

读书报告

汇报人：牛铭铭

2019年04月14日



IF=9.133



[Microbiome](#). 2018; 6: 230.

PMCID: PMC6307301

Published online 2018 Dec 26. doi: [10.1186/s40168-018-0613-2](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0613-2)

PMID: [30587241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30587241/)

Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing

[Da-Shuai Mu](#),^{1,2} [Qi-Yun Liang](#),² [Xiao-Man Wang](#),² [De-Chen Lu](#),² [Ming-Jing Shi](#),² [Guan-Jun Chen](#),^{1,2} and [Zong-Jun Du](#)^{1,2}✉

▸ [Author information](#) ▸ [Article notes](#) ▸ [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

Keywords: Enrichment culture, Mixed culture, Metatranscriptomics, Resuscitation, Uncultured bacteria

富集培养过程中复苏机制的元转录和比较基因组见解

<https://doi.org/10.1098/rsob.140106>.

CONTENT



Introduction



Materials and Methods



Results and Discussion



Conclusion





Introduction



01

Background

- 1、 Many microbial species in the biosphere that would otherwise be "culturable" may fail to grow because of their growth state in nature, such as dormancy (Connon SA et al.,2002), which results in species that are referred to as viable but non-culturable (VBNC)(Xu HS et al.,1982).
- 2、 Some isolates merely grew with mixed-culture (Lewis K et al., 2002) , thereby demonstrating mixed-culture dependence for some certain isolates (Stewart EJ et al., 2012) .



Background

富集培养法 (Enrichment culture) 是微生物分离培养中的一个经典方法，已经有上百年的使用历史，但是研究者对其中的富集和可培养机制的认识仍然非常有限。本研究中，作者设计了新的富集培养基和富集条件，分离出了大量的海洋细菌新类群。在验证了新的富集分离技术有效性的基础上，进一步对细菌在富集培养过程中复苏机制进行了探讨，发现复苏是利用富集培养分离未培养海洋微生物的重要机制。研究还发现富集培养过程中伴随着微生物之间的相互作用，结合宏转录组学和比较基因组学对互作及复苏机制进行深度解析。





Materials and Methods

02

Materials and Methods

01

海洋沉积物的富集培养

02

涂布分离培养

03

物种的鉴定与测序

04

高通量测序分析

05

综合分析

Sediment collection and bacterial isolation



从三个威海潮间带采集表层海洋沉积物的样本，并在低营养的2216海洋琼脂培养基（添加丙酮酸钠和乙酸钠）中进行富集培养，每隔0d、5d、12d、21d、30d在普通2216海洋琼脂培养基中进行稀释、涂布培养。

VBNC状态的诱导和复苏

诱导：将选择的细菌在海洋琼脂2216培养基中于30°C培养24h，同时以150rpm温和摇动，然后以16,000× g离心3分钟收集菌体。用无菌海水洗涤细菌细胞两次，再次通过16,000× g离心3分钟收集菌体，最后重悬于无菌海水中至密度为 10^8 CFU / ml，将细胞在4°C下储存35天。使用平板计数法随时间监测细菌细胞状态。VBNC是在这种处理后不能在MA上形成菌落的细菌。

复苏：将VBNC细菌在富集培养基中于25°C培养5天，涂布在MA上并在28°C培养1天。基于MA培养基上可见菌落的形成计数可培养细胞。另外将VBNC细菌直接涂布在MA上，在28°C下培养6天，用作对照处理。

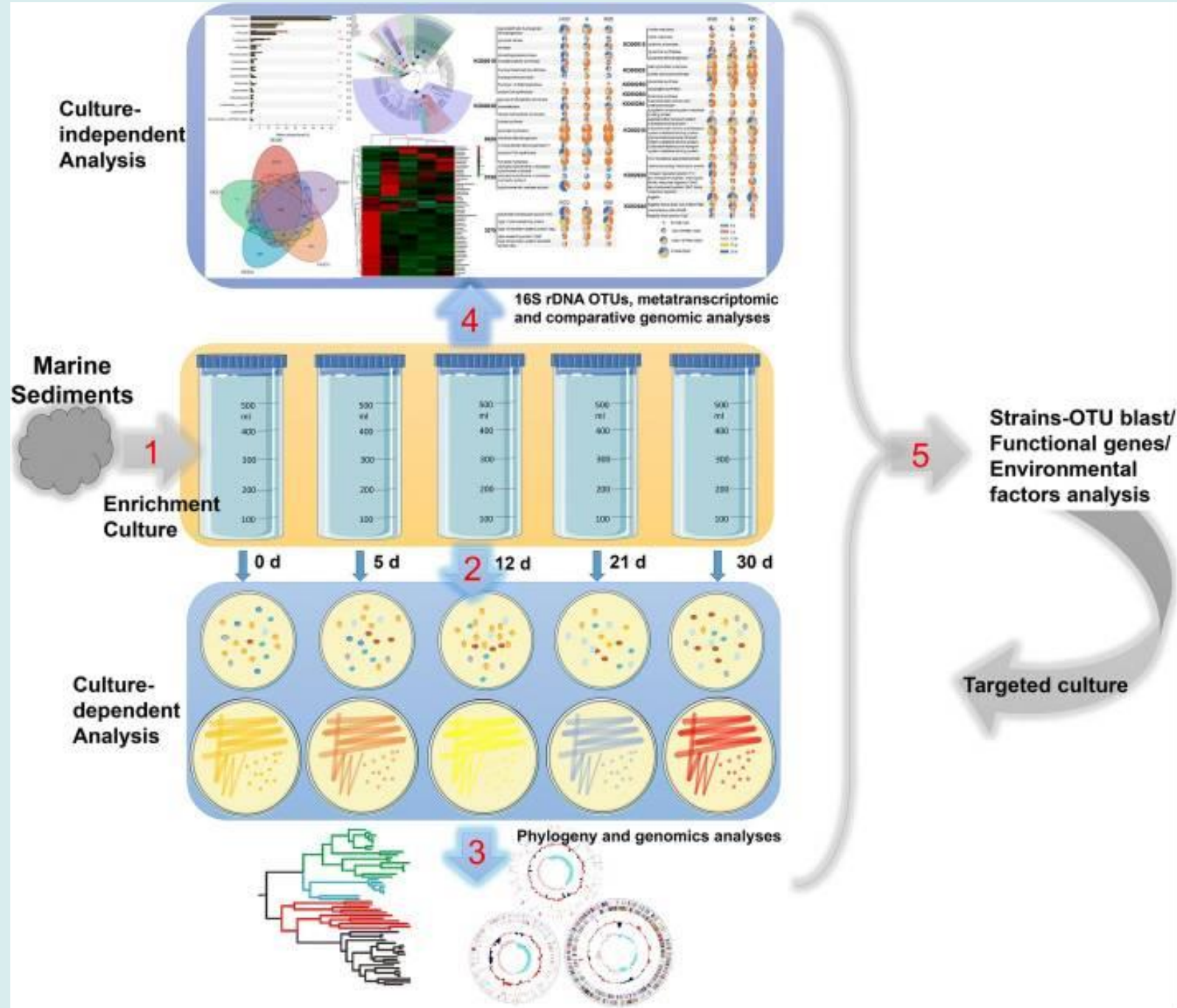


图1 海洋沉积物中微生物群分离培养、保藏及鉴定流程



Results and Discussion



03

1、基于富集培养的方法培养海洋沉积物微生物

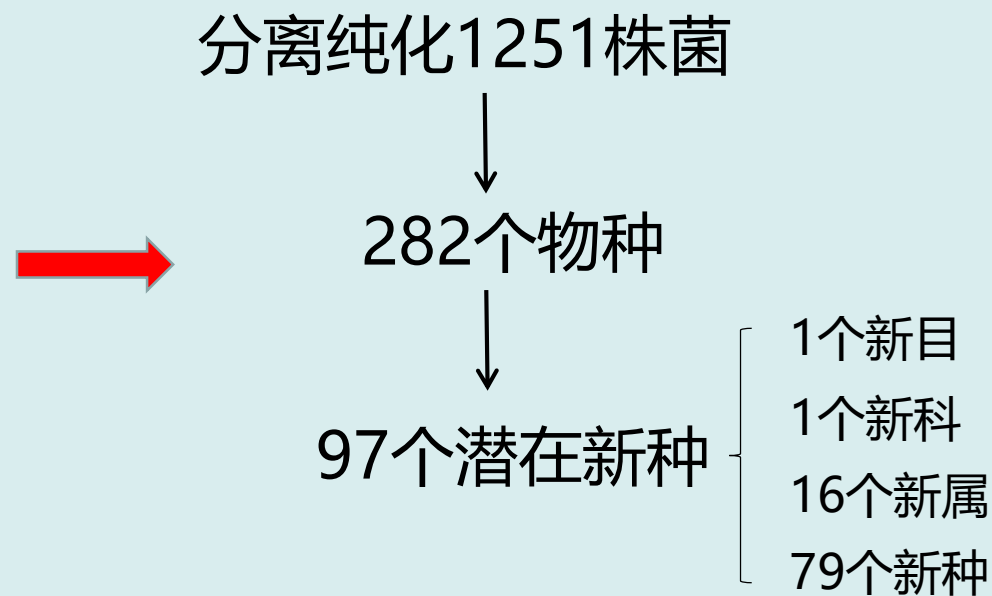
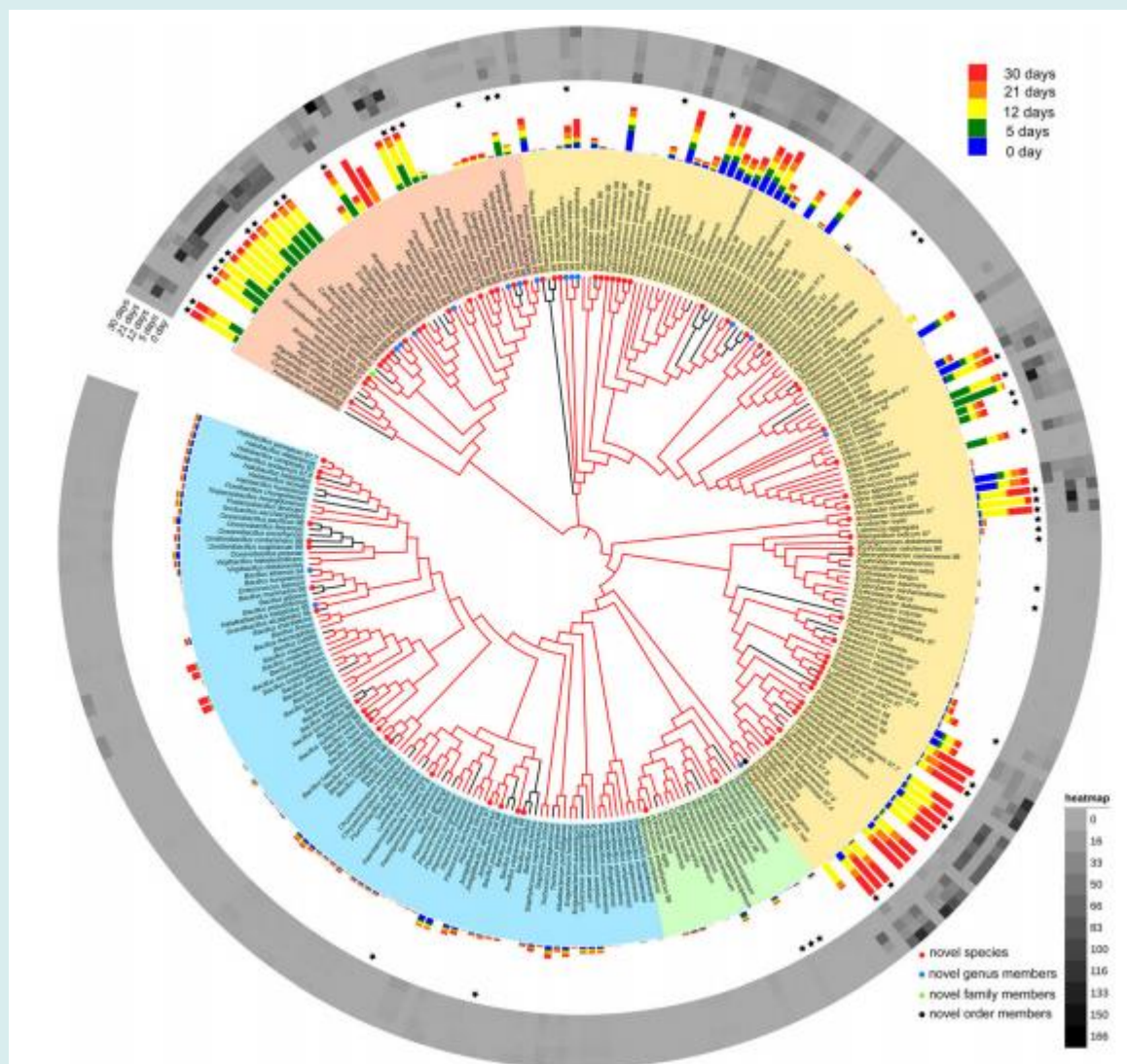


图2 分离培养物种系统发育树构建及富集过程中相对丰度分析

2、富集培养基中微生物群落组成和多样性

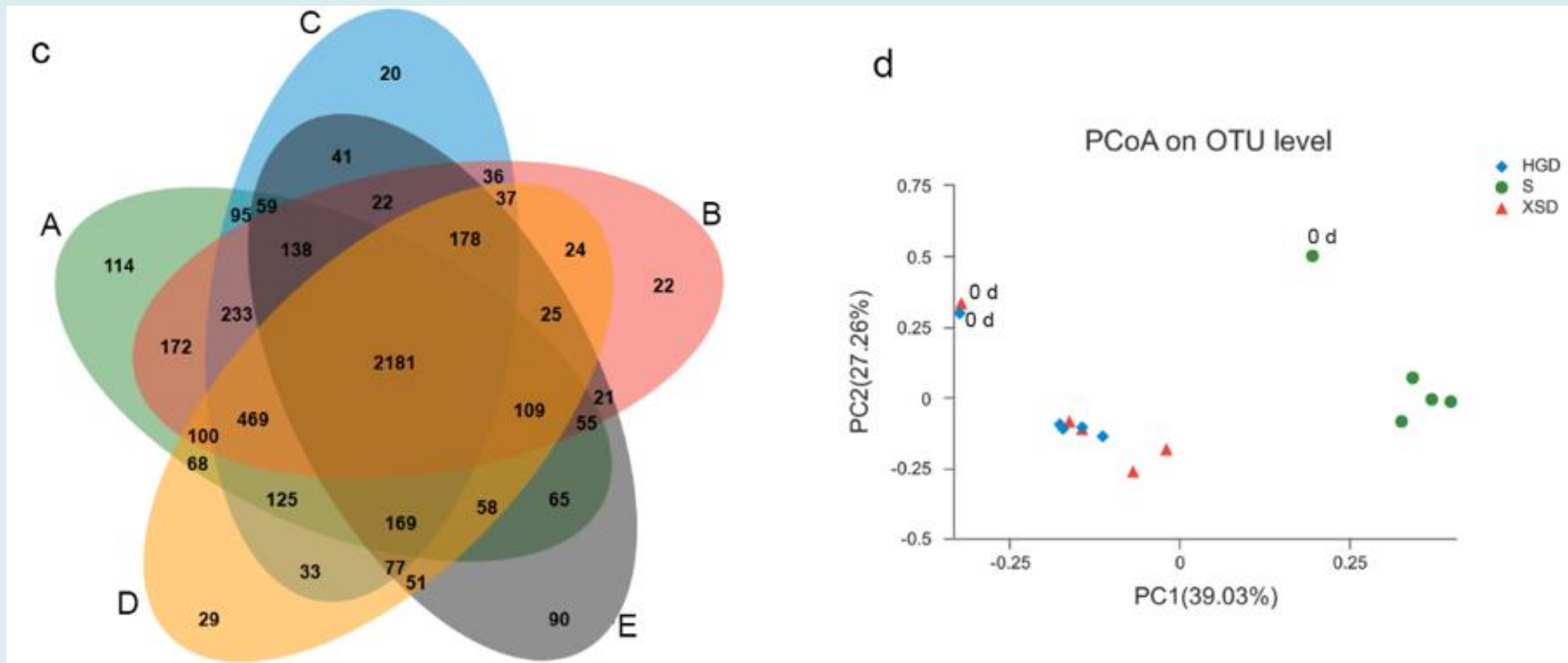
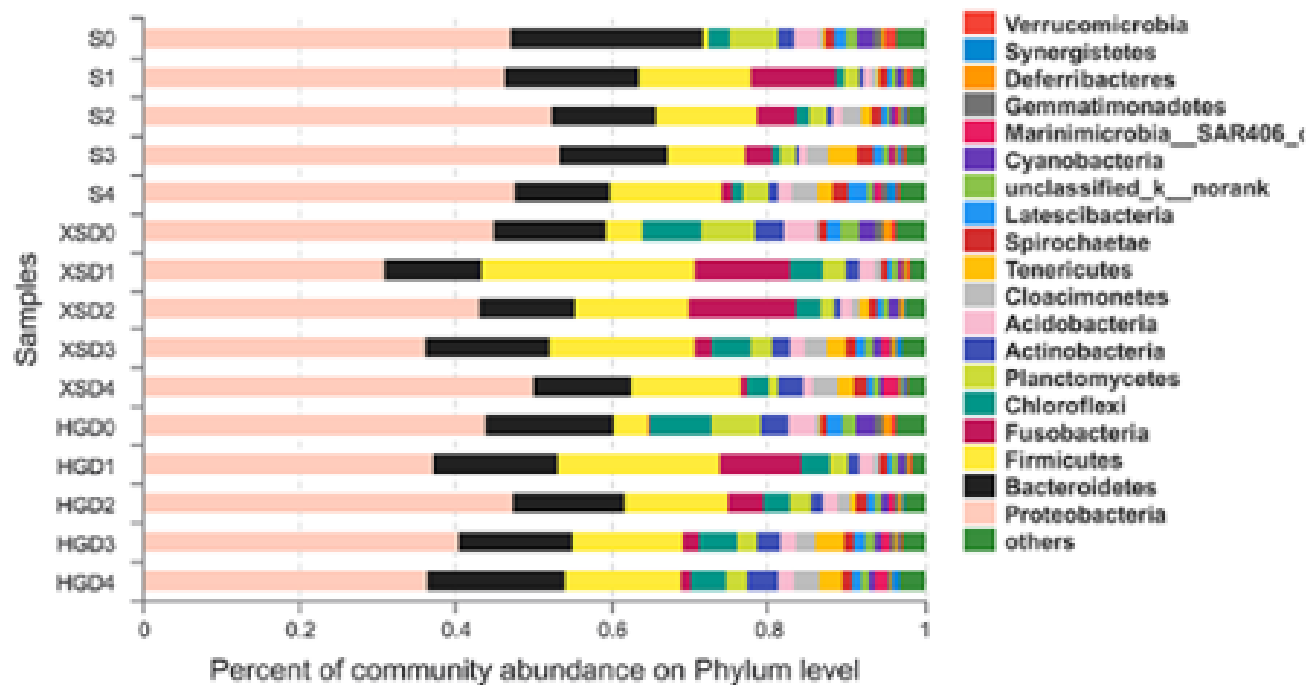


图3c/d 三种沉积物样本在富集培养不同阶段中物种丰富度和细菌群落多样性的变化

2、富集培养基中微生物群落组成和多样性

e

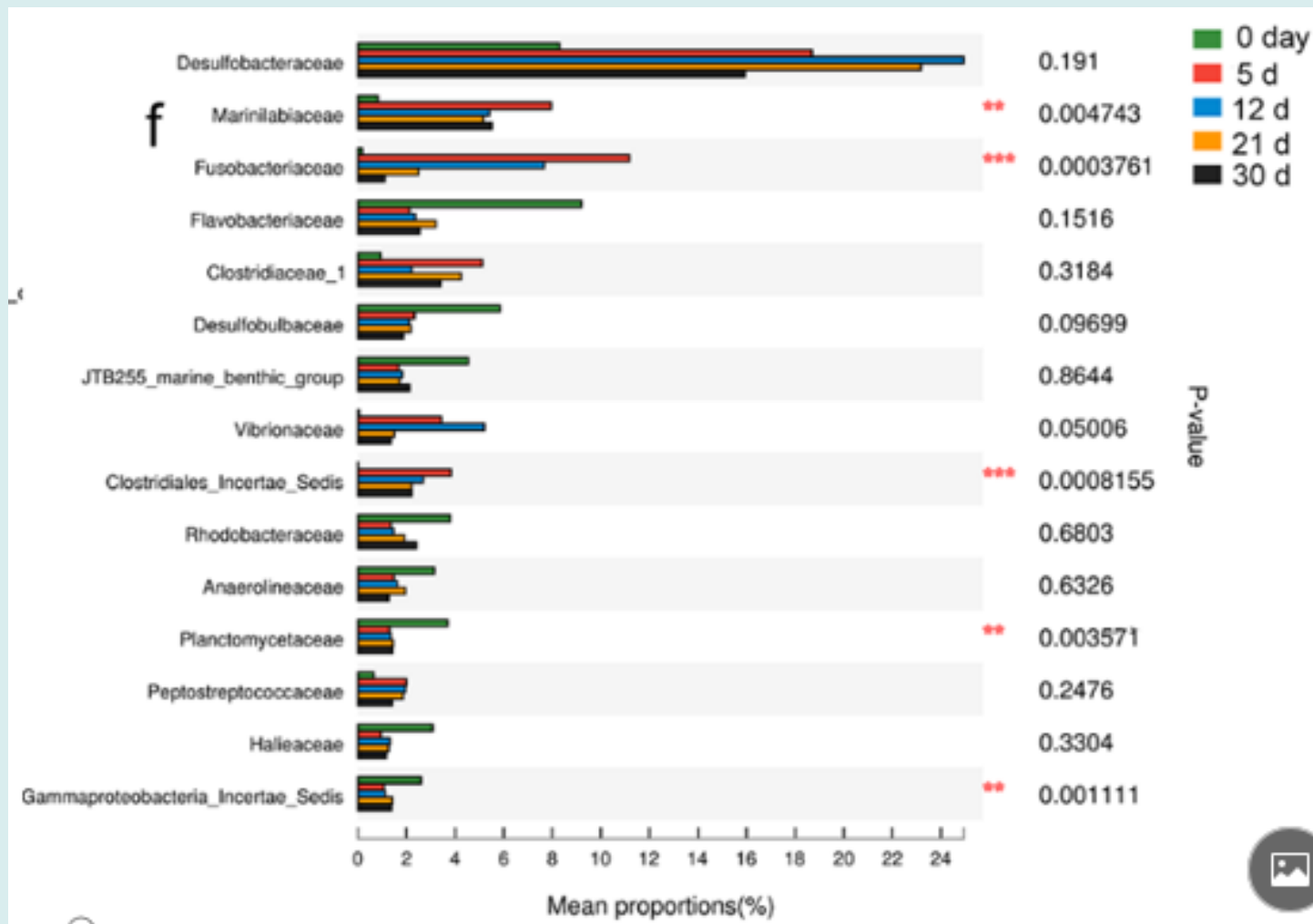


门水平:

Proteobacteria	变形菌门	
Fusobacteria	梭杆菌门	↑
Bacteroidetes	拟杆菌门	
Firmicutes	厚壁菌门	↑
Chloroflexi	绿湾菌门	
Planctomycetes	浮霉菌门	
Acidobacteria	酸杆菌门	↓

图3e 三种沉积物样本在富集培养不同阶段中物种丰富度和细菌群落多样性的变化

2、富集培养基中微生物群落组成和多样性



科水平:

Marinilabiaceae 马氏菌科

Fusobacteriaceae 梭杆菌科

Clostridiaceae 梭菌科



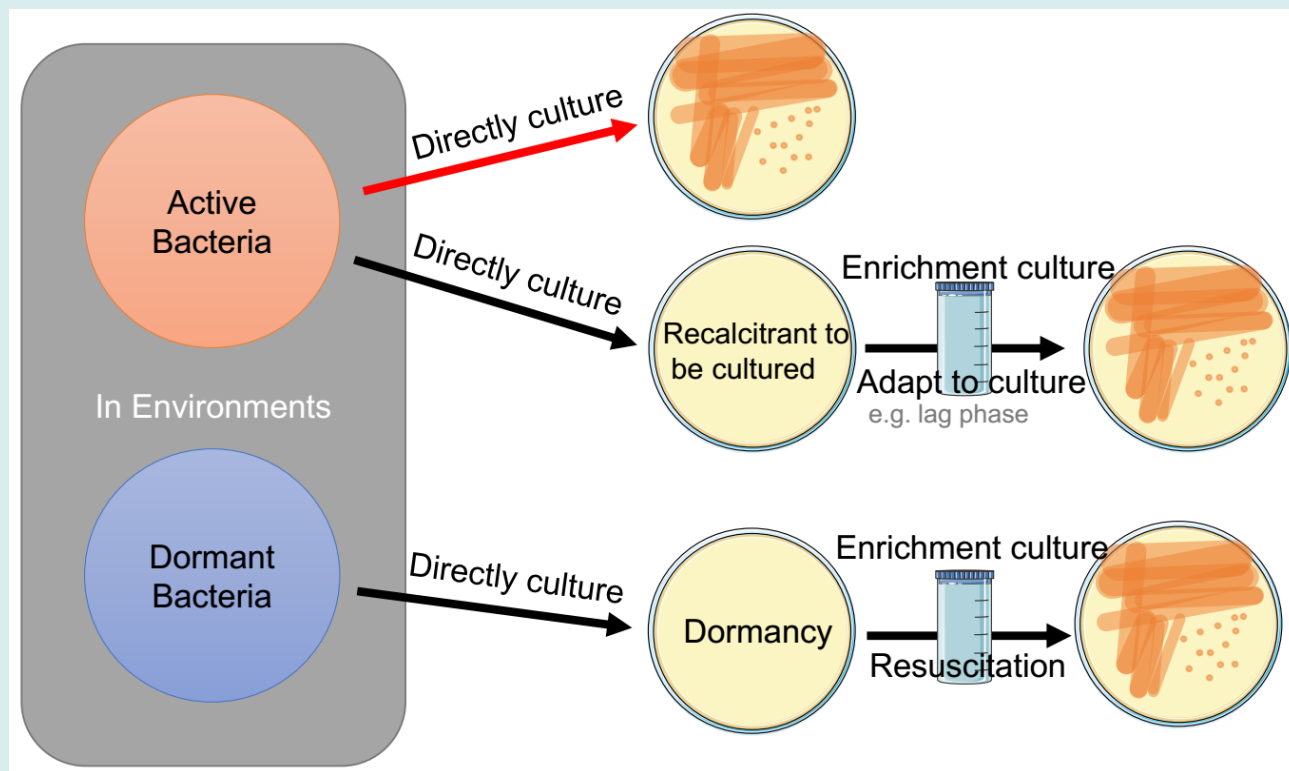
图3f 三种沉积物样本在富集培养不同阶段中物种丰富度和细菌群落多样性的变化

小结



微生物群落的组成和多样性随着富集培养后环境因素和新OTUs的出现而变化，这表明海洋沉积物可能包含一个“微生物种子库”或一组在营养物缺乏时几乎无法生存的稀有微生物。

3、培养分离物种的机制



微生物
生长曲线

迟缓期 (适应期)

指数期

稳定期

衰亡期

图4 富集培养过程中细菌可培养机制示意图

3、培养分离物种的机制

k-策略菌群——当环境中营养物质有限时，生长缓慢但稳定地存在。

r-策略菌群——当环境中营养物质有限时存在个体很少，一旦补充营养可快速生长繁殖。

3、培养分离物种的机制

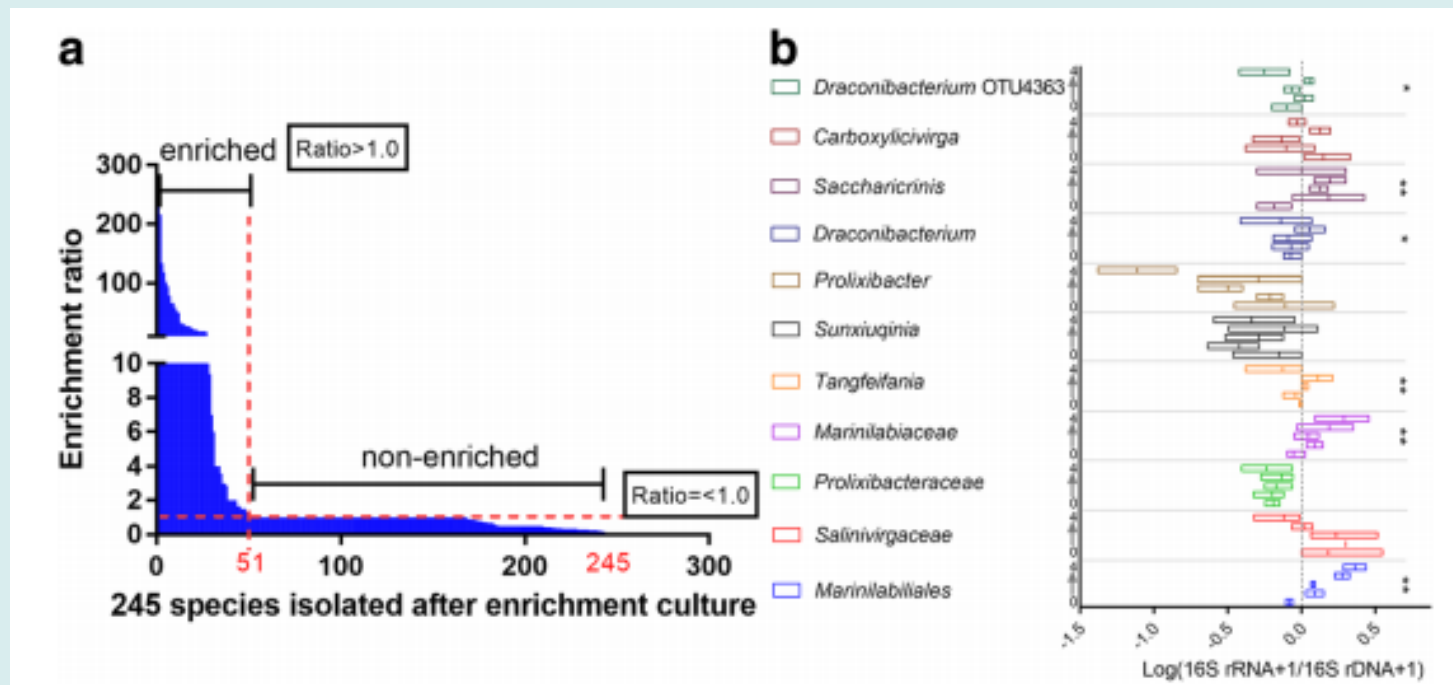


图5 富集培养过程中可培养物种的富集比率和
*Marinilabiliales*的生长状态分析

大多数*Marinilabiliales*细菌在原始沉积物中处于休眠状态，
并且在富集培养后它们可能非常活跃。

小结



大多数细菌在能量匮乏的环境中属于生长缓慢细菌（k-策略菌群），富集培养帮助某些物种（k-策略菌群）在MA培养基上适应和生长，并有助于休眠或VBNC细菌（r-策略菌群）的复苏。

4、富集培养中微生物基因表达分析

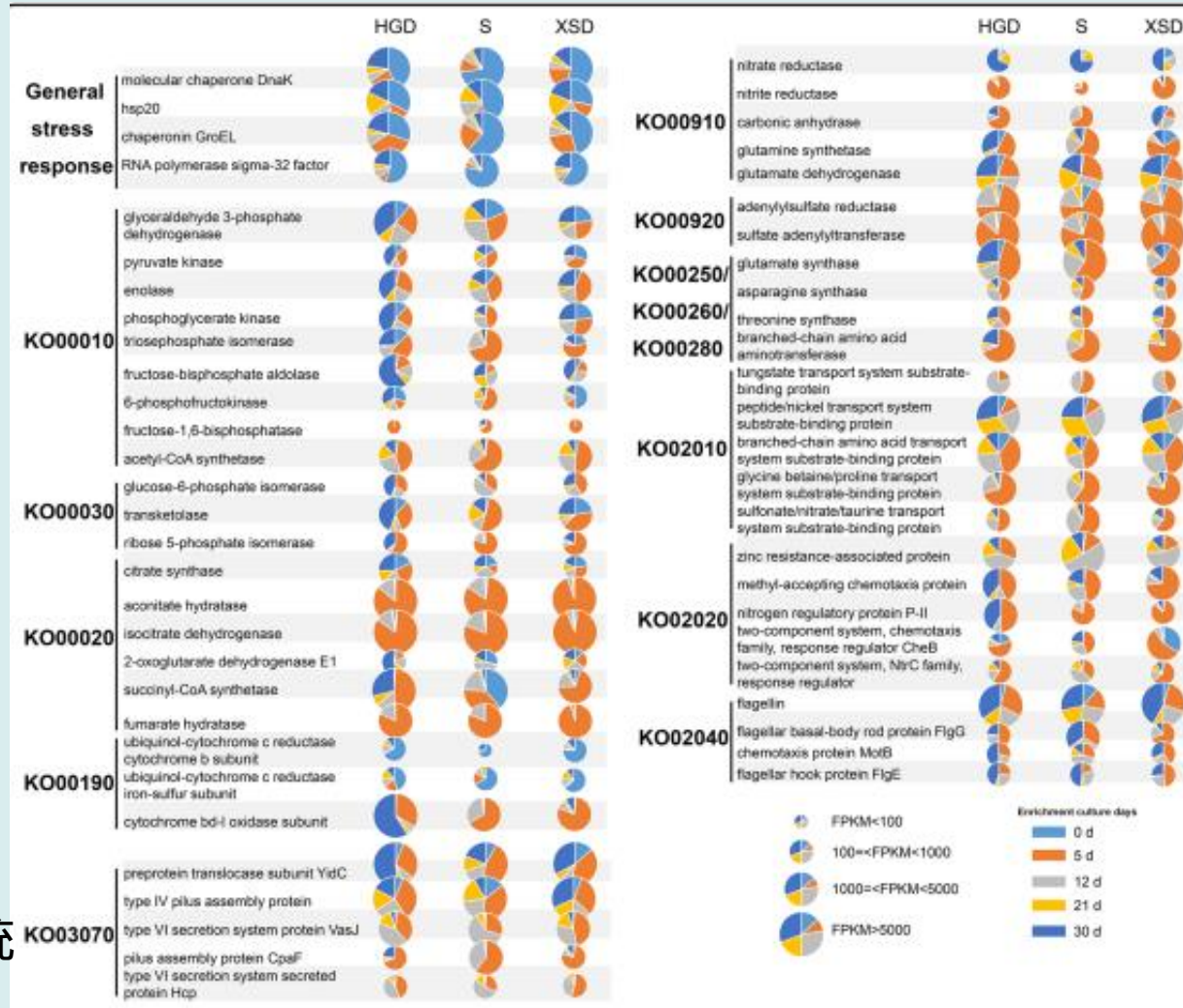
糖酵解/
糖异生

磷酸戊糖
途径

柠檬酸循环

氧化磷酸化

细菌分泌系统



氮代谢

硫代谢
氨基酸
代谢

ABC转运
蛋白

双组分
系统

鞭毛组
装体

富集培养前，参与胁迫

应答的一些基因高表达，这些基因在各种VBNC细菌中显著上调。

而富集培养过程中，参与细胞代谢过程的基因高表达，表明富集培养过程中微生物代谢活动更加活跃。

图6 富集处理下三个沉积物样本群落的原位功能活动相关转录本的相对丰度

4、富集培养中微生物基因表达分析



丙酮酸可能是复苏过程中的关键分子，可将细菌从不可培养状态转化为生长和克隆形成状态。

图7 富集处理下三个沉积物样本 *Prolixibacteraceae* 和 *Marinilabiales* 类群转录活性比较分析

4、富集培养中微生物基因表达分析

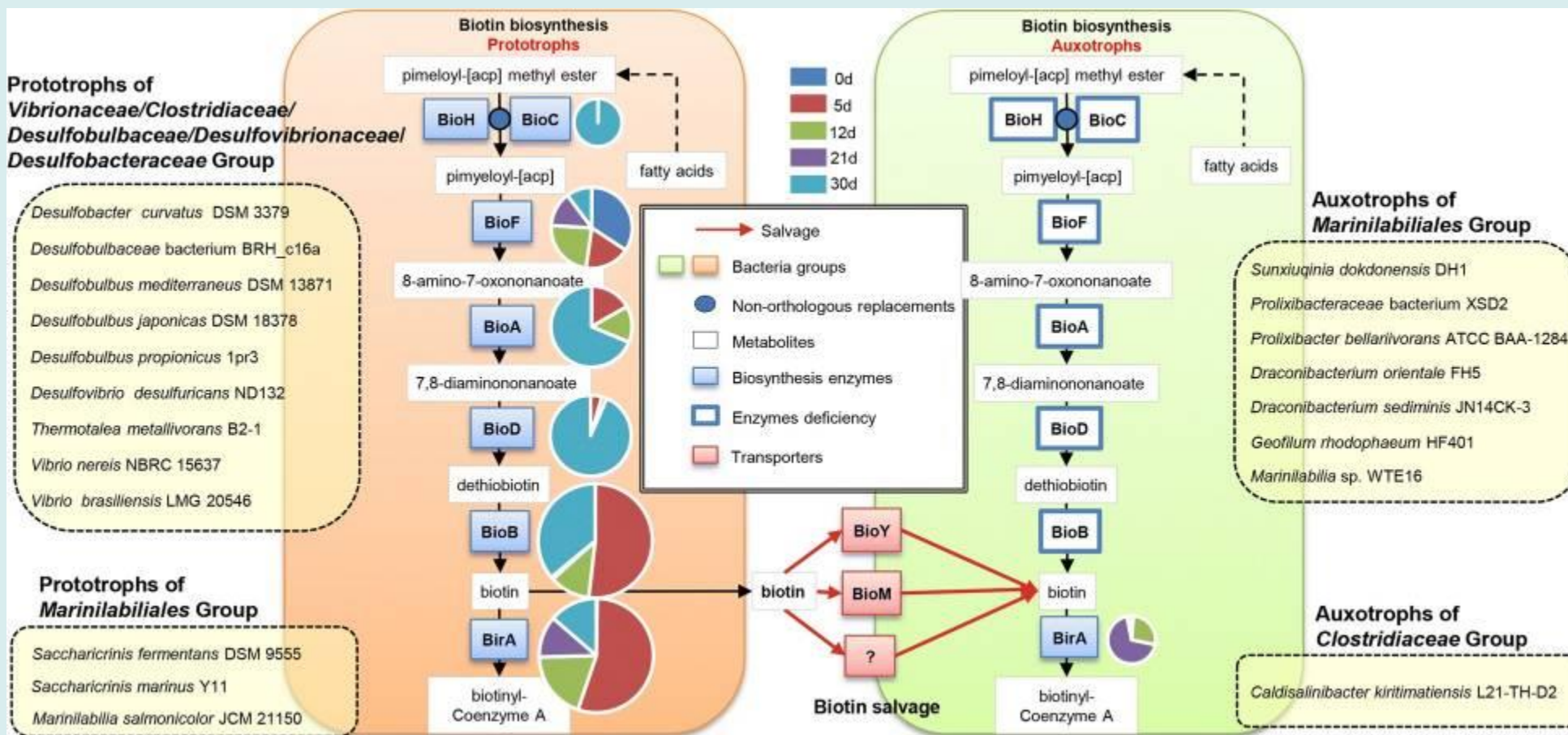


图8 比较基因组学分析 *Marinilabiales*类群和富集培养中富集微生物间的互作关系

合成途径的互补可能是相关类群出现共线性关系的原因。



Conclusion

04

Conclusion

1. 本研究建立了高效的富集培养技术，在富集难培养微生物时有很好的效果。
2. 该培养技术在培养微生物时不仅通过富集提高部分微生物丰度，还可通过复苏机制改善微生物培养状态。
3. 富集培养是一种复杂的混菌培养过程，其中包含微生物间的竞争与协作。考虑到培养技术必须从纯菌培养到混合培养进一步发展，为了让我们充分了解微生物世界，我们应该重新理解经典的浓缩培养方法。



THANK YOU

敬请批评指
正！

