

南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L 的抗盐性

阚光锋^{1,2}, 郑洲², 姜英辉², 缪锦来², 张波涛², 李光友²

(1. 哈尔滨工业大学(威海)海洋学院, 山东 威海 264209; 2. 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要:以南极冰藻(*Chlamydomonas* sp.)为材料对其抗盐性进行研究,结果表明,冰藻在盐度33下生长良好,在盐度66和99也有较大的生长量,盐度132下也能生存,可以维持原有的生物量,而盐度165对冰藻则是致命的,仅能存活8d;常温藻(*Chlamydomonas monadina*)仅能在盐度小于99时生存。由此可以看出,南极藻类较常温藻可抗更高的盐度。同时测定了与盐度变化相关的膜系统变化,与常温藻相比,南极冰藻中的超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和脯氨酸含量较高,而膜透性较低;经盐度99胁迫后,以上4种生化指标都升高。本研究初步结论为,超氧化物歧化酶、丙二醛、脯氨酸和膜透性对南极冰藻的抗盐性研究均有较好的指导意义。这项研究将为南极冰藻抗盐机理研究提供基础依据。[中国水产科学,2006,13(1):73-78]

关键词:南极冰藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L);抗盐性

中图分类号:S868.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0073-06

南极具有独特的地理环境,其气候条件具有严寒、低光照、高盐度和强辐射等特点。南极冰藻主要是指生活在南极高纬度环境海冰中的一大类微型藻类。在南极地区,海冰是极地物理环境的重要组成部分,为南极冰藻的生长提供了合适的栖息地。冰藻的生长环境与海冰密切相连,可分布于冰层的所有部分,或者集中于冰层的某一部分,包括冰雪界面、海冰内部、海冰边缘或冰水界面等。在海冰的形成过程中,海水中的南极冰藻从海水中析出结合到海冰中,形成明显的海冰生物群落。在海冰的形成、冰体的生长和海冰融化的季节性周期中,南极冰藻经受了巨大的盐度梯度变化。温度降低,则容积下降,卤水相应地被进一步浓缩,使盐度升高;温度升高,则变化相反。因此,为了生存和繁衍,南极冰藻必须能够适应大范围的盐度变化,从冰融化时的盐度极度稀释,到普通海水,再到浓缩达到5倍海水的盐度。严酷的极地环境造就了南极冰藻特殊的生物学特征,使其可以作为研究耐盐生命特征的模式生物。

1956年,Bunt等^[1]首先对南极冰藻进行报道。自此,不少学者研究了冰藻的种类组成、数量分布、季节变化、生产力及生态因素等^[2-3]。进入20世纪90年代,越来越多的学者开始研究冰藻独特的生理

生化特性,探讨冰藻对严酷极地环境的适应性^[4-6]。2001年,国家海洋局第一海洋研究所从第十八次南极科学考察采集的海冰样品中分离纯化了20多种南极冰藻,从无机离子、多糖、脂肪酸、蛋白质和形态结构等各个方面开展了室内南极冰藻抗逆性机理的研究^[7-10]。以上研究多集中在冰藻的抗辐射和抗冻方面,而有关冰藻抗盐性的研究很少,大都在极地实地进行,且多集中在耐低浓度盐分方面。南极冰藻可以生活在盐度范围很广的海冰环境中,本研究设计了不同的盐度梯度,对南极冰藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)的抗盐性及其膜系统的变化进行测定,并且分析其膜系统变化与冰藻抗盐性之间的关系,旨在探讨这类极端微藻的耐盐方式,揭示其耐盐机理,这对耐盐植物的引种、培育、遗传优选等具有重要的理论意义和实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L(以下简称冰藻)为第十八次南极科学考察采集样品分离所得,本实验室4℃保存;常温藻 *Chlamydomonas monadina*(以下简称常温藻)作为对照,本实验室保存。

收稿日期:2005-01-19; 修订日期:2005-04-29。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40406003)。

作者简介:阚光锋(1975-),男,博士研究生,研究方向为极地藻类。E-mail:kanguangfeng@163.com

通讯作者:缪锦来。

1.2 生长曲线的测定

将培养至对数生长期的两种藻接种于不同盐度的 Provasoli 培养基^[1]中,接种密度约为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,共 150 mL,在 250 mL 的三角瓶中培养。用 NaCl 调节培养基的盐度,盐度梯度分别为海水的 1、2、3、4 和 5 倍,即 33、66、99、132 和 165。冰藻置于低温(4~8℃)光照培养箱内,光强为 $20 \sim 30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照周期 12 L:12 D,不充气,每日摇动 3 次。分别在培养的第 0、2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 天用血细胞计数法测定 2 种藻的生长量。结果重复 4 次,取平均值。

1.3 膜系统变化的测定

分别在培养的第 0、2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 天取适量盐度 99 胁迫下的藻体,4℃,1 000 g 离心 10 min,然后用 4℃ 预冷的去离子水洗涤 2 次,以除去藻体表面盐分。藻体冷冻干燥后取干藻粉,分别按以下方法测定膜系统变化:膜透性测定采用电导法^[11];丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[12];脯氨酸含量测定采用茚三酮比色法^[13];超氧化物歧化酶(SOD)含量测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法^[14],稍加修改,以抑制 NBT 光化还原 50% 的酶液量为 1 个酶活性单位。盐度 33 培养的藻作对照,结果重复 3 次,取平均值。

2 结果

2.1 生长曲线

冰藻和常温藻在不同盐度胁迫下的生长曲线见

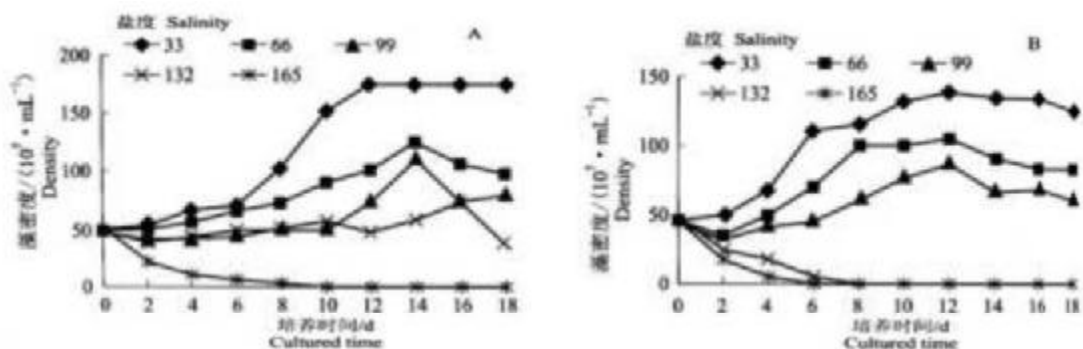


图1 不同盐度胁迫下冰藻(A)和常温藻(B)的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *Chlamydomonas* sp. ICE-L (A) and *C. monadina* (B) under different salinities.

图1。由图1可见,培养初期,冰藻生长比较缓慢,甚至在盐度 99、132 和 165 下细胞数量下降;常温藻密度除盐度 33 外其他盐度组都下降。随着时间的推移,盐度 33 下 6~12 d 为冰藻的对数生长期,第 12 天细胞数量达到 $1.8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,其后进入稳定阶段,生长量变化不大;常温藻 2~6 d 为对数生长期,第 12 天细胞数量最大,为 $1.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。盐度 66 和 99 下冰藻的生长状况类似,经过 8~10 d 的高盐度适应,第 14 天分别达到 $1.3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 和 $1.1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的最大生长量,此后细胞数略有下降;对常温藻来说,盐度 66 和 99 胁迫下的对数生长期分别在 2~8 d 和 6~12 d,12 d 时分别达到最大生长量 10^7 mL^{-1} 和 $0.85 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。盐度 132 下,冰藻在整个生长过程中细胞数变化不大,一直维持在 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的数量。冰藻在盐度 165 下仅能维持 8 d,此后藻体活细胞数为零,藻体全部沉底漂白死亡;常温藻在盐度 132 和 165 下分别仅维持 4 d 和 6 d,此后绿色的细胞漂白死亡。

2.2 盐度对冰藻 *Chlamydomonas* sp. 膜系统的效应

在未进行盐胁迫之前,冰藻中 MDA 的平均含量为 $1.29 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} (\text{DW})$,而常温藻中 MDA 的平均含量为 $0.44 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} (\text{DW})$,前者是后者的 2.93 倍(图 2)。在高盐(盐度 99)胁迫下,两种藻中 MDA 的含量都迅速上升,冰藻在第 12 天含量最高,是对照的 1.4 倍;常温藻第 8 天含量最高 ($1.09 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$),几乎是对照的 2 倍,但仍达不到冰藻非盐胁迫时的水平。

1) Provasoli L. Media and prospects of the cultivation of marine algae[A]. Cultures and collections of algae [C]. Proceeding of the US-Japan Conf. Hakone, Jap. Soc. Plant Physiol. 1968, 63-75.

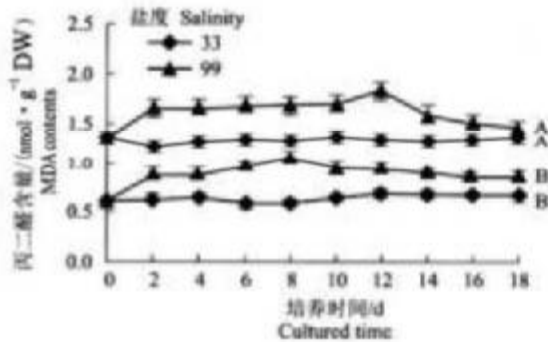


图2 盐度对冰藻(A)和常温藻(B)MDA含量的效应
Fig.2 Effects of salinity on MDA content in *Chlamydomonas* sp. (A) and *C. monadina* (B)

在没有盐度胁迫正常生长条件下,冰藻体中SOD的活性较高(平均为 $0.715 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$),是常温藻(平均 $0.35 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$)的2.04倍(图3)。3倍盐胁迫下,两种藻SOD的活性都有所增加,但常温藻上升较快,第6天时含量就达高峰,然后呈下降趋势;而冰藻胁迫初期上升较慢,第12天时含量最高,此后基本保持稳定。

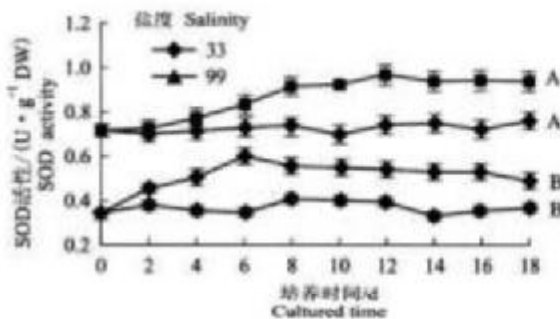


图3 盐度对冰藻(A)和常温藻(B)SOD活性的效应
Fig.3 Effects of salinity on SOD activity in *Chlamydomonas* sp. (A) and *C. monadina* (B)

根据图4,正常生长条件下,冰藻膜透性的平均值为 61.5% ,而对照常温藻为 74.5% ,二者相差 17.45% 。3倍盐胁迫条件下,冰藻膜透性随时间推移而增加,第6天膜透性最大,此后降低;常温藻膜透性增加更为迅速,第2天就几乎达到高峰,此后也呈下降趋势。

从图5中可以看出,正常培养基中,冰藻的脯氨酸平均含量为 $30.3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$,远远高于常温藻 ($12.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$)。当两种藻受到3倍的盐度胁迫时,脯氨酸都迅速积累,只是冰藻积累较快,第8天

达到高峰,含量为 $86.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$,此后有所下降,但总体维持在一个较高的水平,而常温藻中脯氨酸积累较慢,且量较少。

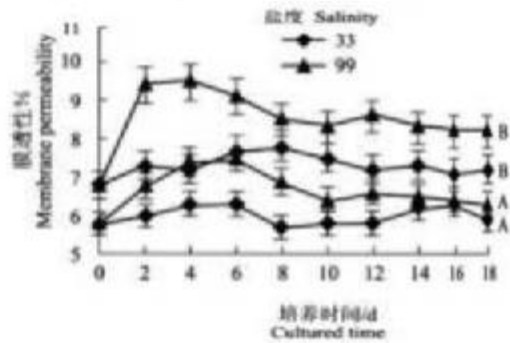


图4 盐度对冰藻(A)和常温藻(B)膜透性的效应
Fig.4 Effects of salinity on electrolyte leakage in *Chlamydomonas* sp. (A) and *C. monadina* (B)

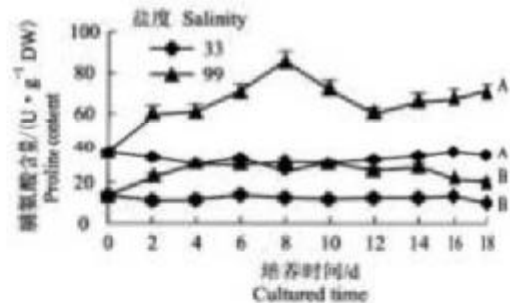


图5 盐度对冰藻(A)和常温藻(B)脯氨酸含量的效应
Fig.5 Effects of salinity on Proline content in *Chlamydomonas* sp. (A) and *C. monadina* (B)

3 讨论

3.1 南极冰藻的抗盐性

与淡水冰不同,海冰为半固体状态,中间存在大量的网状通道和盐囊。冰晶形成时排出的盐水都释放到这些孔洞之间。1992年,Stevens^[15]清楚地看到了这些通道,像一个完整的鸟巢。在南极地区,冬季气温一般为 -27.6°C ,甚至可达 -65.7°C ,随温度的降低,孔洞变小,盐度升高,浓度一般为普通海水的3倍^[16],有时可达5倍^[15]。冰藻就生活在这些高盐浓度的孔洞中,当浮冰被雪或者别的冰块淹没在海水中,富营养的海水就流入浮冰,促进冰藻的生长。夏季,南极海域冰层覆盖面积约为 $4 \times 10^6 \text{ km}^2$,冬季为 $2 \times 10^7 \text{ km}^2$ ^[17]。融化时冰藻周围生活

环境的盐度则接近淡水值。在海冰日积月累的冻溶变化中,冰藻逐渐形成了适应这种变化的生理生化机制。从本实验结果可以看出,南极冰藻对2倍海水盐度(66)有很好的适应性,生长基本不受影响,3倍和4倍海水盐度下冰藻也能生存。如果周围环境盐度逐渐升高,冰藻应有更好的适应性,至少在生存方面不成问题。但冰藻对盐度的抗性有种类之间的差别。作者曾对一种南极绿藻塔胞藻(*Pyramimonas* sp.)的抗盐性进行了测定,结果显示,2倍盐度下塔胞藻的生长就受到抑制。电镜观察结果表明,这种藻是一种没有细胞壁的藻类。朱明等^[18]对一种常温海藻——海链藻(*Thalassiosira* sp.)的抗盐性进行了测定,发现在盐度40时可明显抑制该藻的生长,第5天就出现负增长。

3.2 膜脂过氧化与冰藻抗盐性的关系

近年来,生物自由基伤害学说(Biology radical injury theory)^[19]已被作为生物在逆境下的一个伤害假说受到重视。该假说认为,当生物遭受不良环境时体内自由基增多,膜脂中的不饱和脂肪酸双键受自由基的攻击而被氧化分解,使膜系统破坏,最后造成细胞的伤害甚至死亡。生物体细胞膜透性随盐度的变化而变化,是膜伤害程度的直接反映,膜透性的大小,反映质膜受伤害的程度。本实验中,冰藻较常温藻有更低的膜透性,表明膜透性在生物抗盐性指标中有一定的参考意义。

SOD是存在于生物细胞中一种重要的清除自由基的酶,主要是清除生物体内的 O_2^- 。南极冰藻细胞中SOD的含量较高,远远高于常温藻,从而削弱了脂质过氧化作用,减轻了膜伤害。SOD含量的高低,不仅表现了清除自由基的能力,而且也是体现生物抗性的一种标志。这一结论的获得,不仅从理论上加深了盐胁迫对生物膜伤害机理的认识,而且对筛选抗盐作物等将起到积极的作用。低盐胁迫(5~10)下,刘志礼等^[20]发现螺旋藻体内SOD活性升高,脂质过氧化程度降低,藻的生长不受影响。

MDA是膜脂氧化的最终产物,在生物体中具有重要的作用。不仅会严重地损伤生物膜,并且还可抑制许多生物体中蛋白质的合成,抑制光合羧化酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的活性。MDA间接表示膜受损伤状况,并兼有反馈作用。从本次实验结果看,冰藻和常温藻中MDA的含量相差近3倍。由此可见,在不同的遗传性状控制之下,冰藻能够维持高盐环境的长期胁迫,并且盐诱导

下能形成独特的生化代谢机制,甚至在无盐胁迫下也表现出来,保持较高的MDA含量,而膜透性却处在较低水平。叶春江等^[21]研究了盐分胁迫对大叶藻(*Zostera marina* L.)的影响,结果也发现MDA的含量随盐度升高而增加。

脯氨酸是生物抗逆性中的一个重要因子,不仅可以作为渗透调节物参与调节,而且由于其亲水性可以防止胁迫时组织细胞的脱水。同时脯氨酸与蛋白质相互作用,增加蛋白质的可溶性,减少可溶性蛋白质的沉淀。另外,脯氨酸还可以清除蛋白质分解初期产生的氨,防止其他有毒氨基酸的积累。大量研究表明,许多生物在盐胁迫下脯氨酸迅速积累^[13,22],但也有学者认为脯氨酸积累并不代表抗盐能力的大小^[23-24]。从本次实验看,冰藻*Chlamydomonas* sp.中脯氨酸含量明显高于常温藻,对渗透调节所起的作用较大。可以认为,生物体内脯氨酸含量是衡量生物抗盐能力的重要参考指标。除了脯氨酸以外,高盐度胁迫下,南极冰藻中还积累大量的甘露醇、甜菜碱和二甲基巯基丙酸酯(DMSP)等物质^[16],是很好的抗冻剂和渗透调节剂。

4 结论

冰藻与常温藻的膜系统变化有明显的差异,说明二者对盐胁迫环境的忍耐力不同。膜系统对生物适应不同盐度具有不同的指示意义,但生物体抗盐机制是错综复杂的,是受生物多基因控制的。因此,生化代谢过程不同,表现出的膜系统变化也不同。所以膜系统的变化必须结合生物的结构特点,才能较为准确地综合评价生物抗盐能力的大小。通过本研究,作者认为膜透性、MDA、SOD和脯氨酸含量具有比较明确的指示意义,可作为生物抗盐性评价的重要参考指标。

参考文献:

- [1] Bant J S, Wood Z J F. Microalgae and Antarctic sea-ice [J]. Nature, 1963, 99(2): 1254-1263.
- [2] Sarah M G, Sullivan C W. Sea ice microbial communities V. The vertical zonation of diatoms in an Antarctic fast ice community [J]. J Phycol., 1985, 21(1): 401-409.
- [3] Garrison D L, Sullivan C W, Ackley S F. Sea ice microbial communities in Antarctica [J]. Bioscience, 1986, 36(4): 243-250.
- [4] Anja Eggert, Christian Wernke. Adaptation and acclimation of growth and photosynthesis of five Antarctic red algae to low tem-

- peratures [J]. *Polar Biol*, 2000, 23: 609-618.
- [5] Chattopadhyay M K. Cold-adaptation of Antarctic microorganisms-possible involvement of viable but nonculturable state [J]. *Polar Biol*, 2000, 23: 223-224.
- [6] Michler T, Aguilera J, Hanelt D, et al. Long-term effects of ultraviolet radiation on growth and photosynthetic performance of polar and cold-temperate microalgae [J]. *Mar Biol*, 2002, 140: 1117-1127.
- [7] 缪锦来, 李光友, 侯旭光, 等. UV-B辐射对南极冰藻中抗辐射物质的诱导作用[J]. 高技术通讯, 2002(4): 92-96.
- [8] 缪锦来, 阙光锋, 王波, 等. UV-B辐射增强对南极冰藻超微结构及其主要生化成分变化的研究[J]. 中国海洋药物, 2003, 23(6): 13-18.
- [9] 缪锦来, 阙光锋, 王波, 等. 4种南极冰藻的生化组成对UV-B辐射增强的响应[J]. 海洋科学, 2004, 28(9): 26-31.
- [10] 刘鹏, 缪锦来, 阙光锋, 等. UV-B增强对南极蓝藻形态和超微结构影响的研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(5): 21-25.
- [11] 赵可夫. 植物抗盐生理[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993.
- [12] 王爱国. 丙二醛作为脂质过氧化指标的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1986(2): 55-57.
- [13] 李明亮, 赵可夫. NaCl对耐盐植物和盐生植物生理效应的研究[J]. 曲阜师范大学学报, 1990, 16(2): 64-69.
- [14] 邹琦. 植物生理生化试验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [15] Stevens J E. The Antarctic pack-ice ecosystem[J]. *Bioscience*, 1995, 45: 128-132.
- [16] Thomas D N, Dieckmann G S. Antarctic sea ice—a habitat for extremophiles [J]. *Science*, 2002, 295: 641-644.
- [17] Arrigo K R, Worthen D L, Lianette M P, et al. Primary production in Antarctic sea ice [J]. *Science*, 1997, 276: 394-397.
- [18] 朱明, 张学成, 茅云翔, 等. 温度、盐度及光照强度对海链藻(*Thalassiosira* sp.)生长的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(12): 58-61.
- [19] Aging H D. A theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *J Gerontol*, 1956, 11: 298-300.
- [20] 刘志礼, 李鹏云. NaCl胁迫对螺旋藻生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物学通报, 1998, 15(3): 43-47.
- [21] YE Chun-Jiang, ZHANG Ke-Fu. Effects of adaptation to elevated salinity on some enzymes' salt-tolerance in vitro and physiological changes of *Edgrosso* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(7): 788-794.
- [22] 肖雯, 贾焕亮, 蒲陆梅. 几种盐生生物抗盐生理指标的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 818-825.
- [23] Subu A, Shreeja T E, Narayanan P. Comparison of proline accumulation in callus and seedlings of two cultivars of *Oryza sativa* L. differing in salt tolerance[J]. *Indian J Exp Biol*, 1995, 33(2): 139-141.
- [24] 周翠霞, 卢元芳, 李延团, 等. NaCl对杜氏盐藻生长的影响[J]. 曲阜师范大学学报, 1995, 21(1): 65-68.

Salt resistance of Antarctic ice microalga *Chlamydomonas* sp.

KAN Guang-feng^{1,2}, ZHENG Zhou², JIANG Ying-hui², MIAO Jin-lai², ZHANG Bo-tao², LI Guang-you²

(1. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai 264209, China; 2. Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: Antarctic ice microalgae can survive and thrive in channels or pores with high salinity water in Antarctic ice layer. In this study, Antarctic ice microalga *Chlamydomonas* sp. ICE-L, isolated from Antarctic sea ice samples collected in 18th Chinese Antarctic expedition during 2001/2002, was used as studied material. The resistance of *Chlamydomonas* sp. ICE-L to different salinity was determined with mesophilic microalga *Chlamydomonas monadina* as control, and the results showed that two species of microalgae could both grow normally at salinity 33. *Chlamydomonas* sp. ICE-L grew slowly at the beginning, but increased quickly after 6 days and got to the maximal growth on the 14th day, when the cell density was $1.8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Mesophilic microalga *C. monadina* grew quickly, and its exponential growth phase was from the second day to the sixth day of culture, when the change of cell density was slightly. At salinities 66 and 99, the growth curves of ice microalga were alike. After the adaptation of 8–10 days in high salinity, *Chlamydomonas* sp. ICE-L began to grow rapidly, and got to maximal density on the 14th day. For mesophilic microalga *C. monadina*, the exponential growth phase were from the second day to the 8th day and from the 6th day to the 12th day respectively at salinities 66 and 99, and their maximal density were 10^7 mL^{-1} and $0.85 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ respectively on the 12th day. The density of *Chlamydomonas* sp. ICE-L almost did not change at salinity 132, maintained at about $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. However, the salinity 132 was fatal to mesophilic microalga with no livable cell after the 6th day. Both ice and mesophilic microalga could not survive at the salinity of 165, and all cells were bleached and dead on the 8th and the 6th days respectively. This study indicates Antarctic ice microalgae were tested in a wider range of resistance to high salinity. At the same time, some biochemical changes in *Chlamydomonas* sp. ICE-L related to salinity resistance were also determined. The contents of Superoxide Dismutase (SOD), Malondialdehyde (MDA) and proline in Antarctic ice microalga were higher than those in mesophilic microalga, while the cell membrane permeability was lower. At high salinity pressure of 99, the contents of SOD, MDA and proline increased, and the same to cell membrane permeability. So the conclusion is that the contents of SOD, MDA, proline and the cell membrane permeability can indicate the salt resistance of Antarctic ice microalga. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 73–78]

Key words: Antarctic ice microalga (*Chlamydomonas* sp. ICE-L); salt resistance

Corresponding author: MIAO Jin-lai.