

# 砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫对鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻生理生化指标的影响

穆文静, 杜 玲

(内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022)

**摘要:**为提高钝顶螺旋藻的养殖质量,以鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻为材料,用不同浓度的亚砷酸钠( $\text{As}^{3+}$ )培养液培养螺旋藻,研究了砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫对钝顶螺旋藻的生理生化指标的影响。结果表明:砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫会使叶绿素a和类胡萝卜素的波峰发生蓝移,藻胆蛋白的波峰发生红移。叶绿素a和类胡萝卜素含量在低浓度砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫下增加,高浓度砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫下降低。藻蓝蛋白和可溶性蛋白的含量则是在高浓度砷( $\text{As}^{3+}$ )和低浓度砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫下均会降低。

**关键词:**砷胁迫;鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻;抑制作用

**中图分类号:**Q943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)07-0017-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.07.0017

砷污染是全球水体面临的重大环境污染问题之一。近年来,砷对植物生长的影响一直是研究的热点。詹杰等<sup>[1]</sup>研究发现在砷浓度低于 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,砷能够促进水花生的生长。高浓度砷存在情况下,砷对植物的毒害作用非常明显,康瑞娟等<sup>[2]</sup>研究发现高浓度的砷对蓝藻光合放氧速率及细胞生长均产生严重的抑制作用,诱导藻细胞衰亡,致使蓝藻产生严重的毒害效应。许多研究者进行了有关重金属胁迫对钝顶螺旋藻生理影响的研究报道。张小兰<sup>[3]</sup>等人的研究表明,Hg能抑制或完全终止藻类的生长,损害光合色素,导致叶绿素含量下降。刘慧等<sup>[4]</sup>研究表明,不同质量浓度( $0 \sim 25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内) $\text{Cd}^{2+}$ 对螺旋藻的生长均有抑制作用,而随 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度的增加抑制率也增强。 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫还使藻细胞的主要光吸收峰发生红移动,而对藻蓝蛋白的吸收峰没有明显影响。对于鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻,当地养殖企业在生产和质量监测藻粉过程中发现,国家重视的重金属铅(Pb)、镉(Cd)在鄂尔多斯高原碱湖钝顶藻粉中含量均低于国家行业标准,而重金属砷(As)含量相对较高甚至有时会超

出国家行业标准要求( $\leq 1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[5]</sup>。导致这一结果的主要原因是鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻养殖使用的是地下350 m的深井水,而不是原湖水或地上水,而当地地下水资源的特点是Pb、Cd含量较低,而As含量偏高。内蒙古自治区螺旋藻工程技术研究中心的王志忠等<sup>[6]</sup>曾对鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻藻粉的砷来源进行过统计分析,发现养殖过程中藻粉砷主要来自养殖用水及培养基中的主要化学成分。

本研究以鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻(*Spirulina (Arthrospira) platensis*)为材料,研究液体培养基中不同浓度的As对钝顶螺旋藻生理生化特征的影响,为鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻的安全养殖、产品质量的控制与提高提供一些理论和应用的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻(*S. (A.) platensis*),藻种由内蒙古鄂尔多斯市加力螺旋藻业有限责任公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻的培养

将适量的藻种分别接种于不同浓度(见表1)的100 mL含砷培养液中,并将藻液光密度 $\text{OD}_{560 \text{ nm}}$ 值均调为0.2,置于室内自然光照通气静置培养

收稿日期:2017-05-17

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2013MS0517)

第一作者简介:穆文静(1980-),女,宁夏回族自治区人,硕士,实验师,从事植物生理与生化研究。E-mail:ml3848105857@163.com;

7 d。

表 1 试验组的砷(As<sup>3+</sup>)添加量

Table 1 The addition of As<sup>3+</sup>

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Treatment									
As <sup>3+</sup> / (mg·L <sup>-1</sup> )	0	0.1	1.0	5.0	10.0	25.0	50.0	75.0	100.0

1.2.2 叶绿素 a 含量的测定 叶绿素 a 的提取采用乙醇浸提法,含量测定采用分光光度法<sup>[7]</sup>。

叶绿素 a 含量(mg·g<sup>-1</sup>·FW) = 13.95 × OD × V<sub>T</sub>/V<sub>S</sub>/W

1.2.3 类胡萝卜素含量的测定 类胡萝卜素的提取和含量测定采用王业勤<sup>[8]</sup>等的有机溶剂浸提法和分光光度法。

类胡萝卜素含量(mg·g<sup>-1</sup>·FW) = (OD<sub>1</sub> - 0.046OD<sub>2</sub>) × 4 × V<sub>T</sub>/V<sub>S</sub>/W

1.2.4 藻蓝蛋白含量的测定 藻蓝蛋白的提取和含量测定采用张成武等<sup>[9]</sup>的磷酸缓冲液浸提法

和分光光度法。

藻蓝蛋白含量(mg·g<sup>-1</sup>·FW) = (0.187OD<sub>1</sub> - 0.089OD<sub>2</sub>) × V<sub>T</sub>/V<sub>S</sub>/W

1.2.5 可溶性蛋白的提取 提取方法同藻蓝蛋白,测定方法为采用李合生等<sup>[10]</sup>考马斯亮蓝 G-250 比色法。

可溶性蛋白(mg·g<sup>-1</sup>·FW) = C × V<sub>T</sub>/V<sub>S</sub>/W/1000

2 结果与分析

2.1 叶绿素 a 吸光光谱和含量的分析

从图 1 看出,各浓度组叶绿素 a 的吸光波形基本相同,在蓝紫光区和红光区各出现了一个吸收峰。对照组在蓝紫光区吸收波峰为 434 nm,0.1 mg·L<sup>-1</sup> 组的波峰与对照组相同;1.0 ~ 25.0 mg·L<sup>-1</sup> 组的波峰在 433 nm 处,比对照组蓝移了 1 nm;50.0 ~ 100.0 mg·L<sup>-1</sup> 组的波峰在 432 nm 处,比对照组蓝移了 2 nm。

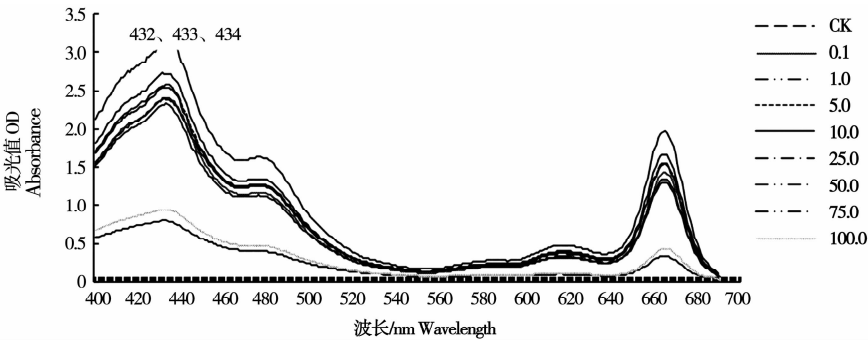


图 1 叶绿素 a 吸光光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of chlorophyll a

叶绿素 a 含量方差分析表明(见图 2),除(As<sup>3+</sup>)胁迫浓度 25.0 mg·L<sup>-1</sup> 与对照组差异不显著外,其它浓度砷(As<sup>3+</sup>)胁迫组的叶绿素 a 含量均有显著性差异( $P>0.05$ )。砷(As<sup>3+</sup>)胁迫浓度 5 mg·L<sup>-1</sup> 时,叶绿素 a 含量比对照组增加 3.8%,而胁迫浓度 75.0、100.0 mg·L<sup>-1</sup> 两组较对照组显著降低,砷(As<sup>3+</sup>)胁迫浓度 100.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,最高抑制率达 19.4%。

2.2 类胡萝卜素吸光光谱和含量的分析

从图 3 可知,各浓度组的类胡萝卜素吸光波形基本相同。对照组类胡萝卜素蓝紫光区的主波

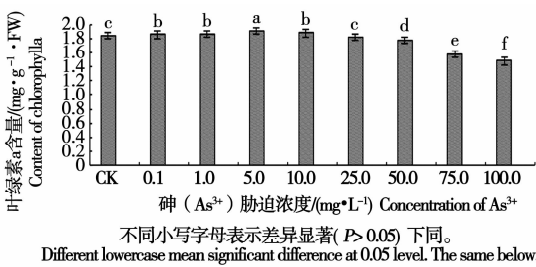


图 2 叶绿素 a 含量

Fig. 2 Content of chlorophyll a

峰在 432 nm 处(一般与叶绿素 a 的波峰重叠);此外,在 488 nm 处有一个明显的次峰。0.1 ~ 50.0 mg·L<sup>-1</sup> 组的主波峰均在 432 nm 处,与对照

组相同。75.0~100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组的主波峰在 431 nm 处,比对照组蓝移了 1 nm。0.1~25.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组次峰在 487 nm 处,比对照组蓝移了 1 nm,而 50.0~100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组的次波峰均在 486 nm 处,比对照组蓝移了 2 nm。

从图 4 看出,随着砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度的增加

类胡萝卜素含量呈先上升再下降的趋势。采用单因素方差分析多重比较检验法,结果表明 5.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比对照组显著增加了 6.7%,而 50.0~100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比对照组显著下降,砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度 100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时抑制率达到 37.1%。

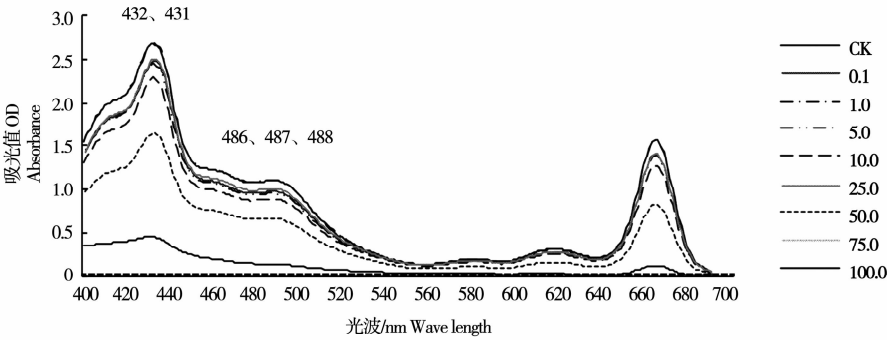


图 3 类胡萝卜素吸光光谱  
Fig. 3 Absorption spectrum of carotenoid

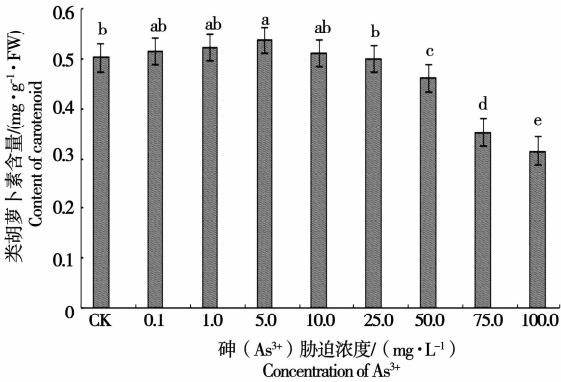


图 4 类胡萝卜素含量  
Fig. 4 Content of carotenoid

2.3 藻蓝蛋白吸光光谱和含量的分析

从图 5 看出,各浓度组的吸光图波形基本相同。621 nm 是藻蓝蛋白(PC)的吸收波峰,678 nm 一般认为是别藻蓝蛋白(APC)和叶绿素 a 的重叠波峰。但红光区的别藻蓝蛋白 650 nm 的吸收波峰和藻红蛋白(PE)490 nm 处的吸收波峰不明显。砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫组在红光区 621 nm 处,0.1~100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组波峰均在 622 nm 处,比对照组红移了 1 nm。而 678 nm 处,0.1~5.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,与对照组没有变化,10~100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组波峰在 679 nm 处,比对照组红移了 1 nm。

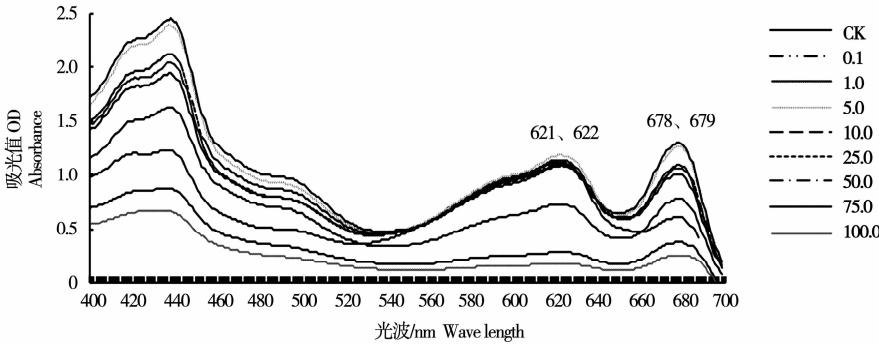


图 5 藻蓝蛋白吸光光谱  
Fig. 5 Absorption spectrum of phycocyanin

从图6可知。随着砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度的增加藻蓝蛋白含量呈先上升再下降的趋势。采用单因素方差分析多重比较检验法( $P=0.05$ )分析,结果 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比对照组显著增加 $3.0\%$ 。而其它浓度组含量均显著低于对照组。砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率达到 $44.8\%$ 。

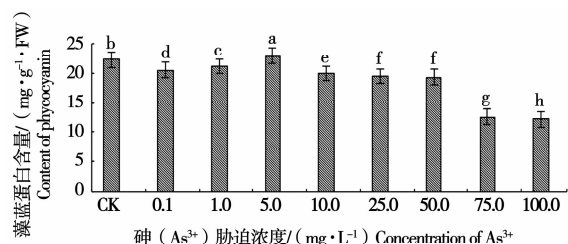


图6 藻蓝蛋白含量

Fig. 6 Content of phycocyanin

## 2.4 可溶性蛋白含量的分析

由图7看出。随着砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度的增加可溶性蛋白含量呈先上升再下降的趋势。 $1.0\sim 5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组可溶性蛋白含量较对照组显著增加( $P>0.05$ ),砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到峰值比对照组增加 $9.7\%$ 。而 $50.0\sim 100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组较对照组显著下降( $P>0.05$ )。砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度 $100.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制率达到 $8.6\%$ 。藻蓝蛋白含量的变化趋势与可溶性蛋白含量的趋势相类似,但藻蓝蛋白含量的下降幅度比可溶性蛋白大。

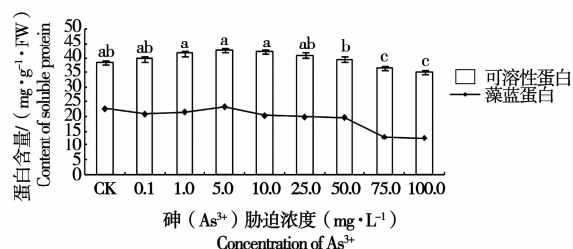


图7 可溶性蛋白含量

Fig. 7 Content of soluble protein

## 3 结论与讨论

对于光合色素吸光光谱的研究发现,对照组和各砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫组的光合色素吸光光谱波形基本相同。叶绿素a在蓝紫光区和红光区各出现了一个吸收峰,对照组蓝紫光区吸收波峰为 $434\text{ nm}$ 处,在红光区的吸收波峰为 $665\text{ nm}$ 处,这

与徐黎等<sup>[7]</sup>介绍的鱼腥藻采用 $96\%$ 的乙醇提取叶绿素a的结果相同。对照组类胡萝卜素的蓝紫光区最大吸收波峰为 $432\text{ nm}$ 处,在 $488\text{ nm}$ 处有一个明显的次峰,这与刘华等<sup>[11]</sup>钝顶螺旋藻类胡萝卜素主波峰 $434\text{ nm}$ 处,次峰在 $488\text{ nm}$ 相似。对照组藻蓝蛋白在红光区的两个吸收波峰分别为 $621\text{ nm}$ 和 $678\text{ nm}$ 处, $621\text{ nm}$ 是藻蓝蛋白(PC)的吸收波峰,这与张厚森和马海乐<sup>[12]</sup>介绍的纯化后的钝顶螺旋藻PC吸收峰结果相同; $678\text{ nm}$ 一般认为是别藻蓝蛋白(APC)和叶绿素a的重叠波峰,这与赵东旭等<sup>[13]</sup>介绍的别藻蓝蛋白复合体的一种ABC-B最大吸收峰 $678\text{ nm}$ 结果相同,但红光区的别藻蓝蛋白 $650\text{ nm}$ 的吸收波峰和藻红蛋白(PE) $490\text{ nm}$ 处的吸收波峰不明显。在相同方法培养和提取光合色素的条件下,砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫组的光合色素吸光波峰,随着砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度的增加出现有规律的向蓝光方向或红光方向移动现象。说明,不同浓度的砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫,使鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻的叶绿素a、类胡萝卜素和藻蓝蛋白发生不同程度的变形。

对于光合色素和可溶性蛋白含量的研究发现,随着砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫浓度的增加叶绿素a、类胡萝卜素、藻蓝蛋白和可溶性蛋白含量均有先上升再下降的趋势。其中, $0.1\sim 25.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫组的叶绿素a、类胡萝卜素和可溶性蛋白含量均略高于对照组,而藻蓝蛋白含量低于对照组。可溶性蛋白含量的趋势与藻蓝蛋白含量的趋势相似,但藻蓝蛋白含量的下降幅度比可溶性蛋白大。说明,砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫可能抑制了鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻细胞藻蓝蛋白的合成或加速了藻蓝蛋白的降解。低浓度的砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫下叶绿素a和类胡萝卜素有略微增加趋势,这可能对砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫影响藻蓝蛋白的抑制作用有一定的保护作用或光合补偿作用。而高浓度的砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫在不同程度上影响鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻细胞吸光能力,使光合色素及相关蛋白含量显著下降。其中,对藻蓝蛋白的影响最严重,其次为类胡萝卜素。砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫对藻蓝蛋白的抑制作用可能是可溶性蛋白发生变化

的主要原因。大量文献报道,蓝藻细胞中存在类金属硫蛋白,使蓝藻细胞对重金属的毒害有一定的抗性<sup>[14]</sup>。金属硫蛋白可以被包括砷( $\text{As}^{3+}$ )在内的许多离子和化合物诱导<sup>[15]</sup>。因此,这种砷( $\text{As}^{3+}$ )胁迫对鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻生长与生理出现不同趋势的现象可能是由于藻细胞内被诱导产生了类金属硫蛋白,较低范围内降低了砷的毒性所致,提高了藻细胞对砷耐受性的可能性。

参考文献:

[1] 詹杰,黄毅斌,郑向丽,等. 砷元素对水花生生长影响[J]. 江西农业学报,2008,20(6):95-97.  
[2] 康瑞娟,秦静芬,汪晶,等. 砷对蓝藻光合作用和细胞生长的影响[J]. 水生生物学报,2005,29(2):230-232.  
[3] 张小兰,施国新,徐楠,等.  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  对轮藻部分生理生化指标的影响[J]. 南京师大学报,2002,25(1):38-43.  
[4] 刘慧,刘鹏举,张少斌,等. 螺旋藻藻胆蛋白研究与应用[J]. 安徽农业科学,2006,34(21):5463-5464.  
[5] 李全顺,贾庆舒. 螺旋藻的生物特性及其应用价值[J]. 沈阳教育学院学报,2006,8(2):122-125.

[6] 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.  
[7] 徐黎,路荣昭,施定基. 蓝藻叶绿素 a 提取方法的比较[J]. 植物学通报,1988,5(4):246-249.  
[8] 王业勤,李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997:146-158.  
[9] 张成武,曾昭琪,张媛贞. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的分离、纯化及理化特性[J]. 天然产物研究与开发,1996,8(2):29-34.  
[10] 李合生,孙群,赵世杰,等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.  
[11] 刘华,乔辰,王志忠,等. 鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻光合生理研究[J]. 植物学通报,2005,22(S):57-63.  
[12] 张厚森,马海乐. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的稳定性实验研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(3):74-76.  
[13] 赵东旭,曾繁杰,容寿榆,等. 嗜热蓝藻优雅黏囊藻藻胆体的特性和别藻蓝蛋白的亚基组成[J]. 植物生理学报,1994,20(3):209-214.  
[14] Turner J S, Morby A P, Whitton B A, et al. Construction of  $\text{Zn}^{2+}$ / $\text{Cd}^{2+}$  hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus [J]. J. Biol. Chem., 1993, 268(6):4494-4498.  
[15] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, et al. Metallothionein: The multipurpose protein[J]. CMLS Cell. Mol. Life Sci., 2002, 59(4):627-647.

# Effects of Arsenic Stress on Physiology and Biochemistry of Spirulina in Alkaline Lakes of the Erdos Plateau

MU Wen-jing, DU Ling

(College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Nomal University, Hohhot, Inner Mongolia 010022)

**Abstract:** In order to improve the quality of cultured *Spirulina platensis*, using *Spirulina platensis* as material, which lives in Ordos Plateau Alkali lake. And *Spirulina* was prepared by adding different concentrations of sodium arsenite ( $\text{As}^{3+}$ ) in the culture medium to study the effects of arsenic ( $\text{As}^{3+}$ ) stress on the growth of *Spirulina*. The physiological and biochemical indexes of *Spirulina platensis* were studied. The results showed that arsenic ( $\text{As}^{3+}$ ) stress caused blue shift of chlorophyll a and carotenoids and red shift of phycobiliprotein. The content of chlorophyll a and carotenoids increased with low concentration of arsenic ( $\text{As}^{3+}$ ), but they decreased with high concentration. While content of the phycocyanin and soluble protein was reduced by arsenic ( $\text{As}^{3+}$ ) stress.

**Keywords:** arsenic ( $\text{As}^{3+}$ ) stress; *Spirulina* in Alkaline Lakes of the Erdos Plateau; inhibiting effect

欢迎加盟理事会、协办单位