

Hg²⁺胁迫对3种微藻生长和叶绿素荧光特性的影响

李明, 潘晓洁, 邹怡, 陈小娟, 万成炎

(水利部中科院水工程生态研究所, 水利部水工程生态效应与生态修复重点实验室, 武汉 430079)

摘要:研究了不同浓度的 Hg²⁺ 胁迫不同时间(1~7 d)后, 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)生长及叶绿素荧光特性的变化情况。测定的主要参数有光系统 II(PSII)的最大光能转化效率(Φ_M)、相对光合电子传递效率(rETR)、饱和光强(I_k)和细胞密度。试验结果表明, Hg²⁺ 胁迫下3种微藻的细胞密度和叶绿素荧光参数与 Hg²⁺ 浓度、胁迫时间有一定的相关关系, 细胞密度和叶绿素荧光各参数间有极显著的相关关系($P < 0.01$)。通过计算 Hg²⁺ 对3种微藻不同胁迫时间的半抑制浓度(EC₅₀), 发现3种微藻对 Hg²⁺ 的耐受性大小顺序为: 斜生栅藻 > 莱茵衣藻 > 蛋白核小球藻。

关键词:微藻; Hg²⁺; 叶绿素荧光; 细胞密度

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2012)02-0096-04

汞(Hg)是一种全球性污染物, 主要来源于燃煤火力发电、垃圾焚烧、水银法氯碱生产、水泥生产、有色金属和钢铁生产等(牟文等, 2009)。我国是汞生产、消费大国, 也是全球范围内汞污染最为严重的地区之一(苏秋克等, 2004; 冯新斌等, 2004)。汞具有持久性、易迁移性和高度的生物富集性, 研究表明, 汞具有神经毒性、肾脏毒性、免疫毒性、生殖毒性及胚胎发育毒性, 此外, 还可导致心脏病、高血压等心血管疾病, 并可影响肝、甲状腺和皮肤功能(温武瑞等, 2009)。

藻类是水环境中最重要的初级生产者, 是重金属进入水生生态系统食物链的主要途径。汞能抑制藻类光合作用, 影响其叶绿素合成, 使藻细胞发生畸变并改变水环境中藻的种类及分布特征; 此外还可影响藻类的生长, 损伤细胞膜导致细胞膜通透性增大(杜敏, 1996)。本试验研究了 Hg²⁺ 对3种微藻生长及叶绿素荧光特性的影响, 并据此计算出叶绿素荧光参数的半抑制浓度(EC₅₀), 比较分析了不同微藻对 Hg²⁺ 毒害作用的敏感程度及耐受性大小顺序, 以为微藻的重金属胁迫研究及水污染生物监测提供参考依据。

收稿日期: 2011-08-29

基金项目:水利部948项目“藻类在线水体生态毒性监测系统”(合同号: 200902); 环境保护部水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07528-003)。

通讯作者:万成炎, 1964年生, 男, 研究员, 主要从事水生态与环境保护研究。E-mail: chywan@mail.ihe.ac.cn.

作者简介:李明, 1982年生, 女, 助理研究员, 主要从事水环境保护工作。E-mail: cdlee2001@sohu.com

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)由中国科学院水生生物研究所藻种库提供, 并经室内扩大培养用于试验。藻类培养基为SE培养基, 所用试剂均为分析纯。培养温度为(25±1)℃, 连续光照, 光照强度为4 000 lx。

1.2 毒性试验方法

HgCl₂(分析纯)用超纯水配制成 Hg²⁺ 母液。玻璃器皿都先用稀盐酸浸泡至少24 h后并用超纯水清洗, 器皿和培养基使用前用高压灭菌锅灭菌20 min。

试验在100 mL的三角烧瓶中进行, 根据预实验的结果, 将 Hg²⁺ 浓度设定为0.16、0.25、0.40、0.63和1.00 mg/L, 以不加 Hg²⁺ 的空白组为对照, 将处于指数生长期的3种藻分别接入培养液中; 每个浓度3个平行组。培养过程中不充气, 每日随机调换三角烧瓶并摇动3次。接种后1周内每天取样, 进行细胞密度(血球计数板)及叶绿素荧光参数的测定。

用德国Walz公司生产的Phyto-PAM测定叶绿素荧光参数, 测量前将藻样品暗适应15 min。叶绿素荧光参数最大光能转化效率(Φ_M)、相对光合电子传递效率(rETR)、饱和光强(I_k)和细胞密度可在荧光仪上直接读出。

1.3 统计分析

使用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析, 半抑制浓度EC₅₀的计算基于Probit模型。

2 结果与分析

2.1 Hg^{2+} 胁迫对 3 种藻生长的影响

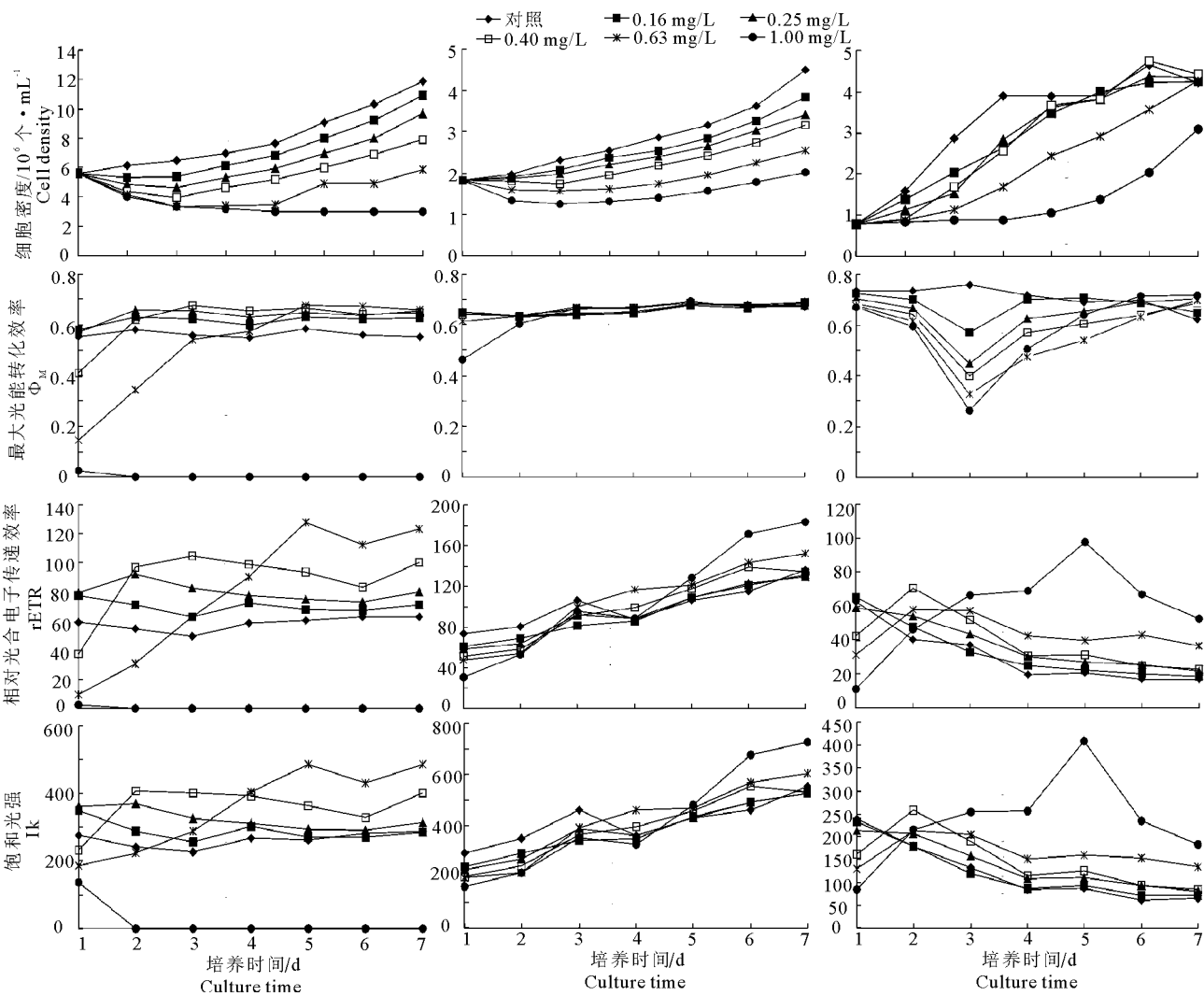
不同浓度的 Hg^{2+} 对 3 种藻的生长均有一定的抑制作用,且随 Hg^{2+} 浓度的升高,藻细胞数目逐渐降低,呈明显的剂量—效应关系(见图 1)。镜检还发现,较高浓度组部分藻细胞体积增大,子细胞出现畸形分裂,出现异性细胞,说明 Hg^{2+} 对 3 种藻的生长与分裂有一定的脱偶联作用(胡芹芹等,2008)。与蛋白核小球藻不同,斜生栅藻和莱茵衣藻最高浓度处理组经过 3 d 后藻细胞数目都有所增加,表明藻细胞在适应重金属胁迫后慢慢恢复。莱茵衣藻的 3 个较低浓度组 4 d 后的生长开始逐渐接近对照组。

2.2 Hg^{2+} 胁迫对 3 种藻叶绿素荧光参数的影响

Hg^{2+} 对不同的叶绿素荧光参数的作用也有一定差异,对 3 种不同的的藻来说, $rETR$ 和 I_k 的变化情况十分相似(见图 1)。 Hg^{2+} 最高浓度组对蛋白核小球藻的 Φ_M 、 $rETR$ 和 I_k 的抑制十分明显,使这 3 个值已基本接近于 0,而斜生栅藻和莱茵衣藻的 Φ_M 、 $rETR$ 和 I_k 却能随着时间逐渐增大。

2.3 半抑制浓度 EC_{50}

Hg^{2+} 胁迫下 3 种藻各参数的 EC_{50} 变化情况见表 1。从细胞密度来看,斜生栅藻的耐受性是最强的,蛋白核小球藻 24、48 和 72 h 的 EC_{50} 比莱茵衣藻略大,但 4~7 d 的 EC_{50} 又明显小于莱茵衣藻。由其他 3 个叶绿素荧光参数得到的 EC_{50} 值都是斜生栅



注:从左至右依次为蛋白核小球藻,斜生栅藻和莱茵衣藻。

图 1 Hg^{2+} 对 3 种藻细胞密度、 Φ_M 、 $rETR$ 和 I_k 的抑制作用

Note: from left to right were *C. pyrenoidosa*, *S. obliquus* and *C. reinhardtii*.

Fig.1 Effects of Hg^{2+} stress on the cell density, Φ_M , $rETR$ and I_k of three microalgae

藻>莱茵衣藻>蛋白核小球藻。总的来说,3种微藻对 Hg^{2+} 的耐受性大小顺序为斜生栅藻>莱茵衣藻>蛋白核小球藻。

2.4 相关分析

3种微藻细胞密度、叶绿素荧光参数与 Hg^{2+} 浓度、胁迫时间的相关关系见表2。在 Hg^{2+} 的胁迫下,蛋白核小球藻细胞密度和叶绿素各参数与 Hg^{2+} 浓度极显著负相关($P<0.01$),但除细胞密度外,叶绿素各参数与胁迫时间不显著相关;斜生栅藻细胞密

度和叶绿素各参数与胁迫时间有极显著相关($P<0.01$),但除细胞密度外,叶绿素各参数与 Hg^{2+} 浓度间不显著相关;莱茵衣藻除 Φ_M 外,其他各参数都与 Hg^{2+} 浓度和胁迫时间极显著相关($P<0.01$)。

细胞密度和叶绿素荧光参数间的相关关系见表3。除了莱茵衣藻的 Φ_M 和细胞密度、Ik间没有显著相关关系外,其他所有藻细胞密度和叶绿素各参数间均存在极显著的相关关系($P<0.01$)。

表1 不同浓度 Hg^{2+} 处理后3种微藻各参数的 EC_{50}

Tab.1 EC_{50} for the parameters of the three microalgae after Hg^{2+} treatment								
藻种	参数	胁迫时间/h						
		24	48	72	96	120	144	168
蛋白核小球藻	细胞密度	0.79	0.66	0.68	0.55	0.56	0.55	0.58
	rETR	0.50	0.65	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
	Ik	0.80	0.79	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
	Φ_M	0.54	0.66	0.79	0.82	0.82	0.82	0.82
斜生栅藻	细胞密度	1.35	0.98	1.00	0.93	0.93	0.94	0.82
	rETR	2.61	3.44	5.52	12.35	41.06	41.00	9.44
	Ik	1.89	1.95	2.74	5.75	9.73	24.41	5.75
	Φ_M	1.79	2.46	2.77	2.75	3.14	2.41	2.43
莱茵衣藻	细胞密度	0.68	0.49	0.54	0.84	1.00	0.99	1.44
	rETR	0.70	4.76	1.44	4.80	4.80	4.59	4.91
	Ik	0.81	2.58	1.76	6.08	6.10	6.08	6.08
	Φ_M	1.17	1.39	1.62	5.28	2.02	5.13	5.19

表2 3种微藻细胞密度、叶绿素荧光参数与 Hg^{2+} 浓度、胁迫时间的相关系数

Tab.2 The correlation coefficient of cell density and chlorophyll fluorescence with concentration of Hg^{2+} and exposure duration in the three microalgae

藻种	细胞密度	rETR	Ik	Φ_M
蛋白核	浓度	-0.806 **	-0.514 **	-0.541 **
小球藻	时间	0.350 *	0.229	0.092
斜生	浓度	-0.670 **	0.111	0.059
栅藻	时间	0.673 **	0.910 **	0.911 **
莱茵	浓度	-0.519 **	0.478 **	0.518 **
衣藻	时间	0.788 **	-0.376 **	-0.413 **

**表示相关性极显著($P<0.01$),*表示相关性显著($P<0.05$)。

3 讨论

叶绿素荧光是光合作用的指标和探针,在荧光分析中最常用的参数是 Φ_M ,它表示PSII的最大光化学量子产量,即PSII的最大光能转化效率。在非胁迫条件下此参数变化很小,但在胁迫条件下却有较大变化,因此它是反映微藻生长良好与否的一个重要指标(王帅等,2009)。本试验结果表明,经 Hg^{2+} 胁迫后3种微藻的 Φ_M 均有所下降,说明PSII反应中心已受到损害,抑制了光合作用的原初反应,

表3 3种微藻细胞密度和叶绿素荧光参数之间的相关系数

Tab.3 The correlation coefficient of cell density with chlorophyll fluorescence in the three microalgae

藻种	细胞密度	rETR	Ik
蛋白核	rETR	0.478 **	—
小球藻	Ik	0.494 **	0.967 **
	Φ_M	0.675 **	0.918 **
斜生	rETR	0.470 **	—
栅藻	Ik	0.510 **	0.995 **
	Φ_M	0.454 **	0.683 **
莱茵	rETR	-0.688 **	—
衣藻	Ik	-0.729 **	0.982 **
	Φ_M	0.045	0.447 **

**表示相关性极显著($P<0.01$),*表示相关性显著($P<0.05$)。

阻碍了光合电子传递的过程。本试验中,除了蛋白核小球藻最高浓度组外,蛋白核小球藻次高浓度组和斜生栅藻、莱茵衣藻的最高浓度组 Φ_M 均是先下降后上升,说明在相应浓度 Hg^{2+} 作用下,微藻的PSII反应中心失活遭到破坏,但经过一段时间后对 Hg^{2+} 产生一定的抗性, Φ_M 值有所上升,而蛋白核小球藻最高浓度组的PSII反应中心是被彻底破坏,无法逐渐恢复。rETR表示相对光合电子传递速率,Ik

表示饱和光强, rETR 和 Ik 的下降表明, Hg^{2+} 胁迫使微藻的电子传递速率和饱和光强下降。

本试验中3种微藻对 Hg^{2+} 的敏感程度存在一定差别, 耐受性顺序为: 斜生栅藻 > 莱茵衣藻 > 蛋白核小球藻。斜生栅藻的 EC_{50} 最高, 显示出它对 Hg^{2+} 胁迫的适应性最强, 与牟文等(2009)的报道基本一致。细胞密度与叶绿素荧光各参数间有极显著的相关关系($P < 0.01$), 因此可以用叶绿素荧光参数值来检测微藻对 Hg^{2+} 的耐受性。叶绿素荧光技术是一种以光合作用理论为基础、利用植物体内叶绿素作为探针, 研究和探测植物光合生理状况及各种外界因子对其细微影响的新型植物活体测定和诊断技术, 相对于传统的费时费力的细胞计数法和细胞色素含量测定法等, 具有快速、准确、不破坏细胞和测量方法简单等特点, 具有非常广泛的应用前景 (Ismail et al, 2002; Mallick & Mohn, 2003)。

志谢: 感谢中国科学院水生生物研究所藻类环境生物学学科组老师和同学提供的无私帮助。

参考文献

杜敏. 1996. 汞污染对两种藻类质膜透性的影响[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学版, 17(2): 46-49.

冯新斌, 汤顺林, 李仲根, 等. 2004. 生活垃圾填埋场是大气汞的重要来源[J]. 科学通报, 49(23): 67-71.

胡芹芹, 熊丽, 田裴秀子, 等. 2008. 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 对斜生栅藻的致毒效应研究[J]. 生态毒理学报, 3(1): 87-92.

李合生, 孙群, 赵世杰. 2003. 植物生理生化试验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社.

牟文, 熊丽, 胡芹芹, 等. 2009. HgCl_2 对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 生理生化特性的影响[J]. 生态毒理学报, 4(6): 854-859.

苏秋克, 蒋敬业, 马振东. 2004. 武汉市湖泊汞污染现状研究 [J]. 地质科技情报, 23(3): 83-87.

王帅, 梁英, 田传远. 2009. Cd^{2+} 胁迫对6株微藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. 海洋湖沼通报, 3: 155-166.

温武瑞, 李培, 李海英, 等. 2009. 我国汞污染防治的研究与思考[J]. 环境保护, (18): 33-35.

Ismail M, Tong S, Phang S, et al. 2002. A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae [J]. Environ Monit Assess, 75: 145-154.

Mallick N, Mohn F H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus* [J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 55: 64-69.

(责任编辑 杨春艳)

Effects of Hg^{2+} Exposure on the Growth and Chlorophyll Fluorescence of Three Microalgal Strains

LI Ming, PAN Xiao-jie, ZOU Yi, CHEN Xiao-juan, WAN Cheng-yan

(Key Laboratory of Ecological Impacts of Hydraulic-Projects and Restoration of Aquatic Ecosystem of Ministry of Water Resources, Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences. Wuhan 430079, P. R. China)

Abstract: The present study investigated the growth and chlorophyll fluorescence characteristics of 3 microalgal strains (*Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii*) under different Hg^{2+} concentrations and different durations (1-7 d). The main parameters including the maximal photochemical efficiency of PSII (Φ_m), the relative electron transport rate (rETR), the saturation intensity (Ik) and cell density were determined. The results showed that the chlorophyll fluorescence and cell density of 3 microalgal strains all exhibit some correlations to Hg^{2+} concentration and exposure duration. While cell density has very significant positive correlations ($P < 0.01$) to fluorescence parameters. Comparison of the EC_{50} values of different exposure durations among the 3 algal species indicated the ability of their tolerance to Hg^{2+} was *S. obliquus* > *C. reinhardtii* > *C. pyrenoidosa*.

Key words: microalgae; Hg^{2+} ; chlorophyll fluorescence; cell density