

基于纳米孔测序的宏基因组学揭示微生物作为生物过滤器 减轻高海拔冻土的温室气体排放

党晨原, 吴子麒, 张淼, 李响, 孙雨芹
吴仁安, 郑焰, 夏雨

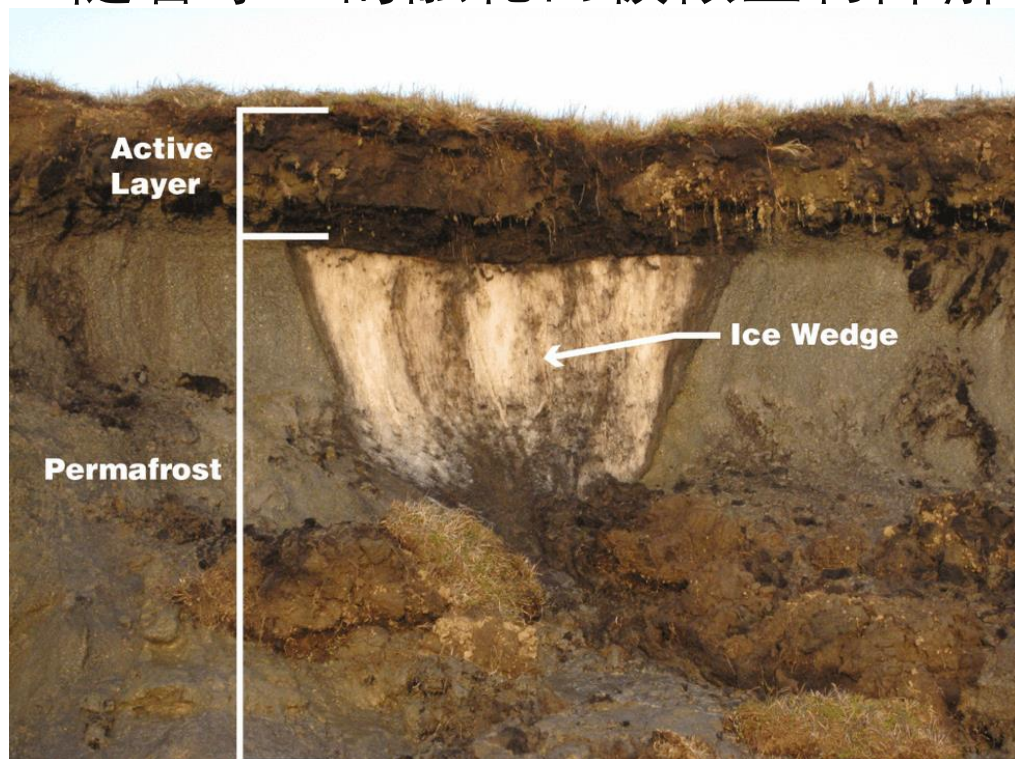
南方科技大学环境科学与工程学院
中国科学院大连化学物理研究所高分辨质谱技术实验室



Chenyuan Dang, Ziqi Wu, Miao Zhang, Xiang Li, Yuqin Sun, Ren'an Wu, *et al.* 2022. Microorganisms as bio-filters to mitigate greenhouse gas emissions from high-altitude permafrost revealed by nanopore-based metagenomics. *iMeta* 1: e24. <https://doi.org/10.1002/imt2.24>

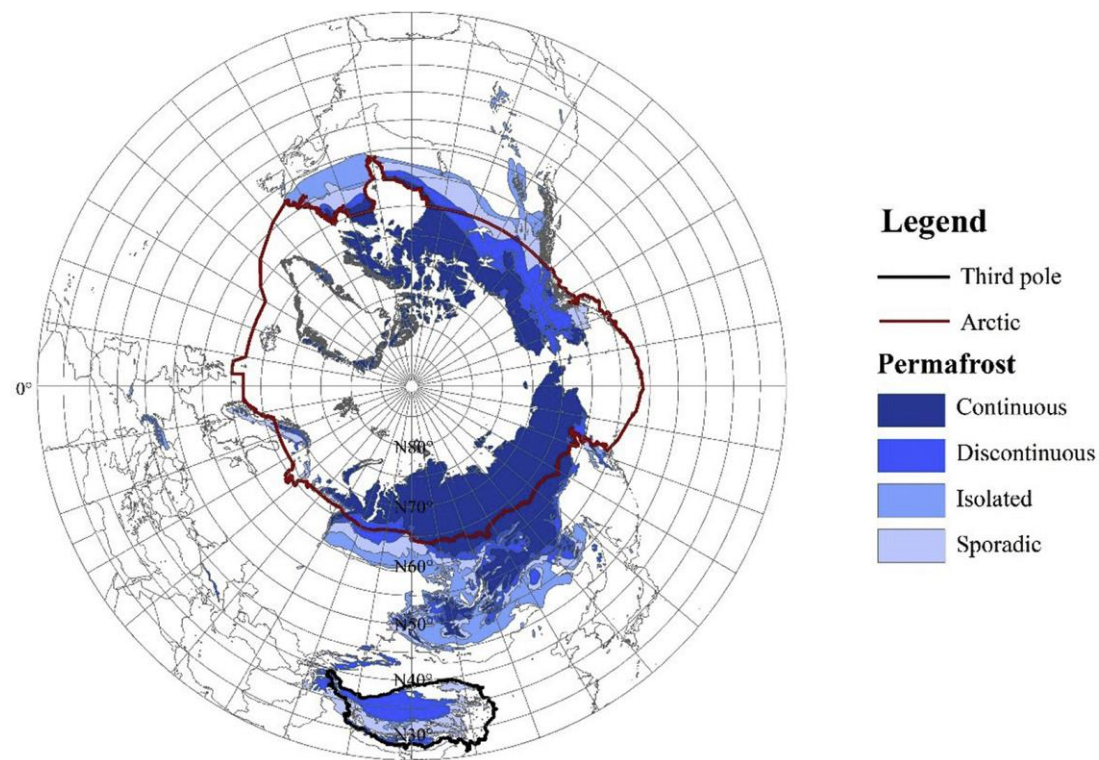
研究背景

- 地球表面大约四分之一的陆地都被冻土覆盖。研究表明，到2100年将有大约174 Pg的近地表碳将随着冻土的融化而被微生物降解。



<https://climatekids.nasa.gov/permafrost/>

- 中国的冻土面积位列世界第三，仅次于俄罗斯和加拿大。中国大部分冻土位于青藏高原等地区，被称为高海拔冻土。



Earth-Science Reviews: 2020, 211, 103433.

研究目标

- 冻土中与温室气体产生相关的微生物群落和功能的响应仍然不十分清楚。
- 因此，我们使用基于Nanopore测序的宏基因组技术和基于Illumina测序的宏转录组技术，调查了青藏高原祁连山不同海拔（3000、3500和4000米）冻土活动层中的微生物群落，并比较了融化（8月取样）和冷冻（11月取样）冻土中微生物代谢活性的差异，以期达到：
 - (1) 开发一个新的生物信息学流程（FUNpore）来分析大量的非组装的冻土宏基因组数据，以发挥nanopore长读长测序的优势。
 - (2) 揭示高海拔冻土冷冻和融化状态下，与温室气体产生相关的微生物活性变化特点。

现场照片

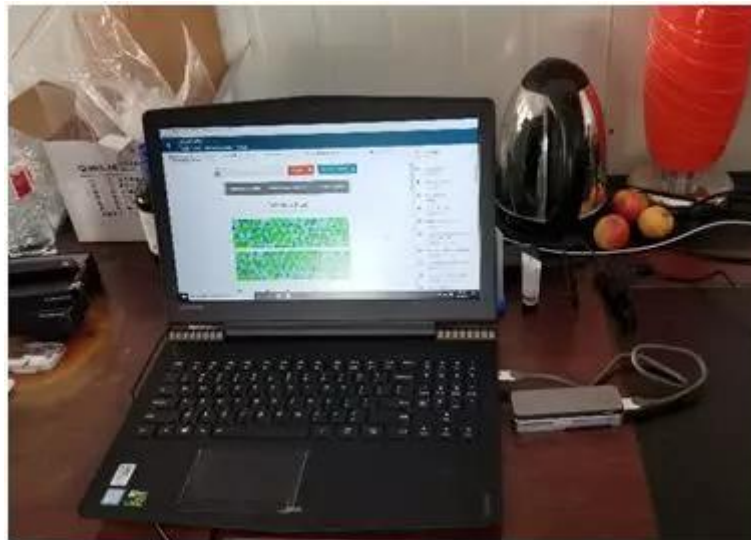
DNA提取: DNeasy PowerSoil Kit

DNA纯化: AMPure XP beads

建库: SQK-LSK108 1D ligation genomic DNA kit

测序: R9.4 flow cells (FLO-MIN 106) on MinION

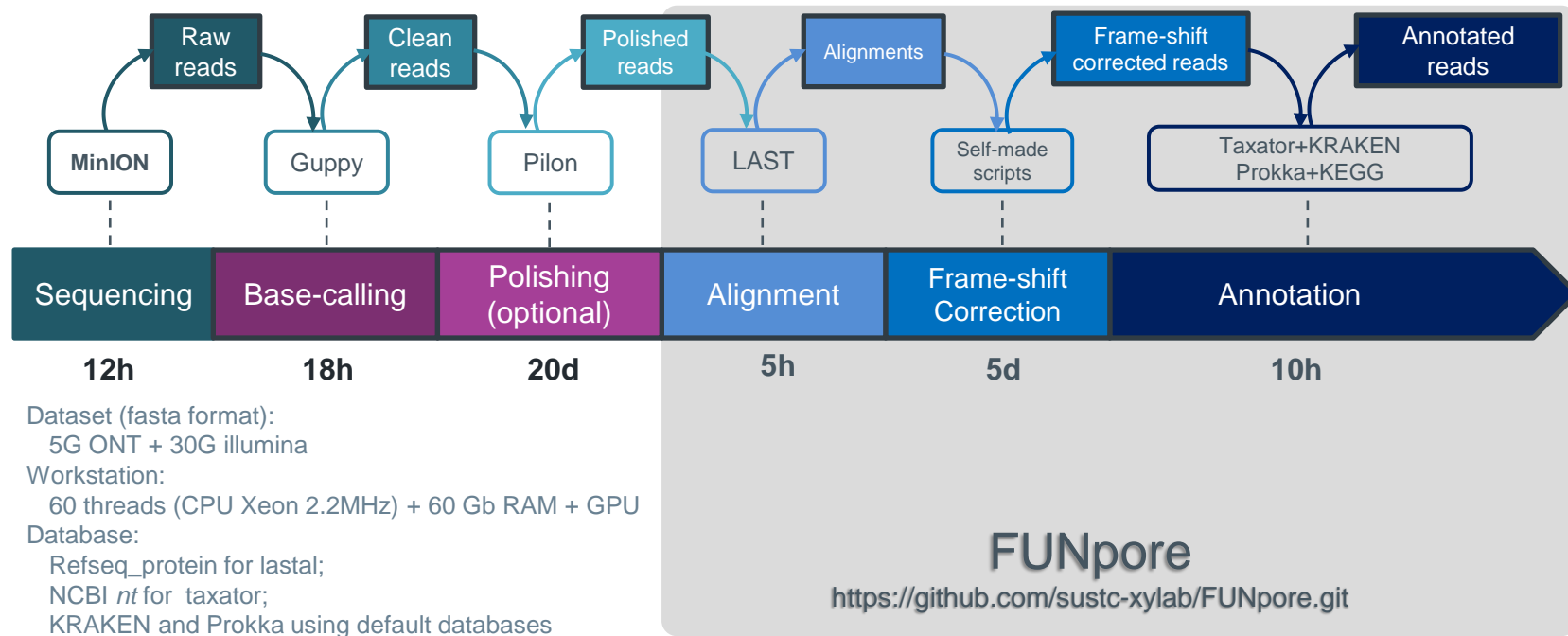
数据分析: MinKNOW + Guppy basecaller + Porechop



DNA extraction, sequencing in field



Nanopore 数据校准



LAST alignment:

```

Query: 2403 MNLPA/LCIRRPVMTLLLTALCIF\GVKGPPLPVNDXXXXSRLP\TIXXXX-PGXXP 2235
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct: 1  MNLPE-LCIRRPVMTLLTVALLVF-GFVAYRALPVSDMPNVE-MP-TITIRANLPGASP 56
    
```

Correction:

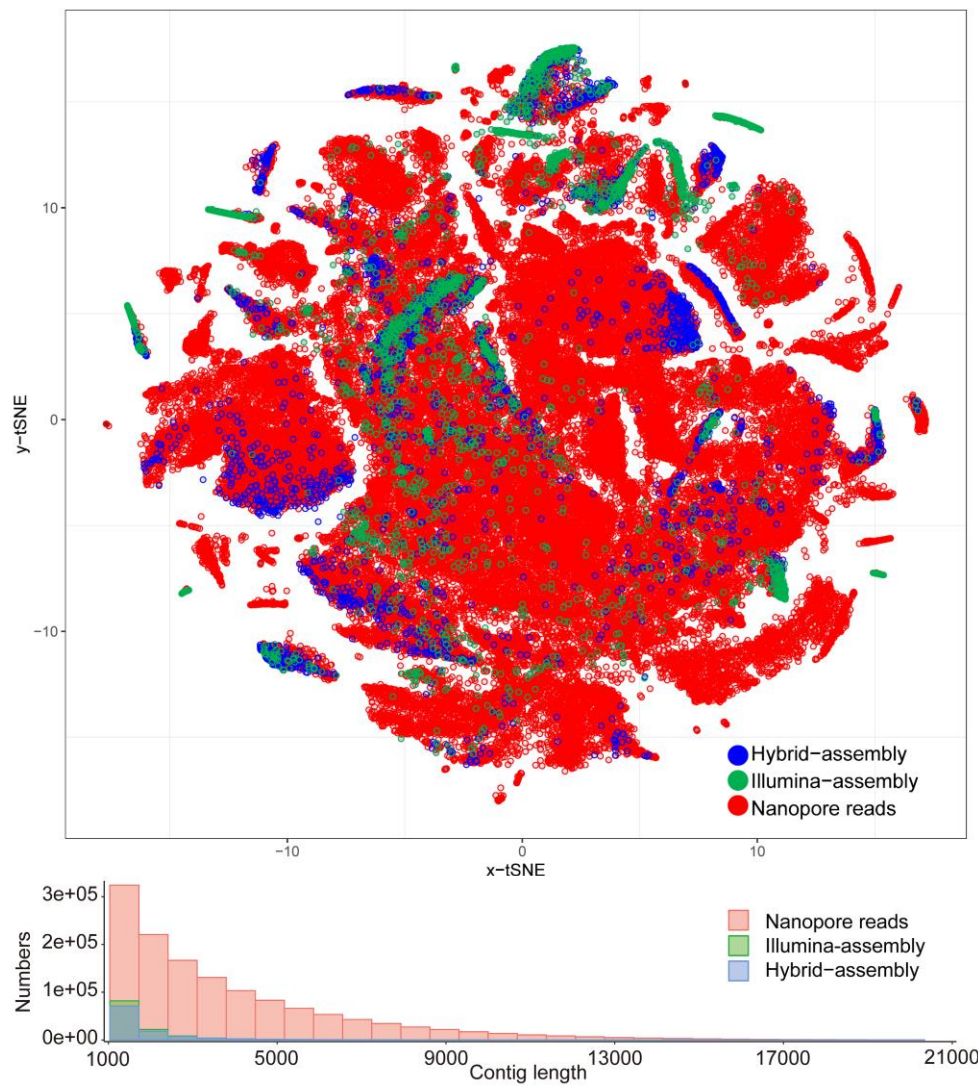
```

          ↓ pNt
          V
          ↓ cNt
          X
          ↓ cNt
          X
    
```

pNt : insert previous nucleotide base at current position
cNt X : delete current nucleotide base at current position

比对数据库
NCBI Refseq_protein

组装方法比较

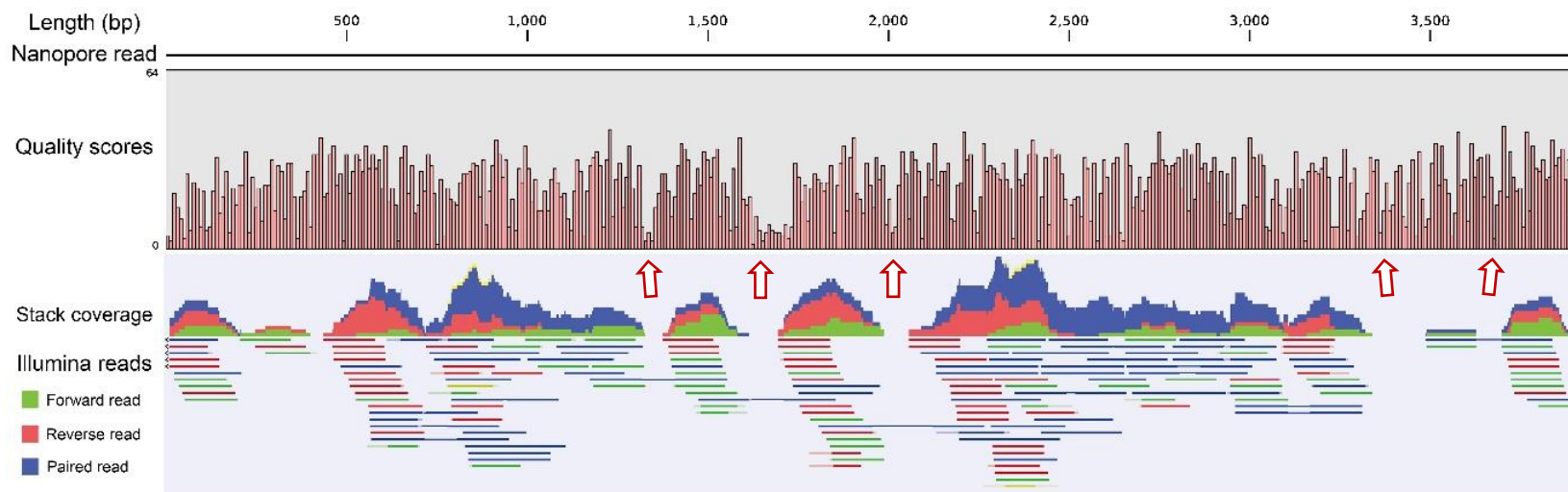


Nanopore数据 (5.2 Gb, 长度平均3.8kb)
和Illumina (42 Gb, 平均长度150bp)
混合组装 (metaSPAdes 和 Opera-MS)
的结果相比于单独使用Illumina数据, 在
contigs的长度和数量上几乎没有提升。

67.4 % 的Nanopore数据在混合组装中未被
使用。

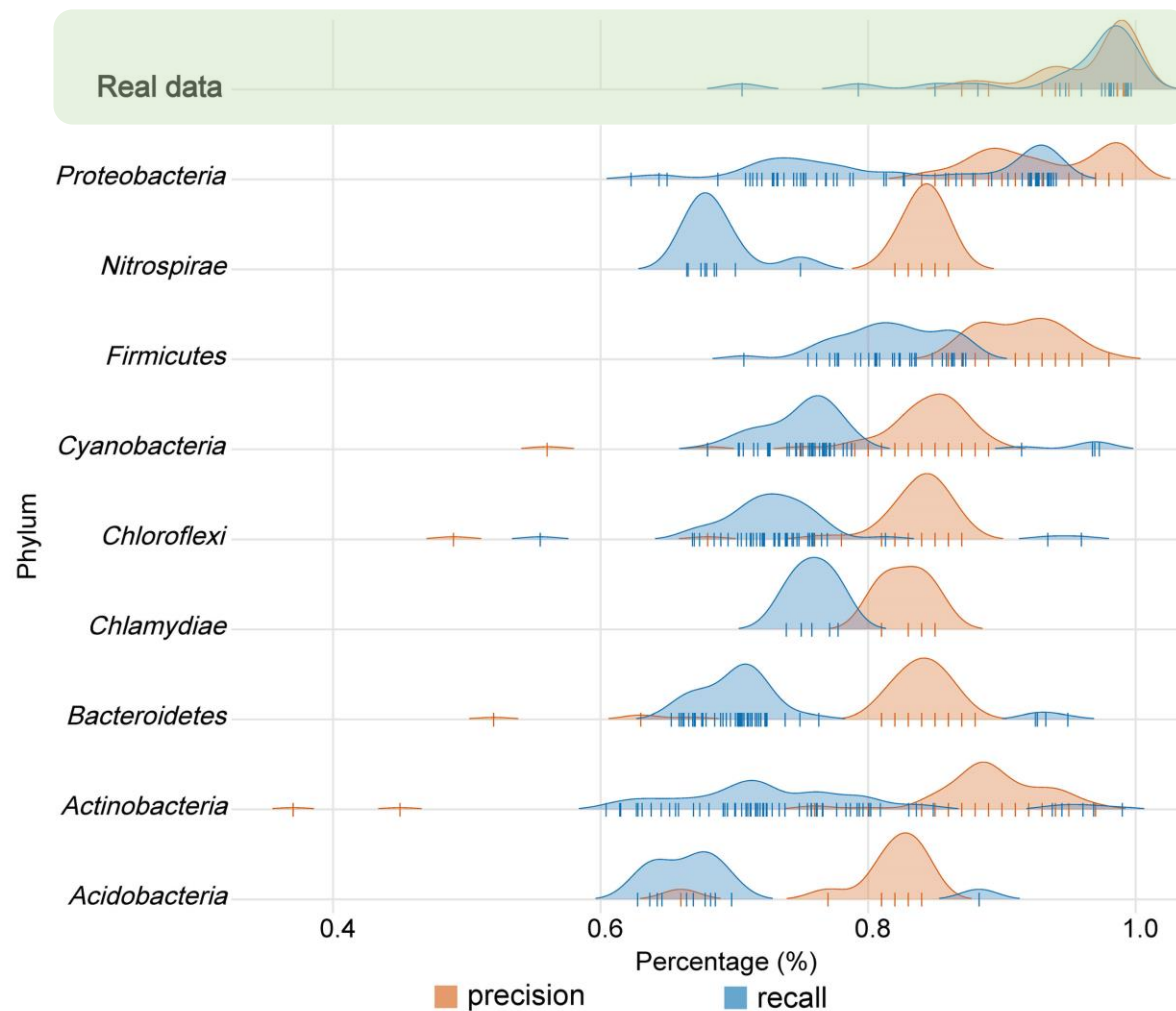
Nanopore 序列特点

	Input fasta data	Assembly data	Total reads number	N50	N90	Min read length	Max read length	Average read length
Raw nanopore reads	5.2	—	1375351	5146	1824	871	510592	3823.48
Polished nanopore reads by Pilon	5.1	—	1358631	5179	1851	871	510619	3860.4
CLC assembly (Illumina reads only)	42	306	148227	2043	1116	1000	482534	2064.93
Opera assembly (Illumina + raw nanopore reads)	42+5.2	317	134333	2566	1136	1000	588631	2362.81
Opera assembly (Illumina + polished nanopore reads)	42+5.1	316	135944	2494	1134	1000	588631	2327.25
CLC assembly (Illumina reads only)	10.5	127	163368	706	526	500	85864	—
metaSPAdes assembly (Illumina+polished nanopore reads)	10.5+5.1	152	173392	809	533	500	90061	—
Miniasm assembly (raw nanopore reads only)	5.2	5.3	308	20999	10354	273	79134	17942.31
Miniasm assembly (polished nanopore reads only)	5.1	3.3	196	20522	9940	839	84067	17389.42
Wtdbg2 assembly (raw nanopore reads only)	5.2	28	2533	12738	5642	4075	254519	11188.08
Wtdbg2 assembly (polished nanopore reads only)	5.1	20	1910	12392	5360	3417	101159	10729.9



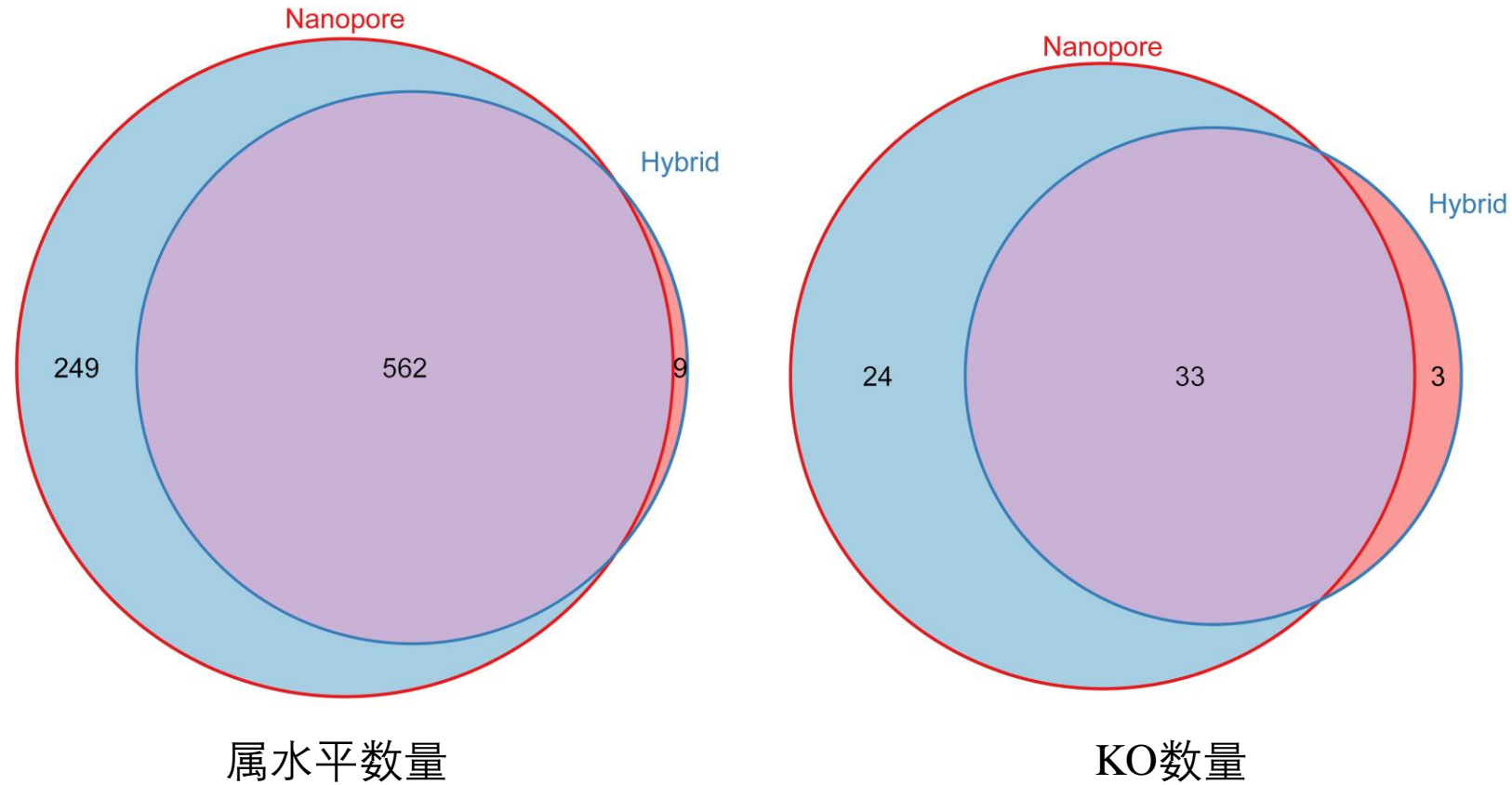
- Nanopore长读长序列中的随机分布的低质量碱基区域不能被高质量的Illumina短序列映射到而矫正，导致nanopore长序列被切割成短片段，失去了超长读长的优势。

FUNpore效果评估



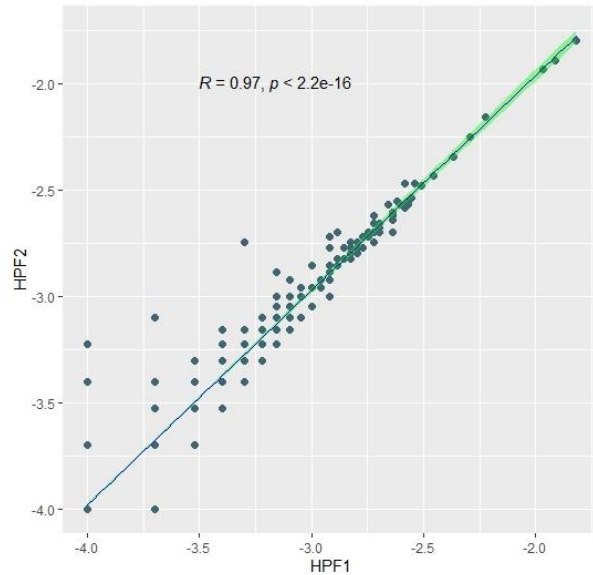
- 在实际测序数据中，FUNpore校准后数据的KO具有很好准确率和回收率。
- 在模拟数据中，对于不同门类的微生物效果略有差异。

FUNpore优势

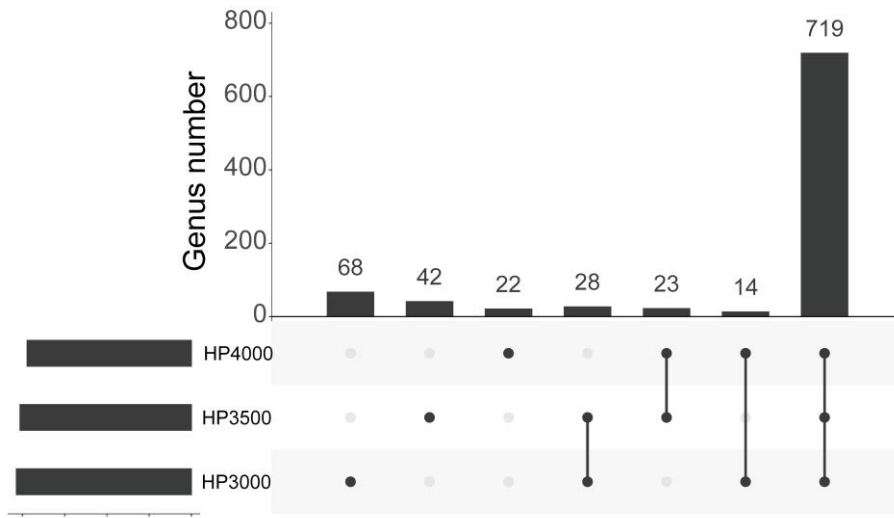


- 利用FUNpore这种不组装而直接校准nanopore序列上错误碱基的方法，我们注释得到的属水平微生物比混合组装结果多了42%，以及与氮和甲烷代谢相关的KO多了58%。

不同海拔融化冻土中的微生物群落



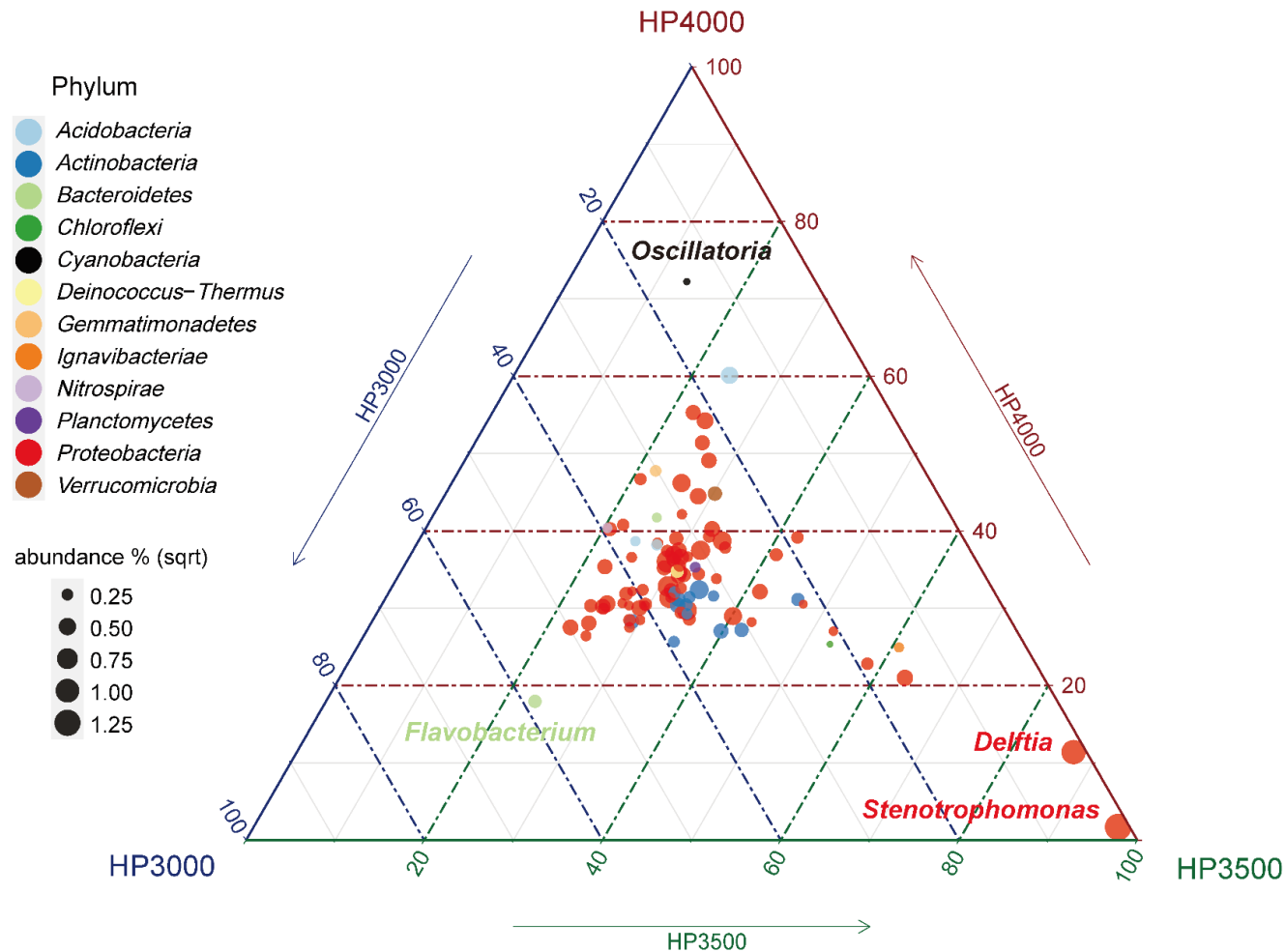
biological repetition results at genus level



➤ 我们对其中一个采样点进行了重复测序（现场测序vs实验室测序），并在属水平评估了平行性。

➤ 冻土中核心微生物群落在不同海拔相对稳定。三个不同海拔高度的冻土样品中，共有属的比例为78.4%，这些共有属的丰度占每个样品微生物群落总丰度的99%以上。

不同海拔融化冻土中的微生物群落



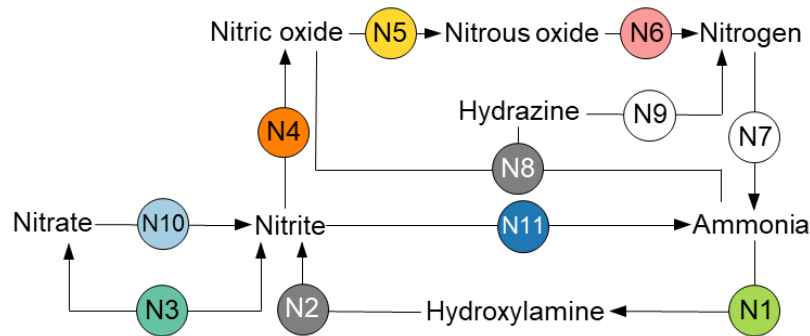
➤ 优势属的93.8%都属于 Proteobacteria 和 Actinobacteria

➤ *Oscillatoria* 富集在海拔 4000米样品中 (光照强)

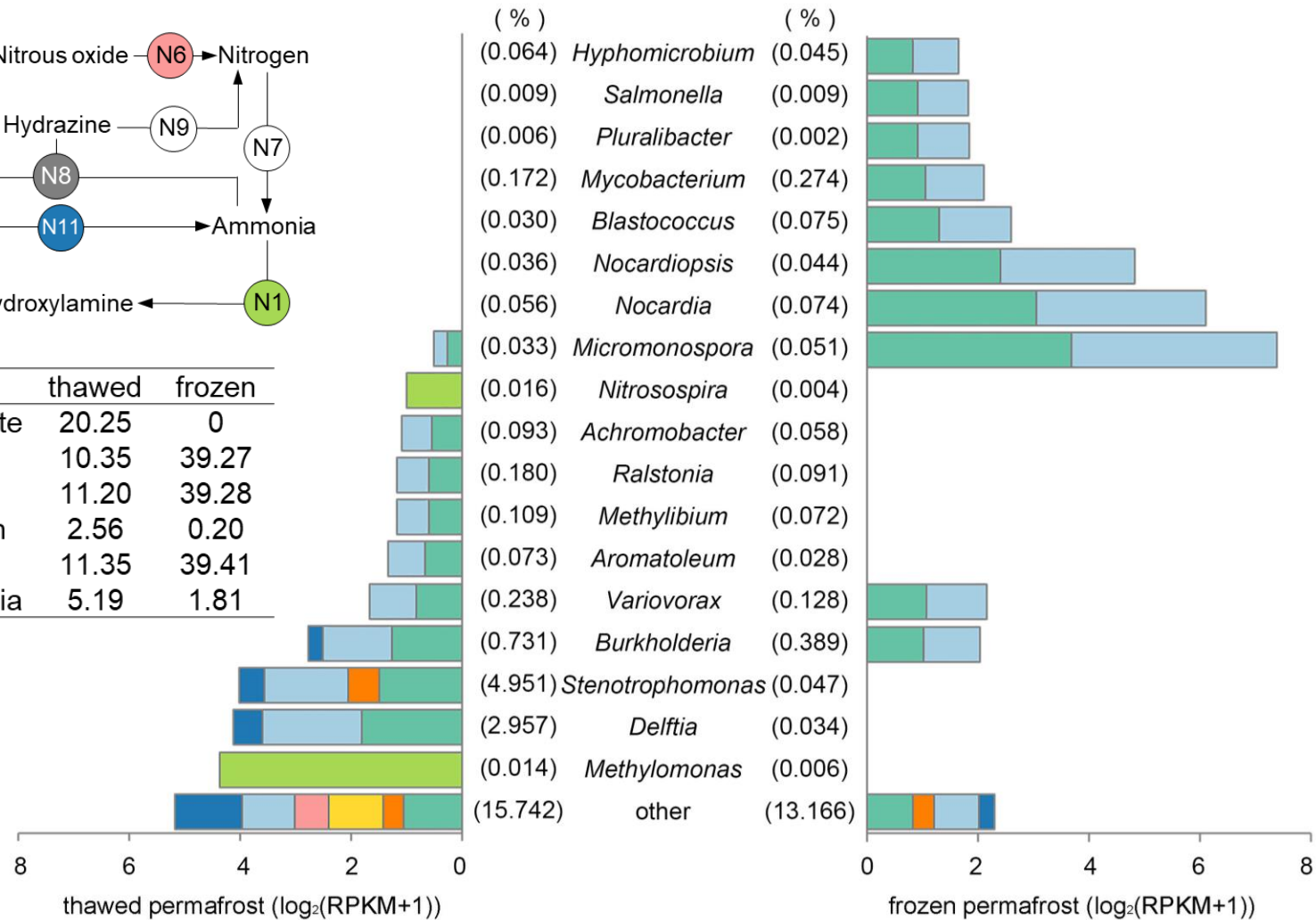
➤ *Stenotrophomonas* 和 *Delftia* 富集在海拔3500米 样品 (氮浓度高)

➤ 虽然冻土中核心微生物群落适应能力较强在不同海拔中相对稳定，但不同环境，例如 4000米海拔的强光照和3500米海拔冻土中的高氮浓度，仍会造成微生物群落的分化。

氮代谢



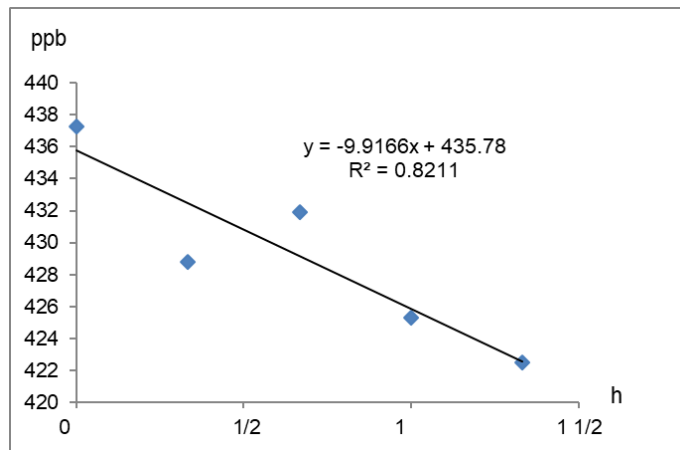
Pathways		thawed	frozen
Nitrification	ammonia > nitrite	20.25	0
	nitrite > nitrate	10.35	39.27
Denitrification	nitrate > nitrite	11.20	39.28
	nitrite > nitrogen	2.56	0.20
Nitrate reduction	nitrate > nitrite	11.35	39.41
	nitrite > ammonia	5.19	1.81



- 冻土中的氮代谢整体上趋于闭路循环，反硝化活性在融化冻土中明显增强。
- 氮代谢活性微生物群落在融化冻土中主要是copiotrophic/heterotrophic (*Proteobacteria*)，在冷冻冻土中主要是oligotrophic/autotrophic (*Actinobacteria*)。

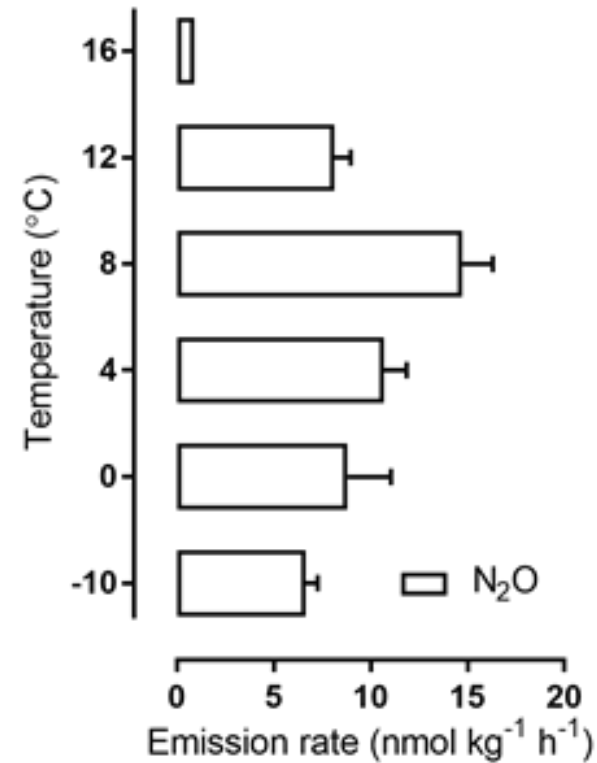
氮代谢

现场测定的排放速率



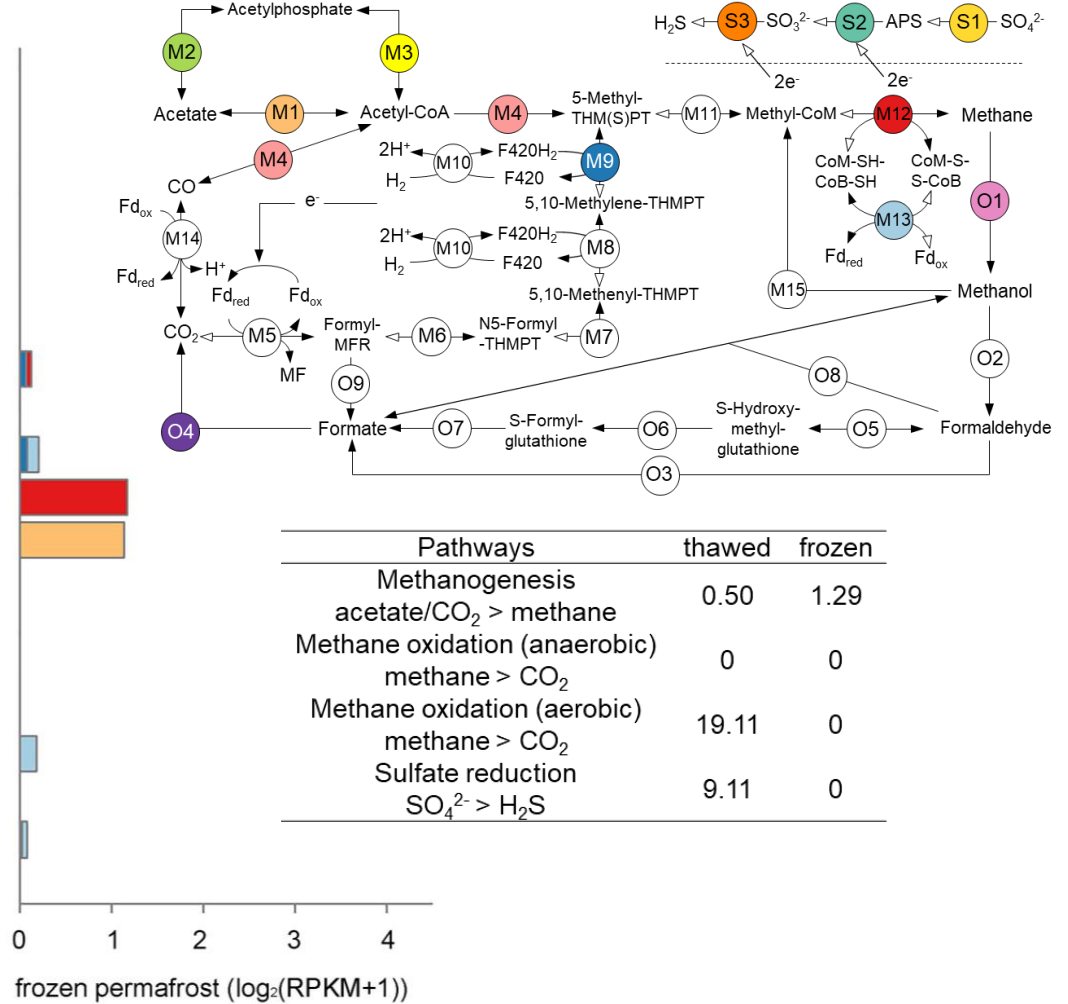
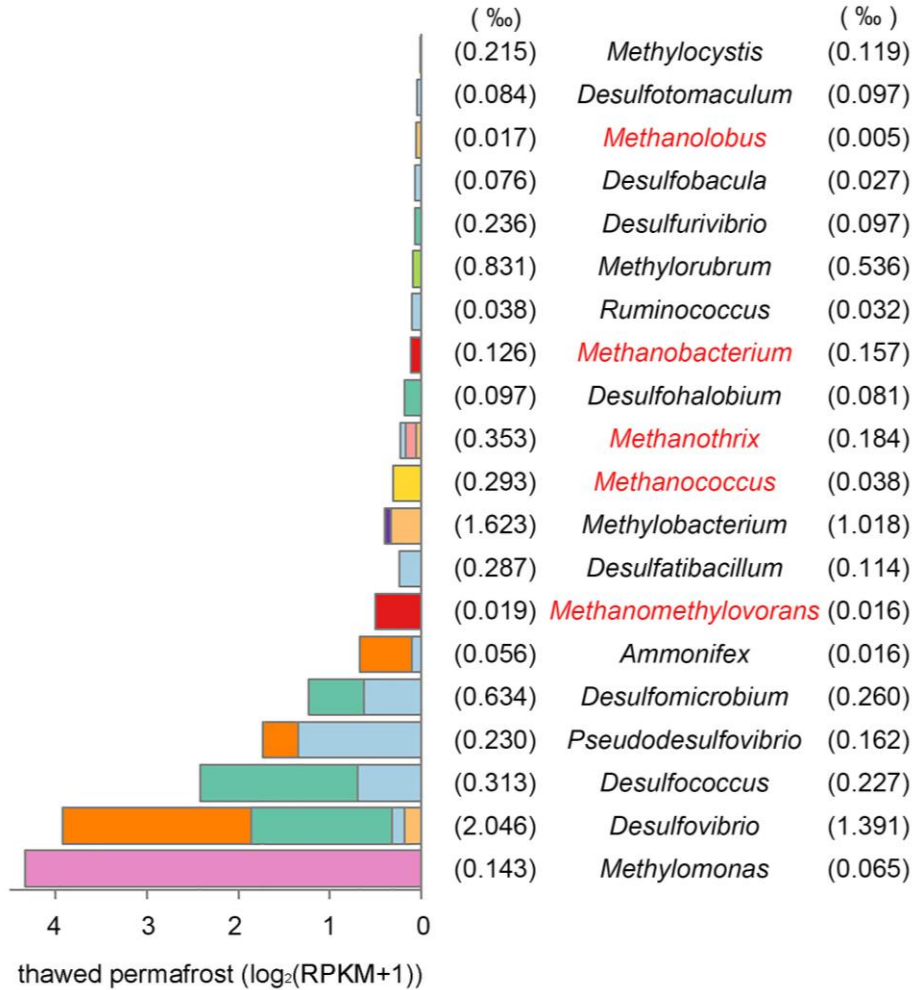
现场（约15 °C）的气相测定实验观察到，融化冻土表层有一定的N₂O消耗速率(18.8 nmol m⁻² h⁻¹)。

培养实验中不同温度的排放速率



实验室培养实验：随着培养温度的升高，N₂O的排放速率先增加（-10 °C到8 °C）后减小（8 °C到16 °C），这是由于随着温度增加冻土中反硝化活性增强，从而促进了N₂O的产生和转化为N₂。

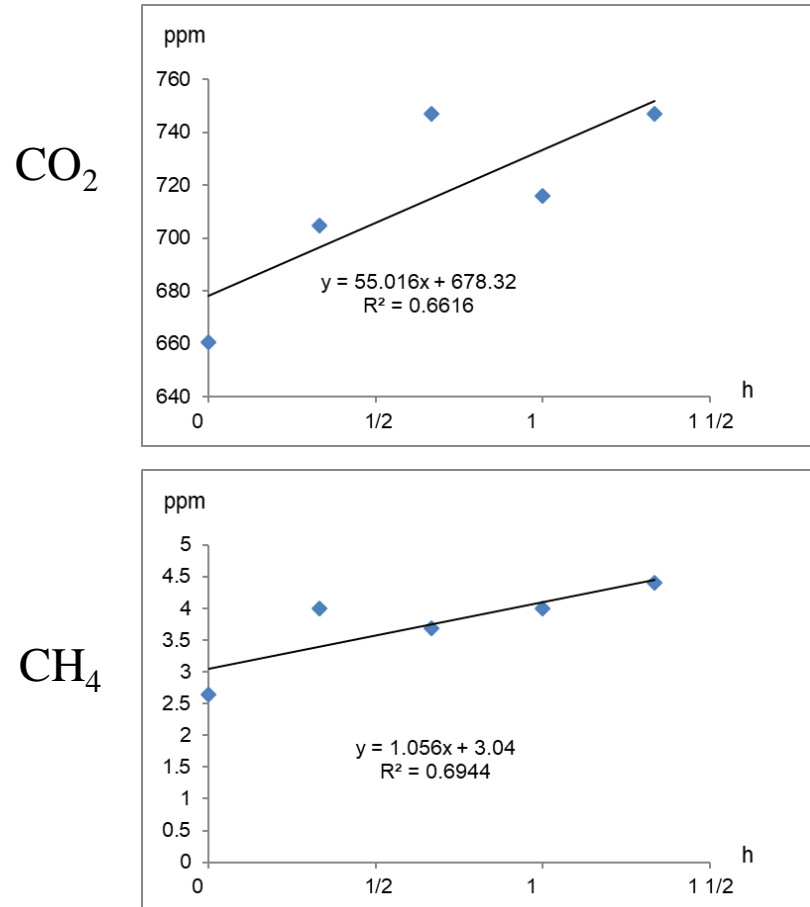
甲烷代谢



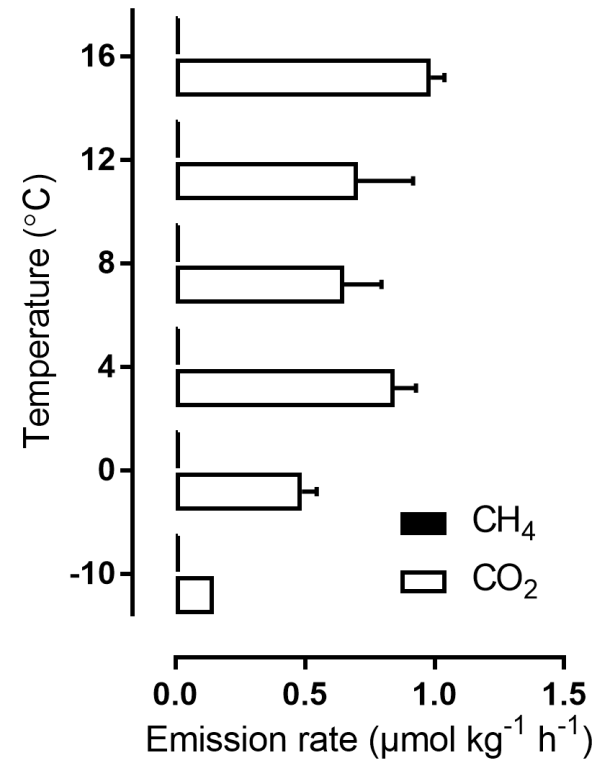
- 随着冻土融化，活跃的产甲烷形式由氢型转变为乙酸型。
- 好氧氧化是祁连山冻土中主要的甲烷氧化过程，该过程只在融化状态的冻土中观察到。
- 基于关键基因的转录活性，计算得到融化冻土中甲烷产生和消耗的比例为1: 38。

甲烷代谢

现场测定的排放速率



培养实验中不同温度的排放速率



- 现场气相测定结果CO₂(104.5 μmol m⁻² h⁻¹)的排放速率约是CH₄(2.0 μmol m⁻² h⁻¹)的50倍。
- 实验室的冻土培养实验也证明，随着冻土融化CO₂是其主要的排放气体。

总结

- FUNpore可以提高nanopore数据的利用率，发挥其长读长优势。
- 冻土中的氮代谢整体上趋于闭路循环。冻土融化，微生物的反硝化活性显著增加。
- 冻土融化，活产甲烷形式由氢型转变为乙酸型。好氧氧化是其中主要的甲烷氧化过程。
- 冻土融化会显著改变其中氮和甲烷的代谢，然而微生物可以作为生物过滤器来缓解相关温室气体的排放（ $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ， $\text{CH}_4 \rightarrow \text{CO}_2$ ）。



“iMeta”是由威立、肠菌分会和本领域数百位华人科学家合作出版的开放获取期刊，主编由中科院微生物所刘双江研究员和荷兰格罗宁根大学傅静远教授担任。目的是发表原创研究、方法和综述以促进宏基因组学、微生物组和生物信息学发展。目标是发表前10%(IF > 15)的高影响力论文。期刊特色包括视频投稿、可重复分析、图片打磨、青年编委、前3年免出版费、50万用户的社交媒体宣传等。2022年2月正式创刊发行!



主页: <http://www.imeta.science>

出版社: <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/2770596x>



投稿: <https://mc.manuscriptcentral.com/imeta>



office@imeta.science



[iMeta](#)

