

微生物菌群 JSM004 对微囊藻毒素的生物降解

杨静东^{1,3}, 尹玉芬^{1,4}, 胡梁斌², 周 威¹, 丁何荣¹, 石志琦¹, 严少华¹

(1.江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏 南京 210014; 2.河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003; 3.江西农业大学理学院, 江西 南昌 330045; 4.南京农业大学植保学院, 江苏 南京 210095)

摘 要:以太湖水华蓝藻中提取纯化的微囊藻毒素(microcystins, MCs)作为微生物生长的碳源和氮源,从富营养化的太湖水体中分离筛选到 MCs 高效降解菌群 JSM004,24 h 内可以将初始浓度分别为 3.64 和 2.62 mg·L⁻¹ 的 MC-RR 和 MC-LR 完全降解。在研究关于环境因子对 JSM004 降解效率的影响中,发现菌群 JSM004 的生长受温度和 pH 值影响较大,而且其对 MCs 的降解效率也随之变化。结果表明,在接近实际水体的中性和弱碱性环境中,JSM004 对 MCs 的降解活性最强,加入不同含碳和含氮化合物能够促进混合微生物菌群的生长,但是对 MCs 的降解却有明显的延滞作用。与对照组相比,MCs 被完全降解的时间至少推迟 24 h。在实验室条件下,JSM004 可在 72 h 内完全降解太湖水中高浓度的 MCs。研究结果表明微囊藻毒素降解菌群 JSM004 具有良好的 MCs 降解效果,有实际应用前景。

关键词:生物降解;微囊藻毒素;菌群;蓝藻

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)08-1669-07

Biodegradation of Microcystins by Indigenous Mixed Bacterial Population JSM004

YANG Jing-dong^{1,3}, YIN Yu-fen^{1,4}, HU Liang-bin², ZHOU Wei¹, DING He-rong¹, SHI Zhi-qi¹, YAN Shao-hua¹

(1. Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. School of Food, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 3. College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 4. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The indigenous mixed bacterial populations JSM004 were isolated from eutrophic waters of Taihu by using the MCs extract from cyanobacteria of blooms as the sole carbon and nitrogen source. This isolate showed high MCs-degrading activity, which could completely degrade 3.64 mg·L⁻¹ of MC-RR and 2.62 mg·L⁻¹ of MC-LR within 24 h. Subsequently, the effects of environmental factors on the MCs-degradation by JSM004 were investigated, and the results showed that both temperature and pH value could affect the growth of JSM004 as well as its MCs-degrading rate. It was demonstrated that JSM004 showed highest MCs-degrading activity in natural or slight alkali culture fluids. The addition of other carbon or nitrogen compounds could promote the growth of JSM004, but cause a prolonged lag phase more than 24 h to completely degrade MCs as compared to the control group. Under the laboratory conditions, JSM004 could completely degrade high levels of MCs of lake water in 72 h. In conclusion, JSM004 could be considered as one of the prospective candidates in the application of MCs removal because of its high efficiency of MCs-degradation.

Keywords: biodegradation; microcystin; bacterial population; cyanobacteria

随着人类生活方式的改变,工业化、城市化的发展以及农业生产大量使用化肥,大量含氮、磷废水排入天然水体,水体富营养化日益加剧,蓝藻水华的暴发呈现越来越频繁的趋势^[1]。据报道有 25%~70%的

蓝藻水华污染可产生藻毒素^[2],如丝状鱼腥藻、囊丝藻、颤藻和微囊藻等^[3-5]都会分泌藻毒素到水体中。目前在富营养化水体中最普遍造成污染的是微囊藻毒素(microcystins, MCs),MCs 是一类环状七肽肝毒素,其一般结构为环(D-丙氨酸-L-X-赤-8-甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸),其中 Adda 为一种特殊的氨基酸,结构为 3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯-4,6-二烯酸,X 及 Y 为两种可变的 L 氨基酸^[6]。目前已发现 60

收稿日期:2008-12-21

基金项目:973 预研项目(2008CB117001)

作者简介:杨静东(1985—),男,江苏射阳人,硕士,主要从事植物和微生物资源的研究。E-mail:smartforest@yahoo.cn

通讯作者:严少华 E-mail:shhyan@yahoo.cn

多种异构体^[7], 其中 MC-RR 和 MC-LR 是我国和世界在天然水体中检出频率最多和含量最高的 MCs 类型^[8]。据调查, 饮用水中痕量 MCs 的存在与人群中原发性肝癌和大肠癌的发病率有明显的相关性^[9], 其致毒机理是通过抑制肝细胞中蛋白磷酸酶的活性, 诱发细胞角蛋白高度磷酸化, 导致哺乳动物肝细胞微丝分解、破裂和出血^[10-11]。虽然早在 1878 年就有蓝藻水华引起家畜及禽类中毒死亡的研究报道^[12], 但 1996 年在巴西发生的 100 多人因饮用含 MCs 的水而发生急性肝功能障碍, 其中约 50 人死亡的严重 MCs 污染事故^[13], 才真正引起世界各国的普遍关注。世界卫生组织(WHO)和我国卫生部颁布实施的《生活饮用水水质卫生规范》(2001)规定了生活饮用水中 MC-LR 标准值为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]。

MCs 呈环状结构, 非常稳定, 在 300°C 高温下还能维持很长时间不分解^[15]。目前, 已被证实能够去除 MCs 的方法主要有化学氧化、光催化、吸附、过滤、生物降解等, 其中生物降解是最为安全有效的去除水体中蓝藻毒素的方法之一。微生物去除 MCs 具有成本低、安全性强、利于生态修复等优点, 是一种去除 MCs 很有潜力的方法。

本研究从有藻毒素污染的太湖水样中筛选出对 MCs 有降解作用的微生物群落, 并评估其在不同营养条件下对 MCs 的降解效率, 以期将微生物菌群应用到富营养化水体中, 治理微囊藻毒素的污染, 保障人们饮用水的安全。

1 材料与方法

1.1 水样采集和含毒藻粉制备

实验用表层水样的采样时间是正值蓝藻水华暴发高峰的季节 2008 年 7 月初, 采样地点是水华较严重的无锡太湖梅梁湾间江口段。采集水样方法是直接用采样瓶装取含有水华蓝藻的表层水体, 放入冰箱中在 4°C 下保存备用。采集水华蓝藻的方法是直接用塑料桶捞取漂浮在水面的水华蓝藻, 倒在纱布上自然阴干后, 用粉碎机粉碎干燥的藻细胞块并过 100 目筛网后放在 -20°C 冰箱中冷冻保存。

1.2 MCs 标准品和纯化的 MCs

两种微囊藻毒素标准品 MC-RR (分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$, 分子量 1038.12) 和 MC-LR (分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$, 分子量 995.12) 购于 Sigma 公司。筛选降解菌群的 MC-RR 和 MC-LR 是从无锡太湖水华蓝藻细胞中提取和纯化的。

1.3 MCs 的提取和纯化

分别称取 0.2 g 太湖水华蓝藻藻粉到 10 mL 80% 甲醇中, 超声波处理 1 h 后, 高速离心 ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4°C) 去沉淀, 将上清液在旋转蒸发仪 55°C 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下蒸干, 并用去离子水定容到 5 mL, 调 pH 值到 3.4, 再离心 ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4°C) 去杂蛋白, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 把藻毒素溶液的 pH 值重新调回到 7, 121°C 灭菌 15 min 后, 加入少量去离子水, 使藻毒素溶液的最终体积是 5 mL。

MCs 的进一步纯化, 过固相萃取柱 (Supelclean LC-18 SPE Tubes, 3 mL, SUPELCO), 先用 10 mL 20% 甲醇溶液过柱, 清洗吸附于柱上的杂质, 再用 10 mL 80% 甲醇溶液对吸附在柱上的 MCs 进行洗脱, 流速控制在流动相不成股流出。洗脱液用氮吹仪吹干后, 用去离子水溶解残留的固体, 溶液再经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 冷冻保存于 -18°C 冰箱中作为实验用 MCs 的储备液。提取液中 MCs 的鉴定采用与标准品 MC-RR 和 MC-LR 的出峰时间是否一致来确定。

1.4 MCs 毒素降解菌群的筛选

吸取 10 mL 水样 (太湖水华蓝藻表层水体) 于细菌选择性培养液中, 在 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 30°C 条件下摇床培养 7 d, 吸取 5 mL 培养液重新转接入新鲜的与上述相同的细菌选择性培养液中, 培养条件保持不变, 连续转接培养 7 次。每次转接时取样测定 MCs 含量的变化, 选取转接培养 24 h 后, MCs 全部降解的微生物菌群 JSM004 作为实验材料进行进一步降解活性研究。

细菌选择性培养液: $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g; KH_2PO_4 0.5 g; K_2HPO_4 4.0 g; NaCl 1.0 g; CaCl_2 20 mg; FeSO_4 5 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mg; CuCl_2 0.5 mg; MCs 200 mL; 去离子水 800 mL。

1.5 JSM004 的生物降解活性

1.5.1 温度对 JSM004 降解速率的影响

把细菌选择性培养液放置在不同的温度 (4°C 、 25°C 、 30°C 、 37°C 、 45°C) 条件下, 分别接入 5 mL JSM004 到 50 mL 不同的温度体系中, 起始 OD_{600} 为 0.14, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下摇床培养 48 h, 在 0、6、12、18、24、36、48 h 取样, 每次取样 2 mL, 分别测定 OD_{600} 。通过培养液 OD_{600} 值的高低判断细菌的生长快慢, HPLC 检测 MC-RR 和 MC-LR 含量的变化, 以确定菌群的降解速率。

1.5.2 pH 对 JSM004 降解速率的影响

把细菌选择性培养液调成不同的 pH (5° 、 6° 、 7° 、 8° 、 9°), 分别接入 5 mL JSM004 到 50 mL 不同的 pH 体系中, 起始 OD_{600} 为 0.14, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 30°C 条件下摇床

培养48 h,在0、6、12、18、24、36、48 h取样,每次取样2 mL,测定 OD_{600} 及HPLC检测MC-RR和MC-LR含量的变化。

1.5.3 不同碳氮源对JSM004降解速率的影响

在细菌选择性培养液中分别添加 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖、甘油(培养基灭菌后在洁净工作台内加入)作为混合微生物菌群的碳源,在培养基中,分别添加 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酵母粉、尿素作为氮源,研究不同含碳和含氮化合物对混合微生物菌群生长(OD_{600})和对MC-RR和MC-LR生物降解的效应。微生物的培养容器是100 mL的三角瓶,培养量是50 mL, $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下摇床培养72 h,每6 h取1次样,每次取样2 mL,分别测定MC-RR和MC-LR的浓度和光密度(OD_{600})。

1.6 JSM004在富营养化水体中对MCs的降解活性

以采集的太湖水样作为本底,研究JSM004对MCs的降解活性,在太湖水样中添加提取纯化的MCs,然后接入5 mL JSM004(起始 OD_{600} 为0.14), $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下摇床培养72 h,每12 h取1次样,每次取样2 mL,分别测定MC-RR和MC-LR的浓度和菌液的光密度(OD_{600})。

1.7 HPLC分析

根据不同反应时间取的样品,高速离心($12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)去沉淀,上清过已经用5 mL甲醇和5 mL去离子水活化过的SPE-C18柱(Supelclean LC-18 SPE Tubes,3 mL,SUPELCO),然后用20%的甲醇淋洗去除部分杂质,再用80%甲醇对吸附在柱上的MCs进行洗脱,洗脱液过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,用HPLC(Agilent 1100)测定MC-RR和MC-LR的浓度。测定条件是:流动相55%甲醇,45%水,在水相中含有0.05%的三氟乙酸,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,紫外检测波长238 nm,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$,所用的分离柱是Waters ODS-C18 column($250\times 4.6\text{ mm}$,5 mm 粒径),柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 MCs的提取和纯化

图1是 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-RR、MC-LR标准品和从太湖水华蓝藻细胞中提取纯化的MC-RR和MC-LR的HPLC出峰图谱,图中显示MC-RR和MC-LR的保留时间分别为10.482和19.872 min(图1A),与提纯MC-RR和MC-LR的保留时间10.588和19.969 min(图1B)几乎一致。另外,由于提取方法改进,MCs的提取率大大提高,把pH调到3,可以沉淀大部分杂蛋

白,而对于MC-RR和MC-LR的提取率没有影响,因此确认从太湖水华蓝藻中提取纯化的化合物主要就是MC-RR和MC-LR。从图1B可发现HPLC图谱的基线有漂移,可能是由于没有除去的部分杂质或者是其他一些MCs的同系物存在引起的,而实际上,少量杂质的存在,不会影响MCs作为降解底物进行筛选微生物菌群的实验,因为富营养化的水体中,MCs是痕量的,筛选出来的微生物菌群必需具备降解痕量MCs的能力,才更有实际意义。

2.2 微生物菌群JSM004的筛选

接种太湖水华蓝藻表层水体到细菌选择性培养液中,对微生物进行连续7次每次4 d的驯化培养后,跟踪取样测定MCs的降解情况。图2为第7次转接后,微生物菌群JSM004对MC-RR和MC-LR的降解效果,随着JSM004的生长从对数生长期进入稳定

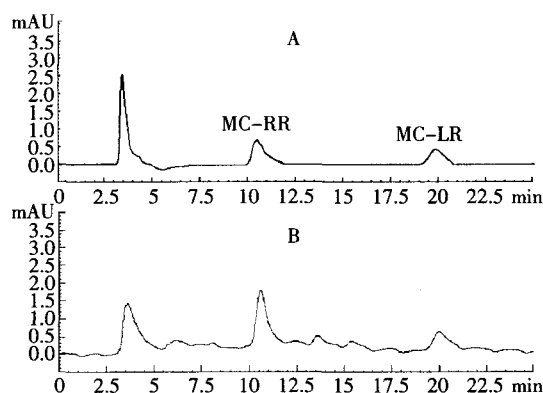


图1 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MC-RR和MC-LR标准品(A)和提取纯化的MCs(B)的HPLC图谱

Figure 1 HPLC profiles of standard MC-RR and MC-LR of $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (A), and extracted and purified MCs (B)

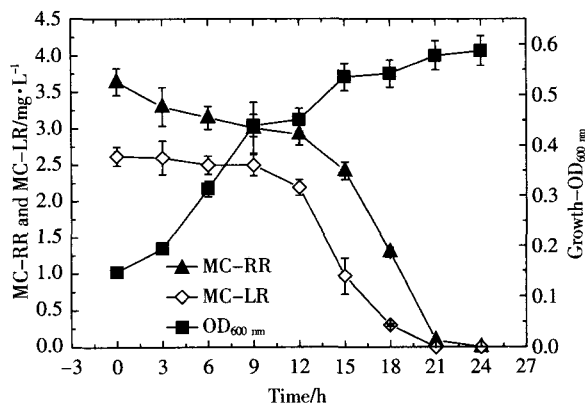


图2 JSM004对MC-RR和MC-LR降解速率

Figure 2 The degrading efficacy of JSM004 toward MC-RR and MC-LR

期,MCs 的浓度显著降低,初始浓度分别为 3.64 和 $2.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MC-RR 和 MC-LR 在 24 h 内完全降解,故确定微生物菌群 JSM004 确实具有降解 MCs 的能力。由于太湖已遭受多年的蓝藻水华和 MCs 污染,在 MCs 长期存在条件下必然驯化出了一定量的能够降解 MCs 的微生物菌群。

2.3 JSM004 在不同温度体系中对 MCs 的降解速率

水体的温度随着季节、昼夜有周期性的波动,JSM004 培养 18 h 时,不同温度条件对其降解速率有明显的影响,如图 3。随着温度在 $4 \sim 45^\circ\text{C}$ 范围内波动,JSM004 的菌液浓度 OD_{600} 在 $0.24 \sim 0.54$ 有明显的变化,可见低温和高温条件对 JSM004 的生长都有明显的抑制作用,导致 JSM004 对 MCs 的降解率也很低,温度在 $30 \sim 37^\circ\text{C}$ 范围内,JSM004 的生长量基本不变,对 MCs 的降解率也很相近,以 30°C 时最高,对 MC-RR 和 MC-LR 的降解率分别为 55.56% 和 80.63% 。

2.4 JSM004 在不同 pH 体系中对 MCs 的降解速率

富营养化水体的 pH 值会随着水体温度以及污染物的排放量的不同,有季节性的波动。研究不同 pH 体系对 JSM004 降解效率的影响有一定的理论和实际意义。图 4 显示 JSM004 培养 18 h 时,不同 pH 体系对其降解速率有一定的影响。当 pH 为 $5 \sim 9$,JSM004 的菌液浓度 OD_{600} 在 $0.449 \sim 0.542$,JSM004 对 MC-RR 的降解率从 29.97% 到 58.03% ,对 MC-LR 的降解率从 37.85% 到 80.53% ,可见 MC-LR 更容易被 JSM004 降解。图 4 还表明,JSM004 在中性或弱碱性条件下,表现出了更好的降解速率,当 pH 在 $7 \sim 9$ 范围内,JSM004 对 MC-RR 和 MC-LR 的最大降解率与最小降解率之差,都不会超过 3% ,而当 pH 在 $5 \sim 7$ 之间波动时,JSM004 对 MC-RR 和 MC-LR 的最大降解

率与最小降解率之差,最高超过 40% 。可能 JSM004 分泌的降解酶,在中性与弱碱性条件下,才能更好地发挥作用,而酸性条件下,部分降解酶可能在等电点沉降,而失去活性。实际上,一般的富营养化水体的 pH 在弱碱性条件下^[16],所以 JSM004 有更大的应用空间。

2.5 碳氮源对 JSM004 降解速率的影响

在含有 MC-RR 和 MC-LR 初始浓度分别为 3.64 和 $2.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的细菌选择性培养液中,分别添加不同含碳化合物作为混合菌群生长的碳源,接种混合菌群(初始 OD_{600} 为 0.14) 培养 3 d 后,不加入辅助碳源的对照 OD_{600} 达到 0.53 ,而添加葡萄糖和甘油可以促进混合菌群生长,其 OD_{600} 均达到 0.64 左右(图 5A),尤其是加入葡萄糖后,菌群生长明显增加。

微生物培养中葡萄糖是最容易被利用的碳源之一,生成丙酮酸,然后在脱氢酶的催化下产生乙酰 CoA,乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合生成柠檬酸进入三羧酸循环,最终产物是二氧化碳和水^[17]。虽然二氧化碳的释放会引起培养液 pH 的降低,但碳酸很不稳定,在 30°C $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,会不断的从水体释放到空气中,对体系的 pH 不会有太大的影响。甘油作为备用能源,在被微生物代谢过程中,首先转化成 3-磷酸甘油,到磷酸二羟丙酮,再到丙酮酸,然后在脱氢酶的催化下产生乙酰 CoA,乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合生成柠檬酸进入三羧酸循环,最终产物也是二氧化碳和水^[17],代谢过程与葡萄糖类似。如图 5B,葡萄糖和甘油的添加,对混合菌群的生长有一定的促进作用,但对 MC-RR 和 MC-LR 的降解却有明显的抑制作用。不加入辅助碳源的对照,培养 24 h 后,MC-RR 和 MC-LR 降解完全,而添加葡萄糖和甘油作为辅助碳源的处理,培养到 48 h 后,才完全降解,推迟了 24 h。

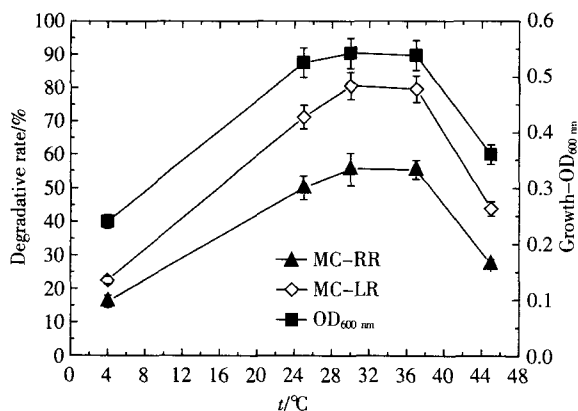


图 3 温度对 JSM004 降解速率的影响

Figure 3 Effect of temperature on degrading rate of JSM004

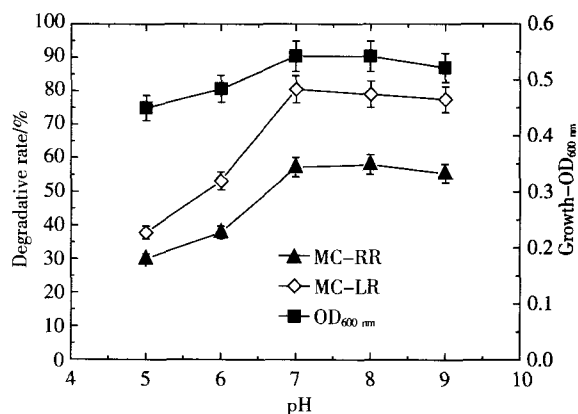


图 4 pH 对 JSM004 降解速率的影响

Figure 4 Effect of pH value on degrading rate of JSM004

可能微生物更倾向于利用结构比较简单、容易被吸收利用的碳源作为营养物质,当然也有可能少量 MCs 也被降解利用了。因为 MCs 的分子结构与蛋白胨中的环状寡肽相类似,微生物会像利用蛋白胨中寡肽的方式偶然的降解 MCs,为机体的正常生长提供必要的物质和能量^[18]。当这些容易利用的营养物质被消耗差不多的时候,菌群的生物量比较大,在巨大的生存竞争条件下,大量的 MCs 被作为碳氮源降解利用。

相同条件下,添加不同含氮化合物培养 3 d 后,不加入辅助氮源的对照 OD₆₀₀ 达到 0.53,添加任何一种含氮有机物都会大幅度提高混合菌群的生长速度。在添加酵母粉、尿素的情况下,OD₆₀₀ 均可分别达到 0.62 左右(图 6A),说明混合菌群可以利用这些含氮有机物作为氮源支持其生长。但对 MC-RR 和 MC-LR 的降解表现出了更明显的抑制作用,JSM004 对 MC-RR 和 MC-LR 的降解推迟了 48 h,可能由于酵母粉、尿素

作为的辅助氮源在体内的代谢相对缓慢所致(图 6B)。

2.6 JSM004 在富营养化水体中对 MCs 的降解活性

在富营养化水体中,JSM004 对 MCs 同样有降解效果,但富营养化水体中可能缺乏细菌选择性培养液中的微量元素,以及氮磷等一些污染物对 JSM004 菌群的降解活性有明显的抑制作用,JSM004 对 MCs 的降解速率有所降低,比在细菌选择性培养液中推迟了 48 h(图 7)。菌群 JSM004 对富营养化水体中痕量 MCs 的降解效果在进一步研究中。

综上所述,外源添加的 MCs 有可能作为一种诱发因子,诱导 JSM004 分泌降解酶,降解 MCs 以维持微生物的正常生长和代谢。至于 JSM004 的菌群结构还知之甚少,在 MCs 作为唯一碳氮源的固体培养基上,筛选分离单克隆降解菌的过程中,随机挑出的百余株单克隆在以 MCs 为碳氮源的选择性培养液中,均未表现出对 MCs 的降解。由此推断,JSM004 中能

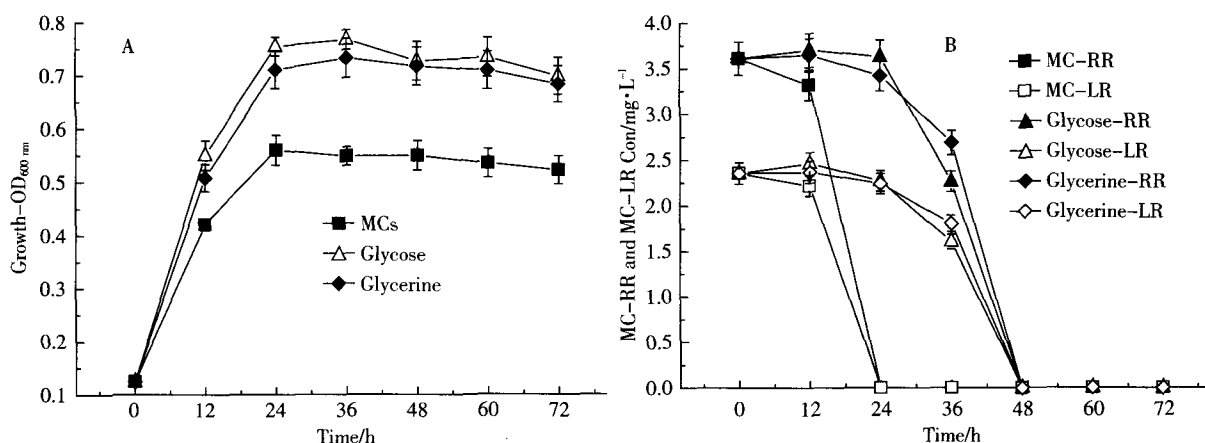


图 5 碳源对 JSM004 降解速率的影响

Figure 5 Effect of carbon compounds(Glycose and Glycerine) on degrading rate of JSM004

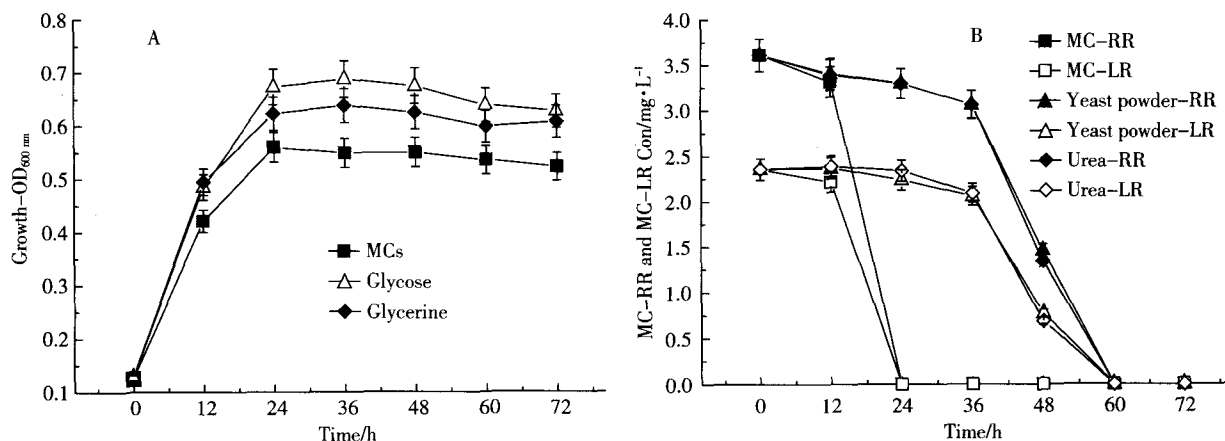


图 6 氮源对 JSM004 降解速率的影响

Figure 6 Effect of nitrogen compounds(Yeast power and Urea) on degrading rate of JSM004

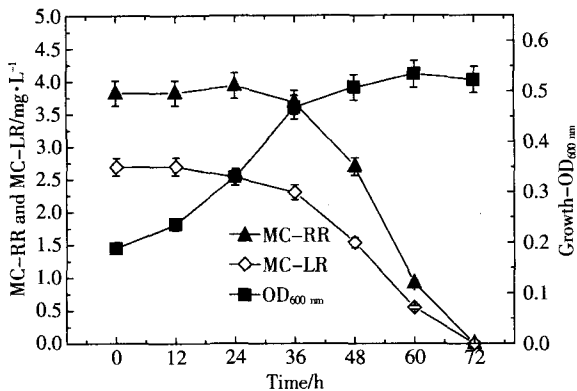


图7 富营养化水体中 JSM004 对 MC-RR 和 MC-LR 的降解曲线
Figure 7 Die away curve for JSM004 against MC-RR and MC-LR at eutrophic waters

够降解 MCs 的可能是一些不可培养的细菌,或者是一些古生菌,所以在混合菌群状态下表现得更加稳定。这与一些国外学者报道不相一致,在 1994 年, Jones 首次从澳大利亚的水体中分离出了 MCs 降解菌,定名为 MJ-PV。16S rRNA 分析表明, MJ-PV 属于鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)^[19]。随后, Park 从日本的富营养化的 Suwa 湖水中分离出了一种能降解 MC-RR、MC-YR、MC-LR 的菌株 Y2,经鉴定,与鞘氨醇单胞菌亲缘关系很近^[20]。Ishii 也从日本的 Suwa 湖表面水样中分离出了能降解蓝藻毒素的细菌 7CY,它是一种革兰氏阴性、好氧杆状菌,亦属^[21]。Takenaka 等报道在日本湖泊中分离出的 MCs 降解菌,属铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[22]。究其原因,可能是由于大多数单胞菌的质粒可以转录表达出与 MCs 降解有关的酶类。而对于未知菌群的结构及其降解 MCs 的机制,将通过 16S rDNA-DGGE 对其进行进一步分析。无论如何,微生物菌群在应用的过程中,可能更适应于外环境的动态变化。

3 结论

(1) 2008 年 7 月采自无锡太湖的水华蓝藻细胞中至少含有 MC-RR 和 MC-LR 两种 MCs,其中 MC-RR 的含量明显高于 MC-LR 的含量,而且在改进提取方法后,MCs 的提取率大大提高,可以作为微生物降解菌群的底物。

(2) 从太湖富营养化水体中分离到了能降解 MCs 的微生物菌群 JSM004。

(3) 该菌群在以 MC-RR 和 MC-LR 为唯一碳、氮源的选择性培养基中,最适生长温度为 30℃,最适生长 pH 条件为弱碱性。

(4) 添加外源的含氮和含碳有机物可以有利于微生物菌群 JSM004 的生长,但对 MCs 的生物降解却有明显的抑制作用,降解时间推迟至少 24 h,但可以确定的是 MCs 可以同时作为微生物生长的碳源和氮源而被生物降解。

(5) 在富营养化水体中,虽然有氮磷等一些污染物的影响,微生物菌群 JSM004 对 MCs 表现出了很好的降解效果,有实际利用价值。

参考文献:

- [1] 张维昊,徐晓清,丘昌强.水环境中微囊藻毒素研究进展[J].环境科学研究,2001,14(2):57-61.
- [2] ZHANG Wei-hao, XU Xiao-qing, QIU Chang-qiang. Advance in study on microcystins in aquatic environment[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2001, 14(2):57-61.
- [3] Duy T N, Lam P K S, Shaw G R. Toxicology and risk assessment of fresh water cyanobacterial (blue green algae) toxins in water[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2000, 163:113-118.
- [4] Carmichael W W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins[J]. *Appl Bacteriol*, 1992, 72(6):445-459.
- [5] Sivonen K, Jones G J. Cyanobacterial toxins[C]//Chorus I, Bartram (Eds) *Toxic Cyanobacteria in Water*. E & FN Spon, London, 1999:41-111.
- [6] Baldia S F, Conaco C G C, Nishijima T, et al. Microcystin production during algal bloom occurrence in Laguna de Bay, the Philippines[J]. *Fish Sci*, 2003, 69(1):110-116.
- [7] Botes D P, Tuinman A A, Wessels P L, et al. The structure of cyanoginonin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *J Chem Soc, Perkin Trans*, 1984, 1:2311-2318.
- [8] Hitzfeld B C, Hoyer S J, Dietrich D R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment[J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108:113-122.
- [9] Pouria S. A fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru[J]. *Brazil Lancet*, 1998, 352(2):21-26.
- [10] 俞顺章,赵宁,资晓林,等.饮用水微囊藻毒素与我国原发性肝癌关系的研究[J].中华肿瘤杂志,2001,23(2):96-99.
- [11] YU Shun-zhang, ZHAO Ning, ZI Xiao-lin, et al. Microcystins in drinking water with our study on the relationship between primary liver cancer[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2001, 23(2):96-99.
- [12] Elleman T C, Falconer I R, Jackson A R B, et al. Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (= *Anacystis cyanea*) bloom[J]. *Aust J Biol Sci*, 1978, 31:209-218.
- [13] Hermansky S J, Stohs S J, Markin R S, et al. Hepatic lipid peroxidation, sulfhydryl status, and toxicity of the blue green algal toxin microcystin-LR in mice[J]. *J Toxicol Environ Health*, 1990, 31:71-91.
- [14] Frandis G. Poisonous Australian lake[J]. *Nature*, 1878, 18:11-12.
- [15] Pouria S A. Fatal microcystin intoxication in Haemodialysis unit in Caruaru[J]. *Brazil Lancet*, 1998, 352(2):21-26.
- [16] Falconer I R. An overview of problems caused by toxic blue green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water[J]. *Environmental*

- Toxicol*, 1999, 14(1):5-12.
- [15] 韩志国, 武宝轩, 郑解生, 等. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展[J]. 暨南大学学报, 2001, 22(3):129-135.
- HAN Zhi-guo, WU Bao-xuan, ZHENG Xie-sheng, et al. Advances research on cyanobacterial toxins in freshwater bodies[J]. *Journal of Jinan University*, 2001, 22(3):129-135.
- [16] 黄钰铃, 纪道斌, 陈明曦, 等. 水体 pH 值对蓝藻水华生消的影响[J]. 人民长江, 2008, 39(2):63-65.
- HUANG Yu-ling, JI Dao-bin, CHEN Ming-xi, et al. Influence of pH value on formation and disappearing of blue algae bloom[J]. *Yangtze River*, 2008, 39(2):63-65.
- [17] 吴梧桐, 等. 生物化学(第四版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:213-225, 251-258.
- WU Wu-tong, et al. *Biochemistry IV*[M]. Beijing:People's Medical Publishing House, 2002:213-225, 251-258.
- [18] Bourne D G, Jones G J, Blakeley R L, et al. Enzymatic Pathway for the Bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR[J]. *Appl Environ Microb*, 1996, 4086-4094.
- [19] Jones G J, Bourne D G, Blakeley R L, et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria[J]. *Nat Toxins*, 1994, 2:228-235.
- [20] Park H D, Sasaki Y, Maruyama T, et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a Hypertrophic Lake[J]. *Environ Toxicol*, 2001, 16:337-343.
- [21] Ishii H, Nishijima M, Abe T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium[J]. *Water Res*, 2004, 38:2667-2676.
- [22] Takenaka S, Watanabe M F. Microcystin-LR degradation by pseudomonas aeruginosa alkaline phosphatase[J]. *Chemosphere*, 1997, 34(4):749-757.