

Hg²⁺对南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 生长和抗氧化系统的影响及藻体富集 Hg²⁺的规律

李冲杰 綦晓青 安美玲 缪锦来* 王以斌 刘芳明 郑洲

(国家海洋局第一海洋研究所 海洋生物活性物质重点实验室 山东 青岛 266061)

摘要: 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 是南极生态系统重要的初级生产力和组成部分, 其长期生长在极地环境中, 有着特殊的生理机制。在生存环境和生长条件发生变化时, 冰藻的膜脂系统和蛋白含量都会发生变化, 而在受到重金属胁迫时, 冰藻的超微结构也会发生明显变化。【目的】研究 *Chlorophyceae* L-4 在重金属离子 Hg²⁺ 胁迫条件下的状态和 Hg²⁺ 富集以及对其抗氧化系统的影响, 为南极环境监测提供依据。【方法】绘制南极冰藻细胞在重金属离子 Hg²⁺ 不同浓度胁迫条件下的生长曲线, 观察其超微结构; 测定丙二醛含量和 SOD 酶活性变化; ICP-MS 法研究藻体富集 Hg²⁺ 规律。【结果】Hg²⁺ 在低浓度时 ($\leq 100 \mu\text{g/L}$), 细胞个数较正常条件明显偏少; 在高浓度时 ($\geq 250 \mu\text{g/L}$), 出现细胞死亡。丙二醛含量随 Hg²⁺ 浓度升高而升高, SOD 酶活性则先增强再减弱。藻体富集 Hg²⁺ 在 1 h 达到峰值, 而在 Hg²⁺ 浓度持续升高时, 富集量轻微降低。【结论】Hg²⁺ 离子对冰藻生长有抑制毒害作用; 对 *Chlorophyceae* L-4 抗氧化系统有明显不利影响; L-4 富集 Hg²⁺ 在 1 h 内饱和, Hg²⁺ 过高时, 富集量稍微降低。

关键词: *Chlorophyceae* L-4, 生长状态, 抗氧化系统, Hg²⁺ 富集, 南极冰藻

Influence of Hg²⁺ on the growth and the antioxidant system of an Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 and the feature of its accumulating Hg²⁺

LI Chong-Jie QI Xiao-Qing AN Mei-Ling MIAO Jin-Lai* WANG Yi-Bin
LIU Fang-Ming ZHENG Zhou

(Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract: Antarctic ice algae *Chlorophyceae* L-4 is an important component and primary productivity of Antarctic ecosystem. It has specific physiological mechanism for longtime survival in the polar environment. When living environment and conditions get change, membrane-lipid system and protein level varies. Ultrastructure of ice algae also changes under heavy metal stress.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200272); 海洋公益性行业科研专项项目(No.201305027, 201405015); 国家海洋局青年海洋科学基金项目(No. 2013106); 海洋一所基本科研专项基金项目(No. 2013G32); 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室开放基金项目(No. MBSMAT-2012-08)

*通讯作者: Tel: 86-532-88967430; 信箱: miaojinlai@163.com

收稿日期: 2014-04-24; 接受日期: 2014-06-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-03

[Objective] To observe *Chlorophyceae* L-4 state under Hg^{2+} stress, and study Hg^{2+} enrichment and influence on antioxidant system of *Chlorophyceae* L-4. Then provide theoretical foundation for Antarctic environmental monitoring. **[Methods]** Drew growth curve of Antarctic algae in different concentration stress conditions of Hg^{2+} and algae ultrastructure observation. Measured MDA content and SOD enzyme activity. Detected Hg^{2+} enrichment rule by ICP-MS. **[Results]** Cell count decreased in lower Hg^{2+} concentration ($\leq 100 \mu g/L$), and in higher concentration ($\geq 250 \mu g/L$), algae cells died. MDA content increases as Hg^{2+} concentration increased. SOD enzyme activity was enhanced at first and then decreased. Hg^{2+} enrichment reaches a peak value within one hour and after that, enrichment value reduced slightly. **[Conclusion]** Hg^{2+} would be inhibiting and poisonous to the growth of algae. Hg^{2+} has obvious adverse influence on *Chlorophyceae* L-4 antioxidant system. Hg^{2+} absorption of L-4 reach saturation in one hour. Enrichment amount of Hg^{2+} decreased slightly when it is over concentrated.

Keywords: *Chlorophyceae* L-4, Growth status, Antioxidant system, Hg^{2+} accumulating, Antarctic ice algae

南极冰藻栖息于南极环境海冰表面、内部和底部,是南极生态系统初级生产力和生物群落的重要组成部分^[1-2],南极冰藻能够生长在严酷的极地环境并且大量繁殖,必定具有适应这种极端环境的特殊生理机制^[3]。在长期的进化过程中,这种适应性可能是分子水平上的改变,引起生化组成和含量的改变^[4]。Smith等^[5]研究表明,在不同的生长条件下(如光照、温度和营养盐限制),南极冰藻蛋白质的含量会发生变化,这是因为细胞内的功能蛋白要维持细胞的正常功能之故。正如Thompson^[6]所指出的:生存环境变化可以影响到南极冰藻膜脂的组成。然而,对南极冰藻的生化组成研究报道很少^[7],缪锦来等^[8]的研究表明,细胞受重金属污染后其超微结构会发生变化,但是重金属离子对南极冰藻的生长影响尚未见报道。

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的主要产物之一,它能交联脂类、核酸、糖类及蛋白质,也可氧化巯基,其含量可以反映膜脂过氧化的水平^[9-10]。丙二醛是植物细胞在逆境下发生膜脂过氧化作用的产物之一,通常将它作为膜脂过氧化作用强弱的一个重要标志^[11]。Halliwell^[12]认为,丙二醛即是过氧化产物,又是一种能强烈地与细胞内各种成分发生反应的物质,因而造成酶和膜的严重损伤,以及膜电阻和膜的流动性降低,最终导致膜的结构及生理完整性的破坏^[12]。超氧化物歧化酶是植物体内重要的

保护性酶,具有清除植物细胞内活性氧、保护植物体免受伤害的作用^[13]。研究证明,它们的活性与植物抗污染能力、抗辐射能力和耐高温能力等逆境胁迫有关^[14-18]。超氧化物歧化酶在紫外线辐射胁迫中所起的作用已经得到许多证实,超氧化物歧化酶能够以活性氧自由基为基质进行歧化反应^[19]。 Hg^{2+} 不仅影响南极冰藻的生长和细胞形态,也影响冰藻抗氧化系统。王红叶等^[20]、Meenakshi等^[21]和Bajguz^[22]研究表明,与其他形式的胁迫相似,重金属胁迫也能导致产生大量活性氧自由基,这些自由基能够在一定程度上对抗重金属的毒害,使毒害症状减轻,但当自由基过多时又会对机体造成伤害。此时,抗氧化酶系统的活性会受到诱导来清除多余的自由基。

生物富集是指环境中的化学物质在生物体内的浓缩。藻类对金属离子产生富集作用,或是作为抵御金属离子毒害效应的一种防御机制,或是其细胞壁化学的一个方面^[23]。现代人类活动的加剧,使得南极地区不再是唯一的净土^[24]。人类活动向环境中释放的重金属离子不可避免地对南极的水体造成了污染。南极冰藻作为南极生态系统中重要的组成部分,必然在重金属离子的生物富集方面有着其特定的生理机制。

本文研究了重金属离子 Hg^{2+} 对南极冰藻生长情况和抗氧化系统的影响,并且观察了冰藻细胞在不同 Hg^{2+} 浓度胁迫条件下的超微结构,同时研究了南

极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 藻体富集 Hg^{2+} 的规律,以期能为南极生物环境监测提供实验数据,同时为环境污染的控制和预防提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种: 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 系国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室在 2001 年第 18 次南极科学考察时采集的南极海水水样和浮冰中分离出来的。培养温度为 0–6 °C, 光强 1 300–1 900 lx, 光照周期为 12 h/12 h。不充气, 每日摇动 3 次。

1.1.2 培养基: f/2 培养基(mg/L): NaNO_3 75, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, Na_2EDTA 4.360, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.160, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.010, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.023, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.012, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.180, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.070, VB_1 1×10^{-4} , VB_2 5×10^{-4} , Biotin 5×10^{-4} 。以上试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.1.3 试剂溶液: HgCl_2 标准溶液均用分析纯试剂配制; 2.5%戊二醛(体积比); 1%鞣酸(体积比); 乙醇; 环氧树脂; 柠檬酸铅; 0.1 mol/L 磷酸缓冲液。

1.1.4 仪器设备: HITACHI S450 型扫描电子显微镜, 日本日立公司; HITACHI H7000 型透射电镜, 日本日立公司; LKBNOVA 型超薄切片, 瑞士 DAKO 公司; UV-9100 型分光光度计, 美国 Labtech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同浓度 Hg^{2+} 离子胁迫下南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 生长曲线的测定: 当该藻生长到细胞密度为 10^5 cells/cm³ 时, 向培养瓶中添加不同体积的 Hg^{2+} 离子(HgCl_2)溶液, 使其分别达到预期浓度梯度; Hg^{2+} 浓度依次为 100、250、600 和 1 500 $\mu\text{g/L}$ 。在 16 d 中, 每隔 1 d 取样 1 次, 用血球计数板在光学显微镜下计数, 设置 3 个平行样, 以保证数值尽量准确, 绘制生长曲线。(本文试验中所用到的南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 均为处于对数生长期前期, 细胞浓度为 10^5 个/mL, 以保证试验的统一性)。

1.2.2 Hg^{2+} 胁迫条件下冰藻细胞的形态观察: (1)

扫描电镜制作方法及条件。样品以 3 000 r/min 的转速离心 3 min 后, 用 2.5%的戊二醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制 pH 7.2)固定, 以 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 3 次, 乙醇(50%–100%)逐级脱水, 临界点干燥, 喷涂机涂金, 最后用 HITACHIS 450 型扫描电子显微镜观察并拍照。

(2) 透射电镜制作方法及条件。样品以 3 000 r/min 离心 3 min 后, 用 2.5%的戊二醛(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.2)固定, 以 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤 3 次, 用 1%的鞣酸(0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.4)于 4 °C 保存 3 h, 用乙醇以 10% 的递增率逐级脱水, 环氧树脂渗透、包埋, LKBNOVA 型超薄切片器切片, 柠檬酸铅染色, 以 HITACHI H7000 型电镜观察并拍照。

1.2.3 Hg^{2+} 对南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 抗氧化系统的影响: (1) TBA 法测定不同浓度 Hg^{2+} 对南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 丙二醛(MDA)含量的影响。将南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 在不同浓度 Hg^{2+} 培养液中(100、250、600、1 500 $\mu\text{g/L}$)培养 12 h 后, 对藻培养液进行 9 000 r/min 离心, 弃上清, 称取 0.5 g 沉淀, 加 pH 7.0 的 50 mol/L 磷酸缓冲液(含 1% PVP)及少量石英砂, 置冰浴中研磨提取, 匀浆液于 20 000 r/min 下冷冻离心 20 min, 取上清液定容至 5 mL, 按 Dhindsa 方法^[25]测定 MDA 含量。取 1 mL MDA 提取液, 加入 3 mL 27%三氯乙酸及 1 mL 2% 硫代巴比妥酸, 在 95 °C 水浴中保温 30 min 后, 立即置于冰浴中冷却, 于 1 500 r/min 下离心 10 min, 测 OD_{532} 值, 减去 600 nm 下非特异吸收值, 按 155 mmol/(L·cm)消光系数计算 MDA 含量。为保证数值的准确, 每个 Hg^{2+} 浓度试验设置 3 个平行样, 试验结果取平均值。用 Origin Pro 8.0 作图。

(2) 不同浓度 Hg^{2+} 对南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 SOD 酶活性的影响。将处于对数生长期前期的 *Chlorophyceae* L-4 藻种接种于含不同梯度浓度 Hg^{2+} 的 f/2 培养基中, 形成五个浓度梯度: 0、100、250、600、1 500 $\mu\text{g/L}$ 。取培养 3 d 的藻液(500 mL), 9 000 r/min 离心 10 min, 取藻体沉淀。SOD 测定采

用 Beauchamp 等^[26]建立、Bealey 等^[27]改进的氮蓝四唑(NBT)光化学还原反应法进行测定。反应体系总体积为 3 mL,其中含有 5×10^{-3} mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8), 13×10^{-3} mol/L 蛋氨酸, 75×10^{-6} mol/L NBT, 100×10^{-9} mol/L EDTA 和 2×10^{-3} mol/L 核黄素。实验中加入粗酶液 0.1 mL,在荧光灯下光照 20 min。光照时,反应体系中产生的氧自由基使 NBT 还原,形成蓝色甲(Blue formazan),SOD 作为氧自由基清除剂可以抑制此反应。反应温度 25 °C。反应结束后,利用 UV-9100 型分光光度计在 560 nm 处测定吸光值。测定使用 0.1 mL 磷酸缓冲液代替粗酶液测得对照组 OD 值。一个 SOD 酶活力单位定义为能引起反应初速度(指不加酶提取液时)半抑制时的酶量。每个 Hg^{2+} 浓度试验设置 3 个平行,试验结果取平均值以保证数据的准确有效。用 Origin Pro 8.0 作图。

1.2.4 ICP-MS 方法研究南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 藻体富集 Hg^{2+} 规律: (1) ICP-MS 测定条件:射频频率:1 300 W;采样深度:7 mm;采样锥 H:1.0 mm;截取锥 V:0.4 mm;载气量:1.15 L/min;补气量:1.0 L/min;雾化泵转速:0.1 r/s。

(2) 南极冰藻 L-4 对 3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Hg^{2+} 富集量随吸附时间变化的规律。向正处于对数生长期前期的 L-4 分别添加预先配制好的 Hg^{2+} 溶液,使其初始浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$,分别吸附 10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、4 h 和 8 h 后离心收集湿藻体,然后用冷冻干燥得到干藻体,精确称取各吸附时间的干藻体 0.1 g,用 ICP-MS 方法测定各种干藻体中的 Hg^{2+} 含量。试验重复 3 次,结果取平均值。

(3) 南极冰藻 L-4 对不同浓度 Hg^{2+} 吸附 1 h 后的吸收富集量规律。向正处于对数生长期前期的 L-4 分别添加预先配制好的 Hg^{2+} 溶液,使其初始浓度依次为 0.50、1.25、3.00、6.25、15.00、30.00 $\mu\text{mol/L}$,富集 1 h 后离心收集藻体,然后用冷冻干燥机冻干得到干藻体。将各种不同浓度的干藻体分别称取 0.1 g,用 ICP-MS 方法测定各种干藻体中的 Hg^{2+} 含量。试验重复 3 次,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Hg^{2+} 对南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 生长的影响

图 1 显示南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 在对照组以及含 Hg^{2+} 浓度为 100–1 500 $\mu\text{g/L}$ 之间的 4 个不同浓度培养液中的生长曲线。从图 1 可看出,实验中不同浓度的 Hg^{2+} 对该藻的生长均有明显的抑制作用。在 100 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 培养液中,L-4 的生长只是轻微受到影响。在 600 $\mu\text{g/L}$ 和 1 500 $\mu\text{g/L}$ 两组中藻体数量出现了显著的降低。

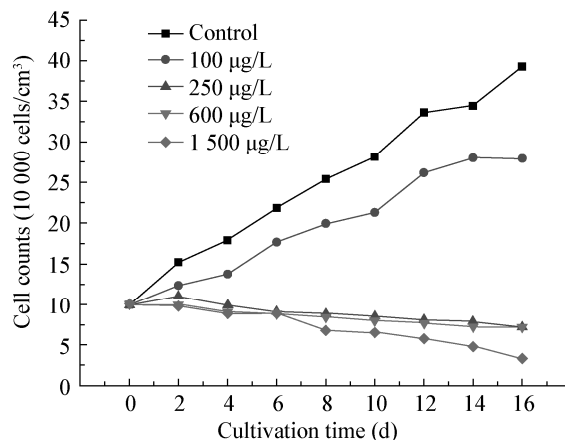


图 1 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 在含不同浓度 Hg^{2+} 培养液中的生长曲线

Figure 1 Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 growth curve in different Hg^{2+} concentration culture medium

2.2 冰藻细胞形态观察

2.2.1 扫描电镜观察结果:如图 2A 所示,正常藻细胞呈圆形,表面略有凹凸不平的褶皱,且有少量分泌物。图 2B 所示为 1 500 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 溶液处理 3 d 后的观察结果,细胞外形已经发生巨大变化。藻细胞变为梭形,表面出现较大空洞,细胞骨架已经裸露在外,细胞周围有大量絮状物质,推测是细胞器泄漏后集聚而成。

图 2C 显示 3 个正常细胞,图 2D 显示 3 个受胁迫的细胞。在图 2D 中,最左侧藻细胞受毒害程度还不甚大,只是表面下部发生了一些凹陷,在某些部位出现了裂隙。右侧两个藻细胞已经明显发生了畸变,细胞残缺不全,受毒害程度与图 2B 所示的单个藻细胞类似。

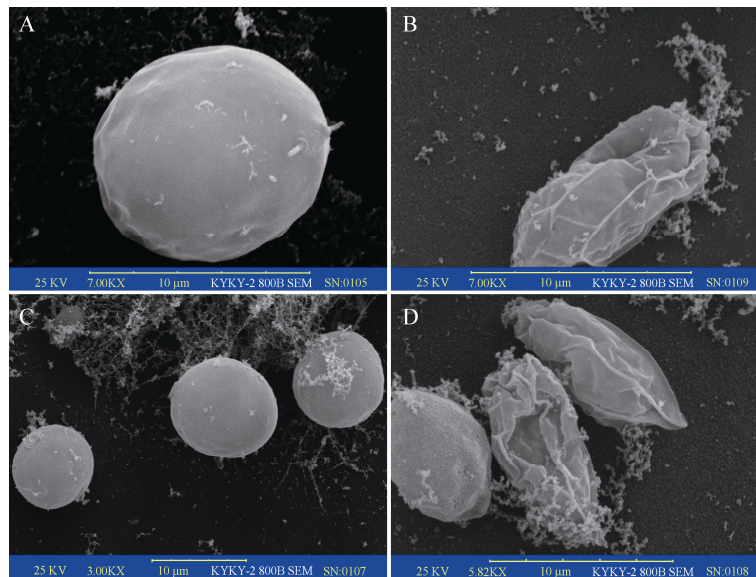


图2 正常藻细胞和胁迫藻细胞扫描电镜图

Figure 2 Normal and stress algae cells SEM pictures

注: A: 单个正常藻细胞; B: 单个胁迫藻细胞; C: 3个正常藻细胞; D: 3个胁迫藻细胞。Hg²⁺浓度为1 500 μg/L, 胁迫时间为3 d。
Note: A: Single normal cell; B: Single stress cell; C: Three normal cells; D: Three stress cells. Hg²⁺ concentration was 1 500 μg/L, stress time was 3 days.

2.2.2 透射电镜观察结果: 在正常情况下, 南极冰藻的超微结构如图 3A: 细胞壁光滑致密; 叶绿体约占细胞体积的 40%左右, 具有多数小液泡, 线粒体较小, 淀粉粒少量存在, 细胞核中核膜核仁清晰可见。南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 受胁迫细胞(图 3B)与正常细胞(图 3A)相比, 细胞壁发生畸变。在图 3B 中, 已经很难观察到正常的细胞内部结构, 说明损伤程度相当大。

在图 3B 和图 3C 中, 细胞膜发生了形状变化。正常细胞的细胞膜近乎圆形, 而受胁迫细胞的细胞完全呈不规则状; 由于细胞膜收缩褶皱, 细胞壁和细胞膜之间的细胞间隙变大, 质壁分离现象明显。

在图 3B 中, 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 受胁迫细胞中液泡数目增多, 体积增大, 这是微藻细胞进行自我抵御的一种防护方式。可以推测, 经汞处理的南极冰藻中液泡的增加也是藻类对汞毒性的一种适应, 进入细胞中的无机汞可能有一部分为液泡所吸收富集或被转化, 以降低汞毒性对其它细胞器的毒害。在图 3A 正常细胞中, 可以观察到清晰的细胞核、核膜和核仁; 在受胁迫细胞中核膜模糊,

核仁相对于正常细胞, 也比较模糊。

在图 3C 中, 受胁迫细胞叶绿体的类囊体片层受到不同程度的影响, 出现了一些致密区域; 在图 3A 正常细胞中, 则可观察到清晰的条纹状叶绿体, 而在受胁迫细胞中, 叶绿体收缩成致密的黑色条带, 这表明叶绿体已极大损伤。

比较图 3A 和图 3C, 杆状或椭圆状的线粒体在图 3A 正常细胞中清晰可见, 且数量不少, 其内部的嵴也较清楚, 而受胁迫细胞的线粒体与正常细胞的相比, 出现了体积膨大和嵴减少的现象。在一些受胁迫严重的细胞中(图 3C), 已经观察不到线粒体, 可以推测线粒体已大多解体。这就是微藻细胞受到严重损伤的情形, 是不可恢复的变化。

2.3 Hg²⁺对 L-4 抗氧化系统的影响

2.3.1 不同 Hg²⁺浓度对 MDA 含量的影响: 如图 4 测定结果显示, MDA 的含量在 Hg²⁺存在条件下要比正常情况下 MDA 的含量要高, 而且随着 Hg²⁺浓度的升高, MDA 的含量也随之升高, 这说明 L-4 在 Hg²⁺胁迫下细胞膜脂被氧化而产生大量过氧化物, 即丙二醛。Hg²⁺浓度越高, 过氧化程度越大。

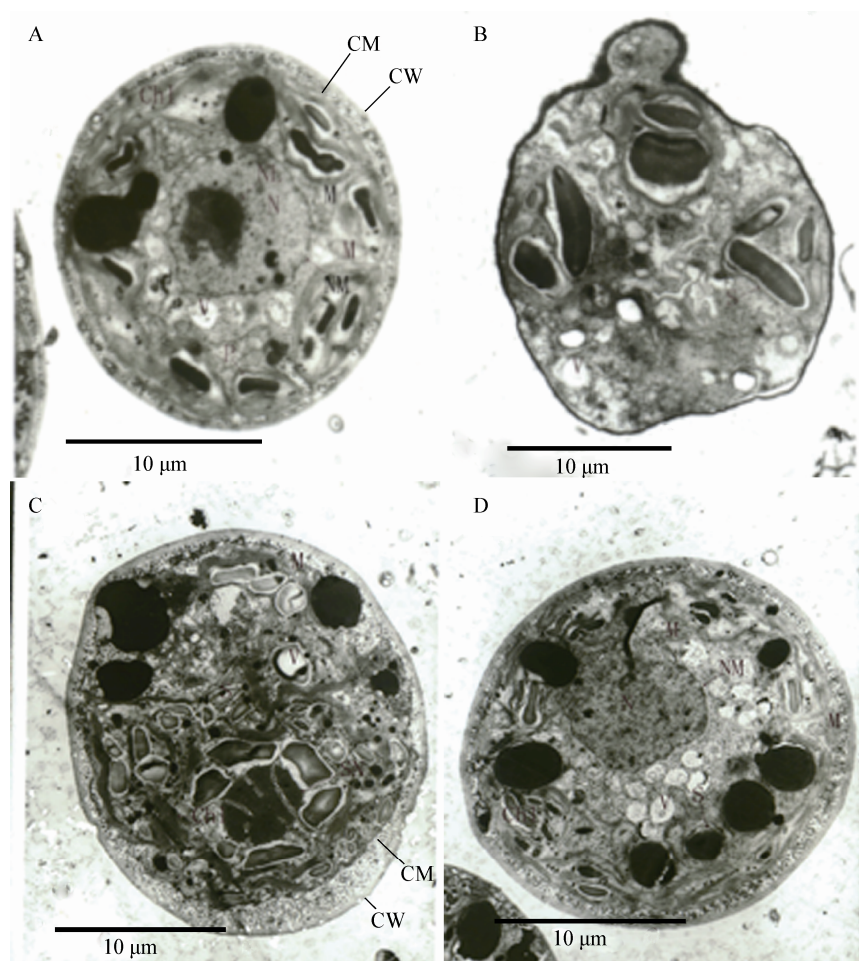


图3 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 的透射电镜图

Figure 3 Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 TEM pictures

注: A、D 为正常细胞, B、C 为毒害细胞, Hg^{2+} 浓度为 $1\ 500\ \mu\text{g/L}$. B 胁迫时间为 3 d, C 胁迫时间为 1 d. 放大倍数分别为 A 为 5 000 倍, B 为 7 000 倍, C 为 5 000 倍, D 为 3 500 倍. CW: 细胞壁; CM: 细胞膜; Chl: 叶绿体; M: 线粒体; S: 淀粉粒; SN: 淀粉核; N: 细胞核; NM: 核膜; NL: 核仁.

Note: A and D show normal cells, B and C show poisoned cells, Hg^{2+} concentration was $1\ 500\ \mu\text{g/L}$. B stress time was 3 days, C was 1 day. Magnification: A: 5 000; B: 7 000; C: 5 000; D: 3 500. CW: Cell wall; CM: Cell membrane; Chl: Chloroplast; M: Mitochondria; S: Starch; SN: Starch nucleus; N: Cell nucleus; NM: Nuclear membrane; NL: Nucleolus.

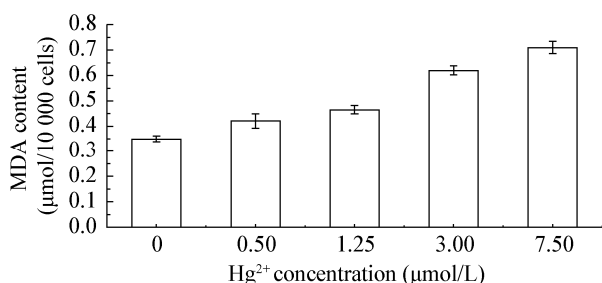


图4 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 在不同浓度 Hg^{2+} 条件下 MDA 含量变化

Figure 4 Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 MDA content under different Hg^{2+} concentrations

2.3.2 不同浓度 Hg^{2+} 对 L-4 SOD 酶活性变化的影响: 从图 5 中可以观察到, SOD 酶活性随着 Hg^{2+} 浓度的升高而呈现出先上升后下降的趋势, 这表明在 Hg^{2+} 胁迫下藻体本身会增强抵抗力, SOD 酶活性上升, 这是 L-4 对外界环境的适应。在一定范围内, L-4 对 Hg^{2+} 的胁迫有抵抗作用, 这是 L-4 细胞应对 Hg^{2+} 毒害的适应机制, 但这只是在当 Hg^{2+} 浓度较低时出现的状况。当 Hg^{2+} 浓度超出一定范围时, 藻的生命力已经受到严重的破坏, SOD 酶的活性也随之锐减。

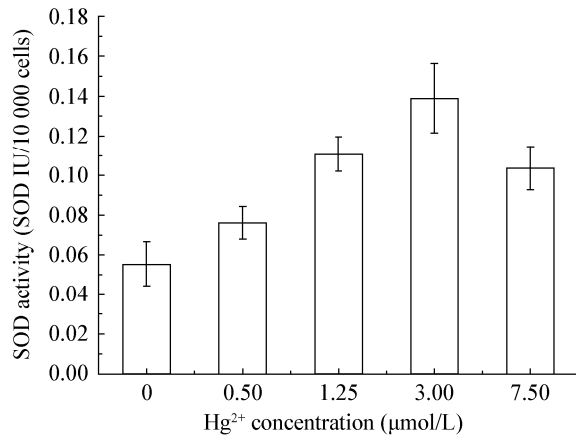


图 5 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 在不同浓度 Hg^{2+} 下 SOD 酶活性变化

Figure 5 Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 SOD enzyme activity under different Hg^{2+} concentrations

2.4 南极冰藻 L-4 藻体富集 Hg^{2+} 的规律

2.4.1 南极冰藻 L-4 对 3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Hg^{2+} 富集量随吸附时间变化的规律: 由图 6 可以看出, 南极冰藻对 Hg^{2+} 的富集量随着吸附时间的延长而持续上升, 在吸附时间到 1 h 时, 离心收集的干藻体测出的含 Hg^{2+} 量最高。从 1 h 开始 L-4 中的 Hg^{2+} 含量开始持续缓慢地下降, 到 4 h 的时候, L-4 中的 Hg^{2+} 含量开始基本保持恒定。综合上述数据, 从开始添加 Hg^{2+} 到吸附 1 h 是 L-4 大量吸附 Hg^{2+} 的过程, 而从 1 h 到 4 h 是 L-4 富集的 Hg^{2+} 量从开始保持恒定到持续缓慢下降至结束的过程(大约 3 h), 这个过程是 L-4 细胞催化膜运输和对 Hg^{2+} 适应的过程。这说明南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 对 Hg^{2+} 的吸收主要在 1 h 内。

2.4.2 南极冰藻 L-4 对不同浓度 Hg^{2+} 吸附 1 h 后的吸收富集量规律: 南极冰藻 L-4 对 0.50、1.25、3.00、6.25、15.00 和 30.00 $\mu\text{mol/L}$ 6 种不同浓度 Hg^{2+} 吸附 1 h 的富集量实验数据结果如图 7 所示。分析上述结果, 可以看出随着添加 Hg^{2+} 浓度的增高, 冷冻干燥后的干藻体中的 Hg^{2+} 含量也是上升的; 当 Hg^{2+} 浓度达到 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 干藻体中的 Hg^{2+} 含量为 0.337 8 mg/g。其后, 虽然 Hg^{2+} 浓度继续提高到 15.00 $\mu\text{mol/L}$ 和 30.00 $\mu\text{mol/L}$, 但是干藻体中的 Hg^{2+} 含量不但没有继续上升, 相反却是稍有下降, 这

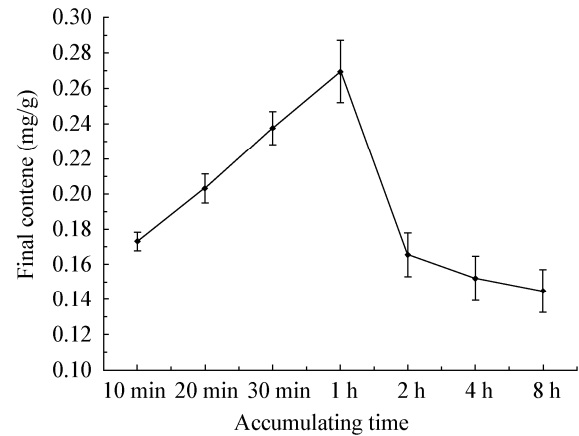


图 6 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 对 3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Hg^{2+} 富集量随时间的变化规律

Figure 6 Enrichment concentration curve of Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 in 3 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} in vary times

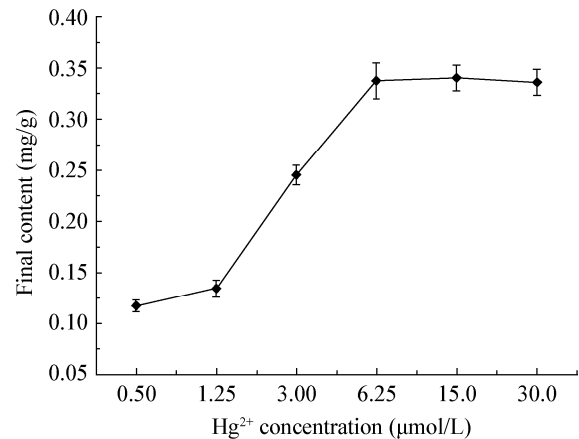


图 7 南极冰藻 *Chlorophyceae* L-4 对不同浓度 Hg^{2+} 的吸收富集规律

Figure 7 Antarctic algae *Chlorophyceae* L-4 assimilate different concentration Hg^{2+} curve

说明 L-4 对 Hg^{2+} 的吸收已经到了一定极限, 超出了这个极限, 即使 Hg^{2+} 浓度继续升高, 单位质量干藻体中的 Hg^{2+} 含量却不再增加, 而是开始降低。

3 讨论

实验结果表明, 重金属离子 Hg^{2+} 对南极冰藻 L-4 的生长有明显影响。 Hg^{2+} 在低浓度时对冰藻的生长有抑制作用, 随着其浓度的升高, 抑制作用越发明显, 在达到一定浓度时, 冰藻细胞出现了明显的负增长, 这表明 Hg^{2+} 胁迫条件对冰藻细胞有破坏作用。

实验观察表明,冰藻细胞在较高浓度的 Hg^{2+} 作用下,冰藻的细胞超微结构发生了明显变化,影响了细胞器的结构和功能。 Hg^{2+} 还可以破坏质膜的正常通透性,使细胞内外物质交换受阻,从而影响细胞生活^[28]。在酵母菌和真菌中,很大部分富集的金属离子是在液泡中,它们以离子形式或与小分子磷酸盐络合的形式存在^[29]。叶绿体受重金属污染后,其最显著的变化发生在膜系统上,一般进入叶绿体的重金属往往富集在类囊体上,与膜蛋白结合,从而破坏叶绿体的膜系统^[30]。当 Hg^{2+} 浓度增加到一定程度时,各细胞器都会受到不可逆的破坏,由此造成细胞功能的丧失甚至使细胞死亡。有资料表明,细胞受重金属污染后其超微结构的变化与核膜变形及细胞膜的渗透性受到破坏有关^[28]。细胞核是稳定的细胞器,是遗传物质代谢的主要场所,细胞核遭到破坏,必将影响到遗传物质的合成,影响冰藻的正常发育^[25]。冰藻细胞受 Hg^{2+} 胁迫后,细胞核变形使正常的核内外物质和信息传递受到干扰和破坏,因而严重影响基因活动。进入细胞内的重金属往往还使酶失活,细胞的正常活动受阻。

膜脂过氧化作用的产物丙二醛含量的变化是质膜损伤程度的重要标志之一^[30-33]。由于 Hg^{2+} 离子浓度增加的胁迫,导致细胞内活性氧的大量产生,从而使细胞内活性氧代谢的平衡被破坏^[34]。活性氧过剩产生的毒害之一,就是引发或加剧膜脂过氧化作用,造成膜系统的损伤^[35]。超氧化物歧化酶是植物体内重要的保护性酶,具有清除植物细胞内活性氧、保护植物体免受伤害的作用^[36],对于南极冰藻 L-4 而言,超氧化物歧化酶的作用显得更为重要,也更容易受到外界胁迫影响。低浓度的 Hg^{2+} 胁迫能够诱导产生活性氧自由基,SOD 酶活性增强以便保护藻体细胞免受伤害。但是在高浓度 Hg^{2+} 压力下,L-4 藻体细胞的生命力受到严重威胁,SOD 酶活力也急剧下降。由此可见, Hg^{2+} 的存在,对 L-4 的抗氧化系统有着明显的不良影响。

光合作用和生物积累是藻类的两个基本生理功能,水体内藻类的生物地球化学作用主要由这两

个基本生理功能决定^[37-38]。金属离子在藻类中的吸收和储存比排出体外快,因此会在藻体内产生积累^[39]。南极冰藻是南极生态系统的重要初级生产力,重金属元素对 L-4 的影响,将涉及到整个南极生态系统。Schiewer 等研究^[40]显示:藻类对水体中重金属元素的生物积累过程及藻类对金属的生物吸收过程十分复杂。藻类细胞质膜上因为有非专一性的蛋白质通道^[41],因而重金属元素离子会被藻体吸收。在本实验中我们可以看到,L-4 吸附 Hg^{2+} 主要在 1 h 之内,而 Sunda 等^[42]的研究证实藻类对金属的吸收或吸附一般在短时间内达到饱和,本实验结果与之相一致。另一方面,结果显示只有在 Hg^{2+} 浓度较低时,L-4 的吸附富集作用才会比较明显。在 Hg^{2+} 浓度持续升高时,其富集量不但没有上升反而有稍微下降。我们猜测这是由于高浓度的 Hg^{2+} 压力已经超出了 L-4 的耐受能力,L-4 的细胞膜脂结构遭到破坏,造成了 Hg^{2+} 的流失和富集量的下降。这与本实验观察到的 L-4 超微结构的变化相一致。

综合上述讨论我们可以得出,在 Hg^{2+} 存在条件下,南极冰藻 L-4 的生长受到抑制;在 Hg^{2+} 浓度较高时,冰藻细胞受到毒害是不可逆的,超微结构的解体和变化会导致细胞的死亡;同时, Hg^{2+} 的存在使得 L-4 的膜脂被大量过氧化,SOD 酶活性也受到严重不利影响;L-4 对重金属离子 Hg^{2+} 有一定的吸附富集效用,而且其富集作用发生的时间较快,在短时间内即达到饱和,但是这种吸附富集作用受到 Hg^{2+} 浓度的影响,在较高 Hg^{2+} 浓度时其富集作用不但不会继续升高,其生命本身也受到了严重威胁。这对南极生物环境监测和环境污染的控制及预防都具有积极的指示意义。

参 考 文 献

- [1] Garrison DL, Sullivan CW, Ackley SF. Sea ice micro-bio communities in Antarctica[J]. *Bioscience*, 1986(36): 243-250
- [2] Sarah MG, Sullivan CW. The vertical zonation of diatoms in an Antarctic fast ice community[J]. *Sea Ice Microbial Communities*, 1985, 21(3): 401-409
- [3] Miao JL, Kan GF, Jiang YH, et al. Response of bio-chemical compositions of four Antarctic ice microalgae to UV-B irradiation enhancement[J]. *Marine Sciences*, 2004, 28(9): 26-31

- (in Chinese)
 缪锦来, 阚光锋, 姜英晖, 等. 4种南极冰藻的生化组成对UV-B辐射增强的响应[J]. 海洋科学, 2004, 28(9): 26-31
- [4] Miao JL, Li GY, Hou XG, et al. Study on induced synthesis of Anti-UV substances in the Antarctic alga[J]. High Technology Letters, 2002(2): 92-96 (in Chinese)
 缪锦来, 李光友, 侯旭光, 等. UV-B辐射对南极冰藻中抗辐射物质的诱导作用[J]. 高技术通讯, 2002(2): 92-96
- [5] Smith RC, Prezelin BB, Baker KS, et al. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters[J]. Science, 1992, 255(5047): 952-959
- [6] Thompson GA. Membrane acclimation by unicellular organisms in response to temperature change[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1989, 21(1): 43-60
- [7] Whitaker C, Barisch I, Bischoff B, et al. Temperature requirements and biogeography of Antarctic, Arctic and amphiequatorial sea weeds[J]. Biotechnology Marine, 1994(37): 247-259
- [8] Miao JL, Kan GF, Li GY, et al. Changes of the Antarctic alga exposed to UV-B in configuration and ultrastructure as well as main biochemical composition[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2003(6): 1-5 (in Chinese)
 缪锦来, 阚光锋, 李光友, 等. UVB辐照培养下南极冰藻的形态和超微结构及主要生化组成的变化[J]. 中国海洋药物, 2003(6): 1-5
- [9] Wang AG, Shao CB, Luo GH. Inquiry into malondialdehyde as index of peroxidation of plant lipids[J]. Plant Physiology Communications, 1986(2): 55-57 (in Chinese)
 王爱国, 邵从本, 罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标的探讨[J]. 植物生理学通讯, 1986(2): 55-57
- [10] Stewart RC, Bewjey JD. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiology, 1980, 65(2): 245-248
- [11] Banerjee BD, Seth V, Bhattarya A. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free 2 radical scavengers[J]. Toxicology Letters, 1999, 107(1/3): 33-47
- [12] Halliwell. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxy radicals *in vivo*[J]. Biochemical Journal, 1982, 205(2): 461-463
- [13] Ma XJ, Zhu DH. Functional roles of the plant superoxide dismutase[J]. Hereditas (Beijing), 2003, 25(2): 225-231 (in Chinese)
 马旭俊, 朱大海. 植物超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 遗传, 2003, 25(2): 225-231
- [14] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte[J]. Biology Chemistry, 1969, 244(22): 6049-6055
- [15] Shi ZJ, Hu ZS, Li RS. Water stress and active oxygen metabolism[J]. Journal of Guizhou University, 2002, 21(2): 140-145 (in Chinese)
 时忠杰, 胡哲森, 李荣生. 水分胁迫与活性氧代谢[J]. 贵州大学学报, 2002, 21(2): 140-145
- [16] Nemat AM, Badawi AM, Hassn NM, et al. Intduction of glutathione and glutathione associated enzymes in butachlor tolerant plant species[J]. American Journal of Plant Physiology, 2007, 2(3): 195-205
- [17] Ke DS, Shi YD, Wang ZX. Effects of environmental faoeces on the activity of peroxidase in *Gracilaria lemaneiformis*[J]. Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition), 2007, 6(4): 26-29 (in Chinese)
 柯德森, 史椰灯, 王正询. 环境因素对龙须菜过氧化物酶活性的影响[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2007, 6(4): 26-29
- [18] Lu N, Zang XN, Zhang XC, et al. Effects of stress on antioxidant enzyme system in algae[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2012, 58(2): 119-124 (in Chinese)
 鹿宁, 臧晓南, 张学成, 等. 逆境胁迫对藻类抗氧化酶系统的影响[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2012, 58(2): 119-124
- [19] Tian JY, Yu J. Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology, 2009, 97(3): 152-160
- [20] Wang HY, Yang F, Chen SJ, et al. Physiological responses to Cd²⁺ stress in *Spirulina platensis*[J]. Marine Environmental Science, 2012, 26(2): 151-153 (in Chinese)
 王红叶, 杨芳, 陈思嘉, 等. 钝顶螺旋藻对Cd胁迫的生理反应[J]. 海洋环境科学, 2012, 26(2): 151-153
- [21] Meenakshi C, Umesh K, Mohammed AK, et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis* S5[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 66(2): 204-209
- [22] Bajguz A. An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 68(2): 175-179
- [23] Lu KX, Tang JJ, Jiang DA. Characteristics of heavy metals enrichment in algae and its application prospects[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(1): 118-122 (in Chinese)
 陆开形, 唐建军, 蒋德安. 藻类富集重金属的特点及应用展望[J]. 应用生态学报, 2006, 17(1): 118-122
- [24] Chen SH, Sun TH, Zhou QX, et al. Interaction between microorganisms and heavy metals and its application[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(2): 239-242 (in Chinese)
 陈素华, 孙铁珩, 周启星, 等. 微生物与重金属间的相互作用及其应用[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 239-242
- [25] Li CY, Ding GH, Liu BD. Research progress of heavy metal affecting plant cell ultrastructure and function[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(18): 114-118
- [26] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improve assays and an assay applicable to acrylamide gel[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-278
- [27] Bewley TD. Physiological aspects of desiccation tolerance[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1979(30): 195-238
- [28] Hu JC, Zheng AZ. The damage of heavy metal stress on plant cell ultrastructure[J]. Journal of Shangqiu Teachers College, 2005, 21(5): 126-128 (in Chinese)
 胡金朝, 郑爱珍. 重金属胁迫对植物细胞超微结构的损伤[J]. 商丘师范学院学报, 2005, 21(5): 126-128
- [29] Zhang JM, Wang ZB. The study of effects of heavy metal irons on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 1999, 26(1): 18-20 (in Chinese)
 张建民, 王转斌. 重金属离子对酵母影响的研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 18-20
- [30] Lu ZM, Yuan S, Yin LH, et al. Different effect of some metal irons on the cell proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizo saccharomyces pombe*[J]. Journal of Microbiology, 1997, 17(4): 12-18 (in Chinese)

- 鲁仲谋, 袁生, 尹丽红, 等. 某些金属离子对酿酒酵母和粟酒裂殖酵母的细胞增殖具有不同的作用效应[J]. 微生物学杂志, 1997, 17(4): 12-18
- [31] Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1981, 32(1): 93-101
- [32] Ranieri A, Castagna A, Scebba F, et al. Oxidative stress and phytochelatin characterization in bread wheat exposed to cadmium excess[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(1): 45-54
- [33] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L.[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(1): 25-37
- [34] He JY, Ren YF, Zhu CQ, et al. Effects of cadmium stress on reactive oxygen species metabolism and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings[J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(3): 1004-1008 (in Chinese)
何俊瑜, 任艳芳, 朱诚期, 等. 镉胁迫对镉敏感水稻突变体活性氧代谢及抗氧化酶活性的影响[J]. *生态环境*, 2008, 17(3): 1004-1008
- [35] Lv Q, Zheng RL. Drought and active oxygen induce wheat membrane lipid peroxidation and degreasing[J]. *Science in China (Series C)*, 1996, 26(1): 26-30 (in Chinese)
吕庆, 郑荣梁. 干旱及活性氧引起小麦膜脂过氧化与脱脂化[J]. *中国科学: C 辑*, 1996, 26(1): 26-30
- [36] Qin P, Liu FH, Liang XN. Superoxide dismutase and plant resistance to the environmental stress[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2002(1): 31-34 (in Chinese)
覃鹏, 刘飞虎, 梁雪妮. 超氧化物歧化酶与植物抗逆性[J]. *黑龙江农业科学*, 2002(1): 31-34
- [37] Wang BL, Liu CQ, Wu YY. Process and effects of *Chlamydomonas reinhardtii* cellular bioaccumulation[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2003, 22(2): 167-169 (in Chinese)
王宝利, 刘丛强, 吴沿友. 衣藻对 Cu²⁺ 生物积累过程及其效应的研究[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2003, 22(2): 167-169
- [38] Wang BL, Liu CQ. Algal biogeochemistry in aquatic system[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 2004, 23(1): 79-82 (in Chinese)
王宝利, 刘丛强. 水体藻类的生物地球化学[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2004, 23(1): 79-82
- [39] Wang BL, Liu CQ, Wu YY. Process and effect of *Chlamydomonas reinhardtii* cellular copper bioaccumulation[J]. *Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry*, 2003, 22(2): 167-169
- [40] Schiewer S, Wong MH. Ionic strength effect in biosorption of metals by marine algae[J]. *Chemosphere*, 2000, 41(1/2): 271-282
- [41] Slaveykova VI, Wilkinson KJ. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*[J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(5): 969-975
- [42] Sunda WG, Huntsman SA. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems[J]. *The Science of the Total Environment*, 1998, 219(2): 165-181