

刘 聪, 许平平, 王 亚, 等. 不同氮磷浓度对蛋白核小球藻砷富集和转化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(9):1665–1671.

LIU Cong, XU Ping-ping, WANG Ya, et al. Effects of various nitrogen and phosphorus concentrations on arsenic accumulation and transformation in *Chlorella pyrenoidesa*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(9):1665–1671.

不同氮磷浓度对蛋白核小球藻砷富集和转化的影响

刘 聪¹, 许平平¹, 王 亚¹, 郑燕恒¹, 林巧云¹, 唐 皓¹, 张春华², 葛 滢^{1*}

(1.南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏省海洋生物学重点实验室, 南京 210095; 2.南京农业大学生命科学实验中心, 元素与生命科学示范实验室, 南京 210095)

摘 要:氮(N)、磷(P)是影响蛋白核小球藻生长的重要因素,通过改变培养液中N、P的浓度,可能实现对蛋白核小球藻富集砷(As)进行调控。为探讨N、P浓度对这种微藻吸收As的影响是否与其生长变化有关,采用室内培养实验,首先研究不同N、P浓度对蛋白核小球藻生长的影响;进而选择不影响小球藻生长的N(247、24.7 mg·L⁻¹)、P(6、0.6 mg·L⁻¹)浓度组合,设置0.8、8 mg·L⁻¹的亚砷酸盐(As³⁺)和砷酸盐(As⁵⁺)处理3 d,研究N、P浓度对小球藻As富集和转化的影响。结果表明,当P浓度为6 mg·L⁻¹时,N浓度降低到24.7 mg·L⁻¹不会影响小球藻对As³⁺和As⁵⁺的富集及其胞内As形态的转化;而当N浓度为247 mg·L⁻¹时,P浓度降低到0.6 mg·L⁻¹则会显著增加小球藻对As³⁺和As⁵⁺的吸收和富集,藻细胞内As⁵⁺还原、甲基化和外排也显著增强。因此,在不影响小球藻细胞生长的条件下,P对其As富集和转化过程的影响比N更为显著。

关键词:蛋白核小球藻;氮;磷;砷;富集;转化

中图分类号:X52 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2016)09-1665-07 doi:10.11654/jaes.2016-0402

Effects of various nitrogen and phosphorus concentrations on arsenic accumulation and transformation in *Chlorella pyrenoidesa*

LIU Cong¹, XU Ping-ping¹, WANG Ya¹, ZHENG Yan-heng¹, LIN Qiao-yun¹, TANG Hao¹, ZHANG Chun-hua², GE Ying^{1*}

(1.College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2.Laboratory Centre of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Nitrogen (N) and phosphorus (P) are important factors controlling the growth of microalgae such as *Chlorella pyrenoidesa*. The accumulation of arsenic (As) by this alga may be regulated through adjusting N and P concentrations in the culture. However, it is unclear whether the effects of N and P on the As uptake are related to microalgal growth changes. Therefore, we first studied the impacts of N and P concentrations on the growth of *C. pyrenoidesa*, and then chosen N (247 mg·L⁻¹, 24.7 mg·L⁻¹) and P (6 mg·L⁻¹, 0.6 mg·L⁻¹) concentrations that had no effects on the algal growth, to investigate their effects on the As metabolism in this algae under exposure of 0.8 mg·L⁻¹ and 8 mg·L⁻¹ As³⁺ and As⁵⁺. Results showed that the algal As accumulation and transformation were not affected when P was 6 mg·L⁻¹ and N was decreased from 247 mg·L⁻¹ to 24.7 mg·L⁻¹. However, these processes were significantly impacted when N was 247 mg·L⁻¹ and P was decreased from 6 mg·L⁻¹ to 0.6 mg·L⁻¹. The decrease in P supply also promoted the reduction, methylation and excretion of As in *C. pyrenoidesa*. These results indicate that, when N and P have no effects on the algal growth, P influences the As accumulation and transformation greater than N does. This study would provide a theoretical basis for elucidating the regulatory mechanisms of As metabolism and enhancing the efficiency of As pollution remediation in water.

Keywords: *Chlorella pyrenoidesa*; nitrogen; phosphorus; arsenic; accumulation; transformation

收稿日期:2016-03-26

基金项目:国家自然科学基金项目(41371468, 31400450)

作者简介:刘 聪(1992—),女,河北邢台人,硕士研究生,主要研究方向为环境污染控制及生物修复。E-mail:2013103006@njau.edu.cn

*通信作者:葛 滢 E-mail:yingge711@njau.edu.cn

砷是自然界中有毒的类金属元素,被列为 I 类致癌物^[1]。随着经济和社会的发展,工农业活动的不合理排放导致砷污染日趋严重,引起了国内外学者的广泛关注。在自然水体中,砷含量范围为 $0.5\sim 5000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2],在某些受污染的水体中甚至高达 $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[3],其形态以砷酸盐(As^{5+})和亚砷酸盐(As^{3+})为主^[4]。

微藻是海洋和淡水生态系统中的初级生产者,以阳光、 CO_2 、无机盐和水自养生长,通过光合作用产生氧气和有机物,对维护水环境生态平衡具有重要作用。小球藻分布广泛、适应能力强,对砷的富集高达 $50\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[5],因而在含砷废水的净化上有巨大的潜力^[6],但其修复效果受到培养介质中营养条件的影响^[7]。

氮(N)、磷(P)等无机营养盐是限制小球藻生长和繁殖的重要因子,不足或过多都会对藻细胞的生长和砷代谢过程产生影响。磷酸盐(PO_4^{3-})能与 As^{5+} 竞争藻细胞膜上的磷酸盐结合位点^[8-9],因此 P 含量的变化会影响小球藻对 As 的吸收和毒性。Bahar 等^[6]发现低 P 增加了 As^{5+} 对小球藻的毒性,Knauer 等^[10]报道低 P 促进了蛋白核小球藻对 As^{5+} 的富集,Levy 等^[11]和 Karadjova 等^[12]则证实增加 P 营养降低了 As^{5+} 和 As^{3+} 对小球藻的吸收和毒性效应。

与 P 相比,N 对微藻 As 富集和转化的影响则报道很少。Maeda 等^[13]发现随着培养液硝酸盐(NO_3^-)浓度的增加,念珠藻细胞中总砷的含量减少,Wang 等^[14]发现缺 N 条件下莱茵衣藻能够富集更多的 As^{3+} 。然而在上述研究中,N 浓度的变化对藻类的生长有显著的影响^[13-14],由此可能造成微藻 As 富集的差异。为了排除 N、P 浓度变化对小球藻生长的影响,本文在多个 N、P 水平中选出不影响藻细胞生长的 N、P 组合,再结合 As^{3+} 和 As^{5+} 处理,研究 N、P 浓度对小球藻 As 富集和转化的影响,为揭示蛋白核小球藻 As 代谢的调控机制、提高水环境砷污染的修复效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

蛋白核小球藻(*C. pyrenoidesa*)FACHB-5 购于中科院武汉水生生物研究所国家淡水藻种库。所用培养基为 BG-11^[15],pH 调至 7.1,高压蒸汽灭菌($121\ ^\circ\text{C}$ 、30 min),培养条件为:温度 $30\pm 1\ ^\circ\text{C}$,光照明暗比 12 h:12 h,光照强度为 $3500\sim 4000\ \text{lx}$,培养期间每天定时摇匀 3 次。

1.2 N、P 浓度对蛋白核小球藻生长的影响

培养基 N 源和 P 源分别为 NaNO_3 ($247\ \text{mg}\ \text{N}\cdot\text{L}^{-1}$)

和 K_2HPO_4 ($6\ \text{mg}\ \text{P}\cdot\text{L}^{-1}$)。为研究 N、P 浓度对小球藻生长的影响,在固定一种元素浓度后,设置另一种元素的系列浓度(表 1),连续培养,每天用酶标仪测定小球藻的 OD_{680} 值。固定 P 元素、不同 N 浓度的藻样于第 3 d 收集,固定 N 元素、不同 P 浓度藻体由于第 3 d 生长无差异,故延长至第 5 d 收集,用甲醇提取色素,利用分光光度法分别测定其在 470、653、666 nm 处的 A 值,计算其叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量^[16]。

表 1 培养液的 N、P 浓度设置

Table 1 N and P concentrations in culture solution

固定 P/ $6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	N/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	2.47	4.94	24.7	247	2470	4940
固定 N/ $247\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	P/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0.06	0.12	0.6	6	60	120

1.3 N、P 浓度对蛋白核小球藻砷富集和转化的影响

小球藻培养至对数期后,离心得到的藻细胞用去离子水清洗 2 次,将其转入不同 N、P 浓度的 BG11 培养基。由于小球藻对缺 N 很敏感,为了避免藻细胞生长受抑制对 As 富集和代谢的影响,培养液 N 浓度设置为 $247\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $24.7\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,且没有进行缺 N 处理;另一方面,小球藻在生长过程中能大量吸收 P 并储存在细胞内,为了降低藻细胞的 P 含量,小球藻在缺 P 营养液中培养 2 d 后,再转至 P 浓度为 $6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中。与前述小球藻生长实验类似,N、P 浓度设置也采取了固定一种元素浓度、变换另一种元素浓度的方法,即 $247\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{N}$ 与 6 、 $0.6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{P}$ 组合、 $6\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{P}$ 与 247 、 $24.7\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{N}$ 组合,在此基础上设置 As^{3+} 和 As^{5+} 处理浓度 $0.8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每个处理 3 个平行,并以不加砷的藻液作为对照,初始 OD_{680} 为 0.085。为消除 pH 变化的影响,培养液中加入 $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-吗啉丙磺酸(MOPS),控制 pH 在 7.1 左右。培养 3 d 后,离心 7 mL 藻液,用去离子水清洗藻体 2 次,样品消解后测定其富集的砷含量。另外离心 7 mL 藻体,用 pH 7.0 的 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗(每次用量为 5 mL 并冲洗 3 次),去除藻细胞表面吸附的砷^[17],测定藻内吸收的砷含量及其形态。

1.4 藻体总砷的测定

称取干重为 1.00 g 样品,加入 2 mL 体积比为 4:1 的 HNO_3 : HClO_4 混合酸,转至玻璃消煮管中,静置过夜,采用海能 SH230 石墨消解仪(上海海能实验仪器科技有限公司)电热消解至溶液澄清透明,赶酸至剩余约 0.2 mL 液体,用去离子水润洗并移至 5 mL 容量瓶中,加浓盐酸(优级纯)、10%硫脲和 10%抗坏血酸

混合溶液后定容^[8]。采用氢化物发生-双道原子荧光光度计(HG-AFS,北京吉天仪器有限公司)测定样品砷含量,同批次运用同样方法消解标准物质(NIST-1568b),回收率为84%~102%,表明测定方法可靠。

1.5 砷形态提取及测定

称取干重样品 1.00 g,加入 $0.28 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 进行提取,90 ℃水浴超声 10 min 后 $14\,000 \times g$ 离心 10 min,重复提取 3 次^[9],上清液合并后用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,滤液采用高效液相-氢化物发生-原子荧光(HPLC-HG-AFS,北京吉天仪器有限公司)测定小球藻中砷的形态。检测条件如下:进样体积 $100 \mu\text{L}$,阴离子交换柱(Hamilton PRP-X100),流动相为 $17.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵($\text{pH}=6.1$),等度洗脱;载流 5%盐酸;还原剂 1.5%硼氢化钾+0.5%氢氧化钾;屏蔽气 $700 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;载气 Ar , $600 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;光电倍增管电压 270 V;灯电流 100 mA。本实验中砷提取效率为 84.7%~

108.5%,说明提取方法可靠。

1.6 数据处理

运用 Excel 2007 和 SPSS 20 统计分析软件进行数据处理与分析,用 SigmaPlot 12.5 作图。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 检验进行差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同 N、P 浓度对蛋白核小球藻生长的影响

由表 2 可以看出,P 浓度为 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,N 浓度过高或过低都会影响小球藻的生长。而在藻体培养 3 d 内, $24.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $247 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 N 浓度对 OD_{680} 值、叶绿素 a、b 及类胡萝卜素含量都没有显著影响。这表明,3 d 内 $24.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $247 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 N 浓度对小球藻的生长没有影响。

当 N 浓度为 $247 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,P 浓度过高或过低也会

表 2 不同 N 浓度对蛋白核小球藻生长的影响(3 d)

Table 2 Effects of different N concentrations on growth of *C. pyrenoidesa*(3 d)

P 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ P concentration	N 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ N concentration	OD_{680}	叶绿素 a/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Chlorophyll a	叶绿素 b/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Chlorophyll b	类胡萝卜素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Carotenoids
6	0	$0.18 \pm 0.00\text{b}$	$0.95 \pm 0.05\text{e}$	$0.51 \pm 0.02\text{d}$	$0.42 \pm 0.01\text{c}$
6	2.47	$0.20 \pm 0.00\text{a}$	$1.47 \pm 0.05\text{c}$	$0.77 \pm 0.02\text{c}$	$0.55 \pm 0.02\text{b}$
6	4.94	$0.21 \pm 0.00\text{a}$	$2.01 \pm 0.01\text{b}$	$0.98 \pm 0.01\text{b}$	$0.66 \pm 0.01\text{a}$
6	24.7	$0.20 \pm 0.01\text{a}$	$2.14 \pm 0.05\text{a}$	$1.00 \pm 0.01\text{ab}$	$0.69 \pm 0.01\text{a}$
6	247	$0.20 \pm 0.00\text{a}$	$2.21 \pm 0.03\text{a}$	$1.03 \pm 0.01\text{a}$	$0.69 \pm 0.01\text{a}$
6	2470	$0.09 \pm 0.00\text{c}$	$1.08 \pm 0.03\text{d}$	$0.50 \pm 0.02\text{d}$	$0.38 \pm 0.00\text{c}$
6	4940	$0.07 \pm 0.00\text{d}$	$0.35 \pm 0.04\text{f}$	$0.17 \pm 0.01\text{e}$	$0.16 \pm 0.02\text{d}$

注:表中数据用“平均值±标准差”(mean±SD)表示;不同字母表示不同 N 浓度处理间各生长指标差异显著($P<0.05$)。

Note: Data in table are mean value ± standard deviation. Different letters indicate significant difference in growth parameters between different N concentrations($P<0.05$).

表 3 不同 P 浓度对蛋白核小球藻生长的影响(5 d)

Table 3 Effects of different P concentrations on growth of *C. pyrenoidesa*(5 d)

N 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ N concentration	P 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ P concentration	OD_{680}	叶绿素 a/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Chlorophyll a	叶绿素 b/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Chlorophyll b	类胡萝卜素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Carotenoids
247	0	$0.33 \pm 0.01\text{b}$	$2.78 \pm 0.02\text{c}$	$1.36 \pm 0.04\text{cd}$	$0.98 \pm 0.02\text{bc}$
247	0.06	$0.34 \pm 0.01\text{b}$	$3.09 \pm 0.09\text{c}$	$1.54 \pm 0.18\text{c}$	$1.04 \pm 0.03\text{b}$
247	0.12	$0.36 \pm 0.01\text{b}$	$3.62 \pm 0.02\text{b}$	$1.81 \pm 0.04\text{b}$	$1.11 \pm 0.00\text{b}$
247	0.6	$0.39 \pm 0.01\text{a}$	$4.95 \pm 0.31\text{a}$	$2.45 \pm 0.03\text{a}$	$1.58 \pm 0.16\text{a}$
247	6	$0.41 \pm 0.01\text{a}$	$4.72 \pm 0.07\text{a}$	$2.49 \pm 0.00\text{a}$	$1.45 \pm 0.03\text{a}$
247	60	$0.31 \pm 0.00\text{c}$	$2.40 \pm 0.06\text{d}$	$1.26 \pm 0.05\text{de}$	$0.85 \pm 0.01\text{cd}$
247	120	$0.29 \pm 0.01\text{c}$	$2.04 \pm 0.05\text{e}$	$1.09 \pm 0.05\text{e}$	$0.78 \pm 0.02\text{d}$

注:表中数据用“平均值±标准差”(mean±SD)表示;不同字母表示不同 P 浓度处理间各生长指标差异显著($P<0.05$)。

Note: Data in table are mean value ± standard deviation. Different letters indicate significant difference in growth parameters between different P concentrations($P<0.05$).

影响小球藻的生长。藻体培养 3 d 时各个 P 浓度都不影响小球藻的 OD_{680} 值,因此延长至第 5 d,发现 P 浓度为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对小球藻的 OD_{680} 、叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素都没有显著性差异(表 3)。这表明,5 d 内 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 P 浓度对小球藻生长没有影响。

2.2 不同 N、P 浓度对蛋白核小球藻砷富集的影响

由表 4 和表 5 可知:相同 N、P 浓度处理下,小球藻对砷的富集和吸收总量随 As^{3+} 和 As^{5+} 处理浓度的增加而增加。当 N 为 $247 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,降低 P 浓度导致藻细胞对 As^{3+} 和 As^{5+} 的富集和吸收都显著增加($P < 0.05$),而当 P 浓度为 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,降低 N 浓度却不影响小球藻对 As^{3+} 和 As^{5+} 的富集和吸收。

2.3 As^{3+} 处理下不同 N、P 浓度对蛋白核小球藻胞内砷形态的影响

As^{3+} 处理小球藻 3 d 后,不同 P 浓度对藻细胞 As 形态及各形态的含量有显著影响(图 1a)。在 P- As^{3+}

处理组合下,胞内主要以 As^{3+} 和 As^{5+} 两种形态存在,其中 As^{5+} 所占比例为 42.8%~57.1%。当 As^{3+} 浓度为 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,胞内都出现了二甲基砷(DMA),表明当外界 As 浓度高时,小球藻体内存在砷甲基化途径。此外,当 P 浓度降为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相同浓度的 As^{3+} 处理下,胞内 As^{3+} 、 As^{5+} 和 DMA 的含量都有明显的增加。

然而,当培养液 P 浓度不变,N 浓度降为 $24.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相同浓度的 As^{3+} 处理下,N 浓度的降低不会影响小球藻胞内各 As 形态的含量(图 1b)。在 N- As^{3+} 处理组合下,当 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 As^{3+} 处理时,胞内存在 As^{3+} 和 As^{5+} 两种形态无机 As, As^{5+} 所占比例为 67.7%~68.9%。当 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 As^{3+} 处理时,胞内 As 以 As^{3+} 、 As^{5+} 和 DMA 三种形态存在,所占比例分别为 35.8%~37.1%,48.3%~52.0%和 12.2%~14.6%。

2.4 As^{5+} 处理下不同 N、P 浓度对蛋白核小球藻胞内砷形态的影响

由图 2 可知,小球藻在 As^{5+} 处理 3 d 后,各个 N、P

表 4 As^{3+} 处理下不同 N、P 浓度对小球藻富集砷和吸收砷的影响

Table 4 Effects of different N and P concentrations on As accumulation and uptake of *C. pyrenoidesa* exposed to As^{3+}

As^{3+} 处理浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ As^{3+} treatment concentration	N 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ N concentration	P 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ P concentration	富集砷/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Accumulated As	吸收砷/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Absorbed As
0.8	247	6	41.36±0.38a	40.66 ±2.48a
	24.7	6	46.10±4.07a	39.74±1.96a
8	247	6	147.06±8.22a	145.98±7.05a
	24.7	6	147.19±3.03a	134.53±4.21a
0.8	247	6	135.89±10.35b	122.22±10.26b
	247	0.6	395.42±21.97a	210.57±6.04a
8	247	6	523.57±60.09b	412.24±37.87b
	247	0.6	913.09±29.50a	629.24±25.33a

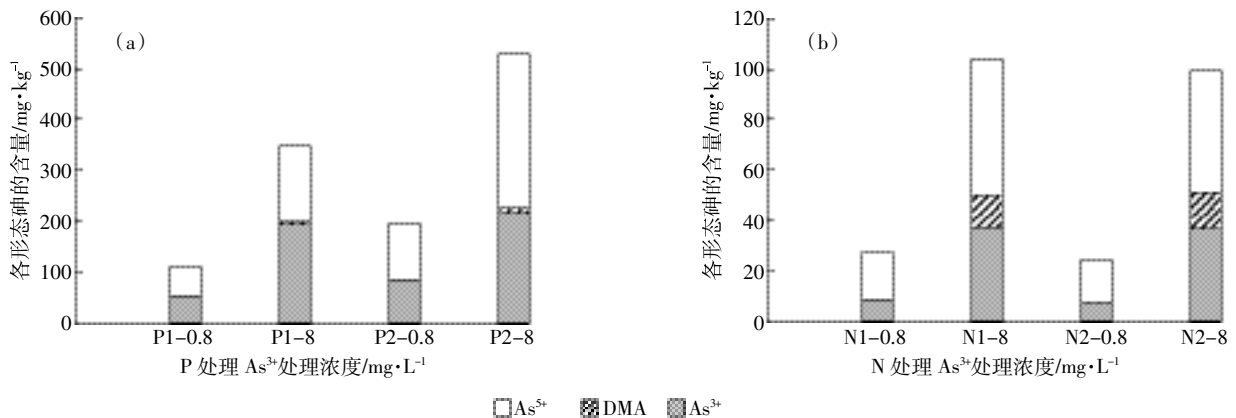
注:不同小写字母表示相同浓度 As、N(P)处理,不同 P(N)浓度处理之间小球藻对砷富集和吸收的总量存在显著性差异($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant different between different P(N) treatments at the same concentrations of As and N(P) ($P < 0.05$). The same below.

表 5 As^{5+} 处理下不同 N、P 浓度对小球藻富集砷和吸收砷的影响

Table 5 Effects of different N and P concentrations on As accumulation and uptake of *C. pyrenoidesa* exposed to As^{5+}

As^{5+} 处理浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ As^{5+} treatment concentration	N 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ N concentration	P 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ P concentration	富集砷/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Accumulated As	吸收砷/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Absorbed As
0.8	247	6	62.82±4.76a	51.77±2.56a
	24.7	6	56.56±0.06a	49.96±5.21a
8	247	6	274.61±30.6a	273.10±21.18a
	24.7	6	281.08±3.69a	228.77±12.24a
0.8	247	6	92.56±10.54b	68.27±7.33b
	247	0.6	569.20±31.23a	385.52±33.02a
8	247	6	434.52±11.60b	335.93±25.19b
	247	0.6	970.74±74.80a	738.75±13.59a



P1: 6 mg·L⁻¹ P+247 mg·L⁻¹ N; P2: 0.6 mg·L⁻¹ P+247 mg·L⁻¹ N; N1: 6 mg·L⁻¹ P+247 mg·L⁻¹ N; N2: 6 mg·L⁻¹ P+24.7 mg·L⁻¹ N。下同

图 1 不同浓度 P-As³⁺(a)和 N-As³⁺(b)处理组合下蛋白核小球藻胞内各种形态砷的含量

Figure 1 Content of various As species in *C. pyrenoidesa* under different concentrations of P-As³⁺(a) and N-As³⁺(b) combinations

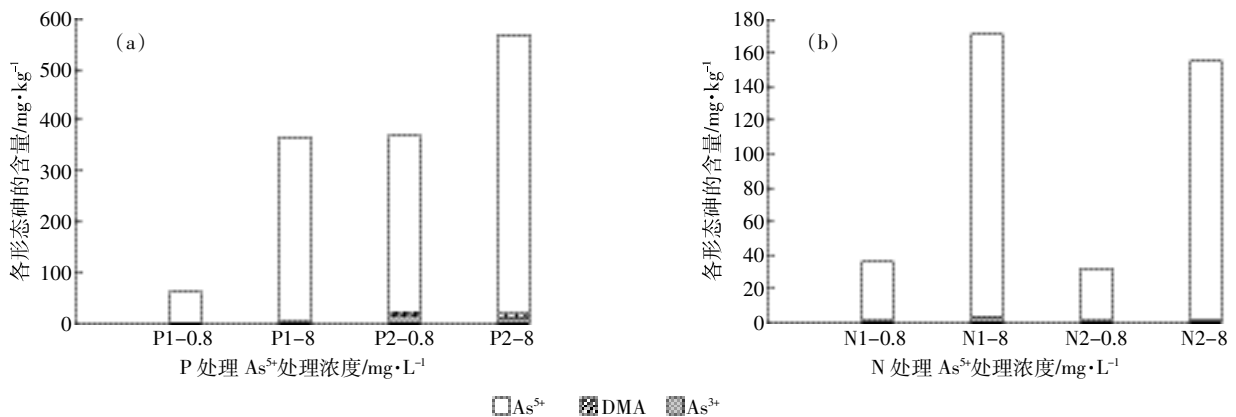


图 2 不同浓度 P-As⁵⁺(a)和 N-As⁵⁺(b)处理组合下蛋白核小球藻胞内各种形态砷的含量

Figure 2 Content of various As species in *C. pyrenoidesa* under different P-As⁵⁺ and N-As⁵⁺ concentration combinations

浓度组合下胞内绝大多数是 As⁵⁺, 约占总 As 含量的 94.2%~99.4%。不同浓度 P-As⁵⁺处理组合下小球藻胞内砷形态有明显的差异,当 N 浓度固定为 247 mg·L⁻¹、P 降为 0.6 mg·L⁻¹ 时,会促进胞内 As⁵⁺还原成 As³⁺,随后甲基化产生二甲基砷(DMA),并且在培养液中检测到 3.23 μg·L⁻¹ 的 DMA,说明小球藻在体内甲基化后会将 DMA 排出体外。与 As³⁺处理类似,当 P 浓度固定为 6 mg·L⁻¹、N 浓度降为 24.7 mg·L⁻¹ 时,胞内各 As 形态的含量没有明显的变化,当 As⁵⁺处理浓度从 0.8 mg·L⁻¹ 上升至 8 mg·L⁻¹ 时,胞内的 As 形态从只有 As⁵⁺ 变为以 As⁵⁺ 为主,并有少量 As³⁺。

3 讨论

3.1 N、P 营养对蛋白核小球藻生长的影响

蛋白核小球藻含有丰富的蛋白质,对 N 营养的

需求比对 P 营养的需求更敏感。当提供较少的 N 时, N 营养不能维持小球藻的正常生长,由于硝酸盐还原酶的活性存在一定阈值,提供较多的 N 元素时也会抑制其生长^[20]。培养 3 d 时发现 24.7 mg·L⁻¹ 和 247 mg·L⁻¹ 的 N 浓度处理下小球藻生长和色素含量达到最佳。当提供较多或较少的 P 元素时,前 3 d 小球藻的生长并没有明显的变化,这是由于小球藻细胞具有储存磷酸盐的功能,外界 P 含量较低时会利用体内的磷酸盐来维持其生长的需要^[21],但随着体内 P 含量的消耗,当培养液中 P 浓度过高或过低时都表现出显著抑制其生长。培养 5 d 和 P 浓度在 0.6 mg·L⁻¹ 和 6 mg·L⁻¹ 时,生长和色素含量达到最大。这说明 N、P 营养过高或者过低都会显著影响蛋白核小球藻的生长和色素的合成,与马彩虹等^[22]发现 N、P 浓度过高和过低都会降低小球藻的生长是一致的。此外,微藻的生

长也与其N:P关系密切相关^[23],因此在大规模培养蛋白核小球藻时,N、P浓度和N:P是生长的重要影响因素,适宜的N、P浓度和N:P才能促进小球藻的快速生长。

3.2 N、P营养对蛋白核小球藻砷富集的影响

有研究指出,N浓度会影响微藻对As的富集。Maeda等^[13]用 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 As^{5+} 处理念珠藻,细胞中总砷的含量随培养液中硝酸盐(NO_3^-)浓度的增加而减少。Wang等^[14]发现缺N条件下莱茵衣藻能够富集更多的 As^{3+} 。然而本研究结果表明,降低N浓度为 $24.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 没有改变蛋白核小球藻对 As^{3+} 和 As^{5+} 的富集量。造成这些差异的原因在于不同N浓度下微藻的生长是否受影响。上述试验中,在不同的N浓度下,念珠藻和莱茵衣藻的生长差异显著。本实验选择不影响小球藻生长的两个N浓度,能较为准确地反映N对小球藻As富集的影响。

Levy等^[11]和Karadjova等^[12]指出,P浓度的降低会增加小球藻对砷的富集。本试验与前人的结果是一致的。降低P浓度为 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 会显著增加蛋白核小球藻对 As^{3+} 和 As^{5+} 的富集量。低P会促进小球藻对 As^{5+} 的吸收是由于 As^{5+} 和P的竞争作用,而低P会促进小球藻对 As^{3+} 的吸收可能是由于培养液中P浓度降低时,会促进小球藻合成更多数量的转运体或者更强能力的转运体来吸收更多的 As^{3+} ^[12]。由此可见,胞外P浓度对微藻 As^{3+} 和 As^{5+} 富集有着重要的影响。这对提高水环境砷污染的修复效率提供了理论依据。

3.3 N、P营养对蛋白核小球藻砷转化的影响

在 As^{3+} 处理后,小球藻胞内 As^{3+} 和 As^{5+} 的比例介于30.6%~37.1%和42.8%~69.4%, As^{3+} 处理浓度提高到 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内出现了DMA(图1)。其他微藻也有类似的结果,例如,集胞藻在 As^{3+} 处理时能启动氧化机制,将大部分的 As^{3+} 转化为毒性较小的 As^{5+} 后存储^[24]。当 As^{3+} 处理浓度更高,小球藻则通过甲基化机制,将体内过量的无机砷转化为毒性更小的DMA。

As^{5+} 处理时,小球藻胞内94.2%~99.4%都是 As^{5+} , As^{3+} 只占总As的0.63%~4.19%,说明小球藻的As还原很少(图2)。同样,Levy等^[11]和Murray等^[25]的结果发现淡水藻体内 As^{5+} 还原成 As^{3+} 的比例为1%~6%。 As^{5+} 还原量低可能是与小球藻胞内高达 $8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的P含量有关,P能与砷酸盐还原酶结合,不利于胞内 As^{5+} 的还原。

P浓度为 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,且N浓度降为 $24.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,无论 As^{3+} 和 As^{5+} 处理,都没有改变小球藻体内砷

形态转化。这说明在不影响小球藻生长的前提下,一定程度上N浓度的变化对小球藻砷代谢没有影响。有研究表明缺N条件下会促进念珠藻甲基化,生成MMA和DMA^[13],可能是由于缺N时,念珠藻会合成刺激砷富集和甲基化的固氮酶^[26]。本实验中小球藻是否也存在同样的固氮酶仍需进一步研究。

N浓度为 $247\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且P降为 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,促进小球藻体内的 As^{5+} 还原为 As^{3+} ,并产生DMA。这与不同P水平下钝顶螺旋藻As代谢的结果^[27]是一致的。培养液中检测到了DMA,说明胞内As的外排也得到了强化。

4 结论

(1)固定N为 $247\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和P为 $0.6、6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以及固定P为 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和N为 $24.7、247\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度组合对蛋白核小球藻的生长没有影响。

(2)上述N、P浓度组合中,降低N浓度不会影响小球藻对 As^{3+} 和 As^{5+} 的富集,而降低P浓度则会显著增加两种形态As的富集。

(3) As^{3+} 和 As^{5+} 处理时,小球藻胞内存在As氧化、还原和甲基化过程。降低N浓度不影响As在胞内的形态转化,而降低P浓度会促进As的还原、甲基化和外排。

参考文献:

- [1] Oremland R S, Stolz J F. The ecology of arsenic[J]. *Science*, 2003, 300 (5621): 939–944.
- [2] Gladysheva T B, Oden K L, Rosen B P. Properties of the arsenate reductase of plasmid R77h3[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(23): 7288–7293.
- [3] Raman M A, Hasegawa H. Arsenic in freshwater systems; Influence of eutrophication on occurrence, distribution, speciation, and bioaccumulation[J]. *Applied Geochemistry*, 2012, 27(1): 304–314.
- [4] Yin X X, Wang L H, Bai R, et al. Accumulation and transformation of arsenic in the Blue-Green alga *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011, 223(3): 1183–1190.
- [5] Maeda S, Nakashima S, Takeshita T, et al. Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae and the application to the removal of inorganic arsenic from an aqueous phase; Part II. By *Chlorella vulgaris* isolated from arsenic-polluted environment[J]. *Separation Science and Technology*, 1985, 20(2/3): 153–161.
- [6] Bahar M M, Megharaj M, Naidu R. Influence of phosphate on toxicity and bioaccumulation of arsenic in a soil isolate of microalga *Chlorella* sp. [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(3): 2663–2668.
- [7] Pantoja M L. The mechanisms of arsenic detoxification by the green microalgae *Chlorella vulgaris*[D]. Middlesex University, 2014.
- [8] Wang N X, Li Y, Deng X H, et al. Toxicity and bioaccumulation kinetics

- of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes[J]. *Water Research*, 2013, 47(7):2497–2506.
- [9] Wang Y, Wang S, Xu P, et al. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae[J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2015, 14(3):427–451.
- [10] Knauer K, Hemond H. Accumulation and reduction of arsenate by the freshwater green alga *Chlorella* sp. (Chlorophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36(3):506–509.
- [11] Levy J L, Stauber J L, Adams M S, et al. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*)[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(10):2630–2639.
- [12] Karadjova I B, Slaveykova V I, Tsalov D L. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 87(4):264–271.
- [13] Maeda S, Mawatari K, Ohki A, et al. Arsenic metabolism in a freshwater food chain: Blue green alga (*Nostoc* sp.) → shrimp (*Neocaridina denticulata*) → carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 1993, 7(7):467–476.
- [14] Wang N X, Huang B, Xu S, et al. Effects of nitrogen and phosphorus on arsenite accumulation, oxidation, and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 157:167–174.
- [15] Podder M S, Majumder C B. Phycoremediation of arsenic from wastewater by *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Groundwater for Sustainable Development*, 2015, 1(1):78–91.
- [16] Lichtenthaler H K, Wellburn A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents[J]. *Biochemical Society Transactions*, 1983, 11(5):591–592.
- [17] 王 亚, 张春华, 王 淑, 等. 带菌盐藻对不同形态砷的富集和转化研究[J]. *环境科学*, 2013, 34(11):4257–4265.
- WANG Ya, ZHANG Chun-hua, WANG Shu, et al. Accumulation and transformation of different arsenic species in nonaxenic *Dunaliella salina*[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(11):4257–4265.
- [18] Ge Y, Ning Z, Wang Y, et al. Quantitative proteomic analysis of *Dunaliella salina* upon acute arsenate exposure[J]. *Chemosphere*, 2016, 145:112–118.
- [19] Shi G L, Lou L Q, Zhang S, et al. Arsenic, copper, and zinc contamination in soil and wheat during coal mining, with assessment of health risks for the inhabitants of Huaibei, China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(12):8435–8445.
- [20] 王金花, 唐洪杰, 王修林, 等. 氮、磷营养盐对东海原甲藻生长和硝酸还原酶活性的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(5):620–623.
- WANG Jin-hua, TANG Hong-jie, WANG Xiu-lin, et al. Effects of nitrate and phosphate on growth and nitrate reductase activity of *Prorocentrum donghaiense*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14(5):620–623.
- [21] 李 斌. 氮、磷等环境因子对有害赤潮生物海洋卡盾藻的生理生态效应[D]. 广州:暨南大学, 2009.
- LI Bin. The ecophysiological responses of harmful alga *chattonella marina* to nitrogen and phosphorus[D]. Guangzhou: Jinan University, 2009.
- [22] 马彩虹, 麻晓霞, 马玉龙, 等. 不同氮磷浓度对小球藻生长性能的影响[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(22):11367–11369.
- MA Cai-hong, MA Xiao-xia, MA Yu-long, et al. Effects of different concentrations of N, P on the growth performance of *Chlorella* sp.[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2012, 40(22):11367–11369.
- [23] Rhee G Y. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake[J]. *Limnology and Oceanography*, 1978, 23(1):10–25.
- [24] 张 兵, 王利红, 徐玉新, 等. 集胞藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 对砷吸收转化特性的初步研究[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(6):629–633.
- ZHANG Bing, WANG Li-hong, XU Yu-xin, et al. Study on absorption and transformation of arsenic in blue alga (*Synechocystis* sp. PCC6803)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(6):629–663.
- [25] Murray L A, Raab A, Marr I L, et al. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2003, 17(9):669–674.
- [26] Maeda S, Kumeda K, Maeda M, et al. Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae (*Nostoc* sp.) and the application to the removal of inorganic arsenic from an aqueous phase[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 1987, 1(4):363–370.
- [27] 王 淑, 许平平, 刘 聪, 等. 不同磷浓度对钝顶螺旋藻吸附、吸收和转化砷酸盐的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(6):1034–1040.
- WANG Shu, XU Ping-ping, LIU Cong, et al. Effects of phosphorus at various concentrations on adsorption, uptake and transformation of arsenate by *Spirulina platensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(6):1034–1040.