

钝顶螺旋藻耐 Cd 性能及其生理响应

彭 方, 胡 超

(湖北工程学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

摘 要: 通过不同浓度镉胁迫实验, 对钝顶螺旋藻的生长、形态、可溶性蛋白含量及抗氧化酶活性进行分析, 研究钝顶螺旋藻对重金属镉胁迫的响应情况。实验显示: 低浓度 Cd^{2+} 胁迫 (低于 20 mg/L) 可促进钝顶螺旋藻的生长, 在 Cd^{2+} 浓度为 10 mg/L 时藻细胞的生长达到最大, 当 Cd^{2+} 浓度超过 20 mg/L 时, 藻细胞的生长受到明显的抑制, SEM 观察发现藻丝形状发生畸变, 出现断藻现象, 藻体干瘪甚至无法保持完整的螺旋形态, Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻的 96 h- EC_{50} 为 38.3 mg/L; 随着 Cd^{2+} 浓度的增加, 藻细胞中可溶性蛋白含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 及过氧化氢酶 (CAT) 活性均呈现先升后降的趋势, 可溶性蛋白含量在镉浓度为 5 mg/L 时达到最大值, 略高于对照组 (无 Cd^{2+} 添加), 之后随着镉浓度的上升而逐渐减小, 且均低于对照组, SOD、POD 及 CAT 活性均显著高于对照组, 在 Cd^{2+} 浓度为 20 mg/L 时 3 种酶活性最大。研究结果表明, 钝顶螺旋藻对低浓度镉有较好的耐受性, 可为钝顶螺旋藻应用于污水处理提供一定的理论参考。

关键词: 镉胁迫; 耐受性; 生理响应; 钝顶螺旋藻

中图分类号: O945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-4824(2021)06-0037-05

水体重金属污染已成为当今世界上较严重的环境问题, 不仅对水生植物、动物产生严重危害, 并可能通过食物链影响到人类健康^[1]。镉 (Cd) 是水体中污染最严重的元素之一, 能破坏植物体光合器官和叶绿体结构, 抑制叶绿素的生物合成^[2]。吕芳等^[3]研究表明 Cd^{2+} 胁迫下铜藻 (*Sargassum horneri*) 岩藻黄素和褐藻多酚的含量明显下降, 且活性成分随 Cd^{2+} 胁迫浓度的增加而减少。尹文珂等^[1]研究显示, 四尾栅藻 (*Scenedesmus quadricauda*) 色素含量随 Cd^{2+} 质量浓度增加而降低, 可溶性蛋白含量随 Cd^{2+} 浓度增加呈现出先上升后下降的趋势。Kováčik 等^[4]研究指出, 生长在含镉培养液中的四尾栅藻, 叶绿素含量、可溶性蛋白和可溶性酚含量下降。上述研究表明 Cd 对水生生物生理指标的影响并不是线性的, 且不同水生生物对 Cd 的响应不同。

钝顶螺旋藻 (*Spirulina latensis*) 属蓝藻门,

丝状藻, 藻丝宽 4 ~ 5 μm , 长 400 ~ 600 μm , 易附着在基质上形成生物膜体系, 有利于污水的分离。有研究报道^[5-6], 钝顶螺旋藻对污水中的氮磷具有较强的去除能力, 并对水体中 Cd^{2+} 表现出较强的吸附和富集能力。这表明其可能在利用污水中氮、磷等营养物质生长的同时有效地去除污水中的重金属, 对处理复合污水具有较好的潜力^[7-9]。虽然国内外大量研究从抗氧化层面研究了微藻对重金属胁迫的响应, 但缺乏响应机理的生理学层面分析, 这使钝顶螺旋藻在水处理和水污染修复领域的应用受到限制。系统研究钝顶螺旋藻的耐 Cd 特性及其生理响应可为响应机理的研究提供重要参考。

本文研究钝顶螺旋藻在不同浓度镉离子胁迫下, 细胞生长、形态、可溶性蛋白含量及抗氧化酶活性的变化, 探讨其对重金属镉的耐受性, 旨在为进一步处理含重金属的废水提供科学依据。

收稿日期: 2021-09-08

作者简介: 彭 方 (1987-), 男, 湖北应城人, 湖北工程学院生命科学技术学院教师, 硕士。

胡 超 (1981-), 男, 湖北应城人, 湖北工程学院生命科学技术学院副教授, 博士。

1 材料与方法

1.1 实验材料

钝顶螺旋藻 (*Spirulina latensis*) 购自中国科学院武汉水生生物研究所国家淡水藻种库 (FACHB), 用 CdCl_2 (分析纯) 配置 1.0 g/L 的 Cd^{2+} 储备液。

采用 Zarrok 培养基^[10]。藻细胞经超纯水清洗 3 次, 在无菌的条件下用接种环将藻细胞接种于含培养基的三角瓶中, 混匀, 在温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照强度 2500 Lux, 光暗比为 12:12 的条件下培养, 每天定时摇瓶 3 次。培养基使用前需经高压蒸汽灭菌锅灭菌 (121°C , 0.5 h) 处理, 冷却至室温后用 1.0 mol/L、0.1 mol/L 和 0.01 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 为 9.0 ± 0.1 。

1.2 实验方法

1.2.1 钝顶螺旋藻毒性实验

取适量对数生长期的钝顶螺旋藻藻液过滤, 并用超纯水清洗 3 次, 收集藻细胞, 将藻细胞接种到不同浓度重金属培养液中振荡培养。根据预实验的结果, 设定 Cd^{2+} 的浓度分别为 0、5、10、20、40、80 mg/L, 初始藻生物量取 $\text{OD}_{560} = 0.1$ (干重浓度 0.1 g/L), 控制培养条件一致, 实验周期为 4 d, 每天定时取样测定生物量浓度。每个梯度设定 3 个平行, 结果取平均值。

1.2.2 蛋白质及酶活性的测定

取培养 96 h 后的藻液 15 mL 置于 25 mL 离心管中离心 (4000 r/min, 10 min), 弃去上清液, 然后加入 15 mL 超纯水后离心洗涤, 重复 3 次后弃去上清液, 改加 15 mL 磷酸盐缓冲液 (pH=7.2), 于冰浴中超声破碎 10 min (采用 SZ-II D 型超声

波细胞粉碎机, 其间工作 3 s, 间歇 2 s), 离心 (4°C , 10000 r/min, 15 min) 收集上清液, 保存于冰箱中待测。可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定采用试剂盒直接测定 (试剂盒购于南京建成生物工程研究所)。所有酶比活以每毫克蛋白计。

1.2.3 藻细胞的形态观察

取培养 96 h 后的藻液 15 mL 置于 25 mL 离心管中离心 (4000 r/min, 10 min), 弃去上清液, 然后加入 15 mL 超纯水后离心洗涤, 重复 3 次后弃去上清液, 收集藻细胞备用。利用扫描电镜 (SEM) 观察藻细胞形态。

1.3 数据分析

藻细胞生长抑制率用式(1)计算:

$$X\% = (I_0 - I) / I_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: X 为细胞生长抑制率, I_0 为对照组, I 为实验组。利用 Logistic 曲线拟合抑制率, 计算出 Cd^{2+} 的 96 h-EC 50 值。

2 结果与讨论

2.1 不同 Cd^{2+} 浓度对钝顶螺旋藻生长的影响

不同浓度重金属镉连续暴露 4 d 后, 钝顶螺旋藻的生长曲线和干重如图 1 所示。从图 1 可以看出, 较低浓度 (5 ~ 20 mg/L) 的 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻的生长表现出一定程度的促进作用, 最大促进作用分别为 11.9%、12.9% 和 5.1%; 随着溶液中 Cd^{2+} 浓度的增大, 钝顶螺旋藻的生长又会受到抑制, 并且重金属浓度越大, 藻细胞生长受到的抑制作用越强, Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻的 96 h-EC 50 为 38.3 mg/L。

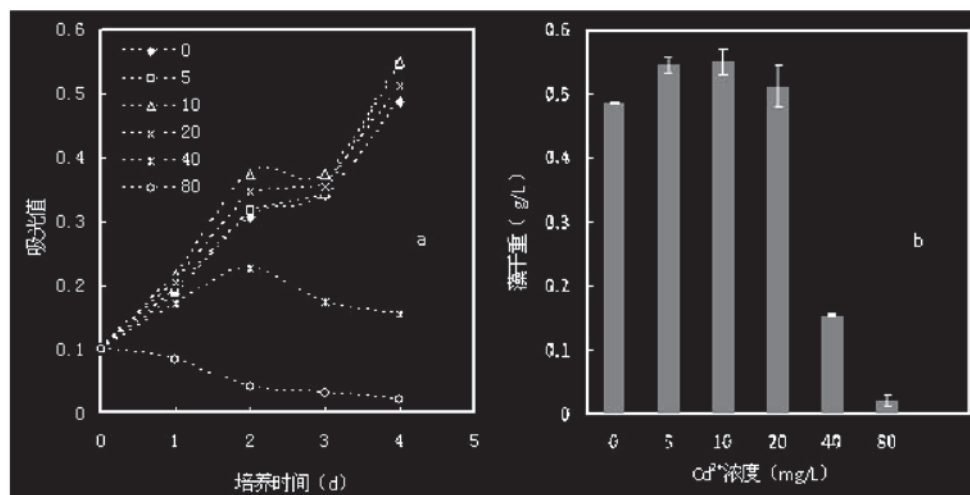
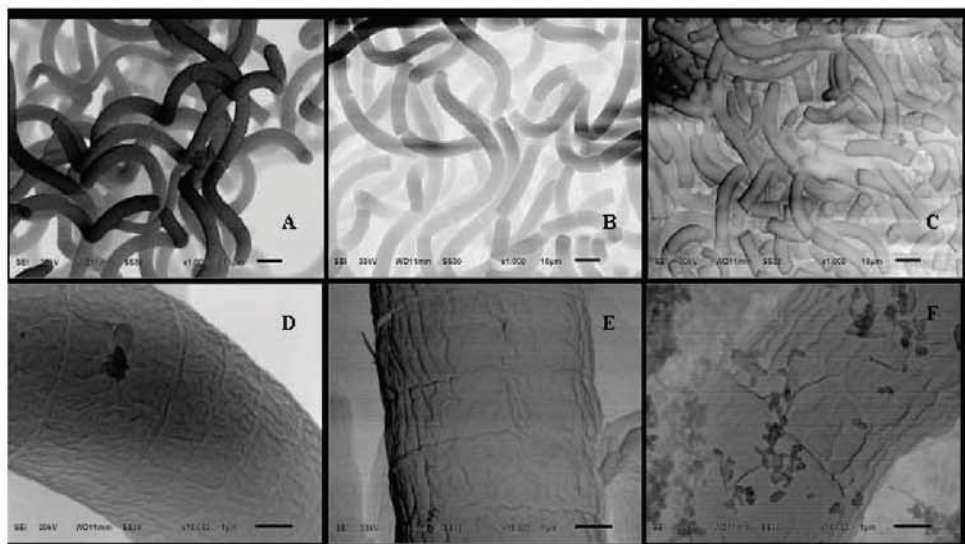


图 1 不同浓度 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻生长曲线(a)及生物量(b)的影响

钝顶螺旋藻的藻密度和干重值越大,藻丝越完好无损,说明其生长得越好。在电镜下观察钝顶螺旋藻在不同浓度 Cd^{2+} 暴露下的形态变化,结果如图 2 所示。正常对照组中(图 2A、图 2D),藻丝形状呈规则的螺旋卷曲状,藻体较长,完好无断裂,藻体顶端细胞钝圆,藻细胞饱满光滑;在低 Cd^{2+} 浓度下(5 ~ 20 mg/L),藻丝形状发生畸变,部分呈螺旋,出现断藻现象,藻细胞出现一定程度

的干瘪(图 2B、图 2E);而高浓度处理($\text{Cd}^{2+} > 20$ mg/L)则断裂现象严重,已无法观察到完整的螺旋形藻丝,均为断裂碎片,藻体表面褶皱加深(图 2C、图 2F)。以上结果表明,低浓度 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻的生长表现出一定的促进作用,对藻细胞的形态存在影响;高浓度 Cd^{2+} 对藻的生长表现出明显的抑制和损伤作用。



A-C:1000 倍;D-F:15000 倍

图 2 Cd^{2+} 胁迫下钝顶螺旋藻电镜图片

2.2 不同 Cd^{2+} 浓度对钝顶螺旋藻中可溶性蛋白的影响

可溶性蛋白大多数是功能蛋白和参与各种代谢的酶类,是植物适应环境、增强抗逆性的基础,因此可作为衡量植物代谢水平的重要指标^[3,11-12]。不同浓度 Cd^{2+} 暴露下,藻细胞中可溶性蛋白的含量如图 3 所示,随着 Cd^{2+} 浓度的增加,可溶性蛋白呈现先上升后下降的趋势。这与叶鹏浩等^[13]及蒯玉琴等^[14]的研究结果一致。本研究中,在 Cd^{2+} 浓度为 5 mg/L 时,可溶性蛋白浓度达到最大;当 Cd^{2+} 浓度超过 10 mg/L 时,可溶性蛋白浓度显著降低。其主要原因是较低浓度的 Cd^{2+} 能诱导钝顶螺旋藻产生可溶性蛋白以减轻自身的伤害,但随着 Cd^{2+} 浓度和处理时间的增加,被藻体吸收的 Cd^{2+} 与 $-\text{SH}$ 基结合导致蛋白变性,也可能是 Cd^{2+} 取代了酶蛋白的活性中心,影响了酶的活性,导致蛋白质合成受阻,从而降低了藻细胞中可溶性蛋白的含量^[3,12]。

2.3 不同 Cd^{2+} 浓度对钝顶螺旋藻中抗氧化酶活性的影响

在重金属胁迫下,植物体内会产生大量的活

性氧自由基,通常情况下,植物体内的抗氧化防御系统会通过清除自由以维持体内环境的相对稳定,一旦超过植物自我清除的能力,这些自由基会与脂质、蛋白质、核酸等物质发生反应,引起脂质过氧化、膜损伤和酶失活,从而影响细胞的性能和生存能力,甚至导致植物死亡^[15-17]。

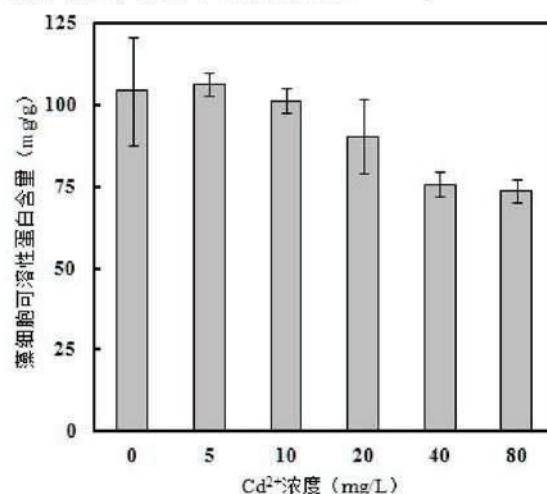


图 3 不同浓度 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻中可溶性蛋白的影响

SOD 是植物体内的重要保护酶,能够通过歧化反应有效地将活性较强的超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)转

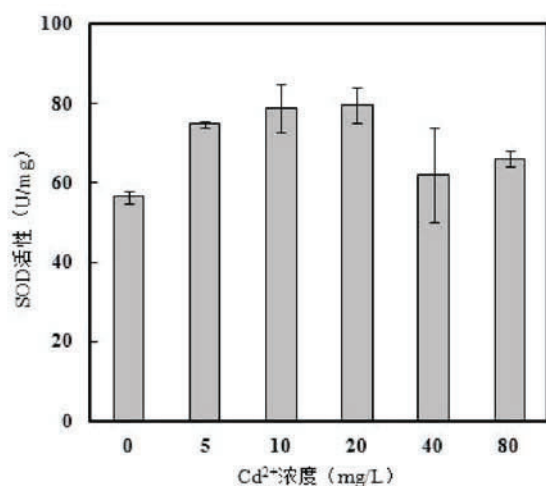
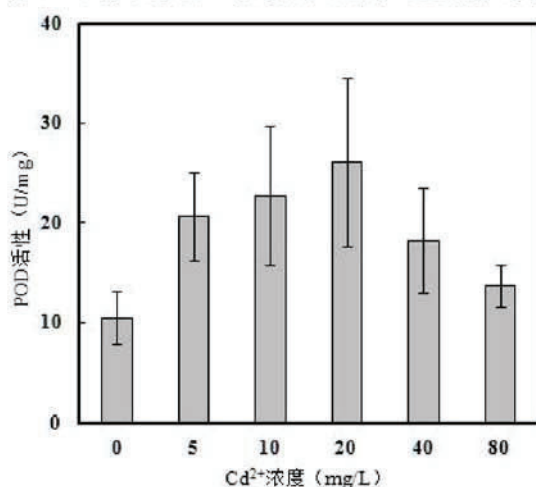
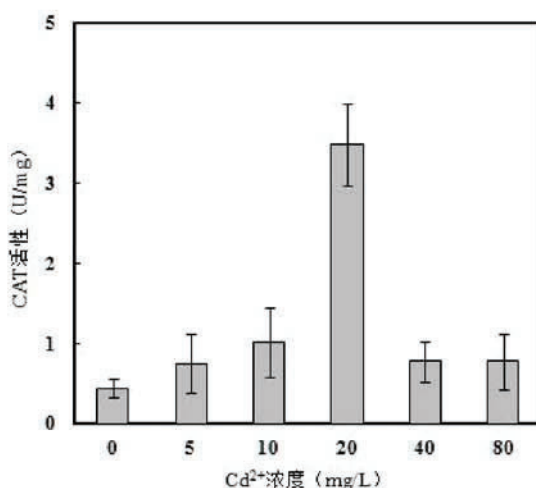
图4 不同浓度 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻中 SOD 活性的影响图5 不同浓度 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻中 POD 活性的影响

图6 不同浓度 Cd^{2+} 对钝顶螺旋藻中 CAT 活性的影响

化为活性较弱的 H_2O_2 , 而 POD、CAT 可以清除细胞内的 H_2O_2 , 进而防止 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 生成活性更强的羟基自由基($\text{OH}\cdot$)^[18]。不同 Cd^{2+} 浓度下, 钝顶螺旋藻中抗氧化酶活性影响如图 4、图 5、图 6 所示。相对于对照组(无 Cd^{2+} 添加), Cd^{2+} 胁迫下, 钝顶螺旋藻中的 SOD、POD 和 CAT 活性均

有提高, 且在 Cd^{2+} 浓度为 20 mg/L 时, 3 种酶的活性达到最大; 随着重金属 Cd^{2+} 浓度增加, 3 种酶的活性均表现出“低促高抑”的现象。这表明 Cd^{2+} 胁迫能促使钝顶螺旋藻抗氧化系统产生应激反应, 清除体内过多的自由基而保持相对活性, 且在低浓度 Cd^{2+} 条件下, 应激反应更显著; 然而高浓度(>20 mg/L)使藻体的正常代谢受到影响甚至遭到破坏, 抑制了抗氧化系统反应能力, 导致抗氧化酶活性显著下降。

3 结论

虽然重金属镉对钝顶螺旋藻有一定的毒害作用, 但在低浓度的镉(低于 20 mg/L)胁迫下, 钝顶螺旋藻可调节藻细胞内可溶性蛋白含量及抗氧化酶(SOD、POD 及 CAT)活性来抵御外界重金属的毒害作用以保证其正常生长; 钝顶螺旋藻对低浓度镉具有良好的适应性和耐受性, 可为钝顶螺旋藻应用于污水处理提供一定的理论参考。

[参 考 文 献]

- [1] 尹文珂, 程金凤, 肖婉露, 等. 四尾栅藻对重金属镉胁迫的响应[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(4): 633-638.
- [2] GRATÃO P L, POLLE A, LEA P J, et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier[J]. Functional Plant Biology, 2005, 32(6): 481.
- [3] 吕芳, 詹冬梅, 郭文, 等. 重金属镉对铜藻生长及其生物活性成分积累的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(6): 664-670. 吕芳, 詹冬梅, 郭文, 等. 重金属镉对铜藻生长及其生物活性成分积累的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(6): 664-670.
- [4] KOVÁČIK J, KLEJDUS B, ŠTORK F, et al. Comparison of methyl jasmonate and cadmium effect on selected physiological parameters in Scenedesmus quadricauda (chlorophyta, chlorophyceae)[J]. Journal of Phycology, 2011, 47(5): 1044-1049.
- [5] 彭方, 唐斐, 梁志杰, 等. 钝顶螺旋藻脱氮除磷效果及条件优化[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(9): 1870-1875.
- [6] 蒋心诚, 李彩云, 周旭东, 等. 活体微藻对镉(II)的富集机理[J]. 环境工程学报, 2018, 2(5): 1382-1388.
- [7] 周旭东, 李彩云, 高鹏程, 等. 活体微藻吸附水体中 Cd^{2+} 的性能特征[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1182-1188.

- [8] 商洪国, 吴楠, 韩飞, 等. 微藻对海水养殖循环水高效碳氮磷一体化去除的研究[J]. 环境科学学报, 2021, 41(9): 3408–3417.
- [9] ZHOU W, LI Y, GAO Y, et al. Nutrients removal and recovery from saline wastewater by *Spirulina platensis*[J]. Bioresource technology, 2017, 245: 10–17.
- [10] CONVERTI A, SCAPAZZONI S, LODI A, et al. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(1): 8–16.
- [11] 陈兰洲, 汪静, 武艳芳, 等. 纤细席藻对重金属镍胁迫的响应研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(4): 45–50.
- [12] 王荣霞, 敏黄, 陈傅晓, 等. 棒叶蕨藻变种对重金属 Cu、Pb 和 Cd 胁迫的生理响应[J]. 渔业现代化, 2017, 44(2): 25–29.
- [13] 叶鹏浩, 韩婷婷, 付贵权, 等. 半叶马尾藻对重金属镉胁迫的生理响应[J]. 南方水产科学, 2019, 15(5): 35–40.
- [14] 蒯玉琴, 任春燕, 朱巧巧, 等. Cr^{3+} 胁迫对小球藻生理生化特性的影响[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 228–233.
- [15] 尹希, 陈填烽, 杨芳, 等. 硒对 H_2O_2 胁迫钝顶螺旋藻的保护作用及其机制[J]. 西北植物学报, 2010, 30(4): 733–740.
- [16] MALEKI M, GHORBANPOUR M, KARIMAN K. Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress[J]. Plant Gene, 2017, 11: 247–254.
- [17] 杨雨嘉, 支崇远, 李培林, 等. 重金属 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对一种曲壳藻生长情况及其抗氧化酶活性的影响[J]. 生态科学, 2015, 34(6): 75–80.
- [18] 杨洪, 黄志勇. 锌胁迫对小球藻抗氧化酶和类金属硫蛋白的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(22): 7117–7123.

Study on the Cd Tolerance and Physiological Response of *Spirulina platensis*

Peng Fang, Hu Chao

(School of Life Science and technology, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000, China)

Abstract: In this study, the growth, morphology, soluble protein content and antioxidant enzyme activity of *Spirulina platensis* were analyzed in different concentrations of cadmium (0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L) stress experiments to explore the tolerance and physiological response of *S. platensis*. It was proved that low concentration of Cd^{2+} stress (5 ~ 20 mg/L) can promote the growth of *S. platensis*. The growth of algae cells reached the maximum when Cd^{2+} concentration was 10 mg/L. However, it was significantly inhibited when the concentration exceeded 20 mg/L. SEM showed the algal body was dried and even could not maintain the complete spiral shape. The 96 h-EC50 of Cd^{2+} against *S. platensis* was 38.3 mg/L. With the increase of Cd^{2+} concentration, soluble protein content and activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in algae cells increased firstly and then decreased. Soluble protein content reached the maximum value in 5 mg/L cadmium, which was slightly higher than that in the control group (without Cd^{2+} addition), but the activities of SOD, POD and CAT were increasing significantly and the maximum appeared in 20 mg/L. The results indicated that *S. platensis* had a good tolerance to low cadmium concentration (less than 20 mg/L), which could provide a theoretical reference for the application of *S. platensis* in wastewater treatment.

Key Words: cadmium stress; tolerance; physiological response; *Spirulina platensis*

(责任编辑: 邹礼平)