

金属离子对中肋骨条藻的胁迫效应及叶绿素 a 合成的影响

王洪斌^{1,2}, 成明³, 钱鹏¹, 李士虎¹, 阎斌伦²

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 连云港市荣盛生物科技有限公司, 江苏 连云港 222005)

摘要: 研究中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)生长对不同质量浓度的 5 种金属离子胁迫的响应, 探讨 5 种金属离子对中肋骨条藻叶绿素 a 合成的影响。结果显示: 生长方面, 中肋骨条藻对 Cd^{2+} 和 Ba^{2+} 的响应较明显, 培养至第 10 天, Cd^{2+} 质量浓度为 1、10 mg/L 组生长量仅有对照组的 59% 及 43.6%; Ba^{2+} 质量浓度为 2 mg/L 组到第 10 天是对照组的 69.4%, 而 0.5 mg/L 组超过对照组 38.9%; 中肋骨条藻对其他金属离子的胁迫响应不明显; 叶绿素合成方面, Cd^{2+} 质量浓度为 1 mg/L 时, 叶绿素 a 合成量达最高, 高于对照组 157%; 而 Ba^{2+} 质量浓度为 0.5、1 mg/L 时, 超出对照组的 116% 和 483%; 其他金属离子对中肋骨条藻叶绿素 a 合成均起抑制作用, 各个质量浓度组均低于对照组, 其中 Pb^{2+} 质量浓度为 0.3 mg/L、 Mn^{2+} 质量浓度为 1 mg/L 及 Li^+ 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 叶绿素 a 含量达最低值, 仅为对照组的 34.1%、37.5% 和 17.6%; 结论是质量浓度为 0.5 mg/L 的 Ba^{2+} 可促进中肋骨条藻的生长及叶绿素的合成, 对其产业化规模培养具有重要意义。

关键词: 中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*); 金属离子; 胁迫; 响应

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)07-0104-05

由于海洋微藻营养丰富, 富含微量元素和各类生物活性物质, 而且易于人工繁殖, 繁殖周期短, 生长速度快, 所以在医药、保健品、化妆品、水产养殖饵料、饲料添加剂、化工和环保等方面具有广阔的应用前景, 是非常重要的可更新资源^[1]。因此, 对海藻的研究和开发利用已经在中国、日本、韩国、智利、瑞典、美国和南非等国家和地区蓬勃开展起来^[2-10]。

本实验以中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)为供试材料, 研究其生长及叶绿素 a 合成对不同质量浓度的 5 种金属离子的响应, 旨在提示利用藻类富集金属离子及净化金属废水是可行的, 寻找对藻类生长有促进作用的低质量浓度金属离子, 对藻类的纯化和产业化培养具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验用微藻中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)由孙颖颖博士惠赠。海水培养液采用 f/2 加富的米勒氏工人海水, 微藻培养所用海水采自连云港高公岛海域(盐度约 31.00~32.00)涨潮时, 醋酸纤维薄膜过滤, 121℃、20 min 灭菌待用; 蒸馏水采用一般蒸馏水,

灭菌要求同海水, 实验所用的试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 中肋骨条藻培养方法

取 20 mL 藻种按照 1 : 9 比例接种至 500 mL 锥形瓶中, 加入 180 mL 灭过菌的蒸馏水, 摇匀, 共接种 5 瓶, 然后放入光照培养箱中培养。温度 22℃, 光强 3 000 lx, 光暗比 12 h : 12 h。每日定时摇动培养瓶 3 次, 防止藻细胞贴壁生长(如未做特别说明, 后续实验培养条件均与之相同)。摇瓶时随机调换锥形瓶的顺序, 以减少误差。

1.2.2 中肋骨条藻生长测定

取培养至第 4 天的藻液, 分别加入不同质量浓度的金属盐溶液, Pb^{2+} 质量浓度设置为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L 6 个梯度, Cd^{2+} 设置为 0、0.1、0.5、1、2、10 mg/L 6 个梯度, Mn^{2+} 、 Li^+ 、 Ba^{2+} 质量浓度分别设置为 0、0.1、0.5、1、2、5 mg/L 6 种梯度, 其他成分含量不变, 蒸馏水作为空白对照, 采用分光

收稿日期: 2011-12-12; 修回日期: 2012-02-13

基金项目: 国家星火计划项目(2010GA690170)

作者简介: 王洪斌, (1966-), 男, 副教授, 理学硕士, 主要从事微生物学及基因工程的教学与科研工作, E-mail: whbvirus@126.com

光度法测定其在 680 nm 处的生长量, 记录数据, 直到第 10 天为止。

比生长速率计算: $K = (\ln N_t - \ln N_0) / T$ 。其中 K 为相对增长速率, N_0 为藻液起始质量浓度, N_t 为培养 t 时间后的藻液质量浓度, T 为培养时间(h)。

1.2.3 中肋骨条藻叶绿素 a 含量测定

采用热乙醇萃取分光光度法^[11], 取 10 mL 培养至 20 d 的藻液, 5℃、6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 取沉淀 - 20℃ 下冷冻 12 h。取出后迅速用 9 mL 95% 乙醇(80℃)于 80℃ 热水浴萃取 2 min, 再用超声波清洗仪超声振荡处理 10 min, 于 4℃ 黑暗静置 6 h 后, 5℃、6 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用分光光度计于波长 665 nm 和 750 nm 测定 A 值, 加入 1 mol/L 盐酸酸化, 于波长 665 nm 和 750 nm 处再测定 A 值。

2 结果与分析

2.1 中肋骨条藻生长及生长速率对不同质量浓度的金属离子的响应

2.1.1 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Cd^{2+} 的响应

由图 1 可知, 实验组的生长情况都要差于对照组, 以 10 mg/L 组最为明显, 在第 7 天出现高峰, 然后下降, 到第 10 天, 10 mg/L 组的生长量只有对照组的 43.6%。对照组的生长量一直处于上升状态, 0.1、0.5、1 mg/L 和 2 mg/L 实验组生长量在第 10 天分别是对照组的 74%、67%、59% 和 72%。

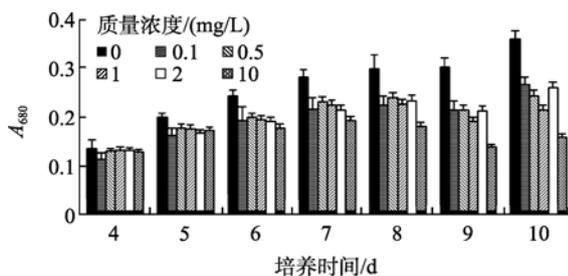


图 1 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Cd^{2+} 的响应
Fig. 1 Response of the growth of *Skeletonema costatum* to different concentrations of Cd^{2+}

2.1.2 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Pb^{2+} 的响应

由图 2 得知, Pb^{2+} 质量浓度 0.4 mg/L 时, 对中肋骨条藻生长的影响最为明显, 整个培养过程, 0.4 mg/L 实验组生长量始终低于对照组; 其他质量浓度实验组对中肋骨条藻生长的影响不明显, 仅显示微

弱的抑制作用。所有实验组的比生长速率均小于对照组。

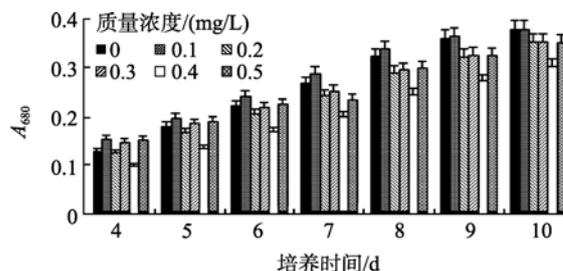


图 2 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Pb^{2+} 的响应
Fig. 2 Response of the growth of *Skeletonema costatum* to different concentrations of Pb^{2+}

2.1.3 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Mn^{2+} 的响应

从图 3 可以看出, 随着培养时间的增加, 各质量浓度实验组与对照组之间的差距越来越小, 到第 10 天, 各组的生长量基本一致。仅 0.1 mg/L 和 5 mg/L 实验组的生长量始终低于对照组, 尤其是 5 mg/L 组, 到第 5、6 天, 生长量只有对照组的 67.4%, 至第 10 天仅显示微弱抑制作用。

0.1 mg/L 组的比生长速率最低, 为对照组的 94.4%。

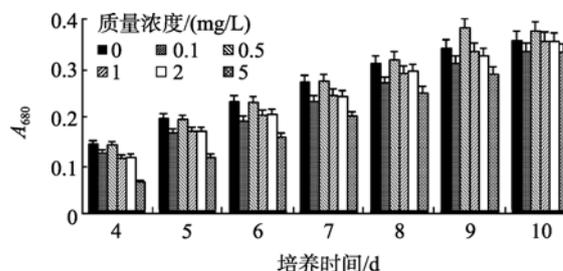


图 3 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Mn^{2+} 的响应
Fig. 3 Response of the growth of *Skeletonema costatum* to different concentrations of Mn^{2+}

2.1.4 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Li^+ 的响应

由图 4 可知, 2 mg/L 和 5 mg/L 实验组对中肋骨条藻生长影响明显, 显示出较好的抑制效果, 到第 10 天, 两组生长量分别是对照组的 74%、71%, 而且在整个培养过程中, 始终低于对照组。所有实验组的比生长速率都要低于对照组, 2 mg/L 组比生长速率最低, 仅为对照组的 76.9%, 其余 4 组的比生长速率与对照组相差不多。

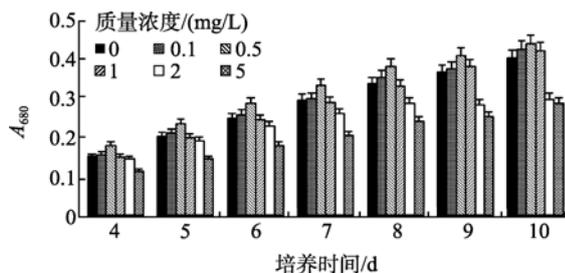


图 4 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Li^+ 的响应

Fig. 4 Response of the growth of *Skeletonema costatum* to different concentrations of Li^+

2.1.5 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Ba^{2+} 的响应

由图 5 可知, 0.1、0.5 mg/L 和 1 mg/L 实验组生长量始终高于对照组, 以 0.1、0.5 mg/L 组最为明显, 到第 10 天, 生长量超出对照组的 36%、39%。2 mg/L 实验组生长量一直低于对照组, 第 10 天仅是对照组的 69%。0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 两组生长量之间差距很小, 生长量随着培养时间的增加而上升。比生长速率在 0.1 mg/L 时达到顶峰, 高于对照组 25.5%, 然后随着质量浓度增加而逐渐下降, 在 2 mg/L 时达到最低值, 为对照组的 66%。

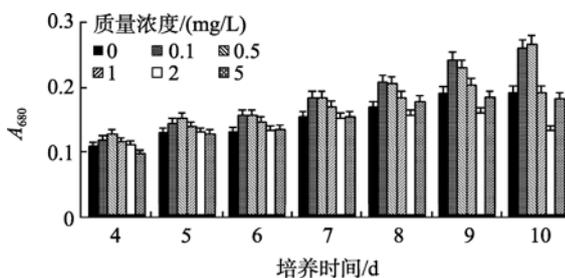


图 5 中肋骨条藻生长量对不同质量浓度 Ba^{2+} 的响应

Fig. 5 Response of the growth of *Skeletonema costatum* to different concentrations of Ba^{2+}

2.2 中肋骨条藻叶绿素 a 含量对不同质量浓度的金属离子的响应

由图 6 得知, 叶绿素 a 含量在 Cd^{2+} 质量浓度 0.1 mg/L 和 10 mg/L 时达到最低值, 仅为对照组的 57.1%, 在 1 mg/L 时达到最大值, 高于对照组 157%。由图 7 看出, Pb^{2+} 对叶绿素 a 含量影响较为明显, 波动幅度较大, 0.1、0.2、0.3 mg/L 和 0.4 mg/L 实验组叶绿素 a 含量均小于对照组, 在 0.3 mg/L 时达到最小值, 仅为对照组的 34.1%。

从图 8 可知, 所有实验组的叶绿素 a 含量均小于对照组, 1 mg/L 组叶绿素 a 含量最低, 仅为对照组的 37.5%。5 mg/L 组叶绿素 a 含量为对照组的 45.8%。

说明 Mn^{2+} 对中肋骨条藻叶绿素 a 合成起抑制作用。由图 9 得知: 0.5 mg/L 组叶绿素 a 含量最大, 高于对照组 2.9%。其余 4 组叶绿素 a 含量均小于对照组, 其中 0.1 mg/L 组叶绿素 a 含量最小, 仅是对照组的 17.6%。

0.1 mg/L 组叶绿素 a 含量小于对照组, 为对照组的 83.3%, 其余 4 组叶绿素 a 含量均大于对照组, 其中 0.5 mg/L 组的生长量高于对照组 117%, 1 mg/L 组叶绿素 a 含量最大, 为对照组 5.8 倍之多。 Ba^{2+} 对中肋骨条藻叶绿素 a 合成起很好的促进作用, 结果见图 10。

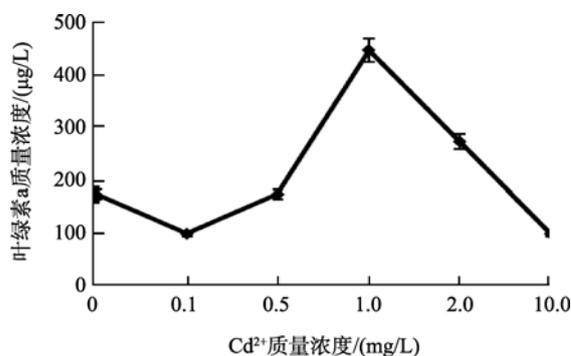


图 6 中肋骨条藻叶绿素 a 含量对不同质量浓度 Cd^{2+} 的响应

Fig. 6 Response of the Chlorophyll a content in *Skeletonema costatum* to different Concentrations of Cd^{2+}

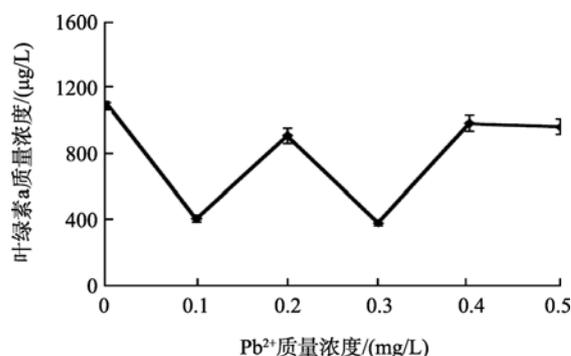


图 7 中肋骨条藻叶绿素 a 含量对不同质量浓度 Pb^{2+} 的响应

Fig. 7 Response of the Chlorophyll a content in *Skeletonema costatum* to different concentrations of Pb^{2+}

3 讨论

在生长方面, 5 种金属离子对中肋骨条藻的生长均有一定程度的胁迫作用, 5 种金属离子对中肋骨条

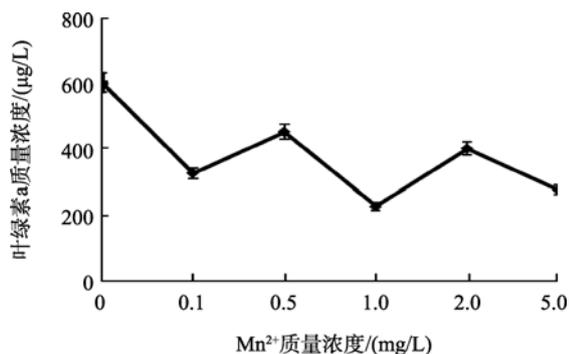


图 8 中肋骨条藻叶绿素 a 含量对不同质量浓度 Mn²⁺ 的响应

Fig. 8 Response of the Chlorophyll a content in *Skeletonema costatum* to different Concentrations of Mn²⁺

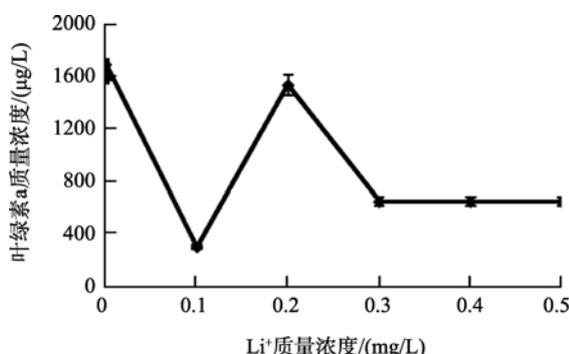


图 9 中肋骨条藻叶绿素 a 含量对不同质量浓度的 Li⁺ 响应

Fig. 9 Response of the Chlorophyll a content in *Skeletonema costatum* to different concentrations of Li²⁺

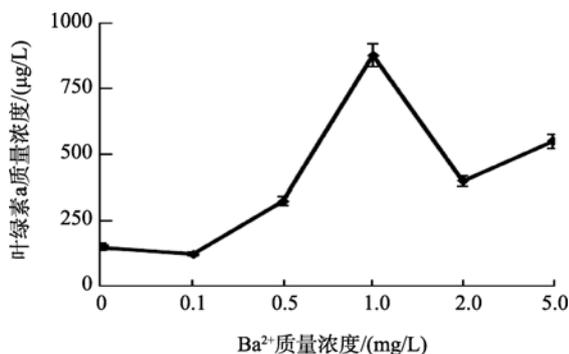


图 10 中肋骨条藻叶绿素 a 含量对不同质量浓度 Ba²⁺ 的响应

Fig. 10 Response of the Chlorophyll a content in *Skeletonema costatum* to different concentrations of Ba²⁺

藻的生长抑制作用强度顺序: Cd²⁺>Pb²⁺>Mn²⁺>Li⁺>Ba²⁺。到第 10 天, Cd²⁺质量浓度 1、10 mg/L 组生长量仅有对照组的 59%及 43.6%, 这与何学佳等^[12]和周银环等^[13]的研究结果不一致, 原因有待于进一

步研究。0.5 mg/L 的 Cd²⁺对中肋骨条藻的抑制比较明显, 这与张亚楠^[14]等的研究一致, 这说明高质量浓度的 Cd²⁺对藻类生长有明显的抑制作用。培养至第 7 天, Pb²⁺质量浓度 0.1 mg/L 组的生长量与对照组的生长量基本一致, 0.4 mg/L 组的生长量为对照组的 87.4%, 这与张莹莹等^[15]研究的结果相一致。Mn²⁺质量浓度 0.1~5 mg/L 时的生长量基本上均小于对照组, 这与黄振芳^[16]等研究的结果不一致, 可能是藻种遗传属性差异所致。到第 10 天, Ba²⁺ 2 mg/L 组的生长量只有对照组的 69.4%, 这说明高质量浓度的 Ba²⁺对中肋骨条藻有一定的抑制作用。

在叶绿素 a 合成方面, 高质量浓度的 Cd²⁺抑制叶绿素 a 的合成, 这与石磊等^[17]的研究相一致。Mn²⁺质量浓度为 1 mg/L 时叶绿素 a 含量最低, 仅为对照组的 37.5%, 5 mg/L 组叶绿素 a 含量为对照组的 45.8%。由于 Mn 是叶绿体的结构成分, 缺 Mn 会导致叶绿体结构被破坏, 甚至解体。但质量浓度过高时, 由于藻类细胞壁带有负电荷和氨基—羟基等官能团, 这些结构特点决定了对带有正电荷的金属离子具有吸引富集的作用, Mn 同细胞表面的 O, S 和 N 结合, 生成稳定的络合物, 从而使细胞表面许多活性基团丧失生物活性, 进而抑制了藻细胞的光合作用和生长。Li⁺为 0.1 mg/L 时叶绿素 a 含量最小, 仅仅是对照组的 17.6%, 而 Ba²⁺为 1 mg/L 时叶绿素 a 含量最大, 为对照组 5.8 倍之多。5 种金属离子对中肋骨条藻的叶绿素 a 抑制作用强度顺序是 Mn²⁺>Li⁺>Pb²⁺>Cd²⁺>Ba²⁺。

本实验采用了热乙醇萃取分光光度法。丙酮法的测定过程比较繁杂, 其中样品研磨需花费大量时间和精力, 且不容易将浮游植物细胞完全磨碎, 影响到叶绿素 a 的萃取效率。而乙醇法由于样品经过冷冻和快速热水浴提取, 运用冷热差以及超声波的粉碎作用将浮游植物细胞破碎, 且热溶液的萃取效果高于冷溶液, 对叶绿素 a 的萃取较完全, 且省时省力。不过, 过高的温度会破坏叶绿素 a, 在操作时必须严格控制水浴温度(80℃)和热萃取时间(2 min), 防止过高温度破坏叶绿素 a 而影响测定结果。另外乙醇对人体的毒害远小于丙酮, 长期使用丙酮萃取分光光度法对操作者的毒害较大, 所以使用热乙醇萃取分光光度法比较合适。

参考文献:

[1] 倪学文. 海洋微藻应用研究现状与展望[J]. 海洋渔业, 2005, 27: 251-255.
 [2] 曾呈奎. 中国海藻的研究[A]//中国藻类学研究. 武汉:

- 武汉出版社, 2001: 12-14.
- [3] Terawaki T, Yoshikawa K, Yoshida G. Ecology and restoration techniques for Sargassum beds in the Seto Inland Sea[J]. Japan J Mar Pollut Bull, 2003, 47: 198-201.
- [4] Chung I K, Kangy H, Yarish C, et al. Application of seaweed cultivation to the bio remediation of nutrient-rich effluent [J]. Algae, 2002, 17(3): 187-194.
- [5] Avila M, Seguel M. An overview of seaweed resources in Chile [J]. J Appl Phycol, 1993, 5: 133-139.
- [6] Troel M, Hallin G C, Nilsson A, et al. Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis*(Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output [J]. A quaculture, 1997, 156: 45-61.
- [7] Buschmann A H, Correa J A, Westermeier R, et al. Red algal farming in Chile: A review [J]. A quaculture, 2001, 194: 203.
- [8] Haglund K, Pedersen M. Out door pondcultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte-control [J]. J Appl Phyco, 1993, 5: 271-284.
- [9] Mcvey J P, Stickney R R, Yarish C, et al. Aquatic polyculture and balanced ecosystem management: New paradigms for seaweed production[A]//Responsible marine aquaculture [C]. NewYork: CABI Publishing, 2002: 91-104.
- [10] Wakibia J G, Anderson R J, Keats D W. Growth rates and agar properties of three gracilarioids in suspended open-water cultivation in St. Helena Bay, South Africa [J]. J Appl Phyco, 2001, 13: 195-207.
- [11] 陈宇炜, 高锡云. 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较测定[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2): 185-188.
- [12] 何学佳, 彭兴跃. 应用流式细胞仪研究 Pb 对海洋微藻生长的影响[J]. 海洋环境科学, 2003, 22 (1) : 1-5.
- [13] 周银环, 刘东超. 4 种微量元素对绿色巴夫藻生长、叶绿素 a 及大小的影响 [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23 (1) : 22-28.
- [14] 张亚楠, 段舜山. 绿色巴夫藻的重金属胁迫效应及吸附能力的研究[J]. 环境科学, 2003, 4: 18.
- [15] 张莹莹, 王修林. Pb(II)对海洋浮游植物生长的影响[J]. 海洋科学, 2005, 6: 32-35.
- [16] 黄振芳, 刘昌明. 铁锰微量元素对淡水藻类的生长影响研究[J]. 北京师范大学学报, 2009, 45: 610.
- [17] 石磊, 姜彬慧. 重金属对小球藻的毒性作用及小球藻对 Hg²⁺的吸附研究[J]. 河南科学, 2008, 12: 30.

The stress effects of metal ions on *Skeletonema costatum* and the influences on chlorophyll a synthesis

WANG Hong-bin^{1,2}, CHENG Ming³, QIAN Peng¹, LI Shi-hu¹, YAN Bin-lun²

(1. College of Marine Sciences, HuaiHai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China; 3. Lianyungang Rongsheng biotechnology Co. Ltd, Lianyungang 222005, China)

Received: Dec., 12, 2011

Key words: *Skeletonema costatum*; meta lions; stress; response

Abstract: The responses of *Skeletonema costatum* to different concentrations of 5 metal ions stress and their influences on chlorophyll a synthesis in *S. costatum* were investigated. The results showed that *S. costatum* had significant responses to Cd²⁺ and Ba²⁺. After 10-day culture, the growth of the 1 mg/L and 10 mg/L Cd²⁺ groups was only 59% and 43.6% of the control group respectively. The *S. costatum* quantity in 2 mg/L Ba²⁺ group was 69.4% of the control group. In contrast, the quantity of the 0.5 mg/L Ba²⁺ group was 38.9% more than the control group. The stress effects of other metal ions were not significant. In terms of chlorophyll a synthesis, when the Cd²⁺ concentration was 1 mg/L, the chlorophyll a quantity was the highest, which was 157% higher than the control group. With, the chlorophyll a quantities in 0.5 mg/L and 1 mg/L Ba²⁺ groups were 116% and 483% higher than the control group. The other metal ions all inhibited chlorophyll a synthesis and the chlorophyll a quantities in all the other groups were lower than the control group. The chlorophyll a quantities of 0.3 mg/L Pb²⁺, 1 mg/L Mn²⁺ and 0.1 mg/L Li⁺ groups were very low and were only 34.1%、37.5% and 17.6% of control group. In summary, 0.5 mg/L Ba²⁺ can promote the growth of *S. costatum* and its chlorophyll a synthesis and this is very important to the large scale culture of *S. costatum*.

(本文编辑: 梁德海)