

铅污染对钝顶螺旋藻生长及 某些生理性状的影响*

周长芳 吴国荣 陆长梅 陈国祥 魏锦城

(南京师范大学生物系, 南京 210024)

提 要 通过在 Zarrouk 培养基中加入不同浓度的 Pb^{2+} , 研究水环境污染对钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 生长、藻蓝蛋白和光合作用、膜脂过氧化反应及以超氧化物歧化酶 (SOD) 为代表的自由基清除系统的影响. 发现当 Pb^{2+} 浓度高于 $20mg \cdot L^{-1}$ 时, 钝顶螺旋藻生长受抑制, 藻细胞随着浓度的升高和时间的延长而黄化死亡. 细胞可溶性蛋白含量、藻蓝蛋白含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均随着 Pb^{2+} 浓度增加而逐渐下降, 呈极显著的负相关. 低浓度 Pb^{2+} 使光合速率大幅度下降. 但完整细胞的吸收光谱在高浓度时才发生急剧变化. Pb^{2+} 处理使超氧阴离子 ($O_2^{\cdot -}$) 和丙二醛 (MDA) 含量上升, 其峰值分别出现在 $30mg \cdot L^{-1}$ 和 $40mg \cdot L^{-1}$ 处理组. SOD 活性在 $20mg \cdot L^{-1}$ 以上显著下降, 但其比活性在 $20 - 50mg \cdot L^{-1}$ 范围内仍维持较高水平, 且相对稳定.

关键词 铅污染 钝顶螺旋藻 生长量 超氧化物歧化酶活性

分类号 X503.2

重金属对水环境造成的污染已经引起人们的日益关注, 研究表明, 包括 Pb 在内的重金属对水生生物有不利影响^[1,2]. 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. 重金属通过各种途径进入水体后, 首当其冲的受害者是藻类生物, 将通过食物链进而危害人类. 因此, 从环境的角度看, 研究重金属对藻类的致毒效应至关重要. 目前, 有关重金属污染的研究相对集中于动物^[3], 而对藻类影响的报道则较少. 螺旋藻常用于科学研究, 且具有重大的经济价值, 可作为水生藻类代表. 本文以钝顶螺旋藻为材料, 研究 Pb 毒害对螺旋藻生长、藻蓝蛋白和光合作用、膜脂过氧化反应及以超氧化物歧化酶 (SOD) 为代表的自由基清除系统的影响, 以期探讨水体重金属污染对植物毒害的机理积累科学依据.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 由南京师范大学生物工程实验室提供, 用 Zarrouk 培养基培养于 400mL 三角瓶中, 在相同接种时间和生长密度的前提下, 加入 $Pb(NO_3)_2$ 至 Pb^{2+} 终浓度依次为 $10 - 80mg \cdot L^{-1}$, 培养待测.

藻类生长量在处理后的次日测定, 各项生理指标均在处理后 5d 测定. 实验重复 3 次, 取得一致的结果.

* 江苏省自然科学基金资助项目 (BJ98077).

收稿日期: 1998-10-09; 收到修改稿日期: 1998-12-17. 周长芳, 女, 1975 年生, 硕士研究生.

1.2 实验方法

1.2.1 生长量的测定 参照李建宏等的方法^[4],隔天测定 560nm 光吸收.

1.2.2 光合速率测定 应用薄膜氧电极法^[5],测定条件为 30℃、200Wm⁻²光照,且藻体密度保持相同.

1.2.3 室温吸收光谱的测定 参照王俊等的方法^[6],用 754 型紫外可见光分光光度计测定 400-740nm 之间的藻体光吸收变化.

1.2.4 藻细胞提取液的制备 抽滤收集藻细胞,以 50mmol pH7.8 的磷酸缓冲液洗涤,称取新鲜藻体悬浮于上述缓冲液中.冰浴下超声破碎(JY88-II 型超声波细胞破碎仪,150W,5min.其间工作 10s,间隙 10s),离心(4℃、12000×g、20min)收集上清液,保存于冰箱中待测.

1.2.5 可溶性蛋白含量的测定 参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 法^[7].

1.2.6 藻蓝蛋白和类胡萝卜素相对含量的测定 参照杜林芳等的方法^[8],将提取液稀释 10 倍,分别测定 620nm、490nm 光吸收.

1.2.7 超氧阴离子(O₂⁻)含量的测定 参照王爱国和罗广华的方法^[9].

1.2.8 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 参照 Stewert 和 Bewley 等的方法^[10].

1.2.9 丙二醛(MDA)含量测定 参照 Heath 等的硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[11],采用南京建成生物工程研究所 MDA 测定试剂盒.

2 结果

2.1 Pb²⁺ 污染对藻体生长的影响

接种后次日开始测定藻体生长量,其后隔天进行,直至处理 15d.从图 1 可以看出,10-20mg·L⁻¹ Pb²⁺ 处理组的藻体生长曲线与对照组基本平行,至 9d 后渐低于对照,显示钝顶螺旋藻对 Pb²⁺ 有一定的耐受性.在更高的 Pb²⁺ 浓度下,藻体密度下降,藻细胞黄化失绿,60mg·L⁻¹、70mg·L⁻¹ 和 80mg·L⁻¹ 处理组生长量显著变化的转折点分别为 7d、5d 和 1d,其后镜检,藻细胞逐渐死亡而成空泡.

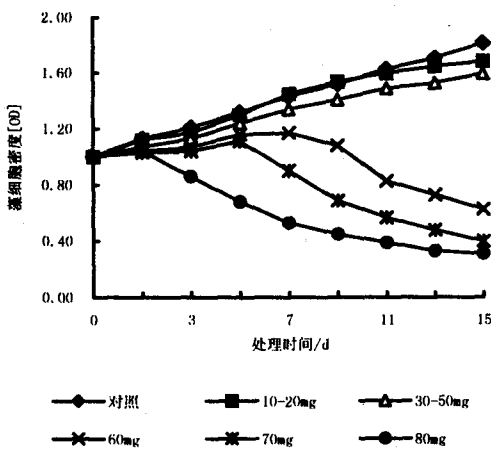


图 1 Pb²⁺ 对藻体生长量的影响

Fig. 1 Effect of Pb²⁺ on the yield of *S. platensis*

2.2 Pb²⁺ 对藻体可溶性蛋白和藻蓝蛋白的影响

处理 5d 后的测定结果表明,藻细胞可溶性蛋白含量随 Pb²⁺ 浓度的增加而降低(表 1),两者间呈极显著的负相关^①($r = -0.9580^{**}$).20mg·L⁻¹ Pb²⁺ 处理组可溶性蛋白下降了 23.8%,低于此浓度影响不明显.藻细胞蓝藻蛋白含量也随 Pb²⁺ 浓度的增加而逐渐降低(表 1),两者间同样呈极显著的负相关($r = -0.9725^{**}$).20mg·L⁻¹ Pb²⁺ 处理组藻蓝蛋白下降幅度较大,与可溶性蛋白的变化一致.

① ** 表示 $P < 0.01$, 以下同.

表 1 Pb^{2+} 对藻细胞可溶性蛋白、藻蓝蛋白含量的影响Tab.1 Effect of Pb^{2+} on soluble protein and phycocyanin content of *S. platensis*

Pb^{2+} 浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	对照	10	20	30	40	50	60	70
可溶性蛋白含量/ $mg \cdot g^{-1}$, FW	113.07	111.68	86.14	74.17	60.71	59.96	57.75	47.19
相对百分含量/%	100	98.8	76.2	66.1	53.7	53.0	51.1	58.3
藻蓝蛋白含量/ $A \cdot g^{-1}$, FW	299.59	280.74	240.82	232.82	191.91	183.94	175.30	100.56
藻蓝蛋白相对含量/ $A \cdot mg^{-1}$, pro	2.65	2.51	2.80	3.11	3.16	3.06	3.04	2.13

从 Pb^{2+} 对藻细胞色素系统的影响看,随着 Pb^{2+} 处理浓度的增加,藻蓝蛋白/类胡萝卜素相对比值下降(图 2).比较上述三者对 Pb^{2+} 的敏感度,可以认为是藻体可溶性蛋白 > 藻蓝蛋白 > 类胡萝卜素.

2.3 Pb^{2+} 对藻体光合作用和吸收光谱的影响

Pb^{2+} 严重抑制藻细胞的光合作用,在低浓度时就非常明显(图 3), $10mg \cdot L^{-1}$ 处理组以 O_2 释放量计的光合速率陡降近 50%,随着 Pb^{2+} 浓度的增加光合速率继续缓降,超过 $50mg \cdot L^{-1}$ 后,下降幅度又加大.

就吸收光谱而言,藻蓝蛋白吸收光谱的最大吸收值在红橙光部位的 620nm,而类胡萝卜素的最大吸收带在蓝绿光部位.从图 4 可以看出, Pb^{2+} 对藻细胞吸收光谱的影响在高浓度处理时才显现出来, $70mg \cdot L^{-1}$ 处理组吸收值明显下降, $80mg \cdot L^{-1}$ 处理组红橙光部位的吸收值下降幅度显著大于蓝绿光部位,且 620nm 处的吸收峰完全消失,680nm 处的峰也有变化,与藻蓝蛋白/类胡萝卜素比值下降的测定结果相符.

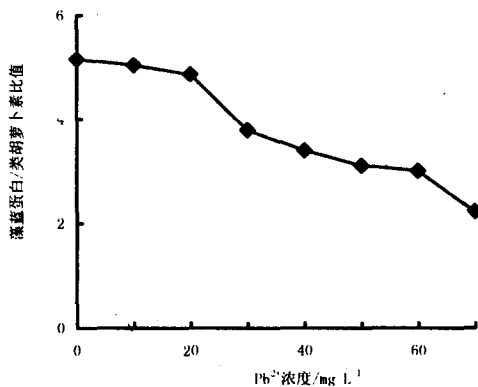
图 2 Pb^{2+} 对藻蓝蛋白与类胡萝卜素比值的影响

Fig.2 Effect of Pb^{2+} on ratio of phycocyanin/carotenoid of *S. platensis*

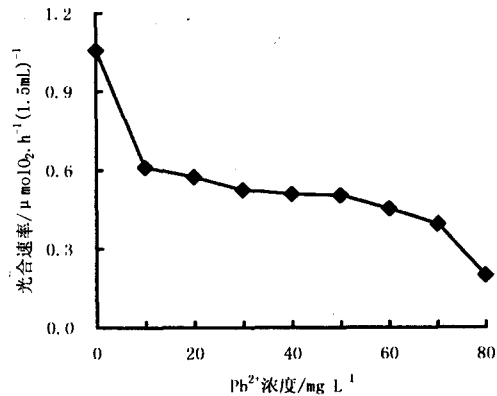
图 3 Pb^{2+} 对藻细胞光合速率的影响

Fig.3 Effect of Pb^{2+} on the photosynthetic rate of *S. platensis*

2.4 Pb^{2+} 对藻细胞 SOD 活性和 $O_2^{\cdot -}$, MDA 含量的影响

Pb^{2+} 处理后藻体的 $O_2^{\cdot -}$ 含量迅速升高(表 2), $20mg \cdot L^{-1}$ 和 $30mg \cdot L^{-1}$ 处理组的升幅分别为 217.3% 和 379.6%;更高浓度组的 $O_2^{\cdot -}$ 含量又有所回降.考虑到实验过程中藻体的死亡,以蛋白质为单位计更加确切,从表 2 中可以看出所有处理组的 $O_2^{\cdot -}$ 含量均显著高于对照,表

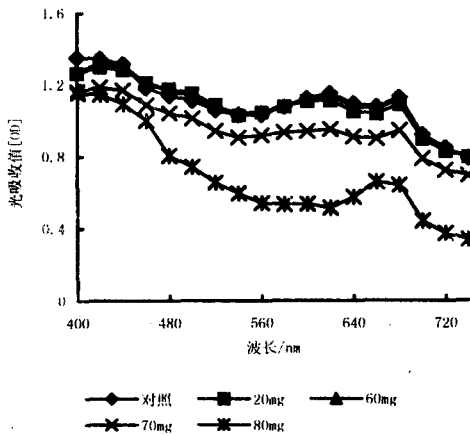


图 4 Pb^{2+} 对藻细胞吸收光谱的影响

Fig. 4 Effect of Pb^{2+} on the absorption spectrum of *S. platensis*

明 Pb^{2+} 严重影响机体的代谢, 导致 $O_2^{\cdot -}$ 大量产生.

在正常代谢过程中, 氧自由基的形成与清除系统处于动态平衡状态. 图 5 为 Pb^{2+} 处理后 $O_2^{\cdot -}$ 清除酶 SOD 活性和比活性的变化. 酶活性在 $20mg \cdot L^{-1}$ 处理组略有升高, 其后酶活性直线下降, 可溶性蛋白含量也同步下降 (表 1), 显然与 Pb^{2+} 对蛋白质及酶蛋白合成的抑制有关, SOD 活性与 Pb^{2+} 浓度之间呈极显著的负相关关系 ($r = -0.9177^{**}$). 但也应看到酶的比活性应激性升高, 在 $20 - 50mg \cdot L^{-1}$ 处理范围内维持高水平, 但 Pb^{2+} 浓度更高时, SOD 比活性则陡然下降. 显示出高浓度的 Pb^{2+} 对酶蛋白的毒害, 可见 SOD 对藻细胞的 Pb^{2+} 毒害虽有防护作用, 但只能在一定范围内起作用.

MDA 是膜脂过氧化产物, 藻细胞 MDA 含量大体上与 $O_2^{\cdot -}$ 含量相对应 (表 2), 但以 $40mg \cdot L^{-1} Pb^{2+}$ 处理组含量最高, 滞后于 $O_2^{\cdot -}$ 的峰位. Pb^{2+} 浓度继续升高, MDA 含量则呈下降趋势, 显示膜开始解体, 细胞出现死亡.

以单位蛋白质计算的 $O_2^{\cdot -}$ 相对含量、SOD 比活性与 MDA 相对含量三者之间的偏相关系数达到极显著程度 ($t = -0.6270^{**}$), 显示出一定浓度范围内的 Pb^{2+} 对藻细胞的毒害与细胞内的防护酶系之间的内在联系.

表 2 Pb^{2+} 对藻细胞 $O_2^{\cdot -}$ 和 MDA 含量的影响

Tab. 2 Effect of Pb^{2+} on $O_2^{\cdot -}$ and MDA content of *S. platensis*

Pb^{2+} 浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	对照	10	20	30	40	50	60	70
$O_2^{\cdot -}$ 含量/ $A \cdot g^{-1}$, FW	8.75	13.66	21.26	27.73	16.36	15.38	13.74	11.24
$O_2^{\cdot -}$ 相对含量/ $A \cdot mg^{-1}$, pro	0.0774	0.1223	0.2456	0.3712	0.2695	0.2565	0.2470	0.2382
MDA 含量/ $nmol \cdot g^{-1}$, FW	497.8	644.8	514.2	578.1	653.8	514.9	470.1	361.8
MDA 相对含量/ $nmol \cdot mg^{-1}$, pro	4.40	5.77	5.97	7.74	10.77	8.59	8.14	7.67

3 讨论

钝顶螺旋藻的生理生化代谢活动对 Pb^{2+} 是敏感的. $10mg \cdot L^{-1} Pb^{2+}$ 处理 5d, 光合速率陡降几达 50% (图 3), Pb^{2+} 可能抑制电子传递和同化力 (ATP、NADPH) 的形成, 使藻体敏锐地表现出光合速率的下降. $20mg \cdot L^{-1} Pb^{2+}$ 处理组, 藻细胞可溶性蛋白量和藻蓝蛋白量分别下降 23.8% 和 19.6% (表 1). $O_2^{\cdot -}$ 和 MDA 的积累量较对照要分别高出 217.3% 和 35.7% (表 2); $20mg \cdot L^{-1} Pb^{2+}$ 浓度以上 SOD 酶活性也显著下降. 这样低浓度的 Pb^{2+} 足以使藻体光合速率、可溶性蛋白、藻蓝蛋白含量和 SOD 酶活性显著下降及 $O_2^{\cdot -}$ 和 MDA 急剧积累, 显示出 Pb^{2+} 胁迫的毒性效应. 已知重金属 Pb 跟 Hg, Cd 一样会与蛋白质中半胱氨酸残基的 SH 基结合, 改变

酶活性部位周边蛋白质的构象,引起催化活性的改变;同时 Pb 可能使 t-RNA 变性和水解抑制蛋白质合成^[12].可以认为包括光合酶、SOD 等众多酶蛋白的功能部位被 Pb^{2+} 修饰以及蛋白质合成被抑制,是 Pb^{2+} 造成钝顶螺旋藻生理生化功能下降的直接原因.

实验表明, Pb^{2+} 处理造成藻细胞内 O_2^- 的剧升是反映 Pb^{2+} 胁迫造成藻细胞代谢性伤害的主要表现之一,结果导致膜脂氧化产物 MDA 含量的升高.SOD 催化清除 O_2^- 的反应,是细胞内重要的保护酶^[13],在逆境条件下 SOD 活性往往激活性提高^[14].本实验中虽然 SOD 比活性在 $20-50mg \cdot L^{-1} Pb^{2+}$ 处理 5d 时仍能维持较高水平(图 5),但 SOD 的总活性整体上随 Pb^{2+} 处理浓度的提高呈持续下降的趋势,表明在较高 Pb^{2+} 浓度下机体中的 SOD 与 O_2^- 未能建立起新的平衡,因而以 SOD 为代表的自由基清除系统对 Pb^{2+} 毒害的保护作用是有限度的.有资料表明,在生物体内 Fe 型、Mn 型、Cu-Zn 型 SOD 同时存在有利于机体适应内外环境,包括环境中的金属成分及含量的变化,确保 O_2^- 在各种条件下均能被有效清除^[13].作者也发现外源的复合型 SOD 对动物细胞防护 Pb^{2+} 毒害有明显效果^[15].原核生物钝顶螺旋藻体内仅含有 Fe-SOD,且该类型 SOD 为非诱导酶.单一的 Fe 型 SOD 是否是限制钝顶螺旋藻抗御重金属 Pb 胁迫能力的原因之一,有待进一步探讨.

从模拟水体重金属 Pb^{2+} 污染的藻体生长状况看, $20mg \cdot L^{-1} Pb^{2+}$ 污染短期内对钝顶螺旋藻生长的影响并不明显,但随着培养时间的延长,其生长速度逐渐低于对照;在更高的 Pb^{2+} 浓度下,藻细胞开始出现明显的黄化症状,且出现的时间随 Pb^{2+} 浓度的提高而缩短.揭示 Pb^{2+} 在藻细胞中有一个积累过程,随积累量的增加逐渐产生毒害和致死作用,这与前人报道的 Pb^{2+} 的积累和时间效应一致^[2,16,17].也可用环境监测中常用的一定时间内的半忍受限 LC_{50} 来衡量^[18].作者正结合藻体中 Pb 的存在状态和积累量的分析测定,以探讨钝顶螺旋藻在不同环境条件下对 Pb^{2+} 的耐受性阈值.

参 考 文 献

- 1 Bake M d, Mayfield C I, Inniss W E. Toxicity of pH, heavy metals and bisufte to a freshwater green algae. *Chemosphere*. 1983, 12(1):35-44
- 2 Capelo S, et al. Effect of lead on the uptake of nutrients by unicellular algae. *Water Res*, 1993, 27(10):1563-1568
- 3 J Maheo, K Chevanne M, et al. Oltipraz stimulates the transcription of the manganese superoxide dismutase gene in rat hepatocytes, Antras-Ferry. *Carcinogenesis*, 1997, 18(11):2113-2117
- 4 李建宏, 郇子厚, 曾昭琪. Cu 对 *Spirulina maxima* 光合作用的抑制机理. *植物生理学报*, 1997, 23(1):77-82
- 5 李德耀, 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

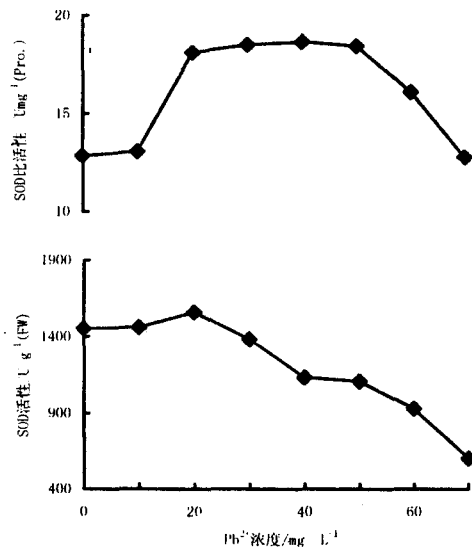


图 5 Pb^{2+} 对藻细胞 SOD 的活性的影响

Fig.5 Effect of Pb^{2+} on the SOD activity of *S. platensis*

- 6 王俊,梁后果,杜林方等. 蚕豆叶中具 DCIP 光还原活性的 D1 - D2 - Cytb559 复合物的纯化和特性研究. 中国科学(B 辑), 1991, (5):479 - 485
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 - 254
- 8 杜林方,付华龙,邹晓东. 铜离子对钝顶螺旋藻完整细胞光系统 II 活性和藻胆体能量传递的影响. 植物学报, 1995, (2): 109 - 113
- 9 王爱国,罗光华. 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, 1990, **26**(6):55 - 57
- 10 Stewert R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 1980, **65**: 245 - 248
- 11 Heath RL, Parker L. Photoperitition in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Bio-phy*, 1968, **25**:189 - 198
- 12 E. L 奥西埃(加拿大)著. 罗锦新、陈汉文译, 生物无机化学导论. 北京: 化学工业出版社, 1987. 478 - 483
- 13 陈淮杨, 刘望夷. 从超氧化物歧化酶的分布和结构看其分子进化. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(5): 408 - 413
- 14 Scandalio JG. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol*. 1993, **101**:7 - 12
- 15 毛伟平, 吴国荣, 魏锦城. SOD 复合酶对铅造成培养细胞损伤的保护作用研究. 当代地方科学杂志, 1997, **15**(7):34 - 35
- 16 Kumar D, Jha M, Kumar HD. Heavy-metals toxicity in the cyanobacterium *Nostoc Linckia*. *Aquatic Botany*, 1982, **22**:101 - 105
- 17 Xu Chao, Yuan Jing, Xu Heping. Effects of lead, cadmium, mercury chlorides and aquatic environmental samples on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Sciences*, 1995, **7**(4):455 - 460
- 18 吴鹏鸣主编. 环境监测原理与应用. 北京: 化学工业出版社, 1989. 289 - 290

Effect of Pb^{2+} on the Growth of *Spirulina platensis* and Its Physiological Characters

ZHOU Changfang WU Guorong LU Changmei CHEN Guoxiang WEI Jincheng
(Department of Biology Nanjing Normal University, Nanjing 210008)

Abstract

In this paper, we studied the growth of *S. platensis* in mimic Pb^{2+} polluted environment with different concentration from 10 to 80 $mg \cdot L^{-1}$. The results showed that the growth rate of *S. platensis* was inhibited by Pb^{2+} above 20 $mg \cdot L^{-1}$, *S. platensis* yellowed and died with Pb^{2+} concentration increasing and time going. The soluble protein, phycocyanin and the ratio of phycocyanin to carotenoid were all decreased. Each had a noticeable correlation with the Pb^{2+} concentration. Lower concentration of Pb^{2+} could decrease the photosynthetic O_2 evolution of *S. platensis*, yet the absorption spectrum of *S. platensis* was only seriously changed on high Pb^{2+} concentration. Contents of $O_2^{\cdot -}$ and MDA were also changed, each reached its maximum at 30 $mg \cdot L^{-1}$ and 40 $mg \cdot L^{-1}$. The activity of SOD was decreased obviously when above 20 $mg \cdot L^{-1}$, but its relative activity was higher and quite steady at Pb^{2+} concentration from 20 to 50 $mg \cdot L^{-1}$.

Key Words Pb^{2+} pollution, *Spirulina platensis*, growth rate, SOD activity