

# 防污剂 Irgarol 1051 对三角褐指藻生长及生理特性的影响

谢尔瓦妮古丽·苏来曼, 成 婕, 邓祥元, 高 坤, 马志欣

(江苏科技大学 生物技术学院, 江苏 镇江 212018)

**摘要:** 为研究防污剂 Irgarol 1051 对微藻生长及生理生化特性的影响, 以三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)为材料, 分析了 Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 生长、叶绿素 *a* 含量、可溶性蛋白质含量、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量等的影响。结果表明: Irgarol 1051 可抑制 *P. tricornutum* 的生长, 并诱导其产生耐受性; *P. tricornutum* 中叶绿素 *a*、可溶性蛋白质含量及 SOD 酶活力等均随 Irgarol 1051 质量浓度的增加而升高, 以维持其生长和生理状态; 随着 Irgarol 1051 质量浓度的升高, 藻细胞中 MDA 含量显著增加, 表明细胞中活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)过量积累, 这将破坏藻细胞的膜结构与功能。研究结果将为探讨 Irgarol 1051 对微藻的效应机制及其环境风险评价提供数据资料和科学依据。

**关键词:** Irgarol 1051; 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*); 生长; 生理特性

中图分类号: Q938.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)04-0054-05

doi: 10.11759/hyxx20150412001

Irgarol 1051(2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-cyclopropylamino-*s*-triazine)是一种三嗪类有机除草剂, 作为光合系统 II(Photosystem II, PSII)抑制剂可有效抑制海洋附着藻类的生长, 常与氧化亚铜一起形成复合防污剂, 实现对海洋污损生物的防除<sup>[1]</sup>。近年来, 由于有机锡类防污剂被全面禁用, Irgarol 1051 结合铜化合物的新型防污剂已成为海洋防污涂料市场的主要产品之一<sup>[2]</sup>。在海洋防污过程中, Irgarol 1051 以 2.5~16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$  的速率被释放到周围水体中<sup>[3]</sup>, 这是其进入水体的主要途径。由于 Irgarol 1051 降解缓慢, 难以被生物或非生物过程降解, 半衰期长达 100~350 d<sup>[4]</sup>, 且其在近岸水域的质量浓度已达到  $\mu\text{g}/\text{L}$  级, 是目前使用最多的防污剂, 也是环境中最容易检测到的、半衰期较长的防污剂之一<sup>[5-6]</sup>。

研究表明, Irgarol 1051 可通过抑制 PSII 中的电子传递, 阻断光合作用的进行, 进而影响藻类等的生存和生长<sup>[7]</sup>; 而且它在水生生态系统中具有累积作用, 会对非目标水生植物造成毒害效应<sup>[8]</sup>。目前, Irgarol 1051 对水生植物的毒性效应机理较为清晰, 主要有 3 种途径: 一是与 PSII 中的 D1 蛋白结合, 干扰 PSII 的电子传递, 从而降低 ATP、NADPH 等的产量; 二是促使细胞体内积累活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS), 增加对 PSII 的氧化应激压力; 三是阻碍 D1 蛋白的周转<sup>[8-9]</sup>。此外, 作为环境污染物, Irgarol 1051 在对水生生态系统产生毒性效应的同时,

还可改变环境生物群落的组成与丰度, 并诱导生物耐受<sup>[9]</sup>。Wendt 等<sup>[1]</sup>研究了 Irgarol 1051 对孔石莼(*Ulva lactuca* L.)游动孢子附着和生长发育的影响, 发现即使 Irgarol 1051 达到 2000 nM, 游动孢子的附着和生长未受到影响, 说明孔石莼游动孢子对 Irgarol 1051 具有较强的耐受能力, 并推测这种耐受能力可能是由于以谷胱甘肽 S 转移酶为主的酶促解毒体系引起的。但目前对 Irgarol 1051 诱导生物耐受的机理尚不清楚。

本研究以三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)为材料, 分析了 Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 生长、叶绿素 *a* 含量、可溶性蛋白含量、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量等的影响, 以期从生理生化水平上揭示 Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 生长及

收稿日期: 2015-10-12; 修回日期: 2016-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200381); 中国博士后科学基金项目(2013M531370, 2014T70532); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201410289035Z)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31200381; China Postdoctoral Science Foundation Funded Project, No. 2013M531370, No. 2014T70532; Jiangsu Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates, No. 201410289035Z]

作者简介: 谢尔瓦妮古丽·苏来曼(1992-), 女, 新疆阿克陶人, 学士, 研究方向为微藻环境生态学, 电话: 15209083736, E-mail: 2582661406@qq.com; 邓祥元, 通信作者, 男, 副教授, 博士, 研究方向为藻类环境生物学, 电话: 15189112925, E-mail: dengxy2009@126.com

生理特性的影响机制,并为阐明藻类对 Irgarol 1051 的应答反应机制提供数据资料和理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室高坤山教授课题组提供。在无菌条件下,将 *P. tricornutum* 转移至 f/2 营养液中进行培养,培养条件为:温度 20℃;光强度 4500 lx;光周期 12 h L : 12 h D。Irgarol 1051 购自广州市齐云生物科技有限公司;可溶性蛋白、SOD 及 MDA 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 藻种的活化和预培养

在无菌条件下,将 *P. tricornutum* 转移至 f/2 培养液中进行同步化培养 7 d,至对数生长期后进一步扩大培养(培养条件为:温度 20℃,光强度 4500 lx,光周期为 12 h L : 12 h D)。

#### 1.2.2 暴露试验

参照 OECD201 藻类生长抑制实验的原理和方法,并根据预试验结果在 *P. tricornutum* 培养液中加入不同质量浓度的 Irgarol 1051(0、1、3、6、9、12 μg/L),每次试验设 3 个平行,暴露时间为 96 h。

#### 1.2.3 藻细胞密度及生长速率的测定

每天取藻液 0.2 mL,采用血球计数板法测定藻细胞密度。

生长速率的计算公式如下:

$$r_t = (\ln(N_t) - \ln(N_0)) / t$$

式中,  $r_t$  为生长速率(h),  $N_t$  为  $t$  时刻的藻细胞密度(个/mL),  $N_0$  为初始藻细胞密度(个/mL),  $t$  为暴露时间(h)。

#### 1.2.4 叶绿素 $a$ 含量的测定

取 5 mL 藻液,用 Sigma 离心机在 5 000 r/min 下离心 10 min,弃上清后,再用蒸馏水重悬洗涤 2 次。向收集到的藻细胞中加入 5 mL 无水甲醇,并在 4℃ 条件下避光抽提 24 h 后,涡旋振荡 10 s,然后在 5 000 r/min 下离心 10 min,取上清液。以无水甲醇为参比,利用分光光度计在 663 nm 和 645 nm 波长下测定上清液的吸光值。

叶绿素  $a$  浓度(Chl  $a$ )的计算公式如下:

$$N_{\text{Chl } a} = 12.71 \times A_{663} - 2.59 \times A_{645}$$

式中,  $N_{\text{Chl } a}$  表示叶绿素  $a$  的浓度, μg/mL;  $A_{645}$ 、 $A_{663}$

分别表示上清液在波长为 645 nm 和 663 nm 下的吸光值<sup>[10]</sup>。

叶绿素  $a$  含量( $C_{\text{Chl } a}$ )的计算公式如下:

$$C_{\text{Chl } a} = \frac{N_{\text{Chl } a} \times V_s}{N_t \times V_z}$$

$C_{\text{Chl } a}$  表示叶绿素  $a$  含量(μg/个);  $V_s$  和  $V_z$  分别表示上清液和藻液取样体积(mL)。

### 1.2.5 可溶性蛋白含量、SOD 酶活力及 MDA 含量的测定

取 50 mL 藻液,用 Sigma 离心机在 5 000 r/min 下离心 10 min 收集藻细胞,弃上清后加入 0.05 mol/L pH 值 7.8 的磷酸缓冲液 2 mL,并利用 JY92-IIIN 型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)破碎细胞 10 min(其间工作 5 s,间歇 10 s),镜检无完整细胞后于 12000 r/min 下离心 10 min,取上清液用于测定可溶性蛋白含量、SOD 酶活力及 MDA 含量等。可溶性蛋白含量、SOD 酶活力及 MDA 含量的测定方法参照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行,结果分别以 μg/10<sup>10</sup> 个, U/10<sup>7</sup> 个, nmol/10<sup>7</sup> 个来表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 生长的影响

由图 1 可以看出,防污剂 Irgarol 1051 可抑制 *P. tricornutum* 的生长,且这种抑制效应随 Irgarol 1051 质量浓度的增大而增强,如在暴露 96 h 后,在 1、3、6、9、12 μg/L Irgarol 1051 处理组中, *P. tricornutum* 的细胞密度为对照组的 91.2%、81.8%、55.3%、52.3%、42.4%,这与 Deng 等<sup>[8]</sup>对 Irgarol 1051 抑制聚球藻 7942 生长的研究结果一致。而随着暴露时间的延长,其生长速率逐渐增大(表 1),表明 Irgarol 1051 可诱导 *P. tricornutum* 产生耐受性。Eriksson 等<sup>[9]</sup>研究了 Irgarol 1051 诱导下海洋附着生物群落的种群组成与丰度,结果发现在 Irgarol 1051 诱导下,海洋附着生物群落的种群组成及丰度发生了改变,其中舟形藻(*Navicula* sp.)的丰度由 0.1% 增加到 4%,说明 *Navicula* sp. 对 Irgarol 1051 具有一定的耐受能力。但目前对 Irgarol 1051 诱导生物耐受的机理尚不清楚,推测可能是类似于陆地植物, Irgarol 1051 导致光合系统 II(PSII)反应中心 D1 蛋白发生突变(Ser264 变成 Gly)<sup>[9]</sup>,但仍需通过进一步研究来解析 Irgarol 1051 诱导生物耐受的机理。

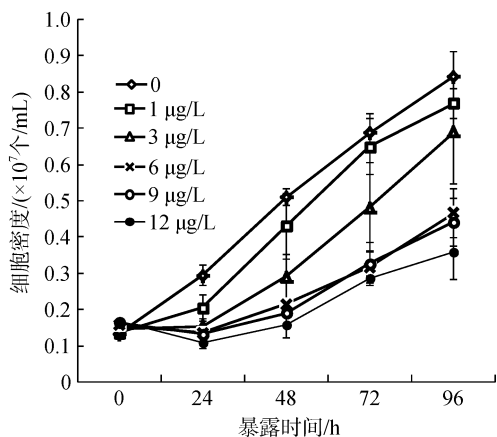


图 1 Irgarol 1051 对三角褐指藻生长的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of Irgarol 1051 on the growth of *P. tricornutum*

表 1 Irgarol 1051 对三角褐指藻生长速率的影响  
Tab. 1 Effects of different concentrations of Irgarol 1051 on the growth rate of *P. tricornutum*

Irgarol 1051 质量浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生长速率 $r_i$ (/h)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	0.0168	0.0239	0.0217	0.0180
3	0.0025	0.0144	0.0166	0.0162
6	-0.0058	0.0066	0.0098	0.0114
9	-0.0090	0.0032	0.0096	0.0103
12	-0.0179	-0.0014	0.0074	0.0079

## 2.2 Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 中叶绿素 *a* 及可溶性蛋白含量的影响

叶绿素 *a* 是绿色植物进行光合作用的重要色素之一, 其含量的变化将直接影响植物的生长发育<sup>[11]</sup>。Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 中叶绿素 *a* 含量的影响如图 2A 所示, 从中可以看出, 随着 Irgarol 1051 质量浓度的升高, *P. tricornutum* 中叶绿素 *a* 含量也逐渐增加, 如在 1、3、6、9、12  $\mu\text{g/L}$  Irgarol 1051 处理组中, *P. tricornutum* 中叶绿素 *a* 含量分别为对照组的 1.18、1.46、1.77、1.65 和 1.81 倍, 表明在 Irgarol 1051 胁迫下, *P. tricornutum* 会通过积累叶绿素 *a* 来维持其光合作用的进行, 促进其生长发育。此外, 随着 Irgarol 1051 质量浓度的升高, *P. tricornutum* 中可溶性蛋白含量也逐渐增加(图 2B), 在 6  $\mu\text{g/L}$  Irgarol 1051 处理组中, *P. tricornutum* 中可溶性蛋白含量达到最大值 (6.94  $\mu\text{g}/10^{10}$  个), 之后略微降低。研究表明: 在一定胁迫条件下, 可溶性蛋白含量的变化可作为衡量植物抗逆性的一个指标, 可溶性蛋白含量的提高是植

物在逆境胁迫下的适应表现, 逆境胁迫可诱导产生一些新蛋白, 并产生大量与抗氧化系统相关的酶类以抵抗逆境的胁迫<sup>[12]</sup>。

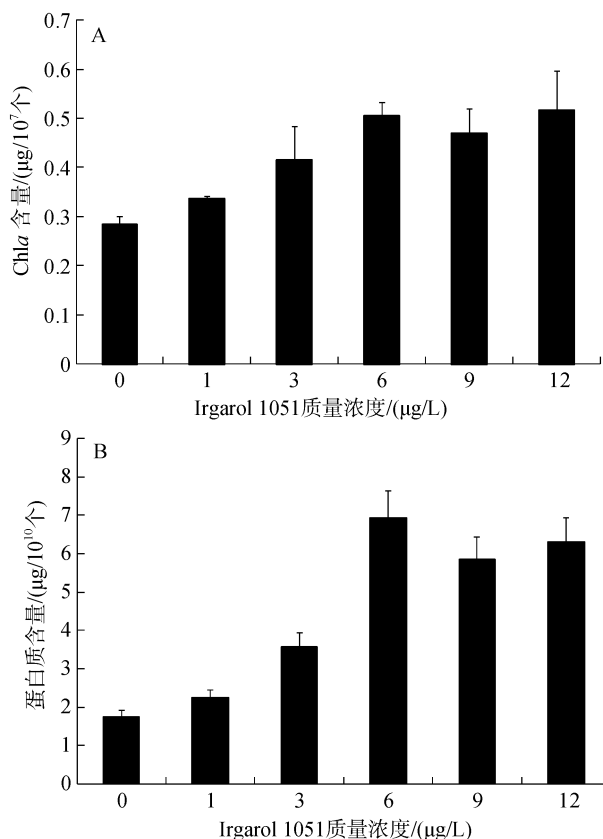


图 2 Irgarol 1051 对三角褐指藻中叶绿素 *a*(A)和蛋白质(B)含量的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Irgarol 1051 on chlorophyll *a* (A) and protein (B) content in *P. tricornutum*

## 2.3 Irgarol 1051 对 *P. tricornutum* 中 SOD 酶活力的影响

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶之一, 可与生物体内过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽酶等组成了抗氧化系统, 抵御各种胁迫条件<sup>[13]</sup>, 其中, SOD 可催化生物细胞中的 ROS 发生歧化反应, 生成过氧化氢, 再由过氧化氢酶将其转化为无害的分子氧和水, 从而有效地清除 ROS, 防止细胞膜系统过氧化作用的发生。从图 3 中可以看出, 随着 Irgarol 1051 质量浓度的升高, *P. tricornutum* 中 SOD 酶活力先升高, 在 6  $\mu\text{g/L}$  Irgarol 1051 处理组中, *P. tricornutum* 中 SOD 酶活力达到最大值 (0.041 U/ $10^7$  个), 之后随 Irgarol 1051 质量浓度的升高而略微降低, 这与 *P. tricornutum* 中可溶性蛋白含量的变化趋势基本一致

(图 2B)。SOD 酶活力的增加表明在 Irgarol 1051 胁迫下, *P. tricornutum* 中产生了 ROS, 从而诱导 *P. tricornutum* 合成 SOD, 用于将 ROS 还原为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 从而减轻 ROS 对 *P. tricornutum* 中生化成分及膜脂结构等的破坏作用。但在高质量浓度 Irgarol 1051 胁迫下, *P. tricornutum* 中 SOD 酶活力降低, 可能是由于 *P. tricornutum* 中与 SOD 合成相关的代谢途径被破坏, 导致其含量降低。

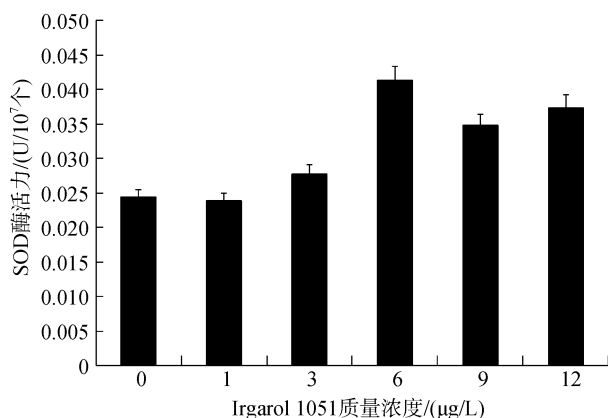


图 3 Irgarol 1051 胁迫下三角褐指藻中 SOD 酶活力变化  
Fig. 3 Changes in SOD activity in *P. tricornutum* under Irgarol 1051-induced stress

#### 2.4 Irgarol 1051 胁迫下 *P. tricornutum* 中 MDA 含量的变化

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的产物之一, 其含量的高低可反映细胞膜脂过氧化的程度, 是膜氧化损伤的重要指标<sup>[8, 14]</sup>。从图 4 中可以看出, 随着 Irgarol 1051 质量浓度的增加, *P. tricornutum* 脂质过氧化产物 MDA 含量也随之增加, 表明在 Irgarol

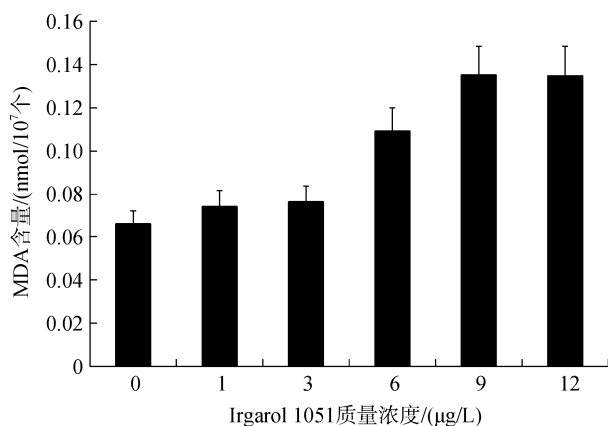


图 4 Irgarol 1051 对三角褐指藻中 MDA 含量的影响  
Fig. 4 Effects of different concentrations of Irgarol 1051 on MDA content in *P. tricornutum*

1051 胁迫下 *P. tricornutum* 中产生了大量的 ROS, 且由于 SOD 等抗氧化酶活力的降低, 加快了膜脂过氧化的进程, 从而致使藻细胞中 MDA 含量升高。

### 3 结论

防污剂 Irgarol 1051 可抑制 *P. tricornutum* 的生长, 并诱导其产生生物耐受性, 但耐受机理尚需进一步研究。在 Irgarol 1051 胁迫下, *P. tricornutum* 中叶绿素 *a* 及可溶性蛋白含量逐渐升高, 用于抵御 Irgarol 1051 的胁迫, 维持其生长状态。且在 Irgarol 1051 胁迫下, *P. tricornutum* 细胞内会发生明显的生理生化反应, 如 SOD 酶活力先上升后下降, MDA 含量逐渐升高, 表明细胞中 ROS 的产生和消除间的平衡随 Irgarol 1051 质量浓度的增大逐步被破坏, ROS 积累可导致藻细胞膜的破坏, 从而影响 *P. tricornutum* 的生长和生理特性。

参考文献:

- [1] Wendt I, Arrhenius A, Backhaus T, et al. Extreme Irgarol tolerance in an *Ulva lactuca* L. population on the Swedish west coast[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 76(1-2): 360-364.
- [2] 许凤玲, 蔺存国, 于泓先, 等. 海洋防污剂及其缓控释技术进展[J]. 材料开发与应用, 2013, 28(3): 119-122.  
Xu Fengling, Lin Cunguo, Yu Hongxian, et al. The study of controlled release of marine antifoulant[J]. Development and Application of Materials, 2013, 28(3): 119-122.
- [3] Lam K H, Lam M H W, Lam P K S, et al. Identification and characterization of a new degradation product of Irgarol 1051 in mercuric chloride-catalyzed hydrolysis reaction and in coastal waters[J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 49: 361-367.
- [4] Kim N S, Shim W J, Yim U H, et al. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 78(1-2): 201-208.
- [5] 周晓见, 董夏伟, 缪莉, 等. 海洋防污损涂料添加剂 Irgarol 1051 环境科学研究进展[J]. 环境科技, 2011, 24(3): 64-68.  
Zhou Xiaojian, Dong Xiawei, Miao Li, et al. Environmental science progress of Irgarol 1051 marine anti-fouling additives[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 24(3): 64-68.
- [6] Thomas K V, Brooks S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides[J]. Biofouling, 2010, 26(1): 73-88.
- [7] Arrhenius A, Backhaus T, Gronvall F, et al. Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea Nine[J]. Archives of Environmental Con-

- tamination and Toxicology, 2006, 50(3): 335-345.
- [8] Deng X Y, Gao K, Sun J L. Physiological and biochemical responses of *Synechococcus* sp. PCC7942 to Irgarol 1051 and diuron[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 122-123: 113-119.
- [9] Eriksson K M, Clarke A K, Franzen L G, et al. Community-level analysis of *psbA* gene sequences and Irgarol tolerance in marine periphyton[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(4): 897-906.
- [10] Porra R J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b[J]. Photosynthesis Research, 2002, 73: 149-156.
- [11] 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.  
Wang Hongbin, Cheng Ming, Qian Peng, et al. The stress effects of metal ions on *Skeletonema costatum* and the influences on chlorophyll *a* synthesis[J]. Marine Sciences, 2012, 36(7): 104-108.
- [12] 瞿建宏, 罗永宏, 裘丽萍, 等. 甲萘威对普通小球藻生长和主要生理指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 319-320.  
Zhai Jianhong, Luo Yonghong, Qiu Liping, et al. Effect of carbaryl on growth and main physiological parameters of *Chlorella vulgaris*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(9): 319-320.
- [13] 于娟, 唐学玺, 李永祺, 等. UV-B 辐射对海洋微藻抗氧化系统的影响[J]. 海洋科学, 2002, 26(12): 49-53.  
Yu Juan, Tang Xuexi, Li Yongqi, et al. The effect of UV-B radiation on the antioxidant system of marine microalgae[J]. Marine sciences, 2002, 26(12): 49-53.
- [14] 成婕, 谢尔瓦妮古丽·苏来曼, 邓祥元, 等. 纳米二氧化钛对斜生栅藻的毒性效应研究[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(1): 238-242.  
Cheng Jie, Xieerwaniguli Sulaiman, Deng Xiangyuan, et al. Toxic effects of nanoparticle TiO<sub>2</sub> on *Scenedesmus obliquus*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2014, 36(1): 238-242.

## Effects of Irgarol 1051 on the growth and physiological characteristics of *Phaeodactylum tricornutum*

XIEERWANIGULI Sulaiman, CHENG Jie, DENG Xiang-yuan, GAO Kun, MA Zhi-xin  
(College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China)

Received: Oct. 12, 2015

Key words: Irgarol 1051; *Phaeodactylum tricornutum*; Growth; Physiological characteristics

**Abstract:** Effects of different concentrations of Irgarol 1051, an antifouling agent, on changes in the growth and physiological characteristics of *Phaeodactylum tricornutum*, such as chlorophyll *a* content, soluble protein content, superoxide dismutase (SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content, were analyzed. Our results showed that Irgarol 1051 significantly inhibited the growth of *P. tricornutum* and increased its tolerance. Chlorophyll *a*, soluble protein content, and SOD activity increased with an increase in Irgarol 1051 concentration to protect *P. tricornutum* cells from Irgarol 1051-induced stress. MDA content in *P. tricornutum* cells also increased with an increase in Irgarol 1051 concentration, indicating that excessive accumulation of reactive oxygen species damaged the structure and function of the microalgal membrane. Thus, these results provided data to exploit the effects of Irgarol 1051 on microalgae and to evaluate its environmental impact.

(本文编辑: 梁德海)