ĐẠI HỌC HUẾ VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGÔ THỊ DIỄM MY

XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN LOÀI VÀ KHẢ NĂNG SINH ĐỘC TỐ CYLINDROSPERMOPSIN CỦA VI KHUẨN LAM TRONG MỘT SỐ THỦY VỰC Ở ĐẮK LẮK

BỘ CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. NGUYỄN THỊ THU LIÊN 2. PGS.TS. TÔN THẤT PHÁP

HUÉ, 2023

Original Research

Population Dynamics of *Raphidiopsis raciborskii* and Cylindrospermopsin Concentration in Ea Nhai Reservoir in Dak Lak Province, Vietnam

My Thi Diem Ngo¹, Dung Manh Doan², Phap That Ton³, Thuy Thi Duong^{4,5}, Ha Manh Bui⁶*, Lien Thi Thu Nguyen¹**

 ¹Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue Province 49100, Vietnam
 ²Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, 567 Le Duan Street, Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province 63000, Vietnam
 ³Department of Biology, University of Science, Hue University, 77 Nguyen Hue, Thua Thien Hue Province 49100, Vietnam
 ⁴Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi Capital 10000, Vietnam
 ⁵Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi Capital 10000, Vietnam
 ⁶Department of Environmental Sciences, Saigon University, 273 An Duong Vuong Street,

> Received: 19 October 2021 Accepted: 14 February 2022

District 5, Ho Chi Minh City 70000, Vietnam

Abstract

Raphidiopsis raciborskii is a globally distributed bloom-forming cyanobacterium and produces toxin cylindrospermopsin (CYN), which results in public and environmental health consequences. piece of evidence To understand their blooming dynamics and to identify the environmental factors that determine their success in the tropical reservoir, a monthly monitoring program was conducted from May 2019 to April 2020. Variations in phytoplankton communities, environmental parameters (temperature, pH, dissolved oxygen, turbidity, dissolved inorganic nutrients) and CYN were simultaneously determined from a total of 36 samples in the Ea Nhai reservoir in Vietnam. The phytoplankton is composed of a dominant cyanobacteria community formed mainly by filamentous *R. raciborskii* with the biovolume of up to 66.8 mm³ L⁻¹. PCA and Pearson correlation results showed the biovolume and variation of *R. raciborskii* in the Ea Nhai reservoir were mainly related to temperature and nutrients (N-NH₄, P-PO₄, TP, TN). Analysis of the toxins by ELISA demonstrated the presence of CYN in all water samples with an average value of 1.24 μ g L⁻¹ and it was significantly correlated with the biovolume of the invasive species *R. raciborskii*. The results of the HPLC analysis confirmed the production of CYN in nine isolated *Raphidiopsis* strains with concentrations ranging from 0.054 to 0.584 μ g g⁻¹DW. The relatively

^{*}e-mail: manhhakg@sgu.edu.vn **e-mail: nthuliencnsh@gmail.com

Author Copy • Author Copy

high biovolume of *R. raciborskii* that is associated with the level of CYN in the water and the capacity to produce CYN of the isolated *R. raciborskii* strains represent a potential threat to the public health and the life of domestic and wild animals in the reservoir catchment.

Keywords: Raphidiopsis raciborskii, cylindrospermopsin, tropical reservoir, Dak Lak province

Introduction

Harmful algal blooms (HABs) occur around the world, causing significant damage in aquatic ecosystems and contributing to the loss of biodiversity globally Cyanobacterial harmful blooms [1-3]. algal (CyanoHABs) are particularly problematic due to their ability to reduce water quality, disrupt nutrient cycling and produce toxic secondary metabolites (cyanotoxins) that are released into the aquatic environment [4, 5]. Raphidiopsis raciborskii (formerly known as Cylindrospermopsis raciborskii) is a harmful, planktonic cyanobacterium. R. raciborskii was originally described in Java, Indonesia and is considered a typical tropical species. Currently, this species is increasingly reported in the tropics, subtropics and temperate lakes and reservoirs worldwide [2, 6-8]. The invasion of R. raciborskii has been hypothesized from the tropical zone to the northern latitudes based on morphology, toxicity, and phylogeography studies [9]. The successful invasion of the temperate zone may be due to its phenotypic flexibility, nitrogen fixation capacity and persistence of different ecotypes [3]. Global warming and eutrophication have also been shown to influence the spread of R. raciborskii in temperate regions [5]. R. raciborskii can also different produce several toxins, such as cylindrospermopsin (CYN), saxitoxin (STX) and anatoxin-a. These toxins have chronic health effects and are associated with the fatal poisonings of many animals and humans [4].

Cylindrospermopsin (CYN) is one toxin produced by *R. raciborskii*. It is an alkaloid $(C_{15}H_{21}N_5O_7S; 415.43)$ Da) with tricyclic guanidine radical, one sulfate group and one uracil ring [10]. At present, five analogues of CYN are known [1]. The impact of this compound's biological activity is wide. CYN can negatively affect organs, such as the liver, eyes, kidneys, lung, heart, thymus, spleen, adrenal glands, and intestine. Moreover, it is toxic to cells, genes, the immune system, the nervous system, and the endocrine system. The major toxicity mechanism is implemented by inhibiting protein synthesis, interacting with cytochrome P450 (CYP450), causing oxidative stress and DNA strand breakage, linking estrogen receptors, and influencing acetylcholinesterase activity (AChE) [11, 12]. Unlike microcystins (MC) which are susceptible to photodegradation, most CYNs have high chemical stability, a high release capacity into the water, and a slow rate of decomposition due to their influence on abiotic factors in nature [13]. Therefore, it creates potential risks in using and managing water resources.

In addition, the lack of visual monitoring signs i.e., no surface scums, no change of water color, rapid germination with large numbers of cells, metamorphosis, relative toxicity and the year-round existence makes the species more challenging to manage, with managers reliant on chemical and microscopic analyses which require significant time and money.

Toxic cyanobacterial blooms occur consistently and at a higher frequency in Vietnam's inland and coastal eutrophic waters. Previous studies have shown that bloom-forming mainly by genus Microcystis and variants of MCs in bloom and cultural samples have been reported in lakes and reservoirs [14, 15]. R. raciborskii blooms have also been found in some water-bodies in Vietnam [16, 17]. However, studies of this species and its toxins in Vietnam are limited. The Ea Nhai reservoir in the Dak Lak province of Vietnam is located in the central highland region. It was built in 1986-1988 to provide drinking water supplies and agricultural irrigation for aquaculture and public usage for Dak Lak province and the surrounding areas. The phenomena of yellow discoloration, odor and streaks suspended under surface water have frequently been observed in the Ea Nhai reservoir during the dry season. However, no data on cyanotoxins exists for this system. The present study therefore aimed to determine the seasonal fluctuations in Raphidiopsis raciborskii biovolume from May 2019 to April 2020 at three sampling sites in the Ea Nhai reservoir. In addition, the correlation between the abundance of cyanobacteria, toxin concentrations (CYN) and environmental factors in the reservoir was examined.

Methodology

Study Site

The Ea Nhai Reservoir (12°44'41"; 108°11'53") located in Dak Lak province, Vietnam has a surface area of 250 ha and an effective water storage capacity of 15 million m³ (Fig. 1). The average depth of the reservoir is 6 m, with the deepest site at full supply capacity being 17 m. The catchment area of the reservoir is 165 km². The average annual air temperature in the area is 26°C with minimum and maximum air temperature values that are between 21°C and 33°C. The climate of the basin has the characteristics of both a humid tropical climate as well as the hot, dry southwest monsoon, which divides this area into two distinct seasons: the dry season from November to April; the rainy season from



Fig. 1. Sampling location in the Ea Nhai reservoir, Dak Lak province.

May to October with a cool and humid climate (90% of annual rainfall). The main uses of the reservoir are as a public water supply and as agricultural irrigation for Dak Lak province and the surrounding areas. Agriculture (mainly coffee and rice crops) is what the land is predominantly used for in the basin.

Sample Collection and Analysis

Field sampling in the Ea Nhai reservoir was conducted monthly at three sampling sites (EN1, EN2 and EN3) from May 2019 to April 2020. Using a calibrated multi-parameter probe, environmental variables (water temperature, pH, dissolved oxygen (DO) and turbidity) were measured in situ. Water samples for nutrient analyses (P-PO4, N-NH4, N-NO3, TP and TN) were collected by immersion of the laboratory cleaned polypropylene sample bottles below the surface water. Samples were kept cool in the dark at 4°C before they were immediately transferred to the laboratory for further analyses. Chemical analyses were conducted according to International Standards (ISO). Water samples were analyzed within 24 h at the Institute of Biotechnology, Tay Nguyen University. Samples for qualitative phytoplankton examination were collected using plankton net (20 µm mesh size) and immediately fixed with formaldehyde solution at a 4% (v/v) final concentration. For phytoplankton enumeration, samples were collected with a plastic tube, 2 m long and 10 cm in diameter. Then, the water samples (0-2 m in depth) were mixed in a bucket and 100 mL sub-samples were transferred to glass bottles, fixed with the Lugol's

iodine solution, and then sedimented for 48 h before counting.

Phytoplankton cell density was counted using a Sedgewick-Rafter counting chamber under a light microscope (Olympus BX51) [18]. The cell biovolume was estimated by measuaring geometric shape and/ or size to each taxon from representative cell counts in field samples [19]. Cyanobacteria species were identified according to their morphology using light microscopic observation. Cyanobacteria species were identified according to their morphology-based on standard references [20]. At each sampling site, a live sample (sample without fixing with formaldehyde solution) was also collected for cyanobacteria isolation. Samples were kept cool and delivered to the laboratory within five h after sampling. For isolation, samples were then concentrated by centrifugation and/or filtering through nylon mesh. Isolation of Raphidiopsis species from living phytoplankton samples was carried out by selectively picking out filamentous Raphidiopsis forms using a modified and sterilized Pasteur pipette under an inverted microscope (Olympus CK40). Single filamentous cyanobacteria were rinsed in several drops of sterilized Z8 media [21] to remove the contaminating cells or suspended particles. The isolated strains were cultured at 24±4°C, dark/light cycle 12 pm:12 am at an intensity of 2.000-3.000 lux. The biomass of cultured strains was harvested at the end of the exponential growth phase by centrifugation for 10 min at 6000 rpm at room temperature. The concentrated material was lyophilized by freeze-drying under vacuum at -55°C for 24 h, then stored at -20°C before toxins analysis. 1.5 mL

Author Copy • Author Copy

Cylindrospermopsin Analysis

Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) Analysis

Cylindrospermopsin (CYN) concentrations in water samples from the Ea Nhai reservoir were examined by the ELISA method using an Abraxis Cylindrospermopsin ELISA kit (Microtiter Plate) (Abraxis, USA). The optical density of the sample was measured at 450 nm on an automatic ELISA reader system (CODA, Bio-Rad, USA) and the concentration of cylindrospermopsin ($\mu g L^{-1}$) in the samples was determined against the standard curve of cylindrospermopsin-HRP. If the cylindrospermopsin concentration in the samples was higher than a standard substance (2 $\mu g L^{-1}$), the samples were diluted until within the range of the standard curve.

HPLC Analysis

The freeze-dried samples from culturing were extracted in 2.5 mL methanol (MeOH - 99.9%) containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in an ultrasonic bath for 15 min. The sample then underwent a probe ultrasonication in ice for one min. Extracts were filtered through C₁₈ column; and the column was cleaned with methanol. After filtration, the filtrate was evaporated at a low temperature (30°C) for five min. After evaporation, the residue was re-suspended in 250 µL of water and purified by centrifugation prior to HPLC analysis [17]. The HPLC system Thermo consisted of an UltiMate 3000 autosampler, and an UltiMate 3000 Variable Wavelength Detector (VWD); column BDS Hypersil C₁₈ (250x4.6 mm, 5.0 µm), mobile phase: MeOH (A) 30 - water containing 10 mM ammonium acetate (B) 70% (v/v) (30:70), flow rate: 0.8 mL min⁻¹; sample volume: 10 µL; column chamber temperature: 30°C; analysis time was seven minutes. The samples were injected into the mobile phase just before the column. In the column, the components were separated and the detector measured the absorbance peak at 262 nm. Cylindrospermopsin was identified by absorption spectra and retention time and quantified at 262 nm using CRM-CYN as an external standard.

Data Analysis

Pearson correlation matrix analyses were performed to quantitatively examine the correlations between the relative biovolume of *Raphidiopsis* species, cylindrospermopsin concentrations and environmental factors (pH, DO, temperature, turbidity, N-NO₃, N-NH₄, P-PO₄, TN and TP). One-way ANOVA was applied to check the significant difference at p<0.05. The IBM-SPSS Statistics Version 22.0 software was used to analyze the results at a 5% significance level.

Results and Discussion

Physical and Chemical Characteristics

The physico-chemical characteristics of the Ea Nhai reservoir from May 2019 to April 2020 are presented in Table 1. Water temperatures ranged from 25.5°C to 32.0°C with an average value of 29.0°C during the investigation period. The pH values varied between a minimum of 7.1 to a maximum of 8.3 and did not differ significantly over the year. The DO ranged from 4.1 to 8.0 mg L⁻¹ and higher values were measured in the dry season than the rainy season. Higher values of turbidity were recorded during the rainy period (May to October). Mean concentrations of ammonium and nitrate across the study were 0.23 ± 0.05 and 0.21 ± 0.08 mg L⁻¹, respectively.

Lower ammonium concentrations were found during the rainy period compared to the dry season. While there were no clear seasonal variations in nitrate concentrations. Dissolved orthophosphate-P concentration varied from 0.06 to 0.1 mg L^{-1} .

The Ea Nhai reservoir was characterized by relatively high concentrations of TN and TP, with mean TP concentrations ranging from 0.16 to 0.4 mg L⁻¹ and mean TN concentrations ranging from 1.4 to 3.67 mg L⁻¹. Monthly TN:TP ratios ranged from 13.9 to 35, with a mean value of the study of 22.3. Agricultural activities and intensive fish cage aquaculture seem to be the main sources of nutrient enrichment in the Ea Nhai reservoir. According to the trophic classification proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development criteria (OECD, 1982), the water quality of the Ea Nhai reservoir was classified to be eutrophic (based on TP values).

Phytoplankton Community and *R. raciborskii* Species in the Ea Nhai Reservoir

This study has provided fundamental information on the spatial and temporal distribution of cyanobacteria community in the poorly researched Ea Nhai reservoir. The microscopic examination of a total of 36 phytoplankton samples collected from the Ea Nhai reservoir from three sampling sites during the period of May 2019 to April 2020 showed the dominance of cyanobacteria during the study period. During the study, 39 taxa of phytoplankton were identified distributed groups: Cyanobacteria, Chlorophyceae, in six Bacillariophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae and Chrysophyceae. Throughout the study period, cyanobacteria were the most dominant contributor to the phytoplankton community accounting for more than 96% of the total phytoplankton and cyanobacteria cell density varied from 380 x 10⁶ to 5009 x10⁶ cells L⁻¹

Author Copy • Author Copy

Table 1. Environme	ntal variables in the	: Ea Nhai reservoir d	uring the year 2019.	-2020 (average valu	tes and min -max va	ilues).			
Month	Temp (°C)	DO (mg L ⁻¹)	Hq	Turbidity (NTU)	$N-NH_4$ (mg L^{-1})	$N-NO_3$ (mg L ⁻¹)	$\begin{array}{c} P\text{-}PO_4 \\ (mg \ L^{-1}) \end{array}$	TN (mg L ⁻¹)	TP (mg L ⁻¹)
May-19	25.33 (25-25.5)	5.92 (5.84-6.02)	8.34 (8.11-8.71)	48.73 (45.8-50.9)	0.15 (0.14-0.16)	0.29 (0.27-0.32)	0.07 (0.066-0.075)	1.86 (1.85-1.87)	0.17 (0.15-0.2)
Jun-19	25.97 (25.9-26.1)	5.81 (5.74-5.88)	8 (7.92-8.07)	52.63 (49.5-56)	0.11 (0.11-0.11)	0.2 (0.2-0.21)	0.06 (0.063-0.065)	1.76 (1.68-1.85)	0.18 (0.176-0.1885)
July-19	27.5 (27-28)	5.37 (5.16-5.78)	8.09 (8.01-8.15)	62.73 (53.2-77.1)	0.14 (0.104-0.182)	0.22 (0.196-0.252)	0.06 (0.059-0.064)	1.38 (1.28-1.54)	0.16 (0.154-0.171)
Aug-19	28.17 (28-28.5)	5.82 (5.72-5.9)	8.25 (8.21-8.3)	66.73 (61.2-70.5)	0.21 (0.196-0.235)	0.24 (0.219-0.28)	0.1 (0.094-0.099)	2.55 (2.34-2.76)	0.4 (0.395-0.408)
Sep-19	28.33 (28-29)	5.51 (5.38-5.6)	7.72 (7.62-7.81)	7 4.1 7 (56.2-100)	0.16 (0.154-0.168)	0.2 (0.196-0.203)	0.1 (0.092-0.102)	1.65 (1.61-1.68)	0.22 (0.218-0.226)
Oct-19	30.17 (30-30.5)	4.14 (4.08-4.18)	7.94 (7.9-7.98)	44.2 (41.9-47.5)	0.18 (0.18-0.184)	0.36 (0.355-0.359)	0.1 (0.099-0.104)	2.1 (1.96-2.24)	0.22 (0.206-0.233)
Nov-19	29.73 (29.2-30.1)	7.21 (7.14-7.3)	7.97 (7.92-8)	52.83 (50.6-55)	0.2 (0.195-0.2)	0.17 (0.163-0.17)	0.1 (0.092-0.103)	2.16 (2.04-2.34)	0.25 (0.233-0.261)
Dec-19	31.4 (31.3-31.6)	5.63 (5.46-5.84)	8.05 (8-8.1)	39.08 (38.52-40.15)	0.15 (0.148-0.162)	0.22 (0.21-0.231)	0.09 (0.089-0.097)	2.96 (2.82-3.07)	0.26 (0.255-0.268)
Jan-20	29.3 (29-29.7)	5.96 (5.88-6.02)	7.14 (7.09-7.23)	37.49 (36.17-39.08)	0.17 (0.159-0.182)	0.26 (0.245-0.275)	0.09 (0.088-0.092)	3.43 (3.31-3.53)	0.21 (0.203-0.221)
Feb-20	32 (30-34)	6.46 (6.36-6.6)	8.25 (8.2-8.31)	39.51 (38.79-40.63)	0.29 (0.29-0.294)	0.27 (0.261-0.282)	0.1 (0.091-0.116)	2.92 (2.86-2.98)	0.29 (0.282-0.304)
Mar-20	28.83 (28.7-29)	7.77 (7.74-7.84)	8.18 (8.01-8.3)	40.14 (40.06-40.24)	0.38 (0.361-0.392)	0.19 (0.19-0.198)	0.11 (0.103-0.114)	3.67 (3.5-3.75)	0.35 (0.321-0.372)
Apr-20	31.73 (31.7-31.8)	8.03 (7.64-8.42)	8.29 (8.27-8.3)	40.09 (40.06-40.11)	0.36 (0.36-0.368)	0.18 (0.179-0.182)	0.1 (0.098-0.102)	3.51 (3.46-3.56)	0.28 (0.279-0.281)



Fig. 2. Changes in occurrence of five most common cyanobacterial biovolume in the Ea Nhai reservoir from May 2019 to April 2020.

with the lowest density occurring in the rainy season period (May to July 2019) and higher cyanobacteria cells observed in the dry season from January to April 2020. Other groups such as Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae and Chrysophyceae were represented but in much lower cell densities. A total of 19 cyanobacteria taxa belonging to the orders of Nostocales, Oscillatoriales, and Chroococcales were recorded, including the known potential cyanotoxin producers, *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) Kutzing; M. wesenbergii (Komarek) Komarek in Kondrateva; M. botrys Teiling; M. flos-aquae (Wittrock) Kirchner; panniformis Komárek, Komárková-Legnerová, М. Sant'Anna, M.T.P.Azevedo & P.A.C.Senna; Oscillatoria limosa C.Agardh ex Gomont; Pseudanabaena mucicola (Naumann et Huber-Pestalozzi) Schwabe; R. Raciborskii Aguilera, Berrendero (Woloszynska) Gomez, Kastovsky, Echenique & Salerno; R. mediterranea Skuja and R. curvata Fritsch et. Rich. Among the cyanobacteria, R. raciborskii consistently dominated the cyanobacterial community throughout the sampling period, accounting for 97.82% of the total cyanobacterial biovolume. Whereas R. curvata, R. mediterranea, Merismopedia tenuissima Lemmermann, and Lyngbya sp. accounted for a significantly lower proportion with 0.08%, 0.05%, 0.02% and 2.08%, respectively (Fig. 2).

Trichomes of the *R. raciborskii* from the Ea Nhai reservoir are free-floating, slightly curved and tightened at the cell wall, tapering toward the ends of trichomes with rounded conical cells (Fig. 3). Vegetative cells



Fig. 3. The morphology of *Raphidiopsis raciborskii* in the Ea Nhai reservoir: a-d. Filaments with heterocytes and akinetes in nature; e-i. Filament with heterocytes and akinetes in cultures. Scale bars = $10 \mu m$.

6

are cylindrical, 4.5-10.1 µm long, 2.5-4.1 µm wide and single heterocytes, conical or arrow-shaped, 2.5-4.5 µm wide, 3.2-9.2 µm long in the field samples. Akinetes are a long oval-shape, 8-12 µm long, 3.5-4 µm wide and located just behind the heterocyte or 3-4 vegetative cells from the heterocyte. In culture, vegetative cells are 6-12 μm long, 3-4.5 μm wide. Heterocytes morphology changes a lot and appears endlessly at one or both ends of the trichome, 7.5-12 µm long, 4-5 µm wide. Akinetes are 10-20 µm long and 4.5-5.5 µm wide. R. raciborskii have been known in their morphology to exist in many forms (straight, curved, coiled) in the natural environment. All isolated strains from the Ea Nhai reservoir were straight form in culture conditions with the average length of trichomes longer than that in the wild and will sometimes form into tufts. R. raciborskii has become increasingly prevalent and appeared in many tropical, subtropical and even in temperate water bodies worldwide [3, 22] and is known to cause blooms in Vietnamese freshwaters such as in Xuan Huong lake, Dau Tieng, Tri An reservoirs and some water bodies in Hue [16, 23]. R. raciborskii biovolume exhibited distinct temporal variation with the lowest biovolume of 0.77 mm³ L⁻¹ and the highest value of 66.80 mm³ L⁻¹ in June 2019 and January 2020, respectively. Although R. raciborskii did not form a scum on the surface of the water in the Ea Nhai reservoir, they were found in high biovolume and had a year-round presence in this tropical climate. R. raciborskii accounted for more than 97% of the total cyanobacterial biovolume. Other studies on R. raciborskii in tropical and subtropical regions found similar results. In a study in New Zealand, R. raciborskii blooms occurred in lakes Waahi, Waikare and Whangape with varying intensities and frequencies. In Lake Waahi blooms occurred in April 2007 (4.5 mm³ L⁻¹). In lake Waikare, *R. raciborskii* has formed dense summer blooms, with the most severe occurring in February 2011 (12.5 mm³ L⁻¹) and March 2013 (7.4 mm³ L⁻¹), while R. raciborskii blooms were most frequent and dense in Lake Whangap with biovolume peaked at 144 mm³ L⁻¹ [24]. Based on a seasonal survey in lakes in Yunnan Province, China, Jia et al. (2021) [25] investigated R. raciborskii populations, where R. raciborskii blooms were found in Lake Xihu at low water temperatures between 10-15°C. The biovolume of R. raciborskii in Lake Xihu ranged from 0.01-42.44 mm³ L⁻¹ [25]. The persistent dominance and occurrence of R. raciborskii throughout the year in this study have also been reported in many other previous studies [3, 5, 22]. However, in several temperate regions where R. raciborskii only occurs in warmer months [26, 27].

Concentrations of Cylindrospermopsin

Cylindrospermopsin (CYN) concentrations in water surface samples collected from the Ea Nhai reservoir were analyzed using ELISA. The ELISA test revealed CYN presence in all of the water samples



Fig. 4. Seasonal variation of the *Raphidiopsis raciborskii*, *R. curvata* and *R. mediterrancea* biovolumes and CYN concentrations in the Ea Nhai reservoir during the study period from May 2019-April 2020. Bar. Biovolume; line. CYN concentrations.

throughout the year from May 2019 to April 2020 with a mean value of $1.24\pm0.08 \ \mu g \ L^{-1}$ (Fig. 4). Higher CYN concentrations were found during the dry season (November to April) than during the rainy season. Mean concentrations of 1.24 µg L⁻¹ measured in this study were comparable to 0.11 to 1.12 µg L⁻¹ reported from six lakes in Washington, USA [19] and 0-1.58 µg L^{-1,} which was referenced from Huong river, Vietnam [16]. However, this value was much lower than those reported an urban reservoir used for drinking water supply, south China (8.25 µg L⁻¹); a temperate lake, Germany $(11.8 \ \mu g \ L^{-1})$ [28, 29] and a farm water supply in central Queensland (1050 µg L-1) [30]. The CYN detected in this study was higher than the lifetime drinking water guideline value for CYN of 0,7 µg L⁻¹ that was proposed by the World Health Organization [31]. CYN is an alkaloid cyanotoxin by which may be produced by some filamentous freshwater cyanobacteria species, including R. raciborskii; R. curvata Fritsch et. Rich;

Table 2. Cylindrospermopsin (CYN) concentrations in nine *Raphidiopsis* isolated strains from the Ea Nhai reservoir.

Species	Strain codes	CYN concentrations (µg g ⁻¹ DW)
	CENG	0.235
D. ugoihoughii	CEN0	0.504
K. FUCIDOFSKII	CEN7	0.054
	CEN10	0.444
R. curvata	RCEN0	0.267
	RCEN1	0.314
	RCEN2	0.172
D	RMEN2	0.584
K. meaiterranea	RMEN3	0.398

Author Copy • Author Copy

R. mediterranea Skuja; Aphanizomenon ovalisporum Forti; A. flos-aquae Ralfs ex Bornet & Flahault; A. gracile Lemmermann; A. klebahnii Elenkin ex Pechar; Umezakia natans Watanabe; Anabaena bergii Ostenfeld; A. planctonica Brunnthaler; A. lapponica Borge; Lyngbya wollei (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck; Dolichospermum sp. and Oscillatoria sp. Vaucher ex Gomont [32, 33]. Of the potential CYN producers, R. raciborskii, R. curvata and R. mediterranea which were identified in the Ea Nhai reservoir, a significant correlation was found between CYN and R. raciborski, R. curvata and R. mediterranea species biovolumes (p<0.01, Table 3). However, the biovolume of *R. cuvarta* and R. mediterranea were very low, 0.08 mm³ L⁻¹ and 0.02 mm³ L⁻¹, respectevely. Therefore, the relatively high biovolume of the invasive species R. raciborskii, up to 66.8 mm³ L⁻¹, in the phytoplankton community of the Ea Nhai reservoir could be the source of the CYN detected in the water during the study period.

The WHO provided Guideline values for CYN in lifetime drinking and recreational water are 0.7 μ g L⁻¹ and 6 µg L⁻¹, respectively [31]. To determine the level of the risk associated with the CYN contamination from three toxin-producing species (R. raciborskii, R. cuvarta and R. mediterranea) in the Ea Nhai reservoir, we calculated the average toxic concentration in a cell from nine strains of the three species. From there, we can estimate the harmful density of the species in accordance with the limits set by WHO. The average toxin concentration in a cell reached 1.87x10⁻⁸ µg cell⁻¹. With the limit for drinking water of 0.7 µg L⁻¹, the harmful density of the three species reached 37.4x10⁶ cells L⁻¹. For recreational water, the toxic density was 320x10⁶ cells L⁻¹. Compared with the above threshold, the R. raciborskii densities in the Ea Nhai reservoir (377x10⁶ cells L⁻¹ to 4.928x10⁶ cells L⁻¹) were higher for both drinking water and recreational water as suggested by WHO. Therefore, the presence of R. raciborskii and CYN in the reservoir makes the water source polluted and represents a potential threat to public health, community, and wildlife species around the reservoir catchment.

To confirm the identity of the potential producer of CYN in the Ea Nhai reservoir, nine *Raphidiopsis* strains belonging to three potential CYN producer species were successfully isolated from water samples collected from the Ea Nhai reservoir, including *R. raciborskii* (4 strains), *R. curvata* (3 strains) and *R. mediterranea* (2 strains). All *Raphidiopsis* strains investigated in the present study produced CYN and toxin concentrations that varied from 0.054 to 0.584 μ g g⁻¹ DW (Table 2). The CYN concentrations of the nine strains with positive results were estimated at the highest value of 0.584 μ g g⁻¹ DW, which was much lower than 1.

2 mg g⁻¹ DW and 1.7-2 mg g⁻¹ DW reported for Thai (*R. raciborskii* CY-Thai) and China strains (*R. curvata* CHAB1150), respectively [34, 35] and 917 μ g g⁻¹ DW noted for a Queensland strain (*R. mediterranea* FSS1-150/1) [36].

The abiotic variables (CYN, Temp., DO, N-NH₄, P-PO₄, TN and TP) were significantly correlated with the R. raciborskii biovolume (R = 0.60, p<0.01; R = 0.66, p<0.01; R = 0.60, p<0.01; R = 0.73, p<0.01;R = 0.65, p<0.05, R = 0.84, p<0.01; R = 0.34, p<0.01, respectively). Beside, R. curvata and R. mediterranea biovolume also showed a significant correlation with abiotic variables (CYN, Temp., DO, N-NH₄, P-PO₄, TN, TP) (Table 3). Cyanobacterial proliferation is typically caused by multiple drivers occurring simultaneously instead of a single environmental factor. Field and laboratory investigations have found that R. raciborskii abundance may be affected by environmental factors such as light, temperature and nutrients [3, 37]. In our study, the temperature was positively correlated with R. raciborskii biovolume. The result suggested that the high water temperature may play a key role in regulating the presence of R. raciborskii in Ea Nhai reservoir. Similar results were found in previous studies [38-40]. So far, R. raciborskii has successfully invaded many regions from tropical and subtropical towards temperate zones. Laboratory researches have shown that the optimum temperature for the proliferation of R. raciborskii is relatively high, between 25°C and 35°C. Typically, they formed blooms at temperatures greater than 25°C [1, 25]. The temperature in the studied reservoir ranged from 25.5°C to 32°C and R. raciborskii blooms occur during the in-between seasons and the dry season of the year. The biological volume reached the highest value at the end of the dry season. The species has also formed dense summer blooms in Lake Waikare [24] and a shallow pond in France [38]. However, in the Xihu Lake, R. raciborskii blooms were also found at low water temperatures between 10°C and 15°C [25]. Those were below the temperature threshold (15°C-17°C) for the growth of R. raciborskii in the natural environment [39]. Several studies have shown that R. raciborskii was capable of growing at low temperatures of 11°C in subtropical lakes [41], 13°C-20°C in tropical lakes [22]. The contrasting results related to the effect of temperature on R. raciborskii seem to be associated with the occurrence genetically and ecophysiologically of different ecotypes of R. raciborskii and its greater phenotypic plasticity in response to environmental factors [1, 42]. Moreover, climate warming is considered an important driver that enhances the expansion of the so-called phenotypically plastic species to new areas. Nitrogen (N) and phosphorus (P) have been shown to affect the dominance of R. raciborskii in freshwater systems [43]. Some studies suggested that R. raciborskii can dominate in both low and high phosphorus and nitrogen conditions. The abiotic variable that played an important role and had a significant influence on the biovolume of R. raciborskii in the present study were dissolved and total phosphorus and nitrogen. This cyanobacteria species have been found to dominate when the concentration of total phosphorus and total nitrogen are high [16, 42]. A recent study demonstrated that high pH

	Temp.	DO	Ηd	$N-NH_4$	N-NO ₃	$P-PO_4$	NT	TP	Turbidity	R. raciborskii	R. curvata	R. mediterranea	CYN
Temp.	1												
DO	0.260	1											
рН	-0.012	0.262	1										
$\mathrm{N} ext{-}\mathrm{NH}_4$	0.518**	0.754**	0.349*	1									
N-NO ₃	-0.008	-0.642**	-0.057	-0.195	1								
$P-PO_4$	0.672**	0.331*	-0.013	0.666**	0.043	1							
TN	0.582**	0.603**	-0.070	0.749**	-0.090	0.634**	1						
TP	0.376*	0.411*	0.299	0.637**	-0.134	0.677**	0.585**	1					
Turbidity	-0.444**	-0.280	0.039	-0.373*	-0.181	-0.233	-0.620**	-0.047	1				
R. raciborskii	0.662**	0.602**	-0.134	0.729**	-0.110	0.648**	0.844**	0.343*	-0.615**	1			
R. curvata	0.494**	0.734**	0.170	0.909**	-0.223	0.576**	0.796**	0.452**	-0.504**	0.842**	1		
R. mediterranea	0.612**	0.728**	0.069	0.796**	-0.274	0.563**	0.857**	0.427**	-0.614**	0.905**	0.928**	1	
CYN	0.698**	0.309	-0.099	0.474**	-0.199	0.515**	0.492**	0.356*	-0.298	0.596**	0.438**	0.506**	1

Table 3. Person correlation between relative abundance of species R. raciborskii and environmental factors in Ea Nhai reservoir from May 2019 to April 2020.

* Correlation is significant at the 0.05 level (2 tailed), ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

facilitated the release of phosphorus from sediment that provided the phosphorus source for the abundance of R. raciborskii in Donggian, China [2]. As mentioned by Posselt et al. (2009) [44] addition of dissolved inorganic phosphate (DIP) in field experiments conducted in a subtropical reservoir in Queensland, Australia, has also promoted R. raciborskii dominance. However, the present study results are contrary to other studies that reported R. raciborskii dominated in phosphoruslimited reservoirs [45, 46]. This is due to their high affinity for P and high phosphate uptake capacity, which allows them to outcompete other cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton species [3, 46]. Ammonium concentrations were positively correlated with R. raciborskii biovolume in the present study. Ammonium concentrations were considered the preferred nitrogen source for the growth of R. raciborskii. The highest growth rate of this species was found in the presence of ammonium. Similarly, as mentioned by, high ammonium concentration (up to 700 mg L⁻¹) was the main factor that boosted the bloom of R. raciborskii in two Brazilian reservoirs [5]. However, the dominance of a heterocyclic species such as R. raciborskii can be found under low nitrate concentration [38]. Although R. raciborskii is able to fix atmospheric nitrogen, this species can maintain high growth rates under diazotrophic and non-diazotrophic conditions [47]. In addition, other studies have reported that the biomass of R. raciborskii remains high in abundance under low phosphorus (P) and nitrogen (N) concentrations [2, 5, 48]. The reason for such contradiction in nutritional requirements for the same species may be due to variation between strains (ecotypes) in populations. Recent studies have demonstrated that R. raciborskii strains isolated in the same lake can dramatically alter their morphological, physiological and genetic properties to enhance the potential of populations, to adapt quickly to changing environmental conditions [1, 3, 48, 49]. Although the relationship between R. raciborskii and different nutrients is complex, these studies showed that R. raciborskii can proliferate over other phytoplankton species in a wide range of nutrient concentration due to their flexible physiological behavious including: high phosphorus and ammonium uptake affinity; and a high storage capacity for phosphorus [49]. More studies are necessary to better understand the factors that promote the dominance of this species in the Ea Nhai reservoir.

Conclusions

This study indicated that the eutrophic conditions of the Ea Nhai reservoir in Vietnam were dominated by the cyanobacterium species *R. raciborskii* with the biovolumes up to 66.8 mm³ L⁻¹. CYN was also measured throughout the study period, representing a risk for aquatic and human health. Nine *Raphidiopsis* strains belonging to three potential CYN producer species (*R. raciborskii, R. curvata* and *R. mediterranea*) were successfully isolated and confirmed to produce CYN. Moreover, such abiotic factors as temperature and nutrients (N-NH₄, P-PO₄, TP, TN) played an essential role in the occurrence and variation of *R. raciborskii* abundance in the Ea Nhai reservoir.

Acknowledgments

We wish to thank the cell laboratory, Institute of Biotechnology, Hue University for identifying, isolating, culturing and analyzing toxins by ELISA, and the laboratory of the Institute of Biotechnology, Tay Nguyen University for analyzing environmental factors and toxins by HPLC, and the laboratory of the Department of Biology, the University of Science for taking pictures of specimens. We appreciate the effort of an anonymous reviewer and the useful comments and suggestions for improving the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- KOKOCIŃSKI M., GĄGAŁA I., JASSER I., KAROSIENĖ J., KASPEROVIČIENĖ J., KOBOS J., KOREIVIENĖ J., SOININEN J., SZCZUROWSKA A., WOSZCZYK M. Distribution of invasive Cylindrospermopsis raciborskii in the East-Central Europe is driven by climatic and local environmental variables. FEMS microbiology ecology, 93 (4), fix035, 2017.
- LI X., HUO S., ZHANG J., XIAO Z., XI B., LI R. Factors related to aggravated Cylindrospermopsis (cyanobacteria) bloom following sediment dredging in an eutrophic shallow lake. Environmental Science and Ecotechnology, 2, 100014, 2020.
- BURFORD M.A., BEARDALL J., WILLIS A., ORR P.T., MAGALHAES V.F., RANGEL L.M., AZEVEDO S.M., NEILAN B.A. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii. Harmful Algae, 54, 44, 2016.
- PEARSON L.A., DITTMANN E., MAZMOUZ R., ONGLEY S.E., D'AGOSTINO P.M., NEILAN B.A. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. Harmful Algae, 54 98, 2016.
- WERNER V.R., TUCCI A., DA SILVA L.M., YUNES J.S., NEUHAUS E.B., BERTHOLD D.E., LAUGHINGHOUSE IV H.D. Morphological, ecological and toxicological aspects of Raphidiopsis raciborskii (Cyanobacteria) in a eutrophic urban subtropical lake in southern Brazil. Iheringia. Série Botânica., **75**, **2020**.
- STEFANOVA K., RADKOVA M., UZUNOV B., GÄRTNER G., STOYNEVA-GÄRTNER M. Pilot search for cylindrospermopsin-producers in nine shallow Bulgarian waterbodies reveals nontoxic strains of Raphidiopsis raciborskii, R. mediterranea and Chrysosporum bergii. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 34 (1), 384, 2020.

- YANG Y., YU G., CHEN Y., JIA N., LI R. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin. Journal of Hazardous Materials, 406, 124653, 2021.
- ANTUNES J.T., LEÃO P.N., VASCONCELOS V.M. Cylindrospermopsis raciborskii: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. Frontiers in Microbiology, 6, 473, 2015.
- VICO P., BONILLA S., CREMELLA B., AUBRIOT L., IRIARTE A., PICCINI C. Biogeography of the cyanobacterium Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data. Molecular Phylogenetics and Evolution, 148, 106824, 2020.
- OHTANI I., MOORE R.E., RUNNEGAR M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the bluegreen alga Cylindrospermopsis raciborskii. Journal of the American Chemical Society, **114** (20), 7941, **1992**.
- PUERTO M., PRIETO A.I., MAISANABA S., GUTIÉRREZ-PRAENA D., MELLADO-GARCÍA P., JOS Á., CAMEÁN A.M. Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindrospermopsin by a battery of in vitro tests. Food and chemical toxicology, 121, 413, 2018.
- YANG Y., YU G., CHEN Y., JIA N., LI R. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin. Journal of hazardous materials, 124653, 2020.
- ADAMSKI M., WOŁOWSKI K., KAMINSKI A., HINDÁKOVÁ A. Cyanotoxin cylindrospermopsin producers and the catalytic decomposition process: A review. Harmful Algae, 98, 101894, 2020.
- DUONG T.T., LE T.P.Q., DAO T.-S., PFLUGMACHER S., ROCHELLE-NEWALL E., HOANG T.K., VU T.N., HO C.T., DANG D.K. Seasonal variation of cyanobacteria and microcystins in the Nui Coc Reservoir, Northern Vietnam. Journal of applied phycology, 25 (4), 1065, 2013.
- 15. PHAM T.-L., DAO T.-S., TRAN N.-D., NIMPTSCH J., WIEGAND C., MOTOO U., Influence of environmental factors on cyanobacterial biomass and microcystin concentration in the Dau Tieng Reservoir, a tropical eutrophic water body in Vietnam 2017: Publisher.
- 16. NGUYEN T.T.L., HOANG T.H., NGUYEN T.K., DUONG T.T. The occurrence of toxic cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii and its toxin cylindrospermopsin in the Huong River, Thua Thien Hue province, Vietnam. Environmental monitoring and assessment, 189 (10), 1, 2017.
- NGUYEN T.T.L., CRONBERG G., LARSEN J., Ø M. Planktic cyanobacteria from freshwater localities in Thuathien-Hue province, Vietnam. I. Morphology and distribution. Nova Hedwigia, 85, 1, 2007.
- KARLSON B., CUSACK C., BRESNAN E. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. 2010.
- TRAINER V.L., HARDY F.J. Integrative monitoring of marine and freshwater harmful algae in Washington State for public health protection. Toxins, 7 (4), 1206, 2015.
- KOMAREK J., ANAGNOSTIDIS K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge, 82 (3), 247, 1989.
- KOTAI J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research, Oslo, 11 (69), 5, 1972.
- 22. SOARES M.C.S., LÜRLING M., HUSZAR V.L.M. Growth and temperature-related phenotypic plasticity

in the cyanobacterium C ylindrospermopsis raciborskii. Phycological Research, **61** (1), 61, **2013**.

- DAO T.S., CRONBERG G., NIMPTSCH J., DO-HONG L.-C., WIEGAND C. Toxic cyanobacteria from Tri An Reservoir, Vietnam. Nova Hedwigia, 90 (3), 433, 2010.
- WOOD S.A., POCHON X., LUTTRINGER-PLU L., VANT B.N., HAMILTON D.P. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of Cylindrospermopsis raciborskii in New Zealand. Harmful Algae, 39, 64, 2014.
- 25. JIA N., WANG Y., GUAN Y., CHEN Y., LI R., YU G. Occurrence of Raphidiopsis raciborskii blooms in cool waters: Synergistic effects of nitrogen availability and ecotypes with adaptation to low temperature. Environmental Pollution, **270**, 116070, **2021**.
- 26. BERGER C., BA N., GUGGER M., BOUVY M., RUSCONI F., COUTÉ A., TROUSSELLIER M., BERNARD C. Seasonal dynamics and toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii in lake Guiers (Senegal, West Africa). FEMS microbiology ecology, 57 (3), 355, 2006.
- MOHAMED Z.A. First report of toxic Cylindrospermopsis raciborskii and Raphidiopsis mediterranea (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. FEMS microbiology ecology, 59 (3), 749, 2007.
- LEI L., PENG L., HUANG X., HAN B.-P. Occurrence and dominance of Cylindrospermopsis raciborskii and dissolved cylindrospermopsin in urban reservoirs used for drinking water supply, South China. Environmental monitoring and assessment, **186** (5), 3079, **2014**.
- RÜCKER J., STÜKEN A., NIXDORF B., FASTNER J., CHORUS I., WIEDNER C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenondominated temperate lakes. Toxicon, 50 (6), 800, 2007.
- 30. SHAW G.R., MCKENZIE R.A., WICKRAMASINGHE W.A., SEAWRIGHT A.A., EAGLESHAM G.K., MOORE M.R. Comparative toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin between mice and cattle: human implications. Harmful Algae, 465, 2002.
- CHORUS I., WELKER M. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, Taylor & Francis, pp. 2021.
- 32. RZYMSKI P., PONIEDZIAŁEK B., KOKOCIŃSKI M., JURCZAK T., LIPSKI D., WIKTOROWICZ K. Interspecific allelopathy in cyanobacteria: Cylindrospermopsin and Cylindrospermopsis raciborskii effect on the growth and metabolism of Microcystis aeruginosa. Harmful Algae, 35, 1, 2014.
- SCARLETT K.R., KIM S., LOVIN L.M., CHATTERJEE S., SCOTT J.T., BROOKS B.W. Global scanning of cylindrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards. Science of The Total Environment, 738, 139807, 2020.
- 34. LI R., CARMICHAEL W.W., BRITTAIN S., EAGLESHAM G.K., SHAW G.R., MAHAKHANT A., NOPARATNARAPORN N., YONGMANITCHAI W., KAYA K., WATANABE M.M. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria). Toxicon, **39** (7), 973, **2001**.
- 35. JIANG Y., XIAO P., YU G., SHAO J., LIU D., AZEVEDO S.M.F.O., LI R. Sporadic distribution and distinctive variations of cylindrospermopsin genes in cyanobacterial strains and environmental samples from

Chinese freshwater bodies. Applied and environmental microbiology, **80** (17), 5219, **2014**.

- 36. MCGREGOR G.B., SENDALL B.C., HUNT L.T., EAGLESHAM G.K. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from Raphidiopsis mediterranea Skuja (Cyanobacteria/ Nostocales). Harmful Algae, 10 (4), 402, 2011.
- PAGNI R.L., FALCO P.B.D., SANTOS A.C.A.D. Autecology of Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju. Acta Limnologica Brasiliensia, 32, 2020.
- BRIAND J.F., ROBILLOT C., QUIBLIER-LLOBERAS C., HUMBERT J.F., COUTÉ A., BERNARD C. Environmental context of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. Water research, 36 (13), 3183, 2002.
- WIEDNER C., RÜCKER J., BRÜGGEMANN R., NIXDORF B. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. Oecologia, 152 (3), 473, 2007.
- YAMAMOTO Y., SHIAH F.-K., HSU S.-C. Seasonal variation in the net growth rate of the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in a shallow artificial pond in northern Taiwan. Plankton and Benthos Research, 8 (2), 68, 2013.
- BONILLA S., GONZALEZ-PIANA M., SOARES M.C.S., HUSZAR V.L.M., BECKER V., SOMMA A., MARINHO M.M., KOKOCIŃSKI M., DOKULIL M., ANTONIADES D. The success of the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in freshwaters is enhanced by the combined effects of light intensity and temperature. Journal of Limnology, 75 (3), 2016.
- KOKOCIŃSKI M., SOININEN J. Environmental factors related to the occurrence of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanophyta) at the north-eastern

limit of its geographical range. European Journal of Phycology, 47 (1), 12, 2012.

- 43. WILLIS A., ADAMS M.P., CHUANG A.W., ORR P.T., O'BRIEN K.R., BURFORD M.A. Constitutive toxin production under various nitrogen and phosphorus regimes of three ecotypes of Cylindrospermopsis raciborskii (Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju). Harmful algae, 47, 27, 2015.
- 44. POSSELT A.J., BURFORD M.A., SHAW G. PULSES OF PHOSPHATE PROMOTE DOMINANCE OF THE TOXIC CYANOPHYTE CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII IN A SUBTROPICAL WATER RESERVOIR 1. Journal of Phycology, **45** (3), 540, **2009**.
- 45. PRENTICE M.J., HAMILTON D.P., WILLIS A., O'BRIEN K.R., BURFORD M.A. Quantifying the role of organic phosphorus mineralisation on phytoplankton communities in a warm-monomictic lake. Inland Waters, 9 (1), 10, 2019.
- 46. WILLIS A., CHUANG A.W., DYHRMAN S., BURFORD M.A. Differential expression of phosphorus acquisition genes in response to phosphorus stress in two Raphidiopsis raciborskii strains. Harmful algae, 82, 19, 2019.
- 47. MOISANDER P.H., CHESHIRE L.A., BRADDY J., CALANDRINO E.S., HOFFMAN M., PIEHLER M.F., PAERL H.W. Facultative diazotrophy increases Cylindrospermopsis raciborskii competitiveness under fluctuating nitrogen availability. FEMS Microbiology Ecology, 79 (3), 800, 2012.
- XIAO M., WILLIS A., BURFORD M.A. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. Harmful Algae, 62, 84, 2017.
- WILLIS A., POSSELT A.J., BURFORD M.A. Variations in carbon-to-phosphorus ratios of two Australian strains of Cylindrospermopsis raciborskii. European Journal of Phycology, 52 (3), 303, 2017.

Vietnam Journal of Earth Sciences, 44(2), 257-272, https://doi.org/10.15625/2615-9783/16997



Vietnam Academy of Science and Technology Vietnam Journal of Earth Sciences http://www.vjs.ac.vn/index.php/jse



Cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* and its toxin in Buon Phong reservoir, Dak Lak province, Vietnam

Thi Diem My Ngo¹, That Phap Ton², Thi Thuy Duong^{3,4*}, Thi Phuong Quynh Le⁵, Thi Thu Lien Nguyen^{1*}

¹Hue University, Institute of Biotechnology, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam ²Department of Biology, University of Science, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam ³Institute of Environmental Technology, VAST, Hanoi, Vietnam

⁴Graduate University of Science and Technology, VAST, Hanoi, Vietnam

5 Graduale Oniversity of Science and Technology, VAS1, Hanoi, Vieina

⁵Institute of Natural Product Chemistry, VAST, Hanoi, Vietnam

Received 05 November 2021; Received in revised form 06 January 2022; Accepted 15 March 2022

ABSTRACT

This study investigated the variation of the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* population under the influence of physicochemical parameters from May 2019 to April 2020 in the Buon Phong reservoir. The correlations between these parameters were explored by using Principal Component Analysis (PCA) and Pearson correlation analysis. The cylindrospermopsin (CYN) toxin in isolated strains from the reservoir was confirmed by using High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses. *R. raciborskii* presented throughout the year in the reservoir with a biovolume from 0.12 to 9.14 mm³ L⁻¹. Four *R. raciborskii* strains (CBP2, CBP3, CBP4, and CBP5) were successfully isolated and confirmed to produce CYN by the HPLC results. The highest concentration in isolated strains was 0.345 μ g g⁻¹ DW in the CBP4 strain. The PCR results of genes responsible for CYN biosynthesis showed that the PCR amplicons of *cyrB* and *CyrC* were amplified in two toxic strains. In addition, such abiotic factors as temperature and nutrients played major roles in the abundance of *R. raciborskii*. Moreover, the biovolume of *R. raciborskii* positively correlated with the CYN concentrations in the Buon Phong reservoir.

Keywords: toxic cyanobacteria, cylindrospermopsin, Buon Phong reservoir, Dak Lak province, Vietnam.

1. Introduction

Raphidiopsis raciborskii (previously *Cylindrospermopsis* raciborskii) is а freshwater, planktonic filamentous and potentially invasive cyanobacterium that has worldwide been known for forming cyanobacterial harmful algal blooms (cyanoHABs) 2020). (Werner al., et

Eutrophication and global warming were likely to increase the bloom frequency, intensity and duration of the cyanobacterium in many aquatic ecosystems globally (O'Neil et al., 2012; Baxter et al., 2020). Blooms of *R. raciborskii* have the potential to alter the function of freshwater ecosystems and contribute to water quality degradation through the release of toxins (Willis et al., 2018). Several *Raphidiopsis* strains can

^{*}Corresponding author, Email: duongthuy0712@gmail.com

produce CYN, other trains can build SXTs, while many different strains do not make either CYN or SXTs. So. the toxin productions are strain-specific and independent of geographical characteristics (Antunes et al., 2015; Kokocinski et al., 2017). This species has been recorded worldwide under different environmental conditions, such as freshwater, brackish water, and various areas from tropical subtropical to temperate regions (Bittencourt et al., 2014; Burford et al., 2016; Wener et al., 2020). The success and rapid expansion of R. raciborskii in various climates are partly attributed to intra-population strain variability, enhancing the potential of populations to rapidly adapt to environmental changing conditions (phenotypic plasticity). In addition, the existence of multiple ecotypes and diazotrophic activities have promoted the further spread of this species (Xiao et al., 2017; Jiang et al., 2014).

CYN is a toxin produced by several cyanobacterial species such as Raphidiopsis raciborskii, Umezakia natans, Chrysosporum ovalisporum, Aphanizomenon flos-aquae, Aphanizomenon gracile, *Raphidiopsis* curvata, *Raphidiopsis* mediterranea, bergii, Anabaena Lyngbya wollei. Phormidium ambiguum.... R. raciborskii was first deemed a harmful bloom species after a toxic bloom event in 1979 when 148 people were hospitalized with symptoms of food poisoning, including vomiting and tender hepatomegaly, after consumption of water from the local reservoir (Byth, 1980; Hawkins et al., 1985). CYN is an alkaloid $(C_{15}H_{21}N_5O_7S; 415,43$ Da) with a tricyclic guanidine, a sulfate group and a cyclic ring. CYN is toxic to cells, genes, immune system, nervous system and endocrine system. Its mechanism of toxicity is mainly by inhibiting protein synthesis, interacting with cytochrome P450 (CYP450), causing oxidative stress and DNA strand breaks, linking to estrogen receptors and affecting acetylcholinesterase

(AchE) functioning (Puerto et al., 2018; Yang et al., 2020). Unlike microcystin (MC) toxin, most CYN toxin is released into the external aquatic environment, is strongly soluble in water, stable to sunlight, heat and exists over a wide pH range (Stefanova et al., 2020). In addition, the CYN decomposition rate in the natural environment is prolonged, thereby causing many potential risks and difficulties in the use and management of water resources. The complete cyr gene cluster responsible for CYN toxin biosynthesis was first proposed by Mihali et al. (2008). This cyr gene cluster spans 43 kb and contains 15 open reading frames encoding all the enzymes required for biosynthesis (cyrA-J and cyrN), regulation (cyrL, cyrM and cyrO), and secretion (cyrK) of CYN. Complete sequences of cvr gene clusters from several toxic cyanobacterial strains have been published to date: R. raciborskii AWT205, CS-505, CS-506, CHAB3438, CHAB358; Aphanizomenon sp. 10E6 (GQ385961.1); Oscillatoria sp. PCC 6506; Raphidiopsis curvata CHAB1150, CHAB114, HB1 and *Raphidiopsis* mediterranea FSS1-150/1 (Sinha, 2015: Pearson et al., 2016; Yang et al., 2020).

According to DWR figures from 2017, Vietnam has a total of 6,648 reservoirs with a total capacity of 12,000 million m³ of water, of which lakes are utilized for a variety of purposes. including hydropower and providing drinking water for inhabitants, tourist visitors, and other activities. It is also imperative that these reservoirs' water quality be properly managed and monitored at all times (Pham et al., 2019). The Buon Phong an artificial reservoir located in Dak Lak province plays an important role in ensuring water safety as it supplies water for domestic use, irrigation, livestock and aquaculture. The water changing color and having an unpleasant odor is regularly observed during the dry season. The reservoir requires an effective biomonitoring program, but at present little is known about phytoplankton diversity in this system. Although the *R. raciborskii* was observed in several freshwater bodies in the Dak Lak, no data on cyanotoxin is available (Le et al., 2010). Therefore, this study aims to investigate the influence of environmental factors on biovolume *R. raciborskii* and the CYN concentration in the Buon Phong reservoir. In addition, the CYN concentration and presence of CYN synthesis genes in cultured strains of *R. raciborskii* are also determined.

2. Materials and methods

2.1. Study site

In Dak Lak province, the study was conducted at the Buon Phong reservoir $(12^{\circ}92'01'', 108^{\circ}16'24'')$. The sampling site is determined as shown in Fig. 1. The Buon Phong is an artificial reservoir with 3.3 million m³. The catchment area of the

reservoir is 13 km². The average depth of the reservoir is 10 m, with the most profound site at total supply capacity being 20m. The climate of the basin is both characterized by a humid tropical climate and a hot, and dry southwest monsoon that divides this area into two distinct seasons: the dry season from November of the last year to April of the following year; the rainy season from May to October with cool and humid climate (90% of the annual rainfall is in the cool and humid climate zone). The primary use of the reservoir is as a public water supply, providing agricultural irrigation. Intensive agriculture (mainly coffee and rice crops) is the predominant land use in the catchment. The reservoir receives pollutants from domestic and agricultural wastewater in the basin (Department of Agriculture and Rural Development, Dak Lak).



Figure 1. Sampling location in the Buon Phong reservoir, Dak Lak province

2.2. Sample collection and analysis

Water and cyanobacteria samples were collected monthly at 3 sampling sites BP1, BP2 and BP3 in the Buon Phong reservoir from May 2019 to April 2020. The physicochemical factors (temperature, and pH) were measured on the spot with a PCSTestr 35 Multi-Parameter Pocket Tester, Eutech brand (Singapore). Dissolved oxygen (DO) was measured on the spot with a portable oxygen meter (Hana HI9147). Turbidity (NTU) was measured directly at the field by a Lovibond - Germany meter. The subsurface water was collected with cleaned polypropylene bottles for analyzing nutritional parameters (P-PO₄, N-NH₄, N-NO₃, TP, and TN). Samples were kept in the dark at 4°C before being transported to the laboratory for analysis during the day. Chemical analyses were conducted in accordance with the International Standards (ISO) at the laboratory of the Institute of Biotechnology, Tay Nguyen University.

A plastic tube with a length of 2 m and a diameter of 10 cm was used to gather quantitative samples. After mixing the water samples (0-2 m depth), 100 ml of the subsample was taken into a glass bottle and fixed with Lugol's iodine solution. Qualitative samples were collected by using a 20- μ m mesh plankton net and promptly preserved with formaldehyde solution at a final concentration of 4%.

Cyanobacteria cells counts were conducted using light microscopes (Olympus BX51) under 400× magnification. The number of cyanobacteria filamentous was counted using Sedgewick-Rafter counting chamber under a light microscope (Olympus BX51) (Karlson et al., 2010). Cyanobacterial biovolume was calculated by multiplying the mean cell volume of each taxon by the cell counts in the sample (Chorus et al., 2021). Cyanobacteria species were identified using light microscopes (Olympus BX51) using а morphological comparison method based on the standard references including Duong, 1996; Komárek and Anagnostidis, 1989; Komárek et al., 1999).

To isolate cyanobacteria, live samples (sample without formaldehyde fixation) were collected at the sampling sites. A modified single-cell isolation method was used to separate filaments of *R. raciborskii* (Kotai, 1972). The isolated strains were grown at $24\pm4^{\circ}$ C in a 12:12 hour dark/light cycle with 2,000-3,000 lux light intensity. Toxins of the cultured strains were determined by obtaining the biomass at the end of the exponential growth phase by centrifugation for 10 minutes at 6,000 rpm at room temperature. The pellets were then freeze-dried at -55°C for 24 hours and kept at -20°C before toxicity analysis (Nguyen et al., 2017).

2.3. CYN determination by Highperformance liquid chromatography (HPLC)

The biomass samples of the lyophilized strains were extracted in 2.5 mL of methanol (MeOH-99.9%) containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in an ultrasonic tank for 15 minutes. The samples were then sonicated on ice for 1 minute. The extracted fluid was filtered through chromatography column C_{18} which was cleaned with methanol. After filtration, the filtered fluid was evaporated at a low temperature (30°C) for 5 minutes. The remaining after evaporation was re-suspended in 250 µL ml of deionized twice distilled water and filtered by centrifugation (4,000 rpm for 30 min) before HPLC analysis (Meriluoto and Codd, 2005; Nguyen et al., 2007). The HPLC Thermo system consists of UltiMate 3000 autosampler and UltiMate 3000 variable wavelength detector (VWD); BDS Hypersil C18 column (250)4.6 mm. × 5.0 µm), mobile phase: MeOH (A) 30% - water containing 10 mM of ammonium acetate (B) 70% (v/v), flow rate: 0.8 mL min⁻¹; sample volume: 10 µL; column chamber temperature: 30°C; analysis time: 7 minutes; the samples were injected into the mobile phase in front of the column. In the column, the components were separated and the detector measured the absorbance of CYN at 262 nm wavelength. Cylindrospermopsin was determined by absorption spectra and retention times and quantified at 262 nm wavelength using the pure cylindrospermopsin standard (CRM-CYN, PESTANAL[®], Sigma-Aldrich Pte. Ltd.) as an standard external substance.

2.4. Amplification of the genes involved in cylindrospermopsin production

2.4.1. DNA extraction

Exponentially growing cultures (10 mL of each) were centrifuged at 1500 rpm for 15 min at room temperature. The pellets were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and frozen at -18°C until DNA extraction. Extraction of total genomic DNA was carried out according to the CTAB protocol of Doyle and Doyle (1987) with some modifications. The pellets were ground in preheated $(65^{\circ}C)$ 1mL 2× CTAB buffer and 10 μ L β mercaptoethanol and then incubated at 65°C for 1h. DNA was extracted with phenol chloroform - isopenthylethanol (25:24:1) solution, then centrifuged at 13000 rpm at 4°C for 10 min to collect the supernatant. The supernatant was aspirated into a new Eppendorf tube, added isopropanol in a 1:1 ratio, and placed in a deep refrigerator for one hour. Then, centrifuge at 13,000 rpm at 4°C for 15 min to collect the precipitated DNA. The pellets were dissolved entirely by adding 1 volume of ethanol (70%). DNA was collected by centrifuging at 13,000 rpm at 4°C for 10 min, dried at room temperature, then re-suspended in 20 µL of double-distilled water at 37°C overnight.

2.4.2. Amplification of the genes

The *cyrB* and *cyrC* gene fragments involved in the cylindrospermopsin (CYN) biosynthesis were amplified by PCR using the oligonucleotide primer pairs M4/M5 and M13/M14 (Schembri et al., 2001). Thermal cycling conditions for PCR were 1 cycle at 94°C for 4 min, 30 cycles at 94°C for 10s, at 55°C for 20s, at 72°C for 1 min, and 1 cycle at 72°C for 7 min. DNA amplification reaction was carried out in the thermal cycler (iCyler, Bio-Rad). PCR products were examined by agarose gel electrophoresis on 1.4% at 50 V in $1 \times$ TAE buffer and the electrophoresis image analysis by a gel documentation system (Bio-Rad).

2.5. Data analysis

Principal component analysis (PCA) and Pearson correlation analysis were used to evaluate the relationship of environmental parameters (pH, DO, water temperature, turbidity, N-NO₃, N-NH₄, P-PO₄, TN and TP) on the biomass of *R. raciborskii* and the CYN concentration in the researched reservoir (SPSS statistics (version 22)). Analysis of variance (ANOVA) was used to test the significant differences at p < 0.05.

3. Results and discussions

3.1. Raphidiopsis raciborskii and its biovolume in the Buon Phong reservoir

The trichomes of the R. raciborskii were Detailed morphological straight. characteristics of this species have been described in the previous study (Ngo et al., 2022) (Fig. 2). In Vietnam, R. racirskii occurs in Xuan Huong Lake, Tri An reservoir and some water bodies in Hue (Dao et al., 2010; Nguyen et al., 2017). In the current study, R. raciborskii occurred throughout the year in the Buon Phong reservoir with its biovolume varying considerably with the seasons, low in the months of the rainy season and higher in the months of the dry season. The biovolume ranged from 0.12 to 9.14 mm³ L⁻¹ (Fig. 3) Blooms of R. raciborskii occurred in the dry months of the year when its biovolume ranged from 1.56 to 9.14 mm³ L⁻¹ and reached the maximum biovolume at the end of the dry

Thi Diem My Ngo et al.

season, 9.14 mm³ L⁻¹. Dense blooms of R. raciborskii were also observed in shallow in northern Taiwan, ponds when its biovolume reached the highest value of 102.5 mm³ L⁻¹ at the end of September 2009 (Yamamoto and Shiah, 2012, 2016). In a study on the influence of environmental factors on cyanobacterial blooms in 20 reservoirs in semi-arid regions in Brazil, Barros et al. observed that R. raciborskii prevailed and bloomed in 8 reservoirs with the highest biovolume above 10 mm³ L⁻¹ in the BO reservoir in Ceará state (Barros et al., 2019). CYN concentration in the Buon Phong reservoir (0.04-0.72 µg L⁻¹, Ngo et al., 2022) was equivalent to that in the Jordan Lake, North Carolina (0-0.83 μ g L⁻¹, Wiltsie et al., 2018), the Macau reservoir, Macau (0-1.3 ug L⁻¹, Zhang et al., 2014) and in the Huong River, Vietnam (0-1.58 μ g L⁻¹, Nguyen et al., 2017), but still higher than those of the Harris Chain Lake, Florida; the Nero Lake, Yaroslavl

and the Tai-Hu reservoir, Taiwan with toxic contents were 0.05-0.2 $\mu g L^{-1}$; 0.12-0.36 μ g L¹ and 0.14 μ g L¹, respectively (Williams et al., 2007; Babanazarova et al., 2015; Marbun et al., 2012). However, CYN concentration in our study was significantly lower than those of the Saudi Arabia Gazan Dam Lake (0.03-23.3 μ g L⁻¹, Mohamed and Al-Shehri, 2013), the Saudi Arabia Gazan Lake $(4-173 \ \mu g \ L^{-1})$, Mohamed and Al-Shehri, 2013) and the water supply farm in central Queensland (1050 μ g L⁻¹, Shaw et al., 2004). The CYN concentration in our reservoir was still within the permitted threshold for lifetime drinking water guideline values by the World Health Organization (WHO), 0.7 μ g L⁻¹ (Chorus et al., 2021). Indeed, the presence of the CYN in the reservoir shows the potential risks in the future water source when it is used for domestic purposes, livestock and aquaculture.



Figure 2. The morphology of *Raphidiopsis raciborskii* in the Buon Phong reservoir: a-c. Filaments with heterocytes in nature; d-h. Filament with heterocytes and akinetes in cultures. Scale bars = $10 \mu m$



Vietnam Journal of Earth Sciences, 44(2), 257-272

Figure 3. Seasonal variation of the *Raphidiopsis raciborskii* biovolume and CYN concentrations in the Buon Phong reservoir during the study period from May 2019 - April 2020

3.2. The ability to produce CYN toxin and genes involved in CYN production in cultured strains

In this study, four potential CYNproducing strains of R. raciborskii (CBP2, CBP3, CBP4 and CBP5) were successfully isolated from water samples taken from the Buon Phong reservoir. These isolated strains were cultured in Z8 medium and harvested in the exponential growth stage. The results from HPLC analysis of biomass extracts of the four strains showed that all of them produced CYN and toxic concentrations varied from 0.016 to 0.345 μ g g⁻¹ DW (Table 1). The highest concentration was 0.345 $\mu g g^{-1}$ DW, which was much lower than those of R. raciborskii cyDB-1 strain in America (0.85 mg g⁻¹, Jiang 2014; Jiang et al., 2014), R. raciborskii CHAB3438 strain in China (2.6 mg g⁻¹, Jiang 2014; Jiang et al., 2014) and R. raciborskii QHSS/NR/Cyl/03 strain in Australia (6.73 mg g^{-1} (LC/MS), Yilmaz et al., 2008). On the other hand, previous studies have noted that some R. raciborskii isolated strains in Europe and Africa did not produce CYN toxin (Berger et al., 2006; Piccini et al., 2013;

Rzymsk et al., 2018; Falfushynska et al., 2018; Stefanova et al., 2020). Willis et al. (2016) demonstrated significant differences in each individual when studying the population variation and toxicity of R. raciborskii in Wivenhoe Lake, Australia. All strains isolated in the small lake also showed differences in growth rate, toxin content and trichome morphology (Willis et al., 2016). A recent study also showed that strain variability could be just as significant as species differences in determining the growth response to light and temperature (Xiao et al., 2017). R. raciborskii exists in many forms (straight, curved, coiled) natural environments. Strains in the Buon Phong reservoir all exist in straight form, with the average length of trichomes in the culture medium (from 97 µm to several centimeters) more extended than in the wild (100-250 μ m) and will sometimes form into tufts. Although all strains could produce CYN, toxin content in strains was different. The difference in toxin content in the strains is probably due to the number, sequence, and organization of genes in the CYN toxin gene cluster between different strains. This could lead to a change in toxicity in these strains.

Table 1. Cylindrospermopsin (CYN) concentrations in cultured *Raphidiopsis raciborskii* isolated strains from the Buon Phong reservoir

nom me buo	n i nong i obei	i o n
Species	Strain codes	CYN concentrations
		μg g ⁻¹ DW
Raphidiopsis	CBP2	0.029
raciborskii	CBP3	0.016
	CBP4	0.345
	CBP5	0.019

Previous studies suggested that CYN producing cyanobacterial species must have homologs for cyrA, cyrB, and cyrC to produce the toxin (Fergusson and Saint, 2003; Rasmussen et al. 2008; Lorenzi et al. 2015). The first three steps in CYN biosynthesis involve the cyrA, cyrB and cyrC genes. CyrB recognizes guanidinoacetate and catalyzes the formation of first N-containing the heterocycle. CyrC further catalyzes elongation of the polyketide chain, resulting in a tricyclic structure. cyrB (PKS) and cyrC (PS) genes as markers to detect and control toxin-producing R. raciborskii strains in water sources quickly and accurately (Saint et al., 2007; Wiedner et al., 2007; Nguyen et al., 2017). Our PCR results showed that two (CBP2, CBP3) out of four toxic strains were amplified both cyrB and cyrC gene fragments. While the cyrB and cyrC gene fragments were not observed in the remaining two toxic strains (CBP4, CBP5). The presence of both these gene fragments was also observed in 8 toxic R. raciborskii strains in water bodies in Hue (Nguyen et al., 2017), 12 toxic R. raciborskii strains in aquatic bodies in Thailand (Tawong et al., 2019) or a toxic strain (R. raciborskii QHSS/NR/Cyl/03) in Australia (Yilmaz et al., 2008). The absence of toxin synthesis genes in the toxic strains was also detected in the study of Tawong et al. (2019). The study results showed a lack of PCR products of the cyrA gene in seven toxic R. raciborskii strains and cyrC gene in one toxic R. raciborskii strain in Thailand. The absence of the cyrB genes in the toxic strain R. raciborskii Boczowskie also presented in some lakes in Poland (Tawong et al., 2019). We think that the absence of cyrB, cyrC gene fragments in toxic strains was probably due mismatches in the primer target sites (genetic variations that occur on the CYN synthesis genes to each strain). Besides, the cyr gene cluster consists of 15 genes from cyrA to cyrO, each gene performs a specific function in the process of the biosynthesis of CYN. In which cyrA gene participates in the initiation of toxin synthesis and cyrJ gene catalyzes the sulfation process and completes CYN structure. In many studies, cyrJ has been considered a suitable genetic marker in identifying CYN-producing cyanobacteria (Hoff-Risseti et al. 2013; Kokociński et al. 2012; Lorenzi et al., 2013; Tawong et al., 2019). Therefore, we suggest that further determination of cyrA, cyrJ gene fragments in toxic strains will have more accurate results.

3.3. Environmental factors affecting biovolume of Raphidiopsis raciborskii and CYN concentration in the Buon Phong reservoir

3.3.1. Physical and chemical characteristics

of The results environmental characteristics from May 2019 to April 2020 of the Buon Phong reservoir are shown in Table 2. Water temperature varied seasonally and higher values were recorded in the dry season, ranging from 25.8°C to 32.2°C, while the average temperature was 28.4°C. The pH values ranged from 6.7 to 7.7 and did not differ significantly during the studied period. The higher values of DO were observed in the dry season and its values varied between a minimum of 3.8 to a maximum of 6.6 mg L^{-1} . The turbidity ranged from 15.1 to 33.0 NTU and higher values were measured in the rainy season than the dry season. The concentrations of N-NH₄ did not have obvious seasonal differences, which slightly changed

from 0.1 to 0.26 mg L⁻¹. The lowest value of the concentrations of N-NO₃ was 0.09 mg L⁻¹, while the highest value was 0.27 mg L⁻¹. The soluble orthophosphate-P concentrations varied from 0.05 to 0.09 mg L⁻¹. The mean concentrations of total nitrogen (TN) ranged from 1.05 to 2.56 mg L⁻¹, higher than that of total phosphorus (TP), ranging from 0.09 to 0.31 mg L⁻¹. Based on the mean concentrations of total phosphorus (TP), the Buon Phong reservoir's water quality was classified as eutrophic (OECD, 1982). This was also the cases of the Nui Coc reservoir and the Suoi Hai Lake where the TN and TP concentrations were characteristic of eutrophic conditions (Duong et al., 2013; Nguyen et al., 2021).

Table 2. Environmental variables in the Buon Phong reservoir during the year 2019-2020 (average values and min-max values)

Month	Temp.	DO $(mg L^{-1})$	Turbidity (NTU)	рН	$N-NH_4$ (mg L ⁻¹)	$N-NO_3$ (mg L ⁻¹)	TN (mg L ⁻¹)	P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	TP (mg L ⁻¹)
May-19	26.87	3.76	23.59	7.57	0.23	0.1	2.34	0.08	0.22
	(26.7 - 27.1)	(3.72 - 3.8)	(23.47 - 23.78)	(7.52 - 7.61)	(0.229 - 0.232)	(0.099 - 0.107)	(2.31 - 2.38)	(0.079 - 0.088)	(0.21 - 0.226)
Jun-19	26.83	4.67	21.37	6.71	0.19	0.09	2	0.07	0.19
	(26.5 - 27)	(4.6 - 4.74)	(21.22 - 21.5)	(6.65 - 6.77)	(0.182 - 0.193)	(0.088 - 0.091)	(1.98 - 2.03)	(0.064 - 0.068)	(0.174 - 0.189)
Jul-19	25.83	4.6	20.87	7.62	0.11	0.24	1.47	0.05	0.17
	(25.5 - 26)	(4.54 - 4.64)	(19.3 - 22.8)	(7.52 - 7.7)	(0.11 - 0.12)	(0.22 - 0.26)	(1.4 - 1.56)	(0.045 - 0.053)	(0.163 - 0.182)
Aug-19	27.83	4.81	22.80	7.63	0.1	0.14	1.40	0.06	0.13
	(27.5 - 28)	(4.72 - 4.9)	(21 - 24)	(7.5 - 7.7)	(0.084 - 0.112)	(0.141 - 0.145)	(1.29 - 1.52)	(0.056 - 0.065)	(0.124 - 0.137)
Sep-19	27.33	4.57	33	7.43	0.14	0.27	1.12	0.06	0.31
	(27 - 27.5)	(4.44 - 4.76)	(28.1 - 42.3)	(7.3 - 7.58)	(0.126 - 0.14)	(0.238 - 0.294)	(1.17 - 1.19)	(0.056 - 0.06)	(0.3 - 0.327)
Oct-19	26.67	5.25	32.7	6.75	0.14	0.21	1.33	0.08	0.13
	(26.5 - 27)	(5.06 - 5.38)	(28 - 37.5)	(6.71 - 6.8)	(0.137 - 0.146)	(0.207 - 0.216)	(1.32 - 1.33)	(0.078 - 0.079)	(0.128 - 0.132)
Nov-19	27.83	5.73	20.5	6.81	0.1	0.19	1.33	0.09	0.13
	(27.5 - 28)	(5.66 - 5.8)	(17 - 24.4)	(6.79 - 6.83)	(0.095 - 0.106)	(0.187 - 0.193)	(1.26 - 1.4)	(0.09 - 0.094)	(0.123 - 0.127)
Dec-19	28.83	5.21	15.07	7.06	0.14	0.12	1.23	0.09	0.12
	(28.5 - 29)	(5.18 - 5.26)	(12.6 - 17.5)	(7.01 - 7.1)	(0.135 - 0.148)	(0.117 - 0.12)	(1.18 - 1.29)	(0.086 - 0.093)	(0.098 - 0.138)
Jan-20	32.17	5.63	23.24	6.97	0.13	0.17	1.32	0.07	0.13
	(32.1 - 32.2)	(5.52 - 5.72)	(22.91 - 23.7)	(6.92 - 7.01)	(0.12 - 0.135)	(0.168 - 0.175)	(1.27 - 1.38)	(0.061 - 0.073)	(0.12 - 0.134)
Feb-20	30.9	6.62	21.36	6.66	0.14	0.17	1.35	0.06	0.09
	(30.8 - 31)	(6.54 - 6.7)	(20.93 - 22.01)	(6.61 - 6.7)	(0.137 - 0.141)	(0.158 - 0.177)	(1.23 - 1.42)	(0.052 - 0.064)	(0.087 - 0.096)
Mar-20	31.37	6.13	23.49	7.70	0.13	0.11	1.05	0.08	0.14
	(31.2 - 31.5)	(6.08 - 6.18)	(23.38 - 23.7)	(7.63 - 7.78)	(0.126 - 0.134)	(0.103 - 0.117)	(1.03 - 1.09)	(0.072 - 0.091)	(0.128 - 0.149)
Apr-20	27.93	5.6	22.8	7.46	0.26	0.1	2.56	0.09	0.25
	(27.3 - 28.3)	(5.42 - 5.89)	(22.29 - 23.1)	(7.4 - 7.5)	(0.237 - 0.282)	(0.098 - 0.105)	(2.37 - 2.8)	(0.081 - 0.089)	(0.231 - 0.264)

3.3.2. Influence of environmental factors on the biovolume of R. raciborskii

To determine the influence of environmental factors on R. raciborskii biovolume during the research period from May 2019 to April 2020 at the Buon Phong reservoir, used we PCA (Principle Correspondence Analysis) and Pearson analysis for evaluation. The results showed that R. raciborskii biovolume was positively correlated with the CYN concentration (R=0.54, p < 0.01). Abiotic variables such as temperature, DO, N-NH₄, P-PO₄ were also correlated with the R. raciborskii biovolume in the Buon Phong reservoir (R=0.45, p<0.01; R=0.58, p<0.01; R=0.46, p<0.01; R=0.35, p<0.05, respectively) (Fig. 4, Table 3). R.

raciborskii is a common bloom species in natural lakes, reservoirs and rivers from tropical, subtropical to temperate regions (Padisák et al., 1997; Burford et al., 2016, 2018; Fu et al., 2019). Numerous studies have suggested that the abundance of R. raciborskii could be influenced by environmental factors such as light, temperature and nutrients (Antunes et al., 2015; Burforf et al., 2016; Pagni et al., 2020). The correlation between temperature and R. raciborskii in the Buon Phong reservoir showed that high temperature stimulated the growth of R. raciborskii. A significant correlation between R. raciborskii and water temperature was also observed in lakes in different climate zones and R. raciborskii biomass reached its highest value during periods of the warmest water

Thi Diem My Ngo et al.

temperatures (e.g., Briand et al., 2004: Mehnert et al., 2010). Similar results were observed when researching the population variation in lakes from tropical, subtropical to indicating temperate regions that *R*. raciborskii was strongly associated with temperature and preferred high temperature for its growth, but it also tolerated a wide range of climates (Bonilla et al., 2012; Recknagel et al., 2019). In this study, although R. raciborskii was present all year round, blooms occurred only in the months of the dry season $(1.56-9.14 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1})$ when the temperature was high, ranging from 27.83-32.17°C. Indeed, field and laboratory studies have indicated that the preferred temperature for blooming was above 25°C (Mehnert et al., 2010; Kokocinski et al., 2017). However, blooms of this species were also found in lakes with low temperatures (Everson et al., 2011; Bonilla et al., 2012; Soares et al., 2013; Jia et al., 2021). Even, their blooms have been observed in winter in lakes and dams in Northern Taiwan, Lago Javier, Uruguay and the Rio Grande do Sul when the temperatures were at 16.3°C, 11.2°C and 11°C, respectively (Fabre et al., 2010; Yamamoto et al., 2012; Wener et al., 2020). Wener et al. (2020) found that the blooms of R. raciborskii formed yellow streaks on the surface at temperatures between 12.6-15.5°C, still its biomass reached its maximum value in late summer when the temperature was high, at 26.6°C. The tolerance to low temperatures may also be important in creating favorable conditions for this species to prevail in winter.



Figure 4. Principal component analysis (PCA) based on biotic and abiotic factors during the period of May 2019-April 2020 in the Buon Phong reservoir

lactors in Buon	Phong	reserve		i iviay.	2019 IU	o April	2020					
	Temp	DO	Turbidity	pН	N-NH ₄	N-NO ₃	P-PO ₄	TN	TP	R. raciborskii	CYN	Total Cyanobacteria
Temp	1											
DO	0.717**	1										
Turbidity	-0.176	-0.173	1									
pН	-0.135	-0.386*	0.051	1								
N-NH ₄	-0.188	-0.237	0.003	0.112	1							
N-NO ₃	-0.227	-0.053	0.475**	-0.049	-0.546**	1						
P-PO ₄	0.066	0.108	-0.193	-0.059	0.313	-0.482**	1					
TN	-0.378*	-0.389*	-0.102	0.129	0.877**	-0.508**	0.190	1				
TP	-0.447**	-0.549**	0.439**	0.434**	0.497**	0.186	-0.093	0.429**	1			
R. raciborskii	0.445**	$\theta.580^{**}$	-0.138	0.136	$\theta.462^{**}$	-0.412*	0.347*	0.286	0.043	1		
CYN	0.300	0.476**	-0.154	0.038	0.115	-0.047	-0.140	0.081	0.056	0.538**	1	
Total Cyanobacteria	0.795**	0.765**	-0.195	-0.056	0.057	-0.340*	0.176	-0.175	-0.308	0.696**	0.377*	1
**. Correlation is signifi	cant at the (0.01 level (2	-tailed).									
*. Correlation is signific	ant at the 0.	05 level (2-	tailed).									

Table 3. Pearson correlation between relative abundance of species *R. raciborskii* and environmental factors in Buon Phong reservoir from May 2019 to April 2020

In addition to temperature, the abundance of these species is also correlated with other environmental factors such as nutrients (nitrogen (N) and phosphorus (P)) (Mohamed et al., 2018). Abiotic variables affecting the biovolume of R. raciborskii in this study were dissolved nitrogen and phosphorus (N-NH₄, P-PO₄). The positive correlation between R. raciborskii and N-NH4 and P-PO4 in our study was also observed in previous studies (Kokocinski et al., 2012; Nguyen et al., 2017; Burford et al., 2016, 2018; Werner et al., 2020). These studies suggested that $N-NH_4$ and P-PO₄ were considered as the preferred source of N, and P to stimulate the growth of the R. raciborskii populations. The biomass of this species is higher in lakes with high N-NH₄ and P-PO₄ concentrations (Kokocinski et al., 2012; Nguyen et al., 2017; Burford et al., 2016, 2018; Werner et al., 2020). On the contrary, a number of studies noted that R. raciborskii can still prevail even under the low N and P conditions (Burford et al., 2018 Recknagel et al., 2019; Galvanese et al., 2019; Xiao et al., 2020; Werner et al., 2020; Li et al., 2020). This is partly explained by the high storage and the absorption capacity for N-NH₄, and P-PO₄ of R. raciborskii (Burford et al., 2006; Kenesi et al., 2009; Kokoscinski et al., 2012). The intraspecific variation occurs in the R. raciborskii strains within a population or among the populations in geographical areas that differ in N, P uptake and storage capacity and dissolved organic phosphorus (DOP), dissolved organic nitrogen (DON) and utilization capacity have been shown in recent studies (Bai et al., 2014; Bolius et al., 2017; Willis et al., 2017; Burford et al., 2020). Studies on isolated strains of R. raciborskii in Australia showed higher P uptake rates than other continents (Willis et al., 2017). The biovolume of R. raciborskii in the Buon Phong reservoir was negatively N-NO₃ correlated with concentration (R=-0.41, p < 0.05). This observation has also been reported in the studies in Dongquan city, Egypt and western Poland) where shows that the strong growth of R. raciborskii can still be detected in reservoirs with low N-NO₃ concentrations (Briand et al., 2002; Mohamed et al., 2007; 2013; Kokociński and Soininen, 2012; Lei et al., 2014). Indeed, studies have indicated that R. raciborskii can utilize nitrogen sources, including nitrogen-soluble inorganic form (N-NH₄, N-NO₃) and organic form (urea) with a clear preference for N-NH₄ based on both growth rate (Amaral et al., 2014) and absorption rate (Burford et al., 2016). Moreover, the Pearson analysis showed that the biovolume of R. raciborskii was positively correlated with the CYN concentration, and the toxic concentration increased when R. raciborskii biomass increased. We identified CYN toxin in the isolated strains of R. raciborskii in the Buon Phong reservoir using the HPLC method,

which further confirmed the correlation between biovolume and the CYN concentration of *R. raciborskii* in the reservoir. From that, the potential hazard of the water sources with the presence of the toxic *R. raciborskii* cyanobacterium and CYN toxic should be noticed.

4. Conclusions

R. raciborskii (straight) occurred throughout the year in the reservoir, but bloomed only in the dry and warmer months. Four strains of R. raciborskii that were able to produce CYN have been successfully isolated. Among them, CBP2 and CBP3 strains were amplified by both cyrB and cyrC gene fragments. Abiotic factors such as temperature and nutrients play a key role in the presence and predominance of R. raciborskii species in the reservoir. In addition, the biovolume of *R*. raciborskii was positively correlated with the CYN concentration indicating that the cause of CYN contamination in this waterbody was the presence of R. raciborskii. Furthermore, the presence of *Microcystis* spp. and Anabaena sp. in the reservoir indicates that the development of R. raciborskii was regulated by environmental factors and can be completed by the cyanobacterial species in the water body.

Acknowledgments

We wish to thank the cell laboratory, Institute of Biotechnology, Hue University for identifying, isolating, culturing, and analyzing toxins by ELISA, and the laboratory of the Institute of Biotechnology, Tay Nguyen University for analyzing environmental factors and toxins by HPLC, and the laboratory of the Department of Biology, the Hue University of Science for taking pictures of specimens. We appreciate the effort of an anonymous reviewer and the valuable comments and suggestions for improving the manuscript.

References

- Amaral V., Bonilla S., Aubriot L., 2014. Growth optimization of the invasive cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii in response to phosphate fluctuations. Eur J. Phycol., 49, 134-41.
- Antunes J.T., Leão P.N., Vasconcelos V.M., 2015. Cylindrospermopsis raciborskii: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. Front. Microbiol, 6, 1-13.
- Babanazarova O.V., Sidelev S.I., Fastner J., 2015. Northern expansion of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanoprokaryota) observed in shallow highly eutrophic lake Nero (Russia). Int. J. Algae, 17, 131-141.
- Bai F., Liu R., Yang Y., 2014. Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii. Harmful Algae, 39, 112-20.
- Barros M.U., Wilson A.E., Leitão J.I., Pereira S.P., Buley R.P., Fernandez-Figueroa, E.G., Capelo-Neto, J., 2019. Environmental factors associated with toxic cyano-bacterial blooms across 20 drinking water reservoirs in a semi-arid region of Brazil. Harmful Algae, 86, 128-137.
- Berger C.B.N., Muriel G., Marc B., Filippo R., Alain C., Marc T., Ce´cile B., 2006. Seaso-nal dynamics and toxicity of Cylindrospermopsis raciborskii in Lake Guiers (Senegal, West Africa). FEMS Microbiol Ecol, 57, 355-366.
- Bernard C., Harvey M., Briand J.F., Biré R., Krys S., Fontaine J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse Cylindrospermopsis raciborskii strains: evidence of liver damage caused by a French C. raciborskii strain. Environ. Toxicol, 18, 176-186.
- Bolius S., Wiedner C., Weithoff G., 2017. High local trait variability in a globally invasive cyanobacterium. Freshwater Biology, 62, 1879-1890.
- Bonilla S., Aubriot L., Soares M.C.S., González-Piana M., Fabre A., Huszar V.L.M., Lürling M., Antoniades D., Padisák J., Kruk C., 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria Planktothrix agardhii and Cylindrospermopsis raciborskii? FEMS Microbiology Ecology, 79, 594-607.

- Briand J.F., Leboulanger C., Humbert J.F., Bernard C., Dufour P., 2004. Cylindrospermopsis raciborskii (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming. J. Phycol, 40, 231-238.
- Burford M.A., Beardall J., Willis A., Orr P.T., Magalhaes V.F., Rangel L.M., Neilan B., 2016. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii. Harmful Algae, 54, 44-53.
- Burford M.A., Carey C.C., Hamilton D.P., Huisman J., Paerl H.W., Wood S.A., Wulff A., 2020. Perspective: Advancing the research agenda for improving under-standing of cyanobacteria in a future of global change. Harmful Algae, 91, 101601.
- Burford M.A., McNeale K.L., McKenzie-Smith F.J., 2006. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte Cylindrospermopsis raciborskii in a subtropical water reservoir. Freshwater Biol., 51, 2143-53.
- Burford M.A., Willis A., Chuang A., Man X., Orr P., 2018. Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 36, 1032-1039.
- Chorus I., eds., 2021. Toxic Cyanobacteria in Water, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva. CH, 859p.
- Dao T.S., Cronberg G., Nimptsch J., Do-Hong L.C., Wiegand C., 2010. Toxic cyano-bacteria from Tri An Reservoir, Vietnam. Nova Hedwigia., 90, 433-448.
- Doyle J.J, Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19, 11-15.
- Duong D.T., 1996. Taxonomy of Cyanobacteria of Vietnam. Hanoi: Agriculture Publishing House (in Vietnamese), 189p.
- Duong T.T., Le T.P.Q., Dao T.S., Pflugmacher T., Rochelle-Newall E., Hoang T.K., Vu T.N., Ho TC., Dang D.K., 2013. Seasonal variation of cyanobacteria and microcystins in the Nui Coc Reservoir, Northern Vietnam. Journal of Applied Phycology, 25, 1065-1075.

- Everson S., Fabbro L., Kinnear S., Wright P., 2011. Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving Aphanizomenon ovalisporum (Forti) and Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. Harmful Algae, 10, 265-276.
- Fabre A., Carballo C., Hernández E., Piriz P., Bergamino L., Mello L., González S., Pérez G., León J.G., Aubriot L., Bonilla S., Kruk C., 2010. El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. PanAmerican Journal of Aquatic Sciences, 5, 112-125.
- Falfushynska H., Horyn O., Brygider A., Fedoruk O., Buyak B., Poznansky D., Poniedziałek B., Kokociński M., Rzymski P., 2018. Is the presence of Central European strains of Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii a threat to a freshwater fish? An in vitro toxicological study in common carp cells. Aquatic Toxicology, 30901-9.
- Fergusson K.M., Saint C.P., 2003. Multiplex PCR assay for Cylindrospermopsis raciborskii and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. Environ Toxicol, 18, 120-125.
- Fu L.Q., Yeung C.Y., Fujii M., Neilan B.A., T. David, Waite T.D., 2019. Physiological responses of the freshwater N2-fixing cyanobacterium Raphidiopsis raciborskii to Fe and N availabilities. Environmental Microbiology, 21, 1211-1223.
- Galvanese L.F., André A.P., Luis A., 2019. Acclimation at high temperatures increases the ability of Raphidiopsis raciborskii (Cyanobacteria) to withstand phosphate deficiency and reveals distinct strain responses. Journal of Phycology, 54, 359-368.
- Hoff-Risseti C., Dörr F.A., Schaker P.D., Pinto E., Werner V.R., Fiore M.F., 2013. Cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in Cylindrospermopsis raciborskii strains from Brazilian freshwater. PLoS One, 8, e74238.
- Jiang Y., Xiao P., Yu G., Shao J., Liu D., Azevedo S.M.F.O., Li R., 2014. Sporadic distribution and distinctive variations of cylindrospermopsin genes in cyano-bacterial strains and environmental samples

from Chinese freshwater bodies. Appl. Environ. Microbiol., 80, 5219-5230.

- Karlson B., Cusack C., Bresnan E., 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis (IOC Manuals and Guides, no. 55) (IOC/2010/MG/55). UNESCO, Paris.
- Kenesi G., Shafik H.M., Kovács A.W., Herodek S., Présing M., 2009. Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N2 fixation of Cylindrospermopsis raciborskii in phosphorus-limited chemostat cultures. Hydrobiologica, 623, 191-202.
- Kokocinski M., Jasser I., Karosiene J., Kasperoviciene J., Kobos J., Koreiviene J., Soi-ninen J., Szczurowska A., Woszczyk M., 2017. Distribution of invasive Cylindrospermopsis raciborskii in the East-Central Europe is driven by climatic and local environmental variables. FEMS Microbiol. Ecol., 93, 127-137.
- Kokocinski M., Soininen J., 2012. Environmental factors related to the occurrence of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanophyta) at the north-eastern limit of its geographical range. Eur. J. Phycol., 47, 12-21.
- Komárek J., Anagnostidis K., 1989. Modern approach to the classification system of cyano-phytes 4-Nostocales. Archiv für Hydrobiologie/Supplements, 56, 247-345.
- Komárková J., Laudares-Silva R., Senna P.A.C., 1999. Extreme morphology of Cylindro-spermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. Algol. Stud., 94, 207-222.
- Kotai J., 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae Publication B-11/69.
 Norwegian Institute for Water Research, Blindern. Oslo 3 Norway.
- Le Thuong, 2010. Variation in species composition and number of phytoplankton in EaNhai and EaSup reservoirs, Dak Lak province. PhD thesis in Biology. Vietnam Institute of Science and Technology, Institute of Oceanography, 147p.
- Lei L., Peng L., Xianghui H., Bo-Ping H., 2014. Occurrence and dominance of Cylindrospermopsis raciborskii and dissolved cylindrospermopsin in

urban reservoirs used for drinking water supply, South China. Environ Monit Assess., 186, 3079-3090.

- Li X., Shouliang H., Jingtian Z., Xiao Z., Beidou X., Renhui L., 2020. Factors related to aggravated Cylindrospermopsis (cyanobacteria) bloom following sediment dredging in an eutrophic shallow lake. Environmental Science and Ecotechnology, 2, 100014.
- Lorenzi A.C., Chia M.A., Piccin-Santos V., 2015. Microcystins and cylindrospermopsins molecular markers for the detection of toxic cyanobacteria: a case study of northeastern Brazilian reservoirs. Limnetica, 34, 269-282.
- Marbun Y.R., Yen H.K., Lin T.F., Lin H.L., Michinaka A., 2012. Rapid on-site monitoring of cylindrospermopsin-producers in reservoirs using quantitative PCR. Sustain. Environ. Res., 22, 143-151.
- Mehnert G., Leunert F., Cires D., 2010. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. J. Plankton Res., 32, 1009-21.
- Meriluoto J., Codd G.A., 2005. Toxic: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Åbo Akademi University Press, Åbo, Finland.
- Mohamed Z.A., 2007. First report of toxic Cylindrospermopsis raciborskii and Raphidiopsis mediterranea (Cyanoprokariota) in Egyptian fresh waters. FEMS Microbiol. Ecol., 59, 749-761.
- Mohamed Z.A., Al-Shehri A.M., 2013. Assessment of cylindrospermopsin toxin in an arid Saudi lake containing dense cyanobacterial bloom. Environ. Monit. Assess., 185, 2157-2166.
- Mohamed Z.A., Bakr A., 2018. Concentrations of cylindrospermopsin toxin in water and tilapia fish of tropical fishponds in Egypt, and assessing their potential risk to human health. Environ. Sci. Pollut. Res., 25, 36287-36297.
- Ngo T.D.M., Ton T.P., Nguyen T.T.L., 2022. Bloom of harmful cyanobacterium Raphidiopsis raciborskii in Buon Phong reservoir, Dak Lak province. Journal of Science: Natural Science: Hue University, 131, 28-35.
- Nguyen T.L., Nguyen T.T.H., Nguyen T.P.T., Pham Q.V., 2021. Assessing trophic status of Suoi Hai

Reservoir using Carlson's Trophic State Index. Vietnam Journal of Earth Sciences, 43(4), 509-523. https://doi.org/10.15625/2615-9783/16562.

- Nguyen T.T.L., Cronberg G., Larsen J., Moestrup Ø., 2007. Planktic cyanobacteria from freshwater localities in Thua Thien-Hue province, Vietnam. I. Morphology and distribution. Nova Hedwigia, 85, 1-34.
- Nguyen T.T.L., Hoang T.H., Nguyen T.K., Duong T.T., 2017. The occurrence of toxic cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii and its toxin cylindrospermopsin in the Huong River, Thua Thien Hue province, Vietnam. Environ Monit Assess., 189, 490p.
- OECD, 1982. Eutrophication of Waters monitoring, Assessment and Control. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Padisák J., 1997. Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: Worldwide distribution and review of its ecology. Archiv Für Hydrobiologie. Supplementband. Monographic Studies, 107, 563-593.
- Pagni R.L., Falco P.B., André C.A.S., 2020. Autecology of Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju. Acta Limnologica Brasiliensia, 32, e24.
- Pham Q.V., Nguyen T.T.H., Nguyen T.B., Nguyen N.T., La T.O., Nguyen T.P.T., 2019. Developing algorithm for estimating chlorophyll-a concentration in the Thac Ba Reservoir surface water using Landsat 8 Imagery. Vietnam Journal of Earth Sciences, 41(1), 10-20.

https://doi.org/10.15625/0866-7187/41/1/13542.

- Piccini C., Aubriot L., D'Alessandro B., Martigani F., Bonilla S., 2013. Revealing toxin signatures in cyanobacteria: report of genes involved in cylindrospermopsin synthesis from saxitoxinproducing Cylindrospermopsis raciborskii. Adv. Microbiol, 03, 289-296.
- Puerto M., Prieto A.I., Maisanaba S., Gutiérrez-Praena D., Mellado-García P., Jos Á., Cameán A.M., 2018.
 Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindrospermopsin by a battery of in vitro tests.
 Food Chem. Toxicol, 121, 413-422.
- Rasmussen J.P., Giglio S., Monis P.T., Campbell R.J., Saint C.P., 2008. Development and field testing of a

real-time PCR assay for cylindrospermopsinproducing cyanobacteria. J. Appl. Microbiol, 104, 1503-1515.

- Recknagel F., Zohary T., Rücker J., Orr P.T., Castelo C., Nixdorf B., Max M.M., 2019. Causal relationships of Raphidiopsis (formerly Cylindrospermopsis) dynamics with water temperature and N:P-ratios: A meta-analysis across lakes with different climates based on inferential modelling. Harmful Algae, 84, 222-232.
- Rzymski P., Horyn O., Budzyńska A., Jurczak T., Kokociński M., Niedzielski P., Klimaszyk P., Falfushynska Н., 2018. report А of Cylindrospermopsis raciborskii and other cyanobacteria in the water reservoirs of power plants in Ukraine. Environ. Sci. Pollut Res., 25, 15245-15252.
- Shaw G.R., McKenzie R.A., Wickramasinghe W.A., Seawright A.A., Eaglesham G.K., Moore M.R., 2004. Comparative toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin between mice and cattle: human implications. Harmful Algae, 465-467.
- Soares M.C.S., Lürling M., Huszar V.L.M., 2013. Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii. Phycological Research, 61, 61-67.
- Stefanova Katerina., Mariana R., Blagoy U., Georg G., Maya S., 2020. Pilot search for cylindrospermopsin producers in nine shallow Bulgarian waterbodies reveals nontoxic strains of Raphidiopsis raciborskii, Raphidiopsis mediterranea and Chrysosporum bergii. Biotechnology & biotechnological equipment, 34, 384-394.
- Tawong W., Pongcharoen P., Nishimura T., Adachi M., 2019. Molecular characterizations of Thai Raphidiopsis raciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) based on 16S rDNA, rbcLX, and cylindrospermopsin synthetase genes. Plankton Benthos Res., 14, 211-223.
- Werner V.R., Andréa T., Lisangela M.S., João S.Y., Emanuel B.N., David E.B., Dail H.L., 2020. Morphological, ecological and toxicological aspects of Raphidiopsis raciborskii (Cyanobacteria) in a eutrophic urban subtropical lake in southern Brazil. Iheringia Serie Botanica, 2446-8231.
- Wiedner C., Ruecker J., Brueggemann R., Nixdorf B., 2007. Climate change affects timing and size of

Thi Diem My Ngo et al.

populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. Oecologia, 152, 473-484.

- Williams C.D., Aubel M.T., Chapman A.D., D'Aiuto P.E., 2007. Identification of cyanobacterial toxins in Florida's freshwater systems. Lake Reserv. Manage, 2, 144-152.
- Willis A., Chuang, A.W., Woodhouse, J.N. 2016. Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii. Toxicon, 119, 307-10.
- Willis A., Posselt A.J., Burford M.A., 2017. Variations in carbon-to-phosphorus ratios of two Australian strains of Cylindrospermopsis raciborskii. European Journal of Phycology, 52, 303-310.
- Willis A., Woodhouse J.N., Ongley S.E., Jex A.R., Burford M.A., Neilan B.A., 2018. Genome variation in nine cooccurring toxic Cylindrospermopsis raciborskii strains. Harmful Algae, 73, 157-166.
- Wood S.A., Pochon X., Luttringer-Plu L., Vant B.N., Hamilton D.P., 2014. Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of Cylindrospermopsis raciborskii in New Zealand. Harmful Algae, 39, 64-74.

- Xiao M., Willis A., Burford M. A., 2017. Differences in cyanobacterial strain responses to light and temperature reflect species plasticity. Harmful Algae, 62, 84-93.
- Yamamoto Y., Shiah F.K., 2012. Factors relating to the dominance of Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria) in a shallow pond in northern Taiwan. J. Phycol., 48, 984-991.
- Yang Y., Gongliang Y., Youxin C., Nannan J., Renhui L., 2020. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin. Journal of Hazardous Materials, S0304-3894, 326431.
- Yilmaz M., Phlips E.J., Szabo N.J., Badylak S., 2008. A comparative study of Florida strains of Cylindrospermopsis and Aphanizomenon for cylindrospermopsin production. Toxicon, 51, 130-139.
- Zhang W., Lou I., Ung W.K., Kong Y., Mok K.M., 2014. Analysis of cylindrospermopsin- and microcystin-producing genotypes and cyanotoxin concentrations in the Macau storage reservoir. Hydrobiologia, 741, 51-68.

SỰ NỞ HOA CỦA LOÀI VI KHUẨN LAM ĐỘC *RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII* TẠI HỒ BUÔN PHONG, TỈNH ĐẮK LẮK

Ngô Thị Diễm My^{1*}, Tôn Thất Pháp², Nguyễn Thị Thu Liên¹

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam
² Khoa Sinh, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Ngô Thị Diễm My <ngothidiemmy@hueuni.edu.vn> (Ngày nhận bài: 20-5-2021; Ngày chấp nhận đăng: 05-9-2021)

Tóm tắt. Nghiên cứu này điều tra thành phần loài, đặc điểm hình thái, sự biến động mật độ tế bào của vi khuẩn lam (VKL) *Raphidiopsis raciborskii* và hàm lượng độc tố cylindrospermopsin trong hồ Buôn Phong. Hàm lượng độc tố được xác định bằng phương pháp ELISA. Kết quả cho thấy sự có mặt của 23 loài VKL phân bố trong 10 chi, 5 họ và 3 bộ (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales). *Raphidiopsis raciborskii* tồn tại dưới dạng sợi thẳng, nở hoa quanh năm với số lượng tế bào 53,6 × 10⁶–58,3 × 10⁷ tb/L. Độc tố cylindrospermopsin tồn tại trong suốt 12 tháng nghiên cứu với hàm lượng 0,04–0,72 µg/L. Mặc dù hàm lượng độc tố vẫn nằm dưới mức độ nguy hại (1 µg/L), nhưng sự xuất hiện độc tố trong nước hồ chứa cho thấy rủi ro tiềm tàng do đây là nguồn nước được sử dụng cho sinh hoạt, chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: phức titanium peroxide, g-C₃N₄, TiO₂, TiO₂/g-C₃N₄, xử lý nước thải

Blooming of harmful cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* in Buon Phong reservoir, Daklak province

Ngo Thi Diem My^{1*}, Ton That Phap², Nguyen Thi Thu Lien¹

¹Hue University, Institute of Biotechnology, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam ²Department of Biology, University of Science, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

> * Correspondence to Ngo Thi Diem My <ngothidiemmy@hueuni.edu.vn> (Received: 20 May 2021; Accepted: 05 September 2021)

Abstract. This study investigates species biodiversity composition, morphological characteristics and fluctuation in cell density of cyanobacterial *Raphidiopsis raciborskii*, and cylindrospermopsin toxin concentration in Buon Phong reservoir. The cylindrospermopsin concentration in the reservoir was identified by using the ELISA test. The results show that 23 species of cyanobacteria in 10 genera, 5 families, 3 orders (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales) were identified. Straight filamentous *Raphidiopsis raciborskii* bloomed all year round in the reservoir with cell densities of 53,6 ×10⁶–58,3 × 10⁷ cells/L. The results of the ELISA test show that cylindrospermopsin toxin in the reservoir existed during the 12 months of the studied period, ranging from 0.04 to 0.72 µg/L. Although the toxin concentration is below the hazard level (1 µg/L), the presence of cylindrospermopsin in the reservoir poses a potential risk because the reservoir water is used for domestic, livestock and aquaculture activities.

Keywords: cyanobacteria, cylindrospermopsin, bloomed, reservoir, Dak Lak

1 Mở đầu

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng hiện tượng phú dưỡng, nồng độ CO2 tăng và sự nóng lên toàn cầu có khả năng làm tăng tần suất, cường độ và thời gian nở hoa của vi khuẩn lam (VKL) trong nhiều hệ sinh thái thủy sinh trên toàn cầu. Xu hướng này rất đáng lo ngại vì nó có thể có tác động tiêu cực đến đa dạng sinh học và hoạt động của lưới thức ăn trong hệ sinh thái thủy sinh cũng như tiềm năng nguy hại khi sử dụng các vùng nước này làm nước uống, sinh hoạt và các mục đích giải trí khác. Raphidiopsis raciborskii (trước đây được gọi là Cylindro-spermopsis raciborskii) là một trong những VKL dạng sợi được nghiên cứu nhiều nhất do sự phân bố trên toàn cầu và khả năng gây độc của nó [1, 2]. Sự xâm lấn ồ ạt của loài này có lẽ một phần chúng có khả năng thích nghi cao với những thay đổi của các yếu tố môi trường; mặt khác, chúng tồn tại trong nhiều kiểu sinh thái khác nhau của môi trường sống [3, 4].

Cylindrospermopsin (CYN) là độc tố do Raphidiopsis raciborskii tạo ra. Nó là một alkaloid (C15H21N5O7S; 415,43 Da) với gốc guanidine ba vòng, một nhóm sulfat và một vòng uracil. Hoạt động sinh học của hợp chất này rất rộng. Cylindrospermopsin gây độc tính trên tế bào, gen, hệ miễn dịch, thần kinh và nội tiết. Cơ chế gây độc chủ yếu bằng cách ức chế sự tổng hợp protein, tương tác với cytochrome P450 (CYP450), gây ra stress oxy hóa và đứt gãy sợi DNA, liên kết với các thụ thể estrogen và ảnh hưởng đến hoạt động của acetylcholinesterase (AChE) [5, 6]. Không giống như độc tố microcystin (MC), phần lớn độc tố CYN được giải phóng ra môi trường nước bên ngoài, tan mạnh trong nước, bền với ánh sáng mặt trời, bền nhiệt và tồn tại trong khoảng pH rộng [7, 8]. Tốc độ phân hủy của CYN trong môi trường tự nhiên rất nhỏ. Vì vậy, CYN gây ra nhiều nguy cơ tiềm

năng và khó khăn trong việc sử dụng và quản lý nguồn nước.

Buôn Phong là hồ chứa nhân tạo có vai trò quan trọng trong đảm bảo an toàn nguồn nước nhằm đáp ứng nhu cầu cho con người như: cung cấp nước sinh hoạt, tưới tiêu, phục vụ cho chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Do đó, trong bài báo này, chúng tôi tập trung nghiên cứu về thành phần loài VKL, đặc điểm hình thái *Raphidiopsis raciborskii*, sự biến động mật độ *Raphidiopsis raciborskii* và hàm lượng độc tố CYN trong nước hồ Buôn Phong. Kết quả cho thấy tiềm năng nguy hại của loài VKL này và độc tố CYN trong vấn đề sử dụng và quản lý nguồn nước noi đây.

2 Phương pháp

2.1 Vị trí nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5-2019 đến 4-2020 tại Hồ Buôn Phong (12°92'01", 108°16'24") thuộc tỉnh Đắk Lắk. Vị trí điểm thu mẫu được xác định như trong Hình 1.

Hồ Buôn Phong là hồ chứa nhân tạo; dung tích toàn bộ là 3,3 triệu m³; diện tích lưu vực 13 km²; hồ có độ sâu trung bình 10 m; nơi sau nhất vào mùa



Hình 1. Bản đồ vị trí hồ Buôn Phong với các điểm thu mẫu: BP1, BP2 và BP3

mưa là 20 m. Hồ nhận nước từ ba con suối nhỏ và nước mưa, cung cấp nước sinh hoạt, nước tưới, phục vụ chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Hồ nhận nguồn thải từ nước thải sinh hoạt và nước thải nông nghiệp.

2.2 Phương pháp thu mẫu

Thời gian thu mẫu: Mẫu nước và mẫu thực vật phù du được thu hàng tháng tại ba điểm thu mẫu ở Buôn Phong (BP1, BP2 và BP3), trong suốt thời gian từ tháng 5 năm 2019 đến tháng 4 năm 2020.

Mẫu định tính: Mẫu được thu bằng cách sử dụng lưới thu mẫu với kích thước mắt lưới 20 μm và được bảo quản bằng dung dịch formaldehyde 4%. Tại mỗi điểm lấy mẫu, mẫu sống (không cố định formaldehyde) được thu trong chai nhựa dùng cho phân lập [9].

Mẫu định lượng: Mẫu được thu thập bằng một ống nhựa dài 2 m và đường kính 10 cm. Sau đó, các mẫu nước (độ sâu 0–2 m) được khuấy đều trong một xô và lấy 100 mL mẫu nước đựng trong chai thủy tinh sẫm màu. Tất cả các mẫu định lượng được bảo quản bằng dung dịch Lugol's acid [9].

Mẫu phân tích độc tố: 3 mL nước được lấy từ hồ chứa đựng trong ống eppendorf và lưu trữ ở -18 °C cho tới khi phân tích.

2.3 Phân tích định tính

Sử dụng phương pháp so sánh hình thái. Việc định loại và mô tả loài được dựa trên cả mẫu sống, mẫu cố định cũng như các mẫu nuôi cấy. Ảnh được chụp bằng kính hiển vi BX51 có gắn bộ phận chụp hình [9].

2.4 Phân tích định lượng

Đếm số lượng tế bào dựa vào phương pháp đếm với buồng đếm Sedgewick – Rafter (dung tích 1 mL với 1000 ô đếm) [10].

2.5 Phân tích độc tố CYN

Thí nghiệm miễn dịch liên kết với enzym (ELISA). Nông độ cylindrospermopsin trong mẫu nước tự nhiên và trong môi trường nuôi cấy được phân tích độc tố với bộ kit Abraxis Cylindrospermopsin ELISA (Microtiter Plate) (Abraxis, Hoa Kỳ). Tất cả các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mật độ quang của mẫu được đo ở bước sóng 450 nm trên hệ thống máy đọc ELISA tự động (CODA, Bio-Rad, Hoa Kỳ) và nồng độ cylindrospermopsin (µg/L) trong các mẫu được xác định dựa vào đường chuẩn của cylindrospermopsin-HRP. Nếu nồng độ cylindrospermopsin trong các mẫu cao hơn chất chuẩn (2 µg/L) thì các mẫu được pha loãng cho đến khi nằm trong khoảng của đường chuẩn.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Thành phần loài VKL ở hồ Buôn Phong

Kết quả khảo sát thành phần loài VKL đã ghi nhận được 23 loài thuộc 10 chi, 5 họ và 3 bộ (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales). Danh mục thành phần loài VKL được sắp xếp theo hệ thống phân loại của Komárek và Anagnostidis và được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần loài VKL ở hồ Buôn Phong tỉn	h
Đắk Lắk	

CTT	T ^1	Hồ Bu (ôn phong BP)
511	Ten knoa nộc	Mùa mưa	Mùa khô
	Bộ Chroococc	ales	
	Họ Merismoped	iaceae	
1	Aphanocapsa holsatic	+	+
2	Merismopedia tenuissima	+	-
3	Woronichinia compacta	+	+
4	Woronichinia naegeliana*	_	+
5	Snowella fennica	+	-
	Họ Microcysta	ceae	
6	Microcystis aeruginosa*	+	+

		Hồ Bu	ôn phong					
CTT	T^- 1.1 1	(BP)					
511	Tên khoả hộc	Mùa	Mùa khô					
		mưa	WIUA KIIO					
7	Microcystis							
/	wesenbergii*	т	т					
8	Microcystis botrys*	+	+					
9	Microcystis flos–aquae*	+	+					
10	Microcystis							
10	panniformis*	+	Ŧ					
11	Microcystis novacerkii	+	+					
12	Microcystis cf natan	+	+					
13	Microcystis sp1.	+	-					
14	Microcystis sp2.	+	-					
	Bộ Oscillatori	ales						
	Họ Oscillatoria	iceae						
15	Oscillatoria limosa*	-	+					
16	Oscillatoria sancta	-	+					
17	Oscillatoria sp1.	+	+					
Ho Pseudanabaenaceae								
10	Planktolyngbya							
18	circumcreta*	+	+					
10	Planktolyngbya		+					
19	limnetica*	+						
	Bộ Nostocal	es						
	họ Nostocace	eae						
20	Anabaena sp.*	+	+					
21	Anabaena circinalis*	_	+					
22	Aphanizomenon							
22	ovalisporum*	-	+					
23	Raphidiopsis raciborskii*	+	+					

Ghi chú: Dấu +: Xuất hiện; dấu *: Loài sinh độc tố.

Tại hồ Buôn Phong tất cả các loài đều có mặt tại ba vị trí nghiên cứu (BP1, BP2 và BP3), trong đó 13 loài sinh độc tố (chiếm 56,5% tổng số loài) tập trung chủ yếu ở bộ Chroococcales (46,2%). Nhìn chung, không có sự khác biệt trong phân bố theo không gian của các loài VKL trong hồ nghiên cứu. Điều này phản ảnh tính chất khá đồng nhất của môi trường nước trong toàn hồ.

Trong số 23 loài VKL ghi nhận được, bộ Chroococcales bao gồm những loài dạng đơn bào, tập đoàn có 2 họ (chiếm 40% tổng số họ), 5 chi (chiếm 50% tổng số chi) và 14 loài (chiếm 60,7% tổng số loài). Tiếp đến là bộ Oscillatoriales bao gồm những loài dạng sợi, không có tế bào dị hình có 2 họ (chiếm 40%), 2 chi (chiếm 20%), 5 loài (chiếm 21,7%); bộ Nostocales gồm những loài dạng sợi, có tế bào dị hình có 1 họ (chiếm 18,1%), 3 chi (chiếm 30%), 4 loài (chiếm 17,4%) (Hình 2). Như vậy, bộ Chroococcales chiếm số lượng nhiều nhất cho cả họ, chi và loài.

Tỉ lệ phần trăm tương đối của các chi VKL trong khu vực nghiên cứu là Microcystis 39,1%, Oscillatoria 13,1%, các chi như Planktolyngbya, Anabaena, Woronichini, mỗi chi chiếm 8,7% và các chi còn lại như Aphanizomenon, Raphidiopsis, Snowella, Merismopedia, Aphanocapsa mõi chi chiếm 4,4%, trong đó chi Microcystis chiếm số lượng loài nhiều nhất trong quần xã VKL (Hình 2). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu của một số tác giả khi thấy rằng Microcystis là thành phần chính trong các thủy vực họ nghiên cứu [11, 9, 12]. Sự giàu loài của những chi này trong các vực nước có thể vì trong những hồ nông và phú dưỡng thường xuất hiện nhiều loài của nhóm VKL không có khả năng cố định nitơ (nitơ trong hồ không giới hạn), đặc biệt là bộ Chroococales và bộ Osillatoriales bao gồm chi Microcystis và Oscillatoria [13].

Khi so sánh với các nghiên cứu về thành phần loài VKL trong một số thủy vực đã được công bố, kết quả khảo sát cho thấy số lượng loài VKL trong khu vực nghiên cứu ít hơn so với hồ Dầu Tiếng – 42 loài [12], hồ Hoàn Kiếm – 55 loài [11] và hồ Trị An – 59 loài [14]. Có thể sự kém đa dạng về thành phần loài ở hồ nghiên cứu một phần là do sự nở hoa thuần loài của *R. raciborskii* xuyên suốt cả năm kết hợp với sự nở hoa của các loài thuộc chi



Hình 2. Tỷ lệ phần trăm số loài trong các chi VKL ở hồ Buôn Phong

Microcystis (Microcystis aeruginosa, Microcystis wesenbergii, Microcystis botrys, Microcystis flos-aquae, Microcystis panniformis) trong suốt những tháng mùa khô. Các loài này được cho là có khả năng tạo ra độc tố như chất ức chế cảm nhiễm. Tại hồ Waahi cũng bắt gặp hiện tượng tương tự khi *R. raciborskii* nở hoa thuần loài, đạt số lượng tế bào trên 262.700 tb/L thì chỉ bắt gặp sự xuất hiện của một loài tảo silic với mật độ rất thấp 1900 tb/L. Khi hiện tượng nở hoa giảm, sự đa dạng thành phần loài tăng lên với sự xuất hiện của một số loài như: Peridinium sp., Trachelmonas volvocina và Scenedesmus sp. [15]

3.2 Sự xuất hiện của *Raphidiopsis raciborskii* và hàm lượng độc tố CYN trong hồ Buôn Phong

Hình thái của Raphidiopsis raciborskii (Wołoszyńska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique và Salerno

Hình thái: Ngoài tự nhiên, sợi đơn độc, dài 100–250 µm, thẳng, trôi nổi tự do, hơi eo thắt tại vách tế bào, thon dần về cuối sợi với những tế bào tận cùng hình nón tròn. Các tế bào dinh dưỡng hình trụ, dài 4,5–10,5 µm, rộng 2,5–4,5 µm. Tế bào dị hình đơn độc, hình nón hoặc hình mũi tên, rộng 3–3,5 µm, dài 6,5–10,5 µm. Bào tử nghỉ không quan sát thấy trong tự nhiên. Trong nuôi trồng, chiều dài sợi biến đổi mạnh từ 50 µm cho đến hàng chục cm, bện lại với nhau thành đám (Hình 3d). Các tế bào dinh dưỡng dài 10–12,5 µm, rộng 3–4,5 µm. Hình thái tế bào dị hình thay đổi đa dạng trong cùng môi trường nuôi cấy, xuất hiện tận cùng ở một hoặc cả hai đầu mao tản, dài 6–11,5 µm, rộng 2,5–5,5 µm.

Phân bố: Loài xâm lấn, có mặt hầu hết ở các lục địa ngoại trừ vùng cực. Loài này trước đây được tìm thấy ở Hà Nội, Huế và Nha Trang với tên gọi *Anabaenopsis raciborskii* Woloszynska. Trong các năm gần đây chúng xuất hiện ở hồ Xuân Hương, hồ Dầu Tiếng, hồ Trị An và một số thủy vực ở Huế [3, 10, 11]. Loài có khả năng tạo độc tố cylindrospermopsin, saxitoxin.



Hình 3. Hình thái của *Raphidiopsis raciborskii* ở hồ Buôn Phong trong tự nhiên và trong nuôi trồng. Kích thước 10 μm

Sự xuất hiện của loài VKL độc Raphidiopsis raciborskii và hàm lượng độc tố CYN trong hồ Buôn Phong

Loài *R. raciborskii* xuất hiện xuyên suốt cả năm trong hồ nghiên cứu với mật độ biến động đáng kể theo mùa, thấp vào những tháng mùa mưa và cao hơn vào những tháng mùa khô. Mật độ dao động từ 53,6 × 10⁶ đến 58,3 × 10⁷ tb/L (Hình 4). Trong những nghiên cứu trước đây, mật độ nở hoa của *R. raciborskii* ở nhiều thủy vực là khác nhau: trên 262 × 10⁶ tb/L [15], trên 200 × 10⁶ tb/L [16] hoặc nằm trong khoảng từ 1,3 × 10⁶ đến 41,5 × 10⁶ tb/L [17]. Với số lượng tế bào trong khoảng từ 53,6 × 10⁶ đến 58,3 × 10⁷ tb/L, loài *R. raciborskii* được xem là nở hoa quanh năm tại hồ nghiên cứu. Hiện tượng



Hình 4. Mật độ và hàm lượng độc tố từ tháng 5-2019 đến 4-2020 ở hồ Buôn Phong

này cũng xuất hiện trong một số thủy vực ở vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới [18, 2]. Có lẽ vì nhu cầu nhiệt độ cao cho sự sinh trưởng nên R. raciborskii không thể tồn tại dạng tế bào dinh dưỡng trong suốt mùa đông ở vùng ôn đới. Riêng ở vùng nhiệt đới ấm quanh năm, quần thể chủ yếu tồn tại dạng sợi dinh dưỡng và đây cũng được xem như nguồn nguyên liệu cho sự nở hoa quanh năm của loài này trong những thủy vực nhiệt đới [16]. Bên cạnh đó, trong hồ còn xuất hiện loài VKL Anabaena sp. với mật độ tế bào khá cao từ 2,2 × 106 đến 72,3 × 106 tb/L. Đồng thời với việc phân tích sự hiện diện và mật độ tế bào R. raciborskii trong hồ, chúng tôi cũng phân tích hàm lượng độc tố CYN trong mẫu nước tự nhiên. Các kết quả phân tích ELISA cho thấy độc tố CYN trong nước hồ chứa có mặt trong suốt 12 tháng nghiên cứu, dao động từ 0,04 đến 0,72 µg/L. Hàm lượng cao nhất rơi vào cuối mùa khô (tháng 4) và thấp nhất là đầu mùa mưa (tháng 5). Mặc dù hàm lượng độc tố vẫn nằm dưới mức độ nguy hại (1 µg/L – WHO) nhưng sự xuất hiện độc tố trong nước hồ chứa đã cho thấy rủi ro tiềm tàng do đây là nguồn nước được sử dụng sinh hoạt, chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản.

4 Kết luận

Qua điều tra thành phần loài VKL ở hồ nghiên cứu, chúng tôi ghi nhận được 23 loài phân bố trong 10 chi, 5 họ và 3 bộ (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales). Trong đó, bộ Chroococcales có số lượng họ, chi và loài cao hơn hai bộ còn lại. Chi *Microcystis* có số lượng loài nhiều nhất trong quần xã VKL tại khu vực nghiên cứu.

Raphidiopsis raciborskii (sợi thẳng) nở hoa quanh năm trong hồ với mật độ tế bào dao động từ $53,6 \times 10^6$ đến $58,3 \times 10^7$ tb/L (thấp vào những tháng mùa mưa và cao hơn vào những tháng mùa khô). Hàm lượng độc tố CYN trong môi trường có mặt trong suốt 12 tháng nghiên cứu, dao động từ 0,03 đến 0,72 µg/L (ELISA). Hàm lượng cao nhất rơi vào cuối mùa khô (tháng 4) và thấp nhất là đầu mùa mưa (tháng 5). Mặc dù hàm lượng độc tố vẫn nằm dưới mức độ nguy hại (1 μ g/L – WHO) nhưng sự xuất hiện độc tố trong nước hồ chứa đã cho thấy rủi ro tiềm tàng do đây là nguồn nước được sử dụng sinh hoạt, chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản.

Tài liệu tham khảo

- Burford MA, Willis A, Chuang A, Man X, Orr P. Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raci-borskii*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 2018(36):1032-1039.
- 2. Werner VR, Tucci A, da Silva LM, Yunes JS, Neuhaus EB, Berthold DE, et al. Morphological, ecological and toxicological aspects of Raphidiopsis raciborskii (Cyanobacteria) in a eutrophic urban subtropical lake in southern Brazil. Iheringia, Série Botânica. 2020;75.
- 3. Amaral V, Bonilla S, Aubriot L. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cy*-*lindrospermopsis raciborskii* in response to phos-phate fluctuations. Eur J Phycol. 2014(49):134-41.
- Rigamonti N, Aubriot L, Martigani F, Bonilla S, Piccini C. Effect of nutrient availability on cylindrospermopsin gene expression and toxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii*. Aquat. Microb. Ecol. 2018(82):105-110.
- 5. Puerto M, Prieto AI, Maisanaba S. Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindro-spermopsin by a battery of in vitro tests. Food Chem Toxicol. 2018(121):413-422.
- 6. Yang Y, Yu G, Chen Y, Jia N, Li R. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin. Journal of hazardous materials. 2021;406:124653.
- Jin Y, Zhang SS, Xu HZ, Ma CX, Sun JM, Li HM, Pei HY. Application of N-TiO₂ for visible light photocatalytic degradation of *Cylin-drospermopsis raciborskii* more difficult than that for photodegradation of *Microcystis aeruginosa*? Environmental Pollution. 2019(245):642-650.
- 8. Stefanova K, Radkova M, Uzunov B, Gärtner G, Stoyneva-Gärtner M. Pilot search for cylindrospermopsin-producers in nine shallow Bulgarian waterbodies reveals nontoxic strains of

Raphidiopsis raciborskii, R. mediterranea and Chrysosporum bergii. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2020;34(1):384-94.

- 9. Nguyen TTL, Hoang TH, Nguyen TK, Duong TT. The occurrence of toxic cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii and its toxin cylindrospermopsin in the Huong River, Thua Thien Hue province, Vietnam. Environmental Monitoring and Assessment. 2017;189(10):490.
- Karlson B, Cusack C, Bresnan E. Microscopic and molecular methods for quantitative phy-toplankton analysis (IOC Manuals and Guides, no. 55) (IOC/2010/MG/55). UNESCO, Paris. 2010.
- 11. Duong TT, Sabine J, Le TPQ, Ho CT, Hoang TK, Nguyen TK, et al. The occurrence of cyanobacteria and microcystins in the Hoan Kiem Lake and Nui Coc Reservoir (Northern Vietnam). Environ Earth Sci. 2014(71)-:2419-2427.
- Pham TL, Dao TS, Tran ND, Jorge N, Claudia W, Utsumi M. Influence of environmental factors on cyanobacterial biomass and microcystin concentration in the Dau Tieng reservoir, a tropical eutrophic water body in Vietnam. Int J Lim. 2017(53):89-100.
- 13. Havens KE, James RT, East TL, Smith VH. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-

point source nutrient pollution. Environmental Pollution. 2003;122(3):379-90.

- Dao TS, Cronberg G, Nimptsch J, Do-Hong LC, Wiegand C. Toxic cyanobacteria from Tri An Reservoir, Vietnam. Nova Hedwigia. 2010b-(90):433-448.
- 15. Ryan EF, Hamilton DP, Barnes GE. Recent occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Waikato lakes of New Zealand. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 2003(37):829-836.
- 16. McGregor GB, Fabbro LD. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and sub-tropical reservoirs: implications for monitoring and management. Lakes and Reservoirs Research and Management. 2000;5(3):195-205.
- 17. Li X, Huo S, Zhang J, Xiao Z, Xi B, Li R. Factors related to aggravated *Cylindrospermopsis* (cyanobacteria) bloom following sediment dredging in an eutrophic shallow lake. Environmental Science and Ecotechnology. 2020;2:100014
- Recknagel F, Zohary T, Rücker J, Orr PT, Branco CC, Nixdorf B. Causal relationships of *Raphidiopsis* (formerly *Cylindro-spermopsis*) dynamics with water temperature and N:P-ratios: A meta-analysis across lakes with different climates based on inferential modelling. Harmful Algae. 2019;84:222-32.

THÀNH PHẦN LOÀI VI KHUẪN LAM Ở HỒ EANHÁI VÀ HỒ BUÔN PHONG TỈNH ĐẮK LẮK

Ngô Thị Diễm My1*, Tôn Thất Pháp2, Nguyễn Thị Thu Liên1

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế
² Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là điều tra sự đa dạng sinh học của những loài vi khuẩn lam (VKL) nước ngọt trong hai hồ chứa ở Đắk Lắk thuộc vùng Cao nguyên Việt Nam. 72 mẫu được thu từ hai hồ trong khoảng thời gian từ tháng 5 năm 2019 đến tháng 4 năm 2020. Kết quả điều tra cho thấy sự hiện diện của 33 loài VKL phân bố trong 14 chi, 6 họ, 3 bộ (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales). Trong đó, bộ Chroococcales ưu thế nhất với 15 loài, chiếm 45,5%, tiếp đến là bộ Oscillatoriales với 12 loài, chiếm 36,4%, còn lại thành phần loài ít nhất là bộ Nostocales với 6 loài, chiếm 18,1%. *Microcystis* là chi đại diện, với số lượng loài nhiều nhất (10 loài), *Cylindrospermopsis raciborskii* (sợi thẳng) xuất hiện quanh năm trong cả hai hồ, 17 loài có tiềm năng sinh độc tố, trong đó có 4 loài (*Cylindrospermopsis raciborskii, Raphidiopsis mediterranea, Aphanizomenon ovalisporum, Planktolyngbya circumcreta*) không chỉ có tiềm năng sinh độc tố mà còn là loài xâm lấn.

Từ khóa: Đắk Lắk, độc tố, hồ chứa, vi khuẩn lam, xâm lấn.

MỞ ĐẦU

Hệ sinh thái nước ngọt là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của VKL, đặc biệt là ở các vùng nhiệt đới, nơi có điều kiện thuận lợi nhất cho sự nở hoa của VKL - một hiện tượng đặc trưng bởi sự phát triển mạnh mẽ của các sinh vật này trong nước. Sinh khối cao của chúng không chỉ là một trong những nguyên nhân chính gây ra vấn đề về mùi và vị trong các thể nước ngọt, mà còn góp phần vào các vấn đề thẩm mỹ, giảm dịch vụ giải trí... Nhiều loài VKL còn tạo ra độc tố gây tử vong hoặc bệnh tật ở các sinh vật nước ngọt, gia súc và thậm chí cả con người (Michele *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2013). VKL nước ngọt ở Việt Nam đã được nghiên cứu từ những năm 1960. Các nghiên cứu của Cao Ngọc Phượng (1964), Phùng Thị Nguyệt Hồng (1992), Dương Đức Tiến (1996), đã ghi nhận được 205 nhóm phân loại VKL từ những vùng miền khác nhau của Việt Nam. Bên cạnh đó, thành phần loài của nhóm sinh vật này cũng được tìm thấy trong các khu hệ thực vật phù du nước ngọt và nước mặn tại Việt Nam (Nguyen *et al.*, 2007).

Đắk Lắk là một trong số các tỉnh nằm trên địa bàn Tây Nguyên và được xem là "**Xứ sở của hồ**". Nguồn nước mặt cung cấp cho hoạt động sống chủ yếu được lấy từ sông, hồ tự nhiên và hồ chứa. Hệ thống hồ nơi đây đóng vai trò quan trọng trong đảm bảo an toàn nguồn nước nhằm đáp ứng nhu cầu cho con người (cung cấp nước uống, nước sinh hoạt), phục vụ cho chăn nuôi, trồng trọt, nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là trong những tháng mùa khô hạn kéo dài (Sở NN&PTNN Đắk Lắk, 2018). Đứng trước tình hình biến đổi khí hậu, Đắk Lắk đang phải đối diện với những sự kiện thời tiết cực đoan như: mưa lớn trong một thời gian ngắn và khô hạn kéo dài khắc nghiệt, điều này có thể dẫn đến thay đổi mực nước và thời gian lưu giữ nước trong hồ. Ở vùng có lượng mưa giảm, lượng nước trong hệ thống thủy sinh giảm và thời gian lưu giữ nước tăng lên sẽ thúc đẩy quá trình phú dưỡng, dẫn đến tăng độ đục, độ dẫn điện, độ mặn, nồng độ dinh dưỡng và sinh khối thực vật phù du, bao gồm cả VKL độc hại. Tuy nhiên, ở những nghiên cứu trước đây trong các thủy vực nước ngọt ở Đắk Lắk chủ yếu tập trung vào thành phần loài thực vật phù du; mối quan hệ giữa các yếu tố môi trường và thành phần loài thực vật phù du, những công trình nghiên cứu về thành phần loài VKL có tiềm năng sinh độc tố trong một số thủy vực ở Đắk Lắk là rất cần thiết. Bài báo này trình bày các kết quả xác định thành phần loài vi khuẩn lam trong 2 hồ chứa EaNhái và Buôn Phong thuộc tỉnh Đắk Lắk.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vị trí nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5/2019 đến 4/2020 tại Hồ EaNhái (12°44'41", 108°11'53") và hồ Buôn Phong (12°92'01", 108°16'24") thuộc tỉnh Đắk Lắk. Vị trí thu mẫu được lựa chọn như trong Hình 1.

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO



Hình 1. Bản đồ các vị trí thu mẫu của 2 hồ chứa thuộc tỉnh Đắk Lắk

Hồ EaNhái là hồ chứa nhân tạo, có nguồn gốc từ một vùng trũng của khu rừng tự nhiên. Tổng diện tích hồ 250 ha với diện tích mặt thoáng là 200 ha, hồ có độ sâu trung bình 6 m, nơi sau nhất vào mùa mưa là 17 m. Diện tích lưu vực 165 km². Hồ nhận nước từ 1 con suối nhỏ và nước mưa. Hồ có vai trò cung cấp nước sinh hoạt, nước tưới, nuôi trồng thuỷ sản và du lịch.

Hồ Buôn Phong là hồ chứa nhân tạo, dung tích toàn bộ là 3,3 triệu m³, diện tích lưu vực 13 km², hồ có độ sâu trung bình 10 m, nơi sau nhất vào mùa mưa là 20 m. Hồ nhận nước từ 3 con suối nhỏ và nước mưa, chủ yếu dùng để cung cấp nước tưới và nhận nước thải sinh hoạt, nông nghiệp. Vào mùa khô thường thấy có hiện tượng nở hoa nước và có mùi.

Phương pháp nghiên cứu

Ngoài thực địa: Mẫu thực vật phù du được thu thập hàng tháng tại 6 vị trí thu mẫu EN1 ($12^{\circ}73'47''$, $108^{\circ}19'98''$), EN2 ($12^{\circ}74'62''$, $108^{\circ}19'76''$), EN3 ($12^{\circ}75'69''$, $108^{\circ}19'96''$), BP1 ($12^{\circ}91'92''$, $108^{\circ}16'23''$), BP2 ($12^{\circ}92'37''$, $108^{\circ}16'77''$), BP3 ($12^{\circ}92'09''$, $108^{\circ}16'92''$) tại hồ Ea Nhái và hồ Buôn Phong (Hình 1). Mẫu thu bằng lưới vớt sinh vật phù du (phytoplankton) đường kính mắt lưới 20 µm và được cố định ngay bằng dung dịch formol 4% (Sournia A., 1978; Findlay và Kling, 2014). Mẫu được thu từ tháng 5/2019 đến tháng 4/2020, tổng số 72 mẫu lưới được thu thập trong suốt thời kỳ thu mẫu.

Trong phòng thí nghiệm: Mẫu tự nhiên, mẫu cố định cũng như mẫu nuôi trồng được kiểm tra dưới kính hiển vi quang học BX51 được trang bị máy hình kỹ thuật số và phần mềm. Kích thước VKL được đo trên cả mẫu tự nhiên và mẫu cố định, đo ít nhất 20 lần trên một đối tượng (Nguyen *et al.*, 2007a). Phân lập theo phương pháp tách tế bào đơn (Andersen, 2005) và nuôi trồng trong môi trường Z8 có cải tiến (Kotai, 1972). Xác định thành phần loài theo hệ thống phân loại của Anagnostidis và Komárek (1985, 1988, 1990) và Komárek và Anagnostidis (1986, 1989, 1999, 2005).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Danh mục thành phần loài VKL trong 2 hồ nghiên cứu

Kết quả khảo sát thành phần loài VKL đã ghi nhận được 33 loài thuộc 14 chi, 6 họ và 3 bộ (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales). Danh mục thành phần loài VKL được sắp xếp theo hệ thống phân loại của Komárek & Anagnostidis (1999, 2005) và được trình bày ở bảng 1. Tại hồ EaNhái có 18 loài (chiếm 54,5% tổng số loài), tất cả các loài đều có mặt tại 3 vị trí nghiên cứu (EN1, EN2 và EN3), trong đó có 10 loài tạo độc tố (chiếm 62,5% tổng số loài) và có mặt trong cả ba vị trí nghiên cứu BP1, BP2 và BP3. Trong đó có 13 loài tạo ra độc tố (chiếm 69,7% tổng số loài) và có mặt trong cả ba vị trí nghiên cứu BP1, BP2 và BP3. Trong đó có 13 loài tạo ra độc tố (chiếm 75% tổng số loài tạo độc) nhiều hơn hồ EaNhái 3 loài và cũng tập trung chủ yếu ở bộ Chroococcales (46,2%). Tại khu vực nghiên cứu có 9 loài phân bố trong 5 chi *Microcystis, Cylindrospermopsis, Oscillatoria, Aphanocapsa* và *Merismopedia* hiện diện trong cả hai hồ (bảng 1). Nhìn chung không có sự khác biệt đáng kể trong phân bố theo không gian của các loài VKL trong cả hai hồ nghiên cứu, điều này phản ảnh tính chất khá đồng nhất của môi trường nước trong toàn hồ.

Bảng 1. Thành phần loài VKL ở hồ EaNhái và hồ Buôn Phong tỉnh Đắk Lắk

OTT	Tên khoa haa	H	ồ EaNhái (EN	1)	Hồ E	Buôn phong (BP)
511	Ten khoa học	EN1	EN2	EN3	BP1	BP2	BP3
	BỘ CHROOCOCCALES HỌ MERISMOPEDIACEAE						
1	Aphanocapsa holsatic	+	+	+	+	+	+
2	Merismopedia tenuissima	+	+	+	+	+	+
3	Woronichinia compacta	-	-	-	+	+	+
4	Woronichinia naegeliana*	-	-	-	+	+	+
5	Snowella fennica	-	-	-	+	+	+
	HỌ MICROCYSTACEAE						
6	Microcystis aeruginosa*	+	+	+	+	+	+
7	Microcystis wesenbergii*	+	+	+	+	+	+
8	Microcystis botrys*	+	+	+	+	+	+
9	Microcystis flos-aquae*	+	+	+	+	+	+
10	Microcystis panniformis*	+	+	+	+	+	+
11	Microcystis novacerkii	-	-	-	+	+	+
12	Microcystis cf natan	-	-	-	+	+	+
13	Microcystis viridis*	+	+	+	-	-	-
14	Microcystis sp1	-	-	-	+	+	+
15	Microcystis sp2.	-	-	-	+	+	+
	BỘ OSCILLATORIALES HỌ OSCILLATORIACEAE						
16	<i>Lyngbya</i> sp.	+	+	+	-	-	-
17	Oscillatoria limosa*	+	+	+	+	+	+
18	Oscillatoria sancta	-	-	-	+	+	+
19	Oscillatoria sp1.	-	-	-	+	+	+
20	Oscillatoria sp2.	+	+	+	-	-	-
	HỌ PHORMIDIACEAE	•	•	•			
21	Phormidium willei	+	+	+	-	-	-
22	Phormidium acticulatum	+	+	+	-	-	-
	HỌ PSEUDANABAENACEAE	•	•	•			
23	Planktolyngbya brevicellularis	+	+	+	-	-	-
24	Planktolyngbya circumcreta*	-	-	-	+	+	+
25	Planktolyngbya limnetica*	-	-	-	+	+	+
26	Pseudanabaena minima	+	+	+	-	-	-
27	Pseudanabaena mucicola*	+	+	+	-	-	-
	BỘ NOSTOCALES HỌ NOSTOCACEAE						
28	Anabaena viguieri*	-	-	-	+	+	+
29	Anabaena circinalis*	-	-	-	+	+	+
30	Aphanizomenon ovalisporum*	-	-	-	+	+	+
31	Cylindrospermopsis raciborskii*	+	+	+	+	+	+
32	Raphidiopsis mediterranea*	+	+	+	-	-	-
33	Raphidiopsis curvata*	+	+	+	-	-	-

Ghi chú: Dấu +: Xuất hiện; dấu - : Không xuất hiện, dấu *: Loài có tiềm năng sinh độc tố.

Trong số 33 loài VKL ghi nhận được, bộ *Chroococcales* bao gồm những loài dạng đơn bào, tập đoàn có 2 họ (chiếm 33,3% tổng số họ), 5 chi (chiếm 35,7% tổng số chi) và 15 loài (chiếm 45,5% tổng số loài). Tiếp đến là bộ Oscillatoriales bao gồm những loài dạng sợi, không có tế bào dị hình có 3 họ (chiếm 50%), 5 chi (chiếm 35,7%), 12 loài (chiếm 36,4%); bộ Nostocales gồm những loài dạng sợi, có tế bào dị hình có 1 họ (chiếm 18,1%), 4 chi (chiếm 28,6%), 6 loài (chiếm 18,1%) (bảng 2, hình 2). Như vậy, bộ Chroococcales và bộ Oscillatoriales đồng chiếm ưu thế với số lượng họ, chi, loài xấp xỉ bằng nhau, bộ Nostocales có số lượng họ, chi, loài thấp nhất. Tỷ lệ này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu ở hồ Dầu Tiếng khi hai bộ Chroococcales (chiếm 35,7%) và Oscillatoriales (chiếm 40,5 %) đồng chiếm ưu thế, trong khi đó bộ Nostocales (23,8%) thấp nhất cả về số lượng họ, chi, loài (Pham *et al.*, 2017).



Hình 2. Tỷ lệ phần trăm số loài theo các bộ trong hai hồ nghiên cứu Bảng 2. Cấu trúc thành phần họ, chi, loài của các bộ VKL trong hai hồ nghiên cứu

Bâ	Chrooco	ccales	Oscillat	oriales	Nosto	cales	Tầng cấ
ВŅ	Số lượng	%	Số lượng	%	Số lượng	%	Tong so
Họ	2	33,3	3	50	1	18,1	6
Chi	5	35,7	5	35,7	4	28,6	14
Loài	15	45,5	12	36,4	6	18,1	33

Tỉ lệ phần trăm tương đối của các chi VKL trong khu vực nghiên cứu là *Microcystis* 30,3%, Oscillatoria 12,1%, *Planktolyngbya* 9,1%, các chi như *Anabaena, Raphidiopsis*, *Pseudanabaena, Phormidium, Woronichinia* mỗi chi chiếm 6,1% và các chi còn lại như *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Snowella*, *Merismopedia*, *Aphanocapsa* mỗi chi chiếm 3,0%, trong đó những loài thuộc chi *Microcystis*, *Oscillatoria* là thành phần chính của quần xã VKL (hình 3). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu của một số tác giả trong và ngoài nước khi thấy rằng *Microcystis* và *Oscillatoria* là hai chi chiếm ưu thế trong các thể nước họ nghiên cứu (Andrew *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2017; Kiên *et al.*, 2017). Sự chiếm ưu thế của những chi này trong các thể nước có thể vì trong những hồ nông, phú dưỡng thường được trội bởi những nhóm VKL không có khả năng cố định Nito (Nito trong hồ không giới hạn), đặc biệt là bộ *Chroococcales* và bộ *Osillatoriales* bao gồm chi *Microcystis* và *Oscillatoria* (Havens *et al.*, 2003). Trái lại, đối với những hồ phú dưỡng phân tầng, có độ sâu trung bình lại được đặc trưng bởi những nhóm VKL có khả năng cố định Nito như *Anabaena* và *Aphanizomenon* (Paerl *et al.*, 2001).



Hình 3. Tỷ lệ phần trăm số loài trong các chi VKL ở 2 hồ nghiên cứu

Khi so sánh với các nghiên cứu về thành phần loài VKL trong một số thủy vực đã được công bố, kết quả khảo sát cho thấy số lượng loài VKL trong khu vực nghiên cứu nhiều hơn số lượng loài VKL được ghi nhận tại ba hồ chứa ở Cao nguyên Lâm Viên tỉnh Lâm Đồng (26 loài) (Tình, 2017), hai hồ chứa ở Đắk Lắk (hồ Easoup + hồ Dakmyl - 29 loài) (Thương, 2010) và 45 hồ chứa ở Sri Lankan (13 loài) (Senanayake *et al.*, 2017) nhưng ít hơn đáng kể so với hồ Dầu Tiếng - 42 loài, hồ Hoàn Kiếm – 55 loài, hồ Trị An – 59 loài. Bên cạnh đó, hầu hết VKL trong khu vực sống trôi nổi, một số ít loài khác có đặc điểm sống đáy (*Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp1., *Oscillatoria* sp2., *Phormidium willei, Pseudana-baena minima*) hoặc vừa sống trôi nổi vừa sống đáy (*Oscillatoria* limosa, *Oscillatoria* sancta, *Phormidium acticulatum*). Nhìn chung, các đặc điểm nêu trên của VKL từ hai hồ nghiên cứu khá giống so với các đặc điểm tương tự của VKL từ hồ Trị An, hồ Dầu Tiếng và một số thủy vực ở Huế (Nguyen *et al.*, 2007; Dao *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2017).

Các loài VKL có tiềm năng sản sinh ra độc tố

Tại hai hồ nghiên cứu đã xác định được 17 loài VKL (chiếm 51,5% tổng số loài) phân bố trong 9 chi nằm trong danh mục các loài có khả năng sản sinh độc tố và được trình bày trong bảng 2. *Trong đó chi Microcystis, Pseudanabaena, Woronichinia* tạo ra độc tố gan; chi *Anabaena, Oscillatoria, Planktolyngbya* thường tạo ra độc tố gan và độc tố thần kinh; chi *Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Raphidiopsis* tạo ra độc tố té bào và độc tố thần kinh (Kim *et al.*, 2014). Kết quả cho thấy rằng, số lượng VKL độc trong khu vực nghiên cứu là rất cao chiếm hơn 50% tổng số loài. Tỷ lệ này cao hơn nhiều so với 3 hồ chứa ở cao nguyên Lâm Viên (chiếm 30,8% tổng số loài), hai hồ chứa (hồ Easoup + hồ Dakmyl) ở Đấk Lắk (chiếm 34,6% tổng số loài). Điều này cho thấy nguy cơ ô nhiễm độc tố cũng như tiềm năng rủi ro về vấn đề sức khỏe khi sử dụng nguồn nước nơi đây là rất lớn.

Tên loài	Hồ EaNh	ái (EN)	Hồ Buôn p	hong (BP)
	Mùa mưa	Mùa khô	Mùa mưa	Mùa khô
Woronichinia naegeliana	-	-	-	+
Microcystis aeruginosa	-	+	+	+
Microcystis wesenbergii	-	+	+	+
Microcystis botrys	-	+	+	+
Microcystis flos-aquae	-	+	+	+
Microcystis panniformis	-	+	+	+
Microcystis viridis	-	+	-	-
Oscillatoria limosa	-	+	-	+
Planktolyngbya circumcreta	-	-	+	+
Planktolyngbya limnetica	-	-	+	+
Pseudanabaena mucicola	-	+	-	-
Anabaena viguieri	-	-	+	+
Anabaena circinalis	-	-	-	+
Aphanizomenon ovalisporum**	-	-	-	+
Cylindrospermopsis raciborskii**	+	+	+	+
Raphidiopsis mediterranea**	+	-	-	-
Raphidiopsis curvata	+	-	-	-

Bảng 2. Thành phần loài VKL có tiềm năng sản sinh ra độc tố ở hồ EaNhái và hồ Buôn Phong

Ghi chú: Dấu +: Xuất hiện; dấu - : Không xuất hiện, dấu **: Loài xâm lấn và có tiềm năng sinh độc tố

Hầu hết các loài VKL độc trong hai hồ nghiên cứu chỉ xuất hiện vào những tháng mùa mưa hoặc những tháng mùa khô của năm, chỉ riêng *Cylindrospermopsis raciborskii* và một số loài thuộc chi *Microcystis* xuất hiện xuyên suốt trong tất cả các tháng của năm (bảng 2).Tại hồ Buôn Phong *Cylindrospermopsis raciborskii* đồng xuất hiện với *Microcystis* ssp. trong suốt thời kỳ nghiên cứu, kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả khi họ cho rằng sự đồng trội này có lẻ do khả năng tự điều chỉnh vị trí của mình trong cột nước và chúng có môi trường sống gối chồng lên nhau (Soares *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2015). Trái với kết quả trên có một số nghiên cứu cho rằng *Cylindrospermopsis raciborskii* đồng trội hoặc đồng xuất hiện với *Lyngbya, planktolyngbya và Planktothrix*, trong khi đó *Microcystis* thì đồng trội hoặc đồng xuất hiện với những loài thuộc cùng một chi và chi *Sphaerocavum* (Soares *et al.*, 2013). Thậm chí, một số tác giả tìm thấy sinh khối của chi *Cylindrospermopsis* trong một vài hệ sinh thái nước (Marinho *et al.*, 2002; Crossetti *et al.*, 2008).

Tại hồ EaNhai *Cylindrospermopsis raciborskii* nở hoa quanh năm, sự nở hoa quanh năm của loài này cũng được bắt gặp trong một số hồ chứa ở vùng nhiệt đới, điều này có lẽ do *Cylindrospermopsis raciborskii* có nhu cầu ánh sáng thấp, khoảng chịu đựng nhiệt độ lớn, chiến lược sử dụng nitơ linh động, khả năng hấp thu và dự trữ photpho cao hay nói cách khác chúng có biên độ sinh thái rộng nơi những yếu tố môi trường chủ chốt (Soares *et al.*, 2013; Michele *et al.*, 2016). Kèm theo đó là khả năng tạo độc tố như chất cảm nhiễm, sống cách tầng nước mặt 2-3 m và khả năng tạo bào tử nghỉ dưới cường độ ánh sáng cao (Senanayake *et al.*, 2017). Trong khi đó những loài thuộc chi *Microcystis* chỉ xuất hiện vào những tháng mùa khô và cũng là mùa nở hoa phổ biến của chúng. Một số tác giả cho rằng khả năng chịu đựng cường đồ ánh sáng cao và khả năng chịu được điều kiện phân tầng đã ủng hộ những loài *Microcystis* ssp. trội trong suốt những tháng mùa hè (Soares *et al.*, 2013).

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO



Hình 4. Các loài VKL có tiềm năng tạo ra độc tố trong hai hồ nghiên cứu
 a. Microcystis wesenbergii; b. Microcystis botrys; c. Microcystis panniformis; d. Microcystis aeruginosa;
 e. Anabaena circinalis; f. Microcystis flosaquae; g. Cylindrospermopsis raciborskii; h và i. Raphidiopsis curvata;
 k. Woronichinia naegeliana; l và m. Aphanizomenon ovalisporum. Thước 10 μm.

KÉT LUẬN

Kết quả điều tra thành phần loài VKL ở hai hồ, ghi nhận được 33 loài phân bố trong 14 chi, 6 họ và 3 bộ (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales). Trong đó, bộ Chroococcales ưu thế nhất với 15 loài chiếm 45,5%, tiếp đến là bộ Oscillatoriales với 12 loài chiếm 36,4%, còn lại thành phần loài ít nhất là bộ Nostocales với 6 loài chiếm 18,1%. Hầu hết các loài VKL sống trôi nổi, một số loài sống bám ở nền đáy hoặc vừa sống trôi nổi vừa sống đáy. Trong tất cả các chi thì *Microcystis* là chi đại diện với số lượng loài nhiều nhất (10 loài), *Cylindrospermopsis raciborskii* (sợi thẳng) xuất hiện quanh năm trong cả hai hồ. 17 loài có tiềm năng sinh độc tố, trong đó có 4 loài (*Cylindrospermopsis raciborskii, Raphidiopsis mediterranea, Aphanizomenon ovalisporum, Planktolyngbya circumcreta*) không chỉ có tiềm năng sinh độc tố mà còn là loài xâm lấn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andrew DT, Monika DR, Alison O, Lewis C, Adam L, Katy L (2018). Analysis of Microcystins in Cyanobacterial Blooms from Freshwater Bodies in England. *Toxins* 1: 39.

Crossetti LO, Bicudo CEM (2008). Adaptations in phytoplakton life strategies to imposed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garc, as Reservoir, over 8 years. *Hydrobiologia* 614:91-105.

Dao TS, Cronberg G, Nimptsch J, Do-Hong LC, Wiegand C (2010b). Toxic cyano-bacteria from Tri An Reservoir, Vietnam, *Nova Hedwigia* 90:433-448.

Duong TT, Sabine J, Le TPQ, Ho CT, Hoang TK, Nguyen TK, Vu TN, Dang DK (2014). The occurrence of cyanobacteria and microcystins in the Hoan Kiem Lake and Nui Coc Reservoir (Northern Vietnam). *Environ Earth Sci* 71:2419-2427.

Havens KE, James RT, East TL, Smith VH (2003). N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environ Pollut*122: 379–390.

Đặng Đình Kim, Dương Thị Thủy, Nguyễn Thị Thu Liên, Đào Thanh Sơn, Lê Thị Phương Quỳnh, Đỗ Hồng Lan Chi (2014). *Vi khuẩn lam độc nước ngọt*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.

Komárek J, Anagnostidis K (1999). Cyanoprokaryota 1, Teil, Chroococcales, 548 p.

Komárek J, Anagnostidis K (2005). Cyanoprokaryota 1, Teil, Oscillatoriales, 759 p.

Marinho MM, Huszar VLM (2002). Nutrient availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (Southeastern Brazil). *Archiv fur Hydrobiologie* 153:443-468.

Moura AN, Oliveira MC, Chia MA, Severiano JS (2015). Co-occurrence of Cylindros-permopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju and *Microcystis panniformis* Komárek et al. in Mundaú reservoir, a semiarid Brazilian ecosystem. *Acta Limnologica Brasiliensia* 27:322-329.

Michele AB, John B, Anusuya W, Philip TO (2016). Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii. Harmful Algae* 54:44-53.

Nguyen LTT, Cronberg G, Larsen J, Moestrup Ø (2007a). Planktic Cyanobacteria from Freshwater Localities in Thua thien Hue Province, Vietnam I. Morphology and Distribution. *Nova Hedwigia* 85:1-34.

Paerl HW, Fulton RS, Moisander PH, Dyble J (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Sci World J* 1: 76-113.

Pham TL, Dao TS, Tran ND, Jorge N, Claudia W, Utsumi M (2017). Influence of environmental factors on cyanobacterial biomass and microcystin concentration in the Dau Tieng reservoir, a tropical eutrophic water body in Vietnam. *Int J Lim* 53:89-100.

Senanayake PAAPK, Yatigammana SK (2017). Quantitative observations of Cyanobacteria and Dinoflagellata in reservoirs of Sri Lanka. J Sci 46:55-68.

Soares S, Huszar VLM, Miranda N, Mello M, Roland F, Lurling M (2013). Cyanobacterial dominance in Brazil: Distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia* 717:1-12.

Lê Thương (2010). Sự biến đổi về thành phần loài và số lượng thực vật nổi ở hồ EaNhái và EaSup tỉnh ĐăkLăk. Luận án tiến sỹ Sinh học. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hải Dương học.

Lê Thị Tình (2017). Cấu trúc quần xã thực vật phù du trong các hồ chứa ở Cao nguyên Lâm Viên tỉnh Lâm Đồng. Luận án tiến sỹ Sinh học. Viện Hàn lâm Khoa học Và Công nghệ Việt Nam, học Viện Khoa học Công nghệ.

CYANOBACTERIAL COMPOSITION IN EANHAI AND BUON PHONG RESERVOIRS IN DAKLAK

Ngo Thi Diem My^{1*}, Ton That Phap², Nguyen Thi Thu Lien¹

¹ Hue University, Institute of Biotechnology

² Department of Biology, University of Science, Hue University

SUMMARY

The purpose of this study is to investigate the biodiversity of cyanobacterial composition in two reservoirs in Dak Lak, which is located in Central Highlands of Vietnam. 72 samples were collected from two lakes in the period from May 2019 to April 2020. The results show that 33 species of cyanobacteria in 14 generas, 8 families, 3 orders (Chroococcales, Oscillatoriales, Noctoscales) were identified. The Chroococcales was the most dominant species, accounting for 45.5%, with 15 species; followed by 12 species of the Oscillatoriales occupying 36.4%. The Nostocales was the last order with 6 species, occupying 18.1%. *Microcystis* is a representative genus with the largest number of species (10 species), Cylindrospermopsis raciborskii (straight strands) appears year-round in both lakes, 17 species have the potential to produce toxins, four of which (*Cylindrospermopsis raciborskii, Raphidiopsis mediter-ranea, Aphanizomenon ovalisporum, Planktolyngbya circumcreta*) not only produce cyanotoxins but also are the invasive species.

Keywords: Dak Lak, reservoirs, toxin, cyanobacteria, invasive.

^{*} Author for correspondence: Tel: +84-364860704; Email: diemmy.ngo@gmail.com