

不同衣藻光合作用响应汞胁迫的比较研究

夏亦雪 艾晓寒 朱飞霞 毕永红

COMPARATIVE OF PHOTOSYNTHESIS OF DIFFERENT *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* IN RESPONSE TO MERCURY STRESS

XIA Yi-Xue, AI Xiao-Han, ZHU Fei-Xia, BI Yong-Hong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0291>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

镉、汞暴露在中华绒螯蟹卵巢中的富集及其氧化应激反应

EFFECTS OF CADMIUM AND MERCURY ON OXIDATIVE STRESS INDEXES IN THE OVARY OF *ERIOCHEIR SINENSIS*
水生生物学报. 2019, 43(3): 554–562 <https://doi.org/10.7541/2019.067>

AHLs对小球藻PS II光化学活性与光合作用关键酶的影响

EFFECTS OF AHLs ON PS II PHOTOCHEMISTRY ACTIVITY AND PHOTOSYNTHESIS CRUCIAL ENZYMES OF *CHLORELLA VULGARIS*
水生生物学报. 2017, 41(3): 629–636 <https://doi.org/10.7541/2017.80>

基于叶绿素荧光探讨链霉素对念珠藻生长及光合毒性效应

THE TOXIC EFFECT OF STREPTOMYCIN ON THE GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS OF *NOSTOC* USING THE CHLOROPHYLL FLUORESCENCE ANALYSIS
水生生物学报. 2019, 43(3): 664–669 <https://doi.org/10.7541/2019.079>

球等鞭金藻对氟苯尼考胁迫的响应研究

THE EFFECT OF FLORFENICOL ON THE GROWTH OF MICROALGAE *ISOCHRYSIS GALBANA*
水生生物学报. 2020, 44(6): 1278–1286 <https://doi.org/10.7541/2020.149>

金鱼藻对盐碱胁迫的生理响应研究

STUDY ON PHYSIOLOGICAL REACTION OF *CERATOPHYLLUM DEMERSUM* TO SALINITY AND ALKALINITY STRESS
水生生物学报. 2020, 44(1): 213–221 <https://doi.org/10.7541/2020.025>

共生与非共生爪哇伪枝藻对高温胁迫的响应

水生生物学报. 2017, 41(3): 671–676 <https://doi.org/10.7541/2017.85>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2023.0291

不同衣藻光合作用响应汞胁迫的比较研究

夏亦雪^{1,2} 艾晓寒^{1,2} 朱飞霞^{1,3} 毕永红¹

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023)

摘要: 为筛选耐受汞胁迫的衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)藻株, 研究不同衣藻光合作用过程响应汞胁迫的差异, 比较了不同汞浓度下11株衣藻的生长、叶绿素 a 含量及叶绿素荧光活性。结果表明, 随着汞离子浓度升高, 叶绿素 a 含量显著下降且生长受抑制, 叶绿素荧光活性参数 W_k 、 V_j 和 M_0 快速增加, ψ_0 和 ϕE_0 快速下降, 表明光合系统II (PS II)反应中心的供体侧和受体侧的电子传递受阻, 光合活性被抑制。在11株衣藻中, 衣藻FACHB-889 (EC_{50} 为0.762 mg/L)对汞耐受能力最弱, 衣藻FACHB-2217对汞耐受能力最强(EC_{50} 为2.848 mg/L)。与对照相比, 在低浓度汞(<0.5 mg/L)胁迫下, 衣藻FACHB-889 PS II活性显著降低($P<0.05$), 衣藻FACHB-2217光合系统II (PS II)活性无显著差异。在高浓度汞(>1.0 mg/L)胁迫下, 衣藻FACHB-889光合活性受抑制, 单位面积活性反应中心数量(RC/CS₀)显著下降($P<0.05$), 单位活性反应中心吸收的能量(ABS/RC)持续增加, 单位反应中心耗散的能量(DI₀/RC)和单位反应中心捕获的用于电子传递的能量(ET₀/RC)呈下降趋势, 表明吸收的能量不能被光合作用有效利用, 且无法通过热耗散释放, 导致能量的非正常积累, 使细胞失活甚至死亡; 衣藻FACHB-2217单位活性反应中心吸收的能量(ABS/RC)、用于还原Q_A的能量(TR₀/RC)及用于电子传递的能量(ET₀/RC)均显著升高, 细胞通过有活性的单位反应中心光合能力的增强, 有效转化吸收的能量, 消除部分反应中心失活的负面影响。研究表明, 光合活性及其能量分配的差异是衣藻对汞敏感/耐受的重要原因。

关键词: 汞; 光系统II; 毒性效应; 衣藻

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2024)06-1040-11



汞(Hg)容易在各种介质间迁移并进入食物链^[1], 因具有生物累积性、高毒性、持久性等导致其对生态系统和人类健康的高风险^[2-4]。中国是目前人为汞排放量最大的国家^[5], 淡水水体中平均汞含量达0.69 $\mu\text{g/L}$, 而在汞污染最严重的万山等地区, 水中汞含量可高达10.0 $\mu\text{g/L}$ ^[6]。汞对藻类叶绿素生物合成和细胞生长增殖具有抑制作用^[7, 8], 对光合系统具有毒性^[9-11]。汞影响光合系统II (PS II)和光合系统I (PS I)的活性, 并降低整个电子传递过程与效率^[12]。在汞胁迫下, PS I活性降低, 但汞对PS I的影响小于对PS II的影响^[13, 14]; 汞可与PS II供体侧和受体侧蛋白质中的硫醇基团强烈结合, 干扰其功能^[15]。藻细胞存在众多汞毒性效应的靶标位点, 尽

管汞对藻类的诸多毒性效应已经受到广泛关注和大量研究, 但有些藻株具有相对较高的耐受汞胁迫的能力; 这些耐受汞胁迫藻株耐受能力及其内在调控机制值得高度关注和重视。

衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是一种遗传背景清晰的模式生物, 具有培养条件简单、生长快、光合效率高特点, 有“绿色酵母”之称^[16, 17]。衣藻不同藻株的汞耐受能力存在显著差异, 为筛选高耐受的衣藻藻株, 本研究基于光合活性考察了淡水藻种库11种衣藻对汞的耐受性。利用叶绿素荧光技术对其在汞处理下电子传递过程及反应中心活性的动态变化进行了分析, 获取了耐受高浓度汞胁迫的衣藻藻株。本研究所获得的高耐受藻株可

收稿日期: 2023-09-14; 修订日期: 2023-11-16

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907402)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program (2020YFA0907402)]

作者简介: 夏亦雪(1999—), 女, 硕士研究生; 主要从事生态毒理学研究。E-mail: xiayixue@ihb.ac.cn

通信作者: 毕永红, E-mail: biyh@ihb.ac.cn

为深入认识生命耐受汞胁迫的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 藻种来源

衣藻FACHB-359 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、FACHB-52 (*Chlamydomonas microsphaera*)、FACHB-333 (*Chlamydomonas* sp.)、FACHB-889 (*Chlamydomonas* sp.)、FACHB-264 (*Chlamydomonas eugametos*)、FACHB-2081 (*Chlamydomonas noctigama*)、FACHB-1741 (*Chlamydomonas* sp.)、FACHB-2222 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、FACHB-2217 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、FACHB-2218 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、FACHB-2219 (*Chlamydomonas reinhardtii*)均来源于中国科学院淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, 简称 FACHB)

1.2 衣藻培养及汞的暴露处理

以TAP培养液和SE培养液按照1:1混合作为培养液, 培养液高温高压灭菌冷却到室温后分装到250 mL的锥形瓶, 每瓶分装150 mL; 藻液接种的初始浓度 $A_{680\text{ nm}}$ 为0.1。细胞在TAP+SE培养基生长到对数期, 在2500 r/min下离心3min收集藻细胞, 用无菌水清洗3次后, 分别接种到含不同汞浓度的锥形瓶中。

在上述培养液的基础上加入汞离子作为处理组, 结合地表水汞的排放标准及预试验结果, 设置汞离子浓度为0.005、0.05、0.5、1、2、4和8 mg/L, 以不添加汞的培养液为对照组。每个处理设置3个重复。将接种衣藻的锥形瓶放入培养箱中, 设置培养温度25℃, 光照强度(20±5) $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 在转速150 r/min的摇床上开展批次培养。随机变换锥形瓶位置以确保均匀受光, 试验时间为96h。

每天在固定时间段取样, 利用紫外分光光度计(UV-1780, Shimadzu)在680 nm处测定培养液的吸光度值, 每隔24h测一次。

1.3 衣藻对汞耐受性的评估

取藻液1 mL, 根据改进的 Lichtenthaler方法进行测定叶绿素 a 含量^[18, 19]。藻液12000 r/min离心3min, 弃上清, 用无菌水洗细胞2次后离心得到沉淀, 加入1 mL甲醇提取液和适量铅珠, 放入细胞冷冻破碎仪破碎; 将破碎的样品置于45℃水浴锅中避光孵育30min。12000 r/min离心3min, 取上清, 避光低温保存24h后采用紫外分光光度计(UV-1780, Shimadzu)测定藻细胞在666、653和470 nm处的吸光值。使用以下公式计算样品叶绿素 a 的含量: $\text{Chl.}a$ (mg/L)=15.65 A_{666} -7.34 A_{653} 。基于叶绿素 a 含量计算半数效应浓度(EC_{50}), EC_{50} 即每株衣藻

Chl. a 下降一半时的 Hg^{2+} 浓度, EC_{50} 通过Origin中的非线性回归(逻辑)建立值计算得出, 以 EC_{50} 作为评价小球藻对汞耐受性的定量指标。

1.4 叶绿素荧光活性的分析

汞离子处理24h的藻样采用便携式Aqua Pen仪器(AP-C 100, Darsov, 捷克)测量叶绿素荧光瞬变(称为OJIP曲线)。取2 mL藻液于比色皿中暗适应20min后, 使用红光作为测量灯, 将测量闪光脉冲设置为0.009 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 饱和脉冲为2100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光化光为400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。所选的JIP测试光合参数具体见文献^[20—22]。

1.5 统计分析

数据统计分析软件为SPSS 25.0 (IBM, USA), 相关曲线用软件Origin 2021进行拟合, 采用进行单因素方差分析(One-way ANOVA)检验处理组间的差异显著性, 显著性水平为0.05 ($P<0.05$)。

2 结果

2.1 生长情况

与对照组相比, 所有衣藻的生长趋势一致: 随着 Hg^{2+} 浓度增加及 Hg^{2+} 处理时间延长, 比生长速率下降, 部分处理中藻类细胞出现死亡。与对照组相比, 低浓度 Hg^{2+} (<0.05 mg/L)对细胞生长具有促进作用。高浓度 Hg^{2+} (>2 mg/L)处理条件下均出现生长被抑制甚至细胞死亡的现象, 尤其是4和8 mg/L Hg^{2+} 处理对生长具有显著抑制作用($P<0.05$; 图1)。

2.2 色素含量

与对照组相比, 随着 Hg^{2+} 浓度增加, 叶绿素 a 含量的变化趋势几乎一致。0.005和0.05 mg/L Hg^{2+} 处理组下的叶绿素 a 含量增加。当 Hg^{2+} 浓度大于1 mg/L时, 叶绿素 a 含量与对照组相比有显著下降($P<0.05$; 图2)。

经过24h暴露后, 叶绿素 a 含量均随着 Hg^{2+} 浓度的增加而显著下降($P<0.05$); 如图3所示, 其中, FACHB-2217对 Hg^{2+} 的耐受性最强, 其 EC_{50} 高达2.848 mg/L, FACHB-889对 Hg^{2+} 的耐受性最弱, 其 EC_{50} 仅为0.762 mg/L。衣藻对汞的耐受性(24h EC_{50} -Chl. a): FACHB-2217>FACHB-2218>FACHB-2219>FACHB-2222>FACHB-359>FACHB-333>FACHB-52>FACHB-1741>FACHB-2081>FACHB-264>FACHB-889。

2.3 Hg^{2+} 对叶绿素荧光诱导动力学曲线的影响

随着暴露时间延长, 低浓度处理组(<1 mg/L)的OJIP曲线没有显著变化, 其中衣藻FACHB-889藻株, 在 Hg^{2+} 浓度为1 mg/L时J、I点高于对照组。但高浓度处理组(Hg^{2+} 浓度为4和8 mg/L)所有衣藻的OJIP曲线几乎均为直线(图4)。

2.4 Hg^{2+} 对光系统II(PS II)受体侧和供体侧活性的影响

通过JIP测试计算了不同浓度 Hg^{2+} 处理组的衣藻的光合参数。如图5a所示,在低浓度处理组(Hg^{2+} 浓度小于0.05 mg/L) Hg^{2+} 剂量的增加而 W_k 无显著

影响($P>0.05$)。在高浓度处理组(Hg^{2+} 浓度大于2 mg/L) Hg^{2+} 剂量的增加导致 W_k 的增加($P<0.05$)。随着 Hg^{2+} 浓度增加, FACHB-889的 W_k 显著增加($P<0.05$),在 Hg^{2+} 浓度为0.5 mg/L时, FACHB-889的 W_k 显著增加($P<0.05$),在 Hg^{2+} 浓度为8 mg/L时, FACHB-889的

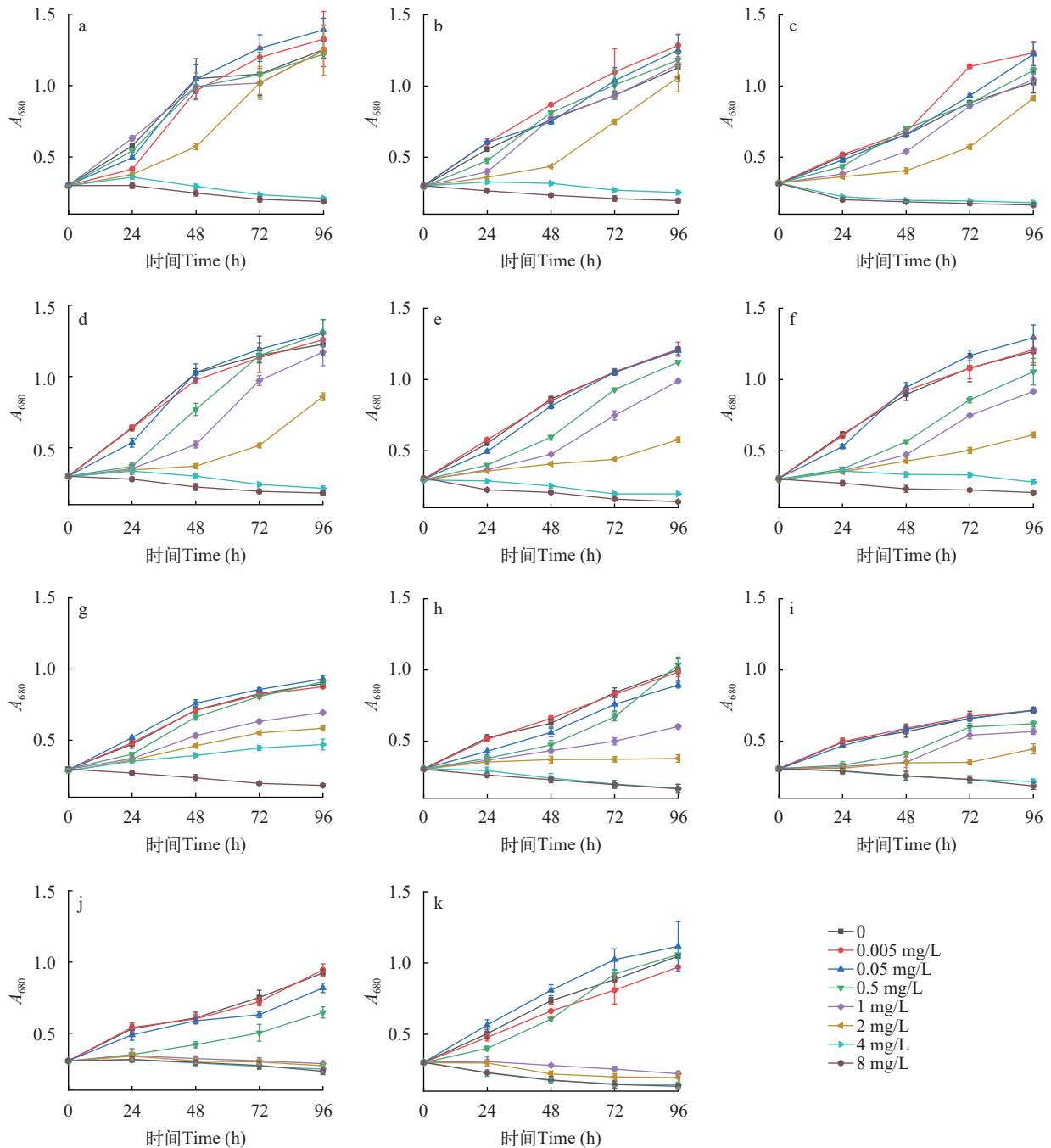


图1 不同浓度 Hg^{2+} 培养11种衣藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of 11 species of *Chlamydomonas* are cultured at different Hg^{2+} concentrations

a—k 分别代表 FACHB-2217、FACHB-2218、FACHB-2219、FACHB-2222、FACHB-359、FACHB-333、FACHB-52、FACHB-1741、FACHB-2081、FACHB-264 和 FACHB-889; 对于所有图, 数据点代表每个独立培养物的3个重复实验的平均值; 下同
a—k stands for FACHB-2217, FACHB-2218, FACHB-2219, FACHB-2222, FACHB-359, FACHB-333, FACHB-52, FACHB-1741, FACHB-2081, FACHB-264, and FACHB-889 respectively; For all plots, the data points represent the average of the three replicates for each independent culture; the same applies below

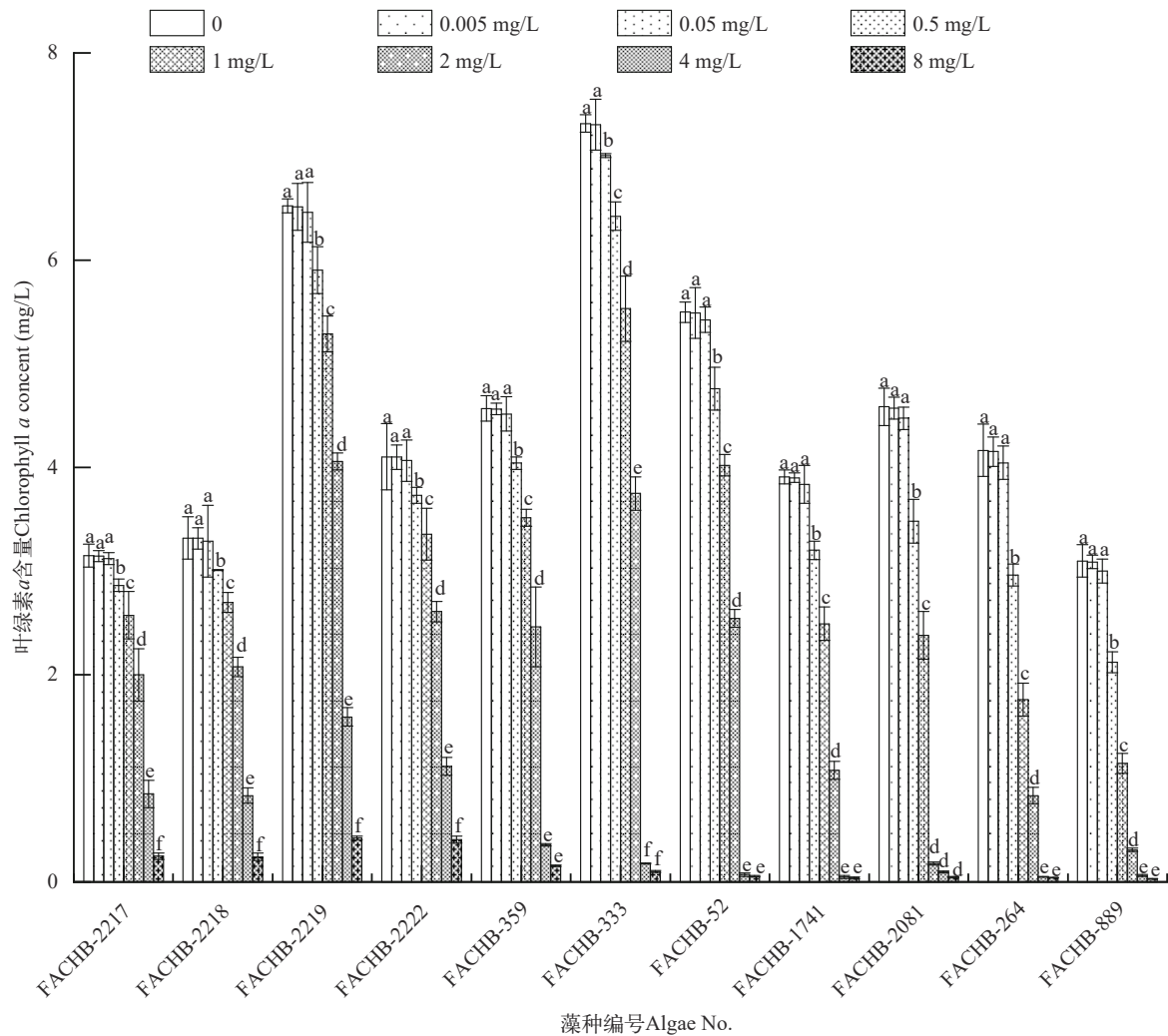


图2 不同浓度 Hg^{2+} 胁迫下衣藻叶绿素a含量的变化

Fig. 2 Changes in chlorophyll a content under different concentrations of Hg^{2+} stress

字母不同表示同一时间各实验组之间差异显著; 下同

Values with the same letters are not significantly different at the same time; the same applies below

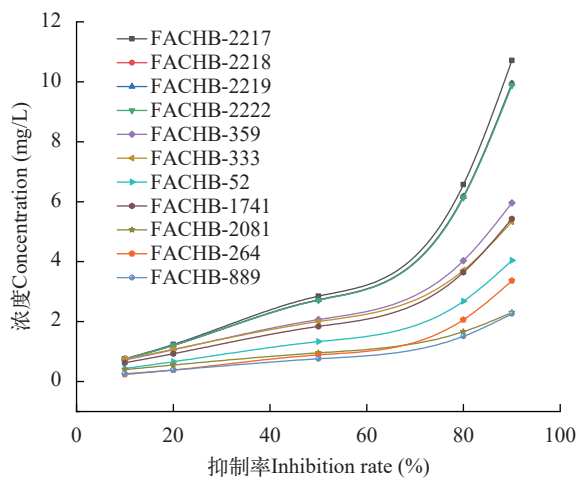


图3 不同浓度 Hg^{2+} 中培养的11种衣藻抑制率的变化

Fig. 3 Changes in inhibition rates of 11 species of *Chlamydomonas* cultured at different Hg^{2+} concentrations

W_k 增加为对照组的449倍。

如图5所示, 在低浓度处理组(Hg^{2+} 浓度小于0.05 mg/L) Hg^{2+} 剂量的增加而 V_j 和 M_0 无显著影响($P>0.05$)。在高浓度处理组(Hg^{2+} 浓度大于2 mg/L) Hg^{2+} 剂量的增加而导致 V_j 和 M_0 的显著增加($P<0.05$)。在 Hg^{2+} 为0.005和0.05 mg/L时, ψ_0 和 ΦE_0 无显著变化($P>0.05$), 而 ψ_0 和 ΦE_0 随着 Hg^{2+} 剂量的增加而呈下降趋势($P<0.05$)。

2.5 Hg^{2+} 对光合能量分配的影响

在不同浓度 Hg^{2+} 处理24h后, 衣藻单位面积的能量参数发生了不同变化。与对照组相比, 在 Hg^{2+} 浓度 >1 mg/L处理组中, FACHB-2217单位面积活性反应中心数量(RC/ CS_0), 单位受光截面吸收的能量(ABS/CS_m), 单位受光截面捕获用于电子传递的能量(ET_0/CS_m), 单位受光截面捕获用于还原 Q_A 的能

量(TR_o/CS_m)及单位受光截面耗散的能量(DI_o/CS_m)呈现显著下降的趋势($P<0.05$),在 Hg^{2+} 浓度为2 mg/L时, ABS/CS_m 、 ET_o/CS_m 、 TR_o/CS_m 、 DI_o/CS_m 分别降低至对照组的95.5%、94.7%、96.1%和96.8% ($P<0.05$)。就FACHB-889而言, ABS/CS_m 、 ET_o/CS_m 、 TR_o/CS_m 、 DI_o/CS_m 在 $Hg^{2+}<0.5$ mg/L处理组中变化不明显。在1 mg/L Hg^{2+} 处理组中, RC/CS_o 、 ABS/CS_m 、 ET_o/CS_m 、 TR_o/CS_m 、 DI_o/CS_m 分别只有对照组的

的13.2%、19.2%、14.3%、13.3%和37.8% ($P<0.05$),并随处理浓度增加呈显著下降趋势(图6和表1)。

衣藻PS II单位活性反应中心的比活性参数呈现出随 Hg^{2+} 浓度增加而升高的趋势。就FACHB-2217而言,与对照组相比,2 mg/L的处理组中,单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)、单位反应中心捕获的用于电子传递的能量(ET_o/RC)、单位反应中心捕获的用于还原 Q_A 能量(TR_o/RC)及单位反应中

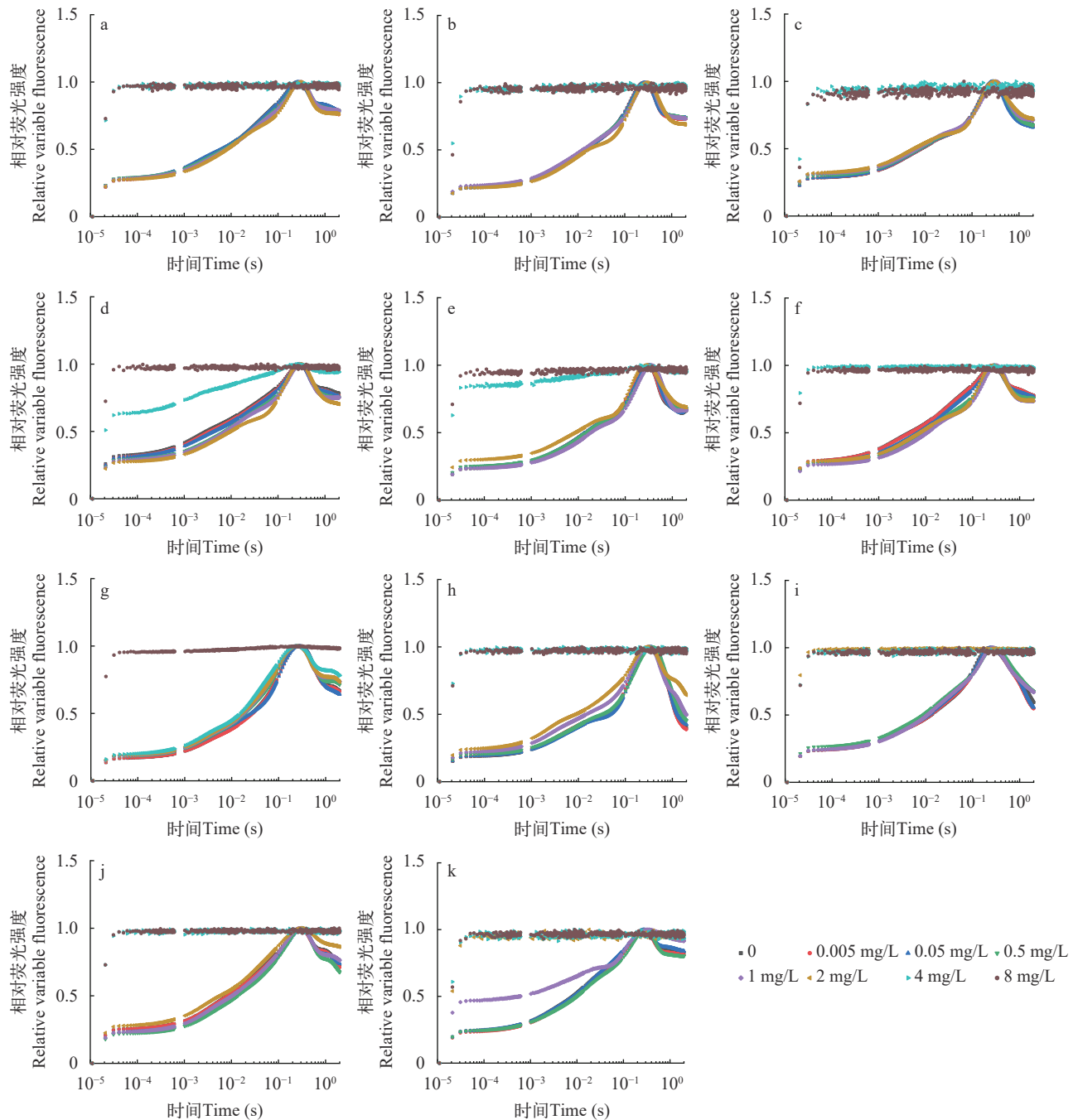


图4 不同浓度 Hg^{2+} 中培养的11种衣藻叶绿素荧光动力学曲线

Fig. 4 Fast fluorescence transient curves of 11 *Chlamydomonas* cultured at different Hg^{2+} concentrations

a—k. FACHB-2217, FACHB-2218, FACHB-2219, FACHB-2222, FACHB-359, FACHB-333, FACHB-52, FACHB-1741, FACHB-2081, FACHB-264和FACHB-889

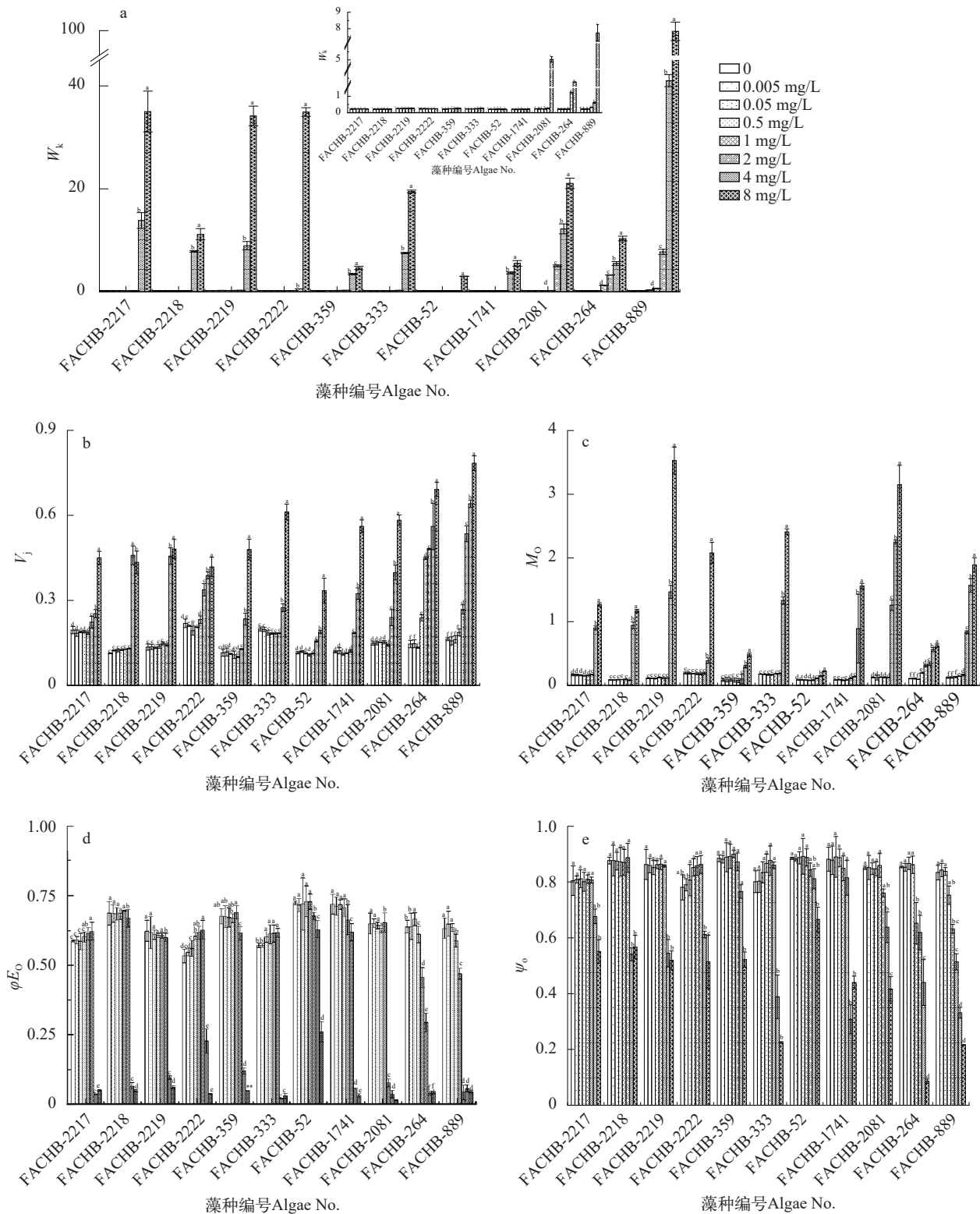


图5 不同 Hg^{2+} 浓度暴露后PSII供体侧和PSII受体侧光合参数的变化

Fig. 5 Changes in photosynthetic parameters on the PSII donor side and PSII receptor side after exposure at different Hg^{2+} concentrations a代表供体侧的光合活性; b—e均代表受体侧的光合活性; W_k 表示PSII中的OEC的状态; V_j 表示 Q_A^- 积累和再氧化的速率; M_o 表示 Q_A^- 的还原速率; ϕE_o 表示吸收的能量用于电子传递的量子产额; ψ_o 表示反应中心捕获的光能用于 Q_A^- 下游电子传递的量子产额

a indicates the donor-side photosynthetic activity; b-e indicates the acceptor-side photosynthetic activity; W_k indicates the state of the OEC in PSII; V_j indicates the accumulation and reoxidation rate of Q_A^- ; M_o indicates the rate of reduction of Q_A^- ; ϕE_o indicates the quantum yield of absorbed energy for electron transfer; ψ_o indicates the quantum yield of light energy captured by the reaction center for Q_A^- downstream electron transfer

心耗散的能量 (DI_o/RC)显著增加($P<0.05$); 在4和8 mg/L 处理组中, ABS/RC 、 ET_o/RC 、 TR_o/RC 、 DI_o/RC 显著增加($P<0.05$)。就FACHB-889而言, 在 Hg^{2+} 浓度 <1 mg/L处理组中, ABS/RC 、 ET_o/RC 、 TR_o/RC 、 DI_o/RC 随着 Hg^{2+} 浓度的增加而增大; 在 Hg^{2+} 浓度 >1 mg/L处理组中, ABS/RC 随着 Hg^{2+} 浓度的增加而增大, 而 TR_o/RC 、 DI_o/RC 且随着 Hg^{2+} 浓度的增加表现为显著的减小($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 Hg^{2+} 对衣藻生长的影响

汞对藻类的毒性效应一般表现为低浓促进高浓度抑制的现象^[23]。本研究测定了11种衣藻对汞的耐受性, 可分为三类: 良好的耐受性(FACHB-2217、2218、2219和2222)、中等的耐受性(FACHB-

359、333、52和1741)和较差的耐受性(FACHB-2081、264和889)。汞毒性在不同藻株间差异很大。本研究发现, Hg^{2+} 浓度小于1 mg/L时, 对衣藻的毒害效应较小, 在0.005和0.05 mg/L Hg^{2+} 时 A_{680} 略高于对照组, 表明衣藻对低浓度的汞具有一定的耐受性, 同时也表明低浓度的汞对衣藻的生长具有一定的促进作用。当暴露浓度为4 和8 mg/L时, 衣藻的 A_{680} 显著减少, 表明生长受到抑制。陶虎春等对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarens*)和锥状斯式藻(*Scrippsiella trochoidea*)以及王文欣对集球藻(*Palmellococcus* sp.)的汞毒性效应研究都表明了高浓度 Hg^{2+} 对藻类生长具有抑制作用^[24, 25]。流式细胞术测量细胞活力并模拟特定生长速率的结果发现汞减少海洋硅藻种群增长的主要原因是受损或死细胞数量的增加^[26]。衣藻叶绿素a与藻类的生

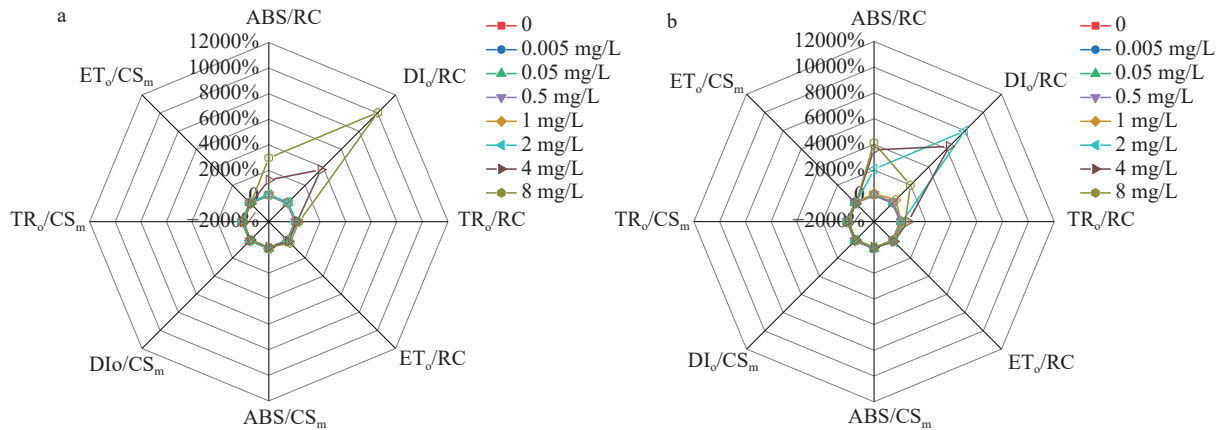


图6 不同 Hg^{2+} 浓度对衣藻比活性能量参数的影响

Fig. 6 Effect of different Hg^{2+} concentrations on specific activity energy parameters of *Chlamydomonas*

a和b分别代表FACHB-2217和FACHB-889; ABS/RC 表示单位反应中心吸收的光能; DI_o/RC 表示单位反应中心耗散的能量; TR_o/RC 表示单位反应中心捕获的用于还原 Q_A 的能量; ET_o/RC 表示单位反应中心捕获的用于电子传递的能量; ABS/CS_m 表示单位受光截面吸收的能量; DI_o/CS_m 表示单位受光截面耗散的能量; TR_o/CS_m 表示单位受光截面捕获用于还原 Q_A 的能量; ET_o/CS_m 表示单位受光截面捕获用于电子传递的能量

a and b represent FACHB-2217 and FACHB-889, respectively; ABS/RC indicates the light energy absorbed per reaction center; DI_o/RC indicates the energy dissipated per reaction center; TR_o/RC indicates the energy captured per reaction center for the reduction of Q_A ; ET_o/RC indicates the energy captured per unit reaction center for electron transfer; ABS/CS_m indicates the energy absorbed per unit of light receiving cross section; DI_o/CS_m indicates the energy dissipated per unit of light received cross section; TR_o/CS_m indicates the energy captured per unit light-receiving cross section for Q_A reduction; ET_o/CS_m indicates the energy captured for electron transfer per unit light-receiving cross section

表1 不同 Hg^{2+} 浓度暴露后反应中心密度的变化

Tab. 1 Changes in reaction center density after exposure at different Hg^{2+} concentrations (RC/CS_o)

藻种编号 Algae number	浓度 Concentration (mg/L)							
	0	0.005	0.05	0.5	1	2	4	8
FACHB-2217	23021.119±232.537 ^a	22133.969±470.998 ^a	21924.927±259.492 ^a	21835.076±525.614 ^a	21421.918±467.696 ^a	16466.723±2326.579 ^b	14.183±1.163 ^c	10.115±2.84 ^c
FACHB-889	20117.67±311.455 ^a	20041.95±2229.019 ^a	20544.755±199.27 ^b	20563.941±143.53 ^b	2654.183±203.988 ^c	24.788±2.113 ^d	20.38±0.189 ^d	15.295±2.039 ^d

注: 表中数据为3个重复的平均值; 同一行相同右上角含有相同英文上标字母或无上标表示差异不显著 ($P\geq 0.05$); 下同

Note: Data are means of triplicates. Means in each bar sharing the same superscript letter or absence of superscripts are not significantly different determined by Tukey's test ($P\geq 0.05$), the same applies below

长有关,当暴露浓度高于1 mg/L时,叶绿素 a 的含量随汞浓度增加而逐渐下降^[27]。这意味着 Hg^{2+} 暴露对藻类叶绿素合成的抑制。可见,高浓度的汞胁迫会直接影响藻类的生长。另一方面,对汞耐受性高的藻类在生长初期不受影响。

3.2 Hg^{2+} 对衣藻光系统II供体侧和受体侧的影响

汞通过抑制光合作用等,对藻类产生毒性效应^[28,29]。快速荧光动力学曲线(OJIP)是用来检测电子传递、PS II作用中心以及受体侧和供体侧活性的常用手段^[30,31]。汞对藻类光合系统具有毒性效应,PS II被发现是汞离子的主要作用部位^[32]。本研究发现,随着汞浓度增加,J点的相对可变荧光强度(V_j)随之上升,表明电子在 Q_A^- 大量积累,证明重金属汞可抑制 Q_A^- 到 Q_B 的电子传递。暴露于4和8 mg/L的 Hg^{2+} 后,衣藻OJIP曲线的J、I和P点几乎消失,表明高剂量 Hg^{2+} 严重破坏了藻类PS II的线性电子传递链。 W_k 反映PS II中的放氧复合体(OEC)状态, W_k 数值升高说明OEC受到损伤^[33,34]。本研究结果表明, Hg^{2+} 处理导致 W_k 升高,OEC遭到损害。OEC损伤导致没有足够的电子从供体侧转移到PS II反应中心,最终会导致电子在P680的积累^[35]。不仅供体侧,PS II的受体侧也受到汞胁迫的影响。 V_j 数值的增大表示 Q_A^- 的大量积累^[36,37], ϕE_0 数值的减少反映了PS II中电子传递受到抑制^[38]。 M_0 反映RC的闭合率^[39]。 ψ_0 表示捕获激子将电子传递到电子传递链中超过 Q_A^- 的其他电子受体的概率^[40]。汞处理后供体侧 W_k 的增加,受体侧 V_j 和 M_0 的快速增加以及 ψ_0 和 ϕE_0 的快速降低,确认了 Q_A^- 到 Q_B 的电子传输受阻^[41],显示汞胁迫破坏了OEC,使得 Q_A^- 到 Q_B 的电子传输受阻。

暴露于高浓度处理组(Hg^{2+} 浓度为4和8 mg/L)时,具有良好耐受性衣藻(FACHB-2217、2218、2219和2222)的 W_k 才极显著增加($P<0.01$)。具有较差耐受性衣藻(FACHB-2081、264和889)的 W_k 在 Hg^{2+} 浓度为1 mg/L时就已极显著增加($P<0.01$)。对于PS II反应中心的受体侧,在暴露于低浓度处理组(Hg^{2+} 浓度为1 mg/L)时,具有较差耐受性衣藻(FACHB-2081、264和889)的 V_j 和 M_0 极显著增加以及 ψ_0 和 ϕE_0 的极显著降低($P<0.01$),但具有良好耐受性衣藻(FACHB-2217、2218、2219和2222)的 V_j 、 M_0 、 ψ_0 和 ϕE_0 在此浓度中保持稳定。具有良好耐受性衣藻(FACHB-2217、2218和2219)的 V_j 和 M_0 在 Hg^{2+} 浓度为4和8 mg/L时才极显著增加($P<0.01$),且 ψ_0 和 ϕE_0 极显著降低($P<0.01$)。这些研究结果表明细胞对汞胁迫的耐受性主要表现为PS II反应中心的耐受性。

3.3 Hg^{2+} 对光合能量分配的影响

进一步比较分析光合能量分配策略。在正常情况下,ABS/ CS_m 、 ET_0/CS_m 、 TR_0/CS_m 和 DI_0/CS_m 能量分配比较稳定,没有大幅度的变化^[42]。两株藻光合能量分配的共性,在本研究中,2 mg/L处理组中衣藻单位面积藻体的RC/ CS_0 、ABS/ CS_m 、 ET_0/CS_m 、 TR_0/CS_m 和 DI_0/CS_m 都出现了显著下降,而衣藻单位反应中心的ABS/RC、 ET_0/RC 、 TR_0/RC 和 DI_0/RC 都出现了显著增加。单位面积的能量参数均显著下降表明较高浓度 Hg^{2+} 使单位面积活性反应中心数量下降、影响了单位藻体面积上吸收光能的能力,导致捕获用于还原 Q_A 的光能减少,使捕获用于电子传递光能的能力减弱,用于光化学反应的能量减少,影响藻体的光合作用,结果表现为生长受到抑制。单位活性反应中心的比活性参数均显著增加表明衣藻PS II有活性反应中心部分失活或者降解,为了适应不利条件,藻细胞尽可能提升剩余有活性的反应中心活性及其功能,这个结果与夏建荣和邹定辉^[43]对大型海藻和夏亦雪等^[44]对雪衣藻的研究结果相类似。

另一方面,随着 Hg^{2+} 浓度增加(>1 mg/L),细胞单位面积活性反应中心数量显著下降^[39]。本研究发现,在1 mg/L处理组,FACHB-2217的PS II能量分配比较稳定,单位面积活性反应中心数量没有大幅度变化,而表征单位面积FACHB-889光合活性的RC/ CS_0 、ABS/ CS_m 、 ET_0/CS_m 、 TR_0/CS_m 和 DI_0/CS_m 均显著降低,单位活性反应中心吸收的能量(ABS/RC)和单位活性反应中心的热耗散(DI_0/RC)均显著增加,FACHB-889在低汞处理中虽单位面积活性反应中心数量下降表明FACHB-889比FACHB-2217对汞浓度变化更敏感,但FACHB-889可通过调整其光合能量分配策略,使剩余有活性反应中心的功能增强,减轻过剩光能对光系统伤害。高汞浓度(>1 mg/L)处理组中,FACHB-889单位面积活性反应中心数量(RC/ CS_0)下降,单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)增加、单位反应中心耗散的能量(DI_0/RC)和单位反应中心捕获的用于电子传递的能量(ET_0/RC)呈下降趋势,表明FACHB-889在较高 Hg^{2+} 浓度处理下,光合能量分配失衡,多余的能量无法通过热耗散释放出去,导致细胞生长受抑制甚至死亡。对于FACHB-2217而言,随着汞浓度增加,单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)增加的同时,单位反应中心耗散的能量(DI_0/RC)也表现出极显著增大,同时单位反应中心捕获的用于还原 Q_A 的能量(TR_0/RC)也显著增加,表明FACHB-2217衣藻为了应对高汞毒害,剩余有活性的反应中心耗散的能量增强,这与梁英

等^[45]对塔胞藻的研究结果相似。可见,在汞胁迫伤害藻细胞光合系统的情况下,通过调整光合能量分配以减少摄取的过多能量对细胞的损伤,是衣藻响应汞胁迫的共同特性;但这种调控能力显示出,莱茵衣藻FACHB-2217调节能力强,耐受汞胁迫的浓度高,FACHB-889调节能力弱,耐受胁迫的浓度低。

低浓度 Hg^{2+} (小于0.5 mg/L)对衣藻生长及叶绿素 a 含量没有显著影响,浓度大于1 mg/L Hg^{2+} 使衣藻叶绿素 a 的含量显著下降,光合作用降低。汞胁迫影响衣藻细胞PS II反应中心的供体侧和受体侧的电子传输,莱茵衣藻FACHB-2217通过调整其光合能量分配策略来提高剩余反应中心的效率以保证能够在逆境中的存活,莱茵衣藻FACHB-889捕获的光能因光合作用无法用掉这些能量而导致能量的非正常积累和电子传递的阻断,导致藻细胞生长受到抑制。

参考文献:

- [1] Farhan A, Zulfikar M, Samiah R, et al. Removal of toxic metals from water by nanocomposites through advanced remediation processes and photocatalytic oxidation [J]. *Current Pollution Reports*, 2023(9): 338-358.
- [2] Douglas T A, Loseto L L, Macdonald R W, et al. The fate of mercury in Arctic terrestrial and aquatic ecosystems, a review [J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 9(4): 321-355.
- [3] Mergler D. Ecosystem approaches to mercury and human health: a way toward the future [J]. *Ambio*, 2021, 50(3): 527-531.
- [4] So S C A, Tsoi M F, Cheung A J, et al. Blood and urine inorganic and organic mercury levels in the united states from 1999 to 2016 [J]. *American Journal of Medicine*, 2021, 134(1): 20-30.
- [5] Futsaeter G, Wilson S. 2013. The UNEP global mercury assessment: sources, emissions and transport [J]. *E3S Web of Conferences*, 2013(1): 36001.
- [6] Lin Y, Vogt R, Larssen T. Environmental mercury in China: a review [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2012, 31(11): 2431-2444.
- [7] Mao Y, Liu W, Yang X, et al. *Syntrichia caninervis* adapt to mercury stress by altering submicrostructure and physiological properties in the Gurbantünggüt Desert [J]. *Scientific Reports*, 2022(12): 11717.
- [8] Ibrahim M, Nawaz S, Iqbal K, et al. Plant-derived smoke solution alleviates cellular oxidative stress caused by arsenic and mercury by modulating the cellular antioxidative defense system in wheat [J]. *Plants*, 2022, 11(10): 1379.
- [9] Asztalos E, Sipka G, Kis M, et al. The reaction center is the sensitive target of the mercury (II) ion in intact cells of photosynthetic bacteria [J]. *Photosynthesis Research*, 2012, 112(2): 129-140.
- [10] De Filippis L F, Hampp R, Ziegler H. The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on euglena. growth and pigments [J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1981, 101(1): 37-47.
- [11] Murthy S D S, Mohanty P. Mercury ions inhibit photosynthetic electron transport at multiple sites in the cyanobacterium *Synechococcus 6301* [J]. *Journal of Biosciences*, 1993, 18(3): 355-360.
- [12] Clijsters H, Van Assche F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals [J]. *Photosynthesis Research*, 1985, 7(1): 31-40.
- [13] Deng C, Zhang D, Pan X, et al. Toxic effects of mercury on PSI and PSII activities, membrane potential and transthylakoid proton gradient in *Microsorium pteropus* [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013(127): 1-7.
- [14] Singh R, Dubey G, Singh V P, et al. High light intensity augments mercury toxicity in cyanobacterium *Nostoc muscorum* [J]. *Biological Trace Element Research*, 2012, 149(2): 262-272.
- [15] Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma, et al. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 52(3): 199-223.
- [16] Hooper J K. The *Chlamydomonas* sourcebook [J]. *Science*, 1989, 246(4936): 1503-1504.
- [17] Xie C X, Han W, Yu Z L. Progress of *Chlamydomonas* as a model organism [J]. *Hereditas*, 2003, 25(3): 350-354. [谢传晓, 韩伟, 余增亮. 模式生物衣藻及其研究进展 [J]. *遗传*, 2003, 25(3): 350-354.]
- [18] Lichtenthaler H K, Wellburn A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents [J]. *Biochemical Society Transactions*, 1983, 11(5): 591-592.
- [19] Lu N, Wei D, Jiang X L, et al. Fatty acids profiling and biomarker identification in snow alga *Chlamydomonas nivalis* by NaCl stress using GC/MS and multivariate statistical analysis [J]. *Analytical Letters*, 2012, 45(10): 1172-1183.
- [20] Strasser R, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples [J]. *Probing Photosynthesis Mechanisms Regulation and Adaptation*, 2000(25): 445-483.
- [21] Strasser R J, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient [M]. *Chlorophyll a Fluorescence*. Dordrecht: Springer, 2004: 321-362.
- [22] Chen K, Chen L, Fan J, et al. Alleviation of heat damage to photosystem II by nitric oxide in tall fescue [J]. *Photosynthesis Research*, 2013, 116(1): 21-31.

- [23] Liu L, Yan H, Xia W T, *et al.* Toxic effect of cadmium on *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus* [J]. *China Environmental Science*, 2014, **34**(2): 478-484. [刘璐, 闫浩, 夏文彤, 等. 镉对铜绿微囊藻和斜生栅藻的毒性效应 [J]. 中国环境科学, 2014, **34**(2): 478-484.]
- [24] Tao H C, Yang S, Ding L Y, *et al.* Study on the effect of two red-tide algae on mercury biocondensation and methylation [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2019, **55**(4): 709-716. [陶虎春, 阳赛, 丁凌云, 等. 两种赤潮藻对汞富集和甲基化影响的研究 [J]. 北京大学学报(自然科学版), 2019, **55**(4): 709-716.]
- [25] Wang W X, Rao B Q. Study on the physiological and biochemical properties of *Palmellococcus* sp. subjected to Hg^{2+} stress in laboratory condition [J]. *Journal of Xinyang Agricultural College*, 2012, **22**(3): 92-96. [王文欣, 饶本强. 实验室条件下 Hg^{2+} 胁迫对集球藻生理生化特性的影响 [J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2012, **22**(3): 92-96.]
- [26] Wu Y, Zeng Y, Qu J A Y, *et al.* Mercury effects on *Thalassiosira weissflogii*: applications of two-photon excitation chlorophyll fluorescence lifetime imaging and flow cytometry [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(110/111): 133-140.
- [27] Nowicka B, Pluciński B, Kuczyńska P, *et al.* Physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to chronic stress induced by Ag, Cd, Cr, Cu and Hg ions [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016(130): 133-145.
- [28] Wu Y, Wang W X. Differential acclimation of a marine diatom to inorganic mercury and methylmercury exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013(138/139): 52-59.
- [29] Jamla M, Khare T, Joshi S, *et al.* Omics approaches for understanding heavy metal responses and tolerance in plants [J]. *Current Plant Biology*, 2021(27): 100-213.
- [30] Zushi K, Kajiwarra S, Matsuzoe N. Chlorophyll *a* fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012(148): 39-46.
- [31] Strasser R J, Tsimilli-Michael M, Qiang S, *et al.* Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2010, **1797**(6/7): 1313-1326.
- [32] Rai L C, Singh A K, Mallick N. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1991, **137**(4): 419-424.
- [33] Zhang X, Ma F, Zhu X, *et al.* The acceptor side of photosystem II is the initial target of nitrite stress in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, **83**(3): 2916-2952.
- [34] Che X, Ding R, Li Y, *et al.* Mechanism of long-term toxicity of CuO NPs to microalgae [J]. *Nanotoxicology*, 2018, **12**(8): 923-939.
- [35] Hakala M, Tuominen I, Keränen M, *et al.* Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2005, **1706**(1/2): 68-80.
- [36] Strasser B J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients [J]. *Photosynthesis Research*, 1997, **52**(2): 147-155.
- [37] Xia J, Li Y, Zou D. Effects of salinity stress on PS II in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements [J]. *Aquatic Botany*, 2004, **80**(2): 129-137.
- [38] Pan X, Deng C, Zhang D, *et al.* Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of *in vivo* chlorophyll fluorescence tests [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, **89**(4): 207-213.
- [39] Xu P P, Tu X J, Cheng F F, *et al.* Toxic effects of gentamicin on growth and activity of photosynthetic system II of *Scenedesmus obliquus* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, **44**(8): 146-153. [许萍萍, 涂晓杰, 成凤凤, 等. 庆大霉素对斜生栅藻生长与光合活性的影响 [J]. 环境科学与技术, 2021, **44**(8): 146-153.]
- [40] Ralph P J, Gademann R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity [J]. *Aquatic Botany*, 2005, **82**(3): 222-237.
- [41] Deblois C P, Dufresne K, Juneau P. Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013(126): 77-84.
- [42] Platt T, Gallegos C L, Harrison W G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine-phytoplankton [J]. *Journal of Marine Research*, 1980, **38**(4): 687-701.
- [43] Xia J R, Zhou D H. Assessing the effect of drying out on *Ulva lactuca* photosystem II using OJIP chlorophyll *a* fluorescence (*Ulva lactuca*) photosystem II using OJIP chlorophyll *a* fluorescence assessment [J]. *Marine Science Bulletin*, 2007, **149**(4): 50-55. [夏建荣, 邹定辉. 利用 OJIP 叶绿素 *a* 荧光评估干出对石莼 (*Ulva lactuca*) 光系统 II 的影响 [J]. 海洋通报, 2007, **149**(4): 50-55.]
- [44] Xia Y X, Xu P P, Ruan G, *et al.* Toxic effects of mercury on photosynthetic system II and energy allocation in *Chlamydomonas nivalis* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2023, **18**(3): 388-397. [夏亦雪, 许萍萍, 阮港, 等. 汞对雪衣藻光合系统 II 及能量分配的影响 [J]. 生态毒理学学报, 2023, **18**(3): 388-397.]
- [45] Liang Y, Feng L X, Tian C Y, *et al.* Effects of salt stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Pyramidomonas* sp [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, **36**(5): 726-732. [梁英, 冯力霞, 田传远, 等. 盐胁迫对塔胞藻生长及叶绿素荧光动力学的影响 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, **36**(5): 726-732.]

COMPARATIVE OF PHOTOSYNTHESIS OF DIFFERENT *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* IN RESPONSE TO MERCURY STRESS

XIA Yi-Xue^{1,2}, AI Xiao-Han^{1,2}, ZHU Fei-Xia^{1,3} and BI Yong-Hong¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Fisheries & Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: Algal growth and photosynthesis are susceptible to Hg stress. To screen for Hg-tolerant *Chlamydomonas reinhardtii* strains, the growth, chlorophyll a content, and chlorophyll fluorescence activity of 11 *Chlamydomonas reinhardtii* strains were compared at different Hg concentrations. The results showed a significant decrease in chlorophyll a content and inhibited growth as mercury ion concentration increased. Parameters such as V_j and M_o increased rapidly, while ψ_o and ϕE_o decreased rapidly. It indicated a disruption in the electron transfer between the donor and acceptor side of the photosynthesis system II (PS II) reaction center, leading to inhibition of photosynthetic activity. Among the 11 *Chlamydomonas reinhardtii* strains, *Chlamydomonas reinhardtii* FACHB-889 displayed the lowest tolerance to Hg (EC₅₀ of 0.762 mg/L), whereas *Chlamydomonas reinhardtii* FACHB-2217 demonstrated the highest tolerance (EC₅₀ of 2.848 mg/L). Under low mercury concentration stress (<0.5 mg/L), PS II activity of *Chlamydomonas reinhardtii* FACHB-889 was significantly reduced compared to the control ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the activity of photosynthetic system II (PS II) of *Chlamydomonas reinhardtii* FACHB-2217. Under high mercury concentration stress (>1.0 mg/L), *Chlamydomonas reinhardtii* FACHB-889 inhibited photosynthetic activity, with a notable decrease in the number of active reaction centers per unit area ($P < 0.05$). This resulted in the inefficient utilization of absorbed energy by photosynthesis, leading to abnormal energy accumulation and cell inactivation or death. In contrast, *Chlamydomonas reinhardtii* FACHB-2217 showed a significant increase in energy absorbed (ABS/RC), energy used for Q_A reduction (TR_o/RC), and energy used for electron transfer (ET_o/RC) in the active unit reaction centers (URCs), and the cells were able to efficiently convert the absorbed energy through the increased photosynthetic capacity of active URCs, energy and eliminating the negative effects of partial reaction center inactivation. The study suggests that differences in photosynthetic activity and energy partitioning are important factors in the sensitivity/tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to Hg.

Key words: Mercury; Photosystem II; Toxic effects; *Chlamydomonas reinhardtii*