

微囊藻毒素对细长聚球藻生长及生理生化特性的影响

胡智泉 刘永定

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 采用改良的微囊藻毒素提取、制备方法可获得一定纯度的 MC。经 HPLC 分析, MG RR 的含量在 95% 以上。用微囊藻毒素处理细长聚球藻, 发现毒素能显著抑制聚球藻的生长, 降低聚球藻的可溶性蛋白与可溶性、不可溶碳水化合物含量, 改变 PC/Chl 比值, 抑制光合系统 PS II 活性, 进而导致光合作用减弱, 生化反应减慢, 从而抑制该藻的细胞分裂, 使生长受阻。

关键词: 微囊藻毒素; 细长聚球藻; 生长; 光合色素; 叶绿素荧光; 可溶性蛋白; 碳水化合物

中图分类号: X173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)02-0155-04

由于经济发展和人口的迅速增加, 河流、湖泊和水库的富营养化问题日趋严重, 近年来蓝藻水华在我国河流、湖泊和水库频繁发生。如太湖、滇池等湖泊都有不同程度的蓝藻水华发生, 严重者每年可达 7—8 个月, 其优势种类是能产生微囊藻毒素的铜绿微囊藻。微囊藻毒素是细胞内毒素, 它在细胞内合成, 细胞破裂后释放出来, 并表现出毒性^[1]。目前, 有关微囊藻毒素的毒性研究大多数集中在动物、高等植物上^[2]。藻类是水生态系统中的初级生产者, 关于微囊藻毒素对藻类生长的影响方面的报道却甚少。最近, Sedmark 等^[3]的研究认为, 微囊藻毒素可调控藻类的增殖, 其作用大小与光照强度和藻的种类有关。根据毒素发生的湖泊藻类生物多样性下降, 人们推测, 微囊藻毒素可能对藻类有作用, 并参与调控水华的形成。但这方面的证据不够充分, 微囊藻毒素对藻类的作用机理也不清楚。本文研究了微囊藻毒素对细长聚球藻的生长及部分生理生化特性指标的影响, 初步探讨了微囊藻毒素对藻类的毒性机制。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用的藻株细长聚球藻 *Synechococcus elongatus* 来自中国科学院水生所藻种库, 并

通过稀释平板法进行纯化, 以 BG11 为基本培养基; 微囊藻毒素制备用的藻样取自滇池微囊藻水华。

1.2 毒素的制备和分析 微囊藻毒素的制备方法参照 Harada 的方法^[4], 稍加修改。将采自滇池的水华藻浆清洁数次后, 真空冻成干粉。然后加入 5% 的乙酸, 搅拌抽提 3h, 7000r/min 离心 40min, 取上清; 上清液过真空纤维素柱, 过滤后的上清液再过 Sep-pakC18 柱; 随后清洗 Sep-pakC18 柱, 先用 20% 甲醇洗一次, 再用 90% 的甲醇洗脱下毒素。将洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发干燥, 此干粉即为粗微囊藻毒素。粗毒素再过正相硅胶柱, 去除色素。去除色素的甲醇洗脱液最后由制备型 HPLC 进行纯化, 并由 HPLC 分析定量。检测波长 238nm, 柱流速 1mL/min, 流动相 pH3 的磷酸缓冲液和甲醇(二者混合比例 4:6)。标样购自 Sigma 公司。

1.3 毒素处理和生长测定 取对数生长期的细长聚球藻藻种接种于 100mL 三角瓶, 培养量 60mL, 加入 MG RR 浓度为 100μg/L, 并设对照, 每处理 3 个平行样品。培养条件为温度 25±1℃, 光照 3000k 左右, 24h 连续光照, 静止培养, 每天定时人工摇动 2 次。每隔 24h 取样, 测定 665nm 光密度值。

1.4 生理生化特性的测定 用植物效率分析仪测定叶绿素荧光, 在室温下测定。暗适应时间不少于

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2003-12-12

基金项目: 973 项目(2002CB412300); 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-12); 国家重大环境课题“滇池蓝藻水华污染控制技术研究”(K99-05-35-01); 中国科学院方向性创新课题(220316)资助

作者简介: 胡智泉(1971—), 男, 湖北省天门市人; 博士。主要从事藻类生态生理和生态毒理学研究

通讯作者: 刘永定, E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

15min, 激发光强为最大光强的50%, 记录时间为5s。用考马斯亮蓝G 250法测定可溶性蛋白质含量。叶绿素含量测定: 以95%乙醇提取, 置4℃冰箱24h, 用UV3000分光光度计, 在665, 649nm波长下测定光吸收 A_{665} 和 A_{649} , 以公式 $C = A_{665} * 13.7 - A_{649} * 5.76$ 计算叶绿素含量, 单位为 $\mu\text{g chl. mL}^{-1}$ 。藻蓝素含量: 参照de Marsac等人的方法^[5]测定。可溶性和不可溶性碳水化合物含量: 采用Kochert的方法^[6]测定。

所有测定至少重复3次, 取平均值。

2 结果

2.1 微囊藻毒素的制备与分析

采用修改的Harada等人的方法, 可获得一定纯度的粗毒素。经HPLC分析, 粗毒素主要为MC-RR, 含量为38.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。MC-RR纯品是粗毒素经制备型HPLC进一步纯化而获得。经HPLC进一步分析, 纯度可达95%以上, 可用于常规的毒理学实验。

2.2 微囊藻毒素对细长聚球藻生长的影响

由图1可知, 微囊藻毒素能显著抑制聚球藻的生长, 毒素处理株的生长速度低于对照组。毒素处理株从第2d起OD值即明显低于对照, 而且其OD值在第8d起下降更显著, 表明其提前进入了生长衰退期。

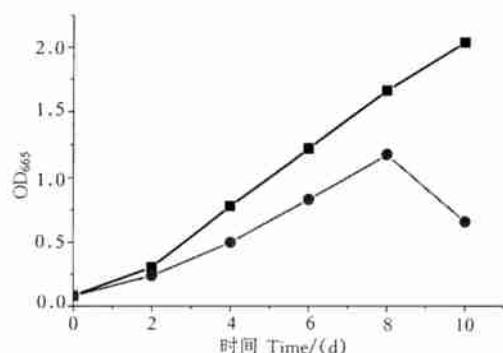


图1 细长聚球藻对微囊藻毒素的生长反应

Fig. 1 Growth response of *S. elongatus* in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ microcystin RR
■ Control. ● 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ MG RR

2.3 微囊藻毒素对细长聚球藻的生理生化特性的影响

2.3.1 微囊藻毒素对细长聚球藻叶绿素荧光的影响
由图2可看出, 对照组的Fv/Fm值在整个实验期间变化不大。而毒素处理组的Fv/Fm值在最初4d, 与对照并无明显差异。但从第4d起, 其Fv/Fm开始显著降低。Fv/Fm值反映着光系统II活性的大小, 并可直接衡量植物的光合作用能力。Fv/Fm的降低意味着, 毒素可能抑制藻株的光合性能。

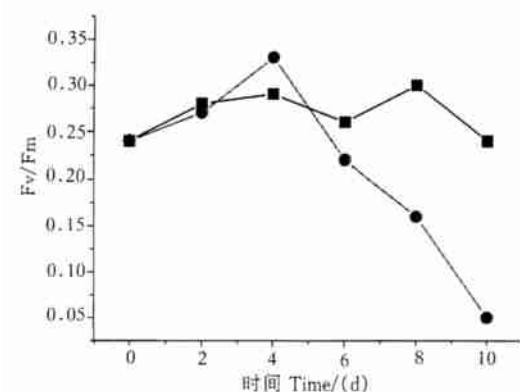


图2 微囊藻毒素处理下细长聚球藻叶绿素荧光的变化

Fig. 2 The changes of Fv/Fm of *S. elongatus* treated with MC-RR
■ Control. ● 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ MG RR

2.3.2 微囊藻毒素对细长聚球藻色素含量的影响

表1可看出, 毒素处理使细长聚球藻的叶绿素、藻蓝素等色素含量有明显的下降, 从而可以这样认为, 毒素对细长聚球藻生长的抑制是通过抑制色素的合成, 进而降低光合作用强度实现的。从表中还可得知, 毒素处理株的PC/Chl比值明显高于对照, 其比值为对照的1.75倍。

表1 微囊藻毒素处理下细长聚球藻色素含量变化

Tab. 1 The changes of pigment content of *S. elongatus* treated with MG RR

	Chl	PC	PC/Chl
对照株	9.364 ± 0.904	0.228 ± 0.061	0.0244 ± 0.005
处理株	2.427 ± 0.351	0.13 ± 0.033	0.0426 ± 0.0002

2.3.3 微囊藻毒素对细长聚球藻蛋白质含量的影响

在微囊藻毒素处理作用下, 细长聚球藻的可溶性蛋白含量比对照有所下降(表2)。说明毒素处理株其营养物质供应不充分, 从而不利于蛋白质的合成。微囊藻毒素的作用可能还在于抑制光合作用, 使藻类营养代谢受阻, 进而影响到一系列的生化反应, 最终抑制藻的生长。

表2 微囊藻毒素处理下细长聚球藻蛋白质含量变化

Tab. 2 The changes of protein content of *S. elongatus* treated with MG RR

	对照株	处理株
蛋白质含量	8.092 ± 0.32	7.148 ± 0.228

2.3.4 微囊藻毒素对细长聚球藻可溶性、不可溶性碳水化合物的影响

从表3可看出, 微囊藻毒素处理使聚球藻的可

溶与不可溶性碳水化合物均明显下降。碳水化合物是藻类重要的化学能量储藏形式, 碳水化合物含量的下降往往是营养或毒素胁迫的结果。毒素处理株的碳水化合物含量下降证明, 微囊藻毒素能影响藻类的能量代谢与利用。

表 3 微囊藻毒素处理下细长聚球藻碳水化合物含量变化

Tab. 3 The changes of carbohydrate content of *S. dongatus* treated with MG RR

	可溶性碳水化合物	不可溶性碳水化合物
对照株	1.55±0.02	4.87±0.03
处理株	1.13±0.01	3.11±0.02

3 讨论

微囊藻为什么要产生毒素, 也就是说微囊藻毒素的作用是什么? 有不少假说试图回答这些问题。其一是: 蓝藻合成毒素是防止被摄食^[7]。微囊藻毒素不仅对鸟类、家畜有害, 而且对浮游动物有害。一些现象表明, 毒素能直接导致取食产毒藻的生物死亡, 或能降低其数量和后代的个体大小。毒素的作用和植物的单宁、苯酚以及生物碱一样, 用来防御摄食者。浮游动物在有其他食物来源时通常不以产毒蓝藻为食。如果不得已以微囊藻为食, 浮游动物也得付出代价, 即后代数量减少。其二: 微囊藻毒素也许曾经有很关键的作用, 通过与蛋白磷酸酶作用调节真核细胞的增殖, 却不参与自身的细胞分裂与其他细胞功能^[1]。其三: 微囊藻毒素和藻类能量、氮、磷代谢和细胞液泡化有关^[8]。其四: 微囊藻毒素是产毒藻与其他藻类展开竞争的工具^[9]。但这只是人们的推测, 在这方面没有什么实验证据。最近, Kearns and Hunter^[10]的研究表明, 微囊藻毒素与莱因衣藻的沉降有关。Sedmark 等^[3]的研究则认为, 微囊藻毒素可调控藻类的增殖。这些研究从一定程度上, 揭示了微囊藻毒素的真正作用。但微囊藻毒素是否对所有浮游植物起作用, 尤其是对水华藻类起作用, 还需要大量的实验加以验证。本文的研究表明微囊藻毒素能显著抑制细长聚球藻的生长, 实验结果支持了第四个观点。作者在研究中还发现不同浓度的微囊藻毒素对其他蓝藻、绿藻的生长也有较明显的调节作用(结果待发表)。这些结果说明微囊藻毒素参与浮游植物的种群调节, 并与蓝藻水华的形成有关。由此也可推论, 微囊藻毒素的产生可能是微囊藻在水华暴发时迅速形成优势种的一个重要条件。

关于微囊藻毒素对藻类的作用机理如何, Sedmark 等的研究均未能涉及到。作者的研究则证实

微囊藻毒素可改变聚球藻的色素组成, 使处理株的叶绿素含量与藻蓝素含量均降低。色素含量的降低, 进而会影响光合作用的强度。值得注意的是毒素处理株比对照有较高的 PC/ Chl 比值, 这可能是藻类对微囊藻毒素的一种适应性反应。以前的研究表明 PS II 抑制剂 DCMU 同样也能提高 PC/ Chl 比值, 抗 DCMU 的突变株比野生株有更高的 PC/ Chl 比值^[11], 由此联想到微囊藻毒素可能类似于 DCMU 的作用, 主要作用于光合系统的 PS II 活性。实验结果中的毒素处理株的 Fv/ Fm 下降也证实了这一推想。由以上结果, 推测微囊藻毒素对藻类的可能作用机理在于微囊藻毒素能抑制藻类的光合系统 PS II 活性, 进而导致光合作用减弱, 生化反应减慢。毒素处理导致的可溶性蛋白与可溶性、不可溶碳水化合物含量的降低可能是光合作用被抑制的结果。由于蛋白、碳水化合物等生物大分子的合成减少, 最终影响到藻类的细胞分裂, 使生长受阻。

参考文献:

- [1] Camichael W W. The toxins of cyanobacteria[J]. *Scientific American*, 1994, **270**: 64—70
- [2] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants[J]. *FEBS Letters*, 1990, **264**: 187—192
- [3] Sedmark B, Kosi G. The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation[J]. *Journal of Plankton Research*, 1998, **20**: 691—708
- [4] Harada K-I, Suzuki M, Dahlem A M, et al. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria[J]. *Toxicon*, 1988, **26**: 433—439
- [5] de Marsac N T, Houmard J. Complementary Chromatic Adaptation: Physiological Conditions and Action Spectra[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, **167**: 318—328
- [6] Kochert G. Carbohydrate determination by phenolsulfuric acid methods. In Hellebust J A, et al. *Handbook of Physiological Methods: Physiological and Biochemical Methods*[M]. London: Cambridge University Press, 1978, 95—97
- [7] Codd G. A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance[J]. *Water Science and Technology*, 1995, **32**: 149—156
- [8] Li X Y, Song L R, Liu Y D. The production, detection and toxicology of microcystin[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(5): 517—523. [李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(5): 517—523]
- [9] Christoffersen K. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs[J]. *Phycologia*, 1996, **35**: 42—50
- [10] Kearns K D, Hunter M D. Toxin producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga[J]. *Microbial Ecology*, 2001, **42**: 80—86

[11] Koenig F. Algal adaptation to environmental stress [M]. Berlin:

Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 389—406

THE EFFECT OF MICROCYSTIN ON SOME PHYSIO BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *SYNECHOCOCCUS ELONGATUS*

HU Zhi-Quan and LIU Yong-Ding

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

Abstract: In China, lake eutrophication is serious. Many lakes are close to death because receiving too big amounts of polluted water. Recently, heavy blooms frequently occurred in Dianchi Lake and *Microcystis* is the dominant species in the bloom, and in many cases, when appeared in the lake, forms a continuous bloom all along the year, eliminating quite all the other species. *Microcystis* produces a family of related cyclic heptapeptides (microcystins, MC). These toxins are severely hepatotoxic, produced in *Microcystis* cells and released into water body when algal cells were broken. Most investigations about the toxicity of the microcystins are focused on animals and higher plants. To our knowledge, few studies have been made on the possible effects of microcystins on algae, which are equally important as primary producers in the whole ecosystem. In this study, We chose the unicellular *Synechococcus elongatus* (one of the most studied, and geographically most distributed, cyanobacteria in the picoplankton) as test material and investigated the toxicological effects of MC RR on it. For this purpose, some physio biochemical parameters (cell optical density, chlorophyll fluorescence(Fv/Fm), pigment content(chlorophyll, phycocyanin, soluable protein content, soluable and insoluable carbohydrate content) were tested in algal cells when exposed to 100 μ g/L microcystin RR. Microcystin RR was isolated and purified with the high performance liquid chromatography(HPLC) method. Thereafter, known amount of purified toxin in distilled water was added to test culture flasks in the way to obtain a final toxin concentration in cultures of 100 μ g•L⁻¹. The results showed that the growth of *Synechococcus elongatus* (shown as optical density) was significantly inhibited compared with the controls. After exposure to the toxin, the OD₆₆₅ were lower than those of the controls from day 2 to day 10. The OD₆₆₅ of the control kept in a increasing tendency but that of the toxin- treated decreased on day 8, which meant that the algae had came into death phase in advance. At the same time, a difference in chlorophyll fluorescence(the efficiency of excitation capture by open photo system II(PS II) reaction centers, expressed as Fv/ Fm) also appeared. Fv/Fm of the controls kept at a stable high level. In contrast, that of the toxin treated algae decreased quickly from day 4. The results also demonstrated that toxin treatment could cause the changes of some biochemical characters. For example, the content of soluable protein and soluable, insoluable carbohydrate all reduced after toxin exposure. Although the content of chlorophyll and phycocyanin of the toxin treated algae decreased, the ratio of PC/Chl was higher than that of the control. From the present study ,we could infer the possible toxicological mechanism of microcystin RR on the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. Microcystin could inhibit the photosynthetic ability and the inhibition may cause the lack of nutrition(protein, carbohydrate), the decrease of the biochemical reactions and the cell division rate. As a result , the growth of the algae was significantly influenced. These results also suggested that microcystins could cause lethal effect on competitive algae and microcystins maybe play a role in phytoplankton succession and population regulation.

Key words: *Microcystin*; *Synechococcus elongatus*; Growth; Photosynthetic pigment; Chlorophyll fluorescence; Protein; Carbohydrate