

草甘膦对铜绿微囊藻生长的影响及其机理研究

张琼, 袁兴超, 裴兆虎, 赵健, 韩敏, 邓涛 (滨州学院资源环境系, 山东滨州 256603)

摘要 [目的]探讨草甘膦对铜绿微囊藻生长的影响及其机理。[方法]研究不同浓度草甘膦对铜绿微囊藻生长和蛋白合成的影响,并从铜绿微囊藻的抗氧化酶系统和对磷营养的代谢和转化两个方面,分析其影响机理。[结果]草甘膦浓度较低时(5或10 mg/L)刺激微囊藻生长和蛋白合成,高浓度(20或40 mg/L)时起到抑制作用。产生这种现象的可能机理有两方面:一是草甘膦诱发了微囊藻的氧化损伤,表现为加药组的MDA含量显著增加,故微囊藻体内的抗氧化相关酶CAT、POD、SOD被大大激活;二是微囊藻细胞内外可生物利用的正磷酸盐比例因为该含磷除草剂的添加发生了变化,低浓度草甘膦有助于磷营养的吸收利用。[结论]该研究为草甘膦生态安全性的评估和铜绿微囊藻磷代谢的研究提供一定的理论依据。

关键词 草甘膦;抗氧化系统;磷代谢;铜绿微囊藻

中图分类号 S482.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)36-157-03

Effects of Glyphosate on *Microcystis aeruginosa* Growth and Related Mechanisms

ZHANG Qiong, YUAN Xing-chao, PEI Zhao-hu et al (Department of Resources and Environment, Binzhou University, Binzhou, Shandong 256603)

Abstract [Objective] The aim was to discuss the effects of glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth and related mechanisms. [Method] The cell density and protein content of *M. aeruginosa* treated by different concentrations of glyphosate were analyzed, and the possible mechanisms related to the results were discussed from the aspects of its antioxidant system as well as phosphorus metabolism and conversion. [Result] The growth and protein synthesis of *M. aeruginosa* were stimulated when glyphosate concentration was 5 or 10 mg/L respectively, while they were inhibited when glyphosate concentration was 20 or 40 mg/L respectively. Two possible mechanisms related to the results were shown as follows. First of all, owing to the rise of MDA content, oxidative stress was observed in all treatments with glyphosate. Therefore, compared to the control, the activities of CAT, POD and SOD in *M. aeruginosa* increased. Second, the proportion of orthophosphate content to total phosphorus content changed because of the addition of glyphosate, and low concentrations of glyphosate was helpful for the absorption of phosphorus by *M. aeruginosa*. [Conclusion] This research can provide theoretical foundation for the ecological safety evaluation of glyphosate and exploration of phosphorus metabolism in *M. aeruginosa* cells.

Key words Glyphosate; Antioxidant system; Phosphorus metabolism; *Microcystis aeruginosa*

草甘膦是近年来全球用量最大的除草剂之一,且随着抗草甘膦转基因作物的种植,其年使用量仍在不断增加^[1-2]。草甘膦可以通过叶面喷洒、大气转运、表面径流等方式进入水体,近年来许多国家的水体里都发现了草甘膦和其主要的降解产物 AMPA 的残留^[3]。如 Couple^[4]等发现,施用的草甘膦有0.009%~0.860%会进入地表水中。一般认为,草甘膦是环境友好型的除草剂,但是最近有较多研究表明,草甘膦对微生物、藻类、水生植物以及低等动物都有较大影响^[5-8]。铜绿微囊藻是我国淡水水体中最常见的优势藻种,因此它和草甘膦很可能在水生生态系统中共存。由于夏季水华的频繁爆发,对铜绿微囊藻生长代谢的研究报道也一直较多。虽然也有不少学者关注外部环境因子如温度、pH、藻种间竞争或营养盐等对微囊藻生长变化的影响^[9-10],但水体是个复杂系统,往往也是各种污染物质的聚集场所。因此,外源性污染物如除草剂是如何对水体中这种优势藻种的生长和繁殖产生影响,产生这样的效应的原因何在,当前的关注度还明显不足。笔者研究了短期内不同浓度草甘膦对铜绿微囊藻生长和蛋白合成的影响,同时从铜绿微囊藻的抗氧化酶系统和对磷营养的代谢和转化两个方面,来深入探讨其影响机理。

1 材料与与方法

1.1 试验材料与仪器 试验所用的铜绿微囊藻 (*Microcystis*

aeruginosa)购自中国科学院武汉水生生物研究所(藻种库编号905)。草甘膦原药购自 Iprochem 公司(广东深圳),其他所有试剂均为分析纯度。主要仪器为多功能酶标仪(Tecan infinite 200pro)和紫外-可见光分光光度计(UV1901)。

1.2 试验方法

1.2.1 铜绿微囊藻的接种和培养。新购的藻种采用 BG11 培养基,经过反复接种2~3次后,再进行大规模培养。每次试验的初始接种量约为 10^6 个细胞/ml藻液,培养3~4d后,铜绿微囊藻即进入对数生长期,采用此时的铜绿微囊藻进行毒理学试验。试验时一次性加药,连续培养4d,每个处理设置4个平行。培养箱的温度 26 ± 1 ℃,光照强度2000 lx,光暗比为14 h:10 h。培养容器为500 ml透明大三角瓶,瓶口用4层纱布密封,以防止被外界环境污染并可保持气体流通。每天定时摇瓶3~4次,培养中始终保持光照条件均等。

1.2.2 铜绿微囊藻生物量和蛋白含量的测定。为测定铜绿微囊藻的生物量,先利用血细胞计数法数出细胞个数,再在680 nm下测出相应的吸光度,由细胞个数(*C. D.*)对吸光度(*OD*)作图,得到一条标准曲线($C. D. = 110.79 \times OD_{680} + 0.1366, R^2 = 0.9961$)。此后根据测得的样品吸光度,计算样品的细胞密度。铜绿微囊藻蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法,利用市售的试剂盒(南京建成生物工程公司)进行。

1.2.3 铜绿微囊藻细胞内的抗氧化酶活性及MDA含量的分析方法。收集培养4d的藻液,每个样品取30 ml,在4℃下6000 r/min冷冻离心10 min,弃去上清液,余下的铜绿微囊藻沉淀加5 ml的PBS磷酸缓冲液和几粒石英砂,在冰上

基金项目 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2014HZ011)。
作者简介 张琼(1983-),女,甘肃兰州人,讲师,博士,从事各类环境污染物质的植物毒理学方面的研究。
收稿日期 2015-12-07

研磨,冷冻保存。经过1~2次冻融,铜绿微囊藻细胞内的酶则释放出来,此时再在4℃下,2500 r/min 冷冻离心10 min,取上清液,利用分光光度法进行过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)3种酶的活性以及脂质过氧化水平丙二醛(MDA)含量的测定和分析。具体分析都是采用购自南京建成生物工程公司的标准试剂盒进行。

1.2.4 藻细胞内外各种形态磷的测定。所有形态磷都先转化为正磷酸盐,然后用钼蓝显色法进行测定。磷标准曲线由 K_2HPO_4 标准溶液绘制,试验时现用现配。所有结果中的含磷量以mM P(mmol/L P)来表示。

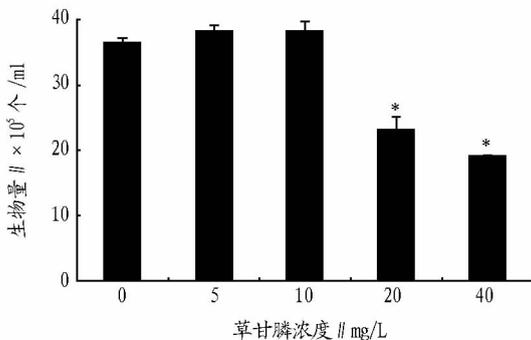
1.2.4.1 细胞内外的正磷酸盐测定^[11]。取铜绿微囊藻藻液10 ml,6000 r/min 离心10 min。上清液直接取出用于细胞外正磷酸盐测定;沉淀经过10%的三氯乙酸提取后,调节pH至中性,用来测定细胞内正磷酸盐。

1.2.4.2 细胞内外的总磷测定^[11]。同样取铜绿微囊藻藻液10 ml,6000 r/min 离心10 min。上清液加1.0 g 过硫酸铵和0.15 ml 浓硫酸,水浴加热(90~100℃)消化1.5 h。冷却后调pH至中性,定容显色后测定细胞外总磷含量;离心所得的沉淀先由6 ml 蒸馏水取出,加4 ml 5%的过硫酸铵,121℃消化30 min,冷却后仍将pH调至中性,定容显色后测定细胞内的总磷含量。

1.2.5 数据处理。利用SPSS18.0软件进行统计显著性分析(ANOVA法)和作图。当 $P < 0.05$ 时,处理间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同浓度草甘膦暴露下铜绿微囊藻生物量的变化 由图1可知,随着草甘膦浓度的增加,铜绿微囊藻的生物量先增加后减小,在10 mg/L时达最大;当草甘膦浓度升至20和40 mg/L时,铜绿微囊藻的生长又显著被其抑制。最新的研究也发现,外源性污染物质如邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对铜绿微囊藻生长的影响也是较低浓度促进,但较高浓度抑制^[12]。这说明外源性污染物质对微囊藻生长的影响与污染物浓度密切相关。

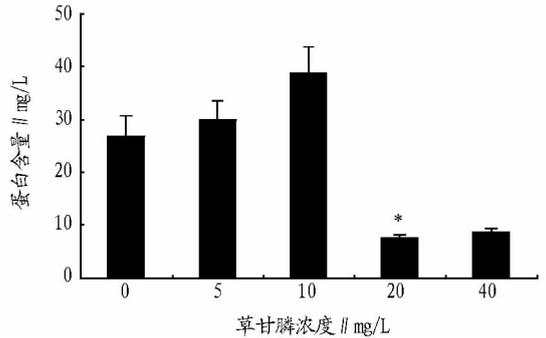


注:“*”表示差异显著($P < 0.05$)。

图1 不同浓度草甘膦对铜绿微囊藻生长的影响

2.2 不同浓度草甘膦暴露下铜绿微囊藻蛋白含量的变化 由图2可知,随着草甘膦浓度的变化,铜绿微囊藻蛋白含量的变化趋势与生物量完全一致。在草甘膦浓度较低时(5和10 mg/L),与空白相比,该除草剂刺激铜绿微囊藻蛋白

的合成,尽管这种刺激效应不显著,但在草甘膦浓度较高时(20和40 mg/L),对铜绿微囊藻蛋白的合成有显著的抑制效应。蛋白是微囊藻细胞各种亚结构形成及一些重要的信号传导通路中不可或缺的成分。由图1和2可知,正是由于低浓度农药的刺激作用,使得蛋白质的合成量增加了,也就使得这些处理组的生物量也相应增加;而高浓度组毒害效果明显,首先是蛋白含量明显下降,这将影响铜绿微囊藻一系列的生理生化反应,如氧化应激系统受到影响。

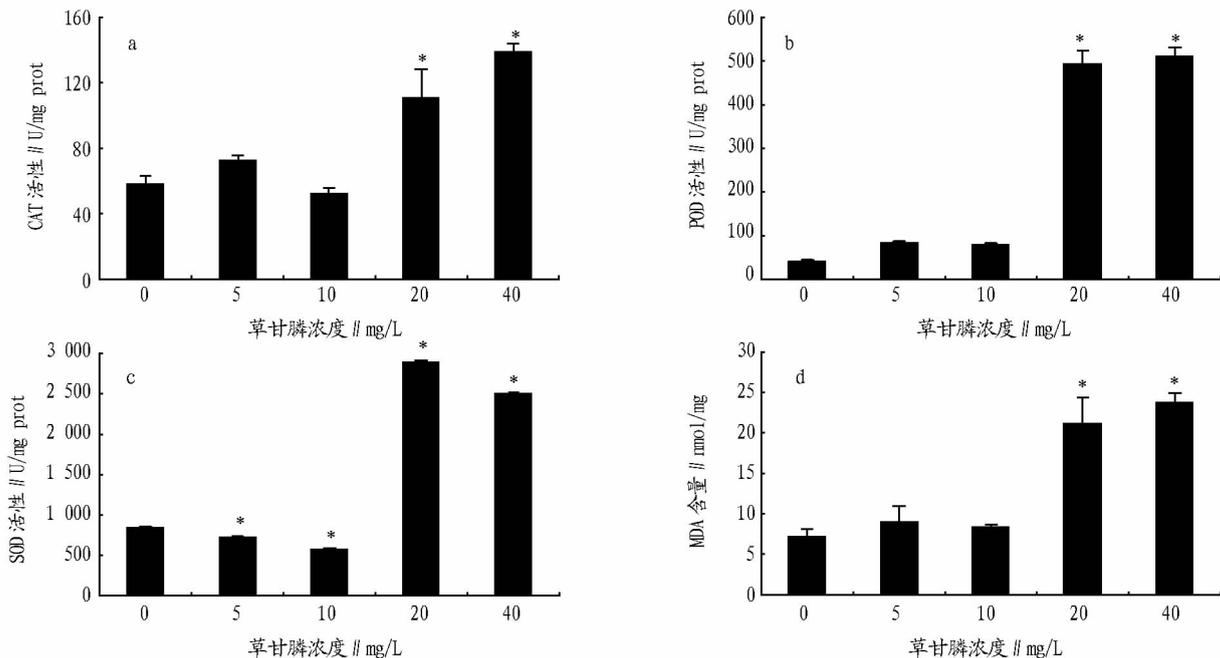


注:“*”表示差异显著($P < 0.05$)。

图2 不同浓度草甘膦对铜绿微囊藻蛋白含量的影响

2.3 草甘膦对铜绿微囊藻细胞内抗氧化酶的活性与MDA含量的影响 由图3可知,与空白相比,在草甘膦浓度较低时,CAT和POD活性略被刺激,但在高浓度时被显著刺激,说明草甘膦的加入使得藻细胞受到了抗氧化损伤,进而清除这种损伤的相关酶类的活性被显著激活了,特别是在高浓度组。所不同的是,SOD活性在低浓度时被显著抑制,但在高浓度时又被显著刺激。MDA是反映生物受到过氧化损伤的重要指标。与空白相比,所有添加除草剂的处理组,其MDA含量都有所增加,说明铜绿微囊藻确实受到草甘膦引起的氧化损伤。任何导致活性氧物质(ROS)形成的生物或非生物胁迫都可以产生氧化胁迫,植物或微生物运用自身的抗氧化防御系统来抵御这种氧化损伤,各种抗氧化酶是生物体内最有效的抗氧化损伤的武器^[13]。CAT是用来清除活性氧物质 H_2O_2 的,而POD在植物体内的催化反应也是以 H_2O_2 等自由基为底物。同时,POD也是组织老化的一种生理指标。试验结果表明,高浓度加药组藻细胞的变色和沉淀现象较为明显,这也证明了细胞在走向老化和衰亡。另外,在高浓度组,草甘膦对微囊藻细胞的损伤仍旧不可逆转,进而使得高浓度处理组生物量和蛋白合成显著被抑制(图1和图2)。所不同的是,SOD是一种广泛存在于动植物、微生物中的金属酶,它能催化生物体内的ROS生成超氧自由基($\cdot O_2^-$)。尽管高浓度组SOD的活性被显著激活,但在草甘膦浓度较低时,SOD活性被显著抑制(图3c),这种抑制作用可能造成微囊藻体内 $\cdot O_2^-$ 的累积,同样也引发微囊藻的氧化损伤(图3d)。

2.4 草甘膦加入对铜绿微囊藻细胞内外磷利用情况的影响 研究表明,在水中各种形态的磷中,只有正磷酸盐才可被生物直接利用。部分有机磷农药的加入,改变了这部分



注：“*”表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 草甘膦对铜绿微囊藻的抗氧化酶活性与丙二醛含量的影响

磷占总磷的比例,进而有可能改变水中铜绿微囊藻对营养成分的利用情况。由图4可知,细胞外正磷酸盐所占比例在草甘膦浓度为5 mg/L时达最大,20 mg/L时降至最低,但细胞外总磷含量最大。Li等的最新研究发现^[14],铜绿微囊藻可以通过调节其生理代谢功能来适应外界环境的变化,当外界正磷酸盐浓度不足时,也可以利用溶解性的有机磷。试验结果表明,溶解性较好的除草剂草甘膦在浓度为5和10 mg/L时,的确刺激了微囊藻的生物量和蛋白合成,这可能是由于草甘膦的加入使得培养液中微囊藻可以直接利用的正磷酸盐的比例和含量都增加了。

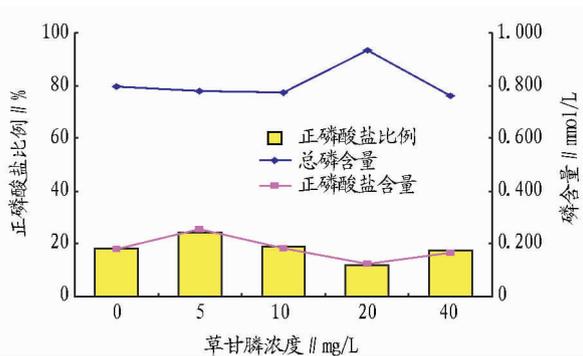


图4 铜绿微囊藻细胞外总磷、正磷酸盐含量及正磷酸盐所占比例

由图5可知,在草甘膦浓度为10 mg/L时,尽管此时细胞内的总磷含量最低,但藻细胞可以直接利用的正磷酸盐比例却最高;而草甘膦浓度为40 mg/L时,总磷浓度较高,但藻细胞能直接利用的正磷酸盐含量和比例均最低。这表明较低浓度的除草剂可以改善微囊藻体内磷营养的存在状态,进而刺激微囊藻生长,而高浓度除草剂则降低磷营养的可利用性,从而抑制了微囊藻的生长。研究表明,在黑暗和氧化还原电位下降等逆境中,铜绿微囊藻细胞内磷代谢的状况会发

生改变。例如,细胞内部聚合磷酸盐的积累速度和磷释放速度会大大增加,这就有利于维持必要的磷浓度并储存一定的能量,进而维持藻细胞正常的生理功能^[15]。该试验中外源污染物草甘膦也是一种逆境胁迫,低浓度时明显改善铜绿微囊藻细胞内可直接利用的磷的比例,最终表现为生长刺激现象。

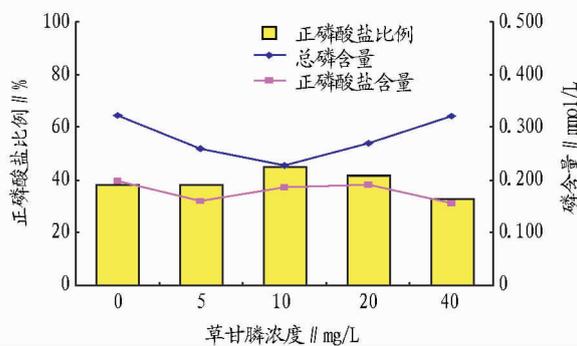


图5 铜绿微囊藻细胞内总磷、正磷酸盐含量及正磷酸盐所占比例

3 结论与讨论

(1)在实际环境中,低剂量刺激、高剂量抑制的污染物作用效应在毒理学中广泛存在,所以污染物对生物的效应通常表现为一种“倒U”型曲线^[16]。在该试验中也存在这种现象,这种低浓度草甘膦刺激铜绿微囊藻生长的现象需要引起重视,这在某种程度上更加促进了藻类的过量繁殖,加重了富营养化水体的危害程度。

(2)从铜绿微囊藻的抗氧化防御系统来看,CAT、POD和SOD酶的活性在所有草甘膦处理组几乎都被显著激活,这表明铜绿微囊藻确实可以利用抗氧化酶来抵御草甘膦所诱发的氧化损伤,但短期内这种防御系统的效果只局限于较低浓

(下转第206页)

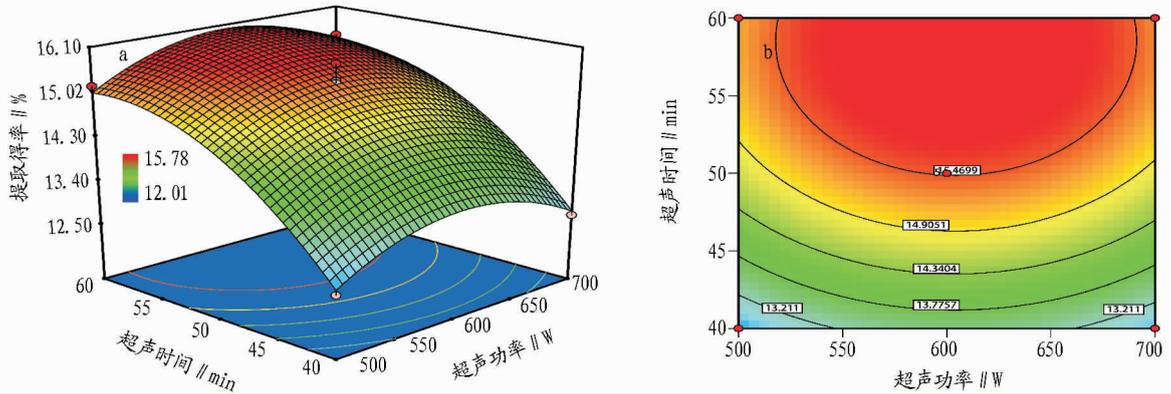


图7 超声功率、超声时间对提取得率的交互作用响应曲面 (a) 和等高线 (b)

3 结论

(1) 基于响应曲面法提出了超声波-高温热水法提取香菇多糖, 进一步提高了多糖的提取得率和香菇的利用率。

(2) 提取工艺参数对香菇多糖提取率的影响顺序为超声时间 > 水料比 > 超声功率 > 超声温度, 二次项中 4 个参数均极显著。

(3) 超声波-高温热水法提取香菇多糖的最佳工艺条件为水料比 30:1、超声温度 64 °C、超声功率 580 W 和超声时间 60 min。

参考文献

- [1] 林楠, 钟耀广, 王淑琴, 等. 香菇多糖的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 174-176.
- [2] 朱俊访, 李博, 袁阳. 多元非线性回归与 BP 神经网络在香菇多糖提取

- 工艺研究中的应用[J]. 海峡药学, 2014, 26(2): 15-17.
- [3] 龚俊涛, 王宗成, 董可因, 等. 香菇多糖的研究[J]. 药学实践杂志, 1996, 14(1): 23-75.
- [4] 邹林武. 香菇多糖提取工艺及其分子结构改性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [5] 魏楨元, 钟耀广, 刘长江. 响应面优化法对香菇多糖提取的工艺研究[J]. 辽宁农业科学, 2010(2): 11-14.
- [6] 燕航, 钟耀广. 影响香菇多糖提取的因素研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 179-180.
- [7] 王恒, 李凤林, 马玮曼. 超声波辅助法提取香菇多糖工艺优化研究[J]. 吉林农业, 2010(7): 40.
- [8] 王琛, 陈平, 江亮. 超声波辅助技术在香菇柄多糖提取中的应用研究[J]. 武汉工业学院学报, 2008, 27(1): 15-17.
- [9] 华海璐, 张一平, 匡群. 酶法结合超声破壁提取香菇水溶性糖和多糖的研究[J]. 食用菌, 2011(2): 54-57.
- [10] 刘春景, 唐敦兵, 何华, 等. 基于响应曲面车削加工表面粗糙度稳健性分析[J]. 南京航空航天大学学报, 2012, 44(4): 520-525.

(上接第 159 页)

度的草甘膦。与空白相比, 高浓度草甘膦处理组尽管酶活性很高, 草甘膦仍然会诱发铜绿微囊藻密度下降和蛋白合成受阻等毒性效应。

(3) 铜绿微囊藻细胞内外各种形态的磷代谢和转化随草甘膦浓度的变化差异明显。添加草甘膦后, 细胞内外可直接利用的磷形态——正磷酸盐的含量和所占比例在低浓度组较大、高浓度组较小, 可能直接造成了铜绿微囊藻的生长刺激或抑制效应。

参考文献

- [1] 孙克. 从选择性除草剂市场恢复情况分析草甘膦抗性杂草的发展[J]. 农药, 2012, 51(4): 235-253.
- [2] 卢信, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 除草剂草甘膦的性质及环境行为综述[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 785-790.
- [3] QIU H M, GENG J J, REN H Q. Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation[J]. Journal of hazardous materials, 2013, 24(8): 172-176.
- [4] COUPE R H, KALKHOFF S J, CAPEL P D. Fate and transport of glyphosate and amino methylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins[J]. Pest management science, 2012, 68: 16-30.
- [5] PESCE S, BATTISSON I, BARDOT C. Response of spring and summer river in emicrobial communities following glyphosate exposure[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2009, 72: 1905-1912.

- [6] 周垂帆, 王玉军, 俞元春, 等. 铜和草甘膦对蚯蚓的毒性效应研究[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(8): 1077-1082.
- [7] 王云彪, 李润琴, 邓茗岑, 等. 砷与农药草甘膦、敌敌畏对秀丽隐杆线虫的联合毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(2): 262-267.
- [8] 张伟, 王进军, 高立明, 等. 草甘膦在水-土壤系统中的环境行为及研究进展[J]. 农药, 2006, 45(10): 649-654.
- [9] 李婷, 景元书, 韩玮. 不同磷条件下高温胁迫对铜绿微囊藻增殖的影响及其恢复[J]. 环境工程学报, 2015, 9(10): 4780-4788.
- [10] 付保荣, 鲁男, 苗斌, 等. 环境因子对铜绿微囊藻生长和产毒的影响[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2015, 42(1): 85-90.
- [11] 张琼. 马拉硫磷影响下铜绿微囊藻的生长及其磷利用过程研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- [12] 刘春晓, 王平, 李海燕, 等. DBP 对铜绿微囊藻生长和抗氧化酶的影响[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(2): 7-12.
- [13] BCHANAN B B, GRUISSEM W, RUSSELL L J. Biochemistry and molecular biology of plants[M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [14] LI J H, WANG Z W, CAO X, et al. Effect of orthophosphate and bioavailability of dissolved organic phosphorous compounds to typically harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. Marine pollution bulletin, 2015, 92: 52-58.
- [15] SHI X L, YANG L Y, NIU X J, et al. Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness[J]. Microbiology research, 2003, 158: 345-352.
- [16] CALABRESE E J, BALDWIN L A. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology[J]. TRENDS in pharmacological sciences, 2001, 22: 285-289.