

广玉兰提取物对铜绿微囊藻抑制作用的机制研究*

靳翠丽^{1,2} 周晓见^{1,2} 李楠¹ 缪莉^{1,2} 董昆明^{1,2} 封克^{1,2#}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州大学海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225127)

摘要 采用前期研究发现的显著抑制铜绿微囊藻的广玉兰正己烷和正丁醇提取物, 对其抑藻机制进行初步研究。研究发现, 经广玉兰提取物处理后, 藻细胞的叶绿素 a 含量显著减少; 超氧化物歧化酶(SOD)活性先升后降; 细胞膜透性显著增强, 最高值达到对照组的 7~8 倍。同时, 藻细胞的超微结构也相应地发生改变, 具体表现为: 细胞变形, 质膜皱缩甚至断裂, 中央拟核区不明显直至消失, 这与叶绿素 a 含量减少的结果相呼应, 与 SOD 活性和细胞膜透性的变化相关联; 叶绿素类囊体片层呈细线状, 排列松散无序。2 种广玉兰提取物的抑藻作用有所不同, 主要是因为广玉兰提取物对铜绿微囊藻的抑制作用是多种物质协同作用的结果。利用铜绿微囊藻的生理指标和超微结构相结合的方法, 可以更好地解释和推导抑藻机制。

关键词 铜绿微囊藻 广玉兰 提取物 抑制作用 机制

The inhibitory mechanism of *Magnolia grandiflora* linn extracts on *Microcystis aeruginosa* JIN Cuili^{1,2}, ZHOU Xiaojian^{1,2}, LI Nan¹, MIAO Li^{1,2}, DONG Kunming^{1,2}, FENG Ke^{1,2}. (1. School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225127; 2. Institute of Marine Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225127)

Abstract: Two extracts of *Magnolia grandiflora* linn, hexane extract and butanol extract, were found having strong inhibitory effects on *Microcystis aeruginosa* by our previous studies. In order to probe the anti-algal mechanism of these two extracts, the content of chlorophyll-a, superoxide dismutase (SOD), membrane permeability and ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* that treated by this two extracts were investigated. The results showed that content of chlorophyll-a was declined rapidly, the SOD activity of algal cell was slightly increased first and then presented a urgent decline, the membrane permeability was increased significantly, with the highest permeability value was 7-8 time of that of control group. Accordingly, the ultrastructure of alga cell was also changed obviously, TEM photographs showed that the cell was destroyed severely with cell membrane wrinkled or even cracked, and pith nucleoid area was unobvious. The thylakoid lamella with linear structures was dispersed in cytoplasm messily. The function of these two extracts was different in alga inhibition, for inhibition process was the results of comprehensive actions. These results suggested that the method to give consideration to both growth indexes and ultrastructure makes it easier to understand antialgal mechanism.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*; *Magnolia grandiflora* linn; extract; inhibitory effect; mechanism

随着水体富营养化程度的加剧, 蓝藻水华爆发已经成为世界性的严峻问题^[1-3]。水华爆发造成水体缺氧, 导致鱼虾死亡。而且, 蓝藻死亡后还会产生腐臭难闻的气味。蓝藻水华的主要优势种之一是铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*), 它能向水中分泌毒素, 除了直接对鱼类、人畜产生毒害之外, 还是肝癌的诱发因素^[4,5]。近年来, 我国经济高速发展, 造成环境污染和水体富营养化状况不断恶化, 导致水华爆发的频率不断加快, 范围也不断扩大。“三湖”(太湖、巢湖和滇池)每年都会爆发蓝藻水华^[6,7]。因此, 世界各国都在积极寻找控制和治理水华的方

法和措施, 其中对铜绿微囊藻的治理成为解决蓝藻水华的关键所在。

众多研究者从植物的次生代谢物中寻找具有克藻活性的物质, 其来源主要集中在水生植物, 如凤眼莲、石菖蒲、金鱼藻、水毛茛、哥伦比亚萍、水花生、水浮莲、浮萍、紫萍、满江红等均有不同程度的克藻效应^[8,9]。也有一些克藻活性的物质来源于陆生植物, 如大麦、稻草秸秆等, 利用其控制水华, 抑制蓝藻生长等^{[10]47, [11,12]}。目前, 抑藻物质的研究主要集中在它对藻类的抑制作用以及分离纯化方面, 有关抑藻物质的抑藻机制则报道不多^{[13]51, [14], [15]672}。现有的

第一作者: 靳翠丽, 女, 1976 年生, 硕士, 讲师, 研究方向为水环境生物学。# 通讯作者。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 41076097, No. 30671240); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2010322); 江苏省环境材料与环境工程重点实验室开放研究项目(No. K090028, No. K090026); 辽宁省教育厅高校科研资助项目(No. 2009A093)。

抑藻机制研究,主要针对克藻活性物质作用下藻细胞的生化指标变化,包括光合色素、蛋白质、多糖以及酶活性等参数^{[13]51,[16,17]}。藻类细胞增殖和生长,更多地体现在细胞分裂和结构变化,而目前对有害藻类抑制作用的机制研究中,很少将生理指标与超微结构相结合^{[15]672}。

本课题组前期工作首次发现陆生植物广玉兰(*Magnolia grandiflora* linn)的纯水浸提液能有效抑制铜绿微囊藻的生长,当每升藻液的叶片质量为8 g时,抑制率高达97%^{[18]36}。利用乙醇浸提,正己烷、乙酸乙酯、正丁醇逐级分相萃取,从广玉兰中得到2个具有抑藻活性的组分,分别为正己烷和正丁醇提取物,其抑藻活性高达96%和98%^{[19]21}。为探明正己烷和正丁醇提取物抑藻的原因,笔者研究经这2种提取物处理后,铜绿微囊藻的叶绿素a含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和细胞膜透性的变化,并与超微结构的变化相结合,初步揭示广玉兰提取物对铜绿微囊藻抑制作用的机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用广玉兰为长绿乔木,属于木兰科木兰属。来自扬州市郊外。

试验所用铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)属蓝藻门,色球藻科,微囊藻属。购自中科院武汉水生生物研究所,编号FACHB-905。

1.2 铜绿微囊藻培养基组分

铜绿微囊藻的培养采用BG11培养基^{[10]48}。藻种活化后,培养在光照培养箱内进行,培养温度为25℃,培养时间为7 d,光暗比为12 h:12 h。

1.3 广玉兰提取物制备

称取350 g广玉兰叶片,置于广口瓶中加入无水乙醇500 mL,浸提48 h,重复3次。合并3次浸提液,30℃旋转蒸发仪浓缩至浸提液体积不再变化。加入300 mL水,置于1 000 mL分液漏斗,加入等体积正己烷后振荡分层,上层为正己烷相呈淡绿色,下层水相用乙酸乙酯继续萃取,液面分层,上层为乙酸乙酯相呈黄褐色,下层水相呈褐色。乙酸乙酯萃取3次后,下层水相用正丁醇继续萃取,振荡后分层,上层为正丁醇相呈橘黄色,下层水相呈黄色。正丁醇萃取3次,合并萃取液,分别得到正丁醇相和水相。将正己烷相和正丁醇相萃取液分别经30℃旋转蒸发仪蒸干,得到广玉兰正己烷和正丁醇提取物。将2种提取物分别溶解于二甲亚砜,配制成质量浓度

均为10.0 g/L的母液。取对数生长期的藻液,分别加入广玉兰正己烷和正丁醇提取物母液,摇匀,使提取物最终质量浓度均为0.1 g/L,对照组中不含提取物,平行样做3次。

1.4 铜绿微囊藻生理指标测定方法

铜绿微囊藻叶绿素a采用丙酮法^[20]测定;SOD活性采用文献[21]规定的方法测定;细胞膜透性(以渗出液在264 nm处测得的吸光度表征)采用文献[22]规定的方法测定。

1.5 铜绿微囊藻超微结构

分别收集对照组、处理组培养第5、7天的藻细胞,用4%(质量分数)戊二醛及1%(质量分数)锇酸固定,用50%(体积分数,下同)、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇进行系列脱水,Epon812浸透与包埋。采用EMUC6型超薄切片机进行切片,得到的切片经铀-铅染色后,于Tecnai 12型透射电镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 广玉兰提取物对铜绿微囊藻叶绿素a含量的影响

图1(a)显示了广玉兰正己烷(处理组1)和正丁醇提取物(处理组2)对铜绿微囊藻叶绿素a含量的变化趋势。由图1(a)可知,随着处理时间的延长,对照组中的叶绿素a含量增加趋势明显,由初始的250 mg/L增加到第7天时的502 mg/L;而2个处理组中的叶绿素a含量一直呈现减少趋势,第7天时分别降至38.52 mg/L,对照组和处理组呈现显著差异($P<0.05$),说明广玉兰提取物能使藻细胞的叶绿素a含量显著减少。有研究表明,克藻物质通过破坏藻类叶绿素,影响其光合作用,从而降低其生物量^{[13]54}。试验结果表明,广玉兰叶片分泌的提取物能够破坏铜绿微囊藻的叶绿素a,影响光合色素的合成和积累,使细胞吸收光能的能力下降,光合作用减弱,进而抑制其生长。

2.2 广玉兰提取物对铜绿微囊藻SOD活性的影响

SOD是细胞中重要的保护酶,能及时清除细胞在不良环境中产生的过量的超氧阴离子,抑制膜脂过氧化反应。由图1(b)可知,对照组与2个处理组的藻细胞SOD活性变化差别较大;对照组中SOD活性几乎没有大的波动,而2个处理组SOD活性均为先升后降,且2个处理组的SOD活性试验初期上升幅度虽不尽相同,但都从4 d后开始下降。试验结果表明,经广玉兰提取物处理过的铜绿微囊藻的

SOD活性在试验初期有所增强,经过4 d的处理,SOD活性开始降低。说明试验初期藻细胞对环境胁迫产生了应激反应,后期SOD活性下降则表明藻细胞发生了实质性伤害。

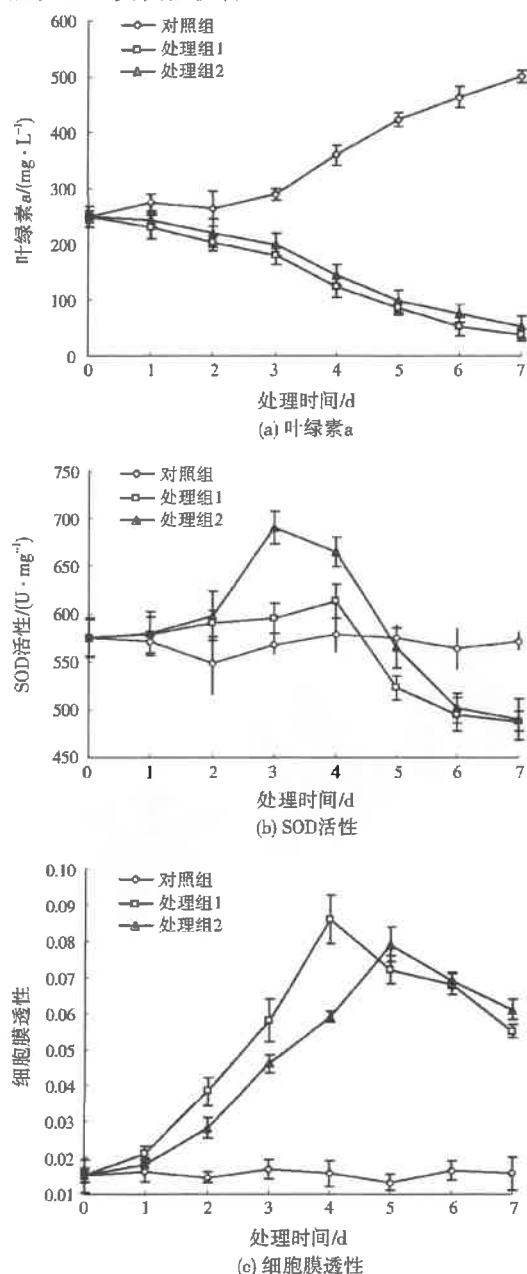


图1 广玉兰正己烷和正丁醇提取物对铜绿微囊藻各生理指标的影响

Fig. 1 Effects of extracts of *Magnolia grandiflora* linn on the chlorophyll-a, SOD activity and membrane permeability of *Microcystis aeruginosa*

2.3 广玉兰提取物对铜绿微囊藻细胞膜透性的影响

由图1(c)可知,在处理7 d内,2个处理组的铜绿微囊藻细胞膜透性出现了明显变化;处理组1在第4天时细胞膜透性出现最高值,是同期对照组的

8倍;处理组2在第5天时细胞膜透性出现最高值,是同期对照组的7倍。2个处理组都表现出试验初期细胞膜透性显著增强,后期又略有回落,说明初期藻细胞大量有机物质外渗,后期由于细胞内可渗透的物质减少而外渗率下降。而对照组细胞膜透性在7 d内无明显变化,说明广玉兰提取物能破坏细胞膜的完整性,使细胞内物质大量渗出,导致渗出液的电导率增加。

2.4 广玉兰提取物对铜绿微囊藻超微结构的影响

广玉兰提取物对铜绿微囊藻超微结构的影响见图2。由图2(a)、图2(b)可知,细胞呈圆形,细胞质膜(CM)贴壁无皱褶且完整连续,中央拟核区(PN)明显,叶绿素类囊体(Th)片层清晰,排列紧密且整齐有序。由图2(c)、图2(d)可知,经广玉兰正己烷提取物处理过的藻细胞,细胞形状不规则,CM在第5天开始皱缩变形,至第7天开始出现断裂;PN不明显直至消失;Th片层呈细线状,排列松散无序。由图2(e)、图2(f)可知,经广玉兰正丁醇提取物处理过的藻细胞,表现出和前种处理基本相同的趋势,

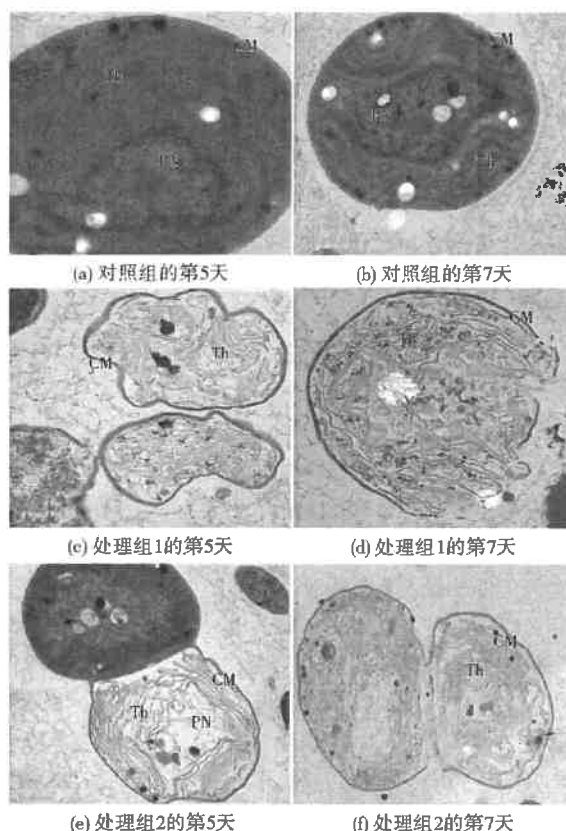


图2 广玉兰正己烷和正丁醇提取物对铜绿微囊藻超微结构的影响

Fig. 2 Effects of extracts of *Magnolia grandiflora* linn on the ultrastructure of *Microcystis aeruginosa* cells

PN 不明显, Th 片层也呈无序排列的细线状, 但 CM 的变形程度低于广玉兰正己烷提取物处理过的藻细胞。

3 讨论

本课题组首次报道了几种植物的提取物有优良的抑藻活性, 其中以广玉兰提取物的抑藻活性最高, 而广玉兰提取物的抑藻原理目前尚无文献报道^{[18]38, [19]20}。基于此, 笔者初步研究了广玉兰提取物对铜绿微囊藻的生理指标和超微结构的影响。结果表明, 广玉兰提取物不仅破坏铜绿微囊藻的细胞结构, 而且在生理生化方面影响藻细胞的一系列代谢活动。

细胞原生质膜的稳定性为物质运转、能量交换和信息传递等一系列功能的实现, 以及维持细胞内外离子的浓度差和物质的主动运输起着重要作用^[23]。广玉兰提取物首先攻击铜绿微囊藻细胞的膜系统, 造成 CM 渗透率迅速增加, 大量电解质外渗, 可溶性物质大量流失。电镜观察的结果也充分表明了细胞膜的损伤程度, 伴随着细胞膜透性的改变, 细胞扭曲变形, 甚至造成 CM 的断裂。这与王立新等^{[15]675}的研究结果一致。所以, 细胞膜损伤是广玉兰提取物对铜绿微囊藻抑制作用产生的重要原因之一。

在接触广玉兰提取物的试验初期, 铜绿微囊藻细胞发生应激反应, 细胞内 SOD 活性增强, 一段时间后, SOD 活性又迅速降低。这种 SOD 活性先升后降的现象, 唐学玺等^[24]有所解释, 在胁迫环境下, 细胞体内活性氧会逐渐增加, 积累的活性氧会使抗氧化体系酶活性升高, 生物体依靠 SOD 清除体内过高的活性氧, 来实现保护细胞的作用。但活性氧浓度超过一定范围时, 过量的活性氧又会破坏抗氧化体系酶的功能, 导致 SOD 活性降低, 引起活性氧累积。而大量的活性氧攻击细胞膜, 会引起膜脂过氧化反应, 从而造成细胞膜损伤^[25, 26]。

经广玉兰提取物处理后, 藻细胞光合色素含量降低, 这与以往报道的其他胁迫物质的作用一致^{[27]、[28]1192, [29]}。在胁迫环境下, 引发氧代谢失调、活性氧累积, 诱导发生膜脂过氧化反应, 从而直接造成叶绿素降解^{[28]1194}。叶绿素 a 减少, 使细胞捕获光能的能力下降, 光合作用的能力也随之降低。同时, 超微结构观察发现, 广玉兰提取物不仅直接破坏藻细胞光合色素, 还能破坏 Th 片层结构, 即细胞光合作用的场所也遭到破坏。最初 Th 片层结构紧密整

齐, 处理后 Th 片层结构松散, 排列无序。所以, Th 片层结构被破坏, 叶绿素 a 减少, 也可认为是细胞膜受到活性氧损伤的佐证和副反应。

综上所述, 广玉兰提取物导致铜绿微囊藻胞内活性氧累积, 膜脂过氧化加剧, 细胞膜透性增强, 叶绿素 a 降解, SOD 活性先升后降, 细胞膜损伤加剧。细胞膜损伤在超微结构上表现为, 细胞变形, CM 皱缩甚至断裂, Th 片层结构松散无序; 一系列结构损伤和代谢紊乱, 导致细胞 PN 不明显直至消失, 细胞裂解死亡。

同时还发现, 2 种提取物的抑藻作用也有所不同, 如 SOD 活性和细胞膜透性的变化幅度差别较大, 后者最高值出现的时间略有不同, CM 的受破坏程度也不尽相同。这可能是因为广玉兰提取物由多种不同物质组成, 对铜绿微囊藻的抑制作用是多种物质协同作用的结果。

4 结语

广玉兰提取物对铜绿微囊藻的抑制作用, 是通过多种途径进行的, 集中体现为细胞膜损伤, 具体的细胞膜损伤过程可能与膜脂过氧化反应有关。后期工作将对广玉兰正己烷和正丁醇提取物进一步研究, 对其有效成分进行分离提纯和化学鉴定, 争取得到安全高效的克藻物质。

参考文献:

- [1] KANN J. *Microcystis aeruginosa* occurrence in the Klamath River System of Southern Oregon and Northern California[J]. *Aquatic Ecosystem Sciences*, 2006(3): 1-26.
- [2] SÖMEK H, USTAÖĞLU M R, YAĞCI M. A case report: algal bloom of *Microcystis aeruginosa* in a drinking-water body, Eğirdir Lake, Turkey[J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2008(8): 177-179.
- [3] ANDRINOLO D, PEREIRA P, GIANNUZZI L, et al. Occurrence of *Microcystis aeruginosa* and microcystins in Rio de la Plata river (Argentina)[J]. *Acta Toxicol. Argent.*, 2007, 15(1): 8-14.
- [4] BLANCHETTE M L, HANEY J F. The effect of toxic *Microcystis aeruginosa* on four different populations of *Daphnia*[J]. *UNH Center for Freshwater Biology Research*, 2002, 4(1): 1-10.
- [5] GILROY D J, KAUFFMAN K W, HALL R A, et al. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108(5): 435-439.
- [6] 蒋丽娟, 史小丽, 杨柳燕, 等. 游离附生假单胞菌对铜绿微囊藻细菌中 32P 释放的影响[J]. *环境科学学报*, 2003, 23(4): 521-524.
- [7] 张巍, 王学军, 江耀慈, 等. 太湖水质指标相关性与富营养化特征分析[J]. *环境污染与防治*, 2002, 24(1): 50-53.

(下转第 58 页)