



微囊藻毒素生物 降解研究

王华生 王俊峰 闫海 著

非外借



科学出版社

江西理工大学优秀博士学位论文文库

微囊藻毒素生物降解研究

王华生 王俊峰 闫海 著



科学出版社

北京

内 容 简 介

微囊藻毒素 (microcystins, MCs) 是一类能诱发肝脏肿瘤的单环七肽化合物, 其化学性质稳定, 常规水处理技术难以有效去除, 而微生物法是去除 MCs 最安全和有效的方法。国内外在微生物降解 MCs 方面做了大量研究, 但在微生物降解 MCs 的途径及其分子机理方面少有深入报道。本书以 1 株能高效降解 MCs 的菌株——鞘氨醇单胞菌 USTB-05 为研究对象, 在菌体及降解酶对微囊藻毒素 LR (MC-LR) 降解特性研究的基础上, 获取完整降解基因序列信息, 并通过降解基因的克隆与表达、重组酶的活性验证及降解产物的分子结构测定, 深入研究鞘氨醇单胞菌 USTB-05 降解 MC-LR 的途径与分子机理, 为构建高效降解 MCs 的基因工程菌奠定理论基础。

本书力求通过微生物分子理论与技术来解决水环境污染重的问题, 理论联系实际, 适用性强, 对从事给排水、环境及微生物水处理方面的科技人员有较高的使用和参考价值, 也可作为大专院校相关专业的教学参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

微囊藻毒素生物降解研究/王华生, 王俊峰, 闫海著 —北京: 科学出版社, 2017.10

ISBN 978-7-03-054671-5

I. 微… II. ①王… ②王… ③闫… III. 蓝藻纲-植物毒素-生物降解-研究 IV. Q949.22

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 242105 号

责任编辑: 杨 震 张淑晓 高 微 / 责任校对: 王萌萌

责任印制: 张 伟 / 封面设计: 铭轩堂

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 10 月第 一 版 开本: 720 × 1000 1/16

2017 年 10 月第一次印刷 印张: 7 1/4

字数: 144 000

定价: 68.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

微囊藻毒素 (microcystins, MCs) 是一类能诱发肝脏肿瘤的单环七肽化合物, 其化学性质稳定, 常规水处理技术难以有效去除, 而微生物法是去除 MCs 最安全和有效的方法。虽然国内外学者在混合菌群和单一纯菌种的筛选及其降解 MCs 方面取得了重要的研究成果, 也有关于降解 MCs 的纯菌种酶催化降解途径和降解基因功能识别方面的报道, 但此方面的研究还不够全面, 这些降解途径还只是停留在理论推导阶段, 没有在真正意义上弄清楚每个降解基因所表达的蛋白酶在降解过程中所起的作用。而从分子水平上研究酶催化降解 MCs 过程可以揭示降解基因的功能特性和 MCs 的降解途径与分子机理。所以, 对 MCs 降解基因进行克隆及异源表达, 在酶水平上对 MCs 催化降解做进一步研究, 可以深入阐释 MCs 的降解途径与分子机理。而构建高效基因工程菌并获取高纯度酶制剂, 研究如何安全、快速、高效去除天然淡水水体中 MCs 的方法是当前形势下亟待解决的问题。本书旨在通过研究 1 株高效降解 MCs 的菌株——鞘氨醇单胞菌 USTB-05 降解微囊藻毒素 LR (MC-LR) 的特性、降解基因信息的获取、降解基因的克隆与表达、酶的活性验证及降解产物的分子结构测定, 推测鞘氨醇单胞菌 USTB-05 降解 MC-LR 的途径与分子机理。

本书的所有研究工作均在北京科技大学完成, 感谢北京科技大学化学与生物工程学院生物系的张怀老师在分子生物学实验方面给予的悉心指导, 尹春华老师、刘晓璐老师、胡继业老师、宋青老师、罗晖老师、许倩倩老师和吕乐老师在课题研究过程中给予的无私帮助, 北京化工大学优势学科测试平台尚飞博士在降解产物质谱测定分析上给予了宝贵建议。感谢国家自然科学基金项目 (No. 21467009, 21677011, 21177009) 和教育部博士点基金项目 (20120006110001) 的资助。

本书由江西理工大学资助出版, 在此表示感谢!

鉴于微囊藻毒素分子生物去除技术应用较少, 涉及领域多, 受作者水平和学科知识面所限, 书中难免存在疏漏和不妥之处, 敬请各位同行和读者批评指正。

作 者

2017 年 6 月

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 MCs 的物化特性、种类及其毒性	2
1.1.1 MCs 的种类及其结构特点	2
1.1.2 MCs 的毒性	3
1.2 MCs 的提纯与分析检测	4
1.2.1 MCs 的提纯	4
1.2.2 MCs 的分析检测	5
1.3 MCs 的物理和化学去除法	6
1.3.1 物理法	6
1.3.2 化学法	7
1.4 MCs 微生物降解研究进展	8
1.4.1 混合菌降解 MCs	8
1.4.2 纯菌种降解 MCs	8
1.5 MCs 降解途径及分子机理研究进展	11
1.5.1 MCs 酶催化降解	11
1.5.2 MCs 微生物降解基因	11
1.5.3 MCs 降解途径及分子机理	12
1.6 USTB-05 菌株简介	15
第 2 章 研究的技术路线、研究方法与实验条件	17
2.1 研究思路及技术路线	17
2.2 实验条件	19
2.2.1 实验材料	19
2.2.2 实验设备	19
2.2.3 样品测试方法	20
第 3 章 菌株 USTB-05 降解 MC-LR 的特性研究	22
3.1 实验方法	22
3.1.1 USTB-05 菌培养	22
3.1.2 MCs 的提纯	22

3.2	氧气对 USTB-05 菌降解 MC-LR 的影响	22
3.3	温度对 USTB-05 菌降解 MC-LR 的影响	23
3.4	初始 pH 对 USTB-05 菌降解 MC-LR 的影响	24
3.5	不同条件下 USTB-05 菌的生长情况	25
3.6	USTB-05 菌对 MC-LR 的降解动力学	25
3.7	本章小结	26
第 4 章	菌株 USTB-05 降解 MC-LR 的基因特性研究	27
4.1	实验方法	27
4.1.1	USTB-05 菌无细胞提取液的制备	27
4.1.2	USTB-05 菌基因组提取	27
4.1.3	质粒的提取	28
4.1.4	DNA 凝胶电泳	29
4.1.5	目的片段回收	29
4.1.6	目的基因与 pGEM-T easy 载体连接	29
4.1.7	连接产物转化至感受态细胞	30
4.1.8	测序	31
4.2	USTB-05 菌无细胞提取液降解 MC-LR 特性	31
4.3	降解基因序列初步探索	33
4.4	降解基因序列反向 PCR 扩增	35
4.5	USTB-05 菌降解 MC-LR 完整基因序列信息	38
4.6	降解基因序列分析	41
4.7	本章小结	45
第 5 章	MC-LR 降解基因的克隆	47
5.1	基本思路	47
5.2	PCR 扩增	48
5.2.1	引物设计	48
5.2.2	PCR 反应条件	50
5.2.3	PCR 反应结果分析	51
5.3	阳性克隆鉴定	52
5.4	基因测序及比对	55
5.5	本章小结	56
第 6 章	重组蛋白的诱导表达与活性验证	58
6.1	实验方法	58
6.1.1	目的蛋白电泳	58

6.1.2 重组菌 CE 提取	59
6.2 重组蛋白诱导表达	59
6.3 包涵体验证	61
6.4 重组菌 A 蛋白酶催化降解 MC-LR 活性验证	63
6.5 重组菌 B 蛋白酶催化降解 MC-LR 及第一个产物	65
6.6 重组菌 C 蛋白酶催化降解 MC-LR 及第二个产物	67
6.7 重组菌 C 蛋白酶催化降解第一个产物	69
6.8 重组蛋白活性验证归纳	70
6.9 本章小结	71
第 7 章 USTB-05 菌降解 MC-LR 的途径及分子机理探讨	72
7.1 实验方法	72
7.1.1 降解产物生成	72
7.1.2 降解产物纯化	73
7.2 MC-LR 降解产物质谱分析	73
7.2.1 产物 A 质谱分析	73
7.2.2 产物 B 质谱分析	75
7.2.3 产物 C 及产物 D 质谱分析	78
7.3 USTB-05 菌降解 MC-LR 的途径及分子机理	80
7.4 本章小结	83
第 8 章 结论与展望	85
8.1 主要结论	85
8.2 主要创新点	86
8.3 展望	86
参考文献	87
附录 A USTB-05 菌降解 MC-LR 完整基因序列信息	95
附录 B 微囊藻毒素 LR 降解产物结构二级质谱分析	102

第 1 章 绪 论

随着世界工业和农业的快速发展,大量含氮、磷的废水以及生活污水排入水体,致使水体富营养化程度日益加剧。水体富营养化(eutrophication)是指在人类活动的影响下,氮、磷等营养物质大量进入湖泊、河口、海湾等缓流水体,引起藻类及其他浮游生物迅速繁殖,水体溶解氧量下降,水质恶化,鱼类及其他生物大量死亡的现象。蓝藻水华是水体富营养化表现最为严重的一类现象。当前,世界上淡水湖泊蓝藻水华发生的频率与严重程度都呈迅猛增长的趋势,发生的地点遍布全球各地^[1]。我国早在 20 世纪 60 年代在太湖中就发现了蓝藻水华现象^[2]。据调查,20 世纪 80 年代初我国有一半以上的湖泊处于富营养化状态^[3]。到 20 世纪 90 年代,我国淡水水体的富营养化状况更严重,有 80%的天然淡水湖泊存在不同程度的富营养化污染现象^[4]。进入 21 世纪,我国云南滇池、江苏太湖和安徽巢湖等淡水湖泊相继爆发了蓝藻水华污染事件^[2,5,6]。此外,在长江、黄河中下游的许多湖泊和水库中也都出现蓝藻水华污染现象^[7-9]。而 2007 年 5 月江苏太湖蓝藻水华的大规模爆发,更是将蓝藻水华的治理推向了国际研究舞台^[10]。

蓝藻水华的藻种有许多种类型,这些藻种能产生并释放出多种藻毒素,其中微囊藻毒素(microcystins, MCs)是一类出现频率最高、产生量最大和造成危害最严重的藻毒素。研究结果显示,MCs 对动物的肝脏损害非常大,能使肝脏充血肿大,严重时可导致肝出血甚至坏死^[11]。调查发现,饮用水中 MCs 的存在与人群中原发性肝癌和大肠癌的发病率有明显的相关性^[12-14]。已有许多 MCs 引起野生动物、家禽和家畜等中毒或死亡事件的报道^[15,16]。虽然浮游动物和鱼类对 MCs 有较大的耐受性,但 MCs 常可以在其体内富集,并达到相当高的浓度,然后通过生态系统、食物链对人类造成潜在的威胁^[17]。MCs 毒性较大,分布广泛,具有稳定的化学结构,常规饮用水处理技术并不能有效地去除^[18],对人们的饮水安全造成了严重的威胁^[19,20]。

面对天然水体中富营养化程度日益严重以及蓝藻水华爆发越来越频繁的局势,如何控制蓝藻的过量繁殖并有效去除蓝藻水华中释放的 MCs,已成为我国乃至世界环境科学研究领域的一个难题。由于 MCs 具有环状结构和间隔双键,在水体中相当稳定,混凝、沉淀和过滤及其组合单元工艺对蓝藻细胞分离效果好,而对溶解性 MCs 的去除效果差;高锰酸钾、臭氧和氯等化学药剂氧化法对降解溶解性 MCs 效果明显,但容易带来“三致”物质以及消毒副产物等,造成二次污染;光解催化降

解以及活性炭吸附对减少水中 MCs 效果较好，但光催化降解工艺操作复杂，活性炭吸附难以二次回收利用等缺点制约其在这方面的进一步应用。而微生物法处理 MCs 因具有高效、运行成本低、无二次污染等优点备受关注。国内外在微生物降解 MCs 方面做了大量研究，特别是纯菌种降解 MCs 的研究。但是这些研究基本集中在纯菌种的筛选及降解基因特性等方面，而对于酶催化降解 MCs 途径及其分子机理则少有报道。本书以 1 株能高效降解 MCs 的菌株——鞘氨醇单胞菌 USTB-05 为研究对象，在菌体及降解酶对微囊藻毒素 LR (MC-LR) 降解特性研究的基础上，获取完整降解基因序列信息，并通过降解基因的克隆与表达、重组酶的活性验证及降解产物的分子结构测定，深入研究鞘氨醇单胞菌 USTB-05 降解 MC-LR 的途径与分子机理，为构建高效降解 MCs 的基因工程菌奠定理论基础。

1.1 MCs 的物化特性、种类及其毒性

1.1.1 MCs 的种类及其结构特点

MCs 是一类单环七肽化合物 (图 1-1)，分子量在 1000 左右，其一般结构是：D-丙氨酸在 1-位，2 个不同 L-氨基酸分别在 2-位和 4-位，D-异谷氨酸在 6-位。另外，3 个特殊的氨基酸分别为：3-位的 D-赤-β-甲基天冬氨酸 (MeAsp)，5-位的 3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯基-4(E), 6(E)-二烯酸 (Adda)，7-位的 N-脱氢丙氨酸 (Mdha)。由于 Adda 基团和 MeAsp 基团的甲基化和去甲基化差异，以及在 2-位和 4-位的两个可变 L-氨基酸的不同，形成了多种类型的 MCs。2-位和 4-位的两个可变 L-氨基酸用 X 和 Z 来区分不同的 MCs 种类。目前，已经从不同的微囊藻中分离鉴定出 80 多种 MCs^[21, 22]。微囊藻毒素 RR (MC-RR)、MC-LR 及微囊藻毒素 YR (MC-YR) 是常见的三种 MCs 类型，其中 MC-LR 是产生量最大、分布最广泛和造成危害最严重的类型之一，其分子结构见图 1-2。

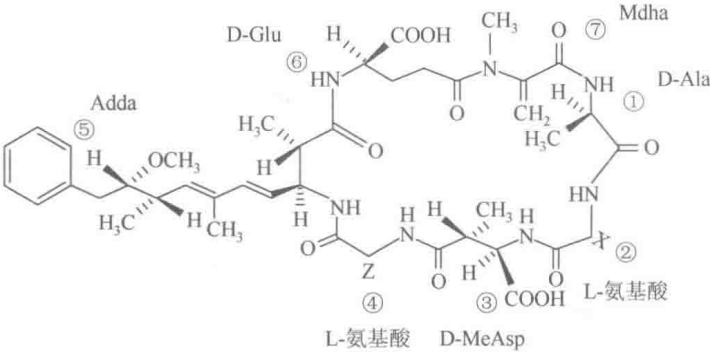


图 1-1 MCs 的化学分子结构通式 (X 和 Z 分别代表可变 L-氨基酸)

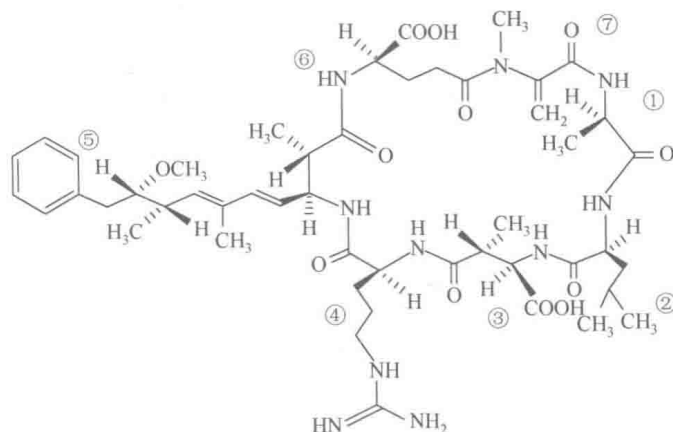


图 1-2 MC-LR 的化学分子结构式 (其中②为亮氨酸, ④为精氨酸)

MCs 的类型受温度影响而呈现出地域性差异。Rapala 等^[23, 24]研究了不同条件下固氮水华鱼腥藻的产毒情况, 发现 MC-LR 主要在 25℃ 以下时产生, 而 MC-RR 主要在高于 25℃ 时产生。因此, 以 MC-LR 作为主要的 MCs 类型一般在欧洲温度较低的地方检出^[25, 26], 但在亚洲温度较高的地区 MC-RR 是主要类型^[27, 28]。闫海^[29]研究发现, 我国云南滇池蓝藻水华藻细胞和水中 MC-RR 的含量都高于 MC-LR。

MCs 的分子结构中含有羧基、氨基和酰氨基, 其离子化倾向在不同的 pH 下有所不同。在中性水体中, 具有疏水性; 但由于存在极性官能团, 其水溶性大于 1.0 g/L (25℃ 下, 2.0 g/L 时 90%±3% 溶解, 1.0 g/L 时 96%±3% 溶解), 不易于吸附在颗粒物或沉积物中, 而是保留在水体中。MC-LR 的正辛醇/水分配系数 ($\lg D_{ow}$) 从 pH 为 1 时的 2.18 降到 pH 为 10 时的 -1.76, 因此可以推测在爆发水华时的碱性条件 (pH>8) 下, MCs 的生物富集效应较小^[28, 30]。

虽然 MCs 化学性质相当稳定, 在 pH 中性甚至 300℃ 高温下还能维持很长时间不分解^[31, 32], 但由于 MCs 分子侧链的 Adda 基团有 β 、 γ 双键, 所以理论上易于通过氧化、光降解和生物降解的途径破坏或改变其分子结构, 达到降低其毒性甚至脱毒的效果, 这已被许多研究报道所证实^[33-38]。

1.1.2 MCs 的毒性

MCs 由于携带 Adda 特殊结构而具有很强的毒性^[39], 其不仅使植物的幼苗发生变形、重量减少、侧根减少、叶片的光合作用效率减少^[40, 41], 而且能干扰鱼类胚胎的发育, 引起胚胎孵化率降低, 还对胚胎有致畸作用。动物若直接接触或饮用含有 MCs 的水会造成昏迷、肌肉痉挛、呼吸急促和腹泻等中毒症状。人若直接

接触含 MCs 的水华蓝藻, 会造成皮肤、眼睛过敏、发烧、疲劳以及急性肠胃炎。如果经常接触或饮用含 MCs 水体, 则会引发皮肤癌、肝炎和肝癌等病症^[42]。在长期饮用含有 MCs 水的人群中, 肝癌的发病率明显高于饮用深井水的人群^[43]。1996 年, 在巴西发生了一件由于使用了含有 MCs 的水进行血液透析而导致 50 多人死亡的中毒事件^[44]。因此, 世界卫生组织推荐饮用水中 MC-LR 的浓度不高于 1.0 mg/L^[45]。研究发现, MCs 能抑制细胞内蛋白磷酸酶 1 (PP1) 和蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 的活性, 使细胞骨架上的蛋白质因过磷酸化而发生变性, 进而损伤细胞骨架系统, 同时还可观察到微管系统的解体, 从而导致细胞变形或器官失活、衰竭甚至坏死^[46, 47]。MacKintosh 等^[48]发现 MCs 能强烈抑制植物中 PP1 和 PP2A 活性, 影响营养物质的吸收、迁移及根韧皮部的功能和茎叶的生长。Miura 等^[49]发现暴露于 MC-LR 的鱼肝脏肿大、充血以致坏死。同时 MCs 可诱导生物体内细胞的凋亡, 影响相应器官的功能及活性^[50]。MCs 在经过相应载体的运输作用进入细胞后, 会引发活性氧自由基的快速产生^[51], 诱导细胞内氧化应激反应, 干扰细胞内某些信号物质 (如 Bcl-2 族蛋白) 的传导, 促进细胞凋亡或增殖等进程^[52]。同时, MC-LR 可以与 PP2A 的催化亚基结合, 抑制该酶的蛋白脱磷酸活性, 通过干扰蛋白分子脱磷酸化而打破细胞内信号物质平衡 (如 p53 蛋白、Bcl-2 蛋白家族、CaMKII 等), 影响线粒体、细胞核、内质网等细胞器的功能, 最终开启、加速细胞凋亡程序^[53, 54]。1997 年, Sueoka 等^[55]首次报道 MC-LR 会改变致癌基因和肿瘤抑制基因的表达, 促进细胞癌变。Toivola 等^[56]认为, MCs 抑制 PP2A 活性并影响 MAPK 信号的过程是其促进肿瘤形成的关键。

1.2 MCs 的提纯与分析检测

1.2.1 MCs 的提纯

MCs 提取提纯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所需纯度的 MCs。

提取主要采用溶剂萃取法, 其步骤包括藻细胞与提取溶剂的混合, 搅拌或振荡, 以及超声波降解或者反复冻融裂解细胞。常用的几种溶剂有 5%乙酸^[57]、正丁醇-甲醇-水^[58]和甲醇-水^[59], 也有采用乙醇-水体系的^[60]。最近报道已开发了沸水浴及微波炉在 MCs 提取方面的应用^[61, 62]。由于提取对象如新鲜蓝藻和冻干的藻细胞、提取溶剂和操作步骤的差异, 各种方法之间很难作出统一的比较, 故很少有明显的证据表明哪种提取方法是最好的。在提取溶剂方面, 目前普遍采用的是不同比例的甲醇-水溶液, 其中 50%~80%的甲醇溶液被认为是最有效的提取液。

闫海等^[63]以冷冻干燥的云南滇池水华蓝藻藻粉为原料,用不同浓度的甲醇溶液提取 MCs 时发现,40%的甲醇溶液可最大限度地从藻细胞中提取 MC-RR 和 MC-LR。在裂解藻细胞方面,虽然超声波降解法被广泛采用,但是也有文章认为其效果较小,如采用反复冻融法也能达到较好的提取效果。另外,提取时间和提取温度也是影响提取效果的因素,但是这方面的研究报道较少,而且也没有明确的定论^[64]。

MCs 提取液的浓缩主要采用蒸发和固相萃取两种方法进行,蒸发的方法可以采用旋转蒸发器在 40℃ 时进行减压旋转蒸发,也可以通过吹空气或氮气的方法将提取液吹干。固相萃取(SPE)是使 MCs 提取液吸附于固相萃取柱并经洗脱后,不仅能够达到浓缩的目的,还能起到初步提纯的作用。基本上采用反相 C₁₈ 填料作为固体萃取相,采用甲醇为洗脱液,但也有采用含 0.1%三氟乙酸(TFA)的 90% 甲醇溶液将 MCs 洗脱^[65]。闫海等^[63]发现,在用 70%甲醇溶液洗脱吸附于固相萃取柱上 MCs 的过程中,洗脱液的颜色基本按照由蓝绿色到橘黄色再到基本无色透明的规律进行变化。收集无色透明洗脱液,经用氮气吹干后,可以获得纯度为 28.6%的 MC-RR 和纯度为 12.9%的 MC-LR。

目前应用最普遍的提纯方法是应用 C₁₈ 等不同类型的分离柱在 HPLC 上根据 MCs 紫外吸收峰收取对应的流动相,可以获得较高纯度的 MCs,但是效率较低。近年来,随着分析仪器的的发展,许多其他技术被运用在藻毒素的分离上,如超滤技术等,为藻毒素的分离提供了更为广阔的发展空间。

1.2.2 MCs 的分析检测

根据所要达到的目的和所需获取的信息的不同,可采取不同的方法应用于 MCs 的分析检测。检测方法有薄层层析法(TLC)、蛋白磷酸酯酶抑制法、气相色谱法(GC)、生物毒理检测法、酶联免疫吸附分析法(ELISA)、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-质谱法(LC-MS)等,最常用的检测方法主要是 ELISA、HPLC 和 LC-MS。

HPLC 是目前欧美等发达国家广泛采用的一种 MCs 的分离、鉴定和定量检测方法,同时也是我国在水质监测领域中 MCs 检测的国标方法(GB/T 20466—2006)^[66]。大多数实验室也是用配有二极管阵列检测器的反相高效液相色谱(HPLC-PDA)来进行 MCs 的常规检测。近年来,HPLC 测定 MCs 的报道很多,基本都集中在对样品的前处理、洗脱液、SPE 柱、淋洗剂、浓缩定容过程、色谱分析条件的优化等方面。HPLC 测 MCs 的前处理以固相萃取为主,一般采用 C₁₈ 或 HLB 柱为填料的反相柱。目前,广泛采用的高效液相色谱-紫外联机法(HPLC-UV)对毒素进行萃取分离并纯化后进行紫外检测,通过被测 MCs 与标准 MCs 出峰时间的比较对毒素种类进行定性鉴定,并用峰面积比较法对毒素进行定量分析,检出限能达到 0.1 μg/L。正是由于 HPLC 技术具有检测 MCs 准

确性高,并且可以对不同的 MCs 异构体进行分析检测等优点,已成为 MCs 的一种常规方法^[67]。但目前 HPLC 方法的普及应用仍受到诸多限制,一是 HPLC 法需要使用昂贵的大型仪器设备和配备专业操作人员;二是 HPLC 检测技术需要标准 MCs 用来获得标准曲线和吸收峰值,而目前除了 MC-RR、MC-LR 等少数的标准 MCs 外,其余的 80 多种 MCs 异构体大多缺乏标准 MCs;三是虽然二极管阵列检测器可获得更多的紫外光谱信息,但是由于 MCs 都显示相似的紫外光谱特征,故 HPLC 法对 MCs 的定性分析能力比较有限。

标准 MCs 的缺乏限制了 HPLC 的应用范围,但 LC-MS 技术很好地解决了这个问题^[68]。LC-MS 将色谱的分离能力与质谱的定性功能结合起来,实现对水体中 MCs 更准确的定量和定性分析。即使没有标准 MCs,只要知道这种 MCs 的分子量,就可对其进行定性定量检测分析。虽然 MCs 种类繁多,有很多异构体,但每种异构体的分子中都只有一个 Adda 侧链,因此,日本学者 Sano 等^[69]建立了一种检测 MCs 总量的方法。首先利用 KMnO_4 和 NaIO_4 对 MCs 进行氧化,将 Adda 上的共轭双键氧化断裂后得到一种共同的产物 2-甲基-3-甲氧基-4-苯丁酸(MMPB),然后通过 GC 对 MMPB 进行分析检测,可获得 MCs 总浓度^[70]。该方法所需样品量少,灵敏度高,检测限度为 pg 级,但较为耗时。

ELISA 是现代应用最为广泛的一种免疫检测方法,自 20 世纪 80 年代就开始用于环境中 MCs 的检测,其基本原理是将特异性的抗原抗体反应与酶的高效催化作用相结合。1990 年,Chu 等^[71]首先提出 ELISA 检测 MCs 的完整程序,它是利用多克隆或单克隆抗体来检测 MCs,灵敏度高、分析速度快捷,特异性识别能力较强,测定水环境中的 MCs 时无需进行样品预浓缩。目前,常用的商品化 ELISA 试剂盒多采用直接竞争性 ELISA 方法,MCs 检测试剂盒由可以与 MCs 和 MCs 酶标记物结合的多克隆抗体制成,样品中的 MCs 与 MCs 酶标记物竞争结合数量有限的抗体结点,样品中 MCs 含量低的则酶标记物结合得多,反之则酶标记物结合得少,最后通过酶与生色底物的反应来观察检测。

1.3 MCs 的物理和化学去除法

1.3.1 物理法

(1) 物理除藻。利用超声波的机械振动和空化效应造成生物细胞组织的损伤、断裂或粉碎,使生物组分发生物理和化学变化,高效节能地破坏蓝藻天然复合物的关键组分,或抑制其生物合成,从而抑制光合作用的进行,达到抑制蓝藻生长、防止水华爆发的目的。还可以通过重力斜筛自动脱水设备进行脱水处理,脱水后形成的藻浆经去毒处理,将成为上好的有机肥料或饲料^[72]。

(2) 过滤和沉淀。常规水处理工艺中的滤料对溶解的藻毒素去除效果不佳,但对存在于藻细胞中还未释放的毒素则有一定的去除效果。有学者直接用石灰和少量明矾在 pH 6~10 的条件下处理水样,由于石灰和明矾引起藻细胞的凝结和沉降,MC-LR 会在聚集的藻细胞中保持或分解,但不能释放到水体中,从而不表现出毒性^[73]。

(3) 活性炭吸附。活性炭具有比表面积大、化学惰性等优点,是一种优良的吸附剂。水处理工艺中常用的活性炭滤料是粉末活性炭(PAC)和颗粒活性炭(GAC)。PAC 可以去除 MC-LR 但对类毒素- α 去除无效果,GAC 对两种毒素均有良好的去除效果^[74]。使用活性炭过滤可以去除 0.1 $\mu\text{g/L}$ 以上浓度的 MC-LR。Warhurst 等^[75]也发现活性炭对 MC-LR 有吸附能力,50 mg/L 活性炭可以将初始 20 $\mu\text{g/L}$ 的 MC-LR 全部吸附,吸附量为 0.4 $\mu\text{g/mg}$ 。

(4) 膜滤。超滤对 MCs 的去除效果可达 98%,反渗透则可达到 99.6%^[76]。膜技术可以将绝大部分的 MCs 分子去除,但使用膜技术成本高。

1.3.2 化学法

(1) 化学除藻。利用除草剂、杀藻剂及金属盐等来控制水华,如用硫酸铜治藻,硫酸铜在水中分解为 Cu^{2+} 和 SO_4^{2-} , Cu^{2+} 与藻体中的蛋白质结合,蛋白质变性,藻体死亡,但 Cu^{2+} 容易给水体带来二次污染,因此不能作为常规使用方法。

(2) 氯化氧化。用氯氧化剂脱除 MCs 毒素的研究较多,其脱毒效能存在较大争议,近期的研究成果显示,部分氯氧化剂可以有效地去除藻毒素。Nicholson 等^[77]在研究中发现,以液氯和次氯酸钙作消毒剂,使水体保持 0.5 mg/L 的氯浓度,可有效控制毒素,加大剂量,效果更佳(1 mg/L 时可达到 95%);次氯酸钠的消毒效果稍差。

(3) 臭氧氧化。Hoeger 等^[78]使用 0.3~2 mg/L 臭氧与含 MCs 的水接触 9 min 后反应 60 min (臭氧关闭)测定去除效果,结果显示,去除效果与藻细胞密度、臭氧浓度、接触时间和温度有关。0.05 mg/L 臭氧能完全破坏藻毒素,但不会引起藻类细胞的裂解。

(4) 光催化氧化。在蒸馏水中,自然光及荧光都不能破坏 MCs,因此直接光降解无法消除自然水体中的 MCs。MCs 可以较为容易地通过特定波长的紫外光照射而去除,如暴露在最大紫外吸收波长(238~254 nm)时,则降解较快(数分钟),其去除率和光线的强度有关。目前的研究表明,使用紫外线照射是一种去除源水中藻毒素的有效方法^[79]。Welker 等^[80]以腐殖质作为光敏剂,在日光照射下 MCs 初始浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时,半衰期为 10.5 h。Shephard 等^[81]利用二氧化钛作为催化剂,使用紫外光氧化 MCs,在 MCs 初始浓度为 80 $\mu\text{g/L}$ 时,其半衰期可降低到 10 min

左右。研究表明,此方法在自然水体中同样适用^[82]。张维昊等^[4]发现蓝藻色素对 MCs 的光降解有一定的促进作用,这可能是天然水体中加速 MCs 光解的一个重要因素。

1.4 MCs 微生物降解研究进展

微生物降解是 MCs 去除的有效途径之一。虽然 MCs 的化学结构稳定,不易被真核生物和一般细菌分解,但是仍然能被天然水体中某些特殊细菌降解。这些细菌能够产生专门降解 MCs 的酶,从而对 MCs 有一定的降解作用。目前,主要采用混合菌和纯菌种两种方法降解 MCs。

1.4.1 混合菌降解 MCs

具备降解 MCs 能力的土著菌在天然水体及其沉积物中均有所发现。吴振斌等^[83]研究了人工湿地系统对 MCs 的去除效果及影响因素,发现以含蓝藻水华的鱼塘水为原水,当进水含 MCs (0.117 mg/L) 时,去除率 50% 左右,其中对 MC-YR 的去除效果最好。吕锡武等^[84]考察了 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 经序批式膜生物反应器的处理效果,经 24 h 处理后发现 3 种 MCs 的去除率均高于 90%。金丽娜等^[85]发现沉积物的用量以及反应体系温度对滇池沉积物生物降解 MCs 影响较大。周洁等^[86]经过初步筛选分离得到了能够在 3 d 内完全降解 MC-RR (50 mg/L) 和 MC-LR (30 mg/L) 的混合菌群微生物。在爆发蓝藻水华污染的水体以及水体沉积物中发现存在具备降解 MCs 能力的微生物^[87-89]。Inamori 等^[90]利用需氧菌对水体中的 MCs 进行降解研究,结果发现该菌能够在 10 d 内将 MCs (40 mg/L) 完全降解。污水厂排污口也存在能够快速降解 MCs 的微生物,其在 2 d 之内将 MC-LR (182~837 mg/L) 完全降解^[91]。

由此可见,对 MCs 有降解能力的微生物菌种普遍存在于天然水体中,筛选分离出具有高效降解 MCs 的纯菌种,可以为进一步研究 MCs 的降解及其应用奠定良好基础。

1.4.2 纯菌种降解 MCs

目前,国外有关分离降解 MCs 纯菌种的报道较多。Jones 等^[92]最早从天然水体中分离出 1 株对 MC-LR 有一定降解能力的纯菌种 ACM-3962,并将其分类为鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas*)。随后,日本学者在此方面开展了大量研究。

Takenaka 等^[93]从天然水体中分离 1 株对 MC-LR 有降解能力的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 它能在 20 d 内将 MC-LR (初始浓度 50 mg/L) 去除 90% 以上。Park 等^[94]和 Ishii 等^[95]分别从日本 Suwa 湖中分离出 1 株对 MCs 具备较高降解能力的纯菌种 Y2 和 7CY, 其中 Y2 菌对 MC-RR 和 MC-LR 的最大日降解速率分别达到 13.0 mg/L 和 5.4 mg/L。通过 16S rDNA 分析发现, 二者均属鞘氨醇单胞菌, 并且 7CY 与 Y2 之间有较高的同源性。Tsuji 等^[96]从日本的 Tsukui 湖中分离出 1 株对 MCs 有降解能力的微生物纯菌种 B-9, 1 d 内可将一定浓度的 MCs 全部降解, 最后通过 16S rDNA 分析发现, B-9 与鞘氨醇单胞菌 Y2 的同源性高达 99%。Saito 等^[97]从中国贵阳市某发生水华的湖泊和日本 Kasumigaura 湖中分别分离了具有降解 MCs 能力的鞘氨醇单胞菌 C-1 和 MD-1。2005 年, 德国学者 Valeria 等^[98]从阿根廷的水库中筛选出 1 株鞘氨醇单胞菌 CBA4, 该菌在 36 h 内就能将浓度为 200 mg/L 的 MC-RR 完全降解。2007 年, Ho 等^[99]从生物沙滤器分离出 1 株能够降解 MC-LR 和 MC-LA 的菌种 LH21, 经 16S rDNA 鉴定为 *Sphingopyxis* sp., 经 PCR 扩增发现该菌株具有完整的降解 MCs 的 *mlr* 基因簇。

进入 21 世纪后, 国内在 MCs 降解菌种筛选方面开始进行研究。2002 年, 我们从滇池底泥中分离出 1 株纯菌种青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*), 该菌在 3 d 内可将初始浓度 50.2 mg/L 的 MC-RR 和 30.1 mg/L 的 MC-LR 全部降解, 日均降解速率分别达 16.7 mg/L 和 9.4 mg/L^[29]。周洁等^[100]从滇池底泥中筛选出 1 株对 MCs 有着更强降解能力的食酸戴尔福特菌 (*Delftia acidovorans*), 在 2 d 内可将初始浓度 90.2 mg/L 的 MC-RR 和 39.6 mg/L 的 MC-LR 全部降解, 日均降解速率分别提高到 45.1 mg/L 和 19.8 mg/L。Wang 等^[101]从滇池底泥中分离出 1 株鞘氨醇单胞菌 (*Sphingopyxis* sp. USTB-05), 其在 36 h 内将初始浓度 42.3 mg/L 的 MC-RR 全部降解, 而该菌的无细胞提取液 (350 mg/L 蛋白) 则在 10 h 内将初始浓度 42.3 mg/L 的 MC-RR 全部降解。宦海琳等^[102]从南京发生水华的水体中筛选分离出了 5 株降解 MCs 能力较强的细菌, 经过鉴定发现分别属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、弗拉特氏菌属 (*Frateriia*) 和微杆菌 (*Micro bacterium*)。刘海燕等^[103]从南京发生水华的水体中分离出对 MC-LR 有显著降解能力的菌株 S3, 经 16S rDNA 序列比对分析发现, 该菌与类芽孢杆菌 (*Paenibacillus validus*) 的相似性达 98%。苑宝玲等^[104]研究了假单胞菌 (*Pseudomonas*) M-5、M-6 及气单胞菌 (*Aeromonas*) M-7 混合培养与单菌株培养对 MC-LR 的降解效率, 结果表明, 混合菌株对 MCs 的降解效果明显优于单菌株, 说明混合菌株之间具有协同生长效应。但同时认为菌株之间的组合具有很大的随机性, 还需从菌株的生理生化特性及对污染物的降解过程和机理的研究入手, 探讨具有协同作用菌株的组合过程。

此外，在寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)^[105]、神经鞘氨醇菌属 (*Sphingosinella*)^[106]、金藻属 (*Poterioochromonas*)^[107]、伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)^[108]、短杆菌属 (*Brevibacterium*)^[109]、红球菌属 (*Rhodococcus*)^[109]和吉氏库特氏菌 (*Kurthia gibsonii*)^[110]等菌属中也发现了可降解 MCs 的菌种。目前，国内外报道能降解 MCs 的菌种多达 50 余种 (部分可降解 MCs 的菌种见表 1-1)，涵盖的菌属较广，但主要为鞘氨醇单胞菌属类菌种。

表 1-1 部分可降解 MCs 的菌种及其详细信息

菌种	来源	GenBank 登录号 ¹⁾	可降解种类
<i>Ralstonia solanacearum</i> ^[29]	中国滇池		MC-LR, MC-RR
<i>Sphingomonas</i> sp. ACM-3962 ^[92]	澳大利亚马兰比吉河	AF401172	MC-LR, MC-RR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[93]	日本		MC-LR
<i>Sphingosinella</i> sp. Y2 ^[94]	日本諏访湖	AB084247	MC-LR, MC-RR, MC-YR, 6 (Z) -Adda-MCLR
<i>Sphingomonas</i> sp. 7CY ^[95]	日本諏访湖	AB076083	MC-LR, MC-RR, MC-LY, MC-LW, MC-LF
<i>Sphingosinella</i> sp. B-9 ^[96]	日本津久井湖	AB159609	MC-LR, MC-RR
<i>Sphingomonas</i> sp. MD-1 ^[97]	日本霞浦湖	AB110635	MC-LR, MC-RR, MC-YR
<i>Sphingopyxis</i> sp. C-1 ^[97]	中国贵阳		MC-LR, MC-RR
<i>Sphingomonas</i> sp. CBA4 ^[98]	阿根廷圣洛克水库	AY920497	MC-RR
<i>Sphingopyxis</i> sp. LH21 ^[99]	澳大利亚麦庞加水库	DQ112242	MC-LR, MC-LA
<i>Delftia acidovorans</i> ^[100]	中国滇池		MC-LR, MC-RR
<i>Sphingopyxis</i> sp. USTB-05 ^[101]	中国滇池	EF607053	MC-LR, MC-RR
<i>Paenibacillus</i> sp. S3 ^[103]	中国南京	DQ836314	MC-LR
<i>Pseudomonas</i> sp. M-5 ^[104]	中国福建		MC-LR
<i>Pseudomonas</i> sp. M-6 ^[104]	中国福建		MC-LR
<i>Aeromonas</i> sp. M-7 ^[104]	中国福建		MC-LR
<i>Stenotrophomonas</i> sp. EMS ^[105]	中国	FJ712028	MC-LR, MC-RR
<i>Burkholderia</i> ^[108]	巴西	DQ459360	MC-LR
<i>Brevibacterium</i> sp. F3 ^[109]			MC-LR
<i>Bacillus</i> sp. M6 ^[110]	中国巢湖	JN717163	MC-LR, MC-RR
<i>Pseudomonas</i> sp. DHU-38 ^[111]	中国淀山湖	HM047515	MC-RR
<i>Novosphingobium</i> sp. THNI ^[112]	中国太湖		MC-LR
<i>Morganella morganii</i> (LAAFP-C25216) ^[113]	澳大利亚		MC-LR
<i>Pseudomonas</i> sp. C25459 ^[113]	澳大利亚		MC-LR
<i>Sphingomonas</i> sp. C25358 ^[113]	澳大利亚		MC-LR
<i>Arthrobacter</i> sp. F7			MC-LR
<i>Rhodococcus</i> sp. C3			MC-LR
<i>Novosphingobium</i> <i>aromaticivorans</i> DSM 12444		CP000248	MC-LR

1) GenBank 登录号对应的是该菌株 16S rDNA 序列