

6 株蓝藻伪空胞的临界破裂压力研究

储昭升¹, 杨波^{1,2}, 金相灿^{1*}, 阎峰², 郑朔方¹, 庞燕¹, 曾清如²

(1. 中国环境科学研究院湖泊环境创新基地 国家环境保护湖泊污染控制重点实验室, 北京 100012; 2. 湖南农业大学资源与环境学院, 长沙 410128)

摘要:通过改进的压力毛细管法,研究了 6 株蓝藻伪空胞的临界破裂压力,并研究了过滤(真空度为 0.02 MPa)和离心(离心力低于 500 r/min)2 种细胞浓缩方法对细胞内伪空胞含量测定的影响.结果表明,对于分散的单细胞的微囊藻,无论是采用过滤还是离心的方法,都难以达到理想的浓缩效果;对于群体形态的微囊藻,可以采用离心的方法进行浓缩,对于丝状的浮游蓝藻,宜采用过滤的方法进行浓缩.此 2 种浓缩方法对细胞伪空胞含量的测定影响很小,伪空胞破裂率 < 7%. 6 株蓝藻均为浅水湖泊藻类,由于长期自然选择的结果,6 株蓝藻伪空胞的临界破裂压力比较接近. 5 株微囊藻伪空胞的临界破裂压力为 0.64 ~ 0.67 MPa 之间;孟氏浮游蓝藻伪空胞的临界破裂压力为 0.715 MPa,与深水湖泊或水库的蓝藻相比,6 株蓝藻的伪空胞平均临界破裂压力均较小;在相同光照和温度条件下,单细胞微囊藻的膨压比群体微囊藻的膨压略大.

关键词:伪空胞;毛细压力管;蓝藻;临界破裂压力

中图分类号: X524 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2695-05

Critical Collapse Pressure of Gas Vesicles in Six Strains of Cyanobacteria

CHU Zhao-sheng¹, YANG Bo^{1,2}, JIN Xiang-can¹, YAN Feng², ZHENG Shuo-fang¹, PANG Yan¹, ZENG Qing-ru²

(1. State Environmental Protection Key Laboratory for Lake Pollution Control, Research Center of Lake Eco-Environments, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2. Academy of Environment and Resources, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: Two methods including filtration (vacuity is 0.02 MPa) and centrifugation (< 500 r/min) were applied to concentrate algal biomass, and capillary compression tube and the concentrated algae suspensions, critical pressure distribution of gas vesicles in six cyanobacteria were also investigated. The results showed that unicellular *Microcystis aeruginosa* cells couldn't be concentrated effectively by filtration or centrifugation, but colony of *Microcystis wesenbergii* and *Microcystis flosaquae*, and filament of *Planktothrix mougeotii* could be concentrated by centrifugation and filtration respectively. Both filtration and centrifugation had a negligibly impact on gas vesicles content of cells, and the loss of gas vesicles was lower than 7%. The mean critical pressure values of five strains *Microcystis* were very close, which ranged from 0.64 to 0.67 MPa, and the mean critical pressure of *P. mougeotii* was 0.715 MPa. All of the six cyanobacteria were isolated from three shallow lakes and their mean critical pressure values were lower than those cyanobacteria that inhabit in deep lakes or reservoirs. At the same condition of illumination density and temperature, turgor pressures of two unicellular *Microcystis* were higher than those of colonial *Microcystis*.

Key words: gas vesicles; capillary compression tube; cyanobacterium; critical pressure

水华蓝藻一般具有伪空胞(gas vacuole),伪空胞是由一些刚性、两端锥形的、蛋白质构成的圆柱体气囊(gas vesicle)组成,能够为蓝藻细胞提供浮力^[1,2]. 伪空胞的这种浮力调节功能是蓝藻在富营养化水体中占据优势的主要因素之一^[3,4].

伪空胞的破裂是蓝藻进行浮力调节的一种重要方式.细胞内伪空胞破裂压力与气囊的直径(d)、伪空胞的临界破裂压力(p_c)以及细胞的膨压(p_i)有关.伪空胞平均临界破裂压力值由于物种的不同而变化.伪空胞破灭压力曲线(破裂压力的分配)能通过测量浊度或伪空胞体积的变化进行定量研究,气囊的平均直径可以通过平均临界破裂压力近似计算^[2,5].另外,细胞的膨压升高也会导致部分脆弱的伪空胞破裂^[6].

太湖和滇池是我国主要的淡水湖泊之一,蓝藻水华在这 2 个湖泊中很常见,目前鲜见关于其蓝藻伪空胞特征的报道.此外,对于某些群体或丝状的藻类的伪空胞压力破裂曲线的表征,应用浊度法测定伪空胞会产生一定偏差,而采用压力毛细管法精度高,但对藻液的浓度有较高要求^[7].

本研究针对不同形态的蓝藻,采用不同的浓缩方法对藻液进行了浓缩,检验浓缩过程对伪空胞测定结果的影响,并采用压力毛细管法,探讨了太湖、

收稿日期: 2007-01-22; 修订日期: 2007-03-09

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412301); 科研条件工作项目(JG-2004-24); 中日合作太湖水环境修复示范项目(JICA)

作者简介: 储昭升(1973~),男,副研究员,主要研究方向为湖泊富营养化及蓝藻水华, E-mail: chuzs@cras.org.cn

* 通讯联系人, E-mail: jinx@cras.org.cn

滇池及日本霞浦湖中 6 株水华蓝藻的压力破裂曲线,分析并比较其伪空胞的特征,以期为我国典型富营养化湖泊蓝藻伪空胞的测定及特性有更清楚的认识提供参照.

1 材料与方法

1.1 藻种培养

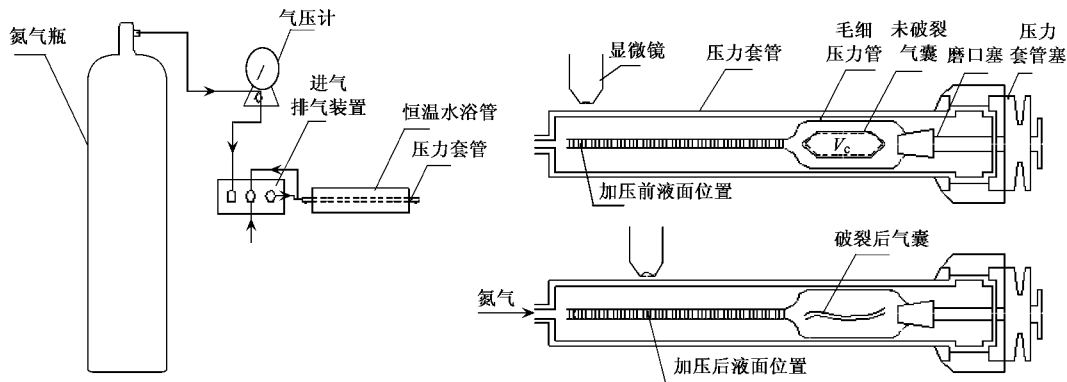
藻种:采用 3 个不同地域的 3 种 6 株蓝藻进行实验,铜绿微囊藻 I (*Microcystis aeruginosa* Kütz.)由 Dr. Yuhe Inamori 赠送,分离自日本霞浦湖;铜绿微囊藻 II,由太湖分离;惠氏微囊藻 [*Microcystis wesenbergii* (Kom.) Kom.]分离自太湖;水华微囊藻 I [*Microcystis flos-aquae* (Witt.) Kirchn.]分离自太湖;水华微囊藻 II 分离自滇池,孟氏浮游蓝丝藻 [*Planktothrix mougeotii* (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek]由 Dr. Yuhe Inamori 赠送,分离自日本霞浦湖.其中,铜绿微囊藻 I 和 II 呈分散单细胞形态,惠氏微囊藻和水华微囊藻 I 和 II 为小型群体状的微

囊藻,浮游蓝丝藻为丝状蓝藻.

培养:实验采用 M₁₁ 培养基,其组成为 1L 去离子水中含有 100 mg NaNO₃、10 mg K₂HPO₄、75 mg MgSO₄·7H₂O、40 mg CaCl₂·2H₂O、20 mg Na₂CO₃、6 mg 柠檬酸铁和 1mg Na₂EDTA·2H₂O. 将藻置于 500 mL 的三角瓶(200 mL 培养基)培养,温度为 28 ℃,光照强度 125 μmol·(m²·s)⁻¹,光暗比为 12 h:12 h,培养基的初始 pH 值为 8,接种量为 2×10⁴ cells·mL⁻¹. 待藻类生长进入对数期后进行相关实验.

1.2 伪空胞测定装置

伪空胞体积的测定采用毛细压力管法,装置为改进的 Walsby 伪空胞测定装置^[5],其中毛细管部分采用带刻度毛细管.图 1 为该装置的示意.藻液装入毛细压力管中(毛细压力管内不能有气泡),毛细压力管置于石英压力管中,待温度恒定后,使用氮气施加压力,从显微镜中读取毛细管处液面位置的变化.当伪空胞气体含量在 0.130~0.20 μL/mL 时,20 个样品的平均相对标准偏差为 3.4%.



V_c 表示伪空胞破裂前后的体积变化

图 1 伪空胞体积测定装置示意

Fig.1 Schematic diagram of gas vesicles measurement apparatus

1.3 浓缩方法

本实验采用 2 种不同的浓缩方法,即过滤浓缩与离心浓缩,对 6 株蓝藻藻液进行浓缩收集.过滤:取藻液 100 mL,采用直径为 50 mm、孔径为 1 μm 的玻璃纤维滤膜过滤,过滤压力为 0.02 MPa,边过滤边振荡,使沉降在滤膜上的藻细胞悬浮于培养液中,以达到浓缩的目的;离心:取藻液 200 mL,在 500 r/min 的离心力下离心 40 min,然后去掉上清液,定容至 20 mL.分别计数浓缩前后的藻细胞浓度,计算浓缩损失;采用压力毛细管法,分别测定浓缩前后藻细胞伪空胞含量.

1.4 压力破裂曲线

通过图 1 的伪空胞体积测定装置,采用压力毛细管法测定伪空胞的压力破裂曲线.用氮气逐步施加压力,通过毛细管中的液位变化直接得出伪空胞的体积,并计算各压力下伪空胞剩余百分含量,以伪空胞剩余百分含量-压力绘制出压力破裂曲线(临界破裂压力分配曲线).由压力破裂曲线可以得出伪空胞的平均临界破裂压力(p_c).

表观临界破裂压力:实验中取 2 mL 对数增长期藻液,采用毛细压力管法绘制出压力破裂曲线.此曲线得出的临界破裂压力为表观临界破裂压力(p_a).

临界破裂压力:实验中取 2 mL 对数增长期藻液,加入 2 mL 浓度为 1 mol·L⁻¹的蔗糖溶液去掉细胞的膨压,采用毛细压力管法绘制出伪空胞压力破裂曲线.此曲线得出的临界破裂压力为真实的临界破裂压力(p'_c).

伪空胞平均直径(d):根据 Walsby 的研究^[2],圆柱型结构伪空胞的平均直径 $d(\text{nm})$ 与平均临界破裂压力(MPa)存在如下近似关系:

$$p_c = 875 d^{-1.67}$$

(1)

式中, d 为伪空胞平均直径(nm).由平均临界破裂压力(p_c),通过公式(1)计算得出伪空胞的平均直径.

细胞的膨压(p_t):从压力破裂曲线得出表观临界破裂压力和真实临界破裂压力,细胞膨压与 p_a 、 p_c 存在如下关系:

$$p_t = p_c - p_a$$

(2)

由公式(2)可计算得出细胞膨压.

2 结果与分析

2.1 离心和过滤浓缩方法对细胞浓缩效果及对细胞伪空胞含量的影响

表 1 过滤和离心对 3 种蓝藻细胞内伪空胞体积(V_c)的影响

Table 1 Effect of filtration and concentration on cellular gas vesicle content(V_c)

蓝藻	V_c (过滤前)	V_c (过滤后)	损失率/%	V_c (离心前)	V_c (离心后)	损失率/%
铜绿微囊藻 I	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.01	4.0	0.49 ± 0.01	0.46 ± 0.01	7.0
惠氏微囊藻	1.12 ± 0.02	1.11 ± 0.05	3.0	1.12 ± 0.02	1.09 ± 0.03	3.0
浮游蓝丝藻 ¹⁾	4.06 ± 0.08	3.89 ± 0.09	4.0	4.06 ± 0.08	3.94 ± 0.04	3.0

1) 浮游蓝丝藻的浓度用吸光度值来表示,伪空胞体积用 $\times 10^{-8} \mu\text{L} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ 藻丝长度来表示; 2) 细胞内伪空胞体积 V_c 的单位为: $\times 10^{-8} / \mu\text{L} \cdot \text{cell}^{-1}$

2.2 6 株蓝藻伪空胞的临界破裂压力分配

当细胞受到一定的外压时,伪空胞会发生不可逆的破裂,细胞内的伪空胞在不同压力条件下破裂的程度不一样.本研究中的 6 株蓝藻在去掉细胞膨压前后的压力破裂曲线见图 2(图 2 中虚线所指示的压力为 50%伪空胞剩余时所对应的压力值,即平均临界破裂压力).通过压力破裂曲线,可以近似计算得到 6 株蓝藻伪空胞的平均临界破裂压力、平均伪空胞直径和细胞平均膨压,计算结果见表 2.在所研究的 6 株蓝藻中,不管是单细胞的微囊藻还是小群体的微囊藻,其伪空胞的平均临界破裂压力都比较接近,平均临界破裂压力为 0.65 MPa 左右,平均伪空胞直径为 75 nm,但是它们的膨压有区别:单细胞微囊藻的膨压明显高于小群体微囊藻.此外,浮游蓝丝藻的平均临界破裂压力要小于 4 株微囊藻的平均临界破裂

实验所用的 6 株蓝藻分别具有 3 种群体形态,即单细胞形态、多细胞不规则群体及藻丝.针对不同形态的蓝藻,不同的浓缩方法对藻细胞数造成的损失有明显的不同.采用过滤方法浓缩时,分散单细胞的铜绿微囊藻 I 细胞的损失达到了 60% 以上,以小群体状存在的惠氏微囊藻的细胞损失也达到了 50%,而丝状孟氏浮游蓝丝藻的细胞损失仅为 10% 左右.采用离心方法对 3 种不同形态的蓝藻进行浓缩时,分散单细胞的铜绿微囊藻 I 的细胞损失达到了 50% 以上,小群体惠氏微囊藻的细胞损失较小,降到 32% 左右,浮游蓝丝藻的细胞损失率最小,仅为 23.8%.

在本实验所设的过滤和离心条件下,浓缩过程对 3 种蓝藻伪空胞的影响都较小,损失最大也不过为 7% 左右(表 1),可以认为这 2 种方法对 3 种蓝藻伪空胞含量的影响可以忽略.比较以上 2 种方法,可以发现对于分散单细胞的微囊藻,在保证细胞伪空胞基本不破裂的情况下,无论是采用过滤还是离心的方法进行浓缩,都难以达到理想的效果;对于以小群体形态存在的微囊藻,可以采用离心的方法进行浓缩;对于丝状的蓝丝藻,宜采用过滤的方法进行浓缩.

压力,并且其膨压和单细胞的微囊藻的膨压接近.

表 2 6 株蓝藻伪空胞的平均临界破裂压力、气囊的平均直径和细胞膨压

Table 2 Values of p_a , p_c , d and p_t in six cyanobacterial strains

藻种	p_a/MPa	p_c/MPa	d/nm	p_t/MPa
铜绿微囊藻 I	0.287	0.653	75	0.366
铜绿微囊藻 II	0.331	0.658	74	0.327
惠氏微囊藻	0.375	0.642	75	0.267
水华微囊藻 I	0.426	0.658	74	0.232
水华微囊藻 II	0.429	0.664	74	0.235
浮游蓝丝藻	0.347	0.715	71	0.363

3 讨论

3.1 临界破裂压力与伪空胞直径

临界破裂压力是指能使伪空胞发生破裂而需要的压力的最小值,此压力值为伪空胞内外的最小压

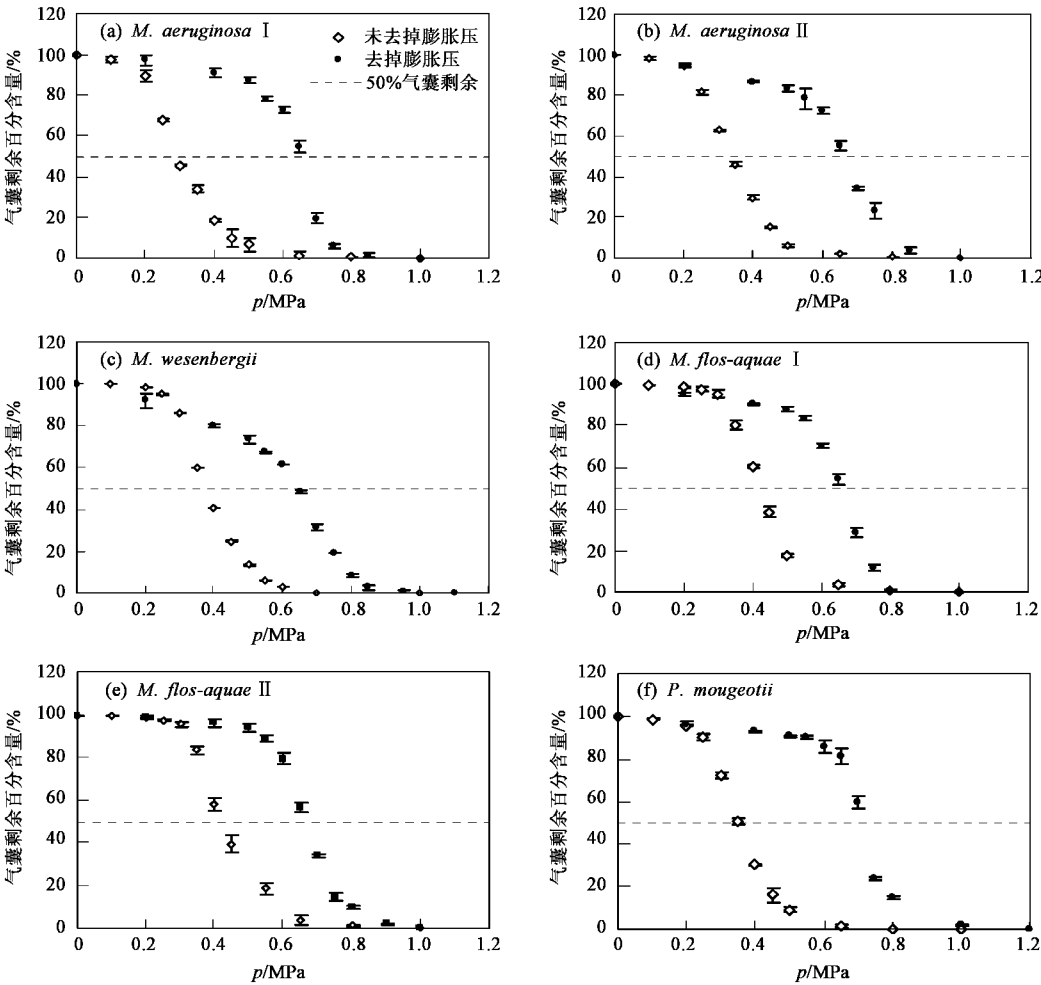


图 2 6 株蓝藻的临界破裂压力分配

Fig.2 Critical pressure distribution of gas vesicles in six cyanobacterial strains

力差^[2]. 伪空胞平均临界破裂压力值由于物种的不同而不同, 低的可以 < 0.1 MPa, 例如盐杆菌; 高的甚至可以超过 3.5 MPa, 例如海洋蓝藻. 在同一物种中, 平均临界破裂压力也会不同, 有时相差 2 ~ 3 倍^[2,8]. 造成这种差异的原因是由于伪空胞中的气囊的半径不同, 而与气囊的长度无关^[2,9]. 许多学者研究了不同物种伪空胞的平均临界破裂压力的变化. Walsby 等^[10]发现 *Aphanizomenon flosaque* 的平均临界破裂压力分别为 0.62 MPa 左右, 与本研究中的微囊藻的临界破裂压力值相近; 在某些浅水水库, Porat 等^[11,12]发现, 同一种蓝藻 *Aphanizomenon ovalisporumde* 的平均临界破裂压力分别为 0.56 MPa 和 0.58 MPa, 略低于本研究的值; 而在某些深水水库或湖泊, 某些蓝藻的临界破裂压力超过了 0.9 MPa^[8-10], 明显高于本研究的值.

Walsby 等^[13]指出伪空胞的平均临界破裂压力

与水体的深度有关, 而且这种关系是长期自然选择的结果. 在某些深水湖泊或水库, 蓝藻的伪空胞一般比较稳定, 具有较高的临界破裂压力, 在冬季气温较低或者营养缺乏时, 蓝藻能够调节浮力沉入湖底或者停留在较深的水位而不易被水柱压力压破. 而在某些浅水湖泊, 伪空胞的平均临界破裂压力一般较小. 太湖、滇池和霞浦湖为典型的浅水湖泊, 本研究中的蓝藻伪空胞的平均临界破裂压力较深水湖泊蓝藻的小.

3.2 临界破裂压力与膨压

许多因素(如温度、pH、盐分、表面活性剂和酶)能影响气囊中蛋白质的稳定性, 增加气囊的临界破裂压力. 然而, 最重要的因素是细胞的膨压. 蓝藻光合作用合成糖类化合物, 会使其膨压升高, 而膨压升高会导致细胞中一些脆弱的伪空胞破裂, 而使部分细胞丧失浮力^[2,6,11]. Porat 等^[12]和 Walsby 等^[2]指

出,当膨压小于平均临界破裂压力时,伪空胞也不会发生破裂.但是在本研究中,蓝藻伪空胞所受到的外力小于临界破裂压力时,也有部分伪空胞发生了破裂,惠氏微囊藻表现尤为明显[图 2(c)].可见,虽然本研究中的 6 株蓝藻平均临界破裂压力比膨压高,但膨压升高时,也可能会使平均临界破裂压力高的蓝藻伪空胞破裂,从而进行浮力调节.不过调节能力有限^[14],而且针对不同的蓝藻,调节的程度不一样.

此外,本研究发现,在相同的光照和温度条件下,单细胞微囊藻的膨压比小群体微囊藻的膨压大.微囊藻形成群体后,细胞之间对光会产生自遮蔽作用,因此,相对群体蓝藻,分散单细胞的蓝藻能更好地利用光,细胞内合成小分子物质含量较高,使膨压增大.

4 结论

(1)压力为 0.02 MPa 的过滤浓缩和离心力为 500 r/min 的离心浓缩方法对铜绿微囊藻、水华微囊藻、孟氏浮游蓝丝藻等 6 株蓝藻的伪空胞含量的影响较小.

(2)本研究中,6 株浅水湖泊蓝藻伪空胞的平均临界破裂压力比较接近,为 0.65~0.72 MPa 不等;在同等光照和营养条件下,分散单细胞微囊藻的膨压略大于群体的微囊藻.

参考文献:

[1] Oliver R L, Ganf G G. Freshwater Blooms [A]. In: Whitten B A, Potts (Eds.). The Ecology of Cyanobacteria [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. 149~194.
[2] Walsby A E. Gas vesicles [J]. Microbiol Rev, 1994, 58: 94~144.
[3] Dokulil M T, Teubner K. Cyanobacterial dominance in lakes [J].

Hydrobiologia, 2000, 438: 1~12.
[4] Irene K E, Brunberg A K. The importance of shallow sediments in the recruitment of *Anabaena* and *Aphanizomenon* (Cyanophyceae) [J]. Journal of phycology, 2004, 40: 831~836.
[5] Walsby A E, Kinsman R, George K I. The measurement of gas vesicle volume and buoyant density in planktonic bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 1992, 15: 293~309.
[6] Kinsman R, Ibelings B W, Walsby A E. Gas vesicle collapse by turgor pressure and its role in buoyancy regulation by *Anabaena flos-aquae* [J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 1171~1178.
[7] 储昭升, 金相灿, 杨波, 等. 不同群体形态蓝藻的伪空胞与光的相互作用 [J]. 环境科学学报, 2006, 26(11): 1909~1913.
[8] Bright D I, Walsby A E. The relationship between critical pressure and width of gas vesicles in isolates of *Planktothrix rubescens* from Lake Zürich [J]. Microbiology, 1999, 145: 2769~2775.
[9] Peter G D, Walsby A E. The diameter and critical collapse pressure of gas vesicles in *Microcystis* are correlated with GvpCs of different length [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247: 37~43.
[10] Walsby A E, Bleything A. The dimension of cyanobacterial gas vesicles in relation to their efficiency in providing buoyancy and withstanding pressure [J]. J Gen Microbiol, 1988, 134: 2635~2645.
[11] Porat R, Teltsch B, Dubinsky Z, et al. Effect of light and pressure on gas vesicle formation and buoyancy in *Aphanizomenon ovalisporum* Forti (Cyanobacteria) from Lake Kinneret, Israel [J]. Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol, 2005, 55: 333~348.
[12] Porat R, Teltsch B, Perelman A, et al. Diel buoyancy changes by the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from a shallow reservoir [J]. Journal of Plankton Research, 2001, 23: 753~763.
[13] Walsby A E, Avery A, Schanz F. The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zurich, Switzerland [J]. J Plankton Res, 1998, 20: 1357~1375.
[14] Chu Z S, Jin X C, Yang B, et al. Buoyancy regulation of *Microcystis flos-aquae* during phosphorus-limited and nitrogen-limited growth [J]. Journal of Plankton Research, 2007, 29: 739~745.