

2-甲基异茨醇降解菌阴沟肠杆菌的分离 鉴定及文库的构建

么敬静 赵有文 邹霞 崔翠 何进** 喻子牛

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室/微生物农药国家工程研究中心,武汉 430070

摘要 从采集到的污水样品中分离得到1株高效降解2-甲基异茨醇(2-methylisoborneol, 2-MIB)的菌株Z5,通过16S rDNA序列分析,鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。该菌在以2-MIB为唯一碳源的培养基中能正常生长代谢。经气相色谱-质谱分析,发现该菌对2-MIB的降解率高达89.7%。同时,测定了Z5在不同质量浓度2-MIB中的生长情况,结果表明:当2-MIB质量浓度为16 μg/L时,其生长状况与在LB中最为接近。为了克隆降解2-MIB关键酶的编码基因并进一步研究其降解途径,本研究构建了*E. cloacae* Z5的全基因组BAC文库,该文库覆盖了大约8倍的基因组,共计810个转化子,外源片段平均大小为40 kb。

关键词 2-甲基异茨醇(2-MIB); 阴沟肠杆菌; 生物降解; BAC文库; 气相色谱-质谱联用
中图分类号 Q 939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2010)01-0055-04

目前,随着工业生产的迅猛发展及城市人口的急剧增加,日益增多的污水恣意排放造成了饮用水水源的污染,许多水体处于富营养化状态。藻类的大量繁殖不仅消耗了水中的溶解氧,而且释放大量的臭味物质,导致了严重的饮用水异味污染问题的暴发^[1-2]。

2-甲基异茨醇(2-MIB)是引起水体异味的主要物质之一,其阈值为6.3 ng/L。它作为蓝细菌或链霉菌的次生代谢产物,是一种具有强烈土腥味的挥发性化合物^[3-4]。由于2-MIB阈值很低,含量极低也会严重影响水的气味。传统的去除方法包括活性炭吸附^[5]、光起始氧化法^[6]、紫外诱导降解法^[7]、化学抑菌法^[5]等。这些方法的成本较高,并且处理效率低,所以多用在饮用水处理上,而对于水量较大、水源很差的养殖用水来说,显然是难以实现的。生物降解法则为水处理提供了新的思路,与传统方法相比,生物降解法具有经济、高效、无二次污染等优点。目前已有多篇关于生物降解去除水体异味物质的报道^[2,8-9]。

本研究从湖北省武汉市多处采集的水样中分离纯化得到1株高效降解2-MIB的菌株Z5,并进行了

菌种鉴定及降解能力研究。同时,构建了Z5的全基因组BAC文库,为克隆关键降解酶的编码基因并进一步研究其降解途径奠定基础。

材料与方法

仪器与试剂

100 μg/mL 2-MIB 标样购自美国 Bellefonte 公司, Finnigan Trace GC Ultra 气相色谱仪购自意大利 Thermo Finnigan 公司, Finnigan Trace DSQ 质谱仪购自美国 Thermo Electron Co. 公司, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm DB-5 MS 毛细管柱购自美国 Agilent Technologies 公司。

降解微生物的初步分离

分别采集湖北省武汉市污水处理厂待处理污水以及南湖、东湖浅层水样。取0.5 mL水样接入100 mL的LB液体培养基中于30、160 r/min摇床震荡培养8 h。

取上述菌悬液加入到含2-MIB(0.1 μg/L)的无机盐培养基(0.11% NH₄NO₃、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.02% KCl, pH 7.0)中,置于恒温摇床培养箱(30、160 r/min)进行选择

收稿日期:2009-06-19; 修回日期:2009-10-13

* 湖北省自然科学基金项目(2005ABA145)和华中农业大学农业微生物学国家重点实验室开放课题(AML0403)资助

** 通讯作者. E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn

么敬静,女,1983年生,硕士研究生.研究方向:微生物生物技术. E-mail: yaojj0403@163.com

培养。待培养物开始变浑浊后按照 1% 接种量转接入新的以 2-MIB 为唯一碳源的无机盐培养基中。重复上述操作 5 次,同时逐渐提高 2-MIB 质量浓度 (1、2、4、8、16 μg/L)。

液体培养阶段结束后,取菌液稀释后涂布至 LB 固体培养基上培养,再通过多次平板划线对培养基表面所生长出的微生物群落进行纯化分离。

- 降解微生物的筛选

将纯化后的菌落接入含有 8 μg/L 2-MIB 的无机盐培养基中 30、160 r/min 摇床震荡培养 24 h,以不接入菌体的培养基作为对照。培养物通过顶空固相或液相萃取^[10-11],气相色谱-质谱联用检测 2-MIB 消耗情况^[11-12]。

- 降解微生物的鉴定

选几株具有较高降解率的菌株挑取单菌落于 10 μL 无菌水中,99 变性,7 300 r/min 离心后取上清液作为模板,使用 Takara 公司的 16S rDNA bacterial identification PCR kit (Code No. D310),以 Forward/ Reverse primer 2 为引物,扩增目的片段,将 PCR 产物送至华大公司进行测序,将 DNA 序列与 NCBI 基因数据库比较,确定菌种可能属于的种属。

菌株 在不同浓度 - 中的生长情况

在 37 条件下,将菌株 Z5 分别接种到含有不同质量浓度 2-MIB 的无机盐培养基中,并以 LB 培养基作为参照,测定 $D_{600\text{nm}}$ 值,绘制生长曲线。

- 高效降解菌基因组文库构建及检测

选择 1 株能够高效降解 2-MIB 的微生物菌株 Z5,参照文献[13]构建其总 DNA 文库,并对文库进行初步检测。

结果与分析

- 降解菌的分离与筛选

从样品中初步分离得到 5 株能够降解 2-MIB 的微生物菌株,分别编号为 Z5、Y072、Z012、Y11 和 Z011,从图 1 中可以看出,编号为 Z5 的菌株具有较强的降解 2-MIB 的能力,降解率为 89.7%。其余 4 株降解能力由大到小依次为 Y072 (71.2%)、Z012 (57.7%)、Z011 (17.0%)、Y11 (8.9%)。其中,Z011 和 Y11 能够在无机盐培养基中迅速生长,而其余三者的生长速度明显不如 Z011 和 Y11。但气相色谱-质谱联用检测结果显示两者的降解能力均不理想,其原因可能在于两者无法直接以 2-MIB 为碳源,维持菌体生长的碳源可能来自于溶解 2-MIB 的溶剂甲醇。

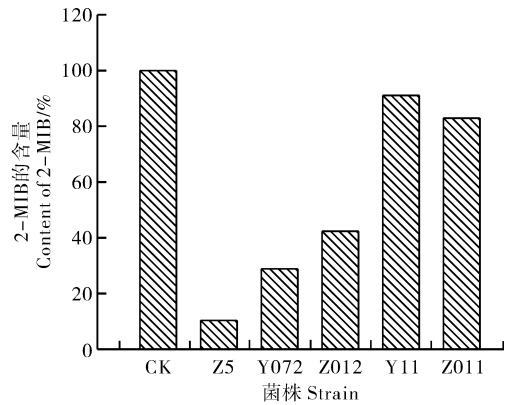


图 1 顶空固相萃取-气相色谱-质谱联用检测微生物对 2-MIB 降解率

Fig. 1 Biodegradation rates of 2-MIB by different bacteria determined by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

菌株 鉴定

菌株 Z5 的 16S rDNA 的测序结果见图 2。经 blast 分析,其与阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 的序列同源性高达 99.0%;其革兰氏染色呈阴性,形态特征与部分生理生化指标与阴沟肠杆菌非常一致。故确定 Z5 为阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*。

```

1 agtttgatctggetcagaltgaacgetggcggcaggct aacacatgca agtogaacgg
61 tagcacagagacttgcctcgggtgacgagtgccggcaggggtgtaagtctgggaaa
121 ctgectgatggaggggataactactggaacggtagctagaccgataaytgecaag
181 accaaagaggggaccctcgggectctgceatcagatgcccagatgggattagctag
241 taggtgggtaacggctcacltaggcagcatccctagcgtgctagaggatgaccagc
301 cacactggactgagacacgctccagactctaccggaggcagcagtggggaatattgca
361 caatgggcgaagcctgatgcagcatgcgcgtggaatgaagaaggcctcgggtgttaa
421 agtacttccgcccggagg a aggtgtgtg gtaataaac rcagcaattg acgtlaccgc
481 cagcagaagcaccggctaaadccgtgccagcagccgcglaatacggaggtgcaagcgt
541 laactggaallactgggcgtaaaagccacgcaggcggctcgtcaagtgatgtgaaatc
601 cccgggtcaacctgggaadgcattgaaactggcaggctggagcttg tagagggggg
661 lagaaltccaggtgtagcggtaaaatgcglagatctggaggaataacgggtggcgaagg
721 eggccccctggacaaaagacgtcgtcagggtggcgaagcgtggggagcaaacagattag
781 atacctggagctcc

```

图 2 E. cloacae Z5 16S rDNA 测序结果

Fig. 2 16S rDNA sequences of E. cloacae Z5

在不同浓度 - 中的生长情况

况

由图 3 可以看出:在以 2-MIB 为碳源的无机盐培养基中,菌体能够达到的最大质量浓度受 2-MIB 含量的限制,在一定范围内 2-MIB 质量浓度越高,

菌体越快达到对数生长期。当 2-MIB 质量浓度为 16 $\mu\text{g/L}$ 时, Z5 能够达到较高的菌体浓度, 此时其生长情况与其在 LB 中的生长情况最为接近。

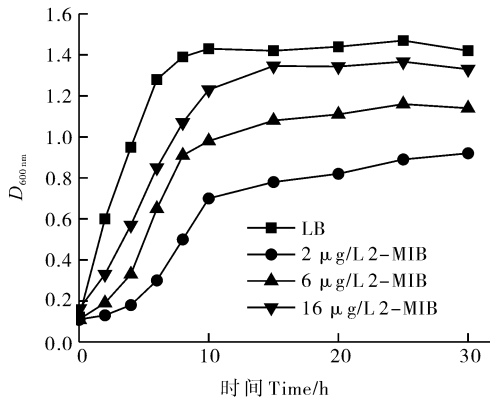
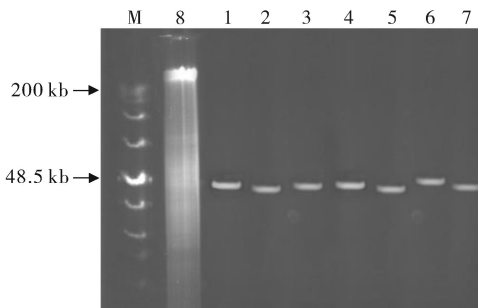


图 3 *E. cloacae* Z5 在不同浓度 2-MIB 中的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of *E. cloacae* Z5 in 2-MIB at different concentrations

总 基因组文库的构建及检测

总 DNA 基因组文库共计 810 个转化子, 随机挑选转化子抽提质粒检测结果如图 4 所示, 外源片段平均大小为 40 kb 左右, 文库覆盖了大约 8 倍的基因组。



M. DNA marker; 1~7. 转化子 Transformants;
8. 总 DNA Total DNA.

图 4 BAC 文库转化子质粒脉冲电泳检测结果

Fig. 4 The detection results of transformants from BAC library determined by pulsed field gel electrophoresis

讨 论

目前, 全球正面临着严重的环境问题。与人们日常生活息息相关的水污染问题自然成为关注的焦点。污水的排放导致水体富营养化, 而由此引发的蓝藻暴发、水葫芦疯长进一步加剧了水体的污染。传统的污水处理方法成本过高, 大多数中小型企业负担不起, 所以必须从寻找处理污水的新方法上着手。生物处理法的特点是某些微生物能够利用体内

特异性的代谢途径对污染物实现降解或转化, 从而将其从水体中去除。如利用反硝化细菌的反硝化作用将水体中多余的硝酸盐、亚硝酸盐转化成氮气而除去^[14-15]。微生物可以募集底物, 所以即使在低底物浓度下也能进行反应。微生物具有运动能力, 能够在污水中迅速分散和向污染物集中区聚集, 并且能不断增殖, 继而产生更多的微生物对污染物进行降解, 从而进一步提高处理能力。这些特点使其对污染物的处理更加方便、成本大大降低。当然, 单一使用生物处理法并不一定能取得很好的效果, 一般先利用传统的方法除去大部分的污染物, 再利用生物法处理以进一步提高水质或者将生物降解与其他工艺结合以更好地发挥各自的优势, 例如 Ho 等采用的生物砂滤法^[16]就是将微生物降解和砂滤结合起来组成的一种新工艺。除此以外, 利用生物防治, 即放养水生生物, 如鞭毛虫、草履虫, 通过它们对土腥味物质的产生菌水生放线菌进行捕食也可以达到降低土腥味物质的目的^[17]。

本研究成功地从湖北省武汉市污水处理厂所采集的污水样品中分离到 1 株 2-MIB 的高效降解菌 Z5, 经鉴定为阴沟肠杆菌。Z5 在不同培养基中的生长情况表明该菌对 2-MIB 的降解能力在一定程度上受到 2-MIB 质量浓度的影响。当 2-MIB 质量浓度达到一定程度, 生长情况与其在 LB 全营养培养基中相近, 但菌体最高浓度略低于在 LB 培养基中所能达到的最高浓度。这种情况的出现有可能与本研究中所采用的无机盐培养基配方有一定关系。

构建的 BAC 文库将为 2-MIB 降解机理的研究提供良好的平台。有报道表明, 2-MIB 的降解过程由多个基因共同完成^[8], 因此较大的文库片段有利于筛选完整的操纵子, 但也增加了后续工作的难度, 可能需要构建亚克隆文库才能对降解机理进行更为深入的研究。由于 *E. cloacae* Z5 具有高降解 2-MIB 的能力, 可以作为研究 2-MIB 降解机理的理想材料。

参 考 文 献

- [1] UWINS H K, TEASDALE P, STRATTON H. A case study investigating the occurrence of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB) in the surface waters of the Hinze Dam, Gold Coast, Australia[J]. Water Sci Technol, 2007, 55(5): 231-238.
- [2] GUTTMAN L, RINJ V. 2-Methylisoborneol and geosmin uptake by organic sludge derived from a recirculating aquaculture

- system[J]. *Water Res*, 2009, 43(2): 474-480.
- [3] KLAUSEN C, NICOLAISEN M H, STROBEL B W, et al. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 52(2): 265-278.
- [4] SAADOUN I. Production of 2-methylisoborneol by *Streptomyces violaceusniger* and its transformation by selected species of *Pseudomonas*[J]. *J Basic Microb*, 2005, 45(3): 236-242.
- [5] 刘欣, 何进, 喻子牛. 微生物产生的土腥味化合物及其清除方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(8): 35-38.
- [6] 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 Res*, 2009, 43(8): 2224-2232.
- [7] SONG W, O'SHEA K E. Ultrasonically induced degradation of 2-methylisoborneol and geosmin [J]. *Water Res*, 2007, 41(12): 2672-2678.
- [8] EATON R W, SANDUSKY P. Biotransformations of 2-methylisoborneol by camphor-degrading bacteria[J]. *Appl Environ Microb*, 2009, 75(3): 583-588.
- [9] 宋文娟, 周北海, 王俊, 等. 水源水中 2-MIB 降解菌的筛选[J]. *北京科技大学学报*, 2007, 29(2): 227-230.
- [10] SAITO K, OKAMURA K, KATAOKA H. Determination of musty odorants, 2-methylisoborneol and geosmin, in environmental water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1186(1/2): 434-437.
- [11] 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[J]. *分析化学*, 2005, 33(8): 1058-1062.
- [12] XIE Y Q, HE J, HUANG J, et al. Determination of 2-methylisoborneol and geosmin produced by *Streptomyces* sp. and *Anabaena* PCC7120[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(17): 6823-6828.
- [13] LUO M Z, WING R A. An improved method for plant BAC library construction[J]. *Method Mol Biol*, 2003, 236: 3-20.
- [14] 曾庆武, 梁运祥, 葛向阳. 反硝化细菌的分离筛选及其反硝化特性的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(5): 616-620.
- [15] 刘卿, 梁运祥, 葛向阳. 腊样芽胞杆菌 DNF409 中硝酸盐还原酶基因敲除的研究[J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(1): 43-47.
- [16] HO L, HOEFEL D, BOCK F, et al. Biodegradation rates of 2-methylisoborneol (MIB) and geosmin through sand filters and in bioreactors[J]. *Chemosphere*, 2007, 66(11): 2210-2218.
- [17] 宋立荣, 李林, 陈伟, 等. 水体异味物质及藻源次生代谢产物研究进展[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(4): 434-439.

Isolation, Identification and BAC Library Construction of an Efficient 2-Methylisoborneol Degradation Bacterium *Enterobacter cloacae* Z5

YAO Jing-jing ZHAO You-wen ZOU Xia CUI Cui HE Jin YU Zi-niu

*College of Life Science and Technology/ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/
National Engineering Research Center of Microbial Pesticides, Huazhong
Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract A bacterium strain Z5, which can degrade 2-methylisoborneol efficiently, was isolated from sewage samples collected from the sewage treatment plant of Wuhan. This strain was identified as *Enterobacter cloacae* via the analysis of 16S rDNA. The results of the sole carbon source assay demonstrated that this stain was able to metabolize 2-MIB and the degradation rate was up to 89.7% determined by GC-MS. The growth of *E. cloacae* Z5 in 2-MIB at different concentrations were also determined and the growth curve in 16 $\mu\text{g/L}$ 2-MIB was found to be as good as that in LB. To clone the gene coding for the key enzyme catalyzing the degradation of 2-MIB and to further investigate the degradation pathway, the global genome BAC library of *E. cloacae* Z5 was constructed. There were 810 clones in the library. The average size of inserts and the genome coverage was 40 kb and about 8-folds, respectively.

Key words 2-methylisoborneol (2-MIB); *Enterobacter cloacae*; biodegradation; BAC library; GC-MS

(责任编辑: 张志钰)