

微囊藻毒素-RR 对大肠杆菌和枯草杆菌的渗透效应

杨翠云^{①②}, 夏传海^①, 周世伟^①, 刘永定^{③*}

① 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003;

② 山东省黄河三角洲生态环境重点实验室, 滨州 256600;

③ 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

2009-09-15 收稿, 2009-12-03 接受

中国科学院知识创新工程项目(批准号: KZCX2-YW-Q07-04)、国家海洋局海洋溢油鉴别和损害评估技术重点实验室开放基金(批准号: 200713)和山东省黄河三角洲生态环境重点实验室开放基金(批准号: 2007KFJJ04)

摘要 微囊藻毒素是一类由蓝藻产生的具有肝毒性的环状肽类化合物, 是富营养化淡水水体中最常见的一种藻类毒素, 也是蓝藻水华污染过程中产量最大、危害最严重的藻毒素种类. 本文研究了微囊藻毒素 MC-RR 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)细胞膜的渗透效应, 采用 MC-RR 和溶菌酶协同处理下由于细胞溶解而引起吸光值 A_{675} 的降低来表示. 结果表明, A_{675} 值的降低随 MC-RR 处理浓度和时间的变化而变化, 浓度越高, A_{675} 值降低越明显, 由此表明, MC-RR 的存在增加了细菌细胞膜对溶菌酶的渗透性, 促进了溶菌酶的溶菌效应. 更进一步的实验证明, MC-RR 能促进细菌细胞内可溶性蛋白和可溶性糖的外渗量, 并且具有一定的剂量效应. 实验结果还进一步暗示, MC-RR 和水环境中的其他化合物的复合效应或许能够调节水体中的细菌群落, MC-RR 在水体生态系统中可能具有非常重要的生态学意义.

关键词

微囊藻毒素-RR
大肠杆菌
枯草芽孢杆菌
渗透性
蛋白质
可溶性糖

湖泊富营养化和蓝藻水华污染已成为世界上普遍关注的环境问题, 蓝藻水华带来的主要危害之一就是蓝藻毒素的产生, 目前发现的蓝藻毒素主要包括肝毒素、神经毒素和皮肤类毒素^[1~3]. 在所有的肝毒素中, 危害最大、影响最严重的就是微囊藻毒素(microcystin, MC). MC 的结构是一种单环七肽, 一般结构为: 环(D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸). 其中 N-甲基脱氢丙氨酸(Mdha)为一种特殊氨基酸, 含有 α, β 不饱和双键; Adda 结构是另一种特殊氨基酸, 结构为 3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6 二烯酸, Adda 是表达其生物活性的必需基团, 其氨基酸的共轭立体结构会影响其毒性, 结构改变则毒性改变. X 和 Y 为两种可变的 L 氨基酸, 由于 X 和 Y 的不同而产生多种异构体 MC, 迄今为止已有 75 种以上 MC 异构体被确认. 存在最普遍、含量较高、毒性较大的

是 MC-LR, RR 和 YR, 其中 L, R 和 Y 分别为亮氨酸、精氨酸和酪氨酸^[4~7]. 目前有关微囊藻毒素对生物的生理生态学效应的研究主要集中在动物、植物上. 微囊藻毒素能够导致无脊椎动物、鱼类、鸟类、家畜及其他野生动物的死亡, 并且水生生物包括鱼类、贝类、浮游动物等对微囊藻毒素的生物富集会人类和动物造成危害^[8~12]. 同时研究表明, 微囊藻毒素是潜在的诱癌剂, 可以诱导鱼的肝细胞以及人类、鸡、鲤鱼的淋巴细胞凋亡^[13~15]. 同样, 微囊藻毒素能够抑制高等植物的生长^[16,17], 诱导植物的氧化胁迫, 并且氧化胁迫可能是微囊藻毒素对植物毒性的主要作用方式^[18~20]. 而最新的研究关注了微囊藻毒素对低等植物-藻类的影响, 短期暴露于高浓度的 MC-LR 下就能够抑制念珠藻(*Nostoc muscorum*)和鱼腥藻(*Anabaena* BT1)的光合作用^[21], MC-RR 还能够抑制聚球藻(*Synechococcus elongates*)的生长并引起其氧

英文版见: Yang C Y, Xia C H, Zhou S W, et al. The permeability effect of microcystin-RR on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Chinese Sci Bull, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-0169-4

化胁迫^[22]。

微生物作为分解者和消费者,在生态系统中具有很重要的作用,但关于微囊藻毒素对微生物效应的研究却很少。Foxall 和 Sasner^[23]研究认为,微囊藻毒素对一些细菌具有显著的杀灭作用,能够抑制枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和某些假单胞菌的生长。Valdor 和 Aboal^[24]报道,纯微囊藻毒素对微藻和细菌的生长具有一定的抑制效应,即使低浓度的微囊藻毒素对细菌生长无明显作用,但也能影响其超微结构的变化;然而 Dixon 等人^[25]的研究表明,微囊藻毒素对大肠杆菌没有抗菌活性但能增加大肠杆菌细胞膜的渗透性,推测微囊藻毒素和水中与其他化学物质的协同效应可能调节水生生态系统中细菌群落的数量。

本文研究了微囊藻毒素对革兰氏阴性代表菌株大肠杆菌和革兰氏阳性代表菌株枯草杆菌细胞膜的渗透效应,考虑到 MC-RR 是我国云南滇池蓝藻水华过程中所产生的主要优势毒素,所以本文采用微囊藻毒素 MC-RR 为材料。研究结果表明了 MC-RR 能促进溶菌酶的溶菌效应,并能增加细菌细胞内可溶性蛋白和可溶性糖含量的外渗。

1 材料和方法

(i) 毒素与试剂。微囊藻毒素提取自滇池蓝藻水华的干藻粉,采用改进的 Harada 等人^[26]的方法获得:取一定量的干藻粉,加入 5%冰醋酸室温下搅拌抽提 3 h,所得提取液 6000×g 离心 20 min,取上清,重复 2 次,并合并 2 次所得的提取液,用 0.45 μm 混合纤维滤膜抽滤,滤液过 C18 柱,将甲醇洗脱液在旋转蒸发仪上蒸发干燥,所得干粉即为微囊藻毒素粗提物。然后利用上海中药创新研究所 Agilent 1100 高效液相色谱仪纯化制备分析,主要成分为 MC-RR,含量在 95% 以上,可用于一般的毒理学实验,标样购自 Sigma 公司,其他试剂均为分析纯。

(ii) 菌株和毒素处理。实验用革兰氏阴性代表菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* HB101 和革兰氏阳性代表菌株枯草杆菌 *Bacillus subtilis* BG2036 来自武汉大学微生物实验室,并用营养肉汤培养基 30℃ 下黑暗培养。

将大肠杆菌和枯草杆菌培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 0.8$),培养液 7000×g 离心 5 min,去上清,用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次,将细胞

重新悬浮于相同缓冲液中,调整细胞数约为 1×10^{10} 个/mL,加入抽滤灭菌的 MC-RR,使其终浓度分别为 0, 0.1, 1, 5, 10 μg/mL,并分别加入溶菌酶使其终浓度为 0.04 g/mL,同时设空白对照,每个处理设 3 个平行,于 0, 10, 20, 30, 40 min 取样测定光吸收值 A_{675} ^[23,25]。

同上,将大肠杆菌和枯草杆菌培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 0.8$),培养液 7000×g 离心 5 min,去上清,用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次,将细胞重新悬浮于相同缓冲液中,加入抽滤灭菌的 MC-RR,使其终浓度分别为 0, 0.1, 1, 5, 10 μg/mL,培养 1 h 后,取样 7000×g 离心 5 min,分别用考马斯亮蓝 G-250 方法^[27]和蒽酮硫酸比色法^[28]测定上清液中可溶性蛋白和可溶性糖的含量。

(iii) 统计分析。实验结果表示为平均数±标准误差。采用 Origin 7.0 软件对数据进行 One-way ANOVA 差异显著性分析 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2 结果

2.1 MC-RR 对细菌细胞膜渗透性的影响

图 1 显示了 MC-RR 对大肠杆菌(图 1(a))和枯草杆菌(图 1(b))细胞膜渗透性的影响。为了确定 MC-RR 对细菌细胞膜渗透性的影响程度,实验中加入了解菌酶,根据细胞溶解后光密度值 A_{675} 随时间的变化来评价。实验结果显示, A_{675} 值的变化具有明显的时间和剂量效应,MC-RR 的浓度越高,处理时间越长, A_{675} 值的降低越明显。而空白对照组,包括仅有溶菌酶或 MC-RR 的处理组,在实验 40 min 内, A_{675} 值均没有明显变化。对于大肠杆菌来说,不同浓度 MC-RR 和溶菌酶共同处理 10 min 时, A_{675} 值开始显著降低 ($P < 0.05$);而枯草杆菌在 20 min 内,各处理组和对照相比无明显变化,处理 30 min 时,只有高浓度 MC-RR (10 μg/mL)和溶菌酶的共同处理组使 A_{675} 值显著降低 ($P < 0.05$),处理 40 min 时,各处理组均显著低于对照。

2.2 MC-RR 对细菌大分子物质释放的影响

MC-RR 能够促进大肠杆菌和枯草杆菌细胞内可溶性蛋白和可溶性糖的释放(图 2)。MC-RR 对细菌细胞内可溶性蛋白和可溶性糖释放量的影响具有剂量效应。所有处理组可溶性糖的含量均显著高于对照 ($P < 0.05$),其中大肠杆菌细胞可溶性糖的释放量在 MC-RR 各处理浓度下均达到了极显著差异 ($P < 0.01$),

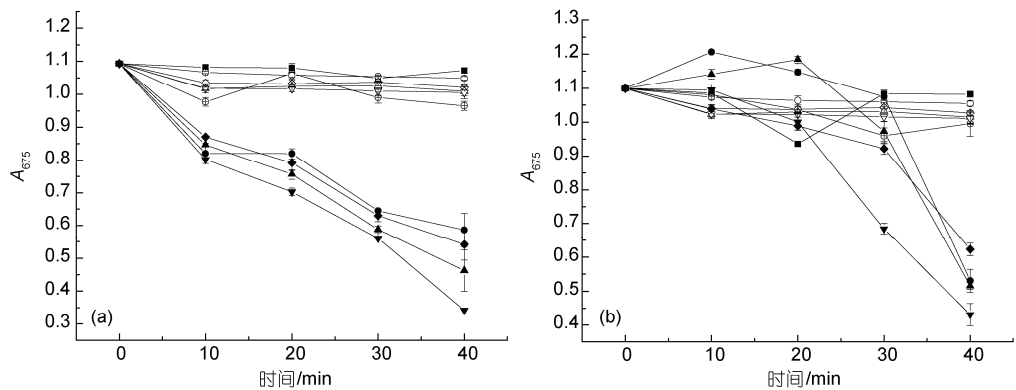


图1 MC-RR 对大肠杆菌 *Escherichia coli* HB101 (a)和枯草杆菌 *Bacillus subtilis* BG2036 (b)的渗透效应

溶菌酶 0.04 g/mL ($\oplus$); MC-RR 0 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacksquare$); MC-RR 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ($\circ$); MC-RR 1 $\mu\text{g/mL}$ ($\diamond$); MC-RR 5 $\mu\text{g/mL}$ ($\triangle$); MC-RR 10 $\mu\text{g/mL}$ (∇); MC-RR 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和溶菌酶 0.04 g/mL ($\bullet$); MC-RR 1 $\mu\text{g/mL}$ 和溶菌酶 0.04 g/mL ($\blacklozenge$); MC-RR 5 $\mu\text{g/mL}$ 和溶菌酶 0.04 g/mL ($\blacktriangle$); MC-RR 10 $\mu\text{g/mL}$ 和溶菌酶 0.04 g/mL ($\blacktriangledown$)

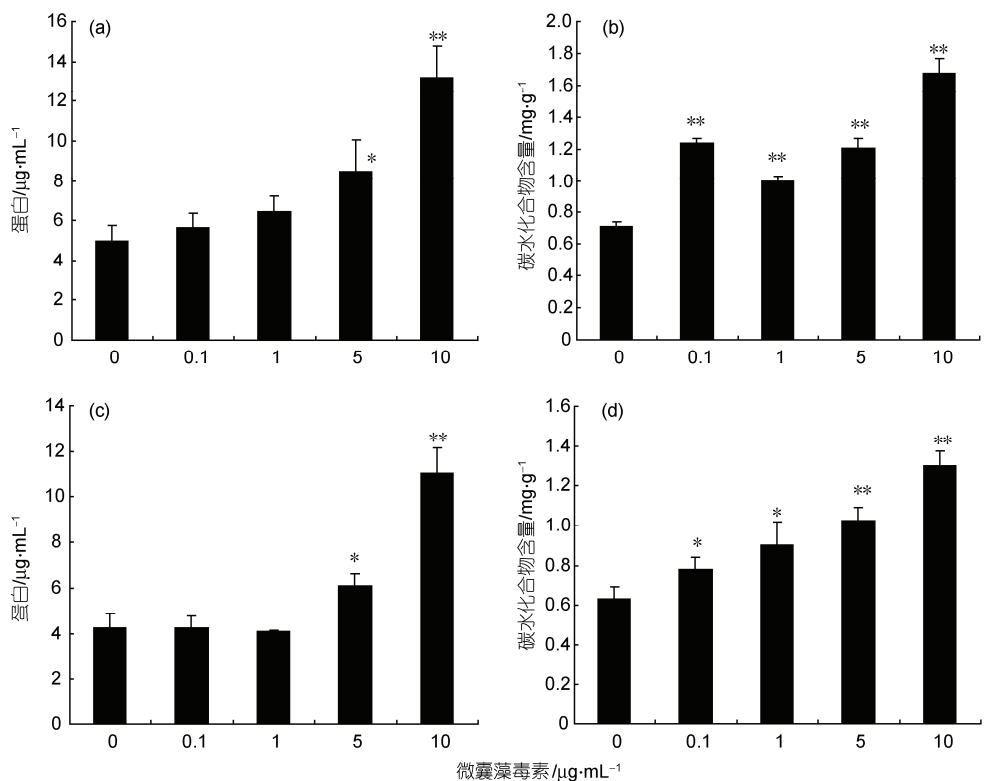


图2 MC-RR 对大肠杆菌 *Escherichia coli* HB101((a)和(b))和枯草杆菌 *Bacillus subtilis* BG2036 ((c)和(d))细胞内可溶性蛋白和可溶性糖外渗量的影响

显著性差异: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

枯草杆菌只有在 MC-RR 处理浓度高于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时才能达到极显著差异($P < 0.01$). 大肠杆菌和枯草杆菌可溶性蛋白的含量在 5 $\mu\text{g/mL}$ MC-RR 处理下均显著高于对照($P < 0.05$), 10 $\mu\text{g/mL}$ MC-RR 处理下均达到了

极显著水平($P < 0.01$).

3 讨论

研究报道, 铜绿微囊藻产生的微囊藻毒素能够

抑制藻类和其他蓝藻的生长,但对异养细菌没有明显作用^[19,23],我们以前的工作也报道 MC-RR 对大肠杆菌和枯草杆菌没有致死效应^[29,30]。目前的工作表明 MC-RR 能够增加大肠杆菌和枯草杆菌对溶菌酶的敏感性。一般情况下,溶菌酶在短时间内能被细菌细胞壁排除在外,起不到溶菌作用。而在实验中,微囊藻毒素和溶菌酶对大肠杆菌和枯草杆菌的复合处理,使得溶菌酶在短时间内显示了溶菌作用,并且该作用具有一定的时间和剂量效应。 A_{675} 值随着 MC-RR 处理浓度的增加和处理时间的延长而降低,浓度越大,时间越长,降低越明显。不同浓度 MC-RR 和溶菌酶的复合处理使大肠杆菌的 A_{675} 值在实验 10 min 时均开始显著降低($P<0.05$),而枯草杆菌在实验 30 min 时, A_{675} 值才开始降低,并且与对照组相比,只有高浓度 MC-RR (10 $\mu\text{g/mL}$)和溶菌酶的复合处理组能达到显著水平($P<0.05$)。当实验处理 40 min 时,各低浓度处理组的 A_{675} 值才明显低于对照。该 A_{675} 值的降低在时间上的差异可能和细菌本身的特性有关。大肠杆菌属于革兰氏阴性菌,枯草杆菌属于革兰氏阳性菌,其细胞壁组成成分有很大差别,对溶菌酶的敏感性不同,促使 A_{675} 值的降低在时间上产生差异。此外,还与 MC-RR 的处理浓度密切相关,实验证明,MC-RR 处理浓度越高, A_{675} 值降低越快越明显。MC-RR 和溶菌酶的这种协同效应表明 MC-RR 能够增加大肠杆菌和枯草杆菌细胞膜的渗透性,促使外源性的溶菌酶快速进入细胞,促进细胞溶解。到目前为止,只有 Dixon 等人^[25]曾报道 2.5 $\mu\text{g/mL}$ MC-RR 类似于一种化学渗透剂多黏菌素 B 类似物(polymyxin B nonapeptide, PMBN)的作用,能够增加大肠杆菌细胞膜的渗透性,促进溶菌酶的作用。本研究结果与

Dixon 等人^[25]的报道一致,并且我们还进一步证实 MC-RR 同样能够增加革兰氏阳性枯草杆菌细胞膜的渗透性,并且毒素处理浓度越高,效果越明显。

目前为止,关于微囊藻毒素对植物和动物的毒性效应的报道很多,但关于微囊藻毒素对微生物的效应的报道却非常有限,并且仍存在很多争议。Foxall 和 Sasner^[23]曾报道微囊藻毒素对大肠杆菌的生长几乎没有抑制作用, Singh 等人^[21]也报道微囊藻粗毒素和纯毒素对生长在固体培养基上的铜绿假单胞菌、杆菌和一些真菌几乎没有影响。而另外一些学者则表明微囊藻粗毒素能够抑制大肠杆菌的生长^[31,32]。例如, Valdor 和 Aboal 等人^[24]认为,很多藻类提取物都能影响大肠杆菌的生长,尤其是含有高浓度 MC-RR 的单歧藻(*Tolypotrrix distorta*)提取物,含有高浓度微囊藻毒素的藻类提取物能更明显影响大肠杆菌的生长,这可以从 Dixon 等人^[25]和本研究进一步证实,微囊藻毒素即使在低浓度下也能影响细菌细胞膜的渗透性,从而可能影响其生长。我们的研究还进一步表明,MC-RR 能够促进大肠杆菌和枯草杆菌细胞内可溶性蛋白和可溶性糖的外渗(图 2),并且可溶性蛋白和可溶性糖的外渗量对毒素剂量具有明显的依赖性,MC-RR 浓度越高,处理组可溶性蛋白和可溶性糖的外渗量与对照相比越高,差异越显著。所有这些表明 MC-RR 能够提高细菌细胞膜的渗透性。

综上所述,MC-RR 能够增加细菌细胞膜的渗透性,促进溶菌酶的溶菌效应。这意味着,在富营养化水体中微囊藻毒素的产生可能具有非常重要的生态学意义,微囊藻毒素和水中其他化合物的复合作用或许能够调节水体中的微生物群落,这需要更进一步深入研究^[33~35]来得到证实。

参考文献

- 1 Bell S G, Codd G A. Cyanobacterial toxin and human health. *Rev Med Microbiol*, 1994, 5: 256—264
- 2 Dawson R M. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 1998, 36: 953—962
- 3 Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: E and FN Spo on behalf of WHO, 1999
- 4 Svrcek C, Smith D W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: A review. *J Environ Eng Sci*, 2004, 3: 155—185
- 5 Carmichael W W. The toxin of cyanobacteria. *Sci Am* 1994, 270: 64—72
- 6 Trogen G B, Annala A, Eriksson J, et al. Conformational studies of microcystin-LR using NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations. *Biochemistry*, 1996, 35: 3197—3205
- 7 Liu Y D, Song L R, Li X Y, et al. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunthe. *Toxicon*, 2002, 40: 395—399
- 8 Pinho G L, Morua da Rosa C, Yunes J S, et al. Toxic effects of microcystin-LR in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp Biochem Phys C*, 2003, 135: 459—468

- 9 Freitas M V, Moraes S R, Azevedo S M F O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 2001, 39: 1077—1085
- 10 Vasconcelos V M. Cyanobacteria toxins: Diversity and ecological effects. *Limnetica*, 2001, 20: 45—48
- 11 Watanabe M M, Kaya K, Takamura N. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J Phycol*, 1992, 28: 761—767
- 12 Montagnolli W, Zamboni A, Luvizotto S R, et al. Acute Effects of *Microcystis aeruginosa* from the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil, on the Microcrustacean *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea: Tanaidacea). *Arch Environ Contam Toxicol*, 2004, 46: 463—469
- 13 Weng D, Lu Y, Wei Y N, et al. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*, 2007, 232: 15—23
- 14 Lankoff A, Carmichael W W, Grasman K A, et al. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Toxicol*, 2004, 204, 23—40
- 15 Zhang J Y, Zhang H J, Chen Y X. Sensitive apoptosis induced by microcystins in the crucian carp (*Carassius auratus*) lymphocytes *in vitro*. *Toxicol Vitro*, 2006, 20: 560—566
- 16 McElhiney J, Lawton L A, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon*, 2001, 39: 1411—1420
- 17 Kinnear S H W, Fabbro L D, Duivenvoorden L J. Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2008, 54: 187—194
- 18 Kos P, Gorzo G, Suranyl G, et al. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepa-toxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal Biochem*, 1995, 225: 49—53
- 19 Pflugmacher S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquat Toxicol*, 2004, 70: 169—178
- 20 Yin L Y, Huang J Q, Huang W M, et al. Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*, 2005, 46, 507—512
- 21 Singh D P, Tyagi M B, Kumar A, et al. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, 17: 15—22
- 22 Hu Z Q, Liu Y D, Li D H, et al. Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongates* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia*, 2005, 534: 23—29
- 23 Foxall T L, Sasner J J. Effects of a hepatic toxin from the cyanophyte *Microcystis aeruginosa*. In: Carmichael W W, ed. *The Water Environment Algal Toxins and Health*. New York: Plenum Press, 1988
- 24 Valdor R, Aboal M. Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon*, 2007, 49: 769—779
- 25 Dixon R A, Al-Nazaw I M, Alderson G. Permeabilising effects of sub-inhibitory concentrations of microcystin on the growth of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230: 167—170
- 26 Harada K I, Suzuki M, Dahlem A M, et al. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon*, 1988, 26: 433—439
- 27 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- 28 Kohert G. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid methods. In: Hellebust J A, Craigie J S, eds. *Handbook of Physiological methods: Physiological and Biochemical Methods*. London: Cambridge University Press, 1978
- 29 Yang C Y, Wang W B, Liu Y D, et al. Growth and antioxidant system of *Escherichia coli* in response to microcystin-RR. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2008, 81: 427—431
- 30 Yang C Y, Liu Y D, Li D H. Effects of MC-RR on the antioxidant system of *Bacillus subtilis*. *Fresen Environ Bull*, 2007, 16: 1435—1441
- 31 Ostensvik O, Skulberg O M, Undrdal B, et al. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria—a comparative study of bacterial bioassays. *J Appl Microbiol*, 1998, 84: 1117—1124
- 32 Piccardi R, Frosini A, Tredici M R, et al. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *J Appl Phycol*, 2000, 12: 543—547
- 33 Aboal M, Puig M A. Intracellular and dissolved microcystins in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*, 2005, 45: 509—518
- 34 Aboal M, Puig M A, Asencio A D. Production of microcystins in calcareous Mediterranean streams: The Alharabe River, Segura River basin in south-east Spain. *J Appl Phycol*, 2005, 17: 231—243
- 35 Whitton B A, Al-Shehri A M, Ellwood N T W, et al. Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. In: Turner B L, Frossard E, Balvin D S, eds. *Organic Phosphorus in the Environment*. Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau International, 2005