

·实验简报·

改性纳米 TiO₂ 对蓝藻的生理生态影响

周丽娟, 陈小兰, 邓国宾, 王炎炎, 刘微, 陈善娜*

云南大学生命科学学院, 昆明 650091

摘要 在自然光照条件和日光灯光照条件下, 用掺1%Ag 纳米TiO₂、掺5%Fe₂O₃纳米TiO₂、掺10%ZnO纳米TiO₂和纯纳米TiO₂对铜绿微囊藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803和集胞藻(*Microcystis aeruginosa*)进行处理, 并对2种藻样的叶绿素含量、类胡萝卜素含量、体外超氧自由基含量及超氧化物歧化酶(superoxidase dismutase, SOD)活性进行测定。结果表明, 自然光照条件比日光灯光照条件更利于纳米材料光催化反应的进行; 改性后的3种纳米材料对蓝藻的抑制效果要好于纯纳米TiO₂, 其中效果最好的为掺1%Ag 纳米TiO₂; 2种藻样在适应由光催化剂引发光催化而产生的自由基胁迫时, 集胞藻的适应能力比铜绿微囊藻更强。

关键词 蓝藻, 叶绿素, 生长抑制, 纳米TiO₂, 超氧阴离子, SOD

周丽娟, 陈小兰, 王炎炎, 刘微, 陈善娜 (2008). 改性纳米 TiO₂ 对蓝藻的生理生态影响. 植物学通报 25, 67–71.

我国是一个拥有众多湖泊的国家。近年来, 因资源利用强度加大, 我国各大湖泊富集化趋势严重, 生态系统退化, 蓝藻水华频繁爆发(马祖友等, 2005), 严重影响了人类的生产生活。目前, 控制蓝藻的方法有很多种, 其中运用最多的是杀藻剂, 但该法用量大且易造成环境的二次污染, 因此不宜推广(陈静等, 1999)。

纳米材料受紫外波段的光激发后, 可引发光催化反应而产生活性氧(吴兴惠等, 2003)。活性氧具有极好的杀菌作用, 并能够降解水和空气中的绝大多数有机污染物, 其产物清洁, 因此被认为是一种极具前途的环保材料。近年来许多学者对纳米 TiO₂ 抑制细菌(Matsunaga et al., 1985; Sunada et al., 1998; Maness et al., 1999; Huang et al., 2000)和藻类(陆长梅等, 2002; Kim and Lee, 2005)生长进行了研究。但不同的改性纳米 TiO₂ 对蓝藻生长的影响及其对不同光强响应性的比较研究还未见报道, 因此本文对这两个问题进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用纳米材料为3种经过改性的光催化剂, 即掺

1%Ag 纳米 TiO₂ (简称为 Ag/TiO₂)、掺 5%Fe₂O₃ 纳米 TiO₂(简称为Fe₂O₃/TiO₂)和掺10%ZnO 纳米TiO₂(简称为 ZnO/TiO₂), 以及未改性的纳米 TiO₂。藻种为铜绿微囊藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803 和集胞藻(*Microcystis aeruginosa*), 均购于中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection of the Institute of Hydrobiology)。

1.2 方法

1.2.1 处理方法

取处于对数生长期的藻液离心去培养液, 用新鲜培养基漂洗2次之后接种, 使 OD₆₈₀ 处于 0.4 左右。将4种纳米材料按照0.1%(W/V)的浓度分别外加于铜绿微囊藻和集胞藻液中。设2组光照处理: 自然光照(360 μmol·m⁻²·s⁻¹)和日光灯光照(20 μmol·m⁻²·s⁻¹); 每组光照条件下2种藻各设1个对照样及4个处理样, 每个样设3个重复。

1.2.2 取样方法

在每天同一时间取藻样, 2 055×g 离心 10 分钟, 上清液

收稿日期: 2006-11-30; 接受日期: 2007-05-20

基金项目: 国家重点基础研究发展规划课题 (No. 2002CB412306)

* 通讯作者。E-mail: shnchen@ynu.edu.cn

用于体外超氧自由基含量的测定; 沉淀部分加入不同的提取液, 提取后用于可溶性蛋白、超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)及色素含量的测定。

1.2.3 测定方法

叶绿素 a 与类胡萝卜素含量测定参照 Lichtenthaler 和 Wellburn (1883)的方法; 可溶性蛋白含量测定参照周丽孟等(2006)的方法; 超氧自由基含量测定参照王爱国和罗广华(1990)的方法; SOD活性测定参照NBT光还原法 (Giannopolitis and Ries,1977)。

2 结果与分析

2.1 改性纳米TiO₂对蓝藻生长的影响

目前测定藻类生长的方法主要有细胞计数法及藻液 OD 值测定法。在本实验中纳米材料的存在使这两种方法的准确性受到严重干扰, 因此本文采用每毫升藻液中叶绿素 a 的含量来表征蓝藻的生长情况, 使其更加准确地反映实际情况。由表 1 的数据分析可知, 在处理光照和藻种相同的条件下, 4 种光催化剂对蓝藻的生长存在不同程度的抑制作用, 其中 TiO₂处理样与对照样无显著差异, Fe₂O₃/TiO₂ 处理样与对照样有显著差异, 而 ZnO/TiO₂和Ag/TiO₂处理样与对照样的差异达到了极显著水

平。在同一光照和同一纳米材料处理的条件下, 2 种藻对于因纳米材料引发光催化反应而产生大量自由基胁迫的适应能力存在着较为明显的差异; 而且 2 种藻样对不同光照条件的适应能力也存在着较为显著的差异。综合分析处理结果可以看出, 经过不同改性的纳米 TiO₂, 其光催化活性得到了不同程度的提高, 尤其是 Ag/TiO₂ 光催化效果最好。

2.2 改性纳米TiO₂对体外超氧自由基浓度的影响

在藻液中因光催化反应而产生的超氧自由基对杀藻效果起到了决定性作用。为了更好地体现不同藻样、不同光照条件下超氧自由基释放的持续性和积累情况, 我们选用了第 6 天体外超氧自由基浓度来作说明。从图 1 和图 2 可以看出, 处理后的第 6 天, 在处理材料相同的条件下, 自然光照条件下处理的藻样中体外超氧自由基的浓度基本都是日光灯光照条件下的 2 倍以上, 因此自然光照条件更有利于纳米材料光催化反应的进行。另外, 在外加催化剂与光照条件相同的情况下, 2种藻样中体外超氧自由基的浓度存在较大的差异, 这可能与 2 种藻抗氧化系统的超氧自由基清除能力有关。

2.3 改性纳米TiO₂对铜绿微囊藻SOD活性的影响

蓝藻之所以在各种胁迫环境下都可以生存, 很大程度上得益于抗氧化物质的保护; 而SOD是细胞内清除活性氧

表 1 不同光照条件下各藻样第 3 天的叶绿素 a 含量

Table 1 The Chl a content of different samples in different light conditions on the 3rd day

Treatment	Content of Chl a(μg·mL ⁻¹)			
	Natural illumination		Fluorescent	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Synechocystis</i> sp.	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Synechocystis</i> sp.
Control	1.11±0.02 b	0.75±0.01 b,++	1.09±0.02 b	1.30±0.02 b,++
1% Ag/ TiO ₂	0.05±0.01**,b,++	0.00±0.00**,b,++	0.51±0.01**,b,++	0.59±0.015**,b,++
TiO ₂	1.11±0.02 b,+	0.69±0.01 b,++	1.058±0.01 b,+	1.19±0.003 b,++
5% Fe/ TiO ₂	1.03±0.02**,b	0.64±0.01**,b,++	1.028±0.01*,a	1.07±0.01**,a,++
10%Zn/ TiO ₂	0.62±0.01**,b,++	0.34±0.01**,b,++	0.55±0.000**,b,++	1.08±0.01**,b,++

同一光照条件及藻种, 不同纳米材料处理样间显著性差异比较; *: 差异显著; **: 差异极显著; 同一藻种及纳米材料, 不同光照条件各处理样间显著性差异比较; +: 差异显著; ++: 差异极显著; 同一光照条件及纳米材料, 不同藻种各处理样间显著性差异比较; a: 差异显著; b: 差异极显著

The comparison of significant difference on the different nanometer materials under the same light condition and algae; *: significant difference at $P<0.05$ level; **: significant sharply difference at $P<0.05$ level; the comparison of significant difference on the different light condition with same nanometer materials and algae; +: significant difference at $P<0.05$ level; ++: significant sharply difference at $P<0.05$ level; the comparison of significant difference on the different algae under same light condition and nanometer materials; a: significant difference at $P<0.05$ level; b: significant sharply difference at $P<0.05$ level

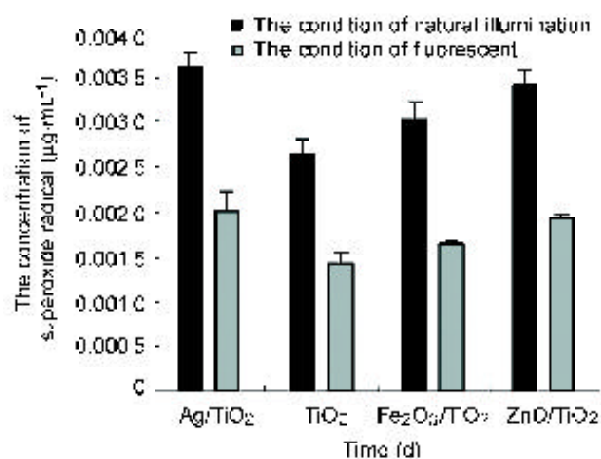


图1 不同光照条件下铜绿微囊藻第6天的体外超氧自由基浓度

Figure 1 The extracellular superoxide radical concentration of *Synechocystis* sp. in the different light conditions on the 6th day

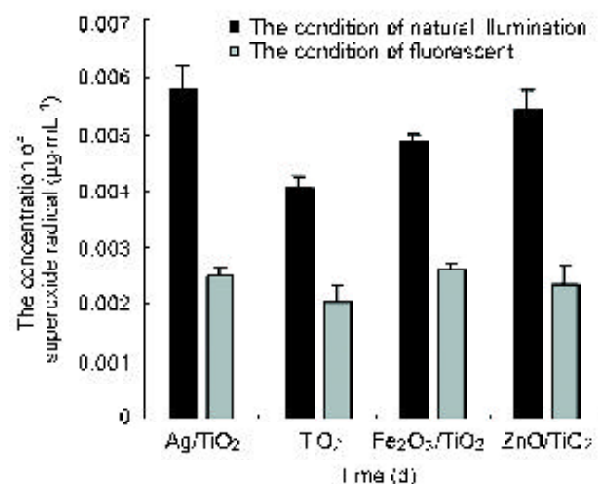


图2 不同光照条件下集胞藻第6天的体外超氧自由基浓度

Figure 2 The extracellular superoxide radical concentration of *Microcystis aeruginosa* in the different light conditions on the 6th day

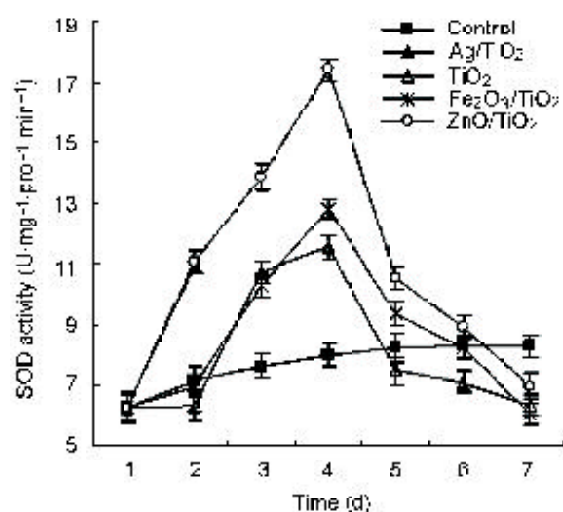


图3 自然光照下铜绿微囊藻 SOD 活性的变化

Figure 3 Variation of SOD activity of *Synechocystis* sp. under natural illumination condition

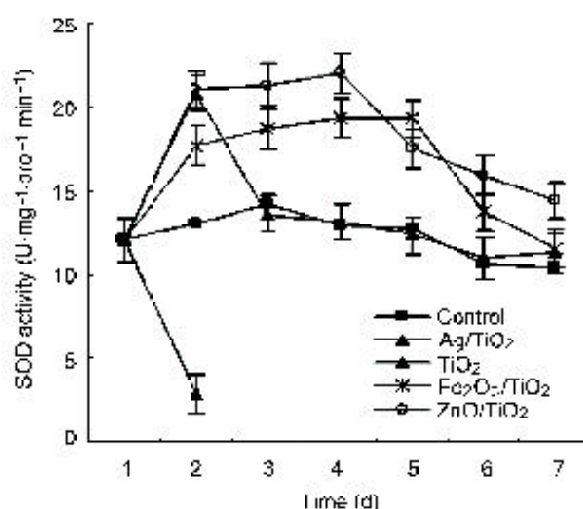


图4 自然光照下集胞藻 SOD 活性的变化

Figure 4 Variation of SOD activity of *Microcystis aeruginosa* under natural illumination condition

的保护酶,也是细胞抗氧化系统中的关键酶(吴国荣等, 2000)。如图3和图4所示,在自然光照条件下,除外加 Ag/TiO_2 的处理样外(由于 Ag/TiO_2 处理后藻样的死亡,数据部分缺失),处理的前4天内铜绿微囊藻的SOD

活性一直都保持明显的上升趋势,而在处理4天后其SOD活性出现明显下降。集胞藻SOD活性的迅速升高出现在处理的第2天,而在这一迅速增长之后,其SOD活性仍保持持续上升的趋势,直至处理的第4、5

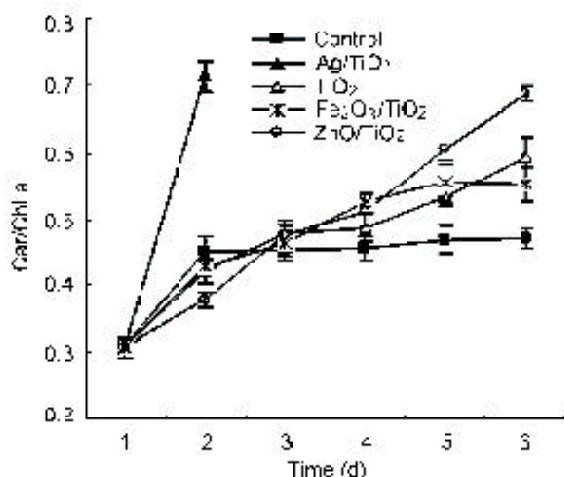


图5 自然光照条件下铜绿微囊藻的胡萝卜素与叶绿素a含量比值的变化

Figure 5 Variation of Car/Chl a of *Synechocystis* sp. under natural illumination condition

天才有所下降。这一数据反映出2种藻在遭受因纳米材料进行光催化反应而产生大量超氧自由基的胁迫时,其SOD活性的变化是存在一定差异的,同时这也说明2种藻的抗氧化适应对策是有区别的(由于Ag/TiO₂处理后藻样的死亡,数据部分缺失)。

2.4 改性纳米TiO₂对铜绿微囊藻Car/Chl a比值的影响

在蓝藻中,类胡萝卜素可以作为抗氧化剂淬灭三线态叶绿素和单线态氧等自由基,在抵抗氧自由基侵袭中起重要作用(Woodall et al., 1997)。虽然外加光催化剂处理的藻样中类胡萝卜素和叶绿素a都呈现出下降的趋势,但由图5和图6可以看出无论是经光催化剂处理的铜绿微囊藻还是集胞藻,其Car/Chl a比值都表现出一个持续上升的趋势。由此我们认为提高相对类胡萝卜素含量是2种藻受到外源自由基胁迫时的一种共同适应性对策。

3 讨论

纳米TiO₂光催化剂经过改性之后,其光催化活性得到不

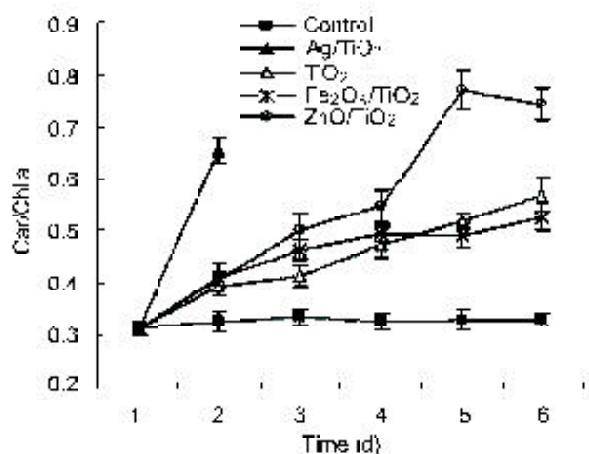


图6 自然光照条件下集胞藻的胡萝卜素与叶绿素a含量比值的变化

Figure 6 Variation of Car/Chl a of *Microcystis aeruginosa* under natural illumination condition

同程度的提高。因此,本实验中采用的4种纳米材料抑制蓝藻生长的效果也存在一定的差异。通过实验数据的分析得知,不同的纳米光催化剂抑制铜绿微囊藻和集胞藻生长的效果从强到弱依次为:Ag/TiO₂、ZnO/TiO₂、Fe₂O₃/TiO₂和TiO₂;其中Ag/TiO₂抑制蓝藻生长的效果最好,特别是在自然光照条件下表现尤为突出。

在遭受因纳米材料进行光催化反应而产生大量自由基的胁迫时,2种藻的适应能力存在着显著差异。在光照及处理材料相同的条件下,由叶绿素含量所反映出的生存率来看,集胞藻的生存率要高于铜绿微囊藻。另外从SOD的活性来看,在处理的第7天集胞藻的SOD仍具有较高的活性,而铜绿微囊藻的SOD活性从第4天后就开始急剧下降。因此我们认为集胞藻对超氧自由基胁迫的适应能力要高于铜绿微囊藻。

另外,值得注意的是,在受到胁迫的初期,蓝藻通过提高自身SOD活性和类胡萝卜素含量来抵御超氧自由基的胁迫,但是到了胁迫的后期,由于体内、体外都聚集了大量的超氧自由基,使藻体内抗氧化物质难以清除,最终导致抗氧化能力急剧下降,藻体死亡。

自然光照条件对于光催化剂作用的发挥有明显的促

进作用, 这也说明在低纬度和高海拔的昆明地区采用光催化剂来抑制蓝藻的生长具有良好的外界环境条件及适用性。而且纳米材料对于水体中难分解的有机物、农药及藻毒素具有极强的分解能力, 因此, 纳米材料在环境治理中将具有广阔的应用前景和研究价值。

参考文献

- 陈静, 郭慧光, 王鸿良, 和丽萍, 胡培铎, 陈异晖, 李立雄 (1999). 滇池草海蓝藻清除应急药剂筛选现场试验研究. *云南环境科学* 18, 30-33.
- 陆长梅, 张超英, 吴国荣 (2002). 纳米级 TiO₂ 抑制微囊藻生长的实验研究. *城市环境与城市生态* 15, 13-18.
- 马祖友, 储昭生, 胡小贞, 金相灿, 张广军 (2005). 不同磷质量浓度体系中 pH 变化对铜绿微囊藻和四尾栅藻竞争的影响. *环境科学研究* 18, 30-33.
- 王爱国, 罗广华 (1990). 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯* 6, 55-57.
- 吴国荣, 陆长梅, 陶明焯, 周芳芳, 顾龚平, 魏锦城 (2000). 百草枯和 H₂O₂ 预处理提高盐泽螺旋藻对铅的耐受性. *湖泊科学* 12, 240-204.
- 吴兴惠, 赵景畅, 柳清菊 (2003). 光催化剂可见光化研究进展. *云南大学学报(自然科学版)* 24, 232-239.
- 周丽孟, 祥红, 刘成圣, 余乐军, 陈西广 (2006). 渗透胁迫对杜氏盐藻胞内甘油含量及相关酶活性影响. *植物学通报* 23, 145-151.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59, 309-314.
- Huang Z, Maness PC, Blake DM, Wolfrum EJ, Sharon LS, Jacoby WA (2000). Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J Photochem Photobiol Chem* 130, 163-170.
- Kim SC, Lee DK (2005). Preparation of TiO₂-coated hollow glass beads and their application to the control of algal growth in eutrophic water. *Microchem J* 80, 227-232.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 603, 591-592.
- Maness PC, Smotinski S, Blake DM (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol* 65, 4094-4098.
- Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H (1985). Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol Lett* 29, 211-214.
- Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A (1998). Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environ Sci Technol* 32, 726-728.
- Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997). Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta* 1336, 575-586.

Effects of Dopant Nano TiO₂ on Vegetal Physiology of Blue-green Algae

Lijuan Zhou, Xiaolan Chen, Guobin Deng, Yanyan Wang, Wei Liu, Shanna Chen*

School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Microcystis aeruginosa* were treated with the dopant nano TiO₂ components 1% Ag, 5% Fe₂O₃, 10% ZnO, and nano TiO₂ alone under natural illumination and fluorescent conditions. We determined the content of chlorophyll a, carotenoids, extracellular O₂ and superoxide dismutase activity in samples. The natural illumination condition was more effective than the fluorescent condition in the photocatalysis of nanometer material. The dopant nano materials were more effective than nano material alone in inhibiting growth of blue-green algae, 1% Ag having the best inhibitory effect. *M. aeruginosa* has a stronger ability to adapt to superoxide anion stress produced by photocatalysis of nano TiO₂ than *Synechocystis* sp.

Key words blue-green algae, chlorophyll, inhibition of growth, nano TiO₂, O₂, SOD

Zhou LJ, Chen XL, Wang YY, Liu W, Chen SN (2008). Effects of dopant nano TiO₂ on vegetal physiology of blue-green algae. *Chin Bull Bot* 25, 67-71.

* Author for correspondence. E-mail: shnchen@ynu.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)