



# 读书报告

汇报人：赵卓丽 汇报日期：2019.01.06

Mu et al. *Microbiome* (2018) 6:230  
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0613-2>

2-year IF=9.133

Microbiome

RESEARCH

Open Access



# Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing

Da-Shuai Mu<sup>1,2</sup>, Qi-Yun Liang<sup>2</sup>, Xiao-Man Wang<sup>2</sup>, De-Chen Lu<sup>2</sup>, Ming-Jing Shi<sup>2</sup>, Guan-Jun Chen<sup>1,2</sup>  
and Zong-Jun Du<sup>1,2\*</sup>

**元转录组和比较基因组揭示富集培养过程中的复苏机制**

# 目 录

Contents

**01 Background**

**02 Results and discussion**

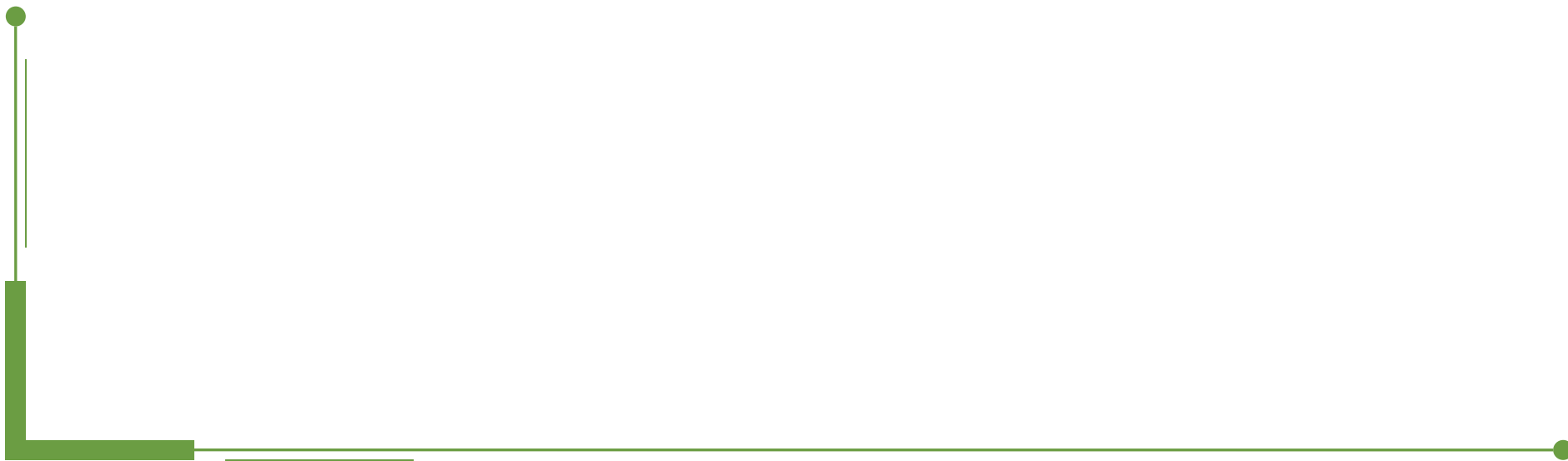
**03 Conclusions**

**04 Methods**



# 01

## Background



**pure culture**

微生物的**纯培养**对于阐明其作用及人们认识和利用微生物至关重要

**关键问题**

大多数微生物物种都**抵抗**实验室培养，不能在人工培养基上纯培养



微生物“暗物质” **microbial “dark matter”**



为培养出更多微生物物种，近年来研究人员进行很多尝试，例如**改进培养基、目标微生物的特殊富集、模拟自然环境条件、原位培养和单个细胞的分离培养**等。与此同时，一些新的培养方法和培养装置不断地被开发出来，这些新型的培养方法大多基于一个基本原理——**模拟微生物的原始生存环境**。

模拟微生物的原始生存环境 —— 取得了很大成效

**VBNC (viable but non-culturable)** : 很多微生物并不活跃, 甚至是处于**休眠**状态

采用模拟原始环境培养自然界的微生物, 其中休眠类群难以苏醒, 也难以被分离培养

如何唤醒原始生境  
中休眠的微生物?

**富集培养法 (Enrichment culture)**



**富集培养法 (Enrichment culture)**：微生物分离培养的经典方法，由Winogradsky很早建立(1856-1953)，使用Winogradsky Column富集和研究硫化细菌和硝化细菌。尽管该方法已有上百年历史，但是对其中的**富集和可培养机制**的认识仍然非常有限。本文就富集培养方法进行了系统研究，并发现了其中**潜藏的微生物复苏机制**。



海洋环境是一个“菌种库”，其中休眠细菌存在于海洋沉积物中，但丰度很低。如果可以预测生物体的代谢并提供优选的碳/营养物质来源，理论上应该能够将休眠状态转换为非休眠状态的微生物。

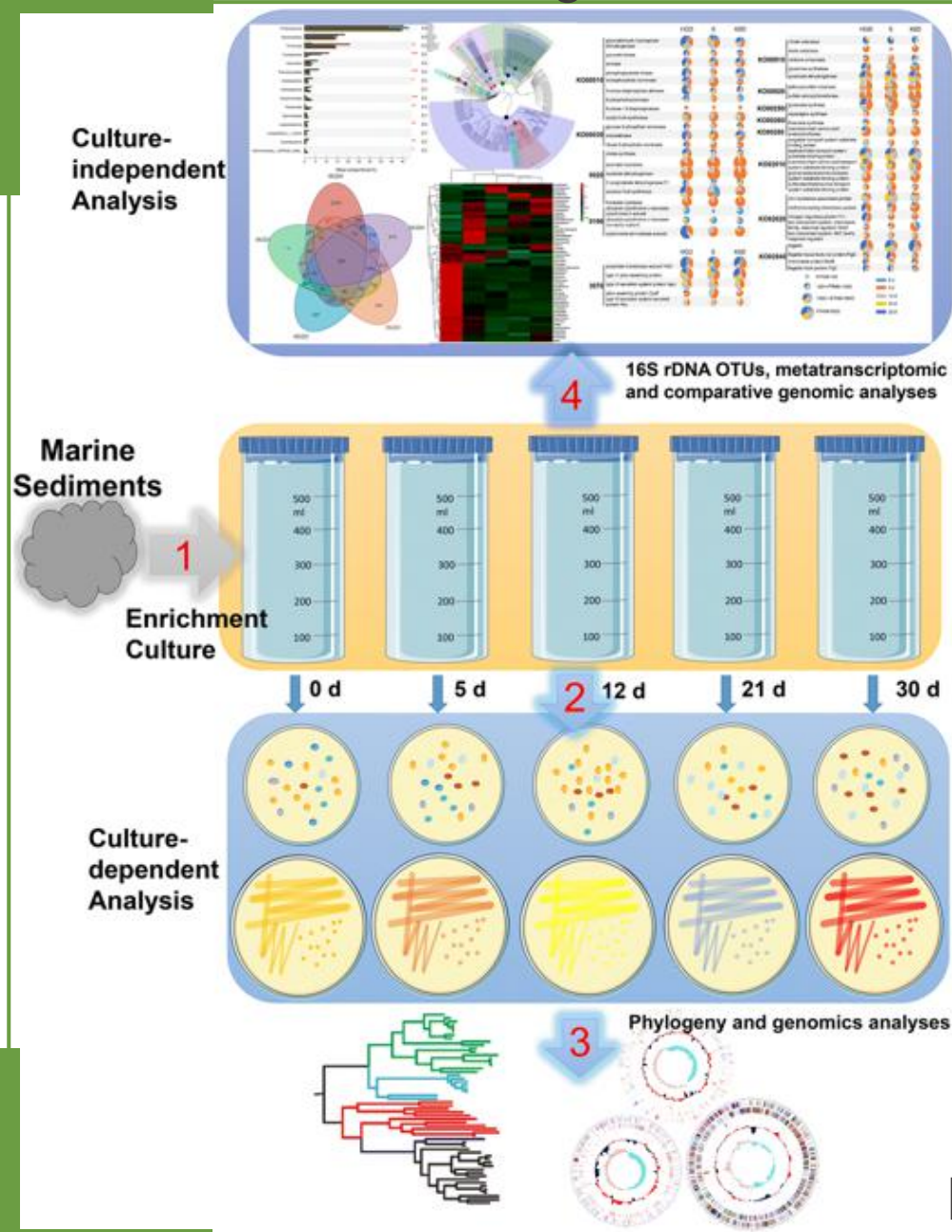


02

# Results and discussion



# Culturing the marine sediment microbiotas based on the enrichment method



样品：威海近海三个不同地点的潮间带表层沉积物

富集培养基：约1/50浓度的2216E培养基  
(添加丙酮酸钠和乙酸钠)

**厌氧培养**

Targeted culture

分离培养基：稀释涂布MA培养基；28°C

图1 富集培养流程图

# Culturing the marine sediment microbiotas based on the enrichment method

Table S1 Cultivable bacterial numbers at different periods of enrichment-culture

Sample	Enrichment-culture (days)	Cultivable bacterial number (/ml)	Isolates number
XSD0	0	$2 \times 10^5$	121
XSD1	5	$1 \times 10^7$	110
XSD2	12	$7 \times 10^5$	80
XSD3	21	$7 \times 10^5$	65
XSD4	30	$4 \times 10^5$	55
HGD0	0	$1 \times 10^5$	107
HGD1	5	$9 \times 10^7$	88
HGD2	12	$4 \times 10^7$	45
HGD3	21	$4 \times 10^7$	41
HGD4	30	$6 \times 10^5$	58
S0	0	$3 \times 10^5$	123
S1	5	$3 \times 10^8$	121
S2	12	$7 \times 10^7$	50
S3	21	$4 \times 10^7$	45
S4	30	$2 \times 10^7$	132

培养细菌的数量在第5天最高  
随着培养时间延长而逐渐降低



# Culturing the marine sediment microbiotas based on the enrichment method

Table S2-1 Number of different phylum/class strains cultured from S sample

	S0	S1	S2	S3	S4	
Bacteroidetes	15	27	27	33	18	
Firmicutes	33	6	12	3	3	
Actinobacteria	15	9	9	15	0	
Proteobacteria	<i>α-proteobacteria</i>	39	12	21	9	15
	<i>γ-proteobacteria</i>	30	27	15	15	6
	<i>ε-proteobacteria</i>	0	3	3	3	0
	<i>δ-proteobacteria</i>	0	0	0	3	0
Summary	132	84	87	81	42	

Table S2-2 Number of different phylum/class strains cultured from XSD sample

	XSD0	XSD1	XSD2	XSD3	XSD4	
Bacteroidetes	12	12	12	11	15	
Firmicutes	66	51	36	22	21	
Actinobacteria	0	3	6	3	6	
Proteobacteria	<i>α-proteobacteria</i>	21	2	9	6	6
	<i>β-proteobacteria</i>	0	0	0	0	0
	<i>γ-proteobacteria</i>	27	10	7	39	24
	<i>ε-proteobacteria</i>	0	1	0	0	0
Summary	126	32	102	66	72	

Table S2-3 Number of different phylum/class strains cultured from HGD sample

	HGD0	HGD1	HGD2	HGD3	HGD4	
Bacteroidetes	24	15	15	14	10	
Firmicutes	75	15	27	10	9	
Actinobacteria	27	6	3	3	2	
Proteobacteria	<i>α-proteobacteria</i>	12	0	3	6	6
	<i>β-proteobacteria</i>	15	0	0	0	9
	<i>γ-proteobacteria</i>	30	27	21	6	0
	<i>ε-proteobacteria</i>	0	6	0	0	0
Summary	183	63	48	33	36	

共分离菌株：1251株

16S rRNA基因分析表明菌株的主要分布

4个门：厚壁菌门、变形菌门、  
放线菌门、拟杆菌门

282个种

含有97个候选新物种

1个候选新目 (order)

1个候选新科 (family)

16个候选新属 (genera)

79个候选新种 (species)

Table S5

1. 特定分离物的量在富集培养的不同阶段不同，并且在富集培养后可以从相同的沉积物样品获得至少2至4倍的不同物种；
2. 从不同海洋沉积物样品中分离的可培养细菌物种是不同的，在两个或三个沉积物样品中均可分离到的物种约占20%；
3. 富集培养物中的不同样品表现出相似性：
  - (a) 在富集培养期间的不同时间，样品中的变形菌门最丰富；
  - (b) 富集培养后可培养的拟杆菌门分离物的数量增加；
  - (c) 部分新物种只能在富集培养后才能分离，包括*Marinilabiliales*， $\epsilon$ -变形菌门和 $\delta$ -变形菌门的一些成员。

该方法可以改变可培养微生物群落的菌群，可以非常有效地分离海洋沉积物细菌



# Composition and diversity of microbial communities in enrichment culture

高通量测序 (16S V4-V5区PCR产物)

15个样品 (3个样点、5个富集时间)

914059个质量序列, 每次处理平均60937个序列。在每个样本中检测到的OTU的数量范围从1285到2982不等

Table S6 Mean bacteria diversity of the samples

Sample\Estimators	ACE	Chao1	Coverage	Shannon	Simpson	OTUs	Reads_num
HGD0	3393.4	3376.94	0.978867	6.37459	0.00483	2690	51490
HGD1	3230.39	3130.75	0.9866	5.41304	0.01931	2485	65516
HGD2	3229.68	3200.91	0.989158	5.6832	0.01389	2590	69758
HGD3	2808.22	2786.95	0.987157	5.96619	0.00748	2261	50443
HGD4	2111.94	2124.37	0.995373	5.84251	0.00926	1970	61359
S0	3013.46	3051.86	0.989523	6.42639	0.00543	2674	60111
S1	2819.69	2757	0.982118	5.10554	0.0275	2052	51473
S2	3049.24	3019.01	0.988835	5.12455	0.03629	2437	67879
S3	3044.59	2989.41	0.983918	5.07835	0.0401	2190	56963
S4	2637.46	2606.82	0.990029	5.71587	0.01476	2248	55375
XSD0	3539.47	3505.66	0.986391	6.42176	0.00469	2982	69562
XSD1	3150.15	3129.36	0.989764	5.48623	0.02089	2566	71632
XSD2	3248.81	3218.01	0.984544	5.04109	0.0387	2307	68229
XSD3	2991.15	2983.47	0.98786	5.81911	0.01054	2411	57578
XSD4	1331.22	1336.71	0.997882	5.21058	0.01849	1285	56691

计算菌群丰度: Chao1、ace;

Chao1 值越大代表物种总数越多; ace 估计群落中含有 OTU 数目;

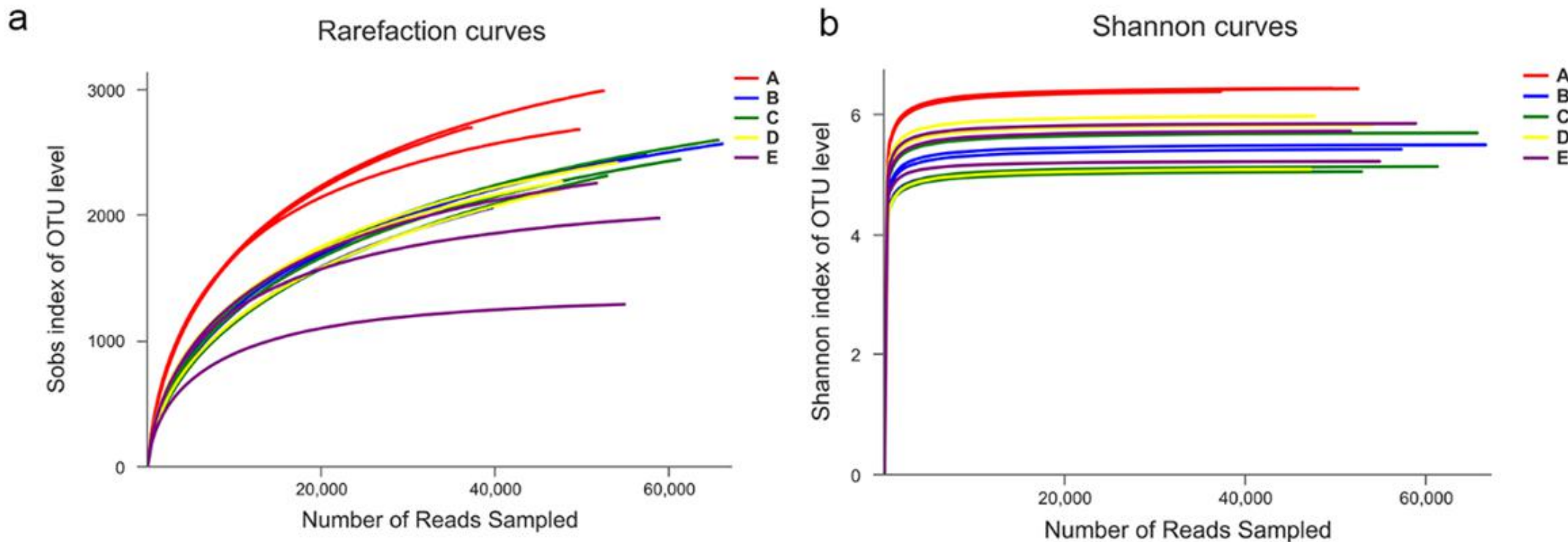
计算菌群多样性: Shannon、Simpson。

Simpson 指数值越大, 说明群落多样性越高; Shannon 指数越大, 说明群落多样性越高。

第0天的样品中的细菌多样性比其他样品高

Alpha多样性指数表

A/B/C/D/E-富集培养的0/5/12/21/30天



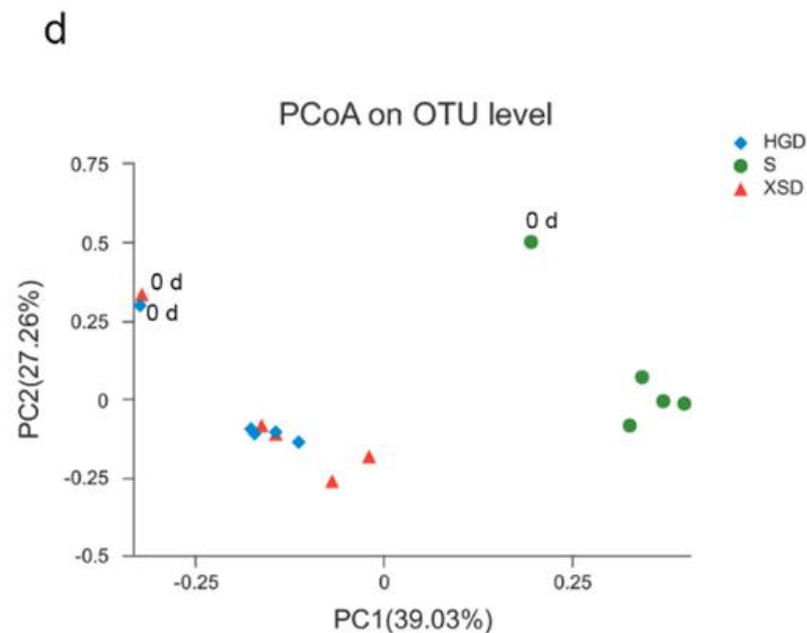
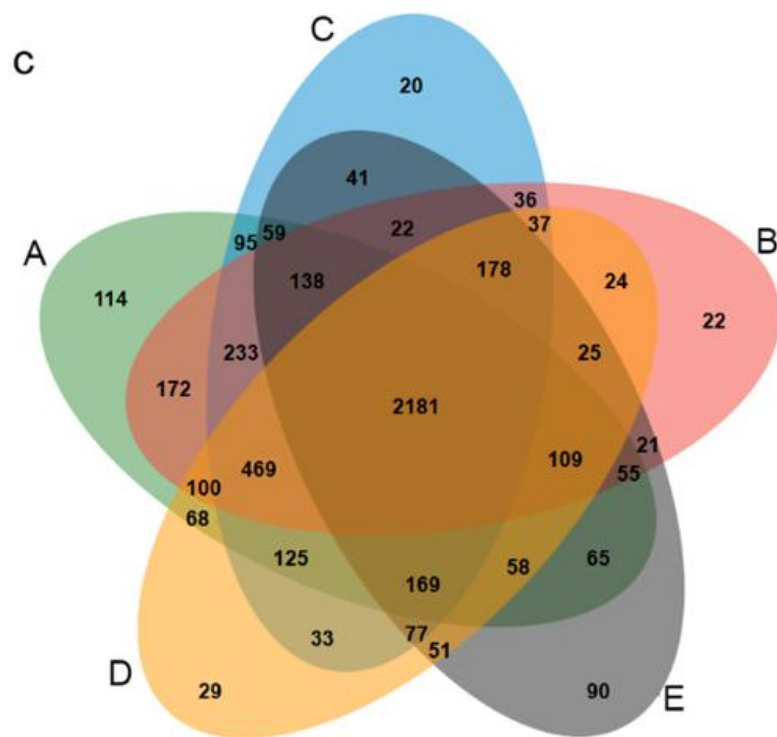
稀薄曲线图

香农指数

曲线平稳：绝大多数原核生物在样本中有很好的代表性



## A/B/C/D/E-富集培养的0/5/12/21/30天

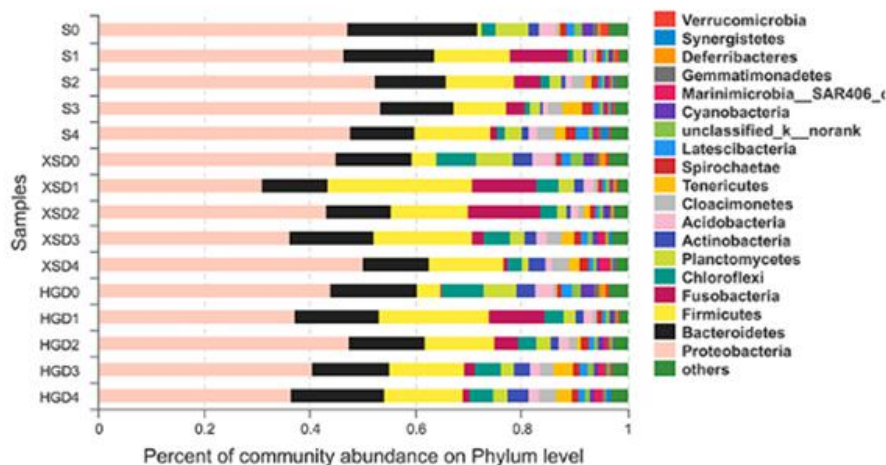


C: 在富集处理后出现了新的独特OTU，并且在富集培养后新的OTU的数量比原始沉积物样品中的数量多16.8%；

测序分析将遗漏一些稀有菌株的低丰度序列，即真正的微生物暗物质。然而，富集培养可以改变一些OTU的丰度，允许一些低丰度的OTU达到检测阈值。

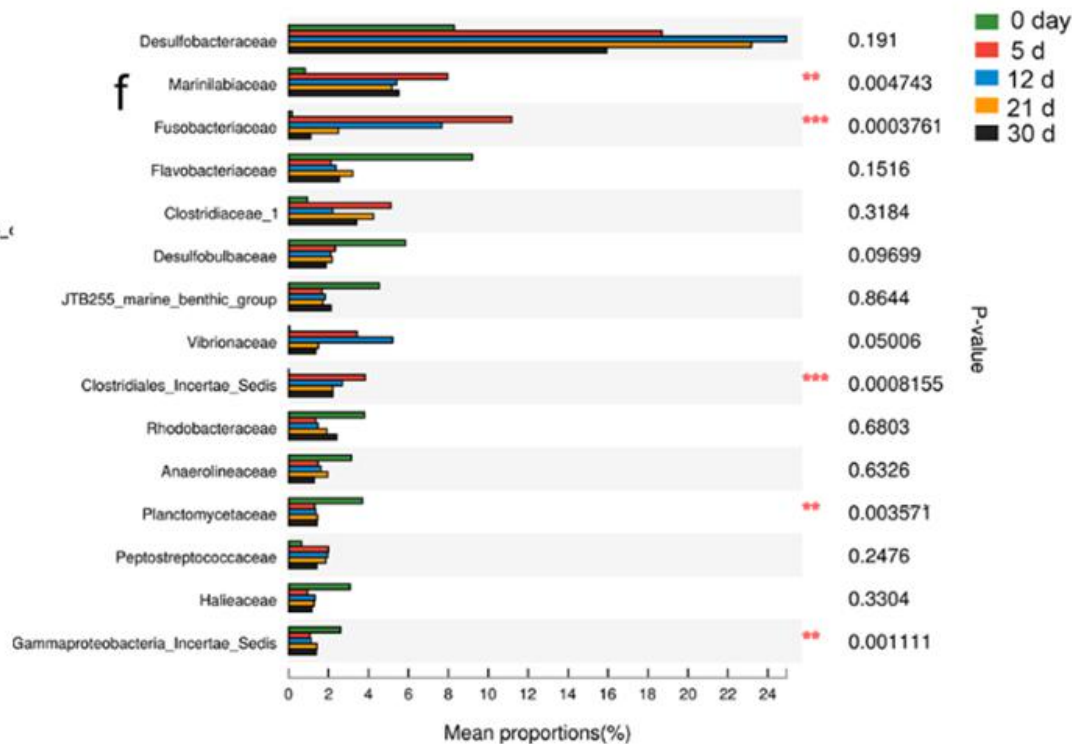
## A/B/C/D/E-富集培养的0/5/12/21/30天

e



门水平：微生物多样性

f



科水平：15个含量差异明显的科

Proteobacteria/Fusobacteria/Bacteroidetes/Firmicutes/Chloroflexi

在富集培养期间，梭杆菌门、厚壁菌门的丰度显著增加，而浮霉菌门、酸杆菌门数量减少；科水平上，厌氧菌、兼性厌氧菌如Marinilabiaceae, Fusobacteriaceae, Clostridiaceae丰度显著增加。

这些结果有力地表明

1. 微生物群落的组成和多样性随环境因素而变化；
2. 富集后出现了新的操作分类单位（OTU）；
3. 表明海洋沉积物可能含有“微生物菌种库”或一组稀有微生物；
4. 在适当的营养物质到来之前，这些类群几乎无法存活。

所谓的“富集培养”获得的微生物真的都是被“富集”出来的吗?



“富集”

通过增加丰度来分离未培养的微生物

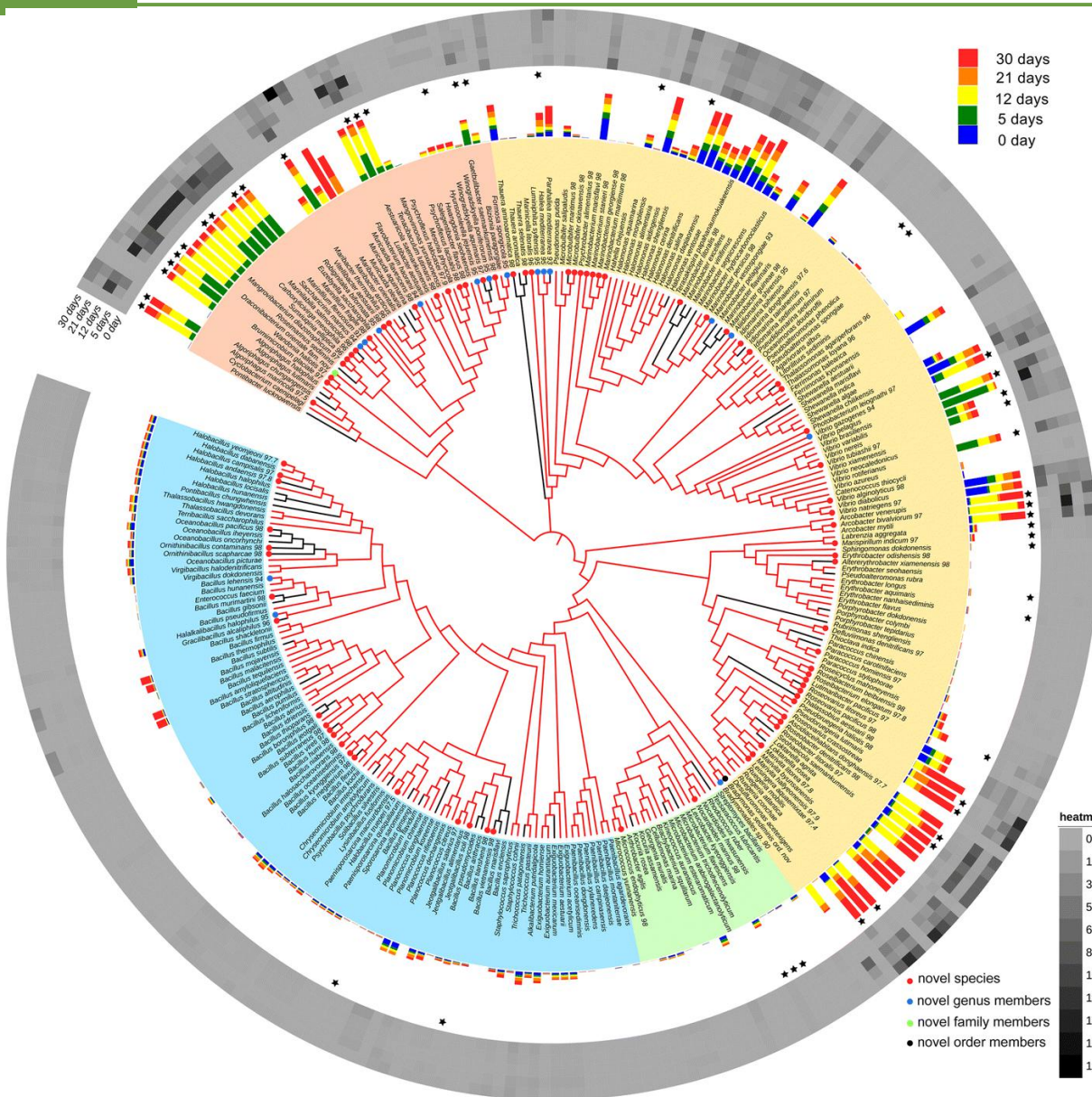
纯培养：282个种的16S rRNA 序列

免培养：16S rRNA基因序列

在16S rRNA基因文库中未检测到与大多数培养菌株同源的16S rRNA基因序列

分析了富集培养后分离的245个物种的富集程度。结果显示，大约80%的菌株不是由于富集培养物中丰度增加而被分离。（Table S5）

# Mechanism of culturing the isolates



红色树枝-富集培养后分离的物种  
 黑色树枝- 0天的富集培养物分离的物种

树上的彩色圆点-候选新物种  
 红-新种 (相似度<98%)  
 蓝-新属 (相似度<95%)  
 绿-新科 (相似度<90%)  
 黑-新目 (相似度<86%)

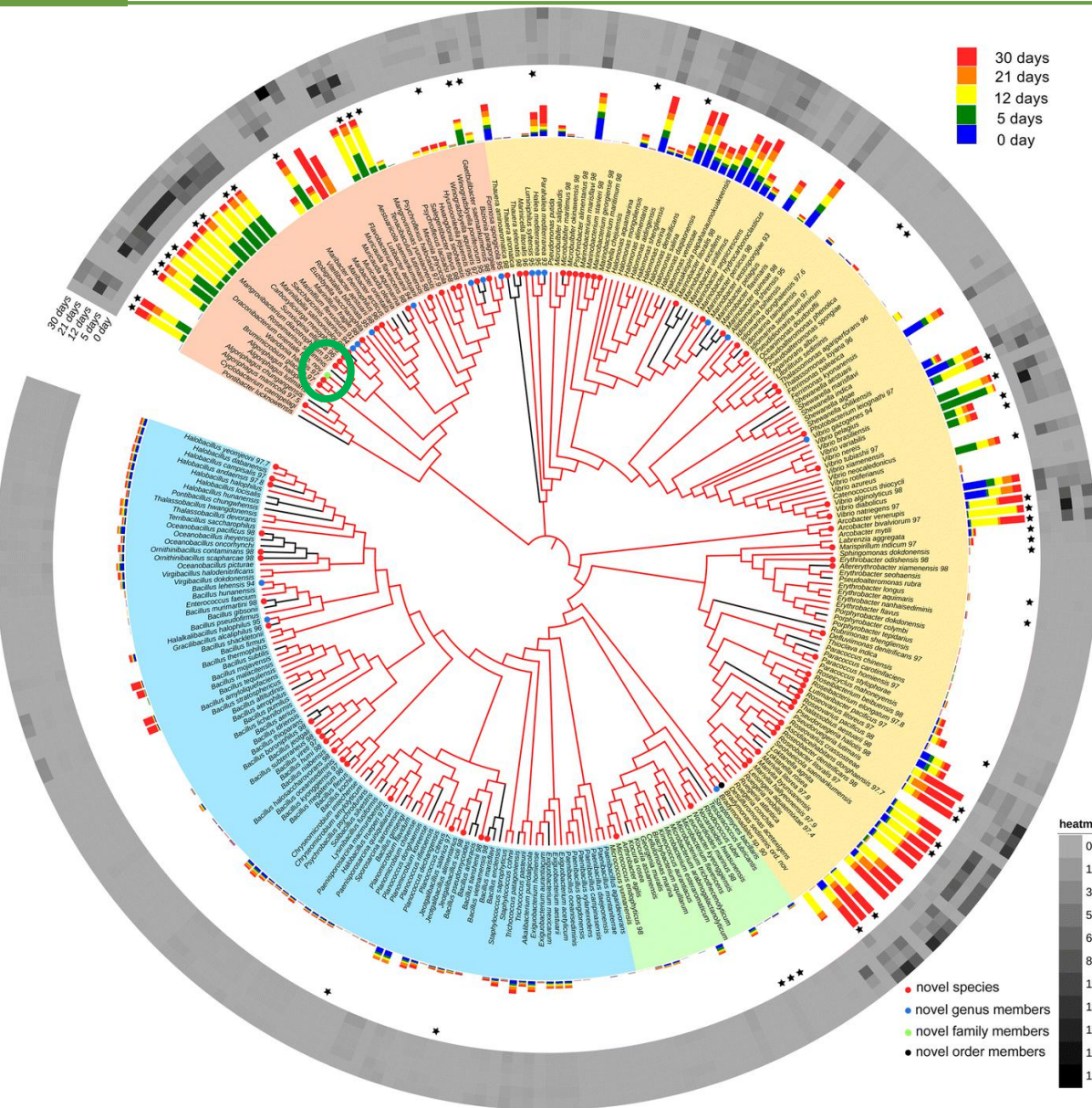
不同颜色标记主要门名称  
 橙色背景-拟杆菌门  
 黄色背景-变形菌门  
 绿色背景-放线菌门  
 蓝色背景-厚壁菌门

黑色星号：富集培养后分离得到的物种

图2 分离培养物种系统发育树构建及富集过程中相对丰度分析



# Mechanism of culturing the isolates



某些分离物种由于丰度在某些富集阶段增加而被分离。最典型的物种是 *Draconibacterium orientale* (属于一个新属和一个新科, 属于 *Marinilabiliales* 目)。

一些物种如脱氮黑藻和沙门氏菌在原始沉积物样品中相对丰富, 但仍然难以直接在MA培养基上进行分离, 而富集培养可以帮助它们分离。

富集培养期间, 一些细菌可以富集但不能在MA培养基上分离-可能由于富集和分离之间的不同环境条件, 例如氧浓度的差异, 液体富集但固体培养, 以及富集后的营养成分变化。

图2 分离培养物种系统发育树构建及富集过程中相对丰度分析



## Mechanism of culturing the isolates

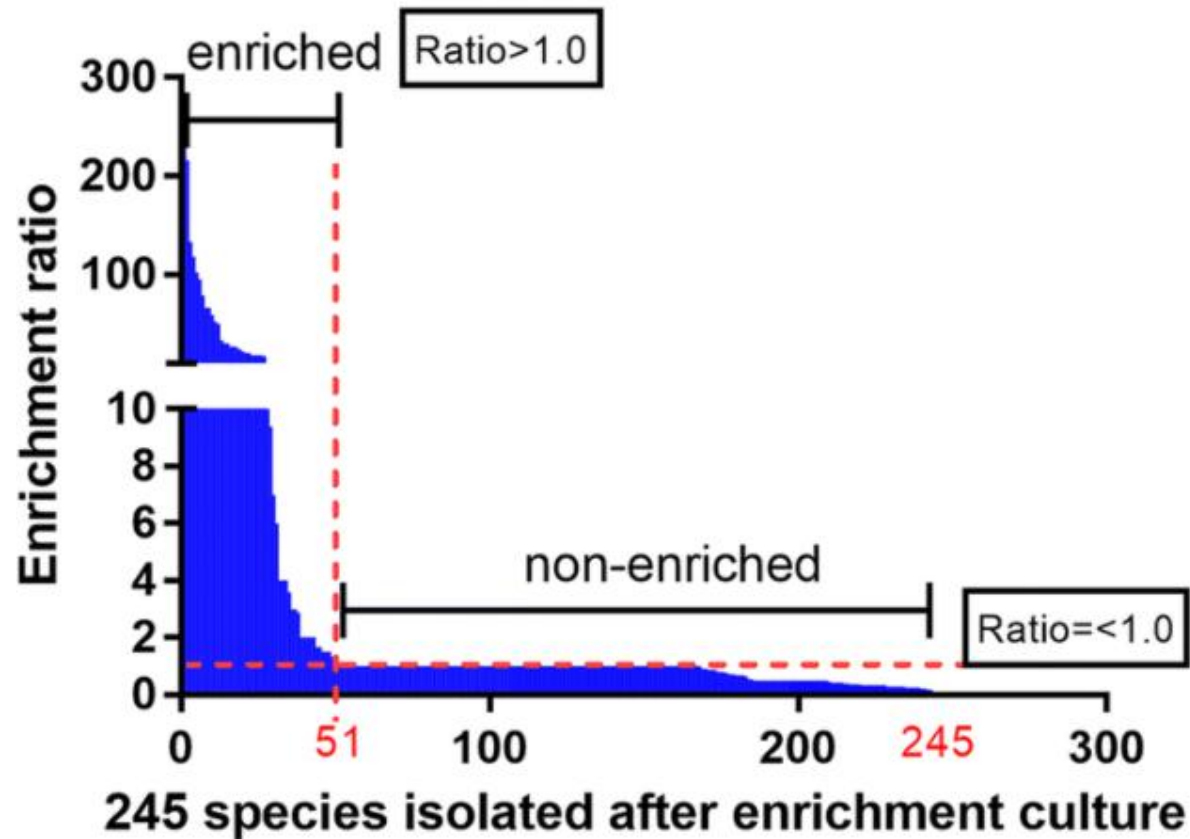


图3a 微生物富集程度数量统计与微生物活跃程度分析

富集率 (Enrichment ratio) 表示在相应的富集培养期间培养物种相对于其原始丰度的丰度。相反, 比率 =  $< 1$  表示物种在分离时不富集。

大量可培养微生物的丰度并未随富集培养改变

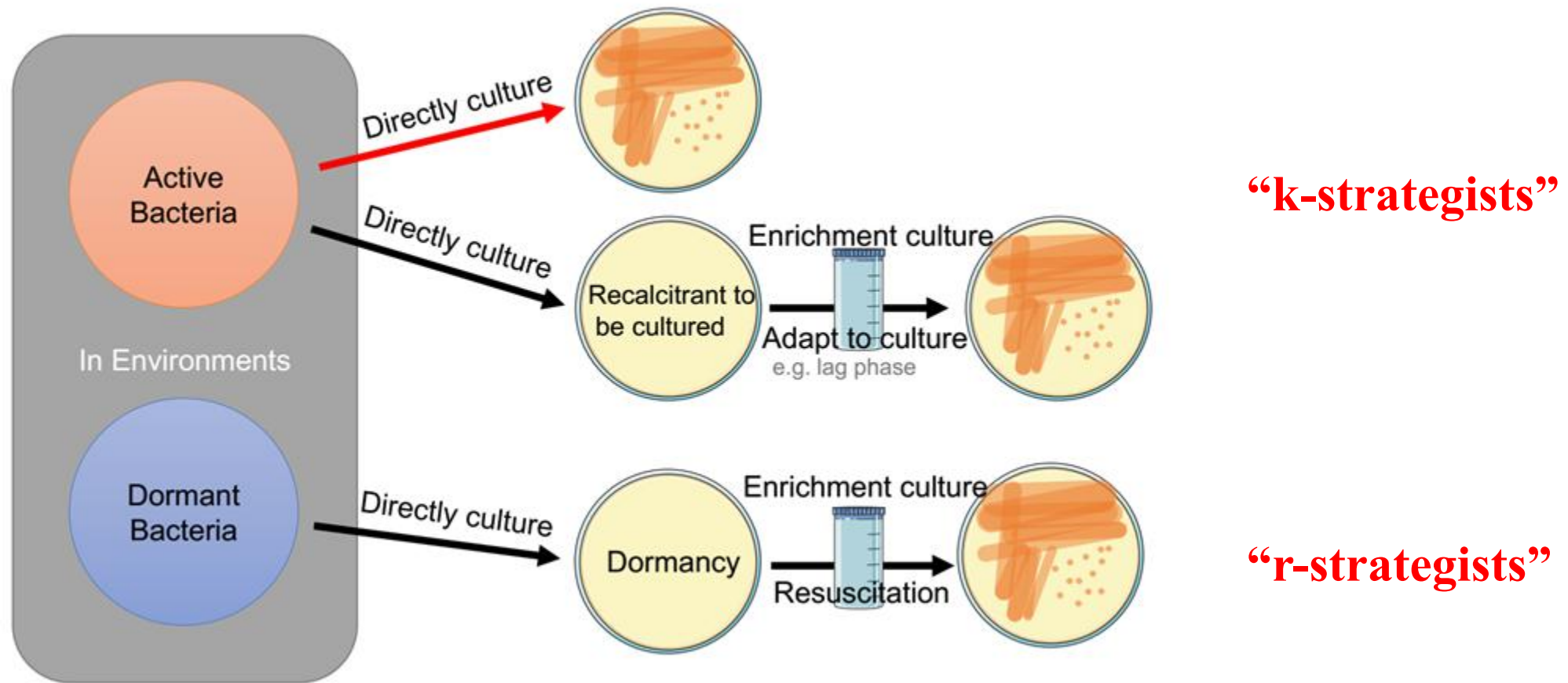
## What attracted us?

为什么某些细菌群体可以通过本文的方法进行富集和培养，以及富集后为什么可以分离出群落中低丰度的菌株？

**“k-strategists”** 一个能量有限的环境中，大多数细菌是生长缓慢的细菌（“k-战略家”）时，它们可能在营养限制下缓慢但稳定的存在，但其快速生长受到抑制，因为细菌没有为短暂的营养物供给做好准备。

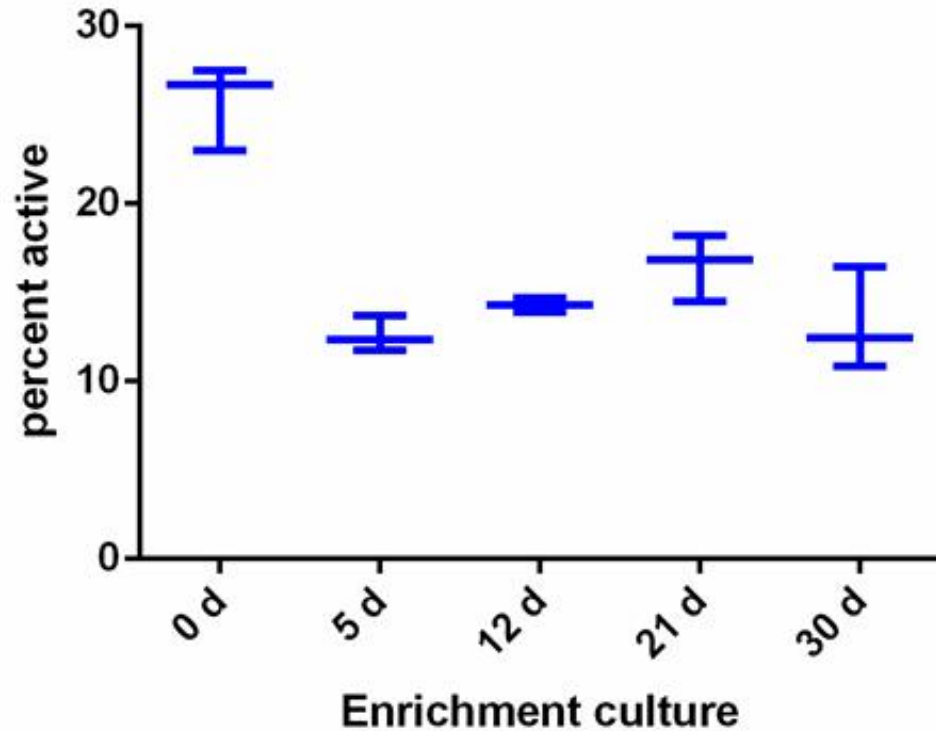
**“r-strategists”** 其他细菌在营养有限的环境中较为罕见，但对营养物质的供给反应迅速，在营养丰富时迅速生长。在营养物供给耗尽之前重新进入休眠状态或者说达到**VBNC**状态，等待下一次营养物供给。

# Mechanism of culturing the isolates



假设：富集培养帮助某些物种（“k-strategists”）在MA培养基上适应和生长；有助于休眠或VBNC细菌的复苏（“r-strategists”）

“k-strategists”



图S3 富集培养中活性分类群的百分比

Gene ratio=(16S rRNA+ 1):(16S rRNA gene + 1)  
定义任何比率>1的分类单元为复苏或活性分类群

活性分类群在原始沉积物中占群落的27%，但在富集培养期间，活性分类群的比例随着时间的推移而减少至13%。

## “r-strategists”

虚线-Gene ratio=(16S rRNA+ 1):(16S rRNA gene + 1)  
=1

Ratio>1-活跃分类群 Ratio<1-休眠分类群

数字0-4-富集的第0/5/12/21/30天

实线-中值 (n = 3, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05)

## 复苏迹象

*Marinilabiaceae*, *Tangfeifania*, *Draconibacterium*, *Saccharicrinis* 在富集培养具有相当高的比例，表明大多数 *Marinilabiliales* 细菌在原始沉积物中处于休眠状态，在富集培养后它们可以显著活跃。这些结果与在富集培养后更频繁地分离某些细菌的想法一致。

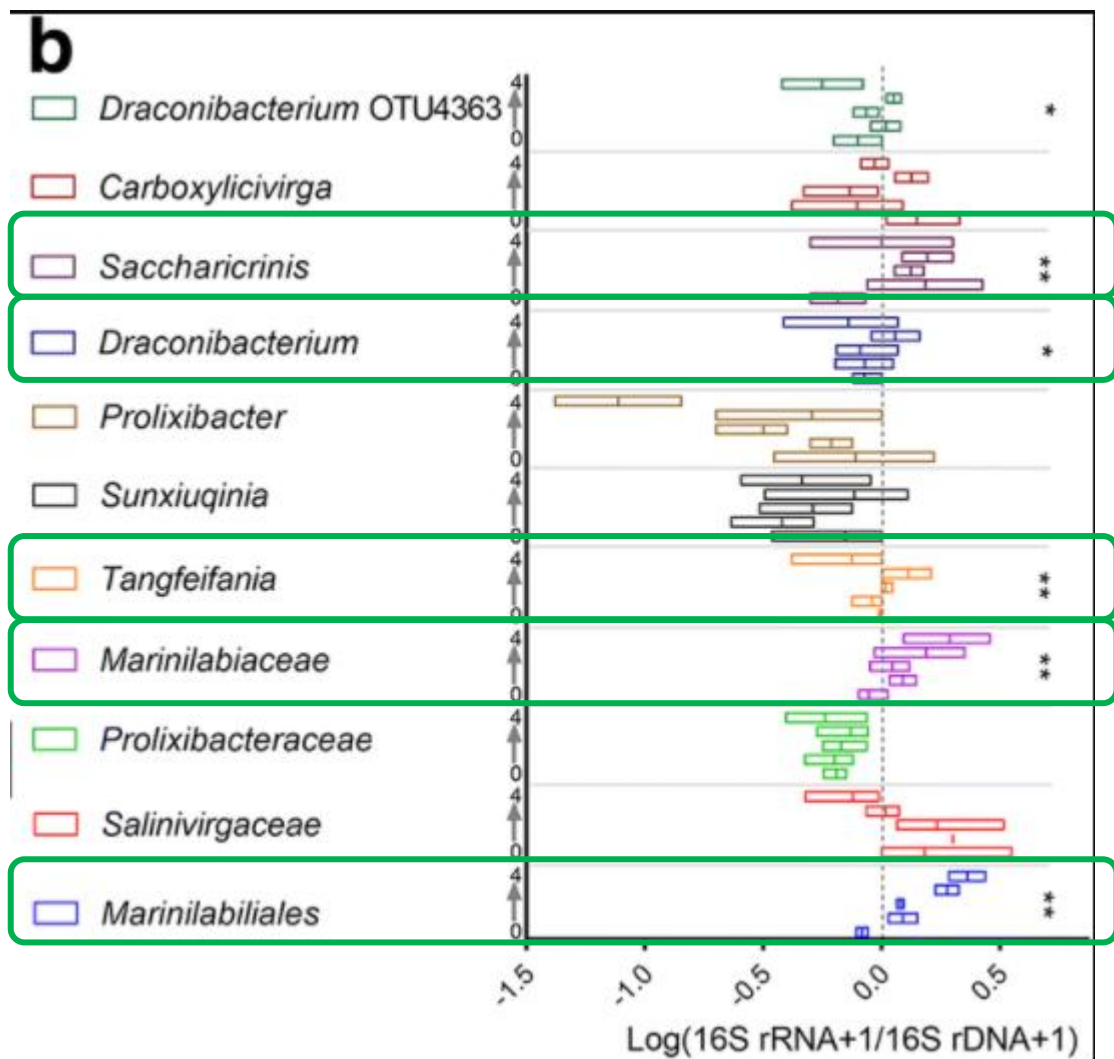
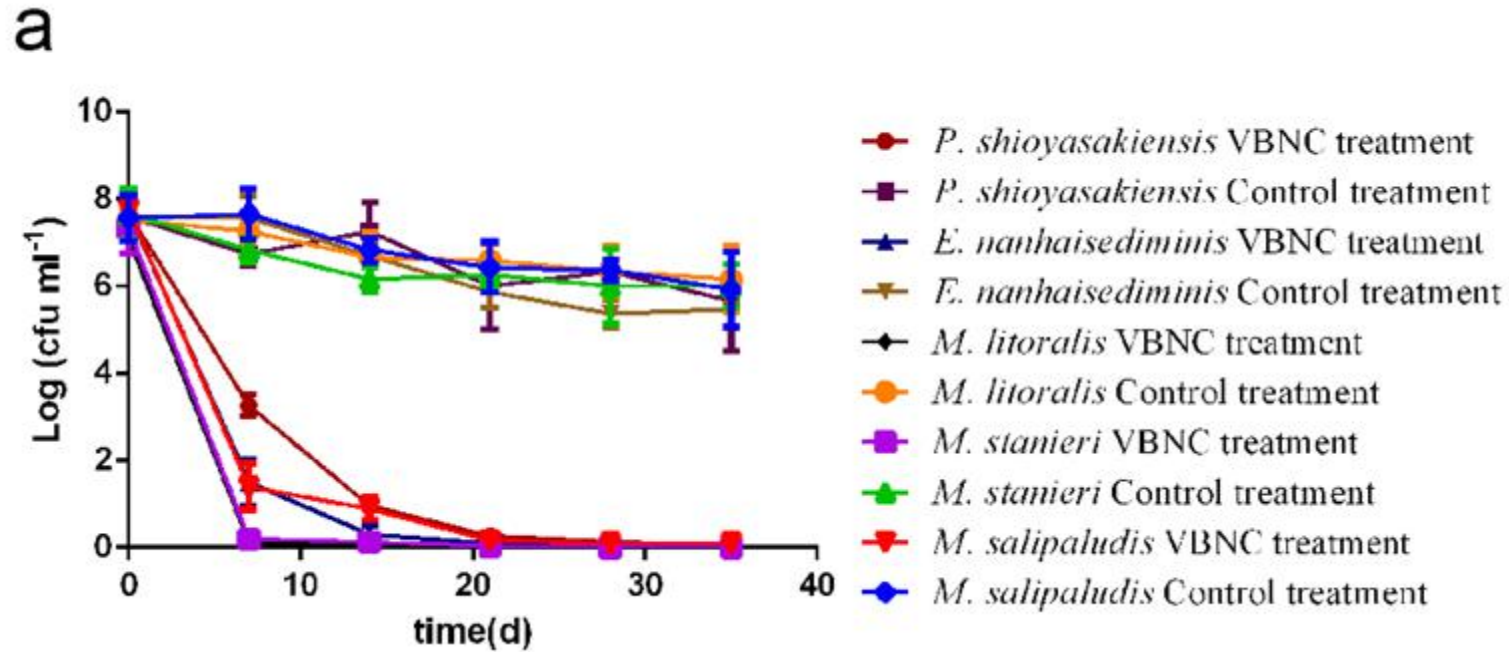


图3b富集培养过程中 *Marinilabiliales* 的休眠和活跃细菌

## Mechanism of culturing the isolates



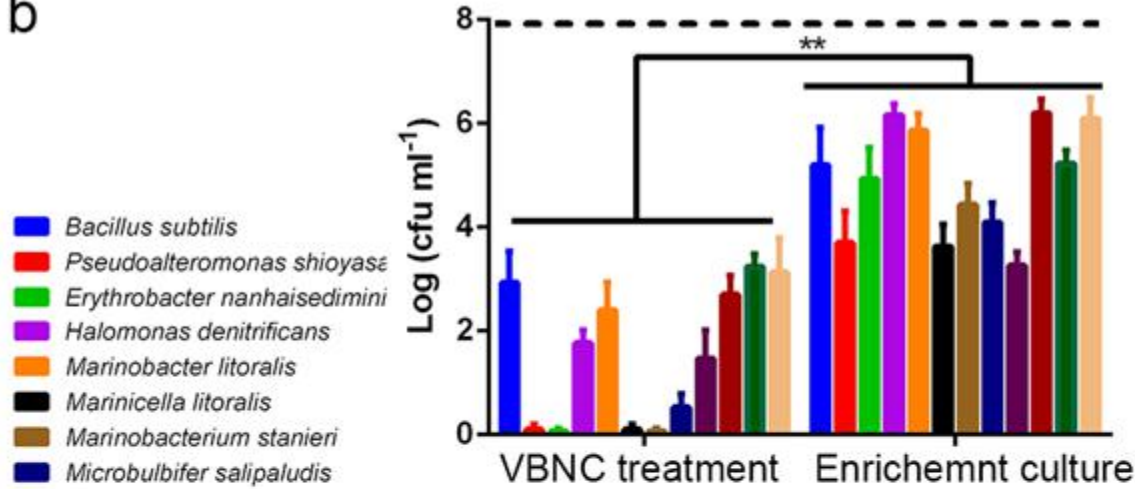
图S4a 10个已分离但在相应富集培养阶段具有低丰度的菌株处理诱导进入VBNC状态

VBNC诱导处理后，即使经过10天的培养，5株菌也不能在MA培养基上生长；然而，这些VBNC细胞在富集培养处理后复苏并在MA培养基上形成菌落。



# Mechanism of culturing the isolates

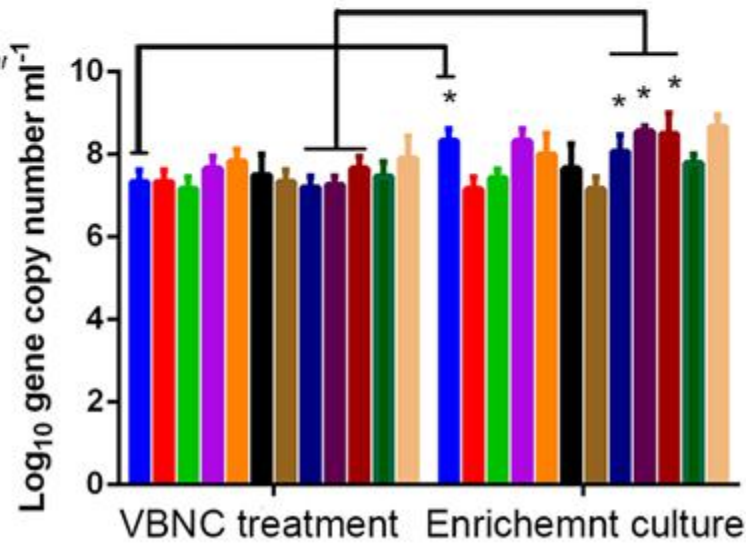
b



图S4b 不同菌株VBNC诱导处理与富集培养实验的CFU数量

图S4c Q-PCR显示大多数复苏的菌株在富集培养期间丰度未增加

c

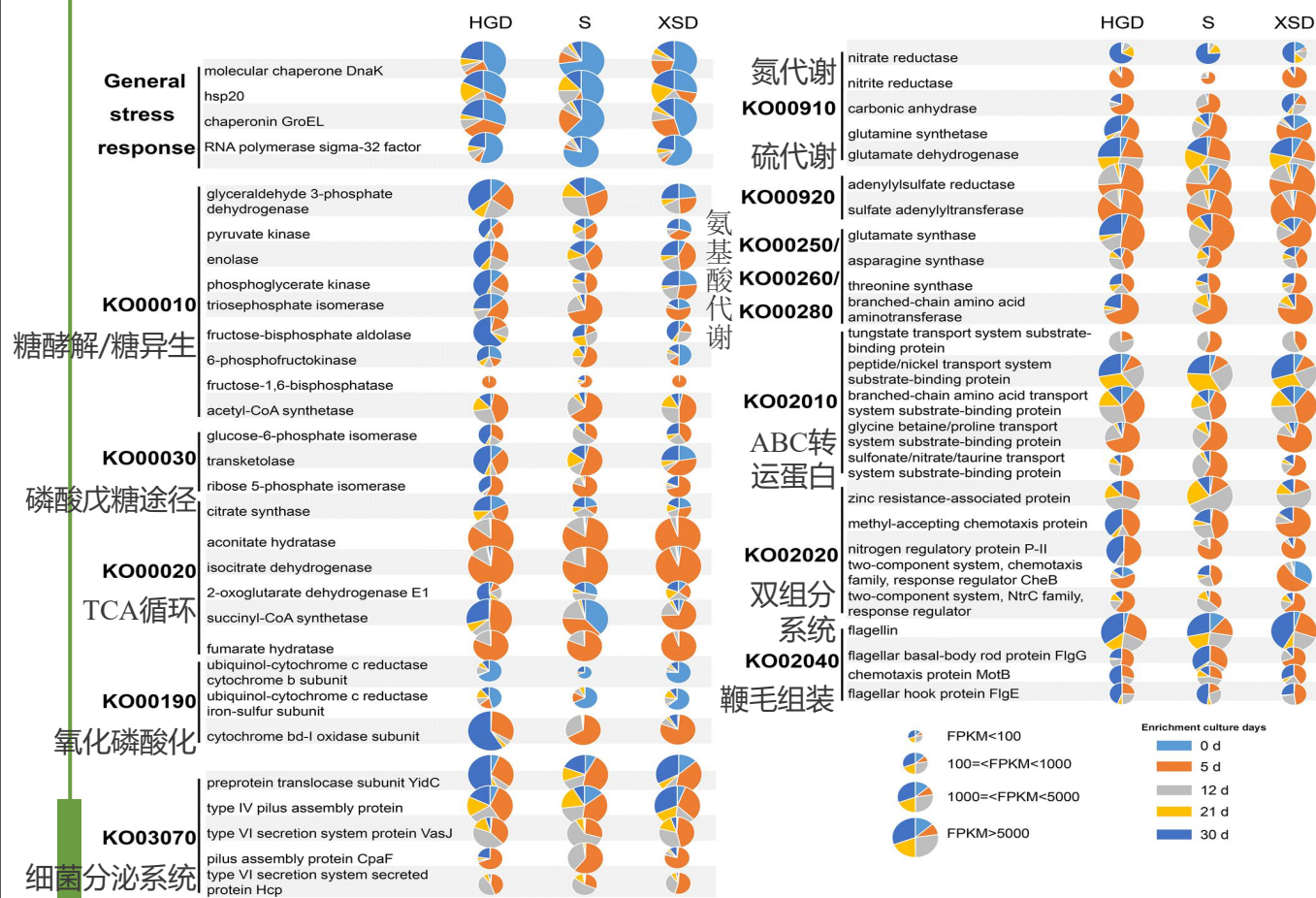


富集培养可以促进一些VBNC菌体的复苏

富集培养方法包括“复苏”一些海洋沉积物细菌的重要机制

## Overview

### metatranscriptomic and comparative genomic analyses



参与核糖体结构和生物发生, 能量产生, 蛋白质翻译, 氨基酸碳水化合物代谢和伴侣蛋白的基因在所有分析的群落转录物库中占主导地位。

FPKM: 表示每个沉积物样品中相应基因的每百万个片段的每千碱基转录物的总片段。

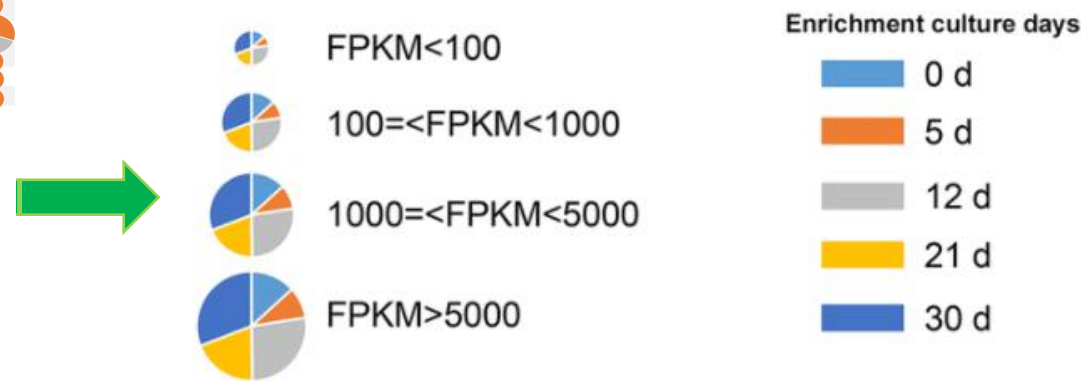


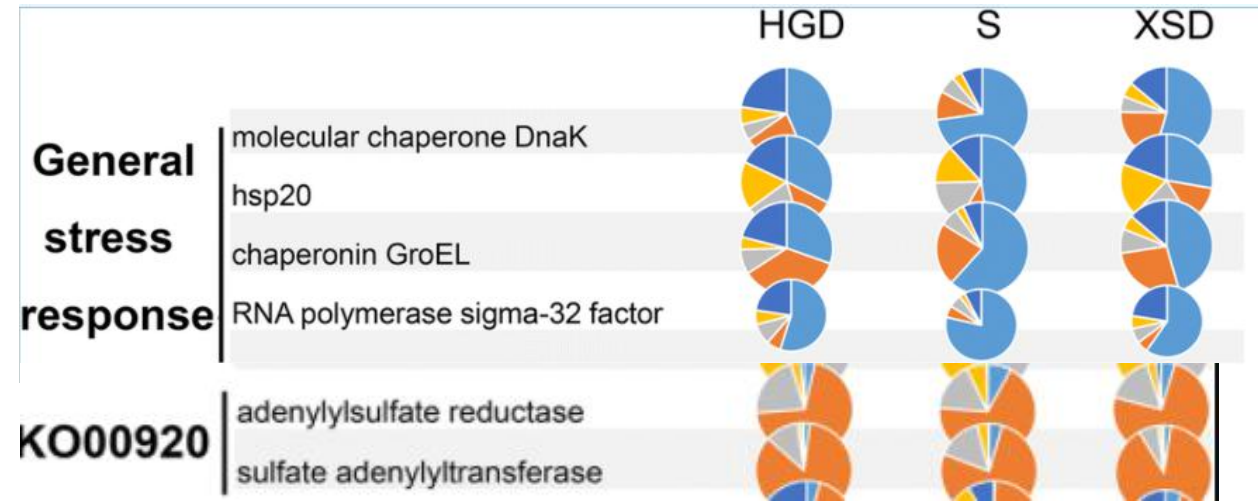
图4 宏转录组学分析富集过程中微生物相关基因转录情况

## Overview

富集培养前，微生物中参与胁迫应答的相关基因高表达，这些基因也被广泛报道参与VBNC状态的维持；而富集培养后，微生物中参与细胞代谢相关基因获得高表达，表明微生物代谢状态变得更加活跃。

转录本的优势基因与已报导的元蛋白质组学分析的结果相似，表明在正常和极端环境中维持基本细胞机制，生长和代谢的转录本普遍丰度较高。正如预期的那样，接受某些富集处理的三个沉积物样品的群落表现出相似的代谢潜力，反映了它们的群落组成与相似的环境条件的相适应。

## Stress responses



浅蓝色-对照

橙色-富集培养5天

灰色-富集培养12天

黄色-富集培养21天

深蓝-富集培养30天

参与一般应激反应的一些基因在对照样品（浅蓝色）中上调，包括编码分子伴侣**DnaK**的基因，小热休克蛋白**sHsp20**，伴侣蛋白**GroEL**。

作用：在大肠杆菌中，GroEL有助于新生或应激变性蛋白的折叠，而小热休克蛋白（sHsp20）可以阻止非天然蛋白质的聚集。

编码转录调节因子（RNA聚合酶sigma-32因子）和硫代谢（亚硫酸还原酶，腺苷酸硫酸盐还原酶）的基因也在对照样品中上调。

作用：Sigma-32因子对于压力下的转录调控很重要



## Stress responses

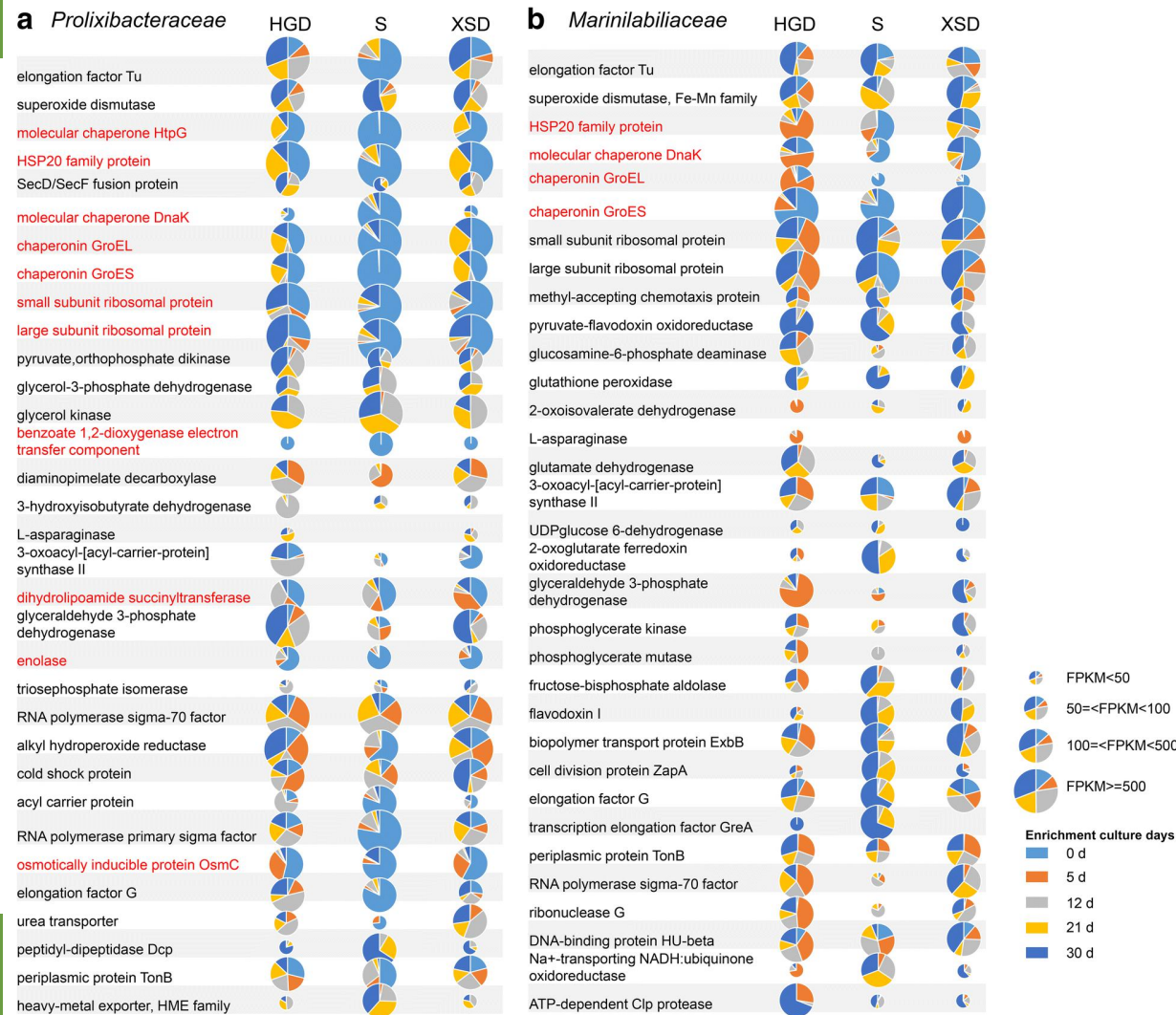


图5 *Marinelabiliales* 类群相关基因转录分析

富集处理下三种沉积物样品群中 *Prolixibacteraceae* 和 *Marinelabiliaaceae* 微生物的转录活性比较。

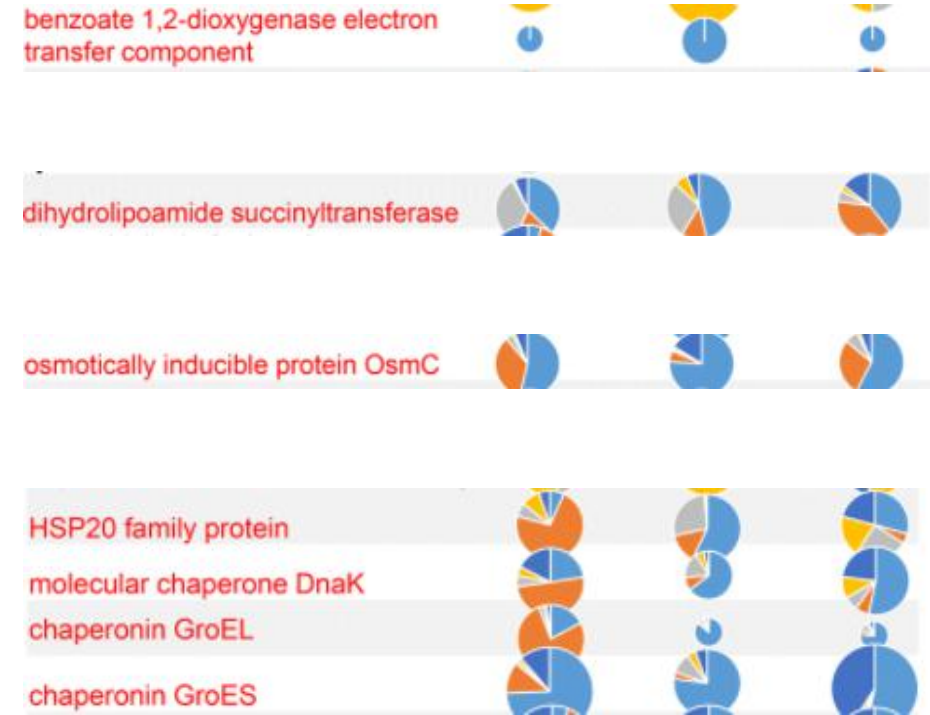
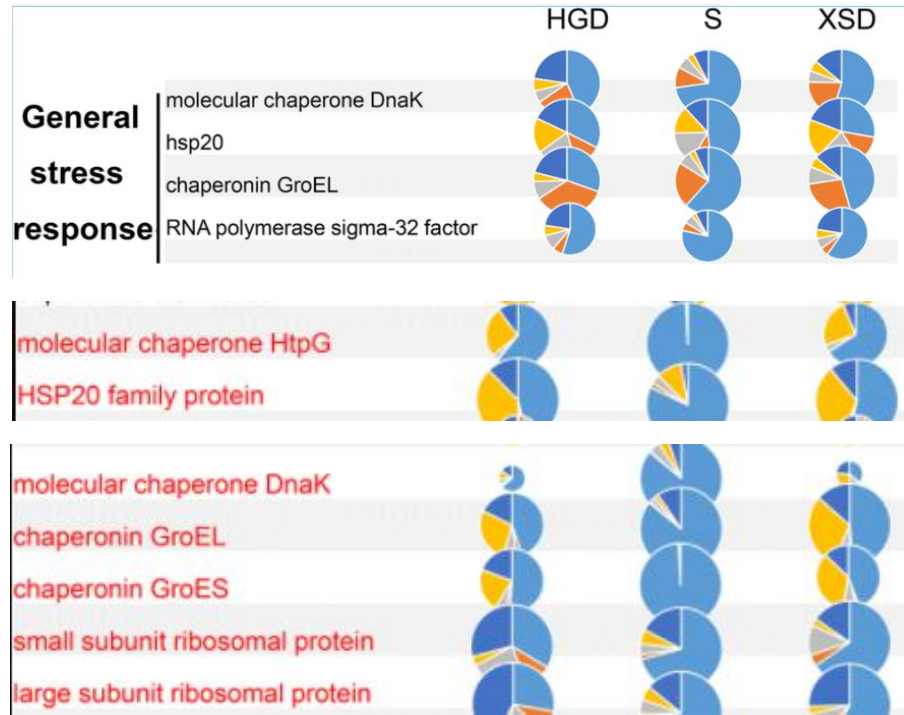
红色字体-基因在对照处理中具有显著高的表达；

*Marinelabiliales* 微生物的元转录组学分析与转录本一致，并且显示在富集培养之前，参与一般应激反应的基因，例如编码 *sHsps20*, *DnaK*, *GroEL*, *enolase*, *OsmC* 的基因被上调。

据报道，这些基因在 VBNC 细菌中显著上调，并且在 VBNC 细菌存活中具有重要作用。最重要的是，大多数 *Marinelabiliales* 微生物不是从原始海洋沉积物中通过纯培养直接分离得到。（Table S8）这些微生物可能在海洋沉积物中保持休眠（图3b）。这些结果表明大多数原始海洋沉积物中的细菌处于应激状态或甚至可能处于休眠状态，这些问题使得微生物暗物质的直接培养变得困难。

# Metatranscriptomic and comparative genomic analyses of the resuscitation mechanism during enrichment culturing

## Cellular metabolism

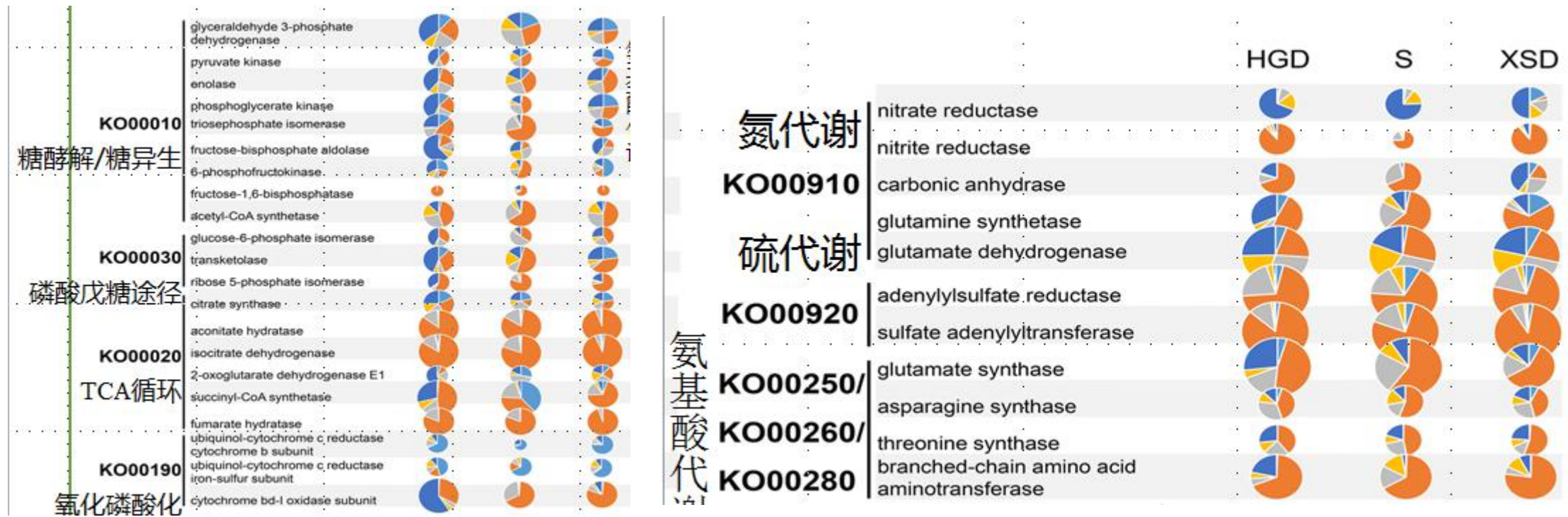


在富集培养期间，大多数一般应激反应基因被下调（图4和5）。



# Metatranscriptomic and comparative genomic analyses of the resuscitation mechanism during enrichment culturing

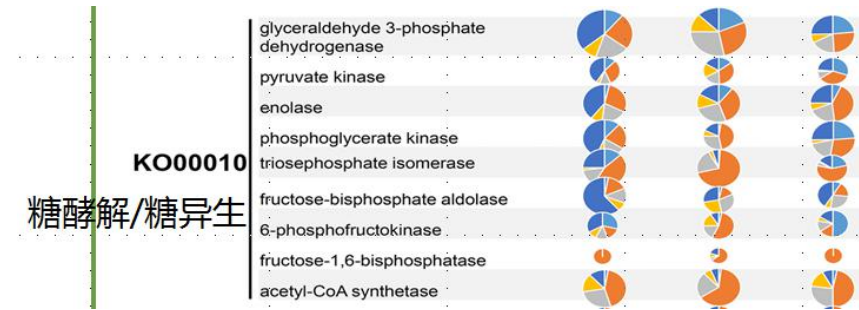
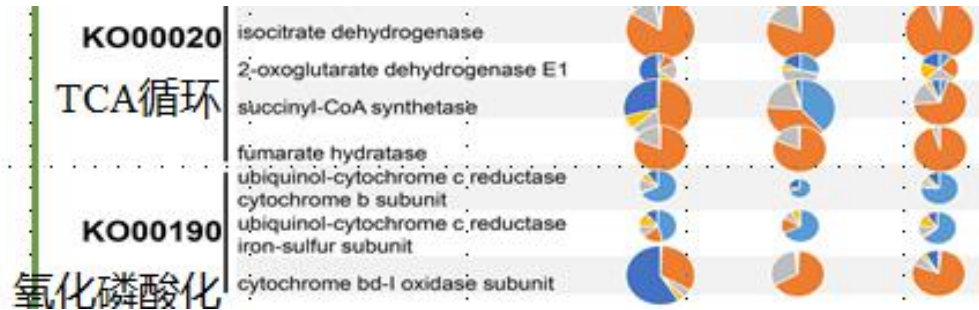
## Cellular metabolism



相反，参与细胞代谢方面的基因如柠檬酸循环（TCA循环），糖酵解/糖异生，磷酸戊糖途径，氮代谢，氧化磷酸化，硫代谢和氨基酸代谢被上调，表明微生物具有高代谢活动（图4）。碳水化合物代谢是最丰富的代表类别之一，在细胞生长中起关键作用。检测到参与糖酵解中大多数重要步骤的基因的表达，并且在富集培养期间所有样品中几种糖酵解基因的表达显著增加（图4）。

## Cellular metabolism

丙酮酸钠和乙酸钠可能为细胞生长所需丙酮酸和乙酰辅酶A的做贡献，进而增强细胞基础代谢



编码乙酰辅酶A合成酶的基因在富集培养的5天期间显著上调，可能是因为在富集之前在发酵液中添加0.2%CH<sub>3</sub>COONa，其成为乙酰辅酶A合成酶的底物。增强乙酰辅酶A产生的另一种方法是使用由糖酵解产生的丙酮酸的氧化脱羧，并且在富集的第一阶段（5天）中与丙酮酸脱氢酶系统相关的基因的表达也显著上调。乙酰辅酶A是一种参与蛋白质，碳水化合物和脂质代谢的许多生化反应的分子。其主要功能是将乙酰基递送至TCA循环以被氧化以产生能量。因此，CH<sub>3</sub>COONa和乙酰辅酶A可能在复苏中具有潜在作用；但是，在我们的进一步研究中应该检查这个过程的详细机制。

## Cooperation or coordination strategy

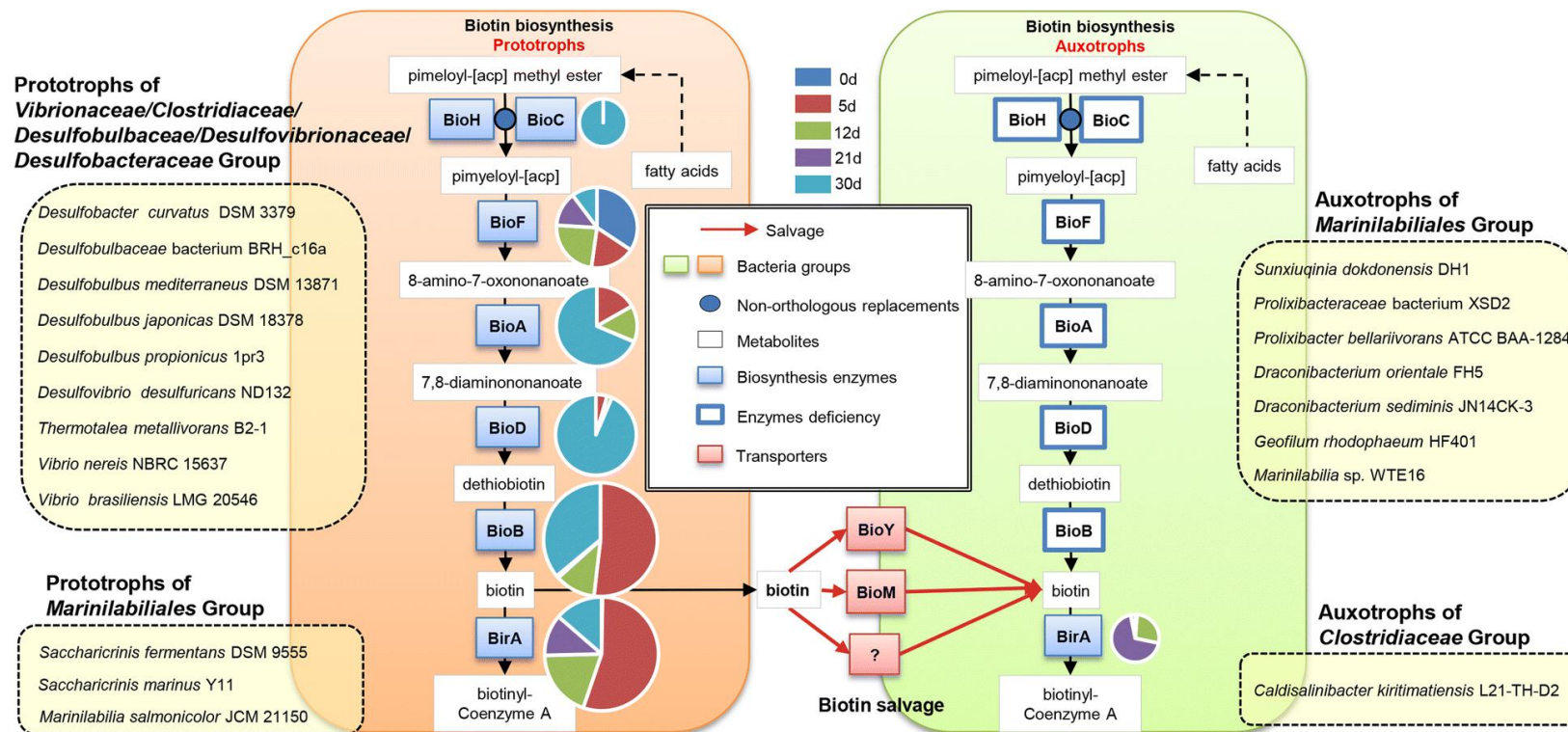


图6 比较基因组学分析互作类群Biotin生物合成途径

考虑到富集培养过程是一个复杂的混菌培养过程，微生物之间的相互作用便不能被忽视。从微生物种群互作角度进行分析，首先基于Network Analysis分析了*Marinilabiales*的共现关系类群，基于比较基因组学分析共现关系类群的可能的互作机制。发现B族维生素（biotin and cobalamin）合成途径的互补可能是相关类群出现共线性关系的原因，这种现象符合物种进化过程中的“Black Queen”理论。



## The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss

J. Jeffrey Morris,<sup>a,b</sup> Richard E. Lenski,<sup>a,b</sup> and Erik R. Zinser<sup>c</sup>

Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA<sup>a</sup>; BEACON Center for the Study of Evolution in Action, East Lansing, Michigan, USA<sup>b</sup>; and University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA<sup>c</sup>

**ABSTRACT** Reductive genomic evolution, driven by genetic drift, is common in endosymbiotic bacteria. Genome reduction is less common in free-living organisms, but it has occurred in the numerically dominant open-ocean bacterioplankton *Prochlorococcus* and “*Candidatus Pelagibacter*,” and in these cases the reduction appears to be driven by natural selection rather than drift. Gene loss in free-living organisms may leave them dependent on cooccurring microbes for lost metabolic functions. We present the Black Queen Hypothesis (BQH), a novel theory of reductive evolution that explains how selection leads to such dependencies; its name refers to the queen of spades in the game Hearts, where the usual strategy is to avoid taking this card. Gene loss can provide a selective advantage by conserving an organism’s limiting resources, provided the gene’s function is dispensable. Many vital genetic functions are leaky, thereby unavoidably producing public goods that are available to the entire community. Such leaky functions are thus dispensable for individuals, provided they are not lost entirely from the community. The BQH predicts that the loss of a costly, leaky function is selectively favored at the individual level and will proceed until the production of public goods is just sufficient to support the equilibrium community; at that point, the benefit of any further loss would be offset by the cost. Evolution in accordance with the BQH thus generates “beneficiaries” of reduced genomic content that are dependent on leaky “helpers,” and it may explain the observed nonuniversality of prototrophy, stress resistance, and other cellular functions in the microbial world.

Cooperation or coordination strategy

自由生物体中的基因丢失可能使它们依赖于共同存在的微生物来弥补代谢功能的丧失。

黑色假设 (BQH) ，一种新的还原进化理论，解释了选择如何导致这种依赖。它的名字是指游戏中的黑桃，其中通常的策略是避免使用此卡。

如果基因的功能是可有可无的，基因丢失可以通过保存生物体的限制资源来提供选择性优势。许多重要的遗传功能都有漏洞，从而不可避免地产生了整个群落可用的公共产品。

因此，这些漏洞功能对于单个物种是不必要的，只要它们不完全从群落中丢失。BQH预测，在单个物种层面上选择性地支持损失漏洞功能，并且直到公共产品的生产足以支持均衡群落为止；在这一点上，任何进一步损失的利益将被成本抵消。

因此，根据BQH的进化产生了依赖于漏洞的“helpers”与基因组含量降低的“beneficiaries”，并且它可以解释在微生物世界中观察到的非原生性，应激抗性和其他细胞功能的非普遍性。





03

# Conclusions

本实验建立了高效的富集培养技术。该方法在培养难培养微生物时仍然具有很大潜力。

该培养技术在培养微生物时不仅通过富集提高部分微生物丰度，还可通过复苏机制改善微生物培养状态。

富集培养是一种复杂的混菌培养过程，其中包含微生物间的竞争与协作。考虑到将来培养技术由纯培养向混菌培养的发展趋势，我们需要重新认识富集培养，该技术应该发展成为一种模型来研究混菌培养及探索微生物暗物质。

最后，研究者根据推测的Marinilabiliales类群的复苏机制，优化培养条件，尝试培养出更多该类群（尝试性工作）。



04

# Methods



Sediment collection and bacterial isolation



Culture-independent microbial community composition



Degree of enrichment detection



rRNA removal, cDNA library construction, and transgenomics sequencing



Induction of VBNC state and resuscitation of growth



Quantitative real-time PCR



Generation of interaction networks



Comparative genomic analysis of vitamin-related cofactor biosynthesis pathways



Data availability





敬请各位老师同学批评指正！