

营养元素对微囊藻毒素好氧生物降解的影响

杨霞¹, 陈晓国¹, 钱辉跃², 肖邦定³

(1.武汉理工大学资环学院, 湖北 武汉 430070; 2.华中农业大学理学院, 湖北 武汉 430070; 3.中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:通过室内模拟实验,研究了在好氧条件下 MCLR 在太湖沉积物-水体系中的生物降解过程,着重探讨了外加碳源、不同形态的氮源和磷源对该过程的影响。结果表明,在好氧条件下沉积物中 MCLR 经过 8 d 明显的迟滞期,于第 16 d 降解到检测限以下,说明太湖沉积物中的土著微生物具有降解 MCLR 的能力。外加氨氮、硝氮和碳源对 MCLR 的降解速率均没有显著影响($P \geq 0.05$),而外加溶解性磷源可显著促进 MCLR 的降解($P < 0.01$),说明在天然水体沉积物中,磷可能是 MCLR 好氧降解过程的限制性营养元素。这一结果对于正确评价水体中 MC 的微生物降解能力以及准确预测 MC 的浓度变化趋势具有指导意义。

关键词:微囊藻毒素;生物降解;营养元素

中图分类号:X524 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)11-2385-04

Effects of Nutrient Elements on the Biodegradation of Microcystin Under Aerobic Conditions

YANG Xia¹, CHEN Xiao-guo¹, QIAN Hui-yue², XIAO Bang-ding³

(1.College of Resources and Environmental Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2.College of Science, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 3.Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The aerobic biodegradation process of microcystin LR (MCLR) in the sediment-water system was investigated through a series of well-controlled microcosm experiments using sediments from Taihu Lake as inocula. The effects of the additions of nutrient elements (carbon, nitrogen and phosphorus) on the degradation process were assessed. The results showed that MCLR was degraded to below the detection limit at the 16th day with a lag period of 8 days, indicating that indigenous microorganisms in the sediment of Taihu Lake were capable of degrading microcystin under aerobic conditions. The addition of glucose or nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_3\text{-N}$) had no obvious effect on the biodegradation of MCLR ($P \geq 0.05$), whereas the addition of phosphorus could significantly promote the biodegradation of MCLR ($P < 0.01$). These results suggest that phosphorus might be the limited nutrient for aerobic biodegradation of MCLR in natural sediment. These findings are helpful for evaluating the biodegradability of MC and predicting the tendency of MC pollution in eutrophic water bodies.

Keywords: microcystin; biodegradation; nutrient elements

微囊藻毒素(Microcystin, MC)是一类由水华蓝藻产生的环状七肽物质,具有肝毒性。流行病学研究表明,饮用水中 MC 的浓度与原发性肝癌的发病率有关^[1],因此,富营养化水体中出现的 MC 对人类的健康具有潜在的威胁。

太湖作为一个重要的饮水水源,近年来频繁爆发水华,水体中已检测到高浓度的 MC^[2],因而对居民的饮用水安全构成了严重的威胁。掌握太湖水体中 MC

的迁移转化规律,对于正确认识和预测 MC 的污染状况,避免对人类健康造成直接危害具有重要意义。

微生物降解过程被认为是水体中 MC 归趋的主要途径之一^[3]。尽管许多水体中的土著微生物都具有降解 MC 的能力,但是不同水体中 MC 的降解速率差别很大^[3-5]。已有的研究表明,水体的水华暴发史和菌群的结构是影响水体中 MC 降解速率的重要因素^[3,6],而氮和碳两种营养元素对 MC 降解速率的影响尚存争议^[3,7-8],磷对 MC 降解的影响还未见报道。

本文通过室内模拟实验,分别研究了碳、氮和磷 3 种外加营养元素对太湖沉积物中 MCLR (Microcystin LR) 好氧微生物降解过程的影响,旨在揭示 3 种元素对水体中 MCLR 降解速率影响的规律,从而

收稿日期:2009-05-04

基金项目:国家自然科学基金项目(20607016)

作者简介:杨霞(1983—),女,在读硕士,主要从事水处理方面的研究。E-mail: yangxia1102@163.com

通讯作者:陈晓国 E-mail: xiaoguo_chen@tom.com

为水体 MC 污染的正确评价和预警提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

MCLR 标准品购自 SIGMA 公司。降解实验用 MCLR 按文献[9]报道的方法从实验室培养的藻类中提取纯化获得, HPLC 法测得纯度达 90% 以上, 于 4℃ 冰箱中保存待用。甲醇 (TEDIA) 和三氟乙酸 (TEDIA) 均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

Agilent 1100 型高效液相色谱仪; YXQ-LS-50SI 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SW-CJ-1D 型单人净化工作台 (苏州净化设备有限公司); HZQ-F-160A 型高低温恒温振荡培养箱 (上海一恒科技有限公司); TGL-16 台式高速离心机 (江苏省金坛市医疗仪器厂); Sartorius 电子天平。

1.2 沉积物

实验所用的沉积物样品于 2004 年 10 月用拜克曼采泥器采自太湖沉积物表层, 经风干、研磨、过筛 (120 目)、混匀, 置于 4℃ 冰箱中密封避光保存。采用重铬酸钾容量法-稀释热法测定沉积物中的总有机质 (TOC), 采用凯氏消煮半微量滴定法测定总氮 (TN), 采用 NaOH 碱熔钼蓝比色法测定总磷 (TP) 和可溶性总磷 (DTP)。

1.3 MCLR 的测定

采用 HPLC 法测定样品中 MCLR 的浓度, 流动相为 0.01% TFA: MeOH=40:60 (V/V), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 色谱柱为 ZORBAX-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测温度 25℃, 检测波长 238 nm, 进样量 10 μL, 依据保留时间定性, 外标法定量。

1.4 MCLR 的好氧生物降解实验

向 100 mL 的锥形瓶中加入 40 mL MCLR 浓度为 5 mg·L⁻¹ 的无菌水, 接种 0.8 g 太湖沉积物, 置于 25℃ 恒温箱中避光振荡 (120 r·min⁻¹) 培养。定期取样, 样品置于 -20℃ 冰箱中冷冻保存待测。通过向体系中添加叠氮化钠 (0.2 g) 进行灭菌对照实验。

通过向上述 MCLR 水溶液中分别添加 10 g·L⁻¹ 葡萄糖、100 mg·L⁻¹ NaNO₃、100 mg·L⁻¹ NH₄Cl 或 100 mg·L⁻¹ K₂HPO₄, 研究外加营养源对 MCLR 降解速率的影响。为了解 MCLR 降解过程中体系 pH 随时间的变化情况, 用精密 pH 试纸对样品 pH 进行测定。以上所有实验设置 2 个平行。

1.5 数据分析

使用 SPSS16.0 统计软件对实验结果进行重复测

量方差分析, 检验对照组与实验组中 MCLR 降解的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 好氧条件下 MCLR 的降解

MCLR 在沉积物中的好氧降解情况如图 1 所示。加叠氮化钠的灭菌组 MCLR 在 18 d 的实验过程中浓度波动低于 10%, 说明实验期间非生物因素对 MCLR 浓度的影响可以忽略。未加叠氮化钠的对照组 MCLR 经过 8 d 的迟滞期, 于第 16 d 降解到检测限以下。这一结果表明, 太湖沉积物中的微生物对 MCLR 具有一定的降解能力, 尽管降解速率远小于滇池沉积物中 MC 的降解速率^[10-11], 也小于其他水体中 MC 的降解速率^[12]。水华历史和 MC 暴露频率可能是导致不同水体中 MC 微生物降解速率差异的一个重要因素^[3]。与滇池相比, 太湖水华历史较短, 所以微生物接触 MC 的时间较短, 这可能是导致微生物降解 MC 能力较弱的原因之一。另外, 实验所用太湖沉积物样品中 TOC、TN、TP 和 DTP 的含量分别为 20.9、0.407、0.134 和 0.012 2 g·kg⁻¹, 而滇池沉积物中其含量分别为 171、6.04、1.58 和 0.020 4 g·kg⁻¹ (内部数据)。太湖沉积物中这些营养元素的含量均偏低。部分营养元素的缺乏可能会限制土著微生物的生长, 从而导致降解 MCLR 的能力相对较弱。

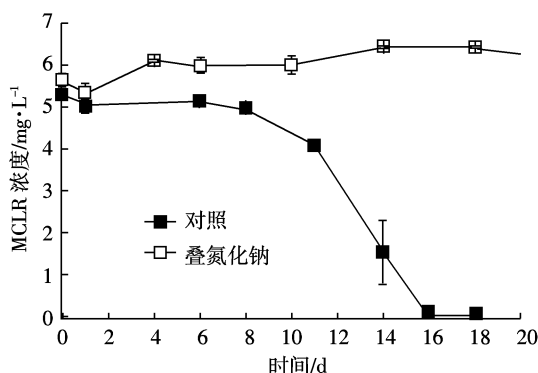


图 1 MCLR 的好氧微生物降解

Figure 1 Aerobic biodegradation of microcystin-LR

Chen^[2]等对太湖沉积物中 MC 的降解情况进行了研究, 所得速率也远大于本文的速率。这一方面可能与采样时间和样品的处理过程有关, 另一方面也与文献中沉积物的接种量较大有关。

2.2 外加营养源对 MCLR 降解的影响

2.2.1 外加碳源对 MCLR 降解的影响

由图 2 可见, 与对照组相比, 添加葡萄糖 (10 g·

L^{-1})实验组中MCLR的降解迟滞期从8 d缩短至2 d,而完全降解时间则从16 d延长至18 d。方差分析表明,两种条件下MCLR的降解曲线没有显著差异($P \geq 0.05$),说明外加碳源对沉积物中MCLR的好氧降解没有显著影响。然而,周洁^[13]等发现,外加葡萄糖对培养基中MCLR的降解具有明显的抑制作用。这是由于葡萄糖在代谢过程中产生酸性物质积累,而培养基对pH的缓冲能力有限,使得体系的pH降低(由初始7降到3.5),从而抑制了降解菌的活性^[13]。本实验体系中由于沉积物具有较强的pH缓冲能力,加入葡萄糖后体系的pH并没有显著变化,始终维持在7左右,所以不会对MCLR的降解速率产生影响。由此可见,碳源对MC生物降解的影响会因存在介质的差异而有所不同。另外,碳源对MC降解速率的影响还会随着接种类型(纯培养、富集液或菌悬液)、菌种、培养温度等的不同而不同^[3,8]。

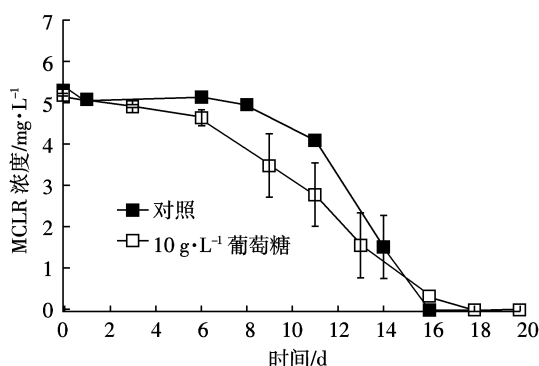


图2 添加葡萄糖对MCLR好氧降解的影响

Figure 2 Effect of glucose addition on aerobic MCLR biodegradation

与其他富营养化水体(如滇池)相比,太湖沉积物中总有机质的浓度较低,然而增加碳源对MCLR的降解仍然没有显著影响,说明碳源浓度不是导致太湖沉积物样品中MCLR降解速率低的主要因素。

2.2.2 外加氮源对MCLR降解的影响

图3是在好氧条件下,添加硝酸钠($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和氯化铵($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对MCLR降解速率的影响。由图3可见,3种条件下,MCLR的降解均存在6~8 d的迟滞期,并且MCLR在16 d内全部降解到检测限以下。方差分析表明,三者之间MCLR的降解速率没有显著差异($P \geq 0.05$),说明两种形态的外加氮源均对MCLR的降解没有显著影响。这一结果与MCLR在缺氧条件下的降解不同。Holst等^[3]的研究结果表明,在缺氧条件下, NO_3^- 可以显著促进MCLR的降解,并且

认为这是由于MCLR的降解过程与反硝化过程相耦合,外加 NO_3^- 为MCLR的降解提供了电子受体^[3]。

太湖沉积物样品中TN的浓度相对较低,而外加氮源并未对MCLR的降解有明显的影响,说明氮的浓度也不是影响太湖沉积物中MCLR降解速率的主要因素。

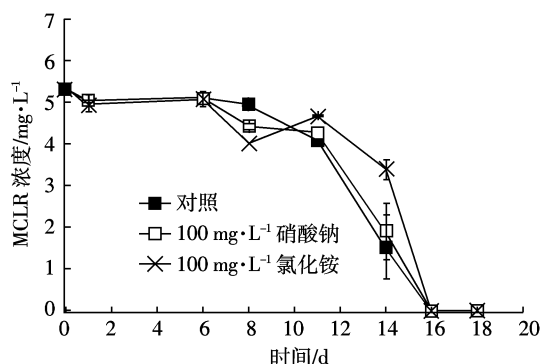


图3 外加氮源对MCLR好氧降解的影响

Figure 3 Effect of nitrogen addition on aerobic MCLR biodegradation

2.2.3 外加磷源对MCLR降解的影响

图4是在好氧条件下,向反应体系中添加磷酸氢二钾($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)后,MCLR的浓度随时间的变化情况。从中可见,与对照组相比,添加磷源实验组中MCLR的降解迟滞期从8 d缩短至1 d,完全降解时间从16 d缩短至6 d,说明磷酸盐对MCLR的降解有明显的促进作用($P < 0.01$)。磷的这种促进作用可能是通过提高降解菌的活性实现的。由于好氧菌对磷的需求量较大,磷源的加入可以增强MCLR好氧降解菌的活性,从而促进MCLR的降解。

与其他富营养化水体沉积物相比(如滇池),太湖沉积物样品中TP和DTP浓度较低。外加磷源对太湖

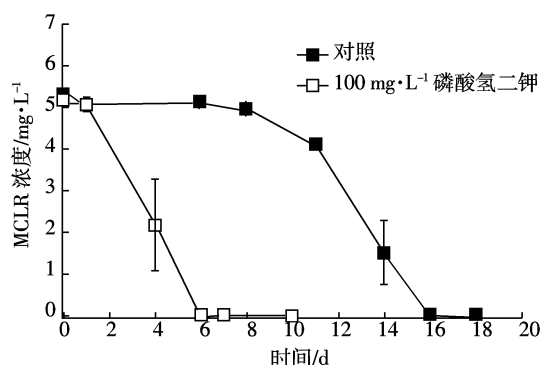


图4 外加磷源对MCLR好氧降解的影响

Figure 4 Effect of phosphorus addition on aerobic MCLR biodegradation

沉积物中 MC 的降解具有显著的促进作用,说明磷浓度较低可能是造成太湖沉积物样品中 MCLR 降解速率低的主要因素。

目前,关于氮和碳两种营养元素对 MC 微生物降解的影响已有报道,但实验多是在培养基中进行^[8,13]。与在培养基中接种降解菌纯培养或菌悬液相比,利用水体沉积物接种来研究 MC 的微生物降解,能够更好地模拟 MC 在沉积物中的转化过程。本研究结果表明,营养元素对沉积物中 MC 降解的影响有别于培养基中的降解,在沉积物中,碳和氮对 MC 的降解并没有显著的影响。

磷对 MC 微生物降解的影响至今未见报道。本研究结果表明,磷可以显著促进太湖沉积物样品中 MC 的降解,说明磷在 MC 的好氧降解过程中具有重要作用。由此可见,碳、氮和磷 3 种营养元素中,磷是限制太湖水体沉积物样品中 MCLR 好氧降解过程的主要因素。

由于水体中可利用态磷的浓度通常不高,如果磷对 MC 好氧降解过程的这种影响具有普遍性的话,它很可能会成为水体中 MC 好氧降解的限制性因素。这一发现对于全面认识 MC 在环境中的迁移转化过程,正确评价水体中 MC 的微生物降解能力,从而准确预测其浓度变化趋势具有指导作用。

3 结论

(1)太湖沉积物中的土著微生物对 MCLR 具有一定的降解能力,但降解速率较滇池沉积物中的低。

(2)外加碳源、氮源对太湖沉积物中 MCLR 的降解速率没有显著影响($P \geq 0.05$)。

(3)外加水溶态磷可以显著促进 MCLR 的降解,说明磷是限制太湖沉积物样品中 MCLR 降解速率的主要因素。

参考文献:

[1] 俞顺章,赵宁,资小林,等. 饮水中微囊藻毒素与我国原发性肝癌关系的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(2): 96-99.
YU Shun-zhang, ZHAO Ning, ZI Xiao-lin, et al. The relationship between cyanotoxin (Microcystin, MC) in pond ditch water and primary liver cancer in China[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2001, 23(2): 96-99.

[2] Chen W, Song L, Peng L, et al. Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: Water and sediment-interface contributions[J]. *Water Res*, 2008, 42(3): 763-773.
[3] Holst T, Jorgensen N O G, Jorgensen C, et al. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions[J]. *Water Res*, 2003, 37(19): 4748-4760.
[4] Hyenstrand P, Rohrlack T, Beattie K A, et al. Laboratory studies of dissolved radiolabelled microcystin-Lr in lake water[J]. *Water Res*, 2003, 37(14): 3299-3306.
[5] Edwards C, Graham D, Fowler N, et al. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(8): 1315-1321.
[6] Maruyama T, Kato K, Park H. Population dynamics of free-living bacteria related to the microcystin-degrading strain y2 in lake suwa and in microcystin amended enrichments[J]. *Microbes Environ*, 2004, 19(2): 137-146.
[7] 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.
[8] Surono I S, Collado M C, Salminen S, et al. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active lactobacillus plantarum from dadih in removing microcystin-Lr[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(2): 502-507.
[9] Chen X-g, Zhang S-h, Zhang Y, et al. Purification of microcystin-Lr by solid-phase extraction procedure[C]. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE 2009). IEEE, Beijing, 2009.
[10] 金丽娜,张维昊,郑利,等. 滇池水环境中微囊藻毒素的生物降解[J]. 中国环境科学, 2002, 22(2): 189-192.
JIN Li-na, ZHANG Wei-hao, ZHENG Li, et al. Biodegradation of microcystin in Dianchi Lake aquatic environment[J]. *China Environmental Science*, 2002, 22(2): 189-192.
[11] 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.
YAN Hai, DENG Yi-min, ZOU Hua, et al. Isolation and activity of bacteria for the biodegradation of microcystins[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(6): 49-53.
[12] Christoffersen K, Lyck S, Winding A. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins[J]. *Aquat Microb Ecol*, 2002, 27(2): 125-136.
[13] 周洁,何宏胜,闫海,等. 滇池底泥微生物菌群对微囊藻毒素的生物降解[J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(4): 30-34.
ZHOU Jie, HE Hong-sheng, YAN Hai, et al. Biodegradation of microcystins by bacterial community enriched from the sediment of Dianchi Lake[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2006, 7(4): 30-34.