科学通报 2018 年 第 63 卷 第 36 期: 3932 ~ 3944
专题: 深地生物圈 论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

喀斯特洞穴滴水细菌群落组成及其代谢功能的季节性变化

云媛[1,2], 程晓钰[1,2], 王纬琦[1,2], 王红梅[1,2*]

1. 中国地质大学(武汉)环境学院, 武汉 430074;
2. 中国地质大学(武汉), 生物地质与环境地质国家重点实验室, 武汉 430074
* 联系人, E-mail: hmwang@cug.edu.cn, wanghmei04@163.com

2018-06-26 收稿, 2018-09-25 修回, 2018-09-27 接受, 2018-10-30 网络版发表
国家自然科学基金重点项目(41130207)资助

摘要 洞穴是研究地下生物圈的天然实验室, 而滴水是连接洞穴内部和外部环境的桥梁, 对滴水微生物群落结构以及代谢功能进行研究, 可以为洞穴中微生物组成、来源以及微生物驱动的元素循环提供重要信息. 本研究采用 Illumina Miseq 平台的 16S rRNA 二代测序技术及 Biolog-ECO 微平板检测法, 对湖北和尚洞弱光带滴水中的细菌群落多样性、细菌群落代谢功能多样性以及环境因子进行了为期 2 年的动态监测. 结果表明: 洞穴滴水中优势细菌属为不动杆菌属(*Acinetobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)并表现出明显的季节性变化, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)相对丰度在夏季最高、冬季最低, 而假单胞菌属(*Pseudomonas*)相对丰度的季节性变化正好相反; 这种季节性差异与宜昌地区的月平均降水量紧密相关. 同时, 基于 16S rRNA 的 PICRUSt 代谢功能预测及 Biolog-ECO 微平板法均显示洞穴滴水中细菌群落代谢功能具有季节性变化, 并且这种代谢能力的季节性变化与不动杆菌属(*Acinetobacter*)相对丰度的季节性变化显著正相关. 总之, 湖北宜昌和尚洞弱光区滴水中的细菌群落结构的季节性变化与降水量密切相关, 同时优势类群不动杆菌属(*Acinetobacter*)是滴水代谢能力的主要贡献者. 此研究将环境因子、滴水细菌群落组成及群落代谢能力三者紧密结合起来, 为进一步解译洞穴这一特殊的地下生态系统中微生物群落组成及其代谢特征的变化规律奠定了基础.

关键词 洞穴滴水, 细菌群落, 碳源代谢功能, 环境因子, 季节变化

洞穴是重要的陆地生态系统之一, 由于缺少阳光、生物可用的有机碳和营养物质含量低, 加上地理位置相对隔离等, 通常被认为是陆地黑暗生态系统中的一种寡营养极端环境[1]. 尽管如此, 洞穴中仍然生存着大量的微生物[2~5], 使得洞穴成为研究地下生物圈的天然实验室. 在洞穴生态系统中, 细菌、古菌和真菌作为主要的生物类群广泛存在于洞穴各个小生境中, 包括风化岩壁[6]、滴水[7]、沉积物[8]、上覆土壤[9]、石笋表面[10]以及蝙蝠粪便[11]等. 与真菌和古菌相比, 洞穴细菌研究相对较多. 洞穴中细菌主要类群为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 且变形菌门主要由α-, β-, γ-和δ-变形菌纲组成[3,8,12]; 洞穴岩壁与石笋表面细菌群落结构相似, 以变形菌门和放线菌门为主[3,8,12]; 洞穴沉积物与上覆土壤中的细菌丰富度以及群落结构相似[10,12].

洞穴内有机质含量十分有限, 滴水作为连接洞穴内部和外部环境的桥梁, 在有机质进入洞穴的过

引用格式: 云媛, 程晓钰, 王纬琦, 等. 喀斯特洞穴滴水细菌群落组成及其代谢功能的季节性变化. 科学通报, 2018, 63: 3932–3944
Yun Y, Cheng X Y, Wang W Q, et al. Seasonal variation of bacterial community and their functional diversity in drip water from a karst cave (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 3932–3944, doi: 10.1360/N972018-00627

© 2018《中国科学》杂志社

程中起着举足轻重的作用[13]. 对滴水微生物群落结构以及代谢功能进行研究能为洞穴中微生物组成、来源以及微生物驱动的元素循环提供重要信息. 目前为止, 利用无机地球化学的方法对洞穴滴水的研究已经取得重大进展[14,15], 但关于洞穴滴水微生物的研究十分匮乏. 对洞穴滴水中微生物脂肪酸监测, 发现冬季和春季滴水样本中的不饱和脂肪酸与饱和同系物比值高于夏季[16]. 运用传统的纯培养方法对滴水微生物群落的研究[7,17]显示, 可培养类群均为变形菌门, 且以假单胞菌属(*Pseudomonas*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)为主. 利用16S rRNA克隆文库测序法, 对湖北清江和尚洞滴水进行了为期5年的细菌群落组成的监测, 结果很好地揭示了洞穴滴水细菌群落结构的季节性变化, 秋冬季节与春夏季节分别以γ-变形菌门和β-变形菌门为主, 且温度是与滴水细菌群落结构变化显著相关的环境因子[17]. 此外, 利用Biolog-ECO微平板对滴水碳源活性的季节性变化进行了监测, 发现不同滴点不同季节碳源代谢活性均不相同[18]. 但目前人们对洞穴滴水微生物群落结构的动态变化与其代谢功能变化之间的关系尚不清楚, 且对群落结构和代谢功能发生变化的影响因素也不明确. 因此, 为了探讨上述问题, 本研究采用Illumina Miseq高通量测序平台的16S rRNA二代测序技术及Biolog-ECO微平板检测法同时对洞穴滴水的细菌群落结构和代谢特征进行了为期2年的分析, 以期揭示微生物群落组成和生态功能之间的相关性以及细菌群落变化与环境因子间的关系, 并为进一步解译洞穴这一地下生态系统中微生物群落的季节性动态特征及其潜在的生态功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 样品的采集

和尚洞位于湖北省宜昌市长阳县的清江南岸, 地理位置为30°27′N, 110°25′E, 属季风性山地湿润气候[19]. 和尚洞发育于寒武纪白云岩中, 洞内有季节性地下河, 且常年有滴水, 生存有少量蝙蝠. 洞穴未进行旅游开发, 平时除了中国地质大学(武汉)的科研人员进行定期的监测活动外, 没有外来人员. 由于洞内黑暗, 缺乏直接来自光合作用的有机质, 加上地理位置相对隔离等, 属于典型的寡营养喀斯特洞穴. 从2014年7月~2016年6月对洞穴中部弱光带的一处滴点(DW3或4D)的滴水进行了为期两年的监测取样, 具体采样点位置信息参考Yun等人[12], 采样时间、季节及样品编号信息见表1. 由于大气降水抵达和尚洞内需要近一个月的时间[19], 因此滴水的季节与采样月份的对应关系如下: 1~3月份为冬季, 4~6月份为春季, 7~9月份为夏季, 10~12月份为秋季. 采样时利用无菌的玻璃漏斗和10 L无菌塑料桶收集滴水, 并用秒表记下每分钟滴水点的滴速. 分装部分滴水至250 mL无菌玻璃瓶中, 置于4℃冰箱保存样品, 用于后续Biolog-ECO微平板检测以及理化参数的测定. 剩余滴水样本运回实验室后, 立即在超净台中进行抽滤, 将微生物细胞收集在0.22 μm滤膜(0.22 μm, 47 mm, Supor-200, Pall Corporation, USA)上, 随后将富集有微生物细胞滤膜装入50 mL无菌离心管中, 并保存在–80℃冰箱, 用于后续DNA的提取.

1.2 理化参数及细胞数目的测定

用便携式多参数水质分析仪(HQ30D, HACH, Loveland, CO, USA)现场测定滴水的pH、电导率(EC)和温度; 利用离子色谱(ICS-600, Thermo, USA)测定滴水阴离子(NO_3^-和SO_4^{2-})和阳离子(Ca^{2+}和Mg^{2+})的含量; 总有机碳(TOC)用元素分析仪(Vario TOC cube, Elementar, Hanau, Germany)进行测定; 利用荧光光谱仪(FluoroMax-4, HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ, USA)测定滴水样本中的可溶荧光有机质指数[20], 包括荧光强度(FI)[21]和腐殖化指数(HIX)[22]. 滴水中的总细胞数采用吖叮橙染色, 样品与吖啶橙染液的比值为(1 mL/333 μL); 活细胞数利用细菌LIVE/DEAD®试剂盒(ThermoFisher, USA)进行染色, 样品与染料的比值为(1 mL/100 μL), 在40倍荧光显微镜(BX51, Olympus, Germany)下随机计数20个视野的菌数.

1.3 DNA提取与测序

采用PowerWater® DNA Isolation Kit(MOBIO, USA)提取滤膜上细胞的总DNA, 对16S rRNA基因的V4区片段进行PCR扩增, 引物序列为520F(5′-AYTGGGYDTAAAGNG-3′) 和 802R(5′-TACNVGGGTATCTAATCC-3′)[23]. PCR产物通过2%琼脂糖凝胶电泳检测, 采用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN, USA)进行回收, PCR扩增回收产物荧光试剂用Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit进行荧光定量,

之后在上海派森诺生物公司的Illumina MiSeq PE300平台进行测序.

1.4 滴水细菌功能多样性测定

采用Biolog-ECO微平板技术分析对滴水中细菌代谢功能多样性. 将150 μL水样加入到已经预热到25℃的Biolog-ECO微平板中, 每个样品对每一种碳源的利用有3个重复. 将接种后的Biolog-ECO微平板放在保湿的容器中, 并置于25℃黑暗的恒温培养箱中进行长达144 h的培养, 每隔24 h在Biolog MicroStation(Biotek Instruments Inc., USA)对微平板进行检测, 读取每孔的吸光度值. 选取测定波长590 nm下的数据用于后续分析[24].

1.5 数据分析方法

细胞总数和活细胞数按照公式$X=(N\times S)/(S_f\times V)$计算, 其中$X$为滴水含菌数(cells/mL), N是各视野平均个数(个), S是滤膜面积(mm^2), S_f是显微镜视野面积(mm^2), V代表过滤滴水体积(mL)[25,26]. 微生物对碳源利用的多样性采用Biolog-ECO微平板中用来表征微生物活性的重要指标——平均颜色变化率(AWCD)来表示[18,26,27]. 参考Sala等人[28]中的方法, 采用Excel 2010和SPSS 16.0软件对0~144 h的数据进行积分和单因素方差分析, 分别就微生物群落对Biolog-ECO微平板中六大类碳源氨基酸、胺类、糖类、羧酸类、聚合物类和芳香化合物类的利用情况进行分析.

利用QIIME软件(Version 1.9.1, http://qiime.org/)对原始下机数据进行质控; 利用UCHIME[29]与Gold database (http://drive5.com/uchime/uchime_download.html)数据库进行比对去除嵌合体, 从而得到优质序列. 利用UCLUST的方法按照97%的相似性将优质序列聚类成可操作分类单元(OTU)[30]; 用RDP Classifier (Version 2.2, http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/)方法与GreenGene数据库(http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi)对OTU进行物种注释分析(阈值为0.8). 在深度为33153的条件下将所有样本的序列进行均一化, 之后使用QIIME软件(Version 1.9.1)计算OTU数目, Chao1, Shannon, Simpson和ACE指数. 采用PICRUSt将16S rRNA基因序列在KEGG数据库(http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)中进行功能预测分析[31]; 细菌碳源利用率和PICRUSt功能预测数据的箱型图在R软件上绘制. 细菌群落的主成分分析(PCA)及其与环境因子、PICRUSt代谢功能和碳源代谢能力的冗余分析(RDA)均利用Canoco 5.0实现[32], 其中在对细菌群落与环境因子的冗余分析中, 所有的环境参数均参与了分析, 但由于大部分环境因子不显著, 图中只显示了能与前期结果[17]进行对比的环境因子.

2 结果分析

2.1 洞穴滴水细菌群落结构特征

洞穴滴水中的细菌以变形菌门(Proteobacteria, 平均相对丰度为82.26%)占主导, 尤其是γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria), 其中不动杆菌属(*Acinetobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)相对丰度最高, 且表现出明显的季节性变化. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)的相对丰度在夏季最高, 冬季最低; 而假单胞菌属(*Pseudomonas*)则与之相反(图1). 细菌丰度及多样性指数在采样期间波动较大, 没有显著的季节性差异($P<0.05$, 表1). 例如, 反映细菌群落丰度的OTU数、ACE指数和Chao1指数的波动范围分别为331~2580, 534~3219和494~2955; 反映菌群多样性的Shannon指数和Simpson指数的变化范围分别为1.83~7.58和0.29~0.91; 此外, 微生物的活细胞数、总细胞数、以及活细胞与总细胞的比值也没有季节性差异(表1).

基于滴水细菌门类组成进行主成分分析显示细菌群落的结构表现出季节性差异(图2(a)). 两个主轴的解释率分别为62.15%和16.09%, 除了一个秋季样本(14-11), 其余的秋冬季节样本均聚类在一起, 其群落组成相似性相对较高, 具体表现为γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)的相对丰度较低, 其他门类相对丰度较高; 而春夏季节的样本分布较散, 群落组成与秋冬季节正好相反, 表现为γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)的相对丰度较高, 其他门类的相对丰度较低(图2(a)).

2.2 洞穴滴水细菌代谢功能特征

基于16S rRNA的PICRUSt代谢功能预测显示细菌群落代谢功能以氨基酸代谢(10.24%~11.46%)和糖类代谢(8.41%~9.65%)为主(图3), 所有代谢类型的相对丰度由高到低依次为氨基酸代谢>糖类代谢>能量代谢>外源物质降解和代谢>脂类代谢>酶因子和维

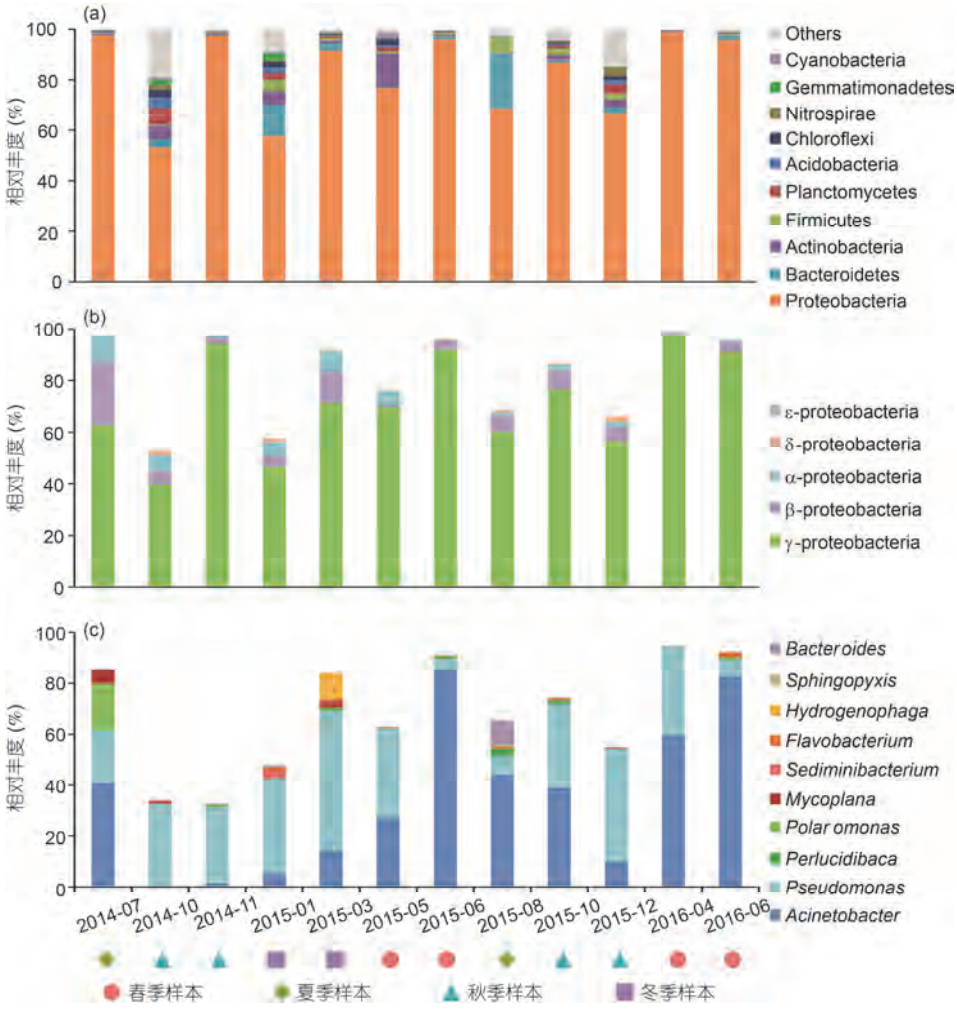


图 1 湖北清江和尚洞滴水中细菌群落结构. (a) 相对丰度排名前十的门; (b) 变形菌门; (c) 相对丰度排名前十的属

Figure 1 Bacterial community of the 10 most abundant phyla in the drip water at the phylum level (a), within Proteobacteria level (b), and at the genus level (c) in Heshang Cave

生素代谢>萜类和聚酮化合物代谢>多聚糖合成与代谢>酶家族，整体代谢能力及外源物质降解和代谢具有显著的季节性差异(P<0.05)，表现为春夏季节潜在代谢功能丰度较高，秋冬季节潜在代谢功能丰度较低. 细菌群落对碳源利用的平均颜色变化率(AWCD)也显示夏季(1.24~1.32)和春季(0.79~1.73)样本的细菌活性最高，其次为冬季(0.76~0.98)和秋季样本(0.38~0.76)，与活细胞和总细胞比值的变化一致(表1). 细菌群落对六类碳源的利用率结果显示细菌群落对胺类和羧酸类的利用率较高，且表现出显著的季节性差异，利用率的变化范围分别是0.29~2.52和0.28~2.41；其次为聚合物和糖类，变化范围是0.33~2.47和0.49~2.11；对芳香化合物和氨基酸类的利用率最低，范围分别为0.1~1.3和0.23~0.98(图4). 此外，基于滴水细菌对六类碳源的利用率进行的PCA分析结果显示两个主轴的解释率分别为59.63%和21.86%，与基于细菌门类的PCA结果一致(图2(b))：秋冬季节的样本聚类在一起，整体表现出较低的碳源利用率；而春夏季节的样本则较为分散，碳源利用率较高(图2(b)).

2.3 洞穴滴水细菌群落与环境因子和代谢功能的相关性

洞穴外宜昌地区的月平均降水量、滴速、洞内外温度及滴水电导率均表现出季节性的波动，主要表现为在5~8月份之间出现波峰，在11~12及1月份之间出现波谷(图5)；同时温度(洞内和洞外)表现出显著

表1 湖北清江和尚洞滴水中死活细胞数、细菌群落 OTU 数目、多样性指数、微生物利用碳源的平均颜色变化率 a)

Table 1 Summary of the bacterial cell number, operational taxonomic units (OTUs), diversity and average well color development (AWCD) value of drip waters in Heshang Cave, central China

季节	采样时间	编号	总细胞数 (cells/mL)	活细胞数 (cells/mL)	活细胞/总细胞(%)	OTUs	Shannon	Simpson	ACE	Chao1	平均颜色变化率(AWCD)
春季	2015年05月	15-05	2.03×10^5	3.67×10^4	18.09	999	4.98	0.86	1181.88	1171.07	0.79
	2015年06月	15-06	3.78×10^5	2.32×10^4	6.16	527	1.58	0.29	778.97	722.94	0.81
	2016年04月	16-04	2.66×10^4	7.75×10^3	29.17	331	1.83	0.56	534.65	494.38	1.73
	2016年06月	16-06	–	–	–	720	2.65	0.56	1494.46	1318.51	1.05
夏季	2014年07月	14-07	7.77×10^4	2.72×10^4	35.04	1509	4.84	0.91	3218.65	2930.47	1.32
	2015年08月	15-08	3.02×10^5	1.13×10^4	3.73	1426	5.40	0.84	2318.41	2140.40	1.24
秋季	2014年10月	14-10	1.07×10^5	4.98×10^3	4.67	2580	7.58	0.90	3013.07	2954.86	0.76
	2014年11月	14-11	–	–	–	480	2.15	0.57	686.62	631.23	0.59
	2015年10月	15-10	1.60×10^5	3.62×10^3	2.27	1142	4.21	0.77	1513.81	1535.50	0.38
	2015年12月	15-12	–	–	–	1771	5.92	0.82	2096.73	2064.49	0.61
冬季	2015年01月	15-01	–	–	–	1476	6.50	0.87	1689.77	1681.83	0.76
	2015年03月	15-03	7.42×10^5	7.80×10^4	10.52	832	3.48	0.71	1318.10	1397.51	0.98
	*P*值(组间)		0.452	0.706	0.190	0.269	0.345	0.227	0.095	0.114	0.080
	F		0.647	0.157	2.186	1.580	1.282	1.787	2.994	2.732	3.276
	df		1	1	1	3	3	3	3	3	3

a) 表中的"–"代表未测数据

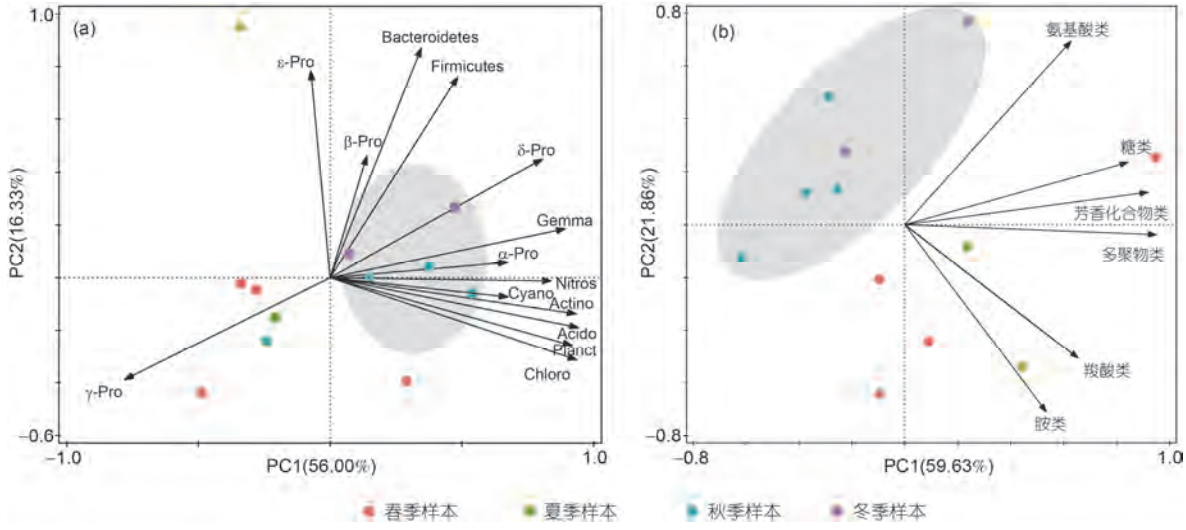


图 2 湖北清江和尚洞洞穴滴水样本细菌群落的主成分分析. (a) 基于门和变形菌门; (b) 基于微生物对六类碳源的利用率. 其中图中的简称 Pro, Gemma, Nitros, Cyano, Actino, Acido, Planct, Chloro, 分别代表变形菌门(Proteobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和绿弯菌门(Chloroflexi)

Figure 2 Principal component analysis (PCA) of bacterial community according to taxon (a) and bacterial utilization of carbon sources based on Biolog-ECO plates in drip waters (b). The abbreviations in this figure were as follows: Pro, Proteobacteria; Gemma, Gemmatimonadetes; Nitros, Nitrospirae; Cyano, Cyanobacteria; Actino, Actinobacteria; Acido, Acidobacteria; Planct, Planctomycetes; Chloro, Chloroflexi

的季节性变化, *P*值分别为0.011和0.032(表S1). 但是洞穴滴水中的其他环境参数的季节性波动不明显(图5和表S1), 例如滴水pH波动无季节规律, 变化范围为7.76~8.53; NO_3^-, SO_4^{2-}, Ca^{2+}和Mg^{2+}的浓度波动平缓, 浓度变化分别为13.83~16.39 mg/L, 26.04~32.26 mg/L, 21.13~25.18 mg/L (除了一个异常值55.56 mg/L)和

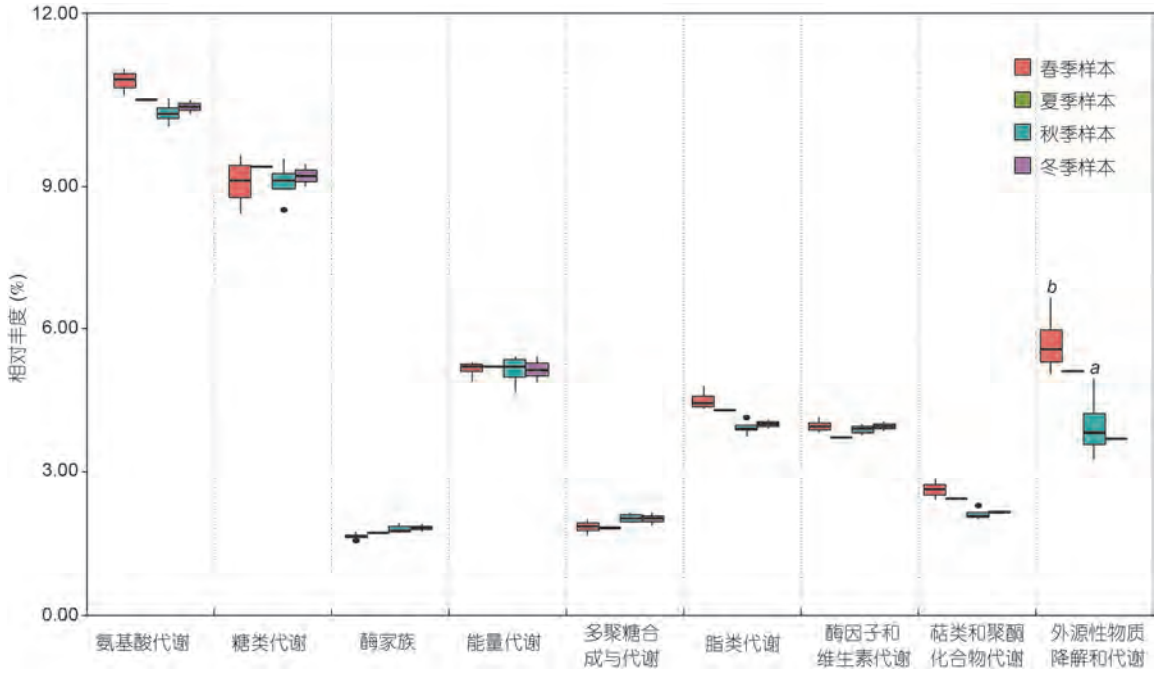


图 3 湖北清江和尚洞滴水中细菌群落潜在代谢类型的相对丰度. 其中, 数值 *a* 和 *b* 是指利用 SPSS 软件进行单因素方差分析后, 具有显著差异(P<0.05)的数值, 其余未标注的则代表组内数值均无显著差异

Figure 3 The relative abundance of potential metabolic types of bacterial communities based on 16S rRNA PICRUSt in drip waters. Based on one-way ANOVA (analysis of variance) calculations, different letters (*a*, *b*) above the bars showed significantly difference (P<0.05) among groups by using SPSS software, unlabeled letters represented no significant difference among groups

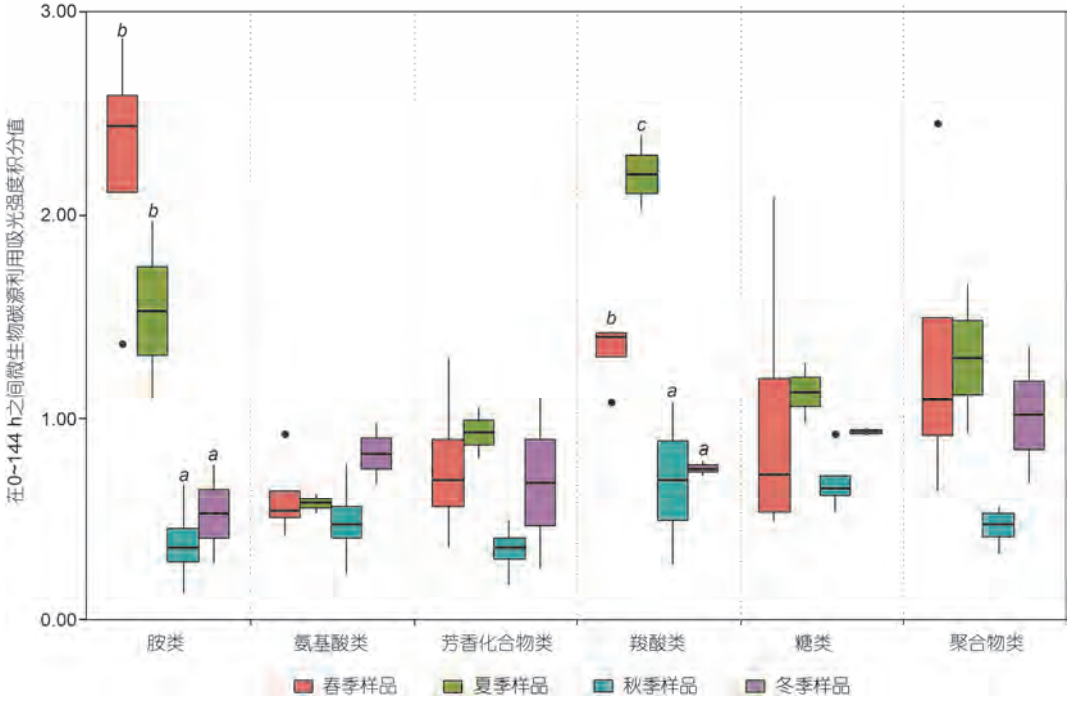


图 4 微生物对六类碳源利用率的箱型图. 其中, 数值 *a*, *b* 和 *c* 是指利用 SPSS 软件进行单因素方差分析后, 具有显著差异(P<0.05)的数值, 其余未标注的则代表组内数值无显著差异

Figure 4 Boxplots of bacterial utilization of carbon sources based on Biolog-ECO plates. Different letters (*a*, *b*, *c*) above the bars showed significantly difference (P<0.05) among different seasons, unlabeled letters represented no significant difference among groups

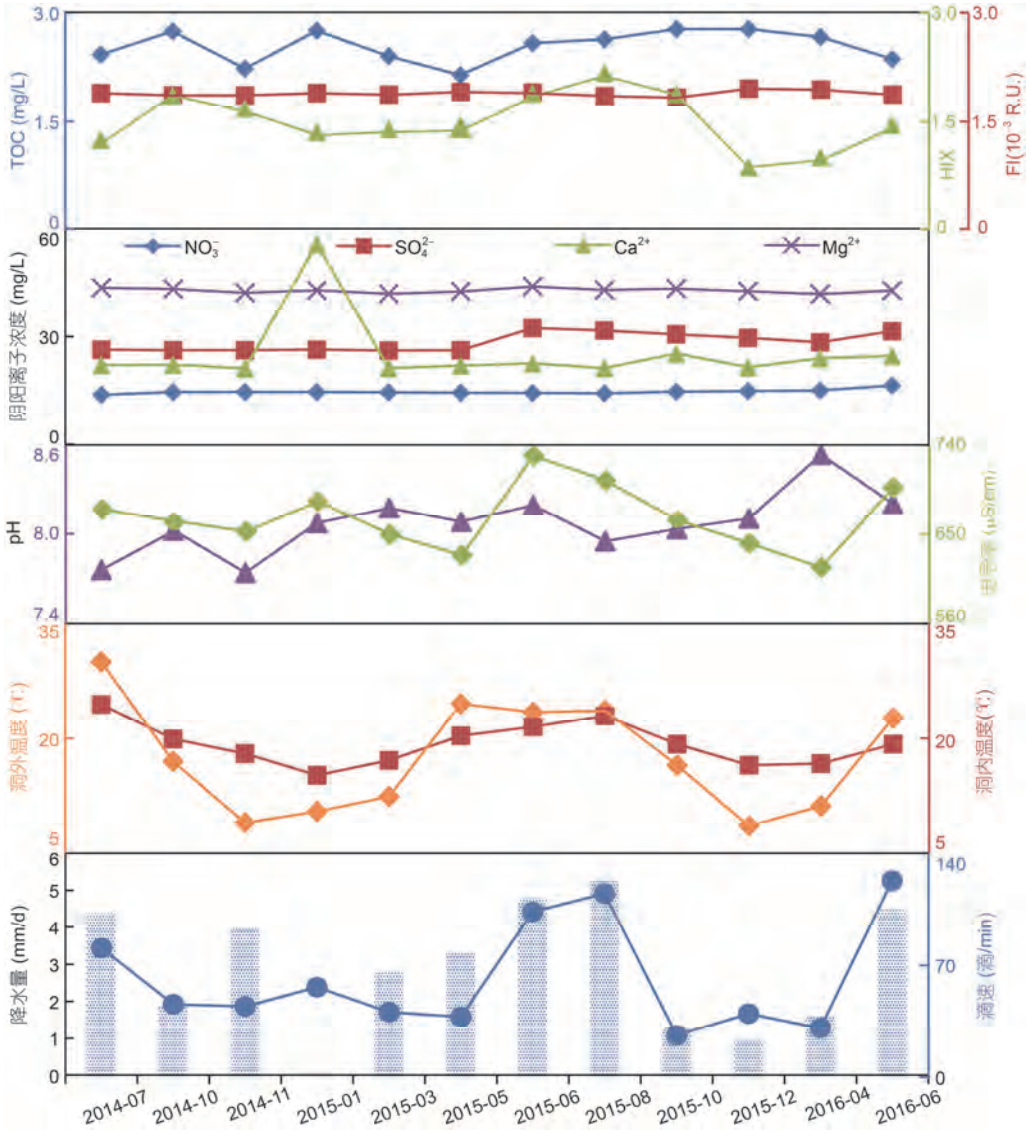


图 5 洞穴滴水中的环境参数信息, 其中 FI 为荧光指数, 代表样本中可溶有机质荧光强度; HIX 为腐殖化指数, 代表样本有机质腐殖化强度

Figure 5 Information of environmental parameters in drip waters. FI and HIX represent fluorescence index and humification index respectively

41.71~43.82 mg/L; 总有机质(TOC)含量、荧光有机质强度(FI)和腐殖化指数(HIX)无季节性变化, 波动也相对较平缓, 范围分别为2.14%~2.77%, 1.83×10^{-3}~1.95×10^{-3} R.U.和0.86~2.17(图5和表S1).

细菌群落组成与环境因子的冗余分析(RDA)结果(图6(a))显示, 第一轴和第二轴对细菌群落相对丰度的解释度分别为56.00%和16.33%; 其中, 只有宜昌地区的降水与细菌群落结构季节性变化显著相关(P=0.024), 并且降水量对细菌群落结构季节性变化的解释度最高(27.6%)(图6(b)). 同时在众多环境因子中, 降水与洞内滴水滴速和洞内外温度显著正相关, R值分别为0.734**, 0.758**和0.693*(图6(e)). 降水和滴速与细菌群落优势属均有关系, 例如, 不动杆菌属的相对丰度与滴水滴速的变化显著正相关(R=0.636, P<0.05); 而假单胞菌属的相对丰度与降水量(P<0.01)和滴速(P<0.001)呈极显著的负相关关系(图6(e)). 此外, 与降水显著相关的洞内外温度只表现出与假单胞菌属的显著负相关关系, R值分别为–0.665*和–0.667*(图6(e)). 基于16S rRNA的PICRUSt代谢能力与细菌群落结构的RDA(图6(c))显示, 第一轴和第二轴对细菌代谢能力的解释度分别为81.80%和12.81%, 而这种代谢能力的季节性差异主要与不动

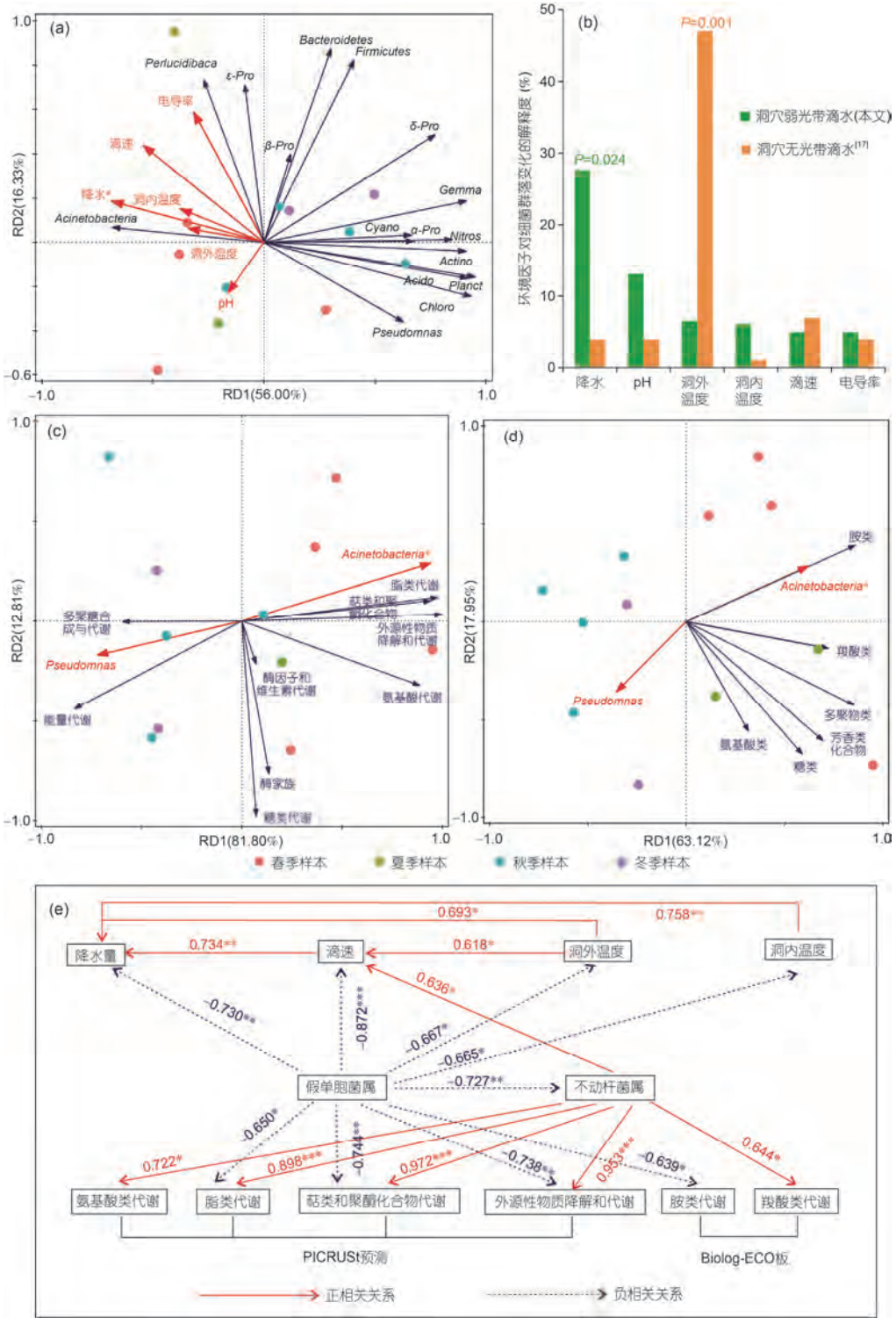


图 6 洞穴滴水中细菌群落结构与环境因子和代谢功能分析. (a) 群落结构与环境因子的冗余分析, 图中的简称与图 2 中的一致; (b) 环境因子对群落结构变化的解释度; 基于 16S rRNA 的 PICRUSt 预测的代谢功能(c)和 Biolog-ECO 板碳源代谢能力(d)与群落结构的冗余分析; (e) 优势属与环境因子及代谢功能相关性分析. 图中*, **和***分别代表 $P<0.05$, $P<0.01$ 和 $P<0.001$

Figure 6 The relationship between bacterial community and environmental factors and metabolic functions. (a) Redundancy analysis (RDA) of bacterial community and environmental factors; (b) the explanation of environmental factors to bacterial similarity pattern; redundancy analysis (RDA) of bacterial community between bacterial community and metabolic function based on 16S rRNA PICRUSt (c) and Biolog-ECO plates (d); correlation analysis among environmental factors, bacterial community and metabolic function (e). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, and*** $P<0.001$

杆菌属的相对丰度相关. 同时, 基于细菌碳源代谢能力与细菌群落结构的冗余分析(RDA)表明(图6(d)), 第一轴和第二轴对细菌碳源代谢能力的解释度分别为63.12%和17.95%, 其中不动杆菌属与细菌碳源代谢显著相关, 与基于16S rRNA的PICRUSt代谢能力的结果一致. 此外, 优势属不动杆菌属的相对丰度与基于PICRUSt预测的氨基酸代谢(P=0.012)、脂类代谢(P<0.001)、萜类和聚酮化合物代谢(P<0.001)和外源性物质降解和代谢(P<0.001), 以及与基于Biolog-ECO微平板的胺类代谢(P=0.024)均呈现显著正相关; 而优势属假单胞菌属与脂类代谢(P=0.030)、萜类和聚酮化合物代谢(P=0.009)、外源性物质降解和代谢(P=0.009)和羧酸代谢(P=0.025)呈显著负相关(图6(e)).

3 讨论

3.1 洞穴滴水细菌群落结构季节性变化及其与环境因子的相关性

洞穴滴水中的细菌群落以变形菌门(Proteobacteria)占主导, 且细菌群落的季节性变化主要与降水量有关. 变形菌门普遍存在于陆地生态系统的水环境中, 据报道在北海湖冬季水样和美国北卡罗纳州3条河流的沉积物样品中变形菌门均是第一优势门[33], 且如果该门类的含量高于60%时则暗示了环境中的寡营养条件, 这些均与本研究的结果(变形菌门平均相对丰度为82.26%)和洞穴滴水的寡营养条件相吻合. 同时, 这些水环境中的细菌群落也具有季节性差异, 如北海湖水样细菌群落中优势门在不同季节的分布呈现季节性变化, 夏季和秋季样本中的细菌群落以蓝细菌门(Cyanobacteria)为优势门, 冬季以变形菌门(Proteobacteria)为主, 春季放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度较高[33]. 在美国北卡罗纳州3条河流沉积物中的细菌群落结构也具有季节性变化, 夏季样本中γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)的平均相对含量显著高于秋冬季节[34]. 在本研究的洞穴滴水中, 细菌群落也呈现出季节性变化, 并且春夏季节和秋冬季节样本的聚类情况与基于克隆文库的研究结果一致, 但是γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria), 尤其是不动杆菌属(*Acinetobacteria*)相对丰度在不同季节中的变化趋势却相反[17], 原因可能是由于不同滴点水文动力学机制的差异进而导致微生物群落对气候因子的差异响应. 基于克隆文库技术对和尚洞1D和3D两个滴点的细菌群落结构进行了5年(2008~2013年)的研究, 发现它们的季节性变化主要与温度变化显著相关, 温度对细菌群落季节性变化的解释度高达47%[17], 而本文中的样本信息为2年(2014~2016年), 细菌群落信息与温度变化的相关性相对较弱(解释度仅为6.6%), 主要受降水量的影响(解释度为27.6%)(图6(b)). 这种差异可能是由于不同时间尺度降水量波动范围不同和不同滴点滴速差异较大所造成, 2008~2013年降水量的波动范围为0.22~4.43 mm/d, 2014~2016年间的降水量波动为0.05~5.25 mm/d; 在春夏季节本文中滴点(4D)的平均滴速(80滴/min)高于1D(16滴/min)和3D的平均滴速(57滴/min), 秋冬季节的滴速也同样如此(40滴/min高于32滴/min和14滴/min)[17]. 水流量的增加会影响洞穴上方非饱和带含水层, 进而对亲水性和疏水性不同的微生物形成一定的选择作用, 从而形成了微生物群落组成的差异[35]. 本研究结果显示不动杆菌属(*Acinetobacter*)与降水和滴速显著正相关(P<0.05), 降水多且滴速快的条件下(湿润)不动杆菌属(*Acinetobacter*)的相对含量较高, 且已有研究表明不动杆菌属(*Acinetobacter*)因其具有种间转化的遗传学特征而经常在较湿润的环境中被发现, 相对于其他细菌在高湿度的环境中具有更长的存活时间[36~40]. 因此在今后的研究中, 应加强对洞穴水文动力学机制的研究, 以期获得更加准确的微生物群落与环境因子之间相互作用的信息.

3.2 洞穴滴水细菌代谢能力季节性变化及其与细菌群落结构的相关性

基于16S rRNA的PICRUSt代谢功能预测和Biolog-ECO微平板碳源利用率的这两种方法均显示洞穴滴水中细菌群落代谢功能的季节性变化, 表现为春夏季节代谢较高, 秋冬季节代谢缓慢. 这一现象在很多生境中均有报道, 例如, 在对我国东北土壤微生物群落代谢能力的季节性研究中发现土壤微生物在夏季对碳源消耗量最大、代谢活性强, 秋季消耗量最小且速率最低[41]. 在水库的沉积物与水体交界面同样发现细菌对碳源的利用效率具有季节性变化, 尤其表现为对糖类、氨基酸类和羧酸类的季节性代谢明显[42]. 同时, 已有研究表明微生物功能基因多样性与微生物分类多样性密切相关, 功能多样性与群落组成和结构多样性均具有很强的正相关关系[43].

其中, 已经被报道的一些特定的关系有: γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)的相对丰度与亮氨酸氨基肽酶(P<0.01)和酚氧化酶(P<0.05)代谢关系显著; β-变形菌纲的相对丰度与葡糖苷酶(P<0.05)、木糖苷酶(P<0.05)和亮氨酸氨基肽酶(P<0.01)的代谢显著相关; δ-变形菌纲的相对丰度也与亮氨酸氨基肽酶的代谢呈现出很强的正相关关系(P<0.05)[44]. 洞穴滴水的结果显示, 细菌代谢功能的季节性变化与不动杆菌属(*Acinetobacter*)显著正相关, 尤其是氨基酸类代谢、脂类代谢、萜类和聚酮化合物代谢、外源性物质降解和代谢以及胺类代谢. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)的相对丰度与滴水整体细菌群落代谢能力的强弱如此相关, 很有可能是由于不动杆菌属(*Acinetobacter*)这类细菌具有广谱性代谢能力[37,39]. 例如, 比较蛋白质组学和功能分析表明, *A.baumannii*的细胞表面具有多种蛋白(特别是尿刊酸酶)参与组氨酸代谢并发挥着重要作用[45]; 同时利用蛋白学方法在*A.baylyi*中发现的一个小型非编码RNA(sRNA)-Aar被证实是氨基酸代谢中的调控器[46]. 在印度吉尔卡湖中分离的一株*A*.sp.的全基因组结果显示该菌株具有脂类代谢的功能[47].

关于两种方法呈现出的主要代谢类型不一致的现象, 一方面可能是由于Biolog-ECO微平板只能通过31种单一有机碳源来评估异养微生物的代谢多样性, 不能精确地表征洞穴滴水有机物底物的复杂性, 还会在一定程度上低估细菌群落的实际代谢水平[48,49]; 并且Biolog-ECO微平板的颜色变化主要取决于异养细菌的丰度, 尤其是生长速率较高的菌群, 表征的只是细菌群落中可培养的、且具有代谢活性的那部分细菌. 洞穴滴水本来是一个寡营养环境, 在Biolog-ECO微平板这个富营养的条件下, 可能会对原本在寡营养条件下具有较高代谢的类群产生一定的抑制作用, 进而表现出细菌的代谢功能存在一定差异[50]. 另一方面, 基于16S rRNA高通量测序进行的PICRUSt代谢功能预测只是在DNA水平上预测细菌群落具有某些代谢潜力, 但与群落实际能执行的代谢功能之间也存在一定的差异. 但是, 将PICRUSt代谢功能预测与Biolog-ECO微平板碳源代谢分析相结合, 能够为我们提供更加完整的微生物群落代谢功能的信息. 当然, 如果能结合DNA-SIP, 转录组和蛋白组方面的研究, 则会为阐述微生物群落的代谢功能提供更加完整和详尽的信息. 但环境样品十分复杂, 代谢功能多种多样, 在实际研究中, 还要结合具体的研究目的, 选择适当的技术和方法加以实施.

4 结论

湖北宜昌和尚洞弱光区滴水中的细菌主要以γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria)占主导, 春夏季节样本中活细胞与总细胞的比值及细菌群落结构(*Acinetobacter*和*Pseudomonas*)表现出季节性差异, 并且这种差异与宜昌地区的月平均降水量紧密相关. 同时, PICRUSt代谢功能预测和Biolog-ECO微平板碳源利用率的这两种方法均显示洞穴滴水中细菌群落代谢功能具有季节性变化, 并且这种代谢能力的季节性变化与不动杆菌属(*Acinetobacter*)相对丰度的季节性变化显著正相关. 此研究将环境因子与洞穴滴水中微生物群落及代谢能力的联系起来, 为进一步阐述深部生物圈中微生物驱动的元素循环、探讨洞穴滴水微生物群落组成和代谢功能的时空变化特征奠定了基础.

参考文献

1 Danielopol D L, Pospisil P, Rouch R. Biodiversity in groundwater: A large-scale view. Trends Ecol Evol, 2000, 15: 223–224

2 Engel A S. Microbial diversity of cave ecosystems. In: Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective. Dordrecht: Springer, 2010. 219–238

3 Barton H A, Jurado V. What's up down there? Microbial diversity in caves. Microbe-AmSoc Microbiol, 2007, 2: 132

4 Barton H A, Giarrizzo J G, Suarez P, et al. Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the Chloroflexi (class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I.1c. FrontMicrobiol, 2014, 5: 615

5 Engel A S, Jones D S, Lavoie K H, et al. Microbial Life of Cave Systems. Berlin/Boston: De Gruyter, 2015

6 Ortiz M, Legatzki A, Neilson J W, et al. Making a living while starving in the dark: Metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. ISME J, 2014, 8: 478–491

7 Liu Q, Wang H, Zhao R, et al. Bacteria isolated from dripping water in the oligotrophic Heshang cave in central China. J Earth Sci, 2010, 21: 325–328

8 Wu Y, Tan L, Liu W, et al. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. Front Microbiol, 2015, 6: 244

9 Ward N L, Challacombe J F, Janssen P H, et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 2046–2056

10 Ortiz M, Neilson J W, Nelson W M, et al. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. Microb Ecol, 2013, 65: 371–383

11 Man B, Wang H, Xiang X, et al. Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang cave, central china. Front Microbiol, 2015, 6: 1158

12 Yun Y, Wang H, Man B, et al. The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification. Front Microbiol, 2016, 7: 1955

13 Lambert W J, Aharon P. Oxygen and hydrogen isotopes of rainfall and dripwater at desoto caverns (Alabama, USA): Key to understanding past variability of moisture transport from the gulf of Mexico. Geochim Cosmochim Acta, 2010, 74: 846–861

14 Tremaine D M, Froelich P N. Speleothem trace element signatures: A hydrologic geochemical study of modern cave dripwaters and farmed calcite. Geochim Cosmochim Acta, 2013, 121: 522–545

15 Baldini J U L, McDermott F, Baldini L M, et al. Identifying short-term and seasonal trends in cave drip water trace element concentrations based on a daily-scale automatically collected drip water dataset. Chem Geol, 2012, 330: 1–16

16 Li X, Wang C, Huang J, et al. Seasonal variation of fatty acids from drip water in Heshang cave, central China. Appl Geochem, 2011, 26: 341–347

17 Yun Y, Xiang X, Wang H, et al. Five-year monitoring of bacterial communities in dripping water from the Heshang cave in central China: Implication for paleoclimate reconstruction and ecological functions. Geomicrobiol J, 2016, 33: 1–11

18 Zhao R, Wang H M, Liu Q Y, et al. Spatial and seasonal variations of microbial communities in dripping water from the Heshang Cave, central China (in Chinese). Earth Sci-J China Univ Geosci, 2010, 35: 899–907 [赵锐, 王红梅, 刘倩瑛, 等. 湖北清江和尚洞滴水微生物群落随空间和季节的变化. 地球科学: 中国地质大学学报, 2010, 35: 899–907]

19 Hu C, Henderson G M, Huang J, et al. Report of a three-year monitoring programme at Heshang cave, central China. Int J Speleol, 2008, 37: 143–151

20 Brannen-Donnelly K, Engel A. Bacterial diversity differences along an epigenic cave stream reveal evidence of community dynamics, succession, and stability. Front Microbiol, 2015, 6: 729

21 McKnight D M, Boyer E W, Westerhoff P K, et al. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. Limnol Oceanogr, 2001, 46: 38–48

22 Ohno T. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. Environ Sci Technol, 2002, 36: 742–746

23 Claesson M J, O'Sullivan O, Wang Q, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. PLoS One, 2009, 4: e6669

24 Jiang Z, Li P, Wang Y, et al. Effects of roxarsone on the functional diversity of soil microbial community. Int Biodeter Biodegr, 2013, 76: 32–35

25 Hobbie J E, Daley R J, Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol, 1977, 33: 1225

26 Dong Q. The disstribution of phosphate solubilizing bacteria and the microbial response to environmental changes in Heshang Cave, Hubei (in Chinese). Doctor Dissertation. Wuhan: China University Geosciences, 2013 [董强. 湖北清江和尚洞洞穴系统溶磷微生物的分布特征及滴水微生物对环境因子的响应. 博士学位论文. 武汉: 中国地质大学, 2013]

27 Meier A, Singh M K, Kastner A, et al. Microbial communities in carbonate rocks-from soil via groundwater to rocks. J Basic Microb, 2017, 57: 752–761

28 Sala M M, Pinhassi J, Gasol J M. Estimation of bacterial use of dissolved organic nitrogen compounds in aquatic ecosystems using biolog plates. Aquat Microb Ecol, 2006, 42: 1–5

29 Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. Uchime improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 2011, 27: 2194–2200

30 Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than blast. Bioinformatics, 2010, 26: 2460–2461

31 Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16s rRNA marker gene sequences. Nat Biotechnol, 2013, 31: 814

32 ter Braak C J F, Smilauer P. Canoco Reference Manual and Canodraw for Windows User'S Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5). Ithaca, NY: Microcomputer Power, 2002

33 Zhang Y J, Li K, Zhu H R, et al. Community structure of microorganisms and its seasonal variation in Beihai lake (in Chinese). Environ Sci, 2017, 38: 3319–3329 [张雅洁, 李珂, 朱浩然, 等. 北海湖微生物群落结构随季节变化特征. 环境科学, 2017, 38: 3319–3329]

34 Bucci J, Szempruch A, Caldwell J, et al. Seasonal changes in microbial community structure in freshwater stream sediment in a north Carolina river basin. Diversity, 2014, 6: 18

35 Gargiulo G, Bradford S A, Simunek J, et al. Bacteria transport and deposition under unsaturated flow conditions: The role of water content and bacteria surface hydrophobicity. Vadose Zone J, 2008, 7: 406–419

36 Jawad A, Heritage J, Snelling A, et al. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. J Clin Microbiol, 1996, 34: 2881–2887

37 Buxton A E, Anderson R L, Werdegar D, et al. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: Epidemiologic characteristics. Am J Med, 1978, 65: 507–513

38 Lim W C. Characterization of *Acinetobacter* sp. Lwc1 isolated from contaminated water and its survivability under different stress condition. Master's thesis. Penang: Universiti Sains Malaysia, 2014

39 Touchon M, Cury J, Yoon E J, et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: Origins, mechanisms, and consequences. Genome Biol Evol, 2014, 6: 2866–2882

40 Juni E. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: Genetic evidence for a ubiquitous genus. J Bacteriol, 1972, 112: 917–931

41 Fan R Y, Yang X Y, Wang E H, et al. Seasonal variations of soil microbial communities of undisturbed typical black soil, northeastern China (in Chinese). Soils, 2014, (2): 285–289 [范瑞英, 杨小燕, 王恩姮, 等. 未干扰黑土土壤微生物群落特征的季节变化. 土壤, 2014, (2): 285–289]

42 Christian B W, Lind O T. Multiple carbon substrate utilization by bacteria at the sediment-water interface: Seasonal patterns in a stratified eutrophic reservoir. Hydrobiologia, 2007, 586: 43–56

43 Fierer N, Ladau J, Clemente J C, et al. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the united states. Science, 2013, 342: 621–624

44 Freixa A, Ejarque E, Crognale S, et al. Sediment microbial communities rely on different dissolved organic matter sources along a mediterranean river continuum. Limnol Oceanogr, 2016, 61: 1389–1405

45 Cabral M P, Soares N C, Aranda J, et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for Acinetobacter baumannii biofilms and a key role for histidine metabolism. J Proteome Res, 2011, 10: 3399–3417

46 Schilling D, Findeiss S, Richter A, et al. The small RNA Aar in Acinetobacter baylyi: A putative regulator of amino acid metabolism. Arch Microbiol, 2010, 192: 691–702

47 Mishra S R, Lopamudra R, Narayan P A, et al. Draft genome sequence of Acinetobacter sp. strain BMW17, a cellulolytic and plant growth-promoting bacterium isolated from the rhizospheric region of Phragmites karka of Chilika Lake, India. Genome Announc, 2016, 4: e00395–e00316

48 Al-Mutairi N Z. Variable distributional characteristics of substrate utilization patterns in activated sludge plants in Kuwait. Bioresource Technol, 2009, 100: 1524–1532

49 Dong Z Y, Hong M, Hu H J, et al. Effect of excess nitrogen loading on the metabolic potential of the bacterial community in oligotrophic coastal water (in Chinese). Acta Sci Circumst, 2018, 38: 457–466 [董志颖, 洪慢, 胡晗静, 等. 过量氮输入对寡营养海水细菌群落代谢潜力的影响. 环境科学学报, 2018, 38: 457–466]

50 Allison S D, Martiny J B H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 11512–11519

补充材料

表 S1 湖北清江和尚洞滴水样本的采集信息、理化参数和荧光有机质指数

表 S2 洞穴滴水中细菌群落结构与环境因子的冗余分析结果

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for "喀斯特洞穴滴水细菌群落组成及其代谢功能的季节性变化"

Seasonal variation of bacterial community and their functional diversity in drip water from a karst cave

Yuan Yun[1,2], Xiaoyu Cheng[1,2], Weiqi Wang[1,2] & Hongmei Wang[1,2*]

[1] *School of Environmental Studies, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, China;*
[2] *State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, China*
* Corresponding author, E-mail: wanghmei04@163.com, hmwang@cug.edu.cn

Caves are natural laboratories to study the subsurface deep biosphere, where drip water connect the caves with outside environments. Drip water may bring microorganisms and DOC from the outside environments into caves which subsequently play a fundamental role in sustaining the oligotrophic subsurface ecosystem. To understand the seasonal dynamics of bacterial communities, their potential metabolic functions, and their association with environmental factors such as precipitation, temperature, drip rate, pH, NO_3^-, SO_4^{2-}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, TOC and FI, drip water samples from Heshang Cave were collected across a two years' sampling period and subject to 16S rRNA Illumina sequencing and the Biolog-ECO plates analysis.

Our results show that the richness and diversity of bacterial communities in the drip water revealed no significant seasonal difference, whereas the compositions of bacterial communities showed a clear seasonal variation, especially *Acinetobacter* and *Pseudomonas*, the dominant groups. In details, the relative abundance of *Acinetobacter* was higher in spring and summer seasons, while lower in autumn and winter seasons. In contrast, the relative abundance of *Pseudomonas* showed an opposite variation to that of *Acinetobacter*. Precipitation, temperature inside and outside the cave, drip rate and conductivity showed strong seasonal variations, whereas other environmental factors exhibited moderate variation within the two years' period. Among all the environmental factors investigated, precipitation significantly shaped the bacterial community structure, explaining about 27.6% of their seasonal variation. *Pseudomonas* significantly negatively correlated with multiple environmental factors such as precipitation, drip rate and temperature, whereas *Acinetobacter* showed a positive correlation only with the drip rate.

Furthermore, potential metabolic functions of bacterial communities in drip water also show clear seasonal variation as indicated both by 16S rRNA PICRUSt and Biolog-ECO plate analysis. The redundancy analysis (RDA) results showed that the relative abundance of *Acinetobacter* demonstrated a significant relationship with the seasonal dynamics of metabolic ability. In addition, *Acinetobacter* revealed a remarkable positive correlation with amino acid metabolism, lipid metabolism, metabolism of terpenoids and polyketid, xenobiotics biodegradation and metabolism, and carboxylic acids metabolism. *Pseudomonas* showed a significant negative correlation with lipid metabolism, metabolism of terpenoids and polyketid, xenobiotics biodegradation and metabolism, and amine metabiolism.

Overall, our results showed that precipitation significantly controls the seasonal variation of bacterial communities in drip water and *Acinetobacter* plays an important role in the variation of bacterial functions. This the first report about the bacterial communities and their carbon utilization variation over a 2 years' period which greatly enhances our understanding about the seasonal dynamics of microbial communities and their correlation with environmental conditions.

cave drip water, bacterial community, metabolic function, environmental factor, seasonal variation

doi: 10.1360/N972018-00627