

# UV-B增强对南极蓝藻形态和超微结构影响的研究

刘鹏<sup>1</sup>, 缪锦来<sup>2</sup>, 阚光锋<sup>1</sup>, 张波涛<sup>2</sup>, 李光友<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局 海洋生物活性物质重点实验室, 山东青岛 266061)

**摘要:** 采用两种微藻分离方法对本实验室在第18次南极考察采集的南极海冰和海水样品进行南极冰藻分离, 得到包括1株南极蓝藻在内的8种南极冰藻。该蓝藻(南极蓝藻-B)的生长曲线表明, 0~6 d有一个明显的延滞期, 第6天进入对数生长期, 第20天达到生长稳定期。紫外辐射增强后, 南极蓝藻的形态和超微结构都发生了显著变化: 细胞个体明显增大、细胞壁变厚、片层结构更加明显、多糖和脂肪颗粒数目增多。并发现了紫外辐射后的蓝藻向培养液中大量分泌物质的现象。这些现象表明, 虽然南极地区紫外线辐射很强, 但南极蓝藻可以产生多种抗紫外辐射的活性物质来适应这种极端环境。

**关键词:** 南极蓝藻; UV-B 辐射; 形态; 超微结构

**中图分类号:** Q94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096-(2004)05-0021-05

最近在南极水域进行的测量表明, UV-B 辐射的增加使上层 10~20 m 内的光合作用减少了 25%<sup>[1]</sup>。尽管如此, 已有研究表明, 南极冰藻在紫外增强后产生了明显的生理变化以适应环境的变化: 酶活改变、色素组成有所改变、产生新的具有抗紫外辐射活性物质等<sup>[2]</sup>。此外, 有许多研究发现, 南极冰藻在较强的紫外辐射条件下能产生一类抗辐射的物质 MAAs, 它们在 310 nm 左右有强烈的光吸收, 而且可以分泌到培养液中, 作为抵御紫外辐射的屏障<sup>[3, 4]</sup>。

蓝藻(Cyanophyceae)是一类能够进行光合放氧的原核微生物, 包括单细胞和丝状体两种类型。1989年、1990年南半球夏季, 宁修仁等<sup>[5]</sup>在自 Valparaiso 至 Melbourne 的南太平洋、南大西洋和南印度洋的广阔海域都观测到了蓝藻的分布。但是在实验室从南极海水中分离纯化和培养南极蓝藻的工作, 以及南极蓝藻的结构和生理生化组成方面的研究工作还未见任何报道。

作者采用不同方法分离、纯化南极冰藻, 得到了包括 1 株南极蓝藻在内的 8 株南极冰藻, 这也是国内外首次分离纯化和培养出南极蓝藻。作者初步研究了这株南极蓝藻的生长规律, 着重探讨南极蓝藻在 UV-B 增强后形态和超微结构方面的变化,

为更深入研究南极蓝藻的抗辐射活性物质的结构及其抗紫外线辐射机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 南极海水和海冰样品

作者所用的南极海水水样和海冰样品是由国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室于 2001 年 10 月~2002 年 4 月在中国第 18 次南极科学考察时采集的, 共 5 瓶, 标号为: 浮冰 1(68°30' E, 65°00' S), 浮冰 2(71°45' E, 66°15' S), 浮冰 3(74°15' E, 68°30' S), 中锚垂直网(76°45' E, 69°00' S), 中外锚(76°30' E, 68°30' S), 以此海水水样和海冰样品进行南极冰藻的分离和鉴定。

#### 1.1.2 培养基

采用 f/2 培养基, 主要成分(mg/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15;  $\text{NaNO}_3$  15;  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.4; 尿素 20。于 120 条件下灭菌 15 min。固体培养基加 1.5% 的琼脂。

收稿日期: 2003-02-27; 修回日期: 2003-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40206022)

作者简介: 刘鹏(1978-), 男, 中国海洋大学硕士研究生, E-mail: liupeng1235@163.com

## 1.2 方法

### 1.2.1 南极蓝藻的分离

#### 方法1：显微镜镜检分离法

首先将海水水样或海冰样品扩大培养,达到一定藻密度后,取适量藻液离心,将离心后的藻液加少许无菌海水稀释。然后在无菌操作台上,用灭菌后的牙签蘸1小滴藻液,点在无菌的载玻片上,在显微镜下镜检分离。牙签上的藻液需要极少,确保有1~2个藻细胞,若细胞数量过多,则藻液需要进一步稀释。将带有1~2个藻细胞的小玻璃片用灭菌过的毛细滴管(将滴管的一端在酒精喷灯上拉成合适孔径的毛细管,另一端加上胶头)将一个藻细胞移至试管中。试管事先灭菌并含有液体培养基。将试管置于光照培养箱中,设置好光强、温度和光周期,每日摇动数次,进行培养。

#### 方法2：平板划线法

采用f/2培养基,加1.5%的琼脂,在培养皿中制成平板。取少量藻液,在平板上划线,然后用封口膜将培养皿封住,此过程在超净工作台上进行。将培养皿置于光照培养箱中,设置好光强、温度和光周期,进行培养。

### 1.2.2 南极蓝藻-B生长曲线的测定

将分离出来的南极蓝藻-B接种于100mL的三角烧瓶中,接种量为20%,在光照培养箱中培养。培养至对数生长期,摇匀,取25mL一定浓度南极蓝藻培养液,接入分别装有100mL配制好的f/2培养基的60个250mL三角烧瓶中,在低温光照培养箱内培养,温度为 $4 \pm 1$ ,培养光强为1300~1900lx,光照周期D:H为12h:12h。不充气,每日摇动3次,每隔48h取出3瓶,分别用烘干至恒重的滤纸抽滤,85℃烘干至恒重并精确称量得到藻体干重,取平均值作生长曲线。

### 1.2.3 南极蓝藻-B的光镜观察

蓝藻的染色和观察参照孟繁艳的方法<sup>[7]</sup>。

### 1.2.4 紫外辐射培养

将处于生长稳定期的南极蓝藻-B接种于100mL的器皿中(接种量为20%),白光(滤除UV-B和UV-C)光源,光强为1300~1900lx(JD-3型光照度计,上海市嘉定学联仪表厂);两根8W的UV-B(312nm)灯管(北京师大光电仪器厂制造),UV-B灯管用乙酸纤维素薄膜(上海生化试剂公司,厚度为0.12mm)包被,以除去280nm以下的短波辐射,离培养皿20cm,辐照光强为 $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$

(UV-B型紫外辐照计,北京师大光电仪器厂,该辐照强度与南极地区夏季地面的紫外强度相当),紫外光照周期为12h:12h。不充气,每日摇动3次。无紫外辐照,其它条件相同,为对照组。

### 1.2.5 扫描电镜观察南极蓝藻-B细胞形态

南极蓝藻-B培养液以3000r/min的转速离心3min后,用2.5%的戊二醛(0.1mol/L磷酸缓冲液配制,pH=7.2)固定,以0.1mol/L磷酸缓冲液洗涤3次,乙醇(50%~100%)逐级脱水,临界点干燥,喷涂机涂金,最后用HITACHIHS-450型扫描电子显微镜观察并拍照。

### 1.2.6 透射电镜观察南极蓝藻细胞超微结构

南极蓝藻-B培养液以3000r/min离心3min后,用2.5%的戊二醛(0.1mol/L磷酸缓冲液配制,pH=7.2)固定,以0.1mol/L的磷酸缓冲液洗涤3次,用1%的锇酸(0.1mol/L磷酸缓冲液配制,pH=7.4)于4℃保存3h,用乙醇以10%的递增率逐级脱水,环氧树脂渗透、包埋,LKB-NOVA型超薄切片机切片,柠檬酸铅染色,以HITACHIHS-7000型电镜观察并拍照。

## 2 实验结果

### 2.1 南极冰藻分离结果

同时采用显微镜镜检分离法和平板划线法从南极海水水样和海冰样品中共分离出8种微藻,初步鉴定结果如下。

硅藻4种,分别为:*Biddulphia* sp., *Coscinodiscus* sp., *Fragilaria* sp.和*Nitzschia* sp.;绿藻2种,一种为塔胞藻(*Pyramimonas* sp.),另一种为衣藻(*Chlamydomonas* sp.)。另有甲藻1种, Dinophyceae-J;蓝藻1种, Cyanophyceae-B,后

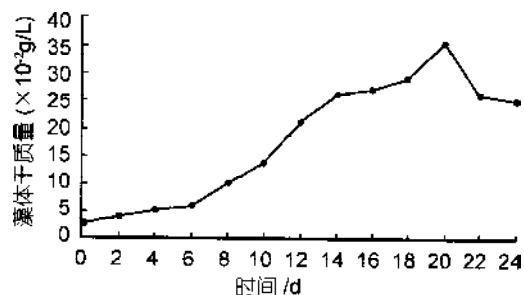


图1 南极蓝藻的生长曲线

Fig.1 Growth curve of Antarctic ice algae Cyanophyceae-B

两种目前未鉴定到属。

## 2.2 南极蓝藻 -B 的生长曲线

如图 1 所示, 南极蓝藻 -B (Cyanophyceae B) 的生长存在延滞期、对数期、稳定期、衰亡期, 0~6 d 有一个明显的延滞期, 第 6 天进入对数生长期, 细胞浓度在第 20 天达到最大, 以后进入稳定生长期。

## 2.3 南极蓝藻 -B 光镜观察结果

该蓝藻细胞按生长阶段分两种形态, 单细胞和丝状体。单细胞多呈棒形, 少数椭圆形。自然状态下胞体呈淡黄色半透明, 染色后可见中心质部分呈深蓝色。丝状体较直, 无分枝, 藻丝顶端无毛丝体。有鞘, 水封装片中胶质鞘呈黄绿色, 染

色后胶质鞘被染成蓝色。细胞大都呈矩形, 相邻细胞以长边相连, 横隔壁无缢缩。

紫外培养后观察到, 无论丝状体还是单细胞个体都较大, 单细胞呈现椭圆、矩形或梭形等多种形状, 丝状体相邻细胞间的缢缩更加明显。胶质鞘比较厚, 部分细胞破裂死亡。

## 2.4 南极蓝藻扫描电镜观察结果

南极蓝藻 -B 的扫描电镜结果见图 2, 与对照组的同期细胞相比, 紫外辐射组的细胞个体增大, 由原来的  $0.5 \sim 1.4 \mu\text{m} \times 0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$  变为  $6 \sim 27 \mu\text{m} \times 1 \sim 9 \mu\text{m}$ ; 形状也有所改变, 部分细胞表面可见颗粒状物 (图 2-2 中黑箭头所示)。

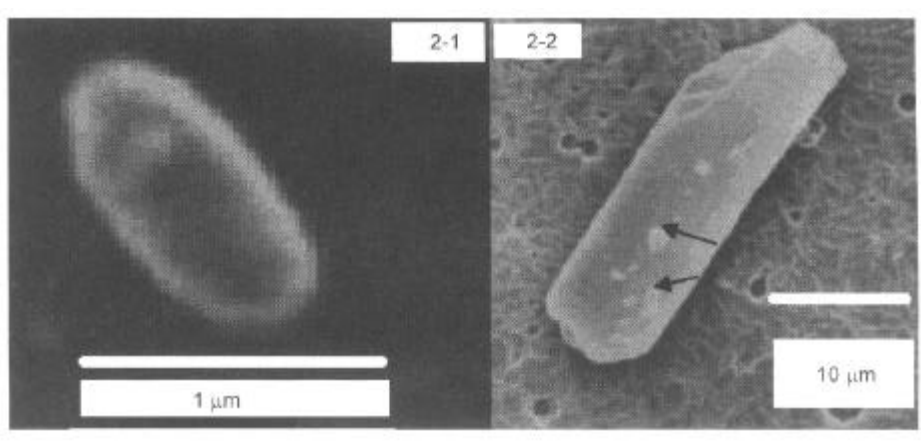


图 2 南极蓝藻 -B 紫外辐射增强前后的表面形态

Fig.2 The Morphology of Antarctic ice algae Cyanophyceae B before and after UV-B radiation enhancement

2-1. 对照组蓝藻细胞扫描电镜图; 2-2. 紫外辐射后蓝藻细胞扫描电镜图

2-1. for the SEM observation of Cyanophyceae-B as control; 2-2. for the SEM observation of Cyanophyceae-B after UV-B radiation enhancement

## 2.5 南极蓝藻 -B 透射电镜观察结果

南极蓝藻 -B 的透射电镜结果见图 3, 与对照组的同期细胞相比, 紫外辐射后, 细胞个体和细胞壁厚度都明显增大: 细胞直径由原来的  $1.5 \sim 2.6 \mu\text{m}$  变为  $7.5 \sim 25 \mu\text{m}$ , 细胞壁厚度由原来的  $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$  增长为  $0.2 \sim 0.6 \mu\text{m}$ 。每个细胞内可见的脂肪颗粒 (图 3 中黑色大颗粒 L) 由对照组的 1~2 个增加到 5 个以上。多糖类颗粒 (图 3 中白色小颗粒 P) 也增多, 尤其是紧贴细胞膜的区域, 这种变化更加明显。一些细小黑色颗粒 (图 3 中黑色小颗粒 B) 所占比例有所减少, 但可以看见一些某些细小的雾状物质 (图 3 中 S)。一些褶皱状的片层结构 (图 3 中 G) 更加明显。

## 3 讨论

### 3.1 两种分离方法的比较

方法 1 (显微镜镜检分离法) 的优点是在显微镜下操作, 精确度高, 范围广, 分离的周期相对较短, 而且易于培养。缺点是操作过程需要高度集中精力, 工作量大; 用牙签蘸取的水滴必须确保其中所含的单细胞藻是同一种类。

方法 2 (平板划线法) 的优点在于分离过程简单, 并且在一定程度上可以将细菌分离掉。该方法的缺点在于分离周期太长; 有些冰藻群落两种或多种单胞藻混杂生长, 需要反复多次分离; 另外, 在培养过程中, 冰藻的生长状况不如第一种方法, 甚至有些冰

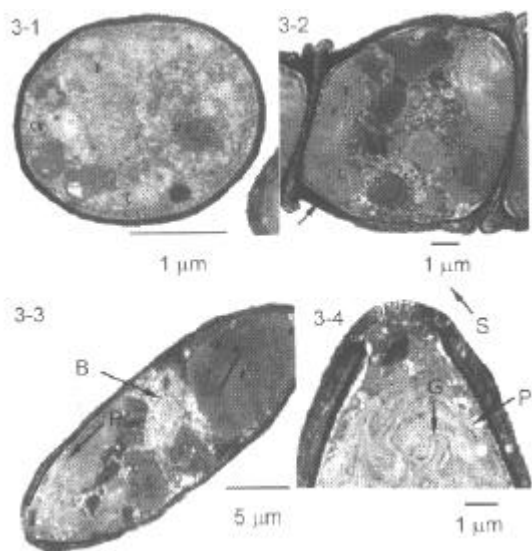


图3 紫外辐射增强前后南极蓝藻-B的超微结构  
Fig.3 Ultrastructure of Antarctic ice algae Cyanophyceae B before and after UV-B radiation

3-1.对照组蓝藻细胞透射电镜图;3-2,3-3,3-4紫外辐射后蓝藻细胞透射电镜图

3-1 the TEM observation of Cyanophyceae-B as control; 3-2, 3-3, 3-4 for the TEM observation of Cyanophyceae B after UV-B radiation enhancement

L 脂肪颗粒; B 黑色小颗粒; CW 细胞壁; P 多糖颗粒; G 片层结构; S 雾状分泌物

L for lipid granule; B for little black granule; CW for cell wall; P for polysaccharide granule; G for laminar structure; S for nepheloid secretion

藻不能在固体培养基上生长。

为了尽可能多地将南极海水水样中的冰藻藻种分离出来,本实验同时采取了上述两种分离方法,以将水样中的冰藻尽可能多地分离出来。

### 3.2 紫外辐射增强前后南极蓝藻形态和超微结构的比较

从光镜和扫描电镜的结果可以看出,紫外辐射增强,南极蓝藻少量细胞出现自溶等死亡现象,但是大多数细胞健康生存,而且活下来的细胞普遍个体增大,细胞表面出现颗粒状黏性物质。说明南极蓝藻自身具有抵抗紫外辐射的机制,大部分细胞能

够经受较强紫外辐射。

透射电镜的观察结果表明,随着紫外辐射增强,南极蓝藻的超微结构发生了显著变化,这是南极蓝藻适应紫外辐射增强环境的结果。多糖和脂肪颗粒的变化也可以初步证实紫外辐射增强南极蓝藻的生化组成发生了显著改变。许多研究结果表明南极冰藻在紫外辐射增强后,会产生一类抗辐射的物质 MAAs<sup>[3,4,8,9]</sup>,它们在310nm左右有很强的吸收峰,而且这些物质大量分泌到培养液中,可作为抵抗紫外辐射的屏障,本实验观察到类似的分泌现象,对观察到的抗紫外辐射物质的结构和活性有待于进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Malanga G, Puntarulo S. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorellavulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation[J]. *J Physiologia Plantarum*, 1995,94: 672-679.
- [2] 缪锦来, 李光友, 侯旭光, 等. UV-B 对南极冰藻中抗辐射物质的诱导作用[J]. 高技术通讯, 2002,12(4):96-98.
- [3] Karentz D, McEwen F S. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organism: potential protection from ultraviolet exposure[J]. *J Marine Biology*, 1991, 108: 157-166.
- [4] Fusheng X, Jiri K. The occurrence of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae(*Chlorophyta*)[J]. *J Aquatic Botany*, 1999, 63: 37-49.
- [5] 宁修仁, 史君贤, 刘子琳, 等. 南大洋蓝细菌和微微型光合真核生物的丰度与分布[J]. 中国科学: C 辑 生命科学, 1996, 26(2): 164-171.
- [6] 姜英辉, 侯旭光, 李光友. 两种南极冰藻的超微结构的观察[J]. 高技术通讯, 2001,11(8): 29-33.
- [7] 孟繁艳. 蓝藻细胞的染色与观察[J]. 植物杂志, 1996, 6: 37.
- [8] Hader D P, Worrest R C. Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems[J]. *J Photochem Photobiol*, 1991, 53: 717-725.
- [9] Groniger A, Hader DP. Introduction of the synthesis of an UV-absorbing substance in the green algae *Prasiola stipitata*[J]. *J Phytochem Photobiol B: Biology*, 2002, 66:54-59.

## Effect of UV-B on the morphology and ultrastructure of a strain of antarctic cyanophyceae

LIU Peng<sup>1</sup>, MIAO Jin-lai<sup>2</sup>, KAN Guang-feng<sup>1</sup>, ZHANG Bo-tao<sup>2</sup>, LI Guang-you<sup>2</sup>

(1. Ocean University of China, College of Marine Biology, Qingdao 266003, China; 2. Key Lab of Marine Biological Active Substances, SOA, Qingdao 266061, China)

**Received :** Feb., 27, 2003

**Key words :** Antarctic cyanophyceae; UV-B radiation; morphology; ultrastructure

**Abstract:** Eight strains of Antarctic ice algae, including a strain of Antarctic Cyanophyceae (Cyanophyceae-B), were isolated using two methods from samples of sea water and sea ices collected on the eighteenth Antarctic exploration. The growth curve of Cyanophyceae-B showed that there was an obvious lag phase in the first 6 days. The log phase then began on the 6<sup>th</sup> day and on the 20<sup>th</sup> day the stationary phase was reached. After exposure to UV-B (70  $\mu\text{W}/\text{cm}$ ), both morphology and ultrastructure changed. Cells enlarged with the cell wall becoming thicker. The laminar structure became more visible and an increased number of polysaccharide and fat granules were seen. Furthermore, after UV-B radiation some Cyanophyceae cells were seen secreting material into the culture. These changes suggest the possible presence of active substances in the cells of Antarctic Cyanophyceae-B able to resist UV-B radiation.

(本文编辑:张培新)