

光合率作为藻类毒理测试指标*

陈德辉^{1,2)} 王 罂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 以氧电极法的光合率作为藻类毒性测试指标, 整个测试过程准确, 简便, 快速, 能够随时测定受试毒物对藻类光合作用的效应, 与常规毒性试验比较, 测定时间由 96h 缩短到 2h, 灵敏度约提高了一倍, Cu^{2+} 对光合作用的半数效应浓度(EC_{50})是 0.105mg/L, 比 Cu^{2+} 对藻的急性毒性试验的 EC_{50} (0.204mg/L)少了一倍.

关键词 光合率, 藻类毒理, 测试指标

藻类测试不管是营养物质的刺激作用测试, 还是有毒物质的抑制或毒害测度, 多以批量培养的数量变化即藻群的生物量作为测试指标^[1-3]. 藻生物量作为测试指标, 尽管准确可靠, 但是试验时工作量较大, 测试的时间短则 2~4d, 长则 7~14d, 测试周期长. 光合作用是藻类重要的特征性的生理过程之一, 光合作用效率可以快速地测定^[4], 为了快速监测环境中各种污染物或各种排放物(如工业废水, 生活污水等)对水环境的胁迫和危害程度, 作者尝试建立一种以光合作用效率作为藻类毒性测试指标的方法. 在水体污染中, 重金属污染相当严重, 主要通过工业废水以及矿区地表径流和淋溶等方式污染水生态系统并对人类生存构成威胁, 对于重金属的排放有必要从各个营养层次进行测试, 为制定排放标准提供依据^[5]. 本文主要报道铜离子 $[Cu^{2+}]$ 对羊角月牙藻光合作用效率的抑制效应, 以此作为具体应用的例子.

1 材料与方法

1.1 材料 羊角月牙藻(*Selenasstrum capricornutum* Printz FACHB271), 试验前两周将固体藻种接种到液体 AAM 培养基中. 试验前将预养的藻液在无菌条件下离心 5min (4000r/min), 弃去上清, 用处置 15mg/L 的 $NaHCO_3$ 溶液重新悬浮藻细胞, 再离心, 重复两次最后以 15 mg/L⁻¹ $NaHCO_3$ 稀释备用.

1.2 受试毒物 氯化铜($CuCl_2$), 用重蒸水配成 158mg/L $CuCl_2$ 的贮存液. 正式试验时利用缺 Cu^{2+} 和 Na_2EDTA 的 AAM 培养基稀释至所需的浓度. 试验采用两个浓度系列的 Cu^{2+} 溶液

即系列 I: 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-3} , 1.0×10^{-2} , 1.0×10^{-1} 和 $1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$

系列 II: 3.16×10^{-4} , 3.16×10^{-3} , 3.16×10^{-2} , 3.16×10^{-1} 和 $3.16 \text{ mg} \cdot L^{-1}$

* 上海市科技发展基金资助
1999-08-16 收到; 1999-09-20 修回

每个系列重复 5 次实验。

1.3 操作步骤 调恒温水浴至所需的温度 22℃, 调节光辐射量为 $433.6 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. YSI - 5300 生物氧监测仪调至 100%, 待自动记录仪的指针稳定后, 将旋纽调至 90%. 5min 内监测仪显示变化不低于 87%, 则说明氧电极有效, 否则应当更换电极。

开动监测仪, 在反应杯中加入 10ml 备用藻液。把反应杯中的气泡全部排除, 接着开启拌器不断搅拌藻液, 当记录仪显示稳定后, 将藻液遮光 15min 作为藻类的呼吸作用, 然后打开光源, 使藻类进行光合作用 15 min. 往反应杯中注入 0.1ml 的 CuCl_2 溶液以达到实验所需的 Cu^{2+} 浓度。重复即更换一次新鲜藻液。叶绿素测定和线性回归分析按报道进行^[6,7]。

1.4 光合放氧率和抑制率的计算 按以下公式进行。

$$Y = a \cdot x \cdot (c \cdot t \cdot b)^{-1}$$

Y: 光合放氧率($\text{mg O}_2/\mu\text{g Chla} \cdot \text{h}$), a: 一定温度下的氧饱和度($\text{mg O}_2/\text{L}$), b: 试样的叶绿素 a 总量(μg), c: 记录仪的量程, x: 记录仪的量程的相对变化值, t: 测试时间

$$I_0 = (1 - Y_T / Y_C) \cdot 100$$

I_0 : 抑制率(%), Y_T : 处理组的光合放氧率, Y_C : 对照组的光合放氧率。

2 结果

2.1 浓度系列 I 试验结果

表 1 铜离子浓度系列 I 对月牙藻光合放氧的抑制作用

Tab. 1 Inhibition of heavy metal copper ion (series I) on photosynthesis ($\text{mg O}_2/\mu\text{g Chla} \cdot \text{h}$)
of *S. capricornutum* Printz

试验次数 Replica	$[\text{Cu}^{2+}] \text{ mg L}^{-1}$	对照 Control	1.0 $\times 10^{-4}$	1.0 $\times 10^{-3}$	1.0 $\times 10^{-2}$	1.0 $\times 10^{-1}$	1.0	Chla(μg)
			6.1	4.8	4.3	3.7	3.4	
1	放氧率 Evolution of O_2	0.76	0.60	0.54	0.46	0.42	0.26	2.73
	抑制率 Inhibition	0.0	21.1	29.0	39.5	44.7	65.8	
	氧变幅 Change of O_2 (%)	6.3	5.2	4.7	4.4	3.5	2.1	
2	放氧率 Evolution of O_2	0.83	0.68	0.62	0.58	0.46	0.28	2.59
	抑制率 Inhibition	0.0	18.1	25.3	30.1	44.6	66.4	
	氧变幅 Change of O_2 (%)	6.2	5.0	3.6	3.1	2.1	1.7	
3	放氧率 Evolution of O_2	0.90	0.73	0.52	0.45	0.30	0.25	2.35
	抑制率 Inhibition	0.0	18.9	42.2	50.0	66.7	72.3	
	氧变幅 Change of O_2 (%)	6.3	5.9	5.54	5.0	4.0	2.7	
4	放氧率 Evolution of O_2	0.88	0.82	0.75	0.69	0.55	0.37	2.46
	抑制率 Inhibition	0.0	6.72	14.77	21.59	37.5	58.0	
	氧变幅 Change of O_2 (%)	7.1	6.6	6.3	5.4	4.3	2.6	
5	放氧率 Evolution of O_2	0.93	0.87	0.83	0.71	0.57	0.34	2.59
	抑制率 Inhibition	0.0	6.45	11.8	23.7	38.7	63.4	

由表1.可知在五次试验中,每次试验结果随着铜离子浓度 $[Cu^{2+}]$ 的升高, $[Cu^{2+}]$ 对月牙藻光合放氧的抑制率增大.最低浓度组 $1.00 \times 10^{-4} mg/L$,其抑制率在6.0~20%之间, $[Cu^{2+}]$ 最高浓度组($1.00 mg/L$)的抑制率在58~72%,其对月牙藻的光合放氧的半数效应浓度,即抑制率在50%时的 Cu^{2+} 浓度均在 $0.01\sim 0.1 mg/L$ 之间.将每次试验结果中 Cu^{2+} 浓度及其对月牙藻光合作用的抑制率进行线性回归的统计分析,相关系数(r)在0.95%以上,经t检验相关显著($p<0.05$).其相应的回归方程如下:

$$\begin{aligned} I_{01} &= 61.1 + 10.5 \lg[Cu^{2+}] \quad (n=5, r=0.974) & EC_{50} &= 0.089 \\ I_{02} &= 60.1 + 11.6 \lg[Cu^{2+}] \quad (n=5, r=0.958) & EC_{50} &= 0.135 \\ I_{03} &= 76.3 + 13.1 \lg[Cu^{2+}] \quad (n=5, r=0.977) & EC_{50} &= 0.010 \\ I_{04} &= 52.7 + 12.5 \lg[Cu^{2+}] \quad (n=5, r=0.973) & EC_{50} &= 0.604 \\ I_{05} &= 57.0 + 14.1 \lg[Cu^{2+}] \quad (n=5, r=0.969) & EC_{50} &= 0.319 \end{aligned}$$

由此得出每次试验的半数效应浓度分别为0.089;0.135;0.010;0.605和0.319mg/L.平均值为0.2315(SV=0.2371, n=5).而所有试验的25对 $[Cu^{2+}]$ 浓度和抑制率I之间的线性回归关系为 $I_A = 61.4 + 12.4 \lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.881$), $EC_{50} = 0.1193$;同时各处理组五次的均抑制率与其对应浓度之间的线性回归方程与上述相同,但后者的r值比前者的高($r=0.987$),即后者的相关性比前者的好.

2.1 系列Ⅱ试验结果

表2 铜离子浓度系列Ⅱ对月牙藻光合放氧的抑制作用

Tab. 2 Inhibition of heavy metal copper ion (series II) on photosynthesis (mg O₂/μg Chla· h)
of *S. capricorutum* Printz

试验次数 Replica	$[Cu^{2+}] mg \cdot L^{-1}$	对照 Control	3.16 × 10 ⁻⁴	3.16 × 10 ⁻³	3.16 × 10 ⁻²	3.16 × 10 ⁻¹	3.16	Chla(μg)
			3.16 × 10 ⁻⁴	3.16 × 10 ⁻³	3.16 × 10 ⁻²	3.16 × 10 ⁻¹	3.16	Chla(μg)
1	氧变幅 Change of O ₂ (%)	5.9	5.6	4.9	3.8	2.3	0.7	
	放氧率 Evolution of O ₂	0.98	0.93	0.82	0.63	0.38	0.12	2.05
	抑制率 Inhibition	0.0	5.10	16.3	35.7	61.2	87.8	
2	氧变幅 Change of O ₂ (%)	7.5	7.0	6.1	4.8	3.0	1.2	
	放氧率 Evolution of O ₂	1.04	0.97	0.85	0.67	0.42	0.16	2.46
	抑制率 Inhibition	0.0	6.77	18.3	35.6	59.6	83.6	
3	氧变幅 Change of O ₂ (%)	5.2	4.8	4.3	2.9	1.8	0.5	
	放氧率 Evolution of O ₂	0.94	0.87	0.78	0.53	0.32	0.09	1.91
	抑制率 Inhibition	0.0	7.53	14.2	44.1	65.6	90.3	
4	氧变幅 Change of O ₂ (%)	6.5	6.1	5.7	4.6	3.0	1.3	
	放氧率 Evolution of O ₂	1.00	0.94	0.88	0.71	0.46	0.20	2.22
	抑制率 Inhibition	0.0	6.0	12.0	29.0	54.0	80.0	
5	氧变幅 Change of O ₂ (%)	6.8	6.4	5.9	4.9	3.2	1.4	
	放氧率 Evolution of O ₂	0.99	0.93	0.86	0.71	0.47	0.21	2.34
	抑制率 Inhibition	0.00	6.1	13.1	28.3	52.5	79.8	

由表 2. 可知:铜离子浓度 $[Cu^{2+}]$ 及其对光合放氧的抑制率有同样的正的线性关系,即抑制作用随着 $[Cu^{2+}]$ 浓度增大而增大.但是其最低浓度处理组($3.16 \times 10^{-4} mg/l$),和最高浓度组($3.16 mg/l$)的抑制率分别在 5.10~7.53% 和 79.8~90.3%,其对月牙藻的光合放氧的半数效应浓度均在 $0.0316\sim0.316 mg/L$ 之间.将每次试验结果中 Cu^{2+} 浓度及其对月牙藻光合作用的抑制率进行线性回归的统计分析,相关系数(r)在 0.975 以上,经 t 检验相关显著.其相应的回归方程如下:

	EC_{10}	EC_{50}	EC_{90}
$IA = 72.7 + 21.0Lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.989$)	1.03×10^{-3}	0.083	6.62
$IA = 70.0 + 19.5Lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.990$)	8.37×10^{-4}	0.094	10.5
$IA = 77.0 + 21.0Lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.992$)	7.37×10^{-4}	0.055	4.03
$IA = 64.7 + 19.0Lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.977$)	1.32×10^{-3}	0.168	21.4
$IA = 64.0 + 18.7Lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.975$)	1.29×10^{-3}	0.078	24.6

由这些方程得出每次试验的半数有效抑制浓度分别为 $0.0827, 0.0939, 0.0548, 0.1684$ 和 $0.0783 mg/L$. 平均值为 0.096 ($SV = 0.0431, n=5$). 而所有试验的 25 对 $[Cu^{2+}]$ 浓度和抑制率 I_A 之间的线性回归关系为 $I_A = 69.7 + 19.9Lg[Cu^{2+}]$ ($n=5, r=0.977$) $EC_{50} = 0.103$; 同时各处理组五次的平均抑制率与其对应浓度之间的线性回归与前者相同,但是后者的 r 值比前者的高($r=0.986$),即后者的相关性比前者的好.

3 分析和讨论

以上结果分析表明,每个系列各次试验的浓度和抑制效应之间的相关性各不相同,由此得出的半数有效抑制浓度也不一样,但是每个系列所有试验的总体相关所得出的 EC_{50} 非常接近. 系列 I 的 EC_{50} 为 0.119 ; 系列 II 的 EC_{50} 为 0.103 ; 其相对误差为 14.4% 比每个系列的五次试验得到的 EC_{50} 平均值之间的相对误差 83.11% 小得多. 这说明对藻类抑制试验的统计分析中应该利用所有的试验数据或者几次试验数据的平均值进行回归分析,即应该包括试验所取得的所有信息量.

从以上试验结果可知:系列 I 的试验结果得到的 Cu^{2+} 抑制率的覆盖区间较小, 五次的均值在 $4.24\sim65.12\%$ 之间; 每次试验获得的 EC_{50} 差别很大, 其标准差也大, 变异系数为 102.5% ; 而系列 II 试验结果, 其抑制率所包括的范围较广, 其均值在 $6.29\sim89.31\%$ 之间, 每次试验获得的 EC_{50} 差异较小, 变异系数为 45.1% , 故试验时, 受试浓度的设置应反映出最高的无作用(效应)浓度和最低的完全作用(或效应)浓度. 综合“水生生物毒性试验法”和“水污染的生物监测”中的观点, 以 EC_{10} 表示最高的无作用(效应)浓度和 EC_{90} 表示最低的完全作用(或效应)浓度. 则以系列 II 的试验结果所得到的全部信息量的回归分析方程, 计算获得 Cu^{2+} 对藻类光合效率的最高的无作用(效应)浓度和最低的完全作用(或效应)浓度分别为 $1.01 \times 10^{-3} mg/L$ 和 $10.43 mg/L$.

与 Cu^{2+} 对藻类生长的急性毒性试验比较, Cu^{2+} 对光合作用的抑制效应的半数有效浓度($EC_{50} = 0.105 mg/L$)比急性毒性的($EC_{50} = 0.204 mg/L$)少一倍. Vvisviki 等^[8]曾报道 Cu^{2+} 对 *Dunaliella minuta* 的 EC_{50} 为 $7.57 M$ (约 $0.481 mg/L$). Lasheen 等^[9]报道当 $Cu^{2+} 0.40 mg/L$ 对藻类的生长即有明显的影响. 林碧琴等综述: Cu^{2+} 浓度为 $0.75 mg/L$ 时对黄

群藻等金藻的生长完全抑制,对于野外栅藻 1.55mg/L 完全抑制生长, 10mg/l 完全抑制小球藻的生长; Shehate 和 Bader 等研究表明,影响栅藻生长率的 Cu^{2+} 浓度为 0.2mg/L . Tamai 和 Sasa 观察到铜离子对镰形纤维藻光系统 II 具有抑制作用。痕量的铜是藻类生长所必须的,但高浓度的铜对藻类有毒害作用。由于光合作用是藻类生长过程中一个重要的提供物质和输送能量的环节,同时光合作用过程是在亚细胞水平上的一种生理生化反应,因而光合作用对外部环境协调的反应就比整个细胞生长的多种生理生化复合过程的反应来得敏感和快速。由此可见这可能是 Cu^{2+} 对光合作用的抑制效应比其对整个细胞生长的抑制作用来得敏感的原因之一。

综上所述以光合效率作为藻类毒理测试指标,具有如下特点:

测试过程简便、快速,能够随时测定受试毒物的效应,亚细胞层次的生化反应,对毒物的毒害作用响应快,在 15min 内即可看出毒效应的程度。与藻类生长的急性毒性试验比较,测定一个样品的时间由 96h 缩短到 2h 。

灵敏性好,对于同一受试毒物和同一受试生物,如和藻类生长的急性毒性试验比较,其灵敏度约提高了一倍。

精度高,由于测试过程简捷,便于试验的多次重复,通过统计分析方法作出结论,提高了试验结果的精确度。从以上的结果分析可知,即使是不同的毒物浓度系列,尽管每次试验获得的 Cu^{2+} 的 EC_{50} 不同;但是由含有五次试验结果全部数据的线性回归方程得出的两个系列的 Cu^{2+} 浓度对藻类光合作用的半数有抑制浓度,两者非常接近。

参 考 文 献

- [1] Weber C. I. . Biological methods for the assessment of water quality. ASTM STP, 1973
- [2] APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed., APHA, washington DC, 1985, 687~737
- [3] 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
- [4] 林碧琴,谢淑琦编著.水生藻类与水体污染监测.沈阳:辽宁大学出版社,1988, 207~223
- [5] 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.
- [6] 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, 272~28.
- [7] 童一中编著.生物统计法.长沙:湖南科学出版社,1987, 339~395
- [8] Visviki I , Rachlin J W. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1991, **20**: 271~175
- [9] Lasheen M R, Shehata S A , Ali G H. Effect of copper and cadmium copper and chromium (VI) on the Nile water algae. *Water, Air and Soil Pollution*, 1990, **50**: 19~30

PHOTOSYNTHESIS RATE AS AN INDEX OF THE ALGAL TOXICITY TEST

Chen Dehui^{1,2)}, Wang Gang¹⁾, Zhang Zongshe¹⁾ and Liu Yongding²⁾

(¹)Shanghai Teachers' University, Shanghai 200234

(²)Institute of Hydrobiology The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract Photosynthetic rate of algae, expressed as oxygen evolution per unit chlorophyll a and one hour, was used as an index of chemical compounds toxicity. It is obvious that the toxicity can be measured exactly, briefly and quickly; and can be carried out anytime to detect the process of photosynthesis. In comparison with the routine acute toxicity test of algae, the temporal scale of whole test range is reduced from 96hr to 2 hr. And the sensitivity was promoted about one time. The 50 % of Effective Concentration (EC_{50}) of Cu^{2+} on algal photosynthesis is 0.105 mg l^{-1} , only about one half of that in acute test of Cu^{2+} on algal toxicity.

Key words Photosynthesis rate, Algal toxicity, Test index