



姜成英,中国科学院微生物研究所研究员。2001年毕业于中国科学院过程工程研究所,获工学博士学位。2006年6月-9月和2008年1月-2009年1月,到德国波鸿鲁尔大学生物化学系做访问学者。2001年至今,一直从事有机污染物的微生物降解和趋化机理及污染环境 and 特殊环境中微生物的种群多样性和功能多样性研究;进行了极端嗜酸热古菌和嗜酸细菌铁、硫代谢调控机制及环境适应机制以及生物冶金技术及矿山污染环境修复治理应用基础的研究;获得了大量嗜酸硫代谢或铁代谢微生物资源,并应用于生物冶金及污染环境修复过程;利用基因组、蛋白质组、转录组及其他新技术发现了嗜酸微生物硫代谢途径的新蛋白,解析了其环境适应机制。在国内外重要学术杂志刊物上发表相关研究论文 50 多篇。

洞穴微生物组: 已知与未知

朱海珍^{1,2}, 姜成英^{1,2,3*}, 刘双江^{1,2,3*}

¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

² 中国科学院大学, 北京 100049

³ IMCAS-RCEECAS 环境微生物技术联合实验室, 北京 100101

摘要: 洞穴是由于岩石受到溶蚀或火山岩浆冷却形成的地下空间和通道。洞穴遍布世界各地, 蕴藏着大量的微生物资源。洞穴内黑暗潮湿, 温度相对稳定, 营养比较贫瘠, 是一种极端的生态系统, 存在着高度特异性的洞穴微生物。对洞穴微生物组的研究, 有助于认知洞穴微生物群体结构、组成及其地理学分布, 加深对洞穴生态系统的理解, 并为保护和开发洞穴资源提供指导。本文主要介绍了洞穴微生物组的研究方法, 总结分析了洞穴微生物的研究进展, 并着重阐述了含特殊化合物成分的洞穴中化能自养的特色微生物组。

关键词: 洞穴, 喀斯特, 微生物组, 化能自养

洞穴是由于岩石受到溶蚀或火山岩浆冷却形成的地下空间或通道。大部分洞穴属于喀斯特地貌(karst landform), 即有溶蚀能力的水对可溶性岩石进行化学溶蚀, 并辅以流动冲蚀等机械作用形成的地表和地下形态。喀斯特地貌覆盖地球表面约 20%, 主要是在碳酸盐岩的基础上形成的^[1]。当富含二氧化碳的地下水流经可溶性岩石(如碳酸盐岩)缝隙时, 对岩石发生溶蚀, 导致缝隙不断扩张, 从而形成溶洞(karst cave)。火山喷发溢出的岩浆沿着沟谷顺流而下, 其外层逐渐冷却凝固成硬壳, 而内部炽热的岩浆继续流动直至流尽, 从而形

基金项目: 科技基础性工作专项(2014FY120100)

*通信作者。刘双江, Tel: +86-10-64807423, Fax: +86-10-64807421, E-mail: liusj@im.ac.cn; 姜成英, Tel: +86-10-64807581, E-mail: jiangcy@im.ac.cn

收稿日期: 2017-02-20; 修回日期: 2017-03-27; 网络出版日期: 2017-04-05

成地下的熔岩洞(lava cave)。有些洞穴中常年冰雪沉积,也叫做冰洞(ice cave)。

洞穴遍布世界各地,美国境内已探明的洞穴系统超过 50000 个,仅田纳西州就有 7000 多个洞穴^[2],目前已知的世界上最大的洞穴——猛犸洞(Mammoth Cave System)位于美国肯塔基州,全长 652 km。欧洲最大的洞穴位于乌克兰境内,总长度 236 km,是世界上长度排名第五的洞穴。北欧的山区有很多冰洞,世界上最大的冰洞位于奥地利,全长 42 km^[3]。亚洲最大的洞穴是中国贵州省绥阳县的双河洞群,长 186 km,高 584 m^[4]。除入口处之外,洞穴内几乎没有光照,很难通过光合作用提供有机营养物质;外界的物质输入一般仅限于地表的渗漏水及穴居动物的粪便,因此,洞穴被认为是一种寡营养的极端生境。尽管洞穴内的总有机碳不到 2 mg/L,但蕴藏着丰富的微生物资源,洞穴的岩石中微生物平均数量可达 10⁶ 个/g 样品^[5]。

1 洞穴微生物的研究方法与研究进展

早期对微生物群落的研究主要采用传统分离培养的方法,通过优化培养条件、接种量、培养基成分等获得尽可能多的可培养菌株。将分离到的菌株进行统计学分析,可以快速衡量一些小群体的多样性^[6]。这种方法能够获得大量微生物资源,根据后续对菌株代谢的分析,进行改造和利用。Laiz 等人将阿尔塔米拉洞穴(Altamira cave)滴水 and 洞顶岩壁中分离到的微生物群落进行了比较,水样中的微生物主要是革兰氏阴性的肠杆菌科(Enterobacteriaceae)和弧菌科(Vibrionaceae)菌株,革兰氏阳性菌所占的比例较低;岩壁样品中分离到的微生物主要是链霉菌(*Streptomyces*)^[7]。

Clara Urzi 等人从西班牙蝙蝠洞(the Cave of Bats)的岩壁光养型生物膜中分离到 17 种不同的蓝藻(Cyanobacteria),其中,色球藻目(Chroococcales) 6 种,颤藻目(Oscillatoriales) 8 种,念珠藻目(Nostocales) 3 种;119 株细菌,革兰氏阳性菌占 90.2%,革兰氏阴性菌占 9.8%^[8]。Velikonja 等人用 7 种不同培养基对斯洛文尼亚某洞穴岩壁上的黄色、粉色、灰色和白色斑点样品进行了微生物分离培养,共得到 80 株形态不同的微生物菌种。其中,农杆菌属(*Agrobacterium*)和链霉菌属的菌株在所有样品中都能分离到。研究者还采用了 16S rRNA 基因文库方式研究了洞穴微生物的多样性,同培养方式相比,得到的群落多样性数据有显著差异。在培养方法得到的数据中,放线菌门(Actinobacteria)的菌株占分离菌株数量的 47%,而在样品 16S rRNA 基因文库中占 16%。除此之外,16S rRNA 基因文库中,变形菌门(Proteobacteria)的优势菌株属于着色菌目(Chromatiales)和黄色单胞菌目(Xanthomonadales),而分离培养菌株主要是假单胞菌属(*Pseudomonas*)和溶杆菌属(*Lysobacter*)的新种;分离培养还能够得到非培养方式未检测到的厚壁菌门(Firmicute)菌株^[9-10]。Axenov-Gibanov 等人从西伯利亚最大的喀斯特洞群中分离到的链霉菌具有抗细菌和真菌的活性,能够产多种次级代谢产物,这些活性物质的纯化、表征及生物合成将成为进一步研究的兴趣点之一^[11]。

作者对我国贵州省遵义市绥阳县宽阔水风景区 2 个喀斯特洞穴的土样、水样、动物粪便、虫蛾、地衣样品进行梯度稀释,选取合适的稀释度用寡营养培养基对其中的细菌进行了分离纯化。将得到的单菌落进行菌落 PCR 扩增其 16S rRNA 基因并测序,结合生理生化特征进行鉴定,共得到 5273 株、448 种细菌。这些菌株属于变形菌门、

放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)和异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)的 119 个属。其中,变形菌门的菌株数量和种类最多,其次是放线菌门,拟杆菌门和异常球菌-栖热菌门的菌株仅在个别样品中偶然出现。变形菌门中占优势的是短波单胞菌属(*Brevundimonas*)的菌株,放线菌门中占优势的是链霉菌属的菌株,厚壁菌门中占优势的是芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株。另外,从样品中分离得到的潜在新种可能具有进一步开发利用的价值。初步研究发现,一株发仙菌属的菌株(*Pilimelia* sp.)其次级代谢产物具有很好的抗菌活性,并能够在特定培养条件下产生黄酮类化合物和具有特殊紫外吸收的芳环类化合物;一株薄层杆菌属的菌株(*Hymenobacter* sp.)能够产生大量胞外附属物,这些物质的成分和功能仍有待探索。

由于在培养过程中,温度、pH、通气量等生长条件都受到人为限制,无法完全模拟自然环境,常会导致选择性地富集一部分微生物,而另一部分完全缺失。统计结果表明,海水、淡水、土壤和活性污泥中微生物的可培养率分别为 0.001%–0.100%、0.25%、0.30%和 1%–15%^[12]。由于分离培养方式的局限性,越来越多的微生物生态学研究使用分子生物学方法对群落的组成和结构进行分析。这些方法大多数需要首先通过 PCR 对目的基因进行扩增,然后通过电泳鉴别扩增产物的序列差异或长度差异^[13]。

Lerman 等人于 20 世纪 80 年代初发明了变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE),起初主要用来检测 DNA 片段中的点突变^[14–17],Muyzer 等人在 1993 年首次将其应用于微生物群落结构研究^[18],后来又发展出其衍生技术——温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel

electrophoresis, TGGE)^[19]。此后,该技术曾被广泛用于微生物生态学研究的各个领域。双链 DNA 分子在电泳时的迁移行为决定于其分子量和所带的电荷,不同长度的双链 DNA 能够被区分开,但同样长度的双链 DNA 在胶中的迁移行为一样,因而不能被区分开。DGGE/TGGE 技术在普通聚丙烯酰胺凝胶的基础上加入了变性剂梯度或温度梯度,使长度相同但序列不同的 DNA 片段发生不同程度的解链,从而区分开来。Schabereiter-Gurtner 等人用基于 16S rRNA 基因的 DGGE 技术分析了西班牙 4 个洞穴的岩壁和壁画上的细菌群落,并对得到的条带进行了测序。通过系统发育分析,所得的序列主要属于变形菌、绿色非硫细菌(green non-sulphur bacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、嗜纤维菌-屈挠杆菌-拟杆菌群(Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides, CFB)、酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门等类群;进一步分析发现,这 4 个洞穴的细菌群落组成相似,酸杆菌门、根瘤菌科(Rhizobiaceae)和氨氧化、硫化相关的细菌尤其丰富^[20–22]。

末端限制性片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)结合了传统的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、PCR 和核酸电泳等多种技术,能够对特定基因进行定量,自发明以来广泛用于微生物群落结构分析。根据目的基因序列上的保守区域设计引物,使其中 1 个引物的 5'端带上荧光标记,以样品中微生物的总 DNA 为模板进行扩增。用合适的限制性内切酶对 PCR 扩增的 DNA 片段进行消化,不同微生物的 DNA 片段因其核苷酸序列不同会导致酶切位点存在差异,从而产生许多长度不同的限制性片段,然后利用 DNA 测序仪对酶切产物进行电泳分离

和荧光检测^[23-25]。Moss 等人用基于 16S rRNA 基因的 T-RFLP 技术分析了美国佛罗里达州某洞穴水体的微生物群落随季节的变化。在相同季节,该洞穴不同水体的微生物群落差异不大,但不同季节同一水体的微生物群落存在显著差异,即尽管洞穴温度常年恒定,但微生物的组成和结构仍随时间发生变化^[26]。

DGGE/TGGE 作为一种基于电泳条带分离的方法,本身能够展现的条带数量有限,主要反映的是群落中的优势菌群。一般只有在总微生物群落中占 1%以上的种群才能被检测出来,系统中的弱势菌群不能被检测到^[18]。T-RFLP 比 DGGE 灵敏度高,但当近缘微生物在扩增片段靠近荧光标记端的酶切位点一样时,T-RFLP 峰值图上的 1 个峰可能代表不只 1 个种,造成对群落多样性的低估。单纯的 DGGE/T-RFLP 只能提供微生物的种类和相对数量的信息,无法确定是何种微生物,定性信息不足,只有结合克隆文库分析或者核酸杂交分析才能确定微生物的种类。

Handelsman 等人于 1998 年首次提出针对特定环境样品中全部微生物的基因组总和进行研究的元基因组(metagenome)概念,指出应用元基因组学研究微生物复杂群落基因组的方法将成为快速发展的领域^[27]。2005 年生命科学公司(Life Science)推出 454 高通量测序(现为罗氏 454),开启了高通量测序的时代^[28]。2006 年美国 Illumina 公司推出 Solexa 基因组分析平台(Genome analyzer platform),2007 年 ABI (Applied BioSystem)公司推出了自主研发的 SOLiD 测序仪(ABI SOLiD sequencer)。从环境样品中提取总 DNA 后,能够利用高通量测序技术直接扩增 16S rRNA 基因高变区进行测序,解决了大部分菌株不可培养的难题。Gulecal-Pektas 通过 454 焦磷酸测序对土耳其某洞穴岩壁的细菌

群落进行了分析,共检测到 10 个门的细菌,占优势的是变形菌门,其次是酸杆菌门、放线菌门、硝化螺旋菌门(Nitrospira)和浮霉菌门等^[29]。Wu 等人用 454 测序技术研究了中国西部黄土高原某石灰岩洞穴中的细菌丰度和组成,发现岩壁沉积物、水体沉积物和排水口土壤中的细菌群落有着显著差异;岩壁沉积物中主要是 γ -变形菌和放线菌类群的微生物,而与洞穴中水体沉积物和表层土壤中主要微生物类群不同;但是水体沉积物中的细菌与表面土壤层中的细菌高度一致。水体沉积物与表层土壤的元素组成一致,表明微生物的群落结构可能与环境中的物质成分密切相关^[30]。

2 含特殊化合物的洞穴中的微生物组

2.1 含硫洞穴的特色微生物组

在洞穴系统中,营养物质成分复杂多样,营养物质以及可供生物利用的能量贫乏,为了维护洞穴生态系统,微生物之间和微生物与其他生物间的竞争关系可能会弱化,协同合作成为主要方面,包括形成生物膜等结构^[2]。

当地下水富含硫化物时,会向洞穴空气中释放硫化氢。硫化氢在潮湿的洞穴中经微生物氧化成硫酸,促使洞穴岩壁溶解,微晶石膏沉淀作为腐蚀残渣会抑制石灰岩岩壁对硫酸的缓冲作用,从而形成极端酸性的岩壁表面。在这些表面富集有较多微生物,形成黏液状生物膜(Snottites)^[31-33]。Jones 等人对意大利 Frasassi 洞穴的黏液状生物膜的元基因组进行了分析,酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)占约 70%,有多个拷贝的 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(RuBisCO),能通过还原性磷酸戊糖途径固定二氧化碳,是主要的初级生产者;该属微生物拥有多种硫氧化代谢途径的编码基因,是硫酸的

主要生产者,也是形成生物膜的主力^[34]。

微生物席(microbial mat)是指微生物构成的多层片状结构,一般存在于潮湿的固体表面,由微生物通过分泌粘液缠绕胶结而成。一些研究表明,洞穴水体中的微生物席主要由丝状细菌组成,为化能无机自养的好氧或微好氧型硫氧化细菌^[31,35-37]。Engel 等人研究了美国怀俄明州 Lower Kane 洞穴水体中微生物席的多样性及空间分布,在表面 3-5 mm 富含氧气的样品中主要是未培养的 ϵ -变形菌纲和可培养的丝硫细菌属(*Thiothrix*)的成员;内部缺氧的环境中微生物多样性高于表面有氧样品,共检测到 17 个细菌类群和 1 个古菌类群,占优势的是 δ -变形菌纲、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和 γ -变形菌纲^[38-40]。

2.2 含氮洞穴的特色微生物组

澳大利亚的 Nullarbor 区域是世界上最大的连续的喀斯特系统,总面积超过 200000 平方公里,洞穴十分密集^[41]。许多洞穴横穿地表 100 m 下的蓄水层,被含盐含氧的水淹没。洞穴内遍布碳酸钙沉积物形成的“雪原(snowfields)”,上面有致密的“微生物地幔(microbial mantles)”或“黏液帷幔(slime curtains)”^[42]。该区域的洞穴中没有大型水生生物,有机物输入也非常有限,水样经过滤膜后检测不到有机碳和硫化物,但含有大量硫酸盐、亚硝酸盐和硝酸盐^[43-44]。该地区 Weebubbie 洞穴的黏液帷幔 16S rRNA 基因文库及元基因组数据均表明样品中存在多种多样的微生物,细菌主要属于变形菌门,其中假单胞菌属和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的菌株尤其丰富;古菌主要是一种氧化氨的泉古菌(*Nitrosopumilus maritimus* SCM1)。除固氮酶的编码基因没有从元基因组数据中检测到,其他氮素循环相关酶的编码基因均能检测到。大部分编码氨单加氧酶的基因来源于

古菌,细菌在该环境的氨氧化过程中作用较小;但硝酸盐还原酶主要来源于细菌^[45]。这些结果表明 Nullarbor 区域洞穴中的黏液帷幔可能代表了一种新的由硝化作用驱动的化能自养微生物群落。

2.3 含甲烷洞穴的特色微生物组

罗马尼亚的 Movile 洞穴是一个原位化能自养的生态系统,地下水微生物席中的初级生产活动供养了 48 种洞穴无脊椎动物,洞穴空气中的 CO₂ 有很大一部分来源于甲烷氧化^[36,46]。洞穴底部空气中含有 1%-2%的甲烷和 7%-10%的氧气,水体中冒出的气泡甲烷含量高达 13.5%,能够使 3 mm 厚的微生物席漂浮起来^[47]。Hutchens 等人用基于 DNA 的稳定同位素探针探究了水体及微生物席中的甲烷氧化细菌群落。微生物在利用同位素标记的 ¹³CH₄ 后会产生 ¹³C 标记的 DNA,从而识别甲烷同化微生物^[48-49]。对带有 ¹³C-DNA 的 16S rRNA 基因克隆进行系统发育分析得到 29 个分类单元(OTUs),主要是变形菌门和酸杆菌门;对甲烷氧化的关键酶进行分析,得到的主要是甲基单胞菌属(*Methylomonas*)、甲基球菌属(*Methylococcus*)、甲基孢囊菌属(*Methylocystis*)和甲基弯曲菌属(*Methylosinus*)的菌株,这些甲烷氧化菌都具有甲烷单加氧酶,能够将甲烷氧化成复杂的有机化合物,协助维持洞穴生态系统的多样性^[50]。

2.4 含铁锰沉积物洞穴的特色微生物组

长期以来,洞穴矿物及堆积物的形成一直被认为主要受温度、pH 等环境影响及氧化还原条件变化等非生物过程控制^[51-52],近年来的研究表明,微生物通过直接或间接的代谢活动及生物膜形成,在洞穴矿物沉积物的形成和溶解过程中起着重要的作用^[53-57]。尽管铁氧化物在有生物参与及没有生物参与的条件下都能形成,但从动力学来

看, 没有生物参加的锰氧化过程即使在有自由氧存在的情况下也很难发生^[58-60]。微生物能够催化 Mn(II) 化合物的氧化, 使锰氧化的速率提高 5 个数量级^[61-63]。Carmichael 等人分析了阿巴拉契亚喀斯特系统 7 个洞穴的锰氧化物相关样品中的微生物群落, 样品中微生物数量丰富, 细菌多达 $7 \times 10^7 - 9 \times 10^9$ 个/g 样品, 古菌为 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ 个/g 样品。对微生物数量最多的 2 个样品进行 SSU rRNA 克隆文库分析, 得到 10% 的 OTUs 与纤发菌属 (*Leptothrix*) 和假单胞菌属等已知的锰氧化微生物相关, 11% 的 OTUs 与已知的铁氧化微生物相关。通过分离培养, 得到多株锰氧化细菌, 其中 *Janthinobacterium* sp. A6 在胞外氧化 Mn(II), 形成与细胞疏松连接的锰氧化物团块; 而 *Leptothrix* sp. G6 能形成鞘, 锰氧化物沿着鞘分布^[64]。

3 小结与展望

洞穴常年黑暗潮湿, 温度相对稳定, 营养比较贫瘠, 形成了一种高度特异性的生态系统, 从洞穴中分离得到的许多微生物新种极大地拓展了微生物资源。作为一种开放而独立的生态系统, 洞穴理化性质稳定, 通过比较不同洞穴的微生物组能够评估特定因素对微生物群落结构的影响, 追踪小的环境波动造成的微生物群落变化, 研究洞穴历史演化以及演化过程中微生物的作用。除此之外, 许多洞穴的岩壁上存有旧石器时代的画作, 游客观光为洞穴输入了大量有机物, 造成微生物爆发, 使壁画的色素受到破坏^[65-67]。探究这些洞穴的微生物群落, 能够为发展有效抑制微生物、保护壁画的方法提供指导。

由于缺少光照, 光合微生物作为初级生产者的作用受限, 洞穴微生物拥有硫氧化作用、硝化

作用、甲烷氧化作用等多种化能自养的营养方式。对洞穴微生物组的研究表明, 在这种寡营养的环境中存在着数量众多、种类丰富的微生物类群, 洞穴微生物以互相协作、合作共赢的方式, 构成洞穴微生物群体。洞穴微生物可能放弃了金字塔式的能量流动结构, 部分适应性较强的微生物通过各种方式获得能量, 释放次级代谢产物以供养其他微生物, 被供养的微生物固定其他必需营养物质供前者利用, 从而形成共生关系^[2]。目前的研究尚未完全证实上述猜测, 微生物种间的相互关系及作用仍有待探索。

据估计, 全球已经勘探过的洞穴仅占洞穴总数的 10%, 即使在欧洲和北美也有 50% 的洞穴尚未开发^[68]。另外, 不同洞穴微生物组的研究采用的方法不同, 造成分析和比较这些研究结果时存在困难。因此, 微生物学者应加强合作与共享, 制定合理统一的洞穴微生物组取样标准及研究方法, 增进对未知的洞穴微生物组的认识。

参考文献

- [1] Ford D, Williams PD. Karst hydrogeology and geomorphology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.
- [2] Barton HA, Jurado V. What's up down there? Microbial diversity in caves//Moselio Schaechter. Microbe. Washington: ASM Press, 2007: 132-138.
- [3] Gabriel CR, Northup DE. Microbial ecology: caves as an extreme habitat//Cheeptham N. Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery. New York: Springer, 2013: 85-108.
- [4] Bob G. Worlds longest caves. 2017. <http://www.caverbob.com/wlong.htm>.
- [5] Tomczyk-Żak K, Zielenkiewicz U. Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal*, 2016, 33(1): 20-38.
- [6] Kennedy AC, Smith KL. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 1995, 170(1): 75-86.
- [7] Laiz L, Groth I, Gonzalez I, Saiz-Jimenez C. Microbiological

- study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(1/2): 129–138.
- [8] Urzi C, De Leo F, Bruno L, Albertano P. Microbial diversity in paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microbial Ecology*, 2010, 60(1): 116–129.
- [9] Velikonja BH, Tkavc R, Pašić L. Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia. *International Journal of Speleology*, 2014, 43(1): 45–56.
- [10] Pašić L, Kovče B, Sket B, Herzog-Velikonja B. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71(1): 50–60.
- [11] Axenov-Gibanov DV, Voytsekhovskaya IV, Tokovenko BT, Protasov ES, Gamaiunov SV, Rebets YV, Luzhetskyy AN, Timofeyev MA. Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the biggest conglomeratic karstic cave in siberia as sources of novel biologically active compounds. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149216.
- [12] Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57(1): 369–394.
- [13] Dorigo U, Volatier L, Humbert JF. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 2005, 39(11): 2207–2218.
- [14] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(6): 1579–1583.
- [15] Lerman LS, Fischer SG, Hurley I, Silverstein K, Lumelsky N. Sequence-determined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1984, 13(1): 399–423.
- [16] Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(9): 3131–3145.
- [17] Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(9): 3111–3129.
- [18] Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695–700.
- [19] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317–322.
- [20] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(7): 392–400.
- [21] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 211(1): 7–11.
- [22] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma). *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 235–247.
- [23] Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 323–327.
- [24] Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, Kitts CL. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, 31(3): 135–142.
- [25] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516–4522.
- [26] Moss JA, Nocker A, Snyder RA. Microbial characteristics of a submerged karst cave system in northern Florida. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28(8): 719–731.
- [27] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245–R249.
- [28] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen ZT, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, H, CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie

- TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu, PG, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, 437(7057): 376–380.
- [29] Gulecal-Pektas Y. Bacterial diversity and composition in oylat cave (Turkey) with combined sanger/pyrosequencing approach. *Polish Journal of Microbiology*, 2016, 65(1): 69–75.
- [30] Wu YC, Tan LC, Liu WX, Wang BZ, Wang JJ, Cai YJ, Lin XG. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 244.
- [31] Hose LD, Palmer AN, Palmer MV, Northup DE, Boston PJ, DuChene HR. Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chemical Geology*, 2000, 169(3/4): 399–423.
- [32] Jones DS, Lyon EH, Macalady JL. Geomicrobiology of biovermiculations from the Frasassi cave system, Italy. *Journal of Cave and Karst Studies*, 2011, 70(2): 78–93.
- [33] Macalady JL, Jones DS, Lyon EH. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(6): 1402–1414.
- [34] Jones DS, Albrecht HL, Dawson KS, Schaperdoth I, Freeman KH, Pi YD, Pearson A, Macalady JL. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *The ISME Journal*, 2012, 6(1): 158–170.
- [35] Angert ER, Northup DE, Reysenbach AL, Peek AS, Goebel BM, Pace NR. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist*, 1998, 83(11/12): 1583–1592.
- [36] Sarbu SM, Kane TC, Kinkle BK. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 1996, 272(5270): 1953–1955.
- [37] Vlasceanu L, Popa R, Kinkle BK. Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3123–3127.
- [38] Engel AS. Microbial diversity of cave ecosystems//Barton LL, Mandl M, Loy A. Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective. Netherlands: Springer, 2010: 219–238.
- [39] Engel AS, Lee N, Porter ML, Stern LA, Bennett PC, Wagner M. Filamentous “*Epsilonproteobacteria*” dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5503–5511.
- [40] Engel AS, Porter ML, Stern LA, Quinlan S, Bennett PC. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*”. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 51(1): 31–53.
- [41] Webb JA, James JM. Karst evolution of the Nullarbor Plain, Australia//Harmon Russell S, Wicks, Carol M. Perspectives on Karst Geomorphology, Hydrology, and Geochemistry; A Tribute Volume to Derek C. Ford and William B. Boulder, CO: Geological Society of America, 2006: 65–78.
- [42] Contos AK, James JM, Pitt BHK, Rogers P. Morphoanalysis of bacterially precipitated subaqueous calcium carbonate from Weebubbe cave, Australia. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18(3): 331–343.
- [43] Richards AM. An ecological study of the cavernicolous fauna of the Nullarbor Plain Southern Australia. *Journal of Zoology*, 1971, 164(1): 1–60.
- [44] Holmes AJ, Tujula NA, Holley M, Contos A, James JM, Rogers P, Gillings MR. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(4): 256–264.
- [45] Tetu SG, Breakwell K, Elbourne LDH, Holmes AJ, Gillings MR, Paulsen IT. Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *The ISME Journal*, 2013, 7(6): 1227–1236.
- [46] Sarbu SM, Kinkle BK, Vlasceanu L, Kane TC, Popa R. Microbiological characterization of a sulfide-rich groundwater ecosystem. *Geomicrobiology Journal*, 1994, 12(3): 175–182.
- [47] Sarbu SM, Kane TC. A subterranean chemoautotrophically based ecosystem. *NSS Bulletin*, 1995, 57(2): 91–98.
- [48] Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770): 646–649.
- [49] Radajewski S, McDonald IR, Murrell JC. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(3): 296–302.
- [50] Hutchens E, Radajewski S, Dumont MG, McDonald IR, Murrell JC. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(2): 111–120.
- [51] Barton HA, Northup DE. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 2007, 69(1): 163–178.

- [52] Northup DE, Lavoie KH. Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18(3): 199–222.
- [53] Barton HA, Luiszer F. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: potential mechanisms of biospeleogenesis. *Journal of Cave and Karst Studies*, 2005, 67(1): 28–38.
- [54] Cañaveras JC, Cuezva S, Sanchez-Moral S, Lario J, Laiz L, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. *Naturwissenschaften*, 2006, 93(1): 27–32.
- [55] Jones B. Microbial activity in caves: a geological perspective. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18(3): 345–357.
- [56] Ríos ADL, Bustillo MA, Ascaso C, Carvalho MR. Bioconstructions in ochreous speleothems from lava tubes on Terceira Island (Azores). *Sedimentary Geology*, 2011, 236(1/2): 117–128.
- [57] Taboroši D. Biologically influenced carbonate speleothems//Harmon RS, Wicks CM. Perspectives on Karst Geomorphology, Hydrology, and Geochemistry-A Tribute Volume to Derek C. Ford and William B. White. Boulder, CO: Geological Society of America, 2006: 307–317.
- [58] Fortin D, Langley S. Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth-Science Reviews*, 2005, 72(1/2): 1–19.
- [59] Luther III GW. The role of one- and two-electron transfer reactions in forming thermodynamically unstable intermediates as barriers in multi-electron redox reactions. *Aquatic Geochemistry*, 2010, 16(3): 395–420.
- [60] Johnson JE, Webb SM, Thomas K, Ono S, Kirschvink JL, Fischer WW. Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): 11238–11243.
- [61] Tebo BM, Johnson HA, McCarthy JK, Templeton AS. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(9): 421–428.
- [62] Emerson D. Microbial oxidation of Fe(II) and Mn(II) at circumneutral pH//Lovley DR. Environmental Microbe-Metal Interactions. Washington: ASM Press, 2000: 31–52.
- [63] Francis CA, Tebo BM. Enzymatic manganese(II) Oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 874–880.
- [64] Carmichael MJ, Carmichael SK, Santelli CM, Strom A, Bräuer SL. Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee River Basin. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(9): 779–800.
- [65] Ma YT, Wu FS, Ma X, Wang WF, Ma XJ, An LZ, Feng HY. A review on a microbial community in prehistoric altamira cave paintings. *Dunhuang Research*, 2011, (6): 115–120. (in Chinese) 马燕天, 武发思, 马旭, 汪万福, 马晓军, 安黎哲, 冯虎元. 史前洞窟阿尔塔米拉壁画微生物群落研究进展. *敦煌研究*, 2011(6): 115–120.
- [66] Bastian F, Jurado V, Nováková A, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, 2010, 156(3): 644–652.
- [67] Cañaveras JC, Sanchez-Moral S, Sloer V, Saiz-Jimenez C. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18(3): 223–240.
- [68] Lee NM, Meisinger DB, Aubrecht R, Kovacik L, Saiz-Jimenez C, Baskar S, Baskar R, Liebl W, Porter ML, Summers-Engel A. Life in caves and karst environments//Bell EM. Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival. Wallingford: CABI, 2012: 320–344.

Cave microbiomes: the known and the unknown

Haizhen Zhu^{1,2}, Chengying Jiang^{1,2,3*}, Shuang-Jiang Liu^{1,2,3*}

¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ IMCAS-RCEECAS Joint Laboratory for Environmental Microbial Technology, Beijing 100101, China

Abstract: Caves are subsurface spaces and tunnels formed by the dissolution of rocks or during the cooling process of lava. Caves spread all over the world, containing a large amount of microbial resources. Being dark and humid, with relatively stable temperature and poor nutrition, and as a kind of extreme ecosystem, caves maintain highly specialized microbiomes. Study of cave microbial communities revealed its structure and function, facilitated the understanding of geographic distribution of cave microbiomes, deepened the understanding of subterranean ecosystems, and provided guidance for cave painting protection and microbial outbreak inhibition. This paper summarizes research techniques and progresses of cave microbiomes, as well as the characteristic chemoautotrophic microbiomes in caves.

Keywords: cave, karst, microbiome, chemoautotrophy

(本文责编: 李磊)

Supported by the Science & Technology Basic Work Specific Projects (2014FY120100)

*Corresponding author. Shuang-Jiang Liu, Tel: +86-10-64807423, Fax: +86-10-64807421, E-mail: liusj@im.ac.cn; Chengying Jiang, Tel: +86-10-64807581, E-mail: jiangcy@im.ac.cn

Received: 20 February 2017; Revised: 27 March 2017; Published online: 5 April 2017