

刘超,支崇远,李培林,等. 舟形藻生长运动过程对重金属 Cu^{2+} 急性毒性胁迫响应研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):373-375.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.104

舟形藻生长运动过程对重金属 Cu^{2+} 急性毒性胁迫响应研究

刘超,支崇远,李培林,易婷婷,张立微

(贵州师范大学生命科学学院,贵州贵阳 550001)

摘要:以浮游硅藻舟形藻(*Planktonic diatoms Navicula*)为受试藻,研究其在不同浓度 Cu^{2+} 胁迫下生长和运动变化特征。试验以 96 h 半致死浓度(EC_{50})、叶绿素 a 含量及综合运动等指标研究 Cu^{2+} 对舟形藻的毒性响应。 Cu^{2+} 对舟形藻 96 h EC_{50} 值为 4.510 mg/L; Cu^{2+} 对舟形藻叶绿素 a 累积最大抑制率为 50%; 运动速率在 1.127 5 mg/L 附近达到最高,表现出“中毒兴奋”,随后速率线性下降。舟形藻叶绿素 a 含量对 Cu^{2+} 反应不敏感,其运动状态可综合指示 Cu^{2+} 含量。利用舟形藻作为指示种来反映水体受 Cu^{2+} 污染程度具有一定的可行性,同时可为农业、工业及生活污水中的 Cu^{2+} 监测及评价提供依据。

关键词:舟形藻; Cu^{2+} 胁迫; 急性毒性; 生长; 运动

中图分类号: X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0373-03

Cu^{2+} 是舟形藻生长必需的微量营养元素之一,但当其超过正常需求量时, Cu^{2+} 会对硅藻产生毒性作用^[1-2]。随着人类对环境的各类干预,环境中 Cu^{2+} 浓度大大提高^[3]。由于重金属有着毒性大、不易被代谢及易被生物富集等特点,严重威胁着水生生物和人类的生存^[4]。硅藻为水生生态系统的初级生产者,在整个生态系统的物质循环与能量流动中有着重要的作用^[5]。进入硅藻中的 Cu^{2+} 可通过水生食物链食物网富集到高等动物体内,最终进入人体危害人类健康,同时 Cu^{2+} 将影响硅藻细胞的种群增长,导致水生生态系统中初级生产力下降,进而破坏整个生态系统的平衡^[6-7]。

贵州省贵阳市的小车河湿地作为居民饮用水源地之一,水质长期以来受到 Cu^{2+} 等重金属的影响,其治理与监测备受关注。本研究通过 Cu^{2+} 的急性毒性胁迫对舟形藻的生长和运动过程的观察^[8],对舟形藻在相同胁迫条件下表现出不同的生长及运动特点进行了线性相关分析,为探索舟形藻对 Cu^{2+} 毒性胁迫的响应、舟形藻生长和运动速率与 Cu^{2+} 浓度间的变化关系奠定研究基础^[9],同时为舟形藻作为指示种,监测水环境重金属污染提供新角度^[10]。

1 材料与方法

1.1 试验藻种及培育方法

舟形藻采自贵州省贵阳市小车河湿地,应用微藻微吸管

分离方法分离。原液经沉淀、过滤(0.45 μm 微孔滤膜), 121.3 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min。采用自制培养液加富的灭菌原液中培养。置于无菌培养室中培养,温度(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照度 66 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光-暗周期 12 h-12 h, pH 值 7.5 左右。经预培养和扩大培养得到舟形藻纯种,在获得足够藻液后进行试验。微藻培养瓶定时摇动 3 次/d,预防附壁生长。

1.2 试验仪器及设备

光学显微镜(深圳市新明光学仪器有限公司, XSP-2CA 生物显微镜)、光学显微镜物镜测微尺(深圳市新明光学仪器有限公司, C6 物镜测微尺)、电子秒表(PC2810)、照相机(Nikon-COOLPIX5400)、载物片、血球计数板。

1.3 试验方法

1.3.1 藻种扩大培养 试验藻种在自制培养液加富的灭菌原液中进行扩大培养,自制培养基各成分质量浓度为: NH_4Cl 15 mg/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L, KH_2PO_4 2.3 mg/L, NaH_2PO_4 50 mg/L, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/L, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 45 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 160 mg/L, ZnSO_4 25 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.007 mg/L, 维生素 B_{12} 0.5 mg/L, 维生素 B_1 50 mg/L, 维生素 H 0.5 mg/L。

1.3.2 急性毒性试验 试验设置 1 个空白组和 4 个试验组,根据预试验结果各组中 Cu^{2+} 的质量浓度分别为 0、1.5、2.5、3.5、4.5 mg/L。硅藻初始含量为 70 000 cells/mL。每个质量浓度设置 3 个平行组,试验所有容器和培养基均经过 121 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min 高压蒸气灭菌。试验共进行 96 h, 0、24、48、72、96 h 取样后,使用血球计数板观察及统计运动数据。观察时,摇匀培养瓶至藻液颜色统一,每日定时取样,取 1 mL 充分混匀的藻液,加适量鲁格氏固定液(Lugol),混匀后取 200 μL 藻液用血球计数板计数,每个样品计数 3 次,取平均值。之后按照下式计算出抑制率 $X = (I_0 - I)/I_0 \times 100\%$,以抑制率作图,利用加

收稿日期:2015-012-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:41062005、30560011);贵州省科技基金(编号:黔科合外 G 字[2012]7023);贵州省科技支撑计划(编号:黔科合 SY 字[2012]3178)。

作者简介:刘超(1983—),男,江西九江人,硕士研究生,主要从事湿地生态学研究。E-mail:276469607@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@126.com。

权直线回归法建立线性回归方程,并计算各时间段的半致死浓度(EC_{50})值。

1.3.3 亚急性毒性试验 设置 1 个对照组和 4 个试验组,根据急性毒性试验结果,设置质量浓度分别为 96 h EC_{50} , 96 h $EC_{50}/2$, 96 h $EC_{50}/4$, 96 h $EC_{50}/8$ 。硅藻初始含量为 7 000 cells/mL。容器为 500 mL 三角培养瓶,培养体积为 200 mL。共进行 15 d,其他条件与“1.1”节相同。在试验的前 5 d 每天对各组进行取样,之后每 2 d 取样 1 次,共取样 9 次,每次取样 10 mL,其中 5 mL 进行叶绿素 a 含量测定并对硅藻细胞的运动状态进行观察。

1.3.3.1 叶绿素 a 含量测定 取 5 mL 藻液,应用文献[11]中叶绿素 a 含量的测定方法,对硅藻叶绿素 a 含量进行测定。

1.3.3.2 舟形藻运动状态观察与分析 对舟形藻的运动过程录像,利用血球计数板上线的交点记录硅藻的行动距离,并用秒表计时,对计数框内硅藻的最大运动速率和平均运动速率进行计算。舟形藻运动状态参数包括平均运动速率、最大运动速率和运动硅藻占总数的比率。通过录像观察,对计数框内硅藻进行计数,得出硅藻总数和 30 s 内所有运动硅藻数量,并记舟形藻运动 2 μm 所耗时间。以上过程按照计数框内硅藻的数量重复 3~5 次,其中,最大运动速率取最大值,平均运动速率取平均值,运动硅藻占总数的比率取各计数框中运动硅藻总数占有所有计数框中硅藻总数的比率。

2 结果与讨论

2.1 Cu^{2+} 急性暴露对舟形藻的影响

在不同质量浓度 Cu^{2+} 胁迫下,舟形藻的生长曲线见图 1。与空白组相比,添加 1.5、2.5 mg/L Cu^{2+} 的试验组舟形藻的生长受到一定的促进,且促进程度与 Cu^{2+} 质量浓度呈正相关,表现出明显的毒性兴奋效应。在 2.5 mg/L 试验组中,在 24 h 时抑制率为 -2.44%,之后呈线性增加;而在 3.5 mg/L、4.5 mg/L 试验组中,在 96 h 时抑制率为 0.23%、0.56%,表明其生长明显受到抑制。

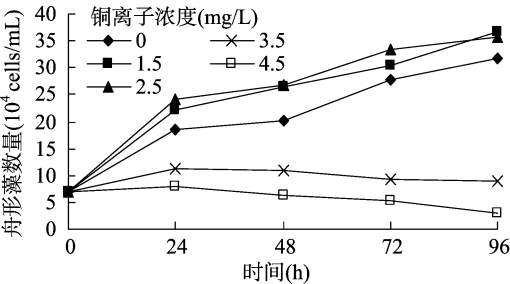


图1 Cu^{2+} 胁迫下舟形藻的生长

使用加权直线回归法分析计算, Cu^{2+} 对舟形藻各时间的 EC_{50} 和 95% 置信区间见表 1。各时间段 EC_{50} 值较为稳定,都在 4.510 mg/L 左右,说明随时间的延长 Cu^{2+} 对舟形藻的毒性无降低,未产生长期毒性,不会对舟形藻产生持续性影响。

2.2.1 Cu^{2+} 对舟形藻叶绿素 a 含量的影响 在不同质量浓度 Cu^{2+} 胁迫下的藻液,经过 15 d 培养,以叶绿素 a 的质量浓度为指标的曲线见图 2。在开始胁迫的前 3 d 叶绿素质量浓度有明显的增加趋势,与对照组差距很小,但随时间的推移 Cu^{2+}

表 1 Cu^{2+} 对舟形藻的半数致死浓度

时间(h)	EC_{50} (mg/L)	EC_{50} 的95%置信区间(mg/L)
24	1.980	-33.19 ~ 37.15
48	2.593	-50.25 ~ 55.44
72	3.583	-16.96 ~ 24.12
96	4.510	-14.38 ~ 23.40

对舟形藻叶绿素 a 含量的抑制作用渐渐增大,5 d 时 4.510 mg/L 的质量浓度下对叶绿素的抑制率达到 50%,最终抑制率持续下降稳定在 30% 左右。表现出一定的质量浓度计量效应。7~13 d 叶绿素 a 含量保持稳定,而在 15 d 时,各组叶绿素 a 含量均略有增加,这可能与 Cu^{2+} 被从离子态代谢固化为相对稳定的化合物有关。

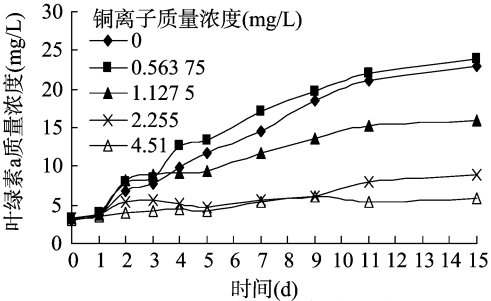


图2 Cu^{2+} 对舟形藻叶绿素a含量的影响

2.2.2 Cu^{2+} 对舟形藻运动状态的影响

2.2.2.1 Cu^{2+} 对运动硅藻数量占总硅藻数量比率的影响 添加不同质量浓度 Cu^{2+} 胁迫下的舟形藻,各组中运动硅藻数量占总硅藻数量比率见图 3。由图 3 可知:在同等条件下随时间增长运动硅藻数量占总硅藻数量的比率减小,暴露 1 d 后运动硅藻数量占总硅藻数量的比率未出现明显变化。在 2~5 d 期间,随 Cu^{2+} 质量浓度增高硅藻占总硅藻的比率出现显著下降。随后,虽有一定降低趋势,但是变化相对较小。由此可见 Cu^{2+} 对运动硅藻的数量有一定影响。

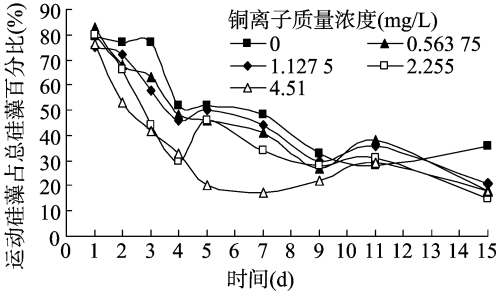
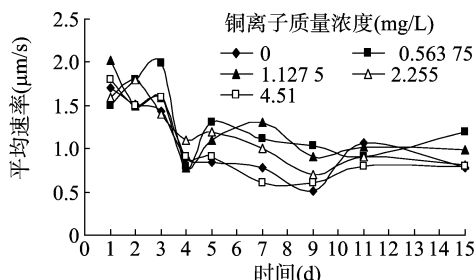


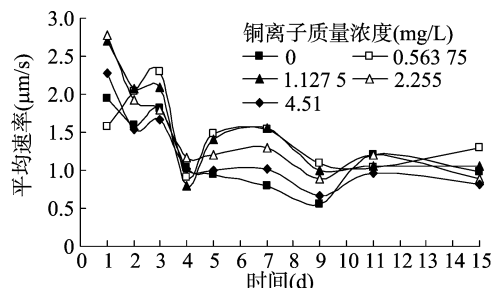
图3 不同质量浓度 Cu^{2+} 下对运动硅藻数量占总硅藻数量比率的影响

2.2.2.2 Cu^{2+} 对硅藻平均运动速率的影响 经过 15 d 的培养,以最快运动速率为指标的曲线见图 4。前 1~3 d 速率变化较稳定,两端相近,中间波动较大;之外其他的总体运动速率都随质量浓度的增高而降低,但是在 4 d、2.255 mg/L 以及 7 d、1.1275 mg/L 时出现 2 个异常值,平均运动速率分别达到 1.0、1.3 $\mu\text{m}/\text{s}$,明显偏高。但是与该组其他慢速运动硅藻相比,运动距离和时间均较短,快速运动 2~5 s 后就停止运动或转为慢速运动。

2.2.2.3 Cu^{2+} 对硅藻最快运动速率的影响 经过 15 d 的培养,以最快运动速率为指标的曲线见图 5。除 1 d 和 15 d 速

图4 不同质量浓度 Cu^{2+} 对硅藻平均运动速率的影响

率变化明显之外其他的总体运动速率都随质量浓度在 0.563 75 mg/L 和 1.127 5 mg/L 附近增高而增高, 在 2.255 mg/L 附近转而降低。但是在 4 d、1.127 5 mg/L 以及 11 d、0.563 75 mg/L 时出现 2 个异常值运动速率分别达到 0.8、1.03 $\mu\text{m/s}$, 速度明显降低。但是与该组与其他慢速运动硅藻相比, 运动距离和时间均较短, 快速运动 5 ~ 7 s 后就停止运动或转为慢速运动。

图5 不同质量浓度 Cu^{2+} 对硅藻最大运动速度的影响

3 结论

硅藻作为自然界中重要的初级生产者, 对生态系统的稳定起着重要作用。通过其在 Cu^{2+} 胁迫下运动变化的研究, 能在水环境评价监测、水污染治理等方面提供一定的理论依据。利用硅藻种类、数量及变化作为评价水生态环境质量指示物种的做法由来已久, 而利用硅藻运动速率变化对水质中不同污染离子浓度测定的研究相对很少。相关研究表明, 在众多除藻剂中铜的杀藻作用有效、稳定、价格低廉、且对人体健康的毒性作用低, 目前在国外已有大量使用^[12-14]。

本试验就 96 h EC_{50} 值 (4.51 mg/L) 来看, 参照《水和废水监测分析方法》的规定^[11] 为中毒, 与小球藻 (55.62 mg/L)^[15] 低毒差距较大。原因是不同的藻类由于生存方式、运动类型及生存环境不同。另外部分 Cu^{2+} 可能会被舟形藻富集代谢为相对离子态更为稳定的化合物, 对水生生物进而对水生生态系统产生直接或间接的影响。

叶绿素 a 含量对 Cu^{2+} 的反应呈现一定的梯度变化, 1 ~ 5 d 和对照组相比, 叶绿素 a 的累积较快, 表现出“促进”作用; 6 ~ 11 d 后含 Cu^{2+} 各组与对照组出现一定差异 ($P < 0.05$), 而在同一天含 Cu^{2+} 各组差异较小 ($P > 0.05$)。可见藻细胞中叶绿素 a 含量对 Cu^{2+} 反应敏感, 少量 Cu^{2+} 对叶绿素 a 含量的累积有明显促进作用, 但是之后随质量浓度增大叶绿素 a 含量变化则逐渐降低, 表现出一定的抑制作用; 11 ~ 15 d, 叶绿素 a 含量的累积出现一定的提高, 可能与 Cu^{2+} 被富集代谢而浓度降低有关^[16]。

Cu^{2+} 急性毒性胁迫能显著影响舟形藻的运动速率。低

浓度 0.563 75 ~ 1.127 5 mg/L 区间内 Cu^{2+} 胁迫能刺激舟形藻运动, 使其表现出毒物的“兴奋效应”, 随着胁迫浓度的增大和胁迫时间的延长, Cu^{2+} 对舟形藻的运动表现出明显的抑制效应, 在 1.127 5 mg/L 附近达到最高之后, 速率线性下降, 在 2.255 mg/L 趋近无胁迫速率。表明随着胁迫浓度的提高, 舟形藻细胞提高了对胁迫的适应能力, 抗性得到一定的增强。

硅藻在受 Cu^{2+} 污染水质处理的治理运用方面有一定的可行性, 同时对农业、工业及生活污水中的 Cu^{2+} 监测方面有广阔的应用前景^[1,17]。本研究发现运动硅藻数量占总硅藻数量的比率和平均运动速率在 2 ~ 3 d 时变化较大, 所以可以应用这 2 个指标在 2 ~ 3 d 时的值来对 Cu^{2+} 的毒性进行综合指示。

参考文献:

- [1] 李国忱, 刘录三, 汪 星, 等. 硅藻在河流健康评价中的应用研究进展[J]. 应用生态学报, 2012, 23(9): 2617-2624.
- [2] 张焕玲. 海洋浮游植物金属元素含量对营养盐水平的响应研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 1-93.
- [3] 张 瑜, 教奇枫. 浅谈重金属污染[J]. 建筑工程技术与设计, 2015, 32(5): 1256-1256.
- [4] 葛光环, 寇 坤, 陈爱侠. 湿地系统中植物和基质对重金属去除贡献的研究现状[J]. 当代化工, 2013, 42(7): 1006-1008.
- [5] 高亚辉, 梁君荣, 陈长平, 等. 海洋硅藻多样性与生态作用研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2011, 50(2): 455-464.
- [6] 师 玥. 青岛大扁藻光合作用过程对重金属 Cu^{2+} 急性毒性胁迫的响应研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 1-84.
- [7] 于小娣, 师 玥, 刘 泳, 等. 重金属胁迫对两种海洋饵料微藻的急性毒性效应研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2014, 44(2): 53-59.
- [8] 周玉春, 支崇远, 王 璐, 等. 舟形藻的运动特征[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 383-385, 386.
- [9] Harper M A, Harper J F. Measurements of diatom adhesion and their relationship with movement[J]. British Phycological Bulletin, 1967, 2(2): 195-207.
- [10] 苏 婧. 三种海洋微藻种群增长和种间竞争的动态变化对 Cd^{2+} 胁迫增强的响应: 基于流式细胞术的研究探讨[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 46-55.
- [11] 《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: 1-9.
- [12] 支崇远. 硅藻与环境[M]. 北京: 海洋出版社, 2005: 1-142.
- [13] 郭金耀, 杨晓玲. 盐藻运动特性及其影响因素[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(5): 91-93.
- [14] 郭 云. 乌江中上游底栖硅藻与水环境因子关系定量研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2008: 60-71.
- [15] McLachlan D H, Brownlee C, Taylor A R, et al. Light-induced motile responses of the estuarine benthic diatoms *Navicula perminta* and *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2009, 45(3): 592-599.
- [16] 胡娜娜. 选择富集培养可沉微藻用于污水处理深度净化实验研究[D]. 北京: 北京建筑大学, 2015: 42-48.
- [17] 蒋晓霞. 阿哈水库表层沉积物中重金属时空变化对硅藻分布影响的研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2009: 30-32.
- [18] 洪 佳, 王振钟, 王丽丽, 等. 金华江流域利用硅藻生物学特性监测水质研究[J]. 长江流域资源与环境, 2014, 23(9): 1283-1288.