

两种温度条件下苯酚对铜绿微囊藻 大型变种生长的影响

王习达, 吴国荣*, 陆长梅, 陈景耀, 沙莎, 王建安

(南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097)

摘要: 模拟春秋季节水温(22 ℃)和夏季水温(30 ℃)环境,用不同浓度的苯酚处理铜绿微囊藻大型变种。结果显示:正常水体中该藻在 30 ℃比 22 ℃生长快。浓度 $C \leq 200 \mu\text{g/mL}$ 的苯酚对它的生长有促进作用,而浓度 $C \geq 400 \mu\text{g/mL}$ 的苯酚则抑制其生长,高浓度苯酚胁迫下的藻细胞光合速率,可溶性蛋白含量下降;细胞膜透性增大;超氧阴离子(O_2^-)和丙二醛(MDA)相对含量升高;超氧化物歧化酶(SOD)活性降低;藻体自发荧光较对照减弱。表明该藻的生长更适合于夏季高温条件,且较高浓度苯酚对其有较强抑制作用。

关键词: 温度; 苯酚; 铜绿微囊藻大型变种; 生长

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)03-0281-05

Effect of phenol on the growth of *Microcystic aeruginosa* var. *major* under different temperature conditions

WANG Xi-da, WU Guo-rong, LU Chang-mei,
CHEN Jing-yao, SHA Sha, WANG Jian-an

(The College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: *Microcystic aeruginosa* var. *major* was retreated with different concentrations of phenol under the imitated normal temperature(22 ℃)and summer temperature(30 ℃). The result showed it grows faster under 30 ℃ than that of 22 ℃. Phenol whose concentration lower than or equal to 200 $\mu\text{g/mL}$ can accelerate its growth while inhibit it when the concentration was higher than 400 $\mu\text{g/mL}$. After being retreated with Phenol, the cell's photosynthetic O_2 evolution rate and soluble protein content decreased, the membrane permeability, the relative content of O_2^- , MDA increased, the SOD activity decreased and the intensity of its spontaneous fluorescence under treatment was weaker. All these illustrated *Microcystic aeruginosa* var. *major* was adapt to summer temperature, and phenol of high concentration could inhibit its growth seriously.

Key words: temperature; phenol; *Microcystic aeruginosa* var. *major*; growth

铜绿微囊藻大型变种(*Microcystic aeruginosa* var. *major*)是一种剧毒的藻类,其细胞内的微囊藻毒素(Microcystins)是一种肝毒性多肽,具有很强的

致癌毒性,危害水体中的食藻动物,败坏水质危害湖区人民身体健康(Hee-Mock等,2000)。同时它又是湖泊、水库及其他水域生态系统水体富营养化、发

收稿日期: 2003-06-20 修订日期: 2003-09-24

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(2000SWX0000SJ3)

作者简介: 王习达(1977-),男,安徽宿松人,硕士,主要从事植物生理生化方面的研究。*为联系作者

生水华的优势种群(Carmichael等,1992)。因此抑制有毒微囊藻的繁衍,防止水华的爆发,已成为人们关注的热点。大量生活和工业废水的排放,除N、P和重金属等污染物外,酚类等有机物在自然水体中的含量也相应增加,形成水环境污染的另一类化学因子。有关前者对铜绿微囊藻生长影响的研究已有详细报道(Kumar等,1982;Prassd等,1990;Yuan-kun等,1996),但对于在不同温度条件下水体中的酚对微囊藻生长状况的作用效应尚未见系统报道。本文模拟太湖流域春秋季节水温(22℃)和夏季水温(30℃)环境,着重研究了不同浓度苯酚对铜绿微囊藻大型变种生长状况及各项生理指标的影响,以期抑制此种藻类的繁衍,控制水华的爆发提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

铜绿微囊藻大型变种(*Microcystic aeruginosa* var. *major*)由南京大学藻类研究所曾昭祺教授分离鉴定。

1.2 处理方法

将处于对数生长期的鲜藻液接种于经灭菌的Detmer培养基(陈德辉等,1999)中,以光密度值(OD 560)代表藻的相对生物量,藻细胞的初始浓度为0.20光密度。分装于5组锥形瓶中(体积均为500 mL),分别加入苯酚,使各组苯酚的终浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)分别为0、100、200、400、600(其中0浓度即为对照组)。在光照培箱中以光强1500 lx,光暗比12 h/12 h培养。实验分两个温度处理组,一组培养温度为22℃,另一组为30℃。各实验组隔天定时取样测定藻液的OD 560 nm值。直至第6 d,收集藻体测定各项生理指标。

实验重复3次,文中所列数据均为各次实验平均值。

1.3 测定方法

酶液制备:参照唐萍等(2000)的超声破碎法。苯酚浓度测定:采用4-氨基安替比林显色法(李建宏等,2001)。藻细胞生长量测定:参照Vonshak(1986)的方法。光合速率的测定:按照李德跃等(1980)的薄膜氧电极法。可溶性蛋白含量测定:按照Bradford(1991)考马斯亮蓝G-250染色法。膜透性测定:参照谢田等(1986)的紫外吸收法。以非电

解质外渗率表示。丙二醛(MDA)含量测定:参照Heath(1968)的硫代巴比妥酸(TBA)比色法。超氧阴离子(O_2^-)相对含量测定:参照王爱国等(1990)的方法;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定:按照Stwert和Bewley(1980)的方法。激光共聚焦(confocal)自发荧光强度检测:参照肖艳梅等(1999)的方法。

2 结果与分析

2.1 对生长量的影响

在不加苯酚处理时,30℃水温条件下藻的生长明显较在22℃水温条件下生长快。30℃水温培养至第六天较初始接种量增加了273.5%,而22℃组仅增长60.5%(图1)。表明水温升高可显著提高受试藻的生长量。在两个温度处理组中,低浓度($C \leq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$)的苯酚对藻的生长表现出促进作用,随着苯酚处理浓度的加大,藻生长受抑制的状况愈趋明显。在600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理浓度下,22℃水温时,第六天藻生物量为其初始值的75%,而30℃水温下则急剧下降为44.5%。实验结果显示,受试藻在两个实验温度条件下生长速率较快时对苯酚浓度的升高更为敏感。

2.2 对光合速率及可溶性蛋白含量的影响

光合速率是藻体生长代谢重要的生理指标。不加苯酚的对照组在30℃水温下光合速率较22℃时有较大的增长,此时光合速率是22℃时的168.46%,低浓度的苯酚对受试藻的光合速率具有促进作用,22℃时,在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,光合速率有所增加,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时亦无明显变化,但水温的升高,使藻光合速率对苯酚浓度的加大更为敏感,水温至30℃时,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯酚下藻光合速率开始显著下降,幅度达到34%,更高苯酚浓度实验组的光合速率几乎呈直线下降。至600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,光合速率仅为对照组的10.9%,而水温22℃时,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组光合速率只降至对照组的48.3%(图2)实验结果表明:受试藻光合速率在实验条件下的变化与它们在该条件下的生长状态是一致的。

细胞内可溶性蛋白含量往往与细胞的代谢强度直接有关,此项指标测定的结果显示,在22℃和30℃水温条件下,藻细胞可溶性蛋白含量的变化及其受苯酚浓度升高的影响与其光合速率的变化有着非常相似的趋势。表明受试藻在不同的水温条件下,对不同苯酚浓度的反应是有其内在生理机制的。

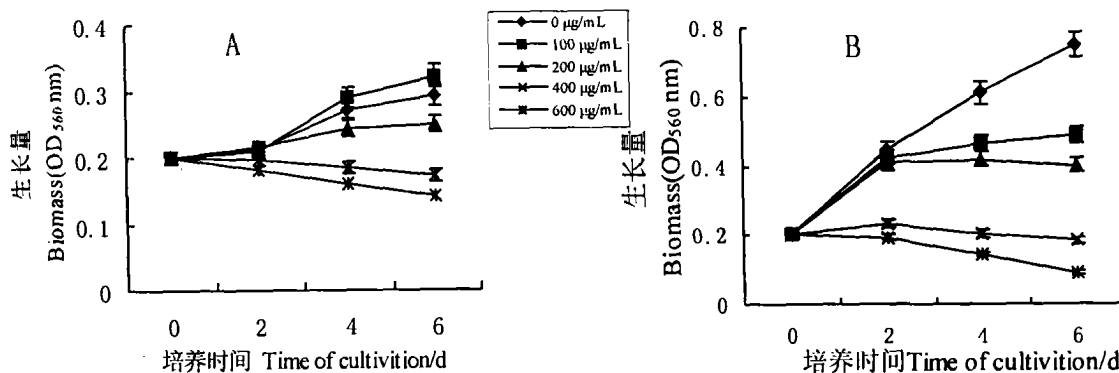


图 1 苯酚对生长量的影响

Fig. 1 Effect of phenol on the growth

A, 22 °C 生长量; B, 30 °C 生长量。

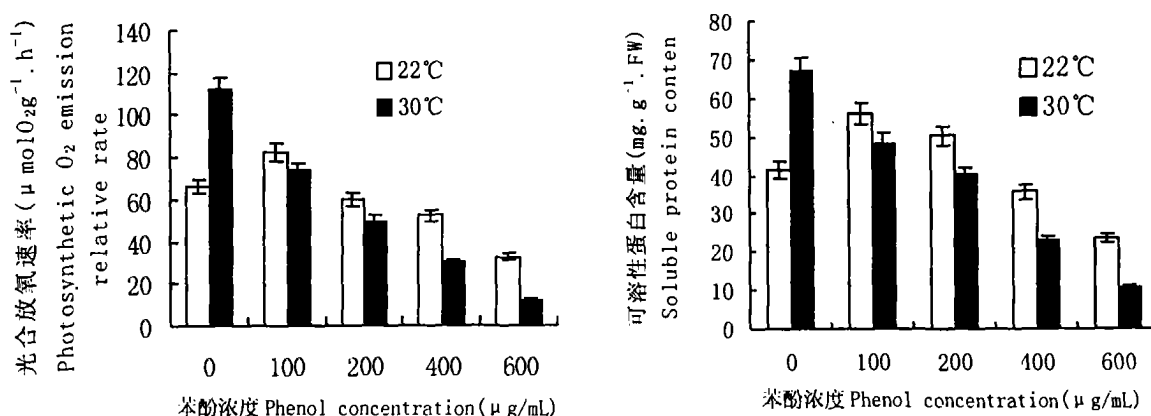


图 2 苯酚对光合速率和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of phenol on the photosynthetic O₂ evolution relative rate and soluble protein content

2.3 对膜透性及 MDA 含量的影响

随着苯酚浓度的加大,藻细胞非电解质外渗率逐渐升高。浓度 $C \geq 400 \mu\text{g/mL}$ 时膜透性发生明显变化,22 °C 水温条件下,在 600 $\mu\text{g/mL}$ 浓度苯酚处理组,藻细胞非电解质外渗率急剧上升,达初始对照的 204.16%。30 mL 水温时,400 $\mu\text{g/mL}$ 浓度苯酚处理组,膜透性是初始对照的 195.24%,600 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组有所降低,其原因可能是该浓度下处理 6 d 已经使藻细胞内非电解质严重外泄(图 3)。

MDA 在细胞内的累积量通常被用来作为膜脂过氧化的指标。实验结果显示,MDA 含量总体变化趋势与膜透性基本相对应,随着苯酚浓度的加大,藻细胞内 MDA 含量呈升高趋势。提示苯酚浓度增大有促进藻细胞膜脂过氧化反应的效应,而处理温度的升高加剧了这一过程(图 3)。

2.4 对 O₂⁻ 相对含量和 SOD 活性的影响

O₂⁻ 是逆境胁迫的产物,超氧化歧化酶 SOD 催

化 O₂⁻ 成为 O₂ 和 H₂O₂ 的歧化反应,是机体内极为重要的保护酶,在机体受到胁迫和损伤的状态下 SOD 活性会相应变化。实验结果表明,O₂⁻ 相对含量变化趋势与 MDA 含量及膜透性变化趋势基本相对应。较低浓度苯酚 ($C \leq 200 \mu\text{g/mL}$) 对藻细胞 SOD 活性有不同程度的促进作用,这可能就是所谓的应激性反应。苯酚浓度 $C \geq 400 \mu\text{g/mL}$ 时藻细胞的 SOD 活性都大幅度下降。30 °C 时藻活性变化比 22 °C 时更显著(图 4)。

2.5 对自发荧光强度的影响

在激光共聚焦显微镜扫描下,植物体细胞自发荧光的强弱在一定程度上反映了细胞生命力的强弱。图 5 为两种温度下处理 6 d 时 600 $\mu\text{g/mL}$ 苯酚处理组与各自对照组的荧光强度经 Laserssharp 软件处理后的数据示意图。结果显示 30 °C 水温时对对照组荧光强度最强,而相同温度条件下 600 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组荧光强度最弱。

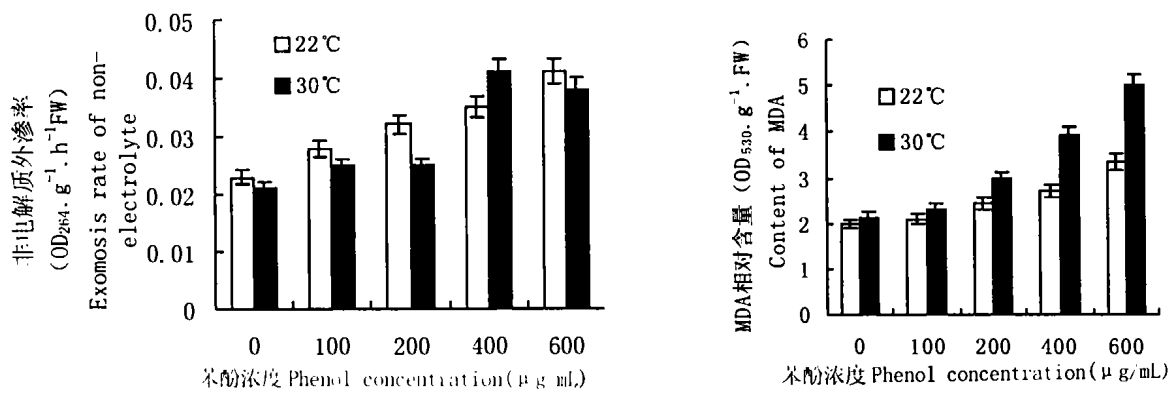


图 3 苯酚对膜透性和 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effect of phenol on the membrane permeability and the relative content of MDA

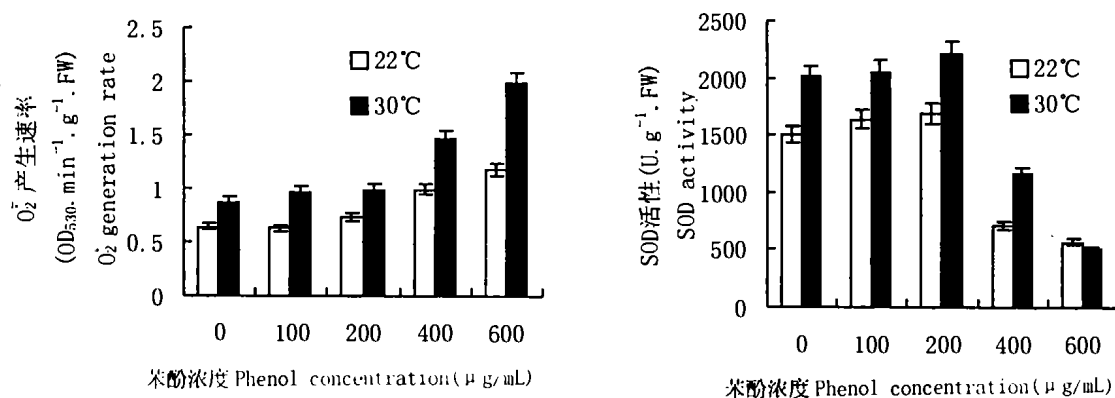


图 4 苯酚对 O₂⁻ 含量和 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of phenol on the relative content of O₂⁻ and the SOD activity

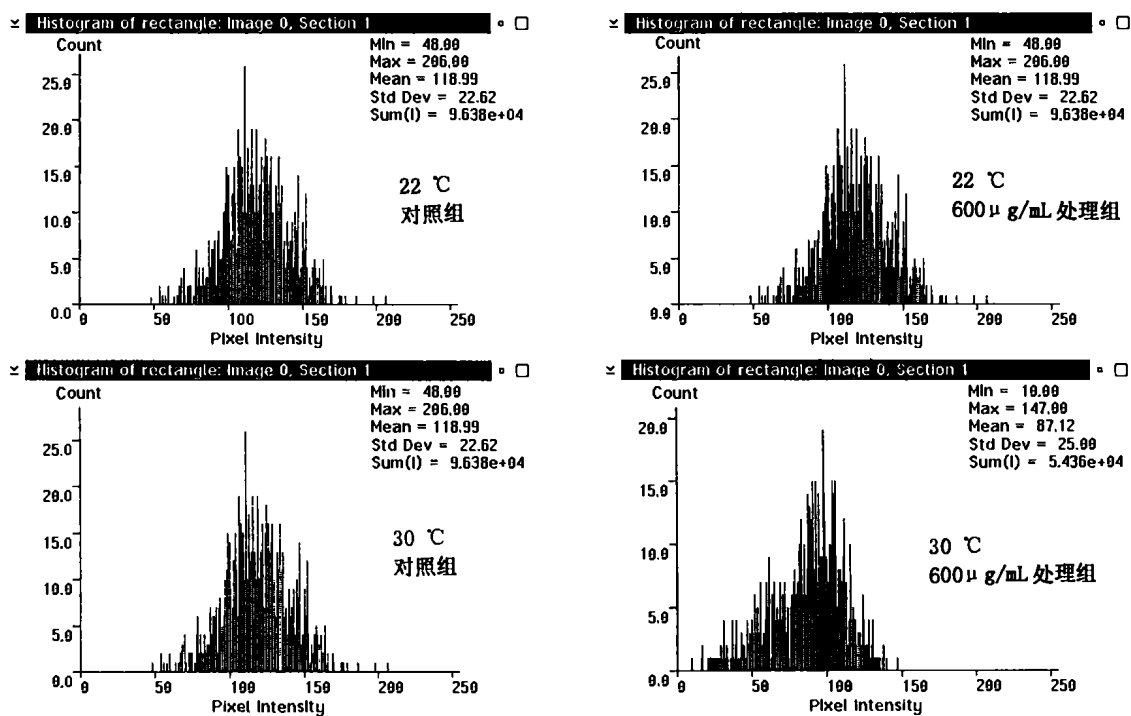


图 5 苯酚对自发荧光强度的影响

Fig. 5 Effect of phenol on the intensity of spontaneous fluorescence

3 讨 论

在模拟夏季水温的条件下,铜绿微囊藻大型变种生长量增加,光合速率和可溶性蛋白含量升高,藻细胞自发荧光增强,表明它是喜温的藻种,水温升高有利于促进微囊藻生长并形成水华。

实验选用不同浓度的苯酚模拟水体中酚类物质的有机污染,结果显示低浓度($C < 200 \mu\text{g}/\text{mL}$)苯酚对受试藻种有促进生长的效应, $C > 200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时才显现抑制效应,浓度越高这种抑制效应显现的越快愈明显。表明该藻种对苯酚有一定的耐受能力,这与 Klekner 等(1992)的报道是一致的,低浓度苯酚可以作为受试藻代谢所需要的碳源,而高浓度苯酚促使藻细胞蛋白质变性,膜透性增大,光合速率大幅度降低,破坏活性氧代谢平衡等。激光共聚焦测定的受试藻细胞自发荧光强弱的变化与受到苯酚胁迫损伤的程度密切相关。这些都表明此时苯酚已成为水体中明显的胁迫因子,抑制铜绿微囊藻大型变种的生长。

苯酚浓度 $C \geq 400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时能强烈抑制铜绿微囊藻大型变种这一水华优势种群的生长,有效抑制了水华形成的基础。对于受试藻而言苯酚既可做碳源又是一种胁迫因子,其界限取决于苯酚的浓度和藻细胞的生命活动的强度,而藻生命活动强度又与水温密切相关,因此在夏季富营养化条件下选择合适的苯酚处理浓度可以有效抑制铜绿微囊藻大型变种的繁衍,防治水华危害。

参考文献:

- Bradford MM. 1991. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein synthesis in tortulia[J]. *Plant Physical*, **95**: 648.
- Carmichael WW. 1992. cyanobacteria secondary Metabolites—the cyanotoxin[J]. *Journal of Applied Bactriology*, **72**: 445—459.
- Chen DH(陈德辉), Liu YD(刘永定), Yuan JF(袁俊峰), et al. 1999. Experiments of mixed culture and calculation of competitive parameters between *Microcystis* and *Scenedesmus*(微囊藻和栅藻共培养实验及其竞争参数的计算)[J]. *Acta Ecologica Sinica*(生态学报), **19**(6): 908—909.
- Hee-Mock oh, Seog June Lee, Min-Ho Jang, et al. 2000. Microstin production by *Microstis aeruginose* in a phosphorous-limited chemostat[J]. *Appl Environ Microbiol*, **66**(1): 176—179.
- Heath RL, Parker L. 1968. Photoperitition in isolated diloroplasts kinetics and stoichimetry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biophys*, **75**: 189—198.
- Li JH(李建宏), Yuan J(袁俊), Ni X(倪霞), et al. 2001. Effect of phenol on the growth of *Spirulina Maxima* (酚对极大螺旋藻生长的影响)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*(水生生物学报), **25**(3): 294—296.
- Li YD(李跃德), Ye JY(叶济宇). 1980. The production of thin-membrane oxygen electrode and the measure of breath and photosynthetic control(薄膜氧电极的制作与呼吸或光合控制的测定)[J]. *Plant Physiol Commum*(植物生理学通讯), **1**: 35—40.
- Kumar D. jha M, Kumar HD. 1982. Heavy metal toxicity in the cyanobacterium *Nostoc linckia* [J]. *Aquatic Botany*, **22**: 101—105.
- Klekner V, Kosaric N. 1992. Degradation of Phenols by algae[J]. *Environ Technol*, **13**: 493—501.
- Prassd PVD. 1990. Effect of Cd, Pb and Ni on three freshwater green algae[J]. *Wat Air Soil Pollut*, **50**(1,2): 19—30.
- Stewart RC, Bewley JD. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. *Plant Physiol*, **65**: 245—248.
- Tang P(唐萍), Wu GR(吴国荣), Lu CM(陆长梅), et al. 2000. Effect of the excretion from root system of *Eichhornia crassipeson* the cell structure and metabolism of *scenedes mus areuatus*(凤眼莲根系分泌物对栅藻结构及代谢的影响)[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*(环境科学学报), **20**(3): 355—359.
- Vonshak A. 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalga. Handbook of Microalgal Mass Culture[M]. Boca Raton: Arichmond CRC Press, 117.
- Wang AG(王爱国), Luo GH(罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants(植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系)[J]. *Plant Physiol Commum*(植物生理学通讯), **6**: 55—57.
- Xiao YM(肖艳梅), Fu DL(付道林), Li AS(李安生). 1999. Laser Scanning Confocal Microscope(LSCM) and its application in biology(激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)及其生物学应用)[J]. *Acta Laser Biology Sinica*(激光生物学报), **8**(4): 305—307.
- Xie T(谢田), Xu ZJ(徐中际). 1986. Ultraviolet absorption method for determination of cell membrane permeability(测定细胞膜透性的紫外吸收法)[J]. *Plant Physiol Commum*(植物生理学通讯), **1**: 45—46.
- Yuan-kun L. 1996. Microtrophic growth of *chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photo-bioreactor[J]. *Appl Phycology*, **8**: 163—169.