

沈清清, 彭 谦, 赖泳红, 等. 光照条件对固定化果胶酶抑藻效应的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 842-846.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.018

光照条件对固定化果胶酶抑藻效应的影响

沈清清¹, 彭 谦², 赖泳红², 纪开燕²

(1. 文山学院环境与资源学院, 云南 文山 663099; 2. 云南大学微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘要: 为探讨固定化果胶酶的抑藻效应机理, 测定了光培养和暗培养条件下果胶酶作用后藻细胞的生物量和叶绿素 a 含量, 并在扫描电镜下观察果胶酶对藻细胞内部结构和形态的损伤情况。结果表明, 光培养条件下果胶酶抑藻效果显著, 试验第 30 d 时抑藻率达 96.31%, 叶绿素 a 含量为 0, 而暗培养条件下果胶酶对藻细胞生长具有缓慢的促进作用。扫描电镜观察结果显示光照下果胶酶对藻细胞存在不同等级的损伤作用, 损伤最严重的藻细胞细胞壁已完全降解, 细胞结构完全解体, 胞质流出。说明光照条件是果胶酶对铜绿微囊藻起抑制作用的一个敏感条件, 光照条件下果胶酶能破坏藻细胞结构、促进叶绿素 a 降解并抑制藻细胞光合作用, 而黑暗条件下果胶酶对藻细胞不表现抑制效应。

关键词: 果胶酶; 铜绿微囊藻; 抑制效应

中图分类号: X52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0842-05

Influence of lighting conditions on the algal-inhibition effect of immobilized pectinase

SHEN Qing-qing¹, PENG Qian², LAI Yong-hong², JI Kai-yan²

(1. College of Environment and Resources, Wenshan University, Wenshan 663099, China; 2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: To study the inhibition effect and mechanism of immobilized pectinase on *Microcystis aeruginosa* cells, the biomass of algae cells and the content of chlorophyll a were determined under the conditions of light culture and dark culture after the action of pectinase. The damage of pectinase on the internal structure and morphology of algae cells was observed under scanning electron microscope. The results showed that the algal-inhibition effect of pectinase was remarkable under the condition of light culture. The algal-inhibition rate reached 96.31% on the 30th day of the experiment, and the content of chlorophyll a was 0. In addition, pectinase had slow acceleration on the growth of algae cell under the condition of dark culture. The observed result of scanning electron microscope showed that pectinase had different grades of damage on algae cells under light. The cell wall of the worst damaged algae cells was totally dissolved, and cell structure was completely disintegrated with cytoplasm discharge. In conclusion, light condition is a sensitive condition for pectinase to have inhibiting action on *Microcystis aeruginosa*. Pectinase can destroy the structure of algae cells, promote the degradation of chlorophyll a and inhibit the photosynthesis of algae cells under light condition. However, pectinase does not show any inhibiting action on algae cells under dark condition.

收稿日期: 2017-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30760006); 云南省教育厅项目 (2014Y473)

作者简介: 沈清清 (1980-), 女, 云南文山, 硕士, 副教授, 主要从事微生物资源开发与生物信息学应用研究。(E-mail) 391291180@qq.com

Key words: pectinase; *Microcystis aeruginosa*; inhibition

果胶酶(Pectinases)是原果胶酶(PPase)、多聚半乳糖醛酸酶(PG)、裂解酶(PL)和果胶酯酶(PE)4类酶构成的复杂酶系总称,主要起到将果胶质分解为多聚半乳糖醛酸的作用,具有高效、安全的优良特性,广泛应用于食品、纺织、制造工业等领域^[1]。目前已有研究结果表明果胶酶能有效减轻含果胶类物质的工业废水污染^[2],但对于果胶酶在水华藻类治理方面的应用未见报道。2012年王海玉等^[3]分离到5株溶藻细菌,经测定均具有果胶酶活性,并推断细菌产果胶酶是细菌溶藻抑藻的一个重要的因素。2012年笔者等^[4]首次研究了果胶酶对铜绿微囊藻的作用效果,发现采用0.1 g游离果胶酶的固定化制剂处理100 ml浓藻液(初始藻细胞数量为1 ml 2.8×10^7 个)至第3 d就开始发挥抑制效应,藻细胞生长量、叶绿素a含量显著降低,细胞内发生严重膜脂过氧化,至第30 d抑藻率达96%,表明果胶酶在治理藻华方面具有一定的应用前景。

本研究在课题组前期研究的基础上,通过比较光培养和暗培养条件下果胶酶对铜绿微囊藻生长抑制作用的差异,进一步探究果胶酶抑藻机制和果胶酶作用的靶标,以期成果胶酶在藻华治理方面的应用提供更多理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* FACHB 469)购自中国科学院武汉水生生物研究所藻种保藏中心。果胶酶,美国Sigma公司生产,酶活性为400~800 U/g。

1.2 试验方法

1.2.1 铜绿微囊藻的培养 在无菌条件下,采用无菌操作,将20 ml处于对数生长期的藻种接入装有150 ml已灭菌的BG-11藻细胞培养液(pH 7.1)的三角瓶中,在温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照度约3 000 lx、光照时间12 h/d条件下培养^[5],每天人工振摇6~9次,扩大培养15 d。

1.2.2 果胶酶的固定化处理 将4%海藻酸钠与4%明胶各100 ml于80℃水浴中混合溶解,约1 h后将混合液降至50℃左右,加入2%果胶酶液100 ml搅拌2~3 min,待充分混合后加入5%戊二醛15 ml搅拌均匀,保持混合液在50℃水浴中,制成小球。静置2 h后放入0.05%戊二醛中固定过夜(4

℃冰箱中浸泡)。滤出小球并以蒸馏水洗涤数次,滤纸吸干,4℃保存备用^[4]。

1.2.3 果胶酶抑藻试验 无菌条件下,将培养15 d的铜绿微囊藻液倒入已灭菌的1 000 ml大三角瓶中充分摇动混匀,分别取150 ml藻液装入250 ml三角瓶(初始藻细胞数量约为1 ml 2.8×10^7 个,叶绿素a质量浓度为4 mg/L)。分为对照组(光)、对照组(暗)、光培养处理组和暗培养处理组共4组进行试验,每组设3个重复,采用一次性培养方式进行试验。对照组(光):藻液在方法1.2.1培养条件下培养;对照组(暗):装有藻液的三角瓶用铝箔严密包裹,置于无光箱培养。光培养处理组:藻液中加入15 g固定化果胶酶,摇匀后在方法1.2.1培养条件下培养;暗培养处理组:藻液中加入15 g固定化果胶酶,三角瓶用铝箔严密包裹,置于无光箱中培养,温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天人工振摇6~9次。

1.2.4 藻细胞数量和生长抑制率的测定^[4] 在光学显微镜下用血球计数板计数藻细胞生物量。生长抑制率的计算公式: $\eta = [(N_0 - N) / N_0] \times 100\%$,式中, η 为生长抑制率, N_0 为对照组藻细胞数量, N 为处理组藻细胞数量。

1.2.5 藻细胞叶绿素含量的测定 取一定量藻液离心,弃上清后将藻细胞放入-20℃冰箱冷冻12 h,取出迅速加入浓度为90%、温度为80℃的乙醇溶液,于80℃热水浴中萃取2 min后放入超声仪中用超声波振荡处理10 min,再放置于无光箱中萃取,24 h后离心30 min,收集上清液,定容,用90%乙醇溶液作为空白对照。分别测定上清液在665 nm、750 nm波长处的吸光值,然后加入3滴1 mol/L盐酸,使上清液酸化,再于相同波长处分别测定吸光值^[4]。

1.2.6 透射电子显微镜拍照 在云南大学现代分析测试中心进行藻细胞玻片喷金,在昆明医学院进行透射电镜拍照。

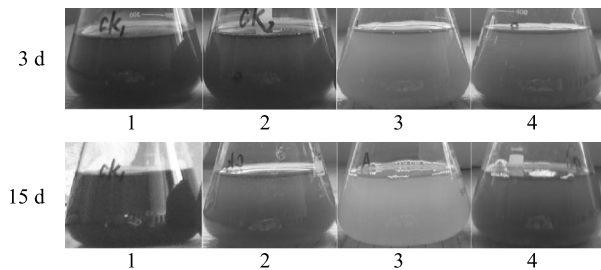
1.2.7 试验数据处理 采用SPSS 16.0软件包和Microsoft Excel 2003进行ANOVA统计分析。

2 结果与分析

2.1 光照和黑暗条件对果胶酶抑藻效应的影响

观察果胶酶加入后在光照和黑暗条件下铜绿微囊藻的生长情况(图1)。4个组藻液培养第3 d与第15 d相比前后差异最大的为光培养处理组,藻液由黄绿色变为浅黄色;其次为对照组(暗),藻液由

深绿色变为浅绿色;而暗培养处理组和对照组(光)藻液颜色没有明显变化。



1:对照(光);2:对照(暗);3:光培养处理;4:暗培养处理。

图1 果胶酶处理后铜绿微囊藻生长情况

Fig.1 Growth situation of *Microcystis aeruginosa* after treatment with pectinase

为获得铜绿微囊藻生物量消长的准确数据,对藻细胞数量进行了计数(图2)。在30 d的培养时间内对照组(光)藻细胞生长呈增长趋势,与第1 d相比,第9 d藻细胞数量增加了28.48%,第30 d增加了50.22%,为第1 d的1.50倍,生长率明显大于死亡率($P < 0.05$);光培养处理组藻细胞数量从第9 d开始显著下降,与第1 d相比,减少了34.02%,至第30 d减少了94.32%,果胶酶对藻细胞生长的抑制率高达96.31%,大部分藻细胞停止生长和增殖,大量死亡。对照组(暗)第9 d藻细胞数量比第1 d减少了30.53%,至第30 d减少了62.11%;暗培养处理组第9 d藻细胞数量与第1 d相比没有减少,反而增加了3.88%,至第30 d增加了6.45%,为第1 d的1.06倍。以上数据表明在光照条件下果胶酶能显著抑制铜绿微囊藻的生长,而黑暗条件下果胶酶不仅对藻细胞没有抑制作用,反而能缓慢促进铜绿微囊藻生长。

2.2 光照和黑暗条件下果胶酶对藻细胞叶绿素a含量的影响

叶绿素a是指示藻体光合系统生理状况的重要指标,其含量在一定程度上反映藻细胞的光合性能与生长能力。图3显示,对照组(光)藻细胞培养至第3 d时叶绿素a含量比第1 d上升了90.41%,至第30 d时上升了343.15%。光培养处理组藻液叶绿素a含量显著下降,并且随着果胶酶处理时间的延长,叶绿素含量下降水平更加显著,第3 d比第1 d下降了34.66%,第5 d比第1 d下降了84.86%,

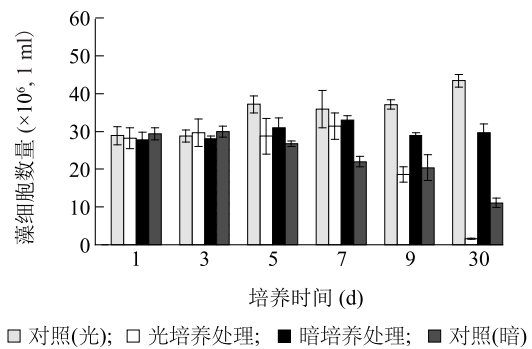


图2 光照和黑暗条件下果胶酶对铜绿微囊藻生长的影响

Fig.2 Effect of pectinase on the growth of *M. aeruginosa* in light and dark conditions

至第9 d降为0,至30 d时仍为0,表明藻细胞已经失去了光合能力。值得注意的是,光培养处理组第3 d后藻液叶绿素a含量开始显著降低,而藻细胞数量反而有所增加,至第9 d时叶绿素a含量降为0,而藻细胞数量才开始明显下降,但1 ml仍有 1.858×10^7 个的具有完整细胞形态的藻细胞,说明光照条件下经果胶酶处理后藻液叶绿素a含量的降低与藻细胞数量的减少并不呈正比关系,果胶酶首先促进藻细胞叶绿素a的降解,之后藻细胞结构才相继解体。对照组(暗)藻液培养至第3 d时叶绿素a含量比第1 d增加了73.49%,第5 d时也有小幅上升,第7 d开始下降,至第30 d时比第1 d下降了31.09%。而暗培养处理组藻液叶绿素a含量没有下降,反而出现上升趋势,至第3 d上升至最大值,比第1 d增加了47.60%,尽管之后的27 d内呈小幅下降趋势,但至第30 d时比第1 d增长了12.73%。以上结果表明光照条件下果胶酶能促进藻细胞叶绿素a的降解,使藻细胞基本失去光合能力,而黑暗条件下无此效应。

2.3 果胶酶对铜绿微囊藻细胞内部结构的影响

在果胶酶作用下,铜绿微囊藻叶绿素a的降解先于藻细胞结构的解体,因此为了了解果胶酶对藻细胞内部结构的影响及藻细胞衰亡情况,取光培养处理组培养第3 d的藻细胞进行透射电镜观察、拍照,比较无损伤、损伤较轻和损伤较重的几类藻细胞。结果(图4)显示,正常生长的藻细胞呈较规则的圆形或椭圆形,细胞膜和细胞壁结构完整,表面光滑、圆润,细胞内部各成分分布均匀,细胞质浓厚,细胞中央的核区较明显,类囊体光合片层整齐地排列

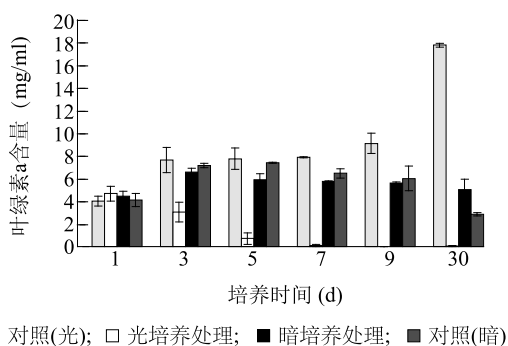
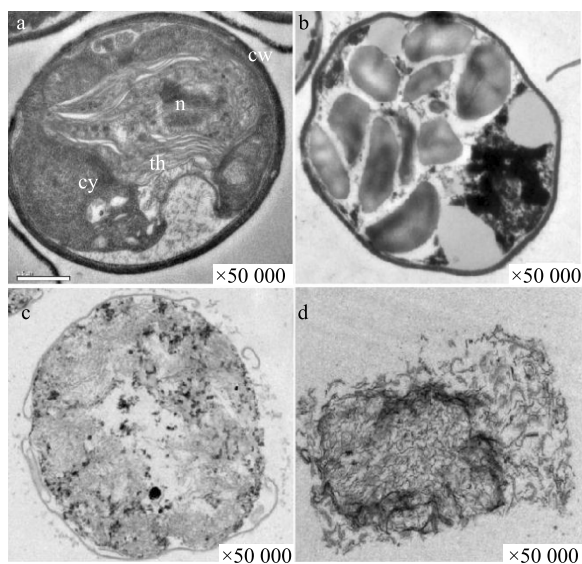


图3 果胶酶对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响

Fig.3 Effect of pectinase on the chlorophylla content of *M. aeruginosa*

在核区周围;果胶酶效应开始显现的藻细胞(图4b),细胞壁出现皱缩,内部细胞质和各种结构开始聚集成不规则的团块,细胞内部大部分出现中空结构,拟核消失,核区损坏,类囊体光合片层断裂,无法清楚分辨;被果胶酶严重损伤的藻细胞(图4c),内部结构已完全模糊,各种结构已断裂为不规则的残片,杂乱地分布在细胞内,细胞质浓缩沉淀,细胞壁破损,但仍维持细胞的球状形态;损伤更严重的细胞(图4d)细胞壁已完全降解,细胞结构完全解体,胞质流出,表明细胞已衰亡。以上结果表明果胶酶对铜绿微囊藻细胞具有不可逆的损伤效应。



a:正常藻细胞;b~d:损伤藻细胞。cy:细胞质;cw:细胞壁;n:拟核;th:类囊体。

图4 果胶酶对铜绿微囊藻细胞形态结构的影响

Fig.4 Effect of pectinase on the morphology and structure of *M. aeruginosa*

3 讨论

果胶酶的4类酶通过协同作用可破坏植物细胞壁,分解细胞壁中的果胶质成分,效果显著,因此果胶酶在与植物脱胶处理相关的工业生产中应用非常广泛^[14,6]。铜绿微囊藻的细胞壁有内外两层,内层是纤维素,外层是以果胶质为主的胶质衣鞘^[7],因此推测果胶酶同样也能分解铜绿微囊藻的细胞壁结构。笔者前期试验中通过扫描电镜观察已证实果胶酶确实能破坏铜绿微囊藻细胞的表层结构,使细胞壁缺损^[4]。在本研究中通过透射电镜观察发现果胶酶同样对细胞内部结构存在明显损伤效应,部分藻细胞在果胶酶作用下虽仍维持细胞的整体形态,但内部结构已发生浓缩或断裂,表明果胶酶对藻细胞具有不可逆的致死效应。导致这一效应的发生存在2种可能性:其一,果胶酶在细胞内部有直接作用位点;其二,果胶酶损伤藻细胞壁后使细胞渗透压、电势电位等理化因素改变而间接引发了细胞凋亡。铜绿微囊藻的死亡存在类似于真核生物细胞凋亡的情况,藻细胞凋亡时表现出活性氧含量和Caspase活性升高,DNA断裂,细胞结构完全解体等类似于真核细胞程序性死亡的现象^[8]。因此判断藻细胞是否发生凋亡还需要从生化分子水平对细胞进行检测,而电镜只能定性而无法定量,而且观察到正常状态下发生凋亡细胞的机率也不高,因为细胞发生凋亡的时间比较短,不易被观察到^[9]。因此仅根据目前所获得的电镜数据来看,果胶酶对藻细胞是直接致死还是间接导致细胞凋亡,我们仍不能妄下定论,有待继续深入研究。

铜绿微囊藻是喜光物种,藻华爆发的时节正是光照强、日照时间长的夏季,光照对铜绿微囊藻生长具有重要意义,有诸多研究结果表明藻类在光照弱或黑暗条件下对外界刺激耐受力较弱,且生长较容易受到抑制;低光照会使藻细胞分泌的胞外多糖含量下降,群体变小^[8,10];抑藻剂在黑暗条件下的抑藻效果更为显著,原因可能是光合作用的停止限制了藻细胞对营养元素的吸收,从而抑制了藻细胞的生长,在此情况下,抑藻剂更易侵蚀藻细胞,导致藻细胞死亡^[11-12]。然而,本试验结果却表明黑暗条件反而有助于铜绿微囊藻抵抗果胶酶的损伤效应,甚至黑暗条件下果胶酶对其生长有缓慢的促进作用,说明光照条件是果胶酶对铜绿微囊藻起抑制作用的一

个敏感条件。2008年林必桂等^[13]报道过类似的现象,他们在研究赖氨酸的抑制作用时发现光照条件下赖氨酸对铜绿微囊藻具有专性抑制作用,而黑暗条件下不同浓度赖氨酸对微囊藻均无明显的抑制作用,2.0 mg/L赖氨酸反而使处理的微囊藻叶绿素 a 含量显著增加,说明黑暗条件下微囊藻具有利用赖氨酸进行化能异养生长的能力。近年来有研究者发现有些藻类在遇到不良环境或极限条件时能够生存下来,是因为它们会启动一些保护机制清除能量消散、自由基等对光合系统及其他一些重要细胞结构的损害,或采取减慢生长速率以保持细胞内稳态的生存策略^[14-15]。另外,有研究者还发现铜绿微囊藻不仅可以利用无机营养元素进行光合自养,还可以在无光照条件下生长于有机物中,利用小分子有机底物进行化能异养生长,如藻类可在黑暗条件下利用糖类物质作为碳源维持细胞生长。由此推测,本试验中黑暗条件下铜绿微囊藻细胞可能选择了异养生长途径,藻细胞不再利用光合系统进行自养生长,细胞内的代谢调控机制发生改变,从而导致果胶酶无法发挥效应,但因为营养物质的缺乏,藻细胞也无法快速增殖,只能以缓慢生长甚至近似休眠状态的方式存活下来,由此说明果胶酶的作用位点之一在藻细胞的光合系统。

参考文献:

- [1] 李琦,李国高,刘绍,等. 果胶酶应用的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30 (21): 258-262.
- [2] 黄俊丽,李常军,王贵学. 微生物果胶酶的分子生物学及其应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17 (6): 992-994.
- [3] 王海玉,孙珮石,毕晓伊,等. 5株溶藻抑藻细菌的筛选及果胶酶活性的初步研究[J]. 农学学报, 2012, 2 (10): 62-67.
- [4] 沈清清,彭谦,赖泳红,等. 固定化果胶酶抑制铜绿微囊藻生长研究[J]. 环境科学, 2012, 33 (12): 4316-4321.
- [5] 刘玉生,韩梅,梁占彬. 光照、温度和营养盐对滇池微囊藻生长的影响[J]. 环境科学研究, 1995, 8 (6): 7-16.
- [6] 王蕾,王万贵,蔡禄,等. 果胶酶在制浆中的应用[J]. 天津造纸, 2011 (1): 20-23.
- [7] FORNI C, TELO F R, CAIOLA M G. Comparative analysis of the polysaccharides produced by different species of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanophyta) [J]. Phycologia, 1997, 36 (3): 181-185.
- [8] 郭莉莎,章军,吴娟,等. 黑暗限气条件下铜绿微囊藻细胞死亡的形态结构和生理生化变化[J]. 微生物学报, 2012, 52 (2): 228-235.
- [9] MATSUBARA K, KUBOTA M, ADACHI S, et al. Different mode of cell death induced by calcium ionophore in human leukemia cell lines: possible role of constitutive endonuclease[J]. Experimental Cell Research, 1994, 210 (1): 19-25.
- [10] LIU Y S, HAN M, LIANG Z B. Influence of light intensity, temperature and nutrients on the growth of microcystis in water of Dianchi lake [J]. Research of Environmental Sciences, 1995, 8 (6): 7-11.
- [11] SHUNMUGAM S, JOKELA J, WAHLSTEN M, et al. Secondary metabolite from *Nostoc* XPORK14A inhibits photosynthesis and growth of *Synechocystis* PCC 6803 [J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37 (6): 1371-1381.
- [12] 黄思明,尹平河,赵玲. 一株芽孢杆菌对球形棕囊藻的溶藻效果[J]. 暨南大学学报 (自然科学版), 2013, 23 (3): 337-342.
- [13] 林必桂,杨柳燕,肖琳,等. 赖氨酸对铜绿微囊藻细胞的抑制机理[J]. 生态与农村环境学报, 2008, 24 (4): 68-72.
- [14] 魏静,王小冬. 南极衣藻对黑暗和低温的适应与恢复[J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2013, 43 (6): 81-86.
- [15] MONTECHIARO F, GIORDANO M. Effect of prolonged dark incubation on pigments and photosynthesis of the cave-dwelling *Cyanobacteria* [J]. Phycologia, 2006, 45 (6): 704-710.

(责任编辑:张震林)