

## 黑暗限气条件下铜绿微囊藻细胞死亡的形态结构和生理生化变化

郭莉莎, 章军, 吴娟, 徐虹\*

细胞应激生物学国家重点实验室, 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

**摘要:** 【目的】研究铜绿微囊藻细胞死亡过程中形态和生理生化变化, 探讨蓝藻细胞死亡机制。【方法】通过黑暗限气处理模拟水华爆发后期水体环境, 在处理后不同时间取样, 对藻液的 OD 值、溶氧含量和 pH 值进行监测, 使用透射电镜对细胞形态结构变化进行观察, 通过胱天蛋白酶 (Cysteine-dependent aspartate specific protease, Caspase) 活性检测、活性氧含量测定、末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling, TUNEL) 染色和琼脂糖凝胶电泳对处理后藻细胞的死亡生理进行研究。【结果】黑暗限气处理后, 藻培养液 pH 值和溶解氧含量下降, 处理 12 h 后藻液开始变黄, 48 h 后藻细胞全部死亡。电镜观察结果表明, 藻细胞在黑暗限气处理所导致的死亡过程中出现空泡和类囊体、核糖体等内部结构解体但细胞壁仍保持完整等现象。活性氧含量和 caspase 活性检测表明, 在藻细胞死亡过程中活性氧含量和 caspase 活性上升。TUNEL 染色和琼脂糖凝胶电泳分析发现, 藻细胞在死亡过程中 DNA 发生断裂和降解。【结论】铜绿微囊藻细胞在黑暗和限气处理中表现出和真核生物细胞程序性死亡相类似的死亡特征, 这说明细胞死亡机制是保守的, 原核细胞和真核细胞一样具有程序性死亡机制。

**关键词:** 铜绿微囊藻, 细胞死亡, 半胱氨酸蛋白酶 3, 活性氧, DNA 降解

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)02-0228-08

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 是属于蓝藻门 (*Cyanophyta*) 色球藻目 (*Chroococcales*) 微囊藻属 (*Microcystis*) 的单细胞藻, 细胞呈球形或椭圆形, 通常许多细胞聚集在一起, 排列紧密, 形成球形、椭圆形或不规则形状的多细胞群体, 喜生活在 pH 值偏碱性的富营养型水体中。盛夏初秋, 水温为 28–30℃ 时铜绿微囊藻大量繁殖, 形成水华<sup>[1]</sup>。以前多次报道的太湖、滇池、巢湖等相继爆发的大规模水华都是以微囊藻为优势藻种的蓝藻水华<sup>[2–3]</sup>。水华爆

发的后期, 由于藻类和细菌微生物的大量繁殖, 改变了水体的理化环境, 使水体透明度降低, 阻断光线向水底的透射, 使水体耗氧量大大增加, 导致水体缺氧, 引发蓝藻快速大面积死亡。据推测, 水华消亡过程中藻细胞的这种大规模死亡是一种程序性死亡 (Programmed Cell Death, PCD)<sup>[4]</sup>。2002 年, Ning 等<sup>[5]</sup> 证明在盐胁迫下鱼腥藻表现出类似于真核生物的程序性死亡。原核生物细丝状的蓝细菌 *Trichodesmium* sp. IMS101 在超过 24 h 的老化培养

基金项目: 福建省自然科学基金 (2009J01193, 2010J01232)

\* 通信作者。Tel: +86-592-2182580; E-mail: hxu@xmu.edu.cn

作者简介: 郭莉莎 (1984–), 女, 四川乐山人, 硕士研究生, 主要从事海洋分子生物学的研究。E-mail: Lisha219@sina.com

收稿日期: 2011-09-14; 修回日期: 2011-12-14

中,生物量的45%的死亡是与细胞程序化死亡(PCD)有关。在N、Fe受到限制、强光、强氧化等条件下都会引起细胞死亡<sup>[5-6]</sup>。2004年,Bidle等<sup>[6]</sup>发现在营养盐缺乏和光限制下可以诱导丝状蓝藻出现自我催化的细胞死亡途径。2006年,Cliff Ross<sup>[7]</sup>等发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可诱导蓝藻*Microcystis aeruginosa* Kütz的Caspase 3活性增加。这些研究都暗示着原核生物蓝藻也和真核生物一样存在程序性死亡现象,在藻细胞中也存在编程死亡机制。

目前对于水华的研究主要集中在水华成因和爆发机理以及水华的预防和防治上,而对于水华消亡过程及其机理的研究则较少。为了研究水华消亡过程中藻细胞大规模死亡的机制,我们以铜绿微囊藻*Microcystis aeruginosa* PCC7806为研究对象,在光生物反应器中对处于生长旺盛期的藻细胞进行黑暗限气处理来模拟水华消亡时的透光度低、溶解氧含量少的水体环境,通过对黑暗限气处理不同时间的藻细胞样品进行分析,了解铜绿微囊藻细胞在死亡过程中的形态结构和生理生化变化,以探讨其死亡机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 藻种:**铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* PCC7806)购自中国科学院武汉水生生物研究所,本实验室保存和无菌培养。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**TUNEL试剂盒(In situ cell death detection kit, fluorescein)购自Roche公司;Caspase 3活力检测试剂盒(Caspase 3 fluorometric assay kit)购自ABCAM公司;蛋白质定量试剂盒(BCA法)购自普利莱公司;双氢罗丹明123, 2.5% DABCO(防荧光淬灭剂),进口丙酮及spurr树脂配制溶液等均购自SIGMA公司;西班牙琼脂糖、溶菌酶、固体多聚甲醛、二甲基亚砜(DMSO)、等购自上海生工生物工程技术有限公司。

PHR-L20C光生物反应器由中国科学院过程研究所研制,YSI556mps便携式多参数水质测量仪购自北京旭通永富科技有限公司,Leica Mltract R型切片机构自德国莱卡公司,JEM-2100HC透射电子显微镜购自日本电子株式会社,荧光正置显微镜购自日本NIKON公司。

### 1.2 藻细胞的培养

将铜绿微囊藻*Microcystis aeruginosa* PCC7806按1:50接种于新鲜配制BG-11培养基,在PhR-L20C型光气升式生物反应器中培养,培养温度为28-30℃,通入压缩空气,通气量为4-6 L/min。

### 1.3 黑暗限气处理

将光生物反应器中长到一定密度的藻给予断气,黑暗处理,分别在0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h梯度取样,作为实验组,以正常培养的藻作为对照组。

### 1.4 OD值、叶绿素含量、藻培养液溶氧量、pH值的测定

利用分光光度计在730 nm测定其吸光值,即OD值。藻细胞叶绿素的含量,藻液的溶解氧量和pH值分别由YSI水质测量仪进行测定。

### 1.5 Caspase 3酶活力检测

取 $5 \times 10^8$ 藻细胞用500 μL细胞裂解缓冲液重悬,放入液氮中速冻,10 min后取出,冰上溶解后超声破碎细胞,4℃、13000 × g离心8 min,取上清25 μL用于蛋白含量测定,根据已测的蛋白含量稀释所有样品至相等蛋白浓度。取50 μL藻裂解液加入等体积的2 × 反应buffer和5 μL 1 mmol/L底物DEVD-AFC(香豆素),37℃避光孵育1-2 h,以400 nm波长激发,505 nm处测量其荧光吸收值。

### 1.6 ROS检测

取 $2 \times 10^7$ 的藻细胞,加入母液浓度为1 mg/mL的罗丹明,使其终浓度为5 μg/mL,37℃避光孵育50 min,孵育完成后用荧光显微镜观察。

### 1.7 TUNEL活性检测

取 $2 \times 10^7$ 藻细胞,1500 × g离心5 min,用2%多聚甲醛重悬,室温下孵育60 min,离心,PBS洗涤藻细胞3次后用渗透液重悬沉淀,并在4℃渗透30 min,PBS洗2次,重悬沉淀,加入2 mg/mL溶菌酶,37℃反应3-4 min,PBS洗两次,用试剂盒中反应buffer(酶液:标记液=1:9)重悬沉淀,37℃避光孵育60 min,PBS洗两次,200 μL PBS重悬沉淀,加入防荧光淬灭剂,用荧光显微镜观察。

### 1.8 电镜超薄切片的制备

低速离心收集 $1 \times 10^7$ 个藻细胞至离心管,迅速加入2.5%的戊二醛,室温下固定2 h。PBS洗涤3次后,再用1%锇酸在4℃固定过夜。固定过夜的藻细胞用1.5%低熔点琼脂进行预包埋。用10-90%的丙酮逐级脱水,每级15 min。无水丙酮脱水3次,

脱水后的样品先后用不完全树脂和完全树脂在干燥室中渗透48 h。渗透后的样品用 Spurr 树脂在 60℃ 包埋2 d。包埋块切片机切成70 nm厚的超薄切片,然后用镊子夹取具膜的铜网,将切片捞出,自然晾干后放入铜网盒中。用小液滴染色法对样品进行 2% 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,最后用透射电子显微镜观察拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 黑暗断气处理条件下藻细胞生长和培养液中 pH 和溶解氧的检测

在光生物反应器中培养铜绿微囊藻细胞  $OD_{730}$  至 0.88 后进行黑暗限气处理。在 0 h、1.5 h、3.5 h、5 h、6.5 h、10 h、12 h、24 h、30 h、36 h 取样进行藻液的  $OD$  值、pH 值、溶氧含量、叶绿素含量各参数的检测,并对培养藻液进行拍照。从图 1 中可以看到,随着处理时间的延长,藻细胞  $OD$  值降低(图 1-A),叶绿素在黑暗处理早期含量保持相对恒定,但是超过 10 h 后其含量明显下降(图 1-B),藻液从绿色变为黄色最后至棕黄色,在处理 48 h 后藻细胞已基本死亡;与此同时,藻培养液中 pH 值降低,溶解氧含量急剧下降(图 1-C, D)。由于对处于指数生长期的藻细胞同时进行限气和避光处理,导致藻细胞光合作用停止,Chl 不能合成,不能产生氧气,而呼吸作用仍在旺盛的进行,不断地消耗培养液中溶解氧,产生  $CO_2$ ,导致藻培养液中溶氧含量急剧下降,而由呼吸作用产生的  $CO_2$  不能通过光合作用消耗而被累积起来,使藻培养液的 pH 值下降。根据以上结果,我们认为,黑暗断气处理能在一定程度上模拟水华爆发后期的水体环境,并且处理 48 h 后铜绿微囊藻细胞全部死亡。

### 2.2 黑暗限气处理不同时间藻细胞形态和结构变化

为了研究黑暗限气处理条件下,藻细胞形态和结构的变化,我们分别取处理 0 h、6 h、9 h、12 h、24 h、36 h 藻细胞制备样品并用透射电子显微镜观察。从图 2 中可以看到铜绿微囊藻细胞在没有进行黑暗限气处理时,细胞质浓厚,周围由细胞膜和壁包围,胞质内类囊体光合片层含量丰富,环绕在胞质四周,中央核区明显,含有 DNA 微丝,核糖体在整个细胞中均匀分布,藻细胞结构清晰,在中央区周围含有

多磷酸体,结构颗粒及伪空泡(气泡)等(图 2-A1, A2);黑暗限气处理 6h 后藻细胞核糖体,多磷酸体开始降解,部分类囊体发生断裂,附着在类囊体光合片层上的藻胆体降解剧烈,核区开始出现空洞(图 2-B1, B2);处理 9-12 h 藻细胞上述变化更加剧烈,核区空洞不断加大,空洞处聚集了大量结构颗粒,和絮状深染物质,12 h 时核质开始朝四周弥散(图 2-C1, C2; D1, D2);到 24 h 细胞结构完全解体,胞质固缩聚集形成均质样颗粒及空泡,类囊体片层断裂,细胞壁出现皱缩以及轻微的质壁分离(图 2-E1, E2),36 h 时已经出现藻细胞结构的完全降解,但细胞壁仍保持完整,细胞内没有任何可见结构,大部分细胞死亡(图 2-F1, F2)。

### 2.3 黑暗限气处理不同时间藻细胞内 ROS 活性检测

由于铜绿微囊藻在黑暗限气条件下光合作用停止,由光合电子传递链产生的还原物质 NADPH 大大减少,而呼吸作用仍在不断进行,产生的氧化性物质不断积累,这势必会启动细胞的过氧化作用而产生活性氧自由基。细胞内活性氧压力的增加往往能导致细胞程序性死亡。并且有研究报道,在衰老、营养限制、高盐、紫外照射等逆境下细胞发生程序性死亡前都出现了活性氧的聚集<sup>[4-6, 8-11]</sup>。因此为了检测黑暗限气处理条件下所导致的铜绿微囊藻细胞死亡前是否也存在活性氧积累的情况,分别取处理 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h 的藻细胞进行活性氧含量检测,结果表明,随着处理时间的延长,细胞内绿色荧光强度不断增强,这说明细胞内活性氧含量不断增加(图 3)。本实验结果表明,黑暗限气处理条件下,藻细胞死亡过程中伴随着胞内活性氧含量的增加。

### 2.4 黑暗限气处理不同时间藻细胞内 Caspase3 活性检测

胱天蛋白酶 Caspase 家族成员被认为是动物细胞程序性死亡的执行者,尤其是 Caspase3 活性升高通常被认为是细胞已经启动死亡程序进入程序性死亡过程<sup>[12-13]</sup>。基因组序列分析确定,在藻类、高等植物和细菌中存在 Caspase 同源物 Metacaspase,我们在铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7806 基因组中也发现了 5 个类似于真核 Caspase 的基因。Bidle 等也确实检测到丝状蓝藻 *Trichodesmium* sp. IMS101 在 Fe 缺乏或高光强照射一段时间后能引起

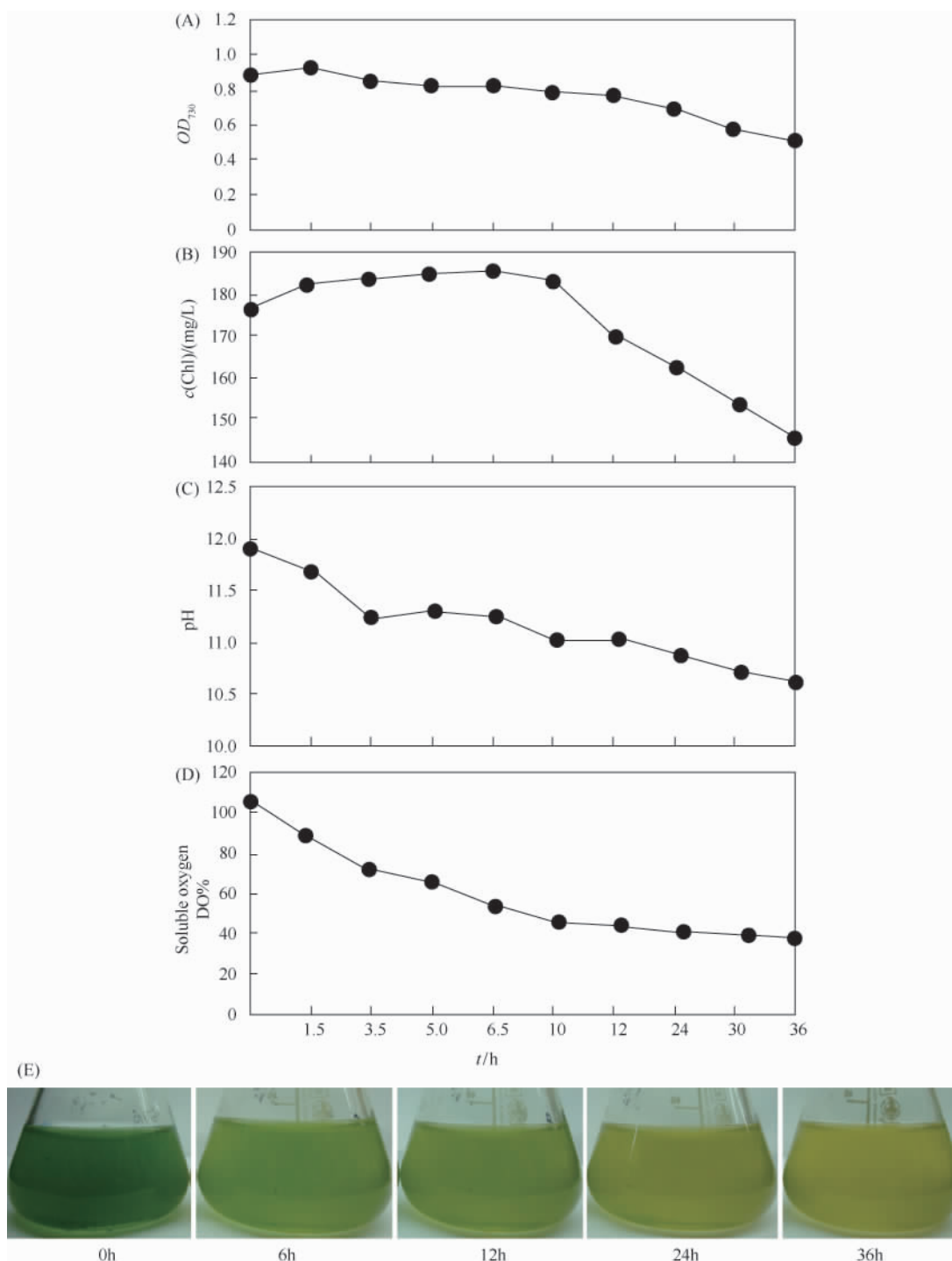


图1 黑暗限气条件下铜绿微囊藻 PCC7806 的生长状态和生长环境变化

Fig. 1 Changes of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 cultures in optical density, chlorophyll content, soluble oxygen and pH after treatment with darkness and O<sub>2</sub> limitation. A: Optical density; B: Chlorophyll content; C: pH; D: soluble oxygen; E: Cultures of *M. aeruginosa* at indicated time after treatment.

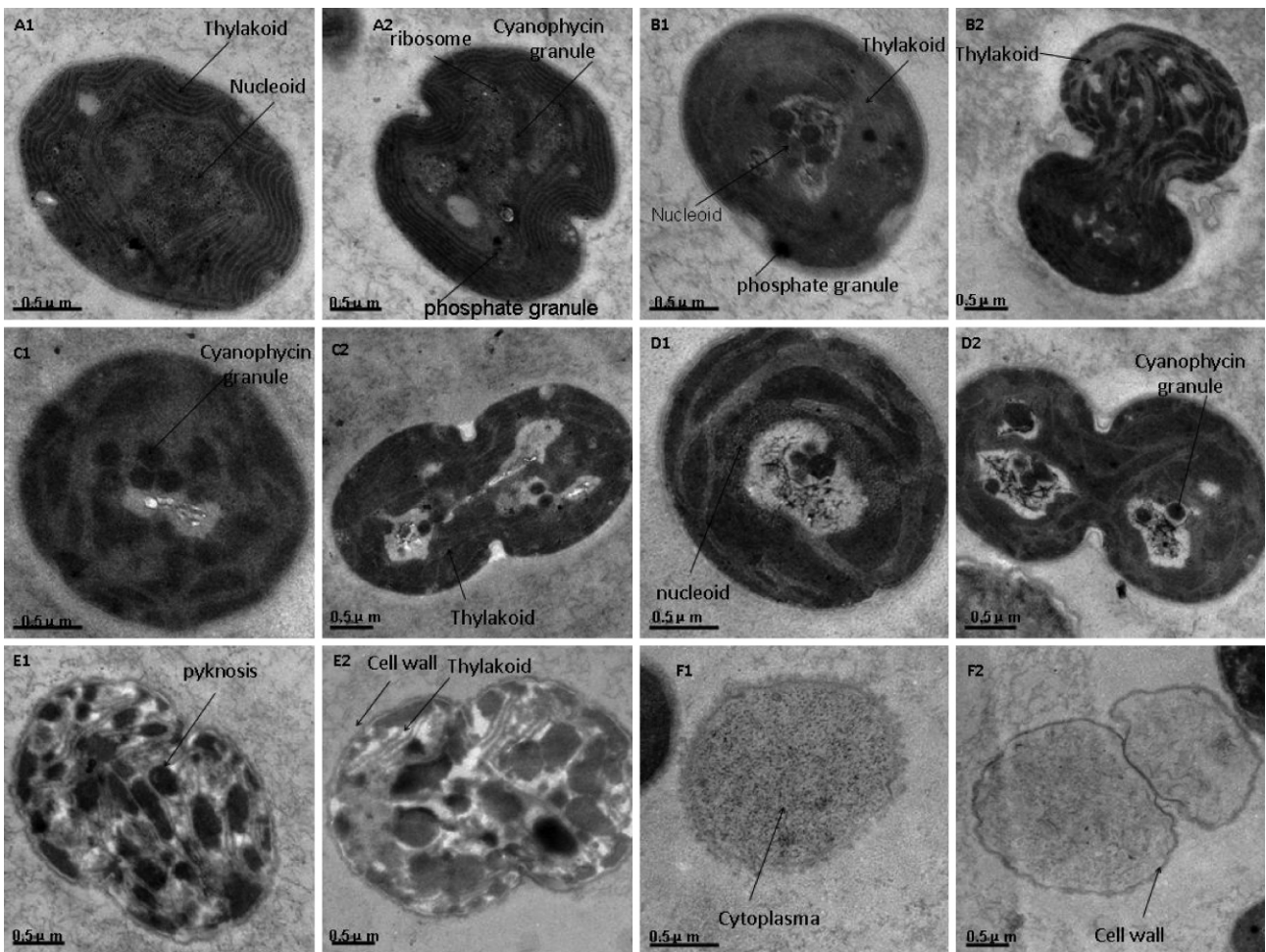


图2 黑暗断气条件下铜绿微囊藻 PCC7806 的细胞形态结构变化(8000 ×)

Fig.2 Ultrastructural changes in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 subjected to dark and O<sub>2</sub> limitation treatment (8000 ×). A1 ,A2: Ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* PCC7806; B1 ,B2: Ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 after treatment for 6h; C1 ,C2: Ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 after treatment for 9h; D1 ,D2: Ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 after treatment for 12h; E1 ,E2: Ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 after treatment for 24h; F1 ,F2: Ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 after treatment for 36 h.

细胞内 Caspase 活性增加和细胞死亡<sup>[6]</sup>。为了研究 *Microcystis aeruginosa* PCC7806 在黑暗限气条件下细胞死亡过程中是否也伴随着 Caspase 活性增强,分别取黑暗限气处理 0 h,6 h,12 h,24 h,36 h 的藻细胞做 Caspase 活性检测。检测结果表明,对照组中 Caspase 3 的活性几乎没有变化,黑暗限气处理组细胞 Caspase 3 的活性在处理过程中呈现先增后减的趋势,在 12 h 时活性最强,达到初始活性的 4-5 倍,这表明细胞已经完全启动死亡程序,到 36 h 时活性仍为初始活性的 2 倍,可以看出,Caspase 3 在整个黑暗限气处理过程中均保持较高水平(图 4)。而同样黑暗限气处理并添加 Z-VAD-FMK 的实验组表现出对 Caspase 3 很好的抑制作用,并且细胞死亡数量

减少,死亡进程明显延缓,但是该抑制剂的添加并不能完全阻止死亡的发生,这说明黑暗限气条件下铜绿微囊藻细胞的死亡过程除了有 Caspase 家族成员参加外,还存在不依赖 Caspase 的其他死亡途径。

## 2.5 黑暗断气处理不同时间藻细胞 DNA 降解程度的检测

细胞在死亡过程中通常伴随着 DNA 的剧烈降解<sup>[14-15]</sup>,为了检测黑暗限气处理导致藻细胞死亡时是否也伴随着 DNA 的降解,我们使用 TUNEL 试剂盒对细胞内 DNA 的断裂情况进行了检测,结果表明(图 5),正常培养条件下铜绿微囊藻细胞发出强烈的红色荧光,没有 DNA 断裂情况(图 5-A,B);而黑暗限气处理的藻细胞确实存在 DNA 断裂现象,断裂

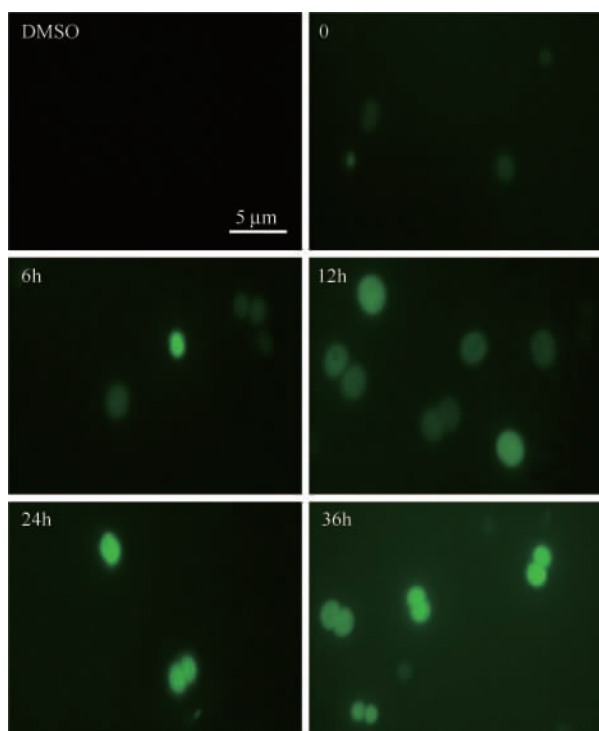


图3 黑暗限气处理条件下铜绿微囊藻 PCC7806 细胞内活性氧(ROS)的变化分析

Fig.3 ROS analysis of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 subjected to darkness and O<sub>2</sub> limitation treatment.

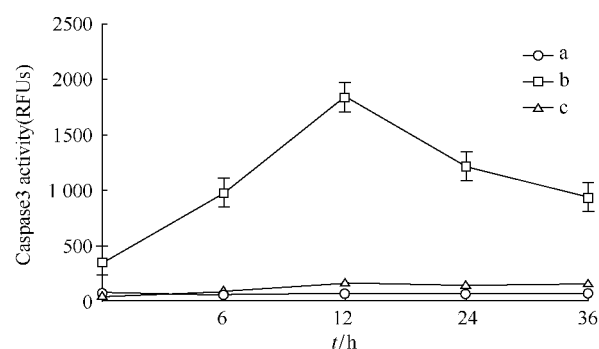


图4 黑暗断气处理不同时间铜绿微囊藻 PCC7806 的 Caspase3 活性变化

Fig.4 Caspase 3 activity analysis of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 subjected to darkness and O<sub>2</sub> limitation treatment. a: Control; b: darkness and O<sub>2</sub> limitation treatment; c: darkness and O<sub>2</sub> limitation treatment + z-VAD-FMK.

的 DNA 能被 TUNEL 试剂标记而发出绿色荧光,从图 5-C 中我们可以看到断裂的 DNA 倾向于集中在细胞的一侧而并不呈弥散分布,而且发生 DNA 断裂的细胞数也并不是特别多,这说明 DNA 断裂情况并不严重。与此同时,我们还对黑暗断气处理 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h 的藻细胞 DNA 进行了琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明,黑暗断气处理 6 h-36 h 的

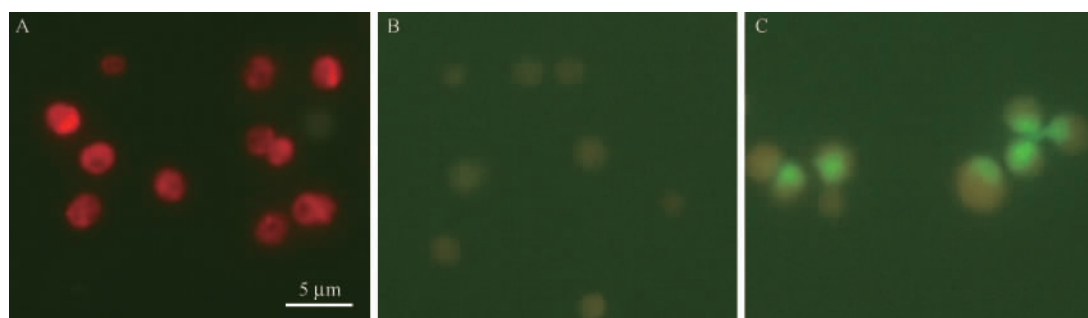


图5 黑暗断气处理后铜绿微囊藻 PCC7806 DNA 的 TUNEL 检测

Fig.5 Identification of DNA breakage in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 subjected to darkness and O<sub>2</sub> limitation treatment by TUNEL staining. A: Autofluorescence of *M. aeruginosa* PCC7806; B: TUNEL staining of *M. aeruginosa* PCC7806; C: TUNEL staining of *M. aeruginosa* PCC7806 after treatment with darkness and O<sub>2</sub> limitation for 36 h.

藻细胞 DNA 有不同程度的拖带现象,这说明藻细胞 DNA 在黑暗断气处理条件下确实存在 DNA 降解现象,但降解程度并不剧烈,这与 TUNEL 的检测结果相呼应。

### 3 讨论

本研究模拟水华衰亡时水体透光率差、溶解氧

含量低的环境,在光生物反应器中当铜绿微囊藻生长到高密度时给予藻黑暗限气处理,并对处理后的藻液按时间梯度取样,进行 OD 值、叶绿素含量、pH 值、溶解氧的测定,同时取 0h、6h、9h、12h、24h、36h 的藻细胞进行检测。可以看出,此处理条件对藻细胞有明显的损伤(尤其色素变化,与光照密切相关),由于我们限气又避光,藻不能进行光合作用产生 O<sub>2</sub>,而呼吸作用又不断地消耗培养基中的溶解

氧,因此这种处理条件下的藻是处于一种缺氧的状态,这也是引起藻细胞发生明显变化的主要原因。另外,由于光合作用的停止,呼吸作用产生的  $\text{CO}_2$  不能通过光合作用消耗掉而累积起来,导致水中 pH 值下降,因此在藻细胞生长旺盛期给予黑暗限气处理所造成的培养液溶解氧含量和 pH 值降低的情况与水华爆发后期藻细胞过度繁殖造成水体透光度下降和溶解氧含量低的情况基本一致。长期处于这种生长条件下,铜绿微囊藻细胞先后出现核糖体、多磷酸体、藻胆体的降解,类囊体光合片层结构完全模糊等现象,且由于光照缺乏,类囊体的解体情况非常明显;随着处理时间的增加,核区出现空洞,核质朝四周弥散,细胞结构完全解体,胞质固缩聚集,形成均质样颗粒,并且出现大量空泡,发生质壁分离,直至胞质降解,虽然细胞壁出现皱缩,但结构依然保持完整。通过对不同处理时间样品的分析可知,caspase 3 活性呈现出先增后减的趋势,在 12 h 时活性达到最高,且为初始活性的 4-5 倍,在 36 h 时仍有较强的活性且与 6 h 取样时差不多,如此高的 Caspase 3 的活性说明其在藻细胞死亡过程中发挥了重要作用。另外,在添加 Caspase 抑制剂后,藻细胞死亡进程虽然被延缓但并没有完全被阻止,因此我们认为在藻细胞死亡过程中 caspase 发挥了非常重要的作用,但是在藻细胞内应该还存在其他不依赖 caspase 介导的细胞死亡途径。我们还检测到黑暗限气处理能导致细胞内 ROS 含量的上升,说明 ROS 也和 Caspase 3 一样参与了黑暗限气条件下的细胞死亡过程,但是它们在铜绿微囊藻细胞死亡过程中究竟是起到激活死亡程序的作用还是本身就是起到执行死亡的功能,目前还不得而知。TUNEL 和 DNA 凝胶电泳检测结果表明,在黑暗限气处理条件下,DNA 存在断裂现象,这种断裂现象是不是由 ROS 造成的 DNA 损伤还值得进一步探究。综上所述,铜绿微囊藻群体在密度较高时,由于光和氧的限制可以导致藻细胞死亡,而且这种死亡过程中表现出活性氧含量和 caspase 活性升高,DNA 断裂,细胞结构完全解体等类似于真核细胞程序性死亡的现象,有研究者称此为类凋亡<sup>[16]</sup>。铜绿微囊藻、鱼腥藻<sup>[5]</sup>等原核蓝藻在死亡过程中与真核细胞编程死亡在很多方面都表现相似的特点,这说明原核生物细胞死亡和真核生物细胞死亡间可能存在共同的机制和起源。

## 参考文献

- [1] 齐雨藻. 赤潮. 中国藻类学研究. 武汉:武汉出版社, 2001: 152-177.
- [2] 刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析. 环境科学研究 (*Research of Environmental Science*), 1999, 12(5): 36-37.
- [3] 陈宇炜, 秦伯强, 高锡云. 太湖梅梁湾藻类及相关环境因子逐步回归统计和蓝藻水华的初步预测. 湖泊科学 (*Journal of Lake Sciences*), 2001, 13(1): 63-71.
- [4] Bidle KD, Falkowski PG. Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nature Review Microbiology*, 2004, 2(8): 643-655.
- [5] Ning SB, Guo HL, Wang L, Song YC. Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(1): 15-28.
- [6] Berman-Frank I, Cullen JT, Shaked Y, Sherrell RM, Falkowski PG. Iron availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in *Trichodesmium*. *Limnology and Oceanography*, 2001, 46(6): 1249-1260.
- [7] Berman-Frank I, Bidle KD, Haramaty L, Falkowski PG. The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(4): 997-1005.
- [8] Ross C, Santiago-Vázquez L, Paul V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78(1): 66-73.
- [9] Vardi A, Berman-Frank I, Rozenberg T, Hadas O, Kaplan A, Levine A. Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by  $\text{CO}_2$  limitation and oxidative stress. *Current Biology*, 1999, 9(18): 1061-1064.
- [10] Moharikar S, D'Souza JS, Kulkarni AB, Rao JB. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses. *Journal of Phycology*, 2006, 42(2): 423-433.
- [11] Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lütz C, Lütz-Meindl U. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Journal experimental botany*, 2009, 60(3): 939-954.

- [12] Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000 64(4): 821-846.
- [13] Harrington HA, Ho KL, Ghosh S, Tung KC. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2008 5: 26-41.
- [14] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998; 391: 43-50.
- [15] Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 2001; 412: 95-99.
- [16] Jiménez C, Capasso JM, Edelstein CL, Rivard CJ, Lucia S, Breusegem S, Berl T, Segovia M. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDaEs. *Journal Experimental Botany*, 2009, 60(3): 815-828.

## Morphological and biochemical changes of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 subjected to dark and oxygen limitation

Lisha Guo, Jun Zhang, Juan Wu, Hong Xu\*

State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract:** [Objective] To explore the mechanism of cell death in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. [Method] According to the water environment of the later period of algal bloom, *M. aeruginosa* PCC 7806 was treated with dark and O<sub>2</sub> limitation. We observed the morphological changes using transmission electron microscope (TEM) and detected the reactive oxygen species (ROS) activity and Caspase3 activity in *M. aeruginosa* PCC7806 subjected to dark and O<sub>2</sub> limitation. DNA status was also examined with the methods of Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) and agarose gel electrophoresis. [Result] Massive algae cell died after 48 h treatment under dark and O<sub>2</sub> limitation. During cell death process, we observed some changes of cell organelles including ribosomes and thylakoids disorganization, cytoplasmic vacuolation, nucleoplasm diffusion and plasmolysis in *M. aeruginosa* PCC7806 subjected to darkness and O<sub>2</sub> limitation. Meanwhile, we found that increased ROS reactivity and caspase 3 activity were related to the cell death process of *M. aeruginosa*. DNA breakage and fragmentation were proved by TUNEL staining and agarose gel electrophoresis during cell death process. [Conclusion] All results showed that cell death with characteristics similar to eukaryotic programmed cell death could be induced in *M. aeruginosa* PCC 7806 after treatment with darkness and O<sub>2</sub> limitation. Therefore, we suggested that the mechanism of cell death are conserved during evolution according to the characteristics of cell death shared between eukaryotes and *Microcystis*.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*, cell death, caspase 3, reactive oxygen, DNA breakage

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2009J01193, 2010J01232)

\* Corresponding author. Tel: +86-592-2182580; E-mail: hxu@xmu.edu.cn

Received: 14 September 2011/Revised: 14 December 2011