



河南师范大学水产学院

College of Fisheries Henan Normal University



读 书 报 告

汇报人：张玲玉

时间：2017-4-28

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle



Surajit De Mandal¹, Raghunath Chatterjee² and Nachimuthu Senthil Kumar^{1*}

洞穴的优势细菌门及它们在C、N循环中的功能预测

IF=3.104

Contents

1

Abstract

2

Background

3

Methods

4

Results&Discussion

5

Conclusions

Abstract

洞穴作为极端环境，其中存在的细菌常常通过改变其代谢途径或其他机制来存活，本文研究了印度Mizoram的五个洞穴的微生物多样性及其群落组成，分析了优势菌群存在的原因。

利用PICRUSt检测到参与各种代谢途径的基因，对于揭示细菌在C、N循环中所扮演的角色至关重要。

Background

细菌构成洞穴生物多样性的主要部分，在保持洞穴生态系统中起着关键作用。洞穴属于寡营养环境，存在于这种营养不良环境下的细菌通常通过改变其代谢途径或其他机制来生存。

洞穴微生物含有广泛的受地质，土壤或沉积物等因素影响的细菌群落。地球化学因子经常会驱动细菌群落组成和多样性发生改变。

研究是基于这样的假设：不受干扰和营养有限的洞穴栖息地将承载特定细菌种类，洞穴地球化学参数可能有利于物种多样性和丰富度。研究目的是探索细菌分类组成，并了解细菌群落如何响应洞穴寡营养环境。

Methods

样点



人为干扰

Fig. 1 Geographical location of the sampling sites in Mizoram, Northeast India. The figure has been adopted from Google Map and modified

1 Sample collection and community DNA extraction

样点: Bukpuk (CBP V3), Lamsialpuk (CLPV3), Reiekpuk (CRP V3), Khuangcherapuk (CKP V3), Farpuk (CFPV3)

沉积物样品的pH使用pH计去测, 氧化物及微量元素使用X-ray Fluorescence测定。详细信息如下

Table 1 Geochemical parameters of the cave samples

Sample ID	GPS Coordinates	Elevation (MSL)	pH	Na ₂ O %	MgO%	Al ₂ O ₃ %	SiO ₂ %	P ₂ O ₅ %	SO ₃ %	K ₂ O%	CuO%	ZnO%	Rb ₂ O%	SrO%	ZrO ₂ %	BaO%	Cl%	V ₂ O ₅ %
CBPV3 (Bukpuk)	N23.69, E93.29	4003	7.2	0.08	1.04	4.59	12.3	7.53	11.9	2.9	0.05	0.071	0.03	0.08	0	0.00	0.06	0
CFPV3 (Farpuk)	N23.11, E93.53	4645	7.3	31	0.92	11.8	44.2	0.16	0.16	2.5	0.01	0.01	0.01	0.03	0.12	0.07	0	0
CLPV3 (Lamsialpuk)	N23.13, E93.29	4446	7.5	42.4	0.92	13.2	37.9	0.71	0.23	2.7	0.01	0.013	0.01	0.03	0.08	0.07	0.06	0.001
CRPV3 (Reiekpuk)	N23.69, E92.60	4312	6.8	0.6	1.67	11.7	39.1	0.16	1.92	2.8	0.01	0.013	0.01	0.02	0.07	0.07	0	0
CKPV3 (Khuangcherapuk)	N23.69, E92.61	4900	6.7	0.37	1.04	10.5	33.4	0.84	0.82	2.5	0.01	0.012	0.03	0.04	0.07	0.07	0	0

All the samples were collected during March 2014
MSL meters above sea level

DNA提取: the Fast DNA spin kit

引物: 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')

2

Pre-processing and sequence analysis

测序: Illumina sequencing, Scigenome Lab, Cochin, India。

OTU聚类: UCLUST method, 相似率低于97%, Greengenes database。

相关性: PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

宏基因组分析: PICRUST软件

3

Statistical analysis

PAST v3.02 software,

Multivariate principal component analysis (PCA)(20种物化参数, 如pH, Na₂O, MgO, Al₂O₃等)

(多元主成分分析)

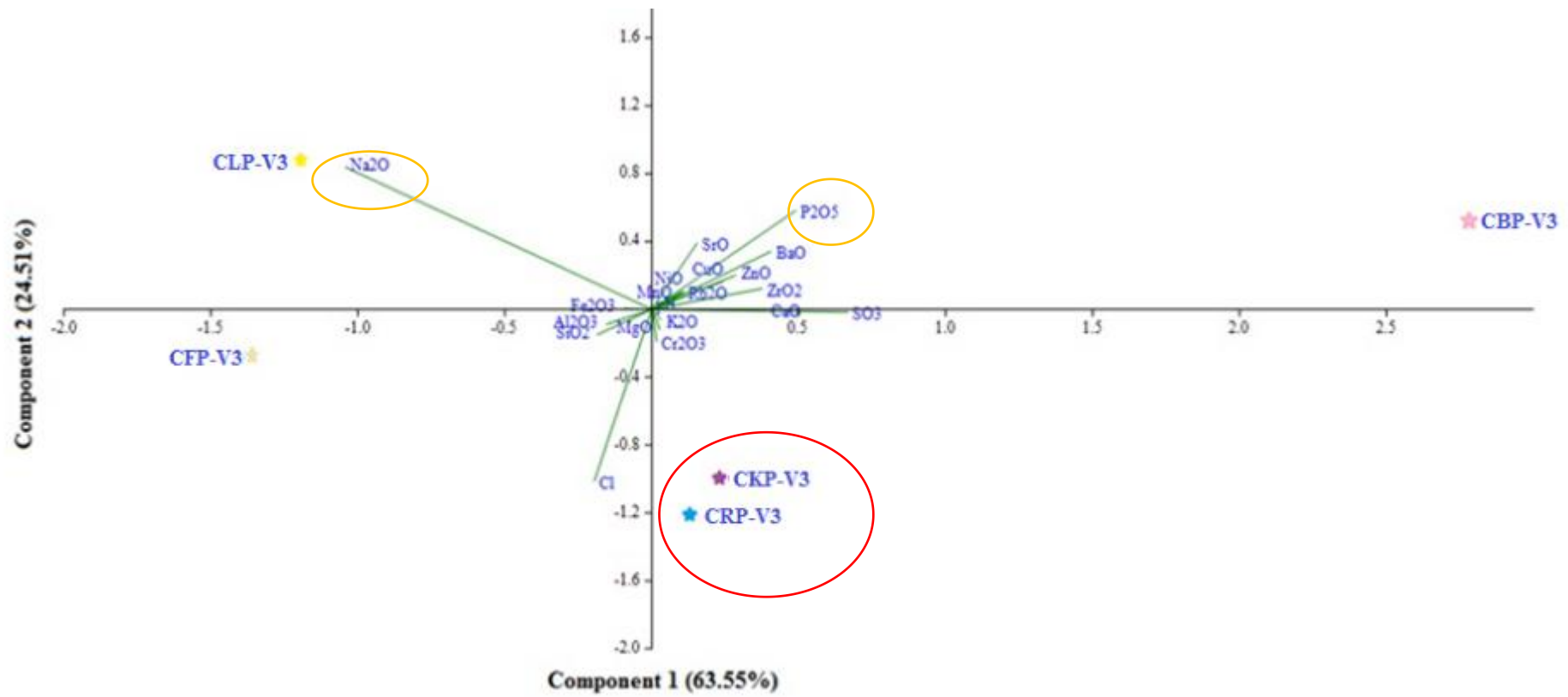
Results

1 Geochemical characteristics of the cave sediment samples

Table 1 Geochemical parameters of the cave samples

Sample ID	GPS Coordinates	Elevation (MSL)	pH	Na ₂ O %	MgO%	Al ₂ O ₃ %	SiO ₂ %	P ₂ O ₅ %	SO ₃ %	K ₂ O%	CuO%	ZnO%	Rb ₂ O%	SrO%	ZrO ₂ %	BaO%	Cl%	V ₂ O ₅ %
CBPV3 (Bukpuk)	N23.69, E93.29	4003	7.2	0.08	1.04	4.59	12.3	7.53	11.9	2.9	0.05	0.071	0.03	0.08	0	0.00	0.06	0
CFPV3 (Farpuk)	N23.11, E93.53	4645	7.3	31	0.92	11.8	44.2	0.16	0.16	2.5	0.01	0.01	0.01	0.03	0.12	0.07	0	0
CLPV3 (Lamsialpuk)	N23.13, E93.29	4446	7.5	42.4	0.92	13.2	37.9	0.71	0.23	2.7	0.01	0.013	0.01	0.03	0.08	0.07	0.06	0.001
CRPV3 (Reiekpuk)	N23.69, E92.60	4312	6.8	0.6	1.67	11.7	39.1	0.16	1.92	2.8	0.01	0.013	0.01	0.02	0.07	0.07	0	0
CKPV3 (Khuangcherapuk)	N23.69, E92.61	4900	6.7	0.37	1.04	10.5	33.4	0.84	0.82	2.5	0.01	0.012	0.03	0.04	0.07	0.07	0	0

All the samples were collected during March 2014
MSL meters above sea level



Supplementary Figure 1: Biplot generated for the Principal Component Analysis (PCA) of twenty geochemical variables. Cave samples are shown as colored symbols and physicochemical variables are represented by green lines.

5个洞穴被分为4个地球化学性质不同的栖息地，CKPV3、CRPV3的理化性质相似，与其他洞穴的差别较大；影响理化性质的因素主要是Na₂O、P₂O₅。

2

Analysis of bacterial community composition

测序得到54,88,530个序列，归类为48个门

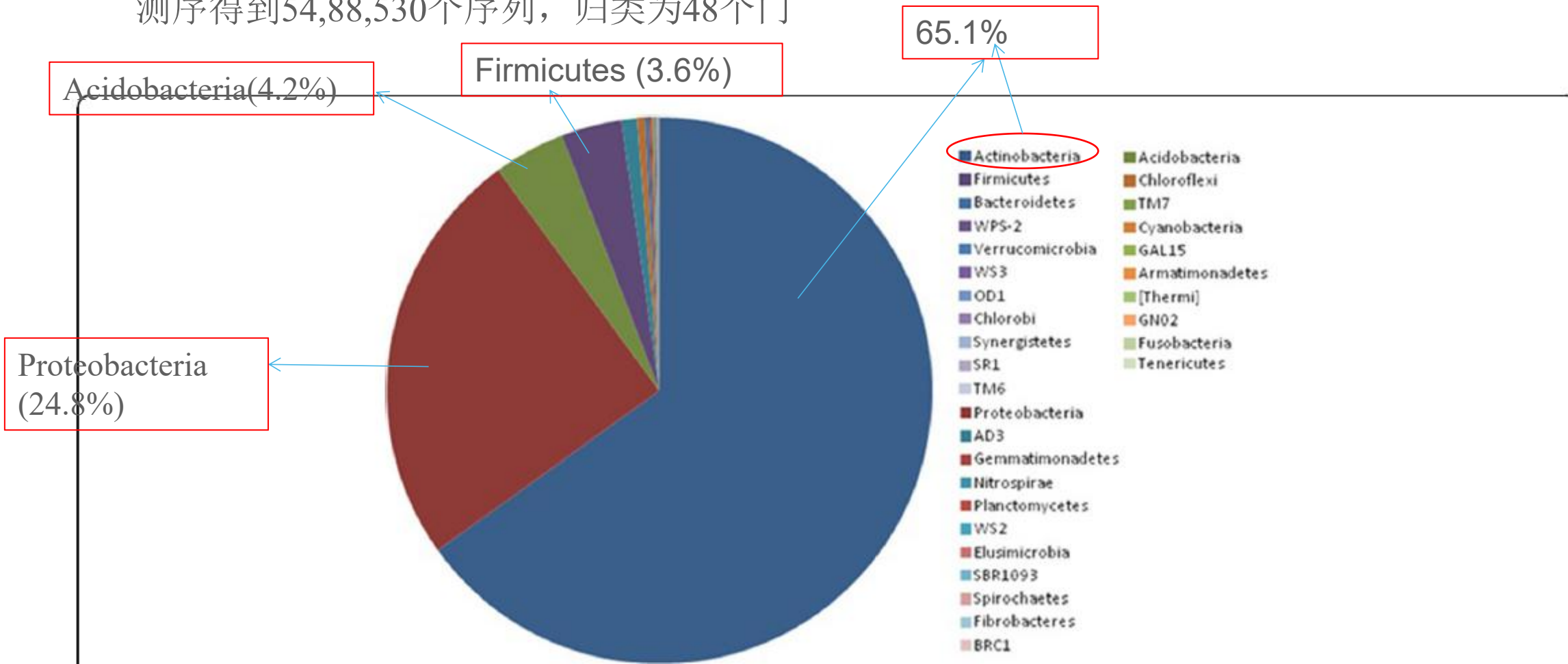


Fig. 2 Average bacterial community compositions at the phylum level present in the cave samples

the top ten phyla present in individual cave

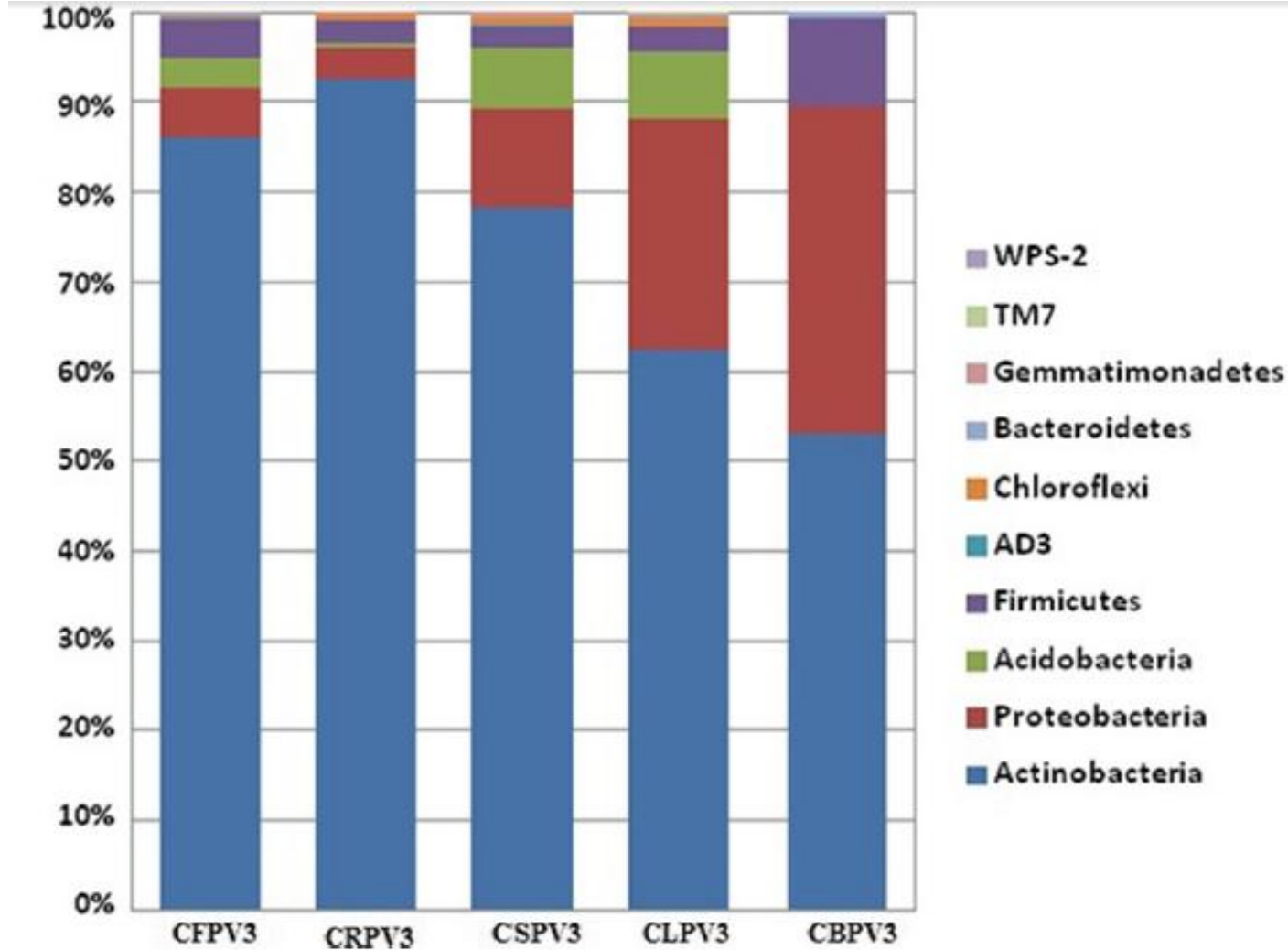


Fig. 3 Bacterial community compositions at the phylum level present in the individual cave samples

① 3个优势门:

Actinobacteria (放线菌门)

Proteobacteria (变形菌门)

Acidobacteria (酸杆菌门)

Actinobacteria
(放线菌门)

Actinobacteria 放线菌纲

主要的科: 22个;

主要属: 放线菌属, 6个种

Acidimicrobiia 酸微菌纲

Thermoleophilia 嗜热油菌纲

Rubrobacteria 红色杆菌纲

MB-A2-108

Coriobacteriia

Nitriliruptoria 腈基降解菌纲

		丰度高	丰度低
Proteobacteria (变形菌门) 有7个属丰度高	优势纲		
	Alphaproteobacteria	2科、3属	11属
	Gammaproteobacteria	2属	37属
	Betaproteobacteria		
	Deltaproteobacteria		
	TA18	未检测到属	
	Epsilonproteobacteria	3科2属	
Zetaproteobacteria	未检测到属		

优势科

Acidobacteria
酸杆菌门, 8科
10属

Solibacteraceae

Koribacteraceae

Acidobacteriaceae

Acidobacterium

Edaphobacter

Terriglobus

Acidicapsa

Acidopila

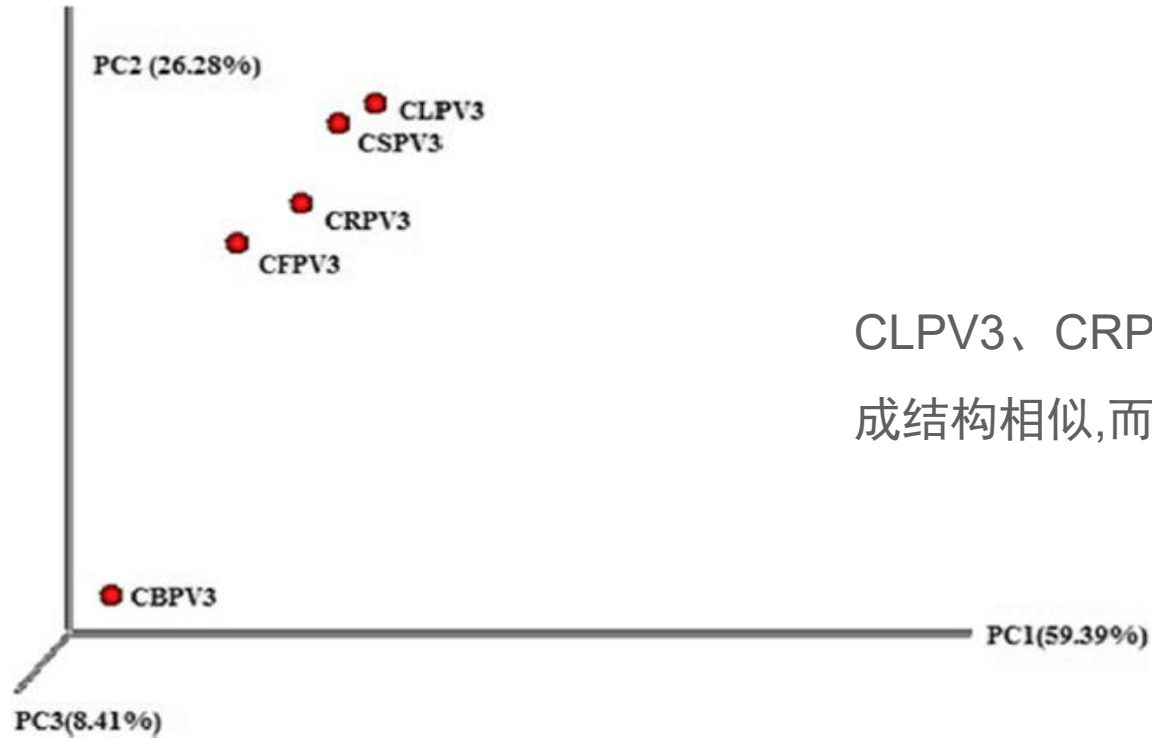
② Diversity estimates of the cave bacterial community

Table 2 Alpha diversity index of the cave samples

	Observed species	Simpson reciprocal	Shannon	Simpson	PD whole tree
CFPV3	87,179	62.04	9.97	0.001	2914.7
CRPV3	72,638	86.33	10.25	0.001	2357.9
CKPV3	89,805	89.17	11.35	0.001	3020.0
CLPV3	83,136	316.81	12.50	0.004	2873.1
CBPV3	22,004	57.32	8.22	0.003	827.8

All the diversity index is calculated using QIIME
PD Phylogenetic Diversity

根据香浓指数，可以看出CLPV3细菌多样性较高，CBPV2细菌多样性较低。



CLPV3、CRPV3、CKPV3、CFPV3，4个洞穴的细菌群落组成结构相似,而CBPV3的细菌群落组成与它们有明显差别。

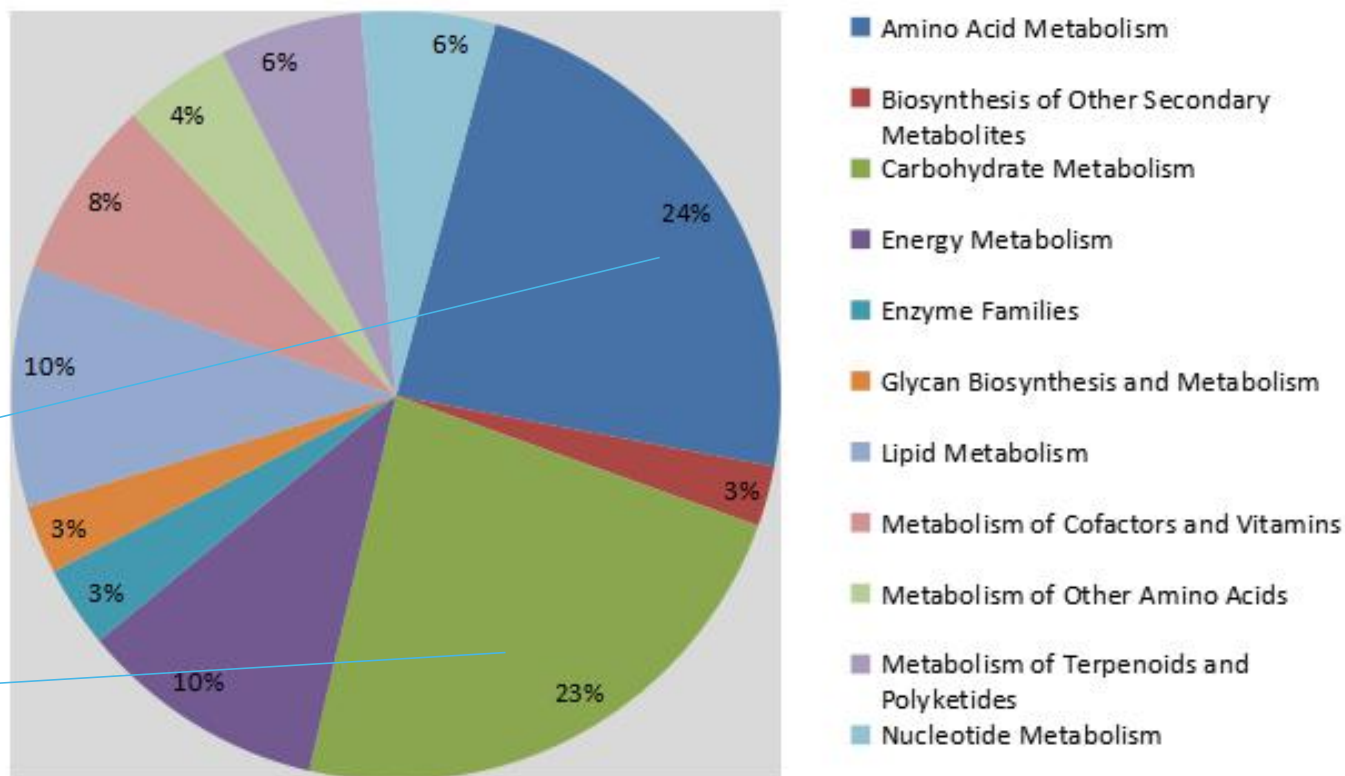
Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) plot of samples using the unweighted UniFrac distance metric. The variance explained by each principal coordinate axis is shown in parentheses. Datasets were subsample to equal depth prior to the UniFrac distance computation

③ Function prediction using PICRUSt

5个代谢模块：新陈代谢，遗传信息处理，环境信息处理，细胞过程和生物体系

氨基酸代谢
(24%)

碳水化合物代谢 (23%)



Supplementary Figure 2: Relative abundance of the functional genes present in the cave samples.

洞穴样品中功能基因的相对丰度

C循环

C循环涉及3个反应：碳降解、碳固定、甲烷代谢

Table S1. List of the genes codes for enzymes involved in carbohydrate degradation identified using PICRUST.

OTU ID	CFPV3	CRPV3	CKPV3	CLPV3	CBPV3	KEGG_Description
K01176	27391	18576	20919	12211	5010	alpha-amylase [EC:3.2.1.1]
K07405	236	177	424	275	36	alpha-amylase [EC:3.2.1.1]
K01178	15132	4170	20708	16034	329	glucoamylase [EC:3.2.1.3]
K01179	150806	123986	108567	78023	33916	endoglucanase [EC:3.2.1.4]
K01190	109617	53776	98347	58180	27861	beta-galactosidase [EC:3.2.1.23]
K12308	104500	87697	91238	68506	12062	beta-galactosidase [EC:3.2.1.23]
K05350	224167	177804	157940	97063	31122	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]
K05349	193177	146916	161768	114774	40231	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]
K01188	95216	80758	76506	48365	23967	beta-glucosidase [EC:3.2.1.21]
K01176	27391	18576	20919	12211	5010	alpha-amylase [EC:3.2.1.1]
K07405	236	177	424	275	36	alpha-amylase [EC:3.2.1.1]
K07407	138423	113472	125872	79099	15619	alpha-galactosidase [EC:3.2.1.22]
K07406	5063	5331	6700	7014	151	alpha-galactosidase [EC:3.2.1.22]
K01187	313018	217131	230125	150604	54696	alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20]
K01183	121687	115347	96013	64813	21106	chitinase [EC:3.2.1.14]

α -淀粉酶，糖化酶，
新型支链淀粉酶和
支链淀粉酶， α -葡
糖苷酶，内切葡聚
糖酶； β -葡聚糖酶，
 β -葡萄糖苷酶等

Table S2. List of the homologs of methanogenesis-associated genes that were identified from the five cave sediments using PICRUST.

OTU ID	CFPV3	CRPV3	CKPV3	CLPV3	CBPV3	KEGG_Description
K00200	535	283	1446	1060	55	formylmethanofuran dehydrogenase subunit A [EC:1.2.99.5]
K00201	532	279	1442	1058	54	formylmethanofuran dehydrogenase subunit B [EC:1.2.99.5]
K00202	532	279	1442	1058	54	formylmethanofuran dehydrogenase subunit C [EC:1.2.99.5]
K11261	13727	2252	18636	14160	132	formylmethanofuran dehydrogenase subunit E [EC:1.2.99.5]
K00672	237	168	693	873	50	Formylmethanofuran - tetrahydromethanopterin N-formyltransferase [EC:2.3.1.101]
K01433	144630	163314	95958	61705	38186	formyltetrahydrofolate deformylase [EC:3.5.1.10]
K01499	315	256	876	907	51	methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase [EC:3.5.4.27]
K00320	235910	197179	146818	61800	36883	coenzyme F420-dependent N5,N10-methenyltetrahydro methanopterin reductase [EC:1.5.99.11]
K03388	1717	439	1239	351	144	heterodisulfide reductase subunit A [EC:1.8.98.1]

甲烷循环在洞穴中普遍存在。

N循环

Table S3. List of the genes coding for enzymes involved in nitrogen cycle identified using PICRUST.

OTU ID	CFPV3	CRPV3	CKPV3	CLPV3	CBPV3	Average	KEGG_Description
K00459	234608	181071	171865	98890	44603	145164.3	nitronate monooxygenase [EC:1.13.12.16]
K04751	148620	153605	119582	79297	31707	112312.2	nitrogen regulatory protein P-II
K00362	186707	187798	122042	66941	42569	106609	nitrite reductase (NAD(P)H) large subunit
K00363	158467	139566	112051	60392	37056	93796.17	nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit
K04488	158002	114409	103742	65094	19771	86914.83	nitrogen fixation protein NifU and related proteins
K01721	109460	180569	59540	40267	9425	72093	nitrile hydratase [EC:4.2.1.84]
K01501	96026	84391	49338	20949	9501	44251	nitrilase [EC:3.5.5.1]
K05916	80284	56745	56551	30192	11872	41549.67	nitric oxide dioxygenase [EC:1.14.12.17]
K00372	58741	73302	39085	30134	23134	40560.67	nitrate reductase catalytic subunit [EC:1.7.99.4]
K00491	52136	65495	27735	9571	4284	26694.33	nitric-oxide synthase, bacterial [EC:1.14.13.39]
K00373	47649	33337	31306	20412	6985	25441.17	nitrate reductase 1, delta subunit [EC:1.7.99.4]
K00370	44072	34009	26246	19227	11699	24024.67	nitrate reductase 1, alpha subunit [EC:1.7.99.4]
K04561	9594	2498	15692	11101	6918	21192.67	nitric oxide reductase, cytochrome b-containing subunit I
K00371	41407	28771	25127	17640	6345	21156.83	nitrate reductase 1, beta subunit [EC:1.7.99.4]
K00374	40555	28424	24419	17059	6319	20598	nitrate reductase 1, gamma subunit [EC:1.7.99.4]

④ Association between bacterial communities with geochemical parameters

Table S4: Pearson correlation (PC) between physiochemical factors with the dominant bacterial phyla.

	pH	Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	SO ₃	K ₂ O	CaO	Fe ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃	MnO	NiO	CuO	ZnO	Rb ₂ O	SrO	ZrO ₂	BaO	Cl
AD3	-0.38	-0.39	0.98**	0.26	0.29	-0.28	-0.08	0.26	0.09	0.09	-0.11	-0.14	0.20	-0.22	-0.20	-0.42	-0.36	0.09	-0.04	-0.44
Acidobacteria	-0.77	-0.36	0.38	0.26	0.10	-0.45	-0.44	-0.38	-0.4	0.65	0.36	-0.79	0.16	-0.47	-0.47	0.43	0.14	-0.07	0.58	-0.12
Actinobacteria	0.32	0.018	-0.69	-0.58	-0.68	0.704	0.551	0.12	0.422	-0.43	0.14	0.43	-0.07	0.638	0.642	0.46	0.33	-0.55	-0.34	0.58
Bacteroidetes	0.287	0.45	-0.33	0.25	0.48	-0.33	-0.34	-0.24	-0.39	0.004	-0.13	0.05	-0.21	-0.3	-0.32	-0.33	-0.12	0.63	0.12	-0.35
Chloroflexi	-0.74	-0.64	0.804	-0.06	-0.11	-0.11	0.015	-0.11	0.12	0.23	-0	-0.29	0.54	-0.07	-0.08	0.19	0.14	-0.33	0.26	-0.12
Firmicutes	0.68	0.72	-0.62	0.31	0.43	-0.19	-0.27	0.04	-0.33	-0.08	-0.07	0.143	-0.56	-0.21	-0.2	-0.42	-0.29	0.63	-0.13	-0.14
Gemmatimonadetes	-0.34	0.004	-0.47	0.01	-0.19	-0.13	-0.28	-0.48	-0.39	0.48	0.46	-0.58	-0.08	-0.2	-0.21	0.73	0.38	-0.19	0.49	0.30
Proteobacteria	-0.57	-0.29	0.76	0.32	0.41	-0.53	-0.38	-0.25	-0.27	0.38	-0.12	-0.4	0.35	-0.46	-0.48	-0.18	-0.08	0.25	0.4	-0.48
TM7	-0.39	-0.40	0.97**	0.25	0.28	-0.28	-0.09	0.23	0.085	0.11	-0.13	-0.15	0.23	-0.22	-0.21	-0.39	-0.33	0.08	-0.01	-0.43
WPS-2	-0.48	-0.41	0.94**	0.24	0.23	-0.31	-0.14	0.09	0.025	0.24	-0.13	-0.26	0.32	-0.26	-0.25	-0.25	-0.20	0.01	0.14	-0.32

Table S5: Pearson correlation (PC) between physiochemical factors with the bacterial diversity.

	pH	Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	SO ₃	K ₂ O	CaO	Fe ₂ O ₃	Cr ₂ O ₃	MnO	NiO	CuO	ZnO	Rb ₂ O	SrO	ZrO ₂	BaO	Cl
Shannon	0.09	0.55	-0.16	0.83	0.63	-0.73	-0.81	-0.48	-0.79	0.93**	0.28	-0.82	-0.84	-0.78	-0.76	-0.38	-0.67	0.55	0.78	-0.06

** - indicates P value <0.001 and is highly significant.

Fe₂O₃与香浓多样性指数（细菌多样性）呈正相关（r=0.93），其次为Al₂O₃。

NiO（-0.84）、SO₃（-0.81）和MnO（-0.82）和细菌多样性呈负相关。

Discussion

① Analysis of bacterial community composition

NGS方法的分析研究正在成为分析地下生态系统隐蔽微生物多样性的重要手段。

在营养有限的环境竞争资源更为激烈，有助于自然选择，可以导致细菌群落的创新和多样化。

放线菌门作为优势菌门出现在所有的洞穴样品中，从未开发的环境中分离稀有和新颖的放线菌是研究的重要领域。诺卡氏菌科是门下的优势科，属寡营养型，可以代谢各种底物，如甲苯、除草剂等；链霉菌属可以代谢醇、糖、氨基酸等，合成抗生素。

变形菌门以 α -变形菌亚门和 γ -变形菌亚门为主，其下一些物种可以通过特殊的途径（ATP结合盒、TRAP：三重ATP独立的周质转运蛋白）在极端环境下生存。硫杆菌可以通过氧化硫和二价铁化合物获得能量；*Burkholderia*（伯克霍尔德菌）属于固氮细菌，能够降低各种异型生物物质（药剂、杀虫剂等）的混合物，可以用于生物修复。*Bdellovibrio*（蛭弧菌属）的独特之处在于它能进入其他细菌的周质空间并吞噬生物聚合物，因此可以用于生物防治。

② Metabolic prediction using PICRUSt

微生物群落，主要参与全球碳和氮的生物地球化学循环。最近，通过采用16S SSU-rDNAs数据，PICRUSt软件包被开发用于推断潜在细菌群落在洞穴沉积物中的功能作用。在洞穴样品中检测到编码磷酸盐转运蛋白(PhnB, PhnG, PhnH, PhnI, PhnJ, and PhnM)的基因表明，细菌能形成 carbonphosphorus lyase（碳磷裂解酶），使甲基磷酸盐转化为甲烷。

在土壤和水生栖息地，细菌在氮循环中的作用得到了很好的研究，但在洞穴沉积物的研究信息有限。此研究中发现了大量涉及N循环的基因，也为洞穴微生物的功能研究打下了很好的基础。

③ Association between bacterial communities with geochemical parameters

细菌群落结构受环境中存在的矿物质底物影响很大，本研究发现观察到 Fe_2O_3 ， Al_2O_3 与香农多样性指数正相关关系，但也只有少数微生物能够存在寡营养和高金属含量的环境中，这是自然的选择使微生物群落维持在这种环境下的适应性。

Conclusions

本研究使用Illumina测序来鉴定洞穴沉积物样品中存在的细菌群落的分类学多样性，这些样品是从印度生物多样性热点的Mizoram收集的。这些营养不良的洞穴具有高度的系统发育多样性，包括所有层次的生物，以及更高比例的未分类序列，表明新物种的可能性。

洞穴沉积物以放线菌门和变形菌门为主。

Fe₂O₃含量与这些洞穴环境中微生物多样性的增加有关。

生物信息学分析检测的参与各种代谢途径的基因，对于营养有限的洞穴环境中细菌群落的生存至关重要。

需要通过培养未培养的群落或全基因组测序进行进一步研究，以说明洞穴环境中的实际生存策略。

综述提纲

题目：洞穴微生物的多样性及应用

摘要

前言（洞穴简介、国内外研究现状）

主题：微生物种类、优势门类、与其他环境中微生物的差异、特殊菌群（微生物参与C、N、S循环、介导铁-锰矿物沉积和转化）、应用（抗菌素、表面活性剂及酶制剂）

展望

THANK YOU .

