

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2018062301

黄飞, 周昉, 姜舒扬, 等. 绿藻胞外聚合物对无机砷生物累积特征的影响[J]. 环境化学, 2019, 38(5): 1021-1027.

HUANG Fei, ZHOU Fang, JIANG Shuyang, et al. Effects of extracellular polymeric substances on the bioaccumulation of inorganic arsenic by green microalgae[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(5): 1021-1027.

绿藻胞外聚合物对无机砷生物累积特征的影响*

黄飞¹ 周昉¹ 姜舒扬¹ 张建英^{1,2,3**}

(1. 浙江大学环境与资源学院, 杭州, 310058; 2. 浙江省有机污染过程与控制重点实验室, 杭州, 310058;
3. 国家级环境与资源实验教学示范中心(浙江大学), 杭州, 310058)

摘要 绿藻对无机污染物的净化作用受其自身分泌胞外聚合物 EPS 影响. 以 EPS 释放量高的蛋白核小球藻为绿藻代表, 通过 24 h 短期 As(Ⅲ) 和 As(V) 的模拟水体暴露实验, 研究绿藻对无机砷的生物累积特征及 EPS 影响. 结果表明, 在 0—40 mg·L⁻¹ As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露浓度范围, 蛋白核小球藻细胞内的砷累积速率随暴露浓度的增加而升高, 其动力学拟合结果符合 Michaelis-Menten 酶促反应动力学方程. EPS 与无机砷存在界面相互作用影响, 无机砷暴露浓度升高可促进小球藻 EPS 分泌, EPS 与砷累积速率之间呈现正相关线性关系 ($R^2 > 0.900$), 主要影响成分是溶解态 EPS. 完整藻细胞与脱除胞外聚合物的活体细胞相比, As(Ⅲ)、As(V) 暴露的最大吸附累积量分别增加 30.6% 和 14.2%, 而最大胞内累积量降低 49.0% 和 31.0%. EPS 与无机砷的微界面交互作用影响绿藻对砷污染的净化修复.

关键词 无机砷, 蛋白核小球藻, 胞外聚合物, 表面吸附, 生物吸收.

Effects of extracellular polymeric substances on the bioaccumulation of inorganic arsenic by green microalgae

HUANG Fei¹ ZHOU Fang¹ JIANG Shuyang¹ ZHANG Jianying^{1,2,3**}

(1. College of Environmental Science and Resources, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China;
2. Zhejiang Province Key Laboratory of Organic Pollution Process and Control, Hangzhou, 310058, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Environment and Resources Education (Zhejiang University), Hangzhou, 310058, China)

Abstract: Extracellular polymeric substances (EPS) self-produced by green algae influence its bio-purification of inorganic arsenic. *Chlorella pyrenoidosa* was chosen as the representative EPS-producing green algae to investigate bioaccumulative characteristics of inorganic arsenic and EPS effects, based on a 24 h short-term simulation exposure experiment to As(Ⅲ) and As(V). Results showed that the intracellular arsenic accumulation rate increased with the exposure concentration of As(Ⅲ) and As(V), and they matched well the Michaelis-Menten enzymatic reaction kinetic equation in the range of 0—40 mg·L⁻¹. Increasing inorganic arsenic promoted the production of algae EPS, especially soluble EPS, and a significantly linear relationship was observed between EPS secretion rate and intracellular arsenic accumulation rate ($R^2 > 0.900$). Compared to EPS-removed live cells, the maximum extracellular accumulation capacity of the intact algae cells for As(Ⅲ) and As(V) increased by 30.6% and 14.2%, while the maximum intracellular accumulation capacity reduced by 49.0% and 31.0%, respectively. The micro-interfacial interactions of algal EPS with

2018年6月23日收稿(Received: June 23, 2018).

* 国家自然科学基金(21477103)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21477103).

** 通讯联系人, Tel: 0571-88982056, E-mail: zjy@zju.edu.cn

Corresponding author, Tel: 0571-88982056, E-mail: zjy@zju.edu.cn

inorganic arsenic impacts arsenic bioremediation.

Keywords: inorganic arsenic, *Chlorella pyrenoidosa*, extracellular polymeric substances, surface adsorption, biouptake.

高毒无机砷类污染物主要以三价As(Ⅲ)和五价砷As(V)形态广泛存于尾矿周边水体中,并可通过农田灌溉,以根系吸收方式进入土壤-水稻-人食物链;同时砷在生态系统中会发生氧化还原、生物转化等形态变化并形成毒效应,危及生态系统安全和人类健康^[1].在世界各水体中已发现藻类具有吸收、生物转化、富集无机砷能力,表现出较大的耐受性及生态修复潜力^[2].

藻细胞对砷的生物吸收累积能力因藻类不同而存在很大差异,影响污染净化效率.例如:在750 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As(Ⅲ)和As(V)水体,小球藻(*Chlorella* sp.)的砷吸收累积量达到874.3、905.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[3],明显高于四尾栅藻(*Scenedesmus* sp.)砷吸收富集量606、761 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[4],而超累积绿藻莱茵衣藻(*Chlamydomonas* sp.)对As(V)的吸收量甚至高达10201 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[5].文献综述报道淡水藻细胞对砷的吸收累积量存在3个数量级差别,即7.3—8617 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (干重)^[6].同时,藻类对砷的吸收动力学还存在争议,例如有研究表明绿藻细胞内无机砷含量变化符合非线性Michaelis-Menten酶促反应方程^[5],进一步的研究表明三价和五价砷的生物吸收符合Bio-dynamic生物动力学方程^[7].关于藻类的重金属净化研究报道,微生物细胞自释放胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)会影响界面传质及净化效率^[8].由于溶解态(solute EPS, sEPS)和结合态EPS(bound EPS, bEPS)具有吸附污染物能力而增加了藻团聚体的吸附累积量^[9],并且EPS会受重金属刺激而增大释放量^[10],从而增加了藻细胞的耐毒能力^[11].

由于我国水体富营养化现象普遍,蛋白核小球藻能通过自养作用来发挥自然净化污染物的生态功能.然而,其对无机砷的累积净化能力尚有许多不确定性问题.因此,本文以蛋白核小球藻*Chlorella pyrenoidosa*(*C. pyrenoidosa*),研究无机砷在绿藻EPS胞外吸附累积和胞内吸收累积的末端效应,分析藻EPS分泌与无机砷的浓度-效应关系以及EPS对砷累积量的影响,表征绿藻及其自分泌EPS的生物累积作用.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 藻种培养和实验试剂

蛋白核小球藻*Chlorella pyrenoidosa*(FACHB-9)购于中国科学院水生生物研究所(中国,武汉).蛋白核小球藻培养基采用BG11培养基,pH值为7.1,在120℃灭菌30 min;置于大型高精度光照恒温摇床(ATL-033LR,上海堪鑫仪器设备公司,上海)内培养,培养条件为光照强度为3000 lux,光暗周期14 h/10 h,温度25℃,摇床转速120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$.

实验试剂:As(Ⅲ)采用亚砷酸钠配制(NaAsO_2 ,山东西亚化学工业有限公司,纯度95%)、As(V)用砷酸钠配制(NaAsO_3 ,上海倍卓生物科技有限公司,纯度 $\geq 99\%$)、阳离子交换树脂(Dowex Marathon C, Sigma).

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白核小球藻对As(Ⅲ)和As(V)的吸收累积试验

采用24 h无机砷吸收累积试验,选择生长状态良好并处于指数生长后期的蛋白核小球藻,初始藻细胞密度为 1×10^6 — 2×10^6 $\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$,砷暴露浓度设置为0、5.625、11.250、22.500、37.500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0—500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每个浓度梯度设置3个平行.

暴露24 h后,取30 mL藻液低速离心(2500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,15 min)收集藻细胞,用新鲜BG11培养基洗涤1次,再加入10 mL磷酸盐缓冲液(0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 5.95)洗涤2次,每次20 min,以洗脱表面吸附砷离子^[12].加入2.0 mL硝酸和0.5 mL过氧化氢,在110℃条件下消解1 h,消解液稀释至50 mL.砷稀释液过0.45 μm 滤膜后采用ICP-MS(Perkin Elmer, NexION 300XX,美国)测定胞内砷浓度^[13].通过80℃烘箱烘至恒重后称量得到藻细胞干重(g),最后无机砷吸收累积量用藻细胞干重进行标定

($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

1.2.2 As(Ⅲ)和As(V)暴露下藻 EPS 分泌的浓度-效应试验

蛋白核小球藻以及无机砷暴露时间、浓度梯度同 1.2.1. 无机砷暴露 24 h 后, 取 30 mL 藻液采用热提取-高速离心法^[14]提取藻细胞 EPS: 藻液先 $10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液记为 sEPS 初悬液; 接着向残留细胞中加入 10 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.1) 并 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min, 待冷却后 $10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液记为 bEPS 初悬液. EPS 初悬液最后经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后利用总有机碳分析仪 (Shimadzu, TOC-VCPH, 日本) 进行定量, 两种 EPS 的总量记为总 EPS 的分泌量, 结果用藻细胞干重进行标定 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

1.2.3 蛋白核小球藻自释放 EPS 影响无机砷吸附和胞内累积试验

采用 0—24 h 无机砷暴露试验, As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露浓度分别设置为 $37.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $11.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 生物动力学和毒性试验结果表明此 As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露浓度下胞内砷吸收累积速率和细胞生长抑制作用基本相当. 通过阳离子交换树脂法^[15]脱除藻细胞表面 EPS, 设置有无 EPS 对照试验以研究 EPS 对砷吸附和胞内累积的影响. 低速离心收集藻细胞后用新鲜 BG11 培养基重悬, 接着加入 $2.5\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重) 阳离子交换树脂后 $300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 磁力搅拌 2 h, 最后在 $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min. 收集藻细胞后用新鲜培养基洗涤 2 次即为脱除 EPS 藻细胞, 记为-EPS, 而未脱除 EPS 的完整藻细胞记为+EPS.

在 24 h 内定时取样, 藻液低速离心 ($2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min) 后收集上清液并利用 ICP-MS 测定溶液中残留砷浓度, 据此计算出藻细胞总生物累积量 = (初始砷浓度 - 残留砷浓度) $\times V$ (体积, 30 mL) / W (干重) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). 离心管底部残留藻细胞通过 1.2.1 的描述方法测定胞内砷吸收累积量, 进一步计算出胞外砷吸附量 = 总生物累积量 - 胞内吸收累积量.

1.2.4 计算方法

通过无机砷吸收累积量进一步计算出胞内吸收累积速率 V , 并利用 Michaelis-Menten 酶促反应动力学方程拟合 V 与砷暴露浓度 $[As]$ 之间的非线性关系, 其方程表达式如下:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [As]}{K_m + [As]} \quad (1)$$

式中, 参数 $V_{\max}$ 、 K_m 分别为最大胞内累积速率 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) 和半饱和浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). 当 $[As]$ 远远小于 K_m 时, 还可以得到无机砷胞内累积速率常数 $K_u = V_{\max}/K_m$ ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

此外, 依据 Zhou 等^[15]提出的生物累积因子 (Bioaccumulation factors, BCF) 计算公式, 分别计算出 24 h 内无机砷最大吸附因子 BCF_{ad} 和胞内吸收累积因子 BCF_{up} ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$), 公式如下:

$$\text{BCF} = C(M)/M \quad (2)$$

式中, $C(M)$ 为砷最大吸附、胞内吸收累积量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), M 为砷暴露浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). 通过 BCF_{ad} 和 BCF_{up} 值可进一步计算出总生物累积因子 $\text{BCF}_{\text{tot}} = \text{BCF}_{\text{ad}} + \text{BCF}_{\text{up}}$ 和迁移系数 (Translocation factors, TF) = 胞内吸收累积量/表面吸附量, 其代表无机砷从藻细胞表面转移至胞内的能力.

1.3 数据分析

采用 origin 2016 软件进行试验数据处理、作图和模型拟合, 并采用 SPSS 18.0 软件中的 t 检验进行不同处理组数据间的差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示存在显著差异性. 试验数据为平均值 $\pm$ 标准偏差 ($n = 3$).

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 蛋白核小球藻胞内吸收累积无机砷的浓度依赖关系及酶促动力学

在 $0\text{--}40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 无机砷浓度下, 蛋白核小球藻胞内砷吸收累积速率随砷暴露浓度的增加而增加, 胞内 As(V) 吸收累积速率高于 As(Ⅲ), 约为 2 倍 (图 1). 线性和非线性方程拟合结果揭示胞内砷吸收累积速率与砷暴露浓度间更满足非线性 Michaelis-Menten 酶促反应动力学方程, 相关系数 R^2 分别达到 0.993 和 0.999 (表 1). 这表明藻细胞表面关键砷转运蛋白参与到 As(Ⅲ) 和 As(V) 的跨膜转运过程, 如

水甘油通道蛋白(Aquaglyceroporins, AQP)和磷酸盐转运蛋白^[16],从而表现出明显的浓度依赖效应差异.因此,As(V)暴露下另外两种淡水绿藻莱茵衣藻和四尾栅藻对砷胞内吸收累积作用也呈现相同的规律^[5].结合表1给出的Michaelis-Menten方程重要拟合参数,As(V)暴露下*C. pyrenoidosa*最大吸收累积速率 $V_{\max}$ 值为 $3.13\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,约为As(Ⅲ)的2倍($1.80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$),而吸收半饱和浓度 K_m 值为 $16.26\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,低于As(Ⅲ)($23.51\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).由此可见,*C. pyrenoidosa*对As(V)暴露的胞内吸收响应速率和累积潜力均高于As(Ⅲ),从而As(V)暴露下藻细胞内砷吸收累积速率常数 K_u 值($0.19\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)达到三价砷 K_u 值的2倍以上($0.08\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).可以推测,本实验藻种*C. pyrenoidosa*细胞表面磷酸盐转运蛋白的数量和活力高于水甘油通道蛋白,造成藻细胞对As(V)更高的界面传质能力.然而,无机砷暴露下本实验绿藻 $V_{\max}$ 值($1.80\text{—}3.13\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)比另一砷超累积绿藻莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)低2到3个数量级($241\text{—}3998\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)^[5, 17],表明*C. pyrenoidosa*细胞表面关键砷转运蛋白的数量显著低于*C. reinhardtii*,进而导致*C. pyrenoidosa*细胞内更低的砷累积浓度和更高的耐砷能力.

*C. pyrenoidosa*细胞生长也表现出不同的砷浓度抑制作用.在 $0\text{—}40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,As(Ⅲ)对藻细胞的生长抑制作用不断加强,其细胞生长因子(24 h暴露后藻细胞密度与起始密度比值)^[18]从空白组的3.3降至2.3(图2).As(V)浓度在 $5.625\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时表现出明显的生长抑制,细胞生长因子从3.1降至2.4.因此As(V)对*C. pyrenoidosa*的毒性小于As(Ⅲ),这也可以解释上文中提到的蛋白核小球藻对As(V)表现出更高的胞内吸收累积能力.

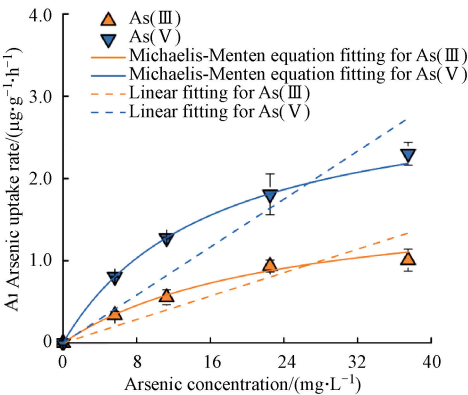


图1 不同砷暴露浓度下蛋白核小球藻对As(Ⅲ)和As(V)的胞内吸收累积

Fig.1 Intracellular accumulation of As(Ⅲ)和As(V) by *C. pyrenoidosa* under different arsenic exposure concentrations

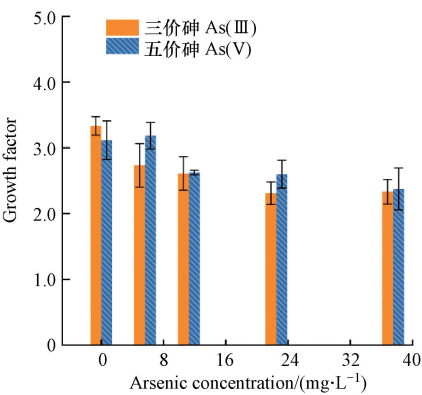


图2 不同无机砷暴露浓度下蛋白核小球藻的生长因子变化

Fig.2 The growth factor of *C. pyrenoidosa* under different inorganic arsenic exposure concentrations

表1 无机砷胞内吸收累积动力学 Michaelis-Menten 方程和线性方程拟合

Table 1 Fitting results of Michaelis-Menten equation and linear equation for intracellular arsenic accumulation kinetics

砷形态 arsenic species	Michaelis-Menten 方程				线性方程		
	$V_{\max}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$K_m/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$K_u/$ ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	R^2	斜率 Slope	截距 Intercept	R^2
As(Ⅲ)	1.80	23.51	0.08	0.993	0.04	0	0.972
As(V)	3.13	16.26	0.19	0.999	0.07	0	0.958

2.2 As(Ⅲ)和As(V)暴露对藻 EPS 分泌的影响

无机砷暴露浓度对藻 EPS 的分泌量产生重要影响.在 $0\text{—}40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 砷胁迫下,藻细胞 EPS 分泌量随砷暴露浓度的升高而升高,As(Ⅲ)和As(V)在 $37.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露浓度下达到最大值,分别为 $62.4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $78.4\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (图3).As(V)对蛋白核小球藻 EPS 分泌的促进作用显著高于As(Ⅲ)($P < 0.05$),与As(V)胞内吸收累积量高于As(Ⅲ)的结果一致,说明 EPS 分泌变化与胞内砷累积量具有一定关系.通过分析藻细胞 EPS 分泌速率与其胞内砷吸收累积速率之间的线性关系,发现随着胞内砷吸收累积速率的增加,藻细胞 EPS 分泌速率也逐渐升高,二者之间满足显著的正线性关系,相关系数 R^2

分别达到 0.967 和 0.954 (图 4). 已有研究证实微生物细胞可以通过调控自身 EPS 分泌释放,降低重金属等有毒物质对细胞的侵害^[19]. 因此本实验藻细胞内砷吸收累积过程也可以有效刺激 EPS 的合成、转运和分泌释放,并反过来缓解无机砷毒性. As(Ⅲ)暴露下藻细胞 EPS 分泌响应速率(斜率 0.48)明显快于As(V)(斜率 0.27),这从另一个角度揭示As(Ⅲ)对 *C. pyrenoidosa* 产生的胁迫效应大于As(V),与无机砷生长抑制毒性结果一致.

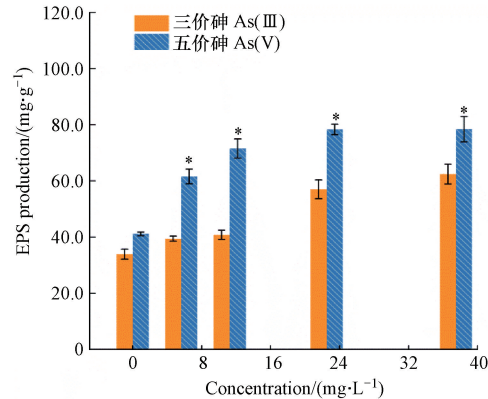


图 3 不同砷暴露浓度下的蛋白核小球藻 EPS 分泌量
(*表示三价和五价砷之间差异显著, $P<0.05$)

Fig.3 EPS production of *C. pyrenoidosa* under different exposure arsenic concentrations
(* represents significant difference between As(Ⅲ) and As(V), $P<0.05$)

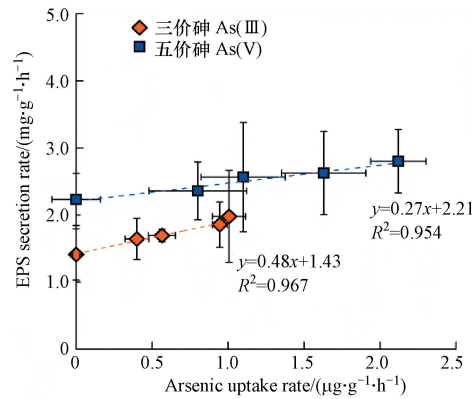


图 4 藻细胞内砷吸收累积速率与 EPS 分泌速率的线性关系

Fig.4 Linear correlation between intracellular arsenic accumulation rate and EPS secretion rate

无机砷暴露对藻细胞 EPS 的组分含量也产生明显影响. 研究报道,微生物 EPS 主要包含溶解态 EPS (sEPS)和结合态 EPS (bEPS)两种,由于多糖、蛋白质和腐殖质等活性组分组成和含量不同,微生物 sEPS 对重金属^[20]和有机污染物^[21]的吸附去除能力高于 bEPS. 本实验中,As(Ⅲ)和As(V)暴露均促进了蛋白核小球藻 sEPS 分泌释放,其 sEPS 和 bEPS 的比值 (sEPS/bEPS) 从空白组的 130.5%分别增加到 171.5%和 187.2%,sEPS 分泌量接近于 bEPS 2 倍 (图 5). 由此可见,无机砷作为一种典型有毒类金属,蛋白核小球藻 sEPS 对其也表现出更高的结合能力,藻细胞通过增加 sEPS 的分泌释放可以提高对无机砷的吸附能力,增强细胞高砷耐受性.

2.3 藻 EPS 对无机砷吸附和胞内吸收累积的影响

胞外表面吸附作用在藻细胞累积无机砷过程中发挥主导地位,本实验绿藻胞外砷吸附量比其胞内

吸收累积量高出 2 到 3 个数量级,如表 2 所示. 24 h 暴露时间内蛋白核小球藻对As(Ⅲ)和As(V)的最大胞内吸收累积量分别达到 600.3,214.9 μg·g⁻¹,远低于土壤中小球藻 *Chlorella* sp.对As(Ⅲ)和As(V) (0.75 mg·L⁻¹砷和 2.0 mg·L⁻¹磷酸盐)暴露的胞内砷累积浓度 (1042.3 μg·g⁻¹)和 1263.6 μg·g⁻¹)^[3]. 除了藻种来源和暴露时间不同外,无机砷暴露浓度和体系磷酸盐含量也会显著影响砷胞内累积能力. 研究发现,高浓度As(Ⅲ) (> 40 mg·L⁻¹) 暴露会造成藻细胞溶解^[22],因此本实验中 37.5 mg·L⁻¹As(Ⅲ)可能会破坏蛋白核小球藻细胞完整性从而释放出胞内累积砷. 此外 BG11 培养基属于富磷体系 (40 mg·L⁻¹),也会对藻细胞吸收累积As(V)产生竞争性抑制作用^[3, 5, 17],降低As(V)富集能力,从而

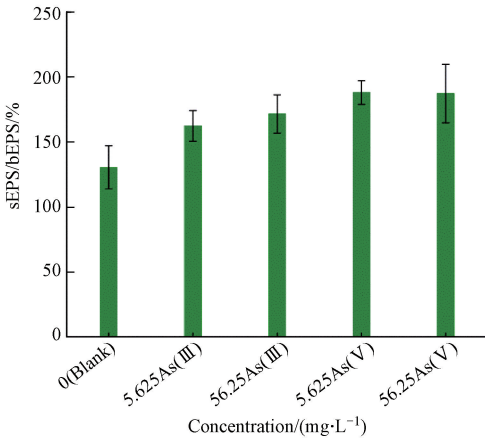


图 5 不同砷暴露浓度下蛋白核小球藻溶解态和结合态 EPS 变化

Fig.5 The sEPS and bEPS of *C. pyrenoidosa* under different arsenic exposure concentration

解释了不同实验结果之间无机砷生物累积差异。

藻 EPS 通过促进无机砷表面吸附作用抑制其进一步的胞内迁移、吸收和累积. 与脱除 EPS 藻细胞 (-EPS) 相比, As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露下完整藻细胞 (+EPS) 最大胞外砷吸附量从 118.8、24.0 mg·g⁻¹ 升高到 155.1、27.4 mg·g⁻¹, 分别增加 30.6% 和 14.2%. 与之相反, 藻细胞最大胞内砷吸收累积量从 1176.9、311.3 μg·g⁻¹ 降至 600.3、214.9 μg·g⁻¹, 分别降低 49.0% 和 31.0% ($P<0.05$) (表 2). 结果表明 EPS 的存在可以有效增加藻细胞对溶液中游离态砷的吸附, 显著减少其胞内的吸收累积. 此外, As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露下无机砷胞内吸收累积因子 BCF_{up} 远低于其吸附因子 BCF_{ad}, 但总生物累积因子 BCF_{tot} 值均远超过 1000, 分别达到 4136 和 2436. 依据 Zhu 等^[23] 于 1999 年提出的超累积植物判定方法 (BCF > 1000), 本实验藻种 *C. pyrenoidosa* 具有很好的超累积砷能力. 脱除 EPS 后砷离子从胞外到胞内的迁移系数 TF 值接近完整藻细胞的 2 倍, 这进一步揭示藻 EPS 可以降低溶液中游离态砷的界面传质过程, 抑制其向胞内迁移累积, 从而降低无机砷生物有效性和毒性.

表 2 ±EPS 藻细胞对砷最大胞外吸附量、胞内吸收累积量及对应的生物累积因子和迁移系数 (平均值±标准偏差)
Table 2 The maximum capacity of extracellular and intracellular arsenic accumulation by algae cells with or without EPS and corresponding bioaccumulation factors (BCF) and translocation factors (TF) (average±standard error)

砷浓度 As dose/ (mg·L ⁻¹)	EPS	最大吸附累积量 As _{ad} / (mg·g ⁻¹)	最大吸收累积量 As _{up} / (μg·g ⁻¹)	吸附累积因子 BCF _{ad} / (L·kg ⁻¹)	吸收累积因子 BCF _{up} / (L·kg ⁻¹)	总累积因子 BCF _{tot} / (L·kg ⁻¹)	转移系数 TF
37.5 mg·L ⁻¹ As(Ⅲ)	+EPS	155.1±17.2	600.3±130.9 *	4136±459	16±3	4152	0.004
	-EPS	118.8±16.4	1176.9±366.2	3168±437	31±10	3199	0.010
11.25 mg·L ⁻¹ As(V)	+EPS	27.4±3.4	214.9±22.1 *	2436±302	19±2	2455	0.008
	-EPS	24.0±1.9	311.3±31.7	2133±169	28±3	2161	0.013

注: * 表示±EPS 藻细胞之间存在显著差异性 ($P < 0.05$).
Note: * represents the significant difference for ±EPS algae cells ($P < 0.05$).

此外, 藻 EPS 还会通过改变吸附和吸收累积作用影响藻细胞对无机砷的去除效率. 砷去除效率 = (起始浓度 - t 时刻浓度) / 起始浓度 × 100%. As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露下藻细胞对砷去除效率随暴露时间动态变化, 在暴露 5 h 后分别达到最大值 24.5% 和 17.6% (图 6a), 同时溶液中残留砷浓度最小 (图 6b).

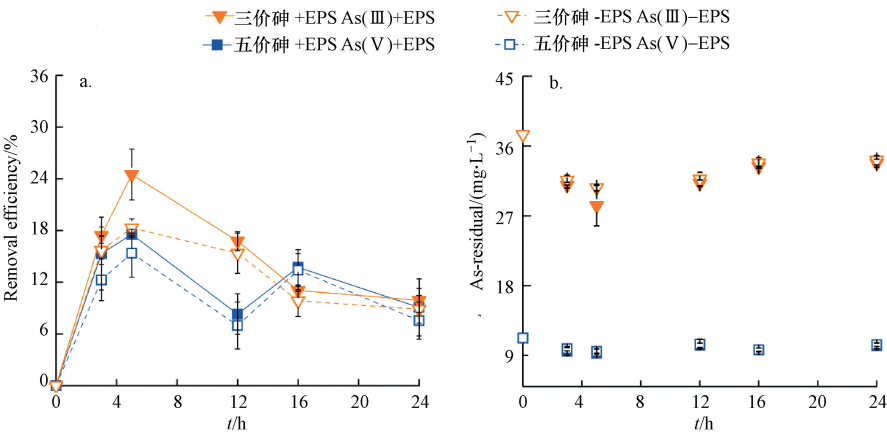


图 6 As(Ⅲ) 和 As(V) 暴露下±EPS 藻细胞的砷去除效率(a)及溶液中残留砷浓度(b)
Fig.6 The arsenic removal efficiency (a) and residual concentration (b) of algae cells with or without EPS after exposure to As(Ⅲ) and As(V)

脱除 EPS 后,藻细胞最大砷去除效率降为 18.3%和 15.4%, 胞外 EPS 可以增加藻细胞砷去除能力. 研究证实^[24], 随着暴露时间增加藻细胞内 As(Ⅲ) 和 As(V) 会发生氧化还原、甲基化等代谢转化过程或直接转移至胞外, 从而达到解毒目的. 因此, 基于活体微藻的无机砷净化修复技术必须充分考虑最佳的时间-效益以及藻细胞自分泌 EPS 的影响.

3 结论 (Conclusion)

在 0—40 mg·L⁻¹ 无机砷短期 (24 h) 暴露下, 蛋白核小球藻 *C. pyrenoidosa* 胞外聚合物 EPS 与无机砷 (As(Ⅲ)、As(V)) 存在交互作用, 影响蛋白核小球藻对无机砷的生物吸附及胞内累积。

(1) 蛋白小球藻细胞内 As(V) 吸收累积量显著高于 As(Ⅲ), 其动力学拟合均符合 Michaelis-Menten 方程。

(2) EPS 分泌量及组分变化显著受 As(Ⅲ) 和 As(V) 差异影响, EPS 分泌速率与胞内砷累积速率之间呈现正线性关系。

(3) 藻 EPS 影响无机砷吸附、吸收和累积, EPS 促进无机砷表面吸附的同时减少其向胞内的迁移累积, 胞外吸附量比其胞内吸收累积量高 2 到 3 个数量级。

参考文献 (References)

- [1] ZHU Y G, YOSHINAGA M, ZHAO F J, et al. Earth abides arsenic biotransformations [J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2014, 42(1): 443-467.
- [2] QIN J, LEHR C R, YUAN C G, et al. Biotransformation of arsenic by a yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(13): 5213-5217.
- [3] BAHAR M M, MEGHARAJ M, and 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.
- [4] BAHAR, MEGHARAJ, and NAIDU. 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.
- [5] 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.
- [6] RAHMAN M A, HASEGAWA H, and LIM R P. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain [J]. Environmental Research, 2012, 116(116): 118-135.
- [7] WANG Y, ZHANG C H, ZHENG Y H, et al. Bioaccumulation kinetics of arsenite and arsenate in *Dunaliella Salina* under different phosphate regimes [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(26): 21213-21221.
- [8] PAL A, PAUL A K. Microbial extracellular polymeric substances: Central elements in heavy metal bioremediation [J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(1): 49-64.
- [9] XIAO R, ZHENG Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications [J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(7): 1225-1244.
- [10] OZTURK S, ASLIM B. Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2008, 15(6): 478-480.
- [11] CHEN H W, HUANG W J, WU T H, et al. Effects of extracellular polymeric substances on the bioaccumulation of mercury and its toxicity toward the cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* [J]. Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2014, 49(12): 1370-1379.
- [12] 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.
- [13] MIYASHITA S, SHIMOYA M, KAMIDATE Y, et al. Rapid determination of arsenic species in freshwater organisms from the arsenic-rich Hayakawa River in Japan using HPLC-ICP-MS [J]. Chemosphere, 2009, 75(8): 1065-1073.
- [14] CHU H, HONG Y, TAN X, et al. Extraction procedure optimization and the characteristics of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) from *Chlorella Pyrenoidosa* [J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2015, 125: 238-246.
- [15] ZHOU K J, HU Y, ZHANG L Q, et al. The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae [J]. Scientific Reports, 2016, 6, 32998.
- [16] ROSEN B P, LIU Z J. Transport pathways for arsenic and selenium; A minireview [J]. Environment International, 2009, 35(3): 512-515.
- [17] 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(7): 167-174.
- [18] VRIENS B, BEHRA R, VOEGELIN A, et al. Selenium uptake and methylation by the microalga *Chlamydomonas Reinhardtii* [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(2): 711-720.
- [19] SHENG G P, YU H Q, and LI X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems; A review [J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 882-894.
- [20] COMTE S, GUIBAUD G, and BAUDU M. Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(4): 815-823.
- [21] PAN X L, LIU J, ZHANG D Y, et al. Binding of dicamba to soluble and bound extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic activated sludge: A fluorescence quenching study [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 345(2): 442-447.
- [22] 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 & Technology, 1985, 20(2-3): 153-161.
- [23] ZHU Y L, ZAYED A M, QIAN J H, et al. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants; II. Water hyacinth [J]. Journal of Environmental Quality, 1999, 28(1): 339-344.
- [24] WANG Y, WANG S, XU P, et al. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae [J]. Reviews in Environmental Science & Bio/technology, 2015, 14(3): 427-451.