

4 种海洋微藻对久效磷的抗性 与其抗氧化能力的相关性*

唐学玺 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, 选用扁藻、叉鞭金藻、三角褐指藻及盐藻 4 种海洋微藻为材料进行海洋微藻对久效磷的抗性与抗氧化能力相关性的实验。结果表明, 久效磷在胁迫过程中, 微藻细胞内产生了过量的对细胞有伤害作用的活性氧, 4 种海洋微藻细胞内活性氧清除酶——超氧化物歧化酶的活性高低依次为盐藻> 三角褐指藻> 叉鞭金藻> 扁藻。比较毒性实验证明: 4 种海洋微藻对久效磷的抗性大小依次为盐藻> 三角褐指藻> 叉鞭金藻> 扁藻, 说明 4 种海洋微藻对久效磷的抗性与其本身抗氧化能力具一定的正相关性, 活性氧对细胞的伤害是久效磷毒害的重要原因之一。

关键词 海洋微藻 活性氧 超氧化物歧化酶 抗氧化

学科分类号 Q178.1

近年来, 由于沿海农、林、果种植业的发展, 加上害虫抗药性的提高, 有机磷等农药的使用量大增。由于有机磷农药污染, 近岸水域鱼、虾、贝死亡事故屡有发生, 对沿海海洋生物的生存和水产养殖业的发展构成了威胁。有关石油、重金属、有机污染、放射性和有机氯农药对海洋微藻的影响已有大量研究报告(李永祺等, 1991; 陈国蔚等, 1994; Oya, 1994), 而关于有机磷农药对海洋微藻的毒性效应的研究相对较少(陈碧鹃等, 1993; Wong, 1988; 邹立等, 1999)。已有的污染物对海洋微藻的毒性效应研究, 主要是对个体、群体和超微结构的影响, 涉及致毒机理的研究甚少。大多数学者认为, 有机磷农药对水生动物的毒性机理, 主要是抑制乙酰胆碱酯酶的活性, 从而干扰和损伤神经系统。微藻没有神经系统, 有机磷农药对其致毒机理应当有别于水生动物。开展有机磷农药对微藻的毒性机理研究, 不仅是水生环境毒理学的一项基础性工作, 而且对于沿海地区农药的合理使用, 以及保护海洋生物多样性和促进水产业的持续发展均有重要意义。本文报道这一研究结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用青岛海洋大学海洋生命学院藻类培养室提供的 4 种海洋微藻: 扁藻(*Platymonas*

* 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: 0086-0532-2032799

sp.)、叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)和盐藻(*Dunaliella* sp.)。

培养液选用 $f/2$ 营养盐配方, 原配方中的 FeCl_3 和 EDTA 以 $20\mu\text{g/ml}$ 的柠檬酸铁代替, 扁藻的培养液需另加脲素至 10mg/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。

微藻培养的三角瓶, 预先在 1mol/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对久效磷的吸附作用。

培养条件为: 光强 $2500\text{--}3500\text{lx}$ 、光暗周期比 $14:10$ 、 $\text{pH} = 8.0 \pm 0.1$ 、盐度 30.0 ± 1.0 、温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (三角褐指藻为 $17 \pm 1^\circ\text{C}$), 指数生长期接种。实验中所用久效磷为青岛农药厂生产的 40% 水溶性产品, 现配现用。

1.2 相对增长速率(K) 求算方法

$$K = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{T}$$

其中, N_t 为培养 t 时刻的细胞密度, N_0 为起始细胞密度, T 为培养时间。

1.3 超氧化物歧化酶活性检测

采用 Beauchamp 等(1971)建立, Bewley 等(1979)改进的氮蓝四唑光化学还原反应法。

1.4 超氧阴离子自由基的检测

参照 Ishii(1987)的肾上腺素氧化法测定。

2 结果与讨论

2.1 4 种海洋微藻对久效磷抗性的差异性

图 1a 结果表明: 久效磷对扁藻、叉鞭金藻和三角褐指藻的生长有严重的抑制作用。随着培养液中久效磷浓度的逐渐提高, 其相对增长率逐渐下降。由 K 值的变化求得它们半抑制剂量(72hEC_{50}) 分别为扁藻: 1.46mg/L ; 叉鞭金藻: 3.49mg/L ; 三角褐指藻: 9.74mg/L 。盐藻与前三者相比呈现出对久效磷较高的抗性, 在所使用的胁迫浓度范围内, 其生长未受到明显的抑制, 即 72hEC_{50} 超过 12mg/L 。因此, 4 种微藻对久效磷的抗性大小依次为盐藻 > 三角褐指藻 > 叉鞭金藻 > 扁藻。扁藻为最敏感的藻种。

2.2 久效磷胁迫下微藻细胞超氧化物歧化酶(SOD) 活性的变化

总体上, 在久效磷胁迫下 4 种海洋微藻细胞的 SOD 活性变化有一定的规律性(图 1b)。扁藻和三角褐指藻随着培养液中久效磷浓度的提高, 其 SOD 活性逐渐降低, 且扁藻的下降幅度大于三角褐指藻。叉鞭金藻的 SOD 活性在低浓度的胁迫下呈现上升趋势, 而随着胁迫压力的不断增大, 其 SOD 活性又逐渐下降。盐藻细胞内的 SOD 活性高于其它 3 种微藻, 久效磷对其 SOD 活性的影响不明显, 在整个胁迫过程中, 其 SOD 始终保持相对稳定的高活性水平。

从 SOD 活性变化的总趋势可以看出, 扁藻 SOD 活性在整个胁迫过程中, 始终处于最低水平, 叉鞭金藻和三角褐指藻较高, 盐藻最高, 即 4 种微藻按照胁迫过程中 SOD 活性的高低依次排列为盐藻 > 三角褐指藻 > 叉鞭金藻 > 扁藻。因此可以推断, 4 种海洋微藻对

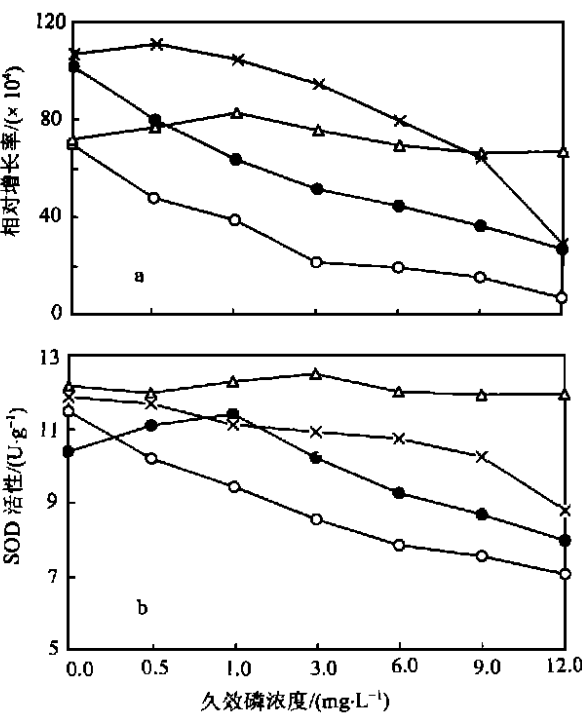


图 1 久效磷对 4 种海洋微藻相对增长率(a) 和 SOD 活性(b) 的影响

Fig. 1 The effect of monocrotophos on the relative growth (a) and SOD activity (b) of 4 species of microalgae
○ 扁藻; ● 叉鞭金藻; △ 盐藻; × 三角褐指藻

细胞内产生了大量的超氧阴离子自由基。而超氧阴离子自由基是生物体内的一种重要的活性氧,是氧进行单电子还原首先生成的产物,由它可以转换成多种其它形式的活性氧。因此,久效磷的胁迫处理,无疑会引起藻细胞内活性氧总量的提高,造成活性氧的积累,对细胞产生氧化伤害。

表 1 不同处理组的扁藻细胞对肾上腺素的氧化强度(OD₄₈₀)

Tab.1 The epinephrine oxidation intensity (OD₄₈₀) of different treated *Platymonas* sp.

组 别	处理时间(h)		
	0	36	72
对照组	0.032±0.004	0.037±0.006	0.036±0.004
处理组	0.036±0.007	1.011±0.008	1.136±0.003
对照组+ 35μg/ml SOD	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
处理组+ 35μg/ml SOD	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
对照组+ 35μg/ml 灭活 SOD	0.034±0.003	0.034±0.007	0.031±0.005
处理组+ 35μg/ml 灭活 SOD	0.035±0.004	0.997±0.006	1.138±0.004

久效磷的抗性与其 SOD 活性有一定的正相关性。即抗性弱的扁藻其细胞内 SOD 的活性较低,抗性强的盐藻其 SOD 活性较高,而抗性居中的三角褐指藻和叉鞭金藻其活性大小也居其间。

2.3 久效磷胁迫下微藻细胞内超氧阴离子自由基的检出

对照组扁藻在不加久效磷的培养液中培养 0、36、72h 时,对肾上腺素的氧化强度皆较弱;在含有半抑制剂量久效磷的培养液中培养 0、36、72h 的处理组细胞,除 0h 对肾上腺素的氧化强度较弱外,后二者(培养 36h 和 72h)则对肾上腺素的氧化能力显著增加。对照组和处理组的扁藻细胞当加入 35μg/ml 的 SOD 时,会完全抑制其对肾上腺素的氧化作用。而当加入已煮沸灭活的 SOD 时,它们对肾上腺素的氧化能力没有影响(表 1)。其余 3 种微藻细胞的测试结果与扁藻类似。这表明处理组对肾上腺素氧化作用的加强是由于久效磷的胁迫处理导致扁藻

McCord 等(1969)提出的生物自由基伤害学说,已广泛用于植物的抗逆生理及逆境胁迫下植物细胞伤害机理的研究。在逆境(盐害、低温、病害、干旱、污染)胁迫下,生物体内产生的活性氧如果得不到及时清除,常常会造成生物体的活性氧伤害。作者以扁藻等为实验材料,以久效磷为胁迫因子的实验结果也证实了这一点。微藻细胞在久效磷的胁迫下,其对肾上腺素的氧化强度远远高于未经久效磷处理的对照组,表明其细胞内由于久效磷的胁迫产生了大量的超氧阴离子自由基,势必会对细胞造成伤害。

研究表明,植物细胞内产生的过量活性氧会参与逆境胁迫对细胞的伤害作用。所以海洋微藻对逆境压力的抗性与其本身的抗氧化能力密切相关。微藻细胞的抗氧化系统有 2 种,其一为酶系统,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等;其二为非酶系统,主要指细胞内的一些抗氧化物质,2 种系统共同来完成活性氧的清除。

4 种海洋微藻对久效磷的抗性与它们的抗氧化能力呈现出一定的正相关性。盐藻与其它 3 种微藻相比,对久效磷的抗性最强,这与它具有较强的抗氧化能力有关。众所周知,盐藻富含一种抗氧化物质即 β -胡萝卜素,是提取 β -胡萝卜素的重要原料。而且实验结果表明,盐藻的 SOD 活性最高,这无疑决定了盐藻细胞清除活性氧的能力较强。对三角褐指藻来说,它一方面具有较高的 SOD 活性,另一方面包含有类似 β -胡萝卜素活性的抗氧化物质——墨角藻黄素(Kawakami *et al*, 1994),二者均能有效地清除活性氧,这也可能是它对久效磷的抗性高于叉鞭金藻和扁藻原因之一。相比之下,扁藻的 SOD 活性最低,对久效磷的抗性最弱。

综上所述,可以认为活性氧参与了久效磷对微藻细胞的毒害,微藻细胞对久效磷的抗性与活性氧的伤害及细胞的抗氧化能力有着密切的联系。

参 考 文 献

- 李永祺,丁美丽,1994. 海洋污染生物学. 北京:原子能出版社,31—35
- 陈国蔚,李 云,赵心玉,1994. 三丁基锡对扁藻超微结构的影响. 海洋与湖沼,25(1):60—70
- 陈碧韵,陈民山,1993. 甲基异柳磷、水胺硫磷对海洋藻类、贝类及对虾仔虾的毒性影响. 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
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. Anal Biochem, 44: 276—287
- Bewley R D, 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. Ann Rev Plant Physiol, 30: 195—238
- Ishii S, 1987. Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplast from oat leaves. In Vitro, 23: 653—657
- Kawakami Y, Kikuchi M, 1994. 3rd International Marine Biotechnology Conference. Tromsø, Norway, 107—111
- McCord J W, Fridovich I, 1969. Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem, 193: 353—358
- Oya S O, 1994. Effect of two herbicide wastewaters on *Chlorella* sp. and *Phaeodactylum triacutum*. Environ Pollut, 84: 1—6
- Wong P K, 1988. The effect of 2, 4- D and organophosphorus pesticides on growth, photosynthesis and Chlorophyll- *a* synthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Pollut, 55: 179—189

RELATIONSHIP BETWEEN MONOCROTOPHOS RESISTANCE AND ANTIOXIDIZATION IN FOUR SPECIES OF MARINE MICROALGAE

TANG Xue-xi, LI Yong-qi

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

Abstract During Aug. 1994—Dec. 1995, an experiment was carried out to investigate the relationship between monocrotophos resistance and antioxidation in four species of marine microalgae using ecotoxicology and biochemistry methods. The results showed that excess active oxygens were induced in algal cells under monocrotophos stress, and the active oxygen caused the damage of alga cells. The order of superoxide dismutase (SOD)'s activities for scavenging active oxygen in four species was: *Dunaliella* sp. > *Phaeodactylum tricornutum* > *Dicrateria* sp. > *Platymonas* sp.; and monocrotophos resistance of the four species was in the same order *Dunaliella* sp. > *Phaeodactylum tricornutum* > *Dicrateria* sp. > *Platymonas* sp.. All these indicated that close relationship between monocrotophos resistance and antioxidation in the four species of marine microalgae were obvious, and damage of the active oxygens was one of the main reasons for monocrotophos-induced toxic damage to the four species of marine microalgae.

Key words Marine microalgae Active oxygen Superoxide dismutase Antioxidization

Subject classification number Q178.1

声 明

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入该数据库, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理。网址: [Http://www.cnki.net](http://www.cnki.net); [Http://www.chinajournal.net.cn](http://www.chinajournal.net.cn)