

菌藻共固定化降解微囊藻毒素*

吴敏¹, 陈明¹, 宦海琳¹, 王一字¹, 李建宏^{1**}, 翁永萍¹, 周耀明²

(1:南京师范大学生命科学学院, 南京 210046)

(2:南京师范大学化学科学学院, 南京 210046)

摘要:研究了微囊藻毒素降解菌 S3 和椭圆小球藻 L1 共固定化后, 对微囊藻毒素(MC-LR)的降解作用. 结果表明, 共固定化藻菌体系比单独固定化菌对 MC-LR 有更好的降解效果, 共固定的藻可促进降解菌 S3 的生长. 固定化细胞对毒素的降解能力较稳定, 受环境温度和 pH 变化的影响较小, 重复使用仍可维持较高的降解活性.

关键词:微囊藻毒素; 降解菌; 共固定化; 椭圆小球藻

Degradation of microcystin-LR by co-immobilization of a bacterium S3 and an algae *Chlorella ellipsoidea* L1

WU Min¹, CHEN Ming¹, HUAN Hailin¹, WANG Yiyu¹, LI Jianhong¹, WENG Yongping¹ & ZHOU Yaoming²

(1:Life Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China)

(2:Chemical Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China)

Abstract: Cyanotoxins produced by cyanobacteria have caused pollutions in land surface water around the world. The most common toxin is microcystin, a cancer inducing hepatotoxin. Microcystin is chemically stable in water and can't be effectively removed by conventional water treatment processes. Microbiological removing, especially bacterial degrading was an effective way to eliminate microcystins from water. In this research, Cyanotoxin degrading bacterium strain S3 and *Chlorella ellipsoidea* L1 were co-immobilized by sodium alginate to degrade microcystin-LR (MC-LR). Results showed that the alga could increase the growth of strain S3 in the gel beads. The co-immobilized bacteria had a higher degrading efficiency of MC-LR than independent immobilized cell. The degrading efficiency of immobilized cells was influenced less than the free cells when temperature and pH changed. When the immobilized cells were re-used, they could maintain high degrading efficiency.

Keywords: Microcystin; bacterial degrading; co-immobilization; *Chlorella ellipsoidea*

随着蓝藻水华的大量爆发, 有毒藻类产生的藻毒素污染也越来越严重, 其中微囊藻毒素(microcystins, MCs)是分布最广、危害最严重的一类. 微囊藻毒素是环状七肽肝毒素, 具有诱发肝癌的作用. MCs 的存在, 给饮水安全造成了严重的威胁^[1]. WHO 制订的《饮用水卫生基准》和我国国家标准《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006)中均对饮用水源中 MC-LR 的浓度设定了 1 μg/L 基准限定值^[2-4].

由于 MCs 的化学结构具有很强的稳定性^[5], 传统的水处理工艺难以有效地将 MCs 从水中去除. 微生物降解是一种有效的方式, 已有报道了铜绿假单胞菌、鞘氨醇单胞菌等菌能有效降解 MCs^[6-8], 本实验室的前期研究也已筛选获得一株能高效降解微囊藻毒素菌株 S3^[9].

菌藻共生的生物膜系统在自然界中是普遍存在的现象, 生物膜废水处理技术已被广泛运用. 为更有效地提高降解菌对毒素的降解效果, 本研究把降解菌与无菌椭圆小球藻混合固定化, 探索利用菌藻的协同作

* 人事部留学回国人员择优资助项目(2005)资助. 2006-12-21 收稿; 2007-04-25 收修改稿. 吴敏, 女, 1984 年生, 硕士研究生.

** 通讯作者; E-mail: lijianhong@njnu.edu.cn.

用降解 MCs, 为消除环境中的藻毒素提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

MCs 降解菌 S3: 分离自发生过水华的水体; 椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*): 由本实验室分离保存, 为无菌培养物(下文简称为“小球藻”)[¹⁰].

细菌培养采用筛选培养基 MM9 (Modified M9), 即去除 M9 中的 NH_4Cl 和葡萄糖, 添加提取提纯的 MCs 作为菌种生长的唯一碳源和氮源; 藻类培养采用 BG-11 培养基[¹¹]. 菌藻共生液为 MBG-11 (Modified BG-11), 即在 BG-11 培养基中添加 MC-LR 50 mg/L. 微囊藻毒素为本实验室 C18 柱分离纯化[⁹].

1.2 方法

1.2.1 在不同培养液中菌藻的混合培养以及在自来水中的混合培养 液体培养的小球藻离心沉淀, 用无菌水洗涤两次, 悬浮于无菌水中备用; 从固体培养基表面挑取少许降解菌 S3 于灭菌自来水中, 放置过夜. 每组取 3 个灭菌空试管, 分别加入 9 ml 灭菌水. 取 1 ml 上述菌液加入第一管内, 按照 10 倍梯度稀释法稀释到第三管; 另一组同上步骤形成菌液梯度后, 每管吸出 2 ml 菌液, 再加入 2 ml 小球藻藻液. 置于 30℃, 3000 - 4000 lux 光照培养箱中培养 48 h 后, 分别测定菌藻混合培养和单独细菌培养的细菌浓度.

在其他培养基中的混合培养: 菌藻混合液分别接种到 MM9 培养基、BG-11 培养基和 MBG-11 培养基中, 隔天测定降解菌在三种培养液中的细菌浓度变化.

1.2.2 藻菌混合固定化及去固定化 将藻菌混合液和单独细菌悬浮液分别与 3% 的海藻酸钠溶液混匀, 用注射器滴入 4% 的 CaCl_2 溶液[¹²], 制得直径约为 3 - 4 mm 的固定化细胞小球. 在恒温振荡器中以 100 转/min 的速度振荡, 振荡 5 h 后小球几乎没有破碎, 说明固定化小球有良好的弹性和机械强度. 固定化小球放入一定量的番红溶液中, 15 min 后, 在番红溶液中的固定化小球的中心几乎全部变成红色, 说明固定化小球的传质性能良好.

在对固定化细胞的生长进行测定时, 必须先脱固定化, 使细胞释放出来. 将固定化小球加入适量体积 0.5 mg/L NaH_2PO_4 (pH6.5) 和 0.5 mol/L 柠檬酸钠的混合溶液, 摇动至小球完全溶解.

1.2.3 悬浮状态与固定化状态去除 MC-LR 的比较 以相同浓度的细菌、小球藻, 分别进行悬浮状态、固定化状态对 MC-LR 降解能力的测定. 悬浮细胞和固定化球分别加入到含 MC-LR 约 50 mg/L 的 BG-11 培养基中, 光照培养 72 h, 上清液 0.45 μm 膜过滤后测定 MC-LR 的含量.

1.2.4 微囊藻毒素的测定 参照文献[⁹]测定水样中微囊藻毒素. 水样离心收集藻细胞, 70% 甲醇提取, 取上清液, 用 C_{18} 柱分离微囊藻毒素 (MCs), 经 0.45 μm 滤膜过滤除菌. 在 HPLC (Agilent) 上测定 MCs 浓度的条件是: 流动相为 55% 甲醇, 45% 0.05M $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 流速 1 ml/min. 色谱柱恒温箱设为 25℃, 紫外检测波长 238 nm, 实验依据保留时间定性, 外标法定量.

1.2.5 细菌浓度测定 细菌浓度测定参照《微生物学实验》, 用梯度浓度平板计数法[¹³].

1.2.6 温度对固定化细胞降解 MC-LR 的影响 将固定化细胞和悬浮细胞分别置于含 MC-LR 初始浓度为 50 mg/L 的 BG-11 培养基中, 分别在 20℃、25℃、30℃ 和 37℃ 下振荡培养 72 h, 对比不同温度下固定化细胞和悬浮细胞对 MC-LR 的降解率.

1.2.7 pH 值对固定化细胞降解 MC-LR 的影响 分别在 pH 为 5、6、7、8 和 9 的不同条件下, 于 30℃ 振荡培养 72 h, 对比不同 pH 值条件下固定化细胞和悬浮细胞对 MC-LR 的降解率.

1.2.8 固定化细胞的重复使用稳定性 降解 MC-LR 后, 从培养基中捞出固定化小球, 用生理盐水洗净, 将其转入新的含 MC-LR 的培养基, 再进行振荡培养, 测定降解率.

2 结果与分析

2.1 在不同培养基中小球藻对降解菌生长的促进作用

在自来水中培养 48 h 后, 藻菌混合液中的降解菌数量比降解菌单独培养高出了 132% (图 1). 原因可能是自来水中有机物较为匮乏, 致使降解菌的生长较为缓慢. 而在藻菌混合液中, 椭圆小球藻代谢过程中释放

出的有机代谢物可以供细菌使用,从而促进了细菌的生长.

降解菌在 MBG-11 培养基中的培养生长较好,8 d 后细菌的数目由 4.1×10^6 ind./ml 上升到 5.5×10^7 ind./ml,其原因可能是在 MBG-11 培养液中,小球藻的代谢产物有助于细菌的生长. 在 MM9 和 BG-11 培养基中,混合培养的小球藻都显著地促进了降解菌的生长(图 2). 因此,菌藻共培养对降解菌的生长繁殖是有利的.

2.2 菌藻共固定去除 MC-LR 的效果

对比固定化细胞和游离细胞对 MC-LR 的降解情况,结果列于表 1. 总体来看,固定化细胞比游离悬浮的菌降解率略低,其原因可能是固定化介质了降解底物 MC-LR 的渗透传递过程延滞降解菌与降解底物的接触速度. 藻菌共固定化的降解能力显著高于单独菌固定化,降解率与悬浮细胞降解率接近.

表 1 降解菌 S3 在不同培养方式下的对 MC-LR 的降解率

Tab.1 The degradation of strains S3 in different culture mode

培养方式	降解率(%)
悬浮菌液	76.31
单独固定化菌	70.05
菌藻共固定	74.18

2.3 温度对固定化细胞降解 MC-LR 的影响

图 3 所示为不同温度下悬浮菌液和菌藻共固定对 MC-LR 的降解结果,30℃为最适降解温度,其余温度条件下,降解率均下降. 但温度对固定化细胞影响程度明显小于悬浮细胞,在 20℃和 37℃下,固定化细胞仍具有相当高的降解能力,分别为 63.6%和 65.6%,而悬浮细胞仅为 35.6%和 48.2%. 这可能是由于微生物经固定化后,固定化载体对菌体有一定的缓冲与保护作用,使细菌局部微环境有利于反应进行,因而所受影响比游离细胞小.

2.4 pH 值对固定化细胞降解 MC-LR 的影响

图 4 所示为不同 pH 下悬浮菌液和菌藻共固定对 MC-LR 的降解结果. 固定化细胞降解 MC-LR 的最适 pH 值为 7,当 pH < 7 或者 pH > 7 时,MC-LR 降解率明显下降,pH 变化对共固定化的菌藻影响显著低于悬浮

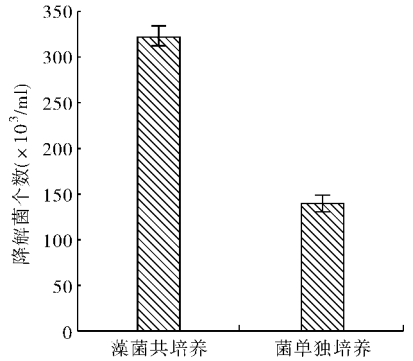


图 1 不同培养条件下降解菌 S3 的细胞个数
Fig.1 Growth of bacterium in different conditions

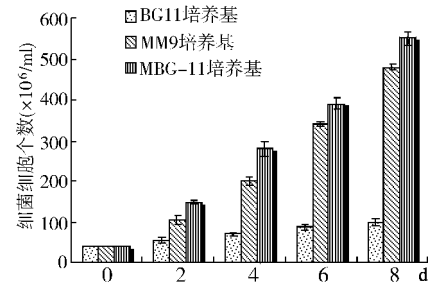


图 2 降解菌 S3 在三种培养基中的生长
Fig.2 Growth of bacterium in three culture mediums

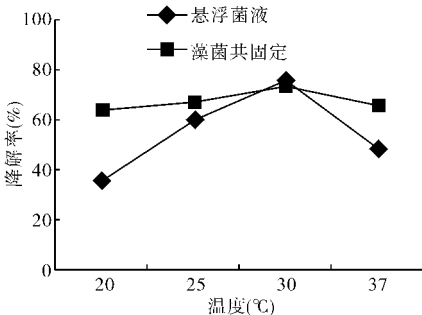


图 3 温度对降解 MC-LR 的影响
Fig.3 Effect of temperature on the efficiency of degrading MC-LR

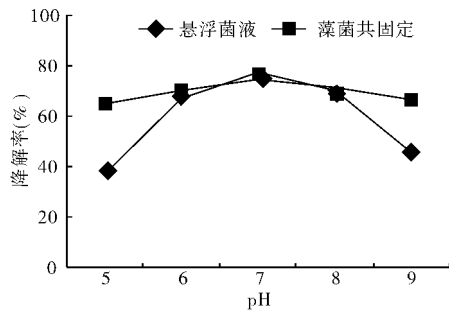


图 4 pH 对降解 MC-LR 的影响
Fig.4 Effect of pH on the efficiency of degrading MC-LR

细菌,这可能是因为固定化细胞载体上负载的 $-H_2$ 、 $-COON$ 等基团对水中酸碱浓度的改变可以起一个缓冲的作用,同时载体孔结构具有一定的屏蔽作用,载体外层的微生物也会对内层微生物起到保护作用,这些作用会在载体内部形成一个浓度梯度,当酸碱浓度改变时,微生物不至于失活。

2.5 固定化细胞的重复使用稳定性

重复三次后的固定化细胞对 MC-LR 的降解率为 69%,可见固定化细胞经过重复使用后,对 MC-LR 仍具有很高的降解活性。但比原初的固定化细胞的降解率略有下降,其原因可能是经过一段时间使用后,部分细菌老化,降解能力下降。将固定化小球放置 30 d 后,发现固定化细胞小块仍具有很好的弹性,肉眼观察无水溶性膨胀现象,且反应后的培养液澄清,可见经重复使用的固定化细胞仍具有很好的机械强度,几乎无菌体渗漏现象。

3 讨论

微囊藻毒素是淡水水体中检出的主要藻毒素。美国和加拿大在 1996 - 1998 年间对 677 个饮用水体的研究发现 80% 的水源水中含有微囊藻毒素^[14],我国的滇池、太湖和巢湖三大淡水湖泊以及黄河流域和长江流域的饮用水源水中均检测到微囊藻毒素^[15-17]。而在现有的自来水生产工艺中,无法去除水中的毒素。要减少毒素的威胁,应对水源中的毒素进行特殊处理。

通过筛选细菌来降解微囊藻毒素被认为是一种可行的方法,国内外也有相关的报道。而有效菌种处理天然污染水体势必要求一定的细菌浓度^[18]。本研究通过筛选获得高效降解微囊藻毒素的菌株 S3,结合实验室已分离筛选的具有吸收氮、磷、吸附重金属、降解酚等有机物的能力的小球藻 L1^[10,19],构建菌-藻复合固定化系统,这样大大促进了固定化菌的生长和合成代谢活性,从而提高了在净化水体中降解菌株的浓度^[20-24],因此能够更高效的降解水源中 MCs,同时小球藻能够吸收水源中重金属,降解有害物质,净化了饮用水水源。

虽然菌藻固定化中的降解菌降解能力略低于悬浮菌,但固定化技术具有保持高生物浓度、操作稳定、固液分离简单、便于回收利用、耐受水流冲击等优点。另外,相比于悬浮菌而言,固定化菌株的适宜温度、pH 值范围更大,对温度、pH 值变化的适应能力更强。固定化细胞经过重复使用后,对 MC-LR 仍具有很高的降解活性,这些优点有利于应用于饮用水源水的预处理,以降解 MC 等微量有害物,净化饮用水水源。而饮用水源水中有机物的含量相对较低,通过降解菌和菌藻混合分别在无菌自来水中培养,发现菌藻混合组中降解菌的生物量远高于降解菌单独培养的生物量,这为这株降解菌在菌藻共固定化进行饮用水的预处理提供了可行性。

4 参考文献

- [1] 狄留妹. 微囊藻毒素对人体健康影响的研究. 江苏预防医学, 2002, 13(3): 5 - 6.
- [2] Falconer I R. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicol*, 1999, 14(1): 5 - 12.
- [3] GB5749 - 2006. 生活饮用水水质卫生标准, 2006.
- [4] Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water, a guide to their public health consequences, monitoring and management. F & FN Spon, 1999, WHO.
- [5] 韩志国, 武宝轩, 郑解生等. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展. 暨南大学学报, 2001, 22(3): 129 - 135.
- [6] 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.
- [7] Takenaka S, Watanabe M F. Microcystin LR degradation by *Pseudomonad aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere*, 1997, 34(4): 749 - 757.
- [8] Park H D, Sasaki Y, Maruyama T *et al.* Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ Toxicol*, 2001, 16(4): 749 - 757.

- [9] 宦海琳, 韩 岚, 李建宏等. 五株微囊藻毒素降解菌的分离与鉴定. 湖泊科学, 2006, **18**(2): 84 - 188.
- [10] 浩云涛, 李建宏, 潘 欣等. 椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*) 对 4 种重金属的耐受性及富集. 湖泊科学, 2001, **13**(2): 158 - 162.
- [11] Allen M M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol*, 1968, **4**: 1 - 4.
- [12] 宋 昊, 何泽超. 降酚菌株的固定化细胞处理含酚废水的性能研究. 环境污染治理技术与设备, 2005, **6**(9): 37 - 40.
- [13] 范秀容, 李广武, 沈 萍. 微生物学实验(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1988: 235 - 238.
- [14] Susan D R. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 2003, **75**(13): 2831 - 2857.
- [15] 闫 海, 潘 纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展. 生态学报, 2002, **22**(11): 1968 - 1975.
- [16] 周 伦, 鱼 达, 余 海等. 饮用水源中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.
- [17] 吴 静, 王玉鹏, 蒋颂辉等. 城市供水藻毒素污染水平的动态研究. 中国环境科学, 2001, **21**(4): 322 - 325.
- [18] 李长征, 李捍东, 刘琴张等. 微生物降解藻毒素的研究进展. 环境科学与技术, 2006, **29**(8): 103 - 105.
- [19] 潘 欣, 李建宏, 浩云涛. 驯化过程对小球藻和螺旋藻生长及酚降解能力的影响. 南京师大学报(自然科学版), 2000, **23**(4): 105 - 107.
- [20] 潘 辉, 熊振湖, 孙 炜. 共固定化菌藻对市政污水中氮磷去除的研究. 环境科学与技术, 2006, **29**(1): 14 - 16.
- [21] 王 佳. 固定化藻菌的小球浓度对模拟生活污水脱氮除磷效果的影响. 水资源保护, 2005, **21**(1): 72 - 74.
- [22] Luz Ede-Bashan, Manuel Moreno. Removal of ammonium and phosphorus ion from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 2002, **36**: 2941 - 2948.
- [23] 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 污水稳定塘菌 - 藻生态系统去除与灭活植物病毒 TMV 研究. 环境科学学报, 2004, **24**(6): 1128 - 1134.
- [24] Carbery J B. Model of algal bacterial clay wastewater treatment system. *Water Science and Technology*, 1992, **26**(78): 1697 - 1706.