

研究报告

基于宏基因组技术分析全球不同温度带土壤微生物多样性

曲颖¹, 孙晓玥¹, 滕新栋², 徐丽³, 金黎明⁴, 王丽君¹, 刘秀梅¹, 曲江勇¹, 王绪敏^{*1}, 邢志凯^{*1}

1 烟台大学, 山东 烟台 264005

2 青岛国际旅游卫生保健中心, 山东 青岛 266071

3 山东青岛大港海关, 山东 青岛 266071

4 大连民族大学生物技术与生物资源利用重点实验室, 辽宁 大连 116600

曲颖, 孙晓玥, 滕新栋, 徐丽, 金黎明, 王丽君, 刘秀梅, 曲江勇, 王绪敏, 邢志凯. 基于宏基因组技术分析全球不同温度带土壤微生物多样性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1853-1871.

QU Ying, SUN Xiaoyue, TENG Xindong, XU Li, JIN Liming, WANG Lijun, LIU Xiumei, QU Jiangyong, WANG Xumin, XING Zhikai. Microbial community diversity of soil in different temperature zones around the world: based on metagenomic technology[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1853-1871.

摘要:【背景】温度在塑造大尺度的土壤微生物群落方面发挥了重要作用,但目前针对全球不同温度带大尺度土壤微生物多样性方面的研究十分缺乏。【目的】明确不同温度带大尺度土壤微生物组成和功能的差异变化。【方法】从宏观的角度运用宏基因组技术对不同温度带土壤微生物群落的组成和功能进行分析。【结果】细菌的物种多样性随着温度带纬度的升高而增多,真菌的物种多样性在温带最多,在寒带最小且假丝酵母属(*Candida*)占绝对优势。3个温度带间除物种多样性存在差异外,微生物群落中物种丰度差异也较大,优势属和特殊属各有不同。其中值得注意的是,假

资助项目:自然资源部海洋生态环境科学与技术重点实验室(MEEST-2021-05);生物技术与资源利用教育部重点实验室(大连民族大学)开放基金(KF2022006);山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2021CXGC011306);山东省自然科学基金(ZR2020MD002);国家重点研发计划(2021YFC2401005);国家自然科学基金(31460562);烟台大学博士科学研究基金(SM15B01, SM19B70, SM19B28);烟台“双百计划”(2320004-SM20RC02)

This work was supported by the Key Fund with the Ministry of Natural Resources Key Laboratory of Eco-environmental Science and Technology (MEEST-2021-05), the Open Fund of Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of the Ministry of Education (Dalian Minzu University) (KF2022006), the Key Research and Development Program of Shandong Province (Major Science and Technology Innovation Project) (2021CXGC011306), the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020MD002), the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2401005), the National Natural Science Foundation of China (31460562), the Doctoral Science Research Foundation of Yantai University (SM15B01, SM19B70 and SM19B28), and the Yantai “Double-Hundred Project” (2320004-SM20RC02).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Xumin, wangxm@ytu.edu.cn; XING Zhikai, xingzhk@ytu.edu.cn

Received: 2022-08-04; Accepted: 2022-10-25; Published online: 2022-12-30

单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的丰度在不同温度带间存在显著差异,且随着温度带纬度的升高而增多,而链霉菌属(*Streptomyces*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、红色杆菌属(*Rubrobacter*)和小单胞菌属(*Micromonospora*)的丰度随温度带纬度的升高而降低。在功能方面,发现与翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣(posttranslational modification, protein turnover, chaperones),细胞内运输、分泌和囊泡运输(intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport)以及细胞运动(cell motility)相关的基因功能可能在微生物耐冷方面具有重要作用。【结论】土壤微生物在物种多样性、群落组成和功能上随温度带变化明显不同,找出受温度带变化显著影响的细菌、真菌及功能,有助于大尺度研究土壤微生物多样性地理格局及其形成机制。

关键词:宏基因组分析技术;温度带;土壤微生物;微生物多样性

Microbial community diversity of soil in different temperature zones around the world: based on metagenomic technology

QU Ying¹, SUN Xiaoyue¹, TENG Xindong², XU Li³, JIN Liming⁴, WANG Lijun¹,
LIU Xiumei¹, QU Jiangyong¹, WANG Xumin^{*1}, XING Zhikai^{*1}

1 Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China

2 Qingdao International Travel Healthcare Center, Qingdao 266071, Shandong, China

3 Qingdao Dagang Customs, Qingdao 266071, Shandong, China

4 Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China

Abstract: [Background] Temperature plays an important role in shaping soil microbial communities at large scales, but there is a paucity of research on large-scale soil microbial diversity in different temperature zones around the globe. **[Objective]** To clarify the difference in composition and function of large-scale soil microbes among different temperature zones. **[Methods]** We used metagenomic technology to analyze the composition and function of soil microbial communities in different temperature zones. **[Results]** The species diversity of bacteria rose with the increase of latitude of temperature zones, and that of fungi was the highest in temperate zone and lowest in cold zone with absolute dominance of *Candida*. The abundance of species in the microbial communities also varied greatly among the three temperature zones, with different dominant and special genera. Particularly, the abundance of *Pseudomonas* and *Bacillus* was significantly different among the three temperature zones and it increased with the rise of the latitude. However, the abundance of *Streptomyces*, *Geodermatophilus*, *Rubrobacter*, and *Micromonospora* decreased with increase of latitude of temperature zones. In terms of function, it was found that gene functions related to posttranslational modification, protein turnover, chaperones, intracellular trafficking, secretion, vesicular transport, and cell motility may play an important role in cold tolerance of microorganisms. **[Conclusion]** This study found that soil microorganisms differed significantly in species diversity, community composition, and function among temperature zones and identified bacteria, fungi, and functions significantly

affected by changes in temperature zones, contributing to a large-scale study of the geographic patterns of soil microbial diversity and their formation mechanisms.

Keywords: metagenomic technology; temperature zone; soil microorganisms; microbial diversity

温度带是以全球各地区活动积温的多少为标准、按农业生产所需要的热量指标划分的地带。通常根据 $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 积温的多少可划分为热带、温带(包括北温带和南温带)和寒带(包括北寒带和南寒带)^[1-2]。热带气候最显著的特点是全年气温较高, 年平均气温 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 四季界限不明显, 日温度变化大于年温度变化^[3]。温带地区的气候温和, 年平均气温为 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 四季变化明显^[4]。寒带地区全年寒冷, 有极昼极夜现象, 年平均气温在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下^[5]。不同温度带既会产生气候和生物周期的变化, 也会引起生物和非生物因子的变化。相关研究发现, 温度在塑造大尺度的森林土壤微生物群落方面发挥了主要作用^[6]。土壤微生物群落主要包括细菌、真菌、古菌、病毒、原生动物和微型动物。其中最重要的两大类群分别是土壤真菌与细菌^[7], 并且表层土壤中的真菌和细菌表现出全球性的生态位分化^[8]。但目前针对全球不同温度带大尺度土壤微生物多样性方面的研究十分缺乏。

近年来, 宏基因组学技术越发广泛地应用在研究大纬度梯度土壤细菌和真菌的生物地理分布、土壤微生物多样性等方面^[9]。宏基因组学技术分析能够克服传统微生物分析仅限于可分离培养微生物的缺陷, 通过对样品中微生物基因序列的分析, 能够快速确定微生物的种类、丰度及功能, 为更加准确地揭示土壤微生物多样性提供了支撑^[10]。土壤微生物多样性的研究既能够预测土壤养分和环境质量的变化, 还能够认识在土壤微生物生态中起重要作用的类群及其功能^[11]。为了更好地了解不同温度带土壤

微生物群落中细菌和真菌物种组成和功能的多样性及异同, 本研究以来自全球不同温度带且分布于 7 个大陆的表层土壤样品作为研究对象, 采用宏基因组分析的方法探究不同温度带中土壤微生物物种组成与功能特征。这将为大尺度土壤微生物多样性地理格局及其形成机制的有关研究提供理论依据, 也可据此预测土壤生物群落应对全球温度变化的响应及其相关功能的演变方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及其来源

本研究共收集了来自全球 3 个温度带且分布于 7 个大陆的 25 份土壤样品数据(表 1)。其中温带土壤样品数据 13 个、热带土壤样品数据 9 个、寒带土壤样品数据 3 个。寒带南极洲的 3 份土壤样品数据来源于本实验室, 其样品来自中国第 31 次南极科学考察, 采样区域为利奇菲尔德岛(Litchfield Island)和乔治王岛(King George Island), 采样时间分别为 2015 年 2 月 3 日和 2015 年 2 月 6 日。采样过程使用无菌铲采集距离地表 0–10 cm 的表层土壤样品, 每个采样点取 3 份重复混合而成, 并用无菌封口袋将混合后的土壤装好并做好标识, 在低温条件下运输至国内, 实验前在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存于烟台大学生命科学学院。其余 22 份土壤样品数据均来自于 NCBI 公共数据库。所有土壤样品均为表层原生土且其数据量平均大小为 5 Gb。样品具体相关信息见表 1。

表 1 土壤样品信息

Table 1 Soil sample information

样品编号	采样地点	温度带	坐标	访问号
Sample No.	Sampling sites	Temperature zone	Coordainte	Accession No.
R1	非洲: 纳米比亚 Africa: Namibia	热带 Tropical zone	23.20S, 15.55E	SRS7503202 ^[12]
R2	非洲: 纳米比亚 Africa: Namibia	热带 Tropical zone	23.19S, 15.42E	SRS7503201 ^[12]
R3	非洲: 纳米比亚 Africa: Namibia	热带 Tropical zone	23.19S, 15.37E	SRS7503200 ^[12]
R4	南美洲: 智利 South America: Chile	热带 Tropical zone	24.08S, 69.99W	SRS7432060 ^[13]
R5	南美洲: 智利 South America: Chile	热带 Tropical zone	22.263S, 69.72W	SRS7432058 ^[13]
R6	南美洲: 智利 South America: Chile	热带 Tropical zone	23.39S, 69.60W	SRS7432055 ^[13]
R7	大洋洲: 澳大利亚 Oceania: Australia	热带 Tropical zone	35.12S, 141.99E	ERS580793 ^[14]
R8	大洋洲: 澳大利亚 Oceania: Australia	热带 Tropical zone	25.35S, 131.04E	ERS580789 ^[14]
R9	大洋洲: 澳大利亚 Oceania: Australia	热带 Tropical zone	25.35S, 131.05E	ERS580787 ^[14]
W1	亚洲: 中国 Asia: China	温带 Temperate zone	36.11N, 117.08E	SRS8254461
W2	亚洲: 中国 Asia: China	温带 Temperate zone	36.11N, 117.08E	SRS8254462
W3	亚洲: 中国 Asia: China	温带 Temperate zone	36.11N, 117.08E	SRS8254460
W4	亚洲: 日本 Asia: Japan	温带 Temperate zone	35.73N, 139.53E	DRS163701
W5	北美洲: 加拿大 North America: Canada	温带 Temperate zone	53.93N, 116.58W	SRS4737170
W6	北美洲: 加拿大 North America: Canada	温带 Temperate zone	53.93N, 116.58W	SRS4737169
W7	北美洲: 加拿大 North America: Canada	温带 Temperate zone	53.93N, 116.58W	SRS4737171
W8	北美洲: 美国	温带 Temperate zone	38.53N, 121.77W	SRS7108660 ^[15]
	North America: United States of America			
W9	北美洲: 美国	温带 Temperate zone	38.53N, 121.77W	SRS7108659 ^[15]
	North America: United States of America			
W10	北美洲: 美国	温带 Temperate zone	38.53N, 121.77W	SRS7108645 ^[15]
	North America: United States of America			
W11	欧洲: 法国 Europe: France	温带 Temperate zone	48.61N, 6.10E	ERS1073739
W12	欧洲: 法国 Europe: France	温带 Temperate zone	48.61N, 6.10E	ERS1073738
W13	欧洲: 法国 Europe: France	温带 Temperate zone	48.61N, 6.10E	ERS1073737
H1	南极洲: 利奇菲尔德岛	寒带 Frigid zone	64.77S, 64.08W	SRR20770300
	Antarctica: Litchfield Island			
H2	南极洲: 利奇菲尔德岛	寒带 Frigid zone	64.77S, 64.08W	SRR20770299
	Antarctica: Litchfield Island			
H3	南极洲: 乔治王岛	寒带 Frigid zone	62.21S, 58.96W	SRR20770298
	Antarctica: King George Island			

1.1.2 主要试剂和仪器

Soil Genomic DNA Kit, 江苏康为世纪生物科技有限公司; Qubit dsDNA HS Assay Kit, 英杰生命技术有限公司; VAHTS DNA Clean Beads、VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V2、VAHTS DNA Adapter for Illumina, 南京诺唯赞生物科技有限公司。台式高速冷冻离心机, 艾本德公司; 涡旋振荡

仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 自动凝胶成像系统、PCR 仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 紫外分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Qubit 荧光仪, 英杰生命技术有限公司; 自动聚焦声波基因组剪切仪, Covaris 公司; NovaSeq6000 测序仪, Illumina 公司。

1.2 样品分析方法

1.2.1 土壤宏基因组 DNA 的提取

准确称取 0.1 g 南极土壤样品, 使用 Soil Genomic DNA Kit 提取南极土壤样品中基因组 DNA (genome DNA, gDNA)。采用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计来检测 gDNA 的完整性和纯度, 采用 Qubit 荧光仪精准定量 gDNA 浓度。质检合格的 gDNA 存储在-20 °C 条件下, 用于宏基因组文库的构建。

1.2.2 文库构建与测序

使用 VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V2 构建宏基因组文库。采用自动聚焦声波基因组剪切仪将检测合格的 gDNA 随机打断, 采用磁珠法纯化片段化产物。纯化后的片段化产物经 5'端磷酸化、3'端加 dA 尾、加测序接头、磁珠法纯化、PCR 扩增等过程完成文库构建。其中, PCR 引物见表 2。PCR 反应体系(50 μ L): 含约 10 ng DNA 片段的无核酸酶水 20 μ L, PCR Primer Mix 2.5 μ L, Amplification Mix 3.25 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3min; 95 °C 20 s, 65 °C 15 s, 72 °C 30 s, 12 个循环; 72 °C 5 min^[16]。PCR 产物送北京贝瑞和康生物技术有限公司测序。从 NCBI 公共数据库中搜集的所有数据也均通过 Illumina 平台测序获得。

1.2.3 数据分析

首先使用 Trimmomatic-0.39 软件对原始测序数据进行过滤等质控过程, 得到高质量的有效读长(reads), 结果见表 3。使用 metawrap^[17] 软件进行组装。通过宏基因组序列分类软件

Kraken2^[18]进行物种注释, 使用软件 Bracken^[19]进行宏基因组物种分类统计并在各个分类学水平上构建样品的物种丰度。采用软件 Prokka V1.12^[20]对预组装基因组 DNA 序列进行基因预测, 并对其结果进行聚类, 之后选取代表序列(每类基因中最长的序列)来构建非冗余基因集, 利用 TranSeq^[21]将核酸序列翻译成蛋白质序列并使用 Salmon 1.7.0 软件进行定量。使用 DIAMOND^[22]软件将构建的非冗余基因集序列分别与基因进化谱系: 非监督直系同源群(evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups, EggNOG)数据库和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行比对, 获得功能基因对应的同源蛋白簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)功能注释和 KEGG 功能注释。

1.2.4 统计分析及数据的可视化

用 R 语言软件中的“vegan”包来计算 α 多样性的 Shannon 指数。通过微科盟生科云网站(<https://www.bioincloud.tech/task-meta>)进行基于 Bray-Curtis 距离算法的非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析和 PERMANOVA 检验来衡量不同分组样本间群落组成的差异性。使用皮尔逊相关系数计算生物和温度带平均温度之间的相关性, 该系数通过 SPSS 软件(版本 21.0)计算获得。通过在线分析网站(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)进行线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)。利用 SPSS 软件(V21.0)进行

表 2 引物序列
Table 2 Primers sequences

Sample No.	Linker primers sequences (5'→3')	Reverse primers sequences (5'→3')
H1	AATGATACGGCGACCACC	CAAGCAGAAGACGGCATA
H2	AATGATACGGCGACCACC	CAAGCAGAAGACGGCATA
H3	AATGATACGGCGACCACC	CAAGCAGAAGACGGCATA

表 3 样品数据质控前后结果统计

Table 3 Statistics of sample data before and after quality control

Sample No.	GC Content (%)		Total sequences		Sequence length (bp)	
	Raw reads	Clean reads	Raw reads	Clean reads	Raw reads	Clean reads
R1	66	66	70 052 376	66 351 628	251	36–251
R2	66	66	70 517 054	66 625 148	251	36–251
R3	67	67	70 862 994	67 326 462	251	36–251
R4	59	59	30 743 064	24 052 488	251	36–251
R5	58	59	27 592 758	20 693 882	251	36–251
R6	62	62	41 947 756	33 271 310	251	36–251
R7	66	65	74 499 360	62 619 284	151	36–151
R8	64	64	77 236 340	66 663 378	151	36–151
R9	66	65	75 382 130	66 087 592	151	36–151
W1	62	62	104 493 794	102 939 290	150	36–150
W2	62	62	109 085 556	107 598 174	150	36–150
W3	62	62	104 351 342	102 912 602	150	36–150
W4	61	61	30 930 704	29 846 874	250	36–250
W5	62	62	164 632 620	154 022 210	100	36–100
W6	62	62	168 934 410	160 893 530	100	36–100
W7	62	62	172 958 010	161 982 540	100	36–100
W8	65	65	66 527 452	45 677 178	151	36–151
W9	65	66	57 311 130	42 250 612	151	36–151
W10	63	65	63 651 670	43 670 742	151	36–151
W11	63	62	17 609 808	15 524 850	301	36–301
W12	63	63	22 773 854	19 867 716	301	36–301
W13	63	62	22 401 276	19 542 316	301	36–301
H1	54	54	70 441 086	58 583 462	150	36–150
H2	56	56	75 565 458	69 154 298	150	36–150
H3	55	55	72 294 468	62 765 458	150	36–150

方差分析, 通过方差分析找出不同温度带间具有显著差异($P < 0.05$)的基因功能; 再对这些具有显著差异的功能采用最小显著差异法 (least-significant difference, LSD) 进行多重比较, 找出这些功能具体在哪两个温度带间具有显著差异。其他数据的可视化使用 Image 网站 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/>) 和 R 语言软件中的 ggplot2、pheatmap、corrplot 和 magrittr 来进行。

2 结果与分析

2.1 不同温度带土壤微生物 α 多样性分析

α 多样性能够反映样品中物种多样性的程

度, α 多样性指数包括 Shannon 指数、ACE 指数等^[23]。其中, 通过 Shannon 指数可以反映不同温度带土壤样品微生物的丰富程度^[24]。本研究结果表明, 在细菌方面的物种多样性为寒带>温带>热带(图 1A)。在真菌方面, 寒带的真菌物种多样性明显低于温带和热带, 且温带物种多样性>热带物种多样性>寒带物种多样性(图 1B)。

2.2 不同温度带土壤微生物 β 多样性分析

NMDS 分析图表明不同温度带之间细菌和真菌群落组成上存在差异(图 2)。样品间距离越近, 则表示二者群落主要物种的丰度越相似; 距离越远, 说明二者的群落的分布差异较大。

此外, 不同温度带之间细菌和真菌群落的 PERMANOVA 检验结果的 P 值均小于 0.05。由此可见, 3 种温度带之间的土壤微生物样品彼此间能够较好地地区分开。

2.3 不同温度带土壤细菌和真菌群落分析

25 份土壤样品基因集中, 细菌(bacteria)和真菌(fungi)分别占已分类基因的 88.54% 和 11.06%, 其余不足 1%来自古细菌(archaea)和病

毒(viruses)。其中细菌鉴定出 5 310 种微生物, 隶属于 40 门 1 296 属。真菌鉴定出 70 种微生物, 隶属于 3 门 42 属。

2.3.1 土壤细菌群落物种多样性分析

在门水平上, 土壤微生物群落中主要富集变形菌门 (*Proteobacteria*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*), 其中变形菌门(*Proteobacteria*) 的相对丰度随着温度带纬度升高而增加, 而在

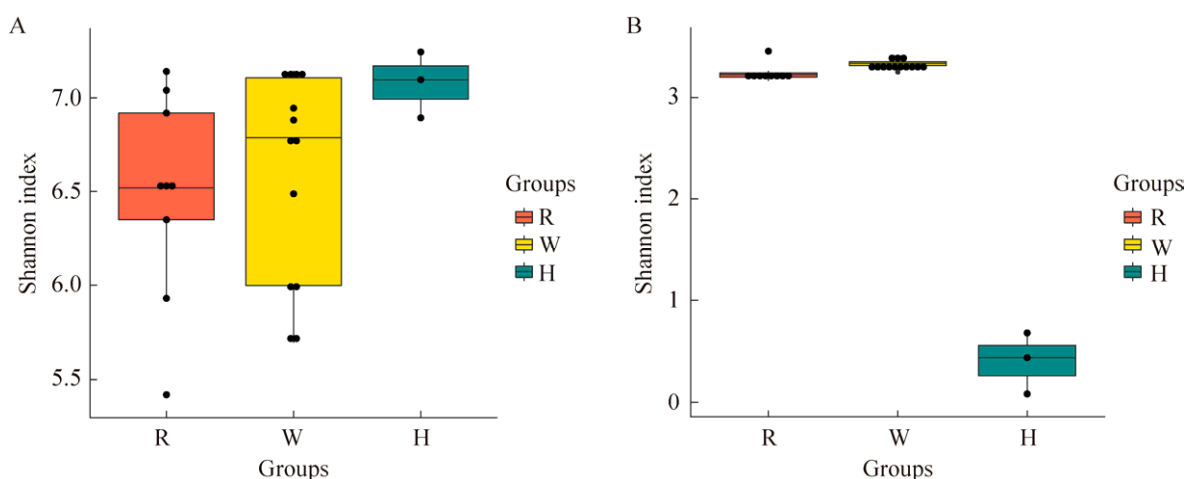


图 1 不同温度带土壤微生物 Shannon 指数 A: 细菌. B: 真菌. R: 热带; W: 温带; H: 寒带. 下同
Figure 1 Shannon index of soil microorganisms in different temperature zones. A: Bacteria. B: Fungi. R: Tropical zone; W: Temperate zone; H: Frigid zone. The same below.

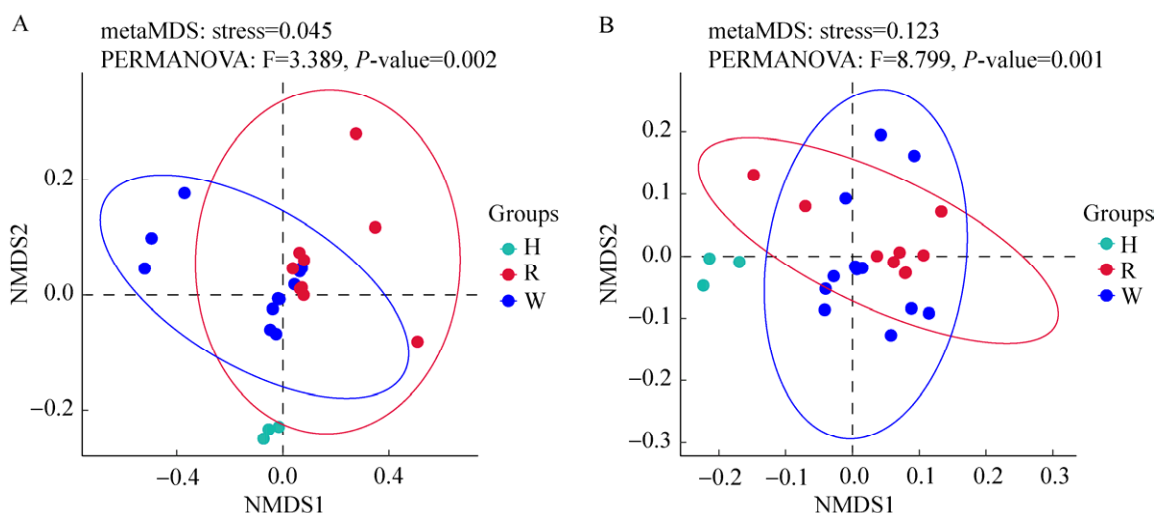


图 2 不同温度带土壤微生物的 NMDS 分析 A: 细菌. B: 真菌

Figure 2 NMDS analysis of soil microorganisms in different temperature zones. A: Bacteria. B: Fungi.

放线菌门(*Actinobacteria*)中观察到相反的现象。此外值得关注的是,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)在寒带的相对丰度明显高于热带和温带(图 3)。

在属水平上,对丰度前 30 的属绘制热图(图 4),根据热图可见,温带和寒带土壤菌群先聚类到一起,后与热带土壤菌群聚类到一起,由此可知,相较于热带土壤细菌群落,温带土壤细菌群落与寒带土壤细菌群落更为相似。另外,相对丰度前 30 的属大部分属于放线菌门(*Actinobacteria*),小部分属于变形菌门(*Proteobacteria*)。此外,芽孢杆菌属(*Bacillus*)和梭菌属(*Clostridium*)属于厚壁菌门(*Firmicutes*)。

根据热图还可以明显看出 3 种不同温度带样品在属水平上菌群丰度的差异性。其中,在

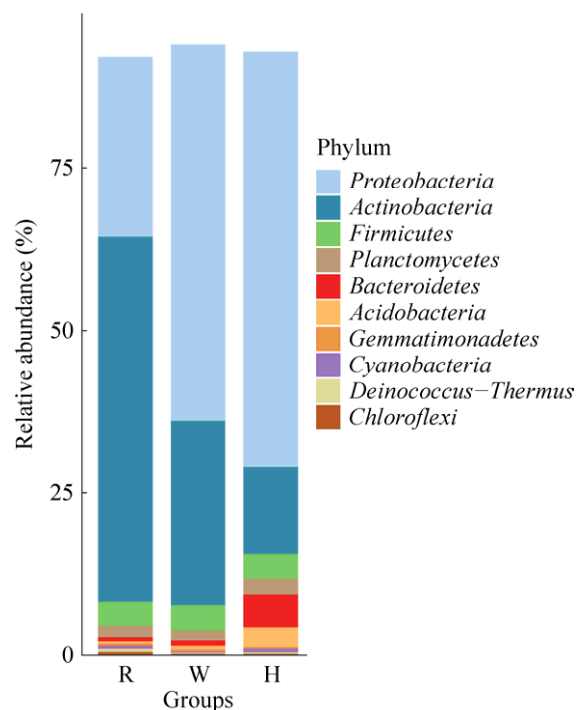


图 3 细菌群落优势门(相对丰度前 10)的相对丰度堆积柱状图

Figure 3 Stacked histogram of relative abundance of dominant phylum (top 10 in relative abundance) of bacterial communities.

热带样品中,链霉菌属(*Streptomyces*)相对丰度最大。在温带样品中,鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)的相对丰度最大,其次是链霉菌属(*Streptomyces*)。在寒带样品中,假单胞菌属(*Pseudomonas*)的相对丰度最大,其次是慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)。此外,热带样品中的红色杆菌属(*Rubrobacter*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽球菌属(*Blastococcus*)、*Baekduia*、红球菌属(*Rhodococcus*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、康奈斯氏杆菌属(*Conexibacter*)和粗食杆菌属(*Modestobacter*)相对丰度相较于温带和寒带占比较高。温带样品中的堆囊菌属(*Sorangium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、梭菌属(*Clostridium*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingopyxis*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和无色杆菌属(*Achromobacter*)相对丰度相较于热带和寒带占比较高。寒带样品中的假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)相对丰度相较于热带和温带占比较高。

细菌群落丰度前 10 的属和温度带的平均温度之间的皮尔逊相关系数揭示了显著的($P<0.05$)相关性(图 5)。温度与慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的相对丰度呈显著负相关,而与链霉菌属(*Streptomyces*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和分枝杆菌属(*Mycolicibacterium*)的相对丰度呈显著正相关。此外,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的相对丰度与链霉菌属(*Streptomyces*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和分枝杆菌属(*Mycolicibacterium*)的相对丰度呈显著负相关。

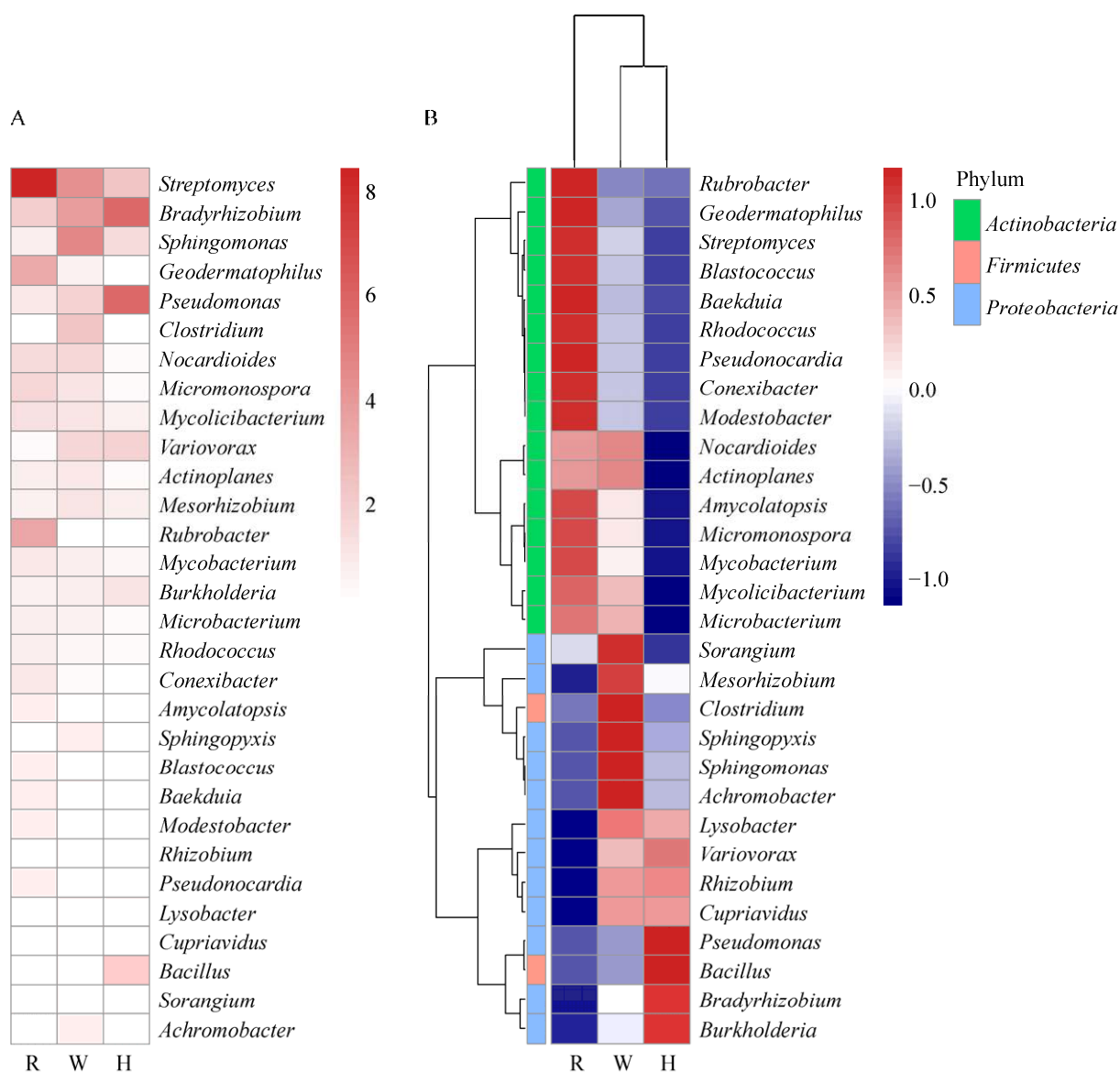


图 4 细菌群落优势属(相对丰度前 30)的相对丰度 heatmap A: 序列百分比值的相对丰度. B: 所有检测样本的属行内缩放, 相对丰度高于平均值为深红色, 相对丰度低于平均值为深蓝色

Figure 4 Relative abundance heatmap of dominant genera (top 30 in relative abundance) in bacterial communities. A: Relative abundance according to sequence percentage value. B: Scaling within genus rows across all examined samples; Relative abundance above average was dark red, relative abundance below average was dark blue.

2.3.2 不同温度带土壤细菌群落组成差异分析

通过 LEfSe (LDA effect size) 分析来寻找 3 个温度带组与组之间具有统计学显著差异的属, 并选取 LDA score 大于 4 的属来绘制柱形

图(图 6)。结果显示, H、W、R 组分别具有 4、1、4 个显著差异的属。R 组样品中链霉菌属(*Streptomyces*)具有最高的 LDA 得分, 其次是 R 组样品中的假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

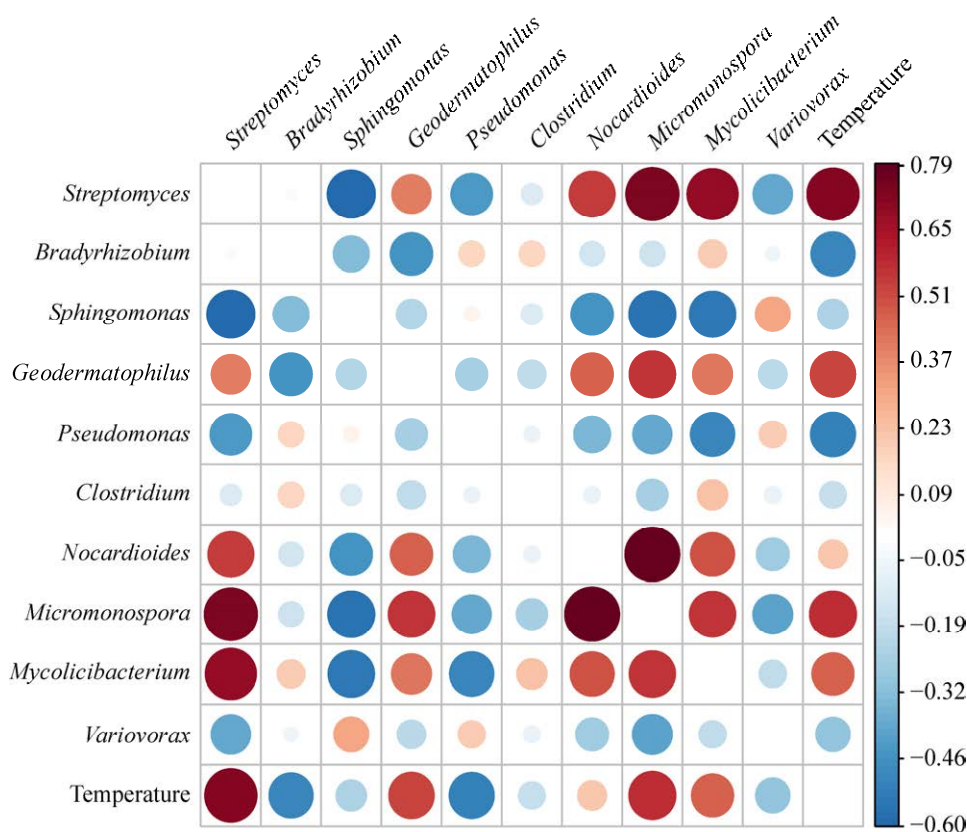


图 5 细菌优势属与温度带年平均温度的相关性图 优势属即相对丰度前 10 的属，寒带的年平均温度取值为 0；深红色表示正相关，深蓝色表示负相关；圆圈大小表示 r ，颜色深浅表示皮尔逊相关系数 (图 10 同)

Figure 5 Correlation plot between the dominant genus of bacterial communities and the average annual temperature of temperature zones. The dominant genera are the top 10 genera in relative abundance, and the average annual temperature in the frigid zone is taken to be 0; Dark red represent positive correlation, dark blue represent negative correlation; Circle size represent r , color shade represent Pearson correlation coefficient.

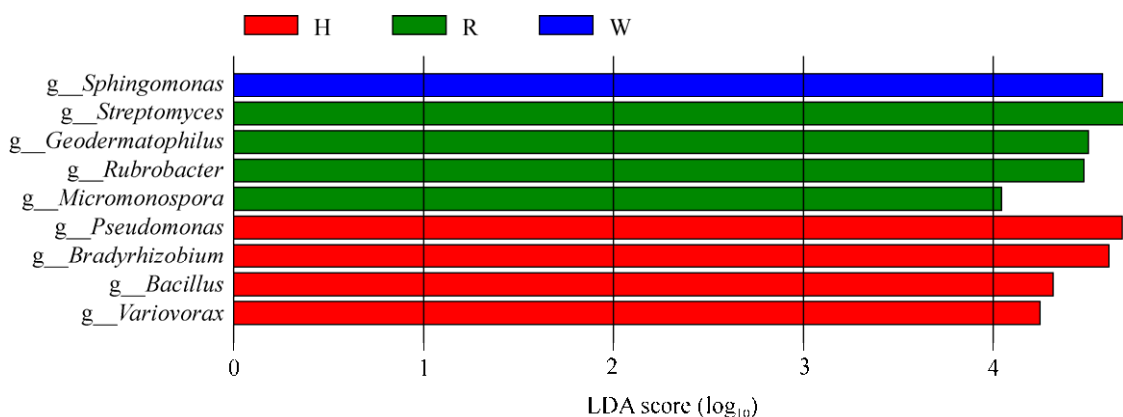


图 6 属水平上菌群 LDA 判别柱形图

Figure 6 LDA discriminant histogram of flora at the genus level.

通过 LEfSe 差异分析可以得到 3 个温度带属水平上存在明显差异的物种(LDA score>默认值 4), 再进一步以不同温度带样品为自变量, 绘制差异明显的微生物丰度随温度带变化折线图(图 7)。具体趋势可以分为 3 种: 持续上升、持续下降、先上升后下降。其中, 随着温度带纬度的增加, 丰度也呈现上升趋势的有假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*); 呈先上升后下降趋势的有慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、贪噬菌属(*Variovorax*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*); 呈下降趋势的有链霉菌属(*Streptomyces*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、红色杆菌属(*Rubrobacter*)和小单胞菌属(*Micromonospora*)。

2.3.3 土壤真菌群落物种多样性分析

在门水平上, 检测到的 3 个门分别是子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)和微孢子菌门(*Microsporidia*)。其中子囊菌门(*Ascomycota*)在寒带样品中占绝对优势, 其相

对丰度的占比明显高于热带和温带, 且在热带中的占比最小(图 8)。

在属水平上共检测出 42 个属, 对丰度前 20 的属绘制热图, 结果发现热带和温带土壤真菌群落先聚类到一起, 后与寒带真菌群落聚类到一起。由此可知, 相较于寒带真菌群落, 温带真菌群落与热带真菌群落更为相似。假丝酵母属(*Candida*)在寒带样品中占绝对优势, 其在寒带的占比明显高于热带和温带。热带和温带样品未发现占绝对优势的属, 其相对丰度最高的属均是 *Thermothielavioides* (图 9A)。此外, 镰刀菌属(*Fusarium*)在温带的相对丰度明显高于热带和寒带, 其次是脉孢菌属(*Neurospora*)。马拉色菌属(*Malassezia*)在热带的相对丰度明显高于温带和寒带(图 9B)。真菌群落丰度前 10 的属和温度带的平均温度之间的皮尔逊相关系数揭示了显著的($P<0.05$)相关性(图 10)。温度与假丝酵母属(*Candida*)呈显著负相关, 而与 *Thermothielavioides*、掘氏梅里

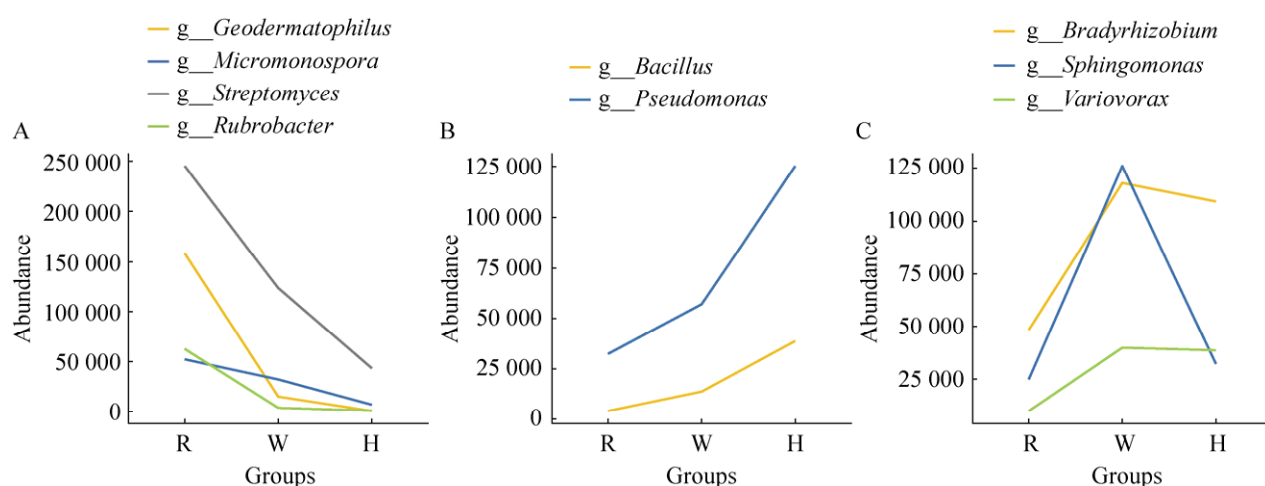


图 7 属水平显著差异细菌丰度折线图 A: 下降趋势的属. B: 上升趋势的属. C: 先上升后下降趋势的属

Figure 7 Folding line graph of bacterial abundance with significant differences in genus levels. A: Genus with a downward trend. B: Genus with an upward trend. C: Genus with an upward and then a downward trend.

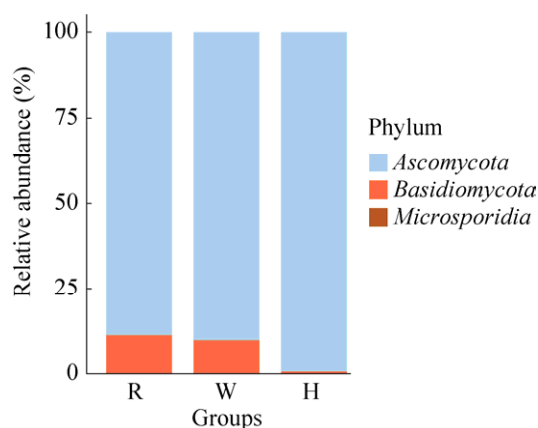


图8 真菌群落门水平的相对丰度堆积柱状图
Figure 8 Stacked histogram of the relative abundance of fungal community phylum levels.

属 (*Drechmeria*)、梨孢菌属 (*Pyricularia*)、*Thermothelomyces*、炭疽菌属 (*Colletotrichum*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和孢堆黑粉菌属 (*Sporisorium*) 呈显著正相关。

2.3.4 不同温度带土壤真菌群落组成差异分析

通过 LEfSe 分析来揭示不同温度带组与组之间具有显著差异的微生物^[25]。选取的 LDA Score 大于 4 的物种来绘制 cladograms 图。图 11 结果显示, 相较于温带和寒带, 在热带具有显著更高丰度的真菌种群包括座囊菌纲 (*Dothideomycetes*) (从纲到科)、内孢霉科 (*Saccharomycetaceae*)、裂殖酵母纲

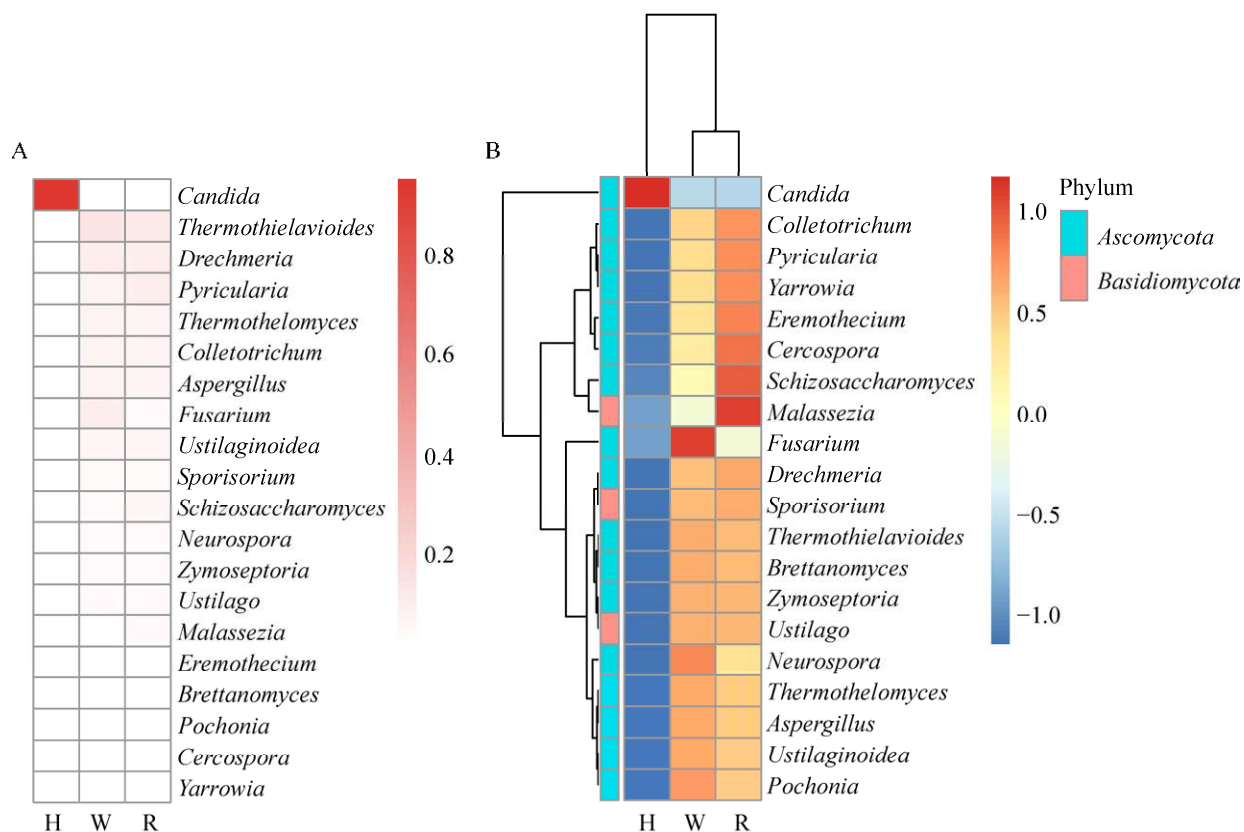


图9 真菌群落优势属(相对丰度前 20)的相对丰度热图 A: 序列百分比值的相对丰度. B: 所有检测样本的属行内缩放, 相对丰度高于平均值为红色, 相对丰度低于平均值为蓝色

Figure 9 Relative abundance heatmap of dominant genera (top 20 in relative abundance) in fungi communities. A: Relative abundance according to sequence percentage value. B: Scaling within genus rows across all examined samples; Relative abundance above average was red, relative abundance below average was blue.

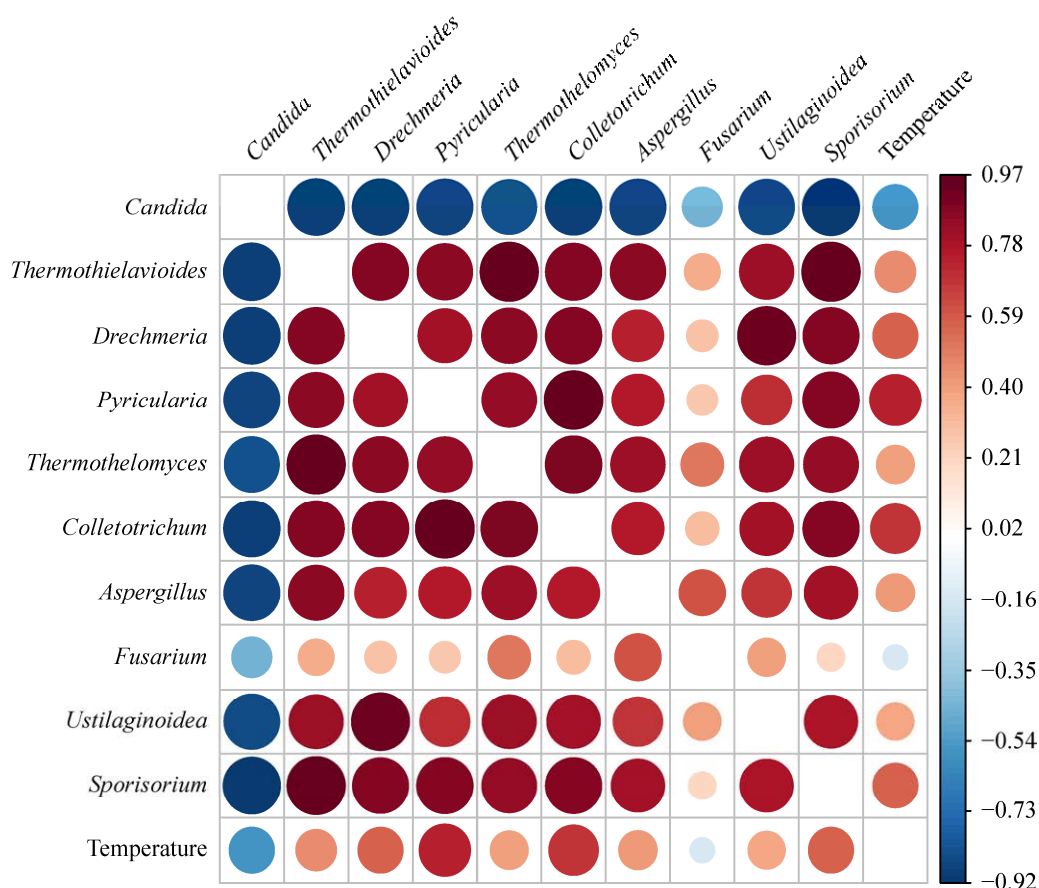


图 10 真菌优势属与温度带年平均温度的相关性图

Figure 10 Correlation plot between the dominant genus of fungi communities and the average annual temperature of temperature zones.

(*Schizosaccharomycetes*) (包括裂殖酵母目 *Schizosaccharomycetales*)、小丛壳目(*Glomerellales*) (包括小丛壳科 *Glomerellaceae*)、线虫草科(*Ophiocordycipitaceae*)、大角间座壳(*Magnaporthales*) (包括巨座壳科 *Pyriculariaceae*)、马拉色菌纲(*Malasseziomycetes*) (从纲到科)、黑粉菌纲(*Ustilaginomycetes*) (从纲到科)和 *Encephalitozoon_romaleae*。散囊菌纲(*Eurotiomycetes*) (包括散囊菌目 *Eurotiales* 和曲霉菌科 *Aspergillaceae*)、毕赤酵母科(*Pichiaceae*)、丛赤壳科(*Nectriaceae*)、粪壳菌纲(*Sordariomycetes*) (包括粪壳菌目 *Sordariales*、粪壳菌科 *Sordariaceae* 和毛壳菌科

Chaetomiaceae) 在温带样品中的丰度更高。酵母菌纲(*Saccharomycetes*)、酵母菌目(*Saccharomycetales*) 和德巴利酵母科(*Debaryomycetaceae*) 在比较组中有显著性差异,且在寒带中的丰度更高。

2.4 COG 基因功能分析

基于 Level 1 层级基因功能分析发现,不同温度带样品中功能基因数目最多的是与新陈代谢(metabolism)相关的基因,该类基因丰度在温带最高。信息存储与处理(information storage and processing)功能的基因数目在温带最低。与细胞信号和进程(cellular processes and signaling)相关的功能基因随温度带纬度升高其丰度也增多(图 12 A)。

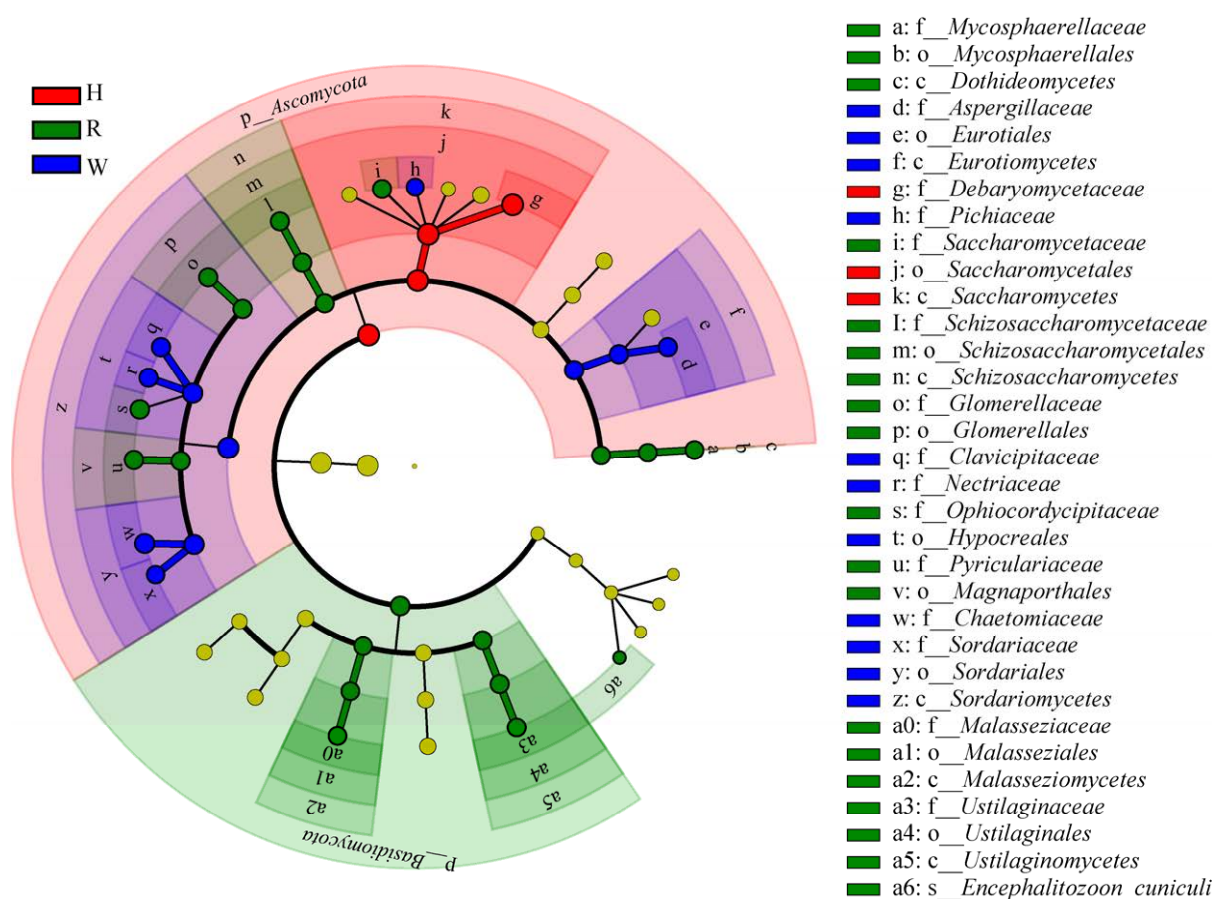


图 11 不同温度带土壤真菌群落差异物种 LEfSe 分析 进化分支图中红色节点代表寒带组各分类级别中丰度更高的物种，绿色节点代表热带组各分类级别中丰度更高的物种，蓝色节点代表温带组各分类级别中丰度更高的物种

Figure 11 LEfSe caldogram of soil fungal communities comparison result between different temperature zones. The red nodes in the evolutionary branching diagram represent species with higher abundance in each taxonomic level of the boreal group, the green nodes represent species with higher abundance in each taxonomic level of the tropical group, and the blue nodes represent species with higher abundance in each taxonomic level of the temperate group.

基于 Level 2 层级基因功能分析发现，注释在 COG 的功能分类共有 24 个，除未知功能外，与复制、重组和修复(replication, recombination and repair)、能量生产和转换(energy production and conversion)、碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism)和转录(transcription)相关的功能基因丰度最高。通过方差分析发现了在不同温度带间具有显著差异的基因功能(图 12B)。其中翻译后修饰、蛋

白质周转、伴侣(posttranslational modification, protein turnover, chaperones)、细胞内运输、分泌和囊泡运输(intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport)和细胞运动(cell motility)相关的功能基因序列随温度带纬度升高呈上升趋势。此外值得注意的是，与 RNA 加工和修饰(RNA processing and modification)、染色质结构和动力学(chromatin structure and dynamics)、细胞骨架(cytoskeleton)、核结构

(nuclear structure)和细胞外结构(extracellular structures)相关的基因功能序列丰度在热带和温带很低,而在寒带显著增高。这些功能可能与微生物适应酷寒、高盐、高辐射等南极极端环境有关。

2.5 KEGG 基因功能分析

对丰度前 20 的已知基因功能进行方差分析,在不同温度带间具有显著差异的基因功能见图 13。通过多重比较发现 3 个温度带两两间均有显著差异,且 ATP 结合盒转运蛋白家族 B 亚科(ATP-binding cassette, subfamily B, bacterial)

的基因功能随着温度带纬度升高呈显著下降趋势。此外,肽/镍转运系统底物结合蛋白(peptide/nickel transport system substrate-binding protein)、ABC-2 型转运系统渗透酶蛋白(ABC-2 type transport system permease protein)、多糖运输系统底物结合蛋白(multiple sugar transport system substrate-binding protein)、多糖转运系统渗透酶蛋白(multiple sugar transport system permease protein)和肽/镍转运系统渗透酶蛋白(peptide/nickel transport system permease protein)基因功能随温度带纬度升高也呈现出下

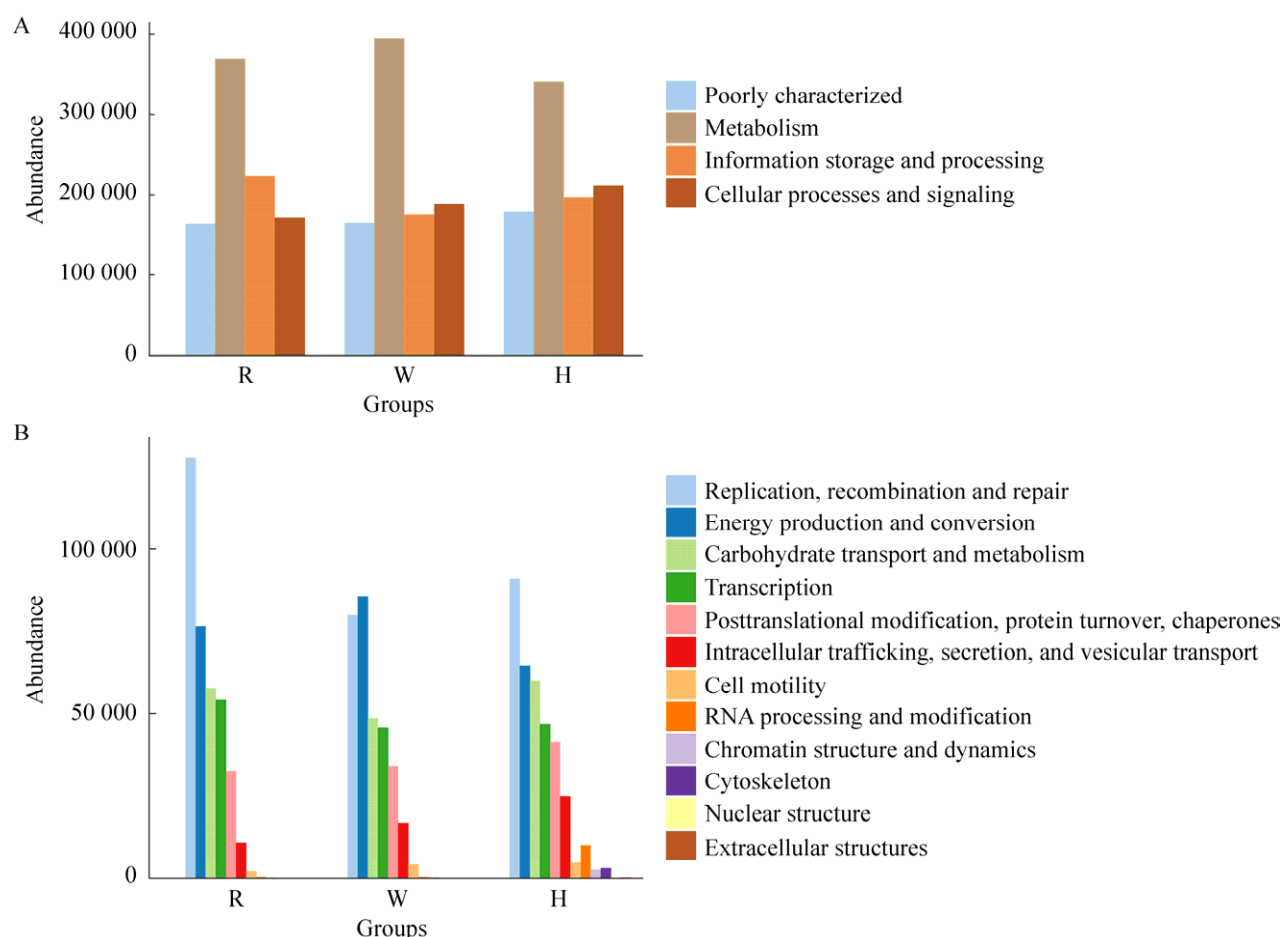


图 12 不同温度带土壤微生物的 COG 功能注释分析 A: Level 1 层级基因功能. B: Level 2 层级基因功能

Figure 12 COG functional annotation analysis of soil microorganisms in different temperature zones. A: Gene function at Level 1. B: Gene function at Level 2.

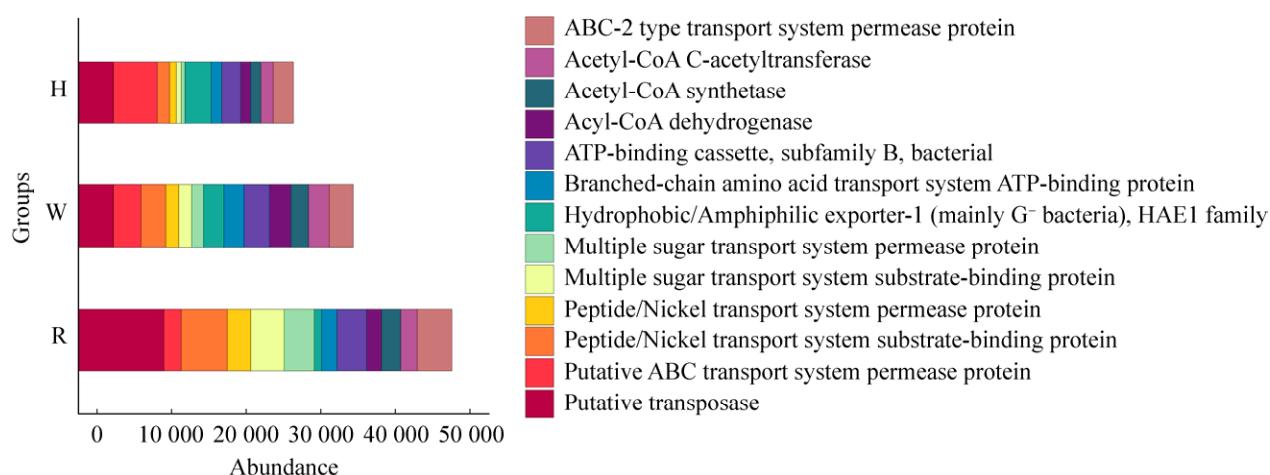


图 13 不同温度带土壤微生物间具有显著差异的 KEGG 功能注释的基因功能

Figure 13 Gene functions of KEGG functional annotations with significant differences among soil microorganisms in different temperature zones.

降趋势，但只在热带和温带、热带和寒带中观察到显著差异。假定的 ABC 运输系统通透蛋白 (putative ABC transport system permease protein) 随着温度带纬度升高呈现显著上升的趋势，并且其在 3 个温度带两两间具有显著差异。假定的转座酶 (putative transposase) 在热带的功能丰度明显高于温带和寒带。

3 讨论与结论

从极地到热带，很多宏观生物 (尤其是植物) 的多样性增加，这种趋势叫纬度的多样性梯度 (latitudinal diversity gradient, LDG)^[26-27]。本研究发现与宏观生物的 LDG 趋势相反，土壤中细菌的物种多样性从热带到温带再到寒带逐步增多；真菌的物种多样性在温带地区达到最高值，向热带和寒带地区，多样性呈下降趋势，并且，寒带土壤中真菌的优势属较为单一。不同温度带的微生物群落除物种多样性存在差异外，物种丰度差异也较大，优势属和特殊属各有不同。

在细菌方面，本研究发现热带样品中的主要分布成员是链霉菌属 (*Streptomyces*)，且其随

着温度带纬度的升高，相对丰度逐渐下降。由此可见，温度对链霉菌属 (*Streptomyces*) 具有很大影响，且其更适合生活在长期温度较高的环境中。另外，相关研究发现链霉菌属 (*Streptomyces*) 是放线菌门在自然界中种类最多的一种^[28]，已知放线菌所产抗生素的 90% 由该属产生。因此，挖掘新的抗生素及其菌株可以优先考虑从热带地区的微生物入手。在温带样品中鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 的相对丰度最大，其在热带样品中相对丰度最小。已知鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 具有降解复杂有机物、利用各种简单分子和耐受极端缺乏营养条件的能力^[29-30]。由此推测，相较于低温、营养匮乏等极端条件，鞘氨醇单胞菌属更难适应长期较高的温度。假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 在寒带样品中的相对丰度最大，且随着温度带纬度的升高，其相对丰度也逐渐升高。已有研究分离出许多假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的适冷菌株，它们能产生不同类型的同工酶，这可能是其适应低温的方式之一^[31]。此外，相关研究发现假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的成员能产生不同的次生代谢产物影响其他细菌、真菌等^[32]。这

有可能是造成寒带地区真菌群落优势菌属单一的原因之一。

在真菌方面, 寒带土壤样品中分布的属主要是假丝酵母属(*Candida*)且占有绝对优势。假丝酵母属(*Candida*)是已发现的适冷微生物, 并且是最普遍存在的适冷酵母^[31]。适冷微生物具有适应低温环境的特殊代谢机制与结构。在低温下, 适冷微生物产生的适冷酶相较于同类的高温酶和中温酶具有更高的柔性, 进而使其在低温下催化效率更高^[33]。此外, 适冷微生物的膜中不饱和脂肪酸含量多且膜的面积大, 这有利于其在低温下膜脂保持液态和吸收更多的营养^[34]。镰刀菌属(*Fusarium*)在温带的相对丰度明显高于热带和寒带, 并且其在热带中的相对丰度高于寒带。相关研究报道镰刀菌属(*Fusarium*)的最适生长温度为 20–30 °C^[35]。由此推测, 相对于长期较高温度, 其更不耐寒。

在 COG 功能方面, 与翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣(posttranslational modification, protein turnover, chaperones)、细胞内运输、分泌和囊泡运输(intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport)和细胞运动(cell motility)相关的基因功能在纬度越高的温度带丰度越大, 这些功能或许在微生物适冷方面具有重要作用。已有相关研究发现, 蛋白质的降解速率在适冷菌中要比中温菌中快得多, 蛋白质的迅速转换能够为新蛋白质的合成迅速提供氨基酸, 是适冷菌节省能量的重要途径^[31]。D'Amico 等^[33]发现适冷酶结构中盐桥、脯氨酸和精氨酸残基的数量较少, 疏水核内芳香环的相互作用减弱, 酶的疏水性弱、亲水性强, 进而使酶与溶剂的相互作用增强。Margesin 等^[36]发现低温能够诱导不饱和脂肪酸合成酶的产生。Gounot 等^[37]发现适冷菌株能够在低温下保持较高的生长速率是使其适冷生长的机制之一。

在 KEGG 功能方面, ATP 结合盒转运蛋白家族 B 亚科的丰度随着温度带纬度升高呈显著下降趋势, 而假定的 ABC 运输系统通透蛋白则呈现出相反的趋势。相关研究发现 ATP 结合盒亚家族 B 成员 1 (ABCB1)在维持细胞代谢能力方面发挥着关键作用, 不仅能够抑制有毒物质进入细胞, 还可将代谢废物带出细胞^[38]。Jones 等^[39]发现温度和养分有效性有助于调节卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)寡肽通透酶(opp)ABC 转运系统。本研究将为热带、温带和寒带土壤微生物动态变化, 以及微生物在不同温度带下的适应机制的相关研究提供数据支持, 同时, 也能够为大尺度土壤微生物多样性地理格局及其形成机制的相关研究提供参考。

REFERENCES

- [1] 杨非一. 中国不同温度带绒泡菌科黏菌物种多样性研究[D]. 吉林: 吉林农业大学硕士学位论文, 2022.
YANG FY. Species diversity of *Physaraceae* under different temperature zones of China[D]. Jilin: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [2] 王凯澄, 赵炯超, 韩桐, 石晓宇, 高真真, 薄晓智, 陈阜, 褚庆全. 基于温度带分区的中国粮食生产格局与热量资源利用效率研究[J]. 作物学报, 2022, 48(7): 1709-1720.
WANG KC, ZHAO JC, HAN T, SHI XY, GAO ZZ, BO XZ, CHEN F, CHU QQ. Research on the grain production pattern and heat resource utilization efficiency based on temperature zone division in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2022, 48(7): 1709-1720 (in Chinese).
- [3] 唐永鏐. 从对全国综合自然区划中所定划分热带指标的意见谈到桂西南热带界线的划分[J]. 地理学报, 1959(6): 460-462.
TANG YL. The delineation of the tropical boundary in southwest Guangxi from the opinion on the index of tropical delineation in the national comprehensive natural zoning[J]. Journal of Geographical Sciences, 1959(6): 460-462 (in Chinese).
- [4] 周淑贞, 张如一, 张超. 气象学与气候学[M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 212.

- ZHOU SZ, ZHANG RY, ZHANG C. Meteorology and Climatology[M]. Third edition. Beijing: Higher Education Press, 1997: 212 (in Chinese).
- [5] 周淑贞, 张如一, 张超. 气象学与气候学[M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 218-219.
- ZHOU SZ, ZHANG RY, ZHANG C. Meteorology and Climatology[M]. Third edition. Beijing: Higher Education Press, 1997: 212 (in Chinese).
- [6] ZHOU J, DENG Y, SHEN L, WEN C, YAN Q, NING D, QIN Y, XUE K, WU L, HE Z, VOORDECKERS JW, NOSTRAND JD, BUZZARD V, MICHALETZ ST, ENQUIST BJ, WEISER MD, KASPARI M, WAIDE R, YANG Y, BROWN JH. Temperature mediates continental-scale diversity of microbes in forest soils[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12083.
- [7] 王健铭. 中国温带荒漠区植物与土壤微生物多样性地理格局及其环境解释[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2019.
- WANG JM. Biogeographical Patterns and its environmental interpretation of plant and soil microbial diversity in temperate desert regions of China[D]. Beijing: Doctoral dissertation of Beijing Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [8] BAHRAM M, HILDEBRAND F, FORSLUND SK, ANDERSON JL, SOUDZILOVSKAIA NA, BODEGOM PM, BENGTSSON-PALME J, ANSLAN S, COELHO LP, HAREND H, HUERTA-CEPAS J, MEDEMA MH, MALTZ MR, MUNDRA S, OLSSON PA, PENT M, PÖLME S, SUNAGAWA S, RYBERG M, TEDERSOO L, BORK P. Structure and function of the global topsoil microbiome[J]. Nature, 2018, 560(7717): 233-237.
- [9] KOU YP, ZHAO WQ, LIU YJ, WU YH, XIAO JT, WANG XH, BING HJ, LIU Q. Diversity patterns and drivers of methanotrophic gene distributions in forest soils across a large latitudinal gradient[J]. Global Ecology and Biogeography, 2021, 30(10): 2004-2015.
- [10] 王慧丽, 江娟. 锯末牛粪堆肥微生物多样性的宏基因组学分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 28-32.
- WANG HL, JIANG J. Metagenomic analysis of microbial diversity in sawdust cow manure compost[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(7): 28-32 (in Chinese).
- [11] 曹宏杰, 倪红伟. 土壤微生物多样性及其影响因素研究进展[J]. 国土与自然资源研究, 2015(3): 85-88.
- CAO HJ, NI HW. Research advances in soil microbial diversity and its impact factors[J]. Territory & Natural Resources Study, 2015(3): 85-88 (in Chinese).
- [12] NAIDOO Y, VALVERDE A, PIERNEEF RE, COWAN DA. Differences in precipitation regime shape microbial community composition and functional potential in Namib Desert soils[J]. Microbial Ecology, 2022, 83(3): 689-701.
- [13] HWANG Y, SCHULZE-MAKUCH D, ARENS FL, SAENZ JS, ADAM PS, SAGER C, BORNEMANN TLV, ZHAO W, ZHANG Y, AIRO A, SCHLOTTER M, PROBST AJ. Leave no stone unturned: individually adapted xerotolerant *Thaumarchaeota* sheltered below the boulders of the Atacama Desert hyperarid core[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 234.
- [14] BISSETT A, FITZGERALD A, COURT L, MEINTJES T, MELE PM, REITH F, DENNIS PG, BREED MF, BROWN B, BROWN MV, BRUGGER J, BYRNE M, CADDY-RETALIC S, CARMODY B, COATES DJ, CORREA C, FERRARI BC, GUPTA VV, HAMONTS K, HASLEM A, et al. Introducing BASE: the Biomes of Australian Soil Environments soil microbial diversity database[J]. GigaScience, 2016, 5: 21.
- [15] SANTOS-MEDELLIN C, ZINKE LA, TER HORST AM, GELARDI DL, PARIKH SJ, EMERSON JB. Viromes outperform total metagenomes in revealing the spatiotemporal patterns of agricultural soil viral communities[J]. The ISME Journal, 2021, 15(7): 1956-1970.
- [16] 李桂秀. 南极土壤微生物多样性初步研究与耐盐相关功能基因筛选[D]. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2019.
- LI GX. Preliminary study on Antarctic soil microbial diversity and screening of functional genes related to salt tolerance[D]. Yantai: Master's Thesis of Yantai University, 2019 (in Chinese).
- [17] URITSKIY GV, DIRUGGIERO J, TAYLOR J. MetaWRAP-a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 158.
- [18] WOOD DE, LU J, LANGMEAD B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2[J]. Genome Biology, 2019, 20(1): 257.
- [19] LU J, BREITWIESER FP, THIELEN P, SALZBERG SL. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data[J]. PeerJ Computer Science, 2017, 3: e104.
- [20] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2014, 30(14): 2068-2069.
- [21] MENON R, GARG G, GASSER RB, RANGANATHAN S. TranSeq annotator: large-scale analysis of transcriptomic data[J]. BMC Bioinformatics, 2012, 13 (Suppl 17):

- 24-30.
- [22] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(1): 59-60.
- [23] 聂志强, 韩玥, 郑宇, 申雁冰, 王敏. 宏基因组学技术分析传统食醋发酵过程微生物多样性[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 198-203.
- NIE ZQ, HAN Y, ZHENG Y, SHEN YB, WANG M. Metagenomic analysis of microbial diversity in the traditional vinegar fermentation process[J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 198-203 (in Chinese).
- [24] XIA F, CHEN X, GUO MY, BAI XH, LIU Y, SHEN GR, LI YL, LIN J, ZHOU XW. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese cordyceps reveals unexpectedly high fungal diversity[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33437.
- [25] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, HUTTENHOWER C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome biology*, 2011, 12(6): R60.
- [26] GREEN J, BOHANNAN BJ. Spatial scaling of microbial biodiversity[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2006, 21(9): 501-507.
- [27] WILLIG MR, KAUFMAN DM, STEVENS RD. Latitudinal gradients of biodiversity: pattern, process, scale, and synthesis[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2003, 34(1): 273-309.
- [28] TADDEI A, RODRÍGUEZ MJ, MÁRQUEZ-VILCHEZ E, CASTELLI C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: morphological and biochemical studies. I[J]. *Microbiological Research*, 2006, 161(3): 222-231.
- [29] 苟敏, 曲媛媛, 杨桦, 周集体, 李昂, 关晓燕, 艾芳芳. 鞘氨醇单胞菌:降解芳香化合物的新型微生物资源[J]. *应用与环境生物学报*, 2008(2): 276-282.
- GOU M, QU YY, YANG H, ZHOU JT, LI A, GUAN XY, AI FF. *Sphingomonas* sp.: a novel microbial resource for biodegradation of aromatic compounds[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008(2): 276-282 (in Chinese).
- [30] 胡杰, 何晓红, 李大平, 刘强. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2007(3): 431-437.
- HU J, HE XH, LI DP, LIU Q. Progress in research of *Sphingomonas*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007(3): 431-437 (in Chinese).
- [31] 陈秀兰, 张玉忠, 高培基. 适冷微生物及其适冷机制研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003(2): 86-90.
- CHEN XL, ZHANG YZ, GAO PJ. Advances in cold-tolerant microorganisms and their cold-tolerant mechanisms[J]. *China Biotechnology*, 2003(2): 86-90 (in Chinese).
- [32] GHEQUIRE MGK, DE MOT R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(4): 523-568.
- [33] D'AMICO S, CLAVERIE P, COLLINS T, GEORLETTE D, GRATIA E, HOYOUX A, MEUWIS MA, FELLER G, GERDAY C. Molecular basis of cold adaptation[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2002, 357(1423): 917-925.
- [34] 张琦, 王志, 何仕武, 季秀玲, 林连兵, 魏云林. 多不饱和脂肪酸对微生物低温适应性的影响[J]. *生命科学*, 2012, 24(1): 58-62.
- ZHANG Q, WANG Z, HE SW, JI XL, LIN LB, WEI YL. Effects of polyunsaturated fatty acids on the cold adaptation of microorganisms[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(01): 58-62 (in Chinese).
- [35] 师雯, 韩铮, 武爱波, 王周平. 温度和 pH 对不同镰刀菌生长及产毒的影响[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(18): 117-122.
- SHI W, HAN Z, WU AB, WANG ZP. Effect of temperature and pH on the growth and mycotoxins production of various *Fusarium* species[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(18): 117-122 (in Chinese).
- [36] MARGESIN R, SCHINNER F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology[J]. *Journal of Biotechnology*, 1994, 33(1): 1-14.
- [37] GOUNOT AM. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms[J]. *Experientia*. 1986, 42(11-12): 1192-1197.
- [38] MORI M, KASA S, ISOZAKI Y, KAMORI T, YAMAGUCHI S, UEDA S, KUWANO T, EGUCHI M, ISAYAMA K, NISHIMURA S, TABATA S, YAMAUCHI N, HATTORI M-A. Improvement of the cellular quality of cryopreserved bovine blastocysts accompanied by enhancement of the ATP-binding cassette sub-family B member 1 expression[J]. *Reproductive Toxicology*, 2013, 35: 17-24.
- [39] JONES MM, MURPHY TF. Expression of the oligopeptide permease operon of *Moraxella catarrhalis* is regulated by temperature and nutrient availability[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(9): 3497-3505.