

# PCR 扩增法检测江苏省 5 大淡水湖泊 产毒微囊藻的空间分布

李大命<sup>1,2</sup>, 阳 振<sup>2</sup>, 于 洋<sup>2</sup>, 唐晟凯<sup>1</sup>, 张彤晴<sup>1</sup>, 周 刚<sup>1</sup>, 潘建林<sup>1</sup>

(1.江苏省淡水水产研究所, 南京 210017; 2.中国科学院南京地理与湖泊研究所 湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

**摘 要:**微囊藻毒素(Microcystin, MC)的产生受微囊藻毒素合成酶基因簇(microcystin biosynthesis gene, *mcy*)调控, 常用 PCR 扩增 *mcy* 基因检测产毒微囊藻。采集江苏省 5 大淡水湖泊——太湖、溧湖、高宝-邵伯湖、洪泽湖和骆马湖的水样, 测定水体营养盐浓度和叶绿素 a 浓度, 根据叶绿素 a 浓度计算 5 个湖泊的富营养化指数(Trophic state index, TSI), 同时应用单一和多重 PCR 扩增 *mcy* 基因。结果表明, 太湖和溧湖处于富营养和超富营养化水平, 洪泽湖和骆马湖处于中营养和富营养化水平, 高宝-邵伯湖处于寡营养水平。太湖、溧湖、洪泽湖和骆马湖的所有水样均检出 *mcy* 基因, 4 个湖泊水体受到微囊藻毒素的潜在威胁, 高宝-邵伯湖没有检测出 *mcy* 基因的存在, 尚未受微囊藻毒素的污染。

**关键词:**蓝藻水华; 微囊藻毒素合成酶基因; 富营养化指数; 多重 PCR

**中图分类号:**X830.2    **文献标志码:**A    **文章编号:**1672-2043(2012)11-2215-08

## Spatial Distribution of Toxic *Microcystis* Detected by PCR Amplification in Five Freshwater Lakes of Jiangsu Province, China

LI Da-ming<sup>1,2</sup>, YANG Zhen<sup>2</sup>, YU Yang<sup>2</sup>, TANG Sheng-kai<sup>1</sup>, ZHANG Tong-qing<sup>1</sup>, ZHOU Gang<sup>1</sup>, PAN Jian-lin<sup>1</sup>

(1.Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 2.State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Blooms of toxic *Microcystis* have become increasing common in eutrophic freshwater lakes of the world. The most prominent toxin produced by *Microcystis* is the hepatotoxin microcystin (MC), a cyclic heptapeptide which pose significant threat to human and animal health. MC are synthesized by the enzyme complex microcystin synthetase, which includes a nonribosomal peptide synthetase and a polyketide synthase, both encode by microcystin biosynthesis genes (*mcy*). Therefore, *mcy* genes are the most common gene markers used for detection of toxic *Microcystis* in natural environments by means of PCR amplification. In this study, water samples were collected from different lake area of five large shallow freshwater lakes: Lake Tai, Lake Ge, Lake Gaobao-Shaobo, Lake Hongze and Lake Luoma in summer season of 2011. For all 32 water samples, the concentrations of Chlorophyll a (Chl-a) and nutrients were measured. Furthermore, trophic state index (TSI) was calculated from Chl-a concentrations. Meanwhile single and multiplex PCR amplification were used to detect whether the presence of *mcy* genes or not in water samples. TSI values demonstrated that Lake Tai and Lake Ge were in eutrophic and hypereutrophic state, Lake Hongze and Lake Luoma were in mesotrophic and eutrophic state and Lake Gaobao-Shaobo was in oligotrophic state. The results from PCR analysis showed that there were the presence of PCR products of partial *mcyA*, *mcyD* and *mcyG* genes in water samples from Lake Tai, Lake Ge and Lake Hongze, only *mcyA* PCR products were detected in Lake Luoma, but no any PCR products were found in Lake Gaobao-Shaobo water samples. In conclusion, Lake Tai, Lake Ge, Lake Hongze and Lake Luoma are potentially contaminated by microcystin, however, no microcystin are present in the Lake Gaobao-Shaobo now.

**Keywords:** cyanobacterial bloom; microcystin synthetase gene; trophic state index; multiple PCR;

收稿日期: 2012-03-30

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); 江苏省内陆省管湖泊资源环境监测(江苏省海洋与渔业局)项目  
作者简介: 李大命(1982—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事有害蓝藻水华检测及湖泊污染生态学研究。E-mail: ldm8212@126.com

湖泊富营养化和全球变暖导致蓝藻水华频繁发生,成为世界各国关注的重大水环境问题之一,其中以微囊藻水华出现频率最高,且大多微囊藻水华能产生具有肝毒性效应的微囊藻毒素(Microcystin,MC),可引发人、畜、鱼、禽慢性或急性中毒甚至死亡。已经证明 MC 是肝癌诱发剂和肿瘤促进因子,严重威胁着人类健康<sup>[1]</sup>。因此,对水体中的产毒微囊藻进行检测非常必要。

微囊藻毒素的产生由微囊藻毒素合成酶基因(microcystin biosynthesis gene)控制<sup>[2-3]</sup>。近年来,国内外学者建立了针对 *mcy* 基因簇的产毒微囊藻的 PCR 检测方法,已经广泛应用于有毒微囊藻水华监测<sup>[4-6]</sup>,其结果与 HPLC 和 ELISA 等针对微囊藻毒素的直接检测结果具有很好的一致性,且该方法具有操作简便、快速、成本低、灵敏度高等优点。

在本研究中,应用单一和多重 PCR 扩增 *mcy* 基因法,对江苏省五大省管淡水湖泊——太湖、溧湖、高宝-邵伯湖、洪泽湖和骆马湖的产毒微囊藻空间分布进行初步研究,为有毒微囊藻水华和微囊藻毒素污染预警提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 采样点和水样采集

采样点分布如图 1 所示,其中太湖设置 8 个采样

点,其他 4 个湖泊均设置 6 个采样点。根据项目要求,于 2011 年夏季(8 月)采集水样,采用 GPS 定位系统,对采样点进行精确定位。用有机玻璃采水器采集表层水样(距水面 0.5 m),混合均匀,取 1.0 L 装入干净玻璃瓶中,带回实验室进行分析。

### 1.2 营养盐浓度

取 50 mL 水样,经玻璃纤维滤膜过滤(GF/F, Whatman),用自动连续流动分析仪(SKALAR, Netherland)测定滤液中的溶解性氮磷,包括硝态氮( $\text{NO}_3^-$ )、铵态氮( $\text{NH}_4^+$ )、亚硝态氮( $\text{NO}_2^-$ )和正磷酸盐( $\text{PO}_4^{3-}$ )。总氮(Total nitrogen, TN)和总磷(Total phosphorus, TP)按照标准方法测定<sup>[7]</sup>。

### 1.3 叶绿素 *a* (Chlorophyll *a*, Chl-*a*) 浓度

根据水样中浮游植物生物量的大小,用 GF/C 滤膜过滤一定体积水样,滤膜置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存。将滤膜放入研磨中,加入 90% 的丙酮,充分研磨,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  避光放置 12 h,然后  $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液定容到 10 mL,用荧光分光光度计(RF5301, Japan)测定,激发波长 350 nm,发射波长 670 nm。根据 Chl-*a* 浓度,计算水体富营养化指数(Trophic state index, TSI)<sup>[8]</sup>。当  $\text{TSI}<37.5$ ,水体处于寡营养水平;当  $37.5<\text{TSI}<52.5$ ,水体处于中营养水平;当  $52.5<\text{TSI}<65$ ,水体处于富营养水平;当  $\text{TSI}>65$ ,处于超富营养化水平<sup>[9]</sup>。

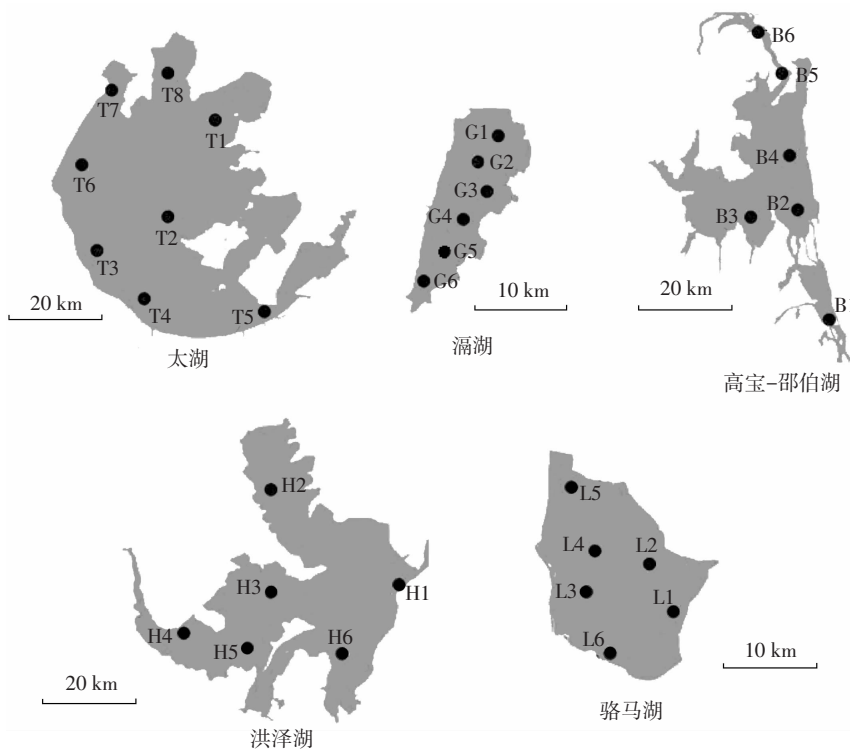


图 1 采样点分布

Figure 1 Sampling locations in five freshwater Lakes

1.4 藻类基因组 DNA 的提取

根据水样中浮游植物生物量的大小,用 0.22 μm 聚碳酸酯滤膜(GTTP, Millipore)过滤一定体积水样。滤膜置于-20 ℃保存。藻类基因组 DNA 提取按照文献进行<sup>[10]</sup>,DNA 用 30 μL 灭菌超纯水溶解,-20 ℃保存备用。

1.5 *mcy*基因的 PCR 扩增

在本研究中,PCR 扩增所用引物如表 1 所示,其中扩增 *mcyA* 基因片段的引物适用于所有蓝藻,而扩增 *mcyD* 和 *mcyG* 基因片段的引物适用于微囊藻。PCR 反应体积为 25 μL,其中含有 12.5 μL PCR 反应混合液(上海博彩),引物 0.2 μL(10 μmol·L<sup>-1</sup>),2 μL 模板,其余部分用超纯水补足。*mcyA* 基因采用单一 PCR 扩增,*mcyD* 和 *mcyG* 基因采用双重 PCR 扩增。PCR 反应在 S1000TM Thermal Cycler PCR 仪(Bio-Rad, USA)上进行。*mcyA* 基因 PCR 反应条件如下:94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 40 s,58 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环,72 ℃延伸 10 min。*mcyD* 和 *mcyG* 基因 PCR 反应条件如下:94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 40 s,56 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 50 s,30 个循环,72 ℃延伸 10 min。取 3 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,Godview 染色,并对图谱进行检测和拍照(Bio-rad, USA)。PCR 反应设置阳性和阴性对照,阳性对照 DNA 模板源于室内纯培养有毒微囊藻株(FACHB-915),阴性对照则用超纯水作为 DNA 模板。

2 结果与分析

2.1 湖泊水体营养盐浓度

五大湖泊采样点水体的营养盐浓度如表 2 所示。总体来看,太湖和溧湖营养盐浓度较高,洪泽湖次之,骆马湖和高宝-邵伯营养盐浓度较低,且不同湖区间存在差异。从总氮和总磷浓度来看,太湖总氮和总磷浓度范围分别为 1.26~4.03 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.044~0.380 mg·L<sup>-1</sup>,平均浓度为 2.10、0.169 mg·L<sup>-1</sup>,其中北部湖区的梅梁湾(T8)和竺山湾(T7)和西北湖区的大浦河口

(T6)采样点氮磷浓度高于其他湖区;溧湖采样点总氮和总磷浓度变化为 2.42~6.00 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.17~0.55 mg·L<sup>-1</sup>,平均浓度为 3.91、0.35 mg·L<sup>-1</sup>,从北部湖区到南部湖区,氮磷浓度呈下降趋势;洪泽湖总氮和总磷浓度变化幅度分别为 1.22~2.25 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.092~0.185 mg·L<sup>-1</sup>,平均浓度分别为 1.56、0.134 mg·L<sup>-1</sup>,其中采样点 H2 和 H3 浓度高于其他湖区;骆马湖总氮和总磷浓度 0.87~3.56 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.050~0.200 mg·L<sup>-1</sup>,平均值分别为 2.09、0.088 mg·L<sup>-1</sup>;不同湖区总氮和总磷浓度变化幅度分别为 1.10~2.23 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.040~0.197 mg·L<sup>-1</sup>,高宝-邵伯湖采样点氮磷浓度变化范围 1.10~2.23 mg·L<sup>-1</sup> 和 0.040~0.197 mg·L<sup>-1</sup>,平均浓度分别为 1.58、0.108 mg·L<sup>-1</sup>。

2.2 湖泊水体叶绿素 a 浓度和富营养化指数

五大湖泊水体叶绿素 a 浓度和富营养化指数如图 2 所示。可以看出,不同湖泊及同一湖泊的不同湖区间叶绿素 a 浓度及富营养化水平存在差异:太湖叶绿素 a 浓度变化范围为 3.36~159.54 μg·L<sup>-1</sup>,平均浓度为 58.69 μg·L<sup>-1</sup>;富营养化指数变化幅度为 42.5~80.3,其中北部和西北湖区(采样点 T6、T7 和 T8)属于超富营养化水平,西南湖区(采样点 T3 和 T4)属于富营养化水平,采样点 T1(贡湖湾)、T2(湖心)和 T5(东太湖)属于中营养水平。溧湖叶绿素 a 浓度变化幅度为 52.19~230.06 μg·L<sup>-1</sup>,平均浓度为 76.33 μg·L<sup>-1</sup>;富营养化指数变化幅度为 69.4~83.9,6 个采样点水体均属于超富营养化水平。洪泽湖叶绿素 a 浓度变化范围为 1.48~28.57 μg·L<sup>-1</sup>,平均值为 7.74 μg·L<sup>-1</sup>;富营养化指数变化幅度为 34.4~63.5,其中采样点 H1 和 H6 水体属于寡营养水平,H2 和 H5 属于中营养水平,H3 和 H4 属于富营养化水平。骆马湖叶绿素 a 浓度变化幅度为 2.28~13.50 μg·L<sup>-1</sup>,平均浓度为 7.02 μg·L<sup>-1</sup>;富营养化指数变化幅度为 38.6~56.1,采样点 L2、L3、L5 和 L6 水体属于中营养化水平,L1 和 L4 水体属于富营养化水平。高宝-邵伯湖水体叶绿素 a 变化幅度为 0.85~1.86 μg·L<sup>-1</sup>,平均浓度为 1.31 μg·L<sup>-1</sup>,

表 1 PCR 扩增引物  
Table 1 Primers for PCR amplification

| 扩增序列                        | 引物序列                                                                | PCR 产物长度/bp |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>mcyA</i> <sup>[11]</sup> | F:5'- AAAATTTAAAGCCGTATCAAA -3'<br>R:5'-AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3' | 297         |
| <i>mcyD</i> <sup>[12]</sup> | F:5'- GACGCTCAAATGATGAAAC -3'<br>R:5'-GCAACCGATAAAACTCCC -3'        | 647         |
| <i>mcyG</i> <sup>[12]</sup> | F:5'- ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC-3'<br>R:5'- AATCGCTAAAACGCCACC-3'       | 425         |

表 2 五大湖泊水体营养盐浓度  
Table 2 Nutrients concentration in water body of five freshwater lakes

| 采样点    |    | TN/mg·L <sup>-1</sup> | TP/mg·L <sup>-1</sup> | TN/TP | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg·L <sup>-1</sup> | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /mg·L <sup>-1</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg·L <sup>-1</sup> | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /μg·L <sup>-1</sup> |
|--------|----|-----------------------|-----------------------|-------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 太湖     | T1 | 1.40                  | 0.091                 | 15.3  | 0.003                                            | 0.004                                            | 0.066                                            | 13.824                                            |
|        | T2 | 1.76                  | 0.044                 | 40.1  | 0.64                                             | 0.008                                            | 0.06                                             | 12.855                                            |
|        | T3 | 1.67                  | 0.114                 | 14.6  | 0.237                                            | 0.018                                            | 0.042                                            | 44.232                                            |
|        | T4 | 1.42                  | 0.109                 | 13    | 0.458                                            | 0.004                                            | 0.028                                            | 6.082                                             |
|        | T5 | 1.26                  | 0.091                 | 13.8  | 0.28                                             | 0.006                                            | 0.023                                            | 11.973                                            |
|        | T6 | 4.03                  | 0.38                  | 10.6  | 0.285                                            | 0.032                                            | 0.385                                            | 192.685                                           |
|        | T7 | 3.72                  | 0.367                 | 10.1  | 0.228                                            | 0.247                                            | 0.107                                            | 115.172                                           |
|        | T8 | 1.57                  | 0.16                  | 9.8   | 0.014                                            | 0.014                                            | 0.162                                            | 40.133                                            |
| 溧湖     | G1 | 6.00                  | 0.50                  | 12.1  | 0.98                                             | 0.35                                             | 0.088                                            | 250.85                                            |
|        | G2 | 4.35                  | 0.42                  | 10.4  | 0.75                                             | 0.25                                             | 0.062                                            | 112.48                                            |
|        | G3 | 5.14                  | 0.55                  | 9.3   | 0.95                                             | 0.37                                             | 0.052                                            | 238.33                                            |
|        | G4 | 3.07                  | 0.23                  | 13.1  | 0.87                                             | 0.15                                             | 0.042                                            | 77.77                                             |
|        | G5 | 2.42                  | 0.20                  | 12.1  | 0.65                                             | 0.12                                             | 0.035                                            | 75.26                                             |
|        | G6 | 2.50                  | 0.17                  | 14.6  | 0.85                                             | 0.24                                             | 0.072                                            | 58.18                                             |
| 洪泽湖    | H1 | 1.22                  | 0.092                 | 13.3  | 0.35                                             | 0.043                                            | 0.043                                            | 17.9                                              |
|        | H2 | 1.67                  | 0.185                 | 9.0   | 0.94                                             | 0.163                                            | 0.329                                            | 87.32                                             |
|        | H3 | 2.25                  | 0.177                 | 12.7  | 0.76                                             | 0.1                                              | 0.034                                            | 39.81                                             |
|        | H4 | 1.37                  | 0.105                 | 13    | 0.51                                             | 0.061                                            | 0.02                                             | 22.57                                             |
|        | H5 | 1.46                  | 0.115                 | 12.7  | 0.08                                             | 0.006                                            | 0.031                                            | 9.35                                              |
|        | H6 | 1.38                  | 0.128                 | 10.8  | 0.77                                             | 0.003                                            | 0.018                                            | 45.61                                             |
| 骆马湖    | L1 | 1.89                  | 0.20                  | 9.2   | 0.22                                             | 0.029                                            | 0.403                                            | 9.18                                              |
|        | L2 | 2.51                  | 0.06                  | 41.9  | 2.25                                             | 0.143                                            | 0.064                                            | 6.48                                              |
|        | L3 | 3.56                  | 0.12                  | 29.0  | 1.29                                             | 0.058                                            | 0.058                                            | 52.41                                             |
|        | L4 | 0.87                  | 0.05                  | 18.8  | 0.02                                             | 0.002                                            | 0.021                                            | 12.29                                             |
|        | L5 | 2.09                  | 0.05                  | 38.4  | 0.48                                             | 0.016                                            | 0.022                                            | 7.62                                              |
|        | L6 | 1.60                  | 0.05                  | 32.7  | 0.04                                             | 0.003                                            | 0.039                                            | 12.55                                             |
| 高宝-邵伯湖 | B1 | 1.42                  | 0.141                 | 10.1  | 0.184                                            | 0.0049                                           | 0.039                                            | 29.35                                             |
|        | B2 | 1.10                  | 0.115                 | 9.5   | 0.055                                            | 0.0045                                           | 0.015                                            | 25.85                                             |
|        | B3 | 2.23                  | 0.197                 | 11.3  | 0.466                                            | 0.0115                                           | 0.023                                            | 51.79                                             |
|        | B4 | 1.43                  | 0.079                 | 18.2  | 0.01                                             | 0.0017                                           | 0.011                                            | 10.17                                             |
|        | B5 | 1.15                  | 0.040                 | 28.5  | 0.079                                            | 0.0037                                           | 0.022                                            | 15.84                                             |
|        | B6 | 2.19                  | 0.074                 | 29.5  | 0.179                                            | 0.0037                                           | 0.082                                            | 45.83                                             |

富营养化指数变化幅度为 29.0~36.6,6 个采样点水体均属于寡营养水平。总体来看,溧湖叶绿素 a 浓度最高,全湖均属于超富营养化水平;太湖次之,北部和西北湖区属于超富营养化水平,其他湖区属于富营养化水平;洪泽湖和骆马湖属于中富营养和富营养化水平;高宝-邵伯湖属于寡营养水平。

2.3 PCR 产物凝胶电泳检测

五大湖泊水样 PCR 产物凝胶电泳检测结果如图 3 所示,阳性对照均有 PCR 产物,而阴性对照则无扩增产物。在本实验中,PCR 反应特异性高,没有明显的引物二聚体出现。从图 3 可以看出,太湖所有水样均

能扩增出 *mcyA*、*mcyD* 和 *mcyG* 基因片段,且采样点 T6、T7 和 T8 的 PCR 产物条带亮度大于其他湖区;溧湖 6 个水样单一和双重 PCR 反应均有相应的产物。洪泽湖水样均能扩增出 *mcyA* 基因片段,在双重 PCR 反应中,除 H2 样品外,其他水样均能扩增出 *mcyD* 和 *mcyG* 基因片段。骆马湖水样仅能扩增出 *mcyA* 基因片段,而双重 PCR 则没有产物出现。高宝-邵伯湖水样则没有 PCR 产物出现。

3 讨论

从营养盐浓度、叶绿素 a 浓度和富营养化指数可

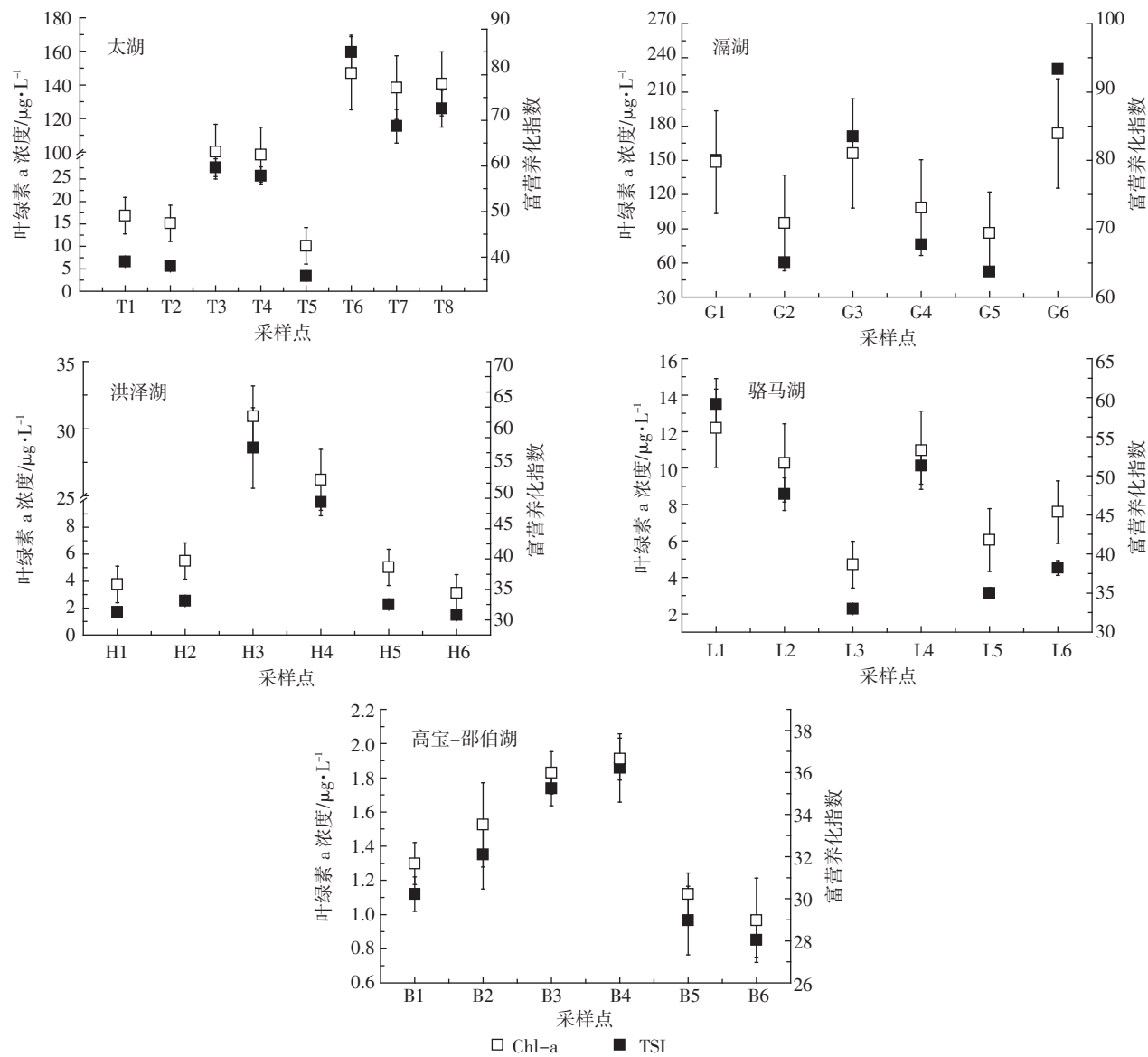


图 2 五大湖泊叶绿素 a 浓度和富营养化指数

Figure 2 Chl-a concentrations and trophic state index in five freshwater lakes

看出,5 个湖泊富营养化水平存在差异,同一湖泊的不同湖区也存在差异:太湖和溧湖处于富营养和超富营养化水平,洪泽湖处于富营养化水平,骆马湖和高宝-邵伯湖处于中营养盐和寡营养水平;在采样期间,溧湖和太湖全湖都可见蓝藻水华的出现,但水华强度不同,结合叶绿素 a 浓度的空间分布可以看出,太湖北部和西北湖区水华强度大于其他湖区,溧湖北部湖区大于湖心和南部湖区,洪泽湖 H3 和 H4 采样点所在湖区水华强度大于其他湖区,骆马湖和高宝-邵伯湖没有蓝藻水华出现。因此,蓝藻水华分布及其强度与水体富营养化水平具有一致性。

微囊藻水华是富营养化湖泊生态系统面临的重大

大水环境问题之一,有必要对水体中微囊藻是否产毒、时空分布进行监测,以便于对微囊藻毒素污染进行预警。基于 *mcy* 基因的 PCR 检测法成本低、灵敏度高、时间短,所需要样品量少,无需毒素富集和提取,具有快速、简便的特点<sup>[6]</sup>,PCR 法对于微囊藻产毒潜能的预测与毒素的直接检测结果高度一致<sup>[13]</sup>,该方法可以用于湖泊水体中微囊藻产毒潜能的监测。*mcy* 基因簇家族成员均可以作为 PCR 扩增对象。研究中常选择单个基因作为 PCR 扩增对象<sup>[14-19]</sup>,也有研究者选择多个 *mcy* 成员<sup>[12,20-21]</sup>。PCR 反应的模板可以是提取的藻类的基因组 DNA 或者是藻细胞<sup>[22-23]</sup>。因所选用引物的灵敏度和扩增效率存在差异,所以多重 PCR 比

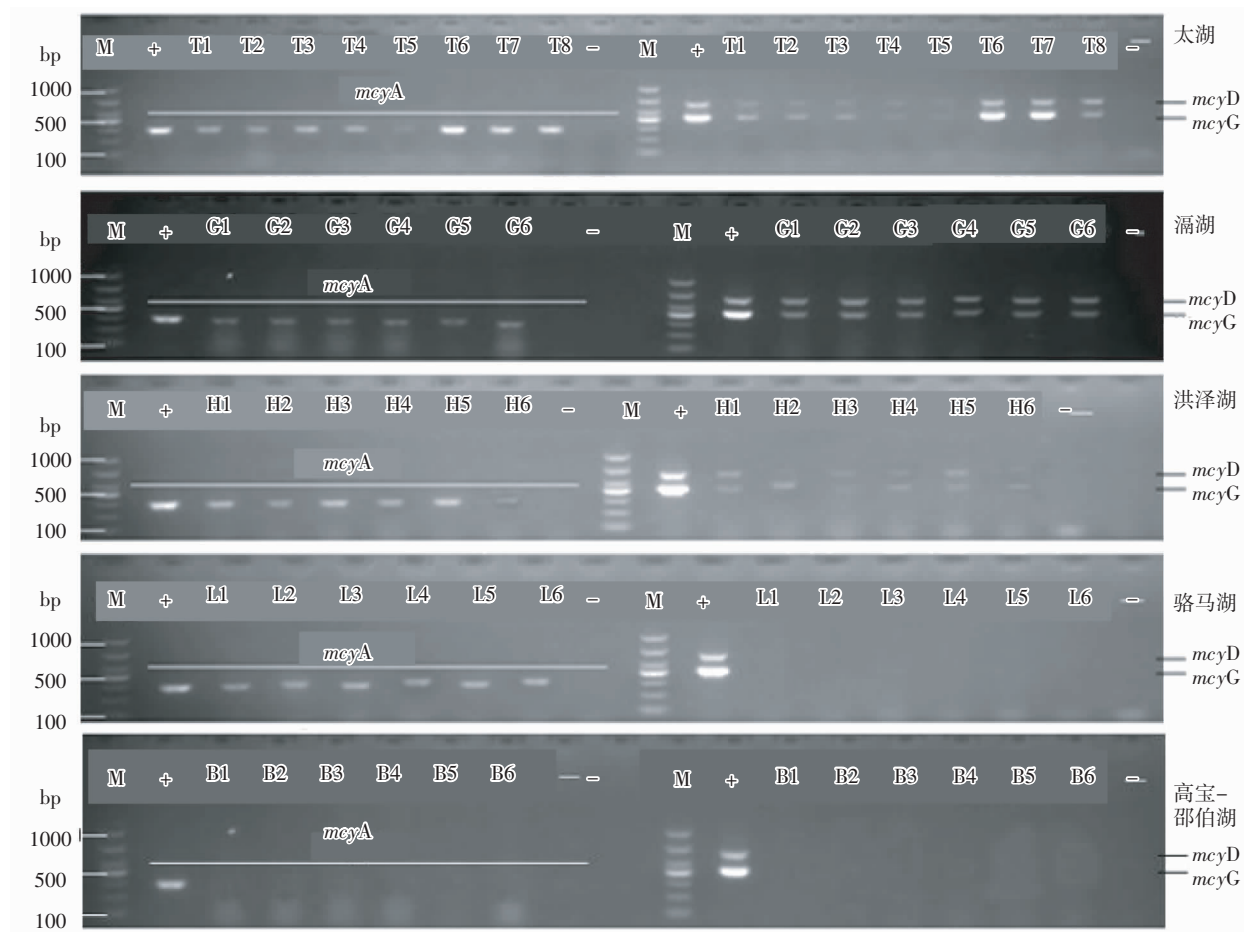


图 3 单一和双重 PCR 产物检测结果

Figure 3 The results of single and duplex PCR amplification of *mcvA*, *mcvD* and *mcvG* gene regions

单一 PCR 所得结果更准确。在本研究中,选择 *mcvA*、*mcvD* 和 *mcvG* 基因作为 PCR 扩增对象,采用单一 PCR 扩增 *mcvA* 基因,采用多重 PCR 扩增 *mcvD* 和 *mcvG* 基因。为了排除水样中存在的 PCR 抑制剂和湖泊水体间差异对 PCR 扩增的影响,采用提取藻类基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板。从凝胶图谱检测中可以看出,阳性和阴性对照结果较好,且没有引物二聚体出现,说明该 PCR 反应效果较好,实验结果准确可靠。

从 PCR 产物的检测结果可以得出,太湖和太湖所有样品均能扩增出 *mcv* 基因产物,洪泽湖样品均能扩增出 *mcvA* 基因产物,有部分样品能同时扩增出 *mcvD* 和 *mcvG* 基因产物,骆马湖水样仅能扩增出 *mcvA* 基因产物,高宝-邵伯湖样品没有 PCR 产物出现,这说明湖泊受有毒蓝藻水华污染与富营养化水平具有相关性,富营养水平越高,有毒蓝藻水华出现的可能性也就越大。这与文献[24]研究结果相似,Rantala 等通过对芬兰 70 个湖泊调查表明产毒蓝藻组

成与富营养化水平的关系,产毒微囊藻出现的几率最大,其次是浮丝藻(*Planktothrix*)和鱼腥藻(*Anabaena*),在寡营养湖泊中,一般只有单个产毒蓝藻属出现,在富营养和超富营养化湖泊中,3 个产毒蓝藻属同时出现的几率较大<sup>[24]</sup>。本文选择用于扩增 *mcvA* 基因片的引物能用于所有产毒蓝藻,而 *mcvD* 和 *mcvG* 基因的引物只能从微囊藻属中扩增目的片段。根据 PCR 产物检测结果和蓝藻群落结构(调查资料,暂未发表)可以判定,太湖、太湖和洪泽湖水体中可能存在多种产毒蓝藻,骆马湖水体中的产毒蓝藻不是微囊藻,可能是鱼腥藻和浮丝藻。但通过对太湖水体和底泥中产毒蓝藻多样性和丰度进行研究发现,太湖产毒蓝藻基因型属于微囊藻属,而没有鱼腥藻和浮丝藻产毒基因型的出现<sup>[25-26]</sup>,说明产毒蓝藻组成与富营养化间的关系受地理分布的影响。从 PCR 产物的凝胶条带亮度可以初步推断,不同湖泊及湖区间有毒微囊藻种群丰度存在空间差异,可能与湖泊的营养盐浓度和富营养化水平有关,已有文献报道应用荧光定量 PCR

技术研究产毒微囊藻种群丰度变化,并分析与环境因子间的关系,表明产毒微囊藻与营养盐浓度有显著正相关<sup>[27-28]</sup>。

到目前为止,已有诸多文献报道太湖产毒微囊藻基因型多样性、产毒微囊藻种群丰度动态变化和微囊藻毒素的时空变化及其影响因子<sup>[25-26,29-31]</sup>,而其他4个湖泊的相关调查较少,需要进一步深入研究,为湖泊有毒微囊藻水华的预警和生态风险评估提供科学依据。

## 4 结论

(1)太湖和溇湖整体上处于富营养化和超富营养化水平,高宝-邵伯湖处于寡营养水平,洪泽湖和骆马湖处于中营养和富营养化水平,蓝藻水华发生及其强度与富营养化水平具有一致性。

(2)PCR扩增 *mcy* 基因能准确有效检测产毒微囊藻。太湖、溇湖和洪泽湖水体中有产毒微囊藻存在,湖泊水体受到微囊藻毒素的潜在威胁,骆马湖水体中存在其他产毒蓝藻(鱼腥藻或浮丝藻),高宝-邵伯湖未检测到 *mcy* 基因的存在,水体暂未受到微囊藻毒素染污。

## 参考文献:

- [1] De Figueiredo 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.
- [2] Dittmann E, Neilan B A, Erhard M, et al. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 26(4): 779–787.
- [3] Tillett D, Dittmann E, Erhard M, et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: An integrated peptide–polyketide synthetase system[J]. *Chemistry Biology*, 2000, 7(10): 753–764.
- [4] 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): 159–166.  
PAN Hui, SONG Li-rong, LIU Yong-ding, et al. Characterization of toxic water bloom forming *Cyanobacteria* by modified PCR[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, 25(2): 159–166.
- [5] 谢数涛, 张占会, 韩博平, 等. 采用套式 PCR 检测水库产毒微囊藻[J]. 水生生物学报, 2007, 31(2): 184–189.  
XIE Shu-tao, ZHANG Zhan-hui, HAN Bo-ping, et al. Detection of toxic *Microcystis* from reservoir water samples by nested PCR[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(2): 184–189.
- [6] 谢数涛, 龙思思, 韩博平, 等. 微囊藻毒素合成酶基因的 PCR 检测方法[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(4): 315–318.  
XIE Shu-tao, LONG Si-si, HAN Bo-ping, et al. A PCR method for detection of microcystin synthetase gene[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2005, 13(4): 315–318.
- [7] 金相灿, 屠清瑛. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 环境出版社, 1990.  
JIN Xiang-can, TU Qing-yin. Research criterion of lake eutrophication [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990.
- [8] Carlson R E. A trophic state index for lakes[J]. *Limnology and Oceanography*, 1977, 22(2): 361–369.
- [9] Hotto A M, Satchwell M F, Berry D L, et al. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY[J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(5): 671–681.
- [10] 李大命, 孔繁翔, 于 洋, 等. 太湖蓝藻水华期间水体和底泥中产毒微囊藻与非产毒微囊藻种群丰度研究 [J]. 环境科学学报, 2011, 31(2): 292–298.  
LI Da-ming, KONG Fan-xiang, YU Yang, et al. The abundance of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations in the water column and sediment during a water bloom in Lake Taihu[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(2): 292–298.
- [11] Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, et al. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera[J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(6): 402–410.
- [12] Ouahid Y, Pérez-Silva G, Del Campo F F. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions[J]. *Environment Toxicology*, 2005, 20(3): 235–242.
- [13] Fergusson K M, Saint C P. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 4145–4148.
- [14] Baker J A, Entsch B, Neilan B A, et al. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6070–6076.
- [15] Baker J A, Neilan B A, Entsch B, et al. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis[J]. *Environment Toxicology*, 2001, 16(6): 472–482.
- [16] Tillett D, Parker D L, Neilan B A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2810–2818.
- [17] Bittencourt-Oliveira M C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with *mcyB* molecular marker [J]. *Harmful Algae*, 2003, 2(1): 51–60.
- [18] 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]. *Microbial Ecology*, 2002, 43(1): 107–118.
- [19] Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, et al. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7289–7297.
- [20] Oberholster P J, Myburgh J G, Govender D, et al. Identification of toxigenic *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.
- [21] Hotto A M, Satchwell M F, Boyer G L. Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario Embayments and Nearshore Waters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(14):4570–4578.
- [22] Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2):787–795.
- [23] Pan H, Song L, Liu Y, et al. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples[J]. *Archives of Microbiology*, 2002, 178(6):421–427.
- [24] Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, et al. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in finnish Lakes with Genus-Specific microcystin synthetase gene E(*mcyE*) PCR and associations with environmental factors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9):6101–6110.
- [25] 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.
- [26] 李大命, 孔繁翔, 于洋, 等. 冬季太湖表层底泥产毒蓝藻群落结构和种群丰度[J]. 生态学报, 2011, 31(21):6551–6560.
- LI Da-ming, KONG Fan-xiang, YU Yang, et al. The community structure and abundance of microcystin-producing cyanobacteria in surface sediment of Lake Taihu in winter [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(21):6551–6560.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80(1):24–29.
- [31] 李大命, 孔繁翔, 叶琳琳, 等. 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[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(6):1135–1143.
- LI Da-ming, KONG Fan-xiang, YE Lin-lin, et al. Spatial variations in compositions and abundance of microcystin-producing cyanobacteria in Lake Taihu in summer time[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(6):1135–1143.