

锗毒性对四种微藻形态和超微结构的影响*

王大志¹ 高亚辉² 程兆第² 李少菁³ 金德祥² (1. 厦门大学国家教育部海洋生态环境开放研究实验室, 厦门 361005; 2. 厦门大学生物系, 厦门 361005; 3. 厦门大学海洋系, 厦门 361005)

文 摘 将钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)、盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)、湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)、微绿藻(*Nannochloropsis*. sp) 4种微藻培养在含 10 mg/dm³ 锗的溶液中, 研究了锗毒性对藻类细胞形态和超微结构的影响。结果表明, 经锗处理的微藻细胞多变形且易破裂, 胞壁和原生质体结合疏松, 一些细胞的鞭毛变得细长弯曲或缺失。细胞超微结构中叶绿体(类囊体)、线粒体受锗毒性的影响最大, 其它一些结构如细胞核、脂含物、淀粉与液泡等也受到了影响, 但不同种间差异较大。这些结果表明, 细胞内的能量传递系统受到明显影响, 从而影响到细胞内有机质的合成、累积及细胞的生长。

关键词 锗 毒性 微藻 形态 超微结构

Effects of germanium toxicity on the morphology and ultrastructure of four species of microalgae. Wang Dazhi¹, Gao Yahui², Cheng Zhaodi², Li Shaojing³, Jin Dexiang² (1. The Research Laboratory of Marine Ecological Environment of State Education Department of China, Xiamen 361005; 2. Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005; 3. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005). *China Environmental Science*. 1998, 18(6): 501~505

Abstract—Four microalgae: *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Dicrateria zhanjiangensis* and *Nannochloropsis* sp. were exposed to 10 mg/dm³ germanium (Ge), the morphology and ultrastructure changes in cells were studied. The results showed that more cells treated with Ge became deformed and cracked, cell wall linked with protoplasm loosely, and flagellates became longer and brooked or lost in some cells. Among ultrastructures, the mitochondria and chloroplasts (or thylakoids) were the most affected by Ge, other changes were observed in the lipids, vacuoles, starches and nucleus, but these showed greater variability among the microalgae studied. The major alterations suggested that energy transducing systems were severely affected by Ge toxicity, which were affected organisms synthesis, accumulation and algal growth.

Key words germanium toxicity microalgae morphology ultrastructure

早期人们在研究锗对藻类生长影响时就发现, 当培养介质中锗浓度过高时, 锗不仅会抑制藻类的生长, 对藻类还具有毒害作用。McLachlan等^[1]发现 *Fucus distichus* 的芽经 GeO₂ 处理后, 会出现顶端坏死的现象; West^[2]发现在 GeO₂ 中生长的 *Pilayella* 长得较慢, 丝状体发生变形; 马家海等人^[3]也观察到, 经锗处理的蛋白核小球藻液泡异常增大, 色素变淡或只留下空壁。这些观察结果表明, 藻类细胞的超微结构发生了变化, 但有关这方面的研究尚未见报道。Yang^[4]曾报道了 GeO₂ 对褐藻生长发育过程中形态变化的影响。本文选择了 4 种微藻: 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)、盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*)、湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*)

和微绿藻 (*Nannochloropsis*. sp), 培养在含 10 mg/dm³ 锗的溶液中, 研究了锗对细胞形态和超微结构的影响, 并对其毒性机理进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 藻种和培养

所用藻种钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)、盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*)、湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*) 和微绿藻 (*Nannochloropsis*. sp) 皆为本室保存种。培养条件: *S. platensis* 采用 Zarrouk 液体培养基, 其它海水

收稿日期: 1998-02-17

* 国家教委博士点基金资助项目 (9538408)

种采用 f/2 加富培养基,在其中加入 GeO_2 来提供锗,锗的最终浓度为 $10 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 。培养光源为日光灯,光照强度 3500 lx 左右,光暗周期 12h/12h,培养温度 28°C 左右,培养至对数生长期后期,用过滤和离心法收集藻细胞 $0.2 \text{ mol}/\text{dm}^3$ 、pH 7.2 的磷酸缓冲液冲洗 3~5 遍,后移入 1 cm^3 Eppen-dof 管中待固定。

1.2 细胞形态的观察

藻细胞用 2.5% 的戊二醛固定 6~12 h 后,用 1% 锇酸再固定 1~2 h,固定后的细胞用涂片法粘附于玻片上,乙醇梯度逐级脱水,再经乙醇-丙酮(V/V,1/1)及 100% 丙酮溶液脱水各两次,每次 10 min,取出进行临界点干燥,喷金后,置于日立 S-520 型扫描电子显微镜下观察。

1.3 超微结构的观察

样品的固定处理同 1.2,固定后样品用磷酸缓冲液冲洗 1 次,70% 的饱和醋酸双氧铀染色过夜,经常规乙醇梯度脱水后,用 Spurr 包埋剂包埋,在 LKB-2088 超薄切片机上切片,在 JEM-100XII 透射电镜下观察细胞超微结构。

2 结果

2.1 锗对微藻细胞形态的影响

4 种微藻在 $10 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 锗中培养一段时间后,细胞形态均发生一定程度的变化。*S. platensis* 的丝状体表面变粗糙,细胞间隔变模糊,胞壁与原生质体结合疏松,细胞多变形,大小也发生变化(图 1)。

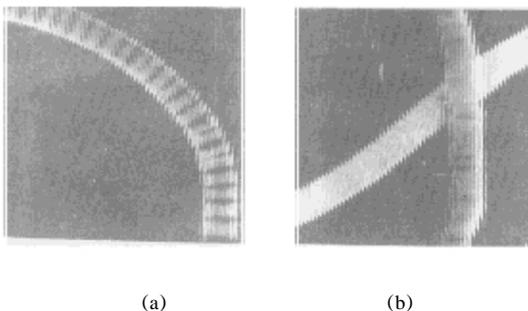


图 1 加锗与未加锗培养的钝顶螺旋藻细胞形态的电镜观察结果

Fig. 1 The results of observation the morphology of *S. platensis* with and without germanium under SEM
(a) 未加锗 (b) 加锗

Nannochloropsis sp. 在锗溶液中培养 16d 后,细胞多变形或破裂,胞壁与原生质体结合不紧密(图 2)。

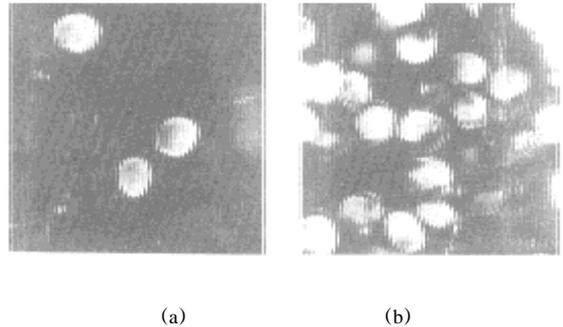


图 2 加锗与未加锗培养的微绿藻细胞形态的电镜观察结果

Fig. 2 The results of observation the morphology of *Nannochloropsis* sp. with and without germanium under SEM
(a) 未加锗 (b) 加锗

D. zhanjiangensis 的细胞壁与原生质体结合疏松,且细胞多破裂,鞭毛也缺失(图 3)。

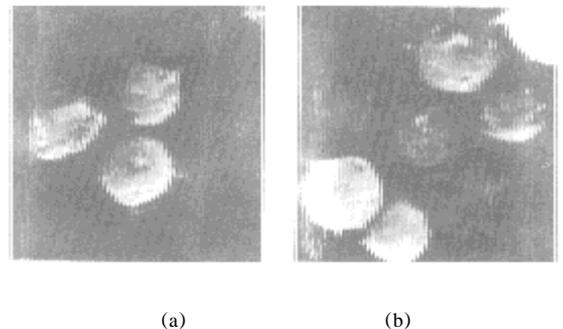


图 3 加锗与未加锗培养的湛江叉鞭金藻细胞形态的电镜观察结果

Fig. 3 The results of observation the morphology of *D. zhanjiangensis* with and without germanium under SEM
(a) 未加锗 (b) 加锗

锗对 *D. salina* 细胞的形状影响不大,但一些细胞的鞭毛变得细长而弯曲(图 4)。

2.2 锗对微藻超微结构的影响

S. platensis 经锗处理 6 d 后,细胞内各种颗粒状物显著减少,且主要集中在细胞的中央部分,在细胞的 4 周出现大量的圆柱状气囊,有的排列成蜂窝状,有的则堆积成圆柱形,同时光合作用片层(类囊体)清晰可见,分布在细胞的四周(图 5)。

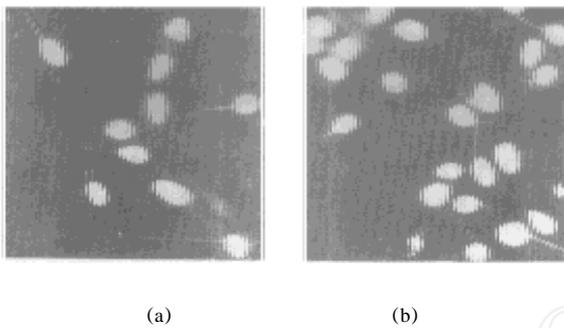


图 4 加锗与未加锗培养的盐生杜氏藻细胞形态的电镜观察结果

Fig. 4 The results of observation the morphology of *D. salina* with and without germanium under SEM
(a) 未加锗 (b) 加锗

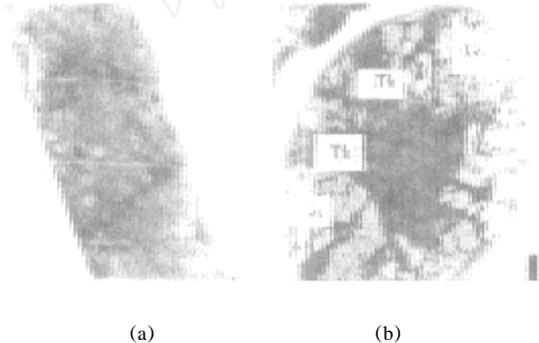


图 5 加锗与未加锗培养的钝顶螺旋藻细胞超微结构的电镜观察结果

Fig. 5 The results of observation the ultrastructure of *S. platensis* with and without germanium under TEM
(a) 未加锗 (b) 加锗 Gv. 气囊 Th. 类囊体

加入锗后, *D. salina* 的叶绿体变小, 淀粉颗粒增多, 围绕在细胞的周边, 有的细胞叶绿体中出现双蛋白核, 线粒体增多, 内嵴多遭破坏, 液泡增多, 内含物丰富, 核仁多消失, 染色体束断裂, 呈低嗜钺状(图 6)。

Nannochloropsis sp. 细胞内基质变稀疏或缺失, 叶绿体内的蛋白核消失, 类囊体的片层结构被破坏, 出现大的致密区域, 叶绿体内脂含物增加, 线粒体变大, 内嵴以一种异常方式排列(图 7)。

D. zhanjiangensis 细胞内基质变得稀疏或缺失, 叶绿体明显变小, 类囊体片层结构模糊, 线粒体异常膨胀, 内嵴多被破坏, 细胞内出现许多大液泡, 内含物丰富(图 8)。

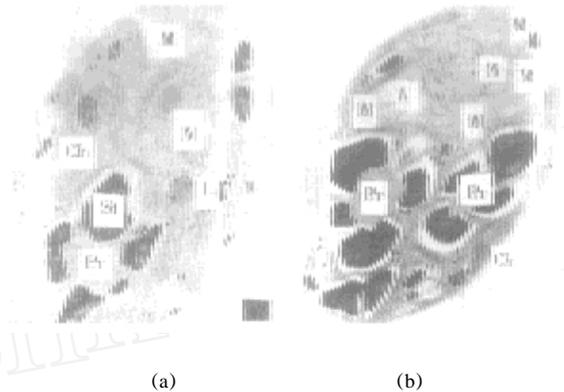


图 6 加锗与未加锗培养的盐生杜氏藻细胞超微结构的电镜观察结果

Fig. 6 The results of observation the ultrastructure of *D. salina* with and without germanium under TEM
(a) 未加锗 (b) 加锗
M. 线粒体 ch. 叶绿体 St. 淀粉颗粒 Pr. 蛋白核
N. 细胞核 V. 液泡 L. 脂含物(以下同)

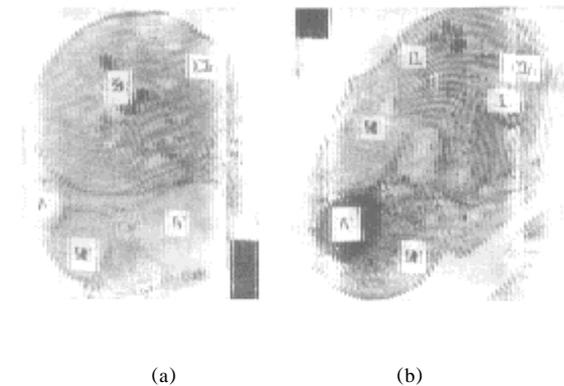


图 7 加锗与未加锗培养的微绿藻细胞超微结构的电镜观察结果

Fig. 7 The results of observation the ultrastructure of *Nannochloropsis* sp. with and without germanium under TEM
(a) 未加锗 (b) 加锗

3 讨论

对锗处理的 4 种藻类的细胞形态和一些主要超微结构(如叶绿体和线粒体等)进行了研究, 此外对其它一些结构, 如细胞核、脂含物及液泡等也进行了观察, 这些变化在不同的藻类中显示出很大的差异。

3.1 锗对细胞形态的影响

经锗处理后, 细胞多变形且易破裂, 细胞壁和原生质体结合疏松, 具鞭毛的种类, 鞭毛变得

细长弯曲或缺失。Yang 在褐藻中也观察到,受 GeO_2 影响的幼芽中,细胞形状异常,细胞间联系缺失;细胞壁纤维变形,细胞壁显得松散,且以一种不寻常的方式排列;细胞中到处可观察到细胞基质缺失,细胞壁中也出现许多异形物质,位于新生芽顶端部分的合子和孢子的细胞异常的薄。这表明锗引起了细胞内部结构的改变,从而影响到细胞形态的变化。

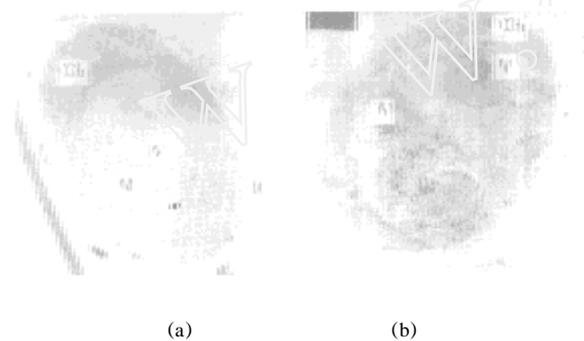


图8 加锗与未加锗培养的湛江叉鞭金藻细胞超微结构的电镜观察结果

Fig. 8 The results of observation the ultrastructure of *D. zhanjiangensis* with and without germanium under TEM
(a) 未加锗 (b) 加锗

3.2 锗对细胞超微结构的影响

细胞超微结构中线粒体受锗毒性的影响最明显。*Nannochloropsis* sp. 中线粒体变得异常膨胀,内嵴遭到破坏;*D. salina* 的线粒体变小,数目增多,内嵴也被破坏。尽管线粒体的变化不同,但两者细胞内的储备物质如淀粉颗粒、脂含物等都有增加的趋势。线粒体是细胞内的呼吸和产能中枢,是藻类生长、各种合成反应、无机营养元素的吸收和同化物运输的能量来源,同时也是细胞代谢的能量来源,它的大小和数量反映了细胞内的呼吸水平。从本实验看,经锗处理后,线粒体都受到不同程度的损坏,表明锗抑制了线粒体的正常生理功能,破坏了线粒体内的氧化磷酸化循环和电子传递系统,导致细胞的呼吸作用减弱,能量储备物质消耗减少。

叶绿体是细胞中受到显著影响的另一个细胞器,锗的处理使 *D. salina*、*Nannochloropsis* sp 和 *D. zhanjiangensis* 的叶绿体明显减小,类囊体片层受到不同程度的影响,还出现了一些致密区

域,但叶绿体中的储备物质(淀粉颗粒、脂含物等)未见减少,还有增加的趋势,在 *D. salina* 中甚至还出现了双蛋白核的现象,这说明适度的锗在一定程度上促进了细胞内储备物质的合成和积累,以供细胞适应更加恶劣的环境条件。

锗对钝顶螺旋藻(*S. platensis*)的影响则不同于上述几种藻类。*S. platensis* 为原核生物,细胞内没有完整的细胞器结构,主要为色素颗粒及其它颗粒物。经锗处理后,细胞中出现了大量的气囊结构,光合作用片层(类囊体结构)也清晰可见。这种变化可能是由于细胞吸收了一定量的锗。在蓝藻类中,气囊结构主要是用于调节细胞的浮力,气囊的多少决定着细胞的沉浮^[5]。细胞吸收锗后,细胞重力增加,为了保证细胞在水中不致下沉,以维持细胞的正常生理功能(光合作用、生长等),*S. platensis* 合成了大量的气囊结构来增加细胞的浮力以抵消这部分增加的重力。这是耗能过程,需要消耗细胞内的大量能源物质,这也促使了细胞类囊体的合成,以合成更多的能源物质满足这一需求。

在锗处理的 *D. salina* 细胞中还观察到,核仁多消失,染色体束断裂且呈低嗜锇状,表明细胞内的遗传物质受到了影响,但这种染色体的改变并非是有利的,因为藻类能成功地适应 10 mg/dm^3 的锗。

此外,经锗处理的 *D. salina* 和 *D. zhanjiangensis* 细胞中都出现了大量的液泡,有些还具有丰富的内含物。液泡具有吸收进入细胞中异物的功能,它是细胞内的一种解毒机制。因而可以推测,经锗处理的藻类细胞中液泡的增加是藻类对锗毒性的一种适应,进入细胞中的无机锗可能有一部分为液泡所吸收或被转化,以降低锗毒性对细胞内其它细胞器的毒害。

4 结论

4.1 当微藻暴露于 10 mg/dm^3 锗溶液中时,微藻的细胞形态和超微结构都受到了影响,但不同种间差别较大。超微结构方面的一些主要变化表明,锗对微藻细胞的能量传递系统毒性最大,从而影响到细胞内有机质的合成、累积及细胞的

生长。

4.2 此外,本研究所用的几种藻类都能够适应较高的锗浓度,虽然对它们的适应机制尚不清楚,但在研究锗的毒性时,必须考虑到藻类对高浓度锗的适应潜力。

参考文献

- 1 McLachlan J W, Chen L C M, Edelstein T. The culture of four species of *Fucus* under laboratory conditions. *Can. J. Bot.* 1971, 47: 537 ~ 540
- 2 Markham J W, Hagmeier E. Observations on the effects of germanium dioxide on the growth of macro-algae and diatoms. *Phycologia*. 1982, 21: 125 ~ 134

- 3 马家海,刘青. 二氧化锗对坛紫菜自由丝状体生长发育的影响. *水产学报*, 1989, 13: 36 ~ 41
- 4 Yang W X. Morphological study on the inhibitory effect of germanium dioxide on growth and development of brown algae. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Hokkaido. Univ.*, 1993, 9: 33 ~ 64
- 5 Oliver R L. Floating and sinking in gas-vacuolate cyanobacteria. *J. Phycol.*, 1994, 36: 161 ~ 175

作者简介

王大志 男, 1970 年 12 月生。理学博士。现在厦门大学国家教委海洋生态环境开放研究实验室从事博士后研究工作。主要研究领域: 海洋微型浮游生物学。已发表论文 5 篇。

《中国环境科学》入网 China Info(中国信息)网络资源系统《电子期刊》

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,《中国环境科学》自 1998 年第 1 期入网“ChinaInfo(中国信息)网络资源系统《电子期刊》”。凡在本刊发表的论文将由编辑部统一纳入 ChinaInfo 信息服务系统,进入因特网提供信息服务。凡不同意将自己的论文纳入因特网传送交流的作者,请在来稿上注明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

ChinaInfo 系统是由国家科学技术部立项,中国科技信息研究所组织实施,万方数据网络中心编辑制作的开放式因特网信息资源系统,《电子期刊》作为国家“九五”科技攻关项目,是 ChinaInfo 系统中的重要信息服务栏目,读者可上因特网进入 ChinaInfo 系统(网址: <http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>) 免费(一年后开始酌情收费)查询、检索本刊内容,也欢迎读者通过 ChinaInfo 系统向《中国环境科学》编辑部提出宝贵意见、建议或征订本刊。

《中国环境科学》入编《中国学术期刊(光盘版)》

为了进一步促进环境学术交流和科研成果的应用与推广,《中国环境科学》自 1996 年第 5 期入编《中国学术期刊(光盘版)》,凡在《中国环境科学》上发表的论文,将同时在《中国学术期刊(光盘版)》上刊载。《中国学术期刊(光盘版)》免收作者版面费,并免费提供作者文章被引用率统计资料(联系地址:北京清华大学立斋《学术电子出版物》编辑部 邮编:100084)。凡不同意自己论文在《中国学术期刊(光盘版)》上刊载的作者,请在来稿上注明。

《中国环境科学》编辑部