

## 【调查与研究】

# 应用流式细胞仪研究 Pb 对海洋微藻生长的影响

何学佳, 彭兴跃

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 运用流式细胞仪研究比较了 Pb 对 3 种常见海洋单细胞微藻: 湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*)、球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*)、小球藻 (*Chlorella* sp.) 的毒害作用。用内插法求得 Pb 对 3 种微藻的 96 h 的半有效浓度 (96 h  $EC_{50}$ ) 分别为 9.03、8.83 和  $>20.00$  mg/L。Pb 抑制细胞的生长分裂, 使延滞期延长, 并影响了叶绿素正常合成, 毒性与浓度成正相关。Pb 对不同生长期的细胞的作用强度不同, 对生长分裂和叶绿素合成的作用程度呈现差异性。

**关键词:** 微藻; 流式细胞仪; Pb; 细胞生长分裂; 叶绿素

**中图分类号:** X503.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2003)01-0001-05

## The influence of lead on marine microalgae by a flow cytometry

HE Xue-jia, PENG Xing-yue

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The effects of lead on the division and chlorophyll synthesis of *Dicrateria zhanjiangensis*, *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp. were studied using a flow cytometer. The results showed that the 96h  $EC_{50}$  values of these three species of algae were 9.03 mg/L, 8.83 mg/L and  $>20.00$  mg/L respectively. Lead inhibits the cell division, lengthened lag phase and caused abnormality of chlorophyll synthesis. Its toxicity is increased as lead concentration increased. For any of the three species studied, the impacts of Lead on the cells of the two different phases of growth differed. It was also suggested that inhibition of chlorophyll synthesis was relatively insensitive to lead compared with that of the cell division rate.

**Key words:** microalgae; flow cytometry; lead; cell division; chlorophyll synthesis

海洋环境的污染问题越来越受到人们的重视, Pb 作为普遍存在的重金属污染物是其中一个重要内容。藻类作为海洋生态系统中的初级生产者, 是首先易受环境中 Pb 影响的生物。Pb 可在藻体内积累, 进而对藻类正常的生长率、细胞呼吸作用、体积、光合作用强度、形态等造成不同程度的影响<sup>[1,2]</sup>, 同时通

过食物链传递给其他的生物。近年来研究 Pb 对微藻作用的报道并不多, 特别在国内这方面的研究还有待进一步的开展。本文选取常见的几种海洋微藻, 采用流式细胞术研究 Pb 对微藻细胞的毒害作用, 探讨致毒机理, 获得基础数据, 为海水水质的综合评估和海洋环境污染的监控提供有价值的资料。

收稿日期: 2002-06-24, 修改稿收到日期: 2002-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(49806004); 高等学校骨干教师资助计划项目

作者简介: 何学佳(1978-), 女, 贵州遵义人, 现为厦门大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事海洋分子标记物的研究工作, E-mail: hexuejia@sina.com.cn.

## 1 材料和方法

材料:选取本实验藻种库的湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*)、小球藻 (*Chlorella* sp.)、球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 作为实验藻种。

实验海水取自厦门海域,静置沉淀后,经 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤,配制成 f/2 培养基,高压灭菌。所用的  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  为分析纯,用蒸馏水配制成 0.2 g/L 母液,冷藏保存。实验器皿均用 10% HCl 浸泡过夜处理,蒸馏水冲洗烘干备用,以消除毒物附壁效应。

培养方法:首先进行藻种的生长同步化,方法见文献<sup>[6]</sup>。然后再进行接种。培养体积为 100 mL。藻细胞接种数为 200~300/mL。在光照强度 1500 lx、光暗周期 12h/12h、22 $^{\circ}$ C 的恒温室中静置培养藻类,每天摇动 3~5 次。

实验设计:培养液中投加的 Pb 浓度为:0.1、0.5、1、5、10、15、20 mg/L。Pb 的加入分两种情况:第一组在接种时同时加入 Pb;第二组待藻生长进入指数期后加入 Pb。

计算 Pb 对 3 种藻的毒性:以 96 h 的半效应浓度  $EC_{50}$  表示,所用方法为内插法<sup>[4]</sup>。

流式细胞仪的测定:第一组藻液从接种算起,取样时间为:0、3、24、48、72 和 96 h。第二组待藻进入指数期加入 Pb 记时为 0,按 0、3、24、48、72 和 96 h 取样。测定采用 Beckman-coulter epics XL 流式细胞仪,该仪器采用氩离子激光器,激发波长 488 nm。选取信号前向散射 (FS)、侧向散射 (SS)、及 4 个波长的荧光 FL1 (520nm)、FL2 (575nm)、FL3 (620nm) 和 FL4 (675nm),调整各信号参数,使各种信号皆处于可测量范围内,并固定此参数进行所有样品测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Pb 对延滞期 3 种藻及延滞期后细胞生长分裂的影响

结果表明 Pb 浓度越大,藻细胞生长的延

滞期受影响的程度越大,且此后细胞数偏离正常对照也越多。湛江叉鞭金藻 0.1~1 mg/L 各组藻细胞的生长曲线与对照无明显差异,5~20 mg/L 各组延滞期延长,其中最高数组延长了近 48 h。球等鞭金藻 0.1~5 mg/L 各组生长曲线与对照无明显差异,0.1~1 mg/L 各组细胞数进入指数期后出现略高于对照组的现象;10~20 mg/L 的延滞期明显比对照组延长了 24、48 h 不等。小球藻 0.1~1 mg/L 各组细胞生长的延滞期与对照无差别,1~10 mg/L 各组在进入指数期后,细胞数增长缓慢,15、20 mg/L 两组的延滞期延长了 24 h (图 1)。

按照经典方法据此项结果计算 Pb 对 3 种藻的半效应浓度 96h  $EC_{50}$ ,计算得到,Pb 对湛江叉鞭金藻、球等鞭金藻、小球藻的 96h  $EC_{50}$  分别为 9.03、8.83 和 >20.00 mg/L (本实验范围内未测到)。

3 种藻中,Pb 对球等鞭金藻的生长抑制最强,毒性最大,湛江叉鞭金藻略次之,对小球藻最弱。3 种藻对 Pb 耐受性的差异首先可能与 3 种细胞的形态上的区别有关。小球藻细胞明显小于两种球等鞭金藻 (流式细胞仪和显微镜检也都可证明),具有细胞壁,Pb 离子进入细胞壁这一屏障时,会以物理性吸附形成无机沉淀在其上沉积或嵌入。细胞壁上存在的活性基团也可结合 Pb 离子,从而在一定程度上保护了细胞。而两种球等鞭金藻细胞无细胞壁,所以易受 Pb 的作用影响<sup>[5,7]</sup>。

### 2.2 Pb 对指数期 3 种藻细胞生长分裂的影响

湛江叉鞭金藻的 0.1 mg/L 组细胞数在 96 h 高于对照,Pb 表现了促生长分裂的作用;0.5~5 mg/L 组细胞生长曲线与对照相差不大;10~20 mg/L 组的细胞生长受到抑制的现象在 72 h 表现出来。球等鞭金藻 0.1~5 mg/L 各组细胞生长除实验中期略有波动外,与对照组的差异是不明显的,但仍能看出 1 mg/L 组细胞数一直略高于对照组,在这一细胞数

下,Pb 表现了促进生长的作用;10~20 组细胞生长 24 h 开始受到抑制。小球藻 0.1~5 mg/L 各组在实验中期细胞浓度略高于对照,细胞生长受到了 Pb 的促进作用;10~20 mg/L 各组细胞数低于对照组(图 1)。

与延滞期 Pb 对 3 种藻细胞的作用结果相比较可知,高浓度的 Pb 抑制细胞分裂使延滞期延长,并且浓度越高,作用越强。细胞进入

指数期后,细胞生长分裂速率受影响,高浓度的 Pb 使处于指数期的藻细胞的生长分裂速率减缓。比较同种藻在这两个生长时期细胞的生长速率发现,Pb 对延滞期藻细胞具有更强的抑制作用。不同生长期的细胞所处的生理状态具有差异性,总的来说,延滞期中细胞相对处于逆境,对 Pb 的抗性弱,受损程度大;而处于指数期的细胞生长旺盛,抗性强。

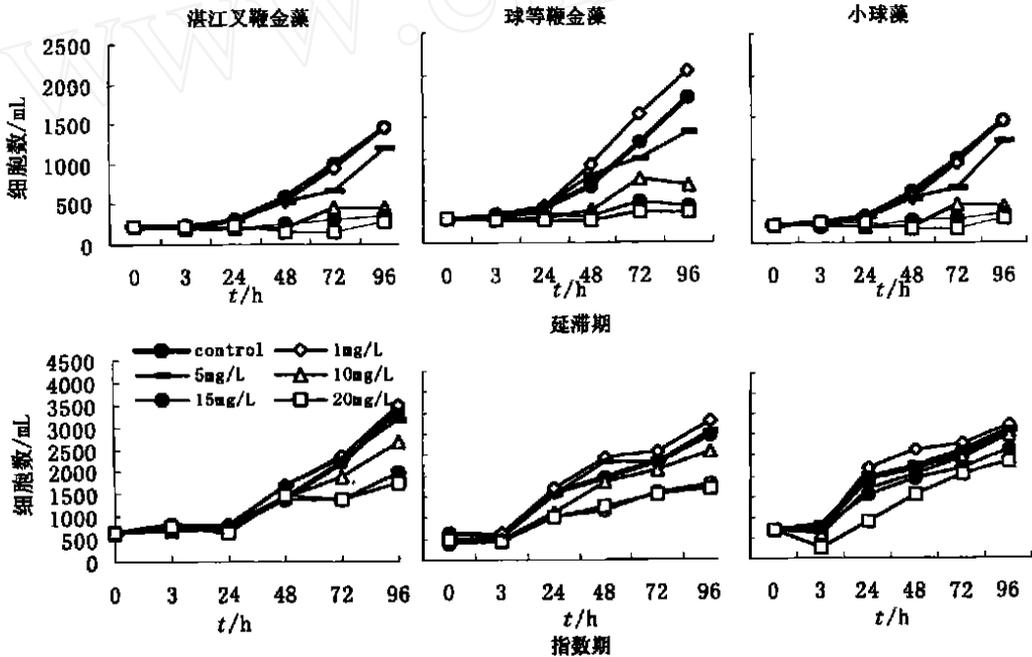


图 1 Pb 对湛江叉鞭金藻、球等鞭金藻和小球藻延滞期及指数期细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of lead on the growth of *D. zhanjiangensis*, *I. galbana* *Chlorella* sp.

and during the lag phase and the exponential phase of growth

### 2.3 延滞期加 Pb 对 3 种藻细胞叶绿素含量的影响

流式细胞仪所测的 FL4 (675 nm) 参数直接反映了单个细胞中叶绿素的含量。

3 种藻的细胞叶绿素含量随时间变化的曲线在实验初期都显示出同样下降的趋势,表明了延滞期细胞叶绿素合成能力下降。

湛江叉鞭金藻的各实验组细胞叶绿素含量具有相似的变化趋势波动特征,5~20 mg/L 各组细胞从 48 h 开始,叶绿素含量明显比对照低,叶绿素合成受到了 Pb 的抑制作用;而 0.1~1 mg/L 各组则比对照略高,显示了

Pb 的促进作用。球等鞭金藻各个实验组细胞叶绿素含量变化趋势相似,5~20 mg/L 各组细胞从 24 h 叶绿素合成开始受到抑制;而 0.1~5 mg/L 各组 72 h 才表现出来。小球藻 5~20 mg/L 各组 72 h 以后,叶绿素含量均比对照要低,其中 15 和 20 mg/L 两组细胞叶绿素合成较早受到抑制(图 2)。

Pb 可能通过对合成叶绿素的酶反应过程的间接作用来抑制叶绿素合成。这种抑制作用总体来说也随浓度的增大而增强。从高浓度组细胞叶绿素合成受 Pb 抑制开始的时间先后来看,大致可以判断出,Pb 对球等鞭金藻

和湛江叉鞭金藻的毒性是前者大于后者。小球藻似乎和两种球等鞭金藻有不同的变化特征。

#### 2.4 Pb对指数期藻细胞叶绿素含量的影响

指数生长期3种藻细胞叶绿素含量呈现周期性波动。指数生长期细胞生长旺盛,分裂频繁,单个细胞的叶绿素含量会随细胞的分裂而出现周期性的变化。

湛江叉鞭金藻0.1~1 mg/L各组细胞叶绿素含量变化情况与对照相似,而且1 mg/L组含量略有提高,但这种趋势在实验后期变得不明显了;而10~20 mg/L各组藻细胞叶绿素含量48 h开始低于对照组,叶绿素合成受到了抑制。球等鞭金藻0.1~1 mg/L各组与对照相比,差别不大;而5~20 mg/L各组在24 h显示出叶绿素含量明显减少。小球藻受影响的情况不同,0.1~1 mg/L各组细胞叶绿素含量与对照无明显差异;而5~20 mg/L各组的含量波动呈现出较大差异,随着Pb浓度增加,这种差异也越大。表明小球藻细胞在Pb

的作用下,叶绿素含量波动的规律性丧失(图2)。

由抑制作用出现的时间来看,Pb对指数期细胞叶绿素合成的抑制作用,仍然是球等鞭金藻大于湛江叉鞭金藻。结合上面延滞期得出的结果,比较同种藻的两个生长期的细胞发现,在同样高的Pb浓度条件下,延滞期细胞叶绿素合成较早于指数期细胞出现受抑制现象,从细胞叶绿素含量的减少来看,前者多于后者,这说明了Pb对指数期细胞的毒性比延滞期细胞要弱。

而小球藻指数期细胞叶绿素合成受抑制与其延滞期细胞的情况差异较大。在Pb的作用下,除叶绿素的绝对含量下降以外,含量变化不再有规律。体现了两个生长期细胞由于所处生理状态的不同,而对逆境反应的不同。

### 3 结论

#### (1) 3种藻细胞生长分裂和叶绿素合成受

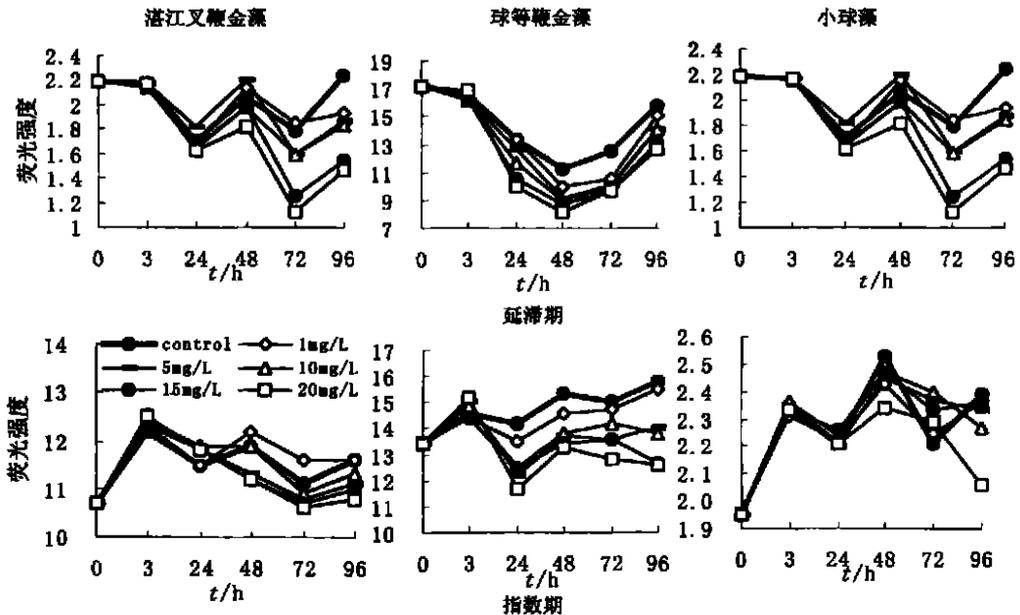


图2 Pb对湛江叉鞭金藻、球等鞭金藻和小球藻延滞期及指数期细胞叶绿素合成的影响

Fig. 2 Effects of lead on chlorophyll synthesis of *D. zhanjiangensis*, *I. galbana* and *Chlorella* sp. during the lag phase and the exponential phase of growth

抑制的情况比较可见,Pb 对同属于球等鞭金藻门的湛江叉鞭金藻和球等鞭金藻的毒性效应相似,这与两种细胞在形态结构上的相似性有关。而属于绿藻门的小球藻与它们的差异则很大。而共同之处是,Pb 对 3 种藻同种藻延滞期细胞的毒性都比指数期细胞要大,这可能是由两个生长期细胞的生理状态特征所决定的。

(2)藻细胞的细胞分裂较之叶绿素的合成对 Pb 毒害的敏感性要强一些,许多学者研究其他的重金属对藻类的影响时也得到了同样的结果。由此,在选取藻类作为环境污染的指示生物时,细胞分裂速率是一个较为敏感的指标。不过,细胞叶绿素也是一个易于测定的指标。

(3)低浓度情况下,Pb 对细胞生长和叶绿素合成有微弱的促进作用,这与董庆霖、林碧琴的研究结果相符<sup>[6]</sup>。另外,本实验所得出的细胞叶绿素含量的变化特征与常规的毒理实验的结果有所不同,呈现了波动性,这与检测方法有关,流式细胞仪测定的是单个细胞叶

绿素的含量变化,而经典方法着重测定多个细胞的整体变化。<sup>[3]</sup>今后我们将结合新的实验方法对 Pb 对微藻的毒害效应作进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] CAPELO S, VILHENA M F, SIMÕES G, *et al.* Effect of lead on the uptake of nutrients by unicellular algae[J]. *Water Res.* 1993, 27(10): 1 563-1 568.
- [2] 廖自基. 微量元素的环境化学及生物效应[M]. 北京: 中国环境学出版社出版, 1992, 359-386.
- [3] JENNIFER L S, NATASHA M F, MERRIN S A. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(4): 141-143.
- [4] 南京大学环境科学系. 环境生物学实验技术与方法[M]. 南京: 南京大学出版社, 1989. 42-44.
- [5] 潘进芬, 林荣根. 海洋微藻吸附重金属的机理研究[J]. *海洋科学*, 2000, 24(2): 31-35.
- [6] 董庆霖, 林碧琴. Pb 对羊角月芽藻的毒性及吸收作用的研究[J]. *辽宁大学学报*, 1997, 24: 89-94.
- [7] 王 音, 顾泳洁. 藻类对重金属的解毒机制[J]. *生物学教学*, 2000, 25(9): 10-12.