

有机磷农药对铜绿微囊藻生长及摄磷效应的动力学研究

沈 宏 林 俊 郑振华 丁力 周培疆

(武汉大学环境科学系, 武汉 430072)

摘要: 研究了两种有机磷农药(甲胺磷、辛硫磷)在较低浓度时对铜绿微囊藻的生长效应以及微囊藻摄取磷形态:总溶解磷(TSP)、溶解反应磷(SRP)和溶解有机磷(DOP)的动力学规律。保持各培养基中总磷的浓度 6.95mg/L ,与培养基中不加有机磷农药相比,当培养基中甲胺磷与 K_2HPO_4 的浓度比为 $1:11$ 和 $1:9$,辛硫磷与 K_2HPO_4 的浓度比为 $1:349$ 和 $1:114$ 时,微囊藻的生长受到促进,并且当甲胺磷与 K_2HPO_4 的浓度比为 $1:9$,辛硫磷与 K_2HPO_4 的浓度比为 $1:114$ 时促进效果最好,而当培养基中没有 K_2HPO_4 甲胺磷作为惟一磷源时,微囊藻的生长受到明显的抑制。微囊藻摄取SRP的速度快于其他磷形态,而对DOP的利用较少。微囊藻生长越快,对SRP的摄取速率也越快。结果表明低浓度有机磷农药促进微囊藻生长的主要原因是有机磷的加入促进了藻类对SRP的摄取。

关键词: 甲胺磷; 辛硫磷; 铜绿微囊藻; 生长效应; 磷形态; 摄磷; 动力学

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)02-0006

有机磷农药具有杀虫力强、适用范围广、易分解、残留期短等特点,在农药病虫害防治上起到了重要的作用。从20世纪80年代起,有机磷农药很快取代了有机氯农药,并在农业上广泛使用,但也不可避免地污染了周围环境,并危害非靶生物^[1,2]。残留农药通过各种途径进入到自然水体,虽然在水中的浓度很低,但是其作用不容忽视。

近年来,我国许多淡水湖泊都不同程度的出现了富营养化现象,破坏了水生态系统的平衡。氮磷在天然水体富营养化中起着重要作用,由于自然界中存在的含磷化合物的移动性较氮化物低,因此磷对水体中初高级生产力的限制作用比氮更为广泛,所以磷是水体中藻类种群和密度的第一限制性营养元素^[3]。同时,磷又在生物代谢过程中起着极其重要的作用。因此,研究藻类对各种磷形态的摄取规律,对揭示蓝藻水华暴发机理有重要意义。本文研究了低浓度有机磷农药对微囊藻的生长效应以及微囊藻摄取磷形态的规律,从微囊藻摄磷的角度初步探讨了低浓度有机物促进藻类生长的机理。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* Kütz)

由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。采用HGZ培养基,培养温度 $27\pm 1^\circ\text{C}$, pH8, 光照强度 2000klx ,光暗比为 $12\text{h}/12\text{h}$ 下,经2—3次纯化培养。取处于对数生长期的藻液于 $5000\text{r}/\text{min}$ 离心分离,用无菌水反复冲洗数次以除去表面吸附的多余磷,然后将藻转入无磷的HGZ培养基中饥饿培养3d,使藻体内蓄积的磷消耗完,从而获得饥饿培养后的藻,该藻液即作为实验用藻液^[3]。

1.2 化合物及其配制 甲胺磷(Methamidophos),辛硫磷(Phoxime)均由湖北省农药检测中心提供。甲胺磷纯度 $> 80\%$,易溶于水。辛硫磷纯度 $> 90\%$,难溶于水,用异丙醇作为溶剂。

通过预备实验,各确定三个浓度梯度。保持各培养基中总磷的浓度 6.95mg/L ,甲胺磷的浓度为总磷浓度的 $1/12$, $1/10$ 和 $1/8$,即与培养基中 K_2HPO_4 的比例为 $1:11$, $1:9$, $1:7$ 以及培养基中全部添加甲胺磷;辛硫磷的浓度为 0.02mg/L , 0.06mg/L 和 0.1mg/L ,即与培养基中 K_2HPO_4 的比例为 $1:349$, $1:114$ 和 $1:69$ 。

1.3 藻生长量的测定 取不同藻细胞浓度的藻液,于 650nm 处测定吸光度,再用血球计数板计算其浓度,得到标准工作曲线方程: $Y = 0.284 + 31.5X$ 。其

收稿日期:2002-07-20; 修订日期:2003-10-10

基金项目:国家重大科技攻关课题“滇池蓝藻水华污染控制技术研究”[K9905-35-01]资助

作者简介:沈宏(1978-),女,武汉市人;硕士;现从事环境生态化学研究

通讯作者:周培疆

中 Y 为藻细胞浓度 ($\times 10^6$ 个/mL), X 为吸光度。相关系数为 0.999, 显著性水平 $P < 0.0001$ 。实验开始后, 自接种起, 每 24h 测定藻细胞光密度 (OD_{650nm})。

1.4 不同磷形态的测定 采用钼蓝显色法^[3] 测定藻液中的磷形态浓度。溶解有机磷(DOP)为总溶解磷(TSP)与溶解反应磷(SRP)之差。

2 结果

2.1 两种有机磷农药对微囊藻生长的影响及动力学分析

2.1.1 异丙醇对微囊藻生长的影响 实验中三个浓度的异丙醇分别是 0.0014%、0.0042% 和 0.007%, 溶剂异丙醇对微囊藻的生长无明显影响(表 1)。

表 1 加入异丙醇后微囊藻生长的动力学参数
Tab.1 Kinetic parameters of growth of *Microcystis a.* in isopropanol treated medium

异丙醇浓度(V/V) Concentration of isopropanol	$k(h^{-1})$	$A(\times 10^6 cell/mL)$	r
对照 Control	0.01961	13.1182	0.9947
0.0014%	0.01964	13.1511	0.9950
0.0042%	0.01967	13.0911	0.9947
0.007%	0.01959	13.0660	0.9940

2.1.2 两种有机磷农药对微囊藻生长的影响 加入不同浓度的有机磷农药后, 微囊藻的生长有较大差异。图 1、2 可以看出, 在实验时间内, 微囊藻的生长经历了 2 个生长期: 延滞期和对数期。

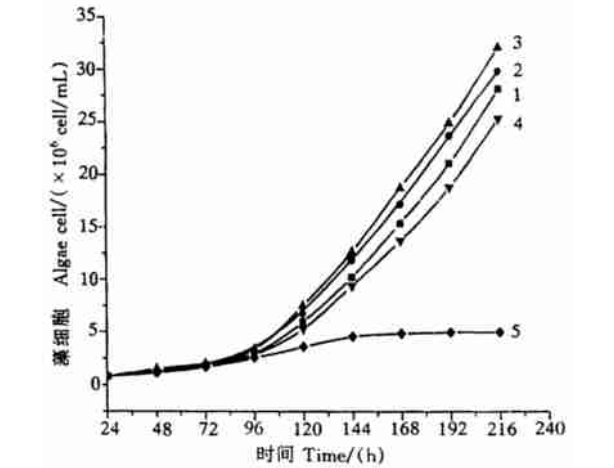


图 1 甲胺磷对微囊藻生长的动力学曲线

Fig.1 Kinetic curves of methamidophos on the growth of *Microcystis a.*
1 全部添加 K_2HPO_4 2 甲胺磷: $K_2HPO_4 = 1:11$ 3. 甲胺磷: $K_2HPO_4 = 1:9$ 4. 甲胺磷 $K_2HPO_4 = 1:7$ 5 全部添加甲胺磷

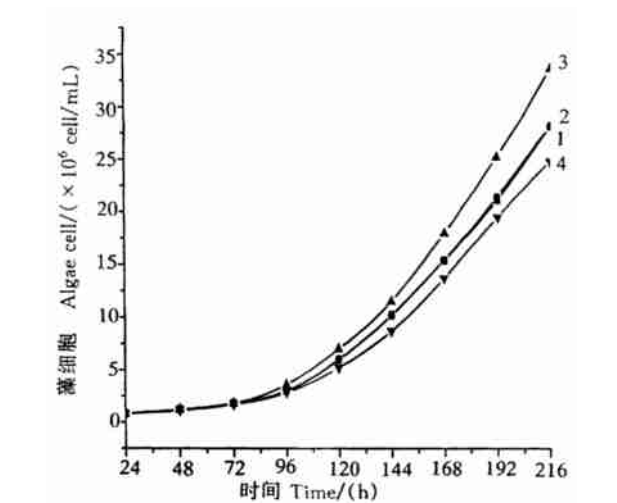


图 2 辛硫磷对微囊藻生长的动力学曲线

Fig.2 Kinetic curves of phoxime on the growth of *Microcystis a.*
1 全部添加 K_2HPO_4 2. 辛硫磷 $K_2HPO_4 = 1:349$
3. 辛硫磷 $K_2HPO_4 = 1:114$ 4 辛硫磷 $K_2HPO_4 = 1:69$

从图 1、2 可以看出, 在延滞期, 各培养介质中微囊藻的生长较缓慢, 差异不大。进入对数生长期后, 各培养介质中藻的生长趋势明显不同。培养介质中有机磷和无机磷的浓度在适当的比例时对微囊藻的生长有促进作用。当培养介质中不添加无机磷而以有机磷作为藻类生长的惟一磷源时, 藻类的生长缓慢, 受到明显抑制。

在实验时段内, 微囊藻的生长曲线是指数函数曲线, 可用指数函数方程拟合:

$$y = Ae^{kt} \tag{1}$$

式中 y 为藻细胞浓度 ($\times 10^6$ 个/mL); A 为指前因子, 藻细胞的外推浓度 ($\times 10^6$ 个/mL); t 为时间 (h); k 为微囊藻的生长速率常数 (h^{-1})。对式 (1) 两边取自然对数, 可得:

$$\ln y = \ln A + kt \tag{2}$$

$\ln y$ 与 t 成线性关系, 进行线性回归后可求得 A 和生长速率常数 k , 结果于表 2。

低浓度的甲胺磷能促进微囊藻的生长, 并且, 当甲胺磷与无机磷 1:9 时, 这种促进效果尤为明显。当甲胺磷作为惟一磷源时, 微囊藻的生长速率常数较小。低浓度的辛硫磷也能促进微囊藻的生长, 且这种促进作用也存在辛硫磷与无机磷的最佳比例点。辛硫磷的这个比例点比甲胺磷低很多。

2.2 微囊藻摄取磷形态的动力学分析

培养介质中各磷形态浓度变化曲线为“倒 S”曲线, 如图 3—8 所示。因而可以用动力学方法进行分析。

表 2 加入有机磷农药后微囊藻生长的动力学参数

Tab. 2 Kinetic parameters of growth of *Microcystis a.* in organophosphorus pesticides treated medium

有机磷与 K ₂ HPO ₄ 浓度比 Concentration ratios of organic phosphorus to K ₂ HPO ₄	<i>k</i> (h ⁻¹)	<i>A</i> (× 10 ⁶ cell/mL)	<i>r</i>
K ₂ HPO ₄	0. 01961	13. 1182	0. 9947
甲胺磷(Methamidophs): K ₂ HPO ₄ = 1: 11	0. 02013	13. 1347	0. 9922
甲胺磷(Methamidophs): K ₂ HPO ₄ = 1: 9	0. 02045	13. 1512	0. 9915
甲胺磷(Methamidophs): K ₂ HPO ₄ = 1: 7	0. 01891	13. 1371	0. 9957
甲胺磷(Methamidophs)	0. 00990	13. 6315	0. 9437
辛硫磷(Phoxime): K ₂ HPO ₄ = 1: 349	0. 01970	13. 1075	0. 9946
辛硫磷(Phoxime): K ₂ HPO ₄ = 1: 114	0. 02062	13. 1053	0. 9938
辛硫磷(Phoxime): K ₂ HPO ₄ = 1: 69	0. 01913	13. 0685	0. 9958

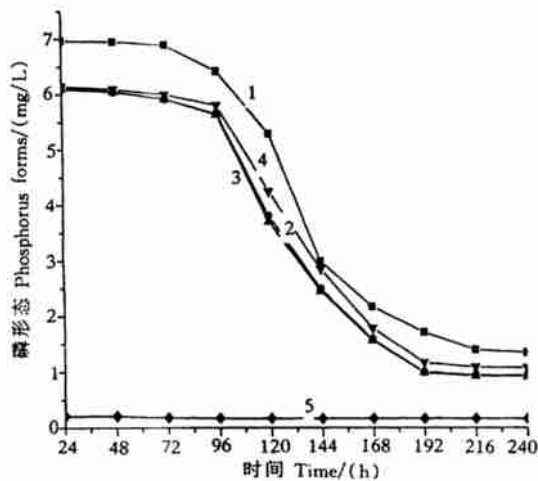


图 3 加入不同浓度甲胺磷时培养介质中 SRP 浓度变化曲线
Fig. 3 Kinetic curves of change of SRP concentration in methamidophs treated medium
1. 全部添加 K₂HPO₄ 2. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1: 11 3. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1: 9 4. 甲胺磷: K₂HPO₄= 1: 7 5. 全部添加甲胺磷

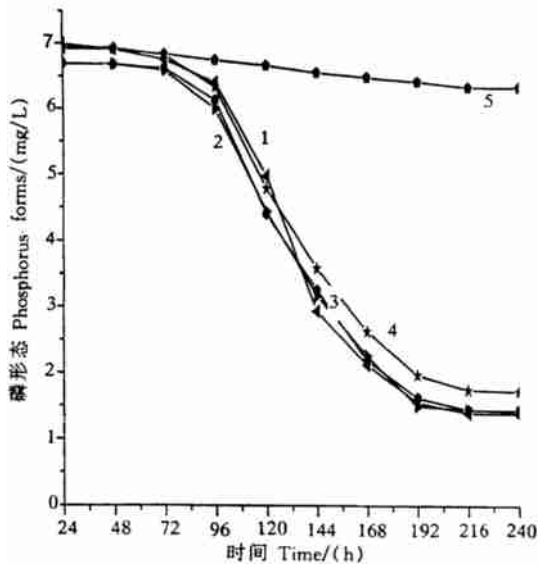


图 4 加入不同浓度甲胺磷时培养介质中 TSP 浓度变化曲线
Fig. 4 Kinetic curves of change of TSP concentration in methamidophs treated medium
1. 全部添加 K₂HPO₄ 2. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1: 11 3. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1: 9 4. 甲胺磷: K₂HPO₄= 1: 7 5. 全部添加甲胺磷

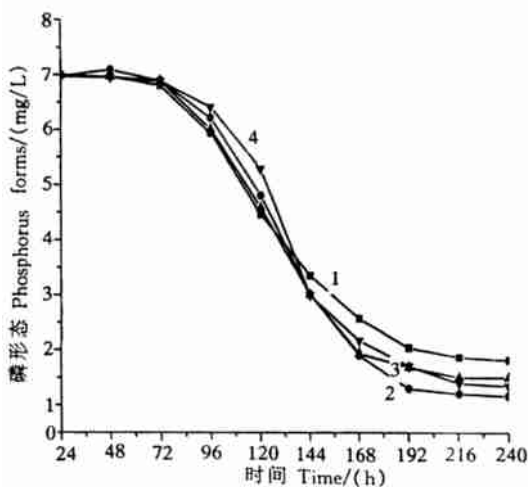


图 5 加入不同浓度辛硫磷时培养介质中 SRP 浓度变化曲线
Fig. 5 Kinetic curves of change of SRP concentration in phoxime treated medium
1. 全部添加 K₂HPO₄ 2. 辛硫磷: K₂HPO₄= 1: 349
3. 辛硫磷 K₂HPO₄= 1: 114 4. 辛硫磷 K₂HPO₄= 1: 69

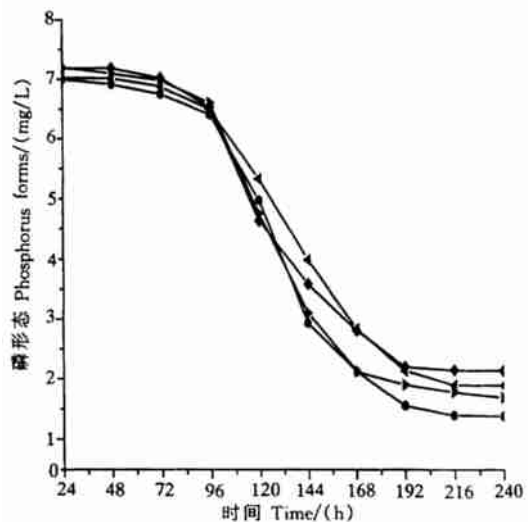


图 6 加入不同浓度辛硫磷时培养介质中 TSP 浓度变化曲线
Fig. 6 Kinetic curves of change of TSP concentration in phoxime treated medium

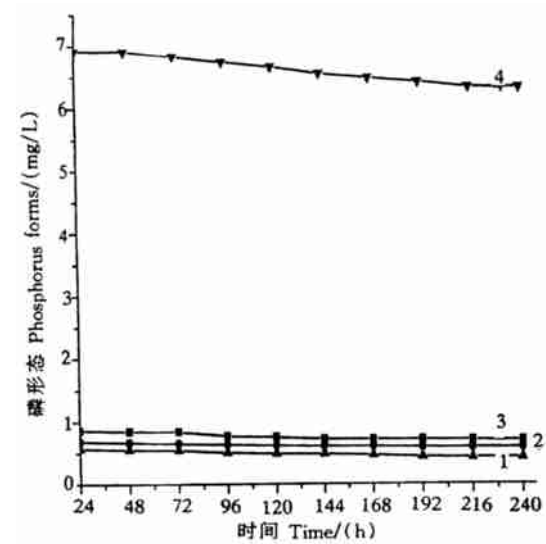


图7 加入不同浓度甲胺磷时培养介质中 DOP 浓度变化曲线
Fig.7 Kinetic curves of change of DOP concentration in methamidophs treated medium

1. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1:11 2. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1:9
3. 甲胺磷 K₂HPO₄= 1:7 4. 全部添加甲胺磷

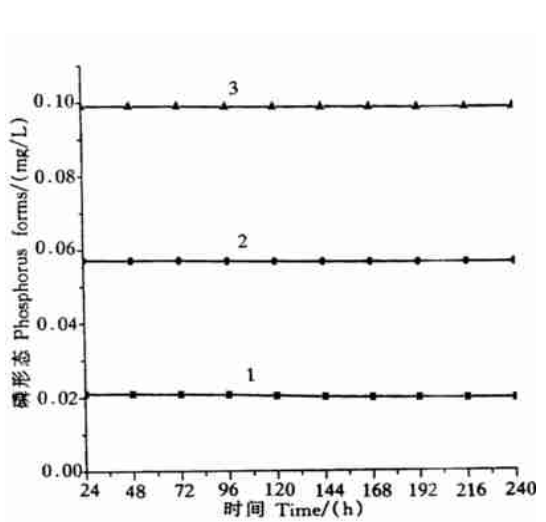


图8 加入不同浓度辛硫磷时培养介质中 DOP 浓度变化曲线
Fig.8 Kinetic curves of change of DOP concentration in phoxime treated medium

1. 辛硫磷 K₂HPO₄= 1:349 2. 辛硫磷 K₂HPO₄= 1:112
3. 辛硫磷 K₂HPO₄= 1:69

设藻摄磷过程中的阻抑因子为 s , t 时刻培养介质中磷形态质量减少量 M_t (mg), k_s 为磷形态浓度的变化速率常数, 即微囊藻摄取磷形态的速率常数 (h^{-1})。则有:

$$\frac{dM_t}{dt} = -k_s M_t (1 - sM_t) \tag{3}$$

设磷形态单位减少值的磷形态浓度为 C_N , t 时刻的磷形态浓度为 C_t (mg/L), 则有:

$$C_t = C_N M_t \tag{4}$$

对式(4)微分, 则有:

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{1}{C_N} \frac{dC_t}{dt} \tag{5}$$

将式(4)和式(5)带入式(3)中, 则有:

$$\frac{dC_t}{dt} = -k_s \frac{C_t - sC_t^2}{C_N} \tag{6}$$

对式(6)积分后有:

$$\ln \left[\frac{C_N/s}{C_t} - 1 \right] = -k_s t \tag{7}$$

令 $a = C_N/s$, 则有:

$$\ln \left[\frac{a}{C_t} - 1 \right] = -k_s t \tag{8}$$

$\ln(a/C_t - 1)$ 与 t 成线性关系, 通过计算寻求两者线性关系最好时的 a 值, 可以确定微囊藻摄取各磷形态的速率常数 k_s (h^{-1})。结果列于表 3。

表 3 微囊藻摄取培养介质中各磷形态的动力学参数

Tab.3 Kinetic parameters of uptake of phosphorus forms by of *Microcystis a.* in organophosphorus pesticides treated medium

有机磷与 K ₂ HPO ₄ 浓度比 Concentration ratios of organic phosphorus to K ₂ HPO ₄	磷形态 Phosphorus	k_s (h^{-1})	r
K ₂ HPO ₄	SRP	0.03698	0.9781
	TRP	0.03360	0.9876
	SRP	0.03742	0.9820
甲胺磷 (Methamidophs): K ₂ HPO ₄ = 1:11	TSP	0.02796	0.9784
	DOP	0.00131	0.9539
	SRP	0.03783	0.9834
甲胺磷 (Methamidophs): K ₂ HPO ₄ = 1:9	TSP	0.02745	0.9793
	DOP	0.00167	0.9908

续表

有机磷与 K ₂ HPO ₄ 浓度比 Concentration ratios of organic phosphorus to K ₂ HPO ₄	磷形态 Phosphorus	<i>k_s</i> (h ⁻¹)	<i>r</i>
甲胺磷(Methamidophs): K ₂ HPO ₄ = 1: 7	SRP	0. 03514	0. 9917
	TSP	0. 02589	0. 9864
	DOP	0. 00106	0. 9867
甲胺磷(Methamidophs)	SRP	0. 00165	0. 9244
	TSP	0. 00092	0. 9834
	DOP	0. 00196	0. 9942
辛硫磷(Phoxime): K ₂ HPO ₄ = 1: 349	SRP	0. 03100	0. 9812
	TSP	0. 02764	0. 9714
	DOP	0. 00134	0. 9843
辛硫磷(Phoxime): K ₂ HPO ₄ = 1: 114	SRP	0. 03743	0. 9834
	TSP	0. 02988	0. 9844
	DOP	0. 00008	0. 9818
辛硫磷(Phoxime): K ₂ HPO ₄ = 1: 69	SRP	0. 03024	0. 9745
	TSP	0. 02431	0. 9712
	DOP	0. 00005	0. 9878

由表 3 可知, 在各种培养介质中, 微囊藻摄取各磷形态的速率常数 *k_s* 的大小均为: *k_s*_{SRP} > *k_s*_{TSP}, 这表明, 微囊藻摄取 SRP 的速度快于 TSP, SRP 是微囊藻优先摄取的磷形态。藻类生长的越快, 对 SRP 的摄取也越快。从图 7, 8 可以看出, 培养介质中 DOP 的浓度均有所下降, 但下降的幅度很小。

3 讨论

在培养基中加入低浓度的有机磷农药甲胺磷、辛硫磷后, 能促进微囊藻的生长, 并且加入的有机磷农药与无机磷在某个合适的比例点时, 这种促进作用比较明显。两种有机磷农药促进微囊藻生长的比例点不同, 辛硫磷的比例点远远低于甲胺磷的比例点, 其主要原因是两种有机磷农药的分子结构和理化性质有较大的差异。辛硫磷的亲脂性较强, 甲胺磷的亲水性较强。有机磷农药的亲脂性越强, 疏水性越强, 致毒作用越大^[4]。辛硫磷有电子密度较高的苯环结构, 并且苯环上有一 CN 基, 是强吸电子基团, 使辛硫磷的结构较甲胺磷稳定得多, 其毒性比甲胺磷强^[5]。

有许多研究认为^[5, 6], 低浓度有机磷农药能促进藻类的生长是因为藻类能利用有机磷农药作为其生长的磷源。本实验中, 从 DOP 浓度的变化来看, 藻类能利用有机磷作为生长的磷源, 但对有机磷的利用较少。在通常情况下, SRP 是藻类优先利用的磷形态, 但是当环境中的 SRP 不足时, 藻类会在酶

的作用或借助外界环境条件增加对溶解态有机磷的利用。当甲胺磷作为微囊藻生长的惟一磷源时, 从微囊藻的摄磷情况看, 甲胺磷在酶的作用下转化成无机正磷酸盐的过程。碱性磷酸酶可使磷酸单酯水解成无机磷酸盐而被藻类利用^[5]。从实验结果看, 这种作用是非常有限的。当培养基中的无机正磷酸盐足够时, 碱性磷酸酶的活性受到抑制, 因此 DOP 浓度的变化很小, 此时藻类主要是利用溶解态无机正磷酸盐。所以, 从微囊藻摄磷的角度可以认为, 培养基中加入低浓度的有机磷农药后促进藻类生长的主要原因不是因为藻类利用有机磷作为生长的磷源而加速生长, 而是因为有机磷的加入促进了藻类对 SRP 的摄取, 藻类对 SRP 的摄取速度越快, 其生长速率也越快。这表明, 藻类的生长效应与藻类摄取 SRP 有直接关系。一定浓度的有机磷和无机磷在促进藻类生长的过程中存在某种协同作用。另外, 有研究表明, 溶解有机碳(DOC)对藻类的生长有特殊的促进作用, 可能有机磷在转换成无机磷的同时还能提供额外的碳源而促进微囊藻的生长, 其作用机制有待进一步研究。

本文是在实验室培养基体系中研究有机磷农药对微囊藻生长的影响, 其中各种营养盐处于理想状态, 总磷浓度远远大于富营养化湖泊中的总磷浓度, 因此在天然湖泊中, 有机磷对微囊藻的生长影响以及微囊藻摄取磷形态的动力学规律与培养基中的作用机制有所不同, 关于这方面的工作将在今后报道。

参考文献:

- [1] Ru S G, Li Y Q, Jing Y C. Comparison study on the toxicity of ten organophosphorus pesticides to *Platymonas* sp. [J]. *Acta. Scientiae Circumstantiae*, 1996, **16**(3): 337—341. [汝少国, 李永祺, 敬永畅. 十种有机磷农药对扁藻的毒性. 环境科学学报, 1996, **16**(3): 337—341]
- [2] Tang X X, Li Y Q. Difference in damage of active oxygen on *Phaeodactylum tricornutum* among three organophosphorus pesticides [J]. *Acta. Scientiae Circumstantiae*, 1999, **19**(5): 579—581. [唐学玺, 李永祺. 三种有机磷农药对三角褐指藻活性氧伤害的差异性研究. 环境科学学报, 1999, **19**(5): 579—581]
- [3] Zhou P J, Zheng Z H, Yu Z K, et al. Studies on the relationship between the growth of *Chlorella vulgaris* and phosphorus fractions in water of Lake Donghu, wuhan [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(6): 571—576. [周培疆, 郑振华, 余振坤, 等. 普通小球藻生长与东湖水体磷形态的相关研究. 水生生物学报, 2001, **25**(6): 571—576]
- [4] Zou L, Li Y Q. Applications of QSAR to the structures and toxicities of 11 organic phosphorus pesticides for marine *Platymonas* [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1999, **30**(2): 206—211. [邹立和李永祺. 用 QSAR 法研究有机磷农药对海洋扁藻的构效关系. 海洋与湖沼, 1999, **30**(2): 206—211]
- [5] Tian S Z, Liu Z, Weng J H, et al. Growth of *Chlorella vulgaris* in cultures with low concentration dimethoate as source of phosphorus [J]. *Chemosphere*, 1997, **35**(11): 2713—2718
- [6] Perona E, et al. Alteration of dinitrogen fixing and metabolism in cyanobacterium *Anabaena* PCC7119 by phosphamidon [J]. *Environ. and Botany.*, 1991, **31**(4): 479—488

KINETIC STUDIES ON THE EFFECTS OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES ON THE GROWTH OF *MICROCYSTIS* A. AND ITS UPTAKE TO PHOSPHORUS

SHEN Hong, LIN Jun, ZHENG Zhen-Hua, DING Li and ZHOU Pei-Jiang

(Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: Organophosphorus pesticides (OPs) are widely used in agriculture and they do not only kill target organisms but also extend to some nontarget organisms. Major portions of some nontarget organisms are algae cells. The objective of this work was to study the effects of low concentration methamidophs (MAP) and phoxime on the growth of *Microcystis aeruginosa*. Meanwhile, the kinetic mechanism of uptake of three kinds of phosphorus forms—total soluble phosphorus (TSP), soluble reaction phosphorus (SRP) and dissolved organic phosphorus (DOP) by *Microcystis* were also studied. The concentration of total phosphorus was 6.95 mg/L in each medium. Methamidophs and phoxime were diluted with sterile distilled water and added into the sterile modified HGZ medium at various phosphorus concentration ratios of methamidophs and phoxime to K_2HPO_4 . *Microcystis* cell density measured by spectrophotometer every 24 hr at 663 nm after inoculation. And adopted ammonium molybdate spectrophotometric methods to determine the phosphorus forms concentration. Compared with no MAP and phoxime in medium, when MAP, phoxime and K_2HPO_4 combined in concentration ratio (1:11 and 1:9, 1:349 and 1:114) was treated, the growth of *Microcystis* was stimulated. And the algal cells in MAP, phoxime K_2HPO_4 ratio 1:9, 1:114 treated medium grew faster than that of in MAP K_2HPO_4 ratio 1:11, 1:349 treated medium. The growth of *Microcystis* significantly inhibited by MAP when no K_2HPO_4 in medium and MAP as unique P source of algal growth. The kinetic curves of change of phosphorus forms concentration in each medium were fit to logistic model. The SRP could be assimilated by algae at higher velocity than that of other phosphorus forms, and few DOP used by algae. The algal grew faster, the values of uptake velocity of the SRP by *Microcystis* were bigger. All these results showed that the MAP and phoxime could stimulate growth of *Microcystis* when they and inorganic phosphorus combined in certain ratio, but the point of the certain ratio for MAP is higher than that for the phoxime. The growth rate of *Microcystis* was dependent upon the concentration of intracellular phosphorus, and SRP was the preferential phosphorus form used by algae. The cause of stimulation might be the MAP and phoxime could accelerate the velocity of SRP uptake by the algal at the low concentration.

Key words: Methamidophs; Phoxime; *Microcystis aeruginosa*; Growth effect; Phosphorus forms; Uptake of phosphorus; Kinetics