

<https://doi.org/10.3799/dqkx.2022.079>



固氮鱼腥藻介导 As(Ⅲ)氧化及其对铵氮输入的响应

钟兆淇¹, 谢作明^{1,2*}, 毛青¹, 赵欣鑫¹, 刘太坤¹

1. 中国地质大学环境学院, 湖北武汉 430078

2. 中国地质大学生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北武汉 430078

摘要: 铵氮在砷的生物地球化学循环过程中发挥着重要作用, 但铵氮输入对藻类介导的 As(Ⅲ)生物氧化机理尚不清楚. 以固氮蓝藻鱼腥藻(*Anabaena* sp.)为研究对象, 通过室内模拟实验, 研究在不同浓度 As(Ⅲ)条件下, 鱼腥藻对 As(Ⅲ)的毒性响应和氧化作用, 并研究了外源铵氮输入对鱼腥藻的生长以及氧化 As(Ⅲ)的影响. 结果表明, 鱼腥藻的半抑制浓度(IC₅₀)值为 15.59 mg/L, 当 As(Ⅲ)的浓度为 0.1 mg/L、1 mg/L 和 10 mg/L 时, 分别在 1 d、2 d 和 7 d 内被完全氧化为 As(V), 并且随着 As(Ⅲ)浓度增加, 鱼腥藻的固氮作用增强. NH₄⁺浓度在 234 mg/L 以内时, 对鱼腥藻(*Anabaena* sp.)的生长有促进作用, 随着 NH₄⁺浓度从 0 mg/L 增加至 1 mg/L、45 mg/L 和 234 mg/L, 1 mg/L As(Ⅲ)分别在 48 h、36 h、24 h 和 12 h 被完全氧化. 随着 NH₄⁺浓度增加, 鱼腥藻对砷的吸附量增加, As(Ⅲ)的氧化加速. 研究结果有助于阐释天然水体中铵氮在砷生物转化过程中的作用.

关键词: 鱼腥藻; 亚砷酸盐; 铵氮; 毒性; 氧化; 吸附; 地球化学.

中图分类号: P593

文章编号: 1000-2383(2024)05-1920-11

收稿日期: 2022-03-02

Nitrogen-Fixing *Anabaena* sp. Mediated As(III) Oxidation and Its Response to Ammonium Input

Zhong Zhaoqi¹, Xie Zuoming^{1,2*}, Mao Qing¹, Zhao Xinxin¹, Liu Taikun¹

1. School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

2. State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

Abstract: Ammonium plays an important role in the biogeochemical cycle of arsenic, but the mechanism of ammonium input on algae-mediated As(III) bio-oxidation remains unexplored. The arsenic-resistant cyanobacteria *Anabaena* sp. was used in this study. Through laboratory simulation experiments, the toxicity, oxidation of different As(Ⅲ) concentrations mediated by *Anabaena* sp. was investigated. The influences of the input of exogenous ammonium on the growth of *Anabaena* sp. and the oxidation of As(Ⅲ) were also explored. The results show that the IC₅₀ value of *Anabaena* sp. was 15.59 mg/L, and 0.1 mg/L, 1 mg/L and 10 mg/L As(Ⅲ) were completely oxidized to As(V) within 1 d, 2 d and 7 d, respectively, after inoculating *Anabaena* sp.. With the concentration of As(Ⅲ) increased, the nitrogen fixation effect of *Anabaena* sp. is enhanced. Furthermore, the growth of *Anabaena* sp. was promoted within 234 mg/L NH₄⁺. With the increase of NH₄⁺ concentration from 0 mg/L to 1 mg/L, 45 mg/L and 234 mg/L, 1 mg/L As(Ⅲ) was completely oxidized at 48 h, 36 h, 24 h and 12 h, respectively, as the concentration of NH₄⁺ increases, the adsorption of *Anabaena* sp. to arsenic increases, and the oxidation of As(Ⅲ) accelerates. The research results help to interpret the role of ammonium nitrogen in the process of arsenic biotransformation in natural waters.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(Nos.41572230, 41172219); 国家自然科学基金创新研究群体项目(No.41521001).

作者简介: 钟兆淇(1997—), 男, 研究生, 主要研究方向为环境生物地球化学. ORCID: 0000-0003-0397-9798. E-mail: 694231763@qq.com

*** 通讯作者:** 谢作明, E-mail: zuoming.xie@cug.edu.cn

引用格式: 钟兆淇, 谢作明, 毛青, 赵欣鑫, 刘太坤, 2024. 固氮鱼腥藻介导 As(Ⅲ)氧化及其对铵氮输入的响应. 地球科学, 49(5): 1920—1930.

Citation: Zhong Zhaoqi, Xie Zuoming, Mao Qing, Zhao Xinxin, Liu Taikun, 2024. Nitrogen-Fixing *Anabaena* sp. Mediated As(III) Oxidation and Its Response to Ammonium Input. *Earth Science*, 49(5): 1920—1930.

Key words: *anabaena* sp.; arsenite; ammonium; toxicity; oxidation; adsorption; geochemistry.

砷(As)是一种剧毒的类重金属元素,广泛分布于天然水体、土壤和岩石矿物中(Che *et al.*, 2018). 全球50多个国家和地区约有2.2亿人接触砷含量超过10 $\mu\text{g/L}$ 的天然水(Ruan *et al.*, 2022). 虽然世界卫生组织(WHO)划定了安全饮用水中As浓度不高于10 $\mu\text{g/L}$,但是一些发展中国家(如孟加拉国)制定的饮用水标准中仍然采用50 $\mu\text{g/L}$ 作为阈值(Bahar *et al.*, 2013). 在天然水体中As含量一般低于10 $\mu\text{g/L}$,但是也有一些地区高达5 000 $\mu\text{g/L}$ (Levy *et al.*, 2005; Bahar *et al.*, 2013). 砷在天然环境中存在4种价态(As(-Ⅲ)、As(0)、As(Ⅲ)和As(V))(Wang *et al.*, 2015; Miyashita *et al.*, 2016),最常见的形式有三价砷[As(Ⅲ)]、五价砷[As(V)]、一甲基砷酸[MMA(V)]和二甲基砷酸[DMA(V)](Patel *et al.*, 2018),其对人体的毒性强度依次为:As(Ⅲ)> As(V)> MMA(V)> DMA(V).

微藻在地表水体中广泛存在. 由于微藻具有较高的比表面积(Zhang *et al.*, 2014),且藻细胞表面具有多种官能团(如-OH、-COOH、-NH₂、-C=O)(Tabaraki and Heidarizadi, 2018),因此被认为是去除水环境中As的理想材料. 另外,微藻可以将As(Ⅲ)氧化为毒性更小、稳定性更强的As(V)(Wang *et al.*, 2013a; Jana *et al.*, 2015),或者将无机砷转化为毒性更小的甲基砷(Wang *et al.*, 2013b; Xue *et al.*, 2017). 蓝藻作为生态系统中的产氧光合生物,可以适应多种极端环境(Patel *et al.*, 2018). 部分蓝藻在缺氮的环境中生长,会产生异形胞,固氮酶在异形胞中将大气中的氮气固定,转化成铵氮(Böhme, 1998; Berman-Frank *et al.*, 2003). 相比于其他氮源,蓝藻更易于吸收利用铵态氮(Kumar and Bera, 2020). 此外,化石燃料的燃烧、农业施肥(赵欣鑫等, 2020)和高浓度铵盐废水流入天然水体等人为活动同样会导致环境中铵氮含量的增加,过高的铵氮浓度会导致水体富营养化,破坏水生态环境(屈国颖等, 2022). 但是,当前对于氮-砷-藻间相互作用的研究聚焦于硝酸盐的作用, Wang *et al.* (2013a)研究了莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)在不同浓度硝酸盐条件下对As(Ⅲ)的积累和氧化,其研究结果表明硝酸盐减少了藻细胞As(Ⅲ)转运蛋白合成,对砷的

吸收量减少. 与莱茵衣藻不同的是,栅藻(*Scenedesmus acutus*)对As(Ⅲ)的吸收与硝酸盐存在没有明显相关性,但在加入硝酸盐后,其对As(Ⅲ)的积累随着As(Ⅲ)浓度的增加而降低(Awoyemi *et al.*, 2020). 然而,造成水体富营养化的氮源除了硝酸盐外,还有铵盐,当前已有研究指出,铵盐输入可以缓解Cr(Ⅳ)对小球藻(*Chlorella vulgaris*)的毒性(Liu *et al.*, 2015). 但是,铵盐作为微藻可以直接利用的氮源,其输入如何影响水体中微藻与As(Ⅲ)之间的关系亟待查明.

本文以淡水环境中广泛存在的水华固氮蓝藻(鱼腥藻 FACHB-418)为研究对象,研究鱼腥藻对As(Ⅲ)的毒性响应和氧化作用,以及铵氮介导下鱼腥藻对As(Ⅲ)的氧化机理,揭示天然水体中铵氮输入(生物固氮、工业氮肥等)对砷生物地球化学循环的重要作用.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用鱼腥藻 FACHB-418(*Anabaena* sp. FACHB-418)购自中国科学院水生生物研究所藻种库,将藻种置于BG₁₁培养基中培养,培养条件为光强2 000 Lux,光暗比为12 h:12 h,培养温度为27 $^{\circ}\text{C}$, pH调至7.2,每天定时摇动3次锥形瓶,当鱼腥藻生长至对数生长期时,5 000 r/min离心15 min收集藻细胞,将藻细胞转接到BG₁₁新鲜培养基中培养2 d,对藻细胞进行脱氮处理,以确保藻细胞内氮含量基本一致. 脱氮处理后的藻细胞再用超纯水清洗两次后收集,用于后续实验.

实验所用As(Ⅲ)为NaAsO₂配制的1 000 mg/L母液. 实验所用的培养基、储备容器和锥形瓶均用高压灭菌锅在121 $^{\circ}\text{C}$ 处理20 min,后续实验过程中的pH通过加入5 mmol/L的HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)缓冲液控制在7.2,藻细胞的初始OD_{750 nm}(光密度)为0.15.

1.2 As(Ⅲ)毒性实验

将As(Ⅲ)加入到BG₁₁培养基中,使As(Ⅲ)浓度分别为1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L. 每个处理组加入2 mL相同浓度经脱氮处理后的藻液于250 mL培养液中,每个处理组设置3个平行,不加As(Ⅲ)的处理组为对照组. 实验进行10 d,实验

过程中 2 d 取一次样。 IC_{50} 值的计算根据第 10 d 鱼腥藻的 OD 值与各处理组初始砷浓度,通过线性插值法得出 (Levy *et al.*, 2005)。

取 2.5 mL 藻液,用紫外-可见分光光度计测定藻液在 750 nm 处的 OD 值 (UV-1800PC, 上海美普达仪器)。根据 Lichtenthaler (1987) 的方法提取藻细胞中叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量,取 5 mL 藻液,5 000 r/min 离心 15 min,倒掉上清液,收集藻细胞,加入 5 mL 95 % 的乙醇,在 4 °C 的黑暗条件下,提取 24 h 后,过 0.45 μ m 水系滤膜,用紫外-可见分光光度计测定 774.2 nm、648.6 nm 和 470 nm 处的 OD 值。

根据如下公式计算得到叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量:

$$\text{叶绿素 a 的计算方程: } C_a = 13.36OD_{664.2} - 5.19OD_{648.6}, \quad (1)$$

$$\text{类胡萝卜素的计算方程: } C_{x+c} = (1\,000OD_{470} - 2.13C_a)/209. \quad (2)$$

1.3 As(Ⅲ)生物氧化及对鱼腥藻固氮能力的影响

由于天然水体中砷浓度通常小于 10 mg/L (Hussain *et al.*, 2021),因此设定 As(Ⅲ)浓度分别为 0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L,每个处理组加入 2 mL 相同浓度经脱氮处理后的藻液于 250 mL 培养液中,并设置 3 个平行和 2 个空白对照 (有藻无砷和有砷无藻)。本文分别在接种藻的第 0、0.25、1、2、3、5、7、9 d 取样,取 2 mL 培养液用 0.45 μ m 水系过滤器过滤后测定溶液中总砷 [As(T)]、As(V)、As(Ⅲ),取 5 mL 培养液用 0.45 μ m 水系过滤器过滤后测定溶液中 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 含量。

根据中华人民共和国环境保护部 (2010) 颁布的水质氨氮测定标准 (HJ535-2009),测定 NH_4^+ 浓度。根据 Fang *et al.* (2021) 的方法测定 NO_3^- 和 NO_2^- 浓度。

1.4 NH_4^+ 输入对 As(Ⅲ)生物氧化的影响

向 BG11₀ 培养基中加入 NH_4Cl 溶液,根据 NH_4^+ 浓度对藻生长的影响 (1 mg/L 为鱼腥藻在 9 d 实验过程产生的 NH_4^+ 浓度,45 mg/L 为最适合鱼腥藻生长的 NH_4^+ 浓度,234 mg/L 为鱼腥藻所能耐受的最大 NH_4^+ 浓度),设置溶液中 NH_4^+ 的浓度分别为 0 mg/L、1 mg/L、45 mg/L 和 234 mg/L。每个处理组加入 2 mL 相同浓度经脱氮处理后的藻液于 250 mL 培养液中,并设置 3 个平行和 2 个空白对照 (有藻

无砷和有砷无藻)。测定藻的 $OD_{750\text{ nm}}$ 、叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量,溶液中 As(T)、As(V)、As(Ⅲ)以及藻细胞表面吸附砷的含量。

对 NH_4^+ 浓度为 0 mg/L 和 234 mg/L 的处理组中藻细胞对砷的吸附量进行准一级动力学模型 (Tabaraki and Heidarizadi, 2018) 和准二级动力学模型拟合 (Pokhrel and Viraraghavan, 2008),准一级动力学模型为:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t,$$

其中, k_1 (h^{-1}) 表示准一级方程的速率常数, q_t 表示在生物吸附时间 t (h) 时的吸附量, q_e (μ g/g) 表示生物吸附平衡时的吸附量。

准二级动力学模型如下:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \left(\frac{1}{q_e}\right)t,$$

其中, k_2 ($g/\mu g \cdot h$) 表示准二级方程的速率常数, q_t 表示在生物吸附时间 t (h) 时的吸附量, q_e (μ g/g) 表示生物吸附平衡时的吸附量。

1.5 砷含量和砷形态分析

根据王晶等 (2021) 的方法,培养液中 As(V)、As(Ⅲ) 和 As(T) 浓度通过氢化物发生-原子荧光分光光谱法进行测定 (HG-AFS; AFS-9700, 北京吉天仪器)。藻细胞表面吸附砷的测定:收集每次取样后的藻细胞,用 20 mmol/L Na_2 -EDTA 冲洗 (吉米拉木·加马力等, 2019), 5 000 r/min 离心 15 min 后,收集上清液并用 0.45 μ m 水系过滤器过滤,测定方法与培养基中砷的测定相同。

1.6 藻细胞表面的光谱分析

FTIR (傅里叶红外) 光谱的测定,通过将 1 mg 经冷冻干燥的藻和 99 mg 干燥的 KBr 混合研磨后,在分辨率 4 cm^{-1} 的条件下利用傅里叶红外光谱仪 (Nicolet iS50, 赛默飞, 美国) 在 $4\,000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 的光谱范围对藻细胞表面官能团进行表征。

1.7 数据处理

数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=3$),使用 Excel 和 Origin 2018 软件分析和处理相关数据。数据的统计分析均使用 SPSS 25.0 软件进行差异显著性分析 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 As(Ⅲ)对鱼腥藻生长的影响

利用藻细胞悬液的吸光度反映鱼腥藻生物量。As(Ⅲ)对鱼腥藻生长的影响如图 1 所示,随着 As

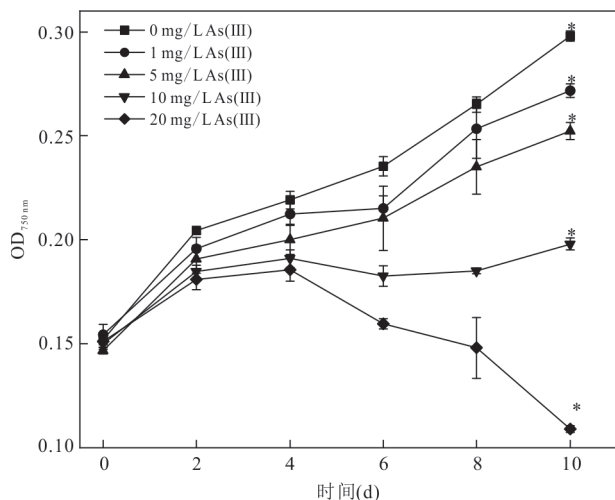


图1 不同浓度 As(III) 对鱼腥藻生长的影响(*表示不同 As(III) 浓度处理组中鱼腥藻在第 10 d 的生长与对照组相比存在显著差异, $p < 0.05$)

Fig.1 The effect of different As(III) concentrations on the growth of *Anabaena* sp. (*Indicates that there is a significant difference in the growth of *Anabaena* sp. on the 10 d in the treatments with different As(III) concentrations compared with the control group, $p < 0.05$)

(III) 浓度升高, 鱼腥藻生长速度下降, 在第 10 d 时, 浓度为 1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 和 20 mg/L As(III) 处理组中, 藻生物量相比于对照组分别减少了 9 %、15.3 %、33 %、63.4 %, 表明 As(III) 显著抑制 ($p < 0.05$) 鱼腥藻生长. As(III) 对鱼腥藻毒性作用表现在阻断-SH 蛋白以及细胞内其他重要蛋白质(如丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶)合

成, 破坏藻细胞正常代谢 (Wang *et al.*, 2015). As(III) 对鱼腥藻的 IC_{50} 值为 15.59 mg/L, 高于前人研究结果 (11.25 mg/L) (Patel *et al.*, 2021). 这可能与实验过程的培养条件有关, 培养过程中的振荡、光照、温度等因素均有可能影响藻生长.

鱼腥藻色素含量与 As(III) 浓度关系如图 2 所示, As(III) 对藻细胞内色素的影响与对生长的影响具有相似性 ($p < 0.05$). 在第 10 d, 随着 As(III) 浓度增加, 叶绿素 a 含量分别减少了 7.17 %、11.06 %、37.09 %、65.81 %, 类胡萝卜素含量分别减少了 6.67 %、10.6 %、35.9 %、60.9 %. 这些结果表明, 随着 As(III) 浓度和处理时间增加, As(III) 对鱼腥藻色素损伤逐渐增强, 叶绿素 a 比类胡萝卜素更易受到 As(III) 伤害. 其他部分蓝藻也存在类似现象, 当铜绿微囊藻暴露于 10 mg/L As(III) 时, 叶绿素 a 的合成相比于类胡萝卜素下降了 30.48 %, 这可能是由于叶绿素 a 的合成比类胡萝卜素的合成对 As(III) 更敏感 (Wang *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2018).

2.2 As(III) 的生物氧化及对藻固氮能力的影响

经过 9 d 培养, 在不加藻的对照组中, 只有 8 % 的 As(III) 被氧化成 As(V) (图 3d), 说明 As(III) 在培养液中相对稳定, 难以被空气中的 O_2 氧化. 鱼腥藻具有很强的 As(III) 氧化能力, 在 0.1 mg/L As(III) 条件下, 培养液中 As(III) 在 1 d 内被鱼腥藻完全氧化 (图 3a). 随着培养液中 As(III) 浓度增加, 鱼腥藻完全氧化培养液中 As(III) 分别需要 2 d (1 mg/L As(III)) 和 7 d (10 mg/L As(III)). 这可能是由于

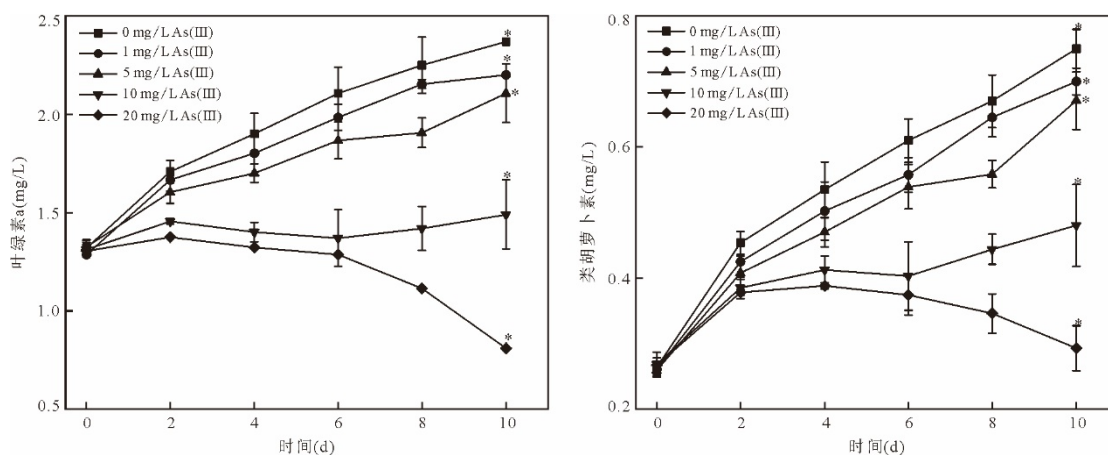


图2 不同浓度 As(III) 对鱼腥藻的叶绿素 a 和类胡萝卜素合成的影响(*表示不同 As(III) 浓度处理组中鱼腥藻在第 10 d 的色素合成与对照组相比存在显著差异, $p < 0.05$)

Fig.2 The effect of different As(III) concentrations on the chlorophyll a and carotenoids of *Anabaena* sp. (*Indicates that the pigments synthesis of *Anabaena* sp. on the 10 d in the treatment groups with different As(III) concentrations was significantly different from that in the control group, $p < 0.05$)

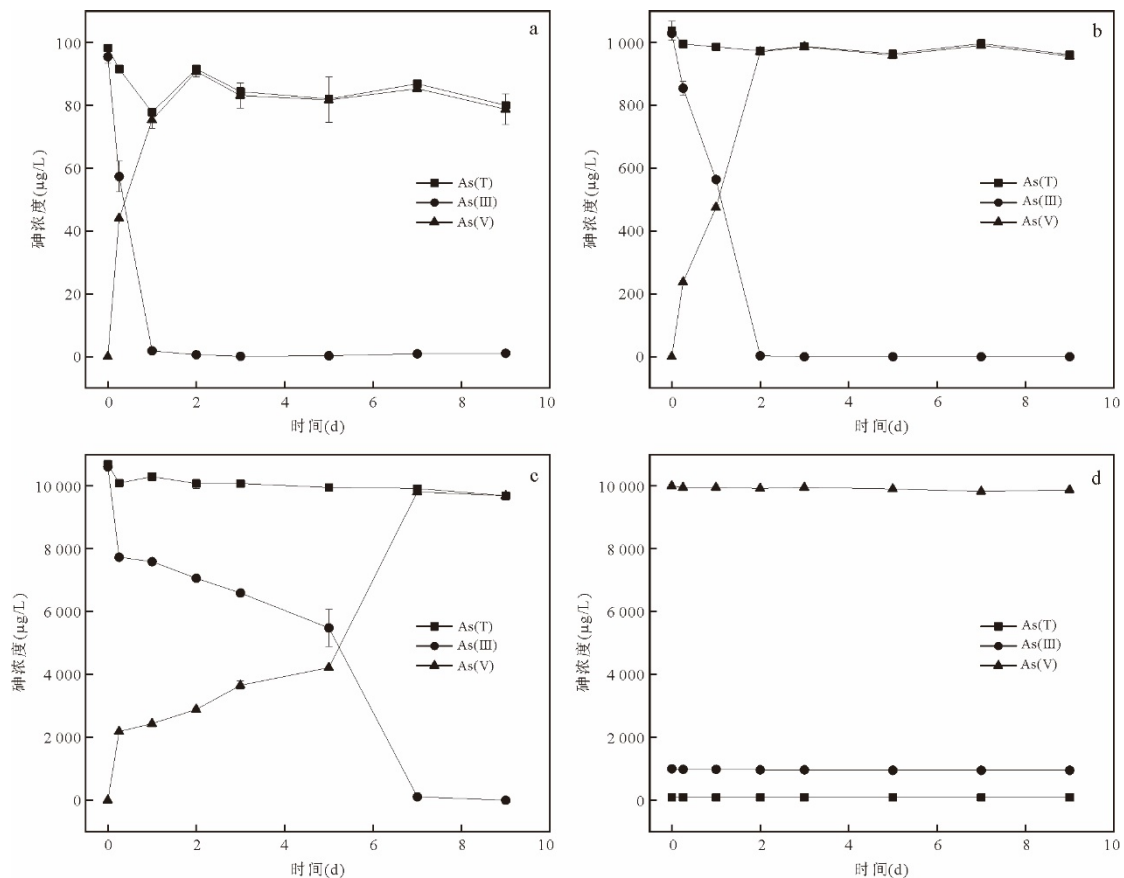


图 3 鱼腥藻对不同浓度 As(III) 的转化

Fig.3 The transformation of As(III) by *Anabaena* sp. in the medium with different As(III) concentrations

a.0.1 mg/L; b.1 mg/L; c.10 mg/L; d.无藻

高浓度 As(III) 破坏藻细胞结构, 抑制藻生长, 从而抑制 As(III) 生物氧化. 当培养液中 As(III) 浓度较低时 (图 3a, 3b), 培养液中 As(III) 在 2 d 内迅速被氧化. 藻类对 As(III) 的氧化主要是细胞表面氧化过程 (Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), 其光合作用产生的 O_2 分布在细胞壁上, 在藻细胞壁的催化作用下, 与 As(III) 接触发生生物氧化 (Jana *et al.*, 2015). 这说明藻对 As(III) 氧化是在藻细胞表面进行, 藻对 As(III) 的生物氧化是一个快速的接触氧化过程.

图 4 表明了培养液中各种无机氮含量变化. 在 9 d 实验过程中, 培养液中 NH_4^+ 含量明显上升, 第 1 d 增加速度最快, 说明鱼腥藻在缺氮环境中激发了固氮作用, 将单质态氮固定并转化为 NH_4^+ , 为其生长提供氮源 (Böhme, 1998; Kumar and Bera, 2020). 随着培养时间增加, 各处理组中 NH_4^+ 含量缓慢增加, 表明当环境中不再缺氮时, 鱼腥藻的固氮能力又逐渐减弱, 这时鱼腥藻产生的 NH_4^+ 对其固氮能力产生一定抑制作用 (Ospina-

Betancourth *et al.*, 2021). 这是由于藻的固氮作用主要是为了满足自身生长所需, 当藻不处于缺氮环境时, 其固氮作用会减弱. 此外, 培养液中 As(III) 浓度越高, NH_4^+ 含量也越高, 说明 As(III) 在实验设置浓度范围内, 会促进鱼腥藻的固氮作用. 这可能是由于砷会促进鱼腥藻固氮酶蛋白的编码基因表达 (Chakraborty *et al.*, 2019). 培养液中也检测出少量 NO_3^- , 但没有检测到 NO_2^- .

2.3 NH_4^+ 输入对鱼腥藻氧化 As(III) 的影响

NH_4^+ 输入对鱼腥藻生长的影响如图 5 所示. 与其他 3 个处理组 (0 mg/L、1 mg/L 和 45 mg/L) 相比, 高浓度 NH_4^+ (234 mg/L) 处理组中, 鱼腥藻在接种后的第 1 d 生长被抑制. 在 9 d 的培养期间, 当培养液中 NH_4^+ 浓度从 0 mg/L 增加至 45 mg/L 时, 藻细胞生长增加了 47.11%. 添加有 234 mg/L NH_4^+ 处理组中, 随着培养时间增加, 鱼腥藻逐渐适应了高浓度 NH_4^+ 环境, 高浓度 NH_4^+ 对藻生长的抑制效果减弱, 在第 9 d, 藻生长相比于对照组, 增加了 21.54%. 但与 NH_4^+ 浓度为 45 mg/L 处理组相比较,

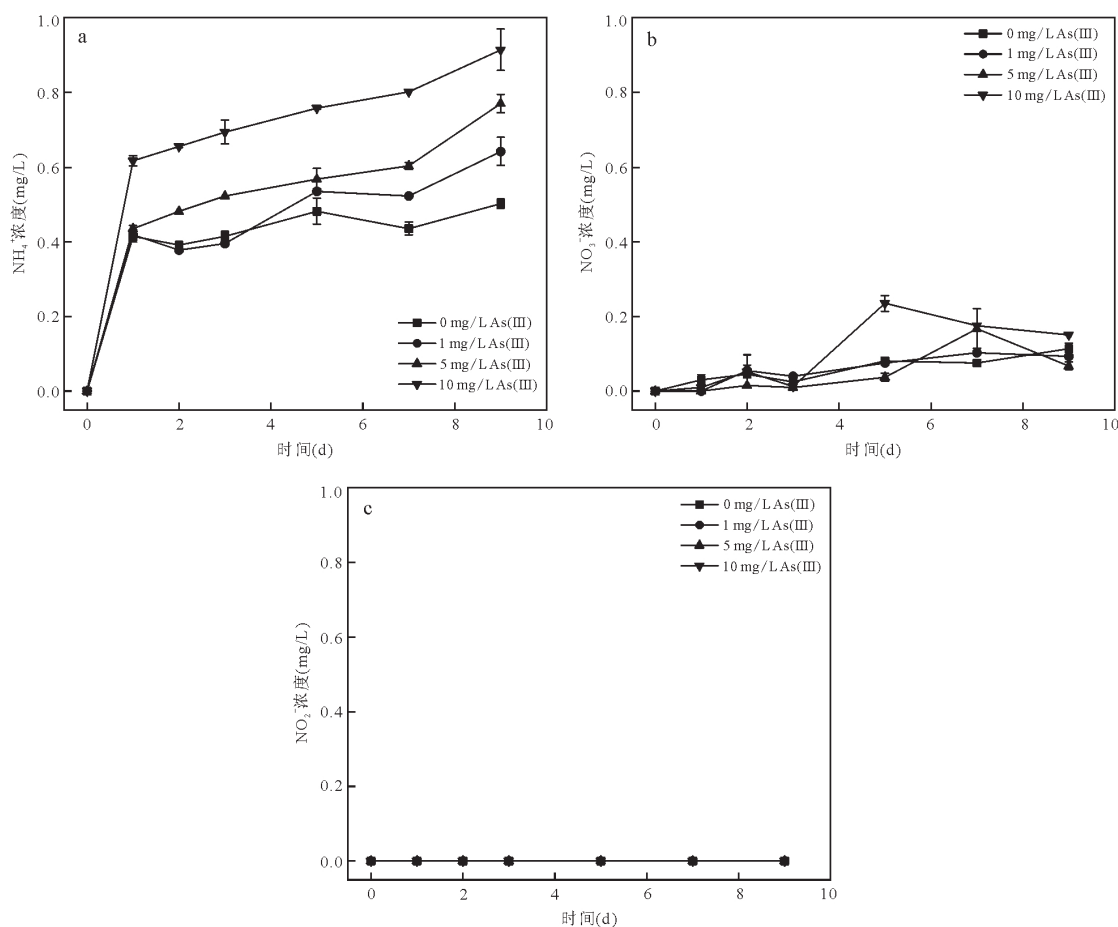


图4 不同浓度As(Ⅲ)培养液中无机氮的含量

Fig.4 The inorganic nitrogen in the medium with different As(Ⅲ) concentrations

a. NH_4^+ ; b. NO_3^- ; c. NO_2^-

其生物量减少了17.38%,说明鱼腥藻生长与 NH_4^+ 浓度相关较弱。 NH_4^+ 的毒性与藻的种类和培养条件有关,在含有不同浓度 NH_4^+ 的人工厌氧消化废水中,蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)处于 NH_4^+ 浓度为350 mg/L条件下时,藻生长急剧下降,当 NH_4^+ 浓度增加到462 mg/L时,藻完全死亡(Zhao *et al.*, 2019).螺旋藻(*Spirulina platensis*)在自养条件下, NH_4^+ 浓度在100 mg/L时很难生长,200 mg/L时藻细胞完全死亡(Li *et al.*, 2019). NH_4^+ 对藻的毒性主要是由于在高 NH_4^+ 浓度环境下,藻细胞破裂,藻色素和光合作用受损,藻细胞生理生化功能紊乱(Collos and Harrison, 2014).然而,由图5和图6可知,当 NH_4^+ 浓度由0 mg/L增加至234 mg/L时, NH_4^+ 仍然促进鱼腥藻生长和色素合成,这表明鱼腥藻存在抵消 NH_4^+ 不利影响的补偿机制。

虽然过量 NH_4^+ 会有一定毒性,但适量的 NH_4^+ 对于缓解重金属毒性也有一定作用.本研究结果表明, NH_4^+ 从0 mg/L增加至234 mg/L可减轻

As(Ⅲ)对鱼腥藻的生长和色素合成的影响.小球藻(*Chlorella vulgaris*)暴露于50 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ Cr(Ⅳ)时,0.5 mmol/L、3 mmol/L和10 mmol/L NH_4^+ 都能缓解Cr(Ⅳ)对小球藻生长的抑制作用(Liu *et al.*, 2015).但是, NH_4^+ 缓解砷对微藻的毒性作用鲜有报道.图5和图6显示,当加入45 mg/L NH_4^+ 时,鱼腥藻的生长、叶绿素a和类胡萝卜素含量分别增加了40.1%、29.1%和41.5%.一方面,由于氮作为藻细胞合成色素所必需的元素,其中铵氮是微藻的最适氮源,促进藻生长和色素合成,减轻砷的毒性.另一方面,As(Ⅲ)的毒性、迁移性均高于As(V),鱼腥藻将As(Ⅲ)氧化为As(V)也被视为藻细胞的一种自我解毒机制(Wang *et al.*, 2021).因此,当培养液中加入 NH_4^+ 时,除了促进藻生长外,还会加速As(Ⅲ)生物氧化,减轻As(Ⅲ)对鱼腥藻的毒害作用.当 NH_4^+ 浓度为234 mg/L时,培养液中1 mg/L As(Ⅲ)在12 h内被完全氧化,而 NH_4^+ 浓度为0 mg/L、1 mg/L和45 mg/L时,培养液中As(Ⅲ)

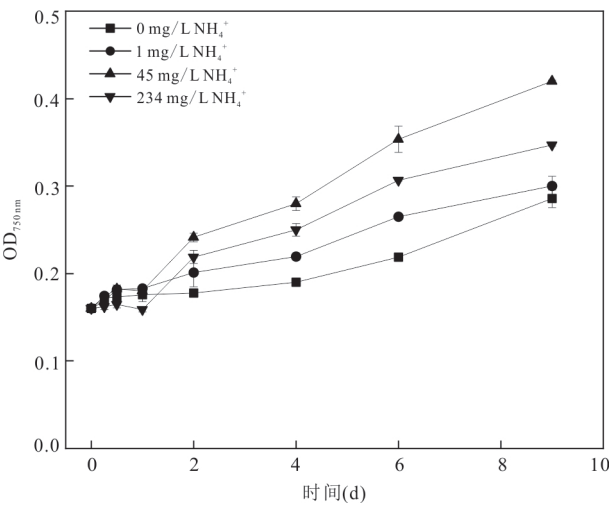


图5 1 mg/L As(Ⅲ)浓度下不同浓度 NH₄⁺对鱼腥藻生长的影响

Fig.5 The effect of different NH₄⁺ concentrations on the growth of *Anabaena* sp. under 1 mg/L As(Ⅲ)

被完全氧化分别需要 48 h、36 h 和 24 h (图 7). 随着 NH₄⁺浓度增加, 培养液内总砷浓度随之下降, 在不加 NH₄⁺的处理组, 总砷浓度仅下降了 5.6%, 但 NH₄⁺浓度为 234 mg/L 时, 总砷下降了 32%.

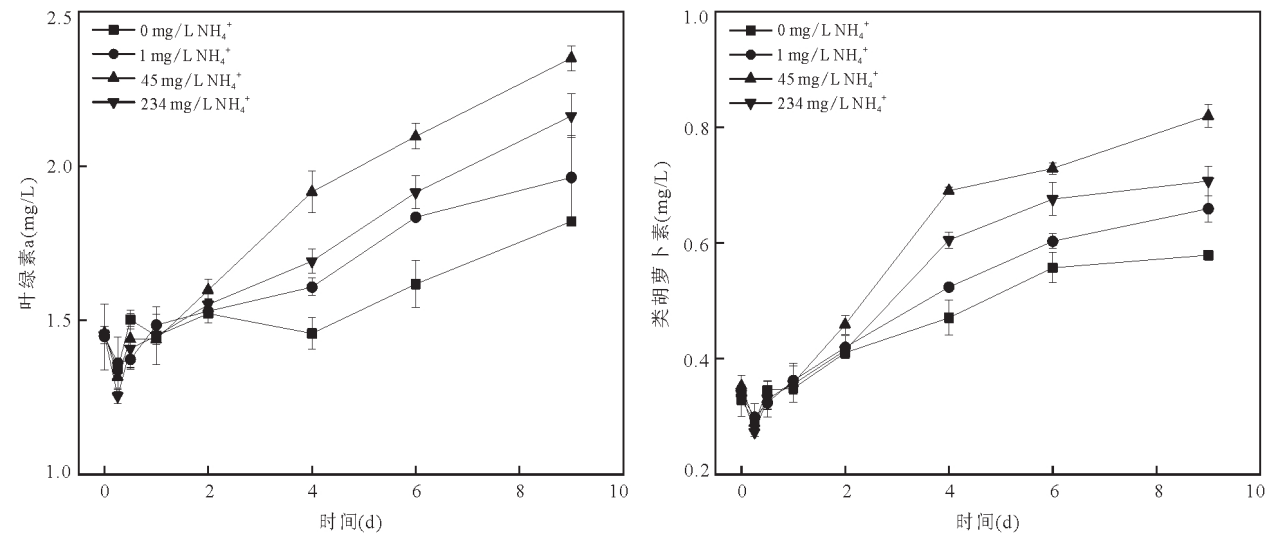


图6 1 mg/L As(Ⅲ)浓度下不同浓度 NH₄⁺对鱼腥藻的叶绿素 a 和类胡萝卜素合成的影响

Fig.6 The effect of adding different NH₄⁺ concentrations on the chlorophyll a and carotenoids of *Anabaena* sp. under 1 mg/L As(Ⅲ)

表 1 不同 NH₄⁺浓度条件下准一级和准二级动力学方程的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters obtained from pseudo-first-order and pseudo-second-order under different NH ₄ ⁺ concentrations				
NH ₄ ⁺ 浓度(mg/L)	准一级动力学		准二级动力学	
	$k_1(\text{h}^{-1})$	R^2	$k_2(\text{g}/\mu\text{g}\cdot\text{h})$	R^2
0	0.106	0.998	2.027×10^{-4}	0.997
234	0.545	0.984	4.103×10^{-4}	0.995

鱼腥藻藻细胞表面吸附砷量如图 8 所示, 细胞表面吸附的砷与环境中 NH₄⁺浓度呈正相关, 表明环境中 NH₄⁺增加, 增加了 As(Ⅲ)与藻细胞表面接触, 从而加速 As(Ⅲ)生物氧化.

准一级和准二级动力学方程拟合得到的吸附速率常数(k_1 , k_2)和 R^2 值如表 1 所示. 在不同浓度 NH₄⁺下鱼腥藻对 As(Ⅲ)的吸附过程与准一级和准二级动力学方程均有良好的拟合, 说明鱼腥藻在 As(Ⅲ)的吸附过程中, 同时存在物理吸附和化学吸附(Dawodu and Akpomie, 2016). 由 k_1 和 k_2 可知, 补充 NH₄⁺后, 鱼腥藻对 As(Ⅲ)的吸附速率明显提高. 如前文所述, 藻对 As(Ⅲ)的氧化是藻细胞表面氧化过程, 因此, 当鱼腥藻对 As(Ⅲ)的吸附速率增加时, 加速了藻对 As(Ⅲ)的吸附, As(Ⅲ)与藻细胞表面的接触增加, 最终促进鱼腥藻氧化 As(Ⅲ).

对吸附砷后的藻细胞进行 FT-IR 光谱(400~4 000 cm⁻¹)表征, 确定 NH₄⁺对鱼腥藻细胞表面官能团的影响(图 9). 未添加 NH₄⁺的藻细胞表面在 3 400~3 500 cm⁻¹出现宽而强的峰, 表明藻细胞表面有羟基(-OH)和胺基(-NH)参与砷的吸附, 在 1 647 cm⁻¹、1 555 cm⁻¹和 1 417 cm⁻¹出现峰值, 是由藻细胞表面

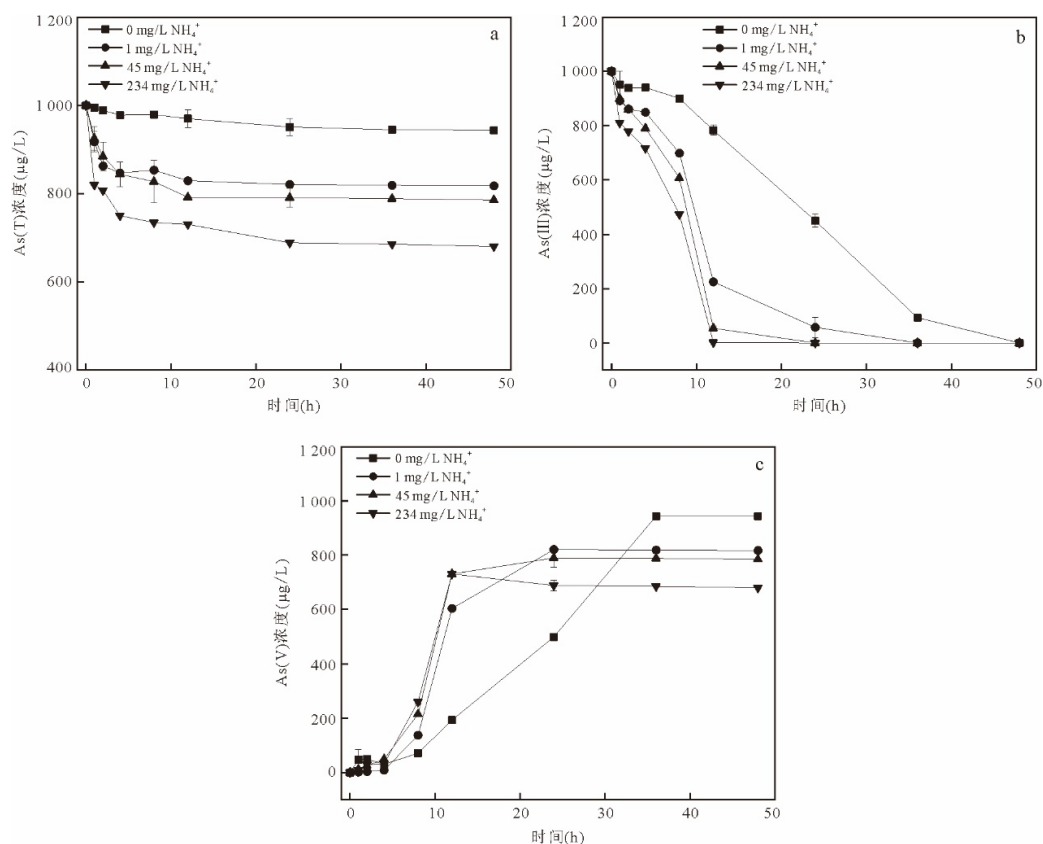
图7 1 mg/L As(III)浓度下不同浓度NH₄⁺培养液中砷的含量

Fig.7 The concentrations of arsenic in the medium with different NH₄⁺ concentrations under 1 mg/L As(III)
 a.As(T); b.As(III); c.As(V)

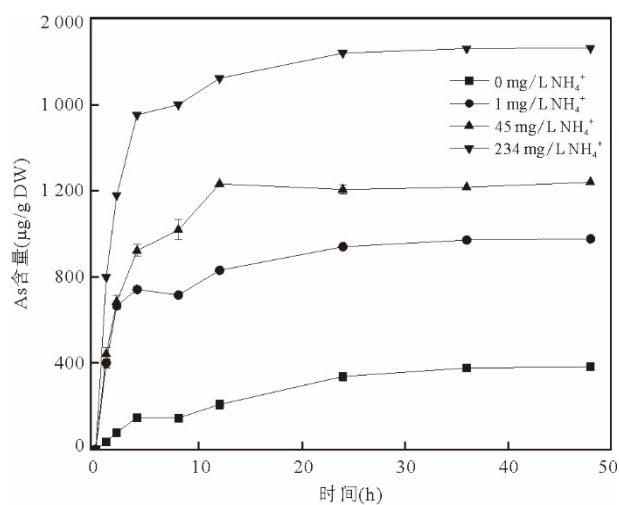
图8 不同浓度NH₄⁺条件下藻细胞表面吸附砷的含量

Fig.8 The adsorbed arsenic on the surface of algal cells under different NH₄⁺ concentrations

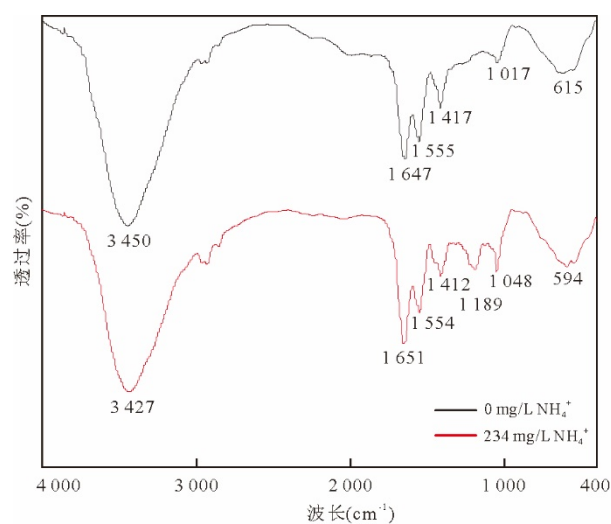


图9 吸附砷后鱼腥藻藻细胞的FT-IR图谱

Fig.9 FT-IR spectra of *Anabaena* sp. adsorbed arsenic

的酰胺I带中的羰基(C=O)官能团对称和不对称伸缩振动以及胺基(-NH)和-CH₂的伸缩振动引起的(Tabaraki and Heidarijadi, 2018).在1047 cm⁻¹出现的峰是由于醇类和羧酸的C-O官能团伸缩产生.另

外,在指纹区的峰则归因于藻的磷酸官能团.

通过比较有无NH₄⁺条件下藻细胞表面FT-IR光谱,发现当加入234 mg/L NH₄⁺以后,藻细胞表面官能团发生了明显变化,藻细胞在3450 cm⁻¹处的不对称伸缩振动转移至3427 cm⁻¹,在1647 cm⁻¹、

1 555 cm^{-1} 、1 417 cm^{-1} 和 1 047 cm^{-1} 出现的峰也移动到 1 651 cm^{-1} 、1 554 cm^{-1} 、1 412 cm^{-1} 和 1 048 cm^{-1} , 并且在 1 189 cm^{-1} 出现了新的峰。这说明 NH_4^+ 加入后藻细胞表面的官能团发生了明显变化, 促进了胺基 ($-\text{NH}$)、羟基 ($-\text{OH}$)、C-O 和磷酸官能团在砷吸附过程中的作用, 这可能是导致鱼腥藻对砷吸附量增加的原因。

3 结论

(1) 鱼腥藻可以耐受一定浓度的亚硝酸盐, 其 IC_{50} 值为 15.59 mg/L; 鱼腥藻可以在 1~2 d 内完全氧化 $\text{As}(\text{III})$, 即使 $\text{As}(\text{III})$ 浓度增加至 10 mg/L, 在 7 d 内也能完全被氧化。鱼腥藻通过对 $\text{As}(\text{III})$ 氧化作用增加对砷的耐受性, 具有修复砷污染天然水体的潜力。

(2) 铵氮可以抵消 $\text{As}(\text{III})$ 对鱼腥藻生长的抑制作用, 同时加速藻对 $\text{As}(\text{III})$ 的氧化, 增加鱼腥藻对 $\text{As}(\text{III})$ 的耐受性。

(3) 铵氮输入会导致鱼腥藻表面官能团改变, 并提高藻细胞表面的砷吸附能力, 从而加速鱼腥藻氧化 $\text{As}(\text{III})$ 。

本文研究结果证实, 在天然水环境中, 铵氮对微藻介导下的砷地球化学过程具有重要影响。为研究砷的生物地球化学循环提供了一定的指示意义。

References

- Awoyemi, O. M., Subbiah, S., Velazquez, A., et al., 2020. Nitrate-N-Mediated Toxicological Responses of *Scenedesmus Acutus* and *Daphnia Pulex* to Cadmium, Arsenic and Their Binary Mixture ($\text{Cd}/\text{As}_{\text{mix}}$) at Environmentally Relevant Concentrations. *Journal of Hazardous Materials*, 400: 123189. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123189>
- Bahar, M. M., Megharaj, M., Naidu, R., 2013. Toxicity, Transformation and Accumulation of Inorganic Arsenic Species in a *Microalga Scenedesmus* sp. Isolated from Soil. *Journal of Applied Phycology*, 25(3): 913–917. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9923-0>
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P., 2003. Nitrogen Fixation and Photosynthetic Oxygen Evolution in Cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 154(3): 157–164. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9)
- Böhme, H., 1998. Regulation of Nitrogen Fixation in Heterocyst-Forming Cyanobacteria. *Trends in Plant Science*, 3(9): 346–351. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(98\)01290-4](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(98)01290-4)
- Chakraborty, A., Aziz Chowdhury, A., Bhakat, K., et al., 2019. Elevated Level of Arsenic Negatively Influences *nifH* Gene Expression of Isolated Soil Bacteria in Culture Condition as Well as Soil System. *Environmental Geochemistry and Health*, 41(5): 1953–1966. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00261-2>
- Che, F. F., Du, M. M., Yan, C. Z., 2018. Arsenate Bio-transformation by *Microcystis Aeruginosa* under Different Nitrogen and Phosphorus Levels. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 66: 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.041>
- Collos, Y., Harrison, P. J., 2014. Acclimation and Toxicity of High Ammonium Concentrations to Unicellular Algae. *Marine Pollution Bulletin*, 80(1/2): 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.006>
- Dawodu, M. O., Akpomie, K. G., 2016. Evaluating the Potential of a Nigerian Soil as an Adsorbent for Tartrazine Dye: Isotherm, Kinetic and Thermodynamic Studies. *Alexandria Engineering Journal*, 55(4): 3211–3218. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2016.08.008>
- Fang, J. H., Xie, Z. M., Wang, J., et al., 2021. Bacterially Mediated Release and Mobilization of As/Fe Coupled to Nitrate Reduction in a Sediment Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 111478. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111478>
- Hussain, M. M., Wang, J. X., Bibi, I., et al., 2021. Arsenic Speciation and Biotransformation Pathways in the Aquatic Ecosystem: The Significance of Algae. *Journal of Hazardous Materials*, 403: 124027. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124027>
- Jana, A., Bhattacharya, P., Swarnakar, S., et al., 2015. *Anabaena* sp. Mediated Bio-Oxidation of Arsenite to Arsenate in Synthetic Arsenic (III) Solution: Process Optimization by Response Surface Methodology. *Chemosphere*, 138: 682–690. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.055>
- Jiamali, J., Maimaiti, G., Tumier, A., 2019. Study on Characteristics of Tolerance and Absorption of Four Heavy Metals by Three Photobionts. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 39(7): 1230–1240 (in Chinese with English abstract).
- Kumar, A., Bera, S., 2020. Revisiting Nitrogen Utilization in Algae: A Review on the Process of Regulation and Assimilation. *Bioresource Technology Reports*, 12: 100584. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584>

- Levy, J. L., Stauber, J. L., Adams, M. S., et al., 2005. Toxicity, Biotransformation, and Mode of Action of Arsenic in Two Freshwater Microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium Arcuatum*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(10): 2630—2639. <https://doi.org/10.1897/04-580r.1>
- Li, X. T., Li, W., Zhai, J., et al., 2019. Effect of Ammonium Nitrogen on Microalgal Growth, Biochemical Composition and Photosynthetic Performance in Mixotrophic Cultivation. *Bioresource Technology*, 273: 368—376. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.042>
- Lichtenthaler, H. K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*. Elsevier, Amsterdam, 350—382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, J. Q., Sun, Z. Q., Lavoie, M., et al., 2015. Ammonium Reduces Chromium Toxicity in the Freshwater Alga *Chlorella Vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7): 3249—3258. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6218-1>
- Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China, 2010. Water Quality Determination of Ammonia Nitrogen Determination by Nessler's Reagent Spectrophotometry (HJ 535—2009). China Environmental Science Press, Beijing (in Chinese).
- Miyashita, S. I., Murota, C., Kondo, K., et al., 2016. Arsenic Metabolism in Cyanobacteria. *Environmental Chemistry*, 13(4): 577. <https://doi.org/10.1071/en15071>
- Ospina-Betancourth, C., Acharya, K., Sanabria, J., et al., 2021. Low Inhibitory Effect of Ammonia on the Nitrogen-Fixing Activity of a Sludge Enriched with Nitrogen-Fixing Bacteria. *Bioresource Technology Reports*, 14: 100655. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100655>
- Patel, A., Tiwari, S., Prasad, S. M., 2018. Toxicity Assessment of Arsenate and Arsenite on Growth, Chlorophyll a Fluorescence and Antioxidant Machinery in *Nostoc Muscorum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157: 369—379. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.056>
- Patel, A., Tiwari, S., Prasad, S. M., 2021. Effect of Time Interval on Arsenic Toxicity to Paddy Field Cyanobacteria as Evident by Nitrogen Metabolism, Biochemical Constituent, and Exopolysaccharide Content. *Biological Trace Element Research*, 199(5): 2031—2046. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02289-3>
- Pokhrel, D., Viraraghavan, T., 2008. Arsenic Removal from an Aqueous Solution by Modified A. Niger Biomass: Batch Kinetic and Isotherm Studies. *Journal of Hazardous Materials*, 150(3): 818—825. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.041>
- Qu, G. Y., Li, M. J., Zheng, J. H., et al., 2022. The Promoting Effect and Mechanism of Nitrogen Conversion in the Sediments of Polluted Lake on the Degradation of Organic Pollutants. *Earth Science*, 47(2): 652—661 (in Chinese with English abstract).
- Ruan, Y. H., Fang, X., Guo, T. Y., et al., 2022. Metabolic Reprogramming in the Arsenic Carcinogenesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229: 113098. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113098>
- Tabaraki, R., Heidarzadi, E., 2018. Simultaneous Biosorption of Arsenic (III) and Arsenic (V): Application of Multiple Response Optimizations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166: 35—41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.063>
- Wang, J., Xie, Z. M., Wang, J., et al., 2021. Influence of Bioreduction of Arsenic-Bearing Goethite by Bacteria under Sulfur Mediation on Migration and Transformation of Arsenic. *Journal of Earth Science*, 46(2): 642—651 (in Chinese with English abstract).
- Wang, N. X., Huang, B., Xu, S., et al., 2014. Effects of Nitrogen and Phosphorus on Arsenite Accumulation, Oxidation, and Toxicity in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 157: 167—174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.012>
- Wang, N. X., Li, Y., Deng, X. H., et al., 2013a. Toxicity and Bioaccumulation Kinetics of Arsenate in Two Freshwater Green Algae under Different Phosphate Regimes. *Water Research*, 47(7): 2497—2506. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.034>
- Wang, Z. H., Luo, Z. X., Yan, C. Z., 2013b. Accumulation, Transformation, and Release of Inorganic Arsenic by the Freshwater Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10): 7286—7295. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1741-7>
- Wang, S. Z., Zhang, D. Y., Pan, X. L., 2012. Effects of Arsenic on Growth and Photosystem II (PSII) Activity of *Microcystis Aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84: 104—111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.028>
- Wang, Y., Wang, S., Xu, P. P., et al., 2015. Review of Arsenic Speciation, Toxicity and Metabolism in Microalgae. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(3): 427—451. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9371-9>
- Wang, Z. H., Fu, Y., Wang, L. L., 2021. Abiotic Oxida-

- tion of Arsenite in Natural and Engineered Systems: Mechanisms and Related Controversies over the Last Two Decades (1999–2020). *Journal of Hazardous Materials*, 414: 125488. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125488>
- Xue, X. M., Yan, Y., Xiong, C., et al., 2017. Arsenic Bio-transformation by a *Cyanobacterium Nostoc* sp. PCC 7120. *Environmental Pollution*, 228: 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.005>
- Zhang, S. Y., Rensing, C., Zhu, Y. G., 2014. Cyanobacteria-Mediated Arsenic Redox Dynamics is Regulated by Phosphate in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*, 48(2): 994–1000. <https://doi.org/10.1021/es403836g>
- Zhao, X. C., Tan, X. B., Yang, L. B., et al., 2019. Cultivation of *Chlorella Pyrenoidosa* in Anaerobic Wastewater: The Coupled Effects of Ammonium, Temperature and pH Conditions on Lipids Compositions. *Bioresource Technology*, 284: 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.117>
- Zhao, X.X., Li, Y.L., Li, Y.W., et al., 2020. Effects of Increased Nitrogen Deposition and Anthropogenic Perturbation on Soil Respiration in a Semiarid Grassland. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 36(15): 120–127 (in Chinese with English abstract).

中文参考文献

- 吉米拉木·加马力, 古海尼沙·买买提, 艾尼瓦尔·吐米尔, 2019.3种地衣体内藻类对4种重金属离子的耐受能力及其吸附特性研究. 西北植物学报, 39(7): 1230–1240.
- 中华人民共和国环境保护部, 2010. 水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法: HJ 535—2009. 北京: 中国环境科学出版社.
- 屈国颖, 李民敬, 郑剑涵, 等, 2022. 受污染湖泊沉积物中氮素转化对有机污染物降解的促进效应与机制. 地球科学, 47(2): 652–661.
- 王晶, 谢作明, 王佳, 等, 2021. 硫介导细菌还原载砷铁矿对砷迁移转化的影响. 地球科学, 46(2): 642–651.
- 赵欣鑫, 李玉霖, 李有文, 等, 2020. 氮沉降增加和人类干扰对半干旱草地土壤呼吸的影响. 农业工程学报, 36(15): 120–127.