

读 书 报 告

汇 报 人：张玲玉

时 间：2016.11.26



JOURNALS
investing in science

FEMS Microbiology Ecology, 91, 2015, fiv141

doi: [10.1093/femsec/fiv141](https://doi.org/10.1093/femsec/fiv141)

Advance Access Publication Date: 12 November 2015

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Cave microbial community composition in oceanic islands: disentangling the effect of different colored mats in diversity patterns of Azorean lava caves

IF=3.530 海洋群岛上微生物群落组成：解开亚速尔熔岩洞穴中不同颜色的微生物垫对微生物多样性模式的影响

目 录

1

前 言

2

材料和方法

3

结果与讨论

4

启发与感想

前言

研究证明，在地下岩石表面的生态系统，微生物通过聚合形成生物膜来加强成活率。世界各地洞穴内细菌门类的存在及相对丰度已经得到评估，变形菌门，拟杆菌门、放线菌门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门、绿弯菌门是最丰富的分类组。

菌席和有机渗出物覆盖熔岩洞壁和天花板，其中白色，黄色和棕褐色是菌席中的主要颜色，近来已经提出颜色作为指示洞穴中环境条件和生物地球化学过程的代表，因为不同颜色的生物膜的分布显然可以受有效营养物和小气候变化的影响。已经有报道说不同的细菌群落分布于不同颜色的微生物垫中，对欧洲古老的碳酸盐岩洞的黄色微生物垫的比较分析揭示了微生物的共同核心，它们中的一些微生物和从熔岩洞壁中的黄色菌席分离的微生物是近亲关系。

亚速尔群岛是北大西洋的一个遥远的群岛，与外界具有生物地理隔离，那里有很多可以进入的熔岩洞穴以及巨大的细菌多样性使亚速尔群岛是一个理想的调查火山岩洞穴微生物多样性的试验场地。亚速尔群岛具有独特的地质结构和特有的大型穴居生物，揭示孤立生态系统生物多样性模式对于保存物种多样性具有重要意义。本研究提供了第一个广泛的，多指标的评估生长在孤立的海洋火山群岛熔岩洞微生物多样性的方法。

本文基于16rRNA基因测序的方法对亚速尔群岛的2个岛屿上13个火山岩洞穴里的彩色菌席进行研究, 利用统计学方法对数据进行分析，结果表明：OTU丰度显示，岛屿和洞穴之间微生物存在较大的 β 多样性，香浓指数则表明洞穴内微生物存在较大的 α 多样性。

材料和方法

研究地点

亚速尔群岛位于北大西洋东中部的火山群岛，为葡萄牙共和国的领土。北纬 $36^{\circ} 55' - 39^{\circ} 43'$ ，西经 $24^{\circ} 33' - 31^{\circ} 17'$ 。有9个火山岛，250个熔岩洞穴。



取样

取样：13个洞穴，分属于Terceira（9个）和Pico（4个）两个岛。其中Gruta das Torres洞当做两个独立的单元，所以相当于在14个洞穴取样。

菌席：每个洞穴取3种微生物垫（黄色、棕褐色和白色）样品，从入口、微弱光照处、洞穴深处（戴手套，无菌操作，取好后迅速放在缓冲液中，实验室-80℃保存）。

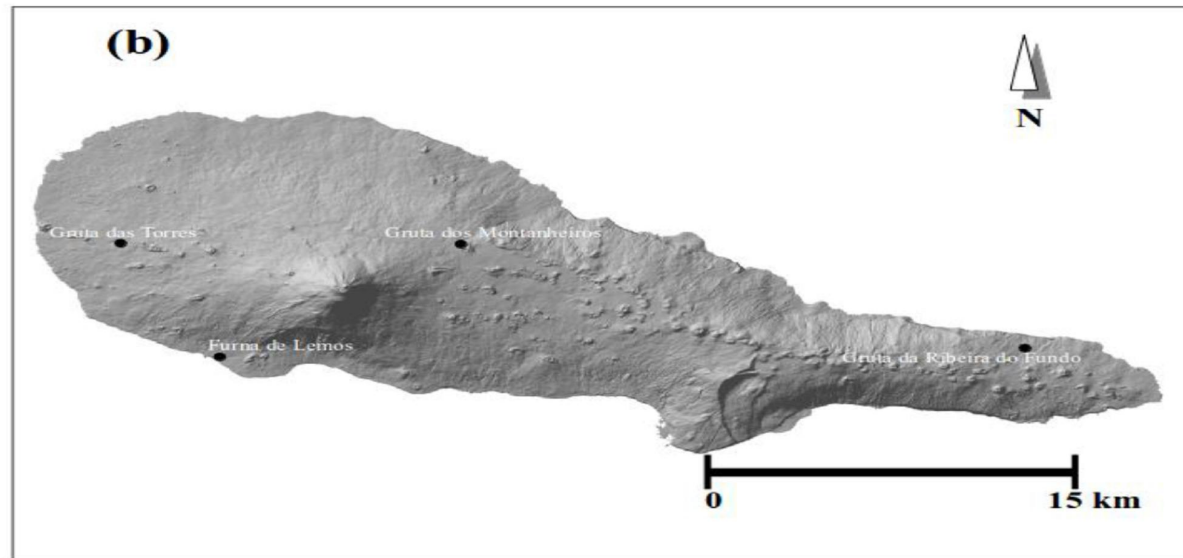
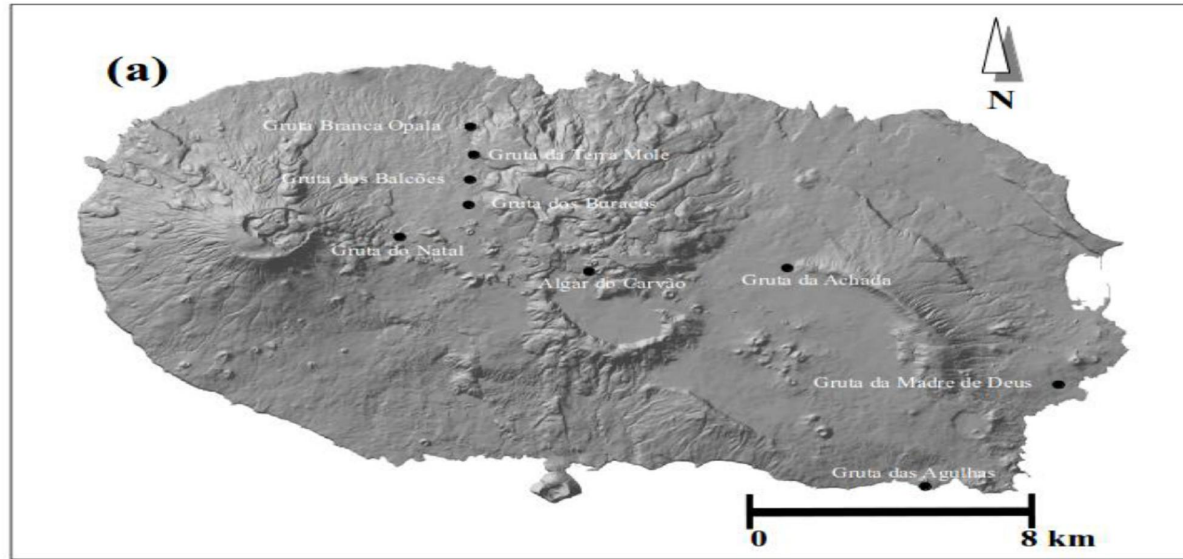
土壤样品：每个洞穴，2个，一个是洞穴入口处、另一个是洞穴深处接近于微生物垫采样点。土壤中C、N含量利用气相色谱分析。

滴水样品：每个洞穴取1个样，Gruta dos Balcoes, Gruta dos Montanheiros 和 Gruta da Ribeira do Fundo这3个洞穴取2个样，取平均。化合物（Cl⁻、Br⁻、SO₄²⁻等）用离子色谱仪进行测定。

Table 1. Names, location and main entrance coordinates measured at the main entrance of each cave.

Caves	Code	Island
Gruta do Lemos	GL	Pico
Gruta dos Montanheiros	GM	Pico
Gruta das Ribeira do Fundo	GRF	Pico
Gruta das Torres (Section 1)	GT	Pico
Gruta das Torres (Section 2)	GT2	Pico
Algar do Carvão	AC	Terceira
Gruta das Agulhas	GA	Terceira
Gruta da Achada	GAS	Terceira
Gruta dos Buracos	GB	Terceira
Gruta dos Balcões	GBL	Terceira
Gruta da Branca Opala	GBO	Terceira
Gruta da Madre de Deus	GMD	Terceira
Gruta do Natal	GN	Terceira
Gruta da Terra Mole	GTM	Terceira

注：黄色表示水样每个洞穴取2个样洞内取（洞口有娱乐设施）



Altitude was measured from each cave.

Sequences white mat^{b)}

- 70
- 71
- 73
- 58
- 53
- 58
- 45
- 49
- 25
- 98
- 72
- 86
- 111
- 20

DNA提取和16S rRNA基因克隆 文库的构建

DNA提取： MoBio PowerSoil DNA分离试剂盒。利用PCR仪对细菌的16S rRNA基因进行扩增

DNA纯化： the QIAQUICK PCR purification kit。

克隆： the TOPO TA Cloning kit。

克隆测序： the Washington University Genome Sequencing Facility，使用T3和T7引物。

序列比对和OTUs划分

序列比对： Sequencher 4.8软件，低于1000bp的剔除。

OTU 划分： software package mothur 1.29.1

序列提交给NCBI GenBank database

统计学分析

工具：R statistical programming environment

多样性指标：OTU丰富度（Jackknife 1, Chao1, ACE）、香农指数，利用方差分析对微生物垫（N=42）、洞穴及岛屿之间的OTU丰富度和香农指数的差异进行检测。

聚类分析：NMDS（非度量多维尺度分析）。

多样性分配： $\gamma_{\text{obs}} = \alpha_{\text{colors}} + \beta_{\text{colors}} + \beta_{\text{caves}} + \beta_{\text{islands}}$ 。

多样性、群落组成、环境条件以及化学变量之间的关系：线性多级模型（LMM）。

扫描电子显微镜检查

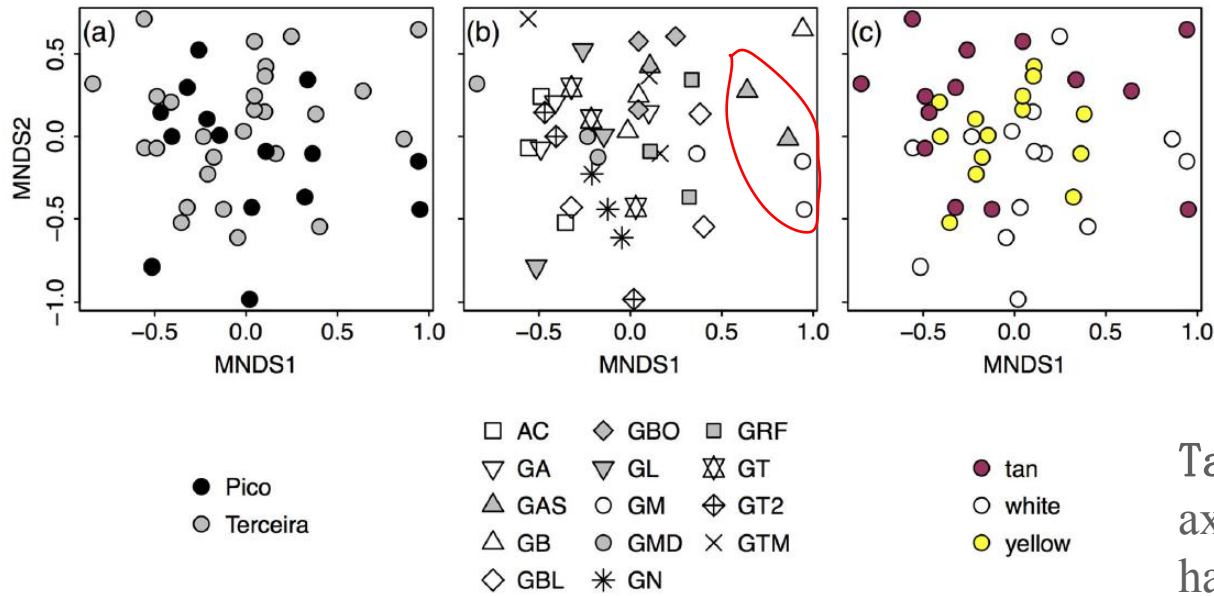
仪器：JEOL 5800SEM，观察不同微生物垫的形态。

结果与讨论

1 统计学描述

将2706个序列归为872个操作分类单元（相似性 $>97\%$ ），20个门，未分类的占OTU总数的12.6%。变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门占分类群的大多数。其中，有5个OTU含有的序列占总序列的33%；OTU866属于克洛氏菌属，503条序列（18.6%），39个样品；OTU870属于硝化螺旋菌属，142条序列（5.2%），34个样品。601个OTU中只含有1条序列（69%），118个OTU含有2条序列（13.5%）。

2 OTU多样性和群落组成



NMDS 1		NMDS 2		NMDS 3	
OTU	r_s	OTU	r_s	OTU	r_s
OTU 868	0.812	OTU 843	0.468	OTU 869	0.473
OTU 679	0.500	OTU 701	0.465	OTU 870	-0.406
OTU 832	0.441	OTU 851	0.441	OTU 811	-0.416
OTU 629	0.429	OTU 869	0.415	OTU 823	-0.433
OTU 870	0.417	OTU 870	0.407		
OTU 435	-0.422	OTU 866	-0.540		
OTU 869	-0.553				

Table S5. Rank Spearman correlation (r_s) between NMDS axis and OTUs distributions performed on NMDS. Only OTU having $r_s > 0.4$ or $r_s < -0.4$ are considered

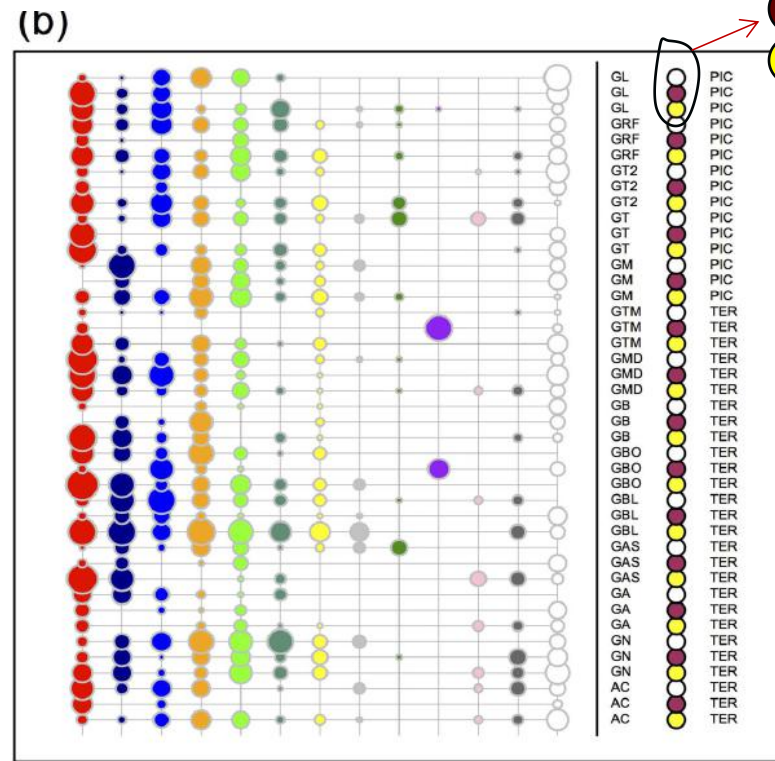
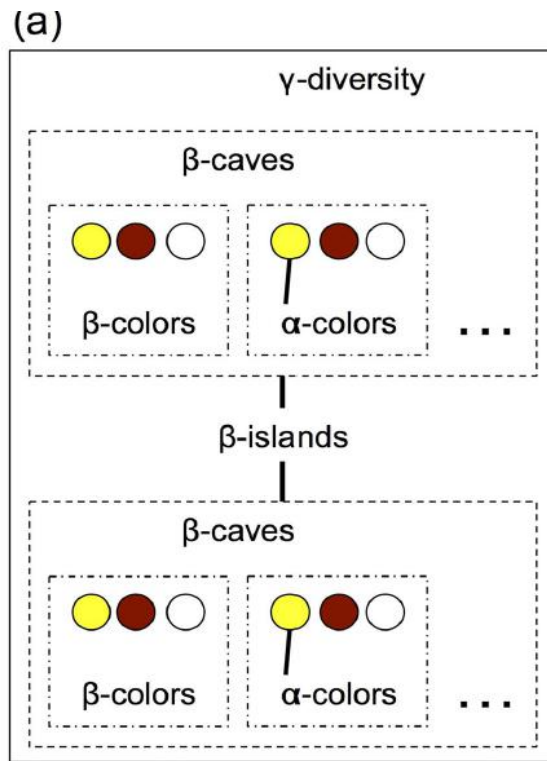
Figure 2. NMDS ordination based on BC dissimilarities of OTU composition (stress = 0.15).

点到轴心及点和点之间距离反映OTU差异性。图b GM(Pico)和GAS(Terceira)的OTU组成与其他洞穴差异较大 ($P=0.001$)。Post-hoc tests显示: GAS和AC、GMD差异大, GM和AC、GA、GMD、GL、GT差异大 ($P<0.05$)。从表S5可以得到差异性具体反映在以下OTU: 较高的丰富度, OTU868、OTU679、OTU832、OTU629、OTU870;较低的丰富度, OTU869、OTU435。

3 多样性分配

为了了解3个层次的群落结构，本研究采用了多样性的加性分配方法，将OTU多样性分割为群落内多样性（ α -diversity）和群落间多样性（ β -diversity）。通过OTU Richness和Shannon diversity分析，可以得到：
$$Y_{obs} = \alpha_{colors} + \beta_{colors} + \beta_{caves} + \beta_{islands}。$$

多样性分配: $\gamma_{obs} = \alpha_{colors} + \beta_{colors} + \beta_{caves} + \beta_{islands}$



- 红色: 放线菌;
- 蓝色: γ -变形菌;
- 绿色: 硝化螺旋菌;
- 亮黄: β 变形菌;
- 青色: 绿弯菌;
- 粉色: 拟杆菌;
- 白色: 未分类
- 藏青: α -变形菌
- 姜黄: 酸杆菌
- 灰绿: δ 变形菌
- 灰色: 芽单胞菌
- 紫色: 厚壁菌
- 深灰: 其他 (微生物少)

- Archipelago (Azores)
- Islands (Terceira & Pico)
- Caves
- Mat colors

- Actinobacteria
- Alphaproteobacteria
- Gammaproteobacteria
- Acidobacteria
- Nitrospirae
- Deltaproteobacteria
- Betaproteobacteria
- Gemmatimonadetes
- Chloroflexi
- Firmicutes
- Bacteroidetes
- Other
- Unclass

OTU Richness
Shannon diversity

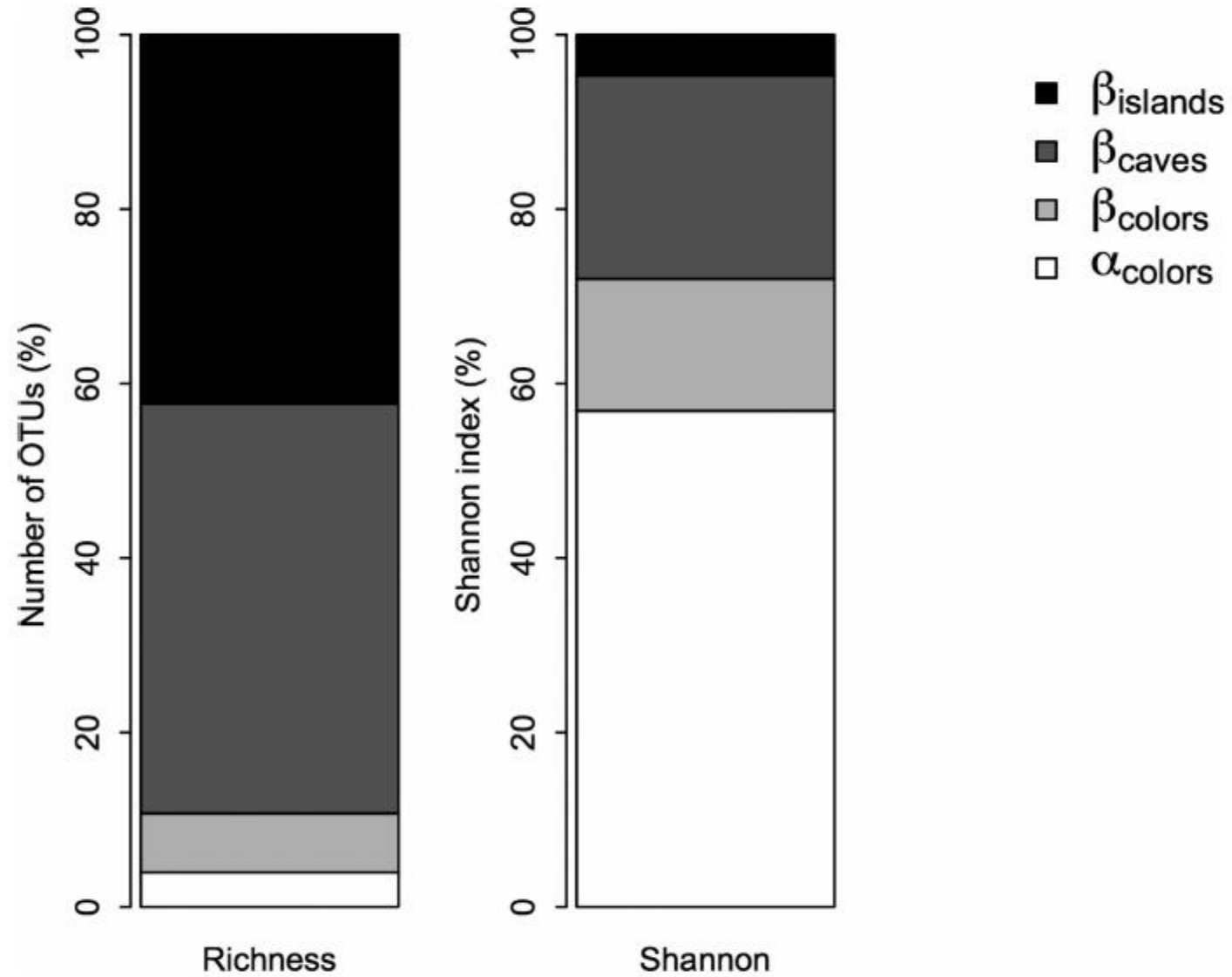
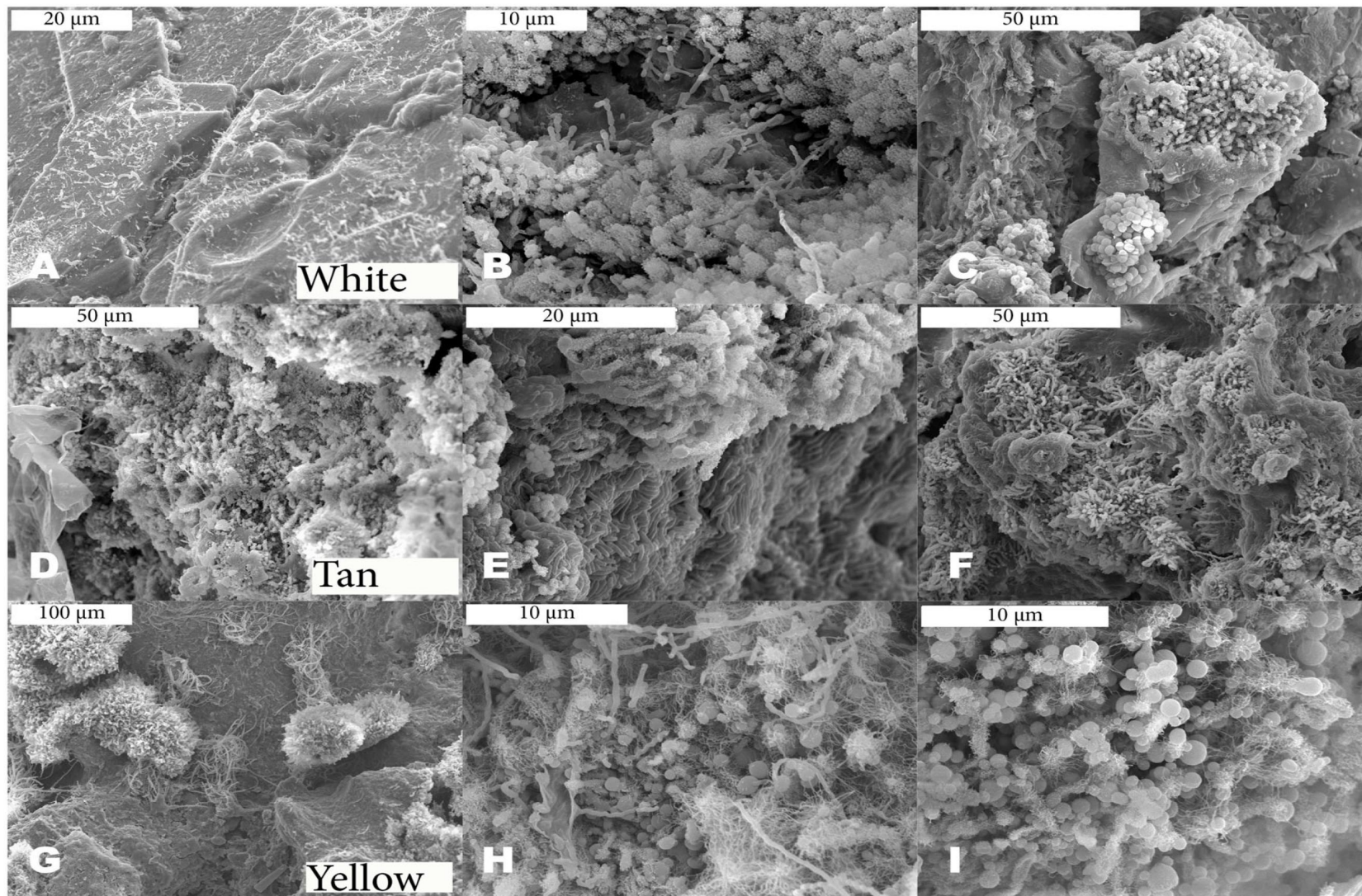


Figure 3. Additive partitioning for OTU richness and Shannon Index observed at all scales. Results are expressed as percentages of γ diversity. Results of the statistical tests are given in Table 2.

Table 2. Additive partitioning of α and β OTU diversity considering both richness and Shannon index.

	Observed	Expected	P-values
Richness			
α_{colors}	34.476	32.723	<0.001
β_{colors}	58.952	59.380	0.346 (ns)
β_{caves}	409.571	410.084	0.864 (ns)
β_{islands}	369	369.812	0.864 (ns)
Shannon			
α_{colors}	2.973	3.370	<0.001
β_{colors}	0.791	0.727	<0.001
β_{caves}	1.218	0.899	<0.001
β_{islands}	0.244	0.231	0.258 (ns)

4 扫描电镜下的微生物形态



B-I: 毛发状的丝状体和多瘤物扩张。

A、H: 氧化铁生物膜。

B-D、H: 平滑的丝状体（3种颜色都有）。

H、I: 球状主要出现在黄色微生物垫。

讨论

- ① 变形菌门作为优势分类群，与早期研究结果相一致(Hathaway et al. 2014a)。放线菌门、酸杆菌门、硝化螺旋菌门、绿弯菌门作为优势门类出现在所有洞穴中，这种优势在其他洞穴系统同样存在（富含硫的除外，Barton et al. 2014; Hathaway et al.2014a）。
- ② β 多样性对于研究多样性模式具有重大意义，对OTU丰度， β caves 和 β islands对总体多样性贡献最大。
- ③ 在亚速尔洞穴中细菌的分布和菌席的颜色没有很大的联系，与以前在碳酸盐洞穴的研究截然不同。如：对3个碳酸盐洞穴(Porca et al. 2012)研究，*Pseudonocardiaceae* 科，Chromatiales 目，*Nitrospira*属仅仅出现在黄色菌席，但是在亚速尔洞穴中，出现在所有颜色的菌席里（OTU866、869、870）在其他研究中Xanthomonadales order（黄色单胞菌目）在黄色菌席中出现并占优势，但是在本研究中，黄色单胞菌目在白色菌席占优势。

- ④在本研究中发现环境变量与细菌多样性之间缺乏相关性，可能是因为研究过程中缺乏相关的环境描述，由于操作困难而不能准确地表征每个微生物垫的微环境，我们可能错过了决定微生物多样性的重要环境变量，这是需要改进的地方。
- ⑤在极端环境中产生和维持微生物的多样性的这种进化机制是复杂的，加性分配这个方法的应用可以很好的解决这个难题。

启发与感想

- ①实验的设计很完整（取样-实验的开展-数据的处理），文章布局清晰，对我目前的学习都有很大的帮助。
- ②统计学知识的应用。



**THANK
YOU**