



文章栏目：环境监测技术

DOI 10.12030/j.cjee.201912184

中图分类号 X832

文献标识码 A

徐晓庆, 苏命, 朱宜平, 等. 基于荧光定量 PCR 技术构建水源地典型致嗅物质 2-甲基异茨醇的评估方法及其应用[J]. 环境工程学报, 2020, 14(11): 3208-3215.

XU Xiaqing, SU Ming, ZHU Yiping, et al. Evaluation of typical odorant 2-methylisoborneol based on real time qPCR in source water and its application[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(11): 3208-3215.

基于荧光定量 PCR 技术构建水源地典型致嗅物质 2-甲基异茨醇的评估方法及其应用

徐晓庆^{1,2}, 苏命², 朱宜平³, 崔长征^{1,*}, MUHAMMAD Suruzzaman², 徐亚楠², 于建伟², 杨敏²

1. 华东理工大学资源与环境工程学院, 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 上海 200237

2. 中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

3. 上海城投原水有限公司, 上海 200125

第一作者: 徐晓庆(1994—), 女, 硕士研究生。研究方向: 饮用水源地产嗅风险评估与调控。E-mail: lovelyyokyo@163.com

*通信作者: 崔长征(1978—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 环境微生物利用等。E-mail: cuichangzheng@ecust.edu.cn

摘要 我国地表水源中由丝状蓝藻代谢产生 2-甲基异茨醇 (2-MIB) 导致的嗅味问题十分普遍。由于传统显微镜检测方法无法鉴别产嗅藻种, 不能满足水源水质管理要求, 故有必要构建能特异性表征水体产嗅潜力的检测方法。由于丝状藻代谢产生 2-MIB 主要受其合成功能基因调控, 设计了 2-MIB 功能基因引物, 经引物特异性检验及 PCR 条件优化后, 构建了基于 2-MIB 功能基因的定量 PCR 方法, 并采用实际环境样品进行测试与验证。结果表明: 引物特异性良好, 定量 PCR 方法能有效检测 2-MIB 功能基因, 并绘制了标准曲线, 得出检测限为 8.44×10^2 copies·L⁻¹; 实际样品测试结果显示其 2-MIB 功能基因浓度在 $2.09 \times 10^7 \sim 1.94 \times 10^{10}$ copies·L⁻¹ 范围内, 与基于仪器分析方法测定的 2-MIB 浓度符合线性关系 ($R^2=0.63$, $P<0.01$), 表明定量方法可行。该方法具有灵敏度高、特异性好的特点, 能特异性检测产嗅基因, 可应用于水源地中产嗅潜力评估与预警。

关键词 定量 PCR; 2-甲基异茨醇; 产嗅功能基因; 丝状蓝藻; 饮用水

湖库是我国许多城市的重要饮用水水源地^[1]。然而, 我国 35 个城市水源水库中有 80% 的水体存在饮用水嗅味问题^[2], 其中由致嗅化合物 2-甲基异茨醇 (2-methylisoborneol, 2-MIB) 导致的水体土霉味问题居多^[3-7]。由于该物质嗅阈值极低^[5](4~16 ng·L⁻¹), 且很难通过常规水处理工艺去除^[8], 饮用水中残留的痕量 2-MIB 物质容易引发消费者对水质的担忧, 威胁城市供水安全^[4]。水源地嗅味问题已经成为我国供水行业中重点关注的问题之一^[9]。

2-MIB 主要由丝状蓝藻生长代谢产生, 这类蓝藻包括颤藻属 (*Oscillatoria*)、席藻属 (*Phormidium*)、浮颤藻属 (*Planktothrix*) 以及伪鱼腥藻属 (*Pseudanabaena*) 等^[9]。丝状蓝藻导致的 2-MIB 嗅味问题可最早追溯到 1983 年, 由于水源水库底泥附着生长的颤藻引发美国加利福尼亚州 3 个供水系统出现嗅味问题^[10]; 1991 年, MARTIN 等^[11]在密西西比某池塘中采集到一株产 2-MIB 的颤藻; 1998 年, 日

收稿日期: 2019-12-31; 录用日期: 2019-05-08

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2017ZX07108-002-02); 国家自然科学基金资助项目 (51878649)

本学者 SUGIURA 等^[12]在 Kasumigaura 湖中分离出 4 株丝状产嗅蓝藻, 包括 2 株席藻、1 株颤藻和 1 株鞘丝藻, 发现这些藻种生物量与水体土霉味之间存在正相关关系。

近 10 年来, 我国关于水源地嗅味问题的报道越来越多。北京密云水库每年 9—10 月局部区域出现浮颤藻生长导致水体嗅味问题^[7]; 上海市新建水源地青草沙水库由于丝状蓝藻爆发导致季节性嗅味问题^[13]; 天津于桥水库、苏州东太湖湖滨水库、上海金泽水库及银川某化工园区水源水库等均存在由于不同种属的丝状产嗅蓝藻生长或爆发导致的嗅味问题^[14]。

大部分水源地中 2-MIB 由丝状蓝藻产生, 由于丝状蓝藻种类较多、形态相近, 不同藻种具有不同的产 2-MIB 特征, 甚至同一藻种在不同外部环境条件下也存在产嗅差异。传统方法主要依托显微镜镜检通过藻细胞形态进行藻种计数。然而, 从细胞形态上无法区分产嗅丝状藻种与非产嗅丝状藻种, 因此, 无法特异性检测水体中的产嗅藻; 此外显微镜镜检前处理耗时长, 检测效率低, 准确度与精确度较低^[7]。致嗅物质 2-MIB 可基于气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 方法^[15]分析, 但因仪器昂贵、操作要求高、运行维护成本高, 大部分水源管理机构不具备该条件, 且该方法只能测定水样中已产生的 2-MIB 物质浓度, 无法提前预警, 也不能鉴别产生来源。因此, 有必要构建一种能特异性检测水体 2-MIB 产生潜力的方法。

由于丝状藻代谢产生 2-MIB 受相关功能基因控制, 可通过实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 方法构建特异性检测 2-MIB 合成功能基因的方法。关于 2-MIB 的合成途径最初在放线菌中被发现^[16], 主要由 SCO7701 基因与 SCO7700 基因调控; 随后, GIGLIO 等^[17]发现蓝藻中 2-MIB 的生物合成机制为 GPP 的甲基化和甲基 GPP 的环化反应, 分别由 GPPMT 基因和 2-MIBS 基因调控。根据序列相似性分析, 蓝藻和放线菌的 2-MIB 相关基因具有相对较高的相似度和同源性^[18]。

本研究通过设计针对蓝藻中 2-MIB 功能基因的特异性引物, 构建实时定量 PCR 方法, 并采用实际水体检验方法的可行性, 实现水源中丝状蓝藻的致嗅功能基因定量检测, 进而评估水体产嗅潜力与产嗅风险, 为水源嗅味问题的监测与预警提供实时、快速、科学的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

所用藻种均为产 2-MIB 蓝藻, 分别为 FACHB-1277 (*Pseudanabaena* sp., 伪鱼腥藻)、FACHB-1375 (*Planktothrix* sp., 浮颤藻), 购自中国科学院淡水藻种库。藻类培养使用 BG11 培养基, 扩大培养后用于 DNA 提取及致嗅物质检测等目的。

1.2 培养藻种及环境样品 DNA 提取方法

取 500 mL 藻培养液将藻细胞过滤富集至 1.2 μm 滤膜 (RTTP04700, 1.2 μm 聚碳酸酯膜, IsoporeTM, 美国)上; 随后将滤膜剪切破碎后使用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒 (6560-200, MPBio, 美国)提取样品 DNA。

1.3 引物设计与特异性验证

采用已有研究^[19]中的 2-MIB 引物 (MIB3313F/MIB4226R 和 MIB3324F/MIB4050R) 可以有效扩增 FACHB-1277 与 FACHB-1375 样品中 2-MIB 功能基因, 验证了实验藻种含 MIB 功能基因。但由于两对引物所扩增得到的 2-MIB 基因片段较长, 分别为 913 bp 与 726 bp, 不能用于定量 PCR 扩增。进一步检验了已有研究中报道的定量 PCR 引物 MIBS-RTF/MIBS-RTR^[19], 发现不能扩增本研究中实验藻种的 2-MIB 功能基因。因此, 本研究基于 NCBI 已公开的 2-MIB 功能基因数据库, 设计 2-MIB 功能基因的特异性引物 (表 1), 基因引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。将所设计的引物与 NCBI 中已有 2-MIB 基因数据库比对验证引物可行性与特异性; 并采用普通 PCR 法测试相

表1 2-MIB功能基因引物
Table 1 Primers of 2-MIB function gene

序号	名称	引物序列(5'~3')	FACHB-1375	FACHB-1277	阴性对照	PCR产物长度/bp	来源
1	MIB3313F	CTCTACTGCCCCATTACCGAGCGA	+	+	-	913	[19]
	MIB4226R	GCCATTCAAACCCGCCGCCATCCA					
2	MIB3324F	CATTACCGAGCGATTCAACGAGC	+	+	-	726	[19]
	MIB4050R	CCGCAATCTGTAGCACCATGTTGA					
3	MIBS-RTF	CGCTCGCTTGTGAGTGAGATAG	-	-	-	未检测	[19]
	MIBS-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT					
4	MIBF	GACCCAKMTCGGCTGYTGAT	+	+	-	389	本研究
	MIBR	TAGAAGCTGTCGTGCTGKCG					

注：“+”表示PCR结果为阳性，琼脂糖凝胶电泳检测结果有条带；“-”表示PCR结果为阴性，琼脂糖凝胶电泳检测结果无条带。

关引物，使用1.2%琼脂糖凝胶电泳方法检验了引物的特异性。

1.4 普通PCR与qPCR扩增条件

普通PCR反应体系为：2×PCR Taq MasterMix with dye (RR005A, TAKARA Bio公司, 日本) 12.5 μL, 上下游引物各0.8 μL, 模板DNA 2.0 μL, ddH₂O 8.9 μL。普通PCR扩增程序为：高保真酶活化阶段95℃, 持续5 min; 高温变性阶段95℃, 持续30 s; 低温退火阶段64℃, 持续45 s; 延伸阶段72℃, 持续30 s; 高温变性、低温退火、延伸阶段共45个循环。

qPCR反应体系为：TB Green™ Premix Ex Taq™ (RR820, TAKARA Bio公司, 日本) 12.5 μL, 上下游引物MIBF/MIBR各0.5 μL, 模板DNA 2.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。qPCR扩增程序为：高温变性95℃, 持续10 s; 低温退火64℃, 持续20 s; 延伸阶段72℃, 持续30 s; 反应共40个循环; 另外, 溶解曲线设置条件为由65℃升温至97℃, 速率为2.2℃·s⁻¹。

1.5 标准曲线的建立

基于引物MIBF与MIBR扩增FACHB-1277 DNA模板, 经测序后根据序列信息合成2-MIB功能基因质粒, 浓度为359 ng·μL⁻¹ (由生工生物工程(上海)股份有限公司合成)。根据式(1)计算质粒拷贝数。

$$N = N_A \cdot (10^{-9}c) / (L \cdot M_w) \quad (1)$$

式中： N 为基因拷贝数浓度，copies·μL⁻¹； N_A 为阿伏伽德罗常数； c 为核酸质量浓度，ng·μL⁻¹； L 为碱基长度，bp； M_w 为单位碱基平均摩尔质量。

由式(1)计算得到质粒拷贝数为 8.44×10^{11} copies·μL⁻¹。按10倍进行梯度稀释, 得到7个浓度水平, 以此为DNA模板, 按照1.4节提及的优化体系与运行参数进行qPCR扩增。同一浓度梯度质粒DNA为模板的反应孔作3组平行实验, 将得到的 C_q 值与2-MIB基因量的对数构建线性模型, 绘制标准曲线。

1.6 实际样品测试

配制了9个不同浓度产嗅藻的培养样品, 包括FACHB-1277伪鱼腥藻-1 (S01)、FACHB-1277伪鱼腥藻-2 (S02)、FACHB-1277伪鱼腥藻-3 (S03)、FACHB-1375浮颤藻-1 (S04)、FACHB-1375浮颤藻-2 (S05)、FACHB-1375浮颤藻-3 (S06)、青草沙分离的*Pseudanabaena* sp. 01 (S10)、青草沙分离的*Pseudanabaena* sp. 02 (S11)、青草沙分离的*Pseudanabaena* sp. 03 (S12)。采集了12个南水北调工程的环境样品, 包括S07~S09、S13~S21。对这21组样品分别进行了定量PCR方法检测与气相色谱-质谱联用的2-MIB物质浓度分析^[15, 20-22], 每个样品重复分析3次。

2 结果与讨论

2.1 引物设计与特异性验证结果分析

实验测试了已有研究^[19]的 2-MIB 基因相关引物, 发现 MIB3313F/MIB4226R、MIB3324F/MIB4050R 两对引物能有效扩增模拟培养藻种 FACHB-1277 与 FACHB-1375。然而, 目标基因片段过长, 因此, 无法用于定量 PCR 扩增。已有研究^[19]的引物不能有效扩增本实验的藻种, 这与 2-MIB 功能基因序列具有一定的可变性有关。因此, 采用 MIB3313F/MIB4226R 引物扩增了 FACHB-1277 DNA, 并通过测序获得 2-MIB 功能基因序列, 序列 NCBI 登记号为 MN869917。基于该序列信息设计了 MIBF/MIBR 引物 (见表 1)。经测试发现, 这对引物能有效扩增 2-MIB 功能基因, PCR 产物长度为 389 bp, 可用于 qPCR 方法。MIBF/MIBR NCBI 比对结果见表 2。

为验证 MIBF/MIBR 引物的可行性, 比对了引物序列与 NCBI 基因数据库中所有蓝藻中 MIB 合成功能基因结果, 发现这对引物能匹配 18 条 MIB 功能基因序列 (截至目前发表了 23 条)。由结果分

表 2 MIBF/MIBR NCBI 比对结果
Table 2 NCBI blast result of MIBF/MIBR

序号	NCBI登记号	基因名	藻种拉丁名	藻种中文名	MIBF/%	MIBR/%
1	HQ830028.1	2-methylisoborneol (2-MIB) synthesis complete sequence	<i>Pseudanabaena</i> sp.	伪鱼腥藻属	100	100
2	HQ630883.1	MIB synthase gene	<i>Pseudanabaena limnetica</i>	湖泊伪鱼腥藻	100	100
3	AB826230.1	pgmtc gene for monoterpene cyclase	<i>Pseudanabaena galeata</i>	洋伪鱼腥藻	100	100
4	HQ630887.1	MIB synthase gene	<i>Pseudanabaena</i> sp.	伪鱼腥藻属	100	100
5	LC486303.1	<i>mic</i>	<i>Microcoleus pseudautumnalis</i>	微鞘藻属	100	100
6	HQ630885.1	MIB synthase gene	<i>Oscillatoria limosa</i>	泥生颤藻	100	100
7	HQ830029.1	2-methylisoborneol (2-MIB) synthesis associated operon	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
8	KP013063.1	A2 MIB cyclase gene	<i>Leptolyngbya</i> sp.	瘦鞘丝藻属	100	100
9	LC157987.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
10	LC157990.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
11	LC157992.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
12	LC157991.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
13	LC157989.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
14	LC157988.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
15	LC157986.1	MIB synthase	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	100	100
16	KJ658377.1	2-methylisoborneol synthase gene	<i>Oscillatoria</i> sp.	颤藻属	100	100
17	KJ658378.1	2-methylisoborneol synthase gene	<i>Planktothrix</i> sp.	浮丝藻属	100	100
18	MN167115.1	MIB synthase gene	<i>Pseudanabaena galeata</i>	洋伪鱼腥藻	100	100
19	MK759878.1	2-methylisoborneol (mib) gene, partial cds	<i>Oscillatoria prolifera</i>	颤藻	0	0
20	KM013398.1	A2 MIB cyclase (<i>mic</i>) gene, partial cds	<i>Leptolyngbya</i> sp.	瘦鞘丝藻属	0	0
21	KM013397.1	MIB cyclase (<i>mic</i>) gene, partial cds	<i>Planktothricoides</i> sp.	浮丝藻属	0	0
22	KM013396.1	MIB cyclase (<i>mic</i>) gene, partial cds	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	拉氏拟浮丝藻	0	0
23	MK124613.1	MIB synthase gene, partial cds	<i>Pseudanabaena</i> sp.	伪鱼腥藻属	0	0

析可知：不能匹配的基因序列(19~23)是由于这些序列仅为部分 MIB 基因序列，未包含 MIBF/MIBR 引物段序列；而这对引物仅能匹配 NCBI 中已发表的 MIB 功能基因。进一步采用实际藻种进行普通 PCR 扩增实验，产物条带介于 250 bp 至 500 bp 之间，验证了 MIBF/MIBR 引物的可行性，结果如图 1 所示。

2.2 定量 PCR 标准曲线的构建

将 1.5 节合成的 2-MIB 功能基因质粒(拷贝数 $8.44 \times 10^{11} \text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 作为标准品进行定量 PCR 测试，基于结果构建循环次数 C_q 值与 2-MIB 基因拷贝数的对数构建线性模型，绘制标准曲线如图 2 所示。标准曲线公式见式 (2)。

$$C_q = -3.740 \lg C_g + 40.05 \quad (2)$$

式中： C_q 为循环次数； C_g 为 2-MIB 基因丰度， $\text{copies} \cdot \text{L}^{-1}$ 。图 2 表明两者符合线性关系 ($R^2 = 0.9995$, $P < 0.01$)，检测限为 $8.44 \times 10^2 \text{copies} \cdot \text{L}^{-1}$ ，说明该方法能满足 2-MIB 功能基因检测要求。

2.3 实际样品 2-MIB 基因丰度测试结果

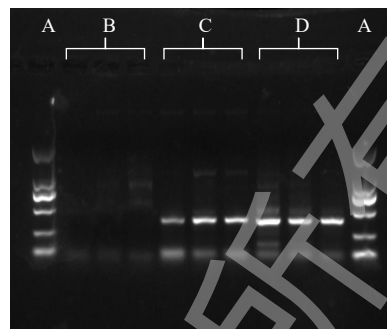
图 3 为 12 个环境水体及 9 个不同浓度产嗅藻的培养样品的测试结果。由图 3 可知，该方法能够检测出环境水体及培养样品中的 2-MIB 功能基因，得到的环境样品浓度为 $2.09 \times 10^7 \sim 1.94 \times 10^{10} \text{copies} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中，实验室培养的 FACHB-1375 *Planktothrix* sp. 浮颤藻样品 2-MIB 功能基因丰度最高，实际环境样品中 2-MIB 功能基因丰度水平相近，最低为于桥水库样品，相应基因丰度为 $2.09 \times 10^7 \text{copies} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外，各水样 3 组重复样品检测结果十分接近，表明该方法的重现性较好。

2.4 2-MIB 监测方法的对比与验证

为验证方法的可靠性，用 GC-MS 方法检测了上述 21 个样品中 2-MIB 浓度^[7]。对比分析 2 种方法的结果发现其符合线性关系 ($R^2 = 0.63$, $P < 0.01$)，表明定量 PCR 方法可以表征水体中 2-MIB 浓度(见图 4)。式 (3) 为 2-MIB 浓度与功能基因之间的定量关系模型，可用于利用定量 PCR 结果评估水体中 2-MIB 浓度水平。

$$\lg C_g = 1.5105 \lg c - 10.1156 \quad (3)$$

式中： C_g 为 2-MIB 基因丰度， $\text{copies} \cdot \text{L}^{-1}$ ； c 为 2-MIB 浓度， $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



注：A. 3427A, DL2000 DNA Marker, Takara; B. 阴性对照；
C. FACHB-1277 伪鱼腥藻；D. FACHB-1375 浮颤藻。

图 1 定量 PCR 引物 (MIBF/MIBR) 凝胶电泳验证结果
Fig. 1 Test result of qPCR primer MIBF/MIBR

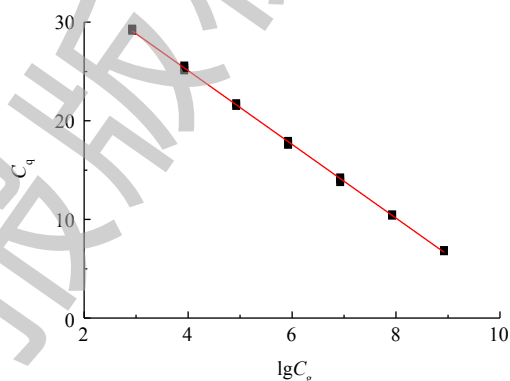


图 2 MIBF/MIBR 质粒定量 PCR 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of plasmid based on primer MIBF/MIBR

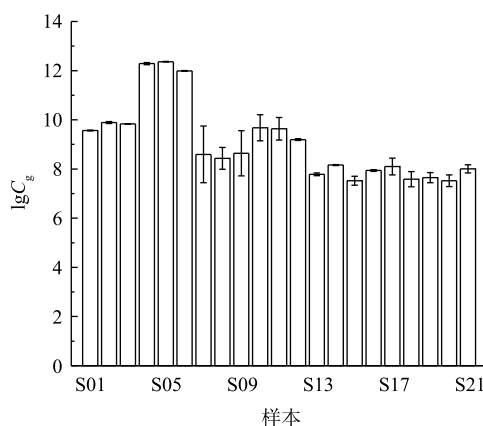


图 3 基于定量 PCR 方法的实际样品 2-MIB 功能基因丰度测试结果

Fig. 3 Quantitative PCR-based detection result of 2-MIB functional genes in real environment samples

2.5 2-MIB 的定量 PCR 监测方法的应用前景

水源地中藻类生长产生的嗅味问题已成为供水行业最为关注的问题。在我国, 由于丝状蓝藻生长代谢 2-MIB 导致的水体土霉味问题尤为普遍, 确认 2-MIB 的产生来源能提升水源地嗅味管理及防控水平。实时荧光定量 PCR(qPCR) 对基因定量的检测方法已广泛应用于检测蓝藻或有毒蓝藻总量中。该方法具有快速高效、灵敏度高、检出限低、特异性好和高重复性高等优点。目前, 已有少量基于 qPCR 方法的检测水体中产土臭素 (geosmin) 微生物生物总量的方法^[23], 但是用于含 2-MIB 功能基因微生物生物总量的检测应用还较少。

本研究中构建的定量 PCR 方法, 能直接定量检测水体中的 2-MIB 功能基因, 避免了传统方法基于形态学无法区分产嗅藻与非产嗅藻的缺陷。相比于采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 的仪器分析方法, 定量 PCR 方法能同时检测多达 96 个样品, 具有通量高、速度快等特点。此外, 该方法检测限低, 能最低检测到 8.44×10^2 copies·L⁻¹ 个 2-MIB 功能基因拷贝数。该结果与基于定量 PCR 方法检测水体中土臭素功能基因的结果一致^[7]。

然而, 由于该方法存在一些缺陷, 限制了其推广应用。大部分分子生物学方法是以目标生物 DNA 为主要研究对象, 而蓝藻具有细胞壁, DNA 的提取难度与误差增加。SU 等^[7]发现 DNA 提取是影响检测样品中土臭素功能基因准确度的最主要步骤, 与本研究的结论类似。DNA 提取过程的不确定显著降低了结果的准确性。此外, 由于产 2-MIB 的蓝藻并未完全界定, 不同产 2-MIB 藻种的基因序列不完全相同, 加上当前有关 2-MIB 的功能基因研究很少, NCBI 中的 MIB 基因序列仍在不断完善中。因此, 本研究中所设计的引物可能无法扩增之后新发现的产嗅藻 2-MIB 功能基因, 正如以往引物不能有效扩增本研究涉及的产嗅藻种一样。随着 DNA 提取方法的不断改进, 以及 2-MIB 功能基因库序列信息的完善, 基于定量 PCR 的水源 2-MIB 风险评估方法具有广泛的应用前景。

基于此, 本课题组还将此方法应用于上海市、厦门市的水源水库中, 旨在考察该方法是否能快速、有效地核算出水体的产嗅潜力, 达到水体嗅味问题预警的要求, 为水源地的水质管理提供十分重要的工具与技术支持。

3 结论

1) 建立了检测水体中 2-MIB 功能基因的定量 PCR 方法, 该方法能克服传统方法无法区分产嗅藻与非产嗅藻的缺点, 且满足检测要求 ($R^2=0.9995$, $P<0.01$)。

2) 通过采集我国不同地区的实际水源样品, 对比验证了定量 PCR 方法与仪器分析方法结果的一致性 ($R^2=0.63$, $P<0.01$), 说明本研究提出基于定量 PCR 评估水体嗅味风险的方法具有可行性。

3) 基于 qPCR 的产嗅基因丰度检测代替了繁琐、重现性低的显微镜看藻、数藻过程。快速、准确有效地检测水体中致嗅功能基因的丰度, 能起到预警作用, 为水源地的水质管理提供十分重要的工具与技术支持。

参考文献

[1] SU M, JIA D M, YU J W, et al. Reducing production of taste and odor by deep-living cyanobacteria in drinking water

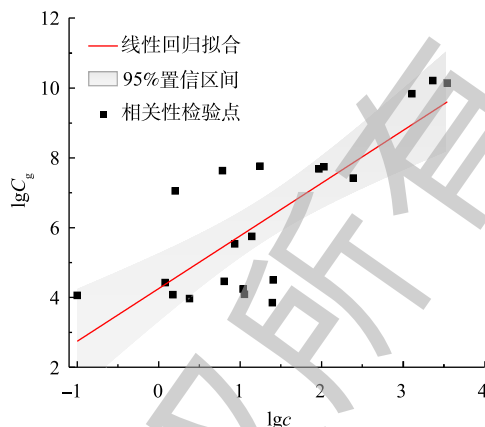


图 4 基于 GC-MS 分析法测定 2-MIB 物质浓度与 qPCR 方法测定 2-MIB 功能基因相关性检验

Fig. 4 Correlation test of 2-MIB substance concentration based on GC-MS analysis and 2-MIB functional gene determination by qPCR method

- reservoirs by regulation of water level[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 574: 1477-1483.
- [2] SUN D L, YU J W, YANG M, et al. Occurrence of odor problems in drinking water of major cities across China[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2014, 8(3): 411-416.
- [3] PETRO K, MANOLIS L, CHRISTINA K, et al. Treatment of unpleasant odors in municipal wastewater treatment plants[J]. *Water Science and Technology*, 2010, 61(10): 2635-2644.
- [4] WANG C M, AN W, GUO Q Y, et al. Assessing the hidden social risk caused by odor in drinking water through population behavioral responses using economic burden[J]. *Water Research*, 2020, 172: 115507.
- [5] WAGNER K. A review of "algae: source to treatment (M57)"[J]. *Lake & Reservoir Management*, 2010, 26(4): 345-346.
- [6] SAADOUN I M, SCHRADER K K, BLEVINS W T. Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by *Anabaena* sp[J]. *Water Research*, 2001, 35(5): 1209-1218.
- [7] SU M, YU J W, ZHANG J Z, et al. MIB-producing cyanobacteria (*Planktothrix* sp.) in a drinking water reservoir: Distribution and odor producing potential[J]. *Water Research*, 2015, 68: 444-453.
- [8] NERENBERG R, RITTMANN B E, SOUCIE W J. Ozone biofiltration for removing MIB and geosmin[J]. *Journal of American Water Works Association*, 2000, 92(12): 85-95.
- [9] WATSON S B. Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: Signals or by-products? A review of their biological activity[J]. *Phycologia*, 2003, 42(4): 332-350.
- [10] IZAGUIRRE G, HWANG C J, KRASNER S W, et al. Production of 2-methylisoborneol by two benthic cyanophyta[J]. *Water Science & Technology*, 1983, 15(6/7): 211-220.
- [11] MARTIN J F, IZAGUIRRE G, WATERSTRAT P. A planktonic *Oscillatoria* species from Mississippi catfish ponds that produces the off-flavor compound 2-methylisoborneol[J]. *Water Research*, 1991, 25(12): 1447-1451.
- [12] SUGIURA N, IWAMI N, INAMORI Y, et al. Significance of attached cyanobacteria relevant to the occurrence of musty odor in Lake Kasumigaura[J]. *Water Research*, 1998, 32(12): 3549-3554.
- [13] ZHANG K J, ZHANG T Q, DENG Y, et al. Occurrence of algae and algae-related taste and odour (T&O) compounds in the Qingcaosha Reservoir, China[J]. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 2015, 64(7): 824-831.
- [14] YANG M, YU J W, LI Z L, et al. Taihu Lake not to blame for Wuxi's woes[J]. *Science*, 2008, 319(5860): 158.
- [15] 钟秀华, 周丽辉, 余胜兵, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱/质谱法测定饮水中2-甲基异茨醇和土臭素[J]. *环境卫生学杂志*, 2015, 5(3): 97-100.
- [16] WANG C M, CANE D E. Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces Coelicolor*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(28): 8908-8909.
- [17] GIGLIO S, CHOU W K W, IKEDA H, et al. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in *Cyanobacteria*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(3): 992-998.
- [18] GIGLIO S, JIANG J Y, SAINT C P, et al. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(21): 8027-8032.
- [19] SUURNÄKKI S, GOMEZ-SAEZ G V, RANTALA-YLINEN A, et al. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds[J]. *Water Research*, 2015, 68: 56-66.
- [20] 吴燕芳. 固相萃取-气相色谱法检测水样中的土臭素和2-甲基异茨醇[C]//中国化学会有机分析专业委员会, 国家自然科学基金委. 中国化学会第十四届有机分析及生物分析学术研讨会会议论文摘要集, 2007: 281-282.

- [21] 李学艳, 陈忠林, 沈吉敏, 等. 固相萃取-气质联机测定水中嗅味物质2-甲基异茨醇和土霉素[J]. *中国环境监测*, 2006, 22(2): 18-21.
- [22] 余沛芝, 阮春蓉, 陈琳琳, 等. 水中2-甲基异茨醇和土臭素的固相微萃取-气相色谱串联质谱检测方法[J]. *净水技术*, 2018, 37(9): 10-14.
- [23] JOHN N, KOEHLER A V, BRENDAN R E, et al. An improved method for PCR-based detection and routine monitoring of geosmin-producing cyanobacterial blooms[J]. *Water Research*, 2018, 136: 34-40.

(本文编辑: 靳炜, 郑晓梅)

Evaluation of typical odorant 2-methylisoborneol based on real time qPCR in source water and its application

XU Xiaoqing^{1,2}, SU Ming², ZHU Yiping³, CUI Changzheng^{1,*}, MUHAMMAD Suruzzaman², XU Yanan², YU Jianwei², YANG Min²

1. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

3. Shanghai Chengtou Raw Water Co. Ltd., Shanghai 200125, China

*Corresponding author, E-mail: cuichangzheng@ecust.edu.cn

Abstract Two-methylisoborneol (2-MIB) is a typical secondary metabolite released from cyanobacteria which causes off-flavor odor problem in surface water across China. Microscopy is the traditional method to identify such cyanobacteria. However, merely it is troublesome to distinguish between 2-MIB producers and non-producers by morphological structure and cannot meet the requirement of the source water quality management. It is necessary to build the test method which can specifically characterize the odor-producing capacity of waterbody. Due to the functional gene regulation for 2-MIB yield from cyanobacteria, the primers of 2-MIB function gene were designed and its specificity test was performed, then the PCR conditions were optimized. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) can be an alternative method to evaluate 2-MIB syntheses which is controlled by 2-MIB functional gene. Here, 2-MIB identification primers (MIBF/MIBR) have been designed and tested with field samples. A good standard curve was established, $R^2=0.9995$, $P<0.01$, and the detection limit was 8.44×10^2 copies·L⁻¹. The concentrations of 2-MIB gene of field samples were between 2.09×10^7 copies·L⁻¹ to 1.94×10^{10} copies·L⁻¹, which were significantly conformity with 2-MIB concentrations measured by GC-MS ($R^2=0.63$, $P<0.01$). The high sensitivity and specificity of this qPCR-based method suggests that it can effectively evaluate the risk of 2-MIB occurrence and able to monitor source water quality management.

Keywords fluorescence quantitative PCR; 2-methylisoborneol; odor-producing functional gene; filamentous cyanobacteria; drinking water