读书报告

报告时间：2018-05-19　　报告人：李帅

Aquaculture 479 (2017) 304–310

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Quantification of novel geosmin-producing bacteria in aquaculture systems

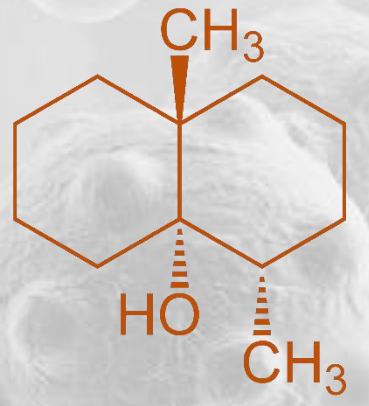
Mie Bech Lukassen[a], Aaron Marc Saunders[a,1], Paul-Daniel Sindilariu[b], Jeppe Lund Nielsen[a,*]

[a] Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Fredrik Bajersvej 7H, DK-9220 Aalborg East, Denmark
[b] Tropenhaus Frutigen AG, Tropenhausweg 1, CH-3714 Frutigen, Switzerland

Introduction

Geosmin

- 土臭素
- 土味素
- 土腥素
- ~~地霉素~~ Terramycin



某些细菌或真菌的次级代谢产物

具有特殊的土味 (Gerber and Lechevalier, 1965)

人类嗅觉和味觉对其极其敏感（毫微摩尔级）(Cook et al., 2001)

亲脂性，易在脂肪组织中累积

存在问题

饮用水

(Ludwig et al., 2007; Smith et al., 2008)

葡萄酒酿造

(Behr et al., 2013)

水产养殖

(Tucker, 2000)

“洗鱼”

成本

拟解决问题

循环水产养殖系统
Recirculating aquaculture systems (RAS)

- 导致异味问题的微生物
- 有利于这类微生物生长的条件

Recirculating aquaculture systems at the Virginia Tech Department of Food Science and Technology

- 纯培养
- 免培养

⇩

分离、鉴定
土腥味产生菌

蓝藻 *Cyanobacteria*

放线菌 *Actinomycetes*（特别是*Streptomyces*属）

(Auffret et al., 2011; Schrader and Summerfelt, 2010)

粘细菌 Myxobacteria

(Dickschat et al., 2005)

产土臭素细菌的鉴定

开端：检测土臭素合成酶（唯一的分子鉴定方法）

属于萜类合酶，由*geoA*基因编码合成，730个氨基酸，存在于所有已知的土臭素产生菌中。

(Jiang et al., 2007)

基因组测序分析表明：链霉菌属（*Streptomyces*），弗兰克氏菌属（*Frankia*），粘细菌（myxobacteria）均有较高水平的土臭素合成基因。(Giglio et al., 2008)

任何土臭素合成酶都由两个高度同源性（成对发生）的域组成。

目前普遍认为，*geoA*基因是一种非常适合的用于研究产土臭素细菌多样性的分子标记。

Materials and methods

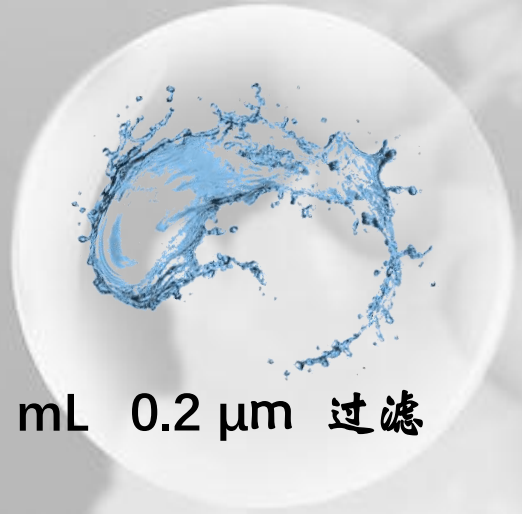
1. 培养、取材

Streptomyces avermitilis (DSM 46492)　阿维链霉菌

Microcoleus sp. (PCC 10601)　微鞘藻

苏格兰Scotland，丹麦Denmark

养殖水体、过滤材料



100 mL　0.2 μm　过滤

−20 ℃

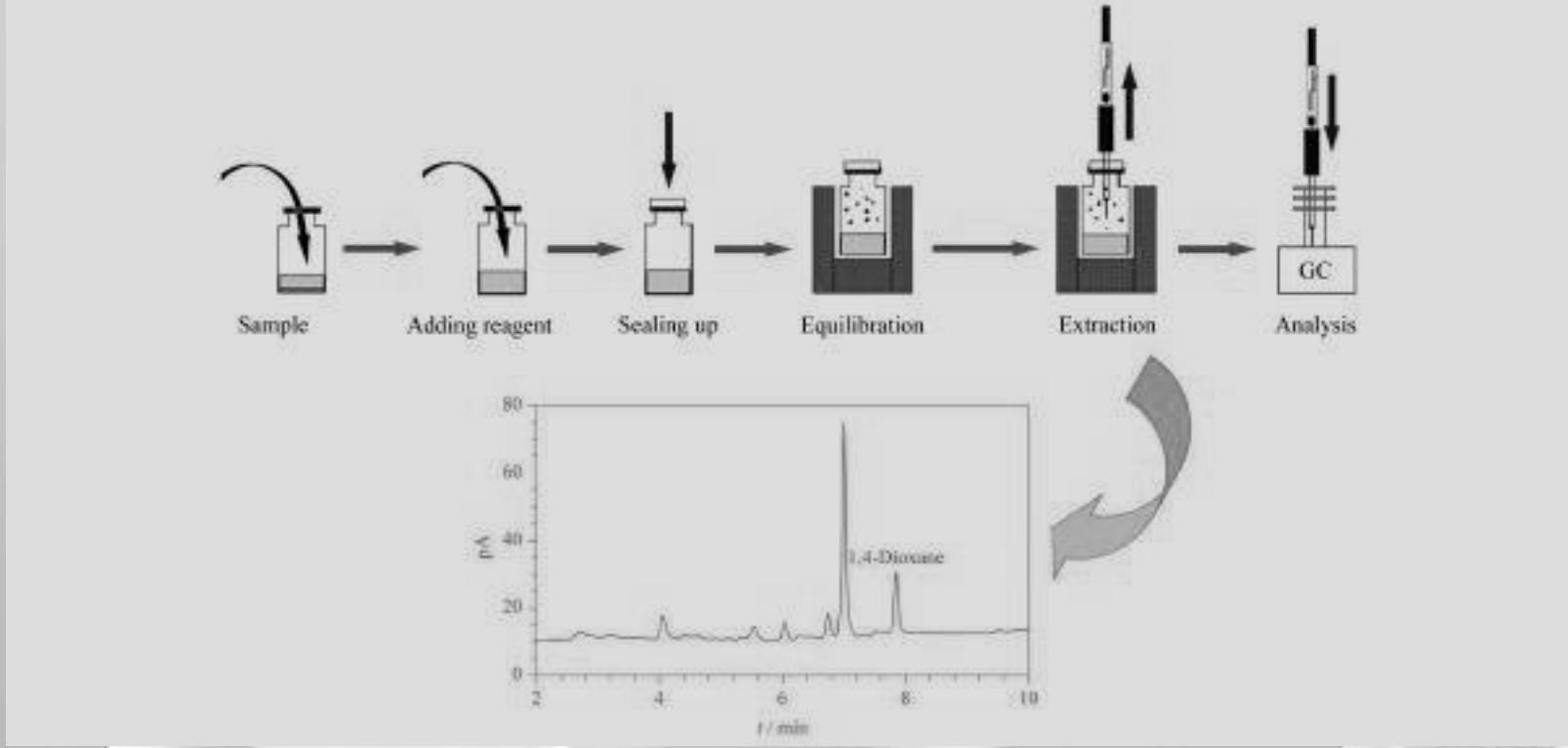
取样地点、水体生化指标

Table S1: Environmental parameters and location for the investigated recirculated aquaculture systems (RAS).

RAS	Location	pH	Temp	TSS	COD	BOD5	NH_{4+}	NO_{2-}	NO_3^-	PO_4^{3-}
	Latitude/Longitude		°C	mg L^{-1}	mg L^{-1}	mg L^{-1}	mg L^{-1}	mg L^{-1}	mg L^{-1}	mg L^{-1}
1	55.407156/9.4033030	4.5	22.5	107.0	94	8	35.0	0.5	300	56.0
2	55.983645/9.2912049	6.9	14.4	147.0	30	6	10.0	1.0	12	0.4
3	57.471543/-5.4485321	6.8	15.7	7.1	152	73	0.6	0.4	92	2.1
4	56.253518/-4.9392490	7.3	15.5	23.0	47	11	0.6	1.2	84	1.2
5	56.253518/-4.9392490	6.9	17.2	15.5	30	2	0.7	2.4	110	1.8
6	56.253518/-4.9392490	7.0	16.1	1.9	50	12	0.8	0.5	10	2.0

2. 土臭素分析

固相微萃取法（Solid-phase microextraction， SPME）



40 mL 玻璃小瓶

25 mL 水样

65℃ 水浴加热10min

插入纤维萃取头，20min

进行下一步GC分析

HP5890 (Palo Alto, CA)

MDN-5 fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)

载气：H_2，1 mL/min

升温程序：60℃，0.5min

30℃/min升到100℃

20℃/min升到185℃

40℃/min升到250℃，并保持2.5min

FID温度：280℃

GC-MS　　土臭素标准品(Sigma Aldrich)

3. DNA提取

Fast-Prep soil kit (Qbiogene)

4. geoA的扩增与克隆

Table 1
Primers and probes used for cloning and quantitative PCR.

Primer name	Target	Sequence 5′-3′	References
CycFW	All *geoA*	TGGTAYGTITGGGTITTYTTYTTYGAYGAYCAYTT	(Ludwig et al., 2007)
CycRW	All *geoA*	CATRTGCCAYTCRTGICCICCISWYTGCCARTCYTG	(Ludwig et al., 2007)
geoA_g1F	*geoA* group 1	AACACCGTGCTCACCGAAAT	This study
geoA_g1R	*geoA* group 1	TCCAAGCCTTCGCATCCA	This study
geoA_g1PR	*geoA* group 1	6-FAM-CCCTTGCTGCAGGACGATCACGA-BHQ-1	This study
geoA_g3F	*geoA* group 3	CGATGCAGGTGCTCAAAGAC	This study
geoA_g3R	*geoA* group 3	GCTGGTAGGAGAACAGGTCGTT	This study
geoA_g3PR	*geoA* group 3	6-FAM-CCTTCTCCGACGGCGTCCACC-BHQ-1	This study
geoA_g4F	*geoA* group 4	GCACACCTGCCGTTCCTAA	This study
geoA_g4R	*geoA* group 4	GAATGGTGCGATTCCATAGATCTT	This study
geoA_g4PR	*geoA* group 4	6-FAM-ACCCCGTCGAGCGTGCGCT-BHQ-1	This study
geoA_g5F	*geoA* group 5	GCGGCTTCAGCAGTTTGAA	This study
geoA_g5R	*geoA* group 5	GTCCGTACTCCGCACACAGA	This study
geoA_g5PR	*geoA* group 5	6-FAM-ACACCGCGCTCGTTGAAGTTCCG-BHQ-1	This study
Strep661F	16S rRNA gene *Streptomyces*	GTAGGGGAGATCGGAATT	(Inbar et al. 2005)
Strep1218R	16S rRNA gene *Streptomyces*	AGCACGTGTGCAGCCCAA	(Inbar et al. 2005)
CYA361F	16S rRNA gene *Cyanobacteria*	GGAATTTTCCGCAATGGG	(Nübel et al. 1997)
CYA785R	16S rRNA gene *Cyanobacteria*	GACTACWGGGGTATCTAATCC	(Nübel et al. 1997)
ACT235F	16S rRNA gene *Actinobacteria*	CGCGGCCTATCAGTTTGTTG	(Stach et al. 2003)
ACT878R	16S rRNA gene *Actinobacteria*	CCGTACTCCCCAGGCGGGG	(Stach et al. 2003)
8F	16S rRNA gene all bacteria	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Eden et al. 1991)
1492R	16S rRNA gene all bacteria	GGTTACCTTGTTACGACTT	(Edwards et al. 1989)

总DNA

*geoA*基因片段扩增 CycFW CycRW

合并PCR产物（3次）

胶纯化

PCR产物回收

克隆、扩增

测序

上传序列到GenBank

已知的GeoA序列：

Streptomyces coelicolor (Q9X839) 天蓝色链霉菌

Nostoc punctiforme (ZP00109187) 点状念珠藻

假定的4个新GeoA分化支序列的判定方法：

根据*geoA*基因典型的双域结构（天冬氨酸盐、Mg^{2+}）

(Jiang et al., 2007)

5. 系统进化分析

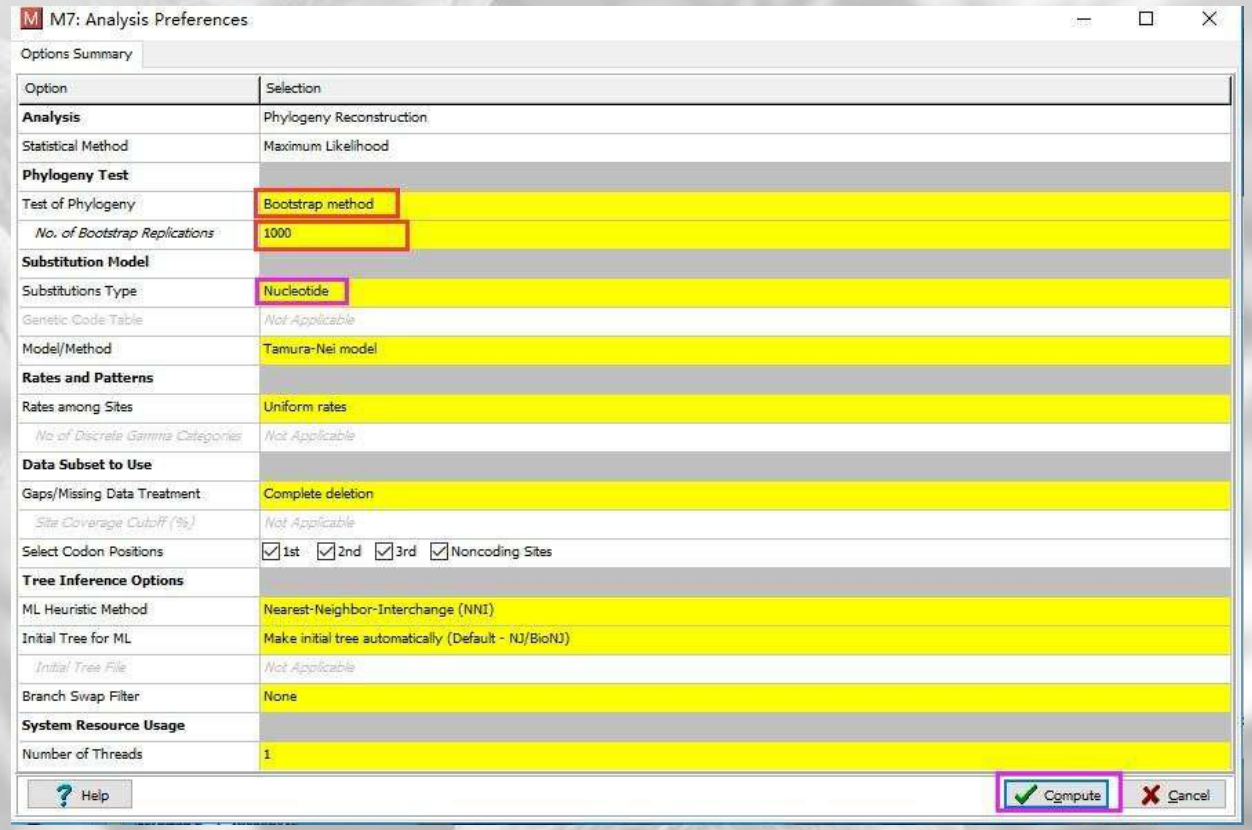
Maximum likelihood method (ProML)

Neighbour joining (sub model)

1000 bootstrap replicates

50% consensus filter

Values of 75%



6. 定量PCR

标准菌株：*S. avermitilis* 、 *Microcoleus*

预变性（95 ℃, 2 min）

变性（95 ℃, 30 s）

退火（57 ℃, 30 s）

延伸（72 ℃, 2 min）

30个循环

终延伸（72 ℃, 5 min）

4个克隆序列（新）

(AQC0016, AQC0065, AQC0073, AQC0326)

退火（55℃, 30 s）

PCR产物定量分析

Qubit HS dsDNA assay kit (Life Technologies)

基于分子质量计算拷贝数

使用10 mM Tris buffer (pH 8.5)将扩增子稀释至10^{-8}（拷贝数），于-18℃保存

Streptomyces，*Cyanobacteria*，*Actinobacteria*的定量

Mx3005P qPCR system (Stratagene)

Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies)

TaqMan探针试验

Mx3005P qPCR system (Stratagene)

EXPRESS qPCR Supermix (Life Technologies)

Results

1. 主要土臭素产生菌种群鉴定

研究发现，采用*geoA*基因片段序列构建的系统发育树与16S rRNA序列构建的具有高度一致性。

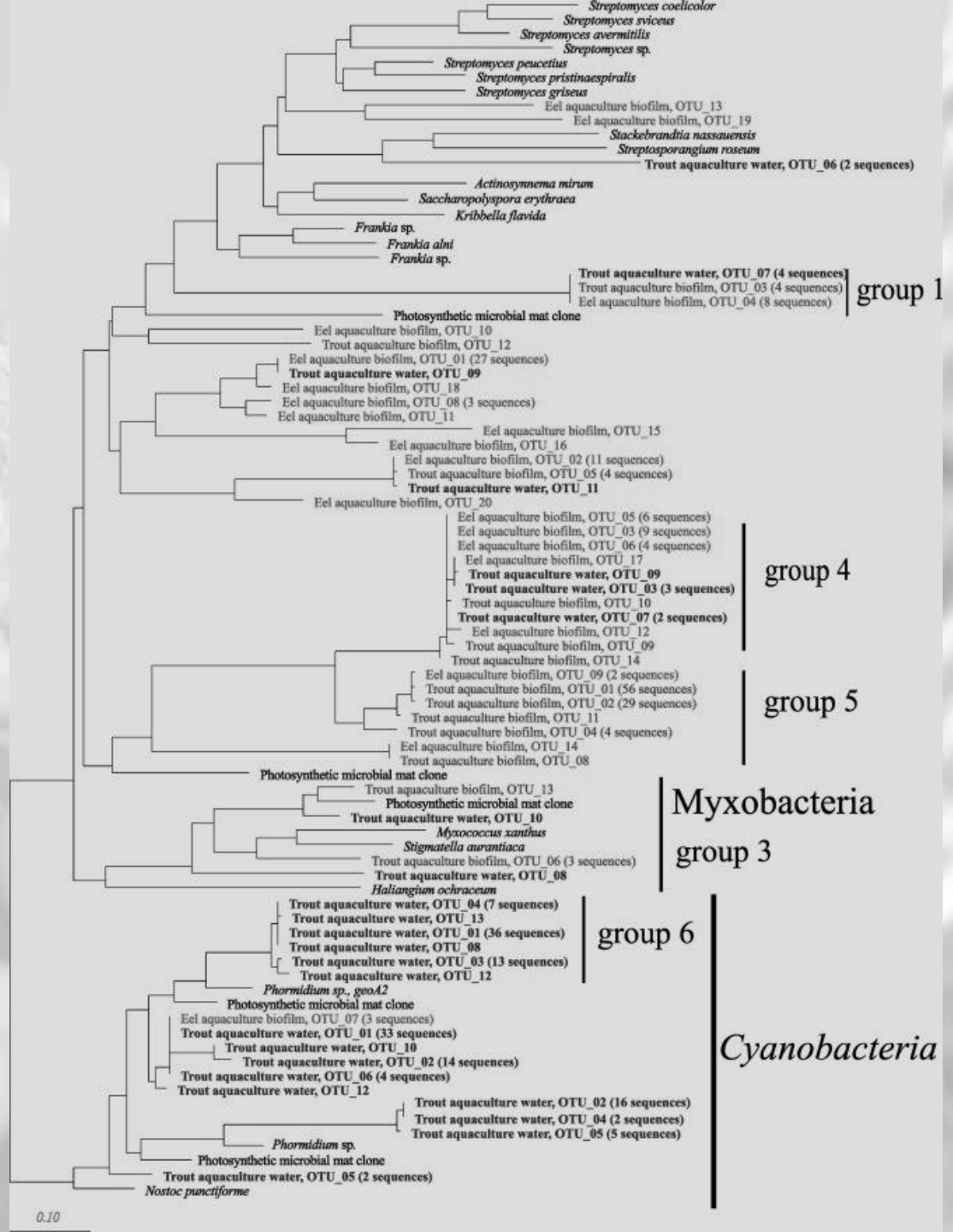


Fig. S1. Phylogenetic tree showing groups 4 and 5 to cluster into two different groups within the order of Sorangium.

Group 3 Myxobacteria 粘细菌

Group 4、5 uncultured *Sorangium* 堆囊菌

Group 1 *Actinomycetales* 放线菌

未发现有典型土臭素产生菌 *Streptomyces*

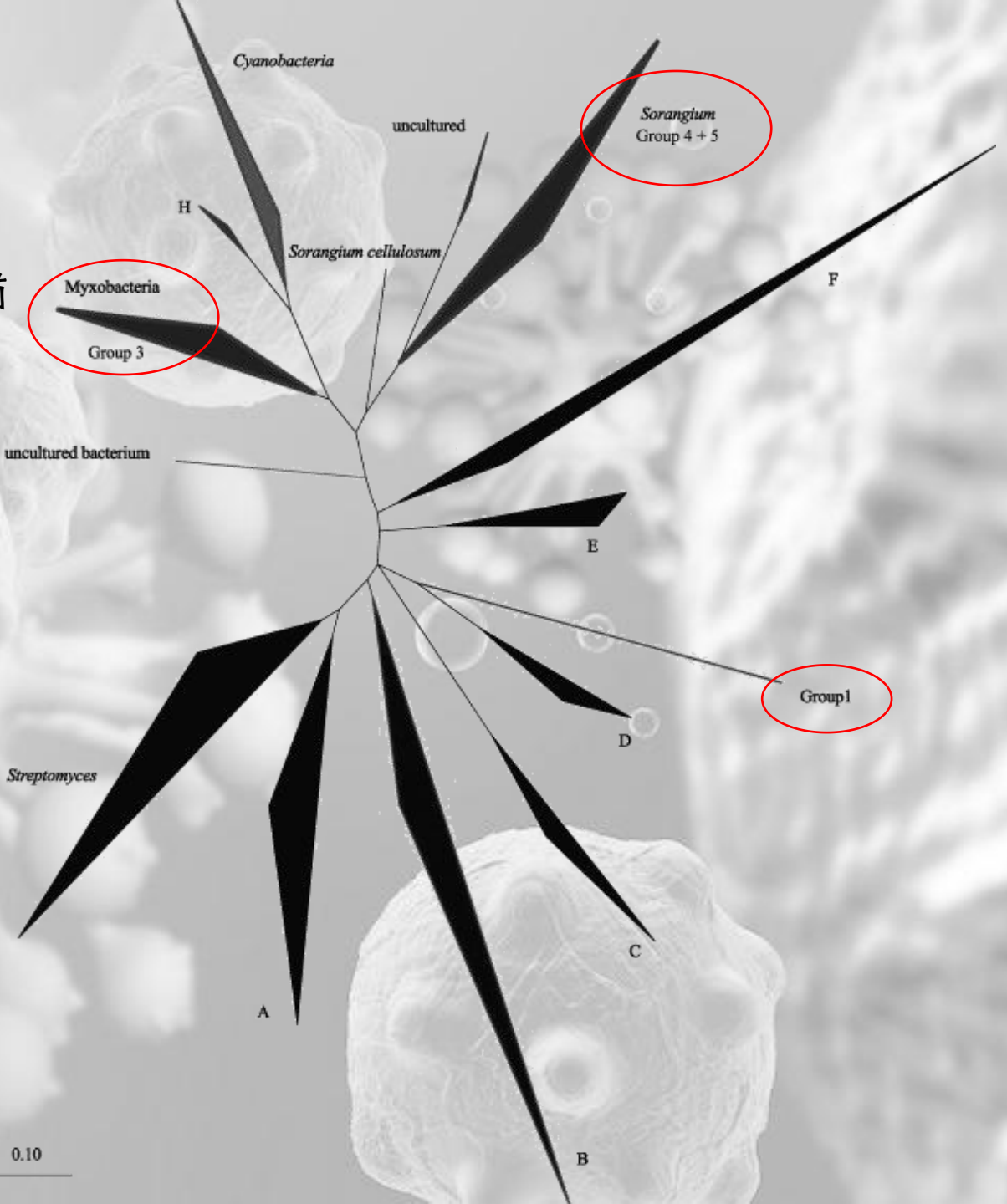


Fig. 1. Phylogenetic tree of all available *geoA* sequences, including > 400 sequences obtained by the CycFW/CycRW primer pair from 6 recirculated aquaculture systems. The phylogenetic groups shown with a red outline are deriving from aquacultures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2. 水产养殖系统中的新geoA序列

Table 2
Quantitative PCR results for different clades of geoA and groups of bacteria. Numbers are shown as percentages relative to the total number of 16S rRNA gene sequences except for the total bacteria count. RAS 1 is an outdoor plant whereas 2–4 are indoor plants. BDL (Below detection level) is < 10 copies.

RAS	Sample type	Group 1	Group 3	Group 4	Group 5	*Actinobacteria*	*Streptomyces*	*Cyanobacteria*	Total bacteria	Geosmin
1	Water phase	0.01%	0.3%	0.2%	0.2%	0.3%	BDL	8%	$8.5 \cdot 10^5$ cells mL^{-1}	650 ng L^{-1}
1	Biofilter	0.007%	0.2%	0.3	0.2%	0.7%	BDL	0.7%	$5.3 \cdot 10^8$ cells media $^{-1}$	NA
2	Water phase	BDL	BDL	0.1%	BDL	2%	BDL	BDL	$1.7 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	650 ng L^{-1}
2	Biofilter	BDL	0.8%	0.7%	0.01%	2%	BDL	BDL	$1.9 \cdot 10^8$ cells media $^{-1}$	NA
3	Water phase	BDL	BDL	0.8%	BDL	NA	BDL	BDL	$2.7 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	200 ng L^{-1}
4	Water phase	BDL	BDL	0.9%	BDL	NA	BDL	BDL	$3.4 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	200 ng L^{-1}
5	Water phase	BDL	BDL	0.3%	BDL	NA	BDL	BDL	$6.9 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	100 ng L^{-1}
6	Water phase	BDL	BDL	0.9%	BDL	NA	BDL	BDL	$6.3 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	200 ng L^{-1}

室内外养殖环境土臭素产生菌群落组成结构存在差异

生物过滤材料中土臭素产生菌非已知类型，且至少隶属于两种新的演化分支

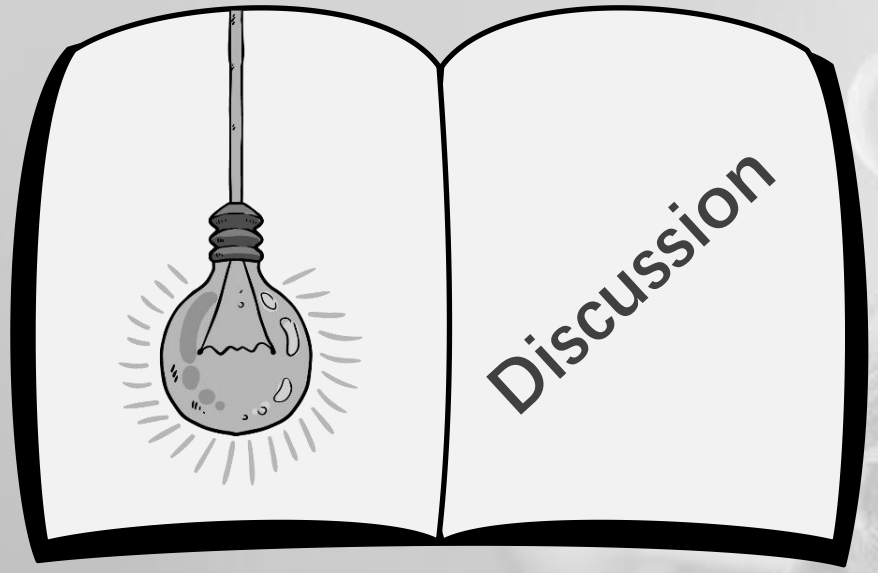
3. 假定土臭素产生菌的定量

新设计的4组*geoA*引物、探针的匹配度非常高

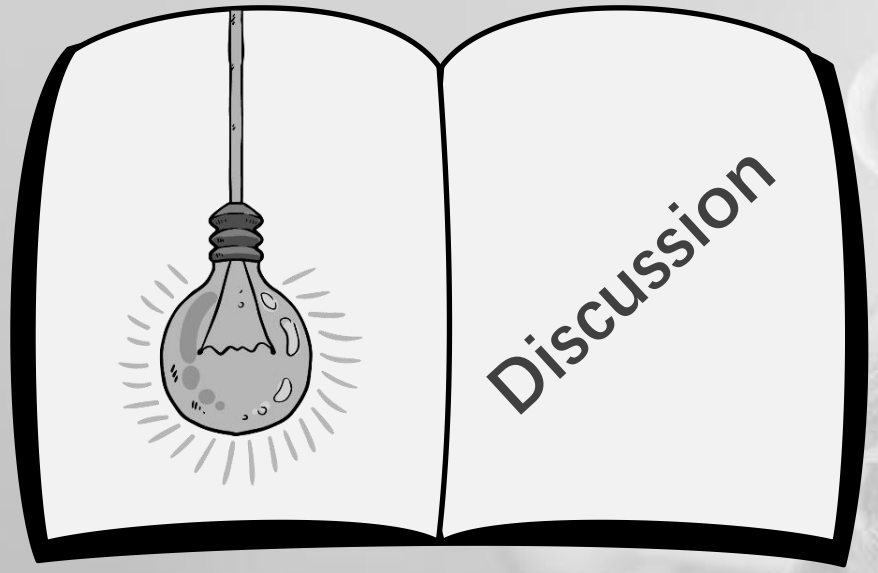
错配率低

RAS	Sample type	Group 1	Group 3	Group 4	Group 5	Total bacteria	Geosmin
1	Water phase	0.01%	0.3%	0.2%	0.2%	$8.5 \cdot 10^5$ cells mL^{-1}	650 ng L^{-1}
1	Biofilter	0.007%	0.2%	0.3	0.2%	$5.3 \cdot 10^8$ cells media $^{-1}$	NA
2	Water phase	BDL	BDL	0.1%	BDL	$1.7 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	650 ng L^{-1}
2	Biofilter	BDL	0.8%	0.7%	0.01%	$1.9 \cdot 10^8$ cells media $^{-1}$	NA
3	Water phase	BDL	BDL	0.8%	BDL	$2.7 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	200 ng L^{-1}
4	Water phase	BDL	BDL	0.9%	BDL	$3.4 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	200 ng L^{-1}
5	Water phase	BDL	BDL	0.3%	BDL	$6.9 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	100 ng L^{-1}
6	Water phase	BDL	BDL	0.9%	BDL	$6.3 \cdot 10^6$ cells mL^{-1}	200 ng L^{-1}

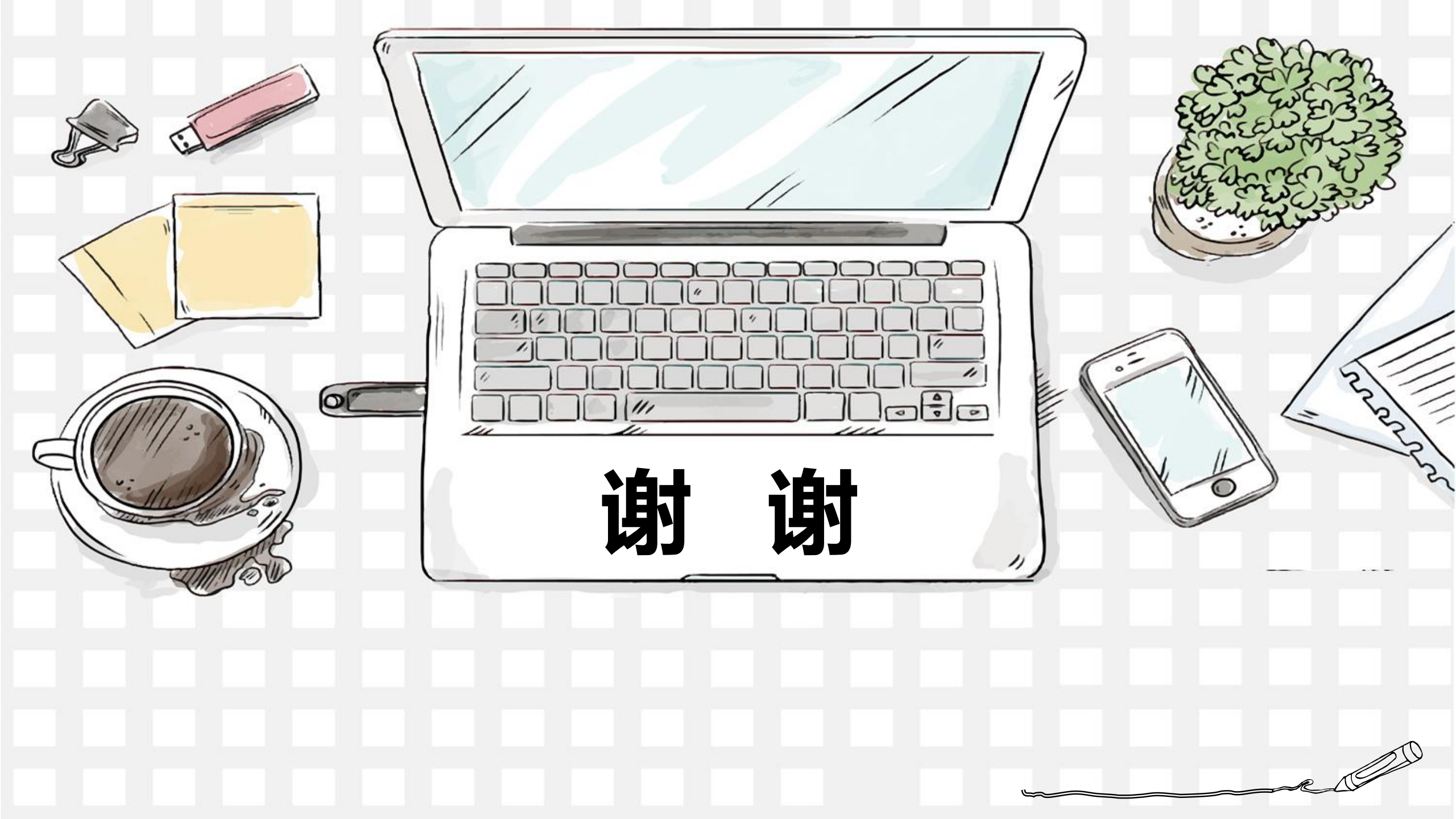
注：该研究没有试图估算整个养殖系统中土臭素产生菌的分布情况



1. *geoA*是一种用于检测土臭素产生的非常合适的功能和系统遗传标记基因；
2. 研究发现了4个新的土臭素产生菌类群；
3. 室内、室外存在差异；水体与过滤材料存在差异；
4. 为研究未经确认的基因簇丰度，探针试验选择了4个具有最高特异性的组（1、3、4、5）；
5. 100–650 ng/L的土臭素浓度远超人类感知范围(4–10 ng/L)



6. 养殖水体和过滤材料尽管细菌总量存在差异，但土臭素产生菌生物量近乎一致；*
7. 土臭素产生菌所占整个水体生态系统比例很低，针对性的清除是可行的，破坏整个水体微生物功能的风险很低；
8. 该研究丰富了人们对*geoA*基因的认识，此外，也揭示了qPCR定量应用于水产微生物多样性分析具有很好的前景。


谢 谢