

## 一株来源于水库的浮游蓝丝藻 SK3 株的生长及产毒特性\*

桂佳, 胡韧, 辛艳萍, 韩博平, 高武熊, 雷腊梅\*\*  
(暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

**摘要:** 浮游蓝丝藻是水华蓝藻的常见种属, 但对其生长和产毒特性认识不多. 本文首次对我国水体中的浮游蓝丝藻进行了研究. 从广东省一重要供水水库中分离到一株丝状蓝藻, 经形态特征鉴定为阿氏浮游蓝丝藻, 并在不同的光照和温度下对该藻株进行了培养. 结果表明, 适合于该藻生长的光强和温度分别为  $20\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  和  $30^\circ\text{C}$ ; 该藻株具有 *mcyE* 基因, 能产生微囊藻毒素 MCRR, 产量为  $0.06\mu\text{g}/\text{mg}(\text{DW})$ .

**关键词:** 浮游蓝丝藻; 分离培养; 微囊藻毒素; 微囊藻毒素合成酶

### Growth and toxin-producing characteristics of *Planktothrix agardhii* SK3 from a reservoir

GUI Jia, HU Ren, XIN Yanping, HAN Boping, GAO Wuxiong & LEI Lamei  
(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

**Abstract:** *Planktothrix agardhii*, a filamentous cyanobacterial species, is one of the major waterbloom-forming cyanobacteria and has been widely founded in lakes and reservoirs. However, its toxin-producing characteristics in the strains was never reported in China. In this paper, a strain *Planktothrix agardhii* SK3 was isolated from a reservoir of Guangdong Province and cultured in a gradient of light intensity and water temperature to investigate its growth characteristics. Results showed that  $20\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  and  $30^\circ\text{C}$  were optimal for its growth. The SK3 strain had microcystin synthetase gene-*mcyE* and was able to produce  $0.06\mu\text{g}/\text{mg}$  (dry weight) microcystin-RR.

**Keywords:** *Planktothrix agardhii*; isolation; microcystin; microcystin synthetase

蓝藻水华是富营养化水体最典型的表征, 水华的发生直接影响水体生态系统结构, 由蓝藻产生的藻毒素则影响供水安全并危害人类健康<sup>[1]</sup>. 世界卫生组织统计, 全世界水华藻类中的 59% 为有毒蓝藻<sup>[2]</sup>. 微囊藻毒素是目前最受关注的肝毒素, 长期饮用含有微囊藻毒素的水可引发肝损伤甚至肝癌, 该毒素被认为是我国南方肝癌高发区的三大环境危险因素之一<sup>[3]</sup>. 能产生微囊藻毒素的种属主要包括 *Microcystis* (微囊藻), *Planktothrix* (浮游蓝丝藻), *Anabaena* (鱼腥藻), *Aphanizomenon* (束丝藻), *Nostoc* (念珠藻) 和 *Anabaenopsis* (项圈藻)<sup>[4-5]</sup>. 因此, 在自然水体中, 除微囊藻外, 还存在其它能够产生微囊藻毒素的蓝藻种类, 在一定条件下这些蓝藻所产生的微囊藻毒素对整个水体微囊藻毒素浓度有很大的贡献.

浮游蓝丝藻原属于颤藻属, 后将颤藻属的浮游种类大部分归于新属——浮游蓝丝藻属<sup>[6]</sup>. 陈宇炜等<sup>[7]</sup>曾撰文介绍了这样的新旧学名变更, 并在他们发表的文章中采用新的分类学名<sup>[8]</sup>. 国内目前常用的浮游藻类研究的工具书(如胡鸿钧等的《中国淡水藻类》)的出版时间均早于新学名的广泛使用期, 因此国内研究中很少使用新学名, 一般仍使用原颤藻属的命名. 浮游蓝丝藻 (*Planktothrix*) 是水华蓝藻的重要常见种属, 常见种类为两种: 含藻红蛋白丰富的 *P. rubescens*, 丝体呈红色; 含藻蓝蛋白丰富的 *P. agardhii*, 丝体呈绿色. *P. rubescens* 一般发生在分层的寡营养和中营养型的深水体, 而 *P. agardhii* 的分布相对广泛, 在对流条件较好的中营养至富营养水体中均有发现<sup>[4]</sup>. 据文献报道, 上述两种浮游蓝丝藻均能产生肝毒素——微囊藻毒素. 在

\* “863”项目(2008AA06A413)和广东省水利厅中小型水库蓝藻水华研究项目联合资助. 2008-07-15 收稿; 2010-01-07 收修稿. 桂佳, 女, 1983年生, 硕士研究生; E-mail: fianrain456@163.com.

\*\* 通讯作者; E-mail: tleilam@jnu.edu.cn.

北半球,尤其是欧洲水体中浮游蓝丝藻广泛分布,挪威、瑞典、法国、波兰、德国、澳大利亚、意大利等也都曾报道过浮游蓝丝藻的大量发生<sup>[1,9-10]</sup>。

近 10 多年来,我国水体富营养化现象日益加剧,有毒蓝藻水华频繁发生,严重危害供水安全。在现有的研究中,目前我国重点关注的产毒蓝藻是微囊藻,对其他产毒蓝藻的研究甚少。我们从广东省一座重要供水水库中分离到一株丝状蓝藻,经形态特征鉴定为 *Planktothrix* (浮游蓝丝藻),并对其生长和产毒特性进行了初步研究,本研究可加深我国对有毒蓝藻种类的了解,为供水安全提供技术保障。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种分离和培养

采取水库水样,在解剖镜下用玻璃毛细管挑出单根的浮游蓝丝藻的丝体,用无菌水洗 3-4 次后,放入 BG11 培养基中培养,约 1-2 个月后,出现肉眼可见的藻细胞,以 Olympus BX-5 显微镜对形态和纯度进行镜检,对所分离的浮游蓝丝藻依据形态特征进行种类鉴定。

### 1.2 生长测定

通过测定细胞叶绿素 665nm 的吸收值 ( $OD_{665}$ ) 表示细胞的生长。生长测定的培养基为 BG11,光源为冷白荧光灯,光照通过光量子计 (OSL-100 型, Biospherical Instruments Inc.) 测定。

1.2.1 光强实验 培养温度设为 30℃,光强分别设置为 40、20、10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,静置加按时摇动条件下连续光照培养,每个样品分别做三个平行,每天进行  $OD_{665}$  测定。

1.2.2 温度实验 光照设为 30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,培养温度分别为 30、22、16℃,静置加按时摇动条件下连续光照培养,每个样品分别做三个平行,每天进行  $OD_{665}$  测定。

### 1.3 产毒特性分析

1.3.1 小鼠毒性实验 用体重在 15g 左右的雄性昆明种小白鼠进行毒性测定。收集对数生长后期的藻细胞,反复清洗后加入一定的蒸馏水,反复冻融使细胞破裂。以不同体积的上清液腹腔注射小白鼠后,开始观察小白鼠的反应症状并记录存活时间。

1.3.2 微囊藻毒素分析 离心收集新鲜藻液,清洗后浸于 5% 的乙酸溶液中,不断搅拌 30min, 5000r/min 离心 10min,保留上清液,沉淀物再经 100% 的甲醇提取两次,所得上清液在真空浓缩蒸馏器中干燥,剩余物用 5% 的乙酸溶解,溶解物通过预先处理过的 Sep-Pak C18 小柱,洗脱物直接用于 HPLC (Agilent1100) 上进行微囊藻毒素分析,以 MCRR、MCYR、MCLR 三种异构体作为标准品。

### 1.4 微囊藻毒素合成酶基因检测

离心收集新鲜藻液,采取常规的酚-氯仿法提取基因组 DNA,以针对微囊藻毒素合成酶基因 *mcyE* 设计的特异引物对 *mcyE*-F2: 5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3' 和 *mcyE*-R4: 5'-AATTCTAAAGCCCAAAGACG-3' 进行 PCR 扩增<sup>[11]</sup>,PCR 产物以 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,结果用凝胶成像系统进行拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 浮游蓝丝藻的形态特征及种类鉴定

本实验室分离到的浮游蓝丝藻是单根丝体,伪空泡多,丝体直或略弯曲,蓝绿色,丝体约 4  $\mu\text{m}$  宽,相邻的细胞壁没有缢缩,丝体朝末端稍变窄,大部分平顶端,有时有头冠 (图 1)。根据上述特征,将该藻定为 *Planktothrix agardhii*,在本实验室编号为 SK3。

### 2.2 不同光照和温度对浮游蓝丝藻生长的影响

*P. agardhii* SK3 藻株在 3 种不同光强下的生长特性 (图 2a) 表明,20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  最适于 *P. agardhii* SK3 藻株生长,其次为 40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,在 10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光强下生长最慢;但培养约 10d 后,藻株在 10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  下的生长速度明显超过了 40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,而 20  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光强下则一直维持相对最高的生长速率。

*P. agardhii* SK3 藻株在 3 种不同温度下的生长特性 (图 2b) 表明,*P. agardhii* SK3 藻株在 30℃ 生长最好,其次为 16℃,22℃ 的生长趋势比 16℃ 稍弱。在 16℃ 和 22℃ 培养下,前 4d 的生长趋势比较接近,随后 SK3



图1 浮游蓝丝藻 SK3 株的光镜照片

Fig.1 Light micrographs of *Planktothrix agardhii* SK3

藻株在 16℃ 表现出相对较好的生长, 在 30℃ 培养下, SK3 藻株在第 2d 即表现出明显的生长优势, 这说明 *P. agardhii* SK3 藻株适于在较高温度下生长, 而 16 - 22℃ 之间的生长差异较小.

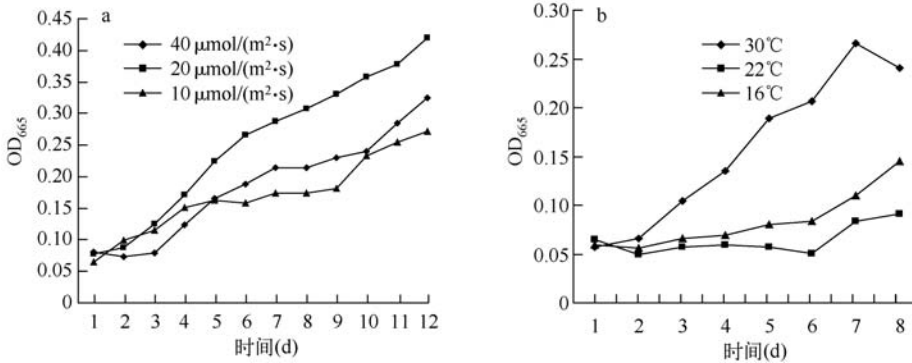


图2 光照(a)和温度(b)对 *Planktothrix agardhii* SK3 生长的影响

Fig.2 Effect of light intensity (a) and temperature (b) on growth of *Planktothrix agardhii* SK3

### 2.3 浮游蓝丝藻的毒素分析

用 HPLC 分析毒素组成, 经与标准毒素对比分析表明, 本次分离到的 *P. agardhii* SK3 藻株能产生微囊藻毒素 RR, 但产量较低, 仅为 0.06  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (DW) (藻细胞干重). 这与小鼠毒性实验的结果一致, 在实验室以高浓度藻细胞裂解上清注射小鼠腹腔, 大剂量下也未见小鼠死亡, 但能观察到小鼠发抖, 反应迟钝, 说明藻细胞有一定的毒性.

### 2.4 浮游蓝丝藻的微囊藻毒素合成酶基因分析

mcyE-F2 和 mcyE-R4 引物对是针对所有产微囊藻毒素的蓝藻的特异性引物, 扩增片段约 812bp. 以该引物对扩增 SK3 藻株基因组 DNA, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 可观察到 800bp 左右的特异性扩增条带 (图 3). 说明 *P. agardhii* SK3 藻株具有微囊藻毒素合成酶基因, 能够产生微囊藻毒素, 这与上面毒素分析测定的结果一致.

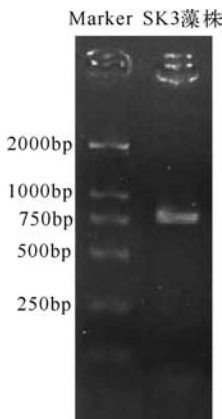


图3 PCR 扩增的电泳图

Fig.3 Electrophoresis graph for PCR

## 3 讨论

微囊藻毒素首次发现于微囊藻, 国际上对微囊藻的生

理生化及产毒特性已有了较深入的研究.除微囊藻外,鱼腥藻和浮游蓝丝藻也是淡水水体中产微囊藻毒素的主要种属,但相对微囊藻而言,其他产毒蓝藻的研究相对较少<sup>[1]</sup>.这种现象在我国更为明显,到目前为止,几乎没有微囊藻以外的产微囊藻毒素蓝藻研究的报道,但这些潜在的产毒蓝藻在富营养化水体中广泛存在甚至会导致蓝藻水华.广东某供水水库所发生的蓝藻水华中鱼腥藻是除微囊藻以外的优势种属<sup>[12]</sup>,浮游蓝丝藻是夏季太湖蓝藻水华中的优势属<sup>[8]</sup>,Rantala 等<sup>[13]</sup>对芬兰 70 个湖泊进行潜在产生微囊藻毒素蓝藻调查时发现,浮游蓝丝藻是除微囊藻外水体中最常见的产毒种类,且 2/3 以上的水体存在一种或两种潜在产毒种类,因此开展微囊藻外其它产毒蓝藻的研究,可更有效地评估蓝藻灾害.

本文对我国水库中分离的纯藻株采用了新的学名进行分类命名,根据形态特征初步鉴定为 *Planktothrix agardhii*,并对其生长特性进行了初步研究.我们的结果显示 *P. agardhii* SK3 藻株在不同的温度和光照下具不同的生长速度,在 20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  光强和 30 $^{\circ}\text{C}$  下生长最快.这与 Ye'pre'mian 等<sup>[14]</sup>的结果一致,该研究发现两株浮游蓝丝藻在 10 $^{\circ}\text{C}$  和 20 $^{\circ}\text{C}$  下的生长特性相似,而 *P. agardhii* SK3 藻株在 16 $^{\circ}\text{C}$  和 22 $^{\circ}\text{C}$  下生长也较接近;Sivonen<sup>[15]</sup>的结果显示 *Oscillatoria agardhii* (新学名为 *P. agardhii*) 在 25 $^{\circ}\text{C}$  生长最佳,本研究中的 *P. agardhii* SK3 藻株则在 30 $^{\circ}\text{C}$  表现出明显的生长优势,这可能是因为 SK3 藻株分离于处于热带亚热带地区的水库,该地区水温常年较高,藻株因而适于在高温下生长.

*Planktothrix agardhii* SK3 藻株产生的毒素异构体主要为 MCRR,这与已有的研究结果相一致:即浮游蓝丝藻产生的毒素类型相对单一,常以一种脱甲基的 MCRR 为主<sup>[16]</sup>.Ye'pre'mian 等<sup>[14]</sup>从法国一富营养化湖泊分离到 41 株 *Planktothrix agardhii*,发现藻株产生微囊藻毒素的能力差异巨大,介于 0.02 - 1.86 $\mu\text{g}/\text{mg}$  (DW) 之间,而本实验室分离到的 *Planktothrix agardhii* SK3 的产毒量为 0.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$  (DW),这进一步说明浮游蓝丝藻株间产毒量差异的存在.

研究表明,浮游蓝丝藻的微囊藻毒素合成受微囊藻毒素合成酶基因调控<sup>[17]</sup>,由于该基因族的存在与产毒能力基本一致,因此分子生物学方法常被用来监测产毒浮游蓝丝藻的存在<sup>[13]</sup>.根据 PCR 检测结果,SK3 藻株有特异性扩增条带,因此具有产生微囊藻毒素的能力,这与小鼠毒性及毒素检测的结果完全一致.

随着新学名的进一步推广,对我国淡水水体中浮游蓝丝藻的报道必将增多.本研究通过分离到的纯藻株和毒素检测揭示了我国淡水水体中产毒浮游蓝丝藻的存在,这将增加对我国产毒水华蓝藻多样性的认识,更有效地评估不同类型有毒蓝藻的灾害.

#### 4 参考文献

- [ 1 ] Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London and New York, 1999.
- [ 2 ] Pitois S, Jackson MH, Wood BJB. Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: An overview. *J Environment Health*, 2001, **64**: 25-32.
- [ 3 ] Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995, **10**: 674-682.
- [ 4 ] Oliver RL, Ganf GG. Freshwater blooms. In: Whitton BA, Potts M eds. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic, 2000.
- [ 5 ] de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves S *et al.* Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, **59**:151-163.
- [ 6 ] Suda S, Watanabe MM, Otsuka S *et al.* Taxonomic revision of water-bloom-forming species of *oscillatorioid* cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**:1577-1595.
- [ 7 ] 陈宇炜,李朋富, Martin Dokull. 浮游藻类三个常见属(颤藻属、直链硅藻属和针杆藻属)学名变更的解释. *湖泊科学*, 2003, **15**(1):85-94.
- [ 8 ] 宋晓兰,刘正文,潘宏凯等.太湖梅梁湾与五里湖浮游植物群落的比较. *湖泊科学*, 2007, **19**(6):643-651.
- [ 9 ] Briand JF, Robillot C, Quiblier-Llobe'ras C *et al.* A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) in a shallow eutrophic French lake: limnological and microcystin production studies. *Arch Hydrobiol*, 2002, **153** (4): 605-622.
- [ 10 ] Scheffer M, Rinaldi S, Gagnani A *et al.* On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology*, 1997, **78**:272-282.
- [ 11 ] Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M *et al.* Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc*

- Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 568-573.
- [12] 肖利娟, 韩博平, 林秋奇等. HA1 絮凝剂在供水水库水华应急处理中的应用研究. *环境科学*, 2007, **28**(10): 2192-2197.
- [13] 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. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(9): 6101-6110.
- [14] Ye'pre'mian C, Gugger MF, Briand E *et al.* Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Research*, 2007, **41**: 4446-4456.
- [15] Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(9): 2658-2666.
- [16] Fastner J, Erhard M, Carmichael WW *et al.* Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch Hydrobiol*, 1999, **45**: 147-163.
- [17] Christiansen G, Fastner J, Erhard M *et al.* Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, evolution, and manipulation. *J Bac*, 2003, **185**(2): 564-572.