

DDT, BHC 对小球藻氨基酸含量的影响

林毅雄

(中国科学院环境化学研究所, 北京)

提要 本文研究的 DDT, BHC 对小球藻氨基酸含量的影响, 可作为环境生物工程及生物监测的依据。实验结果表明, 分别以 0.1 ppm DDT, BHC 处理小球藻对氨基酸含量影响不大, 而 1ppm 和 10ppm 处理下, 其氨基酸含量有所增加, 这可能是由于低浓度的 DDT 和 BHC 有刺激作用。游离氨基酸比蛋白质氨基酸增加更为显著。

污染物对蛋白质和氨基酸的作用, 直接影响生物的结构、功能和一系列代谢活动。Alsopp^[5] 和 Steward^[43] 等, 对于生理和环境因子影响细胞游离氨基酸的含量作了不少研究。Czeczuga 等^[7], 研究了 DDT 对小球藻和柱孢鱼腥藻氨基酸合成的影响。Rabe 等^[11] 指出, 当污染物在低剂量情况下被伤害植物的外观及形态无受害症状, 但对叶绿素、蛋白质及氨基酸的含量、酶的活性等引起一定变化, 说明了生物体对污染物的毒性反应。我们曾系统地研究了 DDT 和 BHC 对小球藻生长、色素、荧光强度, 富集及降解的影响^[2, 1]。有关这些微观变化的报道, 对藻类净化污水过程中的毒理学研究有一定的意义, 为合理利用污水资源的生物工程及生物监测提供了依据。

实验方法

1. 药剂

γ -BHC 和 p, p'-DDT 均为德国产, 纯度为 99%, 用丙酮为溶剂, 配制各种浓度的 γ -BHC 和 p, p'-DDT。

2. 藻种

小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beij) 从汉沽水库分离, 扩大培养。

3. 培养基

KCl 0.025g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.2g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.08g/L, NaHCO₃ 0.1g/L, Ca(PO₄)₂ 0.03g/L, FeCl₃ 1% 5mg/L, pH 7—7.5。

4. 藻类的培养与配制

将小球藻用上述培养基进行培养, 当藻种生长旺盛时, 按 0.5g/L 浓度的鲜藻液为试样, 每一试验用 10L 的藻液。用 γ -BHC 和 p, p'-DDT, 各以 0.1ppm, 1ppm, 10ppm 进行试验。然后, 将试样放置恒温光照室进行培养, 温度控制在 20—25°C, 光照强度为

收稿日期: 1985年8月12日。

1) 林毅雄、王杏君, 1980。汉沽水库生物净化效应(一) DDT 对小球藻生长量, 叶绿素含量及荧光强度的影响。中国科学院环境化学研究所科学成果汇编。

2000 lx, 以 12 小时光照, 12 小时黑暗, 交替试验。于两天后取样离心, 冷冻干燥, 制成粉末。取 100mg 用于氨基酸分析。

5. 氨基酸的测定^[1,2,10]

(1) 蛋白质氨基酸的分析: 取 100mg 干燥样品, 加 6 mol/L HCl 10 ml, 于 110°C 进行水解 24 小时, 过滤定容至 25 ml。取 1 ml 于 60°C 水浴减压蒸干, 以 0.02 mol/L HCl 1ml, 将蒸干样品溶解, 用日立 853—50 型自动氨基酸分析仪分析。

(2) 游离氨基酸的分析: 取 100mg 干粉样品, 置于 10ml 的试管中加蒸馏水 10ml, 浸泡 2 小时, 然后在 100°C 水浴中提取 40min, 冷却定容至 10ml, 过滤, 用 5% 磺基水杨酸淋洗, 定容至 15ml, 以 20000r/min 离心 20min, 取 3ml 上清液, 于 60°C 水浴减压蒸干, 用 0.5 ml pH 2.2 的柠檬酸缓冲液, 将蒸干的样品溶解, 上机分析(仪器同上)。

实 验 结 果

1. 总蛋白质氨基酸的含量

分别用 0.1ppm γ -BHC 和 p,p'-DDT 处理组与对照组相差不大; 1ppm 和 10ppm 的 γ -BHC 处理后分别比对照组增加 2.05% 和 5.12%, 而以 1ppm 和 10ppm 的 p,p'-DDT 处理后分别比对照组增加 5.05% 和 12.2%。处理组与对照组氨基酸种类相同(见表 1)。

2. 游离氨基酸含量

分别以 0.1ppm γ -BHC 和 p,p'-DDT 处理组比对照组增加不多。以 1ppm 和 10ppm 的 γ -BHC 处理组比对照组分别增加 32.9% 和 49.1%, 而以 1ppm 和 10ppm 的 p,p'-DDT 处理组比对照组分别增加 29.8% 和 55.5%。处理组与对照组所得氨基酸种类相同(见表 2)。

分 析 与 讨 论

1. 从表 1 可见, 分别用三种浓度的 γ -BHC, p,p'-DDT (0.1ppm, 1 ppm, 10ppm) 处理小球藻, 其蛋白质氨基酸的种类与对照组均无差异, 处理组与对照组所含的氨基酸相比, 除 0.1 ppm γ -BHC 处理组略为下降外, 其他组各种氨基酸大多有所增加, 其中以缬氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、赖氨酸增加较多, 而丙氨酸相对下降较大。从统计学分析, 缬氨酸 ($t = 6.06$ 及 $t = 1.45$)、亮氨酸 ($t = 2.47$ 及 $t = 4.33$)、谷氨酸 ($t = 2.50$ 及 $t = 3.78$) 及丙氨酸 ($t = -3.83$ 及 $t = -1.20$) 都有明显的差异。Strassman 等^[4]提出, 缬氨酸可由丙氨酸, 通过类似于邻二叔醇的重排作用而形成, 而丙氨酸可通过丙酮酸的还原胺化作用而形成。因此缬氨酸的增加与丙氨酸的下降, 可能有一定相关。而在酵母菌中, 亮氨酸是可能由缬氨酸和醋酸反应而成的, 故亮氨酸的增加与缬氨酸也有一定相关作用。实验结果可见, 天冬氨酸、谷氨酸随着处理浓度增加而增多, 它们能通过酮酸的氨基转化而形成体内各种氨基酸, 是形成各种氨基酸的前体。由于天冬氨酸、谷氨酸的增多, 有些氨基酸也相应地增加。至于各种氨基酸代谢途径, 则有待进一步研究。

2. 从蛋白质氨基酸的总含量分析, 除 0.1ppm γ -BHC 处理组略低于对照组外(这可能由于实验误差所引起), 其他各处理组均高于对照组。而从统计学分析, γ -BHC 的总 t 值为 0.68, p, p'-DDT 的总 t 值为 2.00, 都有一定差异性, 后者差异性更为明显。这

表 1 γ -BHC 和 p,p'-DDT 对小球藻蛋白质氨基酸含量的影响

氨基酸种类 含量g/100g 干重 农药与 浓度	天冬氨酸 (Asp)	苏氨酸 (Thr)	丝氨酸 (Ser)	谷氨酸 (Glu)	甘氨酸 (Gly)	丙氨酸 (Ala)	缬氨酸 (Val)	蛋氨酸 (Met)	异亮氨酸 (Ile)	亮氨酸 (Leu)	酪氨酸 (Tyr)	苯丙氨酸 (Phe)	赖氨酸 (Lys)	精氨酸 (Arg)	脯氨酸 (Pro)	组氨酸 (His)	NH ₃	总含量 -NH ₃	总量 增减(%)	总 值	
CK	4.10	2.06	1.98	4.45	2.50	3.72	2.14	0.72	2.13	4.03	1.71	1.93	2.69	2.70	1.70	0.49	0.96	39.05			
γ -BHC 0.1 ppm	4.00	1.95	1.89	4.87	2.24	3.45	2.24	0.70	1.92	4.31	1.65	2.00	2.61	2.59	1.70	0.53	0.83	38.65	-1.02		
增减(%)	-2.4	-5.3	-4.5	9.4	-10.4	-7.3	4.7	-2.8	-9.9	6.2	-3.5	3.6	-3.0	-4.1	0	8.2	-13.5				
γ -BHC 1 ppm	4.27	1.97	2.06	5.35	2.59	3.09	2.32	0.76	1.97	4.07	1.77	1.97	2.73	2.69	1.68	0.57	1.12	39.86	2.05		
增减(%)	4.1	-4.4	4.0	20.0	3.6	-1.7	8.4	5.6	-7.5	0.24	3.50	1.6	1.5	-0.4	-2.3	20.4	16.3				
γ -BHC 10 ppm	4.34	2.20	2.07	5.70	2.64	3.35	2.28	0.77	2.25	4.25	1.76	2.01	2.85	2.64	1.61	0.33	1.09	41.05	5.12		
增减(%)	5.9	6.8	4.5	28.0	5.6	-9.9	6.5	8.2	5.6	4.7	2.9	4.1	5.9	-2.2	-5.30	-32.6	13.1				
$\bar{x} \pm s$	4.2 0.18	2.04 0.14	2.01 0.10	5.31 0.42	2.49 0.22	3.30 0.19	2.28 0.04	0.74 0.04	2.05 0.17	4.23 0.14	1.72 0.07	1.99 0.02	2.73 0.12	2.64 0.05	1.66 0.05	0.48 0.13			39.65 1.51		0.68
t	0.96	0.25	0.52	2.50	-0.08	-3.83	6.06	0.87	0.90	2.47	0.49	5.20	0.58	2.08	-1.47	-0.13					
p,p'-DDT 0.1 ppm	4.15	2.03	2.07	4.90	2.34	3.72	2.21	0.57	1.89	4.20	1.75	1.90	2.41	2.49	1.72	0.55	0.92	39.23	0.46		
增减(%)	1.2	-1.5	36.3	10.1	-6.4	0	3.3	-2.1	-11.3	3.9	2.3	-1.6	-10.4	-10.7	1.18	12.2	-4.16				
p,p'-DDT 1 ppm	4.35	2.21	2.09	5.71	2.63	3.49	2.39	0.72	2.26	4.22	1.83	2.18	2.71	2.30	1.67	0.44	1.05	41.20	5.05		
增减(%)	6.1	7.3	5.6	2.8	5.2	6.2	11.7	0	6.1	3.9	7.0	12.9	0.74	-14.8	-0.3	-10.2	9.4				
p,p'-DDT 10 ppm	5.17	2.14	2.63	5.62	2.52	3.69	3.25	0.72	0.22	4.11	1.94	1.87	2.91	2.78	1.60	0.56	0.97	43.83	12.2		
增减(%)	26.1	3.8	32.8	26.2	0.8	0.8	5.1	0	4.2	1.2	13.4	-3.10	8.2	3.0	-5.9	14.2	1.0				
$\bar{x} \pm s$	4.56 0.54	2.13 0.09	2.47 0.31	5.41 0.44	2.49 0.15	3.63 0.13	2.61 0.56	0.67 0.09	2.21 0.20	4.18 0.06	1.84 0.10	1.98 0.17	2.68 0.25	2.52 0.24	1.66 0.06	0.52 0.07			41.49 2.11		2.00
t	1.48	1.35	2.65	3.78	0.52	-1.20	1.45	0.96	0.09	4.33	2.25	0.51	0.07	1.30	-1.15	0.74					

表 2 γ -BHC 和 P,p'-DDT 对小球藻游离氨基酸含量的影响

氨基酸种类 含量 mg/g (干重) 农药与 浓度	天冬氨酸 (Asp)	苏氨酸 (Thr)	丝氨酸 (Ser)	谷氨酸 (Glu)	甘氨酸 (Gly)	丙氨酸 (Ala)	缬氨酸 (Val)	蛋氨酸 (Met)	异亮氨酸 (Ile)	亮氨酸 (Leu)	酪氨酸 (Tyr)	苯丙氨酸 (Phe)	赖氨酸 (Lys)	精氨酸 (Arg)	脯氨酸 (Pro)	组氨酸 (His)	NH ₃	总含量 -NH ₃	总量增减 %	总 值 ±s
CK	0.12	0.20	0.40	0.34	0.45	2.26	0.78	0.04	0.32	0.39	0.18	0.23	0.12	0.19	1.32		4.20	7.34		
γ -BHC 0.1ppm	0.17	0.23	0.41	0.37	0.49	1.63	0.97	0.06	0.32	0.35	0.19	0.24	0.15	0.21	1.53		4.06	7.36	0.23	
增减(%)	41.6	15.0	2.5	8.8	8.9	-27.8	14.1	4.0	12.5	-10.2	5.5	4.3	25.0	10.5	15.9		-3.3			
γ -BHC 1ppm	0.31	0.28	0.46	0.57	0.72	2.22	1.65	0.07	0.35	0.41	0.21	0.30	0.21	0.27	1.73		3.83	9.76	32.9	
增减(%)	158.3	40.0	15.0	67.6	60.0	-0.9	111.5	75.0	9.4	5.1	16.7	30.4	75.0	42.1	31.0		-8.80			
γ -BHC 10ppm	0.55	0.30	0.47	0.49	0.72	2.41	2.36	0.08	0.52	0.52	0.25	0.31	0.46	0.36	1.83		3.72	10.95	49.1	
增减(%)	358.3	50.0	17.5	44.1	60.0	6.63	202.6	95.0	0	33.3	38.9	34.8	28.3	89.5	38.6		-11.42			
±s	0.34 ±0.10	0.27 ±0.04	0.45 ±0.03	0.48 ±0.10	0.64 ±0.14	2.08 ±0.14	1.66 ±0.69	0.07 ±0.01	0.34 ±0.02	0.42 ±0.09	0.21 ±0.03	0.28 ±0.04	0.27 ±0.16	0.28 ±0.08	1.70 ±0.15					9.36 ±1.83
t	3.80	3.03	2.89	2.42	2.35	-2.23	2.21	5.20	1.73	0.58	1.73	2.17	1.62	1.95	4.34					1.92
P,p'-DDT 0.1 ppm	0.19	0.18	0.42	0.31	0.41	1.80	0.87	0.07	0.30	0.43	0.17	0.20	0.14	0.19	1.78		4.07	7.45	1.50	
增减(%)	58.3	-10.0	5.0	-8.8	-11.1	-20.3	11.5	75.0	-6.3	10.25	-5.6	-13.0	16.7	0	34.8		-3.10			
P,p'-DDT 1ppm	0.38	0.37	0.46	0.44	0.74	2.20	1.16	0.07	0.33	0.58	0.27	0.34	0.33	0.31	1.75		4.02	9.53	29.8	
增减(%)	216.7	85.0	15.0	29.4	64.4	-11.5	38.0	80.0	3.12	48.7	50.0	47.8	91.8	63.1	32.6		-4.3			
P,p'-DDT 10ppm	0.51	0.44	0.52	0.44	0.86	1.54	2.27	0.08	0.55	0.58	0.35	0.46	0.36	0.44	1.98		3.5	11.42	55.5	
增减(%)	325.0	140.0	30.0	29.4	91.1	-31.9	191.0	103.0	72.0	49.0	94.4	100.0	200.0	132.0	38.0		-16.7			
±s	0.36 ±0.16	0.34 ±0.15	0.47 ±0.02	0.40 ±0.08	0.67 ±0.23	1.78 ±0.23	1.43 ±0.74	0.70 ±0.01	0.39 ±0.14	0.53 ±0.09	0.26 ±0.09	0.33 ±0.13	0.28 ±0.12	0.31 ±0.13	1.84 ±0.13					9.47 ±1.99
t	2.00	1.62	2.42	1.30	1.67	-3.61	1.50	5.54	0.87	2.7	1.54	1.33	2.31	1.60	6.93					1.85

可能是小球藻在低浓度有机氯农药的短时间处理下有刺激作用,致使氨基酸含量有所增加。

3. 用不同浓度的 γ -BHC 和 p,p'-DDT 处理后,小球藻体内游离氨基酸所含种类与对照组无差别。在所有处理组中,各种氨基酸,除丙氨酸外,基本上都有所增加。其中蛋氨酸($t = 5.20$ 及 $t = 5.40$)、脯氨酸($t = 4.34$ 及 $t = 6.93$)、天冬氨酸($t = 3.80$ 及 $t = 2.00$)、丝氨酸($t = 2.89$ 及 $t = 2.42$)、谷氨酸($t = 2.42$ 及 $t = 1.32$),增加较为明显,而脯氨酸增加尤为显著。当植物处于不良环境时,如污染物、干旱、盐渍、低温、微生物感染等,往往可引起游离脯氨酸增加^[4]。Godzik 等^[6]用 SO_2 处理蚕豆及 Soldafini 等^[12]用亚硫酸盐处理小球藻,使游离脯氨酸大量增加,而丙氨酸即明显下降($t = -2.23$ 及 $t = -3.61$),它可能已转化为其他氨基酸。从统计学分析,上述几种游离氨基酸都与对照组有明显的差异。除游离脯氨酸外,其总的变化趋势与蛋白质氨基酸变化相似。但游离氨基酸的总含量,0.1 ppm 组与对照组相比相差不大,而 1ppm 和 10ppm 二组分别高于对照组 32.9%,49.1% 和 29.8%,55.5%。从统计学分析, γ -BHC 的总 t 值=1.92,而 p,p'-DDT 的总 t 值=1.85,也有一定差异性。这说明用一定剂量 DDT, BHC 处理小球藻,可刺激其游离氨基酸含量的增加,而且在一定浓度范围内,随着浓度增加游离氨基酸也相应增多。同时,游离氨基酸的增加比蛋白质氨基酸为多,这也说明游离氨基酸在外界刺激作用下,反应较为敏感,有较强的生理活性,是重要的毒理学指标。

4. 从上述情况分析,以不同浓度 DDT, BHC 处理小球藻,其蛋白质氨基酸及游离氨基酸的含量,除 0.1ppm 的 γ -BHC 组与对照组相差不大外,其它各组的氨基酸均比对照组增加,说明经过低剂量的 BHC, DDT, 在短时间处理后,氨基酸含量增多。Thaker 等^[13]用 10—30ppm 的, p,p'-DDT 和 γ -BHC, 分别处理玉米,发现其主要氨基酸(精氨酸、组氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、酪氨酸),均比对照增加,而氨基酸的总含量也相应增加,认为有一定刺激作用。Czeczuga 等^[7],用 1, 2, 5, 10, 25ppm 的 DDT 处理小球藻,30 天后,其氨基酸的含量与对照组相比变化不大,而 10—25ppm 范围内,则氨基酸含量有所下降,说明在长时间较高的浓度处理下,对氨基酸含量产生抑制作用。Loosanoff 等^[9]和 Christie 等^[6]分别用 1ppm 的 γ -BHC 和 0.01—10ppm 的 DDT 处理小球藻,未见受到影响,林毅雄等^{[3],1)}用 0.1—1 ppm DDT, BHC 处理小球藻;也未影响其生长量、色素含量、荧光强度及富集作用等。因此,利用小球藻处理有机氯农药 (DDT, BHC) 污水,其浓度范围控制在 1ppm 以下较为合适。

我们在系统地研究汉沽污水库中藻类对于 BHC, DDT 的净化作用时发现, DDT 和 BHC 的平均含量分别为 0.003—0.001ppm 和 0.03—0.04ppm, 因此,小球藻在该污水库中生长不受影响,也不发生毒性反应,并且对有机氯农药的污水起了一定净化作用。

参 考 文 献

[1] 王渊源, 1984. 常用海产植物性活饵料氨基酸的测定. 海洋学报 6(4): 505—511.

1) 林毅雄, 王杏君, 1980. 汉沽污水库生物净化效应 (1) DDT 对小球藻生长量, 叶绿素含量及荧光强度的影响. 中国科学院环境化学研究所科学成果汇编.

- [2] 吕芝香、沈恒冠、张增耀, 1981. 在淡水和海水中大米草 (*Spartina anglica* Hubbed) 种子萌发及其游离氨基酸成分的比较. 植物生理学报 7(3): 281—286.
- [3] 林毅雄, 1984. 莱因衣藻 (*Chlamydomonas reinhardi* Dang) 和小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beij) 对丙体-666 的富集和降解的研究. 中国环境科学 4(2): 15—18.
- [4] 汤章城, 1984. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义. 植物生理学通讯 4: 12—21.
- [5] Alsopp, A. D., 1948. Chromatographical study of meristematic plant tissues. *Nature* 161: 833—835.
- [6] Chistie, A. E., 1969. Effect of insecticides on algae. *Water Sewage Works* 116(5): 172.
- [7] Czacuga, B. and M. Gierimow, 1973. Influence of certain pesticides on microorganisms: Influence of DDT on the synthesis of the particular amino acids in *Chlorella vulgaris* and *Anabaena cylindrica*. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 21(11): 751—757.
- [8] Godzik, S. and H. F. Linskens, 1974. Concentration change of free amino acids in primary bean leaves after continuous and interrupted SO₂ fumigation and recovery. *Environ. Poll.* 7(1): 25—38.
- [9] Loosanoff, V. L., J. E. Hanks and A. E. Ganaron, 1957. Control of certain forms of Zooplankton in mass algae cultures. *Science* 125: 1092.
- [10] Ohara, I. and A. Ablyoshi, 1979. Comparison of protein precipitants for the determination of free amino acids in plasms: *Agric. Biol. Chem.* 43(7): 1473—1478.
- [11] Rabe, R. and K. H. Kreeb, 1979. Enzyme activities and chlorophyll and protein content plant as indication of air pollution. *Environ. Poll.* 19(2): 119—137.
- [12] Soldatini, G. F., I. Ziegler and H. Ziegler, 1978. Sulfite: Preferential sulfur source and modifier of CO₂ fixation in *Chlorella vulgaris*. *planta* 142(2): 225—231.
- [13] Steward, F. C., 1955. The nitrogenous components of the shoot apex of *Adiantum Pedatum*. *Am. Jour. Botang.* 43(4): 946—948.
- [14] Strassman, M., L. Locke and L. A. Thomas, 1956. A study of leucine Biosynthesis in the *Touloopsis utilis*. *Am. Chem. Soc* 78(4): 1599—1602.
- [15] Thakre, S. K. and S. N. Saxena, 1972. Effect of soil application of chlorinated insecticides on amino acids composition of maize (*Zea mays*). *Plant and Soil* 37(2): 415—418.

THE EFFECT OF DDT AND BHC ON THE AMINO ACIDS CONTENT OF *CHLORELLA VULGARIS* BEIJ

Lin Yixiong

(*Institute of Environmental Chemistry, Academia Sinica, Beijing*)

ABSTRACT

This paper deals with the effect of DDT and BHC on amino acids content in *Chlorella vulgaris* Beij so as to provide theoretical basis for environmental bio-engineering and biological monitoring.

Experimental results show that the treatment with 0.1 ppm concentration of DDT and BHC gave not much effect on amino acids content. However, after being treated with 1—10 ppm of DDT and BHC, the amino acids contents increased, it may be due to lower concentration of DDT and BHC having stimulated free amino acids and protein amino acids, but the free amino acids increased faster than protein amino acid. There is no much various on the kinds of amino acids after treating by 0.1—10 ppm DDT and BHC respectively.