

太湖夏季蓝藻水华期间产毒蓝藻基因型组成和种群丰度研究

李大命^{1,2}, 孔繁翔^{1*}, 叶琳琳^{1,2}, 于洋¹, 张民¹, 史小丽¹

(1.中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:采用基于 *mcyA* 基因的 PCR-DGGE 和定量 PCR 分子技术,研究了太湖夏季蓝藻水华期间不同湖区水柱和表层底泥中产毒蓝藻基因型组成和种群丰度,同时利用高效液相色谱(HPLC)法测定了水体中微囊藻毒素(Microcystin, MC)3种异构体(MC-LR、MC-YR、MC-RR)的浓度,为太湖蓝藻水华治理及其生态风险评估提供基础资料。结果表明,太湖产毒蓝藻有12种主要的基因型,不同湖区水体和底泥中基因型组成及其丰度存在差异,水体中基因型多样性高于底泥,所有样品中占优势的基因型是一致的,富营养化水平对产毒蓝藻群落结构有一定的影响。同时发现,水体中不同湖区产毒藻细胞种群丰度差异显著,富营养化水平高的湖区种群丰度也较高,底泥中产毒藻细胞种群丰度波动较小。水体中微囊藻毒素3种异构体中 MC-LR 浓度最高,其所占比例在湖区间有一定的差异,总微囊藻毒素浓度范围为 0.54~1.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,部分湖区微囊藻毒素浓度超过 WHO 推荐的安全浓度阈值(<1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),必须引起足够重视。

关键词:蓝藻水华;定量 PCR;变性梯度凝胶电泳;微囊藻毒素;太湖

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)06-1135-09

Spatial Variations in Composition and Abundance of Microcystin-producing Cyanobacteria in Tai Lake in Summer

LI Da-ming^{1,2}, KONG Fan-xiang^{1*}, YE Lin-lin^{1,2}, YU Yang¹, ZHANG Min¹, SHI Xiao-li¹

(1.State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2.Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The community structures and abundances of microcystin-producing cyanobacteria in water column and surface sediment in Tai Lake were investigated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and quantitative real time PCR (qPCR) techniques based on *mcyA* gene. Meanwhile, we measured the concentrations of three microcystin variants (microcystin-LR, microcystin-YR and microcystin-RR) in water body by high performance liquid chromatography (HPLC). DGGE profiles showed that there were 12 main *mcyA* genotypes in the toxic cyanobacteria of Tai Lake. The composition of microcystin-producing genotypes and the abundance of each genotype differ spatially in water column and surface sediment. Although *mcyA* genotype community was more diverse in water body than in sediment, the dominant *mcyA* genotype in all samples was the same. In addition, microcystin-producing community was affected by the status of eutrophication. qPCR data showed significant spatial variation in the abundance of toxic cyanobacteria in water column, which is high in the water with high status of eutrophication. However, this was not the case for sediment. Microcystin-LR is the main toxin of *Microcystis*, and its proportion to the total concentration of dissolved microcystin is not constant. The total concentration of microcystin ranged from 0.54 to 1.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, exceeding the guideline value (1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ set by WHO) in some lake areas. This is the first study on the spatial changes in the community structure and abundance of microcystin-producing cyanobacteria in water column and surface sediment of Tai Lake, and our results can be used for assessing the ecological risk as well as the management of water bloom.

Keywords: cyanobacterial bloom; quantitative real time PCR; DGGE; microcystin; Tai Lake

收稿日期: 2010-11-26

基金项目: 973 计划“大中型浅水湖泊蓝藻水华暴发机理研究”(2008CB418000); 中科院南京地理与湖泊研究所所长基金(07SL021001)

作者简介: 李大命(1982—), 男, 汉族, 博士研究生, 主要从事蓝藻水华发生机理及湖泊污染生态学方面的研究。E-mail: ldm8212@126.com

* 通讯作者: 孔繁翔 E-mail: fxxkong@niglas.ac.cn

在富营养化的淡水生态系统中,蓝藻水华频繁发生已成为一个全球性的重大水环境问题,引起了广泛重视^[1]。微囊藻水华是淡水水体中危害最为严重的一类,微囊藻水华发生频率高,持续时间长,且大多数产毒。微囊藻毒素(Microcystin, MCs)是由蓝藻中的微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、颤藻属(*Oscillatoria*)及念珠藻属(*Nostoc*)的某些种类或品系产生的次生代谢产物^[1],是一类具有生物活性的七肽单环肝毒素,目前已经发现了 70 多种异构体^[2],其中含量较大的主要有 3 种类型,分别是 MC-LR、RR 和 YR(L, R, Y 分别代表亮氨酸、精氨酸和酪氨酸)。MCs 是胞内毒素,在细胞内合成,藻细胞死亡或裂解后毒素释放到水体中并表现出毒性,在世界各地已经有许多关于蓝藻水华导致野生动物、鱼类、鸟类、家畜死亡的报道^[3-5],甚至人类死亡的事件^[6]。微囊藻毒素还是潜在的肿瘤促进剂^[7],流行病学调查显示,中国南方原发性肝癌的高发病率被认为与饮水中的 MC 污染有关^[8-9]。为了保护人类健康,世界卫生组织(WHO)推荐的饮用水源中 MC-LR 的安全限值为 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

微囊藻毒素是由部分产毒藻细胞合成并释放到水体中,产毒蓝藻群落组成及其动态与水体中微囊藻毒素浓度有直接相关性^[10]。在自然水体中,蓝藻水华样品中产毒和非产毒藻株同时存在,呈现出不同的种群动态变化规律^[11-12],常规的显微观察无法将两类藻细胞进行区分。但二者在遗传特征上存在显著差异,产毒藻细胞基因组含有微囊藻毒素合成基因家族,而非产毒藻细胞则不含该基因序列。微囊藻毒素合成受微囊藻毒素合成基因簇的调控(Microcystin synthesis gene, *mcy*),该基因簇由多个家族成员组成,每个成员有特定的功能。目前,微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)和浮游蓝丝藻属(*Planktonthrix*)中代表性藻株的 *mcy* 基因簇的基因结构和序列组成已经十分清楚^[13],因此,利用 *mcy* 基因进行 PCR 扩增和定量 PCR 分析已成为研究产毒蓝藻分子生态学最基本的方法之一^[13-15]。

太湖是中国第三大淡水湖泊,位于经济发达的长江三角洲地区,是该地区重要的饮用水源地,同时具有航运、旅游、水产养殖、灌溉等多种功能。随着湖区周围工农业的发展,大量的工农业废水及生活污水进入湖体,使太湖水质受到严重污染,水体富营养化日益严重。20 世纪 80 年代以来,太湖梅梁湾开始发生蓝藻水华^[16]。自 2000 年以来,太湖几乎每年都发生大规模蓝藻水华,持续时间越来越长,发生面积逐渐扩

大。以微囊藻为优势种群的蓝藻水华已经成为太湖生态系统的基本特征^[17]。谭啸等利用 PCR-DGGE 技术对太湖微囊藻群落结构季节变化进行了研究^[18],Chen 等利用定量 PCR 和 DGGE 技术对梅梁湾产毒蓝藻种群丰度和群落结构的周年变化进行了研究^[19]。以上研究均集中在梅梁湾及其附近湖区,而对太湖其他湖区研究较少,同时,尚未见底泥中产毒蓝藻的群落结构和种群丰度的报道。本文利用 PCR-DGGE 和定量 PCR 技术,从大的空间尺度上研究太湖夏季蓝藻期间水柱和底泥中产毒蓝藻基因型组成和种群丰度,为太湖蓝藻水华生态风险评估和治理提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 采样点分布

根据课题要求和水体富营养化水平的差异,本研究在太湖设置了 8 个采样点(图 1),其中竺山湾(N5)、梅梁湾(N2)和贡湖湾(N4)各设一个采样点,西太湖(W2 和 W4)设置 2 个采样点,大太湖设置 3 个采样点(S2、S4 和 S5)。

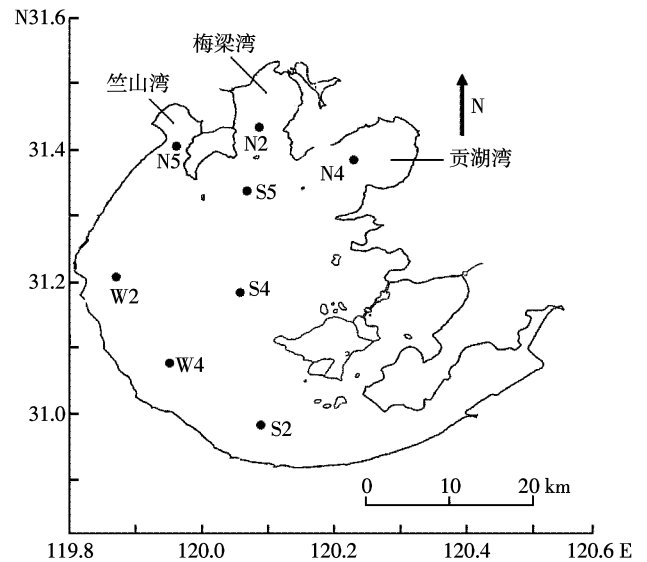


图 1 采样点分布

Figure 1 The distribution of sampling locations in Tai Lake

1.2 样品采集

2010 年 8 月采集样品。用 2 m 长的 PVC 管采集整水柱,混合均匀,取 2.5 L 装入干净的塑料桶,同时利用 YSI 原位测定水质参数,包括水温、溶解氧、混浊度和 pH 等。水样于 2 h 内带回实验室进一步处理。在相同采样点用柱状采泥器采集表层底泥(0~2 cm),装入灭菌塑料盒中,于 2 h 内带回实验室进一步处理。

1.3 营养盐测定

取 50 mL 水样经玻璃纤维滤膜(Whatman, GF/F),用自动连续流动分析系统测定滤液中的溶解性氮磷,包括硝态氮、氨态氮、亚硝态氮和正磷酸盐。总氮和总磷按照标准方法测定^[20]。

1.4 叶绿素 a 浓度

叶绿素 a 浓度常用于指示浮游植物生物量。利用荧光法测定水体和底泥中叶绿素 a 浓度:用 GF/C 滤膜过滤一定体积水样,滤膜置于-20℃保存。泥样放入低温冻干机中冻干。将滤膜或冻干泥样(1.0 g)放入研钵中,加入 90%丙酮后充分研磨,4℃避光放置 12 h,离心,取上清用 90%丙酮定容 10 mL,用 RF5301 型荧光分光光度计测定,激发波长 350 nm,发射波长 670 nm。

1.5 水样和泥样基因组提取

用 GF/C 滤膜过滤一定体积水样(根据水柱中藻类生物量大小),将滤膜置于-20℃保存。藻类基因组提取按照文献[21]的方法进行,最后将 DNA 溶于 TE 溶液,-20℃保存备用。

泥样基因组 DNA 提取按照文献[22]的方法进行,称取 1.0 g 冻干泥样用于基因组提取,最后用 200 μL TE 溶解 DNA,取其中 150 μL 对泥样基因组进行纯化(Mobio-12877),除去 PCR 反应抑制剂,纯化后基因组用于 PCR 扩增和定量 PCR 分析。

1.6 PCR 扩增及 DGGE 分析

PCR 扩增上游引物 *mcyA*-Cd 1F (5'-AAAAT-TAAAAGCCGTATCAAA-3'),下游引物 *mcyA*-Cd 1R (5'-AAAAGTGTTC TATT AGCGGCTCAT-3'),其中上游引物 5'端带有 40bp“GC”夹,该对引物能够扩增所有产毒蓝藻 *mcyA* 基因部分序列,片段长度为 291bp 或 297bp^[23]。PCR 反应体系为 25 μL,其中含有 12.5 μL 混合液(上海博彩),0.25 μL 引物(10 μmol·L⁻¹)、3 μL(水样)或 5 μL(泥样)DNA 模板,其余部分用超纯水补足。PCR 反应在 S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)PCR 仪上进行。为了提高 PCR 扩增的特异性,采用 touch-down 模式,PCR 反应程序如下:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,退火 40 s(退火温度从 60℃降到 56℃,每个循环降低 1℃),72℃延伸 30 s,5 个循环;后按照如下程序进行:94℃变性 40 s,56℃退火 40 s,72℃延伸 30 s,30 个循环,最后 72℃延伸 5 min。取 3 μL PCR 产物跑 1.5%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

DGGE 电泳采用 CBS-DGGE 2001 垂直分析系统

(CBS, American)。10%的聚丙烯酰胺凝胶浓度,变性梯度从 25%~45%(100%变性定义为 7 mol·L⁻¹ 的尿素,40%的去离子甲酰胺),每个泳道加入 30 μL PCR 扩增产物。电泳条件为:恒温 60℃,75 V 恒压 16 h,1×TAE 电泳缓冲液(40 mol·L⁻¹ Tris,20 mmol·L⁻¹ 冰醋酸,1 mmol·L⁻¹ EDTA,pH8.0)。电泳结束后用 SYBR Green I 染色(1:10 000)30 min,用 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。DGGE 图谱用 Quantity one 4.62 软件进行分析,对每个泳道内的条带进行识别,同时辅以手工校正。基因型的丰度用通过 Quantity one 软件分析后得到的波峰面积表示,泳道中条带的相对丰度低于 1%不进行分析。基因型组成多样性采用 Shannon 指数(H)表示:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \lg P_i$$

$$P_i = n_i / N \quad (n_i \text{ 为峰面积}; N \text{ 为所有峰的总面积})$$

1.7 定量 PCR(qPCR)

利用室内纯培养产毒微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7806 作为标准 DNA 浓度构建标准曲线。离心收集处于对数生长期的藻细胞,按照文献[21]的方法提取基因组 DNA,用 Bio Photometer Plus(Eppendorf)测定 DNA 浓度(ABS_{260})和纯度(ABS_{260}/ABS_{280})。按照 10 倍梯度稀释,设置 6 个浓度梯度,每个梯度 3 个平行。根据定量 PCR 反应结果,建立基因组拷贝数和循环阈值(Cycle threshold, Ct)线性回归方程。qPCR 反应体系 25 μL,其中 12.5 μL 2×SYBR premix Ex Taq™ 混合液(TaKaRa),正反引物各 1 pmol,2 μL 模板,超纯水补足 25 μL。PCR 反应在 Mastercycler ep realplex PCR 仪完成(Eppendorf)。反应程序如下:95℃预变性 2 min,95℃变性 20 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 30 秒,40 个循环,之后进行溶解曲线(melting curve)分析。每个样品定量 PCR 反应均设置 3 个平行,反应体系为 25 μL,引物 1 pmol、2 μL(水样)或 5 μL(泥样)模板。实验结果用定量 PCR 仪自带的 Re-plex 软件分析,根据标准曲线得出样品中产毒微囊藻种群丰度。扩增效率(amplification efficiency) $e = 10^{-1/S} - 1$ (S 代表标准曲线斜率)。

1.8 微囊藻毒素测定

参照国标方法(GB/T 20466—2006),取 500 mL 水样,经玻璃纤维滤膜(whatman GF/C)过滤,滤液经固相萃取程序进行富集和洗脱,洗脱液用旋转蒸发仪浓缩,用 1 mL 甲醇溶解浓缩物质,涡旋混合仪充分混合,用氮气将甲醇吹干,最后用甲醇定容,-20℃保

存,用于高效液相色谱(HPLC)分析。

微囊藻毒素检测采用美国安捷伦公司 Agilent HPLC1200 高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器。检测条件为:色谱柱 Ageilent Eclipse XDB-C18(5 μm,4.6×150 mm),波长 238 nm,柱温 25 ℃,进样量 20 μL,流速 1 mL·min⁻¹; 流动相 A 为含 0.04%三氟乙酸超纯水,流动相 B 为乙腈,浓度梯度为:起始值 70%流动相 A+30%流动相 B (时间 10 min),60%流动相 A+40%流动相 B (时间 15 min)。MC-RR、MC-YR 和 MC-LR 标准品购自 Sigma 公司,溶于甲醇中,-20 ℃ 冷冻保存备用。

2 结果

2.1 采样点的理化参数

采样期间太湖平均水温为 29.5 ℃, 其他水质参数如表 1 所示,总氮浓度范围为 0.778~3.520 mg·L⁻¹,总磷浓度范围为 0.025~0.377 mg·L⁻¹。水体 pH 大于 8.0,水质呈碱性。采样期间,太湖正发生大面积蓝藻水华,叶绿素 a 浓度空间分布如图 2 所示,平均值为

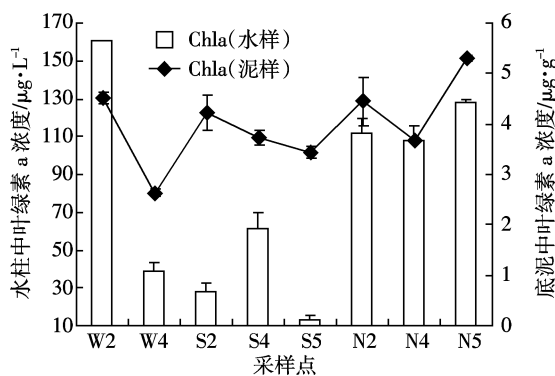


图 2 水柱和表层底泥中叶绿素 a 浓度分布
Figure 2 The distribution of Chla concentrations in water body and surface sediments of Tai Lake

81.24 μg·L⁻¹,采样点 S5 浓度最低,为 13.09 μg·L⁻¹,其中采样点 W2、N2 和 N5 均超过 100 μg·L⁻¹。底泥中总氮浓度范围为 1.534~3.684 mg·g⁻¹,总磷浓度范围为 0.256~0.618 mg·g⁻¹,叶绿素 a 浓度范围为 2 624.82~5 298.25 ng·g⁻¹。

2.2 不同湖区产毒蓝藻基因型组成分析

不同湖区水柱和底泥中 mcyA 基因 DGGE 指纹图谱如图 3 所示。共检测到 12 种主要的基因型。在不同湖区,mcya 基因型组成及其丰度存在差异,其中条带 10 是所有样品中的优势基因型,不同湖区基因型多样性指数存在差异(表 2)。在同一采样点,水体中 mcyA 基因型丰富度高于底泥,说明夏季蓝藻细胞大多存在于水柱中。同时发现,某些基因型仅在底泥或水柱中出现,而有些基因型则同时出现在水柱和底泥中,比如条带 6 仅在水柱中出现,而条带 4 在底泥中出现频率较高,水柱中仅在采样点 S2 中出现,而条带 1、3、8 和条带 10 在水柱和底泥中均有出现。湖心(S4)受污染较轻,水柱和底泥中 mcyA 基因型丰富度最少,多样性指数最低。不同湖区样品 mcyA 基因型组成的相似性系数如表 3 所示,采样点 W2 和 S5 产毒微囊藻种群相似性系数最小,为 52.7%,采样点 N2 和 N4 产毒微囊藻种群相似性最高,为 90.7%。

2.3 太湖产毒蓝藻种群丰度

定量 PCR 扩增效率 e=0.98,荧光定量 PCR 分析得到标准曲线如图 4 所示,其方程如下:

$$Y=-3.333X+45.51 \quad (R^2=0.992,P<0.01)$$

式中:Y 为循环阈值;X 为微囊藻藻株 *M.aeruginosa* 7806 基因组拷贝数。

根据荧光定量 PCR 结果分析,得出水体和底泥中产毒藻细胞种群丰度(图 5 和图 6)。可以看出,不同湖区产毒蓝藻种群丰度差异显著:其中采样点 W4、S2 和 S4 种群丰度较低,而位于富营养化严重湖

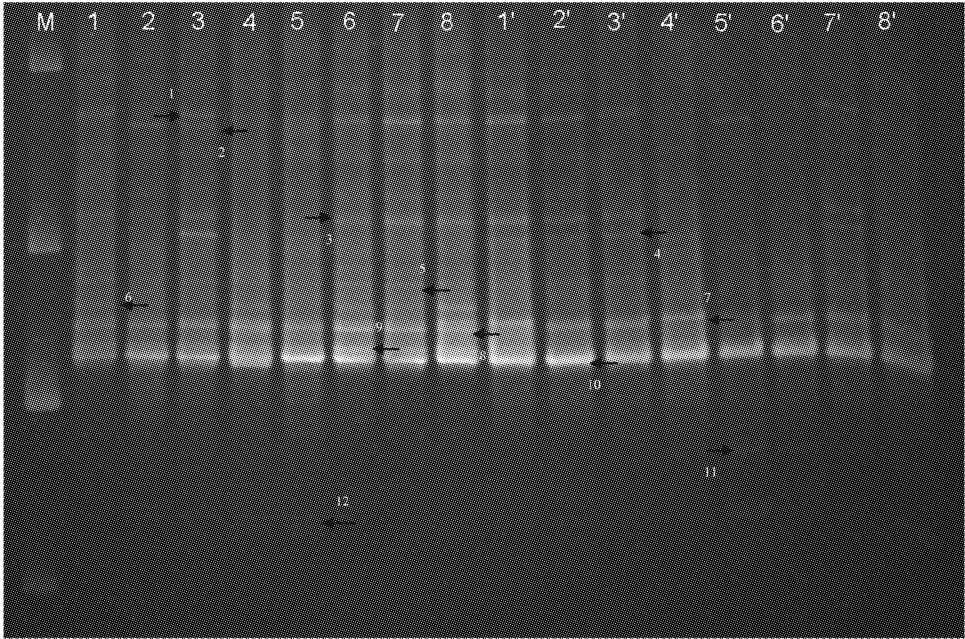
表 1 采样点水体的理化参数

Table 1 Physicochemical parameters in the different sampling points of Tai Lake

采样点	水样 TN/ mg·L ⁻¹	水样 TP/ mg·L ⁻¹	PO ₄ -P/ μg·L ⁻¹	NH ₄ -N/ mg·L ⁻¹	NO ₃ -N/ mg·L ⁻¹	NO ₂ -N/ mg·L ⁻¹	泥样 TN/ mg·g ⁻¹	泥样 TP/ mg·g ⁻¹	pH	Turbidity NTU
W2	1.355	0.082	7.376	0.081	0.034	0.001	3.684	0.618	8.96	86.2
W4	1.710	0.059	6.452	0.054	0.804	0.003	1.889	0.350	8.15	45.3
S2	1.348	0.025	11.655	0.037	0.980	0.002	1.534	0.331	8.32	28.7
S4	1.758	0.044	12.855	0.060	0.640	0.008	1.711	0.331	8.56	42.7
S5	0.778	0.041	9.585	0.066	0.319	0.004	1.508	0.284	8.15	23.2
N2	1.567	0.160	40.133	0.162	0.014	0.014	2.558	0.381	8.65	36.5
N4	1.399	0.091	13.824	0.066	0.003	0.004	1.621	0.256	8.48	35.3
N5	3.520	0.377	125.172	0.117	0.231	0.237	1.962	0.350	8.26	56.5

表 2 不同湖区 *mcyA* 基因型丰富度和香农多样性指数

Table 2 The Band richness and Shannon–Wiener diversity index of <i>mcyA</i> genotypes in water column and sediment in Tai Lake								
采样点	W2	W4	S2	S4	S5	N2	N4	N5
水样 DGGE 条带数	8	8	9	7	9	7	7	8
水样多样性指数	0.825	0.563	0.663	0.548	0.489	0.638	0.652	0.685
优势基因型所占比例	0.29	0.58	0.54	0.57	0.67	0.49	0.49	0.47
泥样 DGGE 条带数	6	6	6	3	5	4	6	4
泥样多样性指数	0.556	0.325	0.413	0.122	0.445	0.169	0.369	0.263
优势基因型所占比例	0.58	0.82	0.74	0.93	0.69	0.91	0.78	0.83



泳道 1~8 分别表示水样 W2、W4、S2、S4、S5、N2、N4、N5 采样点；泳道 1'~8' 分别表示泥样 W2、W4、S2、S4、S5、N2、N4、N5 采样点
lane 1~8 indicating W2、W4、S2、S4、S5、N2、N4、N5 sampling sites from water body respectively；lane 1'~8' indicating W2、W4、S2、S4、S5、N2、N4、N5 sampling sites from sediment respectively.

图 3 不同湖区水样和泥样 *mcyA*–DGGE 指纹图谱

Figure 3 DGGE patterns of *mcyA* gene fragement from the water and sediment samples in Tai Lake

表 3 不同湖区水柱中产毒蓝藻种群相似性系数(%)

Table 3 Similarity coefficient of toxic cyanobacterium population in different lake areas(%)								
采样点	W2	W4	S2	S4	S5	N2	N4	N5
W2	100.0							
W4	54.4	100.0						
S2	59.0	86.6	100.0					
S4	57.0	87.3	84.8	100.0				
S5	52.7	87.6	85.0	85.9	100.0			
N2	65.0	82.5	85.4	90.2	82.3	100.0		
N4	71.0	79.6	84.9	81.0	78.6	90.7	100.0	
N5	62.9	70.4	73.7	79.9	77.2	85.2	79.3	100.0

区 N2、N5 和 W2 采样点种群丰度较高，说明富营养化水平对产毒藻细胞种群丰度具有重要影响。湖区间底泥中产毒蓝藻种群丰度波动小于水体，其中竺山湾（N5）种群丰度最高，而南太湖（S2）种群丰度最低，和

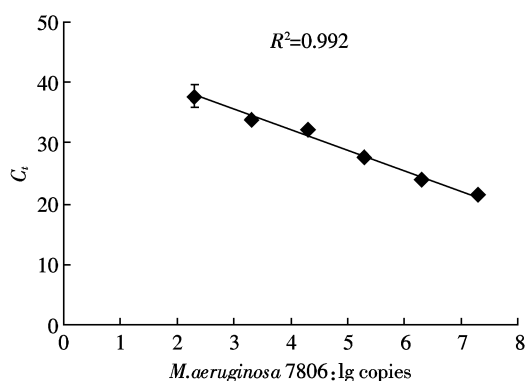


图4 产毒蓝藻定量 PCR 标准曲线

Figure 4 Standard curve of quantitative real-time PCR based on *mcyA* gene

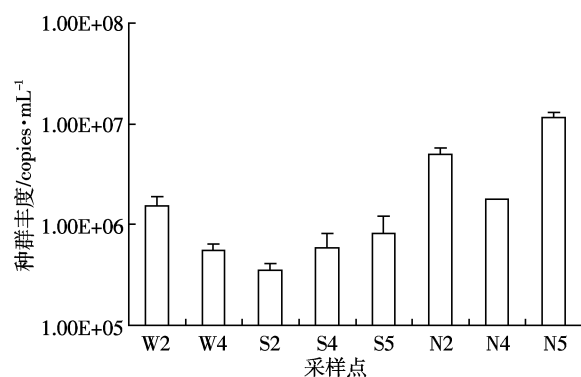


图5 水体中产毒蓝藻种群丰度

Figure 5 Abundance of the toxic cyanobacteria in water body of Tai Lake

水体中产毒蓝藻种群丰度变化趋势基本一致。

2.4 不同湖区微囊藻毒素浓度

根据微囊藻毒素 3 种异构体标准品的 HPLC 图谱可以得出 3 种异构体的出峰顺序为 MC-RR、MC-YR 和 MC-LR,其保留时间分别为 5.79、10.05 min 和 11.19 min。样品中 3 种异构体的出峰时间和标注图谱基本一致。采用外标法进行定量分析。水样中溶解性

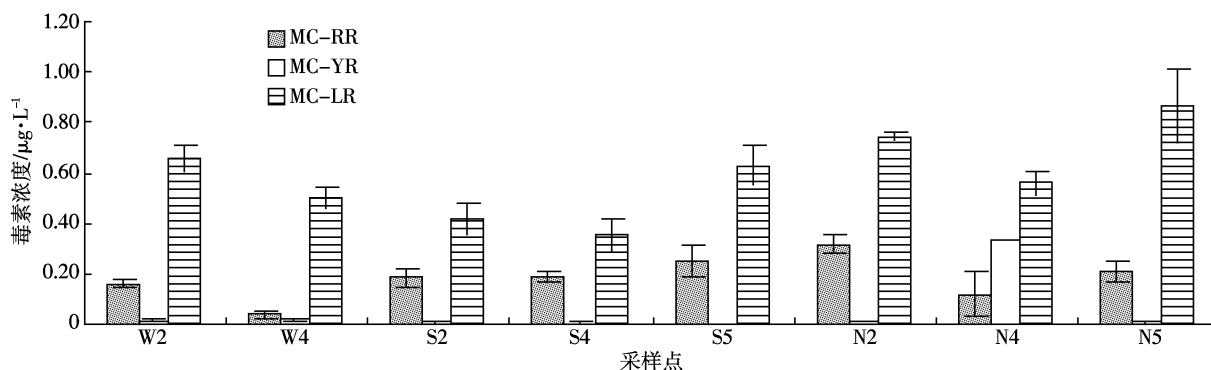


图7 水柱中胞外微囊藻毒素浓度

Figure 7 The changes of extra MC concentrations in water column of Tai Lake

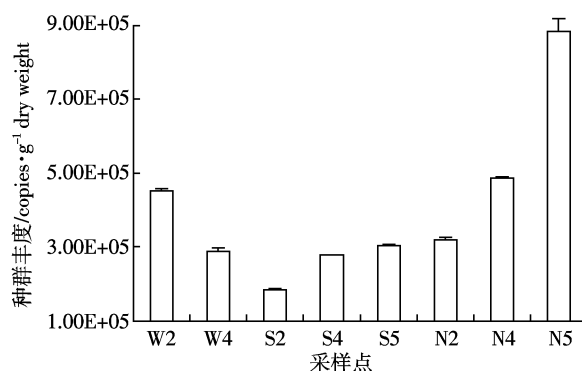


图6 底泥中产毒蓝藻种群丰度

Figure 6 Abundance of toxic cyanobacteria in surface sediment of Tai Lake

微囊藻毒素浓度的空间分布如图 7 所示,可以看出,MC-LR 在 3 种异构体中的浓度最高,是主要的微囊藻毒素,在所有湖区中其占总微囊藻含量的比例均超过 50%,其次是 MC-RR,浓度最低的是 MC-YR,但在采样点 N4,MC-YR 的浓度高于 MC-RR,其中采样点 S2、N4 和 N5 总微囊藻毒素浓度均超过 1 μg·L⁻¹。

3 讨论

从本文的研究结果来看,太湖夏季蓝藻水华发生范围已经扩展到大部分湖区,并且蓝藻水华强度比较严重,这和朱广伟分析的结果是一致的^[17]。在本研究中,采样点叶绿素 a 浓度平均值为 81.24 μg·L⁻¹,富营养化严重的湖区,如梅梁湾(N2)、竺山湾(N5)和西太湖(W2)等湖区叶绿素 a 浓度均超过 100 μg·L⁻¹。同时,结合 PCR-DGGE 和 HPLC 的分析结果,说明太湖蓝藻水华是产毒蓝藻水华,产毒蓝藻群落有多种基因型组成,不同湖区基因型组成及其丰度存在差异。

近年来,荧光定量 PCR 技术在蓝藻水华研究中应用广泛。与传统的显微观察法相比较,该技术灵敏度高、重复性好,能够同时处理大批量样品^[24-26]。同时,

该技术不受样品形态的限制,可以对水样和泥样中的蓝藻进行定量化研究。以 *mcy* 基因簇成员作为定量 PCR 扩增目标已成为研究产毒蓝藻水华的最重要的方法之一。本文选用的引物能够扩增微囊藻属 (*Microcystis*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*)、浮游蓝丝藻属 (*Planktothrix*) 中产毒藻株的 *mcyA* 基因^[23]。因此该引物被广泛用于检测产毒蓝藻水华和定量化研究^[19,27]。从本文的研究结果可以看出,水柱中湖区间产毒藻细胞种群丰度差异显著:富营养化水平较高的 W2、N2、N4 和 N5 采样点种群丰度较高,其中采样点 N5 最高,为 1.14×10^7 copies $\cdot$ mL⁻¹;富营养化水平较低的采样点 S2、S4、S5 和 W4 种群丰度较低,其中 S2 点种群丰度最低,为 3.53×10^5 copies $\cdot$ mL⁻¹,产毒藻细胞种群丰度几乎相差 2 个数量级。说明富营养化水平较高的湖区,产毒藻细胞种群丰度也随之增加,即高浓度营养盐条件下,产毒藻细胞生长速率高于低营养条件下的生长速率,这和许多文献报道的结果是一致的。比如,Rinta 等通过对 Erie 湖蓝藻、微囊藻和产毒微囊藻丰度与环境因子之间的分析发现,随总磷浓度增加,产毒微囊藻种群丰度也增加,两者之间呈显著正相关^[28]。Davis 等通过原位营养盐添加实验同样证明,单一提高 N 或 P 或同时 N、P 浓度可以提高产毒藻细胞生长速率,同时也增加了胞内微囊藻毒素浓度^[29]。Shen 等研究了太湖不同富营养化湖区微囊藻毒素浓度随时间变化规律,发现富营养化水平高的湖区胞内微囊藻毒素含量也较高,推测可能是产毒藻细胞丰度差异所致,本研究结果验证了这一推测^[30]。底泥中产毒藻细胞种群丰度研究资料较少,仅见 Rinta-Kanto 等对底泥中产毒微囊藻种群丰度的动态进行了研究,发现微囊藻不仅存在于底泥表面,在 10~12 cm 深度中也可以检测出 *mcy* 基因^[31]。从本研究的结果来看,夏季底泥中产毒蓝藻种群丰度同样存在差异,与水体相比,底泥中产毒蓝藻种群波动较小,且变化趋势与水体基本一致,说明在夏季底泥中产毒蓝藻种群丰度受水体种群丰度的影响。

DGGE 是检测微生物多样性的一种快速可靠的方法,其图谱中条带的数量和亮度,可相应地反映环境样品中微生物物种的数量和优势种群。Janse 等利用 16S-23S rRNA ITS 序列 DGGE 研究了蓝藻遗传多样性及其动态变化^[32]。谭啸等利用该方法研究了太湖微囊藻群落组成的季节变化规律,发现微囊藻种群可以分为夏秋和冬春 2 个亚群^[18]。Ye 等利用 *mcyA*-DGGE 分析方法研究了梅梁湾产毒蓝藻群落结构的

周年变化,发现水华期间产毒蓝藻群落结构多样性高于非水华期间,水华早期多样性高于水华后期^[19]。本文首次研究了太湖夏季蓝藻水华期间水柱和底泥中产毒蓝藻群落组成的空间变化。总的来看,在夏季蓝藻水华爆发期间,水柱中 *mcyA* 基因型多样性高于底泥,而在冬季,底泥中产毒 *mcyA* 基因型多样性高于水体(数据未给出)。该结果与 Humber 等的研究结果是一致的^[33]。Humber 等采集了法国一水库冬夏 2 季节水柱和底泥样品,通过分析微囊藻 16S-23S rRNA ITS 序列证明了水柱和底泥中微囊藻种群没有遗传差异,微囊藻种群生活史包含两个较为明显阶段即水柱中生长阶段和底栖阶段。

本研究也从另一个角度验证了孔繁翔和高光提出的长江中下游大型浅水湖泊蓝藻水华形成机理的四阶段理论^[34]。同时发现,不同湖区基因型组成及其丰度存在显著差异,富营养水平较为接近的湖区产毒蓝藻群落组成相似性也越高,反之亦然。这可能与产毒藻株对营养盐浓度适应差异所致。在一些湖泊中,微囊藻遗传多样性比较丰富,营养盐对不同基因型藻株具有选择作用。Wilson 等通过分离湖泊不同磷浓度(10~100 μ g $\cdot$ L⁻¹)条件下微囊藻株进行室内培养,发现微囊藻株的存活率和总磷浓度呈正相关性^[35]。Raikow 等将寡营养湖泊(TP<10 μ g $\cdot$ L⁻¹)微囊藻株在低营养和高营养培养基中进行研究,发现在低营养条件下微囊藻株的存活率较高^[36]。因此,营养盐浓度是决定产毒蓝藻群落结构的重要因子。

太湖微囊藻毒素的时空变化已有许多研究。许秋瑾等对太湖 6 个采样点进行了为期 1 年的微囊藻毒素监测,并探讨了微囊藻毒素随时间变化的趋势及其与浮游生物的关系^[37]。Liu 等分析了梅梁湾和贡湖湾胞内和胞外的微囊藻毒素的动态变化及其与环境因子的关系^[38]。Shen 等利用 HPLC 和 ELISA 方法研究了不同富营养化水平湖区水华蓝藻毒性随时间动态变化^[39]。总的来说,太湖微囊藻毒素在夏秋季节较高,不同湖区微囊藻毒素浓度差异较为显著,富营养化水平高的湖区蓝藻水华毒性较高。从本文的研究结果可以得出,太湖所有湖区中,MC-LR 在 3 种异构体中的浓度最高,所占比例均超过 50%,说明 MC-LR 是太湖蓝藻水华产生的主要毒素,这和 Shen 等得出的结论是一致的^[39]。同时可以发现,不同湖区毒素浓度有一定差异,总的来看,水体中总微囊藻毒素浓度与水柱中叶绿素 a 浓度和产毒微囊藻种群丰度分布趋势具有一致性,说明蓝藻生物量和微囊藻毒素浓度之间存

在相关性,这和许多野外调查得出结论是一致的^[37,39],其中梅梁湾、竺山湾和贡湖湾的总微囊藻毒素浓度均超过 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,在蓝藻水华暴发期间,太湖作为饮用水源,潜在的健康风险不容忽视。

4 结论

(1)太湖蓝藻水华是有毒蓝藻水华,能够产生微囊藻毒素。发生范围已经覆盖了除东太湖以外的大部分湖区,暴发强度非常严重,不同湖区水体中均能检测到微囊藻毒素,部分湖区浓度超过 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2)产毒藻细胞种群丰度随富营养水平的提高而呈增加趋势,说明高浓度的营养盐有利于产毒藻细胞的生长,消减水体中的营养盐是限制产毒藻细胞种群丰度的重要措施。

(3)不同湖区水体和底泥中产毒蓝藻群落结构存在差异,夏季水柱中的产毒蓝藻基因型多样性高于底泥,不同基因型藻株对环境因子的适应能力差异显著,应开展太湖微囊藻的分离、培养、生长和遗传特征的研究。

参考文献:

- [1] Sivone K, Jones G. Cyanobacterial toxins//Chorus I, Bartram J. Eds. Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. WHO Ed. E & FN Spon, 1999: 41–111.
- [2] Spoof L, Vesrwrjvust P, Lindholm T, et al. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1020: 105–119.
- [3] Obergikster P J, Myburgh J G, Govender D, et al. Identification of toxicogenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(4): 1177–1182.
- [4] Smith J L, Boyer G L, Zimba P V. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture[J]. *Aquaculture*, 2008, 280(1): 5–20.
- [5] Defiguwiredo D R, Azeiteiro U M, Esteves S M, et al. Microcystin-producing blooms: A serious global public health issue[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59(2): 151–163.
- [6] 谢平. 微囊藻毒素对人类健康影响相关研究的回顾[J]. 湖泊科学, 2009, 21(5): 603–613.
XIE Ping. A review on the studies related to the effects of microcystins on human health[J]. *J Lake Sci*, 2009, 21(5): 603–613.
- [7] Humpage A R, Falconer I R. Microcystin-LR and liver tumor promotion: Effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *Environmental Toxicology*, 1999, 14: 61–75.
- [8] 俞顺章, 赵宁, 资晓林, 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.
- [9] 周伦, 鱼达, 余海, 等. 饮用水源中的微囊藻毒素与大肠癌发病的关系[J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(4): 224–226.
ZHOU Lun, YU Da, YU Hai, et al. Drinking water types, microcystins and colorectal cancer[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2000, 34(4): 224–226.
- [10] Kardinaal W E A, Janse I, Agterveld M K, et al. *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes [J]. *Aquat Microb Ecol*, 2007, 48: 1–12.
- [11] Ohtake A, Shirai M, Aida T, et al. Toxicity of *Microcystis* species isolated from natural blooms and purification of the toxin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(12): 3202–3207.
- [12] Vezoe C, Briant L, Sivonen K, et al. Variation of microcystin content of cyanobacteria blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France)[J]. *Microb Ecol*, 1998, 35: 126–135.
- [13] Kurmayer R, Christensen G. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria[J]. *Freshwater Reviews*, 2009, 2: 31–50.
- [14] Dosanjosa F M, Bittencourt-oliveira M D C, Zajac M P, et al. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event[J]. *Toxicon*, 2006, 48(3): 239–245.
- [15] Kurmayer R, Kutznerberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6723–6730.
- [16] Chen Y W, Qin B Q, Teubner K, et al. Changes of nutrients and phytoplankton chlorophyll-a in a large shallow lake, Taihu, China: 8-year investigation[J]. *Hydrobiologia*, 2003, 506/509: 273–279.
- [17] 朱广伟. 太湖富营养化现状及原因分析[J]. 湖泊科学, 2008, 20(1): 21–26.
ZHU Guang-wei. Eutrophic status and causing factors for a large, shallow and eutrophic Lake Taihu, China[J]. *J Lake Sci*, 2008, 20(1): 21–26.
- [18] 谭啸, 孔繁翔, 曾庆飞, 等. 太湖中微囊藻群落季节变化分析[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(1): 47–52.
TAN Xiao, KONG Fan-xiang, ZENG Qing-fei, et al. Seasonal variation of microcystis community in Taihu Lake[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(1): 47–52.
- [19] YE W J, LIU X L, TAN J, et al. Diversity and dynamics of microcystin-producing cyanobacteria in China's third largest lake, Lake Taihu[J]. *Harmful algae*, 2009, 8(5): 637–644.
- [20] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
JIN Xiang-can, TU Qing-ying. Research criterion of lake eutrophication[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990.
- [21] Rinta-Kanto J M, Ouellette A J A, Boyer G L, et al. Quantification of Toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time[J]. *Environ Sci Technol*, 2005,

- 39(11):4198–4205.
- [22] 申慧彦, 李世杰. 湖泊沉积物中 DNA 提取与 PCR 扩增[J]. 地球科学进展, 2008, 23(4):433–438.
- SHEN Hui-yan, LI Shi-jie. Extraction and PCR amplification of DNA from Lake Sediments[J]. *Advances in Earth Science*, 2008, 23(4):433–438.
- [23] Hisvergues M, Leorouhiainen G C, Sivonen K, et al. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera[J]. *Arch Microbiol*, 2003, 180:402–410.
- [24] Furukawa K, Noda N, Tsuneda S, et al. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on Microcystin Synthetase A Gene[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(2):90–96.
- [25] Foulds I V, Granacki A, Xiao C, et al. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93, 825–834.
- [26] Zhang T, Fang H P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70:281–289.
- [27] Rinta-Kanto J M, Wilhelm W. Diversity of microcystin-producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 22(7):5083–5085.
- [28] Rinta-Kanto J M, Konopka E A, Debruyne J M, et al. Lake Erie *Microcystis*: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake[J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(5):665–673.
- [29] Davis T W, Berry D L, Boyer G L, et al. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms[J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(5):715–725.
- [30] Shen P P, Shi Q, Hua Z C, et al. Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake China[J]. *Environment International*, 2003, 29:641–647.
- [31] Rinta-Kanto J M, Saxton M A, Debruyne J M, et al. The diversity and distribution of toxigenic *Microcystis* spp. in present day and archived pelagic and sediment samples from Lake Erie[J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(3):385–394.
- [32] Janse I, Meima M, Kapdinaal W E A, et al. High-Resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11):6634–6643.
- [33] Humber J F, Dutris-Latour D, Berre B L, et al. Genetic diversity in microcystis populations of a french storage reservoir assessed by sequencing of the 16S–23S rRNA intergenic spacer[J]. *Microbiology Ecology*, 2005, 49:308–314.
- [34] 孔繁翔, 高 光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考[J]. 生态学报, 2005, 25(3):499–595.
- KONG Fan-xiang, GAO Guang. Hypothesis on cyanobacteria bloom-forming mechanism in large shallow eutrophic lakes[J]. *Acta Ecologia Sinica*, 2005, 25(3):499–595.
- [35] Wilson A E, Sarnele O, Neilan B A, et al. Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among Lakes: Implications for Harmful Algal Blooms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10):6126–6133.
- [36] Raikow D F, Sarnelle O, Wilson E, et al. Dominance of the noxious cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in low-nutrient lakes[J]. *Limnol Oceanogr*, 2004, 49(2):482–487.
- [37] 许秋瑾, 高 光, 陈伟民, 等. 太湖微囊藻毒素年变化及其与浮游生物的关系[J]. 中国环境科学, 2005, 25(1):28–31.
- XU Qiu-jin, GAO Guang, CHEN Wei-min, et al. Periodical change of microcystin in Taihu Lake and its relationship with plankton [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(1):28–31.
- [38] Liu Y Q, Xie P, Zhang D W, et al. Seasonal dynamics of microcystins with associated biotic and abiotic parameters in two bays of Lake Taihu, the third largest freshwater lake in China[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2008, 80:24–29.
- [39] 张 娟, 梁前进, 周云龙, 等. 官厅水库水体中微囊藻毒素及其与微囊藻细胞密度相关性研究[J]. 安全与环境学报, 2005, 6(5):53–56.
- ZHANG Juan, LIANG Qian-jin, ZHOU Yun-long, et al. Study on microcystins and their correlation with microcystis cell densities in Guanting Reservoir[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2005, 6(5):53–56.