

化感物质对小球藻抗氧化体系酶活性的影响

李锋民^{1,2}, 胡洪营^{1*}, 门玉洁¹, 洪喻¹, 郭美婷¹

(1. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084; 2. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要: 利用水生植物产生的化感物质抑制有害藻类是 1 种藻类控制新技术. 研究了选择性抑藻化感物质 EMA 对蛋白核小球藻和普通小球藻抗氧化酶体系活性的影响. 结果显示, 化感物质浓度为 0.25 mg/L 时, 2 种藻类的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性都高于对照组. 但随着化感物质浓度的升高, 蛋白核小球藻 3 种酶活性都逐渐下降, 当化感物质浓度为 4 mg/L 时, SOD 活性为 0; 而普通小球藻的酶活性随着化感物质浓度升高持续升高, 都达到对照组的 3~4 倍.

关键词: 化感物质; 蛋白核小球藻; 普通小球藻; 抗氧化体系

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)10-2091-04

Effects of EMA on Activities of Algal Antioxidant Enzymes

LI Feng-min^{1,2}, HU Hong-ying¹, MEN Yur-jie¹, HONG Yu¹, GUO Me-ting¹

(1. Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Using allelochemicals produced by macrophytes to control harmful algae is a novel antialgal method. The present research investigated effects of the species-specific antialgal allelochemical EMA on activities of antioxidant enzymes of *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlorella vulgaris*. The results showed that 0.25mg/L of EMA increased activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) of *C. pyrenoidosa* and *C. vulgaris*. With the increase of EMA concentrations, activities of the 3 enzymes of *C. pyrenoidosa* decreased sharply. The activity of SOD of *C. pyrenoidosa* decreased to 0 when the EMA were 4mg/L. With the increase of EMA concentrations, activities of the 3 enzymes of *C. vulgaris* increased to as higher as 3~4 folders of that of the control set. The results gave hints to elucidate the species-specific antialgal mechanisms of EMA.

Key words: allelochemical; *Chlorella pyrenoidosa*; *Chlorella vulgaris*; antioxidant enzymes

藻类暴发性生长产生的水华会造成水体缺氧, 某些藻类还会产生藻毒素, 危及水生动物和人体健康. 因此, 藻类控制成为环境领域的重要课题之一. 现有的藻类控制技术存在费用高、难操作、生态危害大等缺陷, 而限制了其广泛利用. 利用水生植物产生的化感物质抑制藻类的生长是一种高效、安全、易操作的方法^[1, 2].

化感物质是植物产生的次生代谢物质, 可以通过不同的途径释放到环境中影响其它生物的生长. 许多水生植物产生的化感物质能够抑制藻类的生长, 例如芦苇、香蒲、水盾草、穗花狐尾藻、金鱼藻、眼子菜、菹草等^[3~6]. 现有利用水生植物化感物质抑制藻类的研究主要集中在高抑藻能力水生植物的筛选和抑藻化感物质的分离领域^[1~6], 已经分离出多种具有抑制藻类能力的化感物质. 但这些化感物质抑制藻类的机理的研究鲜见报道.

生物在进化过程中形成了一套完整的抵抗外界不良因素的抗氧化酶系统, 主要的抗氧化体系酶有

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等^[7~10]. 正常情况下抗氧化体系酶会消除过量的氧自由基, 使体内的氧代谢处于一个动态的平衡中. 但在外界胁迫下, 植物体内会增加活性氧的产量, 使抗氧化体系不能及时清除这些活性氧. 活性氧可导致植物细胞内发生过氧化反应, 尤其是脂质过氧化反应, 破坏细胞内膜系统, 导致细胞被破坏. 植物细胞内的抗氧化体系酶可以受诱导产生. 当植物受到环境胁迫, 细胞内氧自由基浓度上升时, 抗氧化体系酶活性也会上升; 当细胞内氧自由基浓度超过一定范围, 抗氧化体系酶不能及时清除, 过量的氧自由基会导致抗氧化体系酶活性降低^[11]. 因此, 抗氧化体系酶活性可以间接反映植物细胞内活

收稿日期: 2005-11-10; 修订日期: 2005-12-02

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目(2004BA809B0402)

作者简介: 李锋民(1975~), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物学.

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

性氧的浓度。

前期研究从芦苇中提取出 1 种具有选择性抑藻能力的化感物质 EMA^[12, 13], 该化感物质能强烈抑制蛋白核小球藻的生长, 但不能抑制普通小球藻的生长。本实验研究了化感物质对藻类抗氧化体系酶活性的影响, 为揭示化感物质的抑藻机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

藻类及培养条件: 蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 和普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 由中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库提供。试验前预培养 4d, 使之处于对数生长期。藻类培养基组分 (mg/L): NaNO_3 25.5, NaHCO_3 15, K_2HPO_4 1.04, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.7, MgCl_2 5.7, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.41, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3, H_3BO_4 0.185, MnCl_2 0.264, ZnCl_2 3.27×10^{-3} , $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78×10^{-3} , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.009×10^{-3} , FeCl_3 0.096, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.26×10^{-3} 。培养条件为: 光暗比 14: 10, 温度 25℃。所有培养每天用血球计数板在 16×40 倍显微镜下计数。

化感物质: 本课题组从芦苇中提取获得, EMA 浓度为 10 g/L^[13]。

1.2 实验方法

500mL 的锥形瓶中加入 195mL 培养基、5mL 预培养 4d 的藻种和化感物质溶液 0, 0.5, 1, 2, 4, 8mL, 即藻类培养液中化感物质的浓度为 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/L, 设置 3 组平行样, 继续培养 5d。3 000r/min 离心 5min, 藻细胞用于测定酶活性。藻细胞分别加预冷至 4℃ 的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液 (提取 SOD, CAT, POD 的磷酸缓冲液 pH 分别为 7.0, 7.0, 5.5) 和少量石英砂在 0~4℃ 冰浴中研磨, 匀浆液 7 000r/min 离心 10min, 取上清液即粗酶液测定酶活性。

1.3 分析测定方法

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD; EC1.15.1.1): 采用 Giannopolitis 和 Ries 的方法^[14, 15]。2mL 反应介质包括: 50 mmol/L (pH = 7.0) 磷酸缓冲液, 77.12 $\mu\text{mol/L}$ 氮蓝四唑 (NBT), 0.1 mmol/L EDTA, 13.37 mmol/L 蛋氨酸, 加 0.1mL 80.2 $\mu\text{mol/L}$ 的核黄素溶液 (用含 0.1 mmol/L EDTA 的 50 mmol/L pH = 7.8 的磷酸缓冲液配制)。于 560nm 测定吸光度值。

过氧化物酶 (EC1.11.1.7): 采用 Evans 的方法^[14, 16]。反应体系为: 1mL 2% H_2O_2 , 1mL 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 愈创木酚, 1mL 粗酶液, 反应由加入启动, 25℃ 下测定 A_{470} 变化。

过氧化氢酶 (catalase, CAT; EC1.11.1.6): 碘量法测定^[14]。

2 结果与讨论

2.1 化感物质对藻类 SOD 活性的影响

在藻类培养开始时投加 EMA, 每 200mL 蛋白核小球藻和普通小球藻培养液内所有藻细胞内 SOD 活性 (以吸光度表示) 随培养时间的变化如图 1 和图 2 所示。蛋白核小球藻对照组吸光度在第 0d 时为 0.008, 至第 5d 时达到 0.013, 说明蛋白核小球藻的总 SOD 随培养时间延长逐渐增加, 这是因为随着培养时间的延长, 藻类生长, 藻细胞不断增加导致的。化感物质浓度为 0.25mg/L 时, 培养至第 5d, 吸光度值达到 0.016, 高于对照组。而其它更高浓度下, 吸光度都低于对照组。上述结果说明在不考虑藻细胞数量因素的前提下, 每 200mL 培养液内 SOD 总活性随着化感物质浓度的升高先上升后降低, 化感物质浓度为 0.25 mg/L 时达最高值。而普通小球藻总 SOD 的活性随培养时间的变化与蛋白核小球藻不同, 所有加入化感物质组的吸光度值都高于对照组 (图 2)。

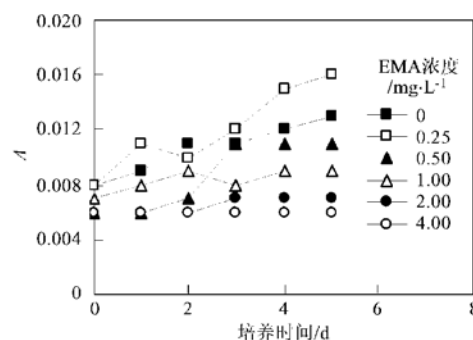


图 1 EMA 对蛋白核小球藻 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effect of the allelochemical on SOD activity of *C. pyrenoidosa*

考虑到藻类生长受 EMA 抑制, 单位体积培养液中的藻细胞数不同, 因此将培养至第 5d 的藻类计数, 计算出单位藻细胞的 SOD 活性, 以 $\Delta A_{470}/(\text{min} \cdot 10^7 \text{ cells})$ 表示。图 3 示出化感物质对蛋白核小球藻和普通小球藻超氧化物歧化酶活性的影响。低浓度的化感物质 (0.25 mg/L) 对 2 种藻的超氧化物歧化酶活性都有促进作用, 但随着化感物质浓度的

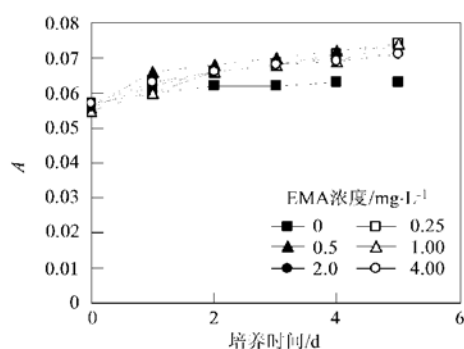


图2 EMA对普通小球藻SOD活性的影响

Fig. 2 Effect of the allelochemical on SOD activity of *C. vulgaris*

增加, 蛋白核小球藻的SOD活性逐渐降低. 当化感物质高于0.5 mg/L时, 蛋白核小球藻的SOD活性已经低于对照组. 化感物质浓度为4 mg/L时, 蛋白核小球藻SOD活性已经为0. 高浓度的化感物质使蛋白核小球藻SOD活性降低, 已经不能除去多余的活性氧. 但所有加入化感物质的普通小球藻的SOD活性大约为对照组SOD活性的3倍, 说明化感物质提高了普通小球藻的SOD活性. 这保证了普通小球藻能及时清除细胞内多余的活性氧, 因此, EMA不能抑制普通小球藻.

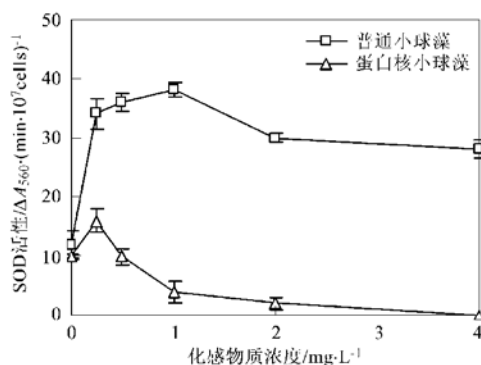


图3 EMA对蛋白核小球藻和普通小球藻SOD活性的影响比较

Fig. 3 Effect of the allelochemical on SOD activity of *C. pyrenoidosa* and *C. vulgaris*

2.2 化感物质对藻类POD活性的影响

化感物质对蛋白核小球藻和普通小球藻过氧化物酶(POD)活性的影响如图4所示. 低浓度的化感物质(0.25 mg/L)对2种藻的POD活性都有促进, 此时蛋白核小球藻的POD活性约为对照组的2倍, 但随着浓度逐渐增加, 蛋白核小球藻POD活性逐渐下降. 而普通小球藻的POD活性随着化感物质浓度的增加则继续升高, 当化感物质浓度为4 mg/L时, 其POD活性达到对照组的4.2倍.

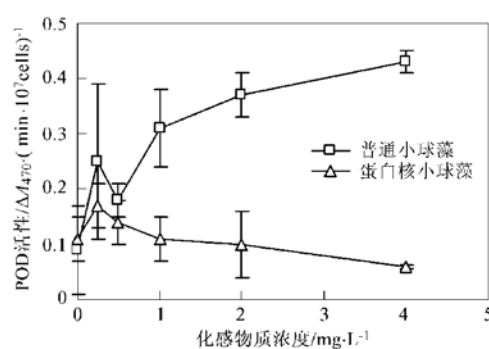


图4 化感物质对蛋白核小球藻、普通小球藻POD活性的影响

Fig. 4 Effect of the allelochemical on POD activity of *C. pyrenoidosa* and *C. vulgaris*

2.3 化感物质对藻类CAT活性的影响

化感物质对2种藻过氧化物酶(CAT)的影响规律与其对SOD、POD的影响规律相类似(图5). 低浓度的化感物质对藻类的CAT活性有促进, 高浓度的化感物质显著降低了蛋白核小球藻的CAT活性, 但化感物质浓度较高时普通小球藻的CAT活性仍能保持在对照组的4倍左右.

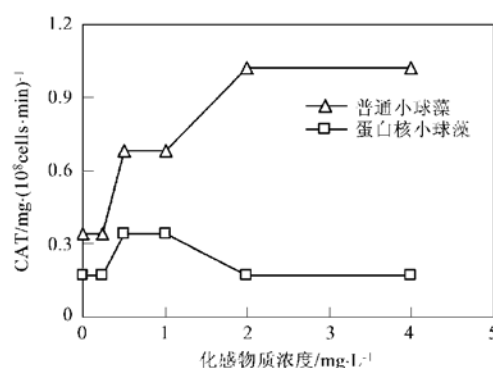


图5 化感物质对蛋白核小球藻、普通小球藻CAT活性的影响

Fig. 5 Effect of the allelochemical on CAT activity of *C. pyrenoidosa* and *C. vulgaris*

在外界胁迫下, 植物体内会增加活性氧如超氧化物阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、氢氧自由基($\cdot OH$)、单线态氧(1O_2)的产量. 这些自由基能参与叶绿体的降解, 降低抗坏血酸含量及抗坏血酸过氧化物酶活性, 导致膜脂过氧化. 某些自由基与光合色素的漂白及膜脂过氧化作用密切相关, 在细胞内 1O_2 能与许多大分子物质发生反应, 从而破坏细胞的正常生长与繁殖. 生物在进化过程中形成了一套完整的抵抗外界不良因素的抗氧化系统, 在一定范围内能消除细胞内因环境压力存在而产生的自由基, 从而起到保护细胞的作用.

本实验的结果显示,低浓度化感物质使藻类 SOD 活性升高,而高浓度化感物质使蛋白核小球藻 SOD 活性下降.这是因为低浓度的化感物质改变了藻细胞内的活性氧代谢平衡,增加了活性氧的积累,致使体内抗氧化系统机能应激加强,以清除体内过多的活性氧.这一结果与其它金属、有机物及干旱等使植物体内 SOD 活性增加的结果相似^[11].而高浓度的化感物质使蛋白核小球藻 SOD 活性下降,说明当 $O_2^{\cdot-}$ 的产生速率大于 SOD 活性增加速率时, $O_2^{\cdot-}$ 及其产物的毒性超过了 SOD 的清除能力,并使 SOD 酶系遭到破坏从而降低了活性.而普通小球藻体内 SOD 活性则不能被化感物质抑制.

低浓度的化感物质使 3 种藻的 POD 活性升高.高浓度的化感物质抑制了蛋白核小球藻的 POD 活性,却使普通小球藻 POD 活性保持在较高值.

高浓度化感物质能使蛋白核小球藻的 SOD、POD、CAT 活性降低,使细胞内活性氧得不到及时清除.活性氧的积累可能会导致细胞内发生脂质过氧化作用,并最终细胞结构被破坏,生长受到抑制.

3 结论

抑藻化感物质 EMA 对蛋白核小球藻和普通小球藻抗氧化体系酶活性的影响表明,低浓度(0.25 mg/L)的 EMA 提高了 2 种藻类的超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性;高浓度的 EMA 显著降低了蛋白核小球藻的抗氧化体系酶活性,而使普通小球藻的抗氧化体系酶活性提高了 3 倍以上.

参考文献:

- [1] Rice E L. Allelopathy [M]. (2nd edition). London: Academic Press. 1984.
- [2] Vyvyan J R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals [J]. Tetradron, 2002, **58**: 1631~ 1646.
- [3] Aliotta G, Greca N D, Monaco P, *et al.* *In vitro* algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. [J]. Journal of Chemical Ecology, 1990, **16**: 2637~ 2646.
- [4] Greca M D, Ferrara M, Fiorentino A, *et al.* Antialgal Compounds from *Zantedeschia aethiopica* [J]. Phytochemistry, 1998, **49**(5): 1299~ 1304.
- [5] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, *et al.* Growth Inhibition of Bluegreen Algae by Allelopathic Effects of Macrophytes [J]. Water Science & Technolgy, 1999, **39**(8): 47~ 53.
- [6] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, *et al.* *Myriophyllum spicatum*-Released Allelopathic Polyphenols Inhibiting Growth of Bluegreen Algae *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Water Research, 2000, **34**(11): 3026~ 3032.
- [7] Blackhall M L, Coombes J S, Fassett R. The relationship between antioxidant supplements and oxidative stress in renal transplant recipients: A review [J]. Asaio Journal, 2004, **50**(5): 451~ 457.
- [8] Del Rio D, Serafini M, Pellegrini N. Selected methodologies to assess oxidative/ antioxidant status in vivo: a critical review [J]. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2002, **12**(6): 343~ 351.
- [9] Foyer C H, Vanacker H, Gomez L D, *et al.* Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, **40**(6~ 8): 659~ 668.
- [10] Mruk D D, Silvestrini B, Mo M Y, *et al.* Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility [J]. Contraception, 2002, **65**(4): 305~ 311.
- [11] Oncel I, Yurdakulol E, Keles Y, *et al.* Role of antioxidant defense system and bio- chemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants [J]. Acta Oecologica International Journal of Ecology, 2004, **26**(3): 211~ 218.
- [12] Li F M, Hu H Y. Allelopathic effects of different macrophytes on the growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. Allelopathy Journal, 2005, **15**(1): 145~ 152.
- [13] Li F M, Hu H Y. Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical from *Phragmites communis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(11): 6545 ~ 6553.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [15] Giannopolities C N, Ries S K. Superoxide dismutase purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedling [J]. Plant Physiol., 1977, **59**: 315~ 318.
- [16] Evans S S. The distribution of peroxidase in extreme dwarf and normal tomato [J]. Phytochemistry, 1965, **4**: 449~ 503.