

文章编号:1000-0615(2009)03-0456-06

球等鞭金藻生长抑制物对自身藻细胞的抑制效应

阎斌伦¹, 孙颖颖¹, 王长海^{2,3}

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 烟台大学海洋学院, 山东 烟台 264005;

3. 大连理工大学环境科学与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要:研究了生长抑制物1-羟基,丙二酸二乙酯-十二烯酸异丙酯(HDMA)对自身藻细胞生长、叶绿素和丙二醛(MDA)含量、胞外可溶性蛋白质和多糖含量、硝酸还原酶(NR)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性等生理指标的影响,分析HDMA对球等鞭金藻的抑制效应。结果表明,HDMA显著降低了细胞密度、叶绿素含量以及NR、SOD和POD活性,显著增大胞外可溶性蛋白质和多糖的比值,并且还明显提高MDA含量。因此,认为HDMA能够影响微藻细胞的某些生理生化过程。其中包括降低叶绿素含量,影响光合作用;改变胞外可溶性蛋白质和多糖的比值,增强细胞的疏水性,促使细胞絮凝;降低微藻硝酸还原酶和抗氧化体系酶的活性,影响细胞内营养平衡,并加速细胞体内活性氧的积累,导致细胞发生过氧化反应,从而影响微藻生长。

关键词:球等鞭金藻;生长抑制物;抑制效应;分析

中图分类号:Q 949.21⁺7; S 917

文献标识码:A

微藻在生长过程中会向周围环境释放某些抑制自身藻细胞生长或其它微藻细胞生长或同时抑制自身藻细胞和其它微藻细胞生长的物质^[1-2]。目前已经在小球藻(*Chlorella vulgaris*),雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)等微藻的培养过程中发现这些微藻自身藻细胞间的抑制现象^[3-5];不同种微藻细胞间的抑制现象也被发现^[6-7],例如,亚历山大藻(*Alexandrium*)抑制角毛藻(*Chaetoceros gracile*),波兰多甲藻(*Peridinium polonicum*)抑制杜氏藻(*Dunaliella* sp.)。这种抑制现象在淡水生态系统中的高等植物与藻类,藻类与藻类以及海藻中也有相关报道^[8-12]。例如,沉水金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)抑制铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),土生席藻(*Phormidium mucicola*)抑制铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),孔石莼(*Ulva pertusa* Kjellm)抑制亚历山大藻(*Alexandrium tamarens*)。Fogg^[1]将引起

微藻间抑制现象的物质定义为“抑制因子”(inhibitor factor)或“生长抑制物”(growth inhibitor),而淡水系统中的高等植物与藻类等之间的抑制现象被称为化感作用,抑制物质称为化感物质。微藻、淡水高等植物以及海藻等通过释放强烈的自抑或它抑物质,对于调节它们自身的种群数量和组成以及种群交替等方面有着重要的作用^[13]。

球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)是水产养殖业中重要的饵料微藻,已广泛用于饲喂贻贝和牡蛎等双壳类动物幼虫。在培养过程中,我们注意到球等鞭金藻存在非常显著的自身藻细胞抑制现象^[14],通过分离提取,我们获得对角毛藻和小球藻具有明显抑制活性的物质^[15]。在此基础上,获得生长抑制物纯品。经鉴定,其分子式为C₂₂H₃₈O₇,命名为1-羟基,丙二酸二乙酯-十二烯酸异丙酯[1-(hydroxyl-diethyl malonate)-isopropyl dodecenoic acid, HDMA]^[16-17]。本文在前期研究

收稿日期:2008-11-28

修回日期:2009-01-16

资助项目:“十一五”国家科技支撑重大项目(2006BAD09A01)

通讯作者:阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

基础上,分析 HDMA 胁迫下,细胞密度,叶绿素,胞外可溶性蛋白质和多糖,丙二醛含量(MDA),硝酸还原酶(NR)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶活性(SOD)等生理指标的变化,进一步明确 HDMA 对自身藻细胞抑制效应的化学基础,为揭示 HDMA 的抑制效应机理提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

球等鞭金藻由中国海洋大学提供,经进一步分离纯化后由烟台大学海洋生化工程研究所保存。

1.2 实验方法

0.10 g 生长抑制物 HDMA,灭菌海水溶解后,用灭菌海水稀释为如下浓度梯度:0.05,0.10,0.15,0.20 和 0.25 mg/L,同时设定 HDMA 浓度为零的对照组。上述溶液按照 f/2 配方添加营养盐后,用于球等鞭金藻的培养,接种密度为 $30 \times 10^4/\text{mL}$,在培养箱内静置培养 12 d,温度(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光强 $72 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,连续光照,每个实验组设定 3 个平行样。每隔一日测定细胞密度,叶绿素含量,胞外可溶性蛋白质和多糖含量,丙二醛含量以及 NR,POD 和 SOD 活性。

1.3 微藻的生理指标测试

叶绿素的测定 5 mL 藻液,2 000 \times g 离心 15 min,弃去上清液,加入 90% 丙酮后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下抽提 24 h。离心后,测定上清液在 630 nm,645 nm 和 665 nm 下吸光度^[18]。

胞外可溶性蛋白质和多糖的提取与测定 藻液 2 000 \times g 离心 10 min,取上清液;用 Milli-Q 水悬浮藻细胞,离心 10 min,取上清液,重复 3 次。在沉淀中加入 90% 的乙醇 10 mL,提取 5 min,离心 5 min,取上清液;继续用 Milli-Q 水冲洗沉淀 3 次并离心,取上清液。将所有离心上清液合并浓缩,定容至 10 mL,蒸馏水透析 24 h 后,参照文献[19]测定可溶性多糖和蛋白质。

NR,POD 和 SOD 的提取与测定 藻液 2 000 \times g 离心 5 min,藻细胞用于测定酶活性。藻细胞分别加预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(提取 NR,POD,SOD 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 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴中研磨,匀浆液 2 000 \times g 离心 10 min,取上清液(即粗酶液)测定酶活性。

采用张志良等^[19]的方法测定硝酸还原酶活性。0.4 mL 硝酸还原酶粗提液,加入 1 mL 0.01 mol/L KNO_3 溶液,0.6 mL 2.0 mg/L NADH。混合后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,保温结束后,立即加入 10.0 mg/L 对氨基苯磺酰胺 1 mL 和 2.0 mg/L 萘基乙烯二胺 1 mL。摇匀显色后静置 15 min,于 5 000 \times g 离心 5 min,取上清液测定 540 nm 下吸光度。

采用 Giannopolitis 等^[20]的方法测定超氧化物歧化酶活性。1 mL 粗酶液,2 mL 反应介质(50 mmol/L pH 为 7.0 的磷酸缓冲液,77.12 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氮蓝四唑,0.1 mmol/L EDTA,13.37 mmol/L 蛋氨酸),加入 0.1 mL 80.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 核黄素溶液(用含 0.1 mmol/L EDTA 的 50 mmol/L pH 为 7.8 的磷酸缓冲液配制),测定 560 nm 下吸光度。

采用 Evans^[21]的方法测定过氧化物酶活性。反应体系为 1 mL 2% H_2O_2 ,1 mL 0.05 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 愈创木酚,1 mL 粗酶液,反应由加入启动,25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 470 nm 下吸光度。

丙二醛含量的测定 丙二醛含量的测定和计算方法参照文献[19]的硫代巴比妥酸(TBA)比色法。

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS 11.5 软件包进行独立样本检验统计分析,以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

微藻的生长抑制量为 $I = (1 - N/N_0) \times 100\%$,式中 N 为处理组藻细胞密度($\times 10^4/\text{mL}$); N_0 为对照组藻细胞密度($\times 10^4/\text{mL}$)。

2 结果

2.1 生长抑制物对球等鞭金藻生长,叶绿素,胞外可溶性蛋白质和多糖含量的影响

HDMA 对球等鞭金藻的生长有明显的抑制作用($P < 0.05$),且此抑制作用随 HDMA 浓度的增大而增大(图 1)。第 12 天,0.05,0.10,0.15,0.20 和 0.25 mg/L HDMA 对微藻的生长抑制量分别为 34.2%,43.4%,47.4%,50.0% 和 54.0%。

HDMA 对藻细胞的叶绿素含量同样有明显的抑制作用($P < 0.05$)。第 6 天所有 HDMA 处理组叶绿素含量均明显低于对照组,且随 HDMA 浓度的增大,叶绿素含量出现明显的降低(图 2)。

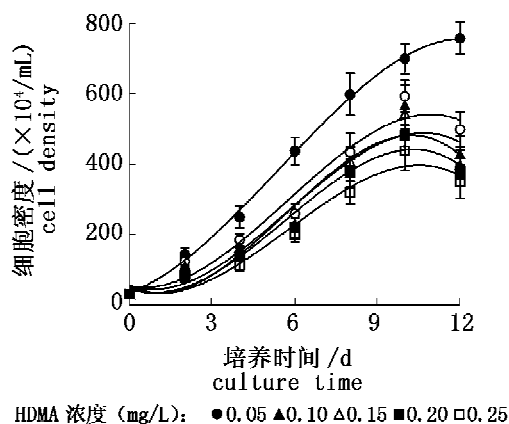


图1 HDMA对球等鞭金藻生长的影响
Fig.1 Effect of HDMA on growth of *Isochrysis galbana*

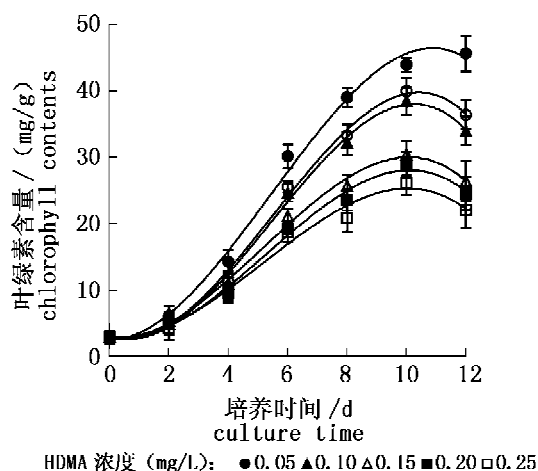


图2 HDMA对球等鞭金藻叶绿素含量的影响
Fig.2 Effect of HDMA on chlorophyll contents of *Isochrysis galbana*

从图3和4可以看出,HDMA对胞外可溶性蛋白质和多糖含量的影响类似。胞外可溶性蛋白质和多糖含量随HDMA浓度的增大而增大。第6天后,所有HDMA处理组胞外可溶性蛋白质和多糖含量均明显高于对照组($P < 0.05$)。

2.2 生长抑制物对球等鞭金藻NR活性的影响

在图5中,对照组藻细胞的NR活性随培养时间的延长而呈现明显的增大,第8天,NR活性有所下降;而HDMA处理组藻细胞的NR活性仅呈现较微弱的增大趋势,且NR活性明显低于对照组的NR活性。HDMA对NR活性表现了极显著的抑制效应($P < 0.01$),并且HDMA浓度越高,对NR活性的抑制作用越明显。

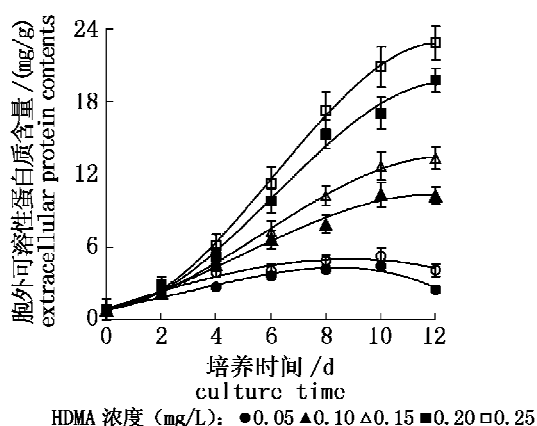


图3 HDMA对球等鞭金藻胞外可溶性蛋白质含量的影响

Fig.3 Effect of HDMA on extracellular protein contents of *Isochrysis galbana*

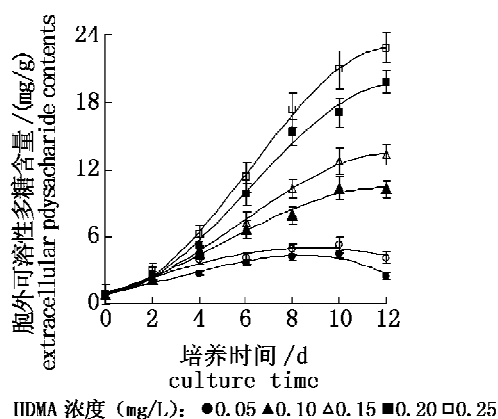


图4 HDMA对球等鞭金藻胞外可溶性多糖含量的影响

Fig.4 Effect of HDMA on extracellular polysaccharide contents of *Isochrysis galbana*

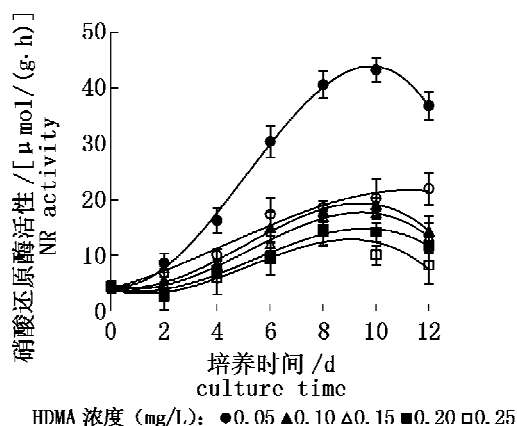


图5 HDMA对球等鞭金藻NR活性的影响
Fig.5 Effect of HDMA on NR activity of *Isochrysis galbana*

2.3 生长抑制物对球等鞭金藻 POD, SOD 活性和 MDA 含量的影响

在培养的 12 d 内,对照组藻细胞的 POD 和 SOD 活性随培养时间的延长而呈现明显的增大; HDMA 处理组藻细胞的 POD 和 SOD 活性也随培养时间的延长而逐渐增大,但 POD 和 SOD 活性均明显小于对照组的 POD 和 SOD 活性 ($P < 0.05$),且第 10 天, SOD 活性开始出现明显的下降;第 12 天, HDMA 对 SOD 活性表现了极显著的抑制效应 ($P < 0.01$)。HDMA 对 POD 活性同样表现出抑制作用,且对 POD 活性的抑制效应与 HDMA 浓度正相关(图 6,图 7)。

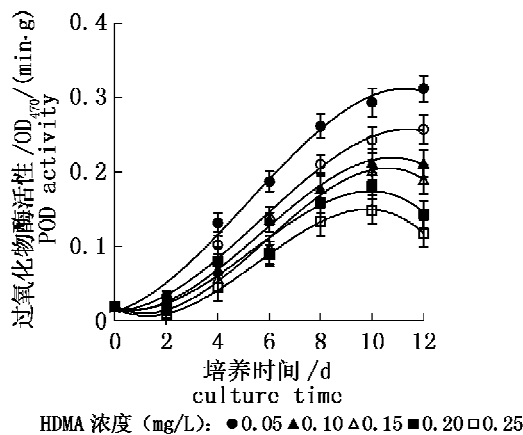


图 6 HDMA 对球等鞭金藻 POD 活性的影响
Fig. 6 Effect of HDMA on POD activity of *Isochrysis galbana*

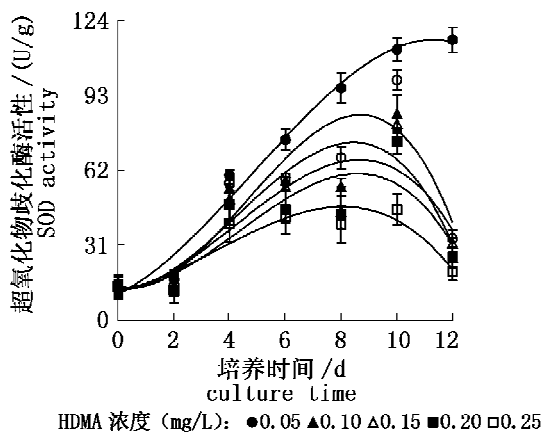


图 7 HDMA 对球等鞭金藻 SOD 的影响
Fig. 7 Effect of HDMA on SOD activity of *Isochrysis galbana*

图 8 表明,在培养的 12 d 内,对照组和 HDMA 处理组藻细胞内的 MDA 含量都随培养时

间的延长而呈现增大趋势。然而, HDMA 处理组 MDA 含量的增大速度明显快于对照组。从而,第 6 天后, HDMA 处理组 MDA 含量明显高于对照组 ($P < 0.05$)。HDMA 对 MDA 含量表现出极显著的促进作用 ($P < 0.01$)。

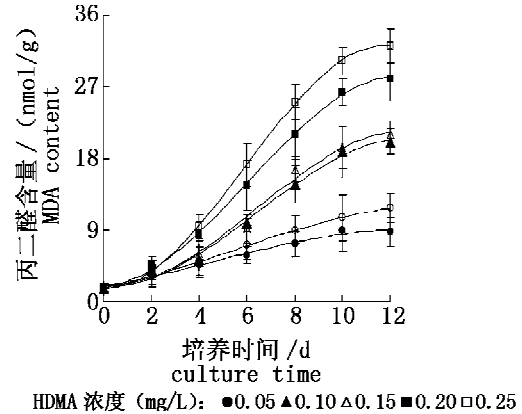


图 8 HDMA 对球等鞭金藻 MDA 含量的影响
Fig. 8 Effect of HDMA on MDA contents of *Isochrysis galbana*

3 讨论

在植物化感作用的研究中,李寿田等^[22]认为化感物质通过破坏藻类的叶绿素,减少藻类的同化物,从而影响其生物量。本文结果也表明 HDMA 显著降低了微藻的叶绿素含量,这就暗示着 HDMA 通过降低叶绿素含量影响微藻的光合作用,进而影响微藻的生长。

细胞的表面物质(细胞壁外的胶被和疏松结合在胶被外的细胞外化合物)与它的疏水性和亲水性密切相关。这些表面物质的组成成分包括蛋白质和多糖,环境条件变化能够改变表面物质的种类和数量^[23]。我们发现 HDMA 改变了微藻的胞外可溶性蛋白质和多糖的比例。对照组胞外蛋白质含量低于多糖含量,二者比值为 0.458; HDMA 处理组胞外蛋白质含量显著高于多糖含量,二者比值上升到 1.6~2.4。由于蛋白质与多糖的比值与微藻的疏水性正相关^[23],这就表明 HDMA 增强了细胞的疏水性,促进细胞絮凝沉降。从而,在 HDMA 处理组观察到明显的细胞絮凝现象。

NR 是氮素代谢中关键性酶,它将浮游植物所吸收的氧化态氮化合物转化为还原态的氮,进一步合成氨基酸和蛋白质,其值代表着细胞内的

营养平衡^[24]。HDMA 使藻细胞内 NR 活性降低,结果表明 HDMA 改变了藻细胞内部的营养平衡,使微藻的生长受到抑制。

SOD 和 POD 是植物保护酶系统中的重要抗氧化体系酶^[25]。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^[26]。我们的实验结果也表明,HDMA 胁迫下微藻细胞内氧自由基浓度增加,并且其增加的速率超过 SOD 和 POD 的清除能力,从而致使 SOD 和 POD 活性随 HDMA 浓度增大而降低。此外,丙二醛(MDA)作为细胞膜结构损伤、藻体受胁迫程度的一种标志^[27],其含量可指示膜脂过氧化水平的高低,也从另一个侧面说明 HDMA 胁迫下微藻细胞内氧化性自由基增加(图 8)。

经过分析,HDMA 能够影响微藻的某些生理生化过程。其中包括降低藻细胞的叶绿素含量,影响光合作用;改变胞外可溶性蛋白质和多糖的比值,增强藻细胞的疏水性,促使藻细胞絮凝;降低藻细胞氮代谢关键酶和抗氧化体系酶的活性,影响藻细胞内营养平衡,并加速藻细胞体内活性氧的积累,导致藻细胞发生过氧化反应,从而影响微藻生长和繁殖。另外,我们认为 HDMA 还可能对藻细胞吸收 K, Ca, P 等离子以及藻细胞分裂、伸长和藻细胞的亚显微结构等方面产生影响。目前,有关这些方面的研究工作正在进行中。

参考文献:

- [1] Fogg G E. The extracellular products of algae [J]. *Oceanogr Mar Bio Ann Rev*, 1966, 4: 195 - 212.
- [2] Hellebust J A. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton [J]. *Limno Oceanogr*, 1965, 10: 192 - 206.
- [3] Robertson P. Studies on *Chlorella vulgaris* V some properties of the growth-inhibitor formed by *Chlorella* cells [J]. *Amer J Bot*, 1942, 9: 142 - 148.
- [4] 孙艳妮, 殷明炎, 刘建国. 雨生红球藻的信号物质 [J]. *海洋湖沼通报*, 2001, 23(3): 22 - 28.
- [5] Imada N, Kobayashi K, Tahara K, et al. Production of an autoinhibitor by *Skeletonema costatum* and its effect on the growth of other phytoplankton *pyrenoidosa* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(12): 2285 - 2290.
- [6] Perez E, Martin D E, Padilla M. Rate of production of APONINs by *Nannochloris oculata* [J]. *Biomedical Letters*, 1999, 59: 88 - 91.
- [7] Arzul G, Segue L M, Guzman L, et al. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1999, 232: 285 - 295.
- [8] 何池全, 叶居心. 石菖蒲 (*Acorus tatarinowii*) 克藻效应的研究 [J]. *生态学报*, 1999, 19(5): 754 - 758.
- [9] 张培玉, 蔡恒江, 肖 慧, 等. 孔石莼与 2 种海洋微藻的胞外滤液交叉培养研究 [J]. *海洋科学*, 2006, 30(5): 1 - 4.
- [10] 张 婷, 宋立荣. 铜绿微囊藻与三种丝状蓝藻之间的相互作用 [J]. *湖泊科学*, 2006, 18(2): 150 - 156.
- [11] 南春容, 董双林. 大型海藻孔石莼抑制浮游微藻生长的原因初探——种群密度及磷浓度的作用 [J]. *中国海洋大学学报*, 2004, 34(1): 48 - 54.
- [12] Nan C R, Dong S L, Jin Q. Test of resource competition theory between microalga and macroalga under phosphate limitation [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(3): 282 - 288.
- [13] Bull A L, Slater J H. *Microbial Interactions and Communities* [M]. London: Academic Press, 1982: 567.
- [14] 王长海, 孙颖颖. 球等鞭金藻细胞生长抑制因子的初步研究 [J]. *海洋通报*, 2006, 25(3): 29 - 33.
- [15] 孙颖颖, 陈 静, 王长海. 球等鞭金藻生长抑制物的分离提取与抑制活性研究 [J]. *华东理工大学学报*, 2007, 33(3): 340 - 344.
- [16] 孙颖颖, 王长海, 陈 静. 球等鞭金藻细胞生长抑制物的分离纯化与抑制活性研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(2): 430 - 435.
- [17] Sun Y Y, Wang C H, Chen J. Growth inhibition of the eight species of microalgae by growth-inhibitor from the culture of *Isochrysis galbana* and its isolation and identification [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(3): 315 - 321.
- [18] Jensen A. *Handbook of physiological methods* [M]. New York: Cambridge University Press, 1978: 147 - 198.
- [19] 张志良, 翟伟善. *植物生理学实验指导* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [20] Giannoplitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedling [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 315 - 318.

- [21] Evans S S. The distribution of peroxidase in extreme dwarf and normal tomato [J]. *Phytochemistry*, 1965, 4: 449-503.
- [22] 李寿田,周健民,王火焰,等. 植物化感作用机理的研究进展[J]. *农村生态环境*, 2001, 17(4): 52-55.
- [23] Kirobe T, Hansen J L S. Phytoplankton aggregate formation. Observation of pattern and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material[J]. *Journal of Plankton Research*, 1993, 15(9): 993-1018.
- [24] Cai C G, Liu J S, Cai W M. Action membrane of extracellular polymers on the aerobic granulation [J]. *China Environmental Science*, 2004, 24(5): 623-626.
- [25] 王利群,王 勇,董 英,等. 硝酸盐对硝酸还原酶活性的诱导及硝酸还原酶基因的克隆[J]. *生物工程学报*, 2003, 19: 632-635.
- [26] 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.
- [27] 唐学玺,李永祺. 抗氧化剂对扁藻久效磷毒害的抑制效应[J]. *环境科学*, 2000, 21(1): 87-89.

Inhibitory effects of growth-inhibitor isolated from *Isochrysis galbana* on its own cells

YAN Bin-lun¹, SUN Ying-ying¹, WANG Chang-hai^{2,3}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. School of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China;

3. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: 1-[hydroxyl-diethyl malonate]-isopropyl dodecenoic acid ($C_{22}H_{38}O_7$), a type of growth-inhibitor, was successfully isolated and purified from cultural liquid of *Isochrysis galbana*. A study was conducted to investigate the inhibitory effects of HDMA on the growth of *Isochrysis galbana*. Results showed that exogenously added HDMA inhibited the growth of this algae. HDMA significantly decreased the chlorophyll contents of algal cells. And it had a very significant effect on the ratio of extracellular protein to polysaccharide and activities of NR (nitrate reductase), SOD (superoxide dismutase) and POD (peroxidase) of algal cells. But it was obvious to increase MDA (malonyldialdehyde) contents of algal cells. The results gave hints to elucidate the species-specific antialgal mechanisms of HDMA. Inhibition mechanism of HDMA on *Isochrysis galbana* is to decrease the chlorophyll contents, and decrease or increase activities of NR, SOD and POD of algal cells, and change the ratio of extracellular protein to polysaccharide, thus increasing ratio of extracellular protein to polysaccharide leads to the increase in hydrophobicity of algal cells, finally algal cells flocculate and subside. Affecting uptake of inorganic nitrogen by cells and photosynthesis might play a major role in the inhibitory mechanism. And the excess active oxygen was produced under HDMA stress and active oxygen participated in the damage of HDMA to this algae. It indicated that the physiological metabolism of *Isochrysis galbana* was inhibited by HDMA.

Key words: *Isochrysis galbana*; growth-inhibitor; inhibitory effect; analysis