

doi: 10.7541/2013.53

微囊藻毒素缓解过氧化氢胁迫下铜绿微囊藻 损伤的初步研究

丁奕^{1,2} 甘南琴¹ 郑凌凌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. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 过氧化氢可抑制藻类生长, 同时会导致微囊藻毒素(Microcystins, MCs)的释放, 实验设置 4 个处理组探讨了外源微囊藻毒素 MC-LR 对 H₂O₂ 胁迫下铜绿微囊藻生理生化变化的影响。结果表明: 在 H₂O₂ 胁迫下, 微囊藻的生长和光合活性受到显著抑制, 藻细胞存活率降低, ROS 含量明显增加, SOD 活性上升。与单独 H₂O₂ 胁迫相比, 加入 MC-LR 能增加微囊藻细胞的存活率。250 μmol/L H₂O₂ 处理 24h 和 48h 后, 在培养基中加入 200 ng/mL MC-LR 可以缓解 H₂O₂ 对铜绿微囊藻光合系统 PSII 活性的抑制作用。当微囊藻暴露于 250 μmol/L H₂O₂ 环境中时, 添加了 MC-LR 处理组藻细胞中的 ROS 含量明显减少($P < 0.05$)。在相同浓度 H₂O₂ 且加入了外源 MC-LR 后藻细胞 SOD 活性下降($P < 0.05$)。因此, 微囊藻毒素 MC-LR 可缓解 250 μmol/L H₂O₂ 引起的氧化损伤并增强微囊藻自身的生存能力。研究结果有利于阐明 H₂O₂ 胁迫影响产毒蓝藻生长代谢的途径及 MCs 生物学意义。

关键词: 铜绿微囊藻; 微囊藻毒素; 过氧化氢; 活性氧; 超氧化物歧化酶

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0515-07

随着工农业生产和人们生活所产生的污水排放量的增加, 湖泊富营养化和蓝藻水华暴发已成为国内外普遍关注的环境问题^[1-4]。从 20 世纪 60 年代开始, 人们一直致力于研究控制蓝藻水华的技术, 一般来说物理法和化学法是除藻的最直接手段。物理法主要包括机械或人工打捞、黏土絮凝和遮光技术等方法, 不会产生二次污染, 但是由于昂贵的费用, 该方法只能局限于小水体或大水体的局部水域。化学法的时间效应比较快, 如硫酸铜、氯化物、高锰酸钾、重金属制剂等, 但由于其对除蓝藻外的其他生物的副作用造成环境污染或破坏生态平衡等缺点而受到限制^[5]。过氧化氢(H₂O₂)氧化性强, 安全易得, 且其分解产物是水和氧气, 不会产生新的污染物, 因此, 过氧化氢被称为绿色氧化剂, 常作为一种环保有效的杀藻剂^[6]。Qian, *et al.*报道 H₂O₂ 通过阻断

光合作用相关基因的转录或破坏光合色素来抑制藻类的生长^[7]。Barrington 和 Ghadouani 利用 H₂O₂ 方法诱导蓝藻和其他浮游植物死亡, 发现 H₂O₂ 去除蓝藻效果比去除绿藻和硅藻更好^[8]。

蓝藻水华污染所带来的主要危害之一是藻毒素。在已发现的各种藻毒素中, 微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是一类出现频率最高、产生量最大和造成危害最严重的藻毒素^[9]。目前所检测到的微囊藻毒素异构体已超过 80 种^[10], MC-LR 是毒性最大并且存在最广泛的一类。长期以来, 微囊藻毒素产生的生物学意义和功能一直受到科学工作者的关注, 但进展甚微。Babica, *et al.*^[11]提出化感作用假说, 认为 MCs 对浮游藻类的光合作用、生长、诱导氧化应激等有抑制作用。Schatz, *et al.*^[12]的研究发现, 无论是程序性死亡还是受到各种胁迫所引起的微囊藻细胞裂解,

收稿日期: 2013-01-08; 修订日期: 2013-03-17

基金项目: 国家自然科学基金-云南联合基金(U0833604); 国家自然科学基金(31070355); 重点实验室优秀基金(31123001)资助

作者简介: 丁奕(1986—), 女, 湖北咸宁人; 博士; 主要从事藻类生理生态学研究。E-mail: lizzy-ding@hotmail.com

通信作者: 宋立荣, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

其后释放的 MCs 能诱导生存下来的微囊藻 McyB 的大量积累, 从而促进其微囊藻 MCs 的产生, 提高对环境的适应性。Sedmak, *et al.* [13] 的研究发现, 500 $\mu\text{g/L}$ 的 MCs 能使微囊藻的形态和生理特征发生改变, 促进单细胞微囊藻积聚成群体。甘南琴等 [14] 研究表明微囊藻毒素 MCs 能促进微囊藻群体尺寸增大, MCs 浓度越高, 群体尺寸越大。Utkilen 和 Gjørlme [15] 的研究表明 MCs 可作为胞内金属离子螯合剂而减轻金属离子对微囊藻的毒性。之前我们的研究结果表明, H_2O_2 可依剂量诱导微囊藻细胞产生类细胞凋亡 [6], 同时 H_2O_2 胁迫会导致微囊藻毒素的释放, 且胞外毒素的释放可能刺激胞内毒素的产生。我们推测 MCs 可能也参与了微囊藻响应 H_2O_2 胁迫的生理生化过程。它对 H_2O_2 胁迫下藻细胞的某些生理改变能否施加影响? 有关这方面的信息还未见报道, 本文对此作了初步的探讨。本实验通过使用外源 MC-LR, 研究 MC-LR 对 H_2O_2 胁迫下铜绿微囊藻生理生化变化的影响有利于阐明 H_2O_2 胁迫影响产毒蓝藻的生长代谢的信号途径和 MCs 生物学意义。

1 材料与方法

1.1 藻种和藻种培养

实验所用产毒铜绿微囊藻 FACHB-905 取自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库 (FACHB-collection)。本实验以 BG11 培养基为培养介质, 正常培养条件下, 温度 25°C , 光强为 $25 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{S})$, 光暗周期为 12/12。初始浓度 $A_{680}=0.15$ 接入 250 mL 三角瓶 7—12d 的培养物视为处于健康生长状态。

1.2 H_2O_2 和 MC-LR 处理

离心收集健康生长的藻细胞, 无菌水清洗 3 遍后, 置于 BG11 培养基中, 计算接种所需用量, 等待接入 50 mL 三角瓶中。正常生长条件(培养基未添加其他物质)作为对照组(Control)。实验设置 4 个处理组: (1) 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理, (2) 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 200 ng/mL MC-LR 处理, (3) 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理, (4) 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 200 ng/mL MC-LR 处理。接种终浓度 A_{680} 控制在 0.4 左右, 终体系为 30 mL, 每组设 3 个平行。本研究所用的微囊藻毒素 MC-LR 购自于台湾藻类研究公司 (Taiwan Algal Science Inc, $\geq 95\%$ HPLC)。

1.3 样品微囊藻毒素检测

为了检测本实验 H_2O_2 浓度对 MC-LR 是否有降解作用, 采用 HPLC 方法分别在 24h 和 48h 检测毒素含量, 参考 Kaya 和 Sano [16]。所用色谱柱为岛津 ODS 柱 (4.6 mm \times 150 mm), 检测波长 238 nm, 流动相为 60% 甲醇, 40% 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L KH_2PO_4 , 20% H_3PO_4 调节 pH=3.0), 流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL 。

1.4 MTT 染色

藻细胞活性检测采用 MTT 染色法, 参考 Li, *et al.* [17] 的方法。其染色原理是水溶性无色或浅色的四唑类化合物, 在活细胞体内被还原成水不溶性蓝紫色的甲臞化合物 (Formazan), 而死细胞体内不能生成甲臞。MTT 溶于 0.05 mol/L PBS (pH 6.8) 中, 浓度为 0.5 g/L, 同时加入 0.1 mol/L 琥珀酸钠, 保存于 4°C 。取 250 μL 样品, 1/2 BG11 清洗后悬浮于 250 μL 1/2 BG11 中开始染色。将 250 μL 样品与 100 μL MTT 储存液混合, 染色在 $(35\pm 1)^\circ\text{C}$ 的光照培养箱中进行, 染色 1h。染色后, 8000 r/min 3min 离心去掉染色液, 将藻细胞悬浮于 250 μL 蒸馏水中, 取 8 μL 于血球计数板中在光学显微镜下计数, 计算染色后阳性细胞占总细胞的比例。

1.5 光合系统活性测定

参考吴忠兴 [18], 用 Phyto-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany) 测定其光系统活性 F_v/F_m 和最大光电子传递速率 ETR_{max} 。取活体藻样 2 mL, 暗适应 15min 以保证电子传递链氧化。

1.6 类胡萝卜素 (Carotenoids) 和叶绿素含量 (Chl. a) 的测定

测得方法参考吴忠兴 [18]。取 3 mL 藻样, 7000 r/min 转速离心 3min, 弃上清液, 加入 3 mL 80% 的丙酮, 低温暗处静置 24h 提取脂溶性色素。24h 后 10000 r/min 离心 5min, 取上清液分别测定 663 nm 和 450 nm 的光吸收值。根据下式分别计算色素的含量:

$$\text{Chl. } a \text{ (mg/L)} = 12.72 \times A_{663} - 2.7 \times A_{645} = 12.19 \times A_{663}$$

$$\text{Carotenoids (mg/L)} = 4.1A_{450} - 0.0435 \text{ Chl. } a。$$

1.7 活性氧 (ROS) 含量测定

铜绿微囊藻细胞内 ROS 用二氯二氢荧光素双醋酸盐 (DCFH-DA) 检测。DCFH-DA 能进入细胞内, 被酯酶分解为 DCFH, DCFH 与 H_2O_2 等小分子过氧化物结合而被氧化成具有荧光性的 DCF。其激发光波长为 485 nm, 发射光为 525 nm。分别在接种后

第 24h 和第 48h 取样, 离心, 重悬于 100 mmol/L PBS (pH 7.2) 缓冲液中, 再用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 再重悬于 PBS 缓冲液, 向其中加入 DCFH-DA 使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 1h, 以 PBS 洗涤 2 次, 再重悬于的 PBS 缓冲液用酶标仪 (Molecular Device, M2, CA, USA) 检测荧光强度。

1.8 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD) 活性测定

取适量藻样 7000 r/min, 离心 3min 后, 将藻泥悬浮于 3 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.8)中, 超声波破碎共 3min, 每超声 20s, 停 10s, 8000 r/min 冷冻离心 15min, 取上清液用于蛋白含量与酶活测定。超氧化物歧化酶(SOD)的测定采用改良的 NBT 光化还原法^[19]。以抑制 NBT 光化还原 50% 作为一个酶活力单位计算比活。蛋白质浓度的测定采用考马斯亮蓝-G250 染色法^[20]。

1.9 数据分析

本实验各组均设三个平行, 实验数据分析和图的绘制采用统计软件 Origin 8.0(Origin Lab, USA)。

2 结果

2.1 H_2O_2 对 MC-LR 的降解

当微囊藻毒素 MC-LR 暴露于 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 时, H_2O_2 很难氧化 MC-LR, 在 24h 和 48h 处理后, MC-LR 浓度和初始浓度值相差不大(图 1)。当微囊藻毒素 MC-LR 暴露于 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 时, 处理 48h 后才有轻微的降解, MC-LR 浓度为初始浓度的 86.4%。

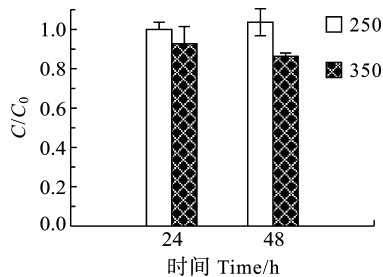


图 1 250 和 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对 200 ng/mL MC-LR 降解的影响

Fig. 1 Effect of 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments on degradation of MC-LR

Relative concentration C/C_0 of MC-LR, $C_0=200$ ng/mL MC-LR

2.2 MC-LR 对 H_2O_2 胁迫下微囊藻生长的影响

在 H_2O_2 胁迫下, 加入或未加入 MC-LR 的微囊藻的生长都受到显著抑制(图 2)。在 250 和 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 9h 后, 加入 MC-LR 的微囊藻存活率明显高于未加入 MC-LR 的微囊藻(图 3)。随着时间的变化, 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理微囊藻在加入 MC-LR 的情况下存活率一直高于未加入 MC-LR 的微囊藻。但

是 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24h 和 48h 后加入了 MC-LR 和未加入 MC-LR 的微囊藻存活率差异不大。

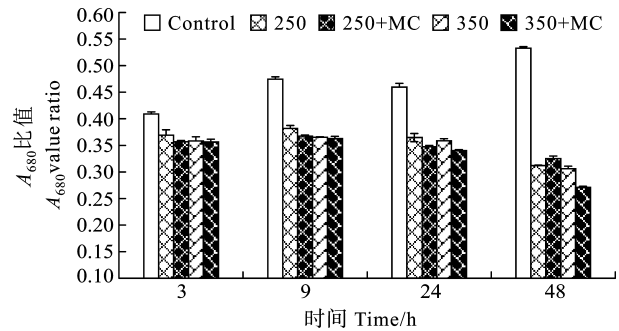


图 2 培养基中加入和未加入外源 MC-LR 分别对 H_2O_2 胁迫下微囊藻生长的影响

Fig. 2 Effect of MC-LR on the growth of *M. aeruginosa* cells under 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments. Control represents untreated cells

2.3 MC-LR 对 H_2O_2 胁迫下微囊藻光合系统活性的影响

在 H_2O_2 胁迫下, MC-LR 对微囊藻 F_v/F_m 和 ETR_{max} 的影响作用相同, 且受微囊藻细胞所处的 H_2O_2 浓度影响(图 4)。250 和 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 都会使微囊藻的 PS 活性降低, 其抑制作用在 3h 后就可以检测到, 而此时 MC-LR 的作用尚不明显。24h 和 48h 后, 在培养基中加入的 MC-LR 可以缓解 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对微囊藻 F_v/F_m 和 ETR_{max} 的抑制作用。但是随着 H_2O_2 浓度的增加, H_2O_2 对微囊藻的 PS 活性的抑制作用也越强, F_v/F_m 和 ETR_{max} 已降到 PAM 检测线以下, 加入的 MC-LR 不能够减轻 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对微囊藻 F_v/F_m 和 ETR_{max} 抑制作用。

2.4 MC-LR 在 H_2O_2 胁迫下对微囊藻类胡萝卜素/叶绿素含量的影响

从图 5 可以看出, 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24h 后和同浓度并加入 MC-LR 处理组的类胡萝卜素/叶绿素含量的比值没有显著变化, 分别为 0.389 和 0.363。而 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 48h 后, 加入 MC-LR 比未加入 MC-LR 的比值高($P<0.05$), 说明 MC-LR 使类胡萝卜素所占比例得到提高。350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 48h 后类胡萝卜素和叶绿素含量比值明显下降, 加入的 MC-LR 不能够减轻 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对光合色素的破坏作用。

2.5 MC-LR 在 H_2O_2 胁迫下对微囊藻细胞内 ROS 含量和 SOD 活性的影响

在 250 和 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后, 微囊藻细胞内 ROS 含量急剧上升, 在处理后的第 48h, 微囊藻细胞内 ROS 含量分别为对照的 3.3 和 8.7 倍(图 6)。

但是 48h 后, 当微囊藻暴露于 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 环境中时, 添加了 MC-LR 使细胞中的 ROS 含量明显减少 ($P < 0.05$), 但仍高于正常条件下微囊藻的 ROS 含量。从图 7 可知, 与对照相比, 24h 后 H_2O_2 处理组和 250 $\mu\text{mol/L}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{MC-LR}$ 处理的 SOD 活性都有上升, 表明微囊藻对处理有一定的应激反应。同时, 添加了 MC-LR 的藻细胞 SOD 活性低于没有加入 MC-LR 的藻细胞活性。随着时间的推移, 在相同浓度 H_2O_2 且加入了外源 MC-LR 后的 48h, SOD 活性急剧下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论

微囊藻是世界各地最常发生水华的蓝藻, 且对于饮用水的危害也是各国瞩目的重点。在高光强下水体表面会形成自然光化学产物 H_2O_2 , 且在淡水中其浓度能达到 10^{-5} mol/L [21]。一方面, 由于经常暴露于变化的环境中, 蓝藻自身也经常产生 H_2O_2 以应对各种胁迫包括光强和温度的剧烈波动等等。另一方面, 由于过氧化氢可以迅速分解成氧和水, 经常作为一种杀藻剂[6]。

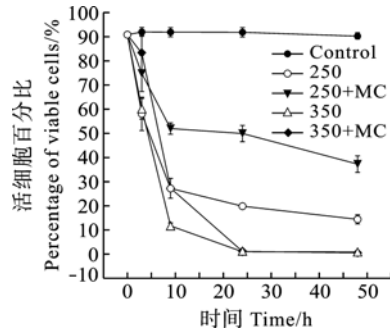


图3 培养基中加入和未加入外源 MC-LR 分别对 H_2O_2 胁迫下微囊藻细胞存活率的影响

Fig. 3 Effect of MC-LR on cell viability of *M. aeruginosa* under 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments Control represents untreated cells

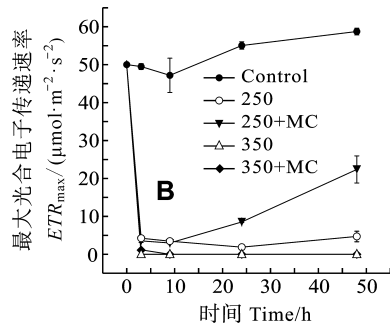
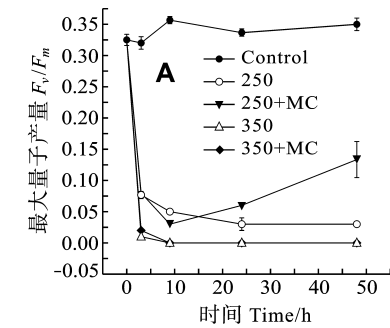


图4 培养基中加入和未加入外源 MC-LR 分别对 H_2O_2 胁迫下微囊藻光合系统活性 (F_v/F_m , ETR_{max}) 的影响

Fig. 4 Effect of MC-LR on PS activity of *M. aeruginosa* under 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments

大部分的蓝藻毒素都存在于细胞中, 只有当细胞死亡裂解时, 毒素才会被释放出来到水体中[22]。微囊藻毒素的大量产生可能有助于提高微囊藻群体的适应性以及与其他浮游植物的竞争力[11, 23]。我们的实验结果表明, 与单独的 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理相比,

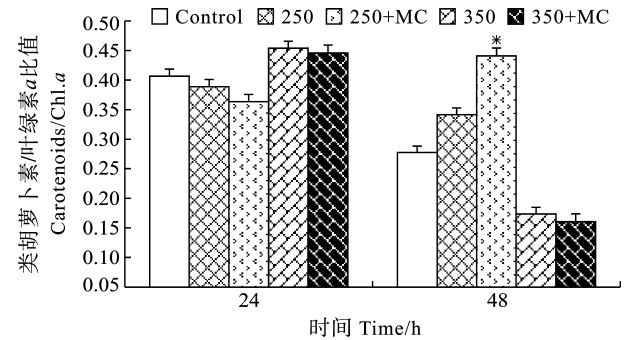


图5 培养基中加入和未加入外源 MC-LR 分别对 H_2O_2 胁迫下微囊藻细胞内类胡萝卜素/叶绿素比值的影响 (“*” 代表 $P < 0.05$)

Fig. 5 Effect of MC-LR on carotenoid and chl a contents of *M. aeruginosa* under 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments (“*” is $P < 0.05$)

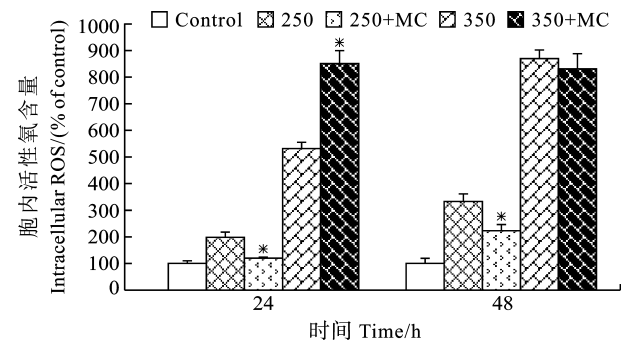


图6 培养基中加入和未加入外源 MC-LR 分别对 H_2O_2 胁迫下微囊藻细胞中 ROS 含量的影响 (“*” 代表 $P < 0.05$)

Fig. 6 Effect of MC-LR on intracellular ROS of *M. aeruginosa* under 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments Measured ROS is expressed as Fluorescence Intensity. The value represent mean \pm SE of three replicate (“*” is $P < 0.05$)

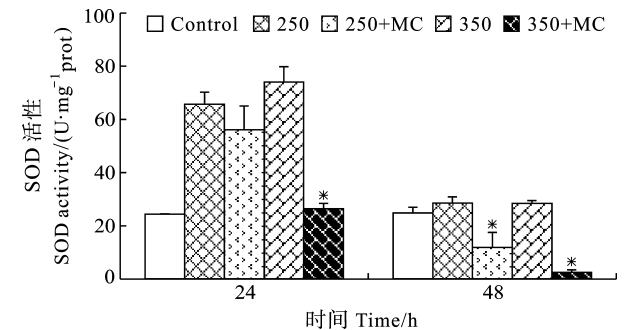


图7 培养基中加入和未加入外源 MC-LR 分别对 H_2O_2 胁迫下微囊藻细胞 SOD 活性的影响 (“*” 代表 $P < 0.05$)

Fig. 7 Effect of MC-LR on SOD activities of *M. aeruginosa* under 250 and 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treatments (“*” is $P < 0.05$)

外源 MC-LR 的添加增加了 H_2O_2 胁迫下微囊藻细胞的存活率, 缓解由 H_2O_2 毒害造成光系统 PSII 活性的减少。但是 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24h 和 48h 后加入了 MC-LR 和未加入 MC-LR 的微囊藻细胞存活率差异不大, 说明高浓度 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 胁迫对藻细胞的伤害程度超过了其抵御能力, 从而不能减轻 H_2O_2 的负面影响。究其根本原因, 可能跟 MC 是否参与程序性细胞死亡(PCD)信号传递途径有关。微囊藻虽然是单细胞生物, 但在自然条件下主要以群体形式存在。之前我们研究发现 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 可诱导微囊藻细胞产生类细胞凋亡(AL-PCD), 且导致微囊藻毒素的释放^[3], 而高浓度的 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 可造成微囊藻细胞坏死。PCD 从种群中移除受损的或者破坏了的细胞, 为同种群其他细胞提供生存机会^[24]。有研究表明 UV-C 处理过的 *Chlamydomonas reinhardtii* 培养物中获得培养基可以改善 *C. reinhardtii* 再次受到 UV-C 胁迫时的生存能力, 使 UV-C 所致的死亡减少 20%^[25]。Schatz, *et al.*^[9] 的研究发现, 微囊藻细胞裂解释放的 MCs 能被存活下来的微囊藻细胞感知并导致胞内 McyB 大量积累, 从而促进其微囊藻 MCs 的产生, 提高对环境的适应性。Dittmann, *et al.*^[26] 发现两种微囊藻毒素相关蛋白质 MrpA 和 MrpB 与豌豆根瘤菌 *Rhizobium leguminosarum* 中的群体感应蛋白 RhiA 和 RhiB 显示出相似性, 认为毒素的存在是蓝光影响微囊藻 MrpAB 表达的先决条件。Zilliges, *et al.*^[27] 发现微囊藻毒素与胞内一些蛋白绑定, 并且这种绑定在高光强和氧化应激条件下得到显著增强。据此推测外源 MC-LR 可能参与了微囊藻响应 H_2O_2 胁迫的 AL-PCD 过程, 从而提高微囊藻的生存力。当然要证明这一观点还需要更多的数据支持, 微囊藻毒素的信号传递途径还需要深入研究, 其中胞内与胞外毒素之间的协同作用值得重视。

ROS 是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程所产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称, 包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基(OH^\cdot)、过氧化氢(H_2O_2) 等^[28]。在正常情况下, 植物细胞内 ROS 的产生和清除是平衡的。但是, 当植物体遭受外来胁迫时, ROS 的产生和清除则失去平衡, 会产生过量的 ROS, 导致氧胁迫, 并进而使得细胞膜结构损伤和生理代谢紊乱^[29]。近期的研究发现微囊藻毒素的释放可能与过氧化压力或细胞的程序性死亡有关, 外源 H_2O_2 使得微囊藻细胞内 ROS 增加且伴随着微囊

藻毒素的释放^[30, 31]。在本研究中, 250 和 350 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后, 微囊藻细胞内 ROS 含量急剧上升; 48h 后, 当微囊藻暴露于 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 环境中时, 添加了 MC-LR 处理组细胞中的 ROS 含量明显减少 ($P < 0.05$)。这表明 H_2O_2 确实对微囊藻细胞产生了氧化胁迫, 而适当外源 MC-LR 可减少 ROS 的积累, 缓解 H_2O_2 诱导的氧化胁迫。SOD 是植物体主要的内源酶系自由基清除剂, 可以清除细胞内过多的 ROS, 从而保护膜和大分子物质^[28]。本研究表明, H_2O_2 处理组和 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 +MC-LR 处理 24h 后的 SOD 活性都有上升, 但是添加了 MC-LR 的藻细胞 SOD 活性低于没有加入 MC-LR 的藻细胞活性。推测在 H_2O_2 胁迫下, ROS 积累, 细胞膜透性增强, 细胞膜损伤加剧; 外源 MC-LR 可能通过调控胞内 ROS 的积累进而影响 SOD 等抗氧化系统酶活性, 从而减轻藻细胞的氧化压力并减弱细胞的氧化应激反应。

综上所述, 目前获得的结果表明 MC-LR 对 H_2O_2 胁迫下微囊藻的光合活性、色素含量、酶活性等代谢过程有一定的影响, 并且其作用效果在不同的 H_2O_2 浓度和不同时间下是不同的。我们发现微囊藻毒素 MC-LR 可缓解 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 引起的藻细胞损伤并增强微囊藻自身的生存能力。

参考文献:

- [1] Hu Z Q, Li D H, Liu Y D, *et al.* Ecotoxicology study of microcystin on aquatic organism. [J]. *Progress in Natural Science*, 2006, **16**(1): 14—20 [胡智泉, 李敦海, 刘永定, 等. 微囊藻毒素对水生生物的生态毒理学研究进展. 自然科学进展, 2006, **16**(1): 14—20]
- [2] Kang L J. Research on chlorophyll *a* criteria establishment in Dianshan Lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(3): 509—514 [康丽娟. 淀山湖富营养化控制叶绿素 *a* 基准研究初探. 水生生物学报, 2012, **36**(3): 509—514]
- [3] Zhou Q, Han S Q, Yan S H, *et al.* The mutual effect between phytoplankton and water hyacinth planted on a large scale in the eutrophic lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(4): 783—791 [周庆, 韩士群, 严少华, 等. 富营养化湖泊规模化种养的水葫芦与浮游藻类的相互影响. 水生生物学报, 2012, **36**(4): 783—791]
- [4] Xiang W Y, Wang X F. Remediation of different aquatic animals and plants on eutrophic water body [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(4): 792—797 [向文英, 王晓菲. 不同水生动植物组合对富营养化水体的净化效应. 水生生物学报, 2012, **36**(4): 792—797]
- [5] Guo L G. Algae removal and control technologies [J]. *China Water Resources*, 2006, **17**(1): 34—36 [过龙根. 除藻与控制

- 藻技术. 中国水资源公报, 2006, **17**(1): 34—36]
- [6] Ding Y, Gan N Q, Li J, *et al.* Hydrogen peroxide induces apoptotic-like cell death in *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) in a dose-dependent manner [J]. *Phycologia*, 2012, **51**(5): 567—575
- [7] Qian H F, Yu S Q, Sun Z Q, *et al.* Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, **99**(3): 405—412
- [8] Barrington D, Ghadouani A. Application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria and other phytoplankton from wastewater [J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, **42**(23): 8916—8921
- [9] Li X Y, Song L R, Liu Y D. The production, detection and toxicology of microcystins [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(5): 517—522 [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. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 517—522]
- [10] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203**(3): 264—272
- [11] Babica P, Blaha L, Marsalek B. Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms [J]. *Journal of Phycology*, 2006, **42**(1): 9—20
- [12] Schatz D, Keren Y, Vardi A, *et al.* Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(4): 965—970
- [13] Sedmak B, Eleršek T. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons [J]. *Microbial Ecology*, 2006, **51**(4): 508—515
- [14] Gan N Q, Xiao Y, Zhu L, *et al.* The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, **14**(3): 730—742
- [15] Utkilen H, Gjolme N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis Aeruginosa* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(2): 797—800
- [16] Kaya K, Sano T. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d₃)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d₃) as the internal Standard [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **386**(1): 107—112
- [17] Li J, Song L R. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *M. aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) [J]. *Phycologia*, 2007, **46**(5): 593—599
- [18] Wu Z X. Studies on the Genetic Diversity and Morphological and Physiological Adaptation of *Microcystis* [D]. Thesis for Doctor of Science. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2006 [吴忠兴. 我国微囊藻多样性分析及其种群优势的生理学机制研究. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2006]
- [19] Giannopotitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase in higher Plants [J]. *Plant Physiology*, 1997, **59**(2): 309—314
- [20] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1): 248—254
- [21] Cooper W J, Zika R G. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight [J]. *Science*, 1983, **220**(4598): 711—712
- [22] White S H, Duivenvoorden L J, Fabbro L D. A decision-making framework for ecological impacts associated with the accumulation of cyanotoxins (cylindrospermopsin and microcystin) [J]. *Lake and Reservoir Management*, 2005, **10**(1): 25—37
- [23] Pflugmacher S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems [J]. *Environmental Toxicology*, 2002, **17**(4): 407—413
- [24] Li J, Ding Y, Xiang R, *et al.* Programmed cell death in phytoplankton [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, **19**(11): 2743—2748 [李杰, 丁奕, 项荣, 等. 浮游植物程序性细胞死亡研究进展. 生态环境学报, 2010, **19**(11): 2743—2748]
- [25] Moharikar S, D'Souza J S, Kulkarni A B, *et al.* Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses [J]. *Journal of Phycology*, 2006, **42**(2): 423—433
- [26] Dittmann E, Erhard M, Kaebnick M, *et al.* Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 [J]. *Microbiology*, 2001, **147**(11): 3113—3119
- [27] Zilliges Y, Kehr J C, Meissner S, *et al.* The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions [J]. *PLOS ONE*, 2011, **6**(3): doi:10.1371/journal.pone.0017615
- [28] Latifi A, Ruiz M, Zhang C C. Oxidative stress in cyanobacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, **33**(2): 258—278
- [29] Luo Y L, Song S Q. Plant mitochondria, reactive oxygen species and signaling transduction [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, **24**(4): 737—747 [罗银玲, 宋松泉. 植物线粒体、活性氧与信号转导. 西北植物学报, 2004, **24**(4): 737—747]
- [30] Ross C, Santiago-Vazquez L, Paul V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **78**(1): 66—73
- [31] Bouchard J N, Purdie D A. Effect of elevated temperature, darkness and hydrogen peroxide treatment on oxidative stress and cell death in the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Phycology*, 2011, **47**(6): 1316—1325

MICROCYSTIN-LR INCREASES THE FITNESS OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* UNDER H₂O₂ STRESS

DING Yi^{1,2}, GAN Nan-Qin¹, ZHENG Ling-Ling¹ and SONG Li-Rong¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Hydrogen peroxide acts as an algicide and can also rapidly decompose into oxygen and water. Because many bloom-forming cyanobacteria species produce and release microcystin, we used MC-LR to test whether MC-LR was involved in H₂O₂ induced growth and metabolic changes in *Microcystis aeruginosa*. The results showed that *M. aeruginosa* growth was significantly inhibited after exposure to 250 μmol/L and 350 μmol/L H₂O₂. The addition of 200 ng/mL MC-LR could increase the cell viability of *M. aeruginosa* under 250 μmol/L H₂O₂ stress. The inhibition of PSII activity after exposure to 250 μmol/L H₂O₂ was also reduced in the presence of MC-LR. Moreover, the addition of MC-LR decreased ROS accumulation ($P < 0.05$) in cells treated with 250 μmol/L H₂O₂ and reduced SOD activity ($P < 0.05$). Hence, MC-LR could increase the fitness of *M. aeruginosa* under 250 μmol/L H₂O₂ stress. Our findings contributed to the understanding of growth and metabolism of toxic *Microcystis* under H₂O₂ stress.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; Microcystin-LR; Hydrogen peroxide; ROS; SOD