

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200401003

傅丽君, 林潇雨, 杨磊, 等. 溶藻细菌 HSY-03 对赤潮异弯藻抗氧化系统的影响[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(3): 302-309

Fu L J, Lin X Y, Yang L, et al. Effects of algicidal bacterium HSY-03 on antioxidant defense system of *Heterosigma akashiwo* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 302-309 (in Chinese)

溶藻细菌 HSY-03 对赤潮异弯藻抗氧化系统的影响

傅丽君^{1,2,*}, 林潇雨³, 杨磊^{1,2}, 黄靖^{1,2}, 李婷²

1. 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室, 莆田 351100

2. 莆田学院环境与生物工程学院, 莆田 351100

3. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

收稿日期: 2020-04-01

录用日期: 2020-05-21

摘要: 为研究溶藻细菌 HSY-03 (*Bacillus* sp.) 对赤潮异弯藻的溶藻机制, 采用不同浓度 HSY-03 无菌上清液处理赤潮异弯藻藻细胞, 测定藻细胞光合色素含量、叶绿素荧光效率、细胞内部活性氧(ROS)水平和抗氧化系统活性变化。结果表明, HSY-03 无菌上清液作用 24 h 之后, 赤潮异弯藻叶绿素 *a* 含量、类胡萝卜素含量和最大光化学效率(F_v/F_m 值)均快速下降, 表明藻细胞光合作用受到抑制; 处理 2 h 后 ROS 含量即上升, 至 6 h 后逐渐下降; 处理 12 h 膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量上升, 至 48 h 达到峰值, 表明藻细胞内部氧化损伤严重; 藻细胞内抗氧化系统响应被激发, 抗氧化酶系统超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性不同程度上升, 以清除细胞内部 ROS。非酶促抗氧化系统谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量上升, 二者协同作用清除 ROS。这表明, HSY-03 上清液可能通过影响光合作用和作用于藻体的膜结构, 引起细胞氧化损伤, 最终导致藻细胞死亡。研究结果表明, HSY-03 可以作为一种长期环境友好型生物因子有效防治赤潮异弯藻。

关键词: 溶藻细菌; 赤潮异弯藻; 氧化损伤; 抗氧化系统; 赤潮

文章编号: 1673-5897(2021)3-302-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Algicidal Bacterium HSY-03 on Antioxidant Defense System of *Heterosigma akashiwo*

Fu Lijun^{1,2,*}, Lin Xiaoyu³, Yang Lei^{1,2}, Huang Jing^{1,2}, Li Ting²

1. Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-Toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants, Putian 351100, China

2. College of Environmental and Biological Engineering, Putian University, Putian 351100, China

3. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Received 1 April 2020

accepted 21 May 2020

Abstract: In order to reveal the algicidal mechanism of bacteria HSY-03 (*Bacillus* sp.) on harmful algae *Heterosigma akashiwo*, the photosynthetic pigments contents, chlorophyll fluorescence efficiency, photosynthetic parameters, reactive oxygen species (ROS) level and antioxidant systems activities in the algae cells treated with HSY-03 cell-free filtrate were measured. The results showed that chlorophyll *a*, carotenoids contents and chlorophyll *a* fluorescence F_v/F_m decreased rapidly after 24 h treatment by HSY-03 cell-free filtrate, indicating that bacterium HSY-03 inhibited the photosynthesis of the algae. The ROS contents increased after 2 h cell-free filtrate treatment then grad-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31400318); 福建省科技厅引导性项目(2020Y0089); 莆田市科技计划资助项目(2017G2012)

第一作者: 傅丽君(1975—), 女, 教授, 研究方向为海洋环境微生物学, E-mail: lijun_fu@sina.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: lijun_fu@sina.com

ually decreased after 6 h treatment. Responses of antioxidant system of algae were stimulated. The activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) increased in different degrees to clear ROS in the algae cells. The activities of non-enzymatic antioxidant systems such as glutathione (GSH) and ascorbic acid (ASA) also increased, and both of them cooperated to eliminate ROS. These results suggested that the algicidal bacterium HSY-03 might affect the photosynthesis and the membrane structure of algae, cause cell oxidative damage, and eventually lead to cell death. Therefore, applying HSY-03 as a long-term and environmentally friendly bio-agent to control the harmful blooms of *Heterosigma akashiwo*, would be effective and promising.

Keywords: algicidal bacterium; *Heterosigma akashiwo*; oxidative stress; antioxidant systems; harmful algal bloom

有害赤潮已成为当今全球性的海洋灾害,严重制约沿海经济的发展,破坏海洋生态环境,威胁人类健康。赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)属于针胞藻类(Raphidophyceae),为近岸海域广布类型藻之一,能产生溶血性鱼毒素,对水产养殖业危害严重^[1-2]。微生物治理赤潮因具有操作简单、高效、不会带来环境二次污染等优势,被认为是最具前途的赤潮防治方法之一^[3-4]。溶藻细菌(algicidal bacteria)通过接触细胞及侵入细胞等直接方式,或者通过分泌胞外活性物质等间接方式抑制藻细胞生长,因种类多、分布广泛、功能强大等特点,成为目前最常用的微生物控藻细菌^[5-6]。由于细菌分泌的杀藻物质浓度较低、难以纯化且杀藻活性不稳定,使得细菌杀藻作用的机制和过程未能得到详尽的阐释。

国内外已有研究表明,杀藻物质或杀藻菌作用藻细胞后,藻细胞结构被破坏,光合、呼吸作用受到抑制^[7-8]。藻细胞在进化过程中形成了一系列适应外界胁迫的生理生态响应体系,但当这种胁迫到一定程度,细胞启动的防御机制不足以应对胁迫对机体造成的损伤,藻细胞内活性氧(ROS)过度积累,降低光合作用效率,进而会导致藻细胞抗氧化防御系统崩溃,膜脂过氧化程度加剧^[9-10]。为减轻氧化胁迫造成的伤害,藻类体内衍生出一套抗氧化防御系统(包括酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统),使ROS含量处于平衡状态。目前,关于抑藻细菌胁迫下微藻非酶促抗氧化系统的报道相对较少,但是氧化应激启动后,细胞酶类和非酶促抗氧化系统通常同时启动,以避免机体受到氧化损伤,同时也有研究表明,过量的ROS极有可能作为信号分子来介导藻细胞程序性死亡(PCD)^[11-12]。

本课题组前期从福建省云霄红树林区泥样中分离出对赤潮异弯藻具杀藻作用的芽孢杆菌属溶藻细菌 HSY-03,其溶藻方式为分泌胞外代谢产物进行间

接杀藻^[13],本研究通过开展溶藻菌 HSY-03 胞外代谢产物对赤潮异弯藻藻细胞光合系统和抗氧化系统的影响,为探讨溶藻细菌对赤潮异弯藻溶藻机制和溶藻制剂开发提供理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和藻种

实验所用菌株 HSY-03 属芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),分离自中国福建省云霄红树林区。供试藻种为单细胞赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*),由暨南大学水生生态研究所提供,经厦门大学应用环境微生物研究所采用无菌藻除菌技术纯化获得无菌菌株。

1.1.2 培养基和培养条件

菌株 HSY-03 培养基为本课题组前期优化所得配方:蛋白胨 $4.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母粉 $4.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KBr $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $0.0375 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.5, 于 28°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 培养 48 h 至对数生长期。

赤潮异弯藻所用培养液为 f/2 培养基^[14],采用三角瓶置于 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 光照生化培养箱,光暗周期 12 h L : 12 h D, 光照强度为 $3\,000 \text{ lx}$ 。

1.2 主要化学试剂与仪器

酶标仪(BIO-RAD, 深圳市科力易翔仪器设备有限公司, 中国), 紫外可见光光度计(TU-1900, 北京普析通用仪器有限责任公司, 中国), 光照培养箱(GTOP-310C, 宁波海曙赛福实验仪器厂, 中国), 超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-IIID, 宁波新芝生物科技股份有限公司, 中国), 高级浮游植物荧光仪(PHY-TO-PAM, Walz 公司, 德国)等。

总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽

(GSH)和抗坏血酸(AsA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(中国)。

1.3 试验方法

1.3.1 HSY-03 对赤潮异弯藻光合色素和光合效率

将培养至对数生长期的 HSY-03 发酵培养液在 $10\,000\times g$ 条件下离心 10 min, 去除菌体, 制得发酵上清液, 以 HSY-03 上清液和添加藻液的体积比计算处理终浓度。不同终浓度(0.5%、1.5% 和 3.0%) HSY-03 上清液处理组, 以 2216E 培养基处理作为对照组, 分别取处理组和对照组藻液各 50 mL, 95% 乙醇萃取细胞中色素, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光静置 24 h, 萃取液 $3\times 10^3\times g$ 离心 5 min, 取上清液分别于 664、630 和 480 nm 处测定吸收值, 实验设置 3 组平行。叶绿素 *a* 含量计算采用 Jeffrey 和 Humphrey^[15] 的公式:

$$\text{Chl } a(\mu\text{g}\cdot\text{cell}^{-1})=11.47\times A_{664}-0.40\times A_{630}$$

类胡萝卜素含量计算采用 Strickland 和 Parsons^[16] 的公式: $\text{Carotenoids}(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})=4\times A_{480}$

式中: A_{664} 、 A_{630} 和 A_{480} 分别为上清液在波长为 664、630 和 480 nm 条件下的吸收值。

室温下用高级浮游植物荧光仪测定叶绿素荧光, 激发光强为最大光强 $3\,000\text{ }\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, 藻液暗处理 15~30 min, 记录时间 5 s, 每隔 24 h 测定一次, 用可变荧光(F_v)与最大荧光(F_m)的比值 F_v/F_m 表示光合效能活性的大小。

1.3.2 HSY-03 对赤潮异弯藻细胞生理生化指标的影响

将 HSY-03 无菌上清液以 1.5% 终浓度加入到 100 mL 赤潮异弯藻中, 于培养 12、24、36、48 和 72 h 后取 20 mL 藻液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\,000\times g$ 离心 10 min 收集藻细胞, 加入经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_3\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 为 7.5)5 mL, 冰浴条件下超声破碎(工作 3 s, 间隙 3 s, 共 20 次), 破碎液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1.2\times 10^4\times g$ 离心 15 min, 取上清液即制得粗酶液。采用南京建成生物工程公司生产的试剂盒测定酶促抗氧化系统 CAT、SOD、POD 活性和非酶促抗氧化系统 GSH、AsA 含量。以 2216E 培养基处理作为对照组, 每处理设置 3 组平行。

藻细胞内部 ROS 强度测定采用荧光染料 DCFH-DA 进行^[17], DCFH-DA 主要针对过氧化物伴随下的 H_2O_2 及 $\cdot\text{OH}$ 。取 0.5 mL 终浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DCFH-DA, 加入到上述处理藻细胞中, 避光置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下温浴 1 h, 间隔 3 min 摇匀一次, 之后用 f2 藻培养基洗涤藻细胞 3 次。在 485 nm 下激发,

525 nm 下采用酶标仪测定藻细胞荧光强度。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 对光合色素含量和荧光效率的影响

叶绿素 *a* 是藻类初始光捕获色蛋白之一, 与藻细胞的生物量密切相关, 能反映杀藻物质对藻细胞生长状况的影响。由图 1 可知, 经溶藻细菌 HSY-03 无菌上清液处理后, 赤潮异弯藻叶绿素 *a* 含量降低, 并表现出明显的时间和剂量效应, 高浓度处理组抑制现象极为明显。低浓度(0.5%)HSY-03 上清液处理前 24 h, 藻细胞叶绿素 *a* 含量与对照组在同一水平, 48 h 开始叶绿素 *a* 含量即显著低于对照组($P<0.05$)。整个处理时期, 中高浓度(1.5% 和 3.0%)处理组藻细胞叶绿素 *a* 含量均显著低于对照组($P<0.01$)。0.5%、1.5% 浓度处理 96 h 后, 藻细胞叶绿素 *a* 含量分别下降了 46.0% ($P<0.05$)、68.4% ($P<0.01$), 3.0% 浓度处理 96 h 后藻细胞叶绿素 *a* 含量几乎为 0。这说明, HSY-03 胞外活性物质对叶绿素 *a* 造成破坏, 叶绿素 *a* 的分解使得为藻细胞提供有机物及能量的光合系统被破坏, 导致能量运输被阻断, 从而引起藻细胞死亡。

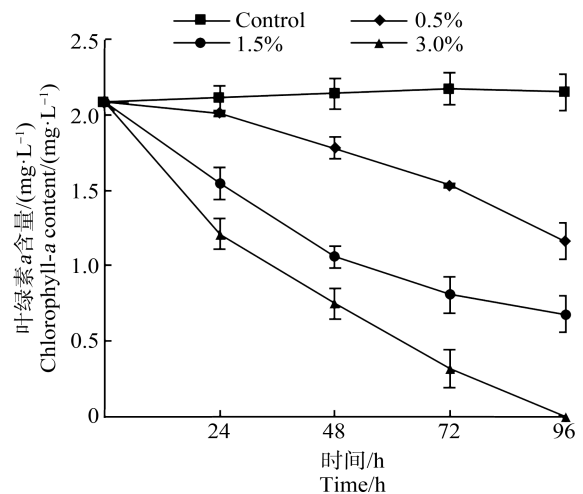


图1 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞叶绿素 *a* 含量影响

Fig. 1 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on chlorophyll *a* content of *Heterosigma akashiwo*

不同浓度 HSY-03 上清液处理下, 赤潮异弯藻类胡萝卜素含量变化如图 2 所示, 结果表明, 对照组藻细胞类胡萝卜素含量总体变化幅度较小, 低浓度(0.5%)HSY-03 上清液处理 24 h, 藻细胞类胡萝卜素含量为对照组 1.07 倍($P<0.01$), 之后藻细胞类胡萝卜素含量接近对照水平。1.5% 上清液处理 24 h, 藻细胞类胡萝卜素含量上升, 为对照组的 1.09 倍($P<$

0.01),处理 48 h 后藻细胞类胡萝卜素含量逐渐开始下降,显著低于对照组($P<0.01$)。而高浓度处理组藻细胞类胡萝卜素始终低于对照组($P<0.01$),24、48 和 72 h 分别下降了 18.3%、43.1% 和 74.5%,处理 96 h,藻细胞类胡萝卜素基本降为 0。这表明,HSY-03 无菌上清液的加入可能造成了藻细胞的氧化胁迫,低浓度上清液在一定程度上能够刺激藻细胞产生类胡萝卜素来削弱氧化胁迫的危害,但随着胁迫的持续增长,藻细胞功能代谢受损,间接影响了藻细胞类胡萝卜素的合成,从而表现出类胡萝卜素含量的下降。

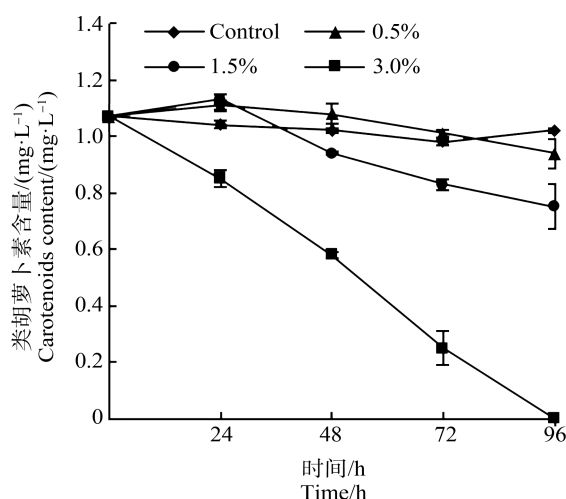


图2 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞类胡萝卜素含量影响

Fig. 2 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on carotenoids contents of *Heterosigma akashiwo*

藻细胞的 F_v/F_m 可代表光系统 II (PS II) 的光化学效率,能准确反映藻细胞 PSII 反应中心开放状态的量子产量,是衡量藻细胞光合作用能力的重要参数之一。利用叶绿素荧光动力学可以快速、灵敏、无损伤地探测逆境对藻类光合作用的影响^[18]。由图 3 可知,HSY-03 上清液处理后,藻细胞 F_v/F_m 值均呈下降趋势,且呈剂量-效应关系。处理 24 h,低浓度 (0.5%) 处理组 F_v/F_m 值即表现出降低的趋势,1.5% 和 3.0% 浓度处理组 F_v/F_m 值明显低于对照 ($P<0.01$ 、 $P<0.05$),随着处理时间的延长,各处理组 F_v/F_m 值均显著低于对照组 ($P<0.01$)。处理 96 h,0.5%、1.5% 和 3.0% 浓度处理组 F_v/F_m 比值比对照分别下降了 37.9%、51.5% 和 80.3% ($P<0.01$)。这表明,HSY-03 无菌上清液的加入降低了 PS II 活性,抑制藻类光合系统,导致光合作用效率下降。

2.2 藻细胞胞内 ROS 含量变化

藻细胞受到胁迫时,胞内会产生大量的 ROS,为了表征 HSY-03 上清液对藻细胞的胁迫作用,对藻细胞内的 ROS 含量变化进行了测定。由图 4 可知,在杀藻菌作用下,藻细胞内的 ROS 含量表现出先升高后降低的趋势。3% 浓度 HSY-03 上清液作用

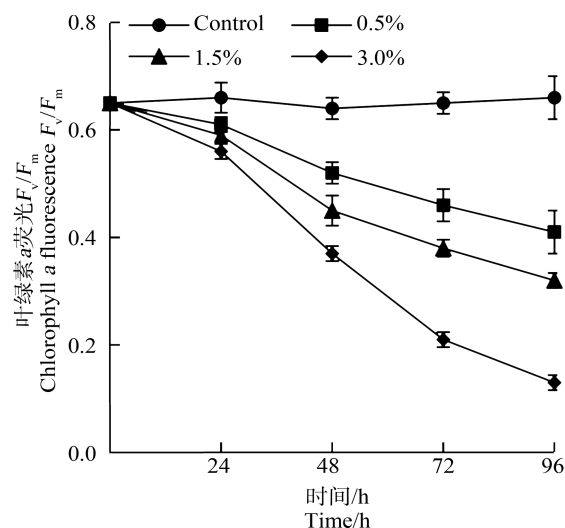


图3 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞叶绿素 a 荧光 F_v/F_m 的影响

注: F_v/F_m 表示藻细胞可变荧光(F_v)强度与最大荧光(F_m)强度之比。

Fig. 3 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on chlorophyll a fluorescence F_v/F_m of *Heterosigma akashiwo*

Note: F_v/F_m represents the ratio of variable fluorescence (F_v) intensity to maximum fluorescence (F_m) intensity of algal cells.

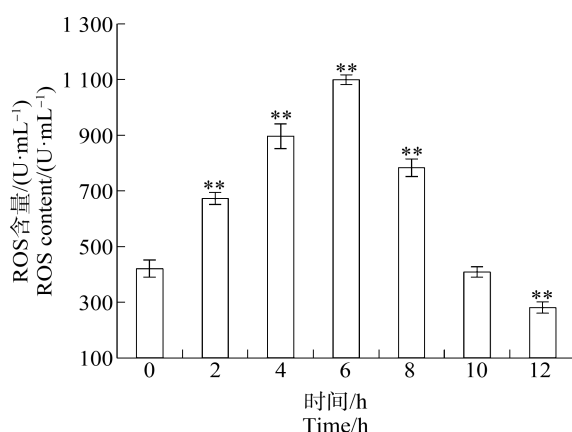


图4 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞活性氧 (ROS) 含量影响

注: ** 表示与对照组相比差异显著 ($P<0.01$)。

Fig. 4 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on reactive oxygen species (ROS) of *Heterosigma akashiwo*

Note: ** means significant differences compared with the control ($P<0.01$).

2 h后,藻细胞内 ROS 含量即显著上升($P<0.01$),为对照组 1.6 倍,至第 6 小时 ROS 含量达到峰值,为初始阶段的 2.61 倍($P<0.01$)。随着处理时间延长,藻细胞内 ROS 含量开始下降,10 h 后 ROS 含量低于初始水平,12 h 后 ROS 含量为初始阶段的 66.7% ($P<0.01$)。

2.3 藻细胞抗氧化系统活性响应

由图 5(a)可知,经 HSY-03 上清液处理 12 h,各处理组 SOD 活性即开始升高,表明藻细胞防御机制启动。但藻细胞的防御能力有限,藻细胞无法产生更多的 SOD 以抵抗伤害,至处理 36 h, SOD 活性开始下降接近对照水平。为了维持对藻细胞内部 ROS 的持续清除作用,随着胁迫时间的延长,藻细胞 SOD 活性又开始上升,至处理 48 h 达峰值,各处理组 SOD 活性分别是对照组 1.69 倍($P<0.01$)、2.10 倍($P<0.01$)和 2.55 倍($P<0.01$),随后 SOD 活性又逐渐下降,但始终高于对照组($P<0.01$)。由图 5(b)和图 5(c)可知,藻细胞内 CAT 活性与 SOD 活性表现出相似的变化趋势。处理至 48 h 时 CAT 活性达峰值,分别是对照组 CAT 活性的 2.06 倍($P<0.01$)、3.95 倍($P<0.01$)和 4.90 倍($P<0.01$),随后 CAT 活性开始下降。SOD 和 CAT 活性的增高有助于清除细胞内部的 ROS,但当细胞内 ROS 超出了抗氧化酶的清除能力时,依然会导致细胞死亡。由图 5(c)可知,POD 活性变化趋势与 SOD 活性类似,但低浓度(0.5%)处理组 POD 活性变化较为不明显,至处理 48 h, 1.5% 和 3.0% 处理组 POD 活性分别是对照组 1.81 倍($P<0.01$)和 2.16 倍($P<0.01$),随着处理时间延长,各处理组 POD 活性呈下降趋势,接近初始阶段。这表明,

高浓度处理组 POD 可用于缓解过量的 ROS,从而造成自身含量下降。在 HSY-03 上清液胁迫下, CAT 和 POD 均发挥酶活特性,清除胞内 H_2O_2 ,使机体氧自由基含量平衡。这也进一步证实了氧化胁迫是诱导藻细胞死亡的作用机理之一。

由图 6 可知,MDA 含量与 HSY-03 上清液浓度呈正相关型剂量-效应关系。处理 12 h, 0.5%、1.5% 和 3.0% 处理组 MDA 含量分别是对照组的 1.15 倍($P<0.05$)、1.35 倍($P<0.01$)和 1.73 倍($P<0.01$)。随着处理时间的增加,各处理组的 MDA 含量继续上升,在 48 h 时达到各自的最高水平,分别为对照组的 1.40 倍($P<0.05$)、1.76 倍($P<0.01$)和 2.28 倍($P<0.01$)。在处理 60 h 时,各处理组的 MDA 含量相对于 48 h 有所下降,但是仍显著高于对照组。这说明,在细菌 HSY-03 胞外活性物质的胁迫下,藻细胞内 ROS 不断积累,造成藻细胞膜脂过氧化程度增强,MDA 含量上升。但持续的胁迫环境,致使藻细胞自身抗氧化系统的启动或者膜脂损伤加剧,MDA 含量则开始逐渐下降。

藻细胞的非酶促抗氧化系统包括 GSG 和 AsA, HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞 GSH 和 AsA 含量影响结果如图 7 所示。由图 7(a)可知,在整个处理过程中,对照组 GSH 水平基本保持不变;在处理 12 h 时,各处理组藻细胞 GSH 含量显著上升,分别为对照组 1.63 倍、1.85 倍($P<0.01$)和 2.72 倍($P<0.01$);随着处理时间延长,GSH 含量继续增大,以清除过量的 ROS,在处理 36 h 时,各处理组 GSH 含量分别达到峰值,分别是对照组的 2.33 倍($P<0.01$)、2.80 倍($P<0.01$)和 3.36 倍($P<0.01$);从 48 h 开始,

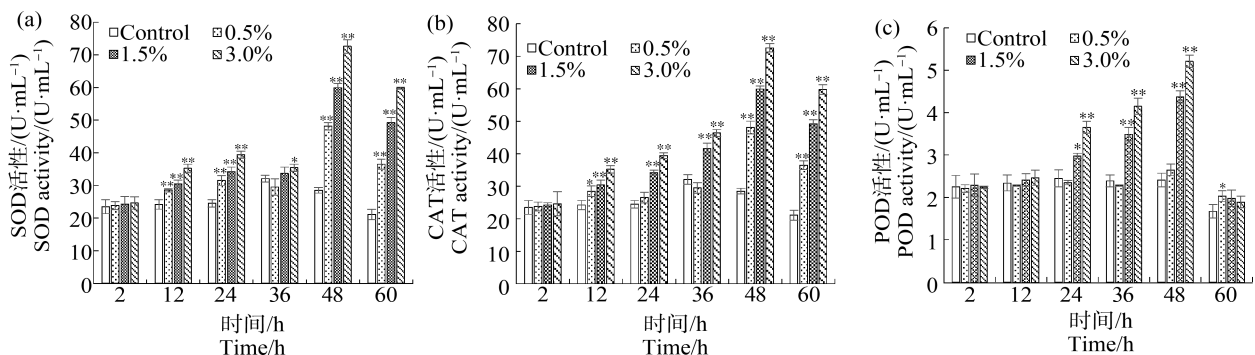


图 5 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的影响

注: *、** 表示与对照组相比差异显著($P<0.05$ 、 $P<0.01$);下同。

Fig. 5 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) of *Heterosigma akashiwo*

Note: *, ** mean significant differences compared with the control ($P<0.05$, $P<0.01$); the same below.

处理组的 GSH 含量逐渐下降至接近对照水平,这可能是 GSH 在清除 ROS 的同时,自身转换成了氧化型谷胱甘肽(GSSGs),因此 GSH 含量降低到低水平。由图 7(b)可知,低浓度(0.5%)处理组藻细胞内 AsA 含量与对照相比无显著差异,中高浓度(1.5% 和 3.0%)处理 12 h 后 AsA 含量则显著高于对照($P < 0.01$),处理 36 h 时达到峰值,为对照组的 1.70 倍($P < 0.01$)和 2.0 倍($P < 0.01$);随后各处理组 AsA 含量开始下降,但仍显著高于对照($P < 0.01$)。AsA 通过与 GSSG 反应以清除部分 ROS,但过多的 ROS 消耗了大量的 AsA,导致处理后期 AsA 含量开始下降。

3 讨论 (Discussion)

藻细胞在外界胁迫下,其叶绿体的膜结构会受到破坏,叶绿素含量将随叶绿体膜结构的解体而降低,进而降低藻细胞光合作用效率^[5]。本研究表明,HSY-03 上清液作用于赤潮异弯藻后,藻细胞叶绿素 *a* 含量下降,并且随着杀藻浓度和处理时间的增加,藻细胞色素严重受损。在 HSY-03 上清液处理 12 h,各处理组 MDA 含量即显著高于对照组,MDA 作为脂质过氧化的产物,它的产生意味着 $O_2^- \cdot$ 、 $\cdot OH$ 等攻击藻细胞引发了脂质过氧化反应,造成藻细胞生理功能紊乱,减少了叶绿素 *a* 合成,影响光合作用,同时藻细胞 PS II 的光化学效率(F_v/F_m 值)与对照相比显著下降,呈显著的浓度和时间效应。类胡萝卜素作为光合作用的辅助色素,是机体内抗氧化防御体系非酶促体系中的一种重要物质,中低浓度 HSY-03 上清液处理组藻细胞类胡萝卜素含量呈先上升后下降趋势,高浓度处理组类胡萝卜素含量下降。当藻细胞受到氧化损伤时,一定程度上促进了类胡萝卜素含量的增加以抑制藻细胞的氧化损伤^[19-20],

但随着胁迫加剧,藻细胞各种功能代谢受损,影响了藻细胞类胡萝卜素合成,其含量下降直至低于检测限。这证实 HSY-03 胞外溶藻活性物质的介入极可能影响了藻细胞内光合色素转化,光合色素含量下降并伴随藻细胞最大光化学效率的降低。藻细胞光合效率和能力受到抑制,导致藻细胞能量运输被阻断,从而引起藻细胞死亡。

由于藻细胞光合作用中的假环式电子传递链也是 $O_2^- \cdot$ 的一个重要来源,因此光合作用受损会诱导大量 ROS 产生^[21]。同时好氧生物在呼吸作用复杂的氧化磷酸化作用中,二磷酸腺苷(ADP)被转化成三磷酸腺苷(ATP),从而为生物体提供生长繁殖所需的能量,而 O_2 则作为最终电子受体被还原成 H_2O 。具体反应步骤为 $O_2 \rightarrow (H)O_2^- \rightarrow \cdot H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + H_2O \rightarrow 2H_2O$,该过程分子氧伴随了不同形态 ROS 的形成^[22]。

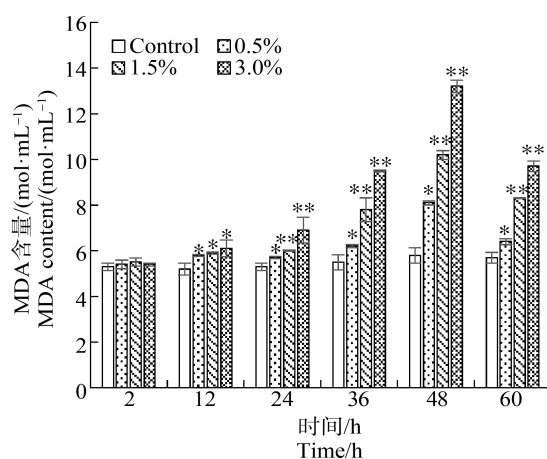


图6 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻丙二醛(MDA)含量的影响

Fig. 6 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on the malondialdehyde (MDA) content of *Heterosigma akashiwo*

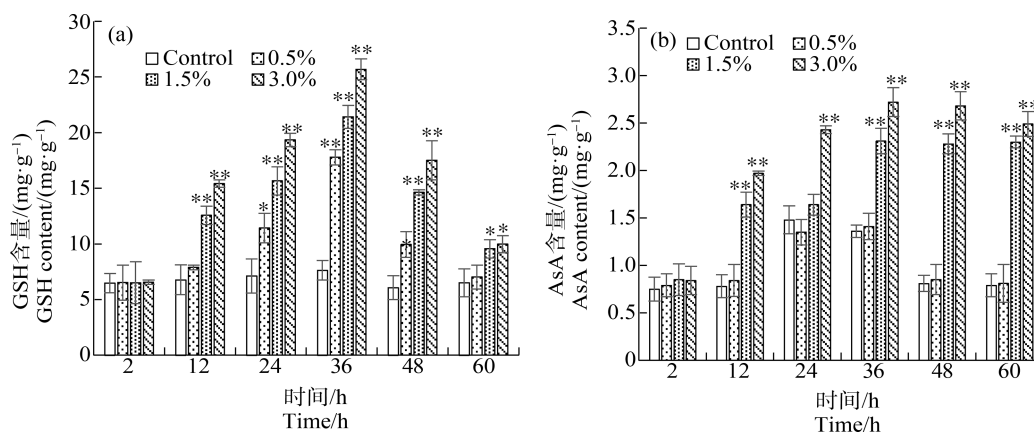


图7 HSY-03 上清液对赤潮异弯藻细胞谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量的影响

Fig. 7 Effects of HSY-03 cell-free filtrate on the glutathione (GSH) and ascorbic acid (ASA) contents of *Heterosigma akashiwo*

ROS 在细胞信号传导方面有着重要的作用,同时也会对细胞内蛋白质、脂质和核酸等造成不可逆的损伤,并引起细胞死亡^[23]。本研究采用 DCFH-DA 法测定 ROS 含量变化,经 3% HSY-03 无菌上清液处理后,赤潮异弯藻细胞 $\text{H}_2\text{O}_2/\cdot\text{OH}$ 水平显著上升到一定水平后逐渐下降。由于 $\cdot\text{OH}$ 是 ROS 中活性最强的基团,其半衰期 $<1\ \mu\text{s}$,对其产生位点附近的生物大分子有非常强的亲合力,反应速率极快($K>10^9\ \text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$),因此对生物体危害极大^[24]。 $\text{H}_2\text{O}_2/\cdot\text{OH}$ 水平上升表明 HSY-03 诱导藻细胞产生 ROS,预示了 HSY-03 无菌上清液可能介导了藻细胞的氧化损伤,研究结果与张化俊等的^[25]一致。

正常情况下,机体细胞内存在抗氧化系统(酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统),维持 ROS 产生和清除的动态平衡状态,当 ROS 产生过多或藻细胞抗氧化防御能力减弱时,藻细胞就会发生氧化损伤^[26]。SOD 作为抗氧化防御系统的第一道防线,能清除 $\text{O}_2\cdot^-$,并催化 $\text{O}_2\cdot^-$ 转化成 H_2O_2 和 O_2 ,缓解 ROS 的压力。转化后的 H_2O_2 继续在 CAT 和 POD 作用下分解成 H_2O 和 O_2 ,从而彻底清除 ROS 对细胞的胁迫^[27-28]。HSY-03 上清液作用后,激活了赤潮异弯藻细胞内酶促抗氧化系统,SOD、CAT 和 POD 酶活性被激活并发挥作用,以平衡机体的正常生理代谢功能,但是随着胁迫的加剧,藻细胞抗氧化系统被破坏,抗氧化酶活性开始降低,故未能完全去除藻细胞内的活性氧和自由基。

非酶促抗氧化系统的 GSH 和 AsA,二者常共同作用以清除过量 ROS。GSH 是一种由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的三肽,其分子结构含有巯基,巯基自身氧化后能将 ROS 清除,同时巯基变成 GSSG;AsA 作为 GSH 的辅助,通过自身的氧化将 GSSG 转化成 GSH,再次用于 ROS 的清除^[29],保护细胞免受氧化损伤。在 HSY-03 上清液作用下,藻细胞 GSH 含量上升,用于清除过量 ROS,在清除 ROS 的同时,自身转换成了 GSSG,故含量开始下降。在 HSY-03 胁迫下,AsA 含量上升,通过与 GSSG 反应含量逐渐下降。在 GSH 和 AsA 共同作用下继续清除过量的 ROS。虽然 ROS 的含量在藻细胞自身抵抗作用下开始下降,但是其作用效果没有被完全缓解,同时大量的抗氧化系统的响应过度消耗了藻自身的能量,造成了藻细胞的氧化损伤。

以上结果表明,溶藻细菌 HSY-03 溶藻机制主要是通过胞外活性物质抑制藻细胞光合作用,引起

藻细胞内部氧化损伤,当胞内产生的过量 ROS 得不到及时清除时,ROS 引发含有膜结构的细胞器发生脂质过氧化,并通过引发一定的级联反应造成藻细胞死亡。但关于菌株 HSY-03 分泌的溶藻活性物质的特性和结构确认,赤潮异弯藻遗传信息的解析和抑藻物质作用下藻细胞关键功能基因的响应有待于进一步探讨。

参考文献 (References):

- [1] Ji N J, Li L, Lin L X, et al. Screening for suitable reference genes for quantitative real-time PCR in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132183
- [2] Wang M, Chen S B, Zhou W G, et al. Algal cell lysis by bacteria: A review and comparison to conventional methods [J]. Algal Research, 2020, 46: 101794
- [3] Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M. Progress in understanding harmful algal blooms: Paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management [J]. Annual Review of Marine Science, 2012, 4: 143-176
- [4] Berdalet E, Fleming L E, Gowen R, et al. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: Challenges and opportunities in the 21st Century [J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2016, 96(1): 61-91
- [5] Yu X Q, Cai G J, Wang H, et al. Fast-growing algicidal *Streptomyces* sp. U3 and its potential in harmful algal bloom controls [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 341: 138-149
- [6] van Tol H M, Amin S A, Armbrust E V. Ubiquitous marine bacterium inhibits diatom cell division [J]. The ISME Journal, 2017, 11(1): 31-42
- [7] Li Y, Zhu H, Lei X Q, et al. The death mechanism of the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* induced by algicidal bacterium *Deinococcus* sp. Y35 [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 992
- [8] Pokrzywinski K L, Tilney C L, Modla S, et al. Effects of the bacterial algicide IRI-160AA on cellular morphology of harmful dinoflagellates [J]. Harmful Algae, 2017, 62: 127-135
- [9] Zhang F X, Fan Y X, Zhang D Y, et al. Effect and mechanism of the algicidal bacterium *Sulfitobacter porphyrae* ZFX1 on the mitigation of harmful algal blooms caused by *Prorocentrum donghaiense* [J]. Environmental Pollution, 2020, 263(Pt A): 114475
- [10] Tan S, Hu X L, Yin P H, et al. Photosynthetic inhibition

- and oxidative stress to the toxic *Phaeocystis globosa* caused by a diketopiperazine isolated from products of algicidal bacterium metabolism [J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(5): 364-375
- [11] 谭烁. 海洋溶藻细菌诱导球形棕囊藻程序性死亡研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016: 55-58
- Tan S. The study of *Phaeocystis globosa* cell programmed death induced by marine algicidal bacteria [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016: 55-58 (in Chinese)
- [12] Pokrzywinski K L, Tilney C L, Modla S, et al. Effects of the bacterial algicide IRI-160AA on cellular morphology of harmful dinoflagellates [J]. Harmful Algae, 2017, 62: 127-135
- [13] 傅丽君, 林天城, 余晓琪, 等. 抑藻细菌 HSY-03 的分离、鉴定及对赤潮异弯藻生长的影响[J]. 热带海洋学报, 2016, 35(3): 87-93
- Fu L J, Lin T C, Yu X Q, et al. Isolation and identification of algicidal bacteria HSY-03 and its impact on *Heterosigma akashiwo* [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2016, 35(3): 87-93 (in Chinese)
- [14] Guillard R R, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8: 229-239
- [15] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. Biochimie und Physiologie der Pflanzen, 1975, 167(2): 191-194
- [16] Strickland J D H, Parsons T R. A Practical Handbook of Seawater Analysis [M]. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1968: 1-293
- [17] Jakubowski W, Bartosz G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: What does it measure? [J]. Cell Biology International, 2000, 24(10): 757-760
- [18] Zhang H J, Lv J, Peng Y, et al. Cell death in a harmful algal bloom causing species *Alexandrium tamarense* upon an algicidal bacterium induction [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(18): 7949-7958
- [19] Carranco Jáuregui M E, Calvo Carrillo M C, Romo F P. Carotenoids and their antioxidant function: A review [J]. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 2011, 61 (3): 233-241
- [20] Saha S K, Moane S, Murray P. Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18 [J]. Bioresource Technology, 2013, 147: 23-28
- [21] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399
- [22] Maughan S C, Pasternak M, Cairns N, et al. Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(5): 2331-2336
- [23] Sohal R S, Orr W C. The redox stress hypothesis of aging [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2012, 52(3): 539-555
- [24] Hippeli S, Heiser I, Elstner E F. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1999, 37(3): 167-178
- [25] 张化俊, 彭云, 张凤, 等. 溶藻细菌 BS01 产二异丁氧基苯基对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. 微生物学报, 2015, 55(7): 834-842
- Zhang H J, Peng Y, Zhang S, et al. Algicidal effect of (2-isobutoxyphenyl) amine on *Alexandrium tamarense* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(7): 834-842 (in Chinese)
- [26] Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions [J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 391-396
- [27] Tan S, Hu X L, Yin P H, et al. Photosynthetic inhibition and oxidative stress to the toxic *Phaeocystis globosa* caused by a diketopiperazine isolated from products of algicidal bacterium metabolism [J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(5): 364-375
- [28] 吴培枫, 韩光耀, 谢丽玲, 等. 溶藻菌 *Halomona* sp. DH-e 无菌滤液对东海原甲藻抗氧化系统的影响及急性毒性检验[J]. 海洋环境科学, 2018, 37(2): 228-232
- Wu P F, Han G Y, Xie L L, et al. Effects of the *Halomona* sp. DH-e aseptic filtrate on the antioxidant enzyme system of *Prorocentrum donghaiense* and its acute toxicity [J]. Marine Environmental Science, 2018, 37(2): 228-232 (in Chinese)
- [29] 胡晓丽. 菌株 Y4 胞外活性物质对球形棕囊藻的氧化损伤和光合抑制[D]. 广州: 暨南大学, 2015: 29-34
- Hu X L. Photosynthetic inhibition and oxidative stress in the toxic *Phaeocystis globosa* induced by algicidal substance from *Bacillus* sp. strain Y4 [D]. Guangzhou: Jinan University, 2015: 29-34 (in Chinese) ◆