

铜和镉对小球藻硝酸盐还原酶活性的影响

THE EFFECTS OF COPPER AND CADMIUM ON NITRATASE ACTIVITY OF CHLORELLA

赵素达¹ 朱松龄¹ 吴以平² 董树刚²

(¹ 青岛教育学院 266071)

(² 青岛海洋大学 266003)

关键词 Cu^{2+} , Cd^{2+} , 小球藻, 硝酸盐还原酶

Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 是毒性较大的两种重金属, 因此在水质质量控制中对它们有严格的限制。有关 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对藻类代谢的影响已有不少报道, 然而有关两种金属的致毒机理至今未完全弄清。Sunda 和 Guillard 1976 年指出 Cu^{2+} 的毒性依赖于离子活度, 而不是总铜的浓度。Sorrentino 1979 年指出 Cu^{2+} 首先影响细胞质膜的透性, 导致细胞丢失 K^+ 离子和细胞体积的变化, 进一步影响叶绿体电子传递, 并损坏叶绿体片层, 从而抑制光合作用。Stromgren 1980 年通过对 4 种潮间带海藻的研究, 发现这些藻 Cu^{2+} 的毒性大于汞, 最敏感的是 *Pelvetia canaliculata* 和 *Fucus spiralis*, 当铜浓度为 60~80 mg/L 时生长速率减少 50%。 Cd^{2+} 的毒性比 Cu^{2+} 大, Markham 等, 1980 年指出海带 (*Laminaria saccharina*) 孢子体在 2 mg/L Cd^{2+} 的海水中生长速率减少 50%。Kremer 和 Markham 1982 年通过 4 种潮间带海藻的研究, 证明 1 mg/L 的 Cd^{2+} 促进 *Pelvetia canaliculata* 和 *Ascophyllum nodosum* 的生长, 而 0.45 mg/L 的 Cd^{2+} 抑制蛋白质合成, 并由此导致酶的数量减少。

本文以小球藻硝酸盐还原酶 (NRase) 活性做指标研究了 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的毒性。

1 材料与方 法

1.1 材料处理

实验所用小球藻 (*Chlorella sp.*) 取自青岛海洋大学生命学院植物生理实验室, 扩种后当藻种处于对数生长期时进行 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 毒性实验。

海水取自青岛鲁迅公园, 经孔径 0.45 μm 滤膜过滤、煮沸消毒, 冷却后配制培养液。培养液配方: 每

1 000 ml 含有 5% NaNO_3 1 ml, 5% KH_2PO_4 或 K_2HPO_4 1 ml, 0.1% $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1 ml, 尿素 10 mg。

实验前先将藻液离心 (转速 3 000 r/min)、洗涤 1~2 次, 弃去上清液, 将藻体 (沉淀) 洗入新鲜无氮海水中培养 1 d, 以便消除培养过程中藻体死亡、腐烂、分解而导致的 NO_2^- 离子的干扰。然后, 将上述藻液培养在每 1 000 ml 海水含 20 mmol NaNO_3 和 18 mmol/L KH_2PO_4 的天然过滤海水中, 在温度 20~25 $^\circ\text{C}$, 光强 4 000 lux 的条件下诱导培养 1 d 后进行酶活性测定和毒性实验。

1.2 酶活性测定

取一定体积的藻液离心 (3 000 r/min)、洗涤 2 次, 将沉淀 (藻体) 加入等体积新鲜无氮海水培养 1 d, 再在含有 20 mmol/L NaNO_3 和 18 mmol/L KH_2PO_4 的天然海水中培养 1 d, 诱导酶活性。

酶活性测定方法: 取 20 ml 藻液, 反复离心, 洗涤 2~3 次, 将藻体全部移入 25 ml 试管中, 加入 20 ml 含有 30 mmol/L NaNO_3 的新鲜海水 (pH=7.5) 塞紧塞子, 在恒温 25 $^\circ\text{C}$ 黑暗中反应 1 h, 经离心将沉淀于 70 $^\circ\text{C}$ 烘干、称重。上清液按对氨基苯磺酸- α -萘胺法, 用 721-分光光度计在波长 520 nm 处测定 NO_2^- 含量。

1.3 硝酸盐浓度对小球藻 NRase 活性影响的实验

实验所用硝酸盐为 NaNO_3 , 浓度 (mmol/L) 分别

收稿日期: 2000-03-15; 修回日期: 2000-09-01

为 0, 10, 20, 30, 40, 50。每个浓度设两个重复样, 诱导培养 1 d 后, 分别取 10 ml 藻液离心, 弃去上清液, 用新鲜过滤海水洗涤 2~3 次, 然后将沉淀移入 25 ml 试管中, 分别加入新鲜无氮海水 (pH = 7.5) 和不同浓度的硝酸钠, 使总体积至 20 ml, 然后在恒温 25 °C 下, 黑暗中反应 1 h 后, 比色测定。

1.4 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 毒性实验

不同浓度的 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 系用分析纯 CdCl₂ 和 CuSO₄ · 5H₂O 配制而成。Cd²⁺ 浓度为 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L, Cu²⁺ 浓度为 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L。

实验培养容器为 500 ml 三角瓶, 实验前所有三角瓶均用 1:3 的 HCl 浸泡 1 d, 再用去离子水充分洗涤, 之后用相应浓度的 Cd²⁺、Cu²⁺ 培养液预平衡两次, 每次 1 d。实验培养液和以上扩种培养液相同, 每个三角瓶 200 ml 培养液, 接种密度 800 000 个细胞/ml, 培养条件和扩种实验相同, 待对数生长期加入不同浓度的 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 继续培养 1, 3, 5 d 测 NRase 活性。

2 实验结果

2.1 硝酸盐浓度对小球藻 NRase 活性的影响

硝酸盐还原酶是一种诱导酶, 必须在硝酸盐存在时才能显示其活性。为了解小球藻 NRase 对硝酸盐的最佳浓度, 在 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 毒性实验前做了不同浓度硝酸钠对小球藻 NRase 活性影响的实验。结果如图 1 所示。

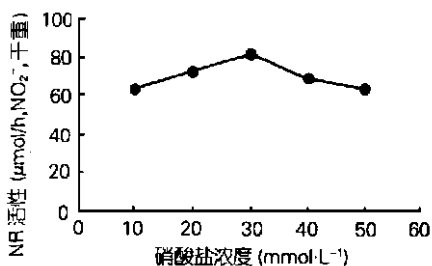


图 1 不同浓度硝酸盐对 NRase 活性的影响

从图 1 中可以看出, NaNO₃ 浓度从 10 到 30 mmol/L, 酶活性随浓度增加而增加。在 30 mmol/L 处出现高峰, 当 NaNO₃ 浓度在 40~50 mmol/L 时酶活性不断下降。此结果与 Kende 等人 1971 年用陆地植物麦仙翁所做实验及高尚德等人 1985 年以海带所做实验均不

一致。其原因可能是由于各种植物对硝酸盐的代谢水平及实验条件不同所致。

2.2 Cd²⁺ 对 NRase 活性的影响

用不同浓度的 Cd²⁺ 离子处理藻液 1, 3, 5 d 后, 在最适硝酸盐浓度 (30 mmol/L) 和最适 pH (7.5) 条件下, 测定酶活性。结果以对照酶活性作 100, 换算成相对酶活性, 如图 2。

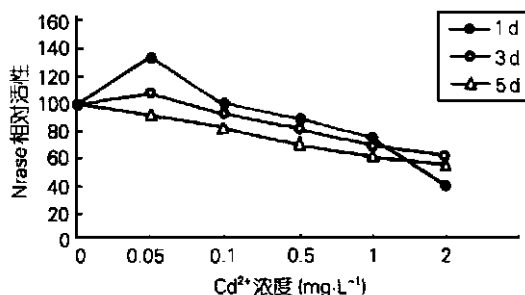


图 2 不同浓度的 Cd²⁺ 对小球藻 NRase 活性的影响

从图 2 表明, 第 1 天, Cd²⁺ 处理浓度除 0.05, 0.1 mg/L 外其他各组 NR 活性均比未加 Cd²⁺ 的对照组小。0.05, 0.1 mg/L Cd²⁺ 处理 1 d NR 活性分别高于和持平对照组, 而 Cd²⁺ ≥ 0.5 mg/L 酶活性迅速下降, 且随 Cd²⁺ 浓度越大 NRase 活性下降越多。

第 3 天, 除 Cd²⁺ 浓度 0.05 mg/L 组 NRase 活性高于对照组外, 其他各组均出现毒性。Cd²⁺ 浓度从 0.1 mg/L 开始 NRase 活性低于对照。与第 1 天相比, 除 2.0 mg/L 组外各浓度组 NRase 活性均低于第 1 天, 说明同样浓度下, Cd²⁺ 处理时间越长, 毒性越大。这可能是由于时间延长, 藻体内 Cd²⁺ 累积的结果。而 2 mg/L Cd²⁺ 浓度组第 3 天的酶活性明显高于第 1 天, 这可能是在高浓度下第 3 天藻体开始死亡, 由于藻体腐烂致使 NO₂⁻ 增加的结果。

第 5 天, 不同浓度 Cd²⁺ 处理各组 NRase 活性全部低于对照, 且低于第 3 天。进一步说明随着时间的延长藻体内 Cd²⁺ 累积浓度加大, 出现更大的毒性。

整个实验表明, Cd²⁺ 在低浓度 (≤ 0.05 mg/L) 短时间 (< 2 d) 对 NRase 活性有促进作用。而 Cd²⁺ 浓度 > 0.1 mg/L 对 NRase 活性有明显的毒性。浓度越大, 毒性越大。同一浓度下, 时间越长, 毒性越大。

2.3 Cu²⁺ 对 NRase 活性的影响

用不同浓度的 Cu²⁺ 处理小球藻 1, 3, 5 d 后, 测定酶活性, 结果如图 3 所示。

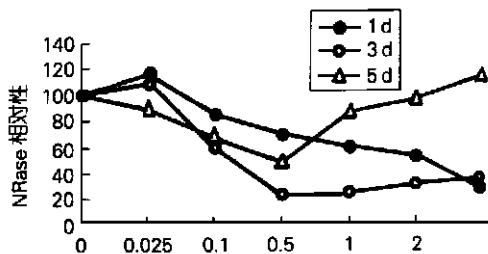


图 3 不同浓度 Cu²⁺ 对小球藻 NRase 活性的影响

图 3 可见,第 1 天,Cu²⁺ 0.025 mg/L 组 NR 活性明显高于对照,其余各组均低于对照,出现了抑制作用,并且浓度越大,抑制越明显。

第 3 天,Cu²⁺ 0.025 mg/L 组 NRase 活性仍高于对照组,但比第 1 天有所降低。0.05 ~ 1.0 mg/L 组 NRase 活性比第 1 天大幅度下降,但 2.0 mg/L 组比第 1 天有所回升,这一现象和 Cd²⁺ 处理结果相同,即由于藻体腐烂分解生成 NO₂⁻ 所致。

第 5 天,Cu²⁺ 0.025 mg/L 组 NRase 活性明显低于对照,出现毒性。但 0.05 ~ 0.1 mg/L 组 NR 活性比第 3 天有所回升,这可能由于处理时间较长,同样浓度下,时间越长 Cu²⁺ 累积越多,毒性越大,导致藻体开始死亡所致,这一结果在 0.5 ~ 2.0 mg/L 间更加明显。

3 讨论

3.1 Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 对小球藻 NRase 活性有明

显的影响,Cu²⁺ 浓度在 0.025 mg/L, Cd²⁺ 在 0.05 mg/L 短时间 (1 ~ 3 d) 对 NRase 活性有促进作用,长时间 (> 3 d) 有抑制作用。Cu²⁺ > 0.05 mg/L, Cd²⁺ > 0.1 mg/L 处理小球藻。第 1 天对 NRase 活性就有明显的抑制作用。浓度越大,时间越长,抑制越明显。NRase 活性是一较好的生态毒理实验指标^[3]。

3.2 Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 相比较, Cu²⁺ 的毒性大于 Cd²⁺, 0.05 mg/L 的 Cd²⁺ 处理小球藻 1 ~ 3 d, 对 NRase 活性有明显的促进作用,而在相同条件下, Cu²⁺ 有明显的抑制作用。重金属对藻类的毒性顺序随藻类种类和实验条件而变化,据 Rai L.C.1981 年报道,一般情况下是 Hg > Cu > Cd > Ag > Pb > Zn 等。以上在张首临和林春野^[2]的实验中也得到了证明。

3.3 低浓度 Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 在短时间内对 NRase 活性有促进作用,该现象属于“毒性兴奋作用”,由于毒性的刺激引起小球藻的代谢加快,致使 NRase 活性增加。

参考文献

- 1 黄秀莲,张大年,何燧原编,环境分析与监测,北京:高等教育出版社,1996。334 ~ 337
- 2 林春野.农业环境保护,1996,15(6):266 ~ 267
- 3 陈 愚.环境科学学报,1998,18(3):313 ~ 317

(本文编辑:张培新)