

微囊藻毒素-LR对恶臭假单胞菌细胞活性和表面特性的影响

邓庭进¹, 叶锦韶¹, 彭辉^{2*}, 刘芷辰¹, 刘则华³, 尹华^{3*}, 陈烁娜¹

(1. 暨南大学环境学院, 广东省高校水土环境毒害性污染防治与生物修复重点实验室, 广州 510632; 2. 暨南大学化学系, 广州 510632; 3. 华南理工大学环境与能源学院, 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006)

摘要: 在恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)降解微囊藻毒素-LR(MC-LR)的体系中,研究了菌体细胞表面特性和活性的变化,考察了MC-LR对菌体的影响,对MC-LR的微生物毒性作用进行了初步的探索.结果表明,MC-LR可以使菌体细胞质膜通透性增加,并影响菌体离子代谢及可溶性蛋白等物质的分泌.当MC-LR质量浓度由0增大到 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,能促进菌体分泌和释放可溶性糖及 Na^+ 、 Cl^- 等离子.流式细胞实验检测发现,MC-LR加速了菌体细胞的死亡,且死亡率随着MC-LR质量浓度的增加而增大. $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR作用5 d,比未添加MC-LR的对照体系增加了近30%.扫描电镜观察表明,在MC-LR作用下,菌体细胞的微观形貌发生了改变,细胞褶皱加深.在 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR存在下培养5 d后,大部分细胞破裂,细胞内含物流出,细胞结构损坏严重.

关键词: 微囊藻毒素-LR; 恶臭假单胞菌; 质膜通透性; 细胞活性; 毒性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)01-0252-07 DOI: 10.13227/j.hj.kx.2015.01.033

Influence of Microcystin-LR on Cell Viability and Surface Characteristics of *Pseudomonas putida*

DENG Ting-jin¹, YE Jin-shao¹, PENG Hui^{2*}, LIU Zhi-chen¹, LIU Ze-hua³, YIN Hua^{3*}, CHEN Shuo-na¹

(1. Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation of Guangdong Higher Education Institutes, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In microcystin-LR(MC-LR) degradation system, the change in surface characteristics and cell viability of *Pseudomonas putida* was studied. The purpose of this study was to reveal the influence of MC-LR on *P. putida* and elucidate the toxicity of MC-LR on microorganisms. The result demonstrated that MC-LR enhanced the cytoplasmic membrane permeability, as well as affected the ion metabolism and protein release of *P. putida*. The soluble sugar and Na^+ , Cl^- release increased with the rising concentration of MC-LR ranging from $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Flow Cytometry Method(FCM) analysis revealed that MC-LR accelerated the death of *P. putida*, and the death rate increased with the ascending concentration of MC-LR. Compared with the control, the death rate on day 5 increased by nearly 30% when $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR was added. Scanning electron microscopy(SEM) analysis showed that the cells were deformed under the toxicity of MC-LR. After 5-day exposure to $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR, the majority of the cells were ruptured and the intracellular materials flew out. The cellular structure was severely damaged under this condition.

Key words: microcystin-LR; *Pseudomonas putida*; cytoplasmic membrane permeability; cell viability; toxicity

随着现代社会的高速发展,水体富营养化现象日趋严重,由此引发的蓝藻水华污染已经成为全球性关注的环境问题^[1]. 研究显示,世界上25%~70%的蓝藻水华能够产生藻毒素^[2],对环境危害极大.而微囊藻毒素(microcystins, MCs)是一类在蓝藻水华污染中出现频率最高,危害最为严重的藻毒素.其分子构成为环状多肽类物质,具有很强的生物毒性^[3],目前已经发现有70多种变体,其中分布最广泛、毒性最强的是微囊藻毒素-LR(MC-LR),世界卫生组织(WHO)规定饮用水中MC-LR的质量浓度不超过 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4].

MCs是一类肝毒素,能够引起人的肝脏损伤,导致肝癌的发生^[5-8].此外,MCs对植物同样具有毒性,能够抑制植物的生长^[9],且能诱导植物的氧化胁迫^[10].目前,关于MCs的生理毒性影响研究主要

收稿日期: 2014-07-28; 修订日期: 2014-08-29

基金项目: 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点项目(U0933002); 广东省自然科学基金重点项目(S2013020012808); 中央高校基本科研业务费专项(2013ZM0126); 广东省教育部产学研结合项目(2012B091000055)

作者简介: 邓庭进(1989~),男,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制与修复, E-mail: dtjin007@126.com

* 通讯联系人, E-mail: huayin@scut.edu.cn; tbpenghui@163.com

集中在动、植物上,而对 MCs 与微生物的作用机制研究还非常有限。大量细菌、真菌、浮游植物等微生物与藻毒素共存于富营养化水体中,两者相互接触,势必存在相互影响。MCs 对细菌和真菌的影响也有报道,杨翠云等^[11]的研究发现,MCs 能够促进溶菌酶对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的细胞膜渗透性,增加细胞内可溶性糖和可溶性蛋白的外渗。

当前,MCs 的微生物降解去除是科学研究的热点,近年来已有不少关于 MCs 降解菌筛选的报道,但大多侧重于菌体对 MCs 降解方面的研究,而关于 MCs 对菌体的作用研究较少。本研究选取我国蓝藻水华中常见且毒性最强的 MC-LR 作为 MCs 代表物,利用本实验室前期分离、筛选得到的对 MC-LR 有降解作用的恶臭假单胞菌纯菌株为研究对象,分析 MC-LR 对菌体细胞表面特性的影响,并考察其对细胞活性及菌体形态的作用,揭示 MCs 对菌体的作用机制和生理毒性影响,以期为 MCs 对微生物的生理毒性及其生物降解研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

实验菌种: 实验室筛选驯化获得的 1 株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),由本课题组从广州市某发生水华的人工湖底泥中筛选驯化得到,对 MC-LR 有良好的降解效果^[12]。

M9 乳糖诱导培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g, KH_2PO_4 3 g, NH_4Cl 1 g, NaCl 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.01 g, 乳糖 5 g, 水 1 000 mL。于 100℃ 下灭菌 30 min 后使用。

磷酸盐缓冲液(PBS): NaCl 8 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, 水 1 000 mL, 调节 pH 为 7.4。

β -半乳糖苷酶反应缓冲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g, KH_2PO_4 0.024 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, NaCl 0.8 g, KCl 0.02 g, β -巯基乙醇 0.39 mL, 水 100 mL。

营养培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 为 7.4~7.6。

无机盐基础培养基(MSM): K_2HPO_4 0.02 g, NaH_2PO_4 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, NH_4NO_3 0.02 g, CaCl_2 0.05 g, 水 1 000 mL。

1.2 MC-LR 储备液的提取与纯化

取 40% 甲醇加入离心、冷冻干燥后的藻粉中,先磁力搅拌 20 min,后进行超声破碎 40 min 并离心,将离心后的上清液调节 pH 为 4,离心去除藻胆

蛋白,然后调节 pH 为 8,并过 0.45 μm 微孔滤膜,所得溶液过 C18 固相萃取小柱进行提纯,将提纯液旋转蒸干,最后用甲醇定容装瓶,于 -20℃ 冰箱中保存待用。

1.3 *P. putida* 的扩大培养和菌悬液的配制

用无菌接种环从固体培养基中挑取 *P. putida* 于营养培养基中,在 30℃、130 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中振荡培养 36 h 后,于 6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,将所得菌体用无菌蒸馏水洗涤 2 次,配成湿重为 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌悬液,待用。

1.4 不同污染物浓度下细胞质膜通透性的变化

1.4.1 β -半乳糖苷酶的诱导

取营养培养基中培养 36 h 的待测 *P. putida* 菌液 1 mL,于 25℃、4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min,无菌生理盐水洗涤 2 次,转移至 10 mL 的 M9 乳糖诱导培养基,37℃ 振荡诱导培养 6~8 h,离心洗涤后用 β -半乳糖苷酶反应缓冲液重悬,使其在 630 nm 时吸光度为 0.2,待用。

1.4.2 菌体细胞质膜通透性的检测

β -半乳糖苷酶是位于细胞膜上的一种水解酶,可以水解乳糖,也可以水解邻硝基苯 β -D-半乳糖苷(ONPG)并释放黄色的邻-硝基苯酚。当细胞膜结构遭到破坏,通透性发生变化时,ONPG 就会进入到细胞中或者 β -半乳糖苷酶会被释放到细胞外,相互作用生成黄色的水解产物,使体系在 405 nm 处吸光度值升高。因此,本实验利用 β -半乳糖苷酶对 ONPG 的水解程度来表征污染物对菌体细胞质膜通透性的影响。

取 10 mL 反应缓冲液重悬的菌液,分别加入不同质量浓度的 MC-LR,再加入 1 mL 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ONPG 混匀,于 37℃ 水浴 5 d 后取样,于 405 nm 下测吸光度值 D_1 。另取不加 MC-LR 平行样作空白对照,吸光度值为 D_0 。细胞质膜通透性的改变用吸光度值 $D = D_1 - D_0$ 来表征^[13]。每个处理设置 3 个平行样,进行 2 次重复实验。

1.5 MC-LR 作用下微生物降解体系中可溶性蛋白与可溶性糖的测定

将 *P. putida* 投加到 MC-LR 质量浓度分别为 0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MSM 中,使体系最终为 20 mL,菌的质量浓度为 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 30℃、130 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中振荡培养 5 d 后取样,于 6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,取上清液用考马斯亮蓝法^[14]测定培养体系中可溶性蛋白含量。

另取 5 mL 培养液于试管中,加入 5 mL 2% 的

EDTA 溶液 4℃ 下放置 4 h, 然后于 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液测定胞外可溶性糖量。胞外可溶性糖的检测使用苯酚硫酸法^[15], 用葡萄糖做标准曲线。以上每个处理设置 3 个平行样, 进行 2 次重复实验。

1.6 MC-LR 作用下微生物降解体系中菌体的离子代谢

将 *P. putida* 投加到 MC-LR 质量浓度分别为 0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹ 的 MSM 中, 使体系最终为 20 mL, 菌体质量浓度为 1.0 g·L⁻¹, 以不加菌体的 MSM 体系作为空白对照。在 30℃、130 r·min⁻¹ 摇床中振荡培养 5 d 后取样, 于 6 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min, 取上清液用离子色谱仪(ICS-900)测定 K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、Cl⁻ 和 NO₃⁻ 等阴、阳离子浓度变化。每个处理设置 3 个平行样, 进行 2 次重复实验。其中阴离子分析柱为 Dionex IonPa[®] AS14(4 mm × 250 mm), 流动相为 3.5 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃ 和 1.0 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 进样体积为 20 μL。阳离子分析柱为 Dionex IonPa[®] CS12A(4 mm × 250 mm), 流动相为 1.6 mmol·L⁻¹ H₂SO₄, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样体积为 20 μL。

1.7 MC-LR 作用下 *P. putida* 细胞活性测定

将 *P. putida* 投加到 MC-LR 质量浓度分别为 0、0.5、2.5 mg·L⁻¹ 的 MSM 中, 使体系最终为 20 mL, 菌体质量浓度为 1.0 g·L⁻¹, 于 30℃、130 r·min⁻¹ 摇床中振荡培养, 分别于第 0、1、2、3、4 和 5 d 取样离心(6 000 r·min⁻¹, 10 min), 收集菌体用 PBS 清洗 3 次后, 用 300 μL PBS 重悬, 加入 5 μL 碘化丙啶(PI)染料, 37℃ 下避光孵育 15 min, 用流式细胞仪(FACSDiva, BD)测定菌体细胞的死亡率。每个处理设置 3 个平行样, 进行 2 次重复实验。

1.8 MC-LR 作用下 *P. putida* 细胞微观形貌观察

将 *P. putida* 投加到 MC-LR 质量浓度分别为 0、0.5、2.5 mg·L⁻¹ 的 MSM 中, 使体系最终为 20 mL, 菌体质量浓度为 1.0 g·L⁻¹, 于 30℃、130 r·min⁻¹ 摇床中振荡培养, 取 2 d、5 d 的样品, 离心弃去上清液, 菌体用 2% 戊二醛固定 24 h, 然后依次用 20%、50%、70%、90%、100% 乙醇进行梯度脱水 15 min, 将脱水后的菌体于醋酸异戊酯中浸泡 30 min, 取菌液滴加到盖玻片上, 利用 CO₂ 超临界干燥 4 h, 经喷金镀膜, 利用扫描电镜(PHILIPS XL-30ESEM)观察各情况下菌体表面的微观形态^[16]。以营养培养基培养 36 h 的菌体作为对照。

1.9 统计分析

实验所获数据利用 Microsoft Excel 和 SPSS 17.0 进行统计及相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 MC-LR 对菌体细胞质膜通透性及可溶性糖分泌的影响

菌体细胞质膜具有稳定的磷脂双分子层结构, 是菌体维持细胞完整性和保持正常物质能量代谢的基础^[17]。微生物处理有机污染物时, 污染物首先被吸附到菌体表面, 到达细胞膜并与菌体磷脂双分子层相互作用^[18], 对菌体细胞质膜通透性产生影响。

可溶性糖是菌体自身生理代谢产生的一种活性物质, 具有缓冲和保护作用, 有助于保护微生物免受有毒物质的毒害, 并适应恶劣环境^[19]。可溶性糖这类大分子的分泌释放, 也能在一定程度上印证细胞质膜通透性的变化。

不同 MC-LR 质量浓度对 *P. putida* 细胞质膜通透性及可溶性糖分泌的影响结果如图 1 所示。从中可知 *P. putida* 在未添加 MC-LR 的 MSM 中, 也能分泌少量的可溶性糖, 这是由于菌体自身代谢的缘故。当菌体在 MSM 中培养 5 d 后, 体系中营养物质匮乏, 菌体细胞继续产生并分泌可溶性糖来适应不利环境。与未添加 MC-LR 的空白体系相比, 污染物的存在会改变菌体细胞质膜的通透性及菌体对可溶性糖的分泌, 且不同质量浓度污染物对菌体细胞通透性的作用程度不同, 对可溶性糖分泌的影响也有差别。分析原因可能是由于污染物对于菌体细胞有刺激胁迫作用, 导致细胞质膜磷脂分子体积缩小, 双分子层结构收缩, 通透性增大^[20], 而菌体通过增加可溶性糖的合成来调节适应污染物的胁迫, 避免或降低自身损害。当 MC-LR 质量浓度增大时, 菌体细胞质膜的通透性不断增大, 向胞外释放的可溶性糖含量也迅速增加, 这是因为 MC-LR 的胁迫作用超过了菌体自身的调节机制, 一方面, 使细胞质膜某些结构或功能发生损坏, 从而导致细胞质膜通透性不断增大, ONPG 不断进入细胞, 与 β-半乳糖苷酶接触反应, 使吸光度值上升; 另一方面, 迫使菌体细胞启动应急机制, 通过大量合成糖类及其他代谢物来抵御 MC-LR 的毒害, 保护菌体细胞。当菌体细胞质膜通透性增大时, 大量的可溶性糖物质更易通过细胞质膜而分泌到胞外体系中, 从而使体系中的可溶性糖含量增大。利用 SPSS 17.0 统计软件对菌体分泌的可溶性糖含量与菌体细胞质膜通透性的变化作相关

性分析,可以得出,相关性为 0.963,在 0.01 水平上显著正相关,与实验分析相吻合。

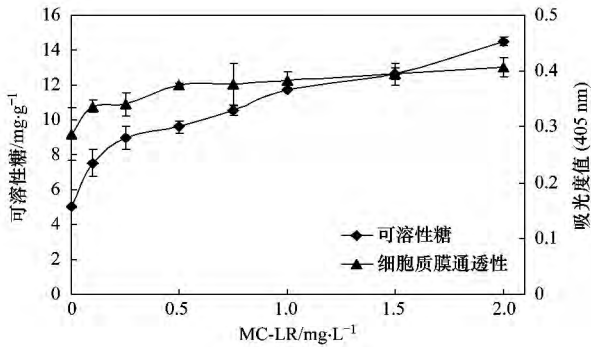


图 1 不同质量浓度 MC-LR 对菌体细胞质膜通透性及可溶性糖分泌的影响

Fig. 1 Effect of MC-LR concentration on the membrane permeability and soluble sugar release of *P. putida*

2.2 MC-LR 对菌体分泌可溶性蛋白的影响

由图 2 可知,降解体系中可溶性蛋白含量呈先上升后下降的趋势,在未添加 MC-LR 的空白体系,由于菌体自身正常的生命代谢活动,能够分泌出约 $6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 细胞的可溶性蛋白。当低质量浓度的 MC-LR 存在时,胞外可溶性蛋白含量有逐渐升高的趋势,当 MC-LR 质量浓度增大到 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可溶性蛋白的释放量达到最大值(约 $18 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 细胞),此后随着 MC-LR 质量浓度的增加,体系中可溶性蛋白量开始下降,当 MC-LR 质量浓度超过 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,胞外可溶性蛋白的量开始低于空白体系并持续降低。研究发现,有毒污染物的适当暴露,可以促进菌体合成跟脱毒和耐受作用相关的酶蛋白^[21],因此,低质量浓度 MC-LR 的加入,能够适当提高菌体的活性,从而增强其蛋白合成的能力,并诱导菌体合成功能蛋白来抵御污染物的破坏作用。而当 MC-LR 质量浓度增大到较高水平时,一方面对菌体表现出胁迫和毒害作用,抑制了菌体细胞的生命活动及对酶蛋白的合成;另一方面,高浓度的污染物可导致微生物细胞内活性氧过度积累,引起氧化胁迫,导致蛋白质过氧化、酶失活等^[22],因此,高质量浓度 MC-LR 的存在能对体系中可溶性蛋白产生破坏和消耗作用,最终导致了蛋白量的减少。

2.3 MC-LR 对菌体离子代谢的影响

在细胞的生命代谢活动中,必然伴随着各类阴、阳离子的吸收与释放。本实验所用 MSM 包含多种无机盐成分,能为菌体提供多种必需的阴、阳离子,保证菌体的正常生命活动。图 3 中各种阴、阳离子数值均为扣除 MSM 背景值后所得数值。可以看出,*P.*

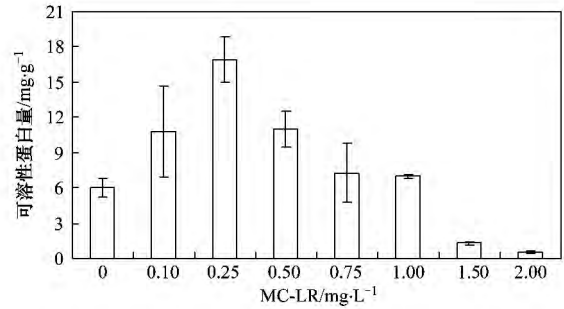


图 2 不同质量浓度 MC-LR 对菌体分泌可溶性蛋白的影响

Fig. 2 Effect of MC-LR concentration on the protein release by *P. putida*

putida 生长代谢过程中对不同阴、阳离子的利用情况各不相同, K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 是细胞新陈代谢的必需因子,在未添加 MC-LR 的 MSM 中,菌体自身代谢导致了各离子的质量浓度差异,其中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- 被菌体细胞吸收,表现为负值;同时菌体细胞向外释放 Na^+ 、 Cl^- 离子,表现为正值。

如图 3 所示,随着 MC-LR 质量浓度的增大, Na^+ 和 Cl^- 的释放量先变小后变大,而 Mg^{2+} 和 NO_3^- 则是吸收量先增大后逐渐减小; K^+ 和 Ca^{2+} 的变化情况则要相对复杂,当增大 MC-LR 的质量浓度时,菌体对 K^+ 和 Ca^{2+} 先进行吸收,然后吸收量逐渐减小,最后转变为胞外释放。

正常情况下,细胞膜内外的离子保持动态平衡,以维持正常的细胞功能^[23]。图 3 中 Na^+ 和 Cl^- 主要由菌体细胞释放到胞外体系,该现象的原因之一,是

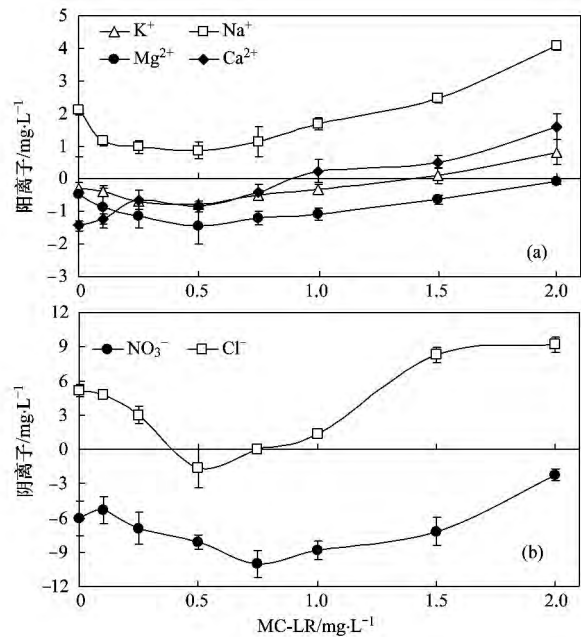


图 3 不同质量浓度 MC-LR 下离子的变化

Fig. 3 Effect of MC-LR concentration on the ion release of *P. putida*

因为 *P. putida* 在扩大培养时所用的营养培养基内含有 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl , 因此, 扩大培养后菌体对 Na^+ 和 Cl^- 进行吸收, 一方面用于自身生命代谢, 一方面调节菌体渗透压的平衡. 当菌体投加到含 Na^+ 、 Cl^- 质量浓度相对较小的 MSM 体系中时, 菌体向胞外释放出一定量的 Na^+ 和 Cl^- , 以维持细胞渗透压的平衡^[24]. 而由于营养体系中未含 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- 等离子, 菌体在扩大培养时未作吸收, 因此在 MSM 体系中即对相应离子进行吸收以维持细胞渗透压并加以利用.

当向体系中加入不同质量浓度的 MC-LR 时, 虽然各离子的代谢情况不尽相同, 但是变化趋势却很相似. 由表 1 可知, K^+ 与 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 离子质量浓度在 0.01 水平上极显著正相关, 与 Ca^{2+} 、 NO_3^- 的离子质量浓度在 0.05 水平上显著正相关, 表明各离子变化存在着很大的相关性. 由图 3 可以看出, 各离子的变化在 MC-LR 浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时发生转折. 推测原因, 可能是因为低质量浓度 MC-LR 的加入可以促进 *P. putida* 的生命代谢活动, 从而增强菌体对各离子的代谢利用, 使 K^+ 、 Mg^{2+} 和 NO_3^- 等离子吸收量增加, 而由于利用量增大, 胞内多余的

Na^+ 和 Cl^- 的释放量则随之减小. 当加入的 MC-LR 质量浓度超过 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对菌体开始表现出胁迫作用, 抑制菌体生命代谢活动, 从而减弱了菌体对各离子的利用, 使菌体对 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- 的吸收量逐渐减少, 对 Na^+ 和 Cl^- 的释放出现反弹. 当 MC-LR 质量浓度继续增大, K^+ 和 Ca^{2+} 由吸收转变为释放, Na^+ 和 Cl^- 的释放量持续增加. 有研究表明, K^+ 和 Cl^- 因为在细胞中极其丰富, 并且具有生理调节功能, 所以它们的释放通常被认为是细胞膜通透性改变的象征^[25]. 当细菌受到体系中有毒物质的毒害和渗透压的改变时, 细胞内应急机制将导致膜上的离子通道打开, 从而造成细胞内部离子的释放^[26]. 可以说明, 高质量浓度 MC-LR 对菌体的胁迫和毒害作用导致了细胞膜对离子的通透性增强, 从而增大了胞内离子的释放. 另外, Mg^{2+} 是许多生物酶催化过程和维持核苷酸结构稳定的辅助因子^[27-28], Mg^{2+} 的释放很可能是由于细胞的死亡以及一些与 Mg^{2+} 结合的生物分子的分解造成的, 由此可以推测, 部分菌体在高质量浓度的 MC-LR 作用下, 细胞死亡并发生破损, 致使胞内物质流出, 最终使得释放到体系外的离子增加.

表 1 MC-LR 质量浓度与菌体离子变化量的相关性分析¹⁾

Table 1 Correlation between MC-LR concentration and ion release

MC-LR	K^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	NO_3^-	Cl^-
MC-LR	1					
K^+	0.809*	1				
Na^+	0.778*	0.977**	1			
Mg^{2+}	0.489	0.898**	0.912**	1		
Ca^{2+}	0.979**	0.807*	0.781*	0.495	1	
NO_3^-	0.321	0.734*	0.729*	0.820*	0.370	1
Cl^-	0.507	0.846**	0.814*	0.915**	0.512	0.780*

1) **表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关; *表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关

2.4 MC-LR 对菌体细胞活性的影响

为了考察 MC-LR 对细胞活性的影响, 选用 PI 对降解体系中的细菌细胞进行染色. PI 是一种核酸染料, 当细胞被破坏或者细胞膜发生破裂时, PI 就能穿过质膜和 DNA 结合, 同时发出红色的荧光^[29,30]. 活性细胞由于具有完整的细胞膜, 能阻止 PI 进入细胞与核酸结合, 从而不显荧光, 而失活的死亡细胞由于细胞完整性被破坏, 由 PI 染色呈阳性. 通过流式细胞仪对荧光现象的检测, 可以分析出体系中菌体活细胞与死亡细胞的比例, 从而说明细胞活性的变化.

由图 4 可知, 第 0 d 投加到体系中的菌体(即营养体系中的菌体), 由于营养体系中营养丰富, 菌体

生命代谢活动旺盛, 细胞活性高, 基本没有死亡细胞. 在未添加 MC-LR 的无机盐空白体系中, 菌体死

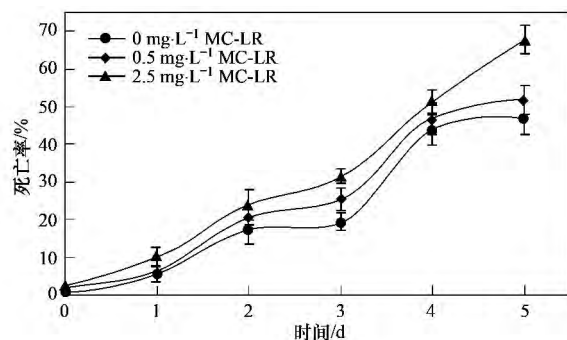


图 4 MC-LR 对菌体细胞活性的影响

Fig. 4 Effect of MC-LR on the death rate of *P. putida*

亡率随着培养时间的延长逐渐增加,是因为体系中营养物质被逐渐消耗殆尽,并出现了代谢物质的积累,导致部分细菌死亡,到第5 d,细菌死亡率达到40%。当向体系中添加 MC-LR 后,菌体死亡率较空白体系升高,且随着添加的 MC-LR 质量浓度增大而增大,说明 MC-LR 的加入使菌体处于不利环境,细胞代谢机制遭到一定程度上的破坏,菌体在 MC-LR 胁迫下发生死亡。MC-LR 质量浓度越大,毒害作用越大,菌体死亡率也显著增加,当加入 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 培养 5 d 后,菌体死亡率比空白体系增加了近 30%,菌体大量死亡。

2.5 *P. putida* 细胞微观形貌观察

本组实验利用扫描电镜来观察 *P. putida* 在 MC-LR 影响下的细胞形貌变化,如图 5 所示,图 5 (a) 是在营养体系中振荡培养 36 h 的菌体;图 5 (b) 和图 5 (e) 分别为 MSM 中培养 2 d 和 5 d 的菌体,作为对照组;图 5 (c) 和图 5 (f) 是加入 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 后培养 2 d 和 5 d 的菌体;图 5 (d) 和图 5 (g) 则是在 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 体系中培养 2 d 和 5 d 的菌体。与对照菌体相比,营养体系中的菌

体细胞呈短杆状,表面光滑且个体饱满,由于营养丰富,菌体生长状态良好。生长于 MSM 的 *P. putida* 细胞则由于营养的相对匮乏,菌体表面产生褶皱,尤其培养到第 5 d 时,细胞发生内陷并开始收缩。

当向体系中投加 MC-LR 后,*P. putida* 细胞变化明显。由图 5 (c) 和图 5 (f) 可知,加入 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 后,在第 2 d 时,细胞表面褶皱加深,并出现不同程度的内陷;培养至第 5 d,细胞出现粘连,部分细胞出现萎缩现象,内陷程度增大。当增大 MC-LR 浓度至 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,如图 5 (d) 和图 5 (g),培养 2 d 后菌体细胞开始发生形变,细胞褶皱加深并且严重内陷,到第 5 d,菌体细胞严重变形,蜷缩成团,大部分细胞已无完整细胞结构,细胞部分内含物流出,细胞破损严重。

对比对照组和实验组菌体可以看出,MC-LR 的存在对细胞微观形貌变化起了主要作用。 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MC-LR 已经对 *P. putida* 细胞表现出不利影响,加速了细胞形态的改变,随着 MC-LR 质量浓度的增大,*P. putida* 细胞变化的速度增快,损坏程度加深,这与 2.4 节的实验分析相一致。

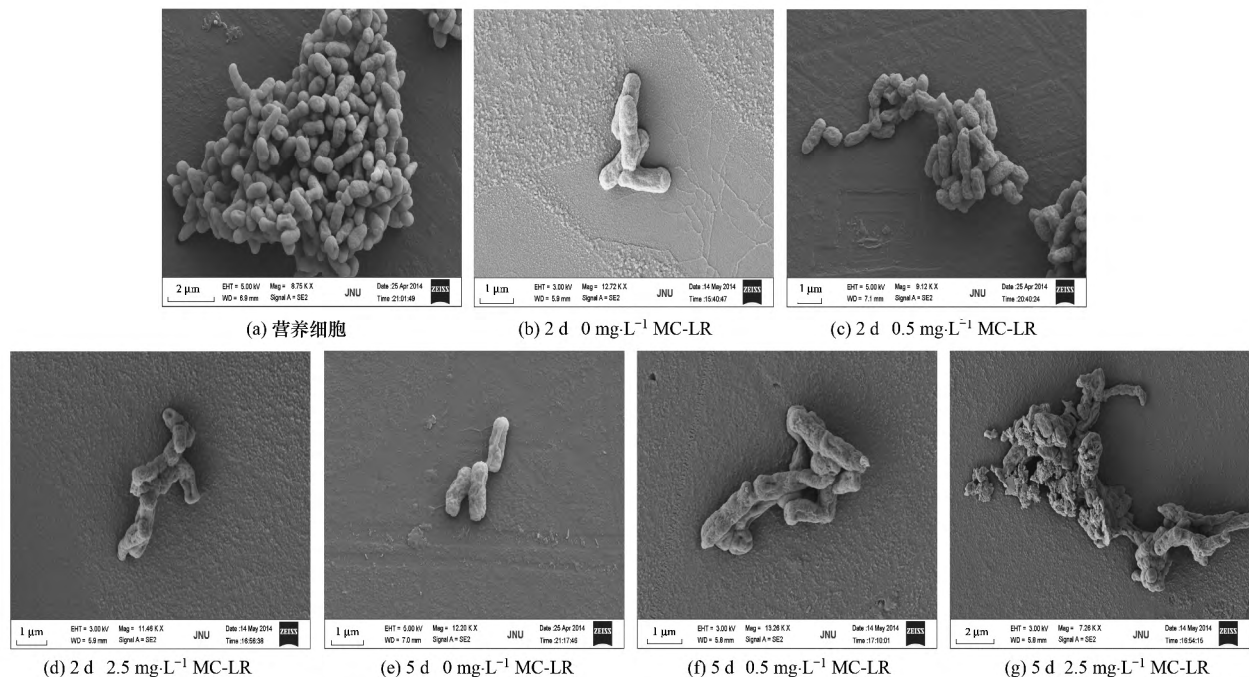


图 5 *P. putida* 细胞微观形态观察

Fig. 5 SEM micrographs of *P. putida*

3 结论

(1) MC-LR 能够改变 *P. putida* 细胞质膜通透性,且随着 MC-LR 质量浓度的增大,质膜通透性增加,菌体对可溶性糖的分泌增加。

(2) 低质量浓度的 MC-LR 促进了 *P. putida* 的生命代谢活动,促进部分离子的吸收及胞外蛋白的释放;高质量浓度的 MC-LR 则对菌体表现出抑制甚至毒害作用。

(3) *P. putida* 的死亡率随着 MC-LR 质量浓度

的增加而增大,在 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MC-LR 条件下处理 5 d 后,细胞严重内陷,大部分细胞已无正常形态,胞内物质流出,菌体死亡率高达 67.6%。

参考文献:

- [1] Yu S Z. Primary prevention of hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1995, **10**(6): 674-682.
- [2] Duy T N, Lam P K S, Shaw G R, *et al.* Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial(blue-green algal) toxins in water [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, **163**: 113-185.
- [3] Cantor G H, Beckonert O, Bollard M E, *et al.* Integrated histopathological and urinary metabonomic investigation of the pathogenesis of microcystin-LR toxicosis [J]. *Veterinary Pathology*, 2013, **50**(1): 159-171.
- [4] Sayato Y. WHO guidelines for drinking water quality [J]. *Eisei Kagaku*, 1989, **35**(5): 307-312.
- [5] Liu I, Lawton L A, Cornish B, *et al.* Mechanistic and toxicity studies of the photocatalytic oxidation of microcystin-LR [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2002, **148**(1-3): 349-354.
- [6] Weng D, Lu Y, Wei Y N, *et al.* The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice [J]. *Toxicology*, 2007, **232**(1-2): 15-23.
- [7] Ufelmann H, Krüger T, Luckas B, *et al.* Human and rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring desmethyl-microcystins and nodularins [J]. *Toxicology*, 2012, **293**(1-3): 59-67.
- [8] Xu C, Shu W Q, Qiu Z Q, *et al.* Protective effects of green tea polyphenols against subacute hepatotoxicity induced by microcystin-LR in mice [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, **24**(2): 140-148.
- [9] 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* [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **54**(2): 187-194.
- [10] 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 [J]. *Toxicol*, 2005, **46**(5): 507-512.
- [11] 杨翠云,李敦海,刘永定. 微囊藻毒素对典型微生物生长及生理生化特性的影响 [J]. *水生生物学报*, 2008, **32**(6): 818-823.
- [12] 肖巧巧,尹华,叶锦韶,等. 一株微囊藻毒素-LR 降解菌的降解特性 [J]. *环境化学*, 2014, **33**(9): 1594-1600.
- [13] 陈烁娜,尹华,叶锦韶,等. 嗜麦芽窄食单胞菌处理苯并[a]芘-铜复合污染过程中细胞表面特性的变化 [J]. *化工学报*, 2012, **63**(5): 1592-1598.
- [14] 叶锦韶,田云,尹华,等. 三苯基锡的微生物降解及其对降解菌的影响 [J]. *环境科学*, 2013, **34**(9): 3607-3612.
- [15] Wang Z K, Hessler C M, Xue Z, *et al.* The role of extracellular polymeric substances on the sorption of natural organic matter [J]. *Water Research*, 2012, **46**(4): 1052-1060.
- [16] 蔡瀚,尹华,叶锦韶,等. 1 株苯并[a]芘高效降解菌的筛选与降解特性 [J]. *环境科学*, 2013, **34**(5): 1937-1944.
- [17] 王飏,田丰伟,励建荣,等. 冷冻干燥对乳酸菌细胞膜通透性的影响 [J]. *微生物学通报*, 2009, **36**(5): 684-688.
- [18] Shapiro L. Protein localization and asymmetry in the bacterial cell [J]. *Cell*, 1993, **73**(5): 841-855.
- [19] Argüelles J C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis [J]. *Archives of Microbiology*, 2000, **174**(4): 217-224.
- [20] Periasamy N, Teichert H, Weise K, *et al.* Effects of temperature and pressure on the lateral organization of model membranes with functionally reconstituted multidrug transporter LmrA [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2009, **1788**(2): 390-401.
- [21] Ye J S, Zhao H J, Yin H, *et al.* Triphenyltin biodegradation and intracellular material release by *Brevibacillus brevis* [J]. *Chemosphere*, 2014, **105**: 62-67.
- [22] Schalk I J, Hannauer M, Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance [J]. *Environmental Microbiology*, 2011, **13**(11): 2844-2854.
- [23] Laurent J, Casellas M, Pons M N, *et al.* Cadmium biosorption by ozonized activated sludge: The role of bacterial flocs surface properties and mixed liquor composition [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **183**(1/3): 256-263.
- [24] Tang S Y, Bai J Q, Yin H, *et al.* Tea saponin enhanced biodegradation of decabromodiphenyl ether by *Brevibacillus brevis* [J]. *Chemosphere*, 2014, **114**: 255-261.
- [25] Buckel W, Thauer R K. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/ Na^+ translocating ferredoxin oxidation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2013, **1827**(2): 94-113.
- [26] Monti J L E, Montes M R, Rossi R C. Alternative cycling modes of the Na^+/K^+ -ATPase in the presence of either Na^+ or Rb^+ [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2013, **1828**(5): 1374-1383.
- [27] Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, **458**(1): 90-102.
- [28] Zorbas Y G, Kakuris K K, Federenko Y F, *et al.* Utilization of magnesium during hypokinesia and magnesium supplementation in healthy subjects [J]. *Nutrition*, 2010, **26**(11-12): 1134-1138.
- [29] Khan M M T, Pyle B H, Camper A K. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76**(15): 5088-5096.
- [30] 毛咏秋,姜愚,雷松,等. 流式细胞术 PI、Annexin V/PI 和 APO 2.7 法检测细胞凋亡的比较 [J]. *华西医学*, 2005, **20**(3): 505-506.