水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

淡水藻种库(FACHB)库藏产2-MIB蓝藻的鉴定及其产嗅特征研究

张琪 夏逸若 李林 李天丽 郑凌凌 宋立荣

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 2-MIB-PRODUCING CYANOBACTERIA IN FACHB

ZHANG Qi, XIA Yi-Ruo, LI Lin, LI Tian-Li, ZHENG Ling-Ling, SONG Li-Rong

在线阅读 View online: https://doi.org/10.7541/2023.2022.0270

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大别山区黑沟绿太阳鱼种群的形态特征研究

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE GREEN SUNFISH (*LEPOMIS CYANELLUS*) IN HEIGOU CREEK, TA-PIEH MOUNTAINS

水生生物学报. 2017, 41(1): 194-200 https://doi.org/10.7541/2017.24

对枝蜈蚣藻的修订研究——基于形态特征和基因序列分析

RESEARCH ON THE REVISION OF *GRATELOUPIA DIDYMECLADIA* LI ET DING BASED ON MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS AND MOLECULAR ANALYSES

水生生物学报. 2017, 41(6): 1273-1281 https://doi.org/10.7541/2017.158

中国淡水胴脂藻属植物形态及分子系统发育分析

MORPHOLOGY AND MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSIS OF FRESHWATER *HILDENBRANDIA* IN CHINA

水生生物学报. 2021, 45(6): 1341-1350 https://doi.org/10.7541/2021.2020.200

光强对菹草生长及抗氧化酶活性的影响

EFFECTS OF LIGHT INTENSITY ON GROWTH AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY OF *POTAMOGETON CRISPUS*

水生生物学报. 2018, 42(4): 846-853 https://doi.org/10.7541/2018.104

浙江近海属鱼类形态描述及中国属鱼类分子系统发育分析

MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF *SILLAGO* SPECIES IN THE COASTAL WATERS OF ZHEJIANG AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *SILLAGO* SPECIES IN CHINA

水生生物学报. 2018, 42(1): 99-105 https://doi.org/10.7541/2018.013

大亚湾水域并基拟菱形藻的种类鉴定和产毒特征分析

THE IDENTIFICATION OF *PSEUDO-NITZSCHIA DECIPIENS* FROM DAYA BAY AND ANALYSIS OF ITS DOMOIC ACID PRODUCTION

水生生物学报. 2017, 41(5): 1118-1125 https://doi.org/10.7541/2017.140

关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0270

淡水藻种库(FACHB)库藏产2-MIB蓝藻的鉴定及其产嗅特征研究

张 琪[1] 夏逸若[2] 李 林[1] 李天丽[1] 郑凌凌[1] 宋立荣[1]

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为认识产二甲基异莰醇(2-MIB)蓝藻的形态和产嗅特征, 从国家水生生物种质资源库淡水藻种库中筛选出24株可产2-MIB藻株, 描述了这些藻株的形态特征和生境分布。结合形态和16S rRNA基因分析对藻株进行物种鉴定复核, 修订了部分库藏藻株物种名称, 例如发现库藏产2-MIB的浮丝藻属种类应当被重新鉴定为拉氏拟浮丝藻或索状气丝藻。基于*mic*基因系统发育树分析, 显示蓝藻*mic*基因形成5个分支。通过2-MIB含量检测发现, 不同藻株间单个细胞总2-MIB含量为6—2549 fg/cell, 其含量通常为拉氏拟浮丝藻>索状气丝藻>灰假鱼腥藻。研究提供了产2-MIB蓝藻的形态、分子、生态和产嗅特性等的基础数据, 首次报道气丝藻、沙丝藻、苏打丝藻种类可产2-MIB, 并在国内首次报道了产2-MIB的微鞘藻, 为进一步研究产2-MIB蓝藻生理生态特性提供重要的实验材料和科学依据。

关键词: 二甲基异莰醇; 丝状蓝藻; 嗅味; 形态特征; MIB环化酶基因

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2023)07-1115-14

嗅味问题是我国供水行业中重点关注的问题之一, 其中以二甲基异莰醇(2-methylisoborneol, 2-MIB)导致的水体土霉味问题较为常见[1]。2-MIB是一种由蓝藻或放线菌产生的次级代谢产物[2]。2-MIB在水体中的嗅阈值极低, 通常在4—16 ng/L, 超过30 ng/L即会散发出极强的气味[1, 3]。在最新颁布的国标《GB 5749-2022 生活饮用水卫生标准》中, 将2-MIB从2006年原标准资料附录指标修订为生活饮用水水质扩展指标, 其限定值为10 ng/L[4]。随着水体富营养化程度的加深, 蓝藻大量繁殖形成水华或成为优势类群, 常会伴随着散发难闻的嗅味, 其中2-MIB 是蓝藻常产生的嗅味物质之一[5]。

自20世纪70年代, Tabachek等[6]在加拿大盐湖中首次发现了产2-MIB的蓝藻。由于地表水体富营养化日益严重, 导致饮用水源中蓝藻水华事件频发, 2-MIB造成的水体异味问题也越来越引起重视[7]。近年来, 在北京、上海、天津、湖北、珠海和深圳等国内多地饮用水源均出现了2-MIB导致的嗅味, 这成为我国供水行业中重点关注的问题之一[1]。丝状蓝藻被认为是导致湖泊和水库发生2-MIB嗅味问题的主要生物, 主要包括了颤藻属(*Oscillatoria*)、席藻属(*Phormidium*)、浮丝藻属(*Planktothrix*)和假鱼腥藻属(*Pseudanabaena*)等[1, 5]。2-MIB和产2-MIB生物的鉴定和快速监测是蓝藻嗅味问题后续处理的基础, 因此需要建立一个关于产2-MIB生物的活体、分类鉴定、生境、时空分布和分子序列的数据库[8]。Watson等[5]综述了产挥发性有机化合物的蓝藻的种类、生化和遗传特性, 并总结了36株已公开报道的产2-MIB藻株信息。目前, 已报道的产2-MIB藻株数量及相关研究仍不充分, 需要获得更多的产2-MIB藻株, 特别是从国内分离的藻株, 并对其开展深入研究进一步提高对产嗅藻的认识。

2-MIB相关的合成路径和基因研究始于放线菌, 后续大量研究表明蓝藻中2-MIB的合成路径与放线菌基本相似[9]。蓝藻2-MIB合成涉及2个关键反应: 前体物质香叶基焦磷酸(Geranyl diphosphate, GPP)在S-腺苷甲硫氨酸依赖性甲基转移酶(GPPMT)催化下甲基化生成2-甲基-GPP, 2-甲基-

收稿日期: 2022-06-30; **修订日期:** 2022-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(52030002); 国家重点研发计划(2018YFE0110600); 中国科学院水生生物研究所特色研究所服务性项目(Y85Z0511)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (52030002); National Key R & D Program of China (2018YFE0110600); Featured Institute Service Project of IHB (Y85Z0511)]

作者简介: 张琪(1985—), 男, 博士, 高级实验师; 主要从事淡水藻类分类与资源利用研究。E-mail: zhangq@ihb.ac.cn

通信作者: 宋立荣(1961—) , 男, 博士, 研究员; 主要从事淡水藻类生态与毒理研究。E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

GPP在环化酶的催化下进一步环化生成2-MIB[10]。研究表明蓝藻与放线菌的2-MIB合成相关基因有高度的同源性但两者间排列顺序不同, 推测放线菌和蓝藻2-MIB合成基因有共同的起源, 在进化过程中发生了基因重组[11, 12]。作为 2-MIB 操纵子的一部分, 2-MIB环化酶(*mic*)基因对 2-MIB合成至关重要, 该基因已被用于开发灵敏、快速地定量检测蓝藻产2-MIB嗅味的定量实时 PCR(qPCR)方法[13, 14]。因此, 可建立基于*mic*基因的实时qPCR方法用于检测2-MIB功能基因丰度, 以及建立基于16S rRNA基因和/或ITS序列的基因鉴定方法用于检测产2-MIB的特定物种[8]。通过开发分子方法来快速跟踪 2-MIB相关信息, 用于实验室检测和/或现场应用[15]。

作为国内重要的微藻种质资源保藏专门机构, 国家水生生物种质资源库淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, FACHB)保藏了超过900株蓝藻[16]。所保藏的藻株如假鱼腥藻FACHB-1277、浮丝藻FACHB-1371和FACHB-1375等藻株被广泛用于产嗅藻相关研究[1, 7, 14, 17—23]。本研究从FACHB库藏蓝藻中筛选出19株产2-MIB藻株, 同时从野外新分离出5株产2-MIB藻株。结合形态特征和基于16S rRNA基因的分子特征研究, 对这些藻株进行准确鉴定, 修订了部分库藏藻株物种名称, 进一步测定和分析产2-MIB藻株藻株的*mic*基因, 比较了不同藻株间单个细胞总2-MIB含量的差异, 提供了产2-MIB蓝藻的形态、分子、生境和产嗅特性等基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和分离培养

采用孔径64 μm浮游植物网采集水体中的藻类样品, 使用镊子采集土壤表面藻类样品。吸取少量样品滴于载玻片上, 采用经典的毛细管分离法在显微镜下挑取单个细胞, 反复吸取-镜检-稀释, 直到水滴中只含单个目标藻种细胞, 再转移至96孔板中静置培养, 30d后镜检藻种生长状况[24]。采用BG11培养基培养, 培养条件为光暗周期12h/12h, 光照强度30 μmol/(m^2·s), 培养温度22℃。藻株接种至含50 mL培养基的三角瓶中扩大培养20 d至对数生长期, 以备后续实验。FACHB-3557、3558、3559、3560和3561由作者新分离纯化, 并保藏于国家水生生物种质资源库淡水藻种库(FACHB-collection)。其他所需实验藻株均由国家水生生物种质资源库淡水藻种库提供。藻株的采集和生境信息见表 1。

1.2 形态观察

取少量新鲜藻细胞, 采用Olympus BX53型显微镜进行形态观察, 并用Olympus DP80型CCD采集图像。数码拍照和数据测量通过显微镜附带的图像分析软件cellSens Standard(V1.14)完成。

1.3 DNA提取及16S rRNA和*mic*基因序列测定

采用通用型柱式基因组DNA提取试剂盒(康为世纪)提取藻类样品总DNA, 分别选取16S rRNA和*mic*基因片段进行PCR扩增。16S rRNA和*mic*基因扩增和测序引物分别为CYA106F(5′-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3′)/PLG2.3(5′-CTTCAYGYAGGCGAGTTGCAGC-3′)[25]和MIB3313F (5′-CTCTACTGCCCCATTACCGAGCGA-3′)/MIB4226R (5′-GCCATTCAAACCCGCCGCCCATCCA-3′)[26]。PCR反应体系为模板基因组DNA 2 μL, 10×缓冲液5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 20 μmol/L的引物各1 μL, *Taq*酶(TaKaRa Ex*Taq*)1.25 U, 最后以灭菌双蒸水补足至终体积50 μL。PCR反应条件为94℃预变性5min, 94℃变性1min, 55℃退火50s, 72℃延伸1.5min, 34个循环; 72℃延伸5min。扩增产物送交北京擎科生物有限公司进行测序。

1.4 系统发育分析

从GenBank中的在线BLAST分别获取蓝藻16S rRNA和*mic*基因的同源序列, 利用Clustal X(V 1.8)对基因序列进行比对[27], 辅以MEGA7(V 7.0.26)手工校正[28]。使用MEGA7计算蓝藻16S rRNA基因序列未校正的p遗传距离(Uncorrected p-distance), 进而获得基因序列相似度。采用jModelTest(V 2.1.5)程序分析ML 树和贝叶斯树采用的替代模型, 筛选出GTR+I+R为蓝藻16S rRNA和*mic*基因的系统发育分析替代模型[29]。分别使用MEGA7软件运用最大似然法(ML, Maximum Likelihood)和MrBayes(V 3.1.2)运用贝叶斯法(BI, Bayesian Inference)构建系统发育树[30]。在ML分析中, 采用自展支持(Bootstraps, BP)进行500 次重复检验。在贝叶斯分析中, 采用马尔科夫链蒙特卡洛方法(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)设置7条链(6条热链, 1条冷链)运行10^6次, 每运行100 次获得1个进化树, 舍弃老化样本burnin=1000, 并采用后验概率(Posterior probability, PP)进行重复检验。

1.5 藻细胞计数

充分摇匀藻液, 用50和10 mL注射器快速反复抽吸, 使藻丝体部分断裂变短充分混匀。取100 μL藻液于浮游植物计数框内, 在显微镜下进行细胞计数, 每个样品计数两次, 取其平均值[7]。

1.6 2-MIB化学测定

充分摇动藻液, 然后采用注射器快速反复抽吸使藻液均匀, 取藻液10 mL于带聚四氟乙烯涂层密

封取样瓶中。在冰浴条件下, 超声波破碎用于总2-MIB分析。2-MIB标准品(100 μg/mL)购置于sigma公司, 用于气相色谱-质谱(GC-MS)联用分析。采用顶空固相微萃取(HS-SPME)方式萃取嗅味物质, 并通过GC-MS方法测定分析2-MIB[21, 31]。顶空固相微萃取方法如下: 待测藻液移入20 mL棕色顶空瓶(CNW, 德国), 加入30%在550℃下烘干2h的优级纯氯化钠(国药, 上海), 用具有聚四氟乙烯(PTFE)涂层的硅橡胶垫的瓶盖(CNW, 德国)密封, 加入1-氯癸烷(Supelco, 美国)作为内标物标定异味物质的测定。用SPME萃取头(65 μm PDMS-DVB, Supelco 57310-U, 美国)在60℃恒温条件下萃取30min。采用MPS robotic自动顶空进样平台(GERSTEL, 德国)进样, 使用Agilent 7000C气相色谱质谱联用仪和7890B气相色谱仪进行测定。分析条件为: 载气为高纯氦气, 恒压120 kPa; 进样口的温度为250℃; 无分流进样2min; 初温60℃, 保持2min, 以5℃/min的速度升至200℃, 保持2min, 再以20℃/min的速度升

表 1　FACHB库藏产2-MIB蓝藻藻株信息

Tab. 1　List of 2-MIB-producing cyanobacterial strains in FACHB

藻株编号 Strain No.	库藏物种 Species in publication	修订后的学名 Revised nomenclature	来源地 Geographic origin	生境类型 Habitat	16S rRNA (GenBank 序列号) 16S rRNA (GenBank accession number)	*mic*基因 (GenBank 序列号) *mic* gene (GenBank accession number)	2-MIB 细胞含量 Cell quota of 2-MIB (fg/cell)	文献报道 Reference
FACHB-1243	*Planktothrix agardhii*	*Planktothricoides raciborskii*	安徽巢湖	浮游	ON622733	ON737836	1421	本研究
FACHB-1261	*Planktothrix agardhii*	*Planktothricoides raciborskii*	江苏太湖	浮游	ON623016	ON737837	1899	[14]
FACHB-1360	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	江苏尚湖	浮游	ON622734	ON737840	2549	本研究
FACHB-1370	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	湖北北湖	浮游	ON622735	ON737843	754	本研究
FACHB-1371	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	江苏尚湖	浮游	ON623017	ON737844	2273	[22]
FACHB-1372	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	安徽巢湖	浮游	ON622736	ON737845	1741	[7]
FACHB-1374	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	江苏尚湖	浮游	ON622737	ON737846	2537	[19]
FACHB-1378	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	江苏尚湖	浮游	ON622738	ON737849	2268	本研究
FACHB-1380	*Planktothrix* sp.	*Planktothricoides raciborskii*	江苏尚湖	浮游	ON622739	ON737850	2283	本研究
FACHB-722	*Lyngbya* sp.	*Aerosakkonema funiforme*	安徽太平湖	浮游	ON623012	MW788980[14]	51	[14]
FACHB-1358	*Planktothrix* sp.	*Aerosakkonema funiforme*	湖北龙感湖	浮游	ON622726	ON737839	54	本研究
FACHB-1362	*Oscillatoria* sp.	*Aerosakkonema funiforme*	湖北陆水水库	浮游	ON622727	ON737841	66	本研究
FACHB-1363	*Planktothrix* sp.	*Aerosakkonema funiforme*	湖北龙感湖	浮游	ON622728	ON737842	31	本研究
FACHB-1375	*Planktothrix* sp.	*Aerosakkonema funiforme*	安徽巢湖	浮游	ON622729	ON737848	67	[14, 18]
FACHB-1377	*Planktothrix* sp.	*Aerosakkonema funiforme*	湖北龙感湖	浮游	ON622730	ON737847	56	本研究
FACHB-1277	*Pseudanabaena* sp.	*Pseudanabaena cinerea*	湖北熊河水库	浮游	ON622740	ON737838	37	[1, 14, 17, 21, 23]
FACHB-3557	*Pseudanabaena cinerea*		湖北保安湖	浮游	ON622741	ON737854	18	本研究
FACHB-3558	*Pseudanabaena cinerea*		上海水库	浮游	ON622742	ON737855	23	本研究
FACHB-3559	*Pseudanabaena cinerea*		上海水库	浮游	ON622743	ON737856	7	本研究
FACHB-3560	*Pseudanabaena cinerea*		上海水库	浮游	ON622744	ON737857	10	本研究
FACHB-278	*Oscillatoria-lutea* var. *contorta*		英国剑桥水沟	底栖	ON623015	ON737852	6	本研究
FACHB-3561	*Microcoleus* sp.		成都文物土遗址	土壤	ON622732	ON737859	327	本研究
FACHB-867	*Oscillatoria* sp.	*Desertifilum tharense*	四川成都	土壤	ON622731	ON737858	18	本研究
FACHB-2717	*Phormidium* sp.	*Sodalinema* sp.	山西运城盐池	盐湖底栖	ON623020	ON737853	10	本研究

至250℃, 保持2min; 传输线的温度为280℃; 离子源的温度为230℃; 电子能量为70 eV。将特征离子m/z 95作为2-MIB的定量离子, 特征离子m/z 135作为2-MIB的监控离子; 最后根据标准品进行定性与定量。

2 结果

2.1 藻株形态和分子特征

(1) 拉氏拟浮丝藻 *Planktothricoides raciborskii* (Wołoszyńska) Suda & Watanabe (图 1)

形态描述: 植物体为单生丝状体, 自由漂浮, 藻丝直或略弯曲, 不具鞘, 可颤动, 蓝绿色或黄绿色。横壁不收缢或收缢不明显, 藻丝末端尖细或略尖细、直或略弯曲, 不具帽状结构、异形胞和厚壁孢子。细胞柱状, 具气囊, 长2.6—6.0 μm, 宽7.2—11.4 μm, 长小于宽, 长宽比为0.4—0.6。

分类地位: 隶属于颤藻目、微鞘藻科、拟浮丝藻属, 是该属的模式物种。

库藏藻株: FACHB-1243, 1261, 1360, 1370, 1371, 1372, 1374, 1378和1380。

序列比较: 在序列分析中, FACHB库藏藻株与拉氏拟浮丝藻藻株间16S rRNA基因序列相似度为99.1%—100%, 这进一步支持了我们形态鉴定的结果。

(2) 索状气丝藻 *Aerosakkonema funiforme* Thu & Watanabe (图 2A—E)

形态描述: 植物体为单生丝状体或形成松散群体, 自由漂浮, 藻丝直或略弯曲, 偶尔扭曲成一束, 可旋转滑动, 蓝绿色或橄榄绿色。横壁不收缢或略收缢, 藻丝末端不尖细, 无帽状结构。气囊小, 分散在细胞内部, 不具伪分枝、异形胞和厚壁孢子。细胞盘状, 长2.5—3.8 μm, 宽10.7—15.8 μm, 长宽比0.2—0.4。

分类地位: 隶属于颤藻目、颤藻科、气丝藻属, 是该属的模式物种。

库藏藻株: FACHB-722, 1358, 1362, 1363, 1375和1377。

序列比较: FACHB库藏藻株与索状气丝藻藻株(Lao26和ACKU621)间的16S rRNA基因序列相似度为99.9%—100%, 这进一步支持了我们形态鉴定的结果。

(3) 灰假鱼腥藻 *Pseudanabaena cinerea* Tuji & Niiyama (图 2F—J)

形态描述: 植物体为单生丝状体, 自由漂浮, 藻丝直, 棕色至暗紫色, 横壁收缢明显, 不具鞘。末端不尖细, 无帽状结构。细胞柱状, 灰色至棕色, 末端具气囊, 长2.5—8.9 μm, 宽2.0—2.8 μm, 长宽比1.2—4.6。

分类地位: 隶属于聚球藻目、假鱼腥藻科、假鱼腥藻属。

库藏藻株: FACHB-1277, 3557, 3558, 3559和3560。

序列比较: 在序列分析中, FACHB库藏藻株与灰假鱼腥藻藻株NIES-4063和NIES-4065间的16S rRNA基因序列相似度99.7%—100%, 这进一步支持了我们形态鉴定的结果。FACHB库藏灰假鱼腥藻藻株与*P. catenata*、*P. galeata*、*P. limnetica*、*P.*

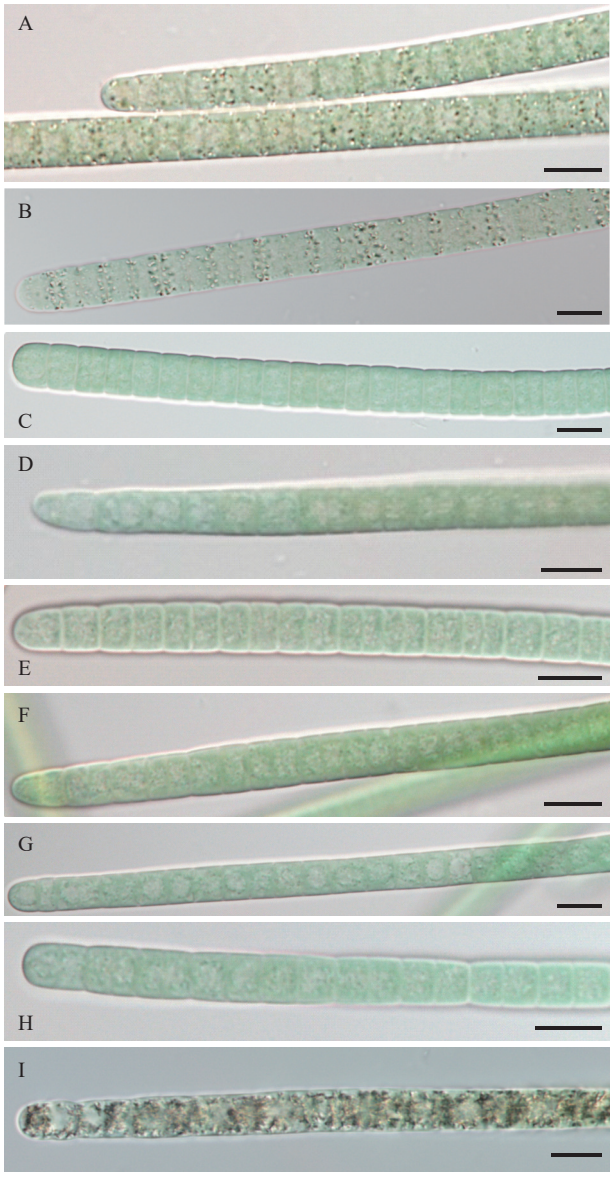

图 1 库藏拉氏拟浮丝藻藻株显微照片

Fig. 1 Micrographs of *Planktothricoides raciborskii* strains in FACHB

A. FACHB-1243; B. FACHB-1261; C. FACHB-1360; D. FACHB-1370; E. FACHB-1371; F. FACHB-1372; G. FACHB-1374; H. FACHB-1378; I. FACHB-1380; 标尺Scale bars, 10 μm

mucicola、*P. yagii*和*P. foetida* var. *intermedia*等其他假鱼腥藻属物种的16S rRNA基因序列相似度为95.1%—96.3%。

(4) 黄颤藻扭曲变种 *Oscillatoria lutea* var. *contorta* Baker et Bold (图 3A)

形态描述: 植物体在液体培养基中为多数藻丝形成的块状漂浮群体, 藻丝直或弯曲, 不具鞘, 可颤动, 蓝绿色或黄绿色。横壁不收缢, 藻丝末端略尖细, 不具帽状结构、异形胞和厚壁孢子。细胞柱状, 具气囊, 长4.2—8.0 μm, 宽3.5—4.2 μm, 长宽比1.0—1.6。

分类地位: 隶属于颤藻目、颤藻科、颤藻属。

库藏藻株: FACHB-278。

序列比较: FACHB-278藻株的16S rRNA基因序列与*O. lutea* SAG 1459-3(KM019965)藻株一致。该藻株在国际上多个藻种库均有保藏, 其与CCAP 1459/3、UTEX LB 390和SAG 1459-3为相同的藻株。

(5) 微鞘藻 *Microcoleus* sp. (图 3B)

形态描述: 植物体为多数藻丝形成的垫状群体, 生长在土壤表面, 藻丝直或弯曲, 不分枝, 具鞘, 黄棕色至褐色。鞘坚固、无色, 末端通常开放, 常仅含1根藻丝。横壁不收缢, 藻丝末端钝圆、不尖细, 不具帽状结构、异形胞和厚壁孢子。细胞盘状, 不具气囊, 长3.2—5.0 μm, 宽6.2—9.8 μm, 长宽比0.35—0.55。

分类地位: 隶属于颤藻目、微鞘藻科、微鞘藻属。

库藏藻株: FACHB-3561。

序列比较: 在序列分析中, FACHB-3561藻株与

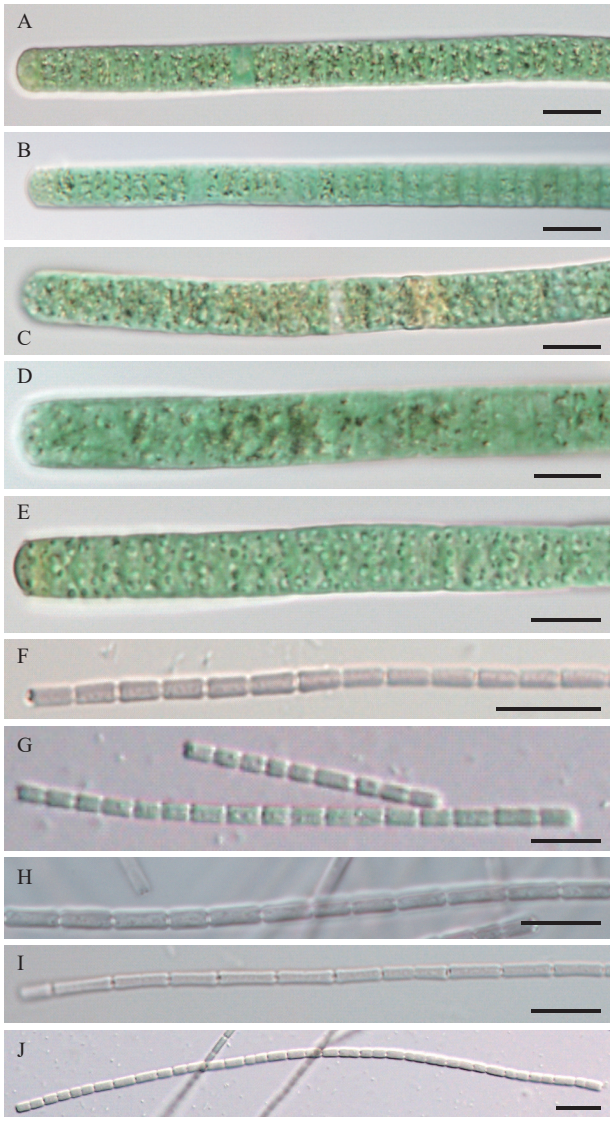

图 2　库藏索状气丝藻和灰假鱼腥藻藻株显微照片

Fig. 2　Micrographs of *Aerosakkonema funiforme* and *Pseudanabaena cinerea* strains in FACHB

索状气丝藻: A. FACHB-1358; B. FACHB-1362; C. FACHB-1363; D. FACHB-1375; E. FACHB-1377;灰假鱼腥藻: F. FACHB-1277; G. FACHB-3557; H. FACHB-3558; I. FACHB-3559; J. FACHB-3560; 标尺, 10 μm

A. funiforme: A. FACHB-1358; B. FACHB-1362; C. FACHB-1363; D. FACHB-1375; E. FACHB-1377; *P. cinerea*: F. FACHB-1277; G. FACHB-3557; H. FACHB-3558; I. FACHB-3559; J. FACHB-3560; Scale bars, 10 μm

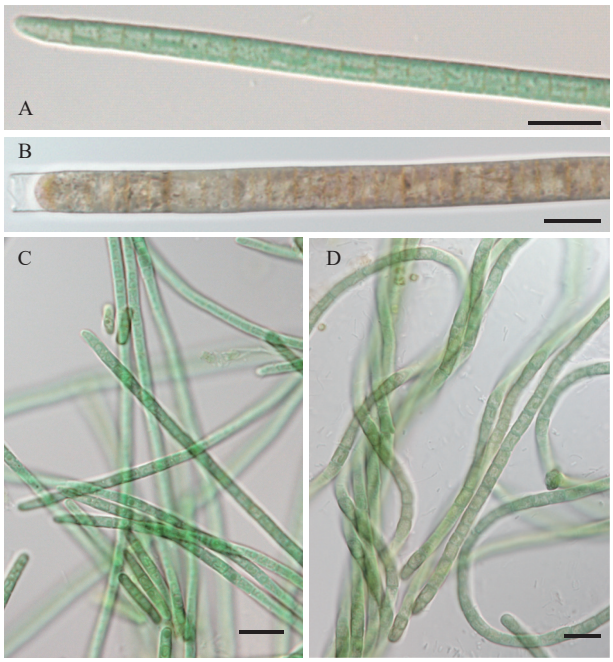

图 3　库藏黄颤藻扭曲变种FACHB-278(A)、微鞘藻FACHB-3561(B)、塔尔沙丝藻FACHB-867(C)和苏打丝藻FACHB-2717(D) 藻株显微照片(标尺, 10 μm)

Fig. 3　Micrographs of FACHB strains of *Oscillatoria lutea* var. *contorta* FACHB-278(A), *Microcoleus* sp. FACHB-3561(B), *Desertifilum tharense* FACHB-867(C) and *Sodalinema* sp. FACHB-2717(D) (Scale bars, 10 μm)

微鞘藻属藻株的16S rRNA基因序列相似度为94.6%—98.7%, 与已报道产2-MIB的伪秋微鞘藻(*M. pseudautumnalis*)藻株AK1609基因序列相似度为98.3%。

(6) 塔尔沙丝藻 *Desertifilum tharense* Dadheech & Krienitz (图 3C)

形态描述: 植物体在液体培养基中为多数藻丝形成的片状漂浮群体, 藻丝常弯曲, 具薄鞘, 蓝绿色。横壁略收缢, 藻丝末端尖细, 不具帽状结构、异形胞和厚壁孢子。细胞柱状, 长3.0—6.2 μm, 宽2.2—2.9 μm, 长宽比为1.2—2.1。

分类地位: 隶属于颤藻目、沙丝藻科、沙丝藻属, 是该属的模式物种。

库藏藻株: FACHB-867。

序列比较: FACHB-867藻株与GenBank 中沙丝藻属的16S rRNA基因序列相似度在96.0%—100%, 其中与塔尔沙丝藻PD2001/TDC4和盐碱沙丝藻(*D. salkalinema*)CHAB7200藻株序列相似度都超过了99.9%。与盐碱沙丝藻相比, FACHB-867藻株在形态上与塔尔沙丝藻更为相似, 如文献报道塔尔沙丝藻细胞比盐碱沙丝藻(前者均值2.75 μm, 后者均值2.08 μm)宽且长宽比小于盐碱沙丝藻(前者均值1.48, 后者均值2.2)[32]。他们在生境上也有明显差异: 我们的藻株与塔尔沙丝藻模式株都生活在土壤表面, 而盐碱沙丝藻发现于盐碱水体[32]。因此, 我们认为FACHB-867应是塔尔沙丝藻。

(7) 苏打丝藻 *Sodalinema* sp. (图 3D)

形态描述: 植物体在液体培养基中为多数藻丝形成的片状漂浮群体, 藻丝常弯曲, 偶尔扭曲成一束, 具薄鞘, 分泌大量胶质, 蓝绿色或橄榄绿色。横壁收缢明显, 藻丝末端钝圆、不尖细, 不具帽状结构、异形胞和厚壁孢子。细胞柱状, 长2.5—6.5 μm, 宽2.8—3.2 μm, 长宽比1.0—2.2。

分类地位: 隶属于颤藻目、微鞘藻科、苏打丝藻属。

库藏藻株: FACHB-2717。

序列比较: 在序列分析中, 藻株FACHB-2717与苏打丝藻属藻株的16S rRNA基因序列相似度为99.4%—99.9%。

2.2 基于16S rRNA基因的分子系统发育分析

以*Gloeobacter violaceus* PCC 7421(NR_074282)为外类群, 搜集蓝藻的相同基因序列, 构建基于16S rRNA基因的系统发育树。在16S rRNA基因序列矩阵中, 含有77个长度为1023 bp 的序列, 共有261个可变位点(Variable site)和235个可供简约分析的信息位点(Parsimony-informative site)。基于ML法和贝叶斯法构建的系统发育树均获得相似的拓扑结构, 图 4显示基于ML法构建的系统发育树。16S rRNA基因系统发育研究显示本研究所用的FACHB库藏产2-MIB蓝藻位于7个不同分支上。FACHB-1243、1261、1360、1370、1371、1372、1374、1378和1380位于拟浮丝藻属分支, FACHB-722、1358、1362、1363、1375和1377位于气丝藻属分支, FACHB-2717位于苏打丝藻属分支, FACHB-867位于沙丝藻属分支, FACHB-3561位于微鞘藻属分支, FACHB-1277、3557、3558、3559和3560位于假鱼腥藻属分支(图 4)。黄颤藻扭曲变种FACHB-278与一些颤藻属、席藻属和*Kamptonema*等类群藻株亲缘关系密切。

2.3 产嗅基因检测和基于*mic*基因的系统发育分析

以2-MIB环化酶(*mic*)基因为扩增目标进行PCR扩增, 在24株库藏蓝藻中均发现*mic*基因, 对*mic*基因进一步测序分析。以放线菌*Amycolatopsis* sp. CA-230715 (CP059997)为外类群, 搜集蓝藻的相同基因序列, 构建基于*mic*基因的系统发育树。在*mic*基因序列矩阵中, 含有50个长度为636 bp 的序列, 共有285个可变位点(Variable site)和155个可供简约分析的信息位点(Parsimony-informative site)。基于ML法和贝叶斯法构建的系统发育树均获得相似的拓扑结构, 图 5显示基于ML法构建的系统发育树。*mic*基因系统发育研究显示产2-MIB的蓝藻可以分为5个分支。所有产2-MIB的拉氏拟浮丝藻、索状气丝藻、2株颤藻(FACHB-1120和FACHB-278)、鞘丝藻(*Lyngbya* sp.)FACHB-722、塔尔沙丝藻FACHB-867、席藻状织线藻(*Plectonema phormidiodes*)FACHB-200、苏打丝藻FACHB-2717及球状蓝藻聚球藻(*Synechococcus* sp.)FACHB-1061聚成了一个具有高度支持的大分支Clade I(BP/PP=1.00/0.98)。微鞘藻FACHB-3561单独形成一分支Clade Ⅱ, 与分支Clade I形成姐妹类群。而伪秋微鞘藻Ak1609藻株与泥生颤藻(*Oscillatoria limosa*) LBD 305b藻株聚在一起形成一个分支Clade Ⅲ。所有产2-MIB的假鱼腥藻聚在一起形成具有高度支持的分支Clade Ⅳ(BP/PP=1.00/1.00)。分支Calde V由*Leptolyngbya* sp. A2(KP013063)、*Oscillatoria* sp. 327/2(KJ658377)和*O. prolifera* OpAlghanmi-77(MK759878)组成, 位于产2-MIB蓝藻的基部位置。在我们遗传距离矩阵分析中, 各分支内藻株间*mic*基因序列相似性分别为97.6%—100%(Clade I分支)、99.0%(Clade Ⅲ分支)、92.1%—100%(Clade Ⅳ分支)和93.5%—98.6%(Calde V分支)。各分支间的*mic*基因遗传距离范围p=0.039—0.173。

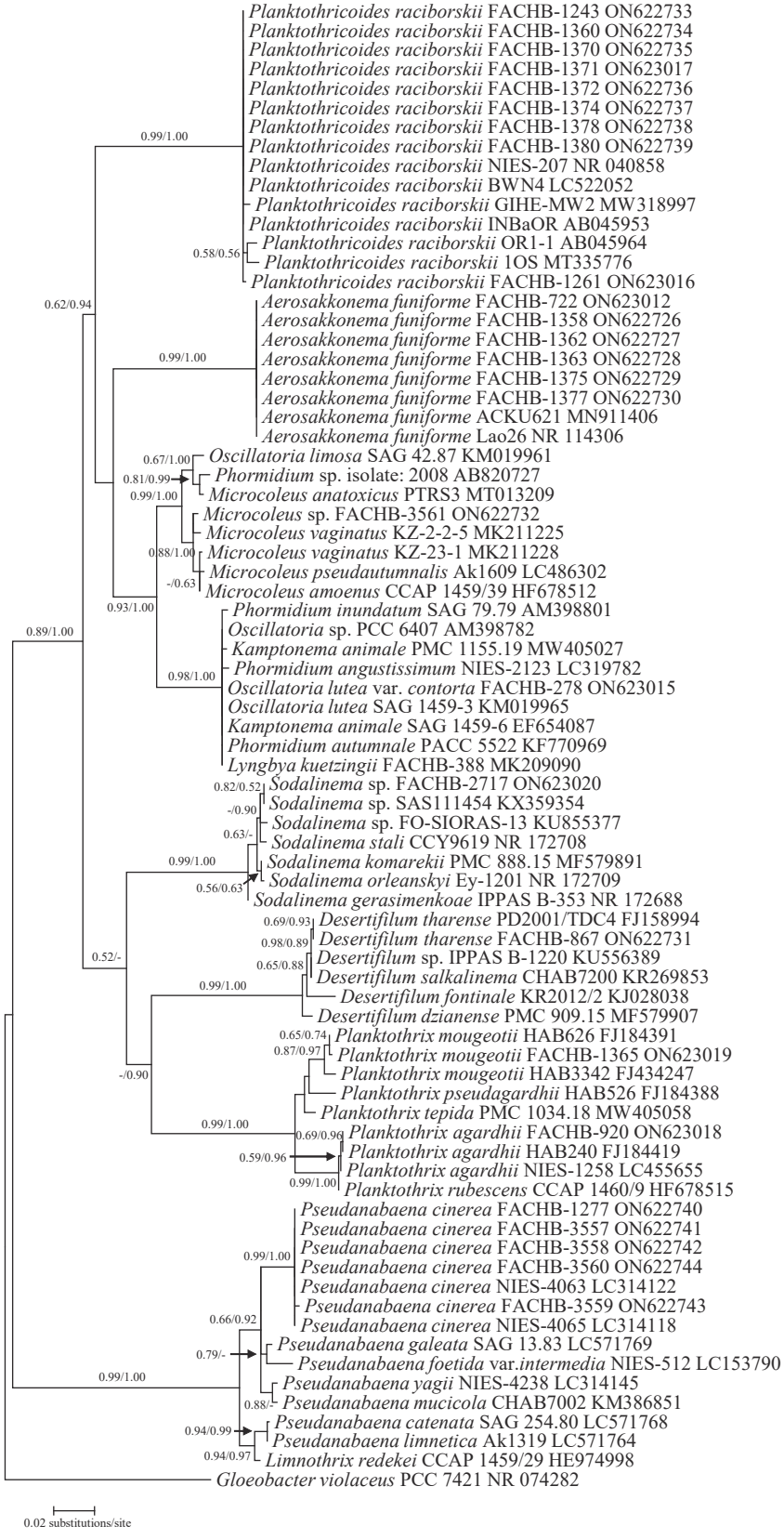

图 4　基于蓝藻16S rRNA基因序列构建的最大似然树

Fig. 4　Maximum-likelihood tree based on 16S rRNA gene from cyanobacteria

节点上的数值代表分别用最大似然法和贝叶斯法所得当前进化枝的自展支持(BP)和后验概率(PP), 仅显示高于0.50的支持值

The numbers on the nodes indicate the bootstrap support values (BP)/posterior probabilities (PP) based on Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Only values>0.50 for BP or PP are shown

2.4 产2-MIB特性

通过测定藻细胞密度和藻液中总2-MIB的含量, 获得单个藻细胞总2-MIB的含量, 分析不同藻株生成2-MIB 嗅味物质情况。本研究检测到含*mic*基因的这些库藏蓝藻均可以产生2-MIB嗅味物质。不同库藏藻株间单个藻细胞总2-MIB的含量差异较大, 其含量6—2549 fg/cell(表 1)。

3 讨论

3.1 库藏产MIB蓝藻物种的种类

尽管2-MIB最初是在放线菌被中发现, 但研究表明丝状蓝藻是饮用水源中更为重要的产生来源[14]。

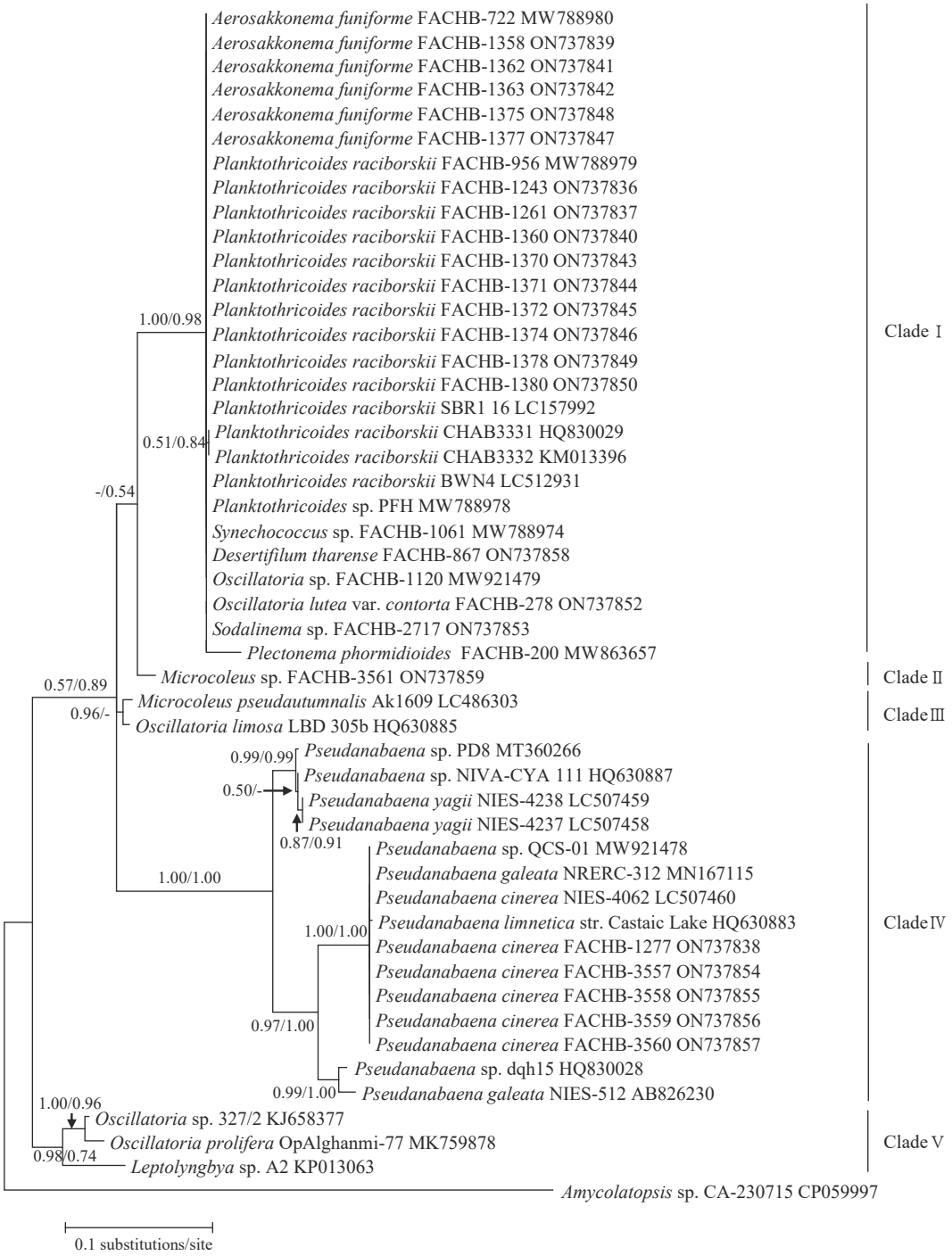

图 5 基于蓝藻*mic*基因序列构建的最大似然树

Fig. 5 Maximum-likelihood tree based on *mic* gene from cyanobacteria

节点上的数值代表分别用最大似然法和贝叶斯法所得当前进化枝的自展支持(BP)和后验概率(PP), 仅显示高于0.50的支持值

The numbers on the nodes indicate the bootstrap support values (BP)/posterior probabilities (PP) based on Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Only values>0.50 for BP or PP are shown

据报道, 这些产嗅蓝藻大部分属于颤藻目和聚球藻目, 主要包括了颤藻属、假鱼腥藻属、浮丝藻属、拟浮丝藻属、席藻属、鞘丝藻属、聚球藻属、细鞘丝藻属(*Leptolyngbya*)、贾丝藻属(*Jaaginema*)、*Limnoraphis*、*Kamptonema*和*Nodosilinea*等类群[8]。结合前人的文献报道, 目前共发现有31株FACHB库藏蓝藻可产2-MIB, 主要类群包括了颤藻目的拟浮丝藻属、气丝藻属、微鞘藻属、鞘丝藻属、颤藻属、沙丝藻属、苏打丝藻属, 聚球藻目的聚球藻属和假鱼腥藻属等。

Anagnostidis和Komárek[33]对颤藻属重新进行了划分, 将浮游种类多数划归到新建立的浮丝藻属, 其模式种为阿氏浮丝藻。文献报道浮丝藻是一种在我国水域中普遍存在可以引起水华的蓝藻, 其代谢可生成2-MIB[5, 7, 14, 18, 19, 22, 34]。近年来随着蓝藻分类学的发展, 发现和建立了一些浮游性颤藻新类群。如表 1所示, 我们对文献中报道的一些产2-MIB的浮丝藻物种重新检查后发现这些藻株并不是真正的浮丝藻。在对FACHB早期鉴定为浮丝藻的藻株进行全面复核后, 进一步发现绝大多数这些产2-MIB的藻株应当被重新鉴定为拉氏拟浮丝藻或索状气丝藻。阿氏浮丝藻经常出现在湖泊、河流的生态调查报告中, 但我们没有在库藏阿氏浮丝藻藻株(如FACHB-920)中检测到2-MIB。

2002年, Suda等[35]依据形态、脂肪酸成分和16S rRNA基因序列等特征从浮丝藻属划分出拟浮丝藻属。研究发现, 拉氏拟浮丝藻广泛分布于日本、东南亚、澳洲和非洲等水体, 生长温度20—30℃, 甚至可耐受40℃高温[35]。2008年, 吴忠兴等[36]首次在北京、福建福州、广东中山、湖北梁子湖、武汉东湖和南湖、云南滇池、浙江杭州和绍兴等地调查中发现大量拉氏拟浮丝藻。拉氏拟浮丝藻常出现于中营养型或富营养型水体中, 春末直至秋末最盛, 可单独形成水华, 或与伴随其他水华种类如阿氏浮丝藻出现。由于其大量生长会导致饮用水水源产生嗅味物质, 可生成2-MIB的拟浮丝藻越来越受到重视[37]。通过形态特征和16S rRNA序列的物种鉴定复核, 发现FACHB库藏产2-MIB藻株中原定名为“浮丝藻”的藻株中FACHB-1243、1261、1360、1370、1371、1372、1374、1378和1380应为拉氏拟浮丝藻。我们发现这些从安徽巢湖、江苏太湖和湖北北湖等地分离的FACHB库藏拉氏拟浮丝藻均可产生2-MIB。基于16S rRNA基因的系统发育分析支持包括FACHB库藏藻株在内的拟浮丝藻都能很好地聚在一起。

依据形态、脂肪酸成分、16S rDNA序列及细胞内气囊结构GvpA蛋白质序列等特征, Thu等[38]2012年建立了1个浮游性淡水颤藻新属即气丝藻属, 并将从老挝Nam Ngum 水库分离的藻株命名为索状气丝藻。2014年, 李守淳等[39]首次在国内鄱阳湖发现并报道了该物种, 并认为目前已知气丝藻属藻种主要分布在亚洲, 可以形成水华; 然而尽管在鄱阳湖水体中索状气丝藻在全湖的敞水区域都有分布, 但并未见其水华现象。通过形态特征和16S rRNA基因序列的物种鉴定复核, 发现FACHB库藏产2-MIB藻株中原定名为“浮丝藻”的藻株中FACHB-1358、1363、1375、1377及鞘丝藻FACHB-722和颤藻FACHB-1362均为索状气丝藻。这些从安徽巢湖、湖北陆水水库和龙感湖等地分离到的气丝藻藻株均可产2-MIB, 这是首次报道气丝藻可产2-MIB。

假鱼腥藻属是一类不具分枝和异形胞的丝状蓝藻, 在全球广泛分布[40]。近年来, 假鱼腥藻在国内广东、浙江、上海、河北、山东的一些淡水水体中成为优势类群[41—44]。研究发现, 假鱼腥藻具有广泛的温度适应性, 可适应4—35℃温度范围, 最适生长温度在20—30℃, 喜好低光、不耐受高光强环境, 对磷缺乏的环境具有较强耐受性[44]。假鱼腥藻在饮用水源地中大量繁殖而造成2-MIB引起嗅味问题越来越受到关注。例如, 近年来青草沙水库作为上海市重要的饮用水水源地由于假鱼腥藻的大量繁殖导致水体中2-MIB 浓度超过300 ng/L[45]。2018年, Tuji和Niiyama[46]分别从日本Serikawa水库及Ogawara和Biwa湖发现了2个可产生2-MIB 的假鱼腥藻属新物种, 即灰假鱼腥藻和*P. yagii*。此外, 他们发现*P. foetida* v. *foetida*、*P. foetida* v. *intermedia*和*P. foetida* v. *subfoetida*也可以产生2-MIB。我们发现从上海水库、湖北熊河水库和湖北保安湖等地分离的FACHB库藏灰假鱼腥藻均可产生2-MIB。从日本和我国不同地点分离到的灰假鱼腥藻具有高度的16S rRNA和*mic*基因序列相似性, 在16S rRNA和*mic*基因系统发育分析中能够聚在形成一个亚支。

颤藻属也是2-MIB的一个重要来源, 有研究报道泥生颤藻、弯曲颤藻(*O. curviceps*)、弱细颤藻(*O. tenuis*)、*O. tenuis* v. *levis*和*O. kawamurae*等种类可以产生2-MIB[8, 47—49]。这些产2-MIB的颤藻常为湖泊、水库或池塘的水生底栖类群, 美国、日本和中国等地报道了其大量繁殖导致嗅味事件。黄颤藻扭曲变种藻株FACHB-278是Pringsheim在1941年从英国剑桥的一个水沟中分离的, 同时被保藏在多个藻种库(如英国CCAP 1459/3 、美国UTEX

LB 390、德国SAG 1459-3)。我们研究发现该藻株也可以产生2-MIB。此外, Yuan等[20]报道库氏鞘丝藻(*Lyngbya kuetzingii*)FACHB-388也可产2-MIB。FACHB-388是一株从国外获得的藻株, 其产地和生境信息不明, 在国外藻种库也有保藏(如美国UTEX 1547)。16S rRNA系统发育分析表明FACHB-388与FACHB-278亲缘关系密切。但是, 通常认为颤藻属和鞘丝藻属亲缘关系较远, 因此未来需要对该藻株的分类鉴定进一步复核。

微鞘藻是一类席藻状的丝状蓝藻, 多数为水生底栖和陆生土壤种类, 少数种类生活在河流、沼泽甚至海洋环境。2019年, Niiyama和Tuji[50]从日本茨城县Naka-numa池塘中发现了一个浮游性的微鞘藻新物种伪秋微鞘藻, 进一步研究发现该物种可产2-MIB和土臭素, 这也是首次在微鞘藻属中发现可产2-MIB的种类。FACHB-3561是作者从四川成都文物遗址土壤表面分离得到的, 是国内首次报道可产2-MIB的微鞘藻藻株。

基于形态特征和16S rRNA 分子证据, Dadheech和Krienitz[51]建立了1个颤藻目新属即沙丝藻属, 其模式种塔尔沙丝藻发现于印度西部干旱的塔尔沙漠生物结皮中。尽管该属最初是在沙漠结皮中发现的, 后来研究发现其具有更广泛的生境分布, 如泉生沙丝藻(*D. fontinales*)发现于东非一个温泉中[52], 而盐碱沙丝藻发现于国内浙江的一个螺旋藻培养池中[32]。塔尔沙丝藻FACHB-867是一株从四川成都土壤中分离到的丝状蓝藻, 本研究首次报道了沙丝藻属种类可产生2-MIB。

苏打丝藻最初是从盐碱湖泊中发现一类颤藻目丝状蓝藻, 后来研究发现一些海洋盖丝藻(*Geitlerinema*)种类应当划入到苏打丝藻属[53]。FACHB-2717是从山西运城盐池分离到的一株苏打丝藻, 本研究首次报道了苏打丝藻种类可产生2-MIB。

3.2 *mic*基因进化分析

蓝藻的2-MIB合成相关基因与放线菌的基因高度同源, 这表明了蓝藻和放线菌中的2-MIB生物合成(和相关基因)可能具有共同的起源, 但2-MIB相关基因在蓝藻和放线菌中的排列顺序不同可能在进化过程中发生了基因重组事件[11]。已有的研究均表明2-MIB相关基因可以分为放线菌和蓝细菌为代表的两大分支, 蓝藻中所有产2-MIB基因可能有一个共同的起源[11]。有研究推测2-MIB合成基因的水平基因转移广泛存在, 不仅可以发生在不同的微生物类群间(例如在细菌*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1菌株中也发现*mic*基因)[11], 也可以发生在同一种生物内部, 例如对产2-MIB与不产2-MIB的拟浮丝藻藻株比较后认为水平基因转移可能是影响产2-MIB拟浮丝藻藻株分布的重要原因[54]。我们的研究发现基于16S rRNA基因和*mic*基因的系统发育树的拓扑结构并不是总是一致的, 这表明蓝藻获得*mic*基因可能经历了共进化和水平基因转移共同作用。*mic*基因具有相对保守性, 这为开发快速定量检测蓝藻产2-MIB嗅味的定量实时PCR(qPCR)方法提供了基础。

3.3 产2-MIB特性分析

本研究发现从安徽巢湖、江苏太湖和湖北北湖等地分离到的FACHB库藏拉氏拟浮丝藻藻株均可产生2-MIB, 其2-MIB含量754—2549 fg/cell。成建国等[7]研究了不同温度(15—30℃)、光照(1000—4000 lx)和营养盐(BG11营养盐浓度20%—100%)对FACHB-1372产2-MIB特性的影响, 发现在30℃温度实验条件下总2-MIB 生成量和胞外2-MIB分泌量最高时分别可达3.64×10^3和2.78×10^3 ng/L, 并认为温度对藻株生长密度、总2-MIB生成量及胞外2-MIB分泌量影响最显著而光照对藻株生长及产嗅味物质影响较小。另外, 有研究发现使用Photo-Biobox连续培养FACHB-1374时在0.10—0.33/d不同稀释率下单个细胞的胞外2-MIB含量保持恒定(约为400 pg/cell), 且磷限制条件下该藻株2-MIB产率下降[19]。我们所测得的FACHB-1374藻株2-MIB含量(2537 fg/cell) 低于Oh等[19]报道的含量, 这可能与藻株的培养条件和培养状态等有关。

从国内安徽巢湖、湖北陆水水库和龙感湖等地分离的库藏索状气丝藻藻株亦都可产生2-MIB, 其2-MIB含量为31—67 fg/cell。Jia等[18]采用250 mL组织培养瓶培养藻液100 mL在温度25℃、光暗周期12h/12h培养条件下研究了不同光照强度[5—250 μmol photons/(m^2 ·s)]对FACHB-1375产2-MIB特性的影响, 发现单个细胞2-MIB含量在0.25—1.6 pg/cell, 其中在85 μmol photons/(m^2 ·s)光照下2-MIB浓度和单个细胞2-MIB含量达到最大, 分别为1300 μg/L和1.6 pg/cell。我们所测得FACHB-1375藻株2-MIB含量为67 fg/cell, 低于Jia等[18]报道的含量, 这可能与藻株的培养条件和培养状态等有关。

库藏灰假鱼腥藻不同藻株2-MIB含量为7—37 fg/cell。Zhang等[21]研究了不同温度(15—35℃)和光照强度[10—85 μmol photons/(m^2 ·s)]对FACHB-1277产2-MIB特性的影响, 在初始转接浓度为1.30×10^6 cells/mL培养12d后发现该藻株2-MIB含量约2.2—27 fg/cell, 均值为7.76 fg/cell, 并认为温度升高有利于胞内结合的2-MIB转化为可溶性2-MIB而光照增加刺激可溶的胞内2-MIB释放到环境中。我们所测

FACHB-1277藻株单个细胞2-MIB含量(37 fg/cell)略高于Zhang等[21]的报道。另外, 有研究将从宁波东钱湖分离的产2-MIB的假鱼腥藻dqh15和从昆明滇池分离的产土臭素的乌克兰鱼腥藻(*Anabaena ucrainica*)混合培养, 设置不同温度(10—35℃)和光照[10—60 μmol photons/(m^2·s)]实验条件, 在培养16d期间2-MIB含量分别为100—380和140—453 ng/μg Chl. *a*, 并发现在高温和高光条件下MIB产量最高且在生长受到抑制的温度和光照条件下释放到胞外的2-MIB比例更高[5, 55]。

本研究所测底栖黄颤藻扭曲变种FACHB-278藻株2-MIB含量为6 fg/cell。在颤藻属类群中, Izaguirre和Taylor[48]在美国加州一个饮用水水库中发现由底栖泥生颤藻和*Oscillatoria* cf. *curviceps*引起的2-MIB嗅味问题, 其表层水和底层水中2-MIB的含量分别可达到72和170 μg/L。

研究表明, 不同物种间, 甚至是同一物种不同藻株间, 其产2-MIB的能力都是有差异的。不同物种间单个藻细胞总2-MIB的含量差异明显, 如拉氏浮丝藻>索状气丝藻>灰假鱼腥藻, 且这些种类间的2-MIB含量差异通常高于同一物种内不同藻株间的2-MIB含量差异。我们所测一些藻株单个细胞2-MIB含量与文献报道有差异, 可能是由于藻株的培养条件、培养状态等环境因素的差异导致的。蓝藻合成的2-MIB有一部分溶解在细胞内部, 另一部分释放到胞外的环境中。本研究只考虑了蓝藻单个藻细胞产2-MIB的总量, 不同藻种胞外2-MIB含量的比例是有差异的, 因此未来应当进一步测定胞内和胞外2-MIB含量的比例。

本研究从FACHB库藏藻株中检测出许多可产2-MIB的丝状蓝藻, 对这些蓝藻重新进行准确的物种鉴定, 发现拟浮丝藻、气丝藻和假鱼腥藻可能是国内许多湖泊和水库中2-MIB的重要贡献者。但是, 浮丝藻、拟浮丝藻和气丝藻等丝状蓝藻形态特征非常相似, 对其准确的形态鉴定依赖于技术人员的经验和专业知识, 因此经常造成鉴定混淆或错误, 亟须建立一个2-MIB产嗅藻识别的分子方法[14]。我们发现产2-MIB不同物种的产嗅能力有明显差异, 尽管没有考虑不同培养条件和培养状态等对蓝藻产2-MIB能力的影响, 但可以从产2-MIB蓝藻的种类和数量等数据大致估算出2-MIB含量。本研究不仅筛选出FACHB库藏产2-MIB蓝藻藻株活体, 还提供了相关藻株的分类鉴定、生境、分子序列和产2-MIB特性等基础数据, 为进一步研究产2-MIB蓝藻生理生态特性提供重要的实验材料和科学依据。

致谢:

感谢中国科学院生态环境研究中心环境微生物技术研究组提供上海水库水样用于实验。

参考文献:

[1] 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. [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.]

[2] Su M, Yu J W, Zhang J Z, *et al*. MIB-producing cyanobacteria (*Planktothrix* sp.) in a drinking water reservoir: distribution and odor producing potential [J]. *Water Research*, 2015(68): 444-453.

[3] Huang X, Gao P Y, Huang Z F, *et al*. Application and research of the detection methods for odorous substances in water reservoirs [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, **39**(10): 3503-3507. [黄鑫, 高佩玥, 黄智峰, 等. 上海水源水库产2-MIB生物总量评估方法与应用 [J]. 环境科学学报, 2019, **39**(10): 3503-3507.]

[4] State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB 5749-2022. Standards for Drinking Water Quality [S]. Beijing: Standards Press of China, 2022: 1-12. [国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 5749-2022 生活饮用水卫生标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022: 1-12.]

[5] Watson S B, Monis P, Baker P, *et al*. Biochemistry and genetics of taste- and odor-producing cyanobacteria [J]. *Harmful Algae*, 2016(54): 112-127.

[6] Tabachek J A L, Yurkowski M. Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites, geosmin, and 2-methylisoborneol, in saline lakes in Manitoba [J]. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 1976, **33**(1): 25-35.

[7] Cheng J G, Ma L T, Zhao W Y, *et al*. Environmental factors on its growth and odor production of freshwater *Planktothrix* sp. [J]. *Journal of Hydroecology*, 2022, **43**(2): 70-76. [成建国, 马力通, 赵文渊, 等. 环境因素对淡水浮丝藻生长及产生嗅味的影响 [J]. 水生态学杂志, 2022, **43**(2): 70-76.]

[8] Su M, Suruzzaman M D, Zhu Y P, *et al*. Ecological niche and in-situ control of MIB producers in source water [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2021(110): 119-128.

[9] Komatsu M, Tsuda M, Ōmura S, *et al*. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, **105**(21): 7422-7427.

[10] Giglio S, Chou W K W, Ikeda H, *et al*. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**(3): 992-998.

[11] Wang Z J, Xu Y, Shao J H, *et al*. Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in cyanobacteria: isolation, characterization, and expression in response to light [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(4): e18665.

[12] Kakimoto M, Ishikawa T, Miyagi A, *et al*. Culture temperature affects gene expression and metabolic pathways in the 2-methylisoborneol-producing cyanobacterium *Pseudanabaena galeata* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, **171**(3/4): 292-300.

[13] 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.

[14] Suruzzaman M, Cao T X, Lu J P, *et al*. Evaluation of the MIB-producing potential based on real-time qPCR in drinking water reservoirs [J]. *Environmental Research*, 2022(204): 112308.

[15] Devi A, Chiu Y T, Hsueh H T, *et al*. Quantitative PCR based detection system for cyanobacterial geosmin/2-methylisoborneol (2-MIB) events in drinking water sources: current status and challenges [J]. *Water Research*, 2021(188): 116478.

[16] Song L R, Zhang Q, Zheng L L, *et al*. Microalgal culture collection: fundamental platform for algal research and industrial development [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 1020-1027. [宋立荣, 张琪, 郑凌凌, 等. 微藻种质资源库——藻类科学研究和产业发展的重要平台 [J]. 水生生物学报, 2020, **44**(5): 1020-1027.]

[17] Li L, Zhu C W, Xie C Q, *et al*. Kinetics and mechanism of *Pseudoanabaena* cell inactivation, 2-MIB release and degradation under exposure of ozone, chlorine and permanganate [J]. *Water Research*, 2018(147): 422-428.

[18] Jia Z Y, Su M, Liu T T, *et al*. Light as a possible regulator of MIB-producing *Planktothrix* in source water reservoir, mechanism and in-situ verification [J]. *Harmful Algae*, 2019(88): 101658.

[19] Oh H S, Lee C S, Srivastava A, *et al*. Effects of environmental factors on cyanobacterial production of odorous compounds: geosmin and 2-methylisoborneol [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, **27**(7): 1316-1323.

[20] Yuan B L, Xu D M, Li F, *et al*. Removal efficiency and possible pathway of odor compounds (2-methylisoborneol and geosmin) by ozonation [J]. *Separation and Purification Technology*, 2013(117): 53-58.

[21] Zhang T, Zheng L L, Li L, *et al*. 2-Methylisoborneol production characteristics of *Pseudanabaena* sp. FACHB 1277 isolated from Xionghe Reservoir, China [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, **28**(6): 3353-3362.

[22] Zhang J Z, Li L W, Qiu L J, *et al*. Effects of climate change on 2-methylisoborneol production in two cyanobacterial species [J]. *Water*, 2017, **9**(11): 859.

[23] Zhang K J, Pan R J, Luo Z, *et al*. Interspecific competition between *Microcystis aeruginosa* and *Pseudanadaena* and their production of T&O compounds [J]. *Chemosphere*, 2020(252): 126509.

[24] Zhang Q, Zheng L L, Li T L, *et al*. *Vacuoliviride crystalliferum* Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida, a new record of the genus and species of Eustigmatophyceae algae from a special habitat in China [J]. *Plant Science Journal*, 2018, **36**(4): 518-523. [张琪, 郑凌凌, 李天丽, 等. 具晶泡绿藻(*Vacuoliviride crystalliferum*)——分离自特殊生境的真眼点藻纲中国新纪录属种 [J]. 植物科学学报, 2018, **36**(4): 518-523.]

[25] Zhang Q, Zheng L L, Li T L, *et al*. *Aliterella shaanxiensis* (Aliterellaceae), a new coccoid cyanobacterial species from China [J]. *Phytotaxa*, 2018, **374**(3): 211-220.

[26] Suurnäkki S, Gomez-Saez G V, Rantala-Ylinen A, *et al*. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds [J]. *Water Research*, 2015(68): 56-66.

[27] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al*. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876-4882.

[28] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016(33): 1870-1874.

[29] Darriba D, Taboada G L, Doallo R, *et al*. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nature Methods*, 2012, **9**(8): 772.

[30] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**(8): 754-755.

[31] Watson S B, Brownlee B, Satchwill T, *et al*. Quantitative analysis of trace levels of geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME [J]. *Water Research*, 2000, **34**(10): 2818-2828.

[32] Cai F F, Chen Y X, Zhu M L, *et al*. *Desertifilum salkalinema* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from an alkaline pool in China [J]. *Phytotaxa*, 2017, **292**(3): 262-270.

[33] Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales [J]. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement*, 1988, **80**(1-4): 327-472.

[34] Jüttner F, Watson S B. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007,

73(14): 4395-4406.

[35] Suda S, Watanabe M M, Otsuka S, *et al*. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002(52): 1577-1595.

[36] Wu Z X, Yu B S, Peng X, *et al*. *Planktothricoides*, a newly recorded genus of water bloom forming Cyanophyta in China [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2008, **26**(5): 461-465. [吴忠兴, 余博识, 彭欣, 等. 中国水华蓝藻的新记录属——拟浮丝藻属(*Planktothricoides*) [J]. 武汉植物学研究, 2008, **26**(5): 461-465.]

[37] Huo D, Gan N Q, Geng R Z, *et al*. Cyanobacterial blooms in China: diversity, distribution, and cyanotoxins [J]. *Harmful Algae*, 2021(109): 102106.

[38] Thu N K, Tanabe Y, Yoshida M, *et al*. *Aerosakkonema funiforme* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales), a new gas-vacuolated oscillatorioid cyanobacterium isolated from a mesotrophic reservoir [J]. *Phycologia*, 2012, **51**(6): 672-683.

[39] Li S C, Huang J, Yu G L, *et al*. *Aerosakkonema*, a newly reported genus of water bloom forming cyanobacteria in the Poyang Lake of China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(6): 1071-1075. [李守淳, 黄静, 虞功亮, 等. 鄱阳湖的中国水华蓝藻新记录属—气丝藻属 [J]. 水生生物学报, 2014, **38**(6): 1071-1075.]

[40] Yu G L, Zhu M L, Chen Y X, *et al*. Polyphasic characterization of four species of *Pseudanabaena* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from China and insights into polyphyletic divergence within the *Pseudanabaena* genus [J]. *Phytotaxa*, 2015, **192**(1): 1-12.

[41] Pan S Y, Zhao Y Y, Hu J L. Diel vertical migration of *Pseudoanabaena* sp. in Tingxia Reservoir [J]. *Modern Scientific Instruments*, 2013(3): 136-138. [潘双叶, 赵洋甬, 胡建林. 亭下水库伪鱼腥藻昼夜垂直变化初步研究 [J]. 现代科学仪器, 2013(3): 136-138.]

[42] Zhang K J, Zhang T Q, Deng Y, *et al*. Occurrence of algae and algae-related taste and odour (T&O) compounds in the Qingcaosha Reservoir, China [J]. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 2015, **64**(7): 824-831.

[43] Zhao J J, Zhang K F, Gao J S, *et al*. Characteristics of temporal and spatial distribution of *Pseudoanabaena* sp. in water transfer route of cascade reservoirs and analysis of influencing factors [J]. *Water Resources Protection*, 2016, **32**(3): 111-116. [赵静静, 张可方, 高静思, 等. 梯级水库输水线路伪鱼腥藻属时空分布特征及影响因子分析 [J]. 水资源保护, 2016, **32**(3): 111-116.]

[44] Pang Y M, Chen S H, Xu H Z, *et al*. Research progress on *Pseudanabaena* sp. and its metabolite 2-methylisoborneol (2-MIB) [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, **40**(5): 1530-1548. [庞一鸣, 陈淑华, 徐杭州, 等. 伪鱼腥藻(*Pseudanabaena* sp.)及其产生2-甲基异莰醇(2-MIB)的研究进展 [J]. 生态学杂志, 2021, **40**(5): 1530-1548.]

[45] Liu H B, Pan D, Zhu M L, *et al*. Occurrence and emergency response of 2-methylisoborneol and geosmin in a large shallow drinking water reservoir [J]. *Clean-Soil, Air, Water*, 2016(44): 63-71.

[46] Tuji A, Niiyama Y. Two new *Pseudanabaena* (Cyanobacteria, Synechococcales) species from Japan, *Pseudanabaena cinerea* and *Pseudanabaena yagii*, which produce 2-methylisoborneol [J]. *Phycological Research*, 2018, **66**(4): 291-299.

[47] Nakashima S, Yagi M. Iron forms that influence the growth and musty odor production of selected cyanobacteria [J]. *Water Science and Technology*, 1992, **25**(2): 207-216.

[48] Izaguirre G, Taylor W D. Geosmin and MIB events in a new reservoir in southern California [J]. *Water Science & Technology*, 2007, **55**(5): 9-14.

[49] Zhong F, Gao Y N, Yu T, *et al*. The management of undesirable cyanobacteria blooms in channel catfish ponds using a constructed wetland: contribution to the control of off-flavor occurrences [J]. *Water Research*, 2011, **45**(19): 6479-6488.

[50] Niiyama Y, Tuji A. *Microcoleus pseudautumnalis* sp. nov. (Cyanobacteria, Oscillatoriales) producing 2-methylisoborneol [J]. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany*, 2019, **45**(3): 93-101.

[51] Dadheech P K, Abed R M M, Mahmoud H, *et al*. Polyphasic characterization of cyanobacteria isolated from desert crusts, and the description of *Desertifilum tharense* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales) [J]. *Phycologia*, 2012, **51**(3): 260-270.

[52] Dadheech P K, Mahmoud H, Kotut K, *et al*. *Desertifilum fontinale* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from a warm spring in East Africa, based on conventional and molecular studies [J]. *Fottea*, 2014, **14**(2): 129-140.

[53] Cellamare M, Duval C, Drelin Y, *et al*. Characterization of phototrophic microorganisms and description of new cyanobacteria isolated from the saline-alkaline crater-lake Dziani Dzaha (Mayotte, Indian Ocean) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, **94**(8): 1-25.

[54] Tawong W. Diversity of the potential 2-methylisoborneol-producing genotypes in Thai strains of *Planktothricoides* (Cyanobacteria) [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2017(60): e17160567.

[55] Wang Z J, Li R H. Effects of light and temperature on the odor production of 2-methylisoborneol-producing *Pseudanabaena* sp. and geosmin-producing *Anabaena ucrainica* (cyanobacteria) [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015(58): 219-226.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 2-MIB-PRODUCING CYANOBACTERIA IN FACHB

ZHANG Qi[1], XIA Yi-Ruo[2], LI Lin[1], LI Tian-Li[1], ZHENG Ling-Ling[1] and SONG Li-Rong[1]

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology*, *Institute of Hydrobiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Odor problems in freshwater caused by 2-methylisoborneol (2-MIB) have received much attention in China recently. The odorous 2-MIB in freshwater is known to be mainly produced by a group of filamentous cyanobacteria which cause offensive taste and odor in drinking water and fish catch. From the detection of MIB synthase gene and GC/MS analyses, 24 strains of 2-MIB-producing cyanobacteria were detected in Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology (FACHB-collection), National Aquatic Biological Resource Center, the largest microalgal culture collection in China. These strains were re-identified as *Planktothricoides raciborskii* (Wołoszyńska) Suda & Watanabe, *Aerosakkonema funiforme* Thu & Watanabe, *Pseudanabaena cinerea* Tuji & Niiyama, *Oscillatoria lutea* var. *contorta* Baker et Bold, *Microcoleus* sp., *Desertifilum tharense* Dadheech & Krienitz and *Sodalinema* sp. by morphological descriptions and molecular characteristics based on the 16S rRNA gene, respectively. Most 2-MIB-producing strains of *Planktothrix* in FACHB-collection should be re-identified as *P. raciborskii* or *A. funiforme*. This was the first report of 2-MIB-producing filamentous cyanobacteria of *Aerosakkonema*, *Desertifilum* and *Sodalinema* in the world, and was also the first report of 2-MIB-producing *Microcoleus* in China. The phylogenetic analyses base on 16S rRNA gene indicated that 2-MIB-producing strains in FACHB-collection were placed on seven separated clades, which reflected true taxonomic relationships. The genera *Planktothricoides*, *Aerosakkonema*, *Pseudanabaena*, *Microcoleus*, *Desertifilum* and *Sodalinema* formed six monophyletic clades in 16S rDNA tree; however, *O. lutea* var. *contorta* was closely related to some strains of *Oscillatoria*, *Phormidium* and *Kamptonema*. The phylogenetic analyses based on *mic* gene indicated that 2-MIB-producing cyanobacteria strains formed five clades with high support values. 2-MIB-producing *P. raciborskii* and *A. funiforme* were clustered into Clade I in *mic* tree. Two 2-MIB-producing *Microcoleus* strains were placed on Clade Ⅱ and Ⅲ, respectively. All 2-MIB-producing *Pseudanabaena* strains were clustered into Clade Ⅳ. Phylogenetic topology of some 2-MIB-producing strains in *mic* tree were incongruent with the topology in 16S rDNA tree. Cell quota of 2-MIB produced by these strains may vary in a wide range, varying from 6—2549 fg/cell. Cell quota of 2-MIB varied considerably among species, such as *P. raciborskii* > *A. funiforme* > *P. cinerea*. The results provide important experimental materials and basic data on morphological, molecular, ecological and 2-MIB-producing characteristics of filamentous cyanobacteria, and contribute to understanding ecophysiological characteristics 2-MIB-producing cyanobacteria.

Key words: 2-methylisoborneol; Filamentous cyanobacteria; Odor; Morphological characteristics; *mic* gene