

流式细胞术在铜对藻类生态毒理研究中的应用*

于 洋^{1,2} 孔繁翔^{1,2**} 钱蕾蕾² 韩小波² 阎 荣²

(1 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京, 210008; 2 南京大学环境学院, 南京, 210093)

摘 要 用流式细胞术研究了铜对铜绿微囊藻的毒性作用, 结果表明, 一定浓度的铜对藻类的生长具有抑制作用, 而且这种抑制作用随着铜浓度的增加而增加, 96h 的 EC_{50} 为 $82.86 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 当铜浓度为 $101.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 时, 藻细胞的生长几乎完全受到抑制. 流式细胞仪检测结果可以说明铜对藻类群体作用的过程, 即铜并不是同时对所有的藻细胞产生抑制作用. 低浓度时只是对部分细胞产生抑制, 随着铜浓度的升高, 受到抑制的细胞也越多, 当达到最高浓度时, 几乎所有细胞的生长都受到抑制.

关键词 流式细胞式, 铜, 微囊藻, 叶绿素, 自发荧光.

流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 是集光电和计算机一体化的生物学测定技术, 可以对单细胞悬液进行自动快速定量分析和分选^[1]. Franqueira 等利用 FCM 研究了污染物对藻类的毒性作用, 结果表明, 对于不同的藻类和不同的污染物, FCM 都是可行的^[2].

本实验利用 FCM 检测了金属铜离子对湖泊中常见的浮游植物铜绿微囊藻生理生态的影响. 用 FCM 测定藻细胞叶绿素的荧光变化, 并与培养物的光密度和叶绿素含量进行比较, 为利用 FCM 进行多种群的生态毒理学研究建立基础.

1 实验部分

1.1 藻种及其培养

铜绿微囊藻 [*Microcystis aeruginosa* Kütz, M. A.] 取自中国科学院武汉水生生物研究所. 采用 BG-11 培养基^[3], 移取 120ml 培养液置于 250ml 的三角瓶中. 培养温度为 $29 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照为白色日光灯, 光照强度为 $4000 \pm 500 \text{lx}$, 光暗比为 14: 10, 静置培养, 每天定时振荡数次.

1.2 铜浓度设置及处理方法

实验中所用的硫酸铜为分析纯, Cu^{2+} 浓度设置为: 0.0, 20.0, 30.0, 45.0, 67.5, $101.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. 将处于对数期生长的藻液接入新鲜的 BG-11 培养基中, 使初始藻细胞密度为 $1.5 \times 10^6 \text{cell}\cdot\text{l}^{-1}$, 加入不同浓度的 Cu^{2+} 进行培养, 每个处理为 3 个平行样. 于 48h

2003 年 11 月 17 日收稿.

* 国家重点基础研究发展规划项目 (2002CB412300)、中国科学院南京地理与湖泊研究所所长基金等资助.

** 通讯联系人.

和 96h 定时取出 30ml 藻液测定藻的光密度、叶绿素含量, 并用流式细胞仪测定藻类细胞叶绿素的荧光变化.

1.3 藻的生长和叶绿素含量的测定

藻生物量的检测用 752 型分光光度计在波长 680nm 处测定 OD 值; 叶绿素 a 含量的测定采用荧光法^[4], 藻细胞经 90% 丙酮反复抽提后, 用日立 850 型荧光光度计于激发波长 436nm, 发射波长 670nm 处测定叶绿素的荧光, 在荧光对叶绿素 a 标准样品浓度系列所得到的标准曲线上查出对应的样品的叶绿素 a 含量.

1.4 流式细胞仪测定细胞的叶绿素荧光

取不同处理组的藻液 2ml, 经 50 μ m 筛绢过滤后移入样品管, 用 Becton Dickinson 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪测定, 在 FL3 处收集叶绿素荧光. 仪器的基本配置: 激发波长 488nm, 荧光检测波长 FL3 > 630nm, FL3 光电倍增管 (FL3 PMT) 为 624V, 前向散射硅电二极管 (FSC) 为 E00, 每个样品所检测的细胞数为 2 万个. 检测到的数据在计算机上用软件 WinMDI 进行分析处理.

2 结果与讨论

2.1 铜对微囊藻的生长和叶绿素含量的影响

一定浓度的铜对微囊藻的生长和叶绿素含量会产生抑制作用, 且这种抑制作用随着浓度的上升而增加 (图 1). 在低浓度铜 (20, 30, 45 μ g \cdot l⁻¹) 的处理组中, 随着时间的延长, 96h 藻的光密度和叶绿素含量比 48h 均有明显的增加, 而当铜浓度增加到最高浓度 (101.25 μ g \cdot l⁻¹) 时, 藻的生长几乎被完全抑制, 48h 和 96h 的光密度与初始光密度相差无几, 而叶绿素含量随着时间的延长有显著的下降. 用图 1 中 96h 的光密度对铜浓度做折线图, 用直线内插法可得到 EC₅₀ 为 76.58 μ g \cdot l⁻¹, 从叶绿素变化图可以看出, 当铜浓度为 67.5 μ g \cdot l⁻¹时, 大约有 50% 的藻细胞受到抑制.

铜对藻类产生毒性是由于铜对藻细胞壁表面的含硫基团有很强的亲和力, 干扰藻类正常的新陈代谢和生化反应过程, 破坏叶绿体等胞内物质, 从而对藻类的生长产生抑制作用^[5], 而且这种抑制作用与很多因素有关, 如藻的种类、藻细胞的密度以及介质的组成和物理条件等^[6].

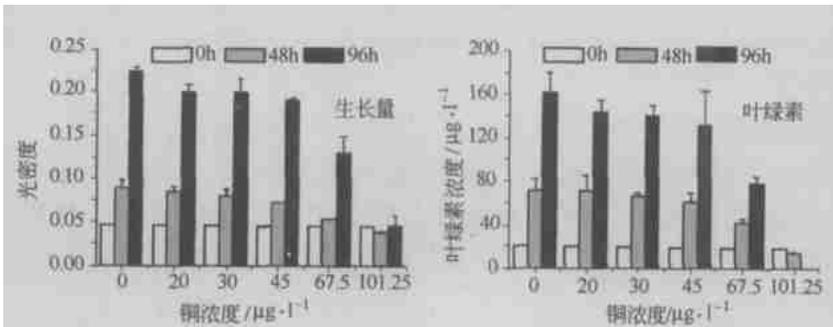


图 1 铜对微囊藻的生长及叶绿素含量的影响

Fig. 1 The effect of Cu on the growth of algae and the chlorophyll concentration in the algae

2.2 藻细胞叶绿素荧光的变化

图2显示了2万个藻细胞在不同处理组中的前向散射光(FSC)和叶绿素荧光(FL3)强度的分布情况,流式细胞仪的FSC的强度与细胞大小有关.图2中圈出的R1区域显示为荧光强度较高的正常藻细胞数量,左侧的亚群则为叶绿素荧光很弱的细胞或经分选后显微观察确认的细胞碎片.通过分析R1区域细胞数量及其与左侧亚群相对比例的变化情况,可以直接说明铜对藻细胞的作用结果.从图2中可以看出,R1区域的正常细胞随着铜浓度的增加不断转为左侧的细胞碎片,其正常细胞数量呈现不断减少的趋势.低浓度的铜($20, 30, 45\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)对R1区域的细胞数量没有明显的影响,细胞数量随时间的变化情况和对照组相似,也就是说,藻细胞的荧光强度和生理状态依然正常.在浓度为 $101.25\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 时,则表现出显著的抑制作用,96h时该区域的细胞数接近为0,说明该处理组中绝大部分藻类细胞的正常荧光都受到不同程度的影响,直至荧光强度完全消失.

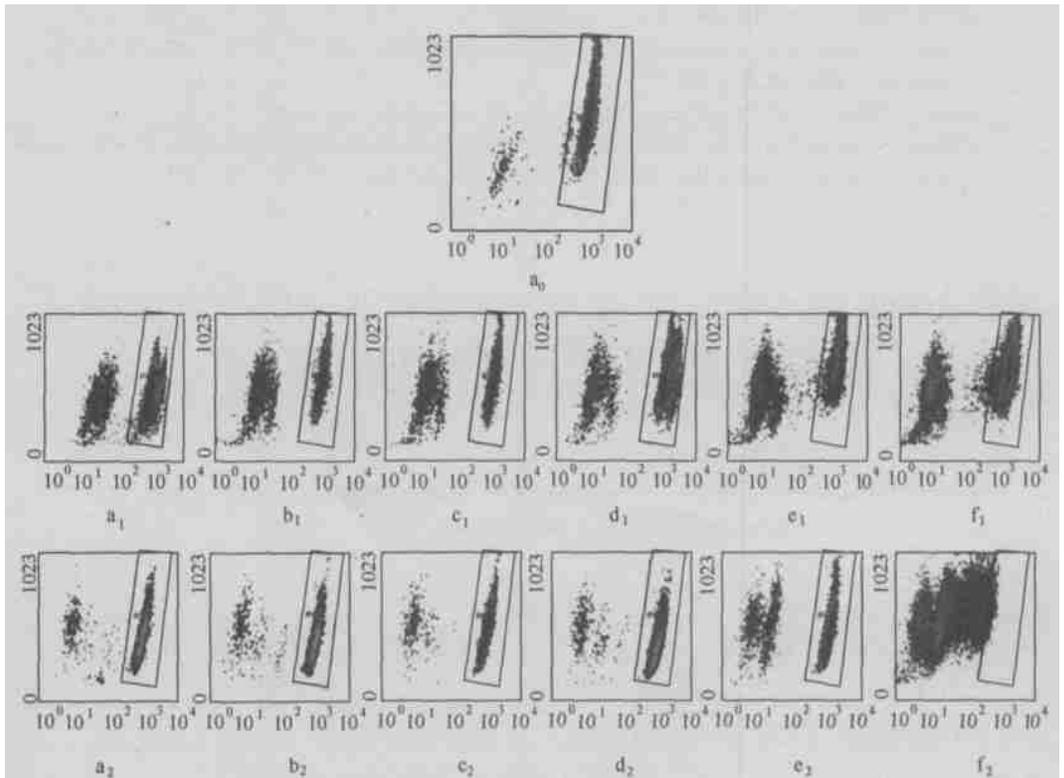


图2 藻细胞叶绿素荧光的变化

a, b, c, d, e, f 分别对应于铜浓度 0, 20, 30, 45, 67.5, $101.25\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 下标 0, 1, 2 分别对应于作用时间 0h, 48h, 96h. X 轴为 FL3 (叶绿素荧光), Y 轴为 FSC (细胞大小).

Fig. 2 The variety of chlorophyll a fluorescence in the algal cells

检测结果表明,随着铜浓度的升高,藻细胞生长受到的抑制作用愈强,从而藻液中处于分裂期的细胞的数目呈递减趋势,使得细胞的荧光值减小,或高浓度的铜使得藻细胞破裂也会出现细胞荧光值减小的现象,在图中就会表现出 R1 区域中细胞数目的减

少. 用 96h 的 R1 细胞数百分比对铜浓度做折线图, 用直线内插法可得到半数效应浓度为 $82.86\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. 比较常规方法和 FCM 方法的测定结果, 可以得到类似的结论, 即低浓度铜离子对藻类生长具有一定的促进作用, 而高浓度铜离子能对藻类的生长产生抑制作用, 且这种抑制作用会随着铜浓度的升高而增加. 进一步说明了 FCM 在毒理研究中的可行性. 由图 2 可以看出, 在铜的作用下并不是所有的藻细胞的荧光一起减小, 即铜并不是同时对所有的藻细胞产生同样的抑制作用, 而是有先后的. 大部分细胞都能抵抗住铜的抑制, 而随着铜浓度的升高, 受到抑制的细胞也越多, 当达到最高浓度时, 几乎所有细胞的生长都受到了抑制. 这样分析也许更加符合实际过程.

参 考 文 献

- [1] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华, 淡水微型浮游植物的 FCM 研究. 中国环境科学, 2002, 22(2): 101—104
 [2] Franqueira D, Orosa M, Torres E, Potential use of Flow Cytometry in Toxicity Studies with Microalgae. *The Science of Total Environment*, 2000, 247: 119—126
 [3] 陈宇炜, 高锡云, 太湖微囊藻的生长特征及其分离纯培养的初步研究. 湖泊科学, 1999, 11(4): 351—356
 [4] Yentsch C S, Menzel D W, A Method for the Determination of Phytoplankton Chlorophyll and Phaeophytin by Fluorescence. *Deep Sea Res.*, 1963, 10: 221—231
 [5] Kaplan D, Stadler T, *Algal Biotechnology* [M]. London: Elsevier Applied Science, 1988, p. 179
 [6] Stauber J L, Florence T M, Interactions of Copper and Manganese: a Mechanism by Which Manganese Alleviates Copper Toxicity to the Marine Diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) *Aquat. Toxicol.*, 1985, : 241—254

THE APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY IN THE ECOTOXICITY STUDIES OF COPPER WITH MICROALGAE

YU Yang^{1, 2} KONG Fan-xiang^{1, 2} QIAN Lei-lei² HAN Xiao-bo² YAN Rong²

(1 Nanjing Institut of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, 210008;

2 School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, 210093)

ABSTRACT

Copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* was studied using flow cytometry (FCM). Results of chlorophyll a fluorescence obtained by FCM showed that the growth of the microalgae was affected, and the growth was more effected if the concentration of copper became higher. EC₅₀ was $82.86\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, and the copper concentration of $101.25\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ almost inhibited the growth. The results obtained in the present study revealed that FCM can demonstrate the process in which the action of copper on the algal population.

Keywords: flow cytometry, copper, *Microcystis aeruginosa*, chlorophyll, autofluorescence.