

低 pH、铝及钙铝比对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*) 的生理生化影响*

孔繁翔 桑伟莲 胡 伟

(南京大学环境科学与工程系污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093 E-mail: kong fx @ pub. jlonline. om)

摘要 为探讨酸沉降对生物早期伤害的作用机理, 研究不同 pH 条件下, 铝及钙/ 铝比对斜生栅藻与磷和氮营养代谢有关酶活性的影响。结果表明, 铝对酸性磷酸酶和硝酸还原酶活性有显著抑制作用。当 pH 为 6. 8 和 5. 2, 铝浓度为 0. 7 mg/L 时, 酸性磷酸酶活性分别为对照组的 46% 和 56%, 而硝酸还原酶活性仅为对照组的 37% 和 30%; 当培养基中加入适量的钙离子, 会一定程度保护藻细胞中这 2 个酶活性不受低 pH 及铝的伤害, 钙的缓解作用取决于钙与铝的相对量; 生物体内酶活性对环境比较敏感, 可作为对环境进行早期监测的生化指标。

关键词 斜生栅藻, 低 pH, 铝, 钙, 酶活性。

Biochemical Responses of *Scenedesmus obliquus* to Low pH, Al and Ratio of Ca to Al

Kong Fanxiang Sang Weilian Hu Wei

(State Key Lab. of Pollution Control and Resources Reuse, Dept. of Environ. Sci. and Eng., Nanjing Univ., Nanjing 210093

E-mail: kong fx @ pub. jlonline. om)

Abstract The effects of low pH value, Al and various ratios of Ca to Al on the enzymes associated with the phosphorus and nitrogen in green alga *Scenedesmus obliquus* were studied. The results showed that the activities of acid phosphatase and nitrate reductase were significantly inhibited by Al. After treated with 0. 7 mg/L Al at pH 6. 8 and 5. 2, acid phosphatase showed only 46% and 56% activity, nitrate reductase showed 37% and 30% activity, relative to that in the control respectively. Supply of Ca to growth medium had a protective effect on these two enzymes against Al and low pH injury. The extent of protective effect was depended on the ratio of Ca to Al. The enzymes studied as the biochemical indicators are very sensitive, and they can be used to early monitor the effects of chemical compounds on environment.

Keywords *Scenedesmus obliquus*, low pH, Al, Ca, enzyme activity.

M Cain 和 Davies 曾报道, 铝有可能导致植物根部的磷缺乏。例如, 在有铝存在的培养基中加入足够量的磷, 将会使植物免受铝的伤害^[1]。早期的研究以及放射性元素示踪实验已证明, 在低 pH 下, 铝抑制了水生生物对⁴⁵Ca 的吸收^[2, 3]。有研究表明, 环境中的铝钙比对铝的生物毒性具有一定的调节作用^[4]。但对钙缓解低 pH 和铝对生物毒性作用机理仍在探讨中。Taylor 报道了铝、钙、磷和 pH 之间的复杂相互作用及其对植物生长的影响, 并肯定了钙和磷

保护植物不受铝及低 pH 的伤害作用^[5]。

本实验选择常见水生藻类生物斜生栅藻作为实验生物, 以酸性磷酸酶(acid phosphatase, AP)和硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)作为指标, 研究不同 pH 条件下铝离子的存在以及不同钙铝比(Ca/Al)对这 2 个与藻类生物的磷和氮营养关系密切的酶的影响, 以深入研究酸

* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by National Natural Science Foundation of China): 39570150
孔繁翔: 男, 41 岁, 硕士, 副教授
收稿日期: 1997-10-24

雨对生物早期伤害的作用机理.

1 材料与方法

1.1 生物及培养方法

斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* Kutz) 从中国科学院水生生物研究所获得. 培养于250 ml 锥形瓶内80 ml 水生四号培养基中. 置于光照培养箱内振荡培养, 25℃, L·D 为14·10h.

1.2 溶液 pH 值及铝浓度设置

用1 mol/L HCl 调节培养液的 pH 分别为6.8和5.2, 并在2个 pH 处理组中各加入 Al₂(SO₄)₃, 使其 Al³⁺ 理论浓度为0.0, 0.25, 0.45, 0.7, 1.4mg·L⁻¹. 在分光光度计上测定藻培养液光密度, 并在4d 后取样, 离心收集, 用蒸馏水洗涤数遍, 在干燥箱105℃中烘干至衡重, 测定单位体积培养液中藻细胞干重, 以确定不同 pH 条件下铝的96 h EC₅₀.

1.3 钙/ 铝比对生物影响实验

在确定了 Al³⁺ 96 h EC₅₀后, 在 pH 分别为6.8和5.2的培养基中, 选择0.7mg·L⁻¹为铝实验浓度, 同时加入相应量的钙, 使培养基中的钙/ 铝离子比(摩尔浓度比)分别为0/ 0, 0/ 1, 0.5/ 1, 1/ 1和2/ 1. 然后接入新鲜藻培养液, 使初始藻细胞密度为3.0– 5.0 × 10⁶ ell·L⁻¹, 培养方法同上. 4d 后, 藻细胞经离心收集并洗涤后, 用液氮冷冻, 低温真空干燥14d. 称重, 待用于酶活性测定. 每个处理为3个平行样, 并重复实验.

1.4 酶的提取及活性测定

称取一定量干燥的藻细胞, 用 Tris·硼酸盐缓冲液(0.1 mol/L ·0.3mol/L, pH7.5, 5mmol/L EDTA, 7 mmol/L β-巯基乙醇) 在0℃下提取10 min, 离心, 10 000g, 4℃, 10 min, 上清液保存于– 30℃下, 用于酶活性和蛋白质含量测定.

AP 活性用 Boller 和 Kende 方法^[6], 在405 nm 处测定底物释放速率; NR 活性按 Hageman 和 Reed 法测定^[7]. 单位干重藻细胞中蛋白质含量用 Folin-酚方法测定, 以牛血清蛋白(BSA) 为标准蛋白^[8].

本实验中所用生化药品来自 Sigma, 酶活

性测定数据统计分析用 STATGRAPHICS 软件包进行.

2 结果与讨论

2.1 低 pH 及铝对酶活性的影响

不同 pH 及 Al³⁺ 对 AP 和 NR 活性影响测定结果见图1和2. 从图中可知, 当 pH 为5.2时, AP 的活性与 pH6.8时的活性相比, 虽然有差异, 但并不十分明显. 在2个 pH 处理组中, 当钙/ 铝比为0/1(即 Al³⁺ 浓度为0.7mg·L⁻¹, 钙为0.0mg·L⁻¹), AP 活性均有明显下降. 如在 pH 为6.8处理中, 其活性仅为对照组的46%, pH5.2处理组中仅为对照组的56%. 可见, 铝对该酶活性有显著的抑制作用($P < 0.01$).

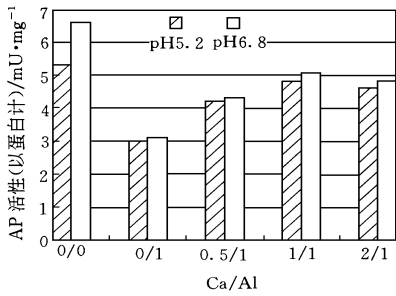


图1 钙/ 铝比及 pH 对 AP 活性的影响

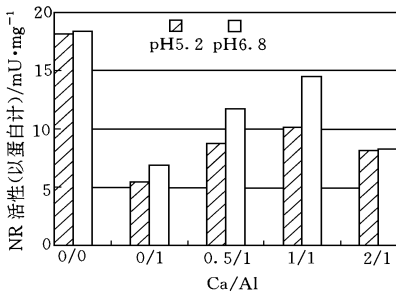


图2 钙/ 铝比及 pH 对 NR 活性的影响

铝的存在对于 NR 活性的影响比对 AP 的影响更为明显. 在 pH 为5.2和6.8, 钙/ 铝比为0/ 1(即铝离子浓度为0.7mg·L⁻¹, 钙为0.0mg·L⁻¹)时, 该酶的活性仅分别为对照组的30%和37%. 这表明, NR 对铝十分敏感($P < 0.01$). 比较不同 pH 条件下 NR 活性测定结果, 可以看到, 当培养基中无铝存在时(钙/ 铝比为0/ 0), 该

酶活性在不同 pH 值处理组中无明显差异;但当同时加入铝离子时,在所有处理组中,pH5.2 中的酶活性均明显低于 pH6.8 的处理组.这可能是由于铝和低 pH 环境的联合毒性,抑制了该酶的活性.

2.2 不同钙/铝比对酶活性影响

酶活性测定结果表明,AP 和 NR 活性对钙/铝比有类似的反应(图1和图2).当培养基中加入适当量的钙离子,均会改变低 pH 及铝对藻细胞中这2个酶活性的作用效果.实验结果表明,当培养基中钙/铝比从0/0提高到0.5/1,也就是说,钙离子的浓度逐步增加,在 pH 为5.2 和6.8 两处理组中,均导致所测2个酶活性上升.当钙铝比为1/1时,虽然其活性仍然低于对照组,但与其它不同钙/铝比值的处理组相比较,AP 和 NR 的活性均达到最大值($P < 0.05$).当钙/铝比为2/1,酶的活性又有所下降.这说明,钙的作用不仅决定于其加入量,同时还取决于与铝的相对量.

生物体内的酶对物质的分解、合成的催化作用,是生态系统中物质循环正常进行的基础.AP 和 NR 与生物的磷和氮营养代谢过程十分密切.AP 可以将环境中的有机磷分解为无机磷,提高了环境中生物可利用磷的浓度,使藻类得以吸收利用;NR 可将植物所吸收的氧化态氮化合物转为还原态氮,进一步合成氨基酸及蛋白质,形成初级生产力.如果环境因子降低了生物体内这些与营养代谢关系密切的酶活性,将会改变藻类的营养平衡,藻类的生长和繁殖受到抑制,种群增长受阻,并通过食物链,对整个群落及生态系统的结构与功能产生影响.因此选择特定的酶活性作为生物标志,是研究污染物对生态系统影响机理的重要手段之一.

本研究结果证明,在低 pH 条件下,一定浓度的铝明显抑制 AP 和 NR 的活性,影响了藻类正常的磷和氮代谢过程,导致藻细胞对环境营养物质吸收与利用不足,这可能是酸雨对生物产生毒害的重要原因之一.而在培养基中加入适当量的钙离子,会在一定程度上保护关键酶活性不受伤害,以减缓酸性环境以及铝

对藻类的伤害.使藻体内氮、钙和磷的代谢能够在一定水平上正常进行,这可能是钙的缓解作用,保护植物不受伤害的机理之一.同时,本研究结果也证明,由于生物代谢过程中一些关键酶的活性对环境因子的改变比较敏感,其变化比生物的生长、种群的增长以及群落的演替等变化更灵敏,测定周期更短.因此,可以作为生化指标,对环境中的污染物浓度进行早期监测,对环境质量作出更为准确的预报.

3 结论

(1)在低 pH 条件下,铝对 AP 和 NR 的活性有显著抑制作用;

(2)当培养基中加入适量钙离子,会改变低 pH 及铝对藻细胞中这2个酶活性的作用效果.当钙/铝为1/1时,酶活性达最大值.钙的缓解作用主要取决于钙与铝的相对量;

(3)生物代谢过程中一些关键酶的活性对环境因子的改变比较敏感,可以作为生化指标,对污染物对环境的影响进行早期监测.

参 考 文 献

- 1 M Cain S and Davies M S. Effects of pretreatment with phosphate in natural populations of *Agrostis capillaris* L. II: Interactions with aluminum on the acid phosphatase activity and potassium leakage of intact roots. *New Phytol.*, 1984, **96**: 589– 599
- 2 孔繁翔,周风帆,陈爽.低 pH 值及铝对泥鳅吸收 ^{45}Ca 的影响. *环境科学*, 1996, **17**(6): 57– 59
- 3 Spry D J and Wood C M. Ion flux rates, acid-base status and blood gases in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed to toxic zinc in natural soft water. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1985, **42**: 1332– 1341
- 4 Truman R A, Humphreys F R and Ryan P J. Effect of varying solution ratios of aluminium to calcium and magnesium on the uptake of phosphorus by *Pinus radiata*. *Plant Soil*, 1986, **96**: 109– 123
- 5 Taylor G J, Adriano D C and Johnson A H (eds). *Aluminium toxicity and tolerance in plants. A critical re-evaluation*, Vol 2. New York: Springer-Verlag, 1989: 327– 361
- 6 Boller T and Kende H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol*, 1979, **63**: 1123– 1132
- 7 Hageman R H and Reed A J. Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.*, 1980, **9**: 270– 280
- 8 Lowry O H and Rosenbrough N R et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**: 263– 275