

## 发状念珠蓝细菌细胞对 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 胁迫的响应

郭金英, 史明科, 赵艳丽, 任国艳, 易军鹏, 牛蕾蕾, 李娟

河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003

**摘要:** 【目的】对发状念珠蓝细菌细胞进行重金属离子  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ )、 $\text{Cr}^{2+}$  ( $\text{CrCl}_2$ ) 和  $\text{Pb}^{2+}$  ( $\text{PbCl}_2$ ) 胁迫, 探讨发状念珠蓝细菌细胞对重金属离子胁迫的响应。【方法】 $25^\circ\text{C}$ ,  $80 \mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$  光照下, BG11 培养液培养发状念珠蓝细菌, 利用不同浓度 (0、0.1、1.0、10、100 mg/L)  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫发状念珠蓝细菌细胞, 测定其质膜透性、超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量、脯氨酸含量、可溶性蛋白含量以及海藻糖含量, 分析发状念珠蓝细菌细胞对重金属离子胁迫的响应。【结果】在  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫下, 发状念珠蓝细菌细胞的外渗率和丙二醛 (malondialdehyde) 含量随着重金属离子浓度的升高而升高, 相对渗透率和膜脂过氧化水平的变化趋势一致。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase) 活性随重金属离子浓度的升高先升后降, 脯氨酸含量随着重金属离子处理浓度的升高, 呈先降后升的趋势, 可溶性糖含量随浓度的增大而减少。【结论】低浓度的重金属离子可以诱导发状念珠蓝细菌细胞产生结构和生理的应激响应, 高浓度会导致发状念珠蓝细菌细胞膜结构和功能的严重损害。

**关键词:**  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫, 发状念珠蓝细菌细胞, 响应

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 06-0553-08

发状念珠蓝细菌 (*Nostoc flagelliforme*) 俗称发菜, 是一种常见的陆生蓝藻, 主要分布在我国西北干旱和半干旱荒漠地区<sup>[1]</sup>, 营养极为丰富, 具有较高的药用<sup>[2]</sup> 和经济价值, 耐干旱能力强, 对于维护生态环境, 防止土地沙漠化有重要作用, 一直以来受到极大的关注。作为一种药用和经济可食用蓝藻, 对发状念珠蓝细菌在重金属离子胁迫下的生理响应进行研究, 为发状念珠蓝细菌的抗重金属离子机制提供理论依据, 同时对筛选耐污染环境种质也具有重要意义。近年来, 关于发状念珠蓝细菌逆境胁迫的研究备受重视, 藻细胞在逆境胁迫的诱导下, 其在形态、功能及抗逆物质上产生了适应性的变化。Zhao

等<sup>[3]</sup> 在不同温度下, 对发状念珠藻恢复吸水过程中光合作用强度进行研究, 发现  $25^\circ\text{C}$  和  $35^\circ\text{C}$  下, 发菜光合速率恢复的较  $5^\circ\text{C}$  和  $15^\circ\text{C}$  时要迅速, 且叶绿素 a 增加的较快。毕永红等<sup>[4]</sup> 对天然发状念珠藻藻体进行不同浓度的盐胁迫处理, 指出盐胁迫下天然发状念珠藻正常生理活性受到抑制而表现出一定的抗逆能力, 对盐胁迫具有一定的耐受性; 进一步研究发现, 随着盐浓度的增加, 发状念珠蓝细菌细胞光合速率与叶绿素荧光强度先升高后下降, 添加外源硝酸盐后有助于缓解发状念珠蓝细菌细胞培养物的盐胁迫, 提高其抗盐性<sup>[5-6]</sup>。此外, 赖永忠、高坤山对发状念珠藻进行 3 种不同的阳光辐射处理, 发现紫外

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31000765); 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2011A330001); 河南科技大学博士科研启动基金; 河南科技大学青年科研基金 (2007QN013); 河南科技大学大学生研究训练 (SRTP) 项目 (2012114)

**作者简介:** 郭金英 (1971 -), 男, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事食品功能因子研究。Tel: +86-379-64282342; E-mail: guojinying8@163.com

收稿日期: 2012-12-19; 修回日期: 2013-03-10

辐射抑制了发状念珠蓝细菌光合活性,但并不影响其生长<sup>[7]</sup>。梅俊学<sup>[8]</sup>研究了逆温条件下发状念珠蓝细菌脯氨酸含量及质膜透性的变化与含水量的关系,指出在低温条件下细胞质膜透性和脯氨酸含量无明显变化。但也有报道<sup>[9]</sup>指出低温胁迫可使发状念珠蓝细菌细胞质膜完整性和光合作用受到伤害,脯氨酸和海藻糖迅速积累。从重金属离子胁迫角度来讲,研究主要集中在海洋藻类<sup>[10-14]</sup>,对陆生藻类的涉及极少。目前关于发状念珠蓝细菌逆境胁迫的报道主要集中在低温、盐胁迫、紫外等对光合作用的影响,而发状念珠蓝细菌对重金属离子胁迫的响应有待深入研究。本研究以发状念珠蓝细菌细胞为材料,研究重金属离子( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ )胁迫下发状念珠蓝细菌细胞质膜透性、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脯氨酸(Pro)、可溶性蛋白以及海藻糖含量的变化,探讨液体悬浮培养下发状念珠蓝细菌细胞对重金属离子胁迫的响应。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

发状念珠蓝细菌细胞(*Nostoc flagelliforme* cell)由工业微生物教育部重点实验室提供,本实验室分离纯化后扩大培养。

### 1.2 胁迫处理

实验于250 mL的三角瓶中进行,无菌离心收集分离纯化后的发状念珠蓝细菌细胞5 mL,无菌条件下,分别接种于含不同浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ (0、

0.1、1.0、10、100 mg/L)的BG11培养基中,25℃,80  $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ 光照强度下培养,取对数生长期的发状念珠蓝细菌细胞(培养10 d),以不加重金属离子的空白组为对照,进行测定,每种处理做3组平行。

### 1.3 质膜透性测定

参照李合生<sup>[15]</sup>的方法,称取离心后不同处理的发状念珠蓝细菌细胞各2 g,放入烧杯中,加20 mL去离子水,25℃下静置10 h。用玻璃棒轻轻搅拌均匀,恒温下用电导仪测定溶液电导率。再将试管放入100℃沸水中恒温水浴15 min,待其冷却至25℃时,恒温测定煮沸液电导率。根据公式(1)计算。

$$\text{电解质相对渗透率}(\%) = (\text{处理液电导率值} / \text{煮沸液电导率值}) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.4 丙二醛(MDA)含量测定

参照 Tsarouhas<sup>[16]</sup>的方法,取0.5 g发状念珠蓝细菌细胞加5 mL 50 mmol/L (pH 7.8)磷酸缓冲液匀浆,3040  $\times g$ 离心,取上清液1 mL加2.5 mL 0.6% TBA(硫代巴比妥酸)溶液混匀,加塞,沸水水浴反应15 min,迅速冷却后离心,取上清液测定532、600、450 nm波长处的吸光度,根据公式(2)进行计算。

$$c(\mu\text{mol}/\text{L}) = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450} \quad (2)$$

### 1.5 超氧化物歧化酶(SOD)酶活性测定

参照王星<sup>[17]</sup>的方法,取0.5 g发状念珠蓝细菌细胞加5 mL 50 mmol/L (pH 7.8)磷酸缓冲液匀浆,17940  $\times g$ 、4℃离心10 min,上清液即为酶提取液(冷冻保存用于SOD的测定)。取透明度好的试管,按表1加入各溶液组分:

表 1. SOD 反应液组分表

Table 1. The compositions of the SOD reaction mixture

Reagent (enzyme)	Volume/mL	Last concentration
0.05 mol/L Phosphate buffer	1.5	
130 mmol/L Met	0.3	13 mmol/L
750 $\mu\text{mol}$ /LNBT	0.3	75 $\mu\text{mol}$ /L
100 $\mu\text{mol}$ /LEDTA- $\text{Na}_2$	0.3	10 $\mu\text{mol}$ /L
20 $\mu\text{mol}$ /LRiboflavin	0.3	2.0 $\mu\text{mol}$ /L
Enzyme	0.05 (Buffer in control test tube)	
Distilled water	0.25	
Total volume	3.0	

混匀后将2支对照管置暗处做空白对照,其余各管于80  $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ 光下反应25 min,反应结束后,以不照光的对照管为空白,560 nm下测定OD值。SOD酶活性以抑制NBT光化学反应的50%为

一个酶活性单位(U),计算SOD酶活性。

### 1.6 脯氨酸(Pro)含量测定

采用酸性茚三酮法<sup>[18]</sup>。准确称取离心后的发状念珠蓝细菌细胞0.5 g,加5 mL 3%的磺基水杨酸

匀浆放入具塞试管里,加塞后沸水水浴10 min;不断振荡摇动,冷却,3040 × g 离心10 min后静止,上清液即为提取的脯氨酸溶液。取2 mL提取液加入2 mL冰乙酸和4 mL酸性茚三酮,沸水浴60 min,溶液为红色,冷却后加入4 mL甲苯,振荡30 s,静止片刻,吸取上层红色甲苯溶液于比色杯中,以甲苯为空白对照,测  $OD_{520}$  值。

### 1.7 可溶性蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝法<sup>[19]</sup>。取上述 SOD 提取液1 mL加5 mL考马斯亮蓝后摇匀,放置2 min后,以蒸馏水做空白,595 nm比色,测定  $OD_{595}$ 。

### 1.8 海藻糖含量测定

采用蒽酮比色法。称取不同处理的发状念珠蓝细菌细胞0.5 g加5 mL 10% TCA 匀浆后浸泡,离心,取上清液1 mL加5 mL蒽酮,沸水中煮10 min,流水冷却,冷却后在室温下静止10 min,以80%乙醇调零,测定626 nm波长处的吸光度。

### 1.9 统计分析

试验数据用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 Duncan 新复极差法进行方差分析确定差异显著性,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞质膜透性的影响

细胞外渗率直接反应了质膜的受破坏程度,外渗率越高,膜透性越大,质膜受破坏的程度越严重。由图1可见,3种重金属离子对发状念珠蓝细菌细胞膜透性均有较大的损害,但影响程度不尽相同,相同浓度下,  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫下的细胞外渗率明显要低于  $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  对细胞质膜透性的损失更为严重,毒性作用更大。随着胁迫浓度的增大,发状念珠蓝细菌细胞外渗率显著增加 ( $p < 0.01$ ),高浓度重金属离子胁迫致使细胞膜结构和功能破坏更加严重。

### 2.2 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞丙二醛含量的影响

MDA 作为质膜过氧化作用的直接产物,能使膜中的酶蛋白发生交联并失活<sup>[20]</sup>,进一步损伤细胞膜的结构和功能,因此可以用 MDA 含量来表示膜脂过氧化作用的程度。随着胁迫加重,丙二醛的含量

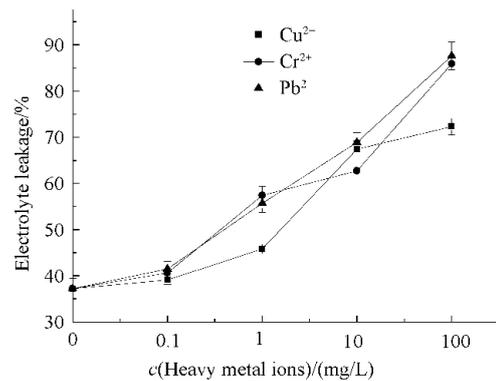


图1. 重金属离子胁迫对发状念珠藻细胞质膜透性的影响

Figure 1. Effect of heavy metal ions stress on electrolyte leakage.

呈显著增加的趋势 ( $p < 0.01$ ) (图2),与电解质渗透率变化一致,表明在重金属离子胁迫下发状念珠蓝细菌细胞膜脂发生了严重过氧化,过氧化程度大小为  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cr}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ 。随着胁迫浓度的增加,膜脂过氧自由基不断积累,膜伤害程度加剧。

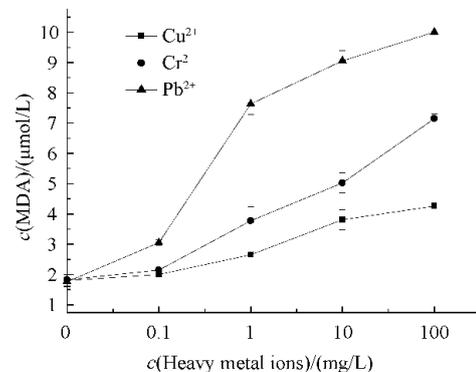


图2. 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞丙二醛含量的影响

Figure 2. Effect of heavy metal ions stress on malondialdehyde content of *Nostoc flagelliforme* cell.

### 2.3 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞 SOD 酶活的影响

图3显示,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  对发状念珠蓝细菌 SOD 活性的影响都呈现先上升后下降的趋势,但不同重金属离子的影响程度不同。SOD 作为超氧自由基清除剂,其活性与生物体抗逆性大小有一定的关系,在适度的逆境诱导下, SOD 活性能够增加以提高生物体的适应能力。在重金属离子浓度小于 10 mg/L 时, SOD 活性迅速增加,且在 10 mg/L 时,活性到达最高值,分别比同期对照高出 48.4%、

36.5% 和 31.3% ;随着离子浓度增加到 100 mg/L 时,发状念珠蓝细菌细胞的 SOD 酶活性迅速下降,  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cr}^{2+}$  胁迫下, SOD 酶活性与对照接近, 分别为 21.45 和 22.18 U/g,  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫下, SOD 酶活性已低于对照 10%。当重金属离子浓度小于 10 mg/L 时,  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫对发状念珠蓝细菌细胞的毒害作用要小于另外 2 种重金属离子, 并且 3 种重金属离子的综合毒害作用大小为  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cr}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ 。

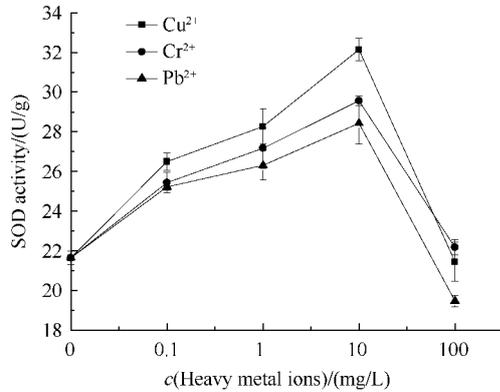


图 3. 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞 SOD 活性的影响

Figure 3. Effect of heavy metal ions stress on superoxide dismutase activity.

#### 2.4 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞 Pro 含量的影响

Pro 作为生物体逆境胁迫下主要的渗透调节物质之一, 不仅能降低细胞的水势, 还有利于减轻细胞质酸中毒, 有利于维持细胞正常代谢所需  $\text{NADP}^+ / \text{NADP}$  值。图 4 为不同重金属离子胁迫下发状念珠蓝细菌细胞中 Pro 含量的积累情况, 随着  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  浓度的增加, Pro 的含量呈先上升后下降的趋势 ( $P < 0.01$ ), 离子浓度为 10 mg/L 时, 发状念珠蓝细菌细胞中 Pro 含量均达到最大值, 分别比对照增加 62.5%、69.7% 和 32.3%, 重金属离子浓度为 100 mg/L 时, Pro 含量基本与对照持平, 表明当离子浓度小于 10 mg/L 时, Pro 对发状念珠蓝细菌细胞起到渗透调节保护作用。

#### 2.5 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞可溶性蛋白含量的影响

图 5 表明,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  处理后, 较低的重金属离子浓度刺激了蛋白质的合成, 可溶性蛋白含量在 10.0 mg/L 时达到了最大, 分别比对照增加 11.2%、35.3% 及 51.3%, 继续加大重金属离子浓

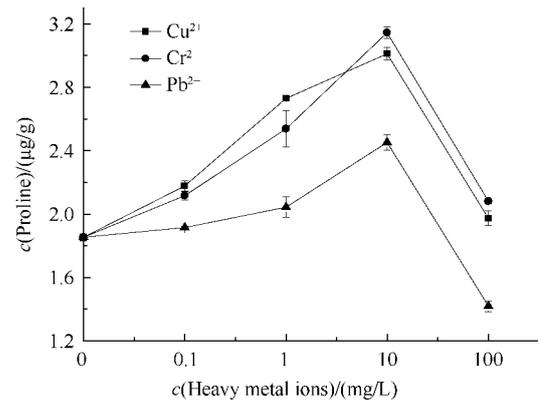


图 4. 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞 Pro 含量的影响

Figure 4. Effect of heavy metal ions stress on proline content of *Nostoc flagelliforme* cell.

度后, 只有  $\text{Cu}^{2+}$  处理组的可溶性蛋白含量基本维持在同一水平,  $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  处理组可溶性蛋白含量逐渐减少,  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫下的可溶性蛋白含量甚至低于对照, 表明在较低浓度下, 发状念珠蓝细菌受更多的可溶性蛋白渗透调节物保护。

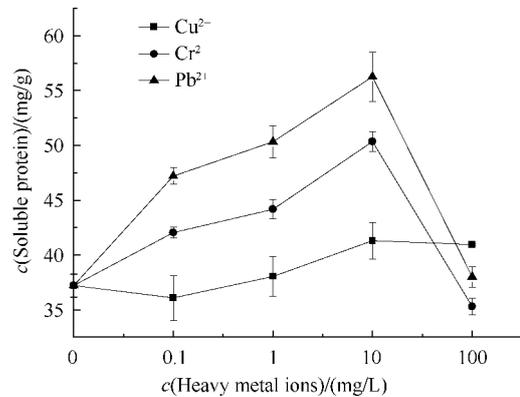


图 5. 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞可溶性蛋白含量的影响

Figure 5. Effect of heavy metal ions stress on soluble protein content of *Nostoc flagelliforme* cell.

#### 2.6 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞海藻糖含量的影响

图 6 所示, 与对照相比, 低浓度  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫处理后, 海藻糖的含量迅速增加, 在 10 mg/L 处理下, 可溶性含量达到最大值, 分别比对照增加 44.2%、30.9% 和 11.5%, 说明海藻糖在发状念珠蓝细菌的重金属离子胁迫中起到保护作用。离子浓度为 100 mg/L 时, 海藻糖含量迅速下降,  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫下甚至低于对照 7%。这可能是由于长期

胁迫使得发状念珠藻细胞严重受损,呼吸作用的增强和光合作用的衰竭所致。

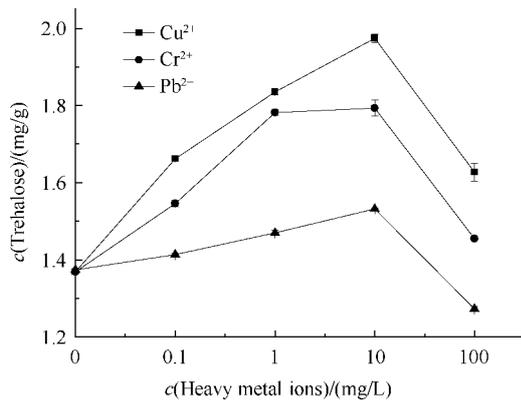


图 6. 重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌细胞海藻糖含量的影响

Figure 6. Effect of heavy metal ions stress on trehalose content of *Nostoc flagelliforme* cell.

### 3 讨论

细菌可以通过改变细胞膜成分及通透性适应重金属盐环境。重金属离子胁迫对细胞的影响首先作用于质膜,其透性大小反映了膜系统的稳定性<sup>[21]</sup>。细胞酶系的改变与物质合成位点的抑制,使菌体原生质膜发生成分与通透性的变化。细胞膜多不饱和脂肪酸成分的增加及通透性的增大,使菌体对重金属离子的抗性增加数倍<sup>[22]</sup>。本研究中, $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 对发状念珠蓝细菌细胞膜透性均有较大的损害。一般认为,几种重金属离子对藻类的毒性强弱顺序为: $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Cr}$ 。Ismail<sup>[10]</sup>对4种热带海洋微藻的研究结果表明, $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Cd}^{2+}$ 对每种微藻的毒性大小没有显著差异。Mallick和Mohr<sup>[12]</sup>对栅藻进行的研究,得出了毒害 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 的结论。本研究认为,相同浓度下, $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫下的细胞外渗率明显要低于 $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 对细胞质膜透性的损失更为严重,毒性作用更大。随着胁迫浓度的增大,发状念珠蓝细菌细胞外渗率显著增加( $p < 0.01$ ),高浓度重金属离子胁迫致使细胞膜结构和功能破坏更加严重。

生物体内酶活性的改变是细菌抗重金属离子胁迫的机制之一。这类菌中,部分抗性酶的活性在重金属盐含量增加时仍然维持正常水平,甚至还可以被激活,从而使耐性菌在重金属离子污染时保持正

常的代谢过程。贾彦等报道,在一定范围内重金属离子对香菇抗坏血酸酶的活性有激活作用<sup>[23]</sup>。多边膝沟藻暴露在(5.0  $\mu\text{g/L}$  Hg、0.5 mg/L Cd、2.0 mg/L Pb和0.1 mg/L Cu)下,SOD活性分别提高了134%、148%、127%和139%<sup>[24]</sup>。本研究中,重金属离子胁迫初期,SOD活性上升,随着胁迫的加重,发状念珠蓝细菌细胞的保护酶系统受到严重破坏,导致SOD活性大幅度下降,活性氧大量积累,膜脂过氧化程度加重。这与Rijstenbil等<sup>[25]</sup>的报道一致,表明发状念珠蓝细菌细胞在重金属离子胁迫下,抗性酶活性的提高是其具有抗金属胁迫能力的机制之一。

一些细菌胞外聚合物,如可溶性糖、可溶性蛋白和氨基酸在在保持食用菌细胞生物形态、胞外酶的分泌和对抗重金属离子等外在干扰的防御机制上起着重要作用。细胞外聚合物对重金属离子的吸附和络合是菌类对重金属离子具有耐性的重要原因<sup>[26]</sup>。胞外聚合物的活性基团可与重金属离子发生定量化合反应,而达到去除重金属离子的目的<sup>[27]</sup>。细胞壁多糖可提供氨基、羧基、羟基、醛基以及硫酸根等官能团,它们与金属离子有着较强的络合能力<sup>[28]</sup>。本研究中,发状念珠蓝细菌细胞在受到低浓度胁迫下,海藻糖迅速积累,降低细胞渗透势,维持其正常的水分平衡,提高了与重金属离子络合能力。但是随着胁迫加重,三者又都呈现下降趋势,这与张学颖<sup>[29]</sup>的报道一致。但徐明德<sup>[30]</sup>研究认为,绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)在重金属离子胁迫作用下,可溶性糖含量明显降低,这可能与不同藻类对重金属离子胁迫的忍耐能力有差异。

可溶性蛋白可反映细胞内蛋白质的合成、变性及降解等信息,反映了细菌在重金属离子胁迫下的功能改变状况。本研究结果表明,在较低浓度下,发状念珠蓝细菌受更多的可溶性蛋白渗透调节物保护,继续加大重金属离子浓度后,只有 $\text{Cu}^{2+}$ 处理组的可溶性蛋白含量基本维持在同一水平, $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 处理组可溶性蛋白含量逐渐减少, $\text{Pb}^{2+}$ 胁迫下的可溶性蛋白含量甚至低于对照。这与向蓓的研究结果一致,重金属离子高浓度时,可溶性蛋白含量下降,蛋白质被破坏<sup>[31]</sup>。这可能是重金属离子与蛋白直接作用,也可能是限制了基因表达,从而影响蛋白质的合成。

综上所述,重金属离子( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ )胁

迫对发状念珠蓝细菌细胞结构和生理均产生一定的影响,随着重金属离子浓度的增加,细胞膜外渗率不断增大,MDA 含量不断增加,质膜过氧化程度显著加重。发状念珠蓝细菌细胞在  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫浓度较小 ( $<10\text{mg/L}$ ) 时,SOD 活性升高,但随着胁迫浓度的增大,酶活性下降,说明活性氧的产生超过了细胞的清除能力,导致发状念珠蓝细菌细胞的抗氧化系统受到一定的破坏。胁迫浓度较小时,Pro、可溶性蛋白、还原糖在发状念珠蓝细菌细胞内积累,减轻了重金属离子胁迫对发状念珠蓝细菌造成的伤害,但存在一定的阈值。

## 参考文献

- [1] Gao KS. Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *Applied Phycology*, 1998, 10: 37-49.
- [2] Knubel G, Larsen LK, Moore RE, Levine IA, Patterson GM. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue green alga belonging to the Nostocaceae. *Antibiotics*, 1990, 43: 1236-1239.
- [3] Zhao XM, Bi YH, Chen L, Hu S, Hu YZ. Responses of photosynthetic activity in the drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* to rehydration at different temperature. *Arid Environments*, 2008, 72: 370-377.
- [4] Bi Y, Deng Z, Hu Z, Xu M. Response of *Nostoc flagelliforme* to salt stress. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29 (2): 125-129. (in Chinese)  
毕永红, 邓中洋, 胡征宇, 徐敏. 发状念珠藻对盐胁迫的响应. *水生生物学报*, 2005, 29 (2): 125-129.
- [5] Zhao X, Bi Y, Qing S, Hu Z. The response of cultivated *Nostoc flagelliforme* to salt stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2005, 25 (11): 2234-2239. (in Chinese)  
赵学敏, 毕永红, 秦山, 胡征宇. 发菜细胞培养物对盐胁迫的响应. *西北植物学报*, 2005, 25 (11): 2234-2239.
- [6] 赵学敏. 发菜培养物的生理生态学研究. 中国科学院水生生物研究所学位论文. 2008.
- [7] Lai Y, Gao K. Effects of solar ultraviolet radiation on physiological characteristics of the aquatic-living colonies of *Nostoc flagelliforme* cultured indoor. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 3 (33): 435-441. (in Chinese)  
赖永忠, 高坤山. 阳光紫外辐射对室内水培发状念珠藻生理特性的影响. *水生生物学报*, 2009, 3 (33): 435-441.
- [8] Mei J. The change of proline content and plasma membrane permeability of dry and wet *Nostoc flagelliforme* in temperature inversion. *Journal of Shandong Normal University*, 2000, 15 (2): 178-181. (in Chinese)  
梅俊学. 逆温下发菜脯氨酸含量及质膜透性的变化与含水量的关系. *山东师范大学学报: 自然科学版*, 2000, 15 (2): 178-181.
- [9] Wang H, Gongbao D, Li Y, Yan K, An L, Chen Y. Physiological responses of *Nostoc flagelliforme* suspension cells under low temperature stress. *Journal of Lanzhou Normal University*, 2011, 47 (2): 77-82. (in Chinese)  
王海燕, 贡保东, 李雨遥, 阎侃, 安黎哲, 陈书燕. 发菜悬浮细胞对低温胁迫的生理响应机制. *兰州大学学报 (自然科学版)*, 2011, 47 (2): 77-82.
- [10] Ismail M, Tong S, Phang S, Brown MT. A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2002, 75: 145-154.
- [11] Satoh A, Vudikaria LQ, Kurano N, Miyachi S. Evaluation of the sensitivity of marine microalgae strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environment International*, 2005, 31: 713-722.
- [12] Mallick N, Mohn FH. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2003, 55: 64-69.
- [13] Liang Y, Wang S, Feng L, Tian Z. Effects of heavy metal stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Chaetoceros gracilis*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 28 (1): 59-67. (in Chinese)  
梁英, 王帅, 冯力霞, 田传远. 重金属胁迫对纤细角毛藻生长及叶绿素荧光特性的影响. *中国海洋大学学报*, 2008, 28 (1): 59-67.
- [14] Liang Y, Wang S, Feng L, Tian Z. Effects of heavy metals stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Phacodactylum tricorutum*. *Marine Environmental Science*, 2009, 28 (4): 374-382. (in Chinese)  
梁英, 王帅, 冯力霞, 田传远. 重金属胁迫对三角褐指藻生长及叶绿素荧光特性的影响. *海洋环境科学*, 2009, 28 (4): 374-382.
- [15] 李合生, 孙群, 赵世洁, 章文华. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 1999: 258-261.

- [16] Tsarouhas V, Kenney WA, Zsufa L. Application of two electrical methods for the rapid assessment of freezing resistance in *Salix eriocephala*. *Biomass and Bioenergy*, 2000, 19 (3) : 165-175.
- [17] 王星. 干旱胁迫条件下发菜的差异蛋白质组学分析. 宁夏大学学位论文, 2010.
- [18] Zhang D, Wang P, Zhao H. Determination of the content of free proline in wheat leaves. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1990, (4) : 62-65. (in Chinese)  
张殿忠, 汪沛洪, 赵汇贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理通讯, 1990, (4) : 62-65.
- [19] 李如亮, 王延芝, 张楚富. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1998.
- [20] Hodges DM, Delong JM, Fomey CF. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207 : 604-611.
- [21] Wang X, Hou P, Yi L, Feng D, Pan B. Effect of soluble substance of Tamarix under soil-water stress slowly. *Arid Zone Research*, 1999, 16 (2) : 6-11. (in Chinese)  
王霞, 候平, 尹林克, 冯大千, 潘伯荣. 水分胁迫对柽柳植物可溶性物质的影响. 干旱区研究, 1999, 16 (2) : 6-11.
- [22] Chen S, Sun T, Zhou Q, Wu G. Interzction between microorganisms and heavy methals and its application. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 13 (2) : 239-242. (in Chinese)  
陈素华, 孙铁晰, 周启星, 吴国平. 微生物与重金属间的相互作用及其应用研究. 应用生态学报, 2012, 13 (2) : 239-242.
- [23] Jia Y, Yang Y, Jiang F, Li H, Wang W. Effects of interactions between Cd and Zn on accumulation of heavy metals in the flammulina velutipes. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28 (7) : 1368-1373. (in Chinese)  
贾彦, 杨勇, 江荣风, 李花粉, 王巍. Cd Zn 交互作用对金针菇富集重金属的影响. 农业环境科学学报, 2009, 28 (7) : 1368-1373.
- [24] Okamoto OK, Colepicolo P. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1998, 119 (1) : 67-73.
- [25] Rijstenbil JW, Derkesen JWM, Gerringa LJA, Poortvliet TC, Sandee A, Berg M, Drie J, Wijinholds JA. Oxidative stress induced by copper: Defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Marine Biology*, 1994, 119 : 583-590.
- [26] Zhang H, Wu H, Tu L. Study on bisorption of heavy metal. *Pollution Control Technology*, 2013, 16 (4) : 53-56. (in Chinese)  
张洪玲, 吴海锁, 土连军. 生物吸附重金属的研究进展. 污染防治技术, 2013, 16 (4) : 53-56.
- [27] Wang L, Chen G, Zeng G, Zhang W, Chen Y. Fungal extracellular polymeric substances and their interaction mechanisms with heavy metals. *Huan Jing Wu Ran Yu Fang Zhi*, 2010, 32 (6) : 74-80. (in Chinese)  
王亮, 陈桂秋, 曾光明, 张文娟, 陈云. 真菌胞外聚合物及其与重金属作用机制研究进展. 环境污染与防治, 2010, 32 (6) : 74-80.
- [28] Yang F. Biological adsorption technique study and progress of the alage on heavy metal. *Journal of Qujing Teachers College*, 2002, 21 (3) : 47-49. (in Chinese)  
杨芬. 藻类对重金属的生物吸附技术研究及其进展. 曲靖师范学院学报, 2002, 21 (3) : 47-49.
- [29] 张学颖. 盐藻和小球藻富集铬(Ⅲ)的优化培养条件研究. 暨南大学硕士学位论文, 2004.
- [30] Xu M, Du C. Toxic effects of organic tin on *Dicrateria* sp.. *Journal of Oceanography of Huanghai & Bohai Seas*, 2001, 19 (1) : 66-69. (in Chinese)  
徐明德, 杜春梅. 有机锡对金藻 (*Dicrateria* sp.) 的毒性效应. 黄渤海海洋, 2001, 19 (1) : 66-6.
- [31] Xiang B, Zhao W, Wang H, Tian D. Effects of cadmium stress on the growth mitochondrial membrane potential and antioxidative system in alga *Dumaliell salina*. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2012, 27 (1) : 64-68. (in Chinese)  
向蓓, 赵文, 王媛, 田丹. Cd(Ⅱ) 胁迫对盐藻生长、抗氧化系统及线粒体膜电位的影响. 大连海洋大学学报, 2012, 27 (1) : 64-68.

# Response of *Nostoc flagelliforme* cell to $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Cr}^{2+}$ and $\text{Pb}^{2+}$ stress

Jinying Guo<sup>\*</sup>, Mingke Shi, Yanli Zhao, Guoyan Ren, Junpeng Yi, Leilei Niu, Juan Li

Food & Bioengineering Department, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

**Abstract:** [Objective] This study aimed to investigate the effects of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  stress on *Nostoc flagelliforme* cell. [Methods] The response of *Nostoc flagelliforme* cell was analyzed under the stress. The modified BG11 culture medium containing different heavy metal ions of 0, 0.1, 1.0, 10, 100 mg/L was used to cultivate *Nostoc flagelliforme* cell at 25°C and light intensity of 80  $\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ . Electrolyte leakage, the activities of superoxide dismutase, the content of malondialdehyde, proline, soluble protein and trehalose were analyzed. [Results] Under 1 – 100 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  stress, electrolyte leakage and malondialdehyde contents in *Nostoc flagelliforme* cell were higher than those in the control group during heavy metal ions stress. Meanwhile, superoxide dismutase activity increased slightly under 10 mg/L, but was lower afterwards. The contents of proline, soluble protein and trehalose increased under 10mg/L heavy metal ions stress, while declined under extreme heavy metal ions stress (100 mg/L). [Conclusion] *Nostoc flagelliforme* cell has resistance to low heavy metal ions stress, but is damaged badly under extreme heavy metal ions stress.

**Keywords:**  $\text{Cu}^{2+}$  /  $\text{Cr}^{2+}$  /  $\text{Pb}^{2+}$  stress, *Nostoc flagelliforme* cell, response

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000765), by the Natural Science Research Projects of Henan Province Education Department (2011A330001), by the Doctoral Research Foundation of Henan University of Science and Technology, by the Youth Scientific Research Foundation of Henan University of Science and Technology (2007QN013) and by the Students Research Training Project of Henan University of Science and Technology (2012114)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel/Fax: +86-379-64282342; E-mail: guojinying8@163.com

Received: 19 December 2012/Revised: 10 March 2013

## 《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”，即：编辑部内审，专家外审，主编总审。从投稿日期开始，争取在2个月之内给出审稿结果，3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后，首先要由编辑初审，通过后再送外审。将请2位专家进行审阅，再送主编进行最后的总审，这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第3位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后（即主编给出总审意见），编辑会给作者发出E-mail告知修改意见（包括学术上的和写作格式上的）。作者在返回修改稿后，经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者，在没有完成全部审稿之前，不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。