有机污染物对藻类毒性的测定*

黄国兰 戴树桂 孙红文

(南开大学环境科学系, 天津, 300071)

竺迺恺 王怀瑾 夏晞娟

(中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

刘静玲 郎佩珍 陆光华

(东北师范大学环境科学系, 长春, 130024)

摘 要

藻类是研究水生毒理学的很好的材料之一, 对其毒性是评价化合物危害的基本数据, 也是研究化合物结构与生物效应的手段之一。通过测定工业废水, 数种硝基芳烃及多种有机锡对藻类的毒性, 发现剂量与效应间有很好的相关性, 化合物结构与效应之间也有一定的规律。

关键词: 藻类, 半数生长抑制浓度, 硝基芳烃, 有机锡。

藻类广泛存在于各种天然水体, 它种类繁多, 个体小, 生长繁殖迅速, 对毒物的毒性敏感。它长时间在水体中生长, 能较好地反映有害物的综合效应。它又是水体的初级生产力之一, 藻类种群和数量的变化, 将影响鱼、虾等水产的发展。藻类中有许多是世界性品种, 实验室培养也比较容易, 方法简便, 实验周期短, 因此是研究水生生态毒理学很好的也是必不可少的材料之一。

1. 仪器、试剂及藻种

1.1 仪器

光照培养箱、恒温振荡器、离心沉淀器、显微镜、分光光度计、照度计、血球计数板、烧杯和三角瓶玻璃仪器。

1.2 培养液

(1) European Communities 培养液^[1]: NH_4Cl 15mg/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15mg/l, KH_2PO_4 1.6mg/l, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.08mg/l, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1mg/l, H_3BO_3 0.185mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.415mg/l, ZnCl_2 3×10^{-3} mg/l, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10^{-5} mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.5×10^{-2} mg/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7×10^{-3} mg/l, NaHCO_3 50mg/l。可将

* 国家自然科学基金资助项目。

常量成分及微量成分分别配成储备液,再混合,并调 pH 至 7.2—7.5.

(2) SE 培养液 (中国科学院武汉水生所提供配方): NaNO_3 250mg/l, CaCl_2 26mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75mg/l, K_2HPO_4 75mg/l, KH_2PO_4 175mg/l, NaCl 25mg/l, 土壤浸出液 40 ml/l, EDTA-Fe 1mg/l, A_5 1ml/l. 其中,土壤浸出液为 500g 花园土加 1000ml 水,搅匀浸泡 48h 以上,取上清液灭菌后备用; EDTA-Fe 为 0.901g FeCl_3 溶于 10ml 1mol/l HCl 中,与 10ml 0.1mol/l EDTA-Na 混合稀至 1L; A_5 为每升水中含 H_3BO_3 2.86g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08g, Na_2MoO_4 0.021g.

(3) D1 培养液 (中国科学院武汉水生所提供配方): NaNO_3 120mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 70mg/l, K_2HPO_4 40mg/l, KH_2PO_4 80mg/l, CaCl_2 20mg/l, NaCl 10mg/l, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, MnSO_4 2mg/l, Fe-Cit 5mg/l, 土壤浸出液 20ml/l, A_5 1ml/l.

待测化学品以水配制成不同浓度.

1.3 藻种

常用有小球藻 (*Chlorella vulgaris*, *C. Pyrenoidosa*), 栅列藻 (*Sceuedesmus subspicatus*, *S. quadricauda*, *S. obliquus*), 月芽藻 (*Seleuatrum capricornutum*), 扁藻 (*Platymonas sp.*) 等^[2-4].

2. 操作步骤

2.1 藻种预培养

实验前两周将保存的藻种转移到三角烧瓶中进行扩繁和驯化培养,4d 移种一次,使藻种达到纯化和同步生长,并记录每天的生长速度,做出生长曲线.

2.2 实验条件

将培养好的藻种,在 3000r/min 离心 5min,吸去上清液,加入适量等渗缓冲液,悬浮洗涤,再离心,以去除营养物及其他物质,在 60ml 试验液中加入适量藻液,使初始浓度约 10^4 — 10^5 个细胞/ml,培养温度 20 — $25 \pm 1^\circ\text{C}$,不同种类的适宜温度有所不同,以白色日光灯连续照明或 12h 照明,12h 黑暗,平均照度 4000 lux 往复或旋转振荡培养.

除对照外,各待测化合物设 5 个浓度,每个浓度最少做两个重复.

实验前及实验后 12, 24, 36, 48, 96h, 分别记录藻类的生长情况. 通常有细胞计数法、光密度法、叶绿素 a 法、ATP 测法、荧光法、 ^{14}C 同位素法等^[1,3,5].

3. 计算方法

3.1 阻碍生长实验法计算 EC

$$U = \ln \frac{(N_t/N_0)}{t-t_0} \quad U = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t-t_0}$$

U : 相对最大生长速度; N_0 , N_t : 分别为对数期开始期 (t_0) 和后期 (t) 的细胞数.

$$\text{阻碍率} = \frac{U_b - U_{\text{tox}}}{U_b} \times 100$$

U_b : 对照组的生长速度, U_{tox} : 有供试化合物时的生长速度.

将供试化合物浓度与生长速度阻碍率进行一元线性回归,求 EC_{50} 值.

3.2 概率单位法计算 EC_{50}

以对照组的生长百分率 (K) 为 100%, 求出各处理组的生长百分率 (r), 查百分比与概率单位对照表得经验概率单位; 以浓度的对数为横座标, 以经验概率单位为纵坐标制图, 在曲线上任选两点, 对应的概率单位 Y_1, Y_2 和剂量对数 X_1, X_2 相关.

$$\frac{Y-Y_1}{X-X_1} = \frac{Y_2-Y_1}{X_2-X_1}; \quad Y = a + bX$$

求出 a, b 值, 代入各剂量对数, 求得概率单位计算值, 反查表得估计生长率 (M) (以小数表示) 和估计生长百分率 (W) (以百分数表示):

$$\text{求卡方值} = \frac{(r-W)^2}{KM(1-M)}$$

计算时不带百分号, 将各处理的卡方值相加 ΣX^2 , 查卡方值表, 凡反应百分率为 0 或 100% 的剂量数不计算在内, 若 P 大于 0.05 表示差异不显著, 该试验可靠, 即可计算 EC_{50} 值.

4. 实例介绍与注意事项

4.1 矿山废水对藻类的毒性^[6]

以小球藻 (*C. Pyrenoidosa*) 研究废水 (其中含有浮选剂及重金属等) 的毒性, 用 SE 培养液稀释废水, 配成相差 1.5 倍的 7 个浓度级别, 测定光密度变化, 经计算其 48h 时的 $EC_{50} = 1/15.29$ 稀释比. 若以上游的清洁河水作为稀释液, 其 $EC_{50} = 1/60.67$, 显示毒性偏高.

4.2 九种硝基芳烃化合物对藻类的毒性

用斜生栅藻 (*S. obliquus*) 研究了九种硝基芳烃化合物的毒性, 由表 1 可见, 不同结构的硝基芳烃毒性不同.

表 1 九种硝基芳烃对斜生栅藻的 EC_{50} 值 (48h)

Table 1 EC_{50} of *S. obliquus* for nine nitryl aromatic hydrocarbons

化 合 物	lg EC_{50}	化 合 物	lg EC_{50}
邻-硝基苯	5.04	邻-硝基氟苯	3.94
间-硝基苯	5.06	间-硝基氟苯	3.95
对-硝基苯	4.96	对-硝基甲苯	3.74
2,4-二硝基甲苯	4.52	硝基苯	3.26
2,6-二硝基甲苯	4.06		

经预培养测定斜生栅藻进入对数生长初期大约是 1—1.5d, 此时接种最好, 在以后 48h 的试验期中, 对照组细胞数可增加 10 倍, 实验组抑制效果明显, 误差也较小; 细胞计数时以 4 次读数为好, 即保证了可信度, 又不至太花时间; 因受毒物的作用, 细胞形态结构及分裂会受到影响, 除非原生质完全解体, 其他均计算在内, 正在分裂而未成为独立个体的细胞, 仍按一个计算.

4.3 不同形态有机锡化合物对藻类的毒性

研究了十六种不同形态有机锡化合物 (R-Sn-x) 对斜生栅藻 (*S. obliquus*) 及扁藻 (*Platymonas sp.*) 的生长影响. 测定了 EC_{50} 要通过显微摄影观察藻细胞的形态、结构和分裂. 十六种有机锡化合物都不同程度地影响藻的生长, 低浓度和中等浓度时, 细胞体积增大, 叶绿体分散, 子细胞不能分开, 有的形成链状或星芒状; 高浓度时, 叶绿体褪色, 质壁分离, 细胞死亡. 根据 EC_{50} 和分子量 (M_{Sn}) 计算各化合物的毒性值 $T = (EC_{50}/M_{Sn})^{-1}$, 可以看出其毒性强弱与形状有关, 三取代有机锡 $\gg$ 二取代有机锡 $\geq$ 一取代有机锡; 同一取代系列中, 烷基 R 越大, 毒性越大; 当 X 是易解离的不同无机离子时, 对毒性影响不大, 但若 X 是较大的难解离的有机基团时, 则会延缓毒性作用的表现. 十六种有机锡化合物对这两种藻的 EC_{50} 具有一定的相关性.

参 考 文 献

- [1] Official Journal of the European Communities, 1988. Algae Inhibition Test, 89—94
- [2] Deneer J W et al., 1989. Aquat, Toxicol., 83—98
- [3] OECD, 1981. Test Guideline 201, Algae Growth Inhibition Test.
- [4] Wang P T S, Couture P, 1985. Toxicity Testing Using Microorganisms, Vol. I, 80—96
- [5] 国家环境保护局, 1990. 化学品试剂准则. 化学工业出版社, 168—177
- [6] Zhu Naikai, Wang Huajing, Xia Xijuan et al., 1992. Study on Toxicity of Wastewater from Mining Activities on Some Biota, *J. of Environmental Sciences (China)* 4 (3) : 116—123

DETERMINATION OF THE TOXICITY OF ORGANIC POLLUTANTS TO ALGAE

Huang Guolan Dai Shugui Sun Hongwen

(Department of Environmental Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Zhu Naikai Wang Huajin Xia Xijuan

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085)

Liu Jingling Lang Peizhen Lu Guanghua

(Department of Environmental Sciences, Northeastern Normal University, Changchun, 130024)

ABSTRACT

Algae is one of the best materials for aquatic toxicology study. The toxicities to them are the basic data for evaluating hazard of chemicals and the determinations a nice approach for studying the relations between chemical structure and bio-effects. This study indicated that there are excellent relationship between dose and effects as well as some routes for chemical structure and effects by determining the toxicity to algae for industrial wastewater, some nitril aromatic hydrocarbons and organic tins.

Keywords: algae, EC_{50} , nitril aromatic hydrocarbons, organic tins.