

邓祥元,高 坤,裴 峰,等. 1-辛基-3-甲基咪唑溴盐对牟氏角毛藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):354-356.

1-辛基-3-甲基咪唑溴盐对牟氏角毛藻生长及叶绿素荧光特性的影响

邓祥元^{1,2}, 高 坤², 裴 峰¹, 曹科伟¹, 王长海¹

(1. 南京农业大学江苏省海洋生物学重点实验室, 江苏南京 210095; 2. 江苏科技大学生物与化学工程学院, 江苏镇江 212018)

摘要:以牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 为材料, 利用浮游植物荧光仪 (Phyto-PAM) 分析了不同浓度 1-辛基-3-甲基咪唑溴盐 (1-octyl-3-methylimidazolium bromide, [C₈mim]Br) 对其生长及叶绿素荧光特性的影响。结果表明: [C₈mim]Br 严重抑制牟氏角毛藻的生长并影响其叶绿素含量; [C₈mim]Br 处理后牟氏角毛藻的叶绿素荧光参数, 如光合系统 II (PS II) 最大光能转化效率 (F_v/F_m)、PS II 潜在活性 (F_v/F_o)、最大相对电子传递速率 ($rETR_{max}$)、光能转化效率 (α)、半饱和光强 (I_k) 等, 均显著降低, 并随 [C₈mim]Br 浓度的增加及处理时间的延长, 各参数下降幅度增大。这可能是由于 [C₈mim]Br 改变了牟氏角毛藻细胞的膜透性, 并阻碍其光合电子的传递, 导致牟氏角毛藻无法进行正常的光合作用和新陈代谢, 引起藻细胞死亡。

关键词: 1-辛基-3-甲基咪唑溴盐; 牟氏角毛藻; 生长; 叶绿素荧光

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0354-03

离子液体 (ionic liquids) 因蒸汽压接近零, 对水和空气稳定, 易被回收利用, 而被称为“绿色溶剂”。离子液体在分离工程、有机合成、电化学及材料加工等领域具有广阔应用前景^[1-2]。与传统有机溶剂相比, 离子液体具有极低的蒸汽压, 且不易挥发, 可显著降低对空气的污染, 但其在水中的溶解度很高, 且不易降解^[3], 因此对水生生物及群落具有潜在影响^[4]。研究表明, 释放到水中的离子液体会导致水体污染, 对水生生物的影响表现出“烷基链效应” (alkyl side chain effect) 和“截止效应” (cut off effect)^[2]。咪唑类离子液体作为被最广泛应用的一类离子液体, 近年来有关其对绿藻、大型蚤、斑马鱼等水生生物影响的研究工作已见诸报道^[5-7], 但有关咪唑类离子液体对藻类生长及光合作用影响的研究尚未见报道。藻类作为水生生态系统的初级生产者, 是环境污染物进入食物链的重要途径。角毛藻作为水产经济动物的优良饵料, 水环境污染对角毛藻的毒害必然会通过食物链影响水产经济动物的产量与质量^[8]。本研究以牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*) 为材料, 利用叶绿素荧光技术分析了 1-辛基-3-甲基咪唑溴盐 (1-octyl-3-methylimidazolium bromide, [C₈mim]Br) 对其生长及叶绿素荧光特性的影响, 探讨了 [C₈mim]Br 对牟氏角毛藻可能的毒性作用机制, 旨在为评价 [C₈mim]Br 对藻类的毒性效应及其环境风险积累提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牟氏角毛藻保存于江苏省海洋生物学重点实验室。在无菌条件下, 将藻种转接到 f/2 培养基^[9]中。培养条件为: 温度 20 ℃, 光照度 3 000 lx, 光-暗周期为 12 h-12 h。

1-辛基-3-甲基咪唑溴盐购自上海成捷化学有限公司, 纯度为 99%; 其他试剂均为上海国药集团化学试剂有限公司生产的分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 藻种的活化、培养、生长抑制试验 用于生物测试的藻必须是处于对数期并且是同步化生长的细胞, 因此在测试前要进行藻类的同步化培养^[10]。将牟氏角毛藻在无菌条件下转移至 f/2 培养基中, 于光照培养箱中驯化培养 7 d, 至对数生长期后进一步扩大培养 (培养条件为: 温度 20 ℃, 照度 3 000 lx, 光-暗周期 12 h-12 h), 静置培养, 每天定时人工摇动 3 次。

参照 OECD201 藻类生长抑制试验的标准方法^[11], 牟氏角毛藻接种后 (初始密度为 1×10^5 个/mL), 根据预试验结果加入 [C₈mim]Br, 使其浓度分别为 0、30、60、90、120、150 mg/L, 每个处理重复 3 次, 静置培养, 每天定时人工摇动 3 次。

1.2.2 细胞密度的测定 定时取样 0.2 mL, 采用血球计数板法测定藻细胞密度。

1.2.3 叶绿素相对含量的测定 采用德国 Walz 公司生产的浮游植物荧光仪 (Phyto-PAM) 测定叶绿素相对含量, 其原理是基于瞬间荧光产量 (F_i 值) 与叶绿素含量在一定范围内成正比, 仪器校正后可测出叶绿素相对含量^[8]。

1.2.4 叶绿素荧光参数的测定 定时取样 2 mL, 用浮游植物荧光仪测定叶绿素荧光参数。测定前将各样品暗适应 15 min, 然后测定光合系统 II (PS II) 最大光能转化效率

收稿日期: 2013-03-02

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31200381); 江苏省自然科学基金 (编号: BK2011493); 江苏省博士后科研资助计划 (编号: 1201063C); 中国博士后科学基金 (编号: 2013M531370)。

作者简介: 邓祥元 (1982—), 男, 山东日照人, 博士, 讲师, 主要从事微藻环境生物学研究。Tel: (0511) 85639697; E-mail: dengxy2009@126.com。

通信作者: 王长海, 博士, 教授, 研究方向为微藻生物学。Tel: (025) 84396680; E-mail: chwang@njau.edu.cn。

(F_v/F_m)、PS II 潜在活性(F_v/F_o)、最大相对电子传递速率($rETR_{max}$)、光能转化效率(α)、半饱和光强(I_k)等参数。

2 结果与分析

2.1 $[C_8mim]Br$ 对牟氏角毛藻生长及叶绿素含量的影响

由图 1 可知,加入 $[C_8mim]Br$ 后,牟氏角毛藻的生长及叶绿素含量受到显著抑制,且随处理时间的延长,这种抑制效应越明显。镜检发现, $[C_8mim]Br$ 可导致藻细胞体积增大、畸形分裂等现象,这可能是由于 $[C_8mim]Br$ 改变了牟氏角毛藻细胞的膜透性,使大量 $[C_8mim]Br$ 进入细胞,从而使细胞生理代谢过程受到抑制,这与段炼等的研究结果^[12] 基本一致。

2.2 $[C_8mim]Br$ 对牟氏角毛藻叶绿素荧光参数的影响

如图 2 所示,牟氏角毛藻的各项叶绿素荧光参数(F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 $rETR_{max}$ 、 α) 随 $[C_8mim]Br$ 浓度的增大而降低,且处理时间越长,下降幅度越大。与对照相比,在 72 h 时 30、60、90、120、150 mg/L $[C_8mim]Br$ 处理的 PS II 最大光能转化效率(F_v/F_m) 分别下降了 50.7%、74.9%、80.5%、96.5%、98.8%;PS II 潜在活性(F_v/F_o) 则分别下降了 60.7%、88.1%、91.7%、98.6%、99.6%。而最大相对电子传递速率($rETR_{max}$) 在 6 h 内大幅下降,之后随时间变化不明显。光能转化效率(α) 则随 $[C_8mim]Br$ 浓度的增大及处理时间延长而

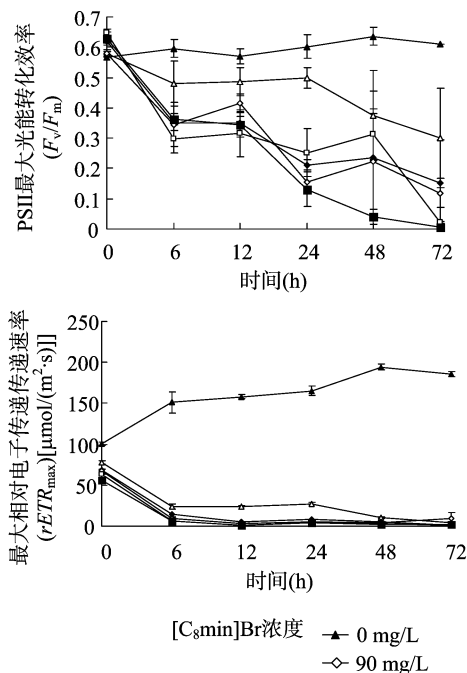


图2 不同浓度 $[C_8mim]Br$ 对牟氏角毛藻叶绿素荧光参数的影响

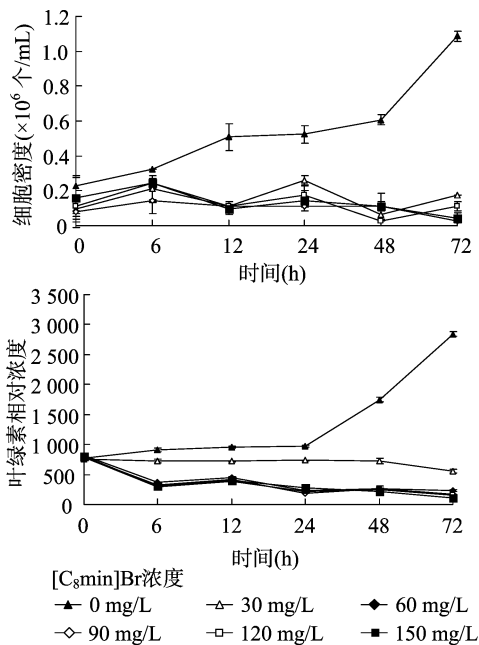
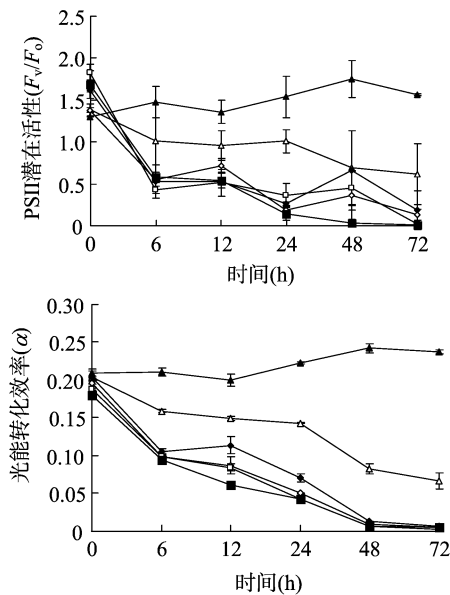


图1 不同浓度 $[C_8mim]Br$ 对牟氏角毛藻生长及叶绿素含量的影响

降低,30 mg/L $[C_8mim]Br$ 处理较对照下降了 71.9%,而当 $[C_8mim]Br$ 浓度 >30 mg/L 时,在 48 h 后 α 值接近 0。



3 结论与讨论

近年来咪唑类离子液体已成为化学领域的研究热点,咪唑类离子液体在化学化工领域相关行业中得到了广泛应用,但与其环保问题相关的研究未得到足够重视,导致有关其毒性的相关数据较少,无法对其环境危害性进行正确评估^[13]。本研究以牟氏角毛藻为材料,利用叶绿素荧光技术分析了

$[C_8mim]Br$ 对其生长及叶绿素荧光特性的影响,以期评价 $[C_8mim]Br$ 对藻类的毒性效应及其环境风险积累提供数据和科学依据。

研究发现, $[C_8mim]Br$ 严重抑制牟氏角毛藻的生长并影响其叶绿素含量,这可能是由于 $[C_8mim]Br$ 可改变藻细胞中纤维素类物质的晶型结构,导致细胞变形、分裂,从而影响藻类正常的新陈代谢和生理过程,抑制牟氏角毛藻生长。段炼

等通过透射电镜观察发现,1-丁基-3-甲基咪唑氯盐([C₈mim]Cl)可造成斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)细胞的质壁分离,体内叶绿体片层断裂,线粒体嵴数量减少等现象;且对其细胞膜的通透性具有一定破坏作用^[12]。

叶绿素荧光分析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天然探针,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^[14],该技术可以快速、灵敏、无损伤地研究和探测多种逆境因子对植物光合作用的影响^[15-16]。在荧光分析中, F_v/F_m 表示PSⅡ最大光能转化效率,反映藻体内潜在的最大光合能力,在非胁迫条件下 F_v/F_m 值变化很小,但在胁迫条件下其变化很大^[15]。研究表明,加入[C₈mim]Br后牟氏角毛藻的 F_v/F_m 值随处理时间延长呈线性降低趋势,72 h后150 mg/L [C₈mim] Br处理的 F_v/F_m 值接近0,表明牟氏角毛藻的PSⅡ反应中心已受到严重损坏,抑制了光合作用的原初反应,使反应过程无法继续进行,而对照的 F_v/F_m 值一直维持在0.62左右,表明其处于正常生理状态^[17]。此外, F_v/F_o 表示PSⅡ的潜在活性,随[C₈mim]Br处理浓度及时间的增加而迅速降低,也说明牟氏角毛藻的光合作用受到严重抑制。

$rETR_{max}$ 代表无光抑制时的最大相对电子传递速率,在达到光饱和和前 $rETR_{max}$ 与光合放氧速率及CO₂固定速率具有良好的线性关系。本研究中,加入[C₈mim]Br后牟氏角毛藻的 $rETR_{max}$ 值在前6 h大幅降低,之后小于10,表明电子传递受到严重阻碍。电子传递受阻会导致PSⅡ反应中心无法正常接受光子,光子累积到一定程度产生光抑制,使藻细胞的同化力(NADPH和ATP)无法正常形成,从而对碳的固定和同化,光合利用效能和转化效率也就出现明显下降趋势^[18]。 α 表示光能转化效率,与捕光色素对光能的吸收有关,由图2可以看出,[C₈mim]Br导致牟氏角毛藻的 α 值随处理时间逐渐降低,当其浓度超过30 mg/L、处理时间超过48 h时, α 值接近0,表明色素对光能的吸收能力逐渐减弱,最终丧失该能力。此外,半饱和光强 I_k 可由公式 $I_k = rETR_{max}/\alpha$ 进行计算,分析发现,加入[C₈mim]Br后牟氏角毛藻的 I_k 值逐渐减小,表明牟氏角毛藻在较低光强下就能达到饱和,这可能是由于其电子传递链受阻,无法进行光合作用的缘故。

因此[C₈mim]Br严重抑制牟氏角毛藻的生长及叶绿素含量,这种抑制作用一方面可能是由于[C₈mim]Br导致藻细胞发生膜透性的改变,致使质壁分离、叶绿体破损等,进而影响了牟氏角毛藻正常的新陈代谢和生理过程;另一方面可能是通过阻碍其光合电子传递引起的,电子传递受阻后,PSⅡ反应中心无法接受光子,抑制了光合作用的正常进行,从而使其生长及生理过程受到抑制;也可能是这2种影响的叠加。

参考文献:

- [1] Cho C W, Pham T P, Jeon Y C, et al. Toxicity of imidazolium salt with anion bromide to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*; effect of alkyl-chain length[J]. *Chemosphere*, 2007, 69(6): 1003-1007.
- [2] Ventura S P, de Barros R L, Sintra T, et al. Simple screening method to identify toxic/non-toxic ionic liquids: Agar diffusion test adaptation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 83(1): 55-62.
- [3] Bruzzone S, Chiappe C, Focardi S E, et al. Theoretical descriptor for the correlation of aquatic toxicity of ionic liquids by quantitative structure-toxicity relationships[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 175: 17-23.
- [4] Cho C W, Jeon Y C, Pham T P, et al. The ecotoxicity of Ionic liquids and traditional organic solvents on microalga *Selenastrum capricornutum* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(1): 166-171.
- [5] Pretti C, Chiappe C, Baldetti I, et al. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(4): 1170-1176.
- [6] Kulacki K J, Lamberti G A. Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae[J]. *Green Chemistry*, 2008, 10(1): 104-110.
- [7] 牧辉, 彭新晶, 戴宁, 等. 离子液体[C₈mim]PF₆对水生生物的毒性作用[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(11): 1196-1201.
- [8] 梁英, 王帅, 冯力霞, 等. 重金属胁迫对纤细角毛藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2008, 38(1): 59-67.
- [9] Guillard R R, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea* (Cleve) gran [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8(2): 229-239.
- [10] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 87.
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 715-721.
- [12] 段炼, 杜耀, 陆秋琳, 等. 离子液体1-丁基-3-甲基咪唑氯盐对斜生栅藻的毒性效应[J]. *中国环境科学*, 2012, 32(5): 886-891.
- [13] 吴波, 张玉梅, 王华平. 离子液体的安全性研究进展[J]. *化工进展*, 2008, 27(6): 814-818.
- [14] 梁英, 尹翠玲, 江新琴, 等. 硅浓度对纤细角毛藻和三角褐指藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(5): 89-94.
- [15] 赵会杰, 邹奇, 余振文. 叶绿素荧光分析技术及其在植物光合机理研究中的应用[J]. *河南农业大学学报*, 2000, 34(3): 248-251.
- [16] 冯建灿, 胡秀丽, 毛训甲. 叶绿素荧光动力学在研究植物逆境生理中的应用[J]. *经济林研究*, 2002, 20(4): 14-18, 30.
- [17] 光应芝, 张芳, 张前前, 等. 10种极地微藻叶绿素荧光特征分析[J]. *极地研究*, 2011, 23(3): 183-188.
- [18] 陈雷, 郑青松, 刘兆普, 等. 不同Cu²⁺浓度处理对斜生栅藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. *生态环境学报*, 2009, 18(4): 1231-1235.