

易婷婷, 支崇远, 李培林, 等. Pb^{2+} 对淡水硅藻谷皮菱形藻 (*Nitzschia palea*) 生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 340–343.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.100

Pb^{2+} 对淡水硅藻谷皮菱形藻 (*Nitzschia palea*) 生长的影响

易婷婷, 支崇远, 李培林, 杨雨嘉, 帅春燕

(贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001)

摘要:通过在自制培养基中加入不同浓度的 Pb^{2+} , 研究水环境中重金属 Pb^{2+} 污染对谷皮菱形藻生长和叶绿素 a 含量的影响, 并在光学显微镜下观察细胞形态变化, 研究该藻对铅离子 (Pb^{2+}) 的耐受性。试验结果表明, 谷皮菱形藻对 Pb^{2+} 的耐受性较强。 Pb^{2+} 浓度低于 5 mg/L, 促进其生长; Pb^{2+} 浓度为 10 mg/L 时, 对其无明显影响; Pb^{2+} 浓度大于 50 mg/L 时, 明显抑制其生长, 且藻细胞出现异常现象; 96 h EC_{50} 值为 27.26 mg/L。 Pb^{2+} 浓度小于 10 mg/L 时, 藻叶绿素 a 含量均较高, 与正常生长情况相似; Pb^{2+} 浓度大于 50 mg/L 时, 叶绿素 a 含量明显降低。 Pb^{2+} 浓度较低时, 藻细胞体形态正常, 且运动能力很强, Pb^{2+} 浓度大于 50 mg/L 时, 藻细胞体出现畸形, 颜色加深, 两端由圆形变成方形, 且运动能力很弱。

关键词:淡水硅藻; 谷皮菱形藻 (*Nitzschia palea*); Pb^{2+} ; 形态; 生长

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0340-04

硅藻是单细胞藻类, 作为水体中重要的初级生产者, 在地球上已存在 1.65 亿年, 对整个海洋初级生产力的贡献高达 40%^[1], 与水生动物相比, 硅藻具有生长周期短、易于分离培养和可以直接观察细胞水平上的中毒症状等优点, 对重金属胁迫更加敏感, 因此, 是较为理想的实验材料^[2]。菱形藻是

底栖硅藻的一种, 因含有丰富的营养物质, 可以作为鲍、海胆、海参等名贵经济动物的饵料, 另外菱形藻属也是环境污染检测指示种^[3-5]。

重金属污染不仅抑制藻类的生长速率, 而且会使其形态发生畸变, 因而硅藻种群或群落中畸形细胞的数量可以作为重金属污染程度的定量指标^[6]。硅藻细胞形态异常在生物监测中是一种很有前途的重金属污染物指示工具^[7]。在环境监测中, 常将叶绿素 a 含量作为湖泊富营养化的指标之一^[8]。铅是一种不能降解且广泛存在的重金属污染物, 铅盐少部分是溶解于水的, 大部分是微溶或不溶于水的^[9]。在自然水体中, 铅的含量一般为 20 $\mu\text{g/L}$, 但污染严重的地区水体含量高达 400 $\mu\text{g/L}$ 。目前 EPA 和 WHO 水体铅浓度标准分

收稿日期: 2015-07-15

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 41062005); 贵州省国际科技合作项目 [编号: (2012)800107]。

作者简介: 易婷婷 (1989—), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 研究方向为现代生物技术应用。E-mail: 136659358@qq.com。

通信作者: 支崇远, 博士, 教授, 主要从事硅藻生理生态方面的研究。E-mail: zhicy@163.com。

[6] 侯文华, 宋关玲, 汪群慧. 浮萍在水体污染治理中的应用[J]. 环境科学研究, 2004, 17(增刊1): 70–73.

[7] Landolt E, Kandeler R. The family of Lemnaceae: a monographic study. 2. Phytochemistry, physiology, application, bibliography[M]. Geobotan Inst, 1987.

[8] 沈根祥, 胡宏, 沈东升, 等. 浮萍净化氮磷污水生长条件研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 284–287.

[9] Caicedo J R, van der Steen N P, Arce O, et al. Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*) [J]. Water Research, 2000, 34(15): 3829–3835.

[10] Cheng J Y, Bergmann B A, Classen J J, et al. Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata* [J]. Bioresource Technology, 2002, 81(1): 81–85.

[11] Reid M S, Bielecki R L. Response of *Spirodela oligorrhiza* to phosphorus deficiency [J]. Plant Physiology, 1970, 46(4): 609–613.

[12] Chen Y, Yablonski M, Ernst E, et al. Duckweed: an alternative starch source for bioethanol production [C]. Michigan: ASABE

Regional Annual Conference, 2007.

[13] Tang J, Zhang F, Cui W, et al. Genetic structure of duckweed population of *Spirodela*, *Landoltia* and *Lemna* from Lake Tai, China [J]. Planta, 2014, 239(6): 1299–1307.

[14] Rose R, Rose C L, Omi S K, et al. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(1): 2–11.

[15] 周雄飞. 浮萍对富营养化水体中 N、P 净化能力初探 [D]. 扬州: 扬州大学, 2011.

[16] 熊正琴, 邢光熹, 沈光裕, 等. 太湖地区湖、河和井水中氮污染状况的研究 [J]. 农村生态环境, 2002, 18(2): 29–33.

[17] Alaerts G J, Mahbub R, Kelderman P. Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon [J]. Water Research, 1996, 30(4): 843–852.

[18] Oron G D, Porath D. Nitrogen removal and conversion by duckweed grown on wastewater [J]. Water Research, 1988, 22(2): 179–184.

别为 0.05 mg/L 和 10 μg/L。《水和废水监测分析方法》(第四版)中指出,铅对水生生物的安全浓度为 0.16 mg/L。然而,由于工厂随意排放铅废水及释放含铅废气,不仅影响水质和溪流中的水生生物^[10],还导致血铅儿童等污染事件频频发生^[11]。铅对植物的影响主要是破坏水生植物细胞的叶绿素、线粒体和细胞核结构,使得叶绿素和维生素 C 含量减少,降低了硝酸还原酶活性和脱氢还原酶活性,从而阻碍了植物的新陈代谢和光合作用,最终导致正常生长植物数量受到影响^[11]。

单一重金属对微藻生长繁殖的影响,国内外都进行了大量工作。对于铅对微藻的毒性影响研究,国外文献主要报道采用微藻吸附水体中铅从而达到净化水质效果^[12-13]。硅藻是当前研究的热点之一,国内偏重于海洋硅藻的研究,对淡水硅藻的毒性研究也逐步展开^[14],主要是从硅藻的生长速率、细胞分化速率以及胞内植物螯合肽等 3 个方面进行探讨^[6]。随着环境污染程度的不同,硅藻会呈现不同的形态畸形,并且影响研究者鉴定其属种。

本研究以谷皮菱形藻(*Nitzschia palea*)为材料,研究 Pb²⁺ 毒害对谷皮菱形藻生长和叶绿素 a 含量的影响。用光学显微镜观察细胞形态变化,评价不同 Pb²⁺ 浓度对谷皮菱形藻的影响以及谷皮菱形藻细胞对 Pb²⁺ 的耐受性,以期探讨水体 Pb²⁺ 污染对硅藻毒害的机理及其耐受机制积累科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所选用的硅藻谷皮菱形藻(*Nitzschia palea*)采集于贵州省贵阳市花溪湿地公园的溪流中,应用微藻微吸管分离方法分离,在自制培养基中纯化后保种培养。经扩大培养后得到菱形藻纯种,并获得足够的藻液进行试验。当藻细胞浓度达到 6 万~10 万个/mL 时加入 Pb(NO₃)₂,使得培养基中 Pb²⁺ 浓度依次为 0.5、1、5、10、50、80 mg/L 以及不加 Pb²⁺ 的对照组。每个浓度设置 3 个平行试验。

1.2 培养条件

试验所用的培养基及所有器皿均经过 121 ℃ 高压灭菌 20 min,试验在无菌条件下进行,试验藻种均用自制培养基培养至对数生长期备用。自制培养基各成分质量浓度为 NH₄Cl 15 mg/L, MgCl₂ · 6H₂O 12 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 18 mg/L, MgSO₄ · 7H₂O 15 mg/L, KH₂PO₄ 1.6 mg/L, NaHCO₃ 50 mg/L, FeCl₃ · 6H₂O 80 μg/L, Na₂EDTA · 2H₂O 100 μg/L, H₃BO₃ 185 μg/L, MnCl₂ · 4H₂O 415 μg/L, ZnCl₂ 3 μg/L, CoCl₂ · 6H₂O 1.5 μg/L, CuCl₂ · 2H₂O 0.01 μg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 7 μg/L, 维生素 B₁₂ 0.5 μg/L, 维生素 B₁ 0.1 mg/L, 维生素 H 0.5 μg/L。每 1 000 mL 培养液加土壤浸出液 50 mL,调节 pH 值至 8.0 左右。

培养温度为 20 ℃,光照度为 1 800 lx,光暗周期为 12 h-12 h,静水培养,硅藻在对数生长期反复接种 3 次后混合所有藻液,摇匀,重新分瓶后,开始下一步试验。

1.3 生物量测定

显微镜下用血球计数板进行藻细胞计数,测定藻细胞的浓度(个/mL)。

通过计算硅藻暴露在不同浓度铅下的抑制率,采用回归

曲线拟合,计算抑制率为 50% 时的铅浓度,记为 EC₅₀。特定生长率(*U*)按以下公式计算:

$$U = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$$

式中:*N*₀、*N*_{*t*} 分别为开始期(*t*₀)和 *t* 时刻(*t*)的细胞数。

$$\text{抑制率 } I = (U_{\text{CK}} - U_{\text{tox}}) / U_{\text{CK}} \times 100\%$$

式中:*U*_{CK} 为对照组的生长速度;*U*_{tox} 为有供试化合物时的生长速度。

采用 Origin 8.0 软件对试验数据进行作图。

1.4 叶绿素 a 含量测定

谷皮菱形藻藻株在不同 Pb²⁺ 浓度的培养基中培养至第 9 天,取 10 mL 藻液于 10 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后,加入 10 mL 95% 丙酮,置于 4 ℃ 冰箱里静置 24 h,然后 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液后,用可见分光光度计在 663 nm 和 645 nm 处测其吸光度,用 95% 丙酮调零。按 Aron 的公式计算提取液的叶绿素 a 浓度。

$$\text{Chl a} = 12.7 D_{663 \text{ nm}} - 2.69 D_{645 \text{ nm}}^{[15]}$$

1.5 谷皮菱形藻活细胞的形态观察

取少量不同 Pb²⁺ 浓度下 96 h 的藻液,在光学显微镜下观察其形态,并拍照。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度的 Pb²⁺ 对谷皮菱形藻生长的影响

由图 1 可见,当 Pb²⁺ 浓度小于 5 mg/L 时,Pb²⁺ 对谷皮菱形藻的生长有一定的促进作用,藻细胞生长呈上升趋势;当 Pb²⁺ 浓度大于 50 mg/L 时,与对照组相比,谷皮菱形藻的生长受到明显抑制。

在培养的前 72 h,当 Pb²⁺ 浓度为 1 mg/L 时,与空白对照组的生长情况无明显差异,培养至 96 h 时,能够促进谷皮菱形藻的生长,且明显超过了对照组。Pb²⁺ 浓度为 0.05 mg/L 时,24 h 时的抑制率为 31.14%,而在之后,起着促进生长作用。其他试验组中,24 h 时的抑制率均较高,之后均大幅度降低。使用回归曲线模拟,计算得出 96 h EC₅₀ 值为 27.26 mg/L。

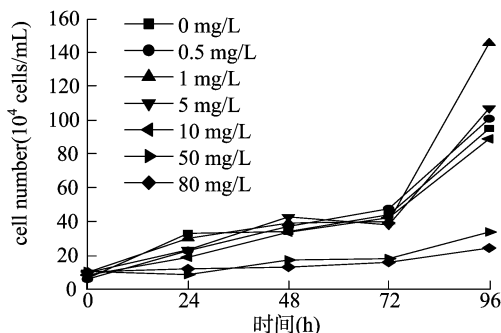


图1 不同质量浓度的Pb²⁺处理培养基中谷皮菱形藻的生长曲线

2.2 不同质量浓度的 Pb²⁺ 对谷皮菱形藻叶绿素 a 含量的影响

由图 2 可见,不同质量浓度的 Pb²⁺ 对谷皮菱形藻叶绿素 a 含量的影响不同,当 Pb²⁺ 浓度小于 10 mg/L 时,叶绿素 a 含量高于对照组中叶绿素 a 含量;Pb²⁺ 浓度为 1 mg/L 时,叶绿素 a 含量达到最大值;当 Pb²⁺ 浓度大于 50 mg/L 时,叶绿素 a 含量明显降低。试验结果表明,Pb²⁺ 浓度小于 10 mg/L 时,有

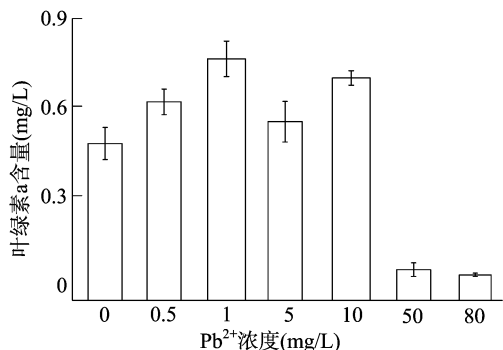
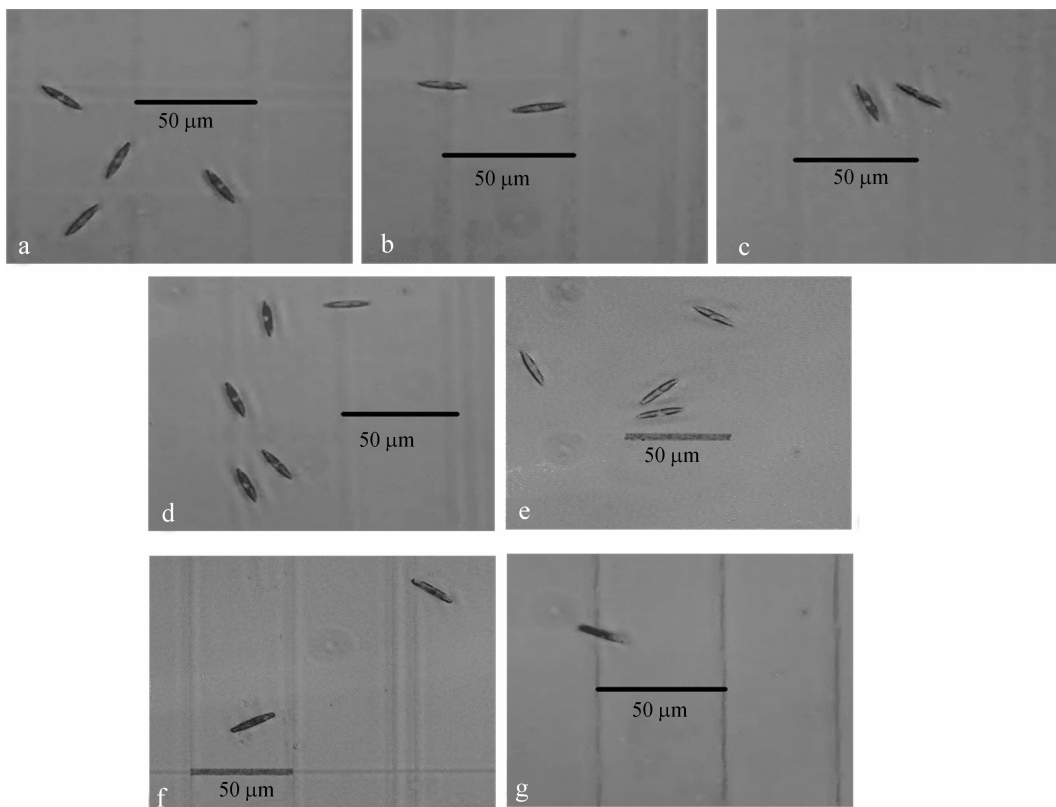


图2 不同质量浓度的Pb²⁺对谷皮菱形藻叶绿素a含量的影响

利于谷皮菱形藻叶绿素a含量的积累。

2.3 不同质量浓度的Pb²⁺对谷皮菱形藻形态的影响



a~g依次分别为对照组、0.5、1、5、10、50、80 mg/L处理

图3 不同浓度Pb²⁺培养基中的谷皮菱形藻活细胞

3 讨论与结论

重金属对水环境造成的污染已经引起人们的日益关注。在工业时代,尤其是将铅添加到车辆的汽油燃料中,导致水生生态系统中的铅含量大大增加^[16]。

本研究表明,不同质量浓度Pb²⁺对菱形藻的生长影响不同。Pb²⁺浓度低于5 mg/L,促进其生长;Pb²⁺浓度为10 mg/L时,对其无明显影响;Pb²⁺浓度大于50 mg/L时,对菱形藻的抑制作用明显,藻液颜色变为淡黄色,藻细胞体出现畸变,这与周长芳等、李勇勇等的研究结果^[17-18]相近。周长芳等研究铅污染对钝顶螺旋藻生长的影响,发现当Pb²⁺浓度高于20 mg/L时,钝顶螺旋藻生长受抑制,藻细胞随着浓度的升高

用肉眼可直接观察出谷皮菱形藻在不同Pb²⁺浓度培养基中的生长情况。Pb²⁺浓度较低时,谷皮菱形藻生长旺盛,藻液颜色正常,呈黄褐色,且附着在培养瓶底部,随着Pb²⁺浓度增加,藻液颜色均变浅,且出现浑浊现象。

对照组和不同浓度Pb²⁺培养基中谷皮菱形藻活细胞见图3。从光学显微镜中观察到,在低于10 mg/L Pb²⁺浓度中的谷皮菱形藻细胞(图3-a至图3-e)生长正常,颜色较鲜,叶绿体分布均匀,且容易分辨,细胞形态上与对照组无明显差异,游动很快;而在高浓度Pb²⁺(>50 mg/L)的培养基中(图3-f、图3-g),细胞发生畸变,活细胞体颜色加深,藻细胞末端位置形状由圆形变成方形,几乎没有游动,有轻微的振颤运动,与对照组相比,形态呈明显差异。随着Pb²⁺浓度增加,藻细胞死亡及残骸数量也增多,即使是正常的细胞,其颜色也很淡。

和时间的延长而黄化死亡^[17]。有报道表明,铅会抑制硅藻的细胞分化速率,当其达到一定浓度(4.8×10^{-7} mol/L)时,中内骨条藻的细胞分化速率几近为0^[19]。铅还能使小环藻(*Cyclotella* sp.)细胞形态发生变化,使其叶绿体相对体积减小^[20]。

硅藻的生长取决于多种环境因素,包括微量金属元素。而过量的重金属,则会引起藻细胞功能障碍,降低其生长量,并可能最终导致其死亡。为了生存,硅藻会启动防御机制,如产生抗氧化剂或金属螯合剂,从而克服重金属胁迫^[21]。

本研究中,谷皮菱形藻96 h EC₅₀值为27.26 mg/L,根据《水与废水监测分析方法 第四版》中藻类生长抑制毒性评价的分级标准,属于中毒级别。李勇勇等研究了铅离子对2

株螺旋藻生长的影响,96 h EC_{50} 值分别为 61.66、72.44 mg/L^[18]。温军杰等报道的 Pb^{2+} 对螺旋藻的 72 h EC_{50} 值为 11.46 mg/L, Pb^{2+} 对湛江叉鞭金藻、小球藻的 96 h EC_{50} 值分别为 9.03、20 mg/L^[22]。从 Pb^{2+} 对谷皮菱形藻生长及前人研究的 Pb^{2+} 对其他藻类生长的影响结果比较看,该藻具有一定的 Pb^{2+} 耐受性。

研究指出,铅对普通小球藻和原壳小球藻的叶绿素 a 具有剂量抑制效应^[3]。这个结果也可从本试验中得出。邱昌恩等研究也表明, Pb^{2+} 可抑制绿球藻叶绿素 a 的合成^[23]。Yan 等研究发现,铅之所以能抑制叶绿素 a 合成,是因为铅破坏了植物吸收必需元素如 Mg 和 Fe,甚至加速叶绿素 a 分解^[24]。因此,本试验中,低浓度铅对谷皮菱形藻叶绿素 a 合成具有促进作用,高浓度铅则抑制其合成,可能是由于低浓度铅促进了谷皮菱形藻吸收必需元素,而过量的铅则抑制其吸收必需元素或者分解叶绿素 a 的缘故。

用光学显微镜观察谷皮菱形藻活细胞在高浓度铅胁迫下的结果,与对照组比较,藻细胞出现畸变,颜色加深,运动能力明显减弱。资料表明,高浓度的铅可使亚心形扁藻丧失运动能力,最终导致鞭毛变形或者脱落。部分研究发现,藻类显示了对较高浓度铅离子的忍耐力,可能是由于铅离子容易从细胞壁排出或是高浓度的铅易于从溶液中沉淀所致^[25]。通过光学显微镜观察到硅藻细胞的畸变情况,一些类群更容易在环境胁迫中受到影响而致变形。例如,舟形藻科的细胞会表现出延长细胞形态,而脆杆藻科的硅藻细胞膜则是扭曲的。重金属被认为是引起硅藻细胞表面畸形的重要因素。有试验证明,在高浓度铜暴露中,高达 3% 的硅藻细胞膜发生了变化,无污染的对照组中,硅藻畸形瓣膜的数量少于 1%^[26]。

本试验首次对谷皮菱形藻进行重金属 Pb^{2+} 胁迫研究,分析藻细胞的生长情况,得出 96 h EC_{50} 值,以了解 Pb^{2+} 对谷皮菱形藻的生长影响及谷皮菱形藻的铅耐受范围,为 Pb^{2+} 污染对淡水底栖硅藻的影响及解析耐受机理积累研究基础。另外,本研究提供了在不同 Pb^{2+} 浓度下生长的谷皮菱形藻图片,以期对野外样品中畸形硅藻的鉴定提供参考依据。

参考文献:

- [1] Heredia A, Figueira E, Rodrigues C T, et al. Cd^{2+} affects the growth, hierarchical structure and peptide composition of the biosilica of the freshwater diatom *Nitzschia palea* (Kützinger) W. Smith [J]. Phycological Research, 2012, 60(3): 229–240.
- [2] 王 帅. 重金属 Cd^{2+} 对微藻生长及叶绿素荧光特性的影响[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [3] 邢荣莲. 海洋底栖硅藻的筛选、培养和应用研究[D]. 大连:大连理工大学,2007.
- [4] 马志珍, 季梅芳, 陈汇远. 一种可作鲍和海参饲料的底栖舟形藻的培养条件的研究[J]. 海洋通报, 1985, 4(4): 36–39.
- [5] 邢荣莲, 苏 群, 王长海, 等. 菱形藻在污水中的生长及其净化能力[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(1): 72–75.
- [6] 丁腾达, 倪婉敏, 张建英. 硅藻重金属污染生态学研究进展[J]. 应用生态学报, 2012, 23(3): 857–866.
- [7] Pandey L K, Kumar D, Yadav A, et al. Morphological abnormalities in

- periphytic diatoms as a tool for biomonitoring of heavy metal pollution in a river[J]. Ecological Indicators, 2014, 36: 272–279.
- [8] 国家环境保护局,《水和废水监测分析方法》编委会. 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: 670–715.
 - [9] 李 华, 孙虎山, 李 磊. 铅污染对海洋生物影响的研究进展[J]. 水产科学, 2011, 30(3): 177–181.
 - [10] Tokatli C, Kose E, Cicek A, et al. Copper, zinc and lead concentrations of Epipellic diatom frustules in Porsuk Stream (Sakarya River Basin, Turkey) [J]. Russian Journal of Ecology, 2013, 44(4): 349–352.
 - [11] 熊 邦. 铅对普通小球藻和原壳小球藻的毒性效应研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
 - [12] Gupta V K, Rastogi A. Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studies[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 152(1): 407–414.
 - [13] Deng L, Su Y, Su H, et al. Sorption and desorption of lead(II) from wastewater by green algae *Cladophora fascicularis* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 143(1/2): 220–225.
 - [14] 马健荣, 刘 明, 徐 信, 等. 硅藻研究与应用展望[J]. 山东农业科学, 2010(8): 52–56.
 - [15] Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplasts[J]. Polyphenol-oxidase in *Betavularis* [J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1–15.
 - [16] Bere T, Tundisi J G. Cadmium and Lead toxicity on tropical freshwater periphyton communities under laboratory – based mesocosm experiments[J]. Hydrobiologia, 2012, 680(1): 187–197.
 - [17] 周长芳, 吴国荣, 陆长梅, 等. 铅污染对钝顶螺旋藻生长及某些生理性状的影响[J]. 湖泊科学, 1999, 11(2): 135–140.
 - [18] 李勇勇, 赵 楠, 李善策, 等. 重金属铅离子 Pb^{2+} 对两株螺旋藻生长影响的研究[J]. 生物学杂志, 2013, 30(4): 37–41.
 - [19] Desai S R, Verlecar X N, Goswami U. Genotoxicity of Cadmium in Marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay[J]. Ecotoxicology, 2006, 15(4): 359–363.
 - [20] Sicko – Goad L, Ladewski B G, Lazinsky D. Synergistic effects of nutrients and lead on the quantitative ultrastructure of *Cyclotella* (Bacillariophyceae) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1986, 15(3): 291–300.
 - [21] Masmoudi S, Nguyen – Deroche N, Caruso A, et al. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: from heaven to hell—a review[J]. Cryptogamie Algologie, 2013, 34(2): 185–225.
 - [22] 温军杰, 陈 艳, 胡勤海, 等. 螺旋藻对铅的耐受力初步研究[J]. 水资源保护, 2005, 21(2): 24–26, 49.
 - [23] 邱昌恩, 胡征宇. Pb^{2+} 胁迫对绿球藻 (*Chlorococcum* sp.) 的影响研究[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 521–526.
 - [24] Yan C L, Hong Y T, Fu S Z, et al. Effect of Cd, Pb stress on the activated oxygen scavenging system in tobacco leaves [J]. Chinese Journal of Geochemistry, 1998, 17(4): 372–378.
 - [25] 况琪军, 夏 宜, 惠 阳. 重金属对藻类的致毒效应[J]. 水生生物学报, 1996, 20(3): 277–283.
 - [26] Morin S, Coste M, Hamilton P B. Scanning electron microscopy observations of deformities in small pennate diatoms exposed to high cadmium concentrations [J]. Journal of Phycology, 2008, 44(6): 1512–1518.