

滇池沉积物菌群对微囊藻毒素的厌氧生物降解

陈晓国¹, 杨霞¹, 陈锦¹, 张圣虎¹, 肖邦定²

(1. 武汉理工大学资源环境学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 好氧微生物降解已经被证明是微囊藻毒素(MC)自然转化的主要途径, 但是厌氧降解的作用尚不明确. 为了揭示这一降解过程, 研究了滇池沉积物中混合菌群在厌氧条件下对 MCLR 的降解能力, 并考察了环境因素和外加营养源对该过程的影响. 结果表明, 厌氧条件下 MCLR 在 2 d 内从 5 mg/L 迅速降解到检测限以下, 说明该菌群在厌氧条件下对 MCLR 具有较强的降解能力, 并且可以利用 MCLR 作为唯一氮源. 在实验温度范围内, MCLR 的降解速率随着温度的升高而增大. 酸性条件下 MCLR 的厌氧降解缓慢(pH = 5.0)甚至停止(pH = 3.0), 而中性(pH = 7.0)和碱性(pH 为 9.0、11.0)条件下降解速率没有显著差异. 单独添加葡萄糖可以产生酸性物质而使体系的 pH 下降, 从而抑制 MCLR 的降解, 但是同时添加硝酸盐可以消除这一影响. 单独添加硝酸盐对 MCLR 的厌氧降解也有显著的抑制作用, 说明硝酸根在这一过程中未被 MCLR 厌氧降解菌用作最终电子受体. 以上结果表明, 厌氧降解可能是沉积物中 MCLR 转化的另一重要途径, 该过程在 MCLR 污染治理方面具有潜在的应用价值.

关键词: 微囊藻毒素; 厌氧; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)09-2527-05

Anaerobic Biodegradation of Microcystin by Bacterial Community from Sediment of Dianchi Lake

CHEN Xiao-guo¹, YANG Xia¹, CHEN Jin¹, ZHANG Sheng-hu¹, XIAO Bang-ding²

(1. College of Resources and Environmental Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Aerobic biodegradation has been identified as the main attenuation mechanism for microcystin, but the role of anaerobic microcystin biodegradation remains unclear. To elucidate this process, we assessed the potential for anaerobic microcystin LR biodegradation by sediment microbial community from Dianchi Lake and evaluated the effects of environmental factors and additional nutrient sources on the rates of anaerobic biodegradation. The results showed that microcystin LR was rapidly degraded from 5 mg/L to below detection limit within 2 days, demonstrating that the indigenous microorganisms can efficiently degrade microcystin LR under anaerobic conditions and can use microcystin LR as a sole nitrogen source. The rates of anaerobic microcystin LR biodegradation increased with increasing incubation temperature within the experimental range of 15–30°C. Anaerobic microcystin LR biodegradation was slower (pH = 5.0) or even ceased (pH = 3.0) at acidic pH, but there was no difference in the rates at neutral (pH = 7.0) and alkaline (pH 9.0, 11.0) conditions. The addition of glucose decreased pH of the culture by producing acidic compounds and therefore significantly inhibited the anaerobic biodegradation of microcystin LR, but with the addition of NO₃⁻, this inhibition disappeared. NO₃⁻ amendment also retarded the biodegradation of microcystin LR, demonstrating that NO₃⁻ was not used as a terminal electron acceptor. These findings suggest that anaerobic biodegradation might be another main attenuation mechanism for microcystin LR in sediments and present a significant bioremediation potential.

Key words: microcystin; anaerobic; biodegradation

近年来滇池水体富营养化严重, 蓝藻水华暴发频繁^[1]. 蓝藻水华释放出多种藻毒素, 其中微囊藻毒素(microcystin, MC)是对人类健康以及生态环境危害最严重的藻毒素之一^[2].

MC 具有环状结构, 化学性质稳定, 因此在环境中很难被去除, 常规水处理工艺对 MC 去除效果也有限^[3]. 好氧生物降解被认为是 MC 自然转化的主要途径之一^[4], 也是 MC 去除的一种有效手段^[5], 因此国内外学者对水体中 MC 的好氧降解过程进行了大量研究^[4–22]. 目前已经分离出多株 MC 降解纯菌株^[7–13], 对 MC 的好氧降解机制也有了深入的认识^[14–18]. 尽管 Holst 等^[4]的研究表明, MC 在缺氧条

件下也可以发生生物降解, 但是目前对于 MC 在厌氧条件下的降解过程却鲜见报道. 由于水环境尤其是富营养化水体的沉积物中普遍存在着间歇性的厌氧环境, 如果 MC 在厌氧条件下也能够发生微生物降解, 这一过程很可能对 MC 的迁移转化产生重要影响.

本研究利用滇池沉积物中的微生物菌群对 MCLR 的厌氧降解过程进行了分析, 考察了环境条

收稿日期: 2008-12-15; 修订日期: 2009-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(20607016); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA06Z304)

作者简介: 陈晓国(1974 ~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境化学, E-mail: xiaoguo_chen@tom.com

件、外加营养源对 MCLR 厌氧降解的影响,以期加深对水体中 MC 迁移转化过程的认识,并为 MC 污染治理提供指导.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

MCLR 标准样品购自 SIGMA 公司.实验用 MCLR 从实验室培养的藻类中提取纯化获得,经 HPLC 检测,色谱纯度 > 90%. MCLR 溶液经 0.22 μm 微孔纤维素滤膜过滤除菌后,置于 4℃ 冰箱保存待用.实验所用沉积物于 2006 年 12 月用拜克曼采泥器采自滇池福保湾,取表层沉积物,于 4℃ 冰箱中保存待用.除甲醇(色谱纯, TEDIA)和三氟乙酸(色谱纯, TEDIA),其余试剂均为分析纯.

Agilent 1100 型高效液相色谱仪; YQX-II 型厌氧培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); YXQ-LS-50SI 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SW-CJ-1D 型单人净化工作台(苏州净化设备有限公司); LRH-250A 生化培养箱(广东省医疗器械厂); Eppendorf 5810R 离心机; Sartorius 普及型 pH 计; Sartorius 电子天平.

1.2 厌氧条件的控制

厌氧环境由厌氧培养箱提供.先用高纯氮气和混合气体($\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2 = 85:10:5$)连续多次置换厌氧培养箱中的空气,然后采用钯催化剂催化去除剩余氧气来创造厌氧环境,并用美兰指示剂进行确认.实验过程中持续向厌氧培养箱中通入微量混合气体,以保持箱内的厌氧环境.

1.3 菌悬液的制备

在厌氧培养箱中将 0.4 g 沉积物接种于 20 mL MCLR 浓度为 5 mg/L 的无氧无菌水中,加塞后用蜡封口,于 30℃ 下富集培养 3 d 后,取上清液.

1.4 培养基

无机盐培养基组成: K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 水 1 000 mL,按实验要求调节 pH.

1.5 MCLR 的测定

实验样品经 10 000 r/min 高速离心 10 min 后,取上清液用 HPLC 法测定 MCLR 的浓度,流动相 0.01% TFA: MeOH = 40:60,流速 0.8 mL/min,色谱柱为 ZORBAX-C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),检测温度 25℃,检测波长 238 nm,进样量 10 μL ,依据保留时间定性,外标法定量.

1.6 MCLR 的厌氧降解实验

向体积为 15 mL 的反应瓶中加入 9 mL pH 为 7.0 MCLR 浓度为 5 mg/L 的无机盐培养基,置于厌氧培养箱中平衡 1 d,以除去其中的溶解氧.在厌氧条件下,每瓶接种 1 mL 菌悬液,加塞后用蜡封口,于 25℃ 恒温箱中避光静置培养.实验期间每瓶样品每天取样 0.4 mL,取样过程均在厌氧箱中进行,以保证严格厌氧条件.样品置于 -20℃ 冰箱中冷冻保存待测.同时作无菌对照,以上所有实验均重复 3 次.

为了解环境因素对 MCLR 厌氧降解的影响,利用上述实验方法对培养温度、初始 pH 值、外加 C 和 N 等因素的影响进行了研究.通过在 15、20、25 和 30℃ 下进行培养,研究温度对 MCLR 厌氧降解的影响.利用 10% NaOH 和 HCl 调节体系初始 pH,研究初始 pH 分别为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 时 MCLR 的降解情况.通过向无机盐培养基中单独或同时加入 1 g/L KNO_3 和 1 g/L 葡萄糖,研究外加营养源对 MCLR 降解的影响.以上实验均重复 3 次.为了掌握 MCLR 降解过程中体系 pH 值的变化情况,在测定 MCLR 浓度之后,利用精密 pH 试纸对样品的 pH 进行了测定.

1.7 数据分析

用 SPSS14.0 统计软件对实验结果进行方差分析.

2 结果与讨论

2.1 厌氧条件下混合菌群对 MCLR 的降解

图 1 是在厌氧条件下混合菌群对 MCLR 的降解情况.从中可见,在 3 d 的实验过程中,无菌对照组中 MCLR 浓度没有明显变化($4.25 \text{ mg/L} \pm 0.05 \text{ mg/L}$),说明实验期间 MCLR 没有发生非生物降解.实验组中 MCLR 降解迅速,2 d 内降解到检测限以下,并且无明显滞后期.该降解速率大于文献报道的混合菌群对 MCLR 的好氧降解速率^[4, 19~21],也大于缺氧条件下的降解速率^[4],说明该菌群在厌氧条件下对 MCLR 具有很强的降解能力.此外,在 MCLR 的厌氧降解过程中检测到 1 种中间产物有明显的积累,质谱分析结果表明该产物为 Adda.

由于厌氧环境普遍存在于自然水体尤其是湖泊沉积物中^[23],这一厌氧降解速率表明,厌氧微生物降解可能会在 MCLR 的自然转化过程中扮演重要角色.这一过程在 MCLR 污染治理方面也具有潜在的应用价值.

无机盐培养基中除了 MCLR 以外,不含其它氮源,在这种条件下 MCLR 仍可以被快速降解,并且在

该过程中混合菌群的生物量有明显的增加($D_{680\text{ nm}}$ 值由初始的 0.004 增加到第 3 d 的 0.059),说明该厌氧降解菌可以利用 MCLR 作为唯一氮源.这与 MC 的好氧降解过程有些类似,很多 MC 好氧降解菌也可以利用 MC 作为唯一氮源^[8, 24].

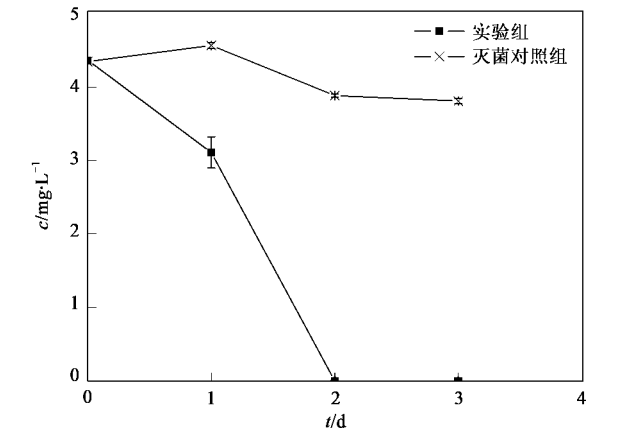


图 1 MCLR 的厌氧降解

Fig.1 Biodegradation of MCLR under anaerobic conditions

2.2 培养温度对 MCLR 厌氧降解的影响

图 2 是在不同温度下 MCLR 的降解情况.从中可见,除了 15℃ 下 MCLR 降解有 1 d 的滞后期外,其他温度下均没有明显的滞后期,并且随着温度的升高,MCLR 的降解速率有逐渐加快的趋势.统计分析表明,除 20℃ 与 25℃ 时降解速率没有显著差异外($p = 0.25$),其他温度之间均有显著的差异($p < 0.05$).MC 的好氧降解过程也有类似的规律,即随着温度的升高,生物降解速率增加,滞后期缩短^[20].这些结果表明,温度对 MCLR 的厌氧降解速率有一定的影响,说明微生物对 MCLR 的降解速率很可能会随着季节的变化而改变.

2.3 初始 pH 对 MCLR 厌氧降解的影响

图 3 是初始 pH 对 MCLR 降解的影响.从中可见,初始 pH 是影响 MCLR 厌氧降解过程的重要因素.酸性条件(pH 为 3.0、5.0)下,MCLR 的降解受到显著的抑制($p < 0.01$),并且抑制作用随着 pH 的降低而增强.pH 为 3.0 时,MCLR 浓度在实验初期有明显的降低,这可能是由于 MCLR 降解菌或降解菌产生的酶在开始阶段仍然具有一定的活性.此外,微生物对 MCLR 的吸附作用可能是 MCLR 浓度降低的另一个原因.随着时间的延长,强酸性条件(pH = 3.0)对 MCLR 降解过程的抑制逐渐明显,3 d 后降解菌和降解酶已经完全失去活性,MCLR 降解过程停止.中性和碱性条件下(pH 为 7.0、9.0、11.0),MCLR 均可

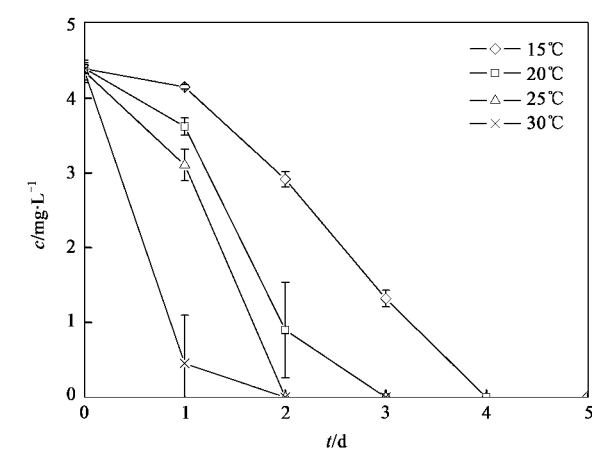


图 2 培养温度对 MCLR 厌氧降解的影响

Fig.2 Effect of incubation temperature on the anaerobic biodegradation of MCLR

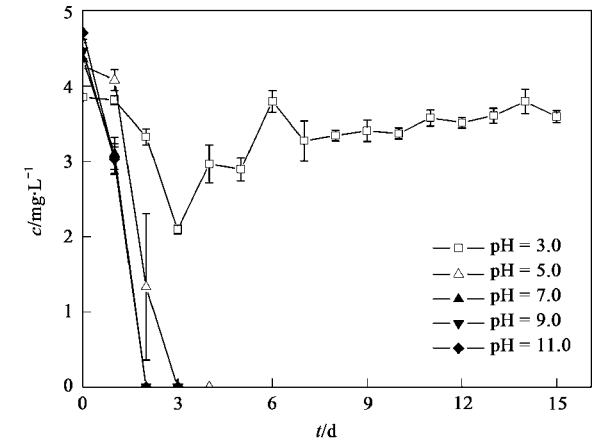


图 3 初始 pH 对 MCLR 厌氧降解的影响

Fig.3 Effect of initial pH on the anaerobic biodegradation of MCLR

以迅速降解,各实验组之间没有显著差异(p 为 0.67 ~ 0.97).

2.4 外加营养源对 MCLR 厌氧降解的影响

图 4 是在厌氧条件下,向无机盐培养基中添加营养源对 MCLR 降解的影响.从中可见,添加葡萄糖(1 g/L)可以显著抑制 MCLR 的降解($p < 0.01$).MCLR 只在前 2 d 降解迅速,降解率达 37.6%,此后 MCLR 浓度无明显变化,一直到实验结束降解率仍维持在 37.6%左右,说明实验后期降解过程已经停止.这与文献报道的 MC 在好氧和缺氧条件下的降解情况不同.在好氧条件下,添加碳源尽管对 MC 的降解也有一定的抑制作用,但是只减慢了 MC 的降解,并未使其停止^[9, 10].Holst 等^[4]研究发现,在缺氧条件下,添加葡萄糖可以促进 MC 的降解.

体系 pH 随时间变化的测定结果表明,对照组

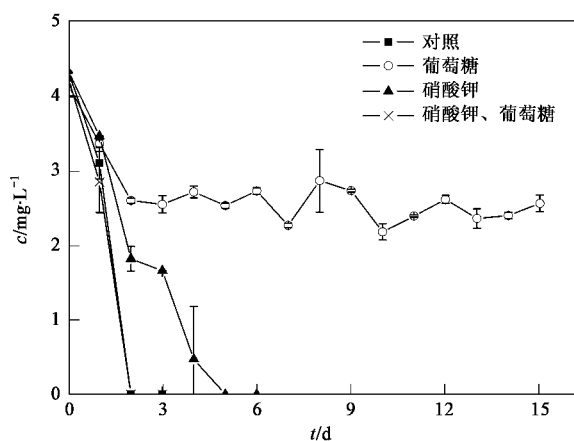


图4 外加营养对 MCLR 厌氧降解的影响

Fig.4 Effect of nutrient amended on the anaerobic biodegradation of MCLR

的 pH 在整个实验过程中没有明显变化,一直在 7.0 左右;而添加葡萄糖实验组的 pH 在 2 d 内由初始的 7.0 迅速降到 3.0 左右,此后一直维持在 3.0 左右.这一 pH 随时间的变化与 MCLR 的厌氧降解曲线恰好吻合,说明葡萄糖对 MCLR 厌氧降解的抑制作用很可能是通过 pH 的变化引起的.葡萄糖代谢过程中可以造成体系中酸性物质的积累,从而导致 pH 的降低^[25],而较低的 pH ($\text{pH} \leq 3.0$) 对 MCLR 的降解有明显的抑制作用(如 2.3 所述).

由图 4 可见,与对照组相比,添加 KNO_3 显著降低了 MCLR 的降解速率($p < 0.01$),使得 MCLR 完全降解所需时间由原来的 2 d 延长至 5 d.在好氧条件下,外加氮源对 MCLR 的降解也有类似的影响^[21].然而, Holst 等^[4]的研究结果表明,在缺氧条件下, NO_3^- 可以显著促进 MCLR 的降解.造成这一差异的原因可能是参与降解过程的细菌不同,因而 MC 的降解机制也有所不同.在缺氧条件下,由于 MC 的降解过程与反硝化过程相耦合, NO_3^- 的加入为 MC 的降解提供了电子受体,因此可以促进 MC 的降解^[4].由于本实验所用培养基除了接种菌悬液时可能会带入微量硝氮外,本身并不含硝氮,如果 MCLR 降解菌利用硝氮作为最终电子受体, NO_3^- 的加入必将促进 MCLR 的降解过程.而本研究结果表明, NO_3^- 的加入不但对 MCLR 的厌氧降解没有促进作用,反而会抑制 MCLR 的降解,说明本实验过程中 MCLR 厌氧降解菌未利用 NO_3^- 作为最终电子受体,因此 MCLR 的厌氧降解过程与反硝化过程并未发生耦合. pH 的测定结果表明,添加 KNO_3 实验组的 pH 在实验过程中

一直在 7.0 ~ 8.0 范围内,该 pH 对 MCLR 的厌氧降解没有不利影响,说明 KNO_3 对 MCLR 厌氧降解的抑制不是通过改变 pH 实现的.

同时添加葡萄糖和 KNO_3 实验组 MCLR 的降解速率与对照组无明显差异($p = 0.98$),却显著快于单独添加葡萄糖或 KNO_3 的实验组,说明外加葡萄糖和 KNO_3 对 MCLR 的降解过程的影响不是由于碳源或氮源过量造成的.

pH 的测定结果表明,同时添加葡萄糖和 KNO_3 的实验组 pH 虽然有所降低,但在整个实验过程中都维持在 5.0 ~ 7.0 范围.说明 NO_3^- 的加入可以减少葡萄糖代谢过程中酸性物质的积累,使得 pH 维持在较适宜的范围内,因而不会对 MCLR 的降解造成显著的影响(如 2.3 所述).另一方面,葡萄糖的加入可能会促进混合菌群对 NO_3^- 的吸收,使 NO_3^- 的浓度迅速下降,从而减小 NO_3^- 对 MCLR 降解的抑制作用.

3 结论

(1) 厌氧条件下 MCLR 可以被微生物迅速降解,说明厌氧降解过程可能在 MCLR 的迁移转化过程中扮演重要角色.

(2) 厌氧降解菌能利用 MCLR 作为唯一的氮源生长,但是不能利用 NO_3^- 作为最终电子受体.

(3) 温度和初始 pH 是影响 MCLR 降解的重要因素.酸性条件(pH 为 3.0~5.0)对 MCLR 的降解有显著的抑制作用($p < 0.01$),而中性(pH = 7.0)和碱性(pH 为 9.0~11.0)条件下降解速率没有显著差异.

(4) 单独添加葡萄糖或 KNO_3 均对 MCLR 的厌氧降解具有抑制作用,而二者同时添加则没有抑制.葡萄糖的抑制作用是通过降低体系的 pH 实现的.

参考文献:

- [1] 潘晓洁,常锋毅,沈银武,等.滇池水体中微囊藻毒素含量变化与环境因子的相关性研究[J].湖泊科学,2006,18(6):572-578.
- [2] Dawson R M. The toxicology of microcystins[J]. Toxicon, 1998, 36(7):953-962.
- [3] Hoeger S J, Hitzfeld B C, Dietrich D R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants[J]. Toxicol Appl Pharm, 2005, 203(3):231-242.
- [4] Holst T, Jorgensen N O G, Jorgensen C, et al. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions[J]. Water Res, 2003, 37(19):4748-4760.
- [5] Tsuji K, Asakawa M, Anzai Y, et al. Degradation of microcystins

- using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake [J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(1): 117-124.
- [6] Nybom S M K, Salminen S J, Meriluoto J A O. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution [J]. *Toxicon*, 2008, **52**(2): 214-220.
- [7] 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[J]. *环境科学*, 2004, **25**(6): 49-53.
- [8] 刘海燕, 宦海琳, 汪育文, 等. 微囊藻毒素降解菌 S3 的分子鉴定及其降解毒素的研究[J]. *环境科学学报*, 2007, **27**(7): 1145-1150.
- [9] 周洁, 闫海, 何宏胜, 等. 食酸戴尔福特菌 USTB04 生物降解微囊藻毒素的活性研究[J]. *科学技术与工程*, 2006, **6**(2): 166-170.
- [10] 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**(4): 337-343.
- [11] Ishii H, Nishijima M, Abe T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium [J]. *Water Res*, 2004, **38**(11): 2667-2676.
- [12] Ho L, Hoefel D, Saint C P, *et al.* Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter [J]. *Water Res*, 2007, **41**(20): 4685-4695.
- [13] Lemes G A F, Kersanach R, Pinto L D S, *et al.* Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2008, **69**(3): 358-365.
- [14] 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 Microbiol*, 1996, **62**(11): 4086-4094.
- [15] Harada K, Imanishi S, Kato H, *et al.* Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation [J]. *Toxicon*, 2004, **44**(1): 107-109.
- [16] Imanishi S, Kato H, Mizuno M, *et al.* Bacterial degradation of microcystins and nodularin [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, **18**(3): 591-598.
- [17] Edwards C, Graham D, Fowler N, *et al.* Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters [J]. *Chemosphere*, 2008, **73**(8): 1315-1321.
- [18] Saito T, Okano K, Park H D, *et al.* Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **229**(2): 271-276.
- [19] Hyenstrand P, Rohrlack T, Beattie K A, *et al.* Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystin-LR in lake water [J]. *Water Res*, 2003, **37**(14): 3299-3306.
- [20] 金丽娜, 张维昊, 郑利, 等. 滇池水环境中微囊藻毒素的生物降解[J]. *中国环境科学*, 2002, **22**(2): 189-192.
- [21] 周洁, 何宏胜, 闫海, 等. 滇池底泥微生物菌群对微囊藻毒素的生物降解[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2006, **7**(4): 30-34.
- [22] 吕锡武, 稻森悠平, 丁国际. 有毒蓝藻及藻毒素生物降解的初步研究[J]. *中国环境科学*, 1999, **19**(2): 138-140.
- [23] Bastviken D, Olsson M, Tranvik L. Simultaneous measurements of organic carbon mineralization and bacterial production in oxic and anoxic lake sediments [J]. *Microb Ecol*, 2003, **46**(1): 73-82.
- [24] Valeria A M, Ricardo E J, Stephan P, *et al.* Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Cordoba-Argentina) [J]. *Biodegradation*, 2006, **17**(5): 447-455.
- [25] Surono I S, Collado M C, Salminen S, *et al.* Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, **46**(2): 502-507.