

doi: 10.7541/2013.55

蓝藻水华堆积处理池中微囊藻毒素降解 细菌的分离及降解特性

赵爽^{1,2} 陈伟¹ 贾云璐^{1,2} 郑凌凌¹
左艳霞¹ 宋立荣¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 微囊藻毒素(Microcystins, MCs)近年来由于蓝藻水华在世界范围内频发而受到广泛关注。从太湖北部蓝藻水华堆积处理池中分离出一株微囊藻毒素降解细菌 SW1, 经 16S rDNA 序列分析鉴定为鞘氨醇单胞菌(*Sphingopyxis* sp.)。SW1 的生长最适 pH 为中性(pH 6—8), 但也能生长于 pH 10 条件下。SW1 对 MCs 的两种异构体 MC-LR 和 MC-RR 具有高降解活性, 并表现出一级反应动力学特征, 其降解速率常数分别为 0.35/h 和 0.28/h。温度和 pH 对 SW1 降解活性有很强影响: 在温度为 22—37℃, pH 中性或弱碱性条件下(MC-LR, pH 6—9; MC-RR, pH 7—8), SW1 具有高降解活性; 而在低温和强碱性条件下其降解活性受到强烈抑制。聚合酶链式反应(PCR)表明 SW1 及蓝藻水华堆积处理池均含有 *mlrA* 的同源基因, 表明处理池中存在 MCs 的生物降解。

关键词: 处理池; 微囊藻毒素; 生物降解; 鞘氨醇单胞菌; *mlrA* 基因

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0522-08

囊藻毒素(Microcystins, MCs)是一类由某些淡水蓝藻(如: 微囊藻)产生的环状七肽, 具有肝脏毒性效应。随着蓝藻水华在世界范围内频繁暴发, MCs 的环境归趋相关研究成为该领域的热点之一^[1, 2]。我国的太湖、滇池和巢湖, 每年都会发生不同程度的蓝藻水华。以太湖为例, 在水华严重暴发时期, 机械打捞蓝藻水华并集中堆积于处理池中, 是我国目前较为有效的高生物量蓝藻水华处理的应急措施之一^[3]。

生物降解被认为是 MCs 环境归趋的主要途径之一^[4]。针对 MCs 的生物降解, 目前国内外已开展了大量研究, 分离出多株 MCs 降解细菌, 并对其降解过程和机理作了较为深入的研究^[5]。也有研究主要集中在自然水体和水净化处理工艺及过程方面^[6, 7], 但在大量蓝藻水华收获处理的条件下, MCs 将如何归趋、生物降解能否起到主导作用等科学问题, 目前鲜有研究报道。本研究拟从太湖蓝藻水华堆积处

理池中分离 MCs 降解细菌并研究其降解特性, 从理论上揭示蓝藻水华生物量堆积处理条件下 MCs 的归趋机制, 为发展有毒蓝藻脱毒和资源化利用提供理论和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试剂和 MCs 提取

MC-LR 和 MC-RR 标准样品购自瑞士 Alexis 公司。实验用 MC-LR 和 MC-RR 从实验室培养的产毒微囊藻经提取纯化获得^[8, 9], 并经高效液相色谱(HPLC)检测其色谱纯度>90%, 实验前经 0.22 μm 无菌滤器过滤除菌。实验所用试剂除甲醇为色谱纯外, 其余均为分析纯。

1.2 MCs 测定

以高效液相色谱(HPLC, LC 10A, Shimadzu)测定 MCs, 条件为: 流动相 100%甲醇: 磷酸盐缓冲液

收稿日期: 2012-04-24; 修订日期: 2013-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(40971249); 国家水专项课题(2009ZX07106-001-002)资助

作者简介: 赵爽(1986—), 男, 重庆璧山人; 硕士研究生; 主要研究方向为蓝藻毒素控制。E-mail: shuangzhao.zs@gmail.com

通信作者: 宋立荣, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

(0.05 mol/L, pH 3.0)=58: 42 (v/v), 流速 1 mL/min, 色谱柱 Kromasil 100-5 C18(150 mm×4.6 mm), 进样体积 10 μ L, 紫外检测波长 238 nm。

1.3 MCs 降解细菌的分离

表层藻水混合物和底部沉积物采集于 2010 年 9 月太湖北部蓝藻水华堆积处理池, 梯度稀释后涂布于 R2A 培养基^[7], 28℃培养 3—5d, 随机挑取不同特征的单菌落于蛋白胨酵母膏液体培养基(PY 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母膏 5 g/L, pH 7.0)培养。取对数期生物量 4380 r/min 离心 5min, 去上清, 无菌水悬液洗涤 2 次, 以无菌磷酸钠盐缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.0)悬液并调 $A_{600}=0.5$, 分别加入 MC-LR 和 MC-R, 使其终浓度分别约 2 μ g/mL, 28℃避光 120 r/min 振荡培养。间隔 6h 取样, 11000 r/min 离心 10min 后, 取上清 HPLC 测定 MCs 浓度。

1.4 菌株的 16S rDNA 鉴定和 MCs 降解基因

分离得到 46 个细菌单菌落, 采用基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F-1492R^[10], 于 PCR 仪(MJ mini, BIO-RAD)中进行 PCR 反应, 反应条件: 95℃ 5min, 95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 90s, 32 个循环, 72℃ 10min, 产物纯化回收测序。

为研究菌株 SW1 的 MCs 降解基因 *mlrA* 的同源序列, 及环境样品中是否含有 *mlrA* 基因, 进行如下实验: 处理池表层藻水混合物样品和同期内太湖梅梁湾表层水, 经 0.2 μ m (GTTP, Millipore)过滤, 对滤膜和处理池藻泥沉积物提取总 DNA (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO)。MCs 降解基因 *mlrA* 的 PCR 引物和反应条件等参考 Bourne, *et al.*和 Saito, *et al.* 的研究^[11, 12]。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, EB 染色成像。另回收 SW1 的 PCR 产物并测序。

1.5 pH 对 SW1 生长的影响

在水华严重暴发时期及蓝藻水华堆积处理池中, 水体常呈碱性, 为研究 pH 对 SW1 生长的影响, 于 PY 培养基中预培养 SW1 至对数期, 接种于不同 pH 的培养基并考察 SW1 的增殖。以 0.1 mol/L PBS 配制 PY 培养基, 并以 0.1 mol/L 磷酸和 4 mol/L NaOH 调 pH, pH 梯度范围为 5.91—11.97。培养条件同降解实验, 间隔取样测定 A_{600} 值。

1.6 SW1 对 MCs 的降解

为考察温度和 pH 对 SW1 降解 MCs 的影响, 以 PBS(0.1 mol/L, pH 7.0)悬液 SW1 并调 $A_{600}=0.5$, 取 2

mL 该菌液于玻璃试管, 加入 MC-LR 或 MC-RR 使其终浓度为 1.8 μ g/mL。温度梯度为 4、15、22、28 和 37℃; pH 梯度范围为 5.91—7.86 (0.1 mol/L PBS), 7.93—10.02 (0.1 mol/L 硼酸钠盐)。避光 150 r/min 振荡培养(pH 实验时温度为 28℃), 每 6h 取样测定反应体系中 MCs 的变化。

根据上述实验结果并参考已有研究报道^[13, 14], 结合蓝藻水华堆积处理池现场数据, 设置温度 28℃、pH 7.0, 其他条件同上, 研究了 SW1 对 MCs 的降解动力学特征。

1.7 数据分析

采用 SPSS 14.0 统计分析和 Origin 8 软件。

2 结果

2.1 细菌鉴定

SW1 在 R2A 固体培养基中菌落呈圆形, 直径一般 <1 mm, 白色半透明有光泽。SW1 革兰氏染色呈阴性, 杆状。将 16S rDNA 基因序列提交至 GenBank 数据库 BLAST, 并以 MEGA5 软件采用邻位连接法 (Neighbor Joining, 1000 bootstrap replicates) 绘制系统发育树(图 1, 加下划线标注为目前已报道的 MCs 降解菌株), 结果表明该菌株可定属于 *Sphingopyxis* sp。

2.2 pH 对 SW1 生长的影响

对不同 pH 的增殖响应表明, SW1 对中性 and 弱碱性具有良好的适应性(图 2)。在 pH 6—9 的条件下培养 24h 后, 生物量增加了 10 倍以上; 在 pH 10—11 的强碱性条件下, SW1 则生长变缓甚至几乎不能生长。

2.3 温度和 pH 对 SW1 的 MCs 降解活性影响

SW1 在 28—37℃具有很强的降解活性, 能在 6h 内降解超过 80%的 MC-LR 和 70%的 MC-RR (图 3)。SW1 对 MC-LR 和 MC-RR 的降解最适温度约在 30℃, 在同一温度下对 MC-LR 的降解速率高于 MC-RR。在中性和弱碱性(pH 7—8)条件下, SW1 具有高的 MCs 降解活性, 能够在 6h 内降解 80%以上的 MC-LR 和 MC-RR(图 4); 在强碱性条件下活性显著下降, 在 pH 10 时, SW1 仅能降解大约 20%的 MC-LR 和 MC-RR。SW1 对 MC-RR 和 MC-LR 降解的 pH 响应是不同的。在 pH 6.5—9, SW1 对 MC-LR 的降解超过 80%, 而对 MC-RR 的最适 pH 范围是 7—8。

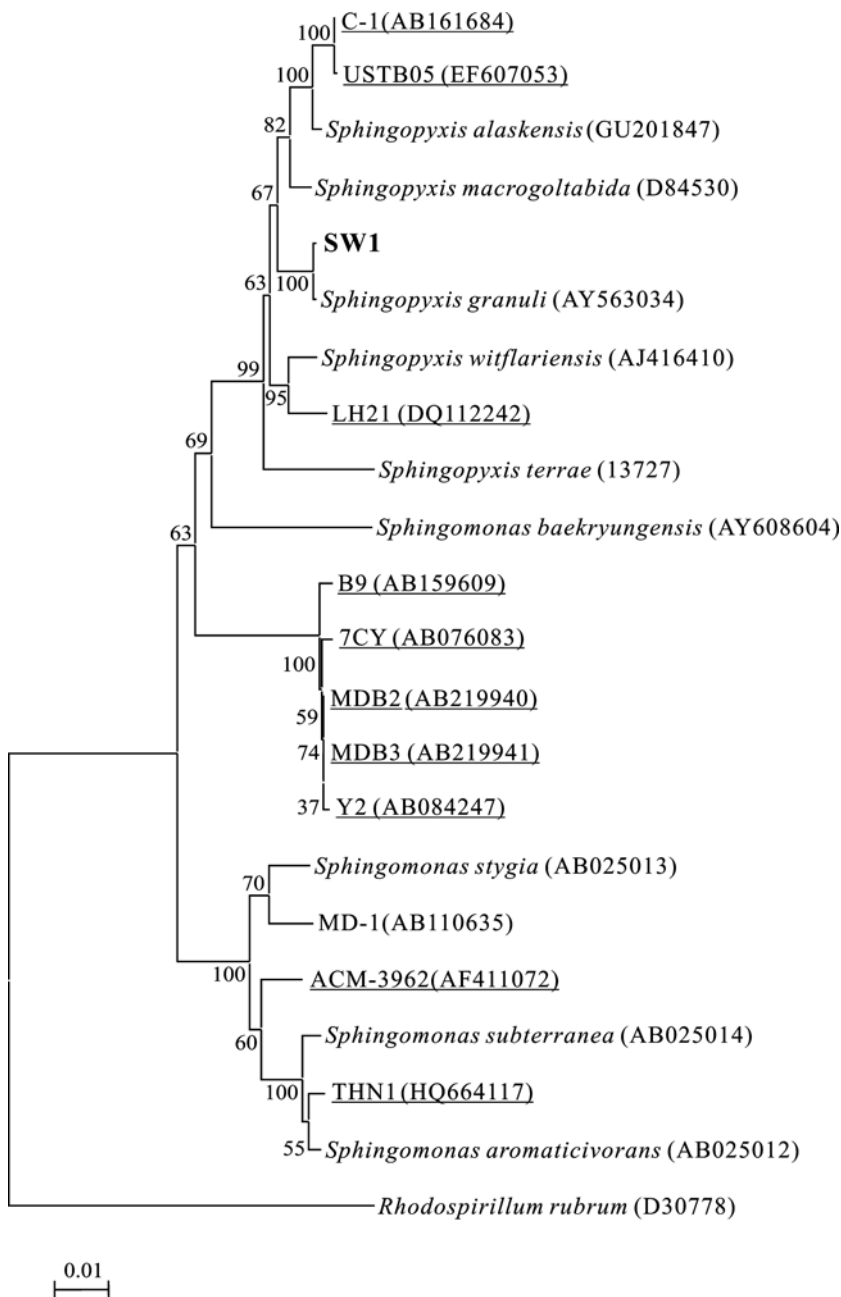


图 1 基于 16S rDNA 基因序列的 SW1 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of microcystin degrading bacterium SW1 based on 16S rDNA gene sequence

2.4 降解动力学

拟合降解动力学曲线表明(图 5), SW1 对 MC-LR 和 MC-RR 的降解具有一级反应的动力学特征, 其对 MC-LR 和 MC-RR 的降解速率方程、降解反应速率常数 k 、降解半衰期 $t_{1/2}$ 和相关系数 R^2 (表 1)。对 MC-LR 和 MC-RR 的降解速率常数分别为 0.35/h、0.28/h, 平均降解速率为分别为 0.20 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 、0.12 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ (MC-RR 初始浓度各为 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 初始细菌浓度 $A_{600}=0.5$)。

2.5 降解基因 *mlrA* 的鉴定

PCR 结果显示, 菌株 SW1、处理池表层藻水混合物和太湖北部表层水的 *mlrA* 基因 PCR 反应呈阳性(图 6), 表明 SW1 和蓝藻水华堆积处理池的细菌中含有 *mlrA* 的同源基因, 说明蓝藻水华堆积处理池中存在 MCs 的生物降解。SW1 和已报道的其他 MCs 降解菌的 *mlrA* 同源基因相似度很高(84%—99%, 表 2)。而堆积池沉积物中未检测出 *mlrA* 基因。

3 讨论

SW1 对 MC-LR 和 MC-RR 的降解具有一级反应动力学特征, 降解速率高于目前已报道的几株毒素降解细菌, 如: ACM-3692、7CY、LH21、EMS 和 THN1 等, 但小于 Y2、MD-1、B9、J10 和 C1 (表 3)。造成降解速率和降解反应速率常数不同的原因除了细菌菌株本身的特性, 还与 MCs 和细菌的初始浓度、培养条件有关, 前培养处理也是影响降解活性的要素^[13, 15, 21]。研究表明 SW1 对不同 MCs 的异构体降解速率不同, 对 MC-LR 降解速率高于 MC-RR (图 3、4), 这与 ACM-3692、J10 相似, 但不同于 MD-1、7CY, 其原因除了可能跟菌株自身特性(如 MCs 降解酶对相似底物不同的亲和力), 还与不同 MCs 异构体本身的性质(如相同 pH 下不同的带电性质)有关。然而, Park, *et al.* 的研究发现, MCs 降解细菌 Y2 在同一条件下对不同浓度的 MCs 异构体降解速率是变化的, 即高浓度的 MC-RR 降解速率高于 MC-LR, 低浓度则反之^[15]。而在自然水体中是否存在相似现象, 仍有待进一步研究。

温度是影响 SW1 降解活性的重要因素, 不同温度下 SW1 表现出不同的 MCs 降解活性, 其最适降解温度约在 30°C, 这与另一株 MCs 降解菌 LH21 相似^[7]。夏秋季节太湖的平均水温一般约在 26—32°C,

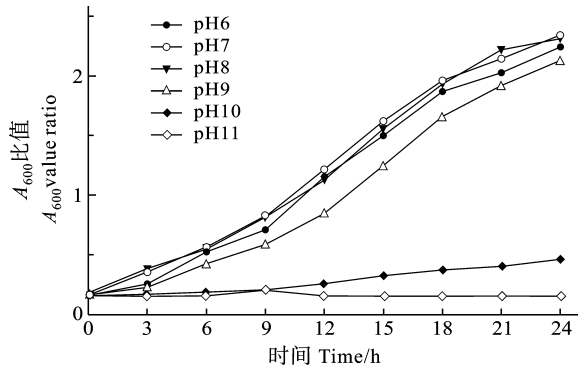


图 2 pH 对 SW1 生长的影响
Fig. 2 Effect of pH on the growth of SW1

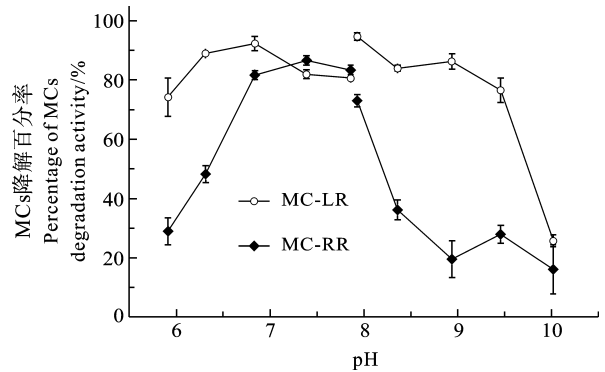


图 4 pH 对 SW1 降解活性的影响
Fig. 4 Effect of pH on the degradation activity of SW1

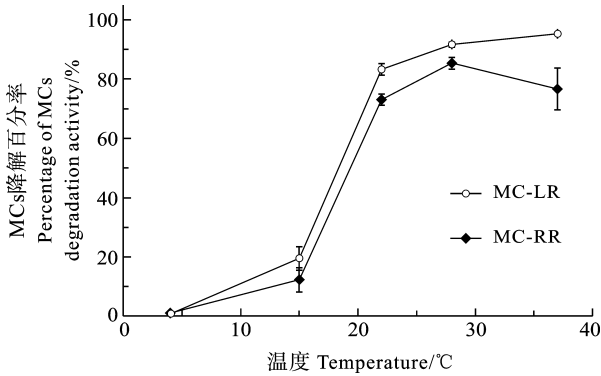


图 3 温度对 SW1 的 MCs 降解活性影响
Fig. 3 Effect of temperature on the degradation activity of SW1

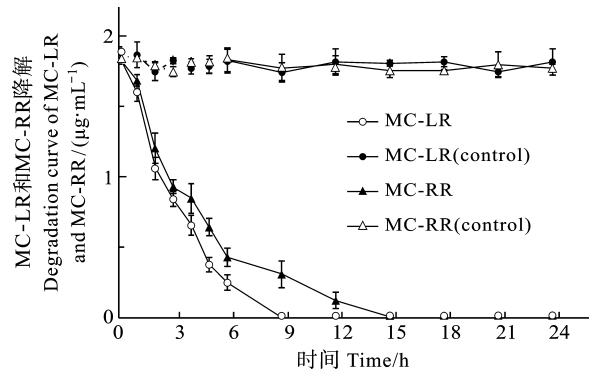


图 5 MC-LR 和 MC-RR 降解曲线
Fig. 5 Degradation curve of MC-LR and MC-RR

表 1 降解速率方程
Tab. 1 Equation of degradation rate

MCs 异构体 MC isomers	降解速率方程 Equation of degradation rate	降解反应速率常数 k Degradation rate constant (/h)	半衰 $t_{1/2}$ Half-life (h)	决定系数 R^2 Determination coefficient
MC-LR	$[MC-LR]=2.5e^{-0.35t}$	0.35	2.0	0.981
MC-RR	$[MC-RR]=2.1e^{-0.28t}$	0.28	2.5	0.985

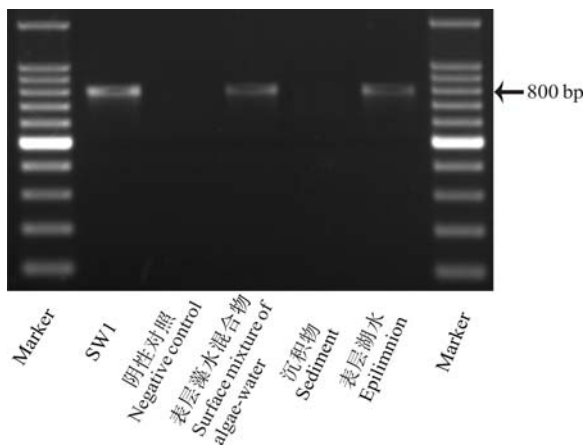


图 6 SW1、蓝藻水华堆积处理池和太湖湖水中 *mlrA* 基因的 PCR 检测
Fig. 6 PCR detection of *mlrA* gene in SW1, treatment ponds and lake water of Lake Taihu

在此期间由蓝藻水华暴发产生的 MCs 也会被更快速地降解; 而对于蓝藻水华堆积处理池由于本身较浅且处于露天环境, 池内温度一般高于太湖水温, MCs 的降解速率很可能更高。

pH 也是影响 SW1 的 MCs 降解活性, 在中性和偏碱性条件下能对 MC-LR 和 MC-RR 快速降解, 这和已报道的几株 MCs 降解细菌相似^[14, 16, 18]。研究表明 MC-LR 的高降解活性 pH 区间范围大于 MC-RR, 其可能原因除了 SW1 对 MCs 异构体降解的选择性差异, 以及细胞代谢功能因体系 pH 改变细胞质膜电荷而受到影响的可能原因外, 还可能与 MCs 异构体自身的结构和电荷特性有关。

同时 SW1 生长的碱性耐受研究表明其能在中性和偏碱性条件下生长, 但不适于强碱性环境, 这

表 2 SW1 和已报道 MCs 降解细菌的 *mtrA* 基因相似性比较
Tab. 2 Similarities of *mtrA* gene between SW1 and reported MCs-degrading bacteria

菌株 Bacterium	来源 Source	可降解 MCs Degraded MCs	GenBank 登录号 GenBank accession number	<i>mtrA</i> 基因与 SW1 相似度 Similarity of <i>mtrA</i> gene with SW1	参考文献 Reference
<i>Sphingomonas</i> ACM-3692	澳大利亚	LR, RR	AF411068	93%	[5, 13]
<i>Sphingomonas</i> Y2	日本	LR, RR, YR, 6(Z)-Adda	AB114203	84%	[15]
<i>Sphingomonas</i> MD-1	日本	LR, RR, YR	AB114202	92%	[16]
<i>Sphingopyxis</i> LH21	澳大利亚	LR, LA	DQ112243	98%	[7]
<i>Sphingopyxis</i> C-1	中国	LR	AB468058	99%	[14]
<i>Methylobacillus</i> J10	中国	LR, RR			[17]
<i>Stenotrophomonas</i> EMS	中国	LR, RR	GU224277	99%	[18]
<i>Sphingopyxis</i> USTB-05	中国	RR	HM245411	96%	[19]
<i>Novosphingobium</i> THN1	中国	LR	HQ664118	92%	[20]

也与之前的研究结果相似^[14, 18]。蓝藻水华发生的水体上层因蓝藻的光合活性 pH 呈较强碱性^[22, 23]，而在处理池中藻水混合物 pH 相对较低，一般在 6.9 至 8.8，这与 SW1 对 MCs 高降解活性的 pH 区间大致是相吻合的，因此蓝藻死亡裂解后释放的 MCs 可以被更快速降解，所以处理池的 pH 并不是 SW1 类降解菌的降解活性限制因子。MC-LR 的高降解活性 pH 区间范围大于 MC-RR，除了 SW1 对 MCs 异构体降解的选择性差异，以及细胞代谢功能因体系 pH 改变细胞质膜电荷而受到影响的可能原因外，还可能与 MCs 异构体自身的结构和电荷特性有关。

蓝藻水华水体及藻的胶被中存在有大量细菌^[24, 25]，能够代谢降解包括蓝藻毒素在内的生物有机质并促进水体的自我净化^[26-28]，即使受自然环境因素影响，生物降解仍为水体中大多数微囊藻毒素的主要归宿^[4]。所有具有 *mtrA* 同源基因的 MCs 降解菌并不只降解 MCs，对蓝藻合成的其他一些环多肽也具有降解活性^[29]。一般研究认为 MCs 降解细菌能够有效地对 MCs 进行脱毒^[30, 31]，但蓝藻水华堆积处理池不同于一般的藻华水体和水处理工艺，有其不同之处(如高有机质、高浓度毒素释放等)，这会促使其中土著和外源(蓝藻水华)进入的微生物群落结构和种群数量发生变化，同时大量可降解的有机质也会与 MCs 发生代谢竞争，进而对 MCs 的生物降解造成影响^[32-34]。以 PCR 对蓝藻水华堆积处理池和水华暴发区域 *mtrA* 基因检测呈阳性表明，处理池很可能存在与已报道相似的 MCs 降解途径^[29, 31, 35]。处理池沉积物样品中 *mtrA* 基因 PCR 检测呈阴性，是否具有与一般湖泊沉积物对 MCs 的降解作用^[36]，仍需进一步研究。SW1 所表现出的 MCs 降解特性可

能与在蓝藻水华堆积处理池特殊环境下的驯化有关，一些细菌(如 SW1)在一定环境下(如高水温和弱碱性)很可能在 MCs 快速降解过程中起到了关键作用。在自然环境下，Jones, *et al.*观察到双相降解动力学(Bi-phasic degradation kinetics)，即快速降解相(包括之前的延滞期)和迟缓降解相，并将这种现象的原因归纳为两个独立的细菌类群：一类能利用 MC-LR 作为碳源和能源，另一类共代谢低含量的 MC-LR^[2]。在对蓝藻水华堆积处理池 MCs 降解模拟实验研究中也发现了类似的双相降解动力学现象(结果未发表)，从这一角度讲，SW1 很可能属于快速代谢 MCs 的细菌种类。SW1 的分离来源——蓝藻水华堆积处理池中的生物量来源于太湖，也有关于太湖 MCs 降解细菌的研究报道^[17, 18, 20]，但目前为止并未能从处理池中分离到已报道的 MCs 降解菌株，这是否与处理池的非自然条件有关，与其他 MCs 降解细菌相比 SW1 是否具有特殊之处，有待进一步的研究。处理高通量的蓝藻水华能否有效去除 MCs，与藻华水体中 MCs 的降解有怎样的异同^[37]，目前尚缺乏相关研究和结论。从蓝藻水华堆积处理池中分离 MCs 降解细菌并进行特性研究对于回答和解决上述问题非常关键，对于进一步研究蓝藻水华脱毒和资源化利用也具有重要价值^[30, 38]。

4 结论

从蓝藻水华堆积处理池中分离获得具有 MCs 高降解活性的菌株 SW1，经 16S rDNA 鉴定为鞘氨醇单胞菌(*Sphingopyxis* sp.)；在实验条件下 SW1 能分别在 9h、15h 完全降解 1.8 μg/mL 的 MC-LR 和 MC-RR，并具有一级反应动力学特征，其反应速率

表 3 SW1 和已报道 MCs 降解细菌对 MCs 的降解比较

Tab. 3 Comparison of MCs degradation using literature reported MC-degrading bacteria and SW1

菌株 Bacterium	MC-LR					MC-RR					前培养 和前处理 Pre-culture & Pretreatment	降解实 验条件 Experiment conditions	参考 文献 References
	半衰期 Half-life (h)	反应 常数 Rate constant (/h)	平均降 解速率 Average rate [$\mu\text{g}/\text{ML}$ (OD=1)/h]	初始毒 素浓度 Initial conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	初始细 菌浓度 Initial conc. of bacteria ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	半衰期 Half-life (h)	反应 常数 Rate constant (/h)	平均降 解速率 Average rate [$\mu\text{g}/\text{mL}$ (OD=1)/h]	初始毒 素浓度 Initial conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	初始细 菌浓度 Initial conc. of bacteria ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
<i>Sphingomonas</i> ACM-3692			0.132	10	$A_{540}=4.73$						PY medium	ASM medium 27°C	[13]
<i>Sphingomonas</i> Y2			11*	20	2.5×10^6 cells/mL			11*	20	2.5×10^6 cells/mL		NB medium 27°C	[15]
<i>Sphingomonas</i> MD-1	1.3	0.66	1.3	1	$A_{600}=0.3$	0.7	1.25	1.3	1	$OD_{660}=0.3$	PY medium	inorganic medium 30°C	[16]
<i>Sphingomonas</i> B9	1			91	**						Sakurai medium cell extract	27°C	[29, 39]
<i>Sphingomonas</i> 7CY	48		0.21	6	3.0×10^8 cells/mL	1		0.21	6	3.0×10^8 cells/mL	LB medium	M9 medium 30°C	[40]
<i>Sphingopyxis</i> <i>wiflariensis</i> LH21			0.00125*	0.003	1.0×10^6 cells/mL						LB medium	sterilized lake water 30°C	[7]
<i>Methylobacillus</i> J10			1.2	3.5	$A_{600} \approx 0.25$		0.2	14	4.5	$OD_{600} \approx 0.25$	M9 medium + crude MCs	30°C	[17]
<i>Sphingopyxis</i> C-1			0.66	1	$A_{600}=0.5$						PY medium	PBS 25°C	[14]
<i>Stenotrophomonas</i> EMS			0.15	0.7	$A_{600} \approx 0.2$			0.14	1.7	$OD_{600} \approx 0.2$	LB medium	M9 medium + crude MCs 30°C	[18]
<i>Sphingopyxis</i> USTB-05									42.3	单菌落 Single colony		basic medium 30°C	[19]
<i>Novosphingobium</i> THN1			0.077	1.38	$A_{600}=0.3$							liquid R2A medium 28°C	[20]
<i>Sphingopyxis</i> SW1	2.0	0.35	0.4	1.8	$A_{600}=0.5$	2.5	0.28	0.24	1.8	$OD_{600}=0.5$	PY medium	PBS 28°C	本文

注: *为细菌初始生物量按 2×10^8 cells/mL=1OD 计算而得; **为细胞提取物, 在引用文献中的浓度未提及

Note: * defined assuming initial bacterial biomass 2×10^8 cells/mL=1OD; ** defined as cell extract, the concentration of which was not mentioned in the literature

常数分别为 0.35/h 和 0.28/h; 温度和 pH 是影响 SW1 对 MCs 降解活性的因素, 温度约 30℃, pH 中性和弱碱性, 具有高降解活性; 在中性及偏碱性条件下(pH 6—9)SW1 能快速增殖; SW1 具有 *mlrA* 的同源基因, 在蓝藻水华堆积处理池的上层藻水混合物中也含有具有 *mlrA* 同源基因的细菌。

参考文献:

- [1] Lahti K, Rapala J, Färdig M, *et al.* Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water [J]. *Water Research*, 1997, **31**(5): 1005—1012
- [2] Wang H, Xu L H. The current developments and future directions in microcystins study [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(3): 504—515 [王昊, 徐立红. 微囊藻毒素研究的当前进展和未来方向. 水生生物学报, 2011, **35**(3): 504—515]
- [3] Chen W, Song L, Gan N, *et al.* Sorption, degradation and mobility of microcystins in Chinese agriculture soils: risk assessment for groundwater protection [J]. *Environmental Pollution*, 2006, **144**(3): 752—758
- [4] Edwards C, Lawton L A. Bioremediation of cyanotoxins [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2009, **67**: 109—129
- [5] Bourne D G, Jones G J, Blakeley R L, *et al.* Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(11): 4086
- [6] Song L, Chen W, Peng L, *et al.* Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: a systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu [J]. *Water Research*, 2007, **41**(13): 2853—2864
- [7] Ho L, Hoefel D, Saint C P, *et al.* Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter [J]. *Water Research*, 2007, **41**(20): 4685—4695
- [8] Chen W, Li L, Gan N, *et al.* Optimization of an effective extraction procedure for the analysis of microcystins in soils and lake sediments [J]. *Environmental Pollution*, 2006, **143**(2): 241—246
- [9] Peng L, Chen W, Song L R. Study on extraction methods of intracellular microcystins [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(4): 708—712 [彭亮, 陈伟, 宋立荣. 微囊藻胞内毒素的提取方法. 水生生物学报, 2011, **35**(4): 708—712]
- [10] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 625—630
- [11] Bourne D G, Riddles P, Jones G J, *et al.* Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR [J]. *Environmental Toxicology*, 2001, **16**(6): 523—534
- [12] Saito T, Okano K, Park H D, *et al.* Detection and sequencing of the microcystin LR degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **229**(2): 271—276
- [13] 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
- [14] Okano K, Shimizu K, Kawauchi Y, *et al.* Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions [J]. *Journal of Toxicology*, 2009: 954291
- [15] 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]. *Environmental Toxicology*, 2001, **16**(4): 337—343
- [16] Saitou T, Sugiura N, Itayama T, *et al.* Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura [J]. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, 2003, **52**(1): 13—18
- [17] Hu L B, Yang J D, Zhou W, *et al.* Isolation of a *Methylobacillus* sp that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria [J]. *New Biotechnology*, 2009, **26**(3—4): 205—211
- [18] Chen J, Hu L B, Zhou W, *et al.* Degradation of microcystin-LR and RR by a *Stenotrophomonas* sp. strain EMS isolated from Lake Taihu, China [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, **11**(3): 896—911
- [19] Wang J, Wu P, Chen J, *et al.* Biodegradation of microcystin-RR by a new isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05 [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2010, **18**(1): 108—112
- [20] Jiang Y, Shao J, Wu X, *et al.* 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
- [21] Alamri S A. Biodegradation of microcystin by a new *Bacillus* sp. isolated from a Saudi freshwater lake [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, **9**(39): 6552—6559
- [22] López-Archilla A I, Moreira D, Lopez-Garcia P, *et al.* Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH [J]. *Extremophiles*, 2004, **8**(2): 109—115
- [23] El Herry S, Fathalli A, Rejeb A J-B, *et al.* Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia [J]. *Water Research*, 2008, **42**(4—5): 1263—1273
- [24] Maruyama T, Kato K, Yokoyama A, *et al.* Dynamics of microcystin-degrading bacteria in mucilage of *Microcystis* [J]. *Microbial Ecology*, 2003, **46**(2): 279—288
- [25] Berg K A, Lyra C, Sivonen K, *et al.* High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms [J]. *ISME Journal*, 2009, **3**(3): 314—325
- [26] Fedorak P M, Huck P M. Microbial-metabolism of cyanobacterial products - batch culture studies with applications to drinking-water treatment [J]. *Water Research*,

- 1988, **22**(10): 1267—1277
- [27] Watanabe M F, Tsuji K, Watanabe Y, *et al.* Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Natural Toxins*, 1992, **1**(1): 48—53
- [28] Ho L, Sawade E, Newcombe G. Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal - A review [J]. *Water Research*, 2012, **46**(5): 1536—1548
- [29] Kato H, Imanishi S Y, Tsuji K, *et al.* Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides [J]. *Water Research*, 2007, **41**(8): 1754—1762
- [30] Tsuji K, Asakawa M, Anzai Y, *et al.* Degradation of microcystins using immobilized microorganism isolated in an eutrophic lake [J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(1): 117—124
- [31] Imanishi S, Kato H, Mizuno M, *et al.* Bacterial degradation of microcystins and nodularin [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, **18**(3): 591—598
- [32] Eleuterio L, Batista J R. 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
- [33] Ho L, Hoefel D, Palazot S, *et al.* Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **180**(1—3): 628—633
- [34] Li J, Shimizu K, Sakharkar M K, *et al.* 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
- [35] Bourne D G, Jones G J, Blakeley R L, *et al.* Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(11): 4086—4094
- [36] Chen X, Yang X, Yang L, *et al.* An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments [J]. *Water Research*, 2010, **44**(6): 1884—1892
- [37] Cousins I T, Bealing D J, James H A, *et al.* Biodegradation of microcystin-LR by indigenous mixed bacterial populations [J]. *Water Research*, 1996, **30**(2): 481—485
- [38] Zeng S, Yuan X, Shi X, *et al.* Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **178**(1—3): 89—93
- [39] Harada K, Imanishi S, Kato H, *et al.* Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation [J]. *Toxicon*, 2004, **44**(1): 107—109
- [40] Ishii H, Nishijima M, Abe T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium [J]. *Water Research*, 2004, **38**(11): 2667—2676

CHARACTERISTICS OF MICROCYSTIN-DEGRADING BACTERIUM ISOLATED FROM SEDIMENTATION PONDS FOR THE TREATMENT OF CYANOBACTERIAL BLOOMS

ZHAO Shuang^{1,2}, CHEN Wei¹, JIA Yun-Lu^{1,2}, ZHENG Ling-Ling¹,
ZUO Yan-Xia¹ and SONG Li-Rong¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cyanobacterial blooms occur worldwide due to eutrophication and climate changes, and microcystins (MCs) have been gaining increasing attention in recent years. A microcystin-degrading bacterium strain, named SW1, was isolated from sedimentation ponds for treating cyanobacterial blooms located at north rim of Lake Taihu. Based on 16S rDNA gene sequence phylogenetic analysis, SW1 was identified as *Sphingopyxis* sp. The optimal culture pH for SW1 was at 7, and it can also survived at pH 10. SW1 degraded MC-LR and MC-RR efficiently, and the degradation reactions followed first-order kinetics with reaction rate constants of 0.35/h and 0.28/h, respectively. The degradation ability of SW1 was significantly influenced by both temperature and pH. The degradation ability of SW1 was relatively high at 22°C—37°C, neutral pH and slight alkaline conditions. However, the degradation was strongly inhibited at low temperature (< 15°C) and extreme alkaline conditions. According to PCR analysis, *mlrA* homologous gene were found in both SW1 and samples from treatment ponds, suggesting that biodegradations were the possible pathway for MCs eliminations in these treatment ponds. Under proper environmental conditions, such as high water temperature and moderate pH, certain species of bacteria, SW1 for example, probably play a key role in rapid degradation of MCs.

Key words: Treatment ponds; Microcystins; Biodegradation; *Sphingopyxis*; *mlrA* gene