

读书报告

吉伟利

2017-05-14





Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Advances

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biotechadv



Research review paper

Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications



M. Sofía Urbietta^a, Edgardo R. Donati^a, Kok-Gan Chan^b, Saleha Shahar^c, Lee Li Sin^c, Kian Mau Goh^{c,*}

^a *CINDEFI (CCT La Plata-CONICET, UNLP), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina*

^b *Division of Genetics and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia*

^c *Faculty of Biosciences and Medical Engineering, Universiti Teknologi Malaysia, 81310 Johor Bahru, Malaysia*

IF:9.848

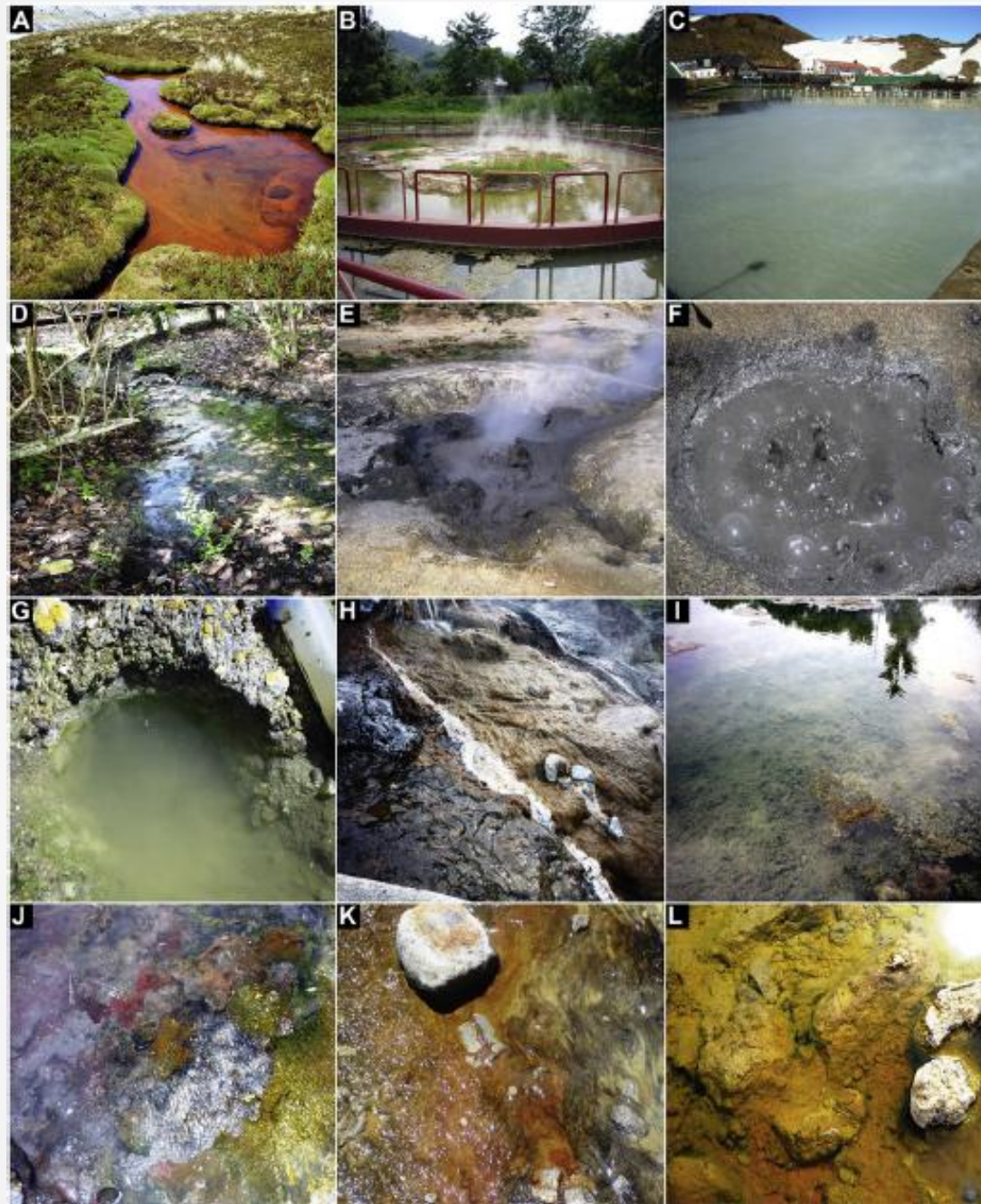


Part 1

前言

嗜热菌
55°C

超嗜热菌
80°C



与火山环境相邻的
温泉通常是酸性的
(Urbieta等
2014b)

石灰石附近的地区,
pH值为中性或微
碱性。

嗜热菌也可以在极
度pH或高盐浓度
的苛刻条件下生活

纯培 1%~10%

Table 1
Examples of hot-spring biodiversity using targeted metagenome sequencing

Hot spring name (Country)	pH	Temp. (°C)	References
Domas and Cibuni (West Java, Indonesia)	2	82–90	Baker et al. (2001)
Boiling Springs Lake (northern California, USA)	2	55	Wilson et al. (2008)
Three hot springs located in Chiang Mai Province (Thailand)	7.7, 8.5, 9	75, 85, 89	Purcell et al. (2007)
Kirishima Natural Park (Japan)	2.0–2.6	66–93	Satoh et al. (2013)
Rehai and Ruidian geothermal fields, located in Tengchong County (Yunnan Province, China)	2.5–9.4	55.1 -- 93.6	Hou et al. (2013)
Ulu Slim hot spring (Perak, Malaysia)	7.8	98	(Goh et al., 2011)
Three Heart Lake Geysir Basin (Mount Sheridanin, YNP, USA)	8.1–8.6	44, 63, 75	Bowen De León et al. (2013)
Obsidian Pool, Sylvan Spring, and Bison Pool (YNP, USA)	6.5, 5.5, 8.1	80	Meyer-Dombard et al. (2005)
Jim's Black Pool (Mud Volcano, YNP, USA)	6.7	74	Barns et al. (1994)
Crater Hills-Alice Spring, Norris Geysir Basin- Beowulf Spring; Joseph's Coat Hot Springs-Scorodite Spring; Mammoth Hot Springs-Narrow Gauge, Calcite Springs-Scary Spring (YNP, USA)	2.5–7.8	>65	Inskeep et al. (2013); Inskeep et al. (2010)
Hot spring Mutnovsky Volcano (Kamchatka Peninsul, Russia)	3.5–4	70	Wemheuer et al. (2013)
Bison Pool (Lower Geysir Basin, YNP, USA)	7.3–7.8	40	Swingley et al. (2012)
Kapkai and Waramung springs on Ambitle Island (Papua New Guinea)	9.5	>90	Millard et al. (2014)
Three springs located within the Long Valley Caldera (Mammoth Lakes, CA, USA)	7	80	Vick et al. (2010)
Three hydrothermal ponds in Copahue (Argentina)	0.2–1.1	87	Urbieta et al. (2014b)

嗜热微生物在生物技术领域引起了极大的兴趣，特别是在工业过程（即“白色生物技术” ‘white biotechnology’）

红色：通常指的是和生物制药有关的部分

绿色：指的是农业上用的生物产品和技术

白色：指的是为工业提供生物产品和技术

工业生产中从废物中去除重金属

工业酶来源

直接或间接地用于再生能源生产

1、近期嗜热菌的应用

2、嗜热菌原核生物的多样性

3、高级基因组测序技术如何扩大

对不可培养微生物的理解



Part 2

Diversity analysis

- Culture-dependent studies
- 16S rRNA gene sequencing and culture-independent studies
- Traditional culture-independent studies
- Shotgun metagenome and culture-independent study

Culture-dependent studies

1%-10%

易培养的微生物可能不代表天然的微生物

Anoxybacillus, Geobacillus, and Meiothermus

影响多样性:

凝胶剂

培养基营养成分

pH值

培养温度

气体水平

阻碍嗜热菌的生长:

缓慢的自然生长速率

培养基成分引起的抑制

群体中其它细胞产生的抗菌物质

缺乏群体感应信号

所提供的营养物质的过度浓缩

专性厌氧或兼性厌氧

琼脂

CO

Culture-dependent studies

Candidatus bacteria have yet to be isolated and grown in laboratories.

Costas et al.

倍增的缓慢生长时间
严格的生长条件（高分压CO₂）
需要两种其它辅助菌株

Traditional culture-independent studies

16S rRNA基因是细菌上编码rRNA相对应的DNA序列，存在于所有细菌的基因组中。

扩增了来自大量基因组DNA的近乎完整的16S rRNA基因

克隆到克隆载体中

转化到合适的克隆宿主中

指纹法（例如限制性内切酶片段长度多态性（RFLP））



Traditional culture-independent studies

手动操作，该过程很费力

扩增可能受温泉或土壤中存在的抑制剂的阻碍，如腐殖酸中存在的抑制剂的阻碍。

所谓的通用引物不能识别所有属的16S rRNA基因，因此不能扩增某些属。

低拷贝数基因经常被忽略。

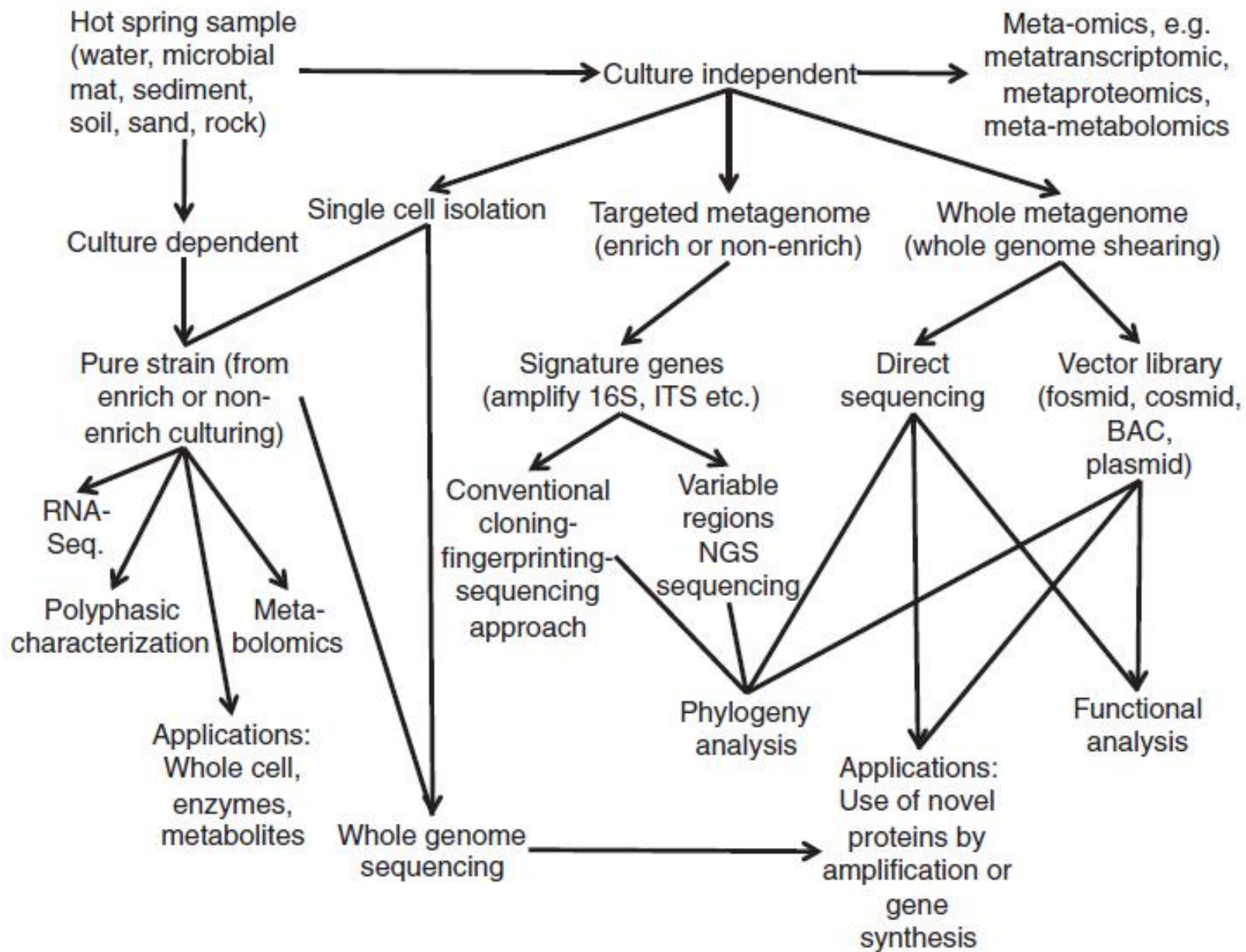
这些限制中的一些常常可以使用微型引物PCR和工程化的Taq DNA聚合酶来克服

已经发现了许多不可培养的候选菌株



P
a

下一代



析更多的样品

Fig. 2. Overall flow diagram of research related to thermophiles and hyperthermophiles.

Partial 16S rRNA gene sequencing and culture-independent studies

这项研究的作者表明

没有一个引物对可以完全扩增所有原核门或**16S rRNA**基因。

更短的读取长度和测序不完整的**16S rRNA**基因序列具有不幸的后果，许多独特和新颖的环境微生物很可能被遗漏。

分析部分**16S rRNA**基因突变型序列的方法目前在全球范围内使用，不仅用于研究**温泉中的微生物多样性**也与**沿海环境，土壤样品，城市废水处理，和小鼠肠道**。这种方法吸引了生态学家，微生物学家和生物信息学家的关注，

Shotgun metagenome and culture-independent study

‘who are they?’

鸟枪法全基因组测序

相对昂贵的设置成本

‘what are they doing?’

对数据存储，检索和分析要求非常高的计算能力

‘how they are interacting’?

读数的分档和汇编非常具有挑战性，需要大量的计算成本



Part 3

**Genomes of
prokaryotic
thermophiles**

超嗜热菌

Aquificaceae and
Thermotogaceae

Archaea (古菌)

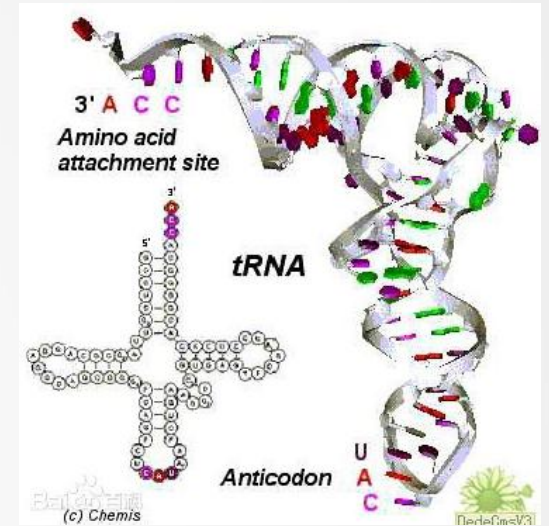
3.1 Life under extreme conditions is made possible by special genome features

GC含量

Aquificaceae 43.4% 95°C

Caldisphaera spp. and *Methanotorris* spp.
30% 32.3%

大肠杆菌的GC含量达到50.7%



rRNA / tRNA的GC含量可能比基因组DNA的GC含量更好地表达嗜热性

3.1 Life under extreme conditions is made possible by special genome features

OGT

基因组

平均来说，每1 kb的细菌基因组编码一个基因

嗜热性

多种因素引起

基于1553个原核生物的比较
<45°C 嗜热菌 >6Mbp的基因组
平均4Mbp

found that thermophiles have less intergenic DNA, which makes their genomes compact.

举个例子，其平均OGT为100.5°C，平均基因组大小仅为1.67Mbp。



3.1 Life under extreme conditions is made possible by special genome features

稳定蛋白质

嗜热蛋白质的氨基酸长度比非嗜热生物体的氨基酸长度短。

基于204个完整的细菌和古细菌蛋白质组，已经发现Ile, Val, Tyr, Trp, Arg, Glu和Leu的氨基酸与OGT相关

从密码子使用，氨基酸组成和核苷酸含量的角度讨论了嗜热菌的具体模式。

嗜热菌也使用相容的溶质来稳定细胞成分



3.1 Life under extreme conditions is made possible by special genome features

基因组时代

热休克蛋白

伴侣蛋白（辅助大分子的折叠）

丁胺（认为稳定DNA和RNA）

精胺（维持膜电位的核糖体）

多胺（生长需要，可能作为膜稳定剂）

α -和 β -亚基预折叠蛋白（蛋白质折叠伴侣）

SOS调节子（DNA损伤反应）

其他DNA修复系统

反相促旋酶（热保护性DNA伴侣）

不是所有的上述生物分子都仅在嗜热菌中发现。例如，DNA修复系统也存在于嗜温细胞中。

DNA微阵列

转录组测序技术



3.2 Horizontal gene transfer and symbiosis between thermophiles

水平基因转移 (HGT)

Thermomicrobium genus

Thermomicrobium roseum DSM 5159

contains a circular chromosome (2.0 Mbp)
and a megaplasmid (919,596 bp)

Candidatus Chloracidobacterium thermophilum



co-cultured with *Anoxybacillus* and *Meiothermus* species



3.2 Horizontal gene transfer and symbiosis between thermophiles

Candidatus Chloracidobacterium thermophilum

缺乏硫酸盐还原酶基因

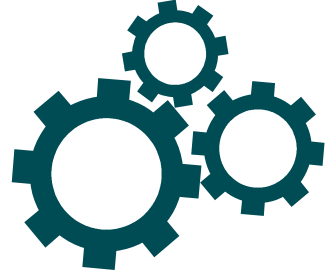


Anoxybacillus and *Meiothermu*

Ignicoccus hospitalis 宿主

Nanoarchaeum equitans

基因交换 导致产生其他的生物化学功能



Part 4

**Applications of
thermophiles and
thermozymes**

Table 3

Advantages of the use of thermophiles in biotechnological applications.

- High metabolic activity leads to enhanced product formation rates
 - Inactivation or elimination of contaminant/pathogenic mesophilic microorganisms
 - Production of heat stable macromolecules and metabolites
 - Metabolic reactions occur at the same high temperature that substrates solubilise
 - No cooling steps required after heating steps
 - Increased diffusion rates, ionization and solubility of chemicals
 - Lower density, surface tension, and viscosity of solutions enhance reaction rates
 - Direct recovery of volatile products
 - Low bacterial mass formation yields higher ratios of desired product over assimilated substrate and lower production of waste
 - Express thermostable enzymes
-

Table 4
Biotechnological applications of whole-cell thermophiles.

Whole cell application	Thermophile	Action	Reference	
Biofuel production	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> , <i>Caldanaerobius polysaccharolyticus</i>	Xylan degrading activity	Han et al. (2012); Su et al. (2013)	
	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Butanol production Consolidated bioprocess for anaerobic hydrogen production	Bhandiwad et al. (2013) Talluri et al. (2013)	
	<i>Methanoculleus thermophiles</i> and other autochthonous thermophiles from coal mine	Methane production from coal mine substrates	Lavania et al. (2014)	
Bioremediation	<i>Geobacillus</i> sp., <i>Anoxybacillus flavithermus</i> , <i>Thermus thermophiles</i> , <i>Thermococcus zilligii</i> <i>Thermus scotoeductus</i> , <i>Pyrobaculum islandicum</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> sp., <i>Thermoterrabacterium ferrireducens</i> <i>Aeribacillus</i> sp., <i>Geobacillus</i> sp.	Biosorption of toxic metals Immobilisation of radionuclides	Chatterjee et al. (2010); Sar et al. (2013) Chernyh et al. (2007)	
	<i>Anoxybacillus</i> sp. Non characterised thermophiles	Biodegradation of recalcitrant aromatic compounds and hydrocarbons Degradation of azo-dyes Construction of biofilters for gas deodorization	Mnif et al. (2014) Deive et al. (2010) Ryu et al. (2009)	
	Bioleaching	<i>Sulfobacillus</i> sp., <i>Ferroplasma</i> sp., <i>Acidianus infernus</i>	Enhanced Cu extraction from chalcopyrite	Abdollahi et al. (2014); d'Hugues et al. (2002); Qin et al. (2013)
		<i>Acidianus brierleyi</i> , <i>Acidianus manzaensis</i> , <i>Metallosphaera sedula</i> , <i>Sulfolobus metallicus</i> <i>Clostridium</i> sp., <i>Caldicellulosiruptor</i> sp.	Metal solubilisation from nickel-copper sulphide	Li et al. (2014)
Food, animal feed, compost for agriculture, cultivation production		Improved compost quality by cellulolytic activity	Basen et al. (2014); Han et al. (2012); Sizova et al. (2011)	

应用

- 1、生物能源—生物燃料
- 2、生物治疗
- 3、热酶
- 4、生物表面活性剂

1、生物能源—生物燃料

嗜热菌

木质纤维素

Caldicellulosiruptor,
Caldanaerobius, and
Clostridium spp.

生产各种液体生物燃料

生物氢

可以通过由某些微生物如**蓝细菌**促进的阳光和水的光合转化来产生。蓝细菌能够将太阳能的**10%**转化为生物质
可以通过有机废物的厌氧发酵来实现

通过酶反应的氢生产

燃料电池：燃料电池(Fuel Cell)是一种将存在于燃料与氧化剂中的化学能直接转化为电能的发电装置。燃料和空气分别送进燃料电池，电就被奇妙地生产出来。

将纤维素转化为葡萄糖，然后将葡萄糖产物及其副产物（葡糖酸）转化成氢，可获得**生物氢**。

将葡萄糖转化为氢的过程在较高温度下更有效;因此，将标准酶替换为来自嗜热菌的酶（即氢化酶）是有意义的。

Pyrococcus furiosus 深海 85°C下效率最高

煤层中的甲烷

生物甲烷是一系列生物反应的结果，其中煤被某些厌氧细菌转化为甲烷

印度的Jharia coal mines

在65°C的甲烷产量为49%

主要：*Methanoculleus thermophilus*

2、生物治疗

生物修复可以定义为利用**微生物**（本土或人为引入）的环保污染治理技术，通常以低成本将环境有机或无机污染物降解，或转化为良性产物

生物修复期间固定有毒金属

热的核废料中沉淀或固定有毒金属和放射性核素

降解石油（波斯湾原油泄漏）

与***Aeribacillus***和***Geobacillus***属相关的嗜热菌已经显示了几种难溶性芳香族化合物和碳氢化合物的生物降解能力

生物过滤器，用于除臭各种行业排出的气体

尽管无机和有机污染物的生物修复具有许多**优点**，即比传统清理方法更具环保性，运行成本更低，但其缓慢是主要的**缺点**，也是该技术尚未采用的可能原因。

3、热酶

热酶的突出特性适用于采用高温的特定行业，如纸浆和纸张，食品，酿造和饲料加工业。

嗜热菌通常对恶劣条件（例如化学变性剂，宽pH范围和/或非水溶剂）具有高度抗性。

这些酶的实例是纤维素酶，木聚糖酶，果胶酶，几丁质酶，淀粉酶，支链淀粉酶，蛋白酶，脂肪酶，葡萄糖异构酶，醇脱氢酶和酯酶

4、生物表面活性剂

生物表面活性剂是由**微生物**产生并有助于增强水不溶性化合物的乳化和分散的两亲性化合物。

在食品，农业，药品，石油和纸/纸浆相关行业中尤其明显，

因为其毒性较低;
更高的生物降解性;
更好的环境兼容性;
较高的泡沫形成;
在极端温度，pH和盐度下具有更高的比活性;
可再生

Aneurinibacillus,
Geobacillus,
Alcaligenes, Bacillus,
and Brevibacillus
genera

已经开发了许多新颖的方法来尝试培育尚待培养的原核生物（Pham和Kim，2012）。尽管做了这些努力，但是仍然无法在实验室培养大量细胞。在黄石公园温泉早期工作期间，许多未知的16S rRNA序列被编码为候选分区，也称为Candidatus。



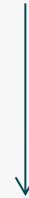
无法培养的嗜热菌 → 单细胞操作

微流体学方法

玻璃微量移液器和光学显微镜的显微操纵器，用于从水源直接捕获细菌，然后进行全基因组测序

微流体流动，激光镊子，光电镊子，微流体阵列，流式细胞术和微滴乳剂

核酸含量不足的限制



多链置换扩增的技术

这种技术能够进行全基因组扩增，因此使得单细胞基因组的**NGS**甚至转录组成为可能

随着巨大的从全基因组测序和宏基因组测序，转录组学，代谢组学，分泌物学和其他可能的信息来源产生的数据量，现在可以获得大量的数据。

“单独增加序列数据不会推动科学”

通过蛋白质生物化学，结晶，突变分析和/或基因敲除方法来确认许多新颖序列的功能和性质。

传统的微生物分离应继续进行，基因组测序不能取代其作用。

请老师同学批评指正

