

南京玄武湖微囊藻水华种类组成的研究

汪育文, 李建宏*, 吴敏, 王一字, 翁永萍

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 2005-08 ~ 2006-10 采集蓝藻水华样品, 通过形态学特征和 ITS 序列分子标记的方法对南京玄武湖水华的优势种类进行了鉴定. 结果表明, 玄武湖水华主要由微囊藻构成, 通过形态特征鉴定主要种类为铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa*)、*M. novacekii* 和惠氏微囊藻 (*M. wesenbergii*). 3 种藻的生物量在水华中的相对比例分别为 30% ~ 45%、35% ~ 40% 和 10% ~ 15%. 采用分子标记的方法对 2 种优势种类进行了分子鉴定. PCR 扩增 ITS 序列并进行测序, 通过基因序列比对和基于 ITS 序列的系统发生树分析, 进一步确定了优势种类为 *M. aeruginosa* 和 *M. novacekii*; 通过检测产毒基因 *mcyB* 来确认 2 株优势微囊藻的产毒特性, PCR 扩增结果均出现了大约为 780 bp 的特异性片段, 表明这 2 种藻均为产毒种. 对水华提取物的高效液相色谱 (HPLC) 测定表明, 玄武湖水华中微囊藻毒素的种类主要是 MC-LR 和 MC-RR.

关键词: 微囊藻; 水华; ITS 序列; *mcyB*; 微囊藻毒素

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)10-2187-05

Composition of *Microcystis* Species of the Cyanobacterial Bloom in Xuanwu Lake of Nanjing

WANG Yu-wen, LI Jian-hong, WU Min, WANG Yi-yu, WENG Yong-ping

(Life Sciences College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The aim of the present study was to clarify the community composition of cyanobacterial bloom in Xuanwu Lake of Nanjing city. The *Microcystis* colonies in cyanobacterial blooms sampled from Xuanwu Lake during August 2005 and September 2006 were identified by morphological characteristics and internal transcribed spacer sequence (ITS). The results indicated that the bloom was composed mainly by *Microcystis aeruginosa*, *M. novacekii* and *M. wesenbergii*. The biomass percentage of them was 30% ~ 45%, 35% ~ 40% and 10% ~ 15%, respectively. ITS of two dominant *Microcystis* strains were amplified by PCR and sequenced to identify their species. The analysis of ITS sequences and the ITS phylogenetic tree demonstrated that the two dominant species should be *M. aeruginosa* and *M. novacekii*. A microcystin-producing gene *mcyB* was detected to test toxic strain. A unique product of approximately 780 bp was amplified in two dominant strains. It indicated that both of them were of microcystin-producing genotype. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that the toxins in the native bloom biomass were mainly MC-LR and MC-RR.

Key words: *Microcystis*; water bloom; ITS; *mcyB*; microcystin

水体环境富营养化引起的蓝藻水华问题在我国已日趋严重^[1]. 淡水湖泊如滇池、太湖、巢湖每年夏秋季都会暴发蓝藻水华. 近些年, 一些小型的观赏娱乐性湖泊或供水性水库也发生了不同程度的富营养化, 导致蓝藻的暴发, 引起了人们的关注^[2~5]. 众多富营养化湖泊的藻类类群中, 微囊藻 (*Microcystis*) 是一个重要优势类群, 它也是世界各国湖泊中分布广、规模大、持续时间长的一类水华蓝藻^[6].

南京玄武湖是我国著名的名胜景区, 属于浅水湖泊, 面积为 3.7 km²^[7]. 于 2005 年夏首次发生大面积以微囊藻属为主要优势种群的蓝藻水华, 不仅影响了其景观功能, 也导致了其水生生态系统的严重破坏.

蓝藻水华问题是全球关注的环境问题^[8]. 研究蓝藻水华藻类的组成和水华蓝藻毒素特征是掌握蓝藻水华发生规律, 控制蓝藻水华发生的一个重要前

提. 国外对不同水体的水华组成特点已有研究报道^[9~11], 国内对滇池、太湖等湖泊蓝藻水华组成特点和毒素特征也有一些相关研究^[12~16], 但多采用传统形态学分析的手段. 本实验同时采用形态学和分子生物学手段, 对组成水华的微囊藻种类和毒素特征进行了研究, 以期探索水华发生规律提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 水样的采集和保存

2005-08 ~ 2006-10 对玄武湖水华发生区域, 每隔 7 d 采集 3 份水样进行分析. 水华暴发期间用 25 号

收稿日期: 2006-11-22; 修订日期: 2007-01-15

基金项目: 人事部留学回国人员择优资助项目 (南京师范大学, 2005)

作者简介: 汪育文 (1983 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: polly84@sohu.com

* 通讯联系人, E-mail: lijianhong@njnu.edu.cn

浮游生物网在玄武湖水面上采集蓝藻水华,采得鲜藻体用蒸馏水洗涤 3 遍, -20℃ 冷冻保存备用。

1.2 水华浮游藻类组成分析

用显微镜(Nikon)观察玄武湖不同时期采集的水样,并用数码相机连接显微镜拍照,根据形态鉴定藻类的主要组成。由于大型微囊藻群体无法进行准确细胞计数,在对小群体进行计数的基础上,通过群体体积,估算各个种类大群体的细胞数量。

1.3 水华优势微囊藻 DNA 的制备及 16S rDNA-23S rDNA ITS 区的 PCR 扩增

微囊藻基因组 DNA 的提取参考文献[17]。

PCR 反应引物^[18]: 正向序列为 5'-GGGGATGCCTAAGGCAGGCT-3', 反向序列为: 5'-CCACGTCCTTCTTCGCCTCTG-3', PCR 循环仪(GeneAmp2400), 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环后 72℃ 10 min, 取 3 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶进行 PCR 产物电泳检测。

1.4 ITS 区的序列测定及序列分析

PCR 产物测序由上海博亚生物公司完成, 获得的序列通过 NCBI 网站上 Blast 比对, 从 GenBank 选取同源性高的微囊藻 ITS 序列, 用 ClustalX (Version1.83) 软件进行比对分析。用 MEGA3.1 软件包中的 Kimura-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发生树, 1 000 次随机取样, 计算 bootstrap 值以评估系统发生树的置信度。

1.5 水华优势微囊藻产毒特性的 PCR 检测

采用针对产毒基因 *mcyB* 序列的特异性引物^[19] FAA(5'-CTATGTTATTTATACATCA GG-3'), RAA(5'-CTCAGCTTAACTTGATTATC-3') 扩增鉴定产毒藻株。预计 PCR 产物长度约 780 bp, PCR 反应体系参照文献[20]。

1.6 水样中微囊藻毒素的测定

水样离心收集藻细胞, 70% 甲醇提取, 取上清液, 用 C₁₈ 柱分离微囊藻毒素(MC), 经 0.45 μm 滤膜过滤除菌。在 HPLC(Agilent) 上测定 MC 的浓度的条件是: 流动相为 55% 甲醇、45% 0.05 mol/L H₃PO₄/KH₂PO₄, 流速 1 mL/min。色谱柱恒温箱设为 25℃, 紫外检测波长 238 nm, 依据保留时间定性, 外标法定量。标样 MC-LR 和 MC-RR 购自武汉水生生物研究所。

2 结果与分析

2.1 水华的主要藻类组成

通过对 2005 年和 2006 年玄武湖水华发生期间多次采集水样的分析, 发现玄武湖蓝藻水华主要由微囊藻属构成, 通过显微镜观察微囊藻形态, 参照文献[21~24]对不同种微囊藻种的形态描述, 特别是细胞大小、群体形态、胶鞘等主要特征, 发现玄武湖蓝藻水华中至少由 3 种不同微囊藻组成。①群体球形、叶状、长圆形或不规则形, 群体成熟后开裂或穿孔, 并且群体细胞排列松散, 胶鞘不做处理在显微镜下不易观察, 符合 *M. aeruginosa* 的形态学特征[图 1(a), (b)]; ②群体较小且细胞排列很紧密, 不开裂, 不成网状, 符合 *M. novacekii* 的特征[图 1(c), (d)]; ③群体呈延长波状, 细胞排列松散, 具有非常明显的胶鞘, 边缘不分层但清晰, 符合 *M. wesenbergii* 的特征[图 1(e), (f)]。从数量上看, 水华优势种为 *M. aeruginosa* 和 *M. novacekii*, 综合 2 a 多次采样估算, 其 2 优势种的生物量分别占 30%~45% 和 35%~40%, 而 *M. wesenbergii* 相对较少, 生物量占 10%~15%。

水华中同时还伴生有其他一些种类, 分属蓝藻门、绿藻门和硅藻门。其中蓝藻的种类最多, 其次为绿藻和硅藻, 其他种类很少。主要种类有: 鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)、色球藻(*Chroococcus minutus*)、蓝纤维藻(*Dactylococcopsis acicularis*)、小球藻(*Chlorella vulgaris*)、栅藻(*Scenedemus quadricanda*)、盘星藻(*Pediastrum simplex*)、多芒藻(*Golenkinia radiata*)、小环藻(*Cyclotella meneghiniana*)、环藻(*Sphaeroplea annulata*)、舟形硅藻(*Navicula* sp.)、直链硅藻(*Melosira* sp.)。

2.2 水华优势微囊藻种类 ITS 序列特征

用毛细管从水样中分离获得了 3 种微囊藻群体, *M. wesenbergii* 由于其典型的群体特征, 从形态学上较容易鉴别。另 2 株优势微囊藻由于群体特性相似, 单从群体形态上鉴定具有很大的不确定性, 所以将其分别编号为 XW01 和 XW02, 并进一步用分子生物学手段进行鉴定。扩增获得的 ITS 序列分别通过 NCBI 网站 Blast 比对(www.ncbi.nlm.nih.gov), 发现 XW01 与 *M. aeruginosa* 相似性较高, XW02 与 *M. novacekii* 相似性较高, 均达到 98% 以上(表 1, 表 2)。

进一步将这 2 株藻分别与 *M. aeruginosa*、*M. novacekii* 的几个不同的株系和其他不同种微囊藻的几个序列进行比对, 并构建系统发生树。结果显示, XW01 与 *M. aeruginosa* 的遗传距离最近; XW02 与 *M. novacekii* 的遗传距离最近, 它们在遗传学特征上有很高的一致性, 可以认为 XW01 和 XW02 分

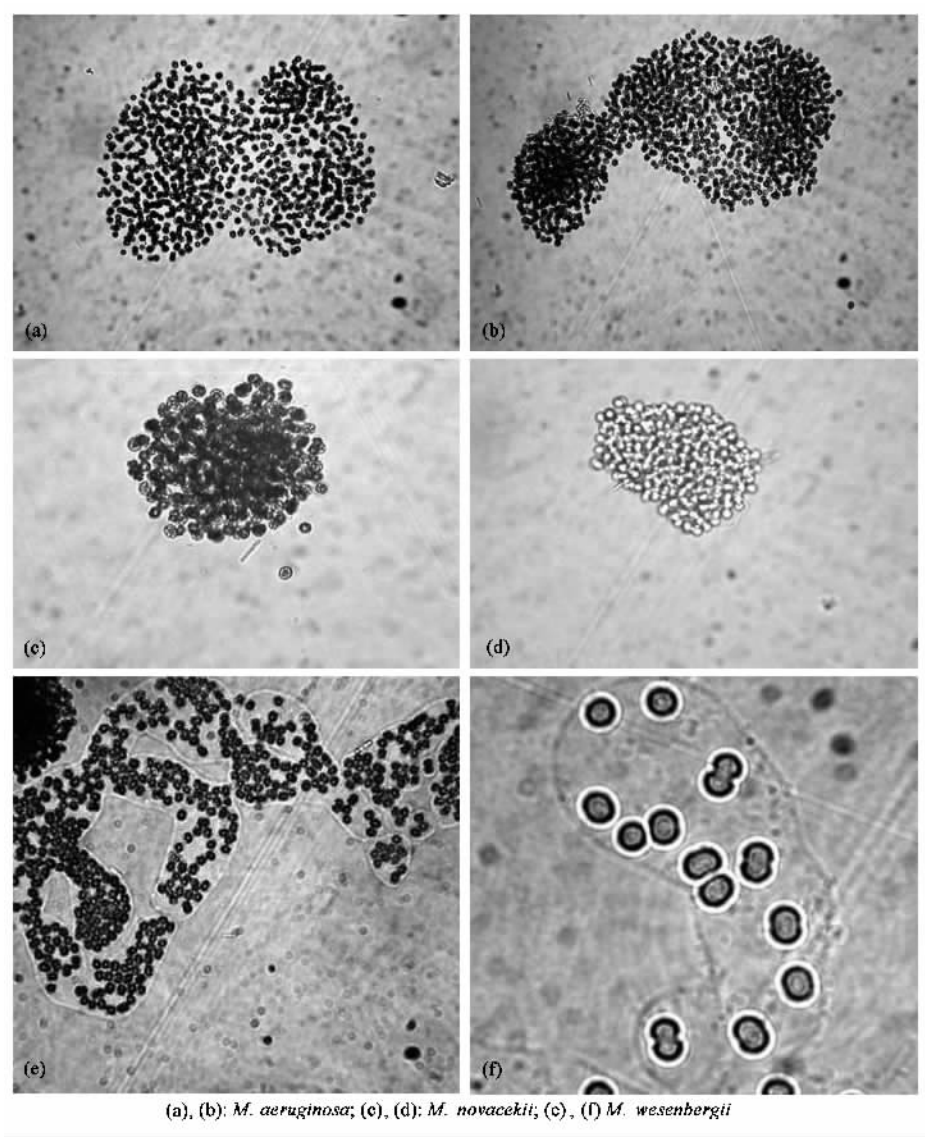


图 1 南京玄武湖水华中微囊藻种类

Fig.1 Photos of *Microcystis* species in bloom of Xuanwu Lake in Nanjing

别为 *M. aeruginosa* 和 *M. novacekii*. 这也与从形态学上的鉴定是一致的(图 2).

表 1 XW01 与近似序列藻株 ITS 序列相似性比较

藻株	登录号	序列长度	相似性
<i>M. aeruginosa</i> cg537	AY431097	356	98%
<i>M. aeruginosa</i> sc93	AY431067	356	98%
<i>M. aeruginosa</i> cg529	AY431068	356	98%
<i>M. aeruginosa</i> cc92	AY431069	356	98%
<i>M. aeruginosa</i> sc112	AY431066	356	98%
<i>M. aeruginosa</i> cc14	AY431065	356	98%
<i>M. aeruginosa</i> cc28	AY431049	358	98%
<i>M. aeruginosa</i> cc15	AY431048	358	98%
<i>M. aeruginosa</i> cg212	AY431047	358	98%
<i>M. aeruginosa</i> cg211	AY431046	358	98%

表 2 XW02 与近似序列藻株 ITS 序列相似性比较

藻株	登录号	序列长度	相似性
<i>M. novacekii</i> TAC66	AB015376	359	99%
<i>M. novacekii</i> TAC65	AB015375	359	99%
<i>M. novacekii</i> TAC20	AB015374	360	99%
<i>M. novacekii</i> CC2	AB015378	359	98%
<i>M. novacekii</i> BC18	AB015377	359	98%

2.3 水华优势微囊藻的产毒特性

FAA/RAA 作为引物鉴定产毒藻株是一个有效的手段, 扩增的目的片段大小理论值为 780 bp 左右. 利用这对引物检测 XW01 和 XW022 株优势微囊藻, 2 株藻都分别获得 780 bp 左右的扩增产物, 说明这 2 株微囊藻藻株均含有微囊藻毒素合成酶基因

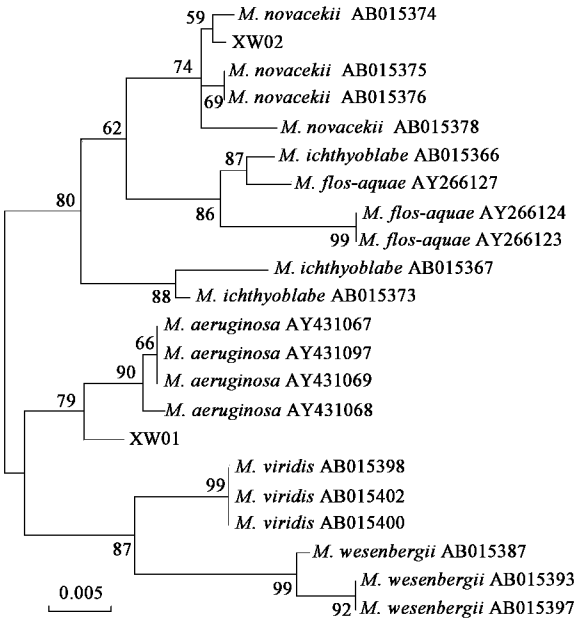
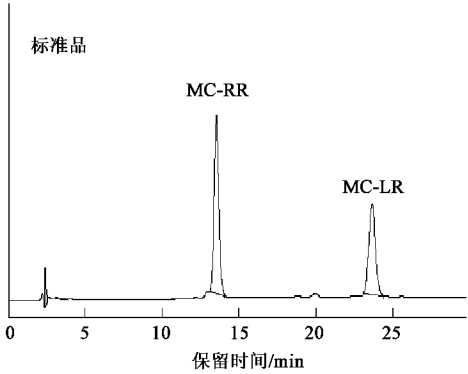


图 2 基于 16S-23S-ITS 的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S-23S-ITS
sequence of selective strains



mcyB, 均是产毒微囊藻. 从玄武湖水华蓝藻中提取的毒素分析结果来看(图 3), 毒素的种类主要是 MC-RR 和 MC-LR, 经计算得到蓝藻水华中的 MC-RR 和 MC-LR 含量(以鲜重计)分别为 1.06 mg/g 和 0.75 mg/g.

3 讨论

了解水华种类组成和产毒特征是揭示水华发生发展机理、研究控制水华发生技术的基础. 本实验同时采用形态学和分子生物学特征对组成水华的微囊藻种类和毒素特征进行了研究, 发现玄武湖蓝藻水华的优势种类不仅是常见的 *M. aeruginosa*, 同时还报道了国内鲜见研究的微囊藻种类 *M. novacekii*.

传统的微囊藻分类主要是基于群体的形态特征, 包括群体形状及胶鞘特征. 但是不同种的差别很细微, 容易导致鉴定结果混乱. 根据传统形态学分类的描述, 水华微囊藻(*M. flos-aquae*)、鱼害微囊藻(*M. ichthyoblabe*)、铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)的群

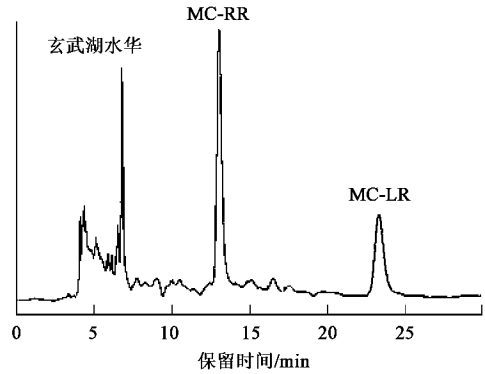


图 3 蓝藻水华微囊藻毒素 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC profile of standard MC and extracted cyanotoxins from water bloom in Xuanwu Lake

体特征接近. Komárek^[25] 和 Watanabe^[26, 27] 认为, *M. flos-aquae* 仅是 *M. ichthyoblabe* 的一种小群体形态类型. 另外, 在不同生长时期以及不同环境生态条件下, 微囊藻形态也会有很大的变化. Otsuka^[23] 观察发现, *M. novacekii* 在不同的培养时期, 会表现出 *M. aeruginosa* 和 *M. ichthyoblabe* 的群体形态, *M. wesenbergii* 在培养时期会表现出 *M. aeruginosa* 的群体特征. 由此可见传统分类中群体形态特征是一个十分不稳定的鉴定标准. 从产毒特性来看, 形态学特征也是无法确定形成水华种类是否为产毒的株系, 为此需要运用分子生物学方法, 用遗传学特征对不同种类进行区分鉴定.

16S rDNA 和 23S rDNA 基因之间 ITS 序列是个特殊的区域, 具有较高的突变速率, 可作为精细的分子指标, 用于亲缘关系较密切的蓝藻和细菌的分类鉴定^[28]. Humbert 等^[9] 运用 ITS 序列研究分析了法国某水库微囊藻的遗传多样性. Otsuka 等^[29] 利用微囊藻的 ITS 序列研究了 47 株微囊藻, 通过构建系统发生树, 表明了这些微囊藻之间的遗传进化规律. 本研究成果显示, XW01 与 *M. aeruginosa* 的不同株系的相似性为 98%, XW02 与 *M. novacekii* 的不同株系的相似性为 98% 以上, 从系统发生树上可以看出, XW01 与 *M. aeruginosa* 的不同株聚为一簇, XW02 与 *M. novacekii* 的不同株聚为一簇, 确认了 2 个优势种

分别为 *M. aeruginosa* 和 *M. novacekii*。但是从系统发生树上也可以看出, *M. ichthyoblabe* (AB015366) 株与 *M. flos-aquae* 归为一簇, 出现了形态学和分子遗传学鉴定的不一致性, 有待更多的数据积累分析原因。

在水华发生水体中, 由于藻类毒素的危害性, 人们十分关心水华藻类是否产毒。毒素合成基因 *mcyB* 仅存在产毒微囊藻藻株中, 这些序列被全球的研究者应用于设计和构建基于 PCR 方法的毒素基因检测^[10, 11, 17], 这为区分产毒和非产毒微囊藻的 PCR 技术提供了现实的可行性。对玄武湖水华优势微囊藻 XW01 和 XW02 的产毒特性进行了 PCR 检测, 经电泳后发现均呈阳性, 符合产毒种类的特征, 水华蓝藻提取物 HPLC 的分析结果也进一步证实了微囊藻中含有较高的毒素含量。在不同环境条件下, 各种产毒微囊藻的贡献有待进一步分析研究。

4 结论

南京玄武湖暴发蓝藻水华的主要种类是微囊藻属, 经形态和分子标记方法鉴定, 主要包括 *M. aeruginosa*、*M. novacekii* 和 *M. wesenbergii*, 生物量分别为 30% ~ 45%、35% ~ 40% 和 10% ~ 15%。水华中优势微囊藻为: *M. aeruginosa* 和 *M. novacekii*。经过 PCR 检测, 2 种优势藻均含有产毒基因 *mcyB*, 水华中含有毒素 MC-LR 和 MC-RR。水华中伴生的种类主要为蓝藻门、绿藻门和硅藻门的一些种类。

参考文献:

[1] 宦海琳, 王一字, 韩岚, 等. 一株椭圆小球藻对微囊藻生长的竞争抑制研究[J]. 生态与农村环境学报, 2006, 22(3): 29 ~ 32.

[2] Kim S G, Rhee S K, Ahn C Y, *et al.* Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of *cpeBA* intergenic spacer region analysis[J]. Appl Environ Microb, 2006, 72(5): 3252 ~ 3258.

[3] Vieira J M S, Azevedo M T P, Oliveira A S M F, *et al.* Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region[J]. Toxicon, 2005, 45: 901 ~ 909.

[4] Al-Jassabi S, Khalil A M. Initial report on identification and toxicity of *Microcystis* in King Talal Reservoir, Jordan[J]. Lakes Reserv Res Manage, 2006, 11: 125 ~ 129.

[5] Oberholster P J, Botha A M, Cloete T E. Toxic cyanobacterial blooms in a shallow, artificially mixed urban lake in Colorado, USA[J]. Lakes Reserv Res Manage, 2006, 11: 111 ~ 123.

[6] 孙慧群, 朱琳, 高文宝. 淡水湖泊中微囊藻水华的成因分析[J]. 生物学通报, 2005, 40(8): 23 ~ 24.

[7] 张哲海, 梅卓华, 孙洁梅, 等. 玄武湖蓝藻水华成因探讨[J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18(2): 15 ~ 18.

[8] 王高鸿, 黄家权, 李敦海, 等. 水华藻类的分子鉴定研究进展[J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 207 ~ 211.

[9] Humbert J F, Duris-Latour D, Le Berre B, *et al.* Genetic diversity in *Microcystis* populations of a French storage reservoir assessed by sequencing of the 16S-23S rRNA intergenic spacer[J]. Microb Ecol, 2005, 49: 308 ~ 314.

[10] kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, *et al.* Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. In Lake Wannsee (Berlin Germany)[J]. Microb Ecol, 2002, 43: 107 ~ 118.

[11] Mankiewicz-Boczek J, Izydorczyk K, Romanowska-Duda Z, *et al.* Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods[J]. Environ Toxicol, 2006, 21: 380 ~ 387.

[12] 张杭君, 张建英, 陈英旭, 等. 微囊藻毒素含量与自然水体环境影响因子的相关性[J]. 环境科学, 2006, 27(10): 1969 ~ 1973.

[13] 史红星, 曲久辉. 官厅水库微囊藻毒素的 LC-ESI/MS 定性分析[J]. 环境科学, 2005, 26(6): 97 ~ 100.

[14] 施玮, 吴和岩, 赵耐青, 等. 淀山湖水质富营养化和微囊藻毒素污染水平[J]. 环境科学, 2005, 26(5): 55 ~ 61.

[15] 刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析[J]. 环境科学研究, 1999, 12(5): 36 ~ 37.

[16] 宋立荣, 雷腊梅, 何振荣, 等. 滇池水华蓝藻铜绿微囊藻和绿色微囊藻的生理生长特性和毒素分析[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 402 ~ 408.

[17] 潘卉, 宋立荣, 刘永定, 等. 水华蓝藻产毒特性的 PCR 检测法[J]. 水生生物学报, 2001, 25(2): 189 ~ 166.

[18] 陈月琴, 何家苑, 庄丽. 二种微囊藻 rDNA 16S-23S-ITS 基因间的转录间隔区的序列测定分析[J]. 水生生物学报, 1999, 23(1): 41 ~ 46.

[19] Neilan B A, Dittmann E, Rouhiainen L, *et al.* Non-ribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria[J]. J Bacteriol, 1999, 181: 4089 ~ 4097.

[20] Bittencourt-Oliveira M C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker[J]. Harmful Algae, 2003, 2: 51 ~ 60.

[21] 朱浩然. 中国淡水藻志——色球藻纲[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 11 ~ 18.

[22] 胡鸿均, 李尧英, 魏印心, 等. 中国淡水藻类[M]. 上海: 上海科技出版社, 1980. 11 ~ 13.

[23] Otsuka S, Suda S, Li R H, *et al.* Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture[J]. J Gen Appl Microbiol, 2000, 46: 39 ~ 50.

[24] Bittencourt-Oliveira M C. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpeBA*)[J]. J Phycol, 2001, 37: 810 ~ 818.

[25] Komárek J. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan[J]. Arch Hydrobiol Algol Stud, 1991, 64: 115 ~ 127.

[26] Watanabe M. Water bloom-forming blue-green algae [A]. In: Watanabe M F, Harada K, Fujiki H (eds). Waterbloom of Bluegreen Algae and Their Toxins[M]. Tokyo: University of Tokyo Press, 1994. 25 ~ 54.

[27] Watanabe M. Isolation, cultivation, and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan[A]. In: Watanabe M F, Harada K, Carmichael W W, (eds). Toxic *Microcystis*[M]. Boca Raton: CRC Press, 1996. 13 ~ 34.

[28] 庄丽, 陈月琴. 蓝藻分子系统学研究进展[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38(1): 74 ~ 78.

[29] Otsuka S, Suda S, Li R H, *et al.* Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 172: 15 ~ 21.