

Zn²⁺ 对蛋白核小球藻生长影响的实验研究

吴 珊, 史京伟, 董晓阳

(北京工业大学建筑工程学院, 北京 100124)

摘要 通过藻类增长潜力实验, 分别以蛋白核小球藻的光密度值、叶绿素 a 值、比增长率以及光合速率和呼吸速率为指标, 对应分析了不同浓度的 Zn²⁺ 对蛋白核小球藻生长的影响。在本实验条件下, Zn²⁺ 质量浓度低于 0.1 μg/L 对蛋白核小球藻的生长有限制作用, 在 1 ~ 100 μg/L 之间则可促进蛋白核小球藻的增殖, 其中在 50 μg/L 时藻类生长最快, 达到 1 mg/L 以上表现出对蛋白核小球藻生长的抑制作用, 达到 100 mg/L 时, 其对蛋白核小球藻的毒性效应可以导致藻类生长停止。实验结果表明, 在景观水体中适当浓度的 Zn²⁺ 是一定条件下触发或抑制蛋白核小球藻爆发性增殖的重要因子之一, 在研究再生水应用于景观水体富营养化防控中应该予以重视。

关键词 Zn²⁺; 蛋白核小球藻; 生长; 再生水

中图分类号 S959 文献标识码 A 文章编号 1004-693X(2009)03-0061-05

Experimental study of the influence of Zn²⁺ on *Chlorella pyrenoidosa* growth

WU Shan, SHI Jing-wei, DONG Xiao-yang

(College of Architecture and Civil Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Based on algae growth potential experiments, the effect of the concentration of Zn²⁺ on the *Chlorella pyrenoidosa* growth was analyzed with the index of optical densities (OD), Chlorophyll-a content, the specific growth rate, and the photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa*. The experimental results show that the growth of *Chlorella pyrenoidosa* was limited when the concentration of Zn²⁺ was less than 0.1 μg/L. A concentration of Zn²⁺ between 1 and 100 μg/L promoted the growth of *Chlorella pyrenoidosa*, and algae multiplied most quickly when concentration of Zn²⁺ was 50 μg/L. When the concentration of Zn²⁺ reached 1 mg/L, the growth of *Chlorella pyrenoidosa* was restrained, and when the concentration of Zn²⁺ reached 100 mg/L *Chlorella pyrenoidosa* growth completely stopped due to the toxic effect of Zn²⁺. It is concluded that appropriate Zn²⁺ concentration under certain conditions might be one of the key factors affecting *Chlorella pyrenoidosa* blooms in the landscape water, and more attention should be paid when using treated waste water as reclaimed water during eutrophication control research.

Key words Zn²⁺; *Chlorella pyrenoidosa*; growth; reclaimed water

健康优美的景观水体对改善生态环境和提升城市的宜居性能起到较好的促进作用。一方面水资源短缺与水污染状况不断加剧, 使得我国很多城市中不可能将大量清洁水用于景观水体, 再生水的利用成为一个积极的补充措施, 受到越来越多的重视; 另一方面, 与清洁水源相比, 再生水水源有着污染物底值相对较高、营养盐含量丰富的特点, 将其应用于景

观水体时, 在适宜的外界条件下更易爆发水华, 影响水体的景观效果^[1]。因此, 针对再生水的水质特点, 研究和控制其应用于景观和生态用水时水华发生的影响因素和条件有着积极的现实意义。

景观水体发生水华是多种环境因子共同作用的结果。除了 N、P 等大量元素起主导作用外, 一些微量元素, 如 Zn²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺ 等也起着促进的

作用。对其中的金属离子来说,一般认为^[2]与藻类的亲和性强弱是导致其抑制藻类生长的主要原因。即与藻类亲和性越强的金属离子对抑制藻类生长的毒性也越强^[3]。金属离子对藻类生长的影响主要表现为:与藻细胞壁表面含硫、氮和氧的基团结合后,通过影响藻类的光合作用、呼吸作用和酶的活性而抑制藻类的正常生长^[4]。其中,Zn²⁺是藻类中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等^[2]的组成成分。缺乏Zn²⁺,藻类生长速率和光合速率就会大大降低。以北京市为例,资料数据表明,目前再生水厂出水中均含有不同浓度的Zn²⁺。因此,本文以景观水体富营养化常见的蛋白核小球藻为测试藻种,通过藻类的光密度值、叶绿素a的变化、比增长率以及光合速率和呼吸速率几个参数,综合分析Zn²⁺对藻类生长的影响,探讨Zn²⁺对水中蛋白核小球藻生长的促进或限制作用范围,为今后以再生水为水源的景观水体水华的控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

试验所用藻种是标准试验藻种——真核绿藻蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*. Fachb-9),购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。

1.2 试验方法

1.2.1 藻种的驯化和扩大培养

将藻种在光照培养箱进行无菌驯化培养。采用SE培养基,配方见表1。

表 1 SE 培养基配方			
成 分	质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	成 分	体积比/ (mL·L ⁻¹)
NaNO ₃	250	Fe-EDTA	0.001
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	75	A ₅ solution*	0.001
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	Distilled water	0.998
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25		
KH ₂ PO ₄	175		
NaCl	25		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	5		

* :A₅ solution 为在 1 L 蒸馏水中加入以下药品得到 :H₃BO₃ , 2860 mg ;MnCl₂ · 4H₂O ,1 810 mg ;ZnSO₄ · 7H₂O ,220 mg ;CuSO₄ · 5H₂O , 79 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O ,39 mg。

培养条件为 :光照度 2 000 lx ;温度(2 ± 1)℃ ;光暗比 12 h/12 h ;经过 30 d 的培养,获得足够多的藻液,且生长良好,满足试验要求。

1.2.2 Zn²⁺ 质量浓度梯度培养基的配制

利用液体稀释法,先用分析纯 ZnSO₄·7H₂O 分别配制 1 000 mg/L、1 mg/L 和 0.001 mg/L 的 Zn²⁺ 储备液,从 Zn²⁺ 各自的储备液当中按不同比例向 SE 培

养基中添加,配制成表 2 所示的培养基浓度梯度组。每个浓度组重复 3 个,均用 250 mL 锥形瓶盛装培养液,配后体积 0.15 L。

表 2 培养基中 Zn ²⁺ 质量浓度 μg/L			
组别	ρ(Zn ²⁺)	组别	ρ(Zn ²⁺)
A	0	F	100
B	0.01	G	1 000
C	0.1	H	10 000
D	1	I	100 000
E	50		

1.2.3 试验条件和接种

取适量预培养藻种液在 3 500 r/min 下离心 10 min,弃上清液。沉淀的藻细胞用 15 mg/L 碳酸氢钠水溶液重新悬浮,3 500 r/min 下再离心 10 min,以除去营养物质及其他物质。同样方法洗涤 2 次,最后用碳酸氢钠水溶液再悬浮,成为测试接种母液。碳酸氢钠溶液的体积根据已计算出的用于接种时所需要的藻种液的细胞密度来确定。然后对每个灭菌后的试验组进行等量接种后,锥形瓶用无菌培养容器封口膜封口,置上述光照培养箱中进行培养。

试验条件 :培养温度(2 ± 1)℃ ;光照度 3 500 lx 左右 ;光暗比 12 h/12 h ;保持试验液的 pH 值小于 8.5。为减少因光照不均匀可能造成的影响,每隔 4 ~ 5 h 摇动培养液并更换各试验组锥形瓶的位置 1 次。操作均在无菌条件下进行。

1.2.4 生长测定和比增长率的计算

光密度值的测定 :先利用紫外分光光度计测定蛋白核小球藻的全吸收波谱,确定它的最大吸收峰为 515 nm。从接种第 3 天开始,每隔 48 h 取样 1 次,用 720 S 型分光光度计测定各组藻液在波长 515 nm 处的光密度值用以表示藻体生长。每个浓度组设 3 个平行样,试验数据取自 3 个平行样的均值,以不加藻种的培养液为空白对照。比增长率利用式(1)^[5]计算 :

$$K = (\log_2 A_1 - \log_2 A_0) / T \tag{1}$$

式中 :K 为比增长率 ;T 为培养时间 ;A₁ 为培养结束时藻液光密度值 ;A₀ 为培养开始时藻液光密度值。

1.2.5 叶绿素 a 的测定

叶绿素是反映藻类生物量的一个重要指标,本试验采用以下测定方法^[6] :取 3 mL 培养液,离心分离 10 min(4 000 r/min),弃去上清液,然后加入等体积 90%(V/V)甲醇,混合均匀。将混匀的溶液放置在 4℃ 黑暗条件下萃取 6 ~ 8 h,然后再离心分离 10 min(4 000 r/min),取上清液,用 720 S 型可见分光光度计测定其在 665 nm 处的光密度值 A_{665 nm},并计算叶绿素 a 的质量浓度,计算公式为 :

$$\rho(\text{Chla}) = 13.94_{665\text{nm}} \quad (2)$$

式中: $\rho(\text{Chla})$ 为叶绿素 a 的质量浓度, mg/L 。

从接种第 3 天开始测定, 每隔 48 h 取样测定 1 次, 直到试验结束。

1.2.6 光合作用强度和呼吸作用强度测定

培养至第 25 天, 每个样取 2.5 mL 藻液, 用氧电极法测量每个样的(净)光合作用速率和呼吸速率。光合速率是在培养温度为 25℃、光照强度为 $64 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下测定的, 呼吸速率是在培养温度为 25℃ 条件下测定的, 重复 2 次。

2 试验结果与分析

2.1 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻增殖的影响

Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻增殖的影响见图 1。

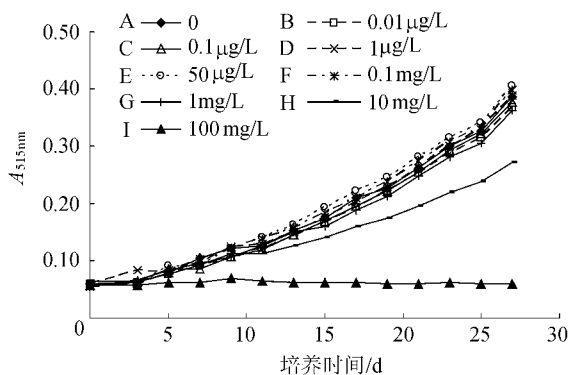


图 1 不同 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻光密度值的影响

由图 1 可见, 除 I 组外, 各组在试验培养的前 7 天, 曲线基本平直, 说明蛋白核蛋白核小球藻处于生长的调整期; 而且 A、B、C、D、E、F、G、H 各组在试验培养的前 7 天曲线相近可能是因为用于接种的藻细胞没有经过 Zn^{2+} 饥饿培养。从第 8 天开始, 藻类开始快速生长, 不同浓度的 Zn^{2+} 对其生长的影响逐渐明显, 除了 I 组外, 各组藻细胞均进入分裂生长的对数期。

从图 1 还可以看出 B、C、D、E、F、G、H 各组藻细胞增长趋势与对照组(A 组)相似, 但是 B、C 组藻细胞光密度值略低于对照组, D、E、F 组光密度值均高于对照组, 说明 Zn^{2+} 质量浓度小于 $0.1 \mu\text{g/L}$ 对蛋白核小球藻的生长有限制作用, 在 $1 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 之间则能够促进蛋白核小球藻的增殖。G、H 组光密度值虽有增加, 但是其生长曲线均低于对照组, 显示出当 Zn^{2+} 质量浓度超过 1 mg/L 时, 已经明显抑制蛋白核小球藻增殖, 且随着 Zn^{2+} 质量浓度的升高, 抑制作用增强, 如 Zn^{2+} 质量浓度达到 100 mg/L 的 I 组在整个试验期间, 曲线一直基本平直, 说明 100 mg/L 的 Zn^{2+} 质

量浓度对蛋白核小球藻的毒性效应导致其生长完全停止。在试验中也观察到 I 组培养瓶中藻液的颜色与对照组相比明显变白。

另外, 采用 SPSS 对上述试验数据进行了统计分析, 主要分别对各组数据进行 T 检验。B、C、D、E、F、E 组细胞吸光度值的 T 检验结果表明, 与 B 组之间有显著性差异 ($P < 0.05$); A、E、F、G、H 组藻细胞光密度值的 T 检验的结果分别显示出 E 组、F 组与对照组 A 组之间, 以及 G 组、H 组与对照组 A 组之间均有显著性差异 ($P < 0.05$)。证实在本试验条件下 Zn^{2+} 质量浓度为 $50 \mu\text{g/L}$ 能明显促进蛋白核小球藻的生长, 在 $1 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 之间时能促进藻细胞生长, Zn^{2+} 质量浓度达到 1 mg/L 及更大时, 对蛋白核小球藻的毒性效应显著。

2.2 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻叶绿素 a 质量浓度变化的影响

以叶绿素 a 质量浓度变化反映出的 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻增长的影响见图 2。

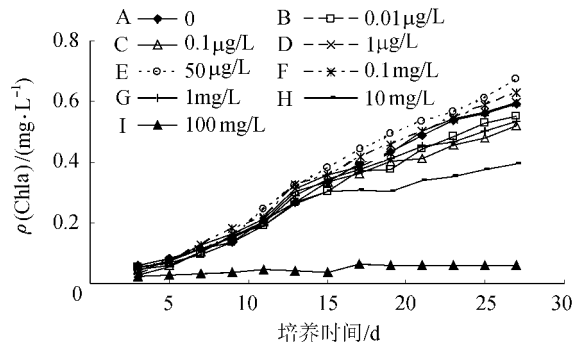


图 2 不同 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻叶绿素 a 质量浓度的影响

图 2 中曲线的趋势与图 1 相似, 即, 当 Zn^{2+} 质量浓度为 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g/L}$ (B、C 组) 时, 叶绿素 a 的质量浓度略低于对照组, 表明极低浓度的锌会限制藻类生长。 Zn^{2+} 质量浓度为 $1 \sim 100 \mu\text{g/L}$ (D、E、F 组), 叶绿素 a 的质量浓度均高于对照组, 表明在该浓度范围内锌离子浓度能促进蛋白核小球藻生长; Zn^{2+} 质量浓度达到 $50 \mu\text{g/L}$ (E 组), 叶绿素 a 增殖效果显著 ($P < 0.05$)。G、H 组叶绿素 a 质量浓度虽有增加, 但是曲线均低于对照组, 当 Zn^{2+} 质量浓度达到 1 mg/L 时 (G 组), 叶绿素 a 的质量浓度增加缓慢, 显示出锌离子抑制作用显著 ($P < 0.05$); 当 Zn^{2+} 质量浓度达到 100 mg/L 时 (I 组), 叶绿素 a 的质量浓度增长完全停止, 表明对光合作用产生了强烈的抑制作用。

2.3 不同 Zn^{2+} 质量浓度条件下蛋白核小球藻的平均比增长率

不同 Zn^{2+} 质量浓度下, 蛋白核小球藻细胞光密

度的平均比增长率的统计结果见表 3。

表 3 不同 Zn^{2+} 质量浓度下蛋白核小球藻细胞
光密度的平均比增长率

$\rho(Zn^{2+})/$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)	蛋白核小球藻 平均比增长率/%	$\rho(Zn^{2+})/$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)	蛋白核小球藻 平均比增长率/%
0	0.098 29	100	0.100 50
0.01	0.088 65	1 000	0.095 32
0.1	0.094 40	10 000	0.069 30
1	0.101 90	100 000	0.005 97
50	0.103 10		

当 Zn^{2+} 质量浓度为 0.01 ~ 0.1 $\mu g/L$ 时,蛋白核小球藻比增长率低于对照组;当 Zn^{2+} 质量浓度为 1 ~ 100 $\mu g/L$ 时,蛋白核小球藻呈正增长; Zn^{2+} 质量浓度大于 10 mg/L 时,蛋白核小球藻比增长率明显低于对照组,达到 100 mg/L 时,几乎不增长,这说明适当的低浓度 Zn^{2+} 促进蛋白核小球藻生长,高浓度的 Zn^{2+} 抑制蛋白核小球藻的生长并对其产生显著的毒性效应。蛋白核小球藻在本试验条件下适宜生长的 Zn^{2+} 质量浓度范围为 0.001 ~ 0.1 mg/L 。

2.4 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻光合和呼吸作用的影响

表 4 中所列数据表示 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻光合和呼吸作用的影响。

表 4 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻光合和
呼吸作用的影响(培养 25 d)

$\rho(Zn^{2+})/$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)	净光合速率		呼吸速率	
	氧量/ ($10^{-10} \mu mol \cdot$ $cell^{-1} \cdot h^{-1}$)	叶绿素 a/ ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot$ h^{-1})	氧量/ ($10^{-10} \mu mol \cdot$ $cell^{-1} \cdot h^{-1}$)	叶绿素 a/ ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot$ h^{-1})
0	1 252.6	764.5	595.1	363.2
0.01	1 209.3	758.2	529.9	332.3
0.1	1 086.7	750.6	466.4	330.8
1	1 319.5	807.4	668.9	409.3
50	1 383.8	811.2	756.2	443.3
100	1 425.6	847.6	796.4	473.5
1 000	1 257.0	809.4	558.7	359.7
10 000	886.3	599.5	304.3	205.8
100 000			64.9	83.1

从表 4 可知,当 Zn^{2+} 质量浓度在 0 ~ 0.1 $\mu g/L$ 之间时,蛋白核小球藻净光合速率随 Zn^{2+} 质量浓度的增加逐渐减小;当 Zn^{2+} 质量浓度在 1 ~ 100 $\mu g/L$ 之间时,净光合速率则随 Zn^{2+} 质量浓度的增加逐渐增大;当 Zn^{2+} 质量浓度超过 1 mg/L 时净光合速率又再次降低,直到 Zn^{2+} 质量浓度达到 100 mg/L 时,净光合速率检测不到。表 4 中蛋白核小球藻呼吸速率值随 Zn^{2+} 质量浓度的变化显示出与光合速率基本相同的规律。出现的这种光合作用和呼吸作用变化规律与所对应的 Zn^{2+} 质量浓度范围与前述不同 Zn^{2+} 质量浓度条件下蛋白核小球藻的光密度值变化、叶绿素 a 质量浓度变化以及平均比增长率变化是一致的。

因此,不同指标参数相互验证了在本试验条件下 Zn^{2+} 质量浓度对蛋白核小球藻生长的影响范围情况。

3 结 论

水体富营养化与藻类“水华”密切相关。“水华”是水体富营养化的结果,是水质变异的一种特殊现象^[5]。大量研究证明,微量元素 Zn^{2+} 是影响“水华”发生和发展的一个不可忽略的因子,在某些特定的条件下甚至可以成为“水华”的限制因子。藻类对重金属的富集作用会促进藻类的优势生长,助长“水华”的发展^[6]。 Zn^{2+} 在藻类的许多生理过程中起重要的作用,是藻类光合作用和相关代谢酶类的组成成分,在适当的浓度下可促进许多酶的活性,高浓度的 Zn^{2+} 促使核酸降解,并且抑制叶绿体中 NADPH(还原型辅酶 II)的形成和藻细胞 ATP(三磷酸腺苷)水平,较低浓度的 Zn^{2+} 可促进藻类细胞增殖^[7-8]。当然, Zn^{2+} 对藻类的影响还取决于其他环境因子, Zn^{2+} 对藻类的生物可利用性以及藻类对 Zn^{2+} 的有效吸收也因藻种不同而异。

本试验结果表明,低于 0.01 $\mu g/L$ 的 Zn^{2+} 质量浓度会对蛋白核小球藻的生长有限制作用;当 Zn^{2+} 质量浓度在 1 ~ 100 $\mu g/L$ 之间时则会促进蛋白核小球藻的增殖,其中 Zn^{2+} 质量浓度为 50 $\mu g/L$ 时,其生长最快;而当 Zn^{2+} 质量浓度达到 1 mg/L 就表现出对蛋白核小球藻增殖的抑制作用; Zn^{2+} 质量浓度继续增大达到 100 mg/L 时,其对蛋白核小球藻的毒性效应会导致其完全停止生长。应该说,不同的实验研究由于所用藻种以及所用培养基的组分及浓度、实验条件的差异,所得到的对于微量元素限制浓度的范围结论可能会有所不同。由于本试验在 Zn^{2+} 质量浓度从 100 ~ 1000 $\mu g/L$ 之间没有设定梯度浓度,所以,在这个浓度范围内的对蛋白核小球藻生长影响的准确“拐点”还有待进一步的深入研究。

据资料,北京市主要的再生水厂不同月份的出水中 Zn^{2+} 平均质量浓度范围在 31 ~ 183 $\mu g/L$ 之间,结合本试验的结果,恰好是在试验确定的促进蛋白核小球藻的增殖的 Zn^{2+} 质量浓度范围内。如以此类再生水为水源补充景观水体,在其他条件适宜的情况下, Zn^{2+} 可能会对藻类的生长起到促进的作用。应该严格控制再生水中 Zn^{2+} 含量,使其尽可能地在藻类生长的限制浓度范围内,创造出遏制蛋白核小球藻增长的条件。

除了 Zn^{2+} 之外,本研究项目还对其他微量元素,如 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 等分别进行了研究,相关的研究成果将陆续介绍,最终希望能够得到一个针对

