

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.06.026

少根紫萍对铜绿微囊藻胁迫的生化响应模式

冯婷¹, 苏稚喆¹, 田若岑², 熊艳丽¹, 古少波¹, 魏炜¹

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与环境教育部重点实验室, 成都 610065; 2. 四川大学匹兹堡学院, 成都 610065)

摘要: 了解在藻类胁迫下浮萍的应激和抗胁迫机制, 为提高浮萍水污染修复的应用效益提供参考. 本研究设置了不同浓度梯度的铜绿微囊藻与少根紫萍共培养体系, 并测生物量、叶绿素、抗氧化酶以及藻毒素等指标. 实验结果如下: 少根紫萍在低剂量铜绿微囊藻 3×10^8 cells/L, 6×10^8 cells/L 共培条件下可持续富集藻毒素; 各组少根紫萍的生长均受到抑制, 3×10^8 cells/L 低剂量组在共培养 6 d 后可以促进少根紫萍的增长; 少根紫萍中不同抗氧化酶在铜绿微囊藻胁迫下的酶活变化不同, 3×10^8 cells/L 低剂量组在共培养 6 d 后过氧化物酶(POD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶活显著提高, 共培养 12 d 后超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)酶活有所提高. 结果表明铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍生长发育受到抑制, 低浓度铜绿微囊藻胁迫下可以提高少根紫萍的抗氧化应激能力, 过高浓度可能会导致抗氧化酶的异常表达并损害体细胞的正常代谢.

关键词: 少根紫萍; 铜绿微囊藻; 生物胁迫; 生理生化指标

中图分类号: Q945; X52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)06-1157-06

Biochemical response pattern of *Spirodela punctata* under the stress of *Microcystis aeruginosa*

FENG Ting¹, SU Zhi-Zhe¹, TIAN Ruo-Cen², XIONG Yan-Li¹, GU Shao-Bo¹, WEI Wei¹

(1. Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Pittsburgh Institute, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: To investigate the response mechanism under *Microcystis aeruginosa* stress provides reference value on improving application efficiency of duckweed in water pollution repair. In this study, we established a co-culture system of *Microcystis aeruginosa* and *Spirodela punctata* with different concentration gradients, and measured biomass, total chlorophyll, antioxidant enzymes and microcystin. The main results showed as following: *Spirodela punctata* co-cultivated with *Microcystis aeruginosa* at 3×10^8 cells/L, 6×10^8 cells/L concentration were enriched Microcystin (MCs) continually; the growth of *Spirodela punctata* was inhibited and the biomass decreased continuously in each group, whereas the fresh weight was increased in low-dose *Microcystis aeruginosa* (3×10^8 cells/L) after 6-days' co-cultivation; the activities of different antioxidant enzymes were different under the stress of *Microcystis aeruginosa*, peroxidase (POD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were significantly increased after 6-days' co-cultivation, and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were inhibited first while they were both improved after 12 days at 3×10^8 cells/L. In summary, the growth and development of

收稿日期: 2019-04-04

基金项目: 四川省科技厅重大科技专项(2019YFS0506)

作者简介: 冯婷(1993-), 女, 山西原平人, 硕士生, 研究方向为生物化学及分子生物学.

通讯作者: 魏炜. E-mail: wxwfbxw@163.com

Spirodela punctata under the stress of *Microcystis aeruginosa* was inhibited, but the antioxidant capacity of *Spirodela punctata* could be enhanced under the condition of lower concentration of *Microcystis aeruginosa*, and excessive concentration of *Microcystis aeruginosa* might lead to abnormal expression of antioxidant enzymes and affect the metabolism of cells seriously.

Keywords: *Spirodela punctata*; *Microcystis aeruginosa*; Biological stress; Physiological and biochemical indicators

1 引言

水资源是人类赖以生存的重要资源之一,但随工业经济的发展,水污染问题也越来越严重,由此引发的水体富营养化会导致一些浮游藻类的爆发性增长^[1].铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)是污染水体中的优势藻种^[2],若水体中微囊藻毒素高于 0.001 mg/L(《地表水环境质量标准》GB 3838-2002^[3])就可定义为藻污染,而贾瑞宝等在城市藻污染控制研究中指出苏州太湖中藻含量在 10^7 cells/L 就导致了水体富营养化,并影响了水厂的正常运行^[4].除影响水体的营养结构外还会释放毒性较强的微囊藻毒素,对水体动植物的生长有很大的抑制作用,而且藻毒素经食物链积累后还会影响人体神经和生殖系统的正常功能^[5].

近年来,利用浮萍治理水体藻污染成为国内外一种新型的生物修复方法.浮萍作为小型水生植物,分布范围广且繁殖能力强,相对其他水生植物而言其对生存条件的要求较低极易存活.此外,浮萍在与藻类共生长的过程中一定程度上会竞争水体中的营养物质^[6],并在吸收铜绿微囊藻藻毒素的同时释放出一些化感物质^[7]来抑制铜绿微囊藻的生长.浮萍体型较大、淀粉含量高^[8],且浮于水面易打捞用于饲料,因此浮萍在水体污染的治理上有很大的应用价值.不可忽视的是铜绿微囊藻同样也会抑制浮萍的正常生长和细胞代谢,对浮萍的养殖与应用造成不利影响^[9],本研究主要通过浮萍科紫萍属少根紫萍(*Spirodela punctata*)与铜绿微囊藻共培养后其生理生化指标的测定以分析少根紫萍在治理藻类污染后其生长发育的损伤程度以及抗胁迫响应的机制.

2 材料与方法

2.1 材料

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*, FAC HB930)用 BG11 培养液扩大培养至对数期(10^7 cells/mL),并设置五个浓度梯度,分别是 0, $3 \times$

10^8 , 6×10^8 , 9×10^8 和 1.2×10^9 cells/L;少根紫萍(*Spirodela punctata*)用霍格兰氏培养液(Hoagland's)扩大培养后按 400 mg/m²的覆盖率平铺于加入梯度铜绿微囊藻的 Hoagland's 中,在共培养后的第 6、12、18 d 收集少根紫萍作为实验原材料备用.

2.2 方法

2.2.1 生理指标测定 将收集的少根紫萍晾干脱水后用滤纸吸收多余水分用以测定少根紫萍的鲜重及植物总叶绿素.微囊藻毒素的测定参考上海酶联生物公司微囊藻毒素(MCs)酶联免疫分析试剂盒的说明操作.抗氧化酶类超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及丙二醛(MDA)的测定均按照苏州科铭生物技术有限公司对应酶活测定试剂盒的说明进行操作.

2.2.2 数据统计与分析 收集的数据用 SPSS 19.0 软件统计分析,差异显著性分析采用单因素差异分析(one-way ANOVA)方法, $P < 0.05$ 视为差异显著,所有结果采用 Origin 8.5 软件绘图.

3 实验结果

3.1 少根紫萍对微囊藻毒素的富集结果

与不同浓度铜绿微囊藻共培养 6~18 d 后收集少根紫萍,按试剂盒说明测少根紫萍中藻毒素的浓度,结果如图 1 所示.总体而言,少根紫萍与铜绿微囊藻共培养后体内的藻毒素浓度升高,与 3×10^8 , 6×10^8 及 9×10^8 cells/L 的铜绿微囊藻共培养后,其体内藻毒素含量随共培养天数的增长而增加,在共培养 18 d 后其体内藻毒素的富集量可分别达到 706.98 ± 7.53 , 697.41 ± 23.15 , 745.04 ± 6.60 $\mu\text{g/g}$,表明少根紫萍在低浓度铜绿微囊藻胁迫下可持续吸收藻毒素;与高浓度铜绿微囊藻(1.2×10^9 cells/L)共培养后,少根紫萍体内的藻毒素含量出现先升高后降低的趋势,表明在高浓度铜绿微囊藻生长竞争和微囊藻毒素毒害的双重胁迫下,少根紫萍应激吸收大量的藻毒素,

但随培养天数增加, 高胁迫下少根紫萍细胞代谢受到抑制, 藻毒素的吸收能力也相应降低。

3.2 铜绿微囊藻对少根紫萍生长的影响

少根紫萍与铜绿微囊藻共培养后, 两者对生物和非生物资源的争夺必然会对彼此的生长发育造成影响^[10]。在两者共培养后的第 6, 12, 18 d 取少根紫萍测其鲜重以及总叶绿素含量以分析其生长和光合作用是否受到影响, 实验结果如图 2(a) 与图 2(b) 所示。总体而言, 少根紫萍共培养组的鲜重和总叶绿素含量均低于单独培养, 说明少根紫萍在共培养条件下其淀粉积累受到抑制, 值得一提的是总叶绿素含量随时间有一个先增长后降低的趋势, 启示其在受到胁迫后总叶绿素合成会有一定程度的恢复, 在合成受到抑制后机体可能会通过一些抗胁迫机制促进叶绿素的合成。

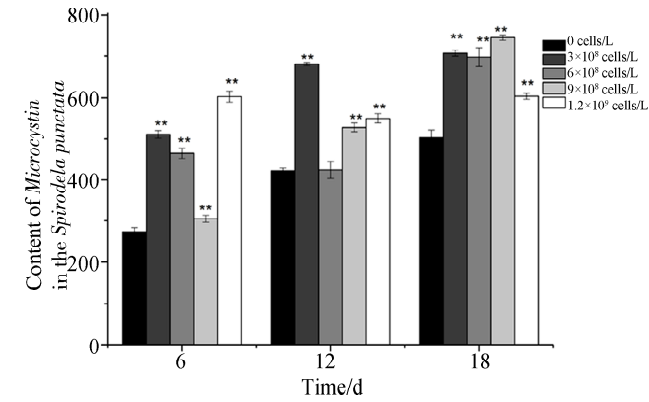
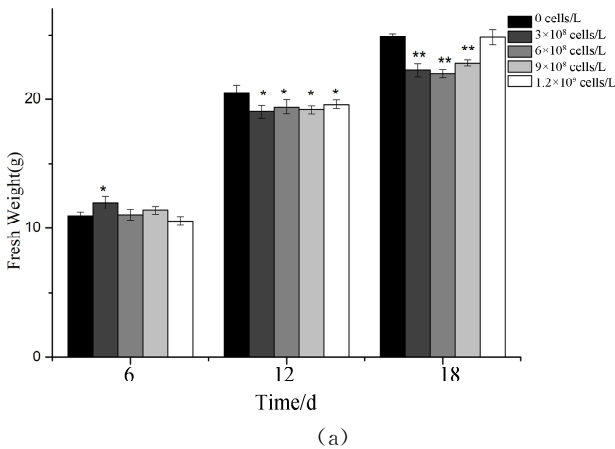


图 1 少根紫萍对藻毒素的富集结果
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 0 cells/L 相比差异显著性)
Fig. 1 The enrichment of Microcystin in *Spirodela punctata*
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significant difference compared to 0 cells/L)

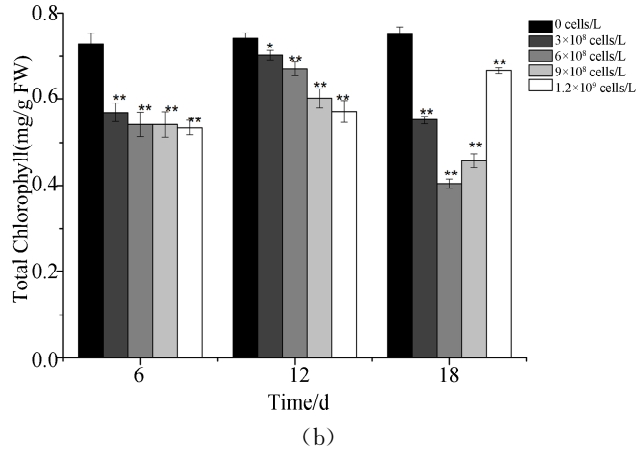


图 2 铜绿微囊藻对少根紫萍的生长发育的影响

(a: 鲜重; b: 总叶绿素; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 0 cells/L 相比差异显著性)

Fig. 2 The effects of *Microcystis aeruginosa* on the growth and the development of *Spirodela punctata*
(a: Fresh Weight; b: Total chlorophyll; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significant difference compared to 0 cells/L)

3.3 铜绿微囊藻对少根紫萍体内抗氧化系统的影响

3.3.1 铜绿微囊藻对少根紫萍丙二醛含量的影响

植物受环境胁迫后细胞膜会受到不同程度的损伤并产生丙二醛(MDA), 因此对丙二醛含量的测定可以在一定程度上反映植物的过氧化损伤程度以及植物的抗逆性^[11]。我们测定了少根紫萍在单独和共培养条件下体内丙二醛的含量, 结果如图 3 所示。总体而言, 受铜绿微囊藻胁迫后少根紫萍中的 MDA 含量高于单独培养, 但不同浓度的铜绿微囊藻的胁迫其 MDA 含量变化趋势不同, 低浓度的铜绿微囊藻(3×10^8 , 6×10^8 cells/L)共培养条件下, MDA 含量不断升高; 而较高浓度铜绿微囊藻(9×10^8 , 1.2×10^9 cells/L)共培养下 MDA 迅速升高随

后减低。结果表明低浓度铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍过氧化程度不断升高, 而高浓度铜绿微囊藻胁迫初期少根紫萍过氧化程度升高, 但随胁迫时间增加少根紫萍细胞代谢下降, MDA 含量也相应降低。

3.3.2 铜绿微囊藻对少根紫萍超氧化物酶的影响

超氧化物歧化酶(SOD)广泛分布于微生物与动植物体内, 是生物体内非常重要的抗氧化酶, 该酶可以通过阴离子自由基的歧化反应来减低自由基含量。我们测定了在铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍 SOD 酶活性的随时间变化情况, 结果如图 4(a) 所示。与铜绿微囊藻共培养 6 d 后, 少根紫萍中 SOD 酶活性低于单独培养组, 说明在 SOD 酶活性在铜绿微囊藻胁迫初期受到抑制, 而在共培养 12 d 后,

低浓度剂量铜绿微囊藻 (3×10^8 cells/L) 处理后的 SOD 酶活性 (58.30 ± 2.76 U/g) 显著高于对照组 (45.22 ± 1.05 U/g), 表明低浓度胁迫下 SOD 酶活受到抑制会有一定程度的恢复, 启示其体内的应

激机制可能滞后, 之后酶活的降低可能与铜绿微囊藻处于生长劣势引起生物胁迫减轻有关。

3.3.3 铜绿微囊藻对少根紫萍过氧化氢酶的影响

过氧化氢酶(CAT)位于植物细胞中的过氧化物酶体中, 它可将过氧化物水解为水和氧气以减少过氧化物的含量. 我们测定了在铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍 CAT 酶活性的变化, 结果如图 4(b) 所示. CAT 在铜绿微囊藻的胁迫下整体活性低于对照组, 低浓度组 (3×10^8 cells/L) 中 CAT 活性是先升高后降低的趋势, 在共培养 12 d 后少根紫萍 CAT 酶活 (130.04 ± 2.07 nmol/min/g) 高于对照组 (104.45 ± 3.04 nmol/min/g), 该模式与 SOD 酶在低浓度铜绿微囊藻胁迫的响应模式相似; 在 1.2×10^9 cells/L 浓度铜绿微囊藻共培养的初期少根紫萍可诱导 CAT 大量合成以抗胁迫, 但后期酶活迅速下降可能与高浓度铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍代谢能力降低有关。

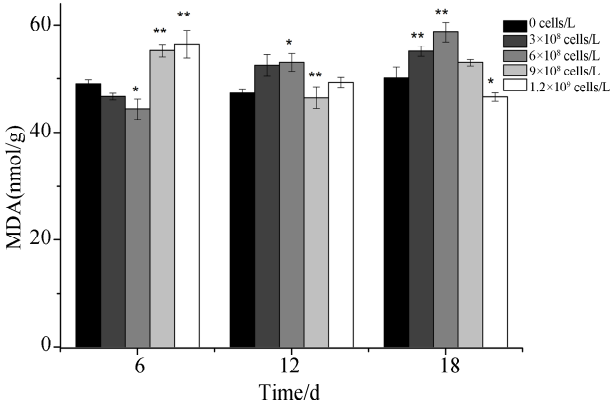


图 3 少根紫萍在铜绿微囊藻胁迫下的 MDA 含量变化 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 0 cells/L 相比差异显著性)

Fig. 3 The content of MDA in *Spirodela punctata* under *Microcystis aeruginosa* stress (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significant difference compared to 0 cells/L)

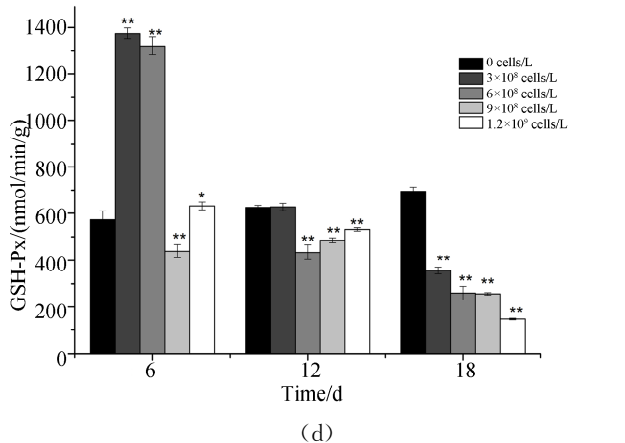
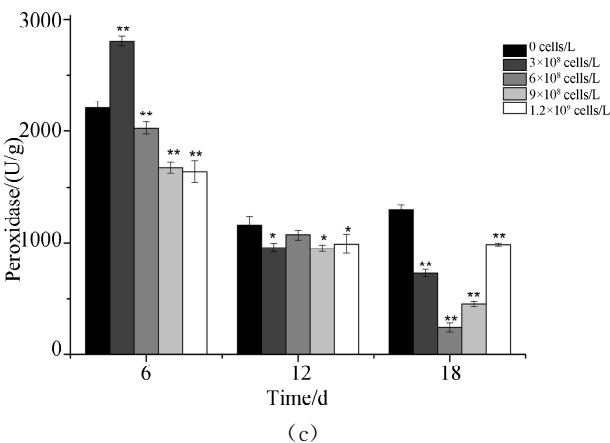
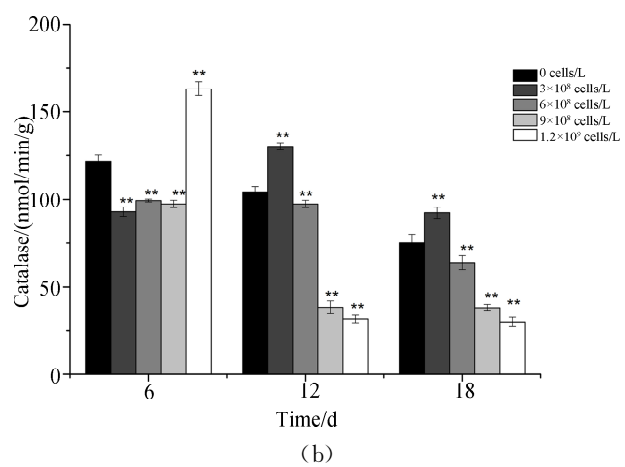
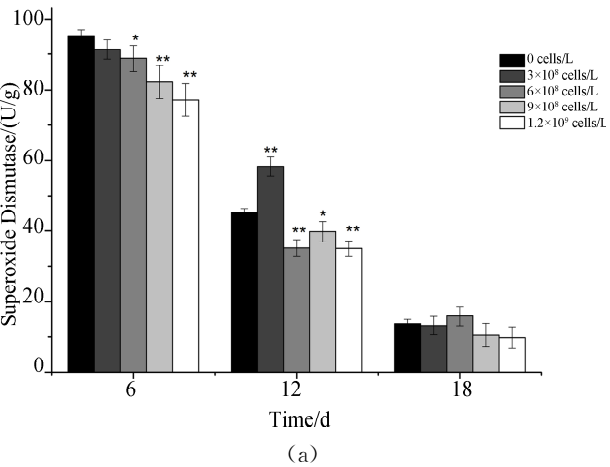


图 4 铜绿微囊藻对少根紫萍体内抗氧化酶的影响

a: SOD 酶; b: CAT 酶; c: POD 酶; d: GSH-Px 酶; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 0 cells/L 相比差异显著性

Fig. 4 The effects of antioxidant enzymes in *Spirodela punctata* under the *Microcystis aeruginosa* stress

a: SOD; b: CAT; c: POD; d: GSH-Px; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significant difference compared to 0 cells/L

3.3.4 铜绿微囊藻对少根紫萍过氧化物酶的影响

过氧化物酶(POD)也是植物过氧化物酶体中一种抗氧化酶,它可将过氧化氢水解为氧化物和水,该酶通常与其他抗氧化酶协同发挥作用.我们测定了在铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍 POD 酶活性的变化,结果如图 4(c)所示.在铜绿微囊藻胁迫下 POD 酶活性整体低于对照组,在 3×10^8 cells/L 浓度的铜绿微囊藻胁迫下 POD 酶在共培养 6 d 后达到峰值($2\ 810.74 \pm 44.24$ U/g)而后下降,而 6×10^8 、 9×10^8 和 1.2×10^9 cells/L 浓度下 POD 酶活性始终低于对照组,表明 3×10^8 cells/L 浓度铜绿微囊藻共培养可以提高少根紫萍 POD 酶活,而浓度一旦高于 6×10^8 cells/L 时 POD 酶活就会受到抑制.

3.3.5 铜绿微囊藻对少根紫萍谷胱甘肽过氧化物酶的影响 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)在保护细胞膜结构免受氧化损害中发挥重要功能,其在催化还原型谷胱甘肽转化为氧化型谷胱甘肽的过程中,将过氧化物转化为羟基化合物以降低氧化物的含量.我们测定了在铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍 GSH-Px 酶活性的变化,结果如图 4(d)所示.与其他抗氧化酶不同的是少根紫萍 GSH-Px 酶活在共培养 6 d 后整体高于对照组(0 cells/L),而后期 GSH-Px 酶活始终低于对照组,低浓度组(3×10^8 、 6×10^8 cells/L)在共培养 6 d 后 GSH-Px 酶活($1\ 374.39 \pm 23.64$ 、 $1\ 320.58 \pm 37.67$ nmol/min/g)显著高于对照组(573.74 ± 36.23 nmol/min/g),启示 GSH-Px 在少根紫萍抵抗藻类生物胁迫的初期发挥重要功能,但随两者生存竞争的加剧,GSH-Px 酶活受到抑制.

4 讨 论

少根紫萍与铜绿微囊藻共培养体系中互相竞争生存资源,而其各自会同时分泌的化感物质会影响彼此的细胞代谢、生长和发育.共培养时铜绿微囊藻的初始浓度对少根紫萍的生长代谢有很大的影响,高浓度的铜绿微囊藻在生存竞争中处于有利位置,会抑制少根紫萍的生长,导致少根紫萍代谢能力降低甚至死亡.实验结果表明,少根紫萍对微囊藻毒素有较强的富集能力,随培养天数的增加藻毒素在紫萍中的含量持续增长,较低浓度铜绿微囊藻胁迫下少根紫萍中的富集能力持续保持较高水平,而较高浓度(1.2×10^9 cells/L)浓

绿微囊藻下少根紫萍对铜绿微囊藻的吸收能力降低表明,高浓度铜绿微囊藻对少根紫萍可能有毒害作用并影响其富集能力;此外藻毒素的富集同时对自身的生长发育也有巨大的危害^[12],少根紫萍的生物量和叶绿素含量变化也证明了这一点:较低剂量组生物量在共培养 18 d 后增长速度降低,总叶绿素含量在较低剂量组呈现先增长后降低的趋势,值得一提的是 1.2×10^9 cells/L 组胁迫下生物量及总叶绿素的变化都出现异常趋势表明高剂量的铜绿微囊藻对少根紫萍的生长有异常调控作用.

植物在受到生物胁迫时会激活体内的抗氧化调节机制,多种抗氧化酶协同发挥作用^[13]以消除体内过量的过氧化物^[9].我们分析了 SOD、CAT、POD 和 GSH-Px 四种抗氧化酶活^[14]对不同浓度铜绿微囊藻胁迫的响应特点,随共培养天数的增加这四种酶活整体都受到抑制,表明铜绿微囊藻对少根紫萍的抗氧化酶系统有毒害作用.此外,我们发现不同抗氧化酶对不同浓度铜绿微囊藻的响应机制不同,低浓度的铜绿微囊藻对 SOD 和 CAT 酶合成调节有滞后作用, 3×10^8 cells/L 浓度以及 1.2×10^9 cells/L 浓度下 SOD 和 CAT 酶活变化趋势一致,表明两种酶在低高浓度铜绿微囊藻胁迫下的抗胁迫机制相似;同样低浓度铜绿微囊藻可以诱导 POD 和 GSH-Px 酶的在初期大量合成,过高浓度 1.2×10^9 cells/L 铜绿微囊藻胁迫下对少根紫萍的 POD 和 GSH-Px 酶出现异常调节.

综上所述,少根紫萍在与铜绿微囊藻共培养后,鲜重降低的同时叶绿素合成减少,多种抗氧化酶活性降低,但不同抗氧化酶对胁迫的响应机制不同.总体而言,少根紫萍在治理低浓度铜绿微囊藻的水体污染时可以富集大量的藻毒素且对少根紫萍生长发育的损伤程度最低.

参考文献:

- [1] 顾启华.富营养化水体中藻类水华成因分析与研究[D].天津:天津大学,2006.
- [2] 张青田,王新华,林超,等.温度和光照对铜绿微囊藻生长的影响[J].天津科技大学学报,2011,26:24.
- [3] 国家环境保护总局.GB3838-2002 地表水环境质量标准[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [4] 贾瑞宝,周善东.城市供水藻类污染控制研究[M].济南:山东大学出版社,2006.

- [5] 林凯,鞠东辉,赵艳. 湖泊富营养化的防治对策[J]. 中国科技纵横, 2010, 5: 20.
- [6] 孙焕,苏稚喆,冯婷,等. 铜绿微囊藻与浮萍联合生长对净化水体的影响[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2018, 55: 853.
- [7] 边归国. 浮水植物化感作用抑制藻类的机理与应用[J]. 水生生物学报, 2012, 36: 978.
- [8] 赵昭,姚广保,张艺琼,等. 猪场污水中浮萍生物量和淀粉含量变化研究[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2012, 49: 693.
- [9] 代亮亮,郭亮亮,吴中奎,等. 不同浓度藻类水华对两种沉水植物的影响[J]. 中国环境科学, 2016, 36: 2765.
- [10] Xu J, Shen G. Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 848.
- [11] Zhang T, Lu Q, Su C, *et al.* Mercury induced oxidative stress, DNA damage, and activation of antioxidative system and Hsp70 induction in duckweed (*Lemna minor*) [J]. *Ecotox Env*, 2017, 143: 46.
- [12] 黄湫淇,詹平. 微囊藻毒素的细胞毒性及机制研究状况[J]. 预防医学情报杂志, 2005, 21: 304.
- [13] 刘国锋,韩士群,刘学芝,等. 藻华聚集的环境效应: 对漂浮植物水葫芦 (*Eichharnia crassipes*) 抗氧化酶活性的影响[J]. 湖泊科学, 2016, 28: 31.
- [14] Dharmendra K G, José M P, Francisco J C, *et al.* Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress [M]. Germany: Springer Verlag, 2015.

引用本文格式:

中文: 冯婷,苏稚喆,熊艳丽,等. 少根紫萍对铜绿微囊藻胁迫的生化响应模式[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2019, 56: 1157.

英文: Feng T, Su Z Z, Xiong Y L, *et al.* Biochemical response pattern of *Spirodela punctata* under the stress of *Microcystis aeruginosa* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 1157.