

# 久效磷对海洋微藻细胞的活性氧伤害\*

唐学玺 于娟 李永祺

(青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

**提要** 于 1994 年 8 月—1995 年 12 月运用生态毒理学和生物化学实验方法对有机磷农药——久效磷对海洋微藻的毒性机理进行了研究。结果表明,随着久效磷胁迫时间的延长,3 种海洋微藻:扁藻、叉鞭金藻和三角褐指藻细胞的膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量不断提高,与此同时,3 种微藻细胞的电解质外渗率也相应地增加。这说明在久效磷的胁迫压力下,微藻细胞内过量的活性氧引起细胞膜的膜脂过氧化伤害,导致细胞膜透性增加,电解质大量外渗,微藻细胞严重受害,进而生长受到抑制甚至死亡。

**关键词** 膜脂过氧化,久效磷,膜透性,丙二醛

**中图分类号** Q178.1

中国是农药生产和使用大国,有上千家农药厂遍布全国各地,年产农药几千万吨,其中大部分是有机磷农药。有机磷农药在农林业上的应用已有二十多年的历史,其使用量仍在逐年增加,它对近岸海域的污染已引起了人们的普遍关注。关于有机磷农药对海洋生态系统和海洋微藻影响的研究已有陆续报道(陈碧鹃等,1993;唐学玺等,1995;邹立等,1999)。本文在前期工作(唐学玺等,2000)的基础上,继续探讨久效磷对微藻细胞的活性氧伤害机理,以期对保护海洋环境、指导陆地农药的合理使用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

实验用 3 种海洋微藻藻种取自于青岛海洋大学海洋生命学院藻类培养室,分别为扁藻(*Platymonas* sp.)、叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)。

### 1.2 培养方法及条件

培养液选用 *f*/2 营养盐配方,原配方中的  $\text{FeCl}_3$  和 EDTA 以  $20\mu\text{g/L}$  的柠檬酸铁代替,扁藻的培养液需另加脲素至  $10\text{mg/L}$ 。

海水取自青岛鲁迅公园附近海滨,经孔径  $0.45\mu\text{m}$  滤膜抽滤煮沸消毒,冷却后配制培养液。

用于微藻培养的三角瓶,预先在  $1\text{mol/L}$  的稀盐酸中浸泡数日,再分别用含有相应久效磷浓度的培养液预平衡 2 次,每次平衡时间为 1d,以清除实验过程中容器壁的吸附作用。

\* 国家攀登计划 B 资助项目, PDB- 6- 7- 1 号。唐学玺,男,出生于 1965 年 1 月,博士,教授, Fax: 0086- 0532

培养条件为:光照强度 2500—3500lx,光暗比 14h: 10h, pH= 8.0 ± 0.1, 盐度 30.3 ± 1.0, 温度(25 ± 1) °C[三角褐指藻为(17 ± 1) °C], 指数生长期接种。

实验中所用的久效磷为青岛农药厂生产的 40% 水溶性产品, 现用现配。久效磷对 3 种微藻的胁迫浓度分别为: 扁藻 1.46mg/L、叉鞭金藻 3.49mg/L、三角褐指藻 9.47mg/L。

### 1.3 膜脂过氧化作用的测定

参照 Heath 等(1981)和林植芳等(1984)的方法, 根据膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)与硫代巴比妥酸(TBA)的定量反应来测定 MDA 的含量。

### 1.4 膜透性测定

按照上海植物生理学会(1985)的方法进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 久效磷对微藻细胞膜脂过氧化程度的影响

细胞内过量的活性氧会攻击细胞的膜脂引起膜脂过氧化, 从而导致细胞的膜脂过氧化伤害。丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的产物, 其含量可指示细胞膜脂过氧化程度的高低。

从总的变化趋势上看, 在久效磷(培养液中含有半抑制浓度的久效磷)的胁迫下, 扁藻、叉鞭金藻和三角褐指藻的 MDA 含量表现出类似的变化规律性, 即随着胁迫时间的延长, 3 种微藻细胞的 MDA 含量不断增加, 反映了膜脂过氧化作用的增强和微藻细胞膜脂过氧化伤害的加重(表 1)。

表 1 久效磷对海洋微藻丙二醛含量的影响

Tab. 1 The effect of monocrotophos on MDA content in marine microalga

藻种	组别	MDA 含量(μmol/g 鲜重)						
		0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
扁藻	对照组	0.028	0.025	0.027	0.030	0.029	0.027	0.032
	处理组	0.028	0.031	0.034	0.043	0.052	0.062	0.075
三角褐指藻	对照组	0.032	0.032	0.031	0.030	0.034	0.033	0.032
	处理组	0.032	0.037	0.037	0.041	0.045	0.049	0.056
叉鞭金藻	对照组	0.026	0.023	0.028	0.027	0.026	0.027	0.028
	处理组	0.026	0.029	0.032	0.036	0.039	0.046	0.055

扁藻细胞在胁迫的前 24h, MDA 的增加速度比较缓慢, 24h 后, 其 MDA 含量迅速上升, 而叉鞭金藻和三角褐指藻细胞的 MDA 含量在整个胁迫过程中始终平稳地逐渐上升。

从表 1 中还可以看出, 扁藻细胞的 MDA 总的上升速度明显高于叉鞭金藻和三角褐指藻, 且在整个胁迫时间内, 扁藻细胞 MDA 的增加幅度也远远大于后二者, 而三者的对照组, 即在无胁迫压力下培养 72h 的全过程中, 其 MDA 值相对稳定。

以上结果表明, 久效磷的胁迫处理可引起微藻细胞膜脂过氧化作用的加强, 而活性氧对膜脂的伤害是膜脂过氧化作用加强的直接原因。

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的终产物。细胞膜中不饱和脂肪酸的过氧化会影响膜的组成、结构、流动性和通透性等, 使膜遭到伤害。而膜脂过氧化的产物丙二醛也能使膜蛋白、酶发生交联反应, 使它们的结构和功能受到损伤, 正常不能透过膜的物质(如  $Ca^{2+}$ )

的通透量增加, 酶活性发生改变, 膜上受体失活, 导致细胞的代谢、结构与功能发生改变。

## 2.2 久效磷胁迫下 3 种海洋微藻细胞膜透性的变化

细胞膜的通透性可用细胞的电解质外渗率来表示。结果显示, 随着久效磷(半抑制浓度)胁迫时间的延长, 3 种微藻细胞的电解质外渗率基本呈现出类似于 MDA 含量的变化趋势, 即随着胁迫时间的延长, 三者的电解质外渗率逐渐升高, 表明久效磷的胁迫处理使微藻细胞膜的透性变大。

表 2 久效磷对海洋微藻电解质外渗率的影响

Tab. 2 The effect of monocrotophos on electrolyte leaking rate in marine microalga

藻种	组别	电解质外渗率(%)						
		0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
扁藻	对照组	7.5	7.5	7.7	7.7	7.6	7.8	7.6
	处理组	7.5	8.1	11.7	23.4	30.7	43.8	64.4
三角褐指藻	对照组	10.0	9.1	9.3	9.6	9.1	9.2	9.8
	处理组	10.0	11.7	17.1	22.1	36.4	47.2	61.8
叉鞭金藻	对照组	13.1	11.9	12.8	12.6	13.0	12.8	13.2
	处理组	13.1	14.2	16.3	22.4	28.7	31.6	42.4

从实验结果(表 2)还可以看出, 扁藻细胞的离子外渗程度比三角褐指藻和叉鞭金藻更为严重。显然扁藻细胞膜伤害最重。

与相应的 MDA 含量变化情况相比较不难发现, 3 种微藻细胞电解质外渗率的急剧变化明显迟于其 MDA 含量的变化, 这似乎表明细胞膜透性的增加发生于膜脂过氧化作用之后。因此作者认为, 久效磷胁迫下, 膜脂过氧化作用加剧是引起膜伤害, 继而造成电解质大量外渗的一个重要原因。

逆境胁迫对高等植物的脂质过氧化作用及其细胞膜透性的影响已有大量的文献报道。许多学者认为, 水分胁迫、盐害和低温可通过影响活性氧的产生与清除之间的平衡促进细胞的膜脂过氧化作用。膜的脂质双分子层中的不饱和脂肪酸的双键被过氧化分解, 又会使整体膜破坏, 透性增大, 离子泄漏, 引起细胞伤害甚至死亡(曾昭西等, 1987; Dhindsa *et al*, 1981; Rabinowitch *et al*, 1985)。赵可夫等(1993)认为, 盐分胁迫和水分胁迫对植物的作用是不同的, 但它们具有共同的特性, 即均导致植物细胞质膜透性的增大及膜脂过氧化水平的提高。他们的进一步研究表明, 盐分和水分胁迫促进膜脂过氧化作用, 导致膜脂过氧化产物(如 MDA)的积累。然后这些过氧化产物与一些细胞组分进行反应, 导致膜透性增大, 胞内溶质外渗, 外界盐离子进入, 从而破坏了细胞内的离子平衡, 导致代谢紊乱, 抑制生长和发育, 这是盐分和水分胁迫导致的伤害原因之一。

本实验结果表明, 在久效磷胁迫下, 3 种海洋微藻的 MDA 含量不断上升, 膜的通透性也逐渐增加, 且二者的这种变化有显著的正相关性。因此, 久效磷的胁迫使微藻细胞的膜脂过氧化作用加强, 进而导致细胞膜结构的破坏和功能的丧失, 这也是久效磷对细胞形成伤害并抑制其生长繁殖的原因之一。

## 参 考 文 献

- 上海植物生物学会编, 1985. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 60—70
- 陈碧鹃, 陈民山, 1993. 甲基异柳磷、水胺硫磷对海洋藻类、贝类及对虾仔的毒性影响. 海洋环境科学, 12(2): 12—17
- 邹立, 李永祺, 1999. 用 QSAR 法研究有机磷农药对海洋扁藻的构效关系. 海洋与湖沼, 30(2): 206—211
- 林植芳, 李双顺, 林桂珠等, 1984. 水稻叶片衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 26(6): 605—615
- 赵可夫, 邹奇, 李德全等, 1993. 盐分和水分胁迫对盐生和非盐生植物细胞膜脂质过氧化作用的效应. 植物学报, 35(7): 519—525
- 唐学玺, 李永祺, 李春雁等, 1995. 有机磷农药对海洋微藻致毒性的生物学研究. 海洋环境科学, 15(2): 1—5
- 唐学玺, 李永祺, 2000. 4 种海洋微藻对久效磷的抗性与其抗氧化能力的相关性. 海洋与湖沼, 31(4): 414—418
- 曾昭西, 王以柔, 1987. 水稻幼苗的低温伤害与膜脂过氧化. 植物学报, 29(5): 506—512
- Dhindsa R S, Matowe W, 1981. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. J Exp Bot, 32: 19—91
- Heath R L, Packer L, 1981. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys, 125: 189—193
- Rabinowitch H D, Fridovich I, 1985. Growth of *Chlorella sorokiniana* in the presence of sulfite elevates cell content of superoxide dismutase and imparts resistance towards paraquat. Planta, 164: 525—528

## DAMAGE OF ACTIVE OXYGEN TO MARINE MICROALGA CELLS BY MONOCROTOPHOS

TANG Xue-Xi, YU Juan, LI Yong-Qi

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qindao, Qingdao, 266003)

**Abstract** Experiments were carried out in laboratory to measure effects of monocrotophos on three marine microalga with ecotoxicology and biochemistry methods from August, 1994 to December, 1995. Three marine microalga—*Platymonas* sp., *Dicrateria* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* were cultured in *f/2* medium for 72 hours under monocrotophos stress, malondialdehyde (MDA) content and membrane permeability of the microalgae were examined at an intervals of 12 hours by centrifugation, collection and extraction. During the experiment lipid peroxidation became stronger and the content of MDA increased with stress time in three microalga, but there were differences among the three microalga in MDA changes, MDA content did not change much in the first 24 hours and increased obviously after 24h in *Platymonas* sp., while MDA content increased gradually in *Dicrateria* sp. and *phaeodactylum tricornutum*. Moreover, MDA change in *Platymonas* sp. was more distinct than that in the other two microalga. Meanwhile, the permeability of cell membrane in the three marine microalga increased, a lot of electrolytes were released. The membrane permeability increase in *Platymonas* sp. was more obvious than that in the other two microalga. So we conclude that damage of active oxygen can possibly result in growth inhibition or even death of algal cells.

**Key words** Lipid peroxidation, Monocrotophos, Membrane permeability, Malondialdehyde