

铜锈微囊藻两种表型的生长生理特性 及毒素组成比较分析

雷腊梅 宋立荣 刘永定
(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 从滇池蓝藻水华中分离得到的铜锈微囊藻群体在实验室无机营养中解聚成单细胞, 结果表明, 群体微囊藻的生长速度明显低于单细胞微囊藻; 前者具明显可见的胞外酸性多糖胶鞘, 而单细胞则几乎没有; 按常规方法分析比较两种细胞形态的毒性大小和毒素组成, 发现群体微囊藻主要含有三种微囊藻毒素的异构体, 而单细胞以 MG LR 为主; 且单细胞微囊藻的毒性约为群体的 10 倍。二者的 LDH 和 PGM 同工酶酶谱也有差异。本研究为解释毒素的合成和调控机理提供了新的证据。

关键词: 铜锈微囊藻; 微囊藻毒素; 表型

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001)03- 205- 05

蓝藻微囊藻水华及其所产生的肝毒素—微囊藻毒素对水体环境和人类健康的潜在危害已引起世界各国的普遍重视。自 Botes^[1]首次分析了微囊藻毒素(Microcystins)的化学结构后, 迄今为止已从微囊藻和其他几种蓝藻中鉴定了五十多种微囊藻毒素变型。在自然状态, 微囊藻一般被普通的胶状基质粘在一起而形成肉眼可见的群体, 而通过分离纯化转入实验室无机营养培养基培养后, 这种群体形态往往消失, 微囊藻以单细胞存在, 有些还失去了浮游特性^[2]。Shirai^[3], Bolch^[4]都曾报道过上述现象, 但是除了明显的形态差别外, 群体和单细胞微囊藻之间是否还存在其他差别, 这一问题还未见到报道。众多的微囊藻研究也甚少提及它们的形态。

本文采用的铜锈微囊藻(*Microcystis aeruginosa* kütz)是从我国西南地区的高原湖泊—滇池中分离得到的, 在实验室不同条件下保种, 发现有些种源失去了群体形态而分散成为单细胞。以此为线索, 对群体和单细胞微囊藻的生长, 胶鞘, 光合放氧活性, 毒性及毒素组成进行了比较分析。

1 材料和方法

1.1 藻种分离和培养 取云南滇池水华水样, 在解剖镜下用玻璃毛细管挑取铜锈微囊藻群体, 用无菌水洗 3—4 次后, 放入 MA(配方参照^[5])中培养, 约 1—2 个月后, 有肉眼可见

收稿日期: 2000- 07- 19; 修订日期: 2000- 08- 22

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(39730380)

作者简介: 雷腊梅(1974—), 女, 湖北省赤壁市人; 硕士生; 从事藻类分子毒理学研究

通讯作者: 宋立荣, Tel: 027- 87647715; E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

的藻细胞出现, 镜检确证所分离的微囊藻后, 以此为材料, 继续保种或做大量培养。在培养过程中, 同个微囊藻群体来源的细胞有的维持良好的群体形态, 有的解聚成为单细胞。选出来源相同但形态差异显著的微囊藻作为实验的材料。

1.2 生长测定 通过测定细胞叶绿素的吸收值(OD_{665nm})的变化表示细胞的生长。群体细胞在测定前先经超声仪(CPS-1A型, 上海超声波仪器厂)处理5s, 使群体分散, 以便于精确测定。生长测定的培养基为MA, 光源为冷白荧光灯, 光照通过光量子计(OSL-100型, Biospherical Instruments Inc.)调节为 $80\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 培养温度为28℃, 通气培养。

1.3 形态比较 取一定量的藻细胞, 加入0.5%乙酸配制的爱新蓝(Alcian blue)染液, 光镜观察两株藻的显微形态及胞外酸性多糖的相对含量。

1.4 光合放氧活性的测定 取对数生长期的细胞2mL, 加入反应槽中, 以Clark型DW1(Hansatech[®], U.K)氧电极测定放氧速率, 水浴温度为25℃, 放氧稳定后记录时间不少于6min。另取2mL藻细胞离心后以100%的乙醇提取叶绿素, 测定方法及计算公式见文献[6]。

1.5 毒性测定 用体重在15g左右的雄性昆明种小白鼠进行毒性测定。腹腔注射。收集对数后期的藻细胞, 冷冻干燥(NEOCOOL, Yamato)后, 加入一定的蒸馏水, 反复冻融使细胞破裂。以不同体积的上清液注射小白鼠, 观察小白鼠的反应症状并记录存活时间, 毒性结果以半致死剂量(LD_{50})表示。

1.6 毒素的提取和测定 离心收集新鲜藻液, 清洗后浸于5%的乙酸溶液中, 不断搅拌30min, 5000r/min离心10min, 留上清液, 沉淀物再经100%的甲醇提取两次, 所得上清液在真空浓缩蒸馏器中干燥, 剩余物用5%的乙酸溶解, 溶解物通过预先处理过的Sep-Pak C18小柱, 洗脱物可直接用于HPLC(岛津LC-10A)上进行微囊藻毒素分析。

1.7 同工酶电泳比较 新鲜藻液在冰浴上超声破细胞, 样品的处理和聚丙烯酰胺凝胶的制备及缓冲液的配制参照分子克隆实验指南^[7], 除了不加SDS外, 其他相同, 上层胶浓度为5%, 下层胶浓度为10%, 电泳在Bio-rad的迷你电泳槽上进行, 在电压60V电泳20min后, 升高电压至120V, 直至电泳结束。磷酸葡萄糖变位酶(PGM)和乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的检测方法参照同工酶技术及应用原理^[8]。

2 结果

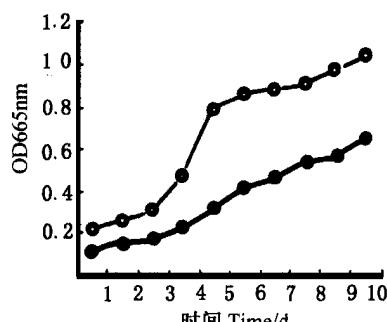


图1 群体和单细胞铜锈微囊藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of colony (—) and single cell (---) of *M. aerogino*se

2.1 单细胞和群体铜锈微囊藻的生长特性

在通气状态下, 群体和单细胞铜锈微囊藻的生长曲线有着较大的差别; 群体微囊藻的整个生长趋势较为平缓, 而单细胞微囊藻则有较明显的四个生长期, 即延滞期、对数期、稳定期和下降期(图1)。

2.2 单细胞和群体铜锈微囊藻的形态比较

在低倍光镜下可清楚地看到铜锈微囊藻的群体(图2a)呈实心球体或网状胶群体, 群体胶被透明无色。单细胞的微囊藻只能在高倍镜下观察: 细胞大多是单个存在(图2b), 也有几个细胞松散连接在一起。从爱新蓝染色的结果可知, 群体细胞(图2c)胶鞘含有

丰富的酸性多糖, 而单细胞(图2d)只是略微着色或者没有着色, 说明两者在胞外酸性多糖含量上存在很大的区别。

2.3 单细胞和群体微囊藻光合放氧活性的比较

在叶绿素含量($2.172\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $1.968\mu\text{g}/\text{mL}$)接近的情况下, 对数生长期的群体和单细胞铜锈微囊藻的光合放氧活性分别为 $348.7\mu\text{mol mg}^{-1}\text{chl}\cdot\text{h}^{-1}$ 和 $197.9\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{chl}\cdot\text{h}^{-1}$, 可见群体微囊藻在同样的生长时期比单细胞微囊藻的代谢活力高些。

2.4 单细胞和群体微囊藻毒性大小比较及毒素组成比较

群体及单细胞微囊藻的半致死剂量 LD_{50} 分别为 111.2mg/kg 和 15.7mg/kg , 结果说明单细胞微囊藻的毒性显著高于群体。从HPLC的

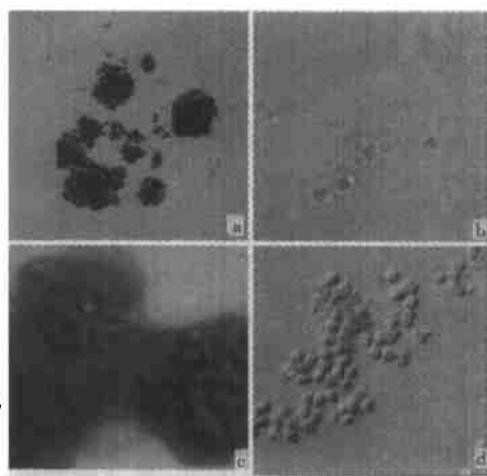


图2 群体和单细胞微囊藻的形态及胞外多糖比较示意图

Fig. 2 Comparsion phenotype and extraecellular polysaccharide of colony and single cell of *M. aeruginosa*

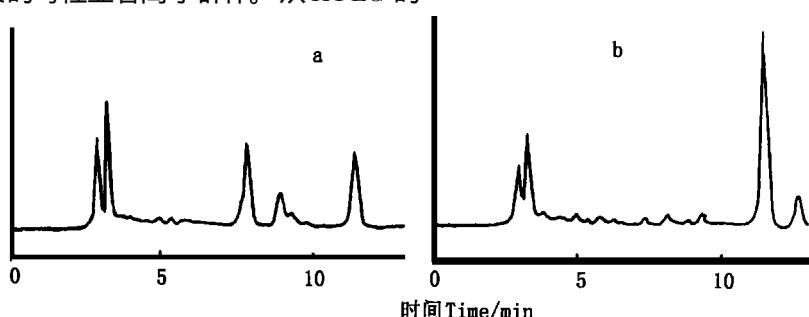


图3 群体(a)和单细胞(b)铜锈微囊藻的高效液相色谱图

Fig. 3 Highr performance liquid chromaeograms of colony (a) and single cell (b) of *M. aeroginose*

结果可知, 群体和单细胞微囊藻在毒素组成和含量上有着本质的不同, 群体微囊藻有三个非常明显的吸收峰(图3a), 与三种标样毒素(YR, LR, RR)峰的滞留时间非常接近, 单细胞微囊藻有一个非常明显的毒素峰(图3b), 经叠加分析, 发现与标样M CLR的滞留时间一致, 这说明在群体变成单细胞后, 毒素组成也发生了根本的改变。

2.5 单细胞和群体微囊藻的同工酶分析比较

两种同工酶电泳染色分析的结果(图4)表明了两者有明显的差异, 由此说明, 群体微囊藻解聚成为单细胞后, 细胞内部出现了一系列变化。

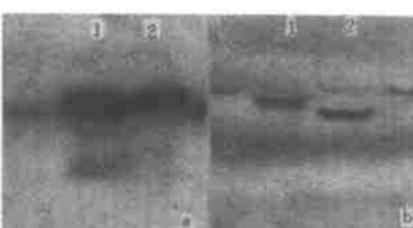


图4 群体和单细胞铜锈微囊藻的

PGM (a)和 LDH (b)同工酶比较

Fig.4 Allozyme comparison of PGM (a) and LDH (b) of colony (1) and single cell (2) of *M. aeroginose*

3 讨论

一直以来, 形成多细胞群体被认为是将微囊藻属与其他属相区分的一个重要特征^[9]。不同的细胞排列所形成的群体及其胶鞘的特性是微囊藻属种鉴定的最重要的特征。相对于自然状态, 这种群体特性在实验室中似乎很容易失去, 并且再难以恢复群体状态。这种单细胞与群体的最明显不同是缺乏粘状、透明、膨大的鞘。这暗示着经过实验室无机营养培养基培养后, 微囊藻的群体胶被和细胞之间的关系在某种程度上发生了改变。Holm-Hansen^[10]指出生长在实验室条件下的蓝藻需要低光强, 而在自然水体中蓝藻往往暴露在强烈的太阳光下。从湖泊转移到实验室后, 许多蓝藻在形态及生长条件的改变使他认为实验室的种都是处于衰弱的亚健康状态的细胞。作者从滇池水华中分离到的群体铜锈微囊藻及实验室保种过程中得到的同源单细胞铜锈微囊藻为材料, 比较了它们的生长等生物学特性及毒性, 结果表明, 两者的差别不仅仅限于形态, 其生理特性及细胞的生化组成都发生了明显改变。Parker^[11], Shirai, Bolch 等都报道在纯化过程中或物理方法可产生永久性或临时的单细胞, 但单细胞特性的改变及原因却没有引起人们的关注。本文首次以同种微囊藻的不同形态株为材料, 初步探讨了它们之间的差异。

大部分真核细胞拥有稳定的内部环境, 原核细胞在自己的环境中必须对环境变化快速反应而产生一系列表型, 被称之为细胞表型可塑性^[12]。微囊藻是单细胞的原核生物, 形成群体应是保护单个细胞, 更好的适应外界多变环境的结果。将单个微囊藻细胞包被在一起的群体胶鞘已得到了一定的研究, 其组分主要是酸性多糖^[13-15], 也有的含蛋白质^[16], 已有的结果证明^[4], 胶鞘并不是微囊藻的必须成分, 失去了群体胶被的微囊藻仍生长良好, 群体形态的变化不仅引起生物学特性的变化, 而且还影响到毒性及毒素的组成。本实验室另一株绿色微囊藻从群体变成单细胞后, 毒性和毒素组成也发生了类似的变化, 为解释毒素的合成和调控机理提供了新的证据。尽管外界环境因素对微囊藻毒素产生的影响已得到广泛的研究, 但微囊藻的产毒机理仍不甚明了。几株有毒和无毒微囊藻的超微结构显示^[17], 除了有毒微囊藻有鞘, 而无毒微囊藻缺乏外, 它们的结构没有明显的差别。作者将进行进一步探讨群体胶鞘的形成对微囊藻毒素的产生的影响及其影响方式。

参考文献:

- [1] Botes D P, Tuiman A A, Wessels P L. The Structure of cyanoginosins- LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1984, **1**: 2311—2318
- [2] Lange W. Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue green algae [J]. *Can. J. Microbiol.*, 1976, **22**: 1181—1185
- [3] Shirai M, Matumaru K, Ohotake A, et. al. Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of culture [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, **55**: 2569—2571
- [4] Bolch JSC, Blackburn IS. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. [J]. *J. Appl. Phycol.*, 1996, **8**: 5—13
- [5] 宋立荣, 雷腊梅, 何振荣, 等. 滇池水华蓝藻铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特性及毒素分析[J]. 水生生物学报, 1999, **23**: 402—407
- [6] 李敦海, 宋立荣, 刘永定. 葛仙米光合活性对盐胁迫的反应[J]. 水生生物学报, 1999, **23**: 420—424

- [7] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1996
- [8] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及原理 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985
- [9] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria [J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1979, **111**: 1—61
- [10] Holm Hansen O. Recent advance in the physiology of blue green algae. *Proceeding symposium on environmental requirement of blue-green algae* [C]. Fed. Water Pollut. Control Adm., Pacific Northwest Water Lab., Corvallis, Oregon. 1967, 87—96
- [11] Parker DL. Improved procedures for the cloning and purification of *Microcystis* cultures (Cyanophyta) [J]. *J. Phycol.*, 1982, **18**: 471—477
- [12] Costerton J W. Structure and plasticity at various organization levels in the bacterial cell [J]. *Can. J. Microbiol.*, 1988, **34**: 513—521
- [13] Plude J L, Parker D L, Schommer O J, et al. Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40 [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**: 1696—1700
- [14] Martin C, Codd G A, Siegelman H W, et al. Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains [J]. *Arch. Microbiol.*, 1989, **152**: 90—94
- [15] Forni C, Teló F R, Caiola M G. Comparative analysis of the polysaccharides produced by different species of *Microcystis* (Chlorococcales, Cyanophyts) [J]. *Phycologia*, 1997, **36**: 181—185
- [16] Nakagawa M., Takamara Y., Yagi O. Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-3A [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**: 329—337
- [17] Shi L, Carmichael W W, Miller I. Immunogold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells [J]. *Arch. Microbiol.*, 1995, **163**: 7—15

COMPARISON OF GROWTH AND TOXIN ANALYSIS IN TWO PHENOTYPE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

LEI Laimei, SONG Li rong and LIU Yong-ding

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Colonial *Microcystis aeruginosa* isolated from water bloom of Dianchi Lake lost its colonial type and became single-celled type upon continuous subcultured in inorganic medium. It was observed that the growth rate of colonial *M. aeruginosa* was markedly lower than that of single cell; the extracellular acid polysaccharide capsule was obviously visible in the colonial type but was absent in the single-celled one; toxin analysis indicated that three microcystins isomers were produced in colonial *M. aeruginosa*, but in single-celled *M. aeruginosa*, only one major toxin MC-LR was detected; single-celled *M. aeruginosa* had the LD₅₀ value almost ten times higher than colonial *M. aeruginosa*. Allozyme divergence was detected, too. The study has brought forward a new proof to explanation of mechanisms on regulation of microcystin synthesis.

Key words *Microcystis aeruginosa*; Microcystin; Phenotype