久效磷对三角褐指藻的毒性

唐学玺 李永祺

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

摘 要 久效磷对饵料单胞藻——三角褐指藻有严重的生长抑制作用。在其毒害下,三角褐指藻细胞的超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性降低,活性氧在细胞内大量积累,膜脂过氧化作用加强,膜透性增大,细胞内的电解质大量外漏,细胞严重受害。研究表明:活性氧参加了久效磷对三角褐指藻细胞的伤害,并是抑制藻细胞生长的主要原因之一。

关键词 三角褐指藻,久效磷,活性氧,超氧化物歧化酶,膜脂过氧化

自80年代起,有机磷农药以其毒效大、易分解的特点代替了有机氯农药,并在农业与林业生产上得到了广泛的使用。目前,有机磷农药对近岸水域的污染已引起人们的高度重视。近10年来,近岸水域因有机磷农药污染不断导致大批鱼虾贝死亡事故,给生物资源和水产养殖业造成严重损害。

大多数学者认为,有机磷农药对昆虫、淡水鱼类和哺乳动物的致毒机理主要是抑制和使乙酰胆碱酯酶失活,从而导致神经系统的紊乱和伤害。单细胞藻不具备神经系统,有机磷农药对其伤害机理应当别于动物体。我们选用海水养殖中常用的单细胞藻饵料——三角褐指藻为材料,研究久效磷对其作用机理,对发展海洋环境科学、保护和促进我国海水养殖业的健康持续发展具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 藻种来源

实验所用的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutun*)来自本院微藻培养室。

1.2 培养方法及条件

按照唐学玺等[1995]的方法及条件进行。久效磷的处理浓度为其对三角褐指藻的72小时半抑制剂量(72h·EC_{50})9.74 mg/L,实验中处理组和对照组各设三个平行样。实验结果取三个样的平均值。

1.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性检测

采用Beauchamp和Fridovich[1971]所建立,Bewley等[1979]改进的氮蓝四唑光化学还原反应法。

收稿日期:1996-06-17

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4　过氧化物酶(POD)活性检测

参照 Chance 和 Mathly[1955]建立, Srivestava 和 Van Huystee[1973]改进的愈创木酚法。

1.5　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

1.6　膜脂过氧化作用的测定

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

1.7　电解质外渗率的测定

根据上海植物生理学会[1985]的方法进行。

2　结果

2.1　三角褐指藻细胞中超氧阴离子自由基的检出

对照组的三角褐指藻在无久效磷压力下培养 72 小时的全过程中,对肾上腺素的氧化强度都较弱;而在半抑制剂量(9.74 mg/L)久效磷的培养液中随着培养时间的延长,处理组对肾上腺素的氧化能力显著增加(表 1)。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三角褐指藻细胞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中一类重要的活性氧,会对细胞构成伤害。

表 1　不同处理后的三角褐指藻对肾上腺素的氧化程度

Table 1 The epinephrine oxidation intensity of different treated *Phaeodactylum tricornutum*

材　料	对照组			处理组		
	0	36 小时	72 小时	0	36 小时	72 小时
肾上腺素氧化强度 OD_{480}	0.049±0.006	0.051±0.003	0.042±0.005	0.047±0.007	0.991±0.006	1.207±0.009

2.2　三角褐指藻膜脂过氧化程度及膜透性的变化

表 2 表明:对照组(培养液中不含久效磷)的丙二醛(MDA)含量和电解质外渗率在培养过程中变化极不明显;而三角褐指藻的处理组(培养液中含有半抑制剂量的久效磷)细胞,无论是 MDA 的含量,还是电解质外渗率在培养过程中均不断增加。即随着胁迫时间的延长,二者均表现出逐渐上升的趋势。

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的产物,它的含量可作为膜脂过氧化程度的指标;而电解质外渗率直接反映出细胞膜透性的变化。三角褐指藻细胞 MDA 含量和电解质外渗率的上升变化反映了久效磷胁迫下膜脂过氧化作用的增强和细胞膜脂过氧化伤害的加重。分析表明,久效磷对 MDA 含量($t=2.898, P<0.02$)和电解质外渗率($t=2.702, P<0.02$)有显著影响。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 久效磷的不同处理时间对三角褐指藻脂质过氧化和膜透性的影响

Table 2 The effect of monocrotophos on lipid peroxidation and membrane permeability of *Phaeodactylum tricornutum*

胁迫时间(小时)		0	12	24	36	48	60	72
MDA含量(μmol/10^9个细胞)	对照组	0.032±0.002	0.032±0.003	0.031±0.006	0.030±0.003	0.035±0.002	0.034±0.002	0.032±0.002
	处理组	0.032±0.003	0.036±0.005	0.036±0.002	0.039±0.007	0.044±0.007	0.048±0.003	0.056±0.005
电解质外渗率(%)	对照组	8.9±1.0	8.5±2.1	8.5±1.4	8.7±2.4	9.0±0.9	9.1±2.7	9.0±1.3
	处理组	8.9±0.7	9.4±1.1	17.4±3.7	22.7±4.1	39.6±4.9	50.1±6.1	61.4±4.4

2.3 久效磷对三角褐指藻超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

久效磷对三角褐指藻细胞SOD活性的影响显著(图1,t=2.488,P<0.05)。与对照组相比,在久效磷胁迫的前36小时,处理组SOD活性保持相对稳定,变化不明显。而36小时过后,其活性随着胁迫时间的延长急剧下降。SOD是一切需氧有机体内清除活性氧,使机体免受氧化伤害的一种关键性保护酶,它的活性的降低无疑使三角褐指藻细胞清除活性氧的能力有所下降。

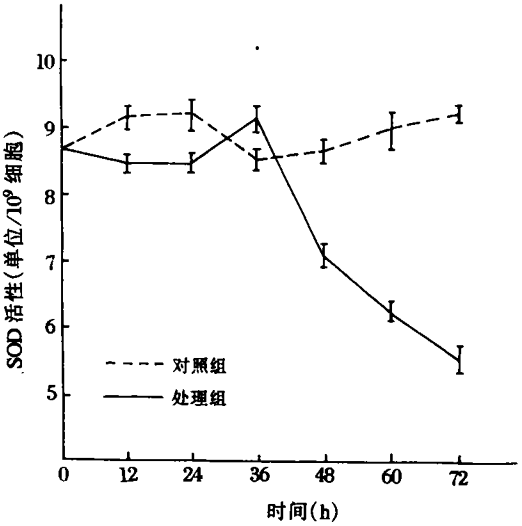

图1 久效磷对三角褐指藻SOD活性的影响

Fig.1 The effect of monocrotophos on SOD activity of *Phaeodactylum tricornutum*

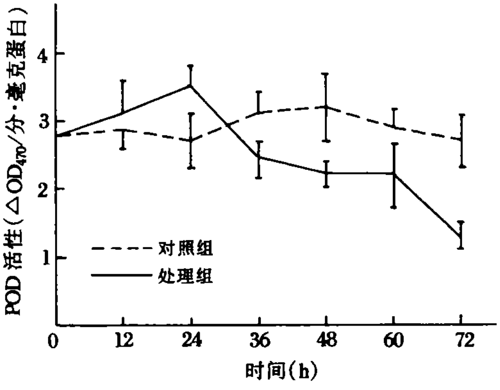

图2 久效磷对三角褐指藻POD活性影响

Fig.2 The effect of monocrotophos on POD activity of *Phaeodactylum triornutum*

2.4 久效磷对三角褐指藻过氧化物酶(POD)活性的影响

以经久效磷处理过的三角褐指藻(处理组)和未经久效磷处理的三角褐指藻(对照组)为材料,进行POD活性分析。结果如图2所示。首先,在久效磷胁迫的前24小时,POD的活性略有升高,24小时过后,随着培养时间的延长,活性逐渐降低。胁迫后期POD活性的逐渐降低再次证明了久效磷的胁迫使三角褐指藻细胞清除活性氧的能力下降。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

3.1　久效磷胁迫下三角褐指藻细胞的膜脂过氧化伤害

McCord和Fridovich[1969]提出的生物自由基伤害学说,已广泛应用于逆境(污染、盐害、病害等)胁迫对植物细胞伤害机理的研究。植物在逆境胁迫下,往往会打破固有的活性氧产生与消除间的平衡,使活性氧在细胞内过量产生并积累。在久效磷的胁迫压力下,三角褐指藻细胞内活性氧产生与消除间的平衡同样地遭到破坏,使得超氧阴离子自由基在细胞内大量产生并积累。超氧阴离子自由基在细胞内可以转换成多种形式的活性氧,最终导致活性氧总量的增加。

细胞内过量的活性氧会攻击细胞膜脂中的不饱和脂肪酸,造成膜脂过氧化作用,进而导致细胞膜结构的破坏和功能的丧失[Stewart和Bewley 1980]。MDA是膜脂过氧化的产物,其含量的高低指示着膜脂过氧化的水平,而细胞的电解质外渗率可直接反映出细胞膜的通透性。我们从三角褐指藻为材料的实验结果充分证明:久效磷胁迫下细胞内产生的过量活性氧引起了细胞的膜脂过氧化伤害,导致细胞膜的通透性增加,大量离子外渗,细胞代谢紊乱,生长和繁殖受到抑制。

3.2　久效磷胁迫下SOD和POD在清除三角褐指藻细胞内活性氧中的作用

在大气污染、低温、干旱、盐分和强光辐射等逆境胁迫下,植物体内的活性氧产生能力大于清除能力,相对过量的活性氧能影响生物膜与其它大分子的结构与功能。SOD和POD等活性氧清除酶具有维持活性氧代谢平衡,保护膜结构的功能[王建华等 1989,Mali和Mehta 1977]。据报道,许多高等植物在环境胁迫下受到伤害时,常常会伴有活性氧的过量积累及SOD和POD活性的降低。三角褐藻的实验结果基本类似于这种情况。在久效磷胁迫的初期阶段,SOD和POD的活性保持相对稳定并有所升高,使三角褐指藻细胞清除活性氧的能力增强。这可能是三角褐指藻为维持其细胞内活性氧平衡,防御细胞免受活性氧伤害,从而有效地抵抗久效磷的毒性胁迫而作出的积极性适应反应。与此同时,细胞的电解质外渗率和膜脂过氧化强度的变化也表现得相对不明显,这充分证明了此间藻细胞的受害较轻。在胁迫的后期,随着久效磷胁迫时间的逐渐延长,SOD和POD的活性都急剧下降,使藻细胞清除活性氧的能力降低,藻细胞的膜透性及由活性氧伤害而引发的膜脂过氧化作用相应地显著增加,这是三角褐指藻细胞的伤害性反应,且表明此时的细胞伤害较为严重。

鉴于上述,我们认为,久效磷对三角褐指藻形成毒害的主要原因之一为:在久效磷的胁迫下,藻细胞的SOD和POD活性下降的同时,也降低了藻细胞清除活性氧的能力,从而打破了活性氧的代谢平衡,造成活性氧的过量产生和积累,并进而引发膜脂过氧化作用,对细胞形成膜脂过氧化伤害。

国家攀登B(PDB6-7-1)和山东省自然科学基金(Y94D0335)资助项目。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参 考 文 献

上海植物生理学会编.1985.植物生理学实验手册.上海出版社.67~70.

王建华,刘鸿先,徐 同.1989.超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老中的作用.植物生理学通讯,(1):1~7.

林植芳,李双顺,林桂珠等.1984.水稻叶片的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,26:605~615.

唐学玺,李永祺,李春雁等.1995.四种海洋微藻对久效磷的耐受力与其SOD活性的相关性.海洋环境科学,14(2):1~5.

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. Anal Biochem, 44: 276~278.

Bewley T D. 1979. Physiological aspects of desication tolerance. Ann Rev Plant Physiol, 30: 195~238.

Chance B, Mathly A C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. In: Lester Paches, ed. Method in enzymology. New York: Academic Press Inc. 764~765.

Heath R L, Packer L. 1981. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Chem 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.

Mali P C, Mehta S L. 1977. Effect of drought on proteins and isoenzymes in rice during germination. Phytochemistry, 16: 643~646.

McCord J M, Fridovich I. 1969. Superixide dismutase: An enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem, 224: 6049~6055.

Srivastava O P, Van Huystee P B. 1973. Evidence for close association of POD polyphenol oxidase and IAA oxidase isoenzyme of peanut suspension culture medium. Can J Bot, 51: 2207~2215.

Steward R R C, Bewley J D. 1980. Lipid peroxidation assoeiated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiol, 65: 245~248.

THE TOXIC EFFECT OF MONOCROTOPHOS ON *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

TANG Xue-Xi, LI Yong-Qi

(*Marine Life Science College*, *Ocean University of Qingdao*, 266003)

ABSTRACT Monocrotophos could heavily inhibit the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. During early period of stress, algal cells were able to maintain higher activity of SOD and POD, less lipid peroxidation and normal membrane permeability. With the prolonged time of stress, activity of SOD and POD lowered, active oxygens accumulated much more, lipid peroxidation became stronger, membrane permeability enlarged and a lot of electrolytes leaked. These indicated that active oxygens participated in the damage of monocrophos to *phaeodactylum tricoenutum*, and it was one of the main reason why monocrotophos could inhibit algal growth.

KEYWORDS *Phaeodactylum tricornutum*, Monocrotophos, Active oxygen, Superoxide dismutase, Lipid peroxidation

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net