

单细胞藻吸收 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 的扫描电镜 X 射线能谱分析*

苏秀榕¹ 刘照彬² 迟庆宏³ 李太武¹ Paul K. Chien⁴

(¹ 辽宁师范大学海洋生物工程研究所 大连 116029)

(² 辽宁师范大学实验中心 大连 116029)

(³ 大连长海县海水养殖研究所 116500)

(⁴ Department of Biology, University of San Francisco USA)

摘要 利用液体稀释法确定了 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 等无机离子对青岛大扁藻 (*Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis* Tseng et T. J. Chang) (细胞密度 3.4×10^6 个/ml)、三角褐指藻 (*Phaeodaetylum triornutum* Bohlin) (细胞密度 2.7×10^6 个/ml)、湛江叉鞭藻 (*Dicrateria zhanjiangensis* Hu) (细胞密度 5.6×10^6 个/ml)、路氏巴夫藻 [*Paviova luther* (Droop) Green] (细胞密度 2.7×10^6 个/ml) 培养至 5 d 的致死和半抑制浓度。培养条件: 培养温度为 25 ± 2 °C, pH = 7.9 ± 0.1 , 盐度 31 ± 1.0 , 自然光照。同时也利用扫描电镜 X 射线能谱分析仪检测了 4 种藻类细胞对 4 种离子的吸收情况。结果表明, Cu^{2+} 对细胞毒害作用大, 是因为藻类细胞对该离子的通透能力强和吸收量大所致。而 Cd^{2+} 对细胞的毒性慢, 它是通过细胞对 Cu^{2+} 吸收量增加来实现其致毒的。而 Zn^{2+} 、 Se^{4+} 毒性相对小, 是因细胞吸收该离子的量少所致。这同藻类培养结果相一致。

关键词 单细胞藻, 无机离子, 扫描电镜, X 射线能谱

青岛大扁藻 (*Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis* Tseng et T. J. Chang)、三角褐指藻 (*Phaeodaetylum triornutum* Bohlin)、湛江叉鞭藻 (*Dicrateria zhanjiangensis* Hu)、路氏巴夫藻 [*Paviova luther* (Droop) Green] 等单细胞藻类, 是养殖对虾、扇贝、鲍、牡蛎、河蟹等人工育苗中幼体的活饵料, 它们的质量决定养殖动物幼体的成活率、生长速度以及抗病能力。所以单细胞藻类的营养成分、生活状态、密度是培育出具优良性状动物幼体的关键环节, 不可忽视^[1]。实验证明: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 对单细胞藻类的超微结构造成了不同程度的破坏^①。但藻类细胞不论死活均能吸收这些离子; 而随着活细胞的抗性增大吸收量也会不断增加。特别是大量生活、工业污染物的流入, 使海水中 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 量不断增加, 单细胞藻类已成为这些有害物质进入养殖动物体内的重要载体之一^[2]。本文

介绍了利用扫描电镜 X 射线能谱仪检测 4 种单细胞藻类吸收 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 的数量和速度等情况, 为进一步了解重金属离子在单细胞藻类中的传递规律及解决海洋污染提供理论数据。

1 材料与方法

1.1 实验所用青岛大扁藻, 三角褐指藻、湛江叉鞭藻、路氏巴夫藻均取于辽宁省海洋水产研究所, 实验所用试剂均购于大连化学试剂商店。

* 本文是同美国旧金山大学生物学系合作研究的部分内容。

① 苏秀榕等, 文章待发表。

收稿日期: 1998-04-03; 修回日期: 1998-07-31

1.2 实验用 CuSO_4 , ZnSO_4 , Na_2SeO_4 , CdCl_2 均用无菌蒸馏水配制。藻的培养温度为 25 ± 2 °C, 自然光照, $\text{pH} = 7.9 \pm 0.1$, 盐度在 31 ± 1.0 等条件下, 一次性培养 5 d, 用血球计数板测离子的致死和半抑制浓度。将藻类培养在上述 4 种致死和半抑制离子浓度中, 当细胞增殖到所需浓度时, 3 500 r/min, 离心 5 min, 浓缩后的藻细胞用 2.5% 戊二醛固定, 喷金镀膜或冷冻干燥, 用 KYKY-1000B SERIES II 扫描电镜 X 射线能谱仪分析检测绘出谱图并拍照。对照组用过

滤海水培养, 不加任何元素, 制样方法与实验组相同。

2 结果

2.1 利用液体稀释法确定的 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 等无机离子对扁藻(细胞密度 3.4×10^6 个/ml)、三角褐指藻(细胞密度 2.7×10^6 个/ml)、湛江叉鞭藻(细胞密度 5.6×10^6 个/ml)、路氏巴夫藻(细胞密度 2.7×10^6 个/ml) 5 d 的致死和半抑制浓度见表 1。

表 1 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 对 4 种藻类的致死和半抑制浓度 ($\mu\text{g/ml}$)

Tab. 1 Lethal and hemi-inhibition concentration of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} to four kinds of unicellular algae

藻类	Cu^{2+}		Zn^{2+}		Se^{4+}		Cd^{2+}	
	致死	半抑制	致死	半抑制	致死	半抑制	致死	半抑制
扁藻	39.8	15.9~19.9	405	40.5~50.5	2 739	465.5~547.5	306.6	30.7~36.79
三角褐指藻	79.7	27.9~31.9	405	202.5~243	913	137~160	613.2	215~345
叉鞭藻	39.8	15.9~19.9	405	40.5~50.5	319.6	65.5~91.3	306.6	12.3~18.4
巴夫藻	39.8	8.0~12.0	405	12.2~16.2	465.5	205.4~228.3	613.2	24.5~30.7

2.2 能谱分析结果 将光标放在藻类细胞的某一个部位上作好标记进行定位后扫描, 得到了一系列能谱分析结果。在对照组的谱图上(图 1), 出现的各种元素峰都是海水中含有的常见而浓度高的离子, 而 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 的峰值为 0。4 种单细胞藻类对 4 种离子的吸收结果如下:

青岛大扁藻 扁藻对上述 4 种离子都可以吸收, 但吸收量差别明显。扁藻对 Zn^{2+} 的吸收峰较高, 但用 Cd^{2+} 培养的扁藻能谱图中, 没有 Cd^{2+} 吸收峰, 而 Cu^{2+} 吸收峰非常明显(图 2)。扁藻对 Cu^{2+} , Se^{4+} 吸收的量较少。

三角褐指藻 该藻吸收 4 种离子的能力与扁藻相似, 但其中 3 种离子的吸收量均略高, 尤其是 Zn^{2+} 的吸收谱图明显(图 3)。 Cd^{2+} 的谱图同扁藻, 仍然只见 Cu^{2+} 的吸收峰, 比扁藻略低。 Cu^{2+} 的吸收峰明显大于 Se^{4+} 。

湛江叉鞭藻 叉鞭藻吸收 4 种离子的能力最差, 在谱图上, 只有 Cd^{2+} 培养的谱图上出现一个很小的 Cu^{2+} 吸收峰。而 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} 3 种离子的吸收只出现小突起没成峰。

路氏巴夫藻 该单细胞藻对 4 种离子均可吸收, 但吸收 Cu^{2+} 的能力最强(图 4), Cd^{2+} 的吸收谱图与前 3 种藻相同, 但峰值较小。 Zn^{2+} 和 Se^{4+} 的吸收峰不明显。

3 讨论

3.1 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 对 4 种单细胞藻类

的致死和半抑制浓度, 是对一定的接种密度和一定的培养时间而言的, 并不是一个固定值。研究发现这 4 种离子对 4 种藻细胞毒性作用有很大的差异, 从细胞的生长状态来看, Zn^{2+} 和 Se^{4+} 的毒性作用相对较小, 而 Cu^{2+} 的毒性最大、发作最快, 致死浓度在第 2 天就完全显示出来, 而且一直不变。 Cd^{2+} 的毒性也很大, 但发作慢而且致死浓度与培养时间成反比, 即随着培养时间的延长致死浓度逐渐减小。4 种单细胞藻类以三角褐指藻的抗性最强, 很可能是它的细胞壁较厚且含有丰富的硅所致, 叉鞭藻和巴夫藻较敏感。此外, 有趣的是几种离子的浓度低于 10×10^{-6} 时可明显地促进藻类细胞的分裂并加速生长。随着培养天数的增加, 藻类细胞耐毒性也增加, 其原因可能是一些金属离子可诱导细胞产生金属硫蛋白而解毒(Cd^{2+} 最明显), 该方面的研究工作正在进行。在加 Se^{4+} 的藻类培养液实验组存在一种奇怪的现象, 即随着时间的延长, 高离子浓度管内的培养液逐渐变成桔红色, 藻类细胞仍活着, 但生长速度较慢, 其原因有待进一步的研究。

3.2 从扫描电镜 X 射线能谱分析结果可以看出, 藻类细胞对 Cu^{2+} 的吸收峰普遍较明显, 巴夫藻吸收 Cu^{2+} 的量最多, 其次是三角褐指藻, 扁藻居第三, 叉鞭藻最小。加之它被吸收的最快, 所以其毒性最大; 藻类细胞对 Cd^{2+} 的吸收是以 Cu^{2+} 的峰值表现出的, 很可能是 Cd^{2+} 能促进水环境中 Cu^{2+} 进入藻类细胞, Cu^{2+} 可破坏叶绿体(待发资料)。从谱图上可以看出扁藻类细胞对 Cd^{2+} 吸收量为最多, 其次是三角褐指藻,

叉鞭藻和巴夫藻吸收量相似。藻类细胞对 Zn^{2+} 的吸收以三角褐指藻为最多,扁藻次之,叉鞭藻和巴夫藻不明显。 Se^{4+} 毒性较弱,其原因可能与其穿透细胞壁和膜的能力弱有关,而与培养时间无关。

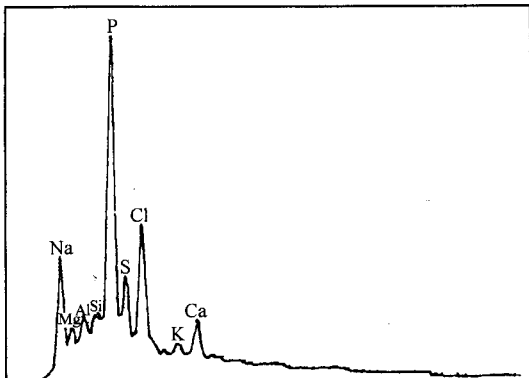


图 1 叉鞭藻对照组能谱分析结果

Fig. 1 The scanning electron microscope x-ray energy spectrum analysis of *Dicrateria zhanjiangensis* (control group)

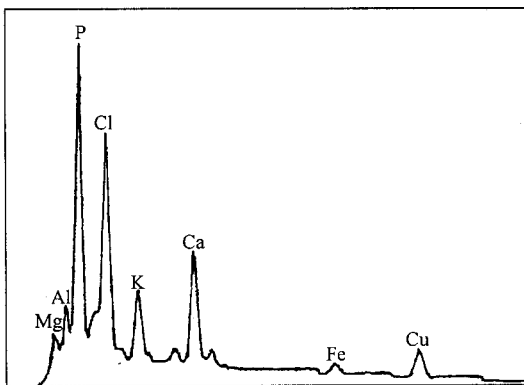


图 2 青岛扁藻吸收 Cd^{2+} 能谱分析结果

Fig. 2 The scanning electron microscope x-ray energy spectrum analysis of *Platymona helgolandica* absorbed Cd^{2+}

3.3 从 4 种藻吸收 4 种离子的谱图中分析可发现,叉鞭藻对 4 种离子的吸收量都是最少的。叉鞭属金藻类,细胞壁很薄,各种离子应容易穿透胞壁进入细胞内,所以理论上叉鞭藻应该吸收离子量很高。实验证明,死亡的藻类仍能吸收离子,而此时吸收的部位主要是细胞壁,由此推论藻类吸收无机离子的能力取决于细胞壁的厚薄。上述 4 种单细胞藻类中,叉鞭藻的壁最薄,当然其吸收量应最低。

综上所述,单细胞藻类能吸收各种无机离子,这种吸收是无选择的。因此,在海水人工养殖育苗中,不但要注重细菌等病原对幼体的危害,也要注意海水污染造成重金属离子的种类和数量增加,从而使单细胞活饵料体内积累有害物质的量也迅速增加并传递给养殖动物幼体,使后者中毒后大批死亡的现象。因此也必须把监测海水污染作为预防水产养殖病害的一个重要方面,加以充分重视。

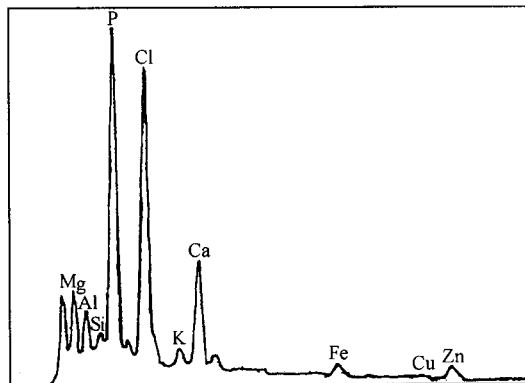


图 3 三角褐指藻吸收 Zn^{2+} 能谱分析结果

Fig. 3 The scanning electron microscope x-ray energy spectrum analysis of *Phaeodaetylum trionrutum* absorbed Zn^{2+}

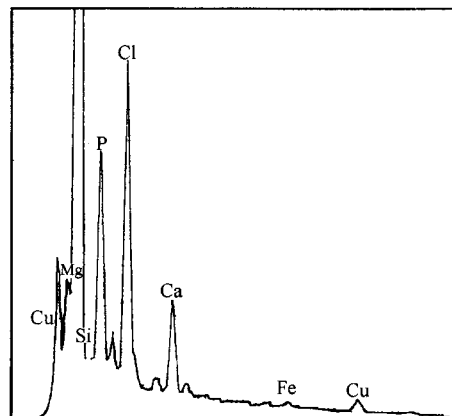


图 4 路氏巴夫藻吸收 Cu^{2+} 能谱分析结果

Fig. 4 The scanning electron microscope x-ray energy spectrum analysis of *Pavlova luther* absorbed Cu^{2+}

参考文献

- 1 Kawanura, T. et al. . *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* , 1995, 194 (2):189~199
- 2 Tadros, M. G. , Philips, J. et al. . *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* , 1994. 52:333~337

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY X-RAY ENERGY SPECTRUM ANALYSIS OF THE UNICELLULAR ALGAE ABSORBED THE Cu^{2+} Zn^{2+} Se^{4+} Cd^{2+} *

SU Xiu-rong¹ LIU Zhao-bin² CHI Qing-hong³ Li Tai-wu¹ Paul K. Chien⁴

(¹ Institute of Biotechnology, Liaoning Normal University, Dalian 116029)

(² Central Laboratory of Liaoning Normal University, Dalian 116029)

(³ Institute of Mariculture, Changhai County, Daitian)

(⁴ Department of Biology, University of San Francisco, USA)

Received: Apr. 3, 1998

Key Words: Unicellular algae, Inorganic ions, Scanning electron microscope, X-ray energy spectrum

Abstract

This paper determined the lethal concentration (LC) and hemi-inhibition concentration (HIC) of inorganic element Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} to the unicellular alga *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis* (cell density were 3.4×10^6 cell/ml), *Phaeodaetylum trioornutum* (cell density is 2.7×10^6 cell/ml) *Dicrateria zhanjiangensis* Hu (cell density were 5.6×10^6 cell/ml), *Paviova luther* (cell density is 2.7×10^6 cell/ml). The culture condition; temperature was 25 ± 2 °C, pH 7.9 ± 0.1 , salinity 31 ± 1.0 , natural sunlight for 5 days. The different species unicellular alga with different absorba- bility to these inorganic elements were analyzed by Scanning Electron Microscopy X-ray Energy Spectrum.

* This is the international cooperation program with Department of Biology, University of San Francisco, USA.