

几种重金属离子对沼泽红假单胞菌的生物效应*

周茂洪** 张学俊 赵肖为

(温州大学应用技术学院 温州 325027)

摘要: 研究了 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 $Cr(VI)$ 和 Pb^{2+} 对光合细菌沼泽红假单胞菌的 96h 平均生长速度、细胞外渗液电导率、总蛋白质和细菌叶绿素含量的影响。结果表明, 依据 5 种重金属离子对该菌的 96h 平均生长速度影响的实验结果, 得出它们对该菌的毒性大小次序为 $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Cr(VI) > Pb^{2+}$ 。在 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 $Cr(VI)$ 和 Pb^{2+} 的胁迫下, 该菌细胞外渗液的电导率增加, 且具剂量效应, 而 Cu^{2+} 并未使其细胞外渗液的电导率增加。 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 $Cr(VI)$ 和 Pb^{2+} 的胁迫均能导致该菌细菌叶绿素含量的降低, 也存在剂量效应。但 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 $Cr(VI)$ 和 Pb^{2+} 的胁迫对该菌总蛋白质含量没有显著的影响。

关键词: 重金属离子, 沼泽红假单胞菌, 生物效应

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0064-05

A FEW BIOLOGICAL EFFECTS OF SOME HEAVY METAL IONS ON PHOTOSYNTHETIC BACTERIUM RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS

ZHOU Mao-Hong ZHANG Xue-Jun ZHAO Xiao-Wei

(College of Applied Technology, Wenzhou University, Wenzhou 325027)

Abstract: It was studied that effects of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , $Cr(VI)$ and Pb^{2+} on 96h average growth rate, conductivity of osmotic liquor and total protein and bacteriochlorophyll content of our *Rhodospseudomonas palustris*. The results showed that the toxicity sequence of these heavy metal ions from high to low is Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , $Cr(VI)$

* 温州大学科研课题 (No.010510003)

** 联系人 E-mail: zhounh@66wz.com

收稿日期: 2002-07-22, 修回日期: 2002-11-26

and Pb^{2+} according to the results of effects of 5 heavy metal ions on 96h average growth rate of this strain; forcing of Hg^{2+} , Cd^{2+} , $Cr(VI)$ and Pb^{2+} lead to increasing of conductivity of osmotic liquor, and this effect has dose response, but that of Cu^{2+} doesn't; forcing of 5 heavy metal ions could result in reducing of bacteriochlorophyll content, and this effect also has dose response. But forcing of 5 heavy metal ions hasn't marked effect on total protein content.

Key words: Heavy metal ions, *Rhodospseudomonas palustris*, Biological effect

光合细菌是一类在无氧条件下进行不放氧光合作用的细菌的总称, 因其在自然生态系统中的意义与较大的应用价值, 一直受到国内外科学工作者的重视, 无论基础研究还是应用研究都取得了重大的进展。我国对将光合细菌应用于有机废水处理、水产养殖和农业上也进行了大量的研究, 并取得了许多成果^[1]。

无论水体还是土壤, 重金属已成为主要污染物之一, 其对生物的生态效应已被广泛深入的研究, 但重金属对光合细菌的毒性效应研究不多。探讨重金属对光合细菌的毒性效应, 无论是了解其对光合细菌在自然生态系统中净化污水的影响, 还是了解其对将光合细菌应用于污水处理或水产养殖业的影响, 都有理论和实际意义。作者曾研究了几种常见重金属离子对光合细菌沼泽红假单胞菌生长的抑制效应及净化氮、磷能力的影响^[2-4], 本文在此基础上以细胞外渗液的电导率、总蛋白质和细菌叶绿素含量为指标, 对几种常见重金属对光合细菌沼泽红假单胞菌毒性效应的机理进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) WZ1, 由温州大学微生物学实验室分离获得。

1.2 培养基^[5]

NaAc 4g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.075g, K_2HPO_4 0.25g, 柠檬酸铁 0.01g, 微量元素 1.0mL, 蒸馏水 1,000 mL, pH 6.9; 微量元素配方: H_3BO_3 0.7 g, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 6 mg, Na_2MoO_4 188mg, 蒸馏水 1,000mL。

1.3 培养方法

将液体培养基装入 100mL 具塞锥形瓶中, 经 $1 \times 10^5 Pa$ 20min 灭菌后, 分别加入灭菌的不同浓度梯度的 Cu^{2+} ($Cu(NO_3)_2$)、 Cd^{2+} ($CdSO_4$)、 $Cr(VI)$ (K_2CrO_4)、 Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$)、 Hg^{2+} ($HgCl_2$) 5 种重金属化合物, 并以不加重金属离子作为对照, 接入 50% (V/V) 对数期沼泽红假单胞菌, 接种方法为将 50mL 的菌液在 4,000r/min 下离心 10min, 去上清液, 将菌体接入培养基在 30℃ 2,500 LX 光照下培养。

1.4 电导率测定方法^[6]

取培养 96h 的菌液, 用蒸馏水将每批次菌液的 OD 值 ($\lambda = 680nm$) 调至相同 (以每批次 OD 值最小者为标准), 取相同体积的菌液在 4,000 r/min 下离心 10min 后去上清液。用 10mL 高纯水分 2 次洗涤菌体, 方法为将高纯水加入离心管搅匀菌体, 在 4,000 r/min 下离心 10min 后去上清液。然后加 5mL 高纯水搅匀菌体后静置 2~3 h 直至达到离子平衡, 在 4,000 r/min 下离心 10min, 以铂电极测量上清液的电导率。

1.5 细菌总蛋白质含量的测定

取培养 96h 的菌液, 在 4,000 r/min 下离心 10min 后去上清液, 称菌体湿重, 然后用

凯氏定氮法测定蛋白质含量。

1.6 细菌叶绿素含量的测定^[7]

取培养 96h 的菌液，在 4,000 r/min 下离心 10min 后去上清液，称菌体湿重，菌体用 80% 丙酮萃取几次，直至菌体无色，合并萃取液用 VIS-722 分光光度计分别在 663nm 和 645nm 下测其吸光度，萃取液细菌叶绿素浓度由吸光度 (*OD* 值) 代入公式计算： $C (\mu\text{g/mL}) = 12.7 \times OD_{663} - 2.69 \times OD_{645}$ ，菌体细菌叶绿素含量 (mg/g) = $C \times V/W$ (V : 萃取液体积, W : 菌体湿重)。

1.7 细菌 96h 平均生长速度的测定

接种及培养方法同 1.3，定时取样用 VIS-722 分光光度计在 680nm 下测定培养液吸光度 (*OD* 值)，将 96h 培养液的吸光度减去刚接入菌体时的吸光度除以时间作为沼泽红假单胞菌的 96h 平均生长速度，即 $\bar{u} (\text{OD/h}) = (OD_{96h} - OD_{0h}) / 96h$ 。

2 结果与分析

2.1 重金属离子对沼泽红假单胞菌 96h 平均生长速度的影响

实验结果见表 1。由表 1 可以看出，5 种重金属离子对沼泽红假单胞菌生长均有抑制作用，且随着重金属离子浓度的增加，抑制作用逐渐增强。当 Hg^{2+} 浓度为 $4\mu\text{mol/L}$ 时，该菌的 96h 平均生长速度接近对照的 1/2，达到 $8\mu\text{mol/L}$ 时，生长完全被抑制； Cu^{2+} 浓度达 $8\mu\text{mol/L}$ 时，该菌的 96h 平均生长速度小于对照的 1/3；当 $\text{Cr}(\text{VI})$ 的浓度为 $250\mu\text{mol/L}$ 时，该菌的 96h 平均生长速度小于对照的 1/2；当 Pb^{2+} 达到 $800\mu\text{mol/L}$ 时，该菌的 96h 平均生长速度开始下降，达到 $1,600\mu\text{mol/L}$ 时，生长完全被抑制； Cd^{2+} 的浓度为 $20\mu\text{mol/L}$ 时，该菌的 96h 平均生长速度接近对照的 1/2，达到 $80\mu\text{mol/L}$ 时，生长完全被抑制。由此可知，5 种重金属对该菌毒性大小的顺序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}(\text{VI}) > \text{Pb}^{2+}$ 。

2.2 重金属离子对沼泽红假单胞菌细胞外渗液电导率的影响

实验结果见表 1。从表 1 可以看出，在 Pb^{2+} 、 $\text{Cr}(\text{VI})$ 、 Hg^{2+} 和 Cd^{2+} 4 种重金属离子胁迫下，沼泽红假单胞菌细胞外渗液电导率均随重金属离子浓度的增加而逐渐增加；但在 Cu^{2+} 的胁迫下，该菌细胞外渗液电导率并未发生明显的变化。

2.3 重金属离子对沼泽红假单胞菌总蛋白质含量的影响

实验结果见表 1。从表 1 可以看出，在 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 $\text{Cr}(\text{VI})$ 、 Hg^{2+} 和 Cd^{2+} 5 种重金属离子的胁迫下，该菌的总蛋白质含量虽然有下降的趋势，但不明显，即 5 种重金属离子的胁迫对该菌的总蛋白质含量没有显著的影响。

2.4 重金属离子对沼泽红假单胞菌细菌叶绿素含量的影响

实验结果见图 1~2。由图可知， Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 $\text{Cr}(\text{VI})$ 、 Hg^{2+} 和 4 种重金属离子对沼泽红假单胞菌的细菌叶绿素含量均具有抑制作用，且随着重金属离子浓度的增加，抑制作用逐渐加强 Cd^{2+} 对该菌细菌叶绿素含量的抑制作用与之相似。表明这 5 种重金属离子均能抑制细菌叶绿素的合成。

表1 重金属离子对沼泽红假单胞菌若干生物指标的影响

金属离子	浓度 (mmol/L)	96h 平均生长速度 (OD/h)	电导率 (us/cm)	总蛋白质含量 (g/g)
Hg ²⁺	0	0.0047	13.3	0.1271
	0.0005	0.0039	15.8	0.1295
	0.001	0.0035	18.4	0.1206
	0.002	0.0029	20.9	0.1193
	0.004	0.0025	21.3	0.1165
	0.008	0	-	-
Cu ²⁺	0	0.0049	16.8	0.1225
	0.001	0.0040	16.0	0.1215
	0.002	0.0039	16.6	0.1242
	0.004	0.0031	16.3	0.1158
	0.008	0.0015	16.4	0.1197
	0.016	0.0012	16.4	0.1071
Cr(VI)	0	0.0053	15.8	0.1272
	0.063	0.0045	16.4	0.1281
	0.125	0.0033	17.5	0.1258
	0.250	0.0024	20.7	0.1200
	0.500	0.0020	26.5	0.1188
	1.000	0.0010	27.1	0.1207
Pb ²⁺	0	0.0050	13.2	0.1252
	0.1	0.0052	14.8	0.1255
	0.2	0.0052	15.5	0.1186
	0.4	0.0049	16.2	0.1196
	0.8	0.0031	17.3	0.1113
	1.6	0	-	-
Cd ²⁺	0	0.0053	22.7	0.1206
	0.005	0.0053	24.3	0.1245
	0.010	0.0040	28.7	0.1191
	0.020	0.0027	30.0	0.1202
	0.040	0.0018	29.6	0.1169
	0.080	0.0002	-	-

注: - 表示细菌几乎不生长, 因菌体量太少, 无法测定

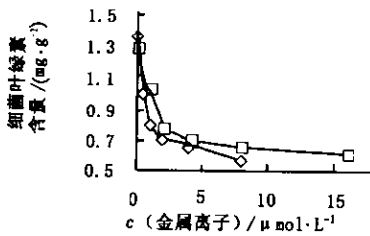


图1 Hg²⁺、Cu²⁺对沼泽红假单胞菌细菌叶绿素含量的影响

—◇— Hg²⁺, —□— Cu²⁺

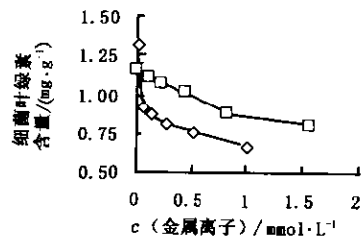


图2 Cr(VI)、Pb²⁺对沼泽红假单胞菌细菌叶绿素含量的影响

—◇— Cr(VI), —□— Pb²⁺

3 讨论

作者曾采用有毒化学品对水生生物急性毒性实验的标准方法研究了 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr(VI) 、 Hg^{2+} 和 Cd^{2+} 5种重金属离子对沼泽红假单胞菌的毒性效应, 培养方法除接种量为5%对数期菌液外, 其它与本文报道的相同, 得出它们对该菌的96h EC_{50} 分别为 $2.17\mu\text{mol/L}$ 、 $617\mu\text{mol/L}$ 、 $392.6\mu\text{mol/L}$ 、 $2.00\mu\text{mol/L}$ 、 $25.61\mu\text{mol/L}$ ^[2,3]。将本文的5种重金属离子对该菌的96h平均生长速度影响的实验结果与之比较, 虽然接种量增加, 但它们对该菌生长产生抑制的浓度范围和毒性大小的次序是一致的。至于不同重金属对该菌毒性大小的差异的原因可能较多。

细胞外渗液的电导率增加是表征细胞膜通透性增加的重要指标, 重金属离子能与细胞膜结合从而增加其通透性, 这是重金属对生物毒性效应的机理之一。从我们的实验结果看, Pb^{2+} 、 Cr(VI) 、 Hg^{2+} 和 Cd^{2+} 4种重金属离子的胁迫使沼泽红假单胞菌细胞外渗液的电导率增加, 表明它们对该菌细胞膜具有损伤作用, 这与重金属能损伤藻类的细胞膜的文献报道相一致^[6,9-12]。但 Cu^{2+} 的胁迫并未使该菌细胞外渗液的电导率增加, 与有关 Cu^{2+} 对藻类的细胞膜具有损伤作用的文献报道不一致^[6,12]。 Cu^{2+} 对沼泽红假单胞菌细胞膜是否具有损伤作用尚有待用其它方法进一步证实。重金属能抑制光合色素的合成, 特别是重金属抑制藻类光合色素的合成有大量的文献报道^[6,9-12]。光合细菌为光营养型微生物, 其主要的的光合色素为细菌叶绿素和类胡萝卜素, 从我们的实验结果看, 5种重金属均能抑制沼泽红假单胞菌细菌叶绿素的合成, 所以光合色素的合成受到抑制应该是重金属对该菌毒性作用的机理之一。但5种重金属对该菌的总蛋白质含量没有显著的影响。重金属对微生物的毒性作用的机理是多方面的^[13], 本文仅从细胞膜通透性、总蛋白质和细菌叶绿素含量3方面进行了初步的研究, 有关重金属对光合细菌的毒性作用的机理的关键可能是抑制一些酶的活性, 这一问题尚有待进一步研究。

致谢 陈正海, 朱雪飞, 王中华参加部分实验工作, 特致感谢。

参考文献

- [1] 周茂洪, 何洋. 温州大学学报, 2001, 14(1): 53~57.
- [2] 周茂洪, 赵肖为, 吴雪昌. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 290~293.
- [3] 周茂洪, 赵肖为, 周峙苗. 上海环境科学(网络刊), 2002-01(网址: www.sesmag.sh.cn/admin/2/doc/12099.mht).
- [4] 周茂洪, 王芸沪, 岑宇. 生态科学, 2002, 21(1): 55~58.
- [5] Weaver P F, Wall J D, Gest H. Arch Microbiol, 1975, 105: 207~216.
- [6] 傅龙华, 陈浩, 董斌, 等. 四川大学学报, 2001, 38(5): 757~763.
- [7] 上海植物生理学会编. 现代植物生理学实验指南, 北京: 科学出版社, 1999.95~96.
- [8] 阎海, 王杏林, 林毅雄, 等. 环境科学, 2001, 22(1): 23~26.
- [9] Kumar D, Jha M, Kumar H D. Aquatic Botany, 1982, 22: 101~105.
- [10] Stratton G M, Huber A L, Corke C T. Applied & Environ Microbio, 1979, 38(3): 537~543.
- [11] Prasad P V D. Wat Air Soil Pollut, 1982, 17(3): 263~268.
- [12] 雷清新, 于志刚, 张经, 等. 海洋环境科学, 1998, 17(1): 11~14.
- [13] 池振明. 微生物生态学, 济南: 山东大学出版社, 1999.109.