基于 97% 相似性聚类获得 OTU 数 1 318 个 (不同样品间取并集), 其中 S1 样品中 OTU 最多, W2a、W2b 和 W2c 样品中的 OTU 最少, 见图 3. 岩石样品与水样中共有 OTU (共有微生物) 数为 873 个, 岩石中特有的 OTU 数为 321 个, 水样中特有的 OTU 数 124 个, 见图 4.

表 1 样品测序结果和拼接的 Tags 数
Tab. 1 sequence results and Tags number of samples

Sample ID	PE Reads	Raw Tags	Clean Tags	Effective Tags	AvgLen/bp	GC/%	Q20/%	Q30/%	Effective/%
S1	79 955	76 804	68 239	65 707	419	56.83	97.11	94.6	82.18
S2	80 009	75 976	67 000	63 262	422	53.27	97.06	94.63	79.07
S3	79 667	75 044	65 859	61 684	421	53.99	96.93	94.42	77.43
S4	80 389	75 710	66 576	66 140	420	53.28	96.96	94.5	82.27
W1	79 981	75 559	66 915	66 302	422	54.37	97.11	94.7	82.9
W2a	80 101	75 479	66 674	66 602	423	53.18	97.11	94.73	83.15
W2b	79 946	74 685	65 233	65 069	428	53.22	97.04	94.61	81.39
W2c	80 041	75 524	66 040	65 997	428	53.19	96.96	94.51	82.45
W3	79 988	76 248	67 845	67 408	420	52.89	97.27	95.01	84.27
W4	79 880	76 078	67 746	66 428	418	54.09	97.28	94.99	83.16
W5	79 799	74 098	64 350	63 975	426	53.36	97.16	94.81	80.17

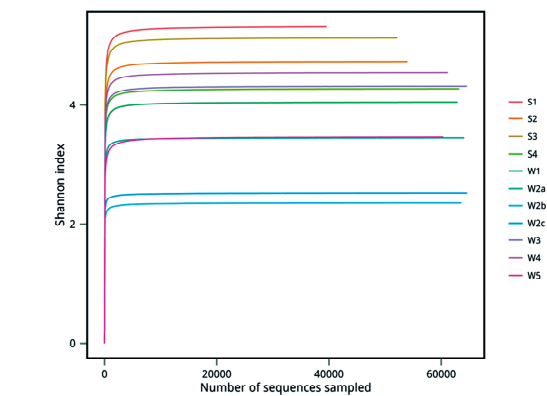


图 2 样品 Shannon index 曲线
Fig. 2 Shannon curves of samples

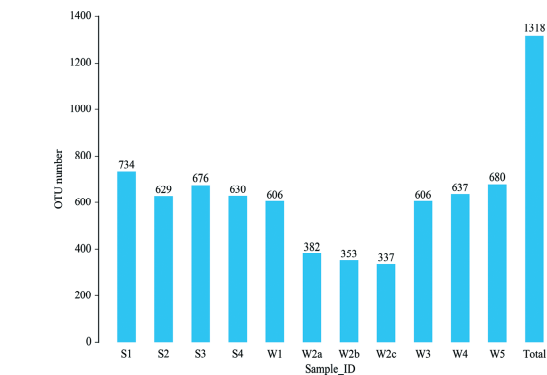


图 3 样品 OTU 个数分布图
Fig. 3 OTU number of samples

3.2 多样性分析

在 97% 相似度水平下,对样品 Alpha 多样性指数进行统计(表 2). Chao1 和 Ace 指数简单指群落中物种的数量,而不考虑群落中每个物种的丰度情况. Shannon 和 Simpson 指数受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响,相同物种丰度的情

况下,群落中各物种具有越大的均匀度,则认为群落具有越大的多样性. 由表 2 可以看出 S1 样品的 Alpha 多样性最高,其次为 S3 和 W4, W2b 和 W2c 样品的单个样品内部的物种多样性较低.

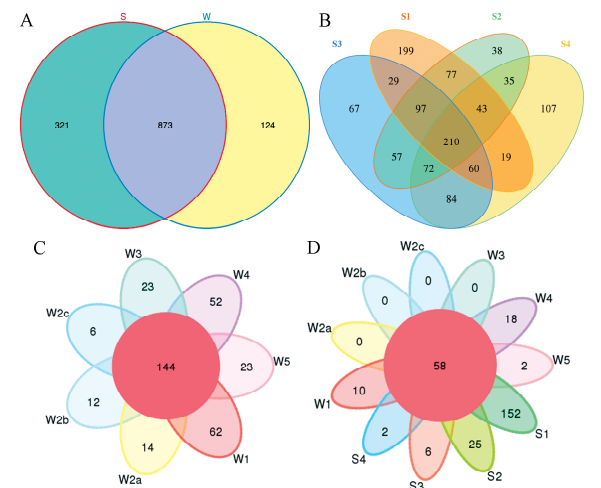


图 4 不同样品间特异性细菌 OTU 数量
Fig. 4 Number of specific OTUs in microbiome among different samples

注: (A) 岩石样品和水样间特异性 OTU 数量; (B) 不同岩石样品间特异性 OTU 数量; (C) 不同水样间特异性 OTU 数量; (D) 11 个样品间特异性 OTU 数量.
Note: (A) Number of specific OTUs in microbiome between rock sample and water sample; (B) Number of specific OTUs in microbiome among rock samples; (C) Number of specific OTUs in microbiome among water samples; (D) Number of specific OTUs in microbiome among 11 samples.

基于 UniFrac 的加权和非加权的主坐标分析其第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 41.88%、15.99% 和 35.92%、23.94%. 采用非加权组平均法进行聚类分析,分析结果表明 S4 和 W1 样品间物种组成的相似性较高; W4 和 W5

样品间物种组成的相似性较高;W2b 和 W2a 品
间物种组成的相似性较高,图 5.

表 2 样品 Alpha 多样性指数统计

Tab. 2 Statistics of microbial Alpha diversity index in the samples

Sample ID	OTU	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Coverage
S1	734	814,282	6 803,558	4 0.015	8 5.307	8 0.997
S2	629	648,573	6 662	0.029	4 4.732	7 0.999
S3	676	725,689	4 731,914	9 0.015	4 5.126	6 0.998
S4	630	686,569	7 698,653	8 0.043	5 4.278	0.998
W1	606	683,447	9 694,596	5 0.056	6 4.049	8 0.998
W2a	382	420,696	8 414,692	3 0.074	6 3.447	6 0.999
W2b	353	424,158	1 442,25	0.180	9 2.354	3 0.998
W2c	337	416,396	7 414,608	7 0.157	5 2.525	2 0.998
W3	606	675,423	680,454	5 0.037	1 4.32	0.998
W4	637	723,923	2 757,659	6 0.030	2 4.546	6 0.998
W5	680	757,782	1 775,878	8 0.114	4 3.461	4 0.998

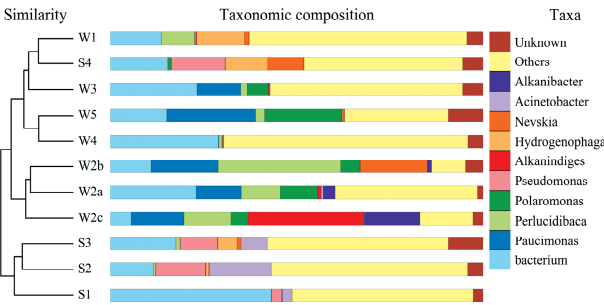


图 5 样品 UPGMA 聚类树

Fig. 5 UPGMA clustering analysis of samples

3.3 物种注释及分类学分析

本研究对各样本进行了物种注释,详细的分类和整理了各个样品具体的菌群结构. 各个样品在门和属水平上物种组成结构存在一定差异,见图 6.

各样品细菌物种注释到 24 个门,11 个样品中绝大多数微生物属于变形菌门(*Proteobacteria*),除样品 S4 中有 0.15% 的微生物被鉴定为 Unknown,其他样品中只有极小一部分微生物被鉴定为 Unknown. 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)在各个样品中的相对丰度均大于 1%,此外放线菌门(*Actinobacteria*) (W2b 0.86%) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*) (S3 0.36%) 在各个样品中的相对丰度均大于 1%. 酸杆菌门(*Acidobacteria*) 在岩石样品中的含量大于 1% (除 S2 0.43%),而在水样中均小于 1% (W1 1.26%).

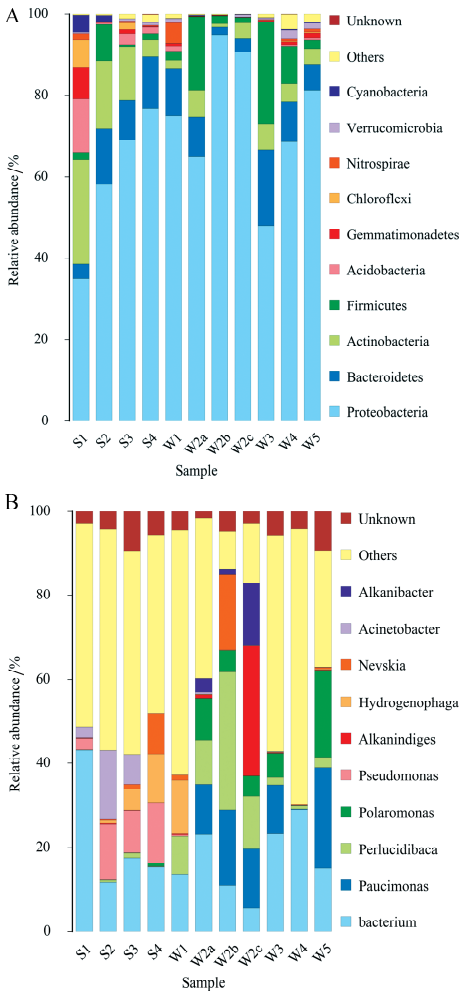


图 6 不同样品细菌在(A)门和(B)属水平的相对丰度
注:只选取前 10 种进行展示,剩余菌属合并为 Others.

Fig. 6 Relative abundances of bacterial in (A) phylum and (B) genus level among different samples

Note: Only the top 10 genera were shown and the other taxonomic level were merged into “other”.

在属水平上,共获得 345 个属. 在 11 个样品中含量均较高的是杆菌属(*Bacterium*),其次在岩石样品中相对含量较多的是假单胞菌属(*Pseudomonas*),在水样中含量较多的是 *Paucimonas*. 位于前 10 的微生物属还有噬氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、涅瓦菌属 (*Nevskia*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、单胞菌属 (*Polaromonas*)、 γ -变形菌纲的 *Alkanindiges*、*Alkanibacter* 和 *Perlucidi-baca*.

3.4 功能预测

通过比对 16S 测序数据获得的物种组成信息,使用基因功能预测 PICRUSt 软件推测样本中的功能基因组成,从而分析不同样本在功能上的差异. KEGG 分析显示共获得 299 个预测的 KEGG,11 个样品中丰度较高的代谢通路相同,涉及的代谢通

路有:碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢、辅助因子和维生素代谢、异源物质的生物降解和代谢、脂质代谢、核苷酸代谢、膜转运、翻译和信号传导等,见图 7A. COG 分析也表明 11 个样品中 COG 功能预测是相同的,包含氨基酸转运和代谢、转录、信号转导机制等,见图 7B.

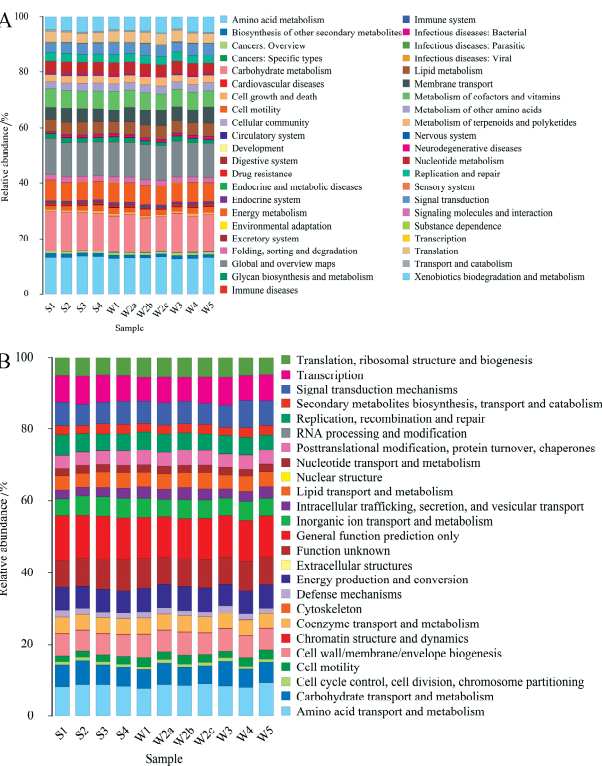


图 7 基因(A)KEGG 和(B)COG 功能预测
Fig. 7 The (A) KEGG and (B) COG predictions of gene function

4 讨论

在自然环境中,99%以上的微生物不可在实验室纯化培养,这些不可培养微生物是研究环境微生物多样性的最大障碍. 传统的微生物形态观察、生理生化测定及分离纯化鉴定不仅周期长而且无法对这类不可培养微生物进行研究. 随着测序技术的发展,基于序列分析为微生物的鉴定提供了新的思路. 16 rDNA 是根据 97%的序列相似性水平来划分种属,能寻找到新物种且操作简便可行,相似性低于 97%则可认为是一个新的物种. 16S rDNA v3+v4 区的序列差异性较大,含有丰富的信息,可根据序列信息快速的进行细菌的鉴定. 本研究采用 Illumina MiSeq 2500 测序技术,克服了环境中大部分细菌不可培养的难题,对锦屏极深岩层环境中的微生物进行了比较全面的检测. Shannon 多

样性指数稀释曲线已经进入平台期,达到实验需要的理想水平,更多的数据量对于发现新的 OTU 贡献很小,且覆盖率高于 99%,说明此次测序数据比较全面的覆盖了样品中的微生物,能够真实全面的反映其组成情况.

在门水平上,样品中的优势菌群均为变形菌门. 在属水平上,样品 S1、S3、S4、W2a、W3 和 W4 的优势菌群均为杆菌属, S2 的优势菌群为变形菌门不动杆菌属, W1 的优势菌群为变形菌门 *Silanimonas* 属, W2b 的优势菌群为变形菌门 *Perlucidibaca* 属, W2c 的优势菌为变形菌门 *Alkanindiges* 属, W5 的优势菌群属于变形菌门 *Paucimonas* 属. 在属水平进行 Beta 多样性分析, S4 和 W1 样品间物种组成的相似性较高; W4 和 W5 样品间物种组成的相似性较高; W2c、W2b 和 W2a 样品间物种组成的相似性较高. S4 与 W1 取样位点一种,均在锦屏 8# 洞东北角 60 °C, W1 为该处水样, S4 为该水样附近岩石沉积物, W1 和 S4 间有 3 个属的微生物相对丰度差异较大:变形菌门 *Silanimonas* 属(W1 16.2%, S4 0.34%)是存在于温泉中的嗜热的革兰氏阴性菌,最适生长温度为 50—55 °C,可以分解几丁质获取营养^[12];变形菌门涅瓦菌属(*Nevskia*) (W1 1.2%, S4 9.67%)为革兰氏阴性严格需氧菌的化能有机营养型细菌,生活最适温度为 20~25 °C^[13];假单胞菌属(*Pseudomonas*) (W1 0.29%, S4 14.41%)需氧的革兰氏染色阴性菌,大多菌的适温为 30 °C. W4 与 W5 样品间物种组成的相似性较高是由于其取样位点相邻. W2c、W2b 和 W2a 物种组成的相似性较高是由于其取样位点相同.

在种水平上,各个样品中杆菌(bacterium)占 70%以上,本研究将装甲菌门、拟杆菌门、绿菌门、蓝细菌门、变形菌门、厚壁菌门等门中的杆菌统计到一起. 其次是在室温 0 °C 以下(水温 12 °C 以下)将铵态氮、NO²⁻ 转化为 NO³⁻ 硝化菌属的 *Perlucidibaca* sp.^[14], 本研究中该菌只存在于水样中. 而噬碱属 *Aquiflexum* sp. 只存在于岩石样品中,具有将硝酸盐还原成亚硝酸盐的能力^[15],此外,从印度罗娜碱性火山口湖分离纯化的一株 *Aquiflexum* sp. DL6 可产生大量催化硝基芳香化合物为芳香胺的硝基还原酶和还原偶氮染料中偶氮键的 NAD(P)H 偶氮还原酶^[16-17]. 硫化共生有机体细菌主要存在于 W4 样品中,大约占该样品总细菌数量的 1%,在样品 S2、S3、S4、W1、W3、W5 也

含有该菌,但数量较少. 硫氧化共生有机体细菌为自养型微生物,通过氧化环境中的还原态硫化物获得能量,能够固定二氧化碳满足自身和共生体的生长,研究发现海绵共生的硫氧化菌与其宿主发生了共进化,既能自养也能异养^[18]. 从云南腾冲温泉酸性水样分离得到一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌 MTH-04,该菌能利用硫磺、硫代硫酸钠、四硫酸钾作为能源生长,不能利用硫酸亚铁、黄铁矿、蛋白胨、酵母粉、葡萄糖,在有硫磺作为能源时也不能利用这些有机质进行混合型生长^[19].

岩石样本 S1 中发现的酸杆菌门 Subgroup 6,在美国怀俄明州低凯恩洞穴(Lower Kane Cave, Wyoming, USA)、西班牙阿尔塔米拉洞窟(The subaerial non-sulfidic Altamira Cave, Spain)中也发现了该 OTU,Subgroup 6 与 ϵ -变形菌、 γ -变形菌和 α -变形菌间存在功能上的相关性^[20]. S1 特有的放线菌门 *Gaiella* 属是非运动的杆状革兰氏阴性菌,在葡萄牙中部的一家矿泉水公司的 150 米深钻孔中也发现该属细菌^[21]. S1 特有的芽单胞菌门 *Longimicrobiaceae* 是一种化学有机异养革兰氏阴性菌,首次发现于地中海森林土中,可在低营养条件下生存^[22]. 在 S4、W1、W4 和 W5 中发现的变形菌门 *Oligoflexaceae* 科 OTU 在撒哈拉沙漠的东部边缘的砂碎石样品中也有发现,*Oligoflexus* 细菌可在低营养条件下生长^[23]. 在 S4、W4 和 W5 中均发现一个未知菌,有待进一步进行鉴定.

水样中特有的 OTU 拟杆菌门 *Cryomorphaceae* 广泛存在于水生栖息地,如河流岩石、海水、海洋沉积物、海岸沙滩和内陆河水体等,贯穿热带和极地,通常存在于有机碳富裕的地方^[24]. 水样中特有 OTU 变形菌门 *Limnobacter* 属首次分离于淡水湖沿岸沉积物中,是一类硫代硫酸盐异养细菌,在日本营养匮乏的火山沉积中发现一株 *Limnobacter* 属菌株 KP1-19^T 可利用硫代硫酸盐作为额外的能量来源^[25-26].

W1 样品特有的变形菌门 *Porticoccaceae* OTU 主要存在于海洋环境中,该科的某些物种可运用视紫质将光能作为额外能源^[27]. W1 特有变形菌门 *Polynucleobacter* 属 OTU 是一些游仆虫属的内共生菌株,但也有些菌株可独立生存于淡水、池塘和河流^[28]. W2 样品中特有的变形菌门 *Alkanibacter* 属 OTU 是无孢子产生的革兰氏阴性菌,分离于炼油厂的 *Alkanibacter* 属细菌可以己烷作为唯一碳源,也可以羟基丁酸和琥珀酸盐为碳源,最适生长温度 30 °C,温度低于 13 °C 或者高于

45 °C 不生长^[29]. W4 特有厚壁菌门 *Desulfosporosinus* 属 OTU 广泛存在于环境中,如原始含水层、城市饮用水、水稻根部和永久冻土,该属菌株 343^T 含有 b-细胞色素并将乳酸盐作为电子供体还原硫酸盐和硫代硫酸盐^[30].

本研究是世界首次对锦屏地下 2 400 多米“中国锦屏地下实验室”(CJPL)8 号洞的微生物多样性进行研究,后续将对采样处地球物理化学环境进行研究,探索微生物多样性与地球环境间的关系,为研究极端微生物能量溯源奠定基础,对于推动生物科学,探索新的可开发生物资源有着重要意义.

参考文献:

- [1] Zeng Z M, Gong H, Yue Q, *et al.* Thermal neutron background measurement in CJPL [J]. Nucl Instrum Meth A, 2015, 804: 108.
- [2] Chivian D, Brodie E L, Alm E J, *et al.* Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth [J]. Science, 2008, 322: 275.
- [3] Könneke M, Schubert Dm, Brown P C, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2014, 111: 8239.
- [4] Inagaki F, Hinrichs K U, Kubo Y, *et al.* Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor [J]. Science, 2015, 349: 420.
- [5] Reitschuler C, Lins P, Schwarzenauer T, *et al.* New undescribed lineages of non-extremophilic archaea form a homogeneous and dominant element within alpine moonmilk microbiomes [J]. Geomicrobiol J, 2015, 32: 890.
- [6] Kamagata Y, Tamaki H. Cultivation of uncultured fastidious microbes [J]. Microbes Environ, 2005, 20: 85.
- [7] Kellenberger E. Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology [J]. Embo Rep, 2001, 2: 5.
- [8] Rappé M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority [J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 369.
- [9] Peer Y V D, Chapelle S, Wachter R D. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA [J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24: 3381.
- [10] Grice E A, Kong H H, Conlan S, *et al.* Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324: 1190.
- [11] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities

- [J]. Appl Environ Micr. 2005, 71: 8228.
- [12] Manucharova N A, Vlasenko A N, Tourova T P, *et al.* Thermophilic chitinolytic microorganisms of brown semidesert soil [J]. Mikrobiologiya, 2008, 77: 683.
- [13] Babenzien H D, Cypionka H. Nevskia [M]. [S. l.]: John Wiley and Sons, Ltd, 2015.
- [14] Hao Y, Jiang X G, Tian Q, *et al.* Isolation and Identification of nitrobacteria adapted to low temperature [J]. Adv Mater Res, 2012, 518-523: 406.
- [15] Whitman W B. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [M]. [S. l.] John Wiley and Sons, Ltd, 2015: 13.
- [16] Misal S A, Lingojwar D P, Gawai K R. Properties of NAD (P) H azoreductase from alkaliphilic red bacteria *Aquiflexum* sp. DL6 [J]. Protein J, 2013, 32: 601.
- [17] Misal S A, Bajoria V D, Lingojwar D P, *et al.* Purification and characterization of nitroreductase from red alkaliphilic bacterium *Aquiflexum* sp. DL6 [J]. Appl Biochem Micro, 2013, 49: 227.
- [18] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea [J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33: 999.
- [19] 刘纓, 齐放军, 林建群, 等. 一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌的分离和系统发育分析[J]. 微生物学报, 2004, 44: 382.
- [20] Meisinger D B, Zimmermann J, Ludwig W, *et al.* In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA) [J]. Environ Microbiol, 2007, 9: 1523.
- [21] Albuquerque L, França L, Rainey F A, *et al.* *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of *Gaiellaceae* fam. nov. and *Gaiellales* ord. nov [J]. Syst Appl Microbiol, 2011, 34(8): 595.
- [22] Pascual J, García M, Bills G F, *et al.* *Longimicrobium terrae* gen. nov., sp. nov., an oligotrophic bacterium of the under-represented phylum Gemmatimonadetes isolated through a system of miniaturized diffusion chambers [J]. Int J Syst Evol Micr, 2016, 66: 1976.
- [23] Nakai R, Nishijima M, Tazato N, *et al.* *Oligoflexus tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, filamentous bacterium of a novel proteobacterial lineage, and description of *Oligoflexaceae* fam. nov., *Oligoflexales* ord. nov. and *Oligoflexia* classis nov [J]. Int J Syst Evol Micr, 2014, 64: 3353.
- [24] Bowman J P. The Family Cryomorphaceae [M]. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 539.
- [25] Spring S, Kämpfer P, Schleifer K H. *Limnobacter thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment [J]. Int J Syst Evol Micr, 2001, 51: 1463.
- [26] Lu H, Sato Y, Fujimura R, *et al.* *Limnobacter litoralis* sp. nov., a thiosulfate-oxidizing, heterotrophic bacterium isolated from a volcanic deposit, and emended description of the genus *Limnobacter* [J]. Int J Syst Evol Micr, 2011, 61: 404.
- [27] Spring S, Scheuner C, Göker M, *et al.* A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 281.
- [28] Hahn M W, Lang E, Brandt U, *et al.* Emended description of the genus *Polynucleobacter* and the species *Polynucleobacter necessarius* and proposal of two subspecies, *P. necessarius* subsp. *necessarius* subsp. nov. and *P. necessarius* subsp. *asymbioticus* subsp. nov [J]. I Int J Syst Evol Micr, 2009, 59: 2002.
- [29] Friedrich M M, Lipski A. *Alkanibacter difficilis* gen. nov., sp. nov. and *Singularimonas variicoloris* gen. nov., sp. nov., hexane-degrading bacteria isolated from a hexane-treated biofilter [J]. I Int J Syst Evol Micr, 2008, 58: 2324.
- [30] Vatsurina A, Badrutdinova D, Schumann P, *et al.* *Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost [J]. I Int J Syst Evol Micr, 2008, 58: 1228.

引用本文格式:

中 文: 李雪丹, 徐绯, 王璨, 等. 基于高通量测序研究锦屏极深岩层微生物多样性[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 016004.

英 文: Li X D, Xu F, Wang C, *et al.* Microbial diversity in the Deep Strata of JinPing based on high-throughput sequencing [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 016004.