

影響藍綠細菌 *Anabaena* sp. 臭味產生之因子

Factors affecting the production of odour from *Anabaena* sp.

胡苔莉^{*}, 黃界銘^{**}, 蔣本芝^{***}

摘 要

豐原淨水場取水口壁曾有黃棕色顆粒之生物繁殖，經分離培養後，以絲狀藍綠細菌佔優勢，且菌液具刺鼻腥臭味，此分離株經鑑定屬 *Anabaena* sp.。本研究利用自製的 closed-loop stripping analysis (CLSA) 裝置濃縮分離株 *Anabaena* sp. 所產生之臭味，並探討影響此分離株臭味產生及生長速率之因子，如溫度與光度之物理因子，和 pH、氮、磷和螯合劑之化學因子等。

分離株 *Anabaena* sp. 所產生之惡臭產物以 CLSA 濃縮後，經 GC/MS 鑑定為 trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol (geosmin) 和 2-methylisoborneol (MIB)。在批次培養下，當 *Anabaena* sp. 進入衰減期時，geosmin 和 MIB 產量最高，胞內的 geosmin 和 MIB 於衰減期後才釋放於培養液中。

分離株 *Anabaena* sp. 喜好於 25°C 及至少 2000 lux 以上光照度下增殖，geosmin 和 MIB 的濃度分別為 300 ng/L 與 16500 ng/L。以照度為 2000 lux，25°C 下，*Anabaena* sp. 在 pH > 7.6 和高氮濃度 140 mg NO₃⁻-N/L 下，生長速率達 0.35d⁻¹ 以上，且 geosmin 和 MIB 濃度分別為 300 和 1,300 ng/L。培養基中磷濃度為 0.1-2.0 mg/L 時，菌株生長速率及 geosmin 和 MIB 濃度變化不大。此外，*Anabaena* sp. 能在缺乏螯合劑的環境下生長。

關鍵詞：geosmin、MIB、CLSA、藍綠細菌

前 言

造成給水中臭味之物質，以水生生物自然代謝釋放的有機異臭物質，在傳統之處理程序中，最難去除 (Montel, 1983)。許多國家，作為飲用水水源之湖泊水，常因水中微生物如藍綠細菌及藻類而引發臭味問題 (Yagi et al., 1983; Izaguirre et al., 1982, 1983)。環保署曾於 1985 年至 1988 年間，調查本省 18 個重要水庫水質發現有半數水庫有異臭問題，其中澄清湖及鳳山水庫存在產生異臭藻類之總類及數量最多，而該二水庫為優養化及污染程度最嚴重之水庫。

* 逢甲大學環境工程與科學系教授

** 逢甲大學土木及水利工程研究所碩士

*** 顧問公司規劃師

而由調查結果可以發現，單一藻類之濃度約在1-1000 cells/ml 之範圍內，應足以使人感覺到異臭(洪正中, 1987)。本研究室曾至中部某淨水場進行例行採樣，採回密佈於取水口壁上的黃棕色小顆粒，經培養後培養液產生刺鼻的腥臭味。以顯微鏡觀察，發現某種絲狀微生物為優勢菌株，經初步鑑定，屬絲狀藍綠細菌 *Anabaena* sp. (張純純, 1995)。

藍綠細菌產生的臭味會因不同菌種生理狀態、蘊育條件而有所不同，即使同一種可能因地區不同，生長階段、形態，甚或生理、生化之變化以及環境因子之影響，以致形成異臭產生之差異(Mohren & Juttner, 1983)。而 geosmin、2-methylisoborneol(MIB) 為最常發現於絲狀藍綠細菌中的二次代謝產物(Wu & Juttner, 1988a)，也是與水中土霉臭味最有牽連的兩種有機化合物(Izaguirre et al., 1983)。故本研究以 geosmin、MIB 作為代表性的異臭有機物，探討影響分離株 *Anabaena* sp. 產生臭味的環境因子，冀期能解決淨水中因藍綠細菌造成的臭味問題。

材料與方法

藍綠細菌 *Nostoc* sp. 分離自某淨水場的取水口壁上黃色顆粒狀物(蔣本芝, 1993)，經再鑑定後，確定菌屬為 *Anabaena* sp. (張純純, 1995)。菌株之培養係將1 mL之菌液(培養10天)，接入125 mL AC培養基中，在一定光照度及溫度，以振盪培養(100-120 rpm)(胡等, 1990)。生長係由葉綠素 a (Wu et al., 1991) 與細胞乾重分析表示，分析為二重覆，取平均值。

物理因子之探討: 做溫度因子之影響時，光照度設定於3000 lux，分別以15、25及35°C的培養溫度作為比較。其中15°C的培養溫度因低於室溫，故在溫振盪培養器上再連接一冷卻器(HOTECH handy cooler)，以調節至適當溫度。本研究中的光照度是由架於溫振盪培養器上方的四組日光燈控制，在其下方40cm處所測得最大光照度為4,000 lux(光照度的測定採用Digital lux meter INS DX-100)，所以最大照度設定為4000 lux。分別1000、2000、3000及4000 lux的培養照度作為比較，而此時之溫度設定為25°C。溫度及光照度的取樣時間，以生長期間中、濃度較高之培養天數作為代表，分別在培養9和14天時，測定細胞乾重及細胞內 geosmin、MIB 之含量。

化學因子之探討: 培養基的pH值分別以1N之HCl和NaOH調整至4、6、7.6和10的初始pH值比較；氮源方面，培養基中的氮源NaNO₃分別以0(缺氮)、7、70、140和1,400 mg/L比較；而培養基中的磷總量分別為0.1、0.5、1.0和2.0 mg/L-P比較；為探討螯合劑對菌株的影響，把培養基中的螯合劑(EDTA)降為0(將Fe-EDTA改用FeSO₄，鐵的濃度不變)。

Geosmin與MIB的分析：係利用CLSA裝置與GC分析定量(APHA, 1985)，CLSA設備由實驗室自行組合而成(胡與蔣, 1993)。

結果與討論

分離株 *Anabaena* sp. 所產生之惡臭產物以 CLSA 濃縮後，經 GC/MS 鑑定為 trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol (geosmin) 和 2-methylisoborneol (MIB)。在批次培養下，當 *Anabaena* sp. 進入衰減期時，geosmin 和 MIB 產量最高，胞內的 geosmin 和 MIB 於衰減期後才釋放於培養液中(蔣本芝, 1991)。有關異臭產生可由物理及化學等培養環境因子探討。

一、溫度之影響

一般而言，藍綠細菌生長之最適溫度較其它綱之藻類為高(Hoson, 1992)，*O. tenuis* 及 *F. muscicola* 的最適溫度為 25-30°C (Wu and Juttner, 1988b; Hoson, 1992)。因此 *Anabaena* sp. 以 3,000 lux 之光照，分別於 15、25 與 35°C 下培養，結果發現溫度愈高，刺激菌株的生長，*Anabaena* sp. 在 35°C 下培養 9 天之葉綠素 a 為 15°C 下之 50 倍，為 25°C 下之 3 倍；然而培養 14 天的結果，則 25°C 與 35°C 之差異不大，表示在 35°C 時，*Anabaena* sp. 之生長速度極快，因培養基中營養用盡，至第 14 天時葉綠素 a 含量下降。25°C 下，geosmin 及 MIB 之總含量較其它二個溫度下為高，其濃度分別為 300 ng/L 及 1650 ng/L (圖一)。而一般夏季之水溫可能在 25°C 左右，此溫度下，除了 *Anabaena* sp. 會增殖外，異臭物之濃度亦最高，值得淨水場人員加以注意。

二、光照度之影響

藍綠細菌屬於好氧自營光合菌，光為其生長能源，故分別培養於 1000、2000、3000 與 4000 lux 之光照度下，探討照度對異臭物產生之影響。結果顯示菌株生長隨光照度之增加而增加，但在 2000 lux 以後其差異並不十分明顯，表示 *Anabaena* sp. 需至少 2000 lux 以上之光照度，才能促進生長(圖二)。Geosmin 之產量在菌株生長第 9 及 14 天有減少之趨勢，MIB 則在第 14 天，在 2,000 lux 以上，異臭物濃度驟減，應是菌體增殖的速度比異臭物合成之速率快許多所造成。Naes et al.(1985) 與 Utkilen & Froshaug(1992) 由一屬絲狀藍綠細菌 *Oscillatoria* sp. 之 geosmin 合成受光照度影響；在高光照度下，生長速率愈快，但含量愈低，而認為 geosmin 的生化合成途徑與葉綠素 a 之合成途徑部份相類似。

三、pH 之影響

由 *Anabaena* sp. 分別在 pH 4、6、7.6 和 10 下培養，顯示菌株在偏於鹼性時生長速率較快(圖三)，MIB 濃度在中性偏鹼性時較在酸性的環境中為高，但 geosmin 的變化不大；而 pH 4 時由於培養環境太酸，不適合 *Anabaena* sp. 生長，故 geosmin 和 MIB 亦不會產生。許多藍綠細菌在偏鹼性時，生長速率較快和溶液中 geosmin 或 MIB 較多(Nakashima & Yagi, 1992)，分離株 *Anabaena* sp. 也有相同之結果。一般水環境中 pH 約在中性，在此 pH 值下，*Anabaena* sp. 的生長，正午時間，水中藻類光合作用旺盛，水中缺乏游離碳酸時，則分解氫碳酸根為碳酸鹽，再進一步將碳酸鹽分解為氫氧根離子，而造成 pH 值的升高(高肇藩,

1990)，會促使 *Anabaena* sp. 生長速率加快，並增加水中臭味量，是值得我們所重視的。

四、氮之影響

為探討氮對臭味產生的影響，將分離株 *Anabaena* sp. 分別培養於缺氮及氮含量 (NO_3^- -N) 7、70、140 (AC培養基氮之濃度) 和 1,400 mg/L 之培養基。由圖四顯示，在氮濃度 (NO_3^- -N) 為 1,400 mg/L 時 *Anabaena* sp. 的生長速率最快 ($\mu = 0.42 \text{ d}^{-1}$)，而 geosmin 和 MIB 總產量也最高；在缺氮時菌株的生長最慢 ($\mu = 0.13 \text{ d}^{-1}$)，且所產生之總 geosmin 和 MIB 量也最少。培養基中氮濃度為 1,400 mg/L 時，其細胞生長速率為缺氮時之 3 倍，MIB 總量為缺氮時的 4 倍，而 geosmin 更高達 8 倍以上；當氮濃度在 7-140 mg/L 間，菌株的生長速率和細胞內 geosmin 總產量變化不大，而 MIB 總產量則隨氮濃度增加而增加，生長速率在此濃度間變化不大，分離株 *Anabaena* sp. 在氮濃度為 7 mg/L 生長速率即可達 0.34 d^{-1} 。德基水庫中總氮最高曾達 6.33 mg/L，且大甲河流域水質之含硝酸氮量曾達 10 mg/L 以上 (經濟部, 1990)，其氮濃度已足夠使 *Anabaena* sp. 快速生長。

某些藍綠細菌在缺氮時會產生異型細胞，以進行固氮作用 (Rippka et al., 1979)，其生長速率雖將減緩，單位葉綠素 a 的 geosmin 卻會提高 (Wu et al., 1991)。分離株 *Anabaena* sp. 在缺氮時也會產生異型細胞 (張純純, 1995)，而單位葉綠素 a 的 MIB 會達到最高，高達 $2600 \mu\text{g/g-chl. a}$ (結果未示)，因此水中氮之濃度實有嚴加控制之必要。

五、磷之影響

氮、磷均為植物或藻類之生長限制因子，而分離株 *Anabaena* sp. 在不同磷濃度培養下，由結果顯示當培養基中磷濃度為 0.5 mg/L 時，生長速率、geosmin 和 MIB 總產量為最高 (圖五)，當磷濃度大於 0.5 mg/L，*Anabaena* sp. 生長速率反而降低，值得進一步探討。不過以整體而言，生長速率、geosmin 和 MIB 產量變化均不大。AC 培養基中之磷含量為 200 mg/L，分離株 *Anabaena* sp. 在此含量下於對數生長期平均生長速率為 0.36 d^{-1} ，而培養基中磷之濃度由 0.1 mg/L 至 2.0 mg/L 時，菌株之對數生長期平均生長速率為 0.355 d^{-1} ，與高磷濃度下之生長速率相差不大，表示在 AC 培養下其他營養成分可能為 *Anabaena* sp. 之生長限制因子。當磷濃度為 0.1 mg/L 以上時就適合 *Anabaena* sp. 生長，因此環境中磷的含量，尤其是淨水廠水源中磷之量應加以控制。

六、螯合劑對臭味產生的影響

當環境中有螯合劑存在，螯合劑會與鐵形成螯合鐵，為藻類或藍綠細菌之生長限制因子 (Hoson, 1992)；但是也有某些藻類和藍綠細菌，能分泌 siderophore (Nakashima and Yagi, 1992)，故能在環境缺乏螯合劑中生長 (Lange, 1974)。

分離株 *Anabaena* sp. 在缺乏螯合劑時也能生長，其生長速率為 $0.27 (\text{d}^{-1})$ (表一)，可能菌株能產生天然螯合劑以代替人工螯合劑 (Lange, 1974)。

Nakashima & Yagi (1992) 曾比較EDTA對四株菌 (O. brevis、O. tenuis、A. macrospora and P. tenue) 生長速率之影響及臭味之產生，發現四株菌均需EDTA生長較好，但geosmin或MIB產量以EDTA不存在時較高；而本菌株在臭味量部分有相似的情況；其所產生的geosmin和MIB量分別約為1,300 ng/L (1,000 μ g/g-chl. a) 與2,600ng/L (1,900 μ g/g-chl. a)，比在含有螯合劑 (EDTA濃度為0.125mM) 的環境中高出甚多，而生長速率則以有螯合劑的培養基生長較快。

由以上結果得知分離株Anabaena sp.在25°C、2000 lux、偏鹼性環境、磷量為0.5 mg/L，較高的氮濃度，和有螯合劑的情況下，其生長速率較快；當Anabaena sp.生長速率較快時，細胞產生的geosmin和MIB量亦相對的提高。

在水源優養化較為嚴重的水場，常以預氣或添加硫酸銅的方式，抑制藻類及藍綠細菌的活性，但Izaguirre et al.(1983)曾在O. curviceps的培養液中以硫酸銅處理後，卻也發現geosmin的濃度增加2-3倍。可見添加化學藥劑，雖可抑制生物體活性，但卻可能增加往後處理水中臭味之問題，且由物理及化學等環境因子影響臭味產生之結果顯示，水質是控制惡臭產生藍綠細菌之主要因素。

參考文獻

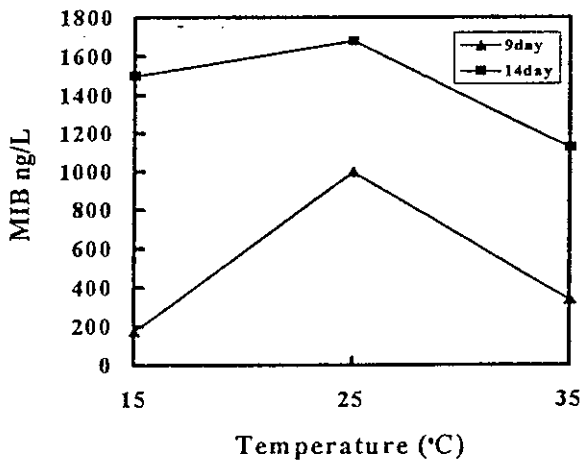
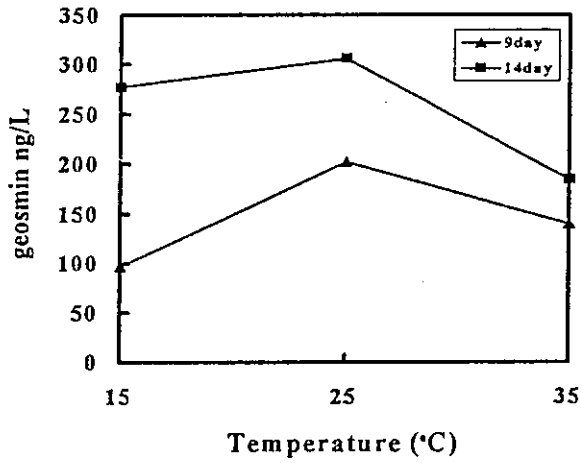
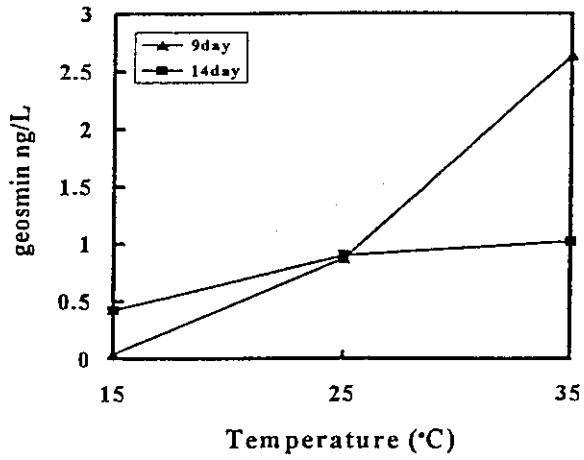
1. 洪正中 (1987) "台灣地區水庫藻毒及異臭問題之探討", 台灣環境衛生, 第二十二卷, 第一期, pp. 1-5.
2. 經濟部(1990) "大甲河流域河川水質長期追蹤計劃 (第七年工作報告)"
3. 胡苔莉、蔣本芝(1993) "自製CLSA分析淨水場之異臭物" 第十屆自來水論文發表會論文集, pp. 9-1.
4. 蔣本芝(1993) "藍綠細菌Nostoc sp.造成給水中臭味問題之研究" 逢甲大學土木水利研究所碩士論文.
5. 高肇藩 (1990) "給水工程" 台南市, 424頁.
6. 張純純 (1995) "產生異臭物藍綠細菌Nostoc sp.與Anabaena sp.細胞型態之比較" 逢甲大學環境科學系學士論文.
7. America Public Health Association.(1985) Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed. America Public Health Association, Washington D.C.
8. Hoson T. (1992) "Growth characteristics of the musty odor production alga, Oscillatoria tenuis" Wat. Sci. Tech., Vol. 25, No. 2, pp.177-184.
9. Izaguirre G., Hwang C. I., Krasner S. W. and McGuire M. I. (1982) "Geosmin and 2-methylisoborneol from Cyanobacteria in three water supply systems" Appl. Environ. Microbiol., Vol. 43, No.3, pp.708-714.

10. Izaguirre G., Hwang C. I., Krasner S. W. and McGuire M. I. (1983) "Production of 2-methylisoborneol by two benthic cyanophyta", *Wat. Sci. Tech.* Vol.15, p.211-220.
11. Izaguirre G. (1992), "A copper-tolerant Phormidium species from lake Mathews California, the produces 2-methylisoborneol and geosmin", *Wat. Sci. Tech.*, Vol.25, No.2, pp.217-223.
12. Lange W. (1974) "Chelating agents and blue-green algae" *Can. J. of Microbiol.* Vol. 20, pp.1311-1321.
13. Mohren S. and Juttner F. (1983) " Odorous compounds of different strains of Anabaena and Nostoc (Cyanobacteria) " *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 15, pp.221-228.
14. Montiel A. J. (1983) " Municipal drinking water treatment procedures for taste and odour abatement — a review", *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 15, pp.279-289.
15. Naes H., Aarnes H., Utkilen H. C., Nilsen S. and Skulberg O. M.(1985)" Effect of photon fluence rate and specific growth rate on geosmin production of the Cyanobacterium Oscillatoria brevis(Kutz) Gom.", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 49, No. 6, pp.1538-1540.
16. Nakashima S. and Yagi M.(1992)"Iron froms that influence the growth and musty odor production of selected Cyanobacteria" *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 25, No. 2,pp.207-216.
17. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., and Stanier R. Y.(1979) "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria" *J. Gen. Microbiol.*, Vol.111, pp.1-61.
18. Utkilen H. C. and Froshaug M.(1992) " Geosmin production and excretion in a planktonic and benthic Oscillatoria" *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 25, No. 2, pp.199-206.
19. Wu J. T. and Jüttner F. (1988_a) "Differential partitioning of geosmin and 2-methylisoborneol between cellular constituents in Oscillatoria tenuis", *Arch. Microbiol.*, Vol. 150, pp.580-583.
20. Wu J. T. and Juttner F. (1988_b) "Effect of environmental factors on geosmin production by Fisherella musciola" *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 20, No. 8/9, pp.143-148.
21. Wu J. T., Ma P. I., and Chou T. L. (1991)" Variation of geosmin in Anabaena cells

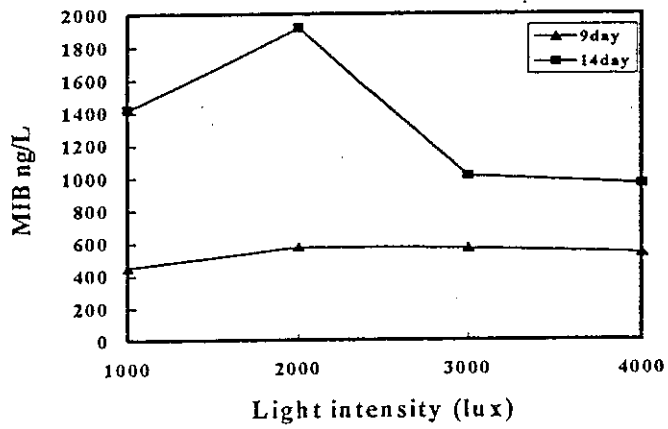
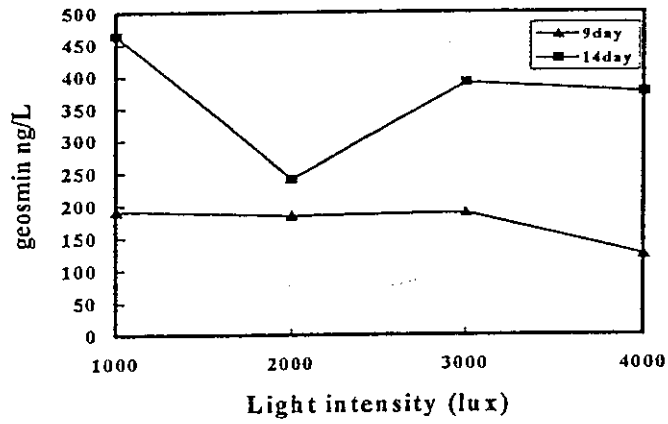
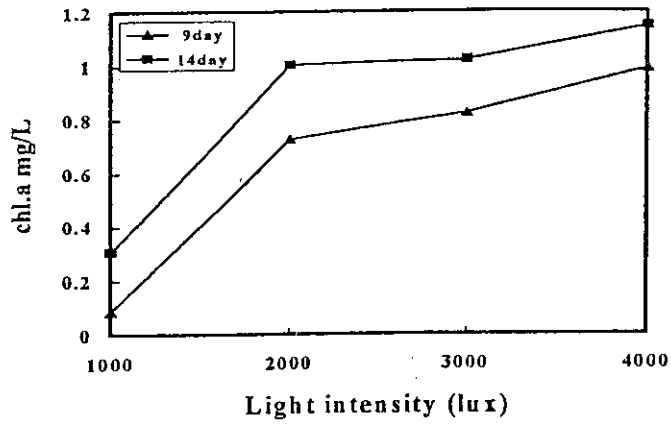
and its relation to nitrogen utilization", Arch. Microbiol., Vol.157, pp.66-69.

22.Yagi M., Kajino M., Matsuo U., Ashitani K., Kita T. and Nakamura T.(1983)

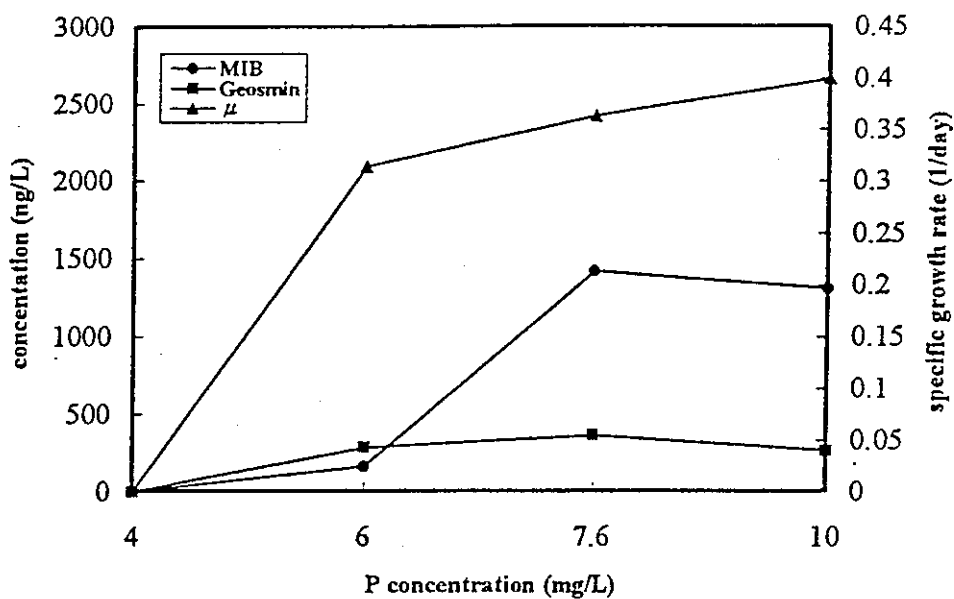
"Odor problem in Lake Biwa", Wat. Sci. Tech., Vol. 15, pp.311-321.



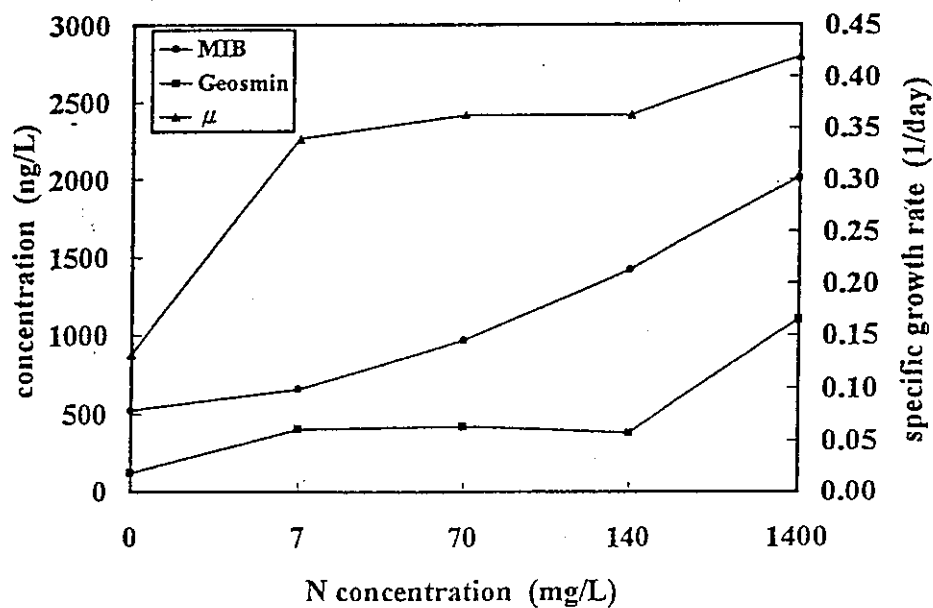
圖一. 溫度對 *Anabaena* sp. 葉綠素a、geosmin 及MIB產量的影響。



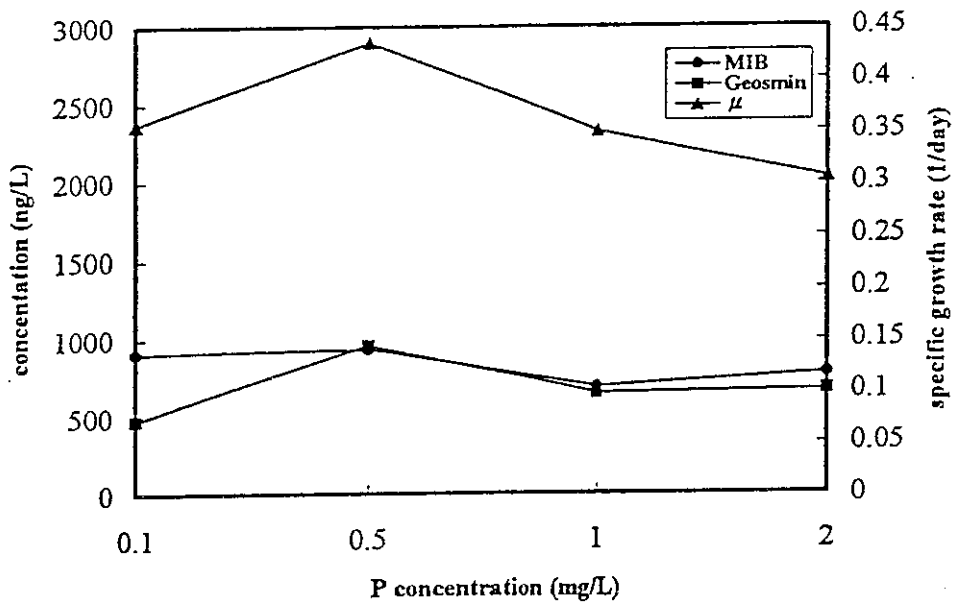
圖二. 光照度對 *Anabaena* sp. 葉綠素a、geosmin 及MIB產量的影響。



圖三. pH對 *Anabaena* sp.之生長速率、geosmin和MIB產生量的影響。



圖四. 培養液中氮濃度對 *Anabaena* sp.之生長速率及geosmin和MIB產生量的影響。



圖五. 磷對 Anabaena sp. 之生長速率及 geosmin 和 MIB 產生量的影響。

表一 螯合劑對 Anabaena sp. 之生長速率及臭味產生之影響

	EDTA-free	Fe-EDTA (control)
μ (day ⁻¹)	0.27	0.36
geosmin(ng/L)	1,300	380
MIB(ng/L)	2,600	1,420
geosmin(μ g/g-chl.a)	1,000	300
MIB(μ g/g-chl.a)	1,900	1,240