

doi: 10.7541/2022.2021.0306

五价砷胁迫处理对普通小球藻的急性毒性效应

李立杰^{1,2} 彭梦^{1,2} 杨帆^{1,2} 余佳妮^{1,2} 金巍² 谭凤霞^{1,2} 柴毅^{1,2}

(1. 长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心, 荆州 434025; 2. 长江大学农学院/动物科学学院, 荆州 434025)

摘要: 为探究重金属砷在水域生态系统中的毒性作用及机制, 以典型浮游植物指示种普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)为试验对象, 通过设置不同浓度 As^{5+} (0、0.1、0.5、1、1.5和2 mg/L)研究其对普通小球藻的藻密度、叶绿素 a 含量、细胞膜通透性、蛋白(TP)含量、活性氧自由基(ROS)含量、丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)、总超氧化歧化酶(T-SOD)活性、三磷酸腺苷(ATP)活性和超微结构的影响。研究表明, 在96h胁迫内, 各浓度 As^{5+} 处理组对普通小球藻的生长均有抑制作用, 其中2 mg/L处理组抑制率最高, 为52.9%, 96h- IC_{50} 为1.94 mg/L。各处理组对藻细胞Chl. a 含量也均有抑制作用, 其中2 mg/L处理组最低, 仅为对照组的31.4%。 As^{5+} 浓度为1.5和2 mg/L时, 藻细胞TP和ATP含量显著降低, MDA含量为对照组的2倍和2.6倍, 细胞膜通透性高于对照的1.7倍和2倍。2 mg/L处理组ROS含量显著增加, 为对照组的4.0倍, 刺激藻细胞产生氧化应激, T-AOC和T-SOD活性显著增加, 为对照组的2.8倍和1.6倍。透射电镜(TEM)结果显示, As^{5+} 2 mg/L处理组会破坏藻细胞内部结构, 造成胞质空泡化, 类囊体片层结构断裂, 叶绿体结构紊乱等现象。这表明高浓度 As^{5+} 对普通小球藻细胞膜和主要细胞器的结构与功能具有破坏性, 同时普通小球藻为应对污染物胁迫机体会产生氧化应激。在 As^{5+} 浓度低于1.5 mg/L时普通小球藻生理生化指标受影响相对较小。研究揭示了典型指示种普通小球藻在 As^{5+} 环境胁迫中的生理生化反应, 为水环境中重金属污染的修复及制定相关环境标准提供基础数据, 进而实现水域生态系统的可持续发展与利用。

关键词: 重金属砷; 急性毒性效应; 抗氧化酶; 超微结构; 普通小球藻

中图分类号: Q178.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)09-1374-08



砷(Arsenic, As)是全球水环境中毒性最强的重金属污染物之一, 主要以 As^{3+} 和 As^{5+} 两种无机形式存在于水体中, 其中 As^{3+} 主要存在于地下水等还原性环境中, 而 As^{5+} 在河流和湖泊等氧化性环境中占主导地位^[1]。毒性试验研究表明, As^{5+} 毒性比 As^{3+} 毒性较弱, 但 As^{5+} 进入机体后经历一系列的还原和甲基化过程, 导致产生其他毒性更强的产物, 如 As^{3+} 、有机单甲基(MMA)和二甲基(DMA)代谢物等, 从而放大毒性, 并且 As^{5+} 在水环境中稳定性和含量均高于 As^{3+} ^[2], 具有低剂量高毒性、难降解和生物富集放大等特征, 其主要来源于地表径流和工业“三废”排放等途径^[3]。近年来, 我国水环境的As污染呈现出集中、多发的趋势, 云南省阳宗海As浓度高达179.6 $\mu\text{g/L}$ ^[4]; 长江中游江北平原和鄱阳湖平原浅层

地下水As含量为0.65—956.72和0.09—267.45 $\mu\text{g/L}$ ^[5]; 河南省大沙河As浓度为0.002—0.530 mg/L^[6]。As的检测浓度均高于我国地表水环境质量标准0.05 mg/L, 然而, 这些As的风险评估仅依赖于总砷, 这可能不适合于不同形式的As潜在风险评估^[1]。研究表明 As^{5+} 会显著影响浮游植物的群落演替, 从而通过食物链间接影响水生生物^[7], 并且水体过量 As^{5+} 会直接导致水生生物产生毒性效应, 如改变运动行为、导致生长发育迟缓、影响生理生化 and 改变遗传基因表达等^[8—11], 给水生生物带来生态压力, 同时 As^{5+} 污染会在水生生物体内富集, 并通过食物链传递^[12], 最终危害人类健康。因此, 从生态毒理学的角度来看, 开展基于不同价态的As浓度监测和水环境质量标准是非常迫切和必要的。

收稿日期: 2021-11-03; 修订日期: 2022-06-10

基金项目: 长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金资助 [Supported by the Engineering Research Center of Wetland Ecology and Agricultural Utilization, Ministry of Education of Yangtze University (KFT202006)]

作者简介: 李立杰(2000—), 男, 硕士研究生; 研究方向为环境毒理。E-mail: 648581458@qq.com

通信作者: 柴毅, E-mail: chaiyi123456@126.com

浮游植物(主要是微藻)是水域生态系统的初级生产者,也是环境污染物在食物链中富集的起点,其多样性和生物量直接影响着水生生态系统的结构和功能^[13]。且大多数微藻结构简单、世代时间短和对环境敏感等特点。近年来,藻类作为水环境指示生物已被广泛应用于水安全评价和环境污染物检测中^[14]。普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)属绿藻门(Chlorophyta),小球藻科(Chlorellaceae),小球藻属(*Chlorella*),分布广泛,可大量繁殖形成水华,也是富营养化水体的指示生物,是研究生态毒理学的经典生物学模型^[15]。本研究以普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为受试生物,探究As⁵⁺胁迫下普通小球藻的藻密度、Chl.a、抗氧化酶活性、活性氧自由基等指标的变化规律,揭示典型指示种普通小球藻在As⁵⁺环境胁迫中的生理生化反应,进一步探究重金属As污染对水生生物的致毒作用及机理提供理论参考,为水环境中重金属污染的修复及制定相关环境标准提供基础数据,进而实现水域生态系统的可持续发展与利用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种:普通小球藻(*Chlorella vulgaris*, FACHB-2338)购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-Collection)。

As⁵⁺标准品(1000 mg/L)购自北京坛墨质检科技股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 藻种扩培

普通小球藻在BG11培养基中培养,并在光照培养箱(GZX-250BSH-III,上海新苗医疗器械制造有限公司)中进行扩大培养,培养条件:温度为(25±1)℃,光暗比为12h:12h,光强为5000—8000 lx,每天摇动培养瓶3—4次,每隔1—2周转接,使藻类生长进入对数生长期。在整个培养过程,均经过灭菌处理。

1.3 五价砷对普通小球藻毒性效应

设置浓度梯度为0(对照组)、0.1、0.5、1、1.5和2 mg/L。选取处于对数生长期的普通小球藻藻液,离心3000×g下离心15min,蒸馏水重悬,再离心,重复3次,去除细胞表面吸附培养基营养盐,培养藻液体积为100 mL,初始藻密度为1×10⁶ cells/mL(初始A₆₈₀=0.122),每组设3个重复,每天摇动培养瓶3—4次,试验周期为96h。

1.4 藻细胞密度测定

通过血球计数板进行藻细胞计数,并在波长680 nm下测定藻液光密度,建立不同藻细胞浓度和

光密度之间的线性关系($y=84.8931x-0.3361$, $R^2=1$),实验中以测定的光密度根据线性方程计算出的藻细胞密度表示生物量,每24h在OD₆₈₀检测各处理组和对照组藻培养液的吸光度。通过藻密度绘制生长曲线并计算抑制率 $I(\%)$ 。

$$I(\%) = \frac{A_{CK} - A_X}{A_{CK}} \times 100$$

式中, A_{CK} 指对照组的藻密度, A_X 指实验组的藻密度。

采用Graphpad Prism 8.0软件,使用非线性回归模型拟合浓度-响应曲线,计算IC₅₀值和相关参数^[16]。

1.5 叶绿素a(Chl.a)质量浓度测定

各浓度组取5 mL藻液,3000×g下离心15min,并用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS; 0.01 mol/L, pH=7.3)清洗3次,去除上清液,加入5 mL体积分数为95%的乙醇在75℃水浴锅中水浴3min。再次离心后用紫外分光光度计测定在665和649 nm处吸光度,并依据公式进行计算^[17]

$$\text{Chl.a (mg/L)} = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$$

1.6 生理生化指标测定

暴露96h时取50 mL藻液离心3000×g下离心15min, PBS缓冲溶液重悬离心,重复3次,藻泥加入1 mL PBS和0.3 g氧化锆珠($R=0.05$ mm),低温条件下在高效组织细胞破碎仪(Tissue Cell-distroyer D1000,湖北新纵科病毒疾病工程技术有限公司)破碎,5000×g下工作30s,间隙10s,重复3次,低温离心上清液为粗酶液。总抗氧化能力(T-AOC, A015-3-1)、总超氧化物歧化酶(T-SOD, A001-3)活性、三磷酸腺苷酶(ATP, A070-1)活性、丙二醛(MDA, A003-1)含量及总蛋白含量(TP, A045-2)用南京建成生物工程研究所相应的试剂盒进行测定。

1.7 活性氧自由基(ROS)和藻细胞膜通透性测定

活性氧自由基(ROS)测定采用DCFH-DA(2, 7-Dichlorofluorescein Diacetate)探针法,南京建成生物工程研究所相应的试剂盒(E004-1-1)进行测定。

用二乙酸荧光素(Fluorescein Diacetate, FDA)法测定细胞通透性^[14]。将5 mL的藻细胞悬液离心(12000×g, 2min),用PBS洗涤3次,然后加入最终浓度为10 μg/mL的FDA。将悬液在室温黑暗条件下孵育30min,离心(12000×g, 2min),用PBS洗涤3次。荧光样品用全自动酶标仪(SpectraMax iD3)检测,激发波长为488 nm,发射波长为530 nm。结果显示为荧光强度与藻细胞数的比值作为单个藻细胞通透性水平(对照组为1)。

1.8 透射电镜(TEM)超微结构分析

96h时,As⁵⁺胁迫2 mg/L处理组和对照组,藻液10 mL在3000×g下离心10min,藻泥弃去培养液加入

电镜固定液(武汉百仟度生物科技有限公司, B0012)4℃固定2—4h,依次入50%—70%—80%—90%—95%—100%—100%乙醇脱水,每次15min,最后渗透、包埋、切片和染色,使用透射电子显微镜(TEM,日立, HT7800)下进行微观结构分析。

1.9 数据分析

实验数据为平均值±标准差(Mean±SD, $n=3$)表示,使用Graphpad Prism 8.0绘图和非线性曲线-最小二乘法回归分析,SPSS 20.0采用单因素(One-way Anova)和Duncan法进行方差分析和多重比较,与对照组相比具有统计学意义: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

2 结果

2.1 不同浓度 As^{5+} 对普通小球藻密度的影响

由图1可知,在试验所设浓度梯度下,普通小球藻密度随 As^{5+} 浓度及暴露时间的增加,均显著降低,普通小球藻在96h生长抑制最为严重,0.1、0.5、1、1.5和2 mg/L处理组抑制率分别达到了4.1%、6.9%、15.0%、32.0%和52.9%。通过非线性曲线-最小二乘法对 As^{5+} 暴露浓度和各时间段普通小球藻生长抑制率进行拟合,得到拟合效应曲线(图1), A^{5+} 对普通小球藻96h- IC_{50} 为1.94 mg/L。

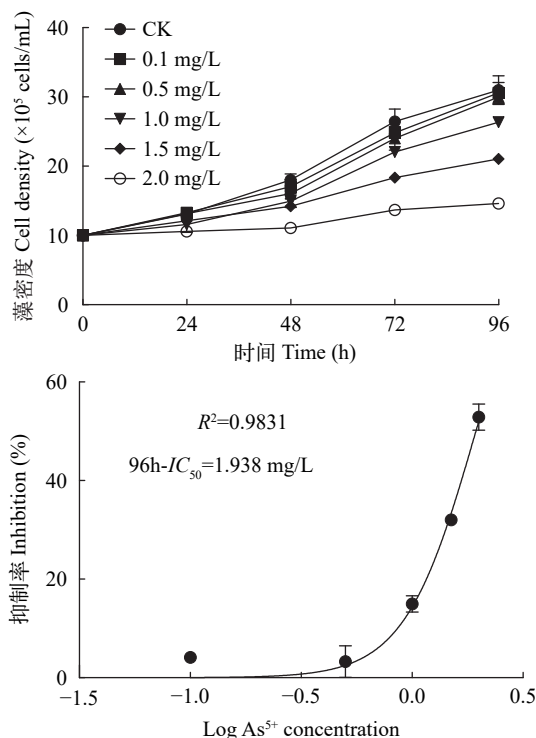


图1 As^{5+} 对普通小球藻生长的影响及各时间段抑制率曲线拟合

Fig. 1 Effect of As^{5+} on the growth of *C. vulgaris* and curve fitting of inhibition rate in different time periods

2.2 不同浓度 As^{5+} 对普通小球藻Chl.a的影响

由图2可知, As^{5+} 对普通小球藻Chl.a含量的影响与其对普通小球藻生长的影响呈现相似的变化规律,96h时,随暴露浓度的增加,Chl.a受到的抑制作用越强,表现出剂量-效应关系。0.1 mg/L处理组与对照组相比无显著性差异;0.5、1、1.5和2 mg/L处理组均表现出显著抑制,Chl.a含量分别下降了17.7%、26.6%、42.3%和68.6%。

2.3 不同浓度 As^{5+} 对普通小球藻细胞膜通透性的影响

由图3可知,在不同浓度 As^{5+} 处理96h后,单个藻细胞通透性水平随 As^{5+} 浓度的增加呈显著升高趋势。0.1、0.5和1 mg/L处理组与对照相比无显著性差异;1.5和2 mg/L处理组通透性显著增加,分别为对照组的1.7倍和2.2倍。

2.4 不同浓度 As^{5+} 对普通小球藻ROS和MDA含量的影响

由图4可知,在不同浓度 As^{5+} 处理96h后,ROS和MDA含量均随暴露浓度的增加而递增。2 mg/L处理组ROS含量与对照组相比显著增加,为对照组的4.0倍。1、1.5和2 mg/L处理组MDA含量分别为对照组的1.6倍、2.0倍和2.6倍,呈显著性差异。

2.5 不同浓度 As^{5+} 对普通小球藻抗氧化酶和能量代谢的影响

As^{5+} 胁迫处理96h后,TP和ATP含量随暴露浓度的增加而降低,0.1、0.5和1 mg/L处理组与对照组相比无显著性差异,1.5和2 mg/L处理组呈显著降低,TP含量分别为对照组的68.4%和35.0%,ATP含量分别为对照组的60.6%和48.1%。T-AOC和T-SOD活性均随暴露浓度的增加而增加,0.1—1.5 mg/L处理组T-AOC和T-SOD活性与对照组相比没有显著

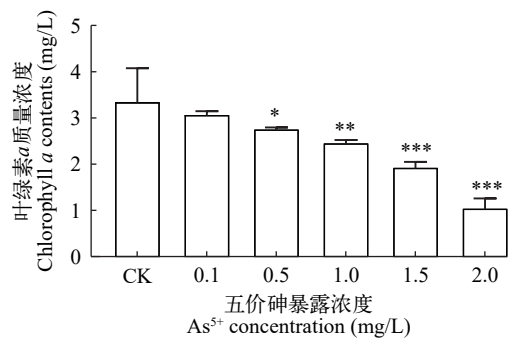


图2 As^{5+} 对普通小球藻叶绿素a的影响

Fig. 2 Effect of As^{5+} on chlorophyll a content of *C. vulgaris* 各处理组与对照组相比差异显著(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$);下同

Significant differences between treatment groups and control groups. The same applies below

性差异, 而2 mg/L处理组T-AOC和T-SOD活性分别为对照组的2.8倍和1.6倍, 呈显著性差异(图5)。

2.6 As^{5+} 胁迫对普通小球藻超微结构的影响

As^{5+} 胁迫96h后普通小球藻透射电镜(TEM)图观察如图6所示, 对照组藻细胞形态完整, 细胞器结构完好清晰可见, 细胞壁和质膜结构紧密。暴露于 As^{5+} 2 mg/L处理组藻细胞结构形态异常, 胞质部分呈空泡化, 类囊体片层结构模糊不清, 部分溶解消失, 叶绿体结构紊乱, 仅蛋白核和淀粉鞘结构完好。

3 讨论

重金属污染是全球水环境的主要问题之一, 藻类作为水生生态系统的主要初级生产者, 能够最大限度地光能转化为有机能, 对维持整个生态系统的平衡和稳定起着十分关键的作用, 同时对栖息环境变化极为敏感, 因而成为监测评价水环境质量的重要指标。在本研究中, 不同浓度 As^{5+} 胁迫下, 普通小球藻生长均表现出抑制作用, 抑制作用随浓度的增大和胁迫时间的延长而增强, 说明抑制作用具有时间-剂量依赖性。通过非线性曲线拟合参数, As^{5+} 胁迫对普通小球藻96h- IC_{50} 为1.94 mg/L。李莉霞等^[18]研究发现 As^{5+} 对大型溞的96h- LC_{50} 为4.25 mg/L; Silva等^[19]研究表明 As^{5+} 对中肋骨条藻的72h-

EC_{50} 为4.46 mg/L; Ghadersarbazi等^[20]研究表明 As^{5+} 对鲤96h- LC_{50} 为9.48 mg/L, 与本试验结果相似, 并且与前人结果相比, 普通小球藻对 As^{5+} 更为敏感。不同受试生物对 As^{5+} 存在敏感性差异, 可能与受试生物的规格、健康状况及生命阶段等诸多因素有关, 此外, 水环境的理化性质也会对水生生物的毒性效应产生影响。当水环境处于还原性条件下时, As^{3+} 占主导地位, 根据其化学性质, As^{3+} 毒性比 As^{5+} 更强, Karthikeyan等^[21]研究表明 As^{3+} 对纺锤水蚤和斑节对虾的96h- LC_{50} 分别为0.132和0.66 mg/L, He等^[22]研究表明 As^{3+} 对水蚤的48h- LC_{50} 为0.554 mg/L, 与本试验结果相比, As^{3+} 毒性较强与前人结果一致, As^{3+} 对水生生物的具体毒性效应机制后续会进一步研究。

光合色素是微藻进行光合作用的物质基础, Chl.a是微藻光合色素的主要色素, 其含量可以直接反映微藻的光合作用效率和生长状况^[23]。TP作为渗透调节物质和营养物质, 是衡量藻细胞代谢水平的重要指标^[24]。ATP是微藻最重要的高能化合物之一, 其主要来源于呼吸作用中的氧化磷酸化和光合作用中的光磷酸化, 因此其含量可直接反应藻类细胞的活性^[25]。在本研究中, As^{5+} 96h胁迫后, 普通小球藻Chl.a、TP和ATP含量与藻细胞生长趋势一

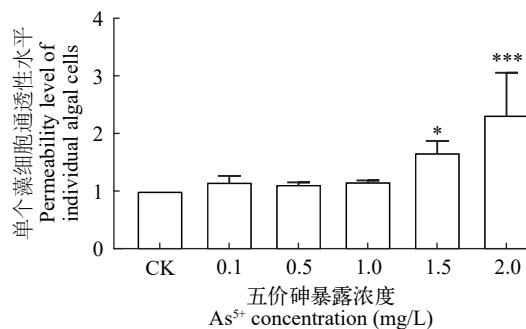


图3 As^{5+} 对普通小球藻细胞通透性水平的影响

Fig. 3 Effect of As^{5+} on the permeability of *C. vulgaris* cells

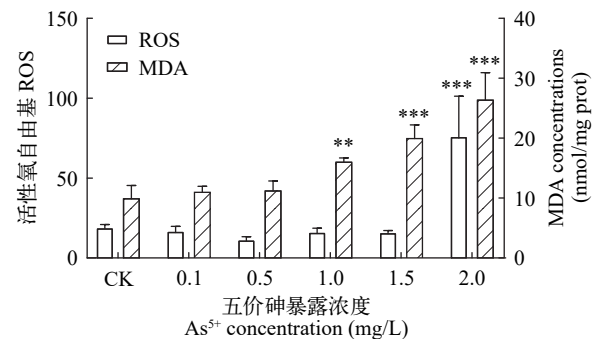


图4 As^{5+} 对普通小球藻ROS和MDA含量的影响

Fig. 4 Effects of As^{5+} on ROS and MDA contents of *C. vulgaris*

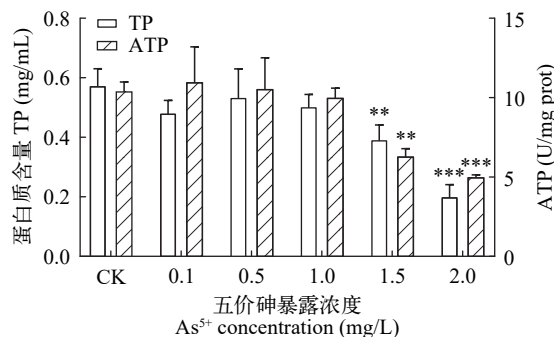
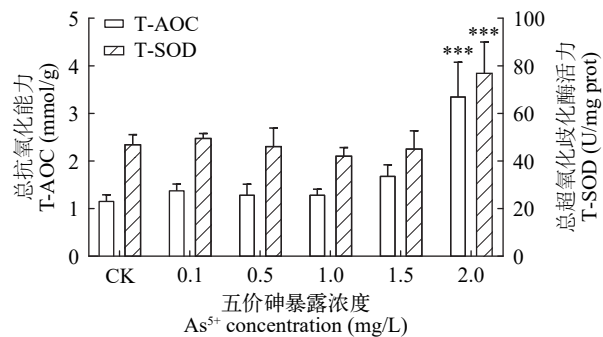


图5 As^{5+} 胁迫对普通小球藻TP、ATP、T-AOC和T-SOD含量的影响

Fig. 5 Effects of As^{5+} on the contents of TP, ATP, T-AOC and T-SOD in *C. vulgaris*



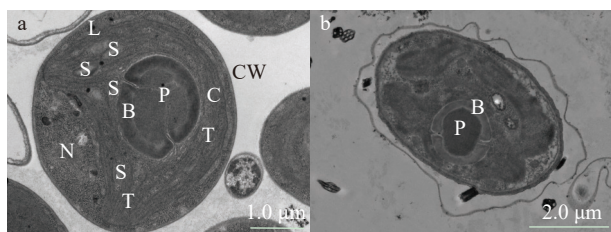


图6 As^{5+} 胁迫对普通小球藻超微结构的影响

Fig. 6 Effects of As^{5+} stress on ultrastructure of *C. vulgaris*

a. 对照组; b. 暴露于2 mg/L As^{5+} ; CW. 细胞壁; S. 淀粉粒; C. 叶绿体; T. 类囊体; B. 淀粉鞘; P. 蛋白核; L. 脂质滴; N. 细胞核
a. Control group; b. Exposure to 2 mg/L As^{5+} ; CW. cell wall; S. starch granule; C. chloroplast; T. thylakoid; B. starch sheath; P. protein nucleus; L. Lipid droplets; N. nucleus

致,随着暴露浓度的增加,Chl.*a*和TP含量显著下降,ATP能量代谢紊乱,藻细胞活性降低。分析其原因,一方面,可能是 As^{5+} 胁迫诱导ROS积累,抑制叶绿素酸脂还原酶和丙酮酸脱氢酶等物质的活性,阻碍光合色素和ATP酶的合成,导致用于蛋白质合成的碳骨架缺乏^[26];另一方面,通过电镜结果可知, As^{5+} 胁迫损伤藻细胞膜及胞内类囊体和叶绿体等结构,光合作用机能遭到破坏,ATP酶活性中心的结构发生变化,从而影响藻细胞能量代谢等生理功能的发挥,最终促使藻细胞凋亡^[27];再者, As^{5+} 与磷酸盐具有相似的结构和性质,能够通过磷酸蛋白转运通道进入细胞内,在许多生化反应中取代磷酸盐,并对细胞磷代谢产生干扰,从而影响高能磷酸键ATP的合成,导致蛋白结构异常和多种酶促反应受阻等^[28]。已有研究表明,当微藻遭受不同污染物胁迫时,TP和Chl.*a*含量变化与污染物剂量呈效应关系^[29]。张仁璇等^[30]研究表明紫球藻ATP酶活性随 Cd^{2+} 浓度的增加而显著降低,与本试验结果一致。

在正常条件下,机体产生的活性氧自由基(ROS)含量低,可被机体的抗氧化系统有效地清除,ROS产生速率和抗氧化系统的运作处于动态平衡,以避免机体损伤。然而,当机体受到超过其抗氧化系统能力的环境胁迫时,机体代谢过程中产生的过量ROS无法消除,从而导致膜脂质过氧化和光合器官损伤等^[31]。在本研究中,2 mg/L处理组ROS水平为对照组的4.0倍。这说明普通小球藻在 As^{5+} 胁迫下,自身抗氧化系统无法完全清除污染物产生的自由基,致使藻细胞受到氧化损伤。在微藻中,ROS主要由环境胁迫下叶绿体和质膜中的电子传递活动产生的,当光合作用相关基因被抑制、电子传递受阻时,多余的电子被输送到分子氧中,由此产生活性氧^[32]。正如本试验电镜结果可知,经 As^{5+} 胁迫处理的藻细胞ROS的增加,可能是叶绿体和类囊体等

结构被破坏的结果一致,与本试验藻细胞中Chl.*a*含量与ROS水平呈负相关一致。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化的重要产物,可以反映生物体受活性氧自由基攻击的程度,间接反映组织过氧化损伤程度^[33]。在本研究中,1、1.5和2 mg/L处理组MDA含量显著增加,分别为对照组的1.6倍、2.0倍和2.6倍,同时1.5和2 mg/L处理组通透性显著增加,分别为对照组的1.7倍和2.2倍。这表明脂质过氧化损伤加剧,改变膜酶、离子通道的脂质微环境,从而使细胞膜的流动性和通透性增强,影响细胞内平衡,最终导致细胞结构和功能的改变,这与透射电镜结果相一致。推测原因,其一,可能是重金属会影响藻细胞金属硫蛋白的结合能力,致使细胞膜脂质过氧化和膜电位去极化,破坏细胞膜完整性,损伤细胞内部结构,进而干扰机体代谢和生长^[34];其二,藻细胞在胁迫环境下,Chl.*a*含量下降,MDA的积累与活性氧的氧化损伤有关^[32]。吕金平等^[35]研究发现随 As^{3+} 浓度不断增加,黄花水龙叶片细胞的脂质过氧化程度不断加深,细胞膜系统受到不可逆损坏,导致细胞生长和光合作用均受到抑制,与本试验结果一致。

T-AOC是总抗氧化能力,由生物机体抗氧化系统和非酶促系统组成,是衡量机体抗氧化系统功能状况的综合指标,其中T-SOD是抗氧化系统中的重要组成部分,可以将超阴离子自由基(O_2^-)转化为 H_2O 和 O_2 ,防止机体受到活性自由基的攻击,在机体的自我保护系统中发挥着极为重要的作用^[36]。在本研究中,暴露于 As^{5+} 96h后,藻细胞ROS呈浓度依赖性增加,同时藻细胞T-AOC和T-SOD有相似的活性变化,2 mg/L处理组T-AOC和T-SOD活性受到显著诱导,分别为对照组的2.8倍和1.6倍,表明随着 As^{5+} 浓度的增加,对藻细胞机体的刺激增大,ROS产生速率增强,抗氧化酶被激活以平衡ROS的产生,其活性增高是为一种典型的清除过氧化物、维持细胞功能的应激反应。因此,T-AOC和T-SOD活性的提高为代偿性增高,用以清除 As^{5+} 胁迫时ROS产生过量的毒害,以维持细胞内的氧化还原平衡,增强藻细胞的自我保护机制。张鹏等^[37]研究发现无机砷胁迫对铜藻产生氧化损伤,为缓解砷胁迫,铜藻的抗氧化酶(SOD、POD)活性和抗氧化物(GSH、NPT)含量也相应提高;蔡卓平等^[38]研究表明,较低浓度的重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫米氏凯伦藻时,机体抗氧化酶系统对其产生应激性,SOD活性会显著升高,清除机体产生过多的自由基,抗氧化酶活性相对增强,本试验结果与前人结果相似。

叶绿体的数量和结构变化可以直接反映光合

作用能力, 其中类囊体是光反应的场所, 是叶绿体的核心结构, 类囊体的有序排列可以保证较大的光面积和光合速率^[39]。本研究透射电镜结果显示, 2 mg/L As^{5+} 胁迫下藻细胞胞质部分呈空泡化, 类囊体片层结构模糊不清, 部分溶解消失, 叶绿体结构紊乱。这主要是类囊体膜中富含不饱和脂肪酸, 容易受到过量ROS的攻击, 脂质过氧化程度不断加深, 导致膜的崩溃, 光合作用机能遭到破坏以及能量供应不足, 造成氧化磷酸化和电子传递受阻, 严重影响藻细胞自身的正常生长以及代谢活动, 促使细胞凋亡^[40], 这与上述本试验结果相一致。这一结果与Gu等^[23]报道增塑剂邻苯二甲酸二丁酯会破坏斜生栅藻和小球藻的内部结构(叶绿体、细胞膜和蛋白核)的完整性及唐学玺等^[41]研究发现2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚(BDE-47)胁迫米氏凯伦藻, 造成藻细胞胞内基质出现许多高电子密度区域及透明空泡, 线粒体和叶绿体等细胞器受到明显破坏作用, 与本试验结果一致。

4 结论

由于重金属对人类、水生生物和其他生物的毒性, 水体重金属污染对水环境生态系统的平衡和稳定是一个潜在威胁。因此, 以水环境为重点的污染影响研究受到越来越多的关注。本研究证实了 As^{5+} 浓度高于1.5 mg/L胁迫下普通小球藻表现出显著的响应, 表现为藻细胞生长受到抑制, Chl.a、TP和ATP含量下降, ROS和MDA含量升高, 脂质过氧化程度加深导致细胞膜通透性增大, 藻细胞内部结构紊乱。但在 As^{5+} 胁迫下, 小球藻可以通过改变T-AOC和T-SOD活性来适应和调节, 从而提高小球藻对 As^{5+} 胁迫的抗性。因此, 普通小球藻在 As^{5+} 胁迫下的一系列生理反应可作为水生态系统中 As^{5+} 污染的天然生物标志物或生物指示物。但是, 重金属砷对微藻毒性作用机制复杂, 仅从浓度、受试生物死亡率和抗氧化酶活性等指标去判断有所欠缺, 需要后续进一步研究, 同时水环境实际污染物呈多元化, 重金属As与其他污染物的联合毒性试验亟待开展。

参考文献:

- [1] Zheng L, Liu Z T, Yan Z G, *et al.* Deriving water quality criteria for trivalent and pentavalent arsenic [J]. *Science of the Total Environment*, 2017(587/588): 68-74.
- [2] Byeon E, Kang H M, Yoon C, *et al.* Toxicity mechanisms of arsenic compounds in aquatic organisms [J]. *Aquatic Toxicology*, 2021(237): 105901.
- [3] Arora N, Gulati K, Patel A, *et al.* A hybrid approach integrating arsenic detoxification with biodiesel production using oleaginous microalgae [J]. *Algal Research*, 2017(24): 29-39.
- [4] Bai N J, Chen L, Jiang Y N, *et al.* Spatio-temporal characteristics of phytoplankton distribution and the identification of driving factors in the arsenic-contaminated Yangzong Lake [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2019, 31(1): 147-158. [白宁静, 陈丽, 蒋伊能, 等. 阳宗海砷污染背景下浮游植物的时空分布特征及其驱动因子解析 [J]. *湖泊科学*, 2019, 31(1): 147-158.]
- [5] Li D, Deng Y M, Du X, *et al.* Isotopic indication of spatial heterogeneity of arsenic in shallow groundwater of the central Yangtze River lacustrine plain [J/OL]. *Earth Science*, 1-18. (2021-05-28)[2021-10-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1874.P.20210528.1513.002.html>. [李典, 邓娅敏, 杜尧, 等. 长江中游河湖平原浅层地下水中砷空间异质性的同位素指示 [J/OL]. *地球科学*, 1-18. (2021-05-28)[2021-10-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1874.P.20210528.1513.002.html>.]
- [6] Chen J, Duo K X, Xu G H, *et al.* Emergency monitoring and analysis of as pollution in Dashahe River [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2009, 25(5): 53-56. [陈静, 多克辛, 徐广华, 等. 大沙河砷污染应急监测与分析 [J]. *中国环境监测*, 2009, 25(5): 53-56.]
- [7] Wei Z B, Chai Y, Luo J B, *et al.* Seasonal succession and ecological niche analysis of the dominant species of phytoplankton in Changhu Lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 612-621. [魏志兵, 柴毅, 罗静波, 等. 长湖浮游植物优势种季节演替及生态位分析 [J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 612-621.]
- [8] Chen M Y, Wang Z H, Luo Z X. Stress effects of arsenate on two common freshwater green microalgae under different phosphorus regimes [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(5): 218-227. [陈敏怡, 王振红, 罗专溪. 不同磷源对砷胁迫下2种绿藻生长的影响 [J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(5): 218-227.]
- [9] Li C X, Li P, Tan Y M, *et al.* Metabolomic characterizations of liver injury caused by acute arsenic toxicity in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151225.
- [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] Li D, Lu C L, Wang J, *et al.* Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91(3): 229-237.
- [12] Liu X L, Wang Q, He J, *et al.* Occurrence, speciation analysis and health risk assessment of arsenic in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) collected from China [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020(94): 103647.
- [13] Shang L, Chen L, Zhang T, *et al.* Seasonal variations and driving factors of phytoplankton community shift in Da-

- tun Lake with long-term stress of arsenic contamination [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, **32**(5): 1845-1853. [尚丽, 陈丽, 张涛, 等. 长期胁迫下大屯海浮游植物群落季节性特征及其驱动因子 [J]. 应用生态学报, 2021, **32**(5): 1845-1853.]
- [14] Ouyang S H, Hu X G, Zhou Q X. Envelopment-Internalization synergistic effects and metabolic mechanisms of graphene oxide on single-cell *Chlorella vulgaris* Are dependent on the nanomaterial particle size [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, **7**(32): 18104-18112.
- [15] Liu J K. Advanced Hydrobiology [M]. Beijing: Science Press, 1999: 1-413. [刘建康. 高级水生生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1-413.]
- [16] Yang W H, Huang X X, Wu Q X, *et al.* Acute toxicity of polychlorinated diphenyl ethers (PCDEs) in three model aquatic organisms (*Scenedesmus obliquus*, *Daphnia magna*, and *Danio rerio*) of different trophic levels [J]. *Science of the Total Environment*, 2022(805): 150366.
- [17] Xu D M, Li C D, Chen H, *et al.* Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013(88): 103-107.
- [18] Li L X, Li D, Gao M, *et al.* Rapid Evolution of Resistance to AsV in *Daphnia magna* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, **11**(3): 237-242. [李莉霞, 李丹, 高蜜, 等. 大型蚤对五价砷抗性选择的响应 [J]. 生态毒理学报, 2016, **11**(3): 237-242.]
- [19] Silva V C, Almeida S M, Resgalla C, *et al.* Arsenate (AsV) in water: Quantitative sensitivity relationships among biomarker, ecotoxicity and genotoxicity endpoints [J]. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2013(92): 174-179.
- [20] Ghadersarbazi Z, Ghiasi F, Ghorbani F, *et al.* Toxicity assessment of arsenic on common carp (*Cyprinus carpio*) and development of natural sorbents to reduce the bioconcentration by RSM methodology [J]. *Chemosphere*, 2019(224): 247-255.
- [21] Karthikeyan P, Marigoudar S R, Mohan D, *et al.* Prescribing sea water quality criteria for arsenic, cadmium and lead through species sensitivity distribution [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021(208): 111612.
- [22] He W X, Megharaj M, Naidu R. Toxicity of tri- and penta-valent arsenic, alone and in combination, to the cladoceran *Daphnia carinata*: the influence of microbial transformation in natural waters [J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2009(31): 133-141.
- [23] Gu S, Zheng H, Xu Q, *et al.* Comparative toxicity of the plasticizer dibutyl phthalate to two freshwater algae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017(191): 122-130.
- [24] Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2014, **73**(1): 57-66.
- [25] Falhof J, Pedersen J T, Fuglsang A T, *et al.* Plasma membrane h⁺-atpase regulation in the center of plant physiology [J]. *Molecular Plant*, 2016, **9**(3): 323-337.
- [26] Ventura-Lima J, Bogo M R, Monserrat J M. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, **74**(3): 211-218.
- [27] Chen S, Wang L, Feng W, *et al.* Sulfonamides-induced oxidative stress in freshwater microalga *Chlorella vulgaris*: Evaluation of growth, photosynthesis, antioxidants, ultrastructure, and nucleic acids [J]. *Scientific Reports*, 2020(10): 8243.
- [28] Hughes M F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action [J]. *Toxicology Letters*, 2002, **133**(1): 1-16.
- [29] Wang J J, Qian X J, An M, *et al.* Effect of combined exposure of diethylphthalate and nonylphenol on growth of *Dunaliella salina* [J]. *Ecological Science*, 2012, **31**(4): 370-376. [王晶晶, 钱晓佳, 安民, 等. 邻苯二甲酸二乙酯和壬基酚联合暴露对杜氏盐藻生长的影响 [J]. 生态科学, 2012, **31**(4): 370-376.]
- [30] Zhang R X, Jiang S, Tong S M. Effects of Cd²⁺ stress on the growth and photochemical activity of *Porphyridium purpureum* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(5): 1037-1042. [张仁璇, 姜思, 佟少明. Cd²⁺对紫球藻生长及光化学活性的影响 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(5): 1037-1042.]
- [31] Thiagarajan V, Iswarya V, P A J, *et al.* Influence of differently functionalized polystyrene microplastics on the toxic effects of P25 TiO₂ NPs towards marine algae *Chlorella* sp. [J]. *Aquatic Toxicology*, 2019(207): 208-216.
- [32] Kumar S, Habib K, Fatma T. Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen-fixing cyanobacteria [J]. *Science of the Total Environment*, 2008, **403**(1/2/3): 130-138.
- [33] Sabatini S E, Juárez A B, Eppis M R, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, **72**(4): 1200-1206.
- [34] Tripathi S, Poluri K M. Heavy metal detoxification mechanisms by microalgae: Insights from transcriptomics analysis [J]. *Environmental Pollution*, 2021(285): 117443.
- [35] Lv J P, Zhang S W, Li T, *et al.* Effect of inorganic trivalent arsenic stress on physiological and biochemical characteristics in sterile immature plant of *Jussiaea stipulacea* ohwi [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(2): 445-452. [吕金平, 张诗雯, 李涛, 等. 无机三价砷对黄花草水龙无菌苗生理生化特性的影响 [J]. 水生生物学报, 2020, **44**(2): 445-452.]
- [36] Kuang X L, Gu J D, Tie B Q, *et al.* Interactive effects of cadmium and *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on the growth, antioxidative responses and accumulation of cadmium and microcystins in rice seedlings [J]. *Eco-*

- toxicology (London, England)*, 2016, **25**(8): 1588-1599.
- [37] Zhang P, Liu W, Wang T G, *et al.* Impacts of short-term inorganic arsenic stress on oxidative damage, antioxidant enzymes and antioxidant in germlings of *Sargassum horneri* [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2021, **30**(5): 1034-1041. [张鹏, 刘玮, 王铁杆, 等. 无机砷短期胁迫对铜藻幼苗氧化损伤、抗氧化酶及抗氧化物的影响 [J]. 生态环境学报, 2021, **30**(5): 1034-1041.]
- [38] Cai Z P, Liu W J, Luo Y M, *et al.* Toxicity of Cd^{2+} and Pb^{2+} to the growth and physiology of marina microalga *Karenia mikimotoi* [J]. *Ecological Science*, 2019, **38**(3): 211-217. [蔡卓平, 刘伟杰, 骆育敏, 等. 重金属镉和铅胁迫对海洋微藻的毒性效应研究 [J]. 生态科学, 2019, **38**(3): 211-217.]
- [39] Bečková M, Gardian Z, Yu J F, *et al.* Association of Psb28 and Psb27 proteins with PS II-PS I supercomplexes upon exposure of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light [J]. *Molecular Plant*, 2017, **10**(1): 62-72.
- [40] Jaspers P, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling [J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, **138**(4): 405-413.
- [41] Zhang X X, Tang X X, Jiang S, *et al.* Toxic effect of 2, 2', 4, 4'-Tetrabromodiphenyl Ether(BDE-47) on *Karenia mikimotoi* in the different levels of biological organizations [J]. *Marine Environmental Science*, 2013, **32**(4): 491-496. [张鑫鑫, 唐学玺, 姜爽, 等. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚(BDE-47)对米氏凯伦藻的毒性效应 [J]. 海洋环境科学, 2013, **32**(4): 491-496.]

ACUTE TOXIC EFFECT OF ARSENATES ON *CHLORELLA VULGARIS*

LI Li-Jie^{1,2}, PENG Meng^{1,2}, YANG Fan^{1,2}, YU Jia-Ni^{1,2}, JIN Wei², TAN Feng-Xia^{1,2} and CHAI Yi^{1,2}

(1. Engineering Research Center for Wetland Ecology and Agricultural Utilization, Ministry of Education, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. College of Agriculture/College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: In order to explore the toxicity and mechanism of heavy metals arsenic in aquatic ecosystem, *Chlorella vulgaris*, a typical phytoplankton indicator species, was used as the experimental object. Different concentrations of As^{5+} (0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2.0 mg/L) were used to study the effects of As^{5+} on the density, chlorophyll a content, cell membrane permeability, reactive oxygen species (ROS) content, malondialdehyde (MDA) content, total antioxidant capacity (T-AOC), total protein (TP) content, total superoxide dismutase (T-SOD) activity, ATP activity and ultrastructure of *C. vulgaris*. The results showed that all concentrations of As^{5+} could inhibit the growth of *C. vulgaris* within 96h, and the inhibition rate of 2 mg/L treatment group was the highest (52.9%). The IC_{50} of 96h was 1.94 mg/L. The Chl.a content of algae cells was also inhibited in all treatment groups, among which, the treatment group of 2 mg/L was the lowest which was only 31.4% of the control group. When the concentration of As^{5+} was 1.5 and 2 mg/L, the content of TP and ATP decreased significantly. The content of MDA was 2 times and 2.6 times higher than that of the control group, and the cell membrane permeability was 1.7 times and 2 times higher than that of the control group. The content of ROS in 2 mg/L treated group increased significantly, which was 4.0 times of that in control group. The activities of T-AOC and T-SOD in algal cells stimulated by oxidative stress were 2.8 times and 1.6 times higher than those in control group. The results of transmission electron microscope showed that the group treated with 2 mg/L As^{5+} could destroy the internal structure of algae cells, resulting in cytoplasmic vacuolation, lamellar structure fracture of thylakoids and chloroplast structure disorder. The results showed that high concentration of As^{5+} was destructive to the structure and function of cell membrane and main organelles of *C. vulgaris*. At the same time, *C. vulgaris* produced oxidative stress in response to pollutant stress. The concentration of As^{5+} below 1.5 mg/L had no significant effect on physiological and biochemical indexes of *C. vulgaris*. This study reveals the physiological and biochemical reactions of the typical indicator species *C. vulgaris* under As^{5+} environmental stress, and provides basic data for the remediation of heavy metal pollution in the water environment and the formulation of relevant environmental standards, thereby realizing the sustainable development and utilization of the aquatic ecosystem.

Key words: Eavy metal arsenic; Acute toxic effects; Antioxidant enzyme activity; Ultrastructure; *Chlorella vulgaris*