



读书报告

汇报人：程利娇

时间：2018.08.18

Received: 9 December 2017

Revised: 29 January 2018

Accepted: 12 February 2018

DOI: 10.1002/mbo3.615

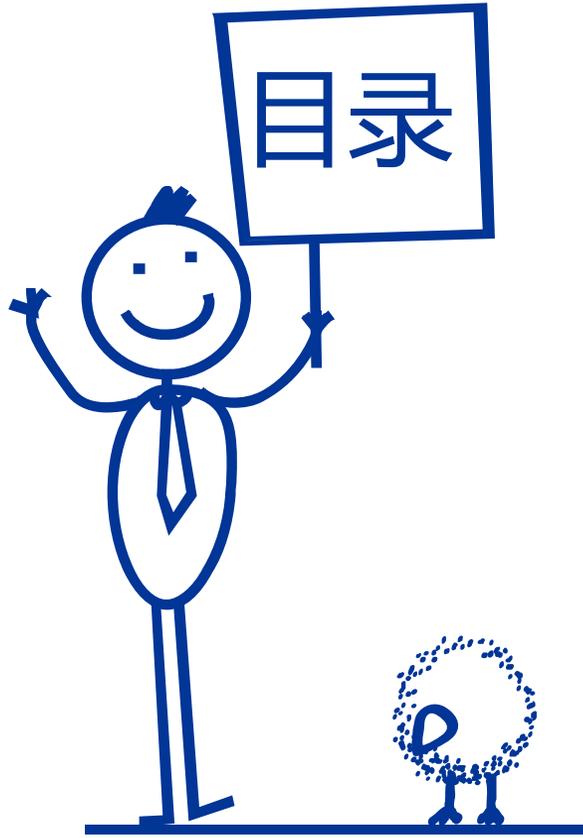
ORIGINAL RESEARCH

WILEY **MicrobiologyOpen** Open Access

Microbial diversity of thermophiles with biomass deconstruction potential in a foliage-rich hot spring

Li Sin Lee¹  | Kian Mau Goh²  | Chia Sing Chan² | Geok Yuan Annie Tan¹ |
Wai-Fong Yin¹ | Chun Shiong Chong² | Kok-Gan Chan^{1,3}





1. Introduction



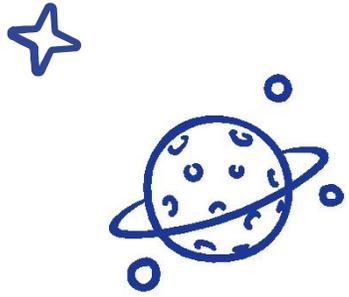
2. Materials and methods



3. Results and discussion



4. Conclusions



PART 01

Introduction



Introduction

近年来，全球对生物燃料的需求增大，加上不可再生化石燃料的枯竭，人类面临着资源紧缺和环境恶化等方面越来越严峻的挑战。

木质纤维素是地球上最丰富的生物质资源，且为第二代生物燃料生产的可持续再生资源。主要由纤维素（占干物质重的30-50%）、半纤维素（占干物质重的20-40%）及木质素（占干物质重的15-25%）三部分构成，此外还包括少量的结构蛋白、脂类和灰分。



Introduction



通过将**可再生木质纤维素类生物质**转化为**液体燃料**和**有用化学品**，有助于实现人类社会的可持续发展，并带来巨大的经济和社会效益。

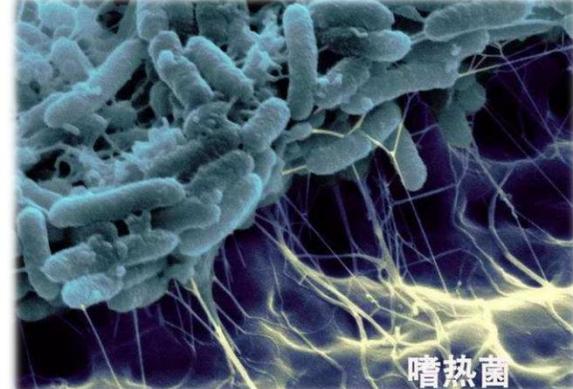
然而，**木质纤维素材料结构的组成复杂**，严重限制了其高效转化和发展生物炼制。因此，开发高效的木质纤维素降解资源多年来一直受到研究者的关注。

Introduction



真菌和细菌是有机物的主要分解者。真菌早已被广泛应用于木质纤维素降解过程中。目前，越来越多的研究显示：细菌由于具有极强的环境适应性（包括极端的pH值、温度等）和丰富的生化多样性，细菌将在木质纤维素生物转化过程中扮演越来越重要的角色。

Introduction



嗜热微生物及其酶分解生物的能力因其快速的反应时间、耐热稳定性、极端的pH值和低污染的特性而受到人们的关注。

耐热生物质能酶因其在工业应用中的适用性而具有广阔的应用前景，开发高效的**耐热糖苷水解酶**(glycoside hydrolases GHs)可以加速生物燃料和生物化学品的产业化生产。

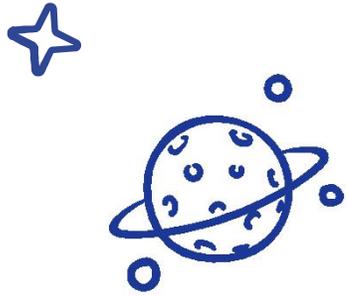
Introduction



目前，由于对高温下生物质降解过程中重要的嗜热菌及其酶尚未得到彻底研究。



马来西亚Y形的Sungai Klah温泉，位于一个树木茂密的地区，在热泉水下形成一层厚厚的生物质层的落叶，是发现和分析生物质降解嗜热微生物的理想环境。



PART 02



Materials and methods



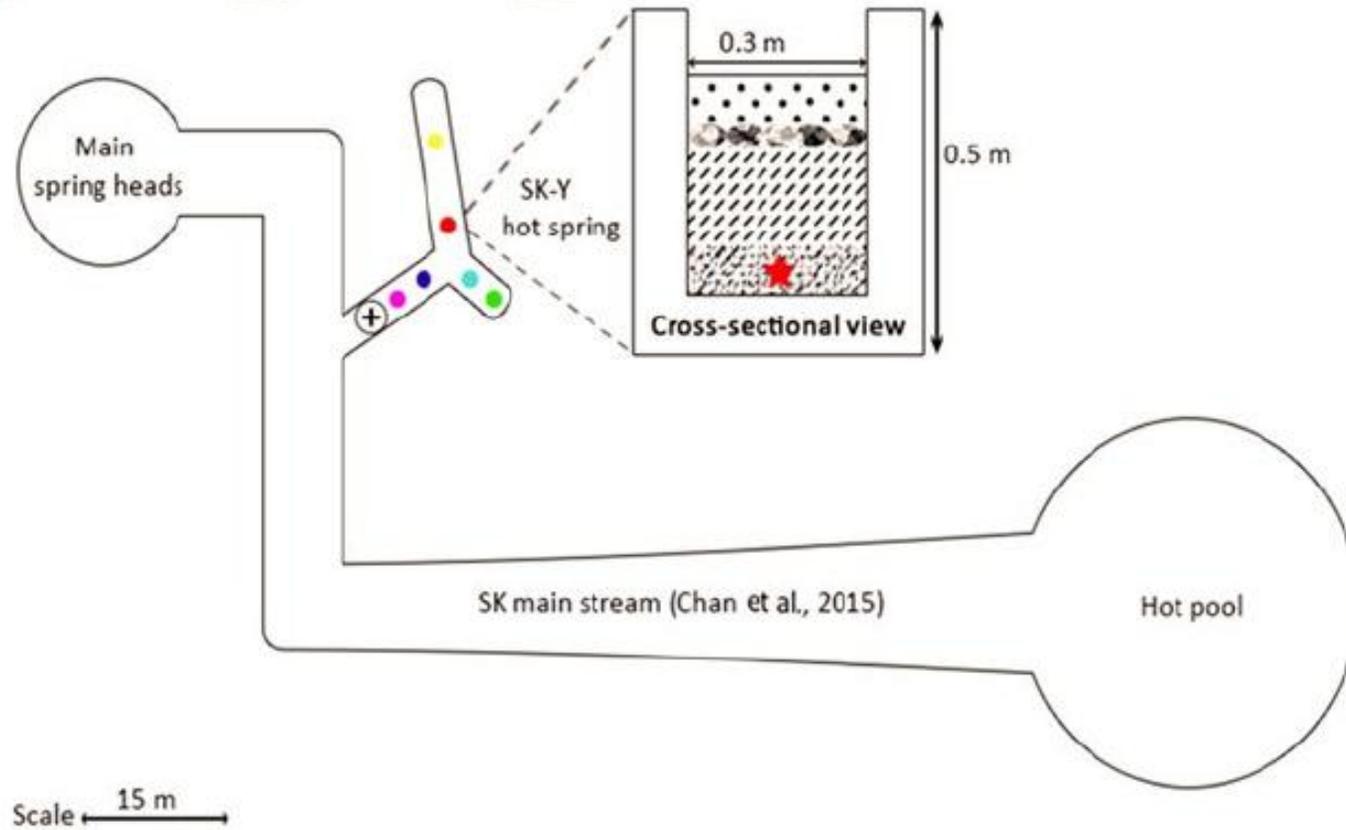
Materials and methods

01. Sample collection

(a)

Legends

	64.5 °C, pH 8		90.0 °C, pH 8		Decay foliages
	70.5 °C, pH 8		59.0 °C, pH 8		Mixture of decay and non-decay foliages
	64.5 °C, pH 7		90.0 °C, pH 8		Foliages with green biofilm
	63.5 °C, pH 7		On-off valve		Water



Y-shaped Sungai Klah hot spring (SK-Y)

Materials and methods

01. Sample collection



采样点:

Perak, Malaysia: ($3^{\circ}59'50.50''\text{N}$, $101^{\circ}23'35.51''\text{E}$)

Y形Sungai Klah温泉(SK-Y)

2016年03月24日

在不同的地方采集水样，间隔约5米。

Materials and methods

01. Sample collection



foliage with green biofilm



nondegraded foliage with no apparent biofilm



degraded foliage

树叶样品中的木质素、纤维素和半纤维素含量在马来西亚农业研究所(MADI)进行检测分析。

Materials and methods

02. Total community DNA extraction

- (1) 泉水;
- (2) 无明显生物膜的浸没叶;
- (3) 具有绿色生物膜的浸没叶;
- (4) 在SK-Y底部被降解的叶。

03. Library construction and 16S rRNA ampliconbased sequencing

使用两对引物对细菌和古菌的高变16S rRNA保守区进行测序研究。

Materials and methods

04. Sequence analysis

rarefaction analysis 稀疏性分析

the number of observed OTUs per sample

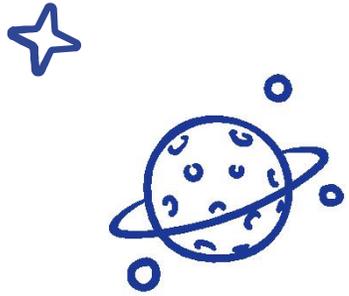
Shannon-Wiener指数

Simpson指数

项目号PRJNA 353967, 向NCBI高通量测序数据库SRA提交测序数据。

05. Carbohydrate-active gene prediction

在使用QIIME进行分类分配后, 根据碳水化合物活性酶数据库 (CAZy) 中可用的完整基因组信息对相对丰度 $\geq 0.85\%$ 的分类群进行检索, 以确定这些分类群中GH家族的数量和类型。



PART 03



Results and discussion



Results and discussion

01. 叶片木质纤维素含量分析

*Vitex*牡荆属, *Ficus*榕属, *Stenochlaena*光叶藤属和*Adenanthaera*海红豆属 是与SK-Y相邻生长的主要植物, 高度约2-4米。

利用NDF (半纤维素、纤维素和木质素)、ADF (纤维素和木质素), 对从树木中随机采摘的树叶中木质素、半纤维素和纤维素的平均百分比进行测定。

TABLE 1 Approximate composition (as a percentage) of various foliage samples

Genus	Lignin (%)	Hemicellulose (%)	Cellulose (%)
<i>Vitex</i>	9.9	3.9	10.2
<i>Ficus</i>	8.7	2.9	7.0
<i>Stenochlaena</i>	16.7	4.3	11.3
<i>Adenanthaera</i>	3.0	4.5	3.8

Results and discussion

02. 16S rRNA基因测序数据分析

TABLE 2 Summary of assembled data obtained from total community DNA of water and foliage microbiota

Dataset	SK-Y water		Green biofilm		Nondecay		Decay		
	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	
Number of reads	510983	1153627	248958	1455515	288476	1437865	651444	826285	
Sequence length (bp)	Minimum	200	200	264	203	264	200	200	200
	Average	294	266	269	263	269	263	329	261
	Maximum	429	422	275	390	275	390	430	320
Observed OTUs	11704	31	16331	26	16153	21	15529	21	
Shannon	7.867	2.195	7.450	0.961	7.318	0.574	7.169	1.402	
Simpson	0.989	0.533	0.982	0.242	0.982	0.141	0.981	0.405	

SK-Y水样中：细菌多样性、物种丰富度和均匀度最高。

Results and discussion

02. 16S rRNA基因测序数据分析

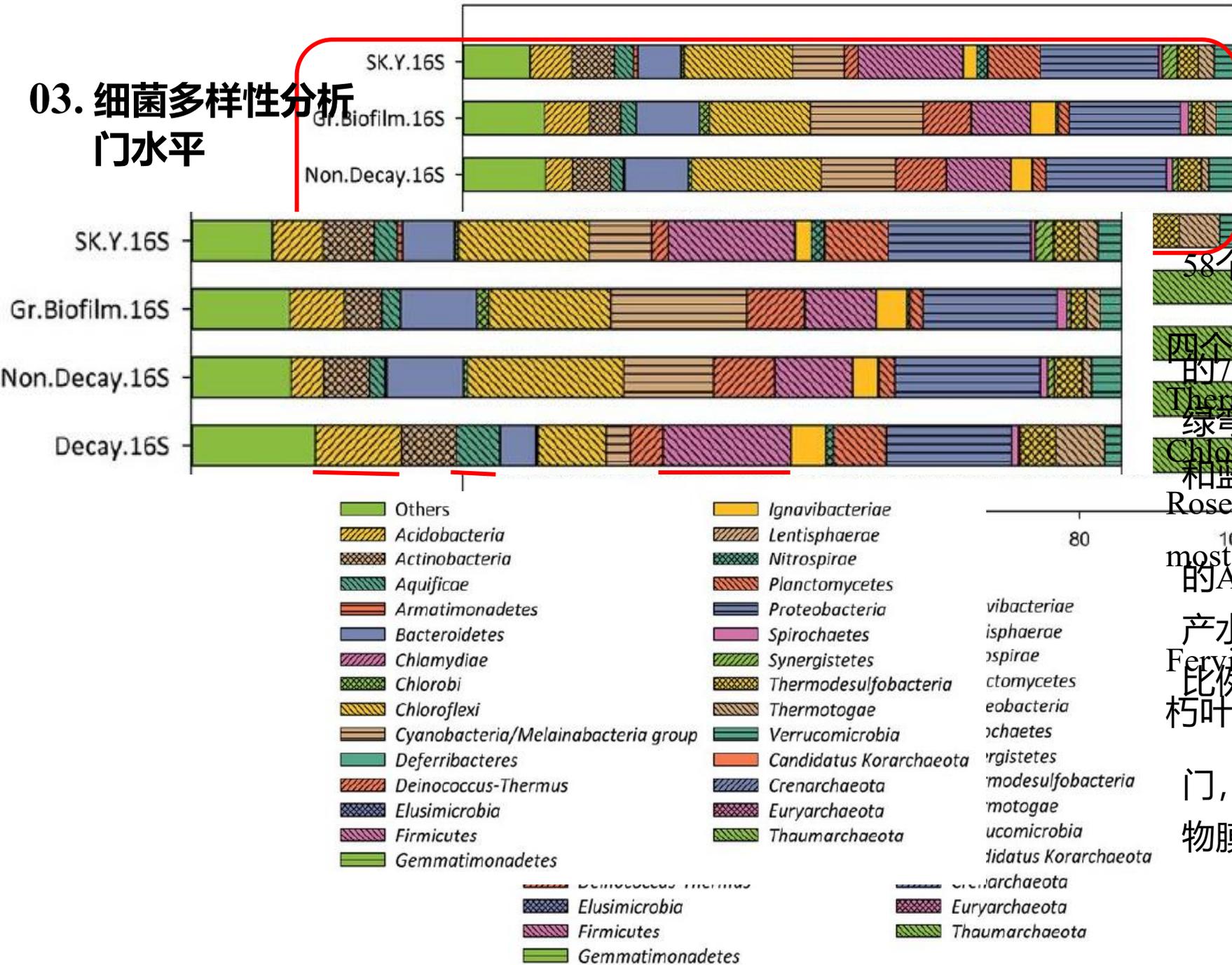
所有样品的**稀释曲线**均未达到饱和，表明具有较高的多样性(图S1A和S1B)。

PCoA主成分分析显示，样本的细菌群落被分成三个不同的集群(图S2A)。

总的来说，具有绿色生物膜的叶片和非腐朽的叶片，细菌群落较相似。其中，SK-Y水、腐朽、绿色生物膜和非腐朽样品之间存在明显的差异。

样品的古菌群落出现类似现象(图S2B)。

03. 细菌多样性分析 门水平



四个样本中细菌的分布于25门，58个科，110目，171科，328属。

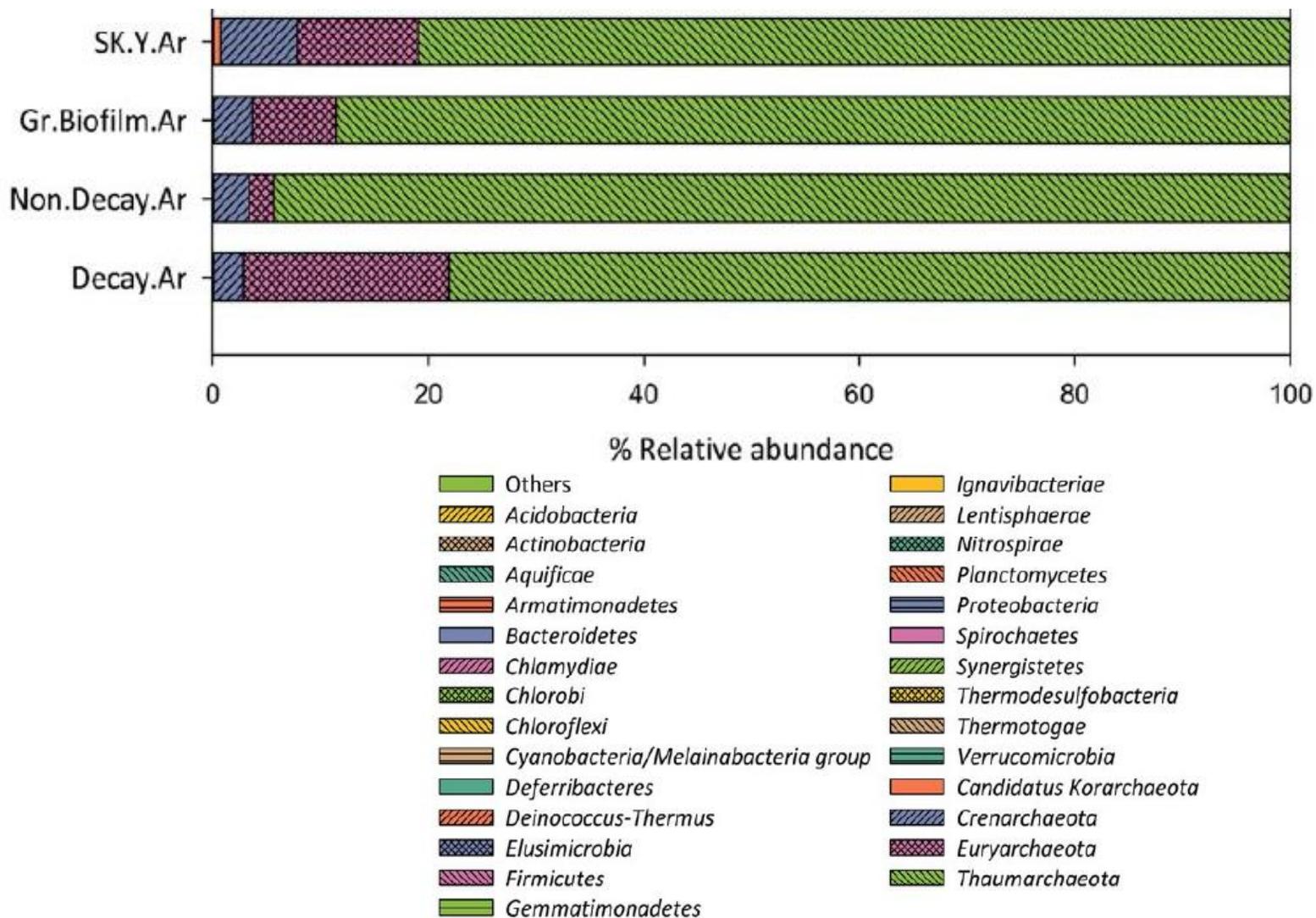
10个最丰富的门占总细菌多样性的75.5%，其中包括蛋白菌门(14.7%)、Thermaceae (4.5%)、Caldilineaceae (3.8%)、绿弯菌门(12.8%)、厚壁菌门(10.8%)、Chloroflexaceae (3.6%)，and Roseiflexaceae (3.6%) representing the most abundant groups.

与其它3种样品相比，腐朽叶样品的Acidobacteria产酸杆菌门, Aquificae产水菌门, Thermotogae 栖热袍菌门的Fervidobacteriaceae 铁氧菌科(5.0%)是腐朽叶子样品中的优势科。

光合菌门，如Chloroflexi 绿弯菌门，Cyanobacteria 蓝细菌门在绿色生物膜样品中的比例较高。

04. 古菌多样性分析 门水平

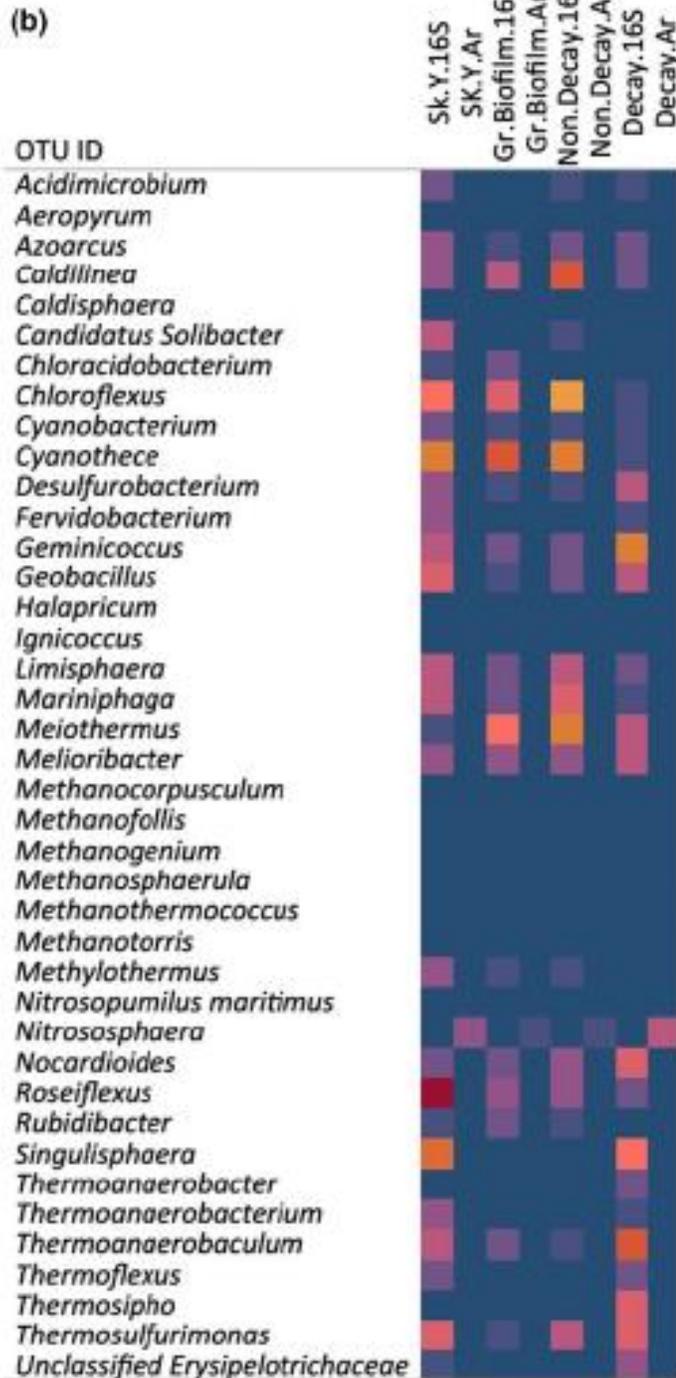
Results and discussion



古菌在SK-Y中存在的比例相对较小，为0.9%–3.8% OTUs。

在所有样品中，Thaumarchaeota 奇古菌门所占比例最高(85.5%)。在SK-Y水、绿色生物膜和腐朽样品中，第二大古菌门为Euryarchaeota 广古菌门，第三古菌门为Crenarchaeota 泉古菌门。

05. 细菌古菌热图 属水平



古菌: 细菌: SK-Y四个样品中,
古菌: SK-Y四个样品中,
细菌OTUs种类相同, 但丰度不同。
主要包含以下8个属:
主要包含以下14个属:
Methanocorpusculum (3.6%),
Caldilinea (3.8%),
Nitrosopumilus (1.5%),
Meiothermus (3.8%),
Methanogenium (0.4%),
Chloroflexus (3.6%),
Ignicoccus (0.3%),
Roseiflexus (3.6%),
Methanotorris (0.3%),
Thermoanaerobaculum(3.1%),
Methanosphaerula (0.3%),
Melioribacter (2.4%),
Halapricum (0.2%),
Geobacillus (2.2%),
and *Methanothermococcus* (0.2%) genera 甲烷热球菌属
Desulfurobacterium(1.8%),
were present in all the samples .
Thermosipho (1.3%),
Caldisphaera genus 古菌 暖球形菌属 was found in all
samples except for the nondecay sample.
Thermoanaerobacterium (1.0%),
Fervidobacterium(1.0%),
Acidimicrobium (1.0%),
Chloracidobacterium (1.0%),
Thermoanaerobacter (0.9%).

06. 嗜热

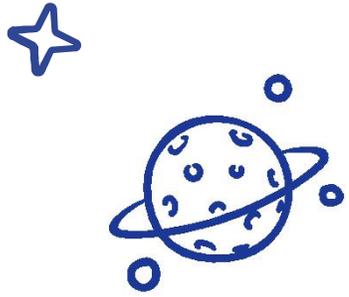
Source	Potential biomass degraders	Analysis approaches	Temp., (°C)	pH	Biomass substrates/source	References
Submerged foliage and hot spring water of SK-Y, Perak, Malaysia	<i>Acidimicrobium</i> , <i>Aeropyrum</i> , <i>Caldilinea</i> , <i>Caldisphaera</i> , <i>Chloracidobacterium</i> , <i>Chloroflexus</i> , <i>Desulfurobacterium</i> , <i>Fervidobacterium</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Meiothermus</i> , <i>Melioribacter</i> , <i>Methanothermococcus</i> , <i>Methanotorris</i> , <i>Roseiflexus</i> , <i>Thermoanaerobacter</i> , <i>Thermoanaerobacterium</i> , <i>Thermoanaerobaculum</i> , <i>Thermosipho</i>	Cultivation-independent	60–70	7.5–8.6	Plant litter	This study
Sediments from hot spring, Xiamen, China	<i>Geobacillus</i> , <i>Thermus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Anoxybacillus</i>	Enrichment	50–80	7.0	Sugarcane bagasse	Zhao et al. (2017)
Mixture of water and sediment from SK main stream hot spring, Perak, Malaysia	<i>Aciduliprofundum</i> , <i>Caloramator</i> , <i>Hydrogenobacter</i> , <i>Ignavibacterium</i> , <i>Melioribacter</i> , <i>Methanocaldococcus</i> , <i>Methanocella</i> , <i>Methanothermus</i> , <i>Methylacidiphilum</i> , <i>Thermodesulfobivrio</i> , <i>Thermotoga</i> , <i>Thermus</i>	Cultivation-independent	50–110	7.0–9.0	Scattered plant litter	Chan et al. (2015)
Soil contacting regions of a bagasse pile at Phu Khieo Bio-Energy Chaiyaphum province, Thailand	<i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> / <i>Chlorobi</i> , <i>Chlamydiae</i> / <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Fibrobacteres</i> / <i>Acidobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Planctomycetes</i> , <i>Proteobacteria</i>	Cultivation-independent	50	n.a	Sugarcane bagasse	Mhuantong et al. (2015)
Vegetated area of Obsidian Pool (site OBP 10), Yellowstone National Park	<i>Anaerobacter</i> , <i>Caldicellulosiruptor</i> , <i>Caloramator</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Thermoanaerobacter</i>	Cultivation-independent and enrichment	55–85	5	In situ sampling (<i>Juncus tweedyi</i>); enrichment (<i>Avicel</i> , xylan, switchgrass, <i>Populus</i>)	Vishnivetskaya et al. (2015)
Anaerobic digestion sludge collected from Shek Wu Hui wastewater treatment plant, Hong Kong, China	<i>Anaerolineales</i> , <i>Bacteroidales</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Methanobacteriales</i> , <i>Methanosarcinales</i> , <i>Thermotogales</i>	Enrichment	55	6.0–7.0	Microcrystalline cellulose with glucose	Xia et al. (2014)

Results and discussion

06. 嗜热菌和热酶在叶片降解中的作用

TABLE 3 (Continued)

Source	Potential biomass degraders	Analysis approaches	Temp., (°C)	pH	Biomass substrates/source	References
Sediment and water column of Great Boiling Spring, Nevada	<i>Archaeoglobales</i> , <i>Desulfurococcales</i> , <i>Dictyoglomus</i> , <i>Thermotoga</i>	<i>In situ</i> enrichment	74–85	5	Ammonia fiber explosion-treated corn stover and aspen shavings	Peacock et al. (2013)
Switchgrass-adapted bacterial consortia	<i>Paenibacilli</i> spp., <i>Rhodothermus marinus</i> , <i>Thermobispora bispora</i> , <i>Thermomicrobia</i> sp., <i>Thermus thermophilus</i>	Enrichment	60	n.a	Microcrystalline cellulose	Park et al. (2012)



PART 04

Conclusions



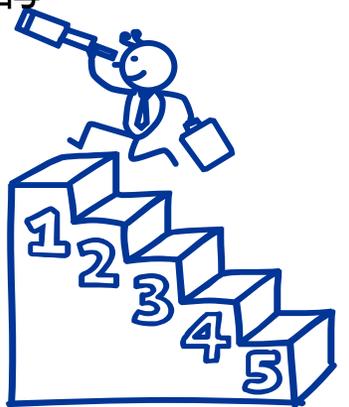
Conclusions

01

目前所研究的热泉大多缺乏木质纤维素类植物材料。SK (Chanet *al*, 2015) 和SK-Y温泉大约相距10米, 但微生物多样性不同。可能与物理化学或地球化学结构、温度、溶解氧水平、植物凋落物数量等因素有关, 非生物因素共同作用于微生物种群的生态环境。

02

SK-Y是一种天然的生物质降解生物反应器, 微生物群落包括25门, 58纲, 110目, 171科, 328属。因此, SK-Y是分离高效生物质降解嗜热菌和嗜热酶的良好来源。



Conclusions

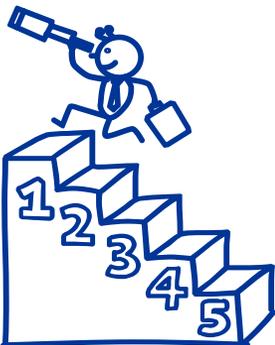
03

本研究表明:

上层: 被绿色生物膜叶片覆盖。微生物多样性分析表明, Cyanobacteria (14.7%), Proteobacteria (14.4%), and Chloroflexi (13.1%)是三个主要的门。

底层: 腐朽叶片。微生物类群中, 以 Firmicutes 和 Proteobacteria为主。厚壁菌门主要包括*Geobacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Candidatus Desulforudis*, and *Caldicellulosiruptor*, 可参与不同阶段木质纤维素的降解过程。

SK-Y中另一重要成分为Acidobacteria酸杆菌门, 酸杆菌专门或优先使用有机底物(本研究中, 植物落叶)作为能源。



Conclusions

04

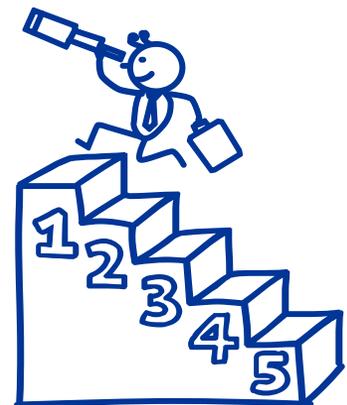
碳水化合物活性酶数据库(CAZy)检索结果表明, SK-Y热泉生态系统中至少18个属是潜在的有效木质纤维素酶的候选种, 发现至少61种GH酶, 这些酶说明了群落中不同微生物之间的重要相互作用。

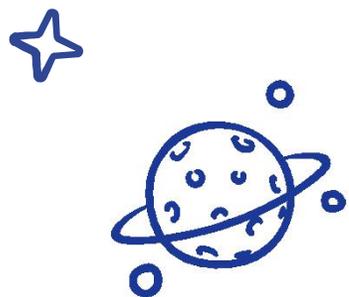
嗜热古菌基因组中GH酶数量低于嗜热细菌(CAZy数据库), 细菌在生物质降解过程中起到重要的作用。

05

目前为止, 大多数经过深入研究的辅酶(Aa)酶来源于真菌。CAZy数据库分类检索结果显示: 大多数嗜热菌缺少或丢失Aa酶基因。

Metatranscriptomic (元转录组学) 可以更详细地了解GHs的基因表达水平, 并可能找到新的Aa酶。





Thank You

敬请各位老师同学批评指正
