

百草枯和 H_2O_2 预处理提高盐泽螺旋藻对铅的耐受性^{*}

吴国荣 陆长梅 陶明煊
周长芳 顾龚平 魏锦城

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

提 要 用 $10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的百草枯 (Paraquat) 和 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 对盐泽螺旋藻 (*Spirulina subsalsa*) 作预处理, 以诱导提高藻细胞内超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 的活性, 随后用 $40\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} 进行胁迫试验. 实验结果表明, 预处理组的藻细胞生长量和光合速率的下降幅度明显较未预处理组小; 预处理组的 SOD, CAT 活性虽有衰减, 但与未预处理组相比仍保持较高的水平, 有效地抑制了藻细胞内 $O_2^{\cdot -}$ 和丙二醛 (MDA) 的积累; 预处理组 POD 活性的升幅介于未预处理组和正常生长的藻细胞之间. 可以推断, 诱导提高藻细胞抗氧化化的能力, 有利于减轻 Pb^{2+} 对藻细胞的毒害.

关键词 盐泽螺旋藻 百草枯 H_2O_2 抗氧化酶 Pb^{2+} 胁迫

分类号 Q949.22

藻类是水体中的初级生产者, 在水生态系统中起着十分重要的作用. 从环境的角度看, 研究包括重金属在内的各种污染因子对藻类的毒害及藻类对这些胁迫的适应和抗御的机理, 已经引起人们的关注^[1,2]. 近年来, 自由基生物学研究发现, 各种理化因子对植物体造成胁迫和伤害的过程大多与体内自由基代谢平衡的破坏有关^[3,4]. 作者等也曾报告过 Pb^{2+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} 等重金属离子对螺旋藻、莼菜等水生植物活性氧清除系统的影响^[2,5]. 这揭示机体内的抗氧化酶活性激应升高是植物对不同胁迫交叉适应的机制之一. 但诱导和提高机体内活性氧代谢的水平, 能否加强藻类抗御重金属毒害的能力, 迄今有关报道甚少. 作者采用适度 (浓度、时间) 的活性氧诱导物百草枯^[3,6] 和外源性活性氧 H_2O_2 ^[7] 作预处理, 诱导盐泽螺旋藻抗氧化酶活性的增加, 观察对铅污染耐受能力的影响, 从自由基生物学的角度探讨植物对水环境重金属污染的适应机理.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

盐泽螺旋藻 (*Spirulina subsalsa*) 由南京师范大学生命科学学院生物工程实验室提供, 接种于 Zarrouk 培养液^[8] 在 30°C 、 $75\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PFD (光量子通量密度) 条件下培养 (12h light/12h dark) 至对数生长期.

* 江苏省自然科学基金资助项目 (1998SWXOSZ0001).

收稿日期: 2000-04-21; 收到修改稿日期: 2000-05-17; 吴国荣, 男, 1948年生, 副教授.

1.2 处理方法

百草枯(Paraquat)预处理:参照周长芳、吴国荣等的报告^[2],在处于对数生长期的鲜藻培养液中加入百草枯溶液,使之终浓度达到 10 μmol · L⁻¹,培养 12h. H₂O₂ 预处理:参照李玲的报告^[7],在处于对数生长期的鲜藻培养液中定时定量滴加 H₂O₂ 溶液,使之终浓度保持在 2 mmol · L⁻¹,培养 48h.

Pb²⁺胁迫处理:参照周长芳、吴国荣等的报告^[2],将经预处理和未经预处理的鲜藻分别移置于含有 40 mg · L⁻¹ Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂) 的培养液中,培养待测.以正常培养的藻细胞作为对照.

所有试验组、对照组于实验起始时,藻细胞密度均相同,培养条件相同.各项生理指标在 Pb²⁺胁迫处理 4d 和 8d 时测定,实验重复 3 次,数据经统计学处理.

1.3 测定方法

藻细胞生长量的测定参照 Vonshak 的方法^[9].光合速率的测定应用李德跃、叶济宇的薄膜氧电极法,测定 O₂ 的释放量^[10],测定条件为 30℃,180 μmol · m⁻² · s⁻¹ PFD 光照.藻细胞提取液的制备参照周长芳、吴国荣等的方法^[2].可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 的考马斯亮兰 G-250 法^[11].超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照 Stewert 和 Bewley 的方法^[12].过氧化物酶(POD)活性测定参照波钦诺克的方法^[13].过氧化氢酶(CAT)活性测定参照 Beers 的紫外分光光度法^[14].超氧阴离子(O₂^{-·})含量测定参照王爱国和罗广华的方法^[15].丙二醛(MDA)含量测定参照 Heath 等的硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[16].酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)活性染色和密度扫描参照罗广华等的方法^[17],活性区带密度扫描用 CS-9000 双波长扫描仪(日本岛津公司)进行.

2 结果与分析

2.1 百草枯与 H₂O₂ 预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞生长的影响

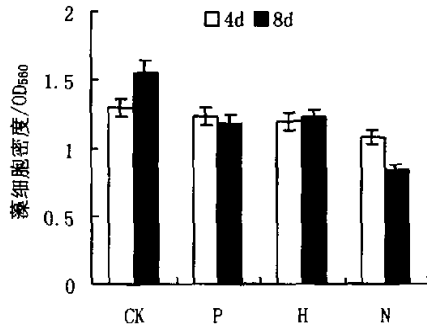
图 1 是各组在 40 mg · L⁻¹ Pb²⁺ 浓度培养液中培养 4d 和 8d 时生长量测定的结果,可以看出经百草枯和 H₂O₂ 预处理的藻细胞与未经预处理的藻细胞的生长速率随 Pb²⁺胁迫时间的延长逐渐呈现明显的差异.4d 时各组藻细胞密度差别尚不大,但未预处理组的藻细胞开始黄化失绿.8d 时未预处理组的藻密度较对照下降了 46.2%,且藻细胞黄化失绿现象加重,镜检中发现有空泡细胞.两个预处理组的藻体密度保持相对稳定或略有下降,藻细胞有少许黄化失绿和絮凝现象. Pb²⁺对藻细胞的毒害是渐进性的,有一个累积的过程^[2],实验结果表明,经预处理的藻细胞明显延缓了 Pb²⁺毒害的进程.

2.2 百草枯和 H₂O₂ 预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞光合速率的影响

已知 Pb²⁺严重抑制藻细胞的光合作用,其原因可能是 Pb²⁺抑制光合电子传递和同化力(ATP 和 NADPH)的形成^[2].从图 2 看,未经预处理的藻细胞光合速率第 4d 即较对照下降了 49.6%,两个预处理组的下降率均在 25%左右.第 8d 未预处理组的光合速率较对照下降 75.7%,百草枯和 H₂O₂ 预处理组的光合速率则分别下降了 44.9%和 40.8%.表明预处理有效地减轻了 Pb²⁺对藻细胞光合放氧的抑制作用.

2.3 百草枯和 H₂O₂ 预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞 O₂^{-·} 和 MDA 积累的影响

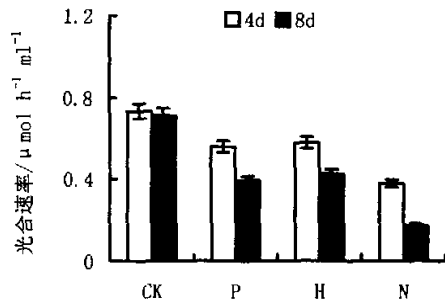
细胞内 O₂^{-·} 含量的增加是细胞代谢功能损伤,活性氧形成和清除之间平衡破坏的直接结果. Pb²⁺胁迫对藻细胞活性氧代谢影响明显(图 3),第 4d 经预处理和未经预处理的藻细胞内



CK:对照 P:百草枯预处理组
H: H₂O₂预处理组 N: 未经预处理组

图 1 不同预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞生长的影响

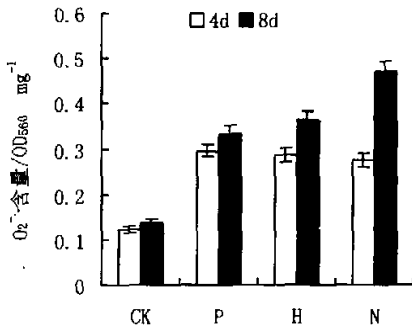
Fig. 1 Effects of different pretreatments on the growth of *Spirulina subsalsa* under Pb²⁺ stress



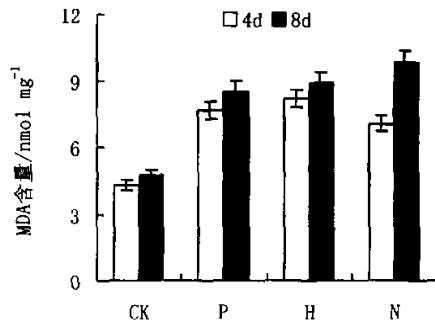
CK:对照 P:百草枯预处理组
H: H₂O₂预处理组 N: 未经预处理组

图 2 不同预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞光合速率的影响

Fig. 2 Effects of different pretreatments on the photosynthetic rate of *Spirulina subsalsa* under Pb²⁺ stress



CK:对照 P:百草枯预处理组



H: H₂O₂预处理组 N: 未经预处理组

图 3 不同预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞 O₂^{-·} 与 MDA 积累的影响

Fig. 3 Effects of different pretreatments on the accumulation of O₂^{-·} and MDA of *Spirulina subsalsa* under Pb²⁺ stress

以毫克可溶性蛋白计的 O₂^{-·} 含量都高于对照 1 倍以上,两个预处理组更高一些,可以理解为是预处理与 Pb²⁺ 胁迫的叠加效应. 第 8d 未预处理组 O₂^{-·} 含量比第 4d 又增加了 70.9%,是同期对照的 3.4 倍;两个预处理组分别增加了 12.8%和 16.4%,已明显低于未预处理组的水平. 表明预处理有效地抑制了 O₂^{-·} 在藻细胞内的积累. 其究竟是抑制了 Pb²⁺ 胁迫下 O₂^{-·} 形成的速率,还是提高了清除 O₂^{-·} 的效率,尚有待进一步研究.

O₂⁻ 会启动膜脂的过氧化反应,从测定结果看,Pb²⁺胁迫促进藻细胞 MDA 的积累是明显的,且随胁迫时间的延长而加剧(图 3).未预处理组第 8d 比第 4d 天增加了 40.3%.两个预处理组第 4d MDA 的含量较未预处理组稍高,但增加速度较低,至第 8d 已经低于未预处理组.从脂质过氧化的角度看,适度的百草枯、H₂O₂ 预处理对提高藻细胞在 Pb²⁺胁迫下的防护能力有一定作用.

2.4 百草枯和 H₂O₂ 预处理对 Pb²⁺胁迫下藻细胞抗氧化酶活性的影响

藻细胞经百草枯或 H₂O₂ 预处理后,抗氧化酶类活性均有不同程度的增加,其中百草枯对 SOD, H₂O₂ 对 CAT, 及以这两者对 POD 的作用尤为显著(图 4). Pb²⁺胁迫试验就是在此基础上进行的.在 Pb²⁺胁迫的过程中,几种抗氧化酶活性的变化不尽相同.以毫克蛋白计的 SOD 活性呈连续下降趋势,未预处理组第 4d 和第 8d 该酶活性分别较对照降了 22.7%和 52.7%;两个预处理组下降的幅度较小,仍保持明显较高的水平,且高于同期对照水平(图 4).

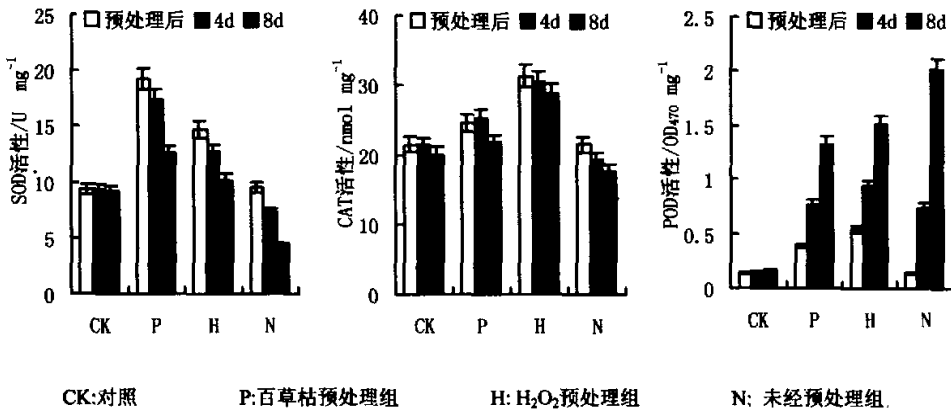


图 4 不同预处理后 Pb²⁺胁迫对藻细胞抗氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effects of Pb²⁺ on the activities of antioxidant enzymes in *Spirulina subsalsa* after different pretreatments

Pb²⁺胁迫对 CAT 活性的影响较对 SOD 要小,这与小麦叶片在 Cd 胁迫下的结果相仿^[16],预处理组和未预处理组 CAT 活性的变化趋势相似,其区别在于,经预处理的藻细胞 CAT 的活性有波动但仍保持较高的水平(图 4).POD 的活性,未预处理组和预处理组在 Pb²⁺胁迫过程中都呈升高的趋势,前者尤为显著,第 8d 其活性升至对照组的 11.5 倍,且明显高于两个预处理组,后者的升幅明显低于前者(图 4).联系藻细胞生长和光合放氧的测定,该现象与“POD 活性的升高往往与植物体胁迫损伤程度正相关”^[4,5,18]的看法一致.从以上结果看,适度的百草枯、H₂O₂ 处理,激发和诱导藻细胞抗氧化酶活性升高,有利于藻细胞对 Pb²⁺毒害的抗御.

图 5 是盐泽螺旋藻各实验组在实验过程中按 0.15mg 蛋白质取酶液经 PAGE 和 SOD 活性染色的照片,该藻细胞 SOD 在均一浓度胶板上呈单一区带,已经证实为铁型 SOD^[6].在百草枯或 H₂O₂ 预处理后与 Pb²⁺胁迫过程中均未发现新的同工酶区带,但其区带的宽度及密度扫描的结果(数据未列入)所反映的活性变化与试管测定的数据是一致的.

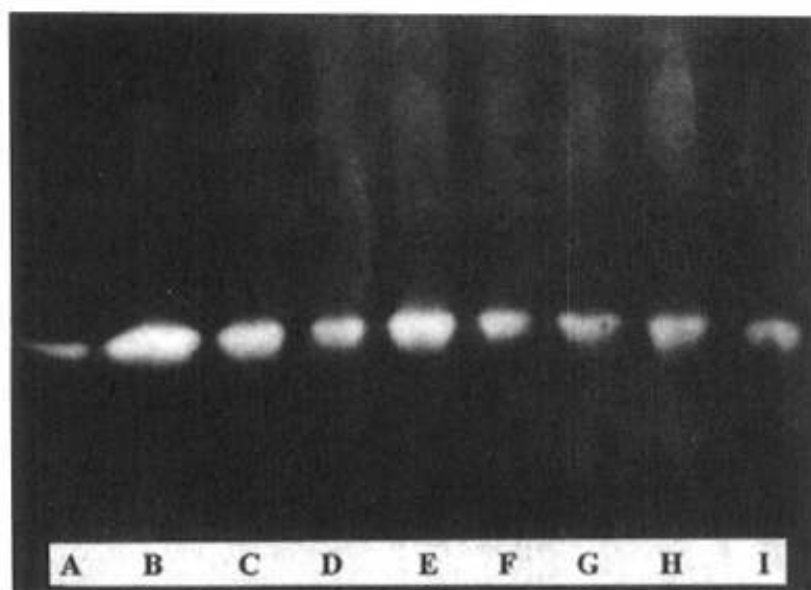


图5 百草枯、 H_2O_2 预处理后和 Pb^{2+} 胁迫过程中 SOD 活性的变化
 A: 未预处理组 Pb^{2+} 胁迫 8d; B: 百草枯预处理后; C: H_2O_2 预处理后;
 D: H_2O_2 预处理组 Pb^{2+} 胁迫 4d; E: 百草枯预处理 Pb^{2+} 胁迫 4d; F: 对照;
 G: H_2O_2 预处理组 Pb^{2+} 胁迫 8d; H: 百草枯预处理组 Pb^{2+} 胁迫 8d;
 I: 未预处理组 Pb^{2+} 胁迫 4d

Fig. 5 Changes of SOD activities in *Spirulina subsalsa* under pretreatments of paraquat, H_2O_2 and Pb^{2+} stress

3 讨论

自由基生物学的研究表明,包括重金属在内的多种理化因子的胁迫都会造成机体内活性氧代谢紊乱, $O_2^{\cdot -}$ 等活性氧产生和消除之间的平衡被破坏,活性氧在细胞内积累,启动膜脂过氧化反应等,引起细胞结构和功能的损伤^[3,6,18]。而自由基的及时清除,并使之保持在一个适宜的低水平,是机体进化过程中形成的重要的保护机制之一^[3,6,7]。因此,细胞活性氧代谢系统在胁迫条件下的变化和胁迫损伤与细胞抗御胁迫的机制密切相关。百草枯处理索氏小球藻,使该藻 Mn-SOD 同工酶出现新的区带^[3]。在 H_2O_2 处理造成的氧逆境中抗旱性强的玉米愈伤组织抗氧化酶活性的升高明显高于抗旱性弱的品种^[7] 等等,都提示这个保护机制促进细胞在胁迫条件下活性氧在较高水平上新平衡的建立,表现出机体对胁迫的适应和抗御。本试验采用适度的 $O_2^{\cdot -}$ 诱导物百草枯和外源性活性氧 H_2O_2 造成藻细胞的氧胁迫,诱导 SOD, CAT 和 POD 活性的激应性升高,用超过盐泽螺旋藻耐受范围的 Pb^{2+} ($40mg \cdot L^{-1}$) 作胁迫处理,目的在于研究激活和诱导提高藻细胞抗氧化酶的活性能否增强藻体耐受 Pb^{2+} 污染的能力。实验过程中,经预处理的藻细胞生长和光合速率等指标均较未经预处理的藻细胞下降幅度小,表现出明显减轻和延缓 Pb^{2+} 毒害的效应。其间经预处理的藻细胞 SOD、CAT 活性虽有下降,但与未经预处理的藻细胞相比仍保持明显较高的水平,有效抑制了 $O_2^{\cdot -}$ 和 MDA 的积累。经预处理的藻细胞 POD 活性的变化介于未预处理和正常生长条件下的藻细胞。实验的结果与实验的预期一

致,这也有助于确认机体内的抗氧化酶系统是机体有效抗御逆境胁迫的重要保护机制之一。

植物对重金属等环境因子胁迫的适应和抗御是有限度的,包括抗氧化酶在内的机体活性氧代谢系统的变化就受到胁迫强度的制约。Pb²⁺胁迫的强度包括浓度和时间两个因素,对植物的毒害显现出一个渐进的、累积的过程^[2],本实验中藻细胞在超过耐受限度的 Pb²⁺胁迫下,藻细胞受到的毒害和损伤几乎与 SOD 活性的衰减过程同步;CAT 虽没有 SOD 那样敏感,但亦呈逐步下降的趋势,其中 SOD 活性的变化更能反映藻细胞在抗御 Pb²⁺胁迫过程中受到的损伤,而 POD 的活性则随着藻细胞毒害的加深,迅速上升,与莼菜冬芽受到 Hg, Cd 的毒害^[5],菠菜叶片受到 UV-B 辐射时的情况相类似^[4]。因此人们认为,POD 活性的上升是植物抗御胁迫和受到伤害后的共同表现之一。经过预处理的藻细胞,虽然增强了 SOD, CAT, POD 的活性,提高了活性氧代谢的水平,但在超过其耐受限度的情况下也只能延缓 Pb²⁺胁迫诱导的 O₂⁻积累的速率,延缓 Pb²⁺对藻细胞毒害的进程。

螯合是植物对细胞内重金属解毒的主要方式之一,和植物体内的抗氧化系统一样,是植物耐受重金属胁迫的主要机制。作者在研究中已经注意到谷胱甘肽(GSH)^[19]、金属硫蛋白(MT)^[20]和植物络合素(PC)^[21]等对重金属的螯合作用。其中 GSH 不仅是细胞内抗氧化酶系统的产物^[7],还是 PC 合成的底物^[21],而细胞抗氧化保护系统的激活或诱导与 MT, PC 的基因转录或其他代谢水平的调节是否也在某些环节上存在某种内在的联系,作者正着手进行探讨。

参 考 文 献

- 1 Gotsis-Skretas O, Christaki U. Physiological responses of two marine phytoplanktonic species to Cu and Hg. *Mar Tech Rep Ser.* 1992, 69:151
- 2 周长芳,吴国荣,陆长梅等. 铅污染对钝顶螺旋藻生长及某些生理性状的影响. *湖泊科学*, 1999, 11(2):135
- 3 Rabinowitch H, Daclase D, Crapo J D *et al.* Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to paraquat toxicity in the green *Chlorella sorokiniana*. *Arch Biochem-Biophys*, 1983, 225(2):664
- 4 黄少白,刘晓忠,戴秩杰等. 紫外光 B 辐射对菠菜叶片脂质过氧化作用的影响. *植物学报*, 1998, 40(6):542
- 5 陆长梅,施国新,吴国荣等. Hg, Cd 对莼菜冬芽茎、叶绿素含量及活性氧清除系统的影响. *湖泊科学*, 1999, 11(4):323
- 6 周长芳,吴国荣,陆长梅等. 百草枯对盐泽螺旋藻超氧化物歧化酶(SOD)影响的研究. *南京师大学报*, 1999, 22(3):238
- 7 李 玲. H₂O₂ 对抗旱性不同的玉米品种愈伤组织抗氧化系统的影响. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(4):347
- 8 Soong P. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: Shelef G, Soeder C J, eds. *Algae Biomass*. Amsterdam, North-Holland Biomedical Press, 1980. 97
- 9 沃沙克著. 藻类的培养方法和生物量生产. 见:库姆斯等主编. *生物生产力和光合作用测定技巧*. 北京:科学出版社, 1985. 196
- 10 李德跃,叶济宇. 薄膜氧电极的制作与呼吸或光合控制的测定. *植物生理学通讯*, 1980, (1):35
- 11 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248
- 12 Stewert R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 1980, 65:245
- 13 X H 波钦诺克. 植物生物化学分析方法. 北京:科学出版社, 1981. 197
- 14 Beers R F, *et al.* A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952, 195:133
- 15 王爱国,罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, 26(6):55
- 16 Heath R L, Parker L. Photoperitration in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem*, 1968, 25:189

- 17 罗广华,王爱国.植物SOD的凝胶电泳及活性显示.植物生理学通讯,1983,20(6):44
- 18 罗立新,孙秩衡,靳月华.辐射胁迫小麦叶中超氧阴离子自由基的积累.环境科学学报,1998,18(5):496
- 19 Ma J F, Hiradate S, Matsumoto H. High aluminum resistance in buckwheat (I): Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol*, 1998, 117:753
- 20 Kagi J H. Overview of metallothionein. *Meth Enzymol*, 1991, 205:613
- 21 Rauser W E. Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiol*, 1995, 109:1141

Enhancement of *Spirulina subsalsa* Tolerance to Pb by Pretreatment of Paraquat and H₂O₂

WU Guorong LU Changmei TAO Mingxuan ZHOU Changfang
GU Gongping WEI Jincheng

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract

In this research *Spirulina subsalsa* was firstly pretreated by paraquat (10 μ mol \cdot L⁻¹) and H₂O₂ (2mmol \cdot L⁻¹) to induce its antioxidant enzymes, then were treated under Pb²⁺ stress (40mg \cdot L⁻¹). The results showed that the decreases of both growth yield and photosynthetic rate of pretreated *Spirulina subsalsa* were less than those of the non-pretreated. Although the activities of SOD and CAT were also decreased, they were higher than those of the non-pretreated, and they inhibited the accumulation of O₂⁻ and MDA effectively. The range of POD increase was between those of the non-pretreated and the control. It could be concluded that induction could increase the antioxidant capacity, and could help *Spirulina subsalsa* resist Pb²⁺'s toxicity.

Key Words *Spirulina subsalsa*, paraquat, H₂O₂, antioxidant enzymes, Pb²⁺ stress