

筛选菌种酶催化降解微囊藻毒素的特点

何宏胜^{1,2}, 闫海^{1*}, 周洁^{1,2}, 葛世友², 肖宝清², 吕乐¹

(1. 北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083; 2. 北京科技大学土木与环境工程学院环境工程系, 北京 100083)

摘要: 从云南滇池底泥中筛选出 1 株能够高效降解微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 的纯菌种. 该菌无细胞提取液能进行降解 MC-RR 和 MC-LR 的酶促反应, 并有最终产物的积累. 在 pH 6~8 范围内酶对 MC-RR 和 MC-LR 的催化降解活性较高, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 对降解 MCs 的酶促反应没有明显的促进作用.

关键词: 微囊藻毒素; 生物降解; 酶促反应

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1171-05

Characterization of Enzymatic Degradation of Microcystins by a New Isolated Bacterium

HE Hong-sheng^{1,2}, YAN Hai¹, ZHOU Jie^{1,2}, GE Shi-you², XIAO Bao-qing², LÜ Le¹

(1. Department of Biological Science and Technology, School of Applied Science, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China; 2. Department of Environmental Engineering, School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: A strain of bacterium capable of biodegrading microcystin (MC) RR and MC-LR was isolated from the sediments of Dianchi Lake. It was demonstrated that the enzymes in cell-free extract of this bacterium were responsible for the degradation of MC-RR and MC-LR, and the dead-end products of MC-RR and MC-LR catalyzed by these enzymes were observed on HPLC chromatograms. Results show that the optimum pH for the activities of these enzymes was in the range from 6.0 to 8.0, however the metal ions of Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} had no apparent effects on the enzymatic degradation of MC-RR and MC-LR.

Key words: microcystins; biodegradation; enzymatic degradation

微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 是蓝藻毒素中产生量最大和造成危害最严重的肝毒素种类^[1,2], 其中 MC-RR 和 MC-LR 是我国和世界上检出频率及含量都最高的 MCs 类型^[3~5]. MCs 最主要危害是能够诱发肿瘤, 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^[6~8]. 1996 年巴西血液透析中心发生的直接导致 52 名病人死亡的医疗事故的直接原因就是透析用水被 MCs 污染^[9]. 世界卫生组织 (WHO) 推荐饮用水中 MC-LR 的浓度应不高于 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10].

MCs 具有环状结构和间隔双键, 在水体中相当稳定, 生物降解被认为是一种安全有效的方式^[11~14]. Bourne 等^[15]研究了鞘氨醇单胞菌 MJPV 酶催化降解 MC-LR 的途径, 发现至少有 3 种酶参与了 MC-LR 的代谢过程, 有 1 个中间代谢产物和 1 个最终代谢产物的生成, 并指出负责催化第一和第三步反应的酶都是金属酶或者金属-激活酶. 闫海等^[14]研究了 *Ralstonia solanacearum* 菌降解 MC-RR 和 MC-LR 的途径, 发现分别至少有 2 种酶参与了代谢过程, 分别有 1 个中间代谢产物和 1 个最终

代谢产物的生成.

本研究从云南滇池底泥中筛选出了 1 株对 MC-RR 和 MC-LR 都具有很强降解能力的纯菌种, 并研究该菌种无细胞提取液降解 MC-RR 和 MC-LR 的酶促反应以及 pH 和金属离子对该酶促反应的效应. 以期对 MCs 的生物降解理论和降解饮用水中 MCs 提供依据.

1 材料与方法

1.1 标准品和提取提纯的 MC-RR 和 MC-LR

标准品 MC-RR (分子式: $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$, 分子量: 1038.2) 和 LR (分子式: $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$, 分子量: 995.2) 均为购自美国 Sigma 公司的产品, 纯度都在 95% 以上. 生物降解实验中所用 MC-RR 和 MC-LR 从蓝藻细胞中提取提纯获得, 具体操作步骤见文献

收稿日期: 2005-06-20; 修订日期: 2005-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270277, 20377047); 北京市自然科学基金项目 (8063029); 中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室开放基金项目 (031029)

作者简介: 何宏胜 (1981~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: hhsheng00@163.com

* 通讯联系人, E-mail: haiyan@sas.ustb.edu.cn

[16].

1.2 菌种筛选

采用文献[17]的基础培养基,加入提取提纯的 MCs 作为微生物生长的唯一碳源和氮源.在液体培养基中经 4 次转接培养后,取微量稀释并涂布于固体培养基表面上.培养 4d 后分别挑取不同形态特征的单克隆菌落接种于含有 MCs 的液体培养基中培养,鉴定其是否具有降解 MCs 的功能.采用此种分离方法筛选出了 1 株能够高效降解 MCs 的纯菌种,暂命名为 USTB04.

1.3 无细胞提取液(cell-free extract, CE)制备

采用同样基础培养基,以葡萄糖和酵母粉为碳源和氮源批量培养,收获对数生长期的菌体细胞,用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液(KH_2PO_4 2.72g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10.74g, 去离子水 1000 mL, pH 7.0)清洗细胞 3 次.悬浮细胞在超声波细胞粉碎仪上破碎,破碎条件:温度 4°C 左右,输出功率 400W,时间 30min(破碎 8s, 间隔 4s).细胞破碎后经高速冷冻离心 $18\,000\text{r}/\text{min}$, 15min, 取上清液作为无细胞提取液(CE),置于 -18°C 冰箱中冻存备用.

1.4 MCs 的酶催化降解

CE 的蛋白浓度采用 Bradford 检测法测定^[18]. MCs 的酶催化降解反应在 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲体系中进行,加入 CE 和提取提纯的 MC-RR 和 MC-LR 开始反应. MC-RR 和 MC-LR 的初始浓度分别为 $56.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $28.8\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入不同比例的 CE 使蛋白浓度分别为 70 、 210 和 $350\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 反应总体积 3mL, 反应条件:摇床转速 $200\text{r}/\text{min}$, 温度 30°C , 定时取样.样品经离心 $18\,000\text{r}/\text{min}$, 10min, 取上清液直接在 HPLC 上分析测定.

金属离子 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} (以盐酸盐形式加入)对该酶促反应的效应研究在 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲体系中进行,其中蛋白浓度为 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MC-RR 和 MC-LR 的初始浓度分别为 $50.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $24.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 的浓度都为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应条件同上.

用 $1.0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸和 $1.0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 分别将磷酸盐缓冲溶液调至不同 pH 值,加入 CE 和 MCs 提取液,反应时间 5.0h,其中蛋白浓度为 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MC-RR 和 MC-LR 的初始浓度分别为 $58.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 和 $31.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其它条件同上.

1.5 MCs 的分析测定

样品在 HPLC 上分析测定. HPLC 配置为:岛津 LC-10ATvp 型输液泵,岛津 SPD-M10Avp 型二极管

阵列检测器,分离柱是 Waters Symmetry C_{18} ($4.6 \times 250 \text{ mm}$) 色谱柱.测定条件:流动相 35% 乙腈水溶液,水相中含 0.05% 三氟乙酸(TFA);流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 239nm;进样量 20 μL .

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

图 1 显示了 USTB04 菌降解 MC-RR 和 MC-LR 的过程.在 MC-RR 和 MC-LR 的初始浓度分别为 $90.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $39.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能在 2 d 内将其完全降解,日均降解能力分别达到 $45.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $19.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.进一步研究发现生长于葡萄糖和酵母粉的 USTB04 菌仍然可以保持降解 MCs 的能力,说明其降解 MCs 活性不需 MCs 的诱导. Bourne 等^[19]发现,鞘氨醇单胞菌 MJ-PV 对 MC-LR 的降解也不需要 MC-LR 的诱导,并推测 MJ-PV 中负责催化降解 MC-LR 的酶与细胞壁上的肽聚糖循环有关,对 MC-LR 的降解是非特异性的.

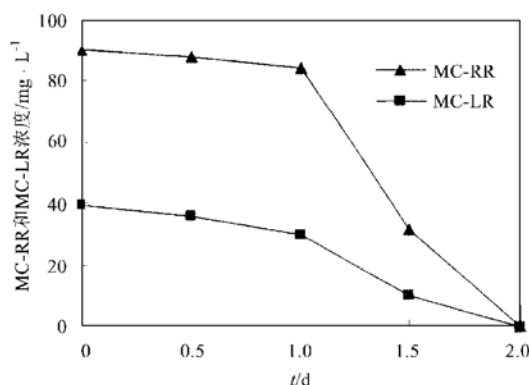


图 1 USTB04 降解 MC-RR 和 MC-LR 的过程

Fig. 1 Biodegradation of MC-RR and MC-LR by USTB04

2.2 MCs 的酶催化降解

图 2 为不同时间酶(蛋白浓度为 $210\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)催化降解 MC-RR 和 MC-LR 的 HPLC 谱图.反应 1.5h,可观测到 MC-RR 和 MC-LR 的出峰都有明显的降低,说明 CE 中存在能够催化代谢 MC-RR 和 MC-LR 的酶,另外在 MC-LR 的出峰位置之前观察到 1 个新的出峰的累积;反应 5.0h, MC-RR 的峰降至很低, MC-LR 的峰已基本消失,而新的出峰在不断增高;反应 10h, MC-RR 的出峰也已消失,而新的出峰增到最大;反应 24h,新的出峰保持不变,说明新的出峰可能是 USTB04 菌酶催化降解 MC-RR 和 MC-LR 的最终产物.

Bourne 等^[15]研究鞘氨醇单胞菌 MJ-PV 酶催化

降解 MC-LR 时, 在 MC-LR 出峰位置的前面也观测到 1 个最终产物的出峰, 但是在 MC-LR 出峰位置的后面还发现了 1 个中间过渡产物的出峰, 而本研究中并未观测到相似位置有任何出峰的累积, 推测是因为不同的菌种对 MCs 的降解途径不同。

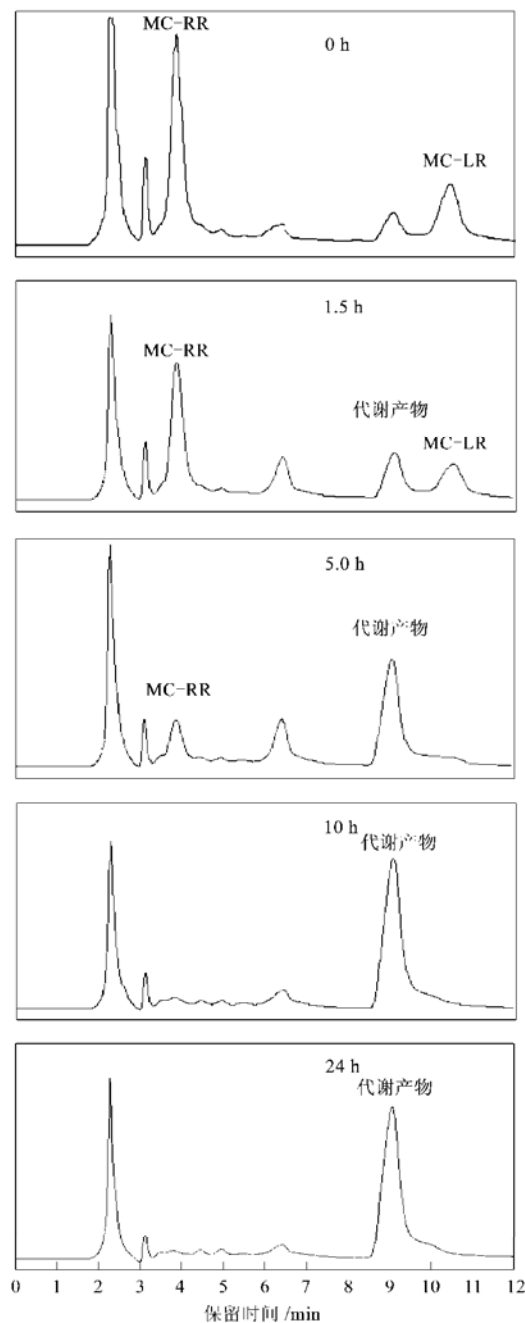


图 2 USTB04 菌无细胞提取液酶催化降解 MC-RR 和 MC-LR 的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the enzymatic degradation of MC-RR and MC-LR by the cell-free extract of USTB04

2.3 酶促反应动力学

图 3 显示了 USTB04 菌酶降解 MC-RR 和 MC-

LR 的酶促反应动力学过程. 结果显示, 随着酶浓度 (蛋白浓度) 的升高, MC-RR 依次分别在 24h 后 24h 和 10h 被完全降解, MC-LR 依次分别在 24h、5h 和 3h 被完全降解, 说明该酶促反应的速率随着酶浓度的升高而加快; 曲线的渐趋平缓表明随着 MCs 的不断降解即底物浓度的减小, 该酶促反应的速率逐渐降低, 符合米氏方程的酶促反应动力学特点。

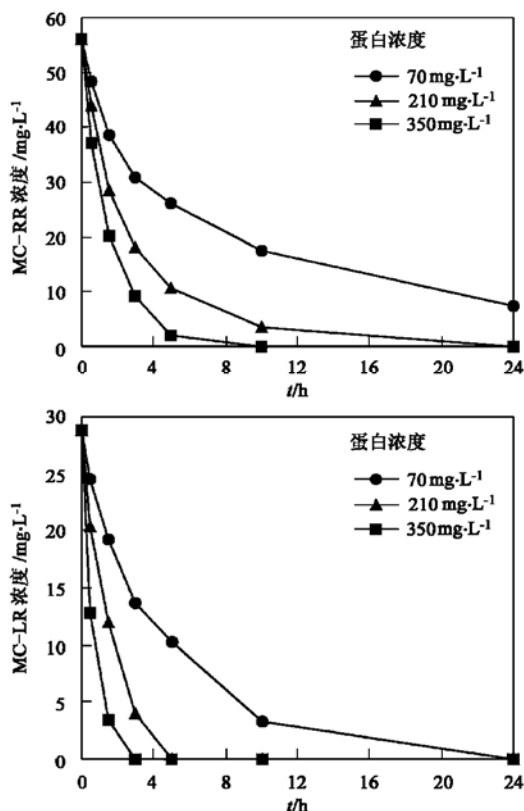


图 3 MC-RR 和 MC-LR 在不同蛋白浓度下的酶催化降解
Fig. 3 Enzymatic degradation of MC-RR and MC-LR by CE at different protein concentration

2.4 金属离子的效应

图 4 显示了金属离子 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 对 USTB04 菌酶催化降解 MC-RR 和 MC-LR 的效应. 结果表明, Zn^{2+} 对 MC-RR 的酶催化降解有一定的促进作用, 但对于 MC-LR 的酶催化降解效应不明显; Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 对 MC-RR 和 MC-LR 的酶催化降解均没有明显的效应. Bourne 等发现^[15], 鞘氨醇单胞菌 MJ-PV 负责催化降解 MC-LR 的 3 种酶中, 负责催化第一和第三步反应的酶都是金属酶或金属-激活酶. 因此 USTB04 菌中负责催化降解 MC-RR 和 MC-LR 的酶可能需要其它金属离子的参与, 也可能这些酶不是金属酶或金属-激活酶, 其机理有待于进一步研究。

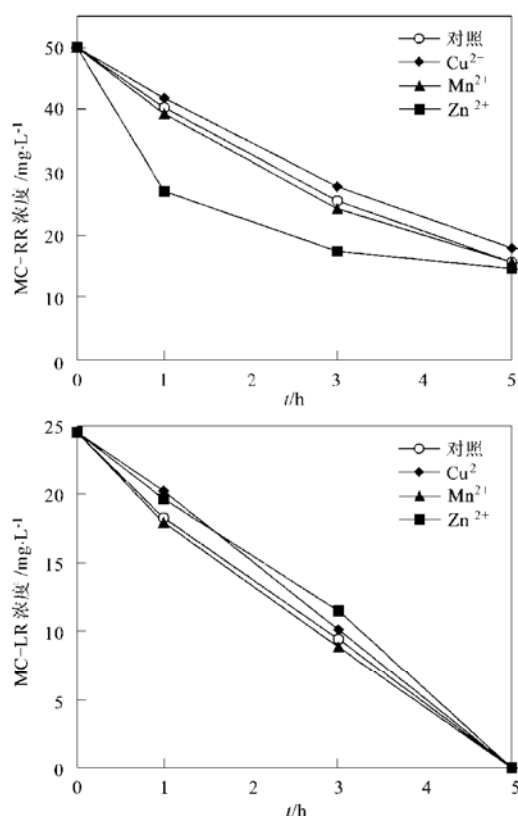


图4 金属离子对酶催化降解 MC-RR 和 MC-LR 的效应

Fig. 4 Effect of different metal ions on the enzymatic degradation of MC-RR and MC-LR

2.5 pH 对酶活性的影响

图5显示了不同的pH对USTB04菌酶催化降解MC-RR和MC-LR活性的影响。结果表明,MC-RR在pH值7~9范围内去除率较高,在pH值为8时最高;MC-LR在pH值5~7范围内去除率较高,在pH值为6时最高。故在pH 6~8范围内USTB04

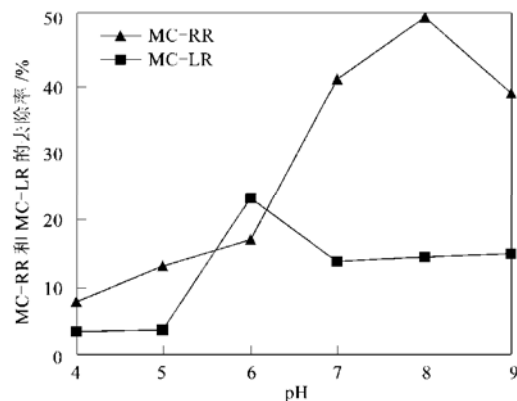


图5 pH值对酶催化降解 MC-RR 和 MC-LR 活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on the enzymatic degradation of MC-RR and MC-LR

菌酶对MC-RR和MC-LR的催化降解活性较高。

3 结论

(1)从云南滇池底泥中筛选出1株能高效降解MC-RR和MC-LR的纯菌种USTB04,其日均降解速率分别达到 $45.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $19.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2)USTB04菌无细胞提取液对MC-RR和MC-LR有酶催化降解能力,且有最终产物的生成;该酶促反应的降解速率随酶浓度的升高而加快,且随底物浓度的减小而降低,符合米氏方程的酶促反应动力学特点。

(3)在pH 6~8范围内USTB04菌酶对MC-RR和MC-LR的催化降解活性较高, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 对降解MC-RR和MC-LR的酶促反应均没有明显的促进作用。

参考文献:

- [1] 闫海,潘刚,张明明.微囊藻毒素的研究进展[J].生态学报,2002,22(11):189~197.
- [2] Haider S, Naithani V, Viswanathan P N, *et al.* Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern [J]. Chemosphere, 2003, 52: 1~21.
- [3] Dawson R M. The toxicology of microcystins [J]. Toxicon, 1998, 36(7): 953~962.
- [4] 宋立荣,雷腊梅,何震荣,等.滇池蓝藻铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特性及毒素分析[J].水生生物学报,1999,23(5):402~408.
- [5] 张维晃,徐晓清,丘昌强.水环境中微囊藻毒素的研究进展[J].环境科学研究,2001,14(2):57~61.
- [6] 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: 113~186.
- [7] 俞顺章,赵宁,资晓林,等.饮水中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.
- [8] 周伦,鱼达,余海,等.饮用水源中的微囊藻毒素与大肠癌发病的关系[J].中华预防医学杂志,2000,34(4):224~226.
- [9] Pouria S. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru [J]. Brazil Lancet, 1998, 352(2): 21~26.
- [10] 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.
- [11] Jones G J, Bourne D J, Blakeley R L, *et al.* Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria [J]. Nat. Toxins, 1994, 2: 228~235.
- [12] 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.

- [13] Takenaka S, Watanabe M F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease [J]. *Chemosphere*, 1997, **34**(4): 749~ 757.
- [14] 闫海. 微囊藻毒素的产生与生物降解[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2002. 64~ 78.
- [15] 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]. *Applied and Environ. Microbiology*, 1996, **62**(11): 4086~ 4094.
- [16] 闫海, 潘刚, 张明明, 等. 微囊藻毒素的提取和提纯研究[J]. *环境科学学报*, 2004, **24**(2): 355~ 359.
- [17] 闫海, 邓义敏, 邹华, 等. 降解微囊藻毒素菌种的筛选与活性研究[J]. *环境科学*, 2004, **25**(6): 49~ 53.
- [18] 汪家政, 范明. 蛋白技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 42~ 47.
- [19] Bourne D G, Riddles P, Jones G J, *et al.* Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR [J]. *Environ. Toxicol.*, 2001, **16**: 523~ 534.
- [16] 闫海, 潘刚, 张明明, 等. 微囊藻毒素的提取和提纯研究[J].

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性, 论点明确, 文字精炼, 数据可靠. 全文不超过 8000 字(含图、表、中英文摘要及参考文献). 国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示). 来稿可用 A4 纸激光打印(一式 3 份), 寄至本刊编辑部; 或网上投稿. 稿件往来一般通过本刊编辑部, 请不要寄给个人, 以免耽搁或丢失.

2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写. 论文各部分的排列顺序为: 题目; 作者姓名; 作者工作单位、地址、邮政编码; 中文摘要; 关键词; 中图分类号; 英文题目; 作者姓名及单位的英译名; 英文摘要; 关键词; 正文; 致谢; 参考文献.

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容, 一般不超过 20 字, 少用副标题.

4. 中文摘要不少于 300 字, 以第三人称写. 摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论, 重点是结果和结论. 英文摘要与中文对应, 注意人称、时态和语言习惯, 以便准确表达内容.

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等. 科普知识不必赘述.

6. 文中图表应力求精简, 同一内容不得用图表重复表达, 要有中英文对照题目. 图应大小一致, 曲线粗于图框, 图中所有字母、文字字号大小要统一. 表用三线表. 图表中术语、符号、单位等应与正文一致.

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI). 论文中物理计量单位用字母符号表示, 如 mg(毫克), m(米), h(小时)等. 科技名词术语用国内通用写法, 作者译的新名词术语, 文中第一次出现时需注明原文.

8. 文中各级标题采用 1, 1.1, 1.1.1 的形式, 左起顶格书写, 3 级以下标题可用(1), (2)表示, 后缩 2 格书写.

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写, 正斜体. 生物的拉丁学名为斜体. 缩略语首次出现时应给出中文全称, 括号内给出英文全称和缩略语.

10. 未公开发表资料不列入参考文献, 可在出现页以脚注表示. 文献按文中出现的先后次序编排. 常见文献书写格式为:

期刊: 作者(外文也要姓列名前). 论文名[J]. 期刊名, 年, 卷(期): 起页~ 止页.

图书: 作者. 书名[M]. 出版地: 出版社, 年. 起页~ 止页.

会议文集: 作者. 论文名[A]. 见(In): 编者. 文集名[C]. 出版地: 出版社(单位), 年. 起页~ 止页.

学位论文: 作者. 论文名[D]. 保存地: 保存单位, 年份.

报告: 作者. 论文名[R]. 出版地. 出版单位, 出版年.

专利: 专利所有者. 专利题名[P]. 专利国别: 专利号, 出版日期.

11. 来稿文责自负, 切勿一稿多投. 编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节. 在 3 个月内未收到本刊选用通知, 可来电询问. 对未刊稿件一般不退, 请作者自留底稿.

12. 投稿请附作者单位详细地址, 邮编, 电话号码, 电子邮箱等. 编辑部邮政地址: 北京市 2871 信箱; 邮编: 100085; 电话: 010-62941102, 010-62849343; 传真: 010-62849343; E-mail: hjkx@rcees.ac.cn