

不同磷浓度对钝顶螺旋藻吸附、吸收和转化砷酸盐的影响

王 淑¹, 许平平¹, 刘 聪¹, 王 亚¹, 张春华², 葛 滢^{1*}

(1.南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2.南京农业大学生命科学实验中心, 南京 210095)

摘 要:采用室内培养实验, 首先用 $0\sim 300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 砷酸盐[As(V)]处理钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*), 分析了螺旋藻对 As(V) 的吸附和吸收特性, 并在 $300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V) 处理下, 研究了不同磷浓度($P_{\text{正}}$ 、 $1/10\ P_{\text{正}}$ 、 $1/25\ P_{\text{正}}$ 、 $1/50\ P_{\text{正}}$)对螺旋藻吸附、吸收和转化 As(V) 的影响。结果表明, 在本研究 As(V) 处理范围内, 螺旋藻的干重与对照没有显著差异。随着 As(V) 浓度的升高, 藻体富集的总砷含量增加, 当 As(V) 处理浓度为 $150\sim 300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时砷富集量为 $1.006\sim 1.569\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 超过了国家保健(功能)食品砷污染限量 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (GB 16740—1997)。随着培养基中磷浓度的降低, 螺旋藻体内吸收的砷含量呈现增多趋势。在正常磷($P_{\text{正}}$)和 $1/10\ P_{\text{正}}$ 条件下, 螺旋藻体内的砷均为 As(V); 当磷浓度降低至 $1/25\ P_{\text{正}}$ 时, 藻细胞中的砷有 3.28% 为 As(III); 当磷浓度降低为 $1/50\ P_{\text{正}}$ 时, 螺旋藻吸收的砷增加至 $1.457\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 其中有 9.24% 和 37.35% 分别转化为 As(III) 和二甲基砷(DMA), 表明降低培养基中磷浓度促进了螺旋藻对 As(V) 的吸收、还原和甲基化, 但藻细胞中砷的主要形态仍为 As(V)。在正常磷浓度培养下, 藻体富集的砷以藻细胞表面吸附为主, 通过磷酸盐缓冲液脱附可去除 95% 以上螺旋藻富集的砷。

关键词:螺旋藻; 磷; 砷; 吸附; 吸收; 转化

中图分类号: X52 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2015)06-1034-07 doi:10.11654/jaes.2015.06.003

Effects of Phosphorus at Various Concentrations on Adsorption, Uptake and Transformation of Arsenate by *Spirulina platensis*

WANG Shu¹, XU Ping-ping¹, LIU Cong¹, WANG Ya¹, ZHANG Chun-hua², GE Ying^{1*}

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

Abstract: Arsenic(As) accumulation in *Spirulina platensis* may reduce the quality of health products produced from this microalga. Phosphorus(P) may influence the algal uptake and biotransformation of As. Thus it would be possible to reduce the accumulation of As in algae by manipulating P concentrations in growth media. To test this, we first set up an experiment to examine the As(V) adsorption and absorption characteristics of *S. platensis* under $0\sim 300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V), and then conducted another experiment to study the effects of normal and low P levels on the As(V) uptake, adsorption and biotransformation by *S. platensis* at $300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V). Algal biomass was not significantly affected by As(V) treatments, compared with the control. However, arsenic accumulation increased with As(V) levels in the growth media. At $150\sim 300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V), *S. platensis* contained 1.006 to $1.569\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, which exceeded the national standard(GB 16740—1997) for health(functional) foods($1.0\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The As absorption was reduced by increasing P concentrations. At P levels of $1/10$ normal or higher, P did not change As speciation in *S. platensis*, whereas only 3.28% of As was transformed to As(III) at $1/25$ normal P level. When P concentration was lowered to $1/50$ of normal P level, As uptake increased significantly to $1.457\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, of which 9.24% and 37.35% were converted to As(III) and DMA, respectively. In conclusion, decrease in P supply promoted the uptake, reduction and methylation of As(V), though As(V) was still the main As species in the microalgae. The majority of As was adsorbed on the surface of algal cells, suggesting that more than 95% of As in the *S. platensis* could be removed by washing with phosphate buffered saline(PBS) solution.

Keywords: *Spirulina platensis*; phosphorus; arsenic; adsorption; absorption; transformation

收稿日期: 2014-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(41371468, 31400450)

作者简介: 王 淑(1989—), 女, 贵州清镇人, 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: 2012103039@njau.edu.cn

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

螺旋藻(*Spirulina*)是一种光合自养型蓝藻,因其含有丰富的蛋白质、多种维生素、碳水化合物、藻多糖、不饱和脂肪酸和微量元素等物质^[1-2],被联合国粮农组织誉为21世纪最优秀的食品^[3]。螺旋藻作为一种高蛋白的绿色天然保健品,其品质近年来也成为国内外关注的热点之一。2012年国家食品药品监督管理局发现市场上某些品牌的螺旋藻保健品存在铅和砷超标的情况^[4]。类似地,Richmond等^[5]报道了来源于墨西哥和乍得的两株螺旋藻,其砷含量分别为2.9、1.8 mg·kg⁻¹,超过了巴西国家卫生监测机构(ANVISA)和目前世界最大的食用螺旋藻农场 Earthrise Farms 对螺旋藻中砷的最大限量 1.0 mg·kg⁻¹^[5-6]。

砷是普遍存在于土壤、矿物、水体和生物体内的类金属元素,其在地壳中的丰度在所有元素中排列第20位。由于其毒性被列为I类致癌物^[7],长期接触砷污染会导致细胞凋亡,还能诱发肝癌、皮肤癌、肺癌等疾病^[8]。在自然水体中,砷主要以砷酸盐[As(V)]和亚砷酸盐[As(III)]的形态存在^[9]。随着我国经济社会的快速发展,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并随河流进入水体。近年来,砷大范围扩散到地表、地下水及饮用水中,已有报道表明,受污染的地下水中砷含量高达5000 μg·L⁻¹^[10]。如果养殖水体遭受砷污染,将对螺旋藻保健品的品质安全产生严重威胁。王志忠等^[11]研究发现鄂尔多斯碱湖钝顶螺旋藻粉中的砷主要来源于螺旋藻的养殖用水,且在养殖过程中随着养殖用水和原料的添加,藻体富集的砷越来越多。

在原核生物中,As(III)通过水通道被吸收或细胞膜渗透进入细胞^[12],As(V)的吸收则是通过磷酸盐通道进入细胞,然后被砷酸盐还原酶还原成As(III)外排或储存在液泡中,As(III)可在甲基转移酶的作用下转化成毒性较小的有机砷,从而达到砷解毒的作用^[13]。磷作为螺旋藻的必需元素之一,与砷同族,化学性质相似,两者会竞争与细胞结合的同一位点,从而调控砷酸盐对细胞的毒性效应^[14]。研究表明^[15-16],胞外的磷浓度对微藻砷的富集有至关重要的作用,增加磷的浓度会抑制藻类对砷的吸收和积累。李宝洁^[15]发现,小球藻(*Chlorella vulgaris*)在1、10、30 μmol·L⁻¹砷处理下,细胞中总砷含量随着磷浓度的降低呈现增加趋势;Wang等^[16]研究表明,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)在缺磷条件下细胞内积累的砷含量最高,在正常磷营养时积累最少。因此,随着螺旋藻培养时间的延长,培养基中的磷酸盐含量降低,可能会促进

螺旋藻对砷的吸收,增加螺旋藻砷污染风险。

目前国内外对螺旋藻砷污染的研究主要集中在藻体、藻粉砷含量的检测,以及利用藻体去除水体中的砷等方面。王亚等^[17]、陈辉等^[18]和Morais等^[19]利用原子荧光光谱法、原子吸收光谱法等不同方法检测了螺旋藻中砷含量。此外,Doshi等^[19]利用螺旋藻活藻和死藻富集去除水体中的As(V),富集量分别高达525 mg·g⁻¹和402 mg·g⁻¹。但是,螺旋藻对砷的转化以及培养基中磷营养水平对螺旋藻砷代谢的影响仍鲜有报道。本试验以钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)为研究对象,通过设置不同As(V)和磷浓度处理,测定螺旋藻吸附和吸收的砷,研究磷浓度对螺旋藻As(V)积累和形态转化的影响,并分析磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)降低藻体砷富集的效果,以期对螺旋藻工业化生产中砷污染的控制提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)购自山东青岛中国科学院海洋生物种质库,本实验室保种、培养。采用Zarrouk培养基(pH9.0, 121℃高压蒸汽灭菌30 min)^[20],培养温度(30±1)℃,光照强度为3500~4000 lx,光照明暗比12 h:12 h,培养期间每天定时摇匀3次。

1.2 实验设计

1.2.1 不同浓度As(V)处理下螺旋藻对砷的富集

将生长至对数期的螺旋藻接种于1 L锥形瓶中,接种初始OD_{560nm}约为0.2,之后取200 mL藻液于500 mL锥形瓶中,分别加入100、200、300、400、500、600 μL的100 mg·L⁻¹ As(V)母液(以Na₃AsO₄·12H₂O配制),藻液最终As(V)浓度分别为50、100、150、200、250、300 μg·L⁻¹。每个处理设置6个平行,并以不加砷的藻液作为空白对照。处理7 d后用快速滤纸过滤收获藻体,在收获时3个平行直接用Beta 1-8 LD plus冷冻干燥机进行干燥,以测定其富集的总砷含量;另外3个平行用0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH=7.0)清洗(每次5 mL冲洗3次),去除藻细胞表面吸附的砷^[21],再经冷冻干燥后测定藻内吸收的砷含量及其形态,富集的总砷含量减去胞内吸收的砷即为螺旋藻表面吸附的砷含量。本研究预实验结果表明,PBS不会对藻细胞的完整性产生影响。

1.2.2 磷浓度对螺旋藻As(V)吸附、吸收、转化的影响

螺旋藻生长至对数期,过滤收集藻体,用无磷培

养液冲洗3遍,接种于无磷培养基中饥饿处理1 d,再接种于4种不同磷供应水平(预实验结果表明,本试验选用的4种磷浓度不会对螺旋藻生长产生影响)的培养基中: $P_{正}$ 、 $1/10 P_{正}$ 、 $1/25 P_{正}$ 、 $1/50 P_{正}$ (正常 Zarrouk 培养基中 K_2HPO_4 含量为 $0.5 g \cdot L^{-1}$, 即 $88.9 mg P \cdot L^{-1}$)。适应2 d后从同一瓶藻液中分别取200 mL藻液于500 mL锥形瓶中,加入60 μL $1000 mg \cdot L^{-1}$ As(V)母液,使不同磷浓度水平藻液的最终As(V)浓度均为300 $\mu g \cdot L^{-1}$,处理7 d后用快速滤纸过滤收获藻体,其余步骤同1.2.1。

1.3 生物量测定

螺旋藻经As(V)处理7 d后,用快速滤纸过滤收集藻体,并冷冻干燥24 h。滤纸和藻体的质量与过滤前滤纸的质量之差即为螺旋藻的生物量。同时将未过滤藻液的滤纸同批次冷冻干燥,避免滤纸水分造成的误差。

1.4 藻体总砷的测定

将冷冻干燥后的螺旋藻样磨碎,称量约0.05 g样品于25 mL玻璃消煮管中,加入2 mL体积比为4:1的 $HNO_3:HClO_4$ 混合酸,静置过夜^[17]。采用Lab Tech ED54型智能样品消解仪(莱伯泰科有限公司)电热消解至溶液澄清透明,打开消煮管塞进行赶酸至消煮管内剩下0.2 mL左右液体时,取出消煮管静置冷却。用去离子水润洗移至10 mL容量瓶中,加0.5 mL浓盐酸(优级纯)和2 mL 5%硫脲+5%抗坏血酸混合溶液后定容。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)测定其总砷含量,以同批次藻样相同步骤加标消解进行加标回收,回收率为93.24%~107.27%。

1.5 砷形态提取及测定

准确称取0.05 g干样于10 mL离心管中,加入3 mL $0.28 mol \cdot L^{-1} HNO_3$ 进行提取,90 $^{\circ}C$ 超声10 min后14 000 $\times g$ 离心10 min,重复提取3次^[22],上清液合并后定容至10 mL。定容后的样品用0.22 μm 滤膜过滤,滤液过阴离子交换柱(Hamilton PRP-X100),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)测定螺旋藻中砷的形态。同时设置As(III)、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)、As(V)的加标回收实验,砷形态提取率为94.73%~134.23%。检测条件^[17]:流动相为17.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 磷酸氢二铵(pH=6.1),等度洗脱;进样体积100 μL ;载流为5%盐酸;还原剂为1.5%硼氢化钾+0.5%氢氧化钾;屏蔽气为700 $mL \cdot min^{-1}$;载气为Ar,600 $mL \cdot min^{-1}$;光电

倍增管电压为270 V;灯电流为100 mA。

1.6 数据处理

用Excel 2010和SPSS 20统计分析软件进行数据处理与分析,用SigmaPlot12.5作图。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和Tukey检验进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 As(V)对螺旋藻生物量的影响

由螺旋藻干重的结果可知(表1),200 mL藻液在无砷处理时生物量为237.2 mg,加入不同浓度As(V)处理后,与对照相比螺旋藻的生物量均有所下降。但单因素方差分析结果表明,在本实验设置的As(V)处理范围内,螺旋藻生物量之间的差异均不显著($P > 0.05$)。由此说明培养基中As(V)浓度在0~300 $\mu g \cdot L^{-1}$ 时,螺旋藻的生长趋势未受到影响。

2.2 螺旋藻对砷的富集

2.2.1 不同As(V)浓度处理下螺旋藻对砷的富集

螺旋藻在不同浓度As(V)处理7 d后,藻体对砷的富集量随着As(V)浓度的升高呈增加趋势(表1)。与无砷处理的螺旋藻空白对照相比,50~300 $\mu g \cdot L^{-1}$ As(V)处理能显著提高螺旋藻对砷的富集($P < 0.05$)。当As(V)处理浓度为150 $\mu g \cdot L^{-1}$ 时,螺旋藻富集的总砷含量为1.006 $mg \cdot kg^{-1}$,且砷形态全部为As(V),超过我国GB 16740—1997保健(功能)食品砷的限量($1.0 mg \cdot kg^{-1}$)^[23]。当培养基中As(V)浓度为300 $\mu g \cdot L^{-1}$ 时,藻体富集的总砷含量最高(1.569 $mg \cdot kg^{-1}$),砷形态也均为As(V)。

从螺旋藻吸收的砷含量可以看出(表1),在50~100 $\mu g \cdot L^{-1}$ As(V)处理时,藻细胞几乎不吸收As(V);当As(V)浓度增加到150 $\mu g \cdot L^{-1}$ 时,藻细胞内检测到少量的砷,含量为0.009 $mg \cdot kg^{-1}$;当As(V)处理浓度达到300 $\mu g \cdot L^{-1}$ 时,藻体吸收的砷含量显著增加至0.076 $mg \cdot kg^{-1}$ ($P < 0.05$),经检测存在形态均为As(V)。随着As(V)处理水平的提高,螺旋藻细胞表面吸附的砷由0.235 $mg \cdot kg^{-1}$ 显著增至1.493 $mg \cdot kg^{-1}$,吸附的砷所占比例均在95%以上。该结果表明,在本研究条件下,螺旋藻对砷的富集可能以吸附为主,只有少量的砷被藻体吸收(<4.84%)。

2.2.2 磷浓度对螺旋藻砷富集的影响

从图1可知,在300 $\mu g \cdot L^{-1}$ As(V)处理条件下,随着培养基中磷浓度的降低,螺旋藻富集的砷含量逐渐增加。在正常磷条件下,螺旋藻富集的砷含量为

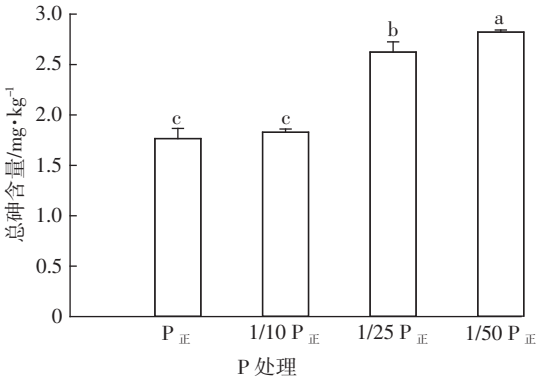
表 1 螺旋藻吸附和吸收的砷含量及比例

Table 1 Amount and proportion of absorbed and adsorbed As by *Spirulina platensis*

As(V)处理浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V) treatment concentration	生物量/mg Biomass	富集的砷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Accumulated As	吸收的砷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (比例/%) Absorbed As(Proportion)	吸附的砷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (比例/%) Adsorbed As(Proportion)
0	237.2 $\pm$ 6.82a	ND	ND	—
50	228.4 $\pm$ 6.70a	0.235 $\pm$ 0.006e	ND	0.235 $\pm$ 0.006e(100)
100	235.8 $\pm$ 2.80a	0.539 $\pm$ 0.068d	ND	0.539 $\pm$ 0.068d(100)
150	231.5 $\pm$ 8.43a	1.006 $\pm$ 0.028c	0.009 $\pm$ 0.003c(0.89)	0.997 $\pm$ 0.022c(99.11)
200	235.5 $\pm$ 2.30a	1.043 $\pm$ 0.016c	0.010 $\pm$ 0.005c(0.96)	1.033 $\pm$ 0.016c(99.04)
250	234.6 $\pm$ 7.65a	1.367 $\pm$ 0.035b	0.025 $\pm$ 0.002b(1.83)	1.342 $\pm$ 0.032b(98.17)
300	233.6 $\pm$ 5.11a	1.569 $\pm$ 0.122a	0.076 $\pm$ 0.007a(4.84)	1.493 $\pm$ 0.087a(95.16)

注:表中数据用“平均值 $\pm$ 标准差”(mean $\pm$ SD)表示;不同字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$);ND表示未检出或低于方法检出限。
Note: Data in table are mean $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant difference between different treatments($P<0.05$). ND means not detected or below the method detection limit.

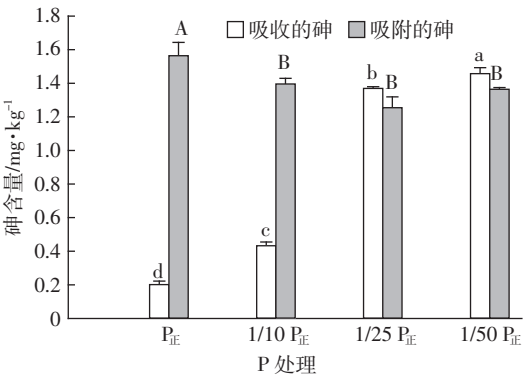
1.766 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;当磷浓度降低至 1/25、1/50 $P_{\text{正}}$ 时,螺旋藻积累的总砷含量分别显著增加至 2.624、2.822 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,表明培养基中磷的浓度对螺旋藻砷富集有重要影响。这主要是由于在培养基磷浓度为 1/25、1/50 $P_{\text{正}}$ 条件下,藻体吸收的砷含量增加所致(图 2)。螺旋藻胞内总砷含量随培养基中磷浓度的降低而增加,当磷浓度降低至 1/10 $P_{\text{正}}$ 时,藻体吸收的砷含量显著增加到 0.433 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,约为 $P_{\text{正}}$ 条件下藻体吸收砷含量的 2 倍;当磷处理浓度为 1/25、1/50 $P_{\text{正}}$ 时,胞内砷含量分别显著增加至 1.369、1.457 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($P<0.05$)。该结果表明,降低培养基磷浓度会促进藻体对砷的吸收。藻体表面吸附的砷含量随着培养基中磷浓度的增加整体呈增加趋势,但在三个低磷水平下(1/10、1/25、1/50 $P_{\text{正}}$)藻细胞表面吸附的砷之间差异不显著($P>0.05$),在正常磷供应条件下吸附的砷含量显著增至 1.684 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。



不同小写字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference($P<0.05$)
between different treatments. The same below

图 1 不同磷浓度处理对螺旋藻砷富集的影响

Figure 1 Effect of different P treatments on arsenic enrichment in *Spirulina*



不同小写字母表示不同磷处理间螺旋藻吸收砷的差异显著($P<0.05$);
不同大写字母表示各处理间螺旋藻吸附砷的差异显著($P<0.05$)
Different lowercase letters indicate significant difference($P<0.05$)
in absorbed As by *Spirulina platensis* between P treatments,
and different capital letters indicate significant difference($P<0.05$)
in adsorbed As by *Spirulina platensis* between various P treatments

图 2 不同磷处理对螺旋藻砷吸附、吸收的影响

Figure 2 Effects of different P treatments on arsenic adsorption and absorption by *Spirulina*

kg^{-1} ($P<0.05$)。

2.3 磷营养条件对螺旋藻胞内砷形态的影响

在 4 种不同磷供应水平下,螺旋藻胞内砷形态均以 As(V)为主(图 3),所占比例为 56.12%~100%。在培养基磷浓度为 $P_{\text{正}}$ 和 1/10 $P_{\text{正}}$ 时,藻细胞内只有 As(V)一种砷形态;当磷浓度降低为正常磷的 1/25 时,胞内 As(III)含量仅 0.045 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,且在培养基中未检测到 As(III)形态;然而当磷浓度降低至 1/50 $P_{\text{正}}$ 时,螺旋藻吸收的砷增加,且部分转化成 0.135 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ As(III)和 0.544 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DMA,同时在培养液中检测到 As(III)的存在,含量为 1.69 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该实验结果表明,培养基中磷浓度的降低会促进螺旋藻对 As(V)的吸收、还原、甲基化和 As(III)的外排。

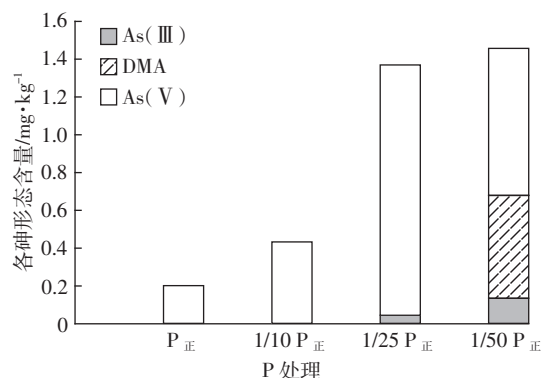


图3 不同磷处理对螺旋藻胞内砷形态的影响

Figure 3 Content of arsenic species in *Spirulina* under different P treatments

3 讨论

水生生物在适应砷污染水体的过程中,形成了一定的砷代谢机制。As(V)可以通过磷酸盐转运通道进入浮游植物细胞,被砷酸盐还原酶还原成 As(III)^[24], As(III)与胞内的谷胱甘肽(GSH)或植物络合素(PC)螯合储存在液泡中,或者直接通过膜蛋白排出^[25],也可以甲基化形成毒性较小的非挥发性甲基砷化物再排出胞外^[15]。磷和砷为同族元素,由于两者的化学性质相似,它们通过同一通道进入生物体内。因此,环境中的磷对藻类 As(V)的积累以及胞内砷形态的转化有着至关重要的作用。

本试验结果表明,不同浓度 As(V)对螺旋藻干重没有产生显著影响。王志忠等^[26]研究结果也发现,螺旋藻培养液中砷浓度在 0~0.32 mg·L⁻¹,随着砷浓度的增加,螺旋藻的生长没有显著变化。这可能是因为磷和 As(V)均通过磷酸盐通道进入细胞,而培养基中磷酸盐浓度较高(88.9 mg·L⁻¹),与 As(V)竞争同一通道,导致 As(V)较难进入藻体造成胁迫,绝大部分的砷都吸附在藻体表面。王静^[24]研究发现,在缺磷条件下,100 μg·L⁻¹和 1、10 mg·L⁻¹As(V)处理铜绿微囊藻 20 d,未对其生长趋势产生影响,主要是由于胞内存在多磷酸体,多磷酸体是重金属结合位点,能富集多种重金属;20 d 后胞内磷酸体消耗殆尽,释放磷酸盐的同时释放其结合的重金属离子,表现出 As(V)的毒性。但在本研究中,螺旋藻体内是否也存在相似作用机理仍需要进一步探索。

螺旋藻细胞壁表面积较大,含有 24%~74%的藻类多糖,能提供许多与金属离子结合的活性基团,如羧基、氨基、羟基、醛基、酰胺基等^[27-28]。有研究表明,螺旋藻培养基中砷浓度越高(0~0.32 mg·L⁻¹),藻粉砷含

量越高^[26]。Doshi 等^[19]研究发现,螺旋藻富集的砷含量随 As(V)处理浓度的升高而增加,当 As(V)初始浓度从 996 mg·L⁻¹升高到 4510 mg·L⁻¹时,藻体富集的砷含量由 176 mg·g⁻¹升至 475 mg·g⁻¹。本试验结果显示,当培养基中 As(V)处理浓度从 50 μg·L⁻¹增至 300 μg·L⁻¹时,藻体富集的总砷含量增加了约 6 倍;且当培养基中 As(V)浓度为 150 μg·L⁻¹时,藻体富集的砷含量已超过国家标准限量值。因此,在螺旋藻的生产养殖过程中,应及时监测水体中的砷浓度。

螺旋藻对 As(V)的吸收和累积与培养基中的磷酸盐密切相关^[29]。有研究发现,增加磷浓度可以抑制小球藻对砷的吸收和积累^[15]。而在本实验中,螺旋藻的 Zarrouk 培养基中磷浓度为 88.9 mg·L⁻¹,导致螺旋藻在 As(V)浓度低于 100 μg·L⁻¹时吸收砷较少。随着砷处理浓度提高,藻体吸收的砷随之增加,但含量均远低于国家标准,藻体仍将大部分的砷吸附在细胞表面。通过 PBS 洗脱可以去除藻体 95%以上的砷,清洗效率是王志忠等^[11]利用蒸馏水清洗减少藻粉砷含量方法的 2 倍。此外,降低培养基中磷浓度有利于藻类对砷的吸收。Zhang 等^[30]研究发现,集胞藻(*Synechocystis*)在低磷(5 μmol·L⁻¹)条件下培养 6 d,藻细胞内总砷浓度迅速增至 7.9 mmol·L⁻¹,约为正常磷(230 μmol·L⁻¹)营养时藻内砷浓度(0.7~0.9 mmol·L⁻¹)的 10 倍。铜绿微囊藻在 10 mg·L⁻¹As(V)处理下,在不含磷酸盐培养基中积累的砷含量达到最大值 19.75 μg·g⁻¹,当磷酸盐含量为 10 mg·L⁻¹时藻细胞对 As(V)的吸收量最小^[24]。本研究中,在正常磷培养基中,螺旋藻吸收的总砷为 0.202 mg·kg⁻¹;当磷浓度降低为 1/25、1/50 P_正时,藻体吸收的砷分别显著增加到 1.369、1.457 mg·kg⁻¹,证明了胞外磷浓度的降低会促进螺旋藻藻体吸收砷,且在 1/25 P_正低磷供应水平下,螺旋藻胞内的砷全为无机砷。其含量已超过国家保健(功能)食品中砷的限量标准,该部分砷被藻细胞吸收进入体内较难去除。因此,在螺旋藻养殖生产的过程中,应当注意培养基中磷含量的监测,及时添加磷酸盐,防止培养液中磷浓度过低导致的螺旋藻砷含量超标。

研究表明低磷不仅能显著影响藻体对砷的吸收,还能影响其细胞内砷的代谢。当 As(V)处理浓度为 50 μg·L⁻¹时,杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)在 3 mg·L⁻¹高磷条件下体内 99.7%的砷为 As(V),磷浓度降低到 0.12 mg·L⁻¹后,促进体内 As(V)的还原,As(III)比例升高至 26%,未检测到体内 As 向 DMA、MMA 等其他砷形态的转化^[29]。然而本研究的结果与

前人报道有所不同:300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V)处理螺旋藻7 d后,正常磷条件下螺旋藻胞内全为As(V);1/25 $P_{\text{正}}$ 条件下胞内仅3.28%的砷转化为As(III);而1/50 $P_{\text{正}}$ 条件下,细胞内9.24%的砷转化为As(III)并外排到培养基中(1.69 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),37.35%的砷转化为DMA储存在体内。Hellweger等^[31]提出,当环境中缺乏磷时,藻内砷代谢以甲基化为主。Qin等^[32]研究也表明,红藻*Cyanidioshyzon* sp. 5508在As(V)吸收增加后,迅速还原成As(III),随后转化为三甲基砷化物(TMAO)和二甲基砷[DMA_s(V)]。据此推测,培养基磷浓度的降低促进了螺旋藻细胞对As(V)吸收、还原和外排,且当磷浓度降至1.778 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1/50 $P_{\text{正}}$)时,胞内As(V)的代谢主要是转化为毒性较弱的DMA,从而降低砷酸盐的毒性。

4 结论

在本试验As(V)处理浓度范围内(0~300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),螺旋藻的生长几乎不受影响,生物量差异不显著($P>0.05$)。此外,正常磷条件下,螺旋藻富集的总砷含量随着As(V)处理浓度的增加显著增加,且砷形态均为As(V)。当培养基中As(V)浓度为150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理7 d后,螺旋藻富集的总砷含量超过了国家标准限量值,在一定程度上造成了螺旋藻保健品的砷污染。

培养环境中磷浓度的降低有助于螺旋藻对砷的吸收、还原、甲基化和外排。正常磷营养条件下,通过PBS清洗可以明显降低螺旋藻胞外对砷的吸附,从而减少螺旋藻的砷污染。

参考文献:

- [1] 胡海燕,张静,徐晶,等.螺旋藻培养液中碳、氮、磷的优化及其效应评价[J].食品科技,2012,37(1):29-33.
HU Hai-yan, ZHANG Jing, XU Jing, et al. Optimization of carbon, nitrogen and phosphorus in *Spirulina* culture medium and its effect[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(1):29-33.
- [2] 许文涛,王颖,罗云波,等.Cr(III)在钝顶螺旋藻中的生物富集及其对钝顶螺旋藻生长的影响[J].食品科学,2009,30(5):153-157.
XU Wen-tao, WANG Ying, LUO Yun-bo, et al. Bioaccumulation of Cr(III) in *Spirulina platensis* and its effects on cultivation of *Spirulina platensis*[J]. *Food Science*, 2009, 30(5):153-157.
- [3] 胡鸿钧.螺旋藻生物学及生物技术原理[M].北京:科学出版社,2003.
HU Hong-jun. *Spirulina biology and biotechnology principle*[M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [4] 食药监办.关于查处康爱斯螺旋藻片等假冒保健食品的通知[EB/OL]. [2012-03-30].
Http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0847/70399.html.
- [5] Richmond A, Hu Q. Handbook of microalgal culture: Applied phyecology and biotechnology[M]. John Wiley and Sons, 2013: 495.
- [6] Morais M G, Radmann E M, Andrade M R, et al. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in Southern Brazil[J]. *Aquaculture*, 2009, 294(1):60-64.
- [7] Oremland R S, Stolz J F. The ecology of arsenic[J]. *Science*, 2003, 300(5621):939-944.
- [8] Abernathy C O, Liu Y P, Longfellow D, et al. Arsenic: Health effects, mechanisms of actions, and research issues[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107(7):593-597.
- [9] 李妍丽,柯林. As(III)和As(V)对小球藻(*Chlorella* sp.)的生长影响研究[J].环境科学与技术,2012,35(12):61-70.
LI Yan-li, KE Lin. Toxicity of arsenic species on growth of green microalgae *Chlorella* sp.[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 35(12):61-70.
- [10] 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.
- [11] 王志忠,刘果厚,巩东辉,等.鄂尔多斯碱湖钝顶螺旋藻粉砷的来源追踪[J].中国农学通报,2012,28(11):108-111.
WANG Zhi-zhong, LIU Guo-hou, GONG Dong-hui, et al. Tracking sources of arsenic in the *Spirulina platensis* powder from the Orados Alkali Lake in Inner Mongolia[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(11):108-111.
- [12] 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):629-663.
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.
- [13] Qin J, Rosen B P, Zhang Y, et al. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(7):2075-2080.
- [14] Knauer K, Behra R, Hemond H. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient[J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 46(3):221-230.
- [15] 李宝洁.不同磷浓度下砷对小球藻*Chlorella vulgaris*的生物效应[D].青岛:中国海洋大学,2012.
LI Bao-jie. Biological effects of arsenic on *Chlorella vulgaris* mediated by different concentrations of phosphorus[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [16] 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.
- [17] 王亚,张春华,申连玉,等.高效液相色谱/氢化物发生-原子荧光光谱法检测微藻中的砷形态[J].分析科学学报,2014,1(30):21-25.

- WANG Ya, ZHANG Chun-hua, SHEN Lian-yu, et al. Detection of arsenic species in microalga using High Performance Liquid Chromatography-Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry[J]. *Journal of Analytical Science*, 2014, 1(30):21-25.
- [18] 陈 辉, 闻 捷, 李春野, 等. 干法消化-原子荧光光谱法同时测定螺旋藻粉中砷和铋[J]. 中国卫生检验杂志, 2013(12):2583-2585.
- CHEN Hui, WEN Jie, LI Chun-ye, et al. Simultaneous determination of arsenic and bismuth in *Spirulina* powder using dry digestion-Atomic Fluorescence Spectrometry[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013(12):2583-2585.
- [19] Doshi H, Ray A, Kothari I L. Live and dead *Spirulina* sp. to remove arsenic(V) from water[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2009, 11(1):53-64.
- [20] Zarrouk C. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*[J]. *University of Paris, France*, 1966.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 国家技术监督局. GB 16740—1997 保健(功能)食品通用标准[S]. 1997.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB 16740—1997 General standard for health(functional) foods[S]. 1997.
- [24] 王 静. 铜绿微囊藻中砷的代谢与生物效应[D]. 天津:天津大学, 2012.
- WANG Jing. Metabolism and biological effects of arsenic in *Microcystis aeruginosa*[D]. Tianjin:Tianjin University, 2012.
- [25] 张思宇, 孙国新, 贾 炎. 海洋真核微藻 *Ostreococcus tauri* 对砷的解毒机制研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(10):2879-2884.
- ZHANG Si-yu, SUN Guo-xin, JIA Yan. Arsenic detoxification mechanism in marine eukaryotic microalgae *Ostreococcus tauri*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(10):2879-2884.
- [26] 王志忠, 刘果厚, 巩东辉, 等. 不同来源钝顶螺旋藻砷富集特性[J]. 科技导报, 2014, 32(32):37-40.
- WANG Zhi-zhong, LIU Guo-hou, GONG Dong-hui, et al. Characterization of arsenic concentration in *Spirulina platensis* from different sources[J]. *Science and Technology Review*, 2014, 32(32):37-40.
- [27] 田 丹, 赵 文, 魏 杰, 等. 蛋白核小球藻对铅、镉和汞吸附速率及其影响因素的研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(12):2548-2553.
- TIAN Dan, ZHAO Wen, WEI Jie, et al. Biosorption rate and influence factors of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} by *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(12):2548-2553.
- [28] 黄宏霞. 钝顶螺旋藻对 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 吸附特性的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2006.
- HUANG Hong-xia. Adsorption characterization of Cu^{2+} and Cd^{2+} by *Spirulina platensis*[D]. Wuhan:HuaZhong Agricultural University, 2006.
- [29] Duncan E G, Maher W A, Foster S D, et al. The influence of arsenate and phosphate exposure on arsenic uptake, metabolism and species formation in the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*[J]. *Marine Chemistry*, 2013, 157:78-85.
- [30] Zhang S, Rensing C, Zhu Y G. Cyanobacteria-mediated arsenic redox dynamics is regulated by phosphate in aquatic environments[J]. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(2):994-1000.
- [31] Hellweger F L, Farley K J, Lall U, et al. Greedy algae reduce arsenate[J]. *Limnology Oceanography*, 2003, 48(6):2275-2288.
- [32] Qin J, Lehr C R, Yuan C, et al. Biotransformation of arsenic by a Yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(13):5213-5217.