

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210315002

周君薇, 张丽娟, 周宇昆, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在太湖蓝藻监测和评估中的应用[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(6): 13-25

Zhou J W, Zhang L J, Zhou Y K, et al. Application of quantitative PCR technology in biomonitoring and assessment of harmful cyanobacteria in Lake Tai [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(6): 13-25 (in Chinese)

实时荧光定量 PCR 技术在太湖蓝藻监测和评估中的应用

周君薇¹, 张丽娟², 周宇昆¹, 张效伟^{2,3,*}

1. 江苏省环境经济技术国际合作中心, 南京 210000

2. 南京大学环境学院, 南京 210023

3. 江苏省生态环境保护化学品安全与健康风险研究重点实验室, 南京 210023

收稿日期: 2021-03-15 录用日期: 2021-06-07

摘要: 我国东部地区的湖泊深受蓝藻水华的影响, 监测可产生毒素的藻种类及其浓度对于水质安全预警与管理有重要意义。然而传统形态学方法无法鉴别藻类产生毒素及臭味物质的潜在趋势。为综合评估湖泊及其水源水体的藻类有毒代谢物发生风险, 采用实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)方法对太湖产毒微囊藻基因、产毒柱胞藻基因和产 2-甲基异莰醇基因进行监测, 同时采用盘式酶联免疫法(enzyme-linked immuno-sorbent assay, ELISA)以及气相色谱-质谱法分析微囊藻毒素、柱胞藻毒素和 2-甲基异莰醇浓度, 并进行相关性分析。结果表明, 太湖水体各项蓝藻产毒基因水平与相关藻毒素浓度具有良好相关性。由蓝藻产毒基因/藻种基因丰度的比值可知, 高丰度的微囊藻菌株不具有产藻毒素的潜力, 而绝大多数柱胞藻都含有产毒素的基因, 表明采用产毒基因的拷贝数预测藻种的产毒能力更准确。不同类型的产毒藻基因在太湖具有显著的时空分布差异, 产毒微囊藻基因在 9 月达到浓度峰值, 在太湖西部浓度更高, 而产毒柱胞藻和产 2-甲基异莰醇基因则在 7—8 月达到峰值, 在中部和东部维持较高浓度。太湖的饮用水源地 2-甲基异莰醇风险显著高于微囊藻毒素和柱胞藻毒素。因此, 分子生物监测和评估可为蓝藻预警与管理提供重要支撑。

关键词: 藻类毒素; 臭味物质; 太湖; 微囊藻毒素; 柱胞藻毒素; qPCR

文章编号: 1673-5897(2021)6-013-13 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Application of Quantitative PCR Technology in Biomonitoring and Assessment of Harmful Cyanobacteria in Lake Tai

Zhou Junwei¹, Zhang Lijuan², Zhou Yukun¹, Zhang Xiaowei^{2,3,*}

1. Jiangsu International Environmental Development Center, Nanjing 210000, China

2. School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Province Ecology and Environment Protection Key Laboratory of Chemical Safety and Health Risk, Nanjing 210023, China

Received 15 March 2021 accepted 7 June 2021

Abstract: The lakes in eastern China have been heavily affected by cyanobacterial blooms. Monitoring the toxic algae species and concentrations of their corresponding toxic metabolites are pre-requirement for water quality management. However, traditional morphological methods are limited in the identification of the potential trend of

基金项目: 2018 年度江苏省省级环保引导资金项目; 江苏省环保科研课题(2018001)

第一作者: 周君薇(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为国际环保技术合作, E-mail: zjw@jsep.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhangxw@nju.edu.cn

algae producing toxins and odorants. To comprehensively assess the risk of toxic metabolites of algae in Lake Tai, the real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays were developed for quantifying potentially toxigenic *Microcystis*, cylindrospermopsin-producing and 2-methylisoborneol (2-MIB)-synthesis cyanobacteria. Furthermore, the concentrations of corresponding toxins were measured by enzyme-linked immuno-sorbent assay and gas chromatography-mass spectrometry method. The results showed statistically significant correlations between the levels of toxigenic genes and the concentrations of corresponding toxins in Lake Tai. The low ratio of the gene copies from toxic *Microcystis* to that from total *Microcystis* showed that the high abundance of *Microcystis* strains weren't potential to produce toxins. However, most of *Cylindrospermopsis* cells were potentially toxigenic as showed by the data. It is indicated that the copy numbers of toxin producing genes are accurate enough to diagnose the presence of harmful cyanobacteria and the potential presence of cyanotoxins in Lake Tai. Significant differences in the temporal and spatial distribution of toxigenic genes were observed for different types of toxic algae. The gene copies of toxigenic *Microcystis* reached the peak in the west of Lake Tai and showed higher abundance in September, while the copies of cylindrospermopsin-producing gene and 2-MIB synthesis gene of cyanobacteria remained high in the middle and east of Lake Tai and reached peaks in July and August. The risk of 2-MIB in drinking water sources of Lake Tai was significantly higher than that of microcystin and cylindrospermopsin. In conclusion, molecular biological monitoring and assessment can provide important powerful tools for cyanobacteria early warning and management.

Keywords: cyanotoxin; odor compound; Lake Tai; *Microcystis*; cylindrospermopsin; qPCR

蓝藻大量繁殖所形成的有毒水华严重威胁饮用水安全,是全球性环境问题。水库与湖泊是世界各国重要的公共给水水源之一。随着国民经济与社会的发展,湖泊富营养化加剧,藻类水华暴发频率增高,富营养化是我国湖泊的主要问题,成为制约流域社会经济持续发展的环境问题^[1]。富营养化的淡水中,蓝藻是水体中水华的主要组成,蓝藻中包含了多种具有产生毒素及臭味物质这2类代谢物的藻种^[2],例如:微囊藻(*Microcystis* spp.)、柱孢藻(*Cylindrospermopsis* spp.)等,会产生微囊藻毒素(microcystin, MC)、柱孢藻毒素(cylindrospermopsin, CYN)和蛤蚌毒素(saxitoxin, STX)等;鱼腥藻(*Anabaena* spp.)、假鱼腥藻(*Pseudanabaena* spp.)等会产生土臭素(geosmin)、2-甲基异茨醇(2-methylisoborneol, 2-MIB)等臭味物质。当饮用水源中存在藻类毒素与臭味物质时,除了影响饮用水的安全外,对饮用水的水质会产生影响,因此是管理及供水部门面临的重要议题。

太湖是我国受蓝藻水华暴发影响水质安全问题最突出的地区。太湖周边经济发达的重要城镇高度依赖太湖水资源,而近年来太湖却深受蓝藻水华的影响。为了有效管理太湖的水资源,基于藻蓝素及叶绿素监测的蓝藻在线自动监测系统被广泛应用,以便实时了解水体中蓝藻数量,达到预警目的。然而许多环境样品分析研究指出,同一藻种的蓝藻中,

可分为具有产毒能力和不具产毒能力的蓝藻,两者不仅时常同时存在^[3-5],且从形态学上无法区分^[6],因此准确辨别蓝藻种类至关重要。

基于DNA的分子检测方法为环境生物监测提供了精准高效的替代技术。有别于传统生物性监测(如蓝藻显微镜镜检),实时荧光定量PCR(qPCR)技术是发展相对更为健全且能广泛运用的生物监测方法。通过专一性的引子(primer)和探针(probe),得以快速了解当下污染物种类(定性)及污染程度(定量)。因此,可依据蓝藻产生藻类毒素及臭味物质的生化反应途径,找出合适的功能性基因,以qPCR快速定量水体中具有产生藻类毒素/臭味物质能力的蓝藻数量,可作为分析水体中二次代谢物存在程度的依据。同时整合传统分析法(毒素的ELISA法及臭味素的SPME-GC-MS法)与qPCR定量系统的分析结果,可找出藻类代谢物与基因量、蓝藻细胞数之间的相关性,大幅提高藻类计数的时效性^[7-8],也可克服传统分析方法的缺点,如耗时过长、无法清楚区分藻种以及无法利用肉眼判断藻种是否产生毒素或臭味物质等。

尽管分子监测技术已经取得长足进步,如何将其应用于水生态环境管理仍然面临挑战。在过去20年间,有许多研究都在利用qPCR技术定量产毒及产臭基因区段。在产MC基因方面,qPCR的分

析结果与 MC 有良好的相关性^[9-16];在产 CYN 基因方面,亦有许多研究都在利用 qPCR 来定量产毒柱孢藻的数量^[11-20];而在产 2-MIB 基因方面,以 qPCR 定量产 2-MIB 基因的研究相对较少^[21-22]。本研究重点将应用基于 qPCR 技术的快速分子监测技术,分析产毒微囊藻、产毒柱孢藻和产 2-MIB 基因;同时采用酶联免疫法(enzyme-linked immuno-sorbent assay, ELISA)分析 MC 和 CYN 这 2 种毒素,并用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析臭味物质 2-MIB。2019 年 7—12 月开展连续监测,建立太湖本土化水源地的相关数据库,以便实时掌握太湖水体中藻类毒素及臭味物质的潜在风险,及时将分析结果反馈给管理部门,让管理部门有足够的时间启动紧急应变程序,为水源安全提供快速且有效的保障。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 样品采集点位

根据江苏省环境监测中心针对太湖全区水质监测的例行点位进行采样,采样点位均匀分布于全湖各处(图 1),总共 24 个采样点。太湖是典型的浅水性湖泊,采样点水深都在 2 m 左右,采样深度<0.5 m。由于夏季气温高,适合蓝藻大量生长,为了解不同季节蓝藻的状况及分布,2019 年 7—12 月,每月采样 1 次,其中 8 月及 9 月为太湖水华好发期,因此这 2 个月额外增加一次采样,共 8 次采样。

1.2 DNA 提取方法

为有效达到破坏藻体细胞壁的目的,在 DNA 提取前利用玻璃珠破壁技术。将 10 mL 样品过滤至 0.22 μm 的醋酸纤维滤纸后,置于 1.5 mL 的离心管中,而后于离心管中加入 400 μL 缓冲液,利用振荡器(SI-G560, Vortex-Gen 2, Scientific Industries, 美国)震荡 10 min,在 65 $^{\circ}\text{C}$ 温度下反应 10 min 后,便可开始进行 DNA 提取。DNA 的提取则选用植物基因组 DNA 提取微型套组(DNA-0301, Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit, 绿准生物科技有限公司, 中国),最后可取得 100 μL 的 DNA 提取液。

1.3 qPCR 定量系统

利用实时定量聚合酶链式反应(qPCR) (CFX Connect, Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD, 美国)进行目标基因的定量分析。qPCR 操作条件:首先以 95 $^{\circ}\text{C}$ 预先反应 300 s,之后开始进行循环放大步骤,每次循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 下接合 20 s,此步骤重复 40 个循环,并于单次循环结束后获得波长 519 nm 的荧光强度值。本研究采用功能性基因作为蓝藻定量标准,参照 Chiu 等^[7, 22]的研究方法,将包含产毒微囊藻基因、产毒柱孢藻基因和产 2-MIB 基因,以 10 倍序列稀释取得各浓度标样,测定范围如表 1 所示。

1.4 藻类毒素的定量分析

采用商品化的盘式酶联免疫套组(ELISA Kit)(微



图 1 太湖监测点位分布图

Fig. 1 Distribution map of routine monitoring points in Lake Tai

囊藻毒 PN 520012、柱孢藻毒 PN 522011, Abraix LLC, 美国)^[23], 参照套组所附的标准作业程序进行分析, 用多孔吸光分光亮度仪(Multiskan FC, Thermo Scientific, 芬兰)在 450 nm 波长下取得吸光值, 并由标准曲线回推取得 MC 和 CYN 浓度。样品分析前, 先以快速冷冻破壁技术进行样品前处理, 利用液态氮快速冻溶方式, 确保目标微生物体得到有效破坏, 使藻体内部的藻毒素完全释出到水体中, 再经 0.22 μm 滤膜过滤, 去除样品中细胞残骸等悬浮性物质, 以免干扰后续分析。

1.5 嗅味素的定量分析

参照 Lin 等^[24]的方法, 于 50 mL 的样品中加入 15 g 的氯化钠, 以固相微萃取法(solid phase micro-extraction, SPME)于 65 °C 恒温水浴下吸附 30 min,

将水样中嗅味物质吸附于吸附纤维上, 再用 GC-MS (6890/5973, 安捷伦, 美国), 将吸附完毕的吸附针注入 GC-MS, 定量分析嗅味素。

1.6 分析灵敏度与质量控制

分析技术的质量控制(quality control)规范如表 2 所示, 用以确认分析是否受到环境基质干扰。

1.7 统计分析

利用 SPSS 17.0 统计软件(IBM, 美国)针对传统分析法与 qPCR 技术的结果进行线性回归分析, 同时用公式(1)计算线性回归在 95% 置信水平下的预期区间^[25]。

$$\hat{y} \pm t_{(n-2)}^* s \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x^* - \bar{x})^2}{(n-1)s_x^2}} \quad (1)$$

式中: $\hat{y}$ 为由线性回归公式回推的 y 值; $t_{(n-2)}^*$ 为 95%

表 1 分析方法测值范围

Table 1 Concentration range for each analytical method

	分析项目 Analytical targets	单位 Unit	测值范围		分析方法 Analytical method
			Measurement range		
			最小值 Minimum	最大值 Maximum	
	产毒微囊藻基因 Microcystin-producing gene of <i>Microcystis</i>				
基因 Gene	产毒柱孢藻基因 Cylindrospermopsin-producing gene of <i>Cylindrospermopsis</i>	copy·mL ⁻¹	25	2.5×10 ⁷	qPCR
	产 2-MIB 基因 2-MIB synthesis gene				
毒素 Toxins	微囊藻毒素(MC) Microcystins (MC)	μg·L ⁻¹	0.15	5	ELISA
	柱孢藻毒素(CYN) Cylindrospermopsin (CYN)		0.05	2	
嗅味物质 Odorant	2-甲基异茨醇 (2-MIB)	ng·L ⁻¹	5	200	GC-MS
	2-methylisoborneol (2-MIB)				

表 2 样品质量控制规范

Table 2 Quality control for sample measurement

分析项目 Analytical targets	空白 Blank	查核 Check	添加 Addition	重复 Replicates
产毒微囊藻基因 Microcystin-producing gene of <i>Microcystis</i>				
基因 Gene	产毒柱孢藻基因 Cylindrospermopsin-producing gene of <i>Cylindrospermopsis</i>	Ct 值<1 Ct value<1	RPD<30%	Ct 值<1 Ct value<1
产 2-MIB 基因 2-MIB synthesis gene				
毒素 Toxins	微囊藻毒素(MC) Microcystins (MC)	不得检出 Not detected	相对差异百分比 (RPD)<20%	RPD<30%
	柱孢藻毒素(CYN) Cylindrospermopsin (CYN)			RPD<20%
嗅味 Odorant	2-甲基异茨醇(2-MIB)	Relative percentage difference (RPD)<20%		
	2-methylisoborneol (2-MIB)			

置信水平(双尾)下的 t 值; $n-2$ 为自由度; s 为 y 轴的标准偏差; n 为样品数; $\bar{x}$ 为 x 轴的平均值; 而 s_x 则为 x 轴的标准偏差; x^* 为 95% 置信水平(双尾)内 x 对应值。

利用皮尔逊相关系数 γ (Pearson's Correlation Coefficient) 分析基因和藻类毒素、臭味物质的相关性。当相关系数为 0.3 以下时为低相关, 0.3 ~ 0.7 为中等相关, 0.7 以上为高度相关。

2 结果 (Results)

2.1 太湖蓝藻基因和代谢物的时空分布

2.2.1 蓝藻产毒基因的时空分布

太湖产毒微囊藻基因的拷贝数范围为 $55 \sim 2.48 \times 10^7 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均值为 $7.83 \times 10^5 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。产毒微囊藻基因具有明显的时空分布特征。时间上, 产毒微囊藻基因的丰度在 7、8 月不断上升, 9 月达到最高值, 10—12 月逐渐下降(图 2(a))。空间上, 产毒微囊藻基因呈现出西部最高, 北部次之的空间分布特征, 其中太湖西北部的竺山湖心 7 月的产毒微囊藻基因的拷贝数达到 $2.48 \times 10^7 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, 北部的梅梁湾在 9 月上旬的产毒微囊藻基因的拷贝数达到 $1.24 \times 10^7 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 3)。

太湖产毒柱孢藻基因的拷贝数介于 $\text{ND} \sim 1.96 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均值为 $2.99 \times 10^4 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, 明显低于产微囊藻毒素基因。太湖产毒柱孢藻基因在 7、8 月达到最高值, 9—12 月逐渐下降(图 2(b))。总柱孢藻基因和产毒柱孢藻基因具有相似的时间分布规律, 产毒柱孢藻基因/总柱孢藻基因的比值范围为 4.1% ~ 100%, 平均值为 88.9%, 说明绝大多数柱孢藻都含有产毒素的基因。产毒柱孢藻基因显示区域性分布差异, 北部和东部的产毒藻基因的拷贝数较高, 如太湖东北部的五里湖心在 7—11 月的藻毒素基因的拷贝数均高于 $3.98 \times 10^4 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 4), 明显高于其他点位。

太湖产 2-MIB 基因丰度介于 $\text{ND} \sim 2.11 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 平均浓度为 $1.52 \times 10^2 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其浓度在 7、8 月维持较高水平, 9 月开始不断下降(图 2(c))。空间上, 东部(尤其东南区)的产 2-MIB 基因浓度较高, 其中 7 月东南部庙港的产 2-MIB 基因浓度最高, 8 月上旬漾西港的浓度达到 $4.19 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 5)。

2.2.2 蓝藻毒素、臭味物质的时空分布

MC 太湖检出的平均浓度为 $4.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最高

浓度出现在 9 月下旬的东部位点新塘港, 达到 $674.47 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其余位点的浓度均低于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。MC 和产毒微囊藻基因具有相似的时空分布特征。时间上, MC 在 9 月上旬达到最高值, 之后逐渐下降。空间上, MC 的平均值也呈现出以西区(尤其西北部)较高的分布格局, 其中 9 月上旬有 6 个采样位点的 MC 浓度高于世界卫生组织推荐的标准($1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 均位于太湖西部和北部, 竺山湖和梅梁湖的浓度最高, 分别达到 $7.53 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.22 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

CYN 在太湖的检出范围为 $\text{ND} \sim 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均浓度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。相比产毒柱孢藻基因, CYN 随着时间的变化滞后, 在 7—9 月浓度较高, 之后逐渐下降(图 2(b))。CYN 和产柱孢藻基因的空间分布格局相似(图 4), 东部和南部的浓度明显高于其他区域, 其中五里湖、西山西和泽山 3 个点位在 8 月下旬检出浓度偏高, 分别达到 1.50、1.17 和 $1.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

太湖 2-MIB 臭味物质整体浓度范围介于 $\text{ND} \sim 1122.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均浓度为 $41.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2-MIB 臭味物质和基因浓度随时间的分布一致, 均在 8 月达到峰值, 之后逐渐下降(图 2(c))。2-MIB 在太湖东部(尤其东南部)的浓度较高, 另外 7—9 月在太湖北部竺山湖和梅梁湾也检出较高浓度的 2-MIB(图 5)。

2.2 太湖蓝藻产毒基因预测代谢产物

产毒微囊藻基因与 MC 浓度具有中等相关性, 皮尔逊相关系数 γ 为 0.572 ($P < 0.01$; 图 6(a)), 其中有 95.5% 的数据会落在 95% 的预测区间内。同样地, 产毒柱孢藻基因与 CYN 浓度呈中等相关, 其皮尔逊相关系数 γ 为 0.504 ($P < 0.01$; 图 6(b)), 其中有 94.8% 的数据会落在 95% 的预测区间内。而在 2-MIB 方面, 产 2-MIB 基因与 2-MIB 浓度有中度到强度的相关性, 其皮尔逊相关系数 γ 为 0.652 ($P < 0.01$; 图 6(c)), 其中有 97.2% 的数据会落在 95% 的预测区间内。由相关性分析获得的相关公式可用于后续由基因浓度判断藻类毒素或是臭味物质浓度的主要参数。

2.3 太湖蓝藻污染的环境影响因素

总微囊藻基因与 pH 呈显著正相关, 与电导率呈显著负相关, 产毒微囊藻和 MC 与溶解氧均呈显著负相关。柱孢藻基因未呈现出和环境因子的显著相关性, 但是柱孢藻毒素呈现出与 pH 显著正相关, 与电导率显著负相关。产 2-MIB 基因和臭味物质均呈现与温度显著正相关(表 3)。

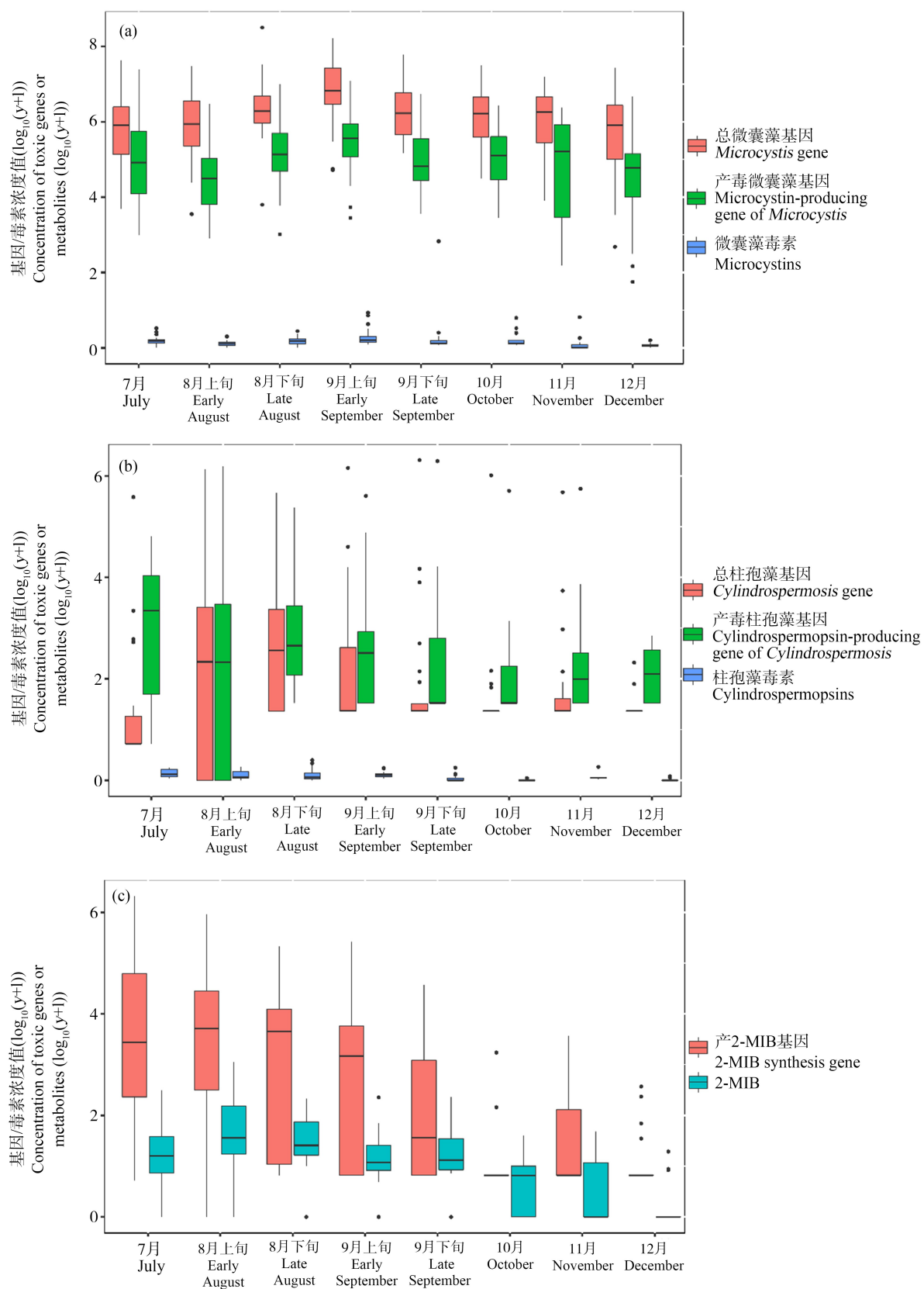


图 2 各月份蓝藻基因、毒素及嗅味物质的浓度变化

Fig. 2 Concentration distribution of cyanobacteria gene, toxins and odorants in different months

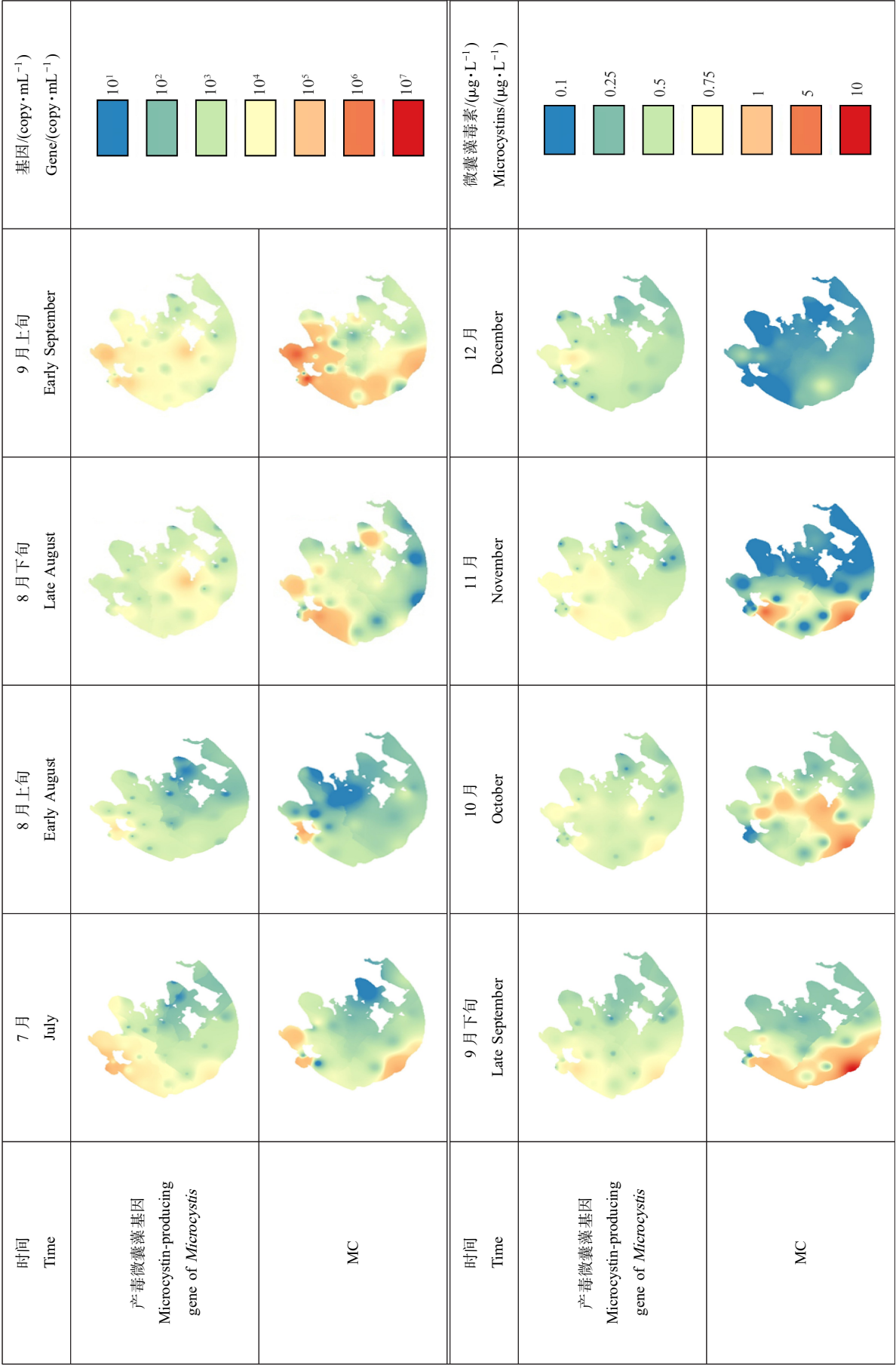


图 3 2019 年 7—12 月产毒微囊藻基因及微囊藻毒素浓度分布图
Fig. 3 Distribution of *Microcystis* toxic genes and microcystin concentration from July to December 2019 in Tai Lake

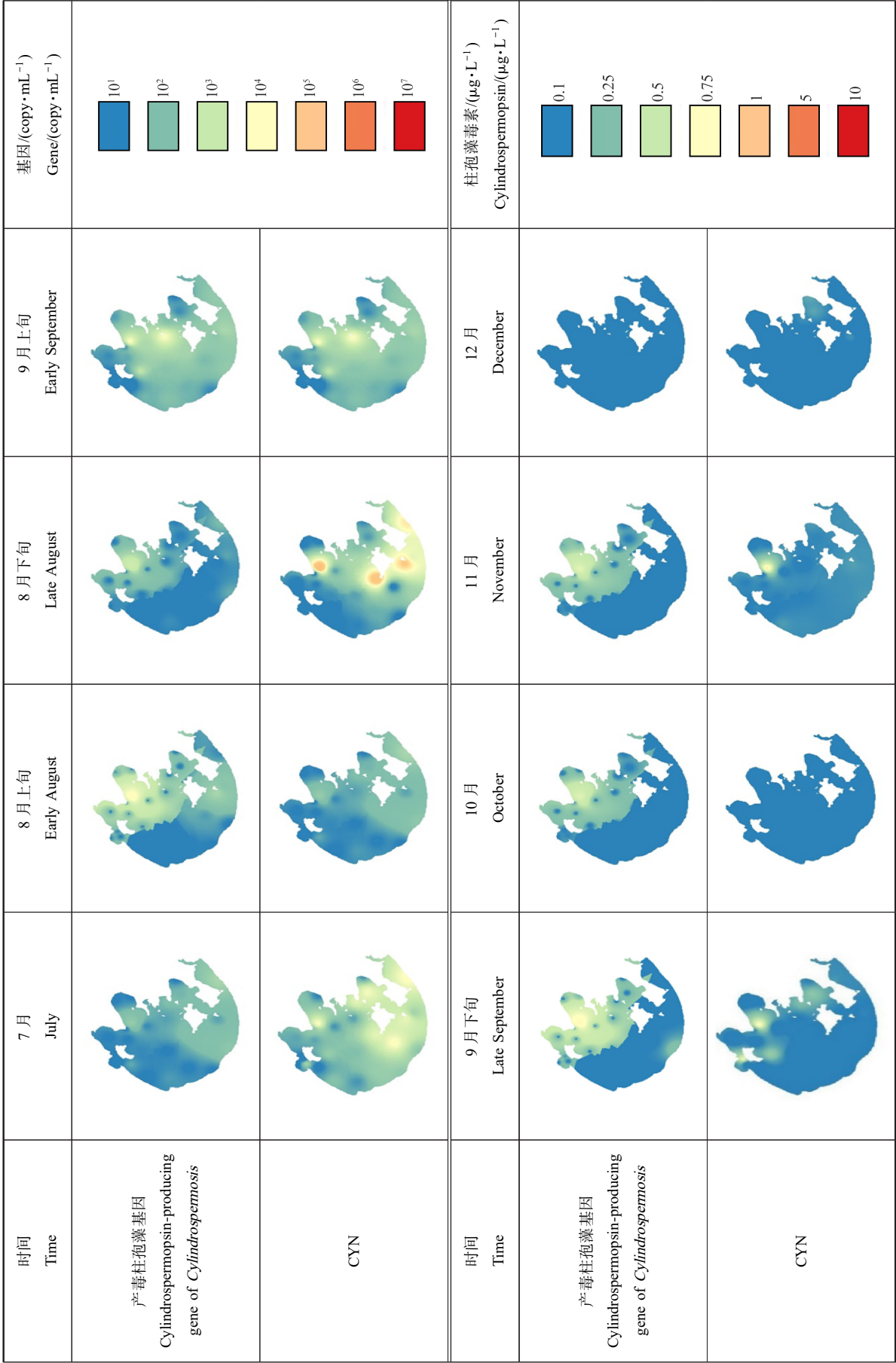


图 4 2019 年 7—12 月产毒柱孢藻基因及柱孢藻毒素浓度分布图

Fig. 4 Distribution of genes and toxin concentration of *Cylindrospermopsis* spp. from July to December 2019 in Tai Lake

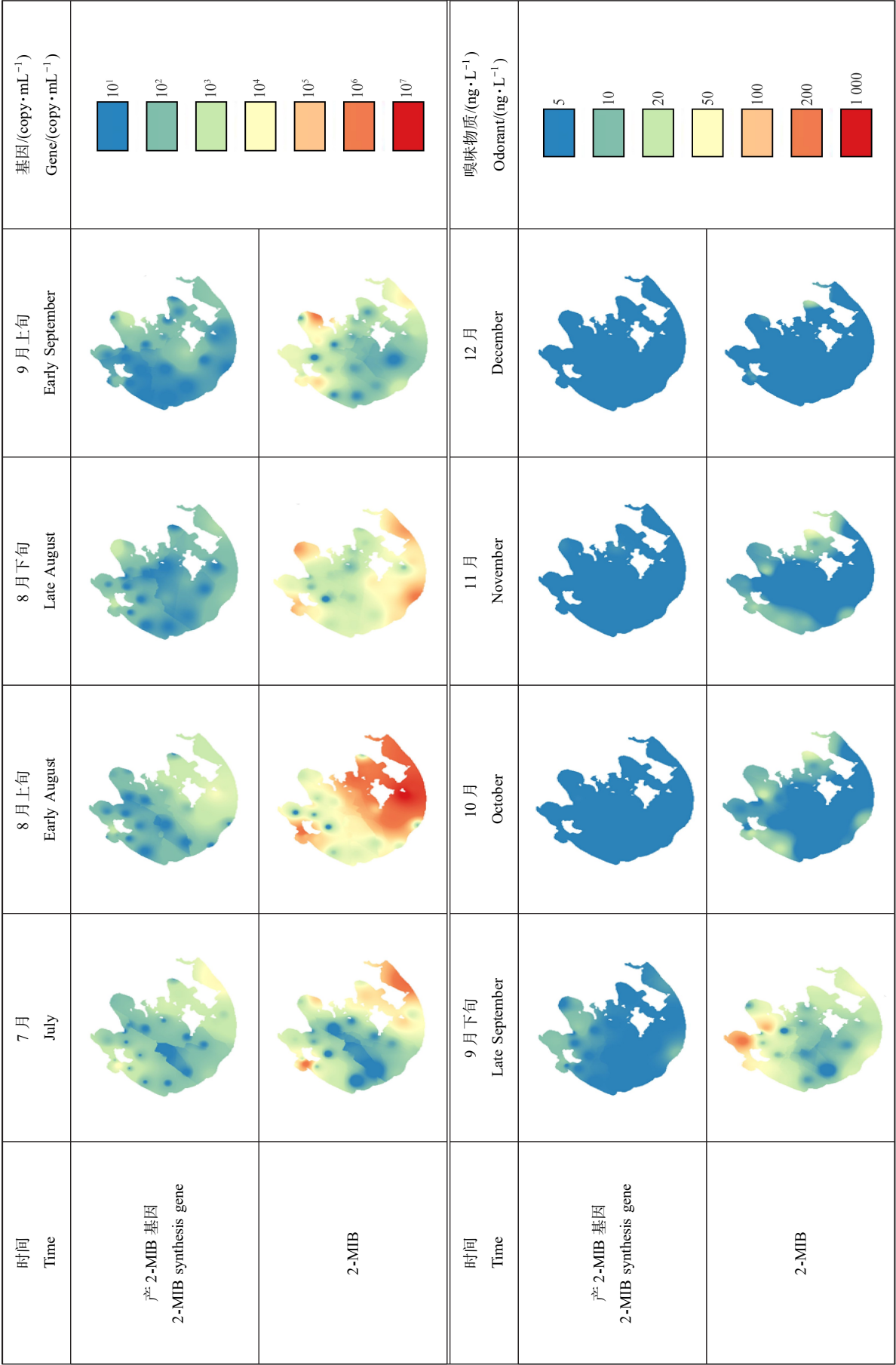


图 5 2019 年 7—12 月太湖产 2-MIB 基因及 2-MIB 浓度分布图

Fig. 5 Distribution of 2-MIB synthesis gene and 2-MIB concentration from July to December of 2019 in Tai Lake

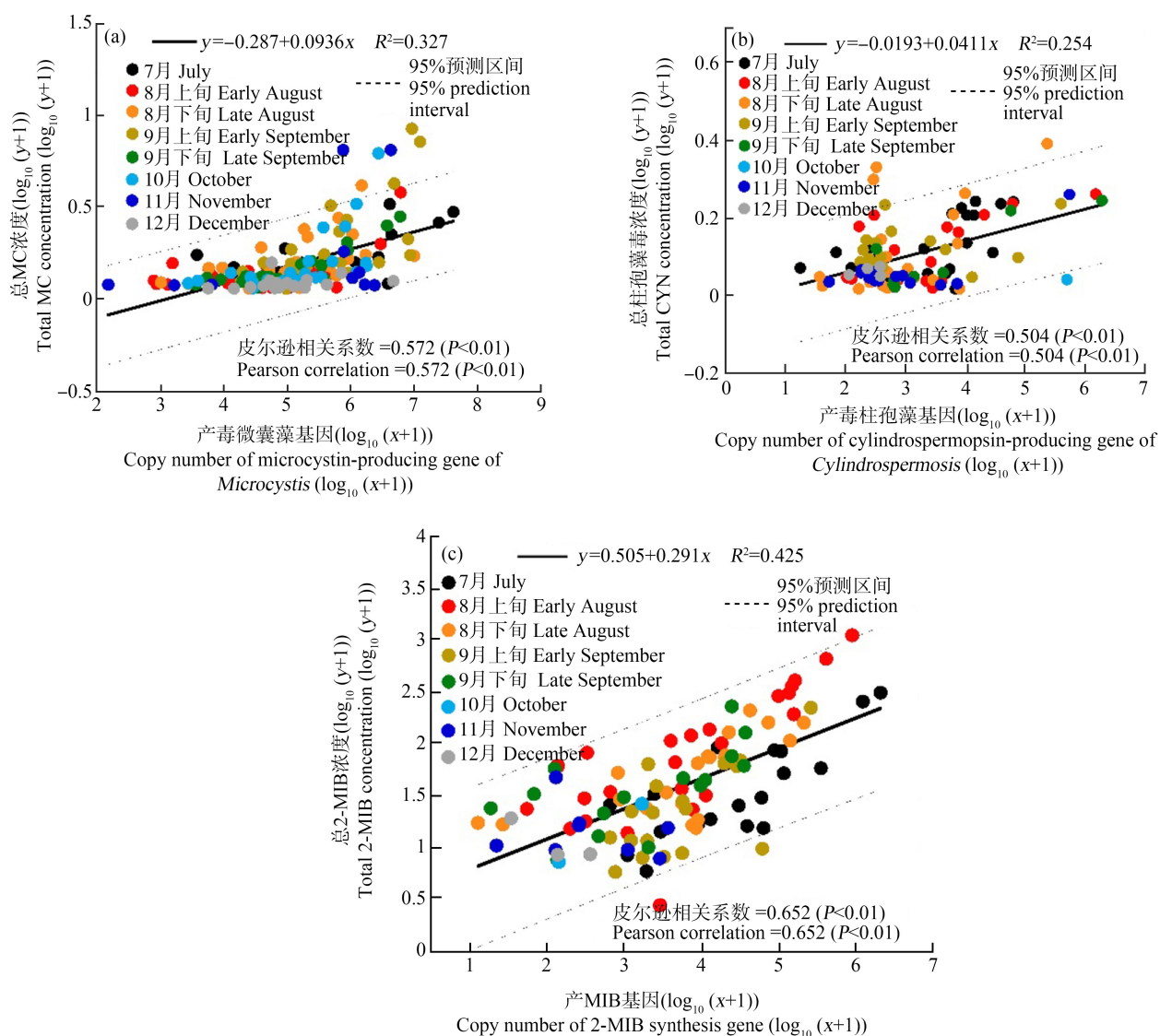


图6 太湖蓝藻各基因与其代谢物的相关性分析

注:(a) $N=177$;(b) $N=100$;(c) $N=108$;基因单位为 $\text{copy} \cdot \text{mL}^{-1}$,MC和CYN浓度单位为 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,2-MIB浓度单位为 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 6 Correlation analysis of genes and metabolites of cyanobacteria in Lake Tai

Note: (a) $N=177$; (b) $N=100$; (c) $N=108$; the units of genes were $\text{copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, the units of concentrations of MC and CYN were $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, the units of 2-MIB concentrations were $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

3 讨论 (Discussion)

不同类型的产毒藻基因在太湖具有显著的时空分布差异。时间上,产毒微囊藻基因在9月达到浓度峰值,产毒柱胞藻和产2-MIB基因则在7、8月维持较高浓度。空间上,产毒微囊藻基因在西部(尤其西北部)的拷贝数更高,已有研究也表明,太湖西北部蓝藻水华暴发频繁,这可能由西北部的地理位置、沉积环境及入湖河流的污染等多种因素综合导致。产毒柱胞藻基因在北部和东部的拷贝数更高,产2-MIB基因则在东部(尤其东南部)的拷贝数更高。

太湖各项蓝藻产毒基因与二次代谢物具有良好

相关性。蓝藻的基因和代谢产物的相关性系数反映了单位产毒基因表达转化成毒素/嗅味的能力,相关性系数越高,代表具有产毒基因的蓝藻产生毒素/嗅味的能力越强,反之亦然。太湖3种蓝藻产毒基因和其代谢产物均呈中度相关,说明基于产毒微囊藻基因的丰度可以有效预警蓝藻污染,并推测蓝藻的生成趋势。不同蓝藻基因和代谢物受环境因子的影响不同,产毒微囊藻和微囊藻毒素和溶解氧均呈显著负相关,柱胞藻毒素呈现出和pH显著正相关,和电导率显著负相关。产2-MIB基因和嗅味物质均呈现与温度显著正相关。

表 3 蓝藻基因/毒素/臭味与环境因子的相关性

Table 3 Correlation between cyanobacteria genes/toxins/odorants and environmental factors

	温度 Temperature	pH	溶解氧 Dissolved oxygen	电导率 Electrical conductivity
<i>mcy</i>	0.072	0.222**	-0.051	-0.162*
<i>t-mcy</i>	0.037	0.168*	-0.178*	-0.085
<i>cyl</i>	0.078	0.004	-0.025	0.036
<i>cyn</i>	0.088	-0.008	0.021	0.040
<i>2-mib</i>	0.233**	0.097	-0.017	-0.020
MC	0.054	-0.235**	-0.457**	-0.228**
CYN	0.388**	0.353**	-0.108	-0.178*
2-MIB	0.336**	0.135	-0.054	-0.091

注:*mcy* 为总微囊藻基因, *t-mcy* 为产毒微囊藻基因, *cyl* 为总柱孢藻基因, *cyn* 为产毒柱孢藻基因, *2-mib* 为产 2-MIB 基因, MC 为微囊藻毒素, CYN 为柱孢藻毒素, 2-MIB 为 2-甲基异茨醇臭味物质; * 表示显著相关($P<0.05$), ** 表示显著相关($P<0.01$)。

Note: *mcy* represents copy number of the total *Microcystis* gene; *t-mcy* represents copy number of toxic gene of *Microcystis*; *cyl* represents copy number of the total *Cylindrospermopsis* gene; *cyn* represents copy number of toxic gene of *Cylindrospermopsis*; *2-mib* represents copy number of 2-MIB synthesis gene; MC represents concentration of microcystic toxins; CYN represents concentration of cylindrospermopsins; 2-MIB represents concentration of 2-MIB; * means significant correlation ($P<0.05$), ** means significant correlation ($P<0.01$).

太湖蓝藻的毒素、臭味物质和相应基因在时空上的分布格局相似。太湖产毒微囊藻基因与微囊藻毒素的线性回归模型的斜率为 0.0936, 与 Chiu 等^[7]报道的斜率(0.374)^[11]有差异。中国太湖产毒柱孢藻基因与柱孢藻毒素的回归斜率为 0.0411 (图 6(b)), 有异于中国台湾地区的斜率(0.142); 而在 2-MIB 方面, 中国太湖 2-MIB 的回归斜率为 0.291, 小于中国台湾地区的斜率^[22]。以上结果表明, 中国太湖的产毒微囊藻、产毒柱孢藻和产 2-MIB 的蓝藻在生理特性与中国台湾地区的有明显的差异, 中国太湖地区的斜率普遍小于中国台湾地区的, 可知在同一基因水平上中国台湾地区的蓝藻毒素及臭味问题较太湖更为严峻。

目前太湖蓝藻的研究仍集中在微囊藻及毒素方面, 太湖中微囊藻毒素的平均浓度达 $4.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 明显高于柱孢藻毒素($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 2-MB($41.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$), 表明太湖蓝藻水华主要由微囊藻导致, 但是柱孢藻毒素在太湖的局部区域构成低风险, 其在五里湖、西山西和泽山 3 个点位在 8 月下旬检出浓度分别达到 1.50 、 1.17 和 $1.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 超过澳洲饮用水的建议值 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[26-27], 建议加强对太湖其他产毒蓝藻的研究。此外, 太湖 8 月上旬和下旬分别有 21 个和 22 个点位的 2-MIB 浓度高于我国的建议值 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[28], 而所有样品中有 53% 高于我国建议限值, 最大浓度($1123 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)更远高于我国建议限值, 为限值的 112 倍, 说明太湖存在较高的 2-MIB 风险。

2-MIB 影响饮用水水质, 且在水体中不易快速降解, 建议持续关注产 2-MIB 基因及臭味物质的浓度变化。

太湖的饮用水源地 2-MIB 风险显著高于 MC 和 CYN。本研究共设置了 5 个饮用水源地点位, 分别为寺前、渔洋山、金墅港、锡东水厂和庙港。相比其他采样点, 饮用水源地的 MC 浓度较低, 产毒微囊藻基因的丰度范围为 $55.4 \sim 1.73 \times 10^6 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, MC 浓度均低于饮用水推荐浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中锡东水厂和渔洋山的产毒微囊藻基因和 MC 浓度略高于其他饮用水点位, 9 月的 MC 浓度高于其他月份。饮用水源地的 CYN 浓度范围为 $0 \sim 0.86 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 7、8 月的浓度偏高, 其中庙港和渔洋山的浓度略高于其他水源地。毒素 2-MIB 的浓度范围为 $0 \sim 412.46 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 其中有 65% 的样品浓度高于我国建议限值 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 8、9 月的浓度偏高, 尤其在庙港、渔洋山和金墅港, 说明太湖的饮用水源地存在较高的 2-MIB 风险, 可能威胁到饮用水供应安全, 应该重点关注。

与传统形态学相比, 分子监测方法具有检测限低、检测范围广等技术优势。本研究以产毒微囊藻基因、产毒柱孢藻基因和产 2-MIB 基因为靶向基因, 通过 qPCR 方法定量检测 7—12 月太湖产生藻类毒素/臭味物质的蓝藻数量。qPCR 技术定量蓝藻基因的检测区间为 $2.5 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^7 \text{ copy} \cdot \text{mL}^{-1}$, 同时提供不同功能性基因的丰度变化。结果显示, 产毒微囊藻基因的平均拷贝数最高, 达到 7.83×10^5

copy·mL⁻¹,产毒柱孢藻基因次之(2.99×10^4 copy·mL⁻¹),产2-MIB基因的拷贝数较低,为 1.52×10^2 copy·mL⁻¹。总微囊藻的基因拷贝数(16S rDNA基因检测)随时间变化趋势与产毒微囊藻的基本一致,每月检测到的产毒微囊藻基因均低于总微囊藻的,说明自然水体中同一蓝藻物种的有毒和无毒菌株通常共存。产毒微囊藻基因/总微囊藻基因的比值为7.6%~35.9%,说明仍有高丰度的微囊藻菌株不具有产藻毒素的潜力。相反,产毒柱孢藻基因/总柱孢藻基因的比值范围为4.1%~100%,平均值为88.9%,说明绝大多数柱孢藻都含有产毒素的基因。因此,采用产毒基因的拷贝数预测藻种的产毒能力更加准确。

本研究通过qPCR技术对太湖的3种关键产毒基因进行连续系统的监测与分析,发现产毒基因和基于传统方法监测的毒素、臭味浓度具有较高的相关性,证明基于DNA的分子检测方法可快速准确地对产毒藻进行监测和预警,为管理部门进行蓝藻水华风险评估和管理提供技术和数据支撑,对保障该区域的饮用水安全具有重要意义。

通讯作者简介:张效伟(1978—),男,教授,博士生导师,主要研究方向为生态毒理学和健康风险评估。

参考文献(References):

- [1] 中华人民共和国环境保护部. 湖库富营养化防治技术政策: 环发[2004]59号[Z]. 北京: 中华人民共和国环境保护部, 2004
- [2] Carmichael W W. Cyanobacteria secondary metabolites—The cyanotoxins [J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1992, 72(6): 445-459
- [3] Otsuka S, Suda S, Li R H, et al. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 172(1): 15-21
- [4] Fastner J, Erhard M, von Döhren H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5069-5076
- [5] Alster A, Kaplan-Levy R N, Sukenik A, et al. Morphology and phylogeny of a non-toxic invasive *Cylindrospermopsis raciborskii* from a Mediterranean Lake [J]. Hydrobiologia, 2010, 639(1): 115-128
- [6] Rouhiainen L, Sivonen K, Buikema W J, et al. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(20): 6021-6026
- [7] Chiu Y T, Chen Y H, Wang T S, et al. A qPCR-based tool to diagnose the presence of harmful cyanobacteria and cyanotoxins in drinking water sources [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(5): 547
- [8] Tsao H W, Michinaka A, Yen H K, et al. Monitoring of geosmin producing *Anabaena circinalis* using quantitative PCR [J]. Water Research, 2014, 49: 416-425
- [9] Pearson L A, Neilan B A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(3): 281-288
- [10] Michinaka A, Yen H K, Chiu Y T, et al. Rapid on-site multiplex assays for total and toxigenic *Microcystis* using real-time PCR with microwave cell disruption [J]. Water Science and Technology, 2012, 66(6): 1247-1252
- [11] Lei L, Lei M, Lu Y, et al. Development of real-time PCR for quantification of *Cylindrospermopsis raciborskii* cells and potential cylindrospermopsin-producing genotypes in subtropical reservoirs of southern China [J]. Journal of Applied Phycology, 2019, 31: 3749-3758
- [12] Ouahid Y, del Campo F F. Typing of toxinogenic *Microcystis* from environmental samples by multiplex PCR [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(2): 405-412
- [13] Sevilla E, Martin-Luna B, Vela L, et al. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: Transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 [J]. Ecotoxicology, 2010, 19(7): 1167-1173
- [14] Ngwa F F, Madramootoo C A, Jabaji S. Development and application of a multiplex qPCR technique to detect multiple microcystin-producing cyanobacterial genera in a Canadian freshwater lake [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(4): 1675-1687
- [15] 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]. Environmental Toxicology, 2005, 20(3): 235-242
- [16] 刘洋, 胡佩茹, 马思三, 等. 实时荧光定量PCR方法检测南太湖入湖口产毒微囊藻[J]. 湖泊科学, 2016, 28(2): 246-252
- Liu Y, Hu P R, Ma S S, et al. Detection of microcystin-

- producing *Microcystis* cells at the entrance of rivers to southern Lake Taihu by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Journal of Lake Sciences, 2016, 28(2): 246-252 (in Chinese)
- [17] Rasmussen J P, Giglio S, Monis P T, et al. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(5): 1503-1515
- [18] Marbun Y R, Yen H K, Lin T F, et al. Rapid on-site monitoring of cylindrospermopsin-producers in reservoirs using quantitative PCR [J]. Sustainable Environment Research, 2012, 22(3): 143-151
- [19] Baker L, Sendall B C, Gasser R B, et al. Rapid, multiplex-tandem PCR assay for automated detection and differentiation of toxigenic cyanobacterial blooms [J]. Molecular and Cellular Probes, 2013, 27(5-6): 208-214
- [20] Te S H, Chen E Y, Gin K Y H. Comparison of quantitative PCR and droplet digital PCR multiplex assays for two genera of bloom-forming cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 5203-5211
- [21] Wang Z J, Song G F, Shao J H, et al. Establishment and field applications of real-time PCR methods for the quantification of potential MIB-producing cyanobacteria in aquatic systems [J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(1): 325-333
- [22] Chiu Y T, Yen H K, Lin T F. An alternative method to quantify 2-MIB producing cyanobacteria in drinking water reservoirs: Method development and field applications [J]. Environmental Research, 2016, 151: 618-627
- [23] Fischer W J, Garthwaite I, Miles C O, et al. Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins [J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(24): 4849-4856
- [24] Lin T F, Liu C L, Yang F C, et al. Effect of residual chlorine on the analysis of geosmin, 2-MIB and MTBE in drinking water using the SPME technique [J]. Water Research, 2003, 37(1): 21-26
- [25] Montgomery D C, Peck E A, Vining G G. Introduction to Linear Regression Analysis [M]. Wiley, 1982: 9-37
- [26] World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety. Guidelines for drinking-water quality: Volume 2: Health criteria and other supporting information [R]. Geneva: WHO, 1996
- [27] Humpage A R, Falconer I R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value [J]. Environmental Toxicology, 2003, 18(2): 94-103
- [28] 徐晓庆, 苏命, 朱宜平, 等. 基于荧光定量 PCR 技术构建水源地典型致嗅物质 2-甲基异莰醇的评估方法及其应用[J]. 环境工程学报, 2020, 14(11): 3208-3215
- Xu X Q, Su M, Zhu Y P, et al. Evaluation of typical odorant 2-methylisoborneol based on real time qPCR in source water and its application [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(11): 3208-3215 (in Chinese)
- ◆