

不同价态砷对斜生栅藻生长及叶绿素荧光的影响

樊香绒^{1,2,3}, 尹黎燕^{1,2}, 李 伟^{1,2}, 常锋毅^{1,2}

(1. 中国科学院水生植物与流域生态重点实验室, 武汉 430074;
2. 中国科学院武汉植物园水生生物学实验室, 武汉 430074; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:对比研究了不同浓度 As(Ⅲ) 和 As(V) 对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 生长及叶绿素荧光特性的影响。试验表明, 较高浓度 ($\geq 500 \mu\text{M/L}$) 时, As(Ⅲ) 对栅藻生长速率的影响大于 As(V)。对叶绿素 a 含量影响表明, 随着砷浓度的增加, 栅藻叶绿素 a 含量呈现降低趋势; 2 种价态之间表现为叶绿素 a 对于 As(Ⅲ) 浓度的变化更为敏感。2 种价态对斜生栅藻光合系统 II 主要荧光参数 F_v/F_m (PSII 的最大光化学量子产量)、Yield (PSII 的实际光能转化效率) 以及 ETR_{max} (PSII 最大电子传递速率) 均与砷浓度呈显著的负相关。研究结果表明, 砷对斜生栅藻产生的抑制作用与对光合系统产生的抑制相一致, 并且 As(Ⅲ) 对叶绿素荧光产生的抑制作用要大于 As(V)。

关键词:砷; 斜生栅藻; 生长; 叶绿素荧光

中图分类号: Q142 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2013)05-0060-05

砷 (As) 是地表环境中普遍存在的微量元素, 其形成的各类有机和无机化合物被广泛应用于冶金、制药、农业等领域。近年来, 随着工农业的快速发展, 砷及其化合物的应用也越来越广泛, 导致微量砷在人们的日常饮食、空气及土壤中均有发现; 因其对动植物的广泛致毒性, 被美国环保局 (US Environmental Protection Agency, USEPA) 列为清洁水源优先控制污染物 (张楠等, 2013)。砷可分为无机砷和有机砷化合物两大类, 其中无机砷主要为三价 As(Ⅲ) 和五价 As(V), 有机砷化合物比较常见的是单甲基砷 (MMAA) 和二甲基砷 (DMAA)。

随着环境生物学的发展, 砷对各类生物生理生态学效应成为重金属生态毒理学研究热点之一。目前, 砷对水生生物毒性效应的研究主要集中于原生动物、枝角类动物、昆虫、底栖无脊椎动物、鱼类和哺乳类水生脊椎动物 (高世荣等, 1997; Markley & Herbert, 2010; Navratilova et al, 2011; Yin et al, 2011); 对藻类的毒性作用也开展了相关研究, 较高浓度砷均会抑制藻类的生长 (康瑞娟等, 2005; 李妍

丽等, 2012)。最近以产毒微囊藻为材料的研究表明, 较低浓度的砷会增加微囊藻毒素的产量 (龚艳等, 2010; 2011); 砷对藻类的影响同样十分显著, 随着 As^{3+} 浓度增大, 其群落逐渐减少, 多样性指数明显下降 (高世荣等, 1997)。

由于砷的毒性很大程度上决定于其价态, 不同形态的砷对浮游植物毒性大小及作用机制有所差别 (龚艳等, 2010)。已开展的研究主要集中在毒性较强的 As(Ⅲ), 对毒性较弱却是水体主要存在状态的 As(V) 开展的对比研究相对有限。本文主要研究了自养条件下, 斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 在不同浓度 As(Ⅲ) 和 As(V) 作用下, 藻细胞的生长、光合色素以及光合效能等生理方面的毒性响应, 初步探讨了砷对藻类的致毒机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用斜生栅藻来自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库 (FACHB), 在实验室用 BG-11 培养基进行扩大培养, 取对数生长期藻类开展毒理试验。三价和五价砷分别使用亚砷酸钠 (NaAsO_2) 和砷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 均为市售分析纯。分别用去离子水配制成砷溶液终浓度为 0、10、50、100、500、1000 $\mu\text{M/L}$ 的 150 倍液液待用。

1.2 试验设计

将扩大培养后处于对数生长期的栅藻接入到 150 mL 的无菌三角瓶中, 并加入不同价态的砷溶液, 使最终藻液体积为 100 mL, 接种后的三角瓶以

收稿日期: 2013-04-28

基金项目: 武汉市学科带头人计划项目 (201051730562)——长江中下游浅水湖泊稳态转换及其调控机制的实验生态学研究; 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金 (2012FB21)。

通讯作者: 李伟, E-mail: liwei@wbgcas.cn; 常锋毅, E-mail: changfy@wbgcas.cn

作者简介: 樊香绒, 1988 年生, 女, 硕士研究生, 主要从事生态毒理学研究。E-mail: bestxiangrong@163.com

无菌膜封口。培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光强 $2\,000\text{ lx}$,光周期 $\text{L}:\text{D}=12:12$,静置培养。每隔 6 h 摇动 1 次,并随机更换锥形瓶位置。栅藻接种后,按照 0 、 10 、 50 、 100 、 500 、 $1\,000\text{ }\mu\text{M/L}$ 终浓度加入砷溶液母液,然后放入人工气候箱中培养,每隔 24 h 取样 1 次,测定 665 nm 光密度,培养结束后(10 d),取样测定细胞色素和叶绿素荧光。

1.3 测定方法

1.3.1 生长测定 藻细胞密度和 665 nm 处吸光度具有很好的线性关系,因此其生长状况以 U-3400 分光光度计测定光密度值表示(OD_{665});同时,根据细胞生长情况计算生长速率(μ),公式如下:

$$\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (T_1 - T_0)$$

式中: N_0 和 N_1 分别为起始时间 T_0 和取样时间 T_1 的测定值。

1.3.2 色素含量测定 叶绿素的测定方法参照Sartory & Grobbelaar (1984),取 3 mL 藻液 $8\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,去掉培养基,用 95% 乙醇重悬浮提取叶绿素, 4°C 过夜抽提;再离心,以 95% 的乙醇为参比,测定上清液在 665 nm 与 649 nm 处的吸光度值(A_{665} 和 A_{649})。叶绿素 a 含量($\mu\text{g/mL}$) $=13.7A_{665}-5.76A_{649}$

1.3.3 叶绿素荧光测定 使用浮游植物效率分析仪(PHYTO-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany)进行叶绿素荧光测定,表征光合效率的强弱。样品经暗适应后,分别在PHYTO-PAM的Light Curve-window和Report-window获取光系统II(PS II)的最大光化学量子产量,实际光能转化效率和最大电子传递速率。所测得的最大光化学量子产量反映了藻细胞光系统II(PS II)光化学能量的变化状况,即通常的 F_v/F_m (F_v 为可变荧光, F_m 为最大荧光)。

1.4 数据分析

统计制图采用Origin 7.0完成,对藻细胞色素和叶绿素荧光测定结果采用SPSS13统计软件进行方差分析和组间差异显著性检验(One-way ANOVA, Tukey)。

2 结果与分析

2.1 砷对斜生栅藻生长的影响

试验结果显示,低浓度时 As(V) 能够刺激栅藻细胞生长,栅藻的光密度随着添加浓度的增加而增加;当 As(V) 浓度到达 $500\text{ }\mu\text{M/L}$ 时,斜生栅藻的生长速率最大,日均可达到 0.82 ,显著高于对照组;而当 As(V) 添加浓度为 $1\,000\text{ }\mu\text{M/L}$ 时,斜生栅藻

的生长速率则有所降低(图1)。 As(III) 对斜生栅藻生长的影响表明,仅在添加初期表现为刺激作用,随着培养时间的增加, 48 h 后迅速表现出抑制作用,并且随着添加浓度的逐渐升高,生长速率逐渐降低;在 $500\text{ }\mu\text{M/L}$ 和 $1\,000\text{ }\mu\text{M/L}$ 时,藻细胞生长速率明显低于对照组(图2)。

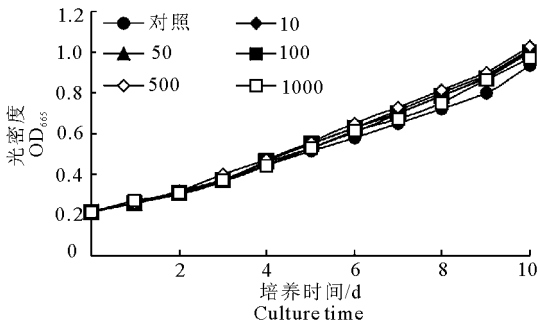


图1 不同浓度 As(V) 对斜生栅藻生长的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of As(V) on the growth of *Scenedesmus obliquus*

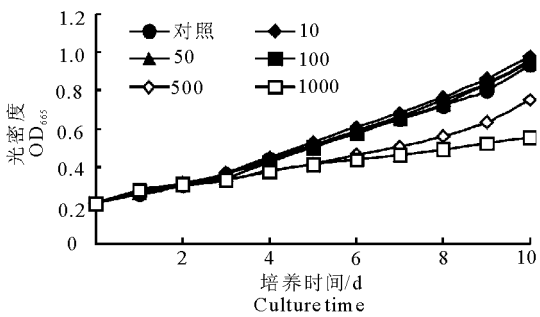


图2 不同浓度 As(III) 对斜生栅藻生长的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of As(III) on the growth of *Scenedesmus obliquus*

2.2 砷对斜生栅藻细胞色素的影响

试验结果表明, As(III) 可以显著影响藻细胞叶绿素 a 含量,随着 As(III) 添加浓度的增加,叶绿素 a 含量逐渐降低, $500\text{ }\mu\text{M/L}$ 和 $1\,000\text{ }\mu\text{M/L}$ 组藻细胞叶绿素 a 含量显著低于对照组。对 As(V) 添加,栅藻叶绿素 a 含量也有降低的趋势,但除 $1\,000\text{ }\mu\text{M/L}$ 浓度组降低的幅度显著低于对照组外,其他浓度组对栅藻叶绿素 a 含量的影响并不显著。通过 As(III) 和 As(V) 两组处理的对比研究,随着2个价态 As 处理浓度的增加,栅藻叶绿素含量大体上均呈现降低的趋势,并有明显的组间差异,表现为栅藻叶绿素 a 对于 As(III) 浓度的变化更为敏感(图3)。

2.3 砷对栅藻光合效能的影响

由图4-6可以看出,高浓度砷添加对斜生栅藻PS II的 F_v/F_m 、Yield以及 ETR_{max} 均存在一定抑制作用,且 As(III) 和 As(V) 对其产生抑制作用的有效

浓度存在差异。对 As(Ⅲ)而言,当添加浓度高于 100 μM/L 时,处理组光合效能和最大电子传递速率即可被显著抑制;而对于 As(Ⅴ),当添加剂量达到 1 000 μM/L 时才会对光合效能和最大电子传递速率产生显著的抑制作用。

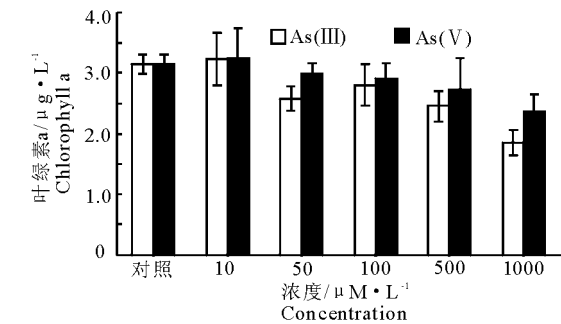


图3 不同浓度 As(Ⅲ)和 As(Ⅴ)对斜生栅藻叶绿素 a 含量的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(Ⅴ) on the chlorophyll a content of *Scenedesmus obliquus*

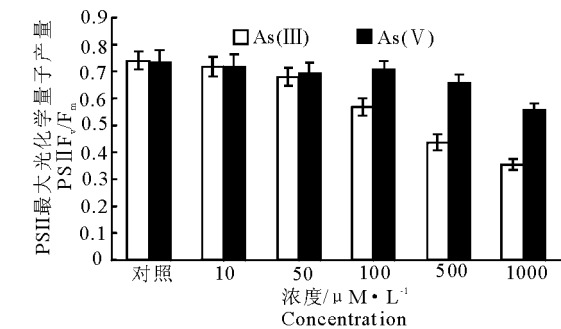


图4 不同浓度 As(Ⅲ)和 As(Ⅴ)对斜生栅藻 PS II 最大光化学量子产量的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(Ⅴ) on the chlorophyll fluorescence F_v/F_m of *Scenedesmus obliquus*

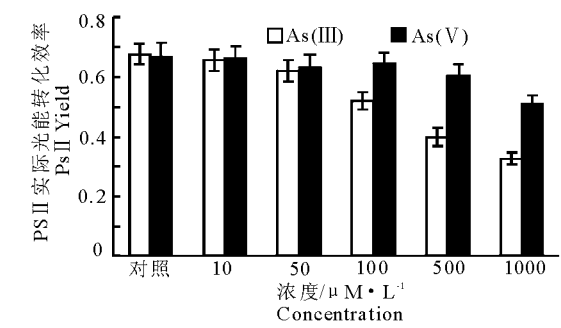


图5 不同浓度 As(Ⅲ)和 As(Ⅴ)对斜生栅藻 PS II 实际光能转化效率的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(Ⅴ) on the chlorophyll fluorescence Yield of *Scenedesmus obliquus*

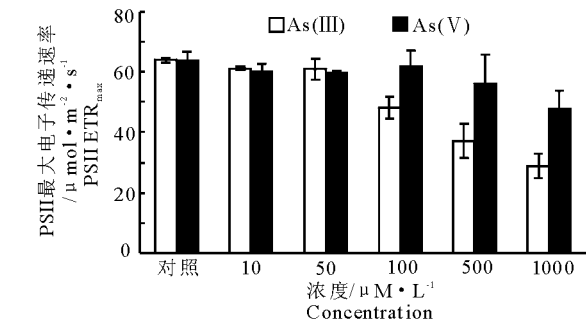


图6 不同浓度 As(Ⅲ)和 As(Ⅴ)对斜生栅藻 PS II 最大电子传递速率的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of As(Ⅲ) and As(Ⅴ) on the chlorophyll fluorescence ETR_{max} of *Scenedesmus obliquus*

3 讨论

3.1 不同价态砷对藻类生长的抑制作用

自然存在的砷可表现出多种价态,最常见的是 -3、+3 和 +5 价,其对生物的毒性也很大程度上依赖于砷的价态。试验结果表明,斜生栅藻对重金属砷在低浓度条件下表现出一定的耐受与生长刺激作用,相同添加浓度下,砷对斜生栅藻生长的抑制作用表现为 As(Ⅲ) > As(Ⅴ);其中,As(Ⅲ)对斜生栅藻生长的抑制作用与硅藻、铜绿微囊藻 (*Microcysis aeruginosa*)、羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornulum*) 等藻类的结果相类似,均表现为较高浓度的生长抑制作用(陈于望和张文, 1985; 康瑞娟等, 2005)。As(Ⅴ)对藻类毒性研究较少,以铜绿微囊藻为试验材料的研究表明,其耐受阈值均值为 106.5 μg/L(龚艳等, 2010),低于本研究中对斜生栅藻产生抑制作用的浓度。

3.2 砷对斜生栅藻叶绿素 a 的抑制作用

重金属对藻类的毒性作用是多方面的,对叶绿素含量的影响是最常用的指标。重金属不仅能引起藻类细胞类囊体结构的变化,而且会最终导致叶绿素合成与功能的改变。本研究中,砷对斜生栅藻叶绿素 a 影响的结果表明,较高浓度砷会破坏藻体的叶绿体,抑制其叶绿素的合成,进而导致其叶绿素 a 含量明显下降。叶绿素 a 作为藻类主要的捕光和光量子能量传递物质,对藻类进行物质转运与能量代谢具有至关重要的作用,直接影响藻类的生长过程。因此,本研究中叶绿素 a 对 As(Ⅲ)和 As(Ⅴ)添加的响应变化与对其生长的影响是一致的,均表现为 As(Ⅲ)对叶绿素 a 的影响大于 As(Ⅴ)。

3.3 砷对斜生栅藻光合系统的毒性机制

叶绿素荧光是研究藻类光合作用的良好指标和探针,通过对各种荧光参数的分析,可以快速灵敏地得到藻类光能利用信息,是研究和测定逆境对植物光合作用影响的理想方法(潘晓洁等, 2010; 李明等, 2012)。本试验发现,重金属砷胁迫后,斜生栅藻的荧光参数 F_v/F_m 、Yield、ETR 在低浓度条件下与对照组差异不显著,而后随着浓度的增加逐渐下降,且 $As(III)$ 对叶绿素荧光各项参数产生影响的有效浓度要远低于 $As(V)$ 。相关性分析表明,各荧光参数与 $As(III)$ 和 $As(V)$ 均呈现显著的负相关关系 ($P < 0.01$; $P < 0.001$)。

F_v/F_m 在藻类光合作用研究中被广泛用于评价其光合作用过程对环境胁迫的响应。由于任何影响 PS II 效能的环境胁迫均会使 F_v/F_m 值降低,本研究中砷对斜生栅藻的作用表明其 PS II 系统受到一定影响,且相同作用浓度下, $As(III)$ 的影响要大于 $As(V)$,这与姚琴等(2009)的研究结果一致。PSI 作为藻类进行光合作用过程中 $NADP^+$ 的最终电子受体,供应量不足会导致 PSII 功能下降,表现为 PSII 实际光能转化效率(Yield)、相对表观电子传递效率(ETR)的降低。本研究结果表明,砷对栅藻光能转化效率和相对表观电子传递效率的影响同其对 F_v/F_m 作用相一致,说明砷胁迫可能阻止了斜生栅藻的细胞同化产物($NADPH$)的形成,导致藻类细胞电子传递效率降低。通过对叶绿素 a 的影响表明,相对于叶绿素 a 含量出现显著下降的作用浓度而言,光合系统荧光参数产生响应的浓度更低,这是由于微藻叶绿素荧光对重金属响应上要快于叶绿素含量,较低浓度的胁迫也会通过荧光参数表现出来。

志谢:中国科学院水生生物研究所朱阿俊为本试验提供藻种,在此表示衷心感谢!

参考文献

陈于望,张文. 1985. 砷污染对硅藻生长的效应[J]. 海洋环境科学,4(4):17-24.

- 高世荣,修瑞琴,郑静,等. 1997. 三价砷对藻类群落结构的影响[J]. 环境科学,18(4):79-80.
- 龚艳,樊铭勇,李书谦,等. 2010. 砷对铜绿微囊藻生长率影响的研究[J]. 湖北农业科学,49(11):2775-2778.
- 龚艳,敖鸿毅,刘碧波,等. 2011. 无机砷对滇池微囊藻生长及产毒的影响[J]. 科学通报,56(21):1720-1725.
- 康瑞娟,秦静芬,汪晶,等. 2005. 砷对蓝藻光合作用和细胞生长的影响[J]. 水生生物学报,29(2):230-232.
- 李明,潘晓洁,邹怡,等. 2012. Hg^{2+} 胁迫对 3 种微藻生长和叶绿素荧光特性的影响[J]. 水生态学杂志,33(2):96-99.
- 李妍丽,刘健,柯林. 2012. 多种藻类对 $As(III)$ 的耐受性及吸附研究[J]. 安徽农业科学,40(15):8702-8706.
- 潘晓洁,常锋毅,万成炎,等. 2010. 滇池与洱海鱼腥藻的分离纯化及其生长特性的初步研究[J]. 水生态学杂志,31(1):60-66.
- 姚琴,黄清辉,陈玲. 2009. 四种砷化合物对藻类生长及光合作用的影响-以三角褐指藻为例[J]. 安全与环境学报,9(6):13-16.
- 张楠,韦朝阳,杨林生. 2013. 淡水湖泊生态系统中砷的赋存与转化行为研究进展[J]. 生态学报,33(2):337-347.
- Markley C T, Herbert B E. 2010. Modeling Phosphate Influence on Arsenate Reduction Kinetics by a Freshwater Cyanobacterium[J]. Environmental Modeling & Assessment, 15(5):361-368.
- Navratilova J, Raber G, Fisher S J, et al. 2011. Arsenic cycling in marine systems: degradation of arsenosugars to arsenate in decomposing algae, and preliminary evidence for the formation of recalcitrant arsenic [J]. Environmental Chemistry, 8(1):44-51.
- Sartory D P, Grobbelaar J U. 1984. Extraction of chlorophyll-a from fresh-water phytoplankton for spectrophotometric analysis[J]. Hydrobiologia, 114(3):177-187.
- Yin X X, Wang L H, Duan G L, et al. 2011. Characterization of arsenate transformation and identification of arsenate reductase in a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Journal of Environmental Sciences-China, 23(7):1186-1193.

(责任编辑 万月华)

Effect of Arsenic Species on the Growth and Chlorophyll Fluorescence Characteristics of *Scenedesmus obliquus*

FAN Xiang-rong^{1,2,3}, YIN Li-yan^{1,2}, LI Wei^{1,2}, CHANG Feng-yi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, P. R. China;

2. Laboratory of Aquatic Plant Biology, Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, P. R. China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

Abstract: The effects of different concentrations of As (III) and As (V) on the growth and chlorophyll fluorescence characteristics of *Scenedesmus obliquus* were investigated. Under the condition of high concentration ($\geq 500 \mu\text{M/L}$), the inhibition of As (III) on growth rate of *S. obliquus* is greater than As (V). The influence of arsenic on the content of chlorophyll a showed that, chlorophyll a content of *S. obliquus* showed a decreasing tendency with the increase of arsenic concentration. the effect between two arsenic species showed that the chlorophyll a is more sensitive to As (III) than As (V). The correlation analysis showed that the main chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , Yield, ETR_{max}) were negatively correlated with the concentrations of two species arsenic. The study showed that the inhibitory effect of arsenic on *S. obliquus* is consistent with the inhibition on photosynthetic system, and As (III) inhibitory effect on chlorophyll fluorescence than As (V).

Key words: arsenic; *Scenedesmus obliquus*; growth; chlorophyll fluorescence