

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201701011



丙酮对小球藻和水华微囊藻的生长 及叶绿素荧光参数的影响

李 玲, 王 俊 英

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以小球藻和水华微囊藻细胞的生长状况、光合作用参数、叶绿素 a 质量浓度的变化作为指标, 研究不同体积分数的丙酮对 2 种藻类的毒性效应. 结果表明: 体积分数为 0.000 5%~0.500 0% 的丙酮对小球藻和体积分数为 0.000 5%~0.050 0% 的丙酮对水华微囊藻均不同程度地促进藻细胞生长, 对藻类的叶绿素 a 无影响, 明显提高了藻类的最大光合速率($rETR_{max}$)、光能利用率(α)和光适应能力(I_k), 同时提高了光系统 II 的最大光化学效率(F_v/F_m); 丙酮体积分数为 5.000 0% 的小球藻和丙酮体积分数为 0.500 0%~5.000 0% 的水华微囊藻, 其藻类光合作用、叶绿素 a 显著降低, 导致藻类生长严重抑制甚至死亡; 丙酮对小球藻和水华微囊藻的最大无影响体积分数(NOEC)分别为 0.500 0%, 0.050 0%, 说明水华微囊藻对丙酮更为敏感.

关键词: 丙酮; 小球藻; 水华微囊藻; 生长效应; 叶绿素

中图分类号: X 171

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2017)01-0058-06

Effects of Acetone on Growth and Chlorophyll Fluorescence Parameters of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae*

LI Ling, WANG Junying

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The toxic effects of different volume fractions of acetone on algae were studied, using the growth condition, photosynthetic parameters, chlorophyll a mass-concentration of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae* as indexes. The results showed that 0.000 5%-0.500 0% and 0.000 5%-0.050 0% volume fractions of acetone respectively were in varying degrees to promote *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae* growth. Both concentration ranges had no significant effect on the chlorophyll a of algae, while increased the maximum photosynthetic rate ($rETR_{max}$), the solar energy utilisation efficiency (α) and the tolerance of algae to strong light (I_k) significantly, as well as improved the photosystem II photochemical efficiency (F_v/F_m). When the *Chlorella vulgaris* was at 5.000 0% acetone volume fraction and *Microcystis flos-aquae* at 0.500 0% to 5.000 0% acetone volume fractions, algae photosynthesis and chlorophyll a were reduced obviously, which resulted in severe algal growth inhibition and even death. The corresponding NOEC of acetone was 0.500 0% for *Chlorella vulgaris* and 0.050 0% for *Microcystis flos-aquae*, indicating that *Microcystis flos-aquae* was more sensitive to acetone than *Chlorella vulgaris*.

Keywords: acetone; *Chlorella vulgaris*; *Microcystis flos-aquae*; growth effect; chlorophyll

收稿日期: 2016-06-21

通信作者: 李玲(1983-),女,讲师,博士,主要从事环境化学物的毒理学的研究. E-mail: liling19830826@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41203077); 华侨大学研究生科研创新能力培养计划资助项目(12BS108)

在环境污染物水生生态风险评价中,常遇到水溶性差的样品,因此,需要有机溶剂助溶.在实际操作过程中,若有机溶剂体积分数太低,样品溶解不全;若体积分数太高,对水生生物又具有潜在的毒性,使结果发生偏差^[1].然而,不同的水生生物对同一有机溶剂的耐受性不同,同一水生生物对不同的有机溶剂的耐受性也不同^[2-3].丙酮由于具有良好的溶解性能,在很多生物毒性实验测定中作为助溶剂^[4-5].因此,如何选择适宜的丙酮质量分数尤为重要.小球藻、水华微囊藻等淡水藻类分布广、对毒物敏感,可在较短时间内评价化学物质对其世代及种群水平的影响特性^[6],将其作为生物指示剂具有无可比拟的优势.本文研究丙酮对小球藻和水华微囊藻的生长及叶绿素荧光参数的影响.

1 材料与方法

1.1 供试溶剂及仪器

丙酮(上海国药集团化学试剂有限公司,分析纯);PYX-250Q-B 型人工气候箱(福建省厦门精艺兴业科技有限公司);YXQ-SG41-280 型高温灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司);SW-CJ-1F 型垂直无菌洁净工作台(上海博讯实业有限公司);UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Phyto-PAM 型叶绿素荧光仪(德国 Walz 公司).

1.2 藻种及其培养

小球藻及水华微囊藻由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供.小球藻采用悬乳剂(SE)培养液培养,水华微囊藻采用 BG11 培养液培养.接种的培养液在 121 ℃ 高压灭菌锅内灭菌 20 min,冷却至室温.在无菌洁净工作台中,紫外灭菌 20 min 后,进行接种.每次实验开始前,藻种均需经过 2~3 周期的活化,以保证藻种处于最佳生长状态.培养条件:温度为 25 ℃;湿度为 60%;白色日光灯,光暗比为 16 h:8 h,光强为 3 700 lx 左右;静置培养,每天定时人工摇动 3~4 次.在藻密度约为 $1.0 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 时,加入丙酮,体积分数分别为 0.000 5%,0.005 0%,0.050 0%,0.500 0%,5.000 0%.每组样设 3 个重复,并设空白对照组.静置培养,每天定期摇 3~4 次,培养 11 d.

1.3 藻类生长效应的测定

通过细胞计数法测定藻体细胞数量,通过分光光度计测定藻液在 680 nm 处的吸光度值,建立细胞数与吸光度之间的线性关系,可得有机溶剂对藻细胞数目的生长影响曲线.

1.4 藻类叶绿素荧光参数

采用 Phyto-PAM 型浮游植物荧光仪监测光合性能参数.最大光系统 II (PS II) 的光能转换效率 (F_v/F_m) 可看作潜在最大的光合效率,通过饱和脉冲猝灭方法测定. F_v/F_m 为

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m. \tag{1}$$

式(1)中: F_0 , F_m 分别为光化光照射下得到的最小和最大的荧光产量.

快速光响应曲线(RLC)反映不同实验条件下浮游植物光和活性的相对变化.拟合模型公式为

$$rETR = rETR_{\max} \cdot (1 - \exp(-\alpha \cdot PAR/rETR_{\max})) \cdot \exp(-\beta \cdot PAR/rETR_{\max}). \tag{2}$$

式(2)中: $rETR$ 为光合速率,即相对电子传递速率; $rETR_{\max}$ 为光抑制时的最大潜在相对电子传递速率,可作为一定光强下单位生物量内光合作用速率的探针; PAR 为光照强度; α 为 RLC 曲线的初始斜率; β 为光抑制参数. I_k 为半饱和光强,反映了浮游植物光适应能力,其计算公式为

$$I_k = rETR_{\max}/\alpha. \tag{3}$$

1.5 溶剂 NOEC 值的测定

利用藻类细胞生长曲线,通过方差分析,与空白组没有显著性差异的最高体积分数,可以认为是最大无影响体积分数(NOEC)^[7].

1.6 数据处理

采用 Office Excel 和 Origin 7.0 进行数据的图表分析,采用 SPSS 16.0 软件进行相关分析.

2 结果与分析

2.1 丙酮对小球藻和水华微囊藻藻细胞生长的影响

丙酮对小球藻和水华微囊藻藻细胞生长的影响,如图 1 所示.图 1 中:数据为平均值 \pm 标准差 ($n =$

3), $P<0.05$, 下同. 由图 1(a)可知:当丙酮体积分数为 0.000 5%~0.500 0%时,小球藻的藻细胞数随时间延伸呈现稳步增长的趋势;当丙酮体积分数低于 5.000 0%时,在第 1~11 天,对藻体抑制效应明显,抑制率达 86%,与其他组差异具有统计学意义($P<0.05$). 经方差分析可得:丙酮对小球藻 NOEC 为 0.500 0%. 由图 1(b)可知:当丙酮体积分数为 0.000 5%~0.050 0%,促进作用明显,最大促进率达 14%;而当丙酮体积分数为 0.500 0%~5.000 0%,丙酮对水华微囊藻抑制效应强烈;此时,0.500 0%, 5.000 0%的丙酮对藻体生长的抑制率分别达到 84%,92%. 经方差分析可得:丙酮对水华微囊藻 NOEC 值为 0.05%. 这说明与小球藻相比,水华微囊藻对丙酮具有更高的敏感性.

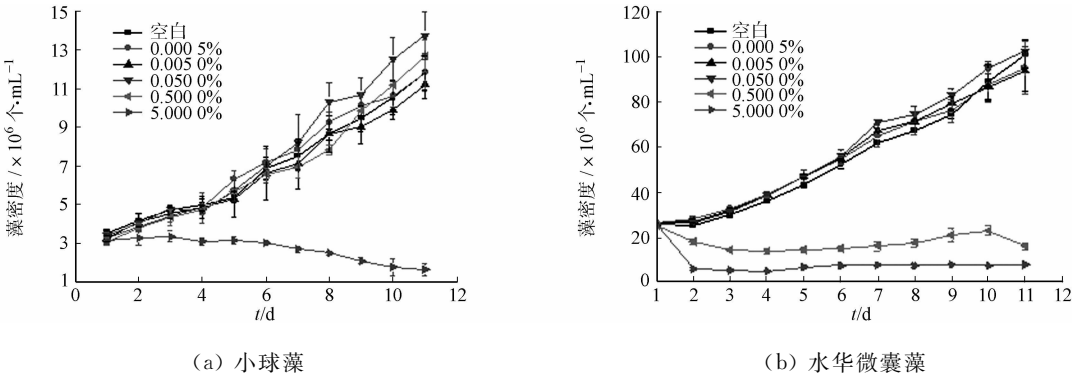


图 1 丙酮对小球藻和水华微囊藻细胞数目的影响

Fig. 1 Effect of acetone on cell number of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae*

2.2 丙酮对小球藻和水华微囊藻叶绿素荧光参数的影响

2.2.1 丙酮对 F_v/F_m 的影响 F_v/F_m 是反应胁迫对浮游植物的影响研究中重要的衡量标准^[8], 该值的改变可以灵敏地反应环境因子对于藻类而言是否适宜^[9]. 丙酮对小球藻和水华微囊藻最大光合作用效率(F_v/F_m)的影响,如图 2 所示. 由图 2(a)可知:当丙酮体积分数为 5.000 0%时,小球藻的 F_v/F_m 显著降低($P<0.05$),在第 5 天后,0.050 0%,0.500 0%处理组的 F_v/F_m 显著高于其他处理组及空白组($P<0.05$);0.000 5%,0.005 0%处理组与空白组无显著差异($P>0.05$).

由图 2(b)可知:从第 1 天开始,丙酮体积分数为 0.500 0%,5.000 0%时,显著降低了水华微囊藻的 F_v/F_m ($P<0.05$),尤其是 5.000 0%处理组;第 3 天后,其值降为零. 实验期间,0.000 5%~0.050 0%处理组的 F_v/F_m 均与空白组无显著差异($P>0.05$).

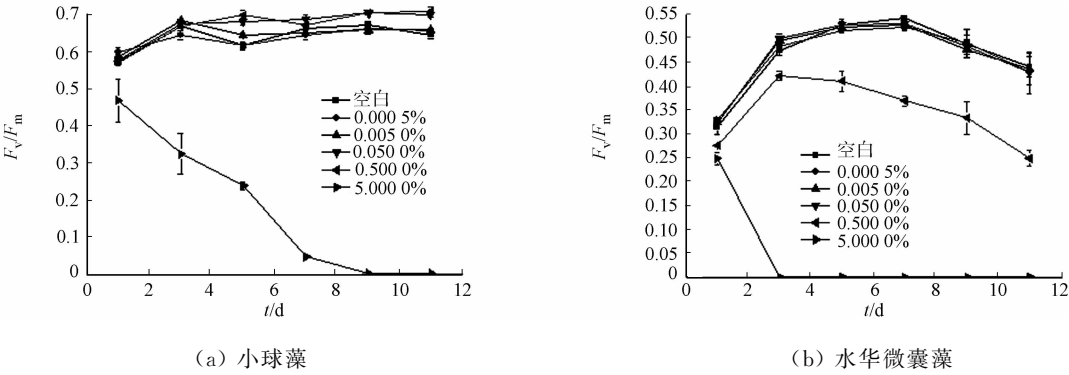


图 2 丙酮对小球藻和水华微囊藻最大光合作用效率的影响

Fig. 2 Effect of acetone on F_v/F_m of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae*

2.2.2 丙酮对快速光响应曲线的影响 通常情况下,快速光曲线与放氧量间有非常好的线性关系,能较好地反映植物的光合作用活性变化情况. 在第 1,5,9 天,丙酮对小球藻和水华微囊藻光响应曲线的影响,如图 3 所示. 由图 3(a),(c),(e)可知:丙酮体积分数为 5.000 0%时,小球藻 rETR 值显著降低($P<0.05$);体积分数为 0.000 5%,0.005 0%时,在暴露期间与空白组差异不具有统计学意义($P>0.05$);随着暴露时间的加长,体积分数为 0.050 0%,0.500 0%条件下,小球藻 rETR 值增加趋势明显.

由图 3(b),(d),(f)可知:丙酮体积分数为 5.000 0%时,水华微囊藻的 rETR 值显著降低;体积分数为 0.500 0%时,第 1 天与空白组无显著差异,随着暴露时间的增长,rETR 值显著降低($P<0.05$);其余

处理组在实验暴露期间与空白组差异不具有统计学意义($P>0.05$).

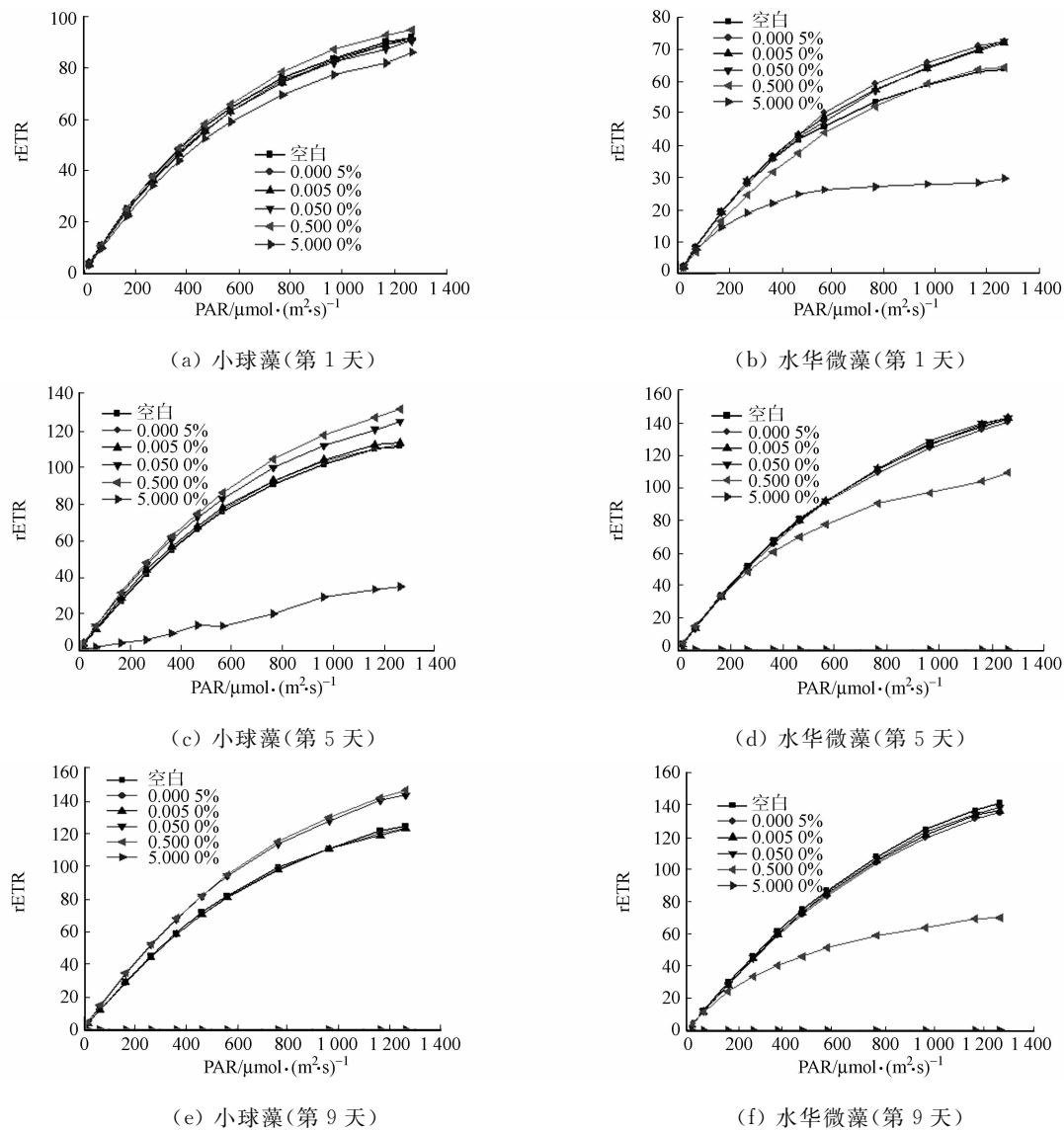


图 3 丙酮对小球藻和水华微囊藻快速光响应曲线的影响

Fig. 3 Effect of acetone on rapid light response curves of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae*

2.2.3 丙酮对叶绿素光合作用参数的影响 丙酮对小球藻和水华微囊藻叶绿素光合作用参数(α , $rETR_{\text{max}}$, I_k)的影响,如图 4 所示.图 4 中: * 为与空白对照组差异具有统计学意义($P<0.05$, $n=3$).由图 4(a), (c), (e)可知:暴露第 3 天后,丙酮体积分数为 0.050 0%, 0.500 0% 时,小球藻 α 值均高于空白组; 0.000 5%, 0.005 0% 处理组与空白组差异不具有统计学意义($P>0.05$); 体积分数为 0.005 0%~0.500 0% 时,从第 3 天开始,小球藻 $rETR_{\text{max}}$ 测量值均显著增加($P<0.05$); 体积分数为 0.000 5% 时,在暴露期间均与空白组差异不具有统计学意义.在暴露期间,0.000 5%~0.500 0% 处理组的小球藻光合参数 I_k 值均大于空白组,而 5.000 0% 处理组则显著降低.

由图 4(b), (d), (f)可知: 0.000 5%~0.050 0% 处理组的水华微囊藻 α , $rETR_{\text{max}}$, I_k 均表现出前增后降的趋势; α 在整个暴露期间内均与空白组差异不具有统计学意义($P>0.05$); $rETR_{\text{max}}$, I_k 在前 5 d 高于空白组,之后其值降低,0.500 0%~5.000 0% 处理组各参数值分别在第 5 天和第 3 天后显著降低.

2.2.4 丙酮对小球藻和水华微囊藻叶绿素的影响 实验最后 1 d,测定各处理组藻液的叶绿素 a 的质量浓度(ρ (叶绿素 a)),如图 5 所示.图 5 中:相同字母表示差异不具有统计学意义;不同字母表示差异具有统计学意义, $P<0.05$.由图 5(a)可知:丙酮体积分数为 0.000 5%~0.500 0% 时,小球藻叶绿素 a 质量浓度与对照组无明显差异;丙酮体积分数为 5.000 0% 时,小球藻叶绿素 a 质量浓度急剧下降,与对照组相比,减少 96.8%.

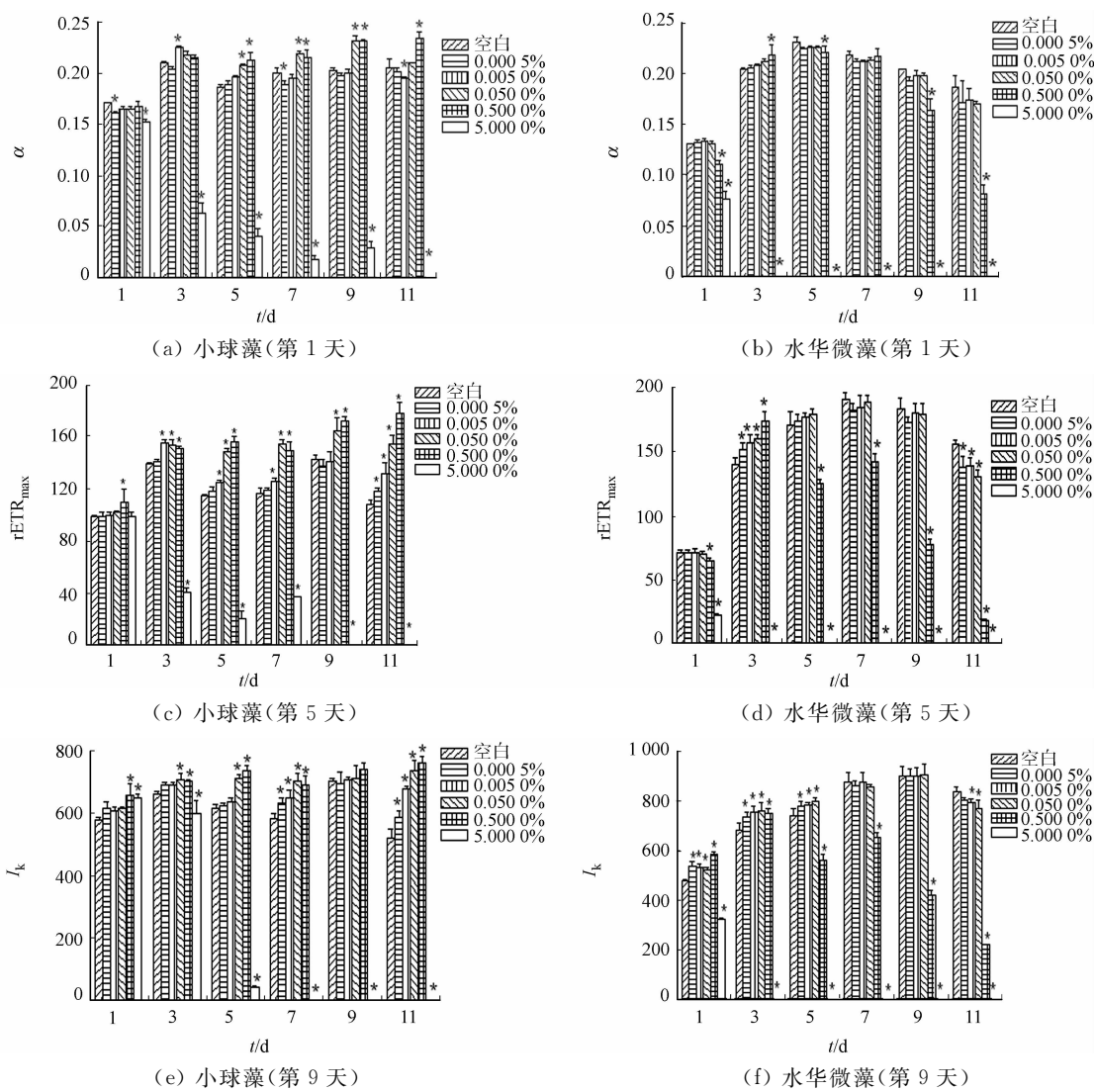


图 4 丙酮对小球藻和水华微囊藻光合作用参数的影响

Fig. 4 Effect of acetone on photosynthetic parameters of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae*

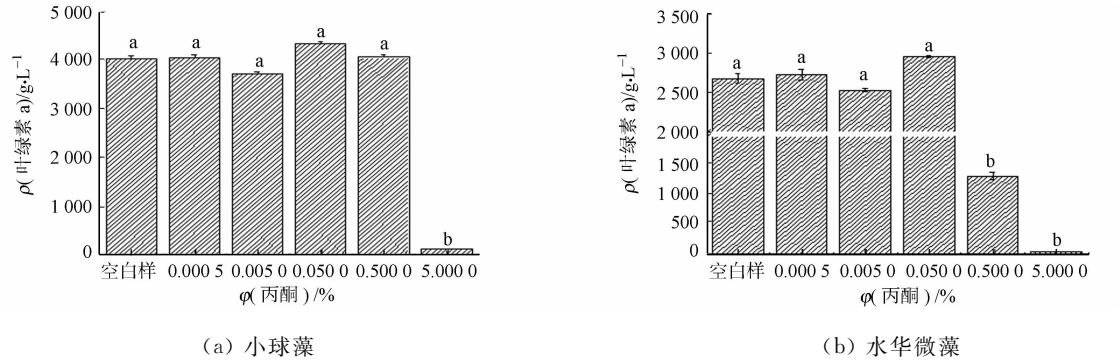


图 5 丙酮对小球藻和水华微囊藻叶绿素的影响

Fig. 5 Effect of acetone on chlorophyll in *Chlorella vulgaris* and *Microcystis flos-aquae*

由图 5(b)可知:水华微囊藻曲线与小球藻差异性同生长曲线相一致;丙酮体积分数为 0.005 0%~0.050 0%时,水华微囊藻叶绿素 a 与对照组无明显差异;丙酮体积分数为 0.500 0%,5.000 0%时,藻液叶绿素 a 明显降低,与对照组相比,分别减少了 88.2%,99.7%。

3 讨论

研究表明,丙酮对小球藻与水华微囊藻生长都产生低促高抑现象,然而,发生抑制作用的起始体积

分数不同,分别为 5.000 0%(小球藻)和 0.500 0%(水华微囊藻).这种现象称为毒物兴奋(hormesis)效应. Morré^[10]从分子生物学的角度对 hormesis 效应进行研究,一些低剂量刺激植物生长而高剂量抑制生长的物质,如丙酮、苯、二甲苯、氯仿和四氯化碳等在低剂量下能刺激生长,这与 NADH 氧化酶(NOX)活性有关. NOX 与植物细胞生长速率密切相关,能促进细胞的分裂速度. 在植物体内,当 NOX 活性被抑制后,细胞就不能增大,低剂量的刺激作用能增加 NOX 活性^[11].

体积分数较低的丙酮还可以提高藻类光合作用,提高 PS II 反应中心光化学速率 F_v/F_m 和光合活性. Stratton 等^[12]研究丙酮对藻类的影响中发现,低剂量的丙酮的双极性分子能改变细胞膜的磷脂结构而提高细胞膜的渗透性,如提高 CO₂ 的扩散性可提高光合作用强度,而细胞膜对 CO₂ 的扩散性是光合强度最重要的限制因子之一. 由此可见,一定体积分数的丙酮,不论是对光合作用的光反应阶段,还是对暗反应阶段均有促进作用. 丙酮为 0.000 5%~0.500 0%和 0.000 5%~0.050 0%时,分别提高了小球藻和水华微囊藻的最大光合作用速率和光能利用率,有利于减轻环境胁迫对光合作用的抑制,以增强光合系统反应中心的稳定性,有较强的光适应能力,从而改善和提高藻类的光合能力,进行物质积累. 而体积分数较高的丙酮有显著的光合抑制作用,严重损害了光合器官,导致藻类对光能的吸收、传递、转化和电子捕获等过程也遭到抑制,用于耗散的能量显著增多,阻碍了藻类生长、光合作用和物质的积累.

4 结束语

分析了丙酮对小球藻和水华微囊藻生长及光合作用的影响,得到丙酮对两种藻类的 NOEC 值. 这为进一步探索丙酮对藻类在生态毒性研究中的应用提供依据. 今后的研究的内容和目标是探索多种溶剂混合使用对藻类产生的联合毒性作用,以利于研究多种溶剂联合作用对环境产生的影响.

参考文献:

[1] 严铁,马建义,王品维. 有机溶剂在农药生物测定中对靶标生物的影响[J]. 浙江农业科学,2004(2):85-88.

[2] TADRPS M G,PHILIPS J,PATEL H,*et al.* Differential response of green algal species to solvents[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,1994,52(3):333-7.

[3] JAY A E. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,1996,57(2):191-198.

[4] TSARPALI V,DAILIANIS S. Toxicity of two imidazolium ionic liquids, [bmim][BF₄] and [omim][BF₄], to standard aquatic test organisms: Role of acetone in the induced toxicity[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2015,117:62-71.

[5] 宋伟华,刘茜,张燕,等. 农药助剂和实验室常用有机溶剂对大型溞的室内急性毒性研究[J]. 农药科学与管理,2014,35(3):33-35.

[6] SLIJKERMAN D M E,MOREIRA-SANTOS M. Functional and structural impact of linuron on a freshwater community of primary producers: The use of immobilized algae[J]. Environmental Toxicology and Chemistry,2005,24(10):2477-2485.

[7] 刘涛,熊丽,生秀梅,等. 高效氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究[J]. 化学与生物工程,2006,23(2):37-39.

[8] 韩丽丽. 浅水水体浮游藻类光合活性研究[D]. 武汉:华中科技大学,2013:7.

[9] 蔡卓平. 有机磷农药对海洋微藻的毒物兴奋效应及其机理研究[D]. 广州:暨南大学,2009:80.

[10] MORRÉ D J. A protein disulfide-thiol interchange protein with NADH: Protein disulfide reductase (NADH oxidase) activity as a molecular target for low levels of exposure to organic solvents in plant growth[J]. Human and Experimental Toxicology,1998,17(5):272-277.

[11] MORRÉ D J. Chemical hormesis in cell growth: A molecular target at the cell surface[J]. Journal of Applied Toxicology,2000,20(20):157-63.

[12] SREATTON G W,CORKE C T. Interaction between acetone and two pesticides towards several unicellular green algae[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,1981,27(1):13-16.