

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017.07.2016110701

刘军晖, 麻冰涓, 毛宇翔, 等. 微藻对无机汞和甲基汞的吸附和吸收特性[J]. 环境化学, 2017, 36(7): 1602-1613.

LIU Junhui, MA Bingjuan, MAO Yuxiang, et al. Adsorption and absorption characteristics of inorganic mercury and methylmercury by microalgae [J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(7): 1602-1613.

微藻对无机汞和甲基汞的吸附和吸收特性*

刘军晖¹ 麻冰涓^{1**} 毛宇翔¹ 李 伟² 张 媛² 刘 军³

(1. 河南理工大学资源环境学院, 焦作, 454003; 2. 焦作市环境监测站, 焦作, 454003;
3. 焦作市环境信息中心, 焦作, 454003)

摘 要 本文选取蛋白核小球藻和斜生栅藻两种微藻作为研究对象, 将其接种于含有低浓度无机汞($0.1\text{—}2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和甲基汞($5.0\text{—}100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基中, 考察两种藻的耐受性及微藻对无机汞及甲基汞的吸附和吸收特性. 结果表明, 在实验浓度范围内, $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机汞和 $5.0\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基汞即可抑制蛋白核小球藻和斜生栅藻的生长, 抑制作用随汞浓度的升高而增强. 超过 60%的无机汞和 70%的甲基汞在 24 h 内通过吸附和吸收快速转移到了微藻, 只有少量汞化合物残留于培养基中, 168 h 后, 两种藻对无机汞和甲基汞的最高去除率分别为 99.75%和 99.82%. 单个微藻细胞对于无机汞和甲基汞的吸附和吸收均在 24 h 达到最大值, 随培养时间的延长, 细胞增殖产生的稀释效应导致单细胞吸附量和吸收量逐渐降低. 实验中观察到了无机汞和甲基汞在微藻细胞表面吸附及内部吸收的转换.

关键词 微藻, 无机汞, 甲基汞, 吸附, 吸收.

Adsorption and absorption characteristics of inorganic mercury and methylmercury by microalgae

LIU Junhui¹ MA Bingjuan^{1**} MAO Yuxiang¹ LI Wei² ZHANG Yuan² LIU Jun³

(1. School of Resource and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo, 454003, China;

2. Jiaozuo Environmental Monitoring Station, Jiaozuo, 454003, China; 3. Jiaozuo Environmental Information Center, Jiaozuo, 454003, China)

Abstract: In this study, two species of microalgae, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*, were inoculated in culture media containing low concentrations of inorganic mercury (Hg^{2+}) ($0.1\text{—}2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and methylmercury (MeHg) ($5.0\text{—}100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) to investigate the inhibition effects and adsorption/absorption characteristics of Hg^{2+} and MeHg. The results showed that $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} and $5.0\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ MeHg inhibited the growth of microalgae, and the inhibitory effect was enhanced with the increase of Hg concentrations. Transport of Hg^{2+} and MeHg from the culture media to microalgae was a relatively fast process, with more than 60% Hg^{2+} and 70% MeHg being transported to microalgae within 24 hours, while only a small amount of mercury compounds remained in the medium. After 168 h, the highest removal rates of Hg^{2+} and MeHg by microalgae were 99.75% and 99.82%, respectively. The amounts of adsorption and absorption of both Hg species by single microalgae cells reached the maxima at the 24 h time point, and then dropped because of the growth

2016 年 11 月 7 日收稿 (Received: November 7, 2016).

* 国家自然科学基金 (21377035, 21177035) 和河南省高校科技创新人才支持计划 (15HASTIT045) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21377035, 21177035) and the Program for Science & Technology Innovation Talents in Universities of Henan Province (15HASTIT045).

** 通讯联系人, E-mail: mbj@hpu.edu.cn

Corresponding author, E-mail: mbj@hpu.edu.cn

dilution effect resulted from the cell proliferation of microalgae. Conversion of Hg between adsorption and absorption forms was indicated by the opposite trends observed in the adsorption/absorption curves.

Keywords: microalgae, inorganic mercury, methylmercury, adsorption, absorption.

自“水俣病”事件发生以来,人类逐渐认识到,汞可以通过参与水体的生物化学循环,影响水生态环境和人类健康.环境中的汞主要以元素汞(金属汞 Hg^0)、无机汞(汞盐 Hg^+ 、 Hg^{2+})和有机汞等 3 种形式存在^[1].在微生物的作用下,水体中的无机汞可被转化为毒性更强的甲基汞^[2].甲基汞是一种脂溶性的有机汞化合物,具有极高的毒性,并可在食物链中富集和放大^[3],从水体到鱼体的富集系数高达 10^6 ^[4].藻类是水环境中最重要的初级生产者^[5-6],是汞进入食物链,经过生物逐级放大,最终威胁动物及人类健康的主要渠道^[7-8],藻类在汞富集过程中占据关键性位置,富集系数从几百到几万不等^[7,9-11].藻类虽然不能直接利用汞,但是却能吸取和富集水中的汞,从而对藻类本身的生理活动产生影响^[12].已有大量研究表明,利用微藻净化污水安全可行,具有十分广阔的应用前景^[13-15].

针对微藻与汞化合物的相互作用,国内外专家学者进行了一系列实验研究. Diéguez 等认为,微藻细胞对无机汞的摄入机制主要为被动吸附,其次为主动运输, Hg^{2+} 可以在藻细胞内部转化为 MeHg ^[16]. Le Faucheur 等也认为,微藻对 Hg 的吸收机制包括主动运输和被动扩散^[17].邓贵福发现, HgCl_2 浓度为 $20\text{--}120\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,三角褐指藻对汞有较强的耐受能力和富集能力, Hg 可以同时藻细胞的表面和内部富集,三角褐指藻还可以将无机汞转化为甲基汞并释放到细胞外部,从而影响汞的生物化学循环^[9].石磊研究了 $0.05\text{--}0.75\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HgCl_2 对小球藻的毒性效应,发现汞对小球藻的生长具有抑制作用,可以使细胞的形态发生明显改变^[18].陈必链等研究了 HgCl_2 浓度为 $0.005\text{--}0.04\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时钝顶螺旋藻对汞的富集作用,发现 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时藻生长受到抑制, $80\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 藻中毒死亡^[19].这些研究工作中的汞浓度处于 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{--mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平,远高于天然水体中的汞浓度 ($1.0\text{--}10\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11,20]),另外,国内外对于藻类和甲基汞的相互作用研究较少,对于微藻吸附和吸收甲基汞的特性尚不清楚.

由于蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* 和斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 对毒物较为敏感,是理想的环境污染物毒性测试材料^[21-23],同时具有易于培养,油脂含量高,对含汞废水有较高的耐受性等特点,在治理环境方面有着十分广阔的应用前景^[14,24-31].鉴于此,本文以蛋白核小球藻和斜生栅藻为实验材料,研究低浓度无机汞和甲基汞胁迫下藻类的生长情况,以及藻细胞对二者的吸附和吸收特性,研究结果有助于加深藻类对于无机汞和甲基汞生物富集机理的认识和理解.

1 材料和方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

主要仪器:总汞及甲基汞测试系统(美国 Brooks Rand)、恒温培养箱、单人超净工作台、数显恒温水浴锅、低速自动平衡离心机(L420,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、数显调速多用振荡器(HY—2A,上海维诚仪器有限公司).

主要试剂:氯化甲基汞标准溶液、 Hg^{2+} 标准溶液、电子级盐酸和硝酸、优级纯硫酸、氯化亚锡、盐酸羟胺、氢氧化钾、甲醇、二氯甲烷、氯化溴、分析纯硫酸铜、柠檬酸钠、柠檬酸和半胱氨酸等.

1.2 材料和实验方法

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库,并经室内扩大培养用于实验.藻种采用 BG11 培养基置于 250 mL 锥形瓶中培养,培养基体积 150 mL,调节 pH 值为 7.1,接种量为 10%,培养条件为:25 ℃,2400 lux 光照,光暗比 12 h:12 h.

将配好的培养基装入锥形瓶,分批次放入高压锅内进行高温高压灭菌 30 min.冷却后,将锥形瓶放入单人超净工作台紫外灭菌 30 min.取一定体积且处于对数生长期的新鲜藻液转接,加入一定量的汞标准溶液,同时以不添加汞标液的培养基和不添加藻类的培养基作为对照,在光照培养箱中培养 7 d,每隔 24 h 取样.无机汞浓度梯度设置为 0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,甲基汞浓度梯度设置为 5.0、10、20、50、100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

汞含量分析分为上清液、细胞表面和细胞内部的汞含量分析.

1.3 分析方法

1.3.1 细胞密度的测定

采用血球计数板计数法^[32].

1.3.2 无机汞的测定

上清液中无机汞的测定:取藻液,用 0.45 μm PVDF 滤膜(经 1% HCl 清洗)抽滤,取定量上清液于 50 mL 离心管中,参照文献中水中总汞的测定方法^[33]进行测定,该方法的检出限为 0.5 ng·L⁻¹.

藻细胞表面吸附的无机汞和细胞内部吸收的无机汞按照文献^[34]半胱氨酸清洗的方法区分:取上述滤膜,用含有 0.8 mmol·L⁻¹半胱氨酸的培养基 150 mL 冲洗滤膜 5 min,冲洗液中的无机汞视为细胞表面吸附的汞,参照上清液中无机汞方法测定.残留于滤膜上的汞视为细胞内部吸收的汞,将滤膜剪碎后置于 50 mL 离心管中,采用硫酸/硝酸消解方法进行测定^[35].

1.3.3 甲基汞的测定

上清液中甲基汞的测定:藻液经用 0.45 μm 的 PVDF 滤膜过滤后,取定量经酸化的上清液转移到特氟龙试管中,按照蒸馏—乙基化衍生-GC-CVAFS 法测定^[36].

藻细胞表面吸附的甲基汞的测定:取上述滤膜,用含有 0.8 mmol·L⁻¹半胱氨酸^[34]的培养基冲洗滤膜 5 min,取定量该淋洗液置于 50 mL 离心管中,采用 KBr/CuSO₄/CH₂Cl₂体系萃取/反萃取-乙基化衍生-气相色谱-原子荧光法测定^[37].

藻细胞内部吸收的甲基汞的测定:取上述滤膜,剪碎后置于 50 mL 离心管中,采用 KOH/CH₃OH 消解-乙基化衍生-气相色谱-原子荧光法测定^[35].

1.4 实验室质量控制

实验室质量控制包括空白实验、平行样分析及加标样分析等手段,以保证实验数据的精密度和准确度.样品测定时,每个样品均设定 3 个平行样,每批次样品均设定 3 个空白样品和 20%的加标回收样品.实验所得,平行样品测定结果的相对标准偏差均小于 20%,加标回收率介于 80%—95%之间.实验采用标准参考物质——河口沉积物(ERM—CC580)作为质量控制措施之一,其总汞和甲基汞的标定值分别为 132±3 mg·kg⁻¹和 75.5±4 μg·kg⁻¹,其总汞、甲基汞标定值与实测值的偏差均小于 20%.所有数据均以 3 个平行组数据的平均值±标准差(Means±SD)来表示,利用 Origin8.5 统计软件对实验结果作图和分析.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 汞对藻细胞生长曲线的影响

在无机汞胁迫下藻细胞的生长曲线如图 1 所示,不同浓度无机汞胁迫下,蛋白核小球藻与斜生栅藻细胞密度均低于对照组,表明藻类的生长受到抑制,随着无机汞浓度的增加,抑制作用增强.

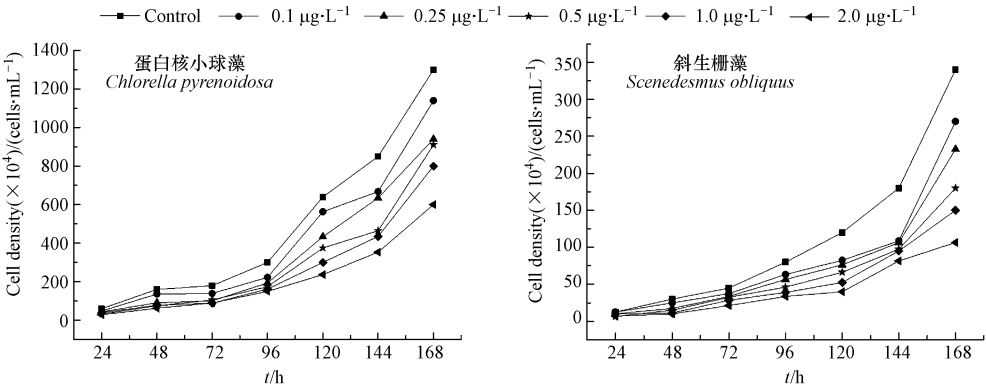


图 1 不同浓度无机汞胁迫下蛋白核小球藻和斜生栅藻的生长曲线

Fig.1 Growth curves of Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus obliquus under different concentrations of HgCl₂ stress

与对照组相比,168 h 后蛋白核小球藻的细胞密度下降了 12.3%—53.9%,斜生栅藻的细胞密度下降了 20.6%—68.7%。蛋白核小球藻和斜生栅藻的初始接种密度分别为 $110\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $60\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$, 后者的初始接种密度偏小,可能是造成二者抑制程度轻微区别的原因。陈必链等报道的无机汞对钝顶螺旋藻的抑制生长浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,致死浓度为 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [19];梁英等发现 Hg^{2+} 对小球藻的 96 h LC_{50} 为 $5.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [38],而本实验中无机汞浓度为 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即表现出了对两种微藻显著的抑制作用(50%左右)。

在甲基汞的胁迫下藻细胞的生长曲线如图 2 所示。由图 2 可见,不同浓度甲基汞胁迫下,蛋白核小球藻与斜生栅藻细胞密度均低于对照组的细胞密度,藻类的生长受到抑制,随着甲基汞浓度的增加,抑制作用增强。与对照组相比,168 h 后蛋白核小球藻的细胞密度下降了 14.2%—83.2%,斜生栅藻的细胞密度下降了 18.2%—63.6%。蛋白核小球藻的初始接种密度($100\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) 低于斜生栅藻($300\times 10^4\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$),造成其受甲基汞的抑制程度较高。有资料表明, $100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基汞即可降低柔弱菱形藻的光合作用,对藻类的生长产生抑制作用[39],与本研究的结果吻合。

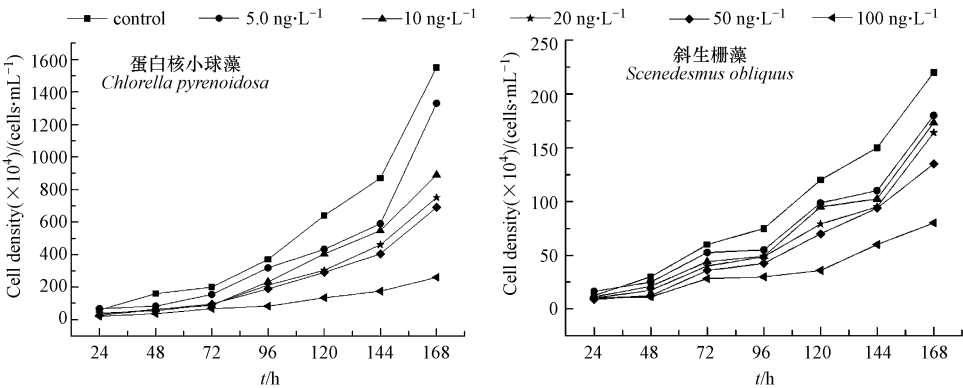


图 2 不同浓度甲基汞胁迫下蛋白核小球藻和斜生栅藻的生长曲线

Fig.2 Growth curves of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* under different concentrations of MeHg stress

2.2 培养基中残留的汞

2.2.1 培养基中残留的无机汞

蛋白核小球藻及斜生栅藻培养基中残留的无机汞含量变化趋势如图 3 所示。24 h 后,蛋白核小球藻培养基中残留的无机汞浓度为 $0.001\text{—}0.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,残留汞质量相当于初始汞质量的 1.4%—40.3%,斜生栅藻培养基中残留的无机汞浓度为 $0.002\text{—}0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,汞质量为初始汞质量的 0.5%—11.7%,之后培养基中无机汞质量基本达到平衡。168 h 后蛋白核小球藻和斜生栅藻培养基中无机汞浓度分别降低至 $0.066\text{—}0.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.001\text{—}0.005\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,相当于初始汞质量的 6.1%—65.6%和 0.3%—5.0%,对无机汞的去除率最高可达 99.7%。两种藻对无机汞均有一定的吸附/吸收效果,斜生栅藻的效果较好,可能与藻细胞内部结构、表面基团等有关。

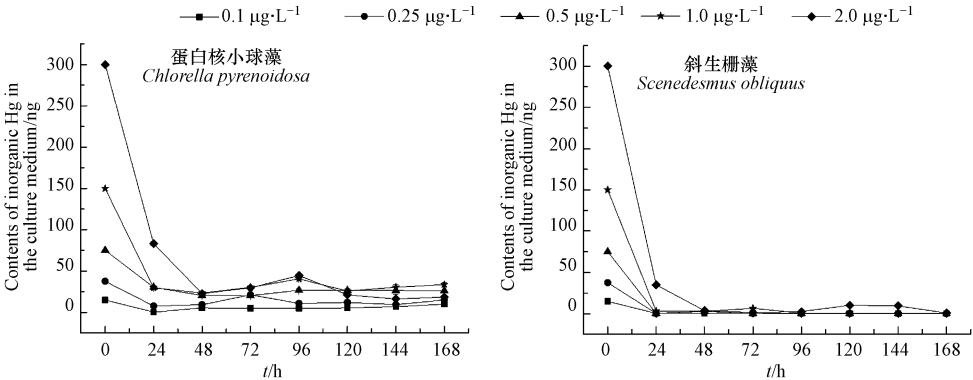


图 3 培养基中无机汞的含量变化图

Fig.3 Contents of inorganic Hg in the culture medium

2.2.2 培养基中残留的甲基汞

蛋白核小球藻及斜生栅藻培养基中残留的甲基汞含量变化趋势如图 4 所示,与无机汞的趋势类似,随着时间的推移,培养基中甲基汞的量逐渐减少,24 h 后蛋白核小球藻培养基中残留的甲基汞浓度为 0.2—5.6 ng·L⁻¹,残留汞质量相当于初始汞质量的 2.2%—6.0%,斜生栅藻培养基中残留的甲基汞浓度为 0.3—31.5 ng·L⁻¹,汞质量为初始汞质量的 3.3%—31.5%,之后培养基中甲基汞质量基本达到平衡.168 h 后蛋白核小球藻和斜生栅藻培养基中甲基汞浓度分别降低至 0.009—0.6 ng·L⁻¹ 和 0.02—0.8 ng·L⁻¹,残留的甲基汞质量均低于 1%,对甲基汞的去除率高达 99.8%说明两种藻类对水中的甲基汞均有较好的吸附/吸收效果.

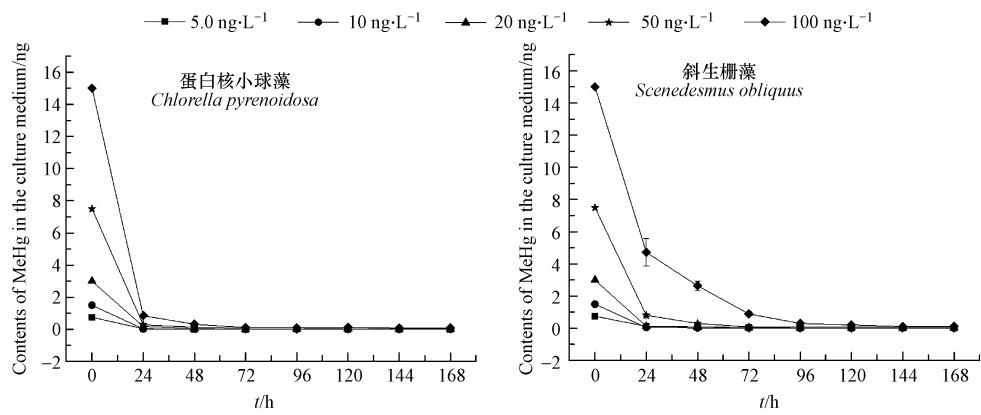


图 4 培养基中甲基汞的含量变化图
Fig.4 Contents of MeHg in the culture medium

2.3 微藻对汞的吸附

2.3.1 微藻对无机汞的吸附

Zhong 等的研究表明,半胱氨酸与汞有强烈的结合力,因此可以通过含有半胱氨酸的培养基洗脱吸附在细胞壁上的汞,当用含 0.8 mmol·L⁻¹半胱氨酸的培养基冲洗藻细胞时,5 min 就可以洗脱掉细胞表面吸附的 90%以上的汞^[34];Fujita 等的研究表明,经过半胱氨酸溶液洗涤后,吸附在藻细胞膜上的汞可以被洗脱,进入洗脱液中^[40].因此,本研究中存在半胱氨酸洗脱液中的汞可被视为吸附在藻细胞表面的汞.

图 5(a,b)表示藻细胞表面吸附无机汞的总量.可以看出,无机汞浓度为 0.1—1.0 μg·L⁻¹时,蛋白核小球藻细胞表面吸附的总量随时间波动幅度不大(0.5 μg·L⁻¹ 144 h、2.0 μg·L⁻¹ 96 h 为异常点),随着无机汞浓度的升高,总吸附量增大,在第 168 小时,吸附的无机汞量达到了初始汞质量的 18.8%—34.8%;无机汞浓度为 2.0 μg·L⁻¹时总吸附量在第 96 h 降低,与下文吸收实验对照,判断可能是发生了无机汞由细胞表面向细胞内部的转移.无机汞浓度为 0.1—1.0 μg·L⁻¹时,斜生栅藻细胞表面总吸附量在前 72 h 波动较明显,整体呈现先上升后下降的趋势,后 96 h 的趋势较为平缓,在第 168 小时,吸附的无机汞量达到了初始汞质量的 11.3%—28.6%;2.0 μg·L⁻¹ 浓度组随时间有明显的下降(第 96 小时)和回升(第 120 小时)趋势,可能发生了细胞内外无机汞的交换,蛋白核小球藻和斜生栅藻的总吸附量最大值(第 120 小时)分别为 82.6 ng 和 50.7 ng,分别达到了初始汞质量的 27.5%和 16.9%.

图 5(c,d)表示单个藻细胞表面吸附的无机汞质量变化趋势.从图 5 可以看出,第 24 小时蛋白核小球藻和斜生栅藻的单个细胞表面吸附的无机汞量均达到最大值,说明前 24 h 是快速吸附阶段,随着时间的延长,无机汞吸附量逐渐降低,可能是细胞增殖引起生长稀释的结果.无机汞浓度越高,单个细胞吸附量越多,两种藻单个细胞表面吸附无机汞量最大值分别为 1.7×10⁻⁶ ng·cell⁻¹ 和 4.0×10⁻⁶ ng·cell⁻¹ (2.0 μg·L⁻¹,第 24 小时).

2.3.2 微藻对甲基汞的吸附

图 6(a,b)表示藻细胞表面吸附甲基汞的总量.与无机汞的总吸附量变化趋势类似,随着甲基汞浓度的升高,细胞表面吸附的甲基汞逐渐增多.低浓度时,趋势较为平缓,基本达到吸附平衡状态,高浓度时,甲基汞量波动较大.

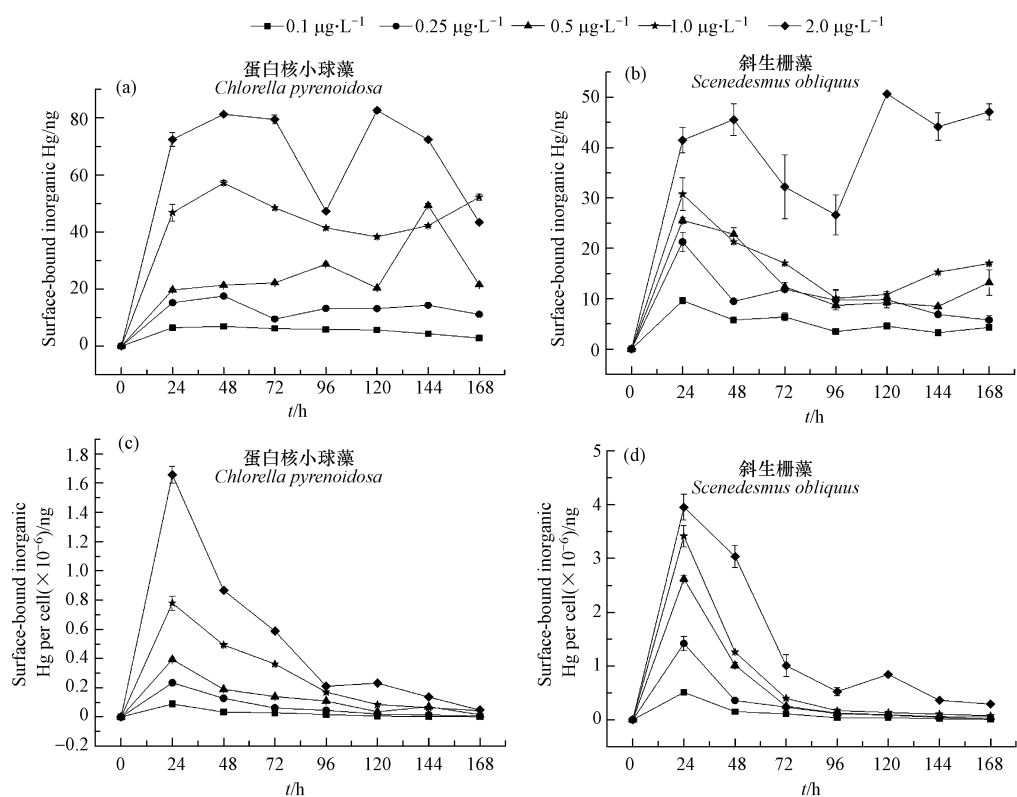


图5 蛋白核小球藻细胞(a)、斜生栅藻细胞(b)、单个蛋白核小球藻细胞(c)及单个斜生栅藻细胞(d)的表面无机汞的含量变化图

Fig.5 Contents of inorganic Hg on the surface of *Chlorella pyrenoidosa* (a), *Scenedesmus obliquus* (b), *Chlorella pyrenoidosa* per cell (c), and *Scenedesmus obliquus* per cell (d)

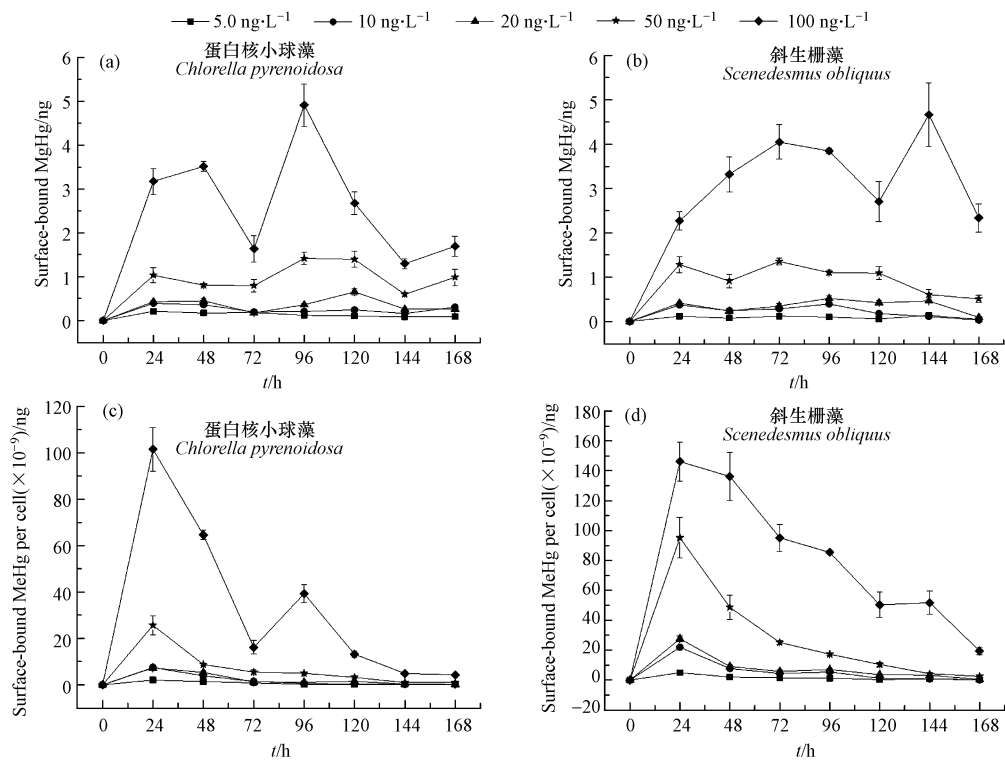


图6 蛋白核小球藻细胞(a)、斜生栅藻细胞(b)、单个蛋白核小球藻细胞(c)及单个斜生栅藻细胞(d)的表面甲基汞的含量变化图

Fig.6 Contents of MeHg on the surface of *Chlorella pyrenoidosa* (a), *Scenedesmus obliquus* (b), *Chlorella pyrenoidosa* per cell (c), and *Scenedesmus obliquus* per cell (d)

就蛋白核小球藻而言,低浓度(5—20 ng·L⁻¹)时,甲基汞的总吸附量变化较小;50 ng·L⁻¹时,总吸附量出现较小的波动,但整体趋势仍较为平缓,在第 168 小时,吸附的甲基汞量达到了初始汞质量的 8.7%—20.5%;高浓度(100 ng·L⁻¹)时,随时间变化较大,第 72 小时总吸附量下降至最小值 1.6 ng,占初始汞质量的 10.9%,第 96 小时回升至最高 4.9 ng,所占比例为 32.8%.斜生栅藻在甲基汞浓度为 5—20 ng·L⁻¹时,总吸附量趋势基本稳定;50 ng·L⁻¹时,表面吸附的甲基汞质量有较小的波动,在第 168 小时,吸附的量达到了初始汞质量的 2.3%—6.6%;高浓度(100 ng·L⁻¹)时,波动较为明显,第 120 小时下降至 2.7 ng,占初始汞质量的 18.0%,第 144 小时回升至最大值 4.7 ng,所占比例为 31.1%.

图 6(c、d)表示了单个藻细胞表面吸附的甲基汞质量的变化趋势.第 24 小时,吸附的甲基汞量均达到最大值,随着时间的推移,表面吸附的甲基汞质量逐渐减少.甲基汞浓度越高,单个细胞吸附量也越多.低浓度组(5.0—50 ng·L⁻¹),单个细胞吸附量下降趋势较为平缓,高浓度组(100 ng·L⁻¹)下降速度较快.同时可以看出,斜生栅藻的单个细胞表面吸附量大于蛋白核小球藻,可能是因为斜生栅藻的初始接种密度小,细胞数少,单个细胞分担的甲基汞量相对较多.与无机汞相似,高浓度组总吸附量出现较大的波动,也可能是甲基汞在细胞表面吸附和细胞内部吸收之间转换的结果.

2.4 微藻对汞的吸收

2.4.1 微藻对无机汞的吸收

图 7(a、b)表示藻细胞内部吸收的无机汞的总量.可以看出,总吸收量在 24 h 内迅速增加,随后趋势转为平缓,随着无机汞浓度的增大总吸收量升高.对于 0.1—1.0 μg·L⁻¹浓度组,在第 168 小时,吸收的无机汞量达到了初始汞质量的 11.3%—27.9%;浓度为 2.0 μg·L⁻¹时,第 96 小时胞内吸收的无机汞总量达到最大值(172.1 ng,占初始汞质量的 57.4%),与图 5(a)中第 96 小时蛋白核小球藻细胞总吸附量呈现明显的相反走向,可能是因为无机汞由细胞表面转运到细胞内部的结果.对于 0.1—1.0 μg·L⁻¹浓度组,斜生栅藻胞内总吸收量从第 24 小时开始进入基本稳定阶段,在第 168 小时,吸收的无机汞量达到了初始汞质量的 49.2%—66.1%;浓度为 2.0 μg·L⁻¹时,第 72 小时总吸收量最大,为 168.3 ng,占初始汞质量的 56.1%.

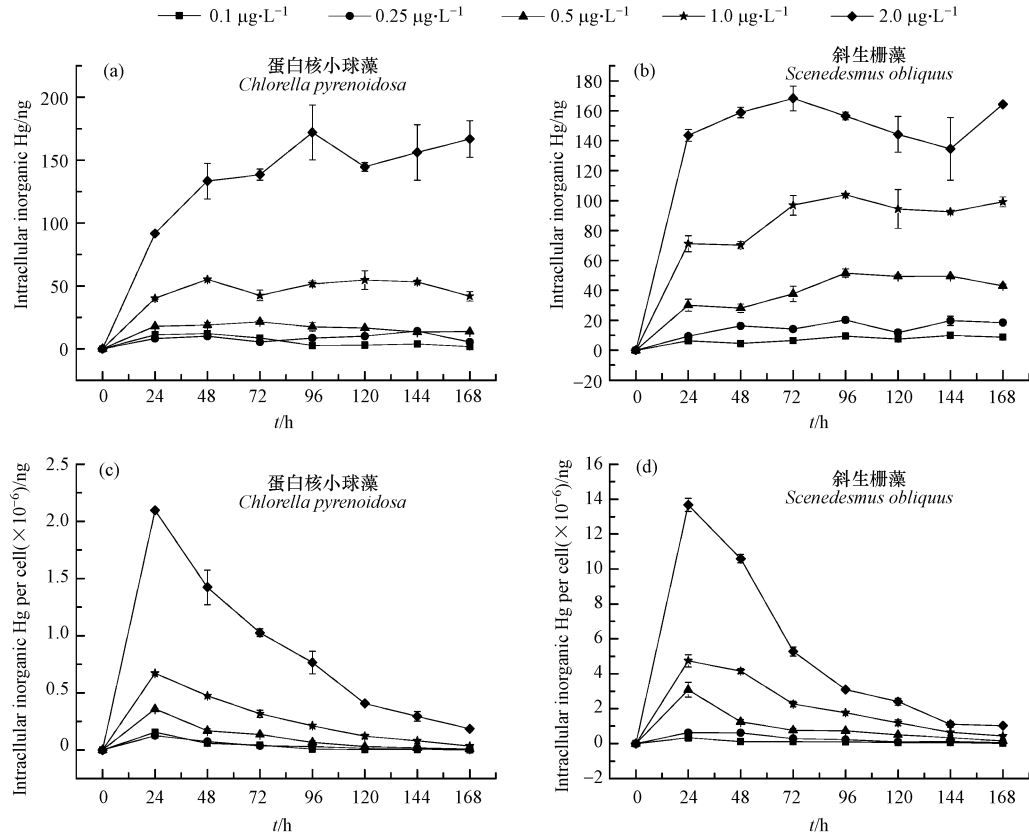


图 7 蛋白核小球藻细胞(a)、斜生栅藻细胞(b)、单个蛋白核小球藻细胞(c)及单个斜生栅藻细胞(d)的内部无机汞的含量变化图

Fig.7 Contents of intracellular inorganic Hg of *Chlorella pyrenoidosa* (a), *Scenedesmus obliquus* (b), *Chlorella pyrenoidosa* per cell (c), and *Scenedesmus obliquus* per cell (d)

图 7(c,d)表示单个藻细胞内部吸收的无机汞的量.与单个细胞吸附无机汞的质量变化趋势类似,随汞浓度增大,单个细胞吸收量增大;单个细胞吸收量在第 24 小时升至最大,随后降低,最大值分别为 $2.1\times 10^{-6}\text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$ (蛋白核小球藻)和 $13.7\times 10^{-6}\text{ ng}\cdot\text{cell}^{-1}$ (斜生栅藻).

2.4.2 微藻对甲基汞的吸收

图 8(a,b)表示藻细胞内部吸收的甲基汞的总量.低浓度($5.0\text{--}50\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)时,蛋白核小球藻和斜生栅藻胞内吸收的甲基汞量在前 24 h 增加迅速,随后逐渐趋于稳定,在第 168 小时,两种藻吸收的甲基汞总量分别达到了初始汞质量的 18.5%—38.2%和 39.3%—105.4%;高浓度($100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)时,第 96 小时两种藻胞内的总吸收量都有明显的下降,之后再回升,与吸附趋势相结合,判断可能发生了甲基汞在胞外吸附和胞内吸收之间的转换.高浓度($100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)时,第 72 小时两种藻的吸收量均达到最大值,分别为 7.7 ng 和 15.9 ng,达到了初始汞质量的 51.4%和 105.9%.

图 8(c,d)表示单个藻细胞内部吸收的甲基汞的量.随着甲基汞浓度增加,单个细胞内部吸收的甲基汞量增加;第 24 小时达到最大吸收值,随着时间的推移,单个细胞内部吸收量逐渐降低,这可能是细胞增殖引起生长稀释作用的结果.

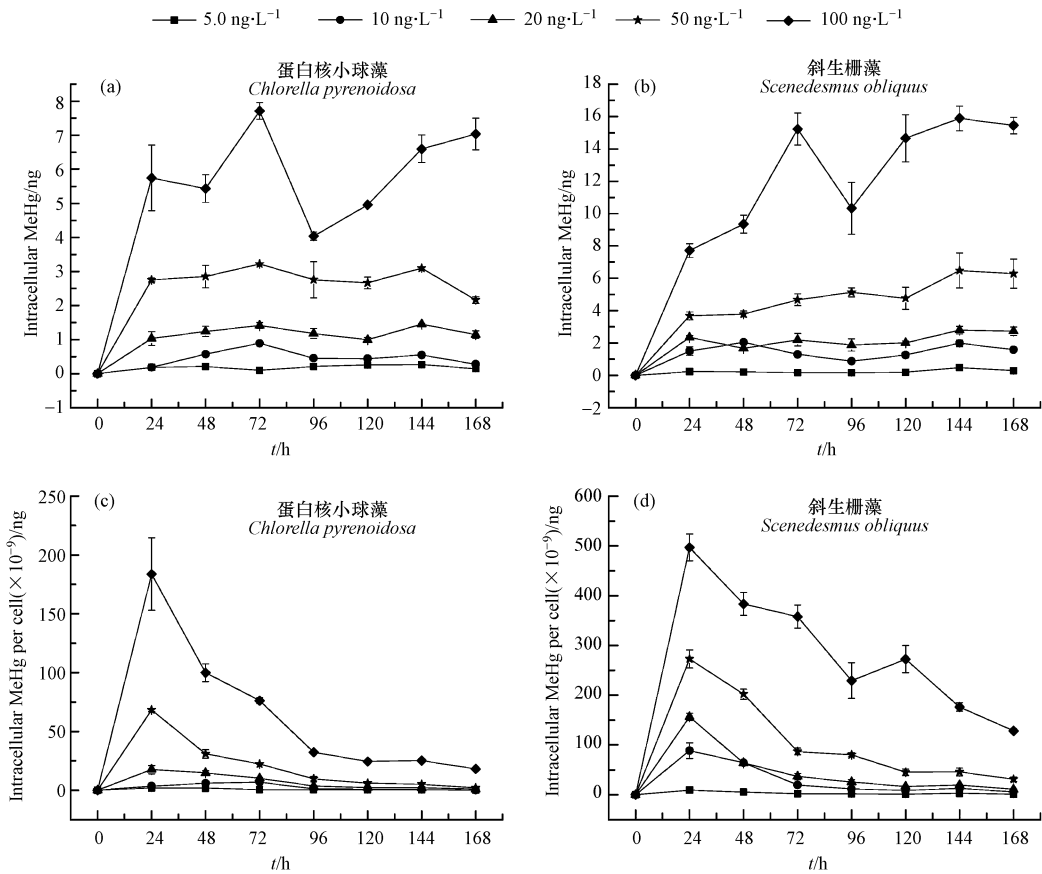


图 8 蛋白核小球藻细胞(a)、斜生栅藻细胞(b)、单个蛋白核小球藻细胞(c)及单个斜生栅藻细胞(d)的内部甲基汞的含量变化图

Fig.8 Contents of intracellular MeHg of *Chlorella pyrenoidosa* (a), *Scenedesmus obliquus* (b), *Chlorella pyrenoidosa* per cell (c), and *Scenedesmus obliquus* per cell (d)

2.5 微藻对汞吸附和吸收的比较

表 1、2 分别列出了不同时间段(24 h 和 168 h),微藻对无机汞和甲基汞的吸附量、吸收量占初始汞质量的比例.对于无机汞而言,在短期内(24 h),蛋白核小球藻对 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的无机汞表现为吸收大于吸附, $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组吸附大于吸收,其余各组吸附和吸收基本相当;长期来看(168 h),在无机汞浓度较低时,吸附占主导地位,当无机汞浓度升高至 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时则表现为吸收大于吸附.短期内(24 h)斜生栅藻对低浓度无机汞($0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的吸附大于吸收,对于高浓度组则表现为

吸收大于吸附;长期来看(168 h),斜生栅藻对于无机汞的吸收远远大于吸附.对于甲基汞而言,蛋白核小球藻在短期内(24 h)对低浓度组甲基汞($5.0\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)表现为吸附大于吸收,随甲基汞浓度升高,吸收作用占据主导地位;长期来看(168 h),蛋白核小球藻对甲基汞均以吸收为主($10\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 除外).无论暴露时间长短,斜生栅藻对于甲基汞的吸收作用均远高于吸附作用.

表 1 微藻对无机汞的吸附及吸收比例

Table 1 Adsorption and absorption rate of inorganic Hg by microalgae					
时间 Time/h	无机汞浓度 Concentration of inorganic Hg/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白核小球藻 <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		斜生栅藻 <i>Scenedesmus obliquus</i>	
		吸附率 Absorption/%	吸收率 Absorption/%	吸附率 Absorption/%	吸收率 Absorption/%
24	0.1	43.2	74.6	64.0	42.4
	0.25	40.6	21.6	56.7	25.1
	0.5	26.3	23.9	34.1	40.2
	1.0	31.2	26.8	20.5	47.5
	2.0	24.2	30.6	13.8	47.9
168	0.1	18.8	11.3	28.6	59.3
	0.25	29.7	14.1	15.3	49.2
	0.5	28.7	18.1	17.6	57.5
	1.0	34.8	27.9	11.3	66.1
	2.0	14.5	55.6	15.7	54.7

表 2 微藻对甲基汞的吸附及吸收比例

Table 2 Adsorption and absorption rate of MeHg by microalgae					
时间 Time/h	甲基汞浓度 Concentration of MeHg/ ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白核小球藻 <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		斜生栅藻 <i>Scenedesmus obliquus</i>	
		吸附率 Absorption/%	吸收率 Absorption/%	吸附率 Absorption/%	吸收率 Absorption/%
24	5.0	28.2	24.7	16.3	31.0
	10	26.2	12.4	24.7	99.9
	20	14.3	34.4	13.8	78.3
	50	13.8	36.7	17.1	49.1
	100	21.2	38.3	15.1	51.4
168	5.0	12.3	19.5	6.5	39.3
	10	20.5	18.5	2.3	105.4
	20	8.7	38.2	2.7	91.1
	50	13.1	28.8	6.6	83.8
	100	11.3	46.9	15.6	103.0

研究表明,重金属向藻细胞的迁移包括胞外的快速吸附和胞内的缓慢富集^[1,16-17,41-43],短期内藻类对汞的去除可能主要是依靠细胞表面的被动吸附作用^[16],这种作用是由藻细胞与汞离子之间的电荷引力造成的^[12].吸附到细胞表面的汞,通过主动吸收等作用,与细胞壁上的某些酶结合,运输到细胞内部,主要表现为传输与沉积^[1,42],该过程是一个复杂的物化和生化过程,需要消耗能量,速度相对较慢,受许多因素的综合影响.然而也有研究表明,汞化合物如 HgCl_2 等可以在细胞膜上快速扩散,引起细胞对汞快速有效的吸收^[8].微藻对于水中无机汞和甲基汞的快速吸附和吸收作用在本实验中均有所表现.

汞是种有毒重金属,对藻细胞会产生毒害作用,细胞为了自身的生长会产生一种解毒机制,即与汞合成结合蛋白或多肽,如植物螯合素(PCs)、谷胱甘肽(GSH)和金属硫蛋白(MTs)等,从而把一部分的汞排到细胞外,减少胞内汞离子的含量^[1,16].有研究表明,三角褐指藻可以将甲基汞排出体外,使得细胞内部的甲基汞含量不断减少,减弱对细胞的生物毒性^[9];人们还发现藻细胞对金属的富集系数(BCF)随着藻类暴露时间的增加而减少,这主要是由于藻类细胞可将细胞内金属离子通过代谢排出体外^[9].这些研究与本实验观察到的无机汞和甲基汞在某些时间点发生胞外吸附和胞内吸收之间的转换现象是吻合的.

3 结论 (Conclusion)

(1) 在实验条件下,无机汞和甲基汞均对藻类的生长产生抑制作用,随无机汞和甲基汞浓度的升高,抑制作用增强.甲基汞对于微藻的毒性远远高于无机汞.

(2) 两种藻均对培养基中的无机汞和甲基汞有较好的吸附和吸收效果,表明利用微藻吸附/吸收废水中的汞切实可行.

(3) 在实验周期内,两种藻对汞的吸附及吸收趋势均呈现先快速增加(24 h),而后渐缓的变化趋势.单个藻细胞对汞的吸附量及吸收量均在第24小时达到最大值,为快速吸附/吸收阶段,随着时间的推移,逐渐降低.微藻自身性质、汞化合物形态、暴露浓度和暴露时间均会影响微藻对无机汞和甲基汞的吸附/吸收特性.

参考文献 (References)

- [1] 秦捷,赵文,张鹏. 环境汞污染对藻类的毒性效应及其影响因素[J]. 生物学杂志,2011,28(3):74-76.
QIN J,ZHAO W,ZHANG P, et al. The environment mercury pollution toxicity effect to the alga and their influencing factors[J]. Journal of Biology,2011,28(3):74-76 (in Chinese).
- [2] WEBER J H. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment[J]. Chemosphere,1993,26(11):2063-2077.
- [3] CAMPBELL L M,NORSTROM R J,HOBSON K A, et al. Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya,Baffin Bay) [J]. Science of the Total Environment,2005,351-352:247-263.
- [4] TSUI M T K,WANG W. Uptake and elimination routes of inorganic mercury and methylmercury in daphnia magna[J]. Environmental Science & Technology,2004,38(3):808-816.
- [5] PICKHARDT P C,FISHER N S. Accumulation of inorganic and methylmercury by freshwater phytoplankton in two contrasting water bodies [J]. Environmental Science & Technology,2007,41(1):125-131.
- [6] MILES C J,MOYE H A,PHILIPS E J, et al. Partitioning of monomethylmercury between freshwater algae and water[J]. Environmental Science & Technology,2001,35(21):4277-4282.
- [7] HAMMERSCHMIDT C R,FINIGUERRA M B,WELLER R L, et al. Methylmercury accumulation in plankton on the continental margin of the northwest atlantic ocean[J]. Environmental Science & Technology,2013,47(8):3671-3677.
- [8] MOREL F O M M,KRAEPIEL A M L,AMYOT M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury[J]. Annual Review of Ecology and Systematics,1998,29:543-566.
- [9] 邓贵福. 三角褐指藻对汞的富集和转化机制[D]. 厦门:厦门大学,2011.
DENG G F. Bioaccumulation and transformation mechanism of mercury by *Phaeodactylum tricornutum* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2011 (in Chinese).
- [10] 林毅雄,闫海,刘秀芬,等. 滇池铜绿微囊藻对重金属的富集和氨基酸含量的变化[J]. 环境污染治理技术与设备,2003,4(3):39-41.
LIN Y X,YAN H,LIU X F, et al. The accumulatoin to heavy metals and the variation of amino acids in *Microcystis aeruginosa kuitz* in the Dianchi lake[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control,2003,4(3):39-41 (in Chinese).
- [11] DENG G,ZHANG T,YANG L, et al. Studies of biouptake and transformation of mercury by a typical unicellular diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Chinese Science Bulletin,2013,58(2):256-265.
- [12] 湖北省水生生物研究所第五室藻类应用组. 利用丝状绿藻处理含汞污水的试验[J]. 水生生物学集刊,1976,6(1):67-73.
Section of Applied Phycology, Fifth Laboratory, Institute of Hydrobiology, Hubei Province. Studies on the treatment of mercury-containing wastewater with filamentous green algae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica,1976,6(1):67-73 (in Chinese).
- [13] 史媛媛. 微藻法污水处理研究与进展[J]. 青海科技,2009,16(5):58-61.
SHI Y Y. Research and development of microalgae wastewater treatment[J]. Qinghai Science and Technology, 2009,16(5):58-61 (in Chinese).
- [14] 姚茹,程丽华,徐新华,等. 微藻的高油脂化技术研究进展[J]. 化学进展,2010,22(6):1221-1232.
YAO R,CHENG L H,XU X H, et al. Advances on technology of microalgal high-lipid production[J]. Progress in Chemistry,2010,22(6):1221-1232 (in Chinese).
- [15] 邹宁,李艳,孙东红. 几种有经济价值的微藻及其应用[J]. 烟台师范学院学报(自然科学版),2005,21(1):59-63.
ZOU N,LI Y,SUN D H. Several species of economic microalgae and their applications[J]. Yantai Normal University Journal (Natural Science),2005,21(1):59-63 (in Chinese).

- [16] DIÉGUEZ M, QUEIMALINOS C P, GUEVARA S R, et al. Influence of dissolved organic matter character on mercury incorporation by planktonic organisms: An experimental study using oligotrophic water from Patagonian lakes[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(10): 1980-1991.
- [17] LE FAUCHEUR S, PG C, C F, et al. Interactions between mercury and phytoplankton: Speciation, bioavailability, and internal handling[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(6): 1211-1224.
- [18] 石磊. 重金属对小球藻的毒性作用及小球藻对汞的吸附研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2008.
SHI L. Research on the toxicity of heavy metals on *Chlorella* sp. and the adsorption of Hg^{2+} by *Chlorella* sp.[D]. Shenyang: Northeastern University, 2008 (in Chinese).
- [19] 陈必链, 吴松刚. 钝顶螺旋藻对 7 种重金属的富集作用[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1999, 15(1): 86-90.
CHEN B L, WU S G. Accumulation of 7 heavy metals in *Spirulina platensis*[J]. *Journal of Fujian Teachers University (Natural Science)*, 1999, 15(1): 86-90 (in Chinese).
- [20] 阎海鱼, 冯新斌, 商立海, 等. 天然水体中痕量汞的形态分析方法研究[J]. 分析测试学报, 2003, 22(5): 10-13.
YAN H Y, FENG X B, SHANG L H, et al. Speciation analysis of ultra trace levels of mercury in natural waters[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2003, 22(5): 10-13 (in Chinese).
- [21] 杜青平, 黄彩娜, 贾晓珊, 等. 1,2,4-三氯苯对 3 种海洋微藻的毒性效应[J]. 生态环境, 2007, 16(2): 352-357.
DU Q P, HUANG C N, JIA X S, et al. The toxic effects of 1,2,4-trichlorobenzene on three kinds of ocean tiny algae[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(2): 352-357 (in Chinese).
- [22] 扬州, 孔繁翔, 史小丽, 等. 萼花臂尾轮虫培养滤液对铜绿微囊藻、斜生栅藻和小球藻群体形成及生长的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(6): 1138-1141.
YANG Z, KONG F X, SHI X L, et al. Effects of *Brachionus calyciflorus* culture media filtrate on *Microcystis aeruginosa*, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* colony formation and growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(6): 1138-1141 (in Chinese).
- [23] MA J, ZHENG R, XU L, et al. Differential sensitivity of two green algae, *scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, 52(1): 57-61.
- [24] 孔维宝, 华绍峰, 宋昊, 等. 利用微藻生产生物柴油的研究进展[J]. 中国油脂, 2010, 35(8): 51-56.
KONG W B, HUA S F, SONG H, et al. Progress on biodiesel production using microalgae[J]. *China Oils and Fats*, 2010, 35(8): 51-56 (in Chinese).
- [25] 杜勇, 杜雨润, 朱绍萍, 等. 微藻在环境修复中的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(S2): 316-320.
DU Y, DU Y R, ZHU S P, et al. Research progress of microalgae in environmental remediation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(120): 316-320 (in Chinese).
- [26] 王海英, 牟晓庆. 城市污水培养富油蛋白小球藻的研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2011, 30(3): 38-41.
WANG H Y, MOU X Q. Cultivation of high oil content *Chlorella pyrenoidosa* on urban sewage[J]. *Journal of South-Central University for Nationalities (Nat Sci Edition)*, 2011, 30(3): 38-41 (in Chinese).
- [27] 张玉玺, 马红军. 藻类生物燃料的发展与环境保护[J]. 当代化工, 2013, 42(12): 1711-1714.
ZHANG Y X, MA H J. Algae biofuel development and environmental protection[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2013, 42(12): 1711-1714 (in Chinese).
- [28] 牟文, 熊丽, 胡芹芹, 等. $HgCl_2$ 对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*) 生理生化特性的影响[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(6): 854-859.
MOU W, XIONG L, HU Q Q, et al. Effects of $HgCl_2$ on physiological and biochemical characteristics of *Scenedesmus obliquus*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(6): 854-859 (in Chinese).
- [29] GOUVEIA L, OLIVEIRA A C. Microalgae as a raw material for biofuels production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(2): 269-274.
- [30] 郭建东, 杨宵宵, 孙清荣, 等. 产油微藻的筛选及油脂含量测定[J]. 中国油脂, 2014, 39(6): 68-71.
GUO J D, YANG X X, SUN Q R, et al. Screening of oleaginous microalgae and determination of its oil content[J]. *China Oils and Fats*, 2014, 39(6): 68-71 (in Chinese).
- [31] 钟成华, 周晓琴, 苏翔, 等. 利用市政污水培养产油微藻的研究[J]. 安全与环境学报, 2014, 14(6): 157-160.
ZHONG C H, ZHOU X Q, SU X, et al. On cultivating oil-containing microalgae by using urban sewage[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2014, 14(6): 157-160 (in Chinese).
- [32] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
ZHOU Q Y, GAO T Y. *Environmental Engineering Microbiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese).
- [33] 程柳, 毛宇翔, 麻冰涓, 等. 汞在小浪底水库的赋存形态及其时空变化[J]. 环境科学, 2015, 36(1): 121-129.
CHENG L, MAO Y X, MA B J, et al. Speciation and spatial-temporal variation of mercury in the Xiaolangdi Reservoir[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(1): 121-129 (in Chinese).
- [34] ZHONG H, WANG W. Controls of dissolved organic matter and chloride on mercury uptake by a marine diatom[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(23): 8998-9003.
- [35] 索乾善, 毛宇翔, 张飞鹏, 等. 小浪底水库鱼体汞的污染现状[J]. 环境化学, 2013, 32(11): 2030-2036.

- SUO Q S, MAO Y X, ZHANG P F, et al. Mercury contents in the muscle tissue of fish species in Xiaolangdi Reservoir[J]. Environmental Chemistry, 2013, 32(11): 2030-2036 (in Chinese).
- [36] 蒋红梅, 冯新斌, 梁琰, 等. 蒸馏-乙基化 GC-CVAFS 法测定天然水体中的甲基汞[J]. 中国环境科学, 2004, 24(5): 568-571.
- JIANG H M, FENG X B, LIANG L, et al. Determination of methyl mercury in waters by distillation-GC-CVAFS technique[J]. China Environmental Science, 2004, 24(5): 568-571 (in Chinese).
- [37] 顾昱晓, 孟梅, 邵俊娟, 等. 在线吹扫捕集-气相色谱-原子荧光光谱法测定土壤中甲基汞[J]. 分析化学, 2013, 41(11): 1754-1757.
- GU Y X, MENG M, SHAO J J, et al. Determination of methylmercury in soil samples with online purge and trap gas chromatography-atomic fluorescence spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(11): 1754-1757 (in Chinese).
- [38] 梁英, 王帅. 重金属对微藻胁迫的研究现状及前景[J]. 海洋湖沼通报, 2009(4): 72-82.
- LIANG Y, WANG S. Current status and prospect of studies on microalgae stress by heavy metals[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2009(4): 72-82 (in Chinese).
- [39] 况琪军, 夏宜琤, 惠阳. 重金属对藻类的致毒效应[J]. 水生生物学报, 1996, 20(3): 277-283.
- KUANG Q J, XIA Y Z, HUI Y. Toxic effects of heavy metals on algae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(3): 277-283 (in Chinese).
- [40] Fujita M, Hashizume K. Status of uptake of mercury by the fresh water diatom, *Synedra ulna*[J]. Water Research, 1974, 9: 889-894.
- [41] 潘进芬, 林荣根. 海洋微藻吸附重金属的机理研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(2): 31-34.
- PAN J F, LIN R G. Studies on heavy metal adsorption by marine algae[J]. Marine Sciences, 2000, 24(2): 31-34 (in Chinese).
- [42] 刘瑞霞, 汤鸿霄, 劳伟雄. 重金属的生物吸附机理及吸附平衡模式研究[J]. 化学进展, 2002, 14(2): 87-92.
- LIU R X, TANG H X, LAO W X. Advances in biosorption mechanism and equilibrium modeling for heavy metals on biomaterials[J]. Progress in Chemistry, 2002, 14(2): 87-92 (in Chinese).
- [43] 王沛芳, 王文娜, 王蓉, 等. 汞对水生生物的毒性效应研究进展[J]. 安全与环境学报, 2014, 14(2): 282-288.
- WANG P F, WANG W N, WANG R, et al. Research progress of the toxic effect of mercury on aquatic organisms[J]. Journal of Safety and Environment, 2014, 14(2): 282-288 (in Chinese).