

金藻吞噬微囊藻产生的无毒变异株与产毒原始株的比较

欧丹云^{1,2} 刘媚¹ 甘南琴¹ 宋立荣¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072 2. 中国科学院研究生院武汉教育基地, 武汉 430072)

摘要: 分别从喂食三株原始产毒铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* (AC, DS和 PCC 7820) 的金藻 *Poterioochromonas* sp. 培养物中获得三株藻, 以 Nested PCR 方法(引物对 CC/CG 和 CH/CI) 确定此三株藻均为微囊藻属藻株。HPLC 测试结果显示这三株藻均不产生微囊藻毒素。显示 *Poterioochromonas* sp. 具有将产毒微囊藻转化为无毒微囊藻的能力。比较产毒原始株与无毒变异株的生理特性发现, 变异株的类胡萝卜素/叶绿素比值高于原始株; 而光反应曲线结果表明, 变异株的 PSII 的量子产率和光合作用活力高于原始产毒株, 并且变异株在较低光强下就可达到最大的光合作用活力。显示喂食后产生的变异株比原始株有较高的光合作用效率。变异株的藻蓝蛋白/叶绿素比值则低于原始株, 光合作用最适光强低于变异株, 并且显示产毒原始株通过增加藻蓝蛋白的相对含量来提高对光照的吸收。变异株具有较高的光合作用效率和藻蓝蛋白含量可能是其能够在微囊藻和金藻混合培养的群体中占优势的原因之一。

关键词: *Poterioochromonas* sp.; 微囊藻; 无毒变异株; 色素含量; 光反应曲线

中图分类号: Q949.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)05-0826-11

有毒蓝藻水华的暴发, 在世界范围内引起了广泛的关注^[1,2]。微囊藻是最为常见的一种水华藻类, 许多微囊藻产生剧毒的微囊藻毒素, 对饮用水的水质健康造成很大的威胁。

微囊藻毒素的合成是由非核糖体的多肽合成酶和聚酮合成酶参与的^[3,4]。自然水体中某些含有微囊藻毒素合成酶基因的微囊藻株并不产生微囊藻毒素^[4,5]。Kumayer et al.^[6] 曾报道了环境因子可能是导致 *Planktothrix* 的产毒能力消失的原因。微囊藻水毒性的变化, 可能是由于环境因子的变化引起产毒株和非产毒株比例变化的结果^[7,8], 或者是由于毒素合成过程所必须的相关蛋白的表达被抑制所引起的^[9]。有报道指出在实验室培养条件下观察到了一些丧失了合成微囊藻毒素能力的微囊藻自发突变株^[5,9,10]。

以产毒微囊藻喂食金藻 *Poterioochromonas* sp. 的实验中, 观察到静止培养 2—3 个月后, 金藻培养物中出现了一些与饵料藻细胞大小相近的单细胞蓝

藻。纯化并培养这些藻株, 并对这些藻株的分类、产毒特性进行了研究。我们比较了两株微囊藻原始株和相应的获得变异株的生长速率、色素含量和光合作用活力。通过生长和光合生理指标的比较结果, 探讨这些生理指标方面的差异对微囊藻的生态适应策略方面是否具有影响。

1 材料与方法

1.1 藻种材料与培养 金藻分离自微囊藻大规模培养物。选用的三株产毒铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 均来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库 (FACHB): DS, AC 和 PCC7820。以上微囊藻分别喂食金藻 2—3 个月后, 分离重新生长出来的微囊藻单细胞, 并分别命名为 *Microcystis* mDS, *Microcystis* mAC 和 *Microcystis* m7820。微囊藻和三株吞噬后获得藻株均以改良的 BG-11 培养基于 25℃恒温培养, 光照周期为 12:12。

1.2 全细胞 Nested PCR 法鉴定微囊藻属藻株 离

收稿日期: 2007-01-18; 修订日期: 2008-06-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2008CB418000); 中国科学院重要方向性项目 (KZCX2-YW-426); NSFC-云南联合基金 (U0833604)

作者简介: 欧丹云 (1978—), 女, 汉族, 福建福州人; 博士研究生; 主要从事藻类生理生态方面的研究。E-mail dyot@xmu.edu.cn

通讯作者: 宋立荣, E-mail lsong@ihb.ac.cn

心收集 3 mL 微囊藻样品, ddH₂O 洗涤细胞 2—3 次后, 用 200 μL ddH₂O 悬浮细胞, 细胞密度大约为 5×10^6 个 /mL。Nest-PCR 扩增 16S rRNA 可变区的方法参考文献 [11], 引物序列 (表 1)。首轮 PCR 反应体系含有: 引物 CC 和 CG 各 1 μL, 2 μL dNTP、2 μL 10 × buffer(Takara 日本)、0.3 μL Taq 酶(Takara 日本)、1 μL 模板 DNA, 加 ddH₂O 至 20 μL。反应使用 PCR 仪为 GeneAmp2400 (PE Corp.)。

poration 美国), 扩增条件为: 94℃预变性 4 min, 接着 96℃ 15 s, 70℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共运行 30 个循环; 最后 72℃延伸 7 min。第二轮 PCR 反应体系含有: 引物 CH 和 CI 各 1 μL, 上一轮 PCR 反应的产物 0.5 μL; 其余成分同上。扩增条件为: 94℃预变性 4 min, 接着 94℃ 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共运行 25 个循环; 最后 72℃延伸 7 min。

表 1 PCR 引物

Tab. 1 PCR primers

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	T _m (°C)
CC	TGTA AAACGACGG CAGTCCAGA CT CCTA CGGG A GGCAGC	72
CG	CGCGTTAG CTA CG GCA CG GCT CG G	72
CH	AGCCAAGTC TG CCGGTCAA ATCA	58
CI	ACCGCTACA CTGGAA TTCCTG	58
CSF	GYCACGCCCGAA GTCRTTAC	60
UN I23S	CCTCTGTGTGCCATA GGTATC	60

1.3 HPLC 分析微囊藻产生微囊藻毒素 MC-LR 的能力

1.3.1 微囊藻毒素的提取和分离纯化 取 25 mL 藻样, 离心弃上清, 将沉淀冷冻干燥。准确称量干燥后的藻粉, 加入 20 mL 5% 乙酸溶液搅拌提取 20 min, 然后 10℃, 10000 r/min 离心 5 min, 取出上清液 1, 离心残渣加入 20 mL 80% 甲醇提取 20 min, 同样条件下离心 5 min, 取出上清液 2, 残渣用甲醇按上述步骤再提取一次得上清液 3, 合并上清液 2 和 3 用旋转浓缩仪浓缩近干再与上清液 1 合并得溶液 4。

分离纯化采用 Waters SPE ODS 进行, SPE 柱采用 15 mL 甲醇活化, 再用 20 mL 水冲洗柱中甲醇。然后将上述溶液 4 上样, 流速为 10 mL/min, 待上样后用 15 mL 20% 甲醇预淋洗 SPE 柱, 弃去淋洗液。最后用 10 mL 90% 甲醇洗脱柱中的毒素, 收集洗脱液用旋转浓缩仪蒸发近干, 再用 1 mL 甲醇重新溶解后转移到 1.5 mL 样品瓶中氮气浓缩干燥, 最后准确加入 500 μL 60% 甲醇溶液定容。

1.3.2 HPLC 检测微囊藻毒素 MC-LR 微囊藻毒素 MC-LR 在波长 238 nm 下有特异的吸收峰, 而不同的微囊藻毒素异构体在高效液相色谱中有不同的保留时间, 与标准微囊藻毒素的保留时间相比较, 即可确定样品中的微囊藻毒素的组成, 根据峰面积即可测定样品中微囊藻毒素的含量^[12]。HPLC 检测的流动相为: 试剂 A 甲醇, 试剂 B 磷酸缓冲液 (0.05

mol/L KH₂PO₄, pH = 3) 等度混合; A 为 60%; B 为 40%。总流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。

1.4 rDNA ITS 区序列分析

1.4.1 微囊藻 DNA 的提取 微囊藻 DNA 提取方法采用 TES 法^[13]。离心收集藻细胞, 加入 600 μL TES (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 0.25 mmol/L 蔗糖) 和 30 μL 10% 溶菌酶, 于 37℃ 温育 30 min, 加入 20 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL) 和 50 μL 10% SDS, 50℃ 30 min, 加入 150 μL 10% SDS, 于 60℃ 反应 20—40 min, 12000 r/min 离心 5 min, 上清液以酚/氯仿/异戊醇抽提两次, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀, 获得的 DNA 沉淀以加入 1 μL RNA 酶 (10 mg/mL) 的 TE 溶解。

1.4.2 rDNA ITS 区序列的扩增 引物对 CSF/UN I23S 用于特异性地扩增蓝藻 16S-23S rDNA ITS 区序列^[14], 引物序列 (表 1)。PCR 反应条件: 94℃ 5 min, 35 个循环的 94℃ 1 min 变性、50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 72℃ 继续延伸 10 min。扩增出的产物以 E.Z.N.A PCR 产物纯化试剂盒 (Omega 美国) 纯化后用于测序。

1.4.3 序列分析 采用 Mega 2.0^[15] 软件对微囊藻 16S-23S ITS 序列进行分析, 按 NJ 建树法建立进化树。

1.5 色素含量的测定

1.5.1 类胡萝卜素 (Carotenoids) 和叶绿素含量 (Chl) 的测定 取 3 mL 藻样, 8000 r/min 转速离

心 5m in, 弃去上清液, 加入 3 mL 80% 丙酮, 低温暗处静置 22—24h 提取脂溶性色素。样品 8000 r/m in 离心 5m in 取上清液分别于 663 nm 和 450 nm 测定光吸收值。根据下式分别计算色素含量:

$$\text{Chl} (\text{mg/L}) = 12.72 \times A_{663} - 2.7 \times A_{645} = 12.19 \times A_{663}^{[16]}$$

$$\text{Carotenoids} (\text{mg/L}) = 4.1A_{450} - 0.0435\text{Chl} - 0.367\text{Chl} = 4.1A_{450} - 0.0435\text{Chl}^{[17]}$$

在微囊藻中, Chl = 0

1.5.2 藻蓝蛋白 (C-PC)含量的测定 取 3 mL 微囊藻样品, 8000 r/m in 转速离心 5m in, 弃去上清液, 加入 3 mL PBS (0.05 mol/L, pH 6.8)。将样品放入液氮中冷冻 8h 后, 室温避光溶解, 如此反复冻融 3 次提取 C-PC^[18]。将样品 8000 r/m in 离心 5m in, 取上清液分别于 615 nm、652 nm 测定光吸收值。根据以下公式计算 C-PC 含量:

$$\text{C-PC} (\text{mg/mL}) = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 5.34^{[19]}$$

1.6 比生长速率 (μ) 的测定

在培养周期开始时, 将微囊藻培养液以 4500 r/m in 的转速离心 4m in, 弃去上清液后接种至新鲜培养基中, 起始接种浓度为 0.2 (A₆₈₀)。根据叶绿素含量的变化, 按下式计算比生长速率:

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)^{[20]}$$

x_1 、 x_2 分别为对数生长期起始时 (t_1) 和结束时 (t_2) 的藻类现存量 (此处以叶绿素含量表示)。

1.7 光反应曲线 (Light response curve) 以浮游植物荧光仪 (Phyto-PAM, Walz 公司, 德国) 检测微囊藻的光合系统 ① (PS①) 在饱和脉冲光强下叶绿素荧光值的变化, 计算出 PS①的有效量子产率 (Effective quantum yield) 和电子传递速率 (Electron transfer

rate ETR)^[21]。

$$Y = \Delta F / F_m' = (F_t - F_m') / F_m'$$

$$ETR (\mu\text{mol electrons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}) = Y \times PAR \times AF \times 0.5$$

F_m' 饱和脉冲 (Saturation pulse) 光下的最大荧光; F_t 作用光 (Actinic light) 下的实时荧光; PAR 光合活性辐射 (Photosynthetically active radiation, $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$); AF 叶绿体吸收对光照的吸收效率 (Absorption Factor), 为 0.84, 0.5 吸收的质子中的 50% 被 PSII 使用 (另 50% 为 PSI 使用)。

2 结 果

2.1 藻株的分离和鉴定

以产毒微囊藻喂食金藻, 后者吞噬产毒微囊藻之后将该培养物静止培养 2—3 个月之后, 培养液中生长出了一些单细胞蓝藻。此时培养液中的金藻的生长速率较缓慢, 吞噬能力也随之下降, 使得这些后续出现的蓝藻株成为优势种。分别从喂食三株原始产毒微囊藻 *M. aeruginosa* AC、DS 和 PCC 7820 的金藻培养物中纯化得到三株藻, 形态学观察与微囊藻十分相近。

Nest-PCR 首轮反应用引物对 CC-CG 检测放氧光合细菌特有的序列。结果显示这三株获得藻株和原始微囊藻株在 500 bp 处都有 PCR 产物 (图 1A)。这说明被测藻株都具有放氧光合细菌的特征序列。第二轮 PCR 反应以首轮反应扩增产物为模板, 用引物对 CH-ClI 鉴定微囊藻藻属的藻株。结果显示, 所有的被测藻株都有 100 bp 左右的扩增产物 (图 1B)。以上结果证实这三株获得藻株均属于微囊藻属。据此, 将获得的变异株分别定义为 *M. aeruginosa* mAC, mDS 和 m7820。

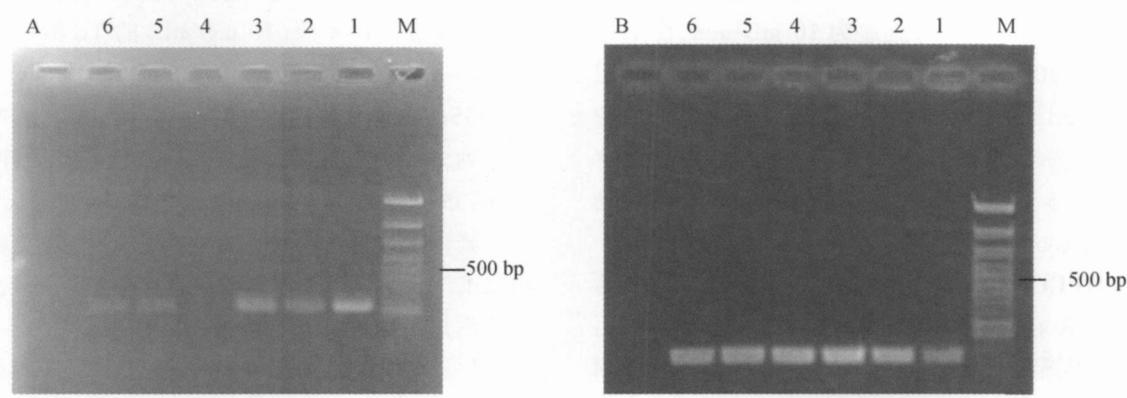


图 1 全细胞 Nest-PCR 鉴定微囊藻属藻株

Fig 1 The identification of *M. aeruginosa* by whole-cell Nest-PCR using Primers CC-CG (A) and Primers CH-ClI (B)
A 引物 CC-CG 鉴定光合放氧细菌; B 引物 CH-ClI 鉴定微囊藻属藻株

-marker 1. *M. aeruginosa* AC; 2. *M. aeruginosa* DS; 3. *M. aeruginosa* PCC 7820; 4. *M. aeruginosa* mAC; 5. *M. aeruginosa* mDS; 6. *M. aeruginosa* m7820

2.2 HPLC 分析微囊藻产生微囊藻毒素 MC-LR 的能力

按微囊藻毒素提纯方法获得微囊藻原始株与变异株的抽提物, 将该抽提物以 HPLC 分析 238 nm 处的光吸收值。从图 2 可以看出, 原始株 *M. aeruginosa* AC、DS 和 PCC7820 在保留时间为

11.5 min 处有特异吸收峰, 与 MC-LR 样品的保留时间一致, 可以断定这三株微囊藻产生的毒素类型为 MC-LR。而三株获得株 *M. aeruginosa* mAC、mDS 和 m7820 在保留时间为 11.5 min 处没有微囊藻毒素 MC-LR 特有的吸收峰, 可以断定这三株藻株不产生微囊藻毒素 MC-LR, 为无毒变异株。

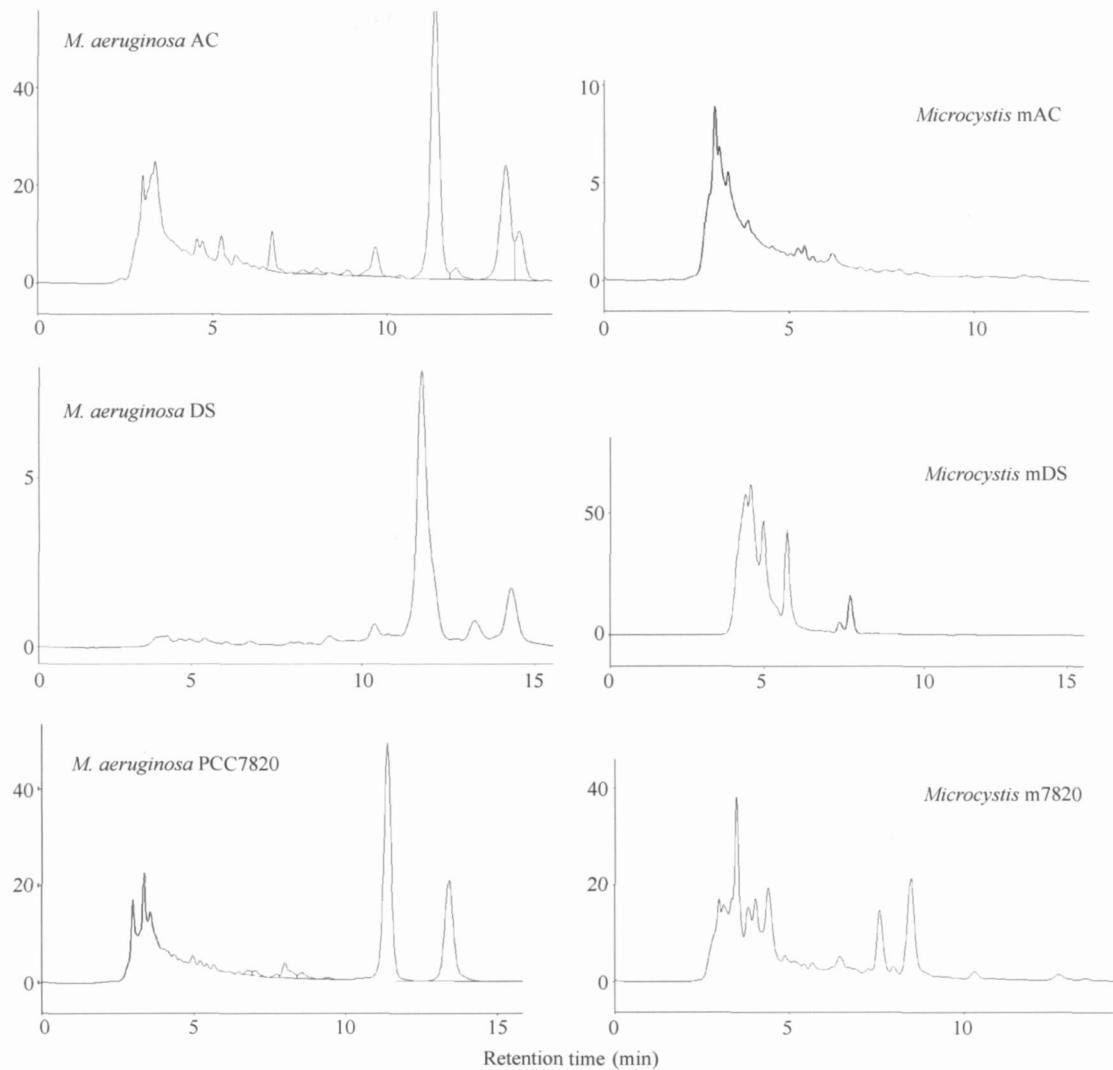


图 2 HPLC 分析无毒变异株与产毒株抽提物中微囊藻毒素含量

Fig. 2 HPLC analysis of cellular extraction of mutant and wild strains

2.3 微囊藻 ITS区序列分析

蓝藻特异的 16S rDNA 引物 CSF 和通用 23S rDNA 引物 UNI 23S 扩增 6 株铜绿微囊藻基因组 DNA, 扩增产物长度为 470 bp, 包括了大部分的 16S rDNA, 完整 ITS 区和部分的 23S rDNA 序列。图 3 显示了基于 NJ 法所构建的微囊藻 16S-23S rDNA ITS 区序列比对结果。选用的对照 16S-23S ITS 序列来自产毒微囊藻 *M. aeruginosa* TAC71、*M. viridis*

TAC 17、44、45、78、92 和 *M. wesenbergii* CL5 以及非产毒微囊藻 *M. wesenbergii* NC1、2、5 和 *M. wesenbergii* TAC52、57, 外组来自另一种单细胞蓝藻 *Synechocystis* PCC6803。从序列比对结果来看, 分为 4 个大类: 产毒微囊藻 *M. aeruginosa* TAC71、*M. viridis* TAC 17、44、45、78、92 和 *M. wesenbergii* CL5 的 ITS 序列相似性较高, 组成 Cluster I; 非产毒微囊藻 *M. wesenbergii* NC1、2、5 和 *M. wesenbergii* TAC52、57 组

成另一个 Cluster_④; Cluster_④ 包括 *M. aeruginosa* AC、DS 和 PCC7820。Cluster_⑤ 由 *M. aeruginosa* mAC、mDS 和 m7820 组成。这一结果表明 ITS 序列分析与微囊藻的产毒性能有很好的对应关系(图 3)。

M. aeruginosa AC、DS 和 PCC7820 组成的 Cluster_④ 与 *M. aeruginosa* mAC、mDS 和 m7820 组成的 Cluster_⑤ 之间的相似性很高, 显示这三株微囊藻变异株与产毒原始株之间亲缘关系比与其他两个 Cluster 更近。

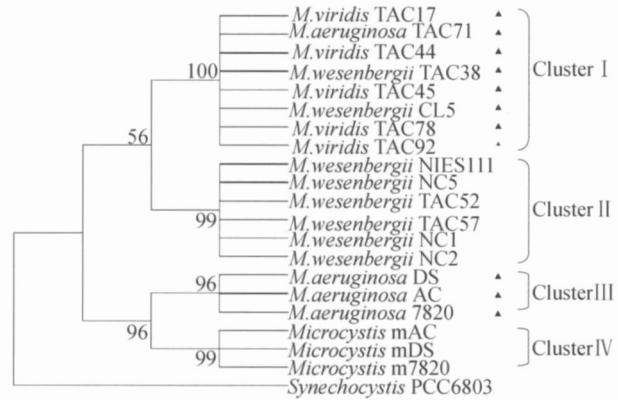


图 3 微囊藻 16S-23S rDNA ITS 序列比对

Fig. 3 16S-23S rDNA ITS comparison of toxic (\blacktriangle) and non-toxic (\square) *M. aeruginosa*

以 \blacktriangle 标识的为产微囊藻毒素藻株; GenBank 中的序号分别为 *M. aeruginosa* TAC71, AB015362; *M. wesenbergii* NC3, AB015395; NC5, AB015395; *M. viridis* TAC17, AB015398; TAC44, AB015399; TAC45, AB015400; TAC78, AB015401; TAC92, AB015402; *M. wesenbergii* NIES111, AB015388; TAC38, AB015389; TAC52, AB015390; TAC57, AB015391; CL5, AB015392; NC1, AB015393; NC2, AB015394; NC5, AB015397; *Synechocystis* PCC6803, D90916。

2.4 Chl 含量和比生长速率比较

四株微囊藻的叶绿素含量随着时间而增加(图 4)。四株藻的生长曲线的趋势比较一致, 经过 3d 的增长相对缓慢的迟滞期后均进入了快速的对数生长期, 在 36d 的生长过程中, 四株藻都没有平台期出现。*Microcystis* mDS 的叶绿素含量的增长较 *M. aeruginosa* DS 稍快, 二者的叶绿素含量在第 33 天分别为 (6.859 ± 0.622) mg/L 和 (5.234 ± 0.178) mg/L。而 *Microcystis* mAC 和 *M. aeruginosa* AC 的叶绿素含量的增长幅度很接近。第 33 天为 (5.746 ± 0.390) mg/L 和 (5.701 ± 0.545) mg/L。根据叶绿素含量计算出的比生长速率显示, *Microcystis* mAC 和 *M. aeruginosa* AC 的比生长速率很接近, 为 0.04 左右; *M. aeruginosa* DS 的比生长速率只有 0.0330 ± 0.0017 , *Microcystis* mDS 为 0.0432 ± 0.0033 , 比前者

快了 30% 左右。除了 *M. aeruginosa* DS 之外, 其他三株微囊藻的比生长速率值都很接近。

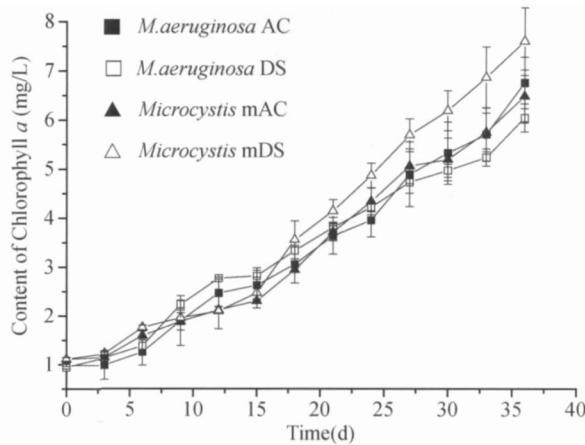


图 4 四株微囊藻的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of mutant stains and wild stains

2.5 类胡萝卜素/叶绿素比值的比较

在生长周期中, 四株微囊藻培养物的类胡萝卜素/叶绿素的比值呈现总体下降的趋势(图 5)。原始株和变异株的下降趋势有所不同: 两株原始株在接种后第 3 天, 类胡萝卜素/叶绿素的比值达到最大, 而后缓慢减小; 变异株的类胡萝卜素/叶绿素的比值则呈现多相变化, 自接种之后有一个下降过程, 然后从第 6 天开始出现回升, 在第 12 至第 15 天开始回落, 最大比值出现在生长的初始。从图 5 可以看出, 在整个生长周期过程中, 变异株的类胡萝卜素/叶绿素的比值明显高于原始株, 由于四株藻起始叶绿素含量接近(图 4), 从而排除了接种浓度的影响, 因此认为类胡萝卜素/叶绿素比值的差异反映了变异株细胞内的类胡萝卜素的相对含量高于原始株。

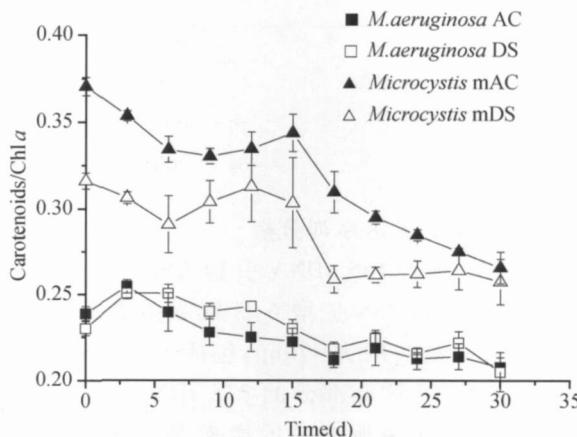


图 5 四株微囊藻类胡萝卜素/叶绿素比值的变化

Fig. 5 Carotenoids/Chla of four *Microcystis* strains

2.6 C-PC / Chl_a 的比较

图 6 显示了四株微囊藻在生长周期过程中 C-PC / Chl_a 比值随生长的变化情况。从图中可以看出, 在整个生长周期中, 原始株的 C-PC 相对含量总是高于变异株, 原始株的 C-PC 相对含量为变异株的 1.54—2.81倍。

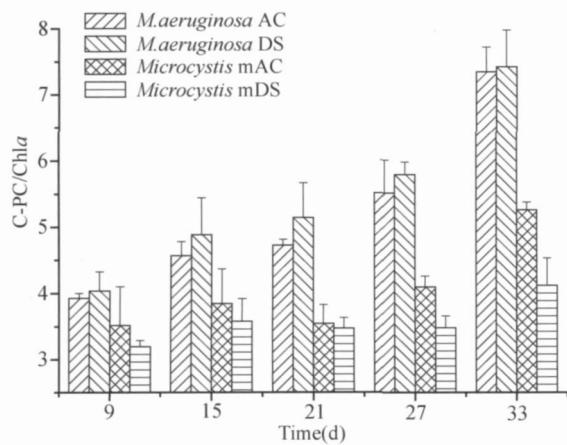


图 6 生长不同阶段四株微囊藻 C-PC / Chl_a 比值的变化

Fig. 6 C-PC / Chl_a of four *M. aeruginosa* strains

在整个生长周期中, 四株微囊藻的 C-PC 相对含量逐渐增大。在叶绿素起始浓度相近的情况下, 原始株的 C-PC 的相对含量增加的幅度较变异株要快。如 *M. aeruginosa* DS 的 C-PC / Chl_a 比值在第 6 天为 4.035 ± 0.289 , 第 30 天为 7.428 ± 0.557 , 增加了 84.1%; 而 mDS 则分别为 3.197 ± 0.0896 和 4.125 ± 0.410 , 增幅仅为 29%, 增加较前者少。相同的情况也出现在其他两株培养物中, 在 24d 内, *Microcystis* mAC 和 *M. aeruginosa* AC 的 C-PC / Chl_a 比值增幅分别为 87.1% 和 49.8%。

2.7 光反应曲线

PSII 的量子产率 (Y) 可通过 $\Delta F / F_m'$ 来计算, 随着光强的增高, $\Delta F / F_m'$ 会逐渐降低, 这主要是由两种因素引起的: 部分 PSII 的反应中心关闭 (QA 被还原) 以及热耗散上升。因此由 Y 和 PAR 计算出的 PSII 的电子传递速率 (ETR) 随饱和光强变化 (PAR) 的光反应曲线分为两个部分, 起始部分的光限制区 (Light limited region), ETR 随 PAR 的增强而成比例的增大的直线部分, 斜率为 α ; 光饱和区 (Light saturated region), ETR 达到最大值 (ETR_{max}), 在光饱和区的后半部分, ETR 减小, 反映了光抑制现象。在光限制区和光饱和区的交界处的 PAR 值定义为最适光强 (I_k)。 $I_k = ETR_{max} \times \alpha^{[22]}$ 。

从光反应曲线 (图 7) 可以看出, 在整个生长周期中, 四株藻的起始斜率 α 值都保持恒定, 说明了在光限制的情况下, 微囊藻的光合系统 (PSII) 的表观量子产率与生长无关。随着藻细胞的生长进程, 四株微囊藻的 ETR_{max} 值逐渐增大, 说明这四株藻的光合活力随生长而增强。

在生长的各个阶段, AC 和 DS 的 ETR 曲线比较接近, mAC 和 mDS 的 ETR 曲线也比较接近。在所有的光反应曲线中, 在相同的光强下, mDS 的 ETR 值均高于 DS, mAC 的 ETR 值也高于 AC。从表 2 可以看出, 在不同的生长阶段中, mDS 的 ETR_{max} 值均高于 DS, DS 的 ETR_{max} 在第 3、9、15、21、27 和 33 天分别为 (66.70 ± 1.20) 、 (88.67 ± 3.51) 、 (97.30 ± 0.89) 、 (82.57 ± 3.78) 、 (93.10 ± 0.57) 和 $(91.00 \pm 2.15) \mu\text{mol electrons/m}^2 \cdot \text{s}$, mDS 的 ETR_{max} 值分别为 (90.43 ± 1.82) 、 (98.13 ± 2.44) 、 (117.07 ± 2.32) 、 (101.43 ± 5.25) 、 (115.00 ± 4.47) 和 $(133.53 \pm 9.01) \mu\text{mol electrons/m}^2 \cdot \text{s}$, mDS 的 ETR_{max} 值比 DS 高 10.6%—46.7%。同时 mDS 的 α 值在各个生长阶段都高于 DS (差值为 27.5%—60.4%)。这是由于在不同强度的光强下, mDS 的 PSII 的有效量子产率 ($Y = \Delta F / F_m' = (F_i - F_m') / F_m'$) 均高于 DS, 因此 mDS 的 PSII 的光合活力 ($ETR = Y \times PAR \times AF \times 0.5$) 亦高于 DS。比较 mAC 和 AC 的光反应曲线也可以得出结果。结果说明这两株变异微囊藻的光合系统 (PSII) 的量子产率和光合活力均高于原始株。

在生长周期中, 原始株的 I_k 值变化范围为 (458.8 ± 14.3) 至 $(619.0 \pm 37.1) \mu\text{mol ectrpm s/m}^2 \cdot \text{s}$, 而变异株为 (390.9 ± 7.7) 至 $(568.5 \pm 34.8) \mu\text{mol ectrpm s/m}^2 \cdot \text{s}$ 之间, 随着生长的进行, 四株藻的 I_k 值逐渐增大。从表 2 中四株藻的 I_k 值可以看出, 这些结果表明这几株微囊藻的最适光强是随着生长情况而改变的, 藻生物量越高, 对光强的适应能力也越强; 与此同步的是四株微囊藻的 ETR_{max} 值随着生长的进行而增大, 即微囊藻的光合活力随着生长的进行而增强。在相同的生长阶段中, AC 和 DS 的 I_k 值接近, mAC 和 mDS 的 I_k 值在相同生长阶段也很接近。这个结果反映了原始微囊藻株和变异微囊藻株在光强的适应范围方面有所差异。AC 的 I_k 值在各个生长阶段均大于 mAC, DS 的 I_k 值也大于 *Microcystis* mDS, 显示出变异微囊藻株在较低光强下就可以达到最大的光合活力。

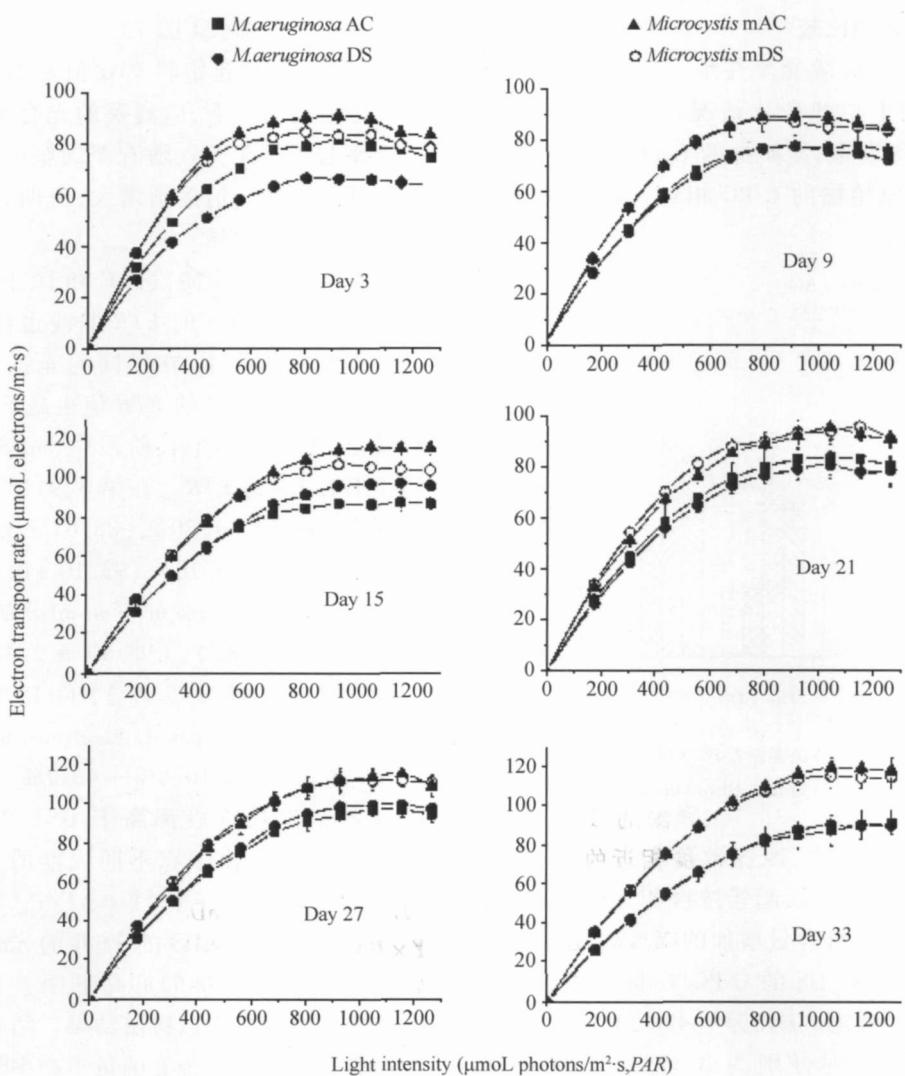


图 7 四株微囊藻 PS_{II}电子传递速率对光强的反应曲线

Fig. 7 Light response curves of mutant and wild strains

表 2 四株微囊藻光反应曲线特征指标

Tab. 2 Light response curve indexes of four *Microcystis* strains

生长周期 Date	荧光参数 Fluorescence parameters	特征指标			
		<i>M. aeruginosa</i> AC	<i>M. aeruginosa</i> DS	<i>Microcystis</i> mAC	<i>Microcystis</i> mDS
Day 3	α	0.175±0.007	0.144±0.006	0.218±0.006	0.231±0.002
	ETR_{max} (μmol electrons/m ² ·s)	80.20±0.87	66.70±1.20	84.57±1.89	90.43±1.82
	I_k (μmol electrons/m ² ·s)	458.8±14.3	463.6±9.5	387.9±18.3	390.9±7.7
Day 9	α	0.173±0.006	0.172±0.008	0.228±0.002	0.232±0.002
	ETR_{max} (μmol electrons/m ² ·s)	81.23±1.68	88.67±3.51	98.37±4.51	97.13±2.44
	I_k (μmol electrons/m ² ·s)	468.8±8.21	517.2±3.7	430.7±17.5	418.5±8.6
Day 15	α	0.177±0.009	0.174±0.005	0.233±0.002	0.231±0.004
	ETR_{max} (μmol electrons/m ² ·s)	87.27±1.70	84.47±0.15	103.63±5.79	106.91±2.02
	I_k (μmol electrons/m ² ·s)	492.4±30.6	485.93±1.25	444.1±21.3	463.2±12.9

续表

生长周期 Date	荧光参数 Fluorescence parameters	<i>M. aeruginosa</i> AC	<i>M. aeruginosa</i> DS	<i>Microcystis</i> mAC	<i>Microcystis</i> mDS
Day 21	α	0.179 ± 0.021	0.178 ± 0.007	0.232 ± 0.008	0.231 ± 0.002
	ETR_{max} ($\mu\text{mol electrons/m}^2 \cdot \text{s}$)	84.63 ± 8.74	82.57 ± 3.78	96.30 ± 5.28	101.43 ± 5.25
	I_k ($\mu\text{mol ectpm s/m}^2 \cdot \text{s}$)	473.8 ± 14.5	464.0 ± 8.6	415.4 ± 37.6	439.2 ± 24.5
Day 27	α	0.174 ± 0.005	0.181 ± 0.018	0.230 ± 0.003	0.233 ± 0.005
	ETR_{max} ($\mu\text{mol electrons/m}^2 \cdot \text{s}$)	90.10 ± 4.24	93.10 ± 0.57	107.40 ± 4.61	103.27 ± 4.47
	I_k ($\mu\text{mol ectpm s/m}^2 \cdot \text{s}$)	517.1 ± 7.8	536.7 ± 6.6	467.7 ± 23.0	442.7 ± 24.4
Day 33	α	0.152 ± 0.002	0.149 ± 0.004	0.229 ± 0.002	0.235 ± 0.003
	ETR_{max} ($\mu\text{mol electrons/m}^2 \cdot \text{s}$)	93.87 ± 4.71	91.00 ± 2.15	120.03 ± 6.99	133.53 ± 9.01
	I_k ($\mu\text{mol ectpm s/m}^2 \cdot \text{s}$)	619.0 ± 37.1	611.1 ± 2.5	524.4 ± 24.5	568.5 ± 34.8

2.8 四株微囊藻的光合作用最适光强 (I_k) 与 C-PC / Chl_a 的关系

从图 8 可以看出, 在整个生长周期中, 这四株微囊藻的光合作用最适光强与 C-PC / Chl_a 比值有很好的正相关性 ($P < 0.0001$), 随着 C-PC / Chl_a 比值的增加, 四株藻的光合作用最适光强逐渐增加。这种对应关系表明微囊藻对光强的适应能力与 C-PC 的相对含量相关。

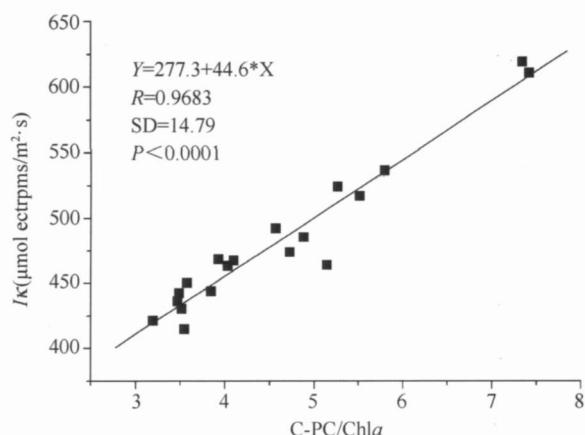


图 8 四株微囊藻的光合作用最适光强 (I_k) 与 C-PC / Chl_a 的关系

Fig. 8 The relationship between I_k and C-PC / Chl_a of four *Microcystis* strains

3 讨论

3.1 金藻吞噬产毒微囊藻后生长的藻属于微囊藻属

从金藻吞噬产毒微囊藻后的培养液中生长出来的单细胞蓝藻经显微镜镜检类似于微囊藻。Rudi *et al.*^[11]根据 16S rDNA 序列的 V6、V7、V8 可变区设计的光合细菌特异性引物对 CC / CG 和微囊藻属特异引物 CH / CI 建立了准确的微囊藻鉴定方法。扩

增变异株 DNA, 证实三株变异藻株属于微囊藻。HPLC 检测本文中的三株产毒微囊藻 *M. aeruginosa* AC、DS 和 PCC7820 能够产生微囊藻毒素 MC-LR, 而从金藻吞噬后的分离出来的变异藻株不产生微囊藻毒素。在实验室培养条件下, 这几株非产毒微囊藻经过数次传代, 多次的 HPLC 和 ELISA 检测结果证实变异株的非产毒性状是稳定遗传的。

产毒和非产毒微囊藻藻株在形态学上是很难区分的。16S-23S ITS 区序列具有比 16S rDNA 更丰富的遗传多态性, 因此被认为是研究进化距离相近的种间生物的多样性以及鉴定培养物纯度的有效手段^[23]。Janse *et al.*^[24, 25]将微囊藻 16S-23S ITS 序列结合高分辨率的 DGGE(变性梯度胶电泳)分析环境样品, 能够有效地区分产毒和非产毒微囊藻。我们测定了微囊藻原始产毒株与无毒变异株的 ITS 序列, 并选取了已知的产毒和非产毒微囊藻株的 ITS 序列作为比对, 发现我们得到的非产毒变异株与已知的非产毒微囊藻株属于一个大类, 而产毒原始株则与已知的产毒微囊藻株属于另一大类, 二者的差异也证实了微囊藻的产毒性能和 ITS 序列的差异有一定的一致性。

3.2 金藻吞噬作用产生的微囊藻为无毒变异株

在自然水体中, 微囊藻的毒性能降低自身被浮游动物吞噬的几率, 所以微囊藻毒素的产生可能是作为一种藻类自身防御措施^[26] 演变出来的。从自然水体中分离的蓝藻在实验室培养后发生生理特性变化的现象时有报道。雷腊梅等^[27]发现了由室温分离的微囊藻株经实验室培养后, 形态从群体转变为单细胞, 产毒性能也发生很大的变化。有报道证实因突变引起的 gvpAC 拷贝的缺失, 导致 *P. kloktothrix* sp. 的伪空胞失去调节藻体浮力的能力^[28];

M louka et al.^[29]也报道了在 *M. aeruginosa* PCC7806中由于随机片段的插入引起了 *gvp*基因的功能的丧失。这些在自然环境下具有生态学优势的生理特性在实验室培养条件下对生物体来说可能不再是必需的^[30]。近期有报道指出产毒微囊藻藻株长期培养的过程中发生了自发突变, 丧失了合成毒素的能力^[5~9]。Schatz et al.^[10]分离到两株非产毒微囊藻, 分别来源于两株产毒微囊藻, PCR结果显示非产毒株缺失了 *mcyB* 和 *mcyD* 区域的相应产物。他们推测非产毒株从产毒株中发展并占优势的原因之一是非产毒株能够在静止期培养条件下占优势。在我们的实验中, 非产毒微囊藻株的出现是在金藻的吞噬实验进行了 2—3 个月之后, 这个时候金藻细胞活力较低, 对微囊藻的吞噬能力减弱, 微囊藻形成优势种群的可能性增大。另外的实验表明当同时以产毒微囊藻和相应的无毒变异株同时喂食金藻, 其总是优先吞噬混合饵料中的非产毒微囊藻, 在无毒饵料藻丰度较低的情况下, 才开始吞噬产毒微囊藻。这一结果间接证实了金藻对微囊藻产毒性能的转化是一种生物诱变作用的结果, 而不是通过对产毒藻的选择性吞噬从而筛选出非产毒藻的结果。推测在金藻吞噬产毒微囊藻之后使部分没有被消化的微囊藻细胞的生理机能产生变异, 金藻死亡裂解之后这些细胞仍具有生命力, 继续生长增殖并成为优势种群。

3.3 金藻吞噬产生的无毒变异株的生理学特征相比产毒原始株发生了变化

比较产毒原始株和无毒变异株的生长曲线可以得出, *M. microcystis* mDS 的比生长速率比 *M. aeruginosa* DS 快 30% 左右, 而 *M. microcystis* mAC 与 *M. aeruginosa* AC 的生长速率相近。产毒原始株与无毒变异株的生长速率没有统计学意义上的差异 ($P > 0.05$), 因此从生长速率上并不能解释非产毒藻株占优势的原因。有意思的是, 非产毒微囊藻株的细胞大小与非产毒原始株的差别不大, 但有些非产毒微囊藻的细胞形态呈现特别的 8 字型, 而这种细胞形态在原始株中则很少见到。

叶绿素荧光值的大小可以反映光合生物光合作用活力的大小^[31, 32]。从四株微囊藻的光反应曲线中可以看出, 在各个生长阶段, 变异株的 α 值和 ETR_{max} 值均明显高于原始株, 说明变异株比原始株有更强的光合作用活力; 而变异株的 I_k 均低于原始株, 说明非产毒微囊藻达到最大光活性所需的光强比原始株低。这些结果说明了非产毒变异株的光

合效率明显高于产毒原始株。Clayton^[33]曾报道在 *M. aeruginosa* 中, 随着类胡萝卜素含量的增加, 藻细胞的光合作用的效率亦提高。这是因为, 类胡萝卜素吸收了光合活性辐射的短波段 (400—550 nm) 的能量, 并将 30%—70% 的能量传递给叶绿素 *a*, 提供光合作用的能量所需。我们的实验中观察到在整个生长周期中变异株中较高的类胡萝卜素含量与其具有较高的光合作用活力的现象也证明了这一点。变异株和原始株在光合活力方面的差异可能是变异株在混合培养物中占优势的原因之一。

蓝藻和真核藻类以及高等植物一样, 都含有 Chl, 两个光合反应中心, 类胡萝卜素以及相似的电子传递组分。然而蓝藻不含绿藻和高等植物中具有的叶绿素 *b* 光吸收蛋白, 而以藻胆蛋白作为天线色素将吸收的光线能量传递给 PSII^[34]。Sedn ak, et al.^[35]提出产毒微囊藻通过增加细胞体积从而在因水华滋生导致进入水体的光照较弱的情况下增加对光照的吸收。在四株微囊藻的生长过程中观察到, 随着 C-PC 的相对含量 (与 Chl 的比值) 和绝对含量的增加, 每株微囊藻的最适光强也随之增大。这表明微囊藻细胞通过增加 C-PC 含量的增高来增加对光照的吸收, 以消除藻体生物量的增加而造成对光线的遮蔽效果。整个生长周期过程中, 原始株的 C-PC 的相对含量均明显高于变异株。同时我们发现四株微囊藻不同生长阶段的光合作用最适光强 I_k 与 C-PC /Chl 有很好的对应关系。在实验室培养条件下, 光照强度恒定为 25—30 $\mu\text{mol ectpm s/m}^2 \cdot \text{s}$ 远远低于自然环境下可能达到的光照强度 (200—500 $\mu\text{mol ectpm s/m}^2 \cdot \text{s}$), 这些分离自野外的产毒原始株处于光照相对较弱的条件, 较高的 C-PC 含量有助于增加对光照的吸收。而变异株具有的较高的光合作用效率, 它们产生最大光合活力所需的光照强度比原始株低。因此变异株对实验室培养条件下的光照强度较为适应, 无需额外增加 C-PC 的含量来提高对光照的吸收。

参考文献:

- [1] Campbell W W. The toxins of cyanobacteria [J]. *Scientific American*, 1994, 270: 78—86
- [2] Codd G A, W and C J Bell S G. Cyanobacterial toxins occurrence, modes of action, health effects and exposure routes [A]. In: Seiler J P, Vilanova E (Eds.), *Applied toxicology* [C]. Berlin: Springer, 1997, 399—410
- [3] Dittman E, Neilan B A, Erhard M, et al. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxicity in *Cylindrospermum* [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2: 113—121

- toxin production in the cyanobacterium *M. aeruginosa* PCC 7806 [J]. *Molecular Microbiology*, 1997, **26**: 779—787
- [4] Nishizawa T, Asayama M, Fujii K, et al. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide in microcystin in *M. aeruginosa* spp [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1999, **126**: 520—529
- [5] Tillett D, Parker D L, Neilan B A. Detection of toxicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *M. aeruginosa* comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin in genetic spacer) phylogenesis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**: 2810—2818
- [6] Kumayer R, Christiansen G, Fastner J, et al. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* sp [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, **6**: 831—841
- [7] Li R H, Yu M J. Studies on growth character and toxin from *M. aeruginosa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, **17**: 90—92 [李仁辉, 俞敏娟. 铜绿微囊藻的某些生长特性及毒性的研究. 水生生物学报, 1993, **17**: 90—92]
- [8] Zhang Q X, Yu M J. Toxicities and toxin of *M. aeruginosa* waterblooms from Chao Lake [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1989, **9**: 86—94 [张青学, 俞敏娟. 铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa*) 水华毒性及毒素的研究. 环境科学学报, 1989, **9**: 86—94]
- [9] Kaebernick M, Rohrlack T, Christoffersen K, et al. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia* [J]. *Environmental Microbiology*, 2001, **3**: 669—679
- [10] Schatz D, Keren Y, Hadas O, et al. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *M. aeruginosa* strains [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(6): 798—805
- [11] Rudi K, Skulberg O M, Larsen F, et al. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in culture on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6—V7, V8 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(7): 2593—2599
- [12] Kaya K. Blooms of toxic cyanobacteria and removal strategies [A]. Proceedings of the 8th Environment Symposium [C]. Pusan Korea: Inje University, Microcystin variants and their quantitative analyses, 1999, 2—5
- [13] Nishihara H, Miyata H, Watanabe M, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for discrimination genotypes of *M. aeruginosa* Cyanobacteria [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1997, **61**(7): 1067—1072
- [14] Janse I, Kardinaal W E, Meima M, et al. Toxic and non toxic microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(7): 3979—3987
- [15] Kumai S, Tanura K, Nei M. Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers [J]. *Biinformatics*, 1994, **10**: 189—191
- [16] Amor D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidases in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiology*, 1949, **24**: 1—15
- [17] Richards F A, Thompson T G. The estimation and characterization of plankton population by pigment analysis. II. A spectrographic method for the estimation of plankton pigments [J]. *Journal of Marine Research*, 1952, **11**: 156—172
- [18] Padgett M P, Krogmann D W. Large scale preparation of pure phycobiliproteins [J]. *Photosynthesis Research*, 1987, **11**: 225—235
- [19] Bennett A, Bograd L. Complementary chromatographic adaptation in filamentous blue-green alga [J]. *Journal of Cell Biology*, 1973, **58**: 419—435
- [20] Guillard R R L. Division rates [A]. In Stein (Eds.), *Handbook of Phycological Methods* [C]. V. 1. Cambridge: Cambridge University Press, 1973: 289—312
- [21] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, **345**: 659—668
- [22] Strong G L, Bannister P, Burritt D J. Are mistletoe shade plants CO₂ assimilation and chlorophyll fluorescence of temperate mistletoes and their hosts [J]. *Annals of Botany*, 2000, **84**: 511—519
- [23] Neilan B A, Stuart J L, Goodman A E, et al. Specific amplification and restriction polymorphisms of the cyanobacterial rRNA operon spacer region [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1997, **20**: 612—621
- [24] Janse I, Kardinaal W E, Meima M, et al. Toxic and non toxic microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(7): 3979—3987
- [25] Janse I, Meima W E, Kardinaal M, et al. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA—internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 6634—6643
- [26] Lampert W. Further studies on the inhibitory effect of the toxic blue-green *M. aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton [J]. *Archiv für Hydrobiologie*, 1982, **95**: 207—220
- [27] Lei L M, Song L R, Liu Y D. Comparison of growth and toxin analysis in two phototype *M. aeruginosa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(3): 205—209 [雷腊梅, 宋立荣, 刘永定. 铜绿微囊藻两种表型的生长生理特性及毒素组成比较分析. 水生生物学报, 2001, **25**(3): 205—209]
- [28] Beard S J, Handley B A, Walsby A E. Spontaneous mutations in gas vesicle genes of *Planktothrix* spp affect gas vesicle production and critical pressure [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **215**: 189—195
- [29] Melouka A, Comte K, Castets A M, et al. The gas vesicle gene cluster from *M. aeruginosa* and DNA rearrangements that

- lead to loss of cell buoyancy [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, **186**: 2355—2365
- [30] Feil E J. Small change keeping pace with microevolution [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, **2**: 483—495
- [31] Demmig B, Winter K, Kruger A, et al. Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress [J]. *Plant Physiology*, 1988, **87**(1): 17—24
- [32] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll-fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of *in-vivo* photo-synthesis [A]. In Schulze R-E, Caldwell M (Eds.), *Ecophysiology of photosynthesis*. Ecological Studies 100 [C]. Berlin: Springer, 1995: 49—70
- [33] Clayton R K. Photosynthesis: Physical mechanisms and chemical patterns [M]. Cambridge: 1980
- [34] Gantt E. Phycobilisomes [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1981, **32**: 327—347
- [35] Sednák B, Kosi G. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation [J]. *Journal of Plankton Research*, 1998, **20**: 691—70

COMPARISON BETWEEN THE TOXIC *MICROCYTIS* SPECIES AND NON-TOXIC *MICROCYTIS* SPECIES ORIGINATED FROM THE COCULTURE OF *MICROCYTIS* AND *POTERIOOCHROMOAS* SP.

OU Dan-Yun^{1,2}, LIU Mei¹, GAN Nan-Qin¹ and SONG Li-Rong¹

(1 State key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072

2 Wuhan Branch, Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract Predation of *Poterioochromonas* sp. on prey *Microcystis* is normally a one way process, i.e., prey cells were continuously ingested and gradually disappeared. However, it was not always the same. Occasionally, a patch of blue-green colored cells may re-appear from the bottom of the culture flask and gradually proliferated. Based on this phenomenon, experiments were designed by using three strains of *Microcystis*-*M. aeruginosa* AC, DS and PCC 7820-as prey organisms co-cultured with predator *Poterioochromonas* sp., respectively. After one or two months, eventually “transformed” *Microcystis* populations were obtained separately from each of co-cultured treatment. Next PCR and 16S rDNA analysis identified these transformed cells to be *Microcystis* sp. Furthermore, it was astonishingly found that these three transformed *Microcystis* populations had lost the microcystin-producing ability. The result strongly suggested that *Poterioochromonas* sp. played an important role in transforming the toxicity of *Microcystis* during predating process.

Transformed non-toxic *Microcystis* had higher value of carotenoids/chlorophyll ratio but lower value of cyanophycin/chlorophyll ratio compared with original toxic strains. Light response curves indicated that the PS \oplus quantum yield and photosynthetic activity of these non-toxic strains were higher than that of original toxic strains; moreover, non-toxic strains achieved the maximum photosynthetic activity at lower light intensity than that of toxic strains. This might explain why the non-toxic transformed strains outgrew the toxic wild strains in *Microcystis* and *Poterioochromonas* co-culture.

Key words *Poterioochromonas* sp.; *Microcystis*; Non-toxic mutant species; Pigment content; PAM light response curves