

铜绿微囊藻在不同供磷水平下对砷胁迫的响应

龚艳^{1,2} 吴幸强^{1,3} 肖邦定^{1,3} 方涛¹ 刘剑彤¹ 宋立荣¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 湖北省农业科学院农业测试与
科技信息中心, 武汉 430064; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:采用磷饥饿培养后的微囊藻细胞进行不同供磷水平的五价砷(As(V))暴露实验,考察单一胞外磷变化的情况下 As(V)对滇池分离出的铜绿微囊藻 FACHB905 生长及产毒的影响。结果表明胞外磷浓度变化不会影响铜绿微囊藻对 As(V)的耐受阈值(10^{-7} mol/L)。少磷条件下的半数抑制浓度(IC_{50})为 $10^{-2.79}$ mol/L,比无磷条件下的 IC_{50} ($10^{-5.81}$ mol/L)高 3 个数量级,并且少磷条件下 As(V)与细胞活性位点的结合常数要远低于无磷条件,因此胞外磷在 As(V)对微囊藻的毒性效应上具有关键的作用。As(V)对微囊藻单细胞的叶绿素含量没有显著影响,但是对毒素产量具有剂量效应。在少磷条件下,As(V)浓度大于 10^{-7} mol/L 可促进微囊藻 FACHB905 的胞内产毒量;而在无磷条件下,所有 As(V)处理组的胞内产毒量均上升 78%左右。由上可知,微囊藻在产毒方面与 As(V)具有协同效应,这对于全面了解滇池水华暴发期间毒素的变化规律具有一定的参考价值。

关键词:铜绿微囊藻;微囊藻毒素;五价砷;磷;协同效应

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0890-06

砷(As)是一种广泛分布的元素,在地壳中的相对丰度是 1.8 ppm^[1]。随着科技和生产的发展,人类活动将大量的砷引入到环境中,增大了砷在环境水体中的浓度和分布范围。目前砷在天然水体中的浓度介于 0.5 到 5000 μ g/L 间(约 6.7×10^{-9} — 6.7×10^{-5} mol/L)^[2]。从热力学平衡可知砷在天然水体中的存在形式主要为 As(V),并且其垂直分布呈营养盐型分布,这表明砷在天然水体中的循环过程与浮游生物有关^[2,3]。由于砷和磷同处元素周期表的第 V 主族,因此 AsO_4^{3-} 可以通过磷转运通道进入浮游植物细胞,其致毒机理是两者通过竞争与细胞活性酶结合^[4]。目前的研究表明,As(V)对于天然水体中的群落结构具有显著效应^[5],同时 As(V)对浮游植物的毒性大小可由磷酸盐的浓度调节^[6]。Hellweger, et al. 通过数学建模成功模拟出磷限制和磷充裕的条件下,As(V)在部分浮游植物体内的不同转化过程^[7]。然而,某些硅藻(Thalassiosira spp.、Chaetoceras spp. 和 Skeletonema costatum)在摄取和排泄的过程中,可以对砷和磷进行有效的辨别^[8]。并且培养液中磷浓度的变化(0.6—3 mg/L)

对于海洋微藻 Dunaliella tertiolecta 和 Phaeodactylum tricornutum 的生长速率及砷的富集量没有显著的影响^[9]。

水体富营养化日益严重,有害藻水华频繁暴发是一个全球性的生态环境问题,滇池就是其中典型代表之一。微囊藻水华所产生的微囊藻毒素是一种强烈的肝毒素和促肿瘤剂^[10],有关微囊藻毒素的研究还是目前国内外学者广泛关注的研究热点之一。2006 年 973 技术报告中指出:滇池全湖可溶态的微量元素中,砷的含量最高。为此本课题组开展一些室内理论性研究,以期考察两者间的关系。由于微囊藻细胞可过量吸收磷在胞内形成多聚磷酸体^[11],并且胞内、外的磷含量均直接影响浮游植物对砷的敏感度^[12,13],因此本文采用磷饥饿培养后的微囊藻细胞进行不同供磷水平的 As(V)暴露实验,考察单一胞外磷变化的情况下砷对微囊藻生长及产毒的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料 滇池表层水体分离出的铜绿微囊藻(Microcystis aeruginosa) FACHB905 来自中国科学

收稿日期: 2008-01-11; 修订日期: 2008-10-29

基金项目: 国家 973 项目(2002CB412300)资助

作者简介: 龚艳(1980—),女,汉族,湖北崇阳人;博士研究生;主要从事有毒藻生物学研究。E-mail: gongyan1026@hotmail.com

通讯作者: 刘剑彤, E-mail: jtlou@ihb.ac.cn

院水生生物研究所淡水藻类库。 $As(V)$ ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$)购自美国 Alfa Aesar公司,其他试剂为分析纯市售品。实验用水均为双蒸水。

1.2 试验设计 两种供磷水平:无磷的 BG-11 和少磷 (正磷酸盐含量为 $1 \mu mol/L$) 的 BG-11 培养液。 Na_2HAsO_4 配制成 $1 mg/mL$ 的无菌储液,以不同的比例分别加入到上述两种培养液中达到所需的暴露浓度,分别为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 $10^{-4} mol/L$,此浓度梯度根据 Smedley 和 Kinniburgh 报道的自然水体中砷浓度范围设定^[2]。将 FACHB905 藻细胞饥饿培养 14d 以耗尽胞内储存的多聚磷酸^[14],然后用无菌水洗去胞外培养液,接种到 200 mL 上述含砷的培养液中,置于摇床光照培养。温度 (27 ± 1) $^{\circ}C$,光强 (2000 ± 200) lx,明暗比为 16:8,摇床转速为 150 r/min。相同培养条件下,无砷的藻液为试验对照。所有样品平行 3 个,当微囊藻细胞生长进入平稳期后终止试验。试验所用玻璃器皿均在 5% 的稀硝酸中浸泡 48 h 以消除背景磷和砷的影响。

1.3 测定方法 藻细胞数测定:采用血球计数板目视计数法。自接种之日起隔天定时取样并计数。

叶绿素 a 含量测定:在试验结束当天进行叶绿素 a 含量的测定,方法采用比色法测定^[15],其含量表示方法是单个细胞的叶绿素 a 含量。

微囊藻毒素含量测定:在试验结束当天取 50 mL 藻液进行胞内毒素测定。胞内毒素的提取方法参照 Ramanan, et al. 方法^[16]。藻毒素浓度分析采用 HPLC 法测定,分析条件参照文献^[17]。毒素标准品购自 sigma 公司。胞内毒素含量以单个细胞的毒素含量表示。

2 结 果

2.1 砷 (V) 对铜绿微囊藻 FACHB905 生长的影响

铜绿微囊藻 FACHB905 在不同 $As(V)$ 浓度的培养液中藻细胞密度随时间的变化趋势基本相同 (图 1)。在少磷条件下,藻细胞在第 10 天进入平稳期;无磷条件下,仅有少量增长即进入平稳期。两种供磷水平下,砷处理组均出现迟缓期,并且当 $[As(V)] \geq 10^{-6} mol/L$ 时, FACHB905 藻株生长受到明显的抑制,并随着 $As(V)$ 浓度增大,其生长受抑制的程度也加强 ($P < 0.05$)。当 $As(V)$ 浓度为 $10^{-4} mol/L$ 时,无磷培养的铜绿微囊藻 FACHB905 细胞密度下降,到第 6 天后出现恢复生长的现象。

根据半对数生长曲线,线形回归的斜率可得出

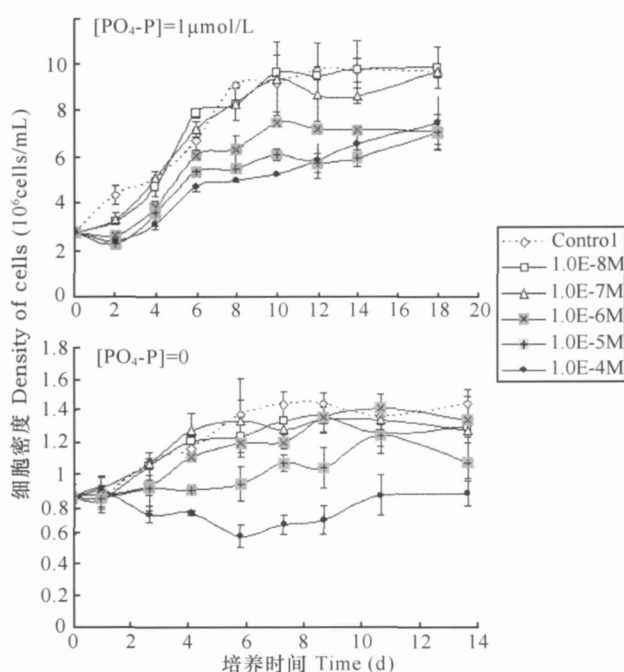


图 1 两种供磷水平下铜绿微囊藻 FACHB905 在不同砷 (V) 浓度培养液中的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *M. aeruginosa* FACHB905 exposed to different concentrations of arsenate under two phosphate regimes

铜绿微囊藻 FACHB905 在不同砷浓度下的前 6 天平均比生长率 μ (d), 由此计算出比生长率受抑制作用对应的 $As(V)$ 浓度值即阈值和比生长率受抑制的半数效应值 (Inhibitant concentration 50, $IC_{50, 6d}$)^[18]。该藻株在两种磷培养条件下, 生长受抑制的阈值均接近 $10^{-7} mol/L$, 但是两种条件下的 IC_{50} 值显著不同 (表 1)。少磷条件下的 IC_{50} 值比无磷条件下的高 3 个数量级。

磷饥饿培养后的铜绿微囊藻 FACHB905 处在少磷和无磷条件下, 胞内无过多的磷, 此时 $As(V)$ 通过磷转运系统进入胞内后, 取代磷与活性酶结合, 使细胞难以有效地进行正常的生化作用^[19], 因此从生长曲线中显现出 $As(V)$ 对微囊藻的抑制作用。Garis 通过数学建模讨论了重金属对浮游植物生长率的抑制作用^[20], 其活性点抑制模式的最终关系式如下:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K}{\mu_{max}} [As(V)]$$

式中 μ 、 μ_{max} 分别为培养液中砷浓度为 $[As(V)]$ 时藻的比生长率及最大比生长率; K 为 $As(V)$ 与藻体的结合常数。以 $1/\mu$ 对 $[As(V)]$ 做图并进行线形回归 (图 2), 可得出不同供磷水平下, $As(V)$ 与微囊藻的结合常数。由表 1 可知, 少磷情况下 $As(V)$ 与藻的结合常数要远远低于无磷条件。

表 1 两种供磷水平下铜绿微囊藻 FACHB 905 的阈值、 IC_{50} 及与砷 (V) 的结合常数

Tab. 1 The threshold and IC_{50} values of *M. aeruginosa* FACHB 905 exposed to arsenate, and the apparent association constants of arsenate to the cyanobacterium under two phosphate regimes

正磷酸盐浓度 Orthophosphate	阈值 Threshold values(mol/L)	$IC_{50, 6d}$ IC_{50} values(mol/L)	活性点抑制模式回归方程 Regression equations of the toxic binding model	
			μ_{max} (/d)	K
1 $\mu\text{mol/L}$	$10^{-6.85}$	$10^{-2.79}$	0.062	5628
0	$10^{-6.66}$	$10^{-5.81}$	0.037	369030

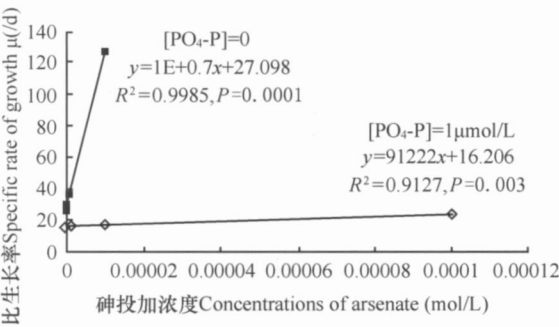


图 2 两种供磷水平下铜绿微囊藻 FACHB905 的比生长率与砷 (V) 处理浓度的关系图

Fig. 2 The relationship between growth rates of *M. aeruginosa* FACHB905 and exposed concentrations of arsenate under two phosphate regimes

2.2 砷 (V) 对铜绿微囊藻 FACHB905 叶绿素 a 含量的影响

在平稳期测得各组中铜绿微囊藻细胞的叶绿素 a 含量 (图 3)。由图可知,单细胞的叶绿素 a 含量不受 As(V) 的影响 ($P > 0.05$)。在少磷条件下,所有样品叶绿素 a 含量为 (44.8 ± 4.7) fg/cell,而无磷条件下为 (34.8 ± 5.5) fg/cell。两种供磷水平下单细胞叶绿素 a 的含量不同,表明磷会影响微囊藻叶绿素 a 含量^[21]。

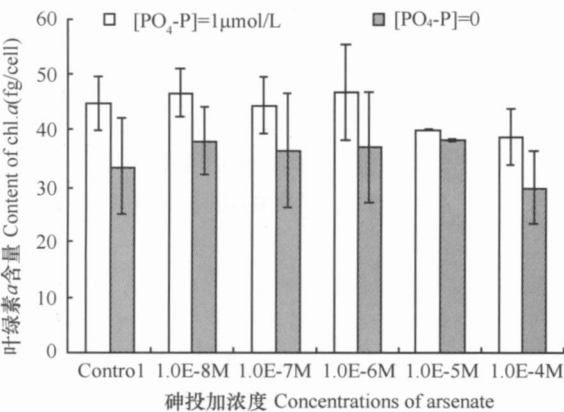


图 3 两种供磷水平下,铜绿微囊藻 FACHB905 在不同砷 (V) 浓度培养液中的叶绿素 a 含量

Fig. 3 Chlorophyll a content of *M. aeruginosa* FACHB905 exposed to different concentrations of arsenate under two phosphate regimes

2.3 砷 (V) 对铜绿微囊藻 FACHB905 胞内微囊藻毒素含量的影响

铜绿微囊藻 FACHB905 在两种供磷水平下,进行 As(V) 暴露培养至平稳期的胞内毒素含量 (用单细胞的毒素产量表示) 如图 4 所示。铜绿微囊藻 FACHB905 主要产微囊藻毒素 (MC) LR 及小部分未知的 MC 毒素。图 4 中给出的胞内毒素含量值为这两种毒素的总和。在少磷条件下,As(V) 浓度为 $10^{-6} - 10^{-4}$ mol/L 可以促进微囊藻 FACHB 905 产毒;而在无磷条件下,所有的砷处理组均出现毒素含量显著升高的现象。微囊藻细胞在对数生长期,胞内毒素产量随着细胞分裂而增加,到平稳期后产毒量保持不变或者略有下降^[22],从而推测平稳期的

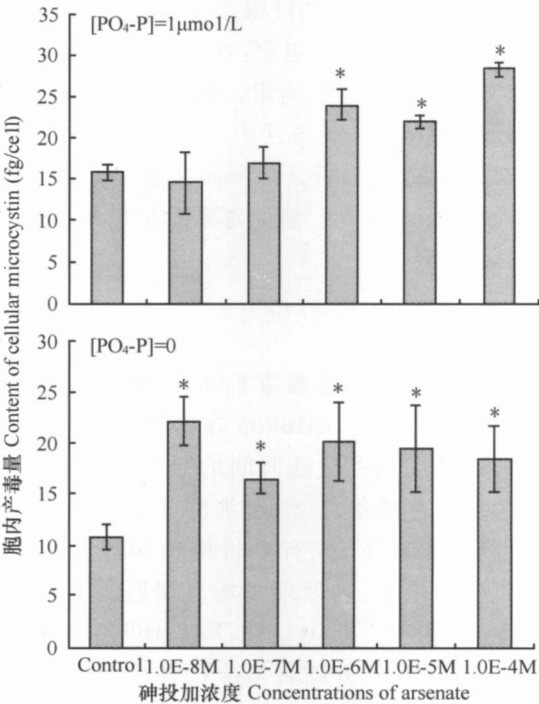


图 4 两种供磷水平下,铜绿微囊藻 FACHB905 在不同砷 (V) 浓度培养液中的胞内产毒量与对照比具有显著差异水平 (* 为 $P < 0.05$)

Fig. 4 Cellular microcystin content of *M. aeruginosa* FACHB905 exposed to different concentrations of arsenate under two phosphate regimes (* indicates a significant difference from the control ($P < 0.05$))

胞内产毒总量与对数期细胞分裂有关。将不同 $As(V)$ 浓度培养液中微囊藻 FACHB905 对数期生长速率和平稳期胞内产毒量作图 5。由图 5 可知,在少磷条件下,铜绿微囊藻胞内产毒量与比生长率存在显著的负线形相关 ($P < 0.003$);然而在无磷条件下,两者间没有类似的相关性。

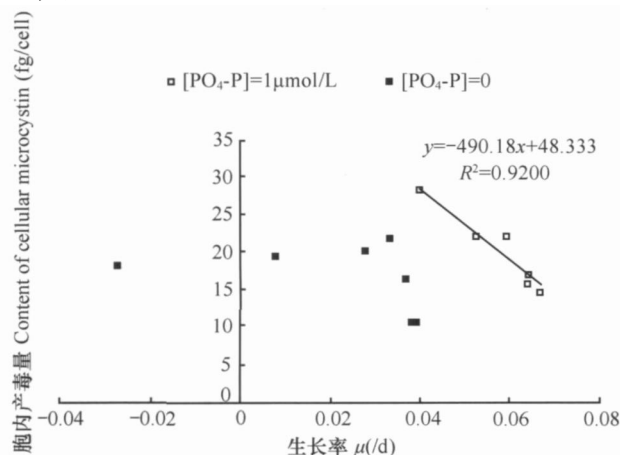


图 5 两种供磷水平下,微囊藻 FACHB 905 在不同砷 (V) 浓度培养液中比生长率及胞内产毒量间关系图

Fig. 5 Cellular microcystin content of *M. aeruginosa* FACHB905 in relation to the specific growth rate when treated with different concentrations of arsenate under two phosphate regimes

3 讨 论

本研究结果表明,单一胞外磷浓度变化不会影响铜绿微囊藻 FACHB905 对 $As(V)$ 的耐受阈值,但会影响 IC_{50} 值。两种供磷水平下,微囊藻对 $As(V)$ 的耐受阈值均接近于 10^{-7} mol/L,而少磷条件下的 IC_{50} 值比无磷条件下的高 3 个数量级,这与叉边金藻的结果类似^[18]。 $As(V)$ 与细胞活性位点的结合常数 (K) 值越大,表明失活点越多,从而藻生长受抑制的程度亦越大。少磷条件下的结合常数要远低于无磷条件的,这表明胞外磷在 $As(V)$ 对铜绿微囊藻 FACHB905 的毒性效应上具有关键的作用,即保护藻细胞免受 $As(V)$ 的毒害。

叶绿素是位于类囊体膜内的蛋白复合物,是微囊藻进行光和作用的场所,其含量往往与藻细胞的生长状态和光合作用密切相关^[23]。微囊藻的叶绿素易受环境胁迫的影响,如某些化感物质可以降低微囊藻中叶绿素的含量^[24, 25];而一些金属离子能促进微囊藻叶绿素含量^[26, 27]。然而 $As(V)$ 对微囊藻 FACHB905 生长抑制的同时,却对其叶绿素含量没有显著的影响。推测本研究中 $As(V)$

不会与类囊体膜结合而抑制藻的光合作用,而是取代磷与某些活性酶结合,来抑制藻细胞的分裂速度。

微囊藻胞内产毒量与叶绿体及光合作用有关联^[28]。在这两种供磷水平下,叶绿素 a 含量不受 $As(V)$ 的影响,因此微囊藻毒素产量也未受抑制,反而出现升高的现象。同时发现在少磷条件下,微囊藻 FACHB905 的胞内产毒量与比生长率成负相关。Oh, *et al.* 发现,在磷限制的情况下,供磷水平决定比生长率,而微囊藻毒素产量随着生长率的下降而升高^[29]。其他研究者们也发现在氮和光照受限的条件下,微囊藻产毒速率与细胞生长速率具有相关性^[22, 30]。推测本研究中铜绿微囊藻 FACHB905 在少磷条件下, $As(V)$ 浓度超过生长率受限的阈值时 (即 $[As(V)] > 10^{-6.85}$ mol/L), $As(V)$ 通过对藻细胞生长的抑制作用促使其胞内产毒量增加,这个推论与 Orr 和 Jones 的结论相符^[22]。然而在无磷条件下,该藻株生长率和胞内产毒量没有类似的相关性。所有的 $As(V)$ 处理样品均出现胞内产毒量升高的现象,并且各处理样品间没有显著差异 ($P > 0.05$);胞内产毒的平均值为 19.34 fg/cell,是无磷条件下对照的产毒量的 1.78 倍 (图 4)。有研究结果表明微囊藻在不同浓度的 Al 、 Cd 、 Cr 、 Cu 、 Fe 、 Mn 、 Ni 、 Sn 、 Zn 和 0.2 mg/L 的壬基酚作用下,其毒素产量均被提高 1.7 倍左右^[31, 32],这与本研究结果类似,同时也支持前人的观点,即产毒藻株总是保持一个较低的毒素水平,当受到外界生长环境的刺激下,产毒量才有所升高,但不会超过最大值^[30, 33]。 $As(V)$ 在无磷条件下促进微囊藻 FACHB905 产毒的机理研究有待深入开展。本研究发现微囊藻在产毒方面与 $As(V)$ 具有协同效应,这对滇池水华期间毒素变化规律的研究具有一定的意义。然而还需进一步研究胞内含有多种聚磷酸体的微囊藻对砷胁迫的响应,并结合野外采样分析,方可全面讨论滇池微囊藻和砷间的关联。

参考文献:

- [1] Lippard S J, Berg J M. Principle of bioinorganic chemistry [M]. CA: Mill valley. 1994, Tab 3 5
- [2] Smedley P L, Kinniburgh D G. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters [J]. *Appl Geochem.*, 2002, 17: 517—568
- [3] Edmonds J S, Shibata Y, Francesconi K A, *et al*. Arsenic transformations in short marine food chains studies by HPLC-ICP MS [J]. *Appl Organomet Chem.*, 1997, 11: 281—287

- [4] Wängberg S-A, Blanck H. Arsenate sensitivity in marine periphyton communities established under various nutrient regimes [J]. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1990, **139**: 119—134
- [5] Knauer K, Behra R, Hemond H. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient [J]. *Aquat. Toxicol.*, 1999, **46**: 221—230
- [6] Takahashi A, Kawakami H, Bada A, et al. Effects of phosphate on arsenate inhibition in a marine cyanobacterium, *Phormidium* sp. [J]. *Appl. Organomet. Chem.*, 2004, **4**: 269—279
- [7] Hellweger F L, Farley K J, Lall U, et al. Greedy algae reduce arsenate [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 2003, **48**: 2275—2288
- [8] Morris R J, McCartney M J, Howard A G, et al. The ability of a field population of diatoms to discriminate between phosphate and arsenate [J]. *Mar. Chem.*, 1984, **14**: 259—265
- [9] Foster S, Thomson D, Maher W. Uptake and metabolism of arsenate by anoxic cultures of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Marine Chemistry*, 2008, **108**: 172—183
- [10] Dawson R M. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicon* 1998, **36**: 953—962
- [11] Baldia S F, Evangelista A D, Aralar E V, et al. Nitrogen and phosphorus utilization in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Laguna de Bay, Philippines [J]. *J. Appl. Phycol.*, 2007, **19**: 607—613
- [12] Watanabe M, Kohata K, Kunugi M. ³¹P nuclear magnetic resonances study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae) [J]. *J. Phycol.*, 1987, **23**: 54—62
- [13] Hoppe H G. Phosphatase activity in the sea [J]. *Hydrobiologia*, 2003, **493**: 187—200
- [14] Tan C X. Comparative studies on physiological responses to phosphorus-limited stress in three waterbloom-forming cyanobacteria [D]. Thesis for Master of Hydrobiology. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2005 [谭春香. 三种水华蓝藻对缺磷胁迫生理响应的比较研究. 硕士学位论文. 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2005]
- [15] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in high plants, algae and natural phytoplankton [J]. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1975, **167**: 191—194
- [16] Ramanan S, Tang J, Velayudhan A. Isolation and preparative purification of microcystin variants [J]. *J. Chromatogr.*, 2000, **833 A**: 103—112
- [17] Liu B B, Xiao B D, Liu J T, et al. The optimization of high performance liquid chromatographic method for analysis of trace microcystins in natural water bodies [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, **33**: 1577—1579 [刘碧波, 肖邦定, 刘剑彤, 等. 天然水体中痕量微囊藻毒素的高效液相色谱测定方法优化. 分析化学, 2005, **33**: 1577—1579]
- [18] Xiao H B, Shi Z L, Zhao X D, et al. The effect of arsenate on the growth rate of *Phaeodactylum tricornutum*, *Dicrateria* [J]. *Marine Sciences*, 1995, **1**: 47—52 [肖虹滨, 史致丽, 赵夕旦, 等. 砷对三角褐指藻, 叉边金藻生长率的影响. 海洋科学, 1995, **1**: 47—52]
- [19] Meharg A A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment [J]. *Plant Cell Environ.*, 1994, **17**: 989—993
- [20] Gavis J. Toxic binding of cupric ion by marine phytoplankton [J]. *J. Mar. Res.*, 1983, **41**: 53—63
- [21] Zhang W, Lin Y Q, Guo D F, et al. Influence of different nitrogen and phosphorus concentrations on growth, photosynthesis and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**: 318—322 [张玮, 林一群, 郭定芳, 等. 不同氮、磷浓度对铜绿微囊藻生长、光合及产毒的影响. 水生生物学报, 2006, **30**: 318—322]
- [22] Orr P T, Jones G J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen limited *Microcystis aeruginosa* cultures [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1998, **43**: 1604—1614
- [23] Wang L X, Wu G R, Wang J A, et al. The inhibition of *Hydrilla verticillata* on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Lake Science*, 2004, **16**: 337—342 [王立新, 吴国荣, 王建安, 等. 黑藻 (*Hydrilla verticillata*) 对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 抑制作用. 湖泊科学, 2004, **16**: 337—342]
- [24] Geoffroy L, Frankart C, Eullaffroy P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin [J]. *Environmental Pollution*, 2004, **131**: 233—241
- [25] Li F M, Hu H Y, Chong Y X, et al. Influence of EMA isolated from *Phragmites communis* on physiological characters of *Microcystis aeruginosa* [J]. *China Environmental Science*, 2007, **27**: 377—381 [李锋民, 胡洪营, 钟云霄, 等. 芦苇化感物质 Ema 对铜绿微囊藻生理特性的影响. 中国环境科学, 2007, **27**: 377—381]
- [26] Yuan X F, Wang N, Wang H M, et al. Effect of organic ligands on distribution of copper in *Microcystis aeruginosa* and the content of pigment [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, **26**: 207—210 [袁信芳, 王宁, 王海明, 等. 有机配体对铜胁迫下铜绿微囊藻生长的影响. 农业环境科学学报, 2007, **26**: 207—210]
- [27] Wang H M, Wang N, Yuan X F, et al. Effects of different forms of iron on growth of *Microcystis aeruginosa* and bioavailability of iron [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, **26**: 1029—1032 [王海明, 王宁, 袁信芳, 等. 不同形态 Fe 对铜绿微囊藻生长及其生物可利用性的影响. 农业环境科学学报, 2007, **26**: 1029—1032]
- [28] Shi L, Camichael W W, Miller I. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells [J]. *Arch. Microbiol.*, 1995, **163**: 7—15
- [29] Oh H M, Lee S J, Jang M H, et al. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**: 176—179
- [30] Wiedner C, Visser P M, Fastner J, et al. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806 [J]. *Appl.*

- Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1475—1481
- [31] Lukac M, Aegerter R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Toxicon*, 1993, **31**: 293—305
- [32] Wang J, Xie P, Guo N. Effects of nonylphenol on the growth and microcystin production of *Microcystis* strains [J]. *Environ Res*, 2007, **103**: 70—78
- [33] Long B M, Jones G J, Orr P T. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 278—283

RESPONSE OF MICROCYSTIS AERUGINOSA TO ARSENATE UNDER DIFFERENT PHOSPHATE REGIMES

GONG Yan^{1, 2}, WU Xing-Qiang^{1, 3}, XIAO Bang-Ding^{1, 3}, FANG Tao¹, LIU Jian-Tong¹ and SONG Li-Rong¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Agricultural Testing and Information Center, Hubei Academy of Agriculture Science, Wuhan 430064; 3. Graduated School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Arsenic is ubiquitous in the environment and potentially toxic to humans. Arsenate, the thermodynamically the dominant species of arsenic in marine and estuarine surface waters, was shown to be taken up by the phosphate transport systems of phytoplankton and plants due to its similar structure to the phosphate. Considerable evidence has been found that *Microcystis* luxuriously uptake phosphate to form polyphosphate bodies in phosphate-rich environments. The cyanobacterial sensitivity to arsenate has often been linked to the structural similarities of arsenate and phosphate, and intracellular polyphosphate was shown to be related to the sensitivity to arsenate. Therefore, the present research was intended to explore the effects of arsenate on the growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* FACHB905, which isolated from Dianchi Lake when only the extracellular phosphate concentration was changeable. The cells of *M. aeruginosa* FACHB905 were cultivated in the phosphate-free BG-11 medium for 14 days in order to completely consume phosphate stored in the cyanobacterial cells. Then, these phosphate-starved cells were inoculated in modified BG-11 media adjusted as following two cases: PO_4^{3-} was added at $1\mu\text{M}$ for the phosphate-limited medium, and PO_4^{3-} was absent as the phosphate-deprived medium. Arsenate as Na_2HAsO_4 was added to the culture media at concentrations from 10^{-8} to 10^{-4}M . It was worthwhile mentioning that the phosphate concentration used in this study ($1\mu\text{mol/L}$) was similar to that under natural conditions. We measured the density of cultures, chlorophyll content and microcystin content of this cyanobacterium responding to arsenate under both the phosphate regimes. This study showed that the extracellular phosphate concentration had no reference to the threshold doses ($\sim 10^{-7}\text{mol/L}$) of *M. aeruginosa* FACHB905 to arsenate. However, the IC_{50} value under phosphate limitation was $10^{-2.79}\text{mol/L}$ and three magnitudes greater than that under phosphate deprivation. The apparent association constant of arsenate to the cyanobacterium under phosphate limitation was much lower than that under phosphate deprivation. Thus, it presumed that extracellular phosphate had the key role on protecting cyanobacterial cells from arsenate. Otherwise, arsenate did not affect the chlorophyll content per cell, but had dosage effect on the cellular microcystin content. Arsenate, higher than 10^{-7}mol/L , could promote the cellular microcystin content per cell under phosphate limitation, while the microcystin content of all arsenate treatments was stimulated about 78% of that of the control under phosphate deprivation. The synergistic effect of arsenate and microcystin production of *M. aeruginosa* FACHB905 is of definite significance for complete understanding the microcystin production in the blooms in Dianchi Lake.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; Microcystins; Arsenate; Phosphate; Synergistic effect