




读书报告


汇报人：程利娇

时间：2019.03.31

Article | [OPEN](#) | Published: 14 March 2019

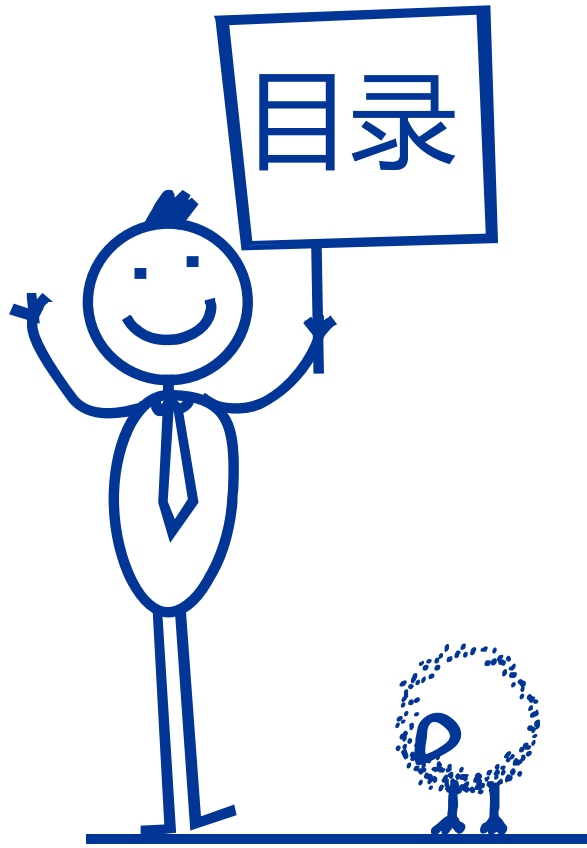
Two Chloroflexi classes independently evolved the ability to persist on atmospheric hydrogen and carbon monoxide

Zahra F. Islam, Paul R. F. Cordero, Joanna Feng, Ya-Jou Chen, Sean K. Bay, Thanavit Jirapanjawat, Roslyn M. Gleadow, Carlo R. Carere, Matthew B. Stott, Eleonora Chiri & Chris Greening 

The ISME Journal (2019) | [Download Citation](#) 

IF: 9.328

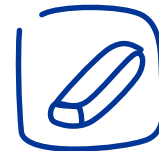




1. Introduction



2. Materials and methods



3. Results and discussion



PART 01

Introduction

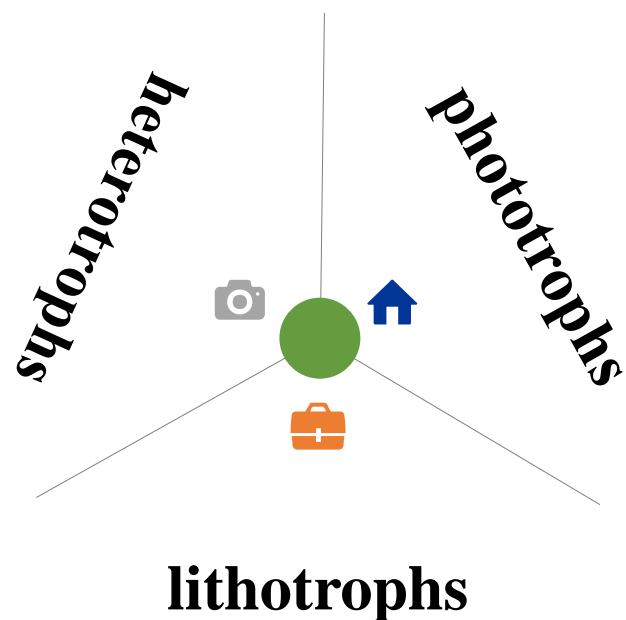


Introduction

Chloroflexi 细菌在自然界微生物群落中广泛存在。全球调查报告显示，4.3%的土壤细菌和3.2%的海洋细菌属于Chloroflexi。大量存在的原因之一是其代谢多样性。



目前，在有氧和厌氧环境条件下，Chloroflexi发现的可培养菌株根据代谢类型主要划分为：



异养细菌



不能利用大气中的 CO_2 , 必须从环境中获得相对复杂的有机碳分子。

无机营养菌（自养菌）



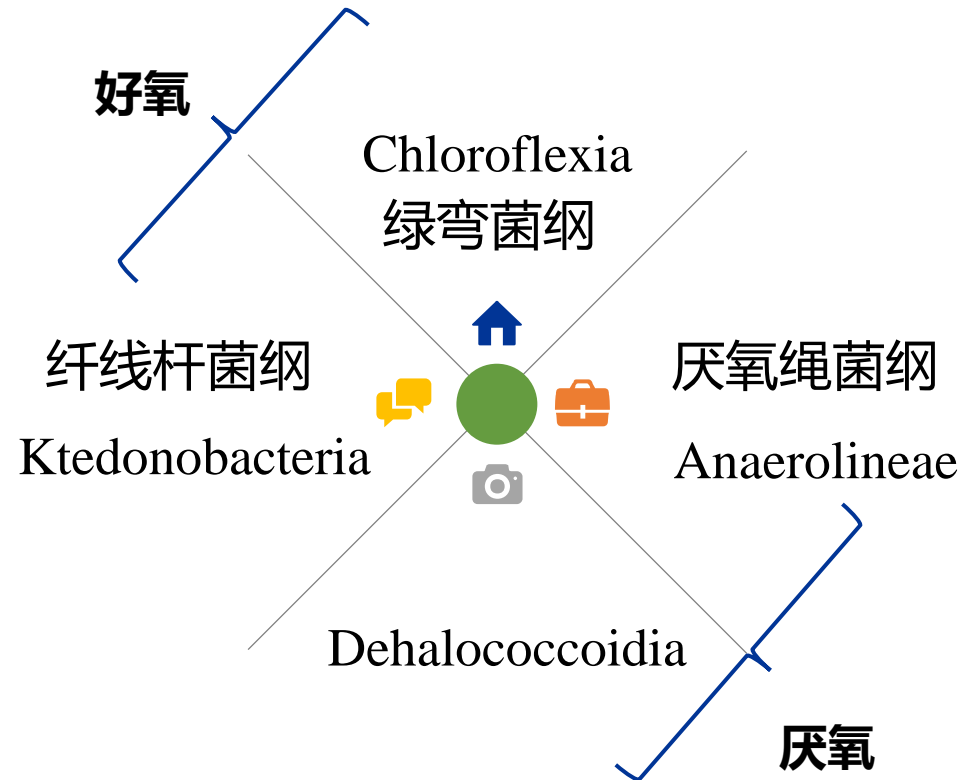
有高度合成能力，利用 CO_2 或碳酸盐作为唯一碳源的细菌。

光能自养菌



利用光作为代谢能源的细菌；含叶绿素的细菌。

Genome Taxonomy Database



Studies have provided insight into the metabolic strategies that **anaerobic** classes within the phylum use to adapt to oligotrophic niches.

However, surprisingly little is known about **how aerobic heterotrophic Chloroflexi colonise oxic environments.**

Genomic and metagenomic studies have revealed that Chloroflexi encode **carbon monoxide dehydrogenases** (一氧化碳脱氢酶) and **hydrogenases** (氢化酶) known to mediate aerobic respiration of these gases.



Chloroflexi isolates have been shown to aerobically oxidise CO at a range of environmentally significant concentrations:

Thermomicrobium roseum DSM 5159^T consumes high concentrations of CO when available during growth and multiple *Thermogemmatispora* isolates have been shown to oxidise CO, including *T. carboxidovorans* to atmospheric concentrations (0.10 ppmv).

While H_2 oxidation has yet to be reported in *Thiomargarita*, strains of the phylum are known to encode **hydrogenase (镍铁氢化酶)**.

镍铁氢化酶具有催化分裂重组氢分子的功能，由于其独特的活性中心结构和催化性能，可方便、廉价利用氢能源。

To date, atmospheric H_2 oxidation has only been confirmed in **Actinobacteria (放线菌)** and **two acidobacterial (酸杆菌)** isolates.

This enzyme class has been shown to support bacterial persistence by mediating oxidation of atmospheric H_2 (0.53 ppmv).



PART 02

Materials and methods





Materials: Bacterial strains

Thermomicrobium roseum DSM 5159^T and *Thermogemmatispora* sp. T81^T

DSM 5159^T: class Chloroflexia, formerly class Thermomicrobia, a strain originally isolated from Toadstool Spring of Yellowstone National Park, USA.

T81^T : class Ktedonobacteria, a cellulolytic thermophilic strain which we previously isolated from geothermal soils in Tikitere, New Zealand. (2017.02)





Materials: Bacterial strains

Thermomicrobium roseum DSM 5159^T

This obligately aerobic bacterium is known to grow heterotrophically on a variety of **carbohydrate (碳水化合物)**, **organic acids (有机酸)**, and **proteinaceous (蛋白质)** substrates.

Previous analyses have shown DSM 5159^T encodes **a type I carbon monoxide dehydrogenase** and **a group 1h [NiFe]-hydrogenase**, and **can oxidise high concentrations of CO**.

However, the bacterium appears to be incapable of supporting chemolithoautotrophic growth (**自养**) and lacks key enzymes for the **Calvin-Benson cycle**.



Methods 1: Culture of strains

T. roseum DSM 5159^T:

30 mL Castenholz media supplemented with 1 g L⁻¹ yeast extract and 1 g L⁻¹ tryptone.

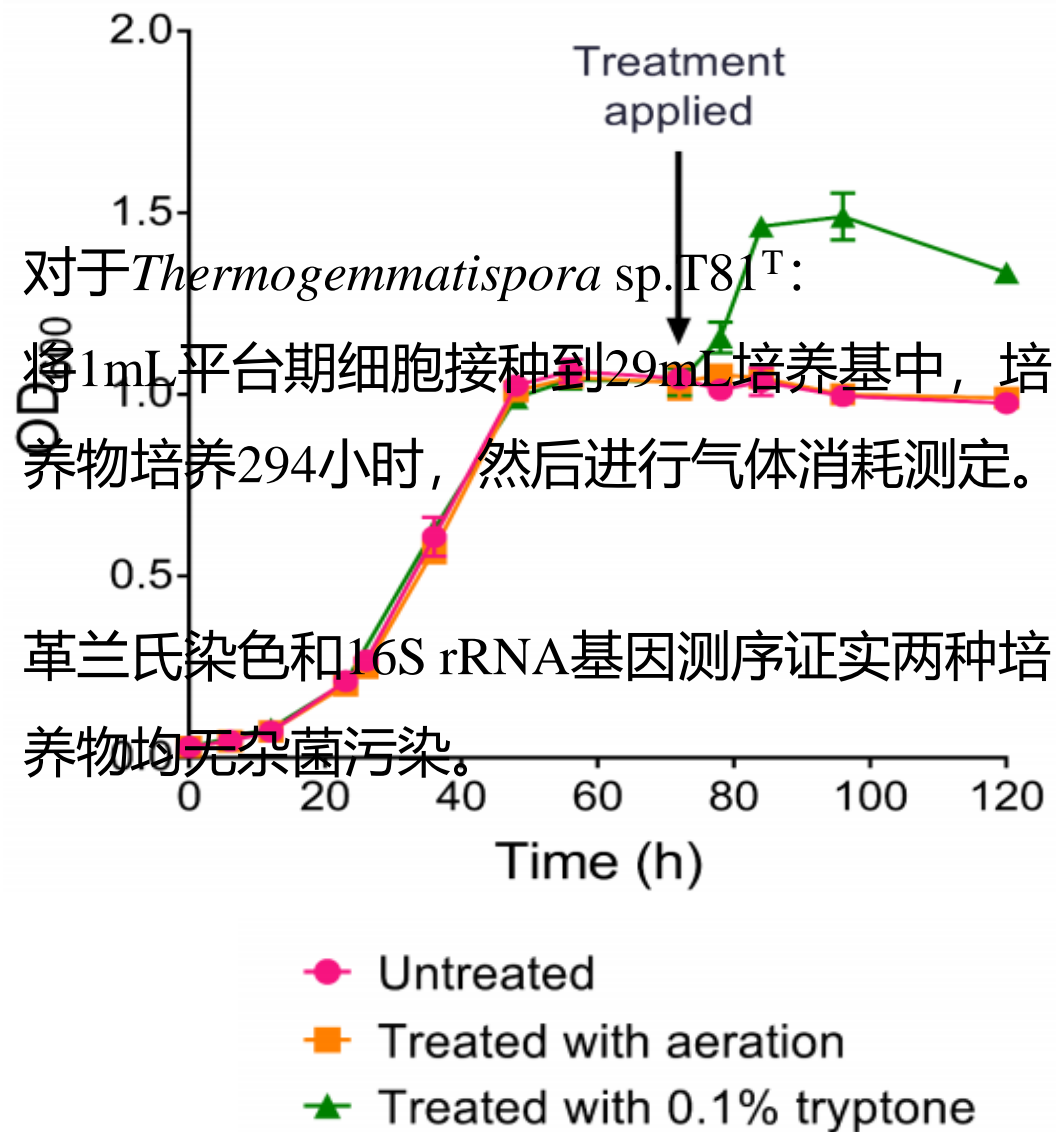
Thermogemmatispora sp. T81^T:

30 mL 10% R2A media.

60 °C, 150 rpm/min 培养

对于*T.roseum* 5159^T, 初始接种OD600为0.03, 48小时进入平台期 (OD_{max} = 0.75至1.0) 。

菌株由于营养限制而不是氧限制而进入生长平台期。





Methods 2: Transcriptomics

转录组测序 (RNA-Seq) 用于比较营养丰富和营养物耗尽时期 *T.roseum* 5159^T 的基因表达。

营养丰富期 (指数期: 10 mL, OD 600为0.3)

营养物耗尽 (平台期: 10 mL, OD 600为0.75)

通过离心 (21,000×g, 15min, 4°C) 分别获得每个时期的样品三份, 除去上清液, 并将细胞沉淀重悬于1mL RNAlater稳定溶液 (ThermoFisher Scientific) 中, 然后冷冻至 -20°C。之后进行RNA提取及全转录组测序。



Methods

3、 Gas chromatography:

采用气相色谱法测定两株Chloroflexi菌株是否可以使用大气中的CO和H₂。

4、 Kinetic measurements:

通过比较不同底物浓度下的气体消耗率来测量培养物中H₂和CO氧化的全细胞动力学参数。

5、 Activity staining:

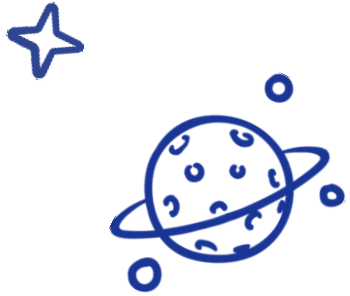
使用菌株平台期培养物的全细胞裂解物对氢化酶和一氧化碳脱氢酶活性进行染色。

6、 Electrode measurements:

对于培养物，用电流法测定呼吸链解耦联剂（CCCP）处理前后H₂氧化速率。

7、 Phylogenetic analyses:

构建系统发育树用于研究Chloroflexi门氢化酶和一氧化碳脱氢酶的进化历史和分布。



PART 03

Results and discussion



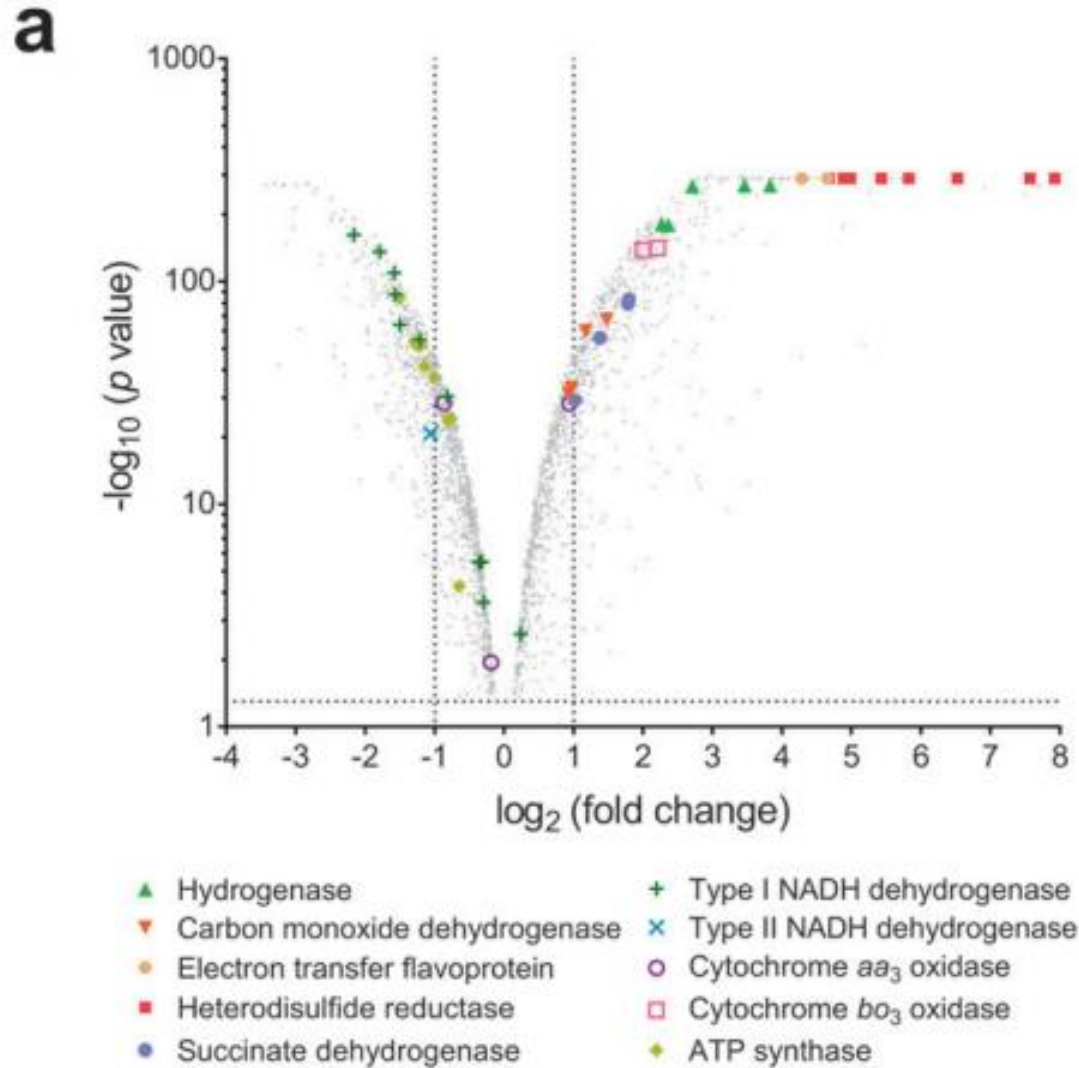
1、 *Thermomicrobium roseum* upregulates hydrogenase and carbon monoxide dehydrogenase expression during a coordinated response to nutrient starvation

营养丰富（指数生长）和营养限制（平台期）不同时期样品转录组测序结果表明：**共有401个基因明显上调，539个基因明显下调至少两倍 ($p < 10^{-6}$)，以响应营养限制。**

T. roseum 5159^T基因表达差异火山图(Volcano Plot):

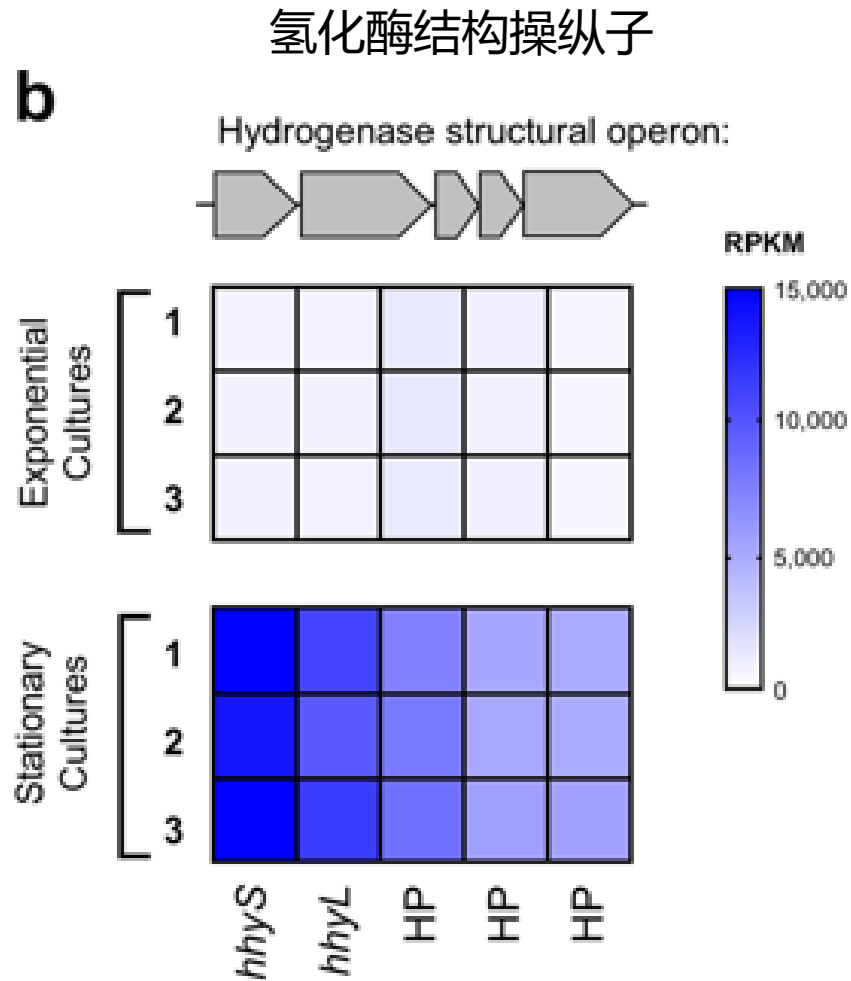
在能量获取和利用方面:

- 1、与**能量消耗**过程相关的基因被**下调**。包括编码核糖体蛋白，细胞色素c和甲基萘醌生物合成酶的相关基因等。
- 2、**内部存储碳源的利用**。3-羟基丁酮脱氢酶，电子转移黄素蛋白。
- 3、**呼吸链的改变**。参与异养生长的两种主要呼吸脱氢酶（I型和II型NADH脱氢酶）下调，参与无机营养能量生成和琥珀酸脱氢酶（sdhA-D）复合物被上调（图1a；表s1）。



1、 *Thermomicrobium roseum* upregulates hydrogenase and carbon monoxide dehydrogenase expression during a coordinated response to nutrient starvation

假定操纵子的标准化丰度热图



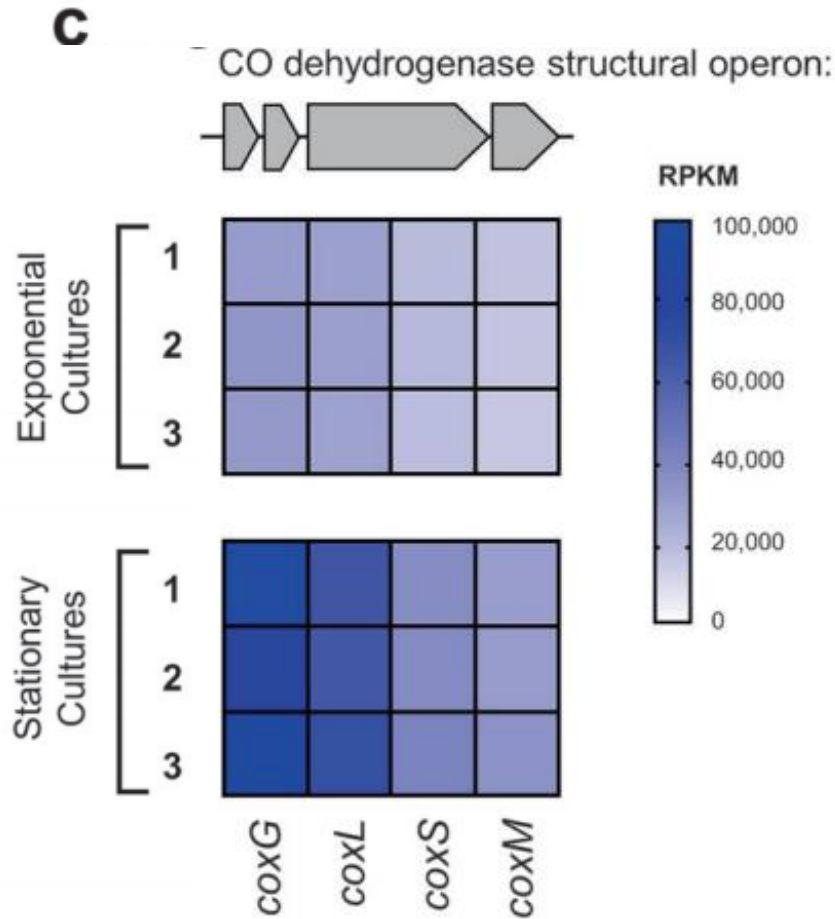
T. roseum 5159^T在营养限制条件下:

与H₂代谢相关的基因上调。编码1h[nife]-氢化酶 (hhyLS) 的结构亚基的基因, 是一类能调节大气H₂氧化的耐氧酶, 平均上调12.6倍。

HP (假定蛋白) 基因表达上调5.5倍。

1、 *Thermomicrobium roseum* upregulates hydrogenase and carbon monoxide dehydrogenase expression during a coordinated response to nutrient starvation

CO脱氢酶酶结构操纵子



在营养限制期间:

与CO代谢相关的基因上调, 一氧化碳脱氢酶基因 (coxGLSM) 平均上调两倍。

与前期关于该生物体生长期间共利用CO的研究一致, 一氧化碳脱氢酶基因在菌株指数期生长期和平台期过程中均高度表达。

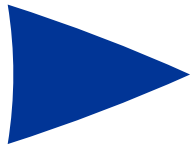
表明 *T. roseum* 5159^T 在生长 (混合营养) 和持续生长过程中通过利用CO来补充有效的有机碳。



小结

1

- 本研究结果与前期在放线菌和变形杆菌中的结果大致相似，即氢化酶和一氧化碳脱氢酶的表达是由有机碳的限制引起。
- *T.roseum* 5159^T在从营养丰富到营养限制条件的转变期间发生的呼吸链的转变，参与利用无机化合物的酶上调，参与O₂利用的基因簇下调。
- 尽管在环境中营养物质波动或受到威胁，但是*T.roseum* 5159^T已经进化出维持有氧呼吸的机制，更具代谢灵活性。



2、 *T. roseum* 5159^T aerobically oxidises H₂ and CO at a wide range of concentrations, including sub-atmospheric levels, during persistence

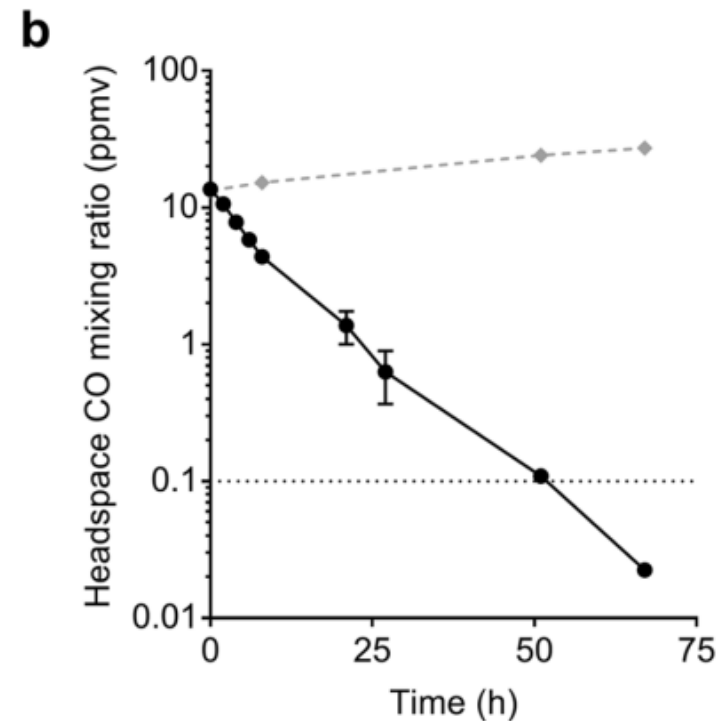
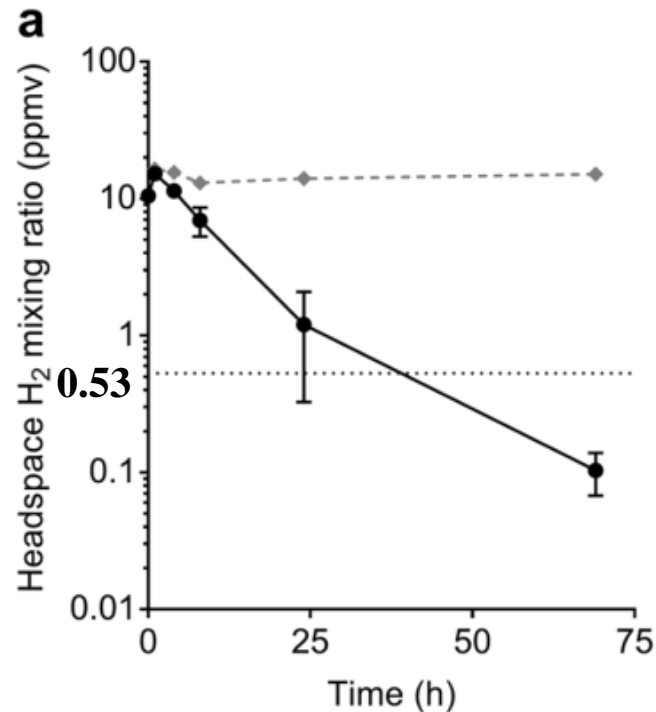
为了测定*T. roseum* 5159^T 在营养限制期对H₂和CO的消耗量，在环境空气中补充约14 ppmv的H₂或CO，培养*T. roseum* 5159^T，并使用气相色谱法监测。

T. roseum 5159^T有氧化H₂和CO的浓度范围广泛，在持续生长期间，气体消耗低于大气水平。

在71 h内，气体（103 ppbv H₂， 22 ppbv CO）的混合比低于大气水平5倍。

本实验是Chloroflexi门内有氧利用H₂呼吸及氧化大气H₂的首次观察。

灰色虚线：阴性对照，热灭活细胞。
对数刻度：H₂和CO的混合比。
虚线：H₂和CO的平均大气混合比。



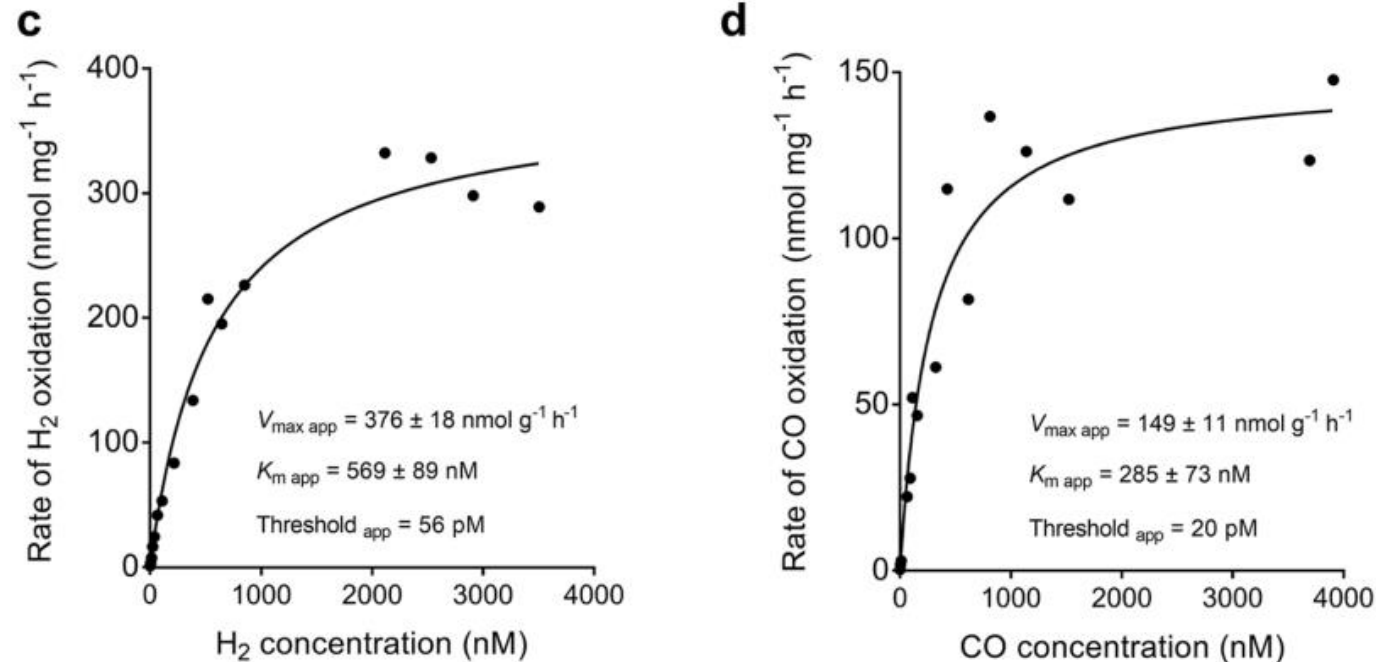
2, *T. roseum* aerobically oxidises H₂ and CO at a wide range of concentrations, including sub-atmospheric levels, during persistence

运用四种表观动力学参数的方法测定*T. roseum* 5159^T全细胞对H₂和CO氧化。

Method	V_{max app} H₂	K_{m app} H₂	V_{max app} CO	K_{m app} CO
Nonlinear regression	376	569	149	285
Lineweaver-Burk plot	319	688	175	427
Hanes-Woolf plot	372	624	133	220
Eadie-Hofstee plot	377	639	137	244
Average	361	630	149	294

2、 *T. roseum* aerobically oxidises H₂ and CO at a wide range of concentrations, including sub-atmospheric levels, during persistence

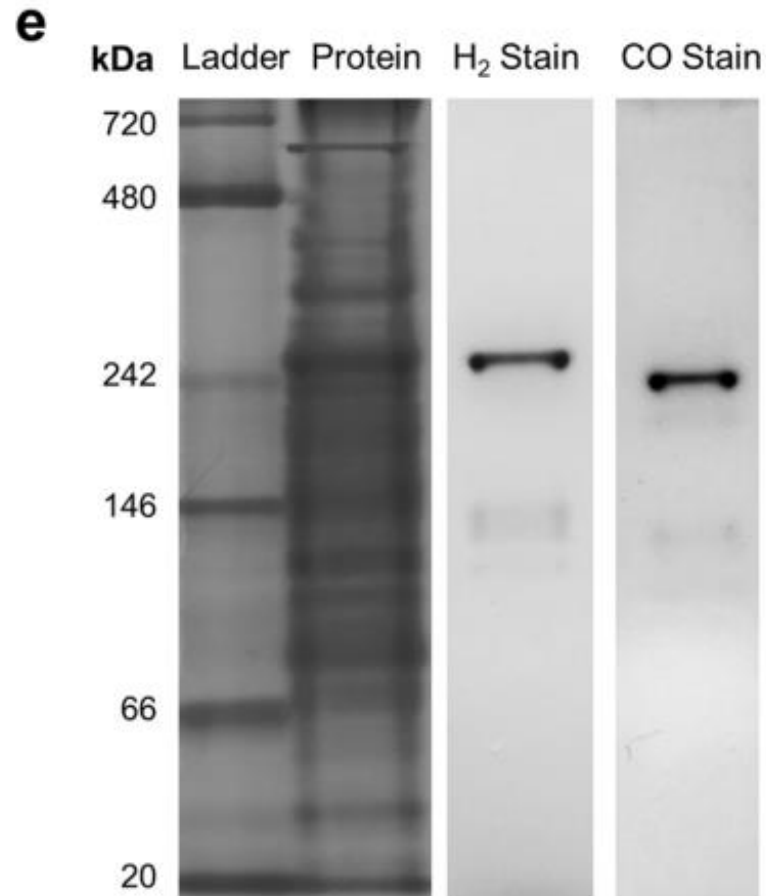
全细胞动力学测试表明， *T. roseum* 5159^T通过氧化酶和一氧化碳脱氢酶活性，在不同浓度范围内有效地氧化H₂和CO。



T. roseum 5159^T全细胞氧化H₂和CO的表观动力学参数。根据米氏非线性回归模型计算最佳拟合曲线和动力学参数。

2、 *T. roseum* aerobically oxidises H₂ and CO at a wide range of concentrations, including sub-atmospheric levels, during persistence

使用*T.roseum* 5159^T培养至平台期的全细胞裂解物对氢化酶和一氧化碳脱氢酶活性进行染色。



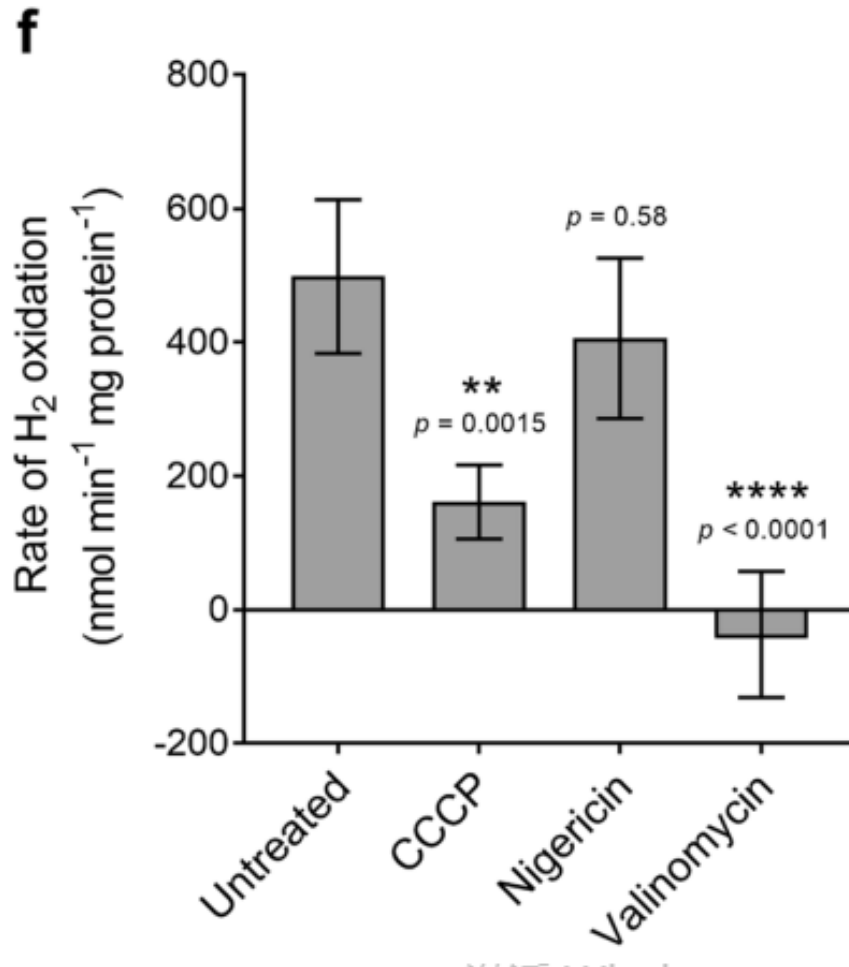
细胞裂解物在天然聚丙烯酰胺凝胶上，可对氢化酶和一氧化碳脱氢酶活性强烈染色。

一氧化碳脱氢酶二聚体分子量：266 kDa，（CoxLMS）₂。

氢化酶二聚体分子量：210 kDa，（HhyLS）₂。

2、 *T. roseum* aerobically oxidises H₂ and CO at a wide range of concentrations, including sub-atmospheric levels, during persistence

电极检测：对 *T. roseum* 5159^T 培养物，用电流法测定呼吸链解耦联剂处理前后 H₂ 氧化速率。



未处理的细胞：快速氧化H₂。

加入呼吸解耦联剂CCCP后：活性降低2.5倍。

加入离子载体抑制剂缬氨霉素后：停止活性。

质子载体尼日利亚菌素：H₂氧化速率没有显著变化。

结果表明：H₂的氧化与呼吸链紧密耦合。



小结

2

- 上述结果更进一步证明, *T.roseum* 5159^T通过在营养物质匮乏时期, 可通过对大气中H₂和CO的氧化而持续生存。
- 由于Chloroflexi的遗传机制研究较少, 且目前缺乏特异性氢化酶或一氧化碳脱氢酶抑制剂, 因此无法确定H₂或CO氧化对于该生物体长久性存活的必要性。
- 先前研究已经证明, 1H[Nife]-氢化酶的基因缺失会缩短梭形芽胞杆菌和链霉菌外孢子的寿命。



3、Scavenging of atmospheric gases is potentially a common persistence strategy within the aerobic heterotrophic Chloroflexi

Chloroflexi菌株所采用的一种常见生存策略???

Thermogemmatispora sp T81^T: 从新西兰地热土壤中分离。

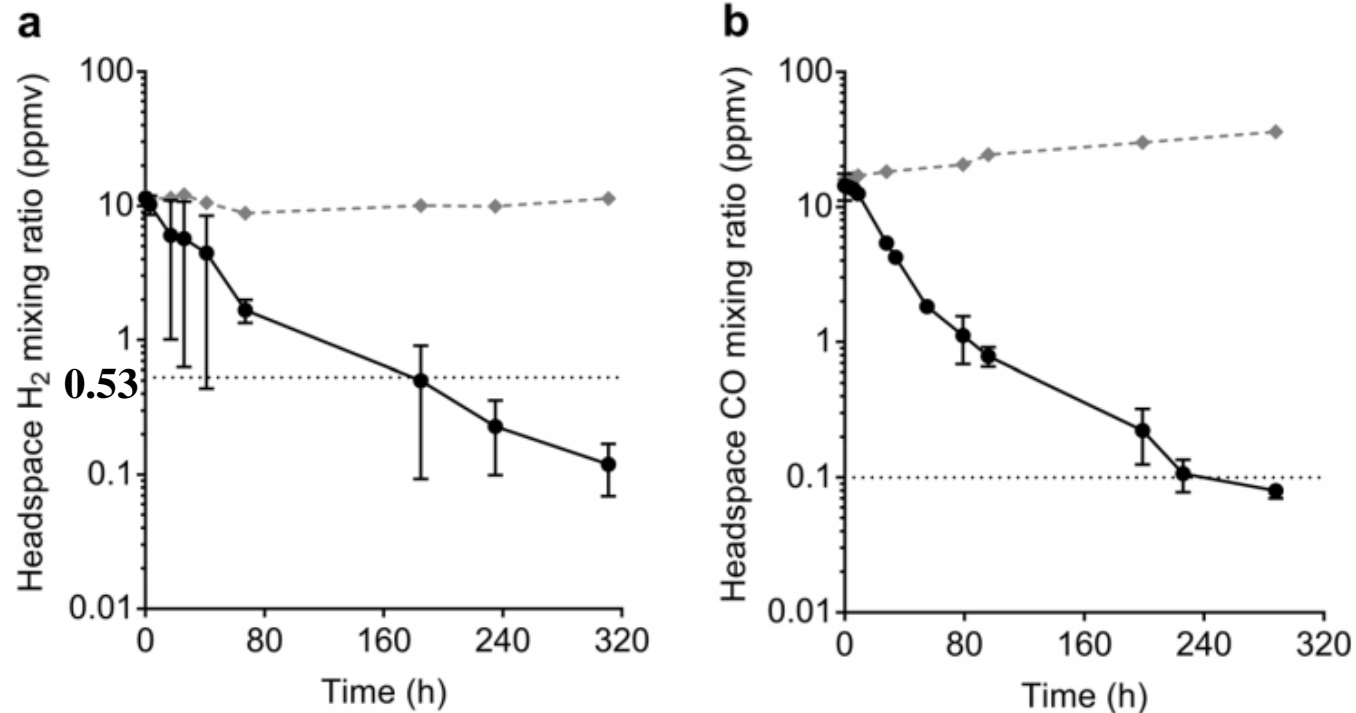
基因组结果分析表明: T81^T编码类似于*T.roseum* 5159^T的核心呼吸链成分。

包括初级脱氢酶 (nuo, ndh, sdh)、末端氧化酶 (cox, cyo) 和ATP合酶 (atp)。

基因组还编码了1H[Nife]-氢化酶的结构亚基和I型一氧化碳脱氢酶的结构亚基的假定操作子。

3、Scavenging of atmospheric gases is potentially a common persistence strategy within the aerobic heterotrophic Chloroflexi

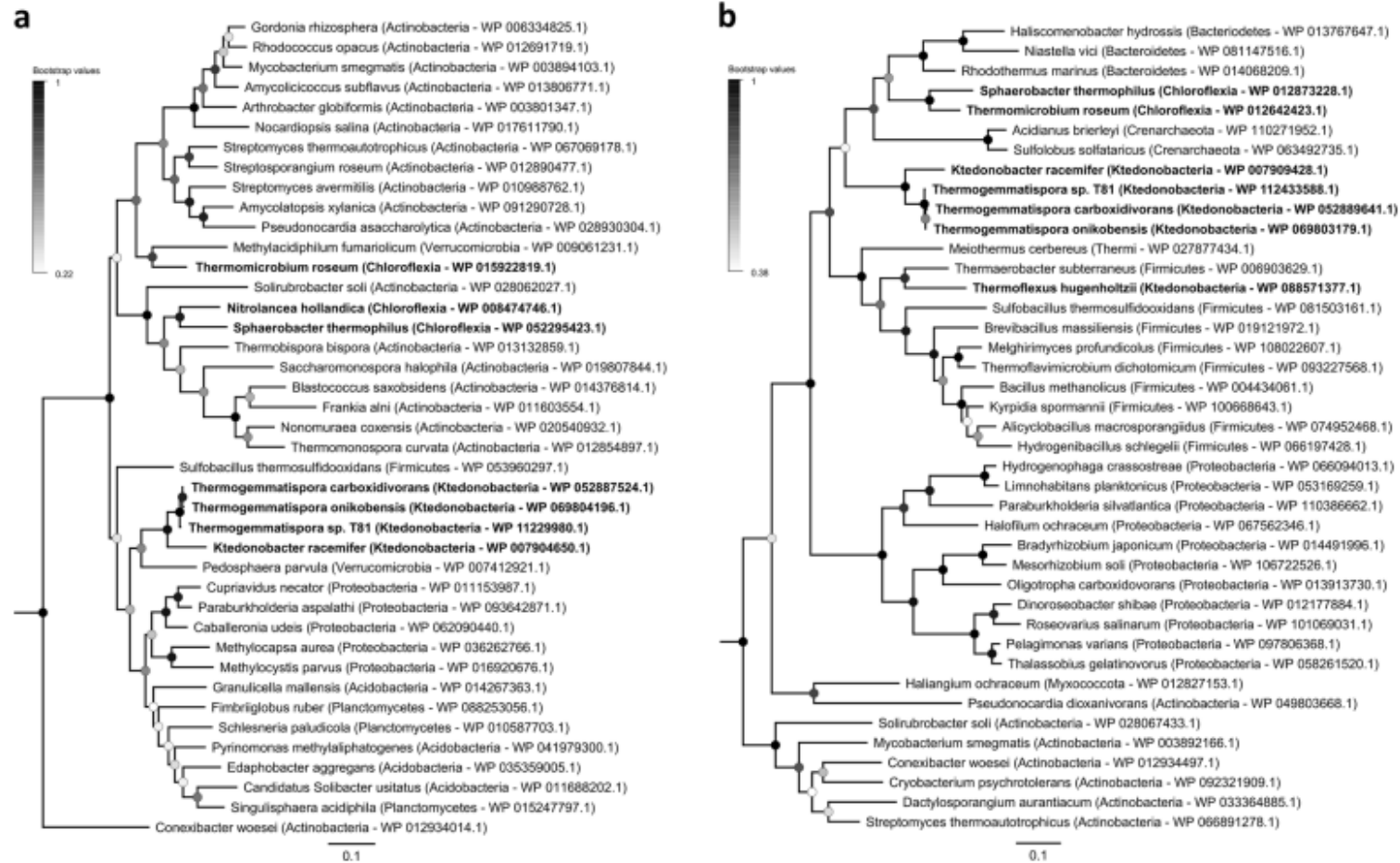
灰色虚线：阴性对照，热灭活细胞。
对数刻度：H₂和CO的混合比。
虚线：H₂和CO的平均大气混合比。



Thermogemmatispora sp T81^T 可非常活跃地消耗H₂和CO。
约320h以上达到亚大气水平（120 ppbv H₂, 70 ppbv CO）。

结果表明，尽管它们有着独特的进化历史和不同生态位，但嗜热*Thermogemmatispora* sp T81^T和*T.roseum* 5159^T都进化出了相似的代谢生存策略以适应营养匮乏的环境。

3、Scavenging of atmospheric gases is potentially a common persistence strategy within the aerobic heterotrophic Chloroflexi

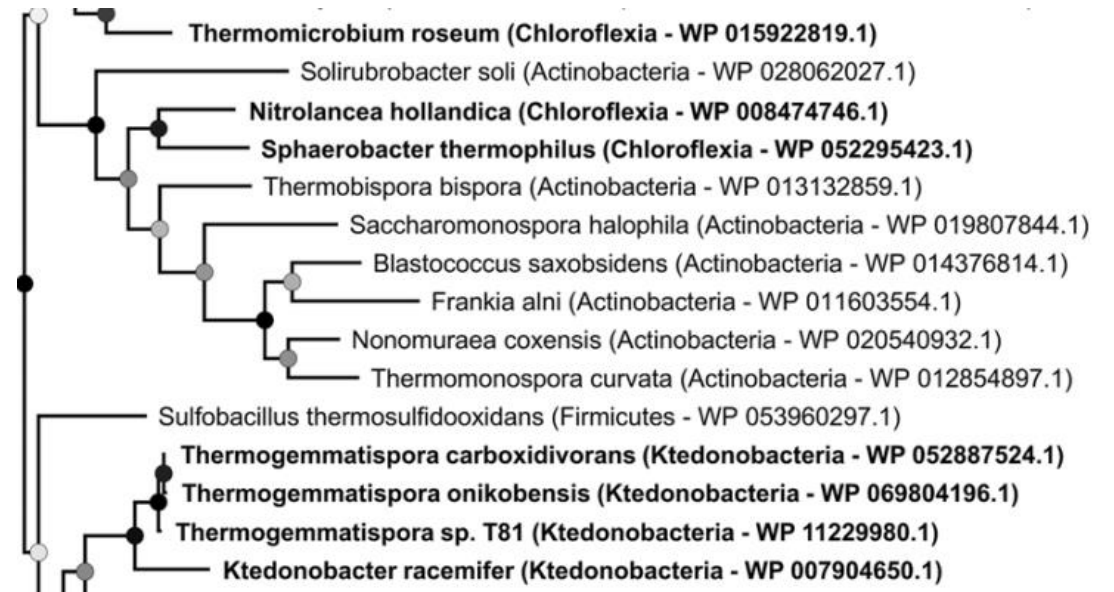


系统发育树显示Chloroflexi门内，1h [NiFe] - 氢化酶 (hhyL) 和 I型一氧化碳脱氢酶 (coxL) 的催化亚基的分布和进化历史。

3、Scavenging of atmospheric gases is potentially a common persistence strategy within the aerobic heterotrophic Chloroflexi

1h [NiFe] - 氢酶和I型一氧化碳脱氢酶在 Thermomicrobiales (Chloroflexia纲, 热微菌目) 中的4个参考基因组和 Ktedonobacteriales (Ktedonobacteria纤线杆菌纲, 纤线杆菌目) 中的5个参考基因组中编码。

利用大气H₂和CO的遗传能力是好氧Chloroflexi 门菌株的共同特征。





PART 04

Conclusions





Conclusions

1

- 大多数好氧细菌在自然环境中处于休眠状态。在恶劣环境条件下，它们通过减少代谢消耗和使用替代能源来生存。
- 在本研究中，选择在环境中普遍存在但未充分研究的Chloroflexi门的两种好氧嗜热菌，研究其生存的持久性能源。



Conclusions

2

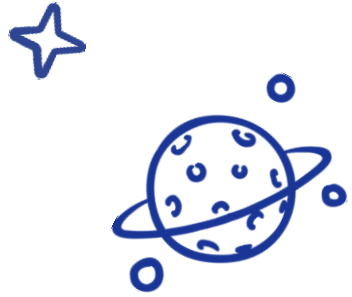
- 转录组研究表明, 由于营养限制, *T. roseum* 5159^T (Chloroflexia) 进入平台期后会对呼吸链进行大范围的改造。当与异养呼吸相关的初级脱氢酶下调时, 推测编码氢(H₂)、一氧化碳(CO)和硫化物氧化作用酶的操纵子明显上调。
- 气相色谱和微传感器电极检测实验表明, *T. roseum* 5159^T在氧浓度低于大气压的浓度范围内呼吸H₂和CO。
- 系统发育分析表明, 介导这些过程的氢化酶和一氧化碳脱氢酶广泛分布于Chloroflexi基因组中。
- *Thermogemmatispora* sp. T81^T (Ktedonobacteria) 在长期生长过程中也会氧化大气H₂和CO, 但需要进一步研究以确定这些发现是否适用于嗜温菌株。



Conclusions

3

- 本研究对象为Chloroflexia，是证实H₂氧化继放线菌和酸杆菌门的第三个门。
- 鉴于已知好氧土壤细菌是全球氢循环中的主要部分，这一研究结果也具有潜在的生物地球化学意义。
- 需要进一步的工作来研究这些生存策略是否适用于存在嗜温土壤环境中的仍然神秘的Chloroflexi物种。



Thank You

敬请各位老师同学批评指正



Methods 5: Activity staining

使用*T.roseum* 5159^T的固定相培养物的全细胞裂解物对氢化酶和一氧化碳脱氢酶活性进行染色。

使用BCA蛋白浓度试剂盒测定牛血清白蛋白标准品浓度。

总蛋白质染色：凝胶在AcquaStain Protein Gel Stain (Bulldog Bio) 中室温下孵育3小时。

氢化酶染色：凝胶部在补充有在厌氧罐500 μ M氮蓝四唑氯化物 (NBT) (5% H 50mM磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中温育2h, 60 $^{\circ}$ C下在 (10%CO₂, 85%N₂ v / v) 中1h。

一氧化碳脱氢酶染色：凝胶在含有50 μ MNBT和100 μ M吩嗪硫酸甲酯的50mM Tris-HCl缓冲液 (pH7.5) , 60 $^{\circ}$ C下在厌氧罐 (100%CO v / v) 中1h。



Methods 6: Electrode measurements

对于 *T. roseum* 培养物，用电流法测定**呼吸链解耦联剂**处理前后 H_2 氧化速率。

羰基氰化物间氯苯腙 (CCCP) 是一种氧化磷酸化抑制剂（解耦联剂）。它是一种离子载体。一般来说，CCCP 导致细胞的逐渐损害以及生命体的死亡。它主要影响线粒体中的蛋白质合成。CCCP 的作用机理是使电子载体在电子传递链的正常活动下形成的质子浓度梯度解偶联化。这种化学物质实质上以离子载体形式减少了 ATP 合酶以最佳方式运行的能力。



Methods 7: Phylogenetic analyses

构建系统发育树用于研究Chloroflexi门氢化酶和一氧化碳脱氢酶的进化历史和分布。

2018年10月, 通过蛋白质BLAST在NCBI RefSeq数据库中的Chloroflexi基因组和宏基因组-组装基因组 (metagenome-assembled genomes, MAGs) 中检索到[Nife]-氢化酶 (HhyL和同源物) 和I型一氧化碳脱氢酶 (CoxL) 的催化亚基。

1、 *Thermomicrobium roseum* upregulates hydrogenase and carbon monoxide dehydrogenase expression during a coordinated response to nutrient starvation

