

藻类对重金属的耐性与解毒机理*

周文彬 邱保胜**

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

提 要 重金属是一类具有潜在危害的重要污染物,越来越多的重金属被排入水体,对水生生态环境构成严重威胁. 藻类在长期响应重金属胁迫过程中,建立起一系列的适应机制. 藻类通过控制重金属的吸收、富集、转运与解毒,使不同细胞组分中的重金属维持在正常浓度范围内. 这些保护机制主要包括:藻细胞的某些胞外组分与重金属结合,从而减少重金属进入胞内;在重金属诱导下藻细胞可合成金属结合蛋白或多肽;重金属诱导藻细胞合成一些代谢物使其免受伤害或修复由重金属胁迫造成的损伤;藻细胞通过液泡区室化作用使重金属远离代谢;藻细胞对重金属具有排斥与排出作用.

关键词 藻类 重金属耐性 植物络合素 金属硫蛋白 液泡区室化作用

分类号 X172

重金属是密度大于 5 g/cm^3 的金属,90种天然存在的元素中有53种是重金属元素^[1]. 随着工农业的发展,越来越多的重金属被排入水体,重金属已成为一类具有潜在危害的重要污染物,对水生生态环境构成严重威胁. 当前最引人关注的汞、砷、镉、铅、铬等重金属元素通常对藻类有较高毒性,甚至植物必需的痕量元素铜、锌、镍等在较高浓度时也能对藻类产生明显的毒性效应. 这些重金属元素可与蛋白质结合引起其活性丧失或结构破坏,取代某些必需微量元素从而导致营养缺乏,以及诱导自由基或活性氧的生成^[2]. 同其它生物体一样,藻类在长期响应重金属胁迫过程中,也建立起一系列的适应机制. 藻类作为水体污染的有效参照物,利用藻类对重金属的耐性及解毒生物指示物或生物标志物,进行水污染生物监测一直是研究的热点之一. 近年来,人们通过研究藻类对重金属的耐性机制,提出将藻类用于生物修复水体重金属污染,这方面的工作也倍受关注. 因此,研究藻类对重金属的耐性机理有着重要的意义. 本文旨在从细胞水平综述藻类对重金属的耐性和解毒机理,以期促进我国相关领域的研究.

1 藻细胞壁及表面与重金属的结合

藻类对重金属的吸收包括胞外的快速吸附与胞内的缓慢富集两个阶段^[3], Rangsayatom 等将它们分别称为快相和慢相^[4]. 在快相中,重金属被吸附到藻细胞表面,该过程迅速而且可逆,吸附到藻细胞表面的重金属可被 EDTA 等螯合剂洗脱;而慢相是重金属跨膜进入胞内富集的过程.

在多数情况下,约 80% - 90% 的重金属被吸附到藻细胞表面^[5, 6]. 藻类细胞壁含有一些功能基团如羟基、羧基、氨基、巯基和磷酸根等^[7, 8],因而细胞壁带负电荷,通过离子交换或其它机制可以与水中的重金属离子结合. 有实验表明,莱因衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的细胞壁缺失突变株较野生型对重金属毒害更敏感^[9],而绿藻 *Scenedesmus abundans* 能去除污染水体中的 Cd 和 Cu^[10]. 许多蓝藻胞外具有多糖组成的胶鞘、胶被或粘液^[11],有些种类在培养过程中能分泌多聚糖到培养液中. 它们分泌的多糖是一些复杂的阴离子络合物,其中约 80% 含有 6 - 10 种多糖,90% 含有一种或更多的糖醛酸,而且几乎所有的都含有非糖组分^[12]. 这些胞外多糖(exopolysaccharide; EPS)能与重金属结合^[11, 13],在其它逆境条件下也可对蓝藻起一定保护作用

* 国家自然科学基金项目(30200021)资助. 2003 - 10 - 22 收稿;2004 - 01 - 03 收修改稿. 周文彬,男,1977年生,硕士研究生.

** 通讯作者:邱保胜, E-mail: bsqiu@public.wh.hb.cn.

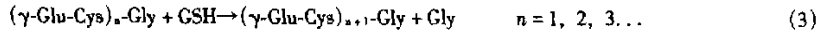
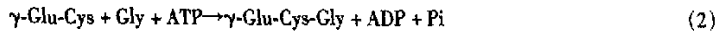
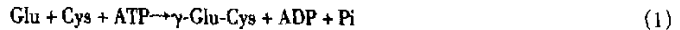
^[11]. 褐藻的细胞壁含有藻酸盐和岩藻聚糖, 其中藻酸盐含羧基, 岩藻聚糖含硫酸基团, 它们均可与重金属络合. Kuyucak 和 Volesky^[14] 曾推测藻酸盐是褐藻富集重金属的主要成分, 并在后来的实验中得到了证实^[15]. 这些研究结果表明, 重金属能与藻类细胞的胞外成分结合, 从而减少了进入胞内的重金属离子数量, 使胞内细胞器免受重金属的毒害.

2 金属结合蛋白(或多肽)与藻类重金属耐逆性

2.1 植物络合素

植物络合素(phytochelatins; PCs)是一类由重金属离子诱导的、酶促合成的富含半胱氨酸的小分子多肽, 结构式为 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, 其中 $n=2-11$ (通常为 $2-5$). PCs有许多结构变体, 如 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ (也称 homo-PC)、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ (也称 hydroxymethyl-PC)、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ (也称 iso-PC)和 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ (也称 des-Gly-PC), 人们已相继在一些植物中发现它们的存在^[16, 17, 18]. PCs广泛分布于单子叶植物、双子叶植物、藻类及真菌中^[18], 尚未见报道动物能合成 PCs, 但研究者已在线虫 *Caenorhabditis elegans* 和 *C. briggsae* 中发现了与植物和酵母中类似的编码植物络合素合酶的基因^[19].

2.1.1 植物络合素的生物合成 PCs在结构上与谷胱甘肽($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$; GSH)相似, 生理、生化和遗传学研究已证实 GSH 是合成 PCs 的底物. PCs 由 γ -谷氨酰半胱氨酸二肽基转移酶($\gamma\text{-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase}$, EC 2.3.2.15)即植物络合素合酶(phytochelatin synthase; PCS)以 GSH 为底物催化合成, 而 PCS 受重金属离子激活^[16, 17, 18]. 1989 年 Grill 等^[20]纯化了 PCS, 但直到 1999 年, 三个研究小组分别在裂殖酵母、拟南芥和小麦中克隆并鉴定出编码 PCS 的基因^[19]. PCS 基因的鉴定对于理解 PCs 生物合成调控中的关键步骤是一个重要的突破. PCs 的合成可用以下几个反应步骤加以说明:



步骤(1)由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶($\gamma\text{-glutamylcysteine synthetase}$; $\gamma\text{-ECS}$, EC 6.3.2.2)催化合成 $\gamma\text{-EC}$;步骤(2)由谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase; GS, EC 6.3.2.3)催化合成 GSH^[21];步骤(3)由 PCS 催化将 GSH 的 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 部分转移到另一个 GSH 分子上生成 PC₂, 或 PCS 催化 GSH 的 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 部分到另一个 PC_n分子上形成 PC_{n+1}.

2.1.2 藻类植物络合素的功能 到目前为止, 尚未见报道表明重金属能诱导原核藻类合成 PCs, 诱导真核藻类产生 PCs 的重金属有 Cd、Cu、Zn、Pb、Hg、Ni 和 Ag 等. 在高等植物中, Cd 诱导 PCs 合成的效应强于其它重金属^[17], 但 Hirrata 等^[22]研究发现, Zn 诱导绿藻 *Dunaliella tertiolecta* 合成 PCs 的能力强于 Cd. Tsuji 等^[23]发现, 经 Zn 预处理的 *Dunaliella tertiolecta* 对其它重金属(如 Cd、Hg、Cu、Pb 和 As)的耐性增强, 对过氧化氢和甲基紫精引起的氧化胁迫的耐受能力亦得到提高. 有离体实验结果表明, PC 可作为过氧化氢和超氧阴离子自由基的清除剂, 能减轻氧化胁迫^[23].

重金属与藻类 PCs 的研究主要集中于二者的剂量关系. 近年来, 关于藻类重金属-PCs 复合物的研究引起了一些研究者的兴趣. Hu 等^[24]用 Cd 处理 *Chlamydomonas reinhardtii*, 经纯化得到两种类型的 Cd-PCs 复合物, 即低分子量(low molecular weight, LMW)复合物和高分子量(high molecular weight, HMW)复合物, 二者的分子量分别为 3.2 kDa 和 5.0 kDa, S²⁻/Cd 比分别为 0.01 和 0.22. HMW 复合物由 LMW 复合物结合 S²⁻转化而来, 由于 LMW 复合物能很快转化为 HMW 复合物, 因此首先检测到 HMW 复合物. 若初期 LMW 复合物富集, 则可作为金属毒害的一个信号. 与 S²⁻的结合不但使得 HMW 复合物能结合更多 Cd, 且增加了 HMW 复合物的稳定性, 而 HMW 复合物的形成可能与 Cys 的合成和周转有关. Morelli 等^[25]用排斥色谱(SEC)、原子吸收光谱(AAS)及高效液相色谱(HPLC)研究海洋硅藻 *Phaeodactylum tricornutum* 的 Cd-PCs 复合物, 发现该藻中存在两类 Cd-PC_n复合物, 一类是特定链长的肽与 Cd 形成的复合物(Cd-PC_n, $n=2-6$), 另一类是具有酸活性的 S²⁻结合到 Cd-PC_n复合物形成的含 CdS 微晶(crystallites)的 PC 复合物, 其分子量大于前者, 为 8-12 kDa, S²⁻/Cd 比为 0.4, 均高于 Hu 等^[24]的实验结果. 具有酸活性的 S²⁻结合到 Cd-PCs 复合物使得 Cd/

SCys 比从 0.6 上升到 1.6, 这表明该复合物结合了更多 Cd. 镉能与 GSH 形成 Cd-GSH 复合物, 它可转移到 γ -(Glu-Cys)_n-Gly 或在 PCS 的催化下转移到 Cd-PC_n 复合物形成更稳定的 Cd-PC_{n+1} 复合物. Morelli 和 Scarano^[26]用 Cd 和 Pb 处理 *P. tricornutum*, 后转入无 Cd 和 Pb 的培养基, 结果发现 PC 含量下降, GSH 含量上升, 说明该条件下重金属-PCs 复合物发生降解.

需要指出的是, 并非所有的真核藻类都能合成 PCs. Satoh 等^[27]用 HgCl₂ 处理绿藻 *Tetraselmis tetrahele*, 结果没有检测到 PCs, 但发现另一种三肽 Arg-Arg-Glu, 它能结合 Hg²⁺, 于是认为它在该藻耐受重金属方面可能起到一定作用, 但它的解毒机理不明.

2.2 金属硫蛋白

2.2.1 金属硫蛋白的分子结构 金属硫蛋白(metallothioneins; MTs)是一类基因编码的低分子量富含半胱氨酸的金属结合蛋白^[28]. MT 和编码 MT 的基因已在动物、植物和蓝藻 *Synechococcus* 中发现^[19]. MT 具有 Cys-Cys、Cys-X-Cys、Cys-X-X-Cys(X 表示任何氨基酸)基序的富含 Cys 的结构域, 哺乳动物 MT 的 61 个氨基酸中, 含有 20 个半胱氨酸残基^[29]. 根据 MT 中半胱氨酸的排列, 将 MT 分为三类: Class I MTs 含有 20 个高度保守的半胱氨酸残基, 广泛分布于脊椎动物中; Class II MTs 中半胱氨酸没有严格的排列, 真菌、植物和无脊椎动物中的 MT 均属于此类; Class III MTs 即前述 PCs. 最近, Cobbett 和 Goldsbrough^[19]又将 MTs 分为四类.

2.2.2 藻类金属硫蛋白的功能 在蓝藻聚球藻属(*Synechococcus*)的一些种类中已证实 MTs 的存在, 由 *smtA* 基因编码^[30], 真核藻类只在褐藻 *Fucus vesiculocus* 中分离到编码 MT 的基因^[31]. 目前, 有关藻类 MT 的研究主要集中于 *Synechococcus*. MT 能通过巯基与重金属离子结合, 从而降低重金属的毒性. 在高等植物中, 许多实验表明 MTs 与 Cu 耐性和稳态有关^[19], 而蓝藻 MTs 可能与 Zn 稳态有关, Turner 等^[32]证实缺失 MT 基因的 *Synechococcus* PCC 7942 突变株对 Zn 高度敏感. Turner 和 Robinson^[33]用 Cd²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Hg²⁺、Co²⁺ 或 Ni²⁺ 处理 *Synechococcus* PCC 6301, 发现只有 Zn 能显著诱导报告基因的表达. 在蓝藻中, 由于 MT 基因表达效率不高, 结合重金属的能力有限^[34], Chen 等^[34]将哺乳动物的 MT-I 基因导入蓝藻, 转基因藻在 60 μ M CdCl₂ 条件下仍能生长, 且 MT 蛋白表达效率大大提高, 达到每克鲜藻 1045 μ g, 蓝藻重金属耐受能力得到提高. 关于 MTs 的确切功能尚不清楚, 一种假说认为 MTs 可能作为细胞内重金属离子的贮存库或隔离重金属, 另一种假说认为 MTs 作为转运蛋白, 能把细胞内某一位点过多的重金属转移到另一需要重金属或不会引起毒性的位点. 最近的研究表明, 颤藻 *Oscillatoria brevis* 利用重金属转运体 Bxa1 将过多的金属离子快速输出细胞作为第一道防线, 利用金属硫蛋白 BmtA 螯合重金属作为第二道防线, 以缓冲并贮存过多的重金属, 从而提高重金属耐性^[35]. 另外, MTs 也富含巯基, 是否具有清除细胞内自由基的作用也有待探讨. 因此, 要真正阐明 MTs 在蓝藻重金属耐性方面的作用还需进行深入细致的研究.

2.3 谷胱甘肽

谷胱甘肽(GSH)是机体内非蛋白硫醇的主要来源, 含有巯基, 能与重金属直接结合, 同时 GSH 又是合成 PCs 的底物. BSO(buthionine sulfoximine)是 γ -ECS 的抑制剂, 能抑制 PCs 合成. Reddy 和 Prasad^[36]用 Cd 处理绿藻 *Scenedesmus quadricauda*, 细胞内 GSH 含量下降, 经 BSO 处理后该藻对 Cd 更加敏感. 用 BSO 处理 *Chlamydomonas reinhardtii* 也得到同样结果^[37]. 这表明, GSH 是 PCs 合成的底物, 且 PCs 对重金属具有解毒作用. γ -ECS 是 GSH 合成的限速酶, GSH 对其具有反馈抑制作用; 经重金属处理后藻细胞中 PCs 合成增加, GSH 含量下降, 这有利于减轻 GSH 的反馈抑制, 提高 γ -ECS 活性^[21]. 重金属处理 2h 后, 硅藻 *Phaeodactylum tricornutum* 细胞中约 50% 的 GSH 用于合成 PCs^[26]. Hirrata 等^[22]用 BSO 处理 *Dunaliella tertiolecta*, 虽然 PCs 含量下降, 但 GSH 含量几乎没有变化.

谷胱甘肽不仅是 PCs 合成的底物, 亦是机体内重要的抗氧化物质^[21]. 重金属胁迫会诱导活性氧的产生, 导致生物体氧化损伤^[38]. 铜胁迫条件下绿藻 *Scenedesmus bijugatus* 中 GSH 被逐渐消耗, γ -ECS、GSH 硫转移酶、GSH 过氧化物酶活性提高, 而 GSSG 还原酶活性降低, 铜胁迫初始阶段过氧化氢升高, 后来降低^[39]. GSH 不但被用于合成 PCs, 且在谷胱甘肽-抗坏血酸循环(Halliwell-Asada 途径)中发挥重要的抗氧化作用^[21]. 锌处理 *Dunaliella tertiolecta* 诱导了活性氧的产生, γ -ECS、GS 被活性氧激活, 从而促进 GSH 合成, 而 GSH 的加

速合成又会导致 PC 合成增加^[46]。

3 细胞内多磷酸体对重金属的络合作用

多磷酸体 (polyphosphate bodies; PPB) 是正磷酸盐的聚合物, 含有大量 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属阳离子。它不仅具有储存磷的功能, 而且对重金属具有解毒作用。在重金属胁迫条件下, 多磷酸体的数量增加^[44], 提高磷浓度可减轻重金属对藻类的毒害^[41]。许多实验表明, 多磷酸体是重金属结合位点之一, 多磷酸体能富集多种重金属, 它是 Ni 在 *Nostoc muscorum* 中的主要富集库^[42]。应用 X 射线能谱分析表明, Pb 在 *Diatoma tenue* 中的富集^[43]以及 Cd、Cu、Co、Hg、Ni、Pb 和 Zn 在 *Plectonema boryanum* 中的富集^[44]也与多磷酸体有关。因此, 在这些生物体中多磷酸体富集重金属可能作为一种解毒机制。Hashemi 等^[45]发现, 在高浓度的铜暴露下 *Anabaena variabilis* 细胞中多磷酸体的数量增加, 但铜并非富集在多磷酸体内。在重金属解毒过程中, 多磷酸体降解可能比细胞中多磷酸体水平更重要。最近, Nishikawa 等^[46]的研究表明: 绿藻 *Chlamydomonas acidophila* 经 Cd 处理后多磷酸体发生水解, 形成一些短链的种类或正磷酸盐, 它们在液泡中与 Cd 结合, phosphate-Cd 很可能是该藻解毒的最终形态。多磷酸体虽然具有解毒作用, 但在磷缺乏条件下, 它会释放正磷酸盐以满足代谢需要, 相应地多磷酸体结合的重金属也被释放, 因而可能对藻细胞产生重金属毒害。因此, 必须满足藻类对磷的需求, 多磷酸体才能发挥解毒作用。

4 脯氨酸在藻类抗重金属胁迫中的作用

在逆境条件下, 生物体会积累脯氨酸, 重金属胁迫能引起藻类积累脯氨酸。Wu 等^[47]用 Cu 和 Cd 处理四种藻 (2 种绿藻、1 种硅藻和 1 种蓝藻), 结果显示: 耐性种类比敏感种类积累更多脯氨酸, 补充外源脯氨酸能明显降低 Cu 对蓝藻 *Anacystis nidulans* 的损伤; 脯氨酸可减少胞内钾离子泄漏, 胞内脯氨酸积累可能与防御渗透改变的保护机制有关。Wu 等^[48]发现细胞内脯氨酸含量较高时可减少 *Chlorella sp.* 对 Cu 的吸收。Mehta 和 Gaur^[49]发现, 脯氨酸的累积并不影响 *Chlorella vulgaris* 对重金属的吸收, 但随着重金属毒性增大, 胞内脯氨酸含量也相应升高。

关于脯氨酸减轻重金属胁迫的机理有多种提法, 游离脯氨酸可作为渗透保护剂 (osmoprotectant)^[50, 51]、蛋白质稳定剂^[52]、金属螯合剂^[53]、脂质过氧化的抑制剂 (inhibitor of lipid peroxidation)^[49]、羟自由基的清除剂 (hydroxyl radical scavenger)^[54]和单线态氧的清除剂 (singlet oxygen scavenger)^[55]。Siripornadulsil 等^[56]将 *Moth-bean* 的 P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) 基因转入绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii*, 转基因藻 P5CS-1 的脯氨酸含量高出生型 80%; 丙二醛是脂质过氧化的指标, 经 50 μ M Cd 处理, 野生型的丙二醛含量比转基因藻高出 70%; 镉处理使野生型的 GSSG (氧化型 GSH) 含量增加近三倍, 而转基因藻的 GSSG 含量并无增加; 转基因藻 P5CS-1 的胞内 Cd 含量高出野生型 4 倍, 表明其对重金属的耐性提高。基于以上结果, 他们认为脯氨酸直接作为一种抗氧化剂, 使细胞免受重金属胁迫诱导的氧自由基伤害, 而 GSH 的含量增加有利于 PC 合成及 Cd 螯合。Siripornadulsil 等^[56]采用延伸 X 射线吸收精细结构 (extended X-ray absorption fine structure; EXAFS) 技术发现, Cd 未与脯氨酸结合, 在转基因藻中它与 4 个 S 原子形成四面体配位, 而在野生型中它与 2 个 S 原子和 2 个氧原子配位。脯氨酸能有效淬灭单线态氧, 它也可能参与清除其它活性氧尤其是 $\cdot OH$ ^[55]。脯氨酸淬灭单线态氧或直接与羟自由基反应, 将减少自由基对细胞造成的损伤, 维持细胞内更多的还原环境 (reducing environment), 使得 GSH 含量升高, 而高的 GSH 含量又促进 PCs 合成及其与重金属的螯合, 因此, 细胞对重金属的耐性或解毒能力得到提高。

5 热激蛋白与藻类重金属耐性

在高于正常生长温度 5°C 时 (即热激条件下), 生物体大部分正常的蛋白合成和 mRNA 转录受到抑制, 细胞转向合成热激蛋白 (Heat shock protein, Hsps)。按照 SDS 电泳的表现分子量大小可以把植物 Hsps 分为五大类: HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 以及小分子量热激蛋白 (smHSP)。每一类 Hsps 在结构上都具有不同程度的保守性, 它们在生理代谢或胁迫响应中行使不同的功能。每种植物体一般含有几类 Hsps, 但在胁迫条件下可能只有一种 Hsps 起主导作用^[57]。许多胁迫因子如高温、低温、重金属离子等都可以诱导 Hsps 合成。大量的研究已证实主要的热激蛋白都具有分子伴侣 (molecular chaperone, CPN) 的功能, 在胁迫条件下修复变

性的蛋白质或保护其它蛋白质免受损伤. Bierkens 等^[58]用 $ZnCl_2$ 和 SeO_2 等处理绿藻 *Raphidocelis subcapitata*, 发现二者可显著诱导 Hsp70 合成, 且 Hsp70 的合成都有剂量效应. 铜也能诱导绿藻 *Enteromorpha intestinalis* 合成 Hsp70^[59]. 重金属胁迫下热激蛋白的协同作用可能在清除重金属变性蛋白质、维持细胞的正常代谢和提高细胞的重金属抗性方面有重要作用. 毋庸置疑, 今后需要更多的实验来阐明 Hsp70 在藻类重金属胁迫中的具体功能.

6 液泡区室化作用

液泡区室化作用 (vacuolar compartmentalization) 在高等植物对重金属的耐性和解毒中起着重要作用^[21]. 最近, Pawlik-Skowrońska^[60]采用双硫腙法 (dithizone test) 分别研究了耐锌与锌敏感的 *Stigeoclonium tenue*, 结果表明锌定位在液泡外周, 因而推测液泡与锌固定和解毒有关. Heuillet 等^[61]应用 X 射线显微分析的方法研究 *Dunaliella bioculata*, Cd 暴露 20 天后在液泡里发现了 Cd 和 S, 但暴露 3 天时液泡中未检测到 Cd 的存在. Nassiri 等^[62]在处于 Cu 和 Cd 胁迫条件下的 *Skeletonema costatum* 的液泡中也检测到了 Cd 和 S, 并发现受重金属胁迫的细胞液泡体积增大, Cu 在液泡中较 Cd 富集少. 在高等植物中, 重金属-PCs 复合物合成后结合 S^{-2} 转运至液泡是一种重要的解毒方式. 藻类虽也能合成重金属-PCs 复合物, 但尚无直接的证据表明它进入液泡并发挥解毒作用. 在藻类细胞中, 通过结合硫可形成高分子量、更稳定的重金属-PCs 复合物^[24, 25], 在前述实验中, 藻类细胞液泡中硫的存在, 可能是由于低分子量的重金属-PCs 复合物结合硫之后所形成的高分子量重金属-PCs 复合物进入液泡所致. 因此, 液泡区室化作用在藻类耐受重金属胁迫方面可能也是重要的解毒方式之一, 至于藻类液泡如何整合重金属以及重金属-植物络合素出入液泡的机理尚有待深入研究.

7 藻类对重金属的排斥和排出作用

藻类对重金属的排斥和排出可能是重金属耐性的一种重要机制. 藻类细胞能以多种方式减少重金属的进入: (1)膜功能的改变, 重金属可导致膜透性降低^[63]; (2)细胞壁的改变^[64]. Rai 等^[63]分离到 *Anabaena douliolium* 的 Cu 耐性株, 与敏感株相比, 耐性株减少了 Cu^{2+} 的输入, 膜完整性提高, 脂含量增加. 在磷缺乏条件下, *Scenedesmus obtusiusculus* 的细胞壁加厚, Twiss 和 Nalewajko^[64]推测可能部分减少重金属的吸收. 褐藻 *Fucus serratus* 的铜耐性存在种群间差异, 耐性种群比敏感种群富集的 Cu 少, 但相对生长速率要高, 耐性种群可能在一定程度上通过排斥机制获得抗性^[65].

褐藻 *Fucus vesiculosus* 可能分泌配体到胞外络合 Cu 以改变 Cu 的离子形态, 也可能分泌已经络合了 Cu 的配体到胞外发挥解毒作用, Gledhill 等^[66]认为作为该藻解毒机制的一部分后一种可能性更大. Verma 和 Singh^[67]发现, 在 *Nostoc calcicola* 的 Cu 抗性突变株中存在依赖于能量的 Cu 排出机制, Yoshimura 等^[68]在 *Cyanidium caldarium* 的 Al 耐性株中也得到类似结果. 藻类是通过主动输出还是被动扩散输出重金属目前尚有争议, 但作为一种解毒机制藻类能排出重金属已被许多研究者认同.

8 展望

藻类作为海洋和内陆水体中重要的初级生产者, 在整个生态系统中有举足轻重的地位. 在水环境中, 藻类一旦富集重金属, 重金属便能进入食物链, 经过生物逐级放大, 高剂量的重金属将危及动物及人类的健康. 因此, 一方面利用藻类对重金属的耐性及解毒生物指示物或生物标志物, 进行水污染生物监测是国际上研究的热点之一, 另一方面藻类用于控制与修复水体重金属污染亦是一个有待发展的新兴领域. 近年来, 应用模式生物 (如拟南芥、酵母等) 研究重金属耐性及解毒机理已取得许多重要进展, 特别是关于高等植物 PCs 和 MTs 的研究有大量报道, 但涉及藻类对重金属的耐性及解毒分子机理的研究相对较少, 并且还有许多未知领域. 今后有必要在以下几个方面开展更多的研究工作: ①鉴定和克隆重金属转运蛋白、金属伴侣蛋白, 探讨重金属跨膜运输及胞内分送的分子机理; ②阐明 PCs 在重金属转运中的作用, 进一步说明重金属-PCs 复合物是进入液泡用于储存还是输出细胞用于解毒或是两者兼而有之; ③原核藻类中没有报道 PCs 的合成, 而真核藻类没有报道 MTs 的合成, 因此有必要加强原核藻类 PCS 基因与真核藻类 MTs 基因的分选鉴定; ④藻类 MTs 除了与 Zn 稳态有关, 还需进一步阐明 MTs 的其它功能; ⑤ Hsps 在重金属胁迫中的保护机制尚待

深入探讨; ⑥ PCs 本身含有半胱氨酸残基, 重金属 PCs - 高分子量复合物含硫, 在某些情况下它们可能作为硫库, 因此有必要研究 PCs 与硫代谢的关系; ⑦藻类响应重金属胁迫的信号转导途径及其保护机制也是下步需要深入研究的一个重要领域. 高等植物中重金属能与氨基酸或有机酸(如组氨酸、柠檬酸、草酸及苹果酸)结合, 从而起到解毒作用^[2], 这一点在藻类研究中尚未见报道. 藻类对重金属胁迫是生理上一系列的响应, 一些耐性机理有些还不清楚, 一些研究结果甚至不一致, 因此需要进一步从分子水平、细胞水平及机体水平进行广泛深入研究. 分离对重金属敏感的突变株, 鉴定、克隆相关基因, 或通过转基因技术获得重金属耐性株, 将有助于揭示藻类重金属耐性和解毒机制, 并推动相关领域研究.

参 考 文 献

- 1 Weast R C. *CRC Handbook of chemistry and physics*. 64th edn. Boca Raton, CRC Press, 1984
- 2 Hall J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*, 2002, 53: 1 - 11
- 3 Xue H B, Stumm W, Sigg L. The binding of heavy metal to algal surfaces. *Water Res*, 1988, 22: 917 - 926
- 4 Rangasayam N, Upatham E S, Krutachue M, et al. Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. *Environ Pollut*, 2002, 119: 45 - 53
- 5 Parker D L, Rai L C, Mallick N, et al. Effect of cellular metabolism and viability in metal ion accumulation by cultured biomass from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 1545 - 1547
- 6 Mehta S K, Tripathi B N, Gaur J P. Influence of pH, culture age and cations on adsorption and uptake of Ni by *Chlorella vulgaris*. *Eur J Protistol*, 2000, 36: 443 - 450
- 7 Xue H B, Sigg L. Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Res*, 1990, 24: 1129 - 1136
- 8 Ting Y P, Lawson F, Prince I G. Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: part II. Multi-ion situation. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 445 - 455
- 9 Genter R B. Ecotoxicology of inorganic chemical stress on algae. In: Stevenson R J, Bothwell M L, Lowe R L, eds. *Algal ecology-freshwater benthic ecosystems*. California: Academic Press, 1996: 403 - 468
- 10 Terry P A, Stone W. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. *Chemosphere*, 2002, 47: 249 - 255
- 11 De Philippis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and possible applications. *FEMS Microbiol Rev*, 1998, 22: 151 - 175
- 12 De Philippis R, Sili C, Paperi R, et al. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *J Appl Phycol*, 2001, 13: 293 - 299
- 13 Parker D L, Schram B R, Plude J R, et al. Effect of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C340. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 1208 - 1213
- 14 Kuyucak N, Volesky B. The mechanism of cobalt biosorption. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 33: 823 - 831
- 15 Fourest E, Volesky B. Contribution of sulphate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. *Environ Sci Technol*, 1996, 30: 277 - 282
- 16 Rauser W E. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1141 - 1149
- 17 Zenk M H. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene*, 1996, 179: 21 - 30
- 18 Rauser W E. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytyl and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys*, 1999, 31: 19 - 48
- 19 Cobbett C S, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 159 - 182
- 20 Grill E, Löffler S, Wintsacker E-L, et al. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6838 - 6842
- 21 Noctor G, Arisi A-C M, Jouanin L, et al. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot*, 1998, 49: 623 - 647
- 22 Hirata K, Tsujimoto Y, Namba T, et al. Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92: 24 - 29
- 23 Tsuji N, Hirayanagi N, Okada M, et al. Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 653 - 659
- 24 Hu S, Lau K W K, Wu M. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci*, 2001, 161: 987 - 996
- 25 Morelli E, Cruz B H, Somovigo S, et al. Speciation of cadmium-γ-glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci*, 2002, 163: 807 - 813
- 26 Morelli E, Scarano G. Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*.

- Mar Environ Res*, 2001, **52**: 383 - 395
- 27 Satoh M, Karaki E, Kakehashi M, *et al.* Heavy-metal induced changes in nonproteinaceous thiol levels and heavy - metal binding peptides in *Tetraselmis tetrahele* (Prasiophyceae). *J Phycol*, 1999, **35**: 989 - 994
- 28 Vallee B L. Introduction on metallothionein. *Methods Enzymol*, 1991, **205**: 3 - 7
- 29 Kagi J H R, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 1988, **27**: 8509 - 8515
- 30 Olafson R W, McCubbin W D, Kay C M. Primary and prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. Cyanobacterium. *Biochem J*, 1988, **251**: 691 - 699
- 31 Morris C A, Nicolaus B, Sampson V, *et al.* Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochem J*, 1999, **338**: 553 - 560
- 32 Turner J S, Morby A P, Whitton B A, *et al.* Construction and characterization of Zn²⁺/Cd²⁺ hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 4494 - 4498
- 33 Turner J S, Robinson N J. Cyanobacterial metallothionein: biochemistry and molecular genetics. *J Ind Microbiol*, 1995, **14**: 119 - 125
- 34 Chen Z, Ren Q, Shi D, *et al.* Expression of mammalian metallothionein-I gene in cyanobacteria to enhance heavy metal resistance. *Mar Pollut Bull*, 1999, **39**: 155 - 158
- 35 Liu T, Nakashima S, Hirose K, *et al.* A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett*, 2003, **542**: 159 - 163
- 36 Reddy G, Prasad M N V. Characterization of cadmium binding protein from *Scenedesmus quadricauda* and Cd toxicity reversal by phytochelatin constituting amino acid and citrate. *J Plant Physiol*, 1992, **140**: 156 - 162
- 37 Howe G, Merchant S. Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 1992, **98**: 127 - 136
- 38 Stohs S J, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, 1995, **18**: 321 - 336
- 39 Nagalakshmi N, Prasad M N V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci*, 2001, **160**: 291 - 299
- 40 Tsuji N, Hirayanagi N, Iwabe O, *et al.* Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry*, 2003, **62**: 453 - 459
- 41 Rai L C, Gaur J P, Kumar H D. Protective effects of certain environmental factors on the toxicity of zinc, mercury and methylmercury to *Chlorella vulgaris* Beij. *Environ Res*, 1981, **25**: 250 - 259
- 42 Singh A L, Asthana R K, Srivastava S C, *et al.* Nickel uptake and its localization in a cyanobacterium. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **99**: 165 - 168
- 43 Sicko - Goad L M, Stoermer E F. A morphometric study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyta). *J Phycol*, 1979, **15**: 316 - 321
- 44 Jensen T E, Baxter M, Rachlin J W, *et al.* Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environ Pollut*, 1982, **27**: 119 - 127
- 45 Hashemi F, Leppard G G, Kushner D J. Copper resistance in *Anabaena variabilis*: Effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microb Ecol*, 1994, **27**: 1159 - 1176
- 46 Nishikawa K, Yamakoshi Y, Uemura I, *et al.* Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acisophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **44**: 253 - 259
- 47 Wu J T, Chang S J, Chou T L. Intracellular proline accumulation in some algae exposed to copper and cadmium. *Bot Bull Acad Sin*, 1995, **36**: 89 - 93
- 48 Wu J T, Hsieh M T, Kow L C. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (Chlorophyceae). *J Phycol*, 1998, **34**: 113 - 117
- 49 Mehta S K, Gaur J P. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol*, 1999, **143**: 253 - 259
- 50 Delauney A J, Verma D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*, 1993, **4**: 215 - 223
- 51 Taylor C B. Proline and water deficit: Ups, downs, ins and outs. *Plant Cell*, 1996, **8**: 1221 - 1224
- 52 Shah K, Dubey R S. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: Role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol Plant*, 1998, **40**: 121 - 130
- 53 Farago M E, Mullen W A. Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorg Chim Acta*, 1979, **32**: L93 - L94
- 54 Smirnov N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989, **28**: 1057 - 1060
- 55 Alia, Mohanty P, Matysik J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 2001, **21**: 195 - 200
- 56 Siripornadulsil S, Traina S, Verma D P S, *et al.* Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metal in transgenic microalgae. *Plant Cell*, 2002, **14**: 2837 - 2847
- 57 陈 忠, 苏维埃, 汤章城. 植物热激蛋白. 植物生理学通讯, 2000, **36**(4):289 - 296
- 58 Bierkens J, Maes J, Plaetse F V. Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to

- different classes of environmental pollutants. *Environ Pollut*, 1998, **101**: 91 - 97
- 59 Lewis S, Donkin M E, Depledge M H. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat Toxicol*, 2001, **51**: 277 - 291
- 60 Pawlik-Skowrońska B. Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz. coming from habitats of different heavy metal concentrations. *Aquat Toxicol*, 2003, **75**: 189 - 198
- 61 Heuillet E, Moreau A, Halpern S, et al. Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. *Biol Cell*, 1986, **58**: 79 - 86
- 62 Nassiri Y, Mansot J L, Wery J, et al. Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1997, **33**: 147 - 155
- 63 Rai L C, Mallick N, Singh J B, et al. Physiological and biochemical characteristics of copper tolerant and a wild - type strain of *Anabaena doliolum*. *J Plant Physiol*, 1991, **138**: 68 - 94
- 64 Twiss M R, Nalewajko C. Influence of phosphorus nutrition on copper toxicity to three strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *J Phycol*, 1992, **28**: 291 - 298
- 65 Nielsen H D, Brownlee C, Coelho S M, et al. Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytol*, 2003, **160**: 157 - 165
- 66 Gledhill M, Nimmo M, Hill S J, et al. The release of copper-complexing ligands by the brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) in response to increasing total copper levels. *J Phycol*, 1999, **35**: 501 - 509
- 67 Verma S K, Singh H N. Evidence for energy-dependent copper efflux as a mechanism of Cu²⁺ resistance in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, **84**: 291 - 294
- 68 Yoshimura E, Nagasaka S, Sato Y, et al. Extraordinary high aluminium tolerance of the acidophilic alga, *Cyanidium caldarium*. *Soil Sci Plant Nutr*, 1999, **45**: 721 - 724

Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance in Algae

ZHOU Wenbin & QIU Baosheng

(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, P. R. China)

Abstract

With the development of industry and agriculture, more and more heavy metals are released into water bodies. Today, many heavy metals constitute a global environmental hazard. Heavy metals such as copper, zinc, and nickel are essential for many physiological processes yet can be toxic at higher levels. Other metals such as cadmium, mercury and lead are nonessential and potentially highly toxic. Algae possess a range of potential cellular mechanisms that may be involved in the detoxification of heavy metals and thus tolerance to metal stress. These include roles for the following: for sequestration of metals on extracellular components that reduce metal bioavailability; for chelation of metals in the cytosol by peptides and proteins; for sequestration of metals in polyphosphate bodies; for the compartmentation of metals away from metabolic process by transporting them into the vacuole; for increasing the efflux or exclusion of metals; for producing stress proteins such as heat shock proteins that repair the stress-damaged proteins; in addition, some heavy metals cause oxidative stress in algae, with the result that metal toxicity can be altered by synthesis of appropriate enzymes or metabolites counteracting metal-induced oxidative stress.

In recent years, some attempts to engineer the production of metallothioneins (MTs) and phytochelatins (PCs) in algae to increase metal tolerance and/or accumulation have been reported. To date, however, it is mainly the model plant species that have been genetically engineered. Phytoremediation strategies have been proposed as an attractive alternative owing to their low cost and high efficiency. The concept of phytoremediation of heavy metal contaminated water has been increasingly supported by research. And, algae have been widely used as pollution indicators in water quality determination. Thus, studies on tolerance and detoxification mechanism of heavy metal in algae have numerous ecological and public health implications.

Keywords: Algae; heavy metal tolerance; phytochelatins; metallothioneins; vacuolar compartmentalization