Cu²⁺ 对普通小球藻的光合毒性: 初始藻密度的影响

欧阳慧灵, 孔祥臻, 何玘霜, 秦宁, 何伟, 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

摘要: 为了研究 Cu²⁺ 对普通小球藻的光合毒性以及初始藻密度对 Cu²⁺ 光合毒性的影响. 将初始密度为 10⁷ mL⁻¹的普通小球 藻暴露于 Cu²⁺的 6 个浓度(0, 5, 10, 20, 30 和 40 º mol·L⁻¹)中进行 96 h 的毒性暴露实 验, 在 2, 48 和 96 h 分别利用叶绿素荧 光仪(MAXHImaging PAM)测定各项叶绿素荧光参数,同时,针对3个不同初始密度的普通小球藻(2×10⁶、5×10⁶和2×10⁷ mL⁻¹), 测定并比较了其暴露于 0.20 和 40 ^µ mol·L⁻¹的 Cu²⁺ 12 h 后, 叶绿素荧光参数的变化。不同初始藻密度的毒性实验 结果显示,初始藻密度为 2×10⁶ mL⁻¹时, 20 和 40^µmol·L⁻¹ Cu²⁺ 可完全抑制普通小球藻的光合作用; 当初始藻密度增加到 5 $imes 10^{\circ}$ 和2imes 107 mL $^{-1}$ 时, 40 $^{\mu}$ mol·L $^{-1}$ Cu $^{2+}$ 对普通小球藻的实际光合作用效率仅有约 75 %和 25% 的抑制。这表明初始藻密 度越大, Cu²⁺的光合毒性越弱。但随着初始藻密度的增加, 初始藻密度的变化对 Cu²⁺ 光合毒性的影响减弱。初始藻密度为 10⁷ m L⁻¹时的毒性实验结果显示,暴露于 20~40 µmol·L⁻¹ Cu²⁺ 2 h 后,普通小球藻的光合作用即受到抑制,且该抑制程度随 Cu²⁺浓度的增加而增强,并随着暴露时间的延长有所缓解。随着 Cu²⁺浓度的增加,最大量子产量(Fv/Fm)、实际量子产量 (Yield)、相对电子传递速率(ETR)和光化学淬灭系数(qP)逐渐降低,非光化学淬灭系数(NPO/4)逐渐上升。研究结果表明, Cu²⁺ 对普通小球藻的光合作用有一定的抑制作用, 其机理可能为通过引起 PSII 系统反应中心的部分失活, 导致 PSII 系统反 应中心的开放比例减少,引起电子传递速率降低以及 ATP 和 NADPH 的合成减慢,从而使光合作用速率下降;初始藻密度对 Cu²⁺ 的光合毒性大小有较大的影响, 故在进行藻类的毒性实验时, 也应关注初始藻密度的影响。 关键词: Cu²⁺; 普通小球藻; 初始藻密度; 光合毒性; 叶绿素荧光

文章编号: 1673 5897(2011)6 499 08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxicological Effect of Cu^{2+} on Photosynthesis of *Chlorella vulgaris*: **Influence of Initial Cellular Density**

Ouyang Huiling, Kong Xiangzhen, He Qishuang, Qin Ning, He Wei, Wang Yan, Wang Rong, Xn Fulin`

Key Laboratory for Earth Surface Processes of Ministry of Education, College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Received 18 April 2011 accepted 21 July 2011

Abstract: To investigate the toxicity of Cu²⁺ to the initial photosynthesis of Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris (at the initial cellular density of 10^7 mL^{-1}) were exposed to Cu^{2+} at the concentrations of 0, 5, 10, 20, 30 and 40 μ m ol· L⁻¹, and chlorophyll fluorescence parameters were measured by MAXI Imaging PAM after the exposure of 2, 48 and 96 h, respectively. In addition, Chlorella vulgaris with three differ ent initial cellular densities $(2 \times 10^6, 5 \times 10^6 \text{ and } 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1})$ were exposed to 0, 20 and 40 μ mol·L⁻¹ Cu^{2+} for 12 h to study the impact of algae cellular density on the toxicity of Cu^{2+} . The results showed that the toxicity of Cu²⁺ decreased with increasing initial cellular density of Chlorella vulgaris, but the effect weakened as initial cellular density became higher. The quantum yield of PSII was completely suppressed

作者简介:欧阳慧灵(1990), 女.硕士研究生,研究方向为藻类生态毒理, Email: huiling31707@gmail.com;

*通讯作者(Corresponding author), E.mail: xufl@urban, pku.edu.cn (C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

收稿日期: 2011:04:18 录用日期: 2011 07 21

基金项目: 国家 973 项目(No. 2007CB407304); 国家杰出青年基金项目(No. 40725004); 国家自然科学基金重点项目(No. 41030529); 国家 水专项(No. 2008ZX 07103 005 01)

by 20 and 40 μ mol· L⁻¹ Cu²⁺ when the initial cellular density was 2×10^{6} mL⁻¹, whereas the quantum yield only decreased by 75% (25%) under 40 μ mol· L⁻¹Cu²⁺ when the initial cellular density increased to 5×10^{6} mL⁻¹(2×10^{7} mL⁻¹). The algal toxicity test at initial cellular density of 10⁷ mL⁻¹ showed that the photo synthesis rate was inhibited by 20 40 μ mol· L⁻¹ Cu²⁺ after only 2 h exposure. Such reductions became stronger under higher Cu²⁺ concentration, but were relieved with longer exposure time. The maximal quantum yield of PSII (Fv/Fm), the actual quantum yield of PSII (Yield), electron transport rate (ETR) and photochemical quenching (qP) declined with increasing Cu²⁺ concentration, while non photochemical quenching (NPQ /4) increased at the same time. In conclusion, the toxicity mechanism of Cu²⁺ to photo synthesis of Chlorella vulgaris was basically due to the deactivation of some PSII reaction centers, which could result in the partial closure of PSII reaction centers, then in turn leading to the deceleration of electron transfer and the synthesis of ATP and NADPH. Moreover, it is found that the toxicity of Cu²⁺ was dependent on the initial cellular density of Chlorella vulgaris, so the effect of initial cellular density should be taken into account when conducting the ecotoxicological studies of algae.

Keywords: Cu²⁺; Chlorella vulgaris; initial cellular density; toxicity to photosynthesis; chlorophyll fluorescence

铜是日常生活中使用最多的重金属之一,它进入水体后能促进藻类的生长和繁殖,但当其浓度超 过一定范围时,就会对藻类产生毒性作用,表现出对 藻类的光合作用及其生长、繁殖的抑制效应^[+3]。藻 类是水体中的初级生产力,研究 Cu²⁺ 对藻类光合作 用的影响,对评估 Cu²⁺ 对水生生态系统的风险和危 害具有重要意义。

以往的毒性研究较多关注环境条件(如温度、 pH、光照和培养基等)对污染物毒性的影响^[46],初 始藻密度的影响往往被忽略。最近有研究表明,不 同初始藻密度会影响 Cu²⁺ 对藻类生长毒性的半效 应浓度(EC50), 初始密度降低时, Cu²⁺的 EC50 随之 减小^[78],然而目前缺乏初始藻密度能否影响 Cu²⁺ 的光合毒性的研究。在进行藻类毒性实验时,藻的 初始密度多设定为 10⁴~10⁵ mL⁻¹(OECD 标准)和 10[°] $\sim 10^{10} \text{ mL}^{-1}$ (水华爆发时藻类顶峰浓度),分别用来比较 不同物质的毒性大小(ECso)以及研究藻类爆发时的治理 手段;然而,针对水体处于中等营养水平,藻类密度处于 $10^{\circ} \sim 10^{\circ} \text{ mL}^{-1}$ 时的毒性研究相对较少。本研究以绿藻 的优势藻种普通小球藻为受试生物,设计了2个实验,以 研究不同初始藻密度对 Cu²⁺ 的光合毒性的影响 以及在 中等初始藻密度下, Cu²⁺ 对普通小球藻光合作用的影响 和可能机理,为全面了解 Cu2+ 对藻类的光合毒性效应提 供依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

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。在GXZ 280B、智能型光照生物培养箱(宁波东南仪器有限公 司) 中采用 BG11 培养基进行培养, 培养条件为: 光 强 4 000 Lux, 光暗比 14 h 相 h; 温度(24±1)℃, 静止培养, 每天人工摇动 2~3 次。

分析纯五水合硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)购自国药 集团化学试剂有限公司,用作 Cu^{2+} 的来源。

1.2 实验设计

1.2.1 初始藻密度对 Cu²⁺ 光合毒性的影响

将处于指数生长期的普通小球藻按 $2 \times 10^{\circ}$ 、 5×10⁶和 2×10⁷ mL⁻¹的初始密度接种于含 50 mL 培养液的 100 mL 锥形瓶中,分别加入一定量的硫 酸铜溶液使 Cu²⁺ 浓度达到 0、20 和 40 μ mol·L⁻¹, 每个浓度设定 3 个平行。将所有样品置于光照培养 箱中培养 12 h 后进行叶绿素荧光参数的测定。

1.2.2 中等初始藻密度下 Cu²⁺ 对普通小球藻光合 作用的影响

选择培养至约 10⁷ mL⁻¹处于指数生长期的普 通小球藻进行实验,设定 5 个 Cu²⁺ 浓度梯度 5、10、 20、30 和 40 µmol·L⁻¹及 1 个空白对照组,每个浓度 设 3 个平行。在 2、48 和 96 h 取样进行叶绿素荧光 相关指标的测定。

1.3 叶绿素荧光参数的测定

采用德国 Walz 公司生产的 MAXH Imaging PAM 叶绿素荧光仪进行各项叶绿素荧光参数的测 定,测定的指标包括初始荧光 Fo,最大荧光 Fm(暗 适应后)和 Fm'(光照条件下),PSII 系统最大量子 产量Fv/Fm(暗适应后),PSII 系统实际量子产量 Yield,相对电子传递速率 ETR,非光化学淬灭系数 (NPQ/4),光化学淬灭系数(qP)。各样品在暗适应 20 min 后进行测定,以上参数均可从,MAXH Ima, ging PAM 叶绿素荧光仪中直接读取,同时可获得 各样品的光诱导曲线及荧光成像图,关于各参数的 定义及其物理意义可参考相关文献^[910]。

1.4 数据统计分析

所有数据利用 excel 2010 和 SPSS 16.0 进行分 析。

2 结果(Results)

2.1 初始藻密度对Cu²⁺光合毒性的影响

Cu²⁺暴露 12 h 后,3 个不同初始密度下普通小 球藻光诱导曲线的变化见图 1。随着初始藻密度的 增加, Cu^{2+} 对普通小球藻荧光强度的抑制程度减 弱。当初始密度为 2×10⁶ mL⁻¹时, 20 μ mol·L⁻¹ Cu^{2+} 能显著地抑制普通小球藻的叶绿素荧光,表现 为荧光变化趋近于零; 当密度升至 5×10⁶ mL⁻¹时, 20 μ mol·L⁻¹ Cu^{2+} 仅导致 Fm 和 Fm'分别下降 14%和 26%, 40 μ mol·L⁻¹ Cu^{2+} 才能完全抑制普通 小球藻的叶绿素荧光; 而当初始密度增至 2×10⁷ mL⁻¹时, 40 μ mol·L⁻¹ Cu^{2+} 处理组中 Fm 和 Fm'仅 下降了约 30%。





(藻密度: A, 2×10⁶ mL⁻¹; B, 5×10⁶ mL⁻¹; C, 2×10⁷ mL⁻¹。Cu²⁺浓度: 黑线 对照组; 红线 20 µm ol·L⁻¹; 蓝线 40 µm ol·L⁻¹。) Fig. 1 Fluorescence induction kinetics of Chlorella vulgaris exposed to Cu²⁺

(black line control; red line 20 μ mol·L⁻¹; blue line 40 μ mol·L⁻¹) for 12 h at different initial cellular densities (A: 2×10⁶ mL⁻¹; B: 5×10⁶ mL⁻¹; C: 2×10⁷ mL⁻¹)

不同于其他叶绿素荧光仪, MAXH Imaging PAM 叶绿素荧光仪可同时测量多个样品并获得叶 绿素荧光成像图。12 h 后普通小球藻叶绿素荧光 参数Fv/Fm和 Yield 的荧光成像图见图 2。图 2 中 3×3的方格中显示的分别是不同初始藻密度下经 不同浓度 Cu²⁺ 处理后 Fv /Fm 和 Yield 的变化,其 中从左到右分别显示的是初始密度为 2×10°、5× 10^{6} 和 2×10⁷ mL⁻¹时的实验结果,从上到下分别显 示的是浓度为 0(空白对照组)、20 和 40 µmol·L⁻¹ 的 Cu²⁺ 暴露组叶绿素荧光参数值的变化。从荧光 成像图可以较为直观地看出初始藻密度对于 Cu²⁺ 的光合毒性的影响,当初始藻密度为 $2 \times 10^6 \text{ m L}^{-1}$ 时,20和 40^µmol·L⁻¹ Cu²⁺ 处理可完全抑制普通小 球藻的光合作用,使其 Fv/Fm 和 Yield 值低于仪器 检出限: 当初始藻密度增加一个数量级达到 2×10⁷ mL⁻¹时, 20 和 40 µmol·L⁻¹ Cu²⁺ 对普通小球藻的 Fv/Fm影响不明显。不同初始藻密度下 Cu^{2+} 对 Fv/Fm和 Yield 的抑制程度如图 3 所示,可以看出, 当初始藻密度从 2×10^6 增加到 2×10^7 mL⁻¹时, 40 的。Gu²⁺处理对Fy/Fm的抑制程度从

100 %降至 6 %, 对 Yield 的抑制程度从 100 %降至 25%。由此可见, 初始藻密度的增加可降低 Cu^{2+} 对 普通小球藻的光合毒性, 且 Yield 与 Fv/Fm 相比对 Cu^{2+} 的毒性更加敏感。



mel. L, f 的 Cu²⁺, 处 埋 对 F v /F m 的 抑制程度,从 (C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.chri.net





(A: Fv/Fm, B: Yield; 白 20 µm ol L⁻¹ Cu²⁺, 灰 40 µmol L⁻¹ Cu²⁺)
 Fig. 3 Inhibition rate of chlorophyll fluorescence parameters (A: Fv/Fm; B: Yield) of Chlorella vulgaris at different initial cellular densities exposed to Cu²⁺

(white column 20 μ mol· L⁻¹; grey column 40 μ mol· L⁻¹) for 12 h

2.2 中等初始密度下 Cu²⁺ 对普通小球藻光合作用 的影响

在 10^7 mL^{-1} 初始密度下考察 Cu^{2+} 对普通小球 藻光合毒性时, Cu^{2+} 浓度为 $20 \ \mu \text{mol} \cdot L^{-1}$ 时, 暴露 2h 后普通小球藻的叶绿素荧光即有所下降(图 4), 与 对照组相比, Fm 和 Fm'分别下降了 6% 和 14%。 随着暴露时间和暴露浓度的增加, 叶绿素荧光降低 的程度也随之增加, 暴露 96 h 后, Cu^{2+} 浓度为 20、 $30 和 40 \ \mu \text{mol} \cdot L^{-1}$ 的处理组的叶绿素荧光均有明 显的下降(图 5), 其中最高浓度处理组($40 \ \mu \text{mol} \cdot L^{-1}$)的荧光下降最为显著, 与对照组相比, 其 Fm 和 Fm'分别降低了 58. 7%和 64. 6%。叶绿素荧光的 变化反映了普通小球藻细胞内光合作用的变化, 叶 绿素荧光的下降表明 Cu^{2+} 对普通小球藻的光合作 用有较大的抑制作用。

普通小球藻各项叶绿素荧光参数(包括 Fv/Fm、Yield、ET R、qP 和 NPQ/4)随 Cu²⁺暴露浓度和 暴露时间的变化如图 6 所示(各参数的大小以相对

值表示)。由于 ETR 由 Yield 计算得到, 两者呈线 性正相关,因而 Yield 和 ETR 的变化规律一致。叶 绿素荧光参数的变化趋势与生物量的变化相似,低 浓度 $Cu^{2+}(5 \sim 10 \ \mu m \, ol \cdot L^{-1})$ 对普通小球藻的叶绿 素荧光参数的影响不大,未检验出差异性(p>0. 01),但较高浓度 Cu²⁺ 处理组(20~40 µm ol· L⁻¹)对 荧光特性有显著性影响(p<0.01)。随着暴露浓度 的增加, Fv/Fm、Yield、ETR和 qP的下降幅度以及 NPQ /4 的上升幅度增大,表明 Cu²⁺ 浓度越高 PSII 系统受影响的程度越大。然而,随着暴露时间 的延长, Fv /Fm、Yield、ETR 和 gP 均表现出先 下降后上升的趋势,暴露 96 h 后各参数值比暴 露48h后略有上升,推测原因为随着时间的延 长普通小球藻对于 Cu²⁺ 的胁迫产生了一定的抵 御能力。比较各项荧光参数的变化可以发现, Yield 和 NPQ / 4 对于 Cu²⁺ 的胁迫最为敏感, 而 Fv/Fm 最不敏感, 40 µmol·L⁻¹ Cu²⁺ 处理 96 h



图 4 Cu²⁺ 暴露 2 h 后普 通小球藻光诱导曲线的变化

注: A, 对照组; B, 20 4 mol·L-1 Cu²⁺处理组。Fm 为暗适应后最大荧光; Fm' 为光照条件下最大荧光。





Fig. 5 Fluorescence induction kinetics of Chlorella vulgaris exposed to Cu²⁺ (B: 20μ mol·L⁻¹; C: 30μ mol·L⁻¹; D: 40μ mol·L⁻¹) for 96 h, compared to the control (A)



Value variations of chlorophyll fluorescence parameters of Chlorella vulgaris exposed to Cu2+ Fig. 6 after 2, 48 and 96 h (A: Fv/Fm; B: Yield and ETR; C: qP; D: NPQ/4)

后, Fv /Fm、Yield、qP 和 NPQ /4 与对照组相比分别 变化了16.1%、48.8%、16.2%和 120.8%。

3 讨论(Discussion)

光合作用是整个生态系统物质流和能量流的基 础,作为初级生产者的藻类,其光合作用强度影响生 态系统的稳定性。叶绿素荧光由植物叶绿体内部发 出,与光合作用中主要反应过程紧密相关,是一种理 想的光系统探针,可直接或间接反映光合作用过 程^[9,11]。本研究探讨了初始藻密度对 Cu²⁺ 光合毒 性的影响,结果显示:初始藻密度能影响 Cu²⁺ 对藻 类光合作用的毒性效应,初始藻密度增加时,Cu²⁺ 的光合毒性减弱,并且随着初始藻密度的增加,初始 藻密度的变化对 Cu²⁺ 光合毒性的影响程度减弱。 以 20 μ mol·L⁻¹的 Cu²⁺处理组为例, 初始藻密度从 2×10⁶ 增加到 5×10⁶ mL⁻¹时, Fv/Fm 和 Yield 受 抑制的程度分别降低了 89%和 75%,然而初始藻密 度从 5×10^6 增加到 2×10^7 mL⁻¹ 时, Fv/Fm 和 Yield 受抑制的程度仅降低了 7 %和 14%, 可见初始 藻密度对 Cu²⁺ 毒性的影响程度随着初始藻密度的 变化而变化。当初始藻密度较低时,单位藻密度的 变化引起的 Cu^{2+} 毒性强度改变较大, 但随着藻密度 的增加,单位藻密度的变化引起的 Cu²⁺ 毒性强度改 变将减小,因而,初始藻密度对 Cu²⁺ 光合毒性的影 响并非简单的线性关系,它们之间的定量关系将在 后续研究中进行探讨。

初始藻密度对 Cu²⁺ 光合毒性的影响可能由以 下原因造成。其一,初始藻密度对于 ECso的影响可 能与单位细胞承受的 Cu^{2+} 浓度有关[7],因而当初始 藻密度增加时,作用于单位细胞的 Cu²⁺ 量减小,从 而使藻细胞受到的 Cu²⁺ 的影响减弱。其二,由于藻 的细胞壁和膜可提供许多与 Cu^{2+} 结合的官能团, Cu²⁺若与官能团结合可被束缚在细胞壁或膜上,游 离态的 Cu²⁺ 浓度会降低, 而游离态 Cu²⁺ 浓度是决 定Cu²⁺对藻类产生毒性效应大小的关键^[12 13],因而 初始藻密度增加时,游离态的 Cu²⁺浓度将降低,即 Cu²⁺的有效作用浓度降低。其三,初始藻密度对 Cu²⁺毒性的影响还可能与受到 Cu²⁺ 影响的细胞比 例有关,Cu²⁺并不是对所有的藻同时产生抑制作 用,藻细胞受到的抑制作用是有先后顺序的^[14],由 此推测,一定浓度的 Cu²⁺可能仅能对一定数量的藻 细胞产生抑制作用,而其他细胞几乎未受影响,因而 当初始藻密度较大时,受影响的细胞比例相对较小, 表现为Gu²⁺的毒性作用较小。以上3种机理均可 能造成 Cu²⁺ 的光合毒性受到初始藻密度的影响,以 及初始藻密度增加时藻密度的变化对 Cu²⁺ 光合毒 性的影响程度相对减小,然而,实际情况下何种机理 占优势有待进一步的研究与证实。

从 10^7 m L^{-1} 初始密度下 Cu^{2+} 对普通小球藻光 合毒性的实验结果中可以发现,随着暴露时间的增 加,光合作用受影响的程度有所降低,普通小球藻表 现出了对 Cu²⁺ 的适应现象。Juneau 等^[15] 的研究也 发现了类似的现象,当 Cu^{2+} 浓度为 $100 \mu_g \cdot L^{-1}$ 时, 暴露 5 h 后小球藻的 Fm 和 Fm' 下降了 20%, 荧光 参数 Yield 和 NPO 变化了约 25%, 但 Fv /Fm 和 qP 无明显变化, 然而, 暴露 48 和 72 h 后 Cu²⁺ 的抑制 作用消失,各项荧光参数均未受到显著抑制。Cu²⁺ 对普通小球藻光合作用的影响随着时间的延长有所 减弱的现象,可能与藻密度增加所造成的 Cu²⁺毒性 下降有关,也可能是普通小球藻在受到 Cu²⁺ 胁迫后 体内的抵御机制受到了一定程度的激发,使毒性有 所缓解,如产生大量的细胞壁多糖¹⁶。由于本研究 只测定了 96 h 内叶绿素荧光参数的变化, 若暴露时 间更长, Cu²⁺的毒性作用能否完全消除有待进一步 的研究。

Juneau 等^[15] 研究发现, 初始密度为 10^4 mL^{-1} 的小球藻暴露于 $100 \mu_g \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 中, 5 h 后小球 藻的叶绿素荧光受到了约 20%的抑制。但本研究 中, 当小球藻初始藻密度为 10^7 mL^{-1} 时, Cu^{2+} 浓度 需达到 $40 \mu_{\text{mol}} \cdot \text{L}^{-1}$ 才可在 2 h 内对叶绿素荧光 产生约 20%的抑制, 此 Cu^{2+} 浓度约为 $100 \mu_g \cdot$ L^{-1} 的 2 5 倍, 尽管 2 个实验中胁迫时间有一定 的差异, 初始藻密度的影响仍不可忽略, 两者的 差异与初始藻密度对 Cu^{2+} 光合毒性影响的结论 一致。由此可见, 在评估污染物的光合毒性时, 藻密度的选择对毒性数据的大小有较大的影 响, 在进行藻类毒性实验时, 应根据实验目的选 择恰当的初始藻密度。

叶绿素荧光参数的变化包含了丰富的信息,通 过测量各参数的变化可了解 Cu^{2+} 影响藻类光合作 用的过程与机理^[11]。本研究的结果表明, Cu^{2+} 能引 起多项荧光参数的变化,Fv/Fm、Yield 和 ET R 的 下降说明光合作用的强度和电子传递速率受到 Cu^{2+} 的抑制,qP、NPQ/4和荧光强度的变化可用于 推测光合作用受抑制的机理。经暗适应后测量得到 的 Fv/Fm可表征植物光合作用的能力,实验中发现 Fv/Fm下降,可知 Cu^{2+} 对普通小球藻光合作用的 能力有抑制作用。由于 Fv /Fm 由 Fo 和 Fm 计算得 到(Fv /Fm=(Fm Fo) /Fm),因而 Fv /Fm 的变化源 于 Fo和 Fm 的变化。当植物受到胁迫时,Fo 的值将 发生改变。PSII 系统反应中心的热耗散增加会导 致 Fo 降低,而叶绿体的破坏或 PSII 系统的可逆失 活会引起 Fo 的上升^[1718],故可根据 Fo 的变化来推测 光反应中心的状况。如图 5 所示,40 μ mol·L⁻¹处 理组的普通小球藻的 Fo 低于对照组,由此推测 Cu²⁺胁迫并未造成 PSII 系统反应中心的被耗散。

光化学淬灭是指由光合作用引起的荧光淬灭, 光化学淬灭系数 qP 反映了 PSII 系统中反应中心开 放的比例^[19]。qP 反映的是 PSII 系统中天线色素吸 收的光能用于光化学电子传递的份额,较低的 qP 说明 PSII 系统中开放的反应中心的比例和参与 CO2固定的电子减少^{20]}。NPQ 反映的是天线色素 吸收的光能未用于电子传递而以热耗散形式损失的 能量比例^[21]。热耗散是植物保护 PSII 系统的重要 机制,故 NPQ 可反映植物光保护能力。NPQ 的值 越高,植物接收的光能中过剩的部分越多。图6显 示 Cu²⁺胁迫下, qP 降低, N PQ /4 值上升。 qP 下降 暗示 PSII 系统中反应中心可能因胁迫而部分关闭, 即 PSII 系统"电子门"的开放比例下降。由于"电子 门"的关闭,传递的电子数量减少,"电子门"另一侧 合成三磷酸腺苷(ATP)和还原型烟酰胺腺嘌呤二 核苷酸磷酸(NADPH)的速率降低,从而导致光合 作用的速度下降(Yield 降低)。随着时间的延长, 积聚在 PSII 系统反应中心左侧的电子不断增加,这 些电子无法通过电子门传递到另一侧以合成 ATP 和 NADPH, 过剩的能量只能通过热耗散的形式流 失,因而导致了热耗散的增加,表现为 NPO /4 上 升。

综合各荧光参数的变化可知, Cu^{2+} 胁迫能导致 F₀、Fm、qP、ETR、Yield 和 Fv/Fm 的下降以及 NPQ /4 的上升, 它通过降低 PSII 系统反应中心的 活性, 阻碍电子传递过程, 导致电子传递速度降低, ATP 和 NADPH 的合成减慢, 光合作用速率下降, 与此同时, 累积于 PSII 系统左侧的电子不断增加, 引起光抑制, 导致热耗散增加。Xia 和 Tian^[22] 对蛋 白核小球藻的研究结果也得到了类似的结论, 即 Cu^{2+} 对藻类光合作用的抑制可能与 Cu^{2+} 引起的 PSII 系统反应中心失活和电子传递的受阻有关。 有研究表明, Cu^{2+} 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 构解体损坏, 进而影响植物的光合作用^[23 24]。但本 研究的结果显示, $5 \sim 40 \ \mu m ol \cdot L^{-1}$ 的 Cu^{2+} 未对普通 小球藻光合系统相关结构造成破坏, 推测 Cu^{2+} 可能 通过其他形式抑制光合作用, 如替换叶绿素中心的 Mg^{2+} 。本研究结果只展示出 Cu^{2+} 对反应中心的抑 制作用, 对于该抑制作用的机理尚有待进一步的研 究。

本研究发现, 当以藻类为受试生物时, 初始藻密 度对毒性数据有较大的影响。初始藻密度能影响 Cu²⁺ 对普通小球藻的光合毒性, 初始藻密度越大, Cu²⁺ 的毒性越弱, 且随着初始藻密度的增加, 初始 藻密度的变化对于 Cu²⁺ 毒性的影响减弱。因而在 比较藻类为受试生物的毒性数据时, 应关注初始藻 密度的影响。

同时,本研究结果显示:初始藻密度为 10^7 mL⁻¹时,暴露于 20~40 μ mol·L⁻¹的Cu²⁺中 2 h 后 普通小球藻的叶绿素荧光即受到抑制,但随着暴露 时间的延长,抑制作用有所减弱;Cu²⁺胁迫对普通 小球藻的光合作用有一定的抑制作用,能导致 Fo、 Fm、qP、ETR、Yield 和 Fv /Fm 的下降以及 N PQ /4 的上升,其可能机理为通过降低 PSII 系统反应中心 的活性,阻碍电子传递过程,导致电子传递速度降 低,ATP 和 NADPH 合成减慢,光合作用速率下 降。

通讯作者简介:徐福留(1962-),男,博士,教授,博士生导师,国家杰出青年科学基金获得者,主要从事污染物表生行为与环境效应研究。

参考文献:

- Price N M, Morel F M M. Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton [J]. Arch Hydrobiologies 1994, 42: 79-97
- [2] Brown M T, Newman J E. Physiological responses of Gracilariopsis longissima (S. G. Gmelin) Steentoft L M. Irvine and Farnham (Rhodophyceae) to sub lethal copper concentrations [J]. Aquatic Toxicology, 2008, 64(2): 201 – 213
- [3] 陈雷,郑青松,刘兆普,等.不同Cu²⁺浓度处理对斜 生栅藻生长及叶绿素荧光特性的影响[J].生态环境 学报,2009,18(4):1231-1235
 - Chen L. Zheng Q S, Liu Z P, et al. Effects of differ ent concentrations of copper ion on the growth and chlorophyll fluorescence characteristics of Scendes mus obliquus L. [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(4): 1231-1235 (in Chinese)
- [4] Stauber J L, Florence T M. The effect of culture me dium on metal toxicity to the marine diatom Nitzschia

勾解体损坏,进而影响植物的光合作用⁽²²²⁾ 但本 (1994–2020) China Academic Fournal Electronic Publishing Plouse. All and the freshwater green/alga Chlorella 506

pyrenoidosa [J]. Water Research, 1989, 23(7): 907 -911

- [5] Franklin N M, Stauber J L, Markich S J, et al. pH dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (Chlorella sp.) [J]. Aquatic Toxi cology, 2000, 48(2-3): 275 - 289
- [6] 赵娜,朱琳,冯鸣凤.不同 pH 条件下 Cr⁶⁺对 3 种藻 的毒性效应 J].生态毒理学报,2010,5(5):657-665

Zhao N, Zhu L, Feng M F. The toxicological effects of Cr⁶⁺ on Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus and Microcystis aeruginosa at different pH values
[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(5): 657 - 665 (in Chinese)

- [7] M oreno Garrido I, Lubián L M, Soares A M V M.Influence of cellular density on determination of EC₅₀ in microalgal growth inhibition tests [J]. Ecotoxicol ogy and Environmental Safety, 2000, 47(2): 112 – 116
- [8] Franklin N M, Stauber J L, Apte S C, et al. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, 21(4): 742 - 751
- [9] Lazár D. Chlorophyll a fluorescence induction [J].
 Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1412(1): 1-28
- [10] Roháček K. Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions photosynthetic meaning and mutual relationships [J]. Photosynthetica, 2002, 40(1): 13 - 29
- [11] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence a practical guide [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(345): 659 - 668
- [12] 阎海, 潘纲, 霍润兰. 铜、锌和锰抑制月形藻生长的 毒性效应[J]. 环境科学学报, 2001, 21(3): 328-332

Yan H, Pan G, Huo R L. Toxic effects of copper, zinc and manganese on the inhibition of the growth of Closterium lunula [J]. Acta Scientiae Circumstanti ae, 2001, 21(3): 328-332 (in Chinese)

- [13] 张树林,邢克智,周艳.铜离子对铜绿微囊藻的急性 毒性效应 J. 水产科学,2007,26(6):323-326
 Zhang S L, Xing K Z, Zhou Y. The acute toxicity of copper ion on alga Microcystis aeruginosa [J]. Fish eries Science, 2007,26(6):323-326 (in Chinese)
- [14] 于洋,孔繁翔,钱蕾蕾,等.流式细胞术在铜对藻类
 生态毒理研究中的应用[J].环境化学,2004,23
 (5):525-528

Yu Y, Kong F X, Qian L L, et al. The application of flow cytometer in the ecotoxicity studies of copper with microalgae [J]. Environmental Chemistry, 2004, 23(5): 525-528 (in Chinese)

- [15] Juneau P, Berdey A E, Popovic R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of Chlorella vulgaris, Selenastrum capricornutum, and Chlamydo monas reinhardtii to copper [J]. Archives of Environ mental Contamination and Toxicology, 2002, 42(2): 155-164
- [16] Andrade L R, Leal R N, Noseda M, et al. Brown al gae overproduce cell wall polysaccharides as a protec tion mechanism against the heavy metal toxicity [J]. Marine Pollution Bulletin, 2010, 60(9): 1482 - 1488
- [17] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluores cence signals [J]. Photosynthesis Research, 1984, 5 (2): 139-157
- Barényi B, Krause G H. Inhibition of photosynthetic reactions by light [J]. Planta, 1985, 163(2): 218-226
- [19] Maxwell D P, Falk S, Trick C G, et al. Growth at low temperature minics high light acclimation in Chlorella vulgaris [J]. Plant Physiology, 1994, 105 (2): 535-543
- [20] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence
 [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 990(1): 87-92
- [21] Horton P, Ruban A V, Walters R G. Regulation of light harvesting in green plants [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996, 47: 655-684
- [22] Xia J R, Tian Q R. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of Chlorella pyrenoidosa O JIP chlorophyll a fluorescence analysis [J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(11): 1569 – 1574
- [23] Pätsikkä E. Aro E.M., Tyystjärvi E. Mechanism of copper enhanced photoinhibition in thylakoid mem branes [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 113(1): 142-150
- [24] Vassilev A, Lidon F, Campos P S, et al. Cu induced changes in chloroplast lipids and photosystem 2 activity in barley plants [J]. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 2003. 29(±2): 33-43