

网络出版时间:2018-03-09 17:09

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.07.009

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180309.1708.018.html>

# 不同 pH 下碱性磷酸酶对 As(V) 污染的响应

赵翊明, 王紫泉, 田海霞, 和文祥, 李道恒

(西北农林科技大学 资源环境学院, 农业部西北植物营养与农业环境重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】分析不同 pH 下砷(As(V))对碱性磷酸酶活性的影响,为砷污染监测提供理论依据。【方法】采用室内模拟方法,研究不同 pH 条件下不同状态(游离态、固定态、土壤)碱性磷酸酶活性与砷污染之间的关系。【结果】同一 As(V)质量浓度下,pH 为 7.0~10.0 时,碱性磷酸酶活性逐渐增大。As(V)明显抑制碱性磷酸酶活性,其对游离态碱性磷酸酶的抑制幅度最大,对土壤碱性磷酸酶抑制幅度最小。砷对碱性磷酸酶的毒性随 pH 升高而增强。砷质量浓度(C)与碱性磷酸酶活性(E)之间的关系可以用模型  $E=A/(1+B\times C)$ (A,B 为系数)较好表征,揭示出在供试 pH 范围内碱性磷酸酶在一定程度上均可作为砷污染程度评价指标,且砷对碱性磷酸酶的作用机理为完全抑制作用。与游离态碱性磷酸酶相比,固定态及土壤碱性磷酸酶对砷敏感度降低,pH 10.0 条件下游离态、固定态及土壤碱性磷酸酶临界生态剂量值分别为 2.60,13.48 和 20.40 mg/kg,远低于国家《土壤环境质量标准》(1995 年)中砷的三级污染临界值。【结论】碱性磷酸酶可作为砷污染的监测指标,其对砷污染程度的反应更加灵敏;砷污染条件下,酶载体土壤起到了缓冲作用和保护作用,最终改变了砷的生物毒性。

**【关键词】** 碱性磷酸酶;As(V);pH;生态剂量

**【中图分类号】** S154.2

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2018)07-0066-07

## Response of alkaline phosphate to arsenic(V) at different pH

ZHAO Yiming, WANG Ziquan, TIAN Haixia, HE Wenxiang, LI Daoheng

(College of Resource and Environment, Northwest A&F University, Key Laboratory of Plant Nutrition and the Agri-Environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 Effects of As(V) on activity of alkaline phosphatase at different pH were analyzed to provide basis for monitoring arsenic pollution. 【Method】 In this study, the relationship between arsenic pollution and activities of alkaline phosphatase at different states (F-ALP, M-ALP and S-ALP) at different pH was investigated using indoor simulation method. 【Result】 At the same concentration of As(V), the activity of ALP gradually increased with the increase of pH during 7.0–10.0. As(V) significantly inhibited the activity of ALP with the largest on F-ALP and the smallest on S-ALP. The toxicity of arsenic on ALP increased with the increase of pH. The model  $E=A/(1+B\times C)$  (A and B are coefficients) fitted well in the relationship between enzymatic activities (E) and arsenic concentration (C). ALP activity could be a good bioindicator for arsenic pollution within the studied range of pH. The sensitivity of M-ALP and S-ALP to arsenic was lower than F-ALP. The threshold concentration of As pollution at pH 10.0 for F-ALP, M-ALP, S-ALP were 2.60, 13.48 and 20.40 mg/kg, respectively, which were lower than the third standard of Environmental Quality Standard for soils(1995). 【Conclusion】 Alkaline phosphatase could be

【收稿日期】 2017-04-21

【基金项目】 国家自然科学基金项目(“土壤酶对 As(III)、As(V)毒性转化的响应机制及主要控制因素研究”(41571245),“好氧砷还原菌 *Pantoea* sp. IMH 对吸附态砷迁移转化的调控机理”(41603116))

【作者简介】 赵翊明(1991—),女,山西太原人,在读硕士,主要从事土壤生态毒理研究。E-mail:18734167562@163.com

【通信作者】 和文祥(1968—),男,陕西黄龙人,教授,博士生导师,主要从事土壤生物化学和生态毒理研究。

E-mail:wenxiang.he@nwfau.edu.cn

used an index to monitor arsenic pollution. Under arsenic pollution, enzyme carriers played a role of buffering and protection, and changed the biological toxicity of arsenic.

**Key words:** alkaline phosphatase; As(V); pH; ecological dose

砷是自然界丰度排第 20 位的具有较强毒性和致癌作用的类金属元素<sup>[1]</sup>, 被称为土壤五大污染元素之一。自然界中超过 245 种矿物中含有砷, 人类活动, 如采矿、化石燃料燃烧、农药使用等都会造成环境砷污染<sup>[2]</sup>。目前我国受砷、镉、铅等污染耕地近  $2.0 \times 10^7$  hm<sup>2</sup>, 占耕地总面积的 20% 以上<sup>[3-4]</sup>, 其中尤以云南、内蒙古、湖南等地最严重, 如湖南石门县雄黄矿附近土壤砷含量最高达 296 mg/kg<sup>[5]</sup>。砷在土壤中主要以无机离子形态存在, 主要有 As(V) 与 As(III) 两种价态, 其中 As(III) 比 As(V) 生物毒性更强<sup>[6-7]</sup>。在自然环境中, 氧化还原电位 (Eh) 和酸碱度 (pH) 是影响砷存在价态的主要因素<sup>[8-9]</sup>; 当  $\text{pH} + \text{pE} > 10$  或  $< 8$  时, As(V) 和 As(III) 分别成为环境中的主要形态<sup>[1-10]</sup>。同时, 由我国《土壤环境质量标准》(1995 年) 中可以看出, 碱性条件下土壤的砷污染临界值小于酸性条件下, 砷的毒性更强。

土壤酶是具有催化能力的土壤组分中最为活跃的成分之一, 它参与土壤物质循环和能量代谢, 是土壤中重要的生物活性指标。磷酸酶是土壤磷循环中的重要酶类, 可水解有机磷为无机磷, 为作物生长提供有效磷。依据最适 pH 不同, 磷酸酶可分为酸性、中性和碱性磷酸酶。近年来, 国内外学者对砷污染的酶效应进行了研究, 结果总体表现为抑制、激活及不变 3 种规律<sup>[6, 11-14]</sup>。可见由于供试样品、砷价态等条件不同, 造成研究结果不尽一致, 难以相互比较。此外, 大多数研究直接利用土壤酶完成, 鲜有采用不同状态酶进行重金属污染的研究, 很难深入探讨砷与酶的作用机理; 加之, pH 是影响砷价态与毒性的主要因素之一, 特别是在碱性 pH 条件下, 砷的生物毒性更强, 但其如何影响砷与酶之间的关系却鲜见报道。鉴于此, 本试验拟在不同 pH 条件下, 研究不同状态(游离态、固定态、土壤)碱性磷酸酶活性与砷污染之间的关系, 揭示碱性磷酸酶活性与砷污染及 pH 的关系, 探明不同条件下砷对酶的作用机理, 为判断砷污染程度、评价土壤质量及完善土壤酶理论提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 游离态和固定态碱性磷酸酶的制备

碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphate, ALP) 储备液

制备: 称取碱性磷酸酶 (购自 Sigma 公司, 酶活性  $\geq 10$  EDA) 0.150 0 g, 溶于 pH 8.8 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 定容, 最终酶质量浓度为 3 mg/mL, 于 4 °C 冰箱保存备用。使用时分别将储备液稀释成游离态碱性磷酸酶 (Free ALP, F-ALP) 溶液 (0.03 mg/mL) 以及 M 工作液 (0.06 mg/mL)。

固定态碱性磷酸酶 (Immobilized ALP by montmorillonite, M-ALP) 制备: 取游离态碱性磷酸酶 M 工作液 2 mL, 加入 10 mg/mL 蒙脱石 ((Al, Mg)<sub>2</sub>[Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub>](OH)<sub>2</sub> · nH<sub>2</sub>O, AR) 悬液 2 mL, 25 °C、250 r/min 振荡 2 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 取沉淀物用 pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液离心洗涤 3 次后, 用 4 mL pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液重新悬浮, 充分分散后得固定态碱性磷酸酶, 于 4 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 供试土壤

采自我国内蒙古自治区未污染农田土壤 (41° 20' N, 109° 50' E) 的栗钙土 (Calci-Ustic Isohumosols)。采样时先去除表层 (0~5 cm) 土, 用五点采样法取 5~20 cm 土层土样, 混匀风干, 过孔径 1 mm 尼龙筛备用。土壤理化性质<sup>[15]</sup>为: 有机质含量 16.30 g/kg, pH 8.80 (水土体积质量比 2.5:1), 全氮含量 0.96 g/kg, 全磷含量 0.38 g/kg, 全钾含量 26.40 g/kg, 速效磷含量 7.01 mg/kg, 速效钾含量 177.99 mg/kg, 阳离子交换量 11.61 cmol/kg, 黏粒含量 10.51%, 总砷含量 0.17 mg/kg (测定砷含量时加入 2 个国家标准土壤样品 GSS 9 和 GSS 10 进行质量控制。GSS 9 和 GSS 10 的标准 As 含量分别为 (8.4 ± 1.3), (8.9 ± 0.9) mg/kg, 本试验测得的结果分别为 8.27 和 9.02 mg/kg)。

### 1.3 不同 pH 下游离态、固定态碱性磷酸酶对 As(V) 污染响应的试验方案

吸取 0.2 mL F-ALP 或 M-ALP 溶液, 分别添加 0.2 mL 不同质量浓度 (0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mg/L) As(V) 溶液 (配制砷溶液采用的砷化合物试剂为 Na<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>, 化学纯), 污染 30 min 后分别添加 pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的 0.005 mol/L 磷酸苯二钠底物缓冲溶液 2 mL, 摇匀后于 37 °C 培养, 在 510 nm 下用比色法测定酶活性<sup>[16]</sup>, 同时用 pH 计电极法测定溶液的 pH, 用 pH 计铂电极直接测定

法测定溶液的 Eh。游离态、固定态碱性磷酸酶活性分别以 1 h 内单位 ALP( $\mu\text{g}$ )、蒙脱石(mg)产生的酚量( $\mu\text{g}$ )表示。

#### 1.4 不同 pH 下土壤碱性磷酸酶对 As(V) 污染响应的试验方案

称取土样 3.00 g 于 50 mL 三角瓶中,添加 0.15 mL 甲苯,15 min 后分别加入 3 mL 不同质量浓度(0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mg/L) As(V) 溶液,污染 30 min 后分别添加 pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的 0.5% 磷酸苯二钠底物缓冲溶液 20 mL,充分振荡后于 37 °C 培养,测定土壤碱性磷酸酶(Soil ALP, S-ALP)活性、pH 和 Eh。土壤碱性磷酸酶活性以 1 h 内单位干土(g)产生的酚量( $\mu\text{g}$ )表示。

酶活性抑制率 = (1 - 处理酶活性/对照酶活性) × 100%。

$$pE = n \times F \times Eh / (2.303 \times R \times T)$$

式中: $n$  为电子转移数; $F$  为法拉第常数,其值为 6.564 kJ/V; $Eh$  为氧化还原电位; $T$  为绝对温度; $R$  为气体常数,其值为 8.314 J/(mol · K)。

#### 1.5 数据处理

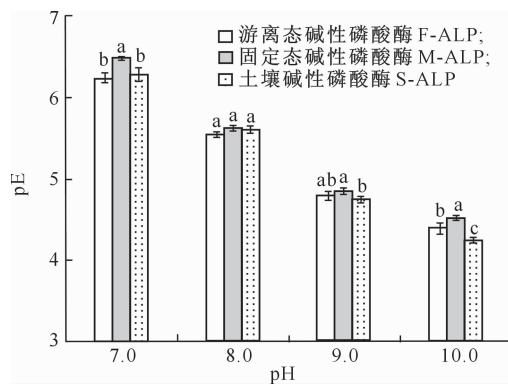
采用 Microsoft Excel 2007、Origin Pro 8.5 和 SPSS 19.0 软件对试验数据进行分析及模型拟合,LSD 法对各处理间差异进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 碱性磷酸酶对 As(V) 污染响应过程中 pE 的影响

不同 pH 下碱性磷酸酶对 As(V) 污染响应过程中 pE 的影响见图 1。从图 1 可以看出,pE 随 pH

升高而减小,除 pH 10.0 时 3 种碱性磷酸酶 pE 差异达到显著水平外,其余 pH 条件下不同状态碱性磷酸酶之间 pE 值差异较小。pH 10.0 时土壤碱性磷酸酶 pE 最小,为 4.24;pH 7.0 时固定态碱性磷酸酶 pE 最大,为 6.49,二者相差 1.53 倍。本试验中 pH+pE 为 13.24~14.39,当 pH+pE>10 时,环境中砷主要以 As(V) 存在<sup>[7]</sup>,故可判断本试验过程中砷并未发生还原反应,均以五价存在。



图柱上标不同小写字母表示相同 pH 下不同体系的 pE 差异显著( $P < 0.05$ )

Different lowercase letters mean significant difference at  $P < 0.05$

图 1 不同 pH 下碱性磷酸酶对 As(V) 污染响应过程中 pE 的影响

Fig. 1 Effects of pH on pE in the response of ALP to As(V) pollution

### 2.2 砷污染下碱性磷酸酶活性的响应

选取 pH 10.0 为代表,分析 As(V) 对 3 种碱性磷酸酶活性的影响,结果见表 1。

表 1 pH 10.0 下 As(V) 对碱性磷酸酶活性的影响

Table 1 Effect of As(V) on alkaline phosphatase activity at pH 10.0

As(V) 质量浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) As(V) concentrations	游离态碱性磷酸酶活性/ ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) F-ALP activity	固定态碱性磷酸酶活性/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) M-ALP activity	土壤碱性磷酸酶活性/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) S-ALP activity
0	32.08 ± 0.33 a	14.85 ± 0.10 a	97.09 ± 3.40 a
10	29.84 ± 0.19 b	14.58 ± 0.23 ab	98.57 ± 5.21 a
25	28.50 ± 0.39 b	14.28 ± 0.19 bc	96.07 ± 4.57 ab
50	26.82 ± 0.37 c	13.88 ± 0.11 c	94.98 ± 1.11 ab
100	22.77 ± 0.06 d	13.33 ± 0.13 d	87.00 ± 6.94 bc
200	18.25 ± 0.78 e	12.46 ± 0.35 e	83.40 ± 1.77 cd
300	15.53 ± 0.37 f	12.12 ± 0.13 ef	80.27 ± 1.65 cd
400	12.96 ± 0.79 g	11.76 ± 0.15 f	77.77 ± 1.92 d

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at  $P < 0.05$ .

从表 1 可以看出,砷加入导致碱性磷酸酶活性总体减小,表明砷抑制了 3 种碱性磷酸酶活性。砷

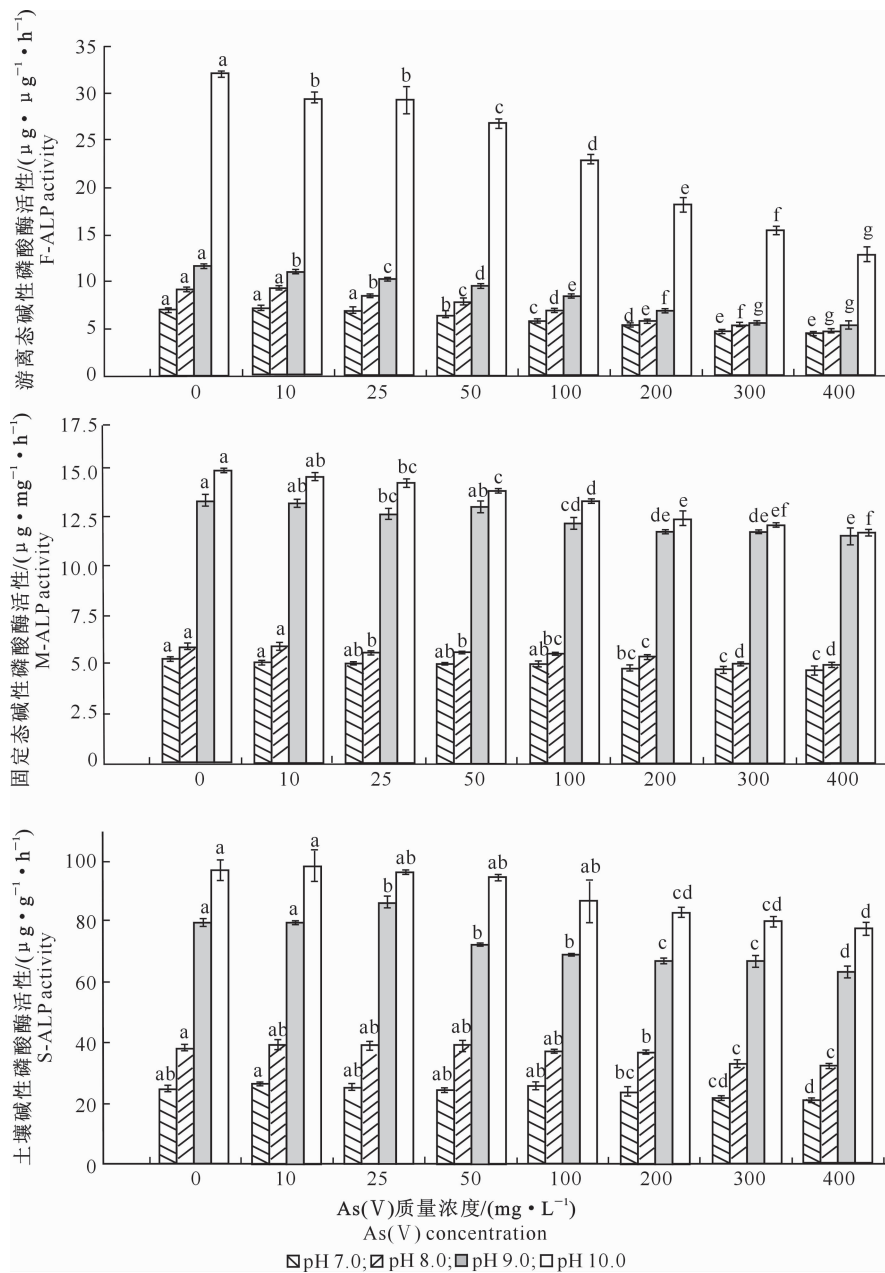
质量浓度较低(<10 mg/L)时,碱性磷酸酶活性表现出激活,但是与 CK 差异不显著。在相同质量浓

度下,砷对固定态碱性磷酸酶的影响小于游离态碱性磷酸酶,对土壤碱性磷酸酶的影响更小。当砷质量浓度为 400 mg/L 时,砷对游离态、固定态、土壤碱性磷酸酶的抑制率分别为 59.61%,20.81%,19.90%,可见 As(V) 污染下碱性磷酸酶活性降幅遵循土壤碱性磷酸酶<固定态碱性磷酸酶<游离态

碱性磷酸酶的规律性变化,表明载体对酶具有保护作用,同时可缓冲砷的毒性,揭示载体形态在酶与重金属关系研究中具有重要作用。

### 2.3 pH 对砷与碱性磷酸酶活性关系的影响

pH 对 As(V) 与碱性磷酸酶活性关系的影响见图 2。



图柱上标不同小写字母表示同一 pH 下 As(V) 浓度间不同碱性磷酸酶活性的差异显著 ( $P < 0.05$ )

Different lowercase letters on bars mean significant difference at  $P < 0.05$

图 2 pH 对 As(V) 与碱性磷酸酶活性关系的影响

Fig. 2 Effect of pH on the relationship of As(V) and alkaline phosphatase activity

从图 2 可以看出,砷未污染时,3 种碱性磷酸酶活性均随 pH 升高而增大,pH 10.0 时,游离态碱性磷酸酶、固定态碱性磷酸酶、土壤碱性磷酸酶活性分

别为 pH 7.0,8.0,9.0 时的 4.56,3.50,2.744 倍;2.79,2.47,1.11 倍;3.91,2.38,1.21 倍。砷污染条件下,3 种碱性磷酸酶活性也随 pH 升高而增加,其

中 pH 10.0 时游离态碱性磷酸酶活性明显高于 pH 为 9.0, 8.0, 7.0, pH 10.0, 9.0 时固定态碱性磷酸酶、土壤碱性磷酸酶活性明显高于 pH 为 8.0, 7.0。砷对碱性磷酸酶活性的抑制率随 pH 增加而增大, 即砷对碱性磷酸酶的毒性随 pH 的升高而增大, 例如砷质量浓度达到 200 mg/L 时, 游离态碱性磷酸酶活性在 pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 时的抑制率分别为 21.07%, 35.01%, 40.46%, 43.11%; 固定态碱性磷酸酶活性在 pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 时的抑制率则分别为 8.36%, 9.69%, 11.88%, 16.11%; 土壤碱性磷酸酶活性在 pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 时的抑制率分别为 3.62%, 9.11%, 15.89%, 14.10%。

采用完全抑制模型  $E=A/(1+B\times C)$  对不同碱性磷酸酶活性( $E$ )与砷质量浓度( $C$ )之间关系进行拟合, 结果(表 2)显示, 拟合模型的决定系数均达到

表 2 不同 pH 下碱性磷酸酶活性( $E$ )与砷质量浓度( $C$ )之间关系的拟合结果

Table 2 Regression equations between alkaline phosphatase activities( $E$ ) and As concentrations( $C$ )

酶状态 Enzyme	pH	拟合方程 Regression equation	$R^2$	生态剂量/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Ecological dose( $\text{ED}_{10}$ )
游离态碱性磷酸酶 F-ALP	7.0	$E=7.14/(1+1.78\times 10^{-2}\times C)$	0.989**	6.24
	8.0	$E=9.18/(1+2.96\times 10^{-2}\times C)$	0.976**	3.75
	9.0	$E=11.34/(1+3.76\times 10^{-2}\times C)$	0.996**	2.96
	10.0	$E=31.39/(1+4.28\times 10^{-2}\times C)$	0.997**	2.60
固定态碱性磷酸酶 M-ALP	7.0	$E=5.19/(1+3.13\times 10^{-3}\times C)$	0.880**	35.50
	8.0	$E=5.91/(1+5.67\times 10^{-3}\times C)$	0.904**	19.60
	9.0	$E=13.05/(1+4.50\times 10^{-3}\times C)$	0.829**	24.69
	10.0	$E=14.52/(1+8.24\times 10^{-3}\times C)$	0.938**	13.48
土壤碱性磷酸酶 S-ALP	7.0	$E=25.81/(1+3.97\times 10^{-3}\times C)$	0.835**	27.99
	8.0	$E=40.09/(1+4.70\times 10^{-3}\times C)$	0.939**	23.64
	9.0	$E=76.75/(1+4.33\times 10^{-3}\times C)$	0.797**	25.66
	10.0	$E=97.24/(1+5.44\times 10^{-3}\times C)$	0.943**	20.40

注: \*\* 表示相关性达极显著水平( $P<0.01$ )。下表同。

Note: \*\* indicates the correlation reached the extremely significant level at  $P<0.01$ . The same below.

## 2.4 砷与环境条件对碱性磷酸酶活性的交互作用

为探讨 pH、pE、砷等因素对碱性磷酸酶活性的影响, 对其进行了方差分析, 结果(表 3)可见, 砷质量浓度、pH+pE 均极显著影响 3 种碱性磷酸酶活

性, 且两因素间存在极显著的交互作用, 即最终的碱性磷酸酶活性是由砷与其 pH、Eh 等因素共同决定的, 这也从侧面反映出研究砷对碱性磷酸酶活性影响时需充分考虑 pH、Eh 的影响。

表 3 pH、pE 和砷对碱性磷酸酶活性影响的方差分析

Table 3 ANOVA analysis of alkaline phosphatase activity in tested samples

因子 Factor	F 值 F value		
	游离态碱性磷酸酶 F-ALP	固定态碱性磷酸酶 M-ALP	土壤态碱性磷酸酶 S-ALP
pH+pE	9 841.76**	15 199.98**	4 721.58**
砷质量浓度 As concentration	706.56**	139.07**	54.78**
(pH+pE)×砷质量浓度 (pH+pE)×As concentration	145.50**	19.64**	6.86**

## 3 讨论

本研究中, 碱性磷酸酶活性随 pH 的升高而增

大。由于本试验中采用碱性磷酸酶的最适 pH 为 9.8, pH 为 10.0 时几乎达到了其最适条件, 故其活性显著大于其余 pH 条件下。pH 9.0 时固定态碱

性磷酸酶活性已明显高于 pH 7.0 和 8.0 时,表明固定态碱性磷酸酶相对于游离态碱性磷酸酶对 pH 敏感程度降低。这可能是由于,一方面蒙脱石和土壤对 pH 的变化具有一定的缓冲性;另一方面当酶被固定在蒙脱石上后,pH 对酶活性特征的影响发生了变化<sup>[17]</sup>。对黏土矿物固定态酸性磷酸酶及  $\beta$ -葡萄糖苷酶等的研究也证实了固定态酶能够降低 pH 的敏感程度<sup>[18-19]</sup>。土壤碱性磷酸酶活性随 pH 升高变化较为平缓。这是因为土壤系统更加复杂,土壤中碱性磷酸酶的最适 pH 为 8.0~10.0<sup>[20]</sup>,土壤碱性磷酸酶活性受土壤性质影响较大,导致其对 pH 的敏感程度较游离态或者单一蒙脱石固定态酶活性小。

本研究结果显示,砷污染抑制了碱性磷酸酶活性,且抑制率随 pH 升高而增大,表明 pH 升高,砷对碱性磷酸酶的毒性增大。此外,ED<sub>10</sub> 随 pH 升高而减小,也证实 pH 是影响砷毒性的因子。随 pH 升高,砷酸盐存在形态从近中性条件下的一价阴离子向强碱性条件的三价阴离子转变,这种变化导致砷在溶液中移动能力增强,更容易与碱性磷酸酶结合,从而导致对酶的抑制增强。重金属对酶活性的抑制主要通过酶活性中心结合阻止底物与酶反应,或者改变酶的构象,或者与底物反应等方式产生作用。砷对碱性磷酸酶的抑制为竞争性抑制,砷酸盐与磷酸盐结构相似,砷通过与酶活性中心结合阻止了酶-底物复合物形成而对其活性产生抑制<sup>[10]</sup>。有研究显示,砷对碱性磷酸酶的抑制常数( $K_i$ )小于米氏常数( $K_m$ ),表明相同砷质量浓度下,砷与碱性磷酸酶的结合能力要强于底物与其结合的能力<sup>[21]</sup>。pH 升高,砷与碱性磷酸酶的结合能力增强,从而导致砷对碱性磷酸酶的抑制增强。

本研究结果显示,砷对不同状态下碱性磷酸酶活性抑制率表现为,游离态碱性磷酸酶>固定态碱性磷酸酶>土壤碱性磷酸酶;同时,ED<sub>10</sub> 也表现出同样的规律。揭示了固定态或土壤碱性磷酸酶对砷的敏感度降低,蒙脱石和土壤对碱性磷酸酶的固定能够降低砷对碱性磷酸酶的毒性。蒙脱石、土壤对酶有吸附固定的作用,这种作用可以提高酶对外界环境胁迫的稳定性,使酶对外界胁迫的敏感度降低<sup>[18-19]</sup>,即酶对砷的敏感度降低。类似研究也发现,针铁矿和氧化锰矿物固定后的酸性磷酸酶对 Cu 的敏感度降低<sup>[22]</sup>;Cu 胁迫下,针铁矿对  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有保护效应,其原因是针铁矿对 Cu 有较强的吸附<sup>[23]</sup>。同时,黏土矿物、土壤等载体有巨大的表面

积及表面能,对砷有较强的吸附作用<sup>[1,2,10]</sup>,并且对 As(V) 的吸附要强于 As(III)<sup>[10]</sup>。在氧化条件下,As(V) 是稳定存在的形态,其可以强烈吸附于黏土矿物、铁锰氧化物(氢氧化物)及有机质中<sup>[1]</sup>,在一定程度上缓解砷对酶活性的毒性<sup>[24]</sup>,起到了对酶的保护作用。

## 4 结 论

砷对碱性磷酸酶活性的抑制作用随 pH 升高而增大,砷毒性增强。模型  $E=A/(1+B \times C)$  可较好地表征砷质量浓度(C)与碱性磷酸酶活性(E)之间的关系。在供试 pH 范围内,碱性磷酸酶在一定程度上可作为表征环境中砷污染的指标,并反映出其间的作用机理为完全抑制作用。3 种状态碱性磷酸酶 ED<sub>10</sub> 值均远低于国家《土壤环境质量标准》(1995 年)中砷的三级污染临界值,揭示碱性磷酸酶是较为灵敏的砷污染评价指标。砷对固定态及土壤碱性磷酸酶活性的抑制率小于游离态碱性磷酸酶。酶固定介质土壤对砷的毒性具有缓冲作用,对酶活性具有保护效应。

## [参考文献]

- [1] Mandal B, Suzuki K. Arsenic round the world: a review [J]. *Talanta*, 2002, 58(1): 201-235.
- [2] Bissen M, Frimmel F H. Arsenic-a review: part I. occurrence, toxicity, speciation, mobility [J]. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 2003, 31(1): 9-18.
- [3] 骆永明, 滕 应. 我国土壤污染退化状况及防治对策 [J]. *土壤*, 2006, 38(5): 505-508.  
Luo Y M, Teng Y. Status of soil pollution degradation and countermeasures in China [J]. *Soils*, 2006, 38(5): 505-508.
- [4] 曾希柏, 徐建明, 黄巧云, 等. 中国农田重金属问题的若干思考 [J]. *土壤学报*, 2013, 50(1): 186-194.  
Zeng X B, Xu J M, Huang Q Y, et al. Some deliberations on the issues of heavy metals in farmlands of China [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(1): 186-194.
- [5] 李圣发, 王宏镛. 土壤砷污染及其修复技术的研究进展 [J]. *水土保持研究*, 2011, 18(4): 248-253.  
Li S F, Wang H B. Advances in the study of arsenic-contaminated soil and its remediation technology [J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2011, 18(4): 248-253.
- [6] Wang Q, He M, Wang Y. Influence of combined pollution of antimony and arsenic on culturable soil microbial populations and enzyme activities [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(1): 9-19.
- [7] Lee B T, Kim K W. Toxicokinetics and biotransformation of As(III) and As(V) in *eisenia fetida* [J]. *Human and Ecological Risk Assessment an International Journal*, 2013, 19(3): 792-806.

- [8] 蒋成爱,吴启堂,陈杖榴. 土壤中砷污染研究进展 [J]. 土壤, 2004,36(3):264-270.  
Jiang C A, Wu Q T, Chen Z L. Arsenic contamination in the soil [J]. Soils, 2004, 36(3): 264-270.
- [9] Beaulieu B T, Savage K S. Arsenate adsorption structures on aluminum oxide and phyllosilicate mineral surfaces in smelter-impacted soils [J]. Environmental Science & Technology, 2005,39(10):3571-3579.
- [10] Sharma V K, Sohn M. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation [J]. Environment International, 2009,35(4):743-759.
- [11] Ghosh A K, Bhattacharyya R, Pal R. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India [J]. Environment International, 2004,30(4):491.
- [12] 谢伟, 和文祥, 王紫泉, 等. 基于水分变化的砷抑制土壤碱性磷酸酶动力学特征研究 [J]. 环境科学学报, 2016, 36(5): 1816-1823.  
Xie W, He W X, Wang Z Q, et al. Kinetic characteristics of soil alkaline phosphatase inhibited by arsenic based on changes of soil moisture [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(5): 1816-1823.
- [13] 和文祥, 马爱生, 武永军, 等. 砷对土壤脲酶活性影响的研究 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(5): 895-898.  
He W X, Ma A S, Wu Y J, et al. Effect of arsenic on soil urease activity [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(5): 895-898.
- [14] Das S, Jean J S, Kar S, et al. Effect of arsenic contamination on bacterial and fungal biomass and enzyme activities in tropical arsenic-contaminated soils [J]. Biology & Fertility of Soils, 2012,49(6):757-765.
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1997:25-177.  
Bao S D. Analysis of soil agricultural chemistry [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1997: 25-177.
- [16] 关松荫. 土壤酶及其研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986: 309-313.  
Guan S Y. Soil enzyme and its research methods [M]. Beijing: Agriculture Press, 1986: 309-313.
- [17] Sedaghat M E, Ghiaci M, Aghaei H, et al. Enzyme immobilization: part 4. immobilization of alkaline phosphatase on Na-sepiolite and modified sepiolite [J]. Applied Clay Science, 2009, 46(2): 131-135.
- [18] Huang Q, Wei L, Peng C. Adsorption, desorption and activities of acid phosphatase on various colloidal particles from an Ultisol [J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2005, 45(3/4): 209-214.
- [19] Yan J, Pan G, Li L, et al. Adsorption, immobilization, and activity of  $\beta$ -glucosidase on different soil colloids [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 348(2): 565-570.
- [20] Frankenberger W T, Tabatabai M A. Amidase activity in soils: IV. effects of trace elements and pesticides [J]. Soil Science Society of American Journal, 1981, 45(6): 1120-1124.
- [21] Wang Z Q, Li Y B, Tan X P, et al. Effect of arsenate contamination on free, immobilized and soil alkaline phosphatases: activity, kinetics and thermodynamics [J]. European Journal of Soil Science, 2017, 68(1): 126-135.
- [22] Huang Q, Shindo H. Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32: 1885-1892.
- [23] Geiger G, Livingston M P, Funk F, et al.  $\beta$ -glucosidase activity in the presence of copper and goethite [J]. European Journal of Soil Science, 1998, 49(1): 17-23.
- [24] 华璐, 张国祥, 杨居荣, 等. 土壤对无机外源砷的缓冲动力学研究 [J]. 土壤学报, 1996(4): 337-343.  
Hua L, Zhang G X, Yang J R, et al. Buffering dynamics of soil to applied inorganic arsenic [J]. Acta Pedologica Sinica, 1996(4): 337-343.

(上接第 31 页)

- [42] Mao R, Raj K P, Guo C, et al. Comparative analyses between retained introns and constitutively spliced introns in *Arabidopsis thaliana* using random forest and support vector machine [J]. PLoS One, 2014, 9: e104049.
- [43] Jacob M, Gallinaro H T. The 5' splice site: phylogenetic evolution and variable geometry of association with U1RNA [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 2159-2180.
- [44] Brown J W, Simpson C G. Splice site selection in plant pre-mRNA splicing [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 77-95.
- [45] Lorkovic Z J, Kirk D A W, Lambermon M H L, et al. Pre-mRNA splicing in higher plants [J]. Trend Plant Sci, 2000, 5: 160-167.
- [46] Burdo B, Gray J, Goetting-Minesky M P, et al. The maize TFome-development of a transcription factor open reading frame collection for functional genomics [J]. Plant J, 2014, 80: 356-366.
- [47] Yin P, Fan H, Hao Q, et al. Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins [J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16: 1230-1236.
- [48] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors [J]. Science, 2009, 324: 1064-1068.
- [49] Park S Y, Fung P, Nishimura N, et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins [J]. Science, 2009, 324: 1068-1071.
- [50] Komatsu K, Suzuki N, Kuwamura M, et al. Group A PP2Cs evolved in land plants as key regulators of intrinsic desiccation tolerance [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2219.
- [51] Wang Y G, Yu H Q, Zhang Y Y, et al. Interaction between abscisic acid receptor PYL3 and protein phosphatase type 2C in response to ABA signaling in maize [J]. Gene, 2014, 549: 179-185.