



摘 要

水环境中微囊藻毒素 (*Microcystins*, MC) 的微生物降解是水环境 MC 消除的主要途径之一。目前分离纯化的 MC 降解菌还较少, 且都是好氧菌, 对水体底层和底泥中进行的 MC 厌氧降解的过程和机理的了解还非常缺乏。因此本研究通过优化天然水华蓝藻中 MC 提取方法, 获得足够的 MC 进行实验, 重点分析 MC 在水体中的好氧和厌氧降解速率, 并从中国不同富营养化水体和底泥中分离主要降解菌特别是厌氧降解菌。

本研究首先对采自武汉东湖水华蓝藻细胞中 MC 的提取方法进行优化。比较了不同极性提取剂对 MC 的提取效果, 结果表明, 5%乙酸溶液能最大限度地从藻细胞中提取出 MC, 而 40%甲醇溶液相对与 80%甲醇溶液和 100%甲醇能够有效地从藻细胞中提取藻毒素异构体。本实验采用连续抽提法 (先用 5%乙酸溶液, 然后用 40%甲醇溶液) 能最有效地从藻细胞中提取出藻毒素 MC-RR 和 MC-LR, 同时可省去调 pH 法去除藻胆蛋白的步骤, 使整个提取过程更加简捷、快速。

从富营养化水体中分离得到多株优势菌, 各种优势菌株对 MC 都有一定的降解能力, 说明 MC 降解菌是广泛存在的。优势菌株 W-2 号菌在不同 MC 浓度下, 降解效率是不同的: 在低浓度下 ($MC\ 2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 有较强的降解能力, 七天内可降解 63.5%; 当 MC 浓度为 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 降解效率降低, 七天仅降解 30% 左右; 在更高浓度下基本表现无降解能力。结果表明, 在相同条件下, 不同 MC 浓度下 W-2 号菌的降解效率是不同的, 且浓度越低, 降解越快, 较高浓度的 MC 可能对细菌的生长有一定的抑制作用, 进一步降低其降解能力。实验过程发现底泥微生物菌群比表层水体中微生物菌群对 MC 有更强的降解能力。

通过分析分析了厌氧条件下中国 11 处湖泊底泥中的微生物对 MC 的降解, HPLC 分析结果显示降解途径多样化。底泥释放到水中营养 (TN、TP、COD) 与降解能力成正相关。MC 的降解主要与厌氧降解菌有直接关系, 菌的生长及微生物种类、数量的不同都直接影响 MC 的降解转化。通过厌氧菌筛选实验, 我们首次分离到一株具有较强降解能力的兼性厌氧细菌 D7-1 菌, 经鉴定为肠杆菌科, 变形菌属。

关键词: 水华、微囊藻毒素、提取、好氧、厌氧、底泥、微生物降解



Abstract

Biodegradation of microcystins (MC) by microorganisms is one of the main ways of MC removal in aquatic environment. Up to now MC-degrading bacteria isolated from surface water are aerobic. The pathways and main species involved in the anaerobic degradation of MC at bottom and sediments of water bodies are still poorly understood. The objectives of this study is to optimize the MC extraction method from natural blue-green algal bloom to obtain sufficient amount of MC for the experiments, and to study the biodegradation efficiency under aerobic and anaerobic conditions, and to isolate the main degrading bacteria, especial the anaerobic bacteria, from eutrophicated water samples and sediments from collected from different locations of China.

The extraction method of MC from blue-green algal bloom was optimized in this study. By comparing different solvents and extraction time, 5% acetic acid was found to be an optimum solvent for extracting MC-RR, the continuous extraction method could obtain more MC-RR and MC-LR from cyanobacterial cells than the other methods. The phycobiliproteins in extract solution, which having negative effects on ODS (C₁₈) cartridgeges, was removed by 5% acetic acid solvents directly, and by this method the step of adjusting the pH of solvents to remove phycobiliproteins can be omitted.

Dominant bacteria separated from eutrophicated water samples showed MC degradation ability. This indicates that MC degradation is widely occurred in aquatic environment. Dominant bacterium W-2 was isolated and showed different degradation efficiencies under different MC concentrations. In low concentration (MC 2mg · L⁻¹) it showed higher degradation ability and could degrade 63.5% of MC in 7 days; when MC is 10 mg · L⁻¹, the degradation efficiency declined, and it only degraded 30% of MC in 7 days; and when MC concentrations was higher than 10 mg · L⁻¹, it showed no degradation ability. The result may due to the inhibition of bacteria growth at high MC concentrations. It was found that the sediment microbes



have higher MC degradation ability than that of the water column.

MC degradation under anaerobic condition of sediments collected from eleven lakes of China was investigated. HPLC chromatograms showed diverse pathways of MC degradation. The degradation of MC showed positive relationship with TN, TP, and COD of the sediments. The differences of growth, species and cell density of bacteria directly correlated with the degradation and transformation of MC. In this study the first anaerobic MC-degrading bacterium (D7-1) was isolated and purified, and which was identified as *Proteus sp.* (*Enterobacteriaceae*).

Keywords: bloom, microcystins, extract, aerobic, anaerobic, sediment, biodegradation



华中师范大学学位论文原创性声明和使用授权说明

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：李锐

日期：2005年6月3日

学位论文版权使用授权说明

本人完全了解华中师范大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华中师范大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密论文在解密后遵守此规定。

论文作者签名：李锐

日期：2005年6月3日

导师签名：杨劲

日期：2005年6月7日

本人已经认真阅读“CALIS 高校学位论文全文数据库发布章程”，同意将本人的学位论文提交“CALIS 高校学位论文全文数据库”中全文发布，并可按“章程”中规定享受相关权益。同意论文提交后滞后： 半年； 一年； 二年发布。

论文作者签名：
日期： 年 月 日

导师签名：
日期： 年 月 日



第一章 文献综述

1. 微囊藻毒素的基本特性和毒性机理

1.1 蓝藻水华及其毒素的危害

水环境与人类生活有着非常紧密的联系，人们很早就对藻类水华有了初步的认识。在 12 世纪末，Giraldus Cambrensis 就描述了英国威尔士附近 Llangors 湖水变为深绿色的现象。后来，在北爱尔兰、北美等地又陆续有类似的报道。这些早期记录中指出了水华发生时水体的颜色变化、气味难闻等方面的影响。但直到 1878 年 Francis 首次报道了澳大利亚南部动物由于饮用含蓝藻的水而死亡的事件^[1]后，它们的危害才被真正认识到。此后，由于水体富营养化现象日益加剧，蓝藻水华的发生越来越频繁，世界各地蓝藻毒素引起各种动物甚至人类中毒的事件也随之增多。研究表明世界各地 25-70 % 的蓝藻水华可产生毒素，而在某些种类的蓝藻引起的水华中，藻类产毒比例甚至更高。

蓝藻毒素使各种哺乳动物、鱼类、鸟类中毒甚至死亡，对畜牧业和水产养殖业造成很大的经济损失，更严重的是，它能够通过多种方式影响人类自身的健康。如皮肤接触含藻毒素水体可引起敏感部位（如眼睛）和皮肤过敏；少量喝入可引起急性肠胃炎；长期饮用则可能引发肝癌。流行病学调查表明，我国江苏海门、启东和广西扶绥地区的原发性肝癌发病率高与当地居民长期饮用含微量微囊藻毒素的浅塘水和河流水有关^[2]。1996 年巴西一个血液透析中心由于使用被蓝藻毒素污染的水造成 126 人中毒，其中六十人死亡的事件，更是引起举世瞩目^[3]。另外，虽然某些浮游动物和鱼类对蓝藻毒素有较大的耐受性，但毒素常可在其体内存留和富集，因此，通过生态系统和食物链以间接方式给人类带来潜在威胁也不容忽视。

多种蓝藻能产生有毒物质，在它的 50 多个属中，至少有 20 个属的 50 多个种可以产生毒素，其中研究较多的主要有微囊藻属 (*Microcystis*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*)、颤藻属 (*Oscillatoria*)、念珠藻属 (*Nostoc*)、鞘丝藻属 (*Lyngbya*) 和束丝藻属 (*Aphanizomenon*) 等。蓝藻产生的毒素，多为次生代



谢物,分为四种^[4]:神经毒素(neurotoxins)、肝毒素(hepatotoxins)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)和非专性毒素(non-specific toxins)。其中肝毒素在淡水蓝藻中最常见,可由微囊藻、鱼腥藻、节球藻、念珠藻、颤藻等产生,主要有微囊藻毒素(microcystin, MC)、节球藻毒素(nodularin)和筒胞藻素(Cylindrospermopsin)三种。其中,微囊藻毒素分布最广,对人类危害也最大,因此是所有蓝藻毒素中研究得最为详细的。

在已发现的各种藻毒素中,MC是一类在蓝藻水华中出现频率最高、产生量最大和造成危害最严重的藻毒素。MC是藻细胞内毒素,当藻细胞衰老、死亡后,毒素被释放到水体中。大面积严重的藻类水华发生会使水体中的毒素浓度达到 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平^[5],部分毒素还随藻细胞和悬浮物沉淀进入沉积物中,有报道指出底泥中的毒素可达 $13\text{-}24\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。同时,环境中的MC对鱼类、水鸟、家禽及牲畜也具有明显的毒性效应。因此,MC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。我国近年的调查显示:除了“三湖”(滇池、太湖、巢湖)已出现严重污染,长江、黄河中下游许多水库、湖泊以及养殖水体也检测出MC,因此水体MC污染已成为我国以及许多其它国家水环境的突出问题之一^[7,8]。

1.2 MC的理化性质

MC是一组七肽单环肝毒素,相对分子质量都在1000左右^[10],其一般结构(见图1)为环(-D-Ala-X-D-Masp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-),其中Masp为D-赤- β -甲基天冬氨酸,Adda为(2S,3S,8S,9S)-3-氨基- β -甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯十基-4,6-二烯酸,Mdha为N-脱氢丙氨酸,R1、R3为两种可变的L-氨基酸。由于R1、R3的2个L-氨基酸的不同及Masp和Mdha的甲基化/去甲基化产生的差异(如图R2、R4的变化),可以形成多种不同的异构体,到目前为止已发现60多种MC^[11]。其中含量较多,存在较普遍,毒性较大的是LR、RR和YR,其中L、R、Y分别代表Leu(亮氨酸)、Arg(精氨酸)和Tyr(酪氨酸)(如图1)。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、鱼腥藻(*Anabaena*)和颤藻(*Oscillatoria*)等是产生MC的主要藻类。研究发现特殊氨基酸Mdha甲基化后形成MdhB,其Mdhb-MC与Mdha-MC的毒性相似,说明Mdha对MC的活性没有大的影响^[10]。而有人发现Adda的C-4和C-6为E型对MC的毒性是必



需的, 当它们变为 Z 型时, 其抑制蛋白磷酸酶的活性比原来低 105 倍, 即 Adda 结构改变则毒性丧失, 证明 Adda 对 MC 的活性是必需的^[8,13]。

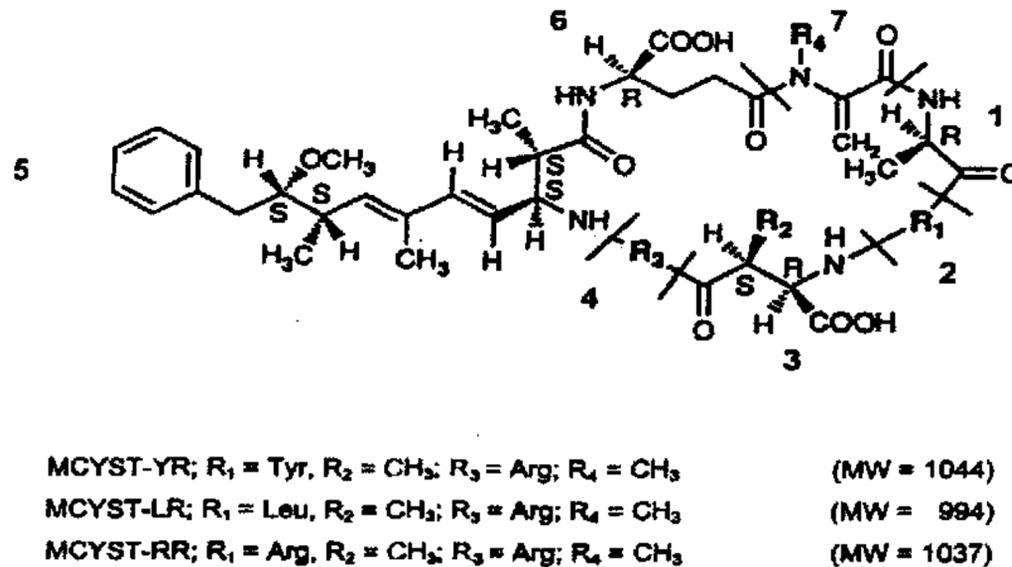


图 1 MC 的分子结构及三种主要 MC 的异构体组成

Fig.1 Molecular structure of microcystins and variants composition of three kinds of MCs

从 MC 的分子结构可看出, 由于环状结构和间隔双键, 所以 MC 具有较强的稳定性。MC 易溶解于水, 在水中的溶解度达 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。由于 MC 分子结构含有羧基、氨基和酰氨基, 所以在不同 pH 下, MC 有不同的离子化倾向。MC-LR 的正辛醇/水分配系数($\log K_{ow}$)从 pH 为 1 的 2.18 降到 pH 为 10 时的 -1.76, 因此在爆发水华时的高 pH(>8)条件下, MC 的生物富集较小^[9,14]。

1.3 MC 的病理与毒理学效应

早期就有报道 MC 具有高毒性, 其作用的主要靶器官是肝脏, MC 可从血液中转移到肝脏。主要表现为使肝脏充血肿大, 严重时可导致肝出血和坏死。其致毒机理是通过与蛋白磷酸酶中的丝氨酸/苏氨酸亚基结合, 抑制其活性, 从而诱发细胞角蛋白高度磷酸化, 使哺乳动物肝细胞微丝分解、破裂和出血, 使肝充血肿大, 动物失血休克死亡。另外, 由于蛋白磷酸酶的活性受到抑制, 这样就相对增加了蛋白激酶的活力, 打破了磷酸化和脱磷酸化的平衡, 从而促进了肿瘤的发生^[15,16]。MC-LR 对小白鼠的半致死量 LD_{50} 在 36 到 $122 \text{ug} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间。

MC 的中毒表现随动物的大小、种类和毒素的剂量不同而有差异。牛和羊中毒后可能表现出疲惫、反应迟钝、呼吸加快、发热、心动过速、临死时发白



等症状。而鸟类则表现出不安、眼球闪烁、通便、阵发性痉挛等。在实验室中，小白鼠或兔子的中毒症状主要是厌食、腹泻、呕吐、颤抖、虚弱直至死亡^[14-16]。

肝脏是 MC 主要的靶器官。它极易从血液转移到肝脏，在肝脏中依赖胆酸转运系统才能进入细胞，因而它的毒性有高度的肝特异性。解剖观察发现肝内出血，使肝重明显增加至原来的二到三倍，肝脏颜色通常呈深红色。电镜观察显示细胞超微结构已明显改变：线粒体膨胀，有囊泡形成，粗面内质网伸展，并发生卷曲，窦状结构减少，桥粒连接丝消失，整个细胞骨架发生变化^[17-19]。

1990 年，Mackintosh 等人首次发现 MC 能特异性地与蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的丝氨酸/苏氨酸亚基结合，从而抑制它们的活性^[20]。它可能通过抑制蛋白磷酸酶的活性，使细胞内的中间丝和微丝因过量磷酸化而解聚，导致肝细胞收缩分离，窦状隙结构丧失，大量血液进入肝组织，肝充血肿大，动物失血休克死亡。另外，由于 PP1 和 PP2A 活性受到抑制，相对增加了蛋白激酶 C 的活力，打破了磷酸化与脱磷酸化的平衡，从而引发细胞一系列生理病理变化。某些蛋白的磷酸化可解除对细胞增殖的正常抑制作用，促进肿瘤的生长。这可能是 MC 促癌或致癌的途径。除了对蛋白磷酸酶 PP1 和 PP2A 的抑制作用外，有人认为 MC 的肝毒性还通过以下两种作用表现：①激活肝细胞内核酸内切酶而损害 DNA，引起 DNA 链的无规律断裂；②脂质过氧化引起的氧化损伤作用^[21,22]。

MC 对鱼类的影响因鱼的种类和研究方法的不同而有很大差异。在实验室中，对鱼类进行腹腔注射或强迫灌流都可使鱼肝脏细胞大量坏死，并引起死亡。Baganz 等考察毒素对斑马鱼的影响指出，长期暴露在微囊藻毒素中会对鱼的习性和繁殖造成不利影响^[23]。很多研究者都曾在实验室用蓝藻提取液或纯微囊藻毒素做实验，观察它们对浮游动物的作用，其中水蚤是研究得最多的。大多数结果表明，微囊藻毒素对它有一定的毒害作用，如不怀卵、降低摄食率，甚至死亡^[24,25]。但 Matveev 用产毒的铜绿微囊藻喂食水蚤却没有观察到毒害影响^[26]。

由于 MC 对蛋白磷酸酶有强烈的抑制作用，它对高等植物的生长生理有明显的影响，如抑制幼芽的生长，影响根系的发展等^[27]。Kurki-Helasmo 研究了对芥菜的研究表明，在芥菜种子的发育过程中，培养基中 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MC-RR



即可造成其发育畸形, IC_{50} 为 $0.8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [28]。另外, MC 对某些高等植物的光合作用也有抑制作用[29]。

1.4 MC 的监测及其安全性控制

当蓝藻细胞死亡或破裂时, 其中的毒素就会释放出来。MC 的环形短肽结构非常稳定, 而且特殊的氨基酸成分也使它不易被分解。多项实验证明, 无论是在藻细胞中, 还是在水中, 它都能存留相当长的时间, 常规的饮水消毒处理也不能完全消除其中的毒素[30]。在天然的水体中, 某些细菌有降解肝毒素的能力, 释放到水中的毒素两星期后被这些细菌降解, 但一个月后仍有小部分残留在水中[31]。经自来水厂灭菌处理后, 水中细菌数量减少, 微囊藻毒素的滞留时间可能会更长。

由于完全消除 MC 尚有一定困难, 各国对它的监测和管理就更加重视了。目前的工作主要分为以下两个方面:

第一, 对水体的监测。这一监测主要针对饮用水和娱乐用水(如: 游泳、划船等), 运用下文所提到的检测及分析方法, 对水体中所含 MC 的类型、性质、浓度和毒力等进行测试。另外, 将这一监测与水体中各种理化及生态因子的分析检测相结合, 还有助于找到蓝藻产毒和毒素的释放、降解等方面的规律, 以便更有效地对 MC 加以控制。

第二, 对人群的监测。MC 对人体的毒害作用目前还未完全明了, 因此, 对接触有毒水体的人群进行健康状况的监测是极为必要的, 它有助于对毒素的危害性做出更全面的评估。此监测分为两种: 短期监测和长期监测。监测时, 必须注意排除其他因素的干扰, 提高诊断的可信度。

短期监测通常在夏季蓝藻水华爆发时进行, 主要是监测人群的急性症状。现有的数据虽然不多, 但足以肯定 MC 对人体健康产生了影响, 如: 血液中谷氨酰转移酶升高、肠胃不适、皮炎、喉疮和红眼病等。短期监测需要医护人员、生物学家、流行病学家等多方面的协调配合。

现在, 全球开始加强对蓝藻的监测与管理。1992 年, 澳大利亚新南威尔士蓝藻工作机构 (NEW SOUTH WALES BLUE-GREEN ALGAE TASK FORCE) 以水体中蓝藻细胞数为标准, 建立了三层次监测警报系统: 层次 I, $500-2000\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为警告量, 此时要加强监测, 注意蓝藻的变化趋势; 层次



II, 2000-15000 cells·mL⁻¹, 此时水样需进行毒性测试, 自来水厂也要采取适当的预防措施; 层次III, 超过 15000 cells·mL⁻¹, 该水域成为“危险区”, 已不适宜使用。人类与有蓝藻的水体接触的建议域值为 15000 cells·mL⁻¹ [32]。1999 年, 世界卫生组织 (WHO) 对饮用水质制定的标准是, 如果体重为 60 公斤的人一天喝 2 升水, 则允许的 MC-LR 最大摄入浓度为 1μg·L⁻¹ [33]。这是针对成人制定的标准, 而且只考虑了 MC 的毒性, 若考虑到其促肿瘤作用, 则 MC-LR 的最高允许含量为 0.3μg·L⁻¹。我国饮用水水质规范中, 于 2001 年 9 月 1 日已将 MC 作为非常规检测指标, 参考标准为 MC-LR 不超过 1.0μg·L⁻¹ 水。

2. MC 的提纯与检测分析方法

2.1 MC 的提纯

Bote 等 [34] 首先进行了 MC 的提取提纯研究, 确定出了多种不同的 MC 提取纯化方法。比较典型的方法是以蓝藻细胞为对象, 经过提取、浓缩和分离等过程, 获得微囊藻毒素纯品。但是由于研究者的不同需要, MC 提纯的步骤和方法相差很大, 至今也没有一种公认的简便有效的提纯方法。在此对微囊藻毒素的提取和纯化方法现状和最新进展进行了详细的介绍, 并总结评价 MC 各种提纯的方法。

2.1.1 MC 的提取

2.1.1.1 提取物质的选择

用于 MC 的提取物质主要有两种, 野外采集的原材料和实验室生长的藻类。两种原材料都有其优缺点。野外采样可以得到很大的量, 特别是当水华很浓密时, 即不需要花时间大量培养藻, 而且所获得的量通常比实验室培养得到的量大的多。但缺点是从其样品所提取的毒素成分比实验培养得到的更复杂, 且重复性差 [34]。对比而言, 实验室培养的藻类重现性好, 单种蓝藻产毒类型少, 提取相对也简单些, 而且纯化也较容易, 其主要缺点是室内大量培养藻较困难, 很难得到大量的 MC。

2.1.1.2 萃取溶剂选择

提纯 MC 的萃取溶剂差别很大, 至今也没有公认最合适的溶剂, 主要是因



为微囊藻毒素的变体很多，且不同毒素异构体的性质亦不统一，所以使用的提取液种类很多。为了能评价藻体中的微囊藻毒素总量，很有必要建立一套可靠的方法来提取样品中所有的微囊藻毒素。由于使用过的溶剂很多，但是提取效率各不相同，为了方便以后的研究，这里讨论并比较几种常用、效果较好的方法（如表 1）。

表 1 不同溶剂萃取体系的比较

Tab1 Comparison of the different solvents extraction

溶 剂	方 法 比 较	参 考 文 献
1M NH ₄ HCO ₃	pH=10 时提取效果最好	[35]
丁醇-甲醇-水 (5 : 20 : 75)	提取(毒素-LR,LY,LW,LF)效果相当满意,但 需要长时间高速离心	[36]
5%乙酸(pH=2.7)	不需要旋转蒸发,提取程序简单;但不能去 除大部分色素	[37]
正辛醇/水	提取 MC-LR、-RR, 随着 pH 值降低,更不溶 于水	[38]
100%、75%甲醇	100%的甲醇比 75%甲醇提取率要少 50%	[39]
甲醇	50%~80%甲醇为最合适的溶剂	[40]
5%乙酸、100%甲 醇	连续提取,先用 5%乙酸,然后用 100%甲醇提 取,而单独用 5%乙酸提取效果较差	[41]

部分缩写字母含义:L=亮氨酸;R=精氨酸;W=色氨酸;F=苯丙氨酸;Y=酪氨酸

2.1.1.3 物理参数的影响

在提取样品时需要周密考虑，提取包括初始样品的混合，随后的搅拌和振荡，还有一些需要考虑的因子如每一步操作时间的长短和用来提取的溶剂的量。报道的许多方法多为用同一种溶剂反复提取多次，然后将提取物收集在一起。最常见的是提取三次，抽提三次，可以有效的提取细胞内的 MC。

细胞质量与抽提溶剂的体积的比也会影响提取的效果，常见比例为 10g/200mL，一般在 10g/100mL~ 10g/1000mL 之间^[42,43]。用于提取的细胞总质量也会影响 MC 的检测和纯化，因为如果生物量足够大，检测和纯化 MC 就容



易的多。

不同方法的提取时间变化较大,从几分钟到 15h^[44]。在相关文献中,对于最适提取时间的研究报道不多,有一个文献中比较了 3min、5min、30min、60min 的提取效果,发现 1h 的提取时间是最适宜的,过长的提取是不必要的。抽提时间将很大程度上影响整个纯化过程所需的时间,而且延长抽提时间会影响 MC 的稳定性,或者可能加剧 MC 的变异。如果在 5%醋酸中,超时提取会伴随 LR 的释放。

提取温度一般从大约 4℃到室温^[45],不需要冷冻,藻毒素在提纯过程还是比较稳定的。而超时的提取(例如在晚上),建议维持一个较低的温度条件。近来,有一些杂志高度评价升温的作用,metcalf 和 codd^[46]首次将沸水浴应用于微囊藻毒素的提取和分析中,实验得到的 MC 与甲醇抽提的结果接近,由于其价廉,预示这种方法可能有更好的应用前景。

2.1.2 样品浓缩

藻细胞最初的提取产物:一般为大量溶剂中含有少量稀释的 MC,该初提产物在纯化检测前需要浓缩。常用的浓缩方法是蒸发和固相萃取。通常使用 40℃旋转蒸发器,将样品完全干燥,再用一种合适的溶剂将其重新溶解,离心或过滤除去微粒,再进行分离。空气和氮气通常也可用来干燥或减少抽提物的体积,其原理与旋转蒸发器相似。

固相萃取(SPE)的基本原理是样品在两相之间的分配:即在固相(吸附剂)和液相(溶剂)之间的分配。近年来,固相萃取成为藻毒素提取的重要方法,基本上采用反相 C18 填料作为固体萃取相,甲醇作为洗脱液^[47-52],也有采用含 0.1%三氟乙酸(TFA)的 90%甲醇溶液将藻毒素洗脱^[49]。固相微萃取(SPME)技术应用于研究含微囊藻毒素水华样本的 MC 特性开始于最近 2 年。香港大学的 HON-WAH LAM 教授研究了三个主要的 MC 变异体,即 MC-LR、MC-YR 和 MC-RR,在样品溶解之后,用 50-umCW/TPR 和 65-umPDMS/DVB 涂层的萃取头萃取,通过 SPME 与高效液相色谱联用研究 MC 的特性^[52]。SPME-HPLC 联用技术作为一种集试样预处理与分析检测于一体的分析方法,由于其自身具有的分析速度快、溶剂消耗少、方法重现性好和易于自动化操作等优点而受到人们的关注。而随着性能更好的萃取头涂层材料的出现,如选择性更高的印记分



子固定相、对有机溶剂有更高稳定性的聚合物涂层材料等，此方法在藻毒素检测的应用范围必然能得到更大的扩展，分析功能也会更强大。

2.1.3 分离纯化

直到 1982 年，通过透析、溶剂萃取及 DEAE-SEPHADEXA25 柱层析结合的方法，才分离纯化出 MC，并用于结构分析。之后，各种色谱技术才开始被广泛用来提纯大量的微囊藻毒素及微囊藻毒素变体，色谱分析步骤可能有 2 个或 7 个，在提纯过程中，有些步骤被反复使用。分离技术的选择依据于实际情况。如下介绍了几种色谱分离技术（如表 2）。

表 2 色谱分离技术在微囊藻毒素分离中的应用

Tab.2 Chromatography applied in MC separation

色谱分离技术	用 途	参考文献
尺寸排阻色谱	简单提取微囊藻毒素	[34, 44,54]
离子交换色谱	藻毒素提纯的初步步骤；	[55]
	快速纯化 MC-LR 和节球藻毒素	[56]
薄层色谱	快速色谱之后的提纯工艺从鱼腥束状藻中 提纯 2 种缩氨酸毒素	[41]
快速色谱	作为一种中间步骤来提纯预先用硅凝胶分 离的藻毒素；	[44]
	分离出粗制 MC-LR 或其它微囊藻毒素；	[57]
	获得部分纯 MC-LR,-RR,-RA；	[54]
	利用正相和反相的选择性来获得粗制 MC-RR 及次要微囊藻毒素；	[53]
	获得 MC-LW 和-LF 的简单且最有效的方法，往往作为最后一步精细步骤	[58]
制备型高压液 相色谱	能即时监测,而且能测出所需要部分含量；	[59]
	能提纯甲基化和非甲基化 MC-LR；	[55-56]
	提纯大量微囊藻毒素变异体；	[60]
	能提纯七种微囊藻毒素,其中 MC-LL 第一	[61-62]



次被提取;

从水华物中提取毫克数量的 7-甲基化 [63]
MC-RR,能获得毫克数量的微囊藻毒素

近年来,随着分析仪器的不断革新,藻毒素的分离方法有了更广泛的选择空间,使得许多其他技术如超滤技术^[43]等均可运用到藻毒素的分离。

2.2 MC 的检测和分析方法

MC 的检测可以分为四个层次^[49]: 筛选、纯化、鉴别和定量。所用的方法通常归为以下几类: ①生物测试, ②组织培养细胞毒性测试, ③色谱分析法, 如 TLC、GC、HPLC 等, ④质谱分析法, 如 FABMS、LSIMS 等, ⑤酶联免疫法, ⑥酶抑制试验等。这些方法的检测侧重点有所不同, 灵敏度差异很大, 对仪器及操作技能的要求也各不相同。因此, 检测毒素时, 要依据样品来源、数量和实验的目的, 选择适当的方法, 也可将多种方法联合运用, 以互相验证和补充。

2.2.1 生物测试

生物测试通常采用小白鼠的腹腔注射法, 选用体重约 20-25g 的小白鼠, 每只注射量不超过 1mL。将冻融的藻浆作系列稀释, 每稀释度注射 3-4 只小白鼠, 观察 3-4h 后, 将死亡的小白鼠进行解剖, 鉴定是否为肝毒素中毒。根据藻样的干重, 将半致死浓度换算成半致死剂量 (LD_{50}), 以 g 干藻 $\cdot kg^{-1}$ 鼠体重为单位。一般 $LD_{50} < 50g \cdot kg^{-1}$ 鼠体重时, 藻浆为高毒; 在 $50-500g \cdot kg^{-1}$ 鼠体重之间, 毒性中等; $LD_{50} > 500g \cdot kg^{-1}$ 鼠体重时, 毒性较低; 若大于 $1000g \cdot kg^{-1}$ 鼠体重, 可视为无毒^[49]。

生物测试法是最早采用的常规方法。它快速直观, 但需消耗较多毒素, 灵敏度和专一性不高, 无法准确地定量测定, 也不能辨认微囊藻毒素异构体的种类。当样品中同时含有神经毒素时, 肝毒素的毒性还会被掩盖。

另外, 盐虾、水蚤、蝗虫等无脊椎动物也都被用来进行微囊藻毒素的生物检测^[64], 并有一些生物学家对细菌检测法也进行了尝试^[65,66]。

2.2.2 HPLC 检测及提纯

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是检测



MC 常用的手段之一，它准确灵敏，检测下限低，可达 ng/L 级，结果的重现性好。在定量检测的同时，可标出不同的 MC 异构体，分离和纯化毒素。但 HPLC 法利用保留时间来定性，检测时必须依赖标准毒素样品。目前市场所能获得的标样主要是 MC-RR、-YR、-LR 三种，因此，HPLC 法只能检测出这三种异构体，而无法辨认其他有毒异构体。最近的研究还表明某些塑料添加剂可干扰 HPLC 对 MC 的检测^[67-68]。

经典的 HPLC 检测 MC 使用反相 C18 柱，流动相使用甲醇和 0.05 M 磷酸缓冲液的混合液 (V/V=60:40)，最近，张维昊等人以甲醇-水配制流动相，以三氟乙酸调节 pH 并进行等度洗脱分析微囊藻毒素，得到了较好的结果，该方法不仅降低了成本，简化了操作，而且实验后色谱柱易于清洗维护^[50]。

另外，检测器的不同也会影响到灵敏度。

2.2.3 酶联免疫吸附法 (ELISA 法)^[69]

ELISA 法是一种固相测定法，它利用抗原、待测抗体和酶标二抗之间的特异性反应，生成抗原-抗体-酶标抗体结合物。加底物显色后，用酶标仪检测消光值的大小，根据标准曲线算出待测抗体的浓度。

ELISA 法可能是目前快速分析 MC 时最常用的方法。它的最大优点是需要的样品量少，简便、快速。ELISA 法灵敏度极高，定量检测水中总毒素，检测限可达到 $0.05\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，所需的酶标仪也不算昂贵。ELISA 法现已发展出多种单克隆和多克隆抗体^[70,71]，并有商品试剂盒提供。然而，因所用的抗体是针对 MC-LR 设计，虽与其他异构体有一定交叉反应，但不能用于毒素的种类鉴定。另外，ELISA 法受多种干扰的影响，容易产生假阳性结果。

2.2.4 蛋白磷酸酶抑制试验

蛋白磷酸酶抑制试验原来多采用放射性同位素标记的方法，较复杂。1994 年 J.An 和 W.W.Carmichael 采用显色蛋白磷酸酶抑制试验的方法，则更为方便和安全。此试验利用萤火虫的生物发光体系来检测蛋白磷酸酶 PP2A 的抑制剂，原理是 PP2A 可催化水解虫荧光素磷酸盐为虫荧光素和无机磷酸盐^[72]。

2.2.5 质谱分析法 (mass spectrometry, MASS 法)

质谱分析法是分析有机大分子的分子量、分子式及其结构等的重要化学手段，其灵敏度可达 pg 级。用于分离和鉴定的质谱方法主要有 FABMS (快速原



子轰击质谱法)和 LSIMS (液相次级离子质谱法)等。通常质谱法与色谱技术结合运用,可以形成 GC(gas chromatography)/MS、LC/MS 和 Frit-FAB LC/MS 等多种分析法。质谱分析法灵敏、准确,但实验花费大。

2.2.6 其他检测方法

除了以上叙述的较常用方法,还有一些方法用于 MC 的检测,如血球凝集法、薄层层析法等,也有方法通过检测 MC 的氧化产物 2-甲基-3-甲氧基-4-苯丁酸 (MMPB) 来鉴定^[73]。免疫学方法中,新近发展了以时间决定的荧光免疫分析法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TR-FIA)^[74]。另外,较先进的毛细管电泳 (CE)、微液相色谱 (micro-LC)、胶束电动色谱 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) 以及核磁共振 (NMR) 等技术也都被用于 MC 的检测和分析^[75,76]。

近几年,运用基因工程方法已证实 MC 是由多肽合成酶复合体通过巯基一模板合成机制合成的,且发现微囊藻的多肽合成酶基因簇的一部分 Mcy B 模数和其产毒性有直接相关性。因此,利用 PCR 技术对蓝藻的产毒进行检测又成为一种新的快速方法。潘卉等人还尝试用全细胞 PCR 技术检测产毒微囊藻^[77],此法省去了 DNA 的提取,更为简单,下限可达 $2000\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3. MC 在水环境中的归趋

对于水体中污染物的归宿,通常有如下途径:水量稀释,颗粒物吸附,化学降解,光降解,微生物降解和生物富集。下面结合 MC 具体情况分析。

MC 是藻细胞内毒素,当藻细胞衰老、死亡或溶解后,毒素被释放到水体中。大型湖泊、河流中蓝藻释放的藻毒素可被大量水体稀释,但高浓度、大面积水华溶解时,仍会使毒素达到较高浓度,从而使水体生态系统和人类健康受到威胁。MC 的分子结构表明,该化合物具有相当稳定的环状结构,PH 中性时难以发生化学水解。在光照稀少的天然水体中,MC 可存留几个月甚至几年。在 PH=1 时,需经过 10 个星期,PH=9 时则需 12 个星期才可降解 90% 的藻毒素。而快速化学降解只在极端条件下,如 6M 的高温盐酸中快速分解,这在自然环境中是难以实现的^[79]。有研究显示滇池沉积物对藻毒素的吸附小于 10%。类



似研究^[81]同样表明,水华蓝藻释放的藻毒素大部分溶解在水体中,但 Moms^[80]曾报道海洋沉积物中细颗粒部分对藻毒素的吸附可达 80%。一些研究分析由于将藻细胞包括在颗粒物中,因此有较高的藻毒素含量,但不能代表颗粒物对溶解藻毒素的吸附。可是,很多研究分析直接检测到的水体中藻毒素的含量很低,说明藻毒素在水体中有更重要的归宿途径。

在色素存在下的光解作用是自然条件下水体中藻毒素归宿的主要方式之一。当光照充足时,MC 可以进行缓慢的光化学降解或异构化,从而使其毒性明显降低,但在自然水体中必须有水溶性的细胞色素或腐殖质等光敏剂的存在,才能有效地进行光降解^[82,83]。蓝藻细胞内毒素在日光照射下可改变侧链 Adda 的双键异构体而使其毒性明显降低(半衰期约 10d),但纯微囊藻毒素在日光照射下却是稳定的。而当 MC 暴露在最大紫外吸收波长(238~254nm)时,则降解较快(在数分钟内)。TSuji^[84]等曾研究了藻毒素的光稳定性,发现自然条件下,日光照射纯水中的藻毒素,其降解非常缓慢;若加入色素,则会大大加快藻毒素的降解速率及其转化速率。Welker^[85]等人还发现腐殖质也可作为光敏剂间接催化藻毒素降解,并认为该途径可能是天然水体中藻毒素低浓度的原因。可见环境水体中水溶性细胞色素和腐殖质等光敏剂的存在,可提高光解速率^[78]。

水体中有机污染物的生物降解通常是其主要归宿途径之一,对于微囊藻毒素也是这样。含毒素的蓝藻细胞在水体中迁移,如与粘土共沉淀,或被水生生物捕食后随其颗粒排泄物沉淀等途径,使毒素积累并滞留在底质中,且在富营养化水体中,发生水华的水体透明度通常很低,水体下层及沉积物中的 MC 不易进行光降解,则主要是通过生物降解起作用。由于其化学结构的稳定性,藻毒素不易被真核生物和细菌肽酶分解,能被天然水体中的某些特殊细菌降解,通过改变侧链 Adda 的结构或打开环状结构降低其毒性,有的还可以使之完全矿化。很多研究发现能够降解 MC 的细菌是广泛存在的,在污水沟^[88]、湖水^[89]、沉积水^[90]和河水^[91]中均已发现降解 MC 的土著菌。MC 的微生物降解是客观存在的,但降解藻毒素的菌种及机制还有待研究。

MC 的生物富集是人们比较关注的问题,因为牵涉到水体生物特别是鱼类是否可以食用。目前文献报道鱼体肝脏、胰腺等内脏器官中检测到毒素^[86],



底栖动物中也有检测到藻毒素^[87]。因此藻毒素的生物富集是存在的,但其富集系数还有待进一步研究。

总之,水华蓝藻中释放的大量藻毒素的归宿途径主要是通过水体稀释、光降解、生物降解,其次吸附、生物富集等也是造成水体中藻毒素浓度低的原因。

4. MC 在水环境中的生物降解

释放到水体中 MC 的降解主要是通过光降解或生物降解。在自然水体中必须有水溶性的细胞色素或腐殖质等光敏剂的存在,且存在充足的光照,才能有效地进行光降解。而在富营养化水体中,发生水华的水体透明度通常很低,水体下层及沉积物中的 MC 不易进行光降解,则主要是通过生物降解起作用。下面综述不同水生生物对 MC 降解作用的研究进展。

4.1 微生物对 MC 的降解和转化

能够降解 MC 的细菌是广泛存在的。在污水沟^[88]、湖水^[89]、沉积水^[90]和河水^[91]中均已发现降解 MC 的土著菌。虽然微生物降解是去除 MC 的一条非常有前途的方法,但 MC 的环状结构和间隔双键具有相当的稳定性,一般的多肽水解酶不能对 MC 进行分解,只有一些特殊的微生物菌种具备对 MC 的降解能力。

尽管 MC 降解菌普遍存在,然而迄今为止,被分离和详细研究的纯种 MC 降解菌株却很少。Takenaka 和 Watanabe^[92]发现从天然水体中分离出的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)对 MC-LR 有降解能力,在初始 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高浓度下,20d 去除率为 90%以上,并发现铜绿假单胞菌能将 MC-LR 降解为 (2S,3S,8S)-3-amino-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-dienoic acid DmADDA。负责催化 MC 降解的降解酶是由该菌株所分泌的碱性蛋白酶。Park 等^[93]于 2000 年发现了一株具备对 MC 有较高降解能力的 Y2 菌,为鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*),它对 MC-RR 和 MC-LR 的最大降解速率分别达到每天 13.0 和 $5.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,这株降解菌具有很高的降解效率。国内阎海^[94]率先从云南滇池底泥中分离出了能够降解 MC 的微生物纯菌种,经中国科学院微生物研究所鉴定为 *Ralstonia solanacearum*。研究发现此菌种在 3d 内可将初始浓度分别为 50.2



和 $30.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MC-RR 和 LR 全部降解, 日平均降解 MC-RR 和 LR 的速率分别高达 16.7 和 $9.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。澳大利亚学者 Bourne 和 Jones 等^[95]早期从自然水体中分离出鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)对 MC-LR 有一定的降解能力, 并发现在降解前存在一个滞后期, 一般为 2~8 天, 存在滞后期原因是在这个时期正在合成降解 MC 的水解酶即微囊藻毒素酶 (microcystinase)。近几年来, 日本学者 Saito 等人分别从日本 Kasumigaura 湖分离 MD-1 菌和从中国贵阳市一常发生水华的湖泊中分离 C-1 菌, 发现其都具有降解 MC 的能力, 且都属鞘氨醇单胞菌属, 而且发现它们的生长受到 pH 的影响, C-1 菌在碱性条件下更易生长^[96]。综上所述, 目前已筛选到的 6 种 MC 降解菌, 其降解能力和测试条件见表 3。不过降解率与培养液中的细菌细胞密度有关, 在以上研究中, 由于细菌的细胞密度数据不全, 因此并不能通过所列数据判定以上数种细菌降解能力的高低。



表 3 MC 降解菌降解能力的比较
Tab3 Comparison of MC biodegradation by different bacteria

菌种	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[92]	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas</i> Y2 菌 ^[93]	<i>Ralstoniasolanace</i> <i>arum</i> ^[94]	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas</i> sp. MJ-PV ^[95]	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas</i> MD-1 ^[96]	鞘氨醇单胞菌 <i>Sphingomonas</i> C-1 ^[96]
菌株来源	日本 某湖上层水样	日本 Suwa 湖	中国 滇池底泥	澳大利亚 河水	日本 Kasumigaura 湖	中国贵阳市 某湖泊
MC 初始浓度	50 ug mL ⁻¹	20 mg L ⁻¹	50.2 mg L ⁻¹ (RR) 30.1mg L ⁻¹ (LR)	10 ug mL ⁻¹	1 mg L ⁻¹	N
初始细胞密度	N	2.5*10 ⁶ cell ml ⁻¹	N	N	0. D. 660=0.3	N
实验培养基	NB (nutrient broth)	NB	N	P-YE/ASM	N	N
培养条件	25℃	27℃, 黑暗	N	30℃	30℃	碱性条件生长 pH=8.91
降解效率	3天延滞期,21天后 剩 4.5%MC	4 天基本降解完 全, 无延滞期	3 天全降解完	3 天延滞期,5 天降 解 95%以上 MC	MC-LR0.66hr ⁻¹ MC -RR1.9hr ⁻¹ MC-YR1.25hr ⁻¹	N
备注	碱性蛋白酶负责催 化降解	MC-RR、LR 最大 降解速率分别达到 每天 13.0 和 5.4mgL ⁻¹	MC-RR、LR 日平 均降解速率分别达 16.7 和 9.4mgL ⁻¹	用降解 MC 作用	MirA 基因起降解 多变的, 说明其存 在的广泛性	降解菌生长条件是

N: 无数据 (no data)



Bourne 等^[97]人对鞘氨醇单胞菌的 MC-LR 的降解途径进行了进一步研究,发现环状 MC-LR 首先被微囊藻毒素酶催化开环变成线状的 MC-LR (NH₂-Adda-Glu-methyldehydroal-anine-Ala-Leu-β-methylaspartate - Arg-OH), 然后进一步降解成四肽化合物(NH₂-Adda-Glu-methylde-hydroalanine-Ala-OH), 再降解为小分子多肽和氨基酸(图 2), 并证明了这 2 种中间代谢产物抑制 50% 鸡脑蛋白磷酸酶活性的浓度都远远高于 MC-LR, 这说明中间代谢产物的毒性明显低于 MC-LR 本身, 降解过程是一个解毒的过程。

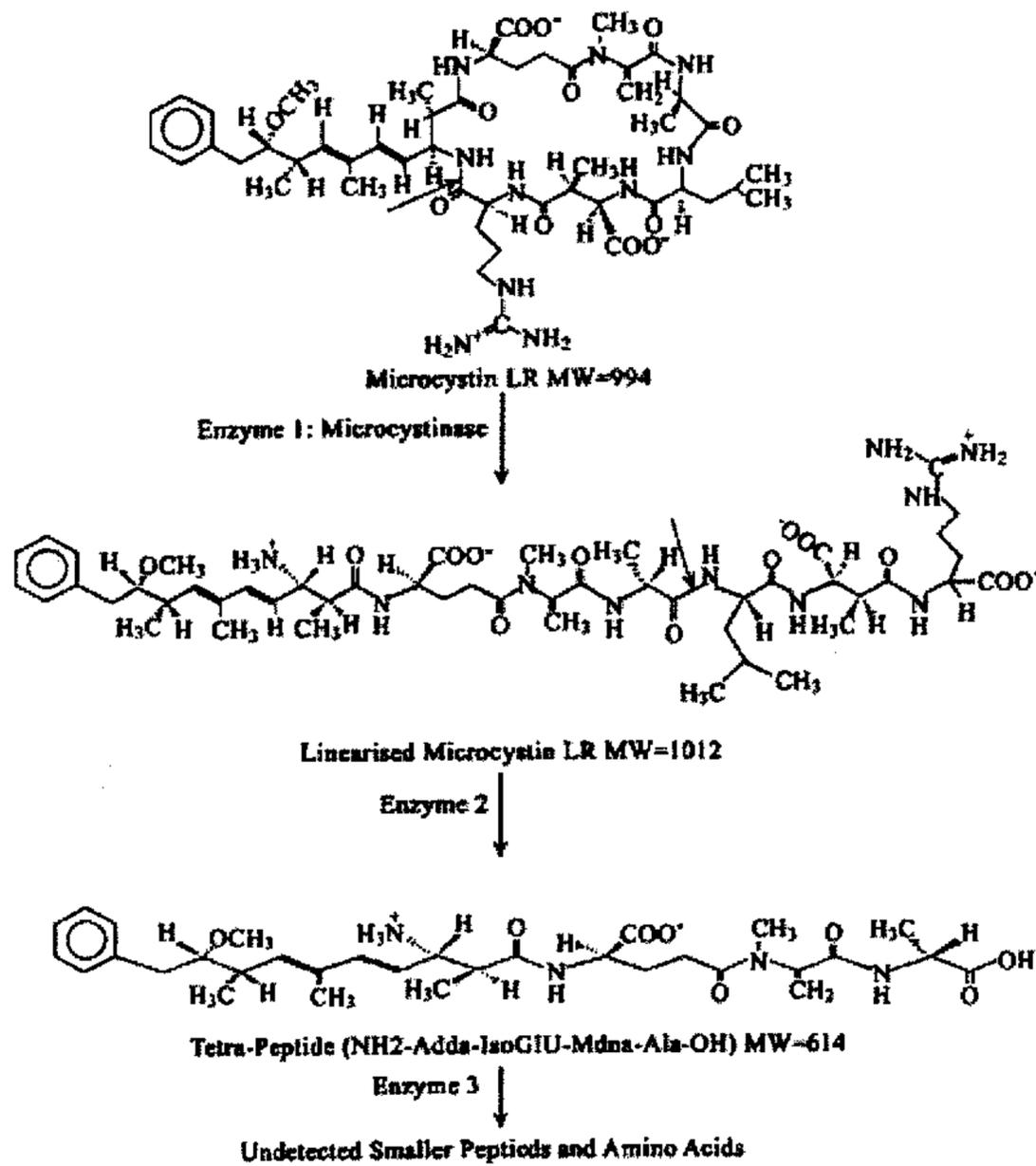


图 2 鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)酶降解 MC-LR 的途径

Fig.2 Enzymatic pathway of MC-LR biodegradation by *Sphingomonas* species^[97]
他们进一步研究发现,在鞘氨醇单胞菌降解 MC-LR 过程中,至少有 3 种微



囊藻毒素酶(microcystinase)参与了 MC-LR 的催化降解反应, 并将对应的基因进行了克隆和分子特点识别分析^[98]。编码三种水解酶的 DNA 片段为 5.8kb(见图 3), 包括 mlrA,mlrB,mlrC,mlrD 基因,其中 mlrA 编码微囊藻毒素酶 (MlrA), 它是降解过程中的第一个酶,是由 336 个残基组成的肽链内切酶,可以被 EDTA 和 1,10 二氮杂菲所抑制,说明它是一种金属蛋白酶,在该酶的催化下将 MC-LR 开环变成线状的 MC-LR; 位于 mlrA 下游且具有相同翻译方向的是 mlrD, 是一个伴随在 mlrA 旁边的寡肽转运子; mlrB 位于它们的下游并具有相反翻译方向, 由它编码的酶 MlrB (402 个残基), 可以将线形 MC-LR 分裂成四肽, 而这种酶属于青霉素结合酶系列, 活性位点是丝氨酸的水解酶; 最后的基因 mlrC 位于 mlrA 上游具有相反的翻译方向, 它编码的酶 MlrC (507 个残基), 可以降解四肽, 酶 MlrC 能被金属整合因子所抑制, 所以是一种金属蛋白酶。其基因活性图谱如下:

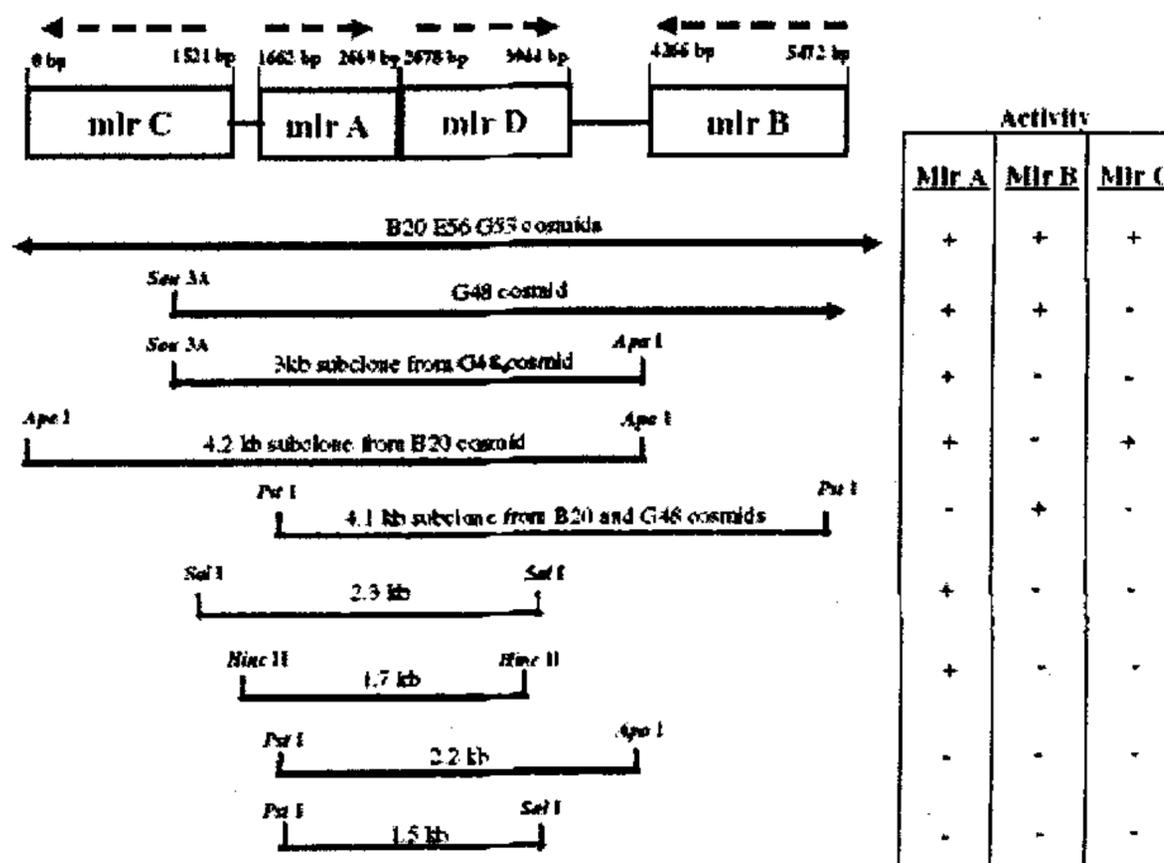


图 3 5. 8kb 序列的限制性图谱及 MC 降解有关基因的位置。基因上方的虚线箭头表示转录方向, 下方的实线表示克隆的 DNA 片断、大小和其对应的 MlrA, Mlr B, MlrC 酶活性; “+”表示肽酶有活性, “-”表示无肽酶活性, 例如, “+ MlrA”说明对应克隆能将环状 MC-LR 降解成直链 MC-LR。



Fig.3 Restriction map of the 5.8 kb of sequence data and localization of genes involved in microcystin LR degradation. Dotted line arrows above each gene represent direction of transcription of each individual gene. Lines below the genes represent cloned fragments and their size and correspond with the activity columns represented by MlrA, Mlr B and MlrC; + represents positive activity of the peptidase, - represents negative activity of the peptidase, eg. + MlrA demonstrates that the clone degrades cyclic microcystinLR to linear microcystinLR.^[98]

MC 酶与碱性蛋白酶没有同源性, 因此根据现有的研究结果推测, 细菌可以通过碱性蛋白酶对胞外的 MC 催化降解成 DmADDA, 也可以通过微囊藻毒素酶等三种胞内水解酶对胞内的 MC 进行降解, 且后者降解能力明显强与前者 (见表 1)。Inamori 等人通过 PCR 监测 *mlrA* 基因, 发现具有降解能力的 Y2 菌、MD-1 菌都含有 *mlrA* 基因且和 MJ-PV 具有很高的同源性, 通过 16SrDNA 分析发现其属于鞘氨醇单胞菌属, 因此作者推测那些很接近鞘氨醇单胞菌属而且含有 *mlrA* 基因的细菌都具有降解 MC 的能力^[99]。

还有许多学者对混合菌降解 MC 进行了研究。吕锡武等^[100]采用序批式生物膜反应器对 3 种 MC 进行降解的实验显示, 混合菌对 MC 有一定的降解能力, 对 MC 的降解好氧条件好于厌氧条件, 但在 3d 内 MC 的去除量都低于 $400\mu\text{gL}^{-1}$; 敖鸿毅等^[101]人利用双协菌 (分别属 *Basidiomycetes* 和 *Geotrichum candidum*) 降解 MC 并对其进行了动力学研究, 双协菌在 $28\sim 32^\circ\text{C}$ 条件下对其进行固态发酵培养, 2 天后 MC 含量明显降低, 6 天后, 基质中 MC 含量未检测出, MC 的去除率达到 91% 以上。作者认为该双协菌是靠营养限制来启动降解过程的, 当将其接入发酵基质中, 由于生物应急性对营养限制作出应答反应, 形成一套酶系统, 在好氧条件下, 依赖于一个主要由细胞产生分泌的酶系统组成的细胞外降解体系, 借助自身形成的 H_2O_2 激活、靠酶触发启动一系列的自由基链反应, 在细胞外对基质中的 MC 进行彻底的氧化分解, 使双协菌不受 MC 溶解性和毒性的限制。虽然有关微生物降解 MC 的研究不少, 可是不同降解菌的降解机理及其调控机制还有待深入的研究。

4.2 鱼类对 MC 的降解和转化

MC 对鱼类有很大毒性。含一定浓度 MC 的水体可使鱼卵变异、鱼类行为及生长异常^[102,103]。水华暴发也时常伴随着大量水生生物死亡, 但是某些鱼类 (如鲢鱼、罗非鱼等) 的耐受性较强, 并可吞食、消化水华藻类, 这是生物控藻



的基础。这些鱼类对 MC 有一定的抗性, 并产生某些生理上及行为上(如排出粪便颜色的变化、体内 GST 变化等多种酶的变化)的适应性使之能与毒藻共存。

不同的鱼种对 MC 毒性承受能力也是不同的。承受能力强的罗非鱼鱼肝中 MC 浓度达到 31.1ug/g 时, 也未见严重的肝损伤^[104]; 然而, 经口给予一年龄红鲮鱼的 MC 的剂量为 6600ng/g 时, 在 72~96h 之内, 鱼全部死亡^[105]。印度学者 Datta^[106]等人利用有效放养食草鱼来控制热带湖泊中的水华, 比较了三种鱼种白鲢、花鲢和罗非鱼耐受 MC 的能力, 发现白鲢能最有效的清理微囊藻来抑制水华的发生。另有研究显示, 在受控条件下, 当用有毒铜绿微囊藻作为食物喂养白鲢和罗非鱼时, 鱼类能在以毒藻为唯一食物的环境中生活 20 天以上, 白鲢和罗非鱼粪便的毒性比喂食藻类的毒性分别降低约 2~4.5 倍, 白鲢对微囊藻的消化能力差, 80%左右的完整藻细胞被排出, 粪便呈绿色; 罗非鱼对藻细胞的消化能力强, 有 70%左右的细胞被消化吸收, 粪便呈红褐色^[103]。MC-LR 对白鲢的半致死量 LD₅₀ 为 300 ug/kg, 对罗非鱼的 LD₅₀ 为 600 ug/kg, 显示罗非鱼对 MC 具有较强的抗性^[107]。可见鱼类必然具有对 MC 降解转化的能力和机制, 而且这种能力和机制在不同鱼种中有差别。

MC 致毒后, 血糖增加, 肝糖原减少等等症状, 谷胱甘肽耗竭也是其中一大症状, Kondo 等人推测 GSH 可能参与了 MC 在动物体中的代谢, 因为 MC 分子中的 Mdha 部分有亲电性的不饱和羧基, 能与 GSH 结合。通过核磁共振分析证明了 GSH 可与 Mdha 部分的不饱和羧基结合, 而且结合后毒性大大降低, MC-LR 与 GSH 结合后对小白鼠的半致死量 LD₅₀ 由原来的 38 变为 630ug/kg, 而 MC-YR 的则由 91 变为 304ug/kg^[108,109]。GSH 是生物转化过程第二阶段 (Phase II) 反应中主要的结合物质之一, GSH 与 MC 结合形成低毒复合物就是在水生生物体内解毒过程主要的结合反应。张甬元^[109]等人发现在草鱼体中 GSH 对 MC 有明显解毒作用; 另外斑马 (*Danio rerio*) 鱼卵和成体^[110]在 mGST 和 sGST 的作用下, 对 MC 也有很高的耐受性。

4.3 水生植物对 MC 的降解和转化

MC 对水生植物的影响是非常明显的, 近期研究表明, 水体中高浓度 MC 对水生植物的生长有负面影响^[111]。Jacqui 等研究 MC 对陆生植物生长的影响,



结果表明不同浓度、不同类型的 MC 对植物生长的影响是不同的,在含 MC 的培养基中植物生长受到抑制,植物的器官(如:根)对之还有一定的吸收^[112]。

水生植物对 MC 解毒过程类似鱼类作用 MC 的原理, Pflugmacher^[113]等研究水生植物金鱼藻 (*Ceratophyllum demersum*) 对 MC 的降解,发现两种状态的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST): 颗粒中的 GST 和水溶性的 GST, 它们作用的效率和范围却是不同: 颗粒状的 GST 只在低浓度 ($0.12\text{--}1.0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 MC 条件下才发挥作用, 而水溶性的 GST 的酶活性随 MC 浓度增加而增大。Pflugmacher^[114]等人进一步研究发现 GSH 与 MC 结合形成低毒复合物就是在水生生物体内解毒过程的第一步。而 GSH 参与 MC 代谢其结合反应是由 GST 的催化下发生的结合反应^[115]。这个 GSH 与 MC 结合形成低毒复合物的解毒过程已经在很多水生生物中都已经发现, 如斑马鱼卵和成体 (*Danio rerio*)^[110]、大型水生植物 (*Ceratophyllum demersum*)^[113]、枝角类大型蚤 (*Daphnia magna*) 和河虾 (*Artemia salina*)^[116]。

最近, 欧丹云等报道发现一种金藻 (棕鞭藻, *Ochromonas* sp.) 对铜绿微囊藻细胞有吞噬现象^[117]。金藻细胞与微囊藻混养时的生长速率明显快于自生长速率。在加入 MC (最高浓度 $800\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 后, 金藻的生长呈现明显的促进。该浓度比自然水体中的毒素浓度高约 100 倍, 说明金藻细胞是对 MC 有较强的耐受能力。发现在金藻培养物中加入 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 毒素, 两天后培养液中毒素消失。而对照组培养基中的毒素浓度则没有变化。这一现象说明了金藻对 MC 有明显的降解能力。金藻细胞不仅能够作为水华微囊藻细胞的吞噬者, 更能够以解毒者的身份参与水华水体的自净作用, 其生态学意义是重大的, 不过其降解 MC 的机理尚有待进一步研究。

4.4 水生无脊椎动物对 MC 的降解和转化

吕锡武等^[100]采用序批式生物膜反应器对 3 种 MC 进行降解的实验显示, 好氧条件下, 草履虫对藻毒素降解起重要作用。另一些无脊椎动物(如: 贻贝、螯虾^[118,119]) 对 MC 有较大的耐受性, 但毒素在其体内有残留富积和放大效应, 可达到相当高的浓度, 通过食物链对人类健康造成潜在的危害。许多研究表明, 贝类能够很好富集 MC。如 Vitor 将贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 放养在有毒的铜绿微囊藻水华中, 发现 16 天后该贝类能富集 MC 浓度达 $10.5\mu\text{g/g}$ 干重,



最高富集浓度达到 $16\mu\text{g/g}^{[119-121]}$ 。贝类能累积高浓度的 MC 而没有显著生理影响的原因尚不清楚。Beattie^[116]等人以河虾 (*Artemia salina*) 三个不同生长时期的个体进行实验, 发现成体能通过 GST 的作用对 MC 进行解毒。

5. 本文研究目的、内容及意义

从现有的研究结果来看, 水环境中 MC 可被各种类型的水生生物降解或转化, 此过程既是生物解毒、自我保护的机制, 也是水环境中 MC 被降解或转化的主要途径之一。前人研究分离出的一些细菌对 MC 具有较高的降解效率, 并且可以完全矿化 MC, 进一步研究表明细菌的碱性蛋白酶和 MC 酶参与了降解过程, 在其它水生生物中 (如鱼类、水生植物、蚤等), MC 的完全矿化尚未有报道, 较多的研究发现 MC 是通过 GST 催化与 GSH 发生结合反应而解毒的。与其它水生生物相比, 细菌因其数量多、繁殖快、代谢速度快, 且可以矿化 MC, 具有较高的研究价值。同时在发生水华的水体中, 因其水体营养丰富, 细菌有大量增殖的条件, 而其它水生生物的繁殖和生长往往受到了一定的抑制, 因此细菌可能在水环境中 MC 的生物降解中起主导作用, 这和细菌作为生态系统的分解者的地位是一致的。

虽然水环境中 MC 的生物降解的研究已经积累了一些资料, 但分离纯化的 MC 降解菌还较少, 且都是好氧菌, 对水体底层和底泥中进行的厌氧降解的降解菌和降解过程的了解还非常缺乏。因此本研究通过优化天然水华蓝藻中 MC 提取方法, 获得足够的 MC 进行实验, 重点分析水体好氧和厌氧降解速率, 从中国不同富营养化水体、底泥中分离主要降解菌特别是厌氧降解菌, 目的是了解 MC 在自然水体的降解过程, 以阐明细菌在水生态系统中对 MC 归趋的作用, 同时力图筛选高效降解菌, 研究其高效降解机理, 为 MC 的生物修复提供理论基础。



第二章 天然水华蓝藻中 MC 提取方法的优化

MC 是一种细胞内毒素,绝大多数情况下只有细胞裂解后才释放到水体中。到目前为止,科学家对微囊藻毒素的结构鉴定、环境行为、毒性评价以及毒性机理等方面已做了大量的研究工作,但仍存在许多问题有待解决。在开展蓝藻及其毒素相关领域研究中,对 MC 纯品的需求有增无减。由于微囊藻毒素在藻细胞内相对含量较少,干扰分离的物质多,且存在对其分离、纯化的成本较高等因素,使得建立快速、高效、低成本的提取 MC 的方法显得尤为必要。但一直以来由于研究者的不同需要,MC 提纯的方法各有不同,至今也没有一种达成共识的最佳方法。本文以丰富的天然水华蓝藻为原料,对目前各种 MC 提取方法进行了比较研究,并分析评价了各方法的优缺点,为获得一定数量满足不同实验需求的 MC 纯品提供了研究基础。

1 材料与amp;方法

1.1 蓝藻样品采集和处理

用于提取 MC 的藻类样品采集于武汉东湖,镜检表明铜绿微囊藻为优势种。藻样用 25 号浮游生物网捞取,过筛并洗涤后浓缩成藻浆,置于超低温冰箱冷冻保存。

1.2 MC 标准样品及固相萃取柱

标样铜绿微囊藻毒素 MC-RR (分子式: $C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$, 分子量: 1038.2) 和 MC-LR (分子式: $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$, 分子量: 995.2) 由浙江大学徐立红教授赠送。固相萃取柱 ODS (C_{18} 柱) 购买于大连物化所,用于 MC 的粗提。

1.3 MC 的提取

提取溶剂 正丁醇:甲醇:水(5:20:75, v/v); 甲醇溶液(40%、80%和 100%); 5%乙酸溶液; 连续抽提法(先用 5%乙酸溶液,然后用 40%甲醇溶液)。

提取操作 分别取一定量的藻浆置于烧杯中,各加入上述提取溶剂,用锡



箔密封后置于恒温磁力搅拌器上抽提，使藻浆和溶剂充分混合。正丁醇:甲醇:水(5:20:75, v/v)、甲醇溶液(40%、80%和 100%)和 5%乙酸溶液各抽提两次，连续抽提法先用 5%乙酸溶液抽提，然后用 40%甲醇溶液抽提第二次。两次提取液混合，以 12000r/min 离心 10min，上清液转移至洁净烧杯中，冷风吹去有机溶剂，用 C₁₈ 柱固相萃取 MC。

1.4 MC 的检测

BENCKMAN 高效液相色谱，流动相为甲醇和磷酸缓冲液（体积比为 58:42，缓冲液为 0.05M，pH 3.0）；流量为 1mL/min，检测波长 238nm；进样量 20 μ L；定量方法：外标峰面积法定量。

2 结果与分析

2.1 采集的蓝藻样品中 MC 的类型

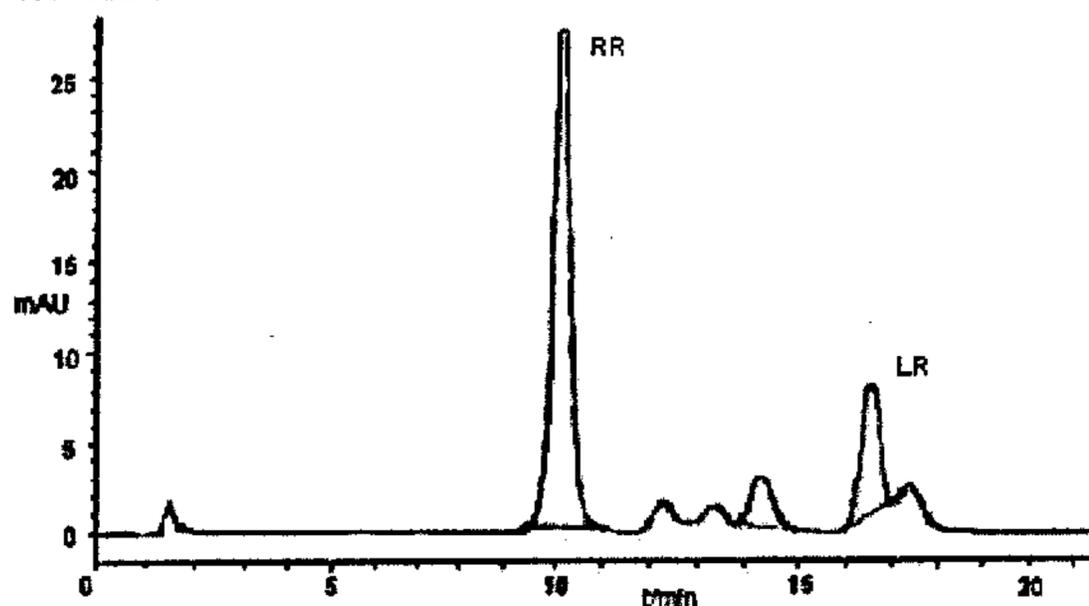


图 4 HPLC 检测粗提 MC 对应色谱图

Fig.4 Chromatogram of rude-extracted MC by HPLC

本实验采用外标法液相检测：MC-RR 与 MC-LR 检测保留时间分别为 9.8min、16.4min（如图 4 示），检测浓度分别为 MC-RR 335 mg · L⁻¹、MC-LR 48.7 mg · L⁻¹。本研究结果表明，此次采集的武汉东湖天然水华蓝藻中所含的藻毒素存在有 MC-RR 和 MC-LR，而 MC-RR 的产量达较高水平且远大于 MC-LR。就 MC 的类型而言，世界上不同地区的水华蓝藻产生的 MC 类型也



不相同。一般在欧洲温度较低的地方，MC-LR 是主要类型，但在亚洲温度较高的地区，MC-RR 是产生的主要类型。

2.2 不同提取液中藻胆蛋白等细胞残留物的比较

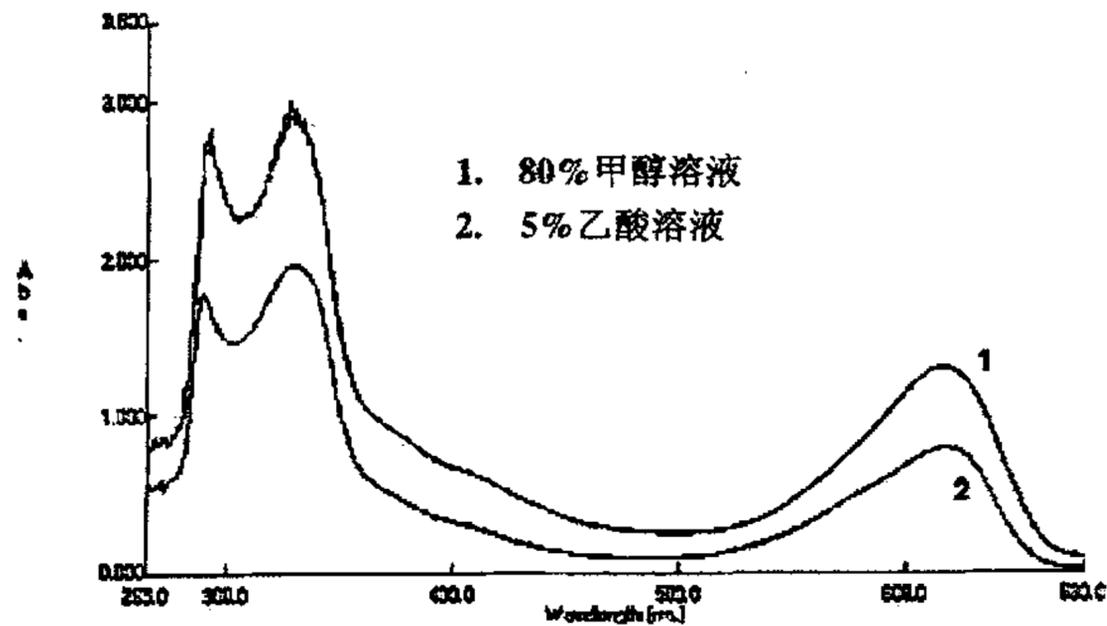
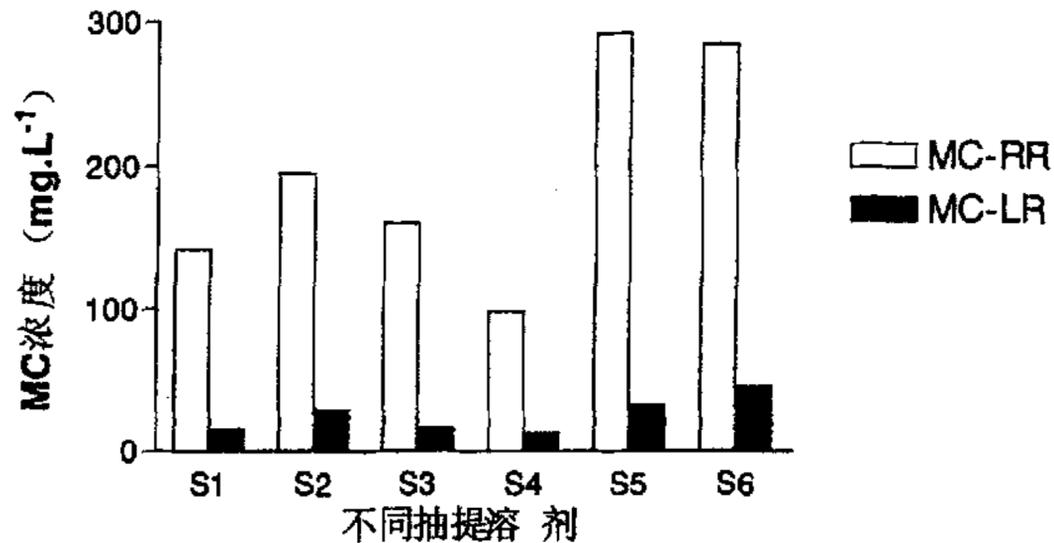


图 5 不同提取液的紫外-可见扫描光谱

Fig.5 Scanning spectrum of various extracts

本实验在抽提过程中，可以观察到不同溶剂提取液呈现不同的颜色。由图 5 紫外-可见扫描光谱可以看出，在 5%乙酸和 80%甲醇提取液中含有数量不等的藻胆蛋白等共提取物，使得它们分别呈蓝绿色和蓝紫色。用 pH 计分别测定各提取液 pH 值，本实验中 5%乙酸溶液和连续抽提法提取液 pH 分别为 3.61 和 3.86，接近藻胆蛋白的等电点，而且在抽提过程中可以明显观察到这两组提取溶剂系统中有大量蓝绿色絮状沉淀物产生，故可省去调 pH 法去除藻胆蛋白的步骤，使整个提取过程更加简捷、快速。

2.3 不同提取溶剂对 MC-RR 和 MC-LR 的提取效果比较



S1—正丁醇:甲醇:水(5:20:75, v/v); S2—40%甲醇溶液; S3—80%甲醇溶液; S4—100%甲醇; S5—5%乙酸溶液; S6—连续抽提法(先用5%乙酸溶液,然后用40%甲醇溶液)

图6 不同提取液抽提后 MC-RR 和 MC-LR 含量

Fig.6 Concentrations of MC-RR and MC-LR by different extracting solutions

本实验使用了六种不同抽提溶剂: S1, 正丁醇:甲醇:水(5:20:75, v/v); S2, 40%甲醇溶液; S3, 80%甲醇溶液; S4, 100%甲醇; S5, 5%乙酸溶液; S6, 连续抽提法(先用5%乙酸溶液,然后用40%甲醇溶液)。在实验比较的所有提取溶剂中, 5%乙酸溶液和连续抽提法可以从藻细胞中提取更多的 MC-RR 和 MC-LR (图6)。用5%乙酸溶液作为提取溶剂, 提取液中 MC-RR 和 MC-LR 的浓度分别为 $292.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $32.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用连续抽提法(先用5%乙酸溶液,然后用40%甲醇溶液), 则提取液中 MC-RR 和 MC-LR 的浓度分别为 $285.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $45.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究发现, 虽然40%甲醇提取液中 MC-RR 和 MC-LR 的浓度分别为 $194.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $29.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 比80%甲醇溶液和100%甲醇的提取效率要高, 但40%甲醇溶液并不是最有效的提取溶剂。利用甲醇溶液和正丁醇:甲醇:水(5:20:75, v/v)从东湖水华蓝藻细胞中提取 MC-RR 和 MC-LR 的效率也都远远低于5%乙酸溶液和连续抽提法。

2.4 抽提时间对 MC 含量的影响

从蓝藻细胞中提取藻毒素, 抽提时间的长短也直接影响 MC 的含量。本文选用提取天然蓝藻藻浆中的微囊藻毒素效率高的5%乙酸提取溶液来比较提取



时间对 MC 含量的影响。图 7 为 5%乙酸提取液中微囊藻毒素浓度随时间变化曲线, 提取溶液中微囊藻毒素浓度随提取时间的改变而有所不同。这主要取决于细胞内的藻毒素的含量及其溶解、浸出的过程。

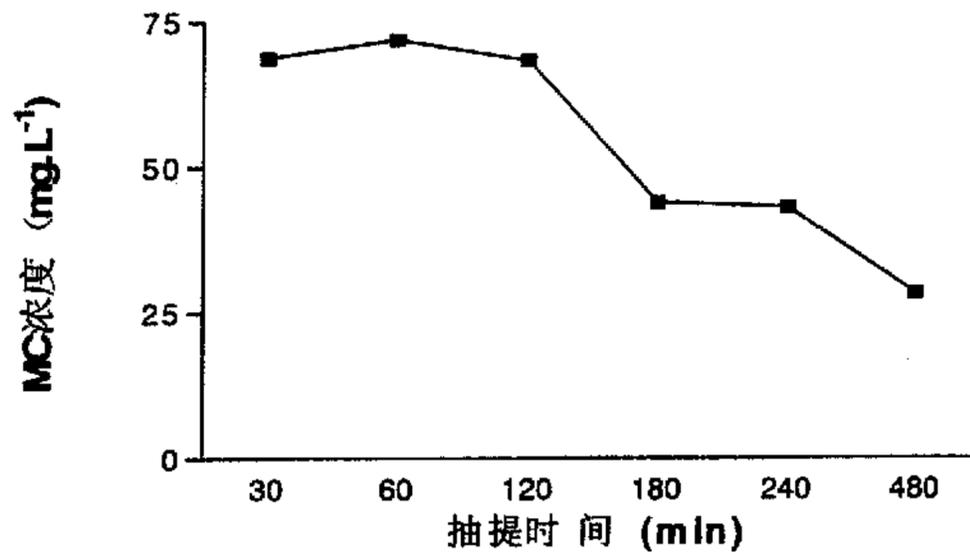


图 7 抽提时间对 MC 含量的影响

Fig.7 The effect of extraction time

文献报道 MC 提取时间为 60~120min 不等^[10,13], 本实验在 30~120min 抽提效果较好。从实验结果还可看出, 在 5%乙酸提取液中抽提 60min 效果最好, 最高浓度达 $72.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。30min 和 120min 时也有较好的提取效果, 提取液中 MC 浓度分别为 $68.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $68.9\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但如果提取时间延长到 120min 以上, 则 MC 含量会明显减少, 这可能是由于抽提时间过长影响了 MC 的稳定性, 或加剧了 MC 的变异。在从蓝藻中提取藻毒素的相关报道中, 用水、乙醇溶液和甲醇溶液为提取溶剂时存在类似的现象, 故过长的抽提时间是不必要的。

3 讨论

据研究报道, 25%~70%暴发蓝藻水华的湖泊可产生藻毒素。世界上不同地区的水华蓝藻产生的 MC 类型也不相同。一般在欧洲温度较低的地方, MC-LR 是主要类型, 但在亚洲温度较高的地区, MC-RR 是产生的主要类型。



本研究结果表明,此次采集的武汉东湖天然水华蓝藻中所含的藻毒素存在有 MC-RR 和 MC-LR,而 MC-RR 的产量达较高水平,且为主要类型。

目前,从蓝藻藻细胞中提取 MC 的溶剂系统主要有 5%的乙酸,水,正丁醇:甲醇:水,乙醇和甲醇等,应用最为普遍的是不同浓度的甲醇溶液,其中 50%~80%的甲醇溶液被认为是 MC 的最有效提取液^[123]。但闫海等^[124]曾报道 40%甲醇溶液可以最有效地从滇池水华蓝藻细胞中提取 MC-RR 和 MC-LR,在甲醇比例提高到 40%以上时,提取液中的 MC 浓度随甲醇浓度的升高而下降。Nina 和 Hans^[125]报道的研究结果显示,分别采用水、5%乙酸、70%甲醇和 100%甲醇作为提取液,从铜绿微囊藻细胞中提取 MC-RR 的效率基本一样。在本实验比较的所有提取溶剂中,5%乙酸溶液和连续抽提法(先用 5%乙酸溶液,然后用 40%甲醇溶液)可以最大限度地从东湖水华蓝藻细胞中提取 MC-RR 和 MC-LR。本研究发现,40%甲醇溶液并不是最高效的提取溶剂,其提取液中 MC-RR 和 MC-LR 的浓度分别为 $194.8\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $29.04\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 比 80%甲醇溶液和 100%甲醇的提取效率要高,但并不是最有效的抽提溶剂。不同提取溶剂对天然藻浆藻细胞中的 MC 提取效果差别很大。这主要是由于藻毒素变体的极性不同而造成在不同极性提取液中的提取效率差异。

蓝藻中含有丰富的藻胆蛋白等物质,藻胆蛋白是大量存在于蓝藻中的捕光色素蛋白,包括藻红蛋白、藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白和别藻蓝蛋白等。在藻胆蛋白色基的吸收光谱中有两个吸收区域,分别位于 300~400nm(紫外区)和 500~700nm(可见光区)^[122]。这些蛋白质类共提取物对藻毒素的纯化有很大的干扰作用,应设法在过固相萃取柱前去除,以达到更好的提纯效果。有文献曾报道^[9],可采用简便有效的调 pH 法,即先以稀 H_2SO_4 调节提取液 $\text{pH}=4$,使藻胆蛋白变性析出(可观察到大量蓝色絮状沉淀物产生),然后该溶液以 5000r/min 离心 20min,移出无色或浅黄色透明上清液,并以稀氨水将 pH 调回中性,避光保存备用。而本实验中 5%乙酸溶液和连续抽提法提取液 pH 分别为 3.61 和 3.86,接近藻胆蛋白的等电点,而且在抽提过程中可以明显观察到这两组提取溶剂系统中有大量蓝绿色絮状沉淀物产生,故可省去调 pH 法去除藻胆蛋白的步骤,使整个提取过程更加简捷、快速、高效。

从天然水华蓝藻藻细胞中提取藻毒素也受到其他物理因素的影响。如抽提



时间对抽提的效率就有一定影响，适当的抽提时间才能更有效的提取 MC。当提取时间延长到 120min 以上，则 MC 含量会明显减少，这可能是由于抽提时间过长影响了 MC 的稳定性，或加剧了 MC 的变异。本实验可见抽提时间应控制在 120min 以下，过长的提取时间会影响 MC 的稳定性，降低提取效率。

在进行 MC 相关研究中，研究者可以根据自己的实验需要使用最合适的抽提方法，本实验就使用连续抽提法（先用 5% 乙酸溶液抽提半小时，然后用 40% 甲醇溶液抽提半小时）最大限度地从东湖水华蓝藻细胞中提取 MC-RR 和 MC-LR，以为后面的降解实验提供足够的 MC 来源。



第三章 富营养水体中 MC 好氧降解菌的 筛选分离及降解能力研究

水环境中微囊藻毒素可被各种类型的水生生物降解或转化,此过程既是生物解毒、自我保护的机制,也是水环境微囊藻毒素被分解的主要途径之一。与其它水生生物相比,细菌具有较高的降解效率,并且可以完全矿化微囊藻毒素,同时,在发生水华的水体中,细菌可大量增殖,对于水环境 MC 的生物降解起主导作用。能够降解 MC 的细菌是广泛存在的。在污水沟^[88]、湖水^[89]、沉积水^[90]和河水^[91]中均已发现降解 MC 的土著菌。虽然水环境 MC 的生物降解研究已经积累了一些资料,但目前从自然水体中分离纯化的 MC 好氧降解菌种类还较少,本实验即进行对富营养化水体中 MC 好氧降解菌的筛选分离,进一步了解水环境 MC 好氧降解的过程,为了解 MC 的环境归趋和生物修复提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验方案设计

采用三种筛选方案:

- A. 从经常爆发水华的水体中分离优势菌株,通过 MC 降解实验检测其降解能力;
- B. 富集法:水样先采用富集培养基培养,然后在培养的过程中逐步提高 MC 含量,同时逐步减少富集培养基的量,直至仅含 MC 的基础培养基培养样品,然后挑取单克隆菌株进行降解实验;
- C. 富集混合降解法:样品先用液体牛肉膏蛋白胨培养基培养,扩增细菌,然后用混合菌直接做降解实验比较各样品间降解 MC 的能力,挑选出有强降解能力的样品,进一步分离单菌株做降解实验,从而筛选出高效降解菌。

1.2 实验仪器



高速离心机、恒温摇床、培养箱、磁力搅拌器、超低温冰箱、BENCKMAN 高效液相色谱 (HPLC, C₈ 柱, 4.5×150mm, 168 检测器)、ODS (C₁₈ 柱) 等

1.3 样品的采集和处理

水样采集于武汉东湖 (卓刀泉、狂欢岛)、中国科学院水生生物研究所关桥实验水池 (富营养化水池)、南湖山庄旁一水池、邮科院旁一水池。水样通过 3 μ m 滤膜处理, 滤液置于-20℃冰箱中冷冻保存。

底泥取自中国科学院水生生物研究所关桥实验水池底泥、鸭儿湖底泥、南湖旁一水池底泥、邮科院旁一水池底泥, 置于-20℃冰箱中冷冻保存。

1.4 MC 的粗提与分析

实验使用的是本实验室粗提的 MC (详见上章)。

1.5 培养基的制备

牛肉膏蛋白胨培养基 (NB 培养基, 细菌生长、分离、纯化用培养基): 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 15—20g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0—7.2。

基础培养基 (降解用无机盐培养基): K₂HPO₄ 1.6g, KH₂PO₄ 0.4g, NH₄NO₃ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, CaCl₂·2H₂O 25mg, FeCl₃·6H₂O 2.3mg, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。根据实验需要加入适量 MC。

富集培养基 (筛选、驯化降解菌): 葡萄糖 1g, 蛋白胨 0.5g, K₂HPO₄ 0.1g, MgSO₄ 0.05g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2—7.4。根据实验需要加入适量 MC。

1.6 水样中优势菌株筛选

(1) 平板分离 将处理过的水样 (即滤液) 进行适当稀释, 涂布于牛肉膏蛋白胨平板, 30℃倒置于培养箱中培养 24—36h。

(2) 挑取单克隆 挑取涂布平板上的菌落, 通过多次划线分离, 使菌落性状得以充分表现, 并根据各菌落外观形态特征和在显微镜下染色观察的细胞形态, 初步挑选菌株, 确定不同细菌的特征。观察的具体形态特征内容包括: ① 菌落培养特征: 菌株经纯化后, 在牛肉膏蛋白胨平板培养基上划线培养, 待出现单个菌落后, 观察菌落的形状、大小、颜色、透明度、隆起程度、边缘、粘度等外观特征; ② 单细胞形态观察: 将培养后的菌株按照细菌学常用的方法进行染色后, 在显微镜下观察细胞形态、排列、大小等, 并将所得纯菌株分别接种于牛肉膏蛋白胨斜面上, 4℃冰箱保存。经划线纯化长出的单菌落待降解实



验使用。

1.7 水样中优势菌降解能力比较

将分离得到的优势菌株挑至 EP 管中, 加入 1mL 基础培养基, 用血球计数板计数调菌悬液浓度至 $2\sim 6\times 10^7\text{cell mL}^{-1}$, 加入含 MC 的基础培养基 2mL 中, 进行 MC 降解实验, 并取上清液 0.2mL 作为降解实验的初始浓度, 保存在 4°C 待 HPLC 检测。其后在 3d, 6d, 10d 分别取 0.4mL 降解液离心后保存上清 0.2mL, 保存在 4°C 待 HPLC 检测 MC 浓度的变化。

优势菌株降解 MC 的初始浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌悬液浓度为 $2\sim 6\times 10^6\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在降解的周期中分别在 1d, 3d, 6d, 10d 各取 0.4mL 降解液离心后保存上清 0.2mL, 保存在 4°C 待 HPLC 检测 MC 浓度变化, 比较各菌株在不同 MC 浓度下的降解能力大小。

1.8 好氧降解菌的富集

将处理过的水样加入 NB 培养基中, 置于 30°C 左右, 110r/min 的摇床, 遮光恒温振荡培养 2—3d。待细菌大量生长 (目测培养液混浊度增加) 后则取出离心, 接种至富集培养基 (含 MC $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 中继续振荡培养 2—3 d。以后每次离心移种逐步提高 MC 浓度, 富集培养时间为期 1 个月左右, 至 MC 浓度达 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 以基础培养基取代富集培养基继续驯化。

1.9 高效降解菌的分离与纯化

将富集培养的菌悬液制备成 $10^{-5}\sim 10^{-7}$ 系列稀释液, 与牛肉膏蛋白胨培养基稀释倒平板, 在 30°C 培养箱中培养, 然后根据其外观形态挑取单菌落, 多次划线纯化, 并将所得纯菌株分别接种于 NB 斜面上培养 24-48h 后保存于 4°C 下, 待进一步做单菌株降解实验。

2 结果与分析

2.1 优势菌株的分离纯化及其降解能力研究 2.1.1 水样优势菌株的分离纯化

从武汉东湖、关桥实验水池分离出 7 株优势菌。水样稀释平板法分离, 按不同的菌落形态特征, 挑选出 7 种菌株, 分别计为 W-1, W-2...W-7。菌种经纯化后, 在牛肉膏蛋白胨平板培养基上划线培养, 待出现单个菌落后, 观察菌落



的形状、大小、颜色、透明度、隆起程度、边缘等，结果见表 4:

表 4 七种菌株的菌落特征

Tab 4. The colony cultural characters of seven isolated strains

细菌编号	菌落形状	菌落颜色	菌落特征
W_1	较小, 圆形	桔黄色	菌落不透明, 表面微湿润, 微隆起, 显乳突状, 边缘整齐
W_2	小, 圆形	淡黄色	菌落不透明, 光滑, 较干燥, 边缘整齐
W_3	较小, 圆形	白色	菌落不透明, 表面较湿润, 具有明显突起, 边缘整齐
W_4	大, 不规则形	白色	此菌从藻浆中分离, 菌落不透明, 较湿润, 表面平坦, 边缘不整齐
W_5	较大, 近圆形	白色	菌落半透明, 较光滑湿润, 微突起, 边缘不太整齐
W_6	小, 圆形	白色	菌落不透明, 微干燥, 略有突起, 边缘整齐
W_7	较大, 不规则	白色	菌落微隆起, 光滑, 较湿润, 边缘不整齐且呈微辐射状

2.1.2 水样优势菌株的降解能力比较

将挑选出来的各菌株在相同条件下进行降解实验, 根据 MC 浓度大小变化情况, 来判断各菌株降解能力的强弱, 结果见图 8。

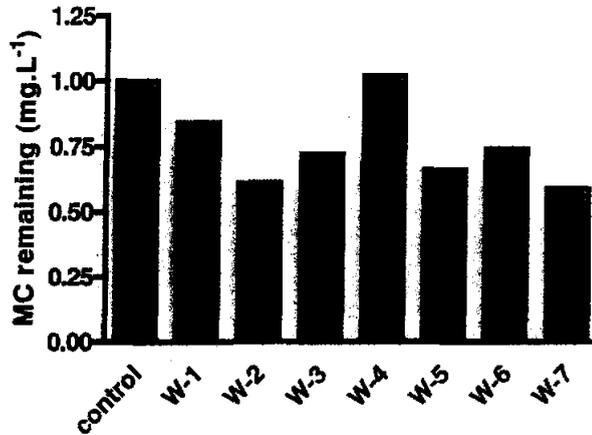


图 8 七种优势菌株一周内对 MC 的降解情况图

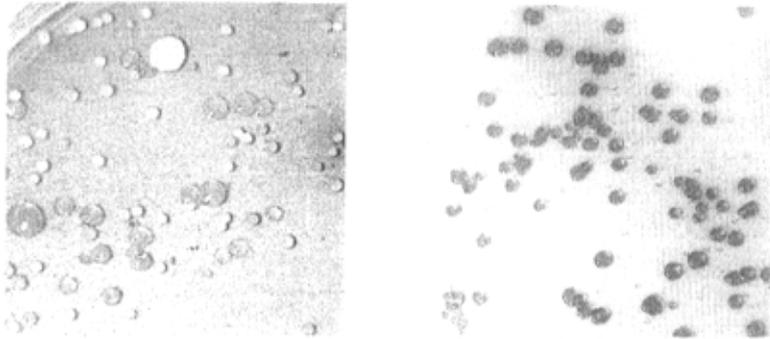
Fig.8 Degradation diagram of MC by seven isolated strains in a week

从图 8 可见：水体中大多菌株对 MC 都有一定的降解能力，而 W_2 号菌（来自关桥水样）和 W_7 号菌（来自关桥水样）表现较强的降解能力。可见降解 MC 的土著菌是广泛存在的，而降解能力也有差异。

2.2 好氧降解菌的筛选分离

2.2.1 富集法：

经富集培养后，微生物种类明显减少（见图 9），富集后菌株出现产色素的菌株，分离两株细菌 F1、F2，但其降解 MC 能力较低，在 MC 初浓度为 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降解实验中，一周后仅降解 10-20%MC，分析可能是菌株通过长时间的富集后对 MC 有很强的耐受力，而并没有高的降解能力。在前面的实验中均以基础培养基为降解液，仅以少量 MC 作为碳源，降解菌可能不能生长或不能很好的生长，同时也不利于其降解 MC，因此后面的实验均改用 NB 培养基作为降解液，在降解菌正常生长情况下，比较各细菌降解能力的大小。因富集法周期长，重复实验富集不同的样品太耗时，改进方案使用富集混合降解法，缩短筛选周期，先找出高效的降解组，再筛选高效降解菌。



富集培养前：微生物种类多

富集培养后：微生物种类减少

图 9：富集前后菌落比较图

Fig.9 Comparison of the microorganisms after enrichment

2. 2. 2 富集混合降解法

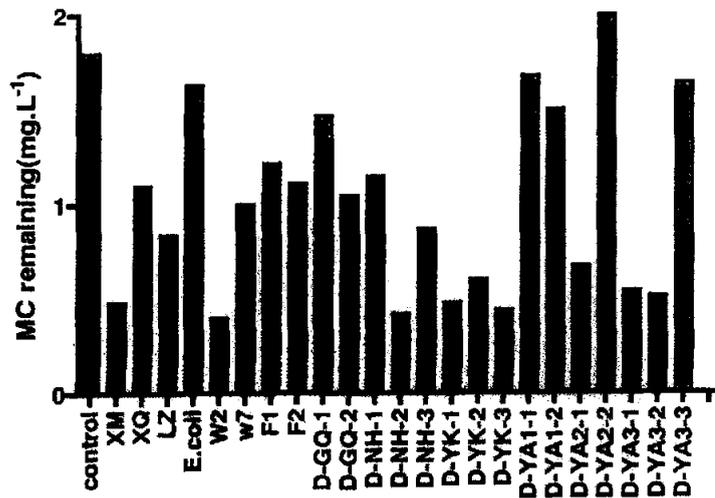


图 10 23 种细菌四天内对 MC 的降解情况图

Fig.10 Degradation diagram of MC by twenty-three isolated strains in four days

在富集混合降解实验中，分别以采样点处的底泥和水样为研究对象，结果



发现混合降解实验中底泥中微生物菌群降解 MC 能力比水样中的快 (初浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解液为 NB 培养基, 四处底泥混合降解菌均在 6d 后 HPLC 检测显示 NO DATA)。分离高效降解组中单克隆菌株, 分别从关桥、南湖、邮科院、鸭儿湖四处底泥混合降解后的样品中分离单克隆, 命名为 D-GQ-1、D-GQ-2、D-NH-1、D-NH-2、D-NH-3、D-YK-1、D-YK-2、D-YK-3、D-YA1-1、D-YA1-2、D-YA2-1、D-YA2-2、D-YA3-1、D-YA3-2、D-YA3-3。同时与前面实验分离的水样中的降解菌 W2、W7、F1、F2 和本实验室保存的特殊菌株 XM、XQ、LZ、E.coli, 共 23 种细菌。在相同条件下进行单菌株降解实验, 根据它们对 MC 降解能力的大小, 来判断各菌株降解能力的强弱 (见图 10)。从图 10 可以看出: XM、W2、D-NH-2、D-YK-1、D-YK-2、D-YK-3、D-YA2-1、D-YA3-1、D-YA3-2 菌在四天内降解率均在 50% 以上, 表现出较高的降解能力。

提高降解实验初始 MC 浓度至 $18.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 对具有较高降解能力的九株菌再进行降解实验, 结果见图 11。结果示, 相对于其它菌株, W2、D-YK-2、D-YK-3、D-YA3-2 在高浓度下仍具有较强的降解能力, 其它菌株在高浓度的 MC 条件下不能表现稳定的降解能力。在重复的降解实验中发现, W2 菌一直表现出稳定的降解能力, 继续进行相关降解能力研究。

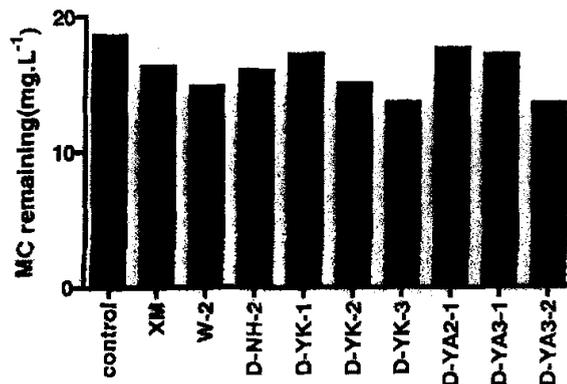


图 11 九种细菌四天内对 MC 的降解情况图

Fig.11 Degradation diagram of MC by nine isolated strains in four days



2.3 W-2 号菌株降解能力研究

从多次重复的降解实验中发现，许多菌株对 MC 的降解能力不稳定，而 W2 号菌一直表现出稳定的降解能力，进而深入对 W-2 号菌进行降解活性的研究。W2 号菌菌落形态、细胞形态等特征，结果如表 5:

表 5 W-2 菌落及细胞的形态特征

Table 5. The morphological characters of W-2 strain

菌株号	W-2
菌落描述	小，球形，淡黄色菌落，不透明，光滑，较干燥，边缘整齐
革兰氏染色	G ⁺
细胞形态特征	球形
细胞排列	对生或单生
芽孢	无
鞭毛	无

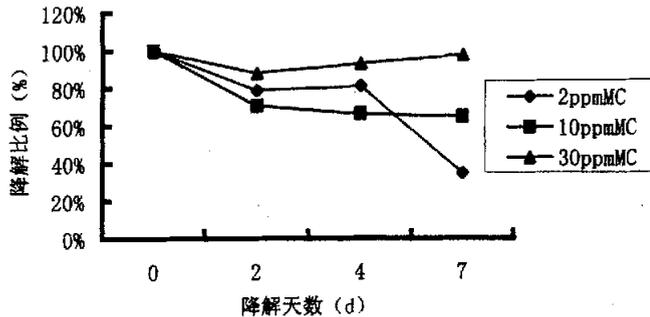


图 12 W-2 号菌株在不同 MC 初始浓度下的降解比较图

Fig.12 Comparison of the degradation rate in different MC initial concentration by W-2 strain

在不同 MC 浓度下，W-2 号菌株的降解效率是不同的（见图 12）。在低浓度下（MC2 mg · L⁻¹）有较强的降解能力，七天内可降解 63.5%；当 MC 浓度为 10 mg · L⁻¹ 时，降解效率降低，七天仅降解 30% 左右；在高浓度下基本表现



无降解能力。结果表明,在相同条件下,不同 MC 浓度下 W-2 号菌的降解效率是不同的,且浓度越低,降解越快,较高浓度的 MC 可能对细菌的生长有一定的抑制作用,进一步降低了细菌的降解能力。在实验中发现有时 MC 浓度出现微增加现象,分析实验过程:由于降解实验在好氧条件进行通气性较好,长时间培养中,溶剂挥发,体积变小,而若 MC 无降解,量不变,则浓度变大。

W-2 号菌对不同 MC 异构体皆存在降解,且降解能力不尽相同(如图 13):

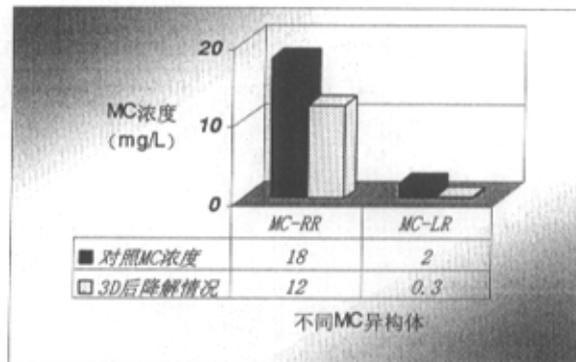


图 13 W-2 号菌株在不同 MC 异构体下降解情况比较

Fig.13 Comparison of different MC variants degradation by W-2 strain

3 讨论

虽然水环境中微囊藻毒素的相关研究很多,可是关于微生物对 MC 的降解方面研究还很少。本实验广泛从不同水体中分离优势菌株研究其降解能力,结果可见,从自然水体中分离的各种优势菌株对 MC 都有一定的降解能力,说明 MC 降解菌是广泛存在的,有报道在污水沟^[88]、湖水^[89]、沉积水^[90]和河水^[91]中均发现降解 MC 的土著菌,所以 MC 的微生物降解是客观存在的,筛选降解 MC 的菌种并研究其机制还有待深入进行。

目前,国内外报道微囊藻毒素降解菌仅有铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*^[92])、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*^[93,95,96]) 和青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*^[94]), 其中后两者皆可高效降解 MC: 鞘氨醇单胞菌日平均降解 MC-RR 和 LR 的速率分别达 13.0 和 5.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 青枯菌日平均降解 MC-RR 和



LR 的速率分别达 20.0 和 $12.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究发现, 水体中多数优势菌株降解 MC 能力并不强。对 W-2 号菌株降解能力的研究显示, 在低浓度下 ($\text{MC}2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 有较强的降解能力, 七天内可降解 63.5%; 当 MC 浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 降解效率降低, 七天仅降解 30% 左右; 在高浓度下基本表现无降解能力。分析推测由于选用优势菌进行降解实验中, 不存在对菌株逐步驯化这一过程, 在低浓度的 MC 条件下, 菌株对 MC 有一定适应性, 随着降解酶的合成表现出降解能力; 而在高浓度的 MC 条件下, MC 毒性可能对细菌自身的生长有一定的抑制作用, 从而进一步也降低了菌株的降解能力。但水体中优势菌株具有降解能力, 具有深远的生态学意义。虽然水体中优势菌的降解效率可能不太高, 但是它们是水体中的优势菌群, 若对 MC 具有一定降解能力, 在水华发生时由于其数量大、分布广, 也能很好起到降解转化 MC 的作用。同时在自然条件下水体中 MC 浓度最大达毫克级, 此浓度正利于细菌对 MC 的降解。

水体中优势菌株具有降解 MC 能力固然具有重要的生态学意义, 我们进一步筛选高效的降解菌, 从而可分离高效降解菌的降解基因, 再通过基因工程技术构建工程菌, 可以更有效的应用到 MC 的治理中。富集法筛选高效降解菌的实验中, 菌株经富集驯化后, 微生物种类明显减少, 说明富集法对除去对 MC 敏感的菌株是很有效的。富集后出现有色菌株, 其原因可能是由于培养条件的变化, 细菌分泌不同水溶性色素导致菌落乃至整个平板呈现出不同颜色。在研究菌株对 MC 的降解实验中, 有色菌株并没有表现较强的降解能力, 可能是其仅对 MC 具有很高的耐受性, 或者它们是协同代谢, 单个菌株不能有效降解 MC, 其原因有待进一步的研究。

改进实验方案, 富集混合降解实验结果表明, 底泥微生物菌群比表层水体中微生物菌群对 MC 有更强的降解能力, 此结果与闫海^[127]所报道的结果一致。因为 MC 属于细胞内毒素, 当细胞破裂后才导致 MC 的大量释放, 而水华蓝藻细胞可能往往在死亡沉入底部后才破裂, 这样导致湖泊底部局部 MC 浓度升高, 有利于驯化出高效降解 MC 的微生物菌种, 这可能是导致底泥中微生物菌群对 MC 的降解能力强于表层水体微生物菌群的原因之一。另外, 底泥中微生物的数量比表层水体中的微生物数量多也可能是导致降解 MC 速度快的另一个因素。在自然水体中, 上层水样中所含的 MC 易于进行光降解和好氧生物降



解，而在富营养化水体中，发生水华的水体透明度通常很低，水体下层及沉积物中的 MC 不易进行光降解，溶氧也低，从而在水体底层和底泥中往往形成厌氧或兼性厌氧环境，在这种条件下的微生物由于特殊的生态位而对 MC 可能有更高的降解能力。因此对底泥中微生物菌群进行厌氧筛选，并研究 MC 在厌氧或兼性厌氧条件下降解，具有显著的生态学意义。



第四章 MC 在湖泊底泥中的厌氧生物降解及厌氧降解菌的 筛选分离和鉴定

在富营养化水体中, MC 的生物降解是水环境中主要降解途径之一。第三章富集混合降解实验发现底泥微生物菌群比表层水体中微生物菌群对 MC 有更强的降解能力, 此结果与闫海^[127]所报道的结果一致。这是由于当细胞破裂后才导致 MC 的大量释放, 而水华蓝藻细胞可能往往在死亡沉入底部后才破裂, 这样导致湖泊底部局部 MC 浓度升高, 有利于驯化出高效降解 MC 的微生物菌种。另外, 底泥中微生物的数量比表层水体中的微生物数量多也可能是导致底泥中 MC 降解速度快的另一个因素。在自然水体中, 上层水样中所含的 MC 易于进行光降解和好氧生物降解, 而在富营养化水体中, 发生水华的水体透明度通常很低, 水体下层及沉积物中的 MC 不易进行光降解, 而且在水体底层和底泥中往往形成厌氧或兼性厌氧环境, 这种条件下厌氧降解就成为了 MC 降解的主要途径。然而目前对 MC 厌氧降解过程的了解十分有限, 因此对底泥中微生物菌群进行筛选, 并研究 MC 在厌氧或兼性厌氧条件下降解, 具有显著的生态学意义。本实验通过模拟生态环境, 分析比较中国 41 处不同湖泊底泥中的微生物在厌氧条件下对 MC 的降解能力, 分析底泥营养水平对 MC 厌氧降解的影响, 并从底泥中分离 MC 的高效厌氧降解菌。

1 材料和方法

1.1 实验仪器

高速离心机、恒温摇床、恒温培养箱、厌氧箱、磁力搅拌器、超低温冰箱、BENCKMAN 高效液相色谱 (HPLC, C₈ 柱, 4.5×150mm, 168 检测器)、ODS (C₁₈ 柱)、COD 仪、BOD 仪

1.2 底泥的采集和处理

本实验所使用底泥的采集地点、时间和采集水体的状况见表 6, 底泥采集



后用塑料袋密封放置于 4℃冰箱内保存。

表 6 不同底泥的采集地点、时间和采集水体的状况

Tab6 Background information on samples

序号	采样地点	采集时间	采样时水体状况
D1	东湖关桥水生所养鱼池 1	2004. 9. 4	微囊藻为主
D2	东湖关桥水生所养鱼池 2	2004. 9. 4	微囊藻和浮萍共生
D3	东湖八一游泳池旁一水池	2004. 9. 4	微囊藻生长不良
D4	落雁岛一鱼池	2004. 9. 4	一个月之前曾爆发水华
D5	解放公园一水池	2004. 9. 11	往年常爆发水华, 现湖面长满浮萍
D6	无锡五里湖	2004. 9. 19	水体富营养化, 但不常爆发水华
D7	无锡梅梁弯	2004. 9. 19	易发生水华
D8	武汉汉阳月牙湖	2004. 9. 22	爆发水华, 多种藻混合共生
D9	关桥多年富营养化水池	2003. 9	常年有微囊藻水华发生
D10	滇池 3 号	2004. 10	常年爆发水华
D11	滇池 15 号	2004. 10	常年爆发水华

1.3 MC 的粗提与分析

实验使用的是本实验室粗提的 MC (详见上章)。

1.4 底泥厌氧生物降解的生态模拟实验

分别称取 1g 底泥, 加 2mL 无菌水, 混均后加粗提 MC 开始降解实验, 并取上清液 0.2mL 作为 0d, 其后在第 3d、6d、10d 分别取 0.4mL 离心后取上清 0.2mL, 上清液均保存在 4℃冰箱待 HPLC 检测。

1.5 湖泊底泥干重测定

分别称取 1g 底泥, 放入烘箱中烘 48h, 称量其干重。

1.6 模拟实验中降解液中初始 TN、TP 和 COD 的测定

总氮 (TN) 和总磷 (TP) 的测定方法分别为过硫酸钾氧化紫外分光光度法、过硫酸钾消解-钼锑抗分光光度法, 参照《水和废水监测分析方法》(第四版) [126]。



使用 HANAAC9800 COD 仪检测不同湖泊底泥中的 COD 值。

1.7 底泥高效降解 MC 的厌氧降解混合菌群的分离

分别称取 1g 底泥于锥形瓶中，加入 10mL 无菌水，并用玻璃珠将其打碎成悬浊液；从上述悬浊液中取 1mL 上清液于青霉素瓶中，加入 2mL 牛肉膏培养液，然后冲氮气 5min (N_2 流量为 15L/min) 除溶液中的氧气 ($O_2 < 0.1\text{mg/L}$ 通过溶氧仪检测溶解氧)，盖上橡胶塞，并用封口膜将瓶口密封，放置于 120r/min 的摇床上 28℃ 恒温培养 48h。然后再将扩增的厌氧菌，加入到含 MC 的降解液 (NB 培养基) 中，进行降解实验，并取上清液 0.2mL 作为 0d，其后分别在第 2d、4d、7d 取 0.2mL 离心后保存上清 0.1mL，样品均保存在 4℃ 冰箱中待 HPLC 检测 MC 浓度变化。

1.8 MC 厌氧降解菌的分离

将具有高效降解能力的降解组进行稀释倒平板，并在 30℃ 厌氧培养箱中培养 24—36h。通过多次划线分离，使菌落性状充分表现，并根据各菌落外观形态特征和在显微镜下染色观察的细胞形态，初步挑选菌株，确定不同细菌的特征。经划线纯化长出的单菌落待降解实验使用。

1.9 MC 厌氧降解菌降解能力的分析

将分离的单克隆菌株进行厌氧降解实验，实验设有单克隆、组合样、原混合样三个降解组。同样条件下培养 24h 后等量加入含 MC 的降解液中，进行降解实验，并取上清液 0.2mL 作为 0d，其后分别在第 2d、4d、7d 取 0.2ml 离心后保存上清 0.1mL，样品均保存在 4℃ 冰箱中待 HPLC 检测 MC 浓度变化。整个实验在厌氧条件下进行，通过稀释倒平板法计算细菌浓度，HPLC 检测 MC 的浓度变化。

1.10 厌氧高效降解菌 7-1 菌株的鉴定

送于华中农业大学动物医学院兽医微生物研究中心鉴定。

2 结果与讨论

2.1 底泥厌氧生物降解 MC 的生态模拟实验

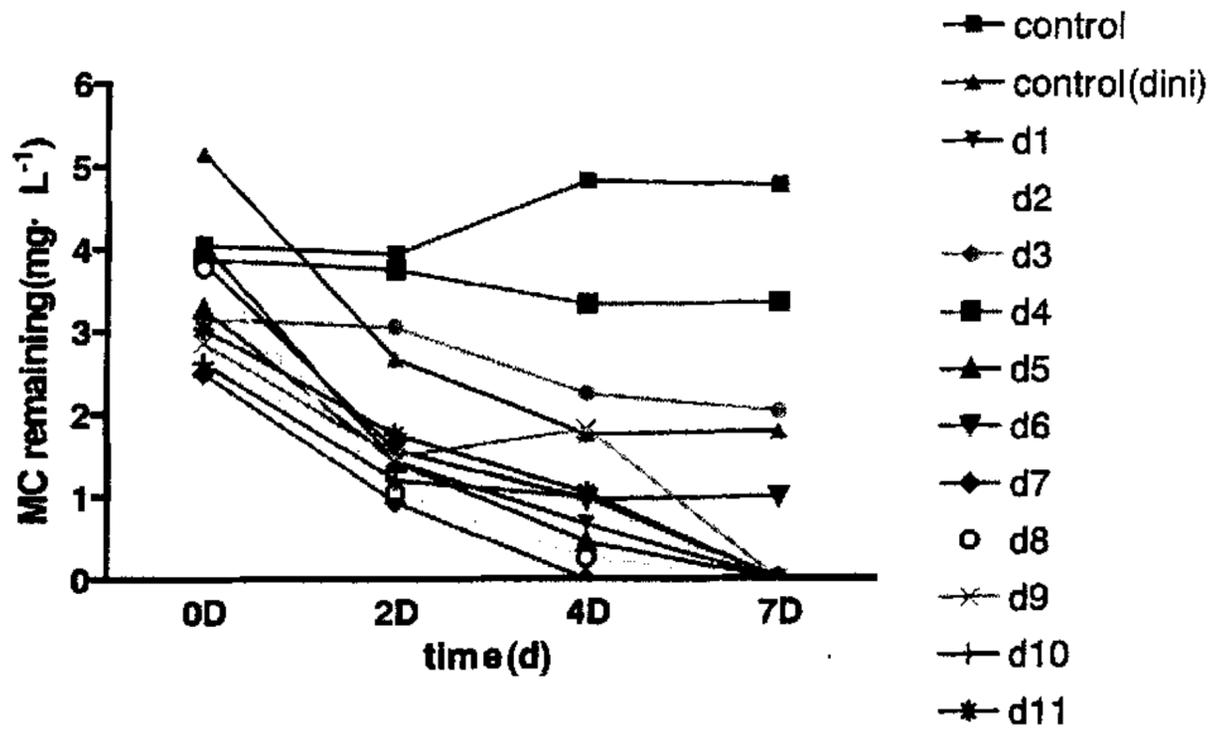
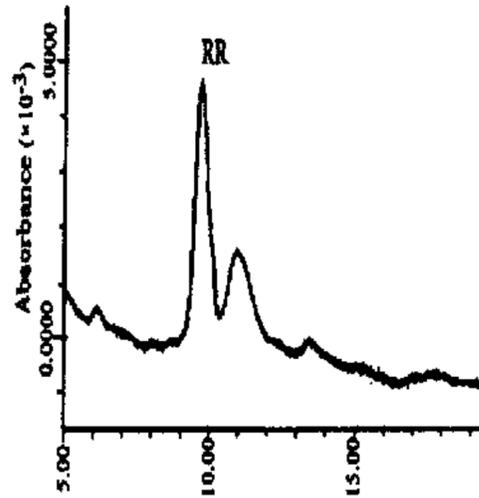


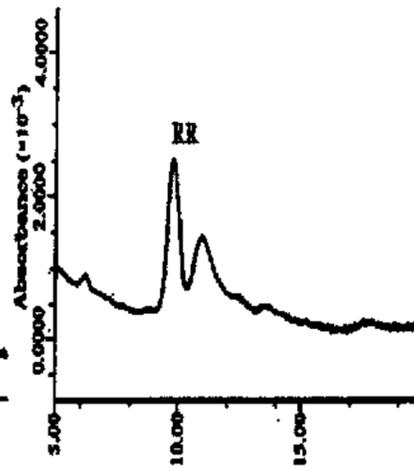
图 14 不同底泥对 MC 厌氧生物降解比较

Fig.14 Comparison of MC biodegradation at anoxic condition in different sediments

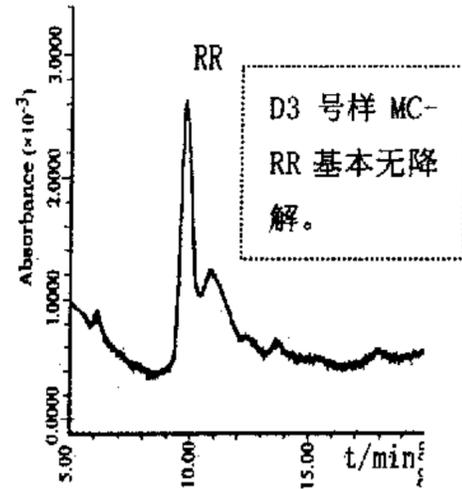
降解结果如图 14 显示, 多数底泥中生物对 MC 有较强的降解能力, 特别是 D1、D2、D5、D7、D8、D9、D10、D11 底泥培养物中, 一周内 MC 可以完全消失。经 HPLC 检测, 实验中初始 MC 浓度有差异, 其原因可能是由于不同底泥中也含有一定量的 MC, 底泥中 MC 的释放以及底泥对 MC 的吸附时间和能力的不同, 导致了 MC 的初始量在检测中存在差异。本实验设有含经灭菌底泥的对照, 结果表明底泥吸附是有一定的限度, 可见 MC 的减少是有两方面的原因, 底泥的吸附和生物降解; 同时 HPLC 检测也发现有降解产物出现, 进一步说明生物降解作用。通过 HPLC 色谱图也发现, 不同底泥的生物降解途径和降解产物也存在不同。如 D1、D5、D7, 降解过程中有降解产物出现, 且降解产物随 MC 的减少而增多; 而 D2、D6、D8、D10、D11, 降解过程中也有降解产物, 但其降解产物随 MC 的减少而减少, 各自减少速率也有差别; 有的样品则对 MC 的降解很彻底, 降解过程中未检测到产物的出现, 如 D9。具体降解过程不同, 可见如下液相图示 (图中已示 MC-RR, 黑色箭头所指为可能的产物峰)。



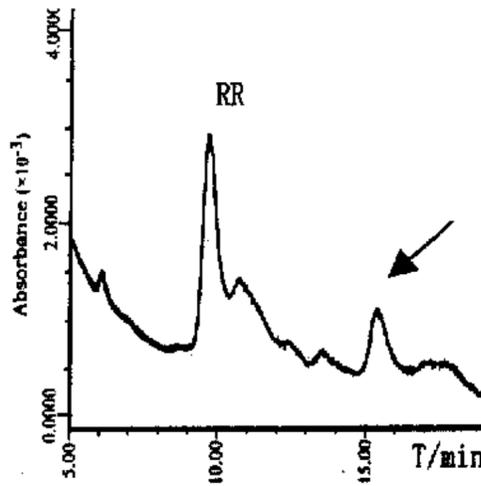
对照 (0d)



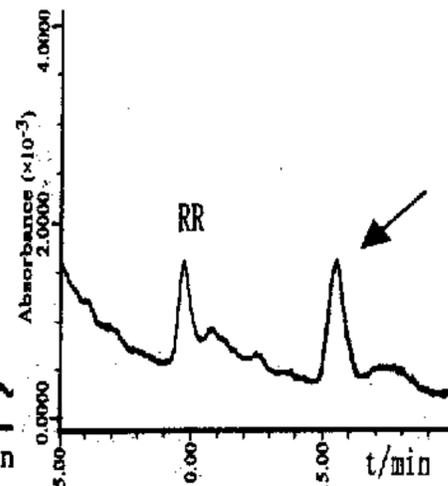
对照 (7d) 有吸附



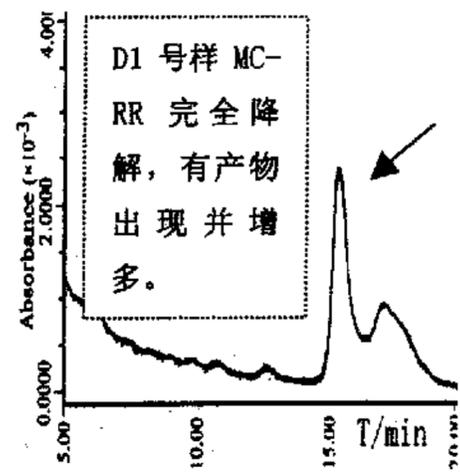
D3 (7d)



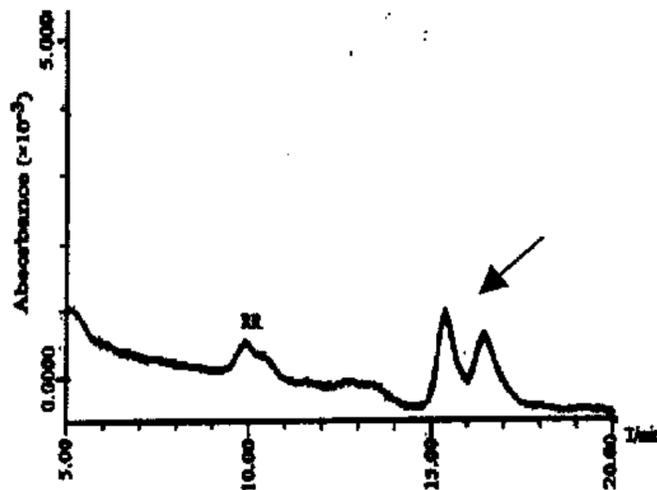
D1 (2d)



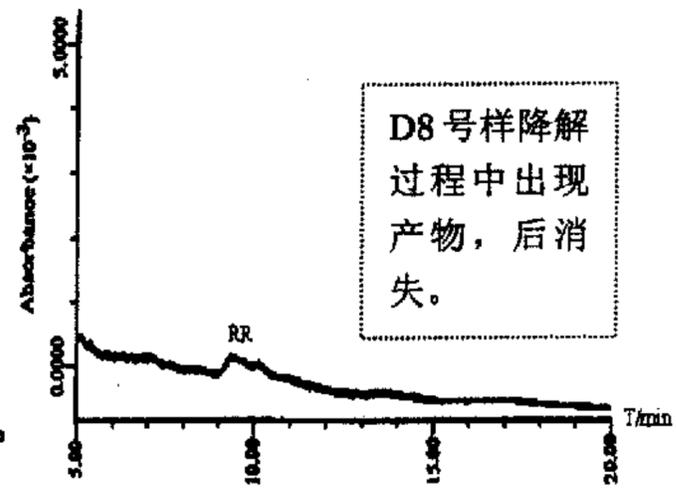
D1 (4d)



D1 (7d)



D8 (4d)



D8 (7d)

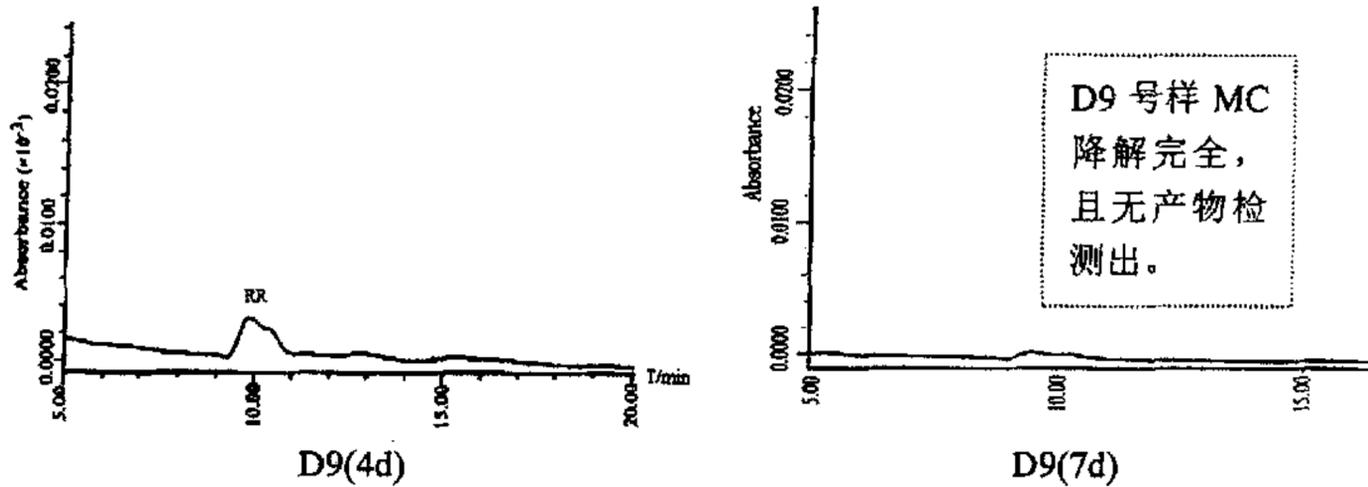


图 15 底泥生物降解 MC 的 HPLC 图谱

Fig. 15 HPLC chromatograms of MC biodegradation by different sediments

2. 2 底泥干重的测定

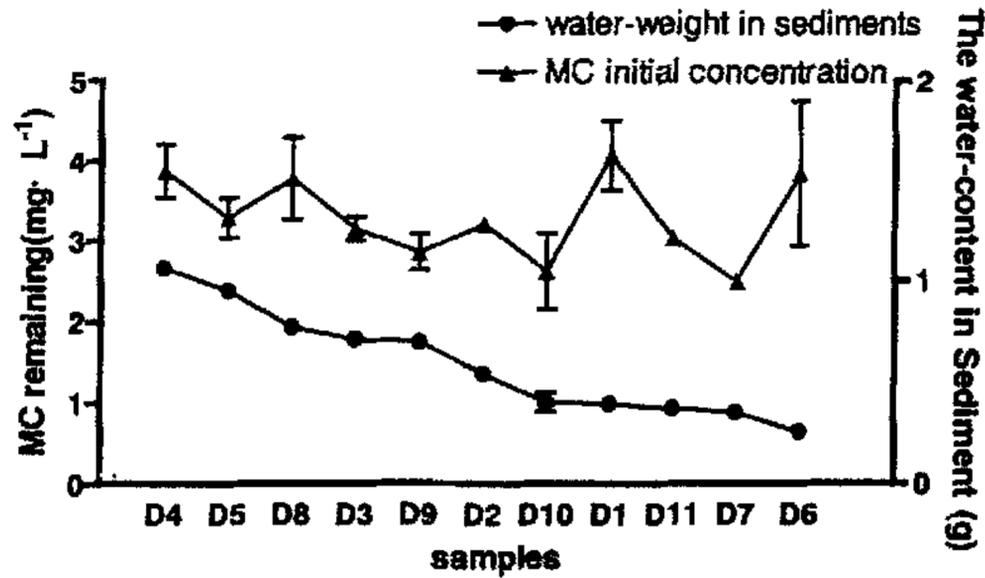


图 16 不同底泥含水量各样品初始 MC 浓度关系比较

Fig. 16 Comparison of MC initial concentrations and water-content in different sediments

通过测定不同湖泊底泥的干重发现，不同底泥样品的含水量有较大差异（如图 16）。但从图 16 可以看出，初始 MC 的差异同底泥的干重无正相关性，可见 MC 变化同底泥中干重无直接关系，在整个降解实验中存在底泥的吸附作用，而底泥的吸附能力还与底泥颗粒大小等多种因素有关。导致初始 MC 浓度的差异，其原因很多：由于不同底泥中也含有一定量的 MC，底泥中 MC 的释放以及底泥对 MC 的吸附时间和能力的不同，导致了 MC 的初始量在检测中存在差异。



2.3 模拟实验中降解液中初始 TN、TP 测定

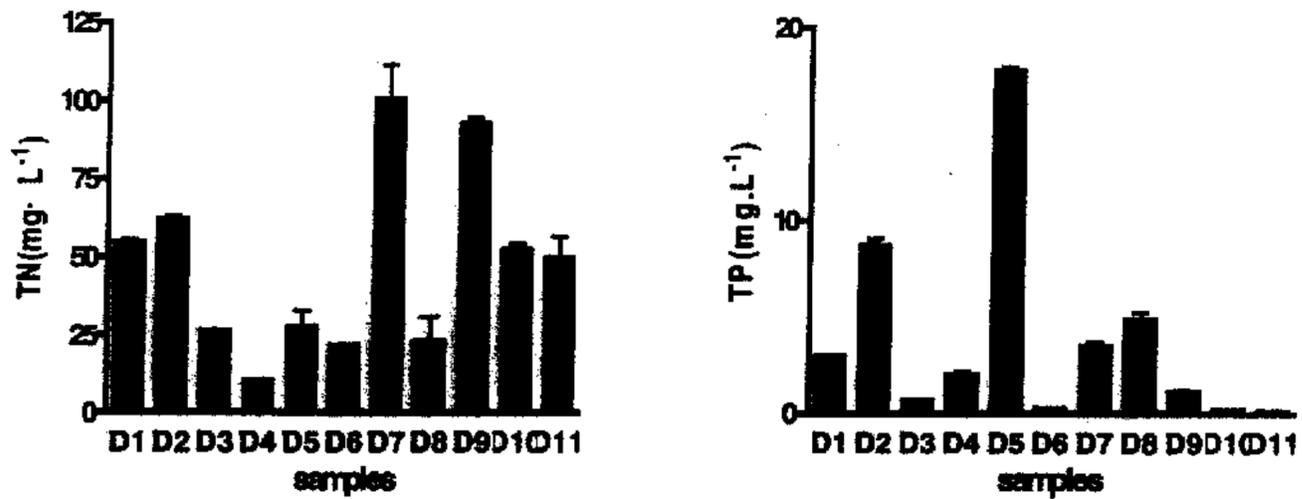


图 17 模拟实验中降解液中初始 TN、TP 含量

Fig. 17 Comparison of the initial content of TN and TP in different degradation solutions

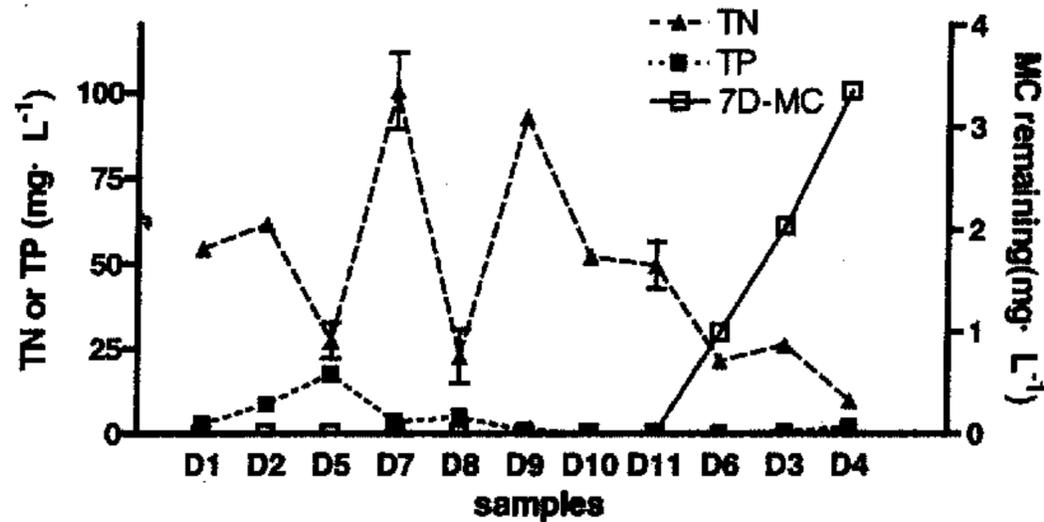


图 18 N、P 与 MC 残留量的关系

Fig. 18 The relationship between MC remaining and TN, TP in different degradation solutions

结果表明：不同的底泥样品的可溶性 TN、TP 有较大差别，TN、TP 水平和 MC 降解成正相关。



2.4 模拟实验中降解液中初始 COD 测定

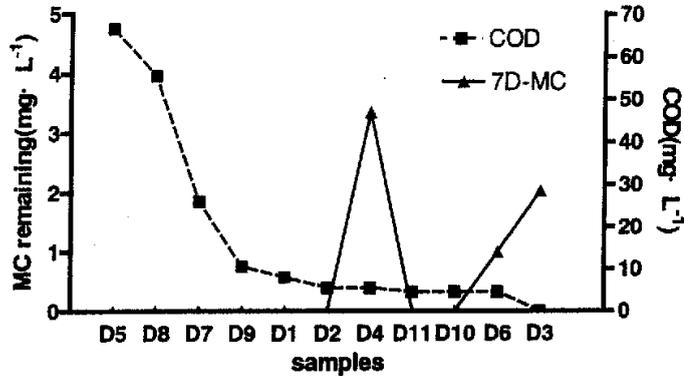


图 19 模拟实验中降解液中 COD 值与 MC 残留量的关系

Fig.19 The relationship between MC remaining and COD in different degradation solutions

从图 19 结果可见，模拟实验中降解液中 COD 值有较大差别。D5、D8 号样品 COD 值较高，显示碳源较为丰富，其 MC 降解能力较强，推测原因是此类样品本身更利于底泥中生物生长从而利于 MC 吸附转化；而对有那些 COD 值极低的样品如 D6、D3，其降解能力很差，其中厌氧菌根本无法生长或者无法正常生长，更不利于 MC 的降解；D4 号样 COD 值较低，降解能力低，综合分析，该样含水量极高，N、P 源也很低，推测可能其中的厌氧菌存在很少，在该实验条件下未显示降解能力。

2.5 底泥高效降解 MC 的厌氧降解混合菌群的分离

提高 MC 初始浓度至 $20.7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，使用 10 处底泥的菌悬液，进行降解实验。实验中，由于直接使用的底泥中的菌悬液，细菌数太少，而 MC 初始浓度又提高，所以降解效果颇差。而一个月后检测结果也不理想，基本无降解。

把有降解能力的 10 处底泥分别经厌氧扩增培养，分别取其混合菌做 MC 的降解实验，在 0d、3d、7d、14d、20d 取样，通过 HPLC 检测 MC（如图 20）。

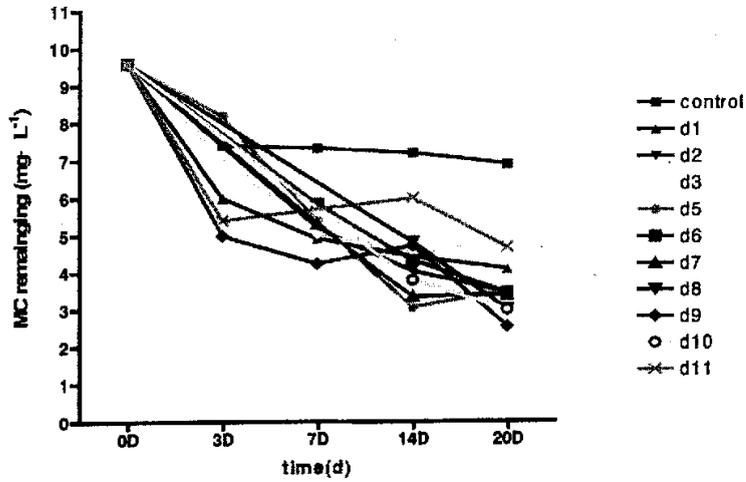


图 20 混合菌的降解情况

Fig.20 Degradation diagram of MC by mixed anaerobe strains

结果表明：从 D2、D5、D6、D7、D8、D9、D10 分离的混合菌群对 MC 均有较强的降解效率，在 20 天内可以降解 MC 70%左右。

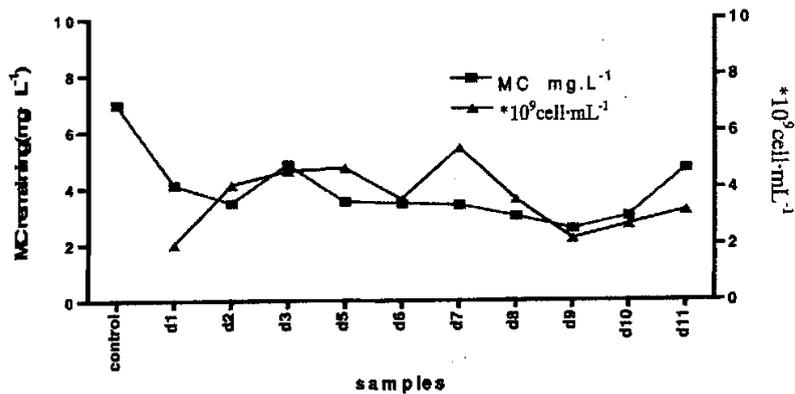


图 21 20d 混合菌细菌计数和 MC 残留量的关系

Fig 21 The number of bacteria and amount of residue of MC by mixed anaerobe strains in twenty days



对第二十天菌体浓度计数与其 MC 浓度变化比较, 由图 21 可以看出: 10 种不同混合菌的细菌数量基本上都在一个数量级 10^9 , 因此细菌数量对于 MC 的降解影响应该不大, 综合多次实验和各参数比较, 发现 D2、D7、D9、D10 号样具有较强的降解能力。

2.6 具有强降解能力的厌氧降解组 D7 号样单克隆分离

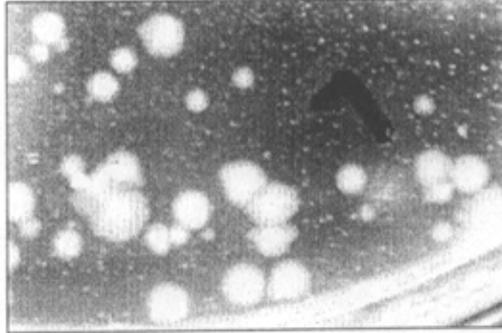


图 22 D7 混合平板菌落形态

Fig.22 The character of D7 mixed anaerobe strains

图 22 为 D7 号样品的混合倒平板的优势菌菌落形态, 通过平板划线法分离出两株菌, 命名为: D7-1、D7-2, 其单克隆菌落形态和细胞形态特征如表 7、图 23、24。

表 7 D7-1 和 D7-2 菌落及细胞的形态特征

Tab.7 The morphological character of D7-1 and D7-2 degradation bacteria

菌株号	D7-1	D7-2
菌落描述	小, 球形, 白色菌落, 不透明, 光滑, 较干燥, 边缘整齐	较大, 荷包蛋状, 淡黄色菌落, 微隆起, 不透明, 较湿润, 边缘不整齐且呈微辐射状
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻
细胞形态	球状或短杆状	球状
细胞排列	对生或单生	单生
降解能力	4d 内可降解 45.7%	4d 内可降解 10.3%

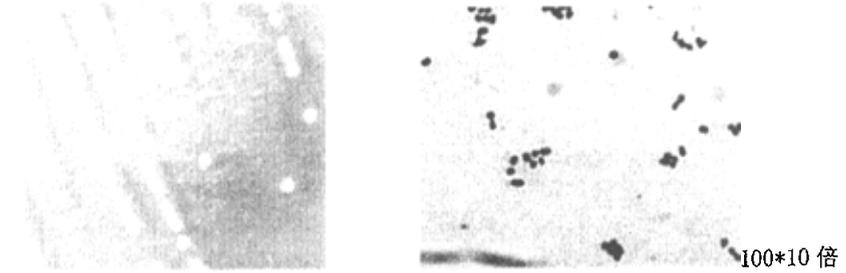


图 23 划线分离 D7-1 菌株菌落形态和细胞形态
Fig.23 The morphological character of D7-1 strain

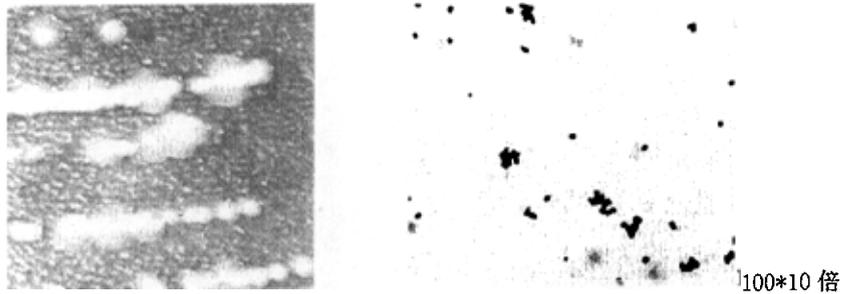


图 24 划线分离 D7-2 菌株菌落形态和细胞形态
Fig.24 The morphological character of D7-2 isolated strains

2.7 厌氧条件下 D7-1 和 D7-2 菌对 MC 降解能力的分析

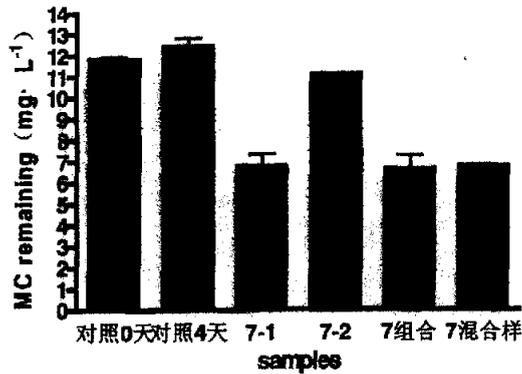


图 25 七号样品降解四天后的结果

Fig.25 Degradation diagram of MC by D7 isolated strains in four days



由图 25 结果显示：D7-1 号菌具有较强的降解 MC 能力，四天内可降解 45.7%；D7-2 号菌降解能力较弱，仅可降解 10.3%；而原 D7 号混合菌群和 D7-1 和 D7-2 组合菌群的降解能力与 D7-1 号菌能力差异不显著，可见 D7-1 号菌是底泥中降解 MC 的主要菌株。

2.8 D7-1 菌鉴定

培养指标：革兰氏阴性，兼性厌氧，麦康凯琼脂支持生长。

生化指标：

氧化酶	-	葡萄糖产酸	+
触酶	+	葡萄糖产气	-
H ₂ S 产生 (TSI)	-	乳糖	-
MR	+	蔗糖	-
V-P	-	麦芽糖	-
碓基质	-	甘露糖	-
胶原酶 (穿刺)	+		

注：“+”代表阳性结果；“-”代表阴性结果

通过以上指标分析，参考《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和《常见细菌系统鉴定手册》，初步鉴定菌株属于肠杆菌科，变形菌属 *Proteus sp.* (*Enterobacteriaceae*)。

3. 讨论

在富营养化水体中，MC 的生物降解是水环境中主要降解途径之一。本研究中富集混合降解实验发现底泥微生物菌群比表层水体中微生物菌群对 MC 有更强的降解能力，此结果与闫海^[127]所报道的结果一致。在自然水体中，上层水样中所含的 MC 易于进行光降解和好氧生物降解，而在富营养化水体中，发生水华的水体透明度通常很低，水体下层及沉积物中的 MC 不易进行光降解，而且在水体底层和底泥中往往形成厌氧或兼性厌氧环境，这种条件下厌氧降解就成为了 MC 降解的主要途径。本研究的模拟实验结果表明，底泥对 MC 有较高的吸附，但通过比较可见生物降解在 MC 的降解过程中起主要作用。



研究中国 11 处不同湖泊底泥中的生物在厌氧条件下对 MC 的降解, 并分析其降解与底泥释放到水体中营养之间的关系。实验结果显示, 不同的底泥样品的可溶性 TN、TP 均有较大差别, 底泥释放到水中营养与 MC 减少成正相关性。模拟实验中降解液中 COD 值有较大差别。D5、D8 号样品 COD 值较高, 显示碳源较为丰富, 其 MC 降解能力较强, 推测原因是此类样品本身更利于底泥中生物生长从而利于 MC 吸附转化; 而对有那些 COD 值极低的样品如 D6、D3, 其降解能力很差, 其中厌氧菌根本无法生长或者无法正常生长, 更不利于 MC 的降解。总之, 底泥中营养成分的不同直接影响微生物的生长, MC 的降解主要还是与厌氧降解菌有直接关系, 菌的生长及其种类、数量的不同都影响 MC 的降解转化。

在厌氧降解实验中发现, 不同微生物菌群存在不同的降解途径。通过 HPLC 色谱图也发现, 不同底泥的生物降解途径和降解产物也存在不同, 如 D1、D5、D7, 降解过程中有降解产物出现, 且降解产物随 MC 的减少而增多; 而 D2、D6、D8、D10、D11, 降解过程中也有降解产物且产物结构不同, 但其降解产物随 MC 的减少而减少, 各自减少速率也有差别; 有的样品则对 MC 的降解很彻底, 降解过程中未检测到产物的出现, 如 D9, 其降解途径有待进一步研究探讨。通过厌氧菌筛选实验, 我们首次分离到一株具有较强降解能力的厌氧降解菌 D7-1 菌, 经鉴定为兼性厌氧菌, 为肠杆菌科, 变形菌属 *Proteus sp.* (*Enterobacteriaceae*), 它不同于现已从水体或底泥中分离的好氧菌株铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*^[44])、鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*^[93, 95, 96]) 和青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*^[52]), 有待深入研究。高效 MC 厌氧降解菌在去除水体 MC 方面具有一定的应用价值。同时了解水体底层和底泥的厌氧环境中 MC 降解菌存在情况和降解途径, 对进一步阐明 MC 在水环境中的归趋有显著的理论意义。



参 考 文 献

1. Francis G, 1878. Poisonous Australian Lake. *Nature*, 18:11-12
2. Uwno Y, Nagata S, et al, 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxins, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17:1317-1321.
3. Pouria S, de Andrade A, et al. 1988. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 352:21-26.
4. Carmichael WW, 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol.* 72:445-459
5. Lahti K, Rapala J, Fardig M, et al. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, Microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water[J]. *Wat.Res.*, 1997, 5: 1005-1012.
6. Tsuji K, Masui H, Uemura H, et al. An analysis of microcystins in sediments using MMPB method[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 687-692.
7. 周伦, 鱼达, 余海, 等. 饮用水、微囊藻毒素和大肠癌的相关性[J]. *中华预防医学杂志*, 2000, 34(4): 224-226.
8. 张维昊, 徐晓清, 丘昌强. 水环境中微囊藻毒素研究进展[J]. *环境科学研究*, 2001, 14(2): 57-61.
9. 韩志国, 武宝旰, 郑解生, 等. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展[J]. *暨南大学学报*, 2001, 22(3): 129-135.
10. Park H, Namikoshi M, Brittain S M, et al. [d-Leu¹] microcystin-LR, a new microcystin isolated from water bloom in a Canadian prairie lake[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 855-862.
11. 刘永定, 范晓, 胡征宇, 等. 中国藻类学研究[M], 武汉: 武汉出版社, 2001.10.
12. Sano T, Kaya K. Two new (E)-2-amino-2-butenoic acid (Dhb)-containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*[J]. *Tetrahedron*, 1998, 54:



- 463-470.
13. 徐立红, 张甬云. 微囊藻毒素分子致毒机理研究近况[J]. 水生生物学报, 1993,17(4):365-374.
 14. de Maagd P G, Hendriks A J, Seinen W, *et al.* pH-dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystinLR[J]. *Wat.Res.*, 1999,33(5): 677-680.
 15. Carmichael, W.W. 1994. The toxin of cyanobacteria. *Scientific American*. 274(1): 78-86
 16. Hunter PR, 1995. Cyanobacterial toxins and their potential risk to drinking water supplies. *Microbiology Europe*,3: 8-10
 17. Falconer IR, Jackson ARB, *et al.*,1981.Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust J Biol Sci*, 34:179-187
 18. Runnegar MT, Falciner IR, *et al.*,1981.Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Arch Pharmacol*. 371:268-272
 19. Lovell RA, Schaeffer, *et al.*,1989.Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of mice. *J Environ Pathol Toxic Incol*, 9(3): 221-237
 20. Mackintosh C, Beattie KA, *et al.*,1990.Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264:187-192
 21. Rao PV, Bhattacharya R, 1996. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*, 114(1): 29-36
 22. Ding WX, Shen HM, *et al.*, 1998. Studies on oxidative damage induced by cyanobacterial extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ Res*, 78(1): 12-18
 23. Baganz D, Staaks, *et al.*1998.Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-LR on behaviour of Zebrafish, *Danio rerio*. *Water Res*, 32(3): 948-952
 24. DeMott WR, S Dhawale.1995.Inhibition of in vitro protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria.



- Arch Hydrobiol, 134:417-424
25. Rohrlack T, Dittmann E, et al.1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl Environ Microbiol, 65(2): 737-739
 26. Matveev V, L Oberer, et al.1994.Study of the ability of *Daphnia carinata* King to control phytoplankton and resist cyanobacterial toxicity: implication for biomanipulation in Australia. Aust J Mar Freshwater Res, 45:889-904
 27. McElhiney J, Lawton LA, et al.2001.Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. Toxicon, 39:1411-1420
 28. Kurki-Helasma K, Meriluoto J, 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. Toxicon, 36(12): 1921-1926
 29. Abe T, Lawson T, et al. 1996. MC-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves implications for current spray irrigation practice. New phytol. 133:651-658
 30. Himberg, K., et al. 1989. The effect of water treatment progresses on the removed of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cynobacteria: A laboratory study. Water Res. 23:979
 31. Jones GJ, Bourne DG, et al. 1994. *Degradation* of the cyanobacterial hepatotoxin *microcystin* by aquatic *bacteria*. Nat Toxins, 2 (4): 228-235
 32. Resson, R, et al.1994.health effects of toxic cyanobacteria of Australia. National health and Medical Res Council.74
 33. WHO, 1997.Report of the Working Group on chemical Substances in Dringking Water, Geneva, 22-26,1997.Section 5.2, Microcystin-LR. World Health Organization. Geneva
- D P, Kruger H, Viljoen C C. Isolation and characterization of 4 toxins
 green alga, *Microcystis aeruginosa*[J]. Toxicon, 1982,20(6):945—



35. A.J.vanderWesthuizen, J.N.Eloff, Toxin extraction from the blue-green alga *microcystis aeruginosa* by different extraction media. *J. Limnol.Soc.s.Aft* 1982,8(2): 76~83.
36. H.W.Siegelman, W.H.Adams, R.D.Stoner, D.N.Slatkin, in: E.P.Ragelis(ED.), *SeafoodToxins*, American Chemical Society, Wash-ington,1984,p.407.
37. K.-I.Harada, M.Suzuki, A.M.Dahlem, V.R.Beasley, W.W.Carmichael, K.I.Rinehart, Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon* 1988,26(5):433~442.
38. P.G.-J.deMaagd, A.J.Hendriks, et al. pH-Dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *WaterRes.*1999,33(3):677~680.
39. J.Fastner, I.Flieger, et al. Optimised extraction of microcystins from field samples a comparison of different solvents and procedures. *WaterRes.* 1998, 32(10): 3177~3181.
40. C.J.Ward, K.A.Beattie, E.Y.C.Lee, G.A.Codd, et al. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis of microcystins. *FEMS. Microbiol.Lett.* 1997,153(2):465~473.
41. T.sano.Tomoharu, Kaya, Kunikitsu et al. Two New (E)-2-Amino-2-Butenoic Acid (Dhb)-Containing Microcystins Isolated from *Oscillatoria agardhii*, *Tetrahedron.* 1998, 54(3-4):463~470.
42. T.Ooi, T. Kusumi, H. Kakisawa, M.M. Watanabe, *J. Appl. Phycol.* 1(1989)31
43. C. Martin, K. Sivonen, U. Matern, R. Dierstein, J. Weckesser, *FEMS Microbiol. Lett.* 68(1990) 1.
44. M.Namikoshi, K.L.Rinehart, R.Sakai, R. Stotts, A.M.Dahlen, V.R.Beasley, W.W.Carmichael, W.R.Evans, Identification of 12 hepatotoxins from a homerlake bloom of the cyanobacteria *microcystis aeruginosa*, *microcystis viridis* and *microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *J.Org.Chem.* 1992,57:866~872.
45. W.P.Brooks, G.A.Codd, Extraction and purification of toxic peptides from



- natural blooms and laboratory isolates of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1986,2(1):1~3.
46. J.S.Metcalf, G.A.Codd, et al. Microwaveoven and boiling water-bath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *FEMS Microb. Lett.* 2000,184(2):241~246.
 47. 苑宝玲, 曲久辉等. 高铁酸盐对藻类肝毒素的降解. *环境科学*, 2001,23(2):96~99.
 48. 林毅雄, 刘秀芬等. 滇池铜绿微囊藻毒素及其在水体中的变化. *环境污染治理技术与设备*, 2001,2(5):10~13.
 49. 许敏, 赵以军等. 水华和赤潮的毒素及其检测与分析. *湖泊科学*, 2001,13(4):376~384.
 50. 张维昊, 徐小清等. 固相萃取高效液相色谱法测定水中痕量微囊藻毒素. *分析化学研究报告*, 2001,29(5):522~525.
 51. 张维昊, 徐小清等. 滇池水华蓝藻中藻毒素光降解的研究. *中国环境科学*, 2001,21(1):1~3.
 52. Hanna Mazur, Marcin Plinsk. Stability of cyanotoxins, Mc-LR, Mc-RR and nodular in seawater and BG-11 medium of different salinity in Poland. *OCEANOLOGIA*, 2001,43(3):211~215.
 53. K.-I. Harada, K. Matsuura, H. Mureta, M. Suzuki et al. Isolation and structures of the minor component associated with microcystins LR and RR in the cyanobacteria. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* 1989,31:648~655.
 54. T.-H. Lee, Y.-M. Chen, et al. First report of microcystins in Taiwan. H.-N. Chou, *Toxicon* 1998, 36(2): 247~255.
 55. J. Cremer, K. Henning. Application of reversed-phase medium-pressure liquid chromatography to the isolation, separation and amino acid analysis of two closely related peptidotoxins of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain Pcc-7806. *J. Chromatogr.* 1991, 587(1): 71~80.
 56. J. Cremer, H. Meyer, K. Henning. Separation of methylated and non-methylated



- cyanoginosin-LR homologues of the cyanobacterium *microcystis aeruginosa* strain PCC-7806 by reversed-phase medium-pressure liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 1991,558(2):430~434.
57. M.Namikoshi, F.Sun, B.W.Choi, K.L.Rinehart, W.W.Carmichael, W.R.Evans, V.R.Beasley, seven more microcystins from homerlakecells: Application of the general method for structure assignment of peptides containing α , β -dehydroaminoacidu-nits. *J.Org.Chem.* 1995, 60(12): 3671~3679.
58. C.Edwards, L.A.Lawton, S.M.Coyle, P.Ross, Automated purification of microlystins. *J.Chromatogr.A* 1996, 734(2):175~182.
59. M.Namikoshi, K.Sivonen, W.R.Evans, F.Sun, W.W.Carmichael, K.L.Rinehart, Isolation and structure assignment of microcystins from acyanobacterial waterbloom (Finland). *Toxicon.* 1992, 30(11):1473~1482.
60. K.Sivonen, M.Namikoshi, W.R.Evans, W.W.Carmichael, K.L.Rinehart, structures of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophony lalanine variant from *anabaena* sp. strain bb. *Chem.Res.Toxicol.* 1992,5(5):661~667.
61. M.Craig, T.L.McCready, H.A.Luu, M.A.Smillie, P.Dubord, C.F.B.Holmes, Identification and characterization of hydrophobic microcystins in Canadian freshwater cyanobacteria. *Toxicon* 1993, 31(12): 1541~1549.
62. C.Martin, K.sivonen, J. Weckesser, et al, Rapid purification of the peptide toxins microcystin-LR and nodularin. *in vitro* 1990,4(1):17~22.
63. K.Sivonen, W.W.Carmichael, M.Namikoshi, K.L.Rinehart, A.M.Dahlem, S.I.Niemela, Isolation and characterization of hepato-toxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *nostoc* sp. strain 152. *Appl.Environ.Microbiol.* 1990,56(9):2650~2657.
64. Kiviranta J, Sivonen K, et al. 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6:423-436
65. Hiripi L, Nagy L, et al. 1998. Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. *Neurotoxicology*, 19(4-5): 605-608.



66. Lawton LA, Campbell DL, et al. 1990. Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. *Lett Appl Microbiol.* 11(4): 205-7
67. Miyoshi I, Nancy P, et al. 1999. Interference by plastics additives in the HPLC determination of microcystin-LR and -YR. *Toxicol.* 37: 923-929
68. P Hyenstrand, JS Metcalf, et al. 2001. Losses of the cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations. *Toxicol.* 39: 589-594
69. Chu FS, Huang X, Wei RD, 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J Assoc Off Anal Chem*, 73:451-456
70. McElhiney J, Lawton LA, Proter AJ, 2000. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naïve human phage display library. *FEMS Microbiol Lett*, 193(1): 83-88
71. Nagatas, Soutome H, et al, 1995. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Nat Toxins*, 3(2): 78-86
72. An JS, Carmichael WW, 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32:1495-1507
73. Tsuji K, Masui H, et al, 2001. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicology*, 39(5): 687-692
74. Mehto P, Ankelo M, et al, 2001. A time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. *Toxicon*, 39(6):831-836
75. Bouaicha N, Rivasseau C, et al, 1996. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in cell extracts by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 685(1): 53-57
76. Bateman KP, Thibault P, et al, 1995. Mass Spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line Chromatography and electrophoretic



- separations. *J Chromatogr A*, 712(1):253-268
77. 潘卉,宋立荣等.2001.水华蓝藻产毒特性的 PCR 检测法.水生生物学报.25(2):159-166
78. 张维吴, 宋立荣, 徐小清等. 2004. 天然水体中微囊藻毒素归宿的初步研究. 长江流域资源与环境.13(1):84-88
79. Harada K .MFWatanabe, KHarada, wWCarmichael, etal. 1996.Chemistry and detection of microcystins. *Toxic Microcystins[C]*:103-148
80. Moms R, Wilhams D. et al. The adsorption of microcystins-LR by natural clay particles[J]. *Toxicon*. 2000.38:303-308
81. Rivasseau C, Martins S, et al. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. [J]. *J.Chromat*. 1998.799:155-169
82. Shephard G S, Stockenstrom S, Villiers D, et al. Photocatalytic degradation of cyanobacterial microcystin toxins in water [J]. *Toxicon*, 1998, 36(12):1895-1901.
83. Shephard G S, Stockenstrom S, de Villiers D, et al. Degradation of microcystin toxins in a falling film photocatalytic reactor with immobilized titanium dioxide catalyst[J]. *Wat. Res.*, 2002, 36: 140-146.
84. Tsuji K, Watanuki T, et al. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of UV light on decomposition and isomerization [J]. *Toxicon*, 1995,33:1619-1631
85. Welker M, Steinberg C. Indirect photolysis of cyanotoxins one possible mechanism for their low persistence. [J]. *Wat.Res*,1999,33(5):1159-1164
86. Magalhães V, Soares R, etal. Microcystin contamination in Ash from the Jacarepagua Lagoon(Rio de Janeiro, Brazil), ecological implication and human health risk. [J]. *Toxicon*, 2001,39:1077-1085
87. Amorim, Vasconcelos V. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. [J]. *Toxicon*.1999,37:1041-1052



88. Lam AKY, Fedorak P M, Prepas E E. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29(1): 242-246.
89. Cousins I T, Bealing D J, Janmes H A, *et al.* Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations [J]. *Wat. Res.*, 1996, 30(2): 481-485.
90. Rapala J, Lahti K, Sivonen K, *et al.* Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a [J]. *Letters in Applied Microbiol.*, 1994, 19: 423-428.
91. Jones G J, Orr P T. Release and degradation of microcystin following algaecide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay [J]. *Wat. Res.*, 1994, 28(4): 871-876.
92. Shigeyuki T, Mariyo F W. MicrocystinLR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease [J]. *Chemosphere*, 1997, 34(4): 749-757.
93. 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.
94. 阎海, 潘纲, 张明明. 微囊藻毒素研究进展 [J]. *生态学报*, 2002, 22 (11): 1968-1975.
95. Jones G J, Bourne D G, Blakeley R L, *et al.* Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria [J]. *Natural Toxins*, 1994, 2(4): 228-235.
96. Saito T, Itayama T, Kawauchi Y, *et al.* Biodegradation of microcystin by aquatic bacteria [C]. 《湖泊有毒藻类控制与生态修复》国际学术讨论会——论文摘要集 (下册), 无锡, 2003, 11: 455-460.
97. Bourne D G, Jones G J, Blakeley R L, *et al.* Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystinLR [J]. *Applied and Environ. Microbiology*, 1996, 62(11): 4086-4094.
98. Bourne D G, Riddles P, Jones G J, *et al.* Characterisation of a gene cluster



- involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystinLR[J]. *Environ.Toxicol.*, 2001,16: 523-534.
99. Mizuochi M, Saito T, Inamori R, et al. Strategies on control measures for toxic water bloom using bio-eco engineering[C], 《湖泊有毒藻类控制与生态修复》国际学术讨论会——论文摘要集(下册), 无锡, 2003, 11: 402-419.
100. 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.
101. 熬鸿毅, 沈银武, 丘昌强, 等. 滇池水华蓝藻干粉制剂的生物脱毒实验[J]. *长江流域资源与环境*, 2002,11(1):43-46.
102. Tencalla F, Dietrich D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Toxicon*, 1997, 35(4):583-595.
103. 何家苑, 何振荣, 郭琼林. 有毒铜绿微囊藻对鱼和蚤的毒性[J]. *湖泊科学*, 1997,9:49-56.
104. Freitas M V, Moraes S R, Azevedo SMFO. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagus' Lagoon(Riode Janeiro,Brazil): ecological implication and human health risk[J]. *Toxicon*, 2001,39(7):1077-1085.
105. 隋海霞, 严卫星, 徐海滨. 微囊藻毒素的毒性以及水生生物的富集作用[J]. *卫生研究*, 2002,31(3):214-216.
106. Datta S, Jana B B. Control of bloom in a tropical lake: grazing efficiency of some herbivorous fishes[J]. *J. Fish Biol*, 1998, 53(1):12-24.
107. 沈强, 刘永定, 何家苑. 白鲢和罗非鱼对微囊藻毒素 MC-LR 解毒机制的研究[C], 中国海洋湖沼学会藻类学分会第六届会员暨第十二次学术讨论会——论文摘要集, 苏州, 2003, 11:139.
108. Kondo F. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins[J]. *Chem.Res.Toxicol*, 1992,5(5): 591-596.
109. 张甬云, 徐立红, 周炳升, 等. 鱼体中谷胱甘肽对微囊藻毒素的解毒作用的初步研究[J]. *水生生物学报*, 1996,20(3):284-286.
110. Best J H, Pflugmacher S, Wiegand C, et al. Effects of enteric bacterial and



- cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish(*Danio rerio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 60: 223-231.
- 111.Casanova M T, Burch M D, Brock M A, *et al.* Does toxic *Microcystis aeruginosa* affect aquatic plant establishment[J]. *Environ Toxicol*, 1999,14: 97-109.
- 112.McElhiney J, Lawton L A, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure[J]. *Toxicol*, 2001, 39(9): 1411-1420.
- 113.Pflugmacher S, Codd G A, Steinberg CEW. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR of detoxication enzymes in aquatic plants[J]. *Environ Toxicol*. 1999,14:111-115.
- 114.Pflugmacher S , Wiegand C, Oberemm A, *et al.*. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication[J]. *Biochimica et Biophysica Acta* ,1998, 1425(3): 527-533.
- 115.Takenaka S. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases[J]. *Environ Toxicol*, 2001,9(4):135-139.
- 116.Beattie K A, Ressler J, Wiegand C, *et al.* Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2003,62(3):219-226.
- 117.欧丹云, 宋立荣, 甘南琴. 微囊藻毒素 MC-LR 对棕鞭藻 (*Ochromonas sp.*) 的毒理学初步分析[C], 中国海洋湖沼学会藻类学分会第六届会员暨第十二次学术讨论会——论文摘要集, 苏州,2003,11:154.
- 118.Richard A H. Mussels as biomonitors of lake water microcystin: a final report for the summer 2000 microcystin monitoring study[J]. *Center for freshwater biology*,2001,5:1-15.
- 119.Vasconcelos V M. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin



- microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Aquatic Toxicology*. 1995,32: 227-237.
120. Amorin A, Vasconcelos V, Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J], *Toxicon*, 1999,37(7): 1041-1052.
121. Williams D E, Dawe S C, Kent M L, *et al.* Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues[J]. *Toxicon*, 1997, 35(11): 1617-1625.
122. Duy T N, Lam P K S, Shaw G R. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial(Blue-green Algae) toxins in water[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2000,163:113-186
123. 张维昊,肖邦定,方涛.天然水华蓝藻中微囊藻毒素的提取和净化研究[J].*环境污染与防治*,2003,24(5):265-266
124. 闫海,潘纲,张明明,陈海柳.微囊藻毒素的提取和提纯研究[J].*环境科学学报*, 2004,24(2):356-357
125. Nina G, Hans U. The extraction and stability of microcystin RR in different solvents[J].*Phycologia*, 1996,35(6,suppl):80—82
126. 国家环保总局,水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法(第四版)[M].北京:中国环境科学出版社,2002:243-258.
127. 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



在读期间已发表和待发表的论文

1. 李祝 (1), 《微囊藻毒素的提取与纯化研究进展》, 华中师范大学研究生报 2004, 2:115-119
2. 李祝 (1), 《水环境中微囊藻毒素的生物降解》, 生态科学, 2005, 1:90-95
3. 李祝 (3), 《理化因子对莼齿眼子菜 (*Potamogeton pectinatus*) 种子萌发的影响》, 水生生物学报 (已接受)
4. 李祝 (5), 《微囊藻毒素在水体中行为和去除方法研究进展》, 华中师范大学学报, 2003, 12: 82-85
5. 李祝 (5), 《微囊藻毒素对水生动物毒性影响的研究进展》, 华中师范大学研究生报 2005, 1:135-139
6. 李祝 (1), 《好氧条件和厌氧条件下微囊藻毒素微生物降解研究》, (整理待发)



致 谢

本文是在导师杨劭教授的悉心指导下完成的，杨老师广博的学识、敏锐的科研洞察力、严谨的治学和谦虚的为人、辛勤忘我的工作态度和求真务实的科研精神令我敬佩不已！在此衷心感谢他三年来对我学业上和生活上无微不至的关怀与指导，谢谢他时常给我的鞭策和鼓励！

在学习和实验过程中赵以军教授，吴刚教授，杨继宏教授，李文新教授、程凯老师、刘实老师和赵进老师为我的研究工作提供诸多指导与帮助，在此表示我最为诚挚的谢意！

三年学习生活中感谢吴俊文书记、邵兰保老师在生活和学习上对我的关心和帮助；感谢三年来与我同甘共苦的学友杨娇艳、熊勤、杜秀丽、廖明军、张玮、刘欣然；感谢我的师兄卢蒙、刘红涛、席宇、张勇，师姐罗文清、张爱清、冯武、夏燕华、彭超对我的鼓励；感谢在学习和生活上给予我莫大帮助和支持的室友李京京、生秀梅、武芸、候爱华；感谢朱小燕、孙茜、朱迟、杨英利、冯玉文、吕伟英、俞融、周瑞、高健、刘治华、戴颖等师妹师弟们，他们让我在紧张的学习生活中体味到了实验室大家庭般的温暖和快乐；感谢我的同学张花香、陈静、吴涛、黄耿青、鲁志松等，无论在生活还是学习上他们均给我无私的帮助。感谢与我在研究生会共事的战友秦伟、刘丽君、李绪友、刘双喜等对我工作的支持，陪我度过了一段快乐而又难忘的时光。

我要特别要感谢我的家人，他们给予了我一切，不论成功还是失败，他们始终在默默的支持我、鼓励我，而且在我最困难的时候给了我莫大的理解和安慰，正是他们的期盼和支持让我保持了乐观的心态和勇往直前的决心。同时向参加本论文评阅、评议和答辩委员会的全体专家、教授致以最诚挚的谢意。

最后，再次对所有关心、帮助我成长的人致以最真挚的谢意！

李 祝

二〇〇五年五月于桂子山