

Mn²⁺ 对铜绿微囊藻生长和养分吸收的影响

刘 静,徐轶群,盛海君,封 克

(扬州大学环境科学与工程学院,江苏 扬州 225009)

摘要:在不同 Mn²⁺ 浓度(0、10、100、1 000、10 000、30 000 nmol/L)条件下,研究了 Mn²⁺ 对铜绿微囊藻的生长以及 N、P、Mg 等营养元素的吸收的影响。100 nmol/L 的 Mn²⁺ 处理获得最大的生物量,30 000 nmol/L 时的生物量最小;100 nmol/L Mn²⁺ 处理的铜绿微囊藻叶绿素 a 含量最高,30 000 nmol/L Mn²⁺ 处理的叶绿素 a 含量最低;不同 Mn²⁺ 浓度处理对铜绿微囊藻的 N 吸收影响不大,但明显影响 P 的吸收;100 nmol/L 的 Mn²⁺ 处理培养基中 P 减少量是 30 000 nmol/L 的 Mn²⁺ 处理组 P 减少量的 5 倍左右;过高的 Mn²⁺ 浓度也影响了铜绿微囊藻对 Mg²⁺ 的吸收。结果表明 Mn²⁺ 浓度为 100 nmol/L 时铜绿微囊藻在各个方面的表现最好。

关键词:铜绿微囊藻;Mn²⁺;生物量;养分吸收

中图分类号:Q935 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)01-0016-05

自 20 世纪 50 年代以来,水域富营养化已成为一个全球性的环境问题,我国各地河流湖泊也不断出现蓝藻水华。微囊藻是全球广泛分布的一种蓝藻(杨波等,2007),在我国大部分水体中,铜绿微囊藻在数量和发生频率上均占主导地位(郑朔方等,2005)。蓝藻具有伪空胞,可通过浮力调节获得足够的光照和营养物质,具有高效的 CO₂ 浓缩机制来保证足够的碳源,这都使得蓝藻能够大量繁殖,在众多藻类中成为优势种(Lu Y & Wen J F,2001)。藻类死亡释放出的恶臭使得城市大气环境恶化,微囊藻释放的藻毒素对人类的日常生活产生严重影响。

一直以来,在营养盐对藻类生长特性的影响的研究中,普遍认为氮和磷是 2 个重要因子,自从 Martin 等人发现铁对赤潮藻的生理生态有影响后,微量元素对藻类生长的影响已引起了人们的重视(陈慈美等,1996)。随着研究的深入,微量金属的重要性逐渐被人们发现。锰元素作为藻类生长必需的微量元素之一,是生物体进行光合作用的催化剂,对有氧呼吸产生的氧化产物有去毒作用,是一些酶的活化剂,以及在生成 ATP 方面也起功能性作用,但它只能以可溶性的还原态被生物体吸收(徐景亮,2005)。有关锰对铜绿微囊藻生长的影响研究还较少,本文观察不同 Mn²⁺ 浓度处理下铜绿微囊藻的生长情况,从而了解 Mn 元素对铜绿微囊藻生长

的影响。同时还研究了不同 Mn²⁺ 浓度处理对铜绿微囊藻吸收 N、P、Mg 等营养元素的影响。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用铜绿微囊藻购自中国科学院水生生物研究所,编号为 FACHB-905。

1.2 仪器和设备

光照培养箱、显微镜、血球计数板、离心机、原子吸收分光光度计、紫外分光光度计、721 分光光度计等。为减少金属污染,所用的玻璃器皿均在 1 mol/L 的 HCl 溶液中浸泡 2~3 d,再用超纯水冲洗干净后,在 60℃ 下烘干,于 121℃ 下高压灭菌 20 min 后备用(徐景亮,2005)。

1.3 培养基的配置

实验所用培养基为 BG11,其配方为:NaNO₃ 1.5 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.04 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.075 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.036 g/L, 柠檬酸 0.006 g/L, 柠檬酸铁铵 0.006 g/L, EDTA 0.001 g/L, Na₂CO₃ 0.02 g/L, A₅ + Co solution 1 mL。其中 A₅ + Co solution: HBO₃ 2.86 g/L, MnCl₂ · H₂O 1.81 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 0.222 g/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.079 g/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.390 g/L, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.049 g/L。

整个实验以上述培养基为基础,以 MnCl₂ · 4H₂O 为母液,其它组分不变,配置成不同 Mn²⁺ 浓度的培养基。本实验所设 Mn²⁺ 浓度分别为 0、10、100、1 000、10 000、30 000 nmol/L。

选用 250 mL 广口三角瓶,内装培养基 150 mL,

收稿日期:2007-12-11

基金项目:广西科技攻关项目(桂科攻 0428001-2)。

通讯作者:封克。E-mail: fengke@yzu.edu.cn

作者简介:刘静,女,1984 年生,江苏射阳人,研究方向为植物营养学。E-mail: liujing841123@yahoo.com.cn

用无菌封口膜封紧瓶口。每个浓度设 3 个重复。 121°C 高压灭菌 20 min 后备用。

1.4 培养方法和实验条件

首先对藻种进行扩大培养,在指数生长期时 5 000 r/min 离心 15 min 收集细胞,用无 Mn 的 BG11 培养基洗涤 2 次,然后用无 Mn 的 BG11 培养基饥饿培养 5 d。5 d 后离心收集细胞,用少量无 Mn 的 BG11 培养基重悬,以重悬液为藻源,接种到已准备好的不同 Mn^{2+} 浓度的培养基中,接种密度为 1.6×10^6 个/mL,在平行样之间的相对偏差小于 10% 时,实验数据取自 3 个平行样的均值。培养时间为 1 月,培养期间,每天定时摇动 3~4 次,并变换其位置,以减少光照的影响。每隔 2 d 取样,测叶绿素 a 含量和生物量(750 nm 处的吸光度)(吕秀平等, 2006)。

整个实验过程中都保持无菌操作。培养实验在恒温培养室中进行,培养条件温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光强为 2 000 lx,光暗比 12 h: 12 h。

1.5 生物量的测定

取一定量藻液,按不同倍数稀释后,用 721 分光光度计分别测定其在 750 nm 处的吸光度;另吸取 1 mL 藻液放入事先加入 50 μL 鲁哥氏液的胶卷盒中,染色固定后,用血球记数板在显微镜下记数。得出溶液中藻的数量与吸光度之间的对应关系并绘制成标准曲线:生物量/ 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1} = A_{750} \times 38.306 - 1.1083$, ($R^2 = 0.9906$)。

1.6 叶绿素 a 含量的测定

根据 Jeffrey 等(1975)改良的方法,取 5 mL 藻液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤膜于 -8°C 冷冻干燥(过夜或 12 h 以上),然后剪碎放入 50 mL 离心管中,加入少量 80°C 的 95% 乙醇,于暗处静置 6 h 后过滤,滤液定容至 10 mL,在波长 665 nm、750 nm 下比色。计算公式如下: $\text{Chl a}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 27.9 \times (A_{665} - A_{750}) \times 10/5$ 。

1.7 培养基中 N、P、Mg 含量的测定

实验结束后,取一定量藻液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液备用。其中硝态 N 含量的测定:紫外分光光度法;P 含量的测定:钼酸铵比色法; Mg^{2+} 含量的测定:原子吸收分光光度法。

2 结果

2.1 生长曲线

图 1 给出了不同 Mn^{2+} 浓度下铜绿微囊藻的生长曲线。在最初的 3~4 d 内,不同 Mn^{2+} 浓度处理

的铜绿微囊藻在生物量方面并没有明显的差别,这可能是由于刚接种后,藻种在新的培养基环境中有个短暂的适应过程,这个时期为铜绿微囊藻生长周期中的延缓期(胡小贞等,2004)。进入指数生长期后,不同 Mn^{2+} 浓度处理的铜绿微囊藻在生长初期就表现出差异。在低浓度范围内(0~100 nmol/L),随着 Mn^{2+} 浓度的增加,生物量也随之增加。但是当 Mn^{2+} 浓度达到 1 000 nmol/L 时,生物量略有下降,至 10 000 nmol/L 时,其生物量明显低于 0 nmol/L Mn^{2+} 处理时的生物量。对于铜绿微囊藻而言,培养基中 100 nmol/L 的 Mn^{2+} 浓度已经接近于铜绿微囊藻对 Mn^{2+} 耐受的极限,其最终生物量为 60.7×10^6 个/mL。继续增加介质中的 Mn^{2+} 浓度则会对藻细胞的生长产生抑制作用。从图 1 还可以看出, Mn^{2+} 浓度为 0、10、1 000 nmol/L 时,藻的生长曲线大致相同,最终生物量分别为 59.3×10^6 、 59.6×10^6 、 59.4×10^6 个/mL。而当 Mn^{2+} 浓度增加到 30 000 nmol/L 时,最终生物量下降为 55.3×10^6 个/mL。

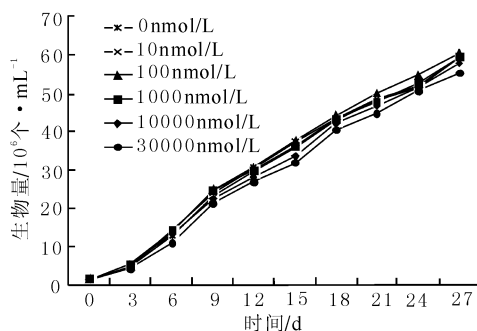


图 1 不同 Mn^{2+} 浓度对铜绿微囊藻生长的影响

Fig. 1 Effect of Mn^{2+} concentrations in culture medium on growth of *Microcystis aeruginosa*

以上结果表明, Mn^{2+} 对铜绿微囊藻的生长有一定影响,但缺锰比锰过量对藻的影响要小。在低浓度 Mn^{2+} 范围内,细胞能够正常生长和分裂。但 Mn^{2+} 浓度达到 30 000 nmol/L 浓度时,就可能对藻产生毒性,从而不利于其生长。有人认为,这是因为藻细胞壁带有负电荷和一些含硫、氮和氧的官能团,它们较易与阳离子发生电荷吸引和进行螯合反应,使重金属沉积在藻细胞表面并通过细胞的生理过程转移到细胞内部,从而抑制藻类的光合作用、呼吸作用、酶的活性和生长(阎海等, 2001a; 阎海等, 2001b)。

2.2 叶绿素 a 含量

图 2 显示,不同 Mn^{2+} 浓度下,铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的变化与生物量的变化趋势相似。在进入

指数生长期后,处理间很快表现出差异。 Mn^{2+} 浓度为 100 nmol/L 的处理,铜绿微囊藻的叶绿素 a 含量最高,最终叶绿素 a 含量为 9.3744 mg/L,其次是 Mn^{2+} 浓度为 1 000 nmol/L 的处理,而 Mn^{2+} 浓度为 30 000 nmol/L 的处理,其叶绿素 a 含量最低,最终叶绿素含量为 5.859 mg/L。这说明,过量的锰离子反而影响了藻细胞叶绿素的合成,这与阎海等(2001a;2001b)人结果相一致。同时,Prassad D 和 Prassad A(1987)研究认为重金属可以影响与叶绿素合成有关的酶的活性。因此可以推断锰可能也有此功能。

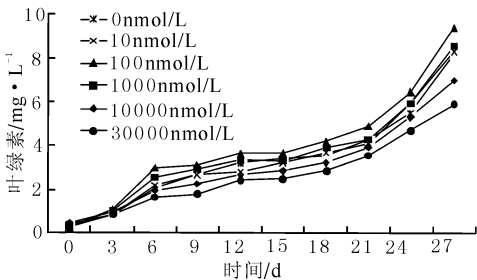


图 2 不同 Mn^{2+} 浓度下铜绿微囊藻的叶绿素 a 含量及其随时间的变化

Fig. 2 Chlorophyll a concentration of *Microcystis aeruginosa* with incubation time under different Mn^{2+} concentrations

2.3 培养基中 N、P、Mg 的含量

本实验对不同处理培养后营养液中的 N、P、Mg 的浓度进行了测定(图 3 ~ 图 5)。N、P 是藻类生长的所必不可少的大量元素,他们在培养基中剩余的多少间接地反映了藻类的生长情况。从图 3 和图 4 可以看出, Mn^{2+} 浓度为 30 000 nmol/L 时,培养基中剩余的 N、P 的含量均最高。但对氮的浓度来说,不同处理间差异不大,如 30 000 nmol/L Mn^{2+} 浓度处理培养基中的 N 浓度为 243.56 mg/L,而 100 nmol/L Mn^{2+} 浓度处理培养基中的 N 浓度最低,为 233.78 mg/L,2 者仅相差近 10 mg/L,说明 Mn^{2+} 对氮的吸收影响不大。但不同处理的 P 浓度间相差很大,如 30 000 nmol/L 的 Mn^{2+} 浓度处理后,培养液中的 P 浓度为 1.244 mg/L,而 100 nmol/L 的处理的相应值为 0.277 mg/L,2 者间相差近 5 倍。这说明高浓度 Mn^{2+} 对铜绿微囊藻的 P 营养吸收的抑制较为明显。

镁是叶绿素的组成成分和酶的活化剂,参与脂肪代谢,促进磷素的运转与某些维生素的合成。通过对培养基中镁含量的分析,可以间接了解铜绿微囊藻叶绿素合成的情况。图 5 显示, Mn^{2+} 浓度为 30 000 nmol/L 时,培养后营养液中剩余的 Mg^{2+} 浓

度最高,约为 1.087 mg/L,其次是 10 000 nmol/L 的 Mn^{2+} 浓度处理,而其它 4 个不同 Mn^{2+} 浓度处理之间营养液中剩余的 Mg^{2+} 浓度相差不大。残留 Mg^{2+} 浓度最小的是 100 nmol/L 处理, Mg 含量为 0.852 mg/L。这说明过高的 Mn^{2+} 浓度影响了铜绿微囊藻对 Mg^{2+} 的吸收。

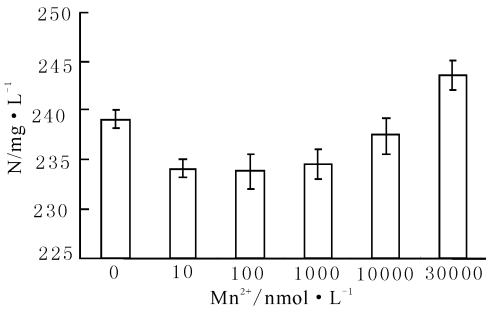


图 3 不同 Mn^{2+} 处理的培养基中残留的 N 含量

Fig. 3 Nitrogen concentration in culture medium after incubation

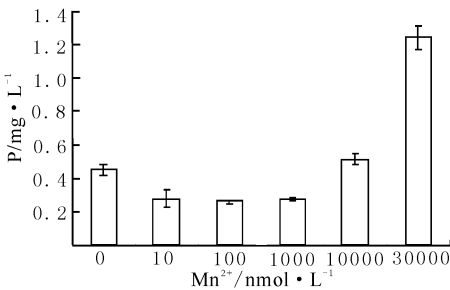


图 4 不同 Mn^{2+} 处理的培养基中残留的 P 含量

Fig. 4 Phosphorus concentration in culture medium after incubation

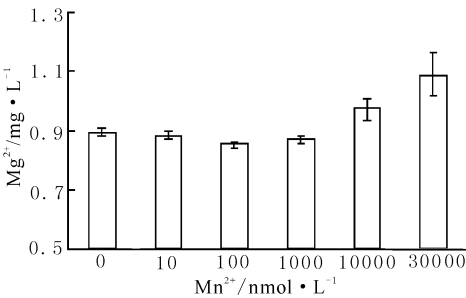


图 5 不同 Mn^{2+} 处理的培养基中残留的 Mg^{2+} 含量

Fig. 5 Magnesium contents of culture medium after incubation

3 讨论

尽管人们早已发现微量元素对藻类的生长有重要的影响,但多年来有关的研究几乎都集中在海洋赤潮藻方面(徐景亮,2005;李灏等,2006),而对淡水藻的研究还鲜见报道。本实验对淡水铜绿微囊藻受 Mn^{2+} 影响的研究结果与前人关于 Mn^{2+} 离子对赤

藻生长的影响趋势是一致的,即低浓度的 Mn^{2+} 可以促进藻的生长,而高浓度的 Mn^{2+} 则会抑制藻的生长。所不同的是,不同藻对 Mn 元素响应的浓度范围和所受到的影响程度不同。

阎海等(2001a;2001b)研究了铜、锌和锰对蛋白核小球藻和月形藻的毒性效应,认为藻类对不同金属离子的富集效率和选择性与静电引力或水合离子的半径有关,藻类对锰离子的亲和性是这3种元素中最低的。同时还认为,与藻类亲和性越强的金属离子抑制藻类生长的毒性作用也越强,这就可以解释本实验中为什么锰离子对铜绿微囊藻的生长和对该藻光合作用的影响并不明显,其原因是因为锰离子对藻类细胞的亲和力较弱,从而在其他离子并不缺乏的条件下,锰离子与藻类细胞表面的官能团的结合不占优势,所以不能大量的进入藻细胞内部,故对藻细胞的生长代谢过程影响较小。

水体中金属微量元素的含量一般是很低的,常常成为藻类生长的限制因子,但一旦这些因子由外界输入水体中,则很可能造成藻类的爆发性增殖从而对水环境造成危害(黄邦钦等,2000)。有人认为,营养盐浓度的升高可能是蓝藻水华形成的因素之一(陈静峰等,2006),因此理论上可以通过限制污水中营养盐的排放来控制水华的发生。但本文研究表明, Mn^{2+} 浓度虽然可以影响铜绿微囊藻的生长,但影响作用并不显著。目前有研究表明,蓝藻水华的爆发是多因子协同交互作用的结果(孔繁翔和高光,2005)。因此,Mn 元素与其它元素或环境因素之间的交互作用值得进一步深入研究。

4 结论

培养基中 Mn^{2+} 浓度为 100 nmol/L 时,铜绿微囊藻生长最好,生物量最大,叶绿素含量也最高。而当 Mn^{2+} 浓度大于 10 000 nmol/L 时,铜绿微囊藻的生长和叶绿素的合成明显受到抑制。

培养基中 Mn^{2+} 浓度对铜绿微囊藻 N 的吸收影响不明显,但随着 Mn^{2+} 浓度的增加,明显抑制了铜绿微囊藻对 P 和 Mg 元素的吸收。

参考文献:

- 陈慈美,周慈由,郑爱榕,等. 1996. 中肋骨条藻增殖的环境制约作用——Fe(Ⅲ)与 N、Mn、光、温交互作用对藻生化组成的效应[J]. 海洋通报, 15(1): 37-42.
- 陈静峰,翁焕新,孙向卫. 2006. 磷、铁营养盐的交互作用对隐藻(*Cryptomonas* sp.) 生长影响的初步研究[J]. 海洋科学进展, 24(1): 39-43.
- 胡小贞,马祖友,易文利,等. 2004. 4种不同培养基下铜绿微囊藻和四尾栅藻生长比较[J]. 环境科学研究, 17: 55-57.
- 黄邦钦,徐鹏,胡海忠,等. 2000. 单种及混合培养条件下 Fe、Mn 对赤潮生物塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*) 生长的影响[J]. 环境科学学报, 20(5): 537-541.
- 孔繁翔,高光. 2005. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考[J]. 生态学报, 25(3): 589-595.
- 李灏,缪锦来,李光友. 2006. N、P、Fe、Mn 对亚历山大藻 LC3 生长的影响[J]. 海洋环境科学, 25(4): 1-3.
- 吕秀平,张栩,康瑞娟,等. 2006. Fe^{3+} 对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响[J]. 北京化工大学学报, 33(1): 27-30.
- 徐景亮. 2005. 东海原甲藻 N、P、Fe、Mn 营养生态位研究[D]. 广州:暨南大学:4-5.
- 阎海,潘纲,霍润兰. 2001b. 铜、锌和锰抑制月形藻生长的毒理效应[J]. 环境科学学报, 21(3): 328-332.
- 阎海,王杏君,林毅雄,等. 2001a. 铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的毒理效应[J]. 环境科学, 21(1): 23-26.
- 杨波,储昭升,金相灿,等. 2007. CO_2/pH 对三种藻生长及光合作用的影响[J]. 中国环境科学, 27(1): 54-57.
- 郑朔方,扬苏文,金相灿. 2005. 铜绿微囊藻生长的营养动力学[J]. 环境科学, 26(2): 152-156.
- Jeffrey S W, Humphrey G F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. Biochem Physiol Pflanz, 167(5): 191-194.
- Lu Y, Wen J F. 2001. Isolation, Pure Cultivation and Total DNA Extraction of *Microcystis aeruginosa* Kütz in Dianchi Lake [J]. Journal of sciences, 13(3): 285-288.
- Prasad D, Prasad A. 1987. Altered δ -aminolaevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajra (*Pennisetum typhoides*) [J]. Journal of Plant Physiology, 127:241-249.

(责任编辑 杨春艳)

Effects of Mn^{2+} on the Growth of *Microcystis aeruginosa* and Uptake of Nnutrients

LIU Jing, SHENG Hai-jun, XU Yi-qun, FENG Ke

(College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Mn is one of the essential trace elements for algae growth, and it functions in many physiological aspects in algae cell. However, effects of Mn on the growth of *Microcystis aeruginosa* were rarely studied. In this study, the biomass, chlorophyll a concentration of *Microcystis aeruginosa* and uptake of N, P and Mg during incubation were measured under six different Mn^{2+} concentrations in culture medium (0, 10, 100, 1000, 10 000, 30 000 nmol/L). Results showed that the optimum Mn^{2+} concentration in medium for algae growth was 100 nmol/L, in which the highest biomass was obtained. In treatment of 30 000 nmol /L, the growth of algae was severely inhibited and the biomass was the lowest. Similar trend was observed for the concentration of chlorophyll a. No significant impacts of Mn^{2+} on the uptake of N were found in this study. However, the uptake of P by the algae responded strongly to Mn^{2+} concentration, and the reduction of P concentration in culture medium treated with 100 nmol/L was 5 times than with 30 000 nmol/L. High concentration of Mn^{2+} in culture medium also inhibited Mg^{2+} uptake by algae.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; Mn^{2+} ; biomass; nutriment uptake