

无机砷 As(V)对牟氏角毛藻(*Chaetoceros mulleri*) 生长、叶绿素 *a* 含量及抗氧化活力的影响*

李 斌¹ 陈亚男^{1,2} 齐占会³ 白艳艳¹ 徐 东⁴ 马元庆¹ 张 娟¹
李焕军¹ 孙 珊¹ 何 鑫¹ 张昀昌¹

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所渔业生态环境重点实验室 广州 510300; 4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 研究了无机砷 As(V)胁迫对牟氏角毛藻(*Chaetoceros mulleri*)培育水体中磷酸盐含量、藻细胞密度、叶绿素 *a* 含量及其抗氧化活性的影响, As(V)浓度梯度为 0、7.3、10.2、23.9、45.2 和 114.0 μg/L(分别记为 Ctr 和 V1—V5), 取样时间为 2、3、5、7、14 和 21 d。结果表明, 试验条件下适当浓度 As(V)暴露会促进牟氏角毛藻对磷酸盐的吸收速度, 而较低浓度暴露时则反之。所有处理组中仅 V2 组在 14d 时藻细胞密度增至最大值 71×10^4 ind./mL, 其它处理组在整个试验期间藻细胞密度变化均不显著($P > 0.01$)。2 d 时各组藻细胞叶绿素 *a* 含量均显著降低, 且均显著低于对照; 5 d 时 V5 组显著升高(达 $102.16 \mu\text{g}/10^8 \text{cell}$), 而其它处理组却仍明显低于其初始值; 21 d 时, 除 V1 组外各处理组均明显高于对照($50.63 \mu\text{g}/10^8 \text{cell}$)。在 As(V)暴露 2 d 时, 处理组 GSH 含量均明显低于对照($3.23 \mu\text{g}/10^8 \text{cell}$) ($P < 0.01$), 且随着 As(V)暴露浓度的升高呈先升高后逐渐降低的趋势。As(V)暴露对牟氏角毛藻 GSH 含量具有显著的抑制作用。谷胱甘肽还原酶活性随着 As(V)浓度升高基本呈降低趋势。As(V)胁迫可能会抑制牟氏角毛藻的光合作用和抗氧化活性, 长期暴露还会对其生长繁殖造成影响。

关键词 As(V); 牟氏角毛藻; 生长; 叶绿素含量; 抗氧化活力

中图分类号 X55 doi: 10.11693/hyhz20151000261

随着工农业的快速发展, 砷及其化合物的广泛应用导致微量砷在水体、空气及土壤中均有发现; 因其较高毒性而被美国环保局(USEPA)列为水源地优先控制污染物(Rahman *et al.*, 2012)。砷是一种较常见且持久性的污染物, 在水体中的停留时间可达 50 年(Klein, 1975), 在海洋环境中的复杂生物地球化学过程决定了其理化形态、生物利用度和毒性效应等(Smedley *et al.*, 2002; Karadjova *et al.*, 2008)。人类活动所产生的砷随河流或降水入海, 海水中无机砷主要以五价砷酸盐 As(V)形式存在(赵艳芳等, 2009), 因此,

As(V)在生态系统中的生物富集、转化及其毒理效应成为研究热点。

海洋微藻作为海洋生态系统的初级生产者, 对于许多毒物比鱼类、甲壳类更为敏感, 在水污染生物监测中具有十分重要的作用(Ma *et al.*, 2002; 梁英等, 2009)。砷对藻类的毒性作用也开展了相关研究, 已开展的研究主要集中在绿藻、蓝藻等对砷的生物富集和转化、生长抑制和代谢机理等(洪华生等, 1991; Karadjova *et al.*, 2008; 龚艳等, 2011; 樊香绒等, 2013), 而对硅藻的相关研究则极少。牟氏角毛藻

* 国家自然科学基金项目, 41206094 号; 广东省渔业生态环境重点实验室开放基金资助, LFE-2014-4 号; 山东省海洋生态修复重点实验室开放基金资助, 201213 号。李斌, E-mail: albert0722@163.com

通讯作者: 李焕军, 副研究员, E-mail: lihuanjun@126.com

收稿日期: 2015-10-12, 收修改稿日期: 2016-01-24

(*Chaetoceros mulleri*)属小型海洋浮游硅藻,是我国沿海许多港湾的优势硅藻种群,也是对虾和贝类等经济动物天然的优质饵料;其对环境变化的快速响应能力,是研究海洋环境变化的重要生物指标(王艳等, 2010)。本文以牟氏角毛藻为试验材料,研究了无机砷 As(V)对其磷酸盐吸收、叶绿素 *a* 含量、生长速率及其抗氧化活性等的影响,初步探讨了 As(V)对海洋浮游硅藻营养盐吸收、生长生理及毒性作用,以期阐明 As(V)对水产养殖安全的影响及其海洋硅藻的生物生态效应提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

牟氏角毛藻(*Chaetoceros mulleri*)藻种由山东省海洋资源与环境研究院藻类种质库提供。在实验室用 *f*/2 培养基进行扩大培养,取对数生长期藻细胞进行暴露试验。海水取自烟台开发区自然海井水,经沉淀、0.45 μ m 滤膜过滤和煮沸消毒,冷却后备用。*f*/2 培养液按照文献方法(陈明耀, 1995)配制。As(V)贮存液为砷酸根溶液标准物质(GBW08667) [(0.233 \pm 0.005) μ mol/g Na₃AsO₄],购自中国计量科学研究院。

1.2 方法与步骤

1.2.1 培养方法和试验设计 培养液采用 *f*/2 营养盐配方,在指数生长期接种。暴露试验中,As(V)添加浓度梯度按等比间隔设为 0、6.0、12.0、24.0、48.0 和 120.0 μ g/L(分别记为 Ctr 和 V1—V5,其实测浓度分别为 0、7.3、10.2、23.9、45.2 和 114.0 μ g/L)。培养温度(19.7 \pm 0.8) $^{\circ}$ C,光照强度 3000 lx,光暗周期 12:12。每组实验同时设 3 个平行样。用于微藻培养的 5 L 三角瓶先用 1 mol/L 的盐酸浸泡 24h,消毒海水冲洗干净后待用。

分别在 0、2、3、5、7、14 和 21d 取样,测定水中磷酸盐含量、藻细胞密度和叶绿素 *a* 含量,并在 2d 时取藻细胞测定其 GSH 含量与谷胱甘肽还原酶活性,用于分析 As(V)暴露对牟氏角毛藻营养盐吸收能力、生长速度、光合作用及其抗氧化活性的影响。

1.2.2 测定方法 用 Lugol 碘液固定微藻样品,血球计数板计数;磷酸盐(PO₄-P)、叶绿素 *a* (chl-*a*)含量测定均参照《海洋监测规范》(GB17378-2007)方法进行;还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定按张宗申等(2001)的方法进行测定,以 DTNB 显色,在 412nm 波长下检测;谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定参照 Foyer 和 Halliwell 的方法(Foyer *et al.*, 1976)。利用日立

U-2900 型紫外可见分光光度计测定吸光值。

1.2.3 数据处理 所有数据均为 3 次重复的平均值,采用 SPSS17.0 统计分析软件对数据进行方差分析、回归分析和差异显著性分析(One-way ANOVA, Tukey)。

2 结果与分析

2.1 对牟氏角毛藻培养水体中磷酸盐含量的影响

由表 1 可知,第 3 天时对照组水体中磷酸盐含量比 2d 时显著降低($P<0.01$),之后 1 周内变化不明显($P>0.01$);第 14 天时,比 7d 时明显减小($P<0.01$),但至试验结束时降低不显著($P>0.01$)。而 V2 和 V5 组磷酸盐含量变化与对照相似,且随时间降低的趋势更明显,在 2d 时均显著低于其初始值。表明,在与适当浓度 As(V)共存条件下,会促进牟氏角毛藻对磷酸盐的吸收速度。而 V1、V3 和 V4 三组均在实验过程中出现磷酸盐含量升高的现象,且随着 As(V)暴露浓度的升高出现的时间越晚,三组分别在 2、14 和 21d 时显著升高。各组水体中磷酸盐含量与时间均呈显著负相关关系,V5 组相关系数和回归方程的斜率最高,而 V3 组均最低。表明,试验条件下适当浓度 As(V)暴露会促进牟氏角毛藻对磷酸盐的吸收速度,而较低暴露浓度时则反之。

2.2 对牟氏角毛藻细胞密度的影响

由图 1 可知,未进行 As(V)暴露处理时,第 1 周牟氏角毛藻密度增加缓慢,之后的两周则增长较快,21d 时达到最高值 63×10^4 ind./mL,明显高于试验初始值($P<0.01$)。而所有暴露处理组在 2d 或 3d 时即显著高于各初始值($P<0.05$),藻细胞密度在 3—5d 时均有所降低,且降低的程度具有随着 As(V)暴露浓度升高而增加的趋势。整个试验期间,V2 组藻细胞密度均高于其它组,且 14d 时为最大值 71×10^4 ind./mL,明显高于其它组($P<0.05$)。表明,As(V)暴露初期牟氏角毛藻细胞分裂加快,但随之出现较大波动,长期高浓度暴露对藻细胞繁殖具有一定的抑制作用。

2.3 对牟氏角毛藻细胞中叶绿素 *a* 含量的影响

As(V)暴露条件下牟氏角毛藻细胞叶绿素 *a* 含量随时间的变化分析表明,2d 时各组均显著降低,且均显著低于对照(图 2),其中 V4 组降低最明显,由 114.13μ g/ 10^8 cell 降至 23.64μ g/ 10^8 cell;3 d 时仅 V2、V4 组较之前明显升高($P<0.01$),其它组变化均不大($P>0.01$);与初始值相比,5d 时除对照变化不明显外,V5 组显著升高(达 102.16μ g/ 10^8 cell),而其它处理组

表 1 As(V)处理牟氏角毛藻培养水体中磷酸盐含量($\mu\text{g/L}$)变化及回归分析
Tab.1 Variation in $\text{PO}_4\text{-P}$ content ($\mu\text{g/L}$) in *C. mulleri* culture water after As(V) exposure and regression analysis

实验组	暴露时间(d)							回归方程(y : 磷酸盐含量; x : 时间。 $n=21$)
	0	2	3	5	7	14	21	
Ctrl	176.03	169.11	153.89	142.82	145.59	67.93	57.13	$y=-6.20x+176.4$ ($R^2=0.93$, $P=-0.97$)
V1	203.71	232.77	223.08	225.85	216.16	154.05	119.52	$y=-5.24x+235.4$ ($R^2=0.83$, $P=-0.91$)
V2	138.67	93.00	80.54	69.47	63.94	17.92	15.53	$y=-5.21x+107.1$ ($R^2=0.82$, $P=-0.91$)
V3	162.19	135.90	124.83	115.14	109.60	124.88	36.33	$y=-4.47x+148.7$ ($R^2=0.73$, $P=-0.86$)
V4	192.64	189.87	181.57	176.03	180.18	51.26	108.43	$y=-5.81x+197.4$ ($R^2=0.65$, $P=-0.81$)
V5	178.80	159.42	148.35	137.28	137.28	56.81	30.78	$y=-7.26x+175.1$ ($R^2=0.83$, $P=-0.98$)

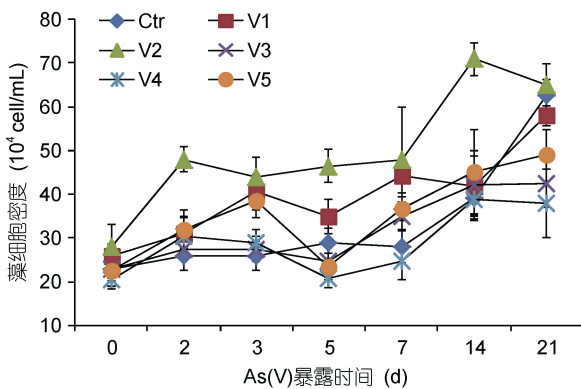


图 1 As(V)暴露条件下藻细胞密度的变化

Fig.1 Effect of As(V) exposure on *C. mulleri* cell density

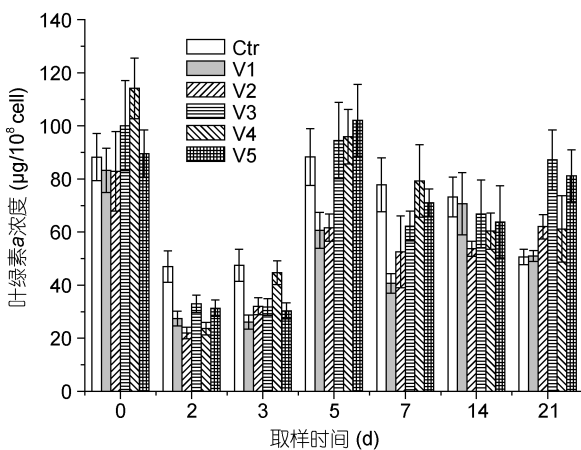


图 2 As(V)暴露条件下藻细胞叶绿素 *a* 含量的变化

Fig.2 Effect of As(V) exposure on Chl-*a* content in *C. mulleri*

却仍明显低于其初始值。之后, 对照呈逐渐降低趋势, 而处理组中除 V1 呈波动性变化外, 其它各组均呈先降低后升高的趋势; 三个低浓度组在 7 d 时出现低值, 而两个高浓度组均在 14 d 时出现低值。21 d 时, 除 V1 组外各处理组均明显高于对照($50.63\mu\text{g}/10^8\text{cell}$), 其中 V3 组($87.22\mu\text{g}/10^8\text{cell}$)最高, V5 组次之($P<0.01$)。结果表明, 在 As(V)暴露初期藻细胞叶绿素 *a* 合成明

显受到抑制, 而长期暴露时藻细胞会产生适应性, 且适当浓度的 As(V)会促进藻细胞叶绿素 *a* 合成。

2.4 对牟氏角毛藻细胞 GSH 含量及谷胱甘肽还原酶活性的影响

图 3 显示, 在 As(V)暴露 48 h 时, 牟氏角毛藻细胞 GSH 含量分析结果发现, 处理组 GSH 含量均明显低于对照($3.23\mu\text{g}/10^8\text{cell}$)($P<0.01$), 且随着 As(V)暴露浓度的升高呈先升高后逐渐降低的趋势; 其中, V2 组($1.91\mu\text{g}/10^8\text{cell}$)为各处理组中的最高值($P<0.01$), V5 组最低, 但与 V4 组差异不明显。结果表明, As(V)暴露对藻细胞 GSH 含量具有显著的抑制作用; 但在低浓度范围的 As(V)暴露对 GSH 含量的抑制作用随着 As(V)浓度的升高而减弱, 而暴露浓度超过一定限值时则反之。

As(V)暴露条件下, 藻细胞谷胱甘肽还原酶活性基本呈随着 As(V)浓度升高而降低的趋势。其中, V1 组谷胱甘肽还原酶活性($3.80\text{U}/10^6\text{cell}$)最高, 明显高于对照($2.47\text{U}/10^6\text{cell}$), 但与 V3 差异不显著; V5 明显低于对照, 仅为 $2.01\text{U}/10^6\text{cell}$, 其它两个处理组与对照差异不明显。较低浓度的 As(V)暴露会诱导谷胱甘肽还原酶活性升高, 而 As(V)暴露浓度过高时则抑制了谷胱甘肽还原酶活性。

3 讨论

3.1 As(V)胁迫对牟氏角毛藻培养水体中磷酸盐含量的影响

砷与磷同处元素周期表的第 V 主族, 因此砷酸盐与磷酸盐具有许多相似的化学性质。As(V)与磷酸盐在生物吸收过程中存在明显竞争, 少磷条件下淡水浮游植物细胞合成更多的磷/ $i\text{As}^v$ 转运体而增加对 $i\text{As}^v$ 的吸收(Zhao *et al.*, 2009); As(V)与细胞的结合常数也远远低于无磷条件(龚艳等, 2009)。本研究表明, 在长期共存条件下, 适当浓度 As(V)会促进牟氏角毛

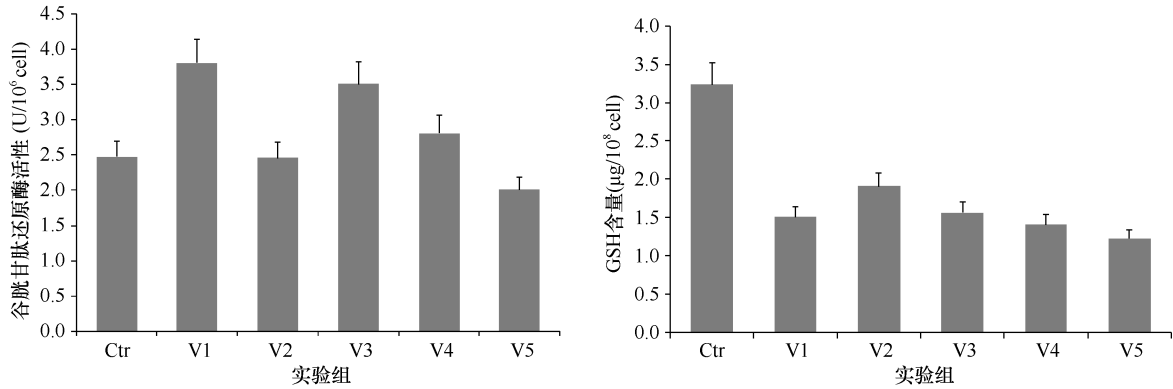


图3 As(V)暴露条件下藻细胞 GSH 含量与谷胱甘肽还原酶活性的变化

Fig.3 Effects of As(V) exposure on GSH content and glutathione reductase activity in *C. mulleri*

藻对磷酸盐的吸收速度,而较低暴露浓度时则反之(表1)。适当浓度 As(V)可能促进了磷/ $i>As^v$ 转运体合成而又尚未对磷酸盐吸收形成明显抑制,从而增加表现为磷酸盐的吸收速度升高。As(V)暴露条件下,不同供磷、氮及有机质水平时牟氏角毛藻等海洋硅藻的营养盐吸收及砷富集动力学有待进一步研究,海洋微藻细胞对的砷的转运、转化的生化、分子机理研究也有待加强。

3.2 As(V)胁迫对牟氏角毛藻生长、色素合成的影响及其机理研究

砷对微藻生长率的影响因藻种不同而有差异,As(V)对三角褐指藻的毒性作用随磷酸盐浓度降低受到抑制,而对叉边金藻的毒性作用不受磷酸盐浓度影响。本结果发现,所有处理组藻细胞密度在整个试验期间均呈波动性增长趋势,第3—5天时均有所降低,之后又出现恢复生长的现象(图1)。这表明,适当浓度 As(V)会促进牟氏角毛藻生长,但高浓度、长期暴露对藻细胞繁殖具有一定的抑制作用,这与肖虹滨等(1995)和龚艳等(2009)的结果一致。而 As(V)对不同微藻的毒性作用会因藻种、磷酸盐含量不同而有所差异,其机理仍需进一步证实。本研究发现,在 As(V)暴露初期牟氏角毛藻细胞叶绿素 *a* 含量显著低于对照,而长期暴露时一定浓度的 As(V)会促进藻细胞叶绿素 *a* 合成(图2),这与龚艳等(2011)的结果一致。无机砷对微囊藻叶绿素 *a* 含量的影响与砷形态有关,As()长期暴露对微囊藻的光合作用有抑制效应(龚艳等,2011);暴露于 As() 48h 时,铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)细胞中叶绿素 *a* 合成明显受到抑制,且受抑制程度比类胡萝卜素更显著(Wang *et al.*, 2012)。因此,As()暴露对牟氏角毛藻细胞色素合成及光合作用的影响及其机理研究有待开展。

3.3 As(V)胁迫对牟氏角毛藻细胞抗氧化活性的影响及其解毒机制

GSH 及植物螯合肽(PCs)类物质在植物的解毒过程中具有重要作用(Esterbauer *et al.*, 1978),但其解毒效果随着毒性物质种类、暴露浓度、暴露时间等不同而发生变化(田丹等,2010)。砷可以刺激大叶井口边草中 GSH 的产生,并通过络合作用与砷形成 As-GSH;植物体内 As(V)向 As()的转化也可能与 GSH 类物质有关(黄泽春等,2003)。本研究发现,As(V)暴露对牟氏角毛藻 GSH 含量具有显著的抑制作用;但在低浓度范围的 As(V)暴露对 GSH 含量的抑制作用随着 As(V)浓度的升高而减弱(图3右),而高浓度的 As(V)暴露可能会对牟氏角毛藻细胞造成氧化损伤,但损伤程度随暴露时间的变化则有待进一步证实。较低浓度的 As(V)暴露会诱导谷胱甘肽还原酶活性升高(图3左),但 As(V)暴露浓度过高时导致牟氏角毛藻细胞损伤,而抑制了谷胱甘肽还原酶基因的表达或其酶分子活性,其具体机理有待进一步探究。综上所述,有关海洋浮游植物、大型藻类等的砷富集、转化和解毒机制研究亟待加强,这对近海砷污染的生物生态效应及其生物修复具有重要意义。

参 考 文 献

- 王 艳, 聂 瑞, 李 扬等, 2010. 广东沿海角毛藻(*Chaetoceros*)的种类多样性及其地理分布. 海洋科学进展, 28(3): 342—352
- 田 丹, 赵 文, 王 媛等, 2010. 镉胁迫对两种海洋微藻生长和抗氧化系统的影响. 大连海洋大学学报, 25(5): 417—421
- 张宗申, 利容干, 王建波, 2001. 草酸处理对热胁迫下辣椒叶片膜透性和钙分布的影响. 植物生理学报, 27(2): 109—113
- 陈明耀, 1995. 生物饵料培养. 北京: 中国农业出版社, 65—71
- 赵艳芳, 尚德荣, 宁劲松等, 2009. 水产品中不同形态砷化合

- 物的毒性研究进展. 海洋科学, 33(9): 92—96
- 洪华生, 潘用树, 商少凌, 1991. 聚生角毛藻、小球藻对砷和磷的分辨. 海洋与湖沼, 22(5): 427—433
- 黄泽春, 陈同斌, 雷 梅等, 2003. 砷超富集植物中砷化学形态及其转化的 EXAFS 研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 33(6): 488—494
- 龚 艳, 吴幸强, 肖邦定等, 2009. 铜绿微囊藻在不同供磷水平下对砷胁迫的响应. 水生生物学报, 33(5): 890—895
- 龚 艳, 敖鸿毅, 刘碧波等, 2011. 无机砷对滇池微囊藻生长及产毒的影响. 科学通报, 56(21): 1720—1725
- 梁 英, 王 帅, 2009. 重金属对微藻胁迫的研究现状及前景. 海洋湖沼通报, (4): 72—82
- 樊香绒, 尹黎燕, 李 伟等, 2013. 不同价态砷对斜生栅藻生长及叶绿素荧光的影响. 水生态学杂志, 34(5): 60—64
- Esterbauer H, Grill D, 1978. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. Plant Physiol, 61(1): 119—121
- Foyer C H, Halliwell B, 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta, 133(1): 21—25
- Karadjova I B, Slaveykova V I, Tsalev D L, 2008. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater. Aquat Toxicol, 87(4): 264—271
- Klein D H, 1975. Fluxes, residence times, and sources of some elements to Lake Michigan. Water, Air Soil Poll, 4(1): 3—8
- Ma J Y, Zheng Y Q, Xu L G *et al*, 2002. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. Ecotoxicol Environ Saf, 52(1): 57—61
- Rahman M A, Hasegawa H, Lim R P, 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. Environ Res, 116: 118—135
- Smedley P L, Kinniburgh D G, 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Appl Geochem, 17(5): 517—568
- Wang S Z, Zhang D Y, Pan X L, 2012. Effects of arsenic on growth and photosystem II (PSII) activity of *Microcystis aeruginosa*. Ecotoxicol Environ Saf, 84: 104—111
- Zhao F J, Ma J F, Meharg A A *et al*, 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. New Phytol, 181(4): 777—794

EFFECTS OF AS(V) EXPOSURE ON GROWTH, CHLOROPHYLL-A CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *CHAETOCEROS MULLERI*

LI Bin¹, CHEN Ya-Nan^{1,2}, QI Zhan-Hui³, BAI Yan-Yan¹, XU Dong⁴, MA Yuan-Qing¹, ZHANG Juan¹, LI Huan-Jun¹, SUN Shan¹, HE Xin¹, ZHANG Yun-Chang¹

(1. Shandong Key Laboratory of Marine Ecology Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, South China Sea Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 4. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract We studied the effects of As(V) exposure on growth, chlorophyll-*a* content, and antioxidant activity of *Chaetoceros mulleri*. The alga was exposed to inorganic arsenic As(V) for 21 days at 6 levels (0, 7.3, 10.2, 23.9, 45.2, and 114.0 μg/L, labeled as Ctr and V1—V5, respectively), during which phosphate concentration, the alga growth, chlorophyll-*a* content, and antioxidant parameters of *C. mulleri* cells were recorded and analyzed on Days 2, 3, 5, 7, 14, and 21. The results show that phosphate assimilation by microalgae cells was promoted in appropriate As(V) exposure dosages but was inhibited in lower dosages. The growth curve shows that only the cell density of group V2 increased to maximum (71×10^4 cells/mL) on Day 14, while that of all other groups rose insignificantly ($P > 0.01$). On Day 2, chlorophyll-*a* content in all groups decreased clearly, and was obviously lower than the control. However, that of group V5 went up greatly to $102.16 \mu\text{g}/10^8$ cells on Day 5, and those of all other groups were significantly lower than their initial values ($P < 0.01$). Furthermore, on Day 21, chlorophyll-*a* content in groups V2—V5 was higher than that of the control ($50.63 \mu\text{g}/10^8$ cell). On Day 2, the GSH content in all the group was remarkably lower than the control ($3.23 \mu\text{g}/10^8$ cell); it increased first and then decreased with the increase of As(V) dosage. Moreover, glutathione reductase activity decreased generally with the increase of the dosage. Therefore, long-term exposure of *C. mulleri* to As(V) could result in depressing the photosynthesis and antioxidant activity, and might affect the growth and ecological function of marine microalgae.

Key words As(V); *Chaetoceros mulleri*; growth; chlorophyll-*a* content; antioxidant activity