

四羟甲基硫酸磷去除铜绿微囊藻效果及其机制研究

卢 晶 钟国华 郝卫宁 孙宝兴 胡美英[#]

(华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要 研究了四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的去除效果及机制。结果表明, 四羟甲基硫酸磷半效应浓度(EC_{50})与藻细胞数目呈正相关, 线性方程为: $Y = 0.6282X + 0.9564$, $R^2 = 0.9973$ (其中 Y 为 EC_{50} , mg/L; X 为处理 48 h 后铜绿微囊藻细胞数目, 10^6 /mL)。11.0 mg/L 四羟甲基硫酸磷处理铜绿微囊藻 36 h 后, 藻细胞可溶性蛋白、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)较对照组分别提高 10.47%、11.31%、140.98%, 四羟甲基硫酸磷能够显著破坏藻细胞膜通透性, 提高酯酶活性。四羟甲基硫酸磷通过破坏藻细胞膜, 造成膜脂过氧化, 干扰藻体正常代谢而除藻。

关键词 四羟甲基硫酸磷 铜绿微囊藻 作用机制 除藻效果

Mechanism of *Microcystis aeruginosa* removal by THPS LU Jing, ZHONG Guohua, HAO Weining, SUN Baoxing, HU Meiyang. (Key Laboratory of Pesticide and Chemical biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642)

Abstract: 4-hydroxymethyl phosphonium sulfate (THPS) was employed for the removal of *Microcystis aeruginosa*, the effect of THPS concentration, initial algae concentration on removal efficiency was investigated and removal mechanism was studied by detecting the variation of dissolved protein, SOD activity and MDA content in *Microcystis aeruginosa*. Results indicated that the EC_{50} of THPS was liner correlated with *Microcystis aeruginosa* cell density, with the liner equation of $Y = 0.6282X + 0.9564$ ($R^2 = 0.9973$). Treating *Microcystis aeruginosa* with 11.0 mg/L of THPS for 36 h, the dissolved protein, SOD activity and MDA content were increased by 10.47%, 11.31% and 140.98%, respectively. THPS destroyed the membrane integrity, enhanced the esterase activity and caused membrane over-oxidation, during these processes, normal metabolism was disturbed and then *Microcystis aeruginosa* was removed.

Keywords: 4-hydroxymethyl phosphonium sulfate; *Microcystis aeruginosa*; mechanism; remove effect

随着城市化进程的加快和社会经济的发展, 水体富营养化成为当今世界面临的最主要的水污染问题之一^[1,2]。铜绿微囊藻是许多湖泊和水库发生富营养化时的优势藻^[3], 其在生长过程中产生微囊藻毒素(MC)。MC 结构稳定, 降解缓慢, 对水生植物、鱼类、水生无脊椎动物、浮游动物等存在一定影响^[4]。并可通过饮用水及食物链富集于人体, 造成肝脏、肾、肠等器官病变, 甚至诱发癌症^[5]。

目前, 除藻方法可以分为化学法、生物法和物理法。化学法主要是采用铜、银及其他一些人工合成化合物^[6-8]除藻, 简单易行, 对湖面景观没有影响, 但这些化学药剂污染严重, 不利于养殖池塘的使用。生物法即加入生物菌^[9]或放入特殊水体动物^[10]除藻, 有可能对湖泊生物种群结构、生物多样性造成一定影响, 但该方法处理时间较长, 不能从根本上清除

湖中的污染物, 有反弹现象。物理法是用捕捞、过滤、气浮等方法除藻, 其优点是标本兼治, 对水质及水生生物种群无不利影响, 能携带去除水中的污染物, 但该方法成本高, 对湖面景观有一定影响, 不宜大面积的使用。因此, 开发新型经济、高效、低污染杀菌剂不仅可以保护人类健康和环境安全, 还可以节省大量开支。

四羟甲基硫酸磷(THPS)^[11]最早是作为处理工作服等棉纤维制品的阻燃剂的前体化合物而大规模生产的, 于 1997 年获得美国“总统绿色化学奖”, 同年通过美国安全证明, 正式用于环境保护领域。四羟甲基硫酸磷分子结构见图 1, 其含磷 11.45% (质量分数), 具有高效、广谱、低剂量、低发泡和低毒的特点, 与传统的杀生剂相比, 具有优秀的环境性能, 不持续存在于环境中, 更有利于环境保护^[12]。笔者

第一作者: 卢 晶, 男, 1984 年生, 硕士研究生, 研究方向为水华蓝藻防治。[#] 通讯作者。

通过分析四羟甲基硫酸磷对藻细胞可溶性蛋白、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)、细胞膜通透性和细胞酯酶活性的影响,探讨四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻去除机制,为更好地利用四羟甲基硫酸磷来控制铜绿微囊藻,开发特效的水华抑制剂提供参考。

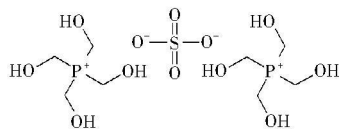


图1 四羟甲基硫酸磷分子结构

Fig.1 The molecules structure of THPS

1 材料与方法

1.1 材料

40%(质量分数)四羟甲基硫酸磷。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*, No. 905)购自中国科学院武汉水生生物研究所,采用MA培养基,在生化培养箱内培养,温度 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度2300 lx,光暗比为12 h:12 h,摇瓶培养,每天振荡2次。

1.2 实验方法

1.2.1 藻细胞数目的测定

用血球计数板在显微镜下计数,并用UV_{mini}1240分光光度计在680 nm波长处测得藻液吸光度(OD_{680}),得出对照组铜绿微囊藻细胞数目(N_0)与 OD_{680} 的换算关系如下:

$$N_0 = 25.28 \times OD_{680} - 0.073 \quad (1)$$

1.2.2 除藻活性检测

通过摇瓶实验检测四羟甲基硫酸磷除藻活性。培养混合液总体积50 mL,其中包括处于指数生长期不同藻细胞数目和生长良好的藻液、一定量的培养液(121 $^\circ\text{C}$ 灭菌30 min)及四羟甲基硫酸磷。四羟甲基硫酸磷设置一定浓度梯度,每个浓度设3个平行样。将上述培养混合液置于温度26 $^\circ\text{C}$ 、光照强度2300 lx、光暗比12 h:12 h的生化箱中培养。根据藻细胞数目,计算四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻的相对抑制率,见式(2)。

$$IR = (1 - N/N_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中:IR为相对抑制率,%; N 为加入四羟甲基硫酸磷的铜绿微囊藻细胞数目, 10^6 个/mL。

1.2.3 可溶性蛋白含量和抗氧化酶活性的测定

取藻细胞数目为 15.05×10^6 个/mL藻液20 mL,4 $^\circ\text{C}$ 、10000 r/min冷冻离心10 min,弃上清液,加入4.0 mL PBS缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 7.0, 4

$^\circ\text{C}$ 预冷),-20 $^\circ\text{C}$ 反复冻融3次,再4 $^\circ\text{C}$ 、7000 r/min冷冻离心10 min,此上清液即为粗提液,用于可溶性蛋白含量和抗氧化酶活性(包括SOD活性和MDA含量)测定。可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝G-250法测定^[13],SOD活性采用氮蓝四唑(NBT)法测定^[14],MDA含量采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定^[15]。

1.2.4 流式细胞术测定细胞膜通透性及酯酶活性

当细胞膜受损后,碘化丙啶(PI)染料大分子能进入细胞内与核酸物质结合,在蓝光的激发下产生红色荧光,使流式细胞仪检测到的荧光信号明显增强,通过流式细胞仪的FL2检测通道(560~590 nm)收集其荧光强度^[16]。PI用三蒸水稀释到100 $\mu\text{mol/L}$,4 $^\circ\text{C}$ 保存;荧光素二乙酸(FDA)用丙酮稀释到1 mmol/L,-18 $^\circ\text{C}$ 保存。取藻液2 mL,经0.05 mm孔径滤膜过滤后,用PI和FDA染色。加入PI和FDA染料的最最终摩尔浓度分别为10、25 $\mu\text{mol/L}$,25 $^\circ\text{C}$ 条件下分别在暗室温育15、8 min后,用流式细胞仪分别检测铜绿微囊藻细胞膜通透性及细胞酯酶活性。PI和FDA荧光值用平均荧光强度表示^[17]。

1.2.5 数据统计分析方法

本试验中的测定数据、平均数、标准误差、线形回归方程数据用Microsoft Excel 2007软件处理,并用DPS软件邓肯氏新复极差多重比较法(DMRT)进行差异性分析。流式细胞仪检测到的数据用CELL Quest软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同浓度四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻的去除效果

图2显示不同质量浓度四羟甲基硫酸磷作用下

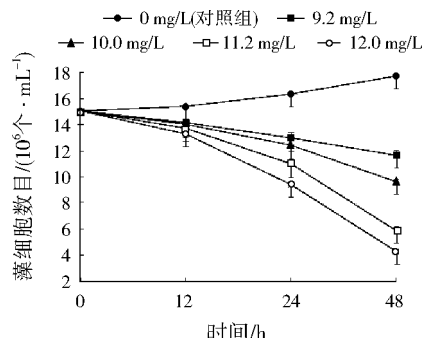


图2 四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻的除藻活性

Fig.2 Effect of THPS concentration on *Microcystis aeruginosa* removal

注:数据为3次重复的平均值±标准误差,图3同。

铜绿微囊藻细胞数目随时间的变化情况。四羟甲基硫酸磷的相对除藻效果随浓度的升高而提高,处理 48 h,四羟甲基硫酸磷质量浓度为 9.2、12.0 mg/L 的相对抑制率分别达到 37.78%、76.82%。

2.2 四羟甲基硫酸磷对不同藻细胞数目下铜绿微囊藻的去除效果

四羟甲基硫酸磷对不同藻细胞数目下铜绿微囊藻 48 h 的去除效果见表 1。根据表 1 中的藻细胞数目和铜绿微囊藻死亡率的回归方程,得出半效应浓度(EC_{50}),将 EC_{50} 和藻细胞数目关系作图 3,数据经拟合后,表明藻细胞数目同 EC_{50} 呈正相关,线性关系表达式如下:

$$Y = 0.628\ 2X + 0.956\ 4, R^2 = 0.997\ 3 \quad (3)$$

式中: Y 为 EC_{50} , mg/L; X 为处理 48 h 后铜绿微囊藻细胞数目, 10^6 个/mL。

表 1 四羟甲基硫酸磷 48 h 除藻效果

Table 1 *Microcystis aeruginosa* removal efficiency of THPS in 48 h

藻细胞数目 (10^6 个 \cdot mL $^{-1}$)	回归方程 ¹⁾	R
7.30	$y = 2.385\ 7 + 3.449\ 9x$	0.997\ 1
10.04	$y = 0.504\ 4 + 5.288\ 0x$	0.986\ 1
15.05	$y = -5.000\ 9 + 9.899\ 8x$	0.990\ 3
17.21	$y = -6.085\ 3 + 10.305\ 4x$	0.996\ 0
21.53	$y = -10.963\ 5 + 13.740\ 3x$	0.986\ 1

注: ¹⁾ x 为四羟甲基硫酸磷浓度的对数值; y 为铜绿微囊藻死亡率, %。

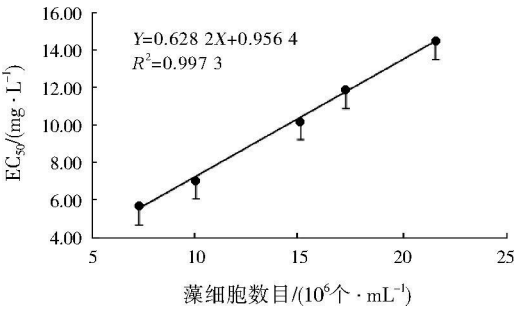


图 3 处理 48 h 铜绿微囊藻细胞数目和 EC_{50} 的关系
 Fig. 3 Relationship between *Microcystis aeruginosa* cell density and EC_{50} in 48 h

2.3 四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白是藻细胞的基本组成成分。本试验测定了在不同时间下四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻细胞中可溶性蛋白含量的影响(见图 4)。由图 4 可知,四羟甲基硫酸磷能够刺激藻细胞蛋白合成,在不同时间下经不同浓度四羟甲基硫酸磷处理后,铜绿微囊藻细胞可溶性蛋白含量较对照组均

有提高。10.0 mg/L 四羟甲基硫酸磷处理 36 h 后,藻细胞可溶性蛋白含量达到最大值,较对照组提高 11.64%;而 11.0 mg/L 四羟甲基硫酸磷处理 36 h 后,藻细胞可溶性蛋白较对照组提高 10.47%。

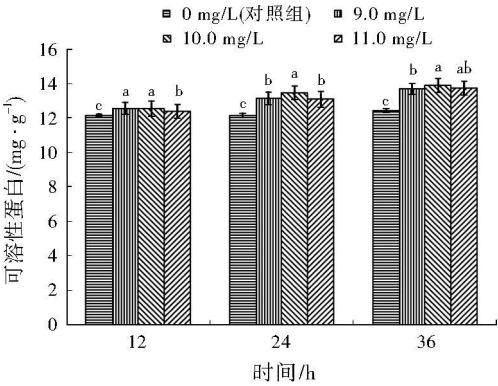


图 4 四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻可溶性蛋白的影响

Fig. 4 Effect of THPS on the dissolved protein of *Microcystis aeruginosa*

注: 数据为 3 次重复的平均值士标准误差,在同一时间下不同四羟甲基硫酸磷浓度上字母相同者表示在 0.05 水平上差异不显著(即 DM RT 法),图 5 至图 8 同。

2.4 四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻细胞抗氧化系统的影响

在不同时间下四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻 SOD 相对活性测定结果(见图 5)显示,不同浓度四羟甲基硫酸磷均能使藻细胞 SOD 相对活性显著提高,这种提高在同一时间下较低浓度水平(≤ 10.0 mg/L)表现为递增。11.0 mg/L 处理较 10.0 mg/L 处理细胞 SOD 含量在不同时间均有一定程度下降,但仍显著高于对照组。在不同时间下四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻 MDA 的影响见图

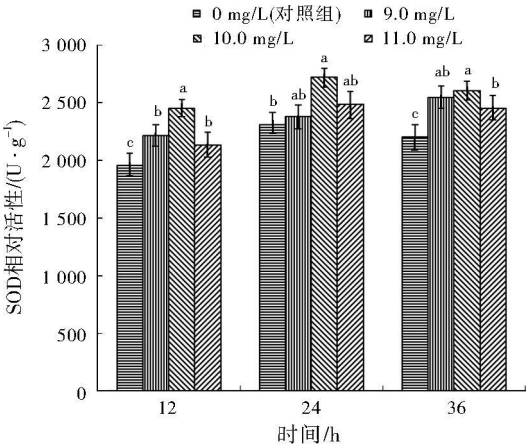


图 5 四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻 SOD 相对活性的影响

Fig. 5 Effect of THPS on SOD activities of *Microcystis aeruginosa*

6. 11.0 mg/L 四羟甲基硫酸磷处理 36 h, MDA 含量达到最大值, 较对照组提高 140.98%, 增幅高于 SOD 活性(11.31%)。

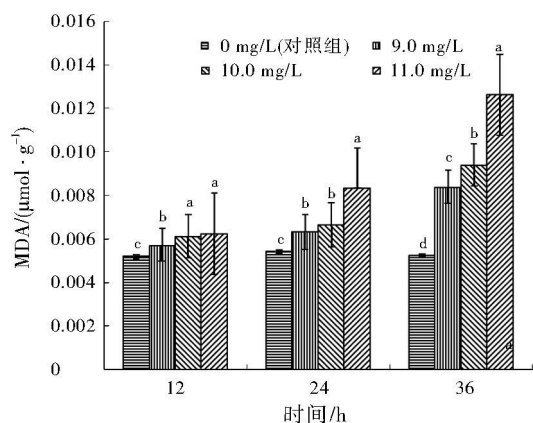


图 6 四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻 MDA 的影响
Fig. 6 Effect of THPS on the MDA activities of *Microcystis aeruginosa*

2.5 四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻细胞膜通透性和细胞酯酶活性的影响

藻细胞膜通透性随四羟甲基硫酸磷浓度的增加和时间的推移而逐渐增强(见图7)。在同一时间下, 不同浓度的四羟甲基硫酸磷处理细胞膜通透性变化差异显著, 11.0 mg/L 四羟甲基硫酸磷处理 36 h, PI 平均荧光强度达到最大值, 较对照组提高 200.00%。不同浓度四羟甲基硫酸磷处理后铜绿微囊藻细胞酯酶活性测定结果显示, 在同一时间下各浓度四羟甲基硫酸磷均使铜绿微囊藻细胞酯酶活性增强, 10.0 mg/L 四羟甲基硫酸磷处理 36 h 铜绿微囊藻细胞酯酶活性最高, 较对照组提高 7.50% (见图 8)。

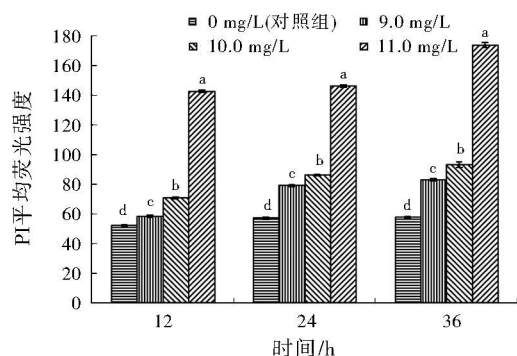


图 7 四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻细胞膜通透性的影响

Fig. 7 Effect of THPS on membrane integrity of *Microcystis aeruginosa*

3 讨论

四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻去除效果随藻细

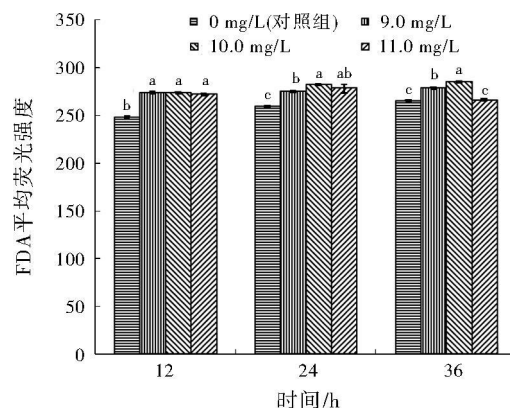


图 8 四羟甲基硫酸磷质量浓度对铜绿微囊藻细胞酯酶活性的影响

Fig. 8 Effect of THPS on esterase activity of *Microcystis aeruginosa*

胞数目升高而降低, EC_{50} 与藻细胞数目呈正相关, 这可能和藻细胞与四羟甲基磷离子的结合率有关^[18]。当培养液中四羟甲基硫酸磷浓度一定时, 四羟甲基磷离子平均分布在带负电的藻细胞表面, 随着藻细胞数目的增加, 与单个藻细胞结合的四羟甲基磷离子减少, 进而除藻活性下降, EC_{50} 升高。

可溶性蛋白是铜绿微囊藻代谢和生理状态的一个重要指标, 其变化反映出藻细胞蛋白质合成、降解和变性等多方面的动态^[19]。经不同浓度四羟甲基硫酸磷处理后, 各组铜绿微囊藻细胞可溶性蛋白含量较对照组均有提高, 四羟甲基硫酸磷能够刺激藻细胞蛋白合成, 干扰藻细胞蛋白代谢平衡。SOD 是细胞体内消除活性氧自由基最关键的酶类之一。四羟甲基硫酸磷干扰藻细胞内活性氧代谢平衡, 增加了活性氧积累, 致使体内抗氧化系统机能应激加强, 以清除体内过多的活性氧。这一结果与其他金属、有机物等使植物体内 SOD 活性增加的结果相似^[20]。当 O_2^- 的产生速率大于 SOD 活性的增加速率时, O_2^- 及其产物的毒性超过了 SOD 清除能力, 并使 SOD 酶系遭到破坏, 从而降低 SOD 活性。MDA 是膜脂过氧化的关键产物, 代表细胞膜脂过氧化程度, MDA 在细胞内的累积量通常被用作膜脂过氧化程度的指标。四羟甲基硫酸磷造成铜绿微囊藻细胞膜脂过氧化, 藻细胞虽然可以通过合成保护性酶来抵抗这种损害, 但其抵抗效果小于破坏程度。

流式细胞仪检测结果说明, 随四羟甲基硫酸磷浓度升高铜绿微囊藻细胞膜通透性显著增加, 四羟甲基硫酸磷对微囊藻毒性呈明显浓度依赖性变化,

这与铜对微囊藻的抑制机制相同^[21]。酯酶是单细胞藻类生长发育不可缺少的酶之一,能催化脂类化合物水解并进入中间代谢,可以表征细胞的代谢活性。低剂量四羟甲基硫酸磷作用下胞内酶活性显著升高,这可能是由于低剂量四羟甲基硫酸磷会加速细胞膜磷质代谢,从而刺激胞内酶活性升高^[22],且在细胞膜显著破碎的情况下,酯酶活性仍有所增强,酯酶活性具有非能量代谢依赖性,死细胞中依然存在这种代谢活力^[23]。11.0 mg/L四羟甲基硫酸处理36 h, FDA 平均荧光强度较 10.0 mg/L处理显著下降,是由于藻细胞膜通透性增强导致胞内荧光物质外流造成的^[24]。

四羟甲基硫酸磷广谱、快速、高效,对虹鳟鱼 96 h 的 $EC_{50} > 119$ mg/L,是一种优良的杀生剂。但四羟甲基硫酸磷会增加水体中磷元素的含量,给水体中蓝藻再次爆发带来隐患。四羟甲基硫酸磷适用于流动水体及养殖池塘中铜绿微囊藻等有害蓝藻暴发时的应急处理,不宜频繁、大规模施用。

4 结 论

(1) 四羟甲基硫酸磷对铜绿微囊藻的去除效果随藻细胞数目变化而变化,处理 48 h 时,藻细胞数目与 EC_{50} 的线性相关方程为: $Y = 0.628 2X + 0.956 4$, $R^2 = 0.997 3$ 。

(2) 四羟甲基硫酸磷能打破铜绿微囊藻细胞代谢平衡,造成藻细胞可溶性蛋白含量、SOD 活性、MDA 含量较对照组升高,并能引起藻细胞膜脂过氧化,改变藻细胞膜的通透性。

参考文献:

- [1] GUO L. Doing battle with the green monster of Taihu Lake [J]. Science, 2007, 317(5842): 1166.
- [2] PAN Gang, ZOU Hua, CHEN Hao, et al. Removal of harmful cyanobacterial blooms in Taihu Lake using local soils. III. Factors affecting the removal efficiency and an in situ field experiment using chitosan-modified local soils[J]. Environ. Pollut., 2006, 141(2): 206-212.
- [3] 邹迪,肖琳,杨柳燕,等.不同氮磷比对铜绿微囊藻及附生假单胞菌磷代谢的影响[J].环境化学,2005,24(6):647-650.
- [4] 韩志国,武宝珩,郑解生,等.淡水水体中的蓝藻毒素研究进展[J].暨南大学学报,2001,22(3):129-135.
- [5] 李效宇,李磊.微囊藻毒素与人类健康关系研究进展[J].中国公共卫生,2008,24(8):1016-1017.
- [6] WILDE K L, STAUBER J L, MARKICH S L, et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*) [J]. Arch. Environ. Contam.

- Toxicol., 2006, 51(2): 174-185.
- [7] PARK M H, HAN M S, AHN C Y, et al. Growth inhibition of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by rice straw extract [J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(3): 307-312.
- [8] 丁丛,于晓娟,李亚红,等. AgBiO₃对铜绿微囊藻生长的致毒效应[J].环境污染与防治,2008,30(6):49-57.
- [9] LEVY J L, STAUBER J L, WAKELIN S A, et al. The effect of bacteria on the sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays[J]. Chemosphere, 2009, 74(9): 1266-1274.
- [10] KIM B H, HWANG S J, HAN M S. Bacterium and fish-mediated morphological changes of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Freshwater Ecology, 2008, 23(4): 613-622.
- [11] 郑书忠.水处理药剂及其应用[M].北京:中国石化出版社,2003:188-189.
- [12] 许力,董文魁,仲金魁,等.环保型杀生剂 THPS 在水处理中的应用[J].甘肃科技,2004,20(4):54-55.
- [13] 王孝平,邢树礼.考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J].天津化工,2009,23(3):40-42.
- [14] 自俊青,邓希贤,金虬.氮蓝四唑光照法实验操作的改进及效果[J].北京师范大学学报:自然科学版,1998,34(1):101-104.
- [15] 赵世杰,许长成,邹琦,等.植物组织中丙二醛测定方法的改进[J].植物生理学通讯,1991,30(3):207-210.
- [16] LIU Wei, CHEN Shuo, XIE Quan. Toxic effect of serial perfluorosulfonic and perfluorocarboxylic acids on the membrane system of a freshwater alga measured by flow cytometry[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(7): 1597-1640.
- [17] 于洋,孔繁翔,钱蕾蕾,等.流式细胞术在铜对藻类生态毒理研究中的应用[J].环境化学,2004,23(5):525-528.
- [18] 王海明,王宁,王晓蓉,等.不同浓度 Mn^{2+} 对铜绿微囊藻生长及其生物可利用性的影响[J].环境污染与防治,2008,30(1):13-16.
- [19] 李小路,潘慧云,徐洁,等.外源脱落酸提高金鱼藻抗铜绿微囊藻胁迫能力的研究[J].农业环境科学学报,2008,27(5):1980-1984.
- [20] ÖNCEL L, YURDAKULOL E, KELES Y, et al. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants[J]. Acta Oecologica, 2004, 26(3): 211-218.
- [21] 于洋,孔繁翔,王美林,等.应用流式细胞技术研究铜对藻细胞膜完整性及酯酶活性的影响[J].应用与环境生物学报,2006,12(5):706-709.
- [22] GIRLING A E, PASCOE D, JANSSEN C R, et al. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000, 45(2): 148-176.
- [23] DAVID N, NANCY G P, RICHARD H H, et al. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique[J]. Cytometry, 1999, 35(1): 55-63.
- [24] BERGLUND D L, EVERSMA S. Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells[J]. Cytometry, 1988, 9(2): 150-155.

编辑:贺锋萍 (修改稿收到日期:2010-02-26)