

文章编号: 1000-0615(2018)06-0846-08

DOI: 10.11964/jfc.20170810923

抑食金球藻对翡翠贻贝抗氧化酶系统的影响

谢磊^{1,2}, 徐晓娇³, 江天久^{1,2*}

(1. 暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心, 广东广州 510632;

2. 水体富营养化与赤潮防治广东普通高校重点实验室, 广东广州 510632;

3. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要: 本研究以单种抑食金球藻及其与亚心形四片藻的混合藻为实验组, 以亚心形四片藻为对照, 探究抑食金球藻对翡翠贻贝超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量的影响。结果显示, 抑食金球藻显著影响翡翠贻贝的SOD活性、MDA和GSH含量, 各实验组均表现出诱导升高与抑制降低交替出现的规律。单种高、中浓度的抑食金球藻在短期(3 h)内即可对翡翠贻贝的SOD活性产生影响, 混合藻组中的SOD活性上升较慢, 说明亚心形四片藻可以延滞氧化还原系统的反应时间。各实验组翡翠贻贝GSH含量在2 d内均显著低于对照组, 且混合藻组与单种抑食金球藻组相差不大, 提示亚心形四片藻对抗氧化还原损伤并未起到明显的缓解作用。

关键词: 抑食金球藻; 翡翠贻贝; 亚心形四片藻; 抗氧化酶系统; 褐潮

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

1985年, 美国纳拉甘西特湾、罗德岛等美国东北部海域首次暴发由抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*)所引发的褐潮, 而后1997年南非的萨尔达尼亚湾也暴发了由该种藻引发的褐潮。2009年, 在我国秦皇岛海域暴发的抑食金球藻使中国成为世界上第三个受其影响的国家^[1]。目前, 抑食金球藻是否对人类有直接的不良影响尚不清楚, 但已知抑食金球藻会抑制贝类生长, 降低其摄食率, 导致贝体质量减轻, 甚至死亡^[2-3]。

抑食金球藻属棕鞭藻门(Ochrophyta)、海金藻纲(Pelagophyceae), 单细胞, 呈球形或椭球形, 金色, 直径1.5~2.0 μm^[4]。研究表明, 相比于等大小、等密度的有机颗粒, 紫贻贝(*Mytilus edulis*)对抑食金球藻的摄食率明显偏低, 因此, 抑食金球藻对贝类的抑食作用并非因其极小的体积所导致的低滞留率, 而使得贝类无法有效地摄食^[5]。此外, 抑食金球藻的无毒株可以作为食物为硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)幼体提供营

养, 而一定浓度的有毒株则会明显影响硬壳蛤的生长^[6-8]。

翡翠贻贝(*Perna viridis*)属于软体动物门(Mollusc)、双壳纲(Bivalvia)、贻贝目(Mytiloida)、贻贝科(Mytilidae), 是亚热带性的海洋贝类, 也是广东、福建沿海的重要经济贝类。本研究通过检测不同浓度的抑食金球藻及其与亚心形四片藻(*Tetraselmis subcordiformis*)的混合藻对翡翠贻贝内脏团的超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量的影响, 分析抑食金球藻对贝类的危害方式, 为抑食金球藻生态毒理学提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

抑食金球藻秦皇岛株, 由暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心藻种室提供, 海水经0.45 μm滤膜过滤后121 °C高温灭菌25 min, 室温冷却后

收稿日期: 2017-08-06 修回日期: 2017-11-16

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展计划(2010CB428702); 国家自然科学基金(41276091)

通信作者: 江天久, E-mail: tjiangtj@jnu.edu.cn

添加L1培养基改良配方备用。藻培养条件为温度(18±1) °C, 光照80 μmol/(m²·s), 光暗比(L:D) 12 h: 12 h, pH(7.5±0.1), 盐度25±1。

翡翠贻贝购于广州黄沙水产市场, 贝龄1~2年, 实验前剪去贝壳外足丝, 将贻贝洗刷干净, 清除附着物, 置于过滤海水中驯养3 d, 水温18 °C, 自然光照, 驯养期间不投喂饵料, 昼夜连续通气以保证水中溶解氧充足。实验前1 d选择健康、反应灵敏、大小一致的翡翠贻贝随机分组进行实验。

1.2 实验方法

实验容器为5 L的玻璃烧杯, 实验体积为4 L。根据预实验结果, 设置6个实验组和1个对照组(表1)。挑选驯养期间健康的翡翠贻贝随机加入到烧杯中, 每杯30只。按照设定的细胞密度(表1), 将调整好藻细胞密度的藻液加入到烧杯中, 每个处理组设3个平行。实验在恒温条件下进行, 温度为(18±1) °C, pH(7.5±0.1), 盐度25±1。实验期间每隔24 h更换1次新鲜藻液, 以保证藻细胞密度较为稳定。

表1 毒性实验各组别中抑食金球藻与亚心形四片藻藻细胞密度

Tab. 1 Cell densities of *A. anophagefferens* and *T. subcordiformis* in each treatment in the toxicity test

组别 treatment	藻细胞密度/(个/mL) algae cell density	
	抑食金球藻 <i>A. anophagefferens</i>	亚心形四片藻 <i>T. subcordiformis</i>
	高抑 HA	1×10 ⁶
中抑 MA	4×10 ⁵	0
中抑常片 MA/NT	4×10 ⁵	6×10 ⁴
中抑低片 MA/LT	4×10 ⁵	6×10 ³
低抑常片 LA/NT	8×10 ⁴	6×10 ⁴
低抑低片 LA/LT	8×10 ⁴	6×10 ³
对照组 control	0	6×10 ⁴

注: 高抑为高浓度抑食金球藻; 中抑为中浓度抑食金球藻; 低抑为低浓度抑食金球藻; 常片为正常浓度亚心形四片藻; 低片为低浓度亚心形四片藻

Notes: HA, high cell density of *A. anophagefferens*; MA, medium cell density of *A. anophagefferens*; LA, low cell density of *A. anophagefferens*; NT, normal cell density of *T. subcordiformis*; LT, low cell density of *T. subcordiformis*

取样时间为暴露后第1、3、6、12、24小时及第2、4、6、8、10、12天, 每次每组随机取3个平行样进行分析。将贻贝的软组织与外壳分

离后用预冷的生理盐水冲洗数次, 以滤纸拭干后装入样品袋内于-80 °C保存待测。

样品解冻后, 按1:10的比例加入蔗糖Tris-HCl缓冲液, 冰浴条件下用组织匀浆机匀浆后, 再在4 °C下, 4 500 r/min离心25 min, 取上清液进行SOD活性、MDA、GSH及蛋白质含量的测定。

SOD、MDA、GSH和蛋白质测试方法均按试剂盒(SOD, A001-3; MDA, A003-1; GSH, A006-1; 蛋白质, A045-3均购自南京建成生物工程研究所)说明进行。

2 结果

2.1 不同浓度藻细胞对翡翠贻贝SOD活性的影响

对照组在24 h之内SOD活性无差异。相比于对照组, 暴露于单种高、中浓度抑食金球藻中翡翠贻贝的SOD活性在3 h时显著升高($P<0.01$), 之后SOD活性有所降低并趋于平缓, 但均明显高于对照组($P<0.05$)。混合藻实验组中, 在12 h内, 除低抑常片组中翡翠贻贝的SOD活性出现了先降低后升高又降低再升高的小幅波动外, 其余各组的SOD活性无明显变化, 而在24 h时, SOD活性又显著升高(图1-a)。

暴露2~4 d时, 相比于对照组, 各实验组中翡翠贻贝的SOD活性均受到显著的诱导作用($P<0.01$)。而从第6天开始, 暴露于单种抑食金球藻2个浓度组中翡翠贻贝SOD活性有所降低且维持在一个较为稳定的水平, 其他各实验组中翡翠贻贝的SOD活性则呈现出先诱导后抑制、再诱导再抑制的趋势。12 d时, 各个实验组中翡翠贻贝的SOD活性均表现出下降趋势(图1-b)。

2.2 不同浓度藻细胞对翡翠贻贝MDA含量的影响

对照组24 h内MDA含量变化无显著差异。暴露于单种高浓度和中浓度抑食金球藻中的翡翠贻贝在1 h和3 h时其体内的MDA含量尚无变化, 而在6 h时MDA含量骤减而达到最低值。4组混合藻组中翡翠贻贝的MDA含量在6 h内与对照组相当。12 h时, 各组MDA含量均有上升, 其中暴露于单种中浓度抑食金球藻及中抑常片、低抑常片3组中翡翠贻贝MDA含量显著高于对照组($P<0.01$), 其余各组MDA含量与对照组相似。24 h

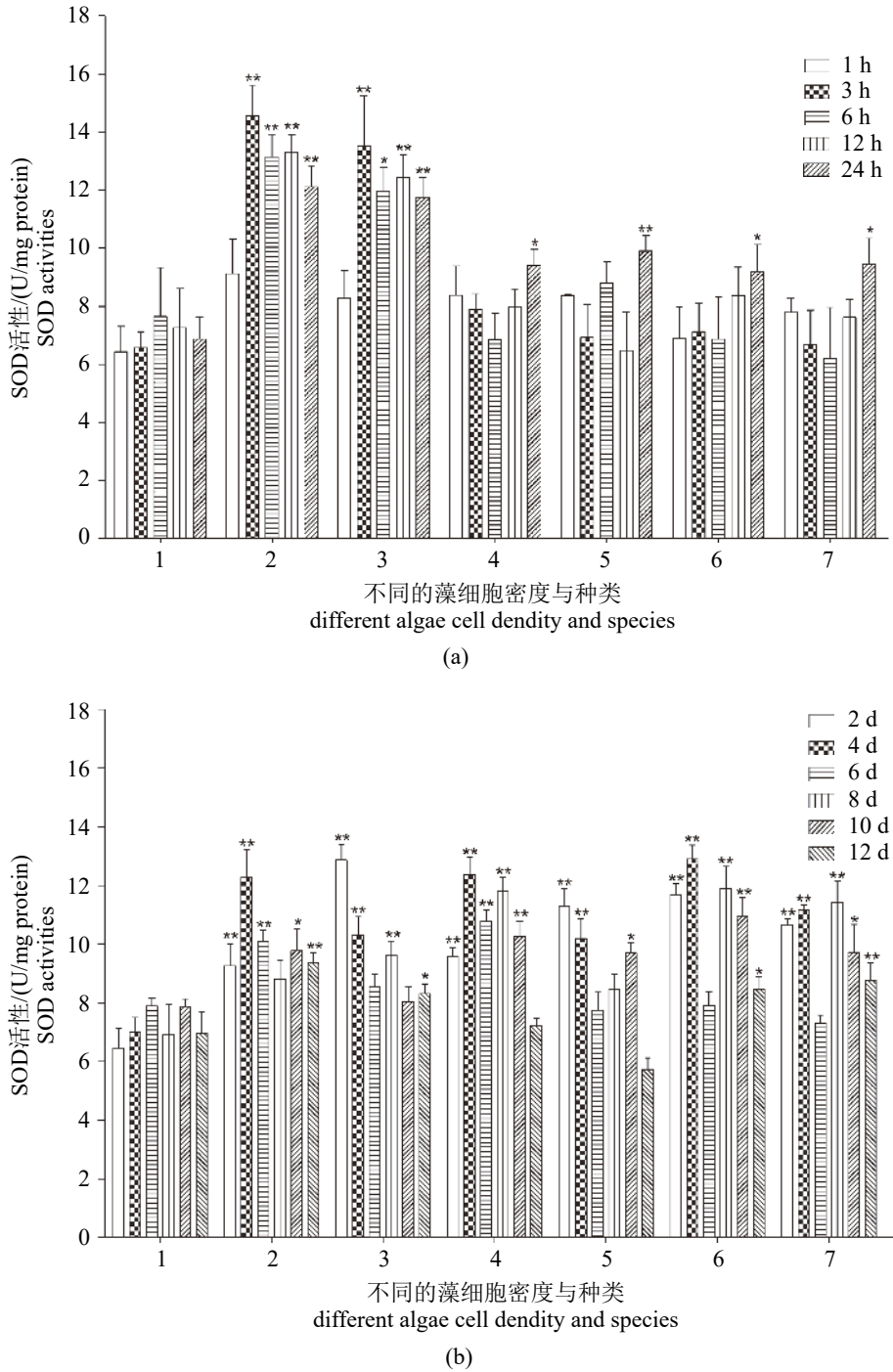


图 1 24 h (a)及2~12 d (b)单种抑食金球藻及其与亚心形四片藻的混合藻对翡翠贻贝SOD活性的影响

1. 对照组, 2. 高抑, 3. 中抑, 4. 中抑常片, 5. 低抑常片, 6. 中抑低片, 7. 低抑低片; 图中标“*”表示差异显著(P<0.05), 标“***”表示差异极显著(P<0.01); 下同

Fig. 1 Effect of *A. anophagefferens* and mixed group (*A. anophagefferens* and *T. subcordiformis*) on SOD activity of *P. viridis* in 24 h (a) and in 12 d (b)

1. control, 2. HA, 3. MA, 4. MA/NT, 5. LA/NT, 6. MA/LT, 7. LA/LT; “*” means significant different (P<0.05), “***” means extremely significant different (P<0.01); the same below

时, 除单种中浓度抑食金球藻组翡翠贻贝 MDA下降至低于对照组水平, 其余各组MDA含

量均极显著高于对照组(P<0.01)(图2-a)。

12 d内对照组贻贝的MDA含量无显著变

化。在6 d内, 实验组贻贝的MDA含量与对照组相比差别不大。8 d时, 单种高浓度抑食金球藻组的MDA含量显著高于对照组($P<0.01$), 但随后MDA含量又降至与对照组水平相当, 其余各组MDA变化基本与对照组相似(图2-b)。

2.3 不同浓度藻细胞对翡翠贻贝GSH含量的影响

对照组在24 h内GSH含量无显著差异, 6 h时, 单种高、中浓度抑食金球藻组GSH含量显著低于对照组($P<0.05$), 且从6 h开始, GSH含量继续减少。4组混合组GSH含量在0~12 h时也低于对照组含量, 24 h时, 各混合组GSH含量也显著低于对照组(图3-a)。

对照组翡翠贻贝的GSH含量相对稳定, 与

对照组相比, 暴露2 d时, 各实验组翡翠贻贝的GSH含量显著低于对照组($P<0.05$), 混合藻组与单种抑食金球藻组相差不大。第4天时各组GSH水平快速回升至对照组水平且于第6天时高于对照组($P<0.01$)。单种高浓度抑食金球藻组在第8~10天时GSH含量大幅下降并显著低于对照组($P<0.01$), 第12天时则又回升至对照组水平, 整体上单种抑食金球藻组与混合组中翡翠贻贝的GSH含量变化相当(图3-b)。

3 讨论

3.1 不同浓度藻细胞对翡翠贻贝SOD活性的影响

SOD是生物体内重要的抗氧化酶, 其活性

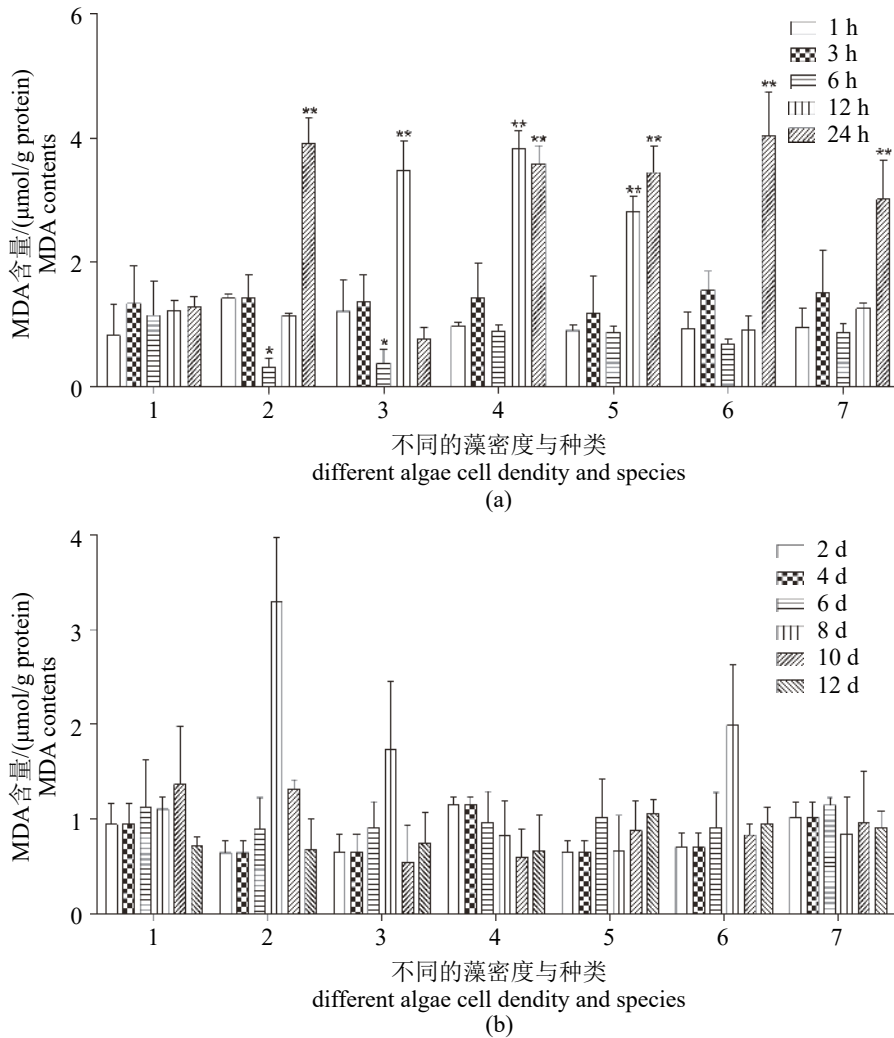


图2 24 h (a)及2~12 d (b)单种抑食金球藻及其与亚心形四片藻的混合藻对翡翠贻贝MDA含量的影响
 Fig. 2 Effect of *A. anophagefferens* and mixed group (*A. anophagefferens* and *T. subcordiformis*) on MDA contents of *P. viridis* in 24 h (a) and in 12 d (b)

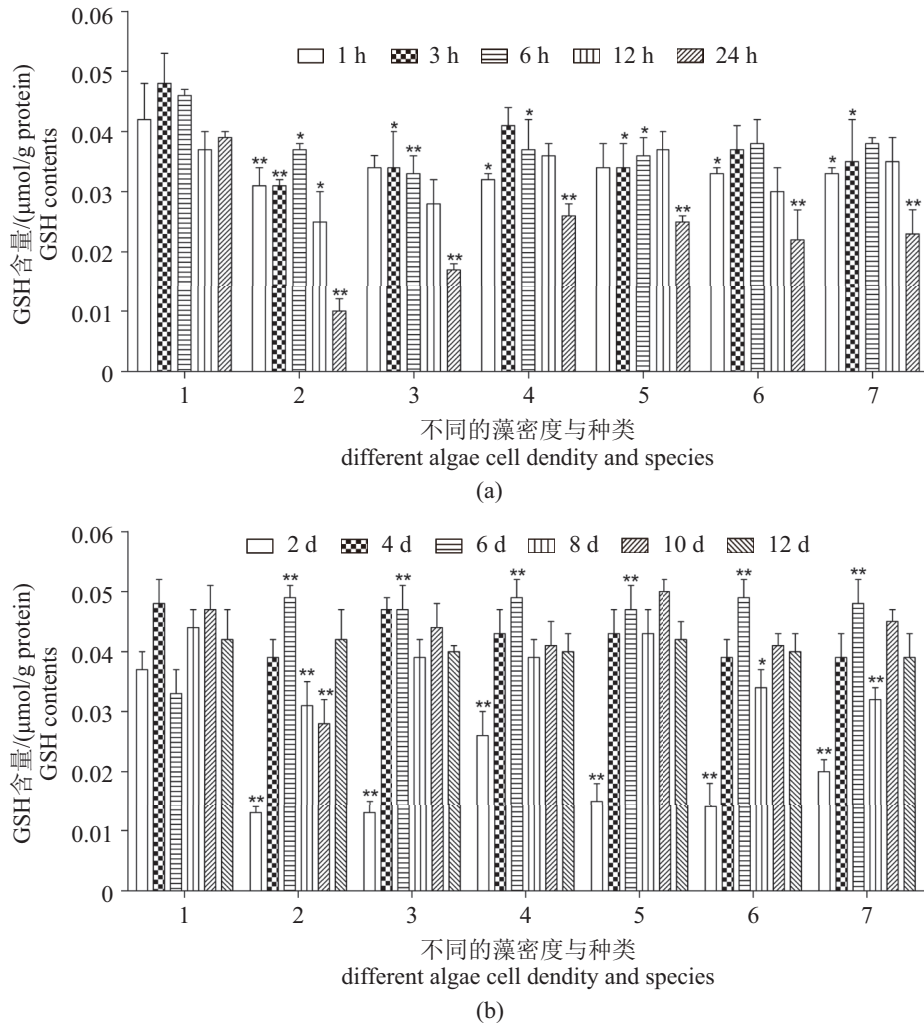


图3 24 h (a)及2~12 d (b)单种抑食金球藻及其与亚心形四片藻的混合藻对翡翠贻贝GSH含量的影响
 Fig. 3 Effect of *A. anophagefferens* and mixed group (*A. anophagefferens* and *T. subcordiformis*) on GSH contents of *P. viridis* in 24 h (a) and in 12 d (b)

可以反映生物体受氧化胁迫的程度。本研究表明,相比于对照组,暴露于单种高、中浓度抑食金球藻中的翡翠贻贝SOD活性短时间内显著升高,说明较高浓度的抑食金球藻在短期内即可对翡翠贻贝的抗氧化酶系统产生影响。而暴露6 d后,高抑和中抑组翡翠贻贝的SOD活性开始下降,甚至恢复到对照组的水平,说明生物体对外界环境的胁迫做出了适应性反应^[9]。相对于单种抑食金球藻实验组,混合藻实验组中翡翠贻贝的SOD活性升高较晚,说明混合藻实验组中的亚心形四片藻可以延滞抑食金球藻对生物体的刺激作用。6~12 d时,混合藻实验组中贻贝的SOD活性表现出抑制诱导交替现象。这与很多研究结果相似,如厚壳贻贝(*M. coruscus*)消化盲囊SOD活性在 Cd^{2+} 胁迫下也表现出“先诱导后抑制”

的模式^[10]。实验12 d时,各组翡翠贻贝的SOD活性开始下降,可能是由于随着暴露时间的延长,氧自由基生成的速率超过了抗氧化酶系统的清除速率,导致细胞结构开始受损,SOD活性开始下降。

3.2 不同浓度藻细胞对翡翠贻贝MDA含量的影响

MDA是生物脂质过氧化的最终产物之一,常用来评价生物脂质过氧化水平及活性氧(ROS)自由基对机体的损害程度。本研究表明,高抑和中抑组中翡翠贻贝的MDA含量在实验6 h时显著下降,而此时该2组中贻贝的SOD活性显著上升,说明高、中浓度的抑食金球藻可刺激贻贝大量产生ROS,从而诱导激活机体SOD等抗氧化

酶并迅速清除贝体内的ROS自由基^[11],进而也逐渐降低了MDA含量。但在实验第12、24小时,各组翡翠贻贝MDA含量出现不同程度的增加,之后又降回与对照组相当的水平,到第8天时,在不同程度的增加后又降低。研究发现,随着在氯化三丁基锡中暴露时间的延长,黑鲷(*Sparus macrocephalus*)机体的抗氧化酶系统活性会不断地降低或增加以维持机体的稳态,进而导致其肝组织中MDA含量呈波动状^[12]。本实验中各组翡翠贻贝MDA含量的波动可能也与上述原因有关。

3.3 不同浓度藻细胞对翡翠贻贝GSH活性的影响

GSH是动物体内重要的水溶性抗氧化剂,其主要通过自身不断地被氧化而将H₂O₂还原为H₂O,当胁迫增强时,谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)受到诱导,GSH作为还原过程的底物被不断消耗而致使其含量降低^[13]。本研究表明,对照组中翡翠贻贝的GSH含量相对稳定,而各实验组中翡翠贻贝的GSH含量在2 d内均降至最低且显著低于对照组,随后各组中贻贝的GSH含量又有所升高,整体上单种抑食金球藻实验组与混合组中贻贝的GSH含量变化相当,说明抑食金球藻对贻贝有胁迫作用,而亚心形四片藻却没有起到明显的缓解作用。

有研究表明,产毒藻可以刺激水生生物的抗氧化酶系统,导致抗氧化酶活性的升高。塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)能够破坏中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗氧化酶系统的平衡,导致氧化损伤并诱导SOD、GST酶活性^[14],链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)可以诱导扇贝(*Nodipecten subnodosus*)鳃内SOD、CAT酶活性^[15],由此推测抑食金球藻可能通过产生一些生物活性物质,而致使贝类机体产生一系列抗氧化反应。已知抑食金球藻会降低贝类的存活率、抑制贝类生长和摄食等,曾有学者将抑食金球藻对贝类摄食的不利影响归因于藻细胞太小而导致的低截留率并由此引发贝类饥饿^[5]。本实验通过投喂抑食金球藻与亚心形四片藻的混合藻液,测得此时翡翠贻贝内脏团的抗氧化酶系统同样受到了胁迫,推测该藻可能产生了某种生物活性物质从而引发了贝类的氧化应激。国外有学者认为,抑食金球藻对滤食性贝类的不良影响是由藻细胞外多糖层中某种类

似多巴胺的生物活性物质所引起的,这种物质会抑制滤食性贝类的侧纤毛摆动^[16]。但由于目前还未从该藻中分离出任何毒素或生物活性物质,所以有关该藻产毒或产生物活性物质的研究还需继续开展。

参考文献:

- [1] Zhen Y, Qiao L, Gu B, et al. Characteristics of eukaryotic microalgal community and its abiotic influencing factors during brown tide blooms near Qinhuangdao, China[J]. Harmful Algae, 2016, 57: 1-12.
- [2] 乔玲,甄毓,米铁柱. 抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*)褐潮研究概述[J]. 海洋环境科学, 2016, 35(3): 473-480.
Qiao L, Zhen Y, Mi T Z. Review of the brown tides caused by *Aureococcus anophagefferens*[J]. Marine Environmental Science, 2016, 35(3): 473-480(in Chinese).
- [3] Qiao L, Chen Y H, Mi T Z, et al. Quantitative PCR analysis of the spatiotemporal dynamics of *Aureococcus anophagefferens* and *Minutocellus polymorphus* and the relationship between brown tides and nutrients in the coastal waters of Qinhuangdao, China[J]. Journal of Applied Phycology, 2017, 29(1): 297-308.
- [4] Sieburth J M, Johnson P W, Hargraves P E. Ultrastructure and ecology of *Aureococcus anophagefferens* gen. et sp. nov. (Chrysophyceae): the dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, summer 1985[J]. Journal of Phycology, 1988, 24(3): 416-425.
- [5] Tracey G A. Feeding reduction, reproductive failure, and mortality in *Mytilus edulis* during the 1985 'brown tide' in Narragansett Bay, Rhode Island[J]. Marine Ecology Progress Series, 1988, 50(1-2): 73-81.
- [6] Robbins H M, Bricelj V M, Ward J E. *In vivo* effects of brown tide on the feeding function of the gill of the northern quahog *Mercenaria mercenaria* (Bivalvia: Veneridae)[J]. Biological Bulletin, 2010, 219(1): 61-71.
- [7] 陈杨航,梁君荣,陈长平等. 褐潮——一种新型生态系统破坏性藻华[J]. 生态学杂志, 2015, 34(1): 274-281.
Chen Y H, Liang J R, Chen C P, et al. Brown tide: a new ecosystem disruptive algal bloom[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(1): 274-281(in Chinese).
- [8] Borcier E, Morvezen R, Boudry P, et al. Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and

- behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus*[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 184: 142-154.
- [9] 于天基, 李健, 李吉涛, 等. pH胁迫对脊尾白虾抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(5): 47-53.
Yu T J, Li J, Li J T, et al. The effects of pH changes on antioxidant enzyme activities of ridgetail white prawn (*Palaemon carinicauda*)[J]. Marine Sciences, 2015, 39(5): 47-53(in Chinese).
- [10] 彭玲, 曾江宁, 陈全震, 等. 镉对厚壳贻贝急性毒性及其鳃抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(2): 13-18, 24.
Peng L, Zeng J N, Chen Q Z, et al. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activity in gill of *Mytilus coruscus* and acute toxicity of cadmium on *Mytilus coruscus*[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 38(2): 13-18, 24(in Chinese).
- [11] Anju A, Jeswin J, Thomas P C, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxid dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3): 946-950.
- [12] 陈海刚, 马胜伟, 林钦, 等. 氯化三丁基锡对黑鲷鳃和肝组织SOD、MDA和GPx的影响[J]. 南方水产科学, 2009, 5(2): 23-27.
Chen H G, Ma S W, Lin Q, et al. Effects of tributyltin chloride (TBTCI) on SOD activities, MDA contents and GPx activities in gill and liver of the black porgy (*Sparus macrocephalus*)[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(2): 23-27(in Chinese).
- [13] Gale S L, Burritt D J, Tervit H R, et al. An investigation of oxidative stress and antioxidant biomarkers during Greenshell mussel (*Perna canaliculus*) oocyte cryopreservation[J]. Theriogenology, 2014, 82(6): 779-789.
- [14] 梁忠秀, 李健, 任海, 等. 塔玛亚历山大藻对中国明对虾鳃组织的氧化胁迫和对Caspase基因(*FcCasp*)表达的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 153-160.
Liang Z X, Li J, Ren H, et al. Toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensense* induces oxidative stress and up-regulate *Caspase* gene (*FcCasp*) expression in gills of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 153-160(in Chinese).
- [15] Estrada N, De Jesús R M, Campa-Córdova A, et al. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 146(4): 502-510.
- [16] Galimany E, Rose J M, Alix J, et al. Responses of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*, to the harmful algae *Aureococcus anophagefferens* and *Heterosigma akashiwo*[J]. Journal of Molluscan Studies, 2014, 80(2): 123-130.

Effect of *Aureococcus anophagefferens* on the antioxidant enzyme system in *Perna viridis*

XIE Lei^{1,2}, XU Xiaojiao³, JIANG Tianjiu^{1,2*}

(1. Research Center for Harmful Algae Blooms and Marine Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institute, Guangzhou 510632, China;

3. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Effects of *Aureococcus anophagefferens* on superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) contents of mussel *Perna viridis* were studied by feeding *P. viridis* with pure culturing *A. anophagefferens* and co-occurring algae (*A. anophagefferens* and *Tetraselmis subcordiformis*). Mussels fed with *T. subcordiformis* were set as control. The results showed that *A. anophagefferens* significantly effected the antioxidant enzyme system in mussel *P. viridis* including SOD, MDA, and GSH. SOD activity and MDA, GSH contents fluctuated after *P. viridis* exposing to *A. anophagefferens*. The high and moderate cell densities of *A. anophagefferens* can affect the SOD activity significantly within a short time (3 h). SOD activity in the mussel exposing to the co-occurring algae, by contrast, increased slowly, suggesting that *T. subcordiformis* can prolong reaction time of the antioxidant system. Compared with control group, GSH content in each experiment group was significantly reduced in 2 d. GSH contents had no difference in the mussel exposed to co-occurring algae and pure culturing *A. anophagefferens*, which suggested that *T. subcordiformis* has no positive effect on restoration of the antioxidant system in mussels.

Key words: *Aureococcus anophagefferens*; *Perna viridis*; *Tetraselmis subcordiformis*; antioxidant enzyme; brown tide

Corresponding author: JIANG Tianjiu. E-mail: tjiangtj@jnu.edu.cn

Funding projects: National Basic Research Program of China (2010CB428702); National Natural Science Foundation of China (41276091)