

假单胞菌降解微囊藻毒素的效能及酶作用机理

陈彩云¹ 菡宝玲¹ 李艳波¹ 刘波² 史怀²

(1. 福州大学环境与资源学院,福州 350108; 2. 福建省农业科学院生物技术中心,福州 350003)

摘要:以从福州市某富营养化水库底泥中筛选出的假单胞菌 M-6为研究对象,分别考察接种量、温度、供氧量(转速)、pH值、微囊藻毒素 MCLR 初始浓度等条件因素对假单胞菌 M-6降解 MCLR 的影响,并探讨假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的分子生物学机理。结果表明,当接种量为 10%时,菌体的降解效果较好,6d 的降解率可达 90%;降解反应的最适 pH 为 7.0,最佳温度为 30℃,摇床转速控制在 150 r/min;MCLR 初始浓度过高都将影响假单胞菌 M-6 对碳源和氮源的吸收和利用,最佳浓度为 15.7 mg/L。SDS-PAGE 电泳分析表明,假单胞菌 M-6 降解藻毒素过程中,主要有 3 种酶参与反应,且这 3 种酶都是细胞内本身所含有的组织酶。

关键词:假单胞菌;微囊藻毒素 LR(MCLR);生物降解;酶

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0951-06

随着水体富营养化程度的加剧和范围的扩大,淡水蓝藻水华暴发的频率和强度日趋严重。当蓝藻水华严重时,水面形成厚厚的蓝绿色湖颤,散发出难闻的气味,不仅影响水环境景观,而且释放出多种藻毒素^[1]。在已发现的各种藻毒素中,微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是在蓝藻水华中出现频率最高、产量最大、危害最严重的藻毒素,至今已发现 80 余种亚型(其中以 MCLR 最常见)^[2]。已有许多研究表明微囊藻毒素对动物和人类都具有明显的毒性效应^[3,4]。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^[5],从而 MCs 对人和动物的饮用水安全以及水生态系统的稳定均已构成严重的威胁。世界卫生组织(WHO)推荐饮用水中的 MCs 浓度标准仅为 1 μg/L^[6]。

高效的生物降解是治理藻毒素污染的有效途径,目前国内广大学者多致力于从环境中寻求生物降解菌^[7-11]。本课题组的前期研究表明,福州市某富营养化水库水常年存在微囊藻毒素污染问题,进而以污染底泥为菌株来源,筛选出了 2 株高效降解藻毒素的假单胞菌 M-6 和 M-7,并对它们的生理生化特性作了初步研究^[12,13]。在此基础上,本文以假单胞菌 M-6 为研究对象,深入研究接种量、温度、

供氧量(转速)、pH 值、MCLR 初始浓度等因素对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的影响,探讨假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的分子反应途径,为治理富营养化水体的藻毒素污染提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 丙烯酰胺、N,N-亚甲双丙稀酰胺(美国 Acros 公司);Tris 碱、N,N,N',N'四甲基乙二胺(TEMED)、甘氨酸(美国 Novon 公司);十二烷基硫酸钠(SDS)(厦门泰京生物技术有限公司);过硫酸铵(汕头市西陇化工厂);甘油、考马斯亮蓝 R-250、甲醇、冰乙酸、NaCl(天津市福晨化学试剂厂);藻毒素 MCLR 标准品(分子量 994.3, 纯度 96%, Alix 公司);试验藻毒素 MCLR(实验室自提取^[14])。

1.2 仪器 HZQ-F160 全温振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、HWS12 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)、3-18K 型冷冻高速离心机(SICMA 公司)、TS-1 型脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、DYCZR-24D 垂直板电泳槽(北京市六一仪器厂)、EPS601 型电源(Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

收稿日期: 2007-11-06; 修订日期: 2009-01-12

基金项目: 教育部霍英东教育基金优选课题(104003);福建省自然科学基金(2006J0134)资助

作者简介: 陈彩云(1983—),女,汉,福建泉州人;硕士研究生;主要从事水源水微污染的控制研究。E-mail: chencyun2007@yahoo.com.cn

通讯作者: 菡宝玲, E-mail: yuanbaoling@yahoo.com.cn

1.3 培养基 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%; NaH_2PO_4 0.05%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%; CaCl_2 0.01%; K_2HPO_4 0.05%; MCLR 从微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 藻种中提取^[7], 微囊藻购买于中国科学院水生生物研究所。藻毒素 MCLR 标准品 (分子量 994.3, 纯度 96%, A lix 公司)

1.4 假单胞菌降解效能研究 在以一定量的 MCLR 为唯一碳源的培养基中, 接入 10% 驯化后的菌株, 培养基 pH 为 7, 在 30 °C, 摆床转速 150 r/min 条件下培养, 测定不同作用时间下培养液中 MCLR 的含量, 研究假单胞菌 M-6 对 MCLR 的降解。分别考察不同的接种量, 培养基 (MCLR 为唯一营养源) 的初始 pH 值、温度、通气量 (撆床转速), 不同浓度的 MCLR 对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的影响。

1.5 假单胞菌降解途径解析

1.5.1 假单胞菌胞内外物质提取液的制备 将假单胞菌 M-6 接种于含 15.0 mg/L MCLR 的无机盐培养液中, 30 °C, 150 r/min 下培养 3d。菌液 8000 r/min 离心 10 min, 收集假单胞菌, 上清液为胞外物质, 设为 A1。用 2mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液清洗菌体细胞 3 次, 配制成细胞悬浊液, 超声波破碎 15 min。破碎液 8000 r/min 离心 20 min 取上清, 即为胞内物质, 设为 A2。将 A1 和 A2 分别加入 15.0 mg/L MCLR 溶液中, 置于 30 °C, 150 r/min 摆床上培养, 并设对照样, 测定各溶液中 MCLR 的残留量, 以判断降解 MCLR 的细胞物质来源。

1.5.2 假单胞菌胞内降解物性质的识别 将制得的胞内物质提取液进行沸水浴加热 30 min 后, 加入 MCLR 溶液中, 置于 30 °C, 150 r/min 摆床上培养, 并设对照样, 每日测定各溶液中 MCLR 的残留量。

1.5.3 藻毒素诱导培养前后假单胞菌 M-6 的全细胞蛋白组电泳 在胞内物质提取液中加入适量的上样缓冲液配置成上样样品, 100 °C 沸水浴 3 min, 使蛋白变性, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6 MCLR 的测定 MCLR 由高效液相色谱 (HPLC) 法测定, HPLC 分析条件如下: 固定相 C₁₈ 反相硅胶柱; 流动相 乙腈 水 (含 0.1% 三氟乙酸) = 60:40; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 紫外 238 nm; 进样量: 10 μL。

2 结果

2.1 菌株接种量对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 效能的影响

在以 MCLR (15.0 mg/L) 为唯一碳源的培养基

中, 分别考察了假单胞菌 M-6 接菌量为 1%、10% 和 15% 时对 MCLR 降解效能的影响 (图 1)。从图 1 可以看出: 当接种量为 1% 时, 菌株降解率较低。这说明当接菌量小时, 菌体的生长较为缓慢, 迟缓期长, 所需降解时间长; 随着接菌量的增加, 菌体生长会有所加快, MCLR 降解效率也相应增加, 当接菌量增加到 10% 时, 6d 的降解率可达 90%, 再增加接种量到 15%, 降解速率有所降低, 6d 降解率低于相同条件下 10% 接菌量的降解率。这是由于接菌浓度太高, 增加了菌体之间对营养的竞争, 也不利于菌株的生长代谢, 由于营养的不足, 导致菌株加速死亡。总体来说接种 10% 的假单胞菌 M-6, MCLR 的降解效果较好。

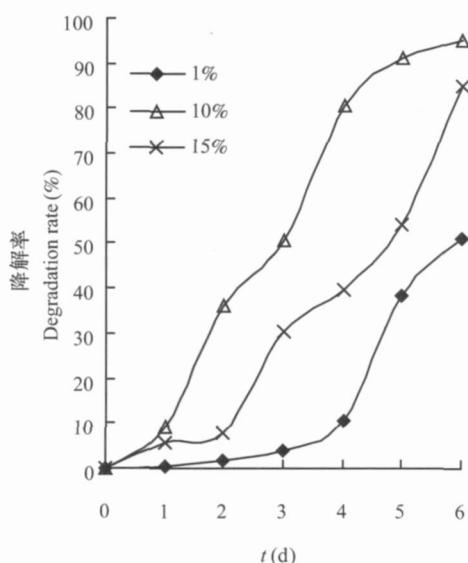


图 1 菌种接种量对 MCLR 降解效果的影响

Fig. 1 Effect of inoculum concentration on MCLR degradation

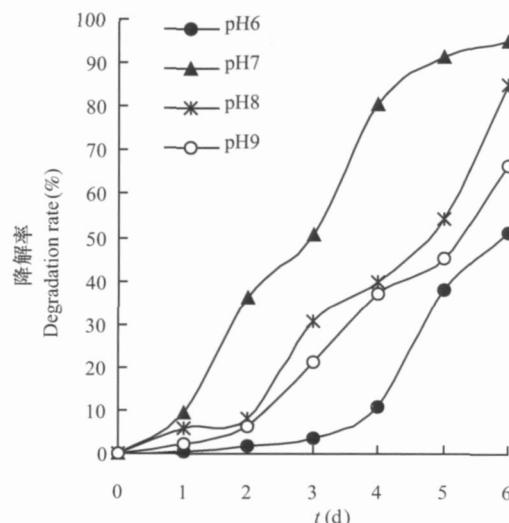


图 2 pH 值对 MCLR 降解效能影响

Fig. 2 Effect of pH on MCLR degradation

2.2 pH值对假单胞菌 M-6降解MCLR的影响

为了考察 pH 值对假单胞菌 M-6 降解效能的影响,在以 MCLR (15.0 mg/L) 为唯一碳源的培养基中,用 0.05% 的 KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 不同比例来调节培养基的 pH 值,分别考察 pH 值为 6.0、7.0、8.0 和 9.0 条件下,假单胞菌 M-6 对 MCLR 降解效能的影响(图 2)。由图 2 可以看出,环境的 pH 值对该菌的降解能力影响较大,该菌株降解反应的最适 pH 为 7.0,在 pH 小于 6.0 或大于 8.0 的条件下,MCLR 的降解效果都不理想,说明该菌在对降解 MCLR 的过程中对环境的酸碱度有一定的要求。

2.3 温度对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的影响

在以 MCLR (15.0 mg/L) 为唯一碳源的培养基中,分别考察温度分别为 15、30、35 的条件下,假单胞菌 M-6 对 MCLR 降解效能的影响(图 3)。由图可以看出,温度对假单胞菌降解 MCLR 有较大的影响。随着温度升高,假单胞菌 M-6 的降解效率逐步提高,在 30 时达到最高,6d 降解率达 90%。但是温度过高也会抑制菌的生长和酶的生成,从而导致降解效能下降。这是由于细胞增殖要在一定温度下进行,适宜的温度有利于细胞的增长和酶的合成,因此确定 30 为该菌株降解 MCLR 的最佳温度。

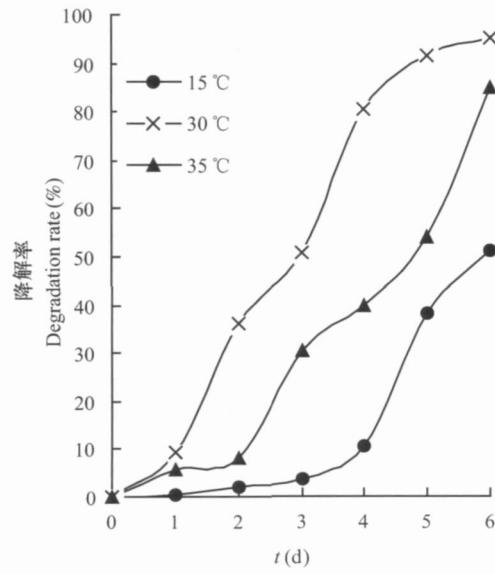


图 3 温度对菌株降解 MCLR 的影响

Fig. 3 Effect of temperature on MCLR degradation

2.4 供氧量对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的影响

在以 MCLR (15.0 mg/L) 为唯一碳源的培养基中,调节摇床转速分别为 120、130、140、150、160 r/min,考察不同的通气量对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的影响。从图 4 中可以看出,不同的转速下 MCLR

均有不同程度的降解,转速增高时,降解速度有所加快。这是因为随着转速的提高,增加了氧气在培养基中的传质,菌的降解速率明显提高,即氧传递速度的加快能促进菌株的生长,从而加快对 MCLR 的消耗降解。当转速增加到 150 r/min 时,氧气在培养基中的溶解度达到最大值,MCLR 的降解率达到最大,再增加转速,MCLR 降解率不再增加,因此,在实验中选择摇床转速为 150 r/min。

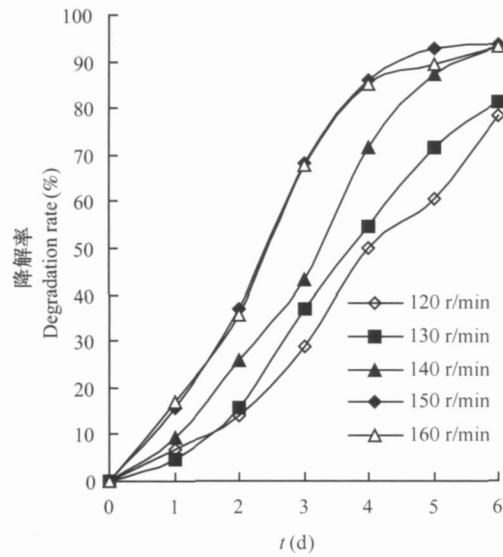


图 4 供氧量对菌株降解 MCLR 影响

Fig. 4 Effect of aeration on MCLR degradation

2.5 假单胞菌 M-6 对不同起始浓度 MCLR 的降解

在以 MCLR 为唯一碳源的培养基中,调节 MCLR 的初始浓度 (mg/L) 分别为 3.8、7.6、15.2、18.6 及 37.2,考察假单胞菌 M-6 对不同初始浓度 MCLR 的降解(图 5)。实验结果表明:该菌经驯化后对 MCLR 都有很好的降解性能。在 MCLR 的初始浓度为 7.6—37.2 mg/L 范围内其降解效率都可达到 70% 左右,而且随着浓度的升高该菌株对 MCLR 的降解速率也有所升高。但是并非浓度越高降解效能就越好,该菌降解 MCLR 的能力有一个限值,当水体中的 MCLR 的浓度达到 15.2 mg/L 时,降解效能最好,降解率可达到 95%。对于初始浓度不同导致该菌对 MCLR 降解效率不同的原因,猜测是由于 MCLR 作为该菌的碳氮来源(培养基中的 N 源可忽略不计)直接影响了细菌的生长繁殖及其生命活动。当 MCLR 浓度低时,细胞处于贫营养状态,大部分细菌进入停滞期,生命活动不活跃,对 MCLR 的降解缓慢;当 MCLR 浓度增高,碳氮营养元素满

足细菌生长需要,细菌大量繁殖且消耗 MCLR。MCLR 的浓度达到 15.2 mg/L 时,降解效能最好,但是再继续增大浓度反而最终降解效果有所下降,说明高浓度的 MCLR 对菌体活性可能存在一定的抑制作用,从而影响对其本身的降解。

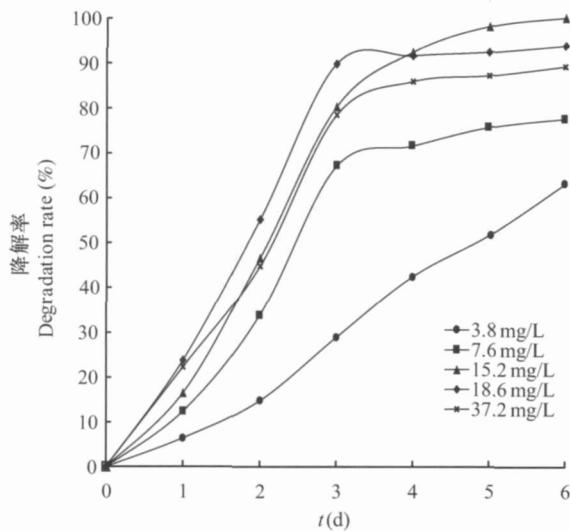


图 5 不同 MCLR 浓度对菌种降解效率的影响

Fig. 5 The efficiency of MCLR degradation at the different initial concentration of MCLR

2.6 假单胞菌 M-6 降解 MCLR 活性物质的定位

细菌分泌的物质一般分为胞内物质和胞外物质,如果起降解作用的物质为胞外物质,则除去菌体的培养液可以表现出一定的降解能力;如果起降解作用的物质为胞内物质,则培养液对 MCLR 没有降解能力,只有菌体表现出一定的降解能力。基于此,本文对假单胞菌 M-6 降解 MCLR 的活性物质进行定位研究。

表 1 胞外物质 A1 和胞内物质 A2 对 MCLR 的降解率

Tab. 1 Degradation rate of MCLR by extracellular and intracellular extracts

处理 Treatment	初始浓度 Initial concentration (mg/L)	处理后浓度 Final concentration (mg/L)	降解率 Degradation rate (%)
A1(胞外物质) A1(extracellular extract)	15.0	14.98	<1
A2(胞内物质) A2(intracellular extract)	15.0	1.20	92
CK	15.0	14.97	<1

胞外物质 A1 和胞内物质 A2 对 MCLR 的降解试验结果(表 1)。结果证明 A1 没有明显的降低

MCLR 的含量,而 A2 则很快降低了 MCLR 的含量,5min 内 MCLR 几乎全部降解。由此可以看出,对 MCLR 产生降解作用的物质为假单胞菌 M-6 的胞内物,当细胞内的降解酶与 MCLR 直接接触时,降解反应在瞬间即可完成。其胞外代谢物基本上不会降解 MCLR 的含量。

2.7 假单胞菌胞内降解物的性质识别

判断出降解 MCLR 的活性物质是假单胞菌 M-6 的胞内物质之后,将胞内物质提取出来,进行物质性质分析。首先将胞内物质加热后用于降解藻毒素,然后通过 HPLC 检测后发现,藻毒素基本没有被降解。这说明菌株产生的具有降解活性的物质不耐热。又由于菌体可产生的活性物质中,不耐热的物质通常有维生素、DNA 以及绝大多数的蛋白(包括酶),而前二者一般不具有催化降解的能力,因此可以初步判断假单胞菌 M-6 所产生的降解活性物质很有可能是酶类,进而对其进行蛋白质电泳分析,以得到详细的酶信息。

2.8 假单胞菌 M-6 胞内降解活性物质的 SDS-PAGE 分析

以假单胞菌 M-6 为研究对象,同时以另一株前期研究筛选出的菌株 M-7(亦为假单胞菌)作为对照样,研究其在添加藻毒素(浓度 15.0 mg/L)诱导培养前后,无细胞提取液的全蛋白电泳(图 6)。

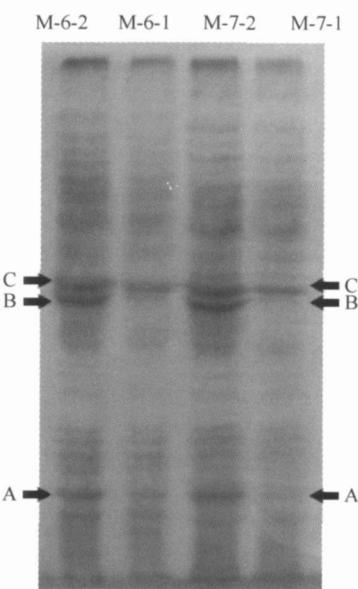


图 6 诱导前后两株菌株细胞全蛋白 SDS-PAGE 电泳分析结果

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the fungi before and after induction

诱导前:M-6-1 和 M-7-1;诱导后:M-6-2 和 M-7-2
Before induction: M-6-1 and M-7-1; After induction: M-6-2 and M-7-2

从图中可以看出,菌株假单胞菌 M-6 在诱导前后的全蛋白电泳结果不尽相同。诱导前假单胞菌 M-6-1 与在培养基中添加藻毒素诱导培养一段时间后的菌株假单胞菌 M-6-2 相比,所含蛋白条带总数量相同,这说明没有新的蛋白被诱导产生。但却有一种低分子量蛋白(A)及两种中等分子量蛋白(B、C)的表达量增加,尤其是蛋白 A 和蛋白 B 表达量的增加极为明显。菌株 M-7 也出现了同样的情况,并且两菌株的蛋白表达量增加的条带位置也相同,由此可见,A、B、C 这三个条带所代表的蛋白对藻毒素 MCLR 的降解起着很重要的作用。因此可以推测这三种蛋白即是与藻毒素降解有关的酶类,而且诱导前后蛋白条带数量不变,仅仅是蛋白表达量的增加说明这些酶是细胞内本身所含有的组织酶,而不是诱导酶,当外界环境中底物 MCLR 的浓度升高时,这些酶的表达量也随之提高。更为详细的酶定性和定量分析还有待于进一步研究。

3 讨 论

菌株的接种量、pH 值、温度、溶解氧对假单胞菌 M-6 降解藻毒素 MCLR 的效能都有一定的影响。当接种量为 10% 时,菌体的降解效果相对较好;其降解反应的最适 pH 为 7.0,此时 6d 内降解率可达 90% 以上;该菌株降解 MCLR 的最佳温度为 30℃;随着通气量的提高,菌的降解速率有明显的提高。假单胞菌 M-6 对不同起始浓度 MCLR 的降解效率不同,当初始浓度为 15.2 mg/L 时,菌株的降解效率最高,可达 95%,MCLR 浓度过高和过低都将影响假单胞菌 M-6 对碳源和氮源的吸收和利用。假单胞菌 M-6 降解藻毒素的酶都属于胞内酶,同时 SDS-PAGE 全蛋白电泳结果表明,该菌在降解藻毒素过程中主要有 3 种酶参与反应,且菌株诱导实验证明这 3 种酶都是细胞内本身所含有的组织酶。

参考文献:

- [1] Orr P T, Jones G J, Hunter R, et al. Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment [J]. *Toxicon*, 2003, 41(5): 613—620
- [2] Haider S, Naithani V, et al. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern [J]. *Chemosphere*, 2003, 52: 1—21
- [3] Wang S Y, Shen Y Z, Shen G F, et al. Drinking water types, microcystins and colorectal cancer [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2000, 34(4): 224—226 [王声湧, 沈永洲, 沈高飞, 等. 饮用水源中的微囊藻毒素与大肠癌发病的关
 - 系. 中华预防医学杂志, 2000, 34(4): 224—226]
- [4] Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil [J]. *The Lancet*, 1998, 352(2): 21—26
- [5] Zhao N. The relationship cyanotoxin (Microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2001, 23(2): 96—99 [赵宁. 饮水中微囊藻毒素与我国原发性肝癌关系的研究. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(2): 96—99]
- [6] 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
- [7] Angelina K YL, Phillip M F, Ellie E P. Biodegradation of the cyanobacterial hepatotoxin Microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay [J]. *Environ Sci Technol*, 1995, 29: 242—246
- [8] Boume D Q, Jones G J, Blakeley R, et al. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environ Microbiology*, 1996, 62(11): 4086—4094
- [9] Hong-Dong Park, Youhei Sasaki, Tomoko Maruyama, et al. Degradation of the cyanobacteria hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake [J]. *Environ Toxicol*, 2001, 16: 337—343
- [10] Yan H, Deng YM, Zou H, et al. Isolation and activity of bacteria for the biodegradation of microcystins [J]. *Environmental Science*, 2004, 25(6): 49—53 [闫海, 邓义敏, 邹华, 等. 降解微囊藻毒素菌种的筛选和活性研究. 环境科学, 2004, 25(6): 49—53]
- [11] He H S, Yan H, Zhou J, et al. Characterization of enzymatic degradation of microcystins by a new isolated bacterium [J]. *Environmental Science*, 2006, 27(6): 1171—1175 [何宏胜, 闫海, 周洁, 等. 筛选菌种酶催化降解微囊藻毒素的特点. 环境科学, 2006, 27(6): 1171—1175]
- [12] Li Y B, Yuan B L, Song W, et al. Investigation of Microcystin-LR and identification of toxic algae strains in a reservoir [J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2005, 21(3): 52—56 [李艳波, 范宝玲, 宋炜, 等. 水库水藻毒素污染成因分析及产毒藻株的分离鉴定. 福建师范大学学报(自然科学版), 2005, 21(3): 52—56].
- [13] Yuan B L, Li Y B, Zhao Y L, et al. Screening the high efficient bacteria for degrading Microcystin-LR and their removal efficiency [J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2005, 21(3): 48—51 [苑宝玲, 李艳波, 赵艳琳, 等. 高效藻毒素降解菌的筛选及其降解藻毒素的效能研究. 福建师范大学学报(自然科学版), 2005, 21(3): 48—51]
- [14] Yuan B L, Qu J H. Accumulation and separation of algae peptide toxins by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *J. Analytical Chemistry*, 2001, 29(12): 1406—1408 [苑宝玲, 曲久辉. 藻类肝毒素的富集提取与分离. 分析化学, 2001, 29(12): 1406—1408]

BIODEGRADATION AND BIOMECHANISM OF MICROCYSTIN-LR BY PSEUDOMONADACEAE

CHEN Cai-Yun¹, YUAN Bao-Ling¹, LI Yan-Bo¹, LIU Bo² and SHI Huai²

(1. College of Environment and Resources, Fuzhou University, Fuzhou 350108;

2. Biotechnology Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Abstract: The high-efficiency microcystin-LR-degrading strain *Pseudomonadaceae M-6*, which isolated from the sediment of eutrophic reservoir in Fuzhou, China, for the biodegradation of MCLR was investigated. We studied the influence of inoculum concentration, temperature, aeration, pH and initial concentration of MCLR on MCLR degradation by *Pseudomonadaceae M-6*. It was shown that the biodegradation rates could be reached to 90% at 10% inoculum concentration, pH 7.0, 30°C, and aeration speed of 150 r/min after 6 days. The MCLR degradation rates were also affected by the initial concentrations of MCLR owing to the effect of the absorption of nitrogen and carbon sources by *Pseudomonadaceae M-6*. The 6-day biodegradation rate was more than 95% when the initial MCLR concentration was 15.2 mg/L. From SDS electrophoresis, it can be concluded that the MCLR biodegradation was mainly due to the three kinds of enzymes which were all intracellular enzymes.

Key words: *Pseudomonadaceae*; Microcystins LR (MCLR); Biological degradation; Enzyme