

几种物质磷形态的生物有效性模拟研究*

吴重华 王晓蓉 孙昊

(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)

摘要 研究了无磷HB-4培养液中添加7种物质磷形态磷酸二氢钾, 焦磷酸钠, 六偏磷酸钠, 磷酸肌酸钠(NaCre), 三磷酸腺苷(ATP), β -甘油磷酸钠(NaGly)和5-腺嘌呤核苷磷酸(AMP)4个浓度系列时羊角月芽藻的生长情况, 获得了各物质磷形态下藻的最大生长量与生长速率. 结果表明: ATP与六偏磷酸钠具有独特的生物效应. 同时获得羊角月芽藻的生长与7种磷形态的相关方程. 进行了太湖湖水中各物质磷形态的添加试验, 发现ATP及焦磷酸钠对藻生长的促进作用较 KH_2PO_4 强.

关键词 湖泊富营养化, 物质磷形态, 羊角月芽藻, 生物效应.

Simulation Study on the Bioavailability of Several Substance Phosphorus Forms

Wu Chonghua Wang Xiaorong Sun Hao

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

Abstract Growth of *Selenastrum capricornutum* was researched after four concentration sets of seven substance P forms: KH_2PO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, $(\text{NaPO}_3)_6$, Creatine phosphate sodium salt (NaCre), Adenosine 5'-triphosphate (ATP), Natrium- β -glycerophosphat (NaGly) and Adenosine-5'-monophosphate (AMP) were added in the non-phosphorous HB-4 culture, and maximum algae growth and algae growth rate when each substance P form adding were acquired. Results showed special biological effects of ATP and $(\text{NaPO}_3)_6$. Correlation equation of algae growth and the seven P forms were also obtained. AGP was studied and bioavailability of ATP and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ were revealed to be greater than that of KH_2PO_4 .

Keywords eutrophication, substance P form, *Selenastrum capricornutum*, biological effects.

已有研究表明湖泊水体中溶解的各形态磷均不同程度地促进藻的生长. 而颗粒磷通过释放或生物转化亦可被藻利用^[1]. 目前采用化学分类法所得的磷形态并不考虑同一形态中不同含磷物质的不同性质, 因而所获得的是一种统计学上的总体结果, 而水体中各种物质磷形态的生物效应到目前还鲜见报道. 为了研究水体中不同类含磷物质形态的独自的生物效应, 本文选取正磷酸盐、无机缩聚磷酸盐、有机正磷酸盐、有机缩聚磷酸盐等作为溶解磷形态的物质形态, 研究对羊角月芽藻生长的影响, 以便获得藻对不同类物质磷形态的生物有效性.

1 实验部分

1.1 试验生物的培养

选用羊角月芽藻(*Selenastrum capricornutum*)作为实验藻种(由中科院武汉水生所提供), 接种到水生4号培养液中, 在 25 ± 1 , 光强为4000 lx, 光暗比为16:8的培养条件下进行恒温培养, 重复2-3次. 所得羊角月芽藻浓度经显微镜计数确定超过 $10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 便

* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by National Natural Science Foundation of China) 编号: 29170300

吴重华: 男, 28岁, 硕士, 助教

收稿日期: 1997-09-11

可作为实验藻种. 每次接种均在无菌室中操作. 实验前将处于生长期的藻液离心分离, 用无菌水反复冲洗数次以除去藻表面吸附的多余的磷. 然后将藻转入无磷的水生4号培养液中培养2-3d, 该藻液即可作为实验用藻种.

1.2 溶解物质形态磷的生物有效性试验

(1) HB-4 培养液中实验 实验选磷酸二氢钾、焦磷酸钠、六偏磷酸钠、磷酸肌酸钠、三磷酸腺苷(ATP)、 β -甘油磷酸钠和5-腺嘌呤核苷酸(简称AMP)7种物质磷形态, 配置浓度为1000mg/L的各物质储备液于4℃保存. 将无磷的水生4号培养液在121℃高压灭菌20min后, 冷却, 放入40只500ml锥形瓶中(为1组试验), 每瓶放入200ml水生4号无磷培养液. 添加磷物质到各锥形瓶中使浓度为20 μ g/L, 留下3瓶不加磷物质的样品作为空白, 调节起始pH值为8.0, 接入经无菌水多次冲洗后的上述试验藻种, 起始接种量为 1.0×10^4 个/ml. 在 25 ± 1 ℃, 光照为4000lx下培养. 每天摇动各锥形瓶5-6次. 培养过程中每隔一定时间取出3个平行样测定藻的生长量直至各磷形态对应的藻达到最大生长量(藻前后2d的生长不超过5%即认为达到了最大生长量). 同上完成另6个磷形态20 μ g/L的添加试验. 同样进行各磷形态为50, 100, 150 μ g/L的AGP试验(共28组).

(2) 太湖湖水中实验 将经高压灭菌的太湖湖水放入一系列500ml锥形瓶中. 加入上述7种磷形态到各锥形瓶中使所添加浓度为50 μ g/L. 调节开始pH为8.0, 接入经无菌水反复冲洗的试验藻种, 接种量为 1.0×10^4 个/ml. 余同上.

2 结果与讨论

2.1 HB-4 无磷培养液中各物质磷形态的生物有效性

羊角月芽藻在不同物质磷形态及不同添加磷浓度时的生长情况如图1所示. 由图1可看出, 同一浓度的各磷形态对月芽藻生长的促进作用各不相同, 且各磷形态促进藻增长的大小顺序在不同浓度时也不相同. 一般认为正磷酸

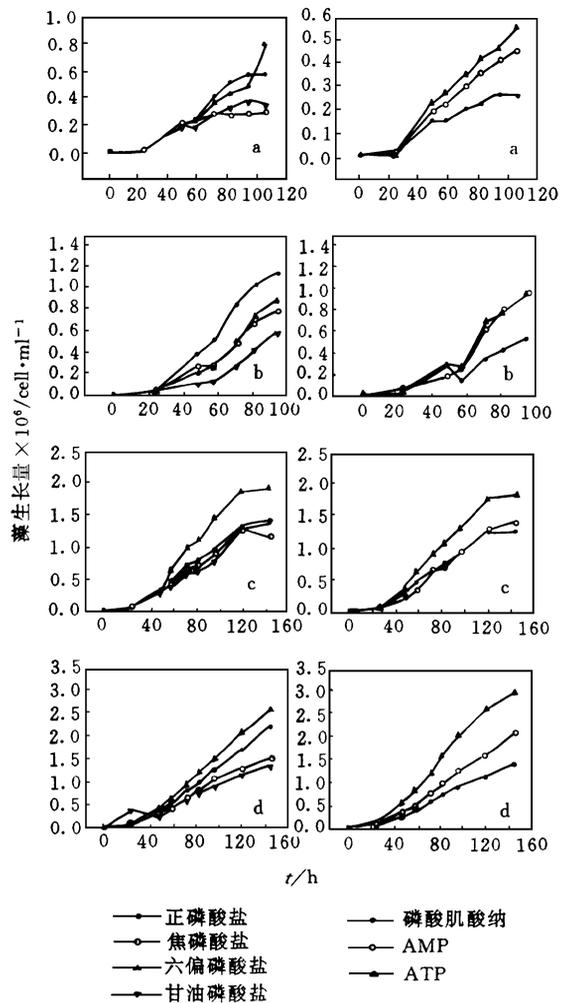


图1 HB-4 无磷培养液中添加20 μ g/L(a), 50 μ g/L(b), 100 μ g/L(c), 150 μ g/L(d)各磷形态时羊角月芽藻的生长

盐是促进藻生长的最佳形态, 因此, 若以正磷酸盐为基准, 把不同浓度系列各形态促使藻达到最大生长量与该浓度组正磷酸盐对应的最大生长量比较, 得表1. 由表1中可看出, 在20 μ g/L时, 以正磷酸盐促使月芽藻生长量最多, 随着添加浓度的增加, 各磷形态生长量占正磷酸盐比重也趋于增加, 除ATP和AMP外几乎都在100 μ g/L时达到最大值, ATP在添加浓度从20 μ g/L增加到150 μ g/L时逐渐表现出其独特的生物效应, 在150 μ g/L时对应的藻最大生长量为正磷酸盐对应的最大生长量的1.5倍, 明显高于正磷酸盐组. 6种磷形态中六偏磷酸盐

从 $50\mu\text{g/L}$ 添加系列起也开始表现其特殊的生物有效性, 所对应的藻生长量也一直比正磷酸盐组高.

表 1 各磷形态对应藻的最大生长量与正磷酸盐组的比较值

浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	正磷 酸盐	焦磷 酸钠	六偏磷 酸钠	甘油磷 酸钠	磷酸肌 酸钠	AMP	ATP
20	1	0.58	0.91	0.71	0.62	0.84	0.96
50	1	0.76	1.05	0.87	0.64	1.00	1.01
100	1	0.79	1.26	1.04	0.64	0.94	1.20
150	1	0.67	1.15	0.60	0.61	0.98	1.51

在藻整个生长过程中各磷形态所对应的月芽藻生长速率与同一浓度系列添加正磷酸盐组对应的速率比值见表 2. 由表 2 可见, 在 20、 $50\mu\text{g/L}$ 2 个较低浓度组的添加实验中, 各磷形态对应的藻的生长速率以正磷酸盐组最大, 随着添加浓度的提高, 各磷形态对应的藻生长速率也明显改变. AMP 磷形态在 4 个浓度系列时无论生长量, 还是藻的生长速率均与正磷酸盐非常接近, 表明 AMP 是一个生物效应比较好的磷形态. 在添加浓度为 $100\mu\text{g/L}$ 和 $150\mu\text{g/L}$ 时, 六偏磷酸钠和 ATP 对应的藻的生长速率较正磷酸盐组的高. 前人文献报道正磷酸盐是藻吸收磷的唯一方式, 其它形态的磷需先转化为正磷酸根, 才可被藻吸收利用^[2]. 这个转化过程可能是分解、水解、酶作用或与其它物质结合等, 存在着是否能完全将其它磷形态转化为可被藻直接吸收的正磷酸根的问题, 因而非正磷酸盐形态促使藻生长的速率及最大生长量应该比对应的正磷酸盐小. 从表 1 及表 2 可看出, 六偏磷酸钠和 ATP 在 $100\mu\text{g/L}$ 及 $150\mu\text{g/L}$ 时所对应的月芽藻的生长速率及最大生长量明显高于正磷酸盐组, 这样便存在着非正磷酸根的磷形态直接被羊角月芽藻吸收的可能性. 由于 ATP 是高能生化物质, 藻可能通过其细胞膜双分子层直接吸收, 然后在细胞体内分解为 ADP 及 PO_4^{3-} , 并且释放出大量能量, 既满足了藻体对磷的需求, 同时获得藻生长所需的大量能量, ADP 也可以在藻体中分解为 AMP, 同时释放能量. 实验结果显示 AMP 对藻的生长也具有

很强的促进作用. ATP 在水体中也可能水解一部分, 或者通过藻分泌的酶及酸性物质作用变成其它含磷物质, 或与其它生化物质结合再进入藻体. 很可能是上述 2 种吸收机制同时存在. 藻对六偏磷酸钠可能是同时吸收六个偏磷酸根分子, 因而表现出六偏磷酸盐的特殊生物效应. 羊角月芽藻对 ATP、六偏磷酸盐以及其它各磷形态的具体吸收机理还需进行深入研究.

表 2 各磷形态对应藻的生长速率与正磷酸盐组的比较值

浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	正磷 酸盐	焦磷 酸钠	六偏磷 酸钠	甘油磷 酸钠	磷酸肌 酸钠	AMP	ATP
20	1	0.45	0.83	0.59	0.44	0.74	0.87
50	1	0.69	0.93	0.73	0.51	0.94	0.92
100	1	0.89	1.39	1.04	0.87	1.31	1.32
150	1	0.66	1.12	0.62	0.63	0.98	1.44

将上述 7 种磷形态 4 个浓度系列对应的最大生长量(Y) 与它们的浓度(c) 进行多元回归, 获得羊角月芽藻与各磷形态的相关方程如下:

$$Y = 1851 \times c_{\text{正磷酸钾}} + 1254 \times c_{\text{焦磷酸钠}} + 2146 \times c_{\text{六偏磷酸钠}} + 1360 \times c_{\text{甘油磷酸钠}} + 1236 \times c_{\text{磷酸肌酸钠}} + 1801 \times c_{\text{AMP}} + 2554 \times c_{\text{ATP}}$$

$$n = 28, r = 0.99$$

由相关方程便可获得 7 种磷形态在 4 个浓度添加系列中对藻生长贡献的综合大小顺序为: ATP > 六偏磷酸钠 > 正磷酸盐 > AMP > 甘油磷酸钠 > 焦磷酸钠 > 磷酸肌酸钠.

2.2 太湖湖水中各物质磷形态的生物有效性

湖水高压灭菌后, 测定起始总磷及总溶解磷浓度分别为 $102.5\mu\text{g/L}$ 及 $64.8\mu\text{g/L}$. 为了避免在评价各磷形态生物效应时受其它物质的干扰, 也为了不致出现湖水在添加了 $50\mu\text{g/L}$ 的各磷形态后藻的生长不再受磷限制, 在灭菌湖水中加入部分无磷水生四号培养液, 加入各磷形态后, 调节 pH 为 8.0, 接种羊角月芽藻进行培养. 其羊角月芽藻的生长如图 2 所示.

从图 2 可见, 湖水样品中的藻最先达到最大生长量, 其它各形态一般较湖水样迟 70h 左右才达到最大生长量(除添加磷酸肌酸钠的样品迟 24h), 而且各形态最大生长量之间差别较大.

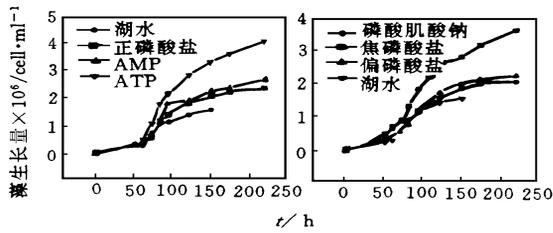


图2 湖水中磷形态添加时藻的生长曲线

将整个藻生长期内的生长量(Y)与时间(t)相关分析,回归方程为 $Y = a + b \log t$,获得各物质磷形态及湖水中羊角月芽藻的生长方程如表3所示.所得各生长方程的相关系数均在0.98

表3 各添加样中藻在整个生长期期间的生长方程

方程参数	湖水	正磷酸盐	AMP	ATP	甘油磷酸钠	磷酸肌酸钠	焦磷酸钠	六偏磷酸钠
$a (\times 10^6)$	- 5.963	- 6.042	- 7.554	- 11.97	- 7.088	- 5.832	- 10.09	- 6.985
$b (\times 10^6)$	1.590	1.744	2.011	3.149	1.836	1.580	2.675	1.819
相关系数	0.98	0.98	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98

表4 各添加样中藻在对数生长期期间的生长方程

方程参数	湖水	正磷酸盐	AMP	ATP	甘油磷酸钠	磷酸肌酸钠	焦磷酸钠	六偏磷酸钠
a	0.281	0.231	0.221	0.231	0.228	0.215	0.297	0.284
b	0.056	0.063	0.062	0.066	0.057	0.061	0.066	0.059
r	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	0.98

从表4可看出,在对数生长期内除添加甘油磷酸盐的样品中藻的生长速率与原湖水对照组相近外,其它各添加样均有不同程度增长.磷酸肌酸钠添加样中藻在开始对数生长期内生长速率高于湖水组,不同于上面在藻整个生长期中分析的无明显促进作用结果,表明磷酸肌酸钠有一定的促进作用,只是促使藻生长的时间先后不同而已.在对数生长期各形态添加样对藻生长速率的影响为:焦磷酸钠> ATP> 正磷酸盐> AMP> 磷酸肌酸钠> 六偏磷酸钠> 湖水对照组> 甘油磷酸钠.焦磷酸钠与ATP在藻对数生长期与整个藻生长期均显示出了超常的促进性.六偏磷酸盐对藻的促进能力与单纯HB-4培养下的情况有一定差别,说明在实际湖泊体系中影响上述各磷物质形态生物效应的因素很多,如磷形态与湖水中某些物质的反应,都能加强或减弱磷形态的生物效应.同样,从添加磷形态对藻的最大生长量影响顺序(ATP> 焦

磷酸钠> AMP> 甘油磷酸钠> 六偏磷酸钠> 磷酸二氢钾> 湖水对照组> 磷酸肌酸钠.表明羊角月芽藻在添加ATP和焦磷酸盐体系中生长速率明显高于正磷酸盐添加组,只有磷酸肌酸钠与湖水对照组无明显差异.若将羊角月芽藻生长分段分析,发现所有样品几乎在前3d便完成了对数生长阶段,取71h以前月芽藻的生长量(Y)与时间(t)进行回归分析,回归方程为 $Y = e^{a+bt}$,获得添加各形态样品中藻在对数生长期中的生长方程如表4.

磷酸钠> AMP> 甘油磷酸钠> 正磷酸盐> 六偏磷酸钠> 湖水对照组)亦可获得类似结果.其中添加ATP时藻的生长量(为 $4.075 \times 10^6 \text{ cell/ml}$)较添加正磷酸盐时藻的生长量($2.394 \times 10^6 \text{ cell/ml}$)增长 $1.683 \times 10^6 \text{ cell/ml}$.本研究结果表明:在湖泊富营养化过程中藻的生长除吸收正磷酸盐外,同时并存吸收非正磷酸盐在含磷物质的过程.实验结果表明ATP及焦磷酸盐在评价太湖富营养化中磷的效应时是不可忽视的磷形态,这也揭示了聚合有机磷酸盐和聚合无机磷酸盐(如焦磷酸盐,偏磷酸盐)特殊的生物有效性.

参 考 文 献

- 1 Bradford M E and Peters R H. The Relationship between Chemically Analyzed Phosphorus Fraction and Bioavailable Phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, 1987, 32(5): 1124- 1137
- 2 Robert Henry Peters. Phosphorus Availability in Lake Memphremagog and Its Tributaries. *Limnol. Oceanogr.*, 1981, 26(6): 1150- 1161