

微囊藻毒素与自然水体中细菌 VIVIFORM 状态的相关性

韩庆国¹ 胡章立¹ 雷安平¹ 宋立荣² 刘永定²

(1. 深圳大学生命科学院, 深圳 518060; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 细菌 VIVIFORM 状态是直接关系到自然水体水质评价和环境保护的生态现象, 其形成机理相当复杂, 但环境胁迫是主要诱因。通过人为改变湖水中的微囊藻毒素 (MG-LR) 水平, 对水体中蓝藻毒素与细菌 VIVIFORM 状态之间的相关性进行了分析。结果表明, 较高的毒素水平对水体中细菌种群总量没有明显的影响, 但能刺激 VIVIFORM 细菌转化成可培养状态, 从而证实了自然水体中蓝藻毒素与水细菌 VIVIFORM 状态之间存在直接的相关性。

关键词: 微囊藻毒素; 细菌 VIVIFORM 状态; 自然水体

中图分类号: Q391.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0199-04

在 20 世纪 80 年代初, Colwell 等^[1] 通过对霍乱弧菌和大肠杆菌存活规律的研究观察, 首次明确提出了细菌“活的非可培养状态”(Viable but Non-Culturable State, VNS) 的现象, 并认为霍乱弧菌的越冬是通过这种形式实现的。在进一步的研究中又引入了“VIVIFORM”这一术语来描述这种 VNS 现象, 它是不形成孢子的革兰氏阴性菌, 在处于连续胁迫的环境条件下, 细胞缩小成球形, 用常规方法培养不能生长繁殖, 但仍然具有代谢活性, 是一种特殊的生理状态^[2]。最近的研究发现, 在蓝藻水华爆发季节, 自然水体中细菌 VIVIFORM 状态细胞的比率出现明显变化。由于蓝藻水华发生是一个相当复杂的生态学现象, 它所涉及的环境因子包括物理因子(如温度、光照、辐射等), 化学因子(如各种有机和无机营养因子、蓝藻毒素、pH 等)和生物因子(如种间、种内竞争)等。与非水华爆发期相比较, 蓝藻水华爆发季节水体中最重要的变化之一是蓝藻毒素含量的明显增加。本研究的主要目的就在于探讨蓝藻毒素与细菌 VIVIFORM 状态和可培养状态之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 水样采集 试验水样均采自深圳西丽水库(图 1), 利用采水瓶收集水面以下 1m 处的水样供实验用。

1.2 水样处理 将采集的水样按不同的实验要求

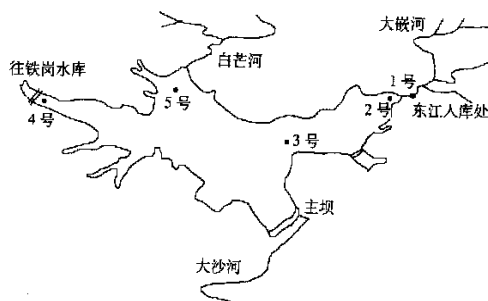


图 1 西丽水库各采样点分布图

Fig. 1 Map of Xili Reservoir with sampling stations

进行处理。在检测水库不同采样点的水体中细菌 VIVIFORM 状况时, 将新鲜水样直接用 PCA (Plate Count Agar, 购自 OXOID 公司) 平板计数和 DAPI 染色法直接计数。在检测藻毒素的影响时, 先将水样与一定量的微囊藻满足要求毒素 (MG-LR, 由宋立荣研究员提供) 混合, 以配成含不同毒素水平的人工湖水体本实验使用。

1.3 细菌计数 采用 PCA 平板计数和 DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) 染色法直接计数^[3]。

2 结果

2.1 西丽水库不同采样点水体中细菌 VIVIFORM 状态

从西丽水库各出、入水口的 VIVIFORM 细菌数量

收稿日期: 2004-07-06; 修订日期: 2004-10-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30270226, 30470281); 国家“863”资环领域课题 (2001AA641030); 国家重点基础研究发展计划课题 (2002CB412309) 资助

作者简介: 韩庆国 (1962—), 男, 湖北沙市人; 讲师; 主要从事微生物生理与生物化学方面的研究

通讯作者: 胡章立, E-mail: huzl@sza.edu.cn

比较,可以看到库区的入水口细菌的 VIVIFORM 比率最低(表 1),虽然东江引水渠、东江入水口的细菌总量与库区差别不大,但形成 VIVIFORM 细菌的比率却是明显偏低;相反,在经过库区的蓄水后,在两个出水口的细菌 VIVIFORM 比率比较高。这可能是因为库区的水环境(如强光照、营养状况和生物种群的变化等)胁迫,致使细菌 VIVIFORM 状态比率的升高。

表 1 深圳西丽水库不同采样点细菌 VIVIFORM 状态情况

Tab. 1 The rates of bacterial viviform states in different sampling stations of Xili Reservoir

采样点	VIVIFORM 细菌比率(%)
1	72.6%
2	76%
3	98%
4	98.5%
5	90.5%

注:1号水样取处东江进入西丽水库前的引水渠,2号水样取自东江进入水库的入水口,3号水样取自东江入水口的岔道与库区中心的交界处,4号水样取自西丽水库供钢岗水库的出水口,5号水样取自西丽水库供深圳自来水管厂的出水口。

2.2 蓝藻毒素(MC-LR)对水体中细菌总数的影响

将 9 个 250mL 经灭菌处理的三角瓶分为 A、B、C 3 组,每组三角瓶中分别装入 200mL 深圳西丽水库水样,再分别加入浓度为 200ng/μL 的微藻毒素 0μL (A 组)、20μL (B 组)和 200μL (C 组),置于光照培养箱中,在温度 22℃,光周期 12h: 12h (L: D),光强 30μE·m⁻²·s⁻¹的条件下培养。

用 DNA 荧光染料 DAPI 对细菌染色,在荧光显微镜下对不同毒素水平水体中的细菌总数进行计数,结果表明:人为增加水体中的毒素含量,水体中的细菌总数变化不明显,对照和毒素处理的水体中细菌总数的变化呈相似的趋势,培养 1d 均增加较快,随后逐渐下降,到 7d 出现回升(图 2)。细菌总数出现变化的原因目前还不清楚。可能与水体中毒

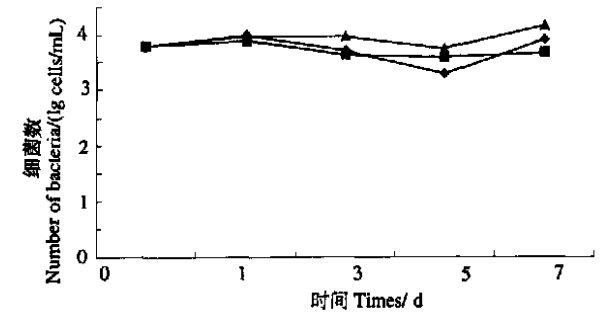


图 2 微囊藻毒素(MG-LR)对水体中细菌总数的影响

Fig. 2 Effect of microcystins on the total number of bacteria

◆ Control ■ 20μL MG-LR ▲ 200μL MG-LR

素水平变化、营养因子变化、生物种群变化等有直接或间接的相关性。

2.3 蓝藻毒素对水体中可培养细菌数量的影响

如 2.2 所述方法,将深圳西丽水库水样进行实验室培养,并人为设置不同的蓝藻毒素水平,在对水体进行细菌总数检测的同时,通过 PCA 平板计数的方法对水体中可培养细菌数量的动态变化规律进行分析,结果发现:随着水体中微囊藻毒素水平的增加,水体中可培养细胞数目有明显增加,特别是在保温培养到第 7d 时,可培养细胞出现峰值(图 3)。

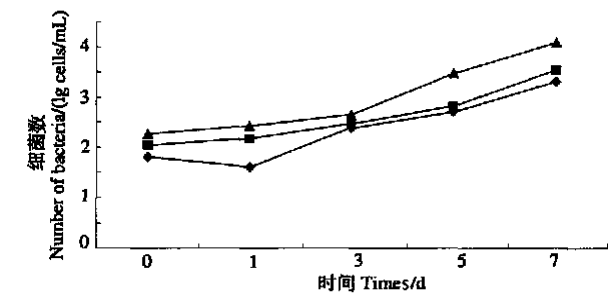


图 3 微囊藻毒素(MG-LR)对水体中可培养细菌的影响

Fig. 3 Effect of Microcystins on culturable bacteria

◆ Control ■ 20μL MG-LR ▲ 200μL MG-LR

2.4 蓝藻毒素(MC-LR)对水体中细菌 VIVIFORM 状态的影响

如图 4 所示,在水体中随着蓝藻毒素的增加,VIVIFORM 状态细菌数大大下降,在培养第 7d,达到最低点,从这里可以看出,微囊藻毒素可能对 VIVIFORM 状态细菌转化为可培养细菌具有促进作用(图 4)。

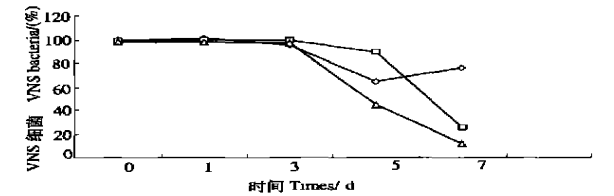


图 4 微囊藻毒素(MC-LR)对自然水体中细菌 VIVIFORM 状态的影响

Fig. 4 Effect of microcystins on bacterial viviform state

◇ Control □ 20μL MC-LR ▲ 200μL MC-LR

图 4 微囊藻毒素(MG-LR)对自然水体中细菌 VIVIFORM 状态的影响

Fig. 4 Effect of microcystins on bacterial viviform state

Control 20μL MG-LR 200μL MG-LR

3 讨论

尽管研究者们对 VIVIFORM 状态的认识已经有了一段时间,但对其形成机理及如何转化成可培养细胞等问题仍存在诸多疑问。更深层次地揭示细菌 VIVIFORM 状态的生态、生理和分子生物学机理是

解决与细菌 VIVIFORM 细胞相关的卫生学、预防医学和环境生物学问题的前提。特别是随着环境问题的日益严重, 各种病原菌随着工业或生活废水大量进入人类赖以生存的自然水资源。这些病原菌在自然水体中是怎样形成 VIVIFORM 状态细胞及转化成可培养细胞的途径等问题, 是直接影响自然水体水质评价与保护等环境问题、疾病预防与控制等卫生学问题的理论基础。

自然水体中细菌 VIVIFORM 状态的比率与水体的胁迫环境诸如高辐射、强光照、湖水盐度及富营养化水平等有密切的关系^[4]。本研究结果表明, 西丽水库的水环境因子(如蓝藻水华、强光照等)对水细菌中 VIVIFORM 状态细胞的比率有明显的影响(表 1)。蓝藻毒素作为自然水体中微量的有机化合物, 已有研究证明蓝藻毒素可导致细菌膜蛋白和质粒特性的改变, 如微囊藻属等产生的毗毒素是蛋白磷酸酶的强抑制剂^[5]; Palmer 等^[6]在分析了有机药物(如硝基苯、间甲硝基苯酚等)对大肠杆菌形成非可培养状态的影响时, 发现有机药物正是通过影响细菌膜蛋白的组成并导致细菌一些特征质粒的丢失, 使细菌转化为 VIVIFORM 状态。所以蓝藻毒素(MG-LR)是否也能通过影响细菌膜蛋白而使之转化为 VIVIFORM 状态? 从本试验的结果来看, 正好相反, 蓝藻毒素的影响是有利于细菌从 VIVIFORM 状态转变为可培养细胞, 并没有表现出促进细菌转化为 VIVIFORM 状态的作用; Mayra^[7]等在研究有毒甲藻 *Ostreopsis lenticularis* 与共生细菌的关系时, 也发现其藻

毒素的存在与细菌 VIVIFORM 状态比率呈负相关。这可能是因为水体中不同的藻毒素水平对细菌的生理状态表现出不同的效应; 也可能是其他的环境因子(如辐射、光照、营养和生物种群等)与蓝藻毒素的协同效应, 具体原因目前正在进一步研究。

参考文献:

- [1] Xu H S, Roberts N, Singleton F, *et al.* Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment [J]. *Microbiol. Ecol.*, 1982, **8**: 313—323
- [2] Xu B, Ji W S, Xu H S. A new bacterial survival state Viable but non-culturable state [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 1990, **2**(3): 144—149 [许兵, 纪伟尚, 徐怀恕. 一种新发现的细菌的特殊存活形式——活的非可培养状态. 中国生态学杂志, 1990, **2**(3): 144—149]
- [3] Porter K G, Feing Y S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1980, **25**(5): 943—948
- [4] Hu Z L, Bergstein T. The influence of artificially induced salinity changes on the bacterial population in Lake Kinneret [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4): 326—330 [胡章立, Bergstein, T. 人为因素导致的盐度变化对 kinneret 湖水细菌种群的影响. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 326—330]
- [5] Mackintosh C, Beattie K A, Klunpp S, *et al.* Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A from both mammals and higher plants [J]. *FEBS Lett.*, 1990, **264**: 187—192
- [6] Palmer L. M. Molecular genetic and phenotypic alteration of *Escherichia coli* in natural water [J]. *Microbial. Letters*, 1984, **21**: 169
- [7] Mayra A., William R, Nadathur S G. *et al.* Cultural and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* [J]. *Toxicon*, 2003, **42**: 419—424

THE STUDIES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN MICROCYSTIN-LR AND VIVIFORM STATE OF BACTERIUM IN NATURAL BODIES OF WATER

HAN Qing-Guo¹, HU Zhang-Li¹, LEI An-Ping¹, SONG Li-Rong² and LIU Yong-Ding²

(1. College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060;

2. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: The bacterial viviform state is an important ecological problem which is relative to water quality assessment and environmental protection in natural water bodies. Though the reasons why it was formed are unclear and complicated, the direct effects came from the environmental stress factors including nutrient starvation, temperature changes and algal toxins stress etc.

The rates of bacterial viviform states in different sampling stations of Xili reservoir were investigated, the results showed: the bacterial total number was similar between the station of Dongjiang river entrance and the internal reservoir, but the rates of bacterial viviform state were lower in Dongjiang river entrance. It was deduced that environmental stress factors (such as high light intensity, water pollution and oxygen stress etc.) induced bacterial cell type transformation from culturable state to viviform cell.

It was found that there were some relationship between blue-green bloom and bacterial viviform state in natural water bodies by studying on eutrophic water bodies in Lake Wenshanhu, Lake Xili and Lake Kinneret etc. The algal toxin is an important environmental factor in water bodies of blue-green bloom, the further experiments which studied on the influence of microcystins-LR on the viviform state of bacterium was done by using artificially induced microcystin-LR concentration gradients. The results showed microcystin-LR had no obvious effect on the aquatic bacterial population, but it could stimulated the bacterial cell transformation from viviform state to culturable state. It indicates that there is the direct relationship between microcystin-LR and the viviform state of bacterium in natural bodies of water. The further research on the molecular mechanism of microcystin-LR stimulating cell type transformation is ongoing.

Key words: Microcystin-LR; Viviform state of bacterium; Natural bodies of water