

doi: 10.7541/2014.33

异味物质 β -环柠檬醛降解菌的分离和鉴定

代志刚^{1,2} 蒋永光^{1,2} 谷依露^{1,2} 胡晗华¹ 李仁辉¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: β -环柠檬醛(β -cyclocitral)是由微囊藻产生的主要藻源性异味污染物之一。利用稀释涂平板法,从采集到的微囊藻水华水样中分离得到两株降解 β -环柠檬醛的菌株DH16和DH18,16S rRNA序列比对和系统进化树分析表明它们分别属于食酸菌属(*Acidovorax*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。实验室保藏的微囊藻毒素降解菌*Novosphingobium* sp. THN1对 β -环柠檬醛也有降解效果,该菌属于新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)。对三株菌进行以 β -环柠檬醛为唯一碳源的培养实验,气相色谱检测分析表明DH18和THN1两株菌具有高效降解 β -环柠檬醛的能力,可以作为研究 β -环柠檬醛生物降解机理的理想材料。

关键词: 微囊藻; β -环柠檬醛; 食酸菌属; 不动杆菌属; 新鞘氨醇杆菌属; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)02-0222-05

水体富营养化引起的蓝藻水华的大规模暴发,不仅消耗了水体中的溶解氧,导致水体生态平衡的破坏,而且还产生了大量具有异味的次生代谢产物,引发了严重的水体异味污染。目前研究较多的藻源性异味物质主要分为两类:一类是以土腥素(Geosmin)和二甲基异茨醇(2-MIB)为代表的土霉异味^[1,2];另一类是以 β -环柠檬醛(β -cyclocitral)和 β -紫罗兰酮(β -Ionone)为代表的草木味^[3]。

根据现有的报道, β -环柠檬醛主要由微囊藻产生,并且是其主要的挥发性代谢产物^[4,5]。 β -环柠檬醛在不同质量浓度下(0.5—80 $\mu\text{g/L}$)分别为青草味、甘草味、木头味和烟草味^[6,7],通常在浅水富营养化湖泊中有较高的浓度,并与微囊藻细胞的数量呈现出良好的相关性^[8]。由于往往伴随微囊藻水华的发生而大量产生,严重影响了水体的水质状况^[9]。

国内外传统的处理饮用水臭味的方法主要包括活性炭吸附^[10]、光起始氧化法^[11]、臭氧和高锰酸钾氧化法^[12,13]等。这些方法的成本较高,处理效率也并不理想。生物降解法是通过添加有降解效果的微生物来去除臭味物质。与传统方法相比,生物降解法经济、高效、无二次污染,为水处理提供了新的

思路 and 手段。目前已有多篇关于微生物降解水体异味物质2-MIB和Geosmin的报道^[14—16]。

国内外对蓝藻中 β -环柠檬醛的研究主要是通过对水样的监测和调查来获得水体中异味物质的浓度^[17],关于 β -环柠檬醛的生物降解、去除的效果和影响因素还没有报道。本研究从微囊藻水华暴发的湖泊中采集水样,分离和鉴定了两株降解 β -环柠檬醛的菌株DH16和DH18,并验证了一株已经报道的微囊藻毒素降解菌THN1对 β -环柠檬醛的降解能力。通过对这三个菌株进行降解 β -环柠檬醛的研究,为进一步探究 β -环柠檬醛的降解机理和建立生物降解 β -环柠檬醛的有效方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

GC-2014C气相色谱仪, FID 检测器(SHIMADZU, 日本); 色谱柱为GL TCseries WondaCap 5 (0.25 mm \times 30 m \times 0.25 μm); 固相微萃取(SPME)装置, 50/30 μm 二乙烯基苯涂层纤维/活性炭/聚二甲基硅氧烷(DVB/CAR/PDMS, 57328-U), 25 mL带PTFE涂层硅橡胶垫的棕色螺口瓶均为Supelco (Sigma-Aldrich公

收稿日期: 2012-12-25; 修订日期: 2013-11-17

基金项目: 国家“十二五”水专项(2012ZX07101-02-001-01)资助

作者简介: 代志刚(1988—), 男, 湖北荆门人; 硕士研究生; 主要从事有害藻类监测研究。E-mail: daizg0601@163.com

通信作者: 李仁辉(1965—), 研究员; 主要从事蓝藻分类系统以及藻类环境生物学研究。E-mail: reli@ihb.ac.cn

司, 美国) 产品; 磁力搅拌器; 0.94 g/mL 的 β -环柠檬醛标准品购买自美国SAFC公司; NaCl为分析纯(上海国药), 经550℃烘烤6h后保存于棕色玻璃试剂瓶中; pMD18-T载体(Takara, Japan); 感受态细胞*E. coli* DH5 α (Takara, Japan); 凝胶试剂盒(BioFlux, Japan)。

1.2 顶空固相微萃取方法

在 25 mL 带 PTFE 涂层硅橡胶垫的棕色螺口瓶中加入待测藻液与 Millipore 超纯水共 10 mL, 3 g NaCl 和一个微型磁转子(最后体系的 pH 要维持在 8—10)。将螺口瓶置于 60℃ 恒温水浴中, 使用固相微萃取装置将萃取纤维针头刺穿硅橡胶垫插入瓶中。推出萃取纤维头, 使其暴露于液面上的顶空环境中。顶空吸附 45min 后, 收回萃取纤维, 插入到气相色谱进样室中解吸附, 进行色谱分析^[8, 18]。

1.3 气相色谱(GC)分析条件

GC-FID的分析条件为: 载气高纯N₂, 恒压150 kPa; H₂恒压45 kPa; 空气恒压40 kPa; 进样口温度250℃, FID 检测器温度270℃; 进样方式采用无分流进样(splitless) 2min。GC-FID的分析程序: 初温60℃, 保持2min, 以5℃/min的升温速度升至200℃, 保持2min 后再以20℃/min的速度升至250℃并保持2min。

1.4 β -环柠檬醛降解菌的分离

分别采集微囊藻水华暴发的黑龙江大庆市的明湖和龙虎泡、无锡太湖和武汉东湖的表层水样, 经孔径为2 μ m的微孔滤膜抽滤后取0.5 mL滤液分别稀释10倍、100倍、1000倍, 均匀涂布于以 β -环柠檬醛为唯一碳源(20 μ g/mL)的固体无机盐培养基M9平板上(无葡萄糖M9液体培养基中添加1.5%的琼脂, 高温灭菌溶解, 冷却后加 β -环柠檬醛), 置于30℃恒温培养箱中进行选择性培养。两个星期长出单个菌落。用牙签挑取单个的菌落划线于新的LB固体平板上培养, 通过多次平板划线对得到的菌落进行分离纯化。

1.5 β -环柠檬醛降解菌的验证

将纯化后的菌落接种到LB液体培养基中培养过夜。离心收集菌体, 用无菌水洗涤, 除去LB。得到的菌种加入到含5 mL液体M9培养基(0.1% NH₄Cl、0.05% NaCl、0.3% KH₂NPO₄、1.28% Na₂PO₄·7H₂O、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.0015% CaCl₂·2H₂O)的试管中, 管口用封口膜密封于30℃下黑暗培养, 以不接入菌体但是含相同浓度的 β -环柠檬醛(20 μ g/mL)的培养基作为对照。7d后取培养物, 过膜除菌后, GC检测

滤液中 β -环柠檬醛的含量。本实验保藏的微囊藻毒素降解菌THN1按同样方法进行实验。

1.6 降解菌株对 β -环柠檬醛降解能力的比较

选取其中有明显降解效果的菌株, 用LB培养过夜。洗涤除去LB后, 用M9液体培养基稀释, 确定菌液OD值(600 nm处)为0.1。以不加菌的空白作为对照, 分别加入 β -环柠檬醛(终浓度20 μ g/mL), 在30℃下进行培养, 在第2、第4、第6天分别对培养液进行GC检测, 高效降解菌在第2天和第4天补加 β -环柠檬醛至20 μ g/mL, GC检测 β -环柠檬醛的含量的变化情况。

1.7 β -环柠檬醛降解菌的鉴定

选取具有明显降解效果的菌株, 挑取单个菌落作为模板, 用细菌16S rRNA的通用引物27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3', PCR扩增后切胶回收得到目的片段, 与pMD18-T载体连接, 转化。挑取阳性的转化子进行PCR检测, 送测序。得到的序列与NCBI基因数据库比对, 构建系统进化树, 确定菌种所属的种类。

2 结果

2.1 β -环柠檬醛降解菌的分离

水样稀释涂固体培养基平板培养两个星期后, 部分平板上长出不同形态的菌落, 大部分为乳白色, 少许为黄色, 面积较小, 直径在0.5—3.5 mm, 菌落表面突起, 边缘光滑。

挑取单个菌落, 继续划线分离, 最终从东湖和太湖水样中分离纯化得到6个菌株, 分别编号为DH14、DH15、DH16、DH17、DH18、TH19。

2.2 β -环柠檬醛降解菌的验证

以上6个菌株和THN1, 在液体M9培养基中以 β -环柠檬醛为唯一碳源培养1个星期后, 与对照比较(图1、图2)。

与对照中 β -环柠檬醛最后含量比较可以发现, DH16、DH18和THN1具有较强的降解能力, THN1的降解率接近100%。

2.3 降解菌对 β -环柠檬醛降解能力的比较

选取菌株DH16、DH18和THN1分别接种到 β -环柠檬醛初始浓度为20 μ g/mL的M9培养基中培养, 以不加菌的培养基作为对照, 分别在第2、第4、第6天对培养物进行GC检测。2d后发现菌株DH18和THN1培养物中 β -环柠檬醛基本上被利用完全(图3)。第2天和第4天后重新加入初始浓度的 β -环柠

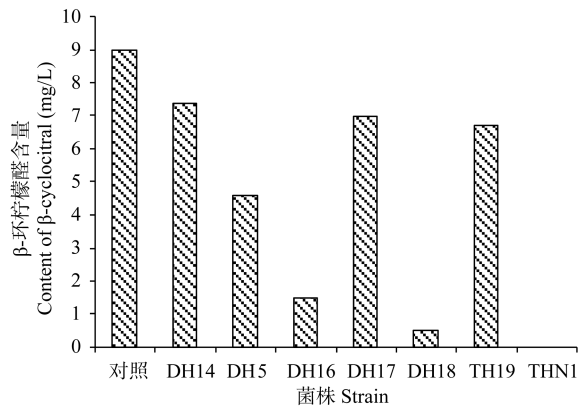


图 1 一星期后对照液和不同菌株培养物中 β -环柠檬醛的含量
Fig. 1 Concentrations of β -cyclocitral in different bacterial cultures after one week

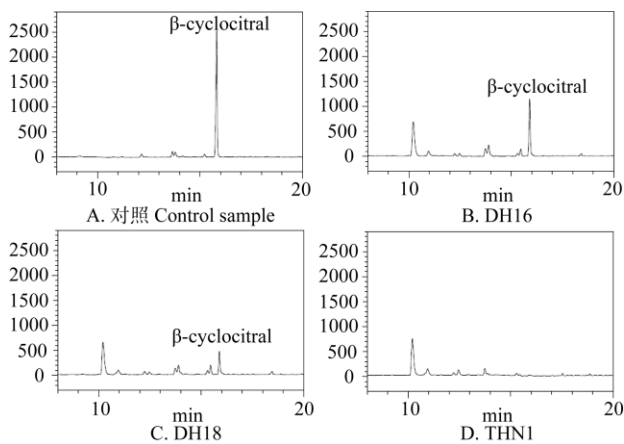


图 2 一星期后对照液和不同菌株培养物中 β -环柠檬醛气相色谱分析图
Fig. 2 Chromatograms of β -cyclocitral in different bacterial cultures after one week

柠檬醛, 继续培养后 β -环柠檬醛再次利用完全, DH16 则不能完全降解 β -环柠檬醛。

2.4 β -环柠檬醛降解菌的鉴定

将三株菌株的 16S rRNA 测序结果在 NCBI 上进行比对分析, 构建系统进化树(图 4)。通过 PCR 扩增得到两株菌 DH16 和 DH18 的 16S rRNA 基因序列, THN1 的序列从 GenBank 中获得, 序列号为 HQ664117.1。将三个菌株的序列与 GenBank 中相似的菌株序列进行比对

整理, 构建 NJ 树。得到的结果显示菌 DH16 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)中新分立出的食酸菌属(*Acidovorax*); 菌 DH18 属于假单胞菌目(*Pseudomonadales*)中的不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

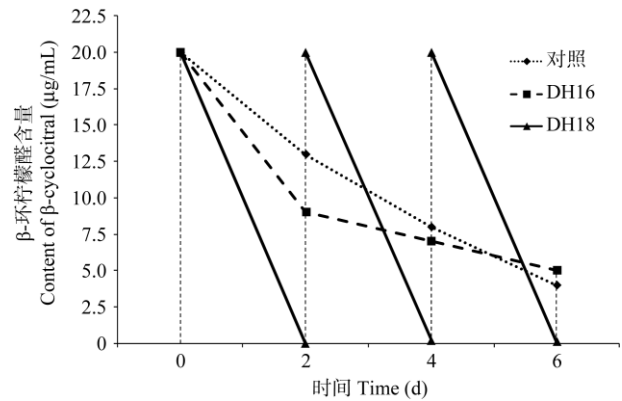


图 3 菌 DH18 对 β -环柠檬醛的降解
Fig. 3 Effect of β -cyclocitral biodegradation by bacteria DH18

3 讨论

目前, 随着全球水体富营养化的加剧, 由蓝藻引起的水华频繁发生。蓝藻的大量繁殖所代谢产生的次生代谢产物引起的水质污染特别是对饮用水源中污染成为一个严重且普遍存在的环境问题。微囊藻的次生代谢产物主要是对人类健康有害的微囊藻毒素和具有挥发性的异味物质 β -环柠檬醛。目前对微囊藻有害代谢产物的研究主要集中在微囊藻毒素的研究上^[19], 对异味物质 β -环柠檬醛的研究相对较少, 但是随着水质的日趋恶化, 由 β -环柠檬醛引起的水体臭味问题也越来越受到研究者的重视。

生物降解法是目前新兴的一种降解异味物质的方法。其特点就是利用微生物本身特异性的代谢途

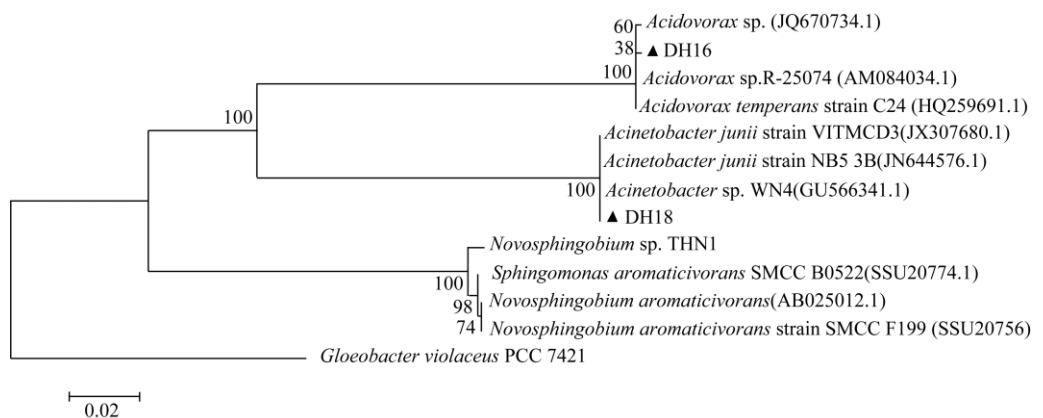


图 4 基于 16SrRNA 基因序列的 NJ 分子系统树
Fig. 4 Phylogenetic tree (NJ) based on 16SrRNA sequences

径对异味物质进行降解和转化, 达到完全除去的效果。由于微生物种类的多样性以及其体积小、代谢速率快等特点, 生物降解法在未来的水体臭味处理技术中具有更大的竞争力和潜力, 而且国内外已经有大量文献报道关于对2-MIB和geosmin的生物降解研究, 积累了丰富的经验, 也取得了比较满意的结果。1996年, Tanaka, *et al.*^[20]从污水处理厂的逆流水中分离出两株能降解 2-MIB 的微生物, 分别属于假单胞菌属和肠杆菌属, 并发现这两株菌存在不同的降解途径; Yagi, *et al.*^[21]报道在生物活性碳滤池上发现了芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis*)能降解 mg/L 级的 2-MIB。Saadoun和 EI-Migdadl^[22]进行了革兰氏阴性菌降解Geosmin的研究; Hoefel, *et al.*^[23]发现一种革兰氏阴性细菌Geo48, 这种细菌可有效降解geosmin。但是目前国内对臭味物质及其生物降解方法研究尚少, 周北海等^[16]从水源水中分离到了降解2-MIB的假单胞菌属(*Pseudomonas*); 么敬静等^[24]从污水处理厂中分离到一株以 2-MIB为唯一碳源的阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。而本实验室王中杰对2-MIB和Geosmin的合成基因做了系统和详细的研究^[25], 并对其特征和分子起源与进化等方面进行了深入的报道。

本研究旨在研究关于生物降解由蓝藻(微囊藻)产生的异味物质 β -环柠檬醛, 从武汉东湖采集的水样中成功分离纯化得到两株 β -环柠檬醛降解菌 DH16 和 DH18, 通过在液体培养基中的降解实验, 证明两株菌均具有较强的降解能力。与以往从活性炭和砂滤池的生物膜中筛选方法相比, 本实验主要通过稀释涂平板法来进行分离, 降低了实验操作难度和分离周期, 而且直接从有微囊藻水华的湖泊中采集水样进行处理, 具有更好的实效性。通过 NCBI 序列比对和构建系统进化树分析, 确定了菌 DH16 属于食酸菌属 (*Acidovorax*), 而菌 DH18 属于不动杆菌属(*Acinetobacter*)。目前, 已有相关文献报道不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[26]可能具有 2-MIB 的生物降解能力。而另一株菌 THN1 为本实验室从太湖分离的一株能降解微囊藻毒素的菌 *Novosphingobium* sp.THN1^[27], 该菌既能有效降解 β -环柠檬醛, 也能有效降解微囊藻毒素, 而两者均为微囊藻产生的次生代谢产物, 这对于后续研究关于微囊藻次生代谢产物的生物降解提供了参考和原料。对三株菌做 β -环柠檬醛的降解实验, 在一定阶段的时间范围内重

复加入 β -环柠檬醛, DH18 和 THN1 表现出高效降解 β -环柠檬醛能力, 可以作为研究 β -环柠檬醛生物降解机理的理想材料。

参考文献:

- [1] Lovell R T, Lelana I Y, Boyd C E, *et al.* Geosmin and musty-muddy flavors in pond raised channel catfish [J]. *Transaction of American Fisheries Society*, 1986, **115**: 485—489
- [2] Song L R, Li L, Chen W, *et al.* Research progress on the off-flavours and secondary metabolites of algae in the aquatic environment [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 434—439 [宋立荣, 李林, 陈伟, 等. 水体异味及其藻源次生代谢产物研究进展. 水生生物学报. 2004, **28**(4): 434—439]
- [3] Jüttner F, Höflacher B. Evidence of β -carotene 7, 8(7', 8') oxygenase (β -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis* [J]. *Archives Microbiology*, 1985, **141**: 337—343
- [4] Scherzinger D, Al-Babili S. *In vitro* characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 reveals a novel cleavage pattern, cytosolic localization and induction by highlight [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, **69**: 231—244
- [5] Huang F C, Molnar P, Schwad W. Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**: 3011—3022
- [6] Young W F, Horth H, Crane R, *et al.* Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants [J]. *Water Research*, 1996, **30**: 331—340
- [7] Wang Z J. Drinking Water Security Evaluation [C]. Beijing: Chemical Industry Press. 2008, 393 [王子健. 饮用水安全评价. 北京: 化学工业出版社. 2008, 393]
- [8] Li L. Distribution, dynamics and degradation of Algae-producing odorous compounds in freshwater bodies [D]. Thesis for Doctor of Science. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2005 [李林. 淡水水体中藻源异味化合物的分布、动态变化与降解研究. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2005]
- [9] Yu J W, Li Z L, Cao N, *et al.* Analyses on cause for odor and potential problems in water source during odor episode event in Wuxi [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, **27**(11): 1771—1777 [于建伟, 李宗来, 曹楠, 等. 无锡市饮用水臭味突发事件致嗅原因及潜在问题分析. 环境科学学报, 2007, **27**(11): 1771—1777]
- [10] Mcguire M J, Gaston J M. Overview of technology for controlling off-flavors in drinking water [J]. *Water Science & Technology*, 1998, **20**(8/9): 215—228
- [11] Kutschera K, Bornick H, Worch E. Photoinitiated oxidation of geosmin and 2-methylisoborneol by irradiation with 254 nm and 185 nm UV light [J]. *Water Research*, 2009, **43**(8): 2224—2232
- [12] Peter A, Von G U. Oxidation kinetics of selected taste and odor compounds during ozonation of drinking water [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, **41**(2): 626—631

- [13] Zhang K J, Gao N Y, Li L. Kinetics of oxidation of odorant β -cyclocitral by potassium permanganate [J]. *Journal of Central South University*, 2011, **42**(4): 1161—1166 [张可佳, 高乃云, 黎雷. 高锰酸钾氧化嗅味物质 β -环柠檬醛的动力学. 中南大学学报, 2011, **42**(2):1161—1166]
- [14] Guttman L, Rijn J V. 2-Methylisoborneol and geosmin uptake by organic sludge derived from a recirculating aquaculture system [J]. *Water Research*, 2009, **43**(2): 474—480
- [15] Eaton R W, Sandusky P. Biotransformations of 2-methylisoborneol by camphor-degrading bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(3): 583—588
- [16] Song W J, Zhou B H, Wang J, et al. Isolation of a bacterium capable of removing 2-methylisoborneol from water [J]. *Journal of University of Science and Technology Beijing*, 2007, **29**(2): 227—230 [宋文娟, 周北海, 王俊, 等. 水源水中 2-MIB 降解菌的筛选. 北京科技大学学报, 2007, **29**(2): 227—230]
- [17] Li D P, Li W G. Analysis of moderately volatile taste and odor compounds from raw water in S city [J]. *Journal of University of Science and Technology of Suzhou: Engineering and Technology*, 2006, **19**(2): 52—53, 66
- [18] Li L, Song L R, Gan N Q, et al. Determination of odorous compounds in cater using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, **33**(8): 1058—1062 [李林, 宋立荣, 甘南琴, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱测定水中异味化合物. 分析化学, 2005, **33**(8): 1058—1062]
- [19] Zurawell R W, Chen H, Burke J M. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2005, **8**(1):1—37
- [20] Tanaka A, Oritani T, Uehara F, et al. Biodegradation of a musty odour component, 2-methylisoborneol [J]. *Water Research*, 1996, **30**(3): 759—761
- [21] Ya J M, Nakashima S, Muramoto S. Biological degradation of musty odor compounds, 2-methylisoborneol and geosmin in a bio-activated carbon filter [J]. *Water Science and Technology*, 1988, **20**(8/9): 255—260
- [22] Saadoun I, El-Migdadi F. Degradation of geosmin-like compounds by selected species of gram-positive bacteria [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, **26**: 98—100
- [23] Daniel H, Lionel H, Paul T. Biodegradation of geosmin by a novel Gram-negative bacterium; isolation, phylogenetic characterization and degradation rate determination [J]. *Water Research*, 2009, **43**: 2927—2935
- [24] Yao J J, Zhao Y W, Zou X, et al. Isolation, identification and BAC library construction of an efficient 2-methylisoborneol degradation bacterium *Enterobacter cloacae* Z5 [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, **29**(1): 55—58 [么敬静, 赵有文, 邹霞, 等. 2-甲基异茨醇降解菌阴沟肠杆菌 Z5 的分离鉴定及 BAC 文库的构建. 华中农业大学学报, 2010, **29**(1): 55—58]
- [25] Wang Z J. The studies on genes responsible for synthesis of earthy-musty odorants in cyanobacteria and their ecological application [D]. Thesis for Doctor of Science, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2012 [王中杰. 蓝藻土霉异味物质合成基因的研究及其生态应用. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2012]
- [26] Lauderdalea C V, Aldrich H C, Lindner A S. Isolation and characterization of a bacterium capable of removing taste and odor causing 2-methylisoborneol from water [J]. *Water Research*, 2004, **38**(19): 4135—4142
- [27] Jiang Y G, Shao J H, Wu X Q. Active and silent members in the mlr gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, **332**(2): 108—114

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF β -CYCLOCITRAL DEGRADING BACTERIA

DAI Zhi-Gang^{1,2}, JIANG Yong-Guang^{1,2}, GU Yi-Lu^{1,2}, HU Han-Hua and LI Ren-Hui¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: β -cyclocitral, one of the most common taste and odour compounds, is mostly produced by water bloom forming *Microcystis*. Using the agar-plate method, bacterial strains DH16 and DH18 for degrading β -cyclocitral were isolated from the water samples in the *Microcystis* dominated water blooms. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences revealed that these strains belonged to genera *Acidovorax* and *Acinetobacter* respectively. The strain *Novosphingobium* sp. THN1, a reported microcystin degraded strain, was also shown to have the ability to degrade β -cyclocitral. The experiment using β -cyclocitral as the sole carbon source demonstrated that strains DH18 and THN1 were able to decompose β -cyclocitral efficiently, and these bacterial strains could provide good model organisms for the studying the biodegradation of β -cyclocitral.

Key words: *Microcystis*; β -cyclocitral; *Acidovorax*; *Acinetobacter*; *Novosphingobium*; Biodegradation