

研究报告



碳、氮、磷源生态因子对新鞘氨醇杆菌降解微囊藻毒素的影响及分子机理

李瑶^{1,2} 左平^{*1,2} 周进³

1 南京大学地理与海洋科学学院 江苏 南京 210023

2 南京大学海岸与海岛开发教育部重点实验室 江苏 南京 210023

3 清华大学深圳国际研究生院海洋科学与技术学部 广东 深圳 518055

摘要:【背景】微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是蓝藻暴发后产生的主要有害物质之一,在河口、湖泊和近海水体中均存在。【目的】研究水体营养物质浓度对新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium* sp. ERN07)降解能力的影响,以求达到快速降解 MCs 的目的。【方法】通过正交实验、基因转录分析等方法鉴定菌株降解特性,了解生物降解和功能基因的表达关系,认识其降解机理。【结果】菌株去除 MCs 的能力受水体中碳、氮和磷源浓度的影响,由碳、氮源组成的双营养物质对生物降解抑制作用比单源弱;与标准 MSM 培养基相比,添加碳源、氮源和减少磷源会抑制生物降解 MCs,表现为降解基因表达下调。不同营养条件下, *mlr* 在转录水平上的基因表达不同,从而产生不同的降解效果。【结论】*Novosphingobium* sp. ERN07 具有较高的 MCs 降解能力,在水华发生之前能有效去除水环境中碳源和氮源,可以应用于治理受 MCs 污染的水体。

关键词: 生物降解, 微囊藻毒素, 营养物质, *mlr* 基因簇, qPCR

Effect of C, N, P elements on *Novosphingobium* sp. ERN07 degradation of microcystinsLI Yao^{1,2} ZUO Ping^{*1,2} ZHOU Jin³

1 School of Geography and Ocean Science, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210023, China

2 Key Laboratory of Coast and Island Development, Ministry of Education, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210023, China

3 Division of Ocean Science and Technology, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: [Background] Microcystins (MCs), one of the main harmful substances produced by cyanobacterial bloom, are found in estuaries, lakes and coastal waters. [Objective] Under different

Foundation items: Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA23040202); Marine Science and Technology Innovation Project of Jiangsu Provincial Department of Natural Resources (HY2018-2)

***Corresponding author:** E-mail: zuoping@nju.edu.cn

Received: 03-06-2020; **Accepted:** 07-08-2020; **Published online:** 06-10-2020

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A类)资助(XDA23040202); 江苏省自然资源厅海洋科技创新项目(HY2018-2)

***通信作者:** E-mail: zuoping@nju.edu.cn

收稿日期: 2020-06-03; **接受日期:** 2020-08-07; **网络首发日期:** 2020-10-06

concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus sources, the paper analysed the ability of *Novosphingobium* sp. ERN07 to remove MCs so as to achieve rapid degradation of MCs. **[Methods]** The degradation characteristics were determined by orthogonal experiments and gene transcription analysis associated biodegradation with the expression of functional genes so as to understand the degradation mechanism. **[Results]** The dual nutrients composed of glucose and sodium nitrate had weaker inhibition of biodegradation than single glucose or sodium nitrate. Compared to those under standard MSM medium, the decelerated biodegradation with glucose or sodium nitrate (1 000 mg/L) or phosphorus source (500 mg/L) related to lower up-regulation in *mlr* gene expression, suggesting that divergent *mlr* gene expression was one of the reasons influencing various nutrient conditions on degradation. **[Conclusion]** *Novosphingobium* sp. ERN07 has a high degradation ability of MCs. Before the bloom, carbon and nitrogen sources were removed effectively so that it can be effectively used in MCs polluted water treatment.

Keywords: biodegradation, microcystins, nutrients, *mlr* gene cluster, qPCR

有 30 多亿年历史的蓝藻(又称蓝细菌, *Cynobacteria*), 在淡水、海水、土壤等广泛分布, 甚至在极端环境中也能生存。蓝藻在水体中大量死亡会形成有害蓝藻水华(Harmful Cyanobacterial Blooms, HCBs), 蓝藻水华在全球出现并暴发的强度和频率在近几十年均有增加, 严重威胁到周边区域的社会、生态与经济发展^[1-2]。蓝藻水华在我国湖泊水体中的暴发广受关注, 但需要注意的是, 其在海水环境中同样会引起严重危害^[3-5]。因此, 有关其降解机理研究具有广泛的普适性。微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是 HCBs 产生的次级代谢产物, 也是分布最广的氰毒素^[6-7]。藻细胞内的 MCs 通过自然衰老或细胞裂解被释放到水体中^[8], MCs 通过抑制真核细胞中的蛋白磷酸酶和氧化应激, 严重毒害多种动植物、生态系统及人类的健康^[9-13]。我国海域近年来蓝藻水华灾害有上升趋势^[14], 如何去除 MCs 成了海域水体即将面临的一个严重问题。当前, MCs 的毒性及其对环境和社会经济的负面影响很大, 为了消除饮用水中的 MCs, 科学界提出了氯化、臭氧化、光催化和电解等物理化学方法^[15-17]。但其在有害副产物的形成、低效率和高运营成本方面都有一定的局限性^[18]。因此, 生物降解作为一种环境友好、经济有效的 MCs 去除方法, 越来越受到人们的重视^[19-20], 并认为是一种主要的技术手段^[21]。

鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium*)是一类革兰

氏阴性非发酵杆状细菌, 广泛分布于各种复杂的环境, 多为严格好氧型或兼性厌氧型, 代谢类型复杂多样, 适应能力极强, 其在盐度为 0.5% 以下的河口区均可存活^[22]。自多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)和嗜温鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium thalpophilum*)被发现具有石油降解能力, 该菌属即受到广泛关注^[23-24]。在蓝藻水华暴发过程中, 大量的营养物质氮、磷等元素会随着 MCs 的释放进入自然水体^[25-26]。MCs 在不同的营养基质存在下可以自然生物降解, 因此, 在不同的营养条件下对 MCs 生物降解动力学的差异进行评价显得尤为重要^[27]。但营养基质对 MCs 生物降解的影响机制尚未被完全了解^[28]; 氮和碳 2 种营养元素对 MCs 降解速率的影响尚存争议^[29-31]。截至目前, 只有少数研究涉及受磷影响的 MCs 生物降解, 应该对不同氮磷比下的 MCs 生物降解进行更多的研究^[32]。蓝藻水华中筛选驯化得到的新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium*)对 MCs 降解效果良好^[33], MCs 降解途径主要是由 *mlr* 基因簇(*mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD*)参与的, *mlr* 基因簇是微囊藻毒素降解菌有效利用 MCs 的特异性基因^[34-35]。本文研究碳、氮和磷营养元素对 MCs 好氧微生物降解过程的影响, 以期揭示各营养元素对水体中 MCs 降解速率影响的规律, 从而为河口、湖泊及近岸水体 MCs 污染治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

实验对象为实验室保存的从蓝藻水华中筛选驯化得到的菌株 *Novosphingobium* sp. ERN07。

1.1.2 主要试剂和仪器

无水葡萄糖、硝酸钠、无水乙醇, 西陇化工股份有限公司; 标准品 MC-RR (分子式: $C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$; 分子量: 1 038.2)、MC-LR (分子式: $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$; 分子量: 995.2), 纯度 $\geq 95\%$ HPLC 纯化级, 用色谱级甲醇溶解, 配制成初始浓度 MC-RR 50 $\mu\text{g/L}$ 、MC-LR 50 $\mu\text{g/L}$ 的 MCs 混合液; EasyPure RNA Kit、*TransScript*TM All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal)试剂盒、*PerfectStart*TM Green qPCR SuperMix 试剂盒, 北京全式金生物有限公司。

高效液相色谱仪, 岛津公司; 三重四级杆串联质谱仪和实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystem 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 台式高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司。

1.1.3 培养基

MSM 无机盐培养基参照文献[18]配制, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2 多营养条件下 MCs 的生物降解

多营养因素的 ERN07 降解正交试验: 在 MSM 无机盐培养基中共设试验组 9 组, 空白 1 组, 每组 3 个平行(表 1)。30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养, 0、5、10、15 h 取样, 用 LC-MS/MS 检测 MCs 浓度。

1.3 单营养条件下 MCs 的生物降解

单营养因素的 ERN07 降解实验, 每组 3 个平

表 1 等水平正交试验表(L_93^3)

Table 1 Orthogonal experimental table (L_93^3)

Test No.	Phosphate (mg/L)	Sodium nitrate (mg/L)	Glucose (mg/L)
1	500	20	100
2	500	100	500
3	500	1 000	1 000
4	100	20	500
5	100	100	1 000
6	100	1 000	100
7	1 000	20	1 000
8	1 000	100	100
9	1 000	1 000	500

注: 磷酸盐含两种物质: KH_2PO_4 和 K_2HPO_4

Note: Phosphate contains two substances: KH_2PO_4 and K_2HPO_4

行。30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养, 0、5、10、15 h 取样, 用 LC-MS/MS 检测 MCs 浓度。

1.4 RNA 提取

15 h 收集整瓶反应液用 EasyPure RNA Kit 进行 RNA 提取实验。将提取的 RNA 置于 -80°C 保存备用。

1.5 反转录

反转录反应体系(20 μL): 总 RNA 15 μL , *TransScript* All-in-One SuperMix for qPCR 4 μL , gDNA Remover 1 μL 。

1.6 RT-qPCR

以反转录获得的 cDNA 在 ABI7300 Real-Time PCR System 进行实时荧光定量 PCR, 检测 ERN07 降解微囊藻毒素的 *mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD* 基因, 引物序列见表 2, 每组基因做 3 个平行重复, 取平均 C_t 值。使用 ERN07 16S rRNA 基因作为内参以减少误差。

表 2 引物序列

Table 2 Primers sequence

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
ERN07 <i>mlrA</i>	TGTGCTTCTATGTGTTGGCGATACTG	TGACAGCGGTAATAATGTTGAGGTGAG
ERN07 <i>mlrB</i>	GCAACGCTTGATACGACCACTCTC	GAGCAAGATCGCCAACAGTAGTCC
ERN07 <i>mlrC</i>	AGTGCGAGGCGGACCTTCTG	TGCGACAAGTGAGCGTGAAGATC
ERN07 <i>mlrD</i>	TGCTGGCTGCGACGGAAATG	GAATAGCCCAGGTCTTGCGTAAGG
ERN07 16S rRNA	CCCTCGTCCTTAGTTGCCATCATTC	CCACTGTCACCGCCATTGTAGC

1.7 数据分析

数据采集软件为 7500 System SDS Software Version 2.3。采用通用的相对定量数学模型 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, 评估基因相对表达结果。使用统计软件 SPSS 17.0 对所得数据进行方差分析和 t 检验, 并检验对照组与实验组中 MCs 降解的差异显著性。

$$\Delta C_t = C_t - C_{t16S \text{ rRNA}} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 实验组}} - \Delta C_{t \text{ 对照组}} \quad (2)$$

其中 C_t 是目的基因的阈值周期, $C_{t16S \text{ rRNA}}$ 是 16S rRNA 基因的阈值周期。

2 结果与分析

2.1 多营养条件下 MCs 的生物降解

在空白实验组中, 所有样品的初始 MCs 浓度均未见明显降低, 表明实验中 MCs 的减少可以归因于生物降解。由图 1、图 2 分析可知, MC-RR 实验组 1、2、5、6、7、9 以及 MC-LR 实验组 1、2、4、5、6、7 在 0–5 h 时降解变化不大, 降解率都小于 10%。10 h 内 MC-RR 实验组 1、6、7 和 MC-LR 实验组 1 降解变化仍小于 10%。15 h 内降解率高于 20% 的有 MC-RR 实验组 3、4、8、9 和 MC-LR 实验组 3、5、6、7、8、9。经计算, 实验组 3 ERN07 对 MC-RR 和 MC-LR 平均降解速率分别为 $1.78 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 和 $1.98 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 高于其他 MC-RR 实验组 $0.20\text{--}0.98 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 和 MC-LR 实验组

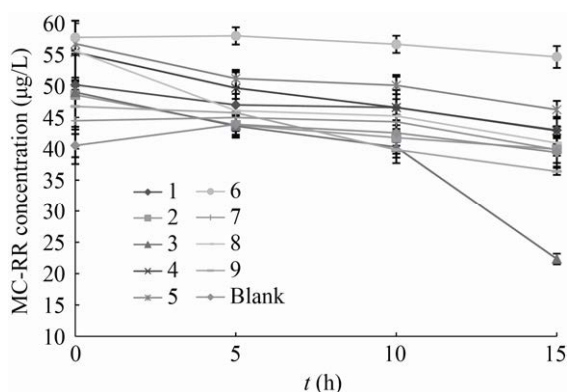


图 1 多营养条件对 ERN07 降解 MC-RR 的影响
Figure 1 Effects of multi-nutrients on MC-RR biodegradation

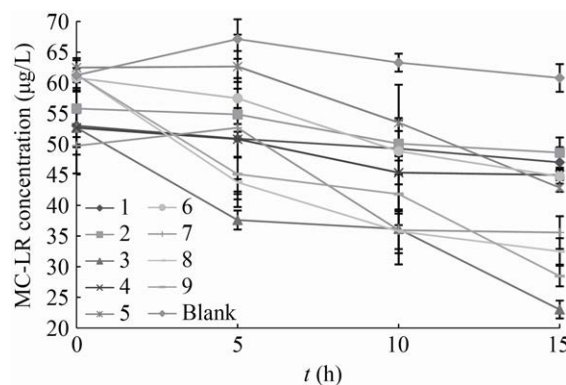


图 2 多营养条件对 ERN07 降解 MC-LR 的影响
Figure 2 Effects of multi-nutrients on MC-LR biodegradation

$1.40\text{--}1.92 \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 的平均降解速率水平。结合图 3 可明显看出, 实验组 3 (磷酸盐 $500 \text{ mg}/\text{L}$ 、硝酸钠 $1000 \text{ mg}/\text{L}$ 、葡萄糖 $1000 \text{ mg}/\text{L}$) 营养条件下菌株的降解效果最好, 在 15 h 内对 MC-RR 和 MC-LR 降解率分别为 54% 和 56%。

由表 3 正交试验分析可知, 在 95% 的置信水平下, 各因素(磷酸盐、硝酸钠、葡萄糖)对微藻毒素的生物降解均有影响。其中, 磷酸盐对 ERN07 降解微藻毒素影响最大, 其次是葡萄糖和硝酸钠。由表 4 和表 5 可知, 各因素对生物降解的影响在 0.01 的显著性水平上极显著 ($P < 0.01$), 并且各水平之间对 MCs 降解率影响差异显著 ($P < 0.05$)。课题组前期的基础降解实验已经获得在标准 MSM 条件下 ERN07 对 MCs 15 h 的降解率为 93% 的结

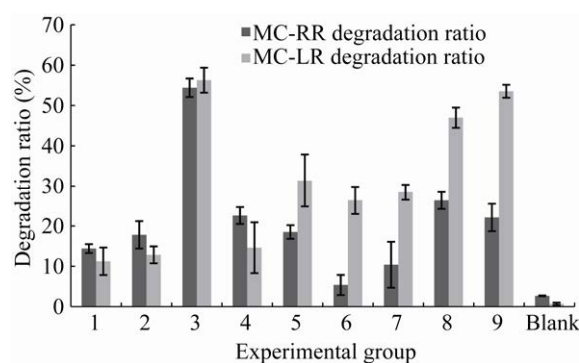


图 3 多营养条件下 ERN07 对 MCs 的降解率
Figure 3 ERN07 degradation ratio of MCs with multi-nutrients

表 3 正交试验直观分析结果

Table 3 The results of direct analysis of orthogonal experiment

Test No.	Phosphate (mg/L)	Sodium nitrate (mg/L)	Glucose (mg/L)	MC-RR degradation ratio (%)	MC-LR degradation ratio (%)
1	500	20	100	14.40	11.26
2	500	100	500	17.81	12.85
3	500	1 000	1 000	54.40	56.28
4	100	20	500	22.60	14.62
5	100	100	1 000	18.51	31.36
6	100	1 000	100	5.38	26.41
7	1 000	20	1 000	10.39	28.43
8	1 000	100	100	26.36	46.89
9	1 000	1 000	500	22.11	53.54
k_1	41.91	48.17	38.71		
k_2	46.77	46.22	48.43		
k_3	45.87	40.16	47.04		
R	14.86	8.01	8.12		

表 4 正交试验的方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment

Source	Sum of squares III	Degrees of freedom	Mean square	F	Significance
Phosphate	0.869	2	0.435	145.000	0.006 00
Sodium nitrate	0.459	2	0.229	76.333	0.003 43
Glucose	0.449	2	0.224	76.200	0.003 40
Error	5.228E-5	8	6.610E-6		
Total	0.007	25			
After revision	0.002	24			

表 5 各因素的边际均值表

Table 5 The marginal mean of each factor

Nutrient concentration (mg/L)	Mean value	Standard error	95% confidence interval	
			Lower limit	Upper limit
Phosphate	100	0.004	0.001	0.007
	500	0.006	0.001	0.009
	1 000	0.015	0.001	0.018
Sodium-nitrate	20	0.014	0.001	0.015
	100	0.016	0.001	0.018
	1 000	0.019	0.001	0.021
Glucose	100	0.014	0.001	0.016
	500	0.016	0.001	0.017
	1 000	0.018	0.001	0.019

果。因此，上述正交试验设计的条件全部抑制降解，而试验组 3 (磷酸盐 500 mg/L，硝酸钠 1 000 mg/L，葡萄糖 1 000 mg/L)的降解效果在正交试验组中最好，所以选择试验组 3 的各单因素条件进行后续实验。

2.2 单营养条件下 MCs 的生物降解

如图 4 所示，在标准 MSM 培养基(磷源浓度约为 4 500 mg/L，无其他碳源氮源)中菌株降解率很高，15 h 内对 MCs (50 μ g/L)的降解率为 93%，而营养物质的添加显著抑制降解($P<0.05$)，如添加葡萄糖(1 000 mg/L)的条件下，菌株对 MC-RR 和 MC-LR 的降解率分别为 6.1%和 25.9%；添加硝酸钠(1 000 mg/L)的条件下，菌株对 MC-RR 和 MC-LR 的降解率分别为 2.9%和 3.3%。降低磷源浓度(调节 MSM 培养基中磷酸盐浓度为 500 mg/L)显著抑制降解($P<0.05$)，菌株对 MC-RR 和 MC-LR 的降解率分别为 4.6%和 5.1%。

2.3 不同单营养条件下 ERN07 降解 MCs 的 *mlrA*、*mlrB*、*mlrC* 和 *mlrD* 基因表达

采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术，对 ERN07 在不同营养条件下 *mlrA*、*mlrB*、*mlrC* 和 *mlrD* 基因相对表达情况进行分析。结果如图 5 所示，MCs 诱导 ERN07 *mlr* 基因簇表达，而在各营养条件下 MCs 生物降解过程中 *mlrA*、*mlrB*、*mlrC* 和 *mlrD* 这 4 种基因相对表达量均降低，将标准 MSM 条件下各基因相对表达量视为 1，添加

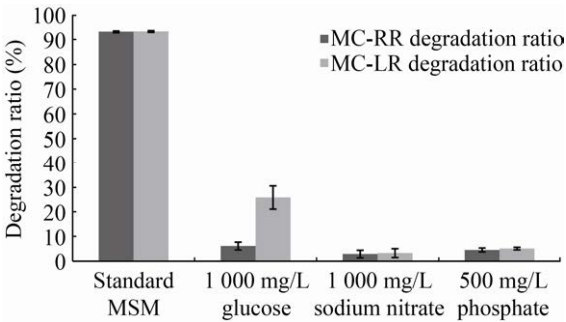


图 4 单营养条件下 ERN07 对 MCs 的降解率

Figure 4 ERN07 degradation ratio of MCs with single nutrient

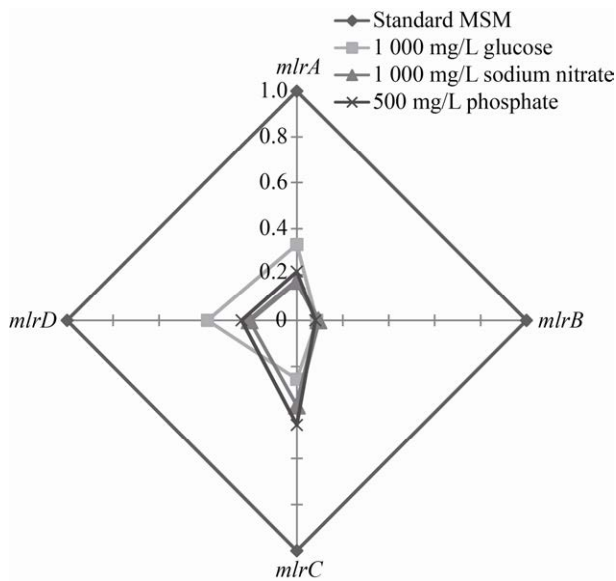


图5 单营养因素对ERN07 *mlr*降解基因簇转录水平的影响

Figure 5 Effects of different nutrient conditions on the transcription levels of ERN07 *mlr* degradation gene clusters

1 000 mg/L 葡萄糖的条件下, *mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD* 基因相对表达量分别下调 66.9%、91.3%、74.5%和 61.2%;添加 1 000 mg/L 硝酸钠的条件下, *mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD* 基因相对表达量分别下调 82.8%、90.6%、63.1%和 79.4%;500 mg/L 磷酸盐条件下, *mlrA*、*mlrB*、*mlrC*、*mlrD* 基因相对表达量分别下调 78.6%、91.9%、54.7%和 75.9%。*mlr* 基因簇对营养条件的扰动有不同的响应,其中 *mlrB* 的相对表达量极显著低于相同条件下 *mlrA*、*mlrC*、*mlrD* 的相对表达量($P<0.01$)。*mlrA*、*mlrD* 变化趋势大致相同($P>0.05$),均显著下调($P<0.05$)。

3 讨论与结论

本文研究了碳、氮、磷源生态因子对 *Novosphingobium* sp. ERN07 降解微囊藻毒素的影响,与标准 MSM 条件相比,随着磷酸盐浓度降低,降解速率减慢(图4)。磷是影响 MCs 微生物降解的重要因素^[36]。杨霞等^[37]发现在有磷酸钾的情

况下, *Novosphingobium* sp. THN1 作用 6 h 去除 MC-LR 的量为 $28.73\% \pm 9.70\%$,在所有条件中降解速度最快。外加可溶性磷源可显著促进沉积物表层微生物 MC-LR 的降解($P<0.01$),磷源促进降解的作用可能是代谢过程中产生了可以促进藻毒素降解酶分泌的物质,或 MCs 的降解产物与添加的磷源物质的代谢产物之间发生了协同作用或共代谢作用^[38]。Shimizu 等^[39]研究表明,耐碱性降解菌可在藻华发生和藻塌过程中,以及蓝藻光合作用引起的碱性条件下实现更有效的 MCs 生物修复。本实验测得附加磷源的初始 pH 被确定为弱碱性(7.6)。菌株在用磷源进行 MCs 生物降解时表现最好,表明该菌株具有耐碱性,在水华发生和崩塌过程中,利用生物 ERN07 消除 MCs 具有特别的指导意义。

与无碳源条件相比,葡萄糖的加入降低了生物降解速率(图4)。周洁等^[40]发现葡萄糖明显抑制 *Delftia acidovorans* 对 MC-RR 和 MC-LR 的生物降解,而杨霞等^[37]发现外加碳源对沉积物中 MC-LR 的好氧降解没有显著影响。此外,100 mg/L 葡萄糖条件下不同的生物降解可能与季节变化有关, Li 等^[41]发现秋季 100 mg/L 葡萄糖对活性膜中微生物降解没有影响,冬季 100 mg/L 葡萄糖对微生物降解 MC-LR 影响较弱^[42]。葡萄糖添加对于 MCs 降解的抑制作用可能是因为 MCs 降解酶易受分解代谢物(如葡萄糖)抑制^[29,32,43];其次,糖代谢产物(如有机酸)可以通过降低 pH 值和影响降解来降低细菌的生存能力^[31]。

与无氮源条件相比,硝酸钠的加入也降低了生物降解速率(图4)。以往的研究将 MC-LR 与硝酸盐的生物降解归结为厌氧去硝化与生物降解的结合^[25,32]。如果 MC-LR 降解菌利用硝氮作为最终电子受体, NO_3^- 的加入会促进 MCs 的降解过程^[32]。本研究结果表明, NO_3^- 的加入会抑制降解,说明本实验过程中 MCs 降解菌未利用 NO_3^- 作为最终电子受体,因此 MCs 的降解过程与反硝化过程未发

生耦合。降解受抑制的原因可能是由于添加硝酸盐造成的氧化还原电位的增加^[43]。此外,硝酸盐对 MCs 生物降解的影响还具有硝酸盐浓度依赖性和接种依赖性^[44]。

葡萄糖和硝酸钠作为碳源和氮源,对生物降解抑制作用的影响机制可能相似,如果培养基中含有其他氮/碳源,微生物会优先利用容易利用的含氮/碳化合物,为其快速发育繁殖提供必要的能量和物质,从而延迟降解菌对 MCs 的降解;当含氮/碳化合物快要耗尽时,菌体数量也较为庞大,种间竞争激烈,于是藻毒素即作为碳、氮源来供给生物生长,但此时由于错过了细菌快速生长期时对 MCs 的快速降解利用,最终导致 MCs 的去除率降低^[45]。

对比以上单营养因素降解实验和正交试验组 3 的结果,试验组 3 对 MC-RR 和 MC-LR 的降解率分别为 54.4% 和 56.3%。试验组 3 在磷源浓度很低的条件下降解率仍然较高,这说明葡萄糖和硝酸钠组成的双重营养物质对 MCs 生物降解抑制作用弱于单源的葡萄糖或硝酸钠,这一结论与 Li 等^[32]的研究一致:一方面,NO₃⁻可以减少葡萄糖代谢过程中酸性物质的积累,因而不会显著影响 MCs 的生物降解;另一方面,葡萄糖可能会促进菌群对 NO₃⁻的吸收,从而减小 NO₃⁻对 MCs 生物降解的抑制作用^[36]。

成功的 MCs 生物修复不仅依赖于 MCs 降解菌群的变化,还依赖于 MCs 生物降解过程中 *mlr* 基因表达的动态变化^[28]。本研究将不同生态因子条件下的生物降解动力学与 *mlr* 基因簇的诱导率联系起来,结果显示,降解的 MCs 与 *mlr* 的诱导率呈正相关,与标准 MSM 相比,外加葡萄糖、硝酸钠以及降低磷酸盐浓度会在转录水平上负调控 *mlr* 基因簇表达,使得 MCs 的降解效率降低。Shimizu 等^[46]对 *mlrA* 基因的 RT-PCR 结果显示,MCs 的去除与 *mlrA* 基因拷贝数成正比。Jones 等^[47]假设对 MCs 生物降解的负调控可能涉及易于利用

的底物对微胱氨酸酶合成的抑制。Li 等^[42]认为葡萄糖能抑制 *mlrA* 基因丰度的增加,与浓度无关。本研究表明不同降解基因在相同营养条件下的响应存在差异,而 *mlrA* 和 *mlrD* 的表达趋势相似 ($P>0.05$), *mlrA* 和 *mlrD* 可能在不同条件下的生物降解过程中共同转录,与 Li 等^[42]研究结果一致。此外, Li 等^[38]发现与 *mlrA* 相比, *mlrD* 基因表达的调控与生物降解动力学的相关性更强,在降解中作用更重要。由于营养物质对 MCs 生物降解的影响机制研究不够,还需要考虑其他因素和观点进行深入研究,如微胱氨酸酶活性的动态变化。

较低的 *mlr* 基因簇诱导率与葡萄糖、硝酸钠的添加及低浓度的磷酸盐有关,考虑到添加碳、氮源营养物质的生物降解减慢,应该强调在水华发生之前有效去除水环境中的碳源和氮源。本研究为高效生物治理水体 MCs 污染提供理论依据,对 MCs 污染治理有一定的应用价值。

REFERENCES

- [1] Finni T, Kononen K, Olsonen R, Wallström K. The history of cyanobacterial blooms in the Baltic Sea[J]. *Ambio*, 2001, 30(4/5): 172-178
- [2] Paerl HW, Hall NS, Calandrino ES. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(10): 1739-1745
- [3] Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J, Niemelä SI. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 1990-1995
- [4] Edler L, Fernö S, Lind MG, Lundberg R, Nilsson PO. Mortality of dogs associated with a bloom of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea[J]. *Ophelia*, 1985, 24(2): 103-109
- [5] Persson PE, Sivonen K, Keto J, Kononen K, Niemi M, Viljamaan H. Potentially toxic blue-green algae (*Cyanobacteria*) in Finnish natural waters[J]. *Aquaculture Fennica*, 1984, 14(2): 147-154
- [6] Sugiura N, Kameyama K, Saito T, Utsumi M, Maekawa T. Spatial and temporal changes of microcystins concentration in eutrophicated lakes in Japan[J]. *Ecological Engineering*, 2002, 14: 11-18
- [7] Leigh C, Burford MA, Roberts DT, Udy JW. Predicting the

- vulnerability of reservoirs to poor water quality and cyanobacterial blooms[J]. *Water Research*, 2010, 44(15): 4487-4496
- [8] Ross C, Santiago-Vázquez L, Paul V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78(1): 66-73
- [9] Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(7): 663-668
- [10] Campos A, Vasconcelos V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(1): 268-287
- [11] McElhiney J, Lawton LA, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure[J]. *Toxicon*, 2001, 39(9): 1411-1420
- [12] Zhang X, Warming TP, Hu HY, Christoffersen KS. Life history responses of *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis aeruginosa* alone and mixed with a mixotrophic *Poterioochromonas* species[J]. *Water Research*, 2009, 43(20): 5053-5062
- [13] Codd GA. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance[J]. *Water Science and Technology*, 1995, 32(4): 149-156
- [14] Lin SJ, Ji NJ, Luo H. Recent progress in marine harmful algal bloom research[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(3): 495-510 (in Chinese)
林森杰, 姬南京, 罗昊. 海洋有害藻华研究进展[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 495-510
- [15] Lee DK, Kim SC, Cho IC, Kim SJ, Kim SW. Photocatalytic oxidation of microcystin-LR in a fluidized bed reactor having TiO₂-coated activated carbon[J]. *Separation and Purification Technology*, 2004, 34(1/3): 59-66
- [16] De La Cruz AA, Antoniou MG, Hiskia A, Pelaez M, Song WH, O'Shea KE, He XX, Dionysiou DD. Can we effectively degrade microcystins? -Implications on human health[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(1): 19-37
- [17] Tran N, Drogui P. Electrochemical removal of microcystin-LR from aqueous solution in the presence of natural organic pollutants[J]. *Journal of Environmental Management*, 2013, 114: 253-260
- [18] Gągala I, Mankiewicz-Boczek J. The natural degradation of microcystins (*Cyanobacterial hepatotoxins*) in fresh water-the future of modern treatment systems and water quality improvement[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2012, 21(5): 1125-1139
- [19] Wu YH, He JZ, Yang LZ. Evaluating adsorption and biodegradation mechanisms during the removal of microcystin-RR by periphyton[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(16): 6319-6324
- [20] Wu YH, Li TL, Yang LZ. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 10-18
- [21] Lemes G, Yunes J. Microcystins Biodegradation: A Review[M]. Germany: Lambert Academic Publishing, 2014: 106-112
- [22] Cai XH, Wang RY, Hu SN, Li Y, Zhou W. Research progress of *Sphingobacterium*[J]. *Journal of genomics and applied biology*, 2020(5): 2096-2102 (in Chinese)
蔡训辉, 王如意, 胡胜男, 李盈, 周玮. 鞘氨醇杆菌的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020(5): 2096-2102
- [23] Gao YC, Wang JN, Kong X, Chen GH, Qiu WZ, Chi JG. Optimization of the liquid fermentation condition of the petroleum degradation bacteria *Sphingobacterium multivorum*[J]. *Biotechnology*, 2009, 19(1): 74-77 (in Chinese)
高永超, 王加宁, 孔学, 陈贯虹, 邱维忠, 迟建国. 石油降解菌多食鞘氨醇杆菌的发酵条件优化[J]. *生物技术*, 2009, 19(1): 74-77
- [24] Duan SW, Liu ZC, Zheng K, Feng XY, Cheng LF, Zheng X. Petroleum degradation capacity of *Sphingobacterium bambusaue* and its UV-mutants[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2336-2341 (in Chinese)
段盛文, 刘正初, 郑科, 冯湘沅, 成莉凤, 郑霞. *Sphingobacterium bambusaue* 及其紫外诱变菌株的石油降解功能[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2336-2341
- [25] Chen XG, Yang X, Yang LL, Xiao BD, Wu XQ, Wang JT, Wan HG. An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments[J]. *Water Research*, 2010, 44(6): 1884-1892
- [26] Eleuterio L, Batista JR. Biodegradation studies and sequencing of microcystin-LR degrading bacteria isolated from a drinking water biofilter and a fresh water lake[J]. *Toxicon*, 2010, 55(8): 1434-1442
- [27] Dziga D, Sworzen M, Wladyka B, Wasylewski M. Genetically engineered bacteria immobilized in alginate as an option of cyanotoxins removal[J]. *International Journal of Environmental Science and Development*, 2013, 4(4): 360-364
- [28] Dziga D, Wasylewski M, Wladyka B, Nybom S, Meriluoto J. Microbial degradation of microcystins[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2013, 26(6): 841-852
- [29] Park HD, Sasaki Y, Maruyama T, Yanagisawa E, Hiraishi A, Kato K. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake[J]. *Environmental Toxicology*, 2001, 16(4): 337-343
- [30] Surono IS, Collado MC, Salminen S, Meriluoto J. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008,

- 46(2): 502-507
- [31] Holst T, Jørgensen NOG, Jørgensen C, Johansen A. Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions[J]. Water Research, 2003, 37(19): 4748-4760
- [32] Li JM, Li RH, Li J. Current research scenario for microcystins biodegradation-a review on fundamental knowledge, application prospects and challenges[J]. Science of the Total Environment, 2017, 595: 615-632
- [33] Jiang YG, Shao JH, Wu XQ, Xu Y, Li RH. Active and silent members in the *mlr* gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 322(2): 108-114
- [34] Ho L, Hoefel D, Saint CP, Newcombe G. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter[J]. Water Research, 2007, 41(20): 4685-4695
- [35] Somdee T. Biodegradation of cyanobacterial hepatotoxins [Dha⁷]MC-LR and MC-LR by natural aquatic bacteria[D]. Wellington, New Zealand: Doctoral Dissertation of Massey University, 2010
- [36] Hutchinson CE. LIKENS, G. E. [ED.]. 1972. Nutrients and eutrophication. Amer. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp. 1. 328 p. \$6.00, members; \$8.00, nonmembers[J]. Limnology and Oceanography, 1972, 17(6): 965-968
- [37] Yang X, Chen XG, Qian HY, Xiao BD. Effects of nutrient elements on the biodegradation of microcystin under aerobic conditions[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(11): 2385-2388 (in Chinese)
杨霞, 陈晓国, 钱辉跃, 肖邦定. 营养元素对微囊藻毒素好氧生物降解的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(11): 2385-2388
- [38] Li JM, Peng LJ, Li J, Qiao YH. Divergent responses of functional gene expression to various nutrient conditions during microcystin-LR biodegradation by *Novosphingobium* sp. THN1 strain[J]. Bioresource Technology, 2014, 156: 335-341
- [39] Shimizu K, Maseda H, Okano K, Itayama T, Kawauchi Y, Chen RZ, Utsumi M, Zhang ZY, Sugiura N. How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity[J]. Lakes & Reservoirs, 2011, 16(3): 169-178
- [40] Zhou J, Yan H, He HS, Zhong GR, Zhang C, Lin H. Activity of delftic acidovorans for the biodegradation of microcystins[J]. Science Technology and Engineering, 2006, 6(2): 166-170 (in Chinese)
周洁, 闫海, 何宏胜, 钟广蓉, 张超, 林海. 食酸戴尔福特菌 USTB04 生物降解微囊藻毒素的活性研究[J]. 科学技术与工程, 2006, 6(2): 166-170
- [41] Li JM, Shimizu K, Sakharkar MK, Utsumi M, Zhang ZY, Sugiura N. Comparative study for the effects of variable nutrient conditions on the biodegradation of microcystin-LR and concurrent dynamics in microcystin-degrading gene abundance[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(20): 9509-9517
- [42] Li JM, Shimizu K, Maseda H, Lu ZJ, Utsumi M, Zhang ZY, Sugiura N. Investigations into the biodegradation of microcystin-LR mediated by the biofilm in wintertime from a biological treatment facility in a drinking-water treatment plant[J]. Bioresource Technology, 2012, 106: 27-35
- [43] Valeria AM, Ricardo EJ, Stephan P, Alberto WD. Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba-Argentina)[J]. Biodegradation, 2006, 17(5): 447-455
- [44] Bao ZY, Wu Y. Biodegradation of microcystin-LR by an amino acid-degrading anaerobic bacterium[J]. Desalination and Water Treatment, 2016, 57(2): 870-880
- [45] Wu LH. Removal of microcystin by bacteria W2 and W4 and its biodegradation characteristics[D]. Shanghai: Master's Thesis of Fudan University, 2012 (in Chinese)
吴林豪. 藻毒素降解菌去除微囊藻毒素及其降解特性研究[D]. 上海: 复旦大学硕士学位论文, 2012
- [46] Shimizu K, Maseda H, Okano K, Kurashima T, Kawauchi Y, Xue Q, Utsumi M, Zhang ZY, Sugiura N. Enzymatic pathway for biodegrading microcystin LR in *Sphingopyxis* sp. C-1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 114(6): 630-634
- [47] Jones GJ, Orr PT. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay[J]. Water Research, 1994, 28(4): 871-876