

微囊藻毒素产生过程中磷素行为与作用研究

史红星, 王庚, 王晨宇, 李艳丽, 白云

(防化研究院, 北京 102205)

摘要: 通过培养实验考察了微囊藻生长过程中磷素的吸收利用情况, 研究了可溶性正磷酸盐对产毒微囊藻生长状况及几种不同磷形态在不同浓度下对微囊藻毒素产率的影响. 结果表明, 可溶性反应磷浓度的增加可以促进微囊藻生长, 磷浓度为 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 更适宜微囊藻生长, 不超过 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷对微囊藻产毒有促进作用, 无磷时产毒率最低, 而高于 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷对微囊藻产毒有抑制作用. 磷酸钾、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾三种无机磷形态对藻毒素产生过程的影响无显著性差异, 但与有机磷形态 β 甘油磷酸钠相比影响较显著.

关键词: 微囊藻毒素; 微囊藻; 磷; 可溶性反应磷

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)10-2916-04

Effect of Phosphorus on the Production of Microcystin

SHI Hong-xing, WANG Geng, WANG Chen-yu, LI Yan-li, BAI Yun

(Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China)

Abstract: Effect of phosphorus on the production of microcystin was researched. The effects of soluble reactive phosphorus (SRP) on the growth of cells and on the production of Microcystin were studied. In addition, the efficiency of four different phosphorus compounds was researched. The results showed that microcystin increased with the increase of SRP, and $c(\text{TP}) = 0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was the best growth concentration. When $c(\text{TP}) \leq 0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the microcystin production increased with the increase of phosphorus concentration and was the lowest without phosphorus. Moreover, when $c(\text{TP}) > 0.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the microcystin was restrained by the content of phosphorus. At the same time, the effects of three inorganic substance of different phosphorus forms (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and KH_2PO_4) were no significant difference, but their effects on the production of microcystin were larger than organic phosphorus of sodium β -glycerophosphate (GP).

Key words: microcystins (MCs); *Microcystis*; phosphorus; soluble reactive phosphorus (SRP)

微囊藻毒素 (microcystins, MCs) 具有强烈的毒性、较高的化学稳定性和水溶性, 富营养化水体中微囊藻毒素的产生和存在对饮用水的水质安全构成了严重威胁. 磷在水体富营养化中的作用已被长期广泛研究, 但藻类和藻毒素仍然威胁人类水源安全, 磷素在藻类生长和微囊藻毒素产生中的作用仍在研究之中^[1,2].

磷素作为重要的生源要素, 在藻细胞的物质能量代谢过程中发挥了重要作用, 但磷素最终没有被细胞合成进入其代谢产物微囊藻毒素的分子, 没有成为微囊藻毒素分子的组成元素. 在富营养化淡水水体中, 磷素作为藻类水华暴发的限制性因素几乎已被公认, 但磷在藻细胞内合成产生藻毒素的实质性作用仍无定论^[3-6].

本研究重点考察了 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 等几种可溶性反应磷 (SRP) 在微囊藻产生过程中的行为和作用, 以期探索磷素在微囊藻毒素分子生化合成中的作用, 进而为富营养化水体藻毒素污染控制以及湖泊水质的改善提供重要的科学参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用铜绿微囊藻购自中国科学院武汉水生生物研究所, 培养基为改进型 MA 和水库水, 光暗比为 12 h: 12 h, 光照 25°C , 4 种不同形态磷 β 甘油磷酸钠、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾均为国产分析纯试剂.

1.2 主要仪器

LX-B35L 型压力蒸汽灭菌器、培养箱和 PRX-350B 智能人工气候箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂).

Agilent1100 型液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 光电二极管阵列检测器 (DAD): 238 nm 波长检测, 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C18 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$).

收稿日期: 2010-09-19; 修订日期: 2011-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20677078)

作者简介: 史红星 (1971 ~), 男, 博士, 主要研究方向为环境安全理论与技术, E-mail: shx2005@yahoo.com.cn

1.3 实验方法

实验选用经过 Whatman 膜滤的北京某水库表层混合水样和经过改进的 MA 培养基作为基础培养基. 取若干 500 mL 锥形瓶, 每瓶加 400 mL 经过滤的混合水样, 以透气膜封口, 置于压力蒸汽灭菌器中 121℃ 灭菌 30 min, 冷却后放入培养箱中保存并以此作为基础培养基. 取若干瓶基础培养基, 接种已经饥饿培养 5 d 以上的铜绿微囊藻, 然后置入人工气候箱按照藻类培养方法进行常规培养. 定期取样分析测定磷浓度、藻生长量和毒素产率.

1.4 分析方法

磷测定采用磷钼蓝比色法, 藻生长量采用显微镜计数法和吸光度法同时测量. 藻毒素提取分析采用 HPLC 法^[7,8], 流动相为乙腈与水 (40:60, 体积比), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量:20 μL.

2 结果与讨论

2.1 磷对产毒微囊藻生长量影响

各藻类培养瓶中营养盐水平控制采用 CCD (central composite design) 实验设计方法. 每一因素的中心点作为重复研究, 可以研究二次交互作用, 也可以减少样品数量. 结合基础培养基中氨氮、硝酸盐氮以及可溶性磷的实际含量, 设计实验中氨氮、硝酸盐氮以及可溶性磷各因素的浓度控制水平如表 1 所示, 每个浓度分别做 3 个平行样. 通过在已知浓度的培养液中室内培养微囊藻, 并检测可溶性正磷酸盐的剩余情况以及产毒微囊藻的生长情况, 考察不同浓度正磷酸盐对产毒微囊藻生长量的影响.

表 1 实验组 I 氮磷浓度的设置 ($n=3$) /mg·L⁻¹

编号	NO ₃ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N	P
C1	8.4	0.84	0.078
C2	8.4	0.84	0.11
C3	8.4	0.84	0.275
C4	8.4	0.84	0.55
C5	8.4	0.84	5.5

隔天通过测量藻溶液的吸光度以及显微镜计数方法分别跟踪测定水样中产毒微囊藻的生长情况和剩余的可溶性磷. 以时间 (d) 为横坐标, 藻量 (10⁴ 个/mL) 为纵坐标, 做出各系列藻量对时间生长曲线如图 1; 再以时间为横坐标, 吸光度为纵坐标, 做出生长曲线如图 2 所示.

C 组是氨氮含量为 0.84 mg·L⁻¹, 硝酸盐氮含量为 8.4 mg·L⁻¹, 而磷含量为不同水平的系列, 其中 C3

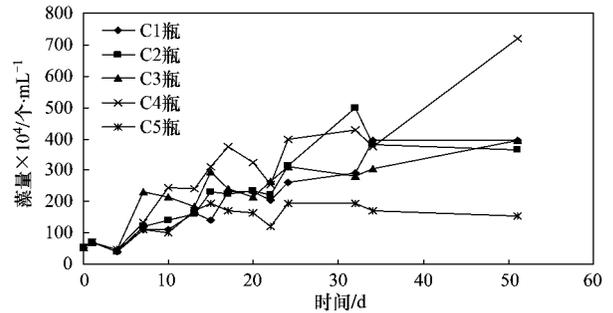


图 1 微囊藻藻量生长曲线 (计数法)

Fig. 1 Growth curves of total *Microcystis*

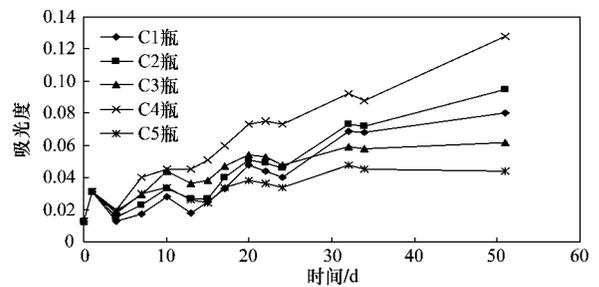


图 2 微囊藻吸光度生长曲线 (光度法)

Fig. 2 Growth curves of absorbency of *Microcystis*

为中心重点研究对象, 磷含量为 0.275 mg·L⁻¹. 图 2 中, C1、C2 瓶磷浓度低于 C3 瓶, C1 瓶磷浓度为 0.078 mg·L⁻¹, C2 瓶磷浓度为 0.11 mg·L⁻¹, C4、C5 瓶磷浓度高于 C3 瓶, C4 瓶磷浓度为 0.55 mg·L⁻¹, C5 瓶磷浓度则达到 5.5 mg·L⁻¹. 对比以上 2 个生长曲线可知, 藻细胞生长趋势基本一致, 在一定的磷浓度范围内, 增大磷的浓度可以刺激产毒微囊藻的生长, 明显增加溶液藻量以及增大溶液吸光度, 但当磷的浓度过大时, 将明显抑制产毒微囊藻的生长. 可见产毒微囊藻对磷的浓度有一个适应范围, 当磷浓度大于这个范围时产毒微囊藻的生长几乎处于停滞状态, C5 瓶的藻量以及吸光度甚至还不如 C1 瓶, 而实验中磷浓度在 0.55 mg·L⁻¹ 左右时藻细胞具有最大活性, 其时的藻溶液吸光度最高, 藻量最大. 实验中表现出的无机磷浓度过高引起藻生长抑制现象与前人的发现相似^[9-11].

2.2 铜绿微囊藻对磷的利用情况

分别取 3 个重复样 A3、B3、C3, 用相同实验条件进行实验, 以各样品瓶中剩余磷的浓度为纵坐标, 以时间为横坐标, 作图可得藻溶液对磷的吸收利用情况 (图 3).

由图 3 可见, 3 个重复样一致性很好, 证明数据

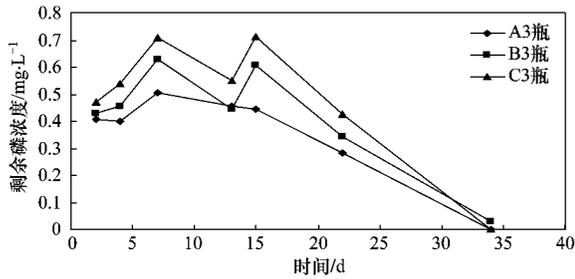


图3 藻液对磷的吸收曲线

Fig. 3 Absorbed curves of *Microcystis* on phosphorus

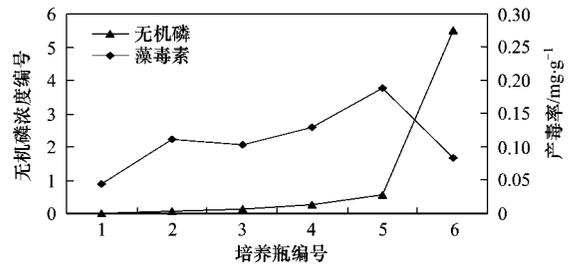
的相关性较好,有较高的可信度.在藻细胞生长过程中,培养基中余磷的变化基本上呈下降趋势,而在在前期过程中,磷的浓度有2次上升,一次是在第7 d左右,另一次是在第15 d左右,其原因可能是,藻液中存在不同生长周期的藻,部分藻细胞周期性死亡后藻细胞破裂,细胞中的磷释放进入培养基中,导致培养基中磷浓度升高^[12].

2.3 磷对微囊藻毒素产率的影响

通过以水库水为基础培养基的培养实验发现,藻细胞生长缓慢,藻总量很少,提取藻毒素并分析藻毒素产率时误差很大不足以说明问题.因此,为了更准确地研究磷对微囊藻毒素产率的影响,实验中将湖水培养基换成经实验改进的MA培养基.每L改进的MA培养基包含NaNO₃ 50 mg, KNO₃ 100 mg, Ca(NO₃)₂·4H₂O 50 mg, Na₂SO₄ 40 mg, MgCl₂·6H₂O 50 mg, Na₂EDTA 5 mg, FeCl₃·6H₂O 0.5 mg, MnCl₂·4H₂O 5 mg, ZnCl₂ 0.5 mg, CoCl₂·6H₂O 5 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.8 mg, H₃BO₃ 20 mg, Bicine (N,N-二羟乙基甘氨酸) 250 mg.

磷浓度梯度实验时,培养基中分别添加磷酸氢二钾溶液,使溶液中无机磷浓度控制在0、0.07、0.14、0.275、0.55、5.5 mg·L⁻¹;磷形态影响实验时,分别添加β-甘油磷酸钠(有机磷C₃H₇O₆PNa₂)、磷酸钾、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾溶液,使溶液中的磷浓度控制在0.55 mg·L⁻¹.添加完毕后,在人工气候箱中进行25℃、12 h:12 h光照黑暗交替培养至静态生长期,破碎藻细胞提取藻毒素,测定对比不同初始磷浓度梯度对应的产毒率,结果如图4所示.

由图4可见,在低浓度范围内,无机磷浓度的增加促进了产毒率的提高,但总体提高幅度有限,无磷时产毒率最低,在磷浓度在0.55 mg·L⁻¹时,产毒率相对较高;但磷浓度为5.5 mg·L⁻¹时表现为细胞产毒抑制,这和较高无机磷浓度时抑制产毒的结果相一致,也和前文的细胞生长具有一致性^[13].

培养瓶中浓度(mg·L⁻¹):1为0;2为0.07;

3为0.14;4为0.275;5为0.55;6为5.5

图4 不同磷酸氢二钾浓度时微囊藻的产毒率影响

Fig. 4 Effects of *Microcystin* rate in different concentration of K₂HPO₄

表2 不同磷形态微囊藻的产毒率

Table 2 *Microcystin* rate of different phosphorus substrates

培养瓶	β-甘油磷酸钠	磷酸钾	磷酸氢二钾	磷酸二氢钾
产毒率/mg·g ⁻¹	0.142	0.185	0.190	0.179

表2中比较不同磷形态下的藻毒素产率可以看出,实验条件下,磷酸氢二钾的产毒率最高,磷酸钾和磷酸二氢钾次之,β-甘油磷酸钠最低.这同时也说明,磷酸钾、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾这三种无机磷形态对藻毒素的产生过程的影响差别不大,它们比β-甘油磷酸钠更易于使微囊藻产生毒素^[14,15].

3 结论

(1)在一定浓度范围内,增大可溶性反应磷浓度可以刺激产毒微囊藻的生长,但当磷浓度过大时,将明显抑制产毒微囊藻的生长.

(2)在低浓度范围内,无机磷浓度的增加略微促进了产毒率的提高,无磷时产毒率最低,实验中磷浓度在0.55 mg·L⁻¹时,产毒率相对较高;磷浓度为5.5 mg·L⁻¹时表现为细胞产毒抑制.

(3)磷酸钾、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾3种无机磷形态对藻毒素产生过程的影响无显著性差异,但比有机磷形态β-甘油磷酸钠的影响略显著.

参考文献:

- [1] Jochimsen E M, Carmichael W W, An J, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil[J]. *New England Journal of Medicine*, 1998, **338**: 873-878.
- [2] Carmichael W W, Azevedo S M F O, An J, et al. Human fatalities from cyanobacteria chemical and biological evidence for cyanotoxins[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, **109** (7): 663-668.
- [3] 丁飞飞,黄鹤忠,陈金凤,等.不同磷源及其配比对铜绿微囊

- 藻生长和摄磷效应的影响[J]. 水生态学杂志, 2010, **3**(3): 32-36.
- [4] 史红星, 曲久辉, 王爱民, 等. 官厅水库蓝绿藻及藻毒素初步研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, **26**(9): 1653-1655.
- [5] 史红星. 官厅水库微囊藻毒素分析及电化学降解[D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2005.
- [6] Lawton L A, Edwards C. Purification of microcystins [J]. Journal of Chromatography A, 2001, **912**: 191-209.
- [7] 史红星, 曲久辉. 官厅水库微囊藻毒素的 LC-ESI/MS 定性分析[J]. 环境科学, 2005, **26**(6): 97-100.
- [8] 梁丽丽, 弓爱君, 李红梅, 等. 高效液相色谱法检测水体中微囊藻毒素[J]. 分析化学, 2010, **38**(5): 740-742.
- [9] 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[J]. 水生生物学报, 2006, **30**(3): 318-322.
- [10] Lee S J, Jang M H, Kim H S, *et al.* Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N: P ratio and growth stage[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, **89**: 323-329.
- [11] 陈国永, 杨振波, 马昱, 等. 氮和磷对铜绿微囊藻细胞生长的影响[J]. 环境与健康杂志, 2007, **24**(9): 675-679.
- [12] 王崇, 王海瑞, 徐晓菡, 等. 光照与磷对铜绿微囊藻生长的交互作用[J]. 环境科学与技术, 2010, **33**(4): 35-38.
- [13] 陈国永, 杨振波, 马昱, 等. 实验条件下氮、磷对微囊藻毒素产生的影响[J]. 卫生研究, 2008, **37**(2): 149-154.
- [14] 邹迪, 肖琳, 杨柳燕, 等. 不同形态磷源对铜绿微囊藻与附生假单胞菌磷代谢的影响[J]. 环境科学, 2005, **26**(3): 118-121.
- [15] 代瑞华, 刘会娟, 曲久辉, 等. 氮磷限制对铜绿微囊藻生长和产毒的影响[J]. 环境科学学报, 2008, **28**(9): 1739-1744.