



申请代码	D0708
接收部门	
收件日期	
接收编号	9195110007



国家自然科学基金 申 请 书

(2019 版)

资助类别：	重大研究计划		
亚类说明：	培育项目		
附注说明：	水圈微生物驱动地球元素循环的机制		
项目名称：	洋底深部真菌反硝化产N ₂ 新途径及原位作用模拟		
申 请 人：	刘常宏	电 话：	025-89685469
依托单位：	南京大学		
通讯地址：	南京市汉口路22号		
邮政编码：	210023	单位电话：	025-89683827/83593827
电子邮箱：	chliu@nju.edu.cn		
申报日期：	2019年01月07日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	刘常宏	性别	男	出生年月	1964年02月	民族	汉族
	学位	博士	职称	教授	每年工作时间（月）		4	
	是否在站博士后	否		电子邮箱	chliu@nju.edu.cn			
	电话	025-89685469		国别或地区	中国			
	个人通讯地址	南京市汉口路22号						
	工作单位	南京大学/生命科学学院						
	主要研究领域	真菌在厌氧生态系统中的作用						
依托单位信息	名称	南京大学						
	联系人	施嵘		电子邮箱	shirong@nju.edu.cn			
	电话	025-89683827/83593827		网站地址	scit.nju.edu.cn			
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	洋底深部真菌反硝化产N ₂ 新途径及原位作用模拟						
	英文名称	New denitrification pathway for N ₂ production and in situ simulation by deep subseafloor fungi						
	资助类别	重大研究计划			亚类说明	培育项目		
	附注说明	水圈微生物驱动地球元素循环的机制						
	申请代码	D0708. 生物地球化学			C010504. 其他环境微生物学			
	基地类别	医药生物技术国家重点实验室						
	研究期限	2020年01月01日 -- 2022年12月31日			研究方向：微生物地球化学			
	申请直接费用	95.0000万元						
中文关键词		生物地球化学循环；洋底真菌；氮素转化过程；反硝化作用；氮循环						
英文关键词		Biogeochemical cycle; Subseafloor fungi; Nitrogen conversion; Denitrification; Nitrogen cycle						



中文摘要	<p>真菌是洋底深部生物圈的主要真核生物，是洋底生态系统食物链的重要一环。由于对其研究起步较晚且纯培养菌株有限，人们对洋底深部真菌多样性、分布及其在驱动元素循环中的作用知之甚少。我们近期研究发现，一株栖息于洋底1.6km深的曲霉具有在厌氧条件下反硝化产N₂能力，完全不同于目前已知的以N₂O为终产物的真菌反硝化过程，但目前尚不清楚该菌株反硝化产N₂机理，也不了解洋底深部是否存在更多的反硝化真菌及其在氮循环中的作用。本项目拟运用多维组学、基因编辑等手段，解析洋底深部曲霉的反硝化作用机理；通过检测已获得的27种69株洋底深部真菌的反硝化能力，阐明洋底深部反硝化真菌的多样性；采用模拟原位环境培养含反硝化真菌的洋底沉积物样品，探究反硝化真菌在驱动洋底深部氮循环中的作用。该项目的实施，不仅有望揭示新的反硝化真菌类群及机理，还可能诠释真菌适应洋底极端环境的新机制，从而提出真菌驱动地球氮循环的研究新方向。</p>
英文摘要	<p>Fungi are the main eukaryotes in deep subseafloor biosphere and an important part of the food chain in the subseafloor ecosystem. Due to the late start of its research and the limited pure culture strains, little is known about the diversity, distribution and the role in driving element cycle of deep subseafloor fungi. Our recent study found that a strain of <i>Aspergillus</i> species inhabiting at a depth of 1.6 km below seafloor has the ability to denitrify and produce N₂ under anaerobic conditions, which is completely different from the currently known denitrifying process of fungi with N₂O as the end product. However, the denitrification mechanism of N₂ production by this strain is not clear, and whether there are more denitrifying fungi and their roles in the deep subseafloor nitrogen cycle remains unknown. This project intends to analyze the denitrification mechanism of <i>Aspergillus</i> sp. in deep subseafloor by means of multi-dimensional omics and gene editing technology. The diversity of denitrifying fungi in deep subseafloor was elucidated by measuring the denitrification ability of 27 deep subseafloor fungal species (69 strains). The sediment samples containing denitrifying fungi were cultured in simulated in-situ environment to investigate the role of denitrifying fungi in driving nitrogen cycle in deep subseafloor environment. The implementation of this project is expected to reveal not only new denitrifying fungi and mechanisms, but also new mechanisms for fungi to adapt to the extreme subseafloor environment, so as to propose a new direction for the study of fungi driving the nitrogen cycle in the earth.</p>



项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	证件号码	每年工作 时间（月）
1	贾舒宇	1988-05-09	女	博士后	博士	南京大学	025-89685469	jiashuyu59@163.com	2*****6	6
2	黄欣	1989-07-06	男	博士生	硕士	南京大学	025-89685469	cyningwong@vip.qq.com	3*****7	10
3	刘璇	1990-12-27	男	博士生	硕士	南京大学	025-89685469	PC1007@126.com	2*****3	10
4	徐慧	1994-11-22	女	博士生	学士	南京大学	025-89685469	xuhuip1@163.com	3*****3	10
5	杨心怡	1995-05-24	女	硕士生	学士	南京大学	025-89685469	15961238806@163.com	3*****5	10
6	冷爽	1996-08-22	女	硕士生	学士	南京大学	025-8968549	351725630@qq.com	3*****1	10
7	郭雨	1994-06-01	女	硕士生	学士	南京大学	025-89685469	gsgysjda@foxmail.com	3*****7	10

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
8	1			1	3	3



国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目编号：9195110007

项目负责人：刘常宏

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
	(1)	(2)
1	项目直接费用合计	95.0000
2	1、设备费	9.8000
3	(1)设备购置费	9.80
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备升级改造与租赁费	0.00
6	2、材料费	22.00
7	3、测试化验加工费	22.10
8	4、燃料动力费	5.70
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	9.50
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	5.50
11	7、劳务费	18.00
12	8、专家咨询费	0.00
13	9、其他支出	2.40



预算说明书（定额补助）

（请按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》的有关要求，对各项支出的主要用途和测算理由，以及合作研究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行必要说明。）

1.设备费，共9.80万元。

- (1) 设备购置费：共9.80万元，用于购买一台由浙江福立分析仪器股份有限公司生产的气相色谱仪。型号为GC-9790plus-EPC。用于该项目研究中气体组分中 N_2 、NO、 N_2O 的分析。
- (2) 设备试制费：0.00万元。
- (3) 设备试制费：0.00万元。

2.材料费，共22.00万元。

- (1) 培养真菌器皿：共3.00万元，包括厌氧瓶、厌氧管、培养皿、三角瓶、冻存管，气体采集袋等。
- (2) 培养真菌材料：共6.00万元，包括 ^{15}N 标记的硝酸钠、亚硝酸钠和氯化铵；葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、琼脂、人工海水、氯霉素和卡那霉素等。
- (3) 常用试剂：共2.00万元，包括乙醇、乙酸、丙酸、硼酸、乙酸乙酯以及DNA marker、 λ DNA/HindIII和蛋白酶K溶液等。
- (4) 厌氧培养及指示试剂：共2.00万元，包括纯氮气和刃天青等。
- (5) DNA/RNA提取试剂盒：共3.00万元，包括基因组DNA提取试剂盒、PCR扩增试剂盒、质粒提取试剂盒和TRIzol RNA提取试剂盒等。
- (6) qRT-PCR扩增试剂盒：共4.00万元，包括THERMOscript One Step qRT-PCR Kit、TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II试剂盒、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR、Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase、RNA Keeper -ICE Tissue Transition Buffer和FastPure Blood DNA Isolation Mini Kit等。
- (7) 标准菌株及质粒的购买：共2.00万元，用于基因敲除。

3.测试化验加工费，共22.10万元。

- (1) 曲霉8L-9-F02全基因组测序：共3.50万元。
- (2) 曲霉8L-9-F02的RNA-Seq分析：共1.20万元，包括36个样品的测序费用【4个含氮培养基培养处理（ NO_3^- ， NH_4^+ ，尿素，无氮），每个处理重复3次，共获得12个样品；每个样品测试费用按1,000元计算，共计1.20万元】。
- (3) 曲霉8L-9-F02的iTRAQ分析：共6.00万元。按照南京大学医药生物技术国家重点实验室iTRAQ标记差异蛋白定量鉴定的收费标准：5,000.00元/样品，12个样品（同上处理），合计6.00万元。
- (4) ^{15}N 的GC-MS检测：共3.40万元【100样品 \times 340元/样品】。



(5) 硝酸盐及亚硝酸盐的离子色谱检测：共2.00万元【100样品×200元/样品】。

(6) 特异性引物的合成、PCR产物及质粒的测序：共6.00万元，用于qRT-PCR，基因敲除等检测。

4.燃料动力费，共5.70万元【平均1度/小时/台×4台×24小时×30天/月×36月×0.55元/度】。主要用于培养箱、摇床、-80℃冰箱、HPLC、实时荧光定量PCR仪、PCR仪、组学分析工作站等的能耗费用。

5.差旅/会议/国际合作与交流费，共9.50万元。

(1) 参加国际会议费用：3.00万元，共3人次，费用包括机票费、交通费和会议注册费等。

(2) 国内学术交流和参加会议费用：4.50万元【5,000元/人次/年×3人次/年×3年】。

(3) 国内外专家来实验室学术交流费用，共2.00万元，拟邀请IODP337航次首席、全球著名的地质微生物学家、日本海洋钻探科学研发中心的Fumio Inagaki教授来实验室进行学术交流。费用包括机票、住宿费、讲课费等。

6.出版/文献/信息传播/知识产权事务费，共5.50万元。

(1) 版面费：共5.00万元，发表3-5篇文章的版面费。

(2) 打印费：共0.40万元，主要用于学生毕业论文打印费、参加学术会议展板的制作费等。

(3) 邮寄费：共0.10万元，实验材料和样品的购买与投递等。

7.劳务费，共18.00万元。

(1) 三位硕士研究生的助研费：共6.00万元【10月/人/年×3人×4年×500元/月】。

(2) 三位博士研究生的助研费：共12.00万元【10月/人/年×3人×4年×1000元/月】。

8.专家咨询费，共0.00万元。

9.其他支出，共2.40万元。

(1) 低值仪器如光学显微镜、离心机、摇床、培养箱、电脑等的维修费用，共1.40万元。

(2) 厌氧培养室等租赁费用，共1.00万元。



报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。
请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。

（一）立项依据与研究内容（5000-10000 字）

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

本项目申请拟开展“洋底深部真菌反硝化产 N_2 新途径及原位作用模拟研究”，符合指南资助研究方向“（一）大洋重要微生物功能类群及其驱动碳氮硫循环的机制”中的“3.典型大洋生境关键功能微生物（群）的代谢新途径及新调控机制”。

1.1 研究意义

氮是重要的生源要素，是支持生命必不可少的元素。氮是海洋初级生产的限制因素，其源汇格局对调控海洋生物泵效率和大气 CO_2 浓度有重要作用^[1]；氮循环过程产生的 N_2O 是重要的温室气体，其温室效应约为 CO_2 的 300 倍，对臭氧层及全球气候变化有重大影响^[2]；氮循环过程形成的铵（氨）态氮和硝态氮对水体和土壤生态系统有重要影响，是水体富营养化和水华爆发的重要诱因^[3]；此外，氮的生物地球化学循环与碳、硫等元素循环相耦联，是整个生物圈最重要的物质和能量循环组成部分^[4]。

经过上百年的研究，目前已基本明确了微生物及其在氮循环中的驱动作用，涉及固氮作用、硝化作用、反硝化作用、厌氧氨氧化作用、异化（亚）硝酸盐还原作用（DNRA）、氨化作用及同化作用等氮转化环节^[4-6]。随着“组学”等分析技术的发展及研究环境的多元化，仍不时有新的微生物类群及新的氮驱动机理被发现，如共生异养固氮蓝细菌（2012）^[7]、氨氧化古菌（2005）^[8]、完全硝化细菌（2015）^[9,10]和氨发酵真菌（2004）^[11]等，体现了微生物及其驱动氮循环过程的复杂性和重要性。发现并揭示新的氮循环驱动微生物类群及其作用机理，是元素生物地球化学循环研究领域的基本课题。

真菌属异养真核生物，是比细菌和古菌进化更高级的微生物类群，广泛分布于地球的不同环境，包括洋底深部环境^[12-15]。大量的研究已证明，真菌在氮转化过程中发挥重要的驱动作用，如硝化作用^[16]、反硝化作用^[17]、异化硝酸盐还原作用^[18,19]、氨发酵作用^[11]等，但其驱动氮转化的机理与细菌或古菌有一定的差别，如在不与其它含氮物质共存的情况下，真菌反硝化作用的终产物为



N_2O ^[4,17,20]。迄今未见真菌反硝化产 N_2 的报道。究其原因,或是真菌在长期的进化过程中丧失了利用(亚)硝酸盐产 N_2 的遗传基础,或是真菌具有至今未被发现的特殊反硝化产 N_2 途径。这一方向的探究仍是一个重要的科学问题。

本项目申请人课题组在研究 IODP337 航次获得的洋底深部煤层相关样品中的可培养真菌时发现,栖息于 1.6 km 深的洋底深部曲霉 (*Aspergillus* sp.) 8L-9-F01 菌株具有在厌氧条件下利用硝酸盐产 N_2 的能力,为完全反硝化菌株(详见“研究基础”部分)。这一发现激励我们思考并希望通过本项目的实施回答如下两个关键科学问题:

①真菌利用硝酸盐/亚硝酸盐产 N_2 的生化过程及基因基础是什么?与反硝化细菌相比异同性如何?

②在深达 1.3~2.5 km 的洋底深部含煤沉积环境,还有哪些真菌具有利用(亚)硝酸盐产 N_2 能力?这些真菌的分布与原位地质环境的关系如何?

这些关键科学问题的回答,不仅有可能发现新的反硝化真菌类群及作用机理,丰富和拓展人类对微生物驱动氮循环机理的认知,还有望从新的角度诠释真菌在洋底极端环境中的生存机理,促进人类对洋底深部生物圈物质与能力循环的了解,具有十分重要的科学意义。

1.2 国内外研究现状及发展动态分析

(1) 微生物是氮循环的主要驱动者,参与了含氮化合物转化的每个环节

氮是最重要的生源要素之一,细胞每利用 100 个碳原子,就会利用 2-20 个氮原子^[21]。微生物是氮循环的主要驱动者,每年约有 350 Tg 的氮气来源于微生物的反硝化作用($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NOO} \rightarrow \text{N}_2$)及厌氧氨氧化作用($\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$),约有 300 Tg 的氮气被固氮微生物固定($\text{N}_2 + 6\text{e}^- + 6\text{H}^+ + \text{nATP} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{nADP} + \text{nPi}$)^[4]。

微生物参与含氮化合物转化的所有环节,涉及 8 种无机氮(NO_3^- 、 NO_2^- 、 NO 、 NH_2OH 、 N_2O 、 N_2 、 N_2H_4 、 NH_4^+)、14 个氧化还原反应和 25 种不同性质的酶(图 1)^[4,22]。其中,羟胺氧化生成 NO ($\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}$)^[23]、 NO 歧化产生 N_2 ($2\text{NO} \rightarrow \text{N}_2$)^[24]、肼合成($\text{NO} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4$)和氧化产 N_2 ($\text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow \text{N}_2$)^[25] 途径以及完全氨氧化产硝酸盐作用^[10]是近年来发现的氮转化新途径。发现和解析驱动含氮化合物转化的新微生物类群及其转化机理,是元素生物地球化学循环领域的基本课题之一。

微生物介导的氮转化途径与环境条件密切相关,固氮及硝化作用主要发生在有氧环境,而反硝化作用、厌氧氨氧化作用以及异化硝酸盐还原作用主要发生在低氧或厌氧环境,是微生物在厌氧环境中获取能量的重要途径之一^[21]。因此,探究以厌氧或乏氧、黑暗、贫营养、高压为显著环境特征的洋底深部生物

圈微生物介导的反硝化作用、厌氧氨化作用及异化硝酸盐还原作用，是“深海钻探计划（1966-1983）”、“大洋钻探计划（1983-2003）”、“综合大洋钻探计划（2003-2013）”、“地圈-生物圈计划（1987-2015）”、“海洋生物地球化学和生态系统综合研究计划（2005-2010）”以及2016年10月我国启动的“水圈微生物驱动地球元素循环的机制”重大研究计划的重要研究内容之一[26]。

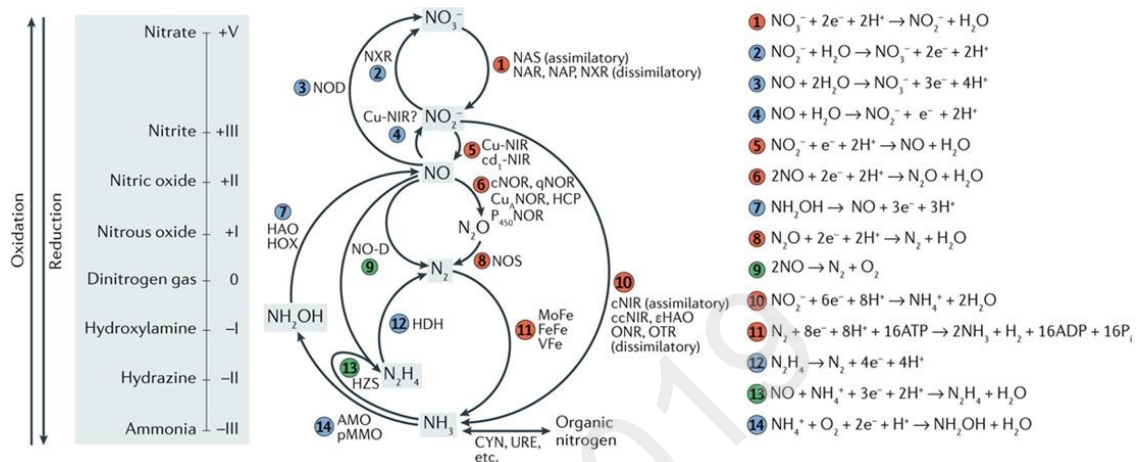


图 1.含氮化合物的微生物转化过程及相应的关键酶^[4]

(2)真菌反硝化途径及作用机理

反硝化作用受微生物类群及环境条件的影响显著，其中，细菌反硝化作用主要通过 NO_3^- 或 NO_2^- 的异化还原生产中间气态产物 NO 、 N_2O 及最终产物 N_2 ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)，分别由结合于质膜内膜的 NO_3^- 还原酶 (Nar) 以及分布于周质空间的 NO_2^- 还原酶 (Nir)、 NO 还原酶 (Nor) 和 N_2O 还原酶 (Nos) 催化完成 (图 1) [4,27,28]。其中， NO_2^- 还原酶基因 *nirS* 与 *nirK* 相对保守，可用于检测环境样品中反硝化菌存在的靶标基因 [29,30]。另外，参与反硝化作用的酶为诱导酶，只有在乏氧或厌氧以及存在硝酸盐 (NO_3^-) 或氮氧化物 (NO_x) 的条件下才能表达 [21,28,31]。

与细菌相比，真菌反硝化作用的研究起步较晚。1991 年 Shoun 和 Tanimoto 首次报道了尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 等真菌具有厌氧或低氧反硝化活性 [32]。经过近 30 年的研究，已证明反硝化真菌普遍存在且多样性丰富，包括子囊菌、接合菌、担子菌以及半知菌等。镰刀菌属 (*Fusarium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、柱孢属 (*Cylindrocarpon*)、毛壳属 (*Chaetomium*)、赤霉属 (*Giberella*)、青霉属 (*Penicillium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 真菌是研究最多的反硝化真菌 [18,33,34]。

已有的研究结果显示，真菌具有类似于细菌的反硝化途径，但其反硝化作用过程、催化反硝化作用的酶、编码基因及其在细胞中的分布均与细菌显著不同 (图 2) [20]：❶所有反硝化真菌都缺少 N_2O 还原酶，部分反硝化真菌缺乏 NO_3^-



还原酶,其主要代谢途径为: $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$,导致最终产物为 N_2O 而非 N_2 ^[17];
② 虽然反硝化真菌 NO_2^- 还原酶 NirK 与细菌 NirK 有很高的同源性,但其催化 NO_2^- 形成 NO 反应发生在线粒体中^[17];
③真菌的 NO 还原酶 Nor 为特有的 P450nor,其在细胞质中直接从 NAD(P)H 接收电子还原 NO 形成 N_2O ^[17,31];
④ 在有其它氮素(如蛋白胨、胺、铵、叠氮化钠、水杨基氧肟酸、羟胺等)存在时,真菌细胞中的异化亚硝酸还原酶将催化亚硝酸盐上的亚硝基转移至这些亲核化合物,形成杂合的 N_2 或 N_2O ,即所谓“共脱氮现象”^[17,18,29]。

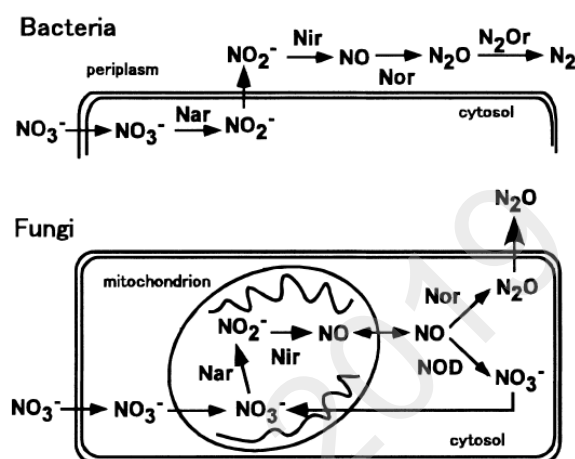


图 2.真菌与细菌反硝化途径比较^[11]

但是上述有关反硝化真菌类群及其反硝化作用机理的认知几乎全部来自于陆地生态系统或海底浅层沉积物中反硝化真菌^[17,18,31,33,34],迄今未见洋底深部环境反硝化真菌类群及其作用机理的研究报道。作为洋底深部生物圈的重要真核生物类群,哪些真菌具有反硝化作用?这些真菌是否具有特殊的反硝化途径及机理?环境因子是否影响该类反硝化真菌的多样性及分布?这些关键科学问题的回答,对人类了解洋底深部生物圈真菌的生存机理、分布及其在驱动氮地球化学循环中的作用具有重要意义。

(3)真菌是洋底生态系统的重要组成部分,具有特殊的反硝化途径

大洋是海洋的主体,约占地球表面积的 50%。自从 2002 年首次以探究深部生物圈为主要目标的大洋钻探计划 (ODP) Leg201 航次以来,已证明洋底蕴含着一个庞大的微生物生态系统,对地球物质和能量循环起着重要作用^[35]。据估计,洋底深部环境的微生物约 10^{29} 个,约占全球微生物数量的三分之一,生物碳约 4 Pg, 占全球总生物碳的 0.18-3.6%^[36,37]。由于基本不受海水对流的影响,洋底深部环境相对稳定,为特殊的厌氧、高压、黑暗、贫营养环境^[38,39]。过去一般认为,其中的微生物已处于维持正常生命的能量需求极限^[40],代谢活性极低^[41]或处于休眠状态^[42]。但科学大洋钻探计划的研究发现,洋底深部环境不但拥有大量的微生物资源^[38,44],包括一些新的微生物类群^[12,13],而且有些微生物具有特殊的环



境适应机制，构成了独特的洋底生态系统^[12-14,36,44]。

2004 年 Raghukumar 等^[45]首次报道从印度洋查戈斯群岛海沟 3.7 mbsf 深的沉积物中分离获得 3 株喜多氏曲霉 (*Aspergillus sydowii*)，揭开了人们探索洋底深部真菌的序幕。经过 10 多年的研究，科学家已获得大量分布于不同洋底环境的可培养真菌菌株^[12,14,15,46]。即使在深达近 2.5 km、温度近 60°C 的洋底沉积环境，仍然有原核微生物和可培养真菌的分布^[14,15,47]。DNA/rRNA^[48]和 mRNA^[15,47]的组学分析结果均显示，洋底深部真菌不仅多样性丰富，分布广泛，而且具有特殊的代谢活性及应对洋底极端环境的进化机制^[15,37,50]，如在 20 MPa 的静水压力下孢子能够正常萌发，菌丝能够正常生长^[51]。即使在压力高达 200 MPa 的条件下，洋底深部酿酒酵母仍可存活^[52]。

虽然已有研究表明真菌广泛分布于各种洋底深部环境，但由于获得的纯培养菌株较少，尚不清楚这些真菌在洋底极端环境下的生长、代谢和生理特性及生态学作用。2017 年，Trembath-Reichert 等^[53]采用 ¹³C 和 ¹⁵N 标记底物的模拟原位培养实验及 SIP-NanoSIMS 检测技术，研究了 IODP337 航次样品中原核微生物的代谢活性及代时，证明来源于 2 km 深的洋底煤层 (15R-3, 1921 mbsf) 和页岩 (8L-4, 1606 mbsf) 样品中的原核微生物具有利用甲基化底物的能力，包括甲胺和甲醇，但代时达数年之久。巧合的是，在同样的煤层和页岩样品中，我们也分离到可培养真菌^[15]。那么，这些真菌是否具有类似于原核微生物的代谢活性？其生态生理学功能如何？这些问题均有待深入探究。

鉴于氮是重要的生源要素，同时考虑到洋底深部为天然的厌氧或乏氧环境，项目申请人课题组对从 IODP337 航次洋底深部样品中分离获得的 7 种真菌进行了反硝化作用检测。结果发现，在以 ¹⁵NO₃⁻ 为唯一含氮底物（以避免共脱氮现象）的液体厌氧培养条件下（21 天），一株分离自 1.6 km 深、中新世的曲霉 (*Aspergillus* sp.) 8L-9-F02 菌株能够产生 ¹⁵N₂，为完全反硝化产 N₂ 真菌（详见“研究基础”部分）。为排除反硝化原核微生物的污染，我们对培养液和菌丝 DNA 进行了针对原核微生物核糖体 RNA 基因的 PCR 扩增分析，结果显示，培养体系中无原核微生物的存在，表明此反硝化产 N₂ 反应确由实验真菌所致。这一发现提示，洋底深部环境可能存新的反硝化真菌类群及新的反硝化作用机制。

本项目拟在前期探索的基础上，以洋底深部真菌 8L-9-F02 菌株为研究对象，运用多维组学、同位素示踪、基因编辑等手段，研究该菌利用 NO₃⁻ 产 N₂ 的新反硝化途径及机理；探究了洋底深部环境反硝化真菌多样性、分布特性及其在原位氮转化中的作用，揭示真菌在驱动洋底厌氧生态系统中氮循环中的作用及意义。



参考文献

- [1] Zehr JP, Ward BB. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68: 1015-1024.
- [2] Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 2009, 326: 123-125.
- [3] Tiwari PK, Sasmal SK, Misra AK, et al. Effects of fertilizers used in agricultural fields on algal blooms. *Eur Phys J-Spec Top* 2017, 226: 2119-2133.
- [4] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* 2018, 16: 263-276.
- [5] 王朱琨, 王尚, 刘洋荧等. 宏基因组技术在氮循环功能微生物分子检测研究中的应用. *生物技术通报* 2018, 34: 1-14.
- [6] 杨雪琴, 连英丽, 颜庆云等. 滨海湿地生态系统微生物驱动的氮循环研究进展. *微生物学报* 2018, 58: 633-648.
- [7] Thompson AW, Foster RA, Krupke A, et al. Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* 2012, 337: 1546-1550.
- [8] Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 2005, 437: 543-546.
- [9] Daims H, Lebedeva EV, Pjevac P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 2015, 528: 504-509.
- [10] van Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, et al. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 2015, 528: 555-559.
- [11] Takasaki K, Shoun H, Yamaguchi M, et al. Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. *J Biol Chem* 2004, 279: 12414-12420.
- [12] Rédou V, Navarri M, Meslet-Cladière L, et al. Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81: 3571-3583.
- [13] Orsi WD, Richards TA, Santoro AE. Cellular maintenance processes that potentially underpin the survival of sub-seafloor fungi over geological timescales. *Estuar Coast Shelf S* 2015, 164:1-9.
- [14] Nagano Y, Konishi M, Nagahama T, et al. Retrieval of deeply buried culturable fungi in marine subsurface sediments, Suruga-Bay, Japan. *Fungal Ecol* 2016, 20: 256-259.
- [15] Liu CH, Huang X, Xie TN, et al. Exploration of cultivable fungal communities in deep coal-bearing sediments from ~1.3 to 2.5 km below the ocean floor. *Environ Microbiol* 2017, 19: 803-818.
- [16] Zhu T, Meng T, Zhang J, et al. Fungi-dominant heterotrophic nitrification in a subtropical forest soil of China. *J Soil Sediment* 2015, 15: 705-709.
- [17] Shoun H, Fushinobu S, Jiang L, et al. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012, 367: 1186-1194.
- [18] 黄灿, 何清明, 邬红东, 等. 真菌异化硝酸盐还原机理的研究进展. *微生物学通报* 2009,



- 36: 1052-1057.
- [19] Stief P, Fuchs-Ocklenburg S, Kamp A, et al. Dissimilatory nitrate reduction by *Aspergillus terreus* isolated from the seasonal oxygen minimum zone in the Arabian Sea. BMC Microbiol 2014, 14: 35.
- [20] Takaya N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. J Biosci Bioeng 2002, 94: 506-510.
- [21] Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. Science 2010, 330: 192-196.
- [22] Stein LY, Klotz MG. The nitrogen cycle. Curr Biol 2016, 26: R94-R98.
- [23] Caranto JD, Lancaster KM. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. Proc Natl Acad Sci USA 2017, 114: 8217-8222.
- [24] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. Nature 2010, 464: 543-548.
- [25] Kartal B, Maalcke WJ, de Almeida NM, et al. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. Nature 2011, 479: 127-130.
- [26] 黄力, 冯雪莲, 杜全生, 等. 水圈微生物重大研究计划: 聚焦水圈微生物组研究的核心科学问题. 中国科学院院刊 2017, 32: 266-272.
- [27] Cathrine SJ, Raghukumar C. Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. Mycol Res 2009, 113(Pt 1):100-109.
- [28] Torres MJ, Avila S, Bedmar EJ, et al. Overexpression of the periplasmic nitrate reductase supports anaerobic growth by *Ensifer meliloti*. FEMS Microbiol Lett 2018, 365(7).
- [29] Long A, Song B, Frیدی K, et al. Detection and diversity of copper containing nitrite reductase genes (*nirK*) in prokaryotic and fungal communities of agricultural soils. FEMS Microbiol Ecol 2015, 91: 1-9.
- [30] Heylen K, Gevers D, Vanparys B, et al. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. Environ Microbiol 2006, 8: 2012-2021.
- [31] Xu X, Liu X, Li Y, et al. High temperatures inhibited the growth of soil bacteria and archaea but not that of fungi and altered nitrous oxide production mechanisms from different nitrogen sources in an acidic soil. Soil Biol Biochem 2017, 107: 168-179.
- [32] Shoun H, Tanimoto T. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P450 in the respiratory nitrite reduction. J Biol Chem 1991, 266: 11078-11082.
- [33] Wankel SD, Ziebis W, Buchwald C, et al. Evidence for fungal and chemodenitrification based N₂O flux from nitrogen impacted coastal sediments. Nat Commun 2017, 8: 15595.
- [34] 何高阳, 徐炜, 郭双双等. 雅浦海沟深海沉积物可培养真菌多样性及其反硝化能力研究. 应用海洋学学报 2018, 37: 229-240.
- [35] Wasmund K, Mußmann M, Loy A. The life sulfuric: microbial ecology of sulfur cycling in marine sediments. Environ Microbiol Rep 2017, 9: 323-344.
- [36] Hoshino T, Inagaki F. Abundance and distribution of Archaea in the subseafloor sedimentary biosphere. ISME J 2019, 13: 227-231.
- [37] Inagaki F, Taira A. Future opportunities in scientific ocean drilling: Illuminating planetary



- habitability. *Oceanography* 2019, 32: 212-216.
- [38] Inagaki F, Hinrichs KU, Kubo Y, et al. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science* 2015, 349: 420-424.
- [39] Parkes RJ, Cragg BA, Bale SJ, et al. Deep bacterial biosphere in Pacific ocean sediments. *Nature* 1994, 371: 410-413.
- [40] Hoehler TM, Jørgensen BB. Microbial life under extreme energy limitation. *Nat Rev Microbiol* 2013, 11: 83-94.
- [41] D'Hondt S, Jørgensen BB, Miller DJ, et al. Distributions of microbial activities in deep sub-seafloor sediments. *Science* 2005, 306: 2216-2221.
- [42] Lomstein BA, Langerhuus AT, D'Hondt S, et al. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment. *Nature* 2012, 484: 101-104.
- [43] 王风平, 陈云如. 深部生物圈研究进展与展望. *地球科学进展* 2017, 32: 1277-1286.
- [44] D'Hondt S, Inagaki F, Orcutt BN, et al. IODP advances in understanding of subseafloor life. *Oceanography* 2019, 32: 198-207.
- [45] Raghukumar C, Raghukumar S, Sheelu G, et al. Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench. *Indian Ocean Deep-Sea Res I* 2004, 51: 1759-1768.
- [46] Zhang XY, Tang GL, Xu XY, et al. Insights into deep-sea sediment fungal communities from the East Indian Ocean using targeted environmental sequencing combined with traditional cultivation. *PLoS One* 2014, 9: e109118.
- [47] Fang J, Kato C, Runko GM, et al. Predominance of viable spore-forming piezophilic bacteria in high-pressure enrichment cultures from ~1.5 to 2.4 km-deep coal-bearing sediments below the ocean floor. *Front Microbiol* 2017, 8: 137.
- [48] Rédou V, Ciobanu MC, Pachiadaki MG, et al. In-depth analyses of deep subsurface sediments using 454-pyrosequencing reveals a reservoir of buried fungal communities at record-breaking depths. *FEMS Microbiol Ecol* 2014, 90: 908-921.
- [49] Orsi W, Edgcomb V, Christman G, et al. Gene expression in the deep biosphere. *Nature* 2013, 499: 201-205.
- [50] 刘常宏, 蔡晓琛. 海底深部生物圈真菌的研究现状. *地球与环境* 2013, 41: 406-409.
- [51] Damare SR, Nagarajan M, Raghukumar C. Spore germination of fungi belonging to *Aspergillus*, species under deep-sea conditions. *Deep-Sea Res Pt I* 2008, 55: 670-678.
- [52] Fernandes PMB, Domitrovic T, Kao CM, et al. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett* 2008, 556(1-3): 153-160.
- [53] Trembath-Reichert E, Morono Y, Ijiri A, et al. Methyl-compound use and slow growth characterize microbial life in 2-km-deep subseafloor coal and shale beds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017, 114: 9206-9215.



2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）

本项目申请符合指南资助研究方向“（一）大洋重要微生物功能类群及其驱动碳氮硫循环的机制”中的“3.典型大洋生境关键功能微生物（群）的代谢新途径及新调控机制”。

2.1 研究目标

- (1) 阐明洋底深部曲霉 8L-9-F02 菌株在厌氧条件下转化 NO_3^- 产 N_2 新机制。
- (2) 揭示洋底厌氧生态系统中反硝化真菌多样性、分布及其在驱动氮地球化学循环中的作用。

2.2 研究内容

(1) 真菌反硝化产 N_2 新途径及影响因素

采用以 $^{15}\text{NO}_3^-$ 为唯一氮源的厌氧培养体系，通过检测培养过程中培养液中 NO_3^- 和 NO_2^- 以及顶空气体中 ^{15}NO 、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 和 $^{15}\text{N}_2$ 含量随培养时间的变化，研究曲霉 8L-9-F02 反硝化产 N_2 过程；通过检测不同电子供体、电子受体以及培养条件对曲霉 8L-9-F02 菌株生长及产 N_2 水平的影响，探究调控真菌生长与完全反硝化作用的环境因素。

(2) 真菌反硝化产 N_2 功能基因的鉴定

利用 Illumina 高通量测序平台，完成曲霉 8L-9-F02 菌株的全基因组测序，预测该菌反硝化产 N_2 相关基因；比较曲霉 8L-9-F02 菌株在含 NO_3^- 、 NH_4^+ 、尿素与不含氮四种培养基中生长的转录组和蛋白质组差异，进一步解析该菌反硝化产 N_2 途径、酶及基因；利用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术及 qRT-PCR 检测技术，验证反硝化功能基因及其编码蛋白的催化活性；揭示曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化产 N_2 的遗传基础；通过构建反硝化作用功能基因及 ITS 序列系统进化树，阐明反硝化真菌的演化过程。

(3) 洋底深部环境反硝化真菌类群的发掘及其地质分布

采用以 ^{15}N 标记的 NO_3^- 或 NO_2^- 为唯一氮源的培养技术，检测实验室拥有的 27 种 69 株洋底深部真菌的反硝化作用能力（部分已完成）；在排除细菌和古菌污染的条件下，揭示各反硝化真菌反硝化作用的生化过程及遗传基础；探究反硝化真菌类群及其与洋底地质环境之间的关系。

(4) 反硝化真菌的原位作用模拟研究

利用采气厌氧反应器（见“研究方法”部分），在模拟原位环境（压力除外）的条件下，培养已从中分离获得反硝化真菌的不同洋底沉积物样品，通过比较



灭菌处理样品、不灭菌样品和不灭菌但添加抗生素样品的产 NO_2 和 N_2 能力，揭示真菌在洋底深部原位环境氮循环中的潜在作用。

2.3 拟解决的关键科学问题

(1) 洋底真菌利用 NO_3^- 产 N_2 新途径及相关的酶/基因？

前期证实洋底真菌—曲霉 8L-9-F02 菌株具有在厌氧条件下利用 NO_3^- 产 N_2 新途径，然而，目前尚不清楚该菌催化 NO_3^- 到 N_2 的生化过程，例如，是否与反硝化细菌类似，即： $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ，或者具有新的途径。是本项目申请拟解决的关键科学问题之一。

(2) 洋底深部环境反硝化真菌多样性及其与地质因子的关系？

真菌是洋底深部生态系统的优势真核生物类群。我们的前期研究也证明洋底深部真菌类群及其分布与环境因子有关。除少数真菌垂直分布跨度较大外，大部分真菌只局限于某一特定的地质层。那么，不同地质环境是否具有不同的反硝化真菌？不同的反硝化真菌是否具有不同的反硝化能力和途径？反硝化真菌的类群、分布与其环境因子的关系如何？这些问题是本项目申请拟解决的另一关键科学问题。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）

3.1 研究方法

(1) 真菌反硝化产 N_2 新途径及影响因素研究方法

①培养基： H_3BO_3 17.26 mg, MgSO_4 4.17 g, KBr 96.2 mg, Na_2SO_4 642.5 mg, $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ 0.8 g, NaNO_3 0.8 g, 葡萄糖 12 g, 刃天青 0.001 g（厌氧指示剂），pH 调至 7，加蒸馏水定容至 1000 ml。

②培养方法：100 mL 的厌氧培养瓶，含培养基 30 mL，灭菌后接种一定量的菌丝或菌球，同时设置不接种真菌的空白对照（CK），重复 3-5 瓶；通过向厌氧瓶中充高纯氮气去氧；30℃培养箱中黑暗静置培养。

③反硝化途径的测定：采用上述培养基及培养方法，接种曲霉 8L-9-F02 菌株于厌氧培养瓶中，定期抽取培养瓶中的顶空气体，按照艾国民等（2011）^[1]提出的 ^{15}N 标记的微生物离体反硝化作用鉴定与确定方法和程序【主要包括：混合气体中氮同位素比的 GC-IRMS 分析和目标化合物的 GC-MS 选择离子模式（SIM）筛查】，检测混合气体中的 ^{15}NO 、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 和 $^{15}\text{N}_2$ 含量。

另外，从培养瓶中采集 5 ml 培养液，过滤获得菌体，称重；滤液过氢柱后用于离子色谱分析，测定培养液中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NO}_2^-$ 的含量^[2]。

根据不同取样时间培养体系中各含氮化合物种类及含量的变化，研究



8L-9-F02 菌株的反硝化途径及能力。

根据菌体生物量、 NO_3^- 的消耗量、 NO 、 N_2O 和 N_2 的产生量，测定曲霉 8L-9-F02 菌株的反硝化作用过程及能力。

④影响因子的研究：采用改变培养基(①)中电子供体(乙酸、乙醇、丙酮、木质素等)、电子受体(SO_4^{2-} 、 SO_3^{2-} 等)、含氮物质(NH_4^+ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 等)以及金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等)的方法，在相同培养条件下(②)，通过检测顶空气体中 N_2 的含量，研究影响 8L-9-F02 菌株反硝化产 N_2 的影响因子。

在保持培养基及接种条件不变的前提下，通过改变培养条件(氧气含量、温度、pH)下产 N_2 能力的检测，研究影响 8L-9-F02 反硝化作用的环境因子。

(2) 真菌反硝化产 N_2 功能基因的鉴定

①基因组学分析：以分离自洋底 1.6 km 深页岩中的曲霉 8L-9-F02 菌株为研究材料，利用真菌基因组提取试剂盒获取全基因组样本，送至基因测序公司进行基于 Illumina 高通量测序平台的全基因组测序；参照目前 NCBI 上已公布的曲霉基因组信息，构建出完整的基因组信息构架；结合生物信息学技术对基因组结构和功能基因进行划定和定义；参照 KEGG 和 NCBI 库中的相关功能基因数据，进行生物信息比对，预测该菌基因组中参与 NO_3^- 转化形成 N_2 途径中的可能基因。

②RNA-Seq 和 iTRAQ 分析：以(1)①培养基为基础，制备只含 $^{15}\text{NO}_3^-$ 、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 、尿素和无氮四个不同的含氮培养基；采用与(1)②相同的培养条件，接种和厌氧培养 8L-9-F02 菌株，各处理重复 3 次；根据(1)⑤培养时间与产 N_2 的关系，确定菌体收集时间，同时测定培养瓶顶空气体中 N_2 含量。所得菌体样品立即放于液氮中保存，一部分样品送至测序公司进行 RNA-Seq 分析，包括 RNA 的提取和 mRNA 的分离、反转录、文库构建、测序和生物信息学分析；另一部分样品用于 iTRAQ 分析，包括蛋白质提取、胰蛋白酶酶切、iTRAQ 试剂标记及液质联用检测及分析^[3]。

综合基因组预测结果、转录组和蛋白质组分析结果以及 KEGG 和 NCBI 中反硝化相关基因信息，初步确定 8L-9-F02 菌株反硝化产 N_2 途径、酶及编码基因。

③反硝化相关基因的验证和确定：利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，对(2)②中获得的候选反硝化功能基因进行逐一敲除，再以 $^{15}\text{NO}_3^-$ 为唯一氮源，结合 N_2 的色谱分析，验证被敲除基因的功能。最后，利用 qRT-PCR 扩增技术^[3]，定量分析各基因在反硝化过程中的表达差异。

④反硝化真菌的系统演化分析

根据曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化作用中各相关基因的序列，利用生物信息学分析工具，分别构建基于反硝化作用相关酶编码基因及 ITS 序列的系统进化树



[4], 揭示洋底深部反硝化真菌的系统演化过程。

(3) 洋底深部环境反硝化真菌类群的发掘及其地质分布

①洋底深部反硝化真菌的筛选：采用(1)①②③相同的培养基、培养方法及气体检测方法，评估实验室拥有的 27 种 69 株洋底深部真菌利用（亚）硝酸盐产 N_2 或 N_2O 的能力^[5]，发掘更多的反硝化真菌种类（部分已完成）。

②反硝化细菌和古菌污染的排除：针对细菌和古菌 16S rRNA 基因以及反硝化作用关键酶基因 *nirK* 和 *p450nor*，采用 PCR 特异性扩增的方法，检测反硝化实验体系（培养液和菌体）中是否受到反硝化细菌和古菌的污染。特异性引物分别为 27F/1429R（细菌）^[6]、Arch21F/Arch958R（古菌）^[7]、*nirK*-F/*nirK*-R（*nirK*）和 P450nor-F/P450nor-R（P450nor）^[8]。根据 PCR 扩增产物的有无，判断是否受到反硝化细菌和古菌的污染。阳性对照为纯培养的反硝化真菌尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）和反硝化假单胞菌（*Pseudomonas denitrificans*），阴性对照为无菌水。

此外，所有样品均进行针对真菌 ITS 的 PCR 扩增，引物为 ITS1/ITS4^[9]，进一步反映实验结果的可靠性。

③反硝化真菌代谢途径及功能基因分析：采用与(1)③相同的方法，分析各反硝化真菌的（亚）硝酸盐转化途径。另外，利用(2)获得的反硝化相关功能基因，设计特异性引物，经 PCR 或 qRT-PCR 扩增，验证是否存在相应的功能基因。

④洋底深部反硝化真菌垂直分布与地质环境因子关系分析：

利用 IODP337 航次获得的不同深度沉积物样品的地质环境参数^[10]，采用 RDA 或 PCA 分析方法，研究反硝化真菌在洋底深部的垂直分布与其栖息环境之间的关系。

(4) 反硝化真菌的原位作用模拟研究

样品的准备：样品为已获得反硝化真菌的洋底沉积物样品^[5]，每个样品于无菌厌氧培养箱中研碎成粉，然后分成 3 份，一份采用高压蒸汽灭菌，杀死样品中所有的微生物，为空白对照；另一份培养时添加 500 mg/L 的氯霉素和 500 mg/L 的红霉素^[5]，通过抑制细菌生长，探究原位环境真菌的反硝化作用；第三份不做任何处理，用于原位环境细菌、古菌和真菌联合反硝化作用的研究。

培养液的制备：按原位沉积环境的离子种类和强度^[5]配制，另外添加 0.15 g/L 的 $^{15}NO_3^-$ 或 $^{15}NO_2^-$ 。

培养方法：在厌氧培养箱中，将样品溶解于适量培养液中，浸泡海绵球 30 min；然后将海绵球放入采气厌氧反应器（图 3），充氮气去氧，每一份样品重复 9 次，在原位温度下黑暗培养。



图3.采气厌氧反应器



根据气袋膨胀情况,判断产气量。

检测方法:实验过程共取样3次;采用(1)⑤的检测方法,计算不同培养时间反硝化产 N_2O 或 N_2 的能力。最后,通过比较四个处理之间的反硝化作用差异,研究真菌在洋底深部环境氮循环中的作用及相对贡献。

参考文献

- [1] 艾国民, 郑海燕, 张敏, 等. ^{15}N -标记的气相色谱-同位素比质谱与气相气谱-质谱联用鉴定微生物反硝化作用. 分析化学 2011, 39: 1141-1146.
- [2] Kartal B, Koleva M, Arsov R, et al. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. J Biotechnol 2006, 126: 546-553.
- [3] Latosinska A, Vougas K, Makridakis M, et al. Comparative analysis of label-free and 8-Plex iTRAQ approach for quantitative tissue proteomic analysis. PLoS One 2015, 10: e0137048.
- [4] Stolz JF, Basu P. Evolution of nitrate reductase: molecular and structural variations on a common function. Chembiochem 2002, 3: 198-206.
- [5] Liu CH, Huang X, Xie TN, et al. Exploration of cultivable fungal communities in deep coal-bearing sediments from ~1.3 to 2.5 km below the ocean floor. Environ Microbiol 2017, 19: 803-818.
- [6] Dong JD, Shi FH, Li H, et al. SSU rDNA sequence diversity and seasonally differentiated distribution of nanoplanktonic ciliates in neritic Bohai and Yellow Seas as revealed by T-RFLP. PLoS One 2014, 9: 602-640.
- [7] Tiquia SM. Microbial community dynamics in manure composts based on 16S and 18S rDNA T-RFLP profiles. Environ Technol 2005, 26: 1101-1113.
- [8] 何高阳, 徐炜, 郭双双, 等. 雅浦海沟深海沉积物可培养真菌多样性及其反硝化能力研究. 应用海洋学学报 2018, 37: 229-240.
- [9] Lindner D, Banik M. Intra-genomic variation in the ITS rDNA region obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus *Laetiporus*. Mycologia 2011, 103: 731-740.
- [10] Inagaki F, Hinrichs KU, Kubo Y, et al. Deep coal-bed biosphere off Shimokita: microbial processes and hydrocarbon system associated with deeply buried coal-bed in the ocean. IODP Prel Rept 337. 2012, http://publications.iodp.org/preliminary_report/337/337pr_2.htm.

3.2 技术路线

首先,利用稳定同位素标记底物的反硝化作用过程检测方法,结合基因组学、转录组学和蛋白质组学分析技术,解析曲霉 8L-9-F02 菌株转化 NO_3^- 产 N_2 途径、功能酶及基因。

其次,针对实验室拥有的27种69株洋底深部真菌及其栖息地沉积物样品,采用以 ^{15}N 标记的 NO_3^- 或 NO_2^- 为唯一氮源的液体厌氧培养及GC-MS检测技术,甄别洋底深部反硝化真菌,结合反硝化真菌栖息地的地质环境参数,揭示洋底深部真菌的垂直分布及其与生境因子的关联性。



第三，采用模拟原位环境条件的培养基技术，通过检测反硝化真菌栖息地沉积物样品的产 N_2O 或 N_2 能力，探究反硝化真菌在洋底深部环境元素地球化学循环中的作用及生态学意义。

技术路线见图 4：

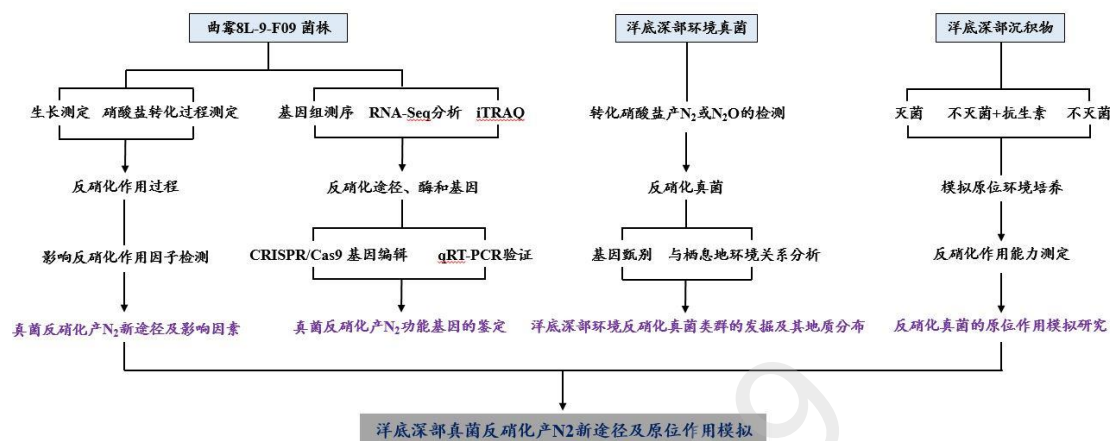


图 4. 技术路线

3.3 可行性分析

(1) 已拥有该项目研究需要的独特研究材料

项目申请人全程参与了 IODP337 航次（2012）的船上和后续研究，已获得了本项目研究所需要的所有材料（Liu et al. 2017），包括：①1.3~2.5 km 深 47 个核心洋底沉积物样品；②洋底深部可培养真菌，共 27 种 69 株；③具有反硝化产 N_2 的纯培养真菌—曲霉 8L-9-F02 菌株。

这些洋底深部沉积物样品、可培养真菌及反硝化产 N_2 曲霉菌株，是本项目必需且独特的研究材料。

(2) 研究方法成熟、研究团队相关研究经验丰富

本项目涉及的方法主要有：真菌反硝化作用生化过程的检测；影响真菌反硝化作用因子的分析；真菌生物学和分子生物学的研究；真菌基因组、转录组和蛋白质组学分析；反硝化真菌原位作用模拟实验。这些方法均有大量的文献报道，而且项目申请人实验室长期从事微生物的分离与鉴定、遗传基础、代谢途径、分子生物学、生态学功能及组学等研究，积累了丰富的研究经验，发表了多篇相关技术和研究成果的学术论文（Huang et al. 2018; Kang et al. 2018; Liu et al. 2017; Cai et al. 2016, 2017; 郑红叶等 2017）。

(3) 国际合作紧密，有助于难点问题的解决

项目研究团队已与本领域国际知名地质微生物学家、日本海洋钻探科学研发中心的 Inagaki F 教授、德国不来梅大学的 Hinrichs K-U 教授以及瑞士苏黎世联邦理工学院地质微生物学家 Lever MA 教授等建立了紧密的合作关系，已联合



在 Science (2015) 和 Environmental Microbiology (2017) 上发表了 2 篇相关论文。

(4) 研究平台及硬件条件好

项目申请人所在的南京大学生命科学学院分子与应用微生物实验室, 长期从事微生物相关研究, 具备相关研究的基本条件; 实验室还可依托南京大学医药生物技术国家重点实验室、南京大学现代分析中心、南京大学表生地球化学教育部重点实验室等先进的实验平台, 完成该项目所需的检测内容。

4. 本项目的特色与创新之处 (本项目与重大研究计划中总体目标的关系)

本项目特色在于:

① 研究对象独特。本项目研究所用材料来源于 1.3~2.5 km 深的洋底深部环境, 包括: 沉积物样品、栖息于沉积物中的纯培养真菌以及具有反硝化产 N_2 作用的曲霉 8L-9-F02 菌株。除了沉积物样品由 IODP337 航次参与成员分享外, 其它材料均为本项目申请人课题组自主拥有。

② 研究方法先进。综合利用了多维组学技术、CRISPR/Cas9 基因编辑技术、同位素示踪技术以及生化分析技术, 研究反硝化真菌及其作用机理。

③ 研究目标精准对接“水圈”重大研究计划中“(一) 大洋重要微生物功能类群及其驱动碳氮硫循环的机制”中的“3. 典型大洋生境关键功能微生物(群)的代谢新途径及新调控机制”。拟开展洋底深部真菌反硝化产 N_2 新途径及原位作用模拟研究, 揭示真菌在洋底深部环境氮循环中的驱动作用及机制。

主要创新之处在于:

① 通过对洋底深部环境曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化作用途径及遗传基础的研究, 揭示真菌完全反硝化产 N_2 新途径及新机理。

② 通过甄别洋底深部环境反硝化真菌类群及其分布特性, 结合原位作用的模拟研究, 探究真菌在厌氧生态系统氮循环中的驱动作用。

5. 年度研究计划及预期研究结果 (包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等)。

2020.1~12: 完成研究内容(1)“真菌反硝化产 N_2 新途径及影响因素”以及部分(2)“真菌反硝化产 N_2 功能基因的鉴定”工作。预期结果包括: 明确曲霉 8L-9-F02 菌株在厌氧条件下转化 NO_3^- 形成 N_2 的生化过程及影响因子; 完成 8L-9-F02 基因组、转录组和蛋白质组测序。

2021.1~12: 完成研究内容(3)“洋底深部环境反硝化真菌类群的发掘及其地质分布”; 开展研究内容(4)“反硝化真菌的原位作用模拟研究”中的培养实验;



继续从事研究内容(2)中反硝化功能基因的鉴定及验证工作。预期结果包括：明确反硝化真菌类群及其在洋底深部不同地层中的分布规律；筛选获得参与曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化作用的候选基因，并展开基因功能验证。整理并撰写论文 2~3 篇。

2022.1~12：完成研究内容(2)和(4)。预期结果包括：明确曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化产 N_2 途径及分子机理；阐明洋底深部环境反硝化真菌对 N_2O 或 N_2 形成的作用及贡献，揭示真菌在洋底深部生态系统氮循环中的驱动作用。整理并撰写论文 2~3 篇。

(二) 研究基础与工作条件

1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）

本项目申请人课题组自 2012 年获得 IODP337 航次洋底 1.3~2.5 km 深沉积物样品以来，陆续开展了以探索洋底深部环境真菌组成及其在 C、N、S 三大重要元素生物地球化学循环中作用为主要目标的研究，积累了相关研究的理论基础及实践经验，获得了一些惊喜的结果。其中，与本项目密切相关的研究进展如下：

(1) 分离获得 27 种 69 株洋底深部沉积环境的可培养真菌

通过优化培养基及培养方法，在严格控制污染的厌氧培养条件下，从 43 个样品中共分离获得了 69 株约 2000 万年前的古老真菌，经形态学和产孢结构观察以及核糖体 rRNA 基因的序列分析，共鉴定出 27 种真菌，其中，23 种为子囊菌，4 种为担子菌。系统发育分析结果显示，这些古老的真菌与陆源真菌亲缘关系较近，可能来源于早期陆地真菌的沉积；其在富含有机质的褐煤层中分布较多，是其它生境数量的 2.2 倍。相关研究已发表（Liu et al. 2017）。

(2) 发现并确证洋底真菌具有厌氧降解褐煤产甲烷及反硝化产 N_2 活性

在分离获得的洋底可培养真菌中，发现一株真菌具有厌氧降解褐煤产甲烷功能，相关研究已获得国家自然科学基金（项目号：41773083, 2017.01-2020.12）立项资助【题目：洋底深部真菌利用褐煤产甲烷的生化过程及代谢机理】，还获得了一项国家发明专利授权【刘常宏等. 2018. 授权专利号：ZL201511029308.X】。

以 $^{15}NO_3^-$ 为唯一氮源，采用厌氧瓶接种真菌的液体培养方法，培养瓶中充氮气 10min 去氧，30℃培养 21 天，用 GC-MS 定性、定量检测培养瓶顶空气体的组成，共测定了 7 种洋底深部真菌，分别为 *Penicillium* sp. 21R-4-F01、*Schizophyllum* sp. 20R-7-F01、*Aspergillus* sp. 8L-9-F02、*Hamigera insecticola* 21R-4-F02、*Aspergillus tubingensis* 14R-2-F04、*Chaetomium madrasense* 23R-3-F01 和 *Termitomyces cartilagineus* 29R-4-F03。发现曲霉 8L-9-F02 具有在厌氧条件下



利用 NO_3^- 产 N_2 的反硝化作用, N_2 产量高达 3500 ppm (图 5)。与未接种的空白对照相比, 其它真菌均无反硝化产 N_2 活性 (图 5)。

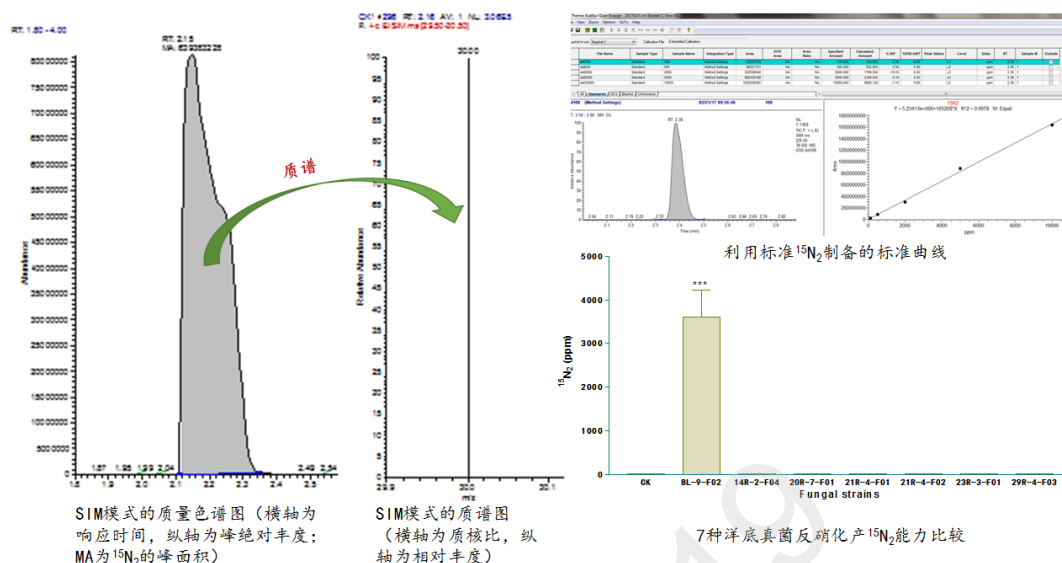


图 5. 七种洋底真菌反硝化产 $^{15}\text{N}_2$ 活性检测

(3) 已排除反硝化细菌和古菌的可能污染

为了排除反硝化原核微生物对曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化产 N_2 的可能影响, 我们对曲霉 8L-9-F02 菌株培养液及菌体进行了针对细菌和古菌核糖体 RNA 基因的 PCR 扩增实验, 结果显示 (图 6), 培养体系中均无原核微生物污染, 曲霉 8L-9-F02 菌株确实能够利用 NO_3^- 产 N_2 。

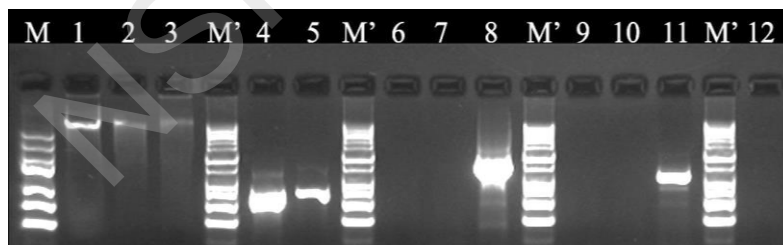


图 6. 基于 PCR 的反硝化原核微生物污染排除实验结果

Marker: M=Markerλ III, M'=Marker1K

基因组 DNA: 1: 真菌, 2: 古菌 (标准菌株), 3: 细菌 (标准菌株)

针对 ITS 的 PCR 扩增: 4=菌体, 5=菌液

针对细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增: 6=菌体, 7=菌液, 8=细菌 (标准菌株)

针对古菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增: 9=菌体, 10=菌液, 11=古菌 (标准菌株)

水对照: 12=水

(4) 已拥有反硝化真菌栖息的原位地质环境数据

根据 IODP337 航次钻孔的地层学研究结果 (图 7), 我们分离获得的真菌主要分布于 3 个地质层。第一层 (1.3~1.8 km) 厚约 570m, 粉砂质页岩为主, 接近浅海沉积环境, 温度 34.8~44.6°C, 中新世; 第二层 (1.8~2.0 km), 厚约 220m,



有多层厚度不等的低成熟度褐煤层，为相对稳定的近海岸环境，富含有机质，温度 44.6~48.4℃，中新世早期到晚期；第三层（2.0~2.5 km），厚约 420m，粉砂质页岩为主，有一层 0.9 m 厚的褐煤层，接近潮滩和潮沟环境，温度 48.4~55.6℃，中新世早期和渐新世晚期。相关研究已发表（Inagaki et al. 2015）。

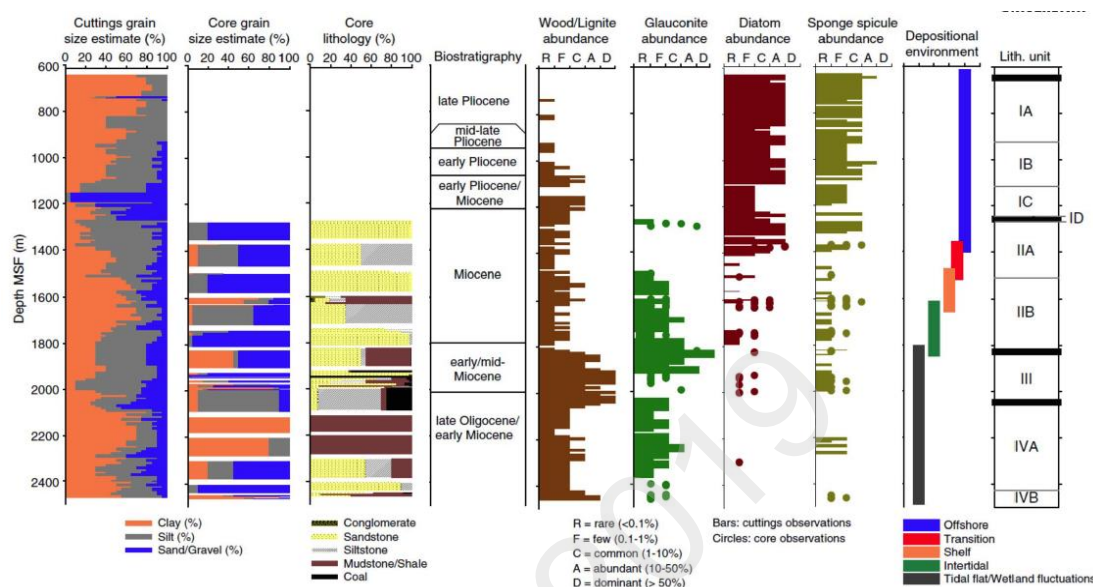


图 7. IODP337 航次钻孔剖面图

基于上述研究结果，我们期望通过对曲霉 8L-9-F02 菌株反硝化产 N_2 机理的研究、洋底深部反硝化真菌类群与地质环境关系的分析以及原位作用的模拟研究，揭示洋底深部生态系统中真菌驱动氮循环的作用及机理。

2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）

该项目依托南京大学“医药生物技术国家重点实验室”、“表生地球化学教育部重点实验室”、“现代分析中心”和“分子与应用微生物实验室”，拥有该项目研究所需的几乎全部仪器设备，如液质联用仪（5600 LC/MS/MS）、高效液相色谱仪（HPLC）、扫描电子显微镜（SEM）、激光共聚焦显微镜（CLSM）、气相色谱仪（GC）、气-质联用（GC-MS）、透射电子显微镜（TEM）、PCR 仪、qRT-PCR 仪等。其中，基因组和转录组测序将委托测序公司（如，华大基因等公司）完成。

3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本



项目的关系及负责的内容等);

国家自然科学基金

项目名称: 洋底深部真菌利用褐煤产甲烷的生化过程及代谢机理。

项目编号: 41773083

经费来源: 国家自然科学基金

起止年月: 2018.1-2021.12

该项目重点研究产甲烷真菌及其产甲烷机理,而本项目申请拟研究反硝化真菌及其反硝化产 N_2 途径及机理,二者研究内容完全不同。但该项目研究洋底真菌的方法对本项目研究具有借鉴意义。

4. 完成国家自然科学基金项目情况 (对申请人负责的前一个已结题科学基金项目(项目名称及批准号)完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要(限 500 字)和相关成果的详细目录)。

结题项目名称: 根内定殖的内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 与小麦的互作机制及对 Ggt 侵染的生防机理。

项目编号: 31471810

完成情况: 圆满完成了项目研究目标及计划研究内容,已于 2018 年 12 月按期顺利结题。

① 结题摘要: 本项目以内生生防贝莱斯芽孢杆菌 CC09 菌株为材料,采用分子生物学、转录组学、蛋白质组学等技术,研究该菌在小麦植株中的定殖、传导、种群消长及其对小麦全蚀病及叶枯病的防治效果;分析了小麦对 CC09 菌株定殖、病原真菌 Ggt 侵染以及 CC09 菌株与 Ggt 联合侵染的响应机制;探讨了在小麦植株内,CC09 菌株调控 Ggt 基因表达的可能机理。取得如下主要结果:(1) CC09 菌株具有在小麦不同器官、不同组织内定殖、传导及产抗菌物质 iturin A 的能力,类似于“疫苗”,根部接种一次,对根部病害全蚀病及叶部病害叶枯病的防效分别高达 66.67% 和 21.64%。(2) 小麦采用不同的响应机理,以应对 CC09 菌株的定殖、Ggt 的侵染以及 CC09 与 Ggt 的联合侵染。(3) CC09 菌株的定殖,抑制了小麦木质素的合成,有利于 CC09 菌株与小麦建立互惠互利的共生关系;Ggt 的侵染,则激活小麦合成木质素,以抵御 Ggt 的进一步扩展;而 CC09 菌株与 Ggt 联合侵染,综合调控小麦木质素的合成,以平衡小麦—CC09 菌株—Ggt 的相互适应关系。(4) 与 Ggt 单独侵染小麦相比,CC09 菌株的定殖,显著降低小麦植株内 Ggt 致病相关基因的表达。

② 相关研究成果 (标注有该项目编号 31272081 的代表性论文,*为通讯作



者): 共发表学术论文 16 篇, 其中 8 篇 SCI 论文, 6 篇中文核心期刊论文。还与北京中龙创科技有限公司合作, 开发了“姜兀忧”、“联植安”等生物菌剂, 进行了菌剂防治生姜、草莓、小麦等植物病害的试验研究, 取得了很好的防治效果。

- [1] Kang XX, Zhang WL, Cai XC, Zhu T, Xue YR*, Liu CH*. *Bacillus velezensis* CC09: A potential ‘vaccine’ for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2018, 31(6): 623-632.
- [2] Cai XC, Xi H, Liang L, Liu JD, Liu CH*, Xue YR, Yu XY.* Rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects. *Frontiers in Microbiology* 2017, 8: 178.
- [3] Cai XC, Liu CH*, Wang BT, Xue YR*. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiological Research* 2017, 196: 89-94.
- [4] Cai XC, Kang XX, Xi H, Liu CH*, Xue YR*. Complete genome sequence of the endophytic biocontrol strain *Bacillus velezensis* CC09. *Genome Announcement*, 2016, 4(5): e01048-16.
- [5] Huang X, Duan N, Xu H, Xie TN, Xue YR, Liu CH*. CTAB-PEG DNA extraction from fungi with high contents of polysaccharides. *Molecular Biology* 2018, 52(4): 621-628.
- [6] 刘京兰, 蔡勋超, 薛雅蓉, 刘常宏*, 余向阳. 生防解淀粉芽孢杆菌 CC09 合成 iturin A 条件的响应面优化. *中国生物防治学报* 2016, (2): 235-243.
- [7] 蔡勋超, 刘佳栋, 高旭, 王保通, 刘常宏*. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 可湿性粉剂的研制. *现代农药* 2015, 14: 8-12, 20.

与本项目的关系: 该结题项目研究内容与本申请项目内容完全不同, 但结题项目中所建立起来的基因组学、转录组学和代谢过程分析方法, 均可应用于本项目研究。

(三) 其他需要说明的问题

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况(列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息, 并说明与本项目之间的区别与联系)。

无

2. 具有高级专业技术职务(职称)的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情况; 如存在上述情况, 列明所涉及人员的姓名, 申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者, 并说明单位不一致



原因。

无

3. 具有高级专业技术职务(职称)的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况;如存在上述情况,列明所涉及人员的姓名,正在承担项目的批准号、项目类型、项目名称、单位名称、起止年月,并说明单位不一致原因。

无

4. 其他。

(1) 五篇代表作

- [1] **Liu CH***, Huang X, Xie TN, Duan N, Xue YR, Zhao TX, Lever MA, Hinrichs K-U, Inagaki F. Exploration of cultivable fungal communities in deep coal-bearing sediments from ~1.3 to 2.5 km below the ocean floor. *Environmental Microbiology* 2017, 19: 803-818.
- [2] Inagaki F*, Hinrichs K-U*, Kubo Y, Bowles MW, Heuer VB, Hong WL, Hoshino T, Ijiri A, Imachi H, Ito M, Kaneko M, Lever MA, Lin YS, Methé BA, Morita S, Morono Y, Tanikawa W, Bihan M, Bowden SA, Elvert M, Glombitza C, Gross D, Harrington GJ, Hori T, Li K, Limmer D, **Liu CH**, Murayama M, Ohkouchi N, Ono S, Park YS, Phillips SC, Prieto-Mollar X, Purkey M, Riedinger N, Sanada Y, Sauvage J, Snyder G, Susilawat R, Takano Y, Tasumi E, Terada T, Tomaru H, Trembath-Reichert E, Wang DT, Yamada Y. Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science* 2015, 349(6246): 420-424. 【除前三人为首席执行官外,其他按作者姓氏排序】
- [3] Cai XC, Xi H, Liang L, Liu JD, **Liu CH***, Xue YR, Yu XY*. Rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects. *Frontiers in Microbiology* 2017, 8: 178.
- [4] Kang XX, Zhang WL, Cai XC, Zhu T, Xue YR*, **Liu CH***. *Bacillus velezensis* CC09: A potential 'vaccine' for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2018, 31: 623-632.
- [5] Wang XX, Xue YR*, Han MZ, Bu YQ, **Liu CH***. The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments. *Chemosphere* 2014, 108: 258-264.

(2) 拟购买的气相色谱仪及参数



刘常宏 简历

南京大学，生命科学学院，教授

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

- (1) 1995.9 - 1998.6, 西北农林科技大学, 植物病理, 博士, 导师：商鸿生
- (2) 1986.9 - 1989.7, 西北农林科技大学, 植物病理, 硕士, 导师：刘汉文, 王树权
- (3) 1982.9 - 1986.6, 西北农林科技大学, 植物保护, 学士, 导师：商鸿生

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

- (1) 2003.12-至今, 南京大学, 生命科学学院, 教授
- (2) 2002.1-2003.12, 美国国立卫生院(NIH), 肿瘤研究所(NCI), 高级访问学者
- (3) 2000.7-2001.12, 南京大学, 生命科学学院, 副教授
- (4) 1994.4-1995.8, 陕西省农业科学院, 植物保护研究所, 助理研究员
- (5) 1993.7-1994.3, 加拿大农业部, 温尼泊试验站, 高级访问学者
- (6) 1989.9-1993.6, 陕西省农业科学院, 植物保护研究所, 助理研究员
- (7) 1998.6-2000.6, 南京大学, 博士后, 合作导师：谭仁祥

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）：

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

1. 国家自然科学基金面上项目，41773083，洋底深部真菌利用褐煤产甲烷的生化过程及代谢机理，2018/01-2021/12，69万元，在研，主持
2. 国家自然科学基金面上项目，31471810，根内定殖的内生解淀粉芽孢杆菌CC09与小麦的互作机制及对Ggt侵染的生防机理，2015/01-2018/12，90万元，已结题，主持
3. 高等学校博士学科点专项科研基金博导类，20130091110036，海底深部生物圈真菌的分离、鉴定及生物活性研究，2013/01-2017/12，12万元，已结题，主持
4. 国家自然科学基金面上项目，31272081，生防解淀粉芽孢杆菌 CC09 菌株环脂肽合成酶基因的转录调控机理研究，2013/01-2016/12，78万元，已结题，主持
5. 江苏省科技支撑计划—农业部分，BE2011355，一种防治小麦白粉病新的生防菌制剂的研发，2011/07-2014/12，40万元，已结题，主持



6. 国家环境保护部公益性行业科研专项, 201009023, 微生物农药生态环境安全性评价与安全使用技术研究——典型微生物农药使用环境行为与生态效应研究, 2010/07-2013/12, 141万元, 已结题, 子课题主持

7. 国家重点基础研究发展计划(973计划)子课题, 2008CB418004, 水华蓝藻优势维持的动态机制, 2008.01-2010.12, 82万元, 已结题, 专题主持

代表性研究成果和学术奖励情况

(请注意: ①投稿阶段的论文不要列出; ②对期刊论文: 应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷(期)及起止页码(摘要论文请加说明); ③对会议论文: 应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称(或会议论文集名称及起止页码)、会议地址、会议时间; ④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况: 所有共同第一作者均加注上标“#”字样, 通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样, 唯一第一作者且非通讯作者无需加注; ⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。)

按照以下顺序列出: ①代表性论著(包括论文与专著, 合计5项以内); ②论著之外的代表性研究成果和学术奖励(合计10项以内)。

一、代表性论著

(1) **Changhong Liu**^(*); Xin Huang; Tianning Xie; Ning Duan; Yarong Xue; Tanxi Zhao; Mark A. Lever; Kai-Uwe Hinrichs; Fumio Inagaki, Exploration of cultivable fungal communities in deep coal-bearing sediments from ~1.3 to 2.5 km below the ocean floor, Environmental Microbiology, 2017, 19(2): 803~818 (期刊论文)

(2) F Inagaki^(*); K-U Hinrichs^(*); Y Kubo; MW Bowles; VB Heuer; W-L Hong; T Hoshino; A Ijiri; H Imachi; M Ito; M Kaneko; MA Lever; Y-S Lin; BA Methé; S Morita; Y Morono; W Tanikawa; M Bihan; SA Bowden; M Elvert; C Glombitza; D Gross; GJ Harrington; T Hori; K Li; D Limmer; **CH Liu**; M Murayama; N Ohkouchi; S Ono; YS Park; SC Phillips; X Prieto-Mollar; M Purkey; N Riedinger; Y Sanada; J Sauvage; G Snyder; R Susilawat; Y Takano; E Tasumi; T Terada; H Tomaru; E Trembath-Reichert; DT Wang; Y Yamada, Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor, Science, 2015.6.24, 349: 420~424 (期刊论文)

(3) Xunchao Cai; Huan Xi; Li Liang; Jiadong Liu; **Changhong Liu**^(*); Yarong Xue; Xiangyang Yu^(*), Rifampicin-resistance mutations in the rpoB gene in Bacillus velezensis CC09 have pleiotropic effects, Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 178 (期刊论文)



(4) Xingxing Kang; Wanling Zhang; Xunchao Cai; Tong Zhu; Yarong Xue^(*); **Changhong Liu^(*)**, *Bacillus velezensis* CC09: a potential ‘vaccine’ for controlling wheat diseases, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(6): 623~632
(期刊论文)

(5) Xiaoxian Wang; Yarong Xue^(*); Meizhe Han; Yuanqing Bu; **Changhong Liu^(*)**, *The ecological roles of Bacillus thuringiensis within phyllosphere environments*, *Chemosphere*, 2014, 108: 258~264
(期刊论文)

二、论著之外的代表性研究成果和学术奖励

(1) Yanting Wang; **Changhong Liu^(*)**; Yarong Xue, *A Brief Review of Bioactive Metabolites Derived from Deep-Sea Fungi*, *Marine Drugs*, 2015, 13: 4594~4616
(期刊论文)

(2) Zhenzhen Zhao; Qiushuo Wang; Kaimei Wang; Kemp Brian; **Changhong Liu^(*)**; Yucheng Gu^(*), *Study of the antifungal activity of Bacillus vallismortis ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components*, *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 292~297
(期刊论文)

(3) Xunchao Cai; **Changhong Liu^(*)**; Baotong Wang; Yarong Xue^(*), *Genomic and metabolic traits endow Bacillus velezensis CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease*, *Microbiological Research*, 2017, 196: 89~94
(期刊论文)

(4) Ping Zhang; Chunmei Zhai; Ruqi Chen; **Changhong Liu^(*)**; Yarong Xue; Jihong Jiang, *The dynamics of the water bloom-forming Microcystis aeruginosa and its relationship with biotic and abiotic factors in Lake Taihu, China*, *Ecological Engineering*, 2012, 47(1): 274~277
(期刊论文)

(5) **Changhong Liu^(*)**; Xin Chen; Tingting Liu; Bin Lian; Yucheng Gu^(*); V. Caer; Yarong Xue; Baotong Wang, *Study of the antifungal activity of Acinetobacter baumannii LCH001 in vitro and identification of its antifungal components*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(2): 459~466
(期刊论文)

(6) Chunmei Zhai; Shuang Song; Shaohua Zou; **Changhong Liu^(*)**; Yarong Xue^(*), *The mechanism of competition between two bloom-forming Microcystis species*, *Freshwater Biology*, 2013, 58(9): 1831~1839
(期刊论文)



(7) **Changhong Liu**^(*); AK Mishra; Renxiang Tan; Cheng Tang; Huan Yang; Yuefei Shen, [Repellent and insecticidal activities of essential oils from Artemisia princeps and Cinnamomum camphora and their effect on seed germination of wheat and broad bean](#), Bioresource Technology, 2006, 97(15): 1969~1973 (期刊论文)

(8) Chunmei Zhai; Ping Zhang; Fei Shen; Changxin Zhou; **Changhong Liu**^(*), [Doe s Microcystis aeruginosa have quorum sensing](#), FEMS Microbiology Letters, 2012, 336(1): 38~44 (期刊论文)

(9) **刘常宏** (2/9), [植物内生真菌代谢物研究](#), 教育部, 自然科学, 省部一等奖, 2008 . 1. 25 (谭仁祥; **刘常宏**; 申丽; 焦瑞华; 吕红; 宋勇春; 刘俊彦; 朱海亮; 丁刚) (科研奖励)

(10) **刘常宏**; 薛雅蓉; 公丕贤; 赵潭溪, 一种裂褶菌及其应用, 2018. 8. 14, 中国, Z L201511029308. x (专利)



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

贾舒宇，南京大学生命科学学院，博士后

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2014/09-2018/06，南京大学，环境科学与工程，博士，导师：张徐祥

2011/09-2014/06，南京大学，环境工程，硕士，导师：张徐祥

2007/09-2011/06，东北林业大学，环境科学，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

2018/07-至今，南京大学，生态学博士后流动站博士后，导师：刘常宏

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

1. 中国博士后科学基金面上项目，2018M640475，饮用水消毒影响致病菌耐药性变化特征及其健康风险研究，2019/01-2020/12，8万元，在研，主持。

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）



按照以下顺序列出：

一、代表性论著（包括论文与专著，合计5项以内）；

(1) **Shuyu Jia**, Xu-Xiang Zhang*, Yu Miao, Yanting Zhao, Lin Ye, Bing Li, Tong Zhang, Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water, *Water Research*, 2017, 124: 259-268

(2) **Shuyu Jia**, Peng Shi*, Xu-Xiang Zhang, Bing Li, Tong Zhang, Xu-xiang Zhang*, Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination, *Environmental Science & Technology*, 2015, 49: 12271-12279

(3) **Shuyu Jia**, Xiwei He, Yuanqing Bu, Peng Shi, Yu Miao, Huiping Zhou, Bing Wu, Xu-Xiang Zhang*, Environmental fate of tetracycline resistance genes originated from swine feedlots in river water, *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2014, 49(8): 624-631

(4) **Shuyu Jia**, Zhu Wang, Xu-Xiang Zhang*, Bo Liu, Weixin Li, Shupeu Cheng, Peng Shi, Metagenomic analysis of cadmium and copper resistance genes in activated sludge of a tannery wastewater treatment plant, *Journal of Environmental Biology*, 2013, 34(2): 375-380



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	Environ Microbiol	研究了洋底深部环境真菌的多样性及起源	代表性论著
2	Science	研究了洋底深部地质环境、煤、甲烷与微生物的关系	代表性论著
3	Front Microbiol	研究了RNA聚合酶突变对生防菌次生代谢产物的影响	代表性论著
4	Mol Plant Microbe Interact	研究了细菌-植物-真菌互作 关系	代表性论著
5	Chemosphere	研究了微生物制剂的生态安全性	代表性论著
6	气相色谱仪	拟购买的“福立”气相色谱仪及参数	其他



项目名称： 洋底深部真菌反硝化产N₂新途径及原位作用模拟

资助类型： 重大研究计划/培育项目/水圈微生物驱动地球元素循环的机制

申请代码： D0708. 生物地球化学

国家自然科学基金项目申请人和参与者公正性承诺书

本人**在此郑重承诺**：严格遵守中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》规定，所申报材料和相关内容真实有效，不存在违背科研诚信要求的行为；在国家自然科学基金项目申请、评审和执行全过程中，恪守职业规范和科学道德，遵守评审规则和工作纪律，杜绝以下行为：

- (一) 抄袭、剽窃他人科研成果或者伪造、篡改研究数据、研究结论；
- (二) 购买、代写、代投论文，虚构同行评议专家及评议意见；
- (三) 违反论文署名规范，擅自标注或虚假标注获得科技计划等资助；
- (四) 购买、代写申请书；弄虚作假，骗取科技计划项目、科研经费以及奖励、荣誉等；
- (五) 在项目申请书中以高指标通过评审，在项目计划书中故意篡改降低相应指标；
- (六) 以任何形式打听尚未公布的评审专家名单及其他评审过程中的保密信息；

(七) 本人或委托他人通过各种方式及各种途径联系有关专家进行请托、游说，违规到评审会议驻地游说评审专家和工作人员、询问评审或尚未正式向社会公布的信息等干扰评审或可能影响评审公正性的活动；

(八) 向评审工作人员、评审专家等提供任何形式的礼品、礼金、有价证券、支付凭证、商业预付卡、电子红包，或提供宴请、旅游、娱乐健身等任何可能影响评审公正性的活动；

(九) 其他违反财经纪律和相关管理规定的行为。

如违背上述承诺，本人愿接受国家自然科学基金委员会和相关部门做出的各项处理决定，包括但不限于撤销科学基金资助项目，追回项目资助经费，向社会通报违规情况，取消一定期限国家自然科学基金项目申请资格，记入科研诚信严重失信行为数据库以及接受相应的党纪政纪处理等。

编号	姓名 / 工作单位名称 (应与加盖公章一致) / 证件号码 / 每年工作时间 (月)	签字
1	刘常宏 / 南京大学 / 6*****4 / 4	
2	贾舒宇 / 南京大学 / 2*****6 / 6	
3	黄欣 / 南京大学 / 3*****7 / 10	
4	刘璇 / 南京大学 / 2*****3 / 10	
5	徐慧 / 南京大学 / 3*****3 / 10	
6	杨心怡 / 南京大学 / 3*****5 / 10	
7	冷爽 / 南京大学 / 3*****1 / 10	
8	郭雨 / 南京大学 / 3*****7 / 10	
9		
10		



项目名称： 洋底深部真菌反硝化产 N_2 新途径及原位作用模拟
资助类型： 重大研究计划/培育项目/水圈微生物驱动地球元素循环的机制
申请代码： D0708. 生物地球化学

国家自然科学基金项目申请单位公正性承诺书

本单位依据国家自然科学基金项目指南的要求，严格履行法人负责制，**在此郑重承诺：**本单位已就所申请材料内容的真实性和完整性进行审核，不存在违背中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》规定和其他科研诚信要求的行为，申请材料符合《中华人民共和国保守国家秘密法》和《科学技术保密规定》等相关法律法规，在项目申请和评审活动全过程中，遵守有关评审规则和工作纪律，杜绝以下行为：

（一）采取贿赂或变相贿赂、造假、剽窃、故意重复申报等不正当手段获取国家自然科学基金项目申请资格；

（二）以任何形式探听未公开的项目评审信息、评审专家信息及其他评审过程中的保密信息，干扰评审专家的评审工作；

（三）组织或协助项目团队向评审工作人员、评审专家等提供任何形式的礼品、礼金、有价证券、支付凭证、商业预付卡、电子红包等；宴请评审组织者、评审专家，或向评审组织者、评审专家提供旅游、娱乐健身等任何可能影响科学基金评审公正性的活动；

（四）包庇、纵容项目团队虚假申报项目，甚至骗取国家自然科学基金项目；

（五）包庇、纵容项目团队，甚至帮助项目团队采取“打招呼”等方式，影响科学基金项目评审的公正性；

（六）在申请书中以高指标通过评审，在计划书中故意篡改降低相应指标；

（七）其他违反财经纪律和相关管理规定的行为。

如违背上述承诺，本单位愿接受国家自然科学基金委员会和相关部门做出的各项处理决定，包括但不限于停拨或核减经费，追回项目经费，取消一定期限国家自然科学基金项目申请资格，记入科研诚信严重失信行为数据库以及主要责任人接受相应党纪政纪处理等。

依托单位公章：

日期： 年 月 日

合作研究单位公章：

日期： 年 月 日

合作研究单位公章：

日期： 年 月 日