

不同营养源条件下螺旋鱼腥藻生长与产嗅特征研究

于建伟¹, 陈克云^{1, 2}, 苏命¹, 杨敏¹, 刘代成²

(1. 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; 2. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要: 蓝藻次生代谢产物所导致的嗅味问题已成为饮用水的主要水质问题之一, 然而不同种属蓝藻的产嗅特征往往差别明显. 本研究将从洋河水库中分离得到的可高产土臭素(geosmin)的螺旋鱼腥藻(*Anabaena* sp.) 进行扩大化培养, 通过测定不同营养源条件下的生物量及土臭素等各项指标的变化, 探讨了不同营养盐条件对该螺旋鱼腥藻生长及产嗅特征的影响. 结果表明, 不同氮源及磷源条件下, 产生的土臭素主要分布在藻细胞内, 胞外含量基本在 0.2% ~ 9.6% 的范围内; 与氨氮相比, 硝氮更能促进螺旋鱼腥藻的生长, 最高产嗅量是氨氮条件下的 1.4 倍; 氨氮浓度 0.5 mg/L 条件下, 相应藻细胞及产嗅量均达到最高值, 分别为 $3.8 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.1 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 而硝氮浓度在 2.0 mg/L 条件下达到最高值, 分别为 $6.6 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.3 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$; 与氮源条件相比, 磷源浓度在 0.12 mg/L 条件下才能够显著促进藻细胞的生长, 是螺旋鱼腥藻生长的限制性营养源. 洋河水库中营养盐的浓度已具备螺旋鱼腥藻生长所需的营养条件, 为抑制该水库的蓝藻水华及嗅味问题, 应有效削减水库中营养盐尤其是磷的含量.

关键词: 螺旋鱼腥藻; 土臭素; 氮源; 磷源; 营养盐

中图分类号: X52; X131.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2011)08-2254-06

Influence of Nutrient Sources on *Anabaena spiroides* Growth and Odorous Compounds Production Characteristics

YU Jian-wei¹, CHEN Ke-yun^{1, 2}, SU Ming¹, YANG Min¹, LIU Dai-cheng²

(1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China)

Abstract: The occurrence of taste and odors, produced by secondary metabolites of cyanobacteria, has been one of the major water quality problems in drinking water. However, the odorous compounds produced by cyanobacteria usually differ significantly with different species. One cyanobacterium isolated from Yanghe reservoir was identified as *Anabaena* sp., which can produce high level of geosmin consistently during laboratory culture. By culture expanding experiments, the algal growth and geosmin production characteristics of the *Anabaena* sp. were studied on different conditions of nitrogen and phosphorus sources. The results indicated that geosmin mainly remained in the intracellular algal cells regardless of the nutrient sources, and the extracellular content was only in the range of 0.2% - 9.6%. Compared with ammonia nitrogen conditions, the growth of *Anabaena* sp. in nitrate nitrogen conditions was much higher, with a 1.4-fold variation in geosmin production. While ammonia nitrogen concentration was 0.5 mg/L, the algal biomass and geosmin production achieved the highest level of $3.8 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.1 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. When the nitrate nitrogen concentration was 2.0 mg/L, the algal biomass and geosmin production achieved the highest level of $6.6 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.3 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Compared with nitrogen sources, the growth of *Anabaena* sp. could be promoted significantly until phosphorus level attained 0.12 mg/L, indicating that phosphorus is the main limiting nutrient source for *Anabaena* sp.. For Yanghe reservoir, the nutrient level has already been enough for the growth of *Anabaena* sp.. Therefore, the nutrient source content, especially phosphorus, should be reduced effectively to control the cyanobacterium bloom and taste and odor problems.

Key words: *Anabaena* sp.; geosmin; nitrogen; phosphorus; nutrient source

湖泊、水库的富营养化以及由此引发的蓝藻水华已成为世界性的环境问题之一. 蓝藻水华的发生, 不仅冲击自来水厂的正常运行, 其次生代谢物所导致的嗅味问题, 已成为饮用水中所面临的主要水质问题之一^[1]. 我国尤其自 2007 年无锡“水危机”事件后, 饮用水中的嗅味问题日益引起高度的关注^[2]. 2-甲基异莰醇(2-methylisoborneol, 2-MIB)和土臭素(geosmin)是最为常见的致土霉味问题的嗅味

物质. 研究表明多种蓝藻, 如席藻、颤藻、束丝藻、鱼腥藻等, 均可代谢产生此类物质^[3, 4]. 有关蓝藻产嗅的影响因素, 有研究表明水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)土臭素的产量与生物量的比值随光照强度变

收稿日期: 2010-09-20; 修订日期: 2010-12-16

基金项目: 环境保护公益性行业专项(2008467145); 国家自然科学基金项目(50808171, 50938007); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2006CB403306)

作者简介: 于建伟(1976~), 男, 博士, 主要研究方向为饮用水安全保障技术, E-mail: jwyu@ceees.ac.cn

化,两者具有很好的相关性^[5];而温度的增加可增强叶绿素 a 的产生,但同时抑制了土臭素的合成^[6];不同营养源因素条件下的蓝藻产嗅特征也有报道^[7],然而对不同种属蓝藻来说,营养盐对其产嗅的影响往往差别明显^[8],这可能与相应蓝藻的具体种属以及生理生态特性有关。2007 年洋河水库爆发的嗅味事件中,已确定螺旋鱼腥藻水华产生的土臭素是主要致嗅物质,含量最高达到 7 100 ng/L^[9]。然而有关该种属蓝藻的生理生长特征,以及不同环境条件下的产嗅特征有待于进一步的研究评价。

本研究利用在洋河水库嗅味暴发期分离得到的螺旋鱼腥藻,通过测定不同营养源条件下螺旋鱼腥藻的生物量、土臭素产量等各项指标,探讨了该螺旋鱼腥藻不同营养盐条件下的生理生长及产嗅特征。相关结果对于预测水库蓝藻水华导致的嗅味问题,进而针对性的采取相应应对处理技术措施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 气相色谱/质谱仪 (HP6890/5975, 安捷伦, 美国); 荧光显微镜 (BX51, Olympus, 日本); 培养瓶 (5 L 玻璃瓶, 北玻); 固相微萃取装置 (TALBOYS, Supelco, 美国); 培养箱 (HPG-280HX, 哈东联); 醋酸纤维素滤膜 (0.45 μm, 47 mm, ADVANTEC); DVB/Carboxen/PDMS 材质固相微萃取纤维头 (No. 57348-U, Supleco, 美国)。

1.1.2 藻种

试验用螺旋鱼腥藻由中国环境科学研究院提供,分离自秦皇岛洋河水库。

1.1.3 培养基

采用 M-11 培养基配方配制培养液^[10]。

1.2 实验方法

1.2.1 培养实验

(1) 培养条件 藻种接种前用无氮、磷的 M-11 培养基饥饿培养 3 d, 接种量为 10^4 cells·mL⁻¹; (25 ± 1) °C, 湿度 70%, 光照 1 500 lx 的培养箱里进行培养, 光暗周期 12 h: 12 h。

(2) 藻类生长特征实验 采用半连续培养方式进行, 分别将藻种接种于 2 瓶加了 4 L 培养液的 5 L 广口瓶中, 接种量 10^4 cells·mL⁻¹, 隔天取样一次测定相关指标。

(3) 藻类生长及产嗅实验 批量培养方式进行, 藻细胞接种到含 100 mL 不同浓度的氨氮、硝氮

及磷酸盐 (K_2HPO_4) 的培养液的 150 mL 培养瓶中, 氮源浓度分别为 0.05、0.17、0.5、1.0、2.0 mg/L, 磷源浓度分别为 0.04、0.12、0.4、1.0、1.8 mg/L。对照组不加任何营养盐, 每个条件设 3 个重复, 每天定时振荡培养瓶 3 次, 以确保藻液混合均匀。

1.2.2 检测指标

(1) 藻类 藻细胞采用 1 mL 的藻类计数框在配备 CCD 摄像头和长工作距离镜头的显微镜下计数。螺旋鱼腥藻呈现规则的螺旋形, 每个螺旋含有的细胞个数为 15 ~ 17 个, 每个样品计数 3 次, 每次不少于 200 个螺旋。

(2) 土臭素 采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱法 (HSSPME-GC/MS) 进行分析^[11]。取藻液直接测定后为总土臭素含量; 0.45 μm 醋酸纤维膜过滤后测定结果为溶解性 (胞外) 土臭素含量。

2 结果与讨论

2.1 藻类生长特征曲线

图 1 给出了半连续培养条件下, 螺旋鱼腥藻的生长及土臭素变化情况。可以看出, 螺旋鱼腥藻在接种后立即进入对数生长期 (1 ~ 15 d), 接种 1 周后藻细胞数量增加; 之后进入稳定生长期 (16 ~ 25 d), 期间藻的生长过程出现多个生物量高峰, 25 d 后藻细胞数目开始下降, 进入细胞衰亡阶段; 土臭素含量在螺旋鱼腥藻接种后出现对应的增加, 增加趋势与藻的生物量保持一致。

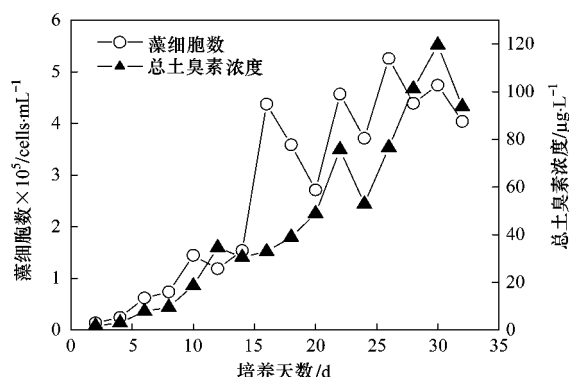


图 1 螺旋鱼腥藻生长过程中的生物量与总土臭素产量变化曲线

Fig. 1 Algal growth and geosmin production change curve of *Anabaena* sp.

后续研究中对对应选择了 3 个不同的生长时期 (对数生长期、稳定期、衰亡期), 对不同营养源条件下该螺旋鱼腥藻的生长特征及产嗅特征进行了系统评价, 以确定不同生长时期影响藻类生长和产嗅的

主要营养源因子.

2.2 氮源的影响

氮源是影响藻细胞生长的主要因素之一,研究中分别对不同硝氮及氨氮浓度条件下螺旋鱼腥藻的生长及产嗅情况进行了评价.

图2及图3列出了不同硝氮及氨氮浓度条件下的螺旋鱼腥藻生长及产嗅变化情况.可以看出,不同生长阶段条件下,螺旋鱼腥藻的生长受硝氮浓度的

影响较大,低浓度硝氮条件下(0~0.05 mg/L)螺旋鱼腥藻生物量及产嗅量在20 d左右即已达到最高产量;而较高浓度条件下(0.17~1.0 mg/L),在30 d左右的生物量及产嗅量仍继续增高;但过高的硝氮浓度(2.0 mg/L)会抑制螺旋鱼腥藻的生长和产嗅. Rashash 等^[12]以及 HU^[13]的研究中也发现硝酸盐浓度过高时会抑制鱼腥藻和席藻产生土臭素的能力.

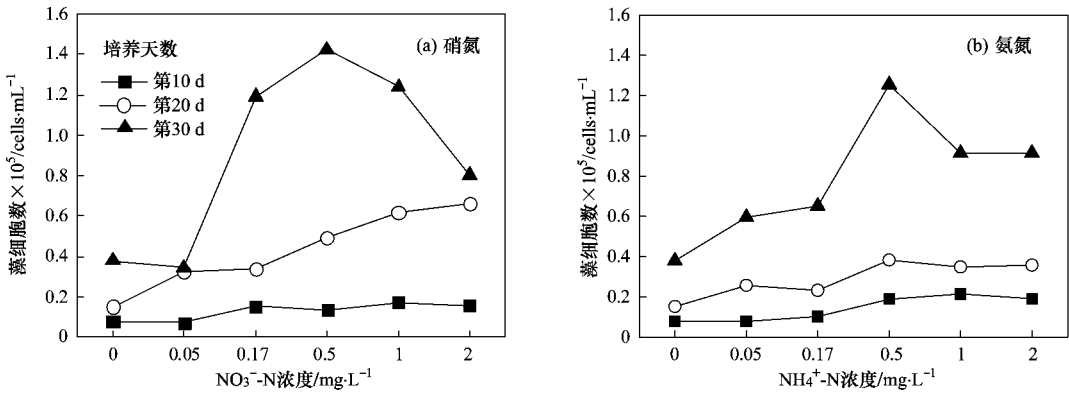


图2 不同氮源条件下螺旋鱼腥藻生物量变化结果

Fig. 2 Change of *Anabaena* sp. in different nitrogen source conditions

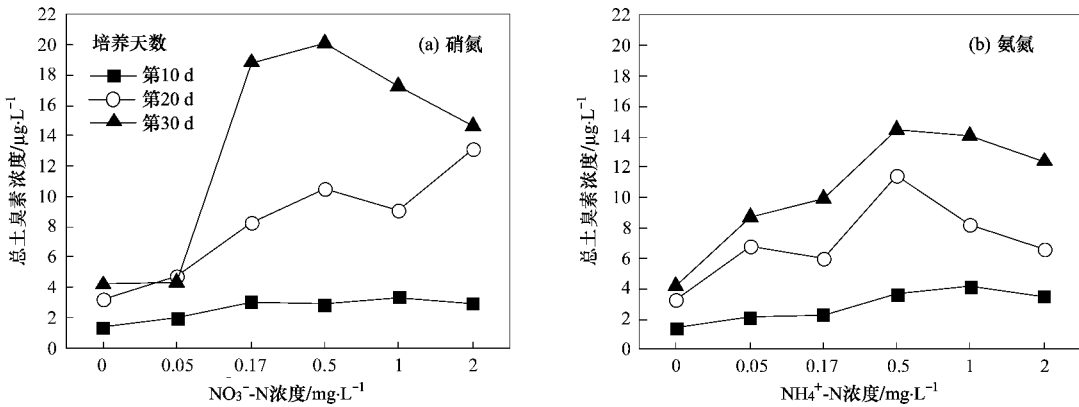


图3 不同氮源条件下螺旋鱼腥藻的产嗅量变化结果

Fig. 3 Geosmin production change of *Anabaena* sp. in different nitrogen source conditions

与硝氮条件下的结果相比,氨氮条件下生物量及土臭素含量均在30 d才增加到最高值;同样,生物量和土臭素含量在0.5 mg/L NH_4^+ -N条件下达到最高,而浓度继续增加后其生长和土臭素的产生会受到一定的抑制.与硝氮条件下的实验结果相比,最高生物量及土臭素浓度分别为 $12.55 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $14.4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,显著低于0.5 mg/L硝氮浓度条件.对比不同浓度条件下的生物量及土臭素含量,氨氮条件下的相应含量均低于硝氮条件,然而

单位产嗅量却基本一致,表明氨氮及硝氮均可被螺旋鱼腥藻的生长所利用,但硝氮更易被其吸收.

值得注意的是,对照体系(未加氮源)接种后,螺旋鱼腥藻仍保持了一定的生长,这可能是无氮或氮含量较低条件下,螺旋鱼腥藻会通过异形胞的固氮补偿机制合成藻细胞生长所需的氮,使得细胞内蛋白质含量减少而通过光合作用产生碳水化合物来补偿,从而使生物量随细胞内的氮循环而持续增加^[14].较高含量氮营养源条件下,硝氮所诱导的高

硝酸还原酶活性及随后的硝酸根的累积导致硝酸还原酶活性与硝酸盐的排出失去平衡,从而对光合作用失去平衡,最终抑制藻细胞的生长^[15];而氨氮在低浓度下依赖于通透酶催化膜电位的主动运输,但这个体系在高浓度氨氮条件下受到抑制,进而也会抑制藻细胞的生长^[16, 17].

2.3 磷源的影响

图 4 及图 5 给出了不同磷浓度条件下螺旋鱼腥藻的生长和土臭素产量变化情况.可以看出,磷是鱼腥藻生长的限制性因子.初始生长期(10 d)磷浓度对螺旋鱼腥藻的生长和土臭素产量的影响不大,基本在同一水平;而在后期生长期(20 d、30 d),土臭素的合成与磷浓度具有较好的相关性,较低磷浓度下(<0.04 mg/L)藻细胞的生长及土臭素的合成均没有明显升高;后期(30 d)时 1.8 mg/L 磷浓度条件下藻细胞数量及土臭素浓度均有一定程度的下降,这可能与磷浓度充足条件下,藻的生长速度加快,已提前进入了细胞衰亡期有关;20 d 时 1.8 mg/L 磷浓度条件下土臭素生成量达到最高值,到 30 d 时除 1 mg/L 磷浓度条件外,体系中土臭素的浓度均有不同程度的下降,这可能与进入衰亡期后,体系中具有了一定的土臭素降解菌有关^[18].

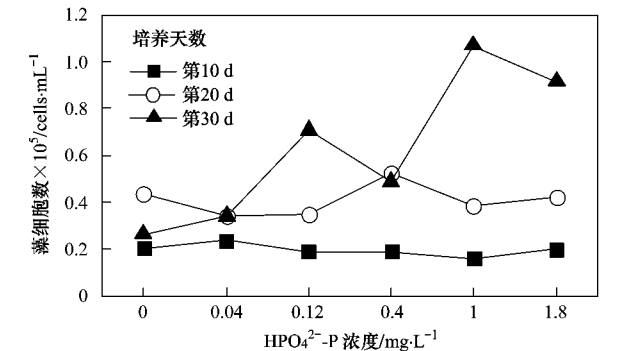


图 4 不同磷浓度下螺旋鱼腥藻生物量变化结果
Fig. 4 Change of *Anabaena* sp. in different phosphorus conditions

2.4 营养盐对螺旋鱼腥藻生长及土臭素产生影响分析

从实验结果来看,磷是影响该螺旋鱼腥藻的关键营养盐因素.不同营养因素条件下有关蓝藻的产嗅特征文献中已有报道,Saadoun 等^[3]以及 Hu^[13]发现磷酸盐浓度的增加能刺激土臭素的合成.本研究体系中,发现螺旋鱼腥藻在无磷或低磷条件下也有一定的生长,这可能与螺旋鱼腥藻诱导细胞内产生碱性磷酸酶,将细胞中的多聚磷颗粒分解为可以为藻类直接吸收的磷酸盐,从而满足其生长的需求有

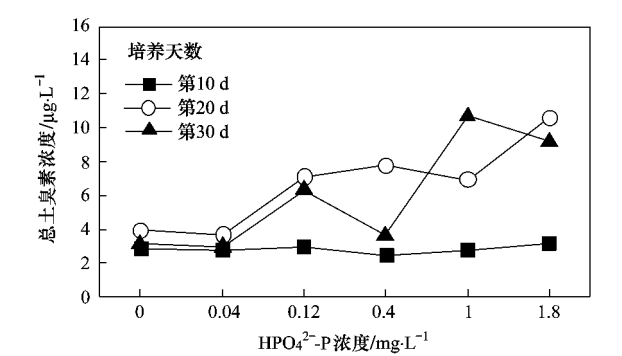


图 5 不同磷浓度下螺旋鱼腥藻的产嗅量
Fig. 5 Geosmin production change of *Anabaena* sp. in different phosphorus conditions

关^[19],与 Hoson 等^[20]研究中发现颤藻(*Oscillatoria tenuis*)产 2-甲基异茨醇不受硝酸盐氮和磷酸盐浓度影响的结果类似.但值得注意的是,此条件下土臭素的合成已受到抑制.对氮源条件来说,由于螺旋鱼腥藻具有固氮功能,从而培养体系在无氮条件下,培养过程中螺旋鱼腥藻和土臭素均保持一定的生长及合成.

图 6 给出了不同生长阶段、不同营养盐条件下鱼腥藻的平均单位产嗅量变化情况.可以看出,生长及稳定期藻的单位产嗅量较高,生长后期(衰亡期)单位产嗅量明显下降.在氮源充足条件下,其平均产嗅量要低于磷源充足的条件,进一步说明了磷是鱼腥藻生长产嗅的限制性营养因子;而在磷源充足条件下,除稳定期(20 d)氨氮条件下的单位产嗅量略高于硝氮条件下外,其余时期单位产嗅量基本一致,表明氨氮及硝氮均可被螺旋鱼腥藻的生长所利用.另外,与文献^[7]报道结果相似,研究中发现鱼腥藻

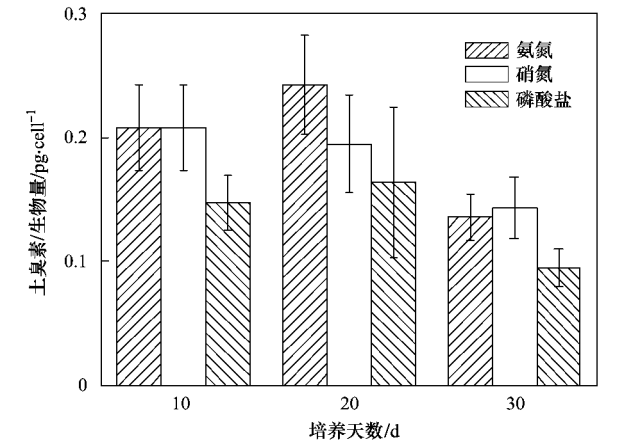


图 6 不同营养源浓度下螺旋鱼腥藻的平均产嗅率
Fig. 6 Average geosmin production rate of *Anabaena* sp. in different nutrient sources

生长中产生的土臭素多以胞内形式存在. 表 1 给出了不同硝氮含量条件下螺旋鱼腥藻胞外土臭素的变化情况,可以看出其含量基本维持在 1.4% ~ 9.6% 的范围内,不同氨氮及磷源条件下也得到类似的结果(0.2% ~ 9.6%). 因而对藻类导致的臭味问题来说,工艺处理中应尽量在保证藻细胞完整条件下实现优先去除.

表 1 不同硝氮条件下土臭素在胞内外的分布结果

Table 1 Geosmin content ratio in the extracellular <i>Anabaena</i> sp. in different nitrate conditions			
硝氮浓度 /mg·L ⁻¹	胞外土臭素所占质量分数/%		
	第 10 d	第 20 d	第 30 d
0.0	4.8	4.4	2.8
0.05	4.4	5.3	3.4
0.17	9.6	6.1	3.2
0.5	5.2	3.3	1.4
1.0	6.2	5.1	3.5
2.0	4.3	6.2	1.4

对洋河水库来说,历史监测数据表明其总磷含量基本在 0.04 mg/L 以上,最高达到 0.14 mg/L^[21],具备了螺旋鱼腥藻的营养盐生长条件.因而有效削减水库中营养盐尤其是磷的含量,对于抑制该水库的蓝藻水华及臭味问题具有重要意义.

3 结论

(1) 不同氮源及磷源条件下,螺旋鱼腥藻生长过程中代谢产生的土臭素主要分布在藻细胞内,胞外含量低于 10% .

(2) 硝氮和氨氮含量的增加均能促进藻细胞的生长和土臭素的产生,而硝氮更易被螺旋鱼腥藻所利用.

(3) 螺旋鱼腥藻所具有的固氮功能,使其在无外加氮源条件下,仍能够保持生长;而氮源浓度较高条件下,会对藻细胞的生长产生抑制.

(4) 磷是螺旋鱼腥藻的限制性营养源因子,一定浓度条件下才能够显著促进藻细胞的生长.

(5) 对洋河水库来说,所含的营养盐浓度已具备螺旋鱼腥藻生长的营养盐条件,为抑制该水库的蓝藻水华及臭味问题,应有效削减水库中营养盐尤其是磷的含量.

参考文献:

[1] Karageorgos P, Latos M, Kotsifaki C, *et al.* Treatment of unpleasant odors in municipal wastewater treatment plants [J]. Water Science and Technology, 2010, **61**(10): 2635-2644.

[2] 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[J]. 环境科学学报, 2007, **27**(11): 1771-1777.

[3] Saadoun I M K, Schrader K K, Blevins W T. Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by *Anabaena* sp. [J]. Water Research, 2001, **35**(5): 1209-1218.

[4] Zhang T, Li L, Song L R, *et al.* Effects of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2009, **21**(3): 279-285.

[5] Pinto P D T, Litchman E. The interactive effects of N: P ratios and light on nitrogen-fixer abundance [J]. Oikos, 2010, **119**(3): 567-575.

[6] Campbell D, Hurry V, Clarke A, *et al.* Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, **62**(3): 667-683.

[7] Ou M M, Wang Y, Zhou B X, *et al.* Effects of Iron and Phosphorus on Microcystis Physiological Reactions [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2006, **19**(5): 399-404.

[8] Naes H, Utkilen H C, Post A F. Geosmin production in the cyanobacterium *Oscillatoria brevis* [J]. Archives of Microbiology, 1989, **151**(5): 407-410.

[9] Li Z L, Yu J W, Yang M, *et al.* Dynamics of cyanobacterial population and harmful metabolites during a cyanobacterial bloom in Yanghe Reservoir in North China [J]. Harmful Algae, 2010, **9**(5): 481-488.

[10] 刘妍娟,储昭升,金相灿,等. 螺旋鱼腥藻土臭素的产生分布规律研究[J]. 中国环境科学, 2009, **29**(10): 1082-1085.

[11] Yu J W, Yang M, Lin C F, *et al.* Effects of surface characteristics of activated carbon on the adsorption of 2-methylisobornel (MIB) and geosmin from natural water [J]. Separation and Purification Technology, 2007, **56**(3): 363-370.

[12] Rashash D M C, Dietrich A M, Hoehn R C, *et al.* The influence of growth conditions on odor-compound production by two chrysophytes and two cyanobacteria [J]. Water Science and Technology, 1995, **31**(11): 165-172.

[13] Hu T L. The odor production of *Anabaena* sp. isolated from the inlet of a water purification plant[R]. Taiwan, Proceeding of 4th International Workshop on Drinking Water Quality Managemant and Treatment Technoly, 1998. 149-153.

[14] Teubner K. Phytoplankton, pelagic community and nutrients in a deep oligotrophic alpine lake: ratios as sensitive indicators of the use of P-resources (DRP: DOP: PP and TN: TP: SRSi) [J]. Water Research, 2003, **37**(7): 1583-1592.

[15] Jimenze C, Niell F X, Fernandez J A. The photosynthesis of *Dunaliella parva* Lerch as a function of temperature, light and salinity [J]. Hydrobiologia, 1990, **197**(1): 165-172.

[16] Luque I, Bermudez M F V, Yepes J P, *et al.* In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, **236**(1): 47-52.

- [17] Isabel Muro-Pastor M, Reyes J C, Florencio F J. Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, **276** (41): 38320-38328.
- [18] Hoefel D, Ho L, Aunkofer W, *et al.* Cooperative biodegradation of geosmin by a consortium comprising three gram-negative bacteria isolated from the biofilm of a sand filter column [J]. Letter in Applied Microbiology, 2006, **43** (4): 417-423.
- [19] Jansson M, Olsson H, pettersson K. Phosphatases: orgin, characteristics and function in lakes [J]. Hydrobiologia, 1988, **170** (1): 157-175.
- [20] Hoson T, Hayashi S, Hattori K. The Contribution of sedimentation of algal cell to the downstream levels of musty odor [J]. Water Science and Technology, 1995, **31** (11): 139-144.
- [21] 蔡金榜, 李文奇, 刘娜, 等. 洋河水库污染源调查与分析 [J]. 中国农村水利水电, 2006, (9): 51-54.