

盐度对早期链霉菌产生二甲基异茨醇和土臭味素的影响

徐立蒲^{1,2} 潘 勇¹ 曹 欢¹ 王静波¹ 熊邦喜²

(1. 北京市水产技术推广站, 北京 100021; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

EFFECT OF SALINITY ON THE PRODUCTION OF 2-METHYLISOBORNEOL AND GEOSMIN BY *STREPTOMYCES PRAECOX*

XU Li-Pu^{1,2}, PAN Yong¹, CAO Huan¹, WANG Jing-Bo¹ and XIONG Bang-Xi²

(1. Beijing Aquatic Technology Extension Station, Beijing 100021, China; 2. Fisheries Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

关键词: 二甲基异茨醇; 土臭味素; 早期链霉菌; 寡盐鱼池; 盐度

Key words: 2-Methylisoborneol; Geosmin; *Streptomyces praecox*; Salt water fish pond; Salinity

中图分类号: Q142 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)01-0175-05

天津是中国北方重要的渔业生产基地, 2006 年全市水产养殖面积 430 km², 水产品总产量 35.5 万吨, 其中养殖产量 30 万吨, 渔业产值 40 亿元。天津养鱼池水盐度普遍在 2—5, 属于寡盐鱼池, 但在该地区采取高密度精养模式生产鱼类普遍存在土腥异味, 降低了水产品食用价值和养殖效益。已有研究表明鱼体土腥异味主要是由水中藻类和放线菌分泌的次生代谢产物二甲基异茨醇(2-methylisoborneol MIB)和土臭味素(Geosmin)渗透到鱼体内所引起的^[1,2]。目前鱼体及水体土腥异味问题已经逐步成为我国渔业生态学领域的研究热点之一, 研究主要集中在土腥异味物质检测技术^[3-5]、水体土腥异味存在现状及产源分析^[6-10]等方面, 但鱼池中放线菌产生土腥异味物质的研究^[11], 尤其是在实验室可控条件下关于盐度对放线菌生成土腥异味物质(MIB 和 Geosmin)影响的研究还较少。本试验在天津寡盐鱼池中分离得到一株放线菌 SP2, 经过形态和理化特征观察、生理生化反应试验以及 16S rDNA 基因序列分析, 确定该放线菌为早期链霉菌 *Streptomyces praecox*; 并研究了盐度对该菌产生 MIB 和 Geosmin 的影响, 旨在为寡盐鱼池水质管理、提高食用水产品品质提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 放线菌来源

在天津市选择 3 个鱼池按季度进行样品采集。鱼池面积 3300—133300 m², 水深 1.5—2.0 m, 主要养殖品种是草鱼 *Ctenopharyngodonid ellus* 和鲤 *Cyprinus carpio Linnaeus*, 鱼产量在 10000 kg/hm² 以上。鱼池中浮游藻类和放线菌生物量, 水体土腥异味物质(MIB 和 Geosmin)浓度等情况(表 1)。浮游藻类和放线菌的鉴定和计数参照文献^[12-14], 土腥异味物质检测按照我国台湾公布的固相微萃取-气质联用色谱法进行^[15]。

取养鱼池水, 采样深度统一在水面下 0.5 m, 在鱼池四周各设一点, 每点取 1 L 水, 混合后备用。于采样当天立即以梯度稀释法接种水样入高氏 1 号培养基(1 g KNO₃、20 g 可溶性淀粉、0.5 g K₂HPO₄、0.5 g MgSO₄·7H₂O、0.5 g NaCl、0.01 g FeSO₄、20 g 琼脂、1000 mL 水, pH 7.2—7.4), 在 25℃ 黑暗条件下培养 28d, 其间观察挑取单个菌落后接种入新的培养平板中。划线纯化 2 次, 插片观察^[13,14]。依据形态和培养特征共分离出 12 株放线菌。嗅觉鉴定放线菌土腥异味程度^[3], 发现凯润公司鱼池中分离到的 SP2 土腥异味程度最高, 同时该菌所在

收稿日期: 2010-01-09; 修订日期: 2010-10-20

基金项目: 北京市农委重大项目(20080601); 北京市农委项目 (20090102)资助

通讯作者: 徐立蒲(1972—), 男, 黑龙江哈尔滨市人; 博士, 高级工程师; 主要从事渔业生态学研究。E-mail: xulipu@sohu.com

表 1 鱼池基本情况
Tab. 1 Basic situation of the experimental ponds

鱼池 Ponds	采样时间 Investigation time	盐度 Salinity	MIB (ng/L)	Geosmin (ng/L)	MIB/ Geosmin	浮游藻类生物量 Phytoplankton biomass (mg/L)	放线菌生物量 Actinomycetes biomass (10 ⁶ /L)
凯润公司 KaiRun com- pany	2006-04	5.0	41.71	1.33	31.4	1.07	0.53
	2006-07	1.5	5302.70	3.70	1433.2	31.71	1.50
	2006-10	3.4	19.26	1.97	9.8	18.73	0.45
	2007-01	4.0	97.56	2.24	43.6	186.48	0.14
西青渔场 XiQing fisher- ies bureau	2006-04	5.0	1.40	0.29	4.8	13.35	0.40
	2006-07	4.0	4.80	1.10	4.4	0.07	0.23
	2006-10	4.3	0.53	0.83	0.6	15.37	0.07
	2007-01	4.0	49.10	2.20	22.3	176.88	0.12
团泊水库渔场 TuanBo reser- voir	2006-04	4.0	12.02	0.83	14.5	18.42	0.01
	2006-07	4.0	9.10	12.10	0.8	2.44	0.16
	2006-10	3.7	1.03	1.76	0.6	29.04	0.08
	2007-01	5.0	4.10	1.78	2.3	37.67	0.03

鱼池土腥异味物质浓度也最高(MIB 为 5302.70 ng/L, Geosmin 为 3.7 ng/L), 故选取 SP2 做试验材料。

1.2 放线菌 SP2 的种类鉴定

常规鉴定方法 依据文献[14]对放线菌 SP2 进行鉴定, 鉴定依据包括形态及理化特征, 生理生化试验。

16S rDNA 序列分析 放线菌 SP2 DNA 的提取参照徐平等的方法^[16]。取 10 μL PCR 产物在 1.0 %琼脂糖凝胶(90 V)电泳 1.5h, 其扩增条带单一, 直接将 PCR 产物进行测序。

参照徐丽华等^[17]的方法设计 PCR 引物。PCR 引物: 引物 A, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 引物 B, 5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3'; 引物 C, 5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'。由北京华大中生科技发展有限公司进行 DNA 序列测定, 所用测序仪器为 ABI PRISM 3730DNA sequencer 全自动序列仪, 测序试剂为 BigDye terminator v3.1。

根据测序结果, 利用 BLAST 搜索软件从 GenBank 与 EMBL 等数据库中调出相关放线菌菌株的 16S rDNA 序列, 随后用 CLUSTAL W1.8 软件进行多序列比对, 并采用 Neighbor-joining 法进行系统进化树的构建和同源性比较。

1.3 盐度对放线菌 SP2 产生土腥异味物质的影响

将 SP2 接种到高氏 1 号液体培养基, pH 为 8, 将试验盐度设为 6 个梯度(0、1、2、3、4、5)。25℃静置培养 8d 后, 测定培养液中 MIB 和 Geosmin 浓度^[15]。

2 结 果

2.1 分离得到 1 株产生土腥异味能力较强的放线菌

本试验依据放线菌形态和培养特征, 共分离出 12 株放线菌。经过嗅觉鉴定, 各株放线菌均能不同程度地产生

土腥异味, 其中 SP2 产生土腥异味能力较强, 并且分离该菌时其所在鱼池土腥异味物质浓度最高(表 1), 因此以放线菌 SP2 作为试验材料。SP2 形态(图 1): 孢子丝直, 孢子数目大于 20; 孢子圆, 大; 气丝青灰色; 基丝发达, 不断裂, 青灰色; 可溶性色素无。SP2 形态及理化特征(表 2), 生理生化反应特征(表 3)。

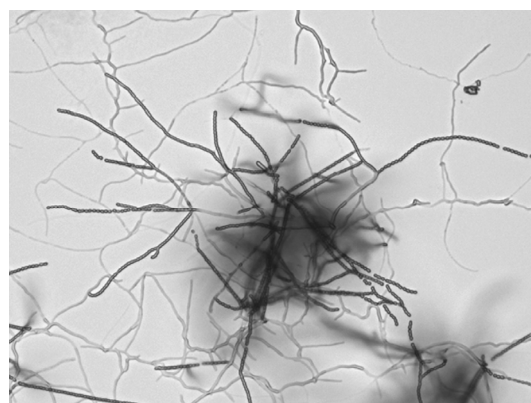


图 1 SP2 的形态(×100)
Fig. 1 SP2 morphology(×100)

放线菌 SP2 的 16S rDNA 核苷酸序列全长 1520 kb, 经过同源性比较(图 2), 以及放线菌 SP2 的形态及理化特征、生理生化试验, 可确定 SP2 为早期链霉菌 *Streptomyces praecox*。

2.2 盐度对放线菌 SP2 产生 MIB 和 Geosmin 的影响

本试验在实验室可控条件下研究了 SP2 在不同盐度下, 产生 MIB 和 Geosmin 的差异(表 4)。在盐度 0—5 间, SP2 均有 MIB 和 Geosmin 产生, 产生 MIB 的量为 29.60—4029.92 ng/mL, 产生 Geosmin 的量为 0.40—1.70 ng/mL。在同一条件下 SP2 产生 MIB 的量是产生 Geosmin 量的

55—3030 倍(表 4), 存在极显著差异($P<0.01$), 在盐度为 2 时有最高差异达到 3030 倍, 在盐度为 5 时有最小差异 55 倍。可见放线菌 SP2 主要产生 MIB, 而产生 Geosmin 相对较少。

在不同盐度下, SP2 产生土腥异味物质的量有较大波动。在盐度为 2 时, MIB 产生量最大; 在盐度 0—2 之间 SP2 产生的 MIB 随盐度增加而增大, 在盐度 2—3 之间 SP2 产生的 MIB 大幅降低, 在盐度 3—5 之间产生 MIB 量基本持平。盐度为 1 时, geosmin 的产生量最大, 盐度在 1—5 之间 SP2 产 geosmin 呈下降趋势。

3 讨 论

在北京地区淡水鱼池中 Geosmin 是主要土腥异味物质成分, Geosmin 与浮游藻类总生物量正相关, 与放线菌总生物量无关^[9]; 而在天津地区寡盐水鱼池中 MIB 是主要土腥异味物质成分, MIB 与放线菌总生物量显著相关, 而与浮游藻类总生物量无关^[10]。两地区鱼池中主要土腥异味物质成分以及它们的主要产源存在差异。作者推测这主要是由于天津地区寡盐水鱼池中存在着大量类似 SP2 的放线菌, 这些放线菌主要产 MIB, 较少产 Geosmin。由此可解释为何在天津地区寡盐水鱼池中主要土腥异味物质成分是 MIB, 并主要来源于放线菌。

表 2 SP2 的形态及理化特征
Tab. 2 Morphology and culture characteristic

培养特征 Culture character- istic	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
察氏培养基 Czapek Dox Me- dium	灰色 Griseus	灰黑色 Plumbeus	—
葡萄糖天冬素培养 基 Glu- conse-asparagin culture-medium	浅黄色 Buff	谷黄色 Golden- rod	—
甘油天冬素培养基 Glycerin-asparagin culture-medium	浅乳黄色 Wheat	浅黄绿色 Pale yel- low-green	—
无机盐淀粉培养基 Salt-starch cul- ture-medium	灰白色 Farinaceus	浅芥黄色 Citrinus	—
ISP-2 培养基 ISP-2 Medium	灰白色 Farinaceus	芒果棕色 Russet	—
燕麦粉培养基 Difco oatmeal agar	灰白色 Farinaceus	黄绿色 Yel- low-green	—
高氏 1 号培养基 Gao's medium	白色 Albus	黄绿色 Yel- low-green	—
桑塔氏培养基 Sauton's Medium	灰白色 Farinaceus	芒果棕色 Russet	—
显微形态特征: 孢子丝短, 松散螺旋形; 孢子球形、卵圆形 Microscopic form character: short capillitium, loose spira. Spore being spherical and egg round			

本文研究表明, 在天津地区鱼池水中放线菌生物量为 $(0.01—1.50) \times 10^6$ 个/L(表 1), 而北京地区鱼池水中放线菌生物量 $(1—27) \times 10^6$ 个/L^[9]。北京地区鱼池水中放线菌生物量明显高于天津地区鱼池, 但数学分析显示北京地区鱼池水中较高生物量的放线菌与异味物质(Geosmin 和 MIB)无关, 而天津地区鱼池水中相对较低生物量的放线

表 3 生理生化特征
Tab. 3 Culture characteristic

碳源利用 C source utility	结果 Result
肌醇 Inositol	+
甘露醇 Mannitol	+
水杨素 D(-)-Salicin	+
棉子糖 D(+)-Rafinose	+
鼠李糖 Rhamnose	+
淀粉 Difco	+
山梨醇 D(-)-Sorbitol	—
蔗糖 Sucrose	+
密二糖 D(+)-Melibiose	+
果糖 D-Fructose	+
甘露糖 D(+)-Mannose	+
麦芽糖 Maltose	+
菊糖 Inulin	—
甘油 Glycerin	+
葡萄糖酸钠 Sodium D-Gluconate	+
半乳糖 D(+)-Galactose	+
柠檬酸钠 Sodium citrate	+
琥珀酸钠 sodium succinate	+
苹果酸钠 Sodium DL-malate	+
纤维二糖 D(+)-Cellobiose	+
丙二酸钠 Sodium malonate	—
L-天冬酰胺 L-Asparagine	+
苦杏仁甙 Amygdalin	+
酒石酸钠 Sodium D(-)-tartrate	+
D-葡萄糖 D(+)- Gluconse	+
马尿酸钠 Sodium hippurate	—
木糖 D(+)-Xylitol	+
乳糖 Lactose	+
L-阿拉伯糖 D(-)-Arabinose	+
卫矛醇 Galactitol	+
赤藓醇 meso-Erythritol	+
糖元(原)Glycogen	+
丙酸钠 Sodium propionate	+
酪氨酸酶 Tyrosinase	—
淀粉酶 Amylase	+
牛奶胨化 Peptonised Milk	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
硝酸盐还原 Nitrate Reduction	+

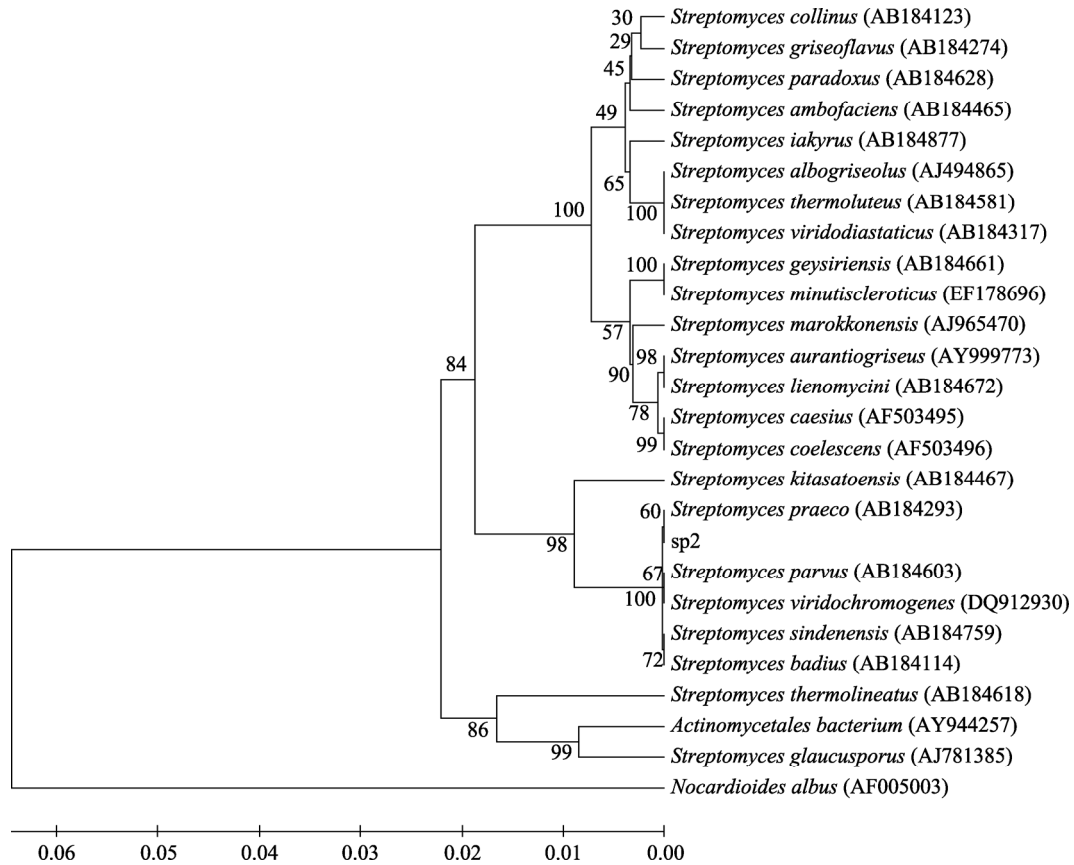


图 2 SP2 的系统发育树

Fig. 2 SP2 phylogenetic tree

表 4 不同盐度对放线菌 SP2 产生土腥异味物质的影响

Tab. 4 The influence of different salinity in odourous compounds of Actinomycetales SP2

盐度 Salinity	0	1	2	3	4	5
MIB (ng/mL)	29.60	764.34	4029.92	95.97	117.70	30.86
Geosmin (ng/mL)	0.40	1.70	1.33	0.54	1.02	0.56
MIB /Geosmin	74	450	3030	177	115	55

菌与异味物质 MIB 有关。这主要与北京、天津两地鱼池水盐度差异有关,北京地区鱼池水是淡水,盐度普遍低于 0.5;天津地区鱼池水是寡盐水,盐度普遍在 2—5。本文研究结果表明放线菌 SP2 对盐度变化较敏感,在盐度 0—5 之间放线菌 SP2 产生土腥异味物质质量均存在着极显著差异($P<0.01$)。作者认为天津地区鱼池水的盐度正适合 SP2 等放线菌大量产生土腥异味物质,水体盐度的作用超过了放线菌生物量的贡献。

许多研究表明,水体中 MIB 和 Geosmin 的来源是放线菌或浮游藻类^[1,2,6-11],但 MIB 和 Geosmin 浓度不一定与放线菌或浮游藻类生物量相关^[9,10],这不但与放线菌或浮游藻类的种类组成有关^[1,2,11],还与环境因素有关,如盐度就影响到放线菌 SP2 产生土腥异味物质的量。由此可见控制鱼池水体环境(如盐度),对防范水体中土腥异味的发生可能有现实意义。

参考文献:

- [1] Yin S R, Xu L P, Zhao W, *et al.* A review on the studies of off-flavour in aquatic animals [J]. *Dalian Fish Univ*, 2003, **18**(2): 135—140 [殷守仁, 徐立蒲, 赵文, 等. 水产动物异味的研究. 大连水产学院学报, 2003, **18**(2): 135—140]
- [2] Song L R, Li L, Chen W, *et al.* Research progress on the off-flavours and secondary metabolites of algae in the aquatic environment [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 434—439 [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. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 434—439]
- [3] Yin S R, Zhao W, Xu L P, *et al.* A sensory methods and practices of off-flavor in common carp [J]. *Dalian Fish Univ*, 2004, **19**(4): 264—267 [殷守仁, 赵文, 徐立蒲, 等. 鲤土腥味的感官检测与实践. 大连水产学院学报, 2004, **19**(4):

- 264—267]
- [4] Li L, Song L R, Gan N Q, *et al.* Determination of odorous compounds in water by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, **33**(8): 1058—1062 [李林, 宋立荣, 甘南琴, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱测定水中异味化合物. 分析化学, 2005, **33**(8): 1058—1062]
- [5] Zhang T, Li L, Chen W, *et al.* Analysis of off-flavors in fish by microwave mediated distillation with headspace solid-phase microextraction and Gas chromatography-mass spectrum [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(3): 449—454 [张婷, 李林, 陈伟, 等. 微波蒸馏-顶空固相微萃取-气质联用检测鱼体中土霉味化合物. 水生生物学报, 2009, **33**(3): 449—454]
- [6] Xu Y, Li W, Wu W Z, *et al.* Study on aquatic off-flavors in eutrophic Donghu Lake [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19**(2): 212—216 [徐盈, 黎雯, 吴文忠, 等. 东湖富营养水体中藻菌异味性次生代谢产物的研究. 生态学报, 1999, **19**(2): 212—216]
- [7] Li L, Wan N, Gan N Q, *et al.* Studies on the diurnal variation of the odorous compounds and correlated factors in Lake Dalianhua Wuhan [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(1): 112—118 [李林, 万能, 甘南琴, 等. 武汉大莲花湖异味化合物及其相关因子分析. 水生生物学报, 2007, **31**(1): 112—118]
- [8] Yuan Y, Wang S Q, Zhu J R, *et al.* Investigation on the Impact of Microbial Community on off-Flavor of Raw Water in Miyun Reservoir [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, **6**: 8—13 [原媛, 汪善全, 竺建荣, 等. 密云水库微生物相变化对水质及嗅味的影响. 环境科学研究, 2007, **6**: 8—13]
- [9] Xu L P, Zhao W, Xiong B X, *et al.* The relationship between concentration of odorous compounds and biomass of phytoplankton and actinomycetes in freshwater fish ponds of Beijing [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, **27**(7): 2872—2879 [徐立蒲, 赵文, 熊邦喜, 等. 淡水鱼池土腥异味物质含量与浮游藻类和放线菌生物量之间的关系. 生态学报, 2007, **27**(7): 2872—2879]
- [10] Xu L P, Pan Y, Cao H, *et al.* Preliminary study on off-flavour compounds of algae and actinomycete in saline water ponds [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, **28**(10): 5173—5178 [徐立蒲, 潘勇, 曹欢, 等. 寡盐鱼池藻菌土腥异味化合物的初步研究. 生态学报, 2008, **28**(10): 5173—5178]
- [11] Pan Y, Xu L P, Cao W X, *et al.* Actinomycetes and earthy-musty odorous compounds in brackish fishponds in Tianjin, China [J]. *Water Science & Technology*, 2009, **59**(6): 1185—1194
- [12] Zhao W. Experiments of Hydrobiology [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2004, 116—125 [赵文. 水生生物学实验. 北京: 中国农业出版社. 2004, 116—125]
- [13] Ruan J S. Taxonomic Foundation of Actinomycetes [M]. Beijing: Science Press. 1977, 93—103 [阮继生. 放线菌分类基础. 北京: 科学出版社. 1977, 93—103]
- [14] Actinomycetes class group in microorganism graduate schools of Chinese Academy of Sciences. Streptomycin Identified Handbook [M]. Beijing: Science Press. 1975 [中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社. 1975]
- [15] The test method of Geosmin and 2-Methylisoborneol in water-headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. Environment office in Taiwan in China-0920056895 [水中 Geosmin 及 2-Methylisoborneol 检测方法-固相微萃取/气相层析质谱仪法. 中国台湾环署检字第 0920056895 号公告]
- [16] Xu P, Li W J, Xu L H, *et al.* A Microwave-Based method for genomic DNA extraction from actinomycetes [J]. *Microbiology*, 2003, **30**(4): 82—84 [徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, **30**(4): 82—84]
- [17] Xu L H, Li W J, Liu Z H, *et al.* Actinomycete Systematic—Principle, Methods and Practice [M]. Beijing: Science Press. 2007, **119** [徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践. 北京: 科学出版社. 2007, **119**]