

草甘膦对铜绿微囊藻生长和叶绿素荧光诱导动力学的影响

潘文静, 王钰亮, 刘洋, 李效宇

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:以铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7806 为研究对象, 研究草甘膦 Glyphosate 胁迫下 *M.aeruginosa* PCC7806 生长、细胞色素含量的变化, 以及对光合系统的影响。结果表明, 当草甘膦质量浓度 ≥ 50 mg/L 时, *M.aeruginosa* PCC7806 的生长受到显著抑制。通过线性回归分析, 96 h, 草甘膦对铜绿微囊藻的半效应质量浓度 EC_{50} 为 62.33 mg/L。草甘膦质量浓度为 200 mg/L 时能显著降低铜绿微囊藻单位细胞内叶绿素 a 和类胡萝卜素含量。光诱导动力学分析结果显示, 低质量浓度下光系统没有表现出明显抑制, 并表现出高于对照组的峰, 而当质量浓度为 100 mg/L 时, 24 h 与 96 h 结果发现 O-J-I-P 特征均已消失, 表明其光合系统 II (PSII) 活性受到抑制。

关键词:草甘膦; 细胞色素; 铜绿微囊藻; 半效应质量浓度 EC_{50} ; 叶绿素荧光

中图分类号:Q178.1

文献标志码:A

我国作为一个农业大国, 除草剂在现代农业中应用较多, 除草剂有灭生性和选择性, 可以使农作物的产量和质量得到提高, 除草剂属难降解易污染的有毒有机物^[1]。早期使用的大多是灭生性除草剂, 发展到百草枯、草甘膦等选择性除草剂。

草甘膦是我国发展迅速、产量高、出口量最大的其中一种农药^[2], 其具有广谱灭生性, 通过内吸传导方式杀死杂草。其使用范围比较广泛, 可以在园林、田地等进行除草^[3]。残留在环境中的除草剂通过地表径流、降雨冲刷等途径进入到水体中, 随着食物链的积累放大, 导致大量水生生物死亡, 对水生生态系统的稳定构成危害^[4-5]。Solomon 等^[6]在 20 世纪 90 年代在水体的表层检测出低剂量的除草剂。最新的研究表明, 在地表水、饮用水和循环用水中的真实环境微量污染物中, 除草剂对藻类的毒性占着主导地位^[7]。虽然除草剂在水体中残留较少, 但是要重视其对水生生态系统的影响。

水生生态系统藻类是初级生产者, 藻类密度及群落结构的改变都会影响到其他生物^[8]。水体的养料和能量都来源于其光合作用, 还可以维持水生生态系统的平衡。因此, 除草剂对藻类毒性的研究具有重要意义。

叶绿素荧光诱导动力学曲线分析方法—JIP-test^[9], 可以反映 PSII 反应中心的生理状态。藻类的光合系统 II 对环境较为敏感, 叶绿素光诱导荧光多相瞬态上升动力学曲线可以反映出样品受胁迫的程度。

本文以铜绿微囊藻为研究对象, 观察除草剂草甘膦胁迫下铜绿微囊藻的生长及细胞色素含量及的变化, 以及对藻类光合系统的影响。阐述了草甘膦对藻类的毒性效应, 为水体附近草甘膦除草剂的合理使用和水生生物多样性的保护等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7806 为实验材料, 由中国科学院水生生物研究所淡水藻种

收稿日期:2017-09-25;修回日期:2018-04-10.

基金项目:国家自然科学基金(31400395);国家博士后基金(2014M552006);河南省科技厅国际合作项目(144300510046);河南师范大学博士基金(qd13034).

作者简介(通信作者):刘洋(1983—),男,河南新乡人,河南师范大学副教授,博士,研究方向:蓝藻分子生态,E-mail:ly@htu.cn.

库提供,藻株用 BG11 完全培养基培养^[10],在无菌条件下接入 BG11 培养基,于光照培养箱中培养 7 d,至对数生长期进行扩大培养,培养条件为光强 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期 12 h : 12 h,温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.静置培养.草甘膦除草剂(有效成分 68% 粉剂)购自新乡市某农药市场.

1.2 草甘膦抑藻试验

实验在 250 mL 三角瓶中进行,将对数期的 *M.aeruginosa* PCC7806 加入,再加入无菌的 BG11 培养基终体积为 100 mL,草甘膦的最终质量浓度为 50、100、200、400、800 mg/L,*M.aeruginosa* PCC7806 的初始藻细胞数为 $7.9 \times 10^5 \text{ cells/mL}$.试验以 0 mg/L 处理组作为对照,每组设 3 个重复.在光照培养箱中培养,光强 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比 12 h : 12 h,温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,每天定时摇动 3 次,使藻细胞充分与培养液接触.

1.3 细胞计数

实验每 24 h 取样,藻细胞密度用血球计数板在 OLYMPUS-CX31 显微镜(日本,OLYMPUS)40 倍下计数.

1.4 叶绿素和类胡萝卜素含量的测定及 EC_{50} 测定

藻细胞叶绿素和类胡萝卜素的含量用 80% 的丙酮进行提取测定,低温暗处静置 24 h 提取脂溶性色素.在 450、645、663 nm 下测定藻细胞吸光值,按照下列公式进行计算:叶绿素质量浓度 $\text{Chl}a = 12.72 \times \text{OD}_{663} - 2.7 \times \text{OD}_{645}$;类胡萝卜素质量浓度 $\text{Carotenoids} = 4.1 \times \text{OD}_{450} - 0.0435 \times \text{Chl}a$ ^[11-12].以概率单位-质量浓度对数法(Probit method),利用 SPSS17.0 中 Probit 程序对 *M.aeruginosa* PCC7806 在草甘膦暴露后 96 h 的 EC_{50} 值进行计算^[13-14].

1.5 叶绿素荧光多相瞬态上升动力学参数分析

不同温度下的叶绿素荧光多相瞬态上升动力学用水体叶绿素荧光仪(Aquapen-CAP-C100,Photo Systems Instruments,The Czech Republic)测定,测定光强为 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,记录 50 $\mu\text{s} \sim 1 \text{ s}$ 荧光瞬态上升曲线的变化.测定前,所有样品充分暗适应 15 min^[15].

1.6 数据统计分析

实验数据使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(Qne-Way ANOVA,LSD)及回归分析, $P < 0.05$ 时认为具有显著差异, $P < 0.01$ 时认为有极显著差异.

2 结果与分析

2.1 草甘膦对 *M.aeruginosa* PCC7806 生长的影响

草甘膦对 *M.aeruginosa* PCC7806 生长的影响如图 1 所示,在草甘膦胁迫 24 h 后,当质量浓度大于或等于 50 mg/L 时,*M.aeruginosa* PCC7806 的生长就表现出显著抑制效应.随着草甘膦质量浓度的增加,*M.aeruginosa* PCC7806 生长抑制效应也逐渐增强.胁迫时间达到 96 h 后,50 ~ 400 mg/L 草甘膦胁迫处理组的细胞数还是显著低于对照.将草甘膦质量浓度对数与 96 h 相对应的抑制率做回归分析(图 2),得出草甘膦对 *M.aeruginosa* PCC7806 50% 生长抑制质量浓度(EC_{50})为 62.33 mg/L.

2.2 草甘膦对 *M.aeruginosa* PCC7806 细胞色素含量的影响

图 3、图 4 分别显示了草甘膦胁迫对 *M.aeruginosa* PCC7806 细胞内 Chl.a 类胡萝卜素的影响.细胞内 Chl.a 与类胡萝卜素含量变化趋势基本相似.当草甘膦质量浓度为 50 mg/L 时,*M.aeruginosa* PCC7806 细胞内 Chl. a 含量在 48 h 显著高于对照.在 100 mg/L 时,*M.aeruginosa* PCC7806 细胞内 Chl. a 和类胡萝卜素含量在 72 h 均显著高于对照.当草甘膦质量浓度大于或等于 200 mg/L 时,*M.aeruginosa* PCC7806 细胞内 Chl. a 和类胡萝卜素含量均显著低于对照.

2.3 叶绿素光诱导动力学

从图 5(a;24 h;b;96 h)中可以看出草甘膦胁迫下 *M.aeruginosa* PCC7806 叶绿素诱导荧光多相瞬态上升动力学呈 O-J-I-P 特征.对照及低质量浓度(50 mg/L)组的叶绿素诱导荧光多相瞬态上升动力学均具有典型的 J,I,P 三个波峰.24h 培养后,低质量浓度(50 mg/L)组的 I 相和 P 相高于对照组,100 mg/L 与 200 mg/L

L 组的叶绿素诱导荧光均低于对照组,二者变化幅度较高质量浓度(400 mg/L)组低,且二者曲线较为接近。当质量浓度达到 800 mg/L,其 O-J-I-P 特征消失。96 h 培养后,各质量浓度变化较大,低质量浓度(50 mg/L)组的 P 相高于对照组,100 mg/L 与 200 mg/L 组的叶绿素诱导荧光的 P 相均高于对照组,O-J-I-P 特征变化较为平缓,400 mg/L 与 800 mg/L 质量浓度的 O-J-I-P 特征均已消失。

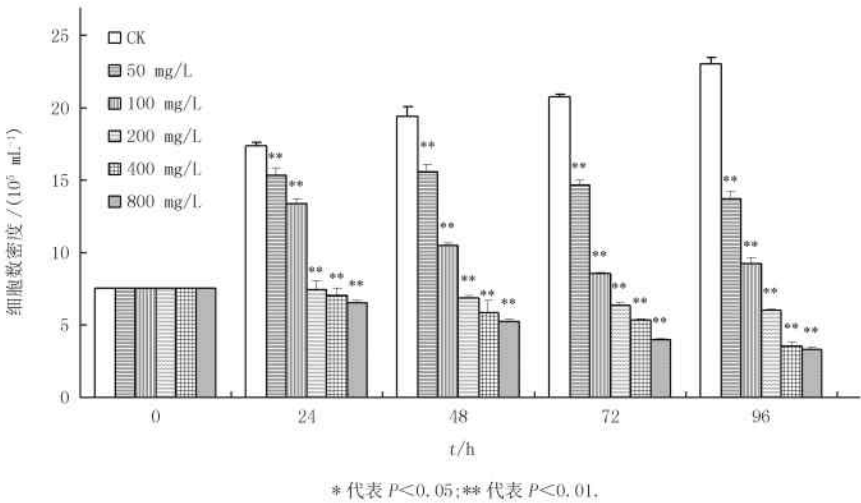


图1 草甘膦胁迫对 *M. aeruginosa* PCC7806 细胞密度的影响

3 讨 论

长期以来农药的广泛使用为防治病害对农作物及农副产品的危害,保障农业健康稳定发展,做出了贡献,但长期使用农药对于环境及人类健康又是一把双刃剑,会对环境产生巨大影响。除草剂进入市场较晚,但发展迅速,目前已经成为第一大类农药,草甘膦是一种非选择性、无残留灭生性除草剂,目前被广泛使用。通过长期的喷洒,草甘膦可通过地表径流和渗透进入水环境,直接威胁水生态平衡,已有研究表明,可以在地表水中检测出一定质量浓度的草甘膦,其对于水中的初级生产力有一定影响,如草甘膦可以影响藻类群落的组成,对于绿藻的生长具有抑制作用等。

蓝藻作为水体中常见的原核藻类,其分布较为广泛,由于水体富营养化,蓝藻常常成为水体的优势种类。已有研究报道了草甘膦对于部分蓝藻的生理影响,如对蓝藻超微结构、色素含量等研究,但关于草甘膦对蓝藻叶绿素光诱导动力学研究较少,对于其光合系统的响应还需要进一步研究。

通过本研究,发现除草剂对藻类的毒性效应在很多时候表现为剂量—效应相关性。草甘膦在高质量浓度(大于 100 mg/L)下能抑制 *M. aeruginosa* PCC7806 叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量,草甘膦质量浓度越大,其抑制作用越强;而低质量浓度下(50 mg/L 和 100 mg/L)的草甘膦对叶绿素 a 和类胡萝卜素具有促进作用。不少研究表明,低质量浓度下,除草剂能够促进藻类生长;而高质量浓度下,除草剂又抑制藻类生长,这可能是由于除草剂对藻细胞的毒性和藻细胞对除草剂的降解两种作用同时存在,只是对于不同的质量浓度,两种作用占主导地位会有所不同^[16]。

将草甘膦质量浓度对数与 96 h 相对应的抑制率做回归分析,得出草甘膦对 *M. aeruginosa* PCC7806

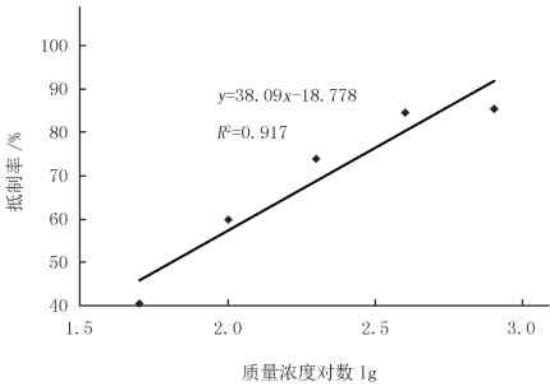
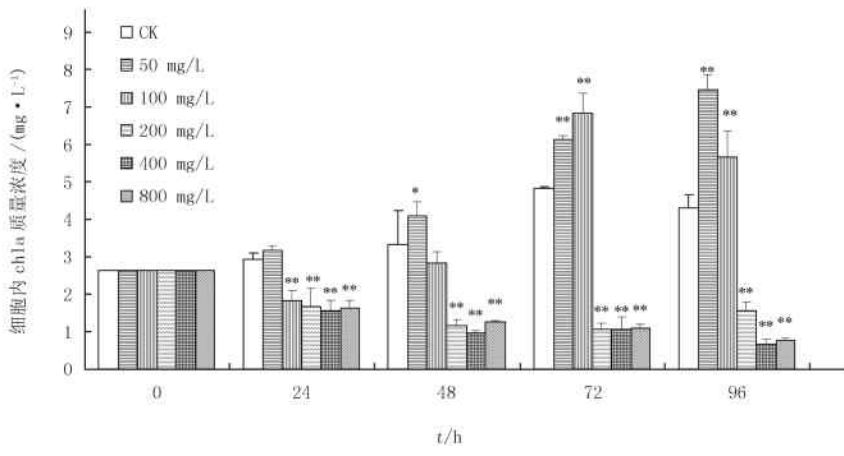


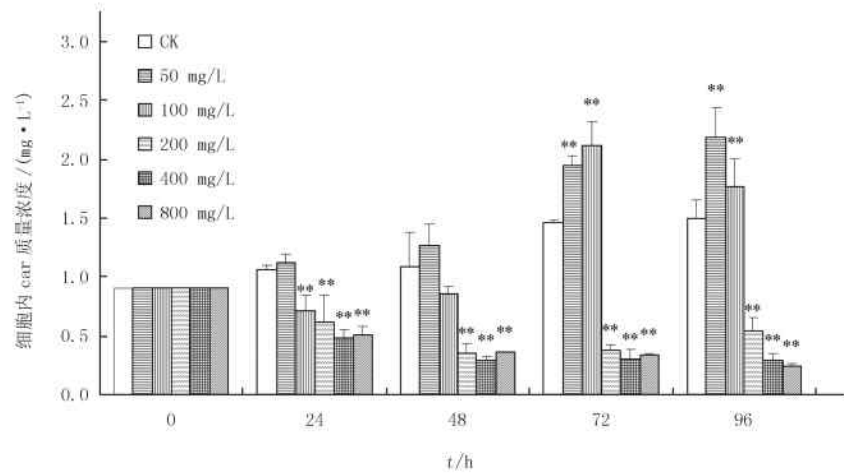
图2 生长抑制率—质量浓度回归分析的影响

50%生长抑制质量浓度(EC_{50})为 62.33 mg/L.而同一种除草剂对不同藻种的生长影响是不同的,主要是由于藻细胞对有害污染物的亲和性不同,进而导致毒性的差异^[17].王娜^[18]研究发现在 96 h 下草甘膦对四尾栅藻的 EC_{50} 值 7.25 mg/L.其急性毒性较比辛硫磷大.朱国念等^[19]研究发现草甘膦对斜生栅藻的 EC_{50} (96 h)为 623.2 mg/L,同时观察到低质量浓度下(18.8 mg/L)72 h 后,草甘膦对斜生栅藻的生长有刺激作用.张哲^[20]研究发现质量浓度 2~8 mg/L 以及 5~15 mg/L 的草甘膦分别对旋链角毛藻和盐生杜氏存在不同的刺激生长效应,而草甘膦对两种藻的抑制生长剂量分别是 >10 mg/L 和 >15 mg/L.李培林^[21]研究发现草甘膦对硅藻的 EC_{50} (96 h)值为 55.92 mg/L,草甘膦属于中毒性.藻类对除草剂的降解,会影响其在水体中的残留,藻类降解草甘膦的过程中需要可能需要细菌的参与,蓝藻细胞没有此类基因^[23].



* 代表 $P < 0.05$; ** 代表 $P < 0.01$.

图3 草甘膦胁迫对 *M. aeruginosa* PCC7806 Chl. a 质量浓度的影响



* 代表 $P < 0.05$; ** 代表 $P < 0.01$.

图4 草甘膦 *M. aeruginosa* PCC7806 类胡萝卜素质量浓度的影响

藻类常常被作为环境的指示种应用于毒理学研究,藻类的光合系统 II 对环境较为敏感,叶绿素光诱导荧光多相瞬态上升动力学曲线可以反映出样品受胁迫的程度,邱志浩^[22]对两种微囊藻的草甘膦胁迫研究发现,24 h 质量浓度 0.2 mg/L 胁迫下的微囊藻 SOD 活性增高,MDA 含量降低,从酶指标反映出了藻细胞受到了胁迫后的低质量浓度兴奋效应,但未研究其光合系统的影响,本研究发现在低质量浓度时,叶绿素诱导荧光多相瞬态上升动力学曲线在 24 h 后呈现出典型的 J, I, P 三个峰.而且高于对照,表明了其 PSII 光化学活性增高,同时从曲线表明草甘膦对微囊藻细胞 PSII 电子的供给产生了影响.已有研究表明,高质量浓度下的草甘膦会对绿色微囊藻(*M. viridis*)的生长产生影响,并诱导细胞内的细胞器发生程序性死亡^[22].通过本

研究对其光合活性的研究,发现在高质量浓度下,96 h 的胁迫导致 *M.aeruginosa* PCC7806 的 O-J-I-P 特征消失,通过分析可以推测高质量浓度草甘膦胁迫导致 PSⅡ 的反应活性中心破坏,抑制了反应中心的电子传递,同时导致受体侧电子容量减小,导致光合系统中的放氧复合体损伤,最终抑制了光合作用.

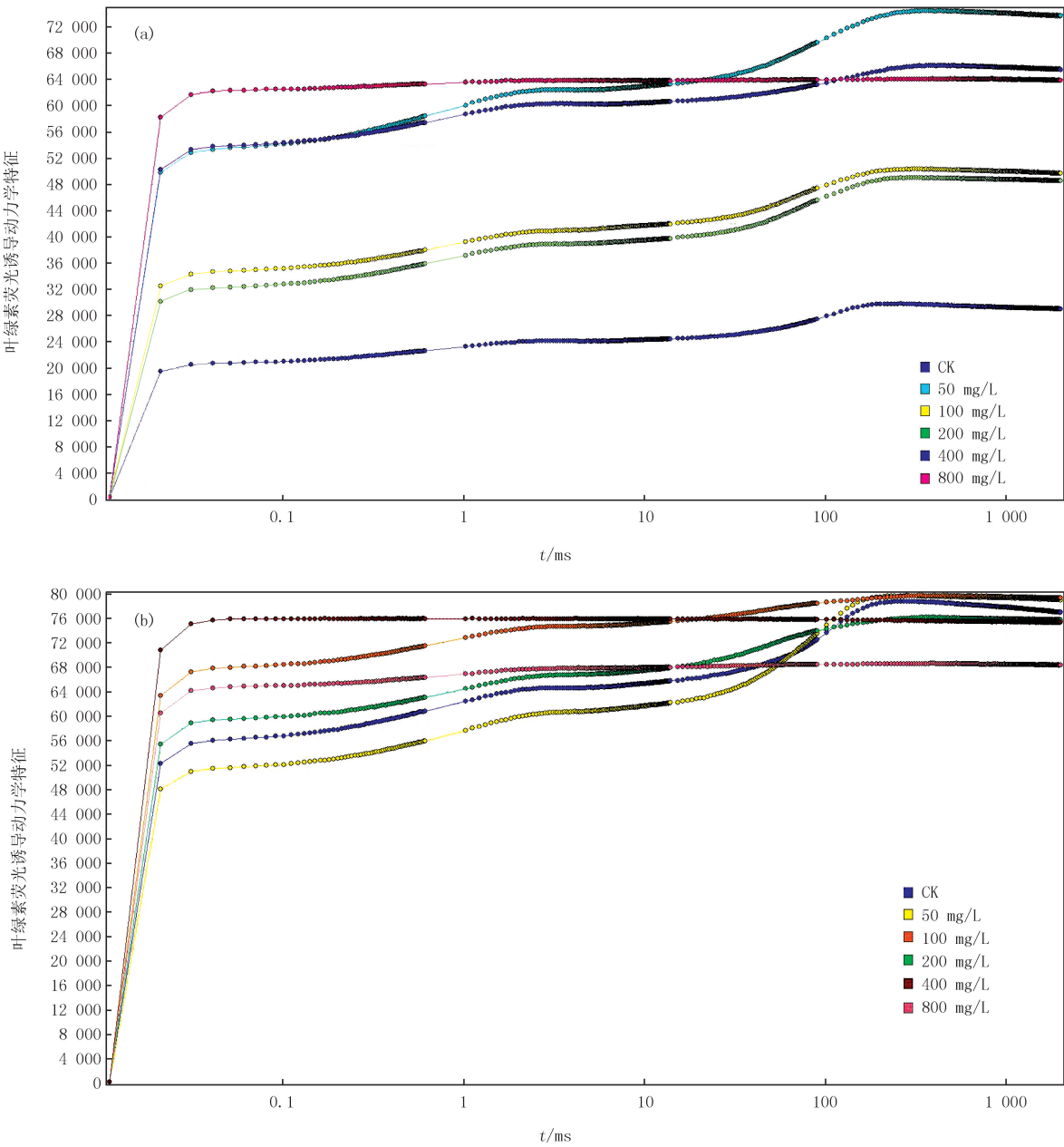


图 5 草甘膦胁迫对 *M. aeruginosa* PCC7806 叶绿素光诱导动力学特征的影响 (a:24 h;b:96 h)

参 考 文 献

[1] 张一宾.当今世界农药市场的特点及趋势[J].新农药,2006(1):1-4.

[2] 潘丽萍,张锋,朱宝立.草甘膦的毒性研究[J].中国工业医学杂志,2016(2):120-123.

[3] 俞慧.草甘膦毒性作用研究进展[J].蚌埠医学院学报,2012,37(6):743-744.

[4] 邓朝晖,袁峻峰,陈德辉,等.三种除草剂对斜生栅藻生长的影响[J].上海师范大学学报(自然科学版),2000,29(01):92-95.

[5] Smith A E,Grover R,Cessna A J,et al.Fate of Diclofop-methyl After Application to a Wheat Field[J].Journal of Environmental Quality, 1986,15(3):234-238.

[6] Solomon K R,Giesy J P,Lapoint T W,et al.Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters[J].Environmental

Toxicology & Chemistry,2013,32(1):10-11.

[7] Tang J Y,Escher B I.Realistic environmental mixtures of micropollutants in surface,drinking,and recycled water;herbicides dominate the mixture toxicity toward algae[J].Environmental Toxicology & Chemistry,2014,33(6):1427-1436.

[8] Ahlgren G,Lundstedt L,Brett M,et al.Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters [J].Journal of Plankton Research,1990,12(4):809-818.

[9] Strasser B J,Strsser R J.Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions:The JIP Test [M].In:Maithis P (Eds.),Photosynthesis:from Light to Biosphere.Dordrecht;KAP Press.1995:977-980.

[10] Stanier R Y,Kunisawa R,Mandel M,et al.Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales)[J].Bacterio-logical Reviews,1971,35(2):171-205.

[11] Richards F A,Thompson T G.The Estimation and Characterization of Plankton Populations by Pigment Analysis.II.A spectrophotomet-ric method for the estimation of plankton pigments[J].Marine research,1952,11:156-157

[12] 康丽娟.淀山湖富营养化控制叶绿素 a 基准研究初探[J].水生生物学报,2012,36(03):509-514.

[13] Spss Inc.SPSS 10.0 Synatx Reference Guid [M].Chicago;SPSS Inc,1999.

[14] 赵劲松,于书霞.利用概率单位法估算 EC₅₀ 的研究 (Estimation of Probit Methods on EC₅₀)[J].生态毒理学报,2010,5(3):420-425.

[15] Shao J,Li R,Lepo J E,et al.Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances:Problems and prospects[J].Journal of Environmental Management,2013,125(1):149-155.

[16] 徐小花,肖铭,潘慧云,等.阿特拉津对铜绿微囊藻和四尾栅藻生长的影响[J].生态与农村环境学报,2008,24(1):72-76.

[17] 陈海柳,潘纲,闫海,等.六价铬抑制淡水蓝绿藻生长的毒性效应[J].环境科学,2003,24(2):13-18.

[18] 王娜.有机磷农药对水华藻的毒性及干扰效应[D].广州:暨南大学,2012.

[19] 朱国念,楼正云,孙锦荷.草甘膦对水生生物的毒性效应及环境安全性研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(3):309-312.

[20] 张哲,王江涛,谭丽菊.草甘膦对旋链角毛藻和盐生杜氏藻的毒性兴奋效应[J].生态毒理学报,2010,05(5):685-691.

[21] 李培林.草甘膦与 Cu²⁺ 对菱形藻的单一与复合胁迫研究[D].贵阳:贵州师范大学,2016.

[22] 邱志浩.除草剂草甘膦对两种蓝藻的毒性研究[D].上海:上海应用技术学院,2016.

[23] Saxton M A,Morrow E A,Bourbonniere R A,et al.Glyphosate influence on phytoplankton community structure in Lake Erie[J].Journal of Great Lakes Research,2011,37(4):683-690.

Effects of glyphosate on the growth and chlorophyll fluorescence induction dynamics of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806

Pan Wenjing, Wang Yuliang, Liu Yang, Li Xiaoyu

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: The effects of the growth ,cytochrome contents and chlorophyll fluorescence transient of *M.aeruginosa* PCC 7806 under the stress of glyphosate were studied.The results indicated that the growth of *M.aeruginosa* PCC 7806 was significantly inhibited when the concentration of glyphosate was greater than 50 mg/L, By linear regression analysis, 96 h, EC₅₀ of glyphosate on *M.aeruginosa* PCC 7806 was 62.33 mg/L.AT the concentration of 200 mg/L, the contents of chlorophyll a and carotenoid could be significantly reduced.The result of chlorophyll fluorescence transient analysis showed that photosynthetic system was no significantly inhibited by the low concentration of glyphosate,and the peak showed higer than control group .But when the concentration of glyphosate was 100 mg/L,24h and 96h results indicated that O-J-I-P features have disappeared,that the photosystem II (PS II) activity is inhibited.

Keywords: Glyphosate;*Microcystis aeruginosa* ;EC₅₀ ;Cytochrome;Chlorophyll fluorescence

[责任编辑 王凤产]