

微囊藻毒素降解菌的筛选、鉴定及其胞内粗酶液对藻毒素 MC-LR 的降解

王光云¹, 吴涓^{1*}, 谢维¹, 李玉成¹, 茆荣²

安徽大学,¹ 资源与环境工程学院,² 生命科学学院, 合肥 230039

摘要: 【目的】从巢湖底泥中分离筛选高效的藻毒素降解菌, 并初步研究其胞内粗酶液降解藻毒素-LR (MC-LR) 的特性, 为水体中藻毒素污染的微生物治理提供有效的菌源与理论依据。【方法】利用富集驯化培养技术, 以 MC-LR 为唯一碳源, 分离筛选 MC-LR 降解菌, 通过形态观察、生理生化实验及 16S rRNA 序列分析鉴定菌株, 并考察其胞内粗酶液在不同条件下对 MC-LR 的降解特性。【结果】分离得到 1 株能高效降解 MC-LR 的菌株 M6。分子鉴定结果表明, 该菌株为蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)。其降解 MC-LR 的活性物质为胞内酶, 而且至少有 3 种酶参与了 MC-LR 的降解, 它们是菌体本身的组织酶而非诱导酶。当反应体系 pH 值为 8.0, 胞内粗酶液浓度为 404.9 mg/L, MC-LR 的初始浓度为 10 mg/L 时降解率最高, 16 h 可达 98.7%。【结论】分离出的 MC-LR 降解菌为蜡状芽胞杆菌, 该菌株对 MC-LR 有较高的降解能力, 并且酶促反应受到反应体系的 pH 值、胞内粗酶液浓度以及藻毒素初始浓度等因素的影响。

关键词: 微囊藻毒素-LR, 筛选, 鉴定, 胞内粗酶液, 降解率

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0096-08

目前水体富营养化所导致的蓝藻水华污染问题已成为全球关注的焦点^[1]。当水华爆发时, 水体表面覆盖的蓝藻散发出难闻的气味, 不仅影响了自然景观, 也向水体中释放出多种微囊藻毒素 (Microcystins, MCs)^[2-3]。近 20 年来, 我国第五大淡水湖巢湖的蓝藻水华频繁爆发, 巢湖已经成为长江下游地区典型的富营养化湖泊^[4]。而我国富营养化水体中检出频率最高的是 MC-LR 和 MC-RR^[5]。据调查^[6], 饮用水中痕量藻毒素的存在与居民的大肠癌和原发性肝癌有明显的相关性, 因此 MCs 的存在对巢湖附近居民的身体健康产生了严重

的影响。世界卫生组织 (WHO) 在《饮用水卫生基准》中规定饮用水中 MC-LR 的上限为 1 $\mu\text{g/L}$ ^[7]。

MCs 为环状七肽化合物, 具有间隔双键, 结构稳定, 传统的水处理工艺很难将其从水中去除^[8]。目前消除水体中藻毒素的方法主要有活性炭吸附、光降解与光催化氧化、化学氧化、膜过滤、生物降解等技术^[9]。但物理法和化学法在实际应用中各自存在着一定的局限性, 如化学氧化法会产生二次污染, 活性炭吸附法和膜过滤法的成本较高等。而藻毒素的微生物降解技术除了具有降解彻底的特点以外, 还具有其它方法所不具备的优势, 如其处理成本低、

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (090415203); 国家自然科学基金项目 (40972092); 国家自然科学基金项目 (31070109); 安徽省教育厅重点科研项目 (KJ2010A027)

* 通信作者。Tel: +86-551-3861783; Fax: +86-551-3861724; E-mail: wujuan628@163.com

作者简介: 王光云 (1986-), 女, 山东枣庄人, 硕士研究生, 研究方向环境微生物。E-mail: wgy-86@163.com

收稿日期: 2011-06-13; **修回日期:** 2011-09-29

不易产生二次污染、安全性好、利于生态修复等,因此就其成本和对环境的影响程度而言,生物降解技术是一种很有潜力的方法,很可能成为解决大面积藻毒素污染的最适方法之一。而且 MCs 降解菌广泛存在于天然水体中,利用这些微生物来降解藻毒素是切实可行的。

但由于藻毒素的环状结构和相当高的稳定性,一般的多肽水解酶不能降解藻毒素,只有一些能产生特殊酶类的微生物才能降解它。因此,获得高效降解 MCs 的菌株是确保微生物降解途径成功的关键。目前国内外筛选出的藻毒素降解菌还比较少,闫海等^[10]首先从蓝藻爆发的滇池底泥中筛选出一株 MCs 高效降解菌青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*)。周杰^[11]、zhang^[12]和徐春霞^[5]等从滇池中分离出一株食酸戴尔福特菌 (*Delftia acidovorans*),其日均降解 MC-LR 和 MC-RR 的速率分别达到 19.8 mg/L 和 45.1 mg/L,是目前报道的降解藻毒素能力最强的菌种。Ho^[13]和 Valeria^[14]等分离出可以快速降解水体中 MCs 的鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)。Takenaka^[15]等发现铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 对 MCs 有降解能力,其可以分泌碱性蛋白酶催化降解 MC-LR。本实验室在前期工作中从巢湖底泥中也分离出一株 MCs 降解菌即吉氏库特菌 (*Kurthia gibsonii*)^[16-17]。何宏胜^[18]等在研究食酸戴尔福特菌 USTB-04 降解 MCs 的过程中,发现藻毒素的降解是在胞内酶的作用下进行的,并且其胞内酶受反应体系的 pH 值及金属离子的影响。Park 等^[19]的研究表明,在不同的藻毒素初始浓度及不同温度下,有效菌的降解效率和速率是不同的。

目前国内外关于微生物降解藻毒素的研究主要集中于寻求高效的生物降解菌及其降解途径,但现今所知的高效降解菌种还不是很多,有关菌株所分泌的酶对藻毒素的降解特性的研究也很有限。本研究从蓝藻爆发期间的巢湖底泥中筛选出 1 株 MC-LR 的高效降解菌株,对其进行了生理生化实验及分子生物学鉴定,研究了在该菌胞内粗酶液降解 MC-LR 的酶促反应过程中 pH 值、胞内粗酶液的浓度以及藻毒素初始浓度等因素对藻毒素酶解特性的影响。从巢湖底泥中筛选藻毒素降解菌并对其酶降解特性展开研究,目前在国内尚未见报道,因此本研究结果对于解决巢湖水体的藻毒素污染将提供有用的材料和理论依据。现将本研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 泥样:巢湖蓝藻爆发时期采集的底泥。

1.1.2 主要仪器和试剂: SW-CJ-2D 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); ZHP-160 智能恒温摇床培养箱 (上海三发科学仪器有限公司); PHO50A 恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); CT14RD 型高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备有限公司); JY92-II 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司); DYCP-8C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); LEICA DM 2500 光学显微镜 (德国徕卡公司); Waters Alliannce-2695 型高效液相色谱仪,配 Waters SunFire C₁₈ (4.6 × 250 mm) 色谱柱。标准品 MC-LR (分子式: C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂, 分子量: 995.2) 购自美国 Sigma 公司,纯度 ≥ 95%。甲醇、三氟乙酸为色谱纯试剂,购自上海星可生化有限公司;氯化钠、硫酸镁等为分析纯试剂,购自上海中试化工总公司;琼脂、蛋白胨、酵母浸出物、牛肉膏等购自北京奥博星生物技术有限公司。

1.1.3 培养基:富集培养基采用 LB 培养基;菌种筛选培养基采用无机盐培养基^[10],并添加本实验室提取纯化的 MCs 作为唯一碳氮源;菌种保藏采用牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 MCs 的提取纯化及检测

藻毒素降解菌的分离筛选中所用藻毒素为实验室从巢湖蓝藻中自行提取纯化所得,提取纯化方法在参考文献^[20]的基础上略微做了调整,采用 5% 的乙酸溶液取代文献中的甲醇作为 MCs 的提取液。

藻毒素的检测条件是: Waters Alliannce-2695 型高效液相色谱仪, DAD 二极管阵列检测器为 Waters-2996 型,流动相为:流动相是 60% 甲醇 + 40% 水,水相中含有 0.05% 的三氟乙酸,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 238 nm,进样量为 20 μL。平行测定 3 次。

1.3 MC-LR 降解菌的筛选与鉴定

称取底泥 10 g,接种于 LB 液体培养基中,在 30℃, 150 r/min 条件下富集培养 3 d。以无机盐培养基为基础培养基,添加提取纯化的 MCs 作为微生物生长的唯一碳源和氮源作为筛选培养基。将富集

培养液涂布于含有藻毒素的无机盐固体培养基上,于 30℃ 下恒温培养 3 d 后,选取长势良好的单菌落进行下一步的驯化。在驯化过程中逐步加大培养基中藻毒素的浓度,经过多次驯化、纯化后得到纯菌株。将获得的纯菌株分别接种于含有 MCs 的无机盐液体培养基中,鉴定其是否具有降解 MCs 的能力。

将分离纯化的菌株进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察菌体形态,并进行生化实验,对菌株进行初步鉴定。同时,采用 DNA 快速提取试剂盒提取降解菌的 DNA,对提取的 DNA 进行 16S rDNA PCR 扩增,引物为通用引物:正向引物 F27 (+) 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3',反向引物 R1492 (-) 5'-ACGGTTACCTGTTACGACTT-3'。将 PCR 扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,由上海生物工程技术服务有限公司进行 16S rRNA 测序,将所测序列在 GenBank 核酸序列数据库中与已有的其他 16S rRNA 序列数据进行同源性分析,并构建系统发育树。

1.4 胞内粗酶液对 MC-LR 的降解特性

1.4.1 降解菌胞外及胞内物质的提取制备:将降解菌株接种于含 MC-LR 的液体无机盐培养基中培养 3 d (其中的 MCs 为本实验室自行提取纯化所得),将所得培养液在 6800 × g 下离心 15 min,收集菌体,上清液中含有胞外物质。用 5 mL 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液清洗菌体 3 次后,制成细胞悬浊液进行超声波破碎,破碎条件为:冰浴,输出功率 500 W,超声 2 s,间隔 10 s,两个 99 次循环,每个循环之间间隔 30 min。破碎液在 6800 × g 下高速冷冻离心 30 min,所得上清液为胞内物质,即胞内粗酶液。将所得胞内及胞外物质置于 -4℃ 冰箱中保存备用。

1.4.2 降解 MC-LR 的细胞物质来源定位:将上述提取制备的胞内、胞外物质分别加入到 MC-LR 浓度为 15 mg/L 的磷酸盐缓冲体系中,该体系组成如下:100 mg/L 的 MC-LR 母液 0.45 mL,胞内或胞外提取液 1.0 mL,磷酸缓冲液 1.55 mL,共 3.0 mL。以无菌水为空白对照,将反应体系置于 30℃、150 r/min 摇床上进行降解试验,定时取样,采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定藻毒素的残留量,以推断降解 MC-LR 的细胞物质来源。

1.4.3 菌株胞内降解物质的定性:将制备的胞内物质提取液沸水浴加热 30 min 后,加入到 MC-LR 溶

液中,于 30℃、150 r/min 下进行降解试验,设置空白对照,定时取样测定藻毒素的残留量。

1.4.4 MC-LR 诱导培养前后菌株的全细胞蛋白组电泳:将 MC-LR 诱导培养前后制备的胞内物质与适量的缓冲液混合,其中胞内粗酶液的提取方法如 1.4.1 中所述。将此粗酶液水浴 30 min 后进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶的浓度为 5%,分离胶的浓度为 15%,染色液为考马斯亮蓝 R-250。诱导前与诱导后的菌体培养过程是完全一样的,并且对这两种培养过程得到的胞内粗蛋白的提取步骤及处理条件也是完全相同的。

1.4.5 影响胞内粗酶液降解 MC-LR 的因素:分别考察酶促反应体系的 pH 值、胞内粗酶液的浓度及 MC-LR 的初始浓度对降解 MC-LR 的影响。其中胞内粗酶液的浓度采用 Bradford 法测定^[21]。酶促反应体系为:在 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中加入一定浓度的胞内酶粗提液和 MC-LR,反应总体积为 3 mL。反应条件为:在 30℃、150 r/min 下进行降解反应。定时取样,样品经 15230 × g 离心 15 min,取上清液在 HPLC 上分析 MC-LR 的残留量。

2 结果和分析

2.1 MC-LR 降解菌的筛选鉴定

从蓝藻爆发期间的巢湖中采集底泥,经富集驯化、筛选分离得到 1 株高效降解 MC-LR 的菌株 M6。该菌的菌落特征是:白色、扁平、圆形、表面光滑。经革兰氏染色后,其在显微镜下的形态如图 1 所示。

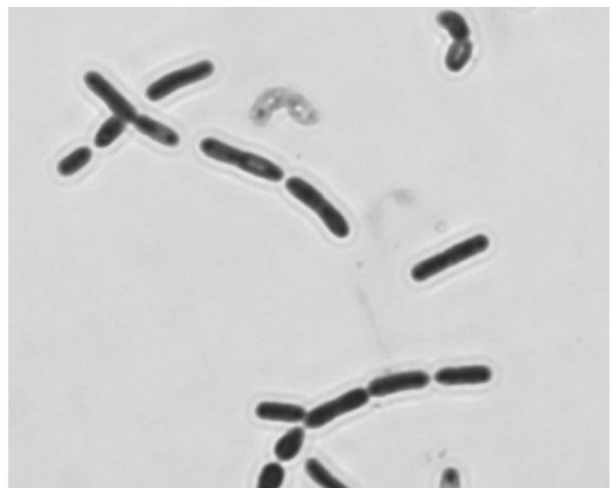


图 1 显微镜下菌株 M6 的形态 (100 ×)

Fig. 1 Morphology of strain M6 under microscope (100 ×).

该菌株为革兰氏阳性菌,细胞长杆状,呈链状。根据文献 [22 - 23] 可初步确定菌株 M6 为蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)。经 PCR 扩增后,菌株 M6 的 16S rRNA 片段长约 1408bp,经 BLAST 比对发现该菌株与蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 有 99% 的同源性,

在 GenBank 中的注册号为 JN717163。使用 MEGA5 软件构建系统发育树,结果如图 2 所示。结合形态学特征和 BLAST 比对分析,将菌株 M6 鉴定为蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)。这与生理生化鉴定结果相一致。

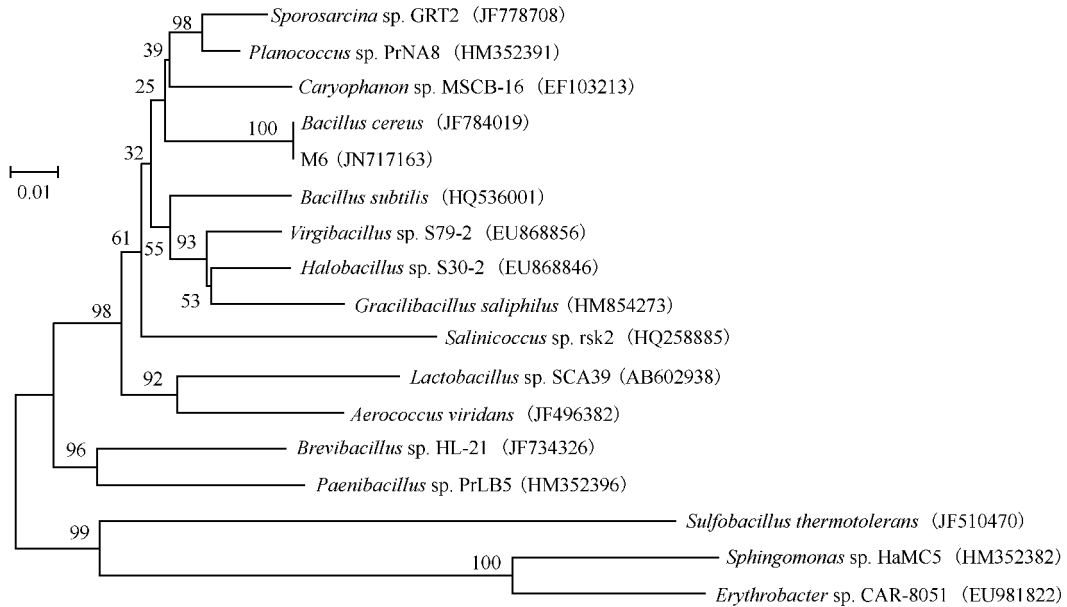


图 2 菌株 M6 的 16S rRNA 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain M6 based on 16S rRNA sequence. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0. 01 sequence divergence.

2.2 菌株 M6 降解 MC-LR 的胞内物质来源定位

菌株 M6 胞内、胞外提取物对 MC-LR 的降解效果如表 1 所示。胞外提取物和空白对照两组试验中 MC-LR 的含量在试验过程中几乎没有变化,而胞内提取物对 MC-LR 的降解则非常明显,8 h 后 MC-LR 的降解率可达到 95.3%。由此可推断菌株 M6 降解 MC-LR 的活性物质为胞内物质,而胞外提取物基本上对 MC-LR 没有降解作用。

表 1 菌株 M6 胞内、胞外提取物对 MC-LR 的降解率

Table 1 Degradation rate of MC-LR by intracellular and extracellular extracts of strain M6

Treatment	Initial concentration of MC-LR / (mg/L)	Final contention of MC-LR / (mg/L)	Degradation rate / %
intracellular extracts	15.0	0.7	95.3
extracellular extracts	15.0	14.7	2.0
blank control	15.0	14.8	1.3

2.3 降解 MC-LR 的菌株 M6 胞内物质的定性

为了进一步判断降解 MC-LR 的胞内物质的性质,将菌株 M6 胞内物质提取出来后经沸水浴加热

30 min, 然后考察其对 MC-LR 的降解效果。通过 HPLC 检测发现 (表 2), 当胞内提取物经沸水浴加热后几乎不再降解 MC-LR, 这一现象说明降解 MC-LR 的胞内活性物质是不耐热的。而在菌体产生的活性物质中, 不耐热的有 DNA、维生素及大多数蛋白 (包括酶), 其中 DNA 和维生素一般不具有催化降解能力, 因此可以初步确定菌株 M6 降解 MC-LR 的胞内物质可能是酶类, 通过以下的 SDS-PAGE 电泳分析可以获得更详尽的有关酶的信息。

表 2 经水浴加热后的胞内提取物对 MC-LR 的降解率

Table 2 Degradation rate of MC-LR by intracellular extracts after heating in boiled water

Treatment	Initial concentration of MC-LR (mg/L)	Final contention of MC-LR (mg/L)	Degradation rate (%)
intracellular extracts	15.0	0.7	95.3
intracellular extracts after heating in boiled water	15.0	14.5	3.3%
blank control	15.0	14.8	1.3%

2.4 菌株 M6 胞内活性物质的电泳分析

在菌株 M6 的培养过程中,提取藻毒素诱导培养前后的胞内物质做比较,得到胞内提取物质的全细胞电泳。由图 3 可知,与诱导前培养的菌体相比,菌株 M6 经 MC-LR 诱导培养后的蛋白条带总数没有变化,说明在诱导过程中没有新的蛋白产生,但有 3 种蛋白的条带明显增粗,说明这 3 种蛋白的表达量增加了,尤其是 A 蛋白和 C 蛋白的表达量增加特别明显。其中 A 蛋白分子量大于 97 kDa, B 蛋白分子量介于 66.3 - 97 kDa 之间, C 蛋白分子量较小,介于 31 - 43 kDa 之间。

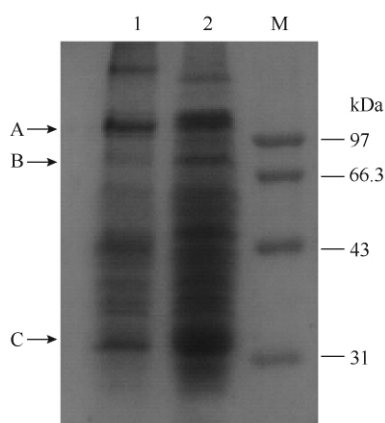


图 3 藻毒素诱导培养前后菌株 M6 全细胞蛋白组 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of strain M6 before and after induction cultivation by microcystins. 1. Before induction; 2. After induction; M. Marker.

2.5 影响菌株 M6 胞内粗酶液降解 MC-LR 的因素

2.5.1 pH 值的影响:保持酶促反应体系中 MC-LR 的初始浓度 (15.0 mg/L) 和胞内粗酶液的浓度 (404.9 mg/L) 不变,分别将酶促反应体系的 pH 值调节为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,考察环境 pH 值对菌株 M6 胞内粗酶液降解 MC-LR 的影响。从图 4 可以看出,体系的 pH 值对胞内粗酶液降解 MC-LR 的效果有明显影响,MC-LR 在 pH 值 7.0 到 9.0 之间的降解效率较高,特别是在 pH 8.0 时 MC-LR 的降解效果最佳,8 h 时已达到 85.5%。由此可见,菌株 M6 胞内粗酶液降解 MC-LR 的最适 pH 值应为 8.0。

2.5.2 胞内粗酶液浓度的影响:胞内粗酶液浓度对 MC-LR 降解效果的影响如图 5 所示。酶促反应体

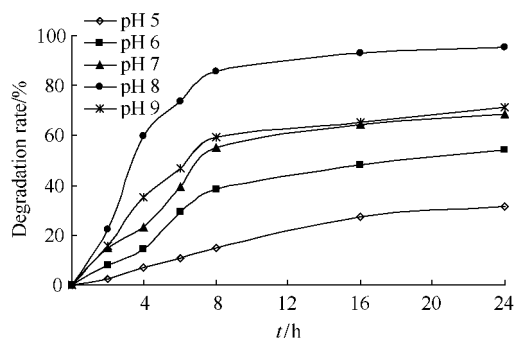


图 4 pH 值对胞内粗酶液降解 MC-LR 的影响

Fig. 4 Effect of pH on degradation of MC-LR by intracellular extracts.

系的 pH 值为 8.0, MC-LR 的初始浓度为 15 mg/L。由图 5 可见,MC-LR 的降解率随胞内粗酶液浓度的逐渐增大而增大,而且降解初速度也随之加快。当胞内粗酶液浓度增大到 404.9 mg/L 时,MC-LR 在 6 h 内的去除率达到 88.4%, 8 h 时 MC-LR 几乎完全降解。但当胞内粗酶液浓度继续增大到 809.8 mg/L 时,MC-LR 的降解率与粗酶液浓度为 404.9 mg/L 时的降解率相比略有下降。这一现象说明,当酶浓度较低、底物 MC-LR 的浓度远远大于酶浓度时,降解速率与酶浓度成正比;当酶浓度增大到一定值而底物 MC-LR 浓度不变时,降解速率增大到一定程度就趋于平缓,这是由于在反应过程中底物 MC-LR 不断被降解而浓度减小,这一酶促反应符合米氏方程酶促反应动力学的特点。

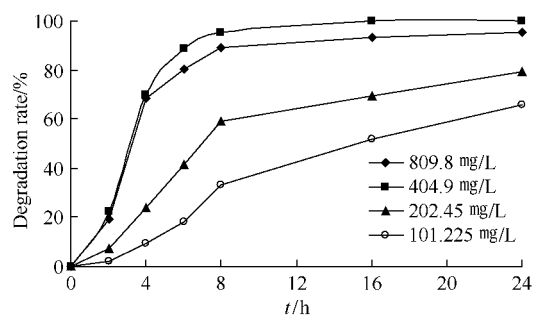


图 5 胞内粗酶液浓度对其降解 MC-LR 的影响

Fig. 5 Effect of the intracellular extracts concentration on degradation of MC-LR.

2.5.3 MC-LR 初始浓度的影响:保持 pH 值为 8.0、粗酶液浓度一定 (404.9 mg/L),考察底物浓度对酶促降解 MC-LR 的影响,结果如图 6 所示。试验结果表明,当 MC-LR 初始浓度在 5 - 10 mg/L 范围内时,

不但 MC-LR 的降解率随 MC-LR 初始浓度的增大而增大, 而且降解初速度也随之增大。当所有的酶与 MC-LR 结合后, MC-LR 的降解率则随着 MC-LR 初始浓度的增大而逐渐减少, 当 MC-LR 的浓度增大到 25 mg/L 和 30 mg/L 时, MC-LR 的降解率大幅度下降。

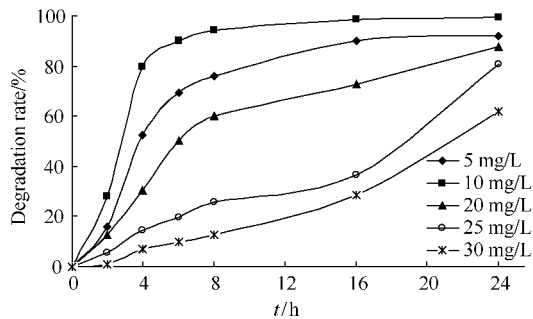


图 6 MC-LR 初始浓度对胞内粗酶液降解 MC-LR 的影响

Fig. 6 Effect of initial concentration of MC-LR on degradation of MC-LR.

3 讨论

近年来, 对藻毒素的微生物降解技术因其成本低、不易产生二次污染、降解较彻底而受到国内外学者的广泛关注。但是由于藻毒素的特殊环状七肽结构, 使其具有很高的稳定性, 一般的多肽分解酶很难将其降解^[8,24], 因此, 藻毒素高效降解菌的筛选是研究的关键步骤。迄今为止, 国内外已筛选出一些能够降解藻毒素的纯菌株, 但种类不多, 而且有关酶的催化降解途径以及降解基因的详细研究并不多见^[25]。Kato 等^[26]在研究 B-9 菌株降解 MCs 的过程中发现, 水解酶可以分解 MCs 的环状七肽结构。Bourne 等^[27-28]在对鞘氨醇单胞菌 MJ-PV 酶催化降解 MC-LR 的途径研究中发现, 在 MC-LR 的酶降解过程中, 至少有 3 种酶参与了此代谢过程, 且产生 1 种中间代谢产物和 1 种代谢终产物。苑宝玲等^[29]研究了假单胞菌胞内粗酶液对 MC-LR 的降解, 也发现粗酶液中至少有 3 种酶参与了 MC-LR 的降解。

本研究以 MC-LR 为唯一碳源, 从巢湖底泥中筛选出 1 株藻毒素高效降解菌 M6, 经 16S rRNA 鉴定为蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*), 并对其胞内粗酶液降解 MC-LR 的特性进行了初步研究, 以期对藻毒素的生物降解提供优势菌株。

该菌株降解 MC-LR 的活性物质为胞内酶。经 SDS-PAGE 全细胞蛋白组电泳发现, MC-LR 诱导培养前后蛋白条带总数没有变化, 但是有两种中等分子量的蛋白条带 (A 和 B) 和一种低分子量的蛋白条带 (C) 明显增粗, 由此可推断这 3 种蛋白即是与 MC-LR 降解密切相关的酶类。而 MC-LR 诱导前后蛋白总条带数量不变, 只是其中 3 种蛋白表达量增加, 表明这些与 MC-LR 降解有关的酶是菌株本身的组织酶, 而非诱导酶。陈彩云^[30]等研究假单胞菌 M-6 对 MC-LR 的酶作用机理时, 也发现有 3 种酶类参与了酶促反应, 且这 3 种酶都是细菌本身所有的组织酶, 而非诱导性酶类, 这与本研究结果一致。

pH 值、胞内粗酶液的浓度及 MC-LR 的初始浓度对 MC-LR 的降解效果有很大的影响。酶促反应体系的 pH 值显著影响降解效果。因为酶促反应受环境 pH 值的影响极为显著, pH 值不仅影响酶活性中心上重要基团的解离程度, 还影响辅酶和底物的解离程度, 从而影响酶与底物的结合, 而且过高或过低的 pH 值还可能使酶的活性降低, 甚至使酶失活^[14]。本研究中菌株 M6 对 MC-LR 的酶促降解最适 pH 值为 8.0, 此时降解效率最高, 8 h 时可达 85.5%, 16 h 可达 93.23%。胞内粗酶液浓度为 404.9 mg/L 时降解效果最好, 6 h 降解率可达 88.4%。在底物 MC-LR 浓度不变的情况下, 随着粗酶液浓度的增大, 降解率逐渐增大, 但当底物与酶完全结合时, 酶浓度即使继续增大, 降解率也不再提高, 这符合酶促反应动力学即米氏方程的特点。同时也表明, 并非酶浓度越高降解效果就越好。而另一方面, 当酶浓度一定而 MC-LR 浓度较低时, 降解率随 MC-LR 浓度的增大而增大, 当 MC-LR 的初始浓度为 10 mg/L 时, MC-LR 的降解率最高, 6 h 可达 90.0%; 但当 MC-LR 初始浓度增大到 10 mg/L 以上时, 降解率不再继续增大。这表明当酶已完全与 MC-LR 结合后, 再增大底物浓度, 酶降解的效率反而会下降。

本研究通过对高效 MC-LR 降解菌的筛选、鉴定, 以及对其粗酶液降解 MC-LR 特性的初步研究, 为 MC-LR 的酶催化降解途径的研究及其降解基因的克隆提供了前期工作基础, 为利用生物降解途径消除水源中的藻毒素污染提供了新的菌种资源。

参考文献

- [1] Haider S, Naithani V, Viswanathan PN, Kakkar P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere*, 2003, 52: 1-21.
- [2] 葛淑敏, 张淑华, 李巧, 于源华, 何秀霞. 微囊藻毒素-LR 降解菌的筛选. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2009, 37(12): 5360-5361.
- [3] Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Renhart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109: 663-668.
- [4] 谢平. 微囊藻毒素对人类健康影响相关研究的回顾. 湖泊科学 (*Journal of Lake Sciences*), 2009, 21(5): 603-613.
- [5] 徐春霞, 何宏胜, 张超, 吕乐, 闫海. 高效降解微囊藻毒素食酸戴尔福特菌 USTB-04 的培养与活性研究. 环境工程学报 (*Chinese Journal of Environmental Engineering*), 2007, 1(5): 21-24.
- [6] Duy TN, Lam PKS, Shaw GR. Toxicology and risk assessment of fresh water cyanobacterial (Blue-green algae) toxins in water. *Reviews of Environment Contamination and Toxicology*, 2000, 163: 113-186.
- [7] Falconer IR. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology*, 1999, 14(1): 5-12.
- [8] 韩志国, 武宝轩, 郑解生. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展. 暨南大学学报 (*Jinan University Journals*), 2001, 22(3): 129-135.
- [9] 王俊峰, 钱元键, 吴鹏飞. 富营养化水体中微囊藻毒素去除技术研究进展. 环境科技 (*Environmental Science and Technology*), 2009, 22(5): 57-62.
- [10] 闫海, 邓义敏, 邹华, 李贤良, 叶常明. 降解微囊藻毒素菌种的筛选与活性研究. 环境科学 (*Environmental Science*), 2004, 25(6): 49-53.
- [11] 周洁, 闫海, 何宏胜, 钟广荣, 张超, 林海. 食酸戴尔福特菌 USTB04 生物降解微囊藻毒素的活性研究. 科学技术与工程 (*Science Technology and Engineering*), 2006, 6(2): 166-170.
- [12] Zhang ML, Pan G, Yan H. Biodegradation of Microcystin-RR by a New Isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(2): 168-175.
- [13] Ho L, Hoefel D, Saint CP, Newcombe G. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Research*, 2007, 41(20): 4685-4695.
- [14] Valeria AM, Ricardo EJ, Stephan P. Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque Reservoir (Cordoba Argentina). *Biodegradation*, 2006, 17(5): 447-455.
- [15] Takenaka S, Watanabe MF. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 1997, 34(4): 749-757.
- [16] 吴涓, 钟升, 王光云, 李玉成. 一株降解微囊藻毒素菌种的鉴定及其活性研究. 中国环境科学 (*China Environmental Science*), 2011, 31(1): 116-122.
- [17] 钟升, 吴涓, 王光云. 微囊藻毒素降解菌的筛选鉴定及其降解活性的研究. 生物学杂志 (*Journal of Biology*), 2010, 27(6): 57-60.
- [18] 何宏胜, 闫海, 周洁, 葛世友, 肖宝清, 吕乐. 筛选菌种酶催化降解微囊藻毒素的特点. 环境科学 (*Environmental Science*), 2006, 27(6): 1171-1175.
- [19] Park HD, Sasaki Y, Maruyama T. Degradation of the cyanobacteria hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology*, 2001, 16: 337-343.
- [20] 卫涛, 向铮, 张婧婧. 藻毒素的提取纯化及制备方法研究. 上海环境科学 (*Shanghai Environmental Science*), 2008, 27(1): 17-21.
- [21] 汪家政, 范明. 蛋白技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 42-47.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 48-67.
- [23] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册第 8 版. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译. 北京: 科学出版社, 1984: 741-751.
- [24] Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe MF, Nakazawa H, Suzuki M, Uchida H, Harada KI. Stability of microcystins from cyanobacteria-IV. effect of chlorination on decomposition. *Toxicology*, 1997, 35(7): 1033-1041.
- [25] 李艳波, 史怀, 苑宝玲, 陈彩云. 假单胞菌 M-6 菌株对微囊藻毒素 MC-LR 的降解机理初探. 环境保护科学 (*Environmental Protection Science*), 2008, 34(5): 4-6.
- [26] Kato H, Imanish SY, Tsuji K, Harada KI. Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides. *Water Research*, 2007, 41(8): 1754-1762.

- [27] Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, Riddles P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environ. Microbiology*, 1996, 62 (11) : 4086-4094.
- [28] Bourne DG, Riddles P, Jones GJ, Smith W, Blakeley RL. Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environmental Toxicology*, 2001, 16: 523-534.
- [29] 苑宝玲, 陈彩云, 李云琴, 刘波, 史怀. 假单胞菌胞内酶粗提液对藻毒素 MC-LR 的降解, 环境化学 (*Environmental Chemistry*), 2009, 28 (6) : 854-858.
- [30] 陈彩云, 苑宝玲, 李艳波, 刘波, 史怀. 假单胞菌降解微囊藻毒素的效能及酶作用机理. 水生生物学报 (*Acta Hydrobiologica Sinica*), 2009, 33 (5) : 951-956.

Screening and identification of a microcystin-degrading bacterium strain and its enzymatic degradation of microcystin-LR by intracellular extract of *Bacillus cereus*

Guangyun Wang¹, Juan Wu^{1*}, Wei Xie¹, Yucheng Li¹, Rong Jia²

¹School of Resources and Environmental Engineering, ²School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

Abstract: [Objective] To provide effective microorganisms for the treatment of water polluted by microcystins (MCs), the strains capable of biodegrading microcystin LR (MC-LR) were isolated from the sediment of Chaohu Lake. The degradation of microcystin-LR by the intracellular extracts of the strains were studied. [Methods] The enrichment culture using MC-LR as the sole carbon source was utilized to isolate the microcystin-degrading strains. The isolated strain was identified according to the observation of morphology, the physiological and chemical tests and the analysis of 16S rRNA gene sequences. The degradation of MC-LR by the intracellular extracts was studied. [Results] Strain M6 effectively degrading MC-LR was isolated and the strain M6 could grow utilizing MC-LR as the sole carbon source. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene showed the similarity of 99% between strain M6 and *Bacillus cereus*. The experimental results suggest that the active substances for degrading MC-LR were the intracellular extracts which were the tissue enzymes of cells rather than induced enzymes. The degradation of MC-LR may be due to the catalytic effects of three enzymes. The degradation rate of 98.7% could be reached under the following conditions: pH 8.0, 404.9 mg/L of intracellular extracts, and 10 mg/L of the initial concentration of MC-LR. [Conclusion] Strain M6 which could biodegrade MC-LR efficiently was identified as *Bacillus cereus*. The influences of pH, the concentration of intracellular extracts and the initial concentration of MC-LR on the enzymatic reaction were obvious.

Keywords: Microcystin-LR, screening, identification, intracellular extracts, degradation rate

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Nature Science Foundation of Anhui Province (090415203), by the National Nature Science Foundation of China (40972092), by the National Nature Science Foundation of China (31070109) and by the Natural Science Research Program of the Educational Office of Anhui Province (KJ2010A027)

* Corresponding author. Tel: +86-551-3861783; Fax: +86-551-3861724; E-mail: wujuan628@163.com

Received: 13 June 2011 / Revised: 29 September 2011