

藻类的接触致毒——恢复培养 及其对化学物质的安全评价*

陈德辉^{1,2)} 杨剑慧¹⁾ 章宗涉¹⁾ 刘永定²⁾

(¹⁾上海师范大学, 上海 200234; ²⁾中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 应用接触致毒—恢复培养法, 试验共有五个浓度组, 即 0.10, 0.13, 0.18, 0.24 和 0.316mg/L Cu²⁺, 和对照组. 以比增长率作指标, 实验结果经回归分析: 确定 Cu²⁺ 对月牙藻逐步加深的三种致毒效应, 半数效应浓度、完全抑藻浓度和完全杀藻浓度分别为 0.204、0.297 和 0.316mg/L Cu²⁺. 由恢复培养可知在杀藻效应浓度以上, 藻类细胞受到不可逆转损害. 恢复培养试验结果能客观地反映了毒物对藻类的毒理效应.

关键词 藻类, 毒性测试, 杀藻效应, 安全评价

有毒化学物质如: 重金属、除草剂和杀虫剂等, 每年都以几十吨甚至几百吨的产量在使用着, 这些物质经各种途径进入水体, 从而对水生生物类群, 水生态系统的结构和功能产生影响. 化学物质的生态毒理学评价已越来越引起人们的重视. 藻类处于水生态系统初级生产者的地位, 在毒性试验和安全评价中是其他水生物评价的基础. 藻类的毒性测试作为毒物评价方法已有广泛介绍如 APHA^[1] 和 ASTM 的标准方法, 国家环保局的《化学品测试准则》, 都详细地规定了藻类毒性试验的内容方法和实施步骤.

一般在藻类毒性试验中, 通常是以生物量或生长率作为藻类抑制指标和安全评价指标的, 随着测试时间的延长, EC₅₀ 的浓度会发生变化^[2,3]. 因此需要对藻类毒性的试验及其表达方法进行必要的改进, 使其能够反映实际情况. 与其他水生物比较, 藻类具有生长周期短的特点. 这可以在短时间的恢复培养中进一步鉴定毒物的效应浓度. 本文参照 Payne 等方法^[3], 将毒性试验分为接毒致毒培养和恢复培养两大步骤, 以一定比增长率下的毒物浓度来说明毒物对藻类逐步加深的三种致毒效应.

1 材料和方法

1.1 材料 羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum* Printz FACHB217), 藻种来自中国科学院水生生物研究所藻种库, 将固体培养藻种接种于 AAM (Algal Assay Medium) 液体培养基中预培养直至对数生长期. 藻种的培养, 玻璃器皿的洗涤, 藻细胞密度的测定比生长率的计算分别参考有关文献^[4-6]. 受试化合物: 氯化铜 CuCl₂, 用重蒸水配成 158mg/L.

* 上海市科委发展基金资助
1999-08-02 收到; 1999-09-16 修回

CuCl_2 的贮存液. 试验时利用缺 Cu^{2+} 和 Na_2EDTA 的 AAM 培养基稀释至所需的浓度.

1.2 试验浓度的设置 设置 6 个 Cu^{2+} 浓度, (3.16×10^{-2} , 1×10^{-1} , 3.16×10^{-1} , 1 和 3.16 mg/L) 进行预试验. 按照等对数间距法, 设置正式试验的 Cu^{2+} 浓度组, 0.1、0.13、0.18、0.24 和 0.316 mg/L , 一个空白对照组. 每组三个平行.

1.3 藻液制备 无菌倒取预培养藻液, $3500 - 4000 \text{ r/min}$ 离心 5 - 10 min, 去掉上清, 藻体液用 15 mg/L NaHCO_3 洗涤二遍后作为藻种. 最终以每个三角瓶 50 mL 计, 预试验的初始密度为 $4.88 \times 10^4 \text{ Cells/mL}$, 后两次试验的藻液的初始密度为 $2.5 \times 10^{-4} \text{ Cells/mL}$ 进行接种.

1.4 培养条件 日光灯光源, $120 \pm 7\%$ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期 12L:12D; 培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 在光照期间, 每隔 2h 摇动培养瓶一次.

1.5 接毒培养 无菌条件下, 接毒培养 5d, 在第 2d、第 5d 各组计数得到藻密度, 依公式计算每组的生长率 μ 进行回归分析, 得出回归方程, 由此计算当 $\mu = 1/2\mu_{\max}[\text{Cu}^{2+}]$ 时的 EC_{50} ; 然后计算 $\mu = 0$ 时的 $[\text{Cu}^{2+}]$ 浓度, 表示 $X_5/X_0 = 1$, 即 $X_5 = X_0$, 藻类生长完全被抑制的浓度.

1.6 恢复培养 将致毒培养 120h 后的各处理组, 分别计数, 高于接种密度的处理组用离心法收集细胞, 小于或等于接种密度的用离心法或过滤法收集全部水样中的细胞. 藻细胞的洗涤方法与前述 1.3 步骤中相同. 在同等条件下, 由 AAM 培养基培养 216h 进行细胞计数. 恢复生长时, $\mu \leq 0$ 的最低浓度, 为完全杀藻浓度.

1.7 细胞计数和生长率(μ)的计算 自接种的次日起, 每日在同一时间, 利用微量吸液器吸取 1 mL 的藻类培养液, 移至经高压灭菌的加有 0.05 mL 鲁哥氏液的青霉素瓶中, 整个取样过程都是在无菌操作台上进行的. 采用平板计数法, 在 Olympus 双筒显微镜下, 进行细胞计数.

以公式 $r = \ln(x_n/x_{n-1})/(t_n - t_{n-1})$, (x_n : 当天的细胞数值; x_{n-1} : 前一天的细胞数值; t_n : 对应于 x_n 的培养天数; t_{n-1} : 对应于 x_{n-1} 的培养天数) 计算指数生长期内的每天的 r 值, 取其中的最大值为 μ 值.

1.8 回归分析及其检验^[7]

2 结果

2.1 预试验结果

各处理组的藻类细胞在致毒培养和恢复培养中的生长见表 1. 可知, 在接毒培养 5d 中, 铜离子浓度 $[\text{Cu}^{2+}]$ 等于或大于 0.316 mg/L 的三个处理组, 藻细胞数量下降, 低于起始密度. 而 0.032 mg/L 和 0.1 mg/L 的 2 个处理组, 藻类呈指数增长. 由恢复培养的可知, 藻类在 $[\text{Cu}^{2+}]$ 为 0.316 mg/L 和 3.16 mg/L 两个浓度组中接毒培养 5d 后, 第 11d、14d, 不能恢复生长到对数生长的水平; 而对照组, 0.032 mg/L 和 0.1 mg/L 二个浓度组都可恢复生长, 而达到对数生长期. 计算接毒培养第 5d 的 μ 值见表 1, 当 Cu^{2+} 浓度大于 0.316 mg/L 时, μ 值明显下降. 这表明在一定浓度范围内 Cu^{2+} 对月牙藻的生长有抑制作用. 利用作图法求出公式:

$\mu = -3.62[\text{Cu}^{2+}] + 1.082$, 计算得 EC_{50} 为 0.199; 计算 $\mu = 0$ 时, $[\text{Cu}^{2+}] = 0.299\text{mg/L}$. 尽管第一次试验选择的 Cu^{2+} 浓度范围广、间距大, 但是可以得到 Cu^{2+} 对藻细胞生长最高无害浓度 EC_0 、完全抑制 ($\mu = 0$) 浓度和不能恢复生长的杀藻浓度分别为 0.100mg/L, 0.299mg/L 和 0.316mg/L. 为了更准确描述 Cu^{2+} 对藻类细胞的致毒过程, 在原有的实验基础上缩小 Cu^{2+} 浓度范围在 0.10–0.316mg/L 之间, 进行深入的试验, 同时小于或等于 0.10mg/L 的浓度组不进行恢复培养试验.

表 1 不同铜离子浓度 $[\text{Cu}^{2+}]$ 致毒和恢复培养的藻类细胞密度和生长率 ($\times 10^4$ Cells/mL)

Tab.1 Algal density ($\times 10^4$ Cells/mL) and growth rate of *S. capricornutum* with concentration gradient of copper ion $[\text{Cu}^{2+}]$ in exposure-recovery culture

$[\text{Cu}^{2+}]\text{mg/L}$	0.0	0.032	0.100	0.316	1.00	3.16
0	4.88	4.88	4.88	4.88	4.88	4.88
5d	109.7	232.7	178.9	3.57	1.13	1.025
μ	3.11	3.86	3.60	-0.313	-1.463	-1.56
5d	4.88	4.88	4.88	0.32	0.467	0.30
11d	63.6	109.0	64.8	0.85	7.88	0.94
14d	92.3	411	753	0.49	21.2	0.96

2.2 第一次试验结果

表 2 不同铜离子浓度 $[\text{Cu}^{2+}]$ 致毒和恢复培养的月牙藻细胞密度 ($\times 10^4$ Cells/ml)

Tab.2 Algal density ($\times 10^4$ Cells/ml) of *S. capricornutum* with concentration gradient of copper ion $[\text{Cu}^{2+}]$ in exposure-recovery culture

$[\text{Cu}^{2+}]\text{mg/l}$	0.0	0.10	0.13	0.18	0.24	0.316
2d	6.83	8.02	8.64	3.49	2.04	2.16
5d	34.7	29.8	34.3	25.8	6.14	2.30
5d			2.5	2.5	1.78	0.68
11d			5.59	61.67	4.20	2.58
14d			338.7	560.7	3.36	1.60

致毒培养的藻类生长见表 2. $[\text{Cu}^{2+}] \leq 0.18\text{mg/L}$ 的 3 个组均以指数方式增长. $[\text{Cu}^{2+}] = 0.24\text{mg/L}$ 的浓度组, 藻细胞在第 2d 生长下降, 第 5d 呈上升趋势, 但其最大值没有达到最大组的一半. 0.316mg/L 组的藻细胞密度始终总是低于起始密度, 没有增加.

μ 值和 $[\text{Cu}^{2+}]$ 进行回归分析, t 检验表明线性相关极显著, 得到回归方程如下:

$$2\text{d}: \mu = -4.3975[\text{Cu}^{2+}] + 1.1596 (n=5, r = -0.8912)$$

$$5\text{d}: \mu = -2.8604[\text{Cu}^{2+}] + 0.881 (n=5, r = -0.9546)$$

由此得到第 2d 和第 5d 的 EC_{50} 分别为 0.193 ppm 和 0.216 mg/L, 藻类被完全抑制 (即 $\mu = 0$ 时) 的浓度分别为 0.264mg/L 和 0.300mg/L $[\text{Cu}^{2+}]$.

从恢复生长可知 (表 2), 0.13mg/L 和 0.18mg/L 浓度组完全恢复生长. 但 0.24mg/L 和 0.316mg/L 有少量增长, 但到第 9d 又下降了, 没有完全恢复生长.

2.3 第二次试验结果

表 3 不同铜离子浓度 $[Cu^{2+}]$ 致毒和恢复培养的月牙藻细胞密度($\times 10^4$ Cells/ml)

Tab. 3 Algal density ($\times 10^4$ Cells/ml) of *S. capricornutum* with concentration gradient of copper ion $[Cu^{2+}]$ in exposure-recovery culture

$[Cu^{2+}]$	0.0	0.10	0.13	0.18	0.24	0.316
2d	6.00	11.5	7.04	6.24	6.24	2.42
5d	15.87	12.68	48.27	15.90	16.28	1.79
5d			2.5	2.5	0.5	0.5
11d			25.3	5.36	1.87	0.13
14d			32.7	3.31	0.55	0.26

致毒培养的藻类生长见表 3, 0.1 mg/L, 0.13 mg/L, 0.18 mg/L 和 0.24mg/L Cu^{2+} 浓度组及对照组藻细胞生长呈指数增长. 而 0.316mg/L 浓度组, 在接种培养 24h 后, 生长下降, 低于起始密度.

μ 值和 $[Cu^{2+}]$ 的回归分析, 得到如下回归方程, t 检验表明线性相关极显著.

第 2d $\mu = -3.5174[Cu^{2+}] + 1.115$ ($n=5, r=-0.9231$)

第 5d $\mu = -3.8037[Cu^{2+}] + 1.1457$ ($n=5, r=-0.9620$)

由此得到 2d 和第 5d 的 ErC_{50} 分别为 0.2088mg/L 和 0.1978mg/L; 而第 2d 和第 5d 的 Cu^{2+} 对藻类生长完全抑制的浓度当 $\mu=0$ 时分别为 0.317 和 0.301mg/L. 从恢复生长可知, 0.13mg/L 浓度组藻细胞呈指数增长能够恢复生长. 0.18mg/L 组虽然在恢复培养后增长, 可恢复生长. 0.24mg/L 组可以增长, 能够恢复培养. 但是 0.316mg/L 浓度组没有增长, 不能恢复生长.

3 讨论和结论

从以上三次的 5d 致毒试验结果可知: 当 $\mu = 1/2\mu_{max}$, 三次试验的 EC_{50} 分别为 0.1994, 0.2160 和 0.1978, Cu^{2+} 对于羊角月牙藻的比增长率的半数抑制浓度的均值为 0.2044 ± 0.0083 . 而完全抑制藻类生长的铜离子浓度 $[Cu^{2+}]$, $[X_5/X_0 = 1, \mu = 0]$ 分别为 0.2989, 0.300 和 0.301, 其平均值为 0.297mg/L. 而 0.316mg/L 浓度组的藻类都无法恢复生长. 这一浓度和兰智文(1992)^[8] 围隔实验的所得到的铜离子 $[Cu^{2+}]$ 的杀藻浓度 0.300ug/L 很接近.

致毒培养试验主要测定毒物对藻类的抑制效应, 即生长率的半数抑制浓度 EC_{50} 和完全抑制浓度. 经过比增长率 μ 和 $[Cu^{2+}]$ 的回归分析, 和所得的回归方程, 即可计算出 $\mu = 1/2\mu_{max}$ 和 $\mu = 0$ 的 EC_{50} 和完全抑制浓度 (Algistatic response). 从恢复培养可知, 在 EC_{50} 即 $[Cu^{2+}] = 0.200$ mg/L 附近的 0.18mg/L 处理组在去除毒物后能够很快地恢复生长. 而在完全抑制浓度为 0.300mg/L 附近的处理组 0.316 浓度组, 则很难恢复培养或生长下降无法恢复培养, 这一浓度为永久性的杀藻浓度.

50% 抑制效应并不意味着决定性的毒效应浓度, (1) 是随着时间的变化 EC_{50} 变大^[3], 或者变小如本次试验. 这可能与 Cu^{2+} 在藻细胞内富集有关. (2) 在去除毒物后 EC_{50} 浓度的处理组藻细胞很快恢复生长达到对数期. 如本实验, 还有 Payne 等试验. 这表明藻类的

生命力并没有相应地降低 50%。

恢复培养表明在由急性致毒试验中获得的半数抑制浓度下藻类的数量及其生活力没有发生任何改变,而完全抑制浓度却可估计藻类细胞被破坏的程度。即在细胞质产生的抑制效应,而这一浓度则有可能对细胞的生长产生不可逆的破坏作用。杀藻浓度对细胞的生长产生不可逆的破坏作用,是有毒物质安全评价一个稳定的指标。因而致毒—恢复培养试验则是较全面而稳妥的化合物毒性的安全评价方法。

参 考 文 献

- [1] American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. Standard methods: For the examination of water and wastewater (16th ed.). American Public Health Association, Washington D.C. 1985, 772~863
- [2] 陈德辉,章宗涉等.苯酚对不同营养层次水生生物的急性毒性.生态科学,1992,2:95~99
- [3] Payne A G, et al. A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals. Aquatic Toxicology, 1979, 171~180
- [4] 周永欣,章宗涉编著.水生生物毒性试验法.北京:农业出版社,1989,75~190
- [5] 金相灿,屠清瑛主编.湖泊富营养化调查规范(第二版).北京:中国环境科学出版社,1990,272~286
- [6] 凯恩斯, J. 等著,曹凤中等译.水污染的生物监测.北京:中国环境科学出版社,1989,106~146
- [7] 童一中编著.生物统计法.长沙:湖南科学出版社,1987,339~395
- [8] 兰智文,赵鸣等.藻类水华的化学控制研究.1992,13:12~15

ALGAL TOXICITY TEST WITH EXPOSURE-RECOVERY AND ITS APPLICATION TO THE SAFETY ASSESSMENT OF CHEMICALS

Chen Dehui^{1,2}, Yang Jianhui¹, Zhang Zongshe¹ and Liu Yongding²

(¹Shanghai Teachers' University, Shanghai 200234

²Institute of Hydrobiology The Chinese Academy of Science, Wuhan 430072)

Abstract The experiments were carried out with the test method of exposure-recovery. The concentrations of 50% growth inhibition, algistatic response and algicidal response, three gradually increasing toxicity of $[\text{Cu}^{2+}]$ on cells of *Selenastrum capricornutum* Printz, were 0.204, 0.297 and 0.316mg/l respectively, derived from regression equation between $[\text{Cu}^{2+}]$ and specific growth rate corresponding with this concentration. It was shown that algal cells were damaged irreversibly when $[\text{Cu}^{2+}]$ above algicidal concentration, and the results of recovery experiments could evaluate the extent of cell damage in algal toxicity test.

Key words Algae, Toxicity test, Algicidal response, Safety assessment