



三角褐指藻对镉的富集机制和转化途径

斯冬芳^①, 杨利民^{①*}, 严华^①, 王秋泉^{①②}

① 厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学重点实验室, 厦门 361005

② 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005

*通讯作者, E-mail: lmfang@xmu.edu.cn

收稿日期: 2009-08-05; 接受日期: 2009-09-10

摘要 本论文报道了在典型配体乙二胺四乙酸(EDTA)和半胱氨酸(Cys)的存在下三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)对镉(Cd)的富集机制和转化途径. 毒性试验表明, 两种配体均可有效降低 Cd 对三角褐指藻的毒性. ICP-MS 分析结果表明, EDTA 存在下细胞表面吸附和内部吸收 Cd 的量随着培养液中 EDTA 浓度的升高(自由 Cd^{2+} 浓度的降低)而降低, 基本符合自由离子活度模型(Free ion activity model, FIAM)的预测; 而 Cys 存在时, 细胞表面吸附 Cd 的量随着 Cys 浓度的增大呈现先增加后降低的趋势. 在 Cys 浓度由空白浓度增加至 4.45 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞内部吸收 Cd 的量呈现增加趋势; 而大于 4.45 $\mu\text{mol/L}$ 时, 又趋于同一水平的现象, 结果偏离 FIAM. FTIR 和 XPS 研究确证了细胞壁上的 -OH 和 -NH₂ 基团对 Cd 的吸附起主要作用. Cd 胁迫后 *P. tricornutum* 细胞内诱导合成的植物螯合肽(PCs)的 HPLC 和 ESI-IT-MS 分析结果证实造成这两种配体对 *P. tricornutum* 积累和转化 Cd 行为产生不同影响的主要原因是 Cys 作为 Cd^{2+} 的配体的同时, 又是 *P. tricornutum* 细胞内 PCs 合成的前驱体之一. *P. tricornutum* 细胞内 PCs、氧化型 PCs 以及 Cd-PC₂ 的发现证明了 Cd 诱导 *P. tricornutum* 合成的 PCs 反过来钝化细胞内吸收的 Cd, 降低了其对 *P. tricornutum* 细胞的氧化毒性.

关键词

三角褐指藻
镉
生物富集和转化
半胱氨酸
乙二胺四乙酸

1 引言

镉(Cd)是典型的重金属污染物之一, 在海水中浓度约为 10 $\mu\text{g/L}$ ^[1]. 虽然 Cd 在海水中的浓度不高, 但由于其主要以自由离子和配合物的形态存在, 其毒性和生物可利用性很高, 易被浮游生物吸收; Cd 被吸收后, 一部分可以随着浮游生物的死亡而进入沉积物, 另一部分则随着浮游生物被其他海洋食物链中的高营养级生物摄食后进入食物链, 并被不断积累放大. 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种常见的单细胞硅藻, 处于海洋生物食物链的底端, 对 Cd 具有很强的耐受和富集能力. Torres 等^[2]报道了 *P. tricornutum* 的 96 h 半致死浓度可以达到

22.39 mg/L. 多年来, 它对 Cd 的强耐受和富集特性引起了许多科学家的研究兴趣, 又因其具有适应性强、易于培养的特点, 是被广泛用于实验室藻类生理、生态以及重金属污染迁移转化研究的单细胞模型生物之一.

海洋中重金属元素可以以自由离子或配合物的形式存在, 配体的存在将会影响其与生物之间的相互作用. 自由离子活度模型(free ion activity model, FIAM)理论被广泛用于解释水生生物对重金属的吸收行为, 重金属的毒性和生物可利用性与其以自由离子形式存在形态的浓度成正相关性^[3, 4]. 但是, 在实际应用中发现一些配体对生物吸收重金属行为的影响不能简单地用 FIAM 进行解释, 如二乙基二硫代

氨基甲酸酯、黄原酸等, 它们与金属形成的配合物是亲脂性的, 这些金属配合物可以通过被动扩散跨过细胞膜/壁进入细胞内部, 从而大大提高了生物对金属的可利用性; 一些无机阴离子、氨基酸、腐植酸等配体和重金属形成配合物后可以通过不同的方式进入细胞内部, 使生物对重金属的生物可利用性偏离 FIAM 的预测^[5-13]. 不断深入认识各类配体对重金属的毒性和生物可利用性行为的影响对于进一步发展环境重金属污染预测模型, 理解重金属的富集、迁移和转化规律, 建立合理的风险评价标准具有非常重要的意义.

乙二胺四乙酸(EDTA)是一种典型的人工配体, 海水中 EDTA 主要来源于工农业生产和生活等人类活动; 半胱氨酸(Cys)是一种天然配体, 是生物残骸的分解产物, 海洋水体中胱氨酸的浓度可达 2 $\mu\text{mol/L}$ ^[14]. 本研究以 EDTA 和 Cys 作为两类模型配体, 利用高效液相色谱(HPLC)与电感耦合等离子体质谱(ICPMS)和电喷雾离子阱串联质谱(ESI-IT-MS)联用技术研究了它们对 *P. tricornutum* 富集和转化 Cd 行为的影响, 探讨了其对 Cd 的富集机制和转化途径的影响.

2 材料和方法

2.1 *P. tricornutum*的培养及胁迫实验

实验所用 *P. tricornutum* 由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室提供. 所采用的培养介质为取自厦门岛的天然海水, 海水经 0.45 μm 的硝酸纤维素膜过滤并灭菌后, 在其中加入 *f/2* 营养盐^[15](*f/2* 营养盐主要成分为 NaNO_3 , NaH_2PO_4 , Na_2SiO_3 , trace metal stock solution 包括 Zn, Cu, Fe, Mn, Mo, Co 等微量元素, vitamin mix stock solution 包括维生素 B_{12} , 维生素 H, 维生素 B_1), 每天将藻液摇匀, 以使其充分接触营养液. 培养实验的环境为: 温度(20 ± 1) $^\circ\text{C}$, 光照强度 3000 Lux, 光暗比 14:10 h. 胁迫实验中, 先将 *P. tricornutum* 培养于含有 *f/2* 营养盐和 0.01 mol/L 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲液(pH 7.5)的天然海水中生长 4 天, 然后加入不同形态的 Cd 进行胁迫, 胁迫周期为 4 天.

2.2 Cd的毒性和Cd在*P. tricornutum*细胞内外的分布

本实验采用细胞数目增长率作为金属 Cd 毒性试

验的检测指标. 将一定量 *P. tricornutum* 分别暴露于天然海水与含有 *f/2* 营养盐、MOPS 缓冲液以及不同比例 Cd 和配体 Cys 或 EDTA 的海水培养液(500 mL)中, 其中 Cd 总浓度(Cd_T)为 10 mg/L, Cys 或 EDTA 和 Cd 的摩尔比分别为 0.5, 1, 5, 10 和 50. 每天取 1.5 mL 藻液, 摇匀, 在 625 nm 的波长下测定其吸光度值, 并通过吸光度和藻密度(由显微镜计数求得)关系计算藻细胞数目.

Cd 在 *P. tricornutum* 细胞内外分布的实验是用不同形态的 Cd 溶液($\text{Cd}_T = 500 \mu\text{g/L}$)胁迫 4 天后, 将其富集的 Cd 分为细胞内吸收的 Cd (胞内 Cd)和细胞壁吸附的 Cd (胞外 Cd). 分离方法如下: 取 30 mL Cd 胁迫的藻液, 4000 g 下离心 10 min 收集藻细胞, 用 10 mL pH 7.5 的海水清洗 3 次, 洗去残留的培养液. 然后加入 10 mL 0.01 mol/L 的 EDTA 溶液振荡洗涤 1 min, 4000 g 下离心 15 min, 上清液中的 Cd 为细胞壁吸附的 Cd. 下层的藻细胞用海水清洗 2 次, 除去残留的 EDTA 溶液, 离心收集, 得到的藻细胞在 60 $^\circ\text{C}$ 下烘干, 加 1 mL 浓 HNO_3 消解过夜, 并用超纯水定容至 25 mL, 其中 Cd 为细胞内吸收的 Cd. 最后用 ICPMS (ELAN DRC II, PerkinElmer, Sciex, Canada)分别测定细胞内吸收和细胞壁吸附 Cd 的含量. 天然海水的培养实验结果作为空白对实验数据进行校正.

2.3 植物螯合肽(PCs)和Cd-PCs的提取和分析

分别离心收集用 CdCl_2 、($\text{CdCl}_2 + \text{Cys}$)和($\text{CdCl}_2 + \text{EDTA}$)胁迫 4 天的藻(500 mL, $\text{Cd}_T = 500 \mu\text{g/L}$), 加入 0.1 mol/L HCl 溶液, 超声破碎(BRANSON 超声波细胞破碎仪 S450D, USA), 在 4 $^\circ\text{C}$, 20000 g 下离心 15 min; 取上清液(500 μL), 加入适量的 6 mol/L NaOH 溶液调 pH 值到中性, 加入 50 μL 三丁基膦(TBP)避光反应 10 min, 再加入适量 6 mol/L 的 HCl 溶液, 调 pH 值至 1; 最后在 4 $^\circ\text{C}$, 20000 g 下离心 15 min, 取上清液用于 PCs 分析. 根据文献[16]的方法, PCs 分析采用 C_{18} (2.0 mm i.d. $\times$ 250 mm; particle size, 5 μm ; Shimadzu, Japan)反相 HPLC 分离, 分离条件采用梯度洗脱方式: 流动相 A 为 0.02% TFA- H_2O 溶液, 流动相 B 为 0.02% TFA-ACN 溶液; 0~25 min, 流动相 B 从 2%线性增加至 25%. 分离过程中, 流动相流速保持在 0.15 mL/min. 50 μL 进样 HPLC 分离, 柱后 5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸 (DTNB)衍生, DTNB 流量 0.05 mL/min, 检测波长为 410 nm. 对于所检测到各色谱峰的归属, 通过

HPLC/ESI-IT-MS (ESQUIRE-LC, Bruker Daltonics, Germany)确定它们的结构. 对于 Cd-PCs 的提取和测定采用文献[17]的方法: 离心收集胁迫 4 天的 *P. tricornutum*, 加入冷 N₂ 饱和的 50 mmol/L NH₄HCO₃, 在冰水浴中超声破碎; 4 °C 下, 20000g 离心分离后, 取上清液. 采用 Superdex Peptide 10/300 GL (GE healthcare, USA)尺寸排阻色谱(SEC)分离, 50 mmol/L NH₄HCO₃ 作为流动相, 截取含 Cd 的色谱流出峰, 直接进样, 用 ESI-IT-MS 检测.

2.4 *P. tricornutum*细胞壁的红外光谱和X射线光电子能谱分析

在 4000 g 下, 分别离心收集天然海水培养(空白对照组)和含 Cys 海水培养以及 CdCl₂ 或 Cd-Cys 胁迫 4 天的 *P. tricornutum*(其中 Cd_T = 500 µg/L, Cys 和 Cd 的摩尔比为 5), 用海水洗去 *P. tricornutum* 细胞表面的培养液. 然后将收集到的三角褐指藻超声破碎, 1000 g 下离心收集细胞壁, 冷冻干燥(Martin Christ Alpha plus, Germany). 干燥后的藻细胞壁用 KBr 压片制样, 用于 FT-IR (Nicolet Avatar 360, Thermo Fisher Scientific, USA)分析. 用同样的方法制得细胞壁碎片粉末, 直接将样品研磨压成小片, 用于 X 射线光电子能谱分析(PHI Quantum 2000 Scanning ESCA Microprobe, USA). X 射线源为单色化的 AlK_{1,2}, 能量为 1486.60 eV, 操作电压为 15 kV, 功率 35 W, 采用 CAE 模式, 分析器通过能为: (1)宽扫描谱(su) $E_p = 187.85$ eV, (2)窄扫描谱(mu)通常收谱条件时 $E_p = 29.35$ eV, 58.70 eV 或 117.40 eV, 得到的谱图以 284.8 eV 处的标准的 C1s 谱峰作为样品荷电位移的能量校正标准, 同时检测了 C、N 元素的窄谱.

3 结果与讨论

3.1 *P. tricornutum*的生长情况和Cd的毒性

1983 年, Morel^[18]基于金属对生物的毒性取决于

自由金属离子活度, 提出了预测金属毒性的 FIAM 模型. 其机理的核心是自由金属离子可以和细胞表面的活性位点结合, 然后跨过细胞膜对生物产生毒性. 该模型从理论上解释了金属对生物可利用性和毒性取决于自由金属离子浓度, 而不是金属的总浓度. 自由离子浓度不仅与可溶性金属总浓度有关, 而且与环境中同时存在的有机配体的种类和含量有关^[19]. 根据 EDTA 和 Cys 配体与 Cd 形成配合物的稳定常数, 我们可以计算不同配体浓度下 Cd 形态的分布情况^[20]. 固定 Cd 的总浓度分别为 500 µg/L 和 10 mg/L, 改变 EDTA 和 Cys 的总浓度(即改变配体与 Cd 的配比), Cd²⁺分布如表 1 所示. 随着配体浓度提高, 自由离子态 Cd²⁺浓度降低.

在不同条件下 *P. tricornutum* 的生长情况如图 1 所示. 我们可以看出与天然海水培养的空白组相比, 10 mg/L Cd²⁺的加入明显抑制了 *P. tricornutum* 的生长, 胁迫 4 天后, Cd²⁺胁迫组细胞数目仅为空白组的 71%, 表现出很强的毒性. 当 EDTA 或 Cys 加入后, Cd²⁺的毒性受到了抑制. 随着 EDTA 浓度的增大, Cd²⁺的浓度逐渐降低, *P. tricornutum* 的生长状况逐渐改善, 表明 EDTA 的加入降低了 Cd²⁺的浓度, 减弱了 Cd 对生物的毒性效应, 但均不及空白对照组藻的生长状况; 但是当 EDTA 浓度超过 5 mmol/L, 即与 Cd 的摩尔比达到 50 时, *P. tricornutum* 的生长受到显著抑制, 这是由于大大过量的 EDTA 络合了营养盐中的 Cu、Zn 等营养元素, 抑制了藻对它们的吸收, 致使藻的生长情况变差. 当 Cys 存在时, 与 10 mg/L Cd²⁺组相比 *P. tricornutum* 的生长状况也随着 Cys 浓度的增加而有所改善, Cys 与 Cd²⁺的配位作用降低了游离 Cd²⁺的浓度; 当 Cys 浓度达到 0.5 mmol/L, 即与 Cd 的摩尔比大于 5 时, 与相应的 EDTA 组相比 *P. tricornutum* 的生长速率有显著提高; 当 Cys 与 Cd 的摩尔比分别大于 10 和 50 时, 生长状况甚至好于空白组, 表明过量 Cys 的存在促进了藻的生长. EDTA 和 Cys 对 *P. tricornutum* 在

表 1 不同 EDTA 和 Cys 浓度下 Cd²⁺的分布系数和浓度

		EDTA/Cd				Cys/Cd			
		0.5	1.0	5.0	50	0.5	1.0	5.0	50
Cd _T 500 (µg/L)	$\delta_{Cd^{2+}}$ (%)	50	1.2×10^{-5}	1.6×10^{-7}	1.3×10^{-8}	93	86	55	11
	[Cd ²⁺] (µmol/L)	2.3	5.3×10^{-7}	7.1×10^{-9}	5.8×10^{-10}	4.1	3.8	2.5	0.5
Cd _T 10 (mg/L)	$\delta_{Cd^{2+}}$ (%)	50	3.0×10^{-6}	6.5×10^{-9}	5.3×10^{-10}	65	41	6.7	0.6
	[Cd ²⁺] (µmo/L)	44.5	2.7×10^{-5}	5.8×10^{-9}	4.7×10^{-10}	57.9	36.5	6.0	0.53

EDTA: pK_{a1}, 0.9; pK_{a2}, 1.6; pK_{a3}, 2.07; pK_{a4}, 2.75; pK_{a5}, 6.24; pK_{a6}, 10.34; logK_{Cd-EDTA}, 16.5. Cys: pK_{a1}, 1.9; pK_{a2}, 8.18; pK_{a3}, 10.3; logK_{Cd-Cys}, 5.35; pH 7.5

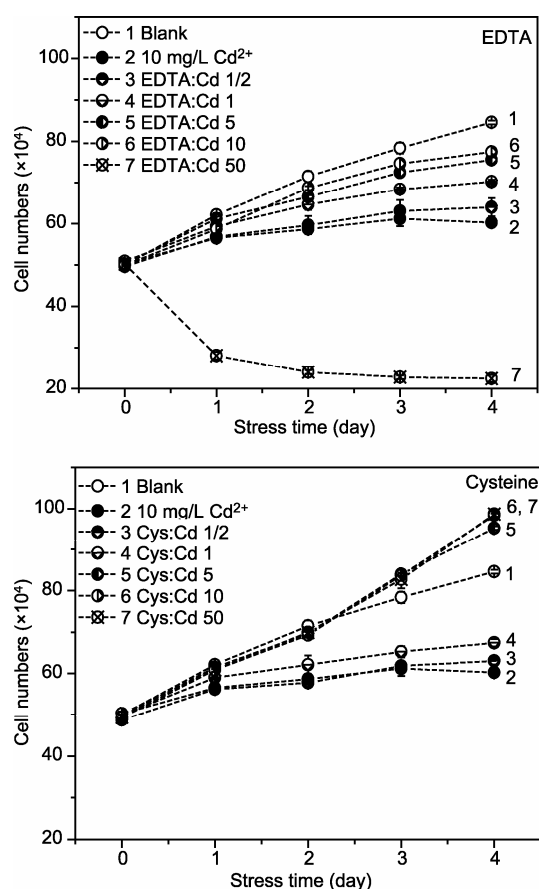


图1 EDTA和Cys对Cd胁迫下三角褐指藻生长的影响. 胁迫条件: $Cd_T = 10 \text{ mg/L}$; 胁迫时间4天; 标准偏差为3次平行实验的结果($n=3$)

Cd胁迫下的生长状况有不同的影响.

3.2 Cd在*P. tricornutum*细胞内外的分布

为了研究配体的存在对于*P. tricornutum*富集Cd行为的影响, 我们分别测定了EDTA和Cys存在下*P. tricornutum*细胞表面和细胞内部Cd的分布情况, 结果如图2所示. 实验结果显示两种配体对Cd在细胞内外的分布的影响明显不同. EDTA存在下细胞表面所吸附和细胞内所吸收的Cd的含量均随着培养液中EDTA浓度的增大而显著降低(图2), 说明EDTA与培养液中的 Cd^{2+} 生成Cd-EDTA配合物降低了游离 Cd^{2+} 的浓度, 导致Cd的生物可利用性下降. 以细胞表面吸附和内部吸收的Cd含量的对数值对溶液游离 Cd^{2+} 含量的对数值作图(图3), 发现EDTA存在时(0~223 $\mu\text{mol/L}$), 细胞表面吸附的Cd和细胞内部吸收的Cd与溶液中 Cd^{2+} 呈正相关, 相关系数分别为0.99

和0.98, 基本符合FIAM. 但是, Cys存在时细胞表面所吸附的Cd含量随Cys的浓度从0增加到223 $\mu\text{mol/L}$ 呈现先增加后下降的趋势; 而细胞内吸收的Cd含量则先增加后又趋于同一水平并呈现略有下降的趋势(如图2所示), 内部吸收的Cd含量的对数值对溶液中游离 Cd^{2+} 含量的对数值之间无相关性($R = 0.02$), 偏离FIAM预测结果, 说明Cys-Cd有不同转运机制. 这可能与Cys既作为 Cd^{2+} 的配体同时又可作为*P. tricornutum*细胞内PCs合成的原料有关. 此外, 对比胁迫条件EDTA:Cd = 0.5和Cys:Cd = 5的情况($Cd_T = 500 \text{ }\mu\text{g/L}$), 虽然两种条件下胁迫溶液中 Cd^{2+} 的浓度相近(约为250 $\mu\text{g/L}$), 但是后者细胞表面吸附和细胞内吸收Cd的量却是前者的3倍. 这说明Cys对*P. tricornutum*细胞吸附/吸收Cd行为的影响与EDTA存在较大的差别, 一定量的半胱氨酸可以促进细胞对Cd的吸附/吸收.

进一步研究Cys对*P. tricornutum*细胞壁表面吸附Cd作用的影响, 将天然海水(空白组)和含有Cys,

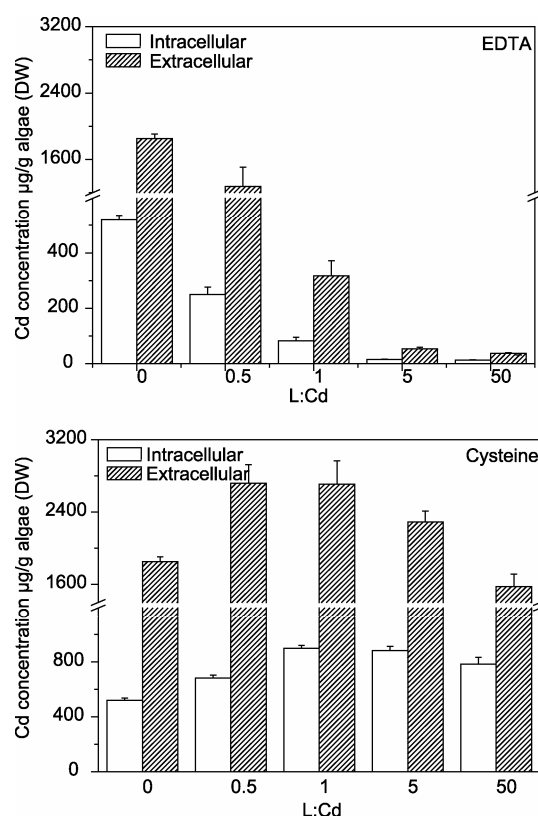


图2 EDTA和Cys对三角褐指藻细胞吸附/吸收Cd的影响及Cd在细胞内外的分布情况. 胁迫条件: $Cd_T = 500 \text{ }\mu\text{g/L}$; 胁迫时间4天; 标准偏差为3次平行实验的结果($n=3$)

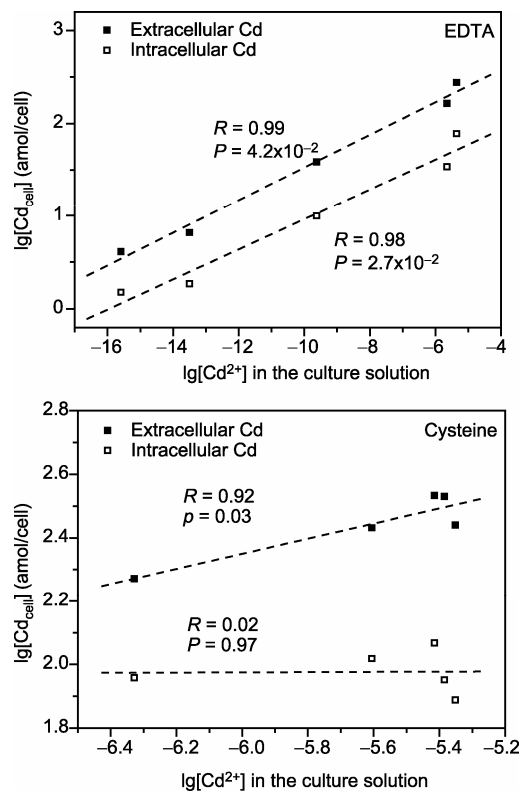


图3 三角褐指藻细胞表面和内部Cd的分布与培养液中游离Cd²⁺浓度的关系. 胁迫条件: Cd_T = 500 μg/L; 胁迫时间4天

CdCl₂ 和(CdCl₂ + Cys)(1:5)的海水培养得到的 *P. tricornutum* 细胞壁做了 FT-IR 和 X 射线光电子能谱(C、N 元素)分析, 结果如表 2 所示. 其中, 红外光谱结果中 1050 cm⁻¹ 处 Si-O(或糖羟基 C-O)的峰发生了明显的位移现象. 通过加 Cys 组和空白组的对比我们看到振动频率为 1050 cm⁻¹ 处的峰红移了 3 cm⁻¹. 这是由于 Cys 以氢键等弱作用被结合在细胞壁上, 引起 Si-O(或糖羟基的 C-O)键的化学环境发生变化; 加 Cd 组与空白组的对比发现这个峰发生了 8 cm⁻¹ 的位移, 表明这些含 O 活性基团跟 Cd 结合形成配位键, 致使 Si-O(或 C-O)的强度和极性发生变化, 从而引起吸收峰的红移; 当 Cd 和 Cys 共同存在时, 与对照组相比, 有 22 cm⁻¹ 的红移发生. 另外, 1651 cm⁻¹ 处为蛋白质中酰胺 I 带 C=O 伸缩振动峰也有 4 cm⁻¹ 的红移, 与 Wang^[21]等人的结果近似. X 射线光电子能谱分析结果表明 Cd 胁迫后 N 1s 谱峰发生了 5 eV 的位移. N 与 Cd 形成配位以后, N 外层电子云密度减少, 屏蔽作用减弱, 使内层电子的结合能增加. 以上 FRIR 和 XPS 研究确证了细胞壁上的 Si-OH, C-OH

和 NH₂-(CO)-OH 基团对 Cd 的吸附起着主要作用. Cys 存在下, 可能在细胞表面形成了 Cys-Cd-X-cell 或 Cd-Cys-X-cell (X-cell 为细胞表面的结合位点, X 为 Si-OH 或 C-OH 或 NH₂-(CO)-OH). 这是 Cys 可以提高 *P. tricornutum* 对 Cd 吸附能力的原因之一.

表2 不同培养介质中三角褐指藻细胞壁的红外光谱和 X 射线光电子能谱(Cd_T = 500 μg/L)

	空白组	Cys	CdCl ₂	Cd-Cys
FTIR (cm ⁻¹)	Si-O(或糖羟基 C-O)	1050	1053	1058
	蛋白质中酰胺带 C=O 伸缩	1651	1652	1655
	振动峰			
	XPS (eV) N 1s 结合能	399.50	399.50	404.50

3.3 *P. tricornutum*细胞内PCs的合成

Cys 是一个比较特殊的配体, 因为它是当 *P. tricornutum* 受 Cd 胁迫时细胞内诱导合成 PCs 的重要原料之一. 我们推测 *P. tricornutum* 在 Cys 存在下对 Cd 的富集行为与 EDTA 不同可能与 PCs 的合成有关. 为了研究 EDTA 和 Cys 对 *P. tricornutum* 在 Cd 的诱导下合成 PCs 的影响, 我们比较了 CdCl₂, Cd-EDTA(1:0.5), Cd-Cys (1:5)胁迫下(Cd_T = 500 μg/L) Cd 诱导产生的 PCs 的种类和数量. 实验结果表明(图 4)EDTA 或 Cys 的存在并没有改变 *P. tricornutum* 细胞内所合成 PCs 的种类. 当 EDTA:Cd 为 0.5 和 Cys:Cd 为 5 时培养液中 Cd²⁺的浓度是相近的, 均为 CdCl₂ 胁迫(500 μg/L)情况下的一半(即 250 μg/L), EDTA 的存在使得 *P. tricornutum* 细胞内诱导产生的ΣPCs 减少, 是 CdCl₂胁迫时的 63%, 这与 *P. tricornutum*细胞内所吸收的 Cd 的量的减少是一致的. 但 Cys 存在时, 所产生的ΣPCs 的量比 CdCl₂胁迫下却提高了将近一倍(如表 3 所示).

进入生物体内部的 Cd²⁺起着激活细胞内部 PC 合成酶的重要作用^[22~24], 可以促进细胞合成 PCs. 通过 Cd 在细胞内外分布实验发现 EDTA 可以阻止 Cd²⁺进入细胞, 和 CdCl₂ 胁迫的情况相比, 细胞内吸收 Cd 的量减少了 52%, 细胞内部合成的 PCs 也减少了约 37%. 在 Cys 存在的条件下, *P. tricornutum* 细胞内部合成的谷胱甘肽(GSH)和各种 PC 的量都比 CdCl₂ 胁迫下要多, 所合成的ΣPCs 的量是 CdCl₂ 胁迫下的

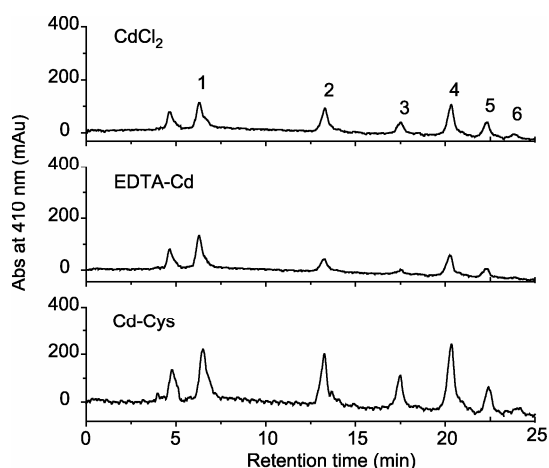


图4 CdCl_2 , Cd-EDTA 和 Cd-Cys 胁迫下三角褐指藻诱导合成PCs的色谱图. 1, GSH; 2, PC_2 ; 3, PC_3 ; 4, PC_4 ; 5, PC_5 ; 6, PC_6 ; 胁迫时间为4天 ($\text{Cd}_T = 500 \mu\text{g/L}$). 色谱柱为 C_{18} 反相色谱柱(2.0 mm i.d. $\times$ 250 mm; particle size, 5 μm ; Shimadzu, Japan). 流动相 A 为 0.02% TFA- H_2O ; 流动相 B 为 0.02% TFA-ACN; 洗脱程序: 0~25 min, 流动相 B 由 2%增加至 25%; 流速为 0.15 mL/min. GSH 和 PCs 柱后衍生液为 1.8 mmol/L DTNB, 流速 0.05 mL/min; 检测波长 $\lambda = 410 \text{ nm}$

183%. 此时, 细胞合成 PCs 的原料一方面来自藻细胞自身合成, 另一方面可以直接摄取溶液中 Cys 作为

合成 PCs 的 S 源^[25, 26]. 合成的 PCs 可以通过络合进入生物细胞的 Cd^{2+} , 减轻 Cd^{2+} 对重要细胞器和功能蛋白的毒性作用. 我们进一步对 Cd 胁迫下的 *P. tricornutum* 的 NH_4HCO_3 提取液(pH 7.8)进行 SEC-ICPMS 和 SEC-ESI-IT-MS/MS 分析, 结果表明除了氧化型 PC_2 和 PC_3 之外, 在体 Cd-PC_2 也被检测到, 并被其 Cd 的同位素分布和其二级质谱所确证(如图 5 所示). 不但揭示了 *P. tricornutum* 细胞内诱导合成的 PCs 受细胞内所吸收 Cd 的氧化胁迫作用, 而且给出了 PCs 络合钝化 Cd 的直接证据. 解释了实验中 Cys 存在时 *P. tricornutum* 能够吸收更多的 Cd 而细胞毒性却下降的现象.

4 结论

P. tricornutum 可以通过细胞壁吸附和细胞内部吸收的方式来富集和转化环境中的 Cd . 不同配体(EDTA 和 Cys)的存在对 Cd 的富集和转化有不同影响. EDTA 阻碍 *P. tricornutum* 对 Cd 的吸收, 而 Cys 对 *P. tricornutum* 富集和转化 Cd 有促进作用. Cd 进入 *P. tricornutum* 细胞内后, 可以诱导合成 PCs, 其抵御细胞内部游离 Cd 的氧化作用, 降低了 Cd 对其他亚细

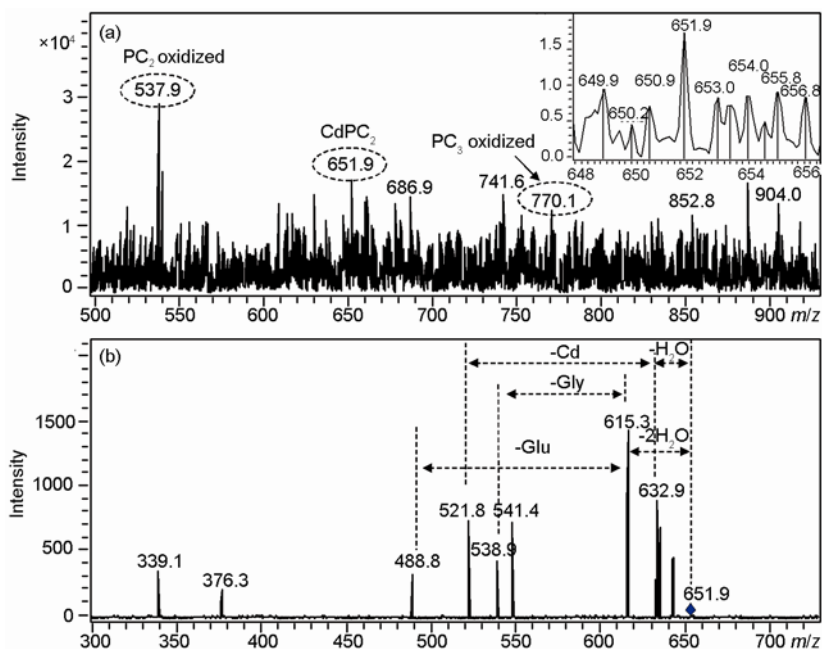


图5 Cd 胁迫下三角褐指藻 NH_4HCO_3 提取液的 SEC-ESI-MS/MS. (a) m/z 从 500~930 扫描质谱图, 右上嵌入的谱图为 CdPC_2 的 Cd 同位素分布; (b) CdPC_2 (m/z 652.0) 的 MS/MS 二级质谱图

表3 不同配体存在下 Cd 诱导三角褐指藻细胞合成的 GSH 和 PCs 的含量 ^{a)}(Cd_T = 500 μg/L)

	GSH/ (mmol/g FW ^{b)})	PCs (μmol/g FW ^{b)})					Σ PCs ^{c)} (μmol/g FW ^{b)})
		PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅	PC ₆	
CdCl ₂	0.098 ± 0.003	0.087 ± 0.002	0.038 ± 0.001	0.095 ± 0.008	0.046 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.93 ± 0.04
CdCl ₂ /EDTA (1:0.5)	0.110 ± 0.007	0.048 ± 0.008	0.030 ± 0.001	0.067 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.003 ± 0.001	0.59 ± 0.01
CdCl ₂ /Cys (1:5.0)	0.160 ± 0.009	0.140 ± 0.009	0.085 ± 0.007	0.17 ± 0.020	0.071 ± 0.005	0.014 ± 0.001	1.70 ± 0.12

a) 三次平行培养实验的 (平均值 ± 标准偏差); b) FW, 鲜重; c) ΣPCs, 各种检测到的 PC 以半胱氨酸为基元表示的总浓度

胞器的毒化作用. Cys 作为合成 PCs 的原料, 它的存在可以提高 *P. tricornutum* 细胞合成 PCs 的数量, 这是 Cys 与 EDTA 对 *P. tricornutum* 细胞吸收和转化 Cd 行为有不同影响的重要原因所在. 所诱导合成的 PCs 络合钝化细胞内游离的 Cd, 进一步降低了 Cd 的毒性, 提高了 *P. tricornutum* 对 Cd 的耐受和富集能力.

参考文献

1 国家环境保护总局、农业部、交通部. 中国近岸海域环境质量公报 2006, 国家环境保护总局, 2007

2 Torres E, Cid A, Fidalgo P, Herrero C, Abalde J. Long-chain class III metallothioneins as mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aqua Toxicol*, 1997, 39: 231—246[DOI]

3 Simkiss K, Taylor MG. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Transport of Metals across Membranes, Publisher: John Wiley & Sons Ltd, 1995

4 Daly HR, Campbell IC, Hart BT. Copper toxicity to *Paratya australiensis*: I. Influence of nitrilotriacetic acid and glycine. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 9: 997—1005[DOI]

5 Chuang CY, Wang WX. Co-transport of metal complexes by the green mussel *perna viridis*. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 4523—4527[DOI]

6 Poldoski JE. Cadmium bioaccumulation assays. Their relationship to various equilibria in Lake Superior water. *Environ Sci Technol*, 1979, 13: 701—706[DOI]

7 Fortin C, Campbell PGC. Silver uptake by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, in relation to chemical speciation: influence of chloride. *Environ Toxicol Chem*, 2000, 19: 2769—2778[DOI]

8 Errecalde O, Campbell PGC. Cadmium and Zinc bioavailability to *Selenastrum Capricornutum* (Chlorophyceae): accidental metal uptake and toxicity in the presence of citrate. *J phycol*, 2000, 36: 473—483[DOI]

9 Florence TM, Stauber JL. Toxicity of copper complex to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquat Toxicol*, 1986, 8: 11—26[DOI]

10 Myers VB, Iverson RL, Harris RC. The effect of salinity and dissolved organic matter on surface charge characteristics of some euryhaline phytoplankton. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1975, 17: 59—68[DOI]

11 Campbell PGC, Twiss MR, Wilkinson KJ. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Can J Fish Aquat Sci*, 1997, 54: 2543—2554[DOI]

12 Vigneault B, Percot A, Lafleur M, Campbell PGC. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environ Sci Technol*, 2000, 34: 3907—3913[DOI]

13 Lamelas C, Wilkinson KJ, Slaveykova VI. Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae, *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 6109—6116[DOI]

14 刘春兰, 郑爱榕, 林祥. 邻苯二甲酸柱前衍生法测定海洋胶体中的水解氨基酸. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45: 941—942

15 Guillard RRL. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In Smith WL, Chanley MH, eds. Culture of Marine Invertebrate Animals. New York: Plenum Press, 1975. 26—60

16 Grill E, Winnacker EL, Zenk MH, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 439—443[DOI]

17 Chen LQ, Guo YF, Yang LM, Wang QQ. SEC-ICP-MS and ESI-MS/MS for analyzing in vitro and in vivo Cd-phytochelatin complexes in a Cd-hyperaccumulator *Brassica chinensis*. *J Anal At Spectrom*, 2007, 22: 1403—1408[DOI]

18 Morel FMM. Principles of aquatic chemistry. New York:Wiley interscience, 1983. 301

19 黄圣彪, 王子健. 水环境中重金属的生物毒性预测模型. 上海环境科学, 2002, 21: 19—23

- 20 Li B, Wang QQ, Yan H, Yang LM, Huang BL. Chromatographic behavior of cadmium in an ion-pair reversed-phase micro HPLC system and its application to the determination of bio-available cadmium in soil samples. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376: 923—927[DOI]
- 21 Zou AM, Chen ML, Shu Y, Yang M, Wang JH. Biological cell-sorption for separation/preconcentration of ultra-trace cadmium in a sequential injection system with detection by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 2007, 22: 392—398[DOI]
- 22 Zenk MH. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene*, 1996, 179: 21—30[DOI]
- 23 Cobbett CS. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 211—216
- 24 Chen LQ, Guo YF, Yang LM, Wang QQ. Synergistic defensive mechanism of phytochelatins and antioxidative enzymes in *Brassica chinensis* L. against Cd stress. *Chin Sci Bull*, 2008, 53: 1503—1511[DOI]
- 25 Nocito FF, Lancilli C, Crema B, Fourcroy P, Davidian JC, Sacchi GA. Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol*, 2006, 141: 1138—1148[DOI]
- 26 Heiss S, Schäfer HJ, Haag-Kerwer A, Rausch T. Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transport and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 847—857[DOI]

Bioaccumulation and transformation of cadmium by *Phaeodactylum tricornutum*

SI DongFang¹, YANG LiMin¹, Yan Hua & WANG QiuQuan^{1,2}

¹ Department of Chemistry & Key Laboratory of Analytical Sciences, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

² State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: This study reported the bioaccumulation and transformation of cadmium (Cd) by *Phaeodactylum tricornutum* in the presence of ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) and cysteine (Cys). Both EDTA and Cys can alleviate the toxicity of Cd to *P. tricornutum*. Short term intracellular uptake and extracellular adsorption experiments using ICP-MS indicated that the amounts of Cd accumulated on the cell surface of *P. tricornutum* and inside the cell decreased along with the increase of EDTA concentration, which conformed to the prediction of the Free Ion Activity Model (FIAM). However, extracellular adsorption of Cd increased at first and then decreased along with the increase in the concentration of Cys, while intracellular uptake increased under Cys concentrations from the blank value to 4.45 $\mu\text{mol/L}$, and then tended to remain at the same level when the Cys concentration was greater than 4.45 $\mu\text{mol/L}$, and this deviated remarkably from the FIAM. The interactions of Cd with $-\text{Si}-\text{OH}$, $-\text{C}-\text{OH}$ and $\text{NH}_2(\text{CO})-\text{OH}$ on the cell wall were confirmed using FT-IR and XPS studies. The results obtained using HPLC of the phytochelatins (PCs) produced by *P. tricornutum* under CdCl_2 , Cd-EDTA and Cd-Cys stress suggested that the main reason for the different effects of EDTA and Cys on the bioaccumulation and transformation of Cd by *P. tricornutum* was that Cys is not only a complexing ligand to Cd, as is EDTA, but also it is a precursor of the intracellular synthesizing PCs participating in the cellular defense mechanism against Cd. Furthermore, the discovery of *in vivo* PCs and oxidized-PCs as well as Cd-PC₂ in *P. tricornutum* using ESI-IT-MS provided the evidence for deactivation of Cd by the PCs, reducing Cd-toxicity to *P. tricornutum*.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, cadmium, bioaccumulation and transformation, cysteine, EDTA