

铅、汞单一及联合胁迫对栅藻的生长、GSH含量及相关酶活性的影响

李燕, 朱琳*, 刘硕

(南开大学环境科学与工程学院, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071)

摘要: 为进一步了解重金属复合污染对水生植物产生毒害作用的机制, 以单细胞藻类生长及细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)含量、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性为指标, 对铅和汞单一及联合胁迫对四尾栅藻的毒性作用进行了研究. 结果表明, 铅[Pb(NO₃)₂]和汞(HgCl₂)单一胁迫对四尾栅藻生长抑制的 96h EC₅₀ 分别为0.678 9 mg/L和0.140 1 mg/L, 二者的联合作用相加指数 AI 为 0.009, 表现为典型的相加作用. 经铅、汞单一及联合染毒 12 h 后, 栅藻体内 GSH 含量降低到对照组的 70% 左右, 并在一定浓度范围内保持水平上的稳定; GST 活性随胁迫浓度的增加而先上升后下降, 联合染毒高浓度组中甚至出现了明显的活性抑制, 抑制率为 13.04%; GPx 活性整体受到明显抑制并随浓度增加而持续下降, 最低值仅为对照组的 38.77%. 铅、汞联合胁迫对四尾栅藻体内 GSH 含量、GST 及 GPx 活性的影响也验证了二者之间的联合作用关系为相加作用.

关键词: 四尾栅藻; 铅; 汞; 联合毒性; GSH; GST; GPx

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)01-0248-06

Individual and Joint Stress of Lead and Mercury on Growth, Glutathione and Glutathione-Related Enzymes of *Scenedesmus quadricauda*

LI Yan, ZHU Lin, LIU Shuo

(Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: To understand the toxicity mechanisms of mixed heavy metals on aquatic plant, indicators of algae growth rate, content of reduced glutathione (GSH), activities of glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) of green algae, *Scenedesmus quadricauda* were measured to analyze the individual and joint toxic effects of lead and mercury. The results show that the 96h EC₅₀ of algae growth inhibition by lead [Pb(NO₃)₂] and mercury (HgCl₂) are 0.678 9 mg/L and 0.140 1 mg/L respectively. After 12 h individual and joint lead and mercury exposure, the content of GSH in alga cells is decreased to about 70% of the level of the control, and keeps a steady level with the increase of the exposure concentration. The GST activities are increased to a peak in lower concentration groups and then decrease with the increase of the exposure concentration. Indeed, the higher concentration of lead and mercury combined-poisoning can inhibit the activities of GST significantly, with 13.04% inhibitory rate. The activity of GPx is almost suppressed continuously with the increase of the exposure concentration, and the lowest activity is only 38.77% of the control. The toxic action of the mixture of Pb and Hg on growth inhibition, GSH content, activities of GST and activities of GPx for *Scenedesmus quadricauda* are addition.

Key words: *Scenedesmus quadricauda*; lead; mercury; joint toxicity; GSH; GST; GPx

随着现代工农业和科学技术的迅速发展, 进入水环境的重金属污染物无论是总量还是种类都在持续不断地增加, 严重破坏了水生生态系统的健康. 重金属可以通过多种途径对植物的生长发育、形态行为及生理生化指标产生不同程度的影响^[1,2]. 其中最重要的影响之一是促进植物体内活性氧自由基(ROS)的产生和积累, 进而诱发细胞膜脂、核酸及细胞色素等变性失活, 加大细胞脂质过氧化(LPX)水平, 严重时甚至可以导致细胞死亡. 为了调节控制体内 ROS 的含量, 减少这种氧化胁迫的危害, 植物体自身形成了由具有抗氧化能力的非酶物质和酶组成的抗氧化系统^[3]. 谷胱甘肽还原系统就是其中一个

典型代表, 它主要由还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、谷胱甘肽还原酶(GR)和谷胱甘肽合成酶等组成. 作为生物体内抵御过氧化系统的重要组成成分, GSH 不仅可以通过抗坏血酸——谷胱甘肽循环直接清除体内由重金属诱导产生的 ROS, 而且可以作为 GPx 和 GST 的底物发挥作用, 其含量是维持生物体内正常还原缓冲能力的关键因素之一. 有研究表明, 铅、汞

收稿日期: 2008-01-17; 修订日期: 2008-03-24

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418504)

作者简介: 李燕(1977~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为生态毒理学, E-mail: hjxyliyan@mail.nankai.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

等重金属正是通过减少细胞内 GSH 这类抗氧化物质的含量而最终导致细胞过氧化水平的提高^[4]。

藻类是水生环境中最重要的初级生产者,是重金属进入水生生态系统食物链的主要途径。在已有的研究中,关注较多的是重金属胁迫对高等植物体内谷胱甘肽及相关抗氧化酶活性的影响^[5,6],在单细胞藻类中的类似研究还较少。并且,已有的研究大多只是单一重金属作用的结果,而实际环境污染中往往是多种元素共存并相互产生影响的。以铅、汞为例,二者的联合污染不仅普遍存在于国内的主要水系^[7,8]和部分沿海^[9,10],还出现在一些饮用水的水源地^[11]。因此,本研究以铅、汞为对象,观察其单一及联合作用对栅藻细胞内 GSH 及 GSH 相关抗氧化酶的影响,以进一步了解铅、汞对植物产生毒害作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)购自中国科学院武汉水生生物研究所,并经室内扩大培养用于实验。铅、汞染毒分别使用硝酸铅[Pb(NO₃)₂]和氯化汞(HgCl₂),用超纯水配制成 1 g/L Pb(NO₃)₂ 和 5 g/L HgCl₂ 的储备液。藻类培养基参照 OECD201 藻类生长抑制实验标准方法^[12]。所有试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 四尾栅藻的培养

将处于对数生长期的四尾栅藻接种到含有无菌藻类培养基的 250 mL 三角瓶内,并使最终藻液体积为 100 mL,接种浓度为 1 × 10⁴ 个/mL。接种后的三角瓶以脱脂棉封口,置于光照培养箱中,温度 25℃ ± 1℃,光强 3 000 lx,光周期 L:D = 12 h:12 h,静置培养。每隔 6 h 摇动 1 次,并随机更换锥形瓶位置。以上操作均在无菌条件下进行,每个实验组设置 3 个平行。

1.2.2 藻类生长抑制实验

参照 OECD201 藻类生长抑制实验标准方法^[12]。栅藻接种后,在三角瓶中加入受试物,放入人工气候箱中培养 96 h。自接种之日起每隔 24 h 取样 1 次,用 XB-K-25 型血球计数板,在 Olympus 显微镜下以显微镜视野法计数藻细胞。绘制各浓度组细胞数平均值与测试时间关系的生长曲线,根据公式(1)计算每个受试物浓度的细胞生长抑制百分率(I_A),求得抑制百分率对污染物浓度的回归分析方程,从而计算受试物质对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀ 值。

$$I_A = \frac{A_C - A_T}{A_C} \times 100 \tag{1}$$

式中, I_A 为每一受试物浓度细胞生长抑制的百分率; A_C 为对照组生长曲线下所包围的面积; A_T 为各受试物浓度生长曲线下所包围的面积。

(1)铅、汞的单一毒性实验 为了尽量减少计算 96 h EC₅₀ 时的误差,提前进行预实验,以优化试验浓度。经过预实验,铅和汞对四尾栅藻生长抑制的实验浓度按等浓度间距设置,浓度梯度分别为 0(对照)、0.2、0.5、0.8、1.1、1.4 mg/L Pb(NO₃)₂ 和 0(对照)、0.06、0.12、0.18、0.24、0.30 mg/L HgCl₂,每组 3 个平行。

(2)铅、汞的联合毒性实验 由单一染毒实验得到铅和汞对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀ 值,定义 0.5 × EC₅₀(铅) + 0.5 × EC₅₀(汞) = 1 个毒性单位(TU_{联合})。经预实验,铅、汞联合染毒实验浓度梯度设为 0(对照)、0.32、0.56、1.00、1.80 和 3.20 毒性单位(TU_{联合}),每个浓度组中 Pb(NO₃)₂ 和 HgCl₂ 的具体含量如表 1 所示。每组设 3 个平行。经回归分析求得铅、汞联合染毒对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀。根据相加指数法(AI)^[13]对 Pb(NO₃)₂ 和 HgCl₂ 的联合毒性进行评价,公式如下:

$$M = \sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{50i}} \tag{2}$$

$$\text{当 } M \leq 1 \text{ 时, } AI = \frac{1}{M} - 1.0 \tag{3}$$

$$\text{当 } M > 1 \text{ 时, } AI = M \times (-1) + 1.0 \tag{4}$$

式中, M 为总毒性强度; c_i 为混合物 EC₅₀ 中 i 组分的浓度;EC_{50*i*} 为单一毒物 i 的 EC₅₀ 值;AI 为相加指数。

表 1 铅、汞联合染毒组中的 Pb(NO₃)₂、HgCl₂ 浓度配比/mg·L⁻¹

Table 1 Concentration of Pb(NO ₃) ₂ and HgCl ₂ in joint treatment group/mg·L ⁻¹		
TU _{联合}	Pb(NO ₃) ₂	HgCl ₂
0.00	0.00	0.000
0.32	0.11	0.022
0.56	0.19	0.039
1.00	0.34	0.070
1.80	0.61	0.126
3.20	1.09	0.224

1.2.3 对 GSH 及相关抗氧化酶的影响

接种后的藻液预培养 72 h,通过生物显微镜对培养初期和培养结束的藻液进行细胞计数,确认培养后的藻细胞处于对数生长期。定义 1 个 96 h EC₅₀

= 1 个毒性单位 (TU). 按表 2 所示, 分别以实验 1.2.2 所得铅、汞单一及联合染毒对四尾栅藻生长抑制的 TU 为单位, 在培养后的藻液中加入铅、汞及

铅汞混合物, 继续培养 12 h 后, 收集藻细胞作为实验材料.

(1)藻细胞的收集及细胞液提取 4 200 r/min

表 2 实验采用的铅、汞浓度¹⁾/TU

Table 2 Concentration of Pb(NO ₃) ₂ and HgCl ₂ /TU						
Pb(NO ₃) ₂	0.0 (0.0)	0.3 (0.203 7)	0.4 (0.271 6)	0.6 (0.407 3)	0.7 (0.475 2)	0.9 (0.611 0)
HgCl ₂	0.0 (0.0)	0.2 (0.028 0)	0.4 (0.056 0)	0.5 (0.070 0)	0.6 (0.084 0)	0.8 (0.112 0)
Pb(NO ₃) ₂ + HgCl ₂	0.0 (0.0 + 0.0)	0.1 (0.033 6 + 0.006 9)	0.3 (0.100 9 + 0.020 8)	0.5 (0.168 2 + 0.034 7)	0.7 (0.235 5 + 0.048 6)	0.9 (0.302 8 + 0.062 5)

1)括号中为实际浓度/mg·L⁻¹

离心 10 min 收集藻细胞, 用蒸馏水洗 2 ~ 3 次, 液氮冷冻后称重. 加入适量石英砂, 液氮研磨成粉状, 按质量体积比 1 : 4 加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4), 冰浴下超声破碎 2 min. 将匀浆于 4℃, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液即为提取的细胞液, 用于测定 GSH 含量、蛋白含量以及 GPx、GST 活性.

(2)GSH、GPx、GST 测定 GSH 测定采用 5-5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)法^[14], GPx 检测参照 Hafemen 等^[15]的方法, GST 检测参照 Habig 等^[16]设计的方法. 为了减少不同染毒体系本底值差异对结果的影响, 实验结果最终表达为染毒组 GSH 含量和酶活性单位相对于对照组结果的百分比.

(3)蛋白含量的测定 采用 Bradford^[17]方法测定, 用小牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白, 含量以 μg/mL 样品表示.

1.2.4 数据处理与分析

所有数据均以 3 个平行组数据的平均值 ± 标准差 (Means ± SD) 来表示, 利用 SPSS 13.0 统计软件对

实验结果进行单因素方差分析 (ANOVA), 并用 LSD 法对组间差异进行比较, 以 $p \leq 0.05$ 作为差异显著水平.

2 结果与分析

2.1 铅、汞单一及联合作用对四尾栅藻生长的影响

根据公式(1)计算细胞生长抑制百分率 (I_A), 求出抑制百分率对污染物浓度的回归分析方程, 得到铅、汞单一及联合作用对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀ 值, 结果如表 3 所示. 铅和汞单一作用对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀ 分别为 0.678 9 和 0.140 1 mg/L, 可见汞对四尾栅藻生长的毒性作用约为铅的 4 ~ 5 倍. 由 HgCl₂ 和 Pb(NO₃)₂ 混合液对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀, 可得二者联合作用对四尾栅藻的总毒性强度 $M = 0.991 0$. 由相加指数法求得铅汞联合毒性的相加指数 $AI = 0.009$.

2.2 铅、汞单一及联合作用对四尾栅藻体内 GSH 含量及 GST、GPx 活性的影响

表 3 铅、汞单一及联合作用对四尾栅藻的 96 h EC₅₀

Table 3 96 h EC ₅₀ of single and joint effects of Pb(NO ₃) ₂ and HgCl ₂ on <i>Scenedesmus quadricauda</i>					
组分	回归方程	<i>n</i>	<i>r</i>	96 h EC ₅₀	95% 置信区间
Pb(NO ₃) ₂	$I_A = 53.46c + 13.68$	3	0.996 0	0.678 9 mg/L	0.597 3 ~ 0.760 5
HgCl ₂	$I_A = 232.58c + 17.42$	3	0.992 2	0.140 1 mg/L	0.120 3 ~ 0.159 9
Pb(NO ₃) ₂ + HgCl ₂	$I_A = -5.77c^2 + 43.71c + 8.94$	3	0.997 4	0.991 0 TU	0.884 8 ~ 1.097 2

2.2.1 铅、汞单一及联合作用对 GSH 含量的影响

不同浓度铅、汞单一及联合染毒 12 h 后, 四尾栅藻体内 GSH 含量变化如图 1 所示. 可以看出, 与对照组相比, 铅、汞及铅汞联合胁迫可显著降低四尾栅藻细胞内 GSH 的含量 ($p \leq 0.05$). 但这种变化并不是简单地随着染毒浓度的增加而呈直线下降的. 在汞单一染毒组中, GSH 含量先随着染毒浓度的增加降低到 $80.08\% \pm 10.49\%$ (0.2 TU, $p \leq 0.05$). 然后这种下降趋势随染毒浓度的增加明显变缓, GSH

含量变化介于 ($80.08\% \pm 10.49\%$) ~ ($68.14\% \pm 7.47\%$) 之间, 各浓度组之间没有显著差异 ($p \geq 0.05$). 当 HgCl₂ 浓度继续增加, 超过 0.6 TU 时, 栅藻细胞内 GSH 含量再次发生快速下降, 达到实验范围内的最低点 $42.91\% \pm 6.80\%$ (0.8 TU, $p \leq 0.05$). 铅单一染毒及铅汞联合染毒系列组中也存在类似的趋势. 虽然实验范围内铅染毒系列的 GSH 含量最低点出现在 0.6 TU ($63.06\% \pm 0.92\%$, $p \leq 0.05$), 但 0.4、0.6、0.7 和 0.9 TU 染毒组之间并不存在显著差异

($p \geq 0.05$). 在最初快速下降达到低点后($68.78\% \pm 4.67\%$, 0.3 TU , $p \leq 0.05$), 随着铅、汞联合染毒浓度的增大, 栅藻细胞内 GSH 含量在($66.47\% \pm 1.37\%$) ~ ($75.27\% \pm 6.38\%$) 范围内小幅振荡, $0.3 \sim 0.9 \text{ TU}$ 染毒范围内各组之间无明显差异($p \geq 0.05$).

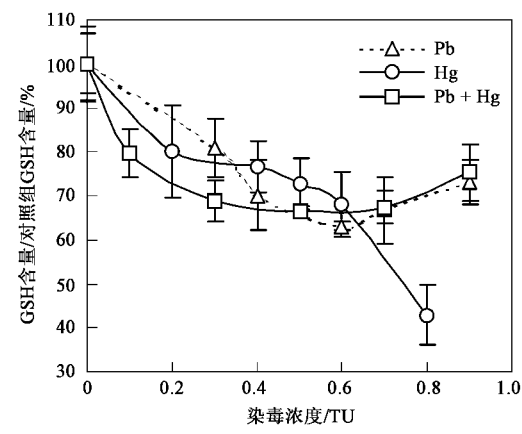


图1 铅、汞单一及联合染毒对栅藻 GSH 含量的影响
Fig.1 Toxic effects of single and joint $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and HgCl_2 on GSH of *Scenedesmus quadricauda*

2.2.2 铅、汞单一及联合作用对 GST 活性的影响

不同浓度铅、汞单一及联合染毒对四尾栅藻细胞内 GST 活性的影响如图 2 所示. 从中可见, 在汞染毒组中, GST 活性先随着 HgCl_2 浓度的增加而逐渐上升, 在 0.4 TU 时达到最高值 $119.25\% \pm 2.80\%$ ($p \leq 0.05$), 然后又随浓度的继续增加而逐渐下降, 最低点为 $85.55\% \pm 10.72\%$ (0.8 TU , $p \geq 0.05$). 虽然与空白相比, 实验范围内最大汞染毒浓度并没有对 GST 活性产生明显的抑制作用, 但与其他浓度组相比, 这种活性降低仍然是具有统计学意义的 ($p \leq 0.05$). 铅单一染毒体系 GST 活性的最大值出现在 0.6 TU 处, 为 $129.54\% \pm 3.68\%$ ($p \leq 0.05$), 随着铅染毒浓度的进一步增大, GST 活性又逐渐回落到对照组水平附近 ($99.77\% \pm 10.70\%$, 0.9 TU , $p \geq 0.05$). 与铅、汞单一染毒体系相比, 联合染毒体系的 GST 活性最大值出现的浓度要低很多, 在 0.1 TU 组既达到峰值 $113.87\% \pm 7.67\%$ ($p \leq 0.05$). GST 活性的这种微弱增加随着铅、汞联合染毒浓度的加大而逐渐减少, 直至 0.7 和 0.9 TU 染毒组出现明显的活性抑制现象, GST 活性最低值为 $86.96\% \pm 3.28\%$ ($p \leq 0.05$).

2.2.3 铅、汞单一及联合作用对 GPx 活性的影响

铅、汞单一及联合染毒后四尾栅藻细胞内 GPx 活性变化见图 3. 从中可知, 与 GST 活性先增加后降

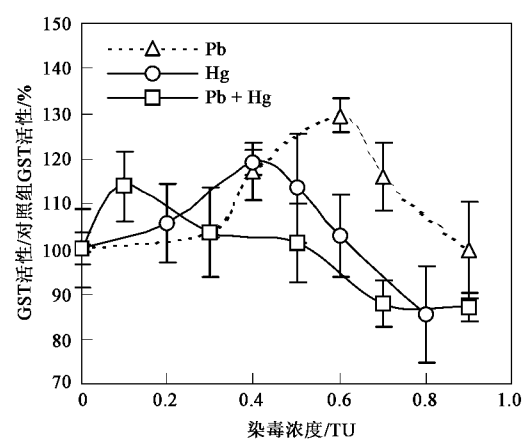


图2 铅、汞单一及联合染毒对栅藻 GST 活性的影响
Fig.2 Toxic effects of single and joint $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and HgCl_2 on GST of *Scenedesmus quadricauda*

低不同, 铅、汞单一及联合染毒对四尾栅藻体内 GPx 活性具有明显的抑制作用 ($p \leq 0.05$), 并且这种抑制作用随染毒浓度的增加而加大. 铅、汞及铅汞联合染毒体系中 GPx 活性的最小值分别为 $45.23\% \pm 10.00\%$ (0.9 TU , $p \leq 0.05$), $58.33\% \pm 9.68\%$ (0.8 TU , $p \leq 0.05$) 和 $38.77\% \pm 8.93\%$ (0.7 TU , $p \leq 0.05$).

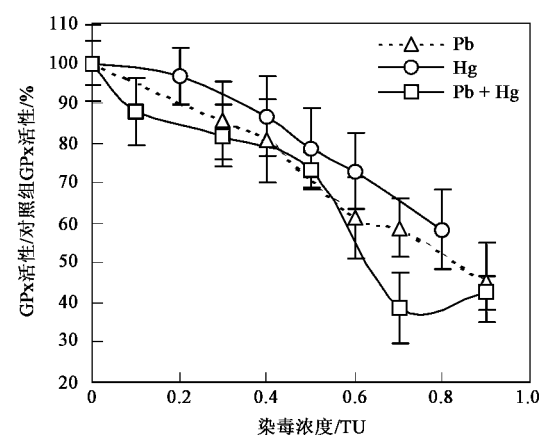


图3 铅、汞单一及联合染毒对栅藻 GPx 活性的影响
Fig.3 Toxic effects of single and joint $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and HgCl_2 on GPx of *Scenedesmus quadricauda*

3 讨论

本研究的结果表明, 在低浓度的铅、汞单一及联合胁迫下, 四尾栅藻体内 GST 活性有明显的增加. 这种现象产生的原因是由于细胞 GST mRNA 对氧化胁迫反应十分灵敏^[19]. 随着重金属诱导的 ROS 在生物体内的逐渐积累和增多, GST mRNA 的表达增强, 在指标上即表现为细胞内 GST 活性的增加. GST 活

性的升高是机体抗击外源污染物亲电基团氧化的一种应激反应机制,这种反应已经被认为是植物对胁迫响应的重要标志之一^[20].由此可见,低浓度的铅、汞胁迫已对栅藻产生了氧化胁迫作用.然而,GST活性的增加并不是无限制的.当铅、汞单一及联合胁迫的力度继续增大,诱导藻类体内 ROS 积累超过了抗氧化体系的代谢能力,细胞内核酸及酶就会受到脂质过氧化的伤害而失去活性.因此,栅藻体内 GST 活性在升高到一定峰值时就开始随着铅、汞浓度的增加而降低,甚至在联合染毒系列中还出现了抑制现象.

作为 GST 催化反应的底物,GSH 对铅、汞单一及联合胁迫的反应与 GST 活性的变化密切相关.在低浓度组中,伴随着 GST 活性的增加,四尾栅藻细胞内的 GSH 含量随胁迫浓度的增加而明显降低,这正是 GSH 作为生物体内抗氧化系统的重要组成部分在抗氧化胁迫中被大量消耗的结果.然而,随着胁迫程度的继续加大,GST 的活性逐渐回落,对 GSH 的消耗逐渐减少,加之 GSH 氧化还原系统的运作,栅藻体内 GSH 含量的降低很快就被控制在一定范围内,达到稳态阶段,不再随着胁迫程度的加大而发生剧烈变化,从而使细胞维持一定的还原缓冲能力,达到保护生物体,提高生物体对胁迫耐受力的目的.在实验范围内,只有汞单一染毒组在高浓度组中打破了这种稳态平衡,再次出现了 GSH 含量明显下降的现象,这说明 GSH 抗氧化防御系统的调节能是有限的,当胁迫超过调节极限时,ROS 与抗氧化系统之间的动态平衡就会被破坏.

与 GST 一样,GPx 在清除过氧化物时也需要消耗 GSH,因此二者之间存在着对共同反应底物 GSH 的竞争.只有在 GSH 得到源源不断的补充时,GPx 的作用才会得到充分的发挥.在本研究范围内,栅藻细胞内 GSH 含量水平一直保持在一个较低水平,GPx 活性因此受到了明显的抑制,并表现为随胁迫强度的加大而活性逐渐降低.高浓度组 GPx 的活性抑制除了受底物竞争的影响,还可能是由于机体内 ROS 含量随胁迫强度增大突然增加,诱发 GPx 变性失活.

与本研究的结果相反,已有的一些研究表明植物受到重金属胁迫时会发生氧化应激反应,其表现之一即为体内 GSH 含量会在一定程度上明显增加^[21,22],而 GPx 活性也往往随着 GSH 含量的增加而增加^[23].实际上,GSH 和 GPx 的这种应激反应是受时间影响的.Okamoto 等^[24]的研究表明,在急性染毒

(48 h)情况下,重金属胁迫会使藻类体内 GSH 含量发生明显下降,而在慢性染毒(30 d)条件下,染毒组中 GSH 含量会明显增加.由此可见,GSH 抗氧化防御系统对植物的保护能力除受胁迫剂量的影响外,还与胁迫持续的时间有关.本研究的染毒时间仅为 12 h,属于急性染毒,因此,各染毒系列四尾栅藻体内 GSH 含量均低于对照组.而 GSH 含量稳态阶段的出现也预示着在低浓度组随着染毒时间的延长,在生物体内多个抗氧化系统协同作用下,GSH 含量有可能得到恢复,甚至有所增加.

大量研究表明,重金属胁迫可以抑制藻类的生长,甚至引起藻类死亡.因此,早在 1975 年,Hutchinson 等^[25]就提出了可以利用藻类生长作为指标对重金属的生物毒性进行评价.然而,在已知文献中,还没有以藻类生长为指标对铅、汞联合作用进行分析的报道.根据相加指数法的规定,当 $AI = 0$,联合毒性表现为简单的相加作用(addition);当 $AI < 0$ 时,为拮抗作用(antagonism);当 $AI > 0$ 时,为协同作用(synergism).但实际上,基于相加指数法来判断联合作用是否属于相加作用的统计模型是非常复杂的.Fernández 等^[26]在研究汞与其他重金属的联合毒性作用时指出,当总毒性强度 M 在 0.8 ~ 1.2 之间时,联合作用与相加作用之间是没有明显差别的.本研究中铅、汞联合染毒后计算得出的总毒性强度 $M = 0.9910$, $AI = 0.009$ 接近于 0.所以,本研究中铅、汞对栅藻生长抑制的联合作用关系最终判定为相加作用.

对铅、汞联合染毒组中栅藻体内 GSH 含量及 GST、GPx 活性的分析进一步验证了铅、汞联合作用之间存在着相加关系.与铅、汞单一染毒组相比,铅、汞联合染毒组的栅藻体内 GST 活性在较低浓度即达到了峰值,且 GST 激活的程度低于单一染毒系列;随着胁迫浓度的增加,联合染毒组中 GST 活性甚至出现了单一染毒组中没有出现的抑制现象,这说明铅、汞联合染毒对 GST 的毒性影响较单一染毒更明显.虽然铅、汞单一及联合染毒之间差别并不显著,但铅、汞联合染毒组对栅藻体内 GPx 的影响曲线始终位于单一联合染毒组的下方,同样说明铅、汞联合染毒对栅藻 GPx 活性的影响较单一染毒更明显.与栅藻体内 GST 和 GPx 活性变化相对应,联合染毒组中 GSH 含量达到稳态状态的浓度也小于单一染毒组,并且稳态状态持续的浓度范围也较单一浓度组大.在联合染毒的高浓度组中,由于 GST 和 GPx 的活性均受到明显的抑制且抑制程度大于单一染毒

组, GSH 含量甚至出现了回升的趋势. 虽然这种回升不具有统计学意义, 但从另一方面证明了铅、汞之间存在着相加关系的联合作用方式. 这些结果均表明, 铅、汞联合染毒对四尾栅藻体内 GSH 含量、GST 及 GPx 活性的影响与单一染毒具有相同的变化趋势, 且毒性略强, 因此, 铅、汞联合作用对栅藻体内 GSH 含量、GST 及 GPx 活性的影响也表现为相加作用.

4 结论

(1) 铅、汞单一胁迫对四尾栅藻生长抑制的 96 h EC₅₀ 分别为 0.678 9 mg/L 和 0.140 1 mg/L, 二者的联合作用表现为相加作用.

(2) 铅、汞单一及联合胁迫使四尾栅藻体内 GSH 含量明显降低, 并在一定水平上保持稳定, 这正是 GSH 能够防御重金属诱导的氧化胁迫, 维持生物体内氧化代谢动态平衡的一种表现.

(3) 铅、汞单一及联合胁迫使四尾栅藻体内 GST 活性随着胁迫浓度的增加而先上升后下降, 体现了栅藻体内抗氧化防御系统对重金属胁迫的应激反应.

(4) 铅、汞单一及联合胁迫使四尾栅藻体内 GPx 活性随胁迫浓度的增加而持续下降. 这种下降可能是底物竞争和 ROS 抑制共同作用的结果.

(5) 铅、汞联合胁迫对四尾栅藻体内 GSH 含量、GST 及 GPx 活性的影响也表现为相加作用.

参考文献:

[1] Assche F V, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants [J]. *Plant, Cell and Environ.* 1990, **13**(3): 195-206.

[2] Bidar G, Garcon G, Pruvot C, *et al.* Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field Plant metal concentration and phytotoxicity [J]. *Environ Pollut*, 2007, **147** (3): 546-553.

[3] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, **9**(7): 405-410.

[4] Cantoni O, Christie N T, Swann A, *et al.* Mechanism of HgCl₂ cytotoxicity in cultured mammalian cells [J]. *Mol Pharmacol*, 1984, **26**(2): 360-368.

[5] 丁海东, 齐乃敏, 朱为民, 等. 镉、锌胁迫对番茄幼苗生长及其脯氨酸与谷胱甘肽含量的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2006, **14**(2): 53-55.

[6] Fatima R A, Ahmad M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater [J]. *Sci Total Environ*, 2005, **346**(1-3): 256-273.

[7] Qu C H, Yan R E. Chemical composition and factors controlling suspended matter in three major Chinese rivers [J]. *Sci Total Environ*, 1990, **97/98**: 335-346.

[8] 徐小清, 邓冠强, 惠嘉玉, 等. 长江三峡库区江段沉积物的重金属污染特征[J]. *水生生物学报*, 1999, **23**(1): 1-10.

[9] 张小林. 渤海海域海水、沉积物中铅、镉、汞、砷污染调查[J]. *黑龙江环境通报*, 2001, **25**(3): 87-90.

[10] Fang J, Wang K X, Tang J L, *et al.* Copper, lead, zinc, cadmium, mercury and arsenic in marine products of commerce from Zhejiang coastal area, China, May 1998 [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2004, **73**(3): 583-590.

[11] 王宁, 朱颜明. 松花湖水源地区重金属非点源污染调查[J]. *中国环境科学*, 2000, **20**(5): 419-421.

[12] OECD guidelines for the testing of chemicals 201, Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test [S].

[13] Making L L. An Approach for Additive Toxicity of Chemical Mixtures [A]. In: Mayor L L, Hamelink J L. (eds). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: ASTM STP 634* [C]. Philadelphia, American Society for Testing and Material, 1997. 634-699.

[14] Ellman G L. Tissue sulfhydryl group [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1959, **82**: 70-77.

[15] Hafeman D G, Sunde R A, Hoekstra W G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat [J]. *J Nutr*, 1974, **104**(5): 580-587.

[16] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *J Biol Chem*, 1974, **249**(22): 7130-7139.

[17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**(7): 248-254.

[18] Marrs K A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants [J]. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 1996, **47**: 127-138.

[19] Conklin P L, Last R L. Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone [J]. *Plant Physiol*, 1995, **109**(1): 202-212.

[20] Edwards R, Dixon D P, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(5): 193-198.

[21] 计汪栋, 施国新, 张慧, 等. 菹草对 Hg²⁺ 胁迫的生理和结构应答反应[J]. *生态学报*, 2007, **27**(7): 2856-2863.

[22] 于方明, 仇荣亮, 胡鹏杰, 等. 不同 Cd 水平对小白菜叶片抗氧化酶系统的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, **26**(3): 954-956.

[23] Ding Y, Miao J L, Li G Y. Effect of Cd on GSH and GSH-related enzymes of *Chlamydomonas* sp. ICE-L existing in Antarctic ice [J]. *J Environ Sci-China*, 2005, **17**(4): 667-671.

[24] Okamoto O K, Pinto E, Latorre L R, *et al.* Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, **40**(1): 18-24.

[25] Hutchinson T C, Stockes P M. Heavy Metal Toxicity and Algal Bioassays [M]. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1975. 320-343.

[26] Fernández N, Beiras R. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* Sea-Urchin [J]. *Ecotoxicology*, 2001, **10** (5): 263-271.