

读书报告

汇报人：程利娇

汇报时间：2018.04.14





文章



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Applied and Environmental
Microbiology®

MICROBIAL ECOLOGY



Differences in Temperature and Water Chemistry Shape Distinct Diversity Patterns in Thermophilic Microbial Communities

Cecilia M. Chiriac,^{a,b} Edina Szekeres,^{a,b} Knut Rudi,^c Andreea Baricz,^{a,b}
Adriana Hegedus,^{a,b} Nicolae Dragoş,^{a,b} Cristian Coman^a

NIRDBS, Institute of Biological Research, Cluj-Napoca, Romania^a; Molecular Biology and Biotechnology Department, Faculty of Biology and Geology, Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania^b; Chemistry, Biotechnology and Food Science Department, Norwegian University of Life Sciences, Aas, Norway^c



目录
CONTENTS



01

Introduction

02

Materials and
methods

03

Results and
discussion

04

Conclusions





PART 01

Introduction





What is microbial mats ?



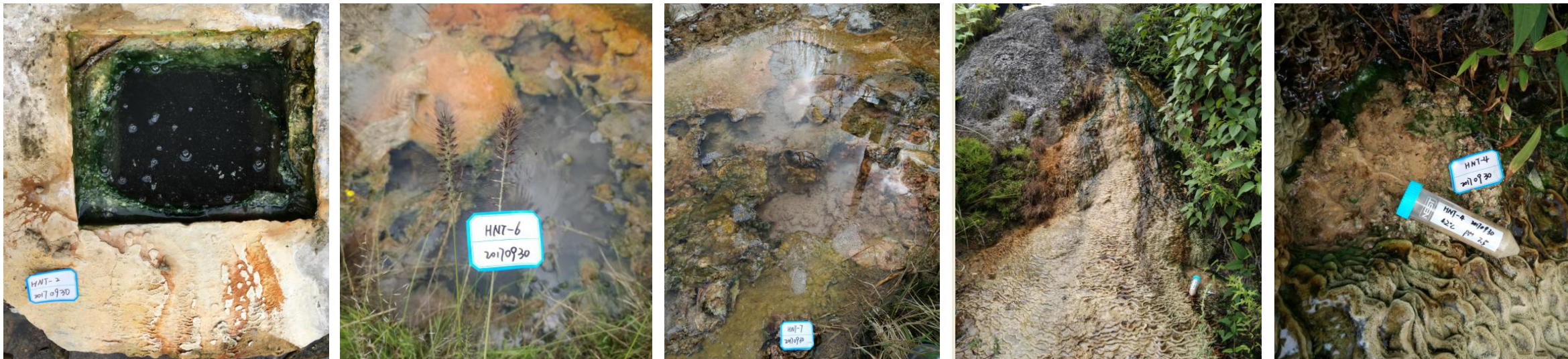
Introduction

微生物席是地球上最早的生命形态，距今大概35亿年前。自出现后，成为地球生态系统中最为重要的成员和生态系统的重要维持者。

生命起源“**海底起源说**”认为：生命起源于海底热烟囱或热液口附近，这些最古老的生命形态生活在高温(热泉口附近温度高达300°C以上)、高压、缺氧、偏酸和无光的环境中，属于化能或光能自养细菌、古细菌。



Introduction



热泉微生物席是地球上生命形态的显着体现，数十年来一直深入研究。由于热泉是一个独立的区域，生物体、营养物质及能量与周围环境交换有限，热泉微生物群落作为研究极端环境下生物繁殖扩增潜力的模型。



Introduction

热泉微生物席组成和生态系统的复杂性似乎主要取决于温度。 (Bolhuis H, 2013.)

从不同地区的热梯度热泉采集的微生物席样品，群落组成没有出现随位置的特异性变化，相反，温度足以解释其变化。 (wang, 2013.)

其它研究发现，硫化物浓度 (Purcell D, 2007.) 和pH值 (Hjorleifsdottir S, 2001. 24) 是控制热泉微生物席样品之间相似性的重要因素。



本研究样品采自罗马尼亚的三个热泉（Chiraleu [CH], Ciocaia [CI]和 Mihai Bravu [MB]）附近不同温度梯度（20-65°C）热泉微生物席，每个热泉样点具有独特的物理化学特征。

通过对16S rRNA基因及其转录产物进行测序，基于DNA metabarcoding 技术对原核微生物进行多样性分析。以期更全面地探究温度、水体理化性质对微生物的丰富度、群落组成和生物多样的影响。





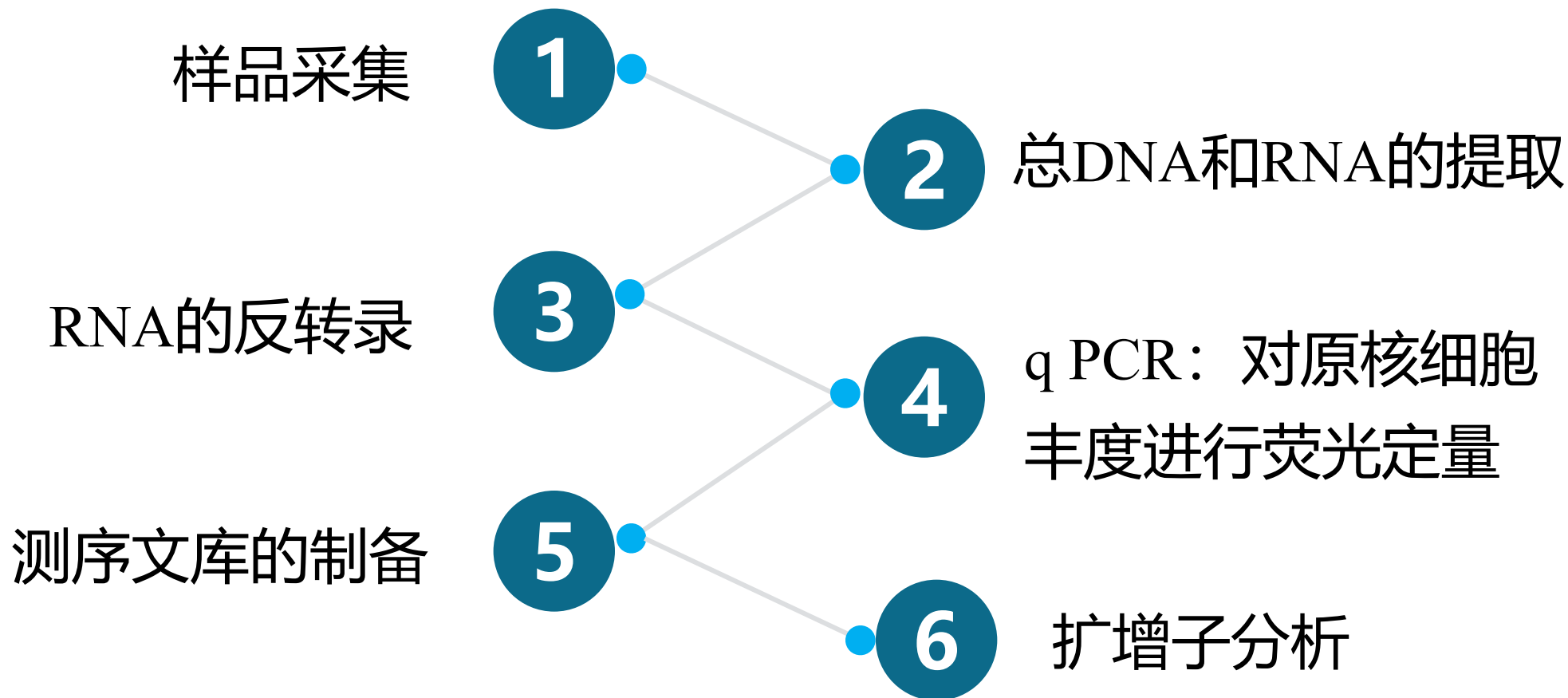
PART **02**

Materials and methods





Materials and methods





位置信息

样品于2013年，在罗马尼亚某一村庄三个废弃热泉Chiraleu (CH) , Ciocaia (CI) 和Mihai Bravu (MB) 附近采集，温度梯度为20-65°C 。

TABLE 2 Hot springs investigated in this study

Hot spring	GPS ^a location	Sample temp (°C)	DNA sample code	cDNA sample code
Chiraleu	N47.3036 E22.2998	40	CH40	CH40r
		46	CH46	CH46r
		53	CH53	CH53r
Ciocaia	N47.3327 E22.0514	20	CI20	CI20r
		35	CI35	CI35r
		65	CI65	CI65r
Mihai-Bravu	N47.2616 E21.9449	53	MB53	MB53r
		59	MB59	MB59r
		65	MB65	MB65r

^aGPS, Global Positioning System.



Physicochemical characteristics of the hot spring waters

TABLE 1 Physicochemical characteristics of the hot spring waters^a

Parameter	Value for:		
	Chiraleu	Ciocaia	Mihai-Bravu
Na ⁺ (mg/liter)	676	4,120	931
K ⁺ (mg/liter)	16.5	99.2	13.3
Ca ²⁺ (mg/liter)	4.53	10.2	15
Cl ⁻ (mg/liter)	1,160	820	537
HCO ₃ ⁻ (mg/liter)	1,140	1,980	895
CO ₃ ²⁻ (mg/liter)	96	<6	132
SO ₄ ²⁻ (mg/liter)	2.7	18.9	50
NH ₄ ⁺ (mg/liter)	23.2	25	0.09
Fe ²⁺ (mg/liter)	0.136	0.114	0.383
Mn ²⁺ (mg/liter)	0.008	0.004	0.018
NO ₃ ⁻ (mg/liter)	0.59	0.81	1.08
PO ₄ ³⁻ (mg/liter)	120	390	150
pH	7.86	7.75	7.91
Water temp (°C)	57	67	60
Water flow (liters/s)	4	3.5	4.5
Conductivity (μS/cm)	2,570	12,100	2,780

^aSO₄²⁻ data are from reference 92; all other data are from reference 91.



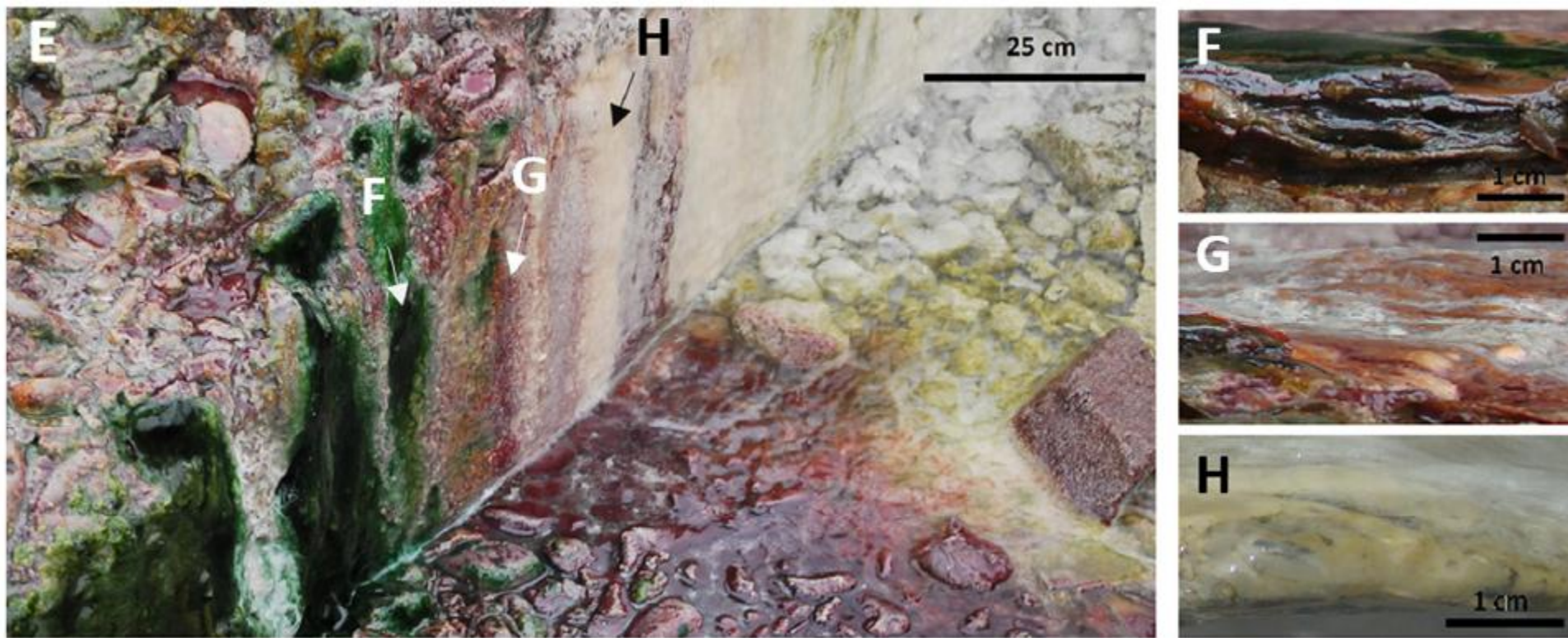
采样点-Chiraleu



在Chiraleu钻井周围 (图6A) , 在53°C时没有明显的垂直分层 (图6B) , 并且在46°C有一个黄色的微生物席, 典型的层压结构 (图6C) 。 40°C取样为薄薄的微生物席, 光滑的橙色表面和下面的绿色层 (图6D) 。



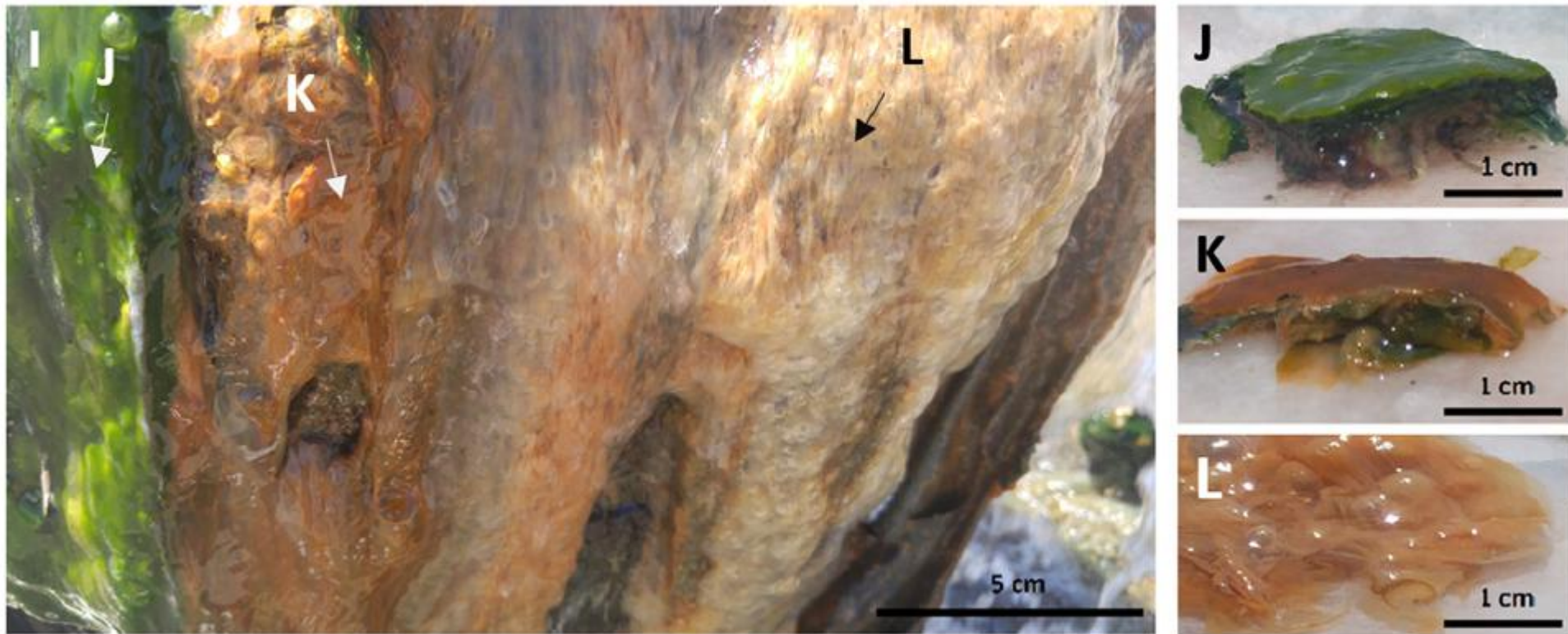
采样点-Ciocaia



在Ciocaia钻孔附近观察到三种不同的微生物席（图6E），包括在20°C形成的绿色，粘液和分层微生物席（图6F），在35°C形成的红色和粘糊状微生物席，没有显示出清晰的分层（图6G），以及在65°C的白色微生物席，在基质附近形成固化结构，并具有半透明的粘液表层（图6H）。



采样点-Mihai Bravu



在Mihai Bravu钻孔开口附近 (图6I) , 存在一个在53°C形成的绿色薄层, 致密且光滑的微生物席 (图6J) , 59°C存在分层的微生物席, 橙色的顶层和绿色的下层 (图6K) , 以及在65°C沿着热水流动, 形成乳白色长而柔软的结构 (图6L) 。

样品采集



使用WTW Multi 340i多参数水质分析仪，确定每个样点微生物席表面和底部的温度及其理化参数。



对于DNA和RNA提取，每个样点收集约3g的微生物席于15ml 离心管中（一式三份），立即加入TRIzol试剂，防止RNA降解，总共18个样品，放于冰上运输到实验室。



✈ 原核细胞丰度的荧光定量

用PRK341F、PRK806R引物对提取的总DNA和c DNA中的16S rRNA基因进行荧光定量PCR(QPCR)

体系

1* Sso Fast Eva Green Super Mix : 7 μ L

PRK341F: 0.2 μ L

PRK806R: 0.2 μ L

模板DNA/c DNA: 1 μ L

ddH₂O: 5.6 μ L

Total: 14 μ L

程序

98°C: 120 s 初变性

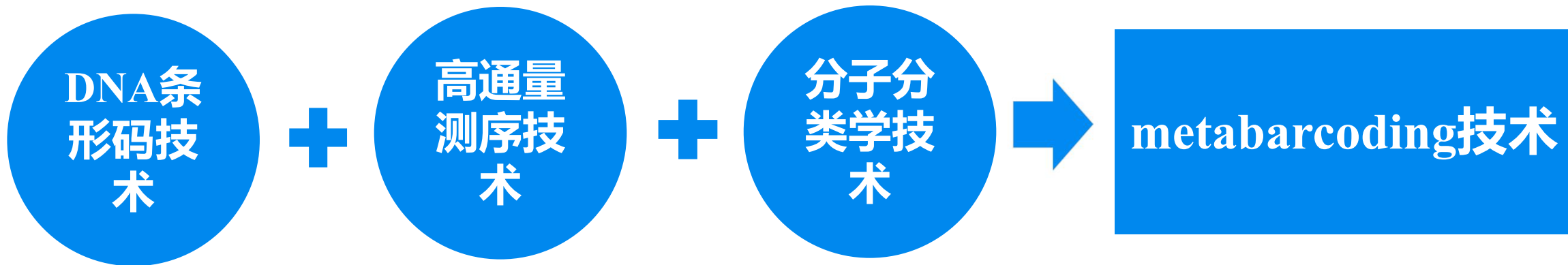
45个循环

98°C: 10 s 退火

55°C: 30 s 延伸

通过比较基因拷贝数来计算扩增结果

DNA metabarcoding 技术



利用高通量测序技术获得条形码基因扩增子序列，通过生物信息学手段分析鉴定群落的物种多样性及其组成的方法。

可对包含大量物种的混杂样品和直接取自于环境的样品进行快速准确的物种鉴定和生物多样性分析，实现从物种的有效识别到生物多样性的评估。



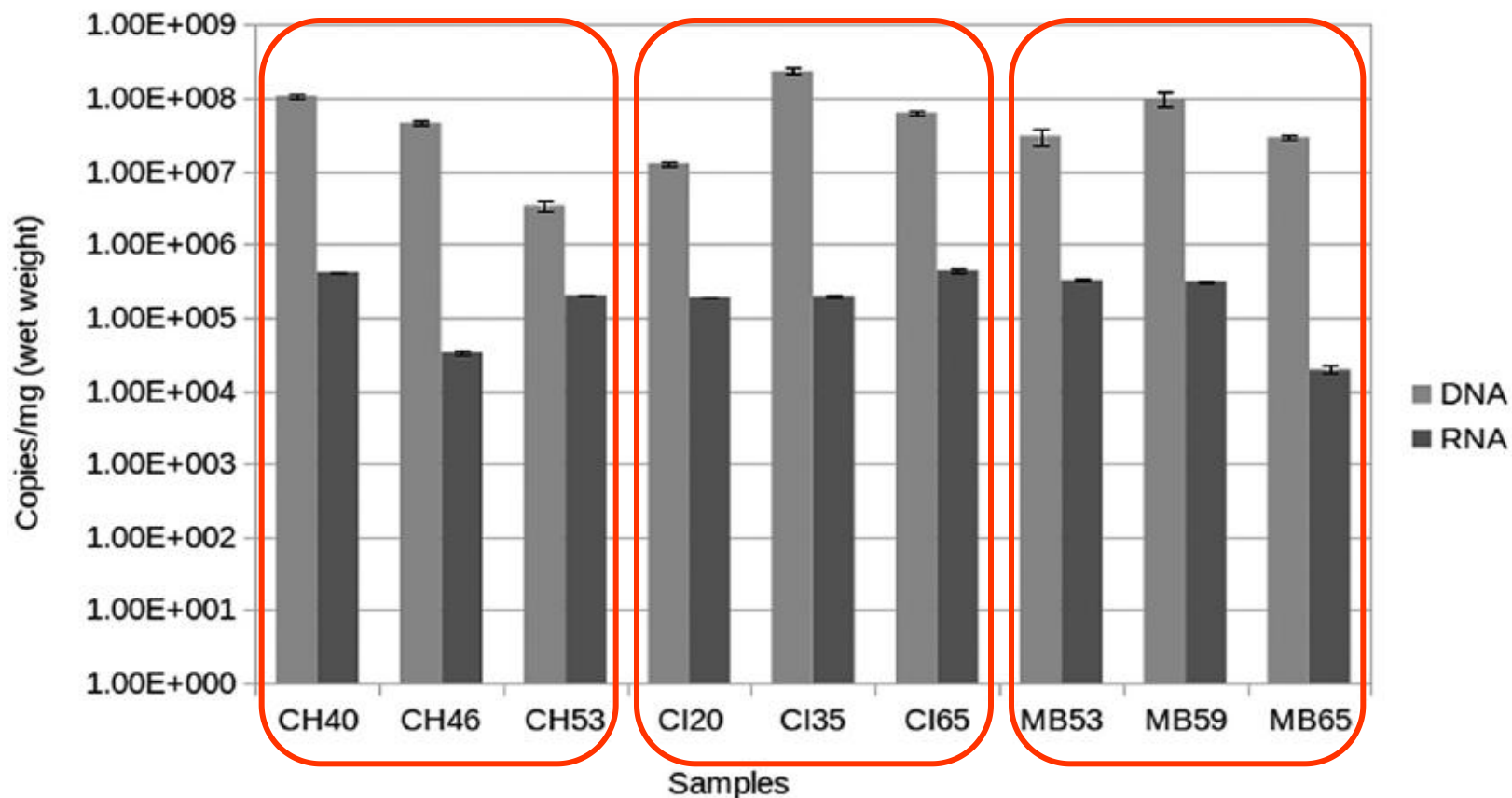


PART **03**

Results and discussion



✈️ 1、原核16S rRNA基因及转录物的丰富度



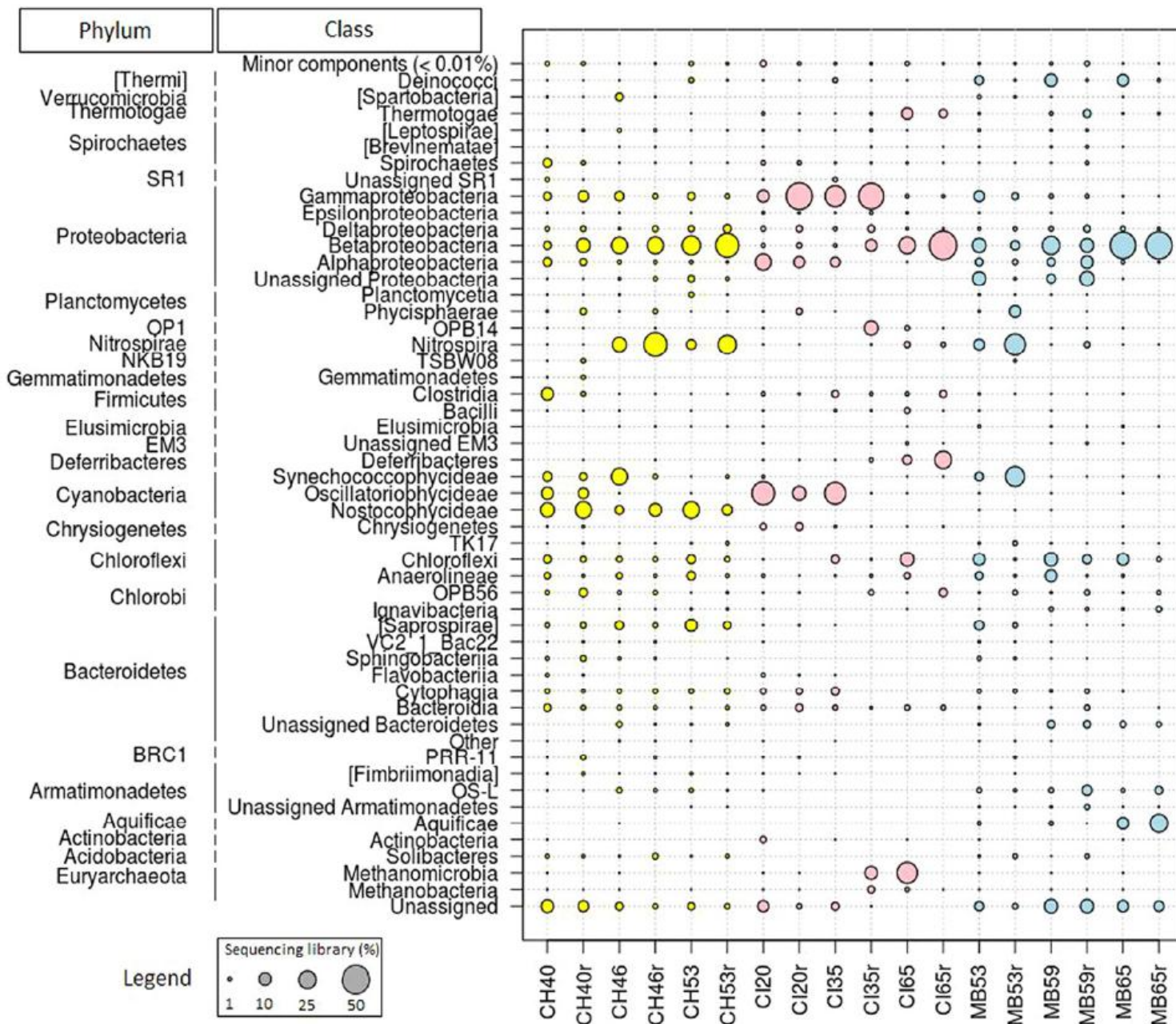
以16S rRNA基因为靶基因, 通过 (qPCR), 对样品中的原核微生物DNA和cDNA的丰度进行定量鉴定, 发现样品中转录物cDNA的丰度比DNA低2至3个数量级。

FIG 1 Quantification of 16S rRNA gene and transcript abundances by qPCR in each of the investigated hot spring microbial mats.

✈ 1、原核16S rRNA基因及转录物的丰富度

Why ?

细胞丰度的评估不应仅仅基于16S rRNA基因。一些研究表明，多达90%的游离DNA在沉积物中是稳定的，并且不受核酸酶的影响。因此，提取的总DNA可能不仅包括存在于环境中微生物的DNA，而且还有细胞外DNA。因游离RNA的不稳定性，似乎可以更好地估计可合成蛋白质微生物细胞的实际丰度。



热泉微生物席在门和纲水平原核生物的相对丰度:

除MB65r外,均存在古细菌;

CI65: *Methanosaeta* (31.6%) 属中的乙酸性甲烷菌;

CI35r: *Methanoculleus* 甲烷囊菌属 (5.3%) 和 *Methanothermobacter* 嗜热甲烷杆菌 (3.2%)

细菌组成: 丰度较高类群是变形菌门 (13.2-66.2%), 蓝细菌 (达40.3%), *Chloroflexi* 绿弯菌门 (达24%), 拟杆菌 (达12.8%) 和厚壁菌门 (达11.3%)。

FIG 2 Relative abundances of prokaryotic classes and phyla encountered in the hot spring microbial mats. The sequencing results from both the DNA- and cDNA-based approaches are shown side by side. Different colors are used to represent the three sampling sites: yellow, Chiraleu (CH); pink, Ciocacia (CI); and blue, Mihai-Bravu (MB).

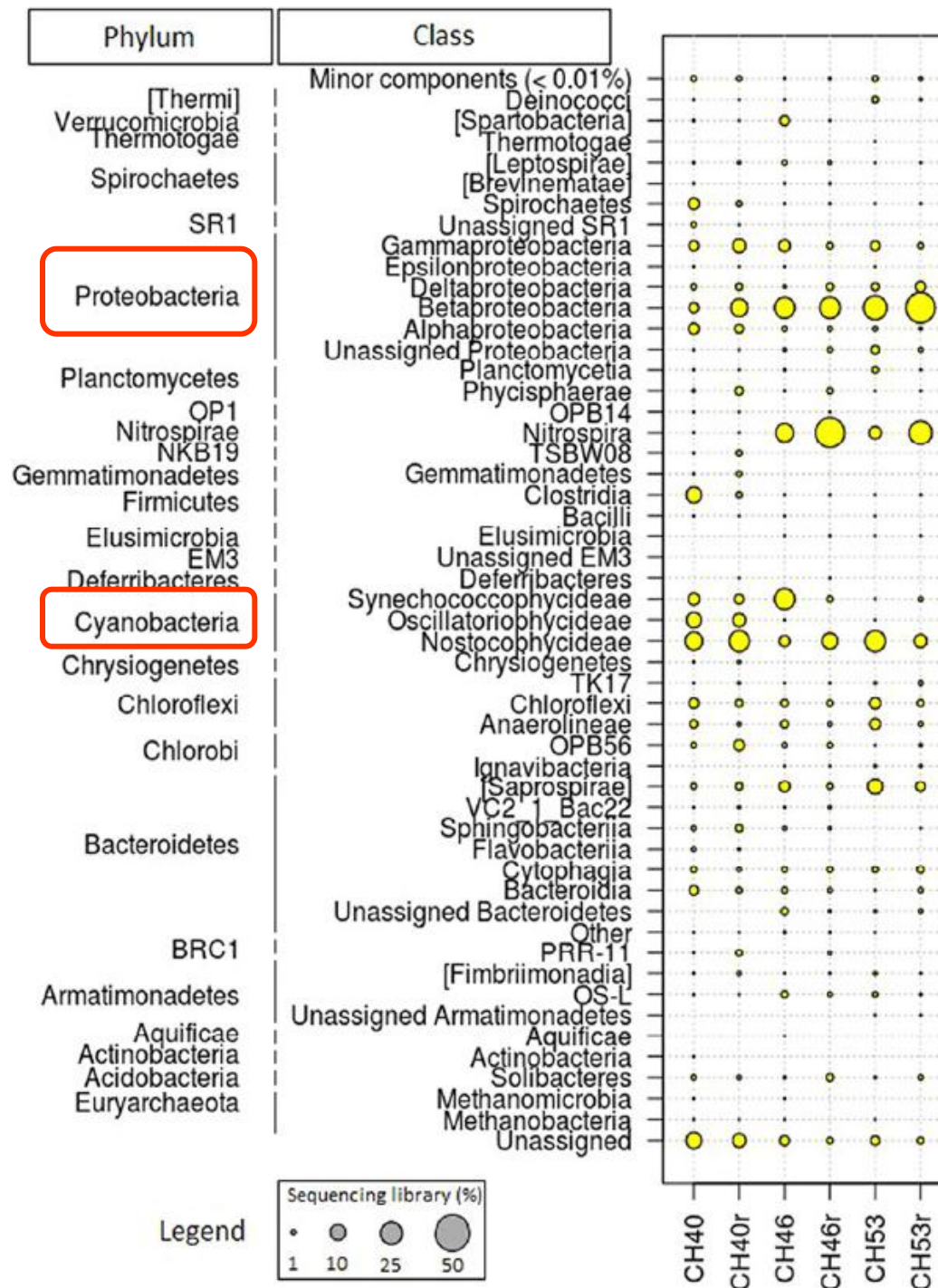


3、CH热泉微生物席

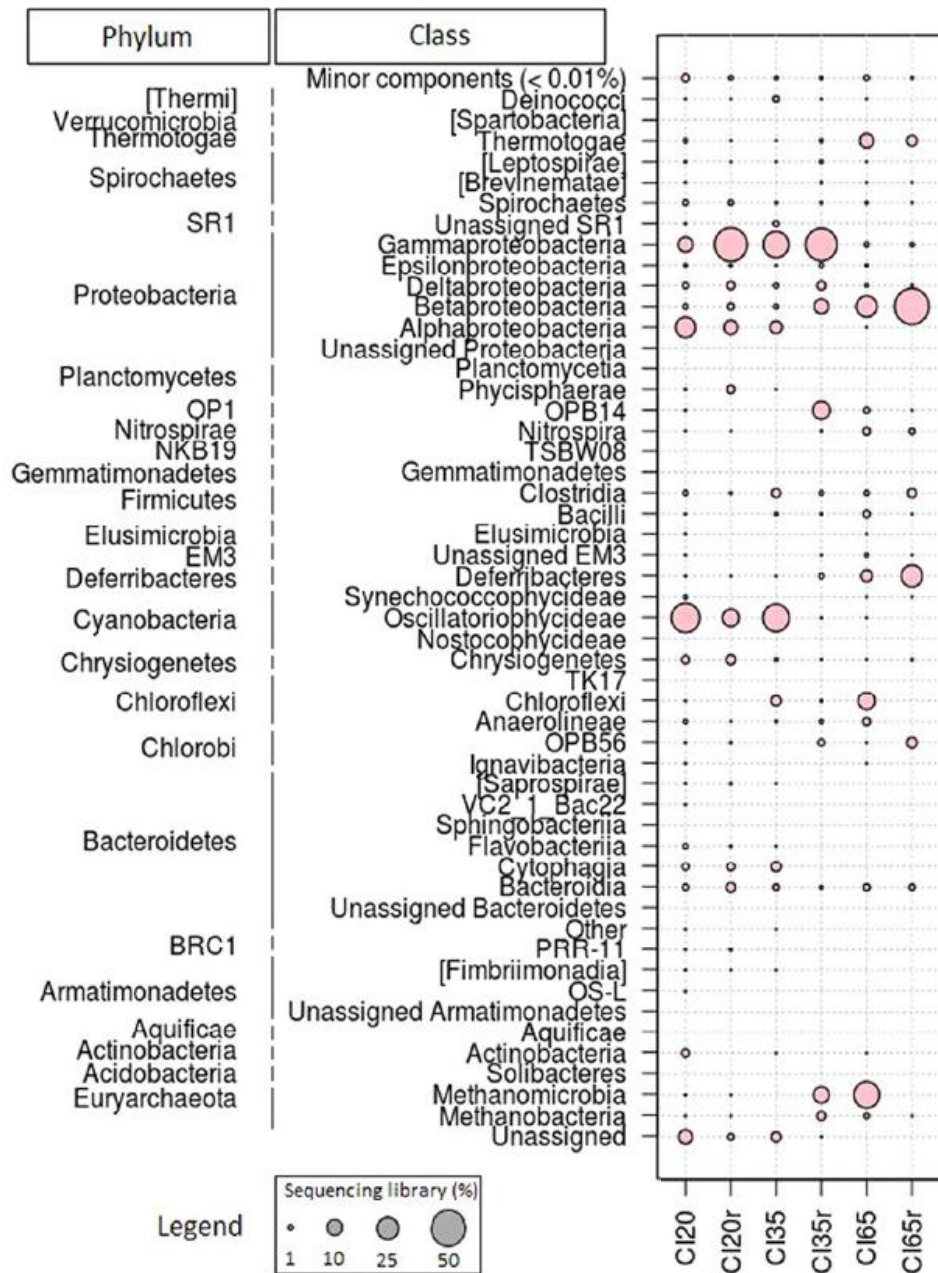
温度：40°C、46°C、53°C

以 *Proteobacteria* 和 *Cyanobacteria* 蓝细菌为主，*Proteobacteria* 的丰度随着温度升高而增加。

Leptolyngbya 和 *Oscillatoria* 颤藻属的中度嗜热蓝藻菌和 *Nostocales* 念珠藻目在温度为40和46°C时占主导地位，最有可能是主要生产者。



4、CI热泉微生物席



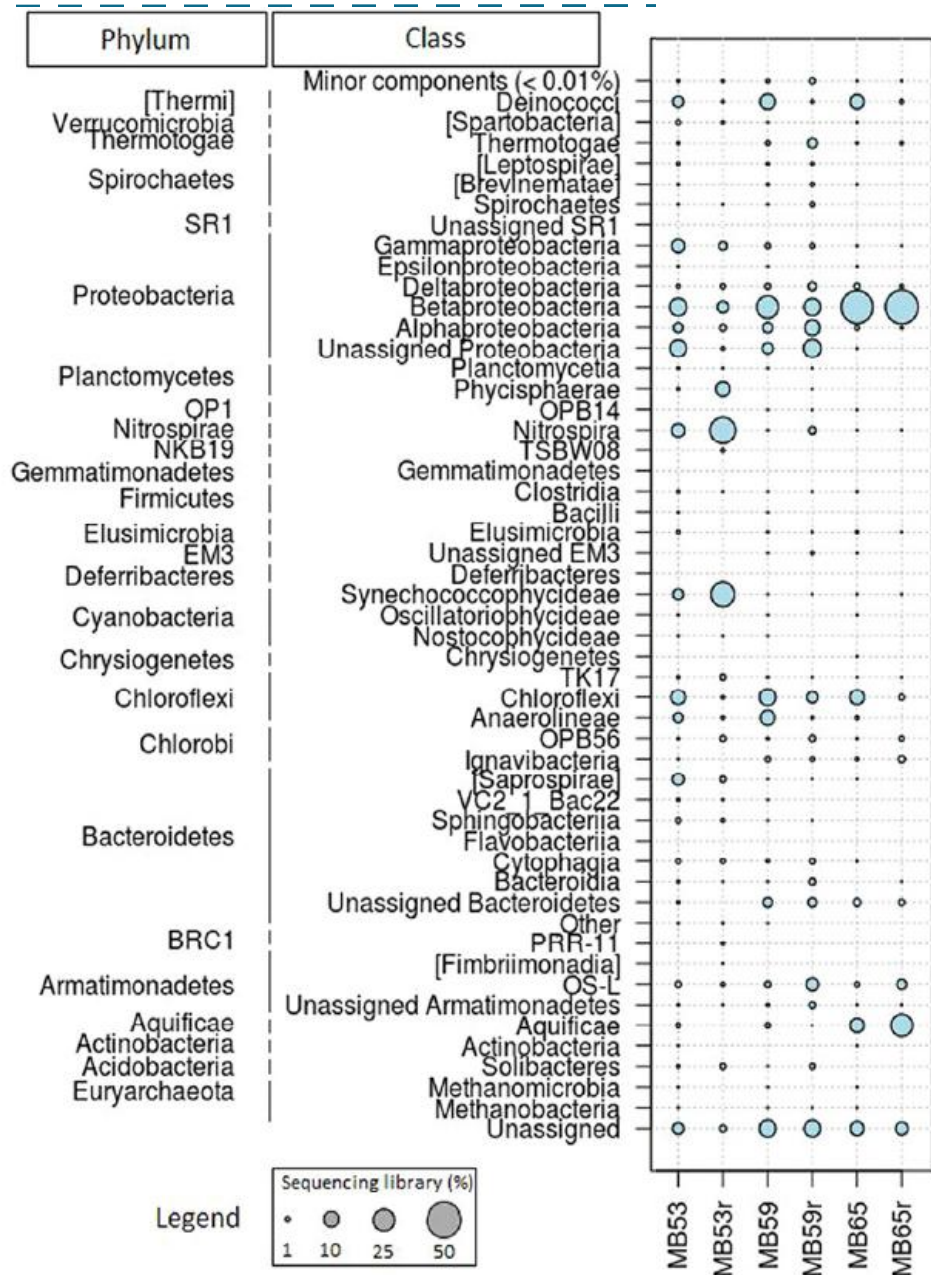
温度：20°C、35°C、65°C

蓝藻（34.2%至40.4%）和变形菌门（32.2%至40.7%）为主要类群。

在35°C采集的样品中：具有高丰度微生物是*Chloronema*绿丝菌（测序文库的5%）。该现象较惊奇，因为这些不含氧的光合生物通常需要低温（4至15°C）生长。

CI35中：*Chloronema*群落可以耐受比先前文献报道的更高温度，表明该属可能存在新的分类群。

5、MB热泉微生物席



MB温度：53°C、59°C、65°C

蓝细菌仅在53°C (5.4%) 时为主要类群存在。环境条件有利于*Chloroflylum*微生物的生长，从MB53和MB65中的15%上升到59°C文库的24%。

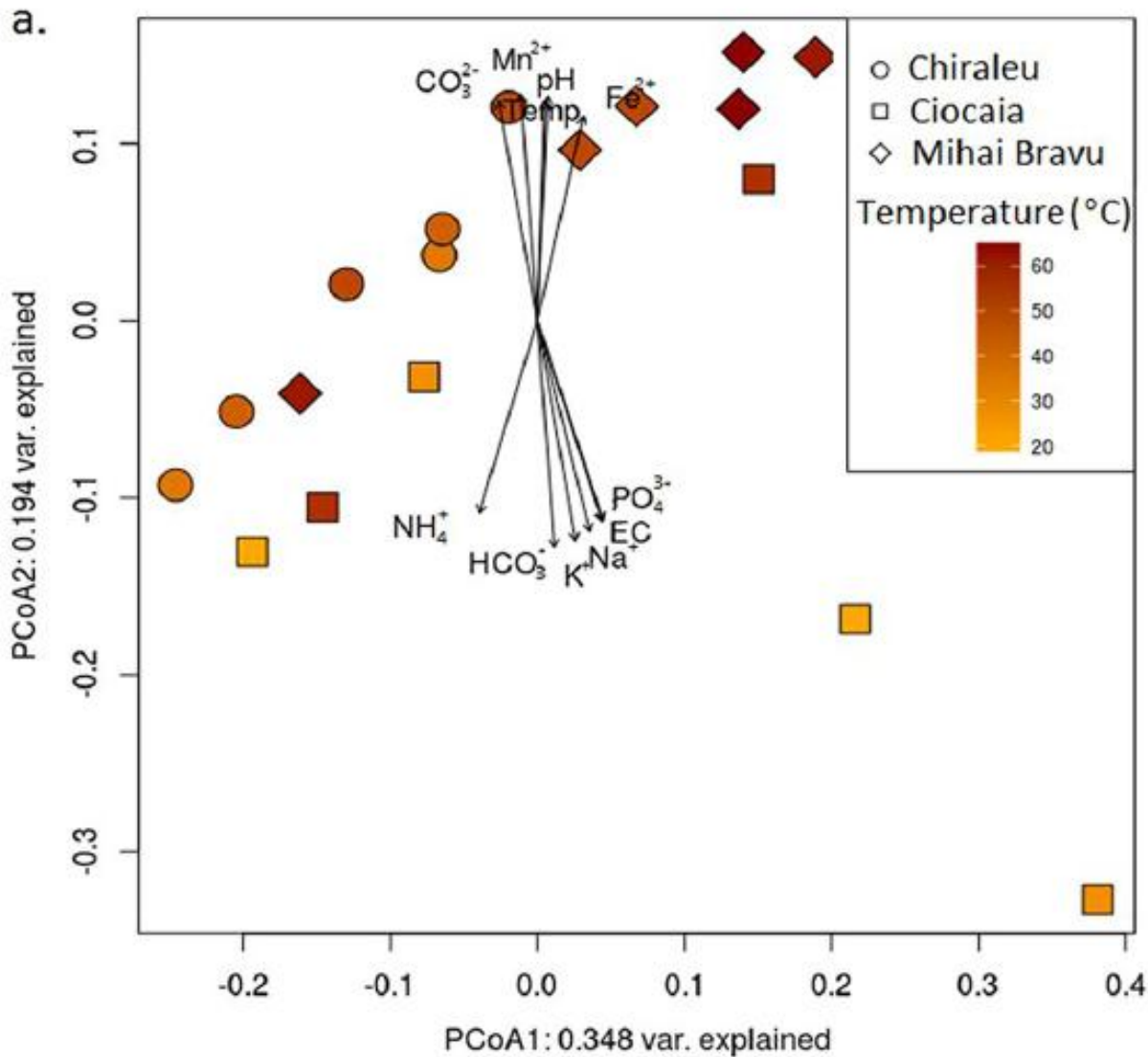
MB微生物席可能是通过无氧的光合作用、通过氢的氧化产生的化学自给作用，或这两种策略的共同作用来维持的。

✈ 6、生态学分析-Beta多样性

Beta多样性：使用16S rRNA基因测序(DNA和c DNA)、
999排列的相似性(ANOSIM)分析

结果表明：微生物群落的形成与取样点自身不同的物理化学特性有关。通过对物理化学数据进行标准Mantel检验，weighted unifrac距离矩阵，进一步证实： β 多样性与环境因素存在直接的相关性。

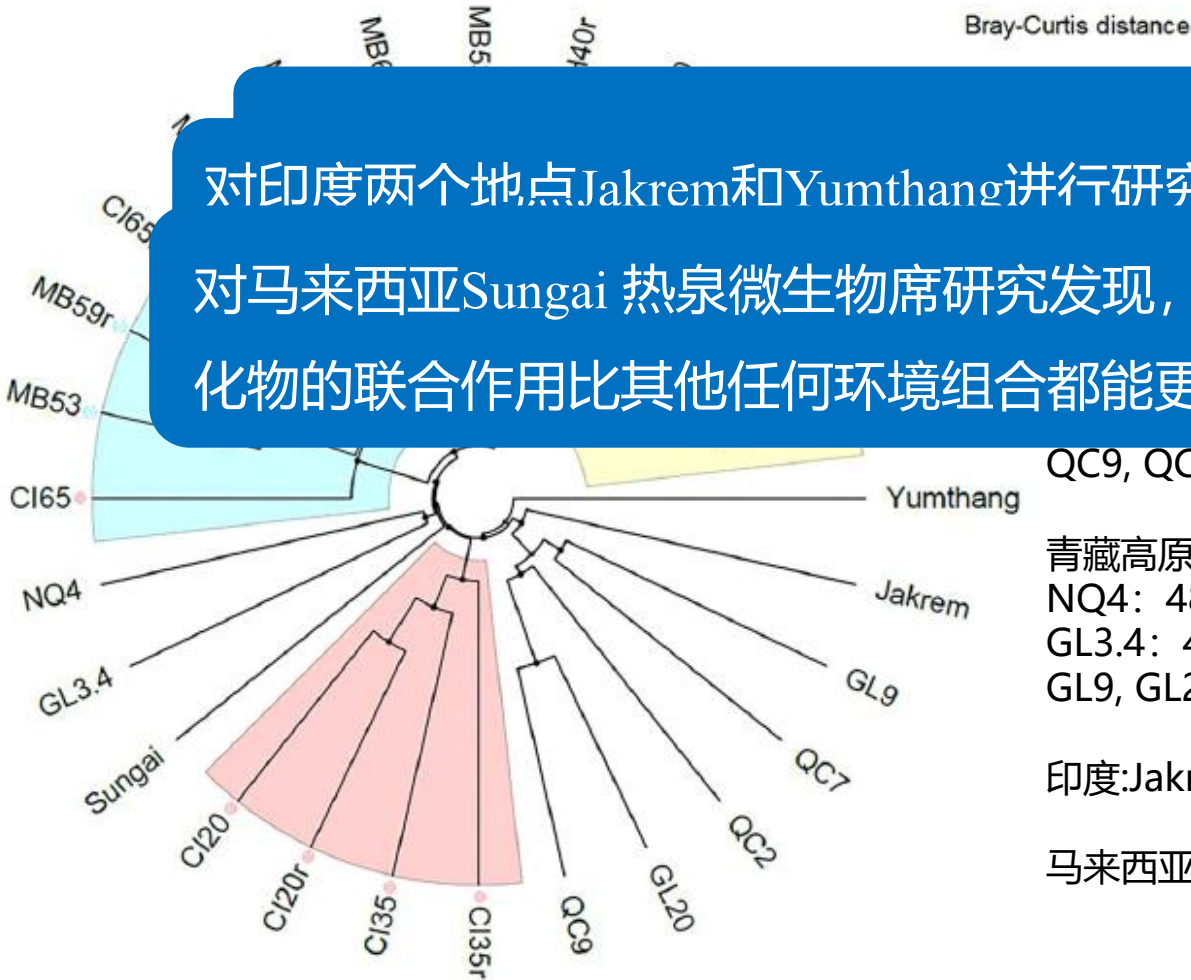
7、PCoA主成份分析



MB样品：温度差异小(53至65 $^{\circ}\text{C}$)，聚
 多样性，确定特定物理化学参
 集在一起，变化较小。
 量和变量组合对微生物多样性
 CI样品：温度范围广泛(20至65 $^{\circ}\text{C}$)。
 离矩阵，进行PCoA主成份分析，
 显示： β 多样性与温度没有明显的相关
 性和电导率。
 性，而与存在于泉水中的离子有关
 (如： Na^+ ， K^+ ， HCO_3^- ， PO_4^{3-})



8、聚类分析-UPGMA tree



对印度两个地点Jakrem和Yumthang进行研究，发现地理距离对群落的影响较小，温度对马来西亚Sungai 热泉微生物席研究发现，每个地点的物理化学特征是不同的，温度和硫化物的联合作用比其他任何环境组合都能更好地解释β-多样性。（ Purcell D, 2017.）

簇，可
flexi，
的结果。

QC9, QC7, QC2
青藏高原那曲：
NQ4: 48°C,
GL3.4: 49°C
GL9, GL20
印度:Jakrem,Yumthang
马来西亚:Sungai

CI 样品：单独成一支，*methanogenic Archaea*产甲烷古菌*Gammaproteobacteria* γ-变形菌，*Oscillatoriophycideae*占主导地位。CI 65与MB样品聚在一起，可能是在65°C时，*Betaproteobacteria* β-变形杆菌，*Hydrogenophilus*嗜氢杆菌丰富度显著升高。

根据Bray-Curtis距离（而非温度）构建UPGMA tree，将本研究的热泉微生物席样品与之前研究的罗马尼亚样品以及其它热泉微生物席的 β-多样性进行比较分析。



PART 04

Conclusions





Conclusions



1、本研究采用DNA metabarcoding技术，对罗马尼亚三个样点 Ciocaia, Chiraleu, Mihai Bravu的热泉微生物席微生物进行16S rRNA 基因及其转录产物进行测序，更全面地讨论微生物的丰富度、群落组成和生物多样性，并对可能影响微生物多样性的因素进行分析。



2、各采样点原核细胞的总丰度相似，没有出现随着温度变化的恒定趋势。在所有的样品中，细菌丰富度远大于古细菌，主要分布于 *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* 蓝细菌, *Chloroflexi*, *Nitrospirae*。





Conclusions



3、温度影响微生物的 α -多样性，随着温度的升高，丰富度和均匀度也随着比例下降。但 β -多样性与环境因素有关，由于各个热泉样点水不同的物理化学特性，尤其是主要离子浓度（ Na^- ， K^+ ， HCO_3^- 和 PO_4^{3-} ），温度和电导率的影响， β 多样性也存在很大的差异。



4、影响热泉微生物席群落组成和多样性的因素是多种多样的，本研究 β -多样性结果增加了对这些微生物生态系统的影响因素的新见解，这些因素导致了微生物席特定生物群落的形成。



请老师批评指正

