

聚生角毛藻、小球藻对砷和磷的分辨*

洪华生 潘用树 商少凌

(厦门大学, 361005)

提要 通过藻类培养实验, 表明福建九龙江河口藻类优势种聚生角毛藻 (*Chaetoceros socialis* Launders) 和广盐种小球藻 (*Chlorella* sp.) 对砷酸盐和磷酸盐具有分辨能力。用 ^{14}C 和 ^{32}P 示踪方法测得不同浓度砷 (5—40 $\mu\text{g/L}$) 对这两种藻类的光合作用和吸收磷的速率均不产生影响。即使在磷几乎耗尽的情况下, 该浓度范围砷对两种藻既不产生毒性效应, 也不能代替磷酸盐维持藻细胞的生命活动。

砷与磷同处元素周期表的第 V 主族。因此, 它们的化合物砷酸盐、磷酸盐具有许多相似的化学性质。基于这一点, 不少研究者就藻类在吸收营养盐时能否对砷酸盐和磷酸盐分辨进行了研究。Sanders 等人提出, 藻类通常不能分辨这两种阴离子, 砷酸盐对生物 (包括细菌、酵母、藻类) 不产生毒性效应是由于生物甲基化作用, 从而产生无毒的砷磷脂化合物, 或比砷酸盐毒性低的砷化合物的缘故^[7,9]。然而, Apte 等人却认为, 在高生产力的海域, 当磷酸盐被消耗到甚至小于砷酸盐的浓度时, 砷酸盐对藻类不产生毒性是因为藻类对砷酸盐和磷酸盐具有分辨能力的缘故^[2,3]。本文通过培养实验来探讨九龙江口优势种聚生角毛藻和广盐种小球藻对砷酸盐、磷酸盐的分辨能力, 以及不同浓度的砷酸盐对这两种藻的效应。

一、材料与方 法

1. 培养实验

海水中溶解砷的一般含量为 1—3 $\mu\text{g/L}$, 黄河和渤海湾为 20 $\mu\text{g/L}$ 左右^[3], 我们测得九龙江河口平均为 0.87 $\mu\text{g/L}$, 而欧洲受污染河流可高达 45 $\mu\text{g/L}$ ^[1]。参照海水中总砷浓度的含量范围, 我们选择 5—40 $\mu\text{g/L}$ 外加砷的浓度范围进行培养实验。

藻在控温培养室培养, 实验过程设计如下 (砷指 AsO_4^{3-} , 磷指 PO_4^{3-}):

培养 I:

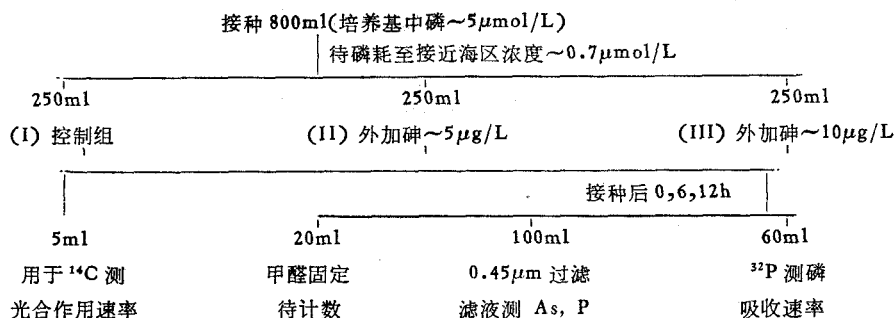
聚生角毛藻、小球藻				
	控制组 (0)	(1)	(2)	(3)
砷	~1 $\mu\text{g/L}$	~20 $\mu\text{g/L}$	~40 $\mu\text{g/L}$	~10 $\mu\text{g/L}$
磷	~11 $\mu\text{mol/L}$	~11 $\mu\text{mol/L}$	~11 $\mu\text{mol/L}$	~7 $\mu\text{mol/L}$

* 本实验的放射性活度测定得到李文权老师的指导和协助, ^{32}P 的示踪实验由戴民汉参加完成; 此外, 本课题得到福建省科学基金的资助。均此一并志谢。

收稿日期: 1989 年 6 月 13 日。

每天同一时间取样 120ml, 其中 20ml 用于藻细胞计数; 另外 100ml 通过 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 滤液用来测溶解无机磷和砷。

培养 II: ^{14}C 示踪及 ^{32}P 脉冲标记法分别测藻光合作用速率及对磷的吸收速率



所用的培养基均用 Ryther's 改良培养基, 其配方是: 在 100ml 过滤海水中含有 10mg KNO_3 , 0.5mg $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.12mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.3mg 柠檬酸铁, 0.3mg 柠檬酸, $2\mu\text{g}$ 维生素 B_{12} , 0.5ml 海泥提取液, Na_2HPO_4 需要另行加入。所用的海水采集于厦门附近的胡里山炮台海边, 海水使用前经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤和高压消毒。培养条件: 平均水温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 光强 4 000lx, 每天光暗各 12h。

培养所用的器皿(均经酸处理)与培养介质均经高压锅消毒, 接种前, 预先在接种室紫外照射 40min。

2. 各参数的测定

(1) 溶解砷的测定 砷采用氢化物原子吸收分光光度计 (PE3030) 测定。无机砷 [As (III), As (V)] 和二甲基砷的检测限分别为 $0.015\mu\text{g/L}$, $0.016\mu\text{g/L}$ 。标准偏差分别为 $\pm 5\%$, $\pm 10\%$ ¹⁾。

(2) 溶解无机磷的测定 参照海洋调查规范进行, 为了方便起见, 将抗坏血酸从显色剂中分出另配。

(3) 生物量计数 聚生角毛藻用显微镜计数, 小球藻采用 ZB 型 Coulter counter 计数。

(4) ^{14}C 测定藻光合作用速率 用黑白瓶的方法测定藻类光合作用速率^[6]。在每个黑白瓶中各盛有 125ml 培养介质 (Ryther's) 改良培养基, 控制磷酸盐浓度接近现场海区 ($\sim 0.7\mu\text{mol/L}$), 然后分别加入 5ml 藻种, 在暗处放置 12h 后, 于每个黑白瓶中加入 1ml $1\mu\text{Ci/ml}$ 的 $^{14}\text{C}\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 。在光强为 18 000lx 下, 控制流动的水温为 $29 \pm 1^\circ\text{C}$, 培养 3h, 取出立即过滤, 滤膜放在干燥器内干燥 2d, 后置于闪烁瓶中, 用 0.5ml 季胺碱溶解, 再加入 10ml 异丁醇, 由液体闪烁计数仪 (Packard Tri-carb 4640) 计数, 单位换算后得 R 值。根据下式计算藻类光合作用速率:

$$\text{P.R.} = [(R_{\text{白}} - R_{\text{黑}}) / (R_{\text{标}} \times t)] \times \text{TCO}_2 \times 12000 \times 1.05 [\text{mgC} / (\text{m}^3 \cdot \text{h})]$$

式中: $R_{\text{白}}$ 为白瓶生物样中 ^{14}C 的放射性活度 (dpm); $R_{\text{黑}}$ 为黑瓶生物样中 ^{14}C 的放射性活度 (dpm); $R_{\text{标}}$ 为在 130ml 培养介质中加入 1ml $1\mu\text{Ci}$ $^{14}\text{C/ml}$ 实际测得的放射性活度

1) 潘用树、洪华生、庄峙厦, 1988。氢化物-电热原子吸收法测定海水中砷的有机和无机化学形态。

(dpm); t 为培养时间(h); TCO_2 为所用培养基的总 CO_2 含量(m mol/L, 根据所测 pH 和碱度计算)。

(5) ^{32}P 测定藻类吸收磷速率 取 60ml 的培养液加入 $50\mu l$ $50\mu Ci/ml$ $^{32}P-Na_2HPO_4$, 在 1h 内的不同时刻, 分别取样 5ml, 过滤, 滤膜在干燥器内干燥 2d, 然后测 ^{32}P 放射性活度。数据按 Lean 等人提出的公式的计算得到藻对磷的吸收速率。

二、结果与讨论

1. 藻类对砷酸盐和磷酸盐的选择性

培养 I 的 4 组实验体系中, 砷、磷的变化情况都类似图 1 (第 4 组的结果), 分析后可以吧介质中砷的变化分为两个阶段: 接种后的头两天, 第三天至介质中磷被耗尽。

(1) 从第三天起, 培养介质中砷酸盐虽略有下降, 但基本保持在一定的水平波动。Sanders 等认为, 某些海洋藻类快速地吸收砷酸盐, 但它们只把吸收的砷的一小部分结合到细胞中, 而把其余的部分还原、甲基化, 然后分泌出细胞外, 这样, 在介质中期望有无机砷(III)、有机砷的增加和无机砷(V)的减少^[7]。可是, 我们的实验结果并没有观察到有砷(III)和有机砷的增加。

本文的实验结果用 Morris 等人提出的分辨因子^[8]能得到较满意的解释。藻细胞对砷酸盐和磷酸盐的分辨因子(D)是这样来定义的:

$$\Delta[P]/[P] = D \times \Delta[As]/[As]$$

其中: $\Delta[P]$ 为观测的介质中磷酸盐的变化量($\mu mol/L$); $[P]$ 为每天观测的介质中磷酸盐的浓度($\mu mol/L$); $\Delta[As]$ 为计算得到的介质中砷酸盐变化量($\mu g/L$); $[As]$ 为观测或计算得到的介质中砷酸盐浓度($\mu g/L$)。当 $D = 1$ 时, 说明藻细胞以同样的速率吸收介质中的磷和砷, 换句话说, 藻细胞对磷和砷不加分辨地吸收; 当 $D > 1$ 时, 藻细胞能分辨磷和

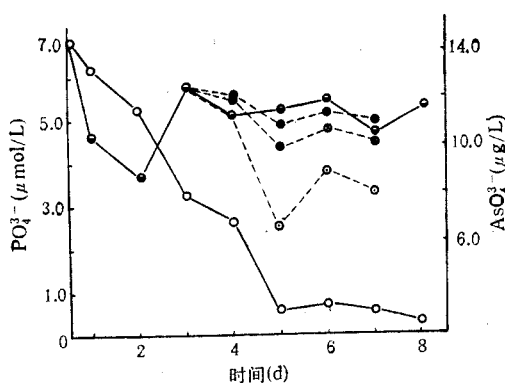


图 1 培养过程介质中 As, P 的变化

Fig. 1 Predicted arsenic profiles based on the utilization of phosphate

实线为实测的砷、磷浓度, $\circ$ PO_4^{3-} , $\bullet$ AsO_4^{3-} ; 虚线为设定某一分辨因子 D 所得的 As 变化理论曲线, $\bullet$ $D = 7$, $\otimes$ $D = 5$, $\circ$ $D = 2$ 。

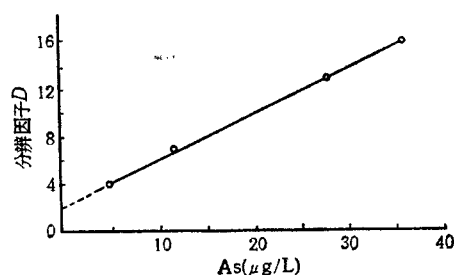


图 2 分辨因子 D 与介质中 As 浓度的关系

Fig. 2 Relationship between discrimination factor D and arsenate level

砷; D 越大, 分辨率越高。基于上面的数学表达式, 对培养 I 实验结果加以处理得到图 1 中的虚线。

与实验曲线重叠得较好的理论曲线所对应的 D 值, 就是藻细胞对砷和磷的分辨因子。这一阶段的各组介质中平均浓度分别为 5.2, 11.7, 28.3 和 $35.6 \mu\text{g/L}$, 它们所对应的分辨因子分别为 4, 7, 13 和 16。在此不难发现, 藻细胞对砷、磷的分辨率的大小与它所生存的介质中砷的浓度的大小有关(图2)。换句话说, 介质中砷磷比值越高, D 值越大, 藻细胞对砷和磷的分辨率越高。改用小球藻进行同样的实验得到的 D 值仍能落在图 2 中的直线上。因此, 我们可以从图中的直线外推至九龙江现场河口区砷的浓度 ($\sim 1.0 \mu\text{g/L}$) 下的 D 值 ($D = 2$), 从这一点出发可知, 在九龙江现场河口区中, 聚生角毛藻和小球藻对砷酸盐和磷酸盐具有分辨能力。

(2) 接种后的头两天和后面阶段不同。培养介质中砷浓度很快减小, 然后又上升。根据实验我们已排除了这种减小是器壁吸附的可能。因此, 这种情况只有两种可能的过程: 其一, 藻类快速地吸收砷酸盐, 随后又快速地分泌出; 其二, 接种后, 藻类对介质中的砷产生吸附。从上面的讨论结果可知, 聚生角毛藻和小球藻对砷和磷具有分辨能力, 也就是说, 藻类在吸收磷酸盐时, 不同时吸收砷酸盐, 这样, 我们可以排除主动吸收的可能性。因此, 介质中砷这样的变化, 主要是藻细胞接触到新的介质后产生的吸附造成的, 而且吸附的大小与介质中砷酸盐的浓度成正比(表 1)。至于接种两天后, 介质中砷浓度的回升, 可能是吸附在藻细胞表面的砷又发生解析的缘故。

表 1 培养周期内介质中溶解无机磷、砷酸盐浓度及生物量①

Tab. 1 Dissolved phosphate, arsenate levels in water and algae cell numbers during the culture experiments

时间 (d)		0	1	2	3	4	5	6	7	8
控制组 (0)	砷酸盐	4.1	3.4	3.4	5.9	5.1	5.1	4.5	4.8	5.2
	磷酸盐	12.05	11.33	10.38	7.38	6.83	5.08	1.19	0.25	0.25
	生物量		0.18	0.2	1.17	4.16	14.75	27.52	37.9	49.5
第一组 (1)	砷酸盐	25.9	21.1	17.5	28.4	28.7	30.2	25.7	27.2	24.4
	磷酸盐	12.86	11.55	10.80	7.61	6.99	4.80	0.33	0.30	0.30
	生物量		0.19	0.21	1.17	4.22	17.25	25.57	36.93	49.63
第二组 (2)	砷酸盐	45.2	38.4	34.3	36.2	35.2	36.1	34.8	41.6	39.1
	磷酸盐	12.94	11.66	11.02	8.11	7.61	5.36	0.99	0.91	0.50
	生物量		0.17	0.2	1.25	5.86	15.15	22.32	41.85	46.13
第三组 (3)	砷酸盐	14.1	10.4	8.6	12.4	11.2	11.4	11.9	10.4	11.6
	磷酸盐	6.83	6.16	5.44	3.08	2.52	0.47	0.63	0.5	0.36
	生物量		0.13	0.21	1.20	4.03	14.43	25.32	35.17	29.7

① 砷酸盐, $\mu\text{g/L}$; 磷酸盐, $\mu\text{mol/L}$; 生物量, $\times 10^4 \text{ cell/ml}$ 。

2. 砷酸盐对聚生角毛藻和小球藻生长的效应

在磷酸盐浓度大约为 $11 \mu\text{mol/L}$ 及不同砷酸盐浓度下, 用聚生角毛藻进行培养实验(培养 I), 结果如图 3 所示。可以看出在不同砷酸盐浓度的培养介质中, 藻类生长曲线几

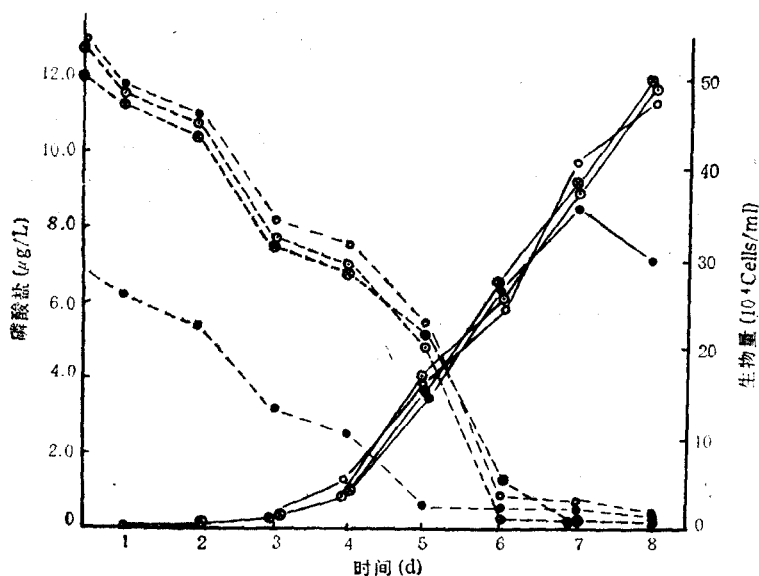


图3 培养过程介质中磷酸盐和生物量的变化

Fig. 3 Variation of phosphate and algae cell levels during the experiment

⊗ 控制组; ○ 砷~40 $\mu\text{g/L}$; ◊ 砷~20 $\mu\text{g/L}$; ● 砷~14 $\mu\text{g/L}$ 。虚线为磷酸盐;实线为生物量。

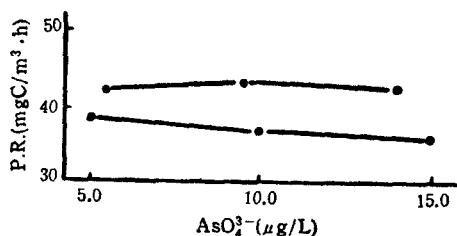
乎是一致的。另外,小球藻的培养实验也得到类似的结果。同时,我们也做了另外一组实验,即磷酸盐浓度只为控制组的一半(6.8 $\mu\text{mol/L}$),而砷酸盐浓度却为控制组的三倍多(~14 $\mu\text{g/L}$),结果发现在培养的前7天,四组的生长曲线几乎一致,至第8天,低磷的这一组的生物量明显下降。这是因为藻细胞在第5天就已把介质中的磷酸盐耗尽,以后藻细胞可利用其贮于体内的磷再维持生长两天直至把体内磷耗尽,这时藻细胞不再分裂,并随后死亡,使得生物量下降;另外,把这组同两组高砷的生长曲线比较,都可以得出这样的结论:不同砷酸盐的浓度不会影响聚生角毛藻和小球藻的生长,同时也不能代替磷酸盐被藻细胞吸收。

3. 砷酸盐的浓度与小球藻、聚生角毛藻光合作用的关系

按培养II用 ^{14}C 示踪法对小球藻进行实验,从测定的结果(见图4)可以看出,小球藻光合作用速率不受介质中砷浓度的影响。改用聚生角毛藻培养,也得到同样的结果。砷浓度不仅不对聚生角毛藻和小球藻产生毒性或营养效应,而且,对它们的光合作用速率也不发生影响。这是藻细胞(聚生角毛藻、小球藻)能分辨砷、磷的进一步佐证。

4. 砷酸盐浓度与小球藻吸收磷动力学关系

按培养II,在接种0,6,12h后加示踪剂 ^{32}P 分别测定小球藻吸收磷的速率。图5中可以看出,接种后12h内,藻细胞吸收磷的速率逐渐增大,但不同砷酸盐浓度的动力学曲线却几乎一样。因此,我们可以得出:不同砷酸盐浓度对小球藻吸收磷的动力学几乎不产生影响。这一点又从另一个侧面证实了小球藻在吸收磷酸盐时,能分辨砷酸盐和磷酸盐这一结论。

图4 AsO_4^{3-} 浓度与光合作用速率(P.R.)的关系Fig. 4 Relationship between AsO_4^{3-} and P. R.

○ 小球藻(图上线); ● 聚生角毛藻(图下线)。

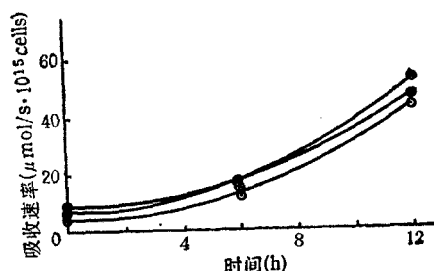


图5 小球藻对磷吸收速率的动力学

Fig. 5 The uptake rate for phosphate plotted as a function of time in *Chlorella* sp.⊗ 控制组; ● 砷, $\sim 5 \mu\text{g/L}$; ○ 砷, $\sim 10 \mu\text{g/L}$ 。

综上所述,在我们外加砷、磷浓度范围内,聚生角毛藻和小球藻能够分辨实验介质中无机砷酸盐和磷酸盐;即使在磷浓度很低的情况下,砷酸盐既不对它们产生毒性效应,也不代替磷酸盐被藻细胞吸收来维持其生命活动。不同的砷酸盐浓度不对这两种藻的光合作用及吸收磷动力学速率产生影响,也进一步证实了它们对砷、磷具有选择性;然而,不同海区藻类与砷的相互效应可能因种类而异,细菌的作用也有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Andreae, M. O., J. T. Byrd & P. N. Froelich, 1983. Arsenic, antimony, germanium and tin in the Tejo estuary, Portugal: modelling a polluted estuary. *Environ. Sci. Technol.*, 17: 731—737.
- [2] Apte, S. C., A. G. Howard, R. J. Morris, et al., 1986. Arsenic, antimony and selenium speciation during a spring phytoplankton bloom in a closed experimental ecosystem. *Mar. Chem.*, 20(2): 119—130.
- [3] Huang, W. W., J. M. Martin, P. Seyler, et al., 1988. Distribution and behaviour of arsenic in the Huanghe (Yellow) River estuary and Bohai Sea. *Mar. Chem.*, 25: 75—91.
- [4] Lean, D. R. S. and E. White, 1983. Chemical and radiotracer measurements of phosphorus uptake by plankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40: 147—155.
- [5] Morris, R. J., M. J. McCartney, A. G. Howard, et al., 1984. The ability of a field population of diatoms to discriminate between phosphate and arsenate. *Mar. Chem.*, 14(3): 259—265.
- [6] Parsons, T. R., Y. Maita, C. M. Lalli, 1984. A manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford, England, pp. 142—160.
- [7] Sanders, J. G. & H. L. Windom, 1980. The uptake and reduction of arsenic species by marine algae. *Est. Coast. Mar. Sci.*, 10(5): 555—567.
- [8] Stephen, J. T. & R. H. Lynn, 1986. Phosphate uptake by microorganisms in lake water: deviations from simple michaelis-menten kinetics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43(1): 319—328.
- [9] Vidal, F. V. & V. M. V. Vidal, 1980. Arsenic metabolism in marine bacteria and yeast. *Mar. Biol.* 60(1): 1—7.

THE ABILITY OF *CHAETOCEROS SOCIALIS* LAUDERS AND *CHLORELLA* SP. TO DISCRIMINATE BETWEEN PHOSPHATE AND ARSENATE

Hong Huasheng, Pan Yongshu and Shang Shaoling
(Xiamen University, 361005)

ABSTRACT

Based on the laboratory culture experiments, it was found that *Chaetoceros socialis* Lauder and *Chlorella* sp. were capable of discriminating between phosphate and arsenate ions in seawater medium. Neither reduced nor methylated arsenic species were detected in the medium during the culture experiments. The arsenate levels remained essentially constant even when the phosphate levels became depleted. The degree of phosphate/arsenate discrimination factor D varied from 4 to 16 with external arsenate concentrations 5—35 $\mu\text{g/L}$, and a linear correlation between discrimination factor D and arsenate concentration was obtained. It was found that the external arsenate concentrations (5—40 $\mu\text{g/L}$) had no significant effect on the growth, photosynthesis rate and uptake rate of phosphate of *Chaetoceros socialis* Lauder and *Chlorella* sp., whereas the photosynthesis rate and uptake rate of phosphate were determined by ^{14}C and ^{32}P radiotracers. These gave further evidence indicating that *Chaetoceros socialis* Lauder and *Chlorella* sp. were capable of discriminating between phosphate and arsenate ions in seawater. Therefore, it is important to assess the differences in arsenic metabolism by different phytoplankton species in localized study.