

铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的毒性效应

阎海,王杏君,林毅雄,温官(中国科学院生态环境研究中心 环境水化学国家重点实验室,北京 100085)

摘要:运用评价化学品毒性藻类测试的标准实验方法,得到铜、锌和锰对蛋白核小球藻生长的安全浓度分别为 $31.8 \mu\text{g/L}$ 、 $65.0 \mu\text{g/L}$ 和 5.5mg/L ,抑制蛋白核小球藻生长的 96h- EC_{50} 分别为 $67.3 \mu\text{g/L}$ 、 $473.0 \mu\text{g/L}$ 和 17.0mg/L .实验结果表明无论从安全浓度还是从 96h- EC_{50} 考虑,都证明抑制蛋白核小球藻生长的毒性由大到小的顺序是铜 > 锌 > 锰.不同金属离子与藻细胞的不同亲和性是导致金属离子抑制蛋白核小球藻生长毒性差异的主要原因.

关键词:蛋白核小球藻;铜;锌;锰;毒性

中图分类号:X173 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2001)01-04-0023

Toxic Effects of Cu, Zn and Mn on the Inhibition of *Chlorella pyrenoidosa*'s Growth

Yan Hai, Wang Xingjun, Lin Yixiong, Wen Guan(State Key Lab. of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: A standard method of algal bioassay for evaluating the toxicity of toxic chemicals was applied in the study. It was found that safety concentrations of Cu, Zn and Mn for *Chlorella pyrenoidosa*'s growth were $31.8 \mu\text{g/L}$, $65.0 \mu\text{g/L}$ and 5.5mg/L , and 96h- EC_{50} were $67.3 \mu\text{g/L}$, $473.0 \mu\text{g/L}$ and 17.0mg/L , respectively. According to both safety concentration and 96h- EC_{50} , the toxic sequences of these metals from high to low on the inhibition of *C. pyrenoidosa*'s growth were Cu, Zn and Mn. The different affinities between different metal ions and algal cells are mainly responsible for the different inhibitions of *C. pyrenoidosa*'s growth.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; Cu; Zn; Mn; toxicity

美国环保局规定保障供水中铜、锌和锰的安全浓度分别为 1.0mg/L 、 50mg/L 和 $50 \mu\text{g/L}$ ^[1].目前,关于藻类与重金属之间相互作用的研究主要集中在藻类对金属的富集和金属对藻类的毒性 2 个方面.富集量因藻种和金属的种类、形态及环境条件特别是 pH 的不同而变化^[2,3].在金属的毒性方面,Edding^[4]的实验表明,铜抑制辐射射线藻(*Plectonema radiosum*)和席藻类(*Phormidium* sp.)的半效应浓度(EC_{50})分别为 318mg/L 和 339mg/L .沈德中等^[5]发现,重金属可导致水田土壤中藻类种群结构的变化,铜和锌的临界值分别为 50mg/kg 和 300mg/kg .王菊英等^[6]在重金属对金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*)的亚微结构变化

进行了研究,发现铜和锌可造成线粒体损伤并阻碍蛋白质合成而抑制金藻的生长. Webster^[7]的研究表明,铜可使莼藻(*Ulva lactuca*)细胞内的钾和镁不可逆转地丧失,从而对藻细胞膜的完整构成破坏.此外,Rojickovapadrtova 等^[8]在 7 种不同蓝绿藻对铜和锌的不同敏感性和毒性测试方法方面进行了研究.为了进一步确定重金属对藻类生长的安全浓度和 96h 抑制藻类生长的半效应浓度(96h- EC_{50}),本研究选择铜、锌和锰 3 种重金属,采用化学品毒性藻类测试的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870133)

作者简介:阎海(1962~),男,在职博士,副研究员,主要研究方向为环境生物学.

收稿日期:2000-02-17

标准实验方法,分别研究它们对淡水标准实验藻种蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长的毒性效应.在制定水质排放标准和进行水质评价方面具有重要意义.

1 实验部分

1.1 实验材料

蛋白核小球藻购自中国科学院水生生物研究所.所用化学试剂 CuCl_2 、 ZnCl_2 和 MnCl_2 等都是分析纯,使用前未经进一步纯化.

1.2 实验方法

(1) 实验条件 采用水生 4 号培养基^[9],所用玻璃器皿和培养基均经过高温 $124\text{ }^\circ\text{C}$ 20 min 的灭菌,实验前又在洁净工作台内经 20 min 的紫外线灭菌.实验所用容器为 100 ml 玻璃三角瓶,培养量为 25 ml.实验平行样 3 个,重复 3 次.实验温度 $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$,12h 光照黑暗循环,光照强度 3500lx.用分光光度计在 650nm 下测定藻液光密度($\text{OD}_{650\text{nm}}$)以示蛋白核小球藻的生长,藻液初始 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 为 0.010.在平行样之间的相对偏差小于 10% 时,实验数据取自 3 个平行样的均值.

(2) 安全浓度 在确定安全浓度的实验中,金属离子浓度呈几何级数增加,以藻液 96h $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 为指标,通过均值最小无显著差异法(LSD)计算^[10],分别确定出铜、锌和锰对蛋白核小球藻生长的安全浓度.

(3) 半效应浓度 在确定 96h 半效应浓度(96h EC_{50})的实验中,根据初步实验的结果,以用直线内插法确定的 96h EC_{50} 为中点,各向两边以等差数列的形式延伸 2 个浓度,共 5 组浓度和 1 组对照进行.根据实验数据,采用机率单位法计算出 96h EC_{50} ^[11].为了保证计算结果的可信度,对金属浓度对数与机率单位之间的剂量反应方程进行了 χ^2 检验.

2 结果与讨论

2.1 铜、锌和锰对蛋白核小球藻生长的安全浓度

图 1、2 和 3 显示,分别随着铜、锌和锰浓度

的增加,96h $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 逐渐减小,说明抑制蛋白核小球藻生长的毒性加强.根据所测定的 $\text{OD}_{650\text{nm}}$,经采用 LSD 法在 $\alpha = 0.05$ 水平进行计算^[10],分别得到在铜、锌和锰抑制藻类生长的均值最小无显著差异, $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 值分别为 0.008、0.023 和 0.010.从图 1、2 和 3 中可以看出,在铜、锌和锰的不同初始浓度下,与对照生长($\text{OD}_{650\text{nm}}$)的差值小于最小无显著差异的最高浓度分别为 $31.8\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $65.0\text{ }\mu\text{g/L}$ 和 5.5 mg/L ,由此确定这 3 个浓度分别是铜、锌和锰对蛋白核小球藻生长的安全浓度.同时也说明,蛋白核小球藻对这些金属离子的敏感度由大到小的顺序是铜 > 锌 > 锰.

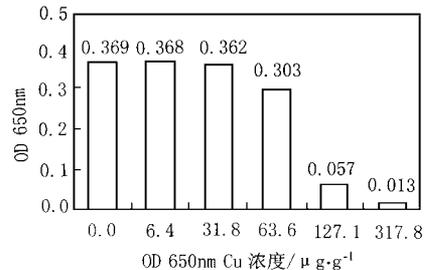


图 1 铜对蛋白核小球藻生长的效应

Fig.1 Effect of Cu on *C. pyrenoidosa*'s growth

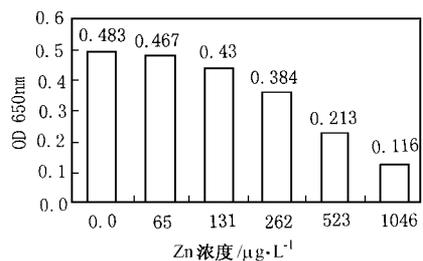


图 2 锌对蛋白核小球藻生长的效应

Fig.2 Effect of Zn on *C. pyrenoidosa*'s growth

2.2 铜、锌和锰分别抑制蛋白核小球藻生长的 96h EC_{50}

表 1 显示铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的 96h EC_{50} 实验结果,铜、锌和锰浓度对数(x)与机率单位(y)分别进行一元线性回归,得到如下剂量反应方程:

$$\text{铜: } y = 15.36 - 5.67x \quad r = -0.991 \quad (1)$$

$$\text{锌: } y = 12.33 - 2.74x \quad r = -0.997 \quad (2)$$

$$\text{锰: } y = 12.20 - 5.85x \quad r = -0.985 \quad (3)$$

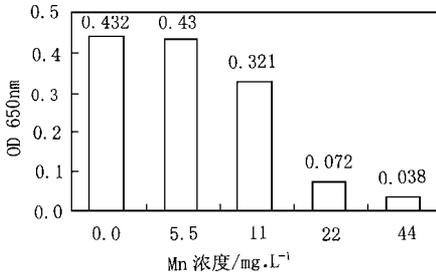


图 3 锰对蛋白核小球藻生长的效应

Fig.3 Effect of Mn on *C. pyrenoidosa*'s growth

当机率单位为 5 时,分别通过上述方程 1、2 和 3 计算得到铜、锌和锰的浓度对数分别为 1.83、2.68 和 1.23,从而分别得到铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的 96h-EC₅₀ 分别为 67.3 μg/L、473.0 μg/L 和 17.0 mg/L.同时也再次说明,金属抑制蛋白核小球藻生长的毒性由大到小的顺序仍是铜 > 锌 > 锰.

铜、锌和锰属于过渡金属,在安全浓度内, > 锌 > 锰的主要原因.

表 1 铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的结果

Table 1 Results of Cu, Zn and Mn on the inhibition of *C. pyrenoidosa*'s growth

Cu 浓度 / μg·L ⁻¹	0	50	60	70	80	90
Cu 浓度对数(x)		1.70	1.78	1.85	1.90	1.95
OD _{650nm}	0.423	0.316	0.263	0.204	0.151	0.092
反应率 / %	100.00	74.70	62.17	48.23	35.70	21.75
机率单位(y)		5.661	5.313	4.955	4.631	4.220
Zn 浓度 / μg·L ⁻¹	0	327	392	458	523	589
Zn 浓度对数(x)		2.51	2.59	2.66	2.72	2.77
OD _{650nm}	0.461	0.310	0.271	0.232	0.213	0.180
反应率 / %	100.00	67.25	58.79	50.33	46.20	39.05
机率单位(y)		5.453	5.224	5.010	4.904	4.722
Mn 浓度 / mg·L ⁻¹	0	13.2	15.4	17.6	19.8	22.0
Mn 浓度对数(x)		1.12	1.19	1.25	1.30	1.34
OD _{650nm}	0.428	0.307	0.258	0.212	0.154	0.096
反应率 / %	100.00	71.73	60.28	49.53	35.98	22.43
机率单位(y)		5.572	5.258	4.986	4.639	4.243

2.3 剂量反应方程的 X² 检验

上述剂量反应方程是否真实反映了金属抑制蛋白核小球藻生长的毒性效应,对上述剂量

反应方程分别进行的 X² 检验结果表明(表 2),查 X² 表,当自由度为 3 时, X_{0.05}² = 7.82,而计算的 X² 分别为 1.15、0.12 和 1.83,因为 X_{0.05}²

这些金属可作为酶的辅助因子促进藻类的光合作用和生长,这在本实验中也明显观察到这一现象.但在高浓度下,这些金属又会抑制藻类的生长.当藻类与金属离子开始接触时,藻类首先表现为对金属的富集.其原因是因为藻类细胞壁带有负电荷和氨基、羟基等官能团,这些结构特点决定了对带有正电荷的金属离子能够吸引富集.过渡金属一般倾向于同氧、硫和氮进行结合,生成稳定的络合物.藻类对不同金属离子的富集效率和选择性与静电引力或水合离子的半径有关.一般藻类对金属离子的亲和性是铜 > 锌 > 锰^[3].因为与锌和锰相比,铜与蛋白核小球藻有更强的亲和性,因此细胞壁更容易结合和沉积铜,从而使细胞表面许多活性基团因与铜结合后丧失了生物活性,进而更强地抑制了蛋白核小球藻的光合作用和生长.因此可推断,金属离子与藻类的亲和性是导致金属抑制藻类生长的主要原因之一,与藻类亲和性强的金属离子对抑制藻类生长的毒性越强,这也是抑制蛋白核小球藻生长的毒性由大到小的顺序是铜

$> X^2$, 故上述剂量反应方程均符合精度要求, 计算出的 96h-EC₅₀ 真实可靠.

表 2 剂量反应方程的 X^2 检验结果

Table 2 X^2 test results of reaction equations of metals

金属	浓度对数 (x)	计算机率 单位(y)	反应率 (p)	对照反应 率(k)/%	实际反应 率(r)/%	kp	$r \cdot kp$	$(r \cdot kp)^2 /$ $kp(1-p)$
铜	1.70	5.726	0.7653	100	74.70	76.53	-1.83	0.186
	1.78	5.273	0.6077	100	62.17	60.77	1.40	0.082
	1.85	4.876	0.4520	100	48.23	45.20	3.03	0.371
	1.90	4.593	0.3415	100	35.70	34.15	1.55	0.107
	1.95	4.309	0.2448	100	21.75	24.48	-2.73	0.403
	X^2							
锌	2.51	5.453	0.6725	100	67.25	67.25	0.00	0.000
	2.59	5.233	0.5915	100	58.79	59.15	-0.33	0.005
	2.66	5.042	0.5160	100	50.33	51.60	-1.27	0.065
	2.72	4.877	0.4523	100	46.20	45.23	0.97	0.038
	2.77	4.740	0.3967	100	39.05	39.67	0.62	0.016
	X^2							
锰	1.12	5.642	0.7407	100	71.73	74.07	-2.34	0.285
	1.19	5.232	0.5907	100	60.28	59.07	1.21	0.061
	1.25	4.881	0.4537	100	49.53	45.37	4.16	0.698
	1.30	4.589	0.3397	100	35.98	33.97	2.01	0.180
	1.34	4.355	0.2583	100	22.43	25.83	-3.40	0.603
	X^2							

3 结论

(1) 采用化学品藻类毒性测试的标准实验方法, 通过均值最小无显著差异法计算, 分别得到铜、锌和锰对蛋白核小球藻生长的安全浓度分别为 31.8 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、65.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 5.5 mg/L .

(2) 采用化学品藻类毒性测试的标准实验方法, 通过金属浓度对数与机率单位的剂量反应方程计算, 得到铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的 96h-EC₅₀ 分别为 67.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、473.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 17.0 mg/L . 经 X^2 检验, 剂量反应方程符合精度要求, 计算出的 96h-EC₅₀ 真实可靠.

(3) 无论从安全浓度还是从 96h-EC₅₀ 考虑, 都说明抑制蛋白核小球藻生长的毒性由大到小的顺序为 $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Mn}$. 不同金属离子与藻细胞的不同亲和性是导致金属离子抑制蛋白核小球藻生长毒性差异的主要原因.

参考文献:

- 1 美国环保局编, 许宗仁译. 水质评价标准. 北京: 中国建筑工业出版社, 1981. 63 ~ 285.
- 2 严国安等. 藻类净化污水的研究及其进展. 环境科学进展, 1995, 3(3): 45 ~ 54.
- 3 李志勇等. 利用藻类去除与回收工业废水中的金属. 重庆环境科学, 1997, 19(6): 27 ~ 32.
- 4 Edding M et al. Copper Transfer and Influence on a Marine Food Chain. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1996, 57(4): 617 ~ 624.
- 5 沈德中等. 铜、镍、铅、锌 4 种重金属对水田土壤藻类的综合效应. 中国环境科学, 1994, 14(4): 277 ~ 281.
- 6 王菊英等. 重金属对湛江叉鞭金藻亚微结构的影响. 海洋环境科学, 1998, 17(4): 11 ~ 16.
- 7 Webster E A et al. Perturbation of Monovalent Cation Composition in *Ulva lactuca* by Cadmium, Copper and Zinc. Biometals, 1996, 9(1): 51 ~ 56.
- 8 Rojickovapadrtova R et al. Selection and Sensitivity Comparisons of Algal Species for Toxicity Testing. Chemosphere, 1999, 38(14): 3329 ~ 3338.
- 9 华汝成等著. 单细胞藻类的培养与利用. 北京: 农业出版社, 1980. 278 ~ 279.
- 10 南京农业大学主编. 田间实验和统计方法. 北京: 农业出版社, 1990. 91 ~ 100.
- 11 周永欣等著. 水生生物毒性实验方法. 北京: 农业出版社, 1989. 175 ~ 176.