

# 对硫磷对扁藻和杜氏藻膜脂的 过氧化与脱酯化伤害\*

唐学玺 李永祺 黄健

(青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

**提要** 于1994—1995年,运用急性毒性实验及生化方法对扁藻和杜氏藻的对硫磷毒性效应进行研究。结果表明,对硫磷对扁藻生长的抑制作用明显强于杜氏藻,在对硫磷的胁迫下,两种微藻细胞的超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )相对含量上升,膜透性增大,微粒体膜脂过氧化水平提高。同时,扁藻微粒体膜的磷脂减少,游离脂肪酸含量增加。说明对硫磷可能导致微藻细胞内活性氧增多,从而引起膜损伤,这种膜损伤是膜脂过氧化与脱酯化单独或共同作用的结果。

**关键词** 对硫磷 扁藻 杜氏藻 膜脂 过氧化 脱酯化

**学科分类号** Q198.1

有机磷农药对近岸水域的污染已引起高度重视。一方面,由于害虫抗药性的逐年提高,沿海农林业对农药的需求量越来越大,而农药的使用多集中于雨水较多的夏季,一场大雨往往将喷施于农田的大部分农药冲刷入海;另一方面,沿海农药厂的不断排污,都对沿海近岸水域构成威胁。近10多年来,每到夏季,近岸水域因有机磷农药污染而不断导致大批鱼、虾、贝类死亡,给生物资源和水产养殖业造成严重损害。本文在以前工作(唐学玺等,1997)的基础上,报告对硫磷对扁藻和杜氏藻膜脂过氧化与脱酯化伤害的研究结果,以期进一步探讨有机磷农药对海洋微藻的毒性机理,为监测和消除海洋有机磷农药污染,保护海洋生态系统提供依据。

## 1 材料和方法

实验于1994年2月—1995年11月进行。

### 1.1 藻种选择

实验用扁藻(*Platymonas* sp.)和杜氏藻(*Dunaliella* sp.)由本院微藻培养室提供。

### 1.2 胁迫条件

培养液选用f/2营养盐配方,海水取自青岛鲁迅公园附近海滨,经0.45 $\mu$ m孔径滤膜抽滤煮沸消毒,冷却后配制培养液。采用6组培养液为胁迫压力,培养液中的对硫磷浓度分别为0、2、4、6、8和10mg/L,在指数生长期接种扁藻和杜氏藻,一次性培养72h后,用于各

\* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-7-1号。唐学玺,男,出生于1965年1月,博士,教授,Fax:0086-0532-2879091

收稿日期:1998-03-26,收修改稿日期:1998-08-18

种指标测定。

### 1.3 相对增长率(K)求算法

$K = \lg N_t - \lg N_0 / T$ , 其中  $N_t$  代表培养  $t$  时刻的细胞密度,  $N_0$  代表起始细胞密度,  $T$  为培养时间。

### 1.4 超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )相对含量的测定

参照 Ishii(1987)的肾上腺素氧化法。

### 1.5 膜脂过氧化水平的测定

参照 Heath 等(1968)和林植芳(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。

### 1.6 膜透性测定

参照上海植物生理学会(1985)的方法。

### 1.7 微粒体膜的提取

按 Kendall 等(1989)的方法。

### 1.8 膜脂分析

提取微粒体膜脂并甲酯化, 然后在岛津 GC-9A型气相色谱仪上测定游离脂肪含量(Sims *et al.*, 1962)。以十七酸甲酯作为内标, 玻璃毛细管柱为 OV-225型, 柱长为 37m, 柱温为 225℃, 用超微量法测磷脂含量(李琳等, 1982)。

## 2 结果

### 2.1 对硫磷对扁藻和杜氏藻的生长抑制作用(图1)

由图1可知, 对硫磷对扁藻和杜氏藻的生长均有明显抑制现象。随着对硫磷浓度的不

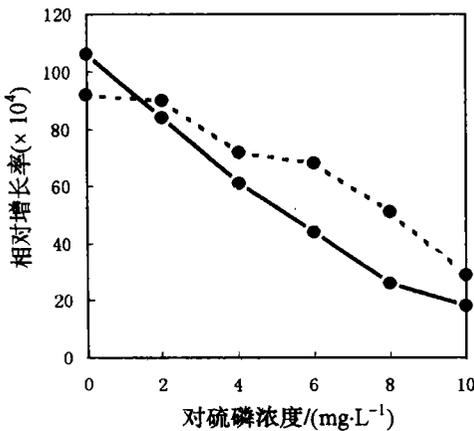


图1 对硫磷对微藻生长的抑制作用

Fig.1 The inhibition effect of parathion on the growth of microalgae

—●— 扁藻, ...●... 杜氏藻, 图2、3、4图例同

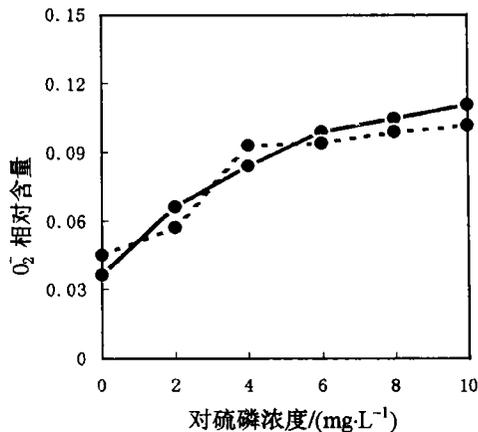


图2 对硫磷对活性氧相对含量(OD<sub>480</sub>)的影响

Fig.2 The effect of parathion on the relative content (OD<sub>480</sub>) of active oxygen

断提高, 二者的相对增长率下降, 由  $K$  值的变化可求得对硫磷对扁藻和杜氏藻的 72h 半抑制剂量( $EC_{50}$ )分别为 4.6mg/L 和 8.3mg/L。由此可见, 对硫磷对扁藻的生长抑制作用明显强于杜氏藻。

## 2.2 对硫磷引起扁藻和杜氏藻活性氧含量的增加(图 2)

超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )是生物体内最重要的一种活性氧,由它可转化成其它形式的活性氧。由图 2 可知,对硫磷处理可引起两种微藻超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )含量的增加,对硫磷浓度低于 6mg/L 时, $O_2^-$ 含量的增加幅度较大;而对硫磷浓度高于 6mg/L 时, $O_2^-$ 含量的增加幅度较小。

## 2.3 对硫磷对微粒体膜脂过氧化的影响

对硫磷胁迫可使扁藻和杜氏藻中的 MDA 含量增加(图 3),且随着胁迫强度的逐渐加大,MDA 含量不断增加,说明两种微藻细胞的微粒体膜脂过氧化水平随胁迫强度的加大而增高。

## 2.4 对硫磷对微粒体膜脂脱酯化的影响

扁藻和杜氏藻分别在其相应的半抑制剂量的对硫磷胁迫下,微粒体膜磷脂和游离脂

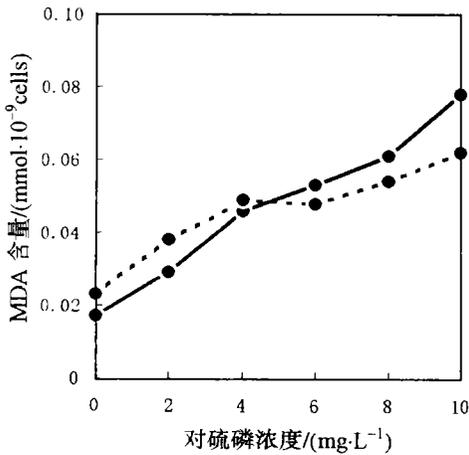


图3 对硫磷对MDA含量的影响

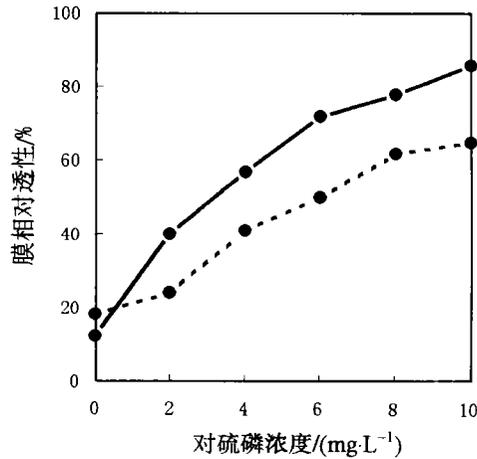


图4 对硫磷对膜透性的影响

Fig.3 The effect of parathion on MDA content

Fig.4 The effect of parathion on membrane permeability

肪酸的含量变化见表 1。由表 1 可知,无胁迫压力下的扁藻膜磷脂含量为 47.4 $\mu$ g/ml 微粒体膜,而在其半抑制剂量(4.6mg/L)胁迫下磷脂含量明显下降,为 27.7 $\mu$ g/ml 微粒体膜;同时,微粒体膜中游离脂肪酸的含量由无胁迫下的 59.7nmol/ml 上升到 102.4nmol/ml 微粒体膜。而对杜氏藻来说,同其对照组比较,在半抑制剂量(8.3mg/L)胁迫下的磷脂和游离脂肪酸的含量均无明显变化。由此可见,对硫磷处理使扁藻膜脂发生了脱酯化,而对杜氏藻无明显影响。

## 2.5 对硫磷对扁藻和杜氏藻膜透性的影响(图 4)

膜的透性大小反映了膜的受伤程度,由图 4 可知,在对硫磷的胁迫下,两种微藻的膜透性均不断增加,扁藻的增加幅度明显高于杜氏藻,说明扁藻膜的受伤程度高

表1 对硫磷对扁藻和杜氏藻微粒体膜磷脂( $\mu$ g/ml)和游离脂肪酸(nmol/ml)含量的影响

Tab.1 The effect of parathion on content of phosphatide ( $\mu$ g/ml) and free fatty acid (nmol/ml) in microsome membrane of *Platymonas* sp. and *Dunaliella* sp.

| 藻种  | 组别  | 磷 脂  | 游离脂肪酸 |
|-----|-----|------|-------|
| 扁 藻 | 处理组 | 27.7 | 102.4 |
|     | 对照组 | 47.4 | 59.7  |
| 杜氏藻 | 处理组 | 50.9 | 65.9  |
|     | 对照组 | 52.7 | 64.4  |

于杜氏藻。

### 3 讨论与结语

#### 3.1 扁藻和杜氏藻的膜伤害与活性氧积累的相关性

随着对硫磷浓度的不断提高,两种微藻的膜透性不断增加,表明膜的损伤程度不断加重。在膜透性增加的同时,伴随有微藻活性氧含量及微粒体膜 MDA 含量的增加,说明膜损伤的加剧与活性氧的积累以及引发的膜脂过氧化密切相关。膜的伤害将直接影响着微藻的生长与繁殖,这可能也是对硫磷抑制微藻生长的一个主要原因。

#### 3.2 扁藻和杜氏藻对对硫磷的敏感性差异分析

由两种微藻的膜透性变化可知,在对硫磷胁迫下,扁藻的膜透性明显高于杜氏藻,表明扁藻膜的伤害程度比杜氏藻严重。另外,由对硫磷对二者的 72h 半抑制剂量可知,扁藻在胁迫条件下的生长抑制性远远强于杜氏藻。这些都说明,与杜氏藻相比,扁藻对对硫磷的胁迫表现出更强的敏感性。作者认为原因可能在于:扁藻在对硫磷胁迫下膜脂过氧化和脱酯化同时发生,而杜氏藻仅有膜脂过氧化发生,即扁藻膜的伤害是由膜脂过氧化和膜脂脱酯化共同引起的,而杜氏藻膜的伤害只是由膜脂过氧化单独引起的。

#### 3.3 扁藻膜脂过氧化与脱酯化的相关性

逆境(干旱、盐害、污染等)胁迫下膜脂过氧化和脱酯化的研究在高等植物中已有许多报道。吕庆等(1996)用活性氧( $O_2^-$ 和 $\cdot OH$ )处理小麦叶片微粒体膜,不仅发现 MDA 增多和脂肪酸不饱和度下降,表明膜脂过氧化水平升高,还发现膜的磷脂减少和游离脂肪酸增多,表明膜脂也发生了脱酯化。Senaratna 等(1984, 1985)用干旱和活性氧胁迫下大豆胚轴微粒体膜脂不饱和度不变来证实他们测得的是原发性的脱酯化,而不是通过膜脂过氧化继发的脱酯化,但 Senaratna 等并没有同时测定膜脂过氧化。本文在测定脱酯化的同时也测定了过氧化,发现扁藻中过氧化和脱酯化并存,而杜氏藻中只发生了膜脂过氧化,因此作者认为膜脂过氧化与脱酯化可在微藻中同时发生,亦可单独发生。目前尚不能确定膜脂过氧化与脱酯化的因果关系,即脱酯化是原发性的还是继发性的,或者原发性和继发性兼有,有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- 上海植物生理学会编, 1985. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科技出版社, 67—70
- 吕 庆, 郑荣染, 1996. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化及脱酯化. 中国科学(C 辑), 26(1): 26—30
- 李 琳, 焦新之, 1982. 应用孔雀石绿染料比色测定千克分子量水平无机磷和磷脂的超微量方法. 植物生理学通讯, 2: 52—54
- 林植芳, 1984. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 26: 605—615
- 唐学玺, 李永祺, 李春雁等, 1997. 久效磷胁迫下扁藻和三角褐指藻脂质过氧化伤害的研究. 海洋学报, 19(1): 139—143
- Heath R L, Packer L, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys, 125: 189—198
- Ishii S, 1987. Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplast from oat leaves. In Vitro, 23: 653—657
- Kendall E J, Mckersie B D, 1989. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. Physiol Plant, 78(1): 86—94

Senaratna T, Mckersie B D, Stinson R H, 1984. The association between membrane phase properties and dehydration injury in soybean axes. *Plant Physiol*, 76(3): 759—762

Senaratna T, Mckersie B D, Stinson R H, 1985. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radical. *Plant Physiol*, 77(2): 472—474

Sims R P A, Larose J A G, 1962. The use of iodine vapor as a general detection agent in the thin layer chromatography of lipids. *The J Amer Oil Chem Soc*, 39: 232

## DAMAGE OF PARATHION ON *PLATYMONAS* SP. AND *DUNALIELLA* SP. BY MEMBRANE LIPID PEROXIDATION AND DEESTERIFICATION

TANG Xue-xi, LI Yong-qi, HUANG Jian

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

**Abstract** During 1994—1995, the toxic effect of parathion on two marine microalgae was analyzed with acute toxicity and biochemistry methods. The results show that the 72h • EC<sub>50</sub> of *Platymonas* sp. was 4.6mg / L, while 72h • EC<sub>50</sub> of *Dunaliella* sp. was 8.3mg / L; therefore, the growth inhibition of parathion on *Platymonas* sp. was stronger than that on *Dunaliella* sp.. Under parathion stress, the content of active oxygens increased significantly, membrane permeability enlarged, and membrane lipid peroxidation increased remarkably in two marine microalgae. Under parathion stress, the content of free fatty acid increased and phospholipid content decreased only in *Platymonas* sp.. It was concluded that membrane damage in algal cell resulted from excess active oxygens which was produced by algae under parathion stress. In *Platymonas* sp., the membrane damage appeared by means of membrane lipid peroxidation and deesterification together; while in *Dunaliella* sp., it was membrane lipid peroxidation alone that resulted in membrane damage, without any relation to deesterification.

**Key words** Parathion *Platymonas* sp. *Dunaliella* sp. Membrane lipid Peroxidation Deesterification

**Subject classification number** Q198.1