锗对两种微藻的毒性及其在细胞中的累积

朱友芳[1]　　王大志[2]

([1]莆田市水产科学研究所 351100)
([2]厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室 361005)

提要　钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* (Cyanophyceae) 和盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) 暴露在不同浓度锗的培养液中。研究了锗对它们的毒性及锗在藻细胞中的累积。结果表明,锗对 *S.platensis* 的毒性较 *D.salina* 大。在培养浓度范围内,*S.platensis* 中的总锗含量与培养介质中的锗含量关系不大。锗在 *S.platensis* 中的分布较均匀且呈剂量效应,在 *D.salina* 中,总锗含量随着培养液中锗含量的增加而增加。锗在细胞中的分布以氨基酸-碳水化合物和蛋白质中为主,脂类中含量则较低。上述差异反映了藻类在生理特性上的不同。研究表明,当藻类暴露在含锗介质中时,可吸收累积一定量的锗并结合到细胞内的大分子物质中,从而达到降低锗毒性的作用。

关键词　锗,微藻,毒性,累积

在海洋中锗是一种微量元素。研究表明,培养介质中锗的存在会影响藻类的生长,低浓度对藻类的生长具有促进作用,高浓度则会抑制藻类的生长,严重时还会对藻类产生毒害作用[1-4]。尽管在这方面已做了大量的工作,但主要集中在硅藻及一些大型藻类的生长方面,有关锗对微藻类生长的影响及其在细胞中的累积却研究甚少。本文研究了锗对两种微藻 *Spirulina platensis*(Cyanophyceae) 和 *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) 生长的影响及其在藻细胞中的累积,对锗在细胞内的分布也进行了研究。

1　材料和方法

1.1　藻种和培养

所用藻种,钝顶螺旋藻(*S.platensis*)和盐生杜氏藻(*D.salina*)均为本室保存种。培养条件为:*S.plaensis* 采用 Zarrouk 液体培养基,*D.salina* 采用 f/2 加富培养基,在其中加入 GeO_2 来提供锗。锗对藻类的毒性试验中,锗的最终浓度在 *S.platensis* 中为 0,0.1,1,5,25,100 mg/dm^3,在 *D.slina* 中为 0,1,10,25,50,100 mg/dm^3。培养光源为日光灯,光强为 150 μmol/(m^2·s),光暗周期 12 h/12 h,培养温度为 28±1 ℃。藻类的生长通过测试其在 680 nm 处的光密度(OD值)来监测,每天或每两天定时测试各瓶藻液的 OD值 3 次,每组取其平均值。

在藻类对锗的吸收累积实验中,锗的最终浓度在 *S.platensis* 中为 0,5,10 和 15 mg/dm^3,在 *D.salina* 中为 0,1,10,15 和 20 mg/dm^3,培养条件同上。至对数生长期后期,用过滤和离心法收集藻细胞,收集后的藻细胞用去离子水配制的 0.5 mol/L 甲酸氨溶液冲洗 3~4 次,用滤纸吸干藻体表面残余水分,将藻体移于 10 cm^3 小烧瓶中,置于 45 ℃恒温箱中烘至恒重。

1.2　生化组分的提取

脂类的提取采取改进的 Bligh 和 Dyer 1959 年的方法,蛋白质及氨基酸-碳水化合物的提取采用 Giry Hocht 等 1978 年的方法。称取一定量的烘干藻粉,用冷的氯仿-甲醇混合液(V/V,1/1)提取两次,经离心、分液萃取后,脂类用氮气吹干。沉淀用冷的 6%三氯醋酸(TCA)提取两次,将两次离心的上清液合在一起,即为氨基酸-可溶性碳水化合物,沉淀即为蛋白质。

1.3　样品的消化和测定

消化体系采用浓 HNO_3-H_2SO_4,CCl_4 萃取,水反萃取,处理液采用陈雁君等 1992 年报道的桑色素荧光分光光度法测定,用 GeO_2 标准溶液做工作曲线。

2　结果

2.1　锗对 *S.platensis* 和 *D.salina* 生长的影响

图 1 A 为锗对 *S.platensis* 生长的影响。从图中可

收稿日期:2001-05-22;修回日期:2001-08-09

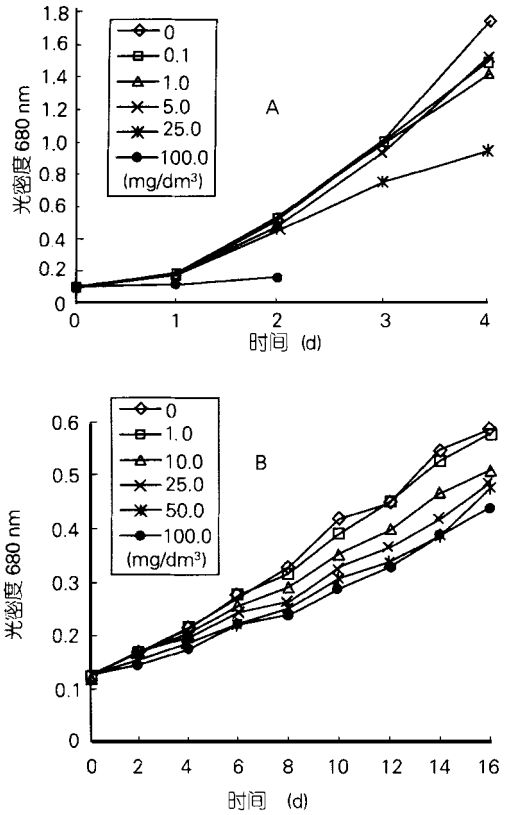

图 1 钝项螺旋藻(A)和盐生杜氏藻(B)在不同锗浓度下的生长曲线

Fig.1 Gorwth curves of *S.platensis* and *D.salina* exposed to different Ge concentration

看到,当锗浓度低于 5.0 mg/dm³ 时,各浓度组的 OD 值与对照组基本接近,说明该浓度下锗对 *S.platensis* 的生长没有抑制作用;当锗浓度达到 25 mg/dm³ 时,*S.platensis* 在生长的前期未受到影响,至中后期生长明显被抑制;锗浓度增至 100 mg/dm³ 时,*S.platensis* 生长至第 2 天即完全被抑制。

锗对 *D.salina* 生长的影响与 *S.platensis* 不同(图 1 B)。1.0 mg/dm³ 组的 OD 值与对照组接近,说明该浓度对 *D.salina* 没有抑制作用;锗浓度增至 10 mg/dm³ 时,OD 值略低于对照组,*D.salina* 的生长受到了轻微抑制;当锗浓度进一步增大时,*D.salina* 的生长受到不同程度的抑制但并不明显。

2.2 锗在 *S.platensis* 和 *D.salina* 细胞中的累积和分布

表 1 为锗在细胞中的含量和分布。从表 1 可看到,经锗处理后,*S.platensis* 细胞中锗含量都较对照组有明显的增加。3 组实验组的总锗含量较接近,与培养液中的锗浓度关系不大。锗在生化组中的含量较均匀,且随培养液中锗浓度的增加而增加。蛋白质结合锗从 0 mg/dm³ 的 0.29 μg/g 干重增至 10 mg/dm³ 的 9.30 μg/g 干重,脂抽提物结合锗从 0.27 μg/g 干重增至 9.31 μg/g 干重,氨基酸-可溶性碳水化合物结合锗也从 0.28 μg/g 干重增至 9.05 μg/g 干重。

表 1 锗在钝顶螺旋藻主要生化组分中的含量(μg/g,干重)

Tab.1 Ge concentration in biochemical components of *S.platensis* (μg/g,dw)

锗浓度 (mg/dm³)	细胞中总锗	蛋白质中锗	脂类中锗	氨基酸和碳水化合物中锗
0	1.40	0.29	0.27	0.28
5	38.25	4.50	4.20	5.47
10	35.79	8.03	6.88	8.30
15	38.40	9.30	9.31	9.05

D.salina 中锗的含量和分布(表 2)不同于 *S.platensis*。细胞中总锗的含量随着培养液中锗浓度的增加而增加;从 1 mg/dm³ 的 26.95 μg/g 干重,增至 20 mg/dm³ 的 283.48 μg/g 干重;进入 *D.salina* 细胞中的锗则主要分布在蛋白质和氨基酸-可溶性碳水化合物中,脂抽提物中的含量则较低;蛋白质中的锗从 1 mg/dm³ 的 8.69 μg/g 干重增至 10 mg/dm³ 的 35.49 μg/g 干重后,随着锗浓度的进一步增大,蛋白质中的含量则有所降低,而氨基酸和可溶性碳水化合物中的含量则明显增加。

表 2 锗在盐生杜氏藻细胞主要生化组成中的含量(μg/g,干重)

Tab.2 Ge concentration in biochemical cimonents of *D.salina* (μg/g,dw)

锗浓度 (mg/dm³)	细胞中总锗	蛋白质中锗	脂类中锗	氨基酸和碳水化合物中锗
1	26.95	8.69	3.07	11.10
10	69.95	35.49	7.90	14.74
15	220.40	18.25	3.48	60.16
20	283.48	28.27	12.94	175.60

3 讨论

Lewin 1966 年和 Werner 1967 年的研究结果表明,锗化合物对 *Chlorophyta*、*Rhodophyta*、*Cyanophyta* 或 *Phaeophyta*(*Ectocapus*)的生长没有影响,但 GeO_2 对硅藻则具有特异性的抑制作用。Markham T.W. 等

1982 年,马家海等 1989 年,Yang W.X.1993 年在这方面也进行了详细的研究,结果说明,锗对藻类生长的影响与藻类种别和锗的浓度有关,低浓度锗一般不具有抑制作用,高浓度则对藻类具有毒害作用。本研究结果也证实了这一现象。当锗浓度低于 5.0 mg/dm^3 时,*S.platensis* 的生长没有受到抑制,当锗浓度进一步增大时(> 25 mg/dm^3),*S.platensis* 的生长明显被抑制。*D.salina* 在锗浓度为 1.0 mg/dm^3 时生长没有受到抑制,当锗浓度大于 10 mg/dm^3 时 *D.salina* 的生长受到不同程度抑制。本研究也表明 *D.salina* 对锗的耐受能力较 *S.platensis* 强,即使锗浓度达到 100 mg/dm^3,其所受的抑制作用也不明显,这反映了藻类生理特性上的差异。

锗抑制藻类生长的机制尚不清楚。Werner 1967 年曾指出锗不仅影响硅的代谢系统,而且对叶绿素合成和叶绿体内酶的合成也有影响。马家海等 1989 年观察到,经锗处理的蛋白核小球藻的液泡异常增大,色素变淡或者只留下空壁。高亚辉等 1997 年也观察到,在高浓度锗的条件下,藻细胞的颜色变黄,因而可以认为,锗对藻类生长的抑制作用主要是通过抑制叶绿素及与叶绿素有关的酶合成,从而破坏了藻类的光合作用,抑制了生长。

Yanagimoto 等 1983 年研究碱性变化对 *Chlorella ellipsodeae*、*Oscillatoria* sp. 和 *Spirulina platensis* 吸收锗的影响时发现,培养介质中的藻类可吸收累积一定量的锗,量的多少与藻种有关,与培养介质中 pH 值的变化也有很大的联系,随着 pH 值的增加而增加。本研究结果表明,当 *S.platensis* 和 *D.salina* 培养在含锗的溶液中时,可从培养介质中吸收累积一定量的锗,量的多少与藻类种别、培养介质中的锗浓度有关。在培养浓度范围内,*S.platensis* 中的锗含量受介质中的浓度的影响不大,锗在各生化组分中的分布较均匀,而 *D. Salina* 细胞中的锗含量却随着培养介质中锗浓度的增加而增加,细胞中的锗主要分布在蛋白质和氨基酸-可溶性碳水化合物中,锗浓度过高时,氨基酸-可溶性碳水化合物中的锗含量明显增加,这可能是由于高深度锗损害了细胞膜的通透性,进入细胞中的锗的量大幅度增加,导致大分子物质对锗的不加选择吸收的结果,是藻类降低高浓度锗毒性的一种代谢途径。

总之,锗对 *S.platensis* 的毒性较 *D.salina* 大,但低浓度锗对藻类的生长没有抑制作用。当 *S.platensis* 和 *D. Salina* 暴露于锗溶液中时,两者都能从培养介质中吸收累积一定量的锗并结合到细胞内的一些大分子物质中,从而达到降低锗毒性的目的。但锗在大分子物质中的分布存在一定的差异,这种差异反映了藻类在生理特性上的不同。因而在研究锗对藻类的毒性时,必须考虑到藻类的种间差异。

参考文献

1 王大志、王海黎、李少菁等。生态学报,2000,**20**(3):482~484
2 王大志、高亚辉、李少菁等。中国环境科学,1998,**18**(6):501~505
3 王大志、高亚辉、程兆第等。海洋与湖沼,1999,**30**(6):646~651
4 高亚辉、王大志、程兆第。台湾海峡,1997,16:63~66

TOXICITY AND BIOACCUMULATION OF GERMANIUM IN TWO MICROALGAE *Spirulina platensis* AND *Dunaliella salina*

ZHU Yourfang[1] WANG Dazhi[2]
([1] *Putian Fisheries Scientific Research Institute*, 351100)
([2] *Key Lab. for Marine Environmental Science of Ministry of Education, Xiamen University* 361005)

Received: May,22,2001
Key Words: Microalgae, Germanium, Toxicity, Accumulation

Abstract

The toxicity and bioaccumulation of germanium were investigated in two microalgae: *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina* in culture. Germanium was more toxic to *S.platensis* than to *D.salina*. Lower concentrations of germanium within the culture germanium concentration, the amount of germanium absorbed by *S.platensis* did not increase with the added germanium concentration, and germanium well distributed in cells and showed dose effect. In *D.salina*, total germanium concentration increased with the added germanium concentraion, most of germanium was associated with proteins and amino acids-dissolved carbohydarte, which may represent a form of storage of detoxication of germanium. These results suggest that rsponse of algae to germanium toxicity is different, which reflects a physiological difference among algae.

(本文编辑:张培新)