

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211224001

阮港, 许萍萍, 殷旭旺, 等. 镉对集胞藻光合活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(6): 325-332

Ruan G, Xu P P, Yin X W, et al. Effects of cadmium on photosynthetic activity of *Synechocystis* PCC 6803 [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(6): 325-332 (in Chinese)

镉对集胞藻光合活性的影响

阮港^{1,2}, 许萍萍², 殷旭旺¹, 张春梅², 宋高飞², 米武娟², 毕永红^{2,*}

1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

收稿日期: 2021-12-24 录用日期: 2022-03-14

摘要: 镉是环境中的主要重金属污染物, 研究镉胁迫下蓝藻光合活性的变化, 有助于深入认识镉的细胞毒性以及蓝藻细胞对镉胁迫的响应特性, 可为评价镉的生态环境风险提供科学依据。为探索镉对淡水蓝藻的毒性效应, 选择集胞藻 PCC 6803 作为受试生物, 以 0、0.05、0.25、0.50 和 1.00 mg·L⁻¹ Cd²⁺ 处理 24 h 后, 测定其光合色素含量、光合活性以及活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)的变化。结果表明, 0.05 mg·L⁻¹ Cd²⁺ 处理下细胞的光合活性与对照组无显著差异; 高于 0.25 mg·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 处理, 细胞叶绿素 *a* 含量下降, PS II 反应中心受损, 活性氧积累并激活抗氧化酶活性。Cd²⁺ 浓度高于 0.50 mg·L⁻¹, 最大光化学效率(F_v/F_m)显著下降, PS II 线性电子传递链受阻, Q_A^- 动力学曲线的快相和中相时长明显增加, Q_A^- 到 Q_B 电子传递受到抑制, PS II 受体侧受损, Q_B 空位点对 PQ 的结合速率减慢。结果表明, 集胞藻能耐受低于 0.05 mg·L⁻¹ Cd²⁺ 胁迫并表现出毒性兴奋效应; 高浓度 Cd²⁺ 通过干扰 PS II 导致生长抑制作用, 影响线性电子传递链中 Q_A^- 和 Q_B , 主要毒性作用位点(受体蛋白)尚不清楚。

关键词: Cd²⁺; 集胞藻; 光合活性; 抗氧化酶活性; 毒性效应

文章编号: 1673-5897(2022)6-325-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Cadmium on Photosynthetic Activity of *Synechocystis* PCC 6803

Ruan Gang^{1,2}, Xu Pingping², Yin Xuwang¹, Zhang Chunmei², Song Gaoifei², Mi Wujuan², Bi Yonghong^{2,*}

1. School of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

2. State Key Lab of Freshwater Ecology & Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Received 24 December 2021 accepted 14 March 2022

Abstract: Cadmium is the main heavy metal pollutant in the current environment. Studying the changes of cyanobacterial photosynthetic activity under cadmium stress is helpful to deeply understand the cytotoxicity of cadmium and the response characteristics of cyanobacterial cells to cadmium stress. In order to provide basis for evaluating the ecological and environmental risks of cadmium, toxic effects of cadmium to freshwater cyanobacteria was studied, selecting *Synechocystis* PCC 6803 as the test organism. After treatment with 0, 0.05, 0.25, 0.50 and 1.00 mg·L⁻¹ Cd²⁺ for 24 h, the content of photosynthetic pigments, photosynthetic activity, reactive oxygen species (ROS) content and superoxide dismutase (SOD) activities were determined. The results showed that there was no

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFA0907400)

第一作者: 阮港(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: zgrgang@163.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: biyh@ihb.ac.cn

significant difference in photosynthetic activity between the low-dose $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ treatment and the control group. Under treatment with $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$, chlorophyll *a* content decreased, the PS II reaction center was damaged, ROS content was accumulated, the antioxidant enzyme was activated and growth was inhibited. The maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) decreased significantly at Cd^{2+} concentrations above $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the linear electron transport chain of PS II was blocked. The fast and middle phases of the Q_A^- reoxidation kinetics curve became significantly longer, inhibiting electron transfer between Q_A^- and Q_B , impairing the receptor side of PS II, and slowing down the binding rate between the vacancy site of Q_B and PQ. The results showed that *Synechocystis* PCC 6803 could tolerate less than $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ stress and Cd^{2+} exhibited stimulant effects; high concentrations of Cd^{2+} cause growth inhibition by interfering with PS II, affecting Q_A^- and Q_B in the linear electron transport chain, and the main toxic sites of action of cadmium (receptor proteins) are not known.

Keywords: Cd^{2+} ; *Synechocystis* PCC 6803; photosynthetic activity; antioxidant enzyme activity; toxic effects

镉是一种生物半衰期相对较长的非必需重金属元素,容易在生物体中积累并行使其生理功能^[1],具有高致毒性^[2];如镉与巯基紧密结合,是一种酶抑制剂^[3],破坏细胞内部离子平衡并与蛋白质中的金属离子发生置换反应导致其失去活性^[4];镉激发细胞的氧化应激造成脂质过氧化、引起蛋白质/DNA 损伤^[5];镉还可通过干扰 DNA 合成与修复,破坏细胞的增殖和分化、细胞周期进程和细胞凋亡等^[6]。即使在较低浓度下,镉也能通过诱导氧化应激和影响生长、代谢、营养吸收、光合作用和呼吸作用对光合生物产生毒害效应^[7-9]。镉对藻类的毒性试验表明,镉胁迫能显著抑制栅藻生长并破坏细胞超微结构^[2];镉对藻类光合系统具有毒性效应,破坏叶绿素合成^[10-12],竞争性结合放氧复合体(OEC)上 Ca^{2+} 位点和叶绿素 *a* 的 Mg^{2+} 等^[13]。长期以来,镉被认为是没有任何有益功能的有毒重金属。但最近研究表明,植物需要微量 Cd^{2+} 才能达到最佳生长状态^[14];在硅藻中,金属镉、钴和锌可以在功能上互相替换,以保持最佳的生长速度^[15]。可见,镉的确切生物效应仍不甚明了,需要深入研究。

蓝藻作为水生生态系统总初级生产力的重要贡献者,是重金属进入食物链的主要途径之一;暴露环境中的蓝藻细胞对重金属胁迫敏感,集胞藻作为光合作用研究的模式生物,是研究水体重金属潜在生态风险的重要模型^[16]。尽管 Cd^{2+} 对藻细胞光合系统影响的研究已非常深入,但此前的研究主要集中在藻细胞对重金属胁迫的生理响应和生物吸附能力^[17-21], Cd^{2+} 的毒性机制仍不明确,且 Cd^{2+} 的急性毒性胁迫影响光合系统中的位点存在一些相互矛盾的结果^[10, 22],例如,PS I 和 PS II 对镉的敏感性存在争议; Cd^{2+} 的胁迫位点位于电子传递链的确切部位存

在分歧。本文选择集胞藻 PCC 6803 为对象,探究不同浓度 Cd^{2+} 对细胞抗氧化酶系统和光合活性的毒性效应,以期寻找 Cd^{2+} 作用于蓝藻细胞的靶标位点,进一步认识重金属对淡水蓝藻的毒性作用及其急性致毒机理、评估重金属的生态风险提供理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料和培养条件

集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC 6803 来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-collection)。以改良 BG11 培养基(不含 EDTA)为培养液,在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $30 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 持续光照条件下,以 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速进行摇床培养,采用紫外分光光度计(UV1701,日本岛津)测定培养物在 730 nm 的吸光值,通过 $A_{730 \text{ nm}}$ 监测其生长。初始接种浓度 $A_{730 \text{ nm}}=0.1$ 接入 250 mL 三角瓶,收集处于对数生长期($A_{730 \text{ nm}}=0.8 \sim 1.0$)的藻细胞用于本研究。

$3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 5 min 收集对数生长期的藻细胞,无菌水冲洗 3 次后,置于 BG11 培养基中,接种量少于培养基的 1%,接入含有 100 mL BG11 的三角瓶。分析纯的试剂 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 购于中国国药有限公司。设置各处理组中 Cd^{2+} 浓度分别为 0.05 、 0.25 、 0.50 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为对照组。每个浓度设置 3 个重复,试验周期为 24 h 。

1.2 指标测定

1.2.1 光合色素含量的测定

光合色素含量的测定如前人^[23]描述,取 5 mL 培养物 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,弃去上清液,加入 5 mL 预冷的 90% 的甲醇,混匀后在 4°C 冰箱避光

提取 24 h, 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 取上清液, 采用紫外分光光度计测定 665、652 和 470 nm 波长的吸光值, 参照公式计算叶绿素 *a* (Chl *a*) 和类胡萝卜素 (Car) 的含量:

$$\text{Chl } a \text{ (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 16.82 A_{665} - 9.28 A_{652}$$

$$\text{Car (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (1000 A_{470} - 1.91 \text{Chl } a) / 225$$

1.2.2 活性氧(ROS)含量测定

集胞藻细胞内的 ROS 用二氯二氢荧光素双醋酸盐(DCFH-DA)检测。DCFH-DA 能进入细胞内, 被酯酶分解为 DCFH, DCFH 与 H_2O_2 等小分子过氧化物结合而被氧化成具有荧光性的 DCF。在 24 h 取样, 离心, 重悬于 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2) 缓冲液中, 再使用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 200 mL 培养物加入 96 孔板用酶标仪(PerkinElmer VICTOR Nivo, 美国)检测 DCF 荧光强度(激发波长 485 nm 和发射波长 530 nm)和叶绿素荧光(激发波长 485 nm 和发射波长 670 nm)。使用叶绿素荧光法归一化单个细胞 ROS 含量, 使用公式 $F_{\text{DCF}}/F_{\text{Chl}}$ 计算相对 ROS 丰度。

1.2.3 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定

取适量藻液 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 将藻泥悬浮于 1 mL 生理盐水(0.9% NaCl), 加入适量铅珠, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清用于蛋白含量与酶活测定。SOD 的测定使用试剂盒(南京建成), 蛋白质测定使用微孔 BCA 蛋白试剂盒 WST-1 法(康为世纪), 使用蛋白量归一化 SOD 含量。

1.2.4 快速荧光诱导动力学曲线(OJIP)和 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)的检测

OJIP 曲线和 F_v/F_m 使用 AquaPen-C AP-C 100 荧光仪 (Photon Systems Instruments, Brno, 捷克)测定, 其中 $F_v = F_m - F_0$, F_0 和 F_m 分别是藻细胞在暗适应状态下的最小和最大荧光产量^[24-25]。调节合适的细胞浓度, 室温暗适应 10 min, 蓝藻 F_0 的测定使用弱蓝色测量光(450 nm, $<0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 该光强不足以引起光化学电子传递, F_m 采用饱和脉冲光($1\,800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)照射 800 ms 测得。以照射时间为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 对快速叶绿素荧光诱导动力学曲线作图, 为了更好地观察 J 点和 I 点, 把横坐标改为对数坐标, 结果得到 OJIP 诱导曲线。

1.2.5 Q_A^- 再氧化曲线的测定

叶绿素荧光衰减的测定用双调制荧光仪 FL6000 (Photon Systems Instruments, Brno, 捷克)测定^[26-27]。室温暗适应 10 min。取 3 mL 暗适应后的藻液放入样品池, 打开测量闪光测定 F_0 , 其闪光长度为 4 μs 。之后打开单次反转饱和和闪光还原电子受体 Q_A^- , 闪光长度为 50 μs 。单次反转饱和和闪光关闭后, 荧光强度下降, 此时即为 Q_A^- 的再氧化过程, 仪器每间隔 $10^{1/6} \mu\text{s}$ 记录一次荧光强度值。参考文献[27-28], 对 Q_A^- 再氧化曲线进行三指数衰减拟合, 拟合方程如下:

$$F_t = A_1 \exp(-t/T_1) + A_2 \exp(-t/T_2) + A_3 \exp(-t/T_3) + A_0$$

式中: F_t 代表可变荧光产量, $A_0 \sim A_3$ 指幅度, $T_1 \sim T_3$ 是时间常数, 半衰期由时间常数 T 计算得来, 公式 $t_{1/2} = \ln 2 T$ 。

1.2.6 S-state 检测

取 3 mL 待测样品放入样品室, 打开测量光测定 F_0 , 测量光照射时间是 1 ms。随后打开光化光闪光照射样品, 光化光闪光次数为 10 次, 每次闪光时间间隔为 100 ms。以照射时间为横坐标, 荧光强度为纵坐标作图即为 S-state 曲线^[29]。根据 S-state 曲线, 无活性 PS II 反应中心(PS II_x)比例可通过 F_0 第 4 次光化光闪光后 100 ms 处荧光值的差值进行估算, 具体计算公式为: $\Delta F_4 = F_{400 \text{ ms}}/F_0 - 1$ 。由于本试验中相对可变荧光强度降低, 使用修改后公式^[30]来计算 PSII_x 的比例: $\text{PSII}_x(\%) = \Delta F_4 \times 100 (F_{300 \text{ ms}}/F_0 - 1)$ 。

1.3 数据分析

本试验各组均设置 3 个平行。统计软件使用 SPSS25.0 (IBM, USA), 处理组和对照组间采用单因素方差(One-way ANOVA)分析检验, 若差异显著进行最小显著差异(LSD)多重比较检验组间差异显著性。绘图和数据处理使用 R 语言中的 tidyverse 包。

2 结果 (Results)

2.1 光合色素含量变化

不同浓度 Cd^{2+} 对叶绿素 *a* 含量影响如图 1 所示。0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理后, 叶绿素 *a* 与对照组相比呈现上升趋势; 以 0.25、0.50 和 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理集胞藻后, 叶绿素 *a* 含量与对照组相比显著下降 ($P < 0.01$)。

2.2 ROS 含量和 SOD 活性变化

如图 2 所示, 处理 24 h 后, Cd^{2+} 浓度 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组与对照组相比 ROS 含量显著上升 ($P < 0.01$), Cd^{2+} 浓度为 0.25、0.50 和 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理组

ROS 含量分别是对照组的 1.47 倍、2.58 倍和 2.69 倍。

与对照组相比, Cd^{2+} 浓度为 0.05、0.25 和 0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理组藻细胞中 SOD 活性显著上升 ($P < 0.05$); Cd^{2+} 浓度为 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理组藻细胞中 SOD 活性与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 叶绿素荧光活性的变化

集胞藻在不同 Cd^{2+} 环境中, 叶绿素荧光诱导曲线和 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m) 如图 3 和图 4 所示。由图 3 可知, Cd^{2+} 浓度为 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, P 峰消失。归一化的 OJIP 曲线可以更好比较各峰之间的变化; Cd^{2+} 浓度 0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, J 峰显著上升 ($P < 0.01$)。由图 4 可知, Cd^{2+} 浓度为 0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 处理组 F_v/F_m 相对于对照组显著下降 ($P < 0.01$)。

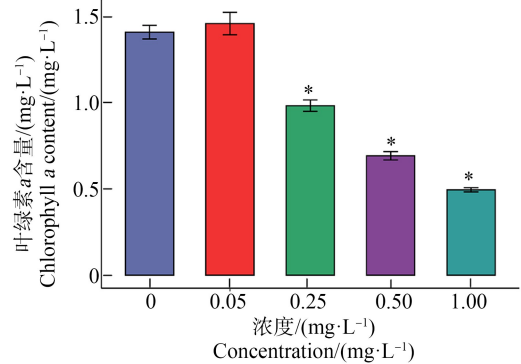


图 1 不同浓度镉离子处理 24 h 对集胞藻光合色素含量的影响

注: * 表示与对照组相比存在显著性差异。

Fig. 1 Effect on the pigment content in *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

Note: * indicates significant difference compared with the control group.

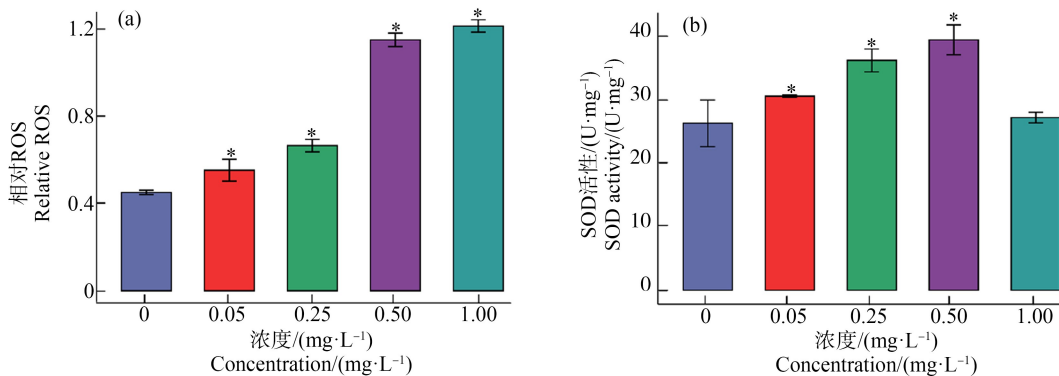


图 2 不同浓度镉离子处理 24 h 集胞藻活性氧 (ROS) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的变化

注: * 表示与对照组相比存在显著性差异。

Fig. 2 Change of reactive oxygen species (ROS) content and superoxide dismutase (SOD) activity in *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

Note: * indicates significant difference compared with the control group.

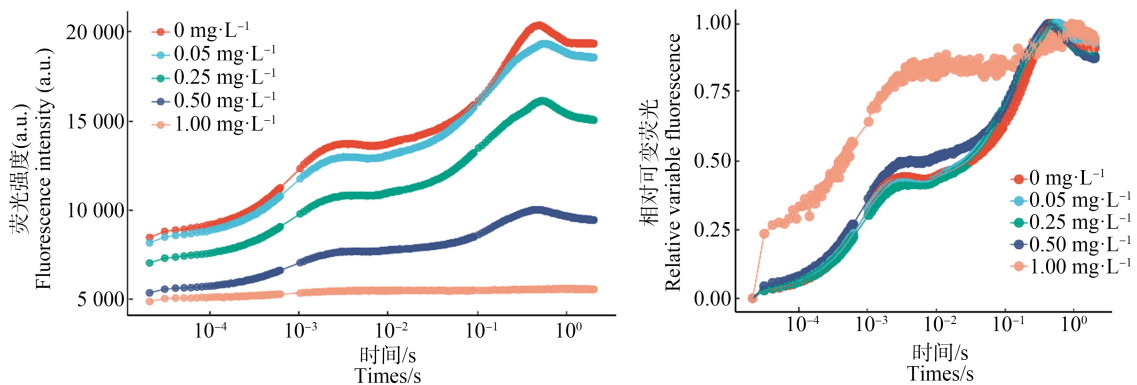


图 3 不同浓度镉离子处理 24 h 集胞藻的 OJIP 曲线

注: 相对可变荧光计算公式为 $V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$ 。

Fig. 3 OJIP fluorescence transients of *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

Note: Relative variable fluorescence is calculated by $V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$.

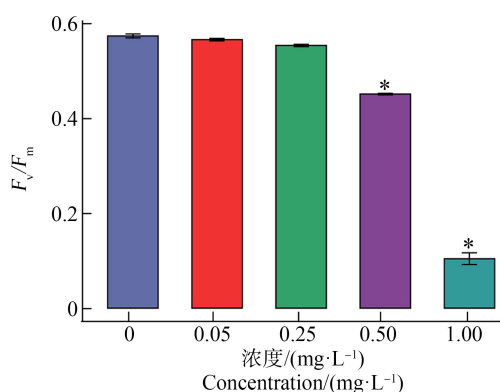


图4 不同浓度镉离子处理24 h 集胞藻的PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)变化

注: *表示与对照组相比存在显著性差异。

Fig. 4 Change of PS II maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) in *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

Note: * indicates significant difference compared with the control group.

2.4 Cd^{2+} 对 Q_A^- 再氧化的影响

如图5所示,不同浓度 Cd^{2+} 作用下集胞藻 Q_A^- 再氧化动力学曲线分析中, Cd^{2+} 浓度在 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可变荧光(F_v)振幅显著($P < 0.01$)减小,衰减期减慢。表1显示 Q_A^- 再氧化的参数, Cd^{2+} 浓度为 0.25 、 0.50 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,快相、中相半衰期随着浓度显著持续增加($P < 0.01$)。

2.5 Cd^{2+} 对无活性PS II反应中心(PS II_x)的影响

不同浓度 Cd^{2+} 作用下连续单饱和反转闪光激发后S-state曲线如图6(a)所示。PS II反应中心的一部分不能将电子从初级受体 Q_A 传递给次级受体 Q_B ,成为 PS II_x 。据此计算细胞内的 PS II_x 的比例的结

果如图6(b)所示, Cd^{2+} 浓度为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,集胞藻 PS II_x 比例显著上升。

3 讨论 (Discussion)

尽管地壳中镉元素含量很低,但人类通过采矿、有色金属冶炼和肥料生产使其浓度在局部环境中增加到有毒水平,如化工园区或密集种植区土壤中的 Cd^{2+} 浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上。这些 Cd^{2+} 最终汇集到江河湖海中,威胁水域生态系统的安全与健康。蓝藻作为水域生态系统的重要成员,对镉具有较强的吸附/吸收能力;研究表明蓝藻细胞能在30 min 吸附70%以上 Cd^{2+} ,胞内聚集的 Cd^{2+} 抑制叶绿素合成并破坏类囊体膜蛋白结构,可直接或间接损伤电子传递系统、酶活和光合系统,进而降低蓝藻细胞的光合能力;可见,蓝藻细胞对 Cd^{2+} 的胁迫极为敏感^[22]。不高于 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低剂量镉浓度能够激发集胞藻细胞的氧化应激和抗氧化酶系统,该结果与曲壳藻^[31]暴露在镉胁迫中的表现基本一致。本试验也发现,镉胁迫对细胞光合系统造成损伤,破坏光合电子传递链导致电子外溢,胞内的氧与外溢电子结合产生ROS^[32];镉离子含量的增加会导致ROS的产生量持续增加,引起胞内ROS聚集;过量的ROS导致亚细胞结构的破坏,并使其他酶失活,破坏色素和光合系统,导致藻细胞光合作用和其他代谢过程发生紊乱^[33-34]。为了应对镉胁迫产生的ROS氧化压力,细胞合成SOD消除ROS的毒性效应;这使得SOD酶活性应激性增强。

F_v/F_m 是表征藻细胞PS II光合活性的重要参数,是反映藻类光合作用效率的重要指标。当环境条件中存在胁迫,叶绿素荧光发生相应改变, F_v/F_m 也随着改变,这个过程可以反映胁迫对于藻细胞影

表1 不同浓度镉离子处理24 h 集胞藻的 Q_A^- 再氧化曲线参数

Table 1 Parameters of Q_A^- reoxidation kinetics in *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ Concentration / $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	快相 Fast phase		中相 Middle phase		慢相 Slow phase	
	$A_1/\%$	$T_1/\mu\text{s}$	$A_2/\%$	T_2/ms	$A_3/\%$	T_3/s
0	95.40	381	3.90	4.1	0.70	19.2
0.05	96.50	350	2.90	4.2	0.60	18.5
0.25	95.90	402	3.10	7.0	0.90	18.2
0.50	93.00	453	4.80	5.8	2.10	5.1
1.00	61.20	3 328	26.25	826.4	12.5	62.5

注: $A_1 \sim A_3$ 指幅度, $T_1 \sim T_3$ 是时间常数。

Note: $A_1 \sim A_3$ refer to the amplitude, and $T_1 \sim T_3$ is the time constant.

响状况^[24]。本研究为确认 Cd^{2+} 对藻细胞光合系统的毒性效应,首先考察 F_v/F_m 的变化,证实了 Cd^{2+} 对藻细胞光合系统的毒性效应;这个结果与文献^[10]报道的结果明显不同。在此基础上进一步考察 Cd^{2+} 对集胞藻 OJIP 曲线的影响,确认了二者间具有明显的剂量效应关系。当 Cd^{2+} 浓度高于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, F_v/F_m 显著降低, J 峰显著上升,表明最大光量子产量减小,光能转化效率下降;镉胁迫下,集胞藻电子传递链被扰乱,导致 PS II 活性降低,说明了 PS II 是 Cd^{2+} 的作用靶标^[26]。当 Cd^{2+} 为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, J-I-P 荧光强度降低到接近平缓,说明 PS II 供体侧电子传递受到严重抑制^[35],导致 P_{680}^+ 的聚集,进一步表明高浓度 Cd^{2+} 会损伤光合电子传递链。

为了进一步验证 Cd^{2+} 造成 PS II 受体侧损伤,进行 Q_A^- 再氧化动力学曲线拟合分析。结果显示, Cd^{2+} 浓度高于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 快相时长明显增加, 镉延缓 PS II 中 Q_B 介导的 Q_A^- 再氧化, 导致 Q_A^- 到 Q_B 电子转移速率减缓; 中相时长明显增加, 镉抑制 Q_B 结合位点上 PQ 的结合^[36], 综上说明镉胁迫可导致 PS II 受体侧受损, 空 Q_B 位点对 PQ 的结合减慢, Q_A^- 到 Q_B 电子转移受到抑制^[30]。PS II 反应中心存在异质性, PS II_x 位于类囊体暴露区, 不能有效地从电子受体 Q_A^- 转移电子到次级电子受体 Q_B , 通过单反转光测定 S-state, 用以确定镉处理下 PS II 反应中心损伤的比例。S-state 分析显示, Cd^{2+} 高于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 短期处理时 PS II_x 比例显著增高, 镉将活跃的 PS II 反应中心转化为不活跃的 PS II_x, 进一步解释镉处

理下 Q_A^- 和 Q_B 之间电子传递延迟。由此确认 PS II 反应中心是 Cd^{2+} 的主要作用靶点。可见, 较低浓度的镉也会诱导氧化应激、损伤蛋白结构、影响光合系统。

Cd^{2+} 会直接影响藻细胞的色素成分和生长增殖^[7, 37-40], 本研究发现, 0.25 、 0.50 和 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 处理集胞藻时, 其叶绿素含量受到显著抑制。该结果与已有文献的研究结果类似^[26, 41]。另一方面, 本试验 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 能促进集胞藻叶绿素的合成。与之前的研究结果“低浓度 Cd^{2+} ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能促进集胞藻生长和叶绿素合成”^[38], 导致蛋白

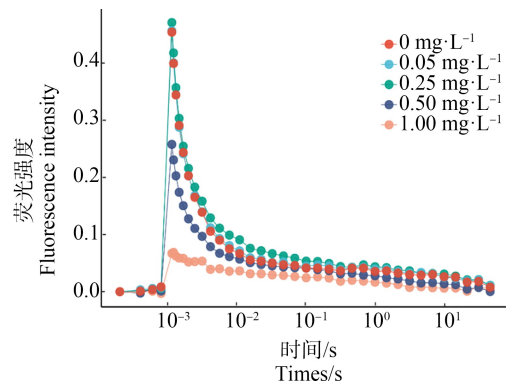


图 5 不同浓度镉离子处理 24 h 集胞藻 Q_A^- 再氧化曲线

注: 荧光强度计算公式为 $F_t - F_0$ 。

Fig. 5 Q_A^- reoxidation kinetic curves of *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

Note: Fluorescence intensity is calculated by $F_t - F_0$.

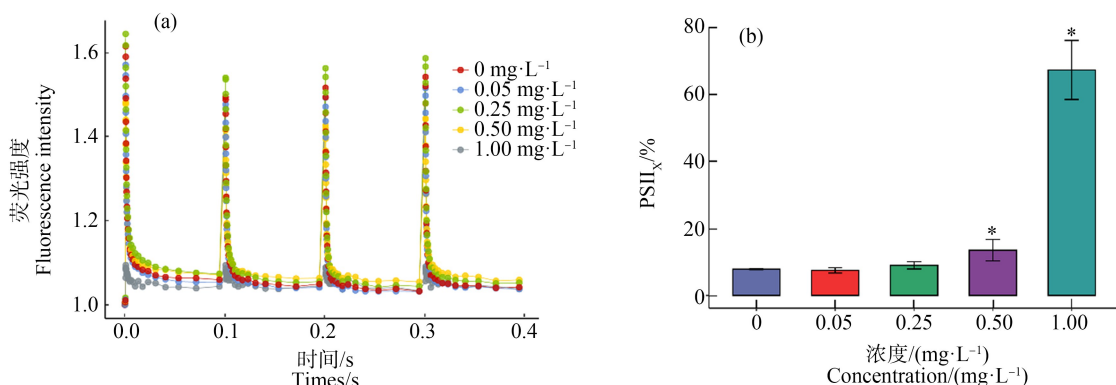


图 6 不同浓度镉离子处理 24 h 集胞藻荧光衰减曲线 (a) 和无活性 PS II 反应中心 (PS II_x) 比例 (b) 的变化

注: * 表示与对照组相比存在显著性差异, 荧光强度计算公式为 F_t/F_0 。

Fig. 6 Fluorescence decay curves (a) and the proportion of inactive PS II reaction center (PS II_x) (b) of *Synechocystis* sp. after exposure to different concentrations of cadmium for 24 h

Note: * indicates significant difference compared with the control group, and fluorescence intensity is calculated by F_t/F_0 .

质合成以及细胞中可溶性糖含量增多^[23]等类似;这些结果均表明集胞藻能够耐受一定浓度的 Cd^{2+} 。推测该现象为“毒性兴奋效应”,低毒性能激发藻细胞的代谢能力,促进藻细胞大分子的合成。综合以上分析,集胞藻能耐受不高于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 浓度胁迫,高浓度的 Cd^{2+} 对集胞藻生长具有显著抑制作用。

通信作者简介:毕永红(1974—),男,博士,研究员,主要研究方向为水域生态学。

参考文献 (References):

- [1] Wagner G. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health [J]. *Advances in Agronomy*, 1993, 51: 173-212
- [2] Tukaj Z, Baścik-Remisiewicz A, Skowroński T, et al. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO_2 concentration [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 60(3): 291-299
- [3] Xia X, Wu S J, Zhou Z J, et al. Microbial Cd(II) and Cr(VI) resistance mechanisms and application in bioremediation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123685
- [4] Ammendola S, Cerasi M, Battistoni A. Deregulation of transition metals homeostasis is a key feature of cadmium toxicity in *Salmonella* [J]. *BioMetals*, 2014, 27(4): 703-714
- [5] Rani A, Kumar A, Lal A, et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: A review [J]. *International Journal of Environmental Health Research*, 2014, 24(4): 378-399
- [6] Aimola P, Carmignani M, Volpe A R, et al. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33647
- [7] Srivastava A, Biswas S, Yadav S, et al. Acute cadmium toxicity and post-stress recovery: Insights into coordinated and integrated response/recovery strategies of *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411: 124822
- [8] Blasi B, Peca L, Vass I, et al. Characterization of stress responses of heavy metal and metalloid inducible promoters in *synechocystis* PCC6803 [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(2): 166-169
- [9] Luo Z X, Wang Z H, Liu A F, et al. New insights into toxic effects of arsenate on four *Microcystis* species under different phosphorus regimes [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(35): 44460-44469
- [10] Zhou W B, Juneau P, Qiu B S. Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium [J]. *Chemosphere*, 2006, 65(10): 1738-1746
- [11] Wang Y, Wang J C, Zhang H H, et al. A intermediate concentration of atmospheric nitrogen dioxide enhances PS II activity and inhibits PS I activity in expanded leaves of tobacco seedlings [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 209: 111844
- [12] Yu Z, Hao R, Zhang L, et al. Effects of TiO_2 , SiO_2 , Ag and CdTe/CdS quantum dots nanoparticles on toxicity of cadmium towards *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 156: 75-86
- [13] Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszczay A. Mechanism of Cd^{2+} toxicity: Cd^{2+} inhibits photoactivation of photosystem II by competitive binding to the essential Ca^{2+} site [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2005, 1706(1-2): 158-164
- [14] Liu M Q, Yanai J, Jiang R F, et al. Does cadmium play a physiological role in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*? [J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7): 1276-1283
- [15] Poole J H, Tyack P L, Stoeger-Horwath A S, et al. Animal behaviour: Elephants are capable of vocal learning [J]. *Nature*, 2005, 434(7032): 455-456
- [16] Glatz A Vass I, Los D A, et al. The *Synechocystis* model of stress: From molecular chaperones to membranes [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(1): 1-12
- [17] Igiri B E, Okoduwa S I R, Idoko G O, et al. Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: A review [J]. *Journal of Toxicology*, 2018, 2018: 2568038
- [18] Deng L P. Sorption and desorption of lead (II) from wastewater by green algae *Cladophora fascicularis* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 143(1-2): 220-225
- [19] Ao D, Lei Z, Dzakupasu M, et al. Role of divalent metals Cu^{2+} and Zn^{2+} in *Microcystis aeruginosa* proliferation and production of toxic microcystins [J]. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2019, 170: 51-59
- [20] Shivaji S, Dronamaraju S V L. *Scenedesmus rotundus* isolated from the petroleum effluent employs alternate mechanisms of tolerance to elevated levels of cadmium and zinc [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 8485
- [21] Newby R Jr, Lee L H, Perez J L, et al. Characterization of zinc stress response in *Cyanobacterium synechococcus* sp. IU 625 [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 186: 159-170

- [22] Tóth T, Zsiros O, Kis M, et al. Cadmium exerts its toxic effects on photosynthesis via a cascade mechanism in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(12): 2075-2086
- [23] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes [J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 350-382
- [24] Pan X L, Zhang D Y, Chen X, et al. Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis* sp. [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(3): 413-418
- [25] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence—A practical guide [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(345): 659-668
- [26] Wang S Z, Zhang D, Pan X. Effects of arsenic on growth and photosystem II (PS II) activity of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 84: 104-111
- [27] Beauchemin R, Gauthier A, Harnois J, et al. Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: Disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr_Z to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2007, 1767(7): 905-912
- [28] Wodala B, Deák Z, Vass I, et al. *In vivo* target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves [J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(4): 1920-1927
- [29] Kaftan D, Meszaros T, Whitmarsh J, et al. Characterization of photosystem II activity and heterogeneity during the cell cycle of the green alga *Scenedesmus quadricauda* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(2): 433-442
- [30] Pan X L, Deng C N, Zhang D Y, et al. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of *in vivo* chlorophyll fluorescence tests [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 89(4): 207-213
- [31] 杨雨嘉, 支崇远, 李培林, 等. 重金属 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 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
Yang Y J, Zhi C Y, Li P L, et al. Effects of heavy metal Cd²⁺ and Cu²⁺ on growth and antioxidant enzymes of *Achnanthes kryophila* [J]. *Ecological Science*, 2015, 34(6): 75-80 (in Chinese)
- [32] Latifi A, Ruiz M, Zhang C C. Oxidative stress in cyanobacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(2): 258-278
- [33] Rutherford A W, Krieger-Liszka A. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(11): 648-653
- [34] Ezraty B, Gennaris A, Barras F, et al. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385-396
- [35] Govindje E. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence [J]. *Functional Plant Biology*, 1995, 22(2): 131-160
- [36] Zhang X, Chen H, Wang H, et al. Time-course effects of Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) on *Chlorella pyrenoidosa*: Growth inhibition and adaptability mechanisms [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 402: 123784
- [37] Tűmová E, Sofrová D. Response of intact cyanobacterial cells and their photosynthetic apparatus to Cd²⁺ ion treatment [J]. *Photosynthetica*, 2002, 40(1): 103-108
- [38] 苏甜, 李义刚, 欧瑞康, 等. 镉离子对羊角月牙藻光合作用及其抗氧化酶的毒性影响[J]. *生态科学*, 2014, 33(2): 301-306
Su T, Li Y G, Ou R K, et al. Toxic effects of Cd²⁺ on the photosynthesis and antioxidase activity of *Selenastrum capricornutum* [J]. *Ecological Science*, 2014, 33(2): 301-306 (in Chinese)
- [39] 邱昌恩, 况琪军, 毕永红, 等. Cd²⁺ 对绿球藻生长及生理特性的影响研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 142-145
Qiu C G, Kuang Q J, Bi Y H, et al. The effects of Cd²⁺ on the growth and physiological characteristics of chlorococum sp. [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 142-145 (in Chinese)
- [40] 聂利华, 杨东娟, 刘亚群, 等. 一株虾池来源的螺旋拟柱孢藻藻株的分离鉴定及重金属离子 Cu²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 对其生长的影响[J]. *微生物学报*, 2019, 59(7): 1307-1317
Nie L H, Yang D J, Liu Y Q, et al. Isolation, identification and effect of heavy metals on the growth of *Cylindrospermopsis raciborskii* helix from shrimp ponds [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(7): 1307-1317 (in Chinese)
- [41] Xu C X, Sun T, Li S B, et al. Adaptive laboratory evolution of cadmium tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 205 ◆