

张思宇, 孙国新, 贾炎. 2013. 海洋真核微藻 *Ostreococcus tauri* 对砷的解毒机制研究[J]. 环境科学学报, 33(10): 2879-2884

Zhang S Y, Sun G X, Jia Y. 2013. Arsenic detoxification mechanism in marine eukaryotic microalgae *Ostreococcus tauri* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 33(10): 2879-2884

海洋真核微藻 *Ostreococcus tauri* 对砷的解毒机制研究

张思宇^{1,2}, 孙国新^{1,*}, 贾炎^{1,2}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2013-01-18

修回日期: 2013-02-20

录用日期: 2013-02-20

摘要: 实验选取模式藻种——海洋真核微藻 *Ostreococcus tauri* 为材料, 以毒性较强的三价砷(As(III)) 为代表, 采用液态纯培养法研究海洋微藻对As(III)的解毒机制. 结果表明, As(III)的氧化是 *O. tauri* 体内主要的砷解毒机制. 暴露于含 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.67 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III)的培养基时, 该微藻分别在培养的 60 h 和 72 h 内将培养基中 90% 以上的As(III)氧化为毒性较低的五价砷(As(V)). 随着培养时间的增加, 培养 6 d 后在添加 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III)的培养基和藻体内均检测到二甲基砷(DMAs(V)), 表明该海洋微藻同时具有砷甲基化功能. 在 *O. tauri* 体内砷甲基化可作为另一种解毒机制, 满足其对较高浓度砷的解毒需要. 对 *O. tauri* 的气态砷挥发能力研究表明, 该海洋微藻具有砷挥发功能, 可通过将砷挥发出体外进行解毒. 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III)培养 4 周后, *O. tauri* 可分别产生气态砷 16.7、4.0 和 1.3 ng. *O. tauri* 通过对砷的氧化来降低细胞周围环境的砷毒性, 通过砷甲基化及挥发降低细胞体内的砷毒性.

关键词: 海洋真核微藻; 解毒; As(III)氧化; 砷甲基化; 砷挥发

文章编号: 0253-2468(2013)10-2879-06

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Arsenic detoxification mechanism in marine eukaryotic microalgae *Ostreococcus tauri*

ZHANG Siyu^{1,2}, SUN Guoxin^{1,*}, JIA Yan^{1,2}

1. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Received 18 January 2013;

received in revised form 20 February 2013;

accepted 20 February 2013

Abstract: Marine phytoplankton is able to accumulate arsenic (As), but the resistant mechanisms are unclear. Microalga *Ostreococcus tauri* (*O. tauri*), a model organism of natural marine phytoplankton assemblage, was chosen to investigate its As detoxification mechanism. *O. tauri* was cultivated in pure culture with different concentrations of arsenite (As(III)). The results showed that As(III) oxidation was the main As resistant mechanism. When the microalga was exposed to $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1.67 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III), more than 90% was oxidized to arsenate (As(V)) after incubation for 60 and 72 hours respectively. After exposed to $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) for 6 days, dimethylarsenate (DMAs(V)) was detected both in culture medium and algal cells. The study of As biovolatilization by *O. tauri* showed that this marine microalga was able to biovolatilize As into atmosphere for As detoxification. After exposed to 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) for 4 weeks, 16.7 ng, 4.0 ng and 1.3 ng volatile As was detected respectively. The results indicated that the As detoxification mechanisms of *O. tauri* were a combination of As oxidation, methylation and biovolatilization. This study expanded the understanding of As resistant mechanisms of marine phytoplankton and implied that marine organisms might play an important role in As biogeochemical cycle.

Keywords: marine eukaryotic microalgae; detoxification; arsenite oxidation; methylation; volatilization

1 引言(Introduction)

砷(As)是广泛存在于自然界的一种公认的剧毒类金属, 并对人类健康产生威胁(Smith *et al.*,

1992; Smedley *et al.*, 2002). 近年来, 随着科技和生产的发展, 含砷农药及添加剂广泛使用, 使大量的砷随着河流或降水入海, 增加了砷在环境水体的浓度和分布范围, 对浮游生物也产生毒性作用.

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21077100)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21077100)

作者简介: 张思宇(1989—), 女, 博士生, E-mail: syzhang_st@rcees.ac.cn; * 通讯作者(责任作者), E-mail: gxsun@rcees.ac.cn

Biography: ZHANG Siyu (1989—), female, Ph. D. candidate, E-mail: syzhang_st@rcees.ac.cn; * Corresponding author, E-mail: gxsun@rcees.ac.cn

环境中的无机砷主要以亚砷酸盐(As(III))和砷酸盐(As(V))形式存在. 对于生物来说, 砷是非生命所需元素, 为适应环境中的砷, 生物在长期的进化过程中发展出一系列的砷解毒机制, 以降低砷对其自身的毒害. 在原核生物中, As(III)可以通过水通道蛋白家族的甘油转运蛋白 GlpF 转运至体内 (Sanders *et al.*, 1997), As(V)可以通过无机磷酸盐转运系统(Phosphate inorganic transport, Pit)和磷酸盐特殊转运系统(Phosphate specific transport, Pst)吸收进入细胞 (Rosenberg *et al.*, 1977); 在真核生物如酵母中, As(III)的吸收主要由 GlpF 的同源物转运蛋白 Fps1 介导 (Wysocki *et al.*, 2001), As(V)的吸收主要通过 Pit 系统的磷转运子 (Yompakdee *et al.*, 1996). 由于As(III)对细胞具有毒性, 且其毒性比As(V)强约100倍, 生物可通过将其泵出细胞外来进行解毒. 在真核生物中, As(III)还可与GSH结合生成As(GS)₃化合物, 并被储存在液泡中以达到解毒目的 (Rosen *et al.*, 2002). 此外, As(III)的氧化也被作为微生物对砷的解毒机制之一 (蔡林等, 2009). 研究发现, As(III)氧化菌目前可分为化能无机自养型和化能有机异养型, 其中, 化能无机自养型As(III)氧化菌能够以CO₂为主要碳源, As(III)作为电子供体进行生长, 通过将As(III)氧化成As(V)同时起到解毒作用; 化能有机异养型As(III)氧化菌仅仅利用As(III)的氧化作为解毒机制, 降低细胞周围的砷毒性 (Oremland *et al.*, 2005). 细胞内的As(III)还可在砷甲基转移酶的作用下, 通过甲基化产生单甲基胂酸和二甲基胂酸, 二甲基胂酸可经过还原后进一步甲基化产生挥发性的三甲基胂 TMAs. 据报道, 真菌、细菌和某些藻类等都可经甲基化过程产生气态的砷化合物 (Bhattacharjee *et al.*, 2007), 通过气态砷挥发也是生物对无机三价砷解毒的一个重要途径 (Bently *et al.*, 2002). 在海洋生物体内二甲基胂酸可以进一步代谢形成砷胆碱、砷甜菜碱和砷糖等化合物 (Francesconi *et al.*, 1998a), 将毒性较高的无机砷转化为毒性低的有机砷. 这些途径也被认为是生物对无机砷解毒的重要途径.

在水生系统及水生食物链中, 藻类作为其他浮游动物的食物及氧气来源, 起着重要的作用. 它个体小, 种类繁多, 生长繁殖迅速. 由于其长期生活在水中, 能较好地反映有害物质的综合效应, 藻类现在正作为一种水体毒性的重要监测生物活跃于科

研领域. 本实验所选用的 *Ostreococcus tauri* 是一株海洋真核微藻, 于1994年在滨海泻湖中发现, 并于2006年完成全基因组测序, 其分布广泛, 在英吉利海峡、地中海、北大西洋、印度洋、太平洋等均有发现 (Courties *et al.*, 1994; Derelle *et al.*, 2006). 该藻是单细胞球状绿藻, 是目前已知最小的可以自由生活的真核生物, 并被作为模式生物广泛地应用于各项研究. 但目前关于该藻对砷的代谢研究未见报道. 因此, 本实验以 *O. tauri* 为材料, 以As(III)为代表, 研究该海洋微藻对As(III)的吸收和转化过程, 有助于理解海藻对砷的解毒机制.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 藻种和培养条件

海洋真核微藻 *Ostreococcus tauri* 购于法国 Roscoff Culture Collection (RCC). 藻种采用 Keller medium 人工海水 (ASW) 培养基 (Keller *et al.*, 1987) 置于光照培养箱中培养, pH = 8.1, 人工海水成分和培养基 KASW 成分详见表1和2. 控制培养条件为: 光暗周期比16h:8h, 光照强度280

表1 人工海水成分

Table 1 Artificial Seawater (ASW)

成分	含量/(g·L ⁻¹)
NaCl	24.55
KCl	0.75
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4.07
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.04
NaHCO ₃	0.21

表2 Keller medium 培养基成分

Table 2 Keller medium stock solution

成分	最终浓度/(mol·L ⁻¹)
NaNO ₃	8.82 × 10 ⁻⁴
NH ₄ Cl	5.01 × 10 ⁻⁵
Na ₂ beta-Glycerophosphate·6H ₂ O	1.00 × 10 ⁻⁵
H ₂ SeO ₃	1.00 × 10 ⁻⁸
Tris-HCl (pH = 7.2)	1.00 × 10 ⁻³
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.12 × 10 ⁻⁴
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.17 × 10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.60 × 10 ⁻⁸
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7.65 × 10 ⁻⁸
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4.20 × 10 ⁻⁸
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9.10 × 10 ⁻⁷
CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.92 × 10 ⁻⁸
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	3.69 × 10 ⁻¹⁰
Biotin	2.05 × 10 ⁻⁹
Thiamine. HCl	2.69 × 10 ⁻⁷

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 昼夜温度 22/20 °C, 湿度 60%。培养器皿为 250 mL 玻璃三角瓶, 培养期间每天定时振荡 2 次。待藻生长至对数生长期, 按 1:10 比例接种到不同条件下的培养基中培养。

实验中所用器皿均用 1:5 的 HNO_3 浸泡 24 h 后, 再用去离子水洗净备用。As(III) (Na_3AsO_3) 和 As(V) ($\text{Na}_3\text{AsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 购自美国 Alfa Aesar 公司, 其他试剂为分析纯。实验用水均为双蒸水。

2.2 海洋微藻细胞和无细胞上清液对 As(III) 氧化

取对数生长期旺盛的 *O. tauri* 培养 2 周后, 在无菌条件下分别收集藻体和藻体分泌物。藻体在 6000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min 后收集, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 藻细胞转移至新的无菌培养基。分别向海藻培养基和上清培养基添加 As(III) 至终浓度为 1.67 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 0、10、20、40、60、90 h 时收集培养基溶液, 对培养基中砷形态进行测定。

2.3 海洋微藻对 As(III) 的甲基化

取对数生长期旺盛的 *O. tauri* 按 1:10 比例接种于含 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 的 KASW 培养基中, 同时设计相同培养条件下不接藻种的培养基作为实验对照, 所有样品重复 3 个。分别在培养 3、6、8、10、12、14 和 16 d 时收集培养基溶液, 对培养基的砷形态进行测定。培养 16 d 后收集藻体, 对藻体内砷形态也进行分析检测。

2.4 海洋微藻对气态砷的挥发

根据 Huang 等(2012)描述的方法, 设置气态砷的捕获装置来捕获 *O. tauri* 产生的气态砷。捕获装置包括 3 mL 的玻璃吸管、带有进出口的玻璃接头和 250 mL 的玻璃三角瓶。操作步骤如下: 首先将直径为 0.5~1.0 mm 的硅胶颗粒浸泡在 10% 的 AgNO_3 溶液 ($M/V, \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 中, 静置过夜; 然后放置烘箱 70 °C 烘干, 将干燥的硅胶颗粒装入吸管中, 吸管两端用玻璃棉塞好, 再将吸管连入玻璃接头的出气端; 最后将接头的进气端与静音气泵 (ACO-9601) 连接。

向 KASW 培养基中添加 As(III), 制成分别含 20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 As(III) 液体培养基。取对数生长期旺盛的 *O. tauri* 按 1:10 比例接种于上述培养基, 培养 4 周后, 卸下吸管, 用 5 mL 1% 的 HNO_3 在微波消解仪 (CEM 微波科技公司, 美国) 中按以下程序萃取: 55 °C 保持 10 min, 75 °C 保持 10 min, 95 °C 保持 30 min, 取出后冷却并定容, 充分混合后, 上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 用 ICP-MS 测定过滤液中的砷总量。

2.5 含砷样品的制备

2.5.1 培养基样品制备 定时在超净工作台中取培养基样品, 置于尖底聚四氟乙烯塑料离心管中, 离心后取上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 将滤液稀释至适当浓度, 置于 -20 °C 冰箱避光保存待测。

2.5.2 藻体待测样品制备 选取尖底聚四氟乙烯塑料离心管若干, 编号后称重并记录。将含藻细胞的培养基于离心机中 6000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后收集藻体, 用 30 mL 蒸馏水和缓冲液 (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES 和 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Abedin *et al.*, 2002) 各洗 1 次后再用蒸馏水洗涤 1 次, 以去除藻体表面附着的砷。将收集的藻体置于烘箱中 70 °C 烘至恒重 (20 h), 冷却后称重。向尖底聚四氟乙烯塑料离心管中加入 5 mL 1% 优级纯硝酸, 充分混匀后, 放置过夜。过夜后的样品在微波消解仪萃取, 取出后冷却, 将各样品萃取液 5 mL 定容, 充分混合后, 上清液过 0.45 μm 的微孔滤膜, 置于 -20 °C 冰箱保存待测。

2.6 砷形态测定方法

提取液中的砷形态采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术 (HPLC-ICP-MS) (7500a, 美国安捷伦公司) 进行测定 (Williams *et al.*, 2006)。分析用色谱柱购于美国 Hamilton 公司, 由保护柱 (11.2 mm, 12~20 mm) 和 PRP-X100 阴离子交换柱 (250 mm \times 4.1 mm, 10 mm) 组成。流动相为 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 和 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸铵 (NH_4NO_3), 用硝酸调节 pH 至 6.2, 流动相配好后通过 0.45 μm 的滤膜。进样体积为 100 μL , 流动相速度为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在整个分析测定过程中, 三价砷和五价砷之间未发生形态转变。

2.7 数据统计和分析

实验数据采用 OriginPro 8.0 进行数据与统计分析。

3 结果 (Results)

3.1 海洋微藻细胞和无细胞上清液对 As(III) 氧化结果

由图 1a 可知, 在 1.67 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 处理条件下, 含 *O. tauri* 的培养基中 As(III) 被氧化为 As(V); 在第 40、60、90 h 时, 培养基中 As(V) 分别占总砷含量的 37.9%、92.9%、92.2%; 随着砷暴露时间增加, 培养基中 As(V) 占总砷百分含量呈上升趋势。而在无细胞上清液的培养基中未发现 As(III)

氧化现象,As(V) 占总砷含量的 10% 左右,并在整个实验过程中保持稳定(图 1b). 表明As(III) 的氧化是由于海洋微藻细胞的作用. 由于培养基中砷浓度较低,培养时间较短,实验过程中,在培养基中未检测到有机砷.

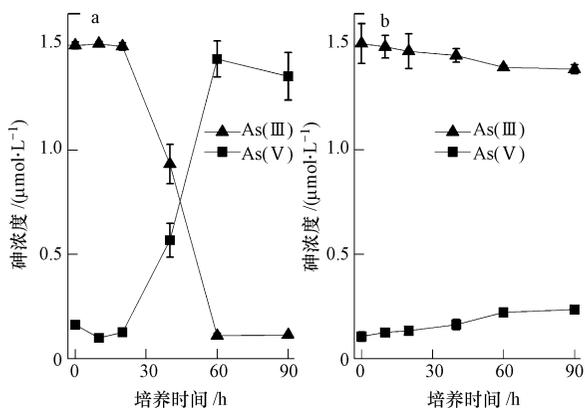


图 1 1.67 μmol·L⁻¹ As(III) 处理条件下 *O. tauri* 培养基 (a) 和无细胞上清液培养基 (b) 中砷形态的转化情况
Fig. 1 Arsenic biotransformation in the medium by *O. tauri* (a) and the supernatant (b) after exposed to 1.67 μmol·L⁻¹ arsenite

3.2 海洋微藻对As(III) 的甲基化结果

当 *O. tauri* 暴露于 30 μmol·L⁻¹ As(III), 培养结束(16 d)后,在微藻体内检测到 DMAs(V) 含量约占藻体内砷总量的 3%. 检测结果显示, *O. tauri* 体内以 As(V) 为主要的无机形态砷, 占藻体内总砷含量的 95% 以上, As(III) 为含量较低的无机砷(图 2).

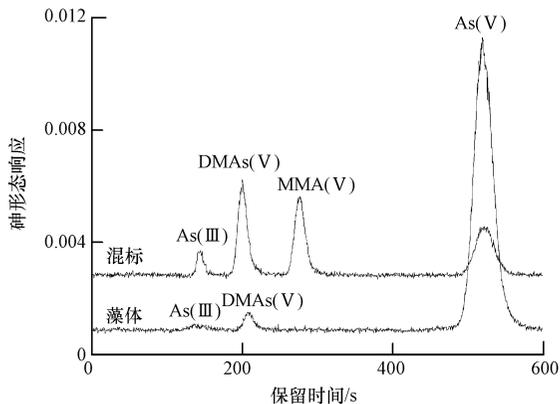


图 2 30 μmol·L⁻¹ As(III) 处理条件下 *O. tauri* 体内砷形态色谱图
Fig. 2 Chromatogram of As species in algal cells after exposed to 30 μmol·L⁻¹ arsenite

与对照(不含藻细胞的培养基)相比,30 μmol·L⁻¹

As(III) 培养 6 d 后,在含 *O. tauri* 的培养基中检测到 DMAs(V), 并且培养基中 DMAs(V) 的浓度随着培养时间增加呈现上升趋势(图 3a). 在培养的第 16 d, 培养基中 DMAs(V) 浓度达到最高值 0.93 μmol·L⁻¹, 占培养基中总砷含量的 3.3%. 培养 3 d 后,含 *O. tauri* 的培养基中 96% 以上的砷形态为 As(V), 并在整个培养过程中保持稳定. 而在不含藻细胞的对照组中,整个培养过程中 As(III) 始终为培养基中主要砷形态,且保持稳定, 占总砷含量的 98% 以上(图 3b).

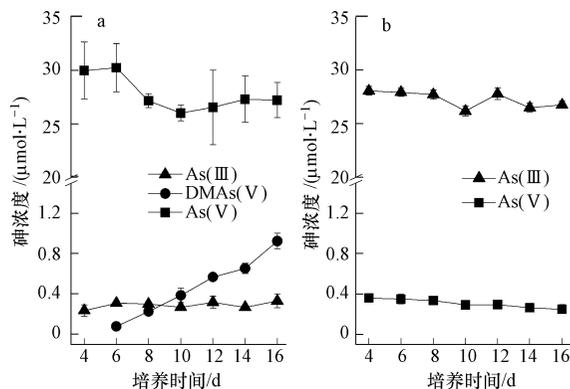


图 3 30 μmol·L⁻¹ As(III) 处理条件下含 *O. tauri* (a) 和无 *O. tauri* (b) 培养基中砷形态的转化情况
Fig. 3 Arsenic biotransformation in the medium with *O. tauri* (a) and without *O. tauri* (b) after exposed to 30 μmol·L⁻¹ arsenite

3.3 海洋微藻对砷的挥发结果

O. tauri 在含 20,40,80 μmol·L⁻¹ 的 As(III) 液体培养基中培养 4 周后,均检测到挥发的气态砷,表明 *O. tauri* 有产生气态砷能力(图 4). 在 20

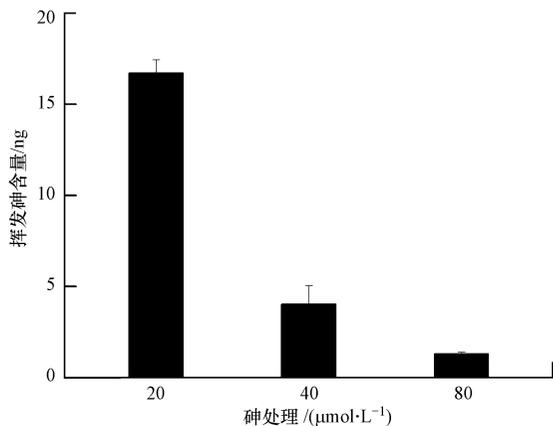


图 4 不同浓度 As(III) 处理条件下培养 4 周后含 *O. tauri* 液体培养基中挥发砷含量
Fig. 4 The content of biovolatilized As by *O. tauri* after exposed to different arsenite concentration for 4 weeks

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 暴露条件下,气态砷的挥发量(为去除砷背景值后的结果)最大,可达 16.7 ng. 随 As(III) 浓度的增加,捕获到的气态砷的总量呈下降趋势,40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 As(III) 培养 4 周后,气态砷的挥发量分别为 4.0 ng 和 1.3 ng. 本文分别对不同浓度 As(III) 处理条件下, *O. tauri* 的砷挥发量占培养基中砷总量的比例进行分析. 结果表明(表 3), As(III) 处理条件下,随浓度的增加, *O. tauri* 对砷挥发比例呈下降趋势. 20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 处理条件下,气态砷挥发比例分别为 0.113%、0.015%、0.003%.

表 3 不同浓度 As(III) 处理条件下含 *O. tauri* 液体培养基中挥发砷比例

Table 3 Percentages of volatile As in the total As added to the medium with different arsenite concentration

砷浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	气态砷挥发比例
20	0.113%
40	0.015%
80	0.003%

4 讨论 (Discussion)

近年来,有关海洋生物体内高砷含量的报道引起了广泛的关注. 已有研究表明,虽然海洋环境中砷含量很低,约为 $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). 但由于 As(V) 与磷酸盐具有化学结构相似性,且磷酸盐含量 ($2 \sim 3.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 也很低 (Takahashi *et al.*, 1990), 作为海水中主要砷形态的 As(V) 可通过与磷酸盐的竞争性吸收大量积累至海洋生物体内 (Edmonds *et al.*, 1987), 海洋生物体内的砷浓度可超出海水砷含量的上千倍 (Šlejkovec *et al.*, 2006). 因此,海洋生物如何耐受高浓度的砷也成为了研究的热点. 本实验选取模式藻种 *O. tauri*, 以毒性较强的 As(III) 为表, 研究其对砷的解毒机制, 对于理解海洋生物如何耐受体内高浓度的砷具有重要意义. 由于环境中的砷对 *O. tauri* 有毒性, 且该藻属于光能自养型生物, 无法利用 As(III) 作为电子供体进行生长, 为适应含砷的环境, *O. tauri* 进化出一系列砷解毒的机制, 以降低环境中砷毒性对其的伤害.

当暴露于含 As(III) 的溶液中培养时, *O. tauri* 可通过迅速地将 As(III) 氧化为毒性较低的 As(V) 来进行解毒. $1.67 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 处理时, *O. tauri* 可在培养的第 60 h 内将培养基中 92.9% 的 As(III) 氧化为 As(V); $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 处理时,

O. tauri 可在 72 h 内将培养基中 96% 以上的 As(III) 氧化为 As(V). 而在经过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜处理, 含藻细胞分泌物的上清液中, 或在无藻细胞和空白对照中, As(III) 一直为培养基中主要的砷形态, 未发现 As(III) 氧化现象. 本实验结果表明, *O. tauri* 具有 As(III) 氧化能力, 可以通过迅速的 As(III) 氧化来降低环境中的砷毒性. Yin 等 (2011a) 的研究表明, 集胞藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 也具有 As(III) 氧化能力, 在含 $2.67 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 的培养基中培养 72 h 后, 集胞藻可将 83% 的 As(III) 氧化为 As(V). 据报道, 在藻类大量分布的海水中, 无机砷主要以氧化态 As(V) 的形式存在 (Francesconi *et al.*, 2005b), 推测其可能与海洋藻类的氧化作用有关.

随着溶液中 As(III) 浓度及培养时间的增加, 在培养基和藻体中均检测到甲基砷 DMAs(V), 表明 *O. tauri* 对 As(III) 具有甲基化功能. 如其他研究报道的蓝藻 (Yin *et al.*, 2011b), 藻体内可能存在砷甲基转移酶, 砷的甲基化是在砷甲基转移酶的催化作用下的产物, 该过程被认为是无机砷在生物体内解毒的另一个重要途径. 在 *O. tauri* 体内砷甲基化可作为另一种砷解毒机制, 满足其在高浓度砷条件下的解毒需要. *O. tauri* 对高浓度 As(III) 的解毒过程为: 首先将培养基中高浓度的 As(III) 迅速氧化为毒性较低的 As(V), 以降低细胞周围环境中的砷毒性; 其次, 随着砷在细胞体内的积累, *O. tauri* 将体内过量的无机砷转化为毒性更小的甲基砷 DMAs(V) 来实现对砷的解毒, 同时体内的 As(III)、As(V) 和 DMAs(V) 还可通过排出体外来降低细胞内砷浓度. 据报道, 其他光能自养生物也可通过排出体内的砷达到解毒目的, 如集胞藻 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 在 As(III) 溶液中培养 24 h 后, 可将体内的 As(III) 和 As(V) 排出体外 (Yin *et al.*, 2011a).

此外, 本研究表明, *O. tauri* 还可通过将培养基中的 As(III) 以气态砷的形式挥发出体外进行解毒. 添加不同浓度的 As(III) 培养 4 周, 检测到 *O. tauri* 能够产生挥发性砷化物, 表明 *O. tauri* 具有砷挥发能力. *O. tauri* 挥发砷产量与起始的砷处理浓度有关, 在实验采样的浓度范围内 ($20, 40, 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 随着砷浓度的增加, *O. tauri* 的砷挥发量降低. Karadjova 等 (2008) 研究表明, 海洋微藻 *Chlorella salina* 对 As(III) 的毒性较敏感, 在含磷丰富的海水中, As(III) 的半效抑制浓度为 $(13 \pm 4) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

鉴于 *O. tauri* 也属于球状绿藻,推测当培养基中 As(Ⅲ)浓度超过 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着 As(Ⅲ)浓度的增加,砷对 *O. tauri* 的毒性增加,可能抑制了该海洋微藻的生长,导致气态砷挥发能力下降.对 *O. tauri* 的砷挥发能力进一步分析表明, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(Ⅲ)处理条件下,其对砷的挥发比例最大,培养基中 0.113% 的砷能够以气态砷的形式从培养基中挥发. Yin 等(2011b)研究发现,蓝藻在较高浓度的砷暴露条件下($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),体内的甲基化反应才会被激活,产生的气态砷化合物才能被检测到.与蓝藻相比,在较低浓度砷处理条件下,*O. tauri* 的气态砷挥发能力较蓝藻更强.

5 结论(Conclusions)

通过研究模式藻种-海洋真核微藻 *O. tauri* 对毒性较强的 As(Ⅲ)解毒机制,发现 *O. tauri* 拥有多种解毒机制,不仅通过对砷氧化来降低细胞周围环境的砷毒性,还可通过砷甲基化及挥发降低细胞体内的砷毒性.该微藻体内主要的砷解毒机制为 As(Ⅲ)氧化,通过将 As(Ⅲ)氧化为毒性较低的 As(V)来进行解毒;当环境中砷浓度较高,培养时间增加时,该藻还可将无机砷甲基化产生毒性较低的甲基砷($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(Ⅲ)培养 6 d),或产生气态砷通过将其挥发出来进行解毒(20 、 40 、 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(Ⅲ)培养 4 周).

责任作者简介:孙国新(1972—),男,博士,研究方向为环境生物地球化学. E-mail: gxsun@rcees.ac.cn.

参考文献(References):

Abedin M J, Feldmann J, Meharg A A. 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants [J]. *Plant Physiology*, 128(3):1120-1128

Bentley R, Chasteen T G. 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2):250-271

Bhattacharjee H, Rosen B P. 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes [J]. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, 6:371-406

蔡林,王草娇. 2009. 抗砷性微生物及其抗砷分子机制研究进展 [J]. *微生物学通报*, 36(8):1253-1259

Courties C, Vaquer A, Troussellier M, et al. 1994. Smallest eukaryotic organism [J]. *Nature*, 370:255

Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, et al. 2006. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(31):11647-11652

Edmonds J S, Francesconi K A. 1987. Transformations of arsenic in the marine environment [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 43(5):553-557

Francesconi K A, Edmonds J S. 1998. Arsenic species in marine samples [J]. *Croatia Chemica Acta*, 71(2):343-359

Francesconi K A. 2005. Current perspectives in arsenic environmental and biological research [J]. *Environment Chemistry*, 2(3):141-145

Huang H, Jia Y, Sun G X, et al. 2012. Arsenic speciation and volatilization from flooded paddy soils amended with different organic matters [J]. *Environmental Science and Technology*, 46(4):2163-2168

Karadjova I B, Slaveykova V I, Tsalev D L. 2008. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater [J]. *Aquat Toxicol*, 87(4):264-271

Keller M D, Selvin R C, Claus W, et al. 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton 1,2 [J]. *Journal of Phycology*, 23(4):633-638

Mukhopadhyay R, Rosen B P, Phung L T, et al. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes [J]. *FEMS Microbiology Review*, 26(3):311-325

Oremland R S, Stolz J F. 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers [J]. *Trends in Microbiology*, 13(2):45-49

Rosen B P. 2002. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 133(3):689-693

Rosenberg H, Gerdes R G, Chegwidden K. 1977. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 131(2):505-511

Sanders O I, Rensing C, Kuroda M, et al. 1997. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 179(10):3365-3367

Šlejkovec Zdenka, Emese K Zpolna, Ildi Ipolyi, et al. 2006. Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the adriatic sea [J]. *Chemosphere*, 63:1098-1105

Smedley P L, Kinniburgh D G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters [J]. *Applied Geochemistry*, 17(5):517-568

Smith A H, Hopenhayn-Rich C, Bates M N, et al. 1992. Cancer risks from arsenic in drinking water [J]. *Environmental Health Perspectives*, 97:259-267

Takahashi A, Kawakami H, Bada A, et al. 1990. Effects of phosphate on arsenate inhibition in a marine cyanobacterium, *Phormidium* sp [J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 4(3):269-279

Williams P N, Islam M R, Adomako E E, et al. 2006. Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters [J]. *Environmental Science and Technology*, 40(16):4903-4908

Wysocki R, Chery C C, Wawrzycka D, et al. 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular Microbiology*, 40(6):1391-1401

Yin X X, Wang L H, Bai R, et al. 2011a. Accumulation and transformation of arsenic in the blue-green alga *Synechococcus* sp. PCC6803 [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(3):1183-1190

Yin X X, Chen J, Qin J, et al. 2011b. Biotransformation and volatilization of arsenic by three photosynthetic cyanobacteria [J]. *Plant Physiology*, 156(3):1631-1638

Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, et al. 1996. A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Gene*, 171(1):41-47