



帕米尔高原可培养需氧冷适应细菌及古菌多样性

卜旭莹, 任敏*, 万传星, 张利莉

塔里木大学生命科学与技术学院, 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆 阿拉尔 843300

卜旭莹, 任敏, 万传星, 张利莉. 帕米尔高原可培养需氧冷适应细菌及古菌多样性. 微生物学报, 2022, 62(7): 2568–2581.
Bu Xuying, Ren Min, Wan Chuanxing, Zhang Lili. Diversity of aerobic cold-adapted bacteria and archaea isolated from the Pamir Plateau. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2568–2581.

摘要:【目的】帕米尔高原是贫营养、高辐射、干燥的冷环境,可能蕴藏丰富的冷适应微生物资源。本研究基于分离培养技术,探究帕米尔高原不同海拔梯度及不同培养条件下的冷适应微生物多样性。【方法】针对采集自帕米尔高原 1 000–2 000 m、2 000–3 000 m、3 000–4 000 m 和 4 000–5 000 m 四个海拔梯度的土壤样品,选用 TSA 和 R2A 两种培养基于 4 °C 进行冷适应细菌的分离培养, NOM 和 F6 两种培养基于 4 °C 和 15 °C 进行冷适应古菌的分离培养。根据 16S rRNA 基因序列同源性对分离菌株进行鉴定,分析不同海拔梯度和不同培养条件的物种多样性及之间的差异性。【结果】本研究从帕米尔高原共分离得到 419 株需氧原核微生物,16S rRNA 基因测序鉴定结果表明,分离菌株隶属于 2 个域、5 个门、8 个纲、18 个目、28 个科、49 个属及 118 个种,为 115 种冷适应细菌及 3 种古菌。冷适应细菌中, γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)为第一优势纲,放线菌纲(*Actinobacteria*)中物种多样性最为丰富。高海拔地区的冷适应细菌物种多样性存在差异,海拔 1 000–4 000 m 的优势菌群均为 γ -变形菌纲,而 4 000–5 000 m 高海拔地区放线菌纲占比最高。古菌域微生物隶属于钠线菌属(*Natrinema*)和盐陆生菌属(*Haloterrigena*),且仅在 1 000–2 000 m 低海拔地区,培养温度为 15 °C 时分离得到。4 种培养基分离菌株中, γ -变形菌纲在 TSA 和 R2A 培养基分离的冷适应细菌中占优越地位,而 NOM 和 F6 培养基仅分离得到盐杆菌纲(*Halobacteria*)的古菌。此外,本研究获得 23 株潜在新物种,隶属于放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和广古菌门(*Euryarchaeota*) 5 个门。【结论】本研究从帕米尔高原分离获得了大量冷适应细菌以及古菌资源,揭示了帕米尔高原不同海拔的冷适应细菌及古菌分布多样性,以及不同培养条件下的分离效果,为冷适应细菌及古

基金项目: 国家自然科学基金(31900007); 兵团重点领域创新团队建设计划(2017CB014)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31900007) and by the Microbial Resources Utilization Innovation Team in Key Field of Xinjiang Production and Construction Corps (2017CB014)

*Corresponding author. Tel: +86-997-4681612; E-mail: renminlure@163.com

Received: 19 October 2021; Revised: 25 January 2022; Published online: 12 March 2022

菌资源的开发与利用及其生态学功能研究提供了菌株材料和科学理论支持。

关键词: 帕米尔高原; 需氧; 冷适应细菌; 古菌; 多样性

Diversity of aerobic cold-adapted bacteria and archaea isolated from the Pamir Plateau

BU Xuying, REN Min^{*}, WAN Chuanxing, ZHANG Lili

State Key Laboratory Breeding Base for the Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin
Co-funded by Xinjiang Corps and the Ministry of Science and Technology, College of Life Science and Technology,
Tarim University, Alaer 843300, Xinjiang, China

Abstract: **[Objective]** The Pamir Plateau is characterized by a cold and oligotrophic environment exposed to strong radiation, in which cold-adapted microorganisms are abundant. Using a cultivation-dependent approach, we aimed to reveal the diversity of cold-adapted bacteria and archaea present in the Pamir Plateau. **[Methods]** Soil samples were collected from a gradient of altitudes in the Pamir Plateau, from which aerobic bacteria and archaea were isolated by different cultivation methods. For the isolation of cold-adapted bacteria, two bacterial culture media were used and the incubation was only conducted at 4 °C. For cultivation of archaeal ones, two archaeal culture media were employed, and cultivation was at two temperatures, *i.e.*, 4 °C and 15 °C. Sampling was conducted at four altitudes: 1 000–2 000 m, 2 000–3 000 m, 3 000–4 000 m and 4 000–5 000 m. All microbial isolates were classified based on their 16S rRNA gene sequences. **[Results]** A total of 419 strains of aerobic prokaryotes were isolated from the soil samples, which belonged to 118 different species, including 115 bacterial species and 3 archaeal species. These microorganisms fell into 49 genera, 28 families, 18 orders, 8 classes, 5 phyla, and 2 domains. *Gammaproteobacteria* was the predominant order of cold-adapted bacteria and *Actinomycetes* constituted the most diverse one. *Gammaproteobacteria* dominated at altitude of 1 000–4 000 m and *Actinobacteria* prevailed at altitude of 4 000–5 000 m (the highest altitude). The archaeal isolates belonged to haloarchaea of *Natrinema* and *Haloterrigena*, and they were obtained from the samples at altitude of 1 000–2 000 m and at the cultivation temperature of 15 °C. Furthermore, among the four culture media used in this work, *Gammaproteobacteria* isolates were mainly obtained with the two bacterial media whereas the haloarchaea only grew on the archaeal media. Additionally, 23 strains represented new taxa among all isolates, and they belonged to *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Euryarchaeota*. **[Conclusion]** A number of cold-adapted bacteria and three archaeal species were isolated as pure cultures from the Pamir Plateau soil samples. These microorganisms exhibited an altitude-dependent distribution. Furthermore, we found that the isolation experiment was benefitted from utilization of different culture conditions, which was a strategy to be exploited in future work. Together, the present study has yielded the first insights into the composition and diversity of cold-adapted bacteria and archaea in the Pamir Plateau. The obtained microorganisms provide unique resources for exploration of their ecological functions and biotechnological applications.

Keywords: Pamir Plateau; aerobic; cold-adapted bacteria; archaea; diversity

冷适应微生物包括耐冷菌和嗜冷菌两种类群,其中耐冷菌能够在 0–5 °C 生长,最适生长温度在 15 °C 以上,嗜冷菌能够在 0 °C 及 0 °C 以下生长,最适生长温度在 15 °C^[1]。冷适应微生物可在高山、极地、深海、洞穴以及大气上层等^[2–6]永久寒冷的环境中生存。冷适应细菌可产生低温蛋白酶、脂肪酶和几丁质酶等多种胞外酶,并已广泛用于食品、洗涤剂、饲料以及环境生物治理等领域^[7–13]。常见的冷适应细菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、冷杆菌属(*Cryobacterium*)等^[14]。冷适应古菌也是冷适应微生物中的一个重要分支,其中嗜盐古菌作为可培养古菌,可产生多种胞外酶和胞外多糖^[15–16],而且还具有产生可再生燃料及化学品的潜力^[17–18]。因此,冷适应微生物为工业发展及人类生活做出了巨大贡献。

中国帕米尔高原地处新疆西南部,由天山、昆仑山、喀喇昆仑山和兴都库什山等交汇而成,是世界十大高原之一,约 80% 的面积分布在海拔 3 300–6 000 m 之间,1 月份平均气温–15 °C,7 月份平均气温 25 °C,年平均气温 3.2 °C,呈独特的高寒干旱气候,分布有火山、湿地和湖泊等多种地貌^[19],是天然的冷环境宝库,适合冷适应微生物的生长,且 Khomutovska 等^[20]对帕米尔高原 4 000–4 500 m 岩石缝隙中的微生物多样性进行了分析,李明源等^[21]对帕米尔高原慕士塔格峰洋布拉克冰川的雪冰及融水中可培养细菌多样性进行了初步研究,已发现帕米尔高原存在丰富的冷适应微生物资源^[20–21],故帕米尔高原是选择性分离冷适应微生物的理想区域。

分离培养技术是获得纯培养物的关键技术,虽然宏基因组技术已然成为探究微生物物

种多样性的重要手段^[22],但只有分离获得纯培养物才能更好地实现微生物资源的充分开发及利用。另外,针对性地按照目标微生物的生长习性和营养需求来选择培养条件,是高效分离目标微生物的必要手段。经前人研究发现,TSA 和 R2A 培养基是选择性分离冷适应微生物的有效培养基^[23],NOM 和 F6 培养基是选择性分离可培养嗜盐古菌的培养基^[24–25]。

本研究以自帕米尔高原 1 000–5 000 m 采集的 72 份土壤样品为研究对象,采用选择性分离的培养方法,利用 TSA、R2A、NOM 和 F6 四种分离培养基,选择 4 °C 和 15 °C 两个培养温度。期望分离得到特殊生境下有应用潜力的冷适应微生物资源,并揭示帕米尔高原不同培养条件以及不同海拔梯度的可培养冷适应微生物多样性。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

本研究的 72 份土壤样品于 2019 年 9 月和 2020 年 10 月采集自新疆帕米尔高原(表 1),自帕米尔高原 1 760–4 539 m 沿河流和植被进行采样,采集地表以下 0–20 cm 土壤。样品采集完成后,迅速将其运送至实验室进行实验操作,剩余样品放置于 4 °C 冷库保藏,备用。

1.2 冷适应细菌及古菌分离培养

1.2.1 土样分类

为探究帕米尔高原以海拔 1 000 m 为间隔的土壤样品中冷适应细菌及古菌的多样性,将其以低海拔(1 000–2 000 m; low altitude)、中海拔(2 000–3 000 m; intermediate altitude)、中海拔(3 000–4 000 m; middle altitude)和高海拔(4 000–5 000 m; high altitude)为分类依据合并成 4 份样品。

表 1 帕米尔高原土壤样品信息

Table 1 Information of soil samples used in this work and their sampling sites in the Pamir Plateau

Altitude ranges /m	Longitude ranges	Latitude ranges	Number of samples
1 000–2 000	75°31'22"–76°12'15"	38°58'54"–37°40'44"	10
2 000–3 000	76°2'57"–75°24'33"	37°50'39"–37°52'4"	16
3 000–4 000	75°17'25"–74°56'10"	37°51'59"–38°17'46"	40
4 000–5 000	74°58'15"–75°25'46"	38°41'19"–36°51'3"	6

1.2.2 分离培养

本研究使用 TSA 和 R2A 培养基用于冷适应细菌的分离, NOM 和 F6 培养基用于冷适应古菌的分离。

(1) TSA 培养基(g/L)^[26]: TSA 25.0, NaCl 20.0, 0.1 mol/L 蔗糖, 琼脂 15.0, 蒸馏水 1 L, pH 7.0。

(2) R2A 培养基(g/L)^[27]: 胰蛋白胨 0.25, 蛋白胨 0.25, 酸水解酪蛋白 0.5, 酵母浸粉 0.5, 葡萄糖 0.5, 可溶性淀粉 0.5, 丙酮酸钠 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.1, K₂HPO₄ 0.3, 琼脂 15.0, 蒸馏水 1 L, pH 7.0。

(3) NOM 培养基(g/L)^[24]: 酵母提取物 0.05, 鱼蛋白胨 0.25, 丙酮酸钠 1.0, KCl 5.4, K₂HPO₄ 0.36, CaCl₂ 0.25, NH₄Cl 0.25, MgSO₄·7H₂O 0.25, MgCl₂·6H₂O 23.0, NaCl 184.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。

(4) 壳聚糖-天冬酰胺培养基(F6)(g/L)^[25]: 酪素水解蛋白 2.0, 天冬酰胺 1.0, 壳聚糖 4.0, MgSO₄ 6.0, K₂HPO₄ 0.36, NaCl 150.0, 琼脂 16.0, 1 mL 制霉菌素(50 mg/mL), 1 mL 四环素(50 mg/mL), 1 mL 维生素溶液, pH 7.0。

维生素溶液(mg/L): 烟酸 10.0, 生物素 4.0, 泛酸 10.0, 硫辛酸 10.0, 叶酸 4.0, 对氨基苯甲酸 10.0, 维生素 B₁ 10.0, 维生素 B₂ 10.0, 维生素 B₆ 10.0, 维生素 B₁₂ 10.0, 蒸馏水 1 L (0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌)。

以上培养基均以 100 倍稀释的土壤浸提液代替蒸馏水配制。

采用稀释涂布法进行冷适应古菌及细菌的

分离培养。首先取不同海拔梯度的 2 g 土样加入装有 18 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中, 放置于 4 °C 摇床振荡 180 r/min 悬浮 30 min, 制备成土壤悬液, 倍性稀释至 10⁻⁴, 最后将 10⁻³ 和 10⁻⁴ 的土壤稀释液分别涂布于培养基平板上, 采用连续划线法对形态不同的菌落进行分离纯化。鉴于古菌的生长周期较长, 冷适应微生物的适宜生长温度在 15 °C 左右, 因此将 NOM 及 F6 平板分别放置于 4 °C 和 15 °C 培养, TSA 及 R2A 平板放置于 4 °C 培养, 所得菌株分离纯化后置于 15 °C 培养。同时对 15 °C 获得的古菌菌株于 4 °C 培养, 进行生长温度验证, 判断其是否为冷适应古菌。所有纯化的菌株均用 40% (V/V) 甘油于 -80 °C 冻存管保藏。

1.3 菌株 16S rRNA 基因鉴定

使用天根生化科技有限公司细菌全基因组 DNA 提取试剂盒进行菌株 DNA 的提取, 细菌 16S rRNA 基因扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCT T-GTTACGACTT-3'), 古菌 16S rRNA 基因扩增引物为 0018F (5'-ATTCCGGTTGATCCTGCC-3') 和 1518R (5'-AGGAGG- TGATCCAGCCGC-3')。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。采用 1% 琼脂糖凝胶检测扩增产物, 将出现目的条带的 PCR 扩增产物送至上海生物工程有限公司进行双向测序。

1.4 菌株系统发育树构建

采用 Seqman 软件对测序所得序列双向末

端的杂峰进行适当裁剪和序列拼接, 将处理好的 16S rRNA 基因序列上传至 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>)^[28]进行序列比对, 确认分类地位, 当与最相似菌株的序列相似度 < 98.65% 时判断为潜在新物种。使用 MEGA 7^[29] 软件以邻接法构建菌株系统发育树, 重复计算次数设置为 1 000 次, 并用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)^[30] 网站进一步完善美化进化树。将无重复序列菌株的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank 数据库, 登录号为 OK298973–OK299070。

2 结果与分析

2.1 不同海拔可培养需氧冷适应细菌及古菌多样性

本研究通过选择培养温度 4 °C 对帕米尔高原冷适应细菌, 以及于 4 °C 和 15 °C 对帕米尔高原冷适应古菌进行分离培养。结果显示, 4 °C 时未分离得到冷适应古菌, 15 °C 时分离得到古菌 25 株, 但在 4 °C 生长温度验证时并未生长, 表明非冷适应古菌。

另外, 经 4 °C 分离培养获得了自帕米尔高原低海拔(25 株, 3 种)的古菌以及低海拔(81 株, 40 种)、中海拔(60 株, 28 种)、中高海拔(206 株, 72 种)和高海拔(47 株, 21 种)的冷适应细菌类群(图 1A)。冷适应细菌广泛分布于所有海拔中, 在中高海拔土壤样品中, 冷适应细菌的种类最为丰富, 高海拔土壤样品中的物种群落组成略低于低海拔区域。帕米尔高原冷适应细菌整体海拔分布结果显示, 随海拔升高, 其数量呈现高-低-高-低的变化趋势。而古菌域的钠线菌属和盐陆生菌属仅在低海拔被分离得到。

基于门和纲水平(图 1B 和 1C), 低、中和中高海拔冷适应细菌的优势菌群均为变形菌门的 γ -变形菌纲, 生长范围广泛, 中高海拔分布最多。随海拔升高, 放线菌门的放线菌纲物种

数量逐渐增加, 且为高海拔地区的主导菌群, 表明该物种更适应高海拔环境。厚壁菌门杆菌纲(*Bacilli*)的物种主要分布在低海拔梯度, 表明高海拔环境不适宜其生长繁殖。此外, 不同海拔梯度同时存在特有菌群, 鞘脂杆菌纲(*Sphingobacteriia*)为中高海拔的特有纲, 拟杆菌门的黄杆菌纲(*Flavobacteriia*)存在于低海拔至中高海拔之间。

基于属水平(图 1D), 假单胞菌属为 4 个海拔的优势属, 该属在帕米尔高原分布最广泛, 尤其在中高海拔区域最为显著, 而动性球菌属(*Planococcus*)在低海拔具有显著地位, 黄杆菌属为中海拔区域第二优势菌群, 节杆菌属为中海拔区域优势菌群, 链霉菌属(*Streptomyces*)为高海拔的优势菌群。动性球菌属、节杆菌属、假单胞菌属、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)、细杆菌属(*Microbacterium*)、棒形杆菌属(*Clavibacter*)和类节杆菌属(*Paenarthrobacter*)属 7 个属为 4 个海拔的共有属(图 1E)。另外, 部分属随海拔梯度变化分布随之改变: 黄杆菌属、红球菌属(*Rhodococcus*)和冷杆菌属为 1 000–4 000 m 特有属, 沙雷氏菌属(*Serratia*)为 2 000–4 000 m 特有属, *Mycetocola* 属为 2 000–5 000 m 特有属, *Peribacillus* 属和叶杆菌属(*Phyllobacterium*)为 3 000–5 000 m 特有属。此外, 每个海拔梯度还拥有各自的特有属(表 2)。

分离培养结果表明, 低海拔地区适合冷适应细菌中动性球菌属以及古菌域钠线菌属和盐陆生菌属的生存, 中海拔及中高海拔地区适合冷适应黄杆菌属及节杆菌属的生存, 链霉菌属是高海拔菌属。帕米尔高原不同海拔均存在大量可培养冷适应微生物资源, 且不同海拔间物种有明显差异, 说明海拔变化会导致微生物群落组成的变化。

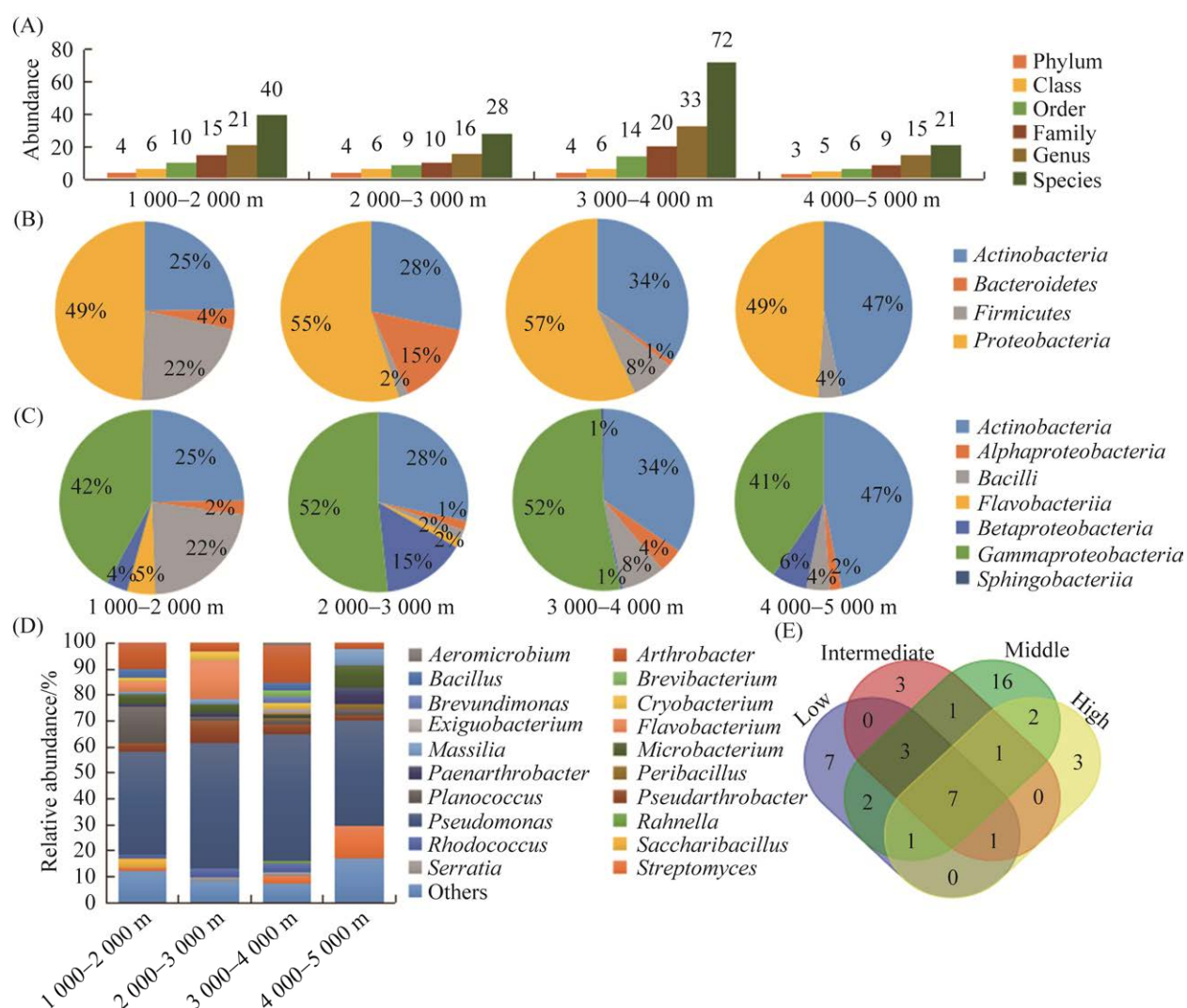


图 1 不同海拔可培养需氧冷适应细菌多样性

Figure 1 Diversity of aerobic cold-adapted bacteria isolated from the samples of different altitudes. A: occurrence at different taxonomic levels; B: occurrence at the phylum level; C: occurrence at the class level; D: relative abundance at the genus level (top 20); E: Venn diagram of the genus level abundance. Low: 1 000–2 000 m; intermediate: 2 000–3 000 m; middle: 3 000–4 000 m; high: 4 000–5 000 m.

表 2 不同海拔可培养需氧冷适应细菌及古菌特有属

Table 2 Genera of aerobic cold-adapted bacteria and archaea isolated from samples collected at different altitudes

Altitude/m	Genus
1 000–2 000	<i>Acidovorax</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Haloterrigena</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Natrinema</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Saccharibacillus</i>
2 000–3 000	<i>Nesterenkonia</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Stenotrophomonas</i>
3 000–4 000	<i>Aeromicrobium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Knoellia</i> , <i>Neorhizobium</i> , <i>Nocardiodides</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Zhihengliuella</i>
4 000–5 000	<i>Conyzicola</i> , <i>Paeniglutamibacter</i> , <i>Promicromonospora</i>

2.2 不同培养基需氧冷适应细菌及古菌多样性

本研究采用 TSA 和 R2A 以及 NOM 和 F6 四种培养基, 分别对帕米尔高原不同海拔梯度土壤样品中的冷适应细菌及古菌进行分离培养, TSA 和 R2A 培养基分别获得 275 株 86 个种和 119 株 47 个种的冷适应细菌, NOM 和 F6 培养基分别获得 13 株 2 个种和 12 株 3 个种的古菌, 结果表明 TSA 培养基对冷适应细菌的分离效果最好, 而 NOM 培养基对古菌的分离效果较好。

培养结果显示, 基于门和纲水平(图 2A 和 2B), 变形菌门的 γ -变形菌纲在 TSA 和 R2A 培养基所分离的冷适应细菌菌株中占优势地位, 但在 TSA 培养基(132 株)中的菌株数量高于 R2A 培养基(60 株)。TSA 培养基对放线菌门的放线菌纲选择性分离效果最好。NOM 和 F6 培养基分离的古菌菌株均隶属于广古菌门的盐杆菌纲。

基于属水平(图 2C), TSA 培养基(37 属)分离获得属的多样性最丰富, 该培养基对假单胞菌属(123 株)的选择性分离效果最为显著, R2A 培养基(23 属)中假单胞菌属(58 株)同样占优势地位, 表明两种培养基对假单胞菌属都具有选择性分离效果, 但两种培养基中第二优势属存在差异, 分别为节杆菌属和黄杆菌属。NOM 培养基(2 属)和 F6 培养基(2 属)均仅获得钠线菌属和盐陆生菌属的古菌。

以上结果表明, 节杆菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒形杆菌属、冷杆菌属、黄杆菌属、马赛菌属(*Massilia*)、细杆菌属、叶杆菌属、动性球菌属、假节杆菌属、假单胞菌属、红球菌属和链霉菌属 13 个属为 2 种培养基的共有属, 故两种培养基均适用于以上冷适应细菌属的分离。但相较 R2A 培养基, TSA 培养基中节杆菌属、假单胞菌属、棒形杆菌、冷杆菌属、细杆菌属、动性球菌属、假单胞菌属、红球菌属及链霉菌属数量较多, 故 TSA 培养基可选择性分离以上属的物种, 而 R2A 培养基较适用于分离黄杆菌属、马赛菌属及假节杆菌属菌株。此外, 由于培养基组分存在差异, TSA 培养基及 R2A 培养基还拥有各自的特有属(表 3)。NOM 培养基中钠线菌属的数量占优势, 而 F6 培养基中盐陆生菌属占比较大, 说明鱼蛋白胨是钠线菌属适宜生长的碳氮源, 而当培养基中添加壳聚糖、酸水解酪蛋白和天冬酰胺时, 则可用于选择性分离盐陆生菌属的嗜盐古菌。

2.3 帕米尔高原可培养需氧冷适应细菌及古菌多样性

本研究自帕米尔高原采集的土壤样品中共分离得到 419 株需氧原核微生物, 包括 394 株冷适应细菌, 25 株古菌(图 3A)。经 16S rRNA 基因测序, 结果表明以上菌株隶属于 2 个域、5 个门、8 个纲、18 个目、28 个科、49 个属及 118 个种。

表 3 不同培养基可培养需氧冷适应细菌特有属

Table 3 Genera of aerobic cold-adapted bacteria isolated with different culture media

Culture media	Genus
TSA	<i>Aeromicrobium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Knoellia</i> , <i>Mycetocola</i> , <i>Neorhizobium</i> , <i>Nesterenkonia</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Paeniglutamicibacter</i> , <i>Paenisporosarcina</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Peribacillus</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Saccharibacillus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Zhihengliuella</i>
R2A	<i>Acidovorax</i> , <i>Conyzicola</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Paenarthrobacter</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Stenotrophomonas</i>

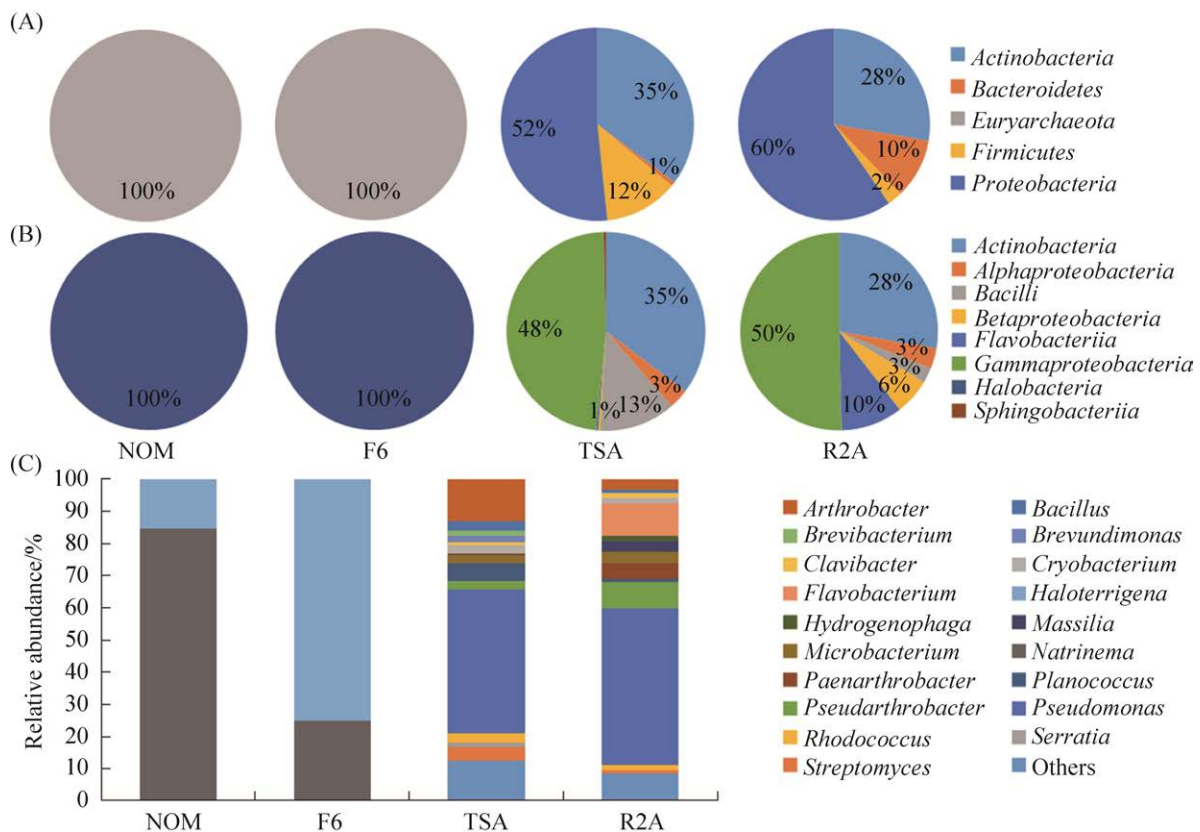


图 2 不同培养基需氧冷适应细菌及古菌组成

Figure 2 Composition of aerobic cold-adapted bacteria and archaea isolated with four different culture media. A: sorted at the phylum level. B: sorted at the class level. The percentage in pie charts represents the number of isolates. C: relative abundance at the genus level.

基于门水平(图 3B), 冷适应细菌中变形菌门(18 属 213 株)为第一主导门, 放线菌门(20 属 130 株)为第二优势门, 此外依次为厚壁菌门(7 属 37 株)和拟杆菌门(2 属 14 株), 古菌域仅含广古菌门(2 属 25 株)一个门。

基于纲水平(图 3C), 冷适应细菌中 γ -变形菌纲(8 属 18 种 192 株)分离菌株数量最多, 放线菌纲(20 属 52 种 130 株)排名第二, 其余为杆菌纲(7 属 21 种 37 株)、 α -变形杆菌纲 (*Alphaproteobacteria*, 7 属 13 种 13 株)、黄杆菌纲 (1 属 7 种 13 株)、 β -变形菌纲 (*Betaproteobacteria*, 3 属 6 种 8 株)和鞘脂杆菌纲(1 属 1 种 1 株), 古菌均隶属于盐杆菌纲(2 属

3 种 25 株)。

基于属水平(图 3D), 冷适应细菌变形菌门中假单胞菌属(10 种 181 株)菌株数量占绝对优势, 占总分离菌株数量的 45.9%, 放线菌门的节杆菌属(14 种 40 株)分离菌株数量较多, 占总分离菌株数量的 10.2%。另外假节杆菌属(4 种 17 株)、动性球菌属(8 种 16 株)、链霉菌属(4 种 13 株)、黄杆菌属(7 种 13 株)、细杆菌属(4 种 11 株)、红球菌属(5 种 10 株)、芽孢杆菌属(5 种 9 株)、冷杆菌属(4 种 8 株)和类节杆菌属(2 种 6 株)占比较少。其他属还有马赛菌属及短波单胞菌属(*Brevundimonas*)等 4 个属均 5 株, 沙雷氏菌属 4 株, 微小杆菌属(*Exiguobacterium*)

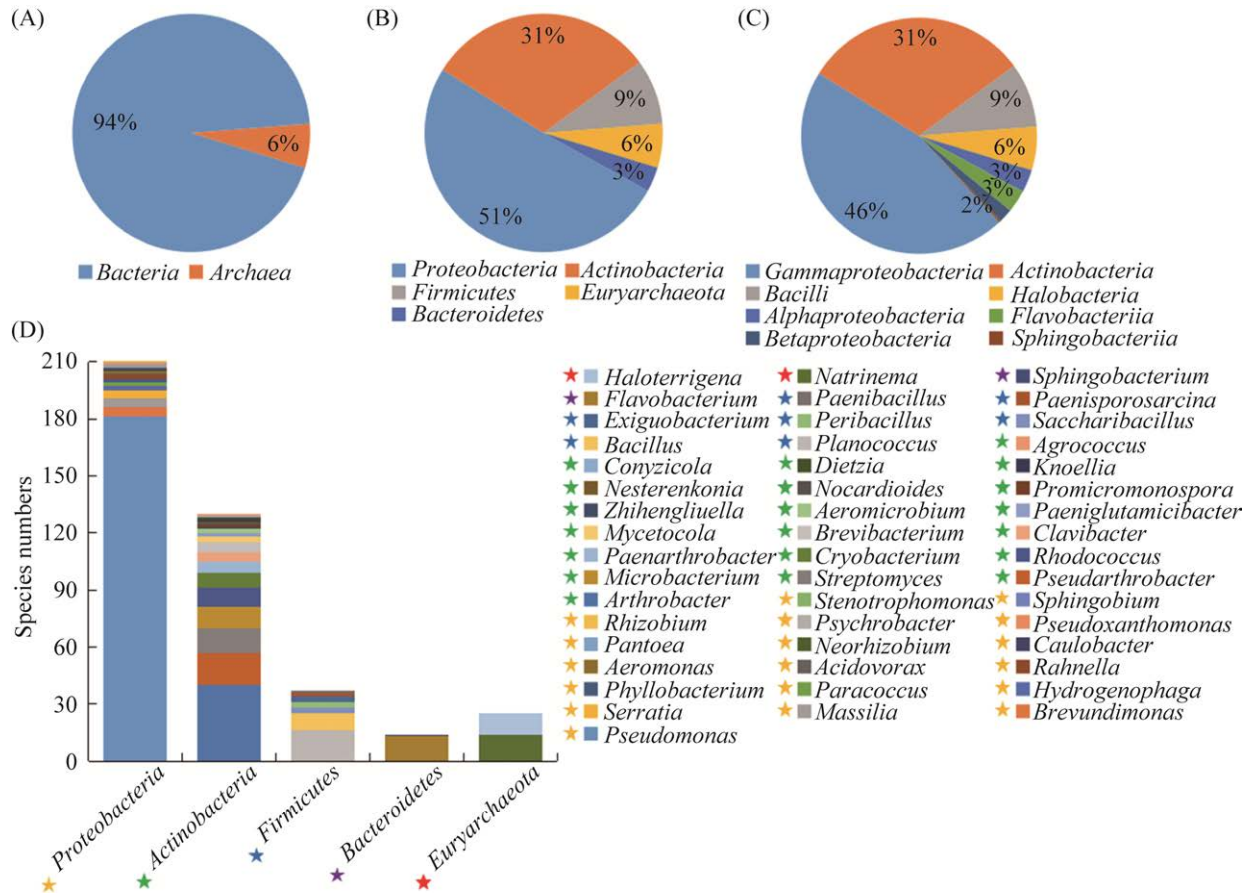


图3 帕米尔高原可培养需氧冷适应细菌及古菌群落组成

Figure 3 Composition of aerobic cold-adapted bacteria and archaea in the Pamir Plateau revealed by a cultivation-dependent approach. A: at the domain level; B: at the phylum level; C: at the class level; D: at the genus level.

及 *Peribacillus* 属等 4 个属均 3 株, 气微菌属 (*Aeromicrobium*) 及嗜氢菌属 (*Hydrogenophaga*) 等 7 个属均 2 株, 嗜酸菌属 (*Acidovorax*) 及气单胞菌属 (*Aeromonas*) 等 20 个属均仅 1 株。此外, 古菌域广古菌门中仅含钠线菌属 (1 种 14 株) 及盐陆生菌属 (2 种 11 株) 两个属, 且钠线菌属数量较多。

以上分离培养结果表明, 帕米尔高原物种多样性较为丰富, 存在可培养冷适应细菌及古菌资源。

2.4 帕米尔高原可培养微生物潜在新物种

本研究通过将分离获得菌株的 16S rRNA

基因测序结果上传至 Ezbiocloud 进行比对, 发现相似度小于 98.65% 的潜在新物种共 23 株 (图 4), 包括冷适应细菌 21 株, 古菌 2 株, 占总菌株数的 5.49%。其中, 相似度介于 96.00%–97.00% 间的潜在物种 3 株 (TRM85882、TRM86049、TRM85033), 介于 97.00%–98.00% 间的潜在新物种 8 株 (TRM86076、TRM86002、TRM86096、TRM86207、TRM86202、TRM86038、TRM86107、TRM85034), 介于 98.00%–98.65% 间潜在新物种 12 株 (TRM86091、TRM86001、TRM86048、TRM86005、TRM86077、

TRM86180、TRM86094、TRM86156、TRM85870、TRM86067、TRM85914、TRM85147), 无潜在新属。潜在新物种中 2 株隶属于放线菌门, 8 株隶属于变形菌门, 9 株隶属于拟杆菌门, 2 株隶属于厚壁菌门, 2 株隶属于广古菌门。1 000–5 000 m 四个海拔梯度由低至高分别分离得到 7 株、9 株、4 株和 3 株潜在新物种。在培养温度为 4 °C, 分离培养基为 R2A 培养基时, 中海拔梯度的新物种数量最多, 共分离得到 9 株疑似新种。此外, 分别在 TSA、

R2A 和 F6 培养基中分别分离得到 5 株、16 株和 2 株潜在新物种, 未在 NOM 培养基中分离得到潜在新物种。另外, 黄杆菌属疑似新种共 8 株, 占比最大。上述研究结果表明, 帕米尔高原存在丰富的微生物潜在新物种资源, 有待挖掘、开发及利用。

3 讨论

土壤微生物群落丰富多样, 在自然界生物地球化学转化中发挥着重要作用, 对生态系统

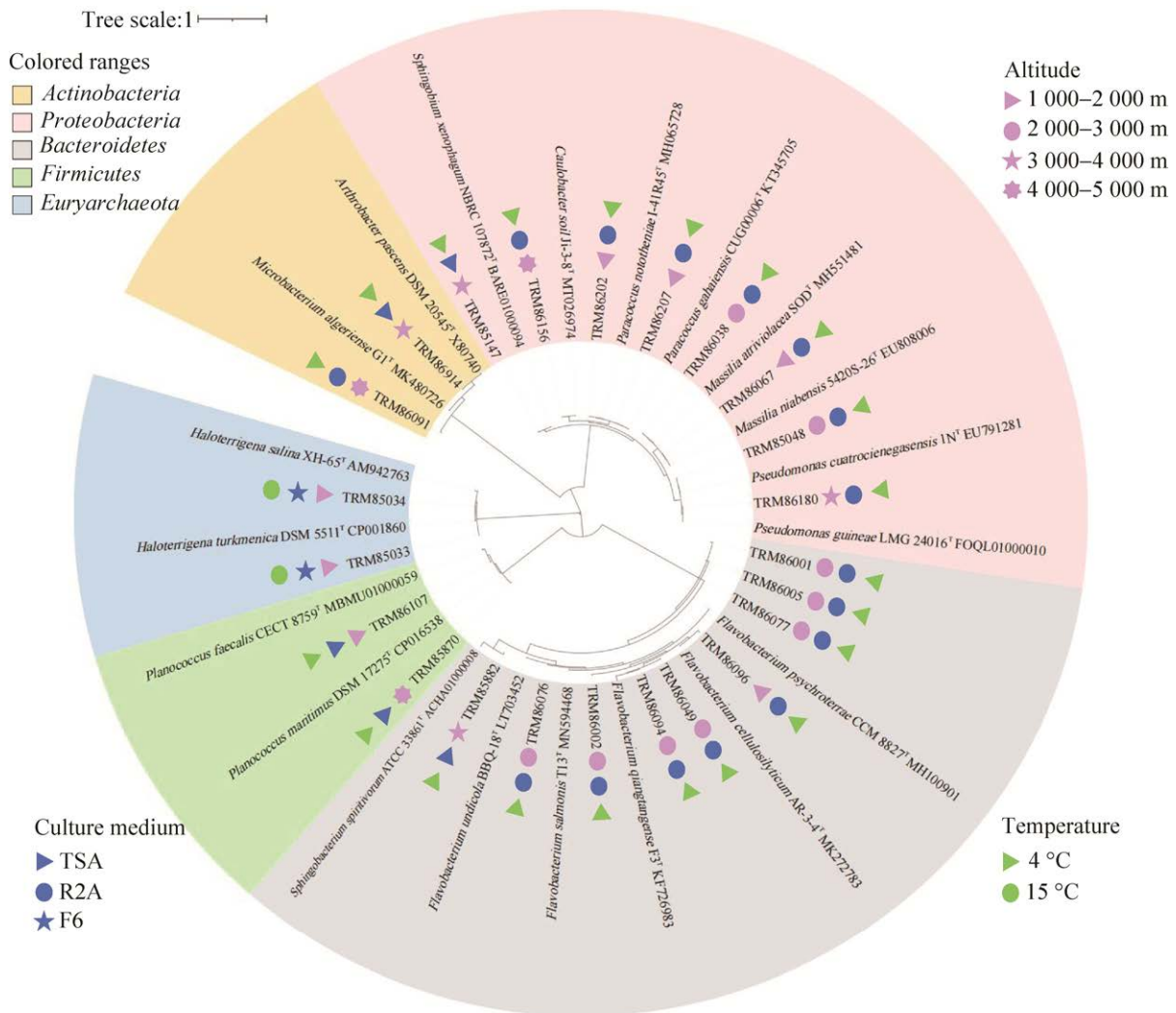


图 4 帕米尔高原可培养潜在新物种分布

Figure 4 Overview of the predicted novel taxa of cold-adapted bacteria and archaea isolated from the Pamir Plateau.

有着不可忽视的影响,是研究环境生态学的理想材料^[31]。组学技术已成为研究微生物多样性及其生态适应性的有力工具^[22],然而剧增的基因组数据除了使我们认识到微生物的多样性及在地球元素循环的功能之外,也与我们不能获得其中许多新类群形成鲜明对比。但冷适应细菌、嗜盐古菌本身具备多种生物学功能,已广泛应用到多种工农业生产中^[32-35],为人类生产、生活做出了一定贡献,因而获得可培养微生物资源对于人类发展至关重要。

本研究为探究帕米尔高原需氧冷适应细菌及古菌群落的多样性,采用低温分离培养的方法,对帕米尔高原海拔 1 000–5 000 m 四个海拔梯度土壤样品中的需氧冷适应细菌及古菌进行研究,使用 4 种培养基及 2 种培养温度,共分离得到 394 株冷适应细菌和 25 株古菌,隶属于 49 个属 118 个种,结果表明帕米尔高原存在丰富多样的冷适应细菌及古菌资源。本研究获得了变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门 4 个门的冷适应细菌以及广古菌门的古菌,其中冷适应细菌分离结果与前人研究一致^[21]。冷适应细菌中变形菌门的 γ -变形菌纲为帕米尔高原的主导类群,放线菌门的放线菌纲和厚壁菌门的杆菌纲同样占有一定比例,拟杆菌门整体占比较小。假单胞菌属被报道为较高海拔环境冷适应微生物中的优势属,在帕米尔高原同样印证了这一事实^[36-37]。古菌类群为广古菌门,这与青藏高原^[24]、南极^[38]、北极^[4]及阿尔卑斯山^[5]土壤菌群组成类似。本研究自 4 °C 共分离得到冷适应细菌 394 株,可见帕米尔高原是冷适应细菌良好的生存场所。

海拔和土壤品质及环境温度息息相关^[39],而这些要素与微生物的生长之间同样存在密切联系。本研究结果表明,在 4 000–5 000 m 高海拔地区随温度的降低,变形菌门数量明显减少,

主导菌群变为放线菌门,其中链霉菌为主导属,与青藏高原^[27]、西藏高原^[38]和南极^[4]高海拔冻土区域群落组成相同。阿尔卑斯山和南极冻土中拟杆菌门在冷适应环境中数量增加^[6],但本研究并未发现此规律,可能与采样地点和培养基不适合于拟杆菌门的生长相关。因帕米尔高原不同海拔间的物种存在差异,且假单胞菌属、黄杆菌属和马赛菌属等微生物与元素循环之间存在密切联系^[40-41],故本研究揭示帕米尔高原不同海拔间物种差异的同时也为生态学研究提供了理论支持。此外,因帕米尔高原中高海拔地区地势地貌最为多样,为展现该海拔区间帕米尔高原更为全面的不同生境的物种多样性,在此区域内采集样品数量最多,因此各海拔区间的特有属可能存在局限性。

多种微生物的培养严格依赖于环境条件和不同的生长因子(比如维生素、氨基酸、核苷酸以及腐殖酸或其他外部的电子穿梭载体),因此在实验室条件下模拟原位环境进行培养也是一种挑战^[42-43]。本研究配制培养基时选用帕米尔高原不同海拔土壤浸提液替代蒸馏水,获得 118 种冷适应细菌和古菌,物种种类较丰富,可能与模拟原位环境的培养方法相关。采用 TSA 和 R2A 两种适合需氧冷适应细菌生长的培养基, NOM 和 F6 两种适合需氧古菌生长的培养基,对帕米尔高原冷适应细菌及古菌进行分离培养。结果表明,假单胞菌属和黄杆菌属分别为 TSA 和 R2A 两种培养基中优势属,钠线菌属和盐陆生菌属分别为 NOM 和 F6 培养基中优势属,与先前研究相似^[44-46]。本研究采用 TSA 培养基得到了大量冷适应细菌,且物种丰富,则相较 R2A 培养基,该培养基更适用于冷适应细菌的选择性分离。R2A 培养基分离冷适应细菌菌株总数不高,但菌株种类丰富,可能与其寡营养的特性相关,故该培养基可适用于黄杆菌

属及假节杆菌属等多种冷适应细菌的培养。此外, 本研究所使用的壳聚糖、酸水解酪蛋白、天冬酰胺和鱼蛋白胨等营养物质有利于嗜盐古菌的生长, 培养时间达半年以上, 但仅在 15 °C 的培养条件下, 得到钠线菌属和盐陆生菌属的古菌, 且 4 °C 没有得到古菌。多数古菌是不可培养的, Imachi 团队通过共培养的方式获得阿斯加德古菌门(*Asgard*), 为真核生物的起源提供了非常重要的证据, 但富集分离培养时间长达 10 年之久^[47], 也许我们在冷适应古菌的分离过程中受到了时间的限制。嗜盐古菌是高盐环境的“定居者”^[46], 且存在冷适应嗜盐古菌类群^[48], 本研究自帕米尔高原土壤样品中获得嗜盐古菌种类较少, 且未得到冷适应嗜盐古菌, 猜测原因为培养基的选择对帕米尔高原土壤中古菌种类针对性存在偏差导致。

本研究为帕米尔高原的冷适应微生物群落分布及多样性提供了新的见解, 获得了宝贵的冷适应微生物资源, 且可能有助于预测在气候变暖背景下帕米尔高原的微生物群落和生物地球化学循环的未来。

参考文献

- [1] Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 1975, 39(2): 144–167.
- [2] Liu KS, Yao TD, Pearce DA, Jiao NZ, Zeng YH, Guo BX, Liu YQ. Bacteria in the lakes of the Tibetan Plateau and polar regions. *Science of the Total Environment*, 2021, 754: 142248.
- [3] 王艳发, 魏士平, 崔鸿鹏, 苏新, 祝有海, 卢振权, 胡非, 李来鹏, 张帅, 刘晖. 青藏高原冻土区土壤垂直剖面中微生物的分布与多样性. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 1902–1917.
Wang YF, Wei SP, Cui HP, Su X, Zhu YH, Lu ZQ, Hu F, Li LP, Zhang S, Liu H. Distribution and diversity of microbial community along a vertical permafrost profile, Qinghai-Tibetan Plateau. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 1902–1917. (in Chinese)
- [4] Signori CN, Thomas F, Enrich-Prast A, Pollery RCG, Sievert SM. Microbial diversity and community structure across environmental gradients in Bransfield Strait, Western Antarctic Peninsula. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 647.
- [5] Nemergut DR, Costello EK, Meyer AF, Pescador MY, Weintraub MN, Schmidt SK. Structure and function of alpine and Arctic soil microbial communities. *Research in Microbiology*, 2005, 156(7): 775–784.
- [6] Wunderlin T, Ferrari B, Power M. Global and local-scale variation in bacterial community structure of snow from the Swiss and Australian Alps. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(9): fiw132.
- [7] Óskarsson KR, Kristjánsson MM. Improved expression, purification and characterization of VPR, a cold active subtilisin-like serine proteinase and the effects of calcium on expression and stability. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Proteins and Proteomics*, 2019, 1867(2): 152–162.
- [8] Perfumo A, Von Sass GJF, Nordmann EL, Budisa N, Wagner D. Discovery and characterization of a new cold-active protease from an extremophilic bacterium via comparative genome analysis and *in vitro* expression. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 881.
- [9] Maharana AK, Singh SM. A cold and organic solvent tolerant lipase produced by Antarctic strain *Rhodotorula* sp. Y-23. *Journal of Basic Microbiology*, 2018, 58(4): 331–342.
- [10] Guo CC, Zheng RK, Cai RN, Sun CM, Wu SM. Characterization of two unique cold-active lipases derived from a novel deep-sea cold seep bacterium. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 802.
- [11] Santa-Cruz Vasquez YM, Gomes MB, E Silva TR, Duarte AWF, Rosa LH, De Oliveira VM. Cold-adapted chitinases from Antarctic bacteria: taxonomic assessment and enzyme production optimization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 34: 102029.
- [12] Han ZG, Shang-Guan F, Yang JK. Characterization of a novel cold-active xylanase from *Luteimonas* species. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2018, 34(8): 123.
- [13] Al-Ghanayem AA, Joseph B. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 2871–2882.
- [14] 刘庆, 杨蕾蕾, 周宇光, 辛玉华, 东秀珠. 冰川细菌冷杆菌属的多样性研究进展. *微生物学报*, 2021, 61(4): 807–815.

- Liu Q, Yang LL, Zhou YG, Xin YH, Dong XZ. Research progress on the diversity of glacial bacteria *Cryobacterium*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 807–815. (in Chinese)
- [15] Menasria T, Aguilera M, Hocine H, Benammar L, Ayachi A, Si Bachir A, Dekak A, Monteoliva-Sánchez M. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 2018, 207: 289–298.
- [16] Biswas J, Saha P, Ganguly J, Paul AK. Production and characterization of a bioactive extracellular homopolysaccharide produced by *Haloferax* sp. BKW301. *Journal of Basic Microbiology*, 2020, 60(11/12): 938–949.
- [17] Kasirajan L, Maupin-Furlow JA. Halophilic archaea and their potential to generate renewable fuels and chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(3): 1066–1090.
- [18] Dayakar B, Xavier KAM, Das O, Porayil L, Balange AK, Nayak BB. Application of extreme halophilic archaea as biocatalyst for chitin isolation from shrimp shell waste. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2021, 2: 100093.
- [19] 杨淑萍, 姜洁, 阎平. 中国帕米尔高原珍稀濒危植物及特有种的生态地理分布. *干旱区资源与环境*, 2018, 32(1): 115–120.
- Yang SP, Jiang J, Yan P. Eco-geographic distribution of rare and endangered plants and endemism in the Pamirs Region of China. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2018, 32(1): 115–120. (in Chinese)
- [20] Khomutovska N, Jerzak M, Kostrzevska-Szlakowska I, Kwiatowski J, Suska-Malawska M, Syczewski M, Jasser I. Life in extreme habitats: diversity of endolithic microorganisms from cold desert ecosystems of eastern Pamir. *Polish Journal of Ecology*, 2017, 65(4): 303–319.
- [21] 李明源, 王继莲, 古丽巴哈尔·萨吾提. 新疆东帕米尔高原慕士塔格峰峰布拉克冰川雪冰及融水中可培养细菌多样性分析. *冰川冻土*, 2015, 37(6): 1634–1641.
- Li MY, Wang JL, Sawuti G. Culturable bacterial diversity in snow, ice and meltwater of the Yangbark Glacier, Muztag Ata. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2015, 37(6): 1634–1641. (in Chinese)
- [22] Valentine G, Prince A, Aagaard KM. The neonatal microbiome and metagenomics: what do we know and what is the future? *NeoReviews*, 2019, 20(5): e258–e271.
- [23] 武凤霞, 张淑彬, 应梦真, 刘建斌. 不同培养基浓度对土壤耐低温微生物分离效果的影响. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2019, 50(2): 315–318.
- Wu FX, Zhang SB, Ying MZ, Liu JB. Effects of nutrient medium concentrations on isolation of cold adapted microorganisms. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition*, 2019, 50(2): 315–318. (in Chinese)
- [24] Cui HL, Gao X, Yang X, Xu XW. *Halorussus rarus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from a marine solar saltern. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2010, 14(6): 493–499.
- [25] 刘琴. 罗布泊地区嗜盐古菌多样性分析及其多相分类. 塔里木大学硕士学位论文, 2014.
- [26] Vishnivetskaya T, Kathariou S, McGrath J, Gilichinsky D, Tiedje JM. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2000, 4(3): 165–173.
- [27] 张宝贵, 刘晓娇, 刘敏, 张威, 章高森, 伍修琨, 陈拓, 刘光琇. 青藏高原疏勒河上游不同类型冻土可培养细菌多样性特征研究. *冰川冻土*, 2018, 40(1): 156–165.
- Zhang BG, Liu XJ, Liu M, Zhang W, Zhang GS, Wu XK, Chen T, Liu GX. Characteristics of culturable bacteria diversity among different permafrost types in the upstream regions of the Shule River Basin, Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2018, 40(1): 156–165. (in Chinese)
- [28] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613–1617.
- [29] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [30] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293–W296.
- [31] Traulsen A, Sieber M. Evolutionary ecology theory—microbial population structure. *Current Opinion in Microbiology*, 2021, 63: 216–220.

- [32] Lou HH, Hu LF, Lu HY, Wei TY, Chen QH. Metabolic engineering of microbial cell factories for biosynthesis of flavonoids: a review. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2021, 26(15): 4522.
- [33] Zhao XH, Niu YN, Mi CH, Gong HL, Yang XY, Cheng JSY, Zhou ZQ, Liu JX, Peng XL, Wei DX. Electrospinning nanofibers of microbial polyhydroxyalkanoates for applications in medical tissue engineering. *Journal of Polymer Science*, 2021, 59(18): 1994–2013.
- [34] Ranjbaran M, Carciofi BAM, Datta AK. Engineering modeling frameworks for microbial food safety at various scales. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(5): 4213–4249.
- [35] Yaguchi AL, Lee SJ, Blenner MA. Synthetic biology towards engineering microbial lignin biotransformation. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(10): 1037–1064.
- [36] 章高森. 青藏高原多年冻土区微生物多样性及其潜在应用的研究. 兰州大学博士学位论文, 2007.
- [37] 彭岳林, 蔡晓布, 于宝政. 不同状态高寒草甸土壤微生物分布及其变化. *西南农业学报*, 2018, 31(6): 1241–1245.
Peng YL, Cai XB, Yu BZ. Distribution and change of soil microorganism in alpine meadow under different states. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(6): 1241–1245. (in Chinese)
- [38] 李桂秀, 宋易洋, 赵芯, 王国良. 基于高通量测序对南极菲尔德斯半岛土壤微生物多样性的初步研究. *渔业研究*, 2020, 42(3): 195–204.
Li GX, Song YY, Zhao X, Wang GL. High-throughput sequencing analysis of soil microbial diversity from Antarctic Fildes Peninsula. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(3): 195–204. (in Chinese)
- [39] Hoffmann T, Bremer E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(7): 1552–1562.
- [40] Guo HL, Chen C, Lee DJ. Nitrogen and sulfur metabolisms of *Pseudomonas* sp. C27 under mixotrophic growth condition. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122169.
- [41] Li P, Jiang DW, Li B, Dai XY, Wang YH, Jiang Z, Wang YX. Comparative survey of bacterial and archaeal communities in high arsenic shallow aquifers using 454 pyrosequencing and traditional methods. *Ecotoxicology: London, England*, 2014, 23(10): 1878–1889.
- [42] Lewis WH, Tahon G, Geesink P, Sousa DZ, Ettema TJG. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 225–240.
- [43] Sun YH, Liu Y, Pan J, Wang FP, Li M. Perspectives on cultivation strategies of archaea. *Microbial Ecology*, 2020, 79(3): 770–784.
- [44] Klarenberg IJ, Keuschnig C, Warshan D, Jónsdóttir IS, Vilhelmsson O. The total and active bacterial community of the chlorolichen *Cetraria islandica* and its response to long-term warming in sub-Arctic tundra. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 540404.
- [45] Choe YH, Kim M, Lee YK. Distinct microbial communities in adjacent rock and soil substrates on a high Arctic polar desert. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 607396.
- [46] Cui HL, Dyll-Smith ML. Cultivation of halophilic archaea (class *Halobacteria*) from thalassohaline and athalassohaline environments. *Marine Life Science & Technology*, 2021, 3(2): 243–251.
- [47] Imachi H, Nobu MK, Nakahara N, Morono Y, Ogawara M, Takaki Y, Takano Y, Uematsu K, Ikuta T, Ito M, Matsui Y, Miyazaki M, Murata K, Saito Y, Sakai S, Song C, Tasumi E, Yamanaka Y, Yamaguchi T, Kamagata Y, Tamaki H, Takai K. Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface. *Nature*, 2020, 577(7791): 519–525.
- [48] Williams TJ, Liao Y, Ye J, Kuchel RP, Poljak A, Raftery MJ, Cavicchioli R. Cold adaptation of the Antarctic haloarchaea *Halohasta litchfieldiae* and *Halorubrum lacusprofundi*. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(6): 2210–2227.

(本文责编 李磊)