

同步扫描荧光光谱对水体四种重金属离子毒性的研究

段静波, 刘文清, 张玉钧*, 赵南京, 王志刚, 殷高方, 方丽, 刘晶

中国科学院环境光学与技术重点实验室, 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽合肥 230031

摘要 采用三维荧光光谱和 $\Delta\lambda = 20$ nm 同步扫描荧光光谱技术研究 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫作用下蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 荧光光谱的变化情况, 两种光谱技术得到了较为一致的结论: 即胁迫作用 96 h 后, 蛋白核小球藻荧光中心处的荧光值显著降低, 四种重金属离子对藻细胞光合系统的叶绿素 a 和叶绿素 b 造成了严重的破坏。进一步分析四种重金属离子浓度与由同步扫描荧光光谱得到的藻荧光猝灭效率 I_0/I 的相关性可知: 重金属离子的毒性与荧光猝灭效率 I_0/I 呈正相关关系, 均随重金属离子浓度和胁迫时间的增加而增强。对某一种重金属而言, 同步扫描荧光光谱可实现藻细胞对该重金属毒性的评价。与三维荧光光谱相比, 同步扫描荧光光谱具有耗时少、对特定荧光中心选择性高等优点, 是研究水体有毒污染物毒性的有利工具。

关键词 蛋白核小球藻; 同步扫描荧光光谱; 重金属胁迫

中图分类号: X524 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2013)05-1262-04

引言

利用生物对水体中有毒有害污染物进行监测是国内外生物科学领域和环境科学领域共同关注的热点问题^[1, 2], 它直接反映了水环境质量变化对生物的影响和危害程度, 是实现水环境监测目的和进行水质安全预警的一种最直接而有效的手段。藻类具有易培养, 繁殖快, 对环境毒物敏感等优点, 被作为实验材料广泛应用于环境污染物检测和水体安全评价^[3, 4]。藻类在环境污染物胁迫作用下, 细胞体内的蛋白质和叶绿素含量会受到影响, 利用高灵敏度的荧光检测技术对叶绿素的变化进行测定, 可反映藻类受污染物毒害的情况, 从而对水体污染物的浓度水平进行判断。同步扫描荧光分析是在荧光扫描过程中保持激发和发射波长间隔恒定的荧光扫描方法, 较传统的荧光检测技术而言, 具有简化图谱、提高选择性、减少光谱重叠和光散射干扰等优点, 是用于藻细胞色素荧光测定和水体污染物浓度分析的有利工具。

实验分别利用三维荧光光谱和同步扫描荧光光谱技术, 研究了在不同浓度的四种重金属 (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) 胁迫作用下, 蛋白核小球藻特征荧光光谱的变化情况, 以及藻细胞荧光猝灭效率与重金属浓度水平间的关系, 为利

用同步扫描荧光光谱技术判断水体重金属毒性水平提供理论依据。

1 实验部分

1.1 材料

藻种: 蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-1222), 购自中科院水生所淡水藻种库。

溶液: 实验选取四种“生活饮用水安全标准”规定的重金属: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 配置实验溶液^[5]。

1.2 藻种培养方法

在 1 000 mL 的透明玻璃瓶中采用 BG-11 培养基对藻种进行预培养, 培养温度: $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$, 连续光照, 光照度: $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光暗比: 14/10 h, pH: 7, 并进行预试验, 以确定合适的重金属浓度范围。

实验在 250 mL 的锥形瓶中进行, 根据预试验的结果, 将 Hg^{2+} 浓度梯度设定为 0, 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 0.75, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Cd^{2+} 浓度梯度设定为 0, 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 5, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Cu^{2+} 浓度梯度设定为 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Zn^{2+} 浓度梯度设定为 0, 25, 50, 100, 250, 500, $1 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所有重金属溶液用纯净水配置。

收稿日期: 2012-10-11, 修订日期: 2013-01-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2009AA063005), 安徽省杰出青年科学基金项目(1108085J19), 安徽省自然科学基金项目(11040606M26)和中国科学院安徽光学精密机械研究所所长基金项目(Y03AG31144)资助

作者简介: 段静波, 女, 1986 年生, 中国科学院安徽光学精密机械研究所硕士研究生 e-mail: jbdwan@aiofm.ac.cn

* 通讯联系人 e-mail: yjzhang@aiofm.ac.cn

以不加重金属的空白藻液为对照,将以上四种重金属溶液分别加入处于对数生长期的蛋白核小球藻中,藻液初始浓度约为 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,每种重金属设定3个平行样。分别于24, 48, 72, 96 h后取样,进行荧光光谱测定。

1.3 叶绿素荧光参数测定方法

利用荧光分光光度计(Hitachi, F-7000)测量藻细胞的三维荧光光谱图和同步扫描荧光光谱图。具体参数为:激发波长:300~700 nm;发射波长:300~700 nm;激发波长和发射波长的采样间隔为5 nm;以步进值 $\Delta\lambda = 20$ nm测量样品同步扫描荧光光谱。波长的扫描速度 $12\ 000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$;PMT电压:700 V。图中采用的三维荧光光谱图均为进行瑞利散射和拉曼散射校正后的光谱图。

1.4 统计分析

用 Matlab 和 Origin7.5 软件对实验结果进行分析。

2 结果与讨论

2.1 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫作用下蛋白核小球藻的三维荧光光谱

图1是蛋白核小球藻未加入重金属离子培养96h的空白样及受不同浓度 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫96h的藻细胞的三维荧光光谱图(空间坐标 X, Y, Z轴分别表示发射波长、激发波长和荧光强度),从图中空白样三维荧光光谱图可以看出:该藻细胞含有三个明显可见的荧光中心,分别是激发波长/发射波长为:435/685 nm, 470/685 nm 和 660/685 nm。蛋白核小球藻属于绿藻门浮游植物,天线色素分别为最大吸收峰在435 nm左右和次级吸收峰在660 nm左右的核心天线色素叶绿素 a 以及最大吸收峰在470 nm左右的外周天线色素叶绿素 b^[6,7]。由此可知:435/685 nm 和 660/685 nm 的荧光中心应该是由叶绿素 a 的吸收产生,470/685 nm 的荧光中心叶绿素 b 的吸收产生。

由不同浓度 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫96h的藻细胞三维荧光光谱图可知:在不同重金属离子胁迫作用下,蛋白核小球藻三个荧光中心的荧光强度均有明显下降,其中以 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} 对荧光中心的破坏作用最为明显,已无明显荧光中心存在。由此可知:蛋白核小球藻叶绿体上的天线色素遭到破坏。这和 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 对微藻的胁迫机理密切相关。总的来说:重金属进入藻体内,会对藻细胞中的捕光色素蛋白复合体造成损伤,降低藻细胞的捕光能力;光合基体吸收的光能减少,光合电子传递链的活性降低,叶绿素的合成受到抑制,以至类胡萝卜素与叶绿素的比例失调;叶绿素 a 含量降低,光合作用效率降低,PS II 的电子传输受抑制,从而导致 PS II 活性降低^[8]。有研究表明: Hg^{2+} 会对微藻的光合作用及似亲孢子的形成产生抑制^[9],从而导致光合色素损害和叶绿素含量下降; Cd^{2+} 可抑制光合作用的原初反应,阻碍光合电子传递,抑制光合放氧; Cu^{2+} 对微藻的毒害作用可能是通过破坏细胞原生质层膜的渗透性,造成细胞中的钾和镁不可逆的流失,使得藻细胞代谢中断,正常的化合物代谢受影响来实现的^[10]。 Cu^{2+} 还会使得叶绿素 a 光合系统的蛋白复合体含量下降,影响藻细胞的光合

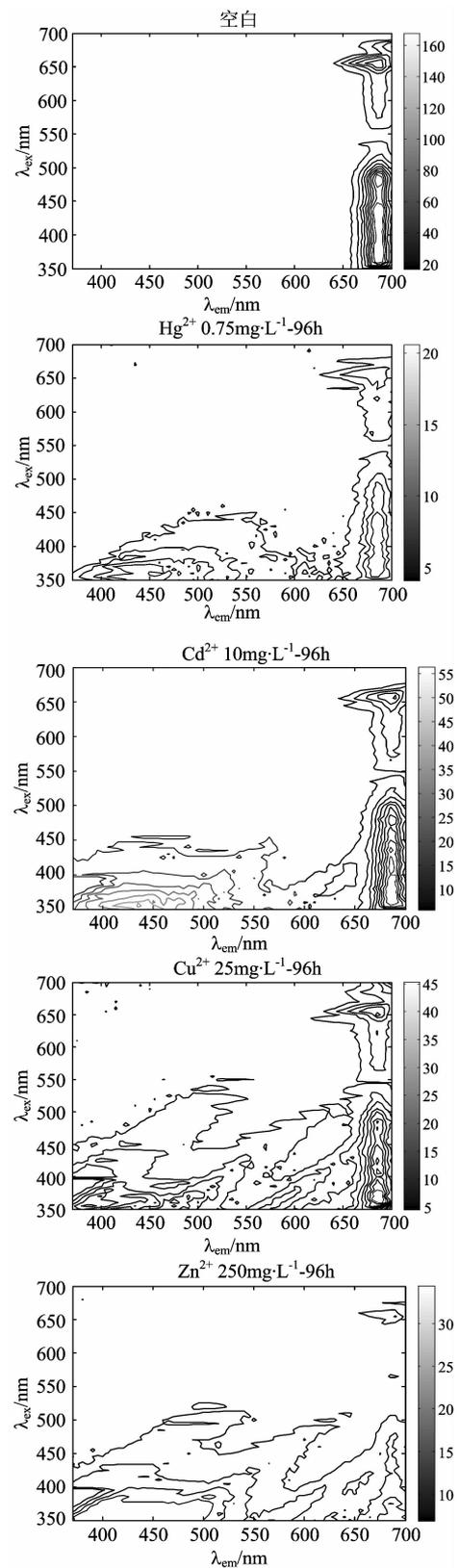


Fig. 1 3DEEM of *Chlorella pyrenoidosa* cells in the absence and after 96 h stress of four kinds of heavy metals

速率,抑制供试藻的光合色素合成。当 Zn^{2+} 浓度达到一定范

围时,会影响藻细胞叶绿体中还原型辅酶的形成及三磷酸腺苷的合成^[11, 12],抑制藻类的生长,降低叶绿素含量,导致类胡萝卜素的比列失调,光合系统电子传递受阻。高浓度锌还能通过增加藻细胞的渗透性和细胞蛋白核的完整性对细胞体产生毒害作用^[13]。

2.2 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫作用下蛋白核小球藻的同步扫描荧光光谱^[14]

图 2 是蛋白核小球藻空白样及受 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫 96h 的同步扫描荧光光谱图。由图 2 可知:选取 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ 的恒波长同步荧光扫描谱包含激发波长/发射波长: 660/685 nm 处的全部信息,而其他波段的信息几乎被略去,这是因为同步扫描荧光光谱的激发波长和发射波长之间存在恒定的常数差。因此,同步扫描荧光光谱较三维荧光光谱而

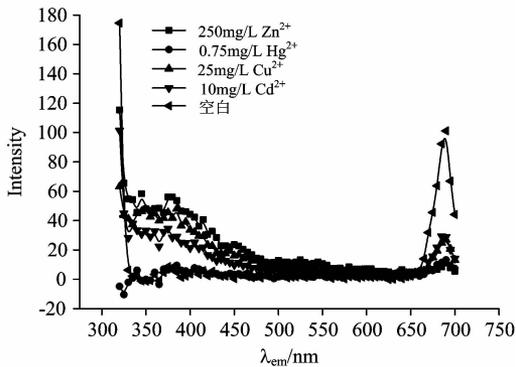


Fig. 2 Synchronous fluorescence spectroscopy of *Chlorella pyrenoidosa* cells in the absence and after 96 h stress of four kinds of heavy metals using $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$

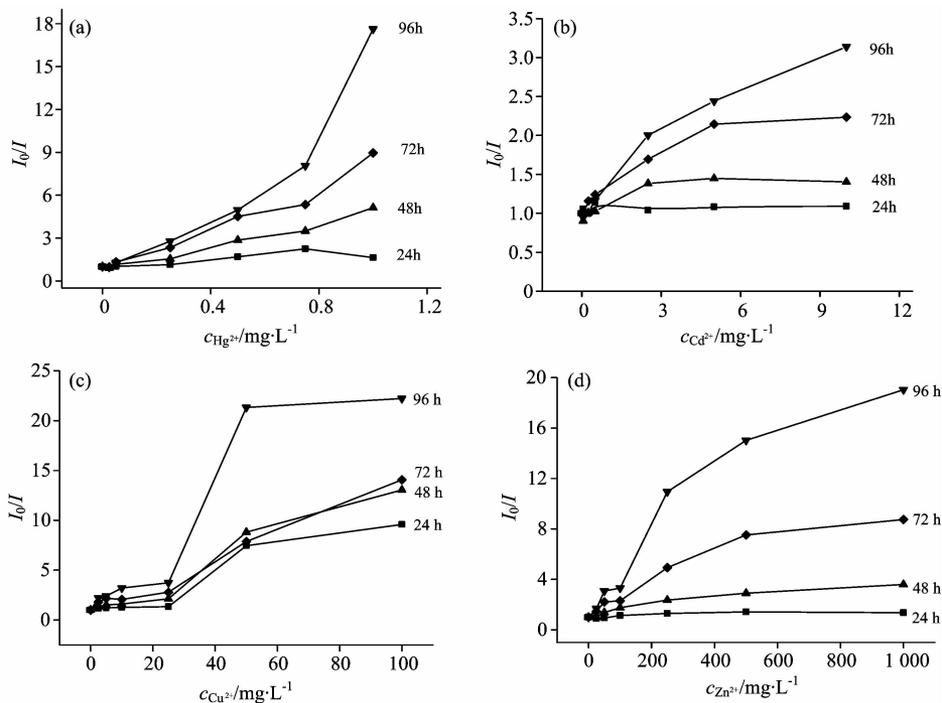


Fig. 3 Relationship between four kinds of metal ions concentration and Synchronous fluorescence quenching efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* cells

言具有耗时少、选择性高的优点,可以代替三维荧光光谱用于重金属对藻类的胁迫研究。

由图 2 可以看出:受 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫 96 h 的蛋白核小球藻荧光峰强度比空白样品的荧光峰强度有不同程度的减弱。其中:受 Zn^{2+} 胁迫 96h 的荧光峰强度最弱,几乎为 0。说明 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} 对荧光中心的破坏作用最为严重,这种变化趋势与三维荧光光谱荧光中心的变化趋势一致。

2.3 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 浓度与蛋白核小球藻荧光猝灭效率相关性研究

图 3 是 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 浓度与蛋白核小球藻荧光猝灭效率的关系图, I_0/I 为荧光猝灭效率,即不受重金属离子胁迫的空白藻样和受重金属离子胁迫的藻样的同步扫描荧光光谱荧光峰处荧光强度 I_0 与 I 的比值(665/685 nm),该值反映了不同重金属离子胁迫作用下藻细胞荧光强度变化的大小,即反映了不同重金属离子对蛋白核小球藻毒性的强弱。重金属离子毒性越强,对藻细胞光合系统的损害越严重,强烈抑制光能的接收和光合电子的有效传递,从而导致藻细胞荧光强度发生显著变化,荧光猝灭效率 I_0/I 增加,由此可知,荧光猝灭效率 I_0/I 与重金属离子毒性成正相关关系。由图可知:四种重金属离子浓度及胁迫作用时间与藻荧光猝灭效率的关系表现出较为一致的变化趋势,即藻荧光猝灭效率随浓度和胁迫时间的增加而增加。由此可得,重金属离子的毒性强弱和浓度有关也与受胁迫的时间有关,重金属离子毒性随浓度和胁迫时间的增加而增强。对于某一种重金属而言,可以由重金属离子浓度和藻荧光猝灭效率的关系拟合出二者的关系曲线,根据拟合得到的关系曲线可以由同步扫描光谱得到的荧光值确定一定范围内的该种重金属的浓

度, 实现利用高灵敏度的同步扫描荧光光谱对重金属毒性的评价。

3 结 论

通过对 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 胁迫 96h 的蛋白核小球藻进行三维荧光光谱研究, 确定四种重金属离子对蛋白核小球藻光合系统的叶绿素 a 和叶绿素 b 造成了严重的破坏,

这与 $\Delta\lambda=20$ nm 的恒波长同步扫描荧光光谱得到的结论相一致。较三维荧光光谱而言, 同步扫描荧光光谱具有耗时少、选择性高等优点, 可以代替三维荧光光谱用于重金属对藻类的胁迫研究。通过对 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 浓度与由同步扫描荧光光谱得到的蛋白核小球藻荧光猝灭效率的相关性进行分析, 认为重金属离子的毒性随浓度和胁迫时间的增加而增强。对某一种重金属而言, 可利用高灵敏度的同步扫描荧光光谱实现重金属对藻细胞毒性的评价。

References

- [1] SHEN Yan-fei, ZHANG Yong, LI Yi-qiang(沈燕飞, 张 咏, 厉以强). Environmental Science and Technology(环境科学技术), 2009, 22(2): 68.
- [2] Ralph P J, Smith R A, Macinnis-Ng C M O, et al. Toxicological & Environmental Chemistry, 2007, 89(4): 589.
- [3] XIE Yan, LI Zong-yun, FENG Lin, et al(谢 艳, 李宗芸, 冯 琳, 等). Environmental Science & Technology(环境科学与技术), 2008, 31(12): 77.
- [4] WANG Xiao-hui, JIN Jing, REN Hong-qiang, et al(王晓辉, 金 静, 任洪强, 等). Hebei Journal of Industrial Science and Technology(河北工业科技), 2007, 24(1): 59.
- [5] National Standards of People's Republic of China(中华人民共和国国家标准). GB-U 5749—2006.
- [6] Catherine A, Escoffier N, Belhocine A, et al. Water Research, 2012, 46(6): 1771.
- [7] Richardson T L, Lawrenz E, Pinckney, J L, et al. Water Research, 2010, 44(8): 2461.
- [8] FENG Tao, LIU Ji-feng(冯 涛, 刘纪凤). Modern Agricultural Science and Technology(现代农业科技), 2009, (13): 360.
- [9] LIANG Ying, WANG Shuai(梁 英, 王 帅). Transaction of Oceanology and Limnology(海洋湖沼通报), 2009, 4: 72.
- [10] WANG Shuai, LIANG Ying, FENG Li-xia, et al(王 帅, 梁 英, 冯力霞, 等). Marine Science(海洋科学), 2010, 34(10): 38.
- [11] WANG Bin-lian, SHI Jian-guo, LI Xue-mei(王丙莲, 史建国, 李雪梅). Environmental Pollution & Control(环境污染与防治), 2009, 31(9): 30.
- [12] ZHANG Tie-ming, DU Gui-sen(张铁明, 杜桂森). Acta Bot. Boreal. Occident. Sin.(西北植物学报), 2006, 26(8): 1722.
- [13] Miao Aijun, Wang Wenxiong, Philippe Juneau. Toxicological & Environmental Chemistry, 2005, 24(10): 2603.
- [14] Hanh Nguyen-Ngoc, Claude Durrieu, Canh Tran-Minh. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2009, 72(2): 316.

Studies on Toxicity of Four Kinds of Heavy Metals in Water by Synchronous-Scan Fluorescence

DUAN Jing-bo, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun*, ZHAO Nan-jing, WANG Zhi-gang, YIN Gao-fang, FANG Li, LIU Jing
Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China

Abstract Spectrofluorometry of *Chlorella pyrenoidosa* was studied by three dimensional excitation-emission (3DEEM) fluorescence spectroscopy and synchronous scan fluorescence spectroscopy with $\Delta\lambda=20$ nm in the stress of Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} . The conclusion from two kinds of Spectrofluorometry was the same: after 96h stress by heavy metals, the maximum fluorescence values reduced obviously, chlorophyll-a and chlorophyll-b in the photosynthetic system were seriously damaged by heavy metal. Further analysis of the correlations between heavy metal concentration and fluorescence quenching efficiency I_0/I can conclude that the toxicity of heavy metal and the fluorescence quenching efficiency I_0/I were positively correlated, and they all increased with the heavy metal concentration and stress time. For one kind of heavy metals, synchronous scan fluorometry is a sensitive method for its toxicity assessment. Compared to 3DEEM fluorescence spectroscopy, synchronous scan fluorescence spectroscopy is less time consuming and of higher selectivity. It is suitable to assess the toxicity of pollutions in water.

Keywords *Chlorella pyrenoidosa*; Synchronous fluorescence spectroscopy; Heavy metals

* Corresponding author

(Received Oct. 11, 2012; accepted Jan. 28, 2013)