5 种重金属亚致死暴露浓度对普通小球藻生长抑制与光合毒性的比较

欧阳慧灵, 孔祥臻, 秦宁, 何伟, 何玘霜, 王雁, 王戎, 徐福留*

北京大学城市与环境学院, 地表过程分析与模拟教育部重点实验室, 北京 100871

* 联系人, E-mail: xufli@urban.pku.edu.cn

2012-01-05 收稿, 2012-02-26 接受

国家自然科学基金重点项目(41030529)、国家杰出青年科学基金(40725004)、国家水专项(2008ZX07103-005-01)、国家环境保护公益性行业科研专项(20100932)和国家教育部博士点专项基金(20100001110035)资助

摘要 研究及比较了 5 种重金属(铜、铬、锌、镉和铅)亚致死暴露浓度(0.05, 0.5, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$)对普通小球藻的生长抑制作用与光合毒性作用. 在不同暴露时间(0, 24, 48, 72, 96 h)测量普通小球藻的生物量和 PS II 系统潜在最大光能转换效率(F_v/F_m), 结果表明, 5 种重金属对普通小球藻的生长抑制作用具有浓度依赖性和时间依赖性, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 5 种重金属对普通小球藻的生长均有抑制作用, 且抑制作用随着时间的延长有所减弱; 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 铜和铬对普通小球藻的光合作用强度有抑制作用, 锌和镉表现为促进作用, 而铅未表现出任何效应; 重金属对普通小球藻生长的影响与其对光合作用的影响相互独立, 两者并不存在因果关系.

关键词

重金属
亚致死浓度
普通小球藻
生长抑制
光合毒性

随着工业化和城市化的快速发展, 各类重金属的使用日益增加, 大量重金属进入自然水体并由此引发了一系列的水环境污染问题. 藻类是水体中的初级生产力, 研究重金属对藻类生长及光合作用的影响, 对评估重金属的水生生态系统风险和危害具有重要意义.

常见的重金属中, 铜和锌是许多生物生长的必需元素, 而镉、铬和铅的生物学功能并不明确. 铜是光合作用及呼吸作用过程的重要辅酶因子和电子传递链的组成成分^[1,2], 锌是光合作用和代谢相关酶类如碳酸酐酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的组成成分^[3]. 铜和锌进入水体后能促进藻类的生长和繁殖, 缺乏铜和锌时, 藻类的生长和光合作用速率会大大降低; 但当其浓度超过一定阈值, 亦会对藻类产生毒性作用. 与铜和锌不同, 铬、镉以及铅均不是植物生长的必需元素, 但随着工业的发展, 日常生活中大量使用的铬、镉和铅随着排放进入到水体中, 对植物的生长产生了一定的影响. 铬有多种存在形态, 其中六价铬

的毒性最强^[4]. 镉是一种具有潜在危害的重金属, 在水环境中非常稳定, 能够直接影响藻类的各项生理过程^[5,6]. 铅可在藻类细胞中大量累积并产生毒性作用^[7].

重金属对藻类的毒性作用主要表现为阻止细胞分裂、抑制藻类的生长速率、降低酶的活性以及影响光合作用效率等^[8-10]. 目前针对重金属对藻类毒性效应的研究多集中于重金属对藻类生长繁殖的影响上, 主要关注重金属对藻类的致死效应(72 h-LC₅₀ 或 96 h-LC₅₀)或生长抑制效应(72 h-EC₅₀ 或 96 h-EC₅₀), 随着叶绿素荧光技术的发展, 污染物对藻类光合作用影响的研究也不断增加, 然而以往的研究多为获得 LC₅₀ 或 EC₅₀ 的数据, 重金属的浓度设定往往偏高, 对于亚致死浓度下重金属的毒性效应研究较少.

本文以绿藻的优势种普通小球藻为研究对象, 分析及比较了亚致死浓度(0.05, 0.5, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$)下 5 种重金属(铜、铬、锌、镉和铅)对普通小球藻生长和光合作用的毒性效应, 以期为进一步了解重金属的

英文版见: Ouyang H L, Kong X Z, Qin N, et al. Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. Chin Sci Bull, 2012, 57, doi: 10.1007/s11434-012-5167-2

毒性效应提供理论基础.

1 材料与方法

(i) 受试生物. 本研究选择普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)为受试生物, 主要基于如下考虑: 普通小球藻是世界普生性种属, 并且是绿藻的优势藻种; 其相对简单的生长条件及较强的环境耐受性, 使其非常适宜于实验室的毒性实验; 国内外有很多使用普通小球藻作为受试生物的研究报道, 这为不同研究的相互比较提供了便利条件.

普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库. 采用 BG11 培养基进行培养, 培养条件为: GXZ-280B 智能型光照生物培养箱(宁波东南仪器有限公司), 光强为 4000 Lux; 光暗比 14 h:10 h; 温度(24±1)℃; 静止培养, 每天人工摇动 2~3 次.

(ii) 化学试剂. 分析纯五水合硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 购自国药集团化学试剂有限公司, 作为 Cu^{2+} 的来源, 用于铜的暴露实验; 分析纯重铬酸钾(K_2CrO_4), 购自国药集团化学试剂有限公司, 作为 Cr^{6+} 的来源, 用于铬的暴露实验; 分析纯氯化锌(ZnCl_2), 购自国药集团化学试剂有限公司, 作为 Zn^{2+} 的来源, 用于锌的暴露实验; 分析纯水合氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$), 购自国药集团化学试剂有限公司, 作为 Cd^{2+} 的来源, 用于镉的暴露实验; 分析纯氯化铅(PbCl_2), 购自国药集团化学试剂有限公司, 作为 Pb^{2+} 的来源, 用于铅的暴露实验.

(iii) 暴露浓度. 亚致死浓度是相对致死浓度(LC_{50})而言的, 当暴露浓度低于 LC_{50} 时, 该浓度可被称为亚致死浓度. 对于藻类毒性实验而言, 初始藻密度、培养基、培养温度等均会影响到 LC_{50} 的值, 因而即便是同样的藻种及同样的金属, 在不同的培养条件下得到的 LC_{50} 也有一定的差异. 不同文献中的铜对普通小球藻的致死浓度(LC_{50})差别较大, 且与本研究的实验条件不完全吻合, 因而无法作为判断依据. 因此, 本研究通过预实验确定亚致死暴露浓度.

预实验显示, 采用与文中相同的实验条件培养普通小球藻时, Cu^{2+} 的 96 h- LC_{50} 约为 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. 许多文献结论显示铜是文中使用的 5 种重金属中毒性最强的物质, 推出其他 4 种重金属的 96 h- LC_{50} 应该高于 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 因而未进行其他金属的预实验. 另外, 为了便于比较各金属的毒性强弱, 将 5 种重金属

的暴露浓度均设定为 0.05, 0.5 和 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. 实际上, 本实验的结果也证实, 在设定的暴露浓度下(0.05~ $5 \mu\text{mol L}^{-1}$), 5 种金属对普通小球藻的生长抑制率(96 h)均低于 50% (详见 2.1 节). 因而, 本研究设定的浓度范围确实属于亚致死浓度.

(iv) 藻类预培养. 由于 BG11 培养基中含有铜离子和锌离子, 在进行铜和锌的暴露实验之前应该先将普通小球藻在无铜或无锌的培养液中进行预培养, 以除去原有的铜或锌.

BG11 培养基中 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的量为 0.079 mg L^{-1} (约 $0.316 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的量为 0.222 mg L^{-1} (约 $0.77 \mu\text{mol L}^{-1}$). 在正式暴露实验中, 由于稀释作用铜的浓度将降至 $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$ 以下, 锌的浓度将降至 $0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$ 以下, 分别是最低暴露浓度($0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$)的 20% 和 40%. 考虑到普通小球藻生长过程对铜和锌的需求以及富集作用, 该浓度将更低; 单是稀释后的 BG11 培养基中剩余的微量铜和锌仍有可能对最低暴露浓度($0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$)组有轻微影响. 为了尽可能消除 BG11 培养基中铜和锌对实验的影响, 本研究在正常暴露之前, 将普通小球藻置于无铜或无锌的培养基中进行预培养. 本研究组前期实验研究发现, 将普通小球藻在无磷的培养液中培养 3 天就可以消除磷对实验的影响. 鉴于此, 本研究把普通小球藻在无铜或无锌的培养基中预培养的时间也设为 3 天. 在整个过程中, 进行了两次稀释; 第一次是将正常培养的普通小球藻接种至无铜或无锌的培养基(稀释 10 倍左右), 第二次是培养 3 天后将普通小球藻稀释至所需的初始密度(一般需稀释 3~4 倍). 此时, 原始的 BG11 培养基中铜或锌的浓度大幅度降低, 再加上藻类生长的消耗, 暴露所用的普通小球藻的藻液中含有的铜和锌将低于 $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$ 甚至低于检出限. 这样, 我们可以认为, 经过 3 天无铜或无锌培养基的预培养, 基本可以消除原始 BG11 培养基中残留铜或锌对 $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ 暴露组的影响.

(v) 暴露实验. 暴露实验在 250 mL 的锥形瓶中进行, 5 种重金属的浓度梯度均设定为 0.05, 0.5, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 以不加重金属的空白组为对照, 每个浓度设定 3 个平行组. 将处于对数生长期的普通小球藻分别加入含有上述重金属浓度的培养基中, 暴露初始的普通小球藻细胞密度设定为 $2 \times 10^6 \text{ 个 mL}^{-1}$. 由于 BG11 培养基中含有铜离子和锌离子, 在进行铜和锌的暴露实验之前先将普通小球藻在无铜或无锌的培

养液中预培养 3 天以除去原培养基中含有的铜或锌。培养过程中不充气, 每日随机调换锥形瓶并摇动 2~3 次, 暴露时间设定为 96 h, 每隔 24 h 进行生物量及叶绿素荧光参数的测定。

(vi) 生物量的测定及抑制率的计算。选用普通小球藻在 450 nm 条件下的吸光值(OD_{450})表征生物量相对大小, 并通过换算得到生物量(个 mL^{-1})。根据普通小球藻的生长曲线, 不同时间重金属对普通小球藻的抑制率可根据如下公式计算:

$$P = \frac{\lg N_{i\text{control}} - \lg N_t}{\lg N_{i\text{control}} - \lg N_{0\text{control}}},$$

式中 N 表示普通小球藻的藻细胞密度(生物量)。 $N_{i\text{control}}$ 表示 t 时刻空白对照组的藻细胞密度, N_t 表示暴露 t 时刻后的藻细胞密度值, $N_{0\text{control}}$ 表示初始时刻(刚加入目标实验试剂时)空白对照组的藻细胞密度值。

(vii) 叶绿素荧光参数的测定。本实验用 PS II 系统的最大量子产量(F_v/F_m)的值表征普通小球藻的光合作用能力。采用德国 Walz 公司生产的 MAXI-Imaging-PAM 叶绿素荧光仪进行测定, 测定前样品需暗适应 25 min, 测定得到初始荧光 F_0 , 最大荧光 F_m , 通过计算可得到 $F_v/F_m(F_v = F_m - F_0)$ 。

(viii) 数据统计分析。所有数据利用 Excel2010 和 Spss16.0 进行分析。

2 结果与讨论

2.1 5 种重金属对普通小球藻生长的抑制作用

5 种重金属对普通小球藻的生长均有一定的影响, 重金属浓度越高, 普通小球藻的生长受到的抑制作用越强。图 1 为普通小球藻在不同暴露条件下的生长曲线, $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的镉和锌对普通小球藻的生长影响不大, 但铜、铬、铅表示出抑制作用, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 5 种重金属对普通小球藻的生长均有显著的毒性作用。普通小球藻在受到重金属的胁迫之后有一个逐渐适应的过程, 随着胁迫时间的延长, 普通小球藻的生长受到的抑制作用有所减弱, 以铜为例, 经 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的铜处理的样品在 24, 48, 72 和 96 h 的抑制率分别为 85.5%, 67.8%, 55.0% 和 38.3%。

重金属对普通小球藻的毒性作用受到时间和金属浓度的共同影响。双因子方差分析结果(表 1)显示: 铜、铬、锌和铅的暴露浓度、胁迫时间及两者的交互作用都对普通小球藻的生长有显著的影响作用($P < 0.05$),

表 1 5 种重金属的暴露浓度和胁迫时间对普通小球藻生长影响的双因子方差分析结果

金属种类	影响因素	F	P -level
铜	暴露浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)	180.848	$P < 0.001$
	胁迫时间(h)	796.695	$P < 0.001$
	暴露浓度 $\times$ 胁迫时间	26.094	$P < 0.001$
铬	暴露浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)	111.172	$P < 0.001$
	胁迫时间(h)	765.912	$P < 0.001$
	暴露浓度 $\times$ 胁迫时间	14.372	$P < 0.001$
锌	暴露浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)	9.218	$P < 0.001$
	胁迫时间(h)	547.360	$P < 0.001$
	暴露浓度 $\times$ 胁迫时间	2.010	$P = 0.049$
镉	暴露浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)	9.330	$P < 0.001$
	胁迫时间(h)	364.299	$P < 0.001$
	暴露浓度 $\times$ 胁迫时间	1.965	$P = 0.055$
铅	暴露浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)	15.888	$P < 0.001$
	胁迫时间(h)	979.575	$P < 0.001$
	暴露浓度 $\times$ 胁迫时间	5.499	$P < 0.001$

镉的暴露浓度和胁迫时间对普通小球藻的生长有显著的影响, 但两者的交互作用表现为无显著影响($P = 0.055$)。

Qian 等人^[5]发现铜抑制普通小球藻生长的 EC_{50} 值比镉低, 可见铜的生长毒性强于镉。Ismail 等人^[9]以 *I. galbana*, *T. tetrahele* 和 *T. sp.* 3 种藻为受试生物时也得到了相同的结论, 但对于 *C. calcitrans* 藻而言, 铜和镉的毒性相当。Franklin 等人^[11]研究结果显示铜>镉>锌(实验藻种为 *Chlorella sp.*), 而梁英等人^[12]实验结果显示镉>铜>锌(实验藻种为 *Phaeodactylum tricornutum*)。尽管与重金属对藻类生长的抑制作用相关的研究颇多, 但未发现重金属对藻类的生长抑制强度的确切大小关系, 藻类对重金属的耐受性易随藻类种类和实验条件而发生变化。本研究发现铜的生长毒性最强, 但其他金属的毒性大小顺序随着暴露时间的变化有所不同。暴露 24 h 后, 5 种重金属的生长抑制强度为: 铜>镉>铅>铬>锌(暴露浓度为 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时), 而暴露 96 h 后, 5 种重金属的生长抑制强度变为: 铜>铬>镉>锌>铅(暴露浓度为 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时)。铜的生长毒性一直强于锌, 该结论与以往的研究结论相同。鉴于铜和锌均为藻类生长的必需元素, 两者的毒性差异可能与藻类生长需求的阈值有关; 而其他几种重金属的毒性变化可能与金属的致毒机理、藻类的耐受性或藻类受胁迫后的解毒顺序等相关, 具体的机理有待进一步研究。

图1 5种重金属对普通小球藻生长的影响

2.2 不同重金属对普通小球藻光合作用过程的影响

本实验用 PS II 系统的最大量子产量(F_v/F_m)的相对变化来表征重金属对普通小球藻光合作用的影响. 图 2 和图 3 分别为 F_v/F_m 随浓度的变化曲线以及暴露 96 h 后 5 种重金属的荧光成像图. 由图 2 可以看出, F_v/F_m 随着暴露时间的延长出现了先下降后上升的过程, 最大量子产量在暴露初期的下降可能是由于暴露实验开始时对普通小球藻进行了稀释, 普通小球藻进入到新环境有一个适应过程, 表现为光合作用强度略有下降; 后期的上升可能与普通小球藻的快速生长有关, 随着时间的延长, 处于对数生长期的普通小球藻藻密度大量增加, 在测定 F_v/F_m 时, 藻密度的增加可能造成荧光的吸收及遮挡增加, 最大荧光(F_m)比最小荧光(F_0)更大, 因而受藻密度增加的影响也更大, 从而导致了 F_v ($F_v = F_m - F_0$) 的变化量比 F_m 更小, 表现为 F_v/F_m 的上升. 尽管在不同的暴露时间下普通小球藻的光合作用强度有一定的变化, 重金

属对其光合作用的影响仍能得以分辨与区分. 从图 3 中可以直观看出 F_v/F_m 的变化: 铜和铬暴露组的 F_v/F_m 变化较为显著, 说明铜和铬对普通小球藻的光合毒性较大; 铜和锌暴露组的 F_v/F_m 值较其他暴露组略低, 这是因为铜和锌为藻类生长的必需元素, 在培养的过程中, 空白对照组因缺乏铜或锌表现出光合作用能力的略微下降.

5 种重金属对普通小球藻的生长均有抑制作用, 但重金属对普通小球藻光合作用的影响有很大的不同. 除镉外, 低浓度的重金属($0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$)对普通小球藻光合作用强度影响不大. 最大暴露浓度($5 \mu\text{mol L}^{-1}$)下, 铜和铬表现出明显的抑制作用; 镉和锌表现出一定的促进作用, 经过 96 h 的暴露处理, 普通小球藻的最大量子产量约有 10% 的增加.

随着叶绿素荧光技术的发展, 针对重金属对藻类光合作用的影响的研究不断增加, 但研究多关注重金属是否对藻类的光合作用产生了影响, 影响强度如何, 或关注于重金属光合毒性的影响因素方面, 对于不同重金属的之间的比较相比较较少. Bauman 等

图2 5种重金属对普通小球藻光合作用的影响

图3 5种重金属暴露96 h后普通小球藻的叶绿素荧光成像图 (F_v/F_m)

人^[10]研究5种重金属对7种藻类光合作用的毒性作用时发现, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 铜、锌、镉和铬均能降低藻类的光合作用, 但铅的影响并不显著. 本研究发现 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 铜和铬对普通小球藻的光合作用强度有抑制作用, 锌和镉表现为促进作用, 而铅未表现出任何效应, 重金属对光合作用的促进作用在以往的研究中描述的较少, 本实验观察到相关现象可能是由于本实验设定的重金属浓度较低($0.05\sim 5 \mu\text{mol L}^{-1}$), 产

生了低浓度的刺激效应.

2.3 5种重金属对普通小球藻生长抑制与光合毒性的比较

为了比较5种重金属对普通小球藻生长和光合作用的影响, 计算各暴露浓度下普通小球藻的生长抑制率及光合作用效率的相对值如图4和5所示. 图4显示了不同暴露时间下5种重金属对普通小球藻生

图 4 不同重金属对普通小球藻生长的影响比较

图 5 不同重金属对普通小球藻光合作用的影响比较

长的影响比较,以生长抑制率为度量,当生长抑制率为正时,重金属对普通小球藻的生长的影响表现为抑制作用,抑制率越高,普通小球藻生长受到的影响越大.图5显示了不同暴露时间下5种重金属对普通小球藻光合作用的影响比较,以PS II系统最大量子

产量的相对变化为度量,当比值大于1时,重金属对普通小球藻光合作用的影响表现为促进,反之则表现为抑制.

铜和铬对普通小球藻生长及光合作用均有抑制作用,但毒性作用的表现不一致.铜和铬的生长抑制

作用在 24 h 便有所体现, 且 24 h 的抑制强度最大, 而后随着暴露时间的延长毒性作用有所减弱, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 铜的生长抑制作用大于铬. 铬对普通小球藻光合作用的抑制作用在 24 h 开始显现, 48 h 后达到最高且存在于整个的暴露实验过程中, 而铜对光合作用的抑制作用在 48 h 才开始显现, 72 h 后达到最高; 两者随着暴露时间的延长均表现出抑制作用的先增强后减弱, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 铬的光合作用毒性强于铜. 与生长相比, 普通小球藻的光合作用在受到重金属的胁迫时反应相对滞后, 普通小球藻的生长和光合作用在受到重金属胁迫后均表现出适应现象.

锌、镉对普通小球藻的生长有抑制作用, 但对光合作用有促进作用. 镉对普通小球藻生长的抑制作用与铜的类似, 在暴露初期抑制强度最大, 而后随着暴露时间的延长不断减弱, 而锌对生长的抑制作用在 48 h 达到最大, 之后也有所减弱, 暴露初期(48 h 之内)镉的生长抑制强于锌, 暴露后期(48 h 之后)锌的生长抑制更大. 镉和锌对普通小球藻的光合作用有一定的促进作用, 在暴露后期有比较明显的体现(72 和 96 h), 镉对普通小球藻光合作用的促进强度略大于锌. 普通小球藻在受到锌和镉的胁迫时, 生长和光合作用受到的影响完全相反, 由此可见重金属对普通小球藻生长和光合作用的影响机制相互独立.

铅对普通小球藻的生长有抑制作用, 但对光合作用的影响不大. 短时间的铅暴露对普通小球藻的生长有较大的影响, 但随着时间的延长, 低浓度的铅($0.05\sim 5 \mu\text{mol L}^{-1}$)对小球藻的抑制作用近乎消失.

Perales-Vela 等人^[13]研究 Cu^{2+} 对 *Scenedesmus*

incrassatulus 藻的毒性作用时发现, 在 $0\sim 3.145 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 胁迫下各项指标的敏感性的大小顺序为: 生长>>光合电子传递速率. 本实验也发现了类似的现象, 在 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 铜和铬暴露浓度下, 暴露 96 h 后的数据显示, 普通小球藻的生长受到的抑制程度高于其光合作用能力受到的抑制程度. 相较于光合作用, 生长更容易受到影响, 这是因为藻类在受到胁迫时, 可将原本用于生长的能量用于维持内平衡及内稳定, 如维持光合作用的正常进行^[14]. 同理, 藻类光合作用受到的影响将晚于生长, 与本实验中铜和镉的表现相一致. 铜的毒害机制主要是增加植物体内活性氧的产量, 导致膜脂过氧化, 致使类囊体片层结构解体破坏, 进而影响到植物的光合作用^[15,16]. 实验结果表明, 铜对普通小球藻光合作用的抑制晚于生长, 可以推测重金属抑制光合作用的前提可能是进入细胞与叶绿体接触, 因而当重金属的浓度较低或藻类可耐受的阈值较高时, 将出现生长受到了一定的影响但光合作用的能力并无明显变化的现象. Andrade 等人^[17]发现藻细胞在抵御重金属的毒性时会产生大量的多糖细胞壁, 以阻止重金属进入细胞内部. 藻类在受到重金属胁迫时将激发其抵御机制以产生更多的多糖物质, 而光合作用是将太阳能转为化学能的关键, 因而藻类在受到重金属胁迫时为抵御胁迫可能引起光合作用强度的增加, 表现为重金属对光合作用的刺激作用.

5 种重金属对普通小球藻生长及光合作用的影响比较如表 2 所示, 不同重金属对普通小球藻的生长和光合作用的影响并不一致, 可见重金属对普通小球藻生长的影响与其对光合作用的影响相互独立,

表 2 5 种重金属对普通小球藻生长及光合作用的影响比较

金属种类	受影响因素	暴露浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
		0.05	0.5	5
铜	生长	- ^{a)} ($P<0.001$)	- ($P=0.002$)	- ($P<0.001$)
	光合作用	0 ^{b)} ($P=0.877$)	0 ($P=0.657$)	- ($P<0.001$)
铬	生长	- ($P=0.013$)	0 ($P=0.826$)	- ($P<0.001$)
	光合作用	0 ($P=0.421$)	0 ($P=0.165$)	- ($P<0.001$)
锌	生长	0 ($P=0.090$)	0 ($P=0.255$)	- ($P<0.001$)
	光合作用	0 ($P=0.910$)	+ ^{c)} ($P=0.020$)	+ ($P<0.001$)
镉	生长	0 ($P=0.485$)	0 ($P=0.281$)	- ($P<0.001$)
	光合作用	+ ($P<0.001$)	+ ($P<0.001$)	+ ($P<0.001$)
铅	生长	- ($P<0.001$)	0 ($P=0.058$)	- ($P<0.001$)
	光合作用	0 ($P=0.857$)	0 ($P=0.548$)	0 ($P=0.084$)

a) “-”表示抑制作用; b) “0”表示无显著影响; c) “+”表示促进作用

两者并不存在因果关系. Nielsen 等人^[18]研究 Cu^{2+} 胁迫对 *Fucus serratus* 的毒性作用时发现, Cu^{2+} 对藻生长的影响与 Cu^{2+} 对光合作用的影响无关, 两者受到影响的机理并不相同. 他们认为, Cu^{2+} 能够直接影响藻的生长过程导致藻的生长速率受到影响, 藻细胞的光合作用是否受到影响对生长率的影响较小, 生长过程与光合作用过程相互独立, 该结论与本实验的结果相一致. 生长率和光合作用能力是评判藻类是否处于健康状态的重要指标, 鉴于毒性物质对于生长过程和光合过程的影响相互独立, 在评价物质的毒性效应时, 特别是评价低浓度的有毒物质的生态风险时, 应综合考虑生长和光合作用的变化.

3 结论

5 种重金属对普通小球藻生长均有一定的抑制作用, 毒性大小受到金属种类和暴露时间的影响, 24 h

的毒性大小为: 铜>镉>铅>铬>锌(暴露浓度为 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时), 96 h 的毒性大小为: 铜>铬>镉>锌>铅(暴露浓度为 $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时). 随着时间的延长, 5 种重金属对普通小球藻的生长抑制作用均有所减弱. 5 种金属对普通小球藻的光合作用亦有一定的影响, 但与对生长的影响有较大的不同, 铜和铬对普通小球藻的光合作用强度有抑制作用, 锌和镉表现为促进作用, 而铅未表现出任何效应. 由此可见, 不同重金属对普通小球藻的生长和光合作用的影响无相关性, 重金属对普通小球藻生长的影响与其对光合作用的影响相互独立, 两者并不存在因果关系.

综合生长和光合作用的变化, 亚致死浓度 ($0.05\sim 5 \mu\text{mol L}^{-1}$) 的 5 种重金属中危害最大的为铜和铬. 尽管 5 种重金属对光合作用的影响并不一致, 但各金属对于普通小球藻的生长均有一定的抑制作用, 低浓度的重金属污染应受到足够的重视.

参考文献

- Burda K, Kruk J, Schmid G H, et al. Inhibition of oxygen evolution in photosystem II by Cu (II) ions is associated with oxidation of cytochrome b_{559} . *Biochem J*, 2003, 371: 597–601
- Andrade L R, Farina M, Filho G M A. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) *in vitro*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2004, 58: 117–125
- Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 2001, 212: 475–486
- Vignati D A L, Dominik J, Beye M L, et al. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotoxicol Environ Saf*, 2010, 73: 743–749
- Qian H F, Li J J, Sun L W, et al. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquat Toxicol*, 2009, 94: 56–61
- Sandalio L M, Dalurzo H C, Gómez M, et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot*, 2001, 52: 2115–2126
- Pawlik-Skowroska B. Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris*. *Environ Pollut*, 2002, 119: 119–127
- 陈雷, 郑青松, 刘兆普, 等. 不同 Cu^{2+} 浓度处理对斜生栅藻生长及叶绿素荧光特性的影响. *生态环境学报*, 2009, 18: 1231–1235
- Ismail M, Phang S M, Tong S L, et al. A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae. *Environ Monit Assess*, 2002, 75: 145–154
- Baumann H A, Morrison L, Stengel D B. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72: 1063–1075
- Franklin N M, Stauber J L, Lim R P, et al. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21: 2412–2422
- 梁英, 王帅, 冯力霞, 等. 重金属胁迫对三角褐指藻生长及叶绿素荧光特性的影响. *海洋环境科学*, 2009, 28: 374–382
- Perales-Vela H V, González-Moreno S, Montes-Horcasitas C, et al. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, 2007, 67: 2274–2281
- Hagemeyer J. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. In: Prasad M N V, Hagemeyer J, eds. *Heavy Metal Stress in Plants*. Berlin: Springer, 1999. 157–181
- Vassilev A, Lidon F, Campos P S, et al. Cu-induced changes in chloroplast lipids and photosystem 2 activity in barley plants. *Bulg J Plant Physiol*, 2003, 29: 33–43

- 16 Pätsikkä E, Aro E M, Tyystjärvi E. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes. *Physiol Plant*, 2001, 113: 142–150
- 17 Andrade L R, Leal R N, Nosedá M, et al. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. *Mar Pollut Bull*, 2010, 60: 1482–1488
- 18 Nielsen H D, Nielsen S L. Photosynthetic responses to Cu²⁺ exposure are independent of light acclimation and uncoupled from growth inhibition in *Fucus serratus* (Phaeophyceae). *Mar Pollut Bull*, 2005, 51: 715–721

Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*

OUYANG HuiLing, KONG XiangZhen, QIN Ning, HE Wei, HE QiShuang, WANG Yan, WANG Rong & XU FuLiu

MOE Laboratory for Earth Surface Process, College of Urban & Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

The impact of five heavy metals, copper (Cu), chromium (Cr), zinc (Zn), cadmium (Cd) and lead (Pb) at sub-lethal concentrations (0.05, 0.5, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris* was studied through 96 h exposure experiments. The results showed that the effects of five metals on the growth of *Chlorella vulgaris* were dependent on both metal concentrations and exposure time. It was found that 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu, Cr, Zn, Cd and Pb significantly inhibited the growth of *Chlorella vulgaris* and the effect became weaker with the increase of exposure time. Different effects on chlorophyll fluorescence were found for different metals, among which Cu and Cr had an inhibiting effect and Zn and Cd promoted it. The effects of heavy metals on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris* are independent of each other; and they are not causally related.

heavy metal, sub-lethal, *Chlorella vulgaris*, growth, photosynthesis

doi: 10.1360/972012-23