

doi: 10.3788/gzxb20144302.0217002

叶绿素荧光技术对受 Cu^{2+} 胁迫藻类暗适应时间的研究

段静波, 刘文清, 张玉钧, 赵南京, 王志刚, 殷高方, 肖雪, 方丽

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

摘 要: 利用叶绿素荧光技术, 对受相同浓度 Cu^{2+} 胁迫的蛋白核小球藻、斜生栅藻、铜绿微囊藻的最佳暗适应时间进行研究. 通过对三种供试藻在光照和暗适应时间分别为 30 s、1 min、3 min、5 min、10 min 和 20 min 条件下的光合荧光参量进行测定, 以光化学淬灭参量值为主要参考依据, 结合 t 检验方法对暗适应时间进行显著性差异分析, 结果表明: 暗适应条件下三种供试藻的潜在最大量子效率值略有增加, 实际量子效率值基本保持不变; 蛋白核小球藻和斜生栅藻的光化学淬灭参量值和非光化学淬灭参量值随暗适应时间的延长显著增加; 铜绿微囊藻光化学淬灭参量值在光照 1 min 时达到最大, 无需进行暗适应, 这可能与蓝藻在暗适应时发生状态转换有关; 藻类不是暗适应时间越长越好, 蛋白核小球藻和斜生栅藻的最佳暗适应时间分别为 5 min 和 10 min. 这将为采用叶绿素荧光技术进一步研究毒物对藻类的胁迫机理提供可靠依据.

关键词: 蛋白核小球藻; 斜生栅藻; 铜绿微囊藻; 暗适应; 叶绿素荧光技术

中图分类号: X524

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2014)02-0217002-5

Study on the Dark Adaptation Time of Algae Stressed by Cu^{2+} Using Chlorophyll Fluorescence Measurements

DUAN Jing-bo, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, ZHAO Nan-jing, WANG Zhi-gang,
YIN Gao-fang, XIAO Xue, FANG Li

(Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics,
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: The best dark adaptation time of *Chlorella pyrenoidosa*, *Snedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa* stressed by Cu^{2+} was investigated by chlorophyll fluorescence measurements. Photosynthetic fluorescence parameters were measured under light and dark conditions. Measurement time in light condition were 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min and 20 min as well as in dark condition. Significant difference of dark adaptation time was analyzed mainly based on the photochemical quenching parameter and t-test method. The results show that compared to light, the potential maximum quantum efficiency values of three algae increase slightly under dark adaptation and the yield value remains the same; the photochemical quenching parameter value and non photochemical quenching parameter value increase significantly as time goes on; the maximum photochemical quenching parameter value of *Microcystis aeruginosa* achieves when the algae is treated under light in 1 min, and *Microcystis aeruginosa* needs no dark adaptation may because blue-green algae state conditions shifts under dark adaptation; the dark

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (No. 2013AA065502)、安徽省杰出青年科学基金 (No. 1108085J19)、安徽省科技计划项目 (No. 1206c0805012)、中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目 (No. yg2012071)、安徽光学精密机械研究所所长基金项目 (No. Y03AG31144) 和黄淮海绿色现代农业集群示范预研项目资助

第一作者: 段静波 (1986-), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水体有毒污染物监测. Email: jbduan@aiofm.ac.cn

导师 (通讯作者): 张玉钧 (1964-), 男, 研究员, 博士, 主要研究方向为光电子技术与应用、有害痕量气体光学与光谱学监测方法、新型环境监测技术. Email: yjzhang@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2013-07-19; **录用日期:** 2013-08-26

<http://www.photon.ac.cn>

adaptation time of algae are not better by long time treated, and the best dark adaptation time of *Chlorella pyrenoidosa* and *Snedesmus obliquus* are 5 min and 10 min respectively. All of these will provide a reliable basis for further studies on the inhibiting effect of toxicant on algae.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; *Snedesmus obliquus*; *Microcystis aeruginosa*; Dark adaptation; Chlorophyll fluorescence measurement

OCIS Codes: 170.1530; 170.6280; 300.2530; 300.6280

0 引言

藻类叶绿素荧光技术以光合作用理论为基础,利用体内叶绿素作为天然探针,研究和探测植物光合生理状况及各种外界因子对其细微影响的新型植物活体测定和诊断技术,具有快速、灵敏、对细胞无损伤的优点.近年来,叶绿素荧光作为光合作用的探针,在生态毒理学、微藻生物技术、水质检测监测和预警等方面得到了广泛的研究和运用^[1-2].常用的光合荧光参量主要有:初始荧光(F_0)、最大荧光产量(F_m)、潜在最大量子效率(F_v/F_m)、实际量子效率(Yield)、光化学淬灭参量(qP)、非光化学淬灭参量(NPQ)等.为了获得可靠的荧光参量测量数据,要对测量条件进行合理的设置.暗适应是叶绿素荧光测量中常用的预处理方法^[3],它与植物体质体醌库的氧化还原^[4]、稳态转换^[5]、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的激活和钝化、光保护机制^[6]等光合作用步骤密切相关^[7].暗适应时间的确定,不同文献具有不同的标准^[8-9],有5 min、10 min、15 min、20 min、30 min等.Papageorgiou指出^[10]不同的暗适应时间对测量结果有显著影响,若要测量体质体醌库和 $C_4Mn_4O_xCl_y$ cluster的再氧化,只需要暗适应几分钟即可.徐德聪等^[9]测定了4个美国山核桃品种叶片基部、中部、尖部的 F_0 、 F_m 、 F_v/F_m 和 F_v/F_0 值,并在0 min、5 min、10 min、20 min、40 min、60min时间段中选择最佳的暗适应时间.结果显示: F_v/F_m 和 F_v/F_0 均表现为叶基部>叶中部>叶尖部,差异不显著.除 F_0 和山核桃Elliot的 F_m 外,其他品种的山核桃在暗适应5 min后 F_m 、 F_v/F_m 和 F_v/F_0 均达到最大值,与未暗适应的处理在品种间有显著差异.不同的植物种类、荧光参量、光照强度、植物所处逆境类别等都会对暗适应时间造成影响,导致测量结果的偏差,这类偏差可能被误解为是由于藻类受到逆境胁迫造成的.对暗适应时间进行设定是测量数据可靠的保证.所以,在进行藻类的光合生理和受胁迫机理研究前,需对藻种特性、荧光参量以及逆境类别与暗适应时间的关系进行研究,选择最优的暗适应时间.

本文以常用的三种淡水藻为实验材料,利用脉冲振幅调制(Pulse Amplitude Modulation, PAM)技术,通过改变暗适应时间测定100 mg/L的 Cu^{2+} 溶液胁迫下的蛋白核小球藻、斜生栅藻、铜绿微囊藻各光合荧光参量 F_v/F_m 、Yield、qP、NPQ,以光照下受毒物胁迫组为

对照,深入分析在一定逆境下不同的植物种类、荧光参量与暗适应时间的关系,选择最优的暗适应时间,为采用叶绿素荧光技术进一步研究毒物对藻类的胁迫机理提供可靠依据.

1 材料与方法

1.1 材料

实验选取三种常用淡水藻:蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-1222)、斜生栅藻(*Snedesmus obliquus*, FACHB-417)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*, FACHB-469)为实验材料,均购自中科院水生所淡水藻种库.

1.2 实验方法

1.2.1 藻种培养方法

试验前,采用BG-11培养基,培养温度为 $20 \pm 1^\circ C$,连续光照,光照度为 $200 \mu mol/m^2/s$,光暗比为14 h/10 h, pH为7,在1 000 mL的透明玻璃瓶中对藻种进行扩繁和驯化培养,每天定期改变锥形瓶在培养箱中的位置并振荡3次,每隔96 h移种一次,反复2~3次,使藻种达到纯化和对数生长,作为试验藻种,各种藻液在试验液中的初始细胞浓度为 10^5 个/mL^[11].

1.2.2 实验方法

实验在20 mL的试管中进行,取处于对数生长期的斜生栅藻、蛋白核小球藻、普通小球藻液5 mL与浓度为200 mg/L的 Cu^{2+} 溶液5 mL以体积比1:1混合,充分振荡使其混合均匀,得到 Cu^{2+} 浓度为100 mg/L的混合藻液,分别于光照及暗适应条件下测定受重金属离子胁迫的藻液的光合荧光参量值.100 mg/L浓度的 Cu^{2+} 溶液可对藻液在短时间内产生抑制.

实验分为光照组和暗适应组:光照组为连续测量,即测量的藻液与重金属离子混合液不经过暗适应,分别于30 s、1 min、3 min、5 min、10 min、20 min测定受 Cu^{2+} 离子胁迫的藻液的各光合荧光参量值;暗适应组为分次测量,将藻液和金属离子混合后,放入样品池中,暗适应时间分别为30 s、1 min、3 min、5 min、10 min、20 min时测定各光合荧光参量.以不经过暗适应的光照组为对照,每组实验设定3组平行样.

1.3 叶绿素荧光参量测定方法

用水样叶绿素荧光仪Water-PAM(德国Walz公司)对受 Cu^{2+} 离子胁迫藻液的叶绿素-a PSII系统各荧光参量进行测定.测定的叶绿素荧光参量有: F_v/F_m 、

Yield、qP 和 NPQ^[12].

1.4 统计分析

用 Origin7.5 软件对实验结果进行统计分析. 实验中用于结果分析的数据均为 3 组平行样的平均值.

2 结果与讨论

2.1 三种供试藻种叶绿素荧光参量差异分析

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到影响来实现的^[13]. Cu^{2+} 还会使得叶绿素 a 光系统的蛋白复合体含量下降,影响藻细胞的光合速率,抑制供试藻的光合色素合成,从而使测得的 PS II 反应中心的荧光参量值下降,藻细胞的光合抑制率上升.

由图 1 可知,与光照组各相应胁迫时间下的叶绿素荧光参量相比,经过暗适应后,三种藻的 F_v/F_m 值均略有增加, Yield 值无明显变化;除铜绿微囊藻外,蛋白核小球藻和斜生栅藻的 qP 值和 NPQ 值均随暗适应时间的延长显著增加,铜绿微囊藻 qP 参量的最大值出现在光照 1 min 左右. 这可能是和各荧光参量所表达的光合作用机理相关联:^[14] F_v/F_m 为光合系统 PSII 最大的或潜在的量子效率指标,反映了开放的 PSII 反应中心的能量捕获效率,它是比较恒定的. 经过暗适应后,三种藻的 F_v/F_m 值与光照组各相应胁迫时间下的 F_v/F_m 值相比略有增加,说明在暗适应一段时间后,藻类光合系统的能量捕获效率增加,暗适应有利于藻类光合系统捕获更多的能量,捕获能量的最大值基本保持不变.

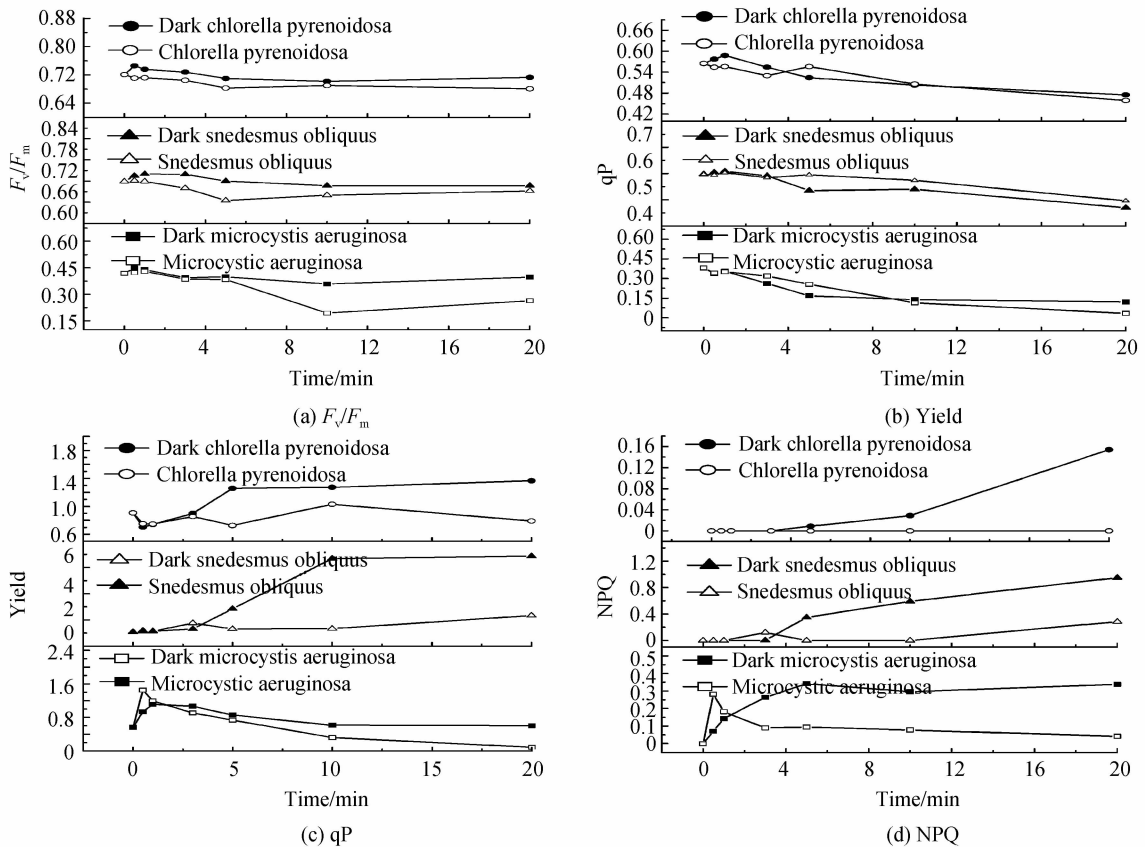


图 1 在光照和暗适应条件下三种供试藻种叶绿素荧光参量随时间的变化关系

Fig. 1 The relationships between the photosynthetic fluorescence parameters of three kinds of algae and time under both light and dark adaptation conditions

Yield 值即 PSII 实际光化学量子效率,它反映 PSII 反应中心在有部分关闭情况下的原初光能捕获效率. 从光照组和暗适应组的测试结果来看,在研究的 0~20 min 的时间范围内, Yield 值几乎不受暗适应的影响,三种供试藻 PSII 反应中心在有部分关闭情况下的原初光能捕获效率基本不变.

qP 即光化学淬灭,反映了 PSII 天线色素吸收的光能用于光化学电子传递的份额,又在一定程度上反映了 PSII 反应中心的开放程度. qP 由 Q_A^- 重新氧化形

成,反映的是 PSII 原初电子传递体 Q_A 的还原状态. 蛋白核小球藻和斜生栅藻 qP 值的增加说明 Q_A^- 重新氧化形成 Q_A 的量增大,即 PSII 氧化侧向 PSII 反应中心的电子传递活性增大^[15]. 铜绿微囊藻暗适应 qP 参量的最大值低于光照组受 Cu^{2+} 胁迫 1 min 时的值,说明该种藻在光照下短时间内 Q_A^- 即可重新氧化形成 Q_A , 因此,铜绿微囊藻不需要进行暗适应. 这与 Timofeev K N^[16] 和 Huang C H^[17] 等人所做的研究得到的结论相一致,即蓝藻的 PQ 和细胞色素 b6f 的氧化还原状态更

容易受到呼吸作用的影响,蓝藻经暗适应后,呼吸作用能够导致 PQ 还原以及光合系统的状态转换。

NPQ 即非光化学淬灭反映的是 PSII 天线色素吸收的光能不能用于光合电子传递而通过叶黄素循环等过程以热的形式耗散掉的部分,非光化学淬灭是一种自我保护机制,对光合机构起一定的保护作用。NPQ 值增大,说明光合系统受胁迫越严重,吸收的能量以热能形式耗散掉的越多,对光合反应中心的保护力度越大。铜绿微囊藻光照组的 NPQ 值在受 Cu^{2+} 胁迫 1 min 时达到最大,然后相对降低。说明无需对铜绿微囊藻进行暗适应,该藻种可通过自身调节,对光合反应中心起到保护作用。

表 1 蛋白核小球藻和斜生栅藻暗适应 3 min、5 min、10 min、20 min 荧光值 qP 的显著性差异分析

Table 1 Significant difference analysis of dark adaptation time as 3 min、5 min、10 min、20 min of *Chlorella pyrenoidosa* and *Snedesmusobliquus*

Algae	The dark adaptation time/min	qP	Significant differences between 5 min and 3 min($P<0.05$)	Significant differences between 10 min、20 min and 5 min($P<0.05$)	Significant differences between 20 min and 10 min($P<0.05$)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	3	1.074±0.036			
	5	1.258±0.051	0.0005**		
	10	1.273±0.090		0.740NS	
	20	1.367±0.146		0.138NS	0.121NS
<i>Snedesmus obliquus</i>	3	1.306±0.098			
	5	2.845±0.628	0.00199*		
	10	6.686±0.554		0**	
	20	6.865±0.114		0.00015**	0.499NS

注:“NS”、“*”、“**”分别表示差异不显著及在 0.05 和 0.01 水平上有差异。

由表 1 可知,蛋白核小球藻暗适应 5 min 的 qP 值与暗适应 3 min 间具有显著性差异,与暗适应 10 min 和 20 min 间无显著性差异(t 检验, $P<0.05$),因此,蛋白核小球藻的最佳暗适应时间为 5 min;斜生栅藻暗适应 10 min 和 20 min 的 qP 值相对于暗适应 5 min 具有极显著性差异,该藻暗适应 20 min 的 qP 值相对于暗适应 10 min 无显著性差异(t 检验, $P<0.01$),因此,斜生栅藻的最佳暗适应时间为 10 min。由分析可知,对于藻类来说,不是暗适应时间越长越好。

3 结论

本实验结果表明:1)利用叶绿素荧光技术,对光照和暗适应条件下,受相同浓度 Cu^{2+} 胁迫的三种供试藻种的光合荧光参量进行测定分析,三种藻在暗适应条件下测得的 F_v/F_m 值与光照组的 F_v/F_m 值相比略有增加,Yield 值基本保持不变;蛋白核小球藻和斜生栅藻 qP 值和 NPQ 值随暗适应时间的延长显著增加,铜绿微囊藻 qP 在光照 1 min 时达到最大值,这与蓝藻在暗适应时可能发生状态转换有关;2)采用 t 检验方法对暗适应分别为 3 min、5 min、10 min、20 min 的蛋白核小球藻和斜生栅藻的 qP 值进行显著性差异分析表

2.2 三种供试藻种最优暗适应时间的选择

由上述对铜绿微囊藻受 Cu^{2+} 胁迫条件下光照组和暗适应组的各荧光参量的最大值的比较可知, F_v/F_m 、Yield 和 NPQ 基本不变,qP 略有下降。这与蓝藻自身的光合系统特性相一致。因此,无需对铜绿微囊藻进行暗适应。

以光照组和暗适应组相同胁迫时间下蛋白核小球藻和斜生栅藻光合荧光参量 F_v/F_m 、Yield、NPQ 的变化规律为前提,qP 值为主要分析参考依据,通过 t 检验的方法对暗适应 3 min、5 min、10 min、20 min 的显著性差异进行分析,确定两种供试藻种的最佳暗适应时间。

明:供试藻种不同,最佳暗适应时间亦不相同。对于藻类来说,不是暗适应时间越长越好。蛋白核小球藻和斜生栅藻的最佳暗适应时间分别为 5 min 和 10 min。铜绿微囊藻各光合荧光参量在光照条件下和暗适应条件下变化不显著,无需对铜绿微囊藻进行暗适应。

参考文献

- [1] CHEN Lian-hua, LIU Lei. Application of the chlorophyll fluorescence in photosynthesis of algae[J]. *JiangXi Science*, 2007, **25**(6): 788-806.
陈莲花,刘雷. 叶绿素荧光技术在藻类光合作用中的应用[J]. *江西科学*, 2007, **25**(6): 788-806.
- [2] LI Xiao, FENG Wei, ZENG Xiao-chun. Advances on chlorophyll fluorescence analysis and its uses [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(10): 2186-8196.
李晓,冯伟,曾晓春. 叶绿素荧光分析技术及应用进展[J]. *西北植物学报*. 2006, **26**(10): 2186-8196.
- [3] MAXWELL K, JOHNSON G N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, **51**(345): 659-668.
- [4] CONSALVEY M, JESUS B, PERKINS R G, et al. Monitoring migration and measuring biomass in benthic biofilms: the effects of dark/far-red adaptation and vertical migration on fluorescence measurements[J]. *Photosynthesis Research*, 2004, **81**(1): 91-101.
- [5] DAVID C K, KAZUHIKO S. State I-State II transitions in the thermophilic blue-green algal (Cyanobacterium) *Synechococcus*

- lividus[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2008, **37**(4): 421-427.
- [6] KRAMER D M, JOHNSON G, KIIRATS O. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes [J]. *Photosynthesis Research*, 2007, **79**: 209-218.
- [7] SCHWARS C, BOHNE A V, WANG F, *et al.* An intermolecular disulfide-based light switch for chloroplast psbD gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Journal*, 2012, **72**(3): 378-389.
- [8] RODRIGUEZ M, GREENBAUM E. Detection limits for real-time source water monitoring using indigenous freshwater microalgae[J]. *Water Environment Research*, 2009, **81**(11): 2363-2371.
- [9] XU De-cong, LV Fang-de, LIU Xiao-yang, *et al.* Studies on the determination technique of chlorophyll fluorescence[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, **35**(35): 11335-11337.
徐德聪,吕芳德,刘小阳,等. 2007. 叶绿素荧光测定技术的研究[J]. *安徽农业科学*, 2007, **35**(35): 11335-11337.
- [10] PAPAGEORIOU G C, TISMILLI M M, STAMATAKIS. The fast and slow kinetics of chlorophyll a fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint[J]. *Photosynthesis Research*, 2007, **94**(2-3): 275-290.
- [11] Organization for Economic cooperation and development. OECD/OCDE 201, Guideline for testing chemicals [S]. Paris, France; 2006.
- [12] LI M, WAN C Y, PAN X J, *et al.* Comparative study of stress by four heavy metals on *chlamydomonas reinhardtii* and the potential application in BBE algal toximeter[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2013, **22**(5A): 1494-1500.
- [13] GUAN Yue-qiang, ZHANG Yi-ke, CHEN Yong. Toxic effects of cooper ion on spirulina platensis[J]. *Journal of Hebei University(Natural Science Edition)*, 2002, **20**(2): 182-184.
管越强,张义科,陈勇. Cu²⁺对钝顶螺旋藻的毒性影响[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2002, **20**(2): 182-184.
- [14] ZHANG A-hong, QI Meng-wen, ZHANG Ye-hui. A discussion on chlorophyll fluorescence induction parameters and their measurement[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008, **22**(6): 909-912.
张阿宏,齐孟文,张晔晖. 调制叶绿素荧光动力学参量及其计量关系的意义和公理化讨论[J]. *核农学报*, 2008, **22**(6): 909-912.
- [15] KRAMER D M, JOHNSON G, KIIRATS O. New fluorescence parameters for the determination of Q(A) redox state and excitation energy fluxes [J]. *Photosynthesis Research*, 2004, **79**(2): 209-218.
- [16] TIMOFEEV K N, KUZNETSOVA G V, ELANSKAYA I V. Effects of dark adaptation on tight-induced electron transport through photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803[J]. *Biochemistry-moscow*, 2005, **70**(12): 1390-1395.
- [17] HUANG C H, YUAN X L, ZHAO F D, *et al.* Kinetic analyses of state transitions of the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7002 and its mutant strains impaired in electron transport [J]. *Biochimical et Biophysica Acta-bioenergetics*, 2003, **1607**(2): 121-130.