

Microflora Danica

Jordens mikroliv: Kortlægning i landbrugjorden

Per Halkjær Nielsen

CENTER FOR MICROBIAL COMMUNITIES
AALBORG UNIVERSITY



POUL DUE JENSEN GRUNDFOS
FOUNDATION





Vi er gæster i mikrobernes verden!



Biotechnology



Nutrient cycles



Global warming



Human health



Food



Disease



Symbioses



Sustainability

Forståelse af bakteriers funktion i landbrugsjord, fx klimagasser



Identitet - funktion - udbredelse



Hvor mange bakteriearter findes på jorden?



Bakterier identificeret:

250.000 arter (DNA fingerprints)

80.789 genomer (20 % isoleret)





Hvor mange bakteriearter findes på jorden?



Bakterier identificeret:

250.000 arter (DNA fingerprints)

80.789 genomer (20 % isoleret)



Estimeret:

Tusinder til milliarder

Bedste gæt i dag: nogle millioner...

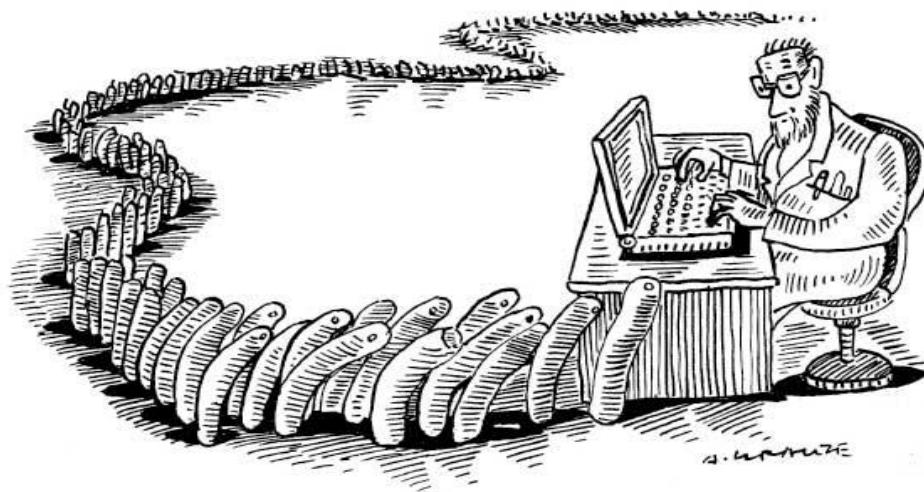
[Louca et al., 2019]



De fleste arter kan
ikke dyrkes med
kendte metoder

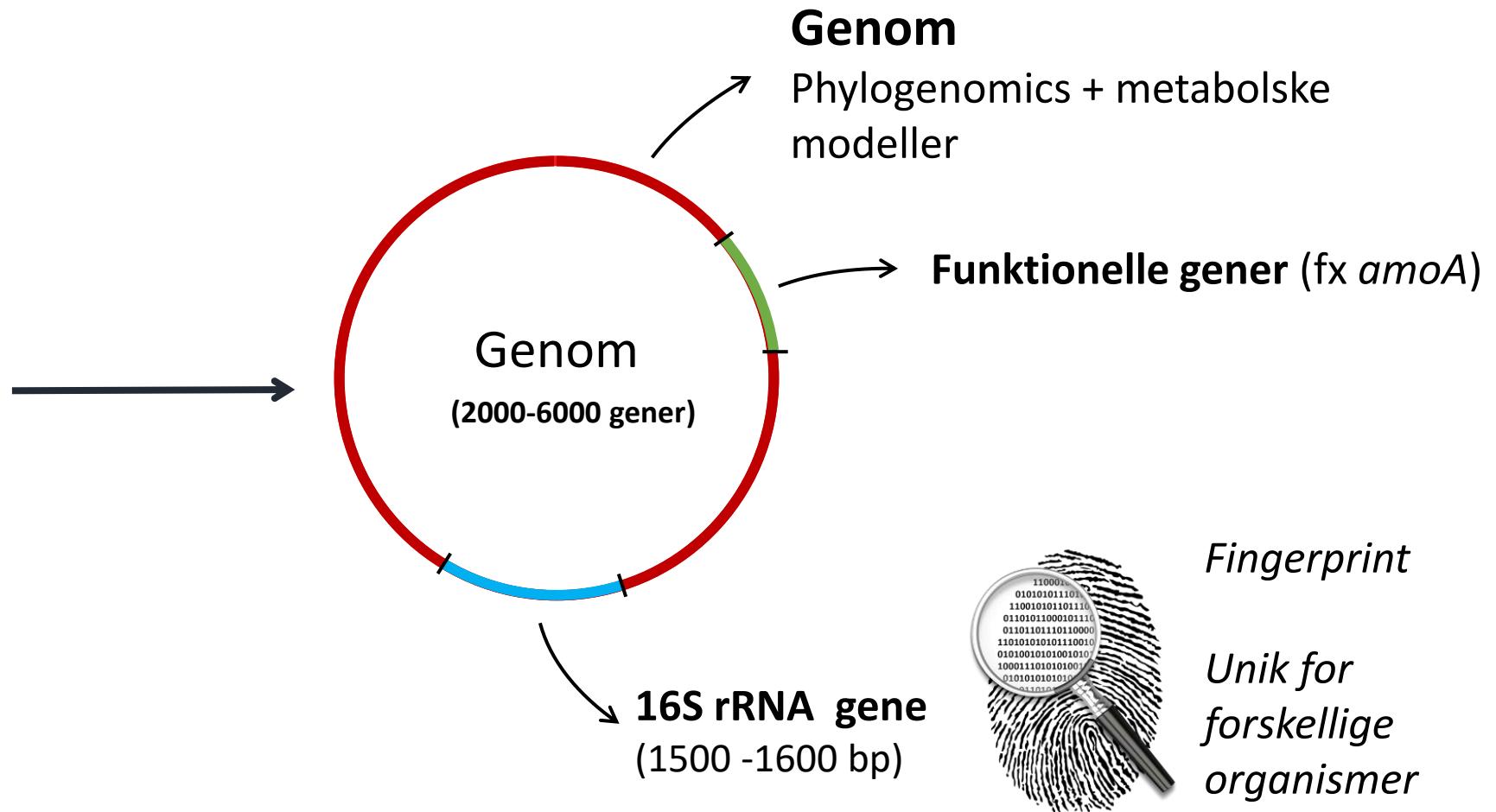
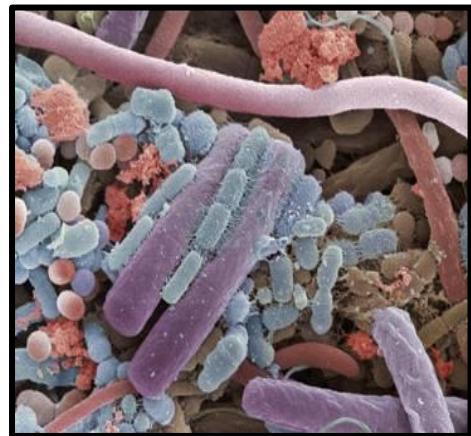


Hvordan identifierer vi millioner af ukendte bakterier?

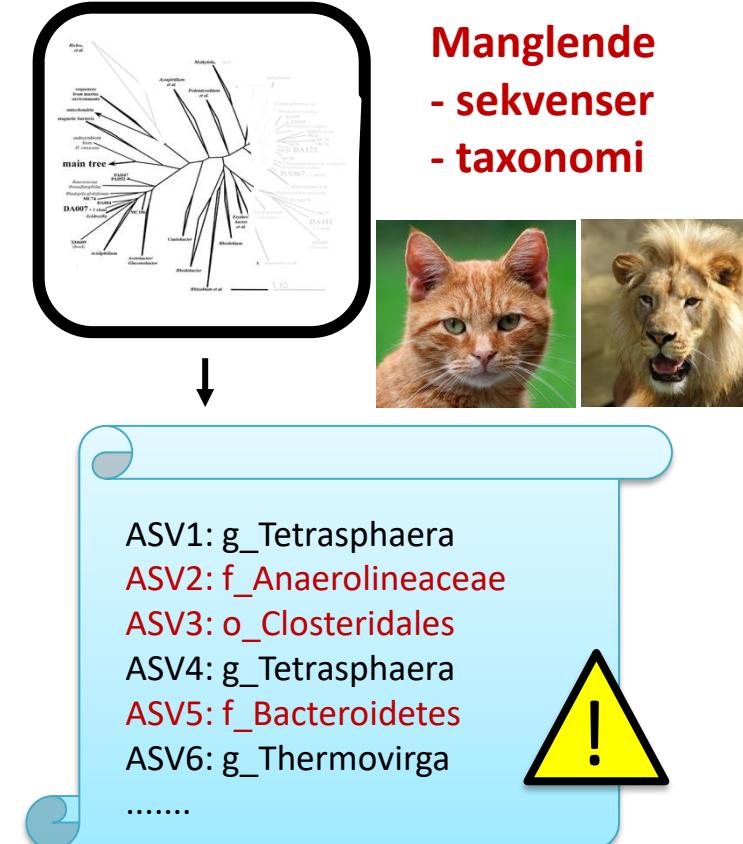
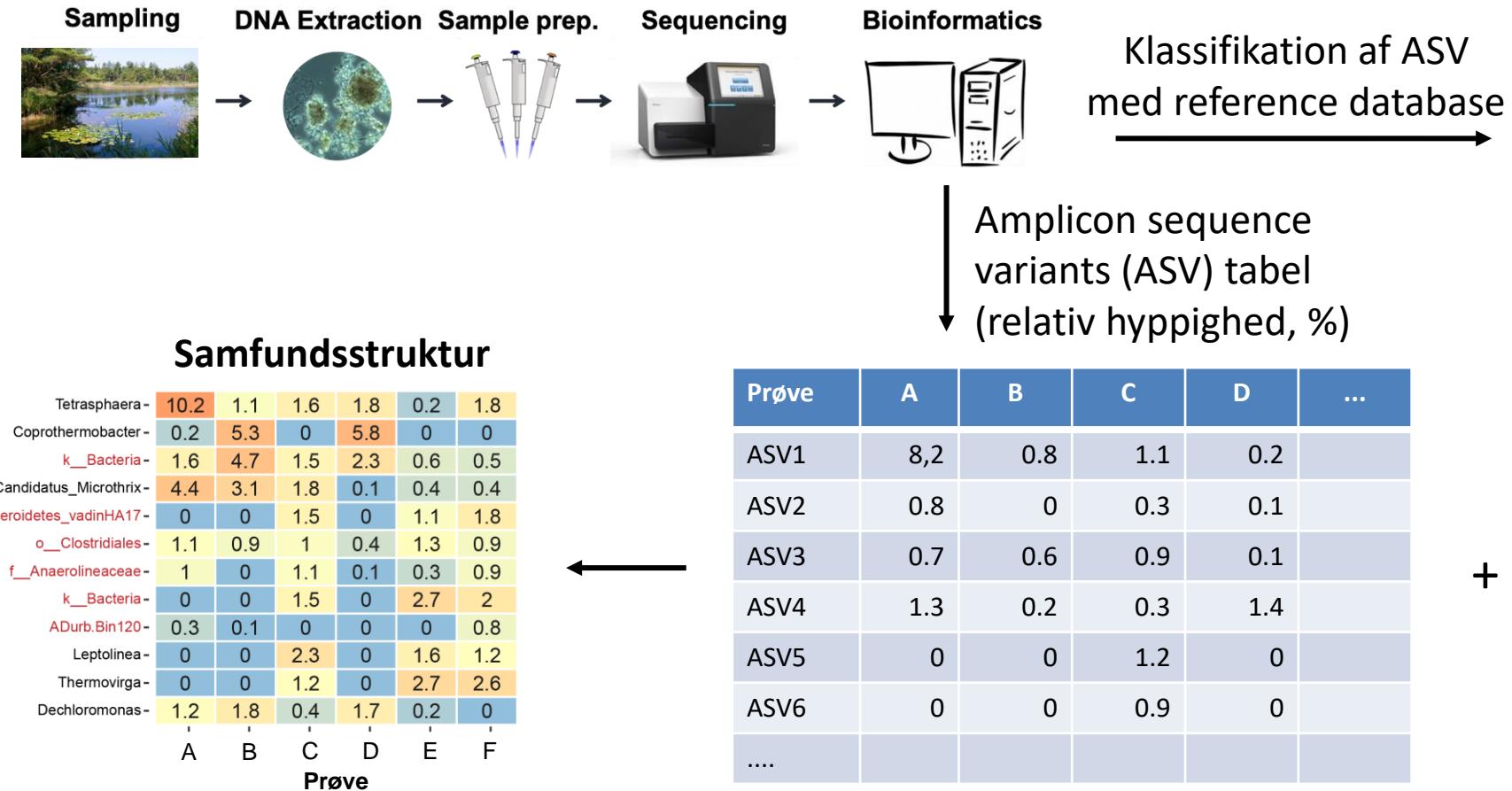


ANDRZEJ KRAUZE

Vi identifierer mikroorganismerne ved hjælp af DNA analyser



Analyse af mikrobielle samfund (fingerprint)



Mange ukendte bakterieslægter i landbrugsjord

Ingen er
beskrevet på
artsniveau –
heller ikke
blandt de
beskrevne
slægter!

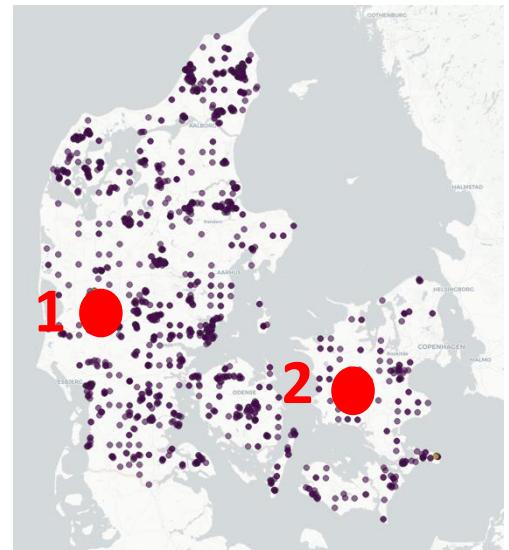
Ubeskrevne
slægter



slægt	1	2
Acidothermaceae; Acidothermus-	12.7	22.1
Solibacteraceae_Subgroup_3_; Bryobacter-	6.6	0.6
Xanthobacteraceae; uncultured_graftm_87-	5.7	3.9
Beijerinckiaceae; Roseiarcus-	5.5	4.6
Unknown_Family_graftm_1; Acidibacter-	4.6	0.6
Solibacteraceae_Subgroup_3_; Candidatus_Solibacter-	4.2	1.9
uncultured_graftm_143; uncultured_bacterium_graftm_563-	4	0.6
Gemmataceae; uncultured_graftm_24-	3.6	2.4
Polyangiaceae; Pajaroellobacter-	2.5	0.5
Koribacteraceae; Candidatus_Koribacter-	2.2	0.5
Acidobacteriaceae_Subgroup_1_; Occallatibacter-	1.9	0.4
Solirubrobacteraceae; uncultured_graftm_167-	1.7	1.5
Pedosphaeraceae; uncultured_bacterium_graftm_265-	1.4	0.3
Solirubrobacteraceae; Conexibacter-	1.3	4.5
uncultured_graftm_26; uncultured_bacterium_graftm_771-	1.2	0.5

1

2



1



2

Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias

Søren M Karst^{1,2}, Morten S Dueholm^{1,2} , Simon J McIlroy¹ , Rasmus H Kirkegaard¹ , Per H Nielsen¹ & Mads Albertsen¹

Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) genes, 16S in bacteria and 18S in eukaryotes, have been the standard phylogenetic markers used to characterize microbial diversity and evolution for decades. However, the reference databases of full-length SSU rRNA gene sequences are skewed to well-studied ecosystems and subject to primer bias and chimerism which results in an incomplete view of the diversity present in a sample. We combine poly(A)-tailing and reverse transcriptase of SSU rRNA molecules with synthetic long-read sequencing to generate high-quality, full-length SSU rRNA sequences, without primer bias, at high throughput. We apply our approach to samples from seven different ecosystems and obtain more than a million SSU rRNA sequences from all domains of life, with an estimated raw error rate of 0.17%. We observe a large proportion of novel diversity, including several deep branching phylum-level lineages putatively related to the Asgard Archaea. Our approach will enable expansion of the SSU rRNA reference databases by orders of magnitude, an contribute to a comprehensive census of the tree of life.

In 1990 two studies reported the first few microbial 16S rRNA sequences from complex environmental samples, and provide first glimpses of the vast, unknown microbial diversity present on Earth^{1,2}. In recent years, high-throughput DNA sequencing of variable regions in the SSU rRNA gene has formed the backbone most microbial ecology studies. However, the usefulness of SSU rRNA fragments is highly dependent on the underlying reference database of near-full-length SSU rRNA gene sequences. Over the past two decades, two million near-full-length SSU rRNA gene sequences have been deposited in databases (SILVA³; SSU Ref v.12). These sequences represent only a fraction of the estimated microbial diversity on Earth which has been proposed to range from millions to trillions of cells⁴. Most full-length SSU rRNA gene sequences are generated by PCR, cloning and Sanger sequencing, but the cost per sequence prevents the large-scale sequencing projects that are needed to populate the tree of life from being feasible. Due to technological limitations, the full-length SSU rRNA genes (1,400–1,900 bp) can

¹Center for Microbial Communities, Department of Chemistry and Bioscience
Correspondence should be addressed to M.A. (ma@bio.aau.dk).

Received 8 December 2016; accepted 22 November 2017; published online 10 January 2018

Received 6 December 2016; accepted 22 November 2017; published online

NY DANSK FORSKNINGSMETODE

Bakterieforskere laver 25 års arbejde på få uger



Generation of Comprehensive Ecosystem-Specific Reference Databases with Species-Level Resolution by High-Throughput Full-Length 16S rRNA Gene Sequencing and Automated Taxonomy Assignment (AutoTax)

© Morten Simonsen Dueholm,^a Kasper Skytte Andersen,^a © Simon Jon McIlroy,^{a*} Jannie Munk Kristensen,^a Erika Yashiro,^a Søren Michael Karst,^a Mads Albertsen,^a Per Halkjær Nielsen^a

Aalborg University, Aalborg, Denmark

rank. Author order was determined based on who wrote the paper.

encing is an essential communities. However, reference sequences are available for the uncultured synthetic long-read length 16S rRNA gene sets that include high-bacteria ($>0.01\%$) and anaerobic digest- sequence identity-based at provides a complete SILVA taxonomy as a. The PL-ASVs are per- d bias associated with researchers to choose s processed with AUTO ASVs at the gen- ual reference databases, a the unclassified enclo- nation with *in situ* anal-

Citation Dueholm MS, Andersen KS, McIlroy SJ, Kristensen JM, Yashiro E, Karl SM, Albertsen M, Nielsen PH. 2020. Generation of comprehensive ecosystem specific reference databases with species-level resolution by high-throughput full-length 16S rRNA gene sequencing and automated taxonomy assignment (AutoTag). *mBio* 11:e01557-20.

<https://doi.org/10.1128/mBio.01557-20>.

Editor Nicole Dubilier, Max Planck Institute for
Marine Microbiology
Copyright © 2020 Dueholm et al. This is an
open access article distributed under the terms
of the Creative Commons Attribution 4.0
International license.

Address correspondence to Morten Simonsen
Dueholm, mds@bio.aau.dk or Per Halkier

* Present address: Simon Jon McIlroy, Centre for Microbiome Research, School of Biomedical Sciences, Queensland University of Technology (QUT), Translational Research Institute, 180 St. Georges Tce, Brisbane, QLD 4000, Australia.

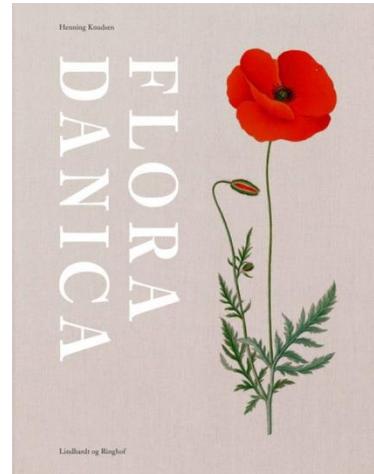
Received 13 June 2020
Accepted 18 August 2020

Published 22 September 2020

mbls.org

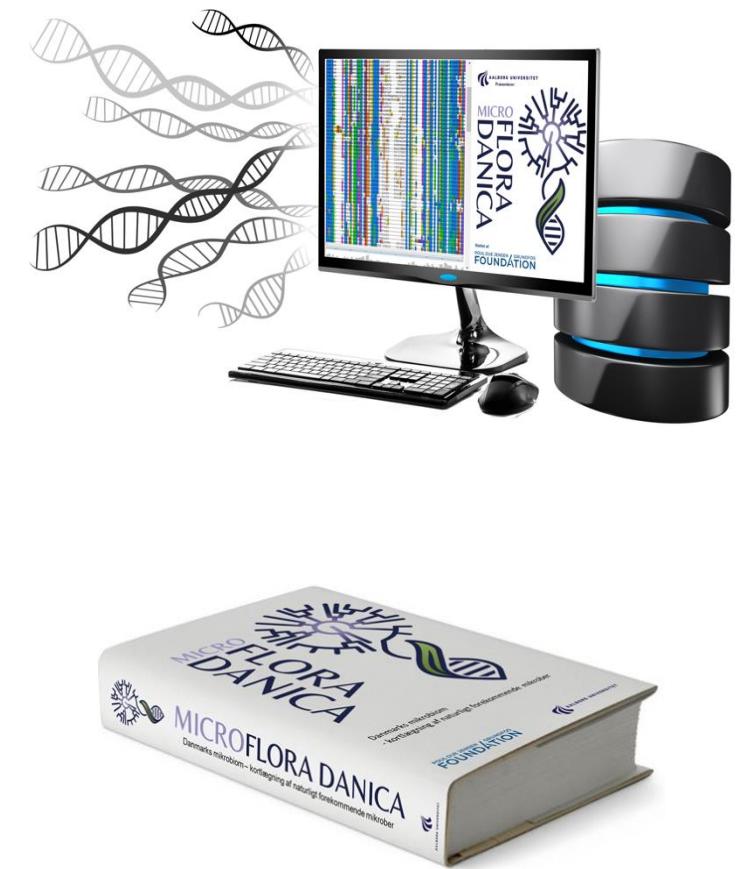
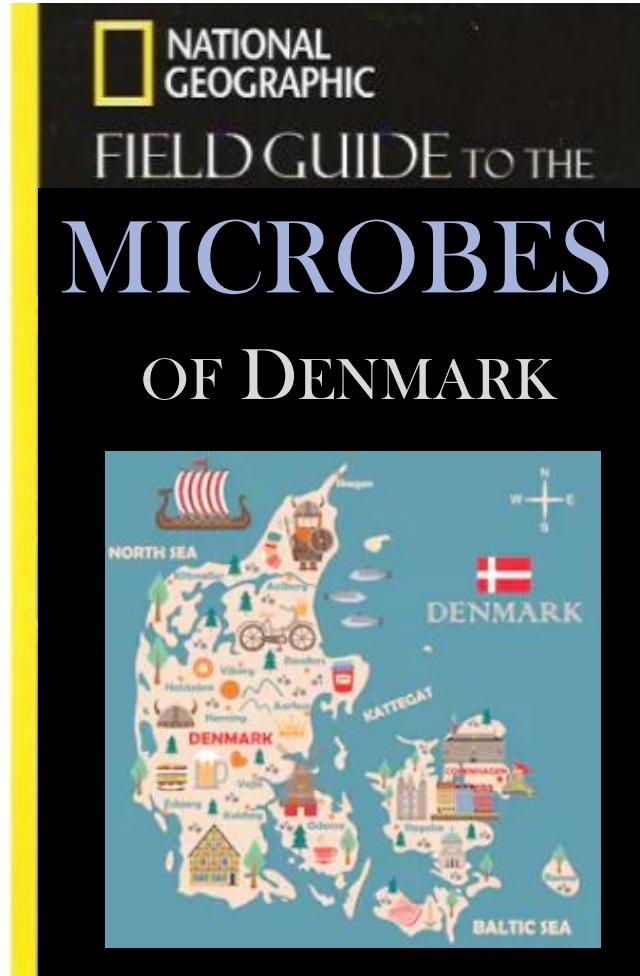
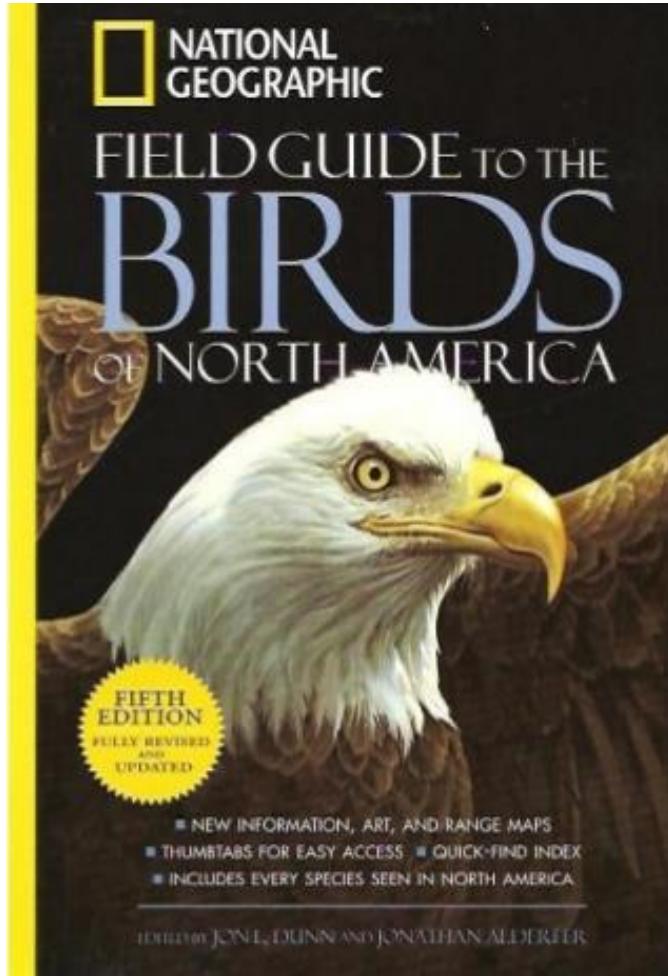
www.ncbi.nlm.nih.gov

Flora Danica: En omfattende bogserie over Danmarks flora - og porcelæn fra Royal Copenhagen



Produceret mellem 1761 og 1883

Microflora Danica – en oversigt over alle bakterier i Danmark



Microflora Danica

- PDJ Fonden ≈ 36 million DKK i perioden 2019-2025
- PIs: Mads Albertsen & Per Halkjær Nielsen
- Vi vil lave **referencedatabasen** over alle mikroorganismer i Danmark. **Det kan kun gøres een gang!**
- Alle områder i Danmark tilstræbes analyseret, ialt ≈ 10.000 prøver
- Sammensætning af arter (biodiversitet) i både naturlige og menneskabte habitater, geografisk fordeling
- En paraply over en masse interne og eksterne samarbejder, fx kvælstofomsætning i landbrugsjord
- Samarbejde med “Earth Microbiome Project”

Hjemmeside: www.microfloradanica.aau.dk

MICRO
FLORA
DANICA



The microbiome of Denmark

AALBORG UNIVERSITET

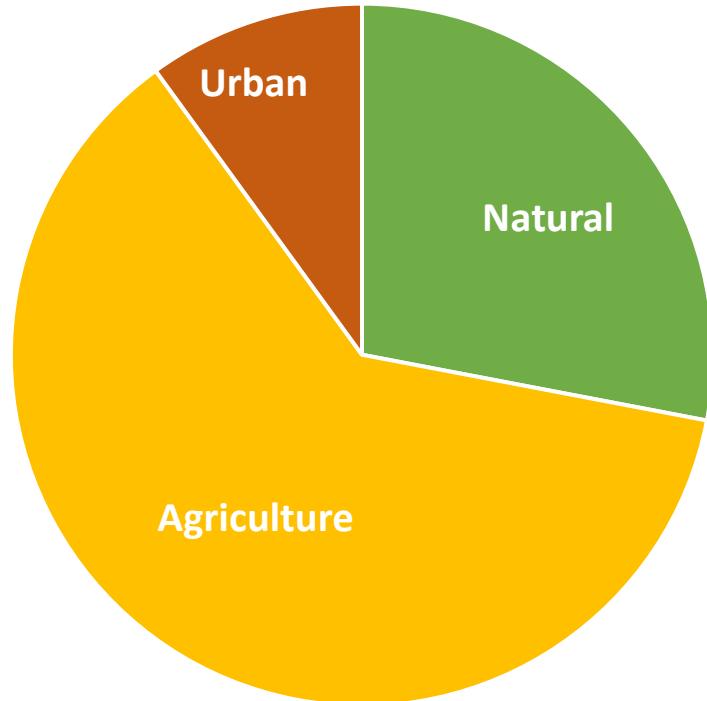
POUL DUE JENSEN GRUNDFOS FOUNDATION

Indsamling af 10.000 prøver i Danmark



Vibeke Rudkjøbing
Project Co-ordinator

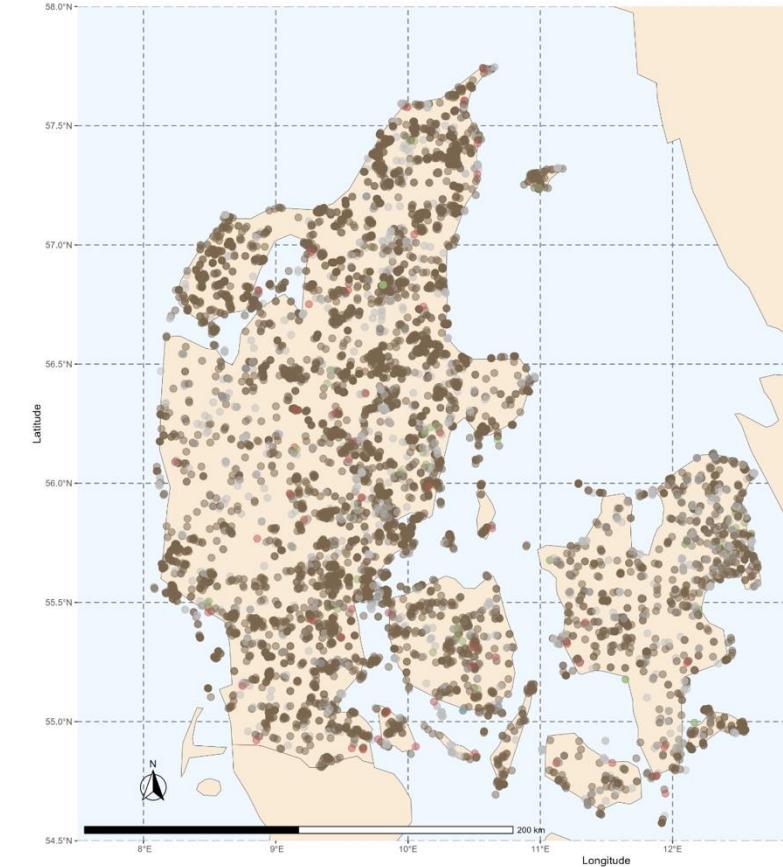
Arealudnyttelse DK



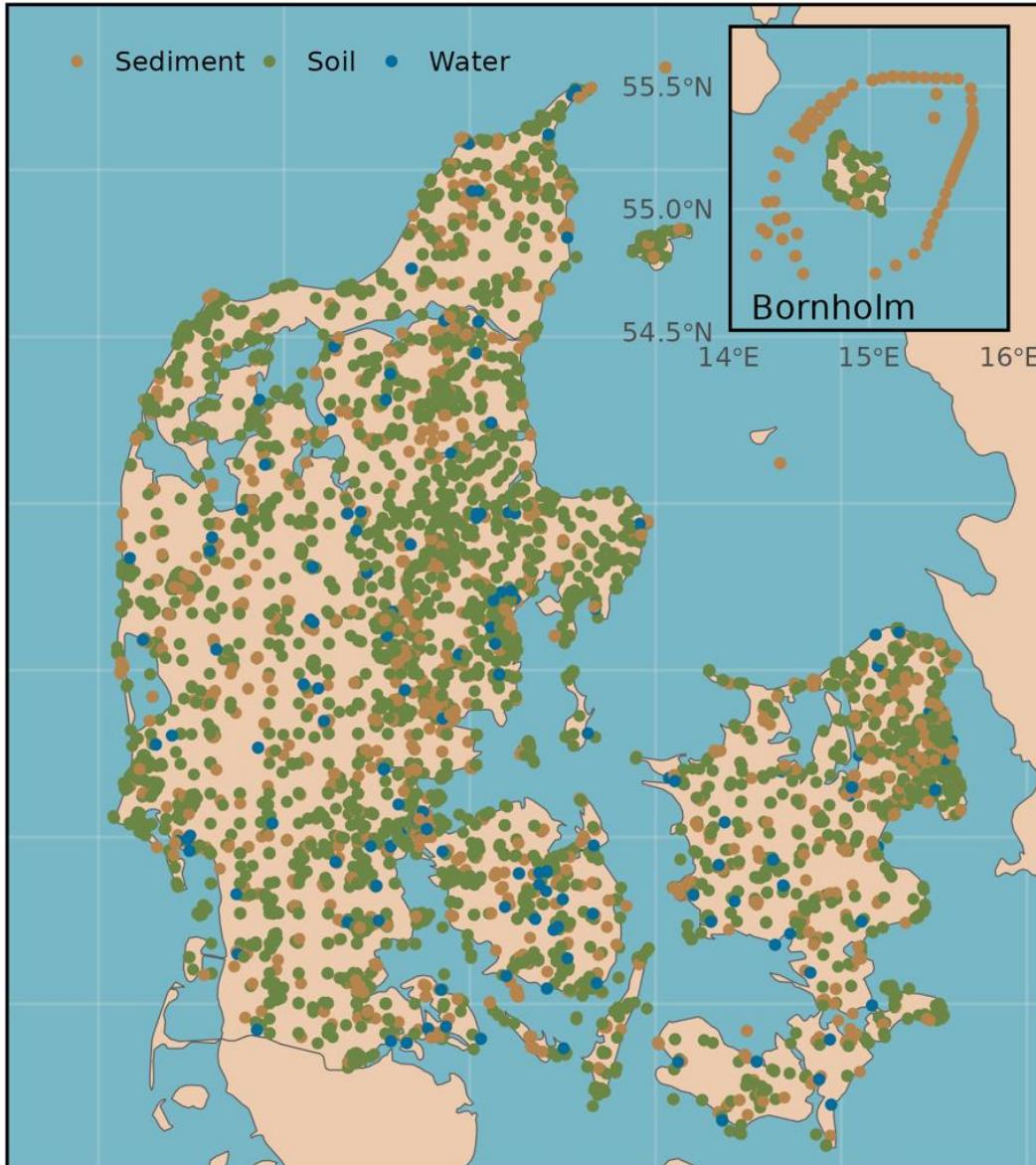
52 indsamlings-
projekter

- Geografisk dækning
- Arealudnyttelse
- Fokus på områder med høj forventet diversitet
- Ca. 2500 prøver fra landbruksområder

Arealudnyttelse MfD



Hvor langt er vi nået?



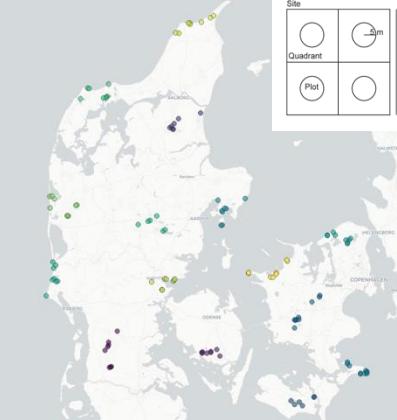
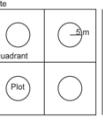
Status

- Vi har indsamlet > 10.000 prøver
- Alle prøver er DNA sekventeret
- Referencedatabase er næsten færdig!
- Vi er i gang med detaljerede analyser.

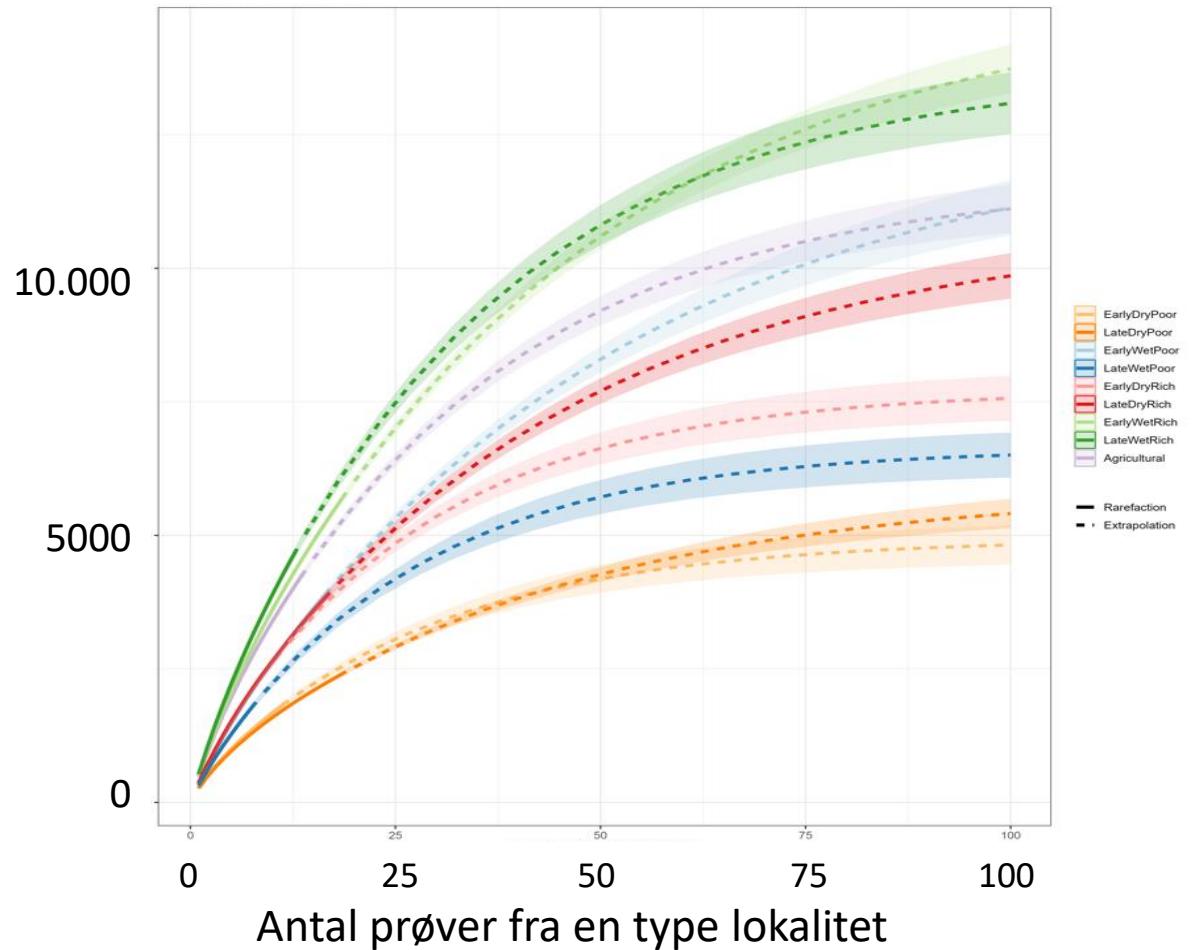
Eksempler:

- Hvor mange bakteriearter findes Danmark?
- Fordeling af bakterier i forskellige habitattyper (indikatorarter)
- Bakterier involveret i metanomsætning
- Nitrifikanter i jord

Hvor mange bakteriarter findes der i Danmark?



Antal observerede arter



Eksempel:

- 8 forskellige habitater.
- Jo flere prøver – jo flere arter.
- Omkring 100 prøver fra et habitat: de fleste arter er detekteret $\approx 5.000 - 15.000$ arter pr. habitat.
- Undersøgelser af andre habitater er i gang.
- Vi forventer 0,5-1 million arter ialt – de fleste nye og $>99,99\%$ uden et artsnavn.
- Alle vil få et navn/ID.

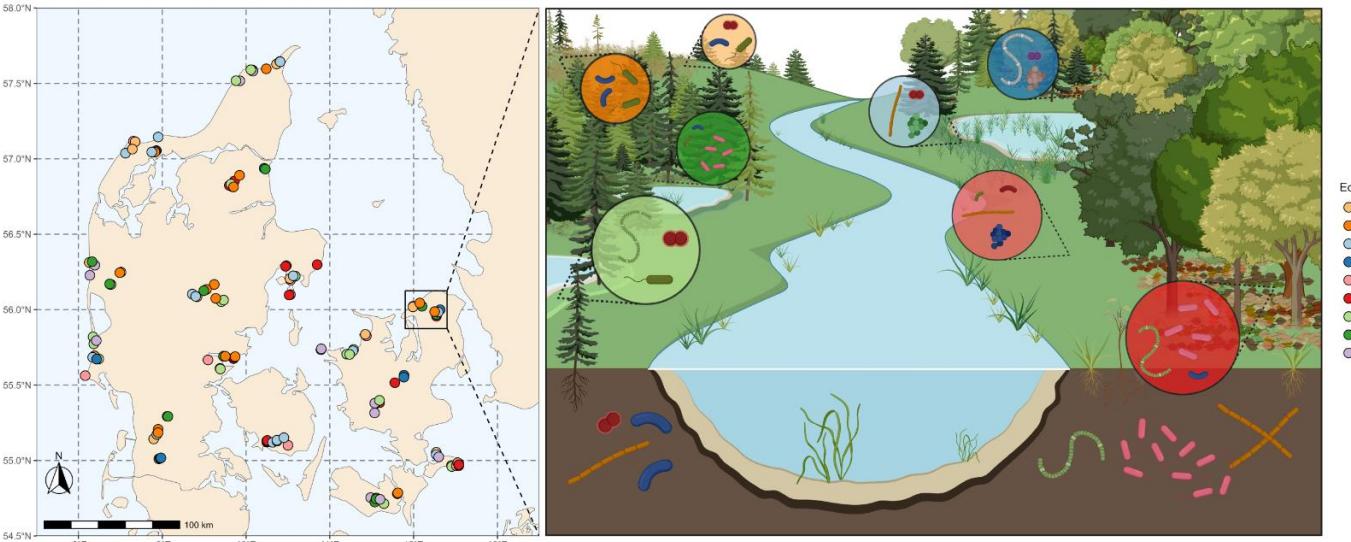
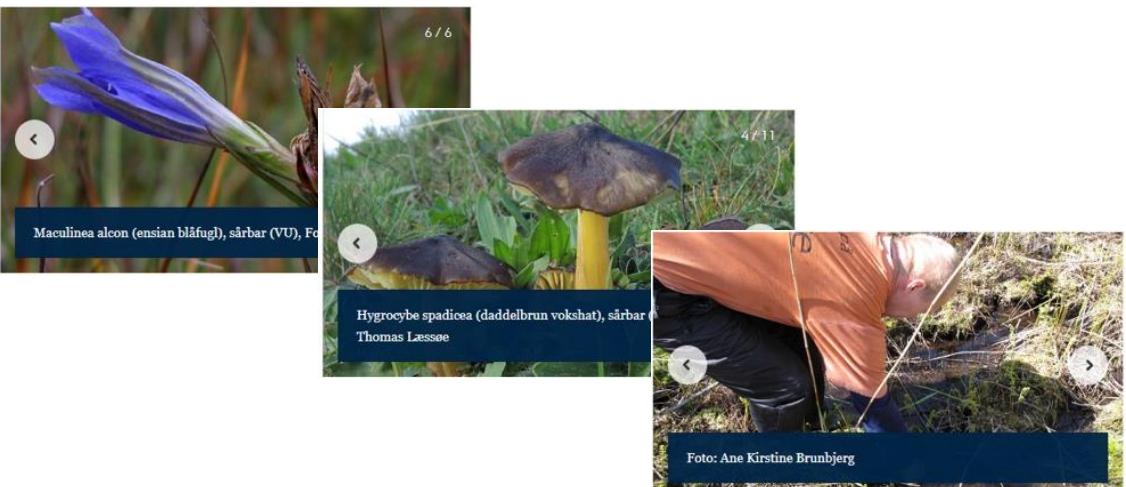
Kan bakterier bruges til at klassificere Natura 2000 habitater (Biowide)?



Thomas BN Jensen

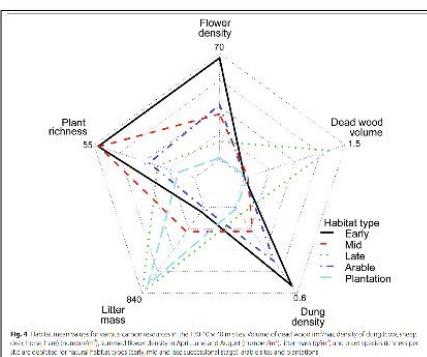
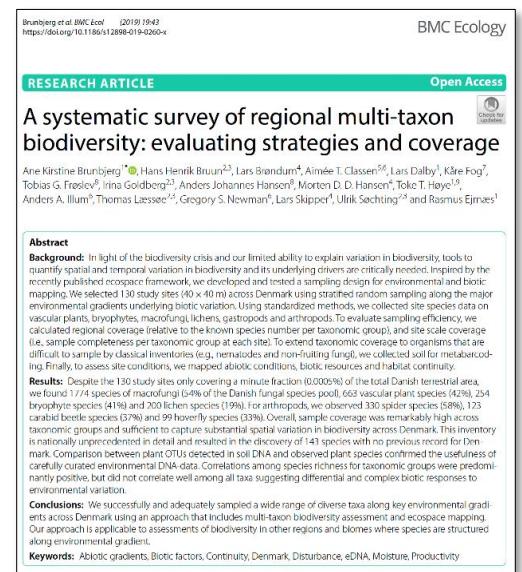
Formål

- Overvågning af biodiversitet (makrofauna) er kompliceret
- Nye metoder nødvendige: Kan bakterier i jorden bruges som indikatorer for biodiversitet over jorden?
- Opdagelse af indikatorarter
- Bedre biodiversitet management



Ecospace

- EarlyDryPoor
- LateDryPoor
- EarlyWetPoor
- LateWetPoor
- EarlyDryRich
- LateDryRich
- EarlyWetRich
- LateWetRich
- Agricultural

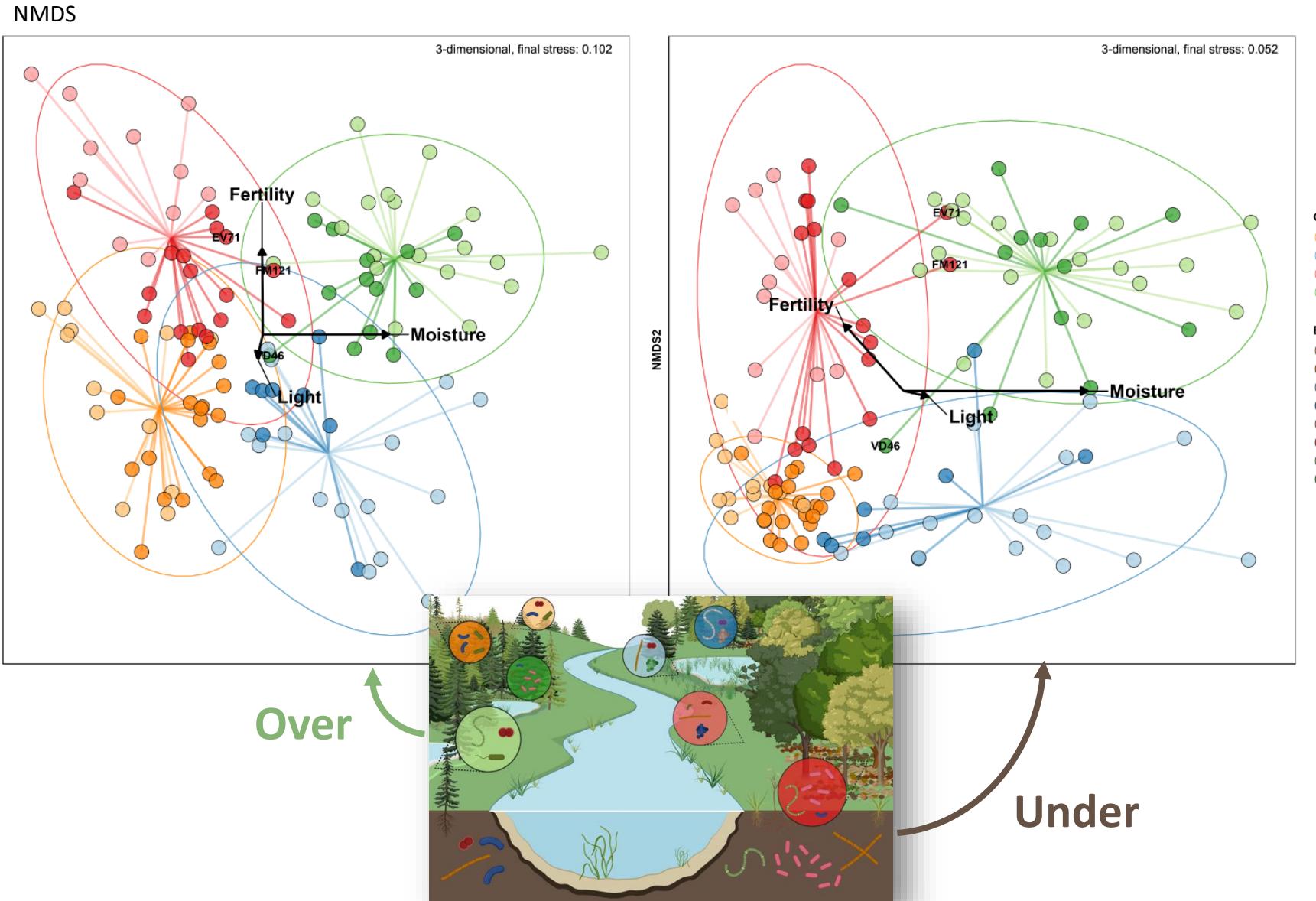


Tobias Frøslev
Univ. Copenhagen



Rasmus Ejernæs
Aarhus University

Foreløbige resultater: Klar sammenhæng mellem bakterier i jord og biodiversitet over jorden



Nu kender vi navne/ID af bakterierne. Hvilken funktion har bakterierne?

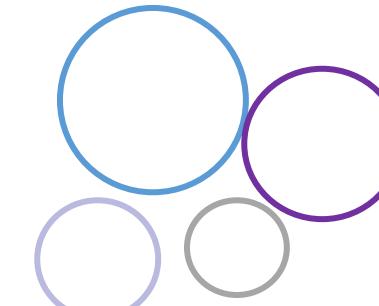


DNA extraktion

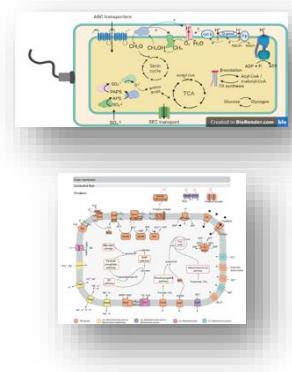
Genom-centric metagenomic



Metagenome assembled genomes (MAGs)



Metabske modeller



nature methods BRIEF COMMUNICATION
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01539-7>

OPEN 2022 Check for updates

Oxford Nanopore R10.4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing

Mantas Sereika^{1,4}, Rasmus Hansen Kirkegaard^{1,2,4}, Søren Michael Karst¹, Thomas Yssing Michaelsen¹, Emil Aarre Sørensen¹, Rasmus Dam Wollenberg³ and Mads Albertsen^{1,2*}



GTDB Genome reference database: ≈ 81.000 genomer

Microflora Danica: ≈ 20.000 nye genomer

Metandannelse og metanfjernelse – vigtig ved udledning af drivhusgasser og gendannelse af vådområder

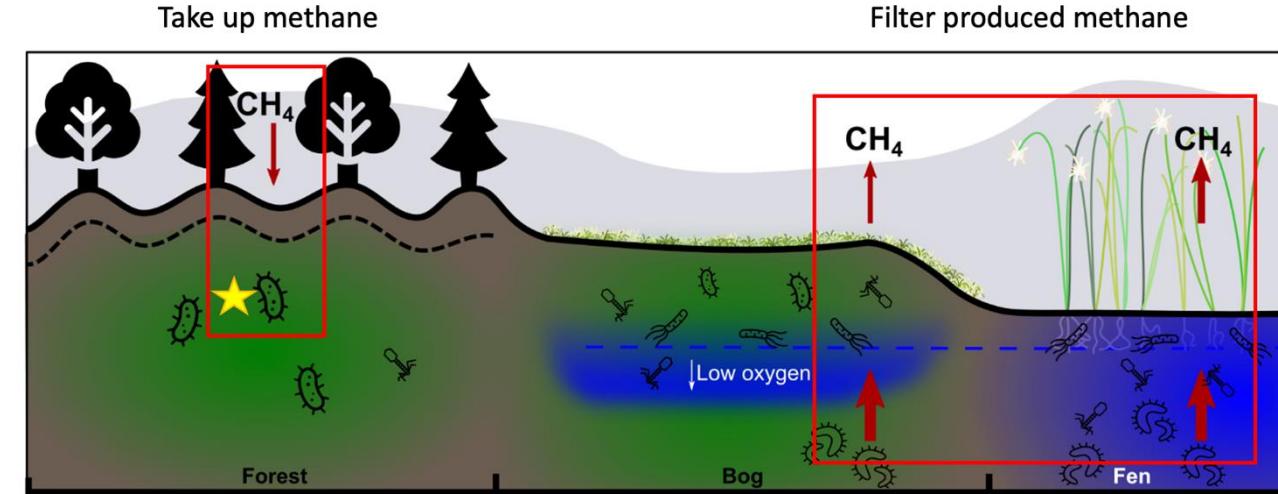


Kalinka Knudsen



Caitlin Singleton

- Etableret et katalog over metanproducerende og metanoxidrerende archaea/bakterier i forskellige miljøer.
- Vi ser mange nye slægter og arter.



Metandannelse og metanfjernelse – vigtig ved udledning af drivhusgasser og gendannelse af vådområder

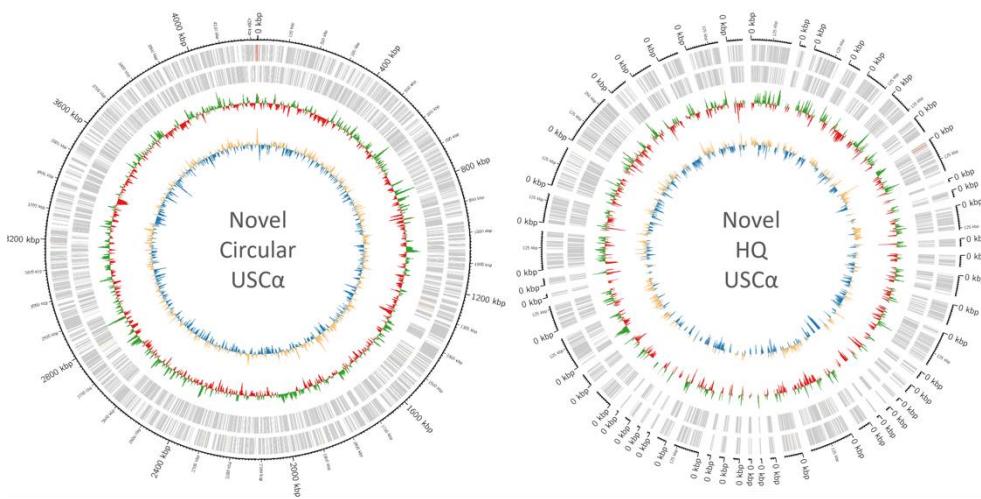
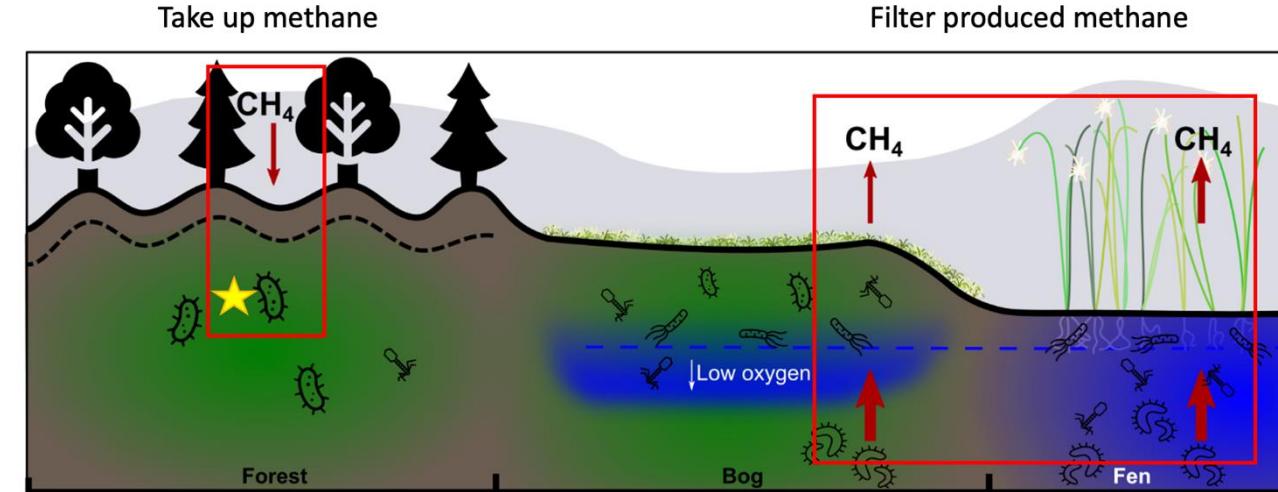


Kalinka Knudsen

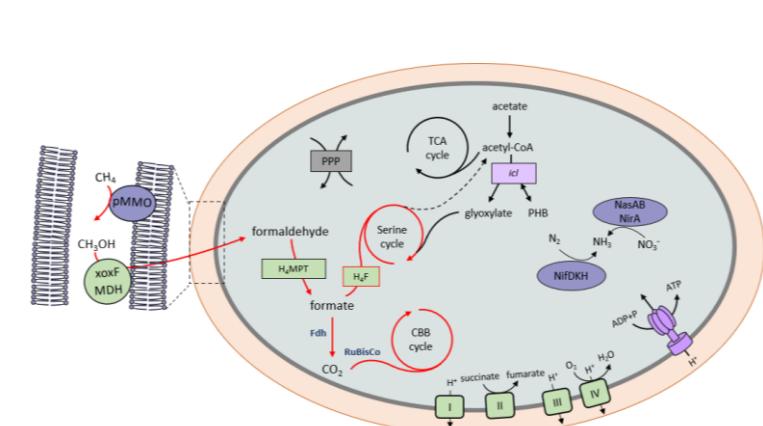


Caitlin Singleton

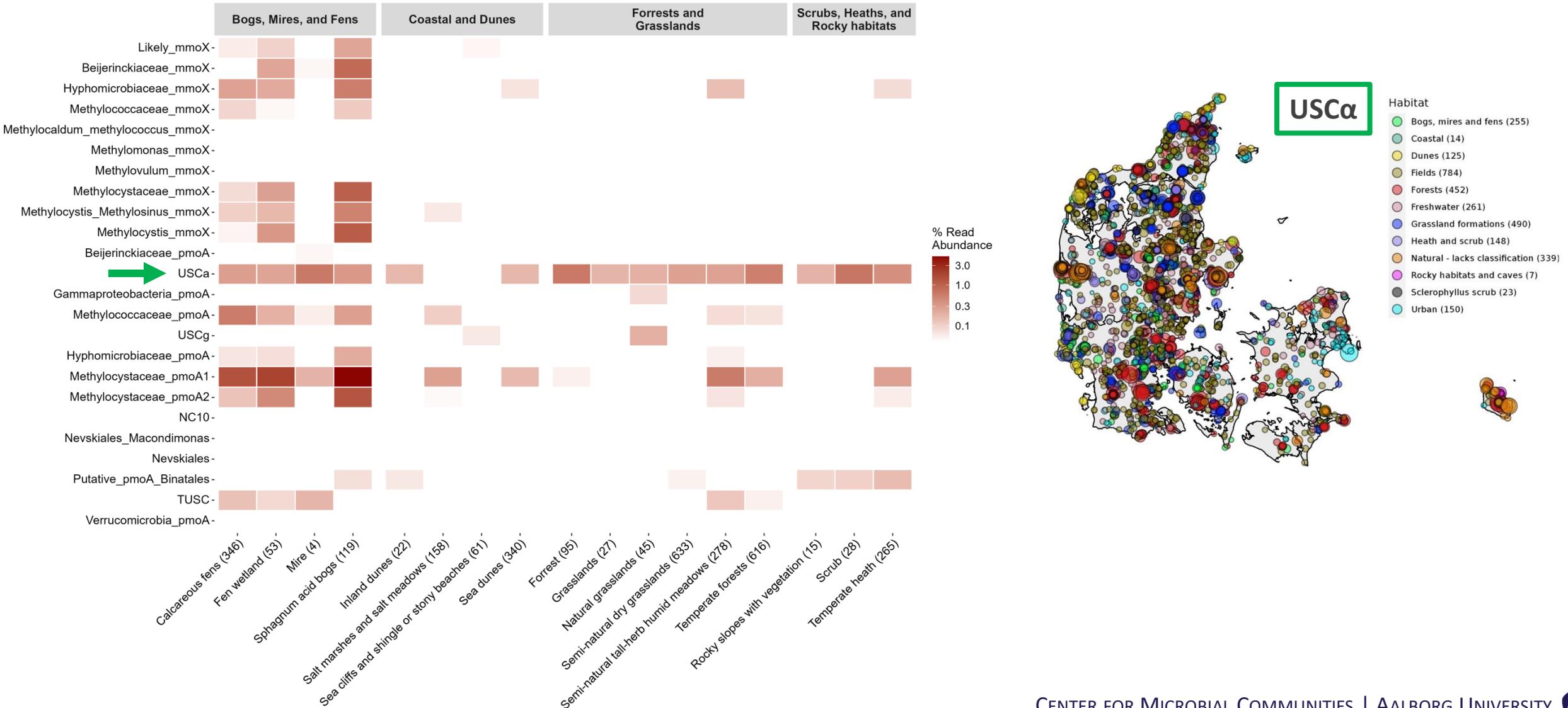
- Etableret et katalog over metanproducerende og metanoxidrerende archaea/bakterier i forskellige miljøer.
- Vi ser mange nye slægter og arter.
- Nye genomer af "Upland Soil Clusters, USC α " – kan oxididere metan ved atmosfæriske koncentrationer – etablering af metabolsk model.



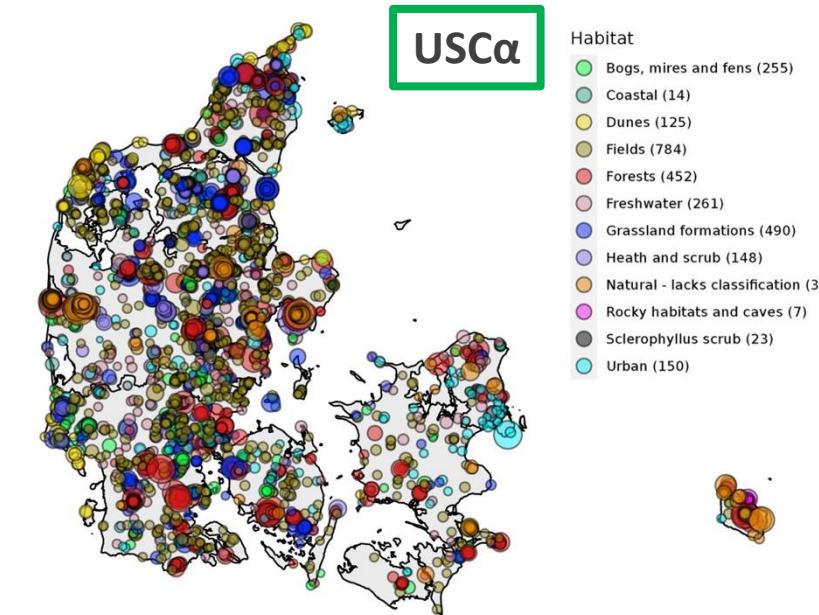
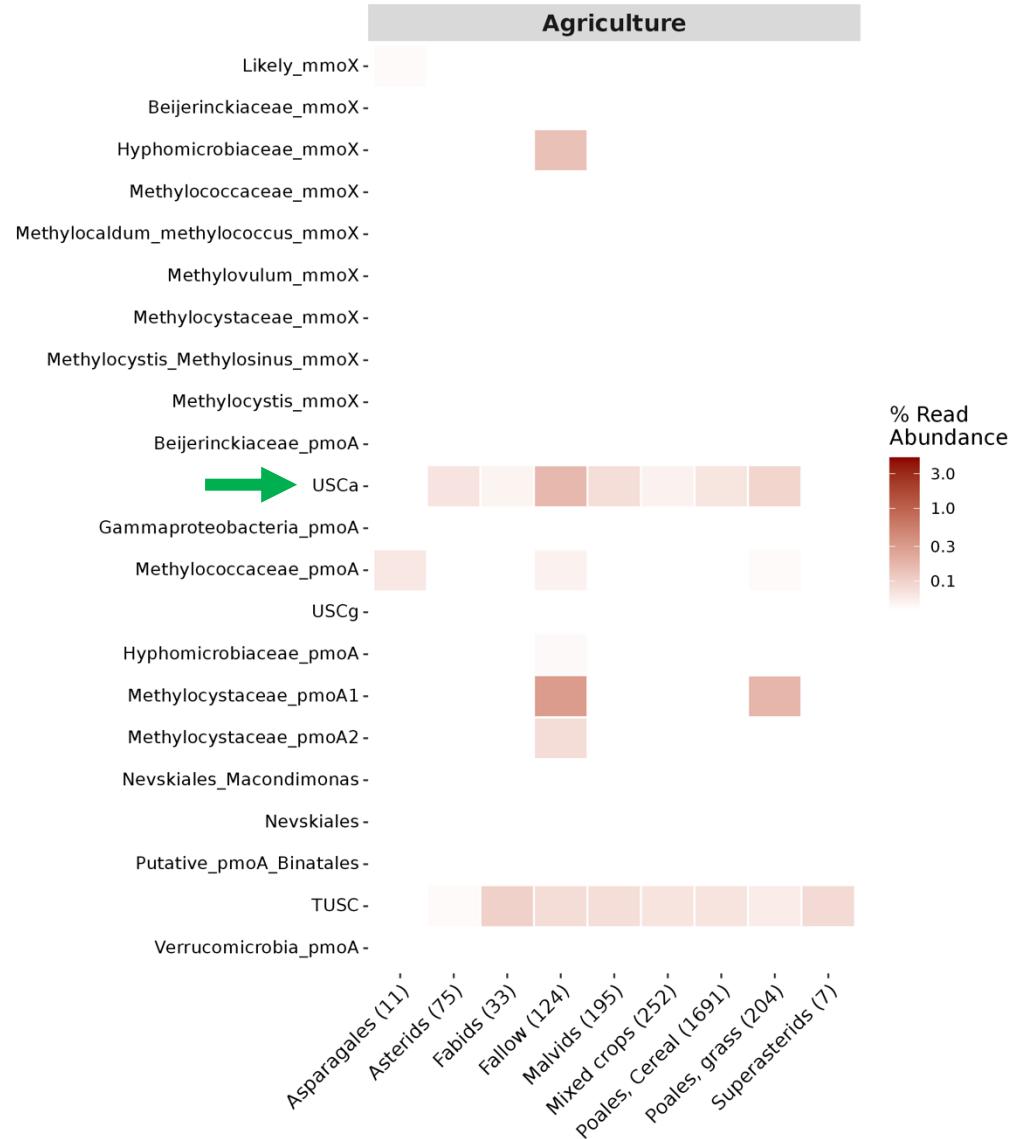
Metabolsk model



Metanoxiderende bakterier, som kan leve ved atmosfæriske metankoncentrationer, er udbredte i “naturlige” systemer



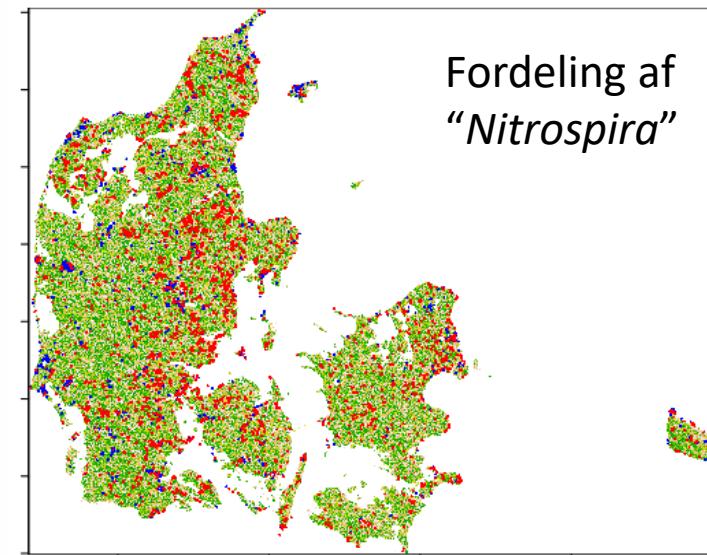
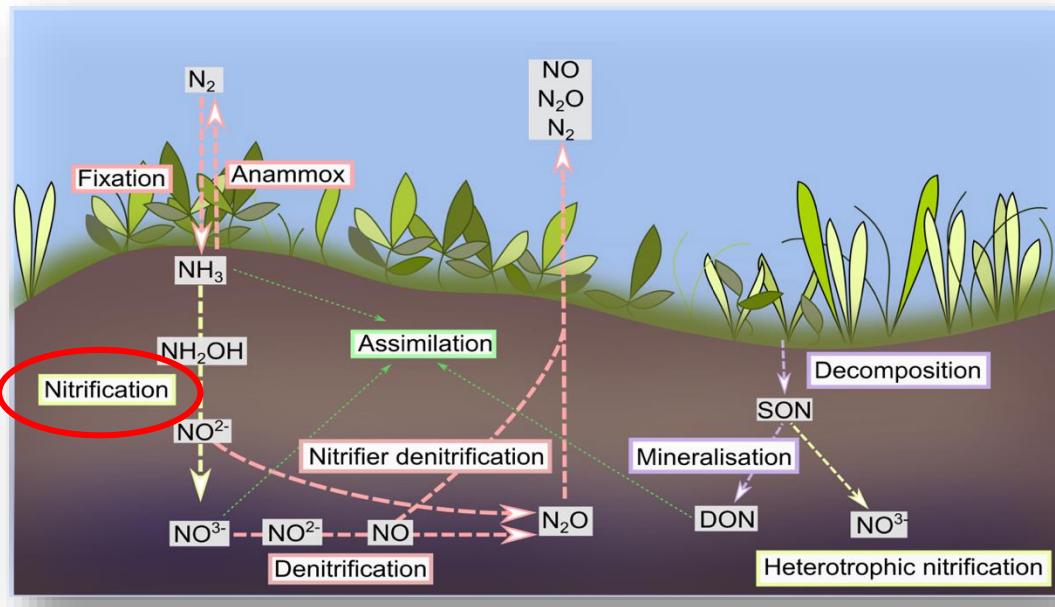
Metanoxidende bakterier, som kan leve ved atmosfæriske metankoncentrationer, er også udbredte i landbrugsjord!



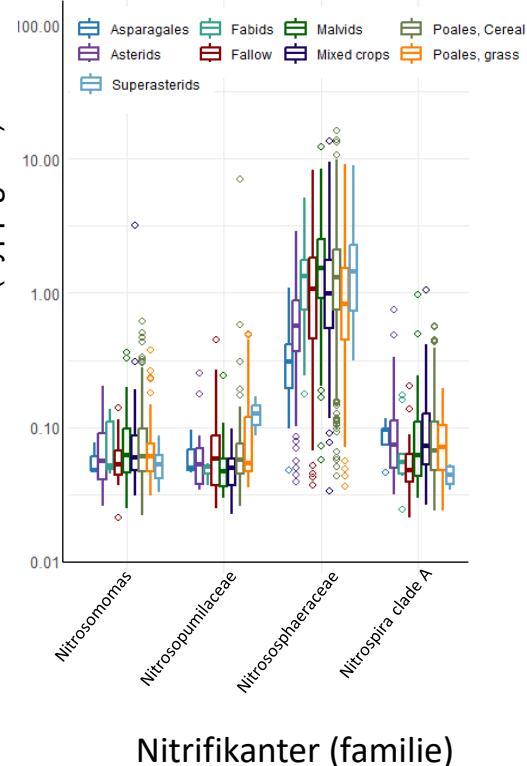
Kvælstofkredsløbet i landbrugsjord

Nitrifikation

- Fordeling af nitrifikanter i Denmark inkl. 2500 prøver i landbrugsjord
- > 600 genomer fra nitrifikanter – det største studie nogensinde
- Mange nye nitrifikanter – både slægter og arter
- Vil danne grundlag for fremtidige studier af nitrifikation i (landbrugs) jord

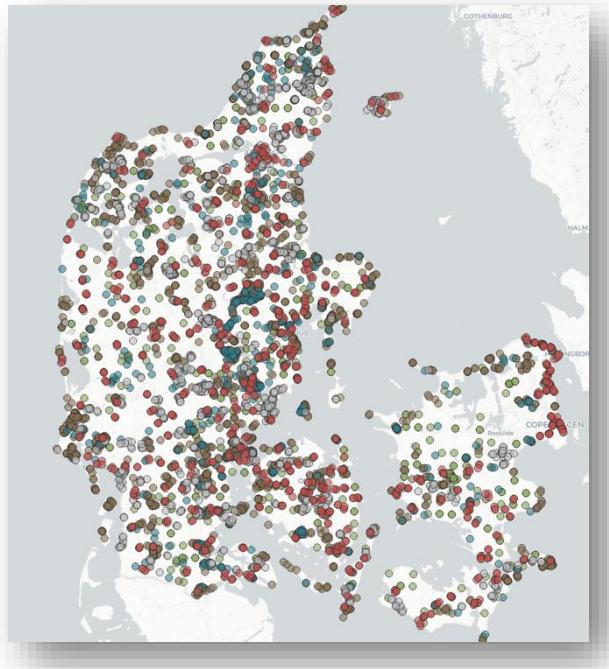


Relativ hyppighed af de dominerende nitrifikanter i landbrugsjord



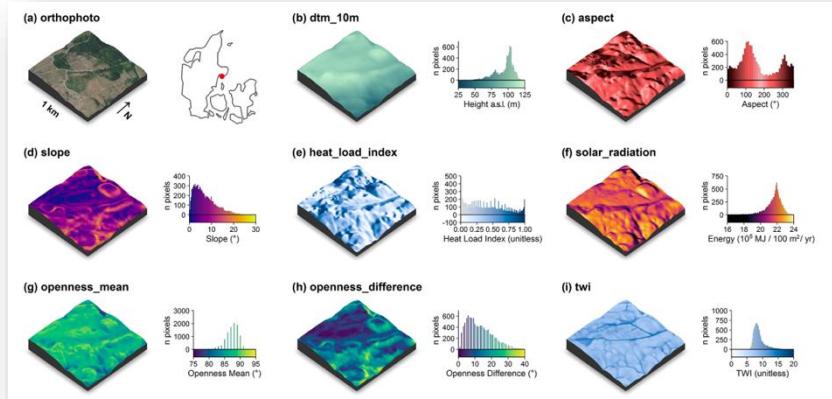
Spændende spørgsmål: hvad bestemmer arters udbredelse?

Microflora Danica data



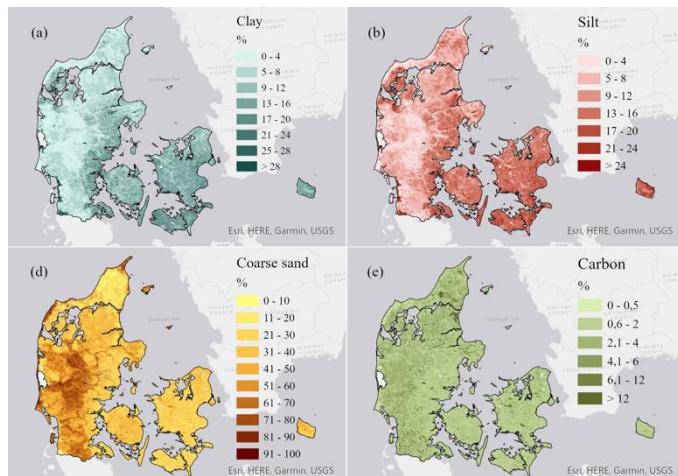
Francesco Delogu

Satelite & drone imaging



Prof.
Signe Normand

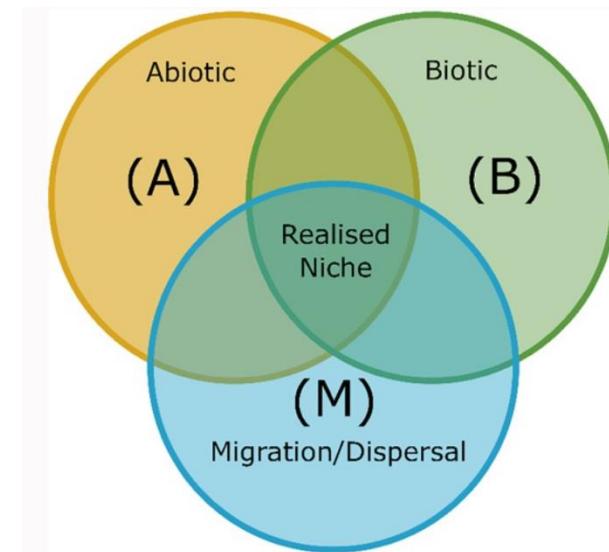
Soil properties



Prof.
Lis W. de Jonge

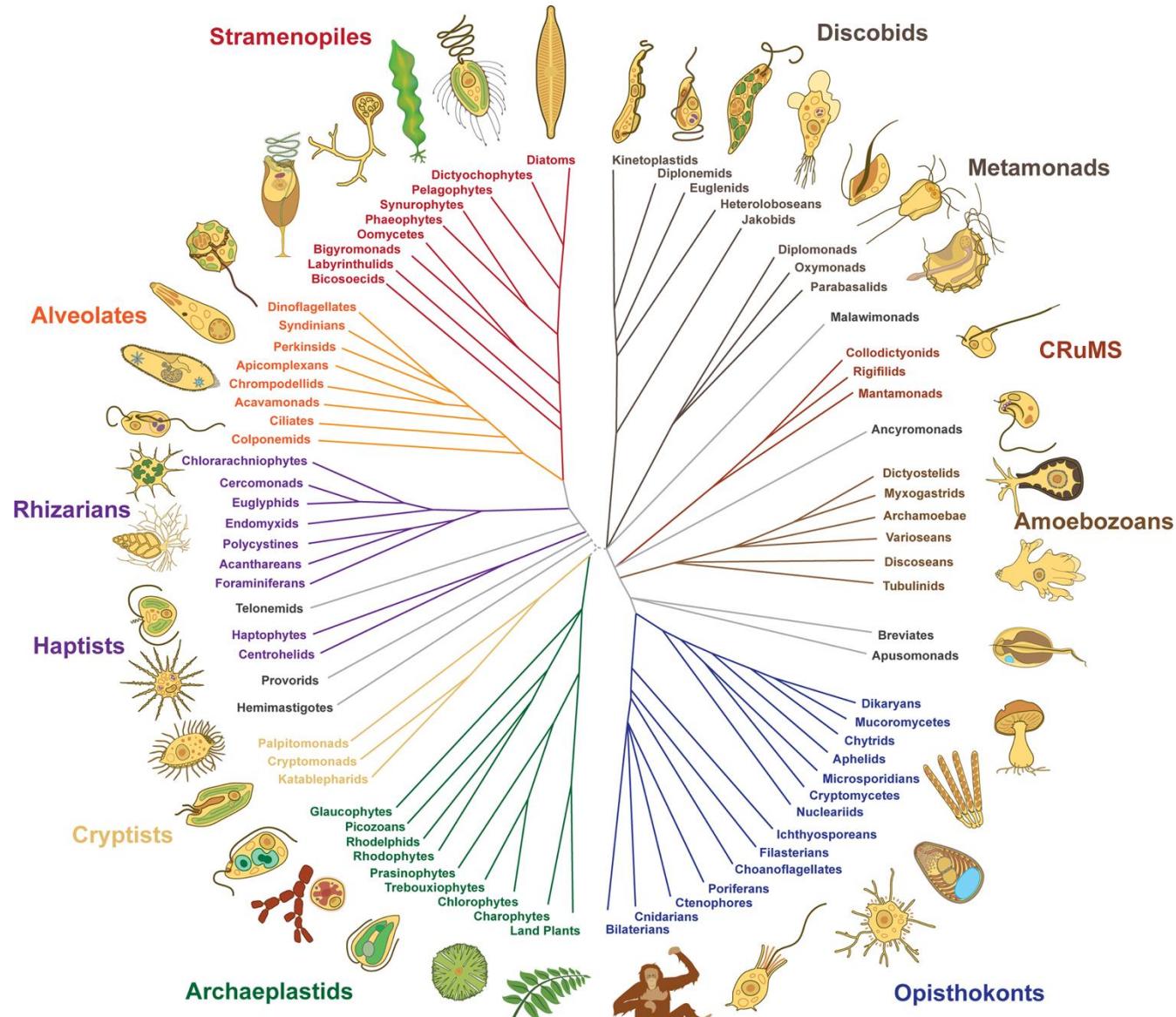


Prof.
Mogens H. Greve



BAM framework

Vi er også i gang med at se på de små eukaryoter (svampe, protister,...)



Keeling and Eglit, 2023

Center for Microbial Communities



The AAU Microflora Danica team



POUL DUE JENSEN GRUNDFOS FOUNDATION

VILLUM FONDEN



www.microfloradanica.aau.dk

FORSIDE BIO / MICROFLORA DANICA /
HVORDAN DÆKKER VI DANMARK? IDENTIFIKATION AF MIKROORGANISMER BAGGRUND OG METODER
MIKROORGANISMER OG DERES BETYDNING TILKNYTNING TIL FLORA DANICA
PRESSEARKIV - MICROFLORA DANICA PRESSEARKIV - CORONA DANICA INTERNE SAMARBEJDSPARTNERE
EKSTERNE SAMARBEJDSPARTNERE INTERACTIVE MAP



MICRO
FLORA
DANICA

+ OM PROJEKTET

Microflora Danica skal skabe en reference database eller et atlas over alle mikroorganismer, som findes naturligt i Danmark. Projektet udføres på Institut for Kemi og Biovedenskab ved Aalborg Universitet og er støttet af Poul Due Jensen/Grundfos fonden med 20 millioner kroner i tidsperioden 2018-2023.

BAGGRUND OG METODER



Læs mere om Microflora Danicas ideologiske tilknytning til det historiske værk Flora Danica, samt om mikroorganismer og deres betydning, og hvordan mikroorganismer identificeres.

LÆS MERE

"Den videnskabelige og teknologiske betydning af en sådan mikrobiologisk database (et atlas) kan vanskeligt overvurderes. Når de store linjer i atlas'et engang er identificeret, vil det ikke ske igen. Projektet har derfor mulighed for at skabe signifikant impact på både kort og lang tidshorisont."

– Poul Toft Frederiksen, programchef for Forskning, Poul Due Jensen/Grundfos Fondet

KONTAKT
MICROFLORA DANICA – DANMARKS MICROBIOM

Projektleader:
Professor MSO Mads Albertsen
Email: ma@bio.aau.dk
Mobile: 2293 2191

Projektleader:
Professor Per Halkær Nielsen
Email: phn@bio.aau.dk
Tel: 9940 8503 / Mobil: 2173 5089

Projektkoordinator:
Vibeke R. Jørgensen
Email: vrj@bio.aau.dk
Tel: 9940 7243 / Mobil: 2617 9672

Projektet er finansieret af:

POUL DUE JENSEN GRUNDFOS FOUNDATION

HVORDAN DÆKKER VI DANMARK?



Læs mere om, hvordan 10.000 prøver indsamles på tværs af Danmarks geografi og terræn for at dække den mikrobielle diversitet, som findes i jordhøjde, i både terrestriske og akvatriske miljøer.

LÆS MERE

+ SAMARBEJDSPARTNERE

+ MATERIALE TIL PARTNERE

+ PRESSEARKIV

+ MICROFLORA DANICA TEAMET

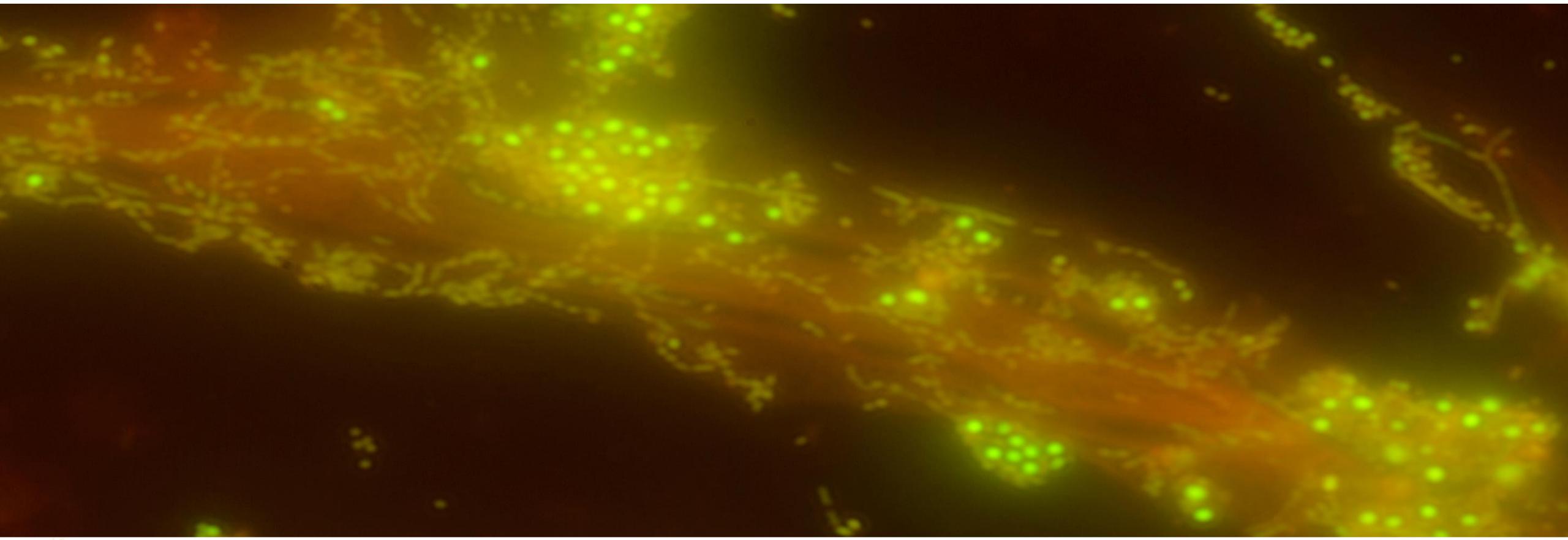


KORT OVER MICROFLORA DANICA

VERDENSMÅL
for bæredygtig udvikling



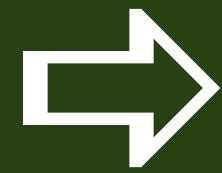
Mikrodiversitet omkring rødder - kan vi forædle til et bedre mikrobiom?



novo
nordisk
fonden

UNIVERSITY OF
COPENHAGEN

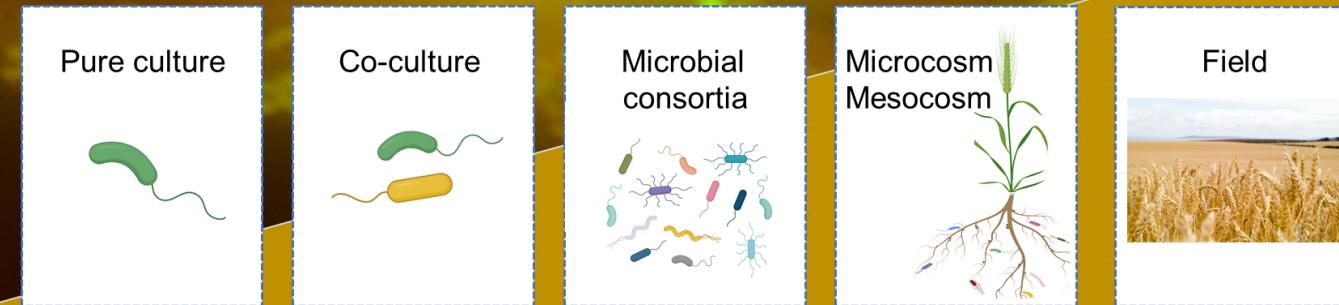




Green solutions

Model systems across scales and complexity

- *laboratory versus natural media*
- *from molecular to field scale*

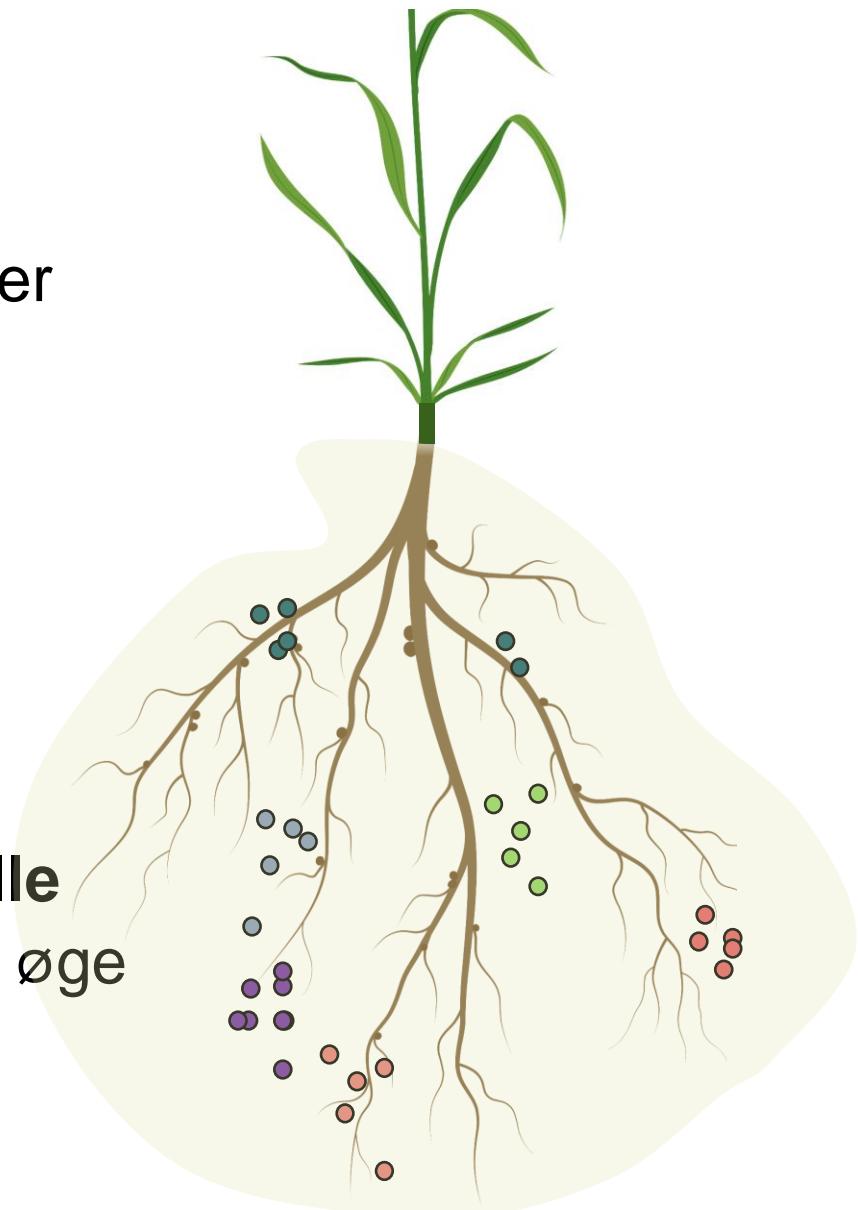


- **Forstå mikrobiel økologi i jord-plante-microbe systemet**
- **Funktionel forståelse af plante-microbe interaktioner**

Rødder som et forædlings-target?

- Jordens **mikroorganismer** er **diverse**, og lever i samfund med et **komplekst netværk** af interaktioner
- Planterødder – **metabolsk aktivt hotspot**
- **Mikroorganismer** bidrager med mange **vigtige funktioner** der styrker plantevækst

Hvilke **parameter** er vigtige for hvordan de **mikrobielle samfund etablerer sig** på rødderne – hvordan kan vi øge de positive interaktioner?



1. Er der forskel i den mikrobielle intraspecies diversitet mellem sorter?



- Forskellig resistensprofil i forhold til *Fusarium* infektioner

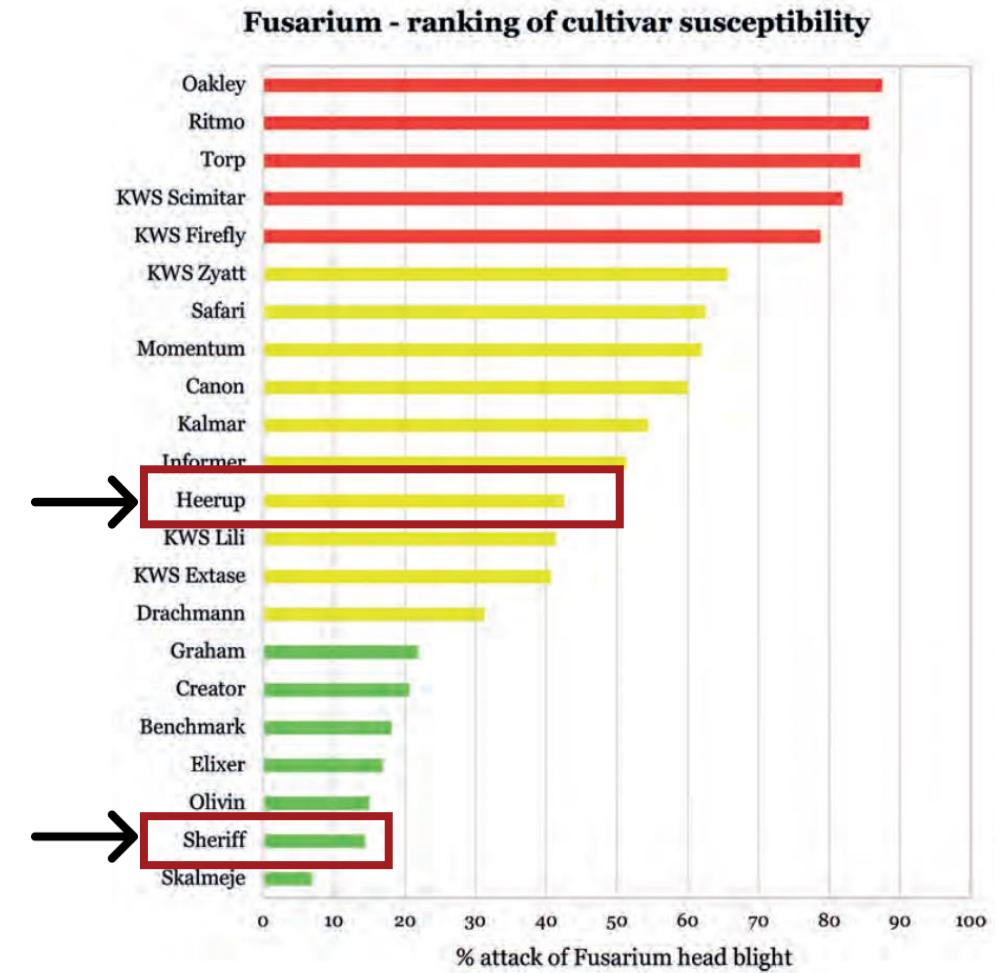


Figure 21. Per cent attack of Fusarium head blight in late July. Average of both trials. The LSD₉₅ value = 5.5.

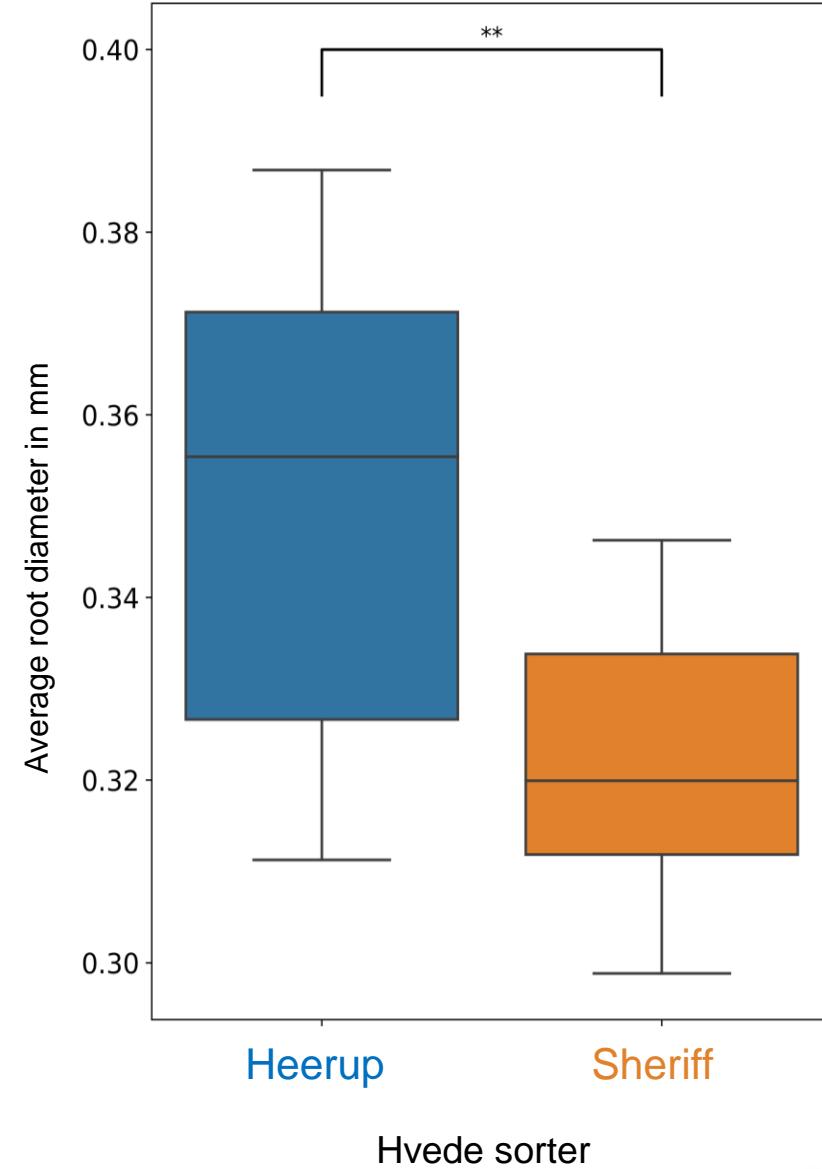
Jørgensen et al., 2020 Aarhus University



1. Er der forskel i den mikrobielle intraspecies diversitet mellem sorter?



- Forskellig resistensprofil i forhold til *Fusarium* infektioner
- Signifikant forskel i rod-diameter mellem de to sorter

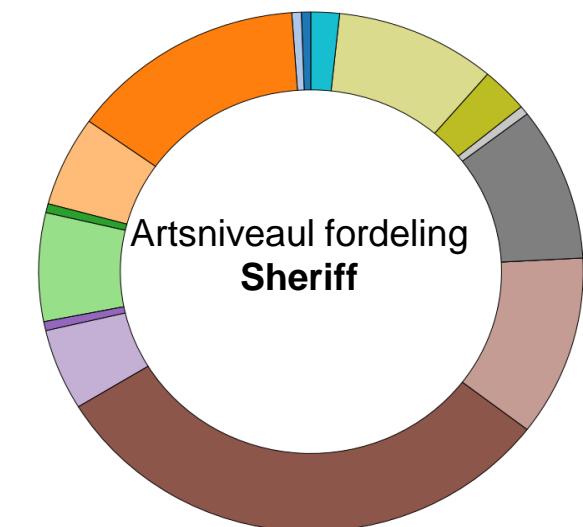
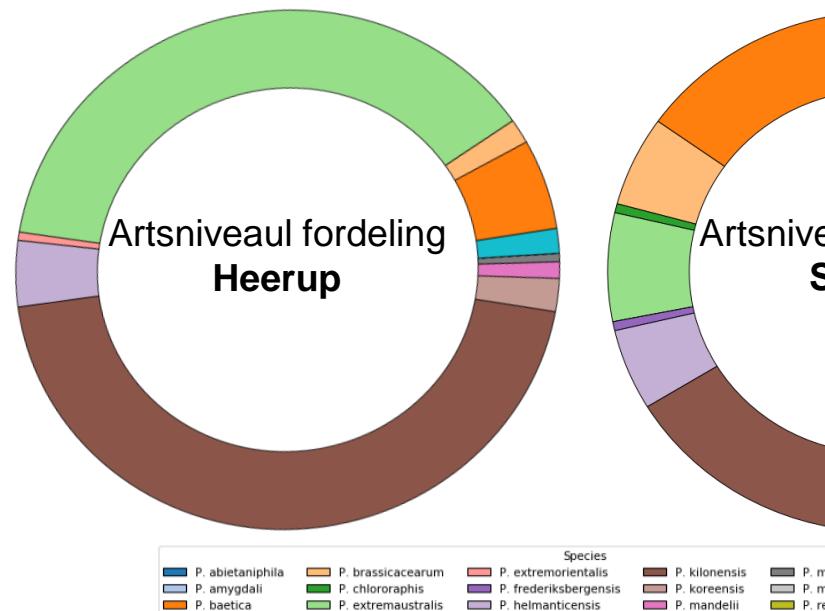


1. Er der forskel i den mikrobielle intraspecies diversitet mellem sorter?



Isolering af 600 *Pseudomonas* stammer
~300 fra hver sort

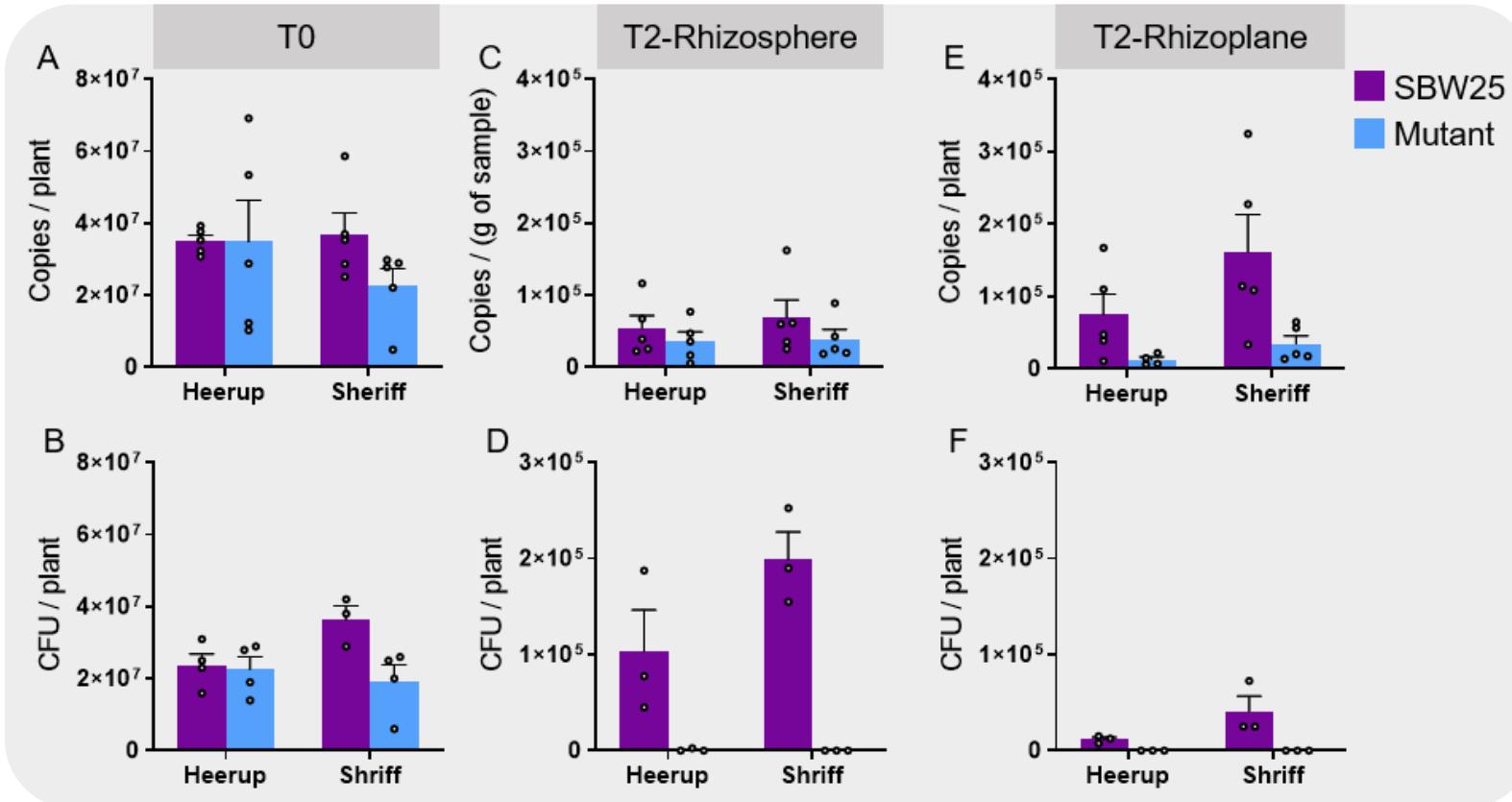
16S rRNA **taxonomi**



- Højere diversitet omkring Sheriff rødder
- Samme arter har forskellig gen-sammensætning



2. Er der helt specifikke træk hos mikroberne som er vigtige for at kolonisere rødder?



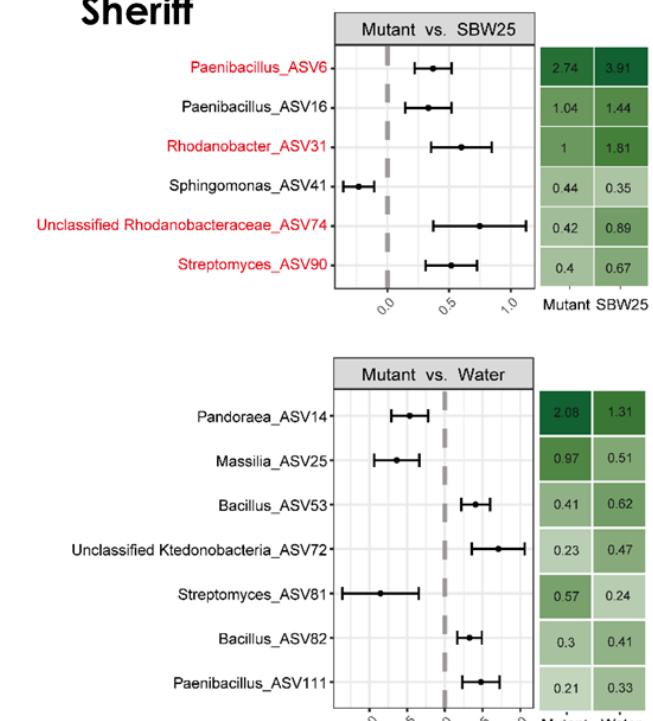
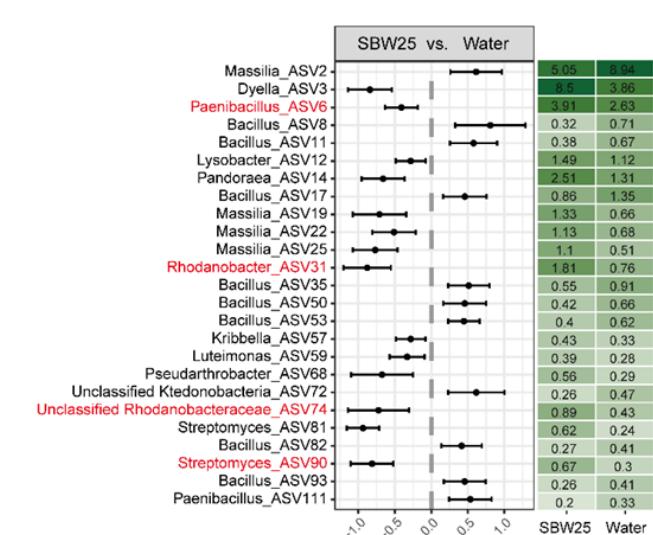
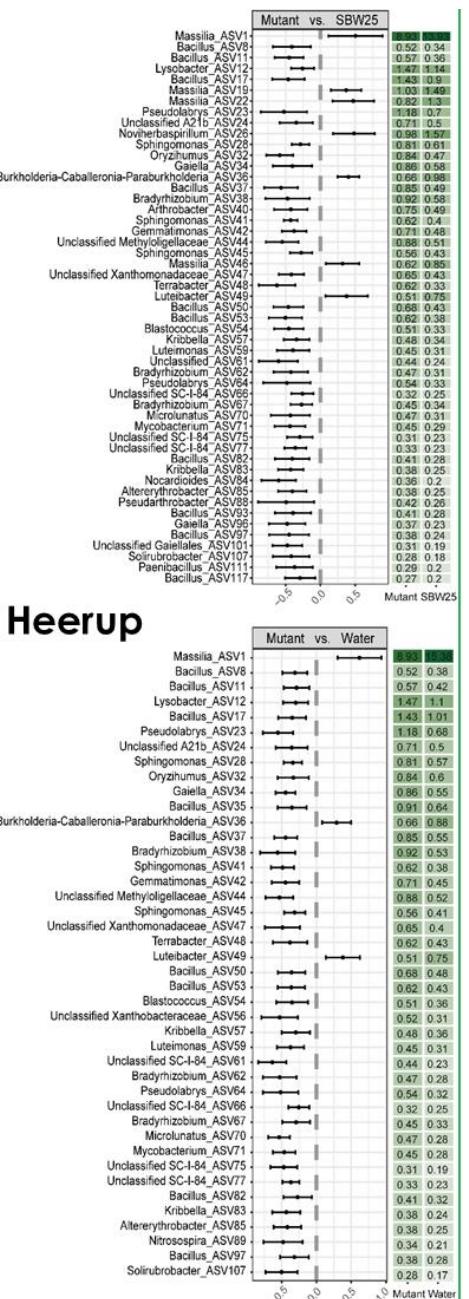
- *Pseudomonas* SBW25, der producerer viscosin, koloniserer hvederødder bedre end den tilsvarende mutant som ikke kan producere viscosin



2. Er der helt specifikke træk hos mikroberne som er vigtige for at kolonisere rødder?



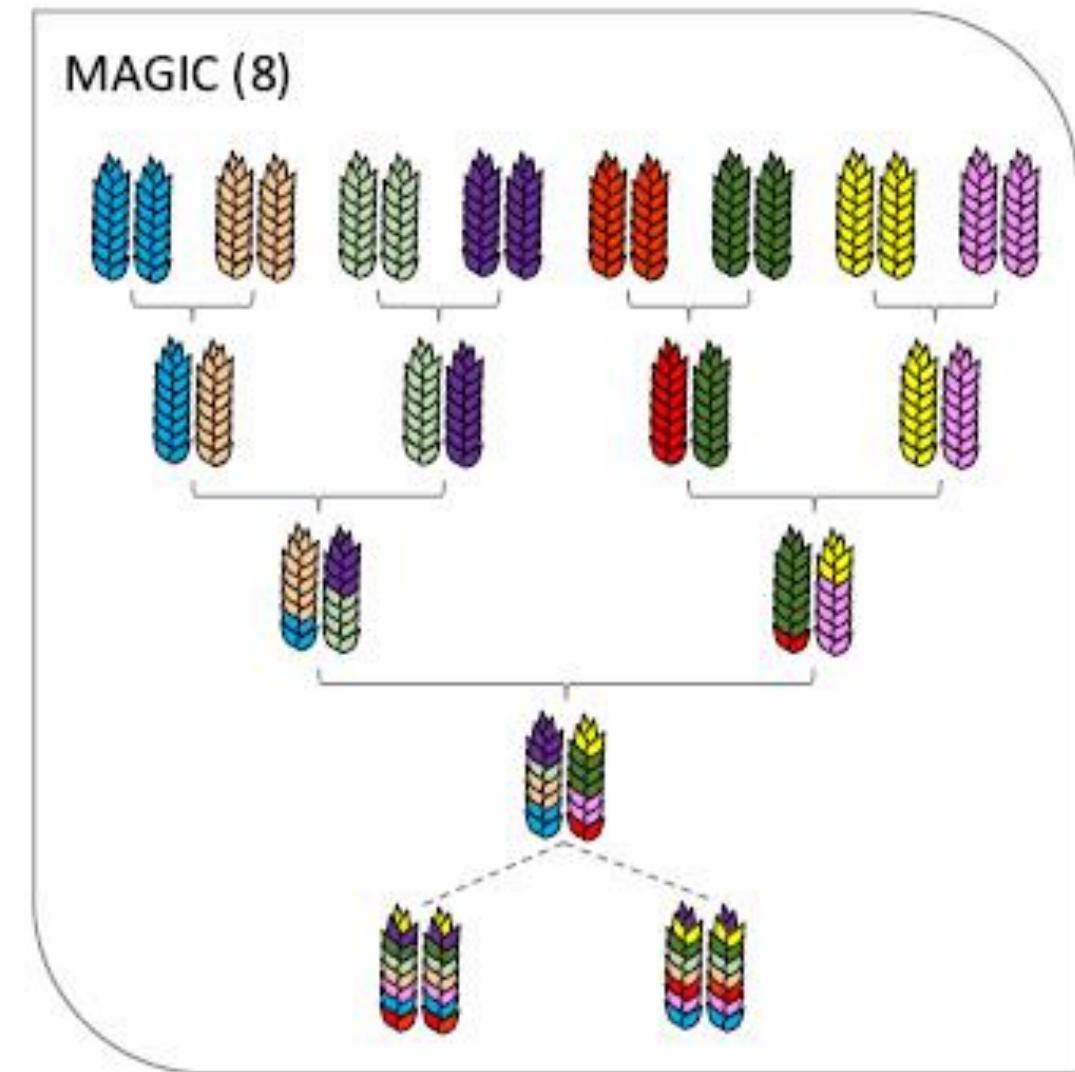
Evnen til at producere viscosin har også en indflydelse på hvilke organismer der ellers koloniserer - både bakterier og protozoer





Ved at fokusere ensidet på forædling af udbytte og vækst, har vi så mistet vigtige interaktioner mellem rødder og mikroorganismer?

I samarbejde med hvede genetikere fra NIAB, Cambridge har vi adgang til hvede populationer med forskellig genetisk sammensætning e.g. MAGIC



Fokus på at forstå kolonisering af rødder, indflydelse på plantevækst samt hvorvidt der er en genetisk komponent der styrer den specifikke kolonisering af mikroorganismær



Acknowledgement

Courtney Horn Herms

Ying Guan

Kitzia Yashvelt Molina Zamudio

Frederik Bak

Rosanna Catherine Hennessy

Dorte Bodin Dresbøll

Tue Kjærgaard Nielsen

UNIVERSITY OF
COPENHAGEN



novo
nordisk
fonden