

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*

宋立荣 雷腊梅 何振荣 刘永定

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 从滇池分离纯化了两种常见水华微囊藻即铜锈微囊藻和绿色微囊藻。在常规培养条件下, 两种藻类在对数生长期的生长速率 μ 值分别为 0.61 和 0.63; 早期生长的抑制光强不大于 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。铜锈微囊藻主要产生 3 种微囊藻毒素: MYCST-RR, MYCST-YR 和 MYCST-LR, 绿色微囊藻产生的主要微囊藻毒素为 $[\text{Dha}^7]\text{-MYCST-RR}$, 和 $[\text{Dha}^7]\text{-MYCST-LR}$, 另含有少量的 $[\text{Dha}^7]\text{-MYCST-YR}$ 。在低光强 $15 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时, 毒素含量每毫克干重细胞达到 $3.127 \mu\text{g}$ 微囊藻毒素, 当光强达到 $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时, 毒素含量降低到每毫克干重细胞 $1.971 \mu\text{g}$; 光强对毒素形成的影响受到温度的调节, 而温度对毒素形成的影响不大。探讨了两种微囊藻细胞在不同光照强度下叶绿素荧光比值 F_v/F_m 的变化, 此比值的变化可以间接反映细胞受外界光照强度抑制程度。

关键词 微囊藻, 滇池, 微囊藻毒素, 生长

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。Botes 等^[1]首次解析了微囊藻毒素(Microcystins)的化学结构, 其基本结构为含有七个氨基酸的环状多肽, 包括五个 D-型氨基酸和二个可变的 L-型氨基酸, 二种 L-型氨基酸的不同组合, 即成为变型不同微囊藻毒素命名的依据。迄今已从微囊藻和其它几种蓝藻中鉴定了逾五十种微囊藻毒素变型。

在我国大多数水体中发生的蓝藻水华, 优势种类主要是微囊藻, 其中以铜锈微囊藻为主^[2-4]。现有的证据表明, 天然水体蓝藻微囊藻水华 80% 是产毒素的, 少数是不产毒的, 即使在产毒种类中, 不同种或同一种类不同变型毒素含量变动很大。因此, 欲深入了解天然水华中哪些是产毒种类, 它们的产毒特性如何, 就有必要通过分离出单种在培养条件下对每个单种的生长特性和产毒特性加以研究, 才能回答特定水体中微囊藻的产毒特性和生态特性, 才能对水华发生及其可能的危害提供较准确的预测。

滇池是我国西南地区的高原湖泊, 近十几年来, 滇池蓝藻水华发生频率和数量均明显增加^[5]。对滇池分离纯化的数个优势蓝藻种类初步筛选试验中, 作者发现其中的铜锈微囊藻和绿色微囊藻是产毒的, 在此基础上, 进一步研究了两个种类的生长特性, 探讨了绿

* 国家自然科学基金资助, 项目号 39730380
李仁辉博士、沈强同志分别协助分离藻种和分析毒素, 谨致谢忱
1999-08-04 收到; 1999-09-03 修回

色微囊藻产毒与环境光强和温度的关系.

1 材料和方法

1.1 藻种及其分离纯化 铜锈微囊藻(*Microcystis aeruginosa* Kütz.)和绿色微囊藻(*M. viridis* (A. Br.) Lemm.)采集自我国云南省昆明滇池,经分离纯化,获得单克隆培养系. 主要步骤如下:吸取一小滴水样滴至有3~4个凹槽的载玻片上,在解剖镜下,利用自制的毛细管有目的地挑选单个细胞群体(第一次吸取常含有数个或多个细胞个体),然后转移到另一凹槽,继续稀释,经3~4次,直至视野下只有一个细胞群体时,用毛细管将欲选目的细胞转移到含培养基的试管中,然后将这些试管置于光照培养箱中,低光、20℃,经过1~2月,少数试管中细胞存活并开始生长. 经镜检确认试管中的细胞为单一类型,即认定为单克隆藻.

1.2 藻种培养 经过筛选比较,选用MA^[6]作为两种微囊藻的培养基,其每升培养液含有以下营养成分:Ca(NO₃)₂·4H₂O, 50mg; KNO₃, 100mg; NaNO₃, 50mg; Na₂SO₄, 40mg; MgCl₂·6H₂O, 50mg; β-Sodium glycerophosphate, 100mg; Na₂EDTA, 5mg; FeCl₃·6H₂O, 0.5mg; MnCl₂·4H₂O, 5mg; ZnCl₂, 0.5mg; CoCl₂·6H₂O, 5mg; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.8mg; H₃BO₃, 20mg; Bicine, 500mg; pH调至8.6. 光源为冷白荧光灯,光照强度通过光量子计(OSL-100型, Biospherical Instruments Inc.)调节为80μmol m⁻²s⁻¹, 培养温度25℃.

1.3 生长测定 通过测定细胞光密度(OD_{750nm})的变化表示细胞的生长. 由于藻体在常规培养条件下保持群体形态,样品在测定前需经超声处理5s,使群体分散为单个细胞,以便于精确分析.

1.4 叶绿素荧光效率分析 用便携式植物效率分析仪(PEA, Hansatech®, U.K.)测定叶绿素荧光. 激发光强为最大光强的50%(1500μmol·m⁻²·s⁻¹),暗适应时间不少于15min,记录时间5s,测定均在室温下进行. 用可变荧光(Fv)与最大荧光(Fm)的比值Fv/Fm表示光合效能活性的大小.

1.5 毒素提取和测定 离心收集微囊藻新鲜培养物,清洗,然后在真空冷冻机中干燥. 干燥样品置于-20℃保存备用. 称取约200mg上述真空冷冻干燥的藻粉,浸于5%醋酸溶液中,不断搅动,提取30min,离心(4000rpm, 15m),沉淀物以100%甲醇提取,重复二次,所得上清液在真空浓缩蒸馏器中干燥,剩留物再以5%醋酸溶解,溶解物通过预先已处理过的Sep-Pak C18过滤小柱(10ml 100%甲醇, 50ml双蒸水),过滤小柱再经20%甲醇清洗,以90%甲醇洗脱. 洗脱物浓缩干燥后,剩余物溶于20%甲醇,此组分用于在反相高效液相色谱(岛津LC-10A)上进行微囊藻毒素分析. 利用核磁共振仪(NMR)和高分辨率快速原子轰击质谱仪进行毒素结构分析^[7].

2 结果

2.1 铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长特性

在通气培养条件下,铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长均经历四个生长期:即延滞期,对数期,稳定期和下降期. 从图1可以看出,在指数期生长速率 μ 和最大生物量上,绿色微

囊藻分别为 0.63 和 0.59(光密度值), 而铜锈微囊藻分别为 0.61 和 0.35, 在培养物细胞浓度低于 OD_{750nm} 0.2 时, 细胞生长可接受的光照强度不大于 $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 超过这一光照强度, 细胞的生长则明显受到抑制.

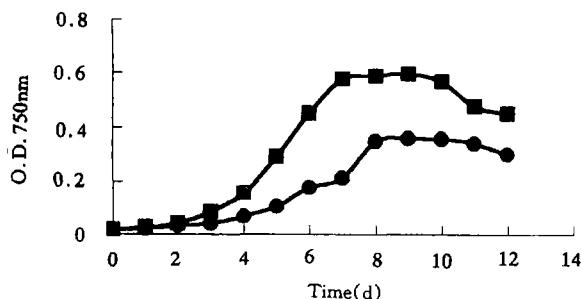


图 1 铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *M. aeruginosa* (-●-) and *M. viridis* (-□-).

2.2 铜锈微囊藻和绿色微囊藻对光强耐受力的比较研究

探讨了两种微囊藻细胞在不同光照强度下叶绿素荧光比值 Fv/Fm 的变化. 此比值的变化可以间接反映细胞受外界光照强度抑制程度, 比值越小, 反映细胞受光强的抑制程度越高. 随着光照强度的升高, 可以看出, 叶绿素荧光比值不断下降; 光照强度达到 $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上, 铜锈微囊藻的荧光比值相当于常态光强的 37.2%, 绿色微囊藻为常态光强的 51.8%, 由此表明, 在 $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强以内, 绿色微囊藻比铜锈微囊藻对高光强的耐受力强. 两者生长对光强的需求也支持由叶绿素荧光比值推论的结果.

表 1 铜锈微囊藻和绿色微囊藻在不同光强下叶绿素荧光比值的变化

Tab. 1 Ratio of Fv to Fm in two *Microcystis* under different light intensity

光强 PFR($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	<i>M. aeruginosa</i>		<i>M. viridis</i>	
	Fv/Fm	Percentage	Fv/Fm	Percentage
35	0.323	100	0.485	100
60	0.176	54.5	0.399	82.3
100	0.120	37.2	0.251	51.8
180	0.079	24.5	0.081	16.7
280	0.033	10.2	0.032	6.6
480	/	0	0.015	3.1

2.3 铜锈微囊藻和绿色微囊藻毒素含量和成分

绿色微囊藻主要产生三种微囊藻毒素: [Dha⁷]-MYCST-RR, [Dha⁷]-MYCST-YR 和 [Dha⁷]-MYCST-LR. 其中, [Dha⁷]-MYCST-RR 占了总毒素的 70~80%. 在适宜的培养条件下, 每毫克干重细胞可生产 3~4 μg 微囊藻毒素. 铜锈微囊藻生产毒素分别为 MYCST-

RR, MYCST-YR 和 MYCST-LR(图 2). 主要毒素类型亦是 MYCST-RR, 但它的含量只占总毒素的 60% 左右, 每毫克干重细胞约生产 1~2 μg 微囊藻毒素.

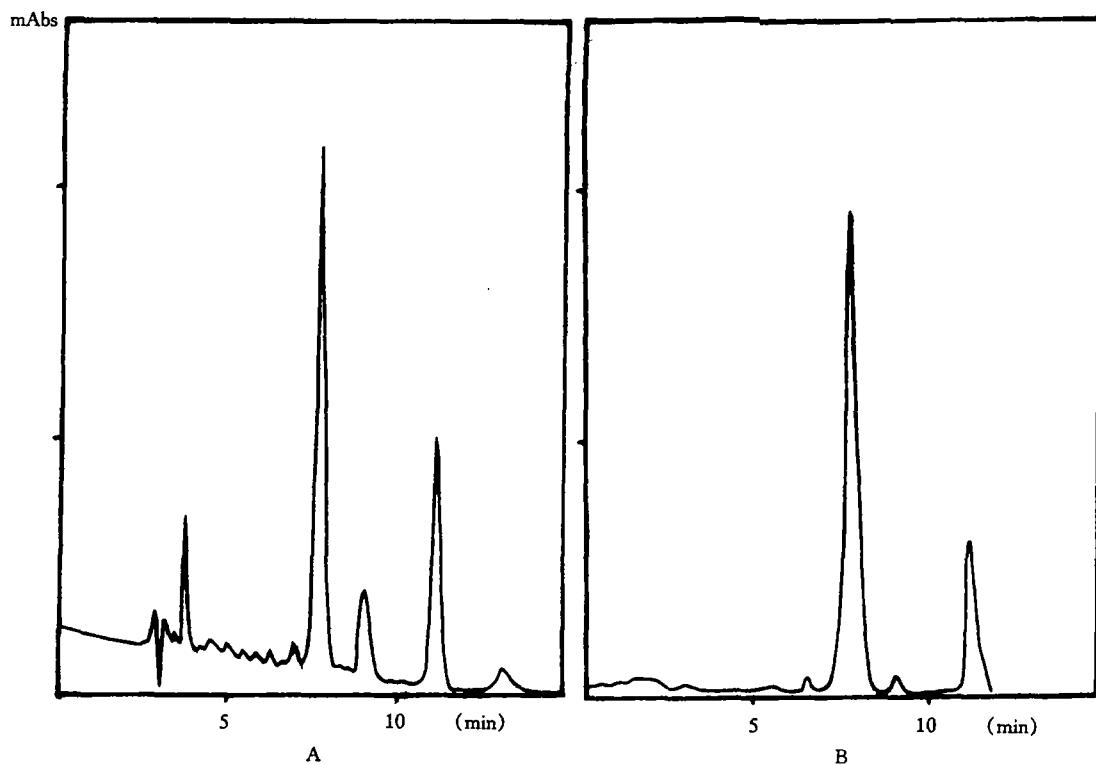


图 2 铜锈微囊藻和绿色微囊藻毒素的高效液相色谱示意图

Fig. 2 High-performance liquid chromatograms of *M. aeruginosa* (A) and *M. viridis* (B)

2.4 绿色微囊藻产毒与光强和温度的关系研究

分别在 15℃ 和 25℃ 条件下研究了光强对微囊藻毒素形成的影响. 在 15℃ 下, 光强(从 15 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 到 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)对毒素形成的影响不大(数据未列出), 而在 25℃ 条件下, 毒素的形成显著地受到光强的影响. 在低光强 15 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时, 毒素含量达每毫克干重细胞 3.127 μg 微囊藻毒素, 当光强达到 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 时, 毒素含量降低到每毫克干重细胞仅产生 1.971 μg 微囊藻毒素(表 2), 结果说明, 低光强促进该种类微囊藻毒素的合成, 同时, 光强对毒素形成的影响受到温度的调节.

在四种培养温度条件(15℃、20℃、25℃ 和 30℃)下, 绿色微囊藻微囊藻毒素的含量变化甚微(表 3).

表 2 绿色微囊藻在不同光强下微囊藻毒素含量和成分的变化

Tab. 2 Changes of microcystin content and composition in cells of *M. viridis* grown in different light intensity

光强 Light intensity ($\mu\text{Einstein m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	含量 Content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ dry cells)	成分 Composition (%)		
		RR	YR	LR
15	3.127	87.6	2.3	10.1
30	2.716	81.6	2.6	15.7
60	2.317	86.3	1.6	12.1
100	1.971	82.2	8.5	9.3

表 3 绿色微囊藻在不同温度下微囊藻毒素含量和成分的变化

Tab. 3 Changes of microcystin content and composition in cells of *M. viridis* grown in different temperature

温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	含量 Content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ dry cells)	成分 Composition (%)		
		RR	YR	LR
15	3.705	71.3	3.9	24.8
20	3.563	71.3	3.8	24.9
25	3.580	69.3	5.6	25.1
30	3.490	65.9	6.9	27.2

3 讨论

滇池水华蓝藻最常见优势种类为微囊藻,有时也会出现大量的水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)、颤藻(*Oscillatoria agardii*)和鱼腥藻(*Anabaena* sp.),虽然国外曾报道上述几个种类中含有微囊藻毒素或神经毒素^[8],但通过生物毒性试验并未检测到滇池这几个种类含有类似毒素.基于以上的研究基础,本文集中研究了滇池两种优势微囊藻:铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长和产毒特性.结果表明,二种微囊藻均表现较高的生长速率,在低细胞浓度时,对光强的耐受力较差,一般不超过 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.两个种类均产生微囊藻毒素,但绿色微囊藻产毒量高,其总微囊藻毒素含量可达到细胞干重的千分之三以上,这是已报道的在绿色微囊藻中毒素含量最高的一种.

微囊藻毒素含量随生长条件的变化已有较多的研究,但大多数研究以铜锈微囊藻为研究对象,而对绿色微囊藻产毒特性的研究报道较少.Watanabe 等^[9]与 Kaya 和 Watanabe^[10]的研究虽然都证实绿色微囊藻产毒能力与培养细胞的生长阶段有关,但是,其毒素成分以及毒素含量随生长期的变化规律,两文得出不同的结论.目前比较一致的研究证据显示光强变化对微囊藻毒素有显著的影响^[11-12],适于生长的温度并不适于毒素的形成^[10,13].作者进一步证实了光强对毒素形成的调控作用,研究结果还表明,光强对毒素的影响效果是与培养温度密切相关的.在同一光强下,温度的变化似乎对毒素含量影响甚微.Orr 和 Jones^[14]提出,外界因子对微囊藻毒素含量的影响,主要是通过影响细胞分裂速

率来表现的。这一推论究竟是否有普遍的意义,仍需进一步研究。

在实验控制条件下获得的微囊藻生长和产毒行为对生态预测与水华控制提供了必不可少的资料积累。但试图利用这些结果预测野外自然水体水华发生和产生毒素行为,需十分谨慎。如许多微囊藻的光照强度耐受力在培养状态下不超过 $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 而野外微囊藻种群夏季可以耐受 $1000\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上光强,这就与实验室所得的结果相差很大。但是,通过对两个或多个种类在不同光强或温度适应性的比较研究,我们可以推测在何种外界条件更有利于那一种生长,对毒素的产生有什么影响。

参 考 文 献

- [1] Botes D P, Tuiman A A, Wessels P L, et al. The Structure of cyanoginosins-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1984, 1: 2311-2318
- [2] 何家莞, 何振荣, 俞家禄等. 东湖铜绿微囊藻毒素的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 1988, 19(5):424-430
- [3] 何振荣, 俞敏娟, 何家莞. 铜绿微囊藻毒株 M.8641 的毒素. 生物化学杂志, 1993, 9(2):168-172
- [4] He Zhenrong et al. Seven microcystins from *Microcystis* water bloom in Lake Dalai, China. *J. Envir. Sci.*, 1997, 9 (1):113-119
- [5] 吴为梁等. 滇池水体中主要藻种毒素研究. 云南环境科学, 1997, 16(2):26-29
- [6] Ichimura T. Media for blue-green algae. In K. Nishizawa and M. Chihara(Eds) *Methods in algalogical studies*. Tokyo, Kyoritsu, 1979.
- [7] Kaya K, Sano T. Algicidal compounds in yeast extract as a component of microbial culture media. *Phycologia* 1996, 35:117-119
- [8] Codd G, Poon G. Cyanobacterial toxins. In L. J. Rogers and J. G. Gallon(Eds) *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. Oxford Sci. Publ., Clarendon Press. 1988, 283
- [9] Watanabe M F, Oishi S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium(*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environm. Microbiol.* 1985, 49: 1342-1344.
- [10] Kaya K, Watanabe M M. Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters. *J. Appl. Phycol.*, 1990, 2:173-178.
- [11] Van der Westhuizen A J, Eloff, J N. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Plant* 1985, 163:55-59.
- [12] Utkilen H, Gjolme N. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1992, 58:1321-1325.
- [13] Gorham P R. Toxic algae. In D. F. Jackson(Ed) *Algae and man*. New York, Plenum Press, 1964, 307-336,
- [14] Orr P T, Jones G J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 1998, 43:1604-1614

GROWTH AND TOXIN ANALYSIS IN TWO TOXIC CYANOBACTERIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA* AND *MICROCYSTIS VIRIDIS* ISOLATED FROM DIANCHI LAKE

Song Lirong, Lei Lamei, He Zhenrong and Liu Yongding

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

Abstract Bloom-forming cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *M. viridis* were isolated and purified from the eutrophic lake of Dianchi, Kunming in Southwestern China. At temperature 25°C and light intensity at 80 μ E, the growth rate of *M. aeruginosa* and *M. viridis* were 0.61 and 0.63, respectively. It was shown that light intensity over 100 μ mol m⁻²s⁻¹ had inhibited the growth of both species. In *M. aeruginosa*, three microcystins, MYCST-RR, MYCTS-YR and MYCST-LR were identified as major toxins; *M. viridis* produced two major toxins-[Dha⁷]-MYCST-RR and [Dha⁷]-MYCST-LR, with [Dha⁷]-MYCST-YR as the minor component. It was revealed that light played an important role in regulating the contents of toxins, the highest toxin contents was found in low light intensity at 15 μ mol m⁻²s⁻¹, while the lowest ones occurred at higher light intensity at 100 μ mol m⁻²s⁻¹. The variation of temperature had little effect on toxin production. The implication of the chlorophyll fluorescence ratio of Fv to Fm in reflecting the cell ability to adapt light intensity has also been explored.

Key words Microcystis, Dianchi Lake, Microcystin, Growth