

芦苇化感物质对藻类细胞膜选择透性的影响

李锋民^{1, 2}, 胡洪营^{1*}, 种云霄³, 郭美婷¹, 门玉洁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 海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266003; 3. 华南农业大学资源与环境学院, 广州 510642)

摘要:以藻类渗出的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 浓度为表征, 以 ICP-MS 检测为手段, 研究了芦苇抑藻化感物质 2-甲基乙酰乙酸乙酯 (eathyl-2-methyl acetoacetate, EMA) 对铜绿微囊藻、蛋白核小球藻和普通小球藻细胞膜选择透性的影响。结果表明, 在实验条件下, 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻细胞经煮沸完全破坏细胞膜时 K^+ 渗出量为 1.45 、 $1.59 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, 当 EMA 浓度为 $2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的 K^+ 渗出量为 1.38 、 $1.40 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, 当 EMA 浓度为 $4 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的 K^+ 渗出量为 1.44 、 $1.58 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, 离子渗出量达到完全破坏细胞膜最大渗出量的 95% 以上。EMA 浓度为 $4 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 普通小球藻的细胞内 K^+ 渗出量为 $0.64 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, 仅为完全破坏细胞膜后 K^+ 渗出量的 31.5%。EMA 对 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的渗出量的影响规律与 K^+ 相同。EMA 破坏了铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的细胞膜, 但对普通小球藻的细胞膜透性没有显著影响。这是 EMA 选择性抑藻的机理之一。

关键词: 2-甲基乙酰乙酸乙酯; 化感物质; 藻类细胞膜选择透性; 芦苇; 水华控制

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)11-2453-04

Effects of Allelochemical Isolated from *Phragmites communis* on Algal Membrane Permeability

LI Feng-min^{1, 2}, HU Hong-ying¹, CHONG Yun-xiao³, GUO Mei-ting¹, MEN Yu-jie¹

(1. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Key Laboratory of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. College of Resource and Environment, Agricultural University of South China, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Efflux of K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ions from algal cells as signals of cell membrane permeability, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as detection method of ions, the present research investigated effects of allelochemical eathyl-2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from *Phragmites communis* on cell membrane permeability of *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlorella vulgaris*. The results showed that, when the cells were boiled for 10 min and the membrane was destroyed absolutely, the K^+ efflux of *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* were 1.45 and $1.59 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, respectively. When the concentration of EMA was $2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, the K^+ efflux of *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* were 1.38 and $1.40 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, respectively. The K^+ efflux of *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* reached 1.44 and $1.58 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$ while the EMA was $4 \text{ mg} \cdot L^{-1}$. When the concentrations were $2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ or $4 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ the K^+ efflux reached more than 95% of the total ion amount in *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* cells. But when EMA concentration was $4 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, K^+ efflux of *C. vulgaris* was $0.64 \mu g \cdot (10^9 \text{ cell})^{-1}$, which was only 31.5% of total K^+ amount in *C. vulgaris*. Effects EMA on efflux of Mg^{2+} and Ca^{2+} were similar to those of K^+ . The results indicated that EMA destroyed the cell membrane of *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* but not *C. vulgaris*. This is one of the mechanisms of EMA species-selective antialgal.

Key words: eathyl-2-methyl acetoacetate; allelochemicals; algal membrane permeability; *Phragmites communis*; water bloom control

某些水生植物产生的化感物质能抑制有害藻类的生长, 化感物质抑藻成为一种较有前景的藻类控制技术^[1~3]. 各国研究者已经发现多种具有分泌抑藻化感物质能力的水生植物, 并从不同的植物中提取出几种具有良好抑藻效果的化感物质. 但化感物质抑制藻类的机理研究仍很缺乏^[4]. 在化感物质抑制杂草、农作物的研究中发现, 某些化感物质能破坏细胞膜的完整性, 使细胞内物质大量渗出, 渗出液的电导率增加^[5]. 脱氢中美菊素 C(DHZ)破坏黄瓜幼苗细胞膜从而抑制其生长. 0.1% 的玫瑰草香

油能破坏细胞膜, 使酵母菌细胞内 K^+ 渗出^[6]. 接触一定量的化感物质的酵母菌、甜菜、玉米等受试生物的细胞膜被破坏, 细胞内 K^+ 流失^[7~9].

前期研究从芦苇中分离到的具有强抑藻能力的化感物质 2-甲基乙酰乙酸乙酯 (eathyl-2-methyl acetoacetate, EMA), 该物质能选择性地抑制铜绿微

收稿日期: 2006-12-12; 修订日期: 2007-05-27

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目(2003BA809B04-02); NSFC-JST 重大国际合作项目(20477021)

作者简介: 李锋民(1975~), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为环境生物学, E-mail: lfm01@ouc.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

囊藻和蛋白核小球藻的生长,但不能抑制普通小球藻的生长^[10].本文研究了 EMA 对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)等3种藻类的细胞膜选择透性的影响,以期揭示 EMA 抑制藻类的机理和利用 EMA 进行有害水华控制奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)、铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)和普通小球藻(*C. 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4 d,使之处于对数增长期.培养条件:光照为 $90 \mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$,光暗比为 14:10,温度为 25℃.

实验中所用 2-甲基乙酰乙酸乙酯从 Sigma 公司购买.

1.2 实验方法

将3种藻预培养至对数增长期(小球藻藻密度约为 40×10^8 个 $\cdot\text{L}^{-1}$,铜绿微囊藻约为 50×10^8 个 $\cdot\text{L}^{-1}$),每瓶 200 mL,于 3 000 r/min 离心 10 min,得到藻类细胞(小球藻每份约 80×10^8 个,铜绿微囊藻每份约 10×10^8 个).

接触时间对细胞膜选择透性的影响:上述方法获得的铜绿微囊藻 39 份,其中 36 份中分别加入 0、0.5 和 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMA 10 mL(用生理盐水配制),每个浓度下 EMA 与藻细胞接触 0、30、60、120 min 后立即用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,测定滤液中 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度.每个处理 3 个重复.3 份作为对照,加入 10 mL 生理盐水,100℃水浴 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液用于测定 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度,以表征细胞膜完全破坏后金属离子渗出总量.

EMA 浓度对细胞膜选择透性的影响:前述方法获取的铜绿微囊藻、蛋白核小球藻、普通小球藻各 21 份,其中 18 份分别加入浓度为 0、0.25、0.5、1.2 和 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMA 溶液 10 mL(生理盐水配制),EMA 与藻细胞接触 120 min 后 4 000 r/min 离心 10 min,上清液用于测定 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度.每个处理 3 个重复.3 份作为对照,加入 10 mL 生理盐水,100℃水浴 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液用于测定 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度,以表征细胞膜完全破坏后金属离子渗出总量.

1.3 分析方法

利用 OPTIMA 3300RL 型 PE 全谱直读等离子体质谱仪(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)测定上清液中 K、Ca、Mg 含量.仪器主要指标:波长范围为 165 ~ 782 nm; ICP 观测方式采用径向(垂直炬)观测;谱线稳定强度 $< 1\% \cdot \text{h}^{-1}$;波长稳定性 $< 2.5 \times 10^{-4} \text{ nm}\cdot\text{h}^{-1}$;仪器对 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的检出下限为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2 结果与讨论

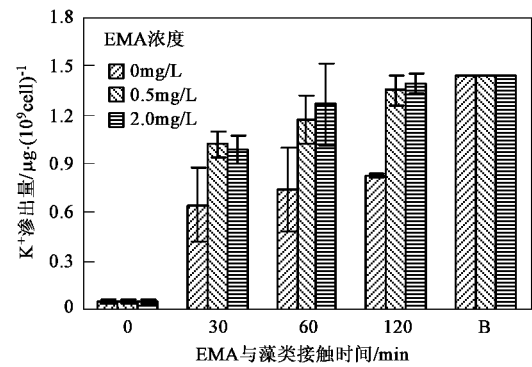
细胞膜是细胞原生质体的屏障,控制着细胞内外物质交换.细胞膜具有选择透性,例如可以将细胞外的 K^+ 选择性地转移至细胞内,而将细胞内的 Na^+ 转移至细胞外.如果细胞膜结构发生改变,细胞膜的选择透性则会被破坏.

图 1 ~ 3 给出不同浓度 EMA 与铜绿微囊藻接触不同时间对细胞内 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 渗出量的影响.将铜绿微囊藻于 100℃水浴 10 min,完全破坏细胞膜后 K^+ 的渗出量为 $1.45 \mu\text{g}\cdot(10^9 \text{ cell})^{-1}$. EMA 浓度为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着时间延长,铜绿微囊藻内的金属离子部分渗出,120 min 后, K^+ 的渗出量为 $0.83 \mu\text{g}\cdot(10^9 \text{ cell})^{-1}$.

加入 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMA,接触时间为 0、30、60 和 120 min 时, K^+ 的渗出量分别为 0.05、1.02、1.18 和 $1.36 \mu\text{g}\cdot(10^9 \text{ cell})^{-1}$.可见随着 EMA 与藻细胞接触时间的延长, K^+ 的渗出量逐渐增大. EMA 浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时也符合这一规律,当接触时间为 120 min 时, K^+ 的渗出量为 $1.39 \mu\text{g}\cdot(10^9 \text{ cell})^{-1}$,为煮沸完全破坏细胞膜后 K^+ 的渗出量的 96.2%,可以认为此时藻细胞膜破坏已经非常严重. Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子的渗出规律与 K^+ 相同.因此后续研究中 EMA 最大浓度设为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,接触时间最大为 120 min.

从图 1 ~ 3 中还可以看出,在相同接触时间下, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EMA 都能提高细胞外 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 浓度,加入 EMA 后 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 渗出量约为对照组的 1.5 ~ 2 倍,说明是 EMA 增加了离子的渗出量,破坏了细胞膜的选择透性.

EMA 对铜绿微囊藻、蛋白核小球藻和普通小球藻的细胞内 K^+ 渗出量的影响如图 4 所示.将藻类在沸水浴中煮沸 10 min,完全破坏细胞膜后,蛋白核小球藻、普通小球藻、铜绿微囊藻的 K^+ 渗出量分别为 1.59 、 2.03 、 $1.45 \mu\text{g}\cdot(10^9 \text{ cell})^{-1}$.加入 EMA 后,当 EMA 浓度为 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,铜绿微囊藻和蛋白



B 为煮沸破坏细胞膜, 下同

图 1 EMA 对铜绿微囊藻 K⁺ 渗出量的影响

Fig.1 Effect of EMA on K⁺ efflux of *M. aeruginosa*

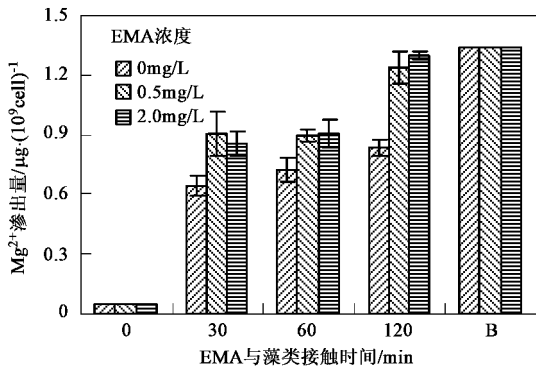


图 2 EMA 对铜绿微囊藻 Mg²⁺ 渗出量的影响

Fig.2 Effect of EMA on Mg²⁺ efflux of *M. aeruginosa*

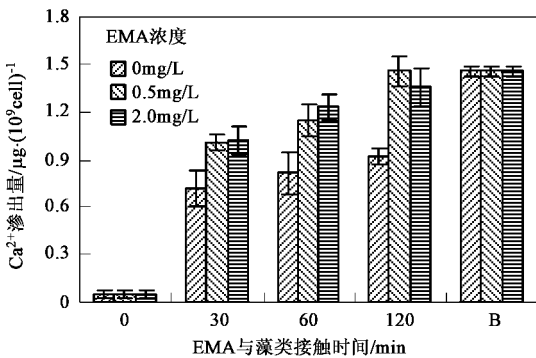


图 3 EMA 对铜绿微囊藻 Ca²⁺ 渗出量的影响

Fig.3 Effect of EMA on Ca²⁺ efflux of *M. aeruginosa*

核小球藻的 K⁺ 渗出量分别为 0.63、0.92 μg·(10⁹ cell)⁻¹, 当 EMA 浓度升高至 2 mg·L⁻¹ 时, K⁺ 渗出量分别升高至 1.38、1.40 μg·(10⁹ cell)⁻¹. 可见随着 EMA 浓度的增加, 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的 K⁺ 渗出量逐渐增加. 当 EMA 浓度为 4 mg·L⁻¹ 时, 细胞内 K⁺ 已完全渗出. EMA 浓度从

0.25 mg·L⁻¹ 上升至 4 mg·L⁻¹, 普通小球藻的 K⁺ 渗出量仅从 0.56 μg·(10⁹ cell)⁻¹ 升高至 0.64 μg·(10⁹ cell)⁻¹, 仅为完全破坏细胞膜后 K⁺ 渗出量的 31.5%. 这说明 EMA 对普通小球藻的 K⁺ 渗出量的影响不大.

EMA 对 3 种藻细胞内 Mg²⁺、Ca²⁺ 渗出的影响规律与 K⁺ 相似, 即 EMA 能增加铜绿微囊藻和蛋白核小球藻 Mg²⁺、Ca²⁺ 的渗出量, 但对普通小球藻中 Mg²⁺、Ca²⁺ 的渗出没有影响.

前期研究表明, EMA 能显著抑制铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的生长, 但对普通小球藻的抑制作用不明显^[10]. 本文的研究显示, EMA 显著增加了铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的细胞膜透性, 使细胞内金属离子加速渗出, 这可能是 EMA 能抑制其生长的机理之一. 而 EMA 不能增加普通小球藻细胞内的金属离子渗出, 因此不能抑制其生长.

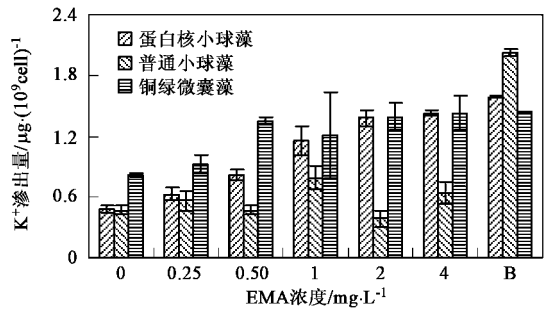


图 4 EMA 对蛋白核小球藻、普通小球藻、铜绿微囊藻 K⁺ 渗出量的影响

Fig.4 Effect of EMA on K⁺ efflux of *C. pyrenoidosa*, *M. aeruginosa* and *C. vulgaris*

细胞膜主要由磷脂双分子层构成的骨架和镶嵌于其上的蛋白质构成. 磷脂是含磷酸基的复合脂类, 是细胞膜的主要组分. 细胞膜具有选择透性, 能将细胞外的 K⁺ 选择性地转移至细胞内. 若细胞内的 K⁺ 大量渗出, 说明细胞膜的结构被破坏.

在环境胁迫下, 植物细胞膜被破坏, 导致细胞内含物渗出的研究已经有许多报道. 金属离子、除草剂等有毒物质能破坏斜生栅藻、小球藻等藻类的细胞膜^[11, 12]. 从玫瑰中提取的化感物质玫瑰草油破坏了酵母菌的细胞膜, 使酵母菌细胞膜中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸相对含量发生变化, 细胞膜的选择透性被破坏, 导致细胞内金属离子的渗出^[6].

在外界胁迫下, 植物体内会增加活性氧如超氧阴离子自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、氢氧自由基(·OH)、单线态氧(¹O₂)的产生. 这些自由基会氧化

细胞膜等膜质结构, 导致其破坏. 某些化感物质, 如儿茶素能使高等植物根尖细胞内的氧自由基含量显著上升^[13], 导致细胞膜被破坏. EMA 使细胞膜破坏的原因可能与增加了细胞内氧自由基含量有关.

植物在进化过程中产生了一套清除自由基的抗氧化体系, 如过氧化物酶、超氧化物歧化酶等. 当外界有轻度环境压力时, 这些酶活性会在一定范围内升高, 以去除由于环境压力产生的氧自由基. 当环境压力过大, 细胞内产生的自由基过多时, 又会抑制这些酶活性^[14]. 前期研究表明, EMA 浓度超过 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 会显著降低蛋白核小球藻的抗氧化酶活性^[15], 这可能导致不能及时清除细胞内产生的氧自由基, 进而破坏了细胞膜. 但当 EMA 浓度在 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时, 普通小球藻的抗氧化酶体系能保持较高活性. 这可能是 EMA 破坏蛋白核小球藻细胞膜, 使细胞内物质泄漏的原因.

3 结论

在实验条件下, 高浓度 ($> 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 EMA 能显著增加铜绿微囊藻和蛋白核小球藻内 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的渗出量, 当 EMA 为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 各金属离子渗出量达到完全破坏细胞膜最大渗出量的 95% 以上, 说明 EMA 破坏了铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的细胞膜. 但 EMA 对普通小球藻的细胞内金属离子渗出量影响不大. 这可能是 EMA 选择性抑制铜绿微囊藻和蛋白核小球藻而不能抑制普通小球藻的机理之一.

参考文献:

- [1] Gross E M. Allelopathy of aquatic autotrophs[J]. Critical Reviews In Plant Sciences, 2003, **22**: 313 ~ 339.
- [2] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols[J]. Water Research, 2001, **35**: 1855 ~ 1859.
- [3] Lurling M, van Geest G, Scheffer M. Importance of nutrient

- competition and allelopathic effects in suppression of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the macrophytes Chara, Elodea and Myriophyllum[J]. Hydrobiologia, 2006, **556**: 209 ~ 220.
- [4] Gniazdowska A, Bogatek R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, **27**: 395 ~ 407.
- [5] Dayan F E, Watson S B, Galindo J C G, et al. Phytotoxicity of quassinoids: physiological responses and structural requirements[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1999, **65**(1): 15 ~ 24.
- [6] Prashar A, Hili P, Veness R G, et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Phytochemistry, 2003, **63**: 569 ~ 575.
- [7] Rice E L. Allelopathy [M]. (2nd edition). London: Academic Press, 1984.
- [8] Einhellig F A. Mechanism of action of allelochemicals [J]. Allelopathy Journal, 1995, **5**: 96 ~ 116.
- [9] Galindo J C G, Hernández A, Dayan F E, et al. Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage [J]. Phytochemistry, 1999, **52**: 805 ~ 813.
- [10] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel antialgal allelochemical from *Phragmites communis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**: 6545 ~ 6553.
- [11] Backor M, Fahselt D, Davidson R D, et al. Effects of copper on wild and tolerant strains of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta) and possible tolerance mechanisms[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, **45**(2): 159 ~ 167.
- [12] Franklin N M, Stauber J L, Lim R P, et al. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, **21**(11): 2412 ~ 2422.
- [13] Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S, et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions [J]. Science, 2003, **301**: 1377 ~ 1380.
- [14] 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.
- [15] 李锋民, 胡洪营, 门玉洁, 等. 化感物质对小球藻抗氧化体系酶活性的影响[J]. 环境科学, 2006, **27**(10): 2091 ~ 2094.