

海洋微藻对 UV-B 辐射的生理生化响应

田继远¹, 唐学玺¹, 于娟¹, 肖惠¹, 冯蕾^{1,2}

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 东营职业技术学院, 山东 东营 257091)

摘要:用生理生化的方法研究了 UV-B 辐射对海洋微藻——小新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*) 生理生化的影响。结果表明: (1) 随着 UV-B 暴露时间的延长, UV-B 辐射对藻的生长以及光合速率有抑制作用, 并且时间越长, 抑制作用越明显; (2) UV-B 辐射使小新月菱形藻可溶性糖含量降低, 而且在最初的 2d, UV-B 辐射使可溶性糖含量降低迅速, 第 4 天的可溶性糖含量稍有所升高但与第 2 天相比差异不显著, UV-B 辐射第 6 天, 可溶性糖含量又迅速降低; (3) UV-B 辐射的可溶性蛋白含量在第 2 天明显升高, 随后又快速下降; (4) 对照组的还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量的变化随时间延长而升高, UV-B 辐射第 2 天的 GSH 含量比初始状态 (0d) 的 GSH 含量稍有升高, 但变化不明显, 第 2 天之后, GSH 含量随时间延长而快速降低; (5) 对照组的过氧化物酶 (POD) 活性随时间延长而升高, UV-B 辐射第 2 天的 POD 活性比初始状态 (0d) 的 POD 活性显著升高, 第 2 天之后, POD 活性随时间延长而快速降低。

关键词: UV-B 辐射; 海洋微藻; 生理生化响应

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)04-0054-05

紫外线 (UV) 对海洋藻类的研究始于 20 世纪^[1], 因为臭氧层的降低, UV-B 增高的影响受到重视^[2]。近年来, 在中国青藏高原也观测到季节性的臭氧层衰减, 因此, 研究增强的紫外线-B (UV-B) 辐射所产生的生物学和生态学效应具有重要的理论和实践意义。紫外线辐射对海洋微藻的影响国内外已有不少工作^[3,4]。Lesser^[5]报道, 紫外线的辐射能够抑制藻细胞的生长, 引起叶绿素的降解和光合速率的下降, 并进一步证实这些伤害性症状的出现是由在紫外线的辐射下藻细胞内产生对本身有伤害作用的活性氧 (超氧阴离子自由基和过氧化氢) 所致。作者主要研究增强的 UV-B 辐射对小新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*) 的生长以及生理生化代谢, 并从活性氧的角度阐明 UV-B 辐射的作用机制。

1 材料与方法

1.1 藻种

选用小新月菱形藻 (由中国海洋大学微藻研究中心提供) 作为实验藻种, 在分类学上属于硅藻门 (Bacillariophyta), 羽纹纲 (Pennatae), 双菱形目 (Surirellales), 菱形藻科 (Nitzschiaceae), 菱形藻属 (*Nitzschia*)。

1.2 培养方法与条件

海水经孔径为 0.45 μ m 的滤膜抽滤, 煮沸消毒, 冷却后配制营养液, 培养液选用 f/2^[6] 营养盐配方。培养条件: 光照强度为 5 000 lx, 光暗比为 12:12, 温度为 20 \pm 1 $^{\circ}$ C, pH 为 8.0 \pm 0.1, 盐度为 30.01 \pm 1.0。

1.3 UV-B 辐射方法

2 根 8 W 的 UV-B (312 nm) 灯管 (北京师大光电仪器厂制造), UV-B 灯外用乙酸纤维素薄膜包被, 以除去小于 280 nm 的短波照射, 整个装置在实验前需连续照射 72 h, 以减少薄膜滤过作用的不稳定性。500 mL 的三角瓶中接种 200 mL 指数生长期的藻, 藻液的 690 nm 处的吸光度值为 0.20。由于 UV-B 穿透力很弱, 实验中, 量取 30 mL 藻液倒于直径为 15 cm 培养皿中, 置于距离 UV-B 灯 20 cm 的正下方处。UV-B 辐射强度为 1.2 μ W/cm², 每日辐射 3 min,

收稿日期: 2004-06-16; 修回日期: 2005-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270258); 山东省优秀中青年奖励基金资助项目 (03BS120)

作者简介: 田继远 (1975-), 男, 山东寿光人, 从事生态毒理学的研究, 电话: 0532-82031640; E-mail: tianjya@tsingtao.com.cn; 唐学玺, 通讯联系人, E-mail: tangxx@ouc.edu.cn

照射完后转移到 500 mL 三角瓶中,在光强为 5 000 lx,温度为 20 ± 1,光暗比为 12:12 的光照培养箱中培养,为了防止光修复,先黑暗 12 h,然后光照 12 h,紫外照射培养 6 d。每组实验设 3 个平行样,结果取平均值。

1.4 生理生化指标测定

每天取 1 mL 藻液测细胞密度,在第 0,2,4,6 天分别取 15 mL 藻液测定光合速率,在第 0,2,4,6 天分别取 10 mL 藻液测定可溶性蛋白、可溶性糖、还原型谷胱甘肽含量以及过氧化物酶活性。

1.4.1 细胞密度的测定

细胞密度的测定用 Lugol 碘液固定样品,血球计数板计数。

1.4.2 光合速率的测定

采用高尚德等^[7]的黑白瓶定氧法。所用的黑白瓶是 15 mL 的碘量瓶。黑白瓶中分别用虹吸方法装满经不同实验处理的藻液。藻液加入之前充分曝气,以使瓶中 CO₂和空气中 CO₂处于平衡状态,然后塞紧瓶塞,使之进行光合作用。使用光源系 40 W 白色日光灯,光强为 5 000 lx,温度为 20。每天 8:30 开始测定光合作用,反应时间为 0.5 h。反应终了后测氧,计算单位水体中氧的增加量,以此表示单位水体中藻的净光合速率。为了解 UV-B 对光合速率(所用光合速率均为相对净光合速率)和生长速率之间的关系,同时还分别测定每个瓶中藻细胞的密度,并以细胞数量增长表示生长速率。

1.4.3 可溶性蛋白含量的测定

提取液采用磷酸缓冲液(pH 7.0),冰浴中匀浆, TGL-16 台式高速离心机上 15 000 r/min 离心 15 min,上清液即为蛋白质提取液。然后,按照 Bradford^[8]的方法进行蛋白质含量的测定。以小牛血清白蛋白为标准曲线。

1.4.4 可溶性糖含量的测定

根据蒽酮比色法^[9]测定可溶性多糖含量。

1.4.5 还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定

按 Ellman 等^[10]和曾韶西等^[11]的方法进行测定,以 DTNB 显色,在 412 nm 波长下检测,用 GSH 作标准曲线。

1.4.6 过氧化物酶(POD)活性测定

按照 Kar 和 Choudhuri^[12]方法。反应液在 28 温育 5 min 后加 1 mL 5% H₂SO₄终止反应。离心后上清液在 470 nm 比色。

1.5 数据处理

实验数据采用数理统计法,将处理组与对照组差异进行显著性的 *t* 检验。

2 结果

2.1 UV-B 辐射对生长的影响

UV-B 辐射对小新月菱形藻的生长影响结果见图 1。可以看出,在第一天 UV-B 辐射,藻细胞密度比对照组的升高了 5%,但变化不显著($P > 0.05$),随着暴露时间的延长,UV-B 辐射抑制藻生长,细胞密度低于对照组,并且时间越长,抑制作用越明显,到第 6 天,细胞密度比对照组降低了 46.4%,变化极显著($P < 0.01$)。

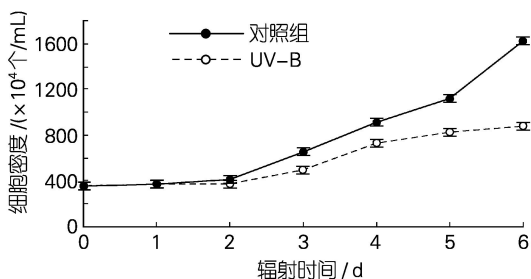


图 1 UV-B 辐射时间延长对小新月藻生长的影响

Fig. 1 Changes of growth of *Nitzschia closterium* with UV-B irradiation time

2.2 光合速率的变化

由图 2 可知,对照组的光合速率随着培养时间的延长而升高,说明藻的生长状态良好处于对数生长期。UV-B 辐射处理后,光合速率急剧下降,UV-B 辐射第 6 天,光合速率比对照组的降低了 40% ($P < 0.01$),所以,UV-B 辐射对光合作用有抑制作用。

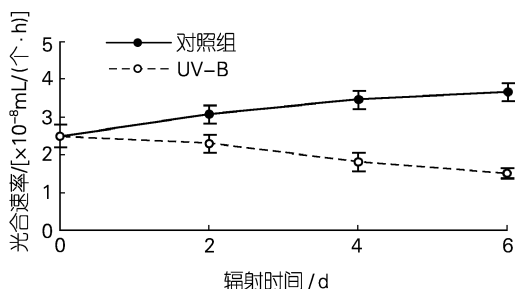


图 2 UV-B 辐射对小新月藻光合速率的影响

Fig. 2 Effects of UV-B radiation on photosynthetic rate of *Nitzschia closterium*

2.3 可溶性糖含量的变化

UV-B 辐射对小新月菱形藻可溶性糖含量的影响见图 3。可以看出,对照组的小新月菱形藻可溶性糖含量随着时间的延长而升高,UV-B 辐射使小新月菱形藻可溶性糖含量降低,而且在最初的 2 天,UV-B 辐射使可溶性糖含量迅速降低,第 4 天的可溶性糖含量稍有所升高但与第 2 天相比差异不显著 ($P > 0.05$),UV-B 辐射第 6 天,可溶性糖含量又迅速降低,比对照组降低了 42.6% ($P < 0.01$)。

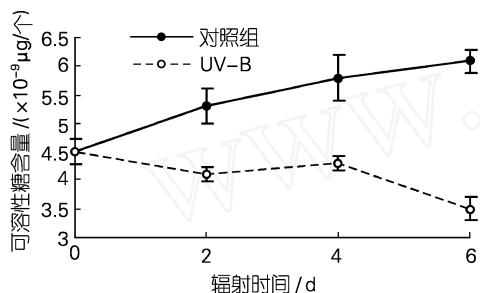


图 3 UV-B 辐射对小新月菱形藻可溶性糖的影响

Fig. 3 Effects of UV-B radiation on soluble sugar of *Nitzschia closterium*

2.4 可溶性蛋白含量的变化

UV-B 辐射对可溶性蛋白含量的变化见图 4。由图 4 可知,对照组的可溶性蛋白含量随时间延长而升高,受 UV-B 辐射的可溶性蛋白含量在第 2 天明显升高,第 4 天又快速下降,第 6 天与第 4 天比较变化不明显,但总的趋势是比对照降低。

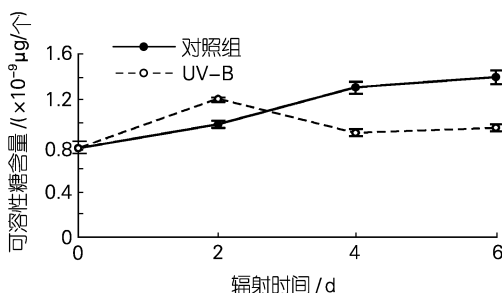


图 4 UV-B 辐射对小新月菱形藻可溶性蛋白的影响

Fig. 4 Effects of UV-B radiation on soluble protein of *Nitzschia closterium*

2.5 GSH 含量的变化

UV-B 辐射对 GSH 含量的变化见图 5。由图可知,对照组的 GSH 含量的变化随时间延长而升高,尽管第 6 天的 GSH 含量与第 4 天的 GSH 含量变化不大,但总的趋势是升高的,UV-B 辐射的 GSH 含量总的趋势是降低的。第 2 天的 GSH 含量比初始状态 (0 d) 的 GSH 含量稍有升高,但变化不明显,第 2 天之后,GSH 含量随时间延长而快速降低,到第 6 天,比对照降低了 15.0% ($P < 0.05$)。

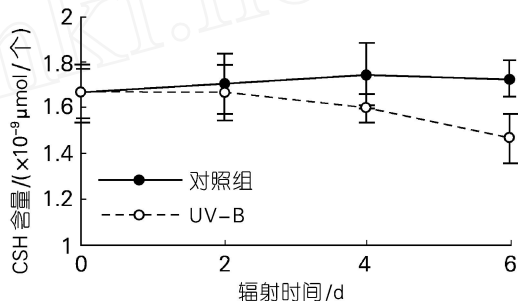


图 5 UV-B 辐射对小新月菱形藻 GSH 含量的影响

Fig. 5 Effects of UV-B radiation on GSH content of *Nitzschia closterium*

2.6 POD 活性的变化

UV-B 辐射对 POD 活性的影响见图 6。由图可知,对照组的 POD 活性随时间延长而升高。UV-B 辐射的 POD 活性总的趋势是降低的。第 2 天的 POD 活性比初始状态 (0d) 的 POD 活性显著升高 ($P < 0.05$),升高了 6.6%,第 2 天之后,POD 活性随时间延长而快速降低,第 6 天比对照降低了 29.7% ($P < 0.05$)。

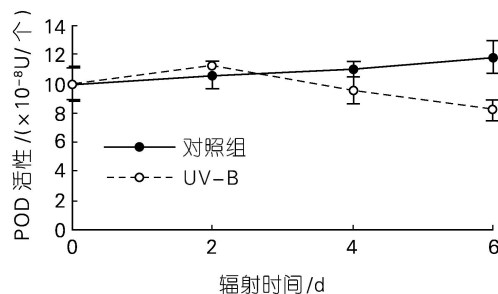


图 6 UV-B 辐射对小新月菱形藻 POD 活性的影响

Fig. 6 Effects of UV-B radiation on POD activity of *Nitzschia closterium*

3 讨论

3.1 UV-B 辐射对生长和光合速率的影响

UV-B 辐射第 2 天,藻细胞密度高于对照组(图 1),但变化不显著。有研究表明低剂量的 UV-B 辐射可以刺激微藻细胞的生长^[13]。本实验结果可能是因为短期 UV-B 辐射刺激使微藻细胞内的活性氧含量增加,而清除活性氧的抗氧化系统也被 UV-B 诱导增强,所以抗氧化能力增强,细胞生长加快。但随着暴露时间的延长,活性氧在细胞体内大量积累,抗氧化系统不足以清除过量的活性氧,所以抗氧化能力下降,而细胞受到氧化伤害,细胞分裂速度下降,UV-B 辐射抑制藻生长,并且时间越长,抑制作用越明显。

在生理活动方面,过量紫外线辐射抑制了微藻的净光合速率(图 2)。紫外辐射可以通过两种方式使光合作用速率降低,一种是 UV-B 辐射直接破坏光合系统酶活性,使光合色素分子分解。另一种方式为 UV 辐射通过间接途径来抑制光合速率。许多研究者发现,紫外线 B 辐射对植物光合作用的抑制具体表现为光系统反应中心的破坏^[14],电子传递链的抑制^[15],羧化酶数量的减少和活性的降低^[16]等。同时,紫外线 B 辐射下叶片光合色素的降解和希尔(Hill)反应活力的降低,也可能与紫外线 B 辐射对植物光合作用的抑制有关^[17]。蒋明义等^[18]发现叶绿素的漂白与 MDA 的产生是同时发生的。这表明光合色素的降解可能是膜脂过氧化作用引起的。并且,紫外线 B 辐射也抑制了 Hill 反应。这与 Vu 等^[19]用蚕豆得出的结论一致。Okada 等^[20]指出叶绿体的脂质过氧化与光系统失活有关。而 Hill 反应是光系统中重要的一环。这说明也许是膜脂的过氧化作用抑制了 Hill 反应的活力。

3.2 UV-B 辐射对蛋白代谢以及可溶性糖的含量的影响

碳水化合物和蛋白质作为生物体的重要组分,在植物的生理活动中起重要作用。许多研究表明,在干旱^[21]、低温^[22]等逆境胁迫下,碳水化合物和蛋白质的合成和代谢会发生变化,这些变化与植株的抗性及其胁迫类型等有关。

有研究表明,UV-B 辐射使藻细胞分泌大量多糖作为亲水性基质将紫外线吸收色素包埋在基质中,既帮助紫外线吸收色素固定在细胞壁外,又延长 UV-B 进入细胞的通道;更进一步发现,部分多糖直接和紫外线吸收色素连接而成为新型紫外线吸收活性物质^[23]。本实验中,UV-B 辐射使小新月菱形藻可溶性糖含量降低,这可能是 UV-B 损伤了微藻细

胞,使细胞中有机质含量减少,是 UV-B 对微藻细胞的能量传递系统的破坏影响到细胞内有机质的合成、累积及细胞的生长。本实验中长时间 UV-B 辐射使蛋白质减少(图 4)的可能原因,一方面是具有抗辐射活性的蛋白质、糖蛋白及氨基酸色素等物质,它们的大量合成和分泌到胞外水体中,以消除紫外线作用于水体产生的羟基自由基等对细胞的危害^[24],从而减少了胞内蛋白质的含量;另一方面,由于要用来合成抗 UV-B 的多糖、脂肪酸、色素类物质等,而影响了细胞内蛋白质的合成。

3.3 UV-B 辐射对海洋微藻的抗氧化系统的影响

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,一为酶促系统,包括超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)等,二为非酶促系统,包括还原型谷胱甘肽(GSH)、维生素 C、维生素 E、类胡萝卜素、茶多酚和甘露醇等。

清除活性氧的抗氧化剂 GSH 含量在海洋微藻的 UV-B 处理组与对照相比降低了(图 5),有报道指出,GSH 在植物体清除活性氧过程中有重要作用,因而与植物的抗逆性,如 GSH 与抗寒性、抗热性、抗旱性以及 SO₂ 和 O₃ 胁迫有密切联系^[11]。因此,UV-B 胁迫下海洋微藻 GSH 含量的降低也可能是植物 UV-B 伤害的一种机制。因而导致清除活性氧的能力降低,可能积累大量的活性氧,使微藻受到伤害。UV-B 辐射还降低了抗氧化系统的酶促系统的关键性酶——POD 的活性。POD 是清除 H₂O₂ 的最重要的酶,实验中,POD 活性在第 2 天明显升高,说明 UV-B 辐射诱导了活性氧的产生,所以微藻提高自身的抗氧化防御系统以适应逆境的胁迫,随着 UV-B 辐射时间的延长,POD 活性又迅速降低,说明当 UV-B 胁迫长时间作用于微藻,使其产生的活性氧超出了 POD 清除能力时就会产生氧化损伤。

紫外线具有比可见光更高的能量,在照射微藻细胞时可能会产生更多的活性氧,UV-B 的伤害可能也是通过活性氧的破坏作用而造成的。随着 UV-B 辐射剂量的加强,使海洋微藻的防御活性氧有关的酶促和非酶促保护系统能力降低,因而清除能力下降,提高了体内自由基浓度,使活性氧在体内生成与清除的动态平衡遭到破坏,导致体内活性氧水平的提高,过量的活性氧会攻击防御系统中的生物功能分子,从而使酶损伤。

4 小结

(1) 随着 UV-B 暴露时间的延长,UV-B 辐射对藻的生长以及光合速率有抑制作用,并且时间越长,抑制作用越明显。

(2) UV-B 辐射使小新月菱形藻可溶性糖含量降低;UV-B 辐射的可溶性蛋白含量在第 2 天明显升高,随后又快速下降。

(3) 随着 UV-B 辐射时间的延长,UV-B 辐射使小新月菱形藻的 GSH 含量降低,而 POD 活性是先上升后下降。说明 UV-B 辐射诱导了活性氧的产生,所以微藻提高自身的抗氧化防御系统以适应逆境的胁迫,随着 UV-B 辐射时间的延长,抗氧化防御系统被破坏,活性氧的产生与清除之间的平衡被破坏,所以对微藻造成损伤。

参考文献:

- [1] Halldal P. Ultraviolet action spectra in algology [J]. *Photochem Photobiol*, 1967, 6: 445-460.
- [2] Blumthaler M, Ambach W. Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions[J]. *Science*, 1990, 248: 206-208.
- [3] Hader D P, Worrest R C, Kumar H D, *et al.* Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems[J]. *Ambio*, 1995, 24: 174-180.
- [4] Keller A A, Hargraver P, Jeon H, *et al.* Effects of ultraviolet-B enhancement on marine trophic levels in a stratified coastal system [J]. *Marine Biology*, 1997, 130 (2): 277-287.
- [5] Lesser M P. Elevated temperature and Ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates[J]. *Limnology and Oceanography*, 1996, 41(2): 271-283.
- [6] Guillard R R, Rhyter H. Studier on marine phytoplankton diatoms: I, *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) [J]. *Gran Can J Microbiol*, 1962, 8: 229-239.
- [7] 高尚德, 吴以平, 赵心玉. 有机锡对海洋微藻的生理效应. 三苯基锡和三丁基锡对扁藻和金藻光合作用的影响[J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25 (4): 362-367.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [9] 华东师范大学生物系植物生理教研组. 植物生理学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1980. 145-147.
- [10] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82: 70-77.
- [11] 曾韶西,王以柔. 低温胁迫对黄瓜子叶抗坏血酸过氧化物酶活性和谷胱甘肽含量的影响[J]. *植物生理学报*, 1990, 16(1): 37-42.
- [12] Kar R K, Choudhuri M A. Possible mechanisms of light-induced chlorophyll degradation in senescing leaves of *Hydrilla verticillata* [J]. *Physiol Plant*, 1987, 70: 729.
- [13] 刘泳,王悠,唐学玺,等. UV-B 辐射对两种海洋微藻生长的影响[J]. *海洋水产研究*, 2000, 21(2): 22-26.
- [14] Smith R C, Prezelin B B, Baker K S, *et al.* Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic Waters [J]. *Science*, 1992, 255: 952-959.
- [15] Brandle J R, Campbell W F, Sisson W B, *et al.* Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation[J]. *Plant Physiol*, 1977, 60: 165-169.
- [16] Jordan B R, He J, Chow W H. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carbonylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation [J]. *Plant Cell Environ*, 1992, 15: 91-98.
- [17] 杨志敏,颜景义,郑有飞,等. 紫外光辐射对不同条件下小麦叶片叶绿素降解作用的研究[J]. *西北植物学报*, 1995, 15(4): 288-293.
- [18] 蒋明义,杨文英,徐江,等. 渗透胁迫下水稻幼苗中叶绿素降解的活性氧损伤作用[J]. *植物学报*, 1994, 36(4): 289-295.
- [19] Vu C V, Allen L H J, Garrand L A. Effects of supplementary UV-B radiation on growth and leaf photosynthetic reactions soybean (*Glycinemax*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 1981, 52: 353-362.
- [20] Okada M, Kitajima M, Butler W L. Inhibition of photosystem 1 and photosystem 2 in chloroplasts by UV radiation[J]. *Plant Cell Physiol*, 1976, 17: 35-41.
- [21] 周琳,杨光宇. 灌浆期冬小麦对干旱胁迫的某些生理生化响应[J]. *小麦研究*, 2000, 21(3): 17-19.
- [22] 王红星,杨光宇. 寒胁迫对小麦幼苗生理生化特性的影响[J]. *周口师范高等专科学校学报*, 2000, 17(2): 4-5.
- [23] Enlings M. UV-B induced synthesis of photo-protective pigments and extracellular polysaccharides in terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* [J]. *Bacteriol*, 1997, 179(6): 1940-1948.
- [24] Zlotnid I, Dubinsky Z. The effect of light and temperature on DOC excretion by phytoplankton [J]. *Limnol Oceanogr*, 1989, 34: 831-839.

(下转第 63 页)

The physiological and biochemical responses of marine microalgae to UV-B radiation

TIAN Ji-yuan¹, TANG Xue-xi¹, YU Juan¹, XIAO Hui¹, FENG Lei^{1,2}

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Dongying Vocation College, Dongying 257091, China)

Received Jun. , 16, 2004

Key words: UV-B radiation; marine microalgae; physiological and biochemical responses

Abstract: The physiological and biochemical responses of marine microalgae to UV-B irradiation were examined by using the physiological and biochemical methods in this article. The results showed that (1) UV-B irradiation can inhibit the growth and photosynthetic rate of *Nitzschia closterium*, and the inhibiting effects were more significant when the time was prolonged; (2) UV-B irradiation decreased soluble sugar. In the initial 2 days, soluble sugar of *N. closterium* decreased rapidly, the soluble sugar on the 4th day has no major change compared with the soluble sugar on the 2nd day, on the 6th day, the soluble sugar decreased again; (3) The protein content of UV-B treated group significantly increased on the 2nd day, rapidly decreased subsequently; (4) GSH content of control group increased as time prolonged, the GSH content on the 2nd day has no major change with initial time (0 d), after the 2nd day, the GSH content decreased rapidly; (5) POD activity of control group increased as time prolonged, the POD activity on the 2nd day increased significantly compared with POD activity on the initial time (0 d), after the 2nd day, POD activity rapidly decreased as time prolonged.

(本文编辑:张培新)