



一株虾池来源的螺旋拟柱孢藻藻株的分离鉴定及重金属离子 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对其生长的影响

聂利华¹，杨东娟²，刘亚群³，韩博平⁴，马秀兰¹，查广才^{2*}

¹ 揭阳职业技术学院生物工程系，广东 揭阳 522000

² 韩山师范学院生物系，广东 潮州 521041

³ 海南大学热带农林学院，海南 海口 570100

⁴ 暨南大学水体富营养化与赤潮防治广东普通高校重点实验室，广东 广州 510632

摘要:【目的】探讨凡纳滨对虾养殖水体中入侵蓝藻拟柱孢藻的生长生理特性。【方法】从汕头澄海人工对虾养殖池分离纯化藻株，通过形态及其 16S rRNA 基因鉴定，之后在 CT 与 BG11 两种蓝藻通用培养基的基础上优化最佳培养条件，最后分析了不同浓度的 3 种重金属离子即 Cu^{2+} (0–0.8 mg/L)、 Cd^{2+} (0–4 mg/L)和 Pb^{2+} (0–80 mg/L)对藻株生长的影响。【结果】澄海虾池来源的分离纯化藻株形态呈卷曲螺旋型，16S rRNA 基因序列与多株其他来源的拟柱孢藻相似度均达 98%以上。实验室培养，藻株最佳生长状态的培养条件是在 BG11 培养基的基础上调整氮浓度及氮磷比分别为 N 62 mg/L, N : P=9 : 1, 在此条件下，藻丝生物量可达 $(0.632\pm 0.170)\times 10^7/\text{L}$ ，藻丝比平均生长速率最高为 $(0.063\pm 0.001)/\text{d}$ 。本分离藻株活体对重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 具有一定的耐受性，其耐受浓度范围分别为 0–0.2、0–0.5 和 1–40 mg/L，其中， Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对藻的生长具有抑制作用，而且此抑制作用随着金属离子剂量的增加及作用时间的延长更加显著， Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对藻体的半数抑制浓度(96 h EC_{50})分别为 0.125 和 0.551 mg/L；而浓度范围为 0–80 mg/L 的 Pb^{2+} 对藻体的生长则表现为低剂量(≤ 40 mg/L)呈促进，高剂量(≥ 80 mg/L)则抑制。【结论】从凡纳滨对虾养殖池中分离鉴定出一株形态呈螺旋型的拟柱孢藻，命名为螺旋拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii helix*)，本藻株活体能够在一定浓度的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 中生长，为螺旋拟柱孢藻活藻生物吸附重金属离子而改善虾池水体环境提供了可能性。

关键词: 螺旋拟柱孢藻，鉴定，重金属，耐受性

基金项目：广东揭阳职业技术学院创新强校工程(2016–2020)立项项目(JYPSHF_W_B1701)；广东揭阳职业技术学院科学研究项目立项课题(2016JYCKY03, 2018JYCKZ01)；2017 年“攀登计划”广东大学生科技创新培育专项资金(pdjh2017b0783)

*通信作者。E-mail: Lsp01cgc@aliyun.com

收稿日期：2018-09-05；修回日期：2018-12-04；网络出版日期：2019-06-10

拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)是一种生存适应力高、入侵性强,近年来呈全球性扩张分布的淡水水华蓝藻,它首次入侵某一水体几年后就能形成强烈占优势的水华藻^[1]。有些种类的拟柱孢藻可以产生毒素,研究较多的主要有 CYN (Cylindrospermopsin)和 STX (saxitoxin)等,前者是一种具有肝肾毒性的细胞毒素,后者为一种神经毒素^[2-3]。产毒拟柱孢藻在全球很多淡水饮用水水源地均有发现^[4-6],由拟柱孢藻及其毒素引起的对水环境、动物及人体造成的危害也日渐受到人们的广泛关注^[7-8]。近几十年来,拟柱孢藻环境强适应性的生长特性^[1,9]、入侵扩张特点^[10-12]、毒素种类及产毒的分子机制^[13-14]以及如何监测及去除拟柱孢藻及其毒素^[15-17]等方面的研究,一直是国内外学者的研究热点。

以拟柱孢藻为优势种的蓝藻水华不仅在河流、水库及湖泊等水体中频繁暴发,也可在鱼塘、盐沼和碱性湖泊中形成优势种^[18]。近年来在广东省,拟柱孢藻不仅在很多水库已取代微囊藻成为优势种^[19],而且在珠海、中山及汕头等多地的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖池中大量生长繁殖并形成优势藻类。凡纳滨对虾养殖池中的拟柱孢藻不产生毒素,形态呈少有的卷曲型^[20],其大量繁殖并未对对虾的生长造成危害,反而有利于对虾健康生长,水质也更稳定。聂利华等^[21]通过对中国科学院武汉水生生物研究所来源的拟柱孢藻藻株研究发现,它对水体多种重金属离子具有很强的富集能力,推测拟柱孢藻可能富集了虾池环境中的大量重金属离子从而改善了水质。为进一步探讨虾池来源的拟柱孢藻潜在的重金属生物富集性能及其他生理生化特性,本研究以广东汕头澄海地区凡纳滨对虾养殖池中分离纯化出

的藻株为实验材料,通过形态及 16S rRNA 基因进行鉴定并进行培养基优化培养,选取 3 种重金属离子(Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+})进行生长耐受试验,以期摸索其耐受范围,为拟柱孢藻活藻吸附重金属性能的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 藻种分离、鉴定与培养

1.1.1 藻种分离与 16S rRNA 的提取:实验选用的藻种采集于广东省汕头市澄海凡纳滨对虾养殖池,样品送至中国科学院武汉水生生物研究所进行分离,在光学显微镜下,用自制的玻璃毛细管从水样中挑取单根藻丝,无菌水洗涤 4-5 次后转入含 2 mL CT 培养基的 96 孔板中,置于恒温光照培养箱中进行培养,培养条件为:光强 $25 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗周期 12 h:12 h,温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,培养约 4 周左右待藻丝明显生长后,先后转入 10 mL 试管及 100 mL 三角锥形瓶中继续扩大培养获得单种藻种。

对所分离的纯种藻依据形态特征进行种类鉴定后,以藻液的总 DNA 为模板,采用针对 16S rRNA 设计的蓝藻特异性引物(27F/809R)进行 PCR 扩增^[22],PCR 的反应体系(30 μL):DNA 模板 1 μL ,引物 1、2 各 3 μL ,dNTP 2 μL , Buffer 3 μL ,酶 0.2 μL ,纯水 17.8 μL 。PCR 反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min,最后 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物。

1.1.2 分离藻株 16S rRNA 序列的测定及系统发育树的构建:PCR 产物送深圳华大基因科技服务有限公司进行序列测定,获得的序列与 GenBank 上下载的多株拟柱孢藻的 16S rRNA 序列及 5 株外

类群藻即念珠藻属 *Nostoc* sp. PCC7120、柱孢藻属 *Cylindrospermum* sp. PCC7417、螺旋藻属 *Spirulina platensis*、鱼腥藻属 *Umezakia natans* TAC101 和 *Anabaena bergii* 等采用 BLAST 软件进行相似性分析^[23], 并使用 MEGA 6.0 软件和邻接法(Neighbor Joining, NJ)对获得的序列构建系统发育树。

1.1.3 藻种培养: 在 CT 和 BG11 两种蓝藻通用培养基的基础上, 根据前期摸索调整氮浓度及氮、磷比, 设定了 6 种条件对分离鉴定后的藻种进行了培养基优化: 对 CT, N 32 mg/L, N:P=13:1; N 64 mg/L, N:P=25:1; N 128 mg/L, N:P=50:1; 对 BG-11, N 247 mg/L, N:P=35:1; N 124 mg/L, N:P=17:1; N 62 mg/L, N:P=9:1, 依次设定为 C1-3 与 B1-3 号条件, 每种培养基条件设置 3 个平行。实验采用单种批量藻液进行, 取同一藻密度相同体积的适量藻液, 无菌接种至含 150 mL 不同培养基的三角瓶中, 置于恒温光照培养箱中进行培养, 培养箱环境条件参考前期研究^[24]。每天摇瓶 1 次, 隔天定时取样, 测定 OD_{680} 反映其生物量, 绘制生长曲线, 并计算平均比生长速率(μ)。藻培养过程中, 不定时无菌取样, 制作临时装片, 显微镜下观察藻的形态。

平均比生长速率(μ)按照公式(1)计算。

$$\mu = (\ln B_t - \ln B_0) / t \quad \text{公式(1)}$$

式中, t 为从 B_0 至 B_t 的时间间隔(d); B_t 为藻丝生长到对数生长末期时的藻丝密度; B_0 为初始藻丝密度。

1.2 不同浓度重金属离子 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对分离藻株的影响

实验所用重金属离子试剂为硫酸铜、硝酸铅及氯化镉, 国产分析纯。根据预实验结果及优化的最佳培养基, 配制含不同浓度的重金属离子溶

液的培养基, 离子水平分别为, Cu^{2+} : 0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/L; Cd^{2+} : 0、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L; Pb^{2+} : 0、1、5、10、20、40、80 mg/L, 每个浓度设定 3 个平行。实验前 1 周进行藻种的活化培养, 使其达到对数生长期, 之后取适量藻液 4000 r/min, 离心 10 min, 收获藻体无菌接种至含不同重金属离子的 150 mL 培养液中, 接种密度为 2.1×10^6 /L。从接种后第 2 天开始, 每天定时取样测定, 绘制不同浓度重金属离子下的藻生长曲线, 同时计算抑制率 $I(\%)$ (公式 2)。

$$I(\%) = (u_0 - u_t) / u_0 \quad \text{公式(2)}$$

式中 I 为藻细胞生长抑制率, u_0 为对照组的特定生长速率, u_t 为藻液在 t 时刻的特定生长速率, 所得数值通过计算后使用 Origin 8.0 软件, 利用曲线拟合得出 96 h 的 EC_{50} 值^[25]。

2 结果和分析

2.1 分离藻株藻属的确定

分离纯化的藻体镜下观察呈卷曲、螺旋的丝状, 末端细胞尖细, 宽度约 2–3.5 μm , 长度可至 60 μm 、多数 20–50 μm (图 1–A、B), 偶见异形胞, 顶生。为进一步明确藻株的归属, 进行了 16S rRNA 的提取、PCR 扩增与测序。

图 2 为藻株 16S rRNA 的 PCR 扩增的电泳图, 产物与预期的大小一致, 约 780 bp。测序结果表明拟柱孢藻 16S rRNA 最重要的 780 个核苷酸序列得到了有效扩增, 将测得的基因序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已发表的其他种类拟柱孢藻 16S rRNA 序列及 5 株外类群进行同源性比较, 并构建系统发育树(图 3), 三角形代表样品。结果表明分离藻株与其他来源的拟柱孢藻都聚集在同一类群中, 与已报道的拟柱孢藻 *Cylindrospermopsis*

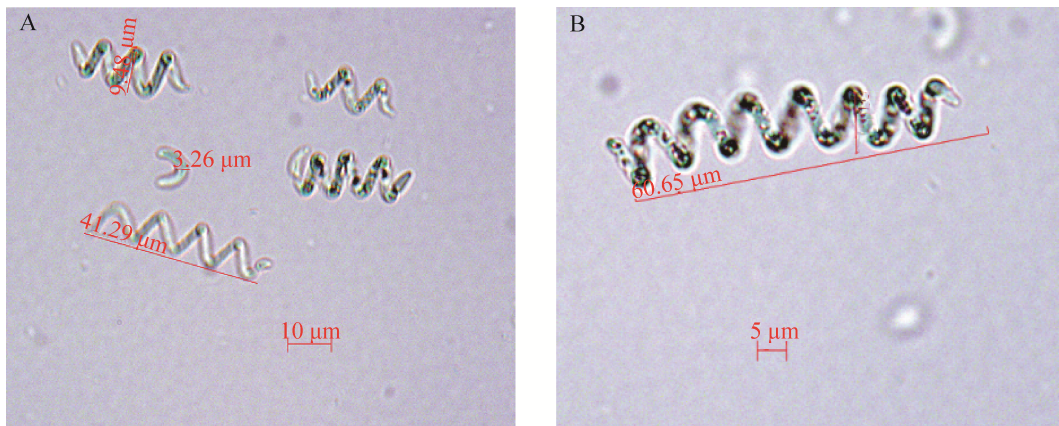


图 1. 分离藻株的形态特征图(10×40)

Figure 1. The morphological characterization of isolated algal strain. A: most of the isolated algae; B: few of the isolated algae.

catemaco CHAB1390 亲源关系最近, 比对显示有 98% 的相似性, 意味着本分离藻株在蓝细菌分类学地位上归属于拟柱孢藻属, 但是否与 *Cylindrospermopsis catemaco* CHAB1390 为同一种则尚缺乏足够的证据, 结合形态学特征, 本藻株命名为螺旋拟柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii* helix)。

2.2 螺旋拟柱孢藻的培养基优化

图 4、图 5 为螺旋拟柱孢藻藻丝在 6 种不同培养基条件下的生长曲线及其生长速率。结果显示, 本藻丝在这 6 种培养基(C1、C2、C3、B1、B2、B3)条件下均能生长。多数条件下, 藻体在经历约 3–5 d 的滞留期即进入生长快速的对数生长期, 约 15–16 d 达稳定生长期, 其中生物量最高及生长速率最快的培养基条件为 B3, 即在蓝藻通用培养基 BG11 的基础上调整氮浓度及氮、磷比分别为 62 mg/L 和 9 : 1, 在此培养基条件下, 最高生物量达 $(0.632 \pm 0.170) \times 10^7 / \text{L}$, 生长速率为 $(0.063 \pm 0.001) / \text{d}$, 另外, 在此培养基中的藻液主要呈绿色, 镜下呈典型的螺旋型藻丝, 多为 3–4 个螺旋, 而

生物量及生长速率较低的培养基条件为 C3(即 CT 培养基上调整氮浓度及氮、磷比分别为 N 128 mg/L, N : P=50 : 1)和 B1(即原始 BG11 未调整的培养基), 这 2 种培养基中的藻液多为黄色, 镜下藻体呈弧形、圆形居多, 其中 C3 的最高生物量低至 $4.50 \times 10^6 / \text{L}$, 平均生长速率为 0.038/d, 分别为 B3 培养基的 68.6% 和 60.3%, C3 与 B3 组的生物量与生长速率存在显著差异 ($P < 0.05$)。由此可见, 螺旋拟柱孢藻生长最优的培养基为 B3 培养基。

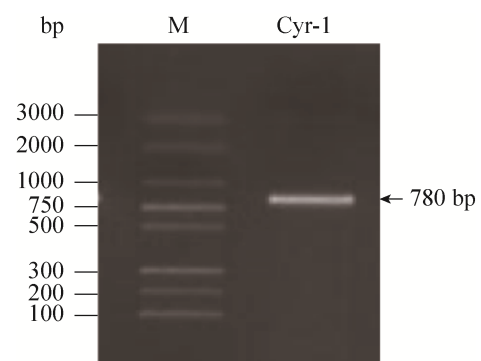


图 2. 分离藻株的 16S rRNA 的 PCR 扩增电泳图

Figure 2. Electrophoresis analysis on PCR amplification of 16S rRNA and derived from isolated algal strain. M: Marker; Cyr-1: isolated algal strain.

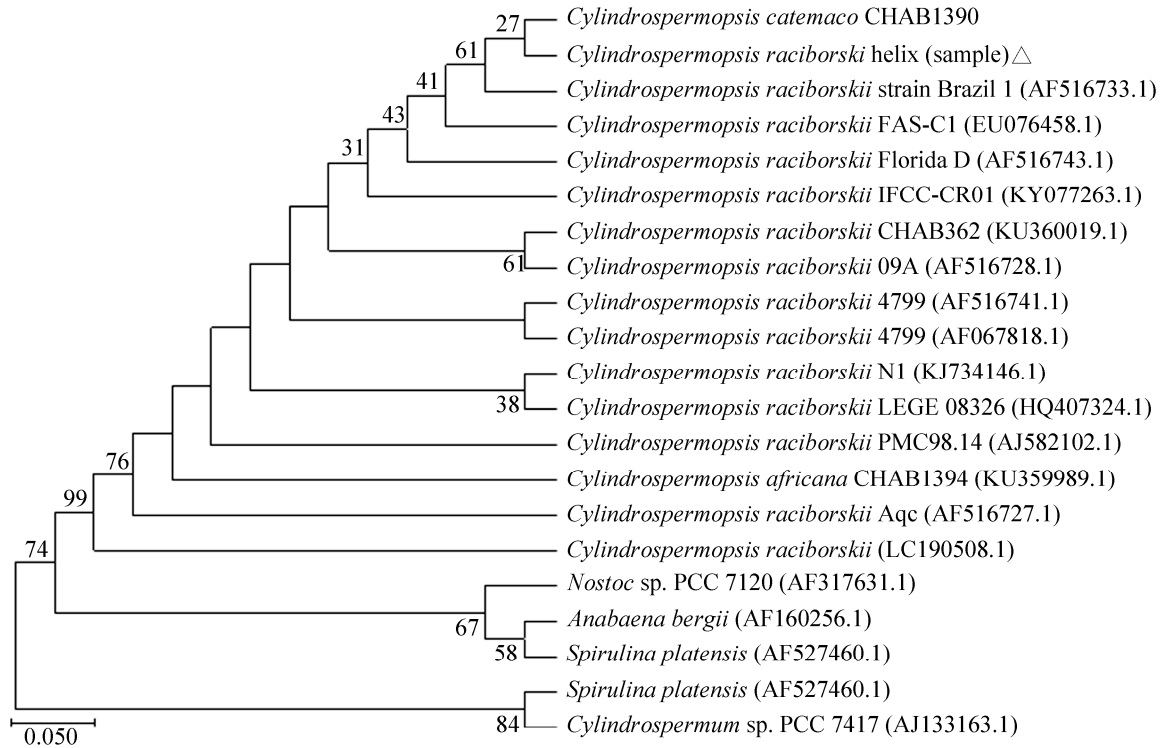


图 3. 基于 16S rRNA 全序列构建的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of isolated algal strain based on 16S rRNA full-length sequence. Numbers above branches from 1000 replicates and are given in the following order: neighbor joining parsimony. The accession numbers of each DNA sequences from NCBI are given in brackets. Scale represents the expected number of substitutions per site. The objective strains are in bold font.

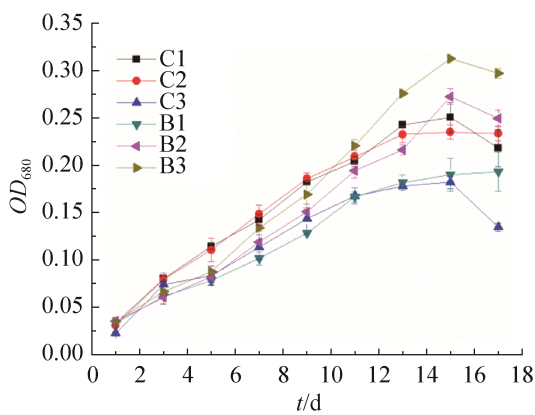


图 4. 螺旋拟柱孢藻在不同培养条件下的生长曲线
Figure 4. Growth curves of *C. raciborskii* helix under different culture conditions.

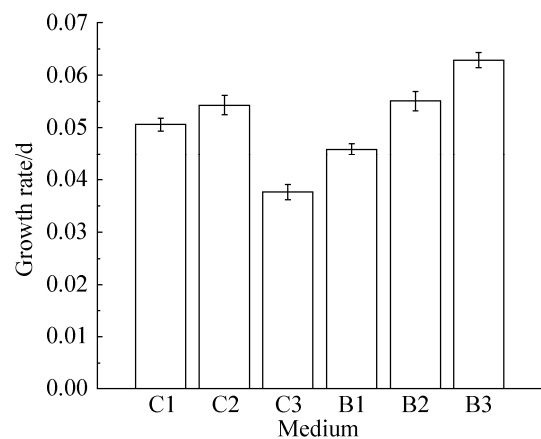


图 5. 螺旋拟柱孢藻在不同培养基条件下的生长速率
Figure 5. Growth rate of *C. raciborskii* helix under different culture conditions.

2.3 不同浓度重金属离子 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 对螺旋拟柱孢藻生长的影响

螺旋拟柱孢藻在不同浓度 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 条件下经过 7–8 d 的培养后, 结果如图 6 所示。在预实验的基础上本实验设置的重金属离子浓度范围内, 相比对照组而言, 除 Pb^{2+} 外, 不同浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对螺旋拟柱孢藻均表现出不同程度的抑制作用, 藻体在经过 2–3 d 的适应性生长后, 于第 4 天(≥ 96 h)受抑制效果更明显, 且此抑制作用随重金属离子浓度的升高而增加。在 Cu^{2+} 浓度范围为 0–0.2 mg/L、 Cd^{2+} 浓度范围为 0–0.5 mg/L 时, 藻细胞仍可进入生长期, 藻液不发黄, 表现出一定的耐受性; 对 Cd^{2+} 的耐受性强于 Cu^{2+} , 在 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 浓度分别为 0.4、1 mg/L 的环境中, 藻细胞无任何生长, 培养液后期为黄白色, 镜检为聚集成堆的死亡藻细胞。使用回归曲线模拟, 计算得出 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对藻体的 96 h EC_{50} 值分别为 0.125、0.551 mg/L。在 Pb^{2+} 浓度为 0–80 mg/L 的范围内, 除 80 mg/L 的 Pb^{2+} 对藻体表现为明显抑制外, 其他浓度对藻体的生长表现为一定的促进作用, 尤其是处理第 4 天(96 h)后, 在 1–20 mg/L 的 Pb^{2+} 浓度范围内, 促进作用随浓度升高而加强, 40 mg/L 的 Pb^{2+} 对藻的生长也是促进的, 但其促进作用低于 10、20 mg/L 的 Pb^{2+} 浓度处理。以上结果表明, 螺旋拟柱孢藻可以在一定浓度范围的 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 重金属离子条件下生存, 具有一定的耐受性, 耐受性能依次为: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, 能耐受的重金属离子浓度分别为 Pb^{2+} 为 1–40 mg/L, Cd^{2+} 为 0–0.5 mg/L, Cu^{2+} 为 0–0.2 mg/L。

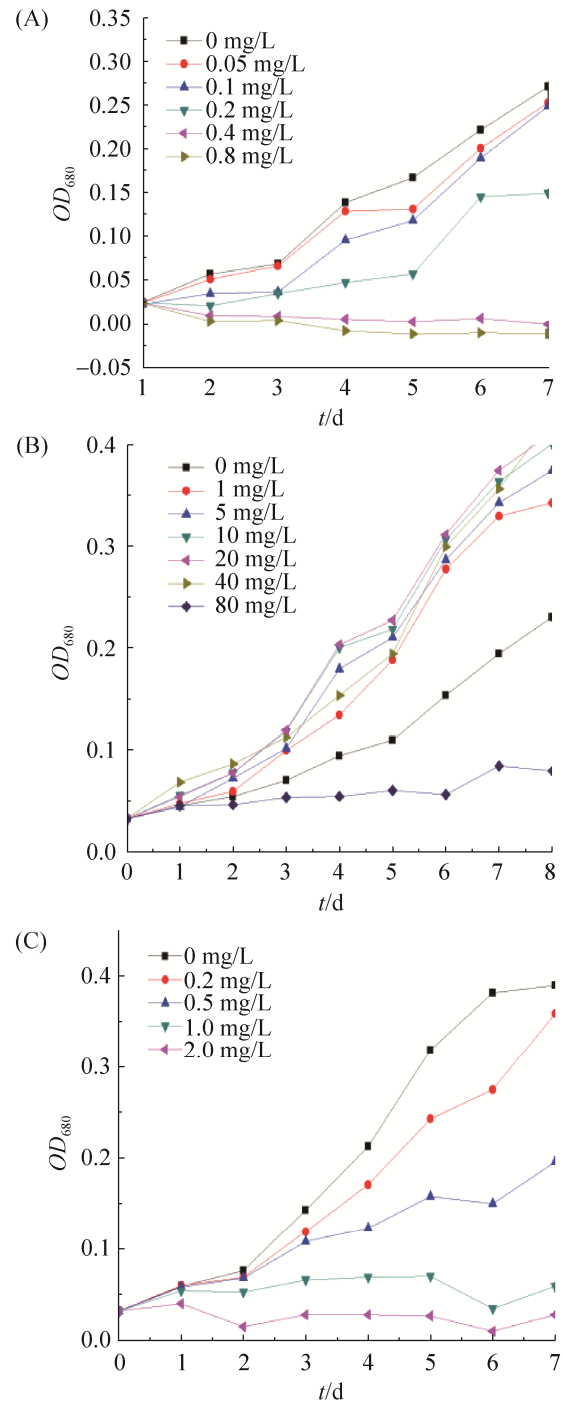


图 6. 螺旋拟柱孢藻在不同浓度 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 中的生长曲线

Figure 6. Growth curves of *C. raciborskii* helix under different concentrations of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} . A: the growth curve of the strain under Cu^{2+} ; B: the growth curve of the strain under Pb^{2+} ; C: the growth curve of the strain under Cd^{2+} .

3 讨论

拟柱孢藻是近年来受到广泛关注的一类具有潜在毒性且入侵性强的淡水水华蓝细菌,属于念珠藻目念珠藻科拟柱孢藻属^[26],其分类主要结合形态学特征及分子生物学方法。根据显微镜下藻株形态、营养细胞、异形胞的大小与形成差异及孢子特征等方面分为 *Cylindrospermopsis africana*、*C. cuspis*、*C. philippinensis*、*C. raciborskii*、*C. allantoidispora*、*C. catemaco*、*C. tavernae* 和 *C. curvispora* 等 8 个种,其中 *C. raciborskii* 即拉氏拟柱孢藻因 CYN、STX 等毒素引发多起毒害事件而备受关注与研究^[27],因而成为拟柱孢藻属的模式种^[28]。分子生物学水平上,16S rRNA 常被用于对各种生物进行系统发育学及种属分类等方面的研究,于婷^[23]通过对广东镇海水库分离的 8 株拟柱孢藻的 16S rRNA 测序结果与 GenBank 上下载的 15 株来源于美、法、澳大利亚、德国等地区的拟柱孢藻 16S rRNA 比对发现,拟柱孢藻藻株间的 16S rRNA 相似度高达 99.8%–100%。Saker^[27]对澳大利亚北部多个水域来源的 7 株拟柱孢藻进行 16S rRNA 遗传学分析,发现其相似度达 99.8% 以上。Wilson^[29]以 16S rRNA、*rpoCl*、PC-IGS 及固氮酶 *nifH* 基因等作为分子标记,分析澳大利亚地区 2 株形态分别为直线型与卷曲形的拟柱孢藻,发现其具有相似的遗传特征。本研究虾池来源的藻株 16S rRNA 序列与 GenBank 上下载的多株拟柱孢藻的 16S rRNA 序列构建的系统发育树可以看出,这些藻株都聚集在同一类群中,相似度均达到 98% 以上,说明在种属类别方面,虾池来源的藻株属于拟柱孢藻属,但此藻株形态为螺旋卷曲型,国内少见。查广才等^[20,30–31]在对广东省凡纳滨对虾低盐度养殖水体环境进行长期跟踪调

查时首次发现此螺旋卷曲型的拟柱孢藻,其在调查中还发现,螺旋拟柱孢藻极易在虾池中大量生长繁殖并形成优势种且对对虾生长无害,虾池的水质反而更稳定,这说明螺旋拟柱孢藻具有某种调节虾池水环境的特性而促进虾体健康,另一方面也说明遗传特征相似的不同拟柱孢藻藻株,其形态与生理功能存在一定程度的差异性。Willis 等^[32]从澳大利亚 Wivenhoe 水库分离出 24 株拟柱孢藻,以 HIP1 为分子标记的遗传分析发现其系统发育异质性小,但其形态、生长率、营养代谢及产毒等方面的差异却较大。另外,也有学者^[33]从巴西一水库中同时分离到直线型与曲线型的拟柱孢藻,发现其生长生理特性也不相同。

本研究虾池来源的螺旋拟柱孢藻在两种通用蓝藻培养基 CT 与 BG11 中,生物量及比生长速率均不高,藻液极易变黄,在 6 种改良培养基中,生长最佳的是 B3 (BG11 基础上, N 62 mg/L, N:P=9:1),生长最差的是 C3 (CT 基础上, N 128 mg/L, N:P=50:1)。分析发现,这 6 种培养基中, B3 的氮磷比最小,而 C3 的氮磷比最高,其次,磷浓度上 B3 (约 7 mg/L) 高于 C3 (约 2.56 mg/L)。根据螺旋拟柱孢藻在这 6 种改良培养基的生物量与比生长速率总体来看,藻丝生长与氮磷比负相关,与磷浓度正相关,氮磷比与磷浓度为主要影响因素,与赵莉等^[34]研究一致。磷对拟柱孢藻的作用一直是多年来的研究热点,拟柱孢藻对磷具有较高的亲和力及储存能力,有研究报道磷浓度与拟柱孢藻生物量之间呈正相关,也有呈负相关的报道^[14,35–36]。不同拟柱孢藻藻株对磷浓度及其波动性变化具有生长反应的差异,这不仅表明藻株反应的灵活性,而且也表明藻株之间具有明显的差异性。此外,本项目调整的 6 种培养基条件中,氮浓度的水平均较高(≥ 32 mg/L),藻株因氮浓度的

不同引起的生长差异性较小,这与于婷等^[37]及戴景峻等^[19]的研究一致,拟柱孢藻藻丝的生长在高氮浓度下,受氮浓度影响小,而磷浓度及氮磷比成为更重要的决定因子。

藻类与重金属的相互作用研究对于了解重金属对水生生物的致毒机理、藻类的抗性机制以及利用藻类进行生物监测和防治水体重金属污染具有重要的意义^[38]。拟柱孢藻是一种近年来才受到广泛关注的水华蓝藻,其与重金属之间的相互作用研究不多。Tonietto 等^[39]分析了不同分子量的拟柱孢藻有机分泌物(EOM)对重金属离子铜与镍的络合作用,结果发现藻株 EOM 络合铜离子的配体有 2 个,络合镍的配体只有 1 个,而且小分子量的 EOM 对铜的络合力更强。Tonietto^[40]将拟柱孢藻的可溶性有机分泌物按分子量分为 3 部分(>30 kDa; 30–10 kDa; 10–3 kDa),其发现不同分子量的有机分泌物对重金属离子 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 具有不同的络合位点与络合力,其中 10–3 kDa 的拟柱孢藻有机分泌物对 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的络合力最强。聂利华等^[21]通过大规模无菌通气培养拟柱孢藻,冷冻干燥法收集藻粉,对 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Cr^{2+} 、 Co^{2+} 及 Ni^{2+} 等 7 种重金属离子设计了 24 h 的吸附实验,结果发现拟柱孢藻对多数离子的吸附作用较强,在 2 h 内即可达到最佳吸附效果。凡纳滨对虾养殖池中处于优势生长的螺旋拟柱孢藻有益于虾体健康,是否因为藻体能够耐受并吸附了重金属离子,从而改善了水质?为此本研究从耐受性方面对水体常见的重金属离子 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 进行了初步探讨,研究发现,螺旋拟柱孢藻对这 3 种离子具有不同程度的耐受性,能耐受的离子浓度范围分别为 Pb^{2+} 1–40 mg/L、 Cd^{2+} 0–0.5 mg/L、 Cu^{2+} 0–0.2 mg/L,本藻株对 Cu^{2+} 的耐受性比淡水蓝藻螺旋藻弱^[41],对 Cd^{2+} 的耐受性与

微囊藻相当^[42]。 Pb^{2+} 对螺旋拟柱孢藻具有低浓度促进高浓度抑制生长的特性,与张展宁等^[43]、李勇勇等^[44]及易婷婷等^[25]研究 Pb^{2+} 对蛋白核小球藻、螺旋藻及淡水硅藻谷皮菱形藻的作用性质类似,但螺旋拟柱孢藻在 80 mg/L 的 Pb^{2+} 浓度下才表现为明显抑制作用,远远高于螺旋藻(60 mg/L)及淡水硅藻谷皮菱形藻(50 mg/L),蛋白核小球藻的抑制浓度与之相同。活体藻类因易受到重金属的毒性作用,适合用于水体重金属浓度为 1 mg/L 左右的生物修复^[45],螺旋拟柱孢藻活体对 Cd^{2+} (≤ 0.5 mg/L)、 Cu^{2+} (≤ 0.2 mg/L)是否具有吸附作用还需进一步研究,藻体对 Pb^{2+} 耐受性更高,以期用于更高浓度 Pb^{2+} 污染的水体处理中。

参 考 文 献

- [1] Kovács AW, Présing M, Vörös L. Thermal-dependent growth characteristics for *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota) at different light availabilities: methodological considerations. *Aquatic Ecology*, 2016, 50(4): 623–638.
- [2] Dittmann E, Fewer DP, Neilan BA. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(1): 23–43.
- [3] Vehovszky Á, Kovács AW, Farkas A, Györi J, Szabó H, Vasas G. Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloom-forming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary. *Environmental Toxicology*, 2013, 30(5): 501–512.
- [4] William WJ, Sarah S. Distribution and abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana lakes and reservoirs. Bloomington, Indiana: Indiana University, School of Public and Environmental Affairs, 2005.
- [5] Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon*, 2003, 42(3): 313–321.
- [6] Lei LM, Peng L, Huang XH, Han BP. Occurrence and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* and dissolved cylindrospermopsin in urban reservoirs used for drinking water supply, South China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, 186(5): 3079–3090.

- [7] Svirčev Z, Obradović V, Codd GA, Marjanović P, Spoo L, Drobac D, Tokodi N, Petković A, Nenin T, Simeunović J, Važić T, Meriluoto J. Massive fish mortality and *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in Aleksandrovac Lake. *Ecotoxicology*, 2016, 25(7): 1353–1363.
- [8] Zanchett G, Oliveira-Filho EC. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. *Toxins (Basel)*, 2013, 5(10): 1896–1917.
- [9] Moreira C, Fathalli A, Vasconcelos V, Antunes A. Phylogeny and biogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of Microbiology*, 2015, 197(1): 47–52.
- [10] Wood SA, Pochon X, Luttringer-Plu L, Vant BN, Hamilton DP. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae*, 2014, 39: 64–74.
- [11] Burford MA, Beardall J, Willis A, Orr PT, Magalhaes VF, Rangel LM, Azevedo SMFOE, Neilan BA. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 2016, 54: 44–53.
- [12] Babanazarova OV, Sidelev SI, Fastner J. Northern expansion of *Cylindrospermopsis raciborskii* (*Nostocales*, *Cyanoprokaryota*) observed in shallow highly eutrophic lake Nero (Russia). *International Journal on Algae*, 2014, 17(2): 131–141.
- [13] Pierangelini M, Sinha R, Willis A, Burford MA, Orr PT, Beardall J, Neilan BA. Constitutive cylindrospermopsin pool size in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different light and CO₂ partial pressure conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(9): 3069–3076.
- [14] Yang YM, Jiang YG, Li XC, Li H, Chen YX, Xie JL, Cai FF, Li RH. Variations of growth and toxin yield in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different phosphorus concentrations. *Toxins*, 2016, 9(1): E13.
- [15] Zhang WY, Lou I, Ung WK, Kong YJ, Mok KM. Application of PCR and real-time PCR for monitoring cyanobacteria, *Microcystis* spp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* in Macau freshwater reservoir. *Frontiers of Earth Science*, 2014, 8(2): 291–301.
- [16] Noyma NP, Silva TP, Chiarini-Garcia H, Amado AM, Roland F, Melo RCN. Potential effects of UV radiation on photosynthetic structures of the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* CYRF-01. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1202.
- [17] Beamud G, Vico P, Haakonsson S, de La Escalera GM, Piccini C, Brena BM, Pirez M, Bonilla S. Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 2016, 763(1): 161–172.
- [18] Đorđević NB, Matić SLJ, Simić SB, Stanić SM, Mihailović VB, Stanković NM, Stanković VD, Ćirić AR. Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats in vivo. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(16): 14259–14272.
- [19] Dai JJ, Peng L, Yu T, Lei LM. The effects of phosphorus and nitrogen on the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* N8 isolated from the Zhenhai Reservoir. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 533–539. (in Chinese) 戴景峻, 彭亮, 于婷, 雷腊梅. 镇海水库拟柱孢藻的分离鉴定和氮磷对其生长的影响. *水生生物学报*, 2015, 39(3): 533–539.
- [20] Zha GC, Mai XW, Zhou CQ, He JG. Study on the planktonic algae community in low salinity culture ponds of *Litopenaeus vannamei*. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(1): 1–7. (in Chinese) 查广才, 麦雄伟, 周昌清, 何建国. 凡纳滨对虾低盐度养殖池浮游藻类群落研究. *海洋水产研究*, 2006, 27(1): 1–7.
- [21] Nie LH, Li XS, Lin ZS, Liu YQ, Yu J, Zha GC. Biosorption of heavy metals by *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of Hydroecology*, 2017, 38(1): 41–45. (in Chinese) 聂利华, 李训仕, 林壮森, 刘亚群, 余俊, 查广才. 拟柱孢藻对水体重金属的生物富集作用研究. *水生态学杂志*, 2017, 38(1): 41–45.
- [22] Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 259–286.
- [23] 于婷. 温度、光照及氮源对拟柱孢藻生长和藻丝形态的影响. 暨南大学硕士学位论文, 2014.
- [24] Nie LH, Li XS, Liu YQ, Zhu XB, Yu J, Zha GC. Study on the effects of temperature, light intensity, salinity and pH on growth characteristics of freshwater cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Ecological Science*, 2016, 35(4): 102–108. (in Chinese) 聂利华, 李训仕, 刘亚群, 朱兴彪, 余俊, 查广才. 温度、光照、盐度与 pH 对淡水蓝藻拟柱孢藻生长的影响. *生态科学*, 2016, 35(4): 102–108.
- [25] Yi TT, Zhi CY, Li PL, Yang YJ, Shuai CY. Effect of Pb²⁺ on the growth of freshwater diatom *Nitzschia palea*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(1): 340–343. (in Chinese) 易婷婷, 支崇远, 李培林, 杨雨嘉, 帅春燕. Pb²⁺对淡水硅藻谷皮菱形藻(*Nitzschia palea*)生长的影响. *江苏农业科学*, 2016, 44(1): 340–343.
- [26] Komárek J, Kling H. Variation in six planktonic cyanophyte

- genera in Lake Victoria (East Africa). *Algological Studies*, 1991, 61: 21–45.
- [27] Saker ML, Neilan BA. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1839–1845.
- [28] Li HM, Pei HY, Sun JM, Jin Y, Xu HZ. Progress and prospect in the study of *Cylindrospermopsis raciborskii* and its toxins. *Journal of Lake Sciences*, 2017, 29(4): 775–795. (in Chinese)
李红敏, 裴海燕, 孙炯明, 金岩, 徐杭州. 拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii*)及其毒素的研究进展与展望. *湖泊科学*, 2017, 29(4): 775–795.
- [29] Wilson KM, Schembri MA, Baker PD, Saint CP. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 332–338.
- [30] Zha GC, Zhou CQ, Huang JR, He JG, Mai XW. Studies on the structure and biodiversity of the microplankton community in *Litopenaeus vannamai* desalination culture ponds. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(8): 1748–1755. (in Chinese)
查广才, 周昌清, 黄建荣, 何建国, 麦雄伟. 凡纳对虾淡化养殖虾池微型浮游生物群落及多样性. *生态学报*, 2004, 24(8): 1748–1755.
- [31] Zha GC. Investigation on the ecological factor in *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom in low salty prawn ponds. *Ecological Science*, 2009, 28(4): 293–298. (in Chinese)
查广才. 虾池拟柱孢藻爆发的生态因子调查. *生态科学*, 2009, 28(4): 293–298.
- [32] Willis A, Chuang AW, Woodhouse JN, Neilan BA, Burford MA. Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Toxicon*, 2016, 119: 307–310.
- [33] Bittencourt-Oliveira MDC, Moura ADN, Hereman TC, Dantas EW. Increase in straight and coiled *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) populations under conditions of thermal de-stratification in a shallow tropical reservoir. *Journal of Water Resource and Protection*, 2011, 3(4): 245–252.
- [34] Zhao L, Lei LM, Peng L, Han BP. Seasonal dynamic and driving factors of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Zhenhai Reservoir, Guangdong Province. *Journal of Lake Sciences*, 2017, 29(1): 193–199. (in Chinese)
赵莉, 雷腊梅, 彭亮, 韩博平. 广东省镇海水库拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii*)的季节动态及驱动因子分析. *湖泊科学*, 2017, 29(1): 193–199.
- [35] Chislock MF, Sharp KL, Wilson AE. *Cylindrospermopsis raciborskii* dominates under very low and high nitrogen-to-phosphorus ratios. *Water Research*, 2014, 49: 207–214.
- [36] Dolman AM, Rücker J, Pick FR, Fastner J, Rohrlack T, Mischke U, Wiedner C. Cyanobacteria and cyanotoxins: the Influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38757.
- [37] Yu T, Dai JJ, Lei LM, Peng L. Effects of temperature, irradiance and nitrate on the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* N8. *Journal of Lake Sciences*, 2014, 26(3): 441–446. (in Chinese)
于婷, 戴景峻, 雷腊梅, 彭亮. 温度、光照强度及硝酸盐对拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii* N8)生长的影响. *湖泊科学*, 2014, 26(3): 441–446.
- [38] 李昊翔. 螺旋藻对重金属的耐受性和吸附研究. 浙江大学硕士学位论文, 2005.
- [39] Tonietto AE, Oliveira NL, Lombardi AT, Polpo A. Copper and cadmium complexation by *Cylindrospermopsis raciborskii* exudate. *Water Science & Technology*, 2016, 73(10): 2544–2551.
- [40] Tonietto AE, Lombardi AT, Vieira AAH, Parrish CC, Choueri RB. *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) exudates: chemical characterization and complexation capacity for Cu, Zn, Cd and Pb. *Water Research*, 2014, 49: 381–390.
- [41] Shan HH, Gao CX. The effects of Cu²⁺ on the growth of *spirulina*. *Environmental Science and Management*, 2009, 34(7): 97–99. (in Chinese)
单环环, 高春晓. 铜离子对螺旋藻生长的影响. *环境科学与管理*, 2009, 34(7): 97–99.
- [42] Ran XF, Liu R, Bai F, Shi JQ, Wu ZX. The response on the growth and photosystem II of *Microcystis aeruginosa* to cadmium, a heavy metal. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 627–632. (in Chinese)
冉小飞, 刘瑞, 白芳, 施军琼, 吴忠兴. 微囊藻生长及光合系统 II 对重金属镉的响应. *水生生物学报*, 2015, 39(3): 627–632.
- [43] Zhang ZN, Cui JS. Effects of Pb²⁺ stress on chlorophyll II fluorescence intensity and ultrastructure of *Chlorella pyrenoidosa*. *Science Technology and Engineering*, 2015, 15(10): 131–135. (in Chinese)
张展宁, 崔建升. Pb²⁺胁迫对蛋白核小球藻叶绿素荧光强度及亚显微结构的影响. *科学技术与工程*, 2015, 15(10): 131–135.
- [44] Li YY, Zhao N, Li SC, Shao MF, Yu ZY, Qin S. Pb²⁺ impacts on growth of two *Spirulina* strains. *Journal of Biology*, 2013, 30(4): 37–41. (in Chinese)
李勇勇, 赵楠, 李善策, 邵明飞, 郁章玉, 秦松. 重金属铅离子 (Pb²⁺) 对两株螺旋藻生长影响的研究. *生物化学杂志*, 2013, 30(4): 37–41.

[45] Zhi TT, Cheng LH, Xu XH, Zhang L, Chen HL. Advances on heavy metals removal from aqueous solution by algae. *Progress in Chemistry*, 2011, 23(8): 1782–1794. (in Chinese)

支田田, 程丽华, 徐新华, 张林, 陈欢林. 藻类去除水体中重金属的机理及应用. *化学进展*, 2011, 23(8): 1782–1794.

Isolation, identification and effect of heavy metals on the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* helix from shrimp ponds

Lihua Nie¹, Dongjuan Yang², Yaquun Liu³, Boping Han⁴, Xiulan Ma¹, Guangcai Zha^{2*}

¹ Department of Bioengineering, Jieyang Polytechnic, Jieyang 522000, Guangdong Province, China

² Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, Guangdong Province, China

³ College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570100, Hainan Province, China

⁴ Department of Ecology and Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Prevention of Guangdong Higher Education Institutes, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] We examined the physiological characteristics of invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* helix isolated from *Litopenaeus vannamei* culture ponds. [Methods] The algal strain was isolated and purified from shrimp ponds in Chenghai, Shantou, and identified by morphology and 16S rRNA sequence analysis. Then, with the general culture media of CT and BG11, we optimized the culture conditions. Finally, we analyzed the effect of heavy metals Cu²⁺ (0–0.8 mg/L), Cd²⁺ (0–4 mg/L) and Pb²⁺ (0–80 mg/L) on the growth of the isolated strain. [Results] The identity of 16S rRNA sequence of the isolated strain was higher than 98% with that of typical strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* from GenBank. Under laboratory culture conditions, the optimal culture medium for the growth of the isolated strain was the modified BG11 (N 62 mg/L, N:P=9:1), the exponential biomass and growth rate were up to (0.632±0.170)×10⁷/L, (0.063±0.001)/d, respectively. The isolated strain tolerated heavy metals Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺, and the tolerance concentrations was Pb²⁺ 1–40 mg/L, Cd²⁺ 0–0.5 mg/L, Cu²⁺ 0–0.2 mg/L. Furthermore, Cu²⁺ and Cd²⁺ inhibited the growth of the isolated strain, and the inhibition increased with enhancing of heavy metal concentration and contact time, the 96 h EC₅₀ of Cu²⁺ and Cd²⁺ were 0.125 and 0.551 mg/L for the strain, respectively, but Pb²⁺ (0–80 mg/L) had a dual effect on its growth, which promoted growth at low concentration (≤40 mg/L) and inhibited growth at high concentration (≥80 mg/L). [Conclusion] A strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from *L. vannamei* culture ponds has the potential of adsorbing heavy metal ions in shrimp ponds.

Keywords: *Cylindrospermopsis raciborskii* helix, identification, heavy metal, tolerance

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Innovation Strong Project of Jieyang Polytechnic (JYPSHF_{B1701}), by the Scientific Research Project of Jieyang Polytechnic (2016JYCKY03, 2018JYCKZ01) and by the “Climbing Plan” Special-funds for University Students on Scientific and Technological Innovation of Guangdong Province (pdjh2017b0783)

*Corresponding author. E-mail: Lsp01cgc@aliyun.com

Received: 5 September 2018; Revised: 4 December 2018; Published online: 10 June 2019