



2017

# 读书报告

汇报人：赵卓丽 日期：2017-4-28



# Metagenomic Analysis of Hot Springs in Central India Reveals Hydrocarbon Degrading Thermophiles and Pathways Essential for Survival in Extreme Environments

Rituja Saxena<sup>1†</sup>, Darshan B. Dhakan<sup>1†</sup>, Parul Mittal<sup>1†</sup>, Prashant Waiker<sup>1</sup>, Anirban Chowdhury<sup>2</sup>, Arundhuti Ghatak<sup>2</sup> and Vineet K. Sharma<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Metagenomics and Systems Biology Laboratory, Department of Biological Sciences, Indian Institute of Science Education and Research, Bhopal, India, <sup>2</sup> Department of Earth and Environmental Sciences, Indian Institute of Science Education and Research, Bhopal, India



01

**Introduction**

02

**Materials and methods**

03

**Results**

04

**Discussion**



01

# Introduction

## 已有研究

极端微生物

极端环境（高温、低温、高盐、极酸、极碱）

嗜热菌、超嗜热菌

保持催化活性的酶类

高温、超高温环境（热泉）

热泉中新型嗜热菌在工业、生物产业中的潜在应用

(Deckert *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2014; Poli *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2015; Dhakan *et al.*, 2016)

宏基因组测序

极端微生物群落的基因组多样性和复杂性

(Lopez-Lopez *et al.*, 2013)

发现多株嗜热细菌新种的潜在应用

(Colman *et al.*, 2016; Elo- Fadrosh *et al.*, 2016; Gudbergdottir *et al.*, 2016)

## 热泉环境

## 宏基因组分析

黄石国家公园三个碱性热泉(44-75°C)三年内微生物群落：

在不同时间点收集的同一样点的样品中，微生物多样性没有观察到显著变化；

**优势菌群**：光合细菌 (*Cyanobacteria*、*Chloroflexi*)

产甲烷古菌 (*Methanomassiliicoccus*、*Methanocella*)

**元素分析**：钠、氯化物和氟化物水平高，铁，钴，银和其他重金属缺乏 (Bowen De Leon *et al.*, 2013)

马来西亚的Sungai Klah (SK) 热泉(50-110°C,pH 7-9)：

**优势菌群**：*Firmicutes*、*Proteobacteria*

**元素分析**：铝、砷、硼、氯化物、氟化物、铁、镁等含量高；

其他重金属如铅，汞，铬，铜等含量低 (Chan *et al.*, 2015)

存在硫、碳、氮代谢的基因表明微生物群落的代谢和功能多样性

哥伦比亚安第斯山脉酸性热泉El coquito :

存在与**水平基因转移和DNA修复系统基因相关的转座酶**序列 (Jimenez *et al.*, 2012) ;

**优势菌群** : *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*

多项酸性热泉的研究报道 :

**优势菌群** : *Verrucomicrobia*, *Acidithiobacillus* spp. (Mardanov *et al.*, 2011; Menzel *et al.*, 2015)

存在**编码生物技术酶的基因** : 如水解酶, 木聚糖酶, 蛋白酶, 半乳糖苷酶和脂肪酶  
(Ferrandi *et al.*, 2015; Littlechild, 2015)



02

# Materials and methods





样点描述和样品采集



取样地点的元素分析



宏基因组DNA提取



16S rRNA测序、shotgun宏基因组测序



扩增子序列分析



宏基因组序列分析



统计学分析



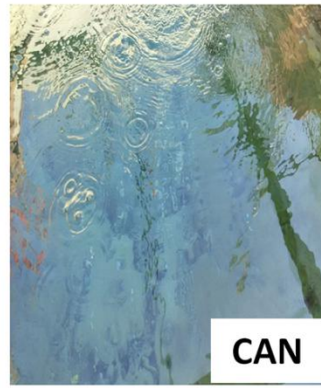
核苷酸序列数据提交



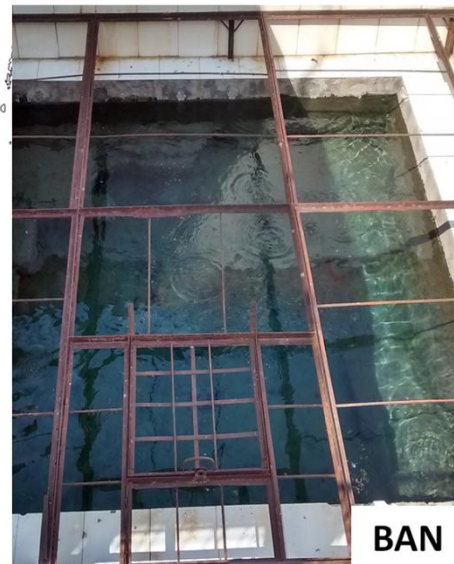
三个位点：  
 Badi Anhoni  
 Chhoti Anhoni  
 Tattapani



CAP



CAN



BAN



TAT-1



Other TAT sites

Pachmarhi , Madhya Pradesh, India

(22.65°N, 78.36°E)

分组：

Anhoni组

(Badi Anhoni hhoti Anhoni)

Tattapani组

**TABLE 1 | Physico-chemical properties of the hot spring samples recorded on-site.**

	Sample name	Temperature (°C)	pH	Total dissolved solids (ppm)
Anhoni	BAN	55	7.8	690
	CAN	43.5	7.5	590
	CAP	52.1	7.8	620
	Mean	50.2 ± 5.98	7.475 ± 0.34	720 ± 116.62
Tattapani	TAT-1	98	7.5	880
	TAT-2	61.5	7.6	600
	TAT-3	69	7	700
	TAT-4	67	7.8	700
	Mean	73.88 ± 16.39	7.7 ± 0.17	633.3 ± 51.31
Mann-Whitney U-test	Tattapani vs. Anhoni	0.057	0.571	0.171

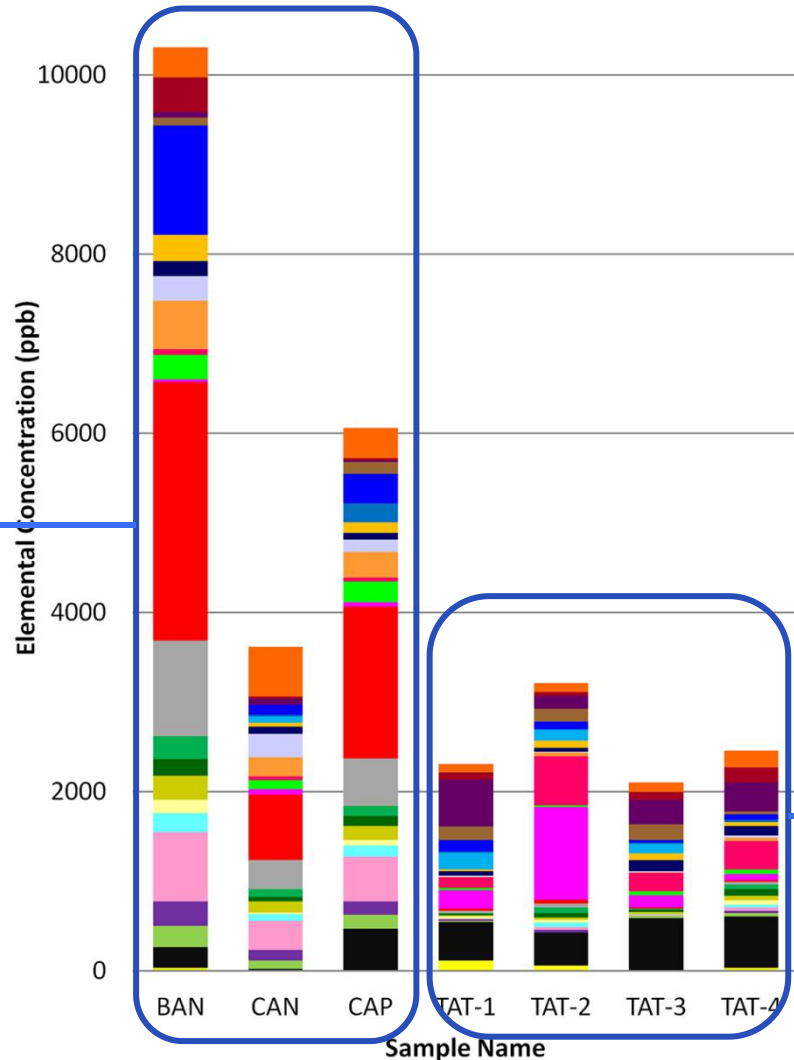
*Six samples (BAN, CAN, TAT-1, TAT-2, TAT-3, and TAT-4) were collected from a depth of about one meter from the surface and one sample (CAP) was collected from the outlet of a ~635 m deep borehole.*



## Results

# 采样地点的物理化学分析

Anhoni 组  
Co , La , Fe , Hg , Si  
浓度高



Tattapani 组  
Pb , Zn , Ni , B  
浓度高

- Li
- B
- Mg
- Al
- Si
- K
- Ca
- V
- Cr
- Mn
- Fe
- Co
- Ni
- Cu
- Zn
- Se
- Sr
- Mo
- Cd
- Cs
- Ba
- La
- Ce
- Pb
- S
- Hg

## 扩增子和宏基因组分析

**Supplementary Table 2. Number of 16S rRNA (V3 hyper variable region) amplicon reads obtained per sample**

<b>Samples</b>	<b>Number of Raw Reads</b>	<b>Number of High quality reads</b>
<b>CAP</b>	3,874,850	3,048,182
<b>BAN</b>	4,382,060	3,567,202
<b>CAN</b>	2,896,430	2,318,060
<b>TAT-1</b>	4,468,139	3,574,921
<b>TAT-2</b>	4,043,404	3,041,973
<b>TAT-3</b>	5,151,447	3,969,061
<b>TAT-4</b>	3,011,091	2,362,487

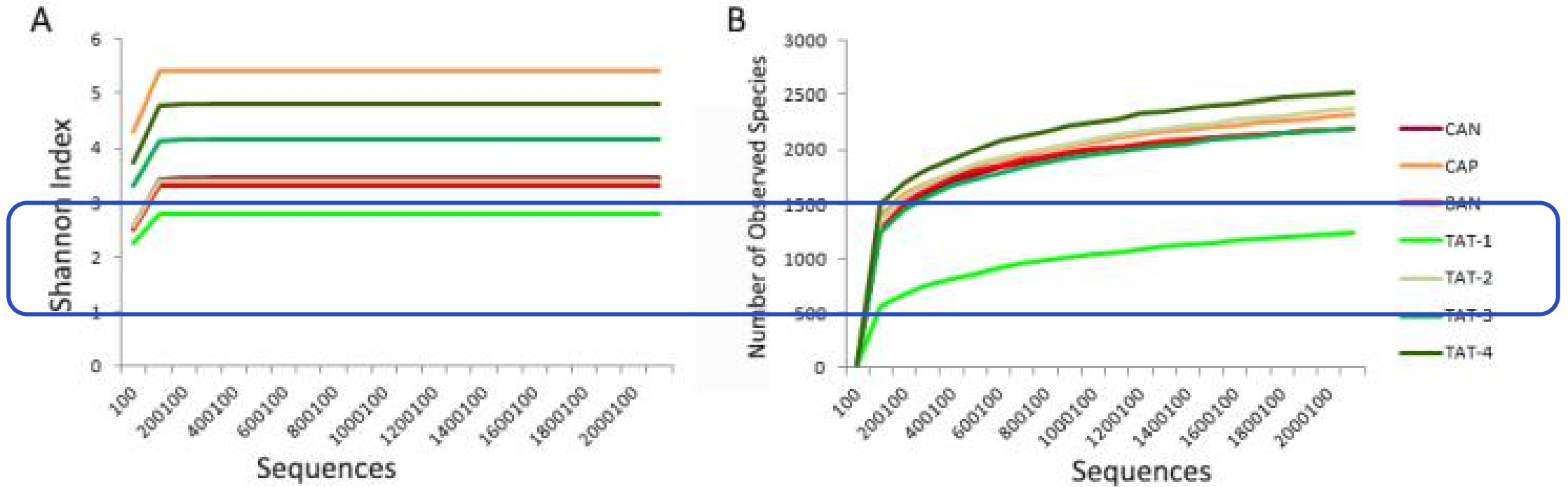
使用closed-reference OTU和denovo OTU采集方法，共获得4018个OTU（聚类为 $\geq 97\%$ 的同一性），其中90个OTU（0.3个总序列）不能在任何分类级别分配。

## 扩增子和宏基因组分析

**Supplementary Table 3. Sequencing and assembly statistics of the hot spring samples obtained after *de novo* assembly.** The size of contigs ranged from 1,817 to 189,789 bp indicating a taxonomic diversity across different samples.

<b>Samples</b>	<b>No. of high quality reads</b>	<b>No. of assembled contigs</b>	<b>Largest contig</b>	<b>N50 contig size</b>	<b>Median Coverage depth</b>	<b>% GC</b>
<b>CAP</b>	19,554,880	189,789	300,790	1,095	5.804	58.76
<b>CAN</b>	15,400,199	35,630	308,961	1,436	5.31	56.83
<b>BAN</b>	15,622,317	10,034	255,192	2,243	5.95	63.36
<b>TAT-1</b>	10,967,018	1,817	203,188	37,514	24.59	50.5
<b>TAT-2</b>	13,563,485	60,087	10,394	358	3.48	67.19
<b>TAT-3</b>	15,209,380	61,774	99,748	2,970	6.58	56.52
<b>TAT-4</b>	8,839,629	14,662	119,840	3,144	5.98	47.45

# 热泉在高温显示低微生物多样性和基因组成

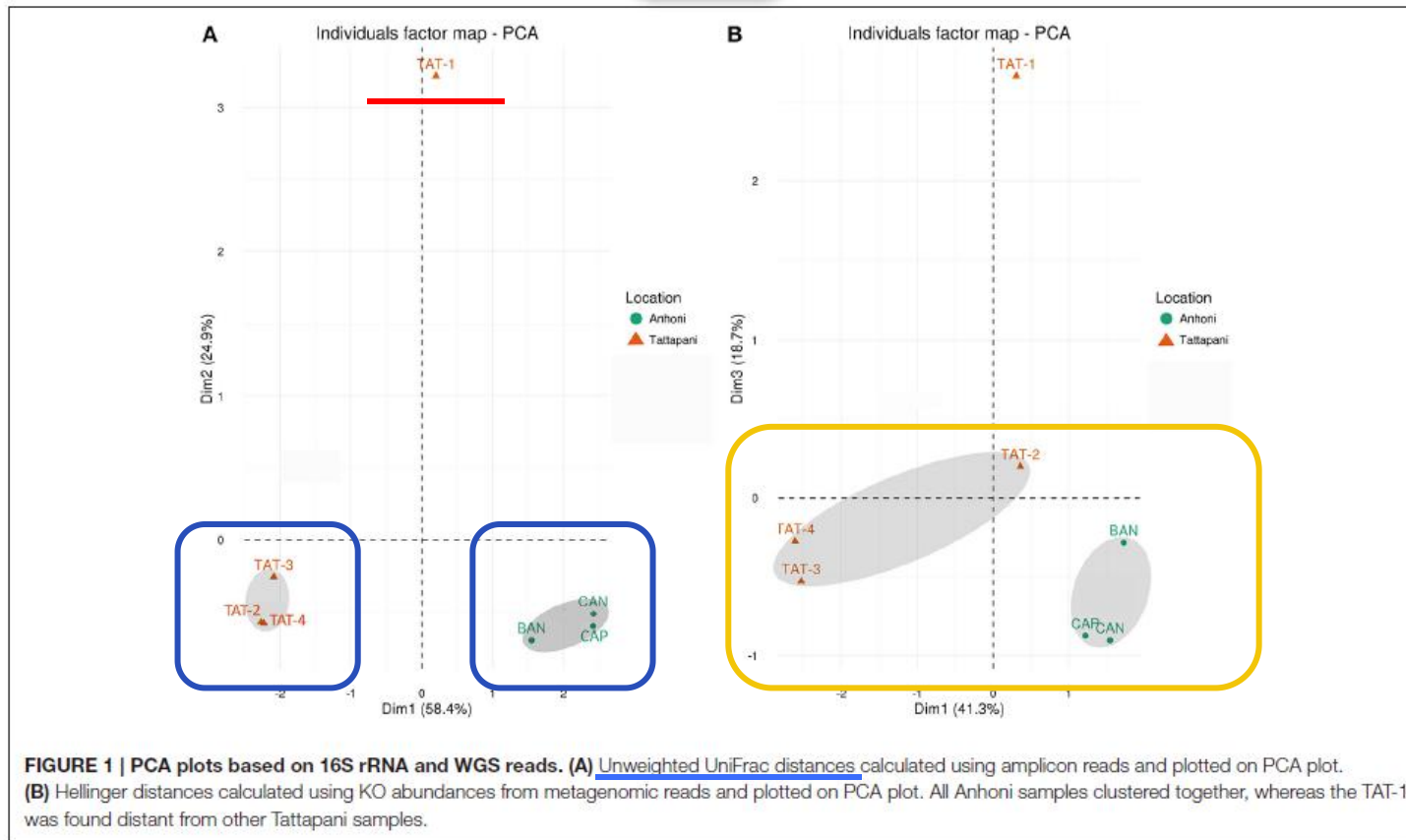


$\alpha$ -多样性：Shannon Diversity Index Pielou's evenness

具有最高温度（98°C）的TAT-1样品物种丰富度和物种多样性最低



# 热泉在高温显示低微生物多样性和基因组成



TAT-1样品显示出与所有其他位点更高的UniFrac距离。

在PCA上Anthoni和Tattapani样品的区域特异性聚类表明从类似区域获得的样品中的系统发育相似性。

突出显示由于地理区域和观测温度的差异，两个地区的微生物群落的变化。

比较样品在特定的进化谱系中是否有显著的微生物群落差异

## 热泉在高温度显示低微生物多样性和基因组成

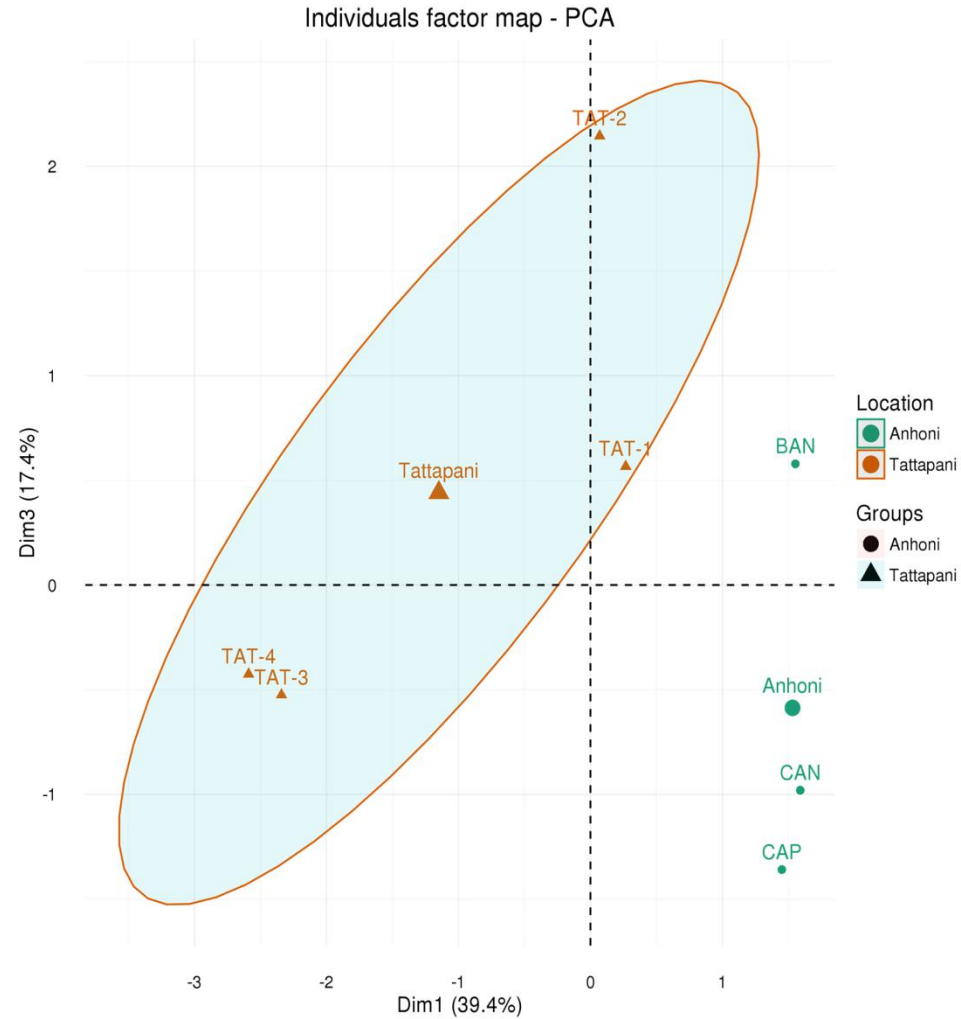
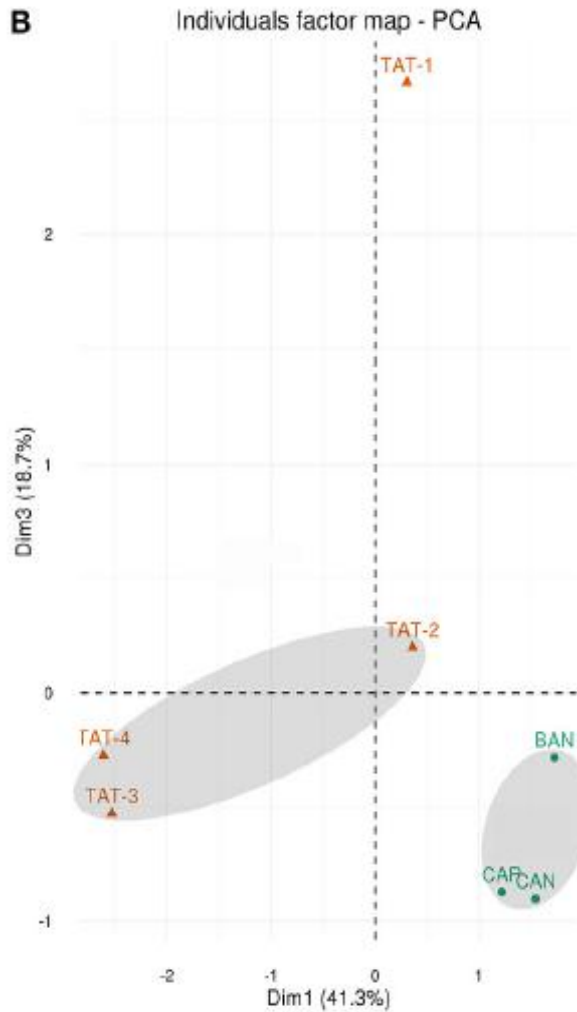
Supplementary Table 4. The alpha diversity metrics calculated for 16SrRNA and metagenomics reads are shown for both sites (mean  $\pm$  sd).

Diversity	Anhoni	Tattapani	Mann-Whitney U Test
Observed Species (16SrRNA)	2239 $\pm$ 95.016	2086.15 $\pm$ 290.220	0.745
Shannon index (16SrRNA)	4.056 $\pm$ 0.676	3.792 $\pm$ 0.441	0.857
Pielou's evenness (16SrRNA)	0.362602 $\pm$ 0.059272	0.341453 $\pm$ 0.035272	0.857
Shannon index (Gene Diversity)	10.73 $\pm$ 0.637	9.51 $\pm$ 0.22	<b>0.0148*</b>
Pielou's evenness (Gene Diversity)	0.898 $\pm$ 0.0193	0.892 $\pm$ 0.03	0.114

\*: significant (p-value  $\leq$  0.05)

Shannon多样性指数用于估计样品中的基因多样性，Anhoni的基因多样性显著低于Tattapani的基因多样性(P $\leq$ 0.05)

# 热泉在高温显示低微生物多样性和基因组成



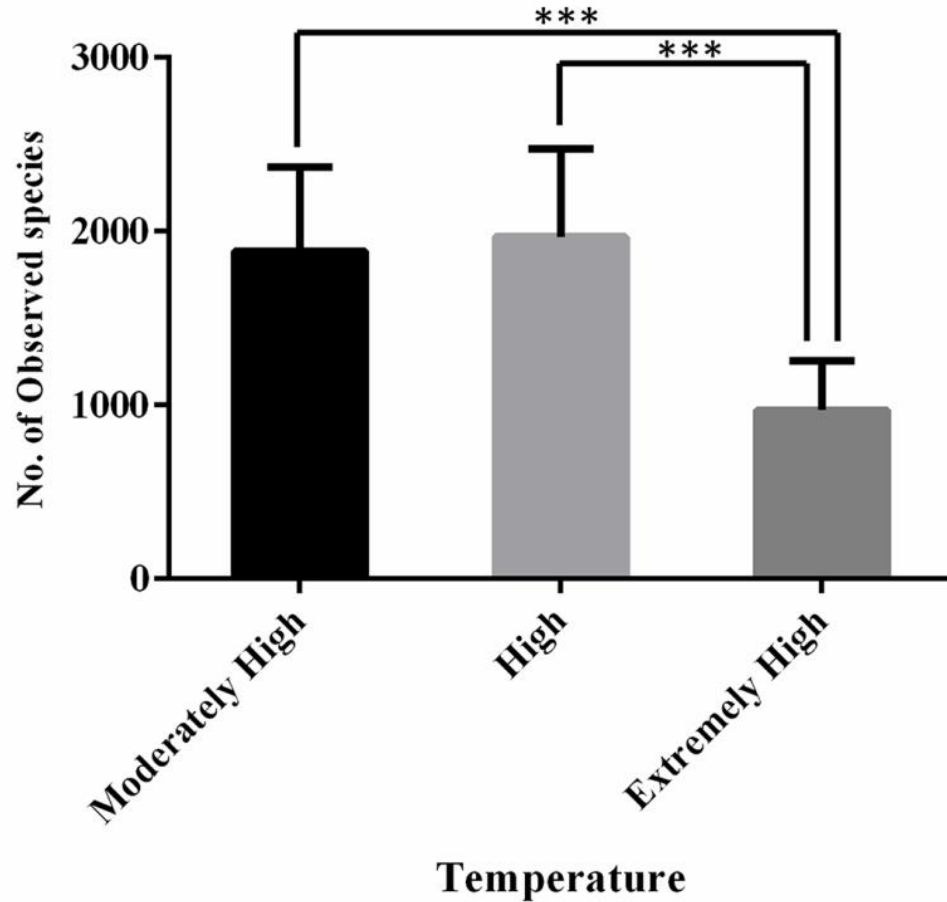
## 同源基因分析

Tattapani样品的ellinger距离高，可能是由于T样品的温度跨度大。

具有最高温度的TAT-1与从相同地理位置收集的其他样品的距离最大。这表明**温度**可能在确定该地区微生物群落的代谢潜力方面发挥重要作用。

The Tattapani samples showed separate clustering from Anthoni samples using Hellinger Distances based on KO proportions and eggNOG proportions.

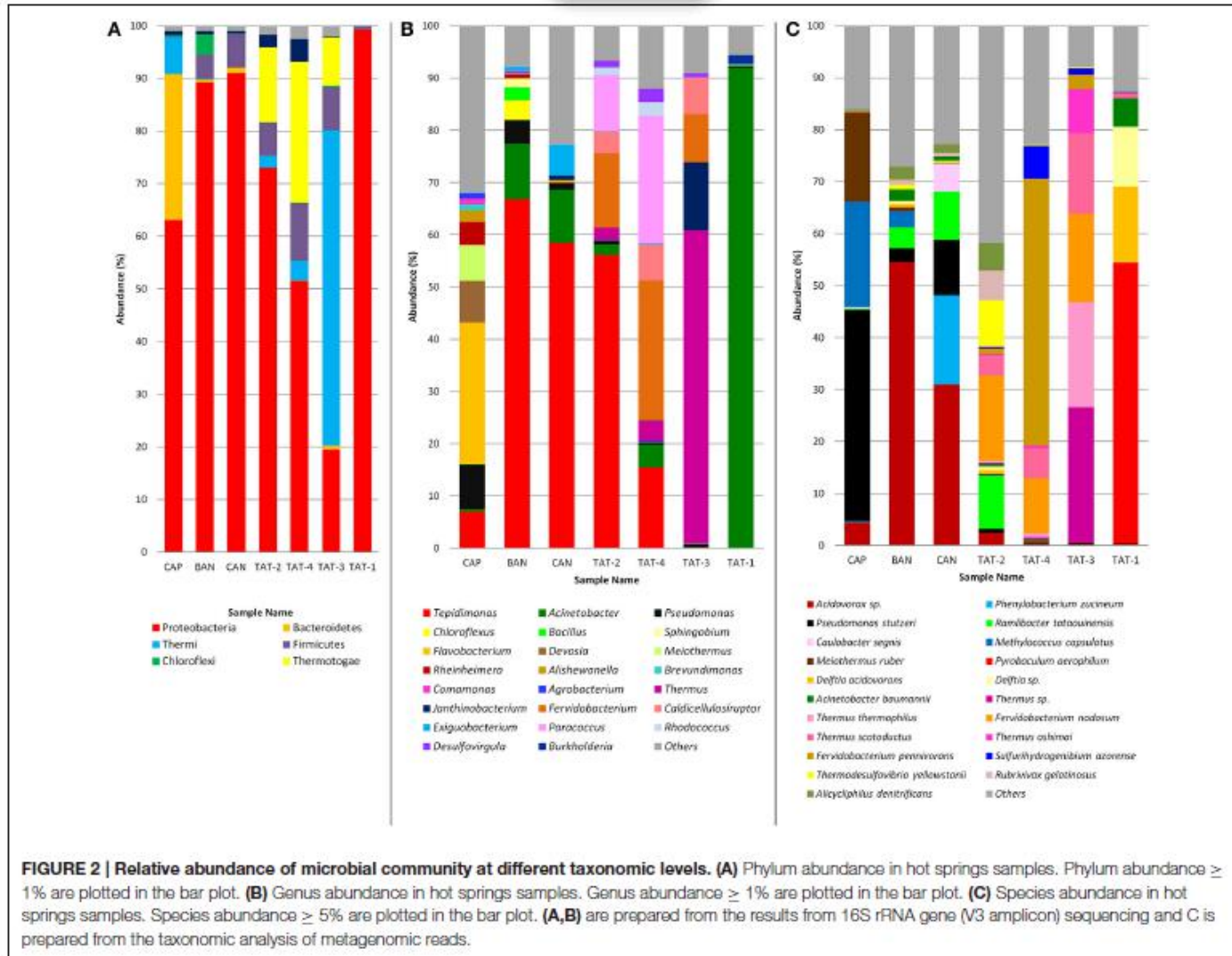
## 热泉在高温显示低微生物多样性和基因组成



Tukey's test :

与中等高度 ( 40-55°C ) 和高温 ( 55-75°C ) 相比, 极高温 (  $\geq 75^{\circ}\text{C}$  ) 的物种数量显著降低。 ( $p \leq 0.001$ ).

# 微生物群落结构



门水平：

*Proteobacteria* (52-99%)

TAT-3 *Thermi* (59.97%)

属水平：

*Tepidimonas* (56-67%)

CAP *Flavobacterium* (27.1%)

TAT-3 *Thermus* (60%)

TAT-1 *Acinetobacter* (92.1%)

种水平：

BAN *Acidovorax* sp. (54.6%)

CAN *Acidovorax* sp. (30.9%)

CAP *Pseudomonas stutzeri* (40.8%)

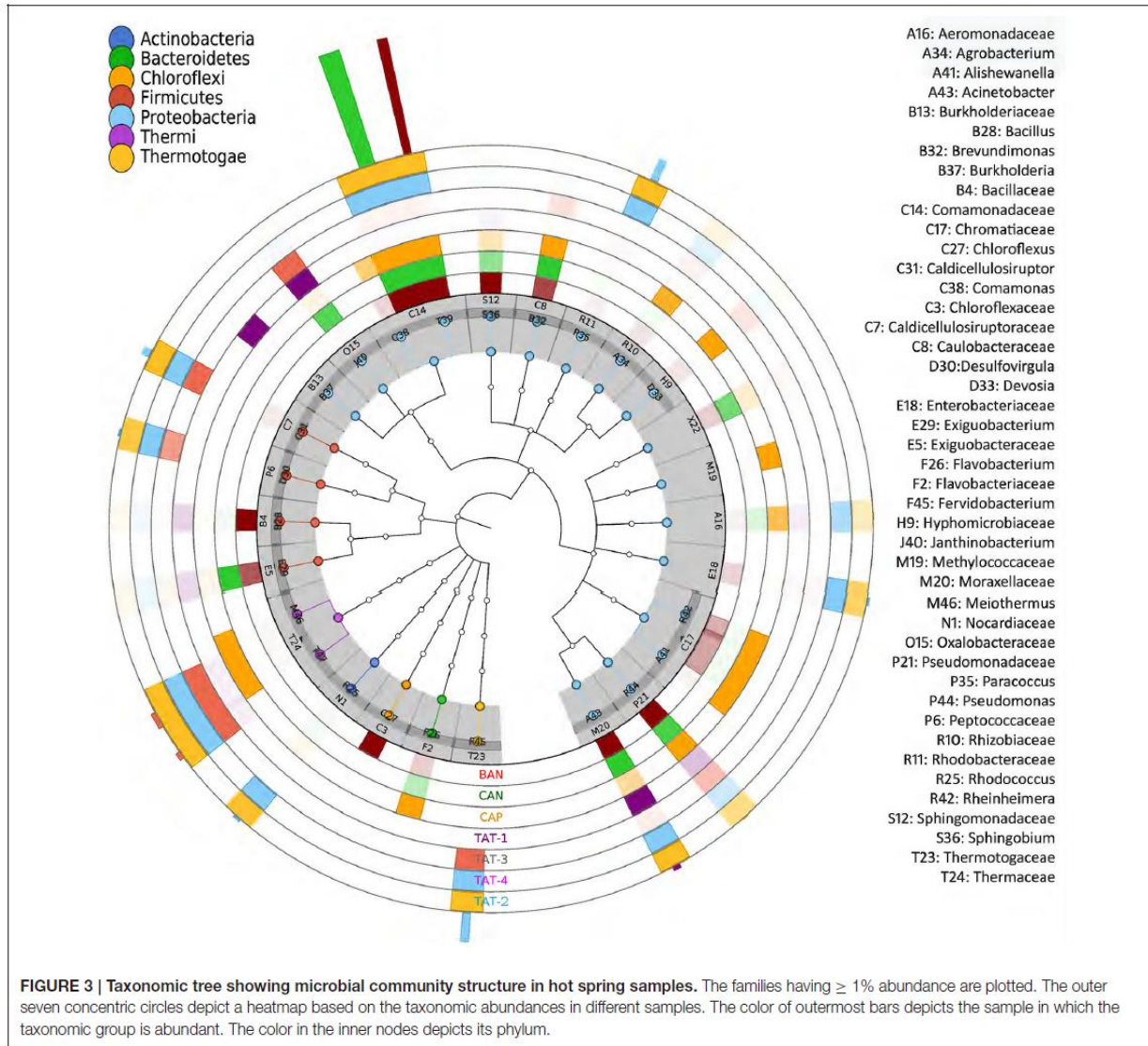
TAT-1 *Pyrobaculum aerophilum* (54.0%) [古菌]

TAT-4 *Fervidobacterium pennivorans* (51.4%)

TAT-2 *Fervidobacterium umnodosum* (16.5%)

TAT-3 *Fervidobacterium umnodosum* (17.1%)

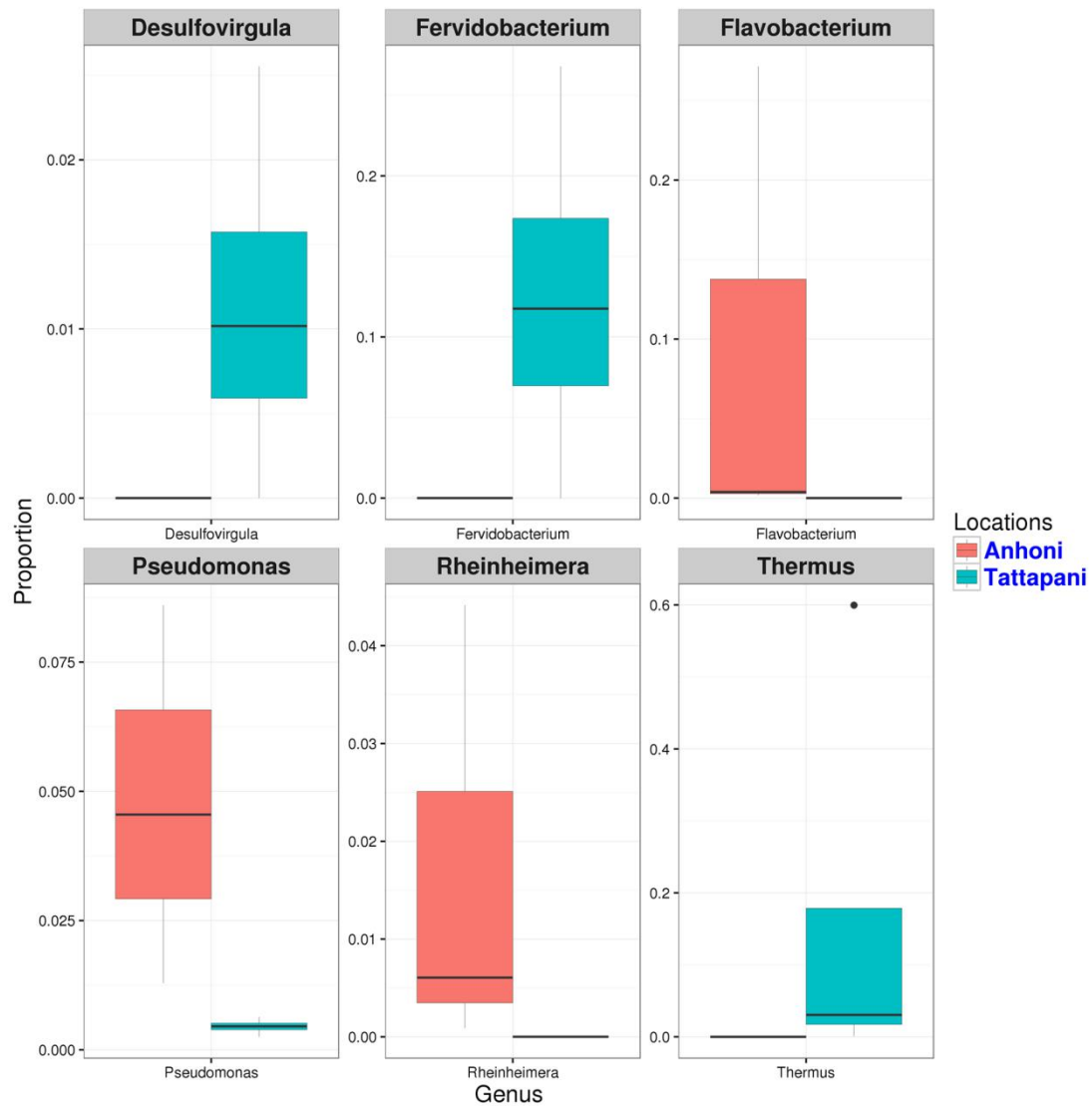
# 微生物群落结构



在Anhoni组中，BAN和CAN样品具有相似的分类学特征，而CAP显示不同的分类组成。

类似地，Tattapani组的TAT-2和TAT-4显示出相似的分类学特征，而TAT-1和TAT-3具有显著不同的分类结构。

# 微生物群落结构



显著相关 ( $p \leq 0.05$ ) :

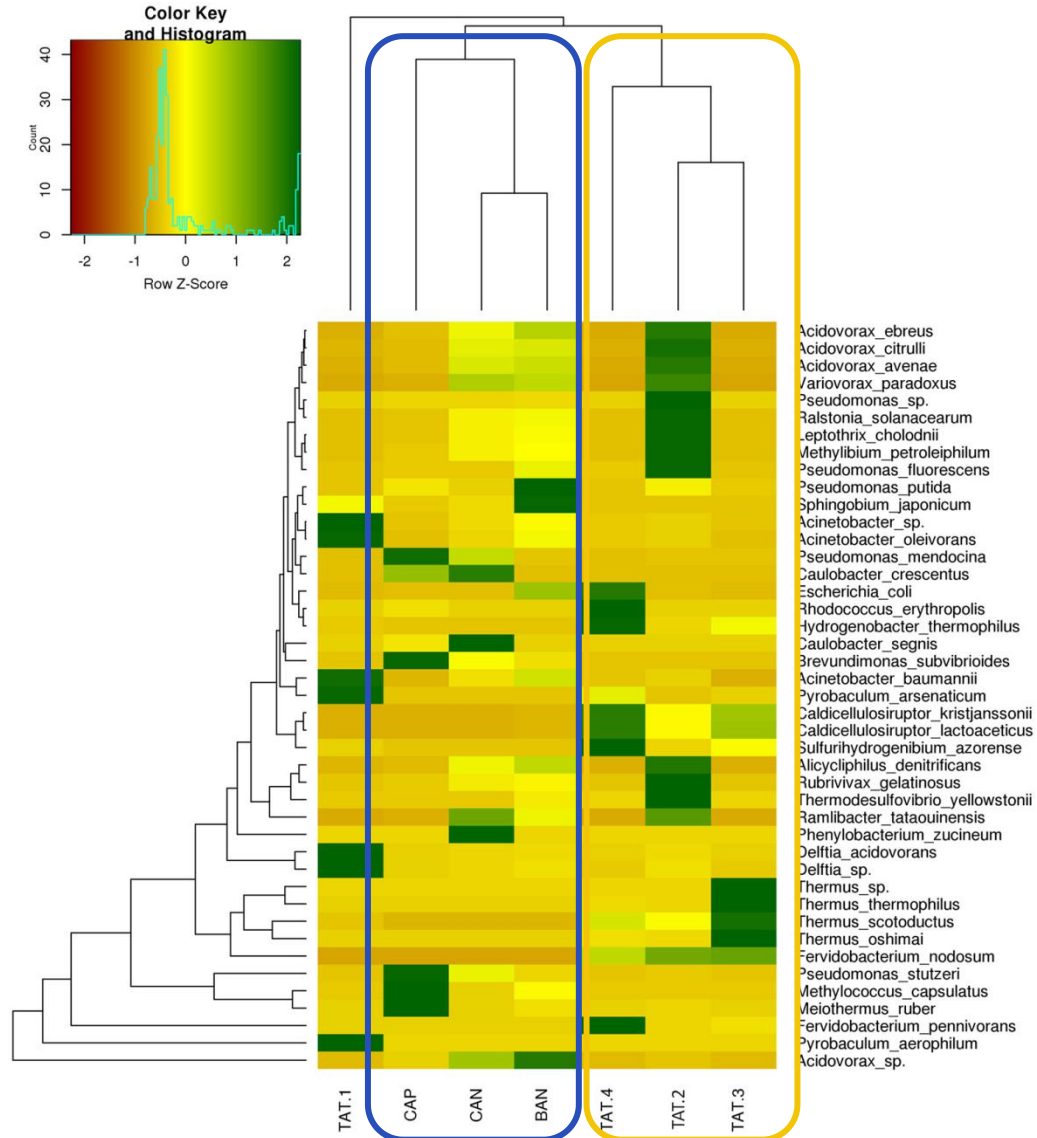
Tattapani组 :

*Desulfovirgula, Fervidobacterium, Thermus*

Anthoni组 :

*Flavobacterium, Pseudomonas, Rheinheimera*

# 微生物群落结构



密集聚类：

Tattapani (TAT-2 , TAT-3 , TAT-4)

Anhoni (BAN , CAN , CAP)

TAT-1：富含古菌菌种的独特微生物群落

FIGURE 4 | Heatmap showing relative abundance of species. Species with  $\geq 5\%$  abundance in each WGS sample are plotted on heatmap. The dendrograms show hierarchical clustering between species and samples.



# 微生物群落结构

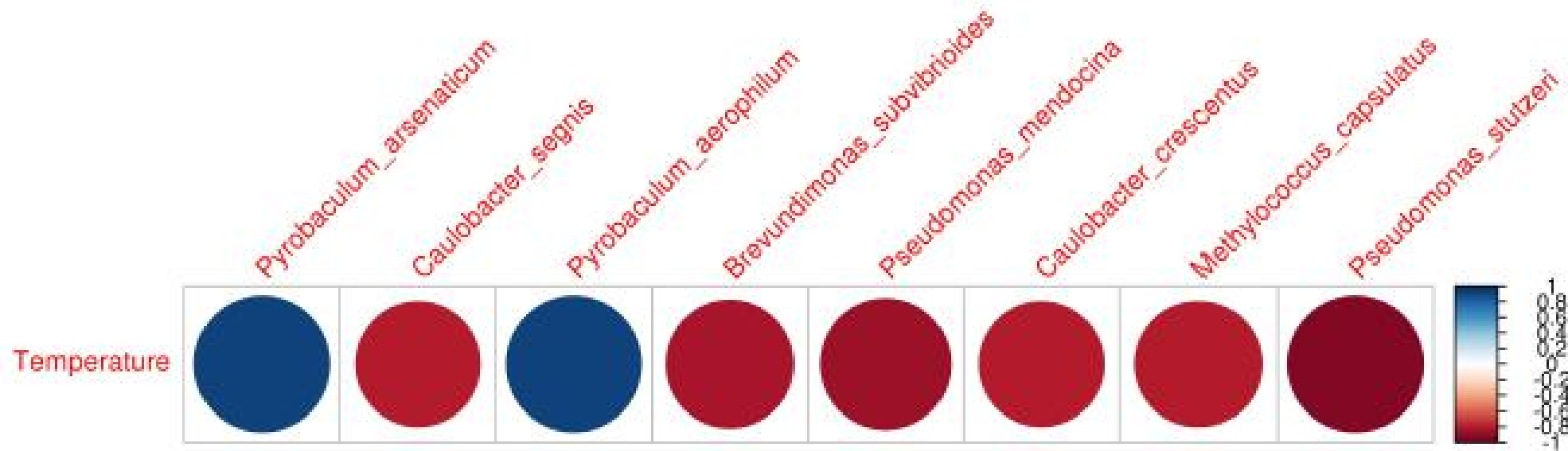


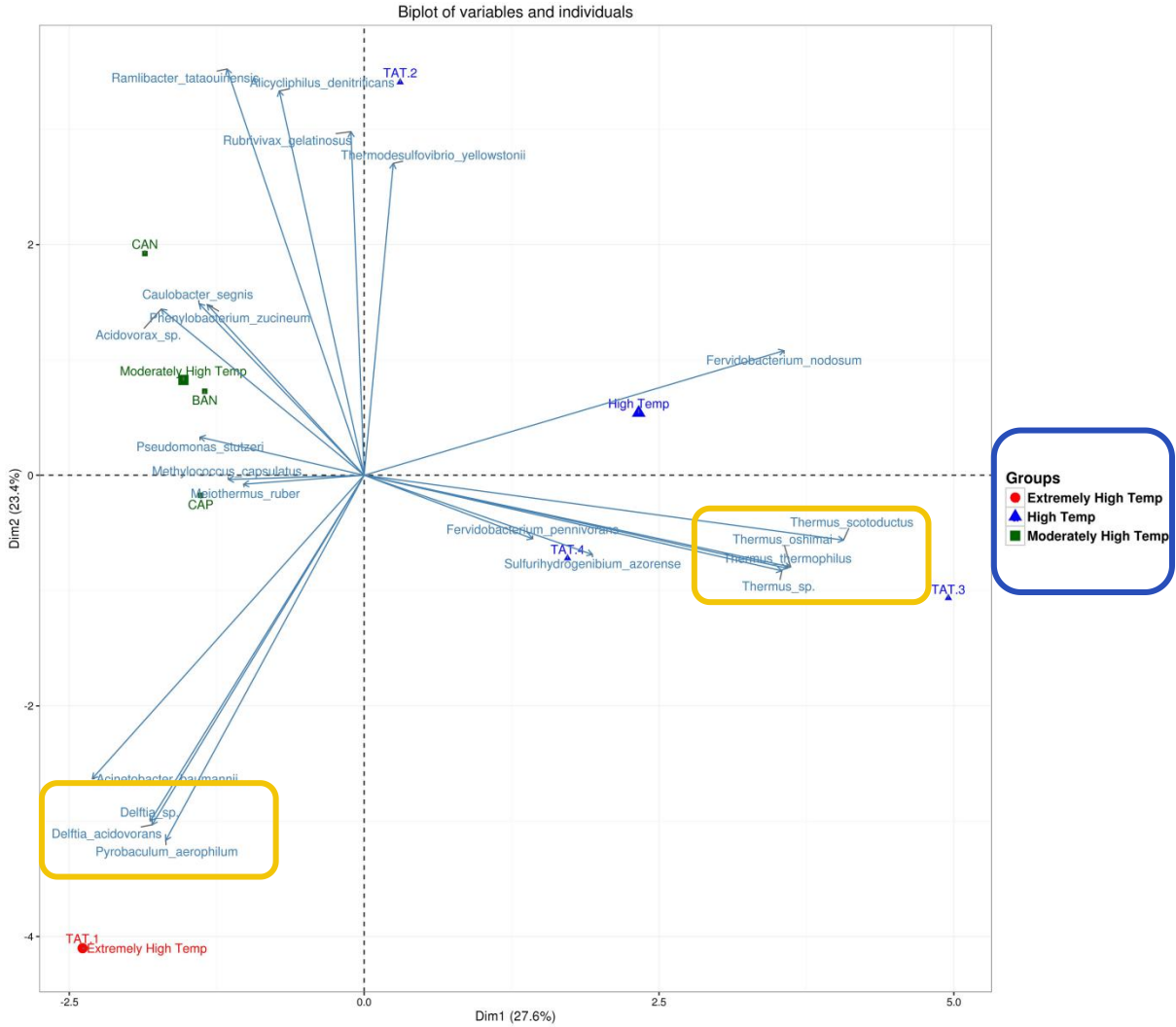
FIGURE 5 | Spearman's Rank correlation of species with temperature. Species proportions obtained from metagenomic analysis were correlated with temperature and those with significant Spearman's Rank correlation coefficient (FDR adjusted  $p \leq 0.05$ ) and higher correlations ( $\rho \geq 0.7$ ;  $\rho \leq -0.7$ ) were plotted.

斯皮尔曼等级相关系数用来估计两个变量X、Y之间的相关性

与温度正相关：*Pyrobaculum aerophilum* , *Pyrobaculum arseniticum*

与温度负相关：*P. stutzeri* , *Methylococcus capsulatus* , *Caulobacter* spp.

# 微生物群落结构



与极高温相关：*P. Aerophilum* , *Deltfia species*

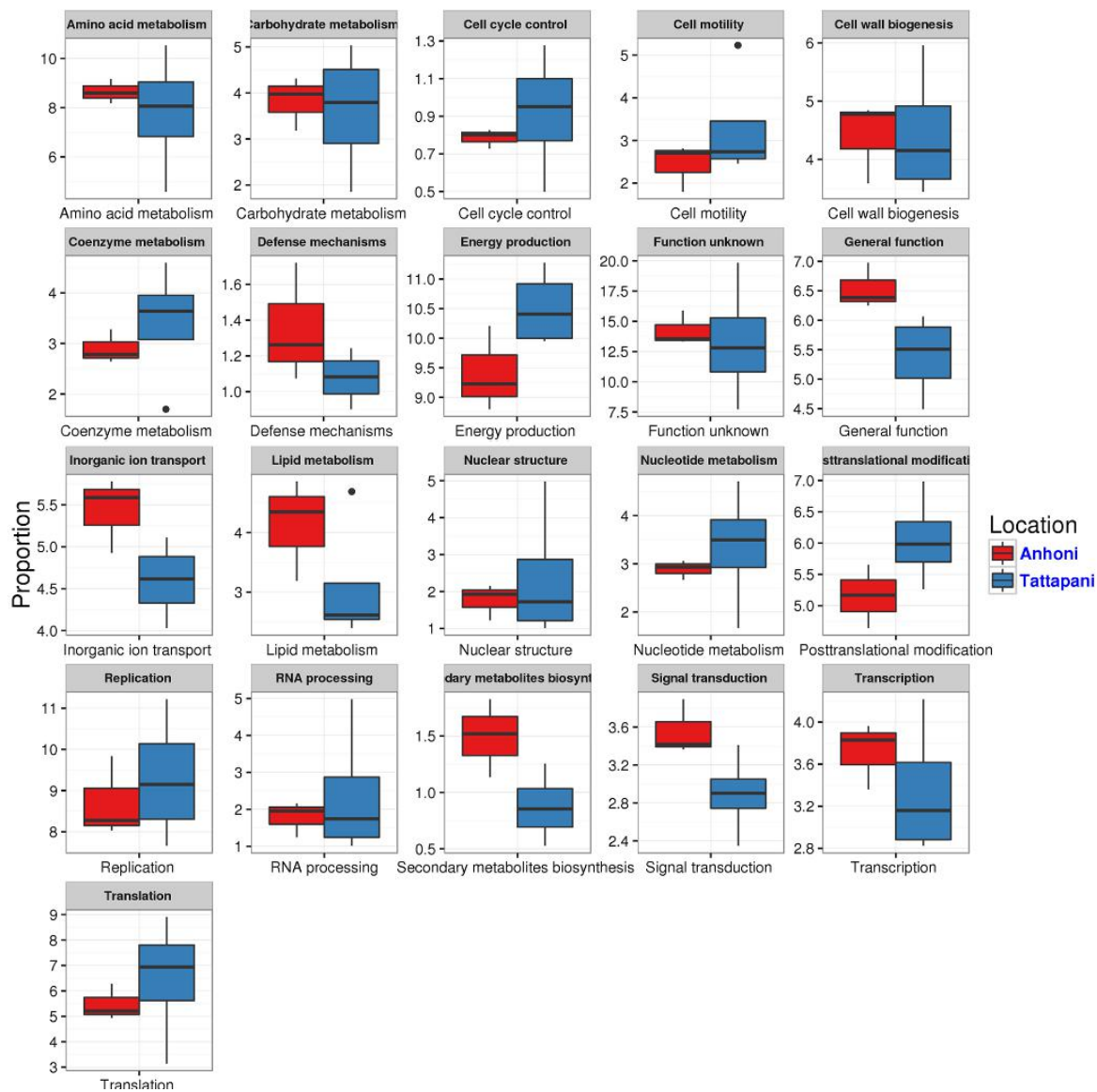
与高温相关：*Thermus thermophilus* ,  
other thermophilic species

*M. Capsulatus* 和 *Meiothermus* 显示与CAP的高关联，使得该样点与其他温泉不同。

物种相关性在TAT-2，TAT-3和TAT-4之间也有所不同，表明了每个部位的独特物种多样性。

用温度对样本进行分组；用向量的排序表示温度与物种之间的关联

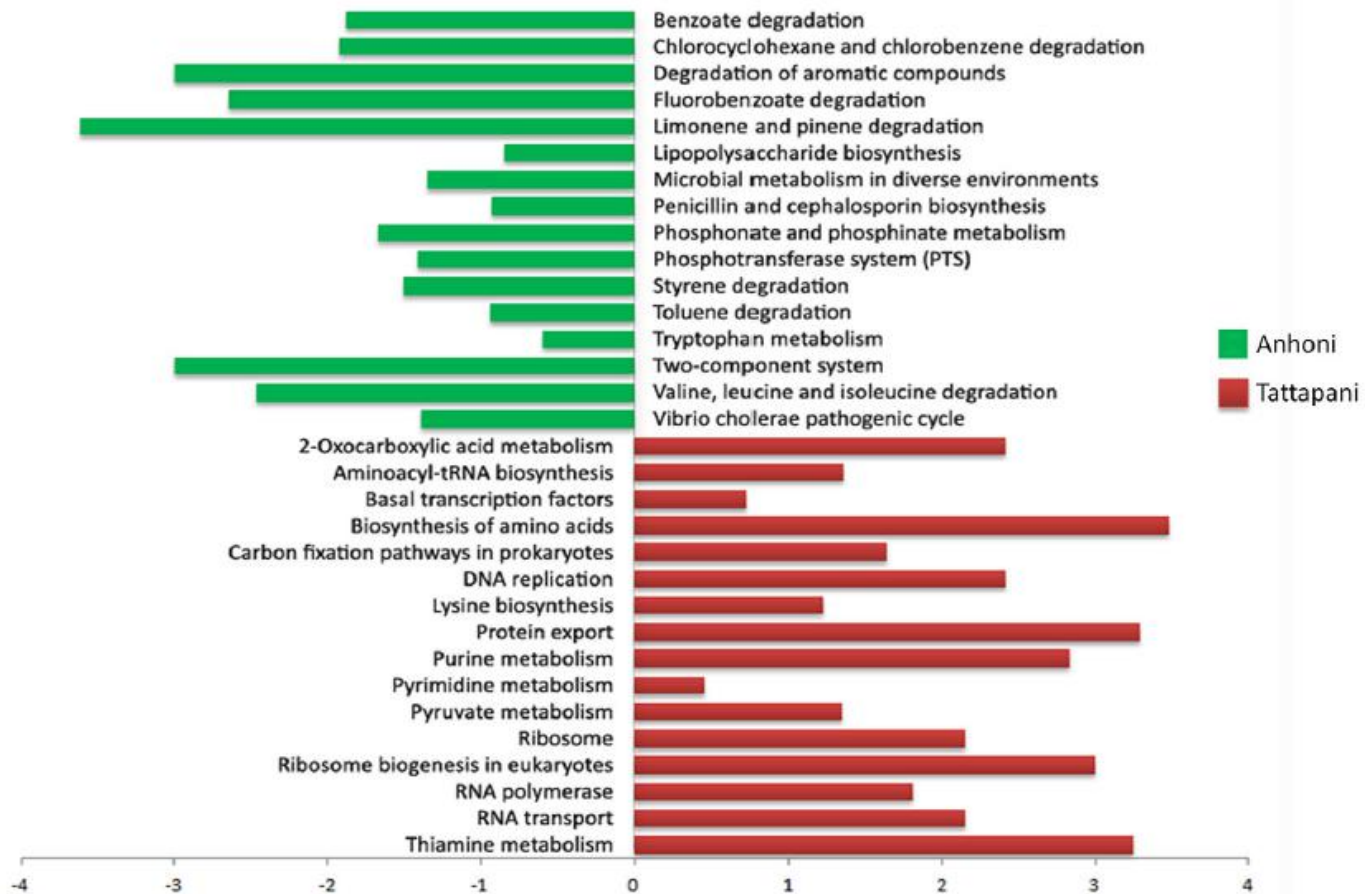
# Anhoni 和 Tattapani 的功能鉴定



**Anhoni: 无机离子迁移、脂质代谢、次级代谢**

**Tattapani: 能量产生、核苷酸代谢、细胞周期控制、复制、翻译修饰功能**

# Anhoni 和 Tattapani 的功能鉴定



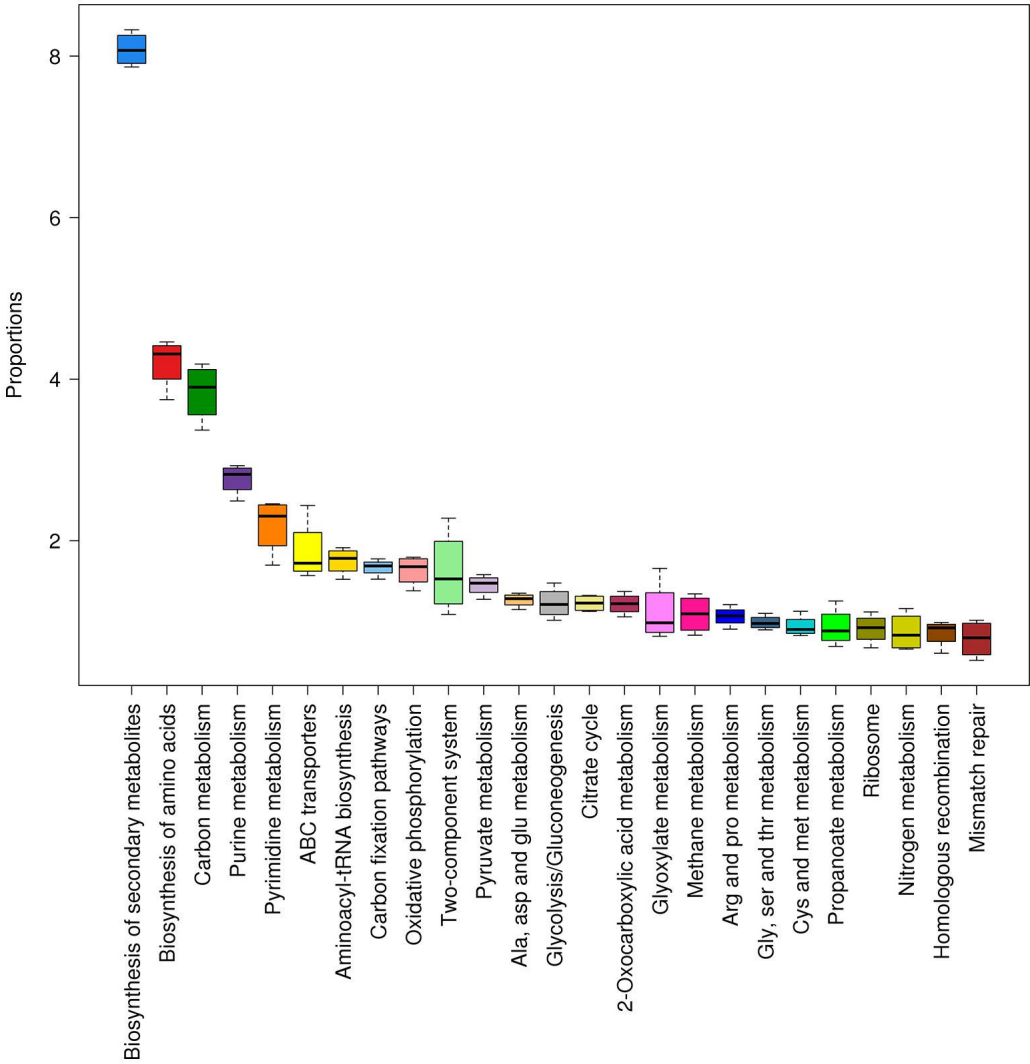
与Anhoni显著相关：  
苯甲酸盐、甲苯、二甲苯、氟代苯甲酸盐、环戊烯、氯苯等降解途径 ( $p \leq 0.05$ )

与Tattapani显著相关：  
DNA复制、嘌呤和嘧啶代谢 ( $p \leq 0.05$ )

FIGURE 7 | Fisher's exact test for pathways in Anhoni and Tattapani samples. The positive bars (in green) are pathways enriched in Anhoni samples, whereas the negative bars (in red) are pathways enriched in Tattapani samples.

费舍尔检验用于衡量统计结果的显著性

# Tattapani 中丰富的 KEGG 代谢途径

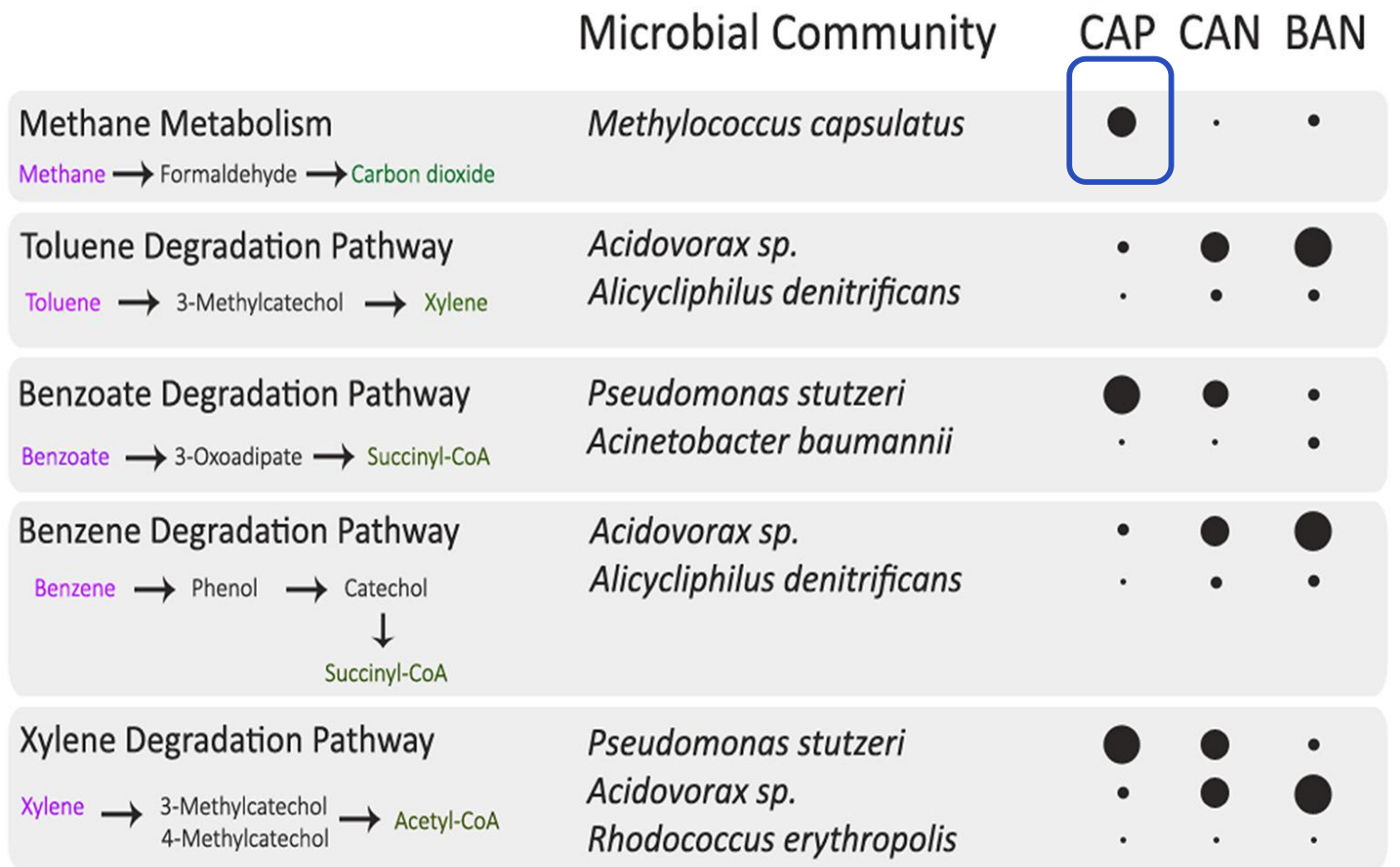


次生代谢物的生物合成途径  
氨基酸生物合成  
碳代谢  
其他细胞功能

与能量产生途径中的TCA循环和氧化磷酸化相关代谢途径的丰度较高，表明有氧呼吸是该地区微生物群落能量产生的主要机制。

FIGURE 8 | Abundant KEGG pathways found in Tattapani samples. The pathways and their proportions in Tattapani samples are shown using box plots ( $\geq 1\%$  proportion). The samples showed a higher abundance of pathways for general cell functions and certain specific functions such as nitrogen metabolism and methane metabolism.

# Anhoni 碳氢化合物降解



· <1 abundance    ● 1-10% abundance    ● 10-40 % abundance    ● >40 % abundance

**FIGURE 9 |** Microbes associated with hydrocarbon degradation pathways and their abundances in Anhoni samples. The major intermediates and the microbes involved in the degradation pathway are described in this figure. The diameter of the circle represents the relative abundance of microbes in the three Anhoni samples.

CAP中甲烷代谢高度富集，先前有研究报道CAP拥有高比例（>80%）的甲烷。

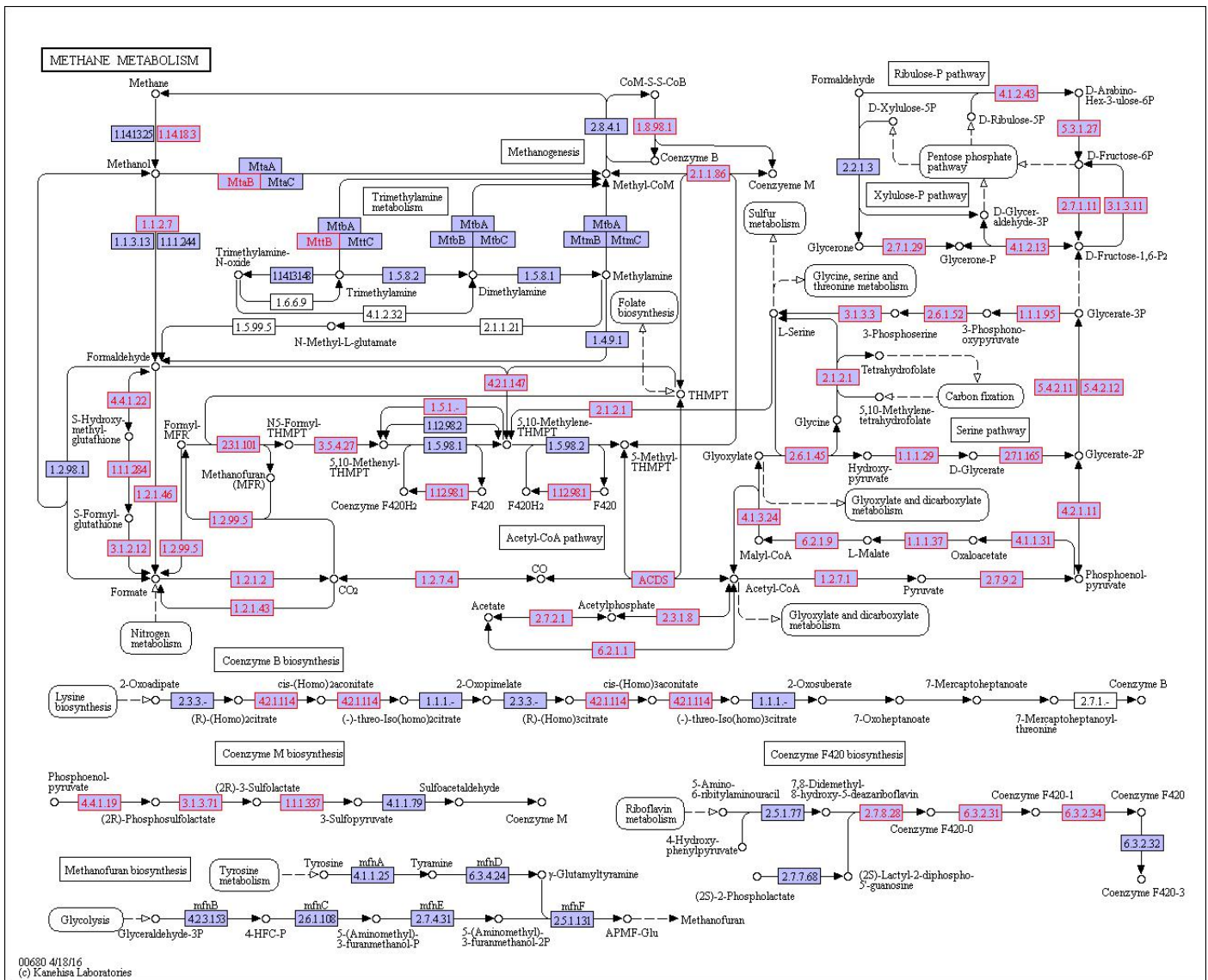
(Sarolkar, 2015)

物种多样性分析中CAP具有高丰度的*M. capsulatus*，具有利用甲烷作为能源的能力，符合该地点富集甲烷代谢途径。

(Ward *et al.*, 2004)

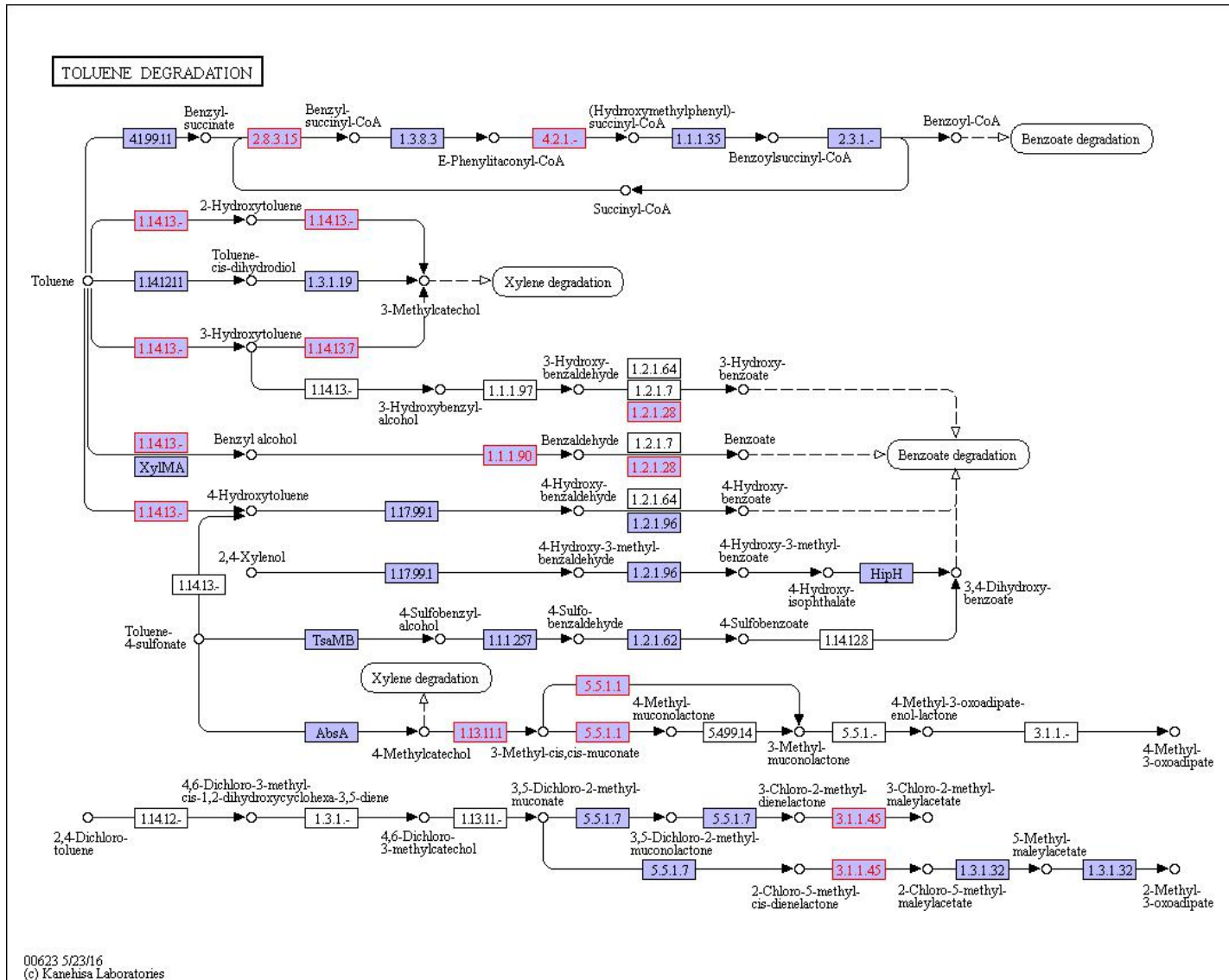
甲烷代谢、甲苯代谢、苯甲酸酯代谢、苯代谢、二甲苯代谢

# Anhoni 碳氢化合物降解



参与**甲烷代谢**的基因存在于宏基因组数据集中，并且可以通过分类排布对该基因组进行注释。通过微生物将甲烷氧化成甲醇，随后甲醛氧化，进一步用于其它下游途径，包括转化为乙酰辅酶A以进行能量生产等。

# Anhoni 碳氢化合物降解

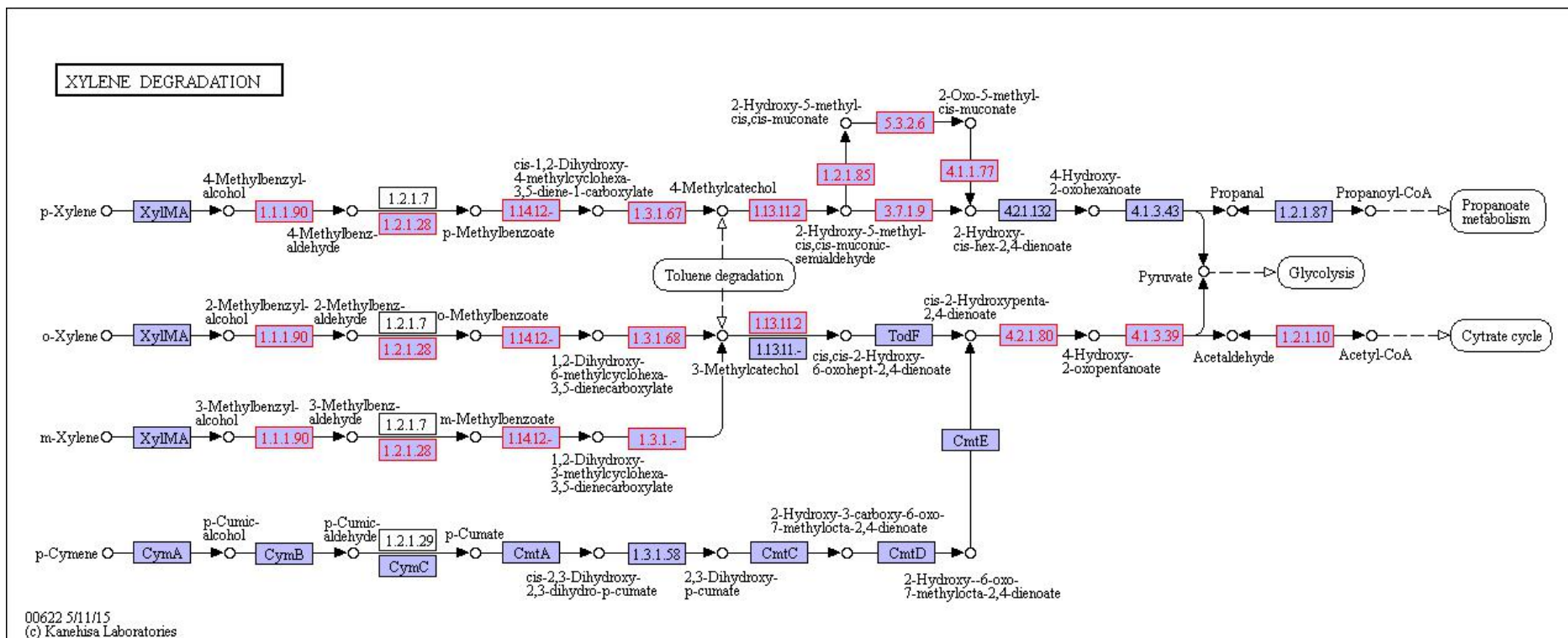


甲苯代谢：

BAN中参与甲苯降解途径的酶最丰富，CAP和CAN（次之）样品中也存在，主要由 *Acidovorax sp.*和 *Alipliphilus denitrificans* 参与。



# Anhoni 碳氢化合物降解

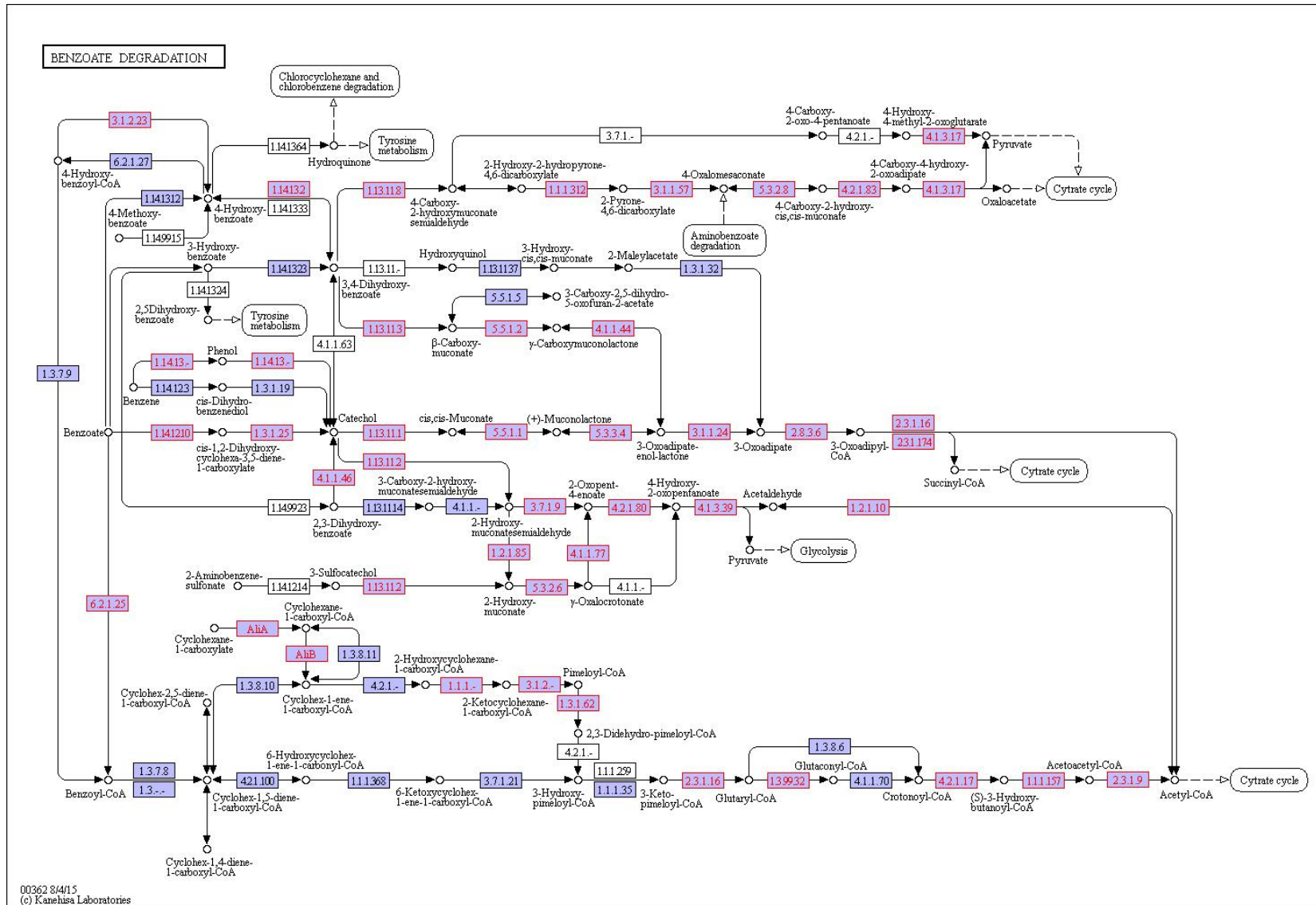


二甲苯代谢：

Anhoni 样品中十分丰富，主要由 *P. stutzeri*, *Acidovorax* sp. 和 *Rhodococcus erythropolis* 组成的微生物群落参与代谢。

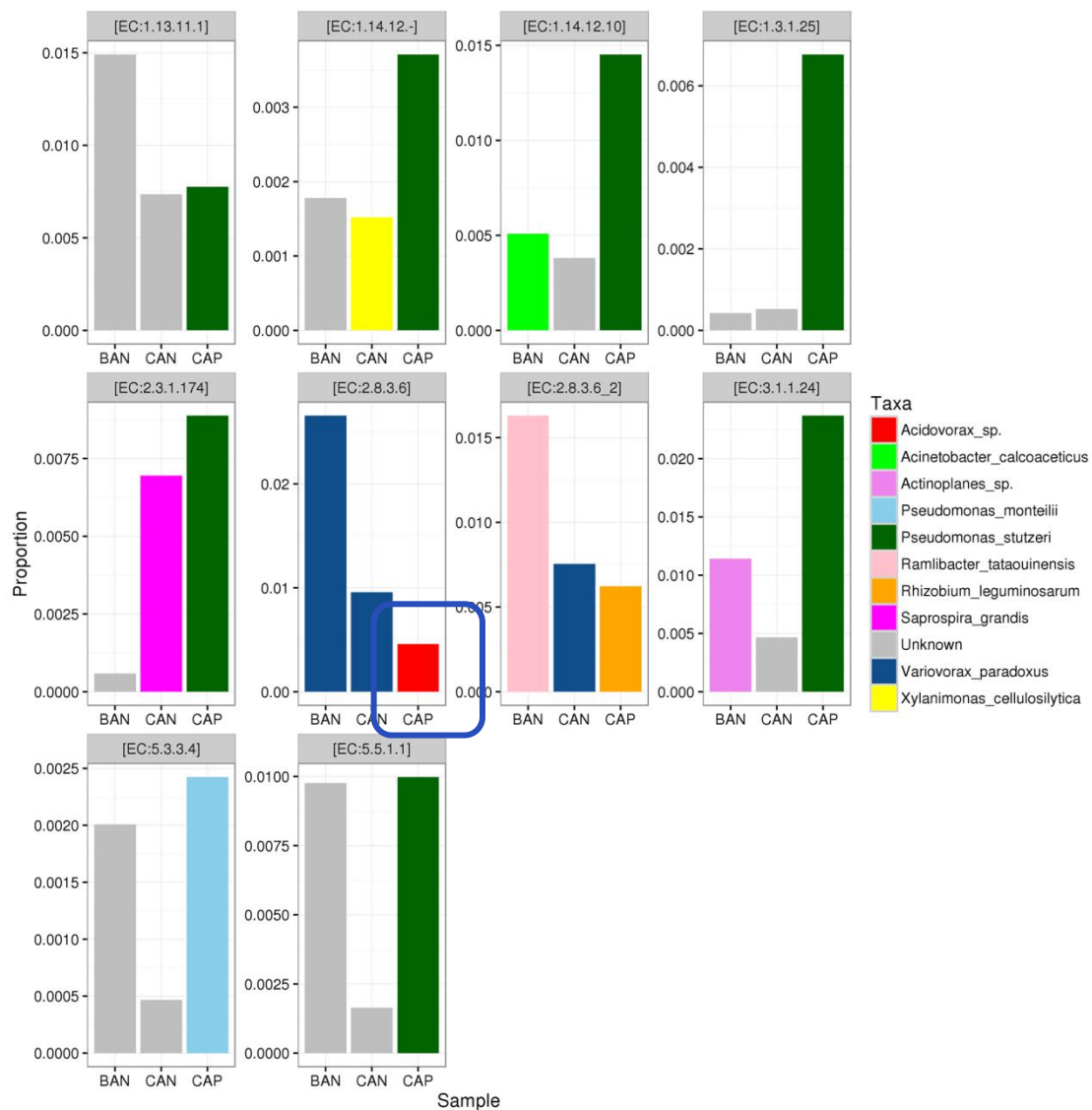
与BAN和CAN样品相比，CAP中苯甲酸和二甲苯降解酶较丰富，是甲苯降解的下游途径；主要由 *P. stutzeri* 和 *Acinetobacter baumannii* 参与引起。

# Anhoni 碳氢化合物降解



苯甲酸酯代谢：  
 苯转化为苯酚和儿茶酚可以通过  
 苯甲酸酯降解途径降解，该途径  
 的酶主要由 *Acidovorax* sp. 和  
*Alicyclophilus denitrificans* 产生。

# Anhoni 碳氢化合物降解



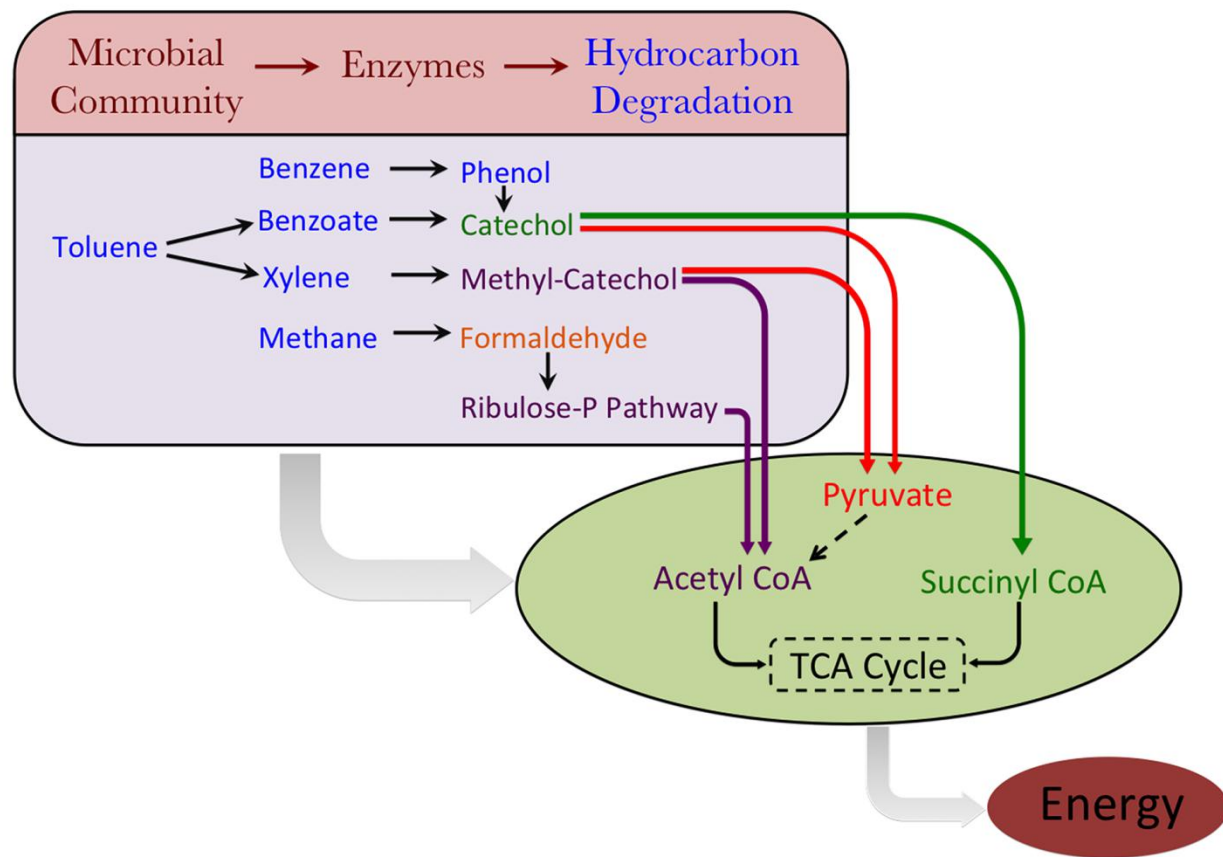
有趣的是，参与碳氢化合物代谢的大多数微生物不具有各自途径中所需的所有酶。

而作为一个群落，他们拥有完成一套途径的所有的酶，从而进行复杂的代谢。

例如，在CAP中的苯甲酸酯降解途径中，3-氧基己二酸 CoA-转移酶（3-oxoadipate CoA-transferase enzyme）不存在于主导的 *P. stutzeri* 中，而途径中的所需其它七种酶（总共八种酶）存在。

发现在相同的微生物群落中丰富的另一种微生物 *Acidovorax sp.* 具有这种酶，参与完成该途径。

## Anhoni 碳氢化合物降解



类似地，在二甲苯降解途径中，包括未知微生物物种在内的个体微生物对二甲苯降解有不同的作用，并且作为一个群落完成了途径。

综合起来，显然 Anhoni 样品拥有一个独特的微生物群落，具有通过有氧呼吸利用各种碳氢化合物作为能源的能力。

通过将这些酶映射到它们各自的途径，观察到苯甲酸酯和二甲苯被利用并转化为琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A，然后进入TCA循环以产生能量。



04

# Discussion

**碳氢化合物的来源**：Anhoni 和 Tattapani 热泉位于煤田边缘，岩层之间原有的火成岩平坦入侵，使这些地区有**火山凝灰岩**和**层间碱性淤泥**的存在。火山沉积物构成碳氢化合物和其他有机化合物，并释放有机气体 (Farooqui *et al.*, 2009)；通过断裂迁移，带到土壤表面。

**无机离子等迁移**：土壤中的石油微渗漏导致几种化学反应，改变了土壤的氧化还原电位，这在元素的迁移中起重要作用。



**微量元素的含量**：钒、铬、镍、钴、锰、汞、铜、钼、铀、锌、铅和镉在石油中含量较高，其在热泉中的异常量可能是由于石油的渗入。(Duchscherer, 1983)

**Tattapani TAT-1**：Tattapani 热泉不同地点的温度在2km深度可达 $230\pm 40^{\circ}\text{C}$ ，1km深度达 $112\pm 30^{\circ}\text{C}$  (Vaidya *et al.*, 2015)。其极高的温度很可能造成微生物多样性较低，群落功能明显异常。

许多研究报道不同地理位置的中等温度和极高温（44-110°C）的热泉的基于16S rRNA分析微生物多样性，**变形菌门**丰度最高 (Bowen De Leon *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2015; Ghelani *et al.*, 2015)，与本研究相符，**可能是热泉等高温极端环境中固有的优势菌。**

Tattapani 中 *Thermotogae* 丰度最高，与高温热泉相关，其耐热性高在早期研究中也有报道。(Chan *et al.*, 2015; Kanoksilapatham *et al.*, 2015; Dhakan *et al.*, 2016)

在BAN, CAN, TAT-2, TAT-4和CAP样品中丰度最高的变形菌门的 *Tepidimonas* sp. 基因组构建和分析草案揭示了**硫代谢，氨代谢，固氮，有机酸同化和各种蛋白酶的基因**的存在。



在单一微生物物种中没有发现涉及碳氢化合物降解途径的所有酶；然而，作为微生物群落，拥有所有酶。 **另一种可能**：这些热泉中存在着新物种，这些物种可能具有完整的降解途径。本研究中鉴定的物种和酶有望用作石油泄漏和碳氢化合物（烃类）污染地区的有希望的生物修复剂。(Kimes *et al.*, 2013; Gaur *et al.*, 2014)

Tattapani中微生物群落**基因复制和DNA修复途径**的存在在可能是其在不利的物理条件下存活的适应机制，如高温会对DNA造成相当大的损害。

微生物群落的进化速度受环境条件的制约 (Gupta and Sharma, 2015)，与稳定环境中的基因组相比，极端栖息地的微生物以广泛的DNA修复系统和高突变率使自身快速发展，以应对环境的有害影响。(Li *et al.*, 2014)

尽管具有基因复制和核苷酸代谢等途径存在，**Tattapani的低物种丰富度**这表明只有少数的微生物物种能够在极端条件下适应和生存。





2017

**敬请大家批评指正！**