

应用荧光定量 PCR 技术监测玄武湖蓝藻水华

张哲海¹, 厉以强²

(1. 南京市环境监测中心站, 江苏 南京 210013; 2. 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036)

摘要: 应用荧光定量 PCR 技术和显微计数法对玄武湖蓝藻水华进行了长期监测, 结果表明, 荧光定量 PCR 法可同步监测蓝藻、微囊藻和有毒微囊藻的数量, 及时准确反映玄武湖蓝藻水华优势种群微囊藻和有毒微囊藻的动态变化。与显微计数法相比, 具有需要的样品量少、时效性强、检出下限较低、自动化程度高等优势, 可有效地应用于蓝藻水华的监测。

关键词: 蓝藻水华; 荧光定量 PCR; 玄武湖

中图分类号: X832

文献标识码: A

文章编号: 1674-6732(2013)-04-0009-04

Application of Monitoring Algae Blooms Using Fluorescence Quantitative PCR

ZHANG Zhe-hai¹, LI Yi-Qiang²

(1. Nanjing Environmental Monitoring Central Station, Nanjing, Jiangsu 210013, China; 2. Jiangsu Provincial Environmental Monitoring Center, Nanjing, Jiangsu 210036, China)

ABSTRACT: Cyanophycean bloom on the Lake Xuanwu was monitored in the long-term by using fluorescence quantitative PCR and microscopic counting method. Results showed that the fluorescence quantitative PCR could be synchronously monitoring the number of cyanophycean, microcystis and toxic microcystis and accurately reflected dominant population of cyanophycean bloom and dynamic change of toxic microcystis in the Lake Xuanwu in time. Compared with microscopic counting method, the PCR technology had advantages in less sample needed, time-effective, lower detection limit, and high automation and could be effectively applied to the monitoring of cyanophycean blooms.

KEY WORDS: Cyanophycean bloom; fluorescence quantitative PCR; Lake Xuanwu

多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术自 20 世纪 90 年代以来, 已被广泛应用于医学诊断、农业生物技术以及环境生物监测上, 近年来国外将此技术应用于有害蓝藻方面的研究^[1-4]。

2005 年 7 月初, 玄武湖发生了以微囊藻 (*Microcystis*) 为优势种群的大面积蓝藻水华^[5]。玄武湖各湖区下风向岸边形成翠绿色薄膜, 局部区域散发恶臭气味, 严重影响了玄武湖的景观、养殖和水上运动功能。为保障全国首届绿色博览会和十运会的顺利召开, 采取了生态补水、黏土沉降、人工打捞等应急治理措施^[6]。2005 年底, 玄武湖沉水植物大量繁衍, 并人工放养了滤食性鱼类, 2006 年玄武湖蓝藻水华发生的范围、规模明显减小。在此过程中, 应用显微计数法和荧光定量 PCR 技术对玄武湖进行了长期的监测, 笔者通过两种监测方法的比较, 探讨荧光定量 PCR 技术监测蓝藻水华的可

行性。

1 监测方法

1.1 监测点位、项目与频次

根据玄武湖湖区特征, 在全湖设置 4 个监测点。参照《水和废水监测分析方法》(第四版)^[7], 每月用显微计数法测定浮游植物的种类组成和数量。同步采集水样用 0.45 μm 醋酸滤膜过滤用于 PCR 实验, 测定蓝藻、微囊藻、产毒微囊藻数量。

1.2 荧光定量 PCR 测定方法

1.2.1 样品的采集和保存

用采水器采集表层水样。取水样 200 mL 以上, 采用真空抽滤法富集藻样于孔径 0.45 μm 滤

收稿日期: 2012-12-07

基金项目: 江苏省环境监测基金项目(0601)。

作者简介: 张哲海(1965—), 男, 高级工程师, 本科, 从事生物监测工作。

膜,采集的滤膜样品迅速置于冰盒(0℃)保存,带回实验室后置于-20℃条件下保存,保存期 < 1 a。

1.2.2 藻细胞基因组 DNA 的提取制备

将含有藻细胞的滤膜用剪刀剪碎装入离心管,加入溶解缓冲液(lysis buffer)(10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 9)2 mL,振荡 2 min;加入 100 mg/mL 溶菌酶(lysozyme)20 μL,37℃水浴 20 min;加入 20 mg/mL 蛋白酶 K(proteinase K)6 μL 和 10% 十二烷基磺酸钠(SDS)105 μL,50℃水浴 2 h;然后加入 1 倍体积平衡酚(tris-phenol)2.5 mL,振荡并 12 000 rpm 离心 8 min;吸取上清液加入 1 倍体积的氯仿(chloroform-isoamyl),振荡并 12 000 rpm 离心 8 min,再取上清液加入 2 倍体积的冰乙醇(ice cold ethanol)和 0.1 倍体积的乙酸氨(ammonium acetate)(10M),-20℃条件下冰冻 1 h;离心倒掉上清液后,加入 70% 的冰乙醇 5 mL,充分振荡并 12 000 rpm 离心 5 min,最后缓慢倒掉乙醇,在无菌操作台上用风机风干液体。风干后加入 200 μL 灭菌双蒸水,50℃水浴 30 min,将提取的 DNA 溶解。取出后离心转入 1.5 mL 离心管中-20℃冷藏。

1.2.3 实时定量 PCR 检测

反应液终体积 25 μL:蒸馏水 9.5 μL,SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO,日本)12.5 μL,正向反引物(10 μM)各 1 μL,样品溶液 1 μL。在 ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪完成。使用的 DNA 引物序列见表 1,其中测定微囊藻细胞数的用 16SrRNA 基因,而测定有毒微囊藻数目则使用微囊藻毒素合成基因的片段(mcyB)。

微囊藻 M16 引物对应反应条件及参数:预变性 95℃ 3 min;变性 95℃ 15 s;退火 53℃ 30 s;延伸 72℃ 30 s。蓝藻特异 16 s 引物及微囊藻毒素基因 mcyB 引物反应条件及参数:预变性 95℃ 3 min;变性 95℃ 15 s;退火 59℃ 30 s;延伸 72℃ 30 s。

表 1 PCR 所用引物序列

引物	序列	参考文献
蓝藻正向引物 Cyan 16S F	CGGACCGCTGAGTAACGCCTG	
蓝藻反向引物 Cyan 16S R	CCCATTCCGGAAAATTCCCC	

续表 1

引物	序列	参考文献
微囊藻正向引物 Micr 16S F	GCCGCRAAGGTGAAAMCTAA	[8]
微囊藻反向引物 Micr 16S R	AATCCAAAGACCTTCCTCCC	
产毒微囊藻正向引物 mcyB F	CCTACCGAGCCGCTTGGG	[2]
产毒微囊藻反向引物 mcyB R	GAAAATCCCTAAAGATTCCTGAGT	

1.3 显微计数法

参照《水和废水监测分析方法》(第四版)。野外水样采集后用 1.5% 鲁哥氏液固定,静置沉淀 24 h 以上,浓缩后镜检。镜检采用 0.1 mL 显微计数框法,双片计数取其平均值,如两片计数结果个数相差 15%,则进行第三片计数,取其中个数相近两片的平均值。

2 结果与讨论

2.1 荧光定量 PCR 法监测水中蓝藻、微囊藻、有毒微囊藻数量

玄武湖蓝藻水华主要以微囊藻为优势种群,该次调查使用荧光定量 PCR 法分别监测了玄武湖各湖区水中蓝藻数量、微囊藻数量和有毒微囊藻数量。

蓝藻数量为 $1.56 \times 10^6 \sim 7.71 \times 10^{10}$ 细胞/L(图 1),全湖均值为 2.11×10^9 细胞/L,2005 年夏季蓝藻水华暴发时蓝藻数量最高。空间分布上,西南湖 > 东南湖 > 西北湖 > 东北湖。

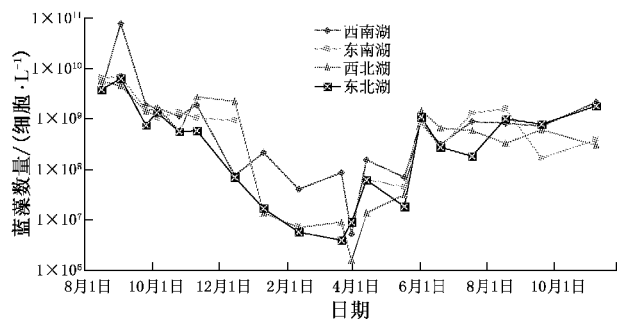


图 1 玄武湖各湖区蓝藻数量变化(PCR 法)

微囊藻数量为 $0 \sim 3.62 \times 10^{10}$ 细胞/L(图 2),全湖均值为 8.16×10^8 细胞/L。2005 年夏季蓝藻暴发时微囊藻数量最高,经过生态补水、黏土沉降、

放养鲢、鳙等治理措施,2006年夏季微囊藻数量大幅下降,最高值为 9.23×10^8 细胞/L,2006年玄武湖蓝藻水华的暴发规模、持续时间均小于2005年。微囊藻在空间分布上与蓝藻数量分布相同。

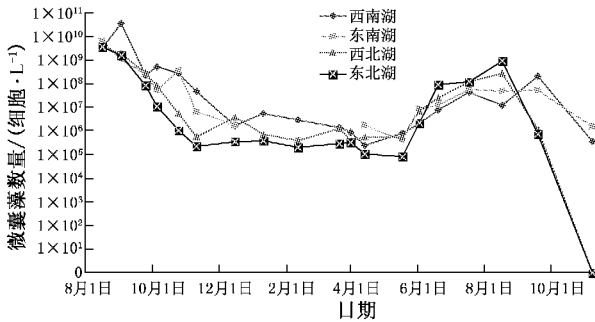


图2 玄武湖各湖区微囊藻数量变化(PCR法)

有毒微囊藻数量为 $0 \sim 3.48 \times 10^7$ 细胞/L(图3),全湖均值 1.31×10^6 细胞/L。2005年夏季有毒微囊藻数量最高,2006年夏季较2005年下降1~2个数量级。有毒微囊藻的空间分布为西南湖 > 西北湖 > 东北湖 > 东南湖。

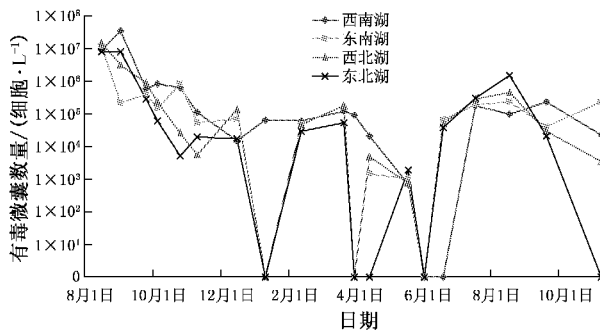


图3 玄武湖各湖区有毒微囊藻数量变化(PCR法)

微囊藻在蓝藻中的比例随着蓝藻数量的下降而下降,最高为2005年8月,最低为12月,在次年1—5月一直维持在较低水平,并在6—9月重新上升,这主要是与蓝藻、微囊藻喜高温的生长特性有关。有毒微囊藻在微囊藻中的比例变化则不同,冬春季高,夏秋季低,其原因需进一步探讨。

蓝藻水华的最大危害是产生微囊藻毒素,威胁饮用水源地安全。因此,蓝藻水华是否产毒、毒性大小是人们最为关心的问题。目前检测微囊藻毒素的方法主要有生物检测法、高效液相色谱法(HPLC)及酶联免疫分析(ELISA)等,这些方法一般需要样品量大,且水体中毒素产生后方能检测。实时定量PCR法可同步监测蓝藻、微囊藻和有毒

微囊藻的数量,及时反映微囊藻和有毒微囊藻的动态变化,需要的样品量少,时效性强,可应用于大批量水样的蓝藻水华和有毒微囊藻的监测与预警。

2.2 实时定量PCR法与显微计数法对微囊藻数量的监测结果比较

从2005年8月—2006年11月对玄武湖微囊藻周年检测中共检测样品数73个,当水中微囊藻数量大于 10^3 细胞/mL时,显微计数法与实时定量PCR法测定微囊藻数量的几何级数的相对误差小于20%,微囊藻数量变化趋势一致;水中微囊藻数量低于 10^3 细胞/mL时,显微计数法均未检出,实时定量PCR法可定量反映水中微囊藻数量的变化(图4)。

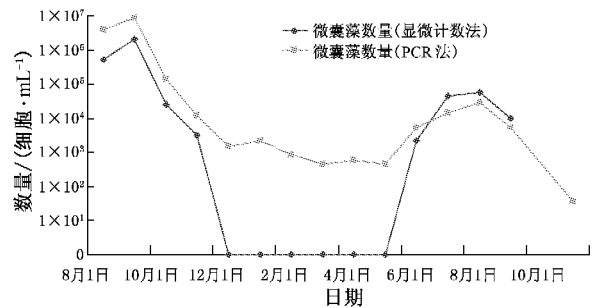


图4 显微计数法、实时定量PCR法对玄武湖微囊藻检测结果

蓝藻水华的程度判别与预警级别,国内外资料均有报道^[9],一般在蓝藻细胞达到 10^3 细胞/mL,即判别为轻度水华,可发出一级警报。玄武湖蓝藻水华监测也表明,当水体中微囊藻达 2×10^3 细胞/mL,下风向区域形成水华薄膜,这与资料报道基本一致。但目前环境监测部门对于蓝藻水华的监测,往往是在蓝藻水华“暴发”之后,其主要原因首先是显微计数法检出下限较高,其次是受到鉴定技术的限制,另外,显微计数法分析时间一般需48h左右,样品数多则时间更长。相对而言,实时定量PCR法监测水中微囊藻,检出下限较低,特异性强,检测样品数多,自动化程度高,省时省力,可有效地应用于蓝藻水华的预警监测。

3 荧光定量PCR技术预警监测蓝藻水华应用展望

3.1 饮用水源地预警监测

分别用实时定量PCR法与显微计数法检测微囊藻培养藻种,结果表明对实验室内培养的成单细胞的微囊藻藻种,这两种方法所得结果差异不大。

而比较两种方法对玄武湖水样的监测结果,表明在检测自然水体中的微囊藻等蓝藻时,实时定量 PCR 法更为适合和准确,且其检出限比传统的显微计数法低 1~2 个数量级,所以在微囊藻水华形成早期,实时定量 PCR 法的优势更为明显,可以应用于蓝藻水华的早期预警预报工作。

3.2 建立以有毒微囊藻为标准的预警系统

实时定量 PCR 法可同步监测蓝藻、微囊藻、有毒微囊藻。有毒微囊藻数量的多寡可代表微囊藻毒素的产生能力。有必要通过进一步研究水中有毒微囊藻数量与微囊藻毒素毒性大小的关系,建立以有毒微囊藻为标准的预警预报系统,及时预测水中微囊藻毒素的可能水平,为保障水体生态环境安全提供科学依据。

3.3 蓝藻水华成因及其时空分布研究

目前中国湖泊蓝藻水华发生频率高、规模大、程度重、持续时间长,开展蓝藻水华成因及其时空分布的研究,以及蓝藻越冬与复苏等的研究十分必要。而在进行相关研究时,由于蓝藻在冬季越冬时数量很低,且多生存于水底的泥水界面,传统的显微计数法因检出限不够而难以检出。实时定量 PCR 法则可以利用 DNA 分子的特异性与高灵敏性,结合 PCR 扩增定量的准确性及时掌握微囊藻等蓝藻的时空分布,研究蓝藻水华成因及控制因子,为蓝藻水华的防治提供技术支持。

[参考文献]

[1] VAITOMAA J, RANTALA A, HALINEN K, et al. Quantita-

tive Real-Time PCR for Determination of Microcystin Synthetase E Copy Numbers for Microcystis and Anabaena in Lakes[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7289-7297.

- [2] KURAYER R, KUTZENBERGER T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium Microcystis sp[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69: 6723-6730.
- [3] FURUKAWA K, NADA N, TSUNEDA S, et al. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 102: 90-96.
- [4] RINTAKANTO 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: 4198-4205.
- [5] 张哲海,梅卓华,孙洁梅,等.玄武湖蓝藻水华成因探讨[J].环境监测管理和技术,2006,18(2):15-18.
- [6] 张哲海.玄武湖蓝藻水华应急治理成效分析[J].污染防治技术,2006,19(5):56-59.
- [7] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:中国环境科学出版社,2002.
- [8] NEILAN B A, JACOBS D, DEL D T, et al. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47: 693-697.
- [9] 郑建军,钟成华,邓春光.试论水华的定义[J].水资源保护,2006,22(5):45-47.

声 明

本刊已加入中国学术期刊网络出版总库、中国学术期刊综合评价数据库、万方数据—数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中文科技期刊数据库和教育阅读网。本刊已许可其以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意本刊上述声明。

《环境监控与预警》编辑部

更 正

本刊2013年6月刊登的《一种用于光度法水质在线分析仪的温度自适应算法》一文,第一作者为杨凯。作者简介:杨凯(1971—),男,高级工程师,硕士,从事环境监测工作。

《环境监控与预警》编辑部