读 书 报 告

汇报人：夏婷婷

时间：2019.11.17

microorganisms

MDPI

Review

Current Status and Potential Applications of Underexplored Prokaryotes

Kian Mau Goh [1,*,†], Saleha Shahar [1], Kok-Gan Chan [2,3], Chun Shiong Chong [1], Syazwani Itri Amran [1], Mohd Helmi Sani [1], Iffah Izzati Zakaria [4] and Ummirul Mukminin Kahar [4,*,†]

1 Faculty of Science, Universiti Teknologi Malaysia, Skudai 81310, Johor, Malaysia; salehas@utm.my (S.S.); cschong@utm.my (C.S.C.); syazwaniitri@utm.my (S.I.A.); helmisani@utm.my (M.H.S.)
2 Division of Genetics and Molecular Biology, Institute of Biological Science, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur 50603, Malaysia; kokgan@um.edu.my
3 International Genome Centre, Jiangsu University, ZhenJiang 212013, China
4 Malaysia Genome Institute, National Institutes of Biotechnology Malaysia, Jalan Bangi, Kajang 43000, Selangor, Malaysia; iffahizzati@nibm.my
* Correspondence: gohkianmau@utm.my (K.M.G.); ummirul@nibm.my (U.M.K.)
† These authors contributed equally to this work.

Received: 13 August 2019; Accepted: 8 October 2019; Published: 18 October 2019

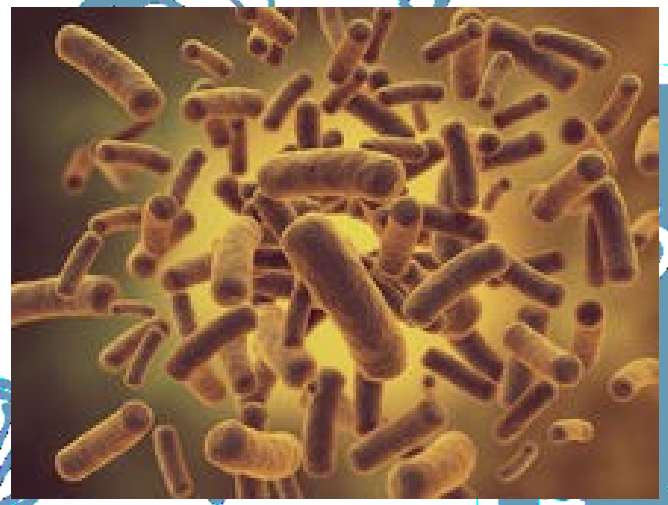
目 录

CONTENTS

01

Introduction

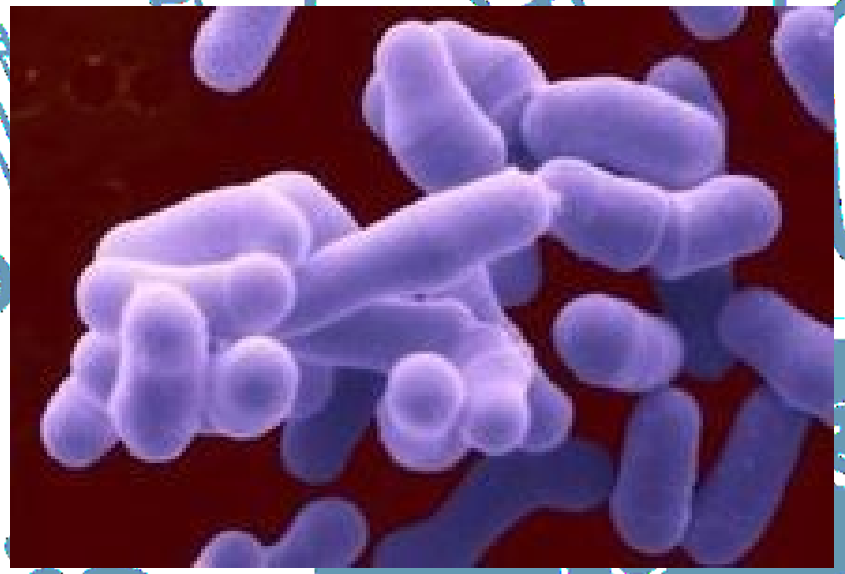
Introduction

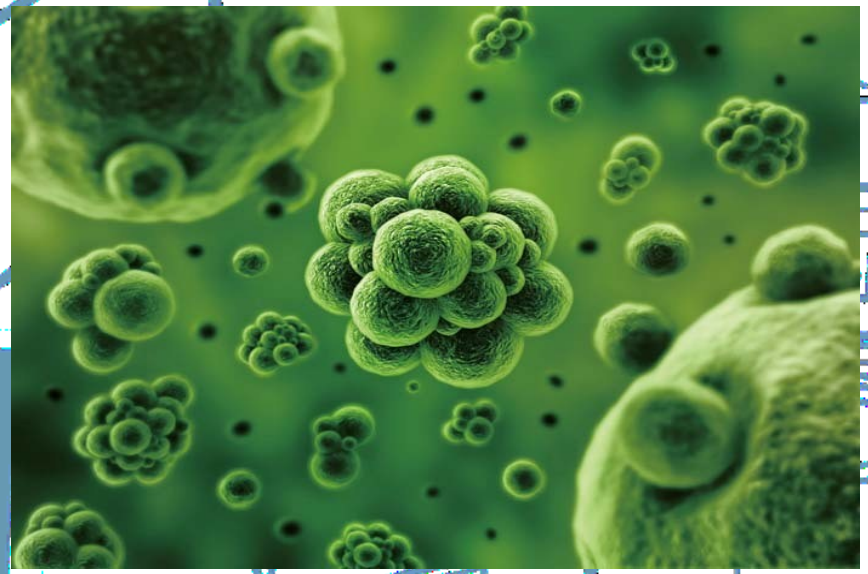


迄今为止（2019.09），已有3800多个原核生物物种发表在IJSEM或出现在《国际细菌命名法规》的名单上。

WFCC对来自48个国家和地区的447444株微生物进行了分类。

Introduction



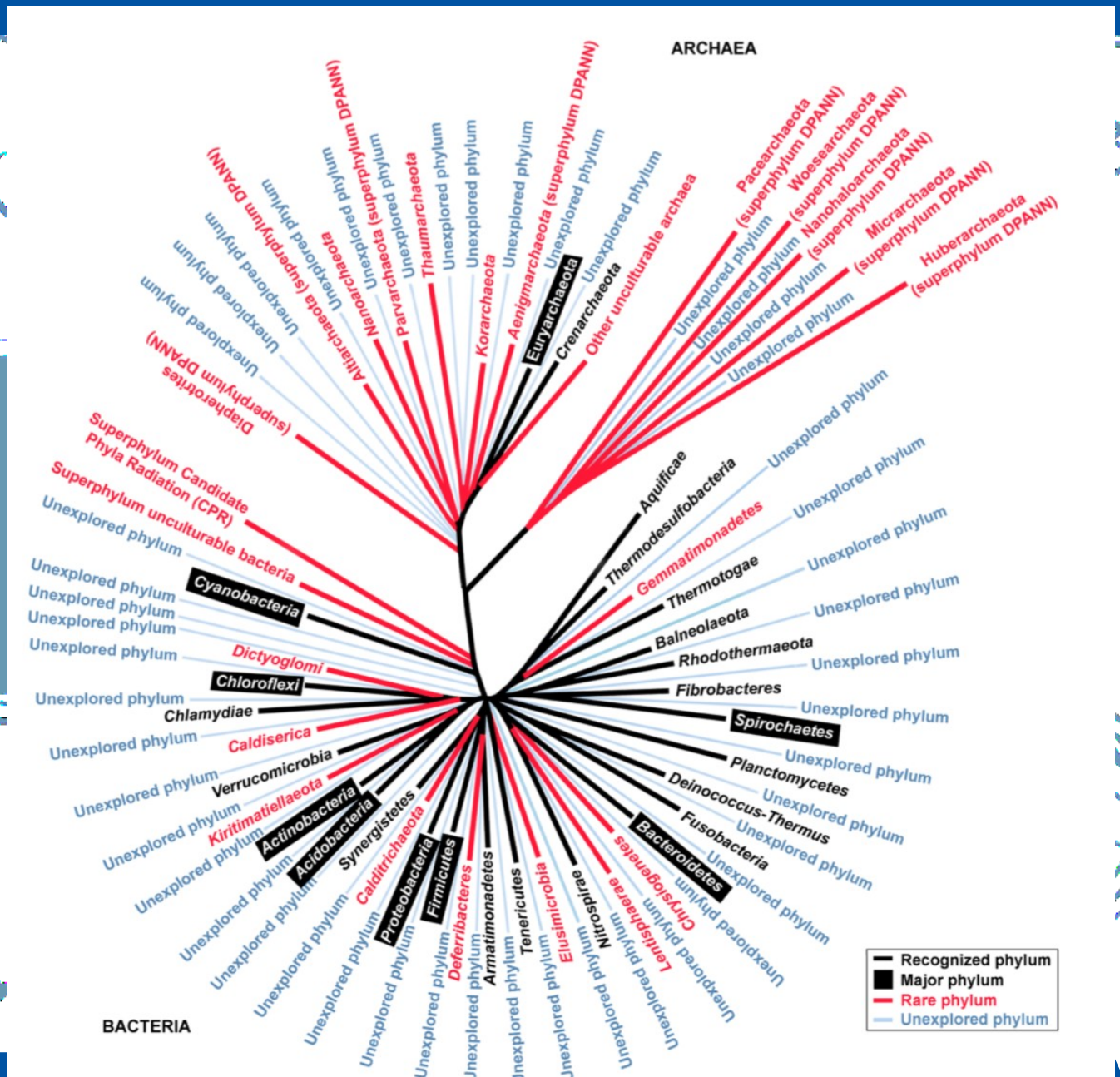


比较容易分离的原核生物已经从多个方面得到了很好的研究。

然而，研究者可能忽视或很少关注不常见的原核生物和难以培养的微生物。

Introduction

16S rRNA系统发育树（门水平）



Introduction

数据来自Scopus数据库

Major bacterial genera with more than 100 species.

No.	Phyla	Genus	Total Species [a]	Total Number of Related Articles [b]
1	Actinobacteria	*Streptomyces*	848	35,008
2	Firmicutes	*Bacillus*	377	168,001
3	Proteobacteria	*Pseudomonas*	254	162,460
4	Firmicutes	*Paenibacillus*	240	1861
5	Firmicutes	*Lactobacillus*	237	49,320
6	Firmicutes	*Clostridium*	229	54,265
7	Bacteroidetes	*Flavobacterium*	208	5555
8	Actinobacteria	*Mycobacterium*	198	114,210
9	Proteobacteria	*Vibrio*	147	35,798
10	Actinobacteria	*Corynebacterium*	132	19,605
11	Firmicutes	*Streptococcus*	129	142,792
12	Tenericutes	*Mycoplasma*	127	28,075
13	Proteobacteria	*Sphingomonas*	127	3051
14	Proteobacteria	*Burkholderia*	122	11,383
15	Actinobacteria	*Nocardia*	119	7969
16	Proteobacteria	*Rhizobium*	112	24,085
17	Bacteroidetes	*Chryseobacterium*	112	1278
18	Actinobacteria	*Microbacterium*	110	1576
19	Actinobacteria	*Nocardioides*	103	435
20	Proteobacteria	*Halomonas*	102	1411

[a] Based on LPSN (http://www.bacterio.net/index.html). Subspecies are not counted. [b] Scopus data using the respective genus name as the keyword.

Introduction

数据来自根据WFCC全球微生物目录

No.	Species	Phyla	Patents	Paper Citations
1	*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032	Actinobacteria	315	478
2	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 6538	Firmicutes	184	610
3	*Synechocystis* sp. PCC 6803	Cyanobacteria	170	4615
4	*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869	Actinobacteria	131	59
5	*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633	Firmicutes	125	1292
6	*Escherichia coli* ATCC 25922	Proteobacteria	113	3594
7	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213	Firmicutes	108	1809
8	*Brevibacterium flavum* ATCC 14067	Actinobacteria	103	59
9	[b] *Candida albicans* ATCC 10231	Ascomycota	93	488
10	*Escherichia coli* ATCC 8739	Proteobacteria	79	315

Introduction

基因组测序主要有三种方法：

第一种方法：利用 Illumina, PacBio, Nanopore, Qiagen, BGISEQ, IonTorrent或其他测序仪器对培养的原核生物进行全基因组测序（WGS）

Introduction

第二种方法：宏基因组测序，可以直接从环境中产生DNA读数，而无需培养单个菌落。整个过程包括环境DNA（eDNA）的提取、扩增和高通量测序。

第三种方法：单细胞DNA基因组测序（SAG）。这是另一种与培养无关的方法。SAG包括使用微流控系统或类似系统分离单个细胞、提取DNA、使用多重置换扩增技术进行DNA扩增、构建测序文库、DNA测序以及将读取的内容组装成序列。

Introduction

可培养和不可培养原核生物发现的全过程

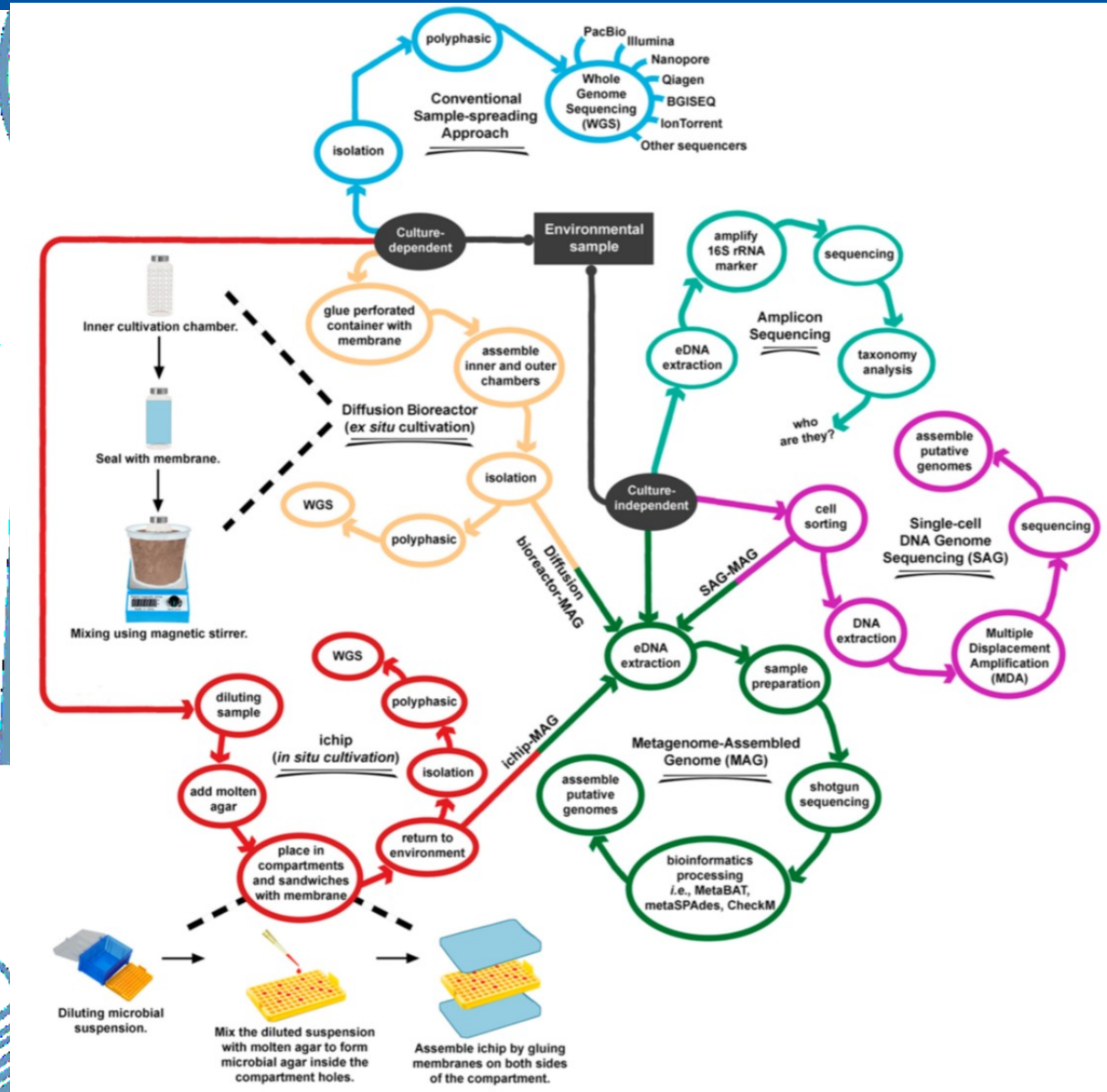


Figure 2. Overall processes of discovery of cultured and unculturable prokaryotes.

02

Underexplored Prokaryotes

2.1. Definition of Underexplored Prokaryotes

rare

微生物学家通常将稀有或未被充分挖掘的原核生物分为

（i）具有有限类型菌株的可培养属

（ii）实验室条件下不可培养的微生物

（iii）环境中呈现少数种群的原核生物

2.2 Reasons for Analysing Underexplored Prokaryotes

1. 获得基本知识，有利于重构生命之树

2. 与健康和疾病的关系

3. “蓝海战略”

对未被充分开发的原核生物及其大分子和天然产物的探索被认为是科学中的“蓝海战略”

2.3. Why Are Great Proportions of Prokaryotes Unculturable

1.可能需要特殊的培养条件：不寻常的营养物质，较小温度或pH范围，或不寻常的化合物来支持其生长。

2.来自环境的细胞处于休眠阶段，无法复苏。

3.基因组较小导致大多数CPR缺乏许多生物合成途径，缺乏ATP合成酶，并且缺乏电子运输链复合体。

“候选门辐射群”（ Candidate Phyla Radiation ），这是一组从来没有被培养成功的细菌，却组成了现今生命中最主要的多样性。

2.4. How Should Underexplored Prokaryotes Be Cultured?

注意其生长条件

使用重水（$H_2{}^{18}O$）对土壤样品进行了再干燥,在引入重水后，最初发现的稀有微生物的数量显著增加，从几乎无法检测到的数量增加到群落的比例。

取样地点

进行采样的地点也许应该考虑一些人类活动最少的，难以到达的地点。

2.4. How Should Underexplored Prokaryotes Be Cultured?

修改培养策略：

1.如隔离芯片（ICIPS)这样的装置来最大化个体菌落的数量

2. Ex situ cultivation：用扩散生物反应器的新型细菌培养装置，从变形菌、厚壁菌、放线菌和拟杆菌中分离出35株以前未培养的菌株。

2.5. Exploring Unculturable Prokaryotes Using Metagenome-Assembled Genomes (MAG)

宏基因组技术是通过直接将环境样品中所有微生物的 DNA 提取出来，构建宏基因组文库，然后一起测序，利用基因组学方法研究环境样品所包含的全部微生物的遗传组成及其群落功能。

Underexplored Prokaryotes

与MAG相关的研究和生物信息学工具

Source	Major Bioinformatics Tools	Purpose/Major Findings	NCBI Bioproject Accession no., Unless Stated	Year/Reference
Aquifer	SPAdes, CONCOCT, CheckM	Analyze the genome of Candidate bacterial phylum BRC1.	SRR710274, CP030759	2019 [95]
Hot spring	SPAdes, Kaiju, CheckM	Expanding the understanding (diversity, phylogenetic, and functional) of microbiome in two well-studied hot springs in Kamchatka, Russia.	PRJNA419931	2019 [98]
Deep-sea	BBmap, MetaBAT, CheckM	Recovered 82 MAGs affiliated with 21 different archaeal and bacterial phyla from petroleum seepage. Authors proposed that acetate and hydrogen are the central intermediates underpinning community interactions and biogeochemical cycling.	PRJNA415828, PRJNA485648	2019 [99]
Aquifer	bbduk in the bbmap package, SPAdes, VizBin, CheckM	Assembled the genome of *Rhodoferax* sp. However, the authors were not able to confirm that this bacterium can degrade sulfolane in the contaminated aquifer.	181102 (JGI IMG/ER)	2019 [100]
Soda lakes	BBnorm, MetaSpades, MetaBat, CheckM	Used metagenomics and metaproteomics to provide a comprehensive molecular characterization of a phototrophic microbial mat microbiome.	PRJNA377096	2019 [101]
Lab-scale reactor	CLC de novo assembler, CheckM	Explaining the shifts in microbial community structures using 16S rRNA metagenome, MAGs, and metaproteomic data.	PRJNA471375	2019 [102]
Artificial acid mine drainage	SPAdes, CheckM, ESOM	Describe taxonomy and ecological role of a new order Ca. Acidulodesulfobacterales (Sva0485 clade).	PRJNA517999	2019 [103]
Freshwater	SolexaQA++, Scythe, IDBA-UD, MetaBAT, MASH, MiGA, CheckM	Explain poorly understood Ca. Pelagibacterales (SAR11 clade IIIb).	PRJNA495371, PRJNA214105, PRJNA497294	2019 [104]
Aquifer	IDBA-UD, ggKbase, ABAWACA, ESOM	Reconstruct the genome of Candidate Parcunitrobacter nitroensis (OD1), and Candidate phylum Aminicenantes (OP8).	LBUF00000000, QUAH00000000	2019, 2017 [105,106]
Ocean	Minimus2, BinSanity, CheckM	Reconstruct the genome of 2,631 genomes, as part of Tara Oceans project.	PRJNA391943	2018 [107]
Bay	MEGAHIT, CheckM, RAST, Phylosift, JspeciesWS	Assembled 87 MAGs including archaeal Asgard group (Thorarchaetoa and Lokiarchaeota). Reveal potential microbial interactions.	4761314.3–4761727.3, 4762868.3–4762965.3 (MGRAST)	2018 [108]
Hot spring	IDBA, MaxBin, CheckM	Reconstruct the genome of cyanobacteria *Fischerella thermalis*.	NA382437	2018 [109]
Hot spring	metaSPAdes, CONCOCT, SNAP, CheckM	To relate MAGs' extracellular electron transfer systems with iron redox-based metabolisms	3300010938 and 3300014149 (IMG/M ER)	2018 [110]

CheckM是一种用于确定基因组完整性和识别污染序列的工具。

03

Limitations and Future Directions of Prokaryote Discovery

Potential Applications of Underexplored Prokaryotes

1.环境领域：如治理海洋环境污染

2.生物技术：嗜冷微生物的酶在生物技术中有潜在的用途，特别是对于需要较低温度的应用。

3.生物能源：尝试寻找未被充分挖掘的可培养原核生物以及利用宏基因组方法进行基因挖掘以生产稀少糖。

Limitations and Future Directions of Prokaryote Discovery

探索稀有原核生物仍有许多障碍和限制，如原核生物基因组的大小各不相同，不可培养的CPR具有非常小的基因组，它们具有最小的生物合成能力，因此，一些不可培养的原核生物，特别是那些基因组非常小的原核生物，可能编码的蛋白质不太适用于工业，从而限制了它们在生物技术中的应用。

04

Conclusions

Conclusions

目前，对于未培养原核生物的培养仍具有一定的挑战性，研究人员可尝试不同的方法，如：采样点的选择、复苏方法、富集技术，或者探索最先进的培养方法，应用更为先进的测序技术，特别是宏基因组和单细胞基因组技术，同时借助相应生物信息学工具，让我们更加全面地了解自然环境中微生物的多样性，从而能够从复杂环境中得到大量未培养微生物的基因组信息。

敬请各位老师同学批评指正