

# 蜡状芽孢杆菌在藻菌共培养系统中对水体异味的影响

杨 希<sup>1,2,3</sup>, 谢 平<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所东湖监测站, 武汉 430072; 2. 武汉市水产科学研究所, 武汉 430207; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:**选取了一株具有杀藻功能的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)与铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 在 28 ℃ 条件下共同培养, 同时利用气相色谱-质谱技术对甲硫醚(Dimethyl sulfide, DMS)、二甲基三硫醚(Dimethyl trisulfide, DMTS)、β-环柠檬醛(β-cyclocitral)等 3 种异味物质进行了测定。气质联用结果显示, 在藻类延滞期阶段, 藻菌共培养组中的 *B. cereus* 能够增加 DMS 和 DMTS 的浓度, 藻菌共培养组中 β-环柠檬醛浓度低于铜绿微囊藻单独培养组; 在藻类对数期阶段, β-环柠檬醛成为主要的异味化合物。双因素方差分析表明藻菌之间的相互关系影响异味化合物的变化, DMS 和 DMTS 同时受到微囊藻和细菌的影响, 而 β-环柠檬醛只和铜绿微囊藻的生物量呈正相关。

**关键词:**藻菌共培养; 异味化合物; 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*); 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2014)02-0301-03

## Effects of *Bacillus cereus* on Off-flavors in Algae/bacteria Co-culture System

YANG Xi<sup>1,2,3</sup>, XIE Ping<sup>1</sup>

(1. Donghu Experimental Station of Lake Ecosystems, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Wuhan Fisheries Science Research Institute, Wuhan 430207, China; 3. The University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** An experiment was conducted to study the effects of *Bacillus cereus* on off-flavors in an algae/bacteria co-culture system at 28 ℃. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyse off-flavor compounds dimethyl sulfide (DMS), dimethyl trisulfide (DMTS) and β-cyclocitral. During the lag phase of the co-culture system with *M. aeruginosa* (first fifteen days), *B. cereus* significantly increased the production of DMS and DMTS. In the exponential phase of the co-culture system (after the fifteen days), β-cyclocitral was the highest off-flavor compound. These results indicated that *B. cereus* increased the productions of DMS and DMTS in co-culture system. Two-Way ANOVA was used to investigate the effects of *M. aeruginosa* and *B. cereus* on the production of off-flavors. The results showed that both *M. aeruginosa* and *B. cereus* could increase the production of DMS and DMTS. β-cyclocitral was positively correlated with the biomass of *M. aeruginosa*.

**Key words:** co-culture system; off-flavors; *Microcystis aeruginosa*; *Bacillus cereus*

近年来,蓝藻水华引起的环境污染已经成为全世界关注的水环境问题。蓝藻水华主要是由铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)造成的,在中国众多的富营养化湖泊中频繁发生<sup>[1]</sup>。蓝藻水华带来的危害不仅包括藻毒素的释放和水体景观的破坏,其生长和腐败产生的水体异味更造成了严重的环境污染。2005 年湖北省襄樊市熊河水库发生严重异味事件<sup>[2]</sup>,2007 年太湖蓝藻水华暴发导致的强烈异味事

件更是引起了全世界的关注,也将水体异味产生的恶劣环境影响提到了亟待解决的议事日程上<sup>[3,4]</sup>。严重水体异味事件不仅给水产养殖业、景观和旅游业造成巨大的损失,也加重了水处理系统的负担<sup>[5]</sup>,所以对异味课题的探讨对解决水环境问题意义重大。

通常情况下富营养化水体异味是由一些可挥发性有机物质(Volatile organic compounds, VOCs)引起的,包括甲硫醚(Dimethyl sulfide, DMS)<sup>[6]</sup>、二甲

收稿日期:2013-04-16

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”项目(2008CB418101)

作者简介:杨 希(1983-),女,四川中江人,博士,主要从事微生物生态学研究,(电话)13657253146(电子信箱)yangxi0414@gmail.com;

通讯作者,谢 平(1961-),男,研究员,主要从事湖泊生态学研究,(电子信箱)xieping@ihb.ac.cn。

基二硫醚(Dimethyl disulfide, DMS)、二甲基三硫醚(Dimethyl trisulfide, DMTS)<sup>[7]</sup>、硫醇<sup>[8]</sup>、2-异丙基-3-甲氧基吡嗪(IPMP)<sup>[9]</sup>、 $\beta$ -紫罗兰酮( $\beta$ -ionone)<sup>[10]</sup>、二甲基异茨醇(2-methylisborneol, MIB)<sup>[11]</sup>、土味素(Geosmin, GEO)<sup>[12]</sup>和 $\beta$ -环柠檬醛( $\beta$ -cyclocitral)<sup>[13]</sup>等。在整个富营养化水体中,水华蓝藻产生的萜类化合物、硫醇和色素衍生物是大多数挥发性有机化合物的前体<sup>[14]</sup>,此外一些光合非硫细菌也可以产生甲基硫化物如甲硫醚和二甲基二硫醚等<sup>[15]</sup>,这些物质通常都是异味化合物的来源。蓝藻和微生物之间的关系影响着整个水生生态系统的能量和营养的流动循环<sup>[16]</sup>,所以异味物质与蓝藻以及异养细菌的生理生化变化有着密不可分的关系。目前一些已有的研究通常从水体异味物质的来源、光照和温度对其产生的影响和动力学方面加以探讨<sup>[17]</sup>,鲜有报道涉及水华蓝藻与异养微生物相互关系对异味物质的影响。本研究利用微囊藻与细菌的共培养系统模拟富营养化水体,以期通过阐述藻菌相互关系对异味的影响为异味物质的控制与去除提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

于2008年暴发蓝藻水华的太湖贡湖湾水体中筛选得到一株蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), *B. cereus* 被报道具有杀藻作用<sup>[18]</sup>。试验中采用的水样来自于太湖水体。*M. aeruginosa* 由中国科学院水生生物研究所藻种保存中心提供。为降低 *M. aeruginosa* 对无菌条件的影响,利用 BG-11 琼脂糖培养基对 *M. aeruginosa* 进行纯化培养<sup>[19]</sup>,然后采用 BG-11 液体培养基连续驯化,条件为温度(25±1)℃、光照为 12 h/d、光照强度 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。将上述无菌培养 *M. aeruginosa* 每周转瓶一次以保证藻生物量被控制在对数生长期。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设计 设置 28℃ 温度条件下的藻菌共培养实验系统,对照组为 *M. aeruginosa* 单独培养和 *B. cereus* 单独培养体系,处理组为 *M. aeruginosa* 和 *B. cereus* 的共培养体系。初始 *M. aeruginosa* 和 *B. cereus* 生物量分别为  $1\times 10^5$ 、 $1\times 10^7$  cells/mL。试验设计 3 个平行并持续 33 d,光照为 12 h/d,光照强度 22  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

1.2.2 铜绿微囊藻与蜡状芽孢杆菌计数 将取得的 *M. aeruginosa* 样品经鲁哥染料固定并进行镜检得到藻生物量。*B. cereus* 样品首先用 4% 的甲醛溶液固定,然后将 0.5~2.0 mL 固定样品经 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色 10~15 min<sup>[20]</sup>,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤(Whatman, Maidstone, UK),通过荧光显微镜镜检,每次镜检重复 10 个样品。

1.2.3 异味化合物测定 将溶解态的异味化合物样品-20℃保存,利用气相色谱(SHIMADZU, 2010)和质谱(SHIMADZU-QP2010 plus)进行测定<sup>[4]</sup>。

1.2.4 统计方法 异味化合物数据利用 SPSS 软件进行单因素方差分析,藻菌对异味化合物的影响通过双因素方差分析,显著差异为  $P<0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 铜绿微囊藻及蜡状芽孢杆菌生物量变化

从图 1 可以看出,藻菌共培养下的 *M. aeruginosa* 生物量在第 15 天出现明显的上升趋势,将 *M. aeruginosa* 的生长曲线划分为延滞期(0~15 d)和对数生长期(15~33 d)。

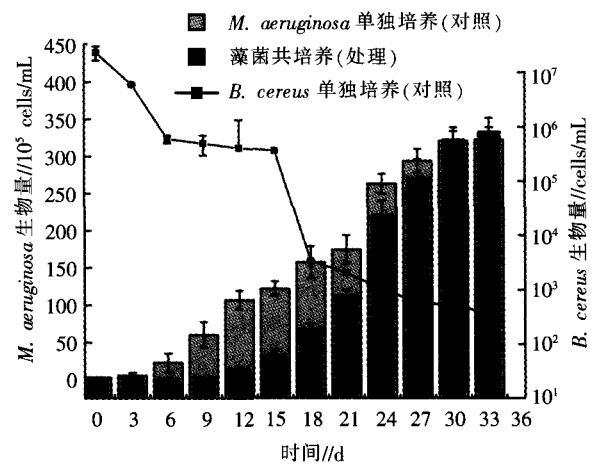


图 1 *M. aeruginosa* 及 *B. cereus* 生物量变化趋势

在整个试验过程中, *B. cereus* 生物量都呈下降趋势,而且在第 15 天下降趋势最为明显。皮尔森相关分析(Pearson correlation analysis)证明微囊藻和细菌的生长关系为相互拮抗(Pearson Correlation=-0.221,  $P=0.01$ )。也就是说,高浓度的微囊藻抑制了细菌的生长,而反过来高浓度的细菌则抑制了微囊藻的生长。据此推测,在本试验中,混合培养的藻类延滞期延长是由于 *B. cereus* 所具有的杀藻作用造成的,而当微囊藻达到对数生长期时,细菌的生长被抑制可能是由于微囊藻的分泌物(如藻毒素)造成的,但这个推测还需要进一步的试验证明。

### 2.2 异味化合物的动态变化

在藻类延滞期阶段, *M. aeruginosa* 和 *B. cereus* 对照组的 DMS 和 DMTS 均小于处理组( $P<0.05$ ) (图 2)。在水体异味物质中,属于挥发性硫化物(Volatile organic sulfur compounds, VOSCs)类的 DMS、DMS

和 DMTS 基本上均来自于藻类降解,有报道证明在这个过程中异养细菌起着很重要的作用<sup>[7]</sup>。*Bacillus* 被认为是一种具有杀藻作用的细菌属<sup>[16]</sup>,在本试验中,*M. aeruginosa* 和 *B. cereus* 均能分泌 DMS 和 DMTS,而对照组浓度低于处理组的结果说明,处理组中的 *B. cereus* 加快了 *M. aeruginosa* 的分解,提高了 DMS 和 DMTS 的产生。这一结果与之前所报道的一些研究结论相似<sup>[7]</sup>。在藻类对数生长期,处理组中的 *B. cereus* 生物量降低,*M. aeruginosa* 加速生长,DMS 和 DMTS 浓度也相应减小,这些现象证明 *M. aeruginosa* 的死亡和分解往往伴随着高浓度挥发性硫化物的产生。

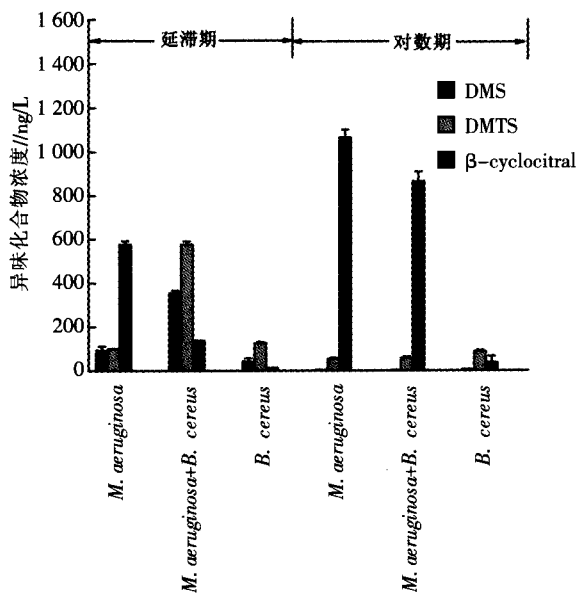


图 2 不同阶段异味化合物柱状图

在本试验中藻类处在延滞期时,*M. aeruginosa* 对照组的 β-环柠檬醛浓度均高于处理组以及 *B. cereus* 对照组;15 d 后,处理组和 *M. aeruginosa* 对照组的 *M. aeruginosa* 均进入对数生长期,而 β-环柠檬醛浓度组间无差别。这一现象有理论依据,即 β-环柠檬醛一般被认为是由微囊藻种属产生的挥发性化合物<sup>[7]</sup>,而且它的产生只和微囊藻有紧密联系<sup>[21]</sup>。结合本试验结果可知,β-环柠檬醛的产生与 *M. aeruginosa* 生长密切相关,*B. cereus* 并非 β-环柠檬醛的主要来源。

### 2.3 铜绿微囊藻、蜡状芽孢杆菌和异味化合物之间的相互关系

双因素方差分析的结果(表 1)显示,*M. aeruginosa*、*B. cereus* 以及它们之间的交互作用均对 DMS 和 DMTS 浓度有显著影响,*M. aeruginosa* 与 β-环柠檬醛之间为正相关。MIB 和 GEO 在本试验中不受到任何因素的影响。

表 1 *M. aeruginosa*、*B. cereus* 和异味化合物之间的双因素方差分析

	异味化合物		
	DMS	DMTS	β-cyclocitral
<i>B. cereus</i>	$F=123.351$ $P=0.000^{**}$	$F=8.365$ $P=0.010^{**}$	$F=0.173$ $P=0.684$
<i>M. aeruginosa</i>	$F=29.580$ $P=0.000^{**}$	$F=4.238$ $P=0.001^{**}$	$F=7.756$ $P=0.038^*$
交互作用	$F=110.924$ $P=0.000^{**}$	$F=06.920$ $P=0.001^{**}$	$F=0.867$ $P=0.527$

注:“\*”表示  $P<0.05$ ,”\*\*”表示  $P<0.01$ 。

### 3 小结

本研究证明,藻类延滞期阶段 *B. cereus* 增加了 DMS 和 DMTS 的合成,且 DMS 和 DMTS 受到 *M. aeruginosa* 和 *B. cereus* 交互作用的影响;β-环柠檬醛只和 *M. aeruginosa* 有相关性。这些结果表明异味物质的来源和影响因素较为复杂,具体情况有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 宋立荣,李 林 陈 伟,等.水体异味及其藻源次生代谢产物研究进展[J].水生生物学报,2004,28(4):435-439.
- [2] ZHANG T, LI L, ZUO Y X, et al. Biological origins and annual variations of earthy-musty off-flavours in the Xionghu Reservoir in China [J]. Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua,2010,59(4):243-254.
- [3] YANG M, YU J, LI Z, et al. Taihu Lake not to blame for Wuxi's woes[J]. Science, 2008,319(5860):158.
- [4] CHEN J, XIE P, MA Z M, et al. A systematic study on spatial and seasonal patterns of eight taste and odor compounds with relation to various biotic and abiotic parameters in Gonghu Bay of Lake Taihu,China[J]. Sci Total Environ, 2010, 409(2):314-325.
- [5] LI L, WAN N, GAN N, et al. Annual dynamics and origins of the odorous compounds in the pilot experimental area of Lake Dianchi, China[J]. Water Sci Technol,2007,55(5):43-50.
- [6] GIGER W, SCHAFFNER C. Groundwater pollution by volatile organic chemicals [J]. Studies in Environmental Science,1981, 17:517-522.
- [7] ZHANG X J, CHEN C, DING J Q, et al., The 2007 water crisis in Wuxi, China: Analysis of the origin [J]. Journal of Hazardous Materials,2010,182(1-3):130-135.
- [8] SLATER G P, BLOK V C. Volatile compounds of the Cyanophyceae. A review[J]. Water Science & Technology,1983, 15(6):181-190.
- [9] BUYER R, LING L. Earthy aroma of potatoes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1973,21(4):745-746.
- [10] HOCKELMANN C, JUTTNER F. Off-flavours in water: Hydroxyketones and beta-ionone derivatives as new odour com-

表8  $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	活菌数/ $10^{15}$ 个/mL
1	1	1	1	1	$y_1=190$
2	1	2	2	2	$y_2=200$
3	1	3	3	3	$y_3=175$
4	2	1	2	3	$y_4=165$
5	2	2	3	1	$y_5=183$
6	2	3	1	2	$y_6=212$
7	3	1	3	2	$y_7=196$
8	3	2	1	3	$y_8=178$
9	3	3	2	1	$y_9=187$
$T_1$	565	551	580	560	
$T_2$	560	561	552	608	
$T_3$	561	574	554	518	
$\bar{x}_1$	188.3	183.7	193.3	186.7	
$\bar{x}_2$	186.7	187.0	184.0	202.7	
$\bar{x}_3$	187.0	191.3	184.7	172.7	
R	5	23	28	90	

接种量4%、发酵温度30℃的条件下,酒曲质量最好,活菌数可达到 $2.12 \times 10^{15}$ 个/mL,比优化前单因素最高菌体产量提高了7.8倍,各种酶活也有一定

水平的提高,且极差分析表明接种量对酒曲发酵影响最为显著。本试验对分离的单酵母菌发酵条件进行了研究,但组合酵母菌发酵和用 $N_4$ 酵母制做麸曲酿造兼香型白酒应用于工业生产等问题还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 熊小毛.浓酱兼香型白云边酒生产工艺技术总结[J].酿酒科技,2007(9):35-424.
- [2] 王秀奇,秦淑媛,高天慧,等.基础生化实验[M].北京:高等教育出版社,1982.
- [3] 杨舒雯,周志江,韩 焯,等.浓香型白酒窖泥中酵母种类的研究[J].食品工业科技,2011,32(5):138-141.
- [4] 郭 霞.浓香型白酒酒糟微生物分离及发酵试验[J].重庆师范大学学报(自然科学版),2005,22(1):50-52.
- [5] 胡文浪.梅酒酵母筛选、分离、纯化、选育应用[J].酿酒科技,2002(4):33-34.
- [6] 张其圣,张文学,方晓璞.新型白酒糖化发酵剂的制作工艺研究[J].中国酿造,2006,25(11):34-37.
- [7] 大连轻工学院,郑州轻工学院,湖北工学院.食品分析[M].第一版.北京:中国轻工业出版社,2002.
- [8] 熊子书.中国名优白酒酿造与研究[M].第一版.北京:中国轻工业出版社,1995.

(责任编辑 龚 艳)

(上接第303页)

- pounds of freshwater cyanobacteria[J]. Flavour and Fragrance Journal,2005,20(4):387-394.
- [11] ROSEN A A, SAFFERMAN R S, MASHNI C I, et al. Identity of odorous substance produced by *Streptomyces griseoluteus*[J]. Applied and Environmental Microbiology,1968,16(1):178-179.
  - [12] GUTTMAN L, RIJN J V. 2-Methylisoborneol and geosmin uptake by organic sludge derived from a recirculating aquaculture system[J]. Water Research,2009,43(2):474-480.
  - [13] OZAKI K, AKEMI O, CHIEKO I, et al. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds[J]. Chemosphere,2008,71(8):1531-1538.
  - [14] WASTON S B, JEFF R, BOYER G L. Boyer, taste and odour and cyanobacterial toxins: impairment, prediction, and management in the Great Lakes[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,2008,65(8):1779-1796.
  - [15] MCCARTHY S, TOM C, MICHELE M, et al. Phototrophic bacteria produce volatile, methylated sulfur and selenium compounds[J]. Fems Microbiology Letters,1993,112(1):93-97.
  - [16] FRAZIER A D, ROWEL J M, RENTZ C A, et al. Bacterial lysis of aureococcus anophageggerens CCMP 1784 (pelagophyceae)[J]. Journal of Phycology,2007,43(3):461-465.
  - [17] 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.
  - [18] NAKAMURA N, NAKANO K, SUGIURA N et al. A novel cyanobacteriolytic bacterium, *Bacillus cereus*, isolated from a Eutrophic Lake[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2003,95(2):179-184.
  - [19] STANIER R Y, KUNISAWA R, MANDELL M, et al., Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews,1971,35(2):171-205.
  - [20] PORTER K, FEIG Y S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora[J]. Limnology and Oceanography,1980,25(5):943-948.
  - [21] HARADA K, OZAKI K, TSUZULI S, et al. Blue color formation of cyanobacteria with  $\beta$ -Cyclocitral [J]. Journal of Chemical Ecology,2009,35(11):1295-1301.

(责任编辑 龚 艳)