

Геномика как инструмент изучения некультивируемых микроорганизмов

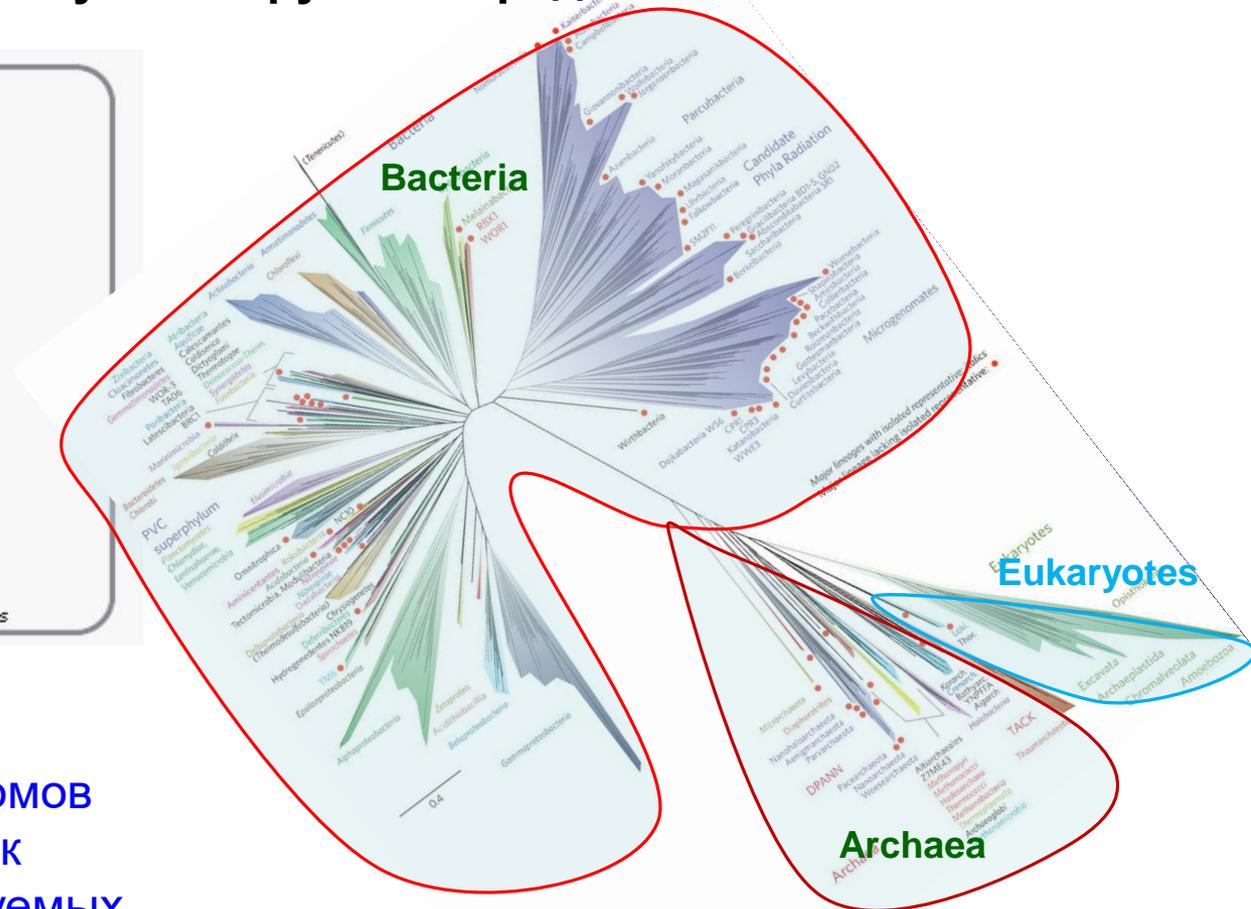
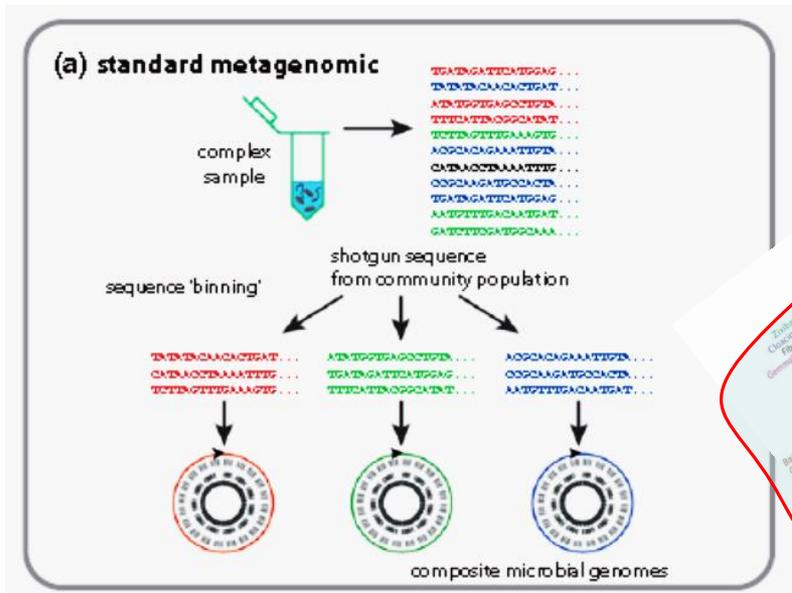
Николай Равин

**ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН**

«Некультивируемые» микроорганизмы

Менее 1% микроорганизмов из природных экосистем удается культивировать

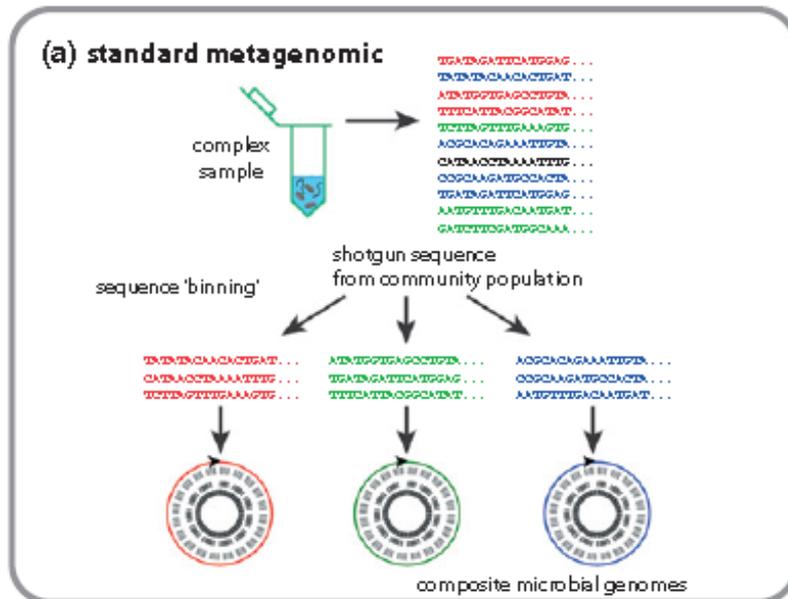
Среди бактериальных таксонов высшего порядка (~ 100 филумов), около половины не имеют культивируемых представителей



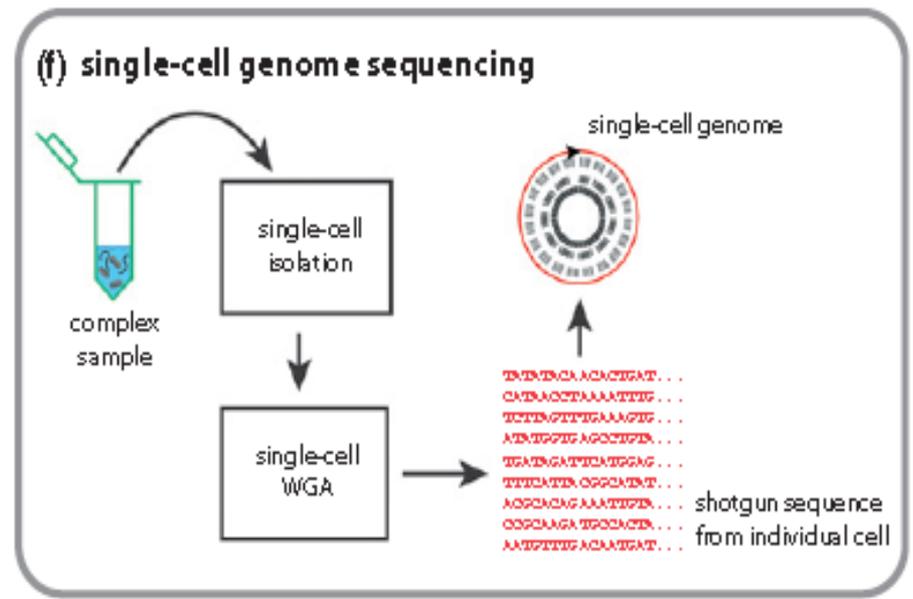
Метагеномика и анализ геномов единичных клеток – источник информации о некультивируемых микроорганизмах

Hug et al., Nature Microbiology, 2016

Метагеномика и секвенирование геномов индивидуальных клеток: как это работает

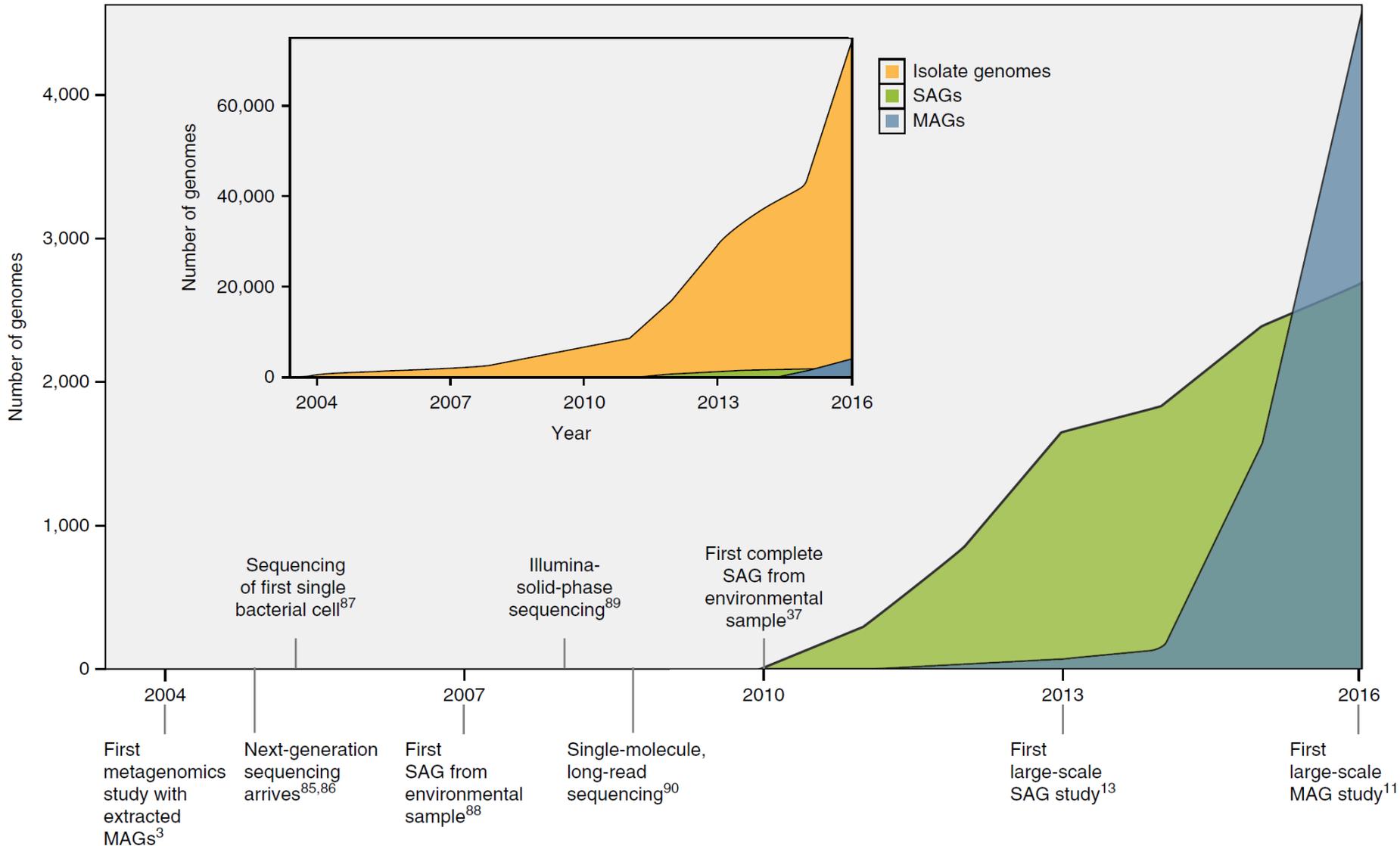


Проблема – распределение контигов между организмами



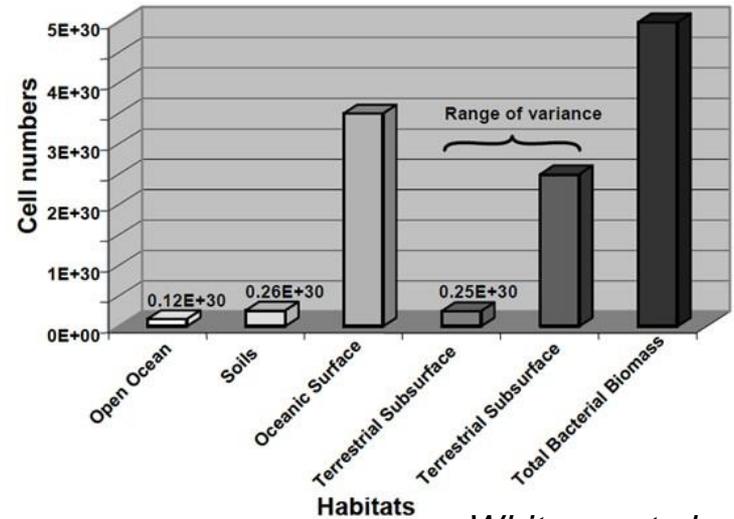
Проблема – неполная амплификация генома одной клетки

Метагеномика и секвенирование геномов индивидуальных клеток: масштабы



Подземная биосфера: экстремальная и малоизученная экологическая ниша

- ❖ Одна из самых больших экосистем на Земле, которая содержит около половины микробной биомассы
- ❖ Глубина: до нескольких километров, ограничена ростом температуры с глубиной и доступностью субстратов
- ❖ Скорость микробного метаболизма низкая, время генерации может достигать сотен-тысяч лет
- ❖ Экстремальные условия: высокое давление и температура
- ❖ Предположительно древние и изолированные системы (нет связи с поверхностью?)



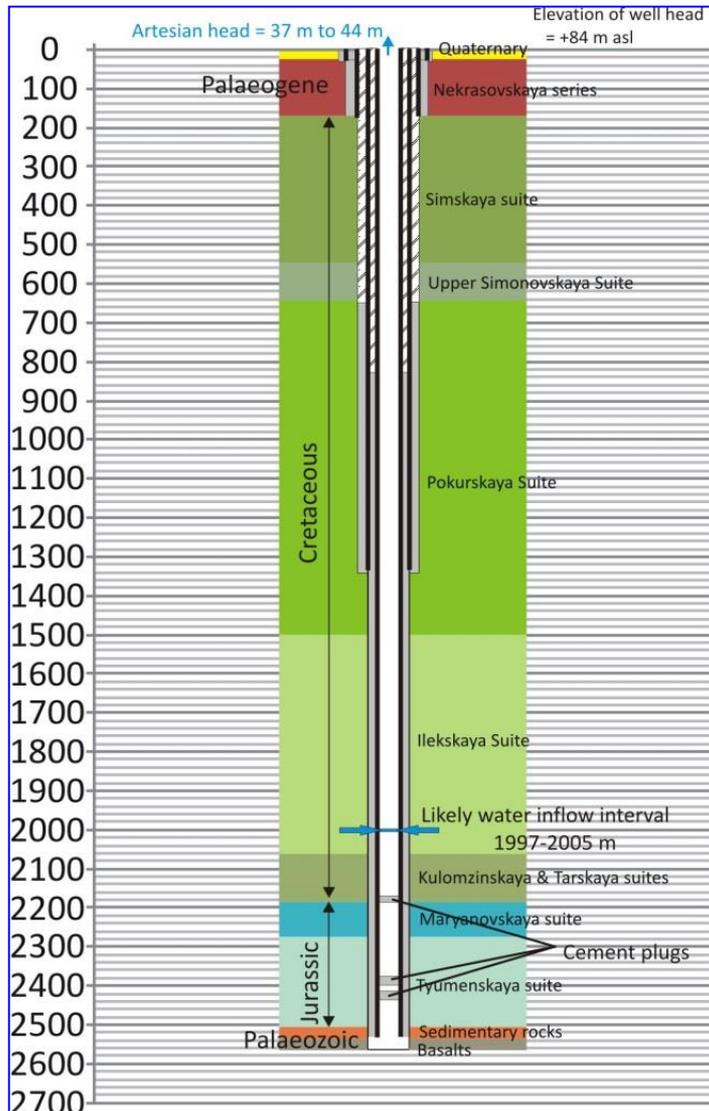
Whitman et al., 1998

Источники энергии и питания:

Вулканические породы: мало органики. Хемолитоавтотрофный метаболизм (H_2 и CO_2)

Осадочные породы: органические вещества являются основным источником углерода и энергии. Гетеротрофный метаболизм.

Нефтепоисковая скважина 1-R (Белый Яр, Томская обл.)



Возраст водовмещающих пород –
Нижнемеловые отложения (~130 млн лет)
Год бурения – 1957, нефть не найдена
Глубина отбора воды – 2.17 км
Температура воды 40.2 - 44.8°C
pH воды 7.92 - 8.25
Eh воды от -279 до -341 mV
Производительность 655 м³/сут

Химический состав: Растворенные газы:

Na⁺ – 661 mg/l

CH₄ – 60,2%

Ca²⁺ – 9.7 mg/l

N₂ - 32%

K⁺ – 3.02 mg/l

O₂ - 6.9%

Mg²⁺ – 0.14 mg/l

He – 0,7%

Cl⁻ – 844 mg/l

CO - 0.2%

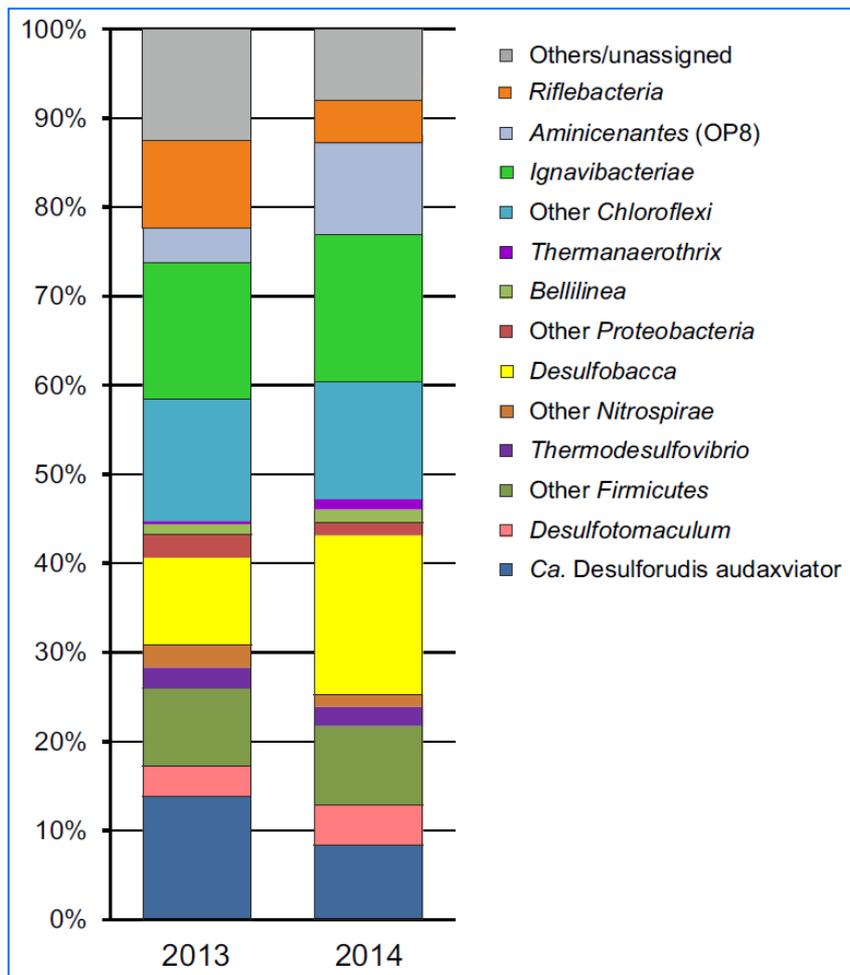
SO₄²⁻ < 5 mg/l

H₂S = 0.64 ± 0.35 mg/L

NO₃⁻ < 3 mg/l

**Общая минерализация 1.8 г/л,
морского происхождения**

Анализ 16S рРНК: сложное по составу сообщество с большой долей «некультивируемых» линий бактерий

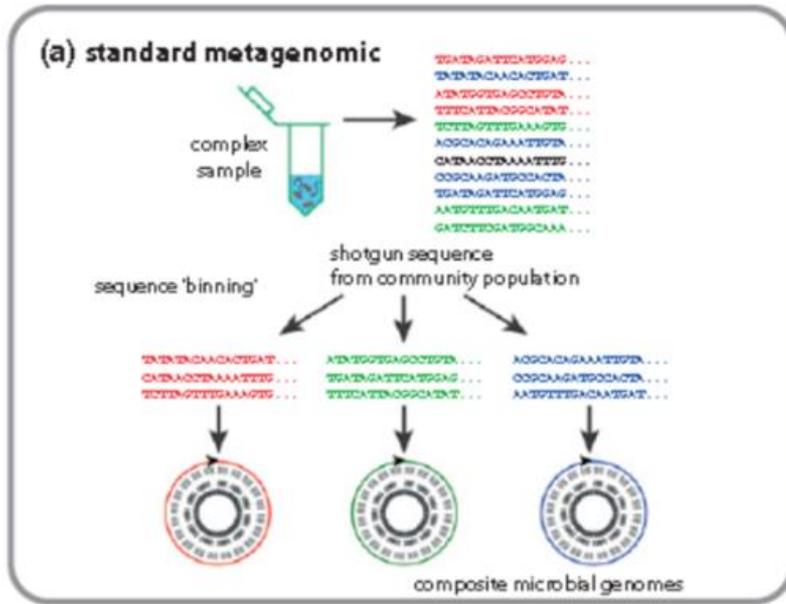


Присутствуют сульфат-редукторы и органотрофы

археи: < 0.1% (*Methanothermobacter*)

Только 30% последовательностей 16S рРНК может быть отнесено к известным видам микроорганизмов (в основном сульфат-редукторы)

Анализ метагенома: «разбор» на геномы отдельных микроорганизмов



Результат: «бины» (Bin, Metagenome-assembled genome), представляющие композитные геномы членов сообщества



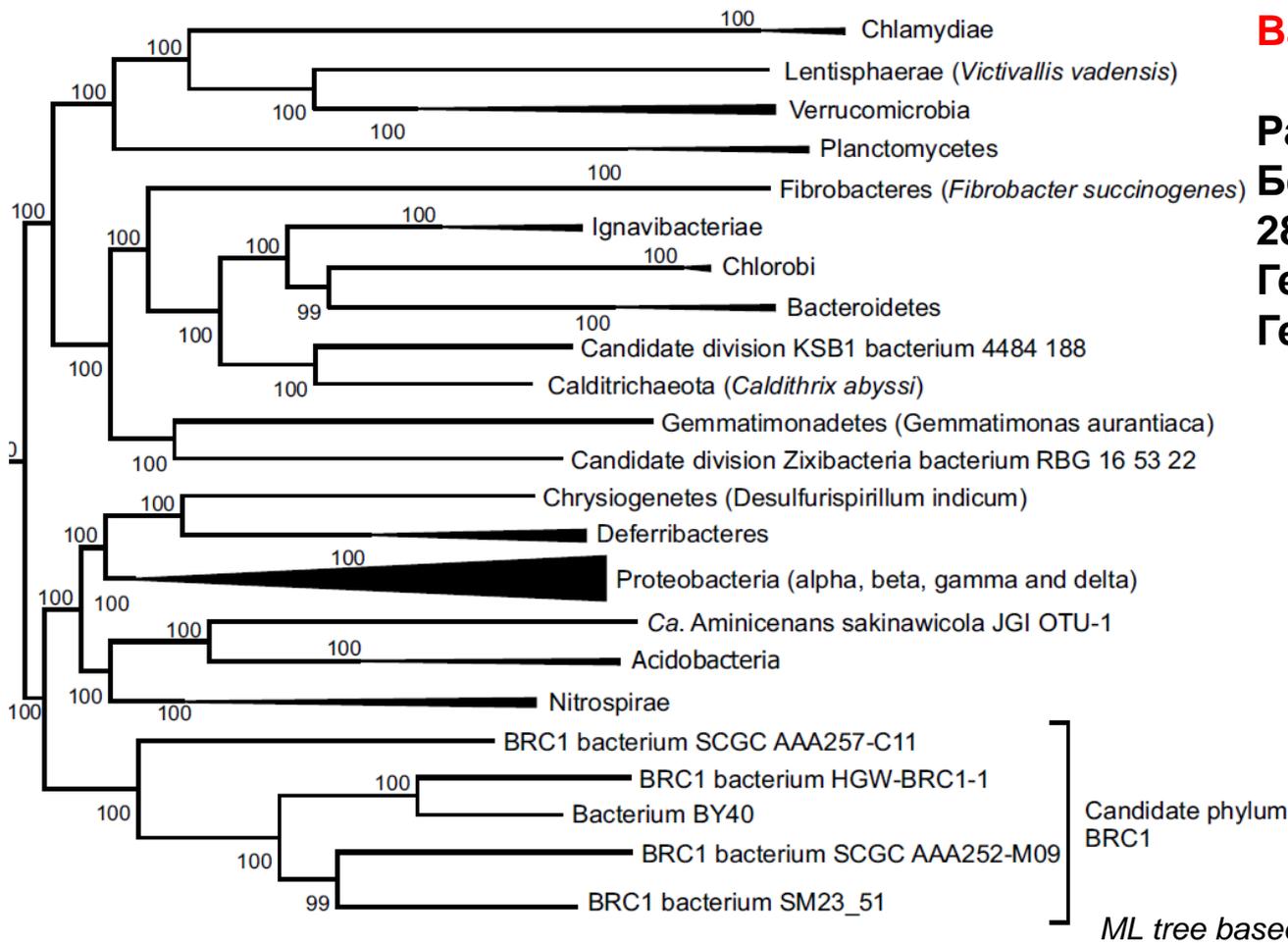
Сортировка контигов по организмам на основании частот встречаемости олигонуклеотидов, кратности прочтения и др.

Анализ метагенома: сборка композитных геномов отдельных микроорганизмов

Bin ID	Phylogenetic assignment	Completeness (%)	Contamination (%)	Contigs	Assembly size, Mb	Sequence coverage	Share in metagenome
57	<i>Firmicutes, Ca Desulforudis audaxviator</i>	98,1	0,3	48	2.18	413	6,04%
29	<i>Firmicutes, Desulfotomaculum</i>	100,0	4,6	83	3.26	102	2,24%
45	<i>Firmicutes, unclassified</i>	100,0	103,1	751	6.76	14	0,62%
12	<i>Firmicutes, unclassified</i>	97,4	1,4	190	3.85	17	0,45%
9	<i>Firmicutes, unclassified</i>	96,6	0,6	39	2.35	33	0,52%
15	<i>Firmicutes, Pelotomaculum</i>	93,4	0,6	330	2.16	9	0,13%
50	<i>Firmicutes, unclassified</i>	90,9	2,3	119	3.23	18	0,39%
55	<i>Nitrospirae, Thermodesulfovibrio</i>	99,0	0,9	17	1.90	140	1,79%
2	<i>Nitrospirae, unclassified</i>	97,3	3,6	74	2.89	36	0,71%
47	<i>Deltaproteobacteria, Desulfobacca</i>	98,1	1,3	32	3.09	1383	28,67%
8	unclassified <i>Desulfobacteraceae</i>	96,8	0,6	26	3.69	37	0,91%
32	<i>Chloroflexi, Thermanaerotherix</i>	100,0	95,8	71	6.29	25	1,06%
23	<i>Chloroflexi, unclassified Anaerolineales</i>	92,7	5,6	32	3.67	36	0,90%
34	<i>Chloroflexi, unclassified Anaerolineales</i>	96,6	12,3	513	4.08	25	0,69%
1	<i>Chloroflexi, unclassified</i>	96,3	5,5	185	4.79	174	5,60%
13	<i>Chloroflexi, unclassified Anaerolineales</i>	92,7	5,6	32	3.97	51	1,36%
21	<i>Chloroflexi, unclass. Anaerolineales</i>	91,8	6,1	20	3.90	484	12,68%
39	<i>Ignavibacteriae, unclassified</i>	95,6	1,1	23	2.63	826	14,58%
27	<i>Actinobacteria, unclassified</i>	95,4	0,8	20	1.84	18	0,22%
33	<i>Spirochaetes, unclassified</i>	91,0	0	83	2.32	30	0,46%
11	<i>Elusimicrobia, unclassified</i>	96,6	0	88	2.11	32	0,45%
38	Aminicenantes (OP8)	94,7	5,1	25	2.90	341	6,64%
40	Candidate phylum BRC1	99,4	6,2	4	3.29	37	0,81%
5	Candidate phylum Riflebacteria	98,3	2,5	60	5.70	85	3,24%

Получено 25 MAGs с полнотой >90%. Даже геномы организмов, составляющих менее 1% сообщества, могут быть собраны

Первый полный геном представителя кандидатного филума BRC1



Bacterium BY40

Размер генома: 3,289,105 bp

Белок-кодирующие гены:
2851

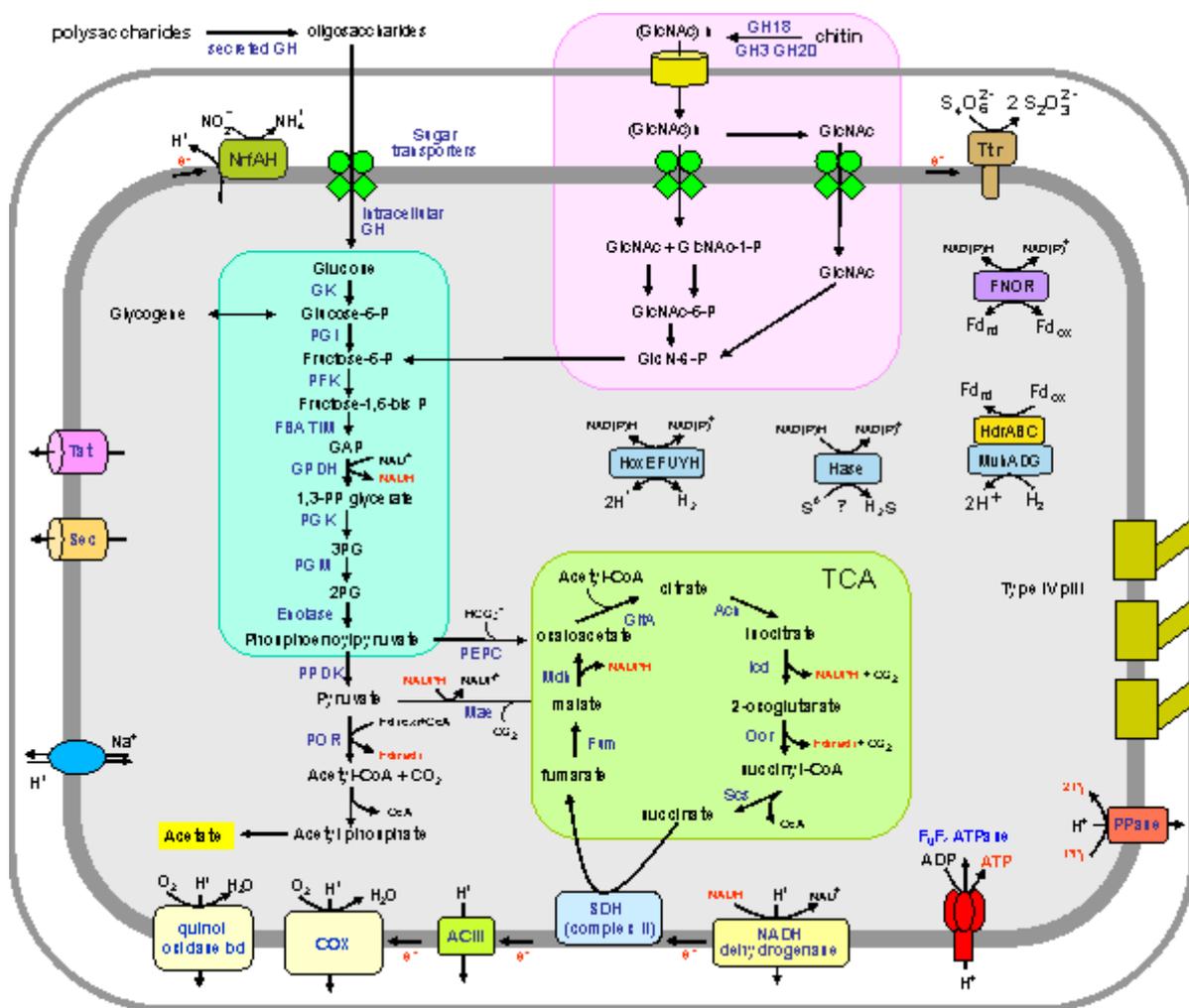
Гены tRNA: 46

Гены rRNA: 16S и 23S-5S

Кандидатный филум BRC1

- обнаружен более 15 лет назад по 16S рРНК в различных экосистемах, в т.ч. почвах
- нет культивируемых штаммов
- известны несколько неполных геномов, собранных из метабеномов или единичных 10 клеток

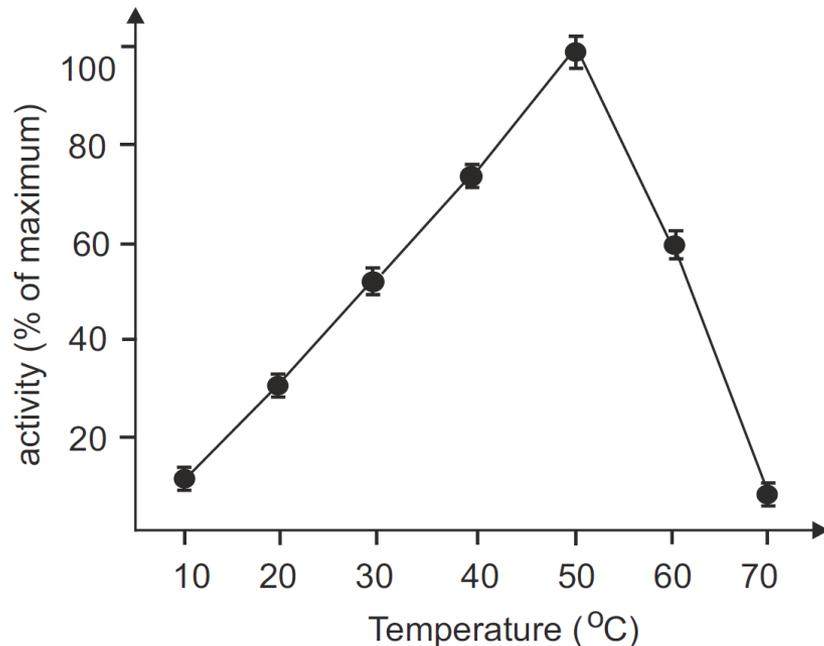
Пути метаболизма BRC1 бактерии BY40, предсказанные на основе анализа ее генома



- факультативный анаэроб
- «ползающая» подвижность клеток обусловленная пиями IV типа
- может использовать полисахариды (хитин и крахмал, но не целлюлозу или ксилан) и белковые субстраты
- аэробная дыхательная цепь (NADH dehydrogenase, SDH, ACIII, COX)
- анаэробный метаболизм: ферментация и анаэробное дыхание с использованием нитрата и соединений серы

Органотрофная бактерия с разнообразными возможностями метаболизма

Экспериментальное подтверждение геномных предсказаний: использование хитина



Активность рекомбинантной хитиназы BY40_1901 максимальна при температуре 50°C, что соответствует условиям подземного резервуара

General characteristics of the genomes of BY40 and HGW-BRC1-1.

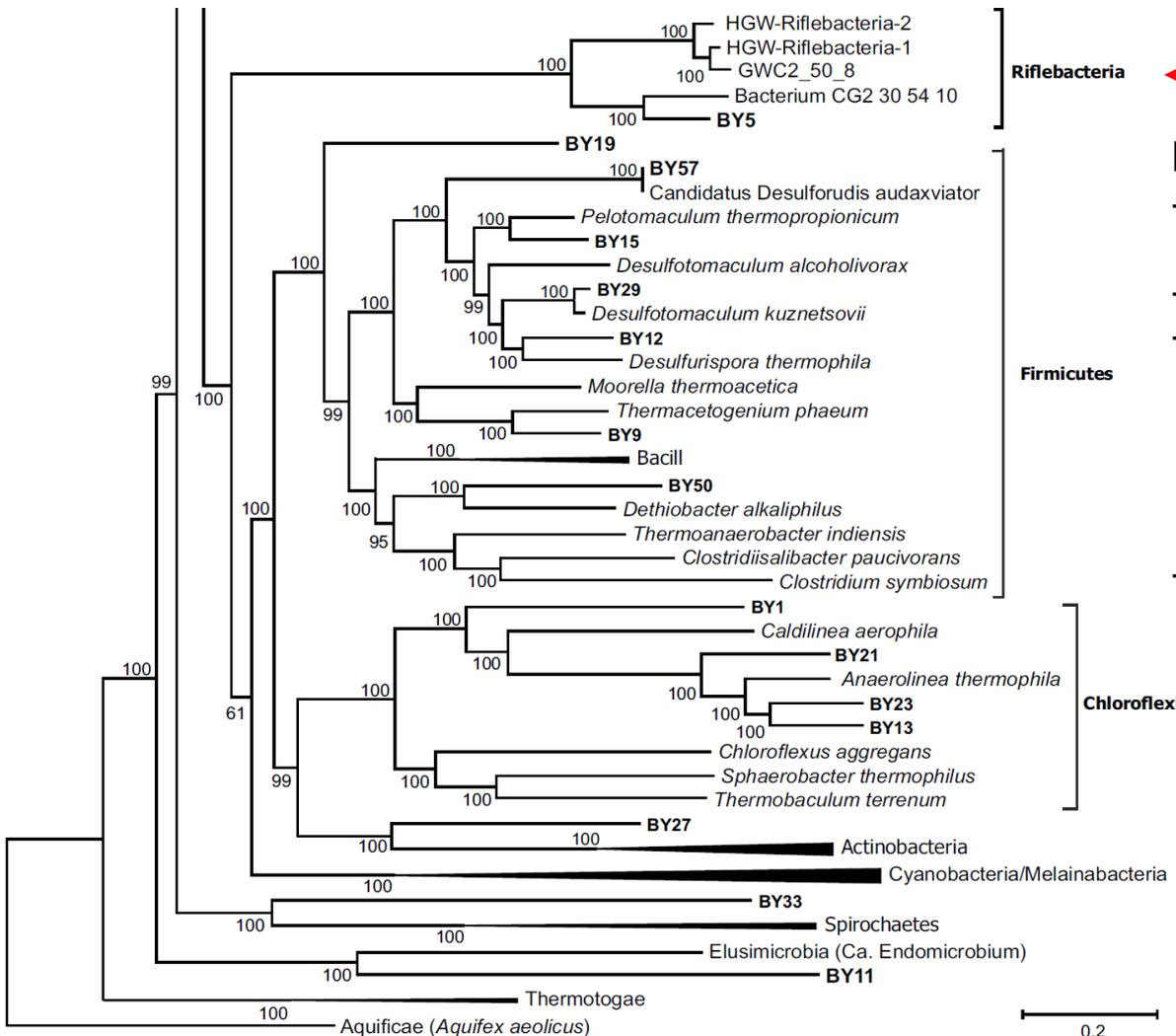
Genome properties	BY40	HGW-BRC1-1
Genome size (Mb)	3.29	3.77
Contigs	1	36
Completeness	finished	99.4%
G + C content (%)	56.0	58.4
rRNA genes	3	3
tRNA genes	46	46
Protein-coding genes	2851	2947
of them functionally assigned	1843	1269

Другая бактерия филума BRC1: HGW-BRC1-1

- Из метагенома подземных вод на глубине 160 м в Японии
- Похожие на BY40 аэробная и анаэробная дыхательные цепи
- Нет флагелл, но есть пили IV типа
- Путь деградации хитина

На основе филогенетических и геномных данных новая бактерия BY40 описана как *Candidatus Sumerlaea chitinivorans*, а для кандидатного филума BRC1 предложено название *Sumerlaeota* (Syst Appl Microbiol., in press)

Бактерия BY5 кандидатного филума *Riflebacteria*



ML tree based on concatenated marker genes

Riflebacteria:

- Впервые найдены в 2016 в водоеме в Colorado, USA
- Некультивируемый
- 4 неполных драфт-генома, все из подземных местообитаний (Crystal Geysir, Utah, USA, Rifle aquifer and a groundwater at the Horonobe Underground Research Laboratory, Japan)
- Возможности метаболизма неизвестны

Бактерия BY5

Размер генома: 5,695,728 bp

Белок-кодирующие гены:
4380

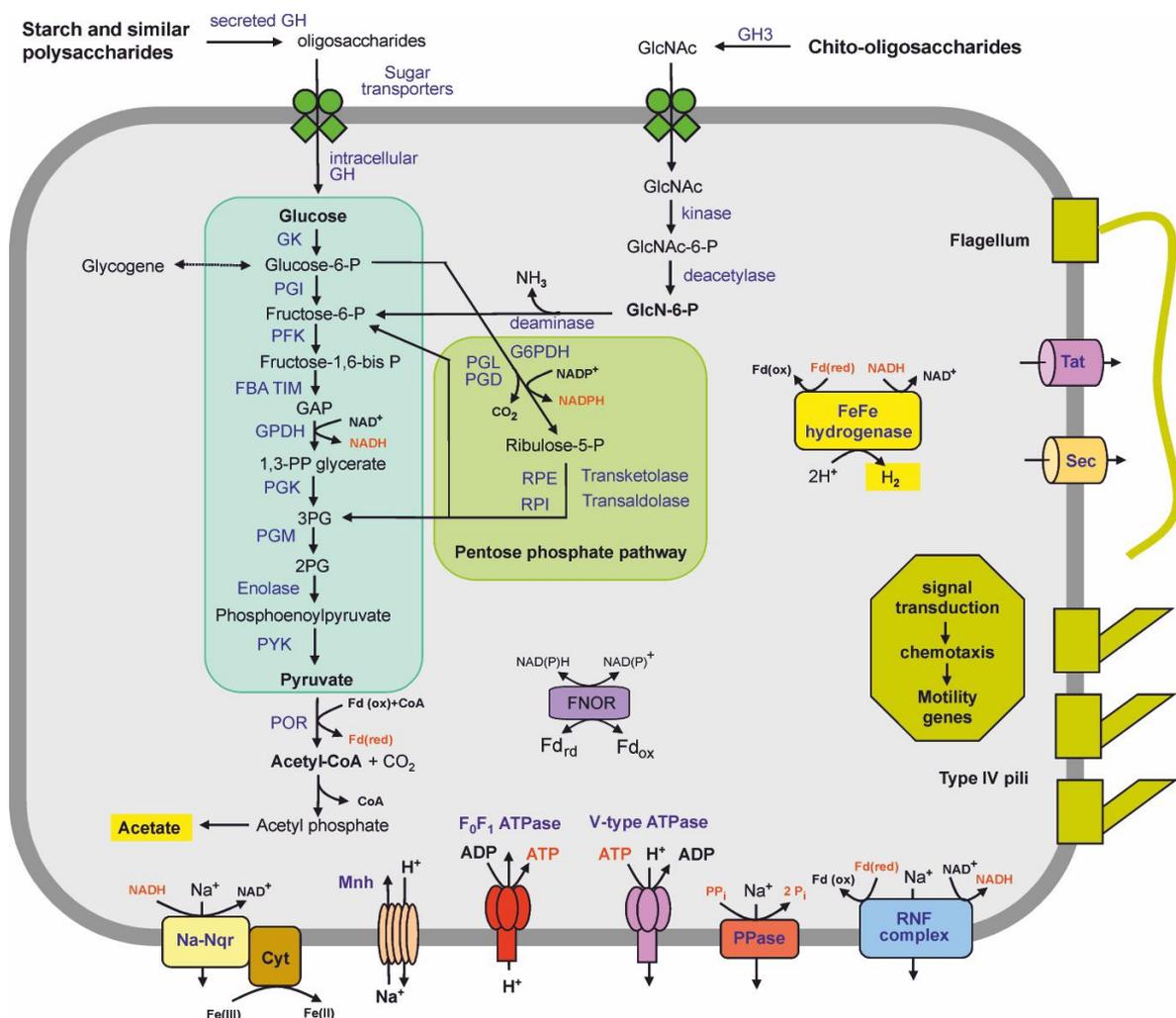
Гены tRNA: 44

Гены rRNA: 16S-23S и 5S

Изолированная эволюционная линия:

- В генбанке нет последовательностей 16S rRNA с >92% идентичностью
- Ближайшая культивируемая бактерия - *Thermaerobacter subterraneus* (82% 16S identity)

Пути метаболизма *Riflеbacteria* бактерии ВУ5, предсказанные на основе анализа ее генома



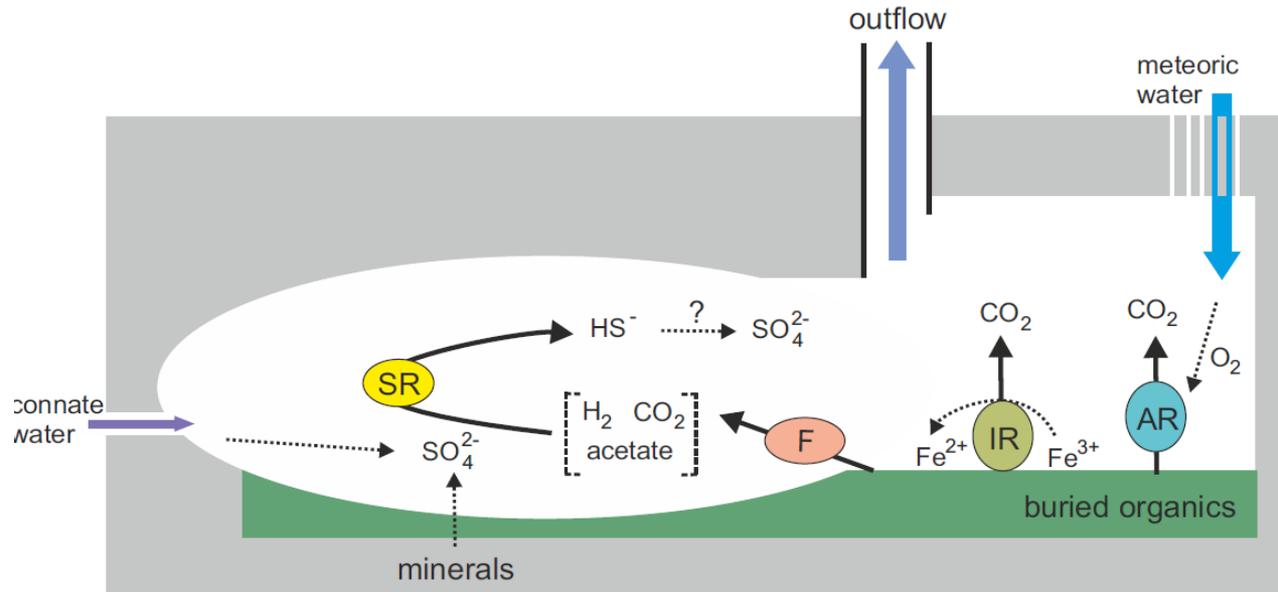
- Анаэроб
- Флагеллы и пили типа IV pili
- Может использовать узкий спектр полисахаридов (хитоолигосахариды и крахмал)
- Нет аэробного дыхания
- Нет путей восстановления сульфата, сульфита, нитрата, нитрита, арсената и серы
- Генерация трансмембранного ионного градиента: RNF complex, Na⁺-translocating NADH-quinone oxidoreductase, V-type ATPase
- Мультигемовые цитохромы с типа: диссимиляционная Fe(III) редуктаза?

***Candidatus Ozemobacter sibiricus* – специализированный органотроф, способный использовать некоторые углеводы, осуществляя ферментацию или диссимиляционное восстановление железа Fe(III)**

Модель экосистемы подземного водного горизонта

Вопросы на которые нужны ответы:

- Большое число сульфат-редукторов при низкой концентрации сульфата (<5 mg /L)
- Широкий спектр ферментов деградации растительных полисахаридов и хитина
- Наличие (факультативных) аэробов и кислорода в образцах газа



AR
Chloroflexi, Ignavibacteriae,
BRC1

F
Aminicenantes, Chloroflexi,
Ignavibacteriae, Riflebacteria,
BRC1

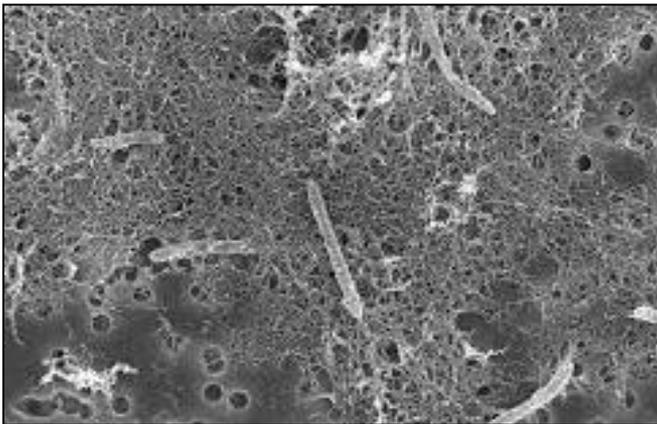
IR
Chloroflexi, Riflebacteria,
BRC1, Ignavibacteriae (?)

SR
Firmicutes, Deltaproteobacteria
Thermodesulfovibrio

- ❖ Сложная пространственно гетерогенная система включающая биопленки и планктонные микроорганизмы
- ❖ Использует «захороненную» органику морских осадков
- ❖ Приток содержащих кислород вод с поверхности?

Эволюция и глобальное распространение микроорганизмов

Desulforudis audaxviator – представитель подземной биосферы

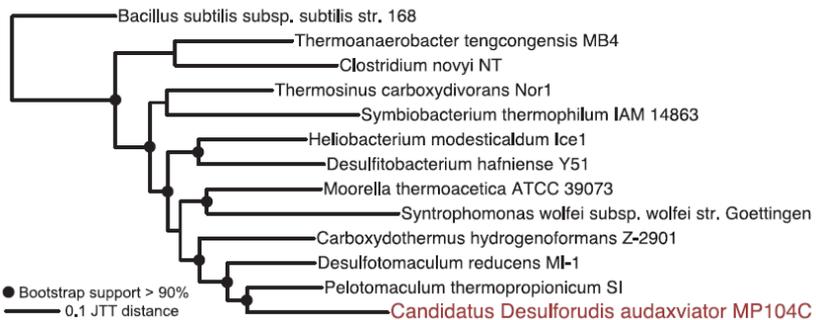


Desulforudis audaxviator MP104C (2349476 нт.)

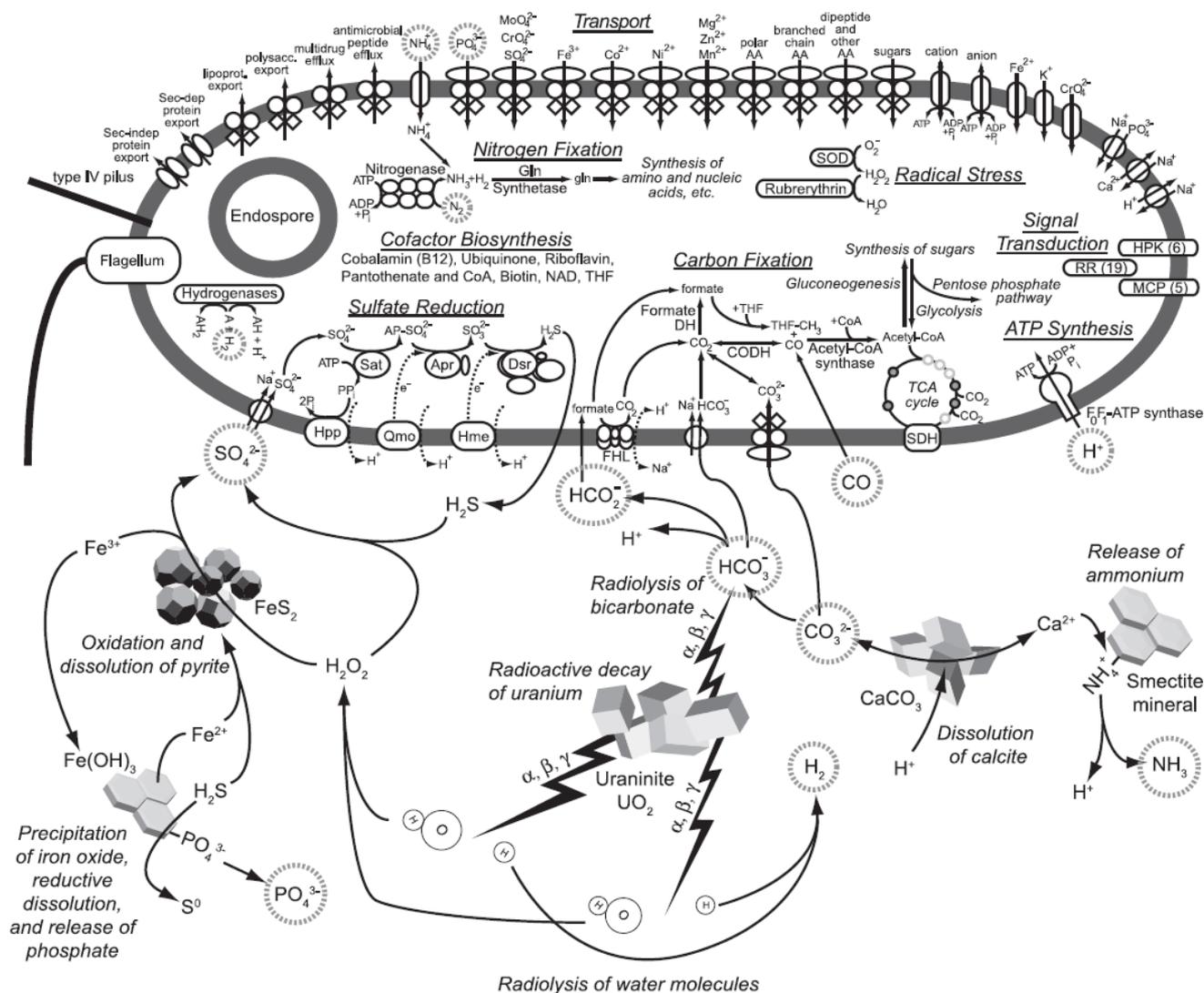
- Обнаружен в метагеноме дренажных вод из рудника по добычи золота в Южной Африки на глубине 2800 метров
- Единственный организм в этой экосистеме
- Анаэробный хемолитотроф способный окислять водород в процессе сульфат редукции и фиксировать углевод по пути Вуда-Лингдаля

Может существовать в полностью изолированной от поверхности экосистеме

A Phylogenetic classification



Desulforudis audaxviator в Южно-Африканской шахте: самодостаточная подземная экосистема не зависящая от поверхности



Desulforudis audaxviator: глобальное распространение

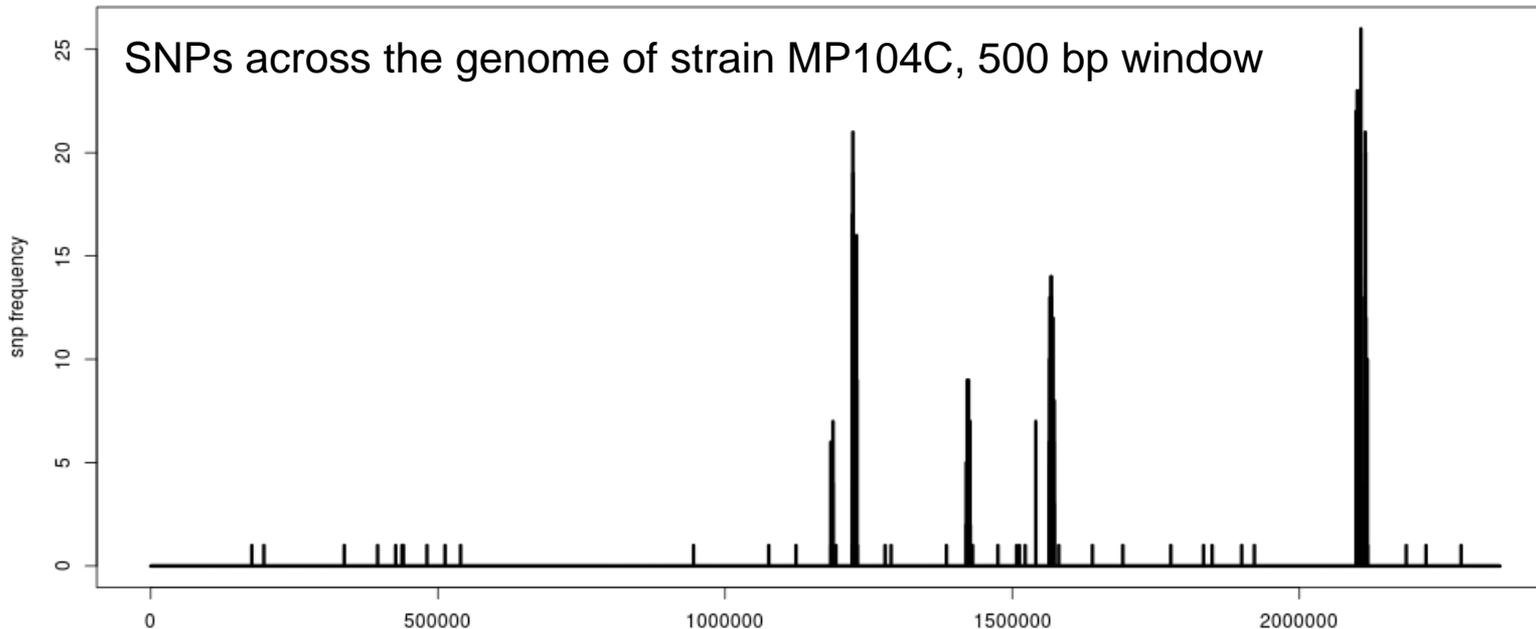


16S rRNA sequences with > 95% identity:

- deep terrestrial fracture systems, South Africa
- alkaline groundwater associated to serpentinization, Portugal
- district heating systems, Denmark
- deep geothermal aquifer in Amargosa Valley, CA, USA
- fluid produced from the warm well of geothermal plant, Germany
- deep subsurface thermal aquifer in Siberia, Russia

Сравнение геномов *D. audaxviator* MP104C и ВУ: Идентичность на нуклеотидном уровне > 99.9%

Полный геном «сибирского» штамма ВУ собран из метагенома



Всего найдено 753 SNPs, из которых 722 кластеризуются в 6 участках генома: 182 несинонимичные / 425 синонимичные $dN/dS = 0.43$

Обмен участками генома размером несколько kb с более удаленными штаммами?

Сравнение геномов *D. audaxviator* MP104С и ВУ: Оценка времени дивергенции

31 “истинных” SNP:

Время дивергенции

$$31 / [4.7 \times 10^{-9} \times 2.3 \times 10^6] =$$

3,000 лет

722 кластерных SNPs в 48.5 kb

Время дивергенции

$$722 / [4.7 \times 10^{-9} \times 4.8 \times 10^4] =$$

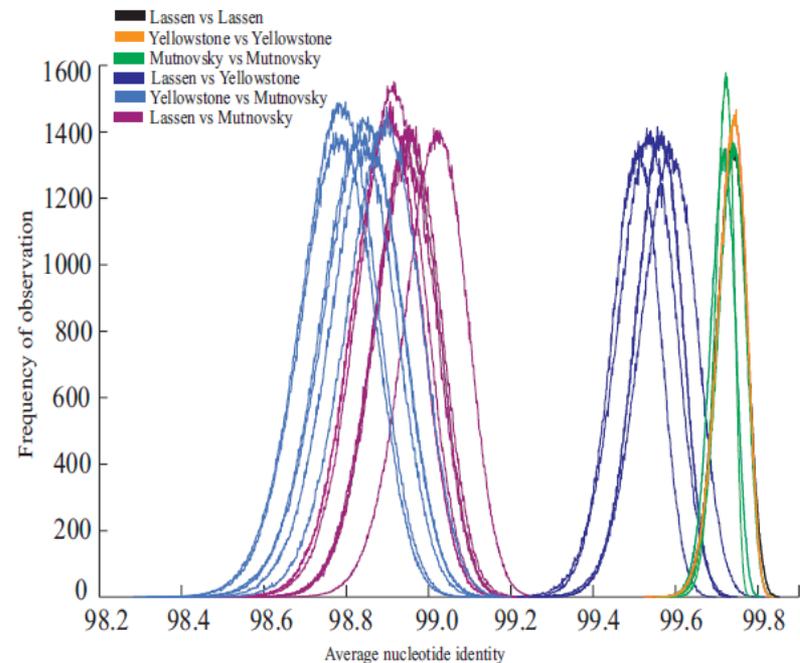
3,200,000 лет

*Время раскола Пангеи – более
130 млн лет*

Biogeography of the *Sulfolobus islandicus* pan-genome

Michael L. Reno^a, Nicole L. Held^a, Christopher J. Fields^b, Patricia V. Burke^a, and Rachel J. Whitaker^{a,b,1}

PNAS | May 26, 2009 | vol. 106 | no. 21 | 8605–8610

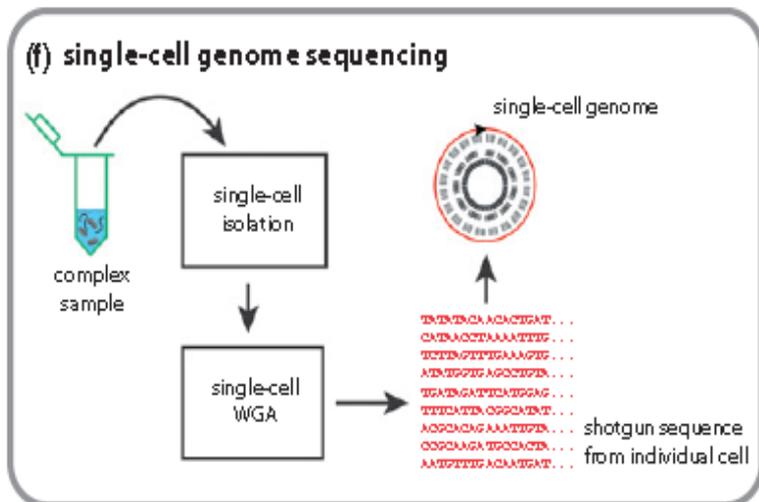


The average rate of nucleotide substitution was estimated to be 4.66×10^{-9} substitutions per site per year, on the order of the universal rates estimated from comparisons of other species and predicted from laboratory determinations of mutation rates in *Sulfolobus*

Альтернатива метагеномике: секвенирование геномов индивидуальных клеток

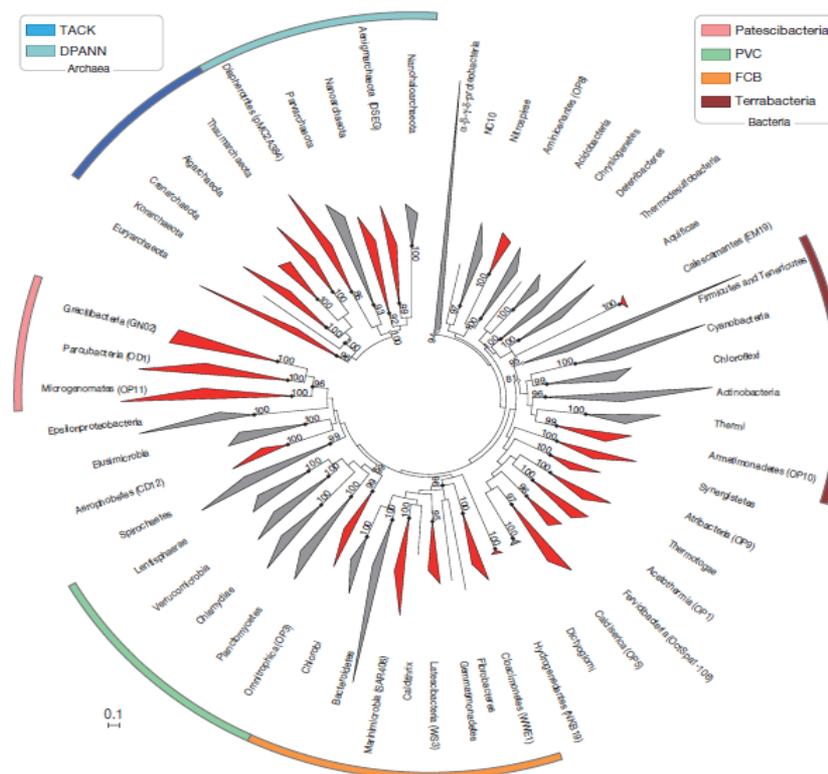
Проект Microbial Dark Matter

Nature 499, 431–437 (2013)



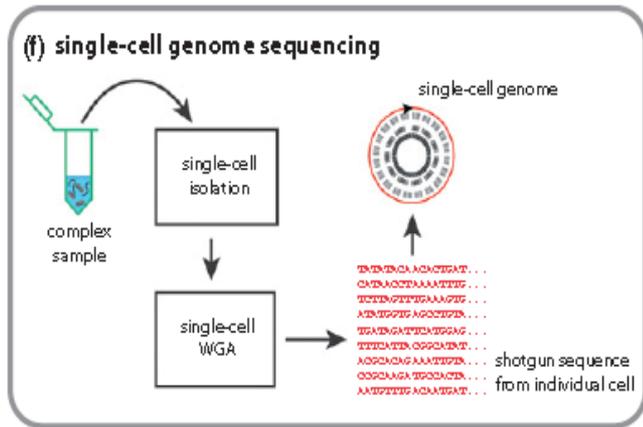
Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter

Christian Rinke¹, Patrick Schwiertek¹, Alexander Sczyrba^{1,2}, Natalia N. Ivanova¹, Iain J. Anderson^{1,†}, Jan-Fang Cheng¹, Aaron Darling^{3,4}, Stephanie Malfatti¹, Brandon K. Swan⁵, Esther A. Gies⁶, Jeremy A. Dodsworth⁷, Brian P. Hedlund⁷, George Tsiamis⁸, Stefan M. Sievert⁹, Wen-Tso Liu¹⁰, Jonathan A. Eisen³, Steven J. Hallam⁶, Nikos C. Kyrpides¹, Ramunas Stepanauskas⁵, Edward M. Rubin¹, Philip Hugenholtz¹¹ & Tanja Woyke¹



Просеквенированы геномы 201 клетки, представляющих 29 «некультивируемых» линий

Характеристика генетического разнообразия сибирской популяции *D. audaxviator* на основании данных секвенирования геномов единичных клеток



Поскольку MAG представляет собой «консенсусную» последовательность, количество SNP в индивидуальных клетках могло бы быть больше 753

Но сиквенс геномов единичных клеток показал что Сибирская популяция *D. audaxviator* BY генетически однородна

Bigelow | Single Cell Genomics Center

SAG ID	Number of contigs	Total assembly length (bp)	BY genome coverage	SNPs *
AG-720-E19	120	959905	43%	11
AG-720-I18	61	568678	26%	1
AG-720-J22	105	1505580	68%	9

* Относительно генома, собранного из метагенома

Какой вклад вносит метагеномика и геномика единичных клеток в микробиологию?

Классическая микробиология

Характеристика чистых культур
Небольшое число «референсных» организмов

Метагеномика и геномика единичных клеток

Описание большого числа микроорганизмов на основе геномного анализа (молекулярная биология + биоинформатика) и знания о «референсных» объектах

- ❖ Возможность описания и предсказания свойств большого числа новых организмов на основе их геномов без культивирования
- ❖ Основа для выбора условия культивирования новых микроорганизмов (genome-based cultivation)
- ❖ Описание структуры и функции микробных сообществ т.е. какие организмы присутствуют и что они могут делать.
- ❖ Практическое применение
 - новые ферменты
 - направленное воздействие на микробное сообщество.

Благодарю за внимание!



**ФИЦ «Биотехнологии»
РАН**

А.В. Марданов

В.В. Кадников

А.В. Белецкий

Н.В. Равин

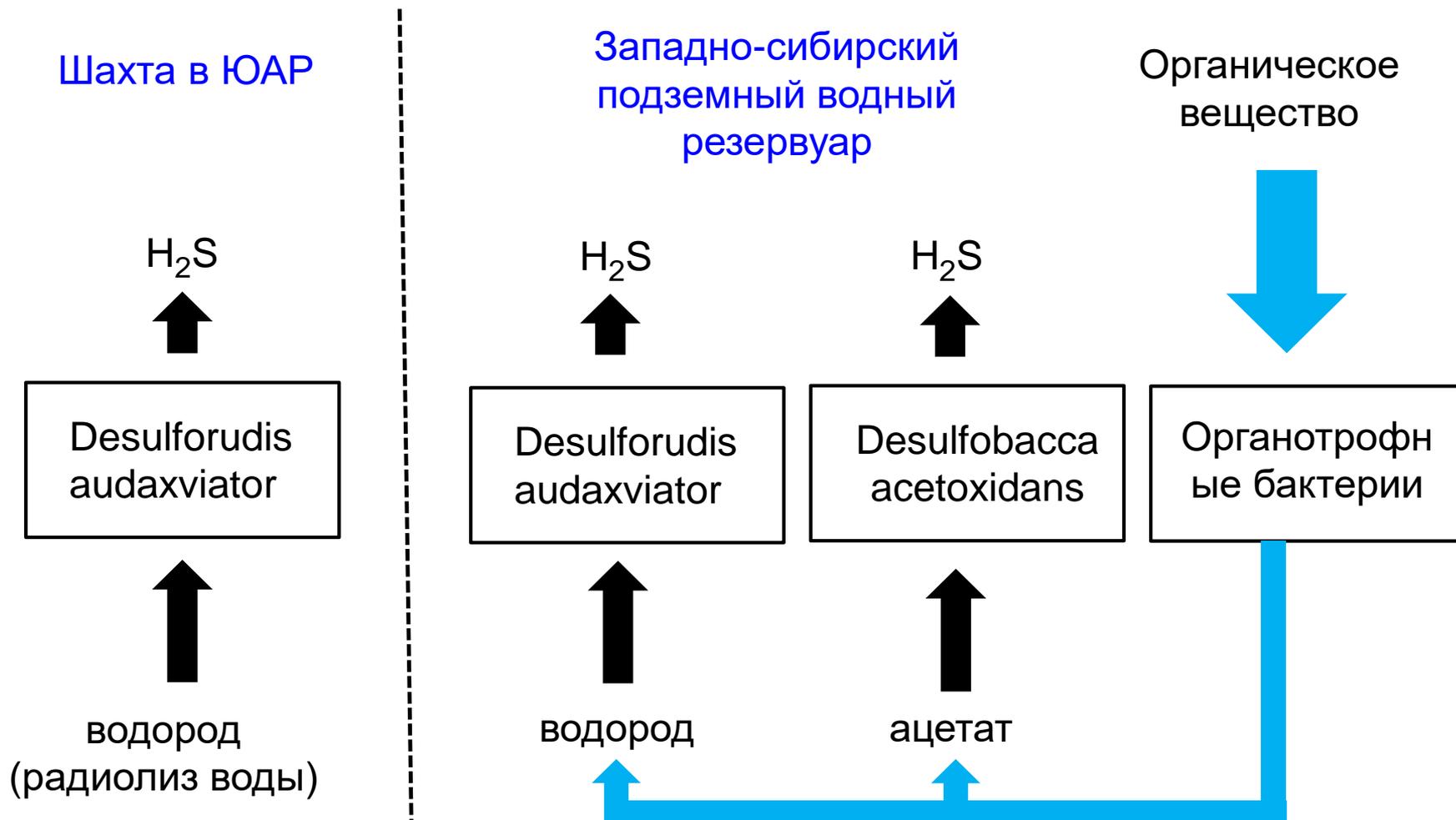
**Томский
государственный университет**
О.В. Карначук

**Институт биоинженерии
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН**

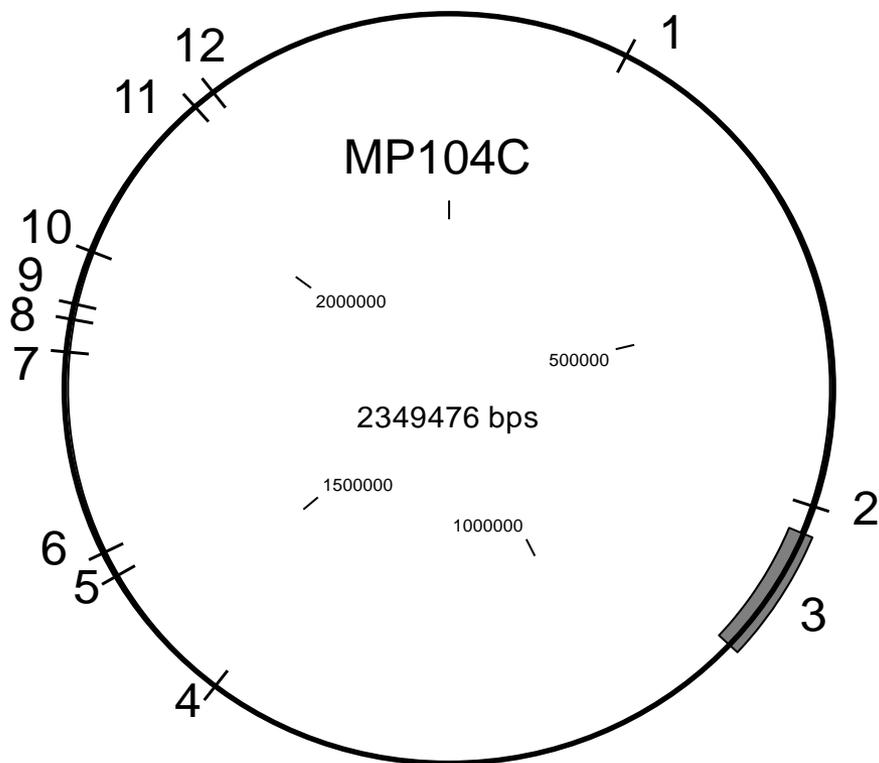


*Москва, просп. 60-летия Октября, 7/1
nravin@biengi.ac.ru*

***Desulforudis audaxviator* в Сибирском подземном резервуаре может использовать водород, образуемый ферментативными бактериями**



Геномы штаммов *D. audaxviator* MP104C и BY имеют исключительно высокое сходство: структурные различия



Полный геном «сибирского» штамма BY собран из метагенома

- 1, 2, 7, 8, 9 Mobile element presence/absence (35 transposases are encoded in MP104C)
- 3 – deletion of 132 kb long prophage in strain BY
- 4 – 36 bp insert in gene Daud1345 in strain BY
- 5 - polymorphism in AT rich intergenic region
- 6 – repeat-containing region
- 10 – CRISPR array
- 11 – duplication of 2 kb region with anion permease gene in strain BY
- 12 – deletion in gene Daud1996 in strain BY, deletion of 6 kb region with 4 mobile-element related genes in strain BY

Нет приобретения или потери метаболически-значимых генов

Метагеномный анализ экосистем

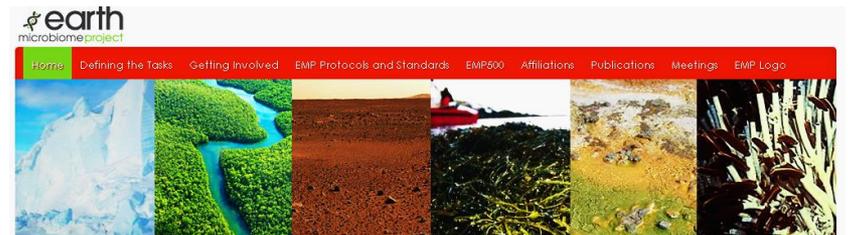
Объекты:

- Почвы и растительно-микробные ассоциации
- Водные (моря, озера, реки, подземные воды)
- Месторождения полезных ископаемых
- Антропогенные/техногенные экосистемы
- Микробиом человека и животных

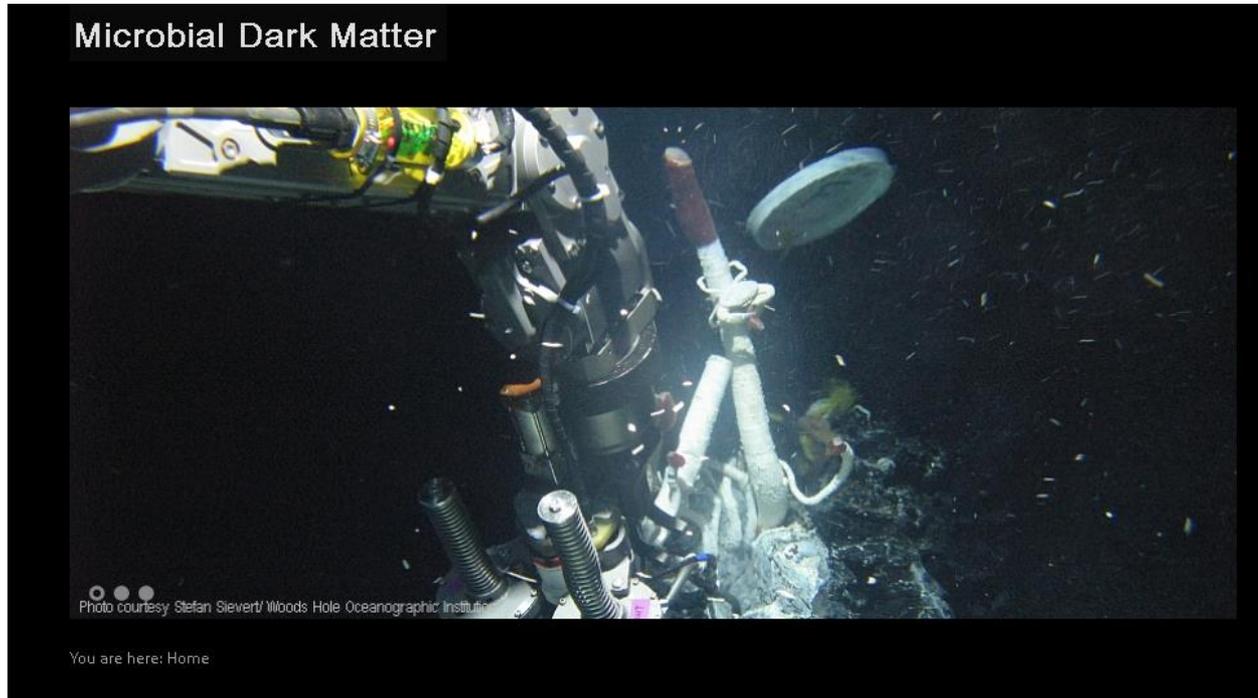
Цели:

- **Характеристика новых организмов на геномном уровне**
- Функционирование сообщества как целого: какие организмы присутствуют и что они делают (могут делать)
- Новые функции: поиск новых генов, ответственных за определенные функции

Крупные метагеномные проекты



Российское участие в проекте Microbial Dark Matter – phase 2



ФИЦ Биотехнологии РАН

ЛИН СО РАН

Томский университет

Озеро Байкал:

Геномы 120 единичных клеток, представляющих филумы OP8, OP9/JS1, BRC1, WS3, NC10, новые линии.

Подземные термальные воды:

Геномы 27 единичных клеток из скважин «Белый Яр» и «Чажемто» (Microgenomates, Ignavibacteriae, Caldiserica, Elusimicrobia, Desulforudis, новые линии)