

致嗅放线菌的分离培养及其致嗅代谢物的测定

李学艳^{1,2}, 沈吉敏¹, 陈忠林¹, 马 军¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090;

2. 同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092, E-mail: lxyhit@sina.com)

摘 要: 为研究放线菌代谢致嗅物质的影响因素, 对典型的致嗅放线菌进行分离和培养. 分别采用液体培养基和固体培养基对放线菌进行培养和分析, 同时利用气相色谱质联用仪 (GC-MS) 对培养过程代谢嗅味物质进行定性和定量分析. 经过分离和鉴定, 能代谢嗅味物质二甲基苄醇 (MB) 和土臭素 (geosmin) 的典型菌种是淡黄链霉菌 (又名放线菌 5460), 发现培养方式、培养基组分、培养基中溶解氧、培养温度等都会影响放线菌的代谢嗅味物质的种类和质量浓度. 目标菌在液体培养和平板培养时均产生嗅味物质, 但种类有所不同, 在液体培养时只产生 geosmin, 而在平板培养则检测出 MB 和 geosmin. GC-MS 谱图分析发现有其他嗅味物质如苯甲醇和 2-甲基苄烷, 它们很可能是水体另外臭味物质的产生源.

关键词: 饮用水; 放线菌; 2-甲基苄醇; 土臭素; 代谢产物

中图分类号: X703.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0367-6234(2008)04-0563-05

Isolation and cultivation of actinomycetes causing T&Os and detection of its metabolized T&O compounds

LI Xue-yan^{1,2}, SHEN Jimin¹, CHEN Zhong-lin¹, MA Jun¹

(1. State Key Lab of Urban Water Resource and Environment, School of Municipal and Environmental Engineering,

Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource

Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China, E-mail: lxyhit@sina.com)

Abstract: To research the factors affecting *Actinomycete* on producing T&Os, one *Actinomycete* was isolated from the soil. By isolation, separation and cultivation, *Streptomyces flaveolus* (also named *Actinomycetes* 5460) that produced MB and geosmin was obtained from soil. By using liquid medium and solid medium, *Actinomycetes* were cultivated in mass and the metabolic products of T&Os in the medium were detected by GC-MS. The results showed that culture phases, composition of culture medium, dissolved oxygen and temperature all affected the amount of metabolized T&O compounds. GC-MS results showed that the taste and odor compounds were different in liquid medium and in plates. There was geosmin in liquid medium, and both MB and geosmin were detected in the plate culture. Furthermore, other compounds were found, such as benzyl alcohol and 2-methylbornane, which are possibly other taste and odor sources of drinking water.

Key words: drinking water; *Actinomycete*; 2-Methylbornane; geosmin; metabolic products

嗅、味已成为世界各国给水处理中普遍存在的一个问题, 日益引起人们的重视^[1,2]. 一般认为水体中的臭味物质主要来源于微生物的代谢^[3-5], 水体

中放线菌是产生土霉味的代表, 如 geosmin 就是放线菌产生的次级代谢产物, 放线菌是一类与人类关系非常密切的微生物, 有关放线菌的分离方法在国内外已有大量文献报道, 但都存在着抑制剂以及特异放线菌的选择性分离问题^[6]. 为了进一步研究水体典型嗅味物质如 MB、geosmin 的来源及其在水体生长繁殖过程代谢致嗅物质的变化, 对土壤中的放线菌进行分离培养, 考察培养基、培养条件等对

收稿日期: 2006-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50378028).

作者简介: 李学艳 (1976—), 女, 博士;

陈忠林 (1967—), 男, 博士, 教授, 博士生导师;

马 军 (1962—), 男, 博士生导师, 长江学者特聘教授.

代谢致嗅物的影响因素,为预防和控制实际饮用水源中的嗅味污染提供参考。

1 实验

1.1 仪器与材料

Olympus BHS显微镜(日本,奥林巴斯);Olympus PM-10 ADS全自动相机(日本,奥林巴斯);超声波发生器(上海超声波仪器厂);电热恒温震荡培养箱(DH2B-500,上海跃进医疗器械厂)。

1.2 放线菌的分离、筛选、放大培养

采用稀释法分离,利用重铬酸钾抑制真菌和细菌的生长。将采集的土样在室温条件下风干 10~20 d后,再将 1/10土壤悬浮液于 40 和 pH=7 的条件下,加 6%酵母膏和 5 mmol/L 磷酸缓冲液,震荡 20 min,用水稀释至 1/100。然后用平板稀释法将菌接在高氏 1号琼脂^[7]+重铬酸钾的平板培养基上,培养 7 d后挑菌分离,将成熟的放线菌单株菌及时转接到改良高氏 1号培养基(I号培养基)和 II号培养基(II号培养基仅将 I号培养基的营养琼脂换成琼脂粉)斜面上,再继续放大培养,培养时间为 6~20 d,培养温度为 30 。

1.3 嗅味物质的测定方法

嗅味物质采用嗅味阈值和 GC/MS两种方法进行测定。嗅味阈值法:在规定培养时间,不同人员进行直接嗅味测定,取平均值。GC/MS法:将不同培养时间的样品,用移液管取一定量重蒸过的 CH_2Cl_2 溶剂加入到培养皿中,盖好,浸渍 2 min,将培养皿中的 CH_2Cl_2 倒入梨形瓶中,重复数次,当接近梨形瓶的有效容积时,用 KD 浓缩器浓缩至 1 mL,通过 GC-MS进行定性和定量测定^[8]。

2 结果与讨论

2.1 抑制剂重铬酸钾最佳质量浓度的确定

从表 1 可以看出,培养基中加入重铬酸钾的质量浓度从 5 mg/L 变化到 150 mg/L 时,放线菌菌落数大致保持在同一个水平,而细菌菌落数和真菌菌落数显著下降。当重铬酸钾质量浓度为 250 mg/L 和 300 mg/L 时,虽然细菌和真菌的生长得到了抑制,但放线菌的出菌率也大为下降,对放线菌的出菌分离结果影响显著。所以,抑制剂重铬酸钾的质量浓度定为 200 mg/L 较为适宜。最后将平板培养基中抑制剂重铬酸钾确定为 200 mg/L,其他成分不变。

2.2 放线菌菌落形态的观察

放线菌的菌落形状很容易与其他微生物区分,这是因为放线菌能产生大量的基内菌丝,并伸

入培养基内,而气生菌丝又紧贴在培养基的表面交织成网,菌落生长比较牢固,不易挑取。菌落起初比较光滑如发状缠绕,当气生菌丝长出孢子后,就成为各种颜色的粉状菌落,与细菌有明显的差异。初期筛选出的菌种中分离出致嗅放线菌菌株,链霉菌属中的淡黄链霉菌放线菌 5460 (*Streptomyces flaveolus*),将其作为目标菌种,其显微镜形态见图 1。从图中可以看到其菌落特征:基丝发育良好、气丝丰茂,产生成长链的孢子气丝黄色,孢子丝松螺旋形,不产生黑色素,孢子带毛发。由图 2~4 的菌落特征图可以看出,菌落正面为白色,表面的孢子较少,比较干燥,菌落相对来说较大,十分不易挑起,菌落背面呈黄色。比较固体培养基和液体培养基菌落特征,发现固体平板培养基表面菌落微发灰色,表面干燥,并且表面有大量孢子,成明显粉末状;两种固体培养基菌落特征也有部分差异,这可以从图 3,4 看出。

表 1 不同质量浓度重铬酸钾下平板培养放线菌分离结果

(重铬酸钾) mg·L ⁻¹	放线菌 个·皿 ⁻¹	细菌 个·皿 ⁻¹	真菌 个·皿 ⁻¹
50	65	60	8
150	67	58	7
200	54	2	0
250	15	1	0
300	21	0	0

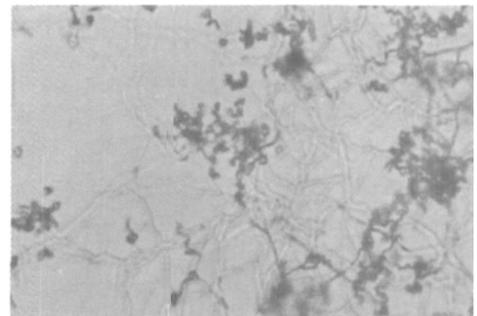


图 1 链霉菌显微图 (*Streptomyces flaveolus*)

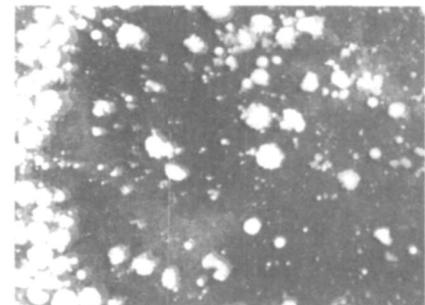


图 2 液体培养基菌落形态 (20 ×40)

图 2 为液体培养的形态图。在培养液中形成了大量的分枝菌丝体,但培养基液不混浊,通常基丝发育良好、气丝丰茂,产生长链的孢子,菌丝体相互缠绕成颗粒状,均分散在培养基底部。在培养

基中还有一些游离的、小的白色带分支的毛状菌体,菌丝整体为纯白色.通过显微镜检,发现菌丝体长链孢子相互缠绕,孢子表面带毛发.在液体培养过程中还发现,菌种培养的前期,培养基呈无色透明.在培养大约 12 d 以后,培养基变成黄色的澄清液体,这与该菌种的生理特性相符合,其代谢出的黄色素导致培养基颜色变化.

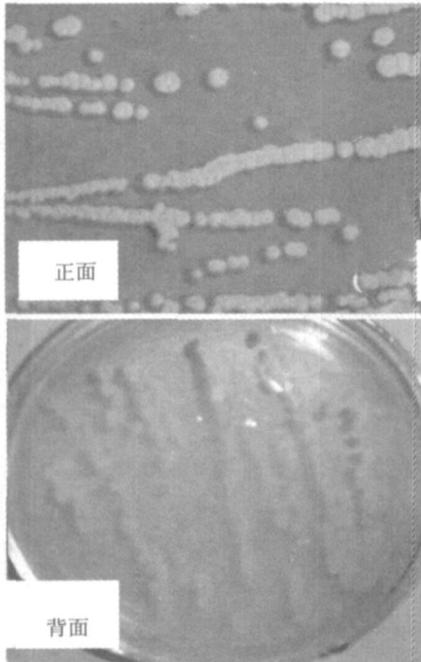


图 3 固体培养基 (D) 菌落形态

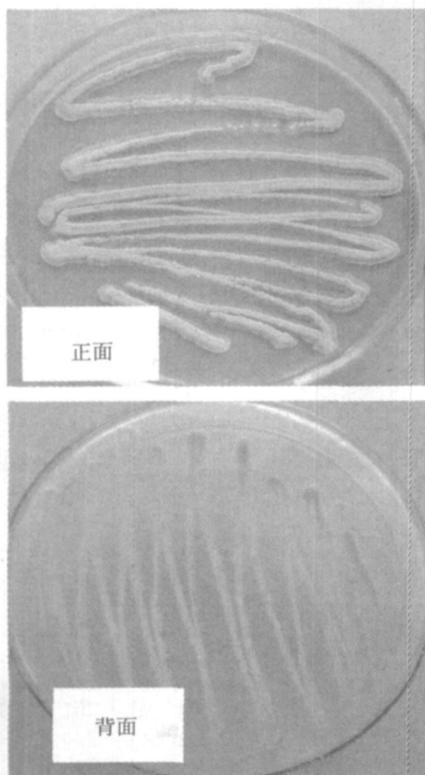


图 4 固体培养基 (II) 上菌落形态

2.3 代谢产物臭味物质 GC - MS 测定

对前期分离出的放线菌在平板培养时的代谢产物进行 GC - MS 测定,从图 5 可以看出,在平板培养皿中有臭味物质 MB 和 geosmin 的存在,其中 MB 的质量浓度比 geosmin 的高很多.实际水体中有报道 MB 在臭味发生的高峰期质量浓度比其他 4 种臭味物质 (Geosmin、IPMP、BMP、TCA) 均高出 10 ~ 100 倍,可能是放线菌代谢出 MB 的量要比 geosmin 大^[10].

对在液体培养和平板培养 GC - MS 测定结果进行分析 (图 6),发现放线菌除了产生典型土霉味臭味物质 MB 和 geosmin 外,还检测到其他臭味物质,结果见表 2.

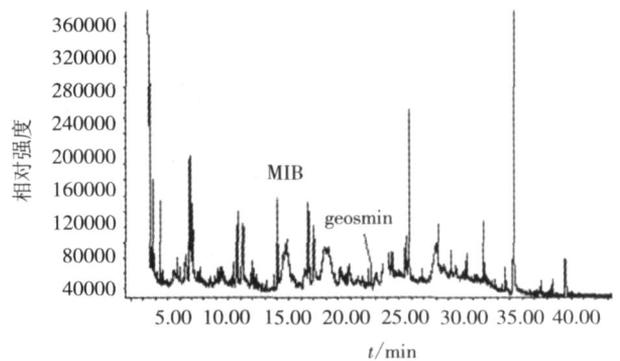


图 5 放线菌在液体培养基中代谢产物的 GC - MS 质谱图

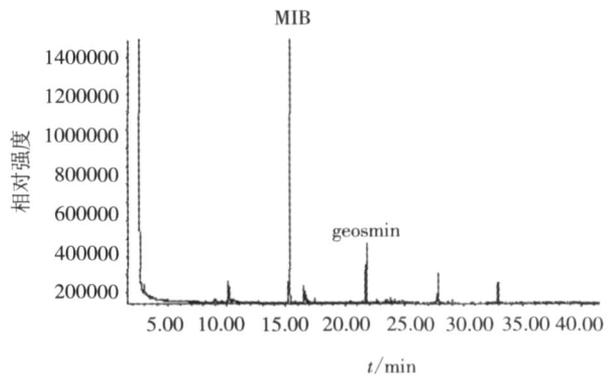


图 6 固体培养基 (II) 浸提液的 GC - MS 谱图

从这些结果可以看出,放线菌生长过程中产生很多含氮化合物,这些含氮化合物嗅阈值较高,对水体臭味贡献相对较小.在平板和液体培养时,放线菌的代谢产物种类不大相同,但都有代谢产物 geosmin 利用 GC - MS 分析平板培养菌体的代谢产物,一共检测到 14 种物质,除了 MB 和 geosmin 外,2 - 甲基苜蓿烷代谢也很旺盛,它可能是另一种产生土霉味的物质.另外 2 - 甲基 - 2 - 苜蓿烯、1 氢 - 环戊烷 [1,3] 环丙烷 [1,2] 苯等也可以发出很强烈的气味.在液体培养时检测到 14 种物质,除了常见的 geosmin 外,同时又检测到了另一

种典型臭味物质苯甲醇,它也是放线菌代谢的土霉味特征性物质.对在培养中产生的其他物质,很可能与放线菌的致臭污染有关. Tsuchiya^[9]等人

对 *Oscillatoria F. Granulata* 进行分离培养,也发现了不同培养基可以产生不同浓度的臭味物质 MB 和 geosmin

表 2 不同培养方式中放线菌代谢产物 GC-MS 检测结果

编号	平板培养代谢产物名称	液体培养代谢产物名称
1	4,6,6-三甲基-双环[3,1,1]庚-3-内-2-酮	2,4-二羟基-2,5-二甲基-咪喃-3-酮
2	2-甲基茨烷	苯酚
3	2-甲基异茨醇(MB)	2,3-二羟基丙酮
4	2-甲基-2-茨烯	四氢噻唑
5	3,4,5-三羟基苯酰胺	苯甲醇
6	1-(乙酰氨基)-2,6-二羟基吡啶	4,6-二羟基-5-甲基嘧啶
7	N-乙基-N-苯基-甲酰胺	3,5-二羟基-6-甲基-吡喃-4-酮
8	十氢-3,5-二羟基-6-甲-2-萘甲醇	2(3H)-咪喃-2-酮
9	丙酸-2-苯酰胺	2-丙烯肼
10	土味素(geosmin)	土味素(geosmin)
11	十氢-4a-三甲基-8-亚甲基萘甲-2-醇	1-(2,3,6-三甲基苯)-3-丁烯-2-酮
12	1-乙烯八氢-7a-甲基茛	吲哚甲基醋酸
13	1氢-环戊烷[1,3]环丙烷[1,2]苯	1,2,3,5,7-五甲基吲哚

2.4 影响代谢臭味物质质量浓度的因素

对目标菌种进行大量培养,在不同培养时间进行观察.接种 24 h 后,平板培养基上有少量浅灰的菌落;接种 72 h 后,培养皿中有土霉味出现,辨出较难,培养皿中土霉味逐渐增强,培养基的背面呈现土黄色;144 h 时土霉味达到最大,其菌落形态变化详见表 3.

表 3 不同培养时间菌体的生长情况

培养时间/h	结果
24	少数孢子萌发
48	部分萌发的孢子分化出营养菌丝
72	少数营养菌丝长出气生菌丝
96	多数营养菌丝长出气生菌丝
120	部分气生菌丝分化出螺旋状的孢子丝
144	大部分气生菌丝分化形成孢子丝

为了考察不同培养条件下各种臭味物质的代谢绝对强度,对几种典型臭味物质的进行了定量分析.从图 7 可以看出,在液体培养时产生的臭味物质 geosmin 随时间变化趋势与平板培养时一样,但在培养的前 10 d 没有检出 geosmin,在 20~25 d 的培养液代谢出的 geosmin 明显比 15~20 d 少,主要原因是在接种后 15 d 左右达到了放线菌生长的对数期,也是产生 geosmin 的旺盛时期,因此在控制实际水体的臭味物质时,必须在放线菌的对数生长期加以控制.同时可以看出,培养 10 d 几乎没有臭味物质产生,当培养超过 10 d 后两种臭味物质逐渐升高,到第 25 d MB 和 geosmin 的

浓度分别达到了 200 ng/L 和 130 ng/L.

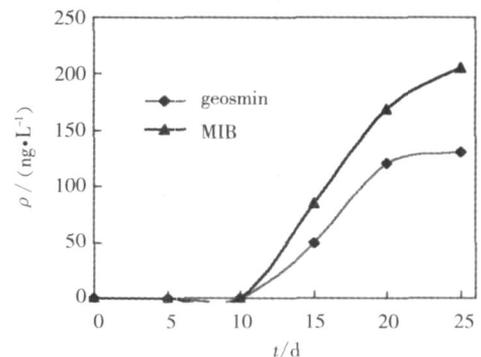


图 7 不同培养时间放线菌产生 MB 和 Geosmin 的量

放线菌是否会产生异臭,取决于水中溶解氧含量(DO)多少^[10,11].直接控制 DO 比较困难,在试验中通过改变摇床中的摇速来控制锥形瓶中培养液溶解氧量,进而分析不同培养条件下对臭味物质产生的影响.在培养箱摇床的培养液有臭味产生,同样条件下没被震荡的就没有臭味,因此培养基中溶解氧的高低直接影响着放线菌臭味物质产生.培养液产生的臭味强度不同,臭味强度随震荡强度增加而增加.臭味强度高,水中的溶解氧含量也大,更加验证了前面提到的结论.在震荡强度为 80 r/min 时,水中 DO 为 4.72 mg/L,臭味强度为 1 级;200 r/min 时,DO 为 7.23 mg/L,臭味强度为 5 级.其中蒸馏水的 DO 为 7.46 mg/L.可以说明 DO 值大小决定放线菌产臭与否,DO 越高,产生的臭味物质越多.

从表 4 可明显看出,温度为 25 和 35 时

抑制了放线菌生长. 温度过低, 菌体无法摄取足够能量, 无法进行充分繁殖生长, 代谢出的臭味物质也会受到严重影响; 温度过高, 菌体代谢旺盛, 溶解氧不足, 菌体大量死亡, 使厌氧菌大量繁殖, 导致培养基发出异臭 (非土霉味). 温度过高或过低都会抑制放线菌正常生长, 温度为 30 时放线菌最佳, 不仅菌种繁殖旺盛, 培养基液澄清, 对臭味物质代谢也旺盛, 这时菌液已有很强的土霉味.

表 4 温度对菌体臭味强度的影响

t /	菌种长势	臭味强度 / 级
20	菌体很少, 培养基几乎没什么变化	0
25	菌体生长较好, 菌量较少, 培养基澄清	1
30	菌体生长旺盛, 菌量多, 菌体呈颗粒状分散, 培养基澄清	4
35	培养基变浑浊, 目标菌种大量死亡, 内有大量霉菌	腐臭

3 结 论

1) 抑制剂重铬酸钾的质量浓度从 5 mg/L 变化到 150 mg/L 时, 放线菌菌落数大致保持在同一个水平, 而细菌菌落数和真菌菌落数显著下降, 抑制剂重铬酸钾的质量浓度定为 200 mg/L 时是最佳浓度.

2) 液体培养和固体培养, 以及培养基的成分的差异致使放线菌的菌落形态具有一定的差异, 但都有致嗅代谢物质的产生, 这些代谢产物中除了常见的 MB 和 geosmin 外, 还有其他臭味物质如苯甲醇、2-甲基-2-茨烯、2,3-二羟基丙酮、2-甲基-2-茨烯、四氢噻唑、1-(乙酰氨基)-2,6-二羟基吡啶、4,6-二羟基-5-甲基嘧啶、N-乙基-N-苯基-甲酰胺、3,5-二羟基-6-甲基-吡喃-4-酮等, 这些物质也可能是饮用水源中的异嗅物质的来源.

3) 培养时间、温度、振荡强度、溶解氧浓度等都是影响放线菌代谢致嗅物质的浓度的重要影响因素. 对分离出放线菌培养 10 d 几乎没有臭味物质产生, 当培养超过 10 d 后两种臭味物质逐渐升高, 到第 25 d MB 和 geosmin 的质量浓度分别达到 200 ng/L 和 130 ng/L.

参考文献:

- [1] MEDSKER L L, JENKNS D, THOMAS J F. Odorous compounds in natural water. 2 - exo - hydroxy - 2 - methyl - bomane, the major odorous compound produced by several actinomycetes [J]. Environment Science Technology, 1969, 3(6): 476 - 477.
- [2] 王占生, 刘文君. 微污染源饮用水处理 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1999.
- [3] JENSEN S E, ANDERS C L, COATCHER L J, *et al*. Actinomycetes as a factor in odour problems affecting drinking water from the north Saskatchewan River [J]. Water Research, 1994, 28(6): 1393 - 1401.
- [4] NEGORO T, ANDO M, ICHIKAWA N. Blue - green algae in Lake Biwa which produce earthy - musty odors [J]. Water Science & Technology, 1988, 20(8/9): 117 - 123.
- [5] ZA IHL N B, WATSON S B. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water. Myths, tenets and truths [J]. Water Research, 2006(40): 1741 - 1753.
- [6] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定 [M]. 北京: 中国科技出版社, 1992.
- [7] 徐成勇, 袁野, 黎丹辉, 等. 选择性分离放线菌 [J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(2): 45 - 49.
- [8] 李学艳, 陈忠林, 沈吉敏. 固相萃取 - 气质联机测定水中臭味物质 2 - 甲基异茨醇和土霉素 [J]. 中国环境监测, 2006, 2: 23 - 26.
- [9] TSUCHIYA Y, MATSUMOTO A. Characterization of Oscillatoria F Granulata producing 2 - Methylisobomeol and geosmin [J]. Water Science & Technology, 1999, 40(6): 245 - 250.
- [10] SAADOUN IM K, SCHRADER K K, BLEV NSW T. Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by Anabaena SP [J]. Water Research, 2001, 35(5): 1209 - 1218.
- [11] RASHASH D M C, DIERTRICH A M. The influence of grow conditions on odor - compound production by two Chrysohytes and two Cyanobacteria [J]. Water Science & Technology, 1995, 31(11): 165 - 172.

(编辑 刘 彤)