

读书报告

汇报人：程利娇

时间：2019.06.16

Network-directed efficient isolation of previously uncultured *Chloroflexi* and related bacteria in hot spring microbial mat

Journal:	<i>Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports</i>
Manuscript ID	EMI-2019-0457
Journal:	Environmental Microbiology
Manuscript Type:	EMI - Research article
Date Submitted by the Author:	30-Mar-2019
Complete List of Authors:	Xian, Wen-Dong; Sun Yat-Sen University, School of Life Sciences Salam, Nimaichand; Sun Yat-Sen University, School of Life Sciences Zhou, En-Min; Yunnan University, Yunnan Institute of Geography Jiang, Hongchen; China University of Geosciences, State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology Li, Wen-Jun; Sun Yat-Sen University, School of Life Sciences
Keywords:	Co-occurrence network, Microbial interaction, spent culture, <i>Chloroflexi</i>, <i>Tepidimonas</i>





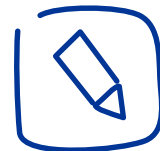
1. Introduction



2. Materials and methods



3. Results



4. discussion

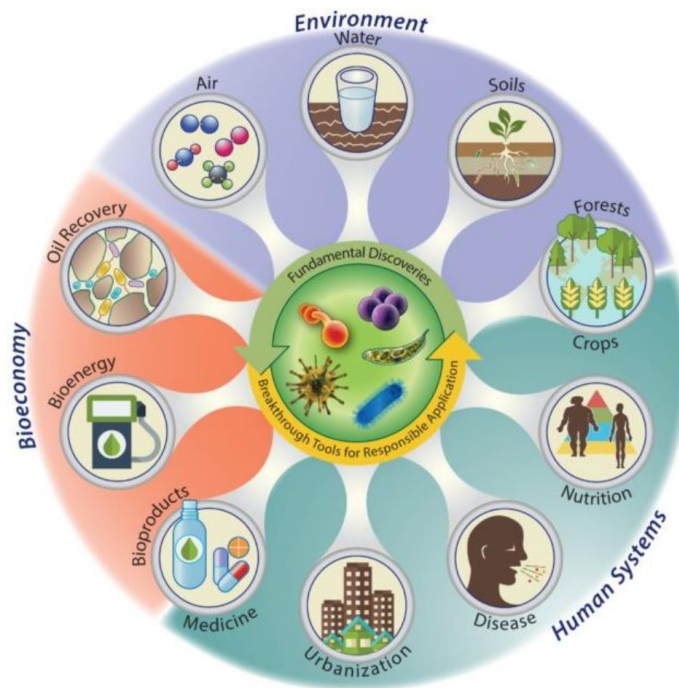


PART 01

Introduction



Introduction

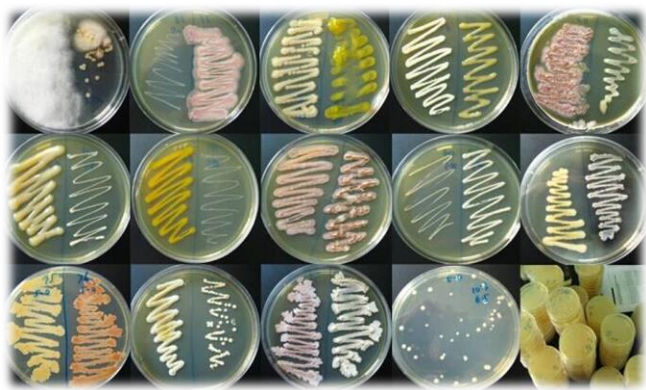


据估计，迄今约12,000（约占总数的1%）细菌或古细菌物种已被培养和有效发表(Chun, Rainey, 2014)。其余99%无法培养(Lok, 2015)。但是，这些未培养的微生物在大气碳氮循环、新型天然化学产物以及维持环境平衡方面发挥非常重要的作用。

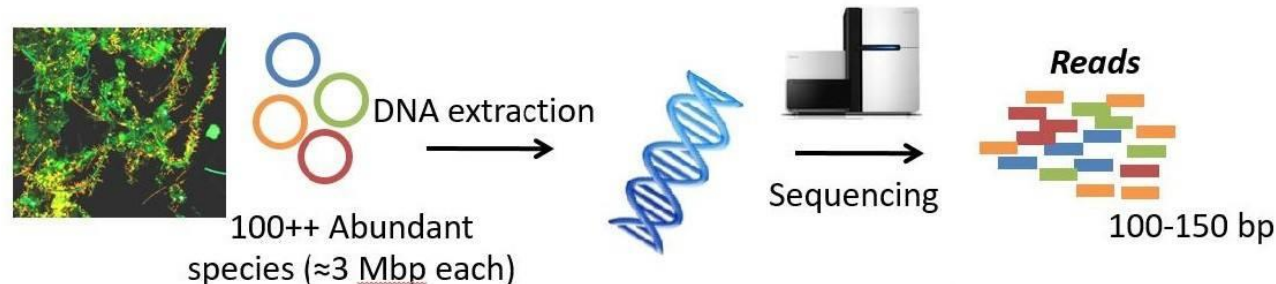
Introduction

近年来，科研工作者们不断探索微生物培养方法。一些新型的培养技术和新型培养基的研发，提高了微生物的可培养性。

新一代测序技术，如：宏基因组技术，提高了我们对微生物多样性认识。通过基因组的组装，来了解未培养微生物群落的代谢特性和潜在的功能信息。



宏基因组建库测序



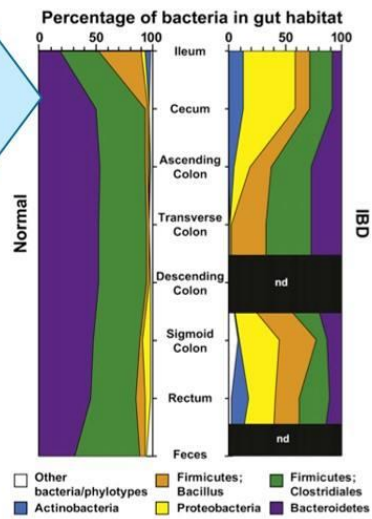
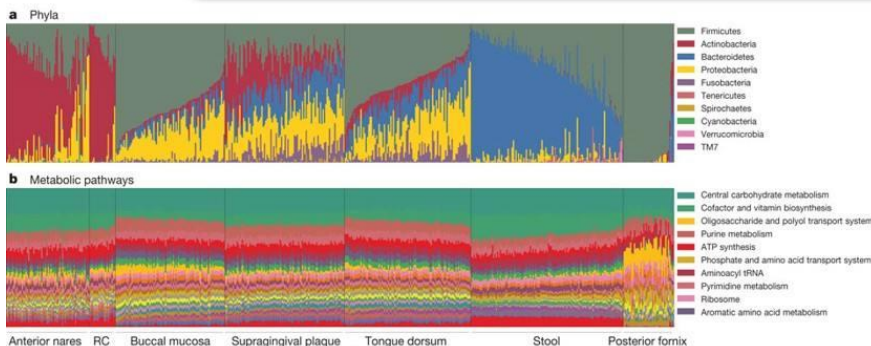
Introduction

宏基因组测序

快，准，性价比高。



16S rDNA 扩增子(“**它们是谁?**”) 广泛应用, 但只产生了有限的机理研究——因果?



宏基因组(“**它们能做什么?**”) 可以提示微生物组的组成和功能

宏转录组(“**它们在做什么?**”) 检查微生物组的活性

尽管宏基因组在微生物生态学方面具有广阔前景, 但在实验室中对这些微生物遗传, 代谢和应用潜力的进一步研究仍然无法进行的。

Introduction

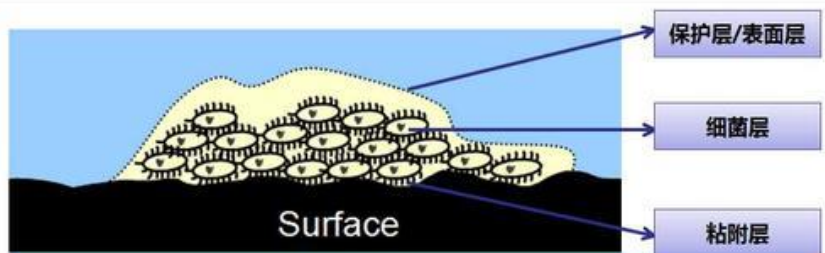


因此，传统的微生物纯培养技术不能被忽视，对于未培养微生物的可培养化，仍然是微生物学家的亟待解决的科学问题，正如生物学家经常说的那样，**“要真正了解它们，你必须培养它们”** (Charnock *et al*, 2017)。

Introduction

自然环境中，大多数微生物以生物膜/席 (Biofilm) 的形式存在。

细菌生物膜的三层结构



保护层/表面层：细菌分泌蛋白质，糖类等，可释放漂浮细菌

细菌层：内含细菌，细菌之间形成相互交联

粘附层：粘附组织或生物材料

Veerachamy S, et al. Proc Inst Mech Eng H. 2014 ;228(10):1083-1099.



陆地温泉是极端微生物独特生态系统，长期以来一直被认为是探索微生物生态学原理的模式栖息地。

Introduction

热泉微生物席 (Hot spring microbial mats, HSMM) , 属于大型生物膜的一种表现形式, 其中细菌细胞彼此粘附, 代表最复杂的微生物群落。

HSMM 通常是大型且垂直封闭, 自我维持的生态系统, 包含基于化学元素循环和

大多数FAPs和相关细菌至今尚未培养, 缺乏培养是探究该环境中生物地球化学循环以及了解群落结构和机制的主要障碍。

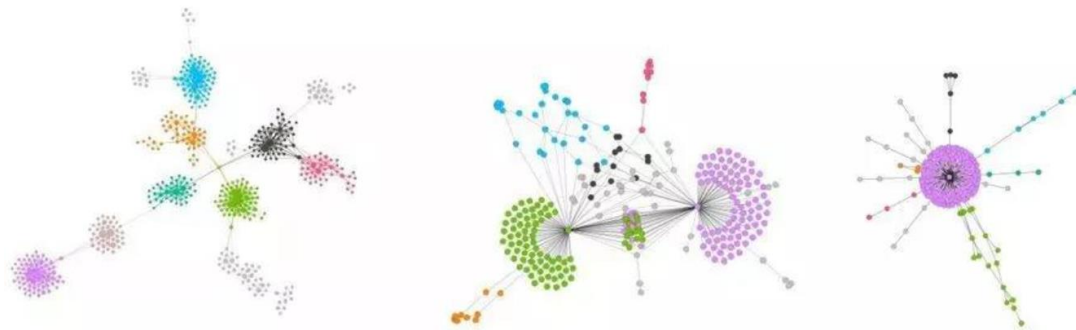
色非硫细菌 (Filamentous anoxygenic phototrophs, FAPs) 包括 *Chloroflexus* 和 *Roseiflexus*。该栖息地的初级生产者通常为FAPs和蓝细菌 (*Cyanobacteria*) 。

Introduction

近年来，随着计算机技术的发展，**网络科学研究**已在各项领域中得以应用，例如：信号传导网络、神经网络、代谢通路网络、基因调控网络、生态网络等。

基于图论(Graph theory)的网络科学认为：**任何非连续事物之间的关系都可以用网络来表示。**通过将互联网内的电脑、社会关系中的个人、生物的基因等不同属性的实体抽象为**节点(Node)**，并用**连接(Link)**来展示实体之间的关系，**通过量化以节点和连接为组件的网络结构指数(Index)**，从而能够在统一的框架下寻找复杂系统的共性。

目前生态学领域大家用到的网络图多为基于群落数据相关性构建的**Co-occurrence网络图**。此类网络可以采用R中igraph包构建并实现出图。



共生网络 (Co-occurrence Network)

Co-occurrence网络可以揭示微生物群落中菌群之间的生态学关系。在正相关为主的网络中，网络模块(module)相当于适应同一生态位的菌群，它们倾向于共发生。通过Mantel test找出影响这些模块的关键环境因子，并评估OTU在群落中的重要性。

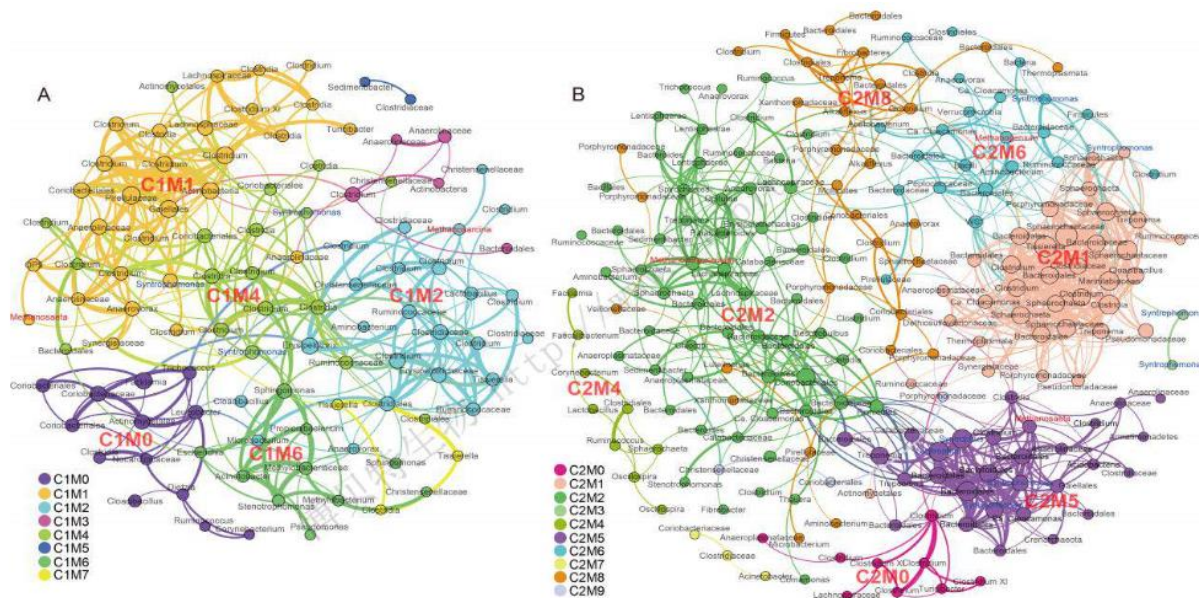


图1 两个Co-occurrence网络

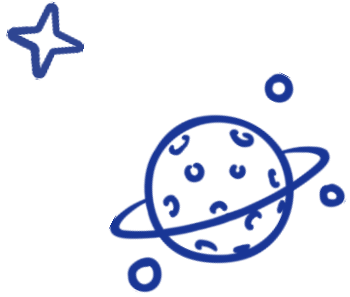
图中的节点表示OTU，边(两节点之间的连线)表示两个OTU存在显著正相关(Spearman $\rho > 0.6$, $p < 0.05$)。节点大小表示该节点的边数目多少，边的粗细代表相关性大小，颜色代表同一模块，节点标签是OTU所属菌群分类。

提出假设： 在微生物群落网络中，发现具有高度中心性“关键节点”的细菌，可通过促进或促进邻近菌群起到组织和调节整个微生物群落的作用。

例如：“分解者”在细菌群落中的作用：

- 1、分解自养细胞产生的有机物质（包括凋亡细菌细胞），为其他成员提供必需的营养物质；
- 2、缓冲作用：在细胞生长过程中产生酸性或碱性代谢物以缓冲环境的pH值；
- 3、**通过提供特定营养物质（如某些生长因子）来调节其他细菌的环境适应性，促进其生长；**
- 4、消除 H_2O_2 等有毒代谢物，以促进细胞免受抑制性应激；
- 5、提供群体感应信号分子以诱导群落形成。

本研究中，我们通过共发生网络（Co-occurrence），找到处于“关键节点”的**生长促进菌株**，**研究目的：** 分离HSMMs中以前未培养的*Chloroflexi*菌株和相关细菌。



PART 02

Materials and methods

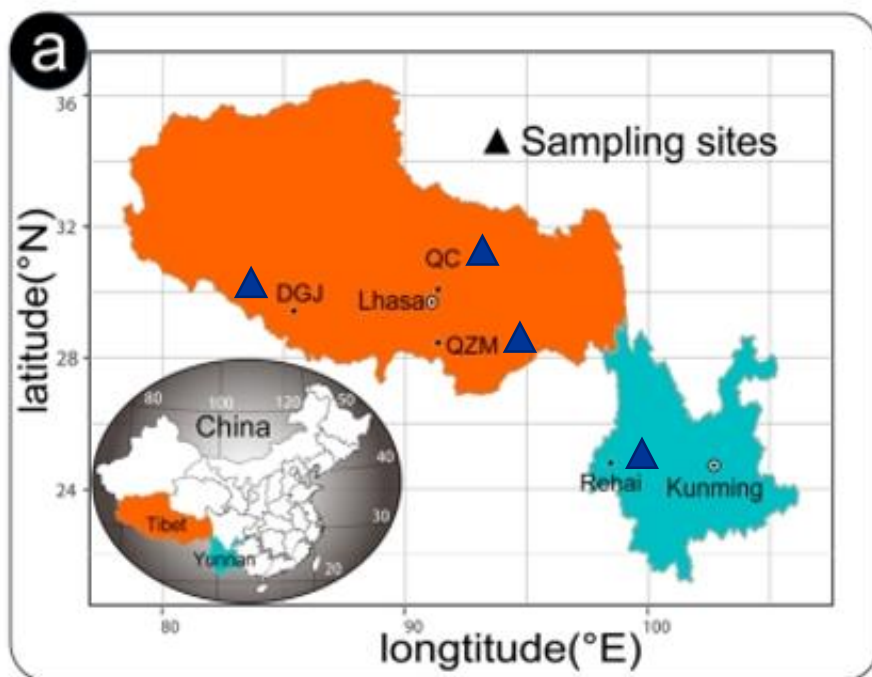




1、样品采集

采样地点：中国西南地区

西藏（2016.08，2018.08），云南（2017.12），共采集了18个HSMMs样品。



Location of the sampling sites

西藏HSMM的样品：

高通量测序，网络分析和纯培养分离，

云南HSMM的样品：

仅用于细菌分离。



1、样品采集

Table S1. Physiochemical parameters of the hot spring samples used in the study.

Sample	Location	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Elevation (m)	Temperature (°C)	pH	Sampling time
DGJ-1	Tibet	29.60	85.75	5067	79.0	8.0	2016.8
DGJ-10	Tibet	29.60	85.75	5079	60.4	9.0	2016.8
DGJ-11	Tibet	29.60	85.75	5079	45.0	8.8	2016.8
DGJ-13	Tibet	29.60	85.75	5082	66.0	7.8	2016.8
DGJ10-2	Tibet	29.61	85.75	5079	66.7	7.4	2016.8
DGJ10-3	Tibet	29.61	85.75	5079	62.3	7.3	2016.8
QC03	Tibet	30.67	91.59	4497	61.4	6.9	2016.8
QC04	Tibet	30.67	91.59	4500	69.5	6.8	2016.8
QC05	Tibet	30.65	91.60	4495	40.8	7.0	2016.8
QZM-14	Tibet	28.25	91.81	4502	67.5	6.5	2015.8
QZM-B2	Tibet	28.25	91.80	4450	76.9	7.0	2016.8
QZM-D2	Tibet	28.25	91.80	4388	74.9	7.5	2016.8
QZM-3	Tibet	28.25	91.80	4388	63.0	6.8	2015.8
QZM-4	Tibet	28.25	91.80	4450	62.0	6.5	2015.8
A96	Tibet	29.59	85.75	5057	45	8	2018.8
Y1	Yunnan	24.95	98.43	1352	55.0	7.0	2017.5
Y2	Yunnan	25.59	98.80	1439	63.0		2017.5
Y3	Yunnan	25.59	98.80	1439	66.0	7.5	2017.5

温度: 40.8–79.0°C

pH: 6.5–9.0

Qucain (QC) 和Quzhumu (QZM)

热泉呈中性pH值。

Dagejia (DGJ) 热泉呈弱碱性。



1、样品采集



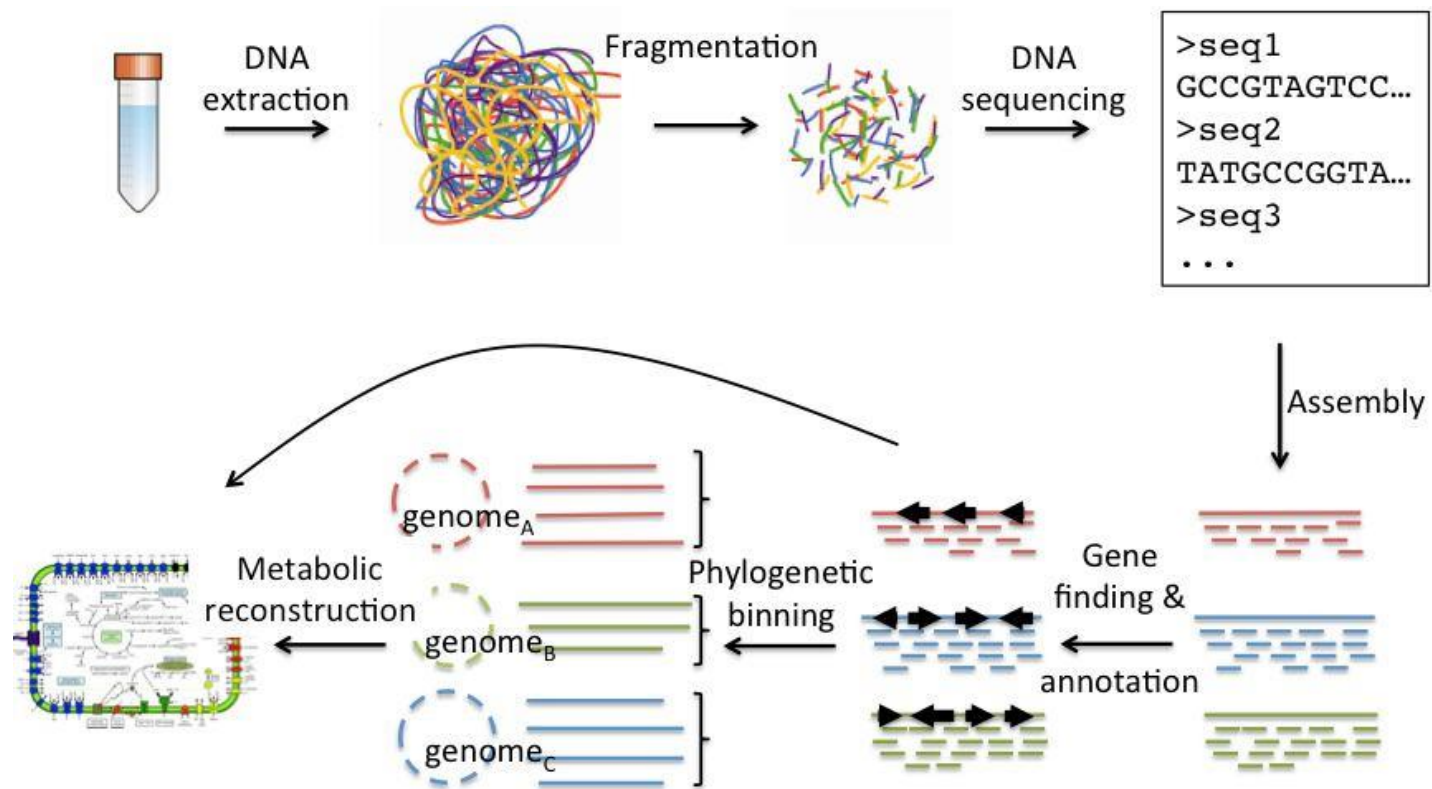
Rehai (Y1, Y2, Y3热泉样点) 是新形成的HSMM, 但受人类活动的干扰。

西藏A96 (52°C, pH 8.0) 是一个良好的HSMM, 厚度2-3 cm, 未发现人类活动的迹象。

Representative samples (Y1, Y2 and Y3 from Yunnan, and A96 from Tibet hot springs) that are used for isolation.



2、宏基因组测序



宏基因组提取, 测序, 数据处理和统计分析



3、共生网络分析

物种相互作用矩阵
(观察, 实验, 相关性推断)

Co-occurrence网络
(igraph)

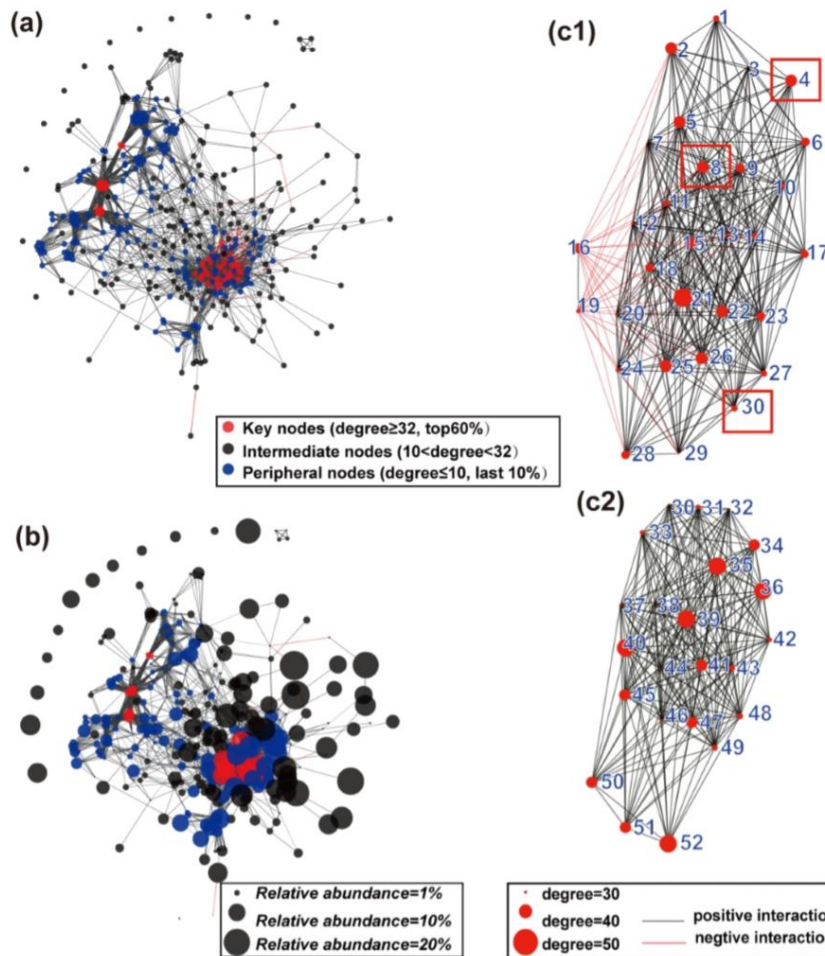
度分布、介数、平均路径长度、聚集系数等性质

结合生物统计学知识或者相关学科背景解决一些科学问题

每个样本中OTU的相对丰度生成相关

矩阵, 用于表示不同类群之间的相互作用。

边 (两节点之间的连线) 表示两个OTU存在显著正相关(Spearman $R > |\pm 0.6|$, $p < 0.05$)。

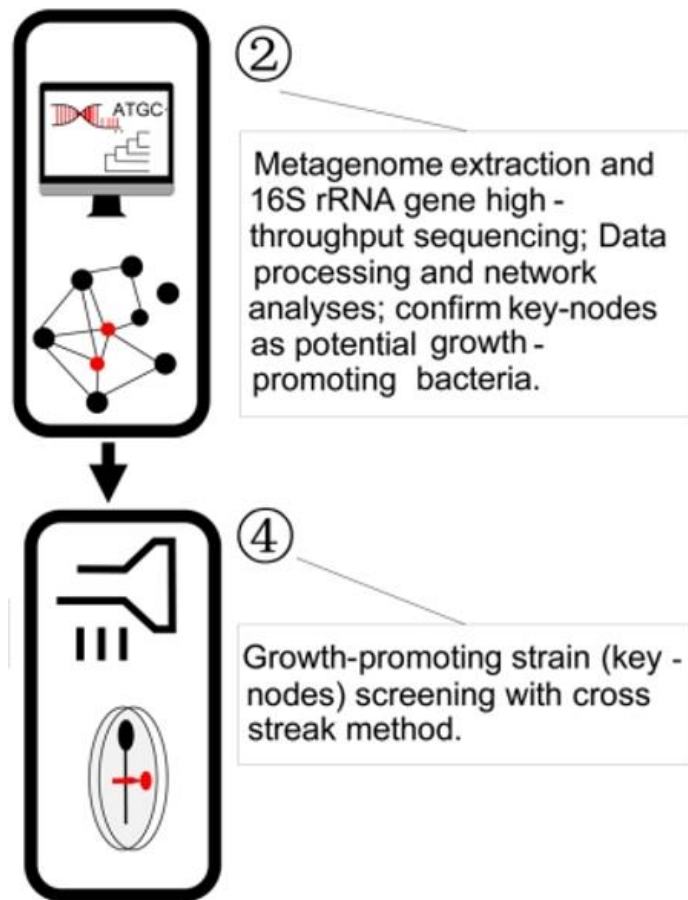


节点大小表示该节点上边的数目多少, 边的粗细代表相关性大小, 颜色代表同一模块, 节点标签是OTU所属菌群分类。

关键节点 (具有前60%中心性的顶点), 外围节点 (具有最后10%中心性的顶点) 和中等节点 (其余顶点)。



4、促生长菌株的确定



网络中的关键节点细菌被视为潜在的生长促进菌株，外周节点作为指示细菌。选择之前分离得到生长缓慢的 *Chloroflexus* sp. SYSU G100190R 作为指示菌。

该菌株沿着单线在R2A琼脂平板上划线。存在于网络关键节点中的代表性生长促进菌株在同一平板上交叉划线，并在黑暗条件下55 °C恒温培养。24h观察指示菌的生长。



5、使用传统和网络定向方法进行微生物分离

Table S2. Media used in the current study.

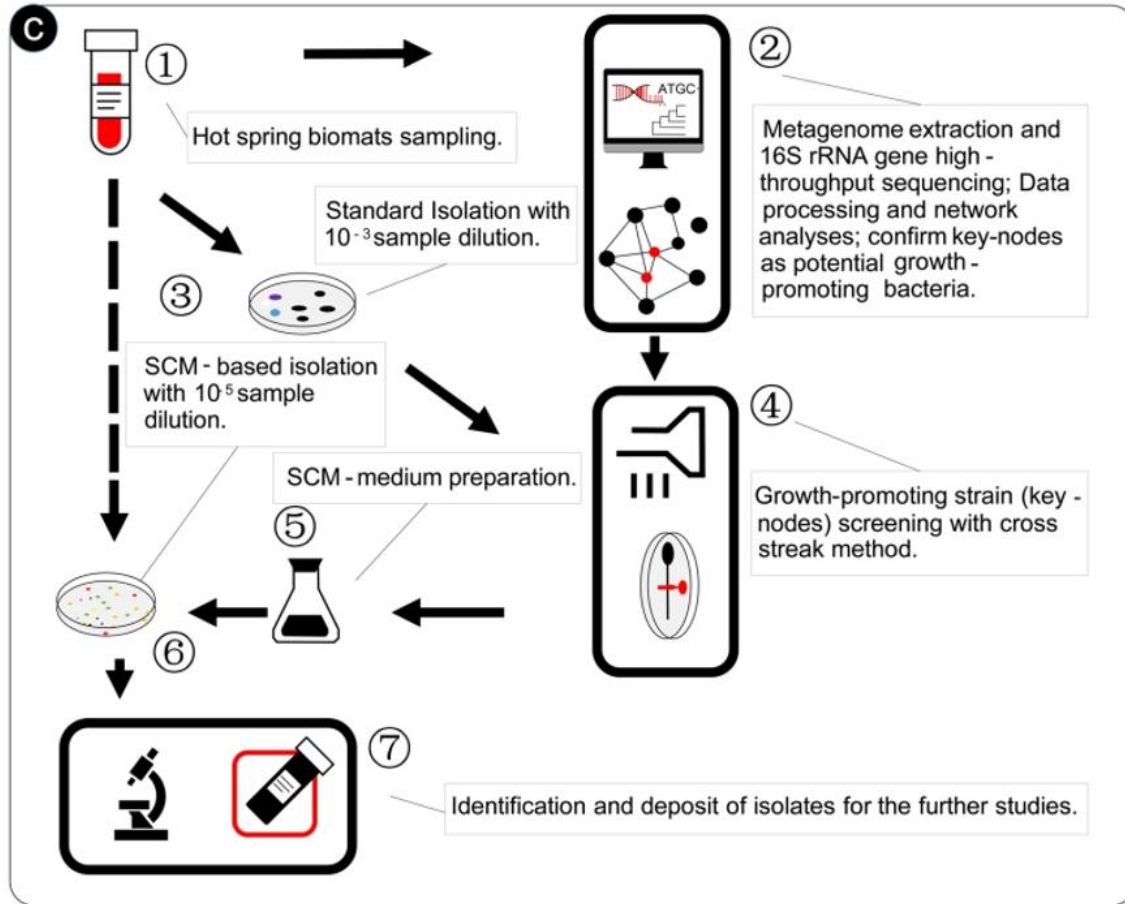
Media	Composition (g/L)
Reasoner's 2A (R2A) agar [DSM 830 medium]	Yeast extract 0.5, peptone 0.5, casamino acids 0.5, glucose 0.5, starch 0.5, K ₂ HPO ₄ 0.3, MgSO ₄ 0.05, Sodium pyruvate 0.3, agar 20, pH 7.2
CC agar	Microcrystalline cellulose 1.0, casamino acids 1.0, KNO ₃ 0.2, Na ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01, Agar 20, pH 7.5
<i>Thermus</i> 162 agar medium (DSM 878 medium)	Yeast extract 1.0, tryptone 1.0, nitrilotriacetic acid 100.0 mg, CaSO ₄ ·2H ₂ O 40.0 mg, MgCl ₂ ·6H ₂ O 200.0 mg, 0.01 M Fe Citrate 0.5 mL, Trace element solution 0.5 mL, Phosphate buffer 100.0 mL, Agar 28.0, pH 7.2. <ol style="list-style-type: none">1. Phosphate buffer (g/L) [KH₂PO₄ 5.44, Na₂HPO₄·12H₂O 43.0, pH 7.2].2. Trace element solution (g/L) [MnSO₄·H₂O 2.28, ZnSO₄·7H₂O 0.5, H₃BO 0.5, CuSO₄·5H₂O Na₂MoO₄·2H₂O 25.0 mg, CoCl₂·6H₂O 45.0 mg]
T5 agar	Tryptone 0.5, yeast extract 2.0, glucose 1.0, lotus root starch 1.0, agar 20, pH 7.2

传统的微生物纯培养分离

样品连续稀释，在R2A, CC, T5和*Thermus* 162琼脂培养基上进行涂布，并在55°C、有氧黑暗条件下培养一周。



5、使用传统和基于共生网络的微生物分离



Workflow use to predict key-node taxon and screening of growth-promoting strain.

基于共生网络的微生物纯培养分离

- 1、热泉微生物样品。
- 2、宏基因组提取、16S rRNA基因高通量测序、数据处理、共生网络分析、确认关键节点是否为潜在的促生长菌株。
- 4、促生长菌株的确定及与指示菌株的共培养。
- 5、SCM 培养基的制备。
- 6、稀释度为 10^{-3} 样品涂布于SCM培养基上。
- 7、分离、纯化、鉴定。



5、使用传统和网络定向方法进行微生物分离

SCM培养基的制备

使用R2A琼脂（或Thermus 162琼脂）作为分离的基础培养基，补充10%生长促进菌株培养上清液。所有实验设置3个重复。

为了制备SCM，将生长促进菌株加入含有R2A液体培养基中，55°C，180rpm，黑暗条件下培养。达到生长期平台期后，通过离心（10,000×g）分离上清液和细胞组分。将细胞重悬于10ml PBS缓冲液（pH8.0）中并通过超声破碎。将得到的裂解物在4°C下，12,000×g离心30分钟。将无细胞提取物和上清液过滤灭菌（0.22μm，Millipore，USA），并分别加入到R2A琼脂/ Thermus 162琼脂中，终浓度分别为10%和1%。





6、DNA提取，16S rRNA基因测序，菌株鉴定及系统发育分析

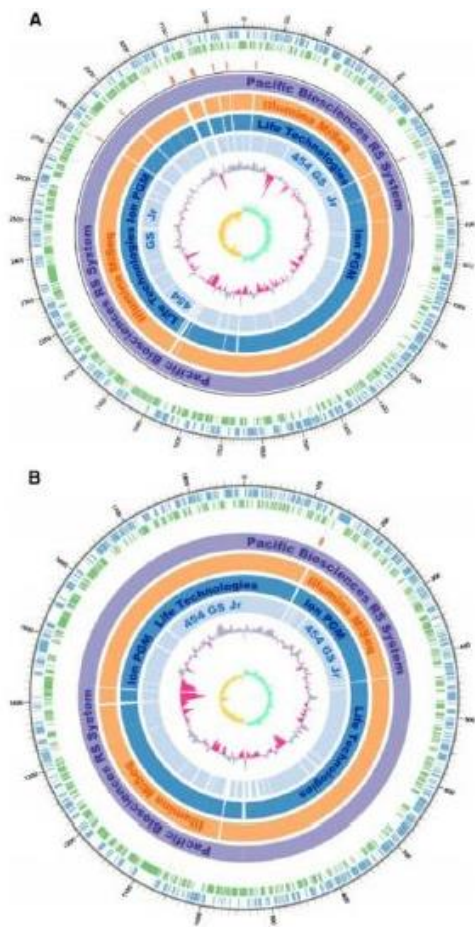
- ✈ 使用Chelex 100 (Bio-Rad, USA) 提取菌株的基因组DNA。
所有测序均在Sangon Biotech Co., Ltd. (中国上海) 进行。
- ✈ 使用EzBioCloud数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>) 与有效发表的身份菌株进行比对，确定分类地位。
通过NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 核苷酸BLAST搜索，将先前未培养的分离物与公开的未培养的基因序列进行比较。
- ✈ 序列相似性阈值98.7%暂时定义为新物种 (Kim *et al*, 2014) 。
95.3-90.0%和小于90%来确定更高的新分类阶元 (Yarza *et al*, 2008) 。
- ✈ 使用MEGA软件包7.0版 (Kumar *et al*, 2016) ，通过最大似然算法进行系统发育分析。

16S rRNA
sequencing





7、比较基因组学分析



比较基因组(Comparative Genomics)是基于基因组图谱和测序基础上,对已知的基因和基因组结构进行比较,来了解基因的功能、表达机理和物种的进化。

为了比较*Tepidimonas*和*Chloroflexus*属成员之间的基因组特征,从JGI数据库 (<https://jgi.doe.gov/>)检索了8个草图基因组。



8、细胞培养上清液的非靶向代谢组学分析

非靶向代谢组学

代谢组(Metabolome)是指细胞、组织、器官或者生物体内的所有小分子代谢组分(主要是相对分子量1000以内的内源性小分子)的集合。

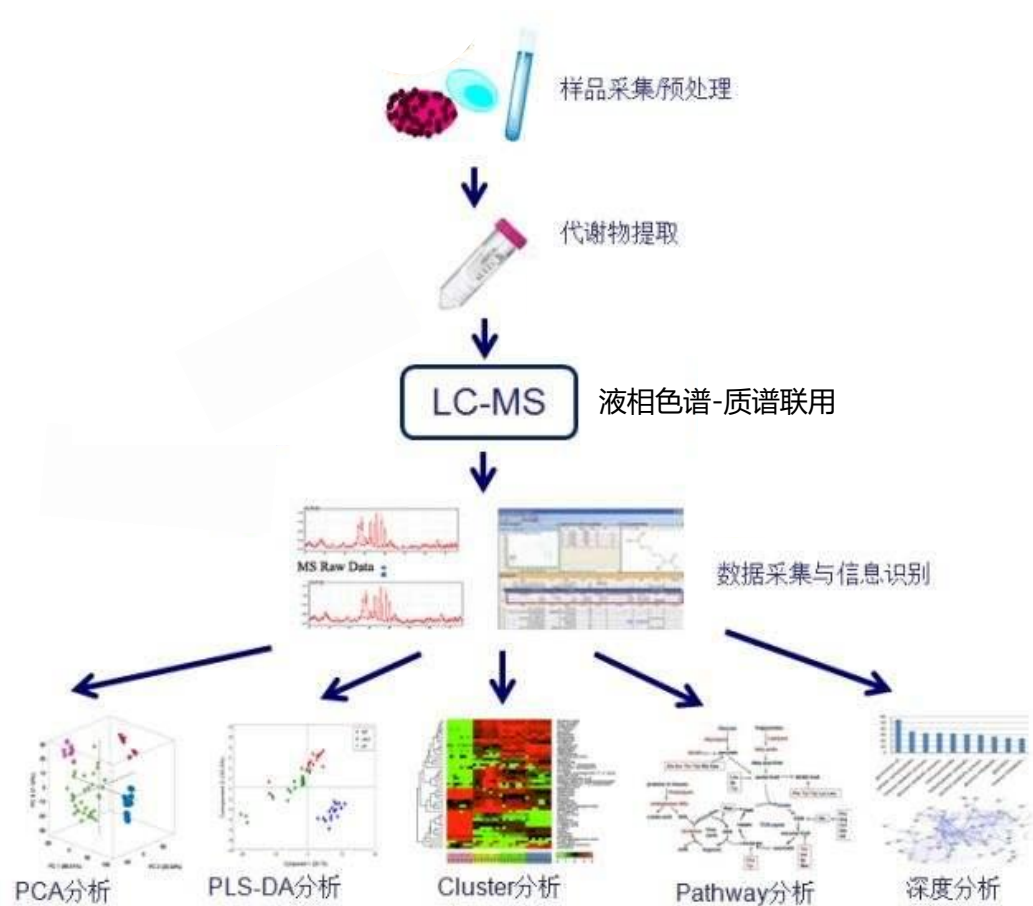
靶向代谢组：对特定的代谢产物在样品中的绝对浓度进行定量测定。

非靶向代谢组学：即发现代谢组学，主要是将对照组和实验组的代谢物进行比对，找出两组间的差异代谢物，同时进行化学成分的鉴定，进一步解释**差异代谢物及其参与的代谢通路**与**相关生物学过程**的关系。



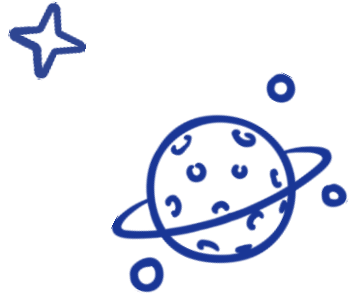


8、细胞培养上清液的非靶向代谢组学分析



提取培养上清液中的代谢物，将100 μ L细菌培养液加入1.5mL Eppendorf管中，离心（14,000 \times g，20min，4 $^{\circ}$ C）。将上清液转移至新的1.5mL Eppendorf管中。最后，加入四倍体积的预冷甲醇，轻轻混合并在-80 $^{\circ}$ C下温育过夜。将混合物在4 $^{\circ}$ C以14,000 \times g离心10分钟，并将得到的上清液转移到新的Eppendorf管中。

使用液氮将颗粒干燥并储存在-80 $^{\circ}$ C冰箱中直至进一步使用。使用Q Exactive Orbitrap (Thermo, CA) 进行非靶向代谢组学分析。

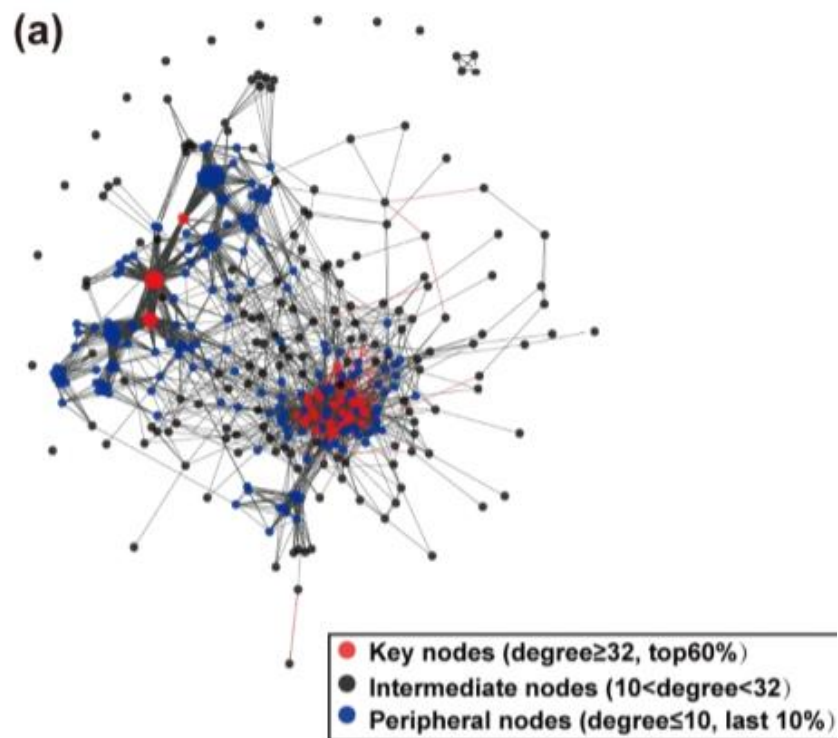


PART 03

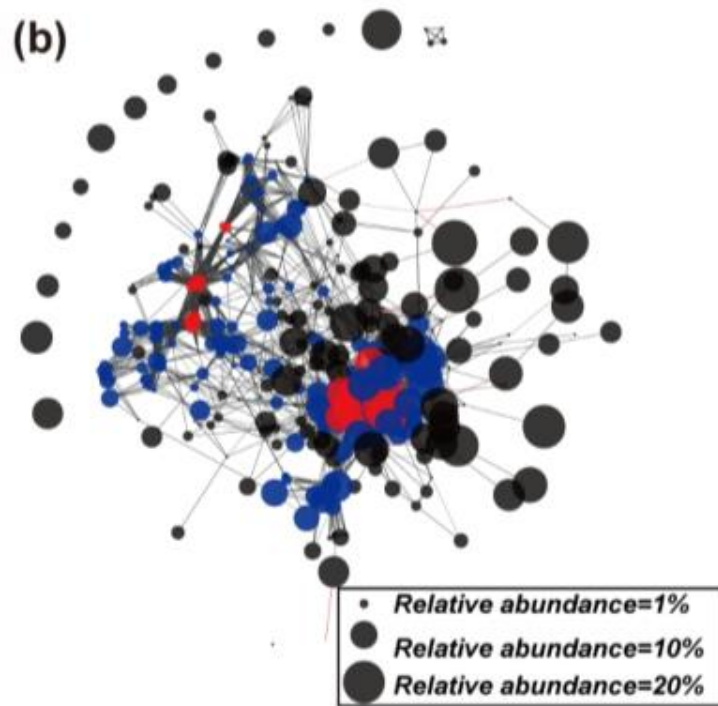
Results



1、宏基因组测序和共现网络分析



来自西藏热泉样本，共有365个OTU在的宏基因组的水平上注释。其中，53个OTU被检测为关键节点（图2a）。



共生网络中的外围节点由168个OTU组成，其中 *Chloroflexus* (17.5%)，*Thermus* (9.51%) 和 *Roseiflexus* (7.3%)，共占外围节点的34.3%。

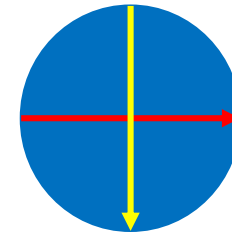
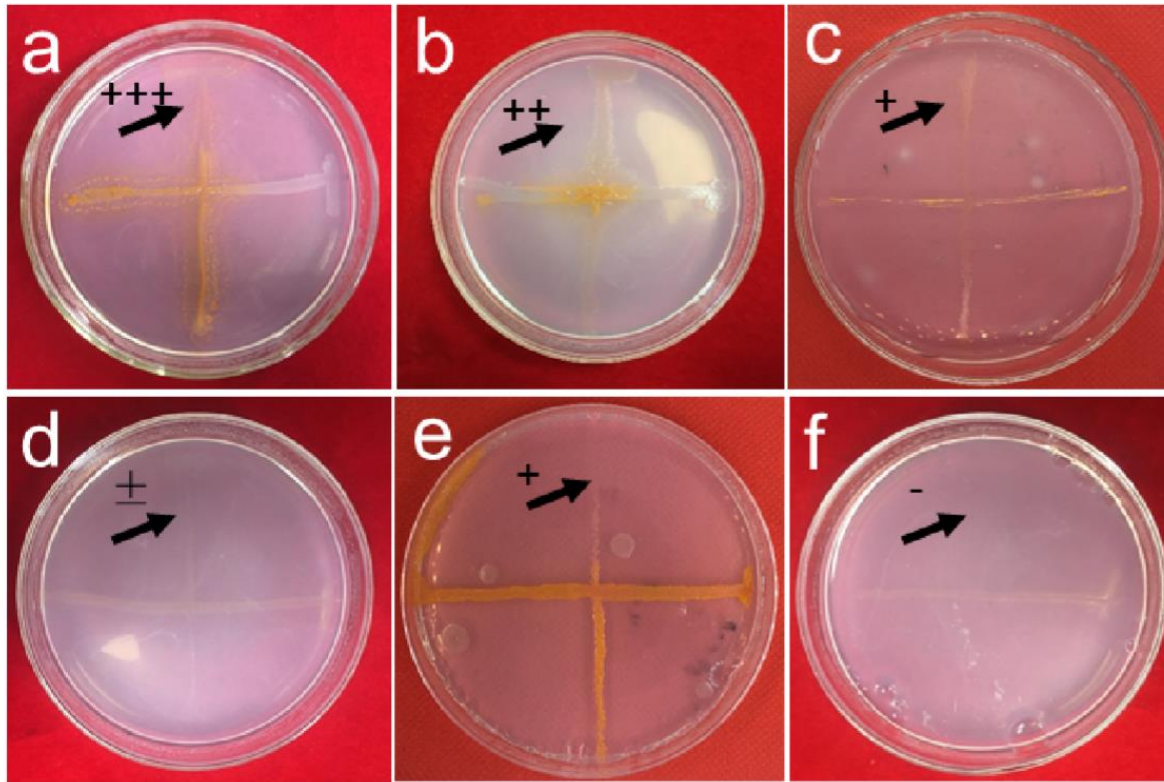
2、关键节点菌株培养及SCM培养基制备

在HSMS网络中被确定为关键节点OTU，通过使用常用分离培养基（R2A、T5、CC、Thermus 162 agar）分离得到*Tepidimonas*（台湾温单胞菌属），*Sandaracinobacter*和*Sphingomonas*（鞘脂单胞菌属）菌株。前期研究表明，可产生潜在促生长因子。

选择存在于外周节点，生长缓慢的*Chloroflexus* sp. SYSU G00190R（190R）作为指示菌，该菌株与*Chloroflexus islandicus* isl-2^T的16S rRNA基因序列相似性为99.2%。

2、关键节点菌株培养及SCM培养基制备

使用上述潜在促生长因子代表菌株与指示菌株交叉接种进行初步生长促进试验。



key node strains

190R

黑暗条件下, 55°C培养3d:

与*Tepidimonas* sp. SYSU G00190W (a)

共培养时, 促190R生长效果最好。

Key node strains:

(a) *Tepidimonas* sp. SYSU G00190W

(b) *Tepidimonas* sp. SYSU G00470

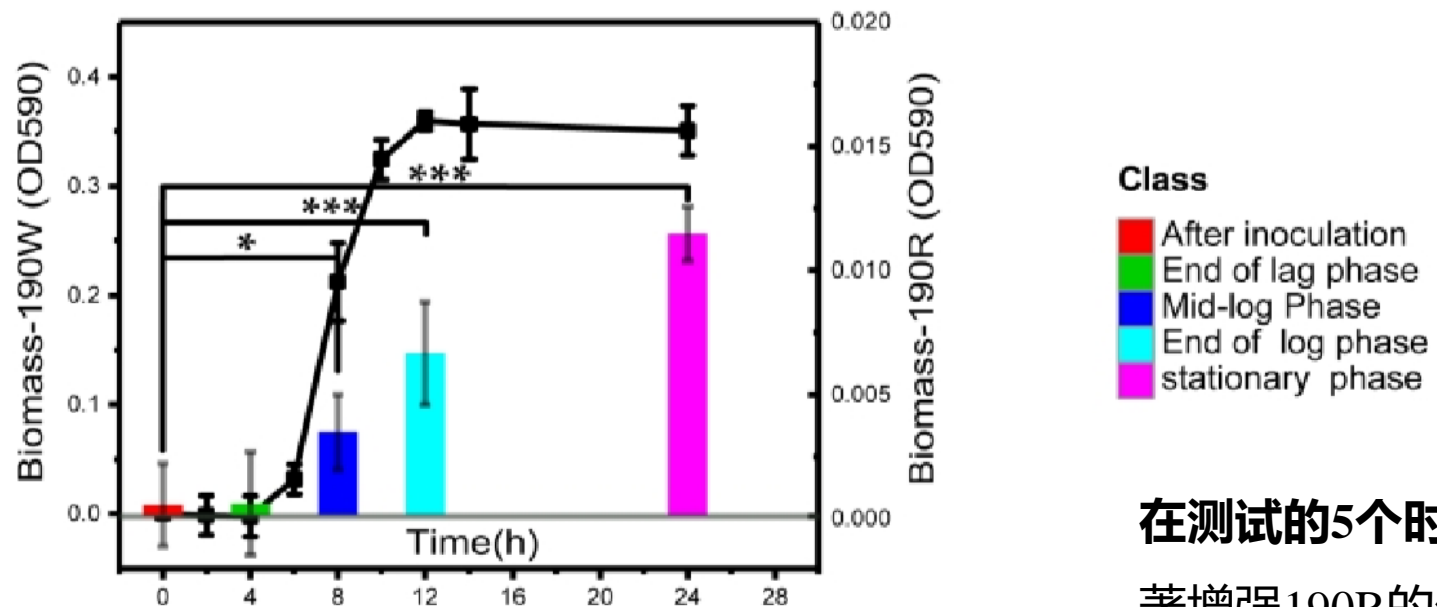
(c) *Sandaracinobacter* sp. SYSU GA8533

(d) *Sandaracinobacter* sp. SYSU GA9328

(e) *Sphingomonas* sp. SYSU G00007

(f) *Thermus* sp. SYSU G00458.

2、关键节点菌株培养及SCM培养基制备



曲线：190W的生长情况

直方图：不同时间段，10%190W培养上清液对190R的生长促进效果

在测试的5个时间段中：8、12和24h培养上清液显著增强190R的生长 ($p < 0.05$) ；

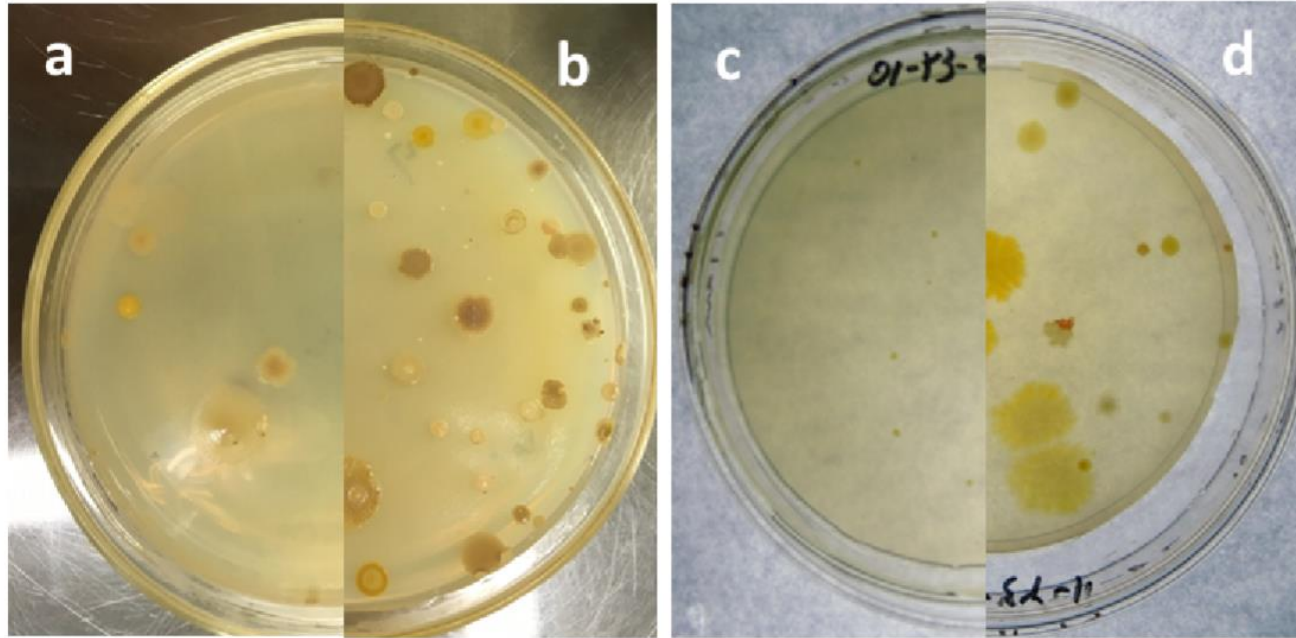
在8、12和24h三个时间段中：12-24h的上清液也显著增强了190R的生长 ($p < 0.001$) 。

选择190W培养24小时上清液用于制备SCM培养基。

(SCM：R2A或Thermus 162培养基添加10%190W培养上清液) 。

3、传统与SCM分离培养的差异

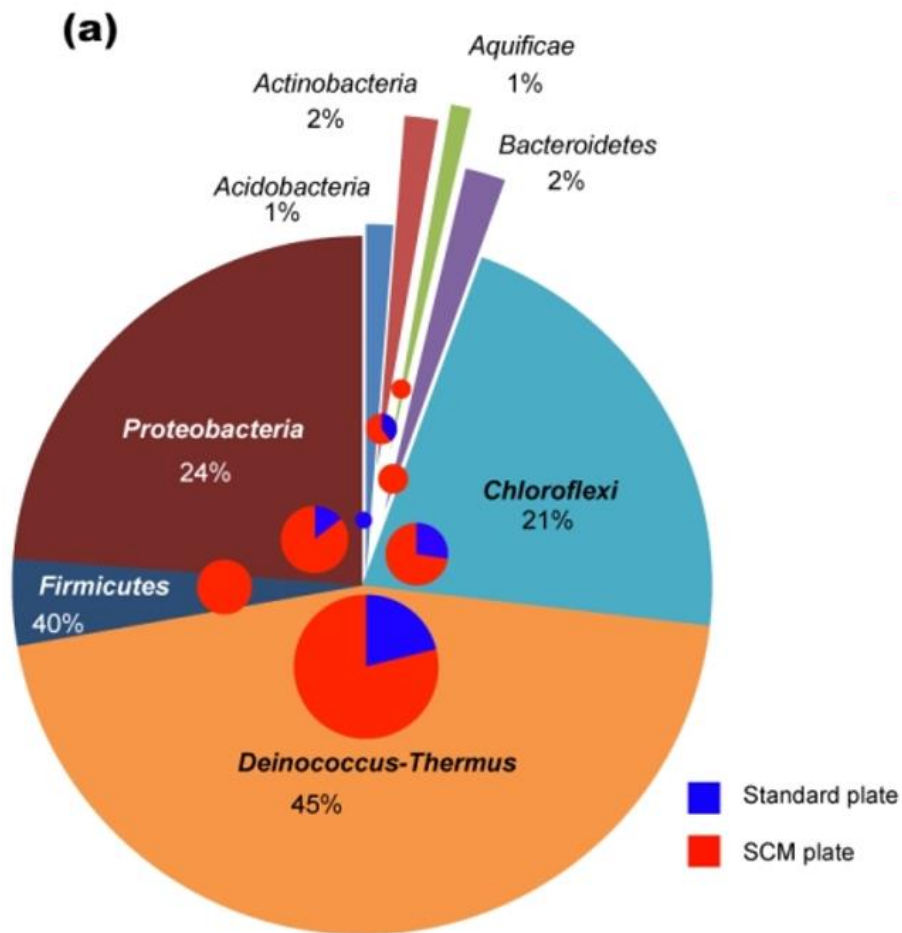
Fig. S2. Representative plates comparing the difference between traditional (a, c) and SCM (b, d). The isolation plates shown in the figures below are taken after 1-week incubation at 55°C using Y3 samples.



Medium used:

- (a) R2A agar
- (b) R2A agar + 10% spent culture supernatant
- (c) *Thermus* 162 agar
- (d) *Thermus* 162 agar + 10% spent culture supernatant

3、传统与SCM分离培养的差异

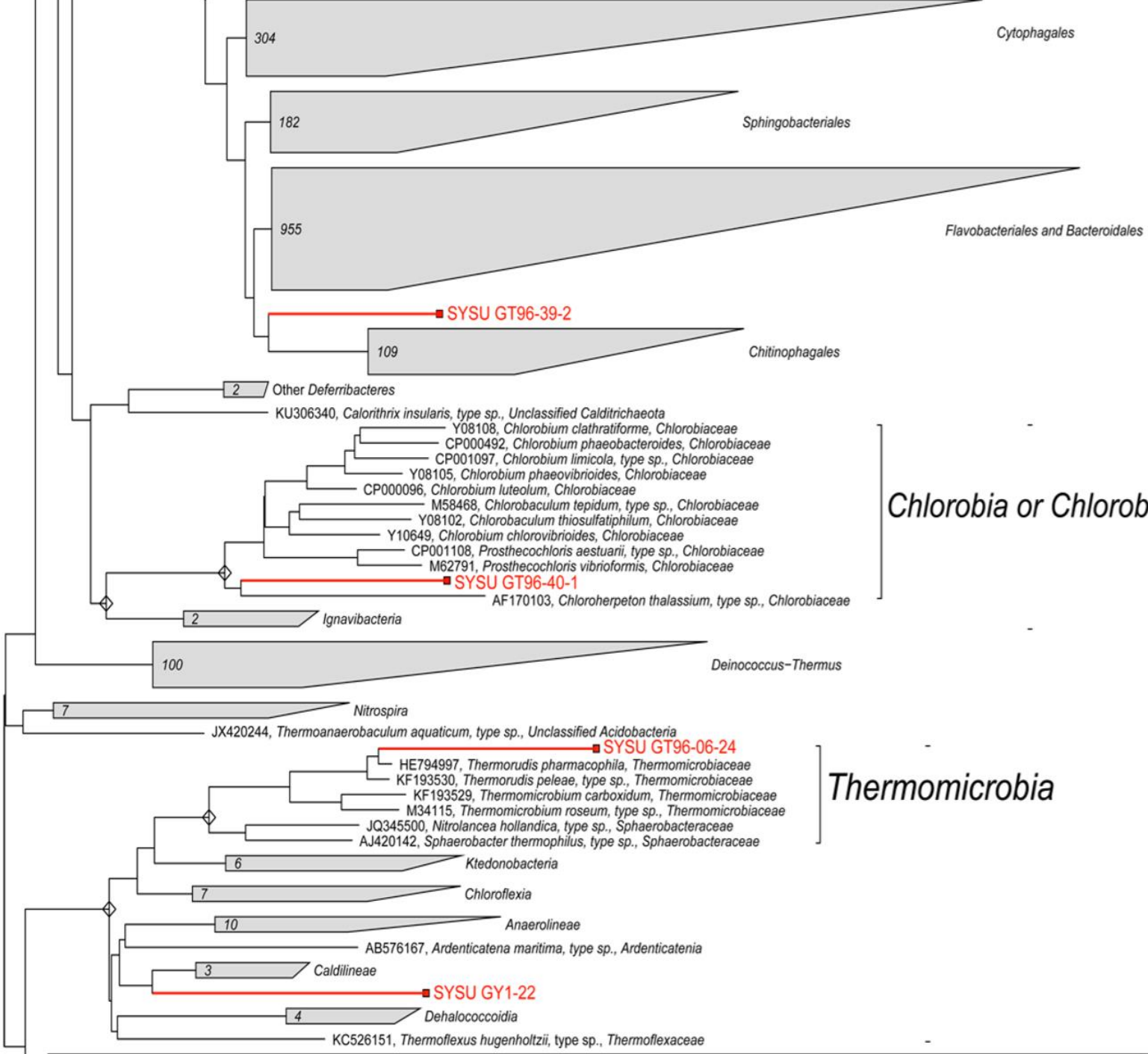


共分离得到319株细菌，分布于以下8个门：

Acidobacteria (4株)、*Actinobacteria* (5株)、*Aquificae* (3株)、*Bacteroidetes* (6株)、*Chloroflexi* (69株)、*Deinococcus-Thermus* (142株)、*Firmicutes* (13株)、*Proteobacteria* (77株)。

其中，75% (239株) 菌株从SCM培养基上分离得到，包括113个潜在候选新物种。

Chloroflexi: SCM平板 (57株)，传统分离培养基 (2株)。



Bacteroidetes 拟杆菌门

Chlorobia or Chlorobea **Chlorobi** 绿菌门

Thermomicrobia

Chloroflexi 绿弯菌门

3、传统与SCM分离培养的差异

Table S2. Media used in the current study.

Media	Composition (g/L)
Reasoner's 2A (R2A) agar [DSM 830 medium]	Yeast extract 0.5, peptone 0.5, casamino acids 0.5, glucose 0.5, starch 0.5, K ₂ HPO ₄ 0.3, MgSO ₄ 0.05, Sodium pyruvate 0.3, agar 20, pH 7.2
CC agar	Microcrystalline cellulose 1.0, casamino acids 1.0, KNO ₃ 0.2, Na ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01, Agar 20, pH 7.5
<i>Thermus</i> 162 agar medium (DSM 878 medium)	Yeast extract 1.0, tryptone 1.0, nitrilotriacetic acid 100.0 mg, CaSO ₄ ·2H ₂ O 40.0 mg, MgCl ₂ ·6H ₂ O 200.0 mg, 0.01 M Fe Citrate 0.5 mL, Trace element solution 0.5 mL, Phosphate buffer 100.0 mL, Agar 28.0, pH 7.2. <ol style="list-style-type: none">1. Phosphate buffer (g/L) [KH₂PO₄ 5.44, Na₂HPO₄·12H₂O 43.0, pH 7.2].2. Trace element solution (g/L) [MnSO₄·H₂O 2.28, ZnSO₄·7H₂O 0.5, H₃BO 0.5, CuSO₄·5H₂O Na₂MoO₄·2H₂O 25.0 mg, CoCl₂·6H₂O 45.0 mg]
T5 agar	Tryptone 0.5, yeast extract 2.0, glucose 1.0, lotus root starch 1.0, agar 20, pH 7.2

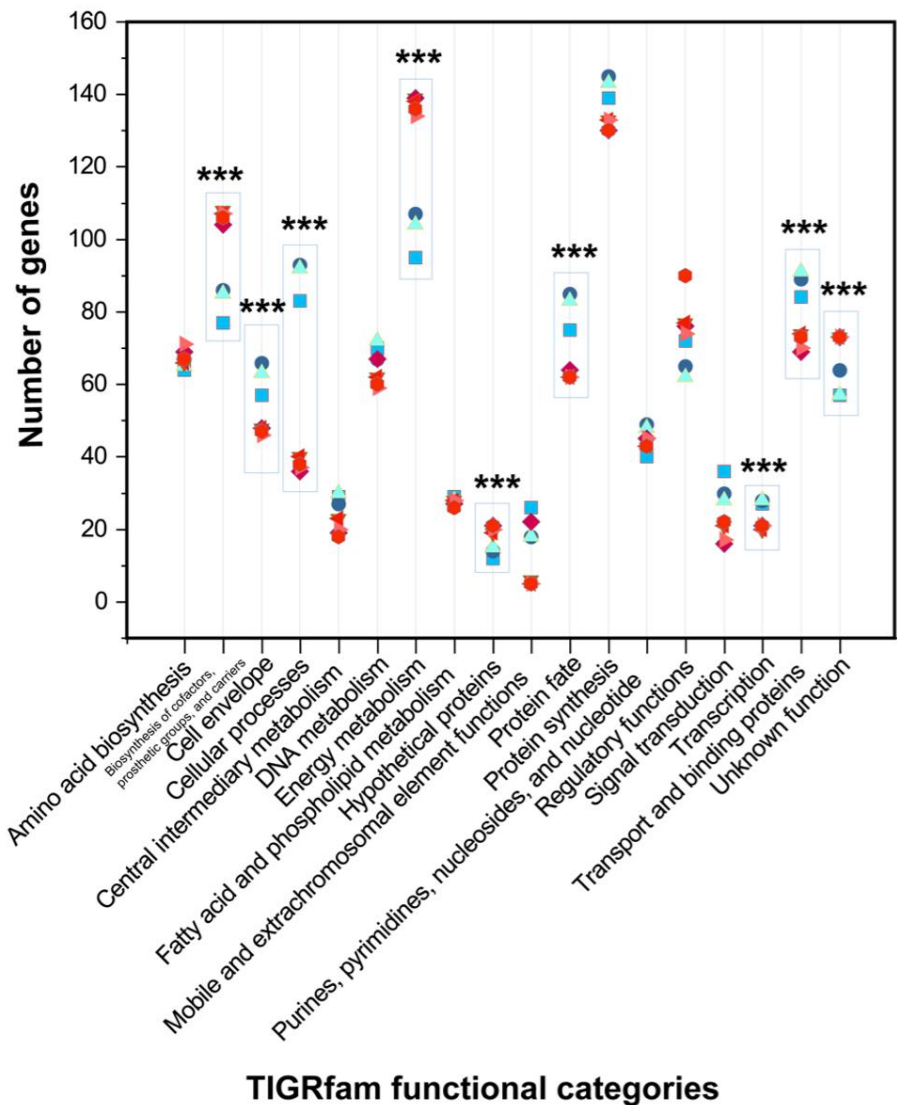
将113个潜在候选新物种分别接种在SCM培养基和传统培养基 (R2A, T5, CC, *Thermus* 162) 上:

所有菌株在SCM平板上有效生长;
在传统培养基上生长效果不好, *Thermus* 162 (5株), R2A (8株), T5 (无) 和CC (无)。

验证SCM培养基 (10%190W培养上清液) 的促生长功效。

4、*Tepidimonas*和*Chloroflexus*基因组比较

Tepidimonas (台湾温单胞菌属) 和*Chloroflexus* (绿弯菌属) 8个草图基因组分析:



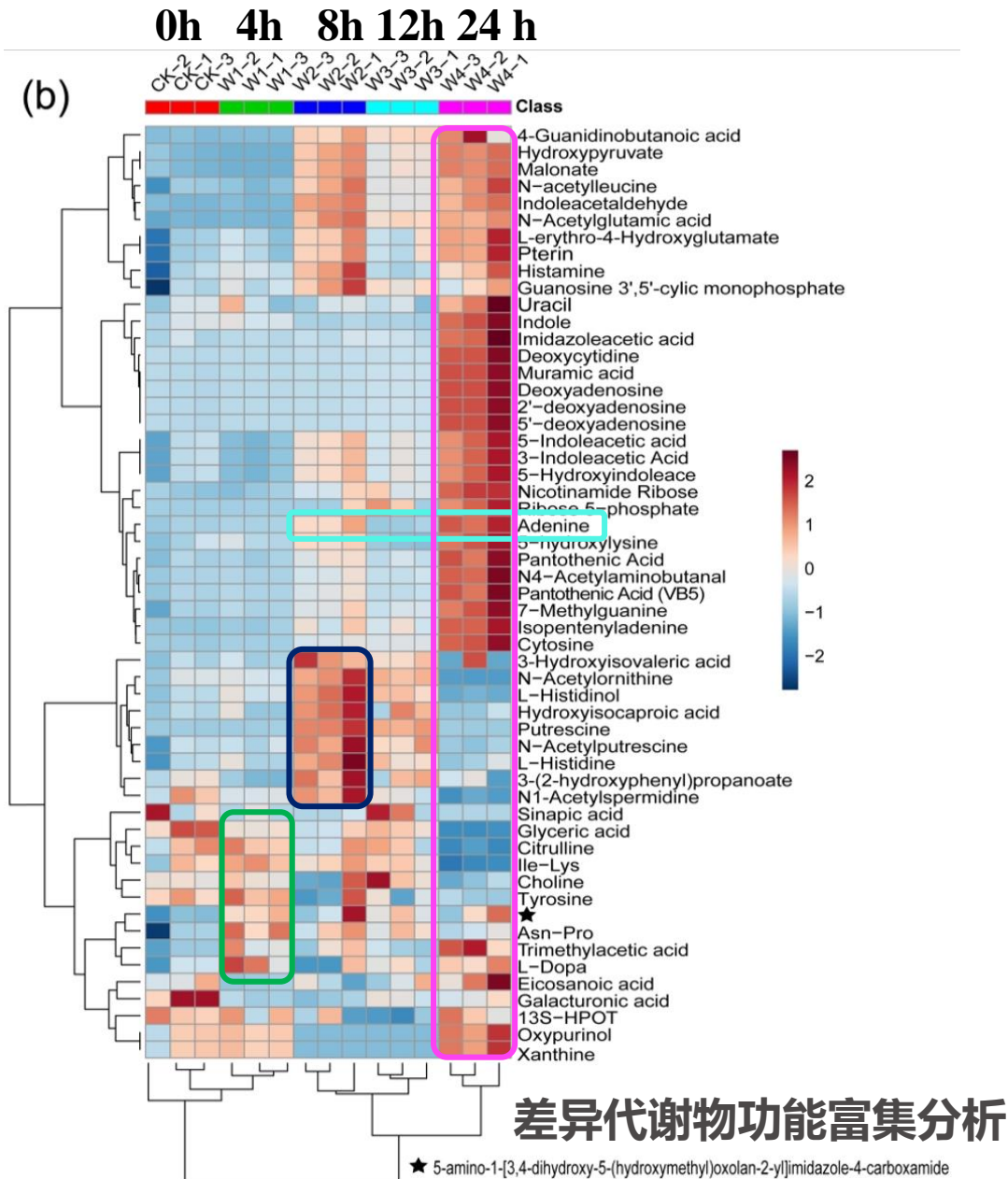
- *T. ignava*_DSM 12035_2784746798
- *T. taiwanensis*_VT154-176_2684622515
- ▲ *T. taiwanensis*_MB3_2630968750
- ▼ *C. aurantiacus*_Y-401-fl_643692015
- ◆ *C. aggregans*_DSM 9486_643348527
- ◀ *C. aurantiacus*_J-11-fl_641228485
- ▶ *C. sp.*_Y-396-2_2506520040
- *C. islandicus*_isl-3_2775507287

细胞被膜、
细胞加工、
转运、
转运和结合蛋白

TIGR (The Institute for Genomic Research)

*Tepidimonas*基因组转运和结合蛋白相关的基因数量显著高于*Chloroflexus* ($p < 0.001$)。

5、Tepidimonas sp. SYSU G00190W非靶向代谢组学分析



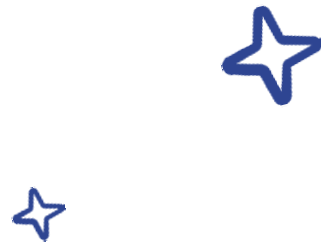
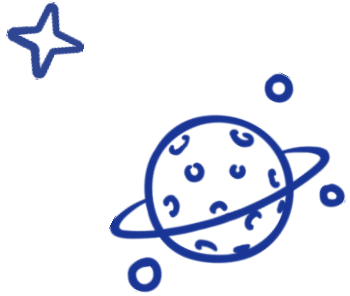
检测190W不同时间段培养上清液低分子量有机物质（LMWOS: low molecular weight organic substances）的成分。

停滞期（4h）：氨基酸和类似物。

进入指数期（8h）：这些化合物被消耗，异戊烯基腺嘌呤，胞嘧啶，吡咯-2-甲酸，羟基丙酮酸开始积累。

指数期结束（12h）：腺嘌呤含量降低（从5倍到1倍）。

稳定期（24h）：大量小分子化合物开始积累。



PART 04

Discussion



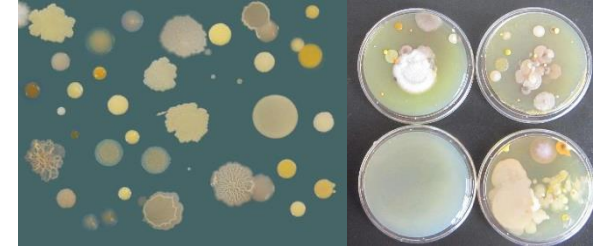
From interaction to network

1985年Staley和Konopka提出：

“伟大的平板，计数太偏” (Great plate count anomaly)：

描述了平板培养菌落计数与自然环境中微生物实际数量之间存在显著差异的现象。

迄今，未培养的微生物被生动地描绘成微生物界的“暗物质” (dark matters)。



长期以来，对于微生物群落相互作用考虑并不充分，微生物在生态环境中并不是作为独立的个体繁殖，而是种群之间发生各种的相互作用，在复杂的多种群落中繁衍生息。

Interaction !

前期研究表明，HSMM中微生物细胞与细胞距离足够短（约 $100\mu\text{m}$ ），可扩散代谢物到达相邻细胞 (Cordero, Datta *et al* , 2016)。对于其中的个体，周围的微生物类群代表最复杂和关键的“环境因素”。

From interaction to network

本研究通过共生网络（Co-occurrence network）探究微生物不同群落之间的相互关系。

研究表明：共生网络定向分离对于培养先前不可培养的微生物是有效的。

HSMM生态环境中，低丰度分类群如*Tepidimonas*（相对丰度：0.014%）对网络作出了重大贡献，并在微生物群落中发挥重要作用。

Chloroflexus 和 *Roseiflexus* (FAPs)是 HSMM生态系统中的优势种群，但存在于网络外围节点，与周围细菌联系不紧密。

作为HSMM生态系统的生产者，为群落储存碳、氮源，维护群落结构的稳定性，并保护低丰度稀有细菌物种。相反，低丰度稀有群体通过释放必需营养素或信号分子来帮助调节群落。

Network !

From network to isolation

近年来，科研工作者们不断探索微生物培养的方法。新型培养技术和培养基的研发，过去被认为不可培养或难培养的微生物，也越来越多地实现了可培养，新的微生物物种也陆续被鉴定，扩展了微生物资源。

面对热泉的高温特性与多变性，在微生物可培养方法上仍面临巨大的挑战。仍需探索适合该环境的微生物纯培养技术，争取培养出更多的“嗜热未培养微生物”，从而进一步研究热泉中的微生物生命现象，实现热泉中嗜热微生物资源的合理开发与利用。



From network to isolation

Isolation !

微生物具有复杂的相互作用，在长期协同进化过程中起着功能性分化作用，**98%的环境微生物是营养缺陷型**，彼此之间通过协作共同维持生态系统的稳定性。

本研究中，FAP（外围节点）与关键节点建立了强大的相关性。*Tepidimona* 与 *Chloroflexus* 的成员之间尤为显著。因此，将 *Tepidimonas* 的细胞外分泌物添加到传统培养基中，作为靶向分离 FAP（*Chloroflexi*）的生长诱导剂。

From isolation to metabolome

Metabolome !

非靶向代谢组学结果表明：在生长稳定期（24h），190W的上清液检测到大量代谢物的积累。

脱氧胞苷（增加78.9倍）： DNA复制的底物。在某种程度上，增加该底物的可用性降低了DNA生物合成的能量成本，从而使慢生长物种得以持续性生长。

异戊烯基乳酸或细胞分裂素（增加44.8倍，第二大积累的化合物）： 植物生长调节剂，是否促进细菌的生长还有待进一步研究。

吲哚及其衍生物： 细菌种内和种间化学信号传导剂，生长调节剂，影响细菌行为。

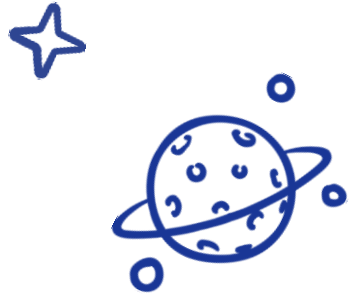
190W分泌的代谢产物中含有大量细菌生长促进或调节化合物。

Conclusions



本研究通过共生网络分析，制备SCM培养基，靶向分离难以在传统的分离培养基上生长的细菌菌株，该方法成功分离得到113个潜在候选新物种，其中四株菌16S rRNA 基因相似性小于 90%，分属于 *Chloroflexi* (2株) ， *Chlorobi* (1株) 和 *Bacteroidetes* (1株) 。

本研究强调了解微生物群落相互作用对于成功分离得到以前未培养细菌的重要性。



Thank You

敬请各位老师同学批评指正
