



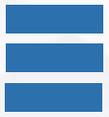
读书报告

黄建蓉

2017.04.28

Bacterial communities

Mineral-enriched biochar



The ISME Journal (2017), 1–15

© 2017 International Society for Microbial Ecology All rights reserved 1751-7362/17

www.nature.com/ismej

ORIGINAL ARTICLE

Chemolithotrophic processes in the bacterial communities on the surface of mineral-enriched biochars

Jun [Ye](#)^{1,2}, Stephen D [Joseph](#)³, Mukan [Ji](#)², Shaun [Nielsen](#)¹, David RG [Mitchell](#)⁴, Scott [Donne](#)⁵, Joseph [Horvats](#)⁶, Jianli [Wang](#)⁶, Paul [Munroe](#)³ and Torsten [Thomas](#)^{1,7}

矿物富集生物炭表面细菌群落的化能自养过程



期刊

The **ISME** Journal
Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology

IF 9.328



UNSW
AUSTRALIA

新南威尔士大学
(The University of New South Wales)

澳大利亚一所世界顶尖级研究学府

海洋生物创新中心
生物技术与生物分子科学系

CONTENTS

1、 Introduction

2、 Methods

3、 Results

4、 Inspiration

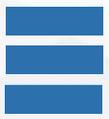


Introduction

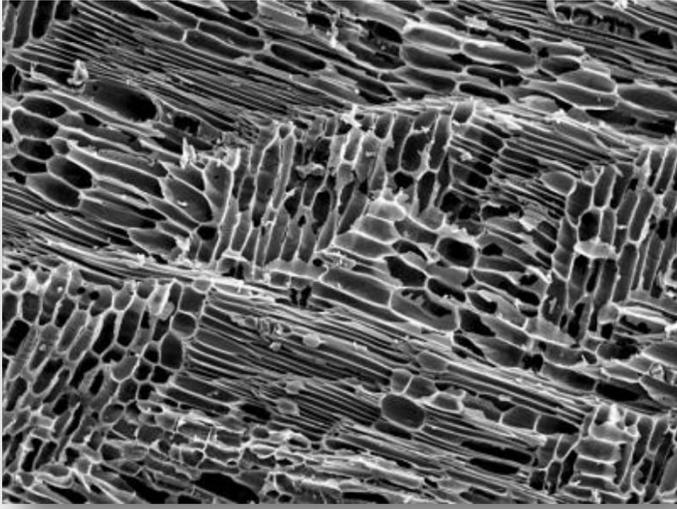


生活在巴西亚马逊河流域的人们长期使用一种特殊的肥料。这种肥料来源于当地，具有极强的恢复贫瘠土壤肥力的能力。

当地人把它称为“**印第安人的黑土壤**”。它多产、肥沃，与当地稀疏、贫瘠的土壤形成鲜明的对比。



Introduction



生物炭（ biochar ）是生物有机材料（生物质）在缺氧或绝氧环境中，经高温热裂解后生成的固态产物。

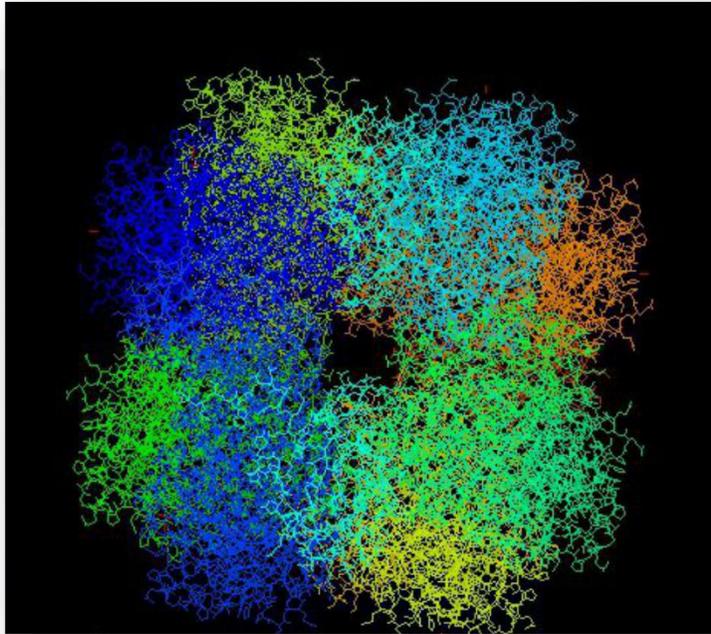
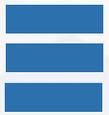
作用：

- 1、二氧化碳封存剂
- 2、减缓温室效应气体排放
- 3、重金属的固定化
- 4、提高土壤肥力

作为高品质能源、土壤改良剂，可在一定程度上为气候变化、环境污染和土壤功能退化等全球关切的热点问题提供解决方案。

MEB：矿物富集生物炭（ mineral-enriched biochar ）





RuBisCo

RuBisCo（核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶）

英文名：(Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase)

作用：是光合作用C3碳反应中重要的羧化酶,也是光呼吸中不可缺少的加氧酶。

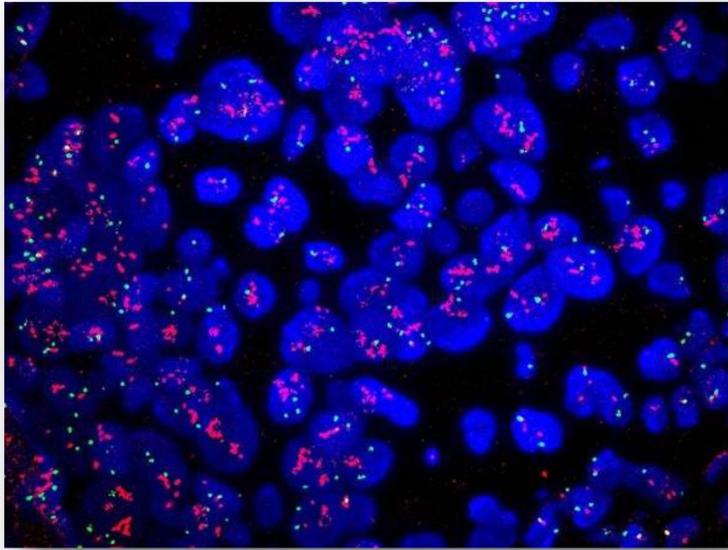
由8个大亚基和8个小亚基组成。

它在光合作用中卡尔文循环里催化第一个主要的碳固定反应，将大气中游离的二氧化碳转化为生物体内储能分子，比如蔗糖分子。

它所催化的反应是无机态的碳进入生物圈的主要途径。



Introduction



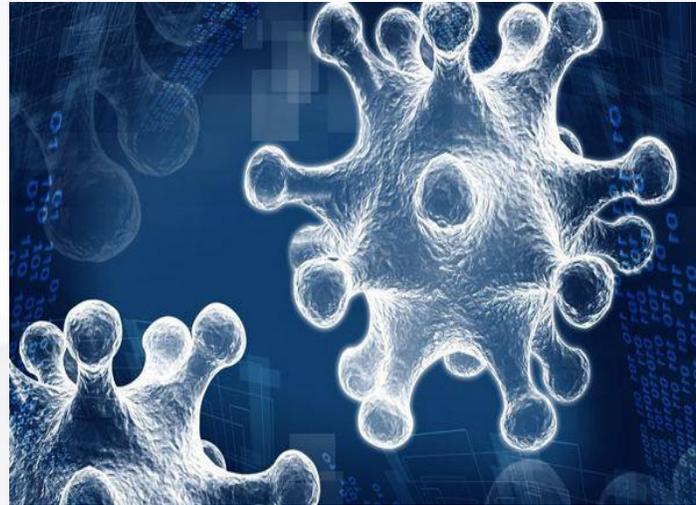
基因组原位杂交
(GISH, genomic in situ hybridization)



EDS元素分析
(Energy Dispersive Spectroscopy)



电子能量损失谱EELS
(Electron Energy Loss Spectroscopy)



生物炭表面和微生物
之间的相互作用？



样品采集



采样地点:

澳大利亚新南威尔士中心，多宝区域 (32°13'S, 148°59'E)。

样品类型:

Red chromosols soils

样品选取:

耕作层 (0-20cm)，均质，过2mm筛。



生物炭类型

Sets:

- 1、无生物炭
- 2、竹炭（Bam）
- 3、膨润土生物炭（Ben）
- 4、高岭土生物炭（Kao）

实验设计由三个因素组成，
包括生物炭型（无生物炭，Bam，Ben，Kao）
肥料（F，NF）
样品类型（土壤，颗粒）。



本实验中三种生物炭类型的组成

Table 1 Composition of the biochar used in this study

	<i>Bam</i>	<i>Ben</i>	<i>Kao</i>
Yield %	35	42	48
C %	75	61	62.9
H %	3.42	2.79	2.82
N %	1.38	0.84	1.45
S %	0.12	1.3	1.1
Fe %	0.023	2.5	2.9
Ca %	0.098	0.12	0.069
Al %	0.0051	0.034	0.093
K %	1.4	0.63	1.2
Ash %	19.1	56.87	35.6
DOC mg g ⁻¹ C	1.45	8.26	8.04
TSN mg g ⁻¹ N	ND	0.13	0.5

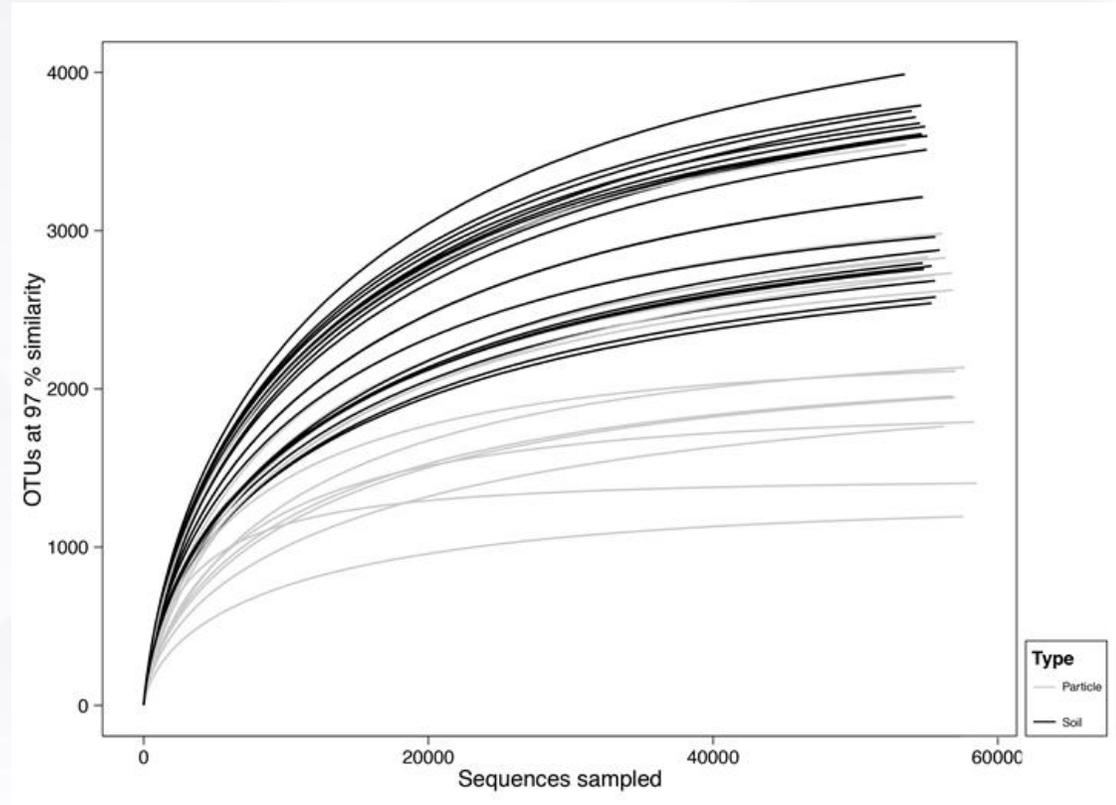


1、细菌16S rRNA分析

2、数据分析 (β 多样性)

(非度量多维尺度)

(Bray–Curtis相似系数)



总共218,0232条高质量的16S rRNA基因序列的产生。



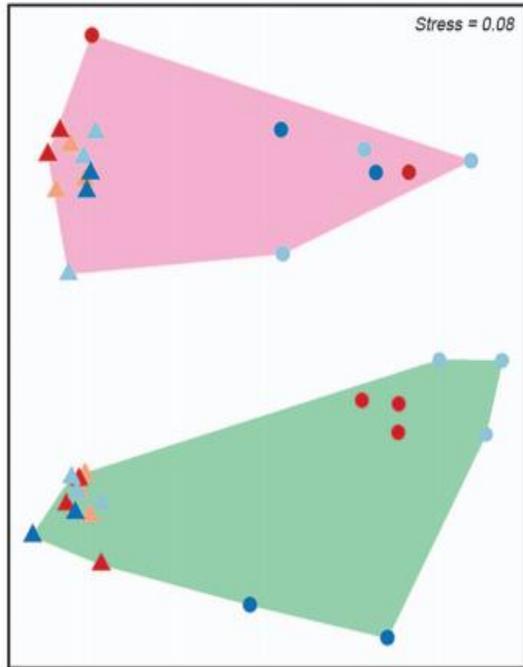
- 3、宏基因组测序和组装（Ben-F-particle, Kao-NF-particle 和 Kao-F-particle）
- 4、基因草图的组装和注释
- 5、对于OTU0001和OTU0017进化分析
- 6、RuBisCo蛋白的分类
- 7、核苷酸登录号（上传NCBI）
- 8、对生物炭颗粒OTU0001定位（GISH杂交，元素分析）
- 9、成分和氧化接触OTU0001粒子状态分析（X射线光电子能谱光谱分析）



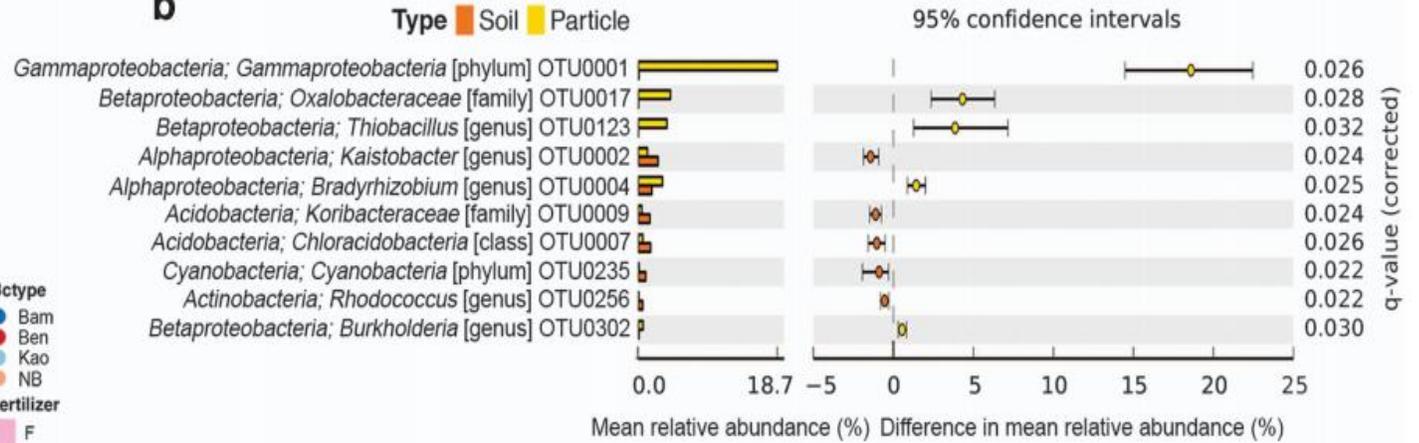
Results

细菌在生物炭的表面富集

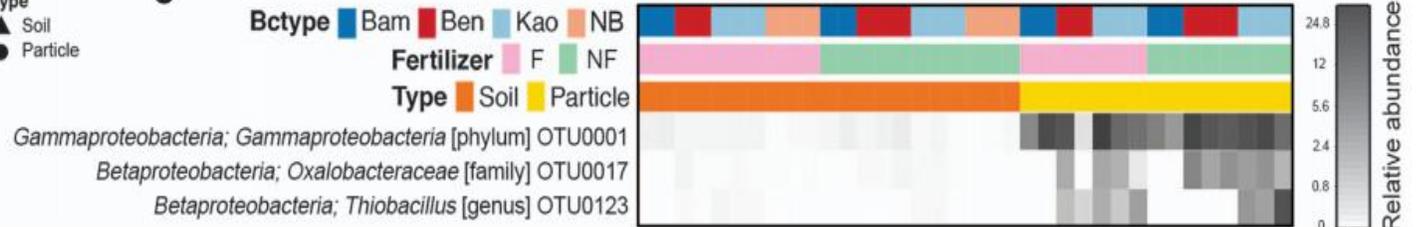
a



b

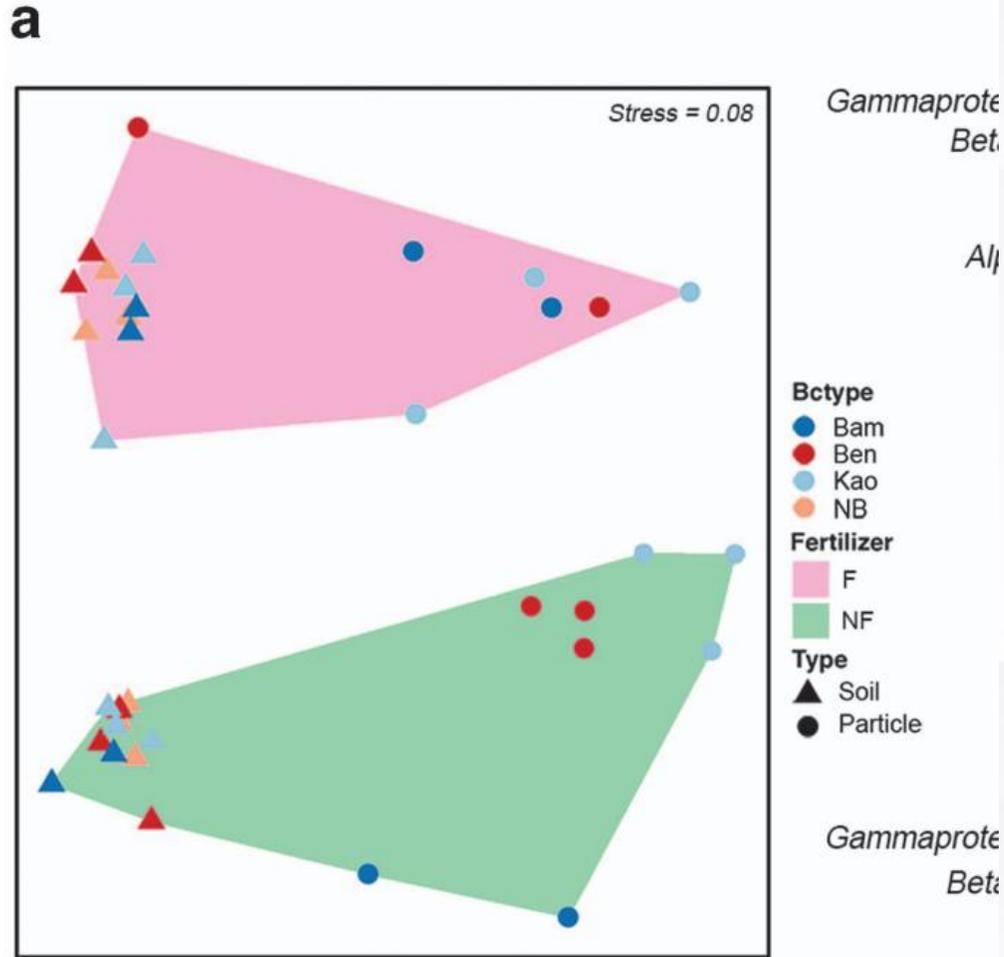


c





Results

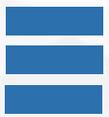


在非度量多维尺度图中，生物炭的类型，肥料和样品类型都显著影响细菌的 β 多样性。

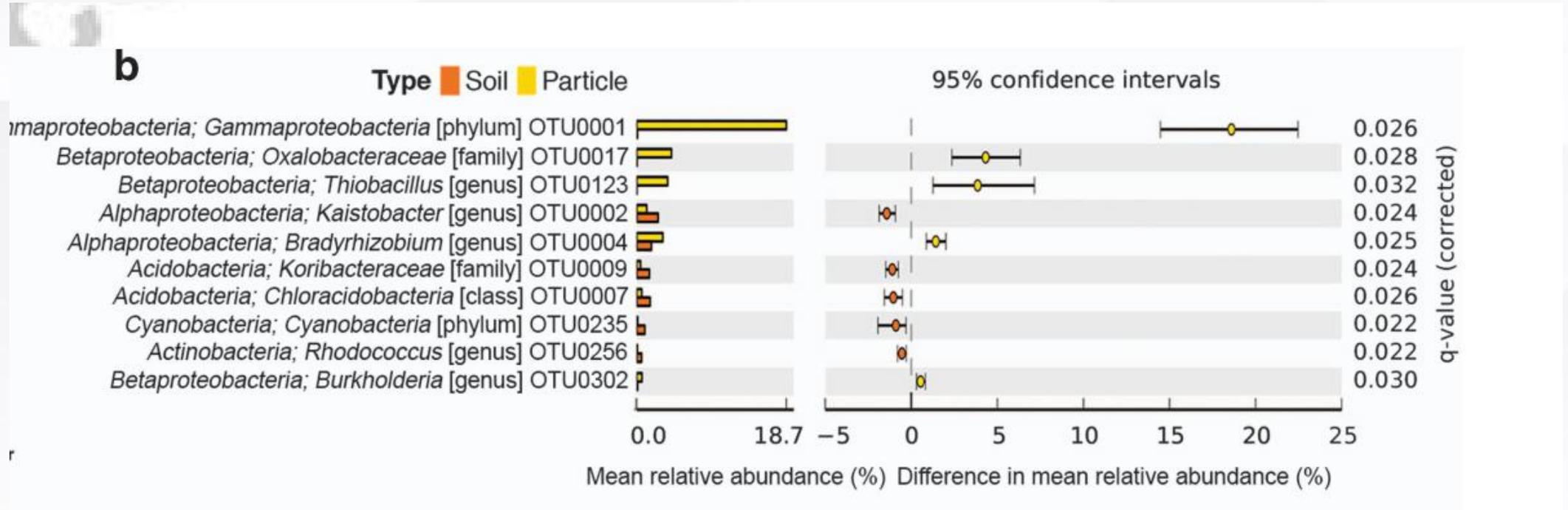
PERMANOVA方差分析（样品组间差异显著性分析）检测也发现生物炭类型和肥料之间，肥料和样品类型之间有显著影响。然而生物炭类型和样品类型无显著差异，三个因素之间无显著差异。



- 1、生物炭在 6.5 t ha^{-1} （6.5吨每公顷）施用，有或无化肥，对超过140天培养的堆积土，细菌群落结构组成无影响。
- 2、肥料的添加对土壤和生物炭颗粒表面的细菌群落组成有显著影响。
- 3、不论肥料存在与否，生物炭颗粒表面的细菌群落组成与堆积土有显著影响。当没有肥料施用的时候，两种MEB颗粒的细菌群落组成显著不同于Bam，而当施肥后，这种关系被打乱。



生物炭颗粒与堆积土土壤之间细菌类群的差异



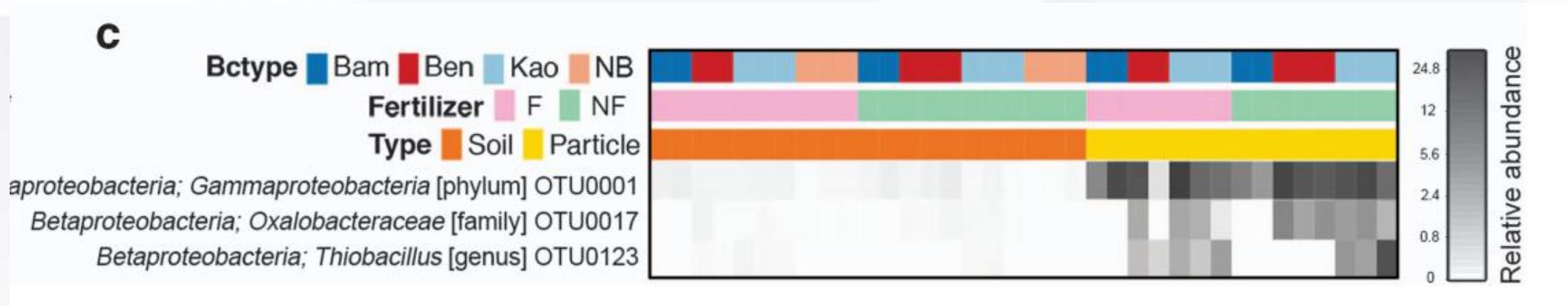
纲 *Gammaproteobacteria* (OTU0001) 成员通常存在碳化材料上，能将电子传递给细胞。

科 *Oxalobacteraceae* (OTU0017) 未知和未发表的，分离自钨尾矿砂分离，98%。

属 *Thiobacillus* (OTU0123) *Thiobacillus thioparus* strain THI 111 ， 93%。



三个最丰富的OTU在所有样品中的分布情况



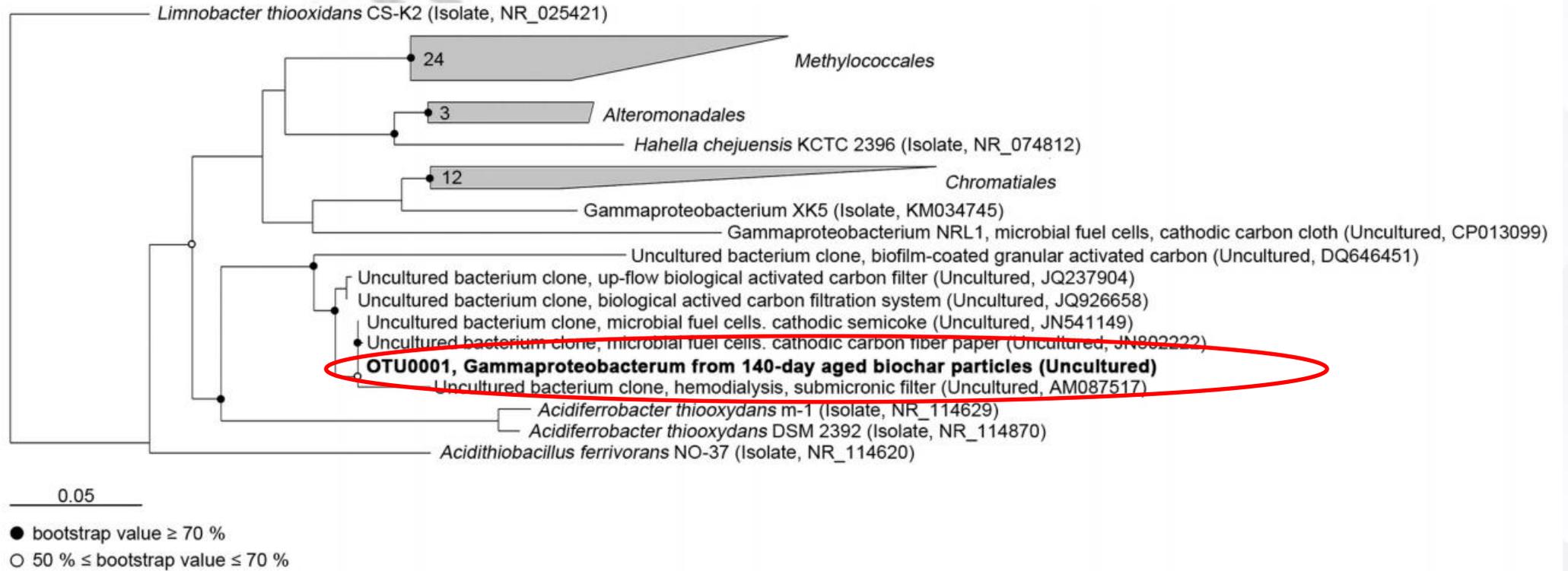
纲 *Gammaproteobacteria* (OTU0001)

科 *Oxalobacteraceae* (OTU0017)

属 *Thiobacillus* (OTU0123)

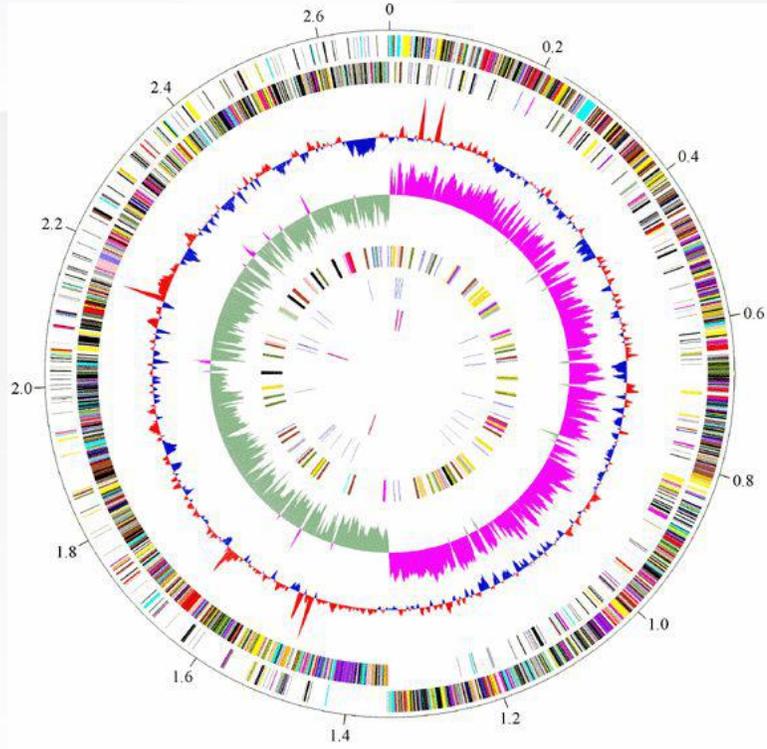


基于OTU0001的16S rRNA基因序列的系统发育树



OTU0001的16S rRNA基因序列与一个未培养细菌相一致，被发现在微生物燃料电池中，在阴极表面中富集。

含碳环境



宏基因组测序

为了深入了解三种生物炭/MEBs的OTUs，我们从宏基因组数据中重建它们的基因组。



总结Gama1, Oxal1和Thio1基因组序列

Table 2 Summary of Gama1, Oxal1 and Thio1 genome sequences

	<i>Gama1</i>	<i>Oxal1</i>	<i>Thio1</i>
Completeness ^a	88.4	99.2	100
Contamination	2.23	2.27	0.31
Total length (base pairs)	2 733 588	3 773 333	3 303 696
GC content	62.69%	57.33%	62.49%
Number of scaffolds	181	27	33
Coding density	89.30%	86.81%	91.98%
Average coverage	315.96	136.34	133.00
16S rRNA sequence	Yes	No	No
Taxonomic classification ^b	Gammaproteobacteria [C]	Oxalobacteraceae [F]	Thiobacillus [G]

^aBased on lineage-specific marker sets determined with CheckM. ^bTo the lowest classified level given by Phylosift.



Gama1

Gama1基因组分析显示基因编码固碳循环的关键酶（Calvin Benson Basham 还原戊糖磷酸途径，CBB），包括RuBisCo大、小亚基和Rubisco活跃的蛋白质CbbO, CbbQ和CbbX。

两种类型的RuBisCo操纵子：

- 1、一个基因簇中的RuBisCo大、小亚基在CbbO, CbbQ之后；
- 2、 RuBisCo大小亚基与CbbX位于下游

IAq RuBisCo和IC RuBisCo酶：能适应高浓度的CO₂

IAq RuBisCo更容易与O₂反应作为一个替代的基质

这表明，Gama1在生物炭表面需要经历大量的CO₂和变化的O₂水平。



Gama1

Gama1基因组显示具有氮资源的吸收功能。

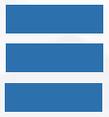
脲酶操纵子尿素转运基因：铵态氮，硝态氮和亚硝酸盐转运基因和硝酸盐还原作用基因。

ATP结合转运和合作转运寡糖和支链氨基酸均未恢复在Gama1基因组，表明无法从环境中获得有机化合物。

没有发现基因编码发酵关键酶，如乳酸脱氢酶，丙酮酸脱羧酶和甲酸脱氢酶。



这些观察结果表明Gama1具有严格的自养生活方式。



Gama1

Gama1基因组的基因簇编码交替呼吸复合物III（AC III），参与铁氧化途径。

Gama1 基因组还编码cbb3类型的细胞色素C氧化酶和细胞色素氧化酶BD-I辅酶，对O₂具有高度亲和力，能支持在微需氧条件生长。

占主导地位的Gama1氧化铁并结合AC III和蛋白细胞色素蛋白复合物。



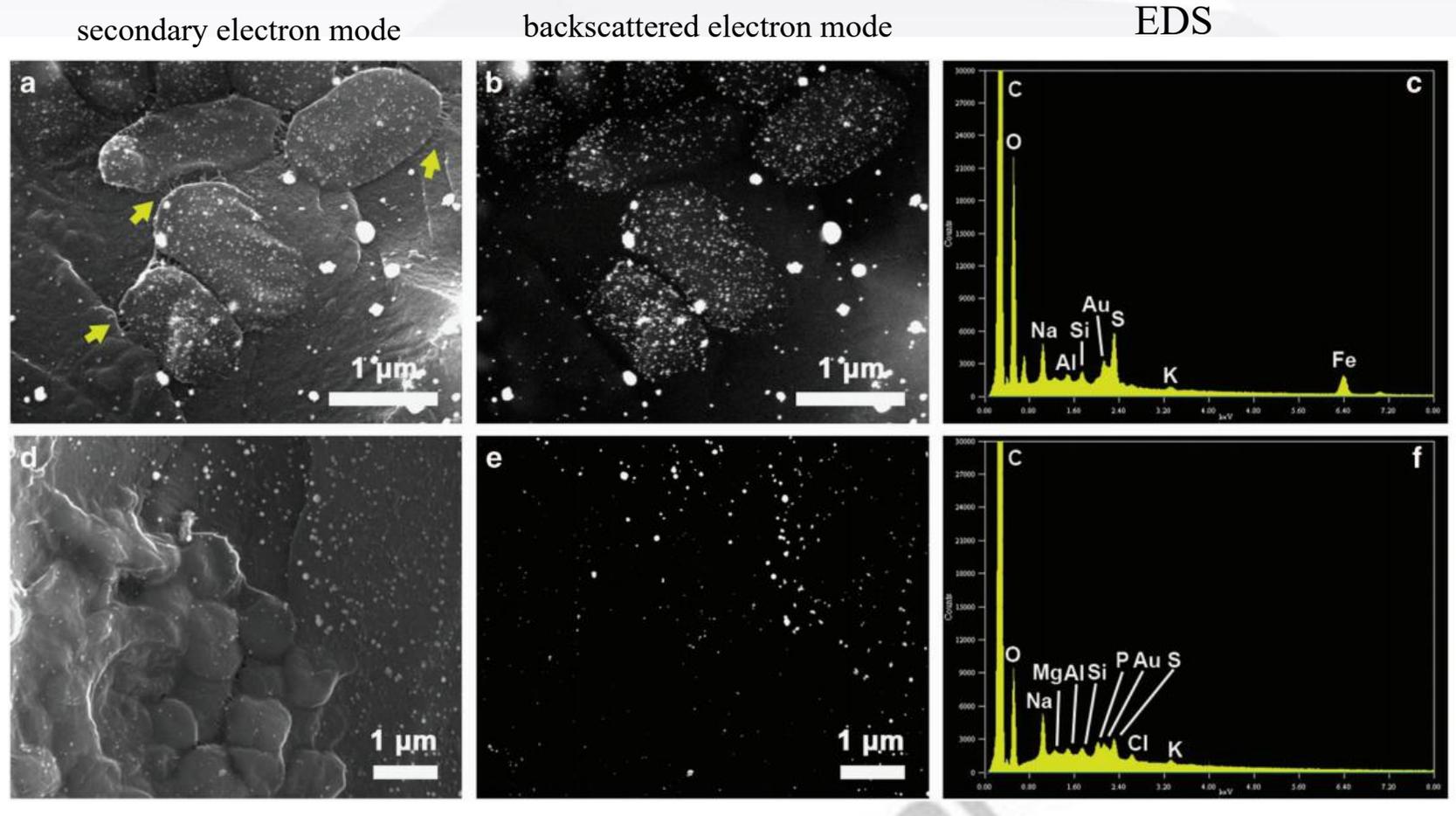
铁氧化电子能转运O₂，生产NADH和ATP支持自养生长。



基于GISH的OTU0001电子显微照片

GISH-labeled

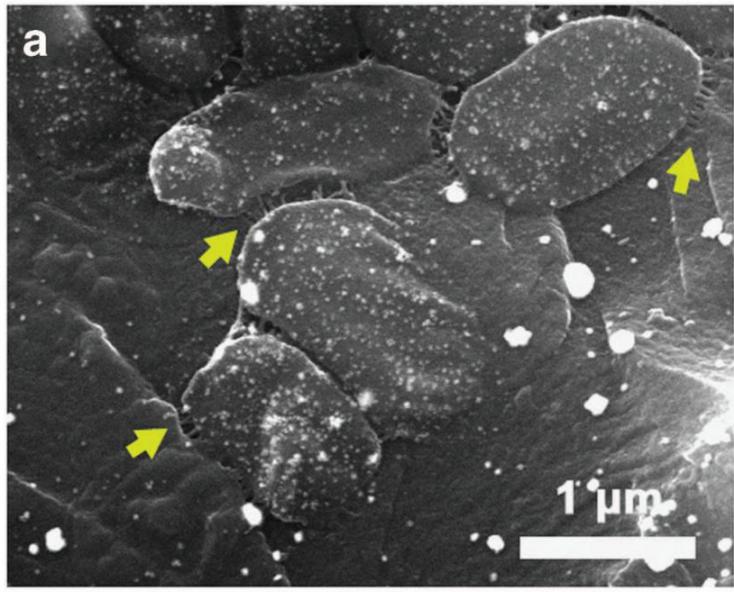
GISH-unlabeled



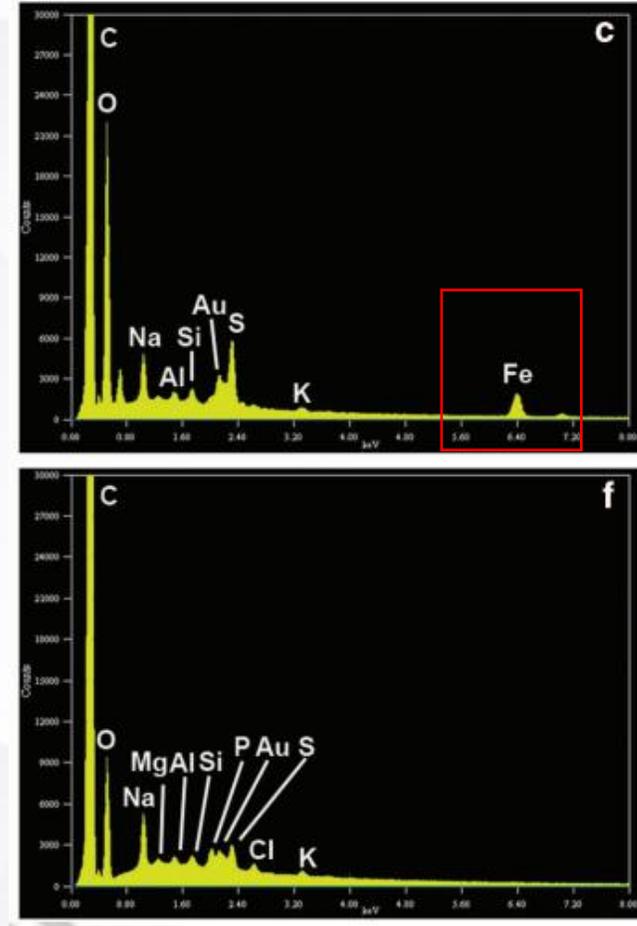
以基因组为征集，Gama1与铁氧化有关，预计细菌存在于靠近生物炭结构中铁的旁边。因此我们采用GISH技术研究Gama1的在生物炭表面物理定位。



Results



黄色箭头部分：菌毛类似结构与Gama1基因组编码的菌毛一致
杆状细胞



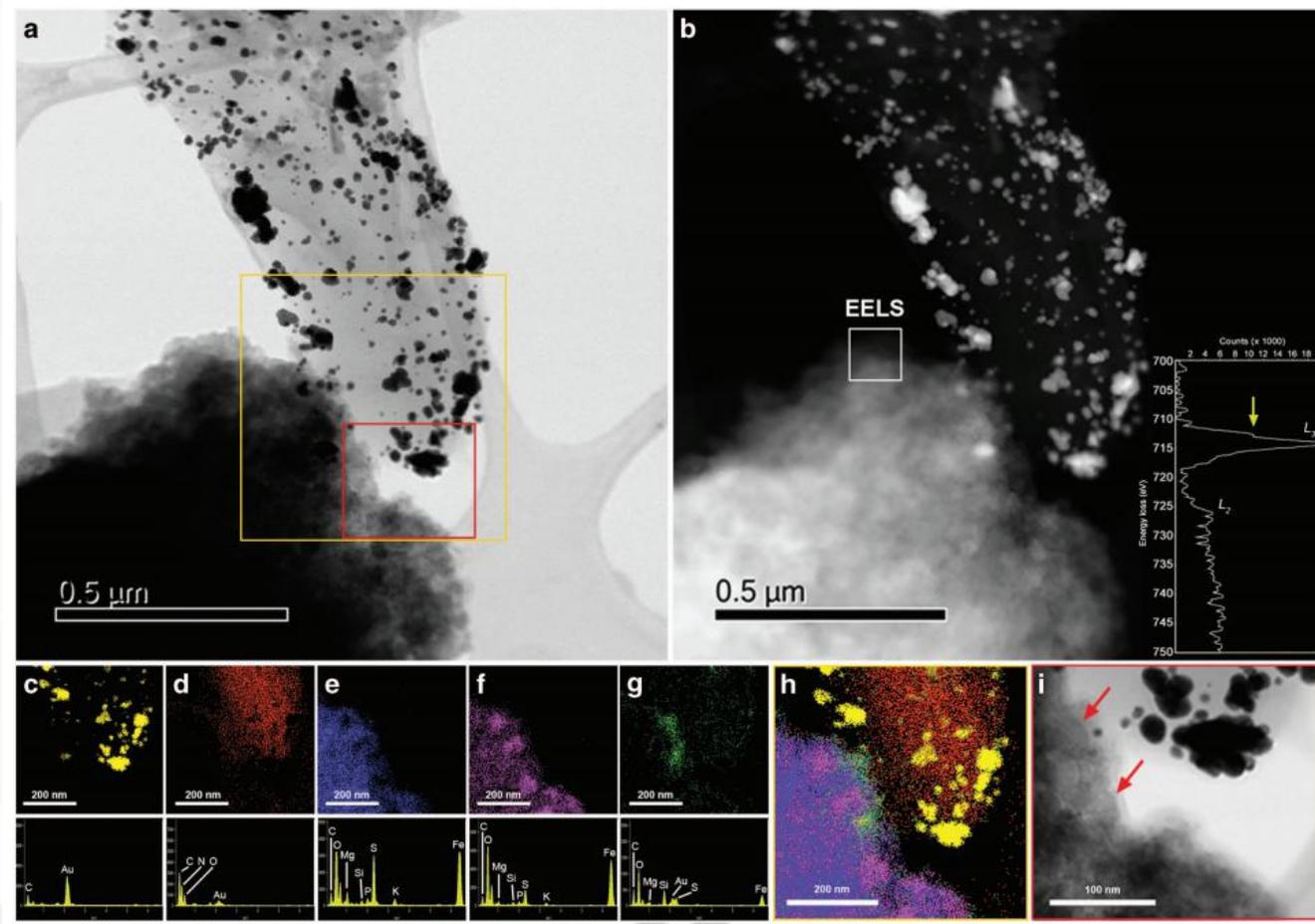
EDS频谱解释了该Gama1细胞铁周围，含量达到峰值。

这个结果显示：Gama1的特异性定位在生物炭铁丰富区域。



Results

采用EDS和EELS，研究元素分布、氧化还原状态。



目的：进一步支持Gama1铁氧化的概念

Gama1活跃铁的氧化，并在界面处取代含铁的有机矿物颗粒。



Oxal1与Thio 1

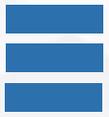
RuBisCo

Oxal 1和 Thio 1的基因组拥有基因能编码RuBisCo大小亚基。

Oxal 1: IAc RuBisCo（适应低CO₂环境）

Thio 1: IAc RuBisCo和II RuBisCo（适应高密度的CO₂环境）

操纵子编码的外壳蛋白羧酶体和壳碳酸酐酶是在Oxal1和Thio1检测的。羧酶体是以封装RuBisCo和碳酸酐酶作用而被熟知的。因此提高碳固定可提高RuBisCo附近的CO₂水平。



Oxal1与Thio 1

硫代谢

Oxal 1和 Thio 1包含参与酶编码的基因簇涉及氧化 硫代硫酸盐（ thiosulfate ） 到硫酸盐（ sulfate ） 。

Oxal 1 Sox操纵子存在soxCDYZXAB (Ga0079480_117)编码四种周质蛋白， SoxXA, SoxYZ, SoxB and Sox(CD)₂。

Thio 1只有soxXYZAB、 soxXA 、 soxC 。

Thio 1无Sox(CD)₂， dsrAB基因簇： 编码含亚硫酸盐还原酶的存在。



Oxal1与Thio 1

有氧呼吸

Oxal 1和 Thio 1的基因组也编码所有有氧呼吸所必须的酶。

Oxal 1: aa3-, bo3- and cbb3-type的细胞色素C氧化酶, 以及细胞色素BD-I辅酶氧化酶。

Thio 1: aa3-and cbb3-type的细胞色素C氧化酶, 以及细胞色素BD-I辅酶氧化酶。

它已被证明同时有aa3-, bo3-细胞色素C氧化酶只有在O₂充足的条件下产生, 而cbb3型细胞色素C氧化酶、细胞色素氧化酶BD-I辅酶具有高亲和力的低水平的氧气。

无论是好氧或微好氧条件下运转, Oxal 1和 Thio 1对O₂水平的适应。



Oxa11与Thio 1

反硝化作用

Thio 1含有一系列的反硝化作用基因，包括硝酸盐还原酶，亚硝酸盐还原酶，一氧化氮还原酶和氧化亚氮还原酶。

Thio 1利用硝酸盐/亚硝酸盐作为终端电子受体的能力，可以解释Kao组可溶性总氮水平与总氮比其他两组要高

TSN $\text{mg g}^{-1} \text{ N}$	ND	0.13	0.5
----------------------------------	----	------	-----



全文实验结果总结

生物炭和矿物富集的生物炭（MEB）被用作土壤改良剂改良土壤肥力，固碳，减少温室气体排放。

- 1、结果显示生物炭与MEBs怀有不同的细菌群落；
- 2、生物炭与MEBs 均以*Gammaproteobacterium* 为主；
- 3、基因组重建结合电子显微镜和高分辨元素分析显示细菌从表面存在的铁的氧化中产生能量。
- 4、*Thiobacillus*菌和*Oxalbacteraceae*菌在MEBs上丰富，他们具有硫代硫酸钠氧化的遗传能力。
- 5、三种表面丰富的菌群具备修复二氧化碳的能力。

结果表明，自养过程的主导地位对生物炭和MEBs可以促进土壤固碳。



THANKS

恳请各位老师同学批评指正！