

一株微囊藻毒素降解辅助菌的分离和鉴定

李现尧 刘晓文 史全良*

(苏州大学基础医学与生物科学学院 江苏 苏州 215123)

摘要: 以从太湖蓝藻中提取的微囊藻毒素作为微囊藻毒素降解菌的筛选物质, 通过稀释平板涂布法从腐烂的蓝藻中富集分离到一菌株, 经形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析将该菌株 (GenBank 序列登录号为 GQ143751) 鉴定为藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*); 微囊藻毒素降解实验结果表明该菌株几乎不能降解微囊藻毒素, 但可以明显促进一株微囊藻毒素降解菌微嗜酸寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas acidaminiphila*) 对微囊藻毒素的降解能力, 将筛选菌株与微嗜酸寡养单胞菌混合培养, 混合菌对微囊藻毒素的降解能力比微嗜酸寡养单胞菌单独培养时提高 66.7%。

关键词: 微囊藻毒素, 生物降解, 辅助菌, 藤黄微球菌

Isolation and Identification of a Microcystin-degrading Assistant Bacterium

LI Xian-Yao LIU Xiao-Wen SHI Quan-Liang*

(School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: A bacterial strain was enriched and isolated from rotten cyanobacteria of Taihu Lake by dilution-plate method, using microcystins as selective material of microcystin-degrading bacteria, which was extracted and purified from cells of cyanobacteria. Based on morphological, physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the strain is preliminarily identified as *Micrococcus luteus* (GenBank accession number is GQ143751). The results of microcystin-degrading experiments show that the strain could hardly degrade microcystins but could enhance the microcystin-degrading capability of another strain *Stenotrophomonas acidaminiphila*. When the strain is mixed with *Stenotrophomonas acidaminiphila*, the microcystin-degrading capability of mixed bacteria is improved 66.7% compared with *Stenotrophomonas acidaminiphila*.

Keywords: Microcystins, Biodegradation, Assistant bacteria, *Micrococcus luteus*

微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 是由淡水藻如微囊藻属、鱼腥藻属、念珠藻属的一些种类产生的环状七肽肝毒素, 该毒素广泛存在于富营养化的水体中, 对人们的生产生活造成极大的威胁^[1-2]。1996 年在巴西 Caruaru 市一所透析医院由于误用微囊藻

毒素污染水作为肾透析用水导致 116 人发生急性肝功能障碍, 52 人死亡^[3], 引起世界各国的普遍关注。

微生物协同作用是消除环境中有机污染物的一种重要且有效的方式, Sorensen^[4]报道将土壤中分离的菌株 SRS1 与一株鞘氨醇单胞菌 SRS2 混合培养

* 通讯作者: Tel: 86-512-65882036; ✉: shiquanliang@suda.edu.cn
收稿日期: 2009-09-26; 接受日期: 2009-11-24

后降解苯脲除草剂的效果优于单菌株, 主要原因是两菌株互相提供对方需要的生长因子; 饶正华^[5]研究发现一株巨大芽孢杆菌 PGPi 不能分解玻璃粉, 却能增强胶冻芽孢杆菌 PGBc13 分解玻璃粉的能力; 管亚军^[6]筛选到一组处理油田污水的混合菌, 利用气相色谱分析了各组成菌在降解原油中的作用, 证实 N5 和 N6 是关键菌株, N1-N4 菌株起辅助作用, 六菌株的协同作用使混合菌群得以高效地降解原油; Chapalamadugu^[7]从土壤中分离得到两株假单胞菌 50552 和 50581, 菌株 50552 可将甲萘威(一种杀虫剂)降解为甲萘胺, 菌株 50581 可将甲萘胺降解为 CO₂, 两菌株混合培养协同作用可将甲萘威彻底降解。国内外已有很多对微囊藻毒素的微生物降解的研究, Jones^[8]于 1994 年最先从澳大利亚水体中筛选出一株能够降解 MCs 的鞘氨醇单胞菌; Park^[9]从富营养化的水体中分离到一株鞘氨醇单胞菌, 此菌株最高降解 MC-RR 和 MC-LR 效率分别为 13 和 5.4 mg/(L·d); 吕锡武^[10]采用批式生物膜研究了污泥中的微生物对 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 的生物降解, 结果表明混合菌对 MCs 有降解能力, 但降解能力并不高; 金丽娜^[11]利用从滇池蓝藻水华生物量中提取的微囊藻毒素试验溶液, 接种滇池沉积物的微生物, 藻毒素的生物降解速度随反应温度和沉积物量的增加而提高。目前关于微生物协同降解微囊藻毒素的报道甚少。

本实验室从宜兴市新庄街道太湖蓝藻堆积池的腐烂蓝藻中分离到一球状菌株, 该菌株几乎不能降解微囊藻毒素, 但可以明显促进本实验室已分离到的微嗜酸寡养单胞菌(*Stenotrophomonas acidaminiphila*)对微囊藻毒素的降解能力(微嗜酸寡养单胞菌对微囊藻毒素的降解效能另文报道)。本文对该菌株进行了鉴定, 以期丰富发展混合菌降解微囊藻毒素理论和微生物降解微囊藻毒素的应用提供有效的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 微囊藻毒素的提取与测定

1.1.1 微囊藻毒素的提取: 太湖蓝藻冻干粉中加入去离子水, 调节 pH 值到 4, 沸水浴^[12] 20 min, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 调节 pH 值到 8, 10000 r/min 离心 10 min, 过滤, 过滤后的液体经

固相萃取柱净化并蒸干^[11], 溶于去离子水, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后, -20°C 保存作为微囊藻毒素储备液。

1.1.2 微囊藻毒素的测定: 用美国 Beacon 公司的微囊藻毒素检测试剂盒测定微囊藻毒素含量(检测限为 0.1–2 μg/L), 试剂盒的检测方法为 ELISA 分析法。

1.2 菌株的筛选与分离

腐烂蓝藻用蒸馏水稀释后, 振荡混匀后静置 1 h, 吸取上层清液接种于添加微囊藻毒素的 M9 的液体培养基中(微囊藻毒素浓度为 1 mg/L), 30°C 恒温振荡避光培养, 转速为 150 r/min, 待培养基浑浊后(本实验为 3 d 左右), 用无菌吸管将菌液接种于另一微囊藻毒素液体培养基中, 如此连续富集培养 3 次, 富集培养基中微囊藻毒素浓度依次为 5、10 和 20 mg/L。富集后的菌液在牛肉膏蛋白胨固体平板上稀释涂布, 30°C 恒温培养 4 d 后根据菌落性状不同挑取菌落分离培养, 并用划线分离法纯化分离菌株。

1.3 菌株的鉴定

对菌株进行形态特征、生理生化特征、16S rDNA 序列分析, 并基于 16S rDNA 序列构建菌株系统发育树。

1.4 筛选菌株对微囊藻毒素降解菌辅助效能的测定

将筛选菌株、微嗜酸寡养单胞菌(GenBank 登录号为 FJ976656)、筛选菌株与微嗜酸寡养单胞菌的混合菌接种于含微囊藻毒素(初始浓度 15.4 mg/L)的 M9 培养基中, 30°C 培养, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 用微囊藻毒素检测试剂盒测定微囊藻毒素含量。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 菌株的形态特征: 筛选得到的菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上培养, 菌株的菌落照片和光镜照片见图 1 和图 2。

该菌株菌落黄色, 不透明, 边缘光滑, 中间凸起, 圆形较粘易挑起; 细胞球形, 直径 1.0 μm–2.0 μm, 成簇或成堆出现。

2.1.2 菌株的生理生化特征: 菌株的生理生化试验结果见表 1。

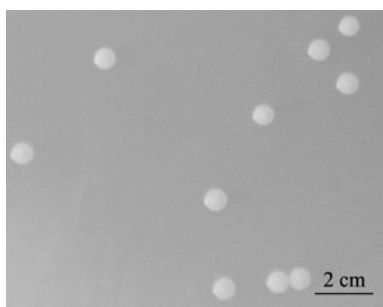


图1 菌株的菌落图片

Fig. 1 Colonies of the strain

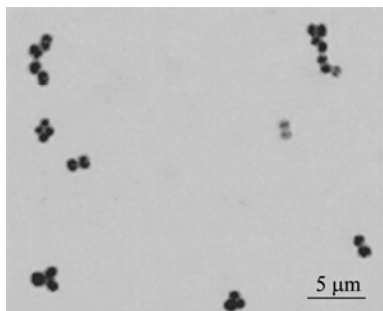


图2 菌株的光镜图片(×1000)

Fig. 2 Light micrograph of the strain(×1000)

表1 菌株的生理生化测定结果
Table 1 Results of physiological and chemical tests of the strain

特征 Characters	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	+
葡萄糖利用 Utilization of glucose	+
蔗糖利用 Utilization of sucrose	+
无机氮琼脂生长 Inorganic nitrogen agar growth	+
柠檬酸盐实验 Citrate test	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-
甲基红 Methyl red	-
明胶液化 Gelatine Liquefication	+
37°C 生长 Growth in 37°C	+
7.5% NaCl 生长 Growth in 7.5% NaCl	+
运动性 Motility	-
接触酶 Catalase	+
氧化酶 Oxidase	+

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13], 菌株的形态特征和生理生化试验结果显示该菌株与藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)主要特征一致。

2.1.3 菌株的 16S rDNA 序列和基于 16S rDNA 序列的系统发育树分析: 菌株的基因组 DNA 提取采用基因组提取试剂盒。PCR 引物采用细菌通用引

物: fD1, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; rP1, 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'^[14]。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 38 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。PCR 产物由上海生工公司测序。从 GenBank 中选取微球菌属(*Micrococcus*)的 21 个菌株, 库克菌属(*Kocuria*)的 2 个菌株与筛选菌株进行序列分析。所有菌株的 16S rDNA 序列通过 Clustal X1.83 软件进行排序并人工校正, 采用 PAUP 4.0b4a 软件, 以最大简约法(Maximum parsimony, MP)和最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统发育树。MP、ML 树选取的序列的所有核苷酸性状态等同加权处理即无序状态, Gaps 做 Missing 处理, 采用启发式搜索(Heuristic search)的逐步加入式算法(Stepwise addition)。MP 树分支交换法设定为树二等分再连接算法(Tree bisection reconnection, TBR), ML 树分支交换法设定为最近邻居互换法(Nearest neighbor interchange, NNI), 运算均取其严格一致性树, 树的拓扑结构的节点支持率均由 1000 次重复的自展检验(Bootstrap, BP)分析得到。

对菌株的 16S rDNA 序列扩增并测序, 得到序列长度为 1348 bp (GenBank 登录号为 GQ143751)。将序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 分析, GenBank 中与该菌株最相似的 30 个序列除未标明属种的菌株外均属于微球菌属(*Micrococcus*), 选取微球菌属的 21 个菌株, 库克菌属(*Kocuria*)的 2 个菌株作为外组群, 用 PAUP 4.0b4a 软件构建 MP 和 ML 树。基于 16S rDNA 序列构建的 MP 树的一致性指数(CI) = 0.825, 保留性指数(RI) = 0.859。如图 3 所示, MP 树显示筛选菌株(本实验室编号为 SP4)与藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)位于同一分支, BP 值为 95%。

基于 16S rDNA 序列构建的 ML 树如图 4 所示。ML 树显示筛选菌株与藤黄微球菌位于同一分支, BP 值为 94%。

MP 树和 ML 树显示了一致的结果, 筛选菌株与藤黄微球菌位于同一分支上, 结合形态与生理生化试验结果, 将该菌株鉴定为藤黄微球菌。

2.2 筛选菌株对微囊藻毒素降解菌的辅助效能

将藤黄微球菌、微嗜酸寡养单胞菌、藤黄微球菌与微嗜酸寡养单胞菌的混合菌接入初始 pH 值为 7 的微囊藻毒素培养基中, 两菌株的接种量均为 5%,

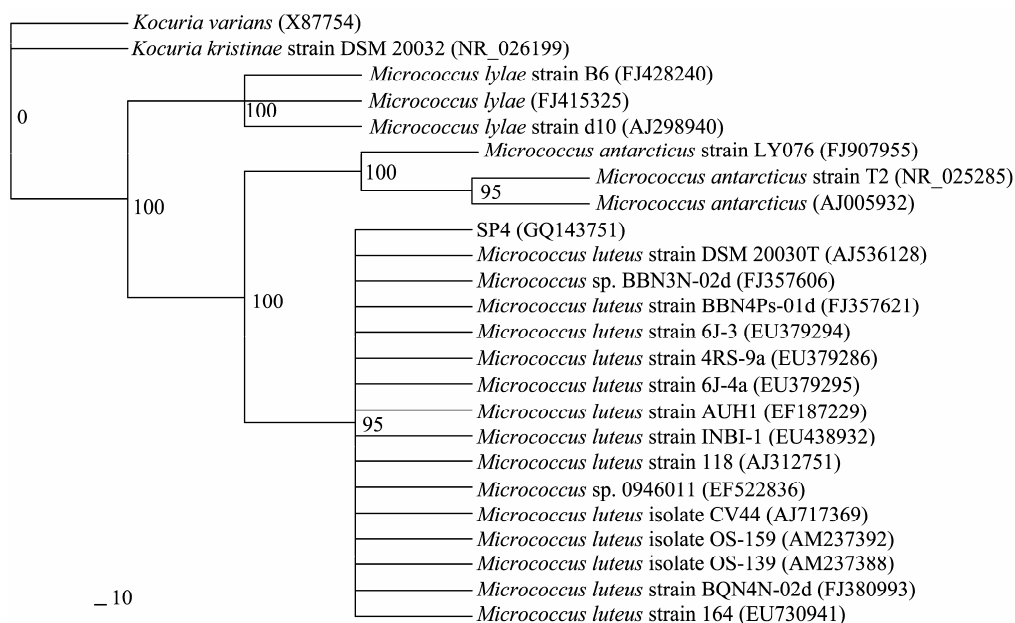


图3 基于16S rDNA序列的MP树

Fig. 3 MP tree based on 16S rDNA sequence of selected strains

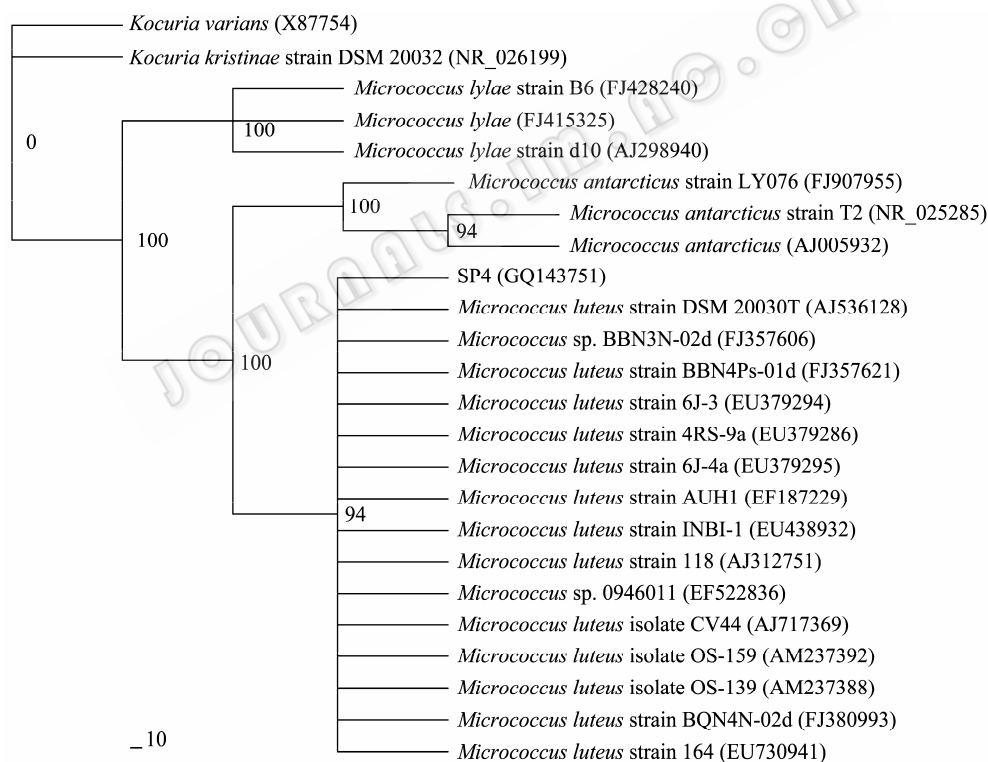


图4 基于16S rDNA序列的ML树

Fig. 4 ML tree based on 16S rDNA sequence of selected strains

混合菌中两菌株的接种量各为 2.5%, 30°C 恒温振荡避光培养, 转速为 150 r/min, 每隔 24 h 取样, 样品经 0.22 μm 滤膜过滤后, 测定微囊藻毒素含量, 每个处理 3 次重复。如图 5 所示, 藤黄微球菌几乎不能降解微囊藻毒素; 微嗜酸寡养单胞菌 5 d 内将 15.4 mg/L

的微囊藻毒素降解完全, 日平均降解速率为 3.08 mg/L; 混合菌只需要 3 d 就可完成全部降解过程, 日平均降解速率为 5.13 mg/L。结果显示, 藤黄微球菌与微嗜酸寡养单胞菌混合后, 混合菌对微囊藻毒素的降解速度比微嗜酸寡养单胞菌提高 66.7%,

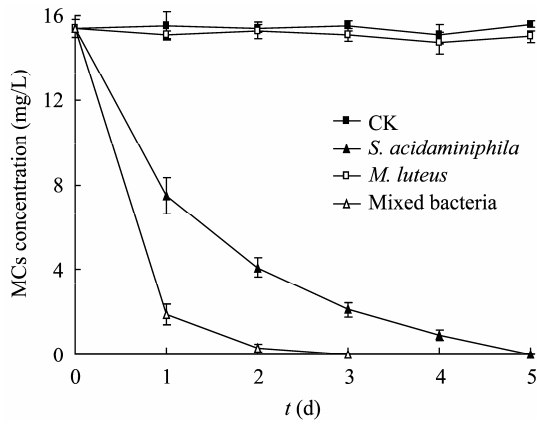


图5 微嗜酸寡养单胞菌、藤黄微球菌、混合菌对微囊藻毒素的降解曲线

Fig. 5 Microcystins-degrading curves of *M. luteus*, *S. acidaminiphila* and mixed bacteria

说明藤黄微球菌可以明显增强微嗜酸寡养单胞菌的降解能力, 在降解微囊藻毒素的过程中两菌株之间存在正向协同效应。

3 讨论

自然环境中, 微生物互作是普遍存在的现象。谢翔^[15]对3种具有水质净化功能的地衣芽孢杆菌、假丝酵母菌和荚膜红假单胞菌的生长关系进行了研究, 发现假丝酵母菌与荚膜红假单胞菌存在互惠互利关系, 而地衣芽孢杆菌与其他两株功能菌为无关共栖关系; 黄艳琴^[16]研究发现海绵细菌在抗菌活性方面存在正向和负向的协同效应, 其中组合 A72-75 对于白假丝酵母和荧光假单胞菌的抑菌活性高于单菌株; A75 单菌对黑曲霉有拮抗作用, 但是 A75 与 A08 混合后对黑曲霉的拮抗作用消失了; 张辉^[17]采用二次交联化学方法对一株芽孢杆菌和一株黄杆菌进行混合固定, 固定化混合菌对油的降解效果明显优于固定化单菌株, 而且都优于游离菌; 单金玉^[18]发现2株假单胞菌 K80-A、K80-B 等比例混合作用原油时效果优于单菌株。研究菌株之间的关系和协同机制不仅有利于丰富协同代谢理论, 而且对于微生物降解污染物的实际应用具有指导作用。本研究发现一株微囊藻毒素降解菌的辅助菌, 经形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析将其鉴定为藤黄微球菌, 该菌株几乎不能降解微囊藻毒素, 但可以明显促进本实验室已分离到的微嗜酸寡养单胞菌对微囊藻毒素的

降解能力, 说明在降解微囊藻毒素的过程中两菌株之间存在正向协同效应, 关于两菌株之间的互作效应和机理还在进一步研究中。

目前关于混合菌降解微囊藻毒素的报道多集中于混合菌降解微囊藻毒素的能力的研究, 而混合菌中菌株的分离以及菌株之间的互作研究报道甚少。研究菌株组合对微囊藻毒素的降解, 使其组成稳定的微生物群落, 不仅可以提高高效降解菌对微囊藻毒素的去除效果, 而且可以保持高效降解菌的稳定性, 具有重要的理论和应用价值, 探索混合菌菌株之间的互作并筛选高效稳定的复合菌种或混合菌种很可能是将微生物降解微囊藻毒素真正应用于水体修复的突破口。

参考文献

- [1] 刘萍, 敖宗华, 汤晓智, 等. 蓝细菌毒素研究进展. 微生物学通报, 2002, 29(3): 85-89.
- [2] Ho L, Hoefel D, Saint CP, *et al.* Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Res*, 2007, 41(20): 4685-4695.
- [3] Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, *et al.* Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Eng J Med*, 1998, 338(13): 873-878.
- [4] Sorensen SP, Ponen Z, Aamand J. Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Applied and environmental microbiology*, 2002, 68(7): 3478-3485.
- [5] 饶正华, 林启美, 孙焱鑫, 等. 解钾菌与解磷菌及固氮菌的相互作用. 生态学杂志, 2002, 21(2): 71-73.
- [6] 管亚军, 梁凤来, 张心平, 等. 混合菌群对原油的降解作用. 南开大学学报(自然科学版), 2001, 34(4): 82-85.
- [7] Chapalamadugu S, Chaudhry R. Hydrolysis of carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl. *Applied and environmental microbiology*, 1991, 57(3): 744-750.
- [8] Jones GJ, Bourne DG, Robert L, *et al.* Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Natural Toxins*, 1994, 2(4): 228-235.
- [9] Park HD, Sasaki Y, Maruyama T, *et al.* Degradation of cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ Toxicol*, 2001, 16(4): 337-343.
- [10] 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. 中国环境科学, 1999, 19(2): 138-140.
- [11] 金丽娜, 张维昊, 郑利, 等. 滇池水环境中微囊藻毒素

- 的生物降解. 中国环境科学, 2002, **22**(2): 189-192.
- [12] Metcalf JS, Codd G. Microwave oven and boiling water-bath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **184**(2): 241-246.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 245-256.
- [14] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology*, 1991, **173**(22): 697-703.
- [15] 谢航, 邱宏瑞, 李中伟, 等. 多菌种微生物混合培养的条件及生长关系研究. 福州大学学报(自然科学版), 2007, **35**(2): 302-307.
- [16] 黄艳琴, 李志勇, 蒋群, 等. 细薄星芒海绵中活性菌筛选及混合菌协同效应. 微生物学通报, 2005, **32**(4): 5-10.
- [17] 张辉, 李培军, 王桂燕, 等. 固定化混合菌修复油污染地表水的研究. 环境工程学报, 2008, **2**(12): 1613-1617.
- [18] 单金玉, 贾莹, 刘健, 等. 两株假单胞菌对烃的作用及其协同效应. 微生物学通报, 2002, **29**(4): 55-58.

2010年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第三届生物资源与环境调控学术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	5-6月	120	安徽合肥	李峰 010-82109561
2	曲霉和曲霉病研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5月 15-16日	150	天津	刘伟 010-83573056
3	第八届中日病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	7月 4-7日	100	黑龙江哈尔滨	张凤民 0451-86669576 钟照华 0451-86685122
4	第八届全国微生物学青年学者学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	7月 21-24日	150	云南昆明	李文均 0871-5033335
5	第三届全国农业微生物研究及产业化研讨会	中国微生物学会农业专业委员会	8月	120	新疆阿拉尔	张利莉 agmicrob@mail.hzau.edu.cn
6	第二届微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8月	150	黑龙江大庆	阮志勇 13301101231
7	第十一届全国土壤微生物学术讨论会暨第四届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物专业委员会	9-10月	150	湖南长沙	李俊 010-68975891
8	合成生物学学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	9-10月	80	上海	朱春宝 021-62896804
9	2010年全国微生物毒素与创伤感染学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	9月 17-20日	250	重庆	梁华平 023-68757404
10	第11届中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	10月	150	四川成都	金城 010-64807425
11	病原进化与致病机制国际研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	10月 22-25日	150	江苏镇江	倪斌
12	第十三次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	10月	500	江苏南京	蒋建东 025-84395326
13	2010年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10月	500	安徽	王旭 010-64807200
14	首届全国芽胞杆菌研究及产业化研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	10月	140	湖北武汉	翁锦周 bacillus@mail.hzau.edu.cn
15	第三届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	11月	150	福建厦门	邵宗泽 micgeno@mail.hzau.edu.cn
16	第一届中国临床微生物学大会	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11月	500	贵州遵义	李宜霖 13976609892