

惠州地区小型村镇水源产毒蓝藻污染初探

袁志勇^{1,2}, 朱红惠², 霍光华^{1*}, 冯广达², 陈远良²

(1.江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045; 2.广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070)

摘要:为了揭示惠州地区农村小型水源产毒蓝藻污染情况,从惠州村镇采取不同类型水源地的水样,分别利用分子生物学和HPLC方法分析水样中的产毒蓝藻污染情况和微囊藻毒素含量。通过微囊藻毒素合成基因片段 *mcyA*-Cd 的检测发现,在采取的 27 个水样中,12 个水样已经被产毒蓝藻污染。PCR-DGGE 和克隆测序的结果证明,利用 *mcyA*-Cd 基因对环境样品中的产毒蓝藻进行初步检测具有较高的特异性和准确性,所有样品中只有一个样品检出来自阿氏浮丝藻属的产毒蓝藻,其他检出的产毒蓝藻均为微囊藻属;HPLC 分析结果显示,8 个水样检出微囊藻毒素,其中 5 个样品超过 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究结果表明,*mcyA*-Cd 基因可以用于快速、准确的对环境样品中的产毒蓝藻进行初步检测;采样区域部分水源地已经被产毒蓝藻污染,应该采取相应措施对惠州地区农村水源地进行产毒蓝藻的监测,防止或减少微囊藻毒素对人产生的危害。

关键词:产毒蓝藻;微囊藻毒素;PCR-DGGE;HPLC

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)07-1404-08

Analysis of Microcystin-producing Cyanobacterial in Small Rural Surface Water Samples from Huizhou, China

YUAN Zhi-yong^{1,2}, ZHU Hong-hui², HUO Guang-hua^{1*}, FENG Guang-da², CHEN Yuan-liang²

(1.College of Biosciences and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology(Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base),South China, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Microcystins (MCs) are potent hepatotoxins produced by microcystin-producing cyanobacteria and give a significant health hazard to human and animals. MCs are normally produced by many, but not all strains of the cyanobacteria genera *Planktothrix*, *Microcystis*, *Anabaena*. To investigate the microcystin-producing cyanobacteria in rural surface water samples, different types of rural surface water were sampled from Huizhou, including pool water, reservoir water and running water. Molecular techniques and HPLC were employed to detect the microcystin-producing cyanobacteria and MCs. The results showed that *mcyA*-Cd, the specific fragment coding for the microcystin synthetase complex, was detected in 12 out of 27 samples. PCR-DGGE in combination with cloning and sequencing proved that the primary detection of microcystin-producing cyanobacteria in the environmental sample using *mcyA*-Cd was of high specificity and accuracy. HPLC analysis indicated that MC-RR or MC-LR was detected in 8 samples, and exceeded $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in 5 samples out of them. These results suggest that *mcyA*-Cd could be applied to the rapid and accurate detection of microcystin-producing cyanobacteria in environmental samples, and that the water resources of the sampling sites had been contaminated by microcystin-producing cyanobacteria. Appropriate measures should be taken to monitor the microcystin-producing cyanobacteria in the rural surface water in Huizhou, in order to avoid or reduce the potential hazards to human.

Keywords: microcystin-producing cyanobacteria; microcystins; PCR-DGGE; HPLC

收稿日期:2012-01-15

基金项目:国家科技重大专项“水体污染控制与治理”资助项目(2008ZX07425-002)

作者简介:袁志勇(1986—),男,江西吉安人,硕士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail:yuanzy1986@126.com

* 通讯作者:霍光华 E-mail:hgh3813899@sohu.com

近年来我国工农业发展非常迅速,在极大地提高人民生活水平的同时,也使得水体污染变得日益严重。生产废水、养殖废水、农田化肥农药等未经处理直接大量排入环境,从而使周围环境的水体富营养化越来越严重,催生水华。水华的暴发会使水体中的溶解氧浓度降低、水质恶化发臭,而且一些浮游藻类会产生大量毒素,对人们的生活用水和饮用水安全构成巨大的威胁。在众多的藻类毒素中,尤其以微囊藻毒素(MCs)最为常见,并且对人的影响也最大。微囊藻毒素的结构由3个D型氨基酸、两个特异性氨基酸、1个2S,3S,8S,9S-3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸(Adda)结构和两个可变氨基酸组成^[1]。由于整个结构中有两个氨基酸是可变的,微囊藻毒素会有很多类型,目前已发现了至少80种类型的微囊藻毒素^[2],其中以LR型微囊藻毒素(MC-LR)、RR型微囊藻毒素(MC-RR)和YR型微囊藻毒素(MC-YR)最为普遍。

微囊藻毒素对人和动物的危害极大,过量摄入可致死。1996年,在巴西就发生过因肾脏渗透用水被微囊藻毒素污染而导致52人死亡的重大事件^[3-4]。长期低剂量的摄入也会对肝脏和肾脏造成损伤,并且会促进癌细胞生长。在世界卫生组织给出的指导值中,饮用水中的微囊藻毒素的含量应该控制在 $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下(以MC-LR为例)^[5]。我国GB 3838—2002《地表水环境质量标准》也规定地表水中MC-LR的含量应该控制在 $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下^[6]。

研究发现部分来自鱼腥藻属(*Anabaena*)、微囊藻属(*Microcystis*)、阿氏浮丝藻(*Planktothrix*)和颤藻属(*Nostoc*)这些属的菌株都具有产MCs的能力^[7]。Rinata-Kanto等^[8]对美国的Erie湖中的微囊藻进行研究发现,只有0.03%~4.7%的微囊藻具有产MCs的能力。蓝藻菌株是否产MCs主要是取决于其是否含有*mcy*基因簇。*mcy*基因簇是蓝藻细胞中控制合成MCs的一段基因,由*mcyA*~J十个基因模块组成^[9]。*mcyA*-Cd是*mcy*基因簇中两个保守的特异性基因片段。Hisbergues等^[10]已证实当来自阿氏浮丝藻属、微囊藻属、鱼腥藻属中的蓝藻缺少*mcyA*-Cd片段时,其产毒能力也丧失。

迄今为止针对水体中微囊藻毒素和产毒藻的研究已有上百年历史,但绝大多数的研究是针对曾经暴发过水华的大型湖泊或水库^[11-14],针对农村池塘、水井等小型水源产毒蓝藻污染的研究则很少。华南地区人口密度极大,水产养殖业也比较发达。随着养

殖业的快速发展,不少养殖场和池塘的富营养化程度也越来越高,给当地小型水源中的产毒蓝藻提供了越来越优越的生长环境。尤其值得注意的是,这些产毒蓝藻产生的微囊藻毒素会在鱼、螺等体内富集,通过不同的方式被人摄入,对人和家畜的健康构成了不同程度的威胁^[15-17]。

本文以华南地区养殖业相对发达的惠州村镇为研究对象,分别采取池塘水、水库水、水井水、自来水等多种类型水样,高效液相色谱(HPLC)与聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)两种方法相结合,分别从化学和分子两个层面研究华南地区典型村镇小型水源产毒蓝藻污染现状。

1 材料与方法

1.1 样品采集

水样于2011年3月和5月采自惠州6个村庄,分别用X-1和X-2对3月和5月采集的两批水样进行编号(X为序号)。水样类型包括水井水、水库水、池塘水、自来水。水样用高温灭菌后的采样瓶采集,每个采样点采集3个水样并混合均匀。水样采集后存放于4℃,并尽快提取水样DNA。水样采集地点如表1所示。

水样采集点在村庄中进行随机抽取,总共采取池塘水14个,沟渠水2个,水井水7个,水库水2个,东江水1个,自来水1个。惠州地区养殖业较为发达,所采集的池塘水均来自当地用于经济鱼养殖的池塘。由于鱼类养殖密度较大,当地居民往池塘中投入大量肥料及饲料等。一些池塘周围还进行鸡、鸭、鹅等养殖,这些家禽所排粪便也流入池塘,多数池塘水呈较深的绿色,说明这些池塘中存在较多藻类生物。沟渠为当地池塘排水或引水所挖,如果没有池塘需要排水或引水,沟渠中水量较少,本文进行样品采集时正处于沟渠水量较少时期。所采取的7个水井水当中2-1、3-1、11-1、2-2、11-2 5个采样点周围都存在村民养殖用池塘,为当地村民饮用水源。6-1、7-1两个采样点离池塘较远,但是由于之前有调查显示该区域水源重金属超标,这两处水源居民只用于洗衣等,而不作为饮用水源。水库离村庄较远,主要供应当地农业用水。16-2为自来水,其水源为离村庄较远处的另一小型水库,水库水经水处理设备处理后直接接入村民家中,供当地村民饮用、洗漱等。

1.2 主要仪器和试剂

TProfessional PCR(Biometra),CW20水浴锅(Pre-

表 1 采样点分布
Table 1 The location of sampling sites

编号	采样点	经纬度	
		北纬	东经
1-1	新华四队水井旁池塘水	N 23.035937°	E 114.282112°
2-1	新华四队集中式供水	N 23.036456°	E 114.281145°
3-1	新华四队老梁家饮用水	N 23.020002°	E 114.166506°
4-1	新华四队老梁家北侧池塘水	N 23.020014°	E 114.166518°
5-1	新华四队老梁家南侧池塘水	N 23.019821°	E 114.166538°
6-1	移民新村手摇井水	N 23.021198°	E 114.164800°
7-1	移民新村村民家日常用水	N 23.021214°	E 114.164839°
8-1	移民新村池塘外沟水	N 23.019240°	E 114.165377°
9-1	新华七队饮用水南侧污水沟	N 23.010373°	E 114.174298°
10-1	新华七队饮用水水井旁池塘水	N 23.010474°	E 114.174262°
11-1	新华七队集中式供水农户饮用水	N 23.010783°	E 114.174292°
1-2	潼湖镇琥珀村池塘	N 23.088669°	E 114.208410°
2-2	潼湖镇琥珀村井水	N 23.088621°	E 114.211040°
3-2	潼湖镇琥珀村池塘(2)	N 23.089410°	E 114.213696°
4-2	琥珀村水库边池塘水	N 23.0785541°	E 114.228886°
5-2	琥珀村水库边池塘水(2)	N 23.078880°	E 114.229122°
6-2	观洞水库	N 23.075905°	E 114.230836°
7-2	观洞水库(2)	N 23. 077209°	E 114.232271°
8-2	琥珀村池塘	N 23.088134°	E 114.205877°
9-2	东江水	N 23.087735°	E 114.177964°
10-2	三和村池塘水	N 23.064640°	E 114.242732°
11-2	三和村饮用水	N 23.064640°	E 114.242732°
12-2	三和村池塘水(2)	N 23.062414°	E 114.240389°
13-2	三和村池塘水(3)	N 23.063075°	E 114.239397°
14-2	杏园村池塘水	N 23.060697°	E 114.239452°
15-2	三和村池塘水(4)	N 23.061145°	E 114.239974°
16-2	杏园村自来水	N 23.059479°	E 114.238610°

ciTemp), 高速冷冻离心机(Thermo), Agilent 1260 高效液相色谱仪(Agilent), ImageQuant 350 凝胶成像系统(GE)。500 mg/6 mL Sep-pak C18 固相萃取柱(Waters)、氮吹仪(AUTO SCIENCE)。

SDS、CTAB、甲叉双丙烯酰胺均为 Amersco 产品, DNA 聚合酶(北京全式金), T4 连接酶、pCR2.1 载体为 Invitrogen 产品, 微囊藻毒素标准品 MC-RR (CeTOX Lab™)、MC-LR(Enzo), SanPrep 柱式 DNA 胶回收纯化试剂盒(上海生工)。

1.3 水样 DNA 的提取

水样采集后, 每个水样取 600 mL, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集较大颗粒的细胞, 离心所得的上清液再过 0.22 μm 孔径滤膜。将所得的滤膜剪碎后与离心收集到的沉淀混合, 用于水样 DNA 的提取。水样 DNA 用 CTAB 法^[18]进行抽提。

1.4 微囊藻毒素 HPLC 分析

1.4.1 微囊藻毒素 HPLC 分析前处理

每个水样取 1.2 L, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 去除大颗粒杂质和细胞, 离心收集的上清分别用 GF/C 玻璃纤维滤膜和 0.45 μm 孔径乙酸纤维酯滤膜过滤。取过滤后收集的水样 1 L 过 Sep-pak C18 固相萃取小柱对藻毒素进行富集。藻毒素富集之前需先后用 10 mL 甲醇和 10 mL 纯水对 C18 固相萃取小柱进行活化。水样流经小柱的速度控制在 5~8 mL·min⁻¹。富集后的小柱分别用 10 mL 10%、20% 和 30% 的甲醇进行梯度淋洗, 之后通空气 10 min, 去除小柱中多余的水分, 再加 5 mL 含有 0.1% 三氟乙酸(TFA)的酸化甲醇进行洗脱, 氮吹仪氮吹至干。用 600 μL 70% 甲醇溶解吹干后的物质, 然后过 0.22 μm 有机相滤膜去除大颗粒杂质。过滤收集到的溶液存于-30 ℃, 等待上机进行

HPLC 分析。

为了研究水样处理过程中微囊藻毒素的回收情况,以双蒸水代替水样,其他条件均按照水样前处理进行处理,然后进行 HPLC 分析。回收率测定的处理为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个,即一个处理分别加 $1\text{ }\mu\text{g}$ MC-RR 和 MC-LR 标准品,另一个处理分别加 $5\text{ }\mu\text{g}$ MC-RR 和 MC-LR 标准品。

1.4.2 微囊藻毒素 HPLC 分析测定

将经过上述处理的样品直接上机进行 HPLC 分析。微囊藻毒素标准品 MC-RR 和 MC-LR 分别用 100% 甲醇溶解配制成 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液。HPLC 分析条件为:色谱柱温度 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇与 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液($\text{pH } 3.0$)按体积比 60:40 混合;流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;紫外可见光检测波长为 238 nm ;进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.5 产毒特异性基因片段检测

以提取的水样 DNA 为模板,扩增产毒特异性片段 *mcyA*-Cd。扩增所用到的引物分别 *mcyA*-Cd 1F($5'$ -AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA- $3'$) 和 *mcyA*-Cd1($5'$ -AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT- $3'$)^[10]。 $25\text{ }\mu\text{L}$ 扩增体系组成为 ddH₂O $20\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物均为 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, EasyTaq DNA Polymerase $0.25\text{ }\mu\text{L}$, 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 。扩增产物用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶进行检测。

1.6 *mcyA*-Cd 片段 PCR-DGGE 分析

为了进行 PCR-DGGE 分析,在前端引物 *mcyA*-Cd 1F 上加上 40 bp GC 夹子 ($5'$ -CGCCCGC CGCGC CCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC- $3'$)^[14],然后利用上述 *mcyA*-Cd 片段扩增的条件进行扩增,扩增体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$ 体系。扩增产物用于变性梯度凝胶电

泳(DGGE)分析。DGGE 电泳胶为 8% 丙烯酰胺胶(100 mL 100% 变性剂中含有 20 mL 40% 丙烯酰胺 2 mL , $50\times\text{TAE}$ 2 mL 、去离子甲酰胺 40 mL 和 42 g 尿素)。40% 丙烯酰胺中丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的比值为 37.5:1。 $50\times\text{TAE}$ 的组成为 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris、 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 冰乙酸和 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (乙二胺四乙酸二钠) EDTA($\text{pH } 8.0$)。DGGE 电泳条件为:胶变性梯度 20%~40%,电压 70 V ,电流 100 mA ,电泳时间 13 h 。电泳结束之后,丙烯酰胺凝胶在含有 GoldView 的双蒸水中染色 1 h ,然后进行拍照、切胶回收以及 Quantity One 图像分析处理。

1.7 *mcyA*-Cd DGGE 切胶条带克隆测序

DGGE 切胶条带用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 无菌双蒸水 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 浸泡过夜,使胶中 DNA 溶解于无菌水中,并以此作为模板扩增 *mcyA*-Cd 片段。 $25\text{ }\mu\text{L}$ 扩增体系组成为:ddH₂O $20\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物均为 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, EasyTaq DNA Polymerase $0.25\text{ }\mu\text{L}$, 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 。扩增产物用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收纯化试剂盒纯化。纯化后的 DNA 片段用于克隆测序。

将克隆测序返回的结果,在 NCBI 中进行序列比对分析。从 GenBank 中选择部分典型蓝藻菌株的 *mcyA*-Cd 片段序列,利用 MEGA 4 软件对这些典型蓝藻菌株的 *mcyA*-Cd 序列和切胶回收的 *mcyA*-Cd 序列构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 水样中产毒蓝藻分子检测

第一批水样(3月)和第二批水样(5月)*mcyA*-Cd 片段扩增的结果分别如图 1 和图 2 所示。可以看出两批水样 27 个样品中有 12 个样品在 300 bp 左右位置

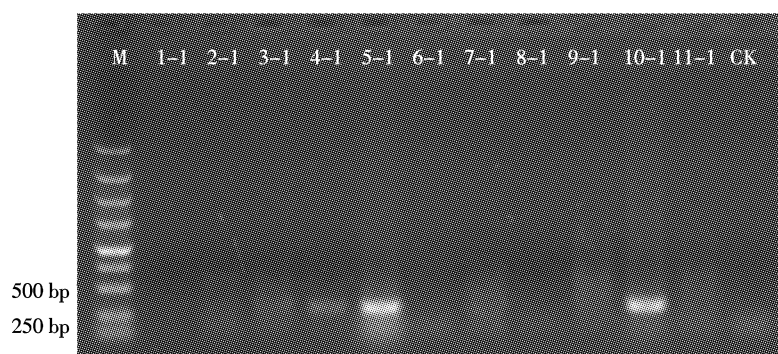


图 1 第一批水样 *mcyA*-Cd 片段验证

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *mcyA*-Cd fragments from the first batch water samples

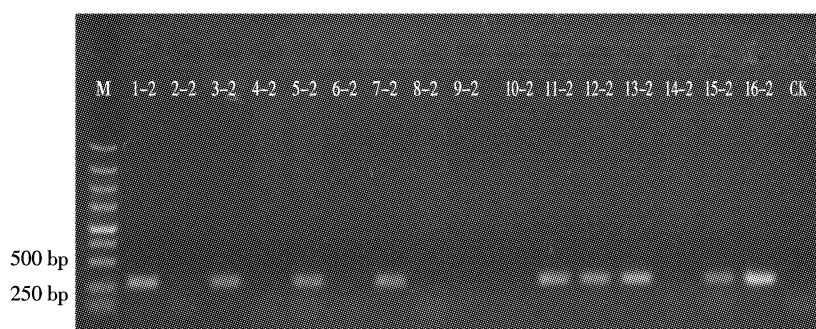
图2 第二批水样 *mcyA*-Cd 片段验证

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *mcyA*-Cd fragments from the second batch water samples

得到条带信号。这 12 个水样中包含有水库水、池塘水、饮用水,其中有 9 个为池塘水。根据 *mcyA*-Cd 片段普通 PCR 验证的结果,可以初步判断这 12 个水样中存在产毒蓝藻的可能性较大。为了进一步证明在 300 bp 位置左右所得的片段为 *mcyA*-Cd 基因,我们进行了 PCR-DGGE 分析,并对 DGGE 分析所得到的条带进行切胶克隆测序。

2.2 *mcyA*-Cd 片段 DGGE 分析及克隆测序

DGGE 分析的结果如图 3 所示,在 12 个水样中,4-1、10-1、5-2、7-2、15-2 五个样品条带较为丰富,其他样品条带类型则较少。不同位置条带全部进行切胶,同一位置的条带则只切 1 条。切胶条带进行克隆测序,NCBI 比对结果显示所得到的所有条带均为 *mcyA*-Cd 基因。DGGE 图谱利用 quantity one 软件进行聚类分析,得到 12 个水样的 DGGE 图谱聚类分析

结果(图 4)。DGGE 图谱聚类分析,可以反映各个水样之间 *mcyA*-Cd 基因型的相似性大小。从图 4 可以看出,所有样品的相似性在 28%以上,相似性超过 60%的样品有 1-2、4-1、10-1、7-2、11-2、12-2、16-2 7 个样品,相似性在 80%以上的有 16-2 和 11-2 两个样品。从聚类分析结果可知,在采样点区域,*mcyA*-Cd 片段基因型在空间分布上存在一定的差异,而且这种差异在部分区域表现得较为明显。

对 *mcyA*-Cd 序列构建系统发育树(图 5),从系统发育树可以得知,绝大多数条带序列都与 *Microcystis* 聚在一支,相似性在 83%以上,而且有 3 个条带与 *Planktothrix* 聚在 1 个枝上,相似性为 93%以上。这 3 个与 *Planktothrix* 聚在 1 支上的胶条带序列均来自 15-2 这一样品。从图中还可知,采样区域内 *mcyA*-Cd 的基因型多样性并不丰富,除 15-2 样品外其他样品

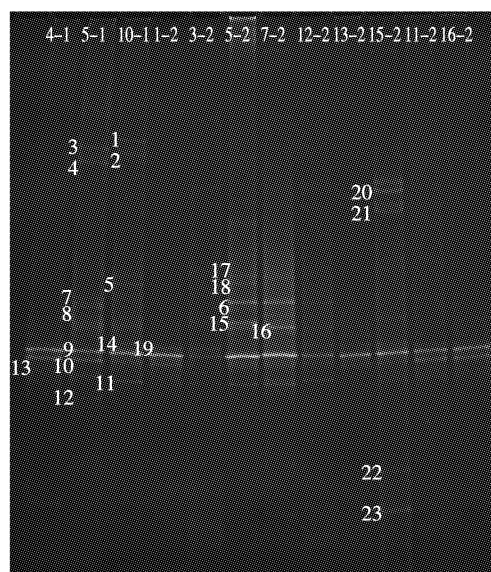


图3 水样 DGGE 分析图谱

Figure 3 DGGE patterns of *mcyA*-Cd fragments from the water samples

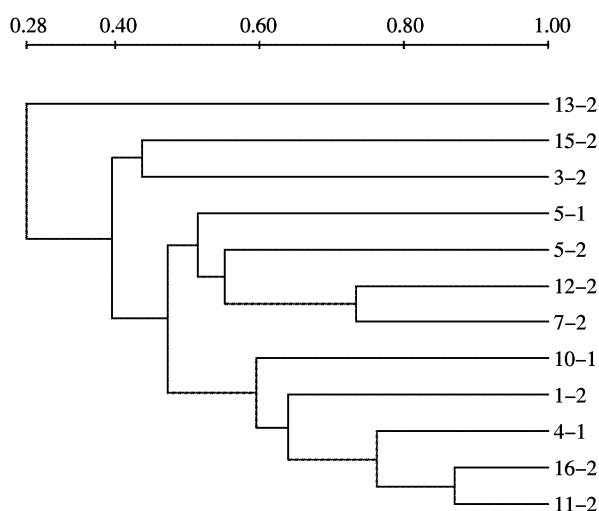


图4 水样 DGGE 图谱聚类分析

Figure 4 Cluster analysis of the DGGE profiles based on the *mcyA*-Cd gene fragments of water samples

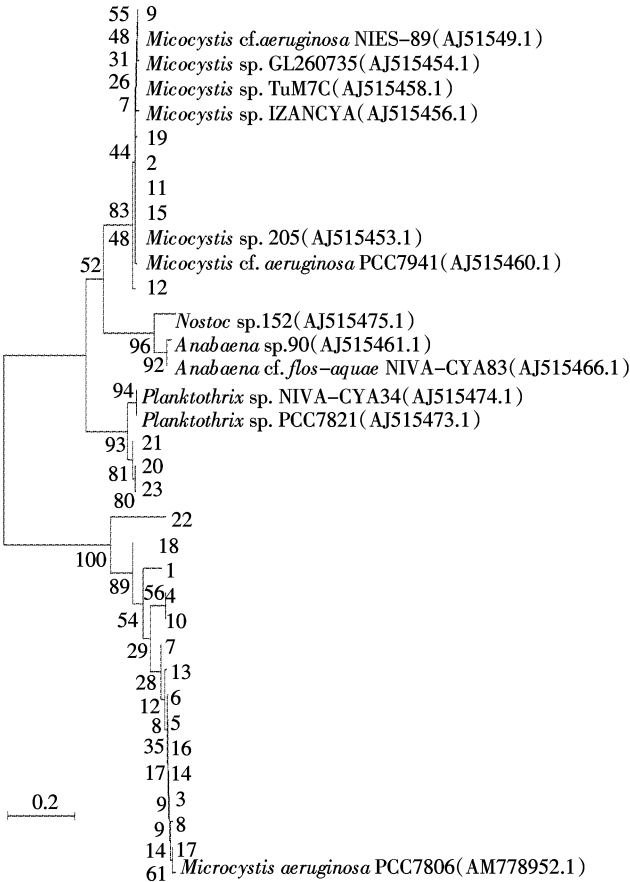


图 5 DGGE 回收胶条带序列构建的系统发育树
Figure 5 Neighbor-joining tree based on the *mcyA*-Cd gene band sequence obtained from DGGE gel bands

中的 *mcyA*-Cd 基因均来自 *Microcystis*。

2.3 水样中微囊藻毒素 HPLC 分析

微囊藻毒素回收率试验结果显示,MC-LR 1 μg·L⁻¹ 和 5 μg·L⁻¹ 的回收率分别为 93.9%和 106.4%, MC-RR 1 μg·L⁻¹ 和 5 μg·L⁻¹ 的回收率分别为 89.5%和 100.1%,回收率效果较好。从 HPLC 分析结果(表 2)可知,27 个水样中有 8 个水样在 MC-LR 或 MC-RR 标准品的出峰时间处检出峰值信号,说明这 8 个水样存在微囊藻毒素,其中 5 个样品的 MCs 含量超过了 1 μg·L⁻¹,浓度最高的样品(6-2)达到了 1 112.02 μg·L⁻¹。在村民直接饮用的自来水 16-2 样品中,同样检测到微量的 MC-RR,浓度为 0.78 μg·L⁻¹。从得到

的结果中可知采样区域内, 部分农村水源已经被微囊藻毒素污染,需采取相应的措施进行处理。

3 讨论

在蓝藻细胞 MCs 合成过程中,*mcyA* 的作用为负责 L-丝氨酸的 N 端甲基化,并将甲基化后的 L-丝氨酸经脱水后合成 MCs 结构中的特殊氨基酸—N-甲基脱氢丙氨酸,当 *mcyA* 基因缺失时则无法合成 MCs^[9]。为了能够有效地区分蓝藻中具有产 MCs 能力的菌株,Hisbergues 等根据 *mcyA* 序列设计引物,扩增其中大约 300 bp 大小的 *mcyA*-Cd 片段^[10]。为了验证其有效性,Hisbergues 等选择分别来自阿氏浮丝藻属、微囊藻属和鱼腥藻属的不同菌株进行 *mcyA*-Cd 片段的扩增,结果发现所有的产毒菌株均能得到 *mcyA*-Cd 片段,而不产毒的菌株无法得到。本文利用 *mcyA*-Cd 片段扩增引物,首先对环境样品中的产毒蓝藻进行初步检测,部分样品可在 300 bp 左右位置得到单一条带信号。

本文所检测的样品为环境样品, 所以其中的 DNA 来源较为复杂。虽然 Hisbergues 等利用 *mcyA*-Cd 基因扩增引物能有效区分纯培养的产毒蓝藻菌株^[10],但是当样品为复杂的环境样品时,有可能得到相同大小的非 *mcyA*-Cd 片段。为了进一步验证它对引物对环境样品进行检测的有效性,我们对环境样品中得到的 300 bp 大小的片段进行 DGGE 分析和克隆测序。DGGE 可以将片段大小相同而碱基排列存在差异的基因有效地区分开来,这可以保证用于测序的样品片段较纯、无双峰。考虑到用于测序的片段较小,直接进行测序时片段的前端和后端大约二三十个碱基信息会丢失,得到的结果不准确,我们进行了克隆测序。克隆测序可以得到基因的全部碱基排列信息,所以测序结果更具说服力。克隆测序的结果显示所有的片段均为 *mcyA*-Cd 基因片段,说明 *mcyA*-Cd 基因用于检测环境样品时同样具有较高的特异性。利用 *mcyA*-Cd 对环境样品中的产毒蓝藻进行初步检测,具有耗时短、操作简单、准确度高等优点。

通过对比 *mcyA*-Cd 片段检测的结果和 HPLC 分

表 2 水样微囊藻毒素 HPLC 分析结果(μg·L⁻¹)
Table 2 Concentrations of MC-LR and MC-RR in water samples(μg·L⁻¹)

水样	1-2	2-2	4-2	5-2	6-2	7-2	12-2	16-2
MC-LR	UD	UD	UD	UD	UD	0.41±0.11	UD	UD
MC-RR	2.97±0.32	0.47±0.13	8.75±0.41	18.38±0.66	1 112.02±5.2	UD	1.2±0.17	0.78±0.11

注:UD 表示未检出该组分。

表 3 *mcyA*-Cd、NMT 片段检测与 HPLC 分析结果对比Table 3 Comparison of the results from *mcyA*-Cd & NMT detection and HPLC

水样	4-1	5-1	10-1	1-2	2-2	3-2	5-2	6-2	7-2	11-2	12-2	13-2	15-2	16-2
MCs	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>mcyA</i> -Cd	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

注: + 表示检出该组分; - 表示未检出该组分; 未列出样品表示所有组分均未检出。

析结果(表 3),发现 4-1、5-1、10-1、3-2、11-2、13-2、15-2 7 个样品 *mcyA*-Cd 检测显示阳性,但是却无微囊藻毒素(MCs)检出。产毒蓝藻的产毒能力不仅与 *mcy* 基因有关,光照、氮磷浓度、铁等环境因素对其产毒能力的影响也非常大^[19-21]。样品中检测出 *mcyA*-Cd 片段只能证明样品中存在产毒蓝藻,样品中检测到 *mcyA*-Cd 片段而无 MCs 检出可能与其本身的环境因素有关,而且微囊藻毒素属于次级代谢产物,一般由蓝藻产生并在胞内累积,而不主动释放到环境中,只有细胞死亡裂解之后才能被释放。在年底或年初的时候部分养殖户会根据池塘状况,对池塘进行晒塘和换水,本研究所采取的两批水样的时间分别为 3 月和 5 月,在这个时间段内,池塘处于刚换完水初期,且温度较低不适合藻类等大量繁殖,藻类细胞释放微囊藻毒素的量很少,这同样可能导致样品检测到 *mcyA*-Cd 片段而无 MCs 检出。

对比的结果同时显示 2-2 样品和 6-2 样品有 MCs 检出而无 *mcyA*-Cd 片段。2-2 样品为水井水,在水井周围有养殖用池塘,此前对其进行总氮、总磷分析时,其总氮、总磷的浓度分别达到了 $8.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.997 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,属于极富营养化水平。水井为当地饮用水源,N、P 来源途径有限,2-2 样品 N、P 含量如此之高,最大的可能是周围池塘水的渗漏。MCs 为水溶性毒素,所以能够随水一起渗漏,2-2 样品中无产毒蓝藻检出却检出 MCs,这或许是因为周围水源中的 MCs 渗漏。6-2 样品为 5 月底所采取的水库水,5 月刚好为当地大旱期间,水库干涸。6-2 采样点为水库干涸后所留下的一小摊积水,其成分非常复杂且散发恶臭,肉眼无法观察到生命迹象,绝大多数藻类可能无法生存,故无法检测到 *mcyA*-Cd 片段。通过 HPLC 分析,6-2 样品中 MC-RR 的浓度高达 $1112.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,虽然水库干涸存在一定的浓缩效应,但是如此之高的浓度还是较为异常,加上样品成分过于复杂,HPLC 分析受其他杂质影响的可能性较大,检测出的物质可能并非 MC-RR。但是目前尚无实验数据证明以上推论,为了证明以上推论还需进行进一步的研究。

16-2 样品为当地村民所用自来水,在对其进行检测时,发现其中同时检测到 *mcyA*-Cd 和 MC-RR。通过对当地居民进行询问得知,自来水水源为当地较远处一水库,水库中的水经一定的水处理设备处理后直接接入村民家中,供村民使用。MCs 为水溶性毒素,物理和化学方法很难将其去除,且部分产毒蓝藻颗粒较小也很难通过物理或化学方法完全去除。所以 16-2 样品中同时检测到 *mcyA*-Cd 和 MC-RR,可能是作为水源的水库已经被产毒蓝藻污染,且水处理设备对水中产毒蓝藻和 MCs 去除不彻底导致。

MC-LR、MC-RR、MC-YR 为目前世界上最为常见的 3 种 MCs。本文中的 HPLC 分析结果显示检出的 MCs 除 7-2 样品为 MC-LR 外,其他的均为 MC-RR。MC-RR 的毒性比 MC-LR 稍低,但是 Gupta 等通过小鼠给药实验发现 MC-RR 仍然具有非常明显的肝脏毒性^[22]。所以虽然水样检出的 MCs 多数为毒性稍小的 MC-RR,但是仍然应该引起当地居民的关注,及早进行产毒蓝藻的防止。

4 结论

通过产毒特异性基因片段 *mcyA*-Cd 对环境样品中的产毒蓝藻进行初步鉴定具有较高的特异性,并且操作简单、耗时短。针对扩增得到的 *mcyA*-Cd 片段进行 PCR-DGGE 和聚类分析发现,产毒蓝藻类群较为单一,除 15-2 样品外其他样品所得 *mcyA*-Cd 片段均来自 *Microcystis*。

HPLC 分析结果显示,部分水源已经被 MCs 污染,其中包括作为饮用水的井水和自来水。检出的 MCs 类型主要为 MC-RR,毒性虽然比 MC-LR 稍低,但是由于其仍然具有较高的肝脏毒性,所以仍需采取必要措施进行治理。

参考文献:

- [1] Rinehart K L, Harada K, Namikoshi M, et al. Nodularin microcystin and configuration of Adda[J]. *American Chemical Society*, 1998, 110:8557-8558.
- [2] Gurbuz F, Metcalf J S, Karahan A G, et al. Analysis of dissolved micro-

- cystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407:4038–4046.
- [3] Jochimsen E M M D, Carmichael W W, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1998, 338(13):873–878.
- [4] Azevedo S M, Carmichael W W, Jochimsen E M, et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru–Brazil[J]. *Toxicology*, 2002(181–182):441–446.
- [5] Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: A Guide to their public health consequences, monitoring and management [M]. London: E&FN Spon, 1999:416.
- [6] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. GB 3838—2002 地表水环境质量标准[S]. 北京: 中国质检出版社, 2002. Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of P. R. C. GB 3838—2002 Environmental quality standards for surface water[S]. Beijing: China Zhijian Publishing House, 2002.
- [7] Kurmayer R, Christiansen G. The genetic basis of toxin production production in *Cyanobacteria*[J]. *Freshwater Biological Association*, 2009, 2:31–50.
- [8] 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 PCR[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(11):4198–4250.
- [9] Tillett D, Dittmann E, Erhard M, et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 an integrated peptide–polyketide synthetase system[J]. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(10):753–764.
- [10] Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, et al. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera[J]. *Arch Microbiol*, 2003, 180:402–410.
- [11] 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.
- [12] Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, et al. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in Japanese lake[J]. *Federation of European Microbiological Societies*, 2007, 266:49–53.
- [13] Rantala A, Rizzi E, Castiglioni B, et al. Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(3):653–664.
- [14] 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, 8:637–644.
- [15] Nyakairu George William Atwoki, Nagawa Christine Betty, Mbabazi Jolocam. Assessment of cyanobacteria toxins in freshwater fish: A case study of Murchison Bay (Lake Victoria) and Lake Mburo, Uganda[J]. *Toxicon*, 2010, 55:939–946.
- [16] DeBlois Charles P, Aranda-Rodriguez Rocio, Giani Alessandra, et al. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs[J]. *Toxicon*, 2008, 51:435–448.
- [17] Berry John P, Lind Owen. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegologo” snails(*Pomacea patula catemacensis*)[J]. *Toxicon*, 2010, 55:930–938.
- [18] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1):8–15.
- [19] Watanabe Mariyo F, Oishi Shinshi. Effects of environmental factors on toxicity of a *Cyanobacterium (Microcystis aeruginosa)* under culture conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(5):1342–1344.
- [20] Jiang Y, Ji B, Wong R N S, et al. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium–*Microcystis aeruginosa* [J]. *Harmful Algae*, 2008, 7:127–136.
- [21] Graham Jennifer L, Jones John R, Jones Susan B, et al. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States[J]. *Water Research*, 2004, 38:4395–4404.
- [22] Gupta Nidhi, Pant S C, Vijayaraghavan R, et al. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice[J]. *Toxicology*, 2003, 188:285–296.