

温度与光强对柔细束丝藻 3 种异味物质产量的影响

周维成^{1,2}, 王素钦^{1,2}, 高翔^{1,2}, 郭亮亮^{1,2}, 代亮亮^{1,2}, 李根保¹

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:2013年3月从武汉喷泉公园人工湖发生水华并散发浓烈异味的水体中分离到1株柔细束丝藻(*Aphanizomenon gracile*), 编号为WH-1, 通过探究温度和光强对其生长及异味物质产量的影响, 为水体异味物质的防治与消除提供理论依据。经顶空固相微萃取法(HS-SPME), 鉴定其产3种异味物质, 分别是 β -环柠檬醛(β -Cyclocitral)、土臭素(Geosmin)和 β -紫罗兰酮(β -Ionone); 实验室条件下研究不同温度(15、25、35℃)、光强[15、25、35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]对该藻株生长及3种异味物质产量的影响。结果表明, WH-1的最适生长条件和最大 Geosmin 产量均出现在低温(15℃)、高光强[35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]的条件下, 但溶解态 Geosmin 的产量并未显著高于其它处理组; 不利的生长条件[25~35℃, 15~25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]有利于异味物质 β -Cyclocitral 和 β -Ionone 在藻细胞内积累。培养过程中, 溶解态 β -Cyclocitral 和 β -Ionone 一直维持较低水平(检测线附近波动), 表明该类异味物质主要存储在细胞内部, 在藻类生长过程中仅少量释放出来。3种异味物质所占比例变化说明, 与光强相比, 温度对异味物质产量的影响更大。

关键词:温度; 光强; 柔细束丝藻; β -环柠檬醛; 土臭素; β -紫罗兰酮

中图分类号:Q142 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2015)04-0078-08

目前, 水体富营养化已成为全球性的重大难题。蓝藻水华是水体富营养化的表征之一, 大量的水华蓝藻不仅影响水体的正常使用, 同时产生各种次级代谢产物, 如藻毒素和异味物质。关于水华蓝藻产生毒素机理、危害的研究已有大量的报道(Banker et al, 1997; Liu et al, 2006; Ballot et al, 2010); 而对藻源性异味物质的研究起步较晚, 近年来也取得了很大的进步(Watson, 2003; Ludwig et al, 2007)。在异味物质中, 土霉味和草木味异味物质因其具有极低的嗅味阈值(表1)且很难通过常规手段将其清除(Ando et al, 1992), 目前已成为水体异味的重要来源。1965年, 作为土霉味的代表异味物质土臭素(Geosmin)首次在放线菌中被分离鉴定(Gerber & Lechevalier, 1965), 随后在很多物种中, 如蓝藻(Ludwig et al, 2007; Giglio et al, 2008)和粘细菌(Schulz et al, 2004), 甚至在一些高等植物中(Marsili et al, 1994)也均有发现。草木味异味物质代表

种类 β -紫罗兰酮(β -Ionone)和 β -环柠檬醛(β -Cyclocitral)是由 β -类胡萝卜素(β -Carotene)氧化而来(Schwartz et al, 2001), 同样在微生物和高等植物中较为常见。有研究表明, 蓝藻水华爆发时水体常常散发异味(Sugiura et al, 1998; 徐盈等, 1999; 邓绪伟等, 2013); 因此蓝藻被认为水体异味的主要生产者。

束丝藻(*Aphanizomenon*)常成为淡水蓝藻水华的优势种, 既有异形胞、又有伪空胞, 具有较强的环境适用能力, 在世界各地水域均有发现(Yamamoto & Nakahara, 2006; Walve & Larsson, 2007; Wu et al, 2010)。不同环境因素对蓝藻异味物质产量的影响已有相关报道(Schrader & Blevins, 2001; Whelton & Dietrich, 2004; Zhang et al, 2009), 但大多数研究集中在 Geosmin, 对于草木味异味物质(β -Cyclocitral, β -Ionone)却鲜有报道。高温的夏季是水体异味频发的季节(Tung et al, 2008); 然而部分研究表明, 低温、弱光的条件更有利于异味物质的积累(Blevins et al, 1995; Zhang et al, 2009); 且目前较少有研究关注异味物质在藻细胞中的分布状况及其在相同环境下积累方式的差异。因此, 本文选取温度和光强环境因子, 探究其对柔细束丝藻藻株WH-1生长及3种异味物质产量的影响, 旨在为异味物质的防治及消除提供理论依据。

收稿日期:2015-03-20

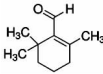
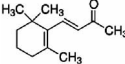
基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项滇池项目(2013ZX07102-005)。

作者简介: 周维成, 1991年生, 男, 硕士研究生, 主要从事藻类环境生物学研究。E-mail: zhou_wc@163.com

通信作者: 李根保, 男, 博士, 副研究员。E-mail: ligh@ihb.ac.cn

表 1 3 种异味物质的化学性质

Tab.1 Chemical properties of β -Cyclocitral, geosmin and β -Ionone

化合物	分子量	分子式	结构	嗅味阈值/ ng · L ⁻¹
β -Cyclocitral	152.23	C ₁₀ H ₁₆ O		1.9 × 10 ⁴
Geosmin	182.30	C ₁₂ H ₂₂ O		4 ~ 10
β -Ionone	192.30	C ₁₃ H ₂₀ O		7

1 材料方法

1.1 藻种培养及实验处理

2013 年 3 月,武汉喷泉公园的人工湖发生水华并散发浓烈的异味,严重影响了周围的居民生活。从该水体分离 1 株柔细束丝藻(*Aphanizomenon gracile*),编号为 WH-1。经纯化后接种于 BG11 培养基,在 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光照周期 12 h : 12 h(L : D)的条件下,24 h 不间断通气培养。取对数期藻样,离心去上清,用无菌 BG11 反复冲洗 3 次,去除藻样表面吸附的异味物质。接种于无菌 BG11 培养基,设置 15、25、35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 共计 3 个光照强度,温度为 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 。温度梯度设定为 15、25、35 $^{\circ}\text{C}$,光强为 35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。光照周期为 12 h : 12 h(L : D),24 h 不间断通气培养,每个处理设 3 个平行。每隔 5 d 进行取样,分别测定藻样总异味物质及溶解态异味物质。异味物质的产量以单位叶绿素 a (Chl-a) 对应异味物质的量表示 (ng/mg)。

1.2 异味物质测定

取样前对藻样充分混匀,将藻样分装入 40 mL 螺纹口瓶中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中反复冻融多次,使藻细胞完全破碎,释放出胞内异味物质进行总异味物质含量测定。对于溶解态异味物质的检测,取样后用 GF/C 玻璃纤维滤膜真空过滤,过滤液立即转入 40 mL 螺纹口瓶中,低温存放。顶空固相萃取法 (HS-SPME) 参考李林等 (2005) 并对其优化;具体方法如下:将固相萃取针插入萃取瓶中 (保证每次插入深度相同) 推出萃取头。置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中,700 r/min,萃取 30 min。在萃取完成后,拔出萃取针,插入气相进样室解吸 5 min (保证每次插入深度相同)。GC 进行样品分析时,同时对下一个样品进行顶空萃取,可缩短样品检测时间。GC 的分析条

件为:载气高纯 N₂ (99.999%), 恒压 100 kPa; H₂ 恒压 55 kPa, 空气恒压 40 kPa; 进样口 (SPL) 温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 尾吹气 30 mL/min; FID 检测器温度 270 $^{\circ}\text{C}$, 进样方式采用无分流进样 (splitless) 5 min。柱箱升温程序:初温 60 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min 后再以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 220 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 2 min。总程序为 35 min。

1.3 数据处理

GC 数据利用 GCsolution 2.3 (SHIMADZU, Japan) 进行分析处理。数据、图形处理分别利用 SPSS 20 (IBM, USA) 和 Origin 8 (OriginLab, USA) 完成。

2 结果

2.1 温度和光强对柔细束丝藻生长的影响

不同温度和光强对柔细束丝藻 WH-1 的叶绿素 a 具有显著影响。柔细束丝藻 WH-1 的 Chl-a 含量随着温度的升高而降低,随着光强的增大而增加,显示其耐低温、喜强光的特征。不同温度条件下 (图 1-A), 柔细束丝藻 WH-1 生长初期 (第 0 - 15 天) 各处理组之间无显著差异,20 d 后 15 $^{\circ}\text{C}$ 处理组显著高于其它 2 组 ($P < 0.05$); 而高温条件下 (35 $^{\circ}\text{C}$) 生长最为缓慢,基本处于停滞状态。由图 1-B 可知,光强对柔细束丝藻 WH-1 生长的影响与温度相反,光强增大促进其生长,中等光强 [25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 处理组与强光处理组 [35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 之间无显著性差异,弱光处理组 [15 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 显著低于其它 2 个处理组 ($P < 0.05$)。

2.2 温度和光强对柔细束丝藻 β -Cyclocitral 产量的影响

不同温度对柔细束丝藻 β -Cyclocitral 的产量存在显著的影响 (图 2-A), 呈现先上升、后下降的趋势。高温处理组 (35 $^{\circ}\text{C}$) 在第 5 天便达到最大值 [(459.1 $\pm$ 117.2) ng/mg], 随后不断下降。第 15 天时, 室温处理组 (25 $^{\circ}\text{C}$) 达最大值 [(468.8 $\pm$ 78.2) ng/mg], 并在第 15 - 25 天显著高于其它处理组 ($P < 0.05$), 而低温处理组 (15 $^{\circ}\text{C}$) 的 β -Cyclocitral 含量不断下降, 第 15 天后一直低于其它处理组。

光强对柔细束丝藻 β -Cyclocitral 产量同样具有显著的影响。培养初期 (第 5 - 15 天), 中等光强 [25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 处理组 β -Cyclocitral 产量显著高于其他实验组 ($P < 0.05$), 并在第 20 天达最大值 [(265.3 $\pm$ 22.7) ng/mg], 随后不断下降。然而在第 20 - 25 天, 弱光处理组 [15 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] β -Cyclocitral 产量达最大值 [(289.7 $\pm$ 11.1) ng/mg]

并高于其他处理组。强光处理组 [$35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 在整个实验周期内一直维持较低水平。

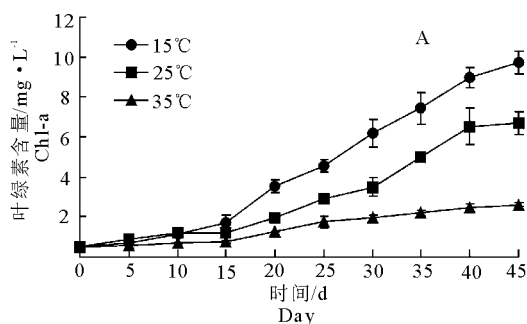


图1 不同温度和光强对柔细束丝藻 (WH-1) 的生长的影响

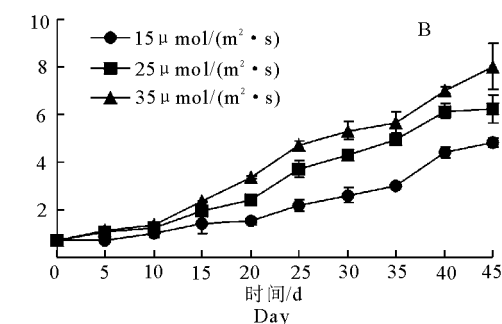


Fig. 1 Effects of temperature and light intensity on the growth of *Aphanizomenon gracile* (WH-1)

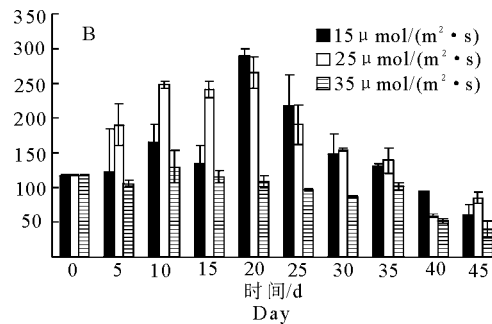
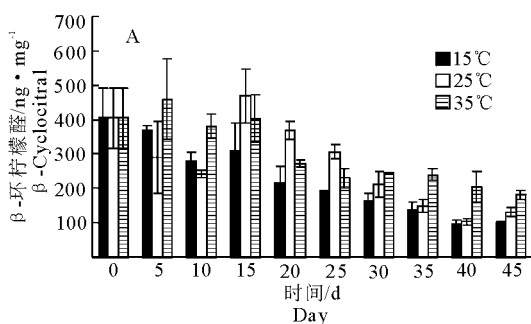


图2 温度和光强对柔细束丝藻 (WH-1) β-cyclocitral 产量的影响

Fig. 2 Effects of temperature and light intensity on β-cyclocitral production by *Aphanizomenon gracile* (WH-1)

2.3 温度和光强对柔细束丝藻 Geosmin 产量的影响

由图3可知,温度、光强对柔细束丝藻 WH-1 Geosmin 产量均有显著影响。Geosmin 产量在各处理组间均表现出先上升、后下降的趋势;但相较于光强,其产量对于温度的影响更为敏感。在实验设置范围内,Geosmin 产量随着温度升高而降低(图3-A),15°C 处理组的产量显著高于其它2组 ($P < 0.05$),并在第15天达最大值 [$(7109.8 \pm 1758.2) \text{ ng/mg}$]。不同温度处理下,最大 Geosmin 产量均出现在第15天。

不同光强处理下(图3-B),第5-15天弱光处理组 [$15 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 显著低于其他处理组 ($P < 0.05$);而培养后期(第20-45天)各处理组间无显著性差异。第10天,强光 [$35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 和中等光强 [$25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 处理组同时达到最大值,分别为 $(6519.9 \pm 432.5) \text{ ng/mg}$ 和 $(6343.5 \pm 520.9) \text{ ng/mg}$,随后不断下降;表明在低温、高光强的生长条件下,有利于 Geosmin 的产生。

2.4 温度和光强对柔细束丝藻 β-Ionone 产量的影响

不同温度和光强对柔细束丝藻 β-Ionone 影响

以上结果表明,高温、低光的不利生长条件有利于柔细束丝藻积累 β-Cyclocitral。

的趋势基本一致(图4)。各处理组均都表现出先增大、后下降的趋势。不同温度的处理之间存在显著性差异(图4-A),低温处理组(15°C)仅在第5天便达到最大值 [$(2566.8 \pm 85.5) \text{ ng/mg}$],且显著高于其它处理组 ($P < 0.05$),随后一直呈现下降的趋势。室温处理组(25°C)在培养初期(第0-10天) β-Ionone 含量处于较低水平,而在随后(第15天)达到最大值 [$(4180.8 \pm 525.5) \text{ ng/mg}$],并显著高于其它处理组 ($P < 0.05$)。高温处理组(35°C)在前15d时,β-Ionone 含量不断增加,在第15天时达最大值 [$(3310.7 \pm 422.2) \text{ ng/mg}$]。

不同光强处理下(图4-B),中等光强处理组 [$25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 的 β-Ionone 含量在第10天便达到最大值 [$(1841.3 \pm 805.1) \text{ ng/mg}$],随后不断下降;而弱光处理组 [$15 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 最晚达到最大值 [$(1687.5 \pm 85.3) \text{ ng/mg}$]。培养初期(第5-15天)中等光强处理组 [$25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 的 β-Ionone 含量显著高于其他处理组 ($P < 0.05$),但随后(第20-30天)弱光处理组 [$15 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 的 β-Ionone 含量高于其他处理组。培养后期(第35-45天)各处理组之间无显著性差异,强光处理组 [$35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 的 β-Ionone 含量在整个培养

过程中均低于其他处理组。实验结果表明, 与温度和光强对 β -Cyclocitral 产量的影响相似, 在高温、低

光的不利生长条件下, 柔细束丝藻会产生更多的 β -Ionone。

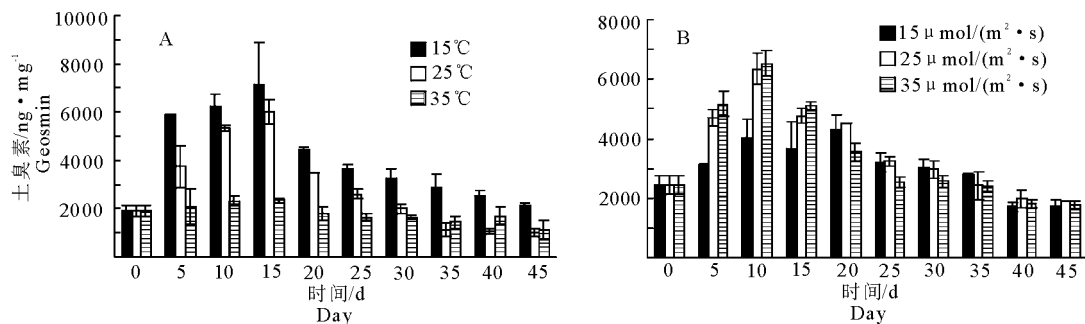


图 3 温度和光强对柔细束丝藻 (WH-1) Geosmin 产量的影响

Fig. 3 Effects of temperature and light intensity on geosmin production by *Aphanizomenon gracile* (WH-1)

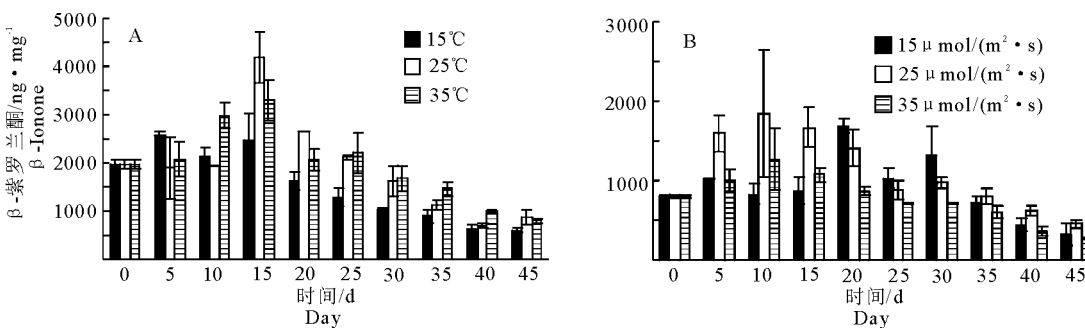


图 4 温度和光强对柔细束丝藻 (WH-1) β -Ionone 产量的影响

Fig. 4 Effects of temperature and light intensity on β -Ionone production by *Aphanizomenon gracile* (WH-1)

2.5 温度和光强对柔细束丝藻溶解态 Geosmin 产量的影响

不同温度条件下柔细束丝藻溶解态 Geosmin 产量发生了显著的变化(图 5-A)。3 处理组均呈现先上升、后下降的趋势, 低温处理组 (15°C), 溶解态 Geosmin 第 5 天最先达到最大值 [(500.3 ± 22.3) ng/mg], 随后下降。室温处理组 (25°C) 在第 15 天后显著高于其它处理组 ($P < 0.05$), 并在第 25 天达最大值 [(760.9 ± 11.1) ng/mg]。高温处理组 (35°C) 溶解态 Geosmin 产量在整个培养过程中均低于其他处理组。

光强对溶解态 Geosmin 产量的变化出现先增加、后下降、再上升的趋势(图 5-B)。弱光处理组 [15 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 和强光处理组 [35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 其产量在第 10 天最先达到最大值, 分别为 (132.6 ± 48.4) ng/mg 和 (182.8 ± 17.4) ng/mg, 随后中等光强 [25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 处理组在第 15 天达最大值 [(147.8 ± 10.3) ng/mg]; 在培养后期 (第 30-45 天) 强光处理组 [35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] 显著高于其它处理组。与 Geosmin 总产量的对比发现, 在有利于柔细束丝藻生长条件下 (低温、强光), 溶解态 Geosmin 并未显著高于其他处理组。

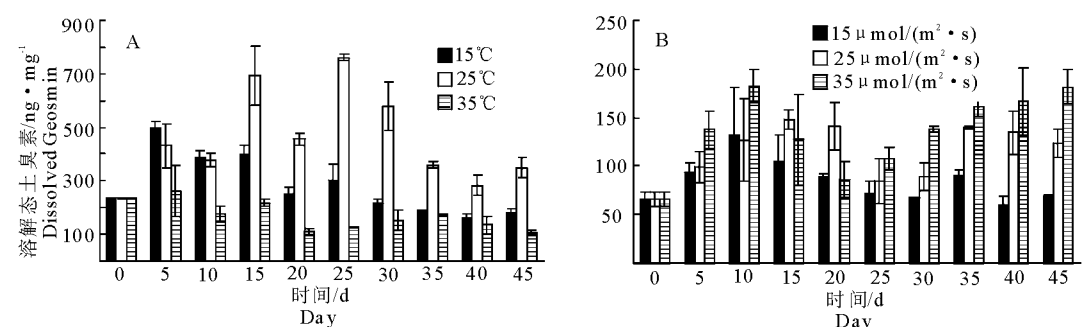


图 5 温度和光强对柔细束丝藻 (WH-1) 溶解态 Geosmin 产量的影响

Fig. 5 Effects of temperature and light intensity on dissolved geosmin production by *Aphanizomenon gracile* (WH-1)

不同温度对柔细束丝藻3种异味物质比例的影响结果表明(图6-A),同一温度处理下3种异味物质所占比例相对恒定,但不同温度处理组之间异味比例差异性较为显著。随着温度的升高,Geosmin所占比例不断减少,而 β -Cyclocitral和 β -Ionone的占比呈上升趋势。低温处理组(15℃)的Geosmin比例显著高于其它处理条件,而 β -Ionone的比例显著

低于其它处理组。

随着培养时间的延长,不同光强对3种异味物质所占比例无显著影响(图6-B),Geosmin产量始终在3种异味物质中占绝对优势(>65%), β -Cyclocitral所占比例最少(<5%)。随着光强的增大,Geosmin占比出现一定程度的增加,但与其他2组处理相比,并没有显著性差异。

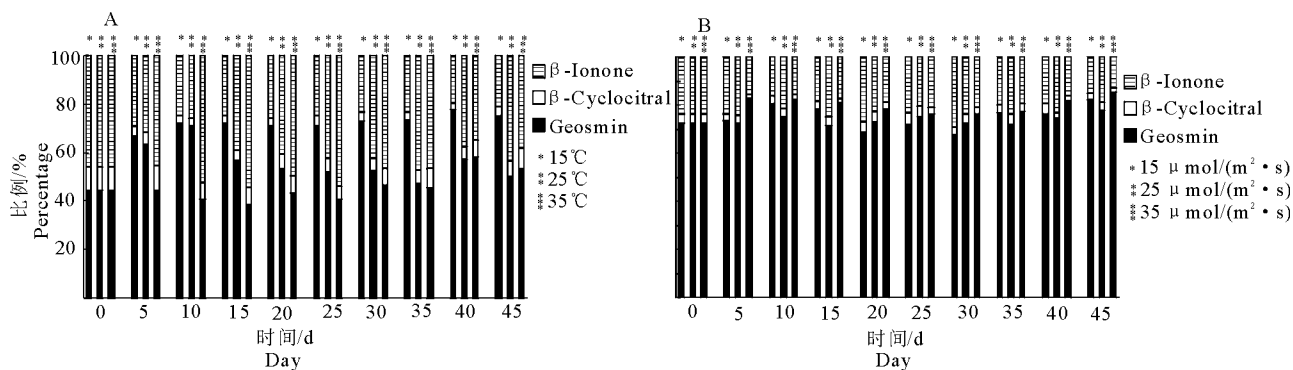


图6 温度和光强对柔细束丝藻(WH-1)3种异味物质产量比例的影响

Fig. 6 Effects of temperature and light intensity on the relative amounts of the three odorous compounds produced by *Aphanizomenon gracile* (WH-1)

3 讨论

3.1 温度和光强影响柔细束丝藻生长与异味物质产生的比较

温度和光强对束丝藻的生长及代谢的影响一直备受关注。Wu等(2010)对滇池研究发现,温度是水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)和铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)演替的决定性因素,束丝藻在每年冬春季节大量繁殖(水温达17℃左右时束丝藻水华爆发),随着气温的升高,微囊藻逐渐成为优势种。Tsujiura等(2001)研究表明,与其他水华蓝藻相比,水华束丝藻在冬季更具优势,8℃时仍可正常生长,表明这种蓝藻具有一定的耐低温性。本研究在实验室条件下同样发现柔细束丝藻WH-1在低温下(15℃)的生物量显著高于其他处理组。然而,也有报道束丝藻水华发生在水温较高的夏季(Carmichael et al, 2000),这可能由于种间的差异性导致。光照作为光合作用的唯一能量来源,对蓝藻的生长、代谢具有重要的影响。结合野外光强测量结果,将光强设置在15~35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的范围内,可见柔细束丝藻WH-1均可正常生长,且中等光强[25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]处理组与强光处理组[35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]之间无显著性差异,即使在15 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件下,藻细胞仍可正常生长,这可能是由于柔细束丝藻具有伪空胞,能根据环境

状况调节自身的浮力,使其能最大程度获取所需的光照强度,从而改变细胞的代谢速率;也可能是相较于光强,温度对柔细束丝藻生长和异味物质产量影响更为显著的重要原因。

3.2 环境因子对异味物质产量影响的差异性

异味物质在生物体内通过类异戊二烯途径(Isoprenoid Pathway)合成,而蓝藻正是通过此途径合成光合色素(Naes & Post, 1988);因此,异味物质的合成可能受到多种环境因子的影响,同时推测Geosmin的合成与光合活性呈负相关(Zimba et al, 1999)。研究表明,在鱼腥藻(*Anabaena* sp.)中叶绿素a和Geosmin产量呈负相关关系(Blevins et al, 1995; Saadoun et al, 2001);Zhang等(2009)在库氏鞘丝藻(*Lyngbya kuetzingii*)的研究中也得到同样的结论;在对假鱼腥藻(*Pseudanabaena* sp.)和乌克兰鱼腥藻(*A. ucrainica* CHAB2155)的研究同样表明,不利的生长条件会增加Geosmin的产量(王中杰, 2012);然而,在一些研究中出现了相反的结果,即Geosmin产量同藻株生长状况呈正相关关系。通过对颤藻(*Oscillatoria brevis*)在不同光强下研究表明,Geosmin的产量和叶绿素a呈正相关关系(Naes et al, 1985)。本研究同样发现Geosmin产量同柔细束丝藻藻株生长状况呈正相关关系,即适宜生长条件下(低温、强光)Geosmin产量最高;因此,环境因素(如温度、光强)对异味物质合成的影响表现出藻类

种间的差异性。随着对萜类化合物合成途径的研究不断深入,发现其有2条不同的合成途径即2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径和甲羟戊酸(MVP)途径,然而蓝藻通过何种途径产生 Geosmin 尚无明确定论。Kuzuyama(2002)在1株不产 Geosmin 的集胞藻(*Synechocystis* sp.)中发现其存在 MEP 合成途径的相关基因,表明蓝藻可能利用 MEP 途径,但在构建 Geosmin 合成酶基因系统发育树时发现,蓝藻与粘细菌(*myxobacteria*)具有更近的亲缘关系,说明蓝藻可能类似粘细菌利用 MVP 途径进行异味物质合成(Zhang et al, 2014)。

在某些高等植物中, β -类胡萝卜素(β -Carotene)经类胡萝卜素双加氧酶(CCD1)裂解产生 β -Ionone(Schwartz et al, 2001; Simkin et al, 2004)。对于原核生物蓝藻是否存在同样的合成途径,尚无相关报道。在微囊藻中(*Microcystis*)发现 CCD 可裂解 β -Carotene 产生 β -Cyclocitral(Jüttner & Höflacher, 1985)。 β -Carotene 作为光合作用的辅助色素同样经萜类化合物合成途径合成,因此推测环境因素可能会对 β -Cyclocitral 产量产生影响。对微囊藻 PCC7806 研究发现(代志刚, 2013),不利条件有利于 β -Cyclocitral 的积累;本研究同样发现藻细胞在生长不利条件下(高温、低光强),对 β -Ionone 和 β -Cyclocitral 均有一定程度的促进作用。根据此研究结果,推测蓝藻 β -Ionone 的合成可能与高等植物类似,也由 β -Carotene 裂解产生。由于 β -Cyclocitral 较高的嗅味阈值($1.9 \times 10^4 \text{ ng/L}$),并且其在3种异味物质中所占比例最高仅为9.4%,因此实验过程中感知到的草木味主要来源于 β -Ionone。

研究过程中发现溶解态 Geosmin 与总 Geosmin 产量之间无相关性,在室温(25°C)、强光[$35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]下溶解态 Geosmin 产量会有所增加,然而溶解态 β -Cyclocitral 和 β -Ionone 在各处理组中含量均很低。对柔细束丝藻 WH-1 整个生长周期的监测发现,这3种异味物质即使在衰亡期也不会大量释放,表明藻细胞正常生长过程中所产生异味物质主要储存于细胞内部,但关于其异味物质的作用及用途目前尚不明确;虽然其向环境中释放的异味物质质量很少,但由于其极低的嗅味阈值和易挥发的特性很容易被人们感知,而夏天的高温更加促进异味物质的挥发,很容易造成严重的水体污染事件。因此,处理藻源性异味污染时,应避免破碎藻细胞使其胞内异味物质大量释放,造成更为严重的水体污染事件。

4 结论

本研究初步了解温度和光强对柔细束丝藻 WH-1 生长及3种异味物质产生的影响。在最适生长条件[15°C 、 $35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]下,Geosmin 产量可达最大值,Geosmin 产量同藻株生长状况之间存在一定的正相关性;不利的生长条件[$25 \sim 35^\circ\text{C}$ 、 $15 \sim 25 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]有利于 β -Ionone 和 β -Cyclocitral 的积累。虽然藻细胞生长过程中产生大量 Geosmin,但大部分保留在细胞内部,不利的生长条件会促进其释放。溶解态 β -Ionone 和 β -Cyclocitral 含量一直在检测线附近波动,表明这3种异味物质主要积累于藻细胞内部,在藻细胞生长过程中仅少量释放出来。

参考文献

- 代志刚. 2013. 蓝藻异味物质 β -环柠檬醛产生及其生物降解的研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所.
- 邓绪伟,陶敏,张路,等. 2013. 洞庭湖水体异味物质及其与藻类和水质的关系[J]. 环境科学研究,26(1): 16 - 21.
- 李林,宋立荣,甘南琴,等. 2005. 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,33(8): 1058 - 1062.
- 王中杰. 2012. 蓝藻土霉异味物质合成基因的研究及其生态应用[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所.
- 徐盈,黎雯,吴文忠,等. 1999. 东湖富营养水体中藻菌异味性次生代谢产物的研究[J]. 生态学报,19(2): 70 - 74.
- Ando A, Miwa M, Kajino M, et al. 1992. Removal of musty-odorous compounds in water and retained in algal cells through water purification processes[J]. Water Science & Technology, 25(2): 299 - 306.
- Ballot A, Fastner J, Wiedner C. 2010. Paralytic Shellfish Poisoning Toxin-Producing Cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany[J]. Applied and Environmental Microbiology, 76(4): 1173 - 1180.
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, et al. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel[J]. Journal of Phycology, 33(4): 613 - 616.
- Blevins W, Schrader K, Saadoun I. 1995. Comparative physiology of geosmin production by *Streptomyces halstedii* and *Anabaena* sp. [J]. Water Science and Technology, 31(11): 127 - 133.
- Carmichael W W, Drapeau C, Anderson D M. 2000. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs Ex Born &

- Flah. var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for Human Dietary Use[J]. Journal of Applied Phycology, 12(6): 585 – 595.
- Gerber N, Lechevalier H. 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes[J]. Applied Microbiology, 13(6): 935 – 938.
- Giglio S, Jiang J, Saint C P, et al. 2008. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria[J]. Environmental Science & Technology, 42(21): 8027 – 8032.
- Kuzuyama T. 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 66(8): 1619 – 1627.
- Liu Y M, Chen W, Li D H, et al. 2006. Analysis of paralytic shellfish toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China[J]. Environmental Toxicology, 21(3): 289 – 295.
- Ludwig F, Medger A, Boernick H, et al. 2007. Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of *geoA*-Like genes in a drinking water reservoir[J]. Applied and Environmental Microbiology, 73(21): 6988 – 6993.
- Marsili R, Miller N, Kilmer G, et al. 1994. Identification and quantitation of the primary chemicals responsible for the characteristic malodor of beet sugar by purge and trap GC-MS-OD techniques [J]. Journal of Chromatographic Science, 32(5): 165 – 171.
- Naes H, Aarnes H, Utkilen H, et al. 1985. Effect of photon fluence rate and specific growth rate on geosmin production of the cyanobacterium *Oscillatoria brevis* (Kütz) Gom[J]. Applied and Environmental Microbiology, 49(6): 1538.
- Naes H, Post A F. 1988. Transient states of geosmin, pigments, carbohydrates and proteins in continuous cultures of *Oscillatoria brevis* induced by changes in nitrogen supply [J]. Archives of Microbiology, 150(4): 333 – 337.
- Saadoun I M K, Schrader K K, Blevins W T. 2001. Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by *Anabaena* sp. [J]. Water Research, 35(5): 1209 – 1218.
- Schrader K K, Blevins W T. 2001. Effects of carbon source, phosphorus concentration, and several micronutrients on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedii* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 26(4): 241 – 247.
- Schulz S, Fuhlendorff J, Reichenbach H. 2004. Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus* [J]. Tetrahedron, 60(17): 3863 – 3872.
- Schwartz S H, Qin X, Zeevaert J A. 2001. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 276(27): 25208 – 25211.
- Simkin A J, Underwood B A, Auldrige M, et al. 2004. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta – ionone, a fragrance volatile of petunia flowers [J]. Plant Physiology, 136(3): 3504 – 3514.
- Sugiura N, Iwami N, Inamori Y, et al. 1998. Significance of attached cyanobacteria relevant to the occurrence of musty odor in Lake Kasumigaura [J]. Water Research, 32(12): 3549 – 3554.
- Tsujimura S, Ishikawa K, Tsukada H. 2001. Effect of temperature on growth of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Biwa and Lake Yogo [J]. Phycological Research, 49(4): 275 – 280.
- Tung S C, Lin T F, Yang F C, et al. 2008. Seasonal change and correlation with environmental parameters for 2-MIB in Feng-Shen Reservoir, Taiwan [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 145(1 – 3): 407 – 416.
- Walve J, Larsson U. 2007. Blooms of Baltic Sea *Aphanizomenon* sp. (cyanobacteria) collapse after internal phosphorus depletion [J]. Aquatic Microbial Ecology, 49(1): 57 – 69.
- Watson S B. 2003. Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity [J]. Phycologia, 42(4): 332 – 350.
- Whelton A J, Dietrich A M. 2004. Relationship between intensity, concentration, and temperature for drinking water odorants [J]. Water Research, 38(6): 1604 – 1614.
- Wu W, Li G, Li D, et al. 2010. Temperature may be the dominating factor on the alternant succession of *Aphanizomenon flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa* in Dianchi Lake [J]. Fresenius Environmental Bulletin, 19(5): 846 – 853.
- Yamamoto Y, Nakahara H. 2006. Importance of interspecific competition in the abundance of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae) [J]. Limnology, 7(3): 163 – 170.
- Zhang T, Li D, Wang G, et al. 2014. Identification and expression analysis of the gene associated with geosmin production in *Lyngbya kuetzingii* UTEX 1547 (cyanobacteria) [J]. Harmful Algae, 39: 127 – 133.
- Zhang T, Li L, Song L, et al. 2009. Effects of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 21(3): 279 – 285.
- Zimba P V, Dionigi C P, Millie D F. 1999. Evaluating the relationship between photopigment synthesis and 2-methylisoborneol accumulation in cyanobacteria [J]. Journal of Phycology, 35(6): 1422 – 1429.

Effects of Temperature and Light on Production of Three Odorous Compounds by *Aphanizomenon gracile*

ZHOU Wei-cheng^{1,2}, WANG Su-qin^{1,2}, GAO Xiang^{1,2}, GUO Liang-liang^{1,2}, DAI Liang-liang^{1,2}, LI Gen-bao¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072, P. R. China;
2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, P. R. China)

Abstract: Cyanobacteria blooms not only influence water quality, but also produce secondary metabolites including toxins and odorous compounds. Research indicates that cyanobacteria are the primary producer of off-flavor episodes in water bodies. *Aphanizomenon gracile* is observed in water bodies worldwide and often becomes the dominant species in freshwater cyanobacteria blooms because it is highly adaptable to a range of environmental conditions. Summer is the season when off-flavor episodes are most frequent due to high temperature, but research has confirmed that low temperature and low light favor the accumulation of odorous compounds. In this investigation, we studied the effects of temperature and light intensity on the growth and off-flavor production of *Aphanizomenon gracile*, as well as the allocation of extra-and intracellular production of odorous compounds. The study provides a theoretical basis for control and removal of substances that give off-flavor to water. A cyanobacteria strain, labeled as WH-1, was isolated from a lake with an odorous algal bloom in Wuhan Fountain Park in March, 2013, and identified as *Aphanizomenon gracile*. The cyanobacteria was cultured in aerated BG11 medium at $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, under an illumination of $20\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ and a photoperiod cycle of 12 h light:12 h dark. *Aphanizomenon gracile* in the exponential growth phase was removed from the medium and centrifuged. Flasks containing BG-11 medium was inoculated with the cells, which were then cultured at three temperatures (15, 25 and 35°C) and three light intensities [$15, 25, 35\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], with all treatments run in triplicate. Total and dissolved concentrations of the three odorous compounds were determined every 5 days. The substances responsible for the off-flavor episodes, β -Cyclocitral, geosmin and β -Ionone, were analyzed by head space solid phase micro-extraction (HS-SPME). Results indicate the following: (1) Low temperature (15°C) and high light intensity [$35\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] promoted the growth of *Aphanizomenon gracile*. (2) Production of geosmin was positively related to the growth of *Aphanizomenon gracile* but dissolved geosmin in the low temperature and high light treatments was not significantly higher than in other treatment groups. (3) Higher temperature ($25 - 35^\circ\text{C}$) and lower light intensity [$15 - 25\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$] favored the accumulation of β -Cyclocitral and β -Ionone in cells. (4) Dissolved β -Cyclocitral and β -Ionone always remained at low levels (near the detection limit), suggesting that β -Cyclocitral and β -Ionone are primarily stored in cells and only small amounts are released. (5) Temperature had a larger effect than light intensity on the production of the three odorous compounds by *Aphanizomenon gracile*.

Key words: temperature; light intensity; *Aphanizomenon gracile*; β -Cyclocitral; geosmin; β -Ionone