

Cd²⁺ 胁迫下不同浓度 N、P 对江蕨体内谷胱甘肽的影响

张皓

(常州市环境监测中心站, 江苏 常州 213001)

摘 要: 以大型海藻细基江篱繁枝变型 (*Gracilaria tenuistipitata* Var) 为实验材料, 研究了 Cd²⁺ 胁迫下, 不同 N、P 条件对江蕨体内谷胱甘肽 (GSH) 及其衍生物含量的影响。结果表明, Cd²⁺ 胁迫条件下, 不加入 N、P 时, 藻体内的 GSH 及其各类衍生物含量均较低, 易受金属离子侵入毒害藻体; 加入适量的 N、P (560 μmol/L, 56 μmol/L) 有利于提高藻体内 GSH 及其各类衍生物的含量, 增强藻体重金属抗性; 加入过量的 N、P (2 160 μmol/L, 216 μmol/L) 反而抑制了藻体内谷胱甘肽及其各类衍生物的合成, 降低了藻体重金属抗性; 同时加入 N、P 要比加入单一的营养盐更有利于提高藻体的 GSH 及其各类衍生物的含量, 增强藻体重金属抗性。实验有利于进一步研究重金属与富营养化复合污染水体中藻类的生物修复。

关键词: 江蕨; 谷胱甘肽; Cd²⁺ 胁迫; 营养盐; 生物修复

中图分类号: X 171 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2011)01-0028-03

Effects of Cd²⁺ Stress at Different N, P Concentration Levels on GSH in Gracilaria

ZHANG Hao

(Changzhou Environmental Monitoring Center, Changzhou, Jiangsu 213001, China)

Abstract Large algae (*Gracilaria tenuistipitata* Var.) was used as a experimental material to study the different N, P concentration levels acting on glutathione and its derivatives contents in Gracilaria under stress of Cd²⁺. The results showed that under the condition of Cd²⁺ stress, glutathione contents was at a low level when there was no N, P in the water; the contents raised at appropriate N, P concentrations (560 μmol/L, 56 μmol/L); oppositely the contents depressed at excessive N, P concentrations (2 160 μmol/L, 216 μmol/L); the contents increased when N and P together had added into water rather than N or P separately. The experiment should help for further research work on algae bioremediation in eutrophic water body polluted by heavy metals.

Key words *Gracilaria tenuistipitata* Var.; Glutathione; Cadmium stress; Nutrient salt; Bioremediation

陆源径流输入、大气沉降输入、海水养殖废水排放和水流状态, 如水交换能力弱、水的滞留时间长等原因, 导致近海富营养化日益严重; 同时, 随着现代工业的迅速发展, 生产过程中排出的有害重金属离子也日益增加, 由于工农业污水的滥排滥放, 导致近海的重金属离子的含量增高。重金属污染物不仅直接破坏自然环境, 危害我国近海养殖业的发展, 而且还会给人们的身体健康带来危害, 甚至给国民经济造成重大损失^[1-3]。

关于营养盐与重金属的复合污染已经成为研究海洋污染的一大热点。许多学者都采用大型藻类作为生物修复材料对受污染水体进行修复^[4-6]。

要了解其生物修复的功效, 必须了解藻体在重金属和富营养化复合污染水体中生理生化变化机制。

谷胱甘肽 (glutathione, 简称 GSH) 作为生物体内最主要的非蛋白巯基和含量最丰富的低分子量多肽, 不仅能直接参与植物的抗逆活动, 而且能通过植物体内各种酶的作用产生各种衍生物 (如 GST、GSH-PX 等) 参与到抗逆活动中^[7-10], 在植

收稿日期: 2010-08-23 修订日期: 2010-12-08

基金项目: 江苏省环境保护科研课题——工业污水处理厂毒性削减评估及管理机制研究基金资助项目 (2009027)

作者简介: 张皓 (1984-), 男, 江苏镇江人, 助理工程师, 硕士, 从事环境生态监测工作。

物体抗性中起着举足轻重的作用, 因此了解藻体内 GSH 及其衍生物含量的变化, 对于了解不同营养盐条件与重金属胁迫复合作用下江蓠藻体的重金属抗性具有很重要的意义。

GSH 是一种三肽 (L-γ 谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸), 其分子式为 C₁₀H₁₇O₆SN₃, 以较高浓度 (0.1 mmol/L~10 mmol/L) 普遍存在于微生物、植物和所有哺乳动物细胞中^[11]。GSH 能参与植物体的低温胁迫保护^[12-13], 且能起到一定的抗氧化作用^[14-15], 并对重金属及其化合物有一定的解毒功效^[16]。

江蓠为温带或热带、亚热带大型藻类, 具有适应性强、生长快、产量高、栽培方法简单、容易推广等特点, 在海洋环境生物修复和监测中受到关注。以大型海藻细基江蓠繁枝变型 (*Gracilaria tunuistipitata* Var.) 为实验材料, 研究 Cd²⁺ 胁迫下, 不同 N、P 条件对江蓠体内 GSH 及其衍生物含量的影响, 为进一步研究重金属与富营养化复合污染水体中藻类的生物修复创造条件。

1 实验材料与方法

1.1 材料

实验用江蓠采自福建沿海, 经空运带回实验室后的鲜活藻体除去表面附着杂藻, 用过滤海水冲洗干净, 移植到光照下盛有 15 L 水的水族箱 (容积为 20 L) 中预培养, 加入 f/2 配方的微量元素并保持 N、P 饥饿 (不加 N、P), 水体盐度为 28, pH 值为 8.0, 水温为 (23±0.5)℃; 光照周期为 12L:12D, 强度为 80 μmol·photons·m⁻²·s⁻¹。在此期间每隔 2 d 添加除 N、P 以外的营养盐 1 次, 每天不定期搅水或充气 4 次~6 次以保持藻体健康。

1.2 方法

根据预先进行的 N、P 和 Cd²⁺ 单因子实验结果, 将 3 种因素均设定为零、中、高 3 个水平 (N、P、Cd²⁺ 浓度设定根据预实验结果而得), N 按 c(NH₄⁺-N):c(NO₃⁻-N)=3:1, P 以 PO₄³⁻-P 形式添加, 均为每 2 d 补充营养盐一次, 以保持浓度。

实验进行组合并分组, 每组设 3 个平行。在每个 500 mL 三角瓶内分别装入健康藻体 3 g±0.2 g 并按照实验设计的浓度梯度分别加入培养液和 CdCl₂。将各三角瓶放入光照培养箱中培养, 设定光照周期为 12L:12D, 温度为 25℃。实验结

果采用 F 值方差分析法进行显著性差异分析。取 α=0.05, 此时 F>19 时, 有显著性差异; F≤19 时, 无显著性差异。实验分组见表 1。

表 1 GSH 及其衍生物含量影响的实验分组
Table 1 The experiment grouping for the effect on glutathione and its derivatives contents of *Gracilaria*

组号	c(N)	c(P)	ρ(Cd)
	/ (μmol·L ⁻¹)	/ (μmol·L ⁻¹)	/ (mg·L ⁻¹)
1	0	216	2.5
2	0	0	2.5
3	2160	0	2.5
4	560	0	2.5
5	560	216	2.5
6	560	56	2.5
7	0	56	2.5
8	2160	56	2.5

谷胱甘肽还原酶 (GR), 还原型 GSH, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX), 谷氨酰胺合成酶 (GS), 谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 等酶的活性测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒, 统一按照说明书进行测定和计算。

2 结果与讨论

培养 6 d 后, 测定 Cd²⁺ 胁迫环境下, N、P 浓度变化对江蓠体内 GSH 及其各类衍生物含量的影响。

数据的差异性分析结果表明, GSH 及其各类衍生物含量在各组间均出现了不同程度上的差异。

6(560, 56, 5)组的 GSH 及其各类衍生物含量均显著高于其他各组; 4(560, 0, 5)组除 GSH-PX 以外的 GSH 及其各类衍生物含量显著高于 2(0, 0, 5)组和 3(1620, 0, 5)组 ($p<0.05$); 7(0, 56, 5)组的 GSH 及其各类衍生物含量显著高于 1(0, 216, 5)组和 2(0, 0, 5)组 ($p<0.05$); 4(560, 0, 5)组、5(560, 216, 5)组和 6(560, 56, 5)组的 GSH 及其各类衍生物含量分别显著高于对应的 2(0, 0, 5)组、1(0, 216, 5)组和 7(0, 56, 5)组 ($p<0.05$); 6(560, 56, 5)组、7(0, 56, 5)组和 8(1620, 56, 5)组的 GS、GSH-PX 含量分别显著高于对应的 4(560, 0, 5)组、2(0, 0, 5)组和 3(1620, 0, 5)组 ($p<0.05$)。数据差异性分析结果见表 2。

表 2 不同实验条件对江蕨体内谷胱甘肽及其各类衍生物含量的影响^①

Table 2 The effect of Cd²⁺ under different experimental conditions on glutathione and its derivatives contents

组号	c(GSH)	c(GS)	c(GSH-PX)	c(GST)	c(GR)
	/(U·mgprot ⁻¹)	/(U·mgprot ⁻¹)	/(U·mgprot ⁻¹)	/(U·mgprot ⁻¹)	/(U·mgprot ⁻¹)
1(0.216, 5)	409.5±37.12	73.1±6.21	119.7±11.47	193.7±17.67	0.020±0.0015
2(0.05, 5)	366.6±31.04	137.1±10.34	330.9±25.51	491.5±39.15	0.034±0.0017
3(2160, 0.5)	394.2±30.19	134.7±10.78	340.6±27.62	369.2±27.34	0.031±0.0015
4(560, 0.5)	466.6±41.03	198.7±14.62	343.4±23.12	537.7±32.81	0.053±0.0039
5(560, 216, 5)	419.9±37.56	86.8±5.39	137.1±11.94	245.8±19.83	0.023±0.0011
6(560, 56, 5)	989.4±77.22	234.7±19.79	894.1±66.71	1002.2±88.12	0.10±0.0087
7(0.56, 5)	694.9±54.18	207.9±15.66	393.9±33.24	643.8±44.54	0.050±0.0033
8(2160, 56, 5)	367.8±29.92	155.1±13.12	359.4±22.77	376.4±29.26	0.022±0.0013

① 表中所有测定数据在 95% 显著水平, 有显著性差异 ($p < 0.05$)。

由表 2 可见, 当不加 N、P 时, 藻体的 GSH 及其各类衍生物的含量均偏低, 这可能因为还原型 GSH 是一种由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的三肽^[17], Cd²⁺胁迫下江蕨无法从水中顺利吸收营养元素, 生长受到抑制, 各类代谢不能顺利进行, 蛋白合成受阻, 因此 GSH 及其衍生物的合成量也较少, 含量偏低。加入适中浓度的 N (560 μmol/L) 或 P (56 μmol/L) 后, 藻体获得了足够生理代谢所需的营养盐, 代谢恢复正常, 蛋白合成顺利进行, GSH 及其各类衍生物此时也被大量合成出来。

已知 GSH 可以在植物螯合肽合成酶催化下在细胞质中聚合形成植物螯合肽 (phytochelatins) (PC)^[18], 植物螯合肽具有很强的重金属亲和力, 可与 Cd²⁺ 螯合后形成无毒化合物 (Cd-S₄-complex), 降低了细胞内游离的重金属离子浓度, 防止金属离子敏感酶变性失活。这些复合物随之转运到液泡, 并且在其他酶的作用下被排出细胞外, 从而能够减轻重金属对植物的毒害作用; GR 是一种黄素酶, 作用主要是催化氧化型谷胱甘肽 (GSSG), 还原成还原型 GSH, 其普遍存在于植物体内, 在机体的氧化还原反应中起到举足轻重的作用; 而 GST 是一组多功能解毒酶, 广泛分布于植物体内, 存在于各组织细胞的细胞质内, 是启动 GSH 结合反应的关键酶^[19]。GSH-PX (谷胱甘肽过氧化物酶) 则是机体内广泛存在的一种重要催化过氧化氢分解酶。它特异地催化 GSH 对机体内过氧化氢的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[20]。藻体内 GSH 及其各类衍生物含量高可以说明此时江蕨的抗 Cd²⁺ 的能力强, 同时说明加入适当浓度的 N、P 有利于江蕨抗 Cd²⁺ 能力的增强。当加入 N (2160 μmol/L) 或 P (216 μmol/L) 浓度

过高时, 易形成 Cd²⁺ 和营养盐的双重胁迫, 此时藻体生长再次受到抑制, GSH 及其各类衍生物的合成又无法顺利进行, 其活性和含量偏低。

同时加入 N、P 要比加入单一的营养盐更有利于提高藻体的 GSH 及其各类衍生物的含量。而 N 在提高藻体的 GSH 及其各类衍生物的含量上所起的作用要大于 P, 这可能是 N 作为合成蛋白的主要来源, 直接影响到蛋白合成的效率, 而 GSH 及其衍生物本身作为肽, 其合成过程必须摄入大量 N, 所以 N 对该类物质含量的影响要大于 P。

3 结论

Cd²⁺ 胁迫条件下, 不加入 N、P 时, 藻体内的 GSH 及其各类衍生物含量均较低, 易受金属离子侵入毒害藻体; 加入适量的 N、P (560 μmol/L, 56 μmol/L) 有利于提高藻体内 GSH 及其各类衍生物的含量, 增强藻体重金属抗性; 加入过量的 N、P (2160 μmol/L, 216 μmol/L) 反而抑制了藻体内 GSH 及其各类衍生物的合成, 降低了藻体重金属抗性; 同时加入 N、P 要比加入单一的营养盐更有利于提高藻体的 GSH 及其各类衍生物的含量, 增强藻体重金属抗性。

[参考文献]

[1] 彭涛, 陈蕾. 扬州古运河底泥重金属污染潜在生态危害评价 [J]. 环境监测管理与技术, 2010, 22(2): 41-43
[2] 利锋, 韦献革, 余光辉, 等. 佛山水道底泥重金属污染调查 [J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18(4): 1-14
[3] 计新丽, 林小涛, 许忠能. 海水养殖自身污染机制及其对环境的影响 [J]. 海洋环境科学, 2000, 19(4): 66-71.

(下转第 38 页)

5 结论与建议

稀土企业排放的放射性废水对环境的影响明显,²³⁸U、²³²Th、²²⁶Ra 3 种核素在环境中累积。²³⁸U、²³²Th、²²⁶Ra、⁴⁰K 的测量结果多次超过江苏省天然环境上限。

应加强对稀土加工企业监管,严格执行法律法规要求。坚决杜绝排放放射性废渣造成的水域放射性污染。开展含放射性污染物底泥综合利用研究,对其进行集中处理,防止二次污染。

[参考文献]

[1] 任炳湘,沈耀锐,徐玲琦. 稀土加工行业放射性污染危害及监测[J]. 环境监测管理与技术, 1991, 3(3): 30- 33

[2] 国家环境保护总局. HJ/T 61- 2001 辐射环境监测技术规范[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2001.

[3] 王昆山. 稀土生产中的放射性污染及评价[J]. 工业安全与防尘, 1997, 7(5): 28- 30

[4] 国家环境保护总局. EJ/T 1075- 1998 水中总 α 放射性浓度的测定 厚源法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998

[5] 国家环境保护局. EJ/T 900- 1994 水中总 β 放射性测定 蒸

发法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1994.

[6] 国家质量监督检验检疫总局. GB 11224- 1989 水中钍的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.

[7] 国家质量监督检验检疫总局. GB 11338- 1989 水中钾- 40 的分析方法(火焰光度法)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.

[8] 国家质量监督检验检疫总局. GB 11214- 1989 水中镭- 226 的分析测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989

[9] 国家质量监督检验检疫总局. GB 6768- 1986 水中微量铀分析方法(液体激光荧光法)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986.

[10] 国家质量监督检验检疫总局. GB 11713- 1989 用半导体 γ 谱仪分析低比活度 γ 放射性样品的标准方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.

[11] 国家质量监督检验检疫总局. GB 11743- 1989 土壤中放射性核素的 γ 能谱分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.

[12] 赵福祥,张伯明,吴小平. 江苏省稀土矿开发利用中的环境放射性污染初步调查[J]. 辐射防护通讯, 2006 26(3): 29- 33

[13] 陈守建. 测量不确定度及其估算[J]. 环境监测管理与技术, 2002, 14(5): 38- 43.

(上接第 30 页)

[4] 尹平河,赵玲. 海藻生物吸附废水中铅、铜和镉的研究[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(3): 12- 15

[5] 冯永梅,王文华. 海带吸附镉离子的研究[J]. 烟台大学学报, 2003 42(3): 772- 776

[6] 汤坤贤. 龙须菜对富营养化海水的生物修复[J]. 生态学报, 2005 25(11): 3044- 3050

[7] MAY M J LEAVER C J Oxidative stimulation of glutathione synthesis in Arabidopsis thaliana suspension cultures[J]. Plant Physiol 1993(103): 621- 627.

[8] MAY M J LEAVER C J A r a b i d o p s i s t h a l i a n a γ - g l u t a m y l c y s t e i n e synthetase is structurally unrelated to mammalian yeast and Escherichia coli homologues Proc[J]. Natl Acad Sci USA, 1995(91): 10059- 10063

[9] FOYER C H, HALL W E L L B The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts a proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. Plants 1994(133): 21- 25

[10] ULLMANN P, GONDET L, POTIER S et al Cloning of the Arabidopsis thaliana glutathione synthetase(GSH2) by functional complementation of a yeast gsh2 mutant[J]. European journal of Biochemistry, 1996(236): 662- 669

[11] MAY M J VERNOUX T, LEAVER C J et al Glutathione homeostasis in plants Implications for environmental sensing and plant development[J]. J Exp Bot 1998(49): 649- 667

[12] W I L D I B L U T Z C. Antioxidant composition of selected high

alpine plant species from different altitudes[J]. Plant Cell Environ 1996(19): 138- 146

[13] K D G S T O N - S M I T H A H, H A R B I N S O N J, F O Y E R C H. A c c l i m a t i o n o f g l u t a t h i o n e s y n t h e t a s e b y b u t h i o n i n e s u l f o x i m i n e [J]. J Biol Chem, 1999(102): 42- 51.

[14] P N H E R O R G, R A O M V, P A L I Y A T H G, et al Change in activities of antioxidant enzyme and their relationship to genetic and paclobutrazol induced chilling tolerance of maize seedling [J]. Plant Physiol 1997(114): 695- 704.

[15] G B L N F J Glutathione a vital lens antioxidant[J]. Ocul Pharmacol Ther 2000(16): 121- 135.

[16] D K O N D P. Glutathione mediated detoxification system in plant[J]. Curr Opin Plant Biol 1998(1): 258- 266

[17] 张军,束文圣. 植物对重金属镉的耐受机制[J]. 植物生理与分子生物学报, 2006, 32(1): 1- 8

[18] M E I S T E R A, A N D E R S O N M E, A N N R. M a n u p u l a t i o n o f g l u t a t h i o n e and amino acid biosynthesis in the chloroplast[J]. Biochem, 1983(52): 711- 718.

[19] M A R R S K A. The function and regulation of glutathione-S-transferase in plant[J]. Annu Rev Plant Mol Biol 1996(47): 16- 58

[20] L A N N E L L I M A, P I E T R N I E, F I O R E L, et al Antioxidant response to cadmium in Phragmites australis plants[J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40(11): 977- 982