超声波对杜氏盐藻生长的刺激效应研究

肖群,段舜山

暨南大学水生生物研究中心//广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室, 广东 广州 510632

摘要:以杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)为实验材料,用超声波细胞均质仪作为超声装置对杜氏盐藻进行处理,分别设 64 s 和 128 s 两个时间强度处理,各时间强度均分 16 次、8 次、4 次、2 次和 1 次五种间隔,以无超声波作用为对照。超声波作 用解除后,将各处理在相同的培养条件下培养 7 d,测定生长过程的吸光值、叶绿素 a 含量、最大光能转化效率、实际光能 转化效和光合电子传递效率等指标。结果表明,在 64 s 和 128 s 两个总时间强度处理下,超声波短时间多次处理有利于杜氏 盐藻的生长,使其吸光值、叶绿素 a 含量、最大光能转化效率、实际光能转化效率以及光合电子传递效率等指标均比对照有 所提高。

关键词:超声波刺激效应;杜氏盐藻;补偿生长中图分类号:X173 文献标识码:A

文章编号: 1674-5906 (2010) 04-0771-05

Hormesis 效应是指生物受到胁迫后产生的适应性反应,以双向剂量反应为特征,通常表现为高剂量时抑制生物的生长,低剂量时却促进生物生长的现象^[1-3]。Hormesis 效应向传统的阈值模型、线性非阈值模型提出了挑战,对生态风险评估具有重大意义,因而引起了国内外研究者的兴趣^[4-5]。 Edward对1888—2003年发表的关于Hormesis 效应的1400余篇文献记载的近5600个剂量一反应关系进行统计后发现:物理和化学因子均能引发Hormesis 效应,关于化学因子引发Hormesis 效应的研究占71%,但是关于物理因子作用引起 hormesis 现象的研究,目前所见文献极少^[6]。

近年来,赤潮、水华在我国水域地区发生的范 围越来越大, 频率越来越高, 持续时间也越来越长; 与此同时,赤潮、水华生物种类也不断增多,给海 洋环境、海洋渔业乃至人类的健康造成了巨大的危 害^[7-9]。超声波控藻技术是近年来发展起来的一种新 型技术,具有操作简便,在处理中不引入其他的化 学物质、反应条件温和、反应速度快等优点^[10-11], 因而受到了众多学者的关注,相应的,超声波对微 藻生理的影响也受到了广泛关注[12-15]。由于超声波 作用是瞬间的,为了提高控藻效果,有人建议每隔 一个时间段施加一次作用^[11]。然而,关于超声波作 用频次对微藻生长影响的研究,目前未见文献报 道。本试验设计了64 s和128 s两个时间强度处理, 各时间强度均分16次、8次、4次、2次和1次五种间 隔,在相同的条件下培养了7d,试图探讨不同的作 用频次对杜氏盐藻生长以及叶绿素荧光参数的影

1 材料与方法

1.1 实验藻种及培养

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)来自暨南大学水 生生物研究所藻种室,采用 f/2 培养基,盐度为 30, 培养温度为(24 ±1)℃,光照强度为 photons 100 µmol·m⁻²·s⁻¹,光暗比为 12L:12D, pH 为 6.5~7.0。 培养时,将 150 mL 藻液转入 250 mL 三角瓶中,置 于 CC275TL2H 型人工气候培养箱中培养。

1.2 超声波处理装置

本实验采用天津奥特赛恩斯仪器有限公司生产的 UH-950B 型超声波细胞均质仪作为超声装置,输出功率为 950 W,频率为 22 kHz。实验时,将 250 mL处于对数生长期的杜氏盐藻加入到 500 mL 的烧杯中,用超生均质仪进行处理,处理完后倒回 500 mL 的三角瓶中。

1.3 实验设计

超声波的总作用时间设为 64 s 和 128 s, 分 16 次、8 次、4 次、2 次、1 次进行处理,所有的处理 均在 4 d 内完成,每次处理的间隔时间相等(实验 设计如表 1,后面数据说明按处理次数从多到少的

表 1 实验方案设计 Tab 1 Experimental design of this study

处理次数	16次	8次	4次	2次	1次
每次处理时间(总处理时间 64 s)	4 s	8 s	16 s	32 s	64 s
每次处理时间(总处理时间 128 s)	8 s	16 s	32 s	64 s	128 s
处理间隔时间	6 h	12 h	24 h	48 h	无

基金项目:国家自然科学基金项目(40876074)

响,为超声波控藻的生态风险评估提供参考依据。

作者简介:肖群(1984年生),女,硕士研究生,研究方向为藻类生态与海洋生物资源。E-mail: xiaoqun263@163.com *通讯作者: 段舜山,男,教授,博士生导师,研究方向为藻类生理生态学。E-mail: tssduan@jnu.edu.cn 收稿日期: 2010-03-22

顺序)。所有处理结束后,将杜氏盐藻在 3 500 r/min 下离心 3 min,弃去上清液,加入新鲜培养基,转 入 250 mL 的三角瓶中培养,以无超声波处理为对 照,起始 OD 值均设为 0.1,每个处理设置三个平行。 每天定时更换三角瓶在培养箱中的位置,以避免光 照不均匀。每隔 24 h 测定藻液 OD 值和叶绿素 a 的 含量,从第 3 天开始测定杜氏盐藻的最大光能转化 效率、实际光能转化效率和光合电子传递效率。

1.4 测定方法

1.4.1 杜氏盐藻吸光值的测定

采用UV-2450型紫外分光光度计测定藻液在 680 nm下的吸光值。

1.4.2 杜氏盐藻叶绿素 a 含量的测定

叶绿素a含量的测定采用甲醇法^[16],取5 mL藻 液,经高速冷冻离心机(10000 r·min⁻¹,10 min,20 ℃)离心后弃去上清夜,加入5 mL甲醇,在70 ℃恒

温水浴锅下水浴至藻泥呈灰白色后,用高速冷冻离 心机(10000 r·min⁻¹, 10 min, 20 ℃)离心,测定上 清液在665 nm、750 nm处的吸光值,用下列公式进 行计算:

叶绿素a的含量(mg L⁻¹)=13.9×(OD₆₆₅-OD₇₅₀) 1.4.3 杜氏盐藻荧光动力学的测定

利用XE-PAM叶绿素荧光仪(Walz, Germany) 测定PSII 最大光能转化效率(F_v/F_m)、实际光能转化效率(Yield)、光合电子传递效率(ETR)等光合参数。

1.4 数据分析

数据整理和作图分别在Excel、Origin中进行, 显著性水平为0.05。

- 2 结果与分析
- 2.1.1 不同的作用次数对杜氏盐藻生长的影响 从图1可以看出,在生长前期,超声波能显著



图 1 不同的作用次数对杜氏盐藻生长的影响

Fig.1 The effects of different ultrasound exposure times on the optical density of Dunaliella salina

抑制杜氏盐藻的生长,但是这种抑制作用会逐渐降低。分多次处理能显著降低超声波对杜氏盐藻生长的抑制作用,到了第7天,处理时间为64s的处理组的OD分别为对照组的110.2%(P<0.05),108.4%(P<0.05),106.0%(P<0.05),100.7%(P<0.05))和97.8%(P>0.05);处理时间为128s的处理组的OD分别为对照组的107.4%(P<0.05),103.3%(P<0.01),103.3%(P<0.01),102.2%(P<0.01))和93.4%(P<0.01)。

2.1.2 不同的作用次数对杜氏盐藻叶绿素 a 的含量 的影响

从图 2 可以看出,超声波能显著减低杜氏盐藻 细胞内叶绿素 a 的含量,作用后的第 1 天,处理时 间为 64 s 的处理组的叶绿素 a 的含量分别为对照组 的 90.70% (*P*<0.05), 88.48% (*P*<0.01), 83.02% (*P*<0.05), 86.76% (*P*<0.05) 和 76.74% (*P*<0.05)。

处理时间为 128 s 的处理组的叶绿素 a 的含量分别 为对照组的 96.08% (*P*<0.05), 95.41% (*P*<0.05), 76.36% (*P*<0.05), 79.59% (*P*<0.05) 和 68.55% (*P*<0.05)。作用解除后,各处理组的叶绿素 a 含量 与对照组的差距会逐渐减小。到了第 7 天,处理时 间为 64 s 的处理组的叶绿素 a 的含量分别为对照组 的 108.62% (*P*<0.05), 105.53% (*P*<0.05), 100.82% (*P*<0.05), 97.53% (*P*<0.05) 和 95.22% (*P*<0.05)。 处理时间为 128 s 的处理组的叶绿素 a 的含量分别 为对照组的 106.03% (*P*<0.05), 105.64% (*P*<0.05), 102.87% (*P*<0.05), 91.39% (*P*<0.05) 和 89.91% (*P*<0.05)。

2.1.3 不同的作用次数对杜氏盐藻叶绿素荧光参数的影响

从图 3 可以看出,超声波可以提高杜氏盐藻的 最大光能转换效率,实际光能转化效率和光合电子



图 2 不同的作用次数对杜氏盐藻叶绿素 a 含量的影响 Fig.2 The effects of different ultrasound exposure times on the content of chlorophyll a of *Dunaliella salina*

传递效率。在第6天,各处理组的最大光能转换效 率,实际光能转化效率和光合电子传递效率均高于 对照组,这与前面观察到的后期处理组生长速率加 快的现象是一致的。

3 讨论

3.1 超声波的低剂量多次作用能促进杜氏盐藻的 生长

Hormesis 效应是生物对环境的适应性反应^[17-18], 低剂量的刺激能激活生物更有效地利用环境资源, 从而使生物能耐受更强的胁迫^[18]。在受某一物质的 胁迫前先用低剂量的同种物质进行处理,能使生物 产生适应性反应,从而降低伤害起到保护生物自身 的作用^[19-27]。超声波处理结束后的第7天,在64 s 和 128 s 两个不同的作用时间下,分 16 次处理的杜 氏盐藻 OD 值分别比对照组提高了 7.0%和 10.2%, 而一次性作用 128 s 和 64 s 后,其 OD 值比对照组 降低了 6.6%和 2.2%。该研究结果表明,在相同的 处理时间下,分多次处理能降低超声波对杜氏盐藻 的胁迫作用,甚至出现促进生长的情况。

3.2 超声波刺激效应的机理探讨

超声波与媒介相互作用的机制主要有三种: 使媒介质点进入振动状态;能量被传播媒介吸收转 变成热量以及空化机制^[8]。已有的研究表明,超声 波能提高芦荟细胞和非洲菊的V-ATPase的运载能 力^[28-29],增强芦荟细胞ATP的水解活动^[28]。在本实 验中,我们观察到适当的超声波处理能够提高杜氏 盐藻的最大光能转化效率、实际光能转化效率和光 合电子传递效率。表明在恢复生长阶段,杜氏盐藻 通过提高光合系统的光合作用能力来加快生长。

按照毒物刺激效应发生的原因,可将毒物刺激 效应分为以下两类:由直接刺激引起的刺激效应 (Direct stimulation hormesis, DSH)和在内稳态受 到干扰后引发超补偿而发生的刺激效应(Overcompensation stimulation hormesis, OCSH)^[30-31]。 在本实验中观察到,超声波分16次和8次处理的杜 氏盐藻的生长指标和荧光动力学参数均显著高于 对照。由此表明,超声波的适当胁迫可能激发了杜 氏盐藻的超补偿作用。

4 结论

(1)在处理时间为 64 s 和 128 s 的情况下,超 声波能抑制杜氏盐藻的生长,降低杜氏盐藻的叶绿 素 a 含量。但是分多次处理能降低超声波对杜氏盐 藻的伤害作用,甚至促进杜氏盐藻的生长,提高其 叶绿素 a 的含量。说明通过增加作用次数来控藻的 方法存在一定风险,有可能引发更大规模的赤潮水 华爆发。

(2)超声波短时间多次处理提高了杜氏盐藻 的最大光能转化效率、实际光能转化效率以及光合 电子传递效率。而在一次处理 64 s 和 128 s 的情况 下,超声波降低了杜氏盐藻的最大光能转化效率、 实际光能转化效率以及光合电子传递效率。表明超 声波通过作用于杜氏盐藻的光合系统来促进或抑 制其生长。

(3) 杜氏盐藻的生长早期出现抑制现象,这种抑制会逐渐减弱甚至出现促进作用,表明超声波激发了杜氏盐藻的超补偿效应。在观察 Hormesis 效应时要考虑时间因素。

参考文献:

- MURADO M A, VA'ZQUEZ J A. The notion of hormesis and the dose–response theory: A unified approach [J]. Journal of Theoretical Biology, 2007, 244:489-499.
- [2] MARK P M. Hormesis defined [J]. Ageing Research Reviews, 2008, 7 :1-7.
- [3] EDWARD J C, KENNETH A. B, A John B, et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response



图 3 不同的超声波作用次数下杜氏盐藻的叶绿素荧光参数

Fig.3 The effects of different ultrasound exposure times on the Chlorophyll fluorescence parameters of Dunaliella salina

and preconditioning stress within a hermetic dose-response framework [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007, 222:122-128.

- [4] JOCELYN K. Sipping From a Poisoned Chalice [J]. Science, 2003, 17(302):376-379.
- [5] EDWARD J C. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status [J]. Mutation Research, 2002, 511:181-189.
- [6] EDWARD J C, ROBYN B. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 202:289-301.
- [7] ANDERSON D M, GLIBERT P M, BURKHOLDER J M. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences[J]. Estuaries, 2002, 25: 704-726.
- [8] JIN D, THUNBERG E, HOAGLAND P. Economic impact of the 2005

red tide event on commercial shellfish fisheries in New England[J]. Ocean and Coastal management, 2008, 51: 420-429.

- [9] TOMAS C R, SMAYDA T J. Red tide blooms of Cochlodinium polykrikoides in a coastal cove [J]. Harmful Algae, 2008, 7: 308-317.
- [10] 王波,张光明,王慧. 超声波去除铜绿微囊藻研究[J].环境污染治理 技术与设备, 2005,6 (4):47-49.
 WANG Bo, ZHANG Guangming, WANG Hui. Removal of Microcysti saeruginosa by ultrasound [J].Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2005,6 (4):47-49.
- [11] 姜登岭,倪国葳,高林,等. 低频、低功率超声波抑制藻类生长的效果
 [J].生态环境学报,2009, 18(5): 1732-1735.
 JIANG Dengling, NI Guowei, GAO Lin, et al. Study on algal control by low-frequency, low-power ultrasonic [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(5): 1732-1735.
- [12] AHN C Y, PARK M H, JOUNG S H. Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: Laboratory and enclosure studies [J]. Environmental Science & Technology, 2003,37(13): 3031-3037.
- [13] NAKANO K, LEE T J, MATSUMURA M. In situ algal bloom control by the integration of ultrasonic radiation and jet circulation to flushing [J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35: 4941-4946.
- [14] 储昭升, 庞燕, 郑朔芳, 等. 超声波控藻及对水生生态安全的影响
 [J]. 环境科学学报, 2008, 28 (7): 1335-1339.
 CHU Zhaosheng, PANG Yan, ZHENG Sufang, et al. Algal control by ultrasonic radiation and its risks to the aquatic environment [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28 (7): 1335-1339.
- [15] HAO H W, WU M S, CHEN W F. Cyanobacterial bloom control by ultrasonic irradiation at 20 .kHz and 1. 7 MHz [J].Journal of Environmental Science and Health, 2004, 39 (6): 1435-1446.
- [16] AZOV.Y. Effect of pH on Inorganic Carbon Uptake in Algal Cultures[J]. Applied and environmental microbiology, 1982, 43(6): 1300-1306.
- [17] EDWARD J C, LINDA A. B. Defining hormesis [J]. Human & Experimental Toxicology, 2002, 21: 91 -97.
- [18] EDWARD J C, KENNETH A. B, JOHN A.B, et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hermetic dose–response framework [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007, 222:122-128.
- [19] VAN Wijk R, WIEGANT FAC. The similar principle as a therapeutic strategy: A research program on stimulation of selfdefense in disordered mammalian cells [J]. Alternative Therapies in Health and Medi-

cine, 1997, 3:33-38.

- [20] VAN W R, OVELGONNE J H, DOKONING E, et al. Mild step-down heating causes increased transcription levels of hsp68 and hsp84 mRNA and enhances thermotolerance development in Reuber H35 hepatoma cells[J]. International Journal of Hyperthermia, 1994, 10: 115-125.
- [21] WIEGANT F A C, SOUREN J E M, VAN W R. Stimulation of survival capacity in heat-shocked cells by subsequent exposure to minute amounts of chemical stressors: Role of similarity in hsp-inducing effects[J]. Human & Experimental Toxicology, 1999, 18: 460-470.
- [22] WIEGANT F A C, SPIEKER N, VAN W R. Stressor-specific enhancement of hsp induction by low doses of stressors in conditions of self- and cross-sensitization [J]. Toxicology, 1998, 127:107-119.
- [23] WIEGANT F A C, VAN R J, VAN W R. Enhancement of the stress response by minute amounts of cadmium in sensitized Reuber H35 hepatoma cells [J]. Toxicology, 1997, 116:27-37.
- [24] OLIVIERI G, BODYCOTE J, WOLFF S. Adaptive Response of Human Lymphocytes to Low Concentrations of Radioactive Thymidine [J]. Science, 1984, 223:594-597.
- [25] WOLFF S. Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents [J]. Mutation Research, 1996, 358:135-142.
- [26] JEFFERY D, SHADLEY, WOLFF S. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation [J]. Mutagenesis, 1987, 2(2): 95-96.
- [27] WANG G J, CAI L. Induction of Cell-Proliferation Hormesis and Cell-Survival Adaptive Response in Mouse Hematopoietic Cells by Whole-Body Low-Dose Radiation [J]. Toxicological science, 2000, 53:369-376.
- [28] LIU Y Y, TAKATSUKI H, YOSHIKOSHI A. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H-ATPase activity of aloe arborescens callus cells [J].Colloids and Surfaces, 2003, 32:105-116.
- [29] JIA Y, WANG B C, WANG X J, et al. Effect of sound stimulation on roots growth and plasmalemma H_-ATPase activity of chrysanthemum (Gerbera jamesonii) [J].Colloids and Surfaces, 2003, 27:65- 69.
- [30] EDWARD J C, LINDA A. B. Defining hormesis [J]. Human & Experimental Toxicology, 2002, 21: 91 -97.
- [31] EDWARD J C. Evidence That Hormesis Represents an "Overcompensation" Response to a Disruption in Homeostasis[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 42: 135-137.

The study of ultrasound hormesis on Dunaliella salina

XIAO Qun, DUAN Shunshan

Key Lab of Water Eutrophication and Red-tide Control, Department of Education of Guangdong Province// Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: To study the ultrasound hormesis on *Dunaliella salina*, an ultrasonic processor was used to produce the ultrasound. The total exposure times were 128 seconds and 64 seconds. Different groups were treated 16,8,4,2, and 1 time respectively. After the ultrasound exposure, the blank control group and treatment groups were simultaneously cultured under the same conditions for 7 days. During this time, the optical density, the content of chlorophyll a, Fv/Fm, the yield and the electron transport rate (ETR) were measured. The results indicated that with the ultrasound exposure times of 64 seconds and 128 seconds, the growth of *Dunaliella salina* would be promoted if it was treated many times with each subsequent exposure decreasing in length. The optical density, the content of chlorophyll a, Fv/Fm, the yield and the electron transport rate (ETR) were measured if it was treated many times with each subsequent exposure decreasing in length. The optical density, the content of chlorophyll a, Fv/Fm, the yield and the electron transport rate (ETR) were measured if it was treated many times with each subsequent exposure decreasing in length. The optical density, the content of chlorophyll a, Fv/Fm, the yield and the electron transport rate (ETR) also increased.

Key words: ultrasound hormesis; Dunaliella salina; compensational growth