

微尼海双眉藻对重金属短期胁迫的生理及形态响应

李 新, 付志鑫, 母伟杰, 刘 妍, 范亚文*

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 水生生物实验室, 哈尔滨 150025)

摘 要: 为了探讨底栖硅藻微尼海双眉藻 [*Halamphora veneta* (Kützing) Levkov] 对重金属胁迫的响应机制, 该研究分析了不同浓度的 4 种重金属 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对微尼海双眉藻处理 96 h 后, 其细胞密度、叶绿素 a 含量、丙二醛含量以及形态结构的变化。结果显示: (1) 低浓度的重金属处理会促进微尼海双眉藻的生长, 而高浓度的重金属胁迫会抑制微尼海双眉藻的生长。(2) 微尼海双眉藻叶绿素 a 对较低浓度的 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫均比较敏感, 表明叶绿素 a 含量可以成为硅藻反映重金属含量的有效指标。(3) 低浓度的重金属胁迫对微尼海双眉藻的丙二醛含量影响不明显, 而高浓度的重金属胁迫会促进微尼海双眉藻的丙二醛含量显著升高。(4) Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫不会引起微尼海双眉藻的明显细胞形变, 而低浓度 Hg^{2+} 胁迫就会使微尼海双眉藻出现细胞膨大及畸形等变化。研究表明, 微尼海双眉藻对于重金属胁迫具有某种耐受机制, 其叶绿素 a 含量以及形态变化可以作为水体重金属污染的监测指标。

关键词: 微尼海双眉藻; 重金属胁迫; 细胞密度; 丙二醛; 叶绿素 a; 形态变化

中图分类号: Q945.79 文献标志码: A

Physiological and Morphological Responses of *Halamphora veneta* (Kützing) Levkov to Acute Heavy Metals Stress

LI Xin, FU Zhixin, MU Weijie, LIU Yan, FAN Yawen*

(Laboratory of Aquatic Organism, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: To investigate the response mechanism of *Halamphora veneta* (Kützing) Levkov to heavy metal stress, we analyzed the effects of different concentrations of four heavy metal, including Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} treatments on its cell density, chlorophyll a, malondialdehyde content and morphological changes. The results showed that: (1) low concentration of heavy metal treatment promoted the growth of *H. veneta* (Kützing) Levkov, while high concentration of heavy metal inhibited the growth of *H. veneta* (Kützing) Levkov. (2) The results of chlorophyll a showed that the *H. veneta* (Kützing) Levkov was sensitive to low concentration of Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} , thus the chlorophyll a content of diatoms could be an effective index for the heavy metal monitor. (3) It is showed that the effect of low concentration of Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on the malondialdehyde (MDA) content in *H. veneta* (Kützing) Levkov was not obvious, while the content of MDA in the *H. veneta* (Kützing) Levkov was promoted by the high concentration of heavy metal. (4) The morphological changes of the cells showed that Cu^{2+} , Cd^{2+} and

收稿日期: 2017-04-25; 修改稿收到日期: 2017-08-16

基金项目: 国家自然科学基金(31470308, 31601866); 黑龙江省自然科学基金(C2015021)

作者简介: 李 新(1993-), 女, 硕士, 主要从事水生生物毒理学研究。E-mail: 13214603808@163.com

* 通信作者: 范亚文, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事水生生物学分类及生态学研究。E-mail: fanyaw@163.com

Pb²⁺ treatment did not cause obvious deformation of *H. veneta* (Kützing) Levkov, and Hg²⁺ treatment could cause the expansion and deformity of the cells. The above results showed that the *H. veneta* (Kützing) Levkov possess tolerance mechanism for heavy metal stress, meanwhile, its chlorophyll a content and morphological changes could be used as the water monitoring index for heavy metal pollution.

Key words: *Halamphora veneta* (Kützing) Levkov; heavy metal treatment; cell density; malondialdehyde content; chlorophyll a; morphological change

重金属污染是全世界普遍关注的环境问题之一,大量的重金属通过工业污染等方式排入水体,这些重金属在水生生物体内富集并且最终危害人类健康^[1]。铜、汞、铅和镉都是造成污染的主要重金属元素。铜是生命体所必须的微量元素,但过量的铜摄入会对机体细胞产生危害^[1]。汞离子进入生物体内很难被排出,且浓度偏高时,会对机体的大脑、神经、视力造成极大损害,因此汞浓度是水体环境监测的必测项目之一^[2]。铅对藻类的影响主要表现在降低叶绿素含量及破坏细胞核结构,阻碍植物光合作用和新陈代谢,从而导致其生长受到抑制^[3]。镉是一种分散元素,其来源十分广泛,如农药、化肥的使用以及工业生产废渣等^[4],其对植物的危害表现在抑制光合作用和影响代谢酶活性等^[5]。传统的化学物理监测水质方法具有时效性短和潜在生态风险等缺点,随着生物监测技术的发展,水生生物在水质监测中的作用日益受到人们的重视。

藻类作为水体中重要的初级生产者,在水生生态系统中起到了举足轻重的作用,其个体小、繁殖较快,对环境变化十分敏感,因此可以作为生物监测的对象^[6]。重金属对于低等水生生物的生长、繁殖、生理和生物化学等方面均会产生影响^[7-10]。例如,绿藻受到 Cu²⁺ 胁迫后其细胞密度发生了明显变化^[11],而 Zn²⁺ 胁迫绿球藻会使其丙二醛(MDA)含量在胁迫浓度较高时出现显著升高^[12]。许多研究表明,硅藻细胞寿命短,对环境变化能够快速反应^[13],同时是水体中的初级生产者,参与物质能量流动^[14],可以作为污染物的指示生物。其中,底栖硅藻通常固定生活于某一处生境,由于不能通过迁移或其他方式躲避水体中污染物的影响,因此通过它们可以较为准确地判断水质的变化^[15]。然而,目前对于底栖硅藻的研究主要集中于重金属污染导致硅藻群落的变化等方面,对其受到胁迫后生理以及形态变化研究较少。

因此本实验以底栖硅藻微尼海双眉藻 [*Hal-amphora veneta* (Kützing) Levkov] 为研究对象,考察 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 这 4 种重金属对其

生长、色素含量、丙二醛含量和细胞形态的急性胁迫影响,探讨微尼海双眉藻对铜、汞、镉和铅胁迫的生理学响应以及可能的耐受机制。

1 材料和方法

1.1 实验藻种培养

微尼海双眉藻 [*Hal-amphora veneta* (Kützing) Levkov] 由哈尔滨师范大学水生生物实验室提供。(1)土壤浸出液配制:取未施肥花园土 200 g 置于烧杯或者三角瓶中,加入蒸馏水 1 L,瓶口用透气塞封口,在沸水浴加热 3 h,冷却,沉淀 24 h,重复这个过程 3 次,过滤,取上清液,高压灭菌后 4 ℃ 保存。(2)培养基:经多次试验采用适合微尼海双眉藻生长的 CSI 培养基,CSI 培养基成分见表 1。将配置好的培养基基础液与土壤浸出液按一定比例混合,用 HCl 液体将 pH 值调到 7.0,4 ℃ 保存。(3)培养条件:温度 20 ℃,光暗周期 12 h : 12 h,光照强度 4 000 lx。每日定时摇匀藻液 3 次,以防硅藻附在玻璃壁上。

1.2 急性毒性实验

选取处于对数生长期的微尼海双眉藻进行急性毒性实验。藻种的初始密度为 1×10^4 cells · mL⁻¹,在 100 mL 培养瓶中加入藻液 50 mL。根据预实验结果,Cu²⁺ 胁迫递进浓度设置为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹;Hg²⁺ 浓度设置为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg · L⁻¹;Cd²⁺ 浓度设置为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg · L⁻¹;Pb²⁺ 浓度设置为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg · L⁻¹,并设置对照组。每个处理组及对照组设 3 个重复,置于 20 ℃ 的恒温培养箱中。每天定时摇匀 3 次,处理 96 h 后取样进行相关指标测定。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 细胞密度 对微尼海双眉藻采用上述浓度的 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 胁迫 96 h 后,采用血球计数板进行细胞计数。

1.3.2 叶绿素 a 含量 采用分光光度计法^[16],采用不同浓度的 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 胁迫 96 h 后,

表 1 CSI 培养基成分

Table 1 Components of culture medium CSI

编号 Code	组份 Component	浓度 Concentration	用量 Consumption
1	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	15 g/100 mL dH ₂ O	1 mL/L
2	KNO ₃	10 g/100 mL dH ₂ O	1 mL/L
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 g/100 mL dH ₂ O	1 mL/L
4	β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	2.5 g/100 mL dH ₂ O	1 mL/L
5	Vitamin B ₁₂	0.1 μg/L	
6	Biotin	0.1 μg/L	
7	Thiamine HCl	10 μg/L	
8(PIV)	Na ₂ EDTA	0.75 g/L dH ₂ O	
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.097g/L dH ₂ O	
	ZnCl ₂ · 7H ₂ O	0.05 g/L dH ₂ O	6 mL/L
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.002 g/L dH ₂ O	
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.041 g/L dH ₂ O	
	Na ₂ Mo ₄ O ₄ · 2H ₂ O	0.004 g/L dH ₂ O	
9	HEPES	0.5 g/L	
10	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	0.1 g/L	
11	土壤浸出液 Soil extract	30 mL/L	

将藻液摇匀并取 10 mL 置于离心管中,5 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液,加入 10 mL 95%乙醇,避光置于 4 ℃ 的冰箱中 24 h 后取出提取液,4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,分别在 649 和 665 nm 波长下测定其吸光度 A_{649} 和 A_{665} ,以 95%乙醇为参比调零,用以下公式计算叶绿素 a 含量。

叶绿素 a 含量(mg · L⁻¹): $Chla=13.95A_{665}-6.88A_{649}$

1.3.3 丙二醛含量 采用 TBA 法^[17],经不同浓度的 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 胁迫处理藻液 96 h 后,向试管藻液中加入 2 mL 待测酶液和 2 mL 的 0.5%硫代巴比妥酸溶液,混匀,于沸水浴上反应 20 min,迅速将试管放到冰水中快速冷却后离心,取上清液分别于 532、600 及 450 nm 下测定吸光度值 A_{532} 、 A_{600} 和 A_{450} 。对照管用 2 mL 蒸馏水代替酶液,按下式计算。

MDA 含量 C(μmol · L⁻¹)= $6.45(A_{532}-A_{600})-0.56A_{450}$

1.3.4 形态观察 采用不同浓度(EC₅₀ 值)的 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 胁迫处理藻液 96 h 后,对每个样品用酸处理后用 Naphrax 胶制成硅藻永久封片。采用光学显微镜(ZeissA2 型)进行观察并拍照。

1.3.5 半抑制浓度 藻细胞的生长抑制率公式为: $X(\%)=(I_0-I)/I_0$ 。式中, X 为细胞生长抑制率, I_0 为对照组, I 为实验组。

1.4 数据处理

实验数据通过 Excel 2003 作图和 SPSS 20.0 软件的 Probit 计算得出 EC₅₀,同时进行 ANOVA 分析,显著性水平为 0.05($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 重金属胁迫后微尼海双眉藻的细胞密度变化

图 1 显示,在不同浓度 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 重金属胁迫 96 h 后,微尼海双眉藻细胞密度随着金属离子浓度增加而呈现先上升后下降的趋势。首先,微尼海双眉藻细胞密度在 Cu²⁺ 胁迫浓度为 0.05 和 0.1 mg · L⁻¹ 时分别比对照显著增长 24% 和 19% ($P<0.05$),而在 Cu²⁺ 胁迫浓度为 1.0 和 2.0 mg · L⁻¹ 时却分别比对照显著降低 35% 和 71%(图 1,A)。其次,细胞密度在 Hg²⁺ 胁迫处理浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时比对照组增加 8%,表明微尼海双眉藻对此浓度的 Hg²⁺ 具有一定耐受性;而在 Hg²⁺ 胁迫浓度为 5.0 和 10.0 mg · L⁻¹ 时却比对照组分别显著降低 55% 和 91%(图 1,B)。再次,细胞密度在 Cd²⁺ 胁迫浓度为 0.05 mg · L⁻¹ 时比对照组显著增加 24%,而在 Cd²⁺ 胁迫浓度为 1.0 和 2.0 mg · L⁻¹ 时却分别显著下降 54% 和 77%(图 1,C)。另外,细胞密度在 Pb²⁺ 胁迫浓度为 0.1 mg · L⁻¹ 时比对照组显著上升 16%,而当处理浓度为 20.0 mg

·L⁻¹时却显著下降76%(图1,D)。与此同时,使用回归曲线模拟计算得出Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺和Pb²⁺4种重金属胁迫96h后对微尼海双眉藻的半抑制效应浓度(EC₅₀)分别为1.49、4.97、1.20和15.46mg·L⁻¹。以上结果表明,微尼海双眉藻对于低浓度的重金属胁迫存在一定程度耐受性,然而高浓度的重金属胁迫将会对其产生有害影响;在4种重金属中,微尼海双眉藻对Cu²⁺和Cd²⁺胁迫较敏感,对Pb²⁺胁迫耐性相对较强。

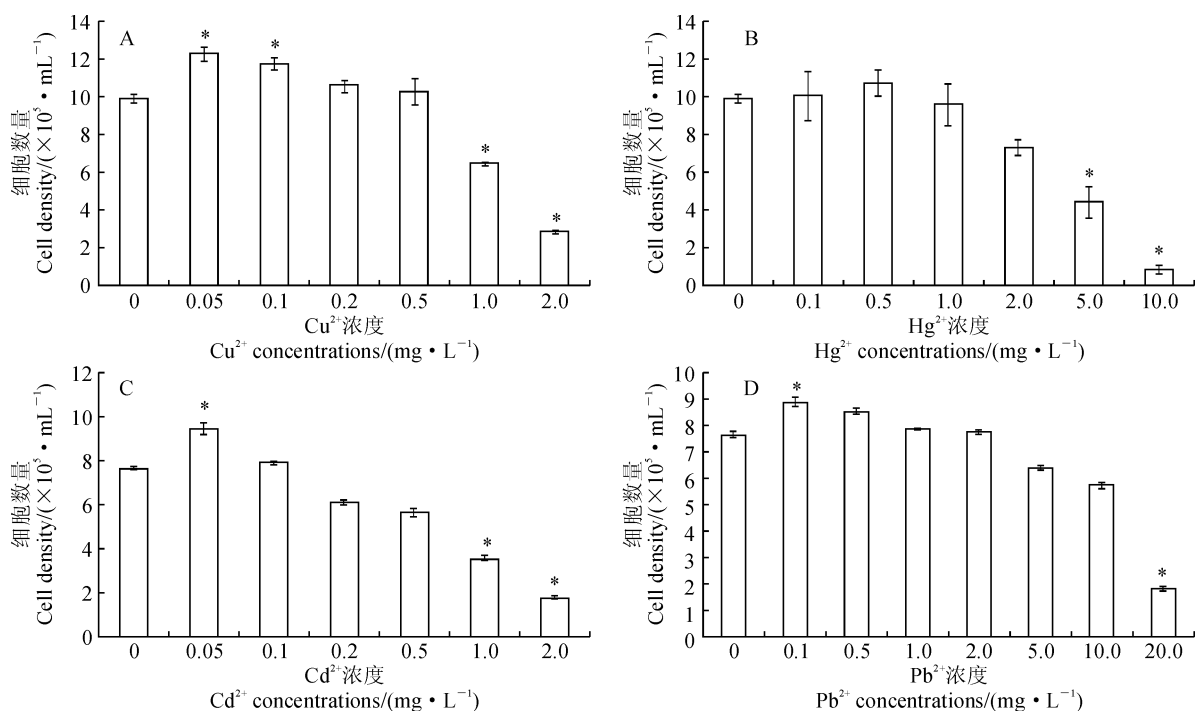
2.2 重金属胁迫后微尼海双眉藻叶绿素a含量变化特征

首先,微尼海双眉藻叶绿素a含量在Cu²⁺胁迫浓度为0.05、0.1和0.2mg·L⁻¹时比对照分别显著增长64%、141%和83%($P < 0.05$),而在Cu²⁺胁迫浓度为2.0mg·L⁻¹时却显著降低75%(图2,A)。其次,叶绿素a含量在Hg²⁺胁迫浓度为0.1和0.5mg·L⁻¹时比对照组分别显著增长23%和18%,而在Hg²⁺胁迫浓度为5.0和10.0mg·L⁻¹时却分别显著下降23%和42%(图2,B)。再次,叶绿素a含量在Cd²⁺胁迫浓度为0.05、0.1和0.2mg·L⁻¹时比对照组分别显著增长44%、29%和

26%,而在Cd²⁺胁迫浓度为2.0mg·L⁻¹时却显著下降33%(图2,C)。另外,叶绿素a含量在Pb²⁺胁迫浓度为0.1和0.5mg·L⁻¹时比对照分别显著增长85%和247%,而当Pb²⁺胁迫浓度为20.0mg·L⁻¹时却显著下降60%(图2,D)。以上结果表明,微尼海双眉藻对于低浓度或高浓度的重金属胁迫反应都比较敏感,具有指示作用;然而,对于中高浓度的重金属胁迫,其叶绿素a含量并没有受到显著抑制。

2.3 重金属胁迫后微尼海双眉藻的丙二醛含量变化特征

微尼海双眉藻MDA含量在Cu²⁺胁迫浓度低于0.1mg·L⁻¹时与对照组无显著差异,而当Cu²⁺胁迫浓度高于0.1mg·L⁻¹时却大幅度显著增加(图3,A)。同时,MDA含量仅在Hg²⁺胁迫浓度为5.0和10.0mg·L⁻¹时比对照组显著增加,其余Hg²⁺胁迫浓度胁迫下却与对照无显著差异(图3,B)。MDA含量在Cd²⁺胁迫浓度高于0.05mg·L⁻¹时均都比对照组大幅度显著增加(图3,C)。另外,MDA含量在Pb²⁺胁迫浓度为5.0、10.0和20.0mg·L⁻¹时比对照组显著增加,其余Pb²⁺胁迫浓度



* 表示处理组与对照组间在0.05水平存在显著性差异;下同

图1 不同浓度Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺和Pb²⁺胁迫96h后微尼海双眉藻的细胞数量变化

* stands for the significant difference between the treatment and control at the 0.05 level; the same as below

Fig. 1 The cell density of *H. veneta* (Kützinger) Levkov treated by different concentrations of Cu²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ for 96 h exposure

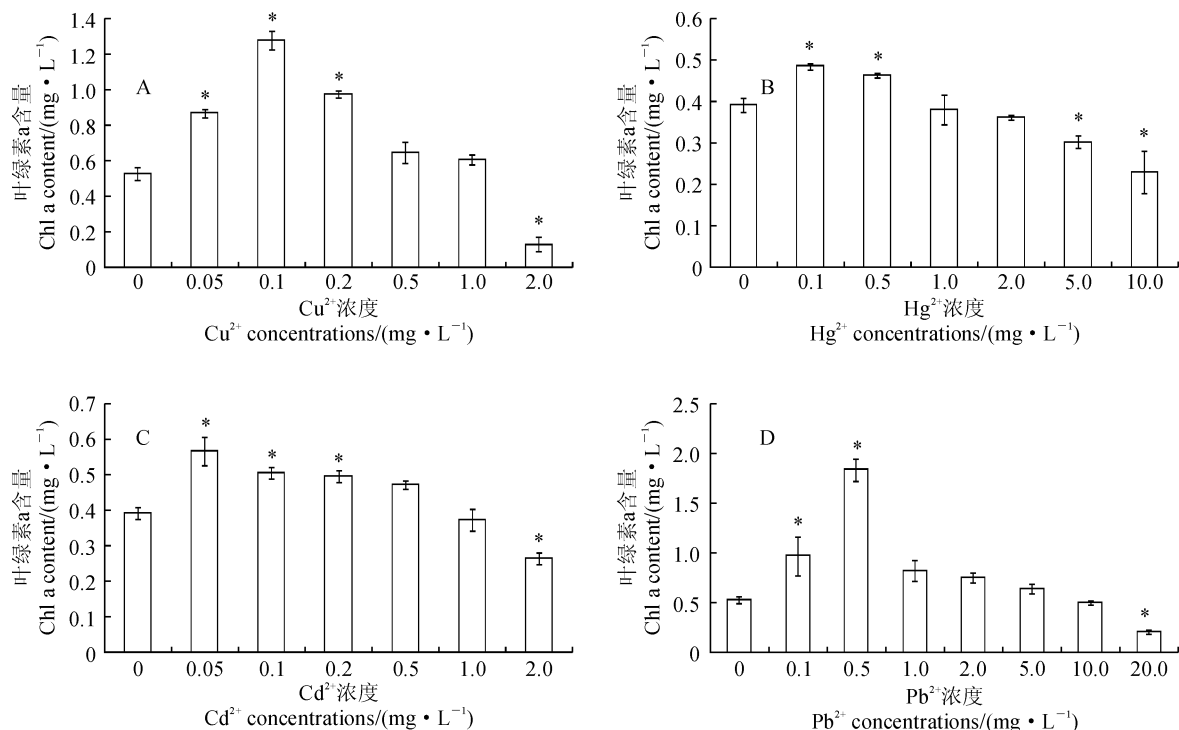


图2 不同浓度 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 胁迫 96 h 后微尼海双眉藻的叶绿素 a 含量

Fig. 2 The chlorophyll a content of *H. veneta* (Kützing) Levkov treated by different concentrations of Cu²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ for 96 h exposure

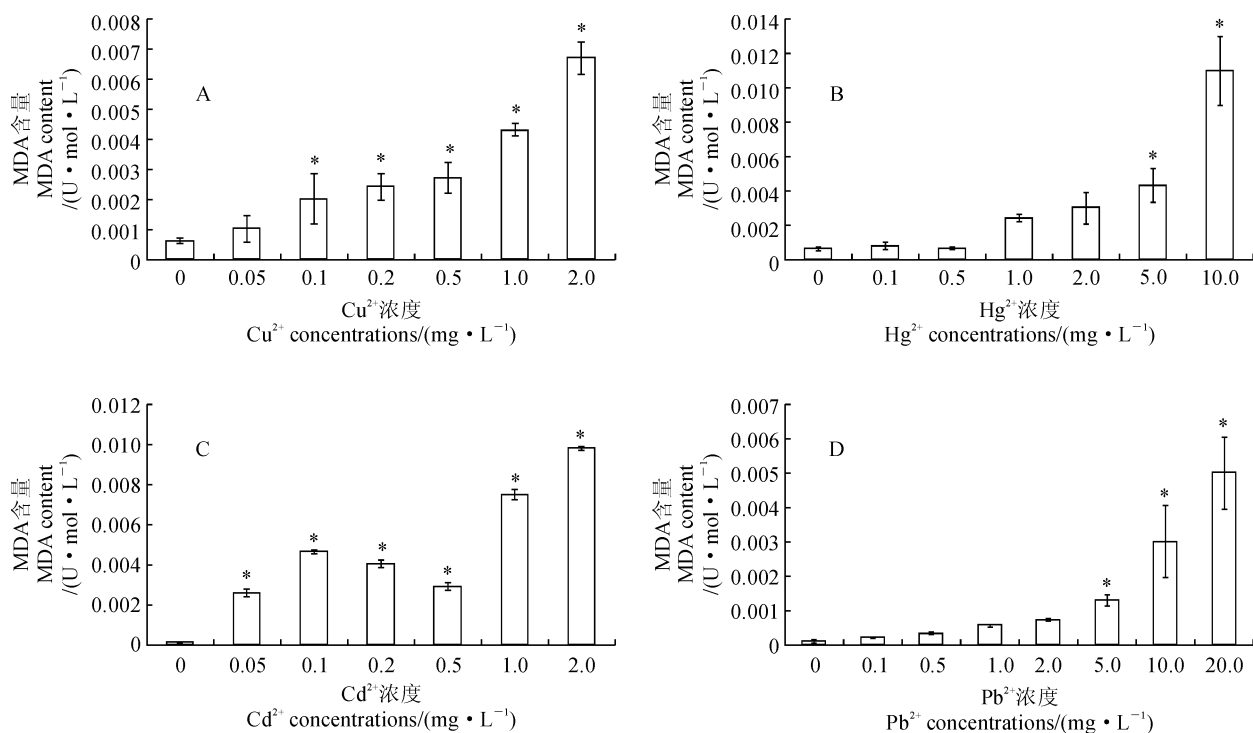


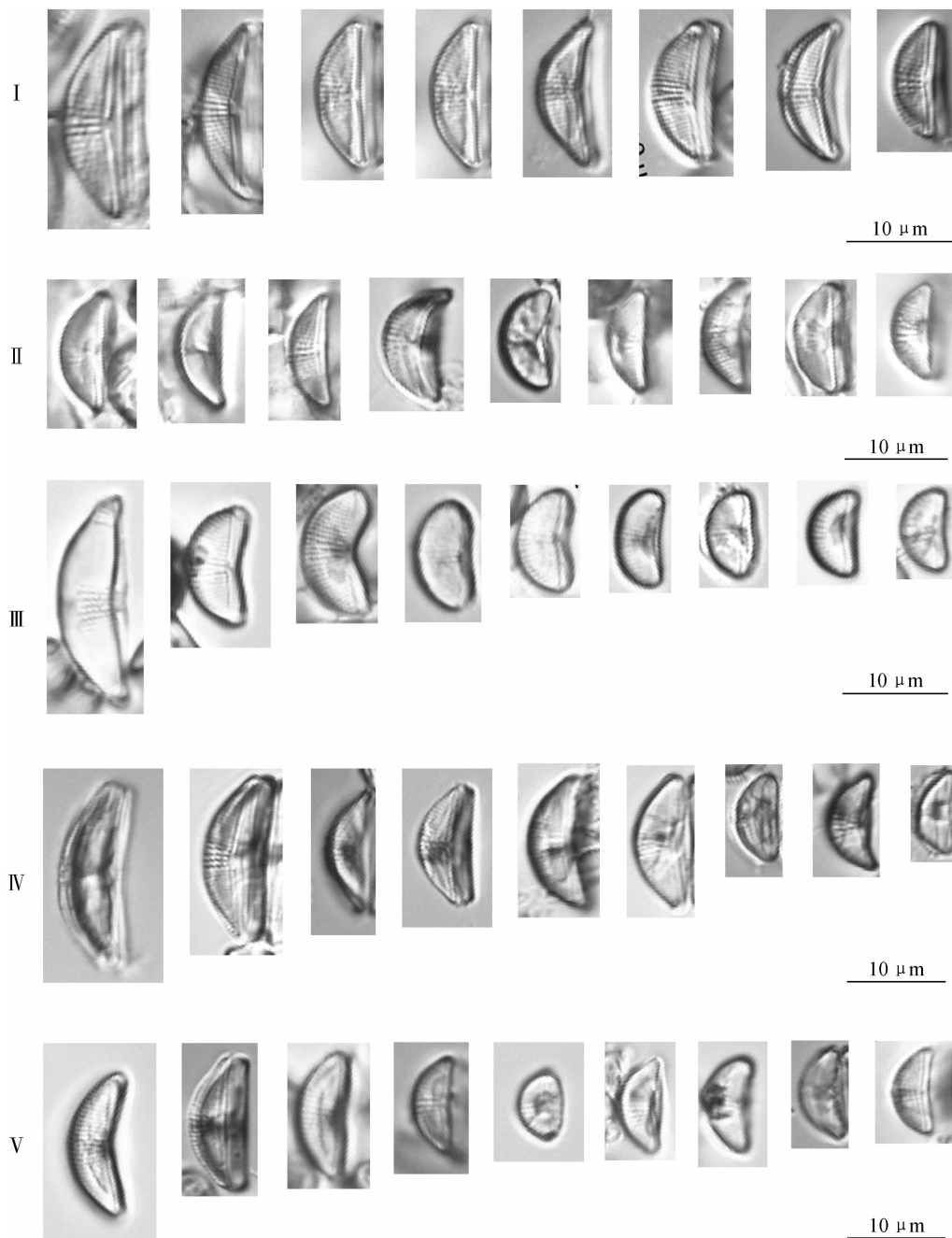
图3 不同浓度 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 胁迫 96 h 后微尼海双眉藻的丙二醛含量

Fig. 3 The MDA content of *H. veneta* (Kützing) Levkov treated by different concentrations of Cu²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ for 96 h exposure

胁迫下却与对照无显著差异(图 3,D)。以上结果表明,微尼海双眉藻的丙二醛含量对于低浓度的重金属胁迫反应较不敏感,然而高浓度的重金属胁迫会显著提高其丙二醛含量;相比较而言,微尼海双眉藻的丙二醛含量对重金属 Cd^{2+} 胁迫的反应最为敏感。

2.4 重金属胁迫后微尼海双眉藻的形态变化特征

采用不同重金属胁迫浓度(EC_{50})处理硅藻96 h后,选择藻体形态变化明显(图 4)并且数量较多的细胞进行观察。由图 4 可以看出,在本研究中,未进行重金属胁迫的微尼海双眉藻细胞形态完整,壳面



I. 对照; II. Cu^{2+} 胁迫($1.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); III. Hg^{2+} 胁迫($4.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); IV. Cd^{2+} 胁迫($1.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V. Pb^{2+} 胁迫($15.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 4 不同重金属(EC_{50})胁迫 96 h 条件下微尼海双眉藻细胞形态变化特征

I. Control; II. Cu^{2+} stress($1.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); III. Hg^{2+} stress($4.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); IV. Cd^{2+} stress($1.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V. Pb^{2+} stress($15.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 4 The morphology of *H. veneta* (Kützing) Levkov under heavy metal stress for 96 h

呈半披针型,有明显的背腹之分,腹缘近平直或略凹入,两末端狭圆形或向内略弯曲(图 4, I);经 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫后微尼海双眉藻细胞形态亦无明显变化(图 4, II、IV、V);然而经 Hg^{2+} 胁迫后,其细胞出现不规则变形,背缘略鼓起,腹缘明显凹入,细胞两端略钝圆,且细胞膨大(图 4, III)。其原因可能是细胞内高尔基体囊泡迁移至细胞壁,叶绿体遭到破坏而变形,导致细胞壁松散,细胞内液数量增多,体积变大,从而导致细胞膨胀^[18]。由此可见, Hg^{2+} 胁迫会明显改变硅藻细胞形态,而 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫对于细胞形态改变不大,该结果说明微尼海双眉藻形态变化可以作为水体中重金属 Hg^{2+} 的环境监测指标。

3 讨 论

传统化学物理监测水质方法存在生态风险并且成本较高^[19]。使用化学监测与生物监测相结合的方式评价水质,是一个具有成本效益和生态相关性的解决方案^[20]。底栖硅藻在水体中分布广泛,能够对环境做出快速的反应^[21],是水体中重要的初级生产者,因此对重金属的耐受能力使其成为水质监测的良好指示生物。与此同时,硅藻对于重金属污染的生理响应机制以及耐受性会因种类不同而有所差别,目前大多数的研究集中在底栖硅藻与环境因子的相关性分析方面^[22-23],而污染物胁迫后生理响应及形态变化相关研究较少。

此外,中国江河、湖泊以及水库等水体已经受到不同程度的重金属污染^[24],对其进行水质监测存在一定难度。例如芜湖市四褐山工业区附近水域水中铜离子含量约为 $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,铅离子含量约为 $1.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,镉离子含量约为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,水体中重金属含量严重超标^[25]。而珠江三角洲养殖水体中铜离子含量最高值约为 $0.1438 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,铅离子含量最高值约为 $0.0973 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,汞离子含量最高值约为 $0.00458 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,镉离子含量最高值约为 $0.1011 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其水体中重金属含量也存在不同程度的超标现象^[26]。本研究发现,微尼海双眉藻在低浓度铜、镉和铅($\text{Cu}^{2+} < 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Cd}^{2+} < 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Pb}^{2+} < 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)胁迫时均含表现出细胞密度以及叶绿素 a 含量的显著变化,说明该藻可以用来进行水体中重金属监测。

许多重金属在浓度较低时能够促进藻类细胞的生长,而高胁迫浓度对藻类有抑制作用,产生的原因可能是自我平衡效应或者藻类对于重金属的耐受

性^[27]。Berland 等^[28]研究发现,中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)经浓度 $0.014 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的汞胁迫 48 h 后受到促进,然而在浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时被抑制。而本研究结果表明,微尼海双眉藻在汞浓度小于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其细胞生长密度会得到促进,但当浓度大于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,则抑制其生长。这可能是由于在低浓度污染物胁迫时,藻类对于汞离子产生了某种程度的抗性,然而当浓度超过藻体接受的阈值,则抑制了藻类细胞的生长。与此同时,微尼海双眉藻在铜离子浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胁迫处理时,细胞数量显著上升,当胁迫浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞数量显著下降,这与海藻中半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)的研究结果类似^[29]。这可能是由于低质量浓度的 Cu^{2+} 是藻类生长代谢所必需的微量元素,适量添加可作为酶的组成成分或辅助因子,从而参与代谢活动促进藻体生长^[30],然而高浓度的 Cu^{2+} 会使藻体的细胞分裂受到抑制,影响新的细胞物质形成,从而抑制藻类生长^[31]。Dao 等^[32] 对小球藻(*Chlorella* sp.)及栅藻(*Scenedesmus acutus*)进行 Pb^{2+} 胁迫后发现,细胞体积小的小球藻对于 Pb^{2+} 耐受性更强,其可能的原因是小球藻具有更大的表面积,或其细胞壁限制了金属离子穿过细胞质膜。而在研究结果表明低浓度的 Pb^{2+} 胁迫对于细胞密度并没有产生显著的影响,然而高浓度的 Pb^{2+} 使细胞密度显著下降,这也许是由于微尼海双眉藻细胞个体微小(约 $10 \mu\text{m}$),表面积较大,使得其对 Pb^{2+} 结合的面积增大,从而呈现了某种耐受现象。

叶绿素是藻类受到污染胁迫后变化的重要生理指标之一,其含量是表征藻类植物生长状况重要的标志^[33]。有研究表明,浒苔受到盐胁迫时,叶绿素 a 含量升高,这可能是植物对不良环境的一种补偿性响应^[34]。而本研究结果表明,当微尼海双眉藻受到低浓度重金属胁迫时,叶绿素 a 含量显著高于对照组,表明该藻对于较低浓度的重金属胁迫敏感,因此微尼海双眉藻叶绿素 a 含量可以成为硅藻指示重金属含量的有效指标。此外,在沉水植物叶轮黑藻的研究中发现,叶绿素含量随着 Cu^{2+} 胁迫浓度升高而下降,从而认为重金属会使叶绿素酶活性增强,促进叶绿素分解,光合作用含量下降^[35]。微尼海双眉藻在 Cu^{2+} 及 Hg^{2+} 浓度大于 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,叶绿素 a 含量出现了下降的趋势。推测是由于 Cu^{2+} 与 Hg^{2+} 离子富集在藻体内的类囊体膜中,打破了质膜结构及细胞器膜离子之间的平衡,阻碍了营养物质的吸收,

所以导致叶绿素 a 含量降低,同时抑制了光系统 II 中电子供体与电子受体间的传递,进而影响光合作用,最终导致藻体生长受到抑制。与此同时,本研究还发现,在低浓度的 Pb^{2+} 胁迫 0.1 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下,微尼海双眉藻叶绿素 a 含量显著升高,而高浓度 Pb^{2+} 胁迫 ($20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下,叶绿素 a 含量显著降低。这与螺旋藻 *Spirulina platensis* 的研究结果类似,即低浓度 Pb^{2+} 对其叶绿素 a 的合成具有促进作用,而高浓度 Pb^{2+} 胁迫会对其产生抑制作用^[36]。

丙二醛是一种脂质过氧化物,常用其含量来反映生物体内脂质过氧化的程度,同时也间接反映细胞膜的损伤程度^[33]。本实验中,在 Cu^{2+} 及 Hg^{2+} 胁迫条件下,微尼海双眉藻丙二醛含量与胁迫浓度呈正相关。在 Cu^{2+} 浓度大于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Hg^{2+} 浓度大于 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,MDA 含量比对照组出现显著性降低,说明微尼海双眉藻细胞在这两个处理水平下细胞受到损害较大。但在低浓度的重金属胁迫下,藻细胞内的 MDA 变化范围不大,这可能是由于藻细胞体内的非酶系统和抗氧化酶系统起到了防御活性氧的伤害作用。同时我们发现,随着 Cd^{2+} 胁迫浓度增加,微尼海双眉藻 MDA 含量呈现出上升-下降-上升的变化趋势。这与镉在高等植物小白菜上研究结果类似。即低镉水平处理下,硅藻中

MDA 含量先下降后上升,而高镉浓度胁迫后,MDA 含量急剧回升,说明镉对于 MDA 产生的抑制作用是在一定范围内起作用^[37]。研究表明,在污染物胁迫下,藻类细胞内的 MDA 含量体现了细胞膜脂质过氧化程度,低浓度的污染物胁迫可以增加细胞内活性氧的积累,致使体内抗氧化系统机能应激加强,以清除体内过多的活性氧^[38]。为了证实此猜测,我们将对微尼海双眉藻重金属胁迫处理后的抗氧化酶体系做进一步研究工作。

重金属胁迫会使藻类细胞形态发生畸变,因此其畸变状态可以作为检测水体重金属污染的指标^[16]。Gautam 等^[39]发现,铜和汞胁迫会使硅藻中异极藻类发生形态变化,主要表现为细胞脂质体膨大,并出现畸形。Sicko-Goad 等^[40]发现,铅可以使小环藻细胞形态发生明显变化,叶绿体体积减小。在本实验中,我们发现不同浓度 Cu^{2+} , Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫处理 96 h 后,对于微尼海双眉藻细胞畸变影响不明显。然而在低浓度 Hg^{2+} 胁迫下,微尼海双眉藻细胞发生明显形变,其背部明显拱起,腹缘凹入且细胞两端钝圆。这说明硅藻细胞形态变化可以作为水体中重金属 Hg^{2+} 的监测指标。与此同时,细胞出现某种程度的形态畸变,是否与该藻类对于重金属胁迫产生某种耐受机制有关仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] 曾丽璇,陈桂珠,余日清,等. 水体重金属污染生物监测的研究进展[J]. 环境监测管理与技术, 2003, **15**(3): 12-15.
ZENG L X, CHEN G Z, YU R Q, *et al.* Review of biological monitoring about water heavy metal pollutants[J]. *The Administration And Technique of Environmental Monitoring*, 2003, **15**(3): 12-15.

[2] 冯新斌,洪业汤. 汞的环境地球化学研究进展[J]. 地球与环境, 1997, **32**(4): 104-108.
FENG X B, HONG Y T. Progresses on environmental geochemistry of mercury[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 1997, **32**(4): 104-108.

[3] 熊 邦. 铅对普通小球藻和原壳小球藻的毒性效应研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.

[4] 赵学茂. 土壤重金属污染的防治方法[J]. 甘肃农业, 2006, (2): 228.
ZHAO X M. Prevention and cure method of soil heavy metal pollution[J]. *Gansu Agriculture*, 2006, (2): 228.

[5] 唐东民,伍 钧,唐 勇,等. 重金属胁迫对植物的毒害及其抗性机理研究进展[J]. 四川环境, 2008, **27**(5): 79-83.
TANG D M, WU J, TANG Y, *et al.* The research advance in toxic hazard of heavy metal stress on plant and Its resistance mechanism[J]. *Sichuan Environment*, 2008, **27**(5): 79-83.

[6] LEUNG P T Y, YAN M, YIU S K F, *et al.* Molecular phylogeny and toxicity of harmful benthic dinoflagellates *Coolia* (Ostreopsidaceae, Dinophyceae) in a sub-tropical marine ecosystem: The first record from Hong Kong[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, pii: S0025-326X(17)30017-6.

[7] 向 华,于晓英. 铜污染对水体——水生植物的毒害效应研究进展[J]. 湖南农业科学, 2009, (11): 54-56.
XIANG H, YU X Y. Toxic effect of copper pollution on water and hydrophyte [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009, (11): 54-56.

[8] IVANOV P, CHIPEV N, TEMNISKOVA D. Diatoms of the River Iskar (Sofia plain) and their implication for water quality assessment. Part II. Diatom indices and their implication for

- water quality monitoring[J]. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2003, **4**(2): 301-310.
- [9] HARDING W R, ARCHIBALD C, TAYLOR J C. The relevance of diatoms for water quality assessment in South Africa: A position paper[J]. *Water S A*, 2005, **31**(1): 41-46.
- [10] 丰卫华,刘春颖,杨桂朋,等. 外源一氧化氮和金属铜对海洋微藻抗氧化系统的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, **41**(12): 69-74.
- FENG W H, LIU C Y, YANG G P, *et al.* The effect of exogenous nitric oxide and copper on the antioxidant systems of marine algae[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, **41**(12): 69-74.
- [11] KUWABARA J S, LELAND H V. Adaptation of *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) to copper[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1986, **5**(2): 197-203.
- [12] 邱昌恩,毕永红,胡征宇. Zn²⁺胁迫对绿球藻生长、生理特性及细胞结构的影响[J]. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 503-508.
- QIU C E, BI Y H, HU Z Y. The effects of Zn²⁺ stress on the growth, physiological characteristics and cell structure of *Chlorococum* SP. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 503-508.
- [13] ROSENWASSER S, van CREVELD S G, SCHATZ D, *et al.* Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**(7): 2 740-2 745.
- [14] MOROSINOTTO T, BASSI R. Molecular mechanisms for activation of non-photochemical fluorescence quenching: from unicellular algae to mosses and higher plants[M]// DEMIG-ADAMS B, GARAB G, ADAMS III W, *et al.* Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014: 315-331.
- [15] VILLENEUVE A, MONTUELLE B, BOUCHEZ A. Effects of flow regime and pesticides on periphytic communities: Evolution and role of biodiversity[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, **102**(3-4): 123-133.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [17] 张志良,翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [18] 王大志,黄世玉,程兆第. 3种海洋硅藻胞外多聚物形态、微观结构及组成的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 2004, **35**(3): 273-278.
- WANG D Z, HUANG S Y, CHENG Z D. Morphology, fine structure and chemical composition of extracellular polymeric substances in three marine diatom species[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, **35**(3): 273-278.
- [19] MAGNUSSON M, HEIMANN K, NEGRI A P. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, **56**(9): 1 545-1 552.
- [20] MORIN S, DUONG T T, DABRIN A, *et al.* Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France[J]. *Environmental Pollution*, 2008, **151**(3): 532-542.
- [21] DESROSIERES C, LEFLAIVE J, EULIN A, *et al.* Bioindicators in marine waters: benthic diatoms as a tool to assess water quality from eutrophic to oligotrophic coastal ecosystems [J]. *Ecological Indicators*, 2013, **32**: 25-34.
- [22] DELGADO C, PARDO I. Comparison of benthic diatoms from Mediterranean and Atlantic Spanish streams: community changes in relation to environmental factors[J]. *Aquatic Botany*, 2015, **120**(Part B): 304-314.
- [23] TAFFS K H, SAUNDERS K M, LOGAN B. Diatoms as indicators of environmental change in estuaries [M]// WECKSTRÖM K, SAUNDERS K M, GELL P A, *et al.* Applications of paleoenvironmental techniques in estuarine studies. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017: 277-294.
- [24] 马井泉,周怀东,董哲仁. 我国应用生态技术修复富营养化湖泊的研究进展[J]. 中国水利水电科学研究院学报, 2005, **3**(3): 209-215.
- MA J Q, ZHOU H D, DONG Z R. A review on the application of eco-technology for restoring eutrophicated lakes and reservoirs in China[J]. *Journal of China Institute of Water Resources and Hydropower Research*, 2005, **3**(3): 209-215.
- [25] 黄永杰,刘登义,王友保,等. 八种水生植物对重金属富集能力的比较研究[J]. 生态学杂志, 2006, **25**(5): 541-545.
- HUANG Y J, LIU D Y, WANG Y B, *et al.* Heavy metals accumulation by hydrophytes[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, **25**(5): 541-545.
- [26] 谢文平,余德光,郑光明,等. 珠江三角洲养殖鱼塘水体中重金属污染特征和评估[J]. 生态环境学报, 2014, **23**(4): 636-641.
- XIE W P, YU D G, ZHENG G M, *et al.* Residues and potential ecological risk assessment of metal in water and sediments from freshwater fish pond of Pearl River Delta[J]. *Ecology and Environment Sciences*, 2014, **23**(4): 636-641.
- [27] 浩云涛,李建宏. 椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)对4种重金属的耐受性及富集[J]. 湖泊科学, 2001, **13**(2):

- 158-162.
- HAO Y T, LI J H. Tolerance of *Chlorella ellipsoidea* and its removal of heavy metals[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2001, **13**(2): 158-162.
- [28] BERLAND B R, BONIN D J, GUERIN-ANCEY O J, *et al.* Action of sublethal doses of heavy metals on the growth characteristics of the diatom *Skeletonema costatum*, (Action de Metaux Lourds a des Doses Subletales sur les Caracteristiques de la Croissance Chez la Diatomee *Skeletonema Costatum*) [J]. *Marine Biology*, 1977, **42**: 17-30.
- [29] 付贵权,韩婷婷,巩秀玉,等. 重金属 Cu²⁺胁迫对半叶马尾藻生长及生理生化特性的影响[J]. *南方水产科学*, 2015, **11**(4): 34-39.
- FU G Q, HAN T T, GONG X Y, *et al.* Effect of Cu²⁺ stress on growth and physiological biochemical characteristics of *Sargassum hemiphyllum*[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, **11**(4): 34-39.
- [30] 周长芳,吴国荣,施国新,等. 水生抗氧化系统在抵御 Cu²⁺胁迫中的作用[J]. *植物学报*, 2001, **43**(4): 389-394.
- ZHOU C F, WU G R, SHI G X, *et al.* The role of Antioxidant Systems in Cu²⁺ stress resistance in *alternanthera philoxeroides*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2001, **43**(4): 389-394.
- [31] CORELLOU F, BISGROVE S R, KROPF D L, *et al.* AS/M DNA replication checkpoint prevents nuclear and cytoplasmic events of cell division including centrosomal axis alignment and inhibits activation of cyclin-dependent kinase-like proteins in fucoid zygotes[J]. *Development*, 2000, **127**(8): 1 651-1 660.
- [32] DAO L H, BEARDALL J. Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae[J]. *Chemosphere*, 2016, **147**: 420-429.
- [33] BAUMANN H A, MORRISON L, STENGEL D B. Metal accumulation and toxicity measured by PAM—chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae[J]. *Eco-toxicology and Environmental Safety*, 2009, **72**(4): 1 063-1 075.
- [34] DUKE C S, LITAKER W, RAMUS J. Effects of temperature, nitrogen supply, and tissue nitrogen on ammonium uptake rates of the chlorophyte seaweeds *Ulva curvata* and *Codium decorticatum*[J]. *Journal of Phycology*, 1989, **25**(1): 113-120.
- [35] 母丹丹,汝双燕,李 涛,等. 铜胁迫对轮叶黑藻无茵苗生理代谢的影响[J]. *水生生物学报*, 2016, **40**(2): 419-424.
- MU D D, RU S Y, LI T, *et al.* Effect of copper stress on physiological metabolism in sterile seedlings of *Hydrilla Verticillata* (L. F.) Royle[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(2): 419-424.
- [36] 王珊珊. 栅藻对重金属离子的富集及其机理的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2013.
- [37] 孙惠莉,吕金印,贾少磊. 硫对镉胁迫下小白菜叶片 AsA—GSH 循环和植物络合素含量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2013, **32**(7): 1 294-1 301.
- SUN H L, LV J Y, JIA S L. Effects of Sulfur on Ascorbate-Glutathione Cycle and the content of phytochelatin in the leaves of pakchoi (*Brassica chinensis* L.) under cadmium stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, **32**(7): 1 294-1 301.
- [38] WANG J, ZHU J, LIU S, *et al.* Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes [J]. *Chemosphere*, 2011, **85**(6): 977-982.
- [39] GAUTAM S, PANDEY L K, VINAYAK V, *et al.* Morphological and physiological alterations in the diatom *Gomphonema pseudoaugur* due to heavy metal stress[J]. *Ecological Indicators*, 2017, **72**: 67-76.
- [40] SICKO-GOAD L, F. STOERMER E, L. FAHNENSTIEL G. Rejuvenation of *Melosira granulata* (Bacillariophyceae) resting cells from the anoxic sediments of Douglas Lake, Michigan. I. Light microscopy and ¹⁴C uptake[J]. *Journal of Phycology*, 1986, **22**: 22-28.

(编辑:裴阿卫)