

铜绿微囊藻叶绿素荧光对 HgCl_2 毒性 响应特性的研究

徐小惠^{1,2}, 段莉丽^{1,2}, 崔建升^{1,2}

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北省污染防治生物技术实验室, 河北石家庄 050018)

摘要:利用叶绿素荧光技术,以铜绿微囊藻在 435 nm/680 nm 处的荧光强度为测试指标,进行了铜绿微囊藻叶绿素荧光对 Hg^{2+} 毒性的最佳响应时间,以及不同 Hg^{2+} 浓度在短时间内对铜绿微囊藻叶绿素荧光强度的影响研究。研究表明,铜绿微囊藻对 HgCl_2 的最佳响应时间为 25 min。当 Hg^{2+} 质量浓度为 0.000 5 mg/L 时,铜绿微囊藻的相对荧光强度(样品荧光强度-空白荧光强度)为负值,即其叶绿素荧光强度小于对照组的叶绿素荧光强度;当 Hg^{2+} 质量浓度为 0.001~0.500 mg/L 时,铜绿微囊藻的相对荧光强度为正值,并且在 0.001~0.400 mg/L 浓度范围内,相对荧光强度随汞浓度的增大而增大,其呈正相关关系, $r=0.983\ 3$ 。

关键词:叶绿素荧光;铜绿微囊藻; Hg^{2+} ;生物毒性

中图分类号:X832 文献标志码:A

Study on the characteristics of *Microcystis aeruginosa* chlorophyll fluorescence responding on the toxicity of HgCl_2

XU Xiaohui^{1,2}, DUAN Lili^{1,2}, CUI Jiansheng^{1,2}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China; 2. Pollution Prevention Biotechnology Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: The toxicity of heavy metal Hg^{2+} on alga *Microcystis aeruginosa* was studied by the change in fluorescence intensity of *Microcystis aeruginosa* at 435 nm/680 nm which treated with different Hg^{2+} concentrations for 25 min. When the Hg^{2+} concentration is 0.000 5 mg/L, the relative fluorescence intensity of *Microcystis aeruginosa* (the sample fluorescence intensity minus the blank fluorescence intensity is equal to the relative fluorescence intensity) is negative; while when the Hg^{2+} concentration is 0.001~0.500 mg/L, the relative fluorescence intensity of *Microcystis aeruginosa* is positive. And the relative fluorescence intensity increases with the concentration of Hg^{2+} (0.001~0.400 mg/L), even the concentration of Hg^{2+} and algal photosynthetic signal have a significant positive correlation ($r=0.983\ 3$).

Key words: chlorophyll fluorescence; *Microcystis aeruginosa*; Hg^{2+} ; biological toxicity

叶绿素荧光现象是由 Kautsky 在 1931 年首先用肉眼发现^[1],之后逐步发展形成叶绿素荧光理论。叶绿素分子吸收光后会由基态跃迁到激发态,激发态不稳定,会通过进行光合作用、发出荧光和以热的形式耗散

而释放能量,三者具有互补关系。对于色素分子来讲,荧光发生在 ns 级,而光化学反应发生在 ps 级,一般光能主要是用于光化学消耗的,所以可以通过荧光的变化探测光合机构的变化和光合作用受环境等的影响^[2-3]。

LU 等在 2000 年利用叶绿素荧光技术研究了汞对蓝藻的急性毒性作用,发现随 Hg^{2+} 浓度的升高,钝顶螺旋藻各叶绿素荧光参数逐渐下降^[4]。EULLAFFROY 等在 2003 年利用 LS50B-PerkinElmer 荧光仪研究几种除草剂对斜生栅藻的毒性作用,研究表明,斜生栅藻在 684 nm 和 735 nm 处的叶绿素荧光比率 (F684/F735) 可作为检测水中抑制光合作用的除草剂毒性的指标,随着除草剂浓度的增大,F684/F735 也不断增大,且呈正相关关系^[5]。王丽等在 2008 年利用双通道脉冲振幅调制叶绿素荧光仪测量三角褐指藻的荧光强度,对莠去津进行检测,荧光强度随莠去津浓度的增大而增大,其检出限为 $0.5 \mu\text{g/L}$ ^[6]。田程在 2010 年利用叶绿素在线分析仪测量斜生栅藻荧光强度,以 HgCl_2 为参比毒物,初步建立毒性评价等级^[7]。叶绿素荧光方法检测方便,且灵敏快速,得到了广泛的应用。

藻类是水体的初级生产者,最先受到水环境中污染物的毒害作用^[3,8-9],且藻类荧光对污染物毒性作用敏感,故藻类荧光常被用来研究污染物对微藻的影响。汞能抑制藻类光合作用,影响其叶绿素合成;还可影响藻类的生长,损伤细胞膜导致细胞膜通透性增大^[10]。铜绿微囊藻属蓝藻,在水环境中很常见,且会在温暖的季节大量生长形成水华,其主导光合色素为叶绿素 a 和藻蓝蛋白,对应的荧光激发波长为 435 nm 和 610 nm^[11],其荧光信号对重金属等污染物敏感。本文以铜绿微囊藻为材料,研究不同质量浓度的 Hg^{2+} 在较短时间内对铜绿微囊藻叶绿素荧光的影响,探索铜绿微囊藻对 Hg^{2+} 的响应特性,丰富叶绿素荧光法的理论和应用。

1 材料与方 法

1.1 生物材料

实验所用铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 藻种购于中国科学院武汉水生生物研究所。

使用 BG-11 培养基,于无菌条件下将生长至对数期的铜绿微囊藻转接到新鲜培养基中,置于恒温光照培养箱中培养。铜绿微囊藻的培养条件是:光照度为 $2\ 000\sim 2\ 500 \text{ lux}$,温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,湿度为 75% RH,光暗周期为 12 h : 12 h,静置培养。每日摇瓶 2~3 次,每次随机调换锥形瓶的位置,以免引起光照不均。

通过实验得出铜绿微囊藻在 680 nm 处^[12]的光密度 (DD) 小于 0.600 时,其藻液浓度与叶绿素荧光强度呈正相关关系。在实验前对生长至对数期的铜绿微囊藻藻液进行稀释,使之在 680 nm 处的 OD 值为 0.400。

1.2 仪器与试剂

RGX-250 型人工气候箱(天津市泰斯特仪器有限公司提供)、722 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司提供)、日立 F-7000 荧光光谱仪(天美(中国)科学仪器有限公司提供)。F-7000 荧光光谱仪工作参数:狭缝为 5 nm,扫描速度为 $2\ 400 \text{ nm/min}$,激发波长为 $400\sim 500 \text{ nm}$,发射波长为 $600\sim 700 \text{ nm}$,步长为 5 nm,电压为 700 V,1 cm 的标准四通石英比色皿。

HgCl_2 由姜堰市环球试剂厂提供。实验设定 HgCl_2 的质量浓度分别为 0.000 5,0.001,0.010,0.100,0.200,0.300,0.400,0.500 mg/L。

1.3 叶绿素荧光参数测定

使用 F-7000 荧光光谱仪进行叶绿素荧光参数的测定。先对铜绿微囊藻进行三维扫描,初步确定铜绿微囊藻的激发/发射波长^[13],然后进行波长扫描,比较激发与发射光谱图,确定铜绿微囊藻叶绿素荧光的最佳激发波长 (Ex) 与发射波长 (Em),然后在该 Ex/Em 波长下测定加入 HgCl_2 标准液前后铜绿微囊藻的叶绿素荧光强度。

2 结果与分析

2.1 铜绿微囊藻特征参数的确定

叶绿素 a 的激发与发射波长为 435 nm/684 nm,而不同介质中的叶绿素 a 具有不同的荧光光谱^[14],故不同种类的藻的叶绿素最佳激发波长与发射波长不同。F-7000 荧光光谱仪对铜绿微囊藻在激发波长为

435 nm处进行荧光光谱扫描,获得铜绿微囊藻荧光光谱图(见图1)。由图1可知,铜绿微囊藻在680 nm处有一峰,对应荧光强度最大;在660 nm前有一个相对平缓的峰,对应的是铜绿微囊藻的藻蓝蛋白。最终确定铜绿微囊藻叶绿素荧光的最佳激发波长与发射波长为435 nm/680 nm。

2.2 铜绿微囊藻叶绿素荧光对 Hg²⁺ 毒性作用的响应时间的确定

为了提高水质检测效率,缩短检测时间,建立一种快速简便的水质检测方法,即需要在短时间内检测信号对毒物毒性有响应。实验采用叶绿素荧光技术,在铜绿微囊藻液中加入1 mL的 HgCl₂ 溶液,检测荧光信号对 Hg²⁺ 的毒性的响应作用,发现叶绿素荧光强度随时间变化增大,荧光信号有明显响应。据报道,温度对藻的叶绿素荧光参数与生长有影响^[15],可能也会对叶绿素荧光响应 Hg²⁺ 的毒性时间有影响。用不同温度处理藻液,观测温度对响应时间的影响,以获取最佳反应温度,缩短响应时间。

图2表明,温度分别为20, 23, 25, 27, 30 °C时,加入 HgCl₂ 标准液的铜绿微囊藻叶绿素荧光强度随时间的变化趋势基本一致,均逐渐增强。在0~10 min内叶绿素荧光强度缓慢增大,在10~20 min内荧光强度急剧增大,铜绿微囊藻与 Hg²⁺ 充分反应,且铜绿微囊藻叶绿素荧光强度在20 min时达到最大,20 min后荧光强度趋于稳定。故20~30 °C范围内的温度均可作为实验温度。从图2中还可以看出随温度的增加,叶绿素荧光强度有一定降低。这与报道中的结论一致,所有的荧光都不同程度的受温度影响,温度与荧光成反比^[16]。

实验中还发现使用培养时间不同但均处于生长对数期的藻液(即未经稀释的初始藻液浓度不同)进行实验,获得的响应时间不同。用灭菌的蒸馏水将不同浓度铜绿微囊藻均稀释至OD值为0.400进行响应时间实验,发现铜绿微囊藻OD值在0.885~1.804范围内,初始藻液浓度越大,响应时间越短,铜绿微囊藻的叶绿素荧光对 Hg²⁺ 毒性作用响应越快。

图3可以看出,铜绿微囊藻OD值为1.804时,加入 HgCl₂ 标准溶液后,0~25 min 荧光强度随时间增加,25~35 min 荧光强度有下降趋势,在25 min处荧光强度最大。藻液OD值为1.453时,10 min以后叶绿素荧光强度急剧增大,20 min后荧光强度

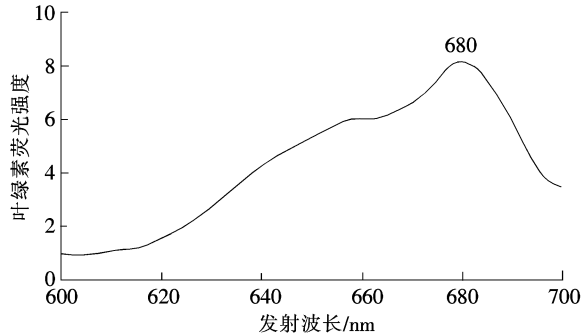


图1 铜绿微囊藻在激发波长为435 nm处的荧光光谱

Fig. 1 Chlorophyll fluorescence emission spectra of *Microcystis aeruginosa* at 435 nm excitation

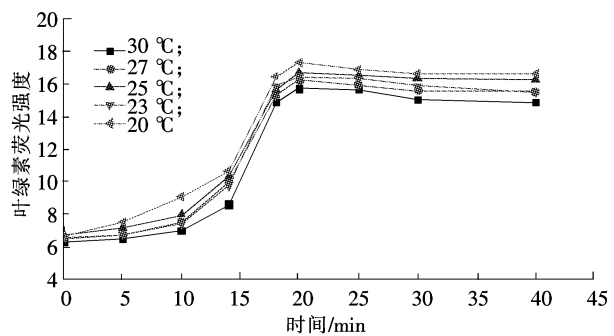


图2 不同温度处理铜绿微囊藻响应 HgCl₂ 生物毒性的影响

Fig. 2 Temporal evolution of chlorophyll fluorescence intensity in temperature-exposed *Microcystis aeruginosa*

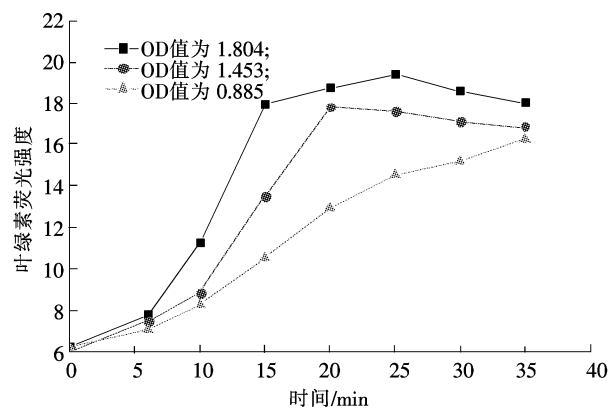


图3 不同初始藻液浓度对铜绿微囊藻叶绿素荧光响应 Hg²⁺ 毒性作用的响应时间的影响

Fig. 3 Temporal evolution of chlorophyll fluorescence intensity in *Microcystis aeruginosa* with different initial concentration

趋于稳定。而藻液 OD 值为 0.885 时, 荧光强度一直随时间增大, 在 35 min 时还未达到稳定。实验选用初始藻液浓度 OD 大于 1.400 的铜绿微囊藻进行实验。

2.3 不同浓度 Hg^{2+} 对铜绿微囊藻叶绿素荧光强度的影响

一定浓度的 Hg^{2+} 对铜绿微囊藻叶绿素荧光具有明显的影响。取铜绿微囊藻与 $HgCl_2$ 标准液在 50 mL 锥形瓶中按体积 1:100 比例混合反应, 25 min 后测定叶绿素荧光强度变化。每一浓度设置 3 个平行样, 设置一组空白样(加入 100 μ L 灭菌的蒸馏水)。

结果表明(见图 4), 较低质量浓度 Hg^{2+} (0.000 5 mg/L) 处理的铜绿微囊藻的叶绿素荧光强度较对照组荧光强度有所减小, 相对荧光强度为负值。0.001~0.400 mg/L Hg^{2+} 处理过的铜绿微囊藻的叶绿素荧光强度有所增加, 其相对荧光强度随 Hg^{2+} 质量浓度的增大而增大, 且在该 Hg^{2+} 质量浓度范围内, 铜绿微囊藻的相对荧光强度与 Hg^{2+} 质量浓度呈正相关关系, 回归方程为 $y=23.699x-0.249$, $r=0.9833$ 。而 Hg^{2+} 质量浓度为 0.500 mg/L 时, 叶绿素荧光强度增大, 但相对荧光强度较 0.400 mg/L Hg^{2+} 处理组的相对荧光强度低很多, 与 0.300 mg/L Hg^{2+} 处理组的相对荧光强度相当, 且镜检发现藻细胞较正常藻细胞体积增大。

《生活饮用水卫生标准》GB 5749—2006^[17] 中对金属汞的限定值为 0.001 mg/L, 《鱼类水质标准》GB 11607—1989^[18] 中对汞的限定值更严, 为 0.000 5 mg/L。实验中发现, 0.000 5 mg/L 的汞浓度胁迫铜绿微囊藻 25 min 后, 铜绿微囊藻的叶绿素荧光强度减小, 相对荧光强度为负值。但田程的研究发现, 用该浓度胁迫铜绿微囊藻, 在 4 h 时荧光信号增强, 而 96 h 时藻液荧光信号减弱, 对藻的生长和光合作用有不明显的抑制作用^[7]。 Hg^{2+} 质量浓度为 0.050 mg/L 时, 短时间内使铜绿微囊藻的叶绿素荧光强度增大, 对藻的光合作用有不明显的抑制作用, 在 24 h 刺激铜绿微囊藻叶绿素 a 的合成^[12]。这说明 Hg 对铜绿微囊藻的毒性作用不单随浓度的变化而变化, 与响应时间长短也有一定关系。当 Hg^{2+} 质量浓度为 0.500 mg/L 时, 其相对叶绿素荧光强度小于 0.400 mg/L Hg^{2+} 处理组, 藻细胞体积增大, 说明藻的细胞结构发生变化。可能因为随 Hg^{2+} 浓度与响应时间的变化, 影响铜绿微囊藻生理变化的作用途径有所不同, 这还需要进一步的研究。

图 4 也表明在短时间(25 min)内铜绿微囊藻的浓度与 Hg^{2+} 质量浓度无关。在 0.000 5~0.400 mg/L Hg^{2+} 的质量浓度范围内, 铜绿微囊藻在 680 nm 处的光密度不随 Hg^{2+} 质量浓度的增大而变化, 均为 0.400 左右。说明短时间内, Hg^{2+} 在 0.000 5~0.400 mg/L 范围内未对铜绿微囊藻的浓度产生影响。

3 结 论

利用叶绿素荧光技术, 通过在铜绿微囊藻中添加 $HgCl_2$ 溶液, 测定铜绿微囊藻在 435 nm/680 nm 处的叶绿素荧光强度的变化来研究铜绿微囊藻叶绿素荧光对 Hg^{2+} 毒性的最佳响应时间, 以及不同浓度的 Hg^{2+} 在最佳响应时间内对铜绿微囊藻的影响。结果表明, 铜绿微囊藻叶绿素荧光对 Hg^{2+} 毒性的最佳响应时间为 25 min, 实验条件为温度 20~30 $^{\circ}C$, 铜绿微囊藻的初始藻液浓度 OD 值大于 1.400。当 Hg^{2+} 质量浓度为 0.000 5 mg/L 时, 铜绿微囊藻的相对荧光强度为负值; 当 Hg^{2+} 质量浓度为 0.001~0.500 mg/L 时, 藻液的相对荧光强度大于零, 且在一定质量浓度范围内(0.001~0.400 mg/L)相对荧光强度与 Hg^{2+} 质量浓度呈正相关关系, 回归方程为 $y=23.699x-0.249$, $r=0.9833$ 。

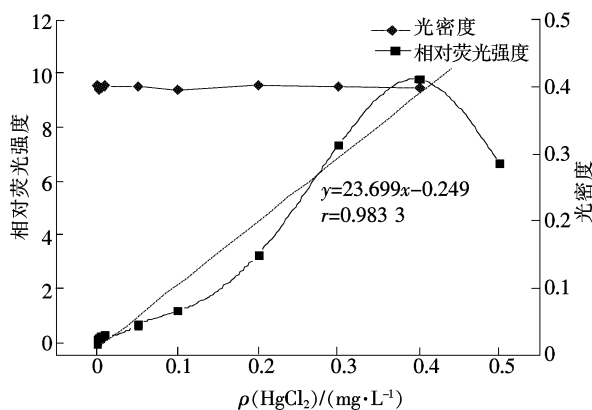


图 4 不同质量浓度 $HgCl_2$ 对铜绿微囊藻叶绿素荧光强度的影响

Fig. 4 Chlorophyll fluorescence intensity from *Microcystis aeruginosa* treated with different concentrations of $HgCl_2$

参考文献/References:

- [1] GOVINDJEE. Sixty-three years since Kautsky, Chlorophyll a fluorescence [J]. Australia Journal of Plant Physiology, 1995, 22: 131-160.
- [2] ROHACEK K, BARTAK M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence; Basic concepts, useful parameters, and some applications [J]. Photosynthetica, 1999, 37: 339-363.
- [3] BEUTLER M, WILTSHIRE K H, MEYER B, et al. A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ* [J]. Photosynthesis Research, 2002, 72: 39-53.
- [4] LU C M, CHAU C W, ZHANG J H. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of Cyanobacterium, *S. Platensis*-assessment by chlorophyll fluorescence analysis [J]. Chemosphere, 2000, 41: 191-196.
- [5] EULLAFFROY P, VERNET G. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio; A potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae [J]. Water Research, 2003, 37(9): 1983-1990.
- [6] 王丽, 应波, 鄂学礼. 水中莠去津的叶绿素荧光定量检测法 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(7): 628-630.
WANG Li, YING Bo, E Xueli. Determination of atrazine in water with ToxY-PAM [J]. Journal of Environment and Health, 2008, 25(7): 628-630.
- [7] 田程. 藻类荧光对重金属毒性响应规律的研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2010.
TIAN Cheng. Study on the Discipline of Algal Fluorescence Response to Heavy Metal Toxicity [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2010.
- [8] 王帅, 梁英. 不同浓度的 Cd²⁺、氮及其交互作用对小球藻的和微绿球藻生长及叶绿素荧光特性的影响 [J]. 水产科学, 2011, 30(4): 210-214.
WANG Shuai, LIANG Ying. The interaction of Cd²⁺ and N concentration on chlorophyll fluorescence characteristics in algal *Chlorella sp.* and *Nannochloris oculata* [J]. Fishery Sciences, 2011, 30(4): 210-214.
- [9] 王晓辉, 金静, 任洪强, 等. 水质生物毒性检测方法研究进展 [J]. 河北工业科技, 2007, 24(1): 58-62.
WANG Xiaohui, JIN Jing, REN Hongqiang, et al. Development of biotoxicity testing method on detecting water quality [J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2007, 24(1): 58-62.
- [10] 杜敏. 汞污染对两种藻类质膜透性的影响 [J]. 中山大学研究生学刊自然科学版, 1996, 17(2): 46-49.
DU Min. Effect of mercury pollution on plasma membrane permeability of *Selenastrum capricornutum* and *anacystis nidulans* [J]. Natural Sciences Journal of the Graduates Sun Yat-sen University, 1996, 17(2): 46-49.
- [11] 殷高方, 张玉钧, 王志刚, 等. 基于荧光传感方法的藻类在线监测 [J]. 科技导报, 2010, 28(23): 40-45.
YIN Gaofang, ZHANG Yujun, WANG Zhigang, et al. Online monitoring technology for algae by fluorescent sensing method [J]. Science & Technology Review, 2010, 28(23): 40-45.
- [12] 田程, 刘杰, 崔建升. HgCl₂ 对铜绿微囊藻的急性毒性效应研究 [J]. 安全与环境学报, 2011, 11(4): 5-8.
TIAN Cheng, LIU Jie, CUI Jiansheng. Acute toxicity of HgCl₂ on the algal *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Safety and Environment, 2011, 11(4): 5-8.
- [13] 刘小静, 吴晓燕, 齐彩亚, 等. 三维荧光光谱分析技术的应用研究进展 [J]. 河北工业科技, 2012, 29(6): 422-425.
LIU Xiaojing, WU Xiaoyan, QI Caiya, et al. Applications of three-dimensional fluorescent spectroscopy analysis technology [J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2012, 29(6): 422-425.
- [14] 王志勤. 小球藻内叶绿素 a 荧光特征的研究 [J]. 福建分析测试, 2012, 21(2): 31-34.
WANG Zhiqin. Fluorescence characteristics studies of chlorophyll a in *Chlorella vulgaris* [J]. Fujian Analysis & Testing, 2012, 21(2): 31-34.
- [15] SAYED O H, EI-SHAHED A M. Growth, photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (chlorophyta) in response to growth temperature [J]. Cryptogamie Algologie, 2000, 21(3): 283-290.
- [16] 陈莲花, 刘雷. 叶绿素荧光技术在光合作用中的应用 [J]. 江西科学, 2007, 25(6): 788-806.
CHEN Lianhua, LIU Lei. Application of the chlorophyll fluorescence in photosynthesis of algae [J]. Jiangxi Science, 2007, 25(6): 788-806.
- [17] GB 5749—2006, 生活饮用水卫生标准 [S].
GB 5749—2006, Sanitary Standard for Drinking Water [S].
- [18] GB 11607—89, 渔类水质标准 [S].
GB 11607—89, Fishery Water Quality Standard [S].