

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017040702

郑燕恒, 李颢, 张春华, 等. 胞内砷磷含量和比值对莱茵衣藻砷酸盐和亚砷酸盐耐性的影响[J]. 环境化学, 2018, 37(1): 75-81.

ZHENG Yanheng, LI Hao, ZHANG Chunhua, et al. Effects of intracellular arsenic and phosphorus content and ratio on the tolerance of arsenate and arsenite in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(1): 75-81.

胞内砷磷含量和比值对莱茵衣藻砷酸盐和亚砷酸盐耐性的影响*

郑燕恒¹ 李 颢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 为探索胞内砷(As)与磷(P)含量和比值与莱茵衣藻 As 耐性的关系, 本文设置两个磷酸盐(PO_4^{3-})和系列砷酸盐(As(V))、亚砷酸盐(As(III))浓度, 处理 72 h 后测定莱茵衣藻生长情况和胞内 As、P 含量, 并以培养液 As 浓度($[\text{As}]_{\text{dis}}$)、胞内 As 含量($[\text{As}]_{\text{intra}}$)、胞内砷磷比($[\text{As};\text{P}]_{\text{intra}}$)推算半数效应浓度(EC_{50}), 比较这 3 种指标对莱茵衣藻 As 耐性的评价效果. 结果表明, 随着 $[\text{As}]_{\text{dis}}$ 的增加, 莱茵衣藻 $[\text{As}]_{\text{intra}}$ 上升, 提高培养液 PO_4^{3-} 浓度不影响As(III)处理下的 $[\text{As}]_{\text{intra}}$, 但显著降低了As(V)处理下的 $[\text{As}]_{\text{intra}}$. 以 $[\text{As}]_{\text{dis}}$ 表征 EC_{50} 时, 两种 PO_4^{3-} 水平($0.315, 3.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)下的As(III)- EC_{50} ($2090.3, 21183.6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$)明显高于As(V)- EC_{50} ($162.1, 2358.3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$). 基于 $[\text{As}]_{\text{intra}}$ 的 EC_{50} 数据显示, PO_4^{3-} 水平不影响As(III)- EC_{50} ($123.9, 125.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$), 但显著影响As(V)- EC_{50} ($7.4, 58.6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$). 由 $[\text{As};\text{P}]_{\text{intra}}$ 推算的 EC_{50} 可知, PO_4^{3-} 对两种形态 As 毒性的影响相反, As(III)- EC_{50} 分别为 21.1、6.1 (mol/mol, As/P), As(V)- EC_{50} 分别为 1.3、3.4 (mol/mol, As/P). 研究结果说明, As(V)对该藻的毒性大于As(III), 莱茵衣藻对As(V)和As(III)的耐性除了受到培养液 PO_4^{3-} 浓度的制约外, 还受到胞内 As、P 含量及其比值的影响.

关键词 莱茵衣藻, 砷, 磷, 砷耐性.

Effects of intracellular arsenic and phosphorus content and ratio on the tolerance of arsenate and arsenite in *Chlamydomonas reinhardtii*

ZHENG Yanheng¹ LI Hao¹ ZHANG Chunhua² GE Ying^{1**}

(1. College of Resource and Environmental Sciences, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China; 2. Demonstration Laboratory of Element and Life Science, Laboratory Centre of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China)

Abstract: In order to explore the relationship between intracellular arsenic(As) and phosphorus(P) content and their ratios with As tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*, two phosphate (PO_4^{3-}) levels and a series of arsenate (As(V)) and arsenite (As(III)) concentrations were set up, and the growth of *C. reinhardtii* and the contents of As and P in the *C. reinhardtii* cells after 72 h treatment were measured. The half maximal effective concentration values (EC_{50}) based on the As concentration in growth media ($[\text{As}]_{\text{dis}}$), the intracellular arsenic content ($[\text{As}]_{\text{intra}}$) and the ratio of intracellular arsenic to phosphorus ($[\text{As};\text{P}]_{\text{intra}}$) were calculated. Results showed that the

2017 年 4 月 7 日收稿 (Received: April 7, 2017).

* 国家自然科学基金(41371468)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41371468).

** 通讯联系人, E-mail: yingge711@njau.edu.cn

Corresponding author, E-mail: yingge711@njau.edu.cn

$[As]_{intra}$ of *C. reinhardtii* increased with the increase of $[As]_{dis}$. Higher level of PO_4^{3-} in the culture did not affect the $[As]_{intra}$ under As(III) treatment, but significantly decreased it under As(V) treatment. When EC_{50} is characterized by $[As]_{dis}$, As(III)- EC_{50} (2090.3, 21183.6 $\mu g \cdot L^{-1}$ -As under two PO_4^{3-} levels) were significantly higher than the As(V)- EC_{50} (162.1, 2358.3 $\mu g \cdot L^{-1}$ -As). The data of $[As]_{intra} EC_{50}$ showed that PO_4^{3-} level did not affect As(III)- EC_{50} (123.9, 125.0 $\mu g \cdot g^{-1}$ -As-dw), but significantly affected As(V)- EC_{50} (7.4, 58.6 $\mu g \cdot g^{-1}$ -As-dw). From the EC_{50} derived from $[As:P]_{intra}$, we found that the effect of PO_4^{3-} on the tolerance of two As species was opposite. The As(III)- EC_{50} were 21.1 and 6.1 (mol/mol, As/P), while As(V)- EC_{50} were 1.3 and 3.4 (mol/mol, As/P). Taken together, these data indicated that As(V) was more toxic to the microalgae than As(III). The tolerance of As(V) and As(III) by *C. reinhardtii* was not only affected by the PO_4^{3-} concentration in the culture, but also affected by intracellular As and P content and their ratios.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, arsenic, phosphorus, arsenic tolerance.

随着世界经济的快速发展,矿山开采、金属冶炼、农药施用等工农业活动的不合理排放造成了大量含砷化合物进入环境,导致周围的土壤、地下水和河流被污染,并随河流从陆地迁移到海洋,导致地球水生生态系统砷污染日益严重,在一些采矿水中砷浓度可以高达 $850 mg \cdot L^{-1}$ [1-2], 远远高于砷在 WHO 饮用水的标准 ($10 \mu g \cdot L^{-1}$). 砷污染已成为人们普遍关注的环境污染问题之一 [3].

微藻在水环境中广泛存在,具有表面积大、吸附吸收能力强等特点,在砷污染水体净化上具有良好的应用前景 [4-5]. 在众多微藻中,莱茵衣藻具有遗传背景清楚、培养条件相对简单、生长周期短等优点,具有较强的砷富集能力 [1,5-8].

研究表明,砷的毒性受其总量影响,但更取决于其形态 [9]. 水体中的砷以无机砷(包括砷酸盐 As(V) 和亚砷酸盐 As(III)) 为主. 以往研究发现,莱茵衣藻对 As(III) 和 As(V) 的耐性存在不同的结果. 例如, Kaise 等 [7] 和 Wang 等 [5] 研究莱茵衣藻 As(III) 的 EC_{50} 值分别为 $750, 132.2 mg \cdot L^{-1}$, Yin 等 [8] 与 Wang 等 [1] 研究得到 As(V) 的 EC_{50} 值分别为 $75, 33.5 mg \cdot L^{-1}$.

不同形态砷进入微藻细胞的途径不同 [4], 致毒机理也不同 [10-11]. 砷酸盐与磷酸盐的性质类似,因此 As(V) 通过磷酸盐通道进入细胞,而亚砷酸盐主要由水-甘油通道蛋白转运. 研究表明,莱茵衣藻对 As(V) 和 As(III) 的吸收都受到磷酸盐含量的影响 [1,5]. 磷酸盐含量增加抑制了 As(V) 吸收 [1], 与胞内 P 含量上升、磷转运蛋白数量降低有关. 磷酸盐对 As(III) 吸收的影响可能是磷酸盐与亚砷酸盐之间存在非竞争性抑制作用,改变了转运体的空间构象 [5], 也可能是磷酸盐影响了 As(III) 氧化为 As(V) 的速率造成的 [12]. 但是,莱茵衣藻对 As(V) 和 As(III) 的耐性差异及其与培养基磷水平的关系还缺乏系统的研究.

为此,本文设置不同 As、P 处理,探讨培养液和莱茵衣藻胞内的 As、P 含量及其比值对两种形态 As 的吸收和毒性的影响,以为微藻在水环境砷污染修复中的应用提供依据.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 购于中国科学院水生生物研究所(中国,武汉). 莱茵衣藻培养基采用 TAP (tris-acetate-phosphate) 培养基, pH 值为 7.0, 在 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 下灭菌 30 min; 培养条件: 昼/夜光照条件为 12 h/12 h, 温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照强度为 2000 lux; 且在藻种传代扩增及培养过程中均保证无菌操作.

1.2 试验方法

1.2.1 莱茵衣藻对砷酸盐和亚砷酸盐的毒性试验

采用 72 h 生长抑制试验,将对数生长期的莱茵衣藻缺 P 驯化 3 d 后接种,初始藻细胞浓度 OD_{680} 值 0.06 (即细胞数为 $10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$), 接种 25 mL 藻液至 50 mL 锥形瓶中培养,整个接种过程中在超净工作台中进行. 设置 2 个不同 PO_4^{3-} 水平 (P_1, P_2), 浓度分别为 $0.315, 3.15 mg \cdot L^{-1}$, 每个 PO_4^{3-} 水平下设置 7 个

不同As(V)和As(III)处理浓度(表1),每组设置3个重复,以不加砷的藻液作为对照组.分别在0、24、48、72 h 利用酶标仪测定细胞密度 OD₆₈₀ 值.

1.2.2 相对生长率 μ 计算公式

$$K_e = \frac{\ln OD_{T_2} - \ln OD_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad K_c = \frac{\ln OD_{T_2} - \ln OD_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad (1)$$

$$\mu = \frac{K_e}{K_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中,OD_{T₁}是T1时间点藻液的光密度 OD₆₈₀ 值,OD_{T₂}是T2时间点藻液的光密度 OD₆₈₀ 值;K_c表示空白对照组莱茵衣藻生长速率,K_e表示处理组莱茵衣藻生长速率.

表1 莱茵衣藻在P₁和P₂条件下砷(As(III)、As(V))的毒性试验中各处理组(A-G)砷的处理浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -As)

Table 1 Arsenic (As(III), As(V)) concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -As) in different treatments(A-G) of the toxicity experiments for *C. reinhardtii* under P₁ and P₂ conditions

处理 Treatments	As(III)		As(V)	
	P ₁	P ₂	P ₁	P ₂
A	200	500	20	200
B	500	1000	50	500
C	800	10000	100	800
D	2000	20000	200	2000
E	6000	40000	300	5000
F	10000	60000	500	10000
G	20000	80000	800	20000

1.2.3 Logistic 模型的剂量效应曲线

用半数效应浓度 EC₅₀ 值(导致莱茵衣藻细胞生长速率降低 50%的 As 浓度)来表示As(III)和As(V)对莱茵衣藻的毒性.结果计算通过用 SigmaPlot 12.5 软件里 S 型剂量-效应曲线方程(3)拟合^[13]:

$$BR = BR_{\min} + \frac{BR_{\max} - BR_{\min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - BR) \times \text{Hillslope}}} \quad (3)$$

式中,BR 代表生物效应,BR_{min}和BR_{max}分别对应最小和最大的生物效应,EC₅₀是导致莱茵衣藻细胞生长速率降低 50%的As(III)和As(V)浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),Hillslope 值来反应曲线斜率因子.

1.2.4 莱茵衣藻样品中总 As、P 含量的测定

As 处理 72 h 后,离心($6000 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$, 2 min)收集藻样和上清液,藻样分别用冷的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)和去离子水清洗 3 遍,藻样冷冻干燥,培养液放置 $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温冰箱保存待测.藻细胞总 As 和 P 含量测定如下:称量 50 mg 冷冻干燥的莱茵衣藻样品于消煮管中,加入 2 mL 硝酸-高氯酸的混酸($V_{\text{HNO}_3}:V_{\text{HClO}_4}=4:1$)溶液^[14],浸没过夜.使用石墨消解仪(海能 SH230,上海海能实验仪器科技有限公司)在 $120\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 下电热消解至溶液澄清透明,赶酸消煮至管内剩下 0.5 mL 左右的液体,静置冷却,将消煮液及消煮管的润洗液转移至 10 mL 容量瓶,加入 0.5 mL 浓盐酸(优级纯)、1 mL 的还原剂(10% 硫脲和 10% 抗坏血酸混合溶液)后用去离子水定容至 10 mL.同时以不加莱茵衣藻的相同体系作为试剂空白.总 As 含量测定采用氢化物发生-原子荧光光谱仪(HG-AFS, AFS-8230,北京吉天仪器有限公司)进行测定^[15].样品中的总 P 含量测定使用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES, PerkinElmer Optimal 2100DV, USA)测定.方法的可靠性采用同批次消解标准物质米粉(NIST-SRM 1568b)进行评估^[16],标准物质米粉中总 As 和总 P 的回收率分别为 89%—103%、95%—110%,说明测定实验数据可靠.

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据处理、SigmaPlot 12.5 作图,并采用 SPSS 20.0 进行差异显著性分析($P < 0.01$).实验数据为平均值 \pm 标准偏差($n=3$).

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 As(III)对莱茵衣藻的毒性

As(III)毒性试验结果显示,莱茵衣藻胞内砷含量($[As]_{intra}$)随着胞外砷浓度($[As]_{dis}$)的增加而增加,但 P_1 和 P_2 条件下,藻细胞内 $[As]_{intra}$ 含量相似(图1a).为比较不同磷水平下莱茵衣藻对As(III)耐性差异,以不同处理组相对于各自对照组的相对生长率 μ 与As处理浓度 $[As]_{dis}$ 通过Logistic剂量-效应曲线关系作图(图2a, 2c, 2e),结果发现,在 P_1 、 P_2 条件下以 $[As]_{dis}$ 表征 EC_{50} 时分别为2090.3、21183.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$ (图2a),两者之间耐性相差10倍,显然 P_2 条件下莱茵衣藻对As(III)耐性要高于 P_1 条件下.当基于 $[As]_{intra}$ 表示时,在 P_1 、 P_2 条件下莱茵衣藻对As(III)耐性无差异,它们的 EC_{50} 值分别为123.9、125.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$ (图2c),此时两者之间的剂量效应曲线几乎接近重合.当剂量参数基于胞内砷磷比值($[As:P]_{intra}$)来表示 EC_{50} 值时, P_1 、 P_2 条件下 EC_{50} 值为21.1、6.1 (mol/mol, As/P)(图2e),两者之间毒性相差近4倍,说明胞内As、P含量比值能明显影响As(III)的毒性.

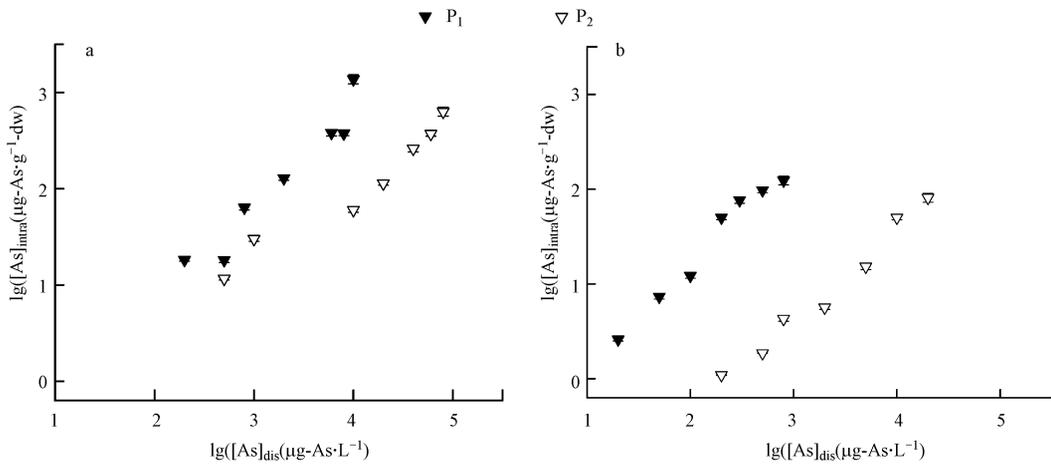


图1 As(III)(a)和As(V)(b)毒性实验中在 P_1 、 P_2 水平和不同砷浓度($[As]_{dis}$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$)条件下莱茵衣藻细胞砷含量($[As]_{intra}$, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$)

Fig.1 Intracellular arsenic content ($[As]_{intra}$, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$) of *C. reinhardtii* at various concentrations of As(III)(a) and As(V)(b) ($[As]_{dis}$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$) in the toxicity experiments under P_1 and P_2 levels

上述结果表明,莱茵衣藻对As(III)有较强的耐性,这与Kaise等^[7]和Wang等^[5]结果一致,但是所得 EC_{50} 值(21.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$)明显小于他们的结果(750 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$ 、132.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$).由此可知,即使对于同一种藻类,砷的毒性受到藻细胞密度、温度、pH、光强、磷酸盐浓度、砷胁迫浓度和时间等多种因素的影响^[17-18].当基于 $[As]_{intra}$ - EC_{50} 时,莱茵衣藻在正常磷、低磷条件下的 EC_{50} 值无显著性差异(图2c),分别为125.0、123.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$,这与图1a中 P_1 、 P_2 水平下胞内 $[As]_{intra}$ 含量近似相一致,说明As(III)对莱茵衣藻的毒性是受细胞内As含量控制的,而培养液中的 PO_4^{3-} 水平对藻细胞As含量没有明显影响.当剂量参数基于 $[As:P]_{intra}$ - EC_{50} 时, P_1 和 P_2 水平下的 EC_{50} 值有显著性差异,分别为21.1、6.1 (mol/mol, As/P)(表2),表明提高培养液 PO_4^{3-} 增加了胞内P含量,但不会增强莱茵衣藻对As(III)的耐性,这可能是由于As(III)的吸收是通过水通道蛋白而非磷酸盐通道,以及As(III)解毒主要是通过与巯基物质(如谷胱甘肽、植物螯合肽等)结合和外排等途径^[19-21],与磷酸盐没有直接的关系.

2.2 As(V)对莱茵衣藻的毒性

图1b中,胞内 $[As]_{intra}$ 随着毒性试验开始时胞外 $[As]_{dis}$ 的增加而呈线性增加,但在 P_1 条件下胞内 $[As]_{intra}$ 明显高于 P_2 条件下.As(V)对不同P水平下莱茵衣藻相对生长率 μ 的抑制情况如图2b, 2d, 2f.当基于 $[As]_{dis}$ 表示 EC_{50} 时,在 P_1 、 P_2 条件下莱茵衣藻对As(V)毒性有显著差异, EC_{50} 值分别为162.1、2358.3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$ (图2b),两者之间相差15倍.当基于 $[As]_{intra}$ 表示 EC_{50} 时,不同磷酸盐水平下莱茵衣藻

对As(V)毒性也有显著差异(EC_{50} 分别为 7.4 、 $58.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$),这与 P_1 、 P_2 条件下胞内 $[\text{As}]_{\text{intra}}$ 明显不同相一致(图1b).当基于胞内砷磷比($[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}$)来表示 EC_{50} 时,不同P水平下As(V)毒性差异减小, EC_{50} 值分别为 1.3 、 $3.4(\text{mol}/\text{mol}, \text{As}/\text{P})$ (图2f),这与As(III)处理下的毒性结果刚好相反.

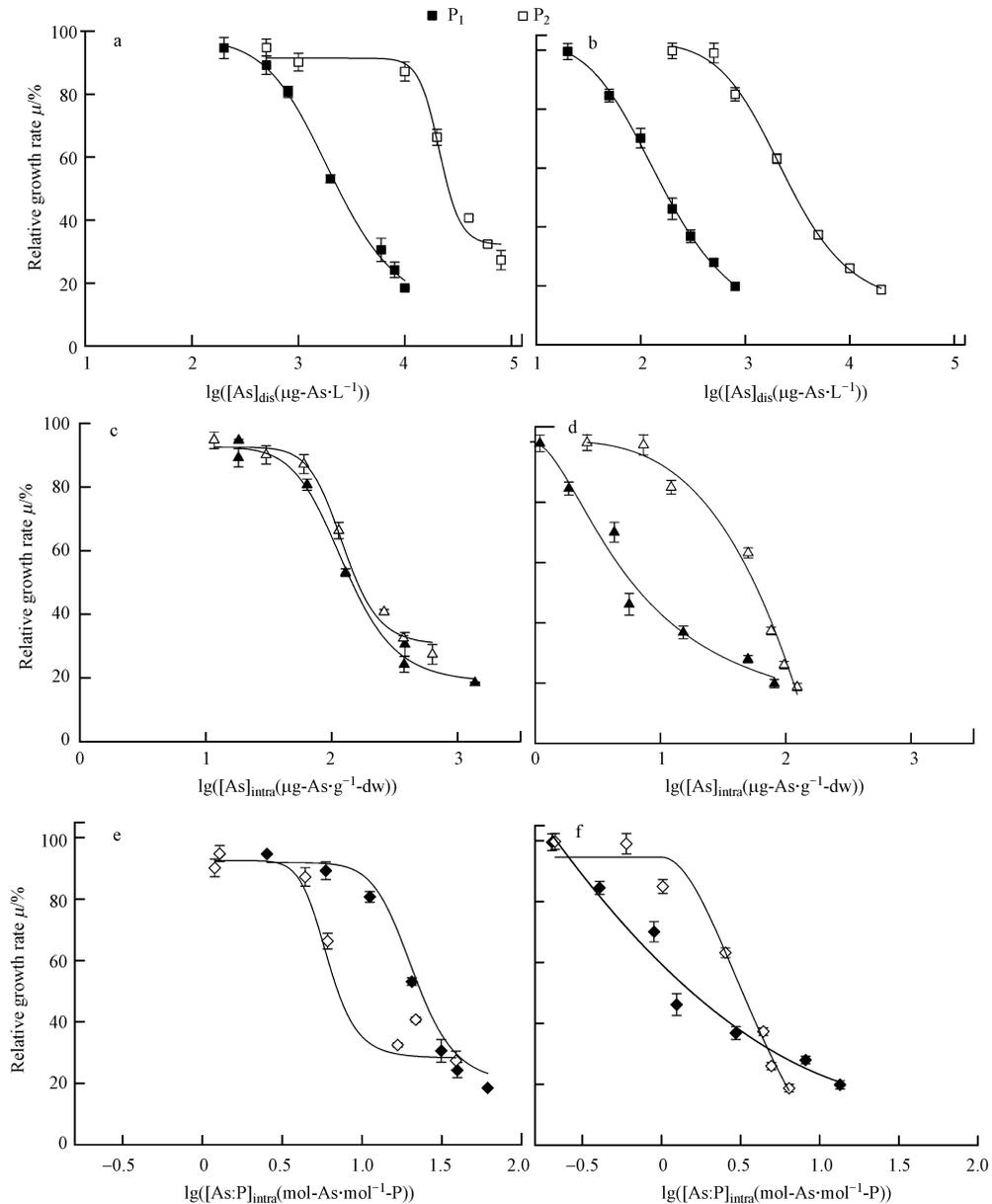


图2 在 P_1 和 P_2 水平下As(III)(a, c, e)、As(V)(b, d, f)的毒性实验中,基于不同条件下莱茵衣藻细胞相对生长率 μ 的相对变化.a, b:不同砷浓度 $[\text{As}]_{\text{dis}}(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As})$ 、c, d:不同胞内砷含量 $[\text{As}]_{\text{intra}}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw})$ 、e, f:不同胞内砷磷比 $[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}(\text{mol}/\text{mol}, \text{As}/\text{P})$;实线为拟合的Logistic模型剂量-效应曲线

Fig.2 Relative cell-specific growth rate μ of *C. reinhardtii* based on different conditions in the toxicity experiments of As(III) (a, c, e) and As(V) (b, d, f) under P_1 and P_2 levels. a, b: different As concentrations $[\text{As}]_{\text{dis}}(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As})$. c, d: intracellular As content $[\text{As}]_{\text{intra}}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw})$. e, f: the intracellular ratio of As to P $[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}(\text{mol}/\text{mol}, \text{As}/\text{P})$; Solid lines are the simulated curves by the Logistic dose-response model

由以上结果可以看出,砷酸盐在两个磷水平下对莱茵衣藻的毒性有极显著性差异(图2b), P_1 和 P_2 水平下的 EC_{50} 值分别为 162.1 、 $2358.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$,显著低于同样P条件下As(III)的 EC_{50} 值(2090.3 、 $21183.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$)(表2).当基于 $[\text{As}]_{\text{intra}}$ 推测 EC_{50} 时,两个磷水平下对As(V)毒性也有显著性差异(EC_{50} 分别为 7.4 、 $58.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$,图2d),这与胞内 $[\text{As}]_{\text{intra}}$ 随培养液As处理浓度增加而增加

(图 1b)是一致的。

两种 PO_4^{3-} 条件下, $\text{As}(\text{III})$ 处理下的 $[\text{As}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$ 值都显著高于 $\text{As}(\text{V})$ 对应的 EC_{50} (123.9 vs 7.4; 125.0 vs 58.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$), 这些结果表明, 相对 $\text{As}(\text{III})$ 而言, $\text{As}(\text{V})$ 对莱茵衣藻的毒性更强, 这与 Wang 等^[1] 研究结果一致。缺 P 条件下莱茵衣藻对 $\text{As}(\text{V})$ 更敏感, 主要是由于胞内 P 含量下降引起的。一方面, 由于 As、P 化学结构类似, $\text{As}(\text{V})$ 能通过磷酸盐通道进入藻细胞体内^[4], 两者之间形成竞争关系; 另一方面, 在缺 P 状态下, *C. reinhardtii* 细胞磷酸盐转运基因和蛋白的表达增加, 吸收速率 (V_{max}) 变大, 促进对 P 的吸收, 但也增加了 $\text{As}(\text{V})$ 的积累^[1]。 $\text{As}(\text{V})$ 的毒性在于干扰细胞内的磷酸盐代谢 (如光合磷酸化、氧化磷酸化)^[11], 胞内积累的砷酸盐也可能与糖代谢过程中的中间产物高能硫酯分子结合, 形成 1-砷酸-3-磷酸甘油酸, 从而减少了 ATP 的合成而造成毒害^[22-23], 这也解释了缺磷状态下莱茵衣藻对 $\text{As}(\text{V})$ 更敏感。当用 $[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}$ 推算 EC_{50} 时, 两个磷水平下 $\text{As}(\text{V})$ 的毒性差异减小 (数值分别为 1.3、3.4 (mol/mol, As/P), 图 2f), 表明除了培养液 PO_4^{3-} 外, 藻细胞内的 P 含量及其与 As 的比值也制约着 $\text{As}(\text{V})$ 的吸收和毒性。

2.3 $\text{As}(\text{III})$ 与 $\text{As}(\text{V})$ 对莱茵衣藻砷毒性的差异

对比 $\text{As}(\text{III})$ 、 $\text{As}(\text{V})$ 对莱茵衣藻的毒性试验可知, 当基于 $[\text{As}]_{\text{dis}}\text{-EC}_{50}$ 时, $\text{As}(\text{III})$ 、 $\text{As}(\text{V})$ 两者在 P_1 、 P_2 水平下的 EC_{50} 值有极显著差异 ($P<0.01$), 并且在相同磷水平 (P_1 或 P_2) 下, $\text{As}(\text{III})$ 的 EC_{50} 值都显著高于 $\text{As}(\text{V})$ 的 EC_{50} (表 2), 说明莱茵衣藻对 $\text{As}(\text{III})$ 耐性较强, $\text{As}(\text{V})$ 对莱茵衣藻毒性更大, 并且 P 浓度增加能显著增强莱茵衣藻对砷酸盐和亚砷酸盐的耐性。然而, 当基于 $[\text{As}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$ 表示时, 两个磷水平下 $\text{As}(\text{III})$ 的毒性无显著性差异 (EC_{50} 分别为 123.9、125.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$), 说明不同磷酸盐含量不影响莱茵衣藻对 $\text{As}(\text{III})$ 的积累和毒性效应, 相反对 $\text{As}(\text{V})$ 的积累和毒性有显著影响 (EC_{50} 分别为 7.4、58.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$, $P<0.01$)。当基于 $[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$ 时, 不同 P 条件下对砷酸盐和亚砷酸盐的毒性影响相反 (表 2), 并且两者 EC_{50} 值在 P_1 、 P_2 水平下都有显著性差异 ($P<0.05$)。

表 2 基于溶液中砷浓度 ($[\text{As}]_{\text{dis}}\text{-EC}_{50}$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$)、胞内砷含量 ($[\text{As}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$) 及胞内砷磷比 ($[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$, (mol/mol, As/P)) 得到的 EC_{50} 值。数据为平均值 \pm 标准差 ($n=3$)

Table 2 EC_{50} derived from the As concentrations in the culture ($[\text{As}]_{\text{dis}}\text{-EC}_{50}$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$), intracellular As content ($[\text{As}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$) and the ratio of intracellular As to P ($[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}$, (mol/mol, As/P)). Data are mean \pm SD ($n=3$)

As	P	$[\text{As}]_{\text{dis}}\text{-EC}_{50}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{-As}$)	$[\text{As}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{-As-dw}$)	$[\text{As}:\text{P}]_{\text{intra}}\text{-EC}_{50}/$ (mol/mol, As/P)
$\text{As}(\text{III})$	P_1	2090.3 \pm 78.5	123.9 \pm 1.8	21.1 \pm 1.3**
	P_2	21183.6 \pm 406.4**	125.0 \pm 0.9	6.1 \pm 0.2
$\text{As}(\text{V})$	P_1	162.1 \pm 1.6	7.4 \pm 0.5	1.3 \pm 0.1
	P_2	2358.3 \pm 27.8**	58.6 \pm 3.7**	3.4 \pm 0.2*

注: * 代表 P_1 和 P_2 处理间有显著性差异 ($P<0.05$); ** 代表 P_1 和 P_2 处理间有极显著性差异 ($P<0.01$)。

Note: * represents significant difference between P_1 and P_2 treatments ($P<0.05$); ** represents significant difference between P_1 and P_2 treatments ($P<0.01$).

3 结论 (Conclusion)

莱茵衣藻对 $\text{As}(\text{III})$ 有较强的耐性, 而对 $\text{As}(\text{V})$ 更加敏感。当以胞内 As 含量推算 EC_{50} 时, 培养液中磷酸盐含量对莱茵衣藻 $\text{As}(\text{III})$ 的积累和耐性无明显影响, 但显著制约着 $\text{As}(\text{V})$ 的积累和耐性。藻细胞 As、P 含量比值推算的 EC_{50} 结果显示, 培养液中磷酸盐含量对 $\text{As}(\text{V})$ 和 $\text{As}(\text{III})$ 的毒性影响相反, 说明除培养液中磷酸盐含量外, 莱茵衣藻对 As 的吸收和耐性还受到胞内 As、P 含量和比值的制约。

参考文献 (References)

- [1] 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.
- [2] BAHAR M M, MEGHARAJ M, NAIDU R. Bioremediation of arsenic-contaminated water: recent advances and future prospects [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2013, 224(12): 1-20.
- [3] WANG S, ZHAO X. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater [J]. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90(8): 2367-2367.
- [4] WANG Y, WANG S, XU P, et al. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 2015, 14: 427-451.
- [5] WANG N X, HUANG B, et al. Effects of nitrogen and phosphorus on arsenite accumulation, oxidation, and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 157: 167-174.
- [6] FUJIWARA S, KOBAYASHI I, HOSHINO S, et al. Isolation and characterization of arsenate-sensitive and resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2000, 41(1): 77-83.
- [7] KAISE T, FUJIWARA S, TSUZUKI M, et al. Accumulation of arsenic in a unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 1999, 13(2): 107-111.
- [8] YIN X, WANG L, DUAN G, et al. Characterization of arsenate transformation and identification of arsenate reductase in a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(7): 1186-1193.
- [9] 苑春刚, LE X CHRIS. 砷形态分析[J]. *化学进展*, 2009, 21(2/3): 467-473.
YUAN C G, LE X CHRIS. Arsenic speciation analysis [J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(2/3): 467-473 (in Chinese).
- [10] ZHAO F, MA J, MEHARG A, et al. Arsenic uptake and metabolism in plants[J]. *New Phytologist*, 2009, 181(4): 777-794.
- [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] ZHANG S, RENSING C, ZHU Y G. Cyanobacteria-mediated arsenic redox dynamics is regulated by phosphate in aquatic environments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(2): 994-1000.
- [13] KARADJOVA I B, SLAVEYKOVA V I, TSALEV D L, et al. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 87(4): 264-271.
- [14] SOMER G, ÜNLÜ A N. The effect of acid digestion on the recoveries of trace elements; Recommended policies for the elimination of losses [J]. *Turkish Journal of Chemistry*, 2009, 30(6): 745-753.
- [15] ZHANG C H, WANG Y, GE Y. Determination of five arsenic species in *Porphyra* by microwave-assisted water extraction and high performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry[J]. *Analytical Letters*, 2013, 46(10): 1573-1586.
- [16] BAHAR M M, MEGHARAJ M, NAIDU R. Toxicity, transformation and accumulation of inorganic arsenic species in a microalga *Scenedesmus* sp. isolated from soil[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(3): 913-917.
- [17] WURL O, ZIMMER L, CUTTER G A. Arsenic and phosphorus biogeochemistry in the ocean; Arsenic species as proxies for P-limitation [J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58(2): 729-740.
- [18] 丁腾达, 阚啸林, 吴振华, 等. 砷对绿藻的毒性效应及氧化还原条件的影响[J]. *环境化学*, 2016, 35(5): 1084-1089.
DING T D, KAN X L, WU Z H, et al. Toxicity of arsenic on green alga and its effect on redox conditions [J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(5): 1084-1089 (in Chinese).
- [19] MUNOZ L P, PURCHASE D, JONES H, et al. Enhanced determination of As-phytochelatin complexes in *Chlorella vulgaris* using focused sonication for extraction of water-soluble species[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(3): 791-797.
- [20] NEARING M M, KOCH I, REIMER K J. Complementary arsenic speciation methods: A review[J]. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2014, 99: 150-162.
- [21] WANG Y, ZHANG C H, ZHENG Y H, et al. Phytochelatin synthesis in *Dunaliella salina* induced by arsenite and arsenate under various phosphate regimes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 136: 150-160.
- [22] 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: 2663-2668.
- [23] CHEN J, YOSHINAGA M, GARBINSKI L D, et al. Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and *ArsJ*, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(6): 945-953.