杯棕鞭藻对微囊藻的摄食与毒素降解作用

冯 然

温州大学生命与环境科学学院,浙江 温州

收稿日期: 2025年5月8日; 录用日期: 2025年6月4日; 发布日期: 2025年6月12日

摘要

目的:研究在高密度比(1:50)下杯棕鞭藻对铜绿微囊藻的摄食效率、降解藻毒素(MC-LR)效率以及该过程中的生理代谢变化。方法:通过室内微囊藻和杯棕鞭藻共培养试验,测定二者在不同时期密度变化以及谷胱甘肽(GSH)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性。结果:本研究发现并分离纯化一株可以摄食 微囊藻的棕鞭藻,经形态学特征鉴定为Poterioochromonas属的杯棕鞭藻Poterioochromonas malhamensis,通过室内实验发现,杯棕鞭藻在降解过程中通过增加GSH含量、SOD和CAT活性,加速藻毒素降解速率并减少活性氧(ROS)和MC产生的氧化损伤。结论:杯棕鞭藻可以通过改变其自身生理代谢过程来摄食微囊 藻并降解藻毒素,以上研究对合理利用生物策略控制微囊藻水华具有关键指导意义。

关键词

杯棕鞭藻,铜绿微囊藻,藻毒素

The Grazing and Microcystin Degradation Effects of *Poterioochromonas malhamensis* on *Microcystis aeruginosa*

Ran Feng

College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou Zhejiang

Received: May 8th, 2025; accepted: Jun. 4th, 2025; published: Jun. 12th, 2025

Abstract

Objective: The study investigates the grazing efficiency of *Poterioochromonas malhamensis* on *Microcystis aeruginosa* under high density ratio (1:50), its microcystin (MC-LR) degradation efficiency, and the changes of physiological metabolic during this process. Methods: Co-culture experiments of *Microcystis aeruginosa* and *Poterioochromonas malhamensis* were conducted under laboratory

conditions. Temporal variations in cell densities, glutathione (GSH) content, as well as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were measured. Results: A strain of *Poterioochromonas malhamensis* capable of grazing *Microcystis aeruginosa* was isolated and purified, which was morphologically identified as *Poterioochromonas malhamensis*. Laboratory experiments revealed that during the degradation process, *Poterioochromonas malhamensis* enhanced GSH content and increased SOD and CAT activities, thereby accelerating MC degradation rate and mitigating oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS) and MC. Conclusion: *Poterioochromonas malhamensis* can graze *Microcystis aeruginosa* and degrade algal toxins by modulating its physiological metabolic processes. These findings provide critical guidance for developing biological strategies to control blooms of *Microcystis aeruginosa*.

Keywords

Poterioochromonas malhamensis, Microcystis aeruginosa, Microcystin

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

1. 材料与方法

1.1. 实验藻类的培养

实验所用铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*, PCC905),购于中国科学院淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, FACHB),将两种藻种分别置于无菌 BG11 培养基中,于光照培养箱中培养,培养条件如下:光暗比 12 h:12 h (L:D),光照强度 40 µmol m⁻²s⁻¹photons,温度为 26℃。

1.2. 棕鞭藻的分离纯化与鉴定

(1) 棕鞭藻的分离纯化

本研究实验前期发现一种能够使产毒铜绿微囊藻死亡的藻类,将其转移至含无菌 BG11 培养基的孔板中于光照培养箱中扩大培养,以备后续实验使用。

(2) 棕鞭藻的形态鉴定



Figure 1. Microscopic picture of the *Poterioochromonas malhamensis* A: *Poterioochromonas malhamensis* morphology under light microscope; B: Feeding state diagram of *Poterioochromonas malhamensis*; C: Aggregated lorica; D: Previously identified microscopic images of *Poterioochromonas malhamensis* under optical microscopy; E: Images of capsule shells aggregated into clusters in previous studies

图 1. 杯棕鞭藻的显微镜图片(A):光学显微镜下的杯棕鞭藻形态图;(B):杯棕鞭藻的摄食 状态图;(C):聚集的囊壳;(D):以往研究已确定的杯棕鞭藻光学显微镜图片;(E):以往 研究中囊壳聚集成群体图片 运用倒置显微镜(ZEISS)对纯化后的微藻进行形态观察,并用数码相机及显微镜拍摄软件(Axiocam 820 color 成像系统)对该藻进行拍摄,结果如图1所示,该藻细胞外体透明、细胞器呈黄褐色具有两个色素体、无细胞壁、可自由游动,整体大多呈圆形或卵圆形,没有眼点;每个细胞有两根长短不等的鞭毛; 长鞭毛是体长的1~1.5倍,短鞭毛在显微镜下有时很难观察到,细胞长度6~18 µm (如图1 (A)),该藻株 可同时摄食 10 个以上的微囊藻细胞(如图 1(B))。该藻株在显微镜下可观察到游离囊壳的聚集现象(图 1 (C))。并与以往研究中确定的藻株比对[10] (图 1(D)、(E)),最终确定本研究发现的微藻为金藻门金藻纲棕 鞭藻目棕鞭藻科杯棕鞭藻属杯棕鞭藻 Poterioochromonas malhamensis。

1.3. 实验过程与方法

1.3.1. 预处理

取足够密度和体积的铜绿微囊藻和杯棕鞭藻同时加入氨苄青霉素(100 μg/mL)、卡那霉素(50 μg/mL) 和硫酸链霉素(50 μg/mL),过夜培养一天后(排除细菌的干扰),使用离心法(8000 rpm, 10 min)将杯棕鞭藻 和铜绿微囊藻中的抗生素去除。

1.3.2. 实验过程

本实验设置微囊藻初始密度为 10⁷ cell/mL,将杯棕鞭藻按照 1:50 (杯棕鞭藻:微囊藻)的密度比接种于 含有 100 mL 微囊藻的 500 mL 锥形瓶中,均设置三组平行。实验期间,测定和观察 0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 的微囊藻和杯棕鞭藻的密度、聚团情况,来反映微囊藻的生长情况和杯棕鞭藻的摄食能力,确 定最佳摄食效率时二者的密度比,并在最佳密度比下,每 24 h 测定微囊藻毒素(MC-LR)和 GSH 含量、超 氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶活性(CAT)和 ROS 水平变化。

1.4. 指标测定

(1) 密度计算

每 12 h 取 1 mL 溶液使用 2% 鲁戈试剂固定至少 6 h,随后利用 0.1 mL 的浮游藻类计数框按照中华人 民共和国国家生态环境标准法对杯棕鞭藻和铜绿微囊藻进行计数。

(2) MC-LR 测定

胞内和胞外 MC-LR 含量测定采用铜绿微囊藻毒素酶联免疫(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)试剂盒,具体的检测步骤参照试剂盒说明书,使用酶标仪测定 450 nm 时的微囊藻毒素含量。

(3) ROS 含量测定

利用活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)每 24 h 测定一次,装载探针后使用激光共聚焦显微镜直接观察。

(4) 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶活性(CAT)测定

使用过氧化氢酶(Catalase, CAT)试剂盒,每 24 h 测定一次样品,具体检测步骤参照试剂盒说明书,使用酶标仪测定 405 nm 时的微囊藻毒素含量。

(5) 谷胱甘肽(GSH)含量的测定

使用还原型谷胱甘肽(reduced glutathionem, GSH)试剂盒每 24 h 测定一次样品,使用酶标仪在吸光度 412 nm 波长处测定 GSH 含量。

以上所有试剂盒均来自上海酶联生物(Enzyme-Linked Biotechnology, Shanghai, China)。

1.5. 数据处理与统计分析

本文统计数据(包括图表)均为平均值 ± 标准差(n = 3)的形式,采用 GraphPad Prism 9 对数据结果进

行分析和绘图;采用方差分析研究杯棕鞭藻对微囊藻降解效率的影响。

2. 结果

2.1. 杯棕鞭藻对藻毒素的摄食效率

当杯棕鞭藻:微囊藻的密度比为 1:50 时,杯棕鞭藻的密度随时间逐渐增加,60 h 时达到最大密度;微 囊藻的密度在 12 h 后出现大幅度降低,最终在 72 h 时杯棕鞭藻对微囊藻的摄食效率为 96% (如图 2)。



Figure 2. The density changes of *P. malhamensis* and *M. aeruginosa* at 1:50 图 2. 1:50 时杯棕鞭藻和微囊藻的密度变化

2.2. 杯棕鞭藻对藻毒素的降解效率

本实验研究的杯棕鞭藻可以在摄食微囊藻同时降解藻毒素(如图 3)。对照组胞内和胞外微囊藻毒素含量随着生长时间延长逐渐增加,胞内藻毒素含量从 800 µg/L 增加到 865 µg/L。处理组中,胞内微囊藻毒素在 24h 内藻毒素含量持续降低,降解率达到 45%,而在 36h 胞内藻毒素增加到 590 µg/L,随后又随着处理时间增加逐渐下降,在处理 72h 时胞内藻毒素降解率为 42%;胞外藻毒素含量自处理开始到 36h 逐渐增加,36h 胞外藻毒素含量达 79 µg/L,随后逐渐下降,并在处理 72h 时达到最低值,同时该时间降解率最高,为 80%。



Figure 3. Changes in the content of intracellular and extracellular MCs when the density ratio of *Poterioochromonas* and *M. aeruginosa* was 1:50. "***" denoted an extremely significant difference between control and grazing treatment (P < 0.001), "**" denoted highly significant difference (P < 0.01)

图 3. 杯棕鞭藻和微囊藻密度比为 1:50 时胞内和胞外藻毒素的含量变化。"***"表示处理组与对照组间极其显著的 差异(*P* < 0.001), "**"表示处理组与对照组间极显著的差异(*P* < 0.01)

2.3. GSH 含量

在杯棕鞭藻降解藻毒素过程中,GSH 含量变化如图 4 所示,单独培养的微囊藻在试验期间 GSH 含量为 5.5~5.8 μM/mL,各处理时期差异不显著(P > 0.05);而杯棕鞭藻和微囊藻以 1:50 的初始密度共培养处理后,处理组的 GSH 含量在 48 h 内活性逐渐增加,由初始的 5.5 μM/mL 增加到 12.56 μM/mL,随后在 72 h 时 GSH 含量增加至最高,为 17.2 μM/mL。此外,除了处理开始时期(0 h)外,处理组中 GSH 含量在 各时期均显著高于对照组。



Figure 4. Changes in GSH content at a density ratio of 1:50 between *P. malhamensis* and *M. aeruginosa.* "***"denoted an extremely significant difference between control and grazing treatment (P < 0.001), "*" denoted significant difference (P < 0.01) **图 4.** 杯棕鞭藻和微囊藻密度比为 1:50 时 GSH 的含量变化。 "***"表示处理组与对照组间极其显著的差异(P < 0.001), "*"表示处理组与对照组间显著的差异(P < 0.01)

2.4. ROS、SOD 和 CAT 活性

如图 5 所示,在实验处理 12 h 后荧光强度(ROS 含量)最高,随着处理时间增加 ROS 荧光强度逐渐降低,直至最后在 72 h 时完全消失。



Figure 5. Changes in reactive oxygen species when the density ratio of *P. malhamensis* and *M. aeruginosa* was 1:50 图 5. 杯棕鞭藻和微囊藻密度比为 1:50 时活性氧的变化

如图 6 所示,单独培养的微囊藻各处理时间之间 SOD 和 CAT 活性无显著差异(P>0.05),并保持在

较低水平;而杯棕鞭藻和微囊藻以 1:50 的初始密度共培养处理后,SOD 活性在 48 h 时达到最高值,为 58 U/mg proteins,到 72 h 时活性降低至 36 U/mg proteins;在所有处理时间,杯棕鞭藻和微囊藻混合培养 SOD 活性均显著大于对照组。对照组的 CAT 活性在 72 h 内有所增加但差异不显著(*P* > 0.05),处理组的 CAT 活性在 24 h 增加到最高,为 1.25 U/mg proteins,而后随着处理时间逐渐降低,至 72 h 出现最低值,为 0.4 U/mg proteins;除 0 h 和 72 h 外,其他处理时间内杯棕鞭藻和微囊藻混合培养 CAT 活性均显著大于对照组。



Figure 6. Changes in SOD and CAT contents at a density ratio of 1:50 between and *P. malhamensis* and *M. aeruginosa.* "***" denoted an extremely significant difference between control and grazing treatment (P < 0.001), "**" denoted highly significant difference (P < 0.01), and "ns" represents no significant difference (P > 0.05) **图 6.** 杯棕鞭藻和微囊藻密度比为 1:50 时 SOD 和 CAT 含量变化图。"***" 表示处理组与对照组间极显著的差异(P < 0.001), "**" 表示处理组与对照组间极显著的差异(P < 0.01), "ns" 表示处理组与对照组间无差异(P > 0.05)

3. 讨论

已有研究证实,杯棕鞭藻可以摄食铜绿微囊藻[11],本实验的杯棕鞭藻可以啃食并消化微囊藻,同时 通过增加 GSH 含量和 SOD 和 CAT 活性来摄食过量的 ROS 并降解摄入体内的藻毒素。

微囊藻在被摄食的 12 h 内 ROS 荧光强度最高,说明微囊藻在此时受到较强的牧食压力,导致其产 生较多的 ROS。抗氧化酶系统如 SOD、CAT 等可以有效清除细胞内产生的过量 ROS。实验中 CAT 活性 在 12 h 到 24 h 时持续增加,同时 SOD 活性在 12 h 时也大幅增加(图 6),这可能是因为 ROS 的增加导致 杯棕鞭藻体内抗氧化系统被激活,从而利用 CAT 和 SOD 有效清除 ROS。而 ROS 荧光强度在 24 h 之后 开始显著降低,至 48 h 和 72 h 几乎消失,原因可能是因为此时微囊藻已被杯棕鞭藻完全摄食,导致无法 再继续产生 ROS;此外杯棕鞭藻 SOD 活性在 48 h 仍维持在较高水平,有效清除了大量的 ROS。

以往研究发现,杯棕鞭藻在摄食微囊藻后,GSH 途径会被快速激活。在本研究中,杯棕鞭藻摄食微 囊藻时,GSH 含量显著增加(图 4),说明此时棕鞭藻会通过增加体内 GSH 含量提高其对藻毒素的耐受性 以及降解藻毒素效率。Zhang [12]等通过转录组学结果发现,杯棕鞭藻可以在其体内将藻毒素与谷胱甘肽 结合生成毒性较小的 GSH-MC 复合物,达到降解藻毒素的目的。因此,本研究中 GSH 含量的增加可能 是杯棕鞭藻降解藻毒素的重要生理途径之一。

此外,GSH 同样可以清除过量 ROS。以往研究表明,GSH 水平的大幅增加会增强氧化应激的程度 [9]。因此,我们认为杯棕鞭藻在培养初期产生更多的 GSH 可以诱导其他抗氧化酶(SOD 和 CAT)活性的 增加。当微囊藻被摄食完全后,GSH 含量增加到最高,因为此时杯棕鞭藻的密度达到较高水平,用于清 除摄入的藻毒素和剩余的藻毒素。

4. 结论

本实验分离纯化得到一株可有效摄食微囊藻的杯棕鞭藻(Poterioochromonas malhamensis),研究了杯 棕鞭藻在高密度微囊藻环境中的降解效率,实验结果表明,杯棕鞭藻对胞内藻毒素的降解率达到 42%, 胞外藻毒素的降解率高达 80%。在藻毒素降解过程中,ROS 水平上升。与此同时,SOD 和 CAT 含量也 显著上升。此外,实验还发现 GSH 含量在藻毒素降解期间显著增加,参与杯棕鞭藻的解毒过程。

参考文献

- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H. and Visser, P.M. (2018) Cyanobacterial Blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 471-483. <u>https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1</u>
- [2] 姜锦林, 宋睿, 任静华, 等. 蓝藻水华衍生的微囊藻毒素污染及其对水生生物的生态毒理学研究[J]. 化学进展, 2011, 23(1): 246-253.
- [3] Badar, M., Batool, F., Khan, S., *et al.* (2017) Effects of Microcystins Toxins Contaminated Drinking Water on Hepatic Problems in Animals (Cows and Buffalos) and Toxins Removal Chemical Method. *Buffalo Bulletin*, **36**, 43-55.
- [4] Smith, J.E., Widmer, J.A., Wolny, J.L., Dunn, L.L., Stocker, M.D., Hill, R.L., et al. (2024) Persistence of Microcystin in Three Agricultural Ponds in Georgia, USA. Toxins, 16, Article No. 482. <u>https://doi.org/10.3390/toxins16110482</u>
- [5] Chen, S., Xie, W., Lin, X., Zhou, H., Teng, S., Jiang, Z., et al. (2024) Controlling Toxic Microcystis Blooms: The Power of a Novel Microalgal Predator Poteriospumella lacustris in Water Safety Improvement. Journal of Cleaner Production, 441, Article ID: 141011. <u>https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.141011</u>
- [6] Smith, V.H. (1983) Low Nitrogen to Phosphorus Ratios Favor Dominance by Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. Science, 221, 669-671. <u>https://doi.org/10.1126/science.221.4611.669</u>
- [7] Holen, D.A. (1994) Physiological Studies of Mixotrophy in the Algal Flagellate *Poterioochromonas malhamensis* (Chryso-Phyceae) Using Batch and Continuous Cultures.
- [8] Tang, J., Li, J., Mo, Y., Safaei Khorram, M., Chen, Y., Tang, J., *et al.* (2020) Light Absorption and Emissions Inventory of Humic-Like Substances from Simulated Rainforest Biomass Burning in Southeast Asia. *Environmental Pollution*, 262, Article ID: 114266. <u>https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114266</u>
- [9] 张露. 原生动物棕鞭毛虫清除有毒微囊藻的环境效应及其降解藻毒素机制的研究[D]: [博士学位论文]. 南京: 南 京师范大学, 2019.
- [10] 陈嫚, 马明洋, 王红霞, 等. 混合营养型马勒姆杯棕鞭藻的重描述及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2020, 44(5): 1130-1142.
- [11] Yan, H., Li, Q., Chen, B., Shi, M. and Zhang, T. (2022) Identification and Feeding Characteristics of the Mixotrophic Flagellate *Poterioochromonas malhamensis*, a Microalgal Predator Isolated from Planting Water of *Pontederia cordata*. *Environmental Science and Pollution Research*, **29**, 40599-40611. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-022-18614-3</u>
- [12] Zhang, L., Lyu, K., Wang, N., Gu, L., Sun, Y., Zhu, X., et al. (2018) Transcriptomic Analysis Reveals the Pathways Associated with Resisting and Degrading Microcystin in Ochromonas. *Environmental Science & Technology*, 52, 11102-11113. <u>https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03106</u>