

小球藻表面疏水性的研究^{*}

罗岳平^{**} 马剑敏 李益健 严国安

(武汉大学环境科学系 武汉 430072)

摘 要 用烃-水两相体系对小球藻的表面疏水性及其随环境条件变化进行探讨的结果表明,二甲苯-水两相体系适于用来研究小球藻的表面疏水性.受培养时间,光照条件和温度、营养条件, $c(\text{Hg}^{2+})$ 和 $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)$ 等环境污染物胁迫的影响,小球藻的表面疏水性发生性质不同的变化.对小球藻表面疏水性发生变化的物质基础及其生态学意义进行了讨论.

关键词 小球藻;疏水性;相体系;生态意义

中图法分类号 Q949.217.08

STUDY ON THE SURFACE HYDROPHOBICITY OF *CHLORELLA VULGARIS*

LUO Yueping, MA Jianmin, LI Yijian & YAN Guoan

(Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Hydrophobicity is one of the most important surface properties of algal cells. The surface hydrophobicity of *C. vulgaris* and its changes with variation of environmental conditions were studied using hydrocarbon-water two-phase system. The results showed that the xylene-water two-phase system was suitable for studying the surface hydrophobicity of *C. vulgaris*. Under the influences of growth phase, light, temperature, nutrient supply, $c(\text{Hg}^{2+})$ and $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)$, the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* was changed remarkably. The material base and ecological significance of those changes are also discussed in this paper.

Keywords *Chlorella vulgaris*; hydrophobicity; phase system; ecological significance

疏水性是决定细菌和藻类非特异性粘附到各种生物和非生物表面及界面的最重要动力之一^[1,2,3],也是影响细菌和藻类吸收疏水性有机化合物^[4],浮游动物选择性滤食细菌和藻类等的因素^[5].因此,研究细菌和藻类表面疏水性及其随环境条件的变化具有重要的生态学意义.自 Mudd 1924 年首次报道细菌的疏水现象并探讨其与吞噬作用的相互关系以来,有关细菌表面疏水性的研究方法不断发展和成熟,人们对细菌表面疏水性的认识也逐渐深入^[6].但在水生态系统中,藻类虽与细菌同为重要的生物组成,其表面疏水性的研究却一直得不到足够的重视.本文就此进行一些有益尝试.

1 材料和方法

1.1 小球藻的培养和收集

小球藻(*Chlorella vulgaris*)藻种由中国科学院水生生物研究所藻种室提供.选用水生4号培养基^[1].在 $E = 2\,400\text{ lx}$, $\theta = 24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温光照培养箱内进行24 h连续光照培养.一般在小球藻生长到对数增长末期稳定初期后离心收集($3\,500\text{ r/min} \times 10\text{ min}$),用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液($c = 0.2\text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$)稀释藻细胞,使细胞浓度(n)达到 $5 \times 10^6\text{ mL}^{-1}$ 后实验.

收稿日期:1998-12-01 接受日期:1999-02-10

* 国家自然科学基金(No:39570144)资助项目

** 现在长沙市自来水公司工作,长沙,410007

1.2 测定细胞表面疏水性

参照 Rosenberg 等(1980)介绍的方法^[8], 选用 $d = 10$ mm 的圆底试管, 于管内加入 4 mL 藻液后按 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 mL 的梯度加正辛醇和二甲苯, 用玻璃小塞封口, 室温 ($\theta = 20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) 下剧烈振荡 2 min, 静置 20 min 使两相完全分离。

藻细胞在相分离过程中发生疏水分配。根据下相水溶液中藻细胞的数量减少, 确定细胞的表面疏水性。以光密度值 $D(650\text{ nm})$ 表示藻细胞数量。用注射针头吸取下相水溶液, 在国产 721 型分光光度计上测定。每个实验重复 3 次。由公式计算疏水分配值 " $H = [D_o(650\text{ nm}) - D_i(650\text{ nm})] / D_o(650\text{ nm}) \times 100\%$ "

式中 D_o 和 D_i 分别为下相水溶液的初始光密度和振荡静置后的光密度。

1.3 小球藻的表面疏水性及其随环境条件的变化

将小球藻培养到对数增长期, 稳定期和衰老期后分别测表面疏水性。将处于稳定初期的小球藻在无光照条件下培养 24 h 和 48 h 后测表面疏水性。在另一组实验中, 先将小球藻无光照培养 24 h 再恢复正常光照培养 24 h, 测量小球藻表面疏水性在这一过程中发生的变化。设置低温和弱光照 ($5^\circ\text{C} + 250\text{ lx}$) 环境, 研究温度和光照对小球藻表面疏水性的综合作用影响。以 1:1 的比例将 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 加入到培养基中, 使培养基中磷酸盐终含量达到设计质量浓度 (ρ) 20, 50 和 100 mg L^{-1} 。待小球藻在其中生长到对数增长末期后测表面疏水性。将小球藻在 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液中悬浮 24 h 和 72 h 后测表面疏水性。在培养基中分别加入 HgCl_2 和六氯代苯 (C_6Cl_6), 使之各自达到实验设计的终浓度。将正常生长起来的小球藻在其中培养 24 h 后测表面疏水性。

2 结果与分析

2.1 烃-水两相体系的选择

在剧烈振荡过程中, 疏水性强的小球藻细胞粘附到油珠表面。静置时, 油珠携带这些细胞上升, 最终在烃相和烃-水及烃-气界面聚集。对照实验表明, 二甲苯-水两相体系的相分离速度明显快于正辛醇-水两相体系, 二甲苯油珠吸附藻细胞的能力也较正辛醇强。在二甲苯-水两相体系中, 疏水藻细胞主要集中在二甲苯-水和二甲苯-空气界面并维持长时间稳定。而在正辛醇-水两相体系中, 藻细胞在两个界面的聚集数量少且稳定性差, 细胞易解除吸附后进入水相。显然, 与正辛醇相比, 二甲苯是研究小球藻表面疏水性的理想化合物。在以后的实验中皆采用二甲苯-水两相体系。

2.2 小球藻在不同生长相的表面疏水性

小球藻的表面疏水性随培养时间的延长而呈下降趋势(图 1)。在对数增长期, 藻细胞的表面疏水性在 65% 左右, 进入稳定期后下降到 55%。衰老期的小球藻的表面疏水性进一步降低, 相分配时仅少量藻细胞聚集到界面, 且二甲苯油珠较大量滞留于水相。这种现象表明衰老藻细胞表面存在一定数量的疏水位点, 但疏水相互作用比较微弱, 藻细胞不能克服重力阻碍而吸附到相界面。

2.3 光照条件和温度对小球藻表面疏水性的影响

经历无光照培养后, 小球藻的表面疏水性下降。从图 2 可看出, 无光照培养 24 h 使小球藻的表面疏水性由最初的 70% 左右下降至 55% 以下。继续延长无光照培养时间, 小球藻的表面疏水性进一步下降, 但下降幅度明显变小。

小球藻在无光照条件下发生的表面疏水性变化具有可逆性。无光照培养 24 h 后再恢复正常光照培养 24 h, 小球藻的表面疏水性经历由降低到逐渐回升的变化(图 3)。

低温和弱光照协同作用降低小球藻的表面疏水性。这表现在低温和弱光照环境中培养 24 h 后, 小球藻表面疏水性的下降幅度达到 45% 左右, 显著超过小球藻在无光环境中的变化(图 4)。

温度和光照等环境条件可能通过改变藻类合成和分泌细胞外化合物的生理过程来影响细胞表面疏水性的强弱。这在洗涤藻细胞的实验中得到证实。按 Nakagawa 等(1987)介绍的方法洗涤藻细胞^[9], 小球藻表面疏水性下降幅度超过 50%(图 5)。显然, 紧粘在细胞表面的细胞外化合物对疏水性的贡献是相当重要的, 改变细胞

表面细胞外化合物种类和数量组成的环境变化都会在不同程度上增强或降低藻细胞的表面疏水性。

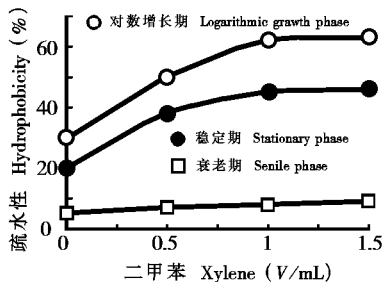


图 1 小球藻在不同生长相的表面疏水性差异

Fig.1 Difference of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* in different growth phases

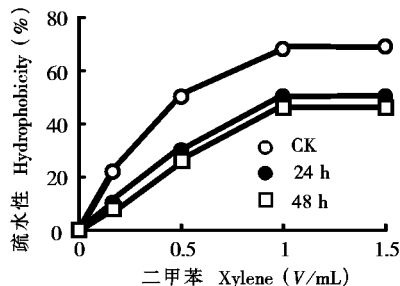


图 2 小球藻表面疏水性在经历无光照培养后的变化

Fig.2 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* cultured in the dark

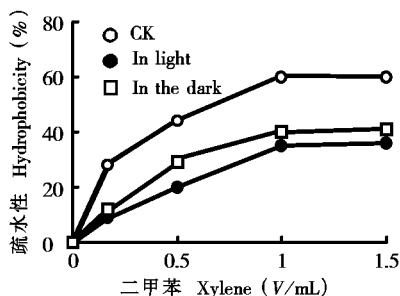


图 3 无光照培养 24 h 后的小球藻在恢复正常光照 24 h 后表面疏水性发生的变化

Fig.3 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* cultured under normal light condition for 24 h after growing in the dark for 24 h

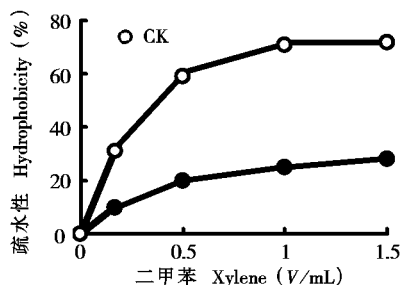


图 4 在低温和弱光照环境中培养 24 h 后小球藻表面疏水性发生的变化

Fig.4 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* cultured under low temperature and light condition for 24 h

2.4 培养基中磷酸盐含量及营养缺乏对小球藻表面疏水性的影响

提高培养基中磷酸盐的含量强烈刺激小球藻的生长,但藻细胞的表面疏水性不发生显著变化.将培养基中磷酸盐的质量浓度(ρ)由 10 mg L^{-1} 提高到 50 mg L^{-1} ,小球藻表面疏水性的增幅不及 3%。

与此相反,小球藻表面疏水性在营养缺乏的环境中显著降低(图 6).在磷酸盐缓冲液中悬浮 24 h 后,小球藻的表面疏水性由最初的 68% 下降到 19% 左右.在继续延长悬浮时间的过程中,几乎没有藻细胞发生疏水吸附,而二甲苯油珠大量滞留于水相。

2.5 $c(\text{Hg}^{2+})$ 和 $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)$ 对小球藻表面疏水性的影响

在 $c(\text{Hg}^{2+}) = 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ 的培养基中生长 24 h 后,小球藻的疏水分配值略有提高(图 7),而受较高 $c(\text{Hg}^{2+})$ 的胁迫,小球藻的表面疏水性大幅度下降,达到 55% 左右。

C_6Cl_6 是一种有毒有机化合物,它对小球藻表面疏水性的影响较复杂.在 $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6) = 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ 的培养基中浸毒 24 h 后,小球藻的表面疏水性明显降低,疏水分配值不及 15%.将 $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)$ 含量提高到 0.05 mg L^{-1} ,小球藻的表面疏水性增强并达到最高值 60% 左右;进一步提高到 0.1 mg L^{-1} ,小球藻的表面疏水性再度下降但仍维持较强的疏水性(图 8)。

3 讨论

3.1 用烃-水两相体系研究藻类表面疏水性的有效性

用二甲苯-水两相体系能比较准确地测量小球藻的表面疏水性及其在不同环境条件下发生的变化.这种基于表面疏水相互作用的分配现象没有特异性,因而也适于用来研究其他藻细胞的表面疏水性。

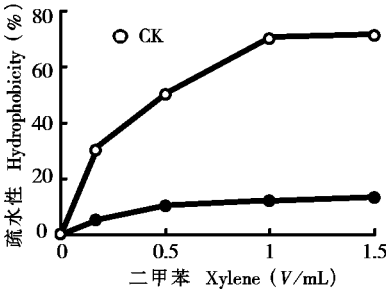


图 5 小球藻表面疏水性在洗涤过程中发生的变化

Fig.5 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* during washing procedure

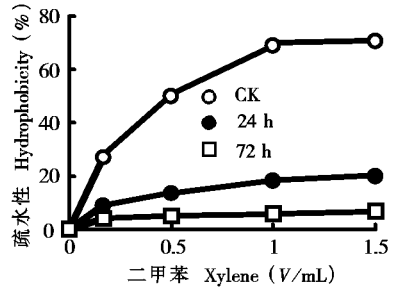


图 6 小球藻表面疏水性在营养缺乏时发生的变化

Fig.6 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* under nutrient deficiency condition

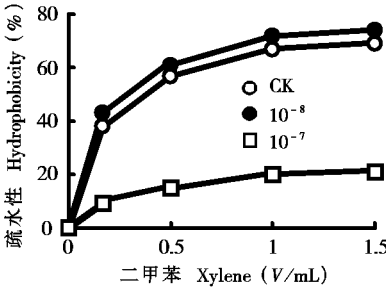


图 7 在含 $c(\text{Hg}^{2+})/\text{mol L}^{-1}$ (10^{-8} , 10^{-7}) 培养基中培养 24 h 后小球藻表面疏水性发生的变化

Fig.7 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* cultured in medium containing $c(\text{Hg}^{2+})/\text{mol L}^{-1}$ (10^{-8} , 10^{-7}) for 24 h

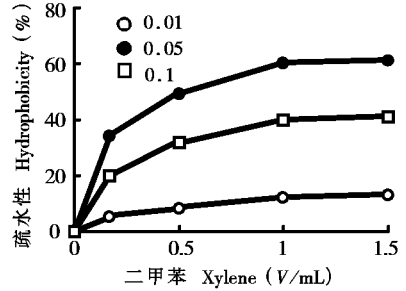


图 8 在含不同 $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)/\text{mg L}^{-1}$ (0.01, 0.05, 0.1) 培养基中培养 24 h 后小球藻表面疏水性发生的变化

Fig. 8 Changes of the surface hydrophobicity of *C. vulgaris* cultured in medium containing $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)/\text{mg L}^{-1}$ (0.01, 0.05, 0.1) for 24 h

小球藻在 2 种不同的烃-水两相体系中的分配行为明显差别,这表明选择合适的烃类化合物对获得准确的实验结果是相当重要的.Rosenberg(1984)还指出,相体积及其比例,生物细胞浓度,缓冲液离子组成等都会影响疏水分配^[9].在研究藻类表面疏水性时根据细胞类型确定适当的实验条件是必要的.

小球藻疏水性弱时出现二甲苯油珠滞留下相水溶液的现象,这给用光密度估数藻细胞带来干扰.在油珠滞留量大的情况下,采用显微镜计数有助于提高准确度.多细胞藻受重力影响大,可采用测量气泡接触角等其他研究方法^[11].

3.2 小球藻表面疏水性的物质基础

疏水性是藻类的表现特征,直接与细胞的表面物质组成有关.真核藻细胞的表面物质结构包括细胞壁,胶被和疏松结合在胶被外的细胞外化合物等^[12].其中细胞壁结构相对稳定,疏水性受环境条件的影响不大.胶被和疏松结合在胶被外的化合物则构成细胞表层的动态物质系统,其成分处在不停地合成、组装、改变和脱落过程中.环境条件通过改变胶被和胶被外化合物的种类和数量增强或降低细胞的疏水性.

细菌细胞外壁中脂多糖的含量与细胞表面疏水性密切相关^[13],表面 A 蛋白^[14],M 蛋白^[15]等也是决定细菌表面疏水性的重要物质成分.这些物质中有的同样出现在真核藻细胞的外壁,因而也是藻细胞表面疏水性的来源.但真核藻与细菌在细胞壁物质结构方面相差甚大,有关其特有的物质成分对表面疏水性的影响值得深入研究.

3.3 藻类表面疏水性的生态学意义

生长早期的小球藻的疏水性较强,但伴随着生长进程,亲水性增加.进入衰老期后疏水性下降可能是藻类的一种繁殖策略,这样有利于繁殖个体在水中扩散,获得各种资源,满足增殖需要.

表面疏水性随光照条件而发生变化对小球藻进行光合作用是有利的.空气-水界面是一个疏水性质的表

面微层(surface microlagyer)^[16].在有光照的白天,小球藻表面疏水性增强,使得它们可通过较强的疏水相互作用向水表接近,从而最大限度地利用光能进行光合作用.

在低温和弱光照的水体,小球藻等藻类可借助弱疏水性而分布到水表以下深度,避免表层水体温度剧变对全部藻的伤害,于藻类安全越冬等很有意义.

在营养耗竭的情况下,小球藻表面疏水性降低,从而促进藻细胞从表层水体沉降.这可能是经历大量增生后,藻类从水表消失的重要动力之一.

受 $c(\text{Hg}^{2+})$ 和 $\rho(\text{C}_6\text{Cl}_6)$ 等环境污染物胁迫,小球藻表面疏水性同样表现出下降趋势.亲水保证藻类能够自由浮游,为它们免受污染胁迫提供更多机会,提高了它们在不利环境中存活的能力.

重金属和有毒有机化合物往往共存于污染水体.重金属可能通过改变表面疏水性控制藻类对有机污染物的吸收.在建立污染物转移和运输模型时应考虑藻类对重金属和有机化合物的共吸收.

参考文献

- 1 Hermansson M, Jlang Q, Gotschalk BW. Hydrophobic and electrostatic characterization of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interfaces. *Arch Microbiol.* 1983, **131**:308 ~ 312
- 2 van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1987, **53**(8):1893 ~ 1897
- 3 Devasia P. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 1993, **59**(12):4051 ~ 4055
- 4 Zhang YH(张育红), Yu HX(于红霞), Han SK(韩朔葵), Zhao YH(赵元慧), Wang LS(王连生). The toxicity of substituted aromatic compounds to algae and quantitative structure-activity relationship studies. *Environ Chem(环境化学)*. 1995, **14**(2):140 ~ 144
- 5 Gerritsen J, Porter KG. The role of surface chemistry in filter feeding by zooplankton. *Science.* 1982, **216**(6):1225 ~ 1227
- 6 Rosenberg M, Kjelleberg S. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. In: Marshall, K. C., New York: Plenum Press, *Advances in Microbial ecology.* 1986, **9**:353 ~ 393
- 7 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用. 北京:农业出版社, 1986
- 8 Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 1980, (9):29 ~ 33
- 9 Nakagawa M, Takamura Y, Yagi O. Isolation and characterization of the slime from a Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-3A. *Agri Biol Chem.* 1987, **51**(2):329 ~ 337
- 10 Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 1984, (22):289 ~ 295
- 11 Fletcher M, Marshall KD. Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Appl Environ Microbiol.* 1982, **44**(1):184 ~ 192
- 12 Kirobe T, Hansen JLS. Phytoplankton aggregate formation: observation of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *J Plankton Res.* 1993, **15**(9):993 ~ 1018
- 13 Gruber K, Sleytr UB. Influence of an S-layer on surface properties of *Bacillus stearothermophilus*. *Arch Micro Biol.* 1991, **180**:101 ~ 105
- 14 Parker ND, Munn CB. Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol Lett.* 1984, (21):233 ~ 237
- 15 Miörner H, Johansson G, Kronvall G. Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infect Immun.* 1983, **39**(1):336 ~ 343
- 16 Norkrans B. Surface microlayers in aquatic environments. In: Alexander M ed. New York:Plenum Press, *Adv Microbial Ecol.* 1980, **4**:51 ~ 86