

文章编号:1000-0615(2001)05-0424-04

褐藻酸降解菌感染对海带抗氧化酶活性的影响

唐学玺¹, 杨震¹, 黄健¹, 严小军²

(1. 青岛海洋大学生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:利用生物化学的方法,研究了海带被褐藻酸降解菌感染过程中的抗氧化酶活性的变化。结果表明,(1)在褐藻酸降解菌感染的初期,海带细胞内超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性急剧升高,随着感染的进行,二者的活性逐渐下降。(2)抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性在感染的初期变化不明显,而在感染的后期活性有所增加。(3)在整个感染的过程中,谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性的变化无规律性,没有表现出明显的升降变化。说明这四种酶在海带抵抗褐藻酸降解菌感染的过程中所起作用的大小和作用的时期有所差异。

关键词:海带;褐藻酸降解菌;感染;抗氧化酶

中图分类号:S946.1; Q553 文献标识码:A

Effects of infection by algalic acid decomposing bacteria on activity of antioxidant enzymes in *Laminaria japonica*

TANG Xue-xi¹, YANG Zhen¹, HUANG Jian¹, YAN Xiao-jun²

(1. Life Science College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071, China)

Abstract: Changes of antioxidant enzyme activity in *Laminaria japonica* during infection process caused by algalic acid decomposing bacteria were studied using biochemical methods. The results showed as follows: (1) The activity of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) increased sharply at the first stage of infection and decreased gradually with the further infection. (2) The activity of ascorbic acid peroxidase(APX) showed no remarkable change in the initial infection stage, but increased during later stage of infection. (3) The activity of glutathione peroxidase(GPX) exhibited irregular changes during whole infection process.

Key words: *Laminaria japonica*; algalic acid decomposing bacteria; infection; antioxidant enzyme

海带是我国开展经济海藻养殖的主要对象,养殖历史长。而海带人工育苗是发展我国海带养殖业的一个重要环节^[1]。海带病烂,尤其在苗期,将造成很大的经济损失。一些研究指出,海带的病烂与褐藻酸降解菌的大量繁殖有关^[2-5]。褐藻酸降解菌是海带藻体上主要附生细菌,正常情况下并不引起病烂,但若养殖环境恶化如过于密植、损伤、温度过高,而使海带的抵抗力下降,细菌易于侵入并大量繁殖而导致病害。本文以褐藻酸降解菌为病原细菌,研究海带感染过程中四种抗氧化酶活性的变化,以企为海带病烂的生物学基础研究和海带病烂的防治提供依据。

收稿日期:2000-10-30

资助项目:国家重点基础研究专项经费资助(G1999012004)

第一作者:唐学玺(1965-),男,山东潍坊人,教授,博士,主要从事生态毒理学的研究。Tel:0532-2032952

1 材料和方法

1.1 海带品种的选择

实验选择日本真海带(*Laminaria japonica*),取自日照市育苗厂,藻体长为1.2~1.5m。

1.2 菌株的选择

选用本实验室分离的二个具有高褐藻酸酶活性的菌株,二者均为革兰氏阴性,杆状,细胞大小为0.6~0.7 Mm×1.5~2.4 Mm。按伯杰氏手册分别将其定为埃氏交替单胞菌(*A. espejiana*, A1)和麦氏交替单胞菌(*A. macleodii*, A2)。

1.3 感染处理

用灭菌棉球沾取无菌海水擦洗海带中带部小块(2.0cm×2.0cm)反复多次,并经无菌海水冲洗后,置于灭菌培养皿中待用。取灭过菌的小刀在海带片上划2mm左右的刀口,然后取褐藻酸降解菌菌悬液(浓度为 2×10^7 ind·mL⁻¹)2μL接种到海带刺伤处,加入适量的无菌海水并置于无光线直射处静置培养。在感染的过程中每隔一段时间取材,测定抗氧化酶活性的变化。感染过程中温度控制在(10±1)°C,光照强度维持在800~1 000 lx范围内。

1.4 抗氧化酶活性的测定

酶液的制备:称取不同处理的海带1g,无菌水冲洗3次后放于研钵中,加入2 mL的磷酸缓冲液(0.05mol·L⁻¹, pH7.8)和少量的石英沙,冰浴中充分研磨后,15 000 r·min⁻¹离心15min,上清液用于酶活性的测定。

测定:超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定,采用Beauchamp和Fridovich^[6]建立、Bewley^[7]改进的氮蓝四唑光化学反应法,一个SOD活力单位定义为能引起反应初速度(指不加酶时)半抑制的酶用量。过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用碘量法^[8]。抗坏血酸过氧化物酶(APX)的测定按照Nakano和Asada^[9]的方法进行。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性的测定参照荣征星^[10]的方法,一个酶活力单位定义为37°C、pH7.8条件下反应1min,扣除非酶反应后,使谷胱甘肽(GSH)浓度下降1μmol的酶用量。

2 结果

2.1 褐藻酸降解菌(A1和A2)感染对海带超氧化物歧化酶活性的影响

无论是菌株A1还是菌株A2,在感染的初期(前3d),海带细胞内SOD的活性急剧上升。3d过后,随着感染时间的延长,SOD活性又呈现出逐渐下降的趋势。至12d时,SOD活性降低到最低点,随后没有明显的升降变化(图1)。t检验表明,在感染的3d至6d,A1和A2感染组的SOD活性与对照组相比差异显著($P < 0.01$)

2.2 褐藻酸降解菌(A1和A2)感染对海带过氧化氢酶活性的影响

褐藻酸降解菌感染后,海带细胞内CAT活性的变化规律类似于SOD活性的变化。在感染的前3d,CAT活性急剧上升,3d过后,随着感染时间的延长,CAT活性逐渐下降(图2)。t检验得知,在褐藻酸降解菌感染的第3d到第9d,感染组(A1和A2)与对照组相比,CAT活性差异显著($P < 0.01$)。

2.3 褐藻酸降解菌(A1和A2)感染对海带抗坏血酸过氧化物酶活性的影响

海带细胞内抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性在褐藻酸降解菌感染过程中的变化趋势与SOD和CAT活性的变化恰好相反。与对照组相比,在感染的前9d,APX的活性没有显示出明显的变化(t检验结果为 $P > 0.05$)。9d后,APX的活性反而有所上升(图3)。t检验表明,感染组与对照组差异较显著($0.01 < P < 0.05$)。

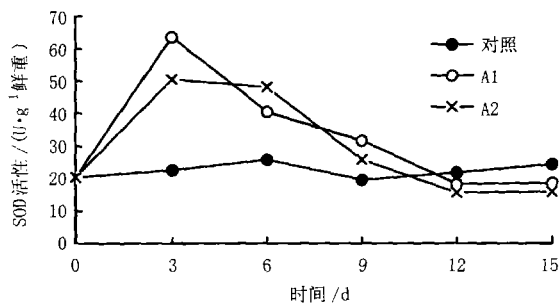


图1 褐藻酸降解菌感染对海带 SOD 活性的影响

Fig.1 Effect of infection on SOD activity of kelp

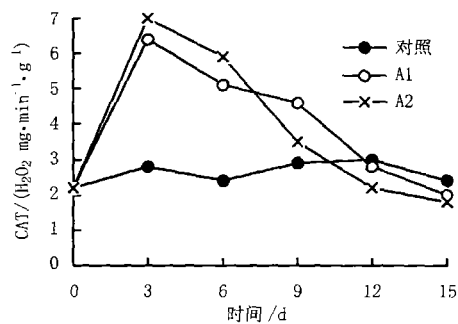


图2 褐藻酸降解菌感染对海带 CAT 活性的影响

Fig.2 Effect of infection on CAT activity of kelp

2.4 褐藻酸降解菌感染对海带谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性的影响

海带细胞内 GPX 活性的变化既不同于 SOD 和 CAT 活性的变化规律,也不同于 APX 的变化趋势。在褐藻酸降解菌感染的整个过程中,GPX 活性的变化无规律性。与对照组相比,没有表现出明显的变化($P > 0.05$)。

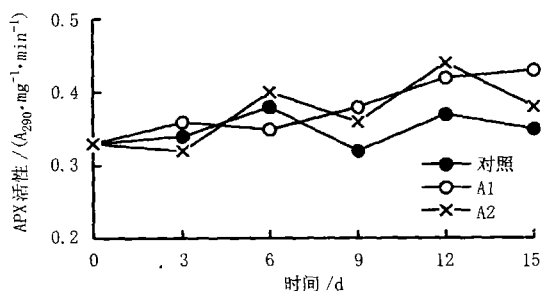


图3 褐藻酸降解菌感染对海带 APX 活性的影响

Fig.3 Effect of infection on APX activity of kelp

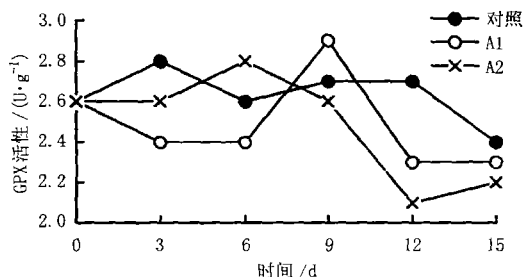


图4 褐藻酸降解菌感染对海带 GPX 活性的影响

Fig.4 Effect of infection on GPX activity of kelp

3 讨论

3.1 抗氧化酶系统在海带抗感染过程中的作用

所有需氧生物体内都存在着一套比较完善的抗氧化系统,它们与生物体的抗盐性、抗旱性、抗热性、抗冻性及抗其他逆境胁迫的能力密切相关。一般把生物体内的抗氧化系统分成二种类型,一为抗氧化酶促系统,是指以 SOD 为中心的与抗氧化有关的一些抗氧化酶类,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等;二为抗氧化剂系统,主要是指生物体内存在的一些与抗氧化有关的物质,如还原型谷胱甘肽,维生素 C、维生素 E 和甘露醇等。二种类型的抗氧化系统相互联合、相互补充共同完成生物体抵抗不良环境胁迫的作用。目前发现酶促系统在生物尤其在植物的抗病和抗感染过程中同样起着重要的作用^[11,12]。本文以海带为材料,探讨了褐藻酸降解菌感染过程中的四种抗氧化酶活性的变化,发现海带的抗氧化酶系统在抵抗褐藻酸降解菌感染中发挥着重要的作用。

3.2 四种抗氧化酶所起作用的差异性

实验发现,四种抗氧化酶在海带抵抗褐藻酸降解菌感染的过程中所起的作用是不同的,这表现在所起作用的时间和大小有所差异。SOD 和 CAT 在感染的初期(前 3d)起着积极的抵抗褐藻酸降解菌感染

的作用;3d 过后,这种防御作用逐渐降低;到后期(9d 以后)不再表现出抵抗作用。相反,APX 在褐藻酸降解菌感染的前期(9d 以前)没有发挥其抗感染的作用,而是在后期(9d 后)显示出了一定的抗感染作用。对于 GPX,在整个过程中对抵抗褐藻酸降解菌感染的不起作用。另一方面,在抵抗褐藻酸降解菌感染的过程中,SOD 和 CAT 所起的作用要远远大于 APX 和 GPX,而 APX 所起的作用又大于 GPX。

参考文献:

- [1] 曾呈奎,吴超远.海带养殖学[M].北京:科学出版社,1962.1-229.
- [2] Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganism newly isolated from decaying *Laminaria* [J]. Jap Sci Fish, 1961, 27(4):339-341.
- [3] 陈 笃,林光恒,沈世泽.褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用[J].海洋与湖沼,1979,10(4):329-323.
- [4] 陈 笃,林光恒,沈世泽.海带夏苗培育中褐藻酸降解菌与烂苗的关系[J].海洋与湖沼,1981,12(2):133-137.
- [5] 丁美丽.环境因子对褐藻酸降解菌引起海带病烂影响的研究[J].海洋学报,1990,12(2):224-229.
- [6] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable acrylamide gel[J]. Anal Biochem, 1971,44(6):276-278.
- [7] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1979,30:195-238.
- [8] 严重玲,洪业汤,付舜珍,等.Cd、Pb 胁迫对烟草叶片中活性氧清除系统的影响[J].生态学报,1997,17(5):488-492.
- [9] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant Cell Physiol, 1981,22:867-880.
- [10] 荣征星.小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力微量测定[J].生物化学与生物物理进展.1994,21(4):362-366.
- [11] Elstner E F, Kramer R. Role of the superoxide free radical ion in photosynthetic ascorbate oxidation and ascorbate-mediated photophosphorylation[J]. Biochem Biophys Acta, 1973,314:340-353.
- [12] 王雅平,刘伊强,施 磊,等.小麦对赤霉病抗性不同品种的 SOD 活性[J].植物生理学报,1993.19(4):353-358.

欢迎订阅 2002 年《水产科学》

《水产科学》杂志是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊,双月刊,1982 年创刊,国内外公开发行人。是中文“水产、渔业类”的核心期刊,已被俄罗斯《文摘》杂志、英国《动物学记录》收录,是“中国学术期刊综合评价数据库”、《中国学术期刊(光盘版)》、“中国期刊网”的全文收录期刊,是《中国水产文摘》的收录期刊。主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产生物病害及防治、水产品保鲜与加工综合利用、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面研究的新进展、新技术、新方法等。主要栏目有:科学实验、实用技术、综述与专论、建议与探讨等。读者对象是水产科技人员,大、中专院校水产、生物、环保等专业师生,渔业行政事业和企业单位有关管理和技术人员,以及广大知识渔民。逢单月 25 日出版,每期 48 页,定价 4.00 元,全年 24.00 元。订阅者请到邮局订阅(邮发代号 8-164)。也可直接汇款到本刊编辑部订阅。地址:大连市沙河口区黑石礁街 50 号辽宁省海洋水产研究所《水产科学》编辑部 邮政编码:116023