

神经毒素 BMAA 对球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 的生长抑制作用研究*

李爱峰^{1,2} 刘建伟¹ 胡 杨¹ 付艺蕾¹ 邱江兵^{1,2}

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院 山东青岛 266100; 2. 海洋环境与生态教育部重点实验室 中国海洋大学 山东青岛 266100)

摘要 神经毒素 β -N-甲氨基-L-丙氨酸(β -N-methylamino-L-alanine, BMAA)主要来自淡水或海洋环境中的蓝藻和硅藻,在海洋生态系统中具有明显的生物放大作用,被认为是诱发阿尔茨海默症(Alzheimer's Disease, AD)等多种神经退行性疾病的重要环境因子。近年, BMAA 及其同分异构体 2,4-二氨基丁酸(2,4-diaminobutyric acid, DAB)在我国及其他多个沿海国家和地区的贝类水产品中被普遍检出,潜在威胁消费者健康和海洋生态安全。但目前有关 BMAA 对海洋微藻的化学生态学作用尚不清楚。为此,通过向球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)培养基中分别添加不同浓度的 BMAA 及 20 种蛋白氨基酸,探究了 BMAA 单独及其与氨基酸联合作用 96 h 对球等鞭金藻比生长率和氨基酸含量的影响,并分析了微藻吸收外源 BMAA 的含量。结果表明,球等鞭金藻能吸收培养体系中的外源 BMAA,吸收量与 BMAA 的添加浓度呈正相关,且进入细胞内的 BMAA 多半以溶解结合态形式存在; BMAA 抑制批次培养的球等鞭金藻比生长率的 96 h 半效应浓度(96 h-EC₅₀)约为 2 μ mol/L; 与对照组相比,暴露于 BMAA 96 h 后球等鞭金藻细胞内酪氨酸、丙氨酸、丝氨酸等 15 种氨基酸的合成量明显降低;除脯氨酸、苏氨酸、甘氨酸外,其他 17 种氨基酸与 BMAA 联合暴露实验均增强了 BMAA 对球等鞭金藻比生长率的抑制效应,这可能与培养体系中的氨基酸促进了微藻吸收外源 BMAA 的能力有关。因此,海洋生态系统中 BMAA 毒素的化学生态学作用应引起人们的关注。有关 BMAA 抑制球等鞭金藻有丝分裂的分子机制有待进一步研究。

关键词 球等鞭金藻; β -N-甲氨基-L-丙氨酸(BMAA); 神经毒素; 氨基酸; 抑制效应; 比生长率
中图分类号 S963.21+3, Q175 **doi:** 10.11693/hyhz20211200341

二十世纪五六十年代,在西太平洋关岛地区当地土著居民查莫罗人群中流行一种地方病——肌萎缩侧索硬化-帕金森痴呆综合症(ALS-PDC),其发病率是其他地区平均水平的 50~100 倍。但该疾病的发病率在移居到其他地区的查莫罗人的后代人群中明显降低,说明某些环境因素可能诱导该疾病的发生(李爱峰等, 2009; 牛琦等, 2012)。科学家推测关岛地区高发的 ALS-PDC 疾病可能与查莫罗人食谱中的苏铁(*Cycas micronesica*)种子和果蝠(*Pteropus mariannus*)有关,其中含有一种神经毒性的非蛋白氨基酸—— β -N-

甲氨基-L-丙氨酸(β -N-methylamino-L-alanine, BMAA),其沿食物链具有显著的生物放大作用(Cox *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2004a)。随后人们在死于阿尔茨海默症的 2 名加拿大患者和 12 名美国患者及死于 ALS 疾病的 13 名美国患者的脑组织中也检出了 BMAA,说明环境中分布的 BMAA 可能与全球散发的这类神经退行性疾病有关(Murch *et al.*, 2004b; Pablo *et al.*, 2009)。我国学者在中国近海尤其是北方沿海采集的多种贝类软体动物样品中普遍检出 BMAA (Li *et al.*, 2016, 2018),且发现 BMAA 在胶州湾生态系统也具有明

* 国家自然科学基金面上项目, 41676093 号; NSFC-山东联合基金重点项目, U2106205 号。李爱峰, 教授, 博士生导师, E-mail: lafouc@ouc.edu.cn

收稿日期: 2021-12-23, 收修改稿日期: 2022-01-15

显的生物放大作用(Wang *et al.*, 2021)。由于 BMAA 分子在生物体内既能以游离态形式存在,也可与低分子量的多肽结合,或直接嵌入蛋白质分子中以蛋白结合态存在(Rosén *et al.*, 2016),通常生物样品中游离态 BMAA 与蛋白结合态 BMAA 含量的比值范围为 1 : 60~1 : 120 (Ince *et al.*, 2005)。因此,目前研究工作中通常将 BMAA 划分为三种形态定量描述:经三氯乙酸等极性溶剂提取离心后,溶解于上清液中的“游离态 BMAA”;在上清液中与多肽或小分子蛋白结合,经盐酸水解后释放出来的“溶解结合态 BMAA”;在沉淀中与大分子蛋白结合,经盐酸水解后释放出来的“沉淀结合态 BMAA”(Lance *et al.*, 2018)。

目前有关人神经退行性疾病的发病机制尚无定论,但有关 BMAA 对神经元的毒性作用已得到普遍认同。离体实验结果表明,BMAA 可通过多种途径导致运动神经元的损伤,主要包括:(1) BMAA 能够与碳酸氢盐结合生成与谷氨酸相似结构的 β -氨基甲酸盐(Weiss *et al.*, 1988),能够竞争性地与神经细胞膜上的离子型和促代谢型谷氨酸受体结合(Cucchiaroni *et al.*, 2010),导致神经细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度升高, K^+ 浓度降低,从而破坏了细胞稳态;(2) 细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高破坏线粒体功能,导致活性氧的释放,造成氧化损伤(Rao *et al.*, 2006);(3) 谷氨酸受体的激活导致神经细胞去极化,使得神经细胞膜的通透性增加,并释放去甲肾上腺素,造成兴奋性中毒(Lindström *et al.*, 1990; Nedeljkov *et al.*, 2005);(4) BMAA 还能抑制神经细胞膜上的半胱氨酸/谷氨酸反转运系统(cystine/glutamate antiporter system, X_c^-),抑制抗氧化剂谷胱甘肽的合成(Liu *et al.*, 2009)。近年的活体实验表明,长期喂食含有 BMAA 的水果导致绿猴(*Chlorocebus sabaues*)脑组织中形成与 ALS-PDC 患者脑组织中相似的神经元纤维缠结和 β -淀粉样蛋白(Cox *et al.*, 2016); BMAA 暴露(≥ 50 mg/kg)也会导致成年大鼠出现轻度短期行为改变和海马神经元丢失,并出现 β -淀粉样蛋白沉积(Scott *et al.*, 2019)。这些发现进一步证实了 BMAA 毒素对人神经退行性疾病的诱导作用。

毒理学研究表明,BMAA 对多种微藻、高等水生植物、水生动物等水生生物也具有一定的毒害作用。研究发现,4.2 $\mu\text{mol/L}$ 的外源 BMAA 对集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 的生长和光合作用能力具有明显的抑制作用(Downing *et al.*, 2012); 20 $\mu\text{mol/L}$ 外源 BMAA 导致固氮念珠藻 *Nodularia* sp. PCC7120 生长停滞和细胞内糖原的积累(Berntzon *et al.*, 2013),

也可抑制鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 细胞分化过程相关的 *hetR* 基因和 *hepA* 基因的表达和固氮酶活性(Popova *et al.*, 2018); 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 BMAA 可导致三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)和威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)细胞内叶绿素 *a* 的含量降低,且干扰藻细胞内氮的代谢过程(Lage *et al.*, 2016)。有关 BMAA 与水生植物的暴露实验表明, BMAA 能够引起罗蔓藤蕨(*Lomariopsis lineata*)、水藓(*Fontinalis antipyretica*)、鹿角苔(*Riccia fluitans*)、爪哇莫丝(*Taxiphyllum barbieri*)和金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)等水生植物组织中抗氧化酶活性降低,且在短时间内不能恢复(Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011; Contardo-Jara *et al.*, 2013)。另外, BMAA 可影响大型蚤(*Daphnia magna*)的存活、运动和繁殖能力(Lüring *et al.*, 2011); 导致斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎心率减慢、心包水肿、脊髓轴异常和痉挛惊厥等症状(Purdie *et al.*, 2009; Wang, 2015); 抑制海胆(*Lytechinus pictus*)胚胎的受精和发育,出现细胞分裂异常和畸形发育(Li *et al.*, 2020)。由此来看, BMAA 毒素对多种水生生物具有普遍的毒性作用,威胁海洋生物的健康和生态系统的结构与功能。

海洋微藻作为海洋生态系统最主要的初级生产者,对海洋生态系统的物质循环和能量流动起着重要作用。海洋硅藻作为 BMAA 毒素的重要来源,在正常生长代谢或细胞死亡后会将水溶性的 BMAA 毒素释放到胞外,直接与海洋生物暴露接触,并可通过化学生态学作用影响海洋生态系统的演化。然而目前有关 BMAA 对海洋微藻毒性效应的研究较少,对其致毒机理的认识也很有限,有关外源 BMAA 跨膜进入微藻细胞的过程及环境中氨基酸的影响尚不清楚。本研究选择我国近海分布的典型饵料藻——球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)为研究对象,对其在 BMAA 暴露条件下的生长状况和吸收毒素的情况进行了分析,并比较分析了不同氨基酸单独及其与 BMAA 联合暴露条件下对球等鞭金藻的影响,以期揭示 BMAA 对海洋浮游植物的化学生态学作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

球等鞭金藻(3011)由中国海洋大学水产学院藻种库提供。BMAA 标准物质(L-BMAA hydrochloride, B107-10 mg)和 DAB 标准物质(DL-2,4-diaminobutyric acid dihydrochloride, D3758-1 g)购自美国 Sigma 公司,

AEG 标准物质[N-(2-aminoethyl) glycine, A608975-1 g] 购自加拿大 TRC 公司。氨基酸标准物质和优级纯盐酸购自国药集团化学试剂有限公司。分析纯三氯乙酸和色谱纯乙腈购自德国 Merck 公司, 色谱纯甲酸购自美国 Sigma 公司。新鲜海水取自青岛市崂山区流清河附近海域。超纯水是由 Direct-Q® 8 UV-R 纯水系统(美国 Millipore)制备。毒素分析用色谱柱 TSK-Gel Amide-80® (250 mm × 2 mm, 5 μm) 购自日本 Tosoh 生物科技有限公司。

1.2 BMAA 单独暴露条件下球等鞭金藻的生长状况

1.2.1 球等鞭金藻的室内培养

将新鲜海水经 0.45 μm 混合纤维滤膜过滤, 按照不含硅的 f/2 培养基配方(Guillard *et al.*, 1993)添加氮磷营养液, 然后在高压灭菌锅中进行高温灭菌(121 °C, 20 min), 待冷却至室温后添加维生素和微量元素, 用于球等鞭金藻的批次培养。选用 250 mL 锥形瓶, 培养体系 100 mL, 在无菌环境中接种藻液, 初始密度为 3 × 10⁵ cells/mL 左右, 接种后立刻添加相应的 BMAA 毒素。根据 BMAA 暴露对球等鞭金藻的预实验结果, 分别设置空白对照组和 200、250、300、350、400 μg/L BMAA·HCl 染毒组进行毒理学实验, 每组设置 3 个平行。将培养液放置在光照培养箱(HDL HPG-280BX, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司)内, 设置温度 18 °C, 光照强度 6 000 lx, 光暗比 12 h : 12 h, 每天分 3 次定时轻轻摇匀微藻培养液, 并随机更换培养箱中藻液的位置。

1.2.2 球等鞭金藻的生长曲线及 96 h 半效应浓度(96 h-EC₅₀)的计算

染毒培养实验开始后每天取 1 mL 藻液, 使用血球计数板在倒置显微镜(CKX53, 日本 Olympus)下计数, 每瓶藻液摇匀后重复计数 3 次, 取平均值记录藻细胞的生长密度并绘制生长曲线。在 96 h 后, 根据《化学品: 藻类生长抑制试验(GB/T 21805—2008)》中的相关计算方法计算比生长率和抑制率, 以体系中 BMAA·HCl 浓度的对数值为横坐标, 以抑制率为纵坐标, 绘制剂量—效应曲线, 采用直线内插法确定 BMAA·HCl 对球等鞭金藻的 96 h-EC₅₀ 值。

比生长率按照下列公式计算:

$$\mu_{i,j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}, \quad (1)$$

式中, $\mu_{i,j}$: 从 i 时刻到 j 时刻的比生长率, 单位: d⁻¹; X_i : i 时刻的藻细胞密度; X_j : j 时刻的藻细胞密度。

抑制率按照下列公式计算:

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100, \quad (2)$$

式中, I_r : 以比生长率为基础的抑制率, 单位: %; μ_c : 对照组中各平行处理的比生长率的平均值; μ_i : 染毒组中各平行处理的比生长率的平均值。

1.3 球等鞭金藻对外源 BMAA 的吸收及其氨基酸含量的测定

1.3.1 球等鞭金藻的室内培养与藻细胞的收集

采用 1.2.1 部分相同的方法准备微藻培养液, 选用 1 L 锥形瓶, 培养体系 500 mL, 接种的初始密度为 5 × 10⁵ cells/mL 左右, 设置空白对照组和 100、300、700 μg/L BMAA·HCl 染毒组共 4 组, 每组 3 个平行。在温度 18 °C, 光照强度 6 000 lx, 光暗比 12 h : 12 h 条件下培养, 每天分 3 次定时摇匀藻液, 并随机更换藻液的位置, 降低光照条件的影响。采用 1.2.1 部分相同的方法计数微藻的细胞密度。在球等鞭金藻染毒培养 96 h 后, 充分摇匀藻液, 每组取 100 mL 于 4 °C 下以 8 000 r/min 转速离心 10 min 收集藻细胞, 用于测定藻细胞中 BMAA 的含量。另取空白对照组和 300 μg/L BMAA·HCl 组每瓶藻液各 400 mL, 于 4 °C 下以 8 000 r/min 转速离心 10 min 收集藻细胞, 尽量去除上清液, 记录藻泥湿重, 用于测定藻细胞中氨基酸的含量。将收集到的藻泥置于 -20 °C 冰箱中保存待测。

1.3.2 藻细胞中 BMAA 的提取

向含有藻泥的离心管中加入 3 mL 0.1 mol/L 的三氯乙酸, 涡旋混匀, 于冰浴中超声破碎 10 min, 最后在 4 °C 条件下以 8 000 r/min 转速离心 5 min。取离心后的上清液 1 mL, 经 0.22 μm 水系滤膜过滤至 1.5 mL 进样瓶, 得到的游离态 BMAA 提取液置于 -20 °C 冰箱中保存。取离心后的上清液 1 mL 转移至 4 mL 进样瓶中, 在 55 °C 条件下氮吹, 吹干后加入 1 mL 6 mol/L 盐酸溶解, 涡旋混匀后在 110 °C 下水解 24 h, 冷却至室温后再次氮吹, 吹干后加入 1 mL 20 mmol/L 盐酸重新溶解, 经 0.22 μm 水系滤膜过滤至 1.5 mL 进样瓶中, 得到的总溶解态 BMAA 提取液置于 -20 °C 冰箱中保存。移除上清液后, 向沉淀中加入 2 mL 6 mol/L 盐酸, 涡旋混匀后转移至 4 mL 进样瓶中, 在 110 °C 条件下水解 24 h, 冷却至室温后在 55 °C 条件下氮吹, 吹干后加入 1 mL 20 mmol/L 盐酸重新溶解, 经 0.22 μm 水系滤膜过滤至 1.5 mL 进样瓶中, 将得到的沉淀结合态 BMAA 提取液置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.3.3 藻细胞中氨基酸的提取

参考《食品中氨基酸的测定(GB/T 5009.124—2016)》, 稍作修改。向含有藻泥的离心管中加入 5 mL 6 mol/L HCl, 涡旋混匀, 转移至 10 mL 消解管中, 充入高纯氮气, 在 110 °C 条

件下水解 22 h。水解结束后冷却至室温,将水解液用滤纸过滤到 25 mL 容量瓶中,用超纯水多次冲洗水解管,经滤纸过滤后合并转移至 25 mL 容量瓶内,用超纯水定容,混匀。取 2 mL 定容后的溶液至 4 mL 样品瓶中,55 °C 条件下用氮气吹干,然后加入 1 mL 20 mmol/L 盐酸重新溶解,经 0.22 μm 水系滤膜过滤至 1.5 mL 进样瓶中,得到的氨基酸提取液置于-20 °C 冰箱中保存。

1.3.4 BMAA 毒素分析 使用 Agilent 1290 高效液相色谱串联 Agilent 6430 三重四极杆质谱仪系统(美国 Agilent 公司),不经衍生直接测定 BMAA 的含量,具体参数如下:

色谱柱为 TSK-Gel Amide-80[®] HILIC 色谱柱(250 mm × 2 mm, 5 μm),柱温 40 °C,进样体积 5 μL,流速 350 μL/min,采用梯度洗脱,流动相 A 为含有 50 mmol/L 甲酸的水溶液,流动相 B 为含有 50 mmol/L 甲酸的乙腈溶液。在 0~15 min 内,流动相 A 由 10% 升高至 40%,保持 4 min 后,在 19.01 min 切换为 45% 并保持至 27 min,在 27.01 min 切换到 10% 并保持至 30 min。

质谱联接口为电喷雾离子源,雾化器压力 40 psi,毛细管电压 4 000 V,电喷雾电压 5 500 V,雾化气为 N₂,雾化温度 450 °C,干燥气体温度 350 °C,干燥气体流速 10 L/min。根据毒素的保留时间和质谱参数,采用多反应监测模式进行定性和定量分析。使用的变迁离子为 119→102、119→101、119→88、119→56 和 119→44,碎裂电压 60 V,碰撞能分别为 8、5、8、15 和 20 V。在使用的 5 个变迁离子中,BMAA、DAB 和 AEG 分别缺少 119→101、119→88 和 119→88,均具有 4 个不同的变迁离子用于定性分析。在定量计算 BMAA、DAB 和 AEG 浓度时,分别采用变迁离子 119→88、119→101 和 119→102 的峰面积进行计算。

1.3.5 藻细胞中氨基酸的分析 应用 Hitachi L-8800 氨基酸自动分析仪测定藻细胞中天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸和脯氨酸共 16 种氨基酸的含量。参照《食品中氨基酸的测定(GB/T5009.124-2016)》中的要求,色谱柱选用磺酸型阳离子树脂,柱温 50 °C,反应器温度 135 °C,进样量 20 μL,泵 1 流速 0.40 mL/min,泵 2 流速 0.35 mL/min,检测波长 570 和 440 nm,采用外标法通过峰面积计算样品测定溶液中氨基酸的浓度。

样品中氨基酸含量 X_i (%) 按照下列公式计算:

$$X_i(\%) = \frac{C_i \times M_i \times (S_{s_i} / S_{i_i}) \times V \times 100}{m \times 10^9} \quad (3)$$

式中, C_i : 标准氨基酸浓度(nmol/mL); M_i : 氨基酸分子量; S_{s_i} : 标准品的峰面积; S_{i_i} : 样品的峰面积; V : 样品水解液转移定容的体积(mL); m : 样品湿重(g)。

1.4 BMAA 与氨基酸联合作用对球等鞭金藻生长状况的影响

1.4.1 球等鞭金藻的室内培养及 96 h 抑制率的计算 采用 1.2.1 部分相同的方法配制微藻培养液,选用 250 mL 锥形瓶,培养体系 150 mL,接种的初始密度在 5×10^5 cells/mL 左右。参考前面的研究结果,选取 BMAA 对球等鞭金藻的 96 h-EC₅₀ 值(2 μmol/L)为暴露浓度,设置空白对照组、2 μmol/L 单一氨基酸组(20 种氨基酸对应 20 组)、2 μmol/L 20 种氨基酸组、2 μmol/L BMAA 组、2 μmol/L (BMAA+单一氨基酸)组(20 种氨基酸对应 20 组)、2 μmol/L (BMAA+20 种氨基酸)组共 44 组,每组 3 个平行。设置光照培养箱温度 18 °C,光照强度 6 000 lx,光暗比 12 h : 12 h,每天分 3 次定时摇匀藻液,并随机更换藻液的位置。采用 1.2.2 部分相同的方法,计数藻细胞密度,并计算比生长率和抑制率。

1.4.2 藻细胞中 BMAA 的提取和分析 球等鞭金藻染毒培养 96 h 后,充分摇匀藻液,选取空白对照组、2 μmol/L BMAA 组、2 μmol/L (BMAA+色氨酸)组、2 μmol/L (BMAA+谷氨酰胺)组、2 μmol/L (BMAA+蛋氨酸)组、2 μmol/L (BMAA+精氨酸)组、2 μmol/L (BMAA+丝氨酸)组共 7 组,每瓶藻液取 100 mL 于 4 °C 条件下以 8 000 r/min 转速离心 10 min 收集藻细胞,离心后的上清液用于提取总溶解态 BMAA。BMAA 毒素提取和分析方法分别见 1.3.2 和 1.3.4 部分。

1.5 数据统计分析

全部数据采用 SPSS 20.0 软件进行分析,在 $P < 0.05$ 水平下通过单因素方差分析(One way ANOVA)对不同处理组的数据进行两两比较,用不同的字母表示两组数据间具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 BMAA 对球等鞭金藻生长的抑制效应

不同浓度的 BMAA 与球等鞭金藻暴露接触 96 h 后微藻的生长曲线如图 1 所示。从图中可以看出,球等鞭金藻与不同浓度的 BMAA 暴露接触 24 h 后即表现出生长密度的差异,随着培养时间的延长这种差

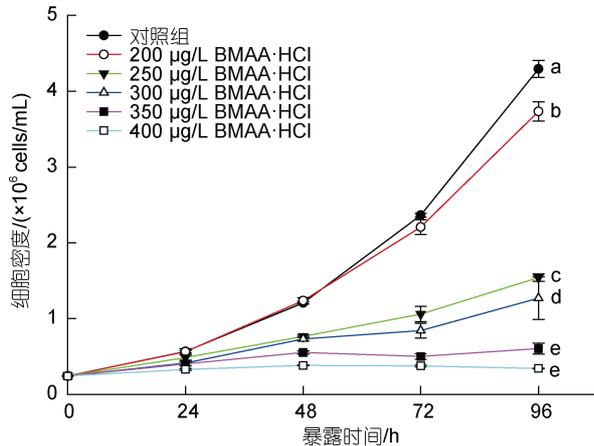


图1 不同浓度 BMAA 暴露条件下球等鞭金藻的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *Isochrysis galbana* (3011) under different concentrations of BMAA during 96-hours exposure period

注: 不同字母表示各组间具有显著差异($P < 0.05$)

异越来越明显。在 96 h 内, BMAA 对球等鞭金藻生长的抑制效应与培养体系中 BMAA 的浓度呈正相关关系。暴露接触 96 h 后, 与对照组相比, 200 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl 对球等鞭金藻的生长抑制率仅为 5%, 表现为轻微抑制; 而当浓度增加至 250 $\mu\text{g/L}$ 时, 生长抑制率迅速提高至 36%; 在最高暴露浓度 400 $\mu\text{g/L}$ 时, 生长抑制率达到 88%, 球等鞭金藻的生长几乎被完全抑制。需要指出的是, 在前期实验中已经验证了毒素溶剂中 2 mmol/L HCl 对球等鞭金藻的生长未见影响, 因此可以确定外源 BMAA 对球等鞭金藻的比生长率产生了抑制效应。

参考《化学品: 藻类生长抑制试验(GB/T 21805—2008)》中绘制受试微藻剂量-效应曲线的方法, 使用染毒 96 h 后不同浓度 BMAA 实验组中微藻的抑制率和对应的 BMAA 毒素浓度的对数值做相关性分析, 得到拟合曲线 $Y=2.638 6X-6.023 8$, $R^2=0.970 1$, 说明剂量-效应曲线的线性关系良好。最后计算得 BMAA 毒素对球等鞭金藻的 96 h- EC_{50} 值为 297 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl, 约为 2 $\mu\text{mol/L}$ BMAA。

本研究首次发现了外源 BMAA 毒素对球等鞭金藻生长的抑制效应, 这种毒性效应与前期报道的蓝藻藻株的 BMAA 毒素暴露实验的结果相似。在向 BG11 培养基中加入 4.2 $\mu\text{mol/L}$ (约合 649 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl) 和 42 $\mu\text{mol/L}$ (约合 6493 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl) 的外源 BMAA 后, 48 h 内 BMAA 对集胞藻 PCC6803 的生长具有明显的抑制作用, 染毒组藻液颜色明显浅于对照组, 表现出萎黄病的症状, 平均

比生长率也始终低于对照组(高浓度染毒组的平均比生长率甚至为负数, 呈现负增长), 在 192 h 内无法恢复至对照组的藻细胞密度(Downing *et al*, 2012)。另一项研究表明, 20 $\mu\text{mol/L}$ 外源 BMAA (约合 3 092 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl) 能够造成固氮念珠藻 PCC7120 在 48 h 内生长完全停滞, 并出现类似萎黄病的症状, 但这种抑制效应在染毒 7 d 后逐渐消失, 表明蓝藻细胞内的 BMAA 能够被代谢或降解(Berntzon *et al*, 2013)。此外, 20 $\mu\text{mol/L}$ 外源 BMAA 在 48 h 内显著抑制鱼腥藻 PCC7120 的生长, 当毒素浓度增加至 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时受试藻细胞生长完全停滞, 并出现了细胞裂解的现象(Popova *et al*, 2018)。本研究中所使用的 BMAA 暴露浓度远低于这些毒性实验中使用的剂量, 但在暴露浓度 400 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl 时, 球等鞭金藻的比生长率的抑制率已高达 88%, 说明球等鞭金藻对 BMAA 的毒性效应相对蓝藻而言更敏感。本研究中各实验组的藻液颜色在染毒 8 d 后也逐渐加深, 表明 BMAA 对球等鞭金藻的抑制效应随时间延长逐渐减弱。

2.2 球等鞭金藻对外源 BMAA 的吸收及其氨基酸含量分析

2.2.1 球等鞭金藻对外源 BMAA 的吸收

本研究采用 LC-MS/MS 方法分析了球等鞭金藻与 BMAA 毒素暴露培养 96 h 后藻细胞内的 BMAA 及其同分异构体 DAB 和 AEG 的含量, 色谱图如图 2 所示。从图中可以看出, 空白对照组培养的球等鞭金藻细胞内未检出 BMAA 和 AEG, 但含有少量的 DAB 毒素, 而在与 BMAA 暴露培养 96 h 后的球等鞭金藻细胞内检出 BMAA, 说明外源 BMAA 可以进入藻细胞内抑制球等鞭金藻的有丝分裂过程。关于 DAB 的检出并不意外, 已有大量研究报道蓝藻、硅藻、贝类及其他水生动物样品中检出 DAB, 且未见明显的种间差异, 总体含量较低(Réveillon *et al*, 2014; Fan *et al*, 2015; Li *et al*, 2018; Wang *et al*, 2021)。该毒素不是本研究的重点, 在此不作详细讨论。

染毒 96 h 后球等鞭金藻单位细胞中 BMAA 和 DAB 含量如图 3 所示。从图中可以看出, 染毒后细胞中 BMAA 主要以总溶解态形式(>99%)存在, 沉淀结合态 BMAA 的含量很低; 在总溶解态 BMAA 中, 约有 36%~51%的 BMAA 是以游离态形式存在, 并且单位细胞内游离态和总溶解态 BMAA 的含量与体系中外源 BMAA 的加入量呈正相关, 进一步说明细胞内的 BMAA 来自于培养基中的外源毒素。球等鞭金藻

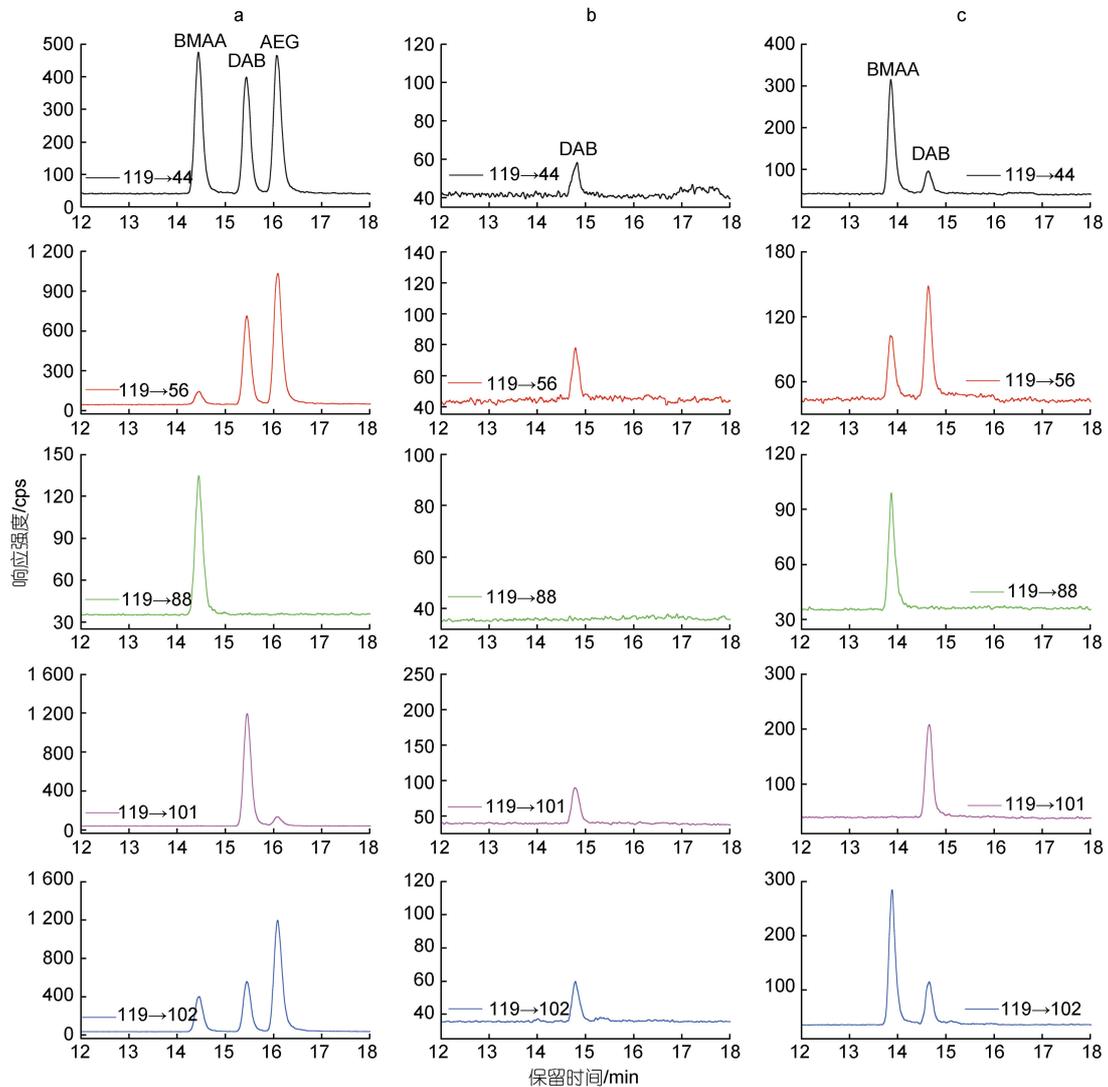


图2 LC-MS/MS 分析 BMAA、DAB 和 AEG 的色谱图

Fig.2 LC-MS/MS chromatograms of (a) BMAA, DAB and AEG mixed standards, (b) total soluble bound extract of *Isochrysis galbana* (3011) from the control group, and (c) total soluble bound extract of *I. galbana* (3011) after 96-hours exposure to 300 µg/L BMAA·HCl
注: a. 0.25 µg/mL BMAA、DAB 和 AEG 混合标准; b. 对照组球等鞭藻总溶解态提取液; c. 300 µg/L BMAA·HCl 组染毒 96 h 后球等鞭藻总溶解态提取液

细胞中 DAB 的本底值为 0.12 fg/cell, DAB 在球等鞭藻细胞中主要以溶解结合态为主, 几乎不含沉淀结合态形式; 仅在浓度最高的 700 µg/L BMAA·HCl 实验组中检出游离态 DAB。虽然所有实验组中球等鞭藻细胞中 DAB 含量普遍较低(<6 fg/cell), 但单位细胞内 DAB 含量也随着 BMAA 暴露浓度的增加而升高, 与体系中外源 BMAA 的加入量呈正相关。目前尚无法解释这种现象, 推测可能是球等鞭藻在吸收外源 BMAA 的过程中, 转化产生了少量的 DAB, 也可能是由于球等鞭藻受到 BMAA 毒素的抑制胁迫后, 使得 DAB 的合成量升高。

据报道, 集胞藻 PCC6803 在含有 0.5 和 5 µmol/L

的 BMAA 培养基中暴露接触 10 min 后, 单位细胞内游离态和沉淀结合态 BMAA 含量明显上升, 且表现出明显的浓度依赖性, 但在 24 h 后单位细胞中游离态和蛋白结合态 BMAA 含量逐渐下降, 蛋白结合态 BMAA 在 72 h 时已无法检出, 表明蓝藻能够迅速吸收体系中的 BMAA 并逐渐将其代谢排出或转化为其他物质(Downing *et al*, 2012)。念珠藻 PCC7120 在 1 min 内也能够迅速吸收体系中的 10 µmol/L 外源 ^{14}C -BMAA, 且单位细胞内 ^{14}C -BMAA 在 30 min 内持续增加(Berntzon *et al*, 2013)。海洋硅藻三角褐指藻和威氏海链藻在添加 0.05 µmol/L 外源 BMAA 的培养体系中, 单位细胞内游离态和蛋白结合态 BMAA 的含

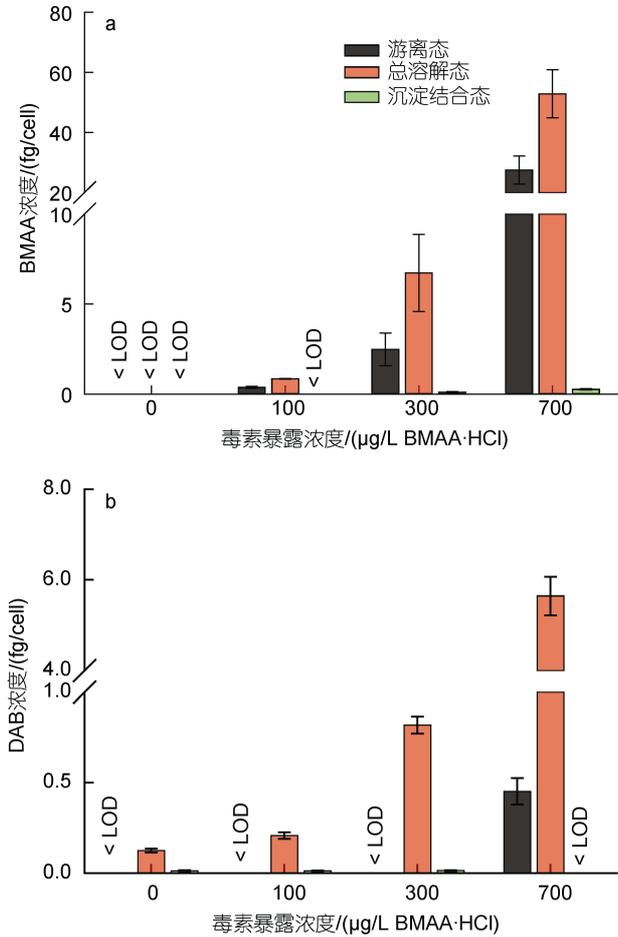


图3 BMAA 暴露接触 96 h 后球等鞭金藻单位细胞中 BMAA (a) 和 DAB (b) 的含量

Fig.3 Concentrations of BMAA (a) and DAB (b) detected in *Isochrysis galbana* (3011) after 96-hours exposure to BMAA

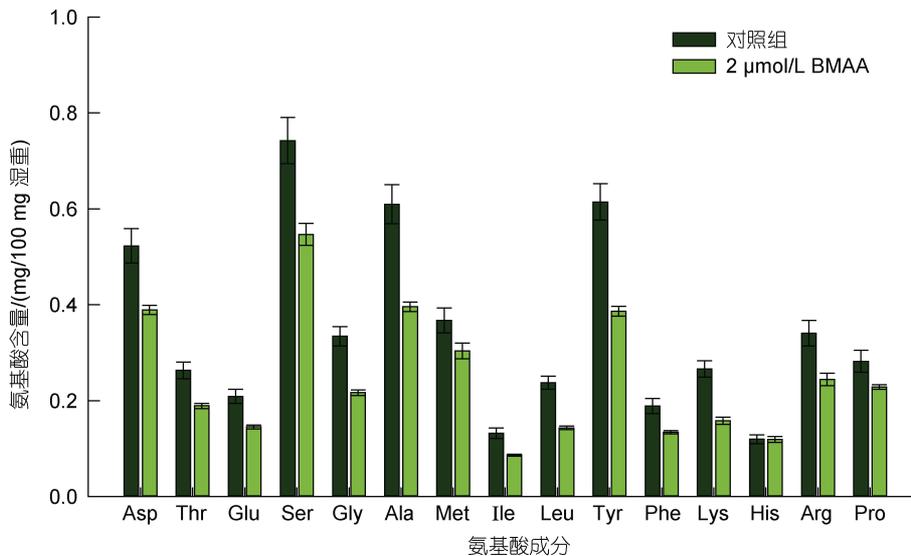


图4 BMAA 暴露接触 96 h 实验组与对照组中球等鞭金藻细胞中氨基酸含量的对比(mg/100 mg 湿重)

Fig.4 Comparison in the content of amino acids (mg/100 mg wet weight) in *Isochrysis galbana* (3011) after 96-hours exposure to BMAA and control groups

量在 96 h 内呈现先升高后降低的趋势(Lage *et al*, 2016)。另外在细菌与外源 BMAA 的暴露实验中(100 µM BMAA), 发现 *Escherichia coli*、*Staphylococcus epidermis*、*Lactobacillus casei*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Micrococcus luteus* 6 种细菌均检出游离态和沉淀结合态 BMAA (van Onselen *et al*, 2015)。但这些研究中均未检测 BMAA 的其他同系物成分。

2.2.2 球等鞭金藻与 BMAA 暴露接触后细胞内氨基酸含量的变化 球等鞭金藻与 BMAA 暴露接触 96 h 后细胞中 16 种氨基酸含量与空白对照组的对比如图 4 所示。需要指出的是, 本研究采用盐酸水解法提取球等鞭金藻细胞内的氨基酸, 由于色氨酸和半胱氨酸在水解过程中被破坏, 天冬酰胺和谷氨酰胺在水解过程中转化为天冬氨酸和谷氨酸, 因此本方法只能检测其他 16 种氨基酸的含量。从图 4 可以看出, 除缬氨酸(Val)外, 其余 15 种氨基酸在球等鞭金藻细胞中均被检出, 对照组和 2 µmol/L BMAA (300 µg/L BMAA·HCl)组中含量最高的氨基酸均为丝氨酸, 分别占藻细胞氨基酸总量的 74.2%和 54.7%。早期人们对球等鞭金藻主要营养成分的分析结果显示, 氨基酸总量占藻细胞干重的 33.74%, 必需氨基酸总量占藻细胞干重的 16.26%(陈淑芬等, 1987)。鄢朝(2012)对球等鞭金藻的测定结果显示, 谷氨酸的含量最高, 占细胞干重的 5.09%, 氨基酸总量占细胞干重的 32.15%, 必需氨基酸总量占细胞干重的 13.41%。假定离心收集后的藻细胞含水率在 80%左右, 换算

后本研究中对照组球等鞭金藻氨基酸总量占藻细胞干重的 26.15%，基本与上述研究结果一致。此外，与对照组相比，300 $\mu\text{g/L}$ BMAA·HCl 未显著影响球等鞭金藻细胞内氨基酸的种类和组成比例($P>0.05$)，但除组氨酸(His)外，其余 14 种氨基酸的含量均明显降低($P<0.05$)，其中以酪氨酸(Tyr)、丙氨酸(Ala)和丝氨酸(Ser)最为明显，分别降低了 36%、34%和 26%，表明 BMAA 在抑制球等鞭金藻细胞分裂的过程中也降低

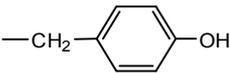
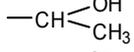
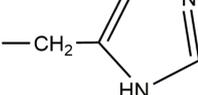
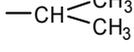
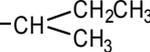
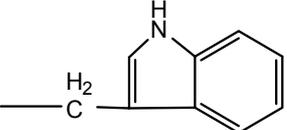
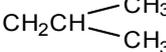
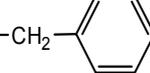
了细胞内的氨基酸合成。

2.3 氨基酸和 BMAA 联合作用对球等鞭金藻生长状况的影响

2.3.1 氨基酸可促进 BMAA 对球等鞭金藻生长的抑制效应 氨基酸单独或与 BMAA 联合作用于球等鞭金藻 96 h 后的生长抑制率如表 1 所示。从表中可以看出，20 种氨基酸单独作用于球等鞭金藻的生长抑制率均在 $\pm 3\%$ 以内，表明外加 2 $\mu\text{mol/L}$ 的氨基酸对球

表 1 氨基酸单独作用(2 $\mu\text{mol/L}$)及其与 BMAA 联合作用(2 $\mu\text{mol/L}$ BMAA+2 $\mu\text{mol/L}$ 氨基酸) 96 h 后球等鞭金藻生长的抑制率

Tab.1 The inhibition rates of *Isochrysis galbana* (3011) after 96-hours exposure to 2 $\mu\text{mol/L}$ amino acids and mixed solution of 2 $\mu\text{mol/L}$ amino acids and 2 $\mu\text{mol/L}$ BMAA

氨基酸	氨基酸 R 基团结构	氨基酸性质	氨基酸单独作用的抑制率/%	联合作用的抑制率/%
天冬酰胺(Asn)	$-\text{CH}_2\text{CONH}_2$	极性、不带电荷	-2	46
甘氨酸(Gly)	$-\text{H}$	非极性、不带电荷	-1	11
丙氨酸(Ala)	$-\text{CH}_3$	非极性	-1	38
天冬氨酸(Asp)	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	酸性	-1	28
谷氨酰胺(Gln)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$	极性、不带电荷	-1	52
酪氨酸(Tyr)		极性、不带电荷	0	65
苏氨酸(Thr)		极性、不带电荷	0	5
组氨酸(His)		碱性	0	45
谷氨酸(Glu)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	酸性	1	39
脯氨酸(Pro)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	非极性	1	0
缬氨酸(Val)		非极性	2	17
精氨酸(Arg)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$	碱性	2	47
丝氨酸(Ser)	$-\text{CH}_2\text{OH}$	极性、不带电荷	2	13
异亮氨酸(Ile)		非极性	2	19
色氨酸(Trp)		非极性	2	60
亮氨酸(Leu)		非极性	2	58
半胱氨酸(Cys)	$-\text{CH}_2-\text{SH}$	极性、不带电荷	3	60
赖氨酸(Arg)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	碱性	3	16
苯丙氨酸(Phe)		非极性	3	53
蛋氨酸(Met)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	非极性	3	49
20 种氨基酸混合	/	/	0	54

注：联合毒性作用的批次实验中，对照组 2 $\mu\text{mol/L}$ BMAA 单独暴露条件下的抑制率为 11%

等鞭金藻的生长没有明显的影响。除溶解性无机氮(dissolved inorganic nitrogen, DIN)外, 溶解性有机氮(dissolved organic nitrogen, DON)也是海洋微藻的重要氮源, 其中溶解性游离态氨基酸(dissolved free amino acid, DFAA)在海洋中的浓度通常低于 $5 \mu\text{mol/L}$ (徐宁等, 2013)。部分海洋微藻在 DIN 含量不足的情况下能够通过多种方式利用环境中的 DFAA, 如通过细胞膜上的氨基酸转运系统, 将与 Na^+ 形成络合物的 DFAA 和 Na^+ 一起转运进入细胞, 同时将 K^+ 排出细胞, 从而吸收环境中部分带有电荷的特定 DFAA (John *et al.*, 1999)。此外, 部分微藻能够与细菌相互作用, 利用细菌产生的多肽水解酶将海洋环境中的多肽分解为 DFAA, 同时释放 L-氨基酸氧化酶, 将 DFAA 氧化为铵盐, 从而间接利用 DFAA (Mulholland *et al.*, 2003)。氨基酸在藻细胞生命活动中起着重要作用, 通常不会对微藻产生毒害作用, 有时微藻吸收利用环境中 DFAA 的量甚至达到总氮吸收量的 50% 以上(徐宁等, 2013)。前期研究发现, 4.2 和 $42 \mu\text{mol/L}$ 的外源精氨酸、天冬酰胺、谷氨酸和甘氨酸在 192 h 内未对集胞藻 PCC6803 的生长产生抑制作用(Downing *et al.*, 2012); 羊角月牙藻(*Selenastrum carpricornutum*)能够直接吸收利用培养体系中 $10 \mu\text{mol/L}$ 的游离态丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和精氨酸作为唯一氮源进行快速生长(翟天恩等, 2017); 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)能够利用 $100 \mu\text{mol/L}$ 精氨酸、丙氨酸和亮氨酸作为氮源进行生长, 而谷氨酸、天冬氨酸和赖氨酸虽然不能被细胞利用, 但对藻细胞也未表现出毒害作用(Dai *et al.*, 2009)。本研究中添加的 20 种外源氨基酸对球等鞭金藻的生长均没有明显的促进作用, 这可能是因为培养体系中含有较充足的 DIN, 球等鞭金藻尚未启动利用 DFAA 的机制。

但本研究发现大部分氨基酸与 BMAA 联合作用时对球等鞭金藻的生长产生了明显的抑制效应, 除 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+脯氨酸)组、 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+苏氨酸)组和 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+甘氨酸)组, 其余 18 个实验组的 96 h 生长抑制率均高于 BMAA 单独作用组(11%), 其中 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+半胱氨酸)组、 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+色氨酸)组和 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+酪氨酸)组的 96 h 生长抑制率高达 60%。从氨基酸 R 基的结构来看, 联合毒性作用下 96 h 生长抑制率超过 50% 的氨基酸均为非极性氨基酸和极性、不带电荷的氨基酸, 而酸性氨基酸与碱性氨基酸的 96 h 生长抑制率均未超过 50%, 似乎表明非极性氨基酸和极性、

不带电荷的氨基酸与 BMAA 联合作用时对生长的抑制作用更强。需要指出的是, 在这批联合毒性实验中 $2 \mu\text{mol/L}$ BMAA 组的 96 h 生长抑制率并没有达到预期的 50% (2.1 部分), 这可能与此次实验所用的天然海水或者藻细胞初始生长状况等因素有关。目前有关 BMAA 与其他污染物对微藻联合毒性作用的研究较少。据报道, $80 \mu\text{g/L}$ 的 BMAA 与 $20 \mu\text{g/L}$ 的微囊藻毒素(MC-LR)联合作用于一种淡水绿藻——毯藻 *Aegagropila linnaei*, 发现两种毒素单独作用下的抗氧化酶活性在染毒 1 和 7 d 后没有明显变化($P>0.05$), 联合作用下也只有过氧化氢酶的活性明显升高($P<0.001$), 表明这两种毒素的联合作用毒性较弱 (Contardo-Jara *et al.*, 2015)。

2.3.2 氨基酸和 BMAA 联合作用下球等鞭金藻对 BMAA 的吸收情况 本研究 2.2 部分已表明球等鞭金藻细胞中 BMAA 和 DAB 主要以总溶解态的形式存在, 因此该部分实验中只分析了部分实验组染毒 96 h 后单位细胞中总溶解态 BMAA 和 DAB 的含量, 结果如图 5 所示。结果表明, 联合毒性作用较强的 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+色氨酸)组、 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+谷氨酰胺)组、 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+蛋氨酸)组和 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+精氨酸)组中单位细胞内总溶解态 BMAA 和 DAB 的含量均明显高于对照组和 $2 \mu\text{mol/L}$ BMAA 单独作用组($P<0.05$), 而联合毒性作用较弱的 $2 \mu\text{mol/L}$ (BMAA+丝氨酸)组(96 h 生长抑制率为 13%)中单位细胞内总溶解态 BMAA 和 DAB 的含量与 $2 \mu\text{mol/L}$ BMAA 单独作用组(96 h 生长抑制率为 11%)相近, 表明单位细胞内总溶解态 BMAA 和 DAB 含量与 96 h 生长抑制率之间具有一定的正相关性。由此来看, 氨基酸与 BMAA 联合暴露的过程中, 氨基酸促进了球等鞭金藻对外源 BMAA 毒素的吸收, 从而使得联合作用实验组中球等鞭金藻的 96 h 抑制率明显升高。这可能是因为当培养基中额外添加氨基酸时, 球等鞭金藻细胞上更多的氨基酸通道被打开, 使得更多的 BMAA 分子通过这些氨基酸通道进入细胞内。但有关 BMAA 抑制球等鞭金藻细胞分裂的机制尚不清楚, 有待深入研究。

3 结论

本研究首次探究了神经毒素 BMAA 对海洋球等鞭金藻的毒性作用, 其对球等鞭金藻比生长率的抑制效应浓度 96 h- EC_{50} 约为 $2 \mu\text{mol/L}$ 。球等鞭金藻能够吸收培养体系中的外源 BMAA 毒素, 且吸收量与

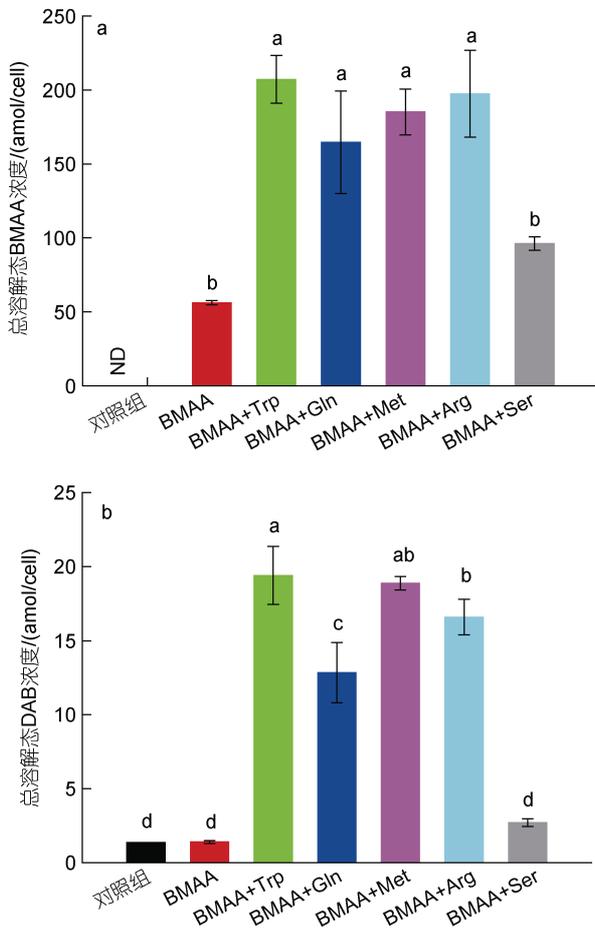


图5 染毒96 h后球等鞭金藻单位细胞总溶解态 BMAA (a) 和 DAB (b) 的含量

Fig.5 Contents of total soluble BMAA (a) and DAB (b) in *Isochrysis galbana* (3011) after 96-hours exposure
注: 不同字母表示各组间具有显著差异($P < 0.05$); ND 表示未检测到

BMAA 的添加浓度呈正相关; 进入藻细胞内的 BMAA 毒素多半以溶解结合态的形式存在, 且 DAB 的含量也随着 BMAA 暴露浓度的增加而升高; 在 BMAA 毒素暴露实验组中, 球等鞭金藻细胞中除缬氨酸外, 所测的其他 15 种氨基酸的合成量明显降低。大多数氨基酸在与 BMAA 联合作用的过程中, 促进了球等鞭金藻对外源 BMAA 的吸收, 增强了 BMAA 对球等鞭金藻生长的抑制效应。

参 考 文 献

牛琦, 丁新生, 2012. 蓝藻菌/ β -N-甲基-L-丙氨酸学说在肌萎缩侧索硬化症及其他神经变性致病机制中的研究进展[J]. 中国临床神经科学, 20(3): 307-311, doi: 10.3969/j.issn.1008-0678.2012.03.013.
李爱峰, 于仁成, 李锋民, 等, 2009. 神经毒素 β -N-甲基-L-丙氨酸的毒理学与检测方法研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 23(2): 152-156, doi: 10.3867/j.issn.1000-3002.

2009.02.012.
陈淑芬, 潘永尧, 1987. 等鞭藻的生长及其主要营养成分的研究[J]. 海洋与湖沼, 18(1): 55-63.
徐宁, 刘静雅, 赖海燕, 等, 2013. 海洋微藻对游离氨基酸的利用特性研究[J]. 环境科学学报, 33(4): 1058-1065, doi: 10.13671/j.hjkxxb.2013.04.007.
鄢朝, 2012. 不同饵料对大珠母贝、葡萄牙牡蛎和马氏珠母贝浮游幼虫生长和存活率的影响及相关机理研究[D]. 海口: 海南大学: 35.
翟天恩, 霍守亮, 张靖天, 等, 2017. 游离态氨基酸对羊角月牙藻的生物有效性[J]. 环境工程技术学报, 7(3): 348-356, doi: 10.3969/j.issn.1674-991X.2017.03.049.
BERNTZON L, ERASMIE S, CELEPLI N, *et al*, 2013. BMAA inhibits nitrogen fixation in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120 [J]. Marine Drugs, 11(8): 3091-3108, doi: 10.3390/md11083091.
CONTARDO-JARA V, FUNKE M S, PEUTHERT A, *et al*, 2013. β -N-methylamino-L-alanine exposure alters defense against oxidative stress in aquatic plants *Lomariopsis lineata*, *Fontinalis antipyretica*, *Riccia fluitans* and *Taxiphyllum barbieri* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 88: 72-78, doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.026.
CONTARDO-JARA V, KUEHN S, PFLUGMACHER S, 2015. Single and combined exposure to MC-LR and BMAA confirm suitability of *Aegagropila linnaei* for use in green liver systems[®]-A case study with cyanobacterial toxins [J]. Aquatic Toxicology, 165: 101-108, doi: 10.1016/j.aquatox.2015.05.017.
COX P A, BANACK S A, MURCH S J, 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(23): 13380-13383, doi: 10.1073/pnas.2235808100.
COX P A, DAVIS D A, MASH D C, *et al*, 2016. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283(1823): 20152397, doi: 10.1098/rspb.2015.2397.
CUCCHIARONI M L, VISCOMI M T, BERNARDI G, *et al*, 2010. Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative β -N-methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons [J]. Journal of Neuroscience, 30(15): 5176-5188, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5351-09.2010.
DAI R H, LIU H J, QU J H, *et al*, 2009. Effects of amino acids on microcystin production of the *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Hazardous Materials, 161(2/3): 730-736, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.04.015.
DOWNING S, VAN DE VENTER M, DOWNING T G, 2012. The effect of exogenous β -N-methylamino-L-alanine on the growth of *Synechocystis* PCC6803 [J]. Microbial Ecology, 63(1): 149-156, doi: 10.1007/s00248-011-9958-9.
ESTERHUIZEN-LONDT M, PFLUGMACHER S, DOWNING T G, 2011. The effect of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA)

- on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum* [J]. *Toxicon*, 57(5): 803-810, doi: 10.1016/j.toxicon.2011.02.015.
- FAN H, QIU J B, FAN L, *et al*, 2015. Effects of growth conditions on the production of neurotoxin 2,4-diaminobutyric acid (DAB) in *Microcystis aeruginosa* and its universal presence in diverse cyanobacteria isolated from freshwater in China [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8): 5943-5951, doi: 10.1007/s11356-014-3766-y.
- GUILLARD R R L, HARGRAVES P E, 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte [J]. *Phycologia*, 32(3): 234-236, doi: 10.2216/i0031-8884-32-3-234.1.
- INCE P G, CODD G A, 2005. Return of the cycad hypothesis—does the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) of Guam have new implications for global health? [J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(4): 345-353, doi: 10.1111/j.1365-2990.2005.00686.x.
- JOHN E H, FLYNN K J, 1999. Amino acid uptake by the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J]. *Marine Biology*, 133(1): 11-19, doi: 10.1007/s002270050437.
- LAGE S, STRÖM L, GODHE A, *et al*, 2016. The effect of exogenous β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira weissflogii* [J]. *Harmful Algae*, 58: 85-92, doi: 10.1016/j.hal.2016.08.005.
- LANCE E, ARNICH N, MAIGNIEN T, *et al*, 2018. Correction: occurrence of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers in aquatic environments and aquatic food sources for humans. *Toxins* 2018, 10, 83 [J]. *Toxins*, 10(5): 191, doi: 10.3390/toxins10050191.
- LI A F, ESPINOZA J, HAMDOUN A, 2020. Inhibitory effects of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus pictus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 221: 105425, doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105425.
- LI A F, HU Y, SONG J L, *et al*, 2018. Ubiquity of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine and its isomers confirmed by two different mass spectrometric methods in diverse marine mollusks [J]. *Toxicon*, 151: 129-136, doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.004.
- LI A F, SONG J L, HU Y, *et al*, 2016. New typical vector of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in the marine benthic ecosystem [J]. *Marine Drugs*, 14(11): 202.
- LINDSTRÖM H, LUTTMAN J, MOUTON P, *et al*, 1990. Plant-derived neurotoxic amino acids (β -N-oxalylamino-L-alanine and β -N-methylamino-L-alanine): effects on central monoamine neurons [J]. *Journal of Neurochemistry*, 55(3): 941-949, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04582.x.
- LIU X Q, RUSH T, ZAPATA J, *et al*, 2009. β -N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc⁻ [J]. *Experimental Neurology*, 217(2): 429-433, doi: 10.1016/j.expneurol.2009.04.002.
- LÜRLING M, FAASSEN E J, VAN EENENNAAM J S, 2011. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna* [J]. *Journal of Plankton Research*, 33(2): 333-342, doi: 10.1093/plankt/fbq130.
- MULHOLLAND M R, LEE C, GLIBERT P M, 2003. Extracellular enzyme activity and uptake of carbon and nitrogen along an estuarine salinity and nutrient gradient [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 258: 3-17, doi: 10.3354/meps258003.
- MURCH S J, COX P A, BANACK S A, *et al*, 2004a. Occurrence of β -methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam [J]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 110(4): 267-269, doi: 10.1111/j.1600-0404.2004.00320.x.
- MURCH S J, COX P A, BANACK S A, 2004b. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33): 12228-12231, doi: 10.1073/pnas.0404926101.
- NEDELJKOV V, LOPIČIĆ S, PAVLOVIĆ D, *et al*, 2005. Electrophysiological effect of β -N-methylamino-L-alanine on retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga* [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1048(1): 349-351, doi: 10.1196/annals.1342.034.
- PABLO J, BANACK S A, COX P A, *et al*, 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease [J]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 120(4): 216-225, doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01150.x.
- POPOVA A A, RASMUSSEN U, SEMASHKO T A, *et al*, 2018. Stress effects of cyanotoxin β -methylamino-L-alanine (BMAA) on cyanobacterial heterocyst formation and functionality [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3): 369-377, doi: 10.1111/1758-2229.12647.
- PURDIE E L, SAMSUDIN S, EDDY F B, *et al*, 2009. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 95(4): 279-284, doi: 10.1016/j.aquatox.2009.02.009.
- RAO S D, BANACK S A, COX P A, *et al*, 2006. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation [J]. *Experimental Neurology*, 201(1): 244-252, doi: 10.1016/j.expneurol.2006.04.017.
- RÉVEILLON D, ABADIE E, SÉCHET V, *et al*, 2014. Beta-N-methylamino-L-alanine: LC-MS/MS optimization, screening of cyanobacterial strains and occurrence in shellfish from Thau, a French Mediterranean lagoon [J]. *Marine Drugs*, 12(11): 5441-5467, doi: 10.3390/md12115441.
- ROSÉN J, WESTERBERG E, SCHMIEDT S, *et al*, 2016. BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels [J]. *Toxicon*, 109: 45-50, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.11.008.
- SCOTT L, DOWNING T, 2019. Dose-dependent adult neurodegeneration in a rat model after neonatal exposure to β -N-Methylamino-L-Alanine [J]. *Neurotoxicity Research*, 35(3): 711-723, doi: 10.1007/s12640-019-9996-5.
- VAN ONSELEN R, COOK N A, PHELAN R R, *et al*, 2015. Bacteria do not incorporate β -N-methylamino-L-alanine into

- their proteins [J]. *Toxicon*, 102: 55-61, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.05.014.
- WANG J Y, 2015. Acute toxicity of β -*N*-methylamino-*L*-alanine (BMAA) to fathead minnow (*Pimephales promelas*) and zebrafish (*Danio rerio*) [D]. Lincoln, Nebraska, USA: University of Nebraska.
- WANG C, YAN C, QIU J B, *et al*, 2021. Food web biomagnification of the neurotoxin β -*N*-methylamino-*L*-alanine in a diatom-dominated marine ecosystem in China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 404: 124217, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124217.
- WEISS J H, CHOI D W, 1988. Beta-*N*-methylamino-*L*-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor [J]. *Science*, 241(4868): 973-975, doi: 10.1126/science.3136549.

EFFECT OF NEUROTOXIN BMAA ON GROWTH OF MICROALGA *ISOCHRYSIS GALBANA* IN BATCH CULTURES

LI Ai-Feng^{1,2}, LIU Jian-Wei¹, HU Yang¹, FU Yi-Lei¹, QIU Jiang-Bing^{1,2}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266100, China)

Abstract Neurotoxin β -*N*-methylamino-*L*-alanine (BMAA) is mainly produced by cyanobacteria and diatoms in the freshwater or marine environments, and it has obvious biomagnification behavior in food web in the marine ecosystem, which has been supposed as an important environmental factor inducing multiple neurodegenerative diseases such as Alzheimer's Disease. In recent years, BMAA and its isomer, 2,4-diaminobutyric acid (DAB), have been widely detected in diverse shellfish aquatic products in China and many other coastal countries or regions, which potentially would threaten the health of consumers and marine ecosystem safety. However, the chemical ecology effect of BMAA on marine microalgae is still unknown. In this study, the effect of BMAA alone and its combination with different amino acids on the specific growth rate and amino acid content of *Isochrysis galbana*, as well as the accumulation of exogenous BMAA by microalgae were studied, through separately adding BMAA in different concentrations and twenty different protein amino acids to the media for batch cultures of microalga *I. galbana*. Results show that the microalga *I. galbana* could accumulate exogenous BMAA from the culture media depending on the concentration of BMAA. More than half of BMAA molecules were present in soluble protein-associate form in the microalgal cells. The 96 h-EC₅₀ value of BMAA was inferred as 2 μ mol/L to inhibit the specific growth rate of *I. galbana* in the batch cultures. Compared with the control groups, the synthesis amounts of fifteen amino acids such as tyrosine, alanine, and serine were significantly decreased in the microalgal cells after 96-h exposure to BMAA. Except for proline, threonine, and glycine, the other seventeen amino acids combined with BMAA enhanced the inhibitory effect of BMAA on the specific growth rate of *I. galbana*, by probably promoting the accumulation of exogenous BMAA by microalgae from the culture media. Therefore, the chemical ecology role of BMAA in marine ecosystems especially in the nearshore regions and the molecular mechanism of BMAA inhibiting the mitosis of *I. galbana* shall be revealed in the future.

Key words *Isochrysis galbana*; β -*N*-methylamino-*L*-alanine (BMAA); neurotoxin; amino acids; inhibitory effect; specific growth rate