

Diversity Detection of Phytoplankton in Campus Lake—Taking Siyuan Lake of Shanghai Jiao Tong University for Instance

Meiheriguli Mijiti, Nayila Mulati, Fengli Zhang*

Marine Biotechnology Laboratory, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai
Email: *zhangfengli@sjtu.edu.cn

Received: Aug. 6th, 2013; revised: Sep. 2nd, 2013; accepted: Sep. 10th, 2013

Copyright © 2013 Meiheriguli Mijiti et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Fresh-water algae, also called phytoplankton, are a natural and essential part of the ecosystem, and also constitute the base of the aquatic food chain. The results of this survey showed that the water body of Siyuan Lake contains 25 species of phytoplankton which belongs to Diatoms, Yellow algae, Euglenophyta, Chlorophyta, Cyanophyta and Chrysophyta. In the study, by PCR method, the *mcy* gene that encodes microcystin synthetase was used as a molecular marker to detect the presence of microcystis producing microcystins and potential microcystin toxicity in Siyuan Lake. The experimental results showed that the water of Siyuan Lake was slight-medium polluted. However, microcystin in the water body didn't produce microcystins. This study provides the basis not only for detection of aquatic pollution but also for treatment of polluted Siyuan Lake.

Keywords: Phytoplankton; Microcystis; Microcystin

校园湖水藻类多样性检测——以上海交通大学思源湖为例

美合日古丽·米吉提, 那依拉·木拉提, 张风丽*

上海交通大学生命科学技术学院微生物代谢国家重点实验室海洋生物技术实验室, 上海
Email: *zhangfengli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013年8月6日; 修回日期: 2013年9月2日; 录用日期: 2013年9月10日

摘要: 藻类是地球上最重要的初级生产者, 它们对维持水环境的生态平衡起着重要作用。本研究对上海交通大学闵行校区内人工湖——思源湖水体检测发现, 水样中共含有 25 种淡水藻, 分属硅藻门、黄藻门、裸藻门、绿藻门、蓝藻门、金藻门 6 个门。以编码微囊藻毒素合成酶基因 *mcy* 作为分子标记, 通过聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)检测产毒微囊藻, 从而检测水体中潜在的微囊藻毒素。研究结果显示: 交大思源湖水体为轻度污染, 水体中发现微囊藻, 但水体中的微囊藻未非产毒微囊藻。本研究为上海交大校园湖水的检测与治理提供依据。

关键词: 淡水藻; 微囊藻; 微囊藻毒素

1. 引言

校园内人工湖水在一定程度上影响着师生员工的日常生活环境和身体健康。思源湖是上海交通大学

*通讯作者。

闵行校区的美丽风景之一, 她美丽的名字取自交大的校训“饮水思源, 爱国荣校”。她贯穿分布在整个交大校园, 水深约 5 米, 思源湖正在承受着污染的挑战。

近些年来, 随着工农业生产的迅速发展和城市规

模的扩大,大量工业污水和生活污水排入水体,使天然水体的富营养化日益严重。富营养化的重要特征是在夏季高温时期藻类大量滋生,形成绿色丝带状的水华^[1-3]。目前,淡水藻类污染已成为全球范围内日益严峻的环境和公共卫生问题,其中蓝藻水华是淡水水体中危害最严重的一类^[3]。淡水藻类作为水体中的初级生产者,分布广泛,适应性强,在水生生态系统食物链中地位重要。藻类对污染毒物非常敏感,当污染物以不同途径进入水体后,藻类将最先受到毒害。所以,藻类可作为监测水质变化的测试生物。藻类不但应用于水质监测,而且还能在去除水体中的氮、磷等营养物质和污水中的有机物,净化污水中起重要作用^[4,5]。

藻类检测日益受到人们重视。不同类型的水体或同一水体的不同季节,藻类的组成是不相同的,各种藻类的相对量在不断地变化^[5]。除此之外,某些湖水中存在潜在产毒蓝藻,产毒蓝藻分泌微囊藻毒素,被微囊藻毒素(*Microcystins*, MCs)污染的饮用水和水产品给人类健康带来了巨大威胁。微囊藻毒素是由蓝藻水华,如固氮的鱼腥藻(*Anabaena*)、束丝藻(*Aphanizomenon*)、拟柱胞藻(*Clindrospermopsis*)、胶刺藻(*Gloeo-trichia*)和节球藻(*Nodularia*),非固氮的微囊藻(*Microcystis*)、颤藻(*Oscillatoria*)和鞘丝藻(*Lyngbya*)等暴发所产生的一种常见的七肽单环肝毒素。微囊藻毒素对蛋白磷酸酶 1 和蛋白磷酸酶 2A 具有抑制作用,因此与肿瘤促进作用有直接关系。由于微囊藻毒素毒性较大,分布广泛,是目前研究较多的一族有毒化合物^[6,7]。

目前对水体中藻毒素的检测技术研究还比较落后。大多数的藻毒素使用价格昂贵、体积庞大的 HPLC-MS 或 GC-MS 检测,样品制备过程复杂、耗时长,需要专业技术人员操作,检测费用很高,因此限制了常规监测次数;而分子生物技术检测微囊藻毒素因其快速、灵敏的特点越来越受到研究者的青睐^[8,9]。研究表明,与微囊藻毒素合成有关的基因有 3 个(*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*),微囊藻毒素合成基因仅存在于产毒微囊藻藻株,无毒的微囊藻藻株不含有该基因^[10,11]。应用传统方法,区分有毒还是无毒水华一直是水资源管理者碰到的难题。本研究用微囊藻毒素合成基因特异性引物,通过 PCR 方法检测微囊藻毒素在水样中的分布,为快速检测产毒和非产毒微囊藻提供了可行的技术,为产毒水华的早期预报和防治提供了新的技术途径。

2. 材料与方法

为了研究交大闵行校区思源湖的水质情况,根据水质的外观,选取交大东大门旁思源湖取样(见图 1)。

2.1. 采样

水深 0.5 m 处使用有机玻璃水样采集器采集水样,采样量为 2L,采样日期 2012 年 7 月 5 号,7 月 15 号,7 月 25 号。水样立即进行藻类富集与浓缩。

2.2. 藻样浓缩与鉴定

将采集的水样轻轻摇匀后,取 2L 水样用 40 目的

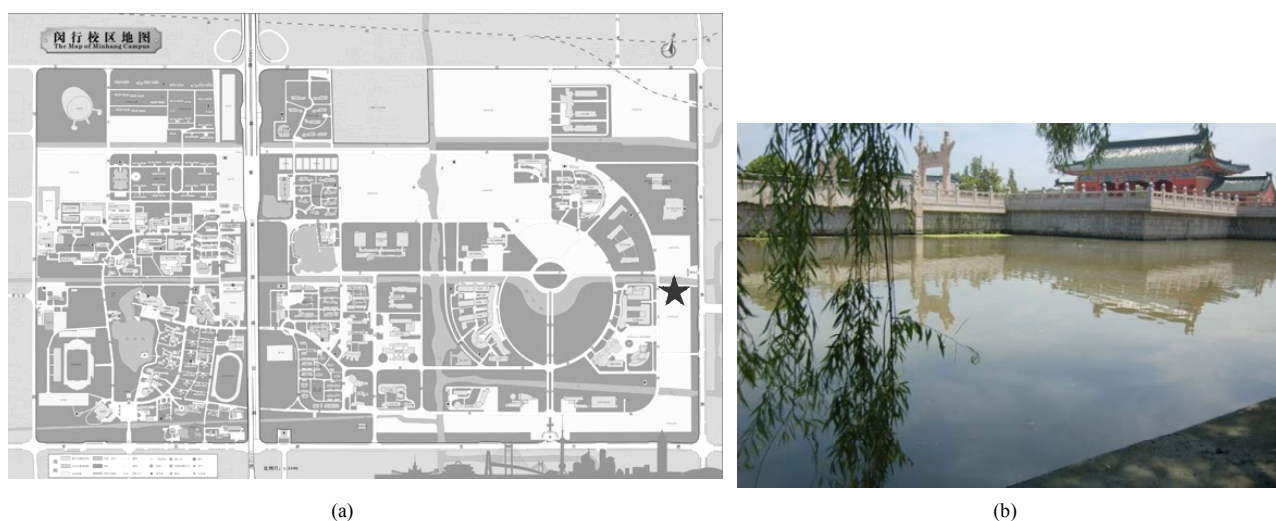


Figure 1. Distribution of Siyuan Lake (a) and picture of water sampling location (b) (five-pointed star indicates sampling point)
图 1. 思源湖在闵行交大分布(a)和采样点水貌(b)(五角星为采样点)

筛网过滤，滤液经 5 μm 孔径滤膜过滤，用 PBS 反复冲洗含有藻细胞的滤膜，收集的藻细胞用于藻细胞观察、鉴定及提取 DNA。

2.3. 藻的计数

在每个计数框内选取四角及中央共 5 个有代表性的小格子观察并计数。单细胞以一个细胞为一个计数单位，单细胞群体以一个群体为一个计数单位。

2.4. 藻细胞 DNA 的提取与 *mcy* 基因的 PCR 检测

用 Qiagen DNeasy Plant mini Kit 试剂盒提取收集的藻细胞 DNA，步骤如下：1) 收集的藻细胞转入到离心管，加入 400 μl FAPG1 缓冲液到离心管中并猛烈摇动，在 65℃ 水浴中加热 10 分钟；2) 加入 130 μl FAPG2 缓冲液到溶解液中，冰上放置 5 分钟；3) 把溶解液转入到过滤柱中，在 12000 rpm 离心 3 分钟；4) 离心后，抽取离心管中的藻细胞转入新的离心管中；5) 加入 1.5 倍体积的 FAPG3 缓冲液到离心管中并充分混匀；6) 转入 750 μl 混合液到 FAPG 微型柱中，离心 2 分钟，弃掉过滤液；7) 对剩下的混合液重复步骤 6；8) 加入 500 μl W1 到柱中，离心 30 秒，弃掉过滤液；9) 加入 750 μl 缓冲液，离心 30 秒；10) 把柱转入到新的 1.5 ml 的离心管中，加入预热的 50 μl 洗脱缓冲液，室温放置 3 分钟，再离心 2 分钟，从而洗脱出 DNA。提取的 DNA，1% 琼脂糖凝胶电泳，Goldview 染色后紫外观察。参考文献^[9-11]，设计微囊藻毒素合成酶基因 *mcy* 引物(表 1)其中 MSF/MSR 用来扩增 *mcyA* 基因，Tox1P/Tox1M，Tox3P/Tox2M，Tox7P/Tox3M，Tox4F/Tox4R 用来扩增 *mcyB* 基因。引物^[12,13] CYA106F: 5'-CGGACGGGTGAGAACGCGTGA-3、CYA781Ra: 5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT-3' 作为对照可以扩增有毒和无毒微囊藻 16SrDNA 基因。PCR 反应体系 50 μl，其中引物各 0.5 μM，TransStart FastPfu DNA Polymerase 酶 2U(北京全式金公司)，dNTP 各 200 μM，模板 0.2 μg，1 × PCR buffer。PCR 反应参数：95℃ 5 min；94℃ 1 min，48℃ 1 min，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 10 min。扩增结束后，取 PCR 产物 2 μl，1% 琼脂糖凝胶电泳，Goldview 染色后紫外观察。将 PCR 产物用上海生工生物技术公司的 UNIQ-10 柱按照操作指南进行纯化后与 PUCm-T 载体

Table 1. Primers in the study used to PCR amplify microcystin synthetase gene fragment
表 1. 用于 PCR 扩增微囊藻毒素基因片段的引物

Primer	Sequence	Reference
MSF	5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3'	[7]
MSR	5'-TGCAGATAAATCCGAGTTG-3'	
Tox1P	5'-CGATTGTTACTGATACTCGCC-3'	[6,7]
Tox1M	5'-TAAGCGGGCAGTTCCTGC-3'	
Tox3P	5'-GGAGAATCTTTCATGGCAGAC-3'	[6,7]
Tox2M	5'-CCAATCCCTATCTAACACAGTACCTC GG-3'	
Tox7P	5'-CCTCAGACAATCAACGGTTAG-3'	[6,7]
Tox3M	5'-CGTGGATAATAGTACGGGTTTC-3'	
Tox4F	5'-GGATATCCTCTCAGATTCGG-3'	[7]
Tox4R	5'-CACTAACCCCTATTTTGGATACC-3'	
CYA106F	5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3'	
CYA781Ra	5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT-3'	

连接，转化大肠杆菌 DH5α，用 PUCm-T 载体引物 T7/M13 进行 PCR 扩增筛选重组克隆，对扩增结果阳性的菌落提取质粒进行 16S rDNA 测序(华大基因科技公司)。在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 上采用序列同源性比对。

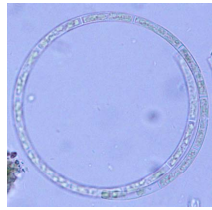
3. 结果与讨论

3.1. 藻种分析与鉴定

取样点样品(三次取样)参考韩茂森《淡水浮游生物图谱》^[14]。经鉴定统计，样品中藻浓度为藻细胞 1266 个/mL。共有浮游藻类 25 种，分别隶属于硅藻门、黄藻门、裸藻门、绿藻门、蓝藻门、金藻门。其中绿藻门占所分到藻种的 54%，蓝藻门 7%，黄藻门 7%，裸藻门 7%，金藻门 4%，可见绿藻门为优势种。主要种为耐污种如蓝藻门的小球藻。

除了蓝藻(蓝细菌)外，其他藻类都是真核生物，单细胞或者多细胞群体。根据韩茂林(1980)年的淡水浮游生物图谱，思源湖水样中共检出 25 种藻种(图 2)。硅藻为单细胞，具有高度硅质化的细胞壁，色素体为黄褐色或黄绿色。硅藻是海洋浮游植物的主要组成者，是海洋初级生产力的一个重要指标，许多属种对某些水环境指标(如 pH 值、盐度、温度、营养盐等)都有一定的最佳值及忍耐值，能很好地指示水环境的

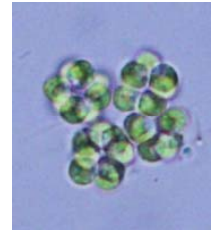
校园湖水藻类多样性检测——以上海交通大学思源湖为例



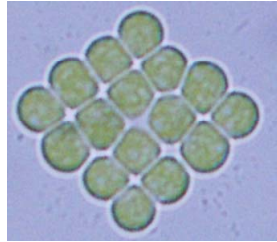
黄藻门-蛇胞藻属



黄藻门-小黄丝藻属



金藻门-黄群藻属



蓝藻门-蓝绿平裂藻



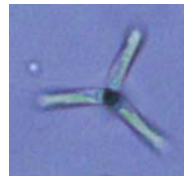
蓝藻门-微囊藻属



绿藻门-空星藻属



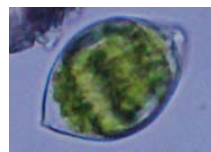
绿藻门-冠盘藻属



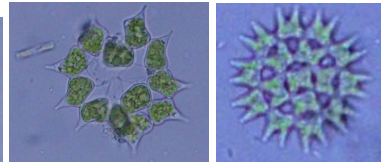
绿藻门-集星藻属



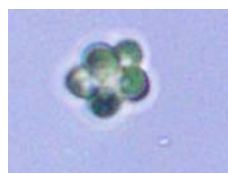
绿藻门-尖镰形纤维藻



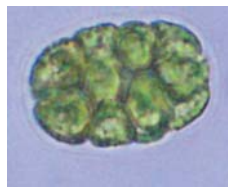
绿藻门-卵囊藻



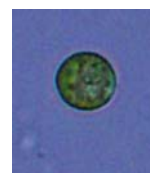
绿藻门-盘星藻属



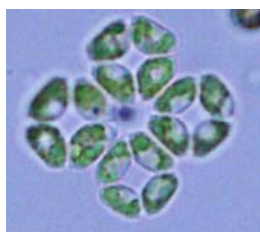
绿藻门-球囊藻



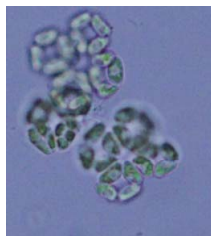
绿藻门-实球藻



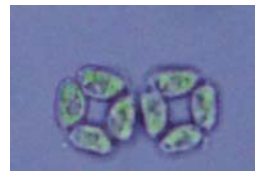
绿藻门-小球藻



绿藻门-四足十字藻



绿藻门-四足十字藻



绿藻门-四足十字藻

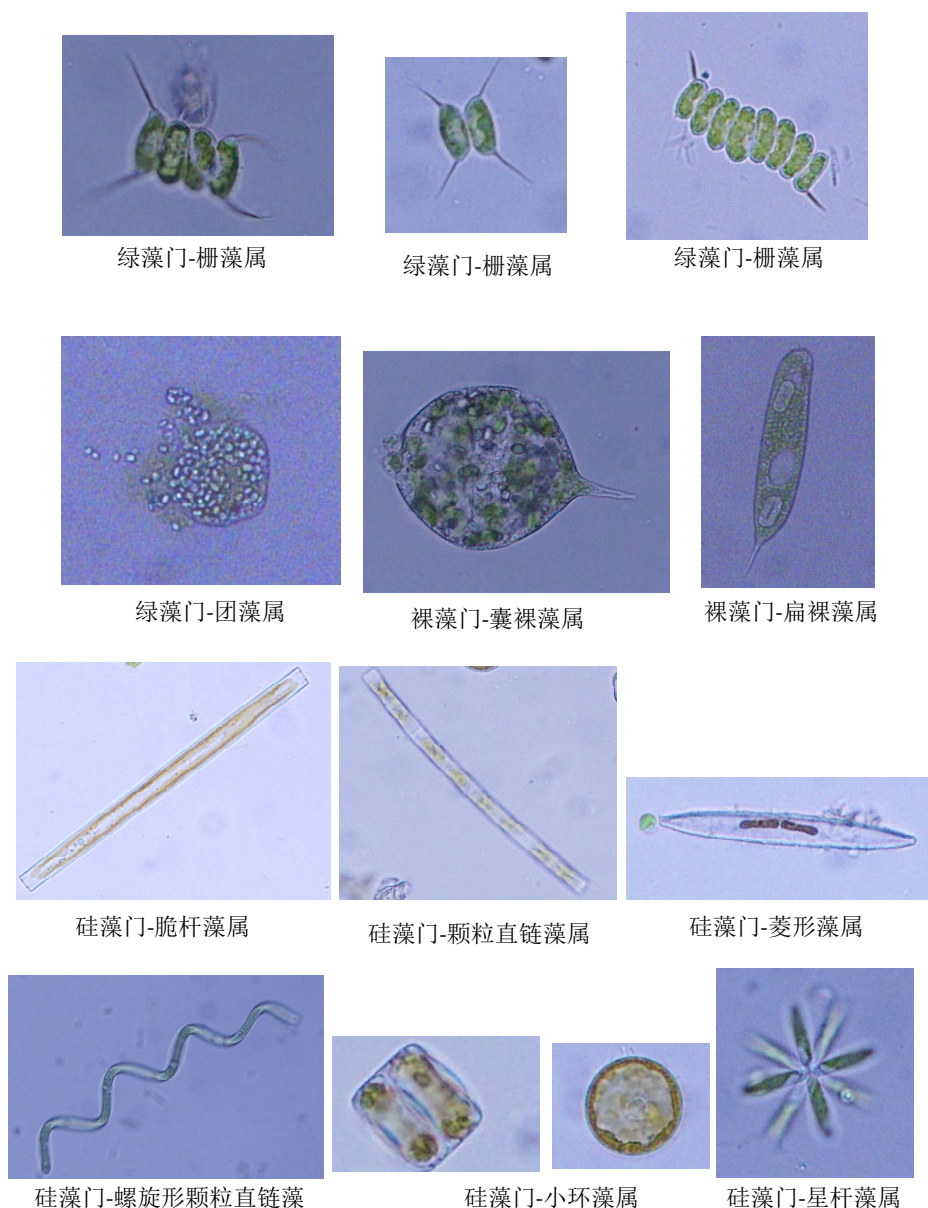


Figure 2. Algae morphology under light microscopy (400×)

图 2. 浮游微藻光学显微镜照片(400×)

变化, 包括湖泊的酸化和富营养化。法国水环境管理机构已经将硅藻应用于河流、湖泊水质的评价^[15]。样品中有硅藻门直链藻属(*Melosira*)如图 2 中的颗粒直链藻(*Melosira granulata*) - 螺旋形颗粒直链藻(*Melosira granulata* Her)、小环藻属(*Cyclotella*)、脆杆藻属(*Fragilaria*)、直链藻属(*Melosira*)、菱形藻属(*Nitzschia*)、星杆藻属(*Asterionella*)。其中脆杆藻属(*Fragilaria*)和小环藻 *Cyclotella* 是 β -中污带的指示生物^[16]。黄藻门(*Xanthophyceae*)是一类属于不等鞭毛类的藻类生物, 色素体为黄绿色, 大多数黄藻在纯净的贫营养的水体

中生长。样品中包括蛇胞藻属(*Ophiocytium*)和黄丝藻属(*Tribonema*)的小黄丝藻(*Tribonema. affin*), 其中小黄丝藻(*Tribonema. affin*)是寡污带区的指示生物^[16]。金藻门(*Chrysophyta*)藻体为单细胞或集成群体, 浮游或附着, 色素体金褐色、黄褐色或黄绿色, 水体样品中有黄群藻属(*Synura*), 黄群藻属多生长在弱酸性或者中性寡营养水体中。蓝藻门是原核细胞, 细胞内只有原始核, 不具有核膜和核仁, 没有叶绿体, 细胞质内具有膜结构的类囊体, 内含叶绿素等光合色素, 其代表属有微囊藻属等, 样品中含有平裂藻属(*Merismopedia*)

蓝绿平裂藻和微囊藻属(*Microcystis*), 其中微囊藻属是β-中污带的指示生物^[13]。绿藻形态多样, 细胞壁主要由纤维组成, 多具有两根或多根顶生长鞭毛, 常见有盘藻属、小球藻属、栅藻属等。样品中含有空星藻属(*Coelastrum*) - 球状空星藻(*Coelastrum sphaericum* Nageli)、冠盘藻属(*Stephanodiscus asteaea*)、集星藻属(*Actinastrum*)、纤维藻属(*Ankistrodesmus*) - 尖镰形纤维藻(*Ankistrodesmus falcatus*)、卵囊藻属(*Oocystis*)、盘星藻属(*Pediastrum*)、球囊藻属(*Sphaerocystis*)、实球藻属(*Pandorina*)、小球藻属(*Chlorella*)、十字藻属(*Crucigenia*)四足十字藻(*Crucigenia tetrapedia* (Kirch.))、栅藻属(*Scenedesmus*)、团藻属(*Volvox*), 其中盘星藻属(*Pediastrum*)和栅藻属(*Scenedesmus*)是α-中污带和β-中污带的指示藻类^[13]。裸藻门生物因不具细胞壁而得名, 大多数为单细胞, 代表属为囊裸藻属, 裸藻对温度的适应性强, 大量繁殖时会形成“水华”, 是水体富营养化的指示生物, 样品中含有囊裸藻属(*Trachelomonas*)裸藻门 - 扁裸藻属(*Phacus*), 其中囊裸藻属 *Trachelomonas* 是β-中污带的指示藻类。根据藻的分布断定, 这一段水域处于轻中污带^[16]。

3.2. 微囊藻毒素合成酶基因分析

以提取的藻细胞 DNA 为模板(图 3(a)), 以表 1 中 4 对引物 MSF/MSR, Tox1P/Tox1M, Tox3P/Tox2M, Tox7P/Tox3M, Tox4F/Tox4R PCR 扩增 *mcyA* 基因和 *mcyB* 基因, 未见阳性条带出现(结果未显示), 重复多

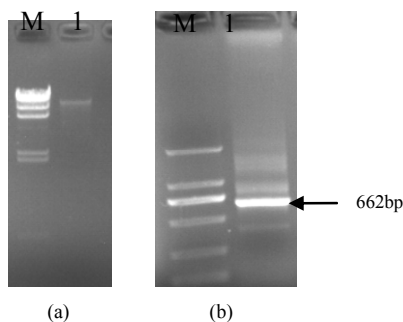


Figure 3. Photo of algae DNA (a) and PCR detection of microcystin synthetase gene and 16s rDNA gene. (a) M: λ HindIII DNA Marker, 1: DNA of algae from water sampling, (b) M: DM2000 DNA Marker, 1: 16Sr DNA gene product of microcystis by PCR amplification with CYA106F/CYA781Ra primers. The arrow indicates the PCR gene fragment.

图 3. 藻细胞 DNA(a)和微囊藻毒素合成酶基因及 16s rDNA 基因的 PCR 检测(b), a) M: λ HindIII DNA Marker, 1: 水样中藻细胞 DNA. (b), M: DM2000 DNA Marker, 1: 微囊藻 16Sr DNA 基因 PCR 产物, 以 CYA106F/CYA781Ra 做引物。箭头所示基因扩增片段。

次; 而以 CYA106F/CYA781Ra 为引物, 扩增出 675 bp 阳性条带(图 3(b)), 经 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 序列比对, 基因序列与 *Oscillatoriales cyanobacterium* HOs24 的 16S rDNA 序列 98%一致。因此, 水样中微囊藻为非产毒微囊藻。

4. 结论

藻类在水质监测评价和污水处理方面比传统的理化方法更优越, 可敏感、有效的预测外界环境的改变, 更综合直观的反应污染物对水环境的影响。通过对上海交大思源湖水藻类细胞的形态学鉴定, 发现思源湖中共有浮游藻类 25 种, 分别隶属于硅藻门、黄藻门、裸藻门、绿藻门、蓝藻门、金藻门。水样中含有中污带的指示藻类, 所以预测交大靠近东大门思源湖中水质为轻中度污染。水样中的微囊藻喜欢在富营养化水体中生活, 当其大量繁殖时, 会在水面形成水华, 同时还会使水体产生强烈的霉味^[1,17]。另外, 有些微囊藻会产生微囊藻毒素, 微囊藻毒素对人类生命和健康造成巨大威胁, 因此区分有毒还是无毒水华一直是水资源管理者碰到的难题^[15]。思源湖作为校园的景观湖, 它的周边没有农业污染区, 工业污染区等等。通过 PCR 检测我们发现, 思源湖水样中不含微囊藻毒素合成基因, 所以水质是无微囊藻毒素的。

藻类指示更多地是一种定性的描述, 难以进行定量地说明和相应的水质标准, 需要结合标准定量的实验室化学检测方法, 使得水质评价结果更加准确。由于藻类的生活习性特点, 利用藻类指示主要反应的是中上层水质指标, 需要结合其他物种同时对水环境进行评估, 而且提高仪器对藻类识别范围与准确性依然是今后的研究重点。

本研究可对校园水生生态系统的污染, 尤其是在此方面的研究工作提供有效的参考。

5. 致谢

感谢上海交通大学文理交叉专项基金项目(12JCY09)和上海交通大学 2011 年特色实验项目(CE179)的经费支持。

参考文献 (References)

[1] J. M. O'Neil, T. W. Davis, M. A. Burford, et al. The rise of

- harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 2012, 14: 313-334.
- [2] V. H. Smith, D. W. Schindler. Eutrophication science: Where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, 2009, 24(4): 201-207.
- [3] S. Kosten, V. L. M. Huszar, E. Bécares, et al. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*, 2012, 18(1): 118-126.
- [4] L. M. Rangel, L. H. S. Silva, P. Rosa, et al. Phytoplankton biomass is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs. *Hydrobiologia*, 2012, 693(1): 13-28.
- [5] T. Kaneko, N. Nakajima, S. Okamoto, et al. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Research*, 2007, 14(6): 247-256.
- [6] 姜锦林, 宋睿, 任静华等. 蓝藻水华衍生的微囊藻毒素污染及其对水生生物的生态毒理学研究[J]. *化学进展*, 2011, 23(1): 247-253.
- [7] S. H. Te, K. Y. H. Gin. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmful Algae*, 2011, 10(3): 319-329.
- [8] A. Srivastava, G. G. Choi, C. Y. Ahn, et al. Dynamics of microcystin production and quantification of potentially toxigenic *Microcystis* sp. using real-time PCR. *Water Research*, 2012, 46(3): 817-827.
- [9] P. J. Oberholster, A. M. Botha and T. E. Cloete. Use of molecular markers as indicators for winter zooplankton grazing on toxic benthic cyanobacteria colonies in an urban Colorado lake. *Harmful Algae*, 2006, 5(6): 705-716.
- [10] H. Sipari, A. Rantala-Ylinen, J. Jokela, et al. Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase E gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(12): 3797-3805.
- [11] M. C. Bittencourt-Oliveira, V. Piccin-Santos and S. Gouvêa-Barros. Microcystin-producing genotypes from cyanobacteria in Brazilian Reservoirs. *Environmental Toxicology*, 2010, 27(8): 461-471.
- [12] S. López-Legentil, B. Song, M. Bosch, et al. Cyanobacterial diversity and a new acaryochloris-like symbiont from Bahamian sea-squirrels. *PLoS One*, 2011, 6: e23938.
- [13] T. Noguchi, A. Shinohara, A. Nishizawa, et al. Genetic analysis of the microcystin biosynthesis gene cluster in *Microcystis* strains from four bodies of eutrophic water in Japan. *The Journal of General and Microbiology*, 2009, 55(2): 111-123.
- [14] 韩茂森. 淡水浮游生物图谱[M]. 北京: 农业出版社, 1980.
- [15] S. Blanco, E. Bécares. Are biotic indices sensitive to river toxicants? A comparison of metrics based on diatoms and macro-invertebrates. *Chemosphere*, 2010, 79(1): 18-25.
- [16] S. S. Barinova, M. Tavassi and E. Nevo. Algal indicator system of environmental variables in the Hadera River basin, central Israel. *Plant Biosystems*, 2006, 140(1): 65-79.
- [17] H. W. Pearl, J. Huissman. Blooms like it hot. *Science*, 2008, 320(5872): 57-58.