

久效磷对叉鞭金藻的毒性

唐学玺 李永祺

(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)

摘 要 在有机磷农药—久效磷的胁迫下, 饵料单胞藻—叉鞭金藻的生长和繁殖严重地受到了抑制。随着胁迫时间的延长, 藻细胞的过氧化物酶活性降低, 活性氧在细胞内大量积累, 膜脂过氧化产物—丙二醛的含量和电解质外渗率同步增加; 而在胁迫的整个过程中, 藻细胞的超氧化物歧化酶活性呈无规则的变化。表明在久效磷的胁迫下活性氧引起了细胞的膜脂过氧化伤害; 与超氧化物歧化酶相比。过氧化物酶在叉鞭金藻清除活性氧的过程中起着更有效的作用。

关键词 久效磷, 单胞藻, 过氧化物酶, 叉鞭金藻

海洋单胞藻是鱼虾贝人工育苗中必不可少的基础饵料。我们在前文工作的基础上, 选用饵料效果好的叉鞭金藻为材料, 继续研究久效磷对它的毒性作用, 这对于弄清久效磷对海洋单胞藻的毒性机制, 发展我国海水养殖业有重要意义。

1 材料和方法

1.1 藻种选用

本实验选用海水养殖中饵料效果较好的叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.), 取自本院微藻培养室。

1.2 培养方法及条件

按照唐学玺等[1995]的方法及条件进行, 实验中处理与对照组各设三个平行样, 实验结果为三次重复的平均值。处理组中久效磷的浓度为其对叉鞭金藻的 72 小时半抑制剂量 3.49 mg/L。

1.3 超氧化物歧化酶(SOD)活性检测

采用由 Beauchamp 和 Fridovich[1971]建立、Bewley[1979]改进的光化学还原反应法。

1.4 过氧化物酶(POD)活性的测定

采用改进后的愈创木酚法[Chance 和 Mathly 1955, Srivestava 和 Huystee 1973]进行。

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

根据膜脂过氧化产物丙二醛与硫代巴比妥酸(TBA)定量反应的关系来测定MDA的含量,以指示膜脂过氧化程度[Heath和Packer 1981,林植芳等1984]。

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 叉鞭金藻细胞中超氧阴离子自由基的检出

表1说明,未经久效磷处理(培养液中不含久效磷)的对照组细胞随着培养时间的延长,其对肾上腺素的氧化能力保持相对稳定,始终处于一个较低的氧化水平。而在半抑制剂量(3.49mg/L)久效磷胁迫下的处理组对肾上腺素的氧化能力较强,且随着胁迫时间的延长越来越显著。这就充分表明,久效磷的胁迫处理使叉鞭金藻细胞内产生了过量的超氧阴离子自由基。超氧阴离子自由基是一类重要的活性氧,造成细胞内活性氧的积累,进而对细胞造成伤害,这一结果与在三角褐指藻细胞中的测试情况相类似[唐学玺和李永祺1997]。

表1 不同处理后的叉鞭金藻对肾上腺素的氧化程度

Tab.1 The epinephrine oxidation intensity of different treated *Dicrateria* sp.

材 料	肾上腺素氧化强度		
	0 小时	36 小时	72 小时
对照组	0.021±0.003	0.029±0.006	0.022±0.004
处理组	0.027±0.007	0.627±0.007	0.942±0.009

2.2 叉鞭金藻膜脂过氧化程度及膜透性的变化

与相应的对照组(培养液中不含久效磷)相比,处理组(培养液中含有半抑制剂量的久效磷)叉鞭金藻的电解质外渗率和MDA的含量均随着培养时间的延长呈现出逐渐上升的趋势。但它们的上升性变化有所差异。MDA含量在久效磷胁迫的整个过程中始终平稳地逐渐上升;而其电解质外渗率在胁迫的前24小时,变化不明显,24小时过后急剧上升。这说明在久效磷胁迫下叉鞭金藻电解质外渗率的显著变化明显迟于膜脂过氧化作用。因此,我们认为,久效磷的胁迫处理使叉鞭金藻细胞内产生了过量的活性氧,活性氧攻击膜脂中不饱和脂肪酸引起膜脂过氧化作用的加强,进而导致膜透性的增加及细胞的伤害(表2)。分析表明,久效磷对MDA含量($t=3.004, P<0.02$)和膜透性($t=3.087, P<0.01$)有显著影响。

表 2 久效磷对叉鞭金藻膜脂过氧化及膜透性的影响
 Tab. 2 The effect of monocrotophos on lipid peroxidation and membrane permeability of *Dicrateria* sp.

胁迫时间(h)		0	12	24	36	48	60	72
MDA 含量 ($\mu\text{mol}/2 \times 10^7$ 细胞)	对照	2.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.5	2.6 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1	2.2 \pm 0	2.3 \pm 0.3	2.5 \pm 0.6
	处理	2.4 \pm 0.3	2.6 \pm 0.4	2.9 \pm 0.3	3.5 \pm 0.7	3.9 \pm 0.2	4.5 \pm 0.8	5.2 \pm 0.4
电解质 外渗率(%)	对照	11.9 \pm 2.1	10.1 \pm 2.0	10.8 \pm 1.8	10.3 \pm 1.8	11.0 \pm 2.0	10.7 \pm 2.0	11.8 \pm 2.4
	处理	11.9 \pm 2.4	13.5 \pm 1.7	15.9 \pm 1.9	22.0 \pm 3.2	28.0 \pm 3.6	31.9 \pm 3.8	41.0 \pm 4.0

2.3 久效磷胁迫下叉鞭金藻细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

在久效磷胁迫下,叉鞭金藻细胞的 SOD 活性呈现出波动性的变化($t=0.135, P>0.10$)。首先,在胁迫的前 24 小时, SOD 活性有所升高;其次,在胁迫的 24 小时至 60 小时之间, SOD 活性出现下降趋势;在胁迫的最后又开始上升。而对照组的 SOD 活性在培养过程中的变化不明显,一直保持相对稳定的状态(图 1)。

2.4 久效磷胁迫下叉鞭金藻细胞过氧化物酶(POD)活性的变化

久效磷对叉鞭金藻过氧化物酶(POD)活性的影响显著($t=2.898, P<0.02$),在胁迫的整个过程中呈现出下降的总趋势。但在胁迫的前 24 小时,下降比较缓慢;24 小时过后下降速度加快。POD 为藻细胞清除活性氧的关键酶之一,它的活性降低证明了久效磷胁迫处理使叉鞭金藻细胞清除活性氧的能力有所降低。

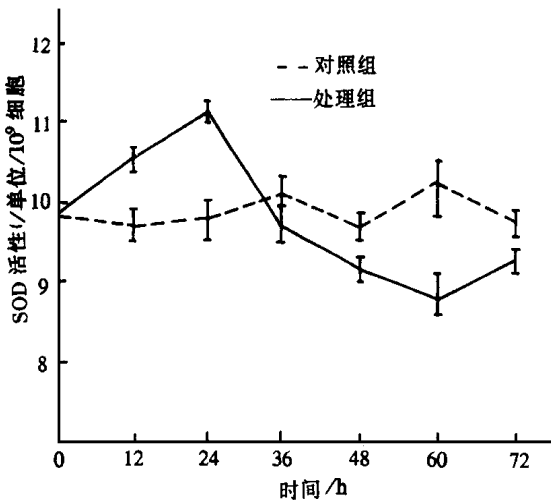


图 1 久效磷对叉鞭金藻 SOD 的影响

Fig. 1 The effect of monocrotophos on SOD activity of *Dicrateria* sp.

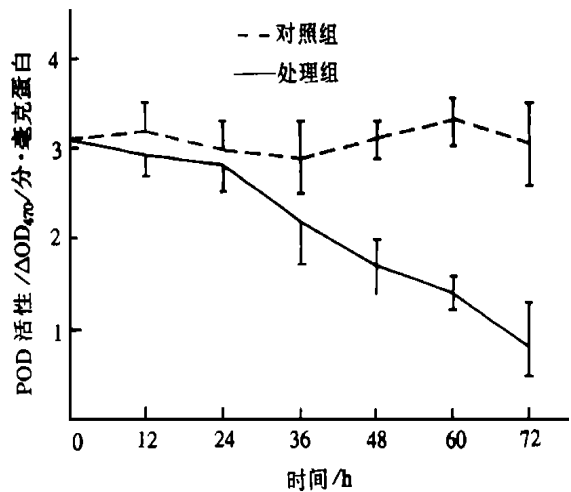


图 2 久效磷对叉鞭金藻 POD 的影响

Fig. 2 The effect of monocrotophos on POD activity of *Dicrateria* sp.

3 讨论

3.1 久效磷胁迫下叉鞭金藻细胞活性氧的过量产生

在正常的生理生长条件下,植物细胞内活性氧的产生和清除处于一种动态平衡,此时,活性氧的含量极低,不但不危害细胞,反而起到一种独特的生理作用。一旦受到逆境胁迫,植物体内清除活性氧的能力下降,这种平衡状态会打破,造成活性氧的过量产生和积累。在久效磷的胁迫下叉鞭金藻细胞对肾上腺素的氧化能力显著增加,说明久效磷的处理打破了叉鞭金藻细胞中活性氧产生与清除间的平衡,造成超氧阴离子自由基的过量产生,细胞中的超氧阴离子是氧毒害的最基本物质,因为它还可以形成其它的活性氧,引发细胞的活性氧伤害。

3.2 活性氧对叉鞭金藻细胞的伤害作用

自60年代末报道超氧化物歧化酶的酶学特性以来,以其为中心的生物活性氧代谢研究进展很快。活性氧伤害植物的机理之一在于它能够启动膜脂过氧化[曾昭西和王以柔 1987],从而破坏膜的结构,使膜透性增加,离子外漏,细胞代谢紊乱。叉鞭金藻在久效磷胁迫下其MDA含量和电解质外渗率都有所增加,且随着胁迫时间的延长,变化愈加显著,反映出叉鞭金藻细胞的伤害愈加严重,而这种伤害很可能就是由细胞内过量的活性氧引发膜脂过氧化造成的。

3.3 SOD 在叉鞭金藻清除活性氧中的作用

超氧化物歧化酶(EC. 1. 15. 1. 1 SOD)是生物活性氧清除系统中的一个关键酶。目前,对植物体中SOD的生化特性,同工酶等都有了较深入系统的研究,是植物生理学中的一个比较热门的研究领域。SOD能够降解活性氧中最根本的超氧阴离子自由基的毒害,降低其在细胞中的浓度,其它活性氧的浓度也大大减少。研究表明,当植物体受到胁迫时,SOD活性会下降。我们对叉鞭金藻的实验结果与从前的报道有所不同。在久效磷胁迫的过程中,叉鞭金藻SOD活性的变化没有规律性。随着胁迫时间的延长,SOD活性时而上升,时而下降,与对照组相比,处于一种上下波动的变化状态中。这就充分显示出SOD在叉鞭金藻清除活性氧的过程中不起主要作用,或者说在某一胁迫阶段中不起主要作用。

3.4 POD 在叉鞭金藻清除活性氧中的作用

过氧化物酶(EC. 1. 11. 7 POD)是生物体系中重要的酶类之一,参与生物体的多种生理代谢反应,在细胞壁的合成,植物内源激素合成的调节及活性氧的清除中起重要的作用。在久效磷胁迫的初期,POD活性下降平缓,表明此时仍保持着较高的清除活性氧的能力,细胞伤害较轻,这可从膜脂过氧化程度和膜透性的变化不明显中得到反映。随着胁迫时间的逐渐增加,细胞伤害严重,而POD活性的显著下降,引起细胞清除活性氧的能力下降和活性氧的过量产生,进而导致细胞膜脂过氧化作用增强是细胞伤害严重的重要原因。

另外,比较SOD和POD在久效磷胁迫下活性变化的异同,我们认为POD在叉鞭金藻清除活性氧的过程中所起的作用要远远大于SOD。

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: 上海科学出版社. 67~ 70
- 林植芳, 李双林, 林桂株等. 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. 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
- 唐学玺, 李永祺. 1997. 久效磷对三角褐指藻的毒性. 水产学报, 21(4): 438~ 442
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gel. Anal Biochem, 44: 276 ~ 278
- Bewley T D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. Ann Rev Plant Physiol, 30: 195~ 238
- Chance B, Mathly A C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. In "Method in enzymology" Vol edited by Lester Paches, 764~ 765. Academic Press Inc. New York
- Heath R L, Packer I. 1981. Photoperoxidation in isolated chloro plasts. 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
- Srivastava O P, Huysse P B V. 1973. Evidence for close association of POD polyphenol oxidase and IAA. oxidase isoenzyme of peanut suspension culture medium. Can J Bot, 51: 2207~ 2215

TOXICITY EFFECT OF MONOCROTOPHOS ON UNICELLULAR ALGAE *DICRATERIA* SP.

TANG Xue-Xi, LI Yong-Qi

(Life Science College, Ocean University of Qindao, 266003)

ABSTRACT The paper reported that the growth and reproduction of *Dicrateria* sp. were obviously, inhibited by monocrotophos. With the prolonging time of stress, peroxidase(POD) activity decreased, active oxygens accumulated remarkably in the cell, malondialdehyda(MDA) content and membrane permeability increased synchronously. On the contrary, the activity of superoxide dismutase (SOD) changed irregularly during the whole time of stress. The results showed that active oxygens resulted in cellular damage by means of lipid peroxidation, and compared with SOD, POD played more important role on scavenging of active oxygens.

KEYWORDS Monocrotophos, Unicellular algae, Peroxidase, *Dicrateria* sp.