

杜金戈, 王应军, 武 阳, 等. 钇(Y^{3+})对缺氮、缺磷胁迫下铜绿微囊藻生长和生理特性及藻毒素释放的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(8): 1500–1507.

DU Jin-ge, WANG Ying-jun, WU Yang, et al. Effects of yttrium on growth and physiological characteristics and microcystin release of *Microcystis aeruginosa* under nitrogen and phosphorus deficiency[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(8):1500–1507.

钇(Y^{3+})对缺氮、缺磷胁迫下铜绿微囊藻生长和生理特性及藻毒素释放的影响

杜金戈, 王应军*, 武 阳, 成晶星

(四川农业大学环境学院, 成都 611130)

摘 要:为探究稀土元素钇(Y^{3+})对缺氮、缺磷胁迫下铜绿微囊藻生长的影响,测定了缺素胁迫下不同 Y^{3+} 浓度时藻的生长量、叶绿素 a、可溶性糖、可溶性蛋白含量、抗氧化酶活性(超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT、过氧化物酶 POD)以及丙二醛(MDA)和藻毒素(MC-LR)含量。结果表明:在缺氮、缺磷胁迫下, Y^{3+} 对铜绿微囊藻的生长表现出低促高抑的“Hormesis”现象。低浓度 Y^{3+} (0.10~0.20 $mg \cdot L^{-1}$)能维持铜绿微囊藻的生长,增强抗氧化酶活性,减轻缺素胁迫造成的损伤;高浓度 Y^{3+} (0.50~2.00 $mg \cdot L^{-1}$)则加剧缺氮、缺磷胁迫对藻的迫害,光合色素、可溶性糖及可溶性蛋白含量呈明显的下降趋势,抗氧化酶活性受到抑制,膜质过氧化程度加重, MC-LR 含量增加。

关键词:钇;稀土元素;铜绿微囊藻;微囊藻毒素-LR;生理特性

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2017)08-1500-08 doi:10.11654/jaes.2017-0495

Effects of yttrium on growth and physiological characteristics and microcystin release of *Microcystis aeruginosa* under nitrogen and phosphorus deficiency

DU Jin-ge, WANG Ying-jun*, WU Yang, CHENG Jing-xing

(College of Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Yttrium is a rare earth heavy metal element which has been gradually considered as an important metal pollutant because of its serious adverse effects on aquatic ecosystems. Under the condition of nitrogen and phosphorus deficiency, the growth and metabolism of algae are slow. In order to explore the effects of Y^{3+} on growth and physiological characteristics and microcystin release of *Microcystis aeruginosa* under nitrogen and phosphorus deficiency, we measured the growth curves of *Microcystis aeruginosa* and the contents of chlorophyll a, soluble sugar, soluble protein, microcystin-LR; the activity of antioxidant enzymes[superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), and malondialdehyde (MDA)]. The results showed that the growth of *Microcystis aeruginosa* exhibited the hormesis phenomenon as a result of Y^{3+} . Low concentrations of Y^{3+} (0.10~0.20 $mg \cdot L^{-1}$) could effectively improve the growth of *Microcystis aeruginosa* and enhance the activity of antioxidant enzymes under the condition of nitrogen and phosphorus deficiency, reducing the damage caused by the lack of nutrients. High concentrations of Y^{3+} (0.50~2.00 $mg \cdot L^{-1}$) exacerbated the damage caused by the nutrient deficiency. Photosynthetic pigments, soluble sugar, and soluble protein content decreased gradually, and the degree of membrane lipid peroxidation and the content of microcystin-LR showed apparent upward trends with the increase of Y^{3+} concentration.

Keywords: yttrium; rare earth elements; *Microcystis aeruginosa*; microcystin-LR; physiological characteristics

收稿日期:2017-04-05

作者简介:杜金戈(1995—),女,山西吕梁人,本科生,研究方向为环境生态工程。E-mail:dujingesx@126.com

*通信作者:王应军 E-mail:wyyjj1972@163.com

氮、磷是藻类维持正常生命活动的必需元素^[1]。过量氮、磷进入水体后引起藻类及浮游植物等迅速繁殖,自然生态平衡遭到破坏,富营养化程度日益加剧,造成一系列严重的水体污染问题^[2-3]。但在缺氮、缺磷胁迫下,藻类光合作用中的卡尔文循环受到抑制,生长代谢缓慢,细胞生物量维持在较低水平^[4]。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)是我国湖泊水体富营养化的主要优势种群之一^[5],大量增殖易引发蓝藻水华并释放危害人体健康的微囊藻毒素^[6]。有研究发现,在贫营养湖泊中蓝藻细胞能有效利用并储存环境中少量的营养元素,某些微量元素的输入也可能造成低营养水体水华爆发^[7]。

随着经济的发展,进入环境中的微量元素稀土总量不断增加,大量研究表明,稀土对植物的生长有重要作用。稀土能提高植物叶绿素质量分数与光合强度,从而促进植物对营养元素的吸收、刺激幼苗的萌发生长^[8]。铈能增强植物幼苗细胞的抗氧化酶活性,维持细胞内 ROS 平衡,缓解外界胁迫的毒害作用^[9]。由于与 Ca^{2+} 具有相似的理化性质,稀土离子能取代 Ca 并与钙调蛋白结合,通过 Ca^{2+} -CaM 信号系统调节蛋白质的合成。稀土对藻类的影响同植物类似,与糖类、脂质、蛋白质代谢密切相关。

钇(Y)是重稀土金属元素之一,本课题组已就稀土钇(Y^{3+})对铜绿微囊藻生长的影响作了系列报道。已有的结果表明:适度浓度的外源 Y^{3+} (0.05~0.20 mg·L⁻¹)可以促进蓝藻增殖,提高其生理代谢水平^[7],并缓解重金属的毒害效应^[10],但尚不能完全揭示和阐明稀土元素与水华蓝藻暴发之间的相关性及其影响机制。基于此,本研究设置缺氮、缺磷胁迫等实验条件以模拟贫营养水体环境,通过测定稀土 Y^{3+} 对铜绿微囊藻生长状况的影响、抗氧化酶活等生理指标的变化以及对藻毒素含量的影响,进一步探究稀土元素对水体富营养化形成的影响及作用机制,也为全面评估稀土元素的生态环境风险提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

实验所用铜绿微囊藻 FACHB912,购自中国科学院武汉水生生物研究所。该株系采自太湖,实验前在 BG11 培养基扩大培养备用。

接种过程:对数期时离心收集藻细胞,并用不含氮磷的 BG11 培养基洗涤 3 次,将各个处理组的细胞密度调整在相当水平上。再重新接种到以下 3 个处理

组的培养基中:空白对照组 CK(BG11 培养基)、缺氮胁迫的实验组 DN(不含氮源的 BG11 培养基)和缺磷胁迫的实验组 DP(不含磷源),培养基中藻密度约为 1.2×10^6 cells·mL⁻¹。

培养过程:将接种后的培养基置于无菌光照培养箱中,设置光照强度为 2000~2500 lx,温度为(25±0.5)℃,光暗比 12 h:12 h,每日早中晚摇动锥形瓶,并随机更换位置,防止因光照不均匀带来影响。

1.2 Y^{3+} 贮备液

称取一定量 Y_2O_3 粉末(AR,成都恒瑞新材料有限公司),加入少量蒸馏水和浓盐酸(AR),加热溶解使多余的盐酸充分挥发后,用蒸馏水稀释配制成 1000 mg·L⁻¹(以 Y^{3+} 计)的贮备液高压灭菌后备用。

1.3 实验设计

向实验组中加入 Y^{3+} 贮备液,使各实验组每个锥形瓶中 Y^{3+} 的浓度为 0、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg·L⁻¹,每种处理 3 个平行。以 16 d 为实验周期,每日测定藻密度。并分别于第 4、8、12、16 d 时测定叶绿素 a、可溶性糖、可溶性蛋白含量、抗氧化酶活性、丙二醛及藻毒素 MC-LR 含量。

1.4 藻密度测定

取 1 mL 藻液,加 1 滴鲁哥氏液固定藻细胞,用血球计数板在 Olympus 光学显微镜下计数并计算藻细胞密度。每个样品计数 3 次,与均值之差在±20%,否则重新计数,实验中最大生物量用生长曲线上最大值表示。

1.5 叶绿素 a 与可溶性糖含量的测定

叶绿素 a 含量的测定:采用丙酮萃取法^[11]。从培养基中取 3 mL 藻液 4℃高速离心 10 min,弃去上清液,用去离子水反复冲洗 3 次,尽可能减少 Y^{3+} 的影响。再加入 1.5 mL 10%丙酮,用涡旋混匀器混匀。锡箔纸包裹在 4℃冰箱中避光萃取 24 h。再经高速离心 10 min 后取上清液,以 90%丙酮作为参比,分别测定上清液在波长 663、750、645、630 nm 的吸光度。

$$C = 11.64(A_{663} - A_{750}) - 2.16(A_{645} - A_{750}) + 0.1(A_{630} - A_{750})$$
$$Chl-a = 10^8 CV_1 / (V_2 \rho)$$

式中: V_1 为提取液体积, mL; V_2 为藻液体积, mL; ρ 为藻细胞密度, cells·mL⁻¹; Chl-a 为叶绿素 a 含量, $\mu\text{g} \cdot (10^8 \text{ cells})^{-1}$ 。

可溶性糖含量的测定:取 10 mL 藻液于离心管中,沸水浴 10 min。常温冷却后, 8000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液于 10 mL 试管中用蒸馏水定容至 10 mL 摇匀备用。采用蒽酮硫酸比色法^[12],使用南京建成

生物工程研究所植物可溶性糖检测试剂盒进行测定。于波长 620 nm 处读取吸光度值。

1.6 粗酶液提取与可溶性蛋白含量的测定

粗酶液的提取：在实验的第 4、8、12、16 d 取 10 mL 藻液，10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，收集藻细胞。加 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 为 7.8 的磷酸缓冲液 1.5 mL（南京建成生物工程研究所），于液氮内反复冻融 5 次，然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，上清液即为粗酶液。

取上述方法提取的粗酶液，利用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白含量。

1.7 抗氧化酶活性和丙二醛含量的测定

利用 1.6 中提取的粗酶液测定抗氮化酶活性和 MDA 含量。SOD 的活性采用羟胺法测定^[13]。POD 利用愈创木酚法测定^[13]。CAT 利用钼酸铵比色法测定^[14]。MDA 采用硫代巴比妥酸 TBA 比色法测定。以上指标均采用南京建成生物工程研究所测试盒完成测定。

1.8 微囊藻毒素 MC-LR 的测定

在试验第 4、8、12、16 d 时，取 10 mL 藻液，4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清。采用酶联免疫吸附法（ELISA），用全自动酶标仪（Bio-Tek, EL309 型）进行测定。

1.9 实验数据的统计与分析

对所得数据用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素方差分析，显著性检验采用 Duncan 新复极差法，当 $P < 0.05$ 时认为各组之间差异显著。

2 结果与分析

2.1 稀土 Y^{3+} 对氮、磷缺乏状态下铜绿微囊藻生长的影响

由图 1 可知，CK 空白对照组的生长期可明显分为适应期、对数期、稳定期以及衰退期。从培养第 3 d 开始，藻细胞的生长进入指数增长期。在第 9 d 时细胞生物量达到最大为 $12.24 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，在稳定期停留 4 d 后迅速进入衰退期。在整个实验周期内，DN、DP 实验组生物量均显著低于 CK 空白对照组。表明环境中营养元素的缺乏确实不利于藻类的增殖生长^[6,15]。

缺氮胁迫下， Y^{3+} 浓度在 0~0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的区间，铜绿微囊藻的生长总体呈现先增大后减小的趋势。在 Y^{3+} 浓度为 0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，藻细胞增长幅度显著高于单一缺氮胁迫对照组（ $P < 0.01$ ），在第 7 d 达到最大生物量 $3.73 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，维持 3 d 稳定期后迅速衰减，藻细胞对数生长期比单一胁迫组增加 2~3 d，且最

大生物量提高了 20.3%。说明 0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的稀土 Y^{3+} 能促进缺氮胁迫下铜绿微囊藻的增殖生长，延长细胞生长的对数期，增强藻的抗逆性。当 Y^{3+} 浓度超过 0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时， Y^{3+} 对缺氮胁迫下的铜绿微囊藻促进不明显。在第 4 d 达到最大生物量后迅速进入衰退期。随着 Y^{3+} 浓度增大，稀土 Y^{3+} 的抑制作用逐渐增强，生物量锐减，生长速率放缓。当稀土 Y^{3+} 浓度达到 2.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，铜绿微囊藻的生长完全被抑制（ $P < 0.05$ ），在第 3 d 只能观察到死亡藻细胞的碎片。因此，在后面生长及生理特性的分析中不考虑此浓度。

在缺磷胁迫下，不加稀土 Y^{3+} 的对照组可以保持 10 d 的指数生长期，细胞密度最大为 $6.19 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，铜绿微囊藻在缺氮培养基中细胞的生物量明显低于缺磷培养基中的生长，细胞密度最大达到 $3.10 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，说明铜绿微囊藻对磷缺乏的耐受能力高于对氮缺乏的耐受能力（ $P < 0.05$ ）。可能是由于铜绿微囊藻生长对磷的需求多取决于胞内磷^[16]。0.10、0.20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Y^{3+} 溶液对缺磷胁迫下的铜绿微囊藻的增殖

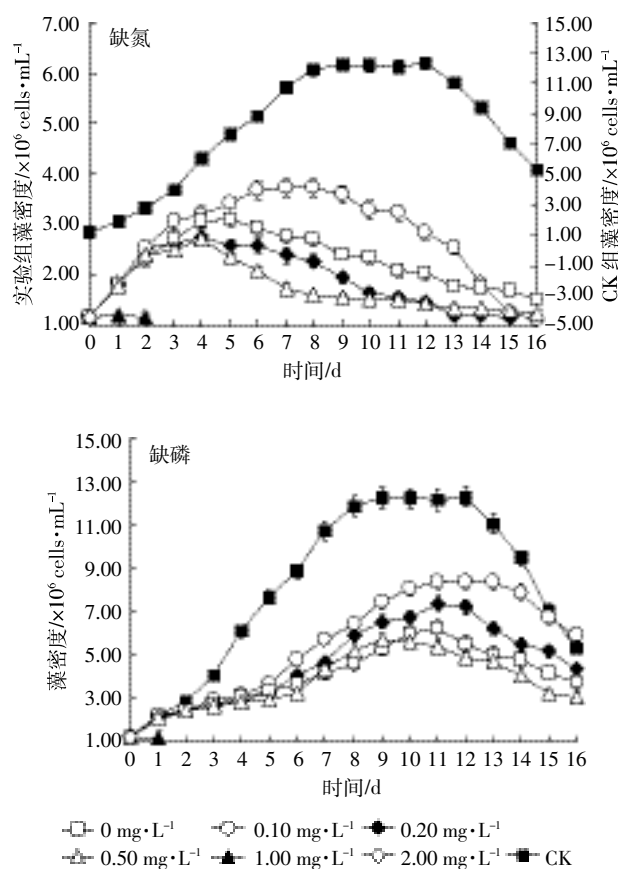


图 1 Y^{3+} 对缺氮、缺磷胁迫下的铜绿微囊藻生长曲线的影响
Figure 1 The effect of Y^{3+} on the growth of *M. aeruginosa* in nitrogen and phosphorus deficiency

生长有极显著的促进作用($P<0.01$),最大生物量分别提高了 35.3%、18.6%。相反,高浓度 Y^{3+} (0.50~2.00 $mg \cdot L^{-1}$)能强烈抑制铜绿微囊藻的生长,且抑制作用随着 Y^{3+} 浓度的增加而逐渐增强。当 Y^{3+} 浓度提高到 2.00 $mg \cdot L^{-1}$ 时,藻细胞完全不增长,在此后的生理指标分析中不再考虑这一浓度。

2.2 稀土 Y^{3+} 对氮、磷缺乏状态下铜绿微囊藻叶绿素 a 与可溶糖含量的影响

2.2.1 对叶绿素 a 含量的影响

根据实验结果,选择第 12 d 的数据为代表作分析讨论。藻体中叶绿素 a 含量可作为评估植物或藻类生长状况的重要指标之一。由图 2(a)可知,在培养第 12 d 时,CK 对照组叶绿素 a 含量为 $2.74 \mu g \cdot (10^8 \text{ cells})^{-1}$,显著高于任意 DN、DP 实验组。缺磷胁迫下,在 Y^{3+} 浓度为 0.00~1.00 $mg \cdot L^{-1}$ 范围内,铜绿微囊藻叶绿素 a 含量随 Y^{3+} 浓度先增后减, Y^{3+} 浓度为 0.10、0.20 $mg \cdot L^{-1}$ 时比单一缺磷胁迫培养下的铜绿微囊藻叶绿素 a 含量分别提高了 20.9%、15.1%。叶绿素含量最高时为 $2.41 \mu g \cdot (10^8 \text{ cells})^{-1}$ 。表明低浓度的 Y^{3+} 溶液能

够刺激光合色素合成,增强光合效率。当 Y^{3+} 浓度达到 0.50 $mg \cdot L^{-1}$ 时,叶绿素含量急剧下降,显著低于单一缺磷胁迫培养下的铜绿微囊藻。表明在此浓度以及更高 Y^{3+} 浓度作用下,叶绿素 a 的生理功能丧失,藻类大量死亡。在缺氮的培养条件下,铜绿微囊藻叶绿素 a 含量变化趋势与缺磷条件下相似,其在 Y^{3+} 浓度为 0.10 $mg \cdot L^{-1}$ 时达到最大,为 $2.03 \mu g \cdot (10^8 \text{ cells})^{-1}$,当 Y^{3+} 浓度大于 0.10 $mg \cdot L^{-1}$ 时,铜绿微囊藻叶绿素 a 含量随 Y^{3+} 浓度的增大呈线性减少($R^2=0.964$)。当稀土 Y^{3+} 浓度相同时,缺磷胁迫下铜绿微囊藻的叶绿素含量均显著大于缺氮胁迫($P<0.05$),说明在不利条件下叶绿素 a 的合成对氮的需求比磷更紧迫。

有研究表明,稀土元素可以作为中间物质通过与 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、吡啶乙酸等相互作用来调节细胞对营养元素的吸收,促进叶绿素合成^[17]。当营养源缺乏时,低浓度稀土 Y^{3+} 可能通过协调与其他物质的相互作用维持叶绿体的基本结构与功能,并诱导叶绿素前体物质的生成。随着培养基中 Y^{3+} 浓度升高, Y^{3+} 反而会造成藻细胞类囊体结构损伤,光合作用受到抑制。

2.2.2 对可溶性糖的影响

如图 2(b)所示,DN、DP 实验组所有 Y^{3+} 浓度下铜绿微囊藻可溶性糖含量均低于不缺氮磷的 CK 对照组。缺磷胁迫下, Y^{3+} 浓度在 0~0.20 $mg \cdot L^{-1}$ 区间内,可溶性糖含量呈线性减少($R^2=0.9868$)。当 Y^{3+} 浓度大于 0.20 $mg \cdot L^{-1}$ 时,可溶性糖含量有所升高,可能是高浓度 Y^{3+} 胁迫下,藻细胞破裂,可溶性糖流出,造成培养基可溶性糖浓度升高。缺氮胁迫下,可溶性糖含量变化趋势与缺磷胁迫大致相同。在 Y^{3+} 浓度为 0.10 $mg \cdot L^{-1}$ 时,可溶性糖含量最低为 $0.11 \mu g \cdot (10^8 \text{ cells})^{-1}$,相比缺磷胁迫降低了 72.8%。当 Y^{3+} 浓度达到 0.20 $mg \cdot L^{-1}$ 及以上时,可溶性糖含量维持在较低水平,其大小无显著变化($P>0.05$)。

2.3 稀土 Y^{3+} 对氮、磷缺乏状态下铜绿微囊藻抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响

2.3.1 对抗氧化酶活性的影响

活性氧 ROS 是自然生理过程产生的有害代谢产物,氧化植物细胞内的蛋白质、脂质和核酸,破坏细胞结构和功能^[18-19]。SOD、POD 和 CAT 是抗氧化酶防御系统的重要保护酶,维持胞内 ROS 产生与消除平衡^[18]。严重胁迫下,细胞产生的 ROS 不能被抗氧化系统及时消除而大量累积,从而抑制抗氧化酶活性^[20-21]。

缺氮、磷胁迫下,SOD、POD 和 CAT 活性随稀土 Y^{3+} 浓度变化的趋势大致相同,即低浓度的 Y^{3+} 能促进

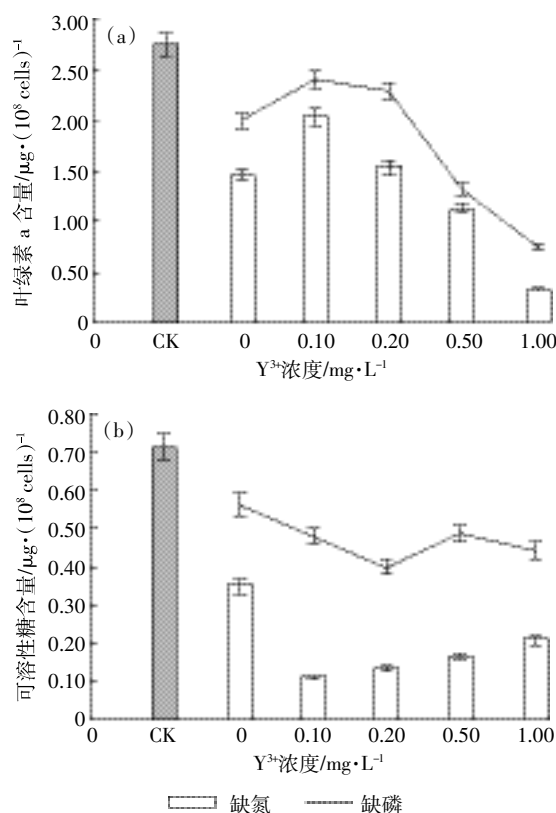


图 2 Y^{3+} 对缺氮、缺磷胁迫下的铜绿微囊藻叶绿素 a(a)与可溶性糖(b)含量的影响

Figure 2 The effect of Y^{3+} on the Chl-a(a) and soluble sugar(b) content of *M. aeruginosa* in nitrogen and phosphorus deficiency

抗氧化酶活性的增强,高浓度则抑制酶活性。由图3(a)至图3(c)可知,单一缺磷或缺氮胁迫下铜绿微囊藻抗氧化酶活性相比CK对照组显著降低。以SOD为例,在缺磷胁迫下,铜绿微囊藻SOD活性随 Y^{3+} 浓度先升后降。SOD活性在 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Y^{3+} 浓度时达到最大为 $19.66\text{ U}\cdot(10^8\text{ cells})^{-1}$,此后SOD活性呈线性降低($R^2=0.9046$),且缺氮胁迫下铜绿微囊藻SOD活性与缺磷培养的差距随着 Y^{3+} 浓度的增大而显著减小。在缺氮胁迫下,SOD活性变化趋势与缺磷培养大致相同。SOD活性的峰值 $16.29\text{ U}\cdot(10^8\text{ cells})^{-1}$ 出现在 Y^{3+} 浓度为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时。这一结果表明 Y^{3+} 对缺磷或缺氮胁迫下铜绿微囊藻抗氧化酶活性的影响有浓度限制,超过限制反而会加重对藻细胞的迫害。

2.3.2 对丙二醛含量的影响

MDA是植物细胞衰老以及逆境胁迫下发生膜脂过氧化的产物之一,其含量可指示细胞膜脂过氧化水平,作为细胞膜结构损伤、藻体受胁迫程度的标志^[22-23]。由图3(d)可知,CK组MDA含量在培养中始终小于胁迫组。在缺氮或缺磷胁迫下MDA含量的最小值出现在 Y^{3+} 浓度为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时。此后, Y^{3+} 浓度升高,实

验组MDA含量显著增大,此时藻密度也呈下降趋势。说明稀土 Y^{3+} 在浓度大于 $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对铜绿微囊藻产生胁迫作用,造成细胞膜系统的损伤,从而引起藻细胞大量死亡,随着 Y^{3+} 浓度的升高,胁迫程度加重。在整个实验周期内,缺氮条件下培养的铜绿微囊藻MDA总含量高于缺磷条件,且 Y^{3+} 浓度越高,显著性越强。说明铜绿微囊藻对缺氮胁迫比缺磷胁迫耐受性弱, Y^{3+} 浓度的增大强化了营养盐缺乏造成的抑制效果。

2.4 稀土 Y^{3+} 对氮、磷缺乏状态下铜绿微囊藻藻毒素含量的影响

由图4可知,缺氮、缺磷胁迫下的铜绿微囊藻在 $0.20\sim 1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Y^{3+} 作用下,MC-LR含量显著大于单一胁迫对照组($P<0.05$)。当 Y^{3+} 浓度为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,缺氮、缺磷胁迫下MC-LR含量都降到最小值,分别为 0.21 、 $0.23\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,比对照组显著降低 18.4% 、 10.4% 。在此浓度下 Y^{3+} 能增强抗氧化酶活性,及时清除细胞内过量ROS,维持细胞的生理功能,MC-LR含量低。而高浓度 Y^{3+} 引起藻体活性氧生成与清除失衡、细胞质膜过氧化损伤破裂,内容藻毒素流出。

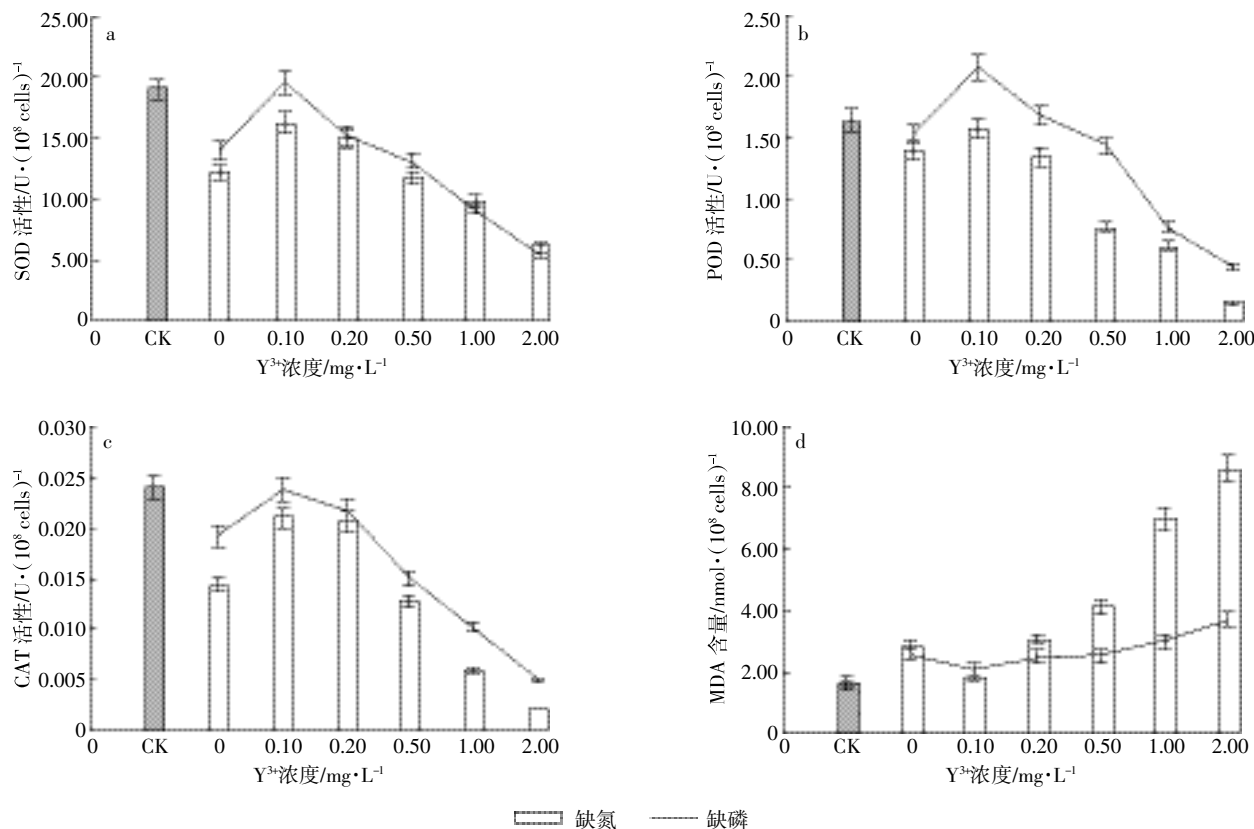


图3 Y^{3+} 对缺氮、缺磷胁迫下的铜绿微囊藻抗氧化酶活性与丙二醛含量的影响

Figure 3 The effect of Y^{3+} on *M. aeruginosa* in nitrogen and phosphorus deficiency

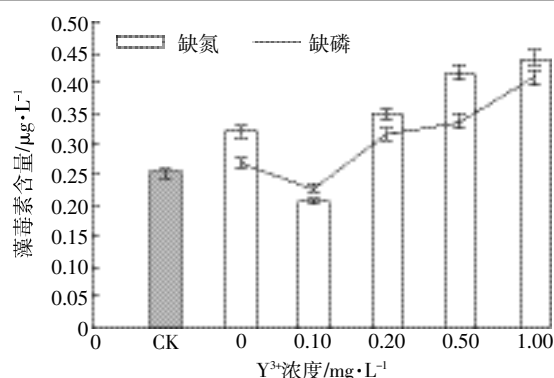


图 4 Y^{3+} 对缺氮、缺磷胁迫下的铜绿微囊藻藻毒素含量的影响

Figure 4 The effect of Y^{3+} on the MC-LR content of *M. aeruginosa* in nitrogen and phosphorus deficiency

3 讨论

在氮、磷元素供给不足的缺素胁迫下,铜绿微囊藻的生长与生理特性受到严重影响。低浓度的稀土能与铜绿微囊藻细胞膜上的转运蛋白或磷脂结合形成复合体,提高蛋白活性或改变转运通道尺寸,影响细胞内外的离子平衡与生理活动,提高膜通道的运输能力,促进藻细胞吸收营养元素与增殖生长^[24-25]。高浓度的稀土元素易于表现重金属的特性,堆积在细胞膜表面,占据转运通道位点,抑制营养物质的吸收与代谢产物的排出,加重细胞的膜质过氧化程度^[26]。本实验中,缺氮、缺磷胁迫下低浓度的 Y^{3+} 能改善细胞的生长代谢,调节细胞内外营养元素的进出平衡,缓解藻细胞对氮磷源的需求。高浓度的 Y^{3+} 则对细胞产生抑制作用,使藻细胞对营养元素吸收能力减弱,加速藻细胞衰亡。

从本实验结果可以看出,在缺氮、缺磷胁迫下,低浓度的稀土 Y^{3+} 对光合效率提高与叶绿素 a 积累有明显的促进作用。施加高浓度的稀土 Y^{3+} 则显著抑制藻体光合色素的合成,可能是由于高浓度 Y^{3+} 胁迫造成类囊体结构损伤、叶绿素 a 总量减少、光合水平降低^[7]。这一结果同胡勤海等^[27]的小球藻的栽培试验结果类似,多种低浓度的稀土元素均能促进藻细胞叶绿素 a 含量升高,高浓度则会导致细胞生长停滞,趋于死亡。可溶性糖及可溶性蛋白是藻类生长必需的营养成分,有研究表明,低浓度的稀土溶液处理能显著提高银杏叶片蛋白质、可溶性糖以及总黄酮的含量,反之则起抑制作用^[28]。本实验中,在低浓度 Y^{3+} 的作用下铜绿微囊藻可溶性糖含量随 Y^{3+} 浓度升高呈降低趋势。推测可能是由于 Y^{3+} 能促进藻类叶绿素合成,增强细胞的

光合作用,加快可溶糖的转化和消耗,且由于缺素胁迫,细胞内可溶性糖与蛋白无法得到及时补充,因此呈线性降低趋势。当 Y^{3+} 浓度大于 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,营养元素的缺乏可能使得藻体叶绿素合成受阻,光合效率降低。藻细胞体内糖代谢阻塞,从而使得可溶性糖含量基本维持在较低水平。

植物在遭受环境胁迫时会表现出“低剂量刺激,高剂量抑制”的现象,即“低促高抑”的“Hormesis”效应^[29]。本研究中,当低浓度的 Y^{3+} ($0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理时,铜绿微囊藻的生长量、叶绿素 a 以及 SOD、POD、CAT 等抗氧化酶活性相比对照组具有明显的促进升高现象,而高浓度($2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时则被抑制,呈现出了“Hormesis”效应。低浓度的稀土 Y^{3+} 能增强原有抗氧化酶的酶活性,抵消缺乏营养盐而产生的 ROS,减轻缺氮条件对酶活性的影响,促进细胞增殖生长。而高浓度的稀土 Y^{3+} 则会破坏抗氧化酶防御系统,包括可能通过抑制蛋白质的合成,从而使抗氧化酶的合成受到显著影响,过量的 ROS 由于无法被及时清除,诱导细胞膜发生膜质过氧化作用,破坏和干扰细胞膜正常的功能,导致 MDA 大量积累,严重干扰并妨碍胞内正常的生理代谢水平,最终对藻细胞造成大量的氧化损伤。本研究中由于缺乏合成蛋白质的主要元素,抗氧化酶的合成受到显著影响。

铜绿微囊藻释放藻毒素可能是对逆境胁迫的应激反应^[30]。本实验中,在缺氮、缺磷胁迫下,抗氧化酶活性受到抑制,ROS 产生消除失衡,MDA 含量升高。施加低浓度的 Y^{3+} 能增强藻类对缺素胁迫的抗逆性,维持细胞正常生理功能,保持 MC-LR 的产出在合理水平上。当 Y^{3+} 浓度过高时,藻体抗氧化防御系统遭到破坏,应激产生过量 MC-LR,细胞质膜破裂,藻细胞趋于死亡。

4 结论

(1)在缺氮、缺磷胁迫下,低浓度 Y^{3+} ($0.10 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)能促进铜绿微囊藻的生长,这种促进作用与 Y^{3+} 浓度呈一定相关性。此时藻细胞叶绿素 a、可溶性糖与可溶性蛋白含量增加,光合效率增强;MDA 与 MC-LR 含量较低,藻类生长状态良好, Y^{3+} 对抗氧化酶防御系统表现出一定的保护作用。

(2)在缺氮、缺磷胁迫下,高浓度 Y^{3+} ($0.20 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对藻的生长有显著的抑制作用,表现为细胞内光合色素含量低,可溶性糖与可溶性蛋白遭到破坏,对必需元素的吸收能力减弱。藻体活性氧生成与

清除失衡,抗氧化酶活性受到抑制,细胞膜质过氧化损伤破裂,内容藻毒素流出。

(3)在贫营养水体中, Y^{3+} 对铜绿微囊藻的生态学效应在细胞层次上表现出的“Hormesis”现象为合理预测稀土引发的生态事故提供参考依据,同时据此可推测稀土元素可能是促进贫营养水体发生富营养化现象的原因之一,但更深层次的影响机制还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孔繁翔,高 光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考[J]. 生态学报, 2005, 25(3):589-595.
KONG Fan-xiang, GAO Guang. Hypothesis on cyanobacteria bloom-forming mechanism in large shallow eutrophic lakes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(3):589-595.
- [2] 程丽巍,许 海,陈铭达,等. 水体富营养化成因及其防治措施研究进展[J]. 环境保护科学, 2007, 33(1):18-21.
CHENG Li-wei, XU Hai, CHEN Ming-da, et al. Review on causes of eutrophication of water body and its control measure[J]. *Environmental Protection Science*, 2007, 33(1):18-21.
- [3] 秦伯强. 湖泊生态恢复的基本原理与实现[J]. 生态学报, 2007, 27(11):4848-4858.
QIN Bo-qiang. Principles and approach for lake ecological restoration [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(11):4848-4858.
- [4] 金月梅. 氮磷限制对8株微藻叶绿素荧光特性及生长的影响[D]. 青岛:中国海洋大学, 2008.
JIN Yue-mei. Effects of nutrient and phosphorus limitation on the chlorophyll fluorescence and growth of 8 microalgal strains[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [5] 金相灿. 中国湖泊环境[M]. 青岛:海洋出版社, 1995.
JIN Xiang-can. China lake environment[M]. Qingdao: China Ocean Press, 1995.
- [6] 周云龙,于 明. 水华的发生、危害和防治[J]. 生物学通报, 2004, 39(6):11-14.
ZHOU Yun-long, YU Ming. The occurrence, damage and prevention of bloom[J]. *Bulletin of Biology*, 2004, 39(6):11-14.
- [7] 王应军,陈 燕,金航标,等. 稀土(Y^{3+})对铜绿微囊藻生长和生理特性的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4):2248-2251.
WANG Ying-jun, CHEN Yan, JIN Hang-biao, et al. Effects of yttrium (Y^{3+}) on physiological and biochemical characteristics of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(4):2248-2251.
- [8] 张 杰,黄永杰,刘雪云. 镉对镉胁迫下水稻幼苗生长及生理特性的影响[J]. 生态环境, 2007, 16(3):835-841.
ZHANG Jie, HUANG Yong-jie, LIU Xue-yun. Effects of La on growth and some physiological characteristics of rice seedlings under Cd stress [J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(3):835-841.
- [9] 赵朝宇,刘 慧,王亚喆,等. 稀土元素铈对黄豆幼苗铅胁迫的缓解效应[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2015, 35(4):67-70.
ZHAO Chao-yu, LIU Hui, WANG Ya-zhe, et al. Alleviation effect of cerium on Pb stress in soybean seedlings[J]. *Journal of Tianjin Normal University(Natural Science Edition)*, 2015, 35(4):67-70.
- [10] Wu Y, Wang Y J, Du J G, et al. Effects of yttrium under lead stress on growth and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Journal of Rare Earths*, 2016, 34(7):747-756.
- [11] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社, 2008.
CHEN Jian-xun, WANG Xiao-feng. Plant physiology experiment guidance[M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2008.
- [12] Yemm E W, Willis A J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone[J]. *Biochemical Journal*, 1954, 57(3):508-514.
- [13] Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kuć J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*[J]. *Physiological Plant Pathology*, 1982, 20(1):73-76.
- [14] 郝再彬. 植物生理实验技术[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社, 2002.
HAO Zai-bin. Plant physiological experiment technology[M]. Harbin: Harbin Press, 2002.
- [15] 岳冬梅,李 洁,肖 琳. 营养盐恢复对氮磷饥饿铜绿微囊藻生长的影响[J]. 环境科学, 2016, 37(11):1-13.
YUE Dong-mei, LI Jie, XIAO Lin. Nutrients recovery on the growth of nitrogen and phosphorus starved *Microcystis aeruginosa*[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(11):1-13.
- [16] 许 海,吴雅丽,杨桂军,等. 铜绿微囊藻、斜生栅藻对氮磷饥饿的耐受能力研究[J]. 生态科学, 2014, 33(5):879-884.
XU Hai, WU Ya-li, YANG Gui-jun, et al. Tolerance of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* to nitrogen and phosphorus deficiency[J]. *Ecological Science*, 2014, 33(5):879-884.
- [17] Chen W J, Gu Y H, Zhao G W, et al. Effects of rare earth ions on activity of RuBPcase in tobacco[J]. *Plant Science*, 2000, 152(2):145-151.
- [18] 李合生. 现代植物生理学[M]. 二版. 北京:高等教育出版社, 2012.
LI He-sheng. Modern plant physiology[M]. 2th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2012.
- [19] Pinto E, Sigaud Kutner T C S, Leitão M A S, et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae[J]. *Journal of Phycology*, 2003, 39(39):1008-1018.
- [20] Oncel I, Yurdakulol E Y, Kurt Y, et al. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants[J]. *Acta Oecologica*, 2004, 26(3):211-218.
- [21] Hejl A M, Koster K L. Juglone disrupts root plasma membrane H^+ -ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*)[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, 30(2):453.
- [22] 唐 萍,吴国荣,陆长梅,等. 凤眼莲根系分泌物对栅藻结构及代谢的影响[J]. 环境科学学报, 2000, 20(3):355-359.
TANG Ping, WU Guo-rong, LU Chang-mei, et al. Effects of the excretion from root system of *Eichhornia crassipes* on the cell structure and metabolism of *Scenedesmus arcuatus*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, 20(3):355-359.

- [23] 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害[J]. 植物生理学通讯, 1991(2):84-90.
CHEN Shao-yu. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell[J]. *Plant Physiology Communications*, 1991(2):84-90.
- [24] 张 民, 史小丽, 蒋丽娟, 等. 两种外源性磷及振荡对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 生长的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5):507-510.
ZHANG Min, SHI Xiao-li, JIANG Li-juan, et al. Effects of two exogenous phosphorous and shake on the growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2002, 8(5):507-510.
- [25] Petersheim M, Halladay H N, Blodnieks J. Tb^{3+} and Ca^{2+} binding to phosphatidylcholine: A study comparing data from optical, NMR, and infrared spectroscopies[J]. *Biophysical Journal*, 1989, 56(3):551-557.
- [26] 聂毓秀, 陈玉兰, 王晓辉, 等. 镧、钐、铕及镱化合物对体外培养 HeLa 细胞的作用[J]. 中国稀土学报, 1989, 7(4):58-64.
NIE Yu-xiu, CHEN Yu-lan, WANG Xiao-hui, et al. Effect of compounds of La, Sm, Eu, and Yb on HeLa cell culture[J]. *Journal of the Chinese Society of Rare Earths*, 1989, 7(4):58-64.
- [27] 胡勤海, 管丽莉, 叶兆杰. 稀土元素对小球藻生长的影响[J]. 环境科学, 1996, 17(2):37-38.
HU Qin-hai, GUAN Li-li, YE Zhao-jie. Effects of rare earth elements on *Chlorella ellipsoidea*[J]. *Environmental Science*, 1996, 17(2):37-38.
- [28] 谢寅峰, 李 群, 沈惠娟, 等. 稀土对银杏苗木叶内含物及其产量的效应[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(6):71-74.
XIE Yin-feng, LI Qun, SHEN Hui-juan, et al. Effects of rare earth elements on some leaf inclusion and leaf yield in seedlings of *Ginkgo biloba*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*, 2000, 24(6):71-74.
- [29] 郭兰萍, 张小波, 杨 光, 等. Hormesis 及其在药用植物生产中的应用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5):525-529.
GUO Lan-ping, ZHANG Xiao-bo, YANG Guang, et al. Hormesis and its application in medicinal plant growing[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(5):525-529.
- [30] 张 玮, 林一群, 郭定芳, 等. 不同氮、磷浓度对铜绿微囊藻生长、光合及产毒的影响[J]. 水生生物学报, 2006, 30(3):318-322.
ZHANG Wei, LIN Yi-qun, GUO Ding-fang, et al. Concentrations on growth, photosynthesis and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(3):318-322.