

# 读书报告

汇报人：程利娇

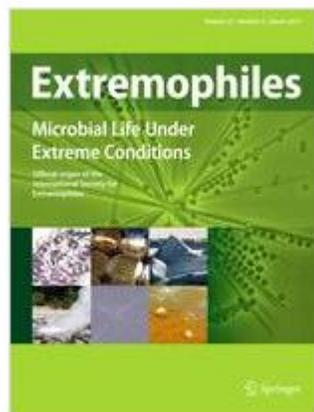
汇报时间：2017. 06. 25

---





文章



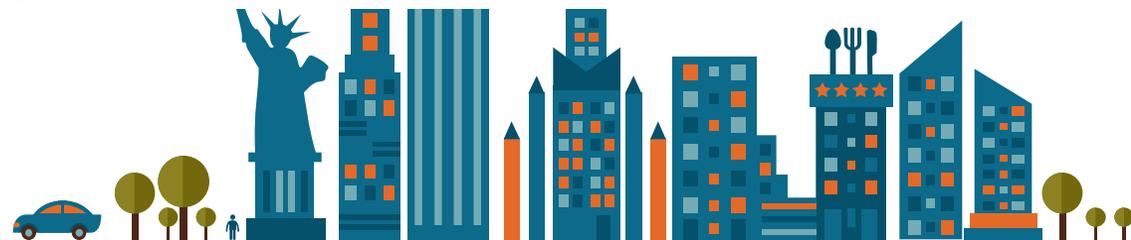
Extremophiles  
DOI 10.1007/s00792-017-0938-y



ORIGINAL PAPER

## Diversity of bacteria and archaea from two shallow marine hydrothermal vents from Vulcano Island

Garabed Antranikian<sup>1</sup> · Marcel Suleiman<sup>1</sup> · Christian Schäfers<sup>1</sup> · Michael W. W. Adams<sup>2</sup> · Simonetta Bartolucci<sup>2</sup> · Jenny M. Blamey<sup>2</sup> · Nils-Kåre Birkeland<sup>2</sup> · Elizaveta Bonch-Osmolovskaya<sup>2</sup> · Milton S. da Costa<sup>2</sup> · Don Cowan<sup>2</sup> · Michael Danson<sup>2</sup> · Patrick Forterre<sup>2</sup> · Robert Kelly<sup>2</sup> · Yoshizumi Ishino<sup>2</sup> · Jennifer Littlechild<sup>2</sup> · Marco Moracci<sup>2</sup> · Kenneth Noll<sup>2</sup> · Tairo Oshima<sup>2</sup> · Frank Robb<sup>2</sup> · Mosè Rossi<sup>2</sup> · Helena Santos<sup>2</sup> · Peter Schönheit<sup>2</sup> · Reinhard Sterner<sup>2</sup> · Rudolf Thauer<sup>2</sup> · Michael Thomm<sup>2</sup> · Jürgen Wiegel<sup>2</sup> · Karl Otto Stetter<sup>2,3</sup>



目录  
CONTENTS



01

Introduction

02

Materials and  
methods

03

Results

04

Discussion





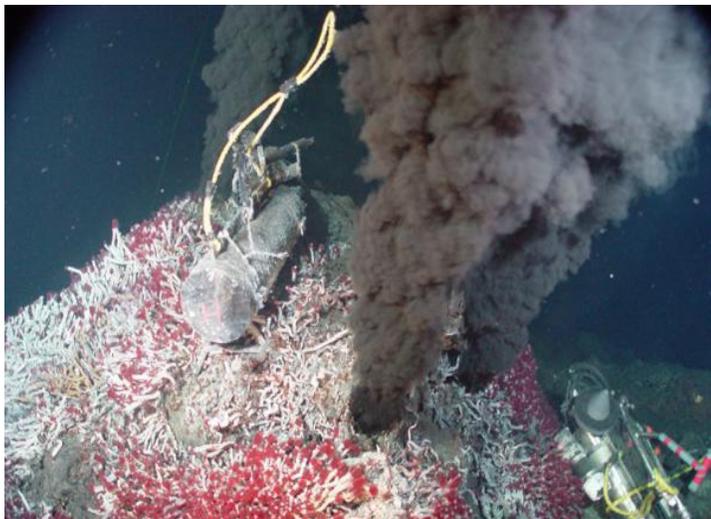
PART **01**

# Introduction





# Introduction



极端嗜热微生物，较好的生存温度为80-105°C之间，一般存在高酸性pH值、高硫及高盐浓度的深海热液喷口、陆地热泉以及火山喷发口等环境中。



## Introduction

迄今为止，研究的大多数嗜热微生物主要是从50°C到89°C之间的热泉中获得。使用基于序列的研究方法分析物种丰度和群落组成，其中主要包括焦磷酸测序等。

在硫化物丰富的深海热液喷口中，存在大量的 $\epsilon$ -*Proteobacteria*。基于16S rRNA基因克隆文库和原位杂交（FISH），显示高达90%的微生物群落由 $\epsilon$ -*Proteobacteria*构成，其中大多数属于*Nautilia* and *Sulfurimonas*。



## Introduction

为了获得更多对超嗜热微生物多样性的新见解，本研究使用多种技术结合的方法，包括变性梯度凝胶电泳（DGGE）和宏基因组测序。

**样品：**采自于Vulcano Island, Italy（意大利武尔卡诺岛）海岸的两个浅海热液喷口处（ $100^{\circ}\text{C}$ ）。

**目的：**

（1）分析两个极端热液喷口微生物的群落特征和物种丰富度。

（2）探究极端嗜热微生物在各种碳水化合物上异养生长的适应性及其群落组成。





PART **02**

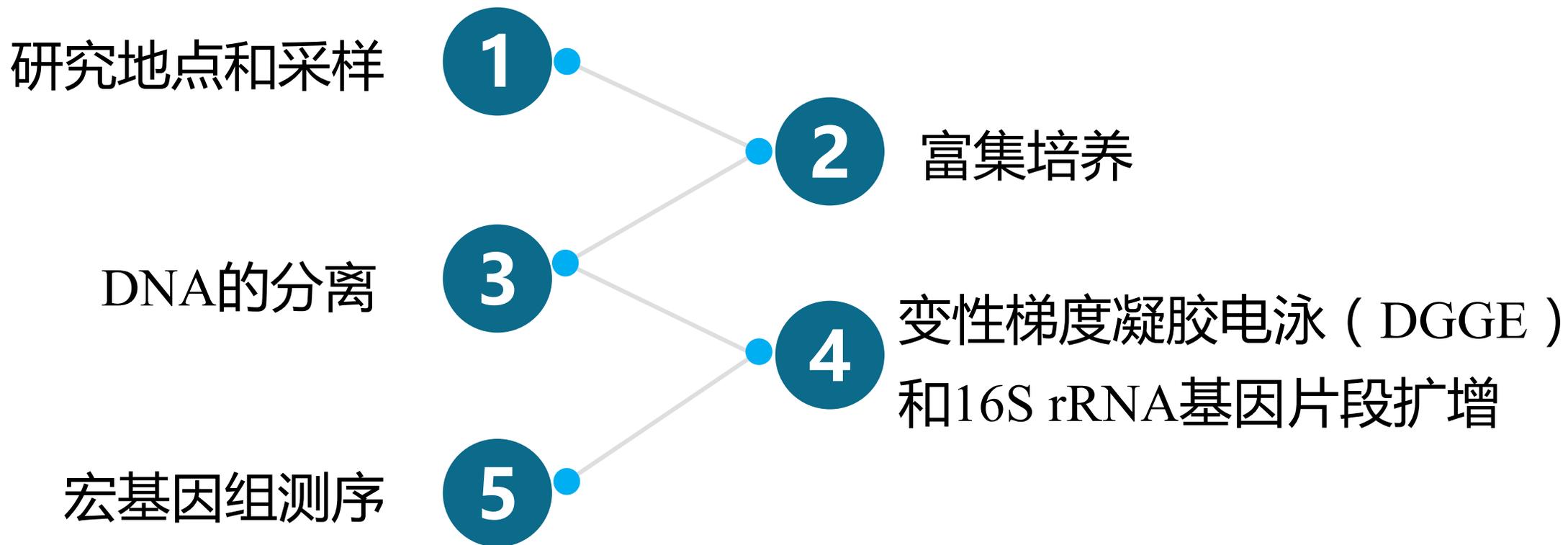
# Materials and methods





# Materials and methods

---





## 1、研究地点及采样

### 地点

采自于Vulcano Island, Italy (意大利武尔卡诺岛) 海岸的两个浅海热液喷口处 (  $38^{\circ}24'59.5''$  N  $14^{\circ}57'39.1''$  E )。

两个热液喷口距离2m，温度为 $100^{\circ}\text{C}$ ，在水深为0.7m处取样。主要由热沙质沉积物，砾石和水组成。

### 样品

样点沉淀物尽力搅拌均匀，将样品吸入注射器。原位测定温度及pH。两个样品转移到无菌瓶中，加入 $\text{Na}_2\text{S}$ 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (连二亚硫酸钠) 使样品保持缺氧，密封 $4^{\circ}\text{C}$ 储存。



# Characteristics of the investigated sites :

**Table 1** Chemical parameters of the original samples I and II

| Sample | pH                    | Na <sup>+</sup> (g/L)               | Fe (mg/L)                            | TIC (mg/L)                          | TOC (mg/L)           |
|--------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| I      | 5.9                   | 11.3                                | 59.2                                 | <5                                  | 9.6                  |
| II     | 5.9                   | 11.4                                | 59.5                                 | <5                                  | 10.0                 |
| Sample | Cl <sup>-</sup> (g/l) | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L) | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L) | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (g/L) | S <sup>0</sup> (g/L) |
| I      | 24                    | <50                                 | <50                                  | 4.0                                 | 1.4                  |
| II     | 24                    | <50                                 | <50                                  | 4.3                                 | 1.42                 |



## 2、富集培养

### 富集培养

在 $N_2 : CO_2$  ( 80:20 ) 气体下，用0.5%淀粉，0.5%槐豆胶和0.5%羧甲基纤维素分别在缺氧条件下进行富集培养，培养温度为 $90^{\circ}C$ 。

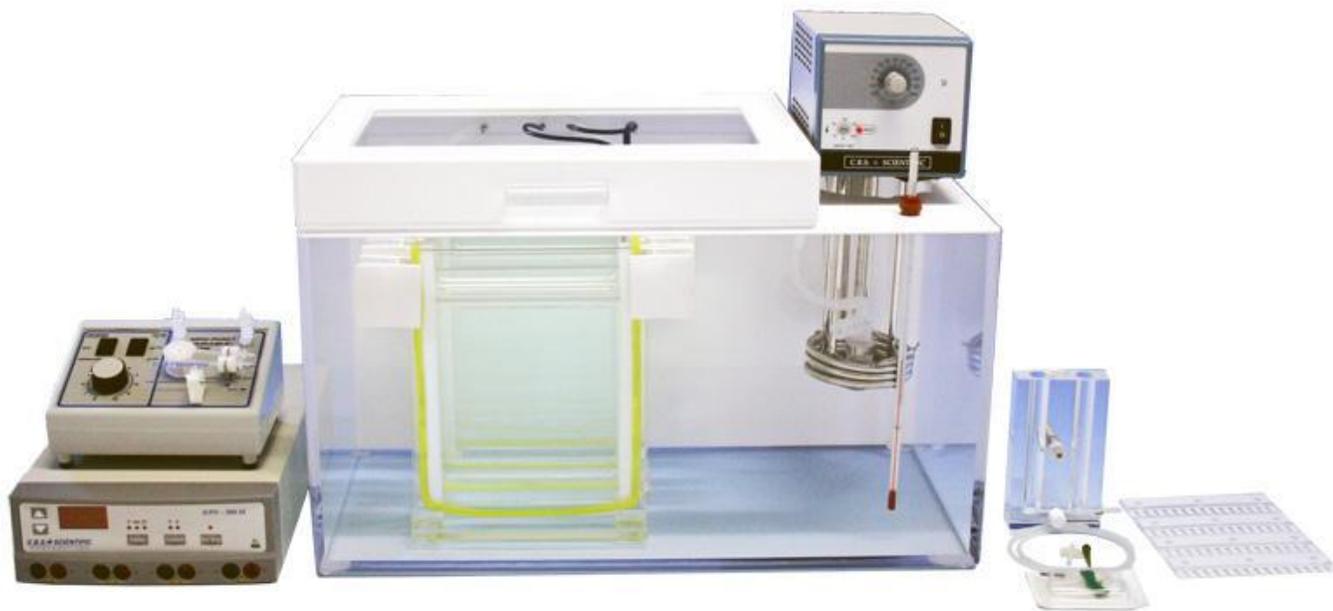
富集培养物用1%样品 II 接种，培养14天，然后再将1%的富集培养物转移到新鲜培养基中进一步培养14天。



## 4、变性梯度凝胶电泳 ( DGGE ) 分析

### 01 概念

概念：根据DNA在不同浓度的变性剂中解链行为的不同而导致电泳迁移率发生变化，从而将片段大小相同而碱基组成不同的DNA片段分开。



## 4、变性梯度凝胶电泳 ( DGGE ) 分析

### 02 特点及应用

用细菌引物 ( 314F和907R ) 和古菌引物 ( Arc334F和Arc915R ) 扩增其相应的16S rRNA基因片段，使用具有30-80%甲酰胺的变性梯度聚丙烯酰胺凝胶分离已扩增的细菌和古菌16S rRNA基因，确定原始样品I和II以及富集培养样品II的多样性。



PART **03**

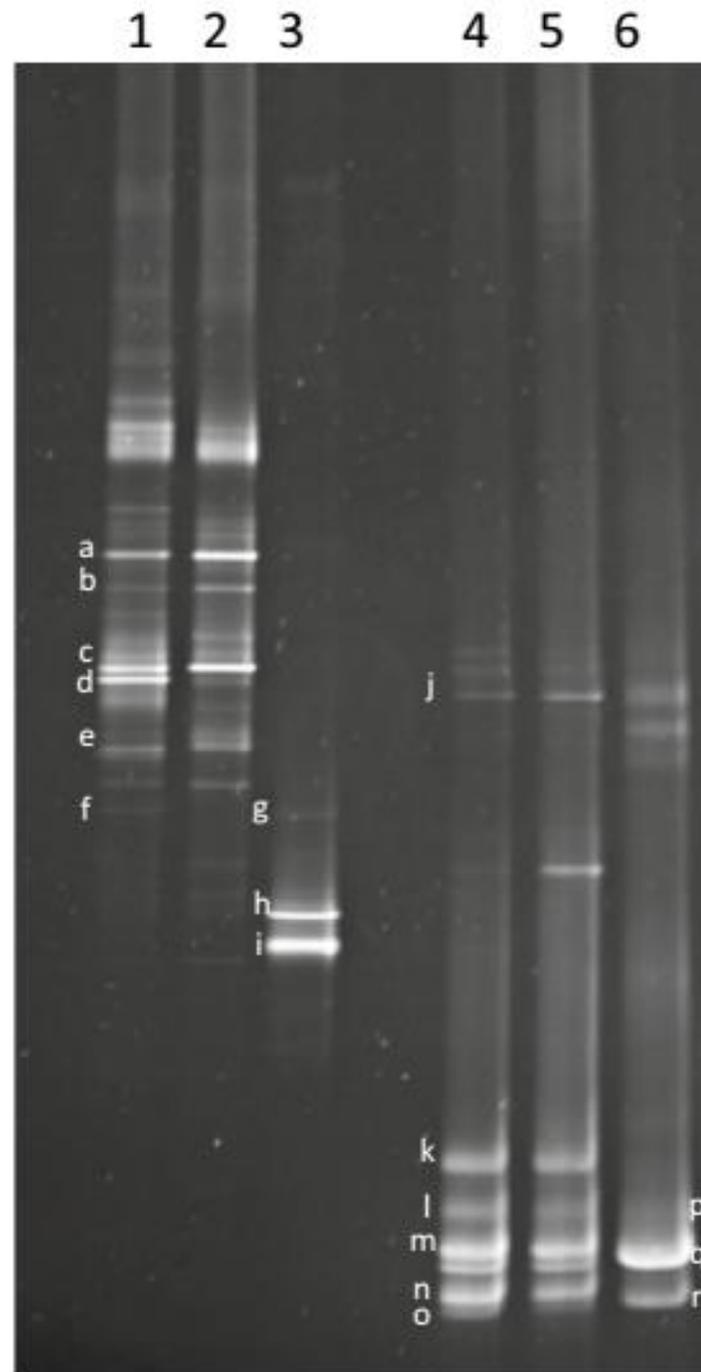
**Results**



# ✈️ 1、梯度凝胶电泳样品的多样性分析

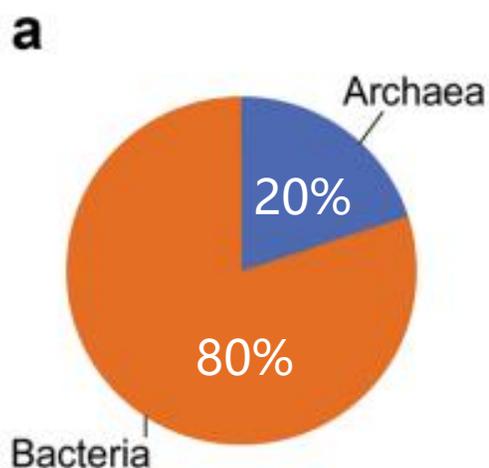
## 泳道：

- 1：细菌群落样本I，
- 2：细菌群落样本II，
- 3：富集培养样本II的细菌群落
- 4：古细菌样本I，
- 5：古细菌群落样本II，
- 6：富集培养的古细菌群落。

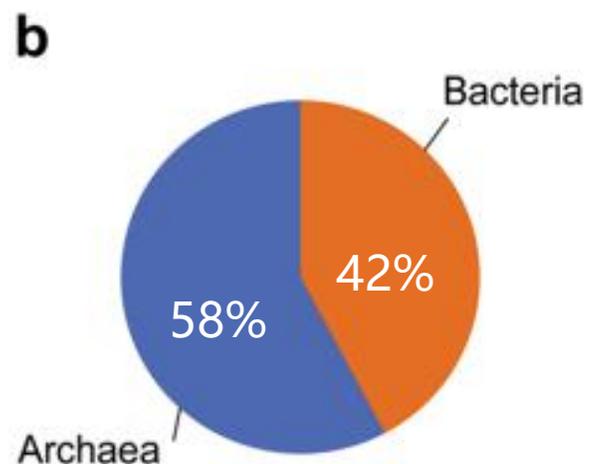


## ✈ 2、基于测序环境样品的多样性和群落组成

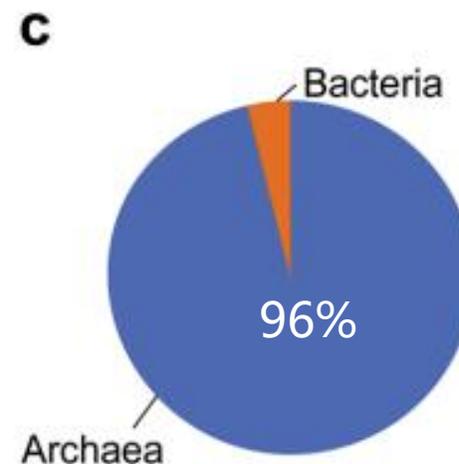
通过Illumina Miseq测序分析以及主成分分析，将蛋白质序列与其已知的微生物（NCBI数据库）比对，测定样品中的古菌和细菌的相对丰度。



原始样品I ( a )



原始样品II ( b )



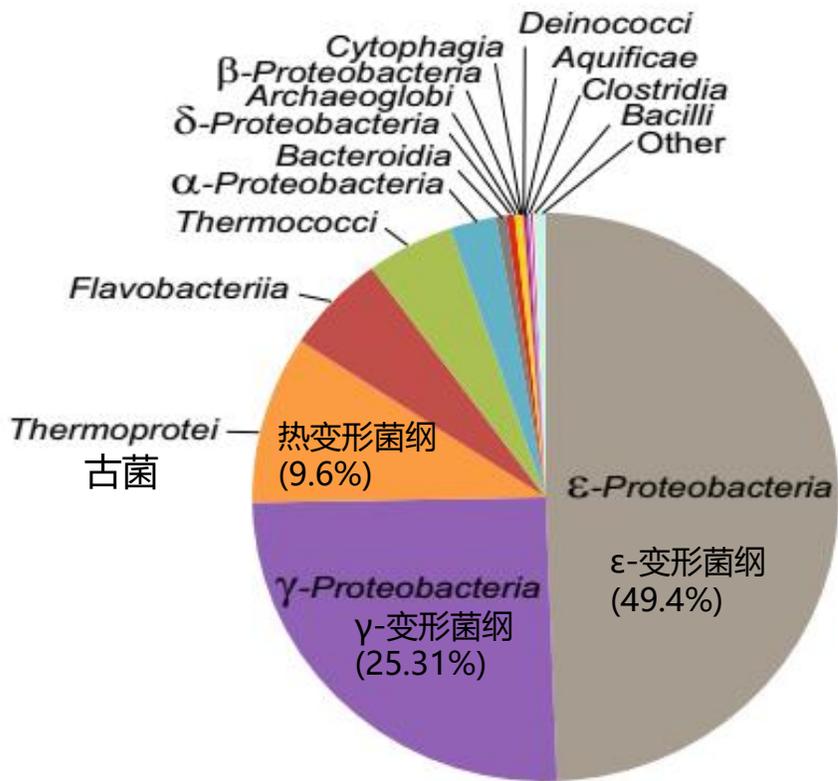
富集培养 ( c )

# 2-1 原始样本I 纲、属水平

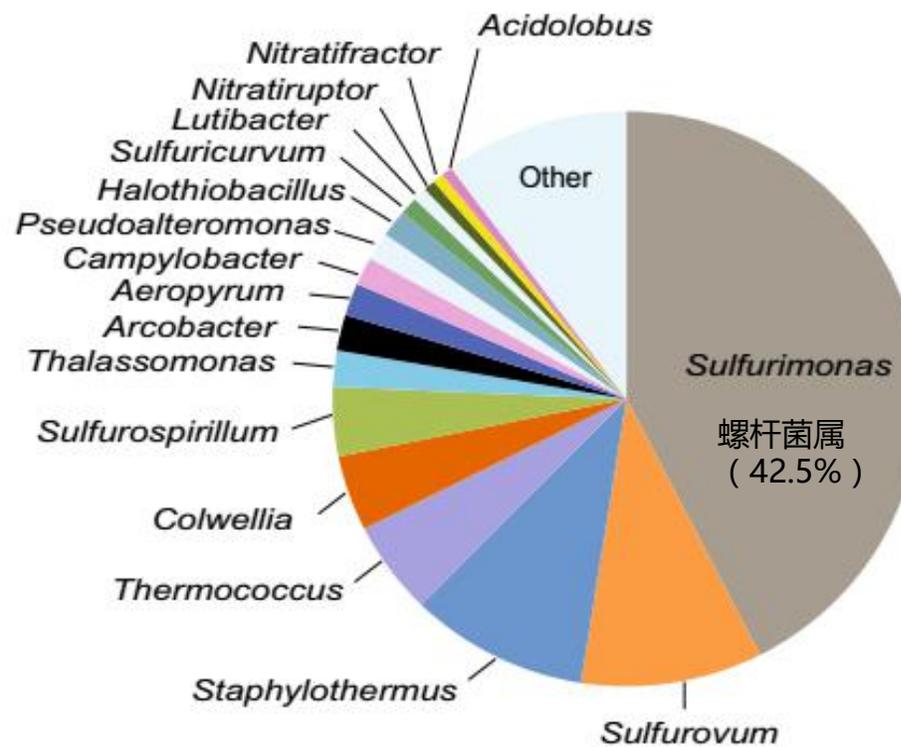
原始样本I

a

Class



Genus

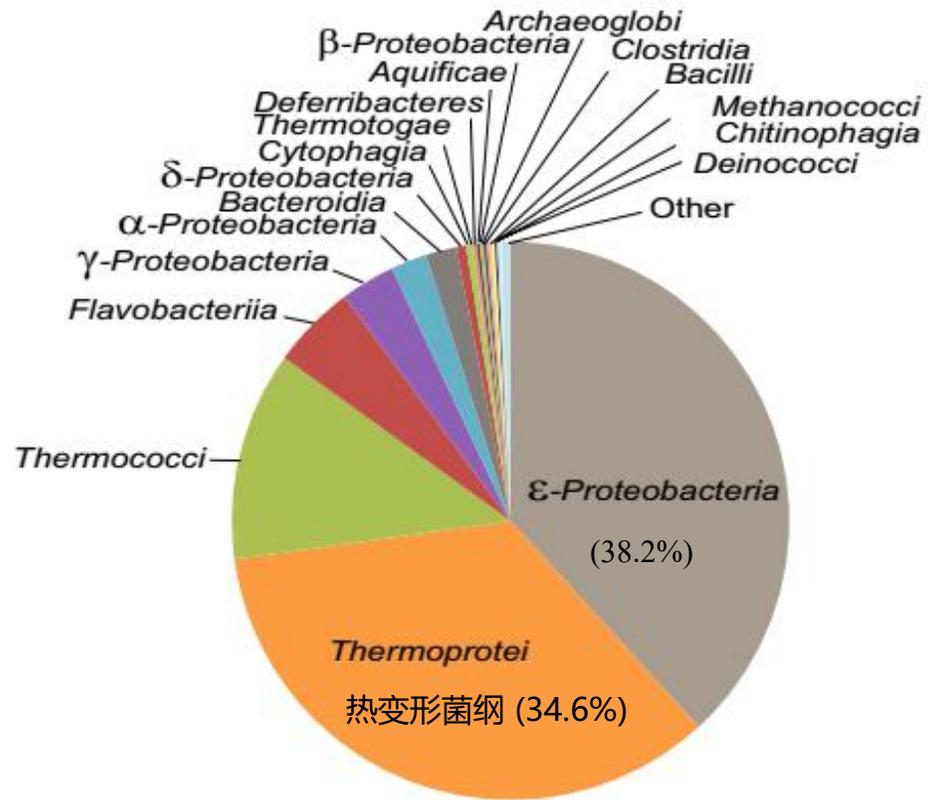




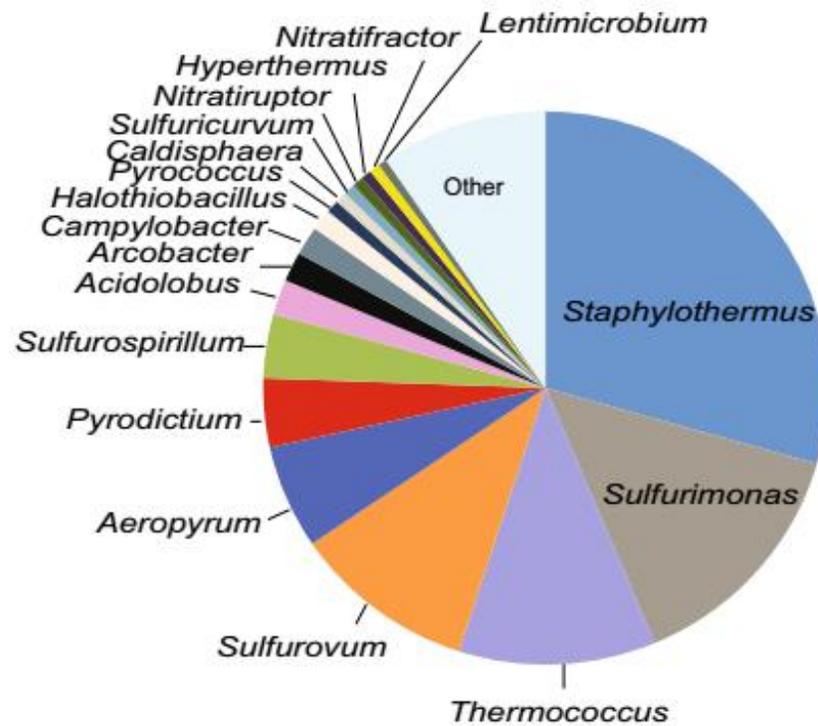
## 2-2 原始样本II 纲、属水平

原始样本II

**b**



**Genus**



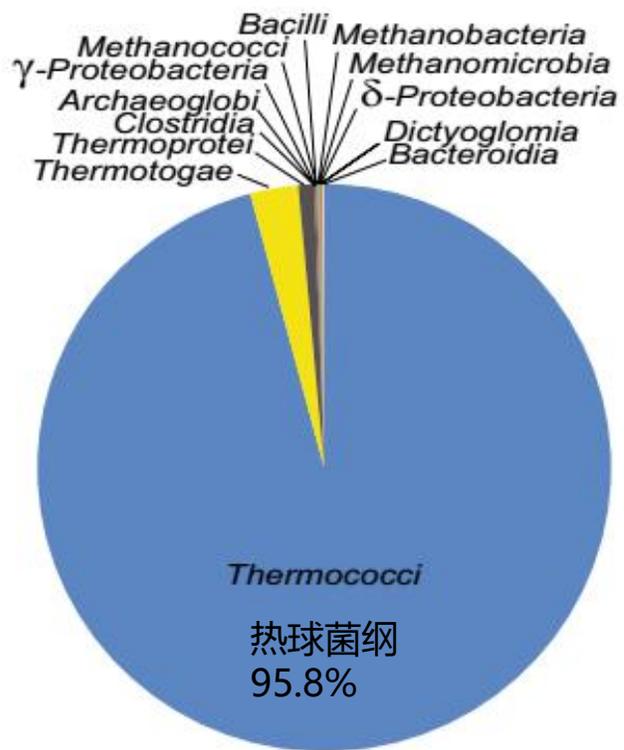


## 2-3 富集培养纲、属水平

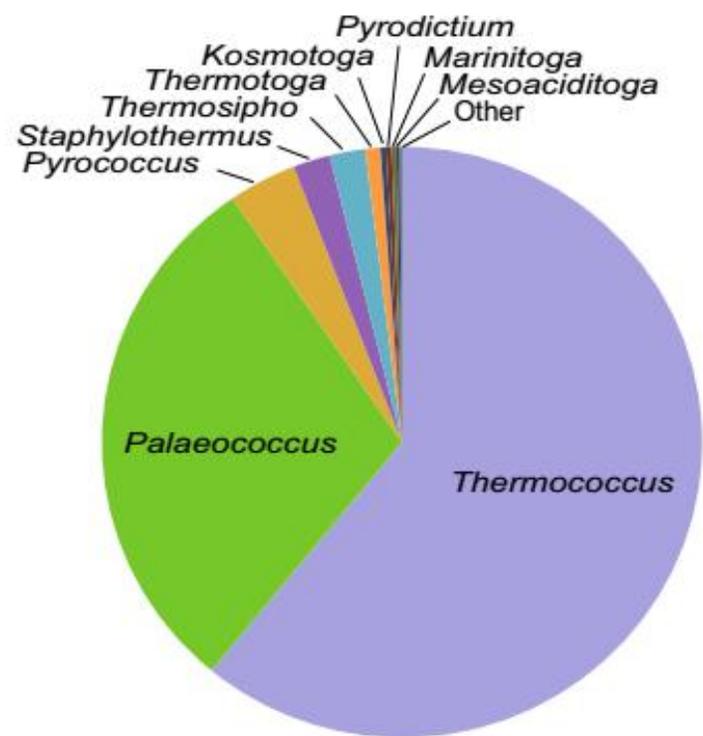
富集培养

c

Class



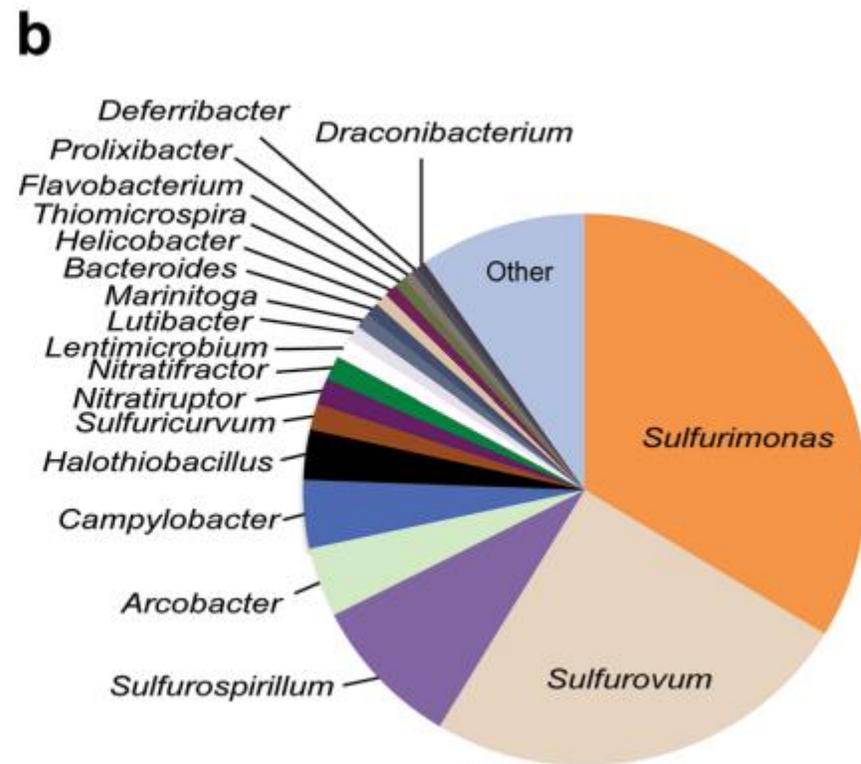
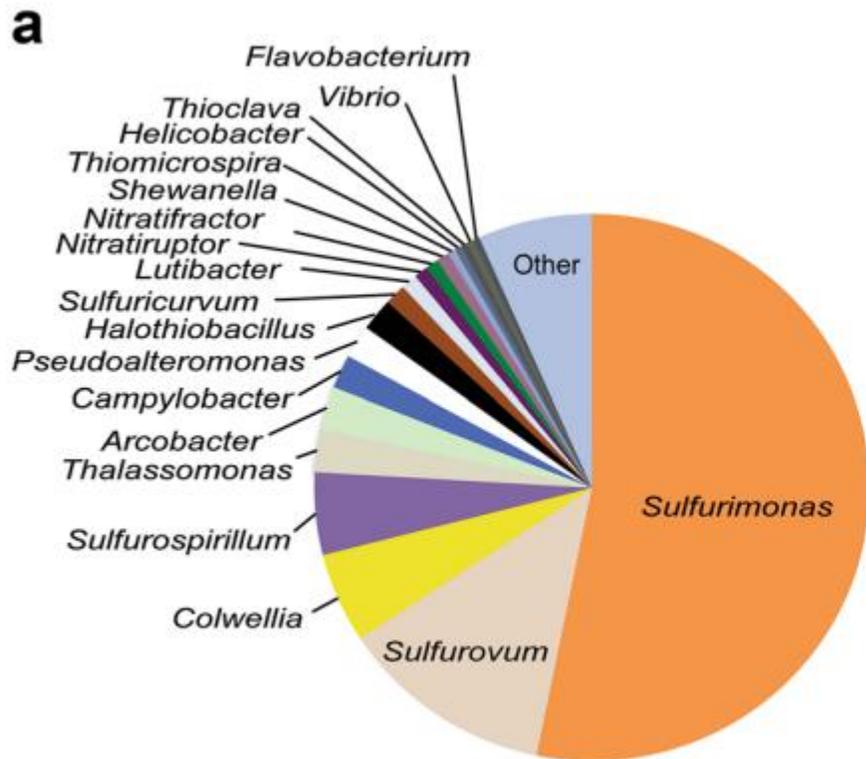
Genus





## 2-5、细菌群落组成

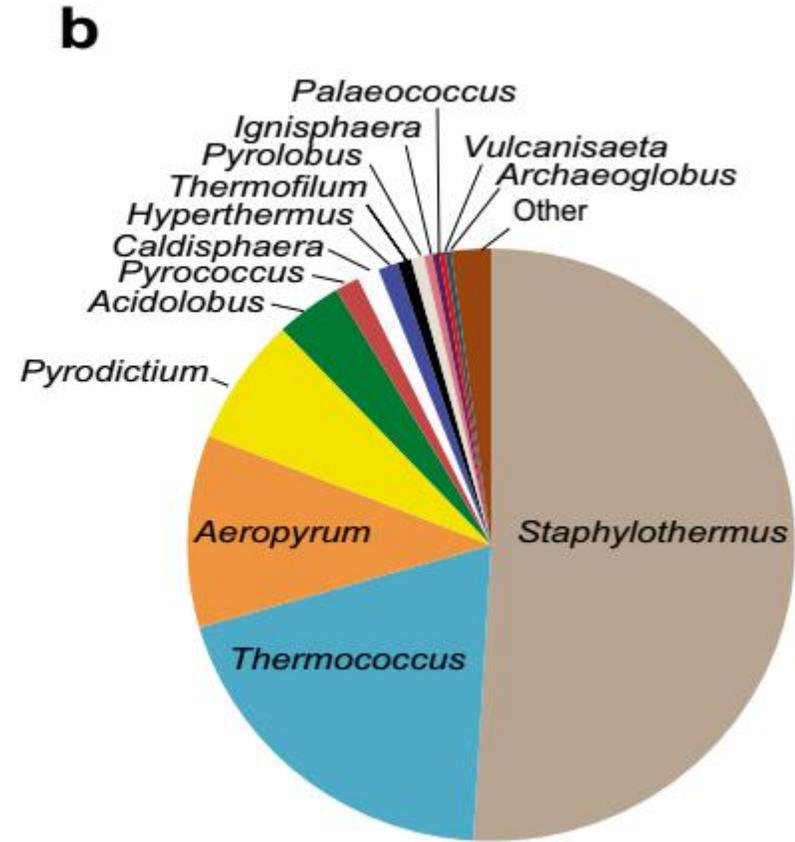
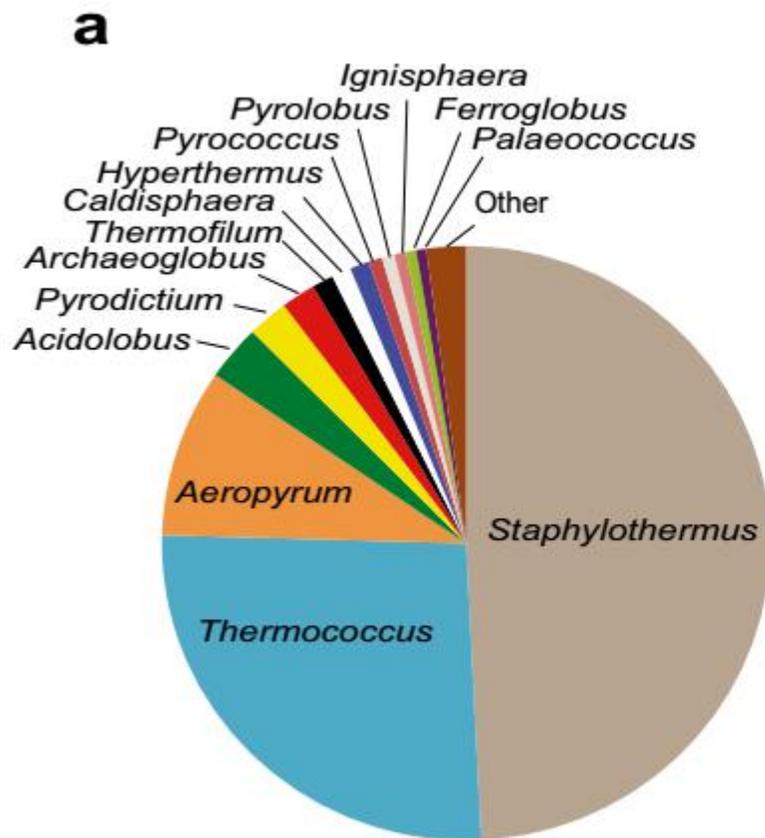
样品 I ( a ) 和 II ( b ) 的细菌群落组成 , *Sulfurospirillum* ( 硫磺单胞菌属 )  
*Sulfurimonas*与*Sulfurovum* ( 螺杆菌属 ) 占主导地位。





## 2-6、古菌群落组成

样品 I ( a ) 和 II ( b ) 的古菌群落的组成非常相似，主要由 *Staphylothermus* ( 葡萄球嗜热菌属 ) ， *Thermococcus* ( 嗜热球菌属 ) 、 *Aeropyrum* ( 气热菌属 ) 、 *Acidolobus* 、 *Pyrodictium* ( 热网菌属 ) 组成。





## 小结

两个浅海热液喷口主要分为四大类，两种细菌 *Sulfurimonas* and *Sulfurovum*（螺杆菌属）和两种古菌 *Staphylothermus* and *Thermococcus*（葡萄球嗜热菌属和嗜热球菌属），样品 I 和 II 各属的总相对丰度分别为67.5和65.48%。

*Colwellia*（细菌属 4.2%），以及 *Thalassomonas*（需氧类 2.0%）和 *Pseudoalteromonas*（假交替单胞菌属 1.6%）只存在于样品 I 中。*Acidolobus*（古菌属 2.04%）只存在于样品 II 中。

除了这些例外情况，两个样品都有相似的属（总丰度 > 0.5%），但相对丰度差别很大。



PART **04**

**Discussion**





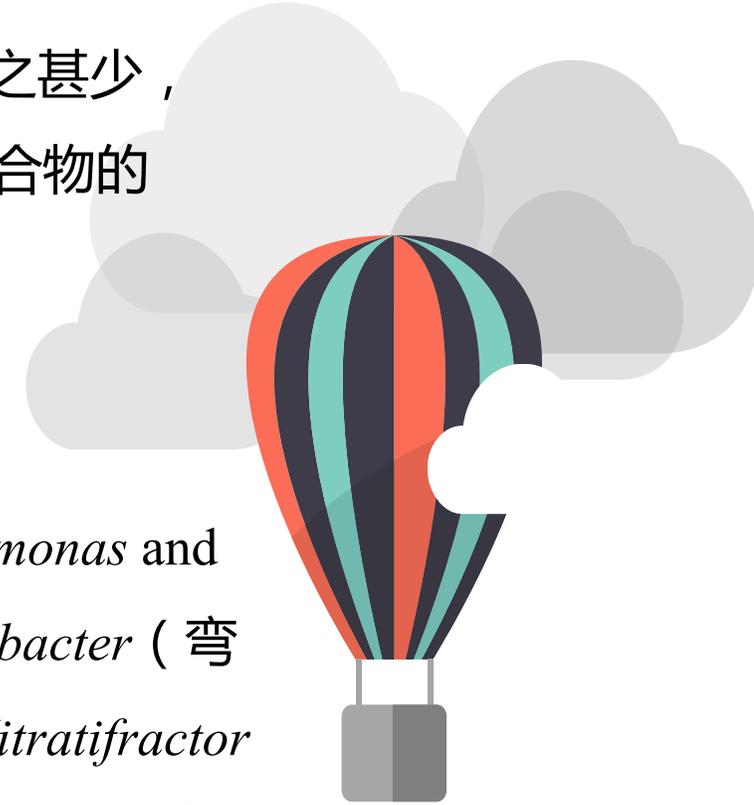
## Discussion



1、目前由于对温度高于80°C的极端热液喷口的微生物群落知之甚少，本研究对90°C的高温下极端嗜热微生物群落组成以及对碳水化合物的适应性提供了深入的见解。



2、关于热液喷口细菌群落，主要是 $\epsilon$ -变形杆菌，特别是*Sulfurimonas* and *Sulfurovum*（螺杆菌属），*Arcobacter*（弓形杆菌属），*Campylobacter*（弯曲菌属），*Sulfurospirillum*（硫磺单胞菌属），*Nitratiruptor* and *Nitratifractor* 占主导地位，占30%（样品II）至62%（样本I）。 $\epsilon$ -*Proteobacteria*是硫和碳循环的关键参与者。





## Discussion



3、有趣的是， $\epsilon$ -变形杆菌含有嗜热菌属（如：*Nitratifactor*）和嗜温菌属（如：*Sulfurimonas*）。在Mariana Volcanic Arc马里亚纳群岛（位于西太平洋）高达40°C的深海热液系统中，发现*Sulfurimonas autotrophica*非常丰富。



4、DGGE分析可初步探讨环境样品的多样性。使用变性梯度凝胶电泳（DGGE）和宏基因组测序组合方法的揭示了Vulcano岛两个独特生境样品的微生物群落组成。



# 请老师批评指正

