

王洪斌,赵鑫,金雪萍,等. 水环境中乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻的致毒胁迫效应[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):465-467.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.134

水环境中乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻的致毒胁迫效应

王洪斌¹, 赵鑫¹, 金雪萍², 肖龙海², 韩雪¹, 李士虎¹

(1. 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏连云港 222005; 2. 江苏省建湖县农业技术服务中心, 江苏建湖 224700)

摘要:以江苏省连云港市海州湾常见海洋微藻塔胞藻(*Pyramidomonas delicatula*)、巴夫藻(*Pavlova viridis*)为试验材料,研究水环境中乙草胺对 2 种海洋微藻的致毒胁迫效应。以叶绿素 a 含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量为指标,研究 2 种海洋微藻的生长量及细胞内抗氧化系统对乙草胺致毒胁迫的响应。结果表明:塔胞藻、巴夫藻 2.5 mg/L 试验组培养至 7 d,生长量分别为对照组的 6.4%、6.0%;96 h 培养时间内,乙草胺对塔胞藻及巴夫藻叶绿素 a 含量的影响表现在降低叶绿素 a 的合成量,2.5 mg/L 试验组叶绿素 a 的含量分别为对照组的 26%、28%;乙草胺对 2 种微藻的 SOD 活性均表现诱导性上升,1.0 mg/L 试验组达最高值,是对照组的 1.58 倍;塔胞藻、巴夫藻 0.5 mg/L 试验组 CAT 活性达最高值,分别是对照组(0 mg/L)的 1.5、1.4 倍;2 种微藻体内 MDA 含量随乙草胺处理浓度增加而明显提高,塔胞藻、巴夫藻在 2.5 mg/L 试验组达最高值,均为对照组 15 倍以上。一定浓度的乙草胺对塔胞藻及巴夫藻具有强烈的致毒胁迫效应,不同海洋微藻对乙草胺致毒胁迫的响应存在种属差异性。

关键词:乙草胺;塔胞藻;巴夫藻;致毒效应

中图分类号: TQ450.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0465-03

乙草胺是一种广泛使用的选择性酰胺类芽前除草剂,主要适用于防除禾本科杂草和阔叶杂草,它被杂草的幼芽和幼根吸收,抑制杂草蛋白质合成而使杂草死亡^[1-3]。由于酰胺类除草剂具有较高的水溶性及相对较低的土壤吸附常数,施用到农田的乙草胺容易通过渗透转移到浅层地下水或随雨水径流而造成水体污染,直接或间接对人体健康造成危害^[4]。而乙草胺是我国使用最多的 3 种除草剂(甲草胺、乙草胺和丁草胺)之一^[5],所以乙草胺使用后在环境中的归宿及残留污染对人和动物的毒性成为学者关心的热点。

浮游藻类具有取材方便、易于培养和操作的特点,对化学污染物的致毒胁迫敏感,浮游藻类受残留污染物致毒胁迫而产生活性氧自由基,能够引发一系列氧化应激反应,产生有毒代谢产物,对生物体的细胞造成损伤,最终导致细胞死亡^[6]。由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等组成的抗氧化系统能够有效防御活性氧自由基的侵害。丙二醛(MDA)产生与脂质过氧化程度相关,可以指示细胞机体受到氧化损伤的程度^[7-9]。研究表明,许多农药能够抑制生物体内抗氧化酶的活性,导致生物体内活性氧自由基含量的增加,对生物体构成氧化胁迫。目前,国内外关于农药残留污染的研究主要集中在它们对水生生物的急性毒性效应^[10],而乙草胺对海洋微藻抗氧化酶活性影响的研究尚属空白。本研究以江苏省连云港市海州湾常见海洋微藻塔胞藻(*Pyramidomonas delicatula*)、绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)为试验材料,研究水环境中

乙草胺对 2 种微藻的致毒胁迫效应。以叶绿素 a 含量、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性及丙二醛含量为指标,研究 2 种海洋微藻的生长及细胞内抗氧化系统对乙草胺致毒胁迫的响应,旨在提示农药污染对水环境破坏的严重性,揭示海洋微藻作为环境毒理学评价指标的潜在应用,并为乙草胺的合理使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

塔胞藻、绿色巴夫藻均为淮海工学院海洋学院海藻实验室保存种。微藻培养液采用 f/2 加富海水,海水采自连云港市连岛海域(盐度 3.10‰~3.20‰)涨潮时,醋酸纤维薄膜过滤,121 ℃灭菌 20 min 待用。

乙草胺(济南天邦化工有限公司生产的 50% 乳油)用蒸馏水稀释为 500 mg/L,备用。

1.2 方法

1.2.1 微藻培养方法 藻种在 f/2 培养液中培养到指数生长期为接种物。微藻培养采用 f/2 海水培养液,不通气静止培养,在无菌条件下将 20 mL 处于指数生长期的藻种接种于装有 180 mL f/2 培养液的 500 mL 锥形瓶中,光照度为 3 000 lx,光—暗周期 12 h—12 h,每天定时摇动 3 次,(23±1)℃下培养^[11]。

1.2.2 微藻生长测定 取培养至 4 d 的藻液 100 mL,分别加入 0、100、200、300、400、500 μL 乙草胺溶液,使乙草胺浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L。采用吸光度法定时对其生长进行测定。以接种时间为初始时间开始测定,每天定时取出 5 mL 藻液。以未接任何藻种的 f/2 加富海水培养液为空白对照,在波长 680 nm 下测定其 $D_{680\text{ nm}}$ 值,连续 7 d^[12]。试验设 3 个平行组。

1.2.3 叶绿素 a 测定 采用丙酮提取法。取培养 96 h 的藻

收稿日期:2015-08-06

基金项目:国家级高等学校大学生创新创业训练计划(编号:201411641049Y);江苏省海洋资源开发研究院开放课题(编号:JSIMR201319)

作者简介:王洪斌(1966—),男,江苏连云港人,硕士,教授,研究方向为环境微生物生物技术。E-mail:lygwhbly@126.com。

液 10 mL, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集藻泥, 加 3 mL 80% 丙酮, 冻融 3 次, 超声波破碎细胞、离心, 上清液即为叶绿素 a 提取液^[13]。

1.2.4 SOD 活性、CAT 活性、MDA 含量检测 试验根据南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。所有试验均重复 3 次, 数据取平均值, 并分析其差异显著性。

2 结果与分析

2.1 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻生长特性的影响

由图 1 可见, 处理组塔胞藻在培养 3 d 后, 表现出强烈抑制效应, 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 组培养 7 d, $D_{680\text{ nm}}$ 分别只有对照组的 24.0%、18.0%、10.0%、7.4%、6.4%。由图 2 可见, 低浓度的乙草胺 (≤ 1.0 mg/L) 对绿色巴夫藻生长胁迫作用不明显, 在培养 3 d 后, 生长水平与对照组 (0 mg/L) 相比, 表现出抑制效应, 0.5、1.0 mg/L 组培养 7 d 后, 分别是对照组的 69%、70%; 而 1.5、2.0、2.5 mg/L 组表现出强抑制效应, 培养 7 d 后分别是对照组的 10.0%、6.0%、6.0%。乙草胺浓度高于 0.5 mg/L, 对 2 种微藻表现出明显抑制作用, 说明高浓度的乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻具有强烈的致毒效应。试验还证实, 不同浓度乙草胺对不同微藻生长的胁迫作用存在差异。

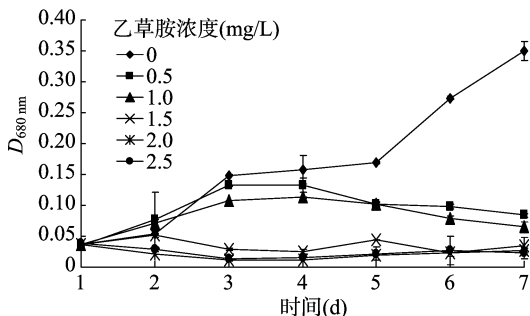


图1 不同浓度乙草胺对塔胞藻生长的影响

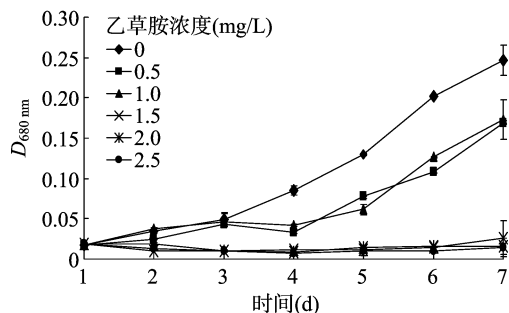


图2 不同浓度乙草胺对绿色巴夫藻生长的影响

2.2 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻叶绿素 a 合成的影响

乙草胺对塔胞藻及绿色巴夫藻叶绿素 a 的影响主要表现在降低叶绿素 a 的合成量, 呈现明显的剂量效应 (图 3)。培养至 96 h, 与对照组相比, 试验组塔胞藻及绿色巴夫藻叶绿素 a 的含量均随浓度增加而降低, 塔胞藻较绿色巴夫藻下降幅度尤为明显, 塔胞藻 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 试验组, 叶绿素 a 含量分别为对照组的 59%、50%、37%、30%、26%, 经分析, 0.5、1.0 mg/L 组与对照组差异显著 ($P < 0.05$), 而其他

各试验组与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。绿色巴夫藻 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 试验组叶绿素 a 含量分别为对照组的 77%、65%、38%、31%、28%, 经分析, 0.5、1.0 mg/L 组与对照组差异不显著, 而其他各试验组与对照组比较有极显著差异 ($P < 0.01$)。2 种微藻比较可知, 低浓度乙草胺对塔胞藻的叶绿素 a 合成致毒胁迫效应远大于绿色巴夫藻, 高浓度乙草胺对叶绿素 a 合成的影响趋向一致, 与“2.1”节所述的生长状况结论是一致的, 不同微藻对农药致毒胁迫的响应存在较大的种属差异性。

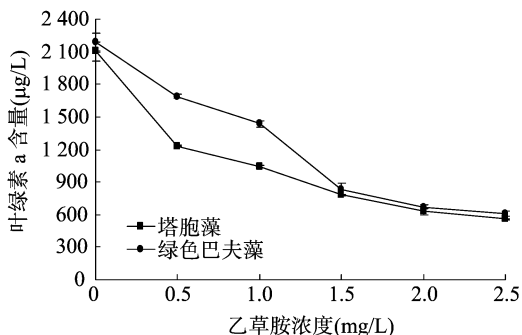


图3 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻叶绿素a合成的影响

2.3 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻 SOD 活性的影响

乙草胺处理 2 种微藻 96 h 后 SOD 活性变化见图 4, 可见低浓度乙草胺对 2 种微藻的 SOD 活性均表现诱导性上升。塔胞藻在 1.0 mg/L 试验组达最高值, 是对照组的 1.58 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$); 随乙草胺质量浓度加大, SOD 活性逐渐下降, 2.5 mg/L 试验组恢复至对照组水平。绿色巴夫藻也在 1.0 mg/L 试验组达最高值, 是对照组的 1.81 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$); 后缓慢降低, 与塔胞藻类似, 在 2.5 mg/L 乙草胺处理下恢复至对照组水平。

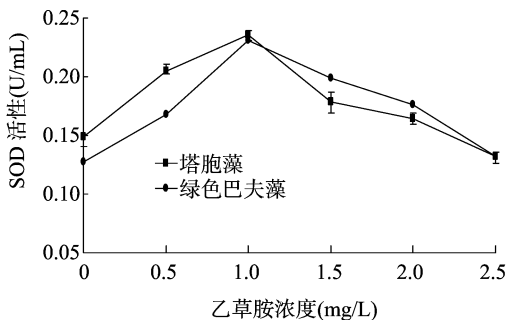


图4 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻 SOD 活性的影响

2.4 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻 CAT 活性的影响

图 5 显示乙草胺处理 2 种微藻 96 h 后 CAT 活性变化情况, 可见塔胞藻 0.5 mg/L 试验组 CAT 活性达最高值, 是对照组 (0 mg/L) 的 1.5 倍; 随乙草胺浓度的进一步上升而下降, 2.5 mg/L 试验组 CAT 活性是对照组的 95%, 基本恢复至对照组水平。绿色巴夫藻也在 0.5 mg/L 试验组 CAT 活性达最高值, 是对照组的 1.4 倍; 2.5 mg/L 试验组 CAT 活性是对照组的 94%, 基本恢复至对照组水平。各试验组与对照组比较, 差异性均不显著。

2.5 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻 MDA 含量的影响

图 6 显示, 96 h 培养时间内, 2 种微藻体内 MDA 含量随

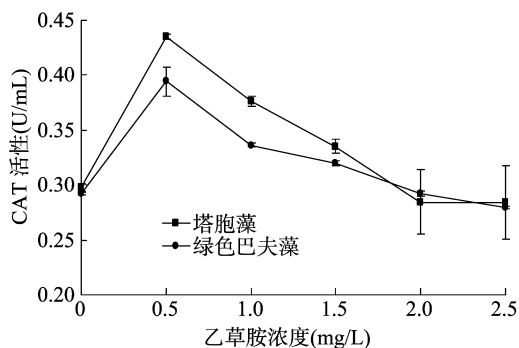


图5 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻 CAT 活性的影响

乙草胺处理浓度增加而明显增高,2 种微藻在 0.5 mg/L 试验组与对照组(0 mg/L)相比即大幅度升高,且随乙草胺质量浓度加大而明显增加;在 2.5 mg/L 试验组达最高值,为对照组 15 倍;绿色巴夫藻在 1.5 mg/L 时 MDA 含量就高达对照组 15 倍,后增长趋势平缓,2.5 mg/L 试验组也达最高值,为对照组 16 倍,差异性均为极显著($P < 0.01$)。MDA 含量反映机体受过氧化损伤程度,塔胞藻、绿色巴夫藻对乙草胺致毒胁迫的响应存在差异。2 种海洋微藻 MDA 含量变化与其生长特性的响应是一致的。

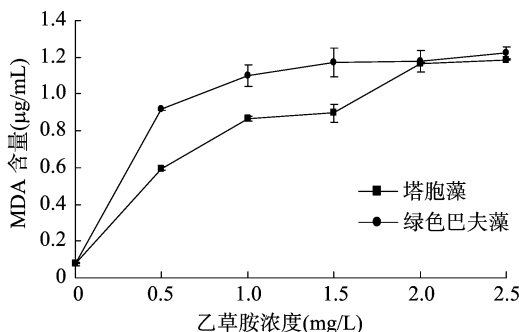


图6 乙草胺对塔胞藻、绿色巴夫藻 MDA 含量的影响

3 讨论

农作物施用农药和沿海一些农药生产厂的排污已对近海水域构成污染,目前,农药残留污染对海洋生物资源、养殖生态环境的破坏性影响已引起广大学者的高度重视。因此监测海洋农药残留污染对保护海洋生物资源及生态修复具有重要意义,本研究用乙草胺残留污染对海洋微藻的致毒胁迫效应进行初步研究,探讨其对海洋微藻毒性效应,为农业生产上合理、安全使用酰胺类除草剂提供理论依据。

本研究以江苏省连云港市海州湾常见藻种塔胞藻、绿色巴夫藻为供试藻,实验室条件下研究乙草胺致毒胁迫对 2 种海洋微藻生长、抗氧化系统及叶绿素 a 合成的影响。试验证实,高浓度乙草胺具有强烈的毒性效应,从对叶绿素含量影响情况看出,乙草胺对绿色巴夫藻的致毒胁迫效应远大于塔胞藻,与其生长特性胁迫影响的结论一致,不同微藻对农药致毒胁迫的响应存在较大的种属差异性。乙草胺对海洋微藻的毒性影响远大于另一种除草剂草甘膦^[14]。

SOD 和 CAT 活性是好氧生物抗氧化机制的主要活性酶,其活性变化可以反映微藻抵御污染物胁迫能力^[15]。本研究显示,低浓度乙草胺对 2 种微藻的 SOD 活性均有诱导性刺激

上升作用,反映微藻受乙草胺氧化胁迫,机体抗氧化能力增强,而后随乙草胺浓度增加逐渐下降,在质量浓度 1.0 mg/L 时,SOD 活性达最高,在质量浓度 2.5 mg/L 时恢复至对照组水平,没有出现抑制效应,与刘霞等结论^[16]不一致,至于多少质量浓度的乙草胺能诱导机体产生过量的超氧阴离子自由基,超出机体的清除能力而导致藻体暴发性死亡,有待进一步研究。对 CAT 活性表现趋势同 SOD。MDA 是生物膜中多种不饱和脂肪酸在活性自由基攻击后产生的过氧化产物,其含量高低反映藻细胞膜过氧化损伤程度,2 种 MDA 含量反应与其生长特性的响应一致,96 h 培养时间,随乙草胺处理浓度加大,MDA 含量显著增加,表明微藻体内活性自由基积累,脂质过氧化产物增加,有毒代谢产物大量积累,MDA 含量与污染物的浓度呈正相关,与刘霞等试验结果^[16-17]一致。

本研究没有涉及其他环境因素,对于乙草胺致毒效应机制以及微藻的种属差异、微藻的适应机制等需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 缪翠云,陈翠芳,张雷. 乙草胺及其复配剂土壤封闭处理防除麦田硬草和繁缕的试验[J]. 杂草科学,2015,33(3):52-54.
- [2] 李恒,杨仁斌,盛莉莎. 乙草胺在水稻环境中的残留及消解动态[J]. 农药学报,2009,11(2):269-273.
- [3] 段成鼎,范建芝,杨淑娟,等. 3 种除草剂对甘薯田杂草的田间防效试验[J]. 杂草科学,2014,32(2):52-55.
- [4] 杨新文,周桂凤. 有机磷农药作业人的心电图分析[J]. 工业卫生与职业病,2000,26(2):115-116.
- [5] 苏少泉. 除草剂品种发展近况[J]. 农药,1999,38(10):11-15.
- [6] Slater T F. Free radical mechanisms in tissue injury[J]. The Biochemical Journal,1984,222(1):1-15.
- [7] Pampanin D M, Camus L, Gomiero A. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy)[J]. Marine Pollution Bulletin,2005,50(12):1548-1557.
- [8] 赵慧,徐迎春,张翔,等. 外源 NO 对铜、镉胁迫下狭叶香蒲生理反应的影响[J]. 江苏农业学报,2015,31(2):260-266.
- [9] 彭英,刘晓静,汤兴利,等. 盐胁迫对北沙参生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(6):1273-1278.
- [10] 蔡后建,周凤帆,金琦,等. 多效唑对几种生物的毒性及对植物超微结构效应的研究[J]. 南京大学学报:自然科学版,1994,30(2):274-280.
- [11] 王洪斌,成明,盛菊,等. 6 种微藻生长及脂肪累积对氮含量变化的响应[J]. 水产科学,2012,31(2):79-82.
- [12] 王洪斌,成明,钱鹏,等. 金属离子对中肋骨条藻的胁迫效应及叶绿素 a 合成的影响[J]. 海洋科学,2012,36(7):104-108.
- [13] 张志良,翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2003:62-70.
- [14] 田密,郑贝贝,苏金丽,等. 塔胞藻及海水小球藻对草甘膦致毒胁迫的生理应答[J]. 水产科学,2013,32(9):541-544.
- [15] 焉翠蔚,肖宜华,朱岩松,等. 多效唑对 2 种海洋微藻生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 中国海洋大学学报,2008,38(2):291-296.
- [16] 刘霞,赵静,但丽霞,等. 壬基酚对胶州湾典型微藻的毒性效应[J]. 海洋环境科学,2012,31(5):667-673.
- [17] 刘英华,李国星,尤健,等. 复方盐藻素对肺癌化疗中 SOD 和 MDA 活性的影响[J]. 毒理学杂志,2008,22(4):299-301.