

# Inhibitory Effect of Luteolin on *Chlorella vulgaris*

Dong Shen\*, Deming Feng, Shiqing Sun#, Bijiao Wang, Xinan Cui, Yujie Zhang

Nanhu College, Jiaxing University, Jiaxing Zhejiang  
Email: #30548471@qq.com

Received: May 7<sup>th</sup>, 2018; accepted: May 17<sup>th</sup>, 2018; published: May 24<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

In this work, we explored the effect of luteolin on antioxidant system and the inhibition mechanism of *Chlorella vulgaris*. The effects of luteolin on the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) and the content of malondialdehyde (MDA) *in vivo* were investigated under different concentration and different time. Scanning electron microscope was used to observe the structural changes of algal cells. The results showed that the content of malondialdehyde (MDA) in the cells increased with the increase of concentration and time, and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) decreased. The scanning electron microscopy (SEM) results showed that it first destroyed the cell membrane structure of the algae and finally resulted in the breakage and decay of its cells, and its semi inhibitory concentration of  $IC_{50} = 10.68 \text{ mg/L}$  (5 d,  $P < 0.05$ ).

## Keywords

Luteolin, *Chlorella vulgaris*, Algae Inhibition

# 木犀草素对小球藻抑制作用的机理研究

沈 栋\*, 冯德明, 孙诗清#, 王碧娇, 崔哲楠, 张宇洁

嘉兴学院南湖学院, 浙江 嘉兴  
Email: #30548471@qq.com

收稿日期: 2018年5月7日; 录用日期: 2018年5月17日; 发布日期: 2018年5月24日

## 摘 要

为了探究木犀草素对小球藻抗氧化系统的影响和抑藻作用机理, 进而考察不同浓度、不同作用时间下,

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 沈栋, 冯德明, 孙诗清, 王碧娇, 崔哲楠, 张宇洁. 木犀草素对小球藻抑制作用的机理研究[J]. 化学工程与技术, 2018, 8(3): 185-190. DOI: 10.12677/hjct.2018.83023

木犀草素对小球藻细胞内丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性的变化影响,通过扫描电镜观察藻细胞在木犀草素作用下的结构变化情况,结果表明,木犀草素随着浓度增加和时间的延长,其细胞内丙二醛(MDA)含量提高,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)的活性均降低。扫描电镜结果显示其首先破坏藻的细胞膜结构并最后导致其细胞破碎衰亡,其对小球藻的半抑制浓度 $IC_{50} = 10.68 \text{ mg/L}$  (5 d,  $P < 0.05$ )。

## 关键词

木犀草素, 小球藻, 抑藻机理

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

随着我国水体的富营养化日益突出,淡水水华现象经常发生,导致生态系统的失衡[1] [2],目前认为水华的爆发是一种表观现象,前提是优势藻类繁殖到一定的生物量,并且是一种逐渐形成的过程[2]。因此从开始阶段控制藻类的生长是研究的重点,开发天然有效的抑藻剂成为控制淡水水华的关键,尤其是天然可降解或保健功能的小分子成为目前抑藻剂的研究热点[3] [4] [5] [6]。我们采用了以自然界中分布范围极广,种类繁多,对温度和气候条件等适应能力较强,在海洋、湖泊、沟渠、池塘以及潮湿的土壤等环境中均可以生长繁殖的小球藻作为模型藻种,研究化感物质木犀草素对小球藻抗氧化系统的影响和作用机理,为进一步筛选天然高效优良的抑藻化合物或有发展前景的先导化合物提供一定的预测。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

小球藻 *Chlorella vulgaris* (FACHB-26)购于中国科学院武汉水生生物研究所;木犀草素(HPLC  $\geq 99\%$ )购自西安岩昊生物科技有限公司;MDA测定试剂盒和CAT试剂盒购于南京建成生物工程研究所;SOD试剂盒购于东仁化学科学(上海)有限公司;BG11所用试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 2.2. 实验仪器

PGX-250 光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂),JYD-650 智能型超声波细胞粉碎机(上海之信仪器有限公司),UV-1801 紫外/可见分光光度(北京瑞利分析仪器有限公司),等。

### 2.3. 实验方法

#### 2.3.1. 小球藻的培养

将购买的试管藻液按照 1:2 (体积比)的比例接入新鲜培养基中进行活化,培养条件:培养温度  $25^{\circ}\text{C}$ ,光照条件 4000 Lux,时间设置 16 Hr 昼/8 Hr 夜,人工摇动 2 次/d (早中晚)。当藻种  $OD_{681 \text{ nm}} = 0.6$  左右时,按照比例 1:5 (藻液:培养基)的体积比进行扩大培养。

#### 2.3.2. 抑藻机制实验

准确称取木犀草素 1.0 g,用二甲亚砜溶解并定容至 10 mL,即配制成为 100 mg/mL 的储备液,备用。

使用时,分别吸取 0.1 mL、1 mL、2.5 mL、5 mL 储备液定容至 10 mL,在 2.3.1 的培养条件下,培养 100 mL 小球藻液至  $OD_{681\text{ nm}} = 0.3$  时,分别加入 100  $\mu\text{L}$  上述不同浓度的溶液,使得木犀草素的终浓度分别为 1 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L,并设定二甲亚砜为对照组。在 1 d、3 d、5 d、7 d 分别对培养的小球藻进行取样,分别测定  $OD_{681\text{ nm}}$ 、SOD 活性、POD 活性、CAT 活性、MDA 含量。其中,SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化学反应法[7],POD 活性测定采用愈创木酚法[8],CAT 活性测定采用紫外分光光度法[8],MDA 含量测定采用分光光度法[9]。所有实验均重复 3 次。

### 2.3.3. 细胞完整性实验

使用 SU8010 型扫描电子显微镜在 3.0 KV 加速电压,自动聚焦,放大 20 倍,观察其形态变化。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 小球藻标准曲线的制备

处于对数生长期的 小球藻进行 UV-Vis 全波段扫描,确定其最大吸收波长为 681 nm。在最大吸收波长下,发现藻细胞在  $1.7 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^7$  的数量之间与其  $OD_{681\text{ nm}}$  值成线性关系,可以直接通过测定  $OD_{681\text{ nm}}$  值确定其小球藻的生长状况,如图 1 所示。

### 3.2. 木犀草素对小球藻生长的影响

根据藻液在  $OD_{681\text{ nm}}$  处的变化情况,作出木犀草素对小球藻生长的抑制曲线,如图 2 所示。从图 2 可以看出,加入木犀草素的小球藻的生长趋势明显被抑制。在加入木犀草素 1~5 天后, $OD$  值增长明显缓慢,7 d 后呈增长的趋势,作为对照的甲醇藻液呈正常生长趋势。实验结果表明对藻生长的抑制程度与木犀草素浓度成正相关。其中,25 mg/L 木犀草素对小球藻的抑制率能到 92.3%, $IC_{50} = 10.68\text{ mg/L}$  (5 d,  $P < 0.05$ )。

### 3.3. 木犀草素对小球藻抗氧化活性与 MDA 含量的影响

从图 3 可以看出,加入木犀草素的小球藻抗氧化活性先增加后减少,丙二醛(MDA)的含量也是先增加后下降。其中,图 3(a)中 CAT 活性在 1~3 d 内均突然增大,可能木犀草素刚加进去使细胞的通透性增大,使胞内酶释放出来,5~7 d 有所下降,其酶活随浓度的增大而增大;图 3(b)中 POD 活性 1~3 d 活性最强,5~7 d 显著下降,说明藻细胞的结构在 5 d 后遭到严重破坏,POD 活性受抑制;图 3(c)中 SOD 活性第 5 d,SOD 活性达到最高,说明木犀草素对藻细胞的生长产生胁迫,机体出现应激性反应,使 SOD 活性大量升高,7 d 后 SOD 活性显著下降,虽然对照组下降也很明显但排除对照组的这段下降不同浓度

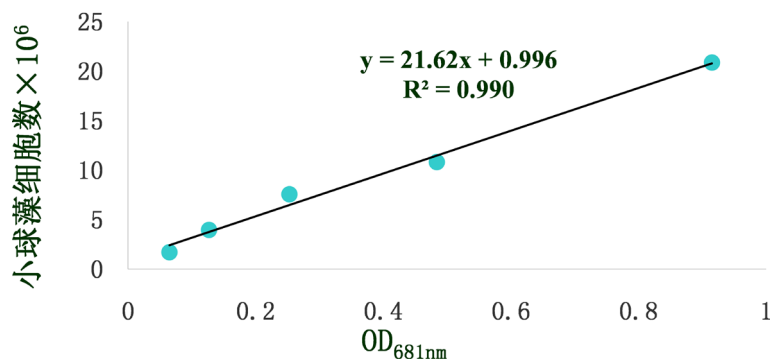


Figure 1. The relation curve between cell number of *Chlorella vulgaris* and absorbance value

图 1. 小球藻的细胞数与吸光度值的关系曲线

木犀草素下降更明显,从而说明藻细胞的结构遭到严重破坏,SOD活性受抑制;图3(d)中MDA含量也是1~5 d显著增加,第7 d有所下降,可能藻细胞已被杀死,其含量呈下降趋势。

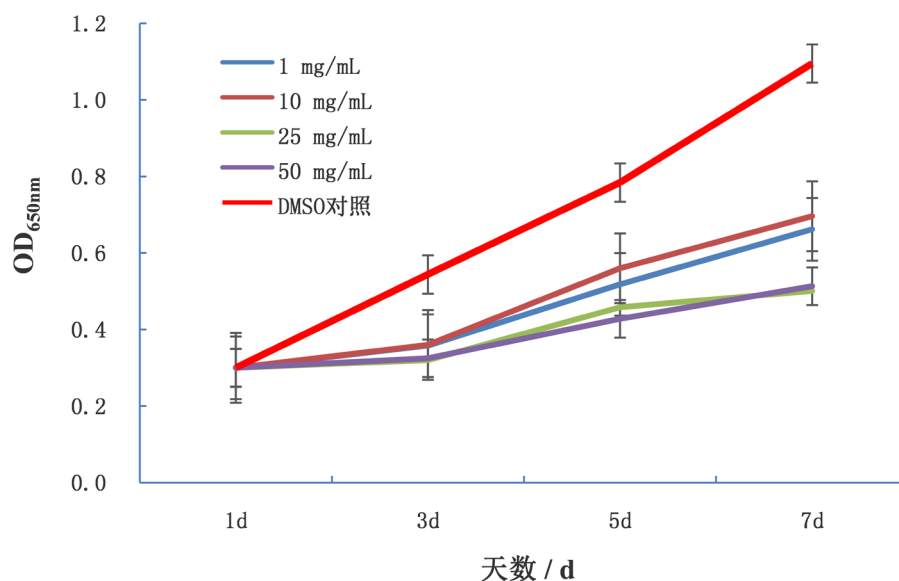


Figure 2. The growth inhibition curve of luteolin to *Chlorella vulgaris*

图2. 木犀草素对小球藻的生长抑制曲线

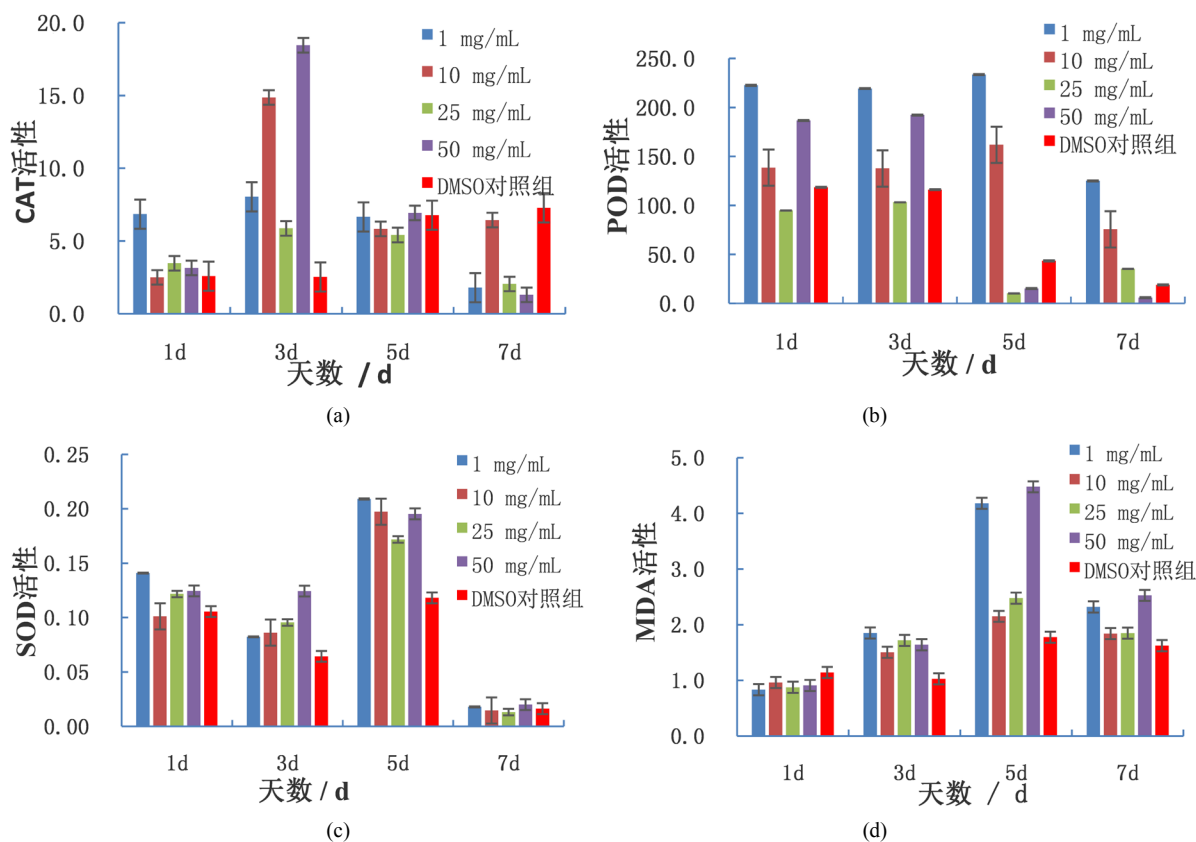
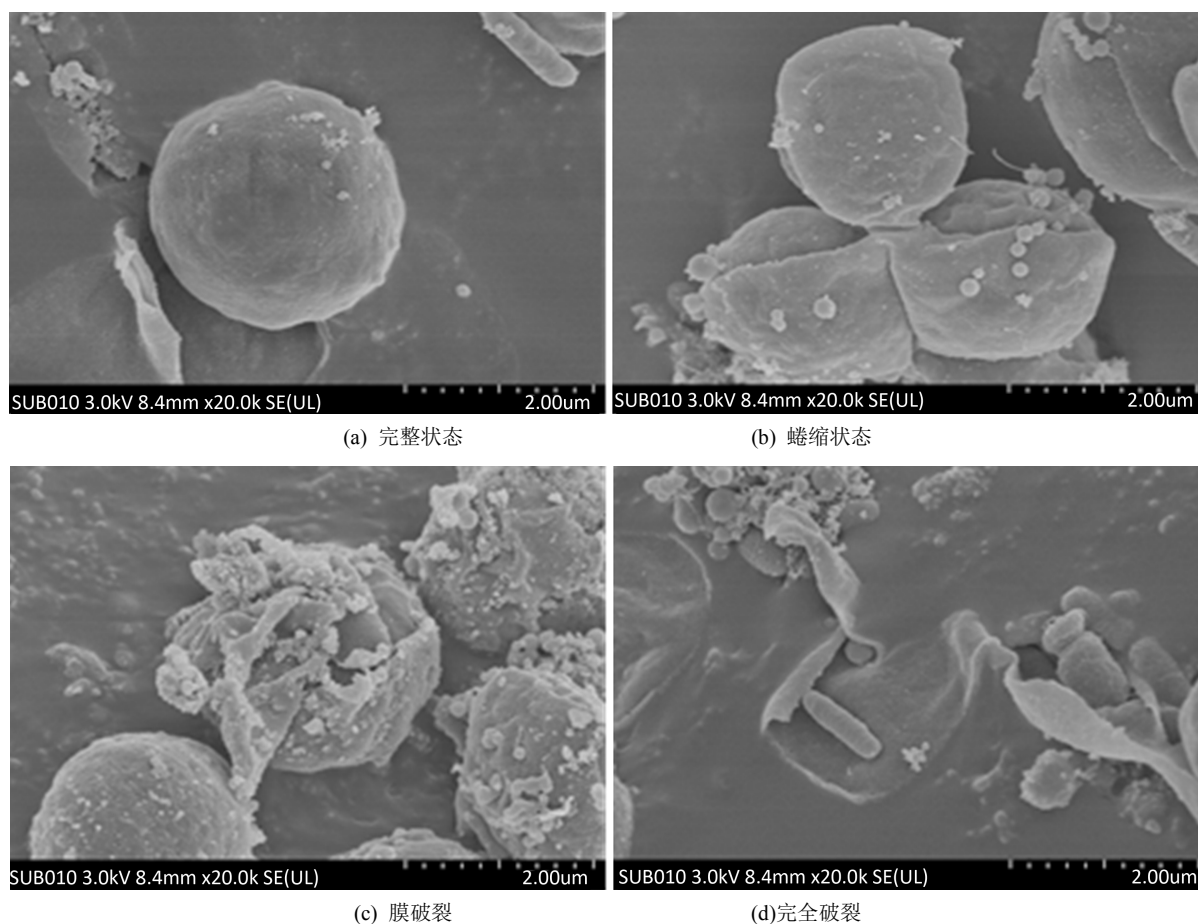


Figure 3. The relation curve between cell number of *Chlorella vulgaris* and absorbance value

图3. 小球藻的细胞数与吸光度值的关系曲线



**Figure 4.** Effect of luteolin on cell integrity of *Chlorella vulgaris*  
**图 4.** 木犀草素对小球藻细胞完整性的影响

### 3.4. 木犀草素对藻细胞完整性的影响

从图 4 可以看出, 小球藻加了木犀草素后, 随着时间的增长, 小球藻细胞结构发生了明显变化, 从完整逐渐蜷缩, 最后发生破裂, 说明 25 mg/L 的木犀草素随着时间推移可以完全杀灭小球藻。

## 4. 结论

通过上述实验可以发现天然小分子化感物质木犀草素对小球藻抗氧化系统有显著的影响, 能够引起超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性以及丙二醛(MDA)含量等显著变化, 符合细胞本身的逆境胁迫防御机制; 扫描电镜显示木犀草素破坏小球藻细胞膜结构并最终导致其细胞破碎衰亡。其  $IC_{50} = 10.68 \text{ mg/L}$  (5 d,  $P < 0.05$ ) 这些结果与文献中[10]相类似, 为天然小分子化感物质对淡水水华的防治提供一定的参考价值。

## 基金项目

2017 年嘉兴学院重点 SRT 项目(85171786)资助。

## 参考文献

- [1] 董静, 高云霓, 李根保. 淡水湖泊浮游藻类对富营养化和气候变暖的响应[J]. 水生生物学报, 2016, 40(3): 615-623.

- [2] 孔繁翔, 高光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考[J]. 生态学报, 2005, 25(3): 589-595.
- [3] 李楠. 木本植物抑藻化感物质的分离、抑藻机理及应用效果研究[D]: [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2009.
- [4] 武赞. 女贞子浸提液对铜绿微囊藻化感抑制作用与机理的研究[D]: [博士学位论文]. 合肥: 安徽大学, 2017.
- [5] 史蕊蕊, 李萌, 裴元生.  $B_2O_3$ - $SiO_2$ - $Na_2O$  缓释抑菌剂的合成及性能表征[J]. 无机材料学报, 2017, 32(5): 529-534.
- [6] 苏跃龙, 王正芳. 不同水生植物抑藻效果及机理研究[J]. 环境科学导刊, 2014(6): 15-22.
- [7] 杨先炯. 稻米中超氧化物歧化酶含量及活性分析[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(2): 11-12.
- [8] 李毅博, 白月梅, 石华荣, 等. 干旱条件下非顺序衰老小麦顶二叶叶绿素及抗氧化酶活性的变化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2017(2): 63-70.
- [9] 李子芳, 吴锡冬. 植物丙二醛含量测定试验设计方案[J]. 天津农业科学, 2016, 22(9): 49-51.
- [10] 黄皓旻. 天然黄酮类化合物的抑藻活性-结构关系、作用机制及抑藻剂开发研究[D]: [博士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2016.

**知网检索的两种方式:**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8844, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [hjcet@hanspub.org](mailto:hjcet@hanspub.org)