

应用腰鞭毛虫评价水体重金属污染的方法研究

袁立娟, 何孟常*

(北京师范大学环境学院, 水环境模拟国家重点实验室, 北京 100875)

摘要: 鉴于腰鞭毛虫(dinoflagellates)生物毒性测试方法尚处于起步阶段, 缺少各种污染物相应的毒性评价标准. 利用美国海军研发的高新技术 QwikLite™ 测试腰鞭毛虫发光量变化, 应用腰鞭毛虫对重金属的响应关系评价水体重金属污染. 结果表明, 单一重金属的生物毒性 $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > As^{5+} > Pb^{2+} > Cr^{6+}$; 2 种、3 种和 4 种重金属联合毒性基本以协同作用为主, 个别有拮抗现象; pH 对腰鞭毛虫影响不显著, 可以直接将其应用于天然水体的生物毒性测试, 但是 pH 对 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 的毒性有较大影响, 测定这 2 类离子时需扣除 pH 影响; 腰鞭毛虫不易受水体中营养物质影响, COD 变化对腰鞭毛虫与 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 的响应关系影响显著. 腰鞭毛虫对重金属污染敏感性好, 响应范围窄, 稳定性高, 是水体重金属生物毒性测试的良好物种.

关键词: 腰鞭毛虫; 重金属; 生物毒性; QwikLite™; IC_{50} 值

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)10-2918-06

Use of Dinoflagellates as a Metal Toxicity Assessment Tool in Aquatic System

YUAN Li-juan, HE Meng-chang

(State Key Laboratory of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Although dinoflagellates have been used to assess biological toxicity of contaminants, this method still lacks of corresponding toxicity assessment standard. This study appraised the toxicity of selected heavy metals to dinoflagellates based on the dinoflagellates bioluminescence with QwikLite™ developed by the United States Navy. The results show that single heavy metal biological toxicity is in the order: $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > As^{5+} > Pb^{2+} > Cr^{6+}$; Two, three and four heavy metal mixture experiments show synergism primarily, antagonism is in minority. pH has not remarkable effect on dinoflagellates, they can be applied directly in natural water, but pH influence Hg^{2+} and Cu^{2+} toxicity greatly, eliminating the influence of pH is essential when doing these two kind of ions measurements. The nutrients has little influence on dinoflagellates, change in COD has obvious effect on the response relationships between dinoflagellates and Hg^{2+} or Cu^{2+} . Metal toxicity assessment using dinoflagellates shows great sensitivity, narrow response scope and high stability. Dinoflagellates are good species for heavy metal biological toxicity test in aquatic system.

Key words: dinoflagellates; heavy metal; biological toxicity; QwikLite™; IC_{50}

水体中的重金属能通过食物链在生物体内富集, 引起水生生物种群和群落结构变化, 甚至会导致水生生态系统的破坏和崩溃, 不但严重威胁到饮用水水源的水质, 还会造成致畸、致癌、致突变等长期危害. 水体重金属污染一直受到广泛关注, 为保障水环境质量和水系周边居民身体健康, 开发高效、准确、便捷的水质毒性测定和评价方法迫在眉睫.

水质分析测定一般采用理化分析和生物测试 2 种方法^[1]. 由于理化方法只能检出各种成分的种类和含量, 既不能确定 pH、Eh 等变化对污染物生物有效性的影响, 也无法确定不同污染物之间的相互作用, 更不能从整体上反映水质的优劣和生物所受的综合毒性强度. 因此越来越多的学者倾向于研究能表征水质综合毒性方法, 其因灵敏、简便、准确性好等优点被广泛应用. 发光细菌法(Microtox)已经发展比较成熟, 于 1995 年被列入国家标准^[2]. 除发光细菌外, 发光藻在适当条件下也能发出肉眼可见的蓝绿色光, 20 世纪 80、90 年代, 发光藻类的研究兴

起^[3~5]. Lapota 等^[6,7]应用腰鞭毛虫(dinoflagellates)测试水体、沉积物和垃圾沥出液的生物毒性, 取得了较好的研究成果. 腰鞭毛虫是海洋表面最普遍的生物发光源, 是海洋生态系统的初级生产者和能量供应者, 也是海洋食物链中的基础环节. 污水经由河水进入大海, 海藻是最直接受影响的生物, 因此利用海藻进行毒性测试比单靠化学分析更能反映污染物对环境的影响.

本实验采用 QwikLite™ 毒性测试仪测定腰鞭毛虫发光量变化, 探讨腰鞭毛虫生物发光毒性测试方法的准确性、灵敏度、稳定性和精确度, 确定几种常见且毒性较大重金属的 IC_{50} 值(半数抑制浓度), 并在此基础上对重金属的联合毒性进行研究, 分析影

收稿日期: 2008-11-26; 修订日期: 2008-12-22

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418502); 香港亚太水业有限公司科研计划项目

作者简介: 袁立娟(1983~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向环境化学, E-mail: yuanlijuan96@yahoo.cn

* 通讯联系人, E-mail: henc@bnu.edu.cn

响腰鞭毛虫发光的几个重要因素,确定最佳测试条件.

1 材料与方法

1.1 藻类来源和培养条件

实验腰鞭毛虫品种为 *Pyrocystis lunula*, 由香港亚太水业有限公司提供, 培养液 ESM (enriched seawater medium) 用人工配制的海水外加某些维生素、矿物质和 pH 缓冲液混合而成, 藻类浓度为 3 000 个/mL, 放于 250 mL 聚乙烯塑料瓶中在光照培养箱中培养.

温度: $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 光照: 白色日光灯照明, 光照度 2 000 ~ 3 000 lx, 光暗比 12 h: 12 h.

1.2 实验仪器和试剂

QwikLite™ (由香港亚太水业有限公司提供); 恒温光照培养箱; 显微镜; 电子分析天平; pH 计; 烘箱.

五水硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 氯化汞 (HgCl_2); 氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$); 氯化镉 ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$); 砷酸钠 ($\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); 硝酸铅 [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$]; 葡萄糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$); 盐酸 (HCl); 氢氧化钠 (NaOH); 所有试剂均为分析纯.

1.3 实验步骤和方法

参照 ASTM 的标准 E1218-04, 实验设置 5 个处理浓度组和 1 个空白对照组, 每组 6 个平行样, 实验溶液体积为 3.25 mL (0.5 mL 藻类 + 2.75 mL 海盐水或待测溶液), 实验周期为 24 h (1 个光暗循环), 每一实验至少 2 次重复, 实验终点为 IC_{50} (以发光量计), 用 QwikLite™ 测试前需要有 3 ~ 4 h 的黑暗时间; 测试完毕丢弃测试管, 不重复使用; 实验用水为去离子水; 稀释液选用 3% NaCl 溶液, 实验中所用烧杯和测试管在使用前均在 3% 海盐水中浸泡 24 h.

1.3.1 单一重金属 IC_{50} 值测定

通过预试验确定单一重金属毒性测试的浓度范围后, 向腰鞭毛虫培养液中添加等体积不同浓度的重金属溶液, 控制试样毒物浓度为 0.0 mg/L, 用作空白对照. 在 12 h: 12 h 光暗循环条件下培养 24 h 后测定发光量变化, 计算 IC_{50} 值. IC_{50} 值的确定是在直角坐标上, 横坐标为实验毒物的浓度, 纵坐标为相对发光度 (% , 与对照组对比), 从 50% 相对发光度与曲线交点引一条水平直线至浓度坐标, 即可得到 IC_{50} 值.

1.3.2 联合毒性评价

参考刘国光等^[8]的研究方法, 在得到单一重金

属的 IC_{50} 值后, 应用水生毒理联合效应相加指数 AI (Addition Index) 法^[9]评价不同重金属之间的联合作用, 即在单一重金属毒性试验的基础上, 按等毒性比 (毒性比为 1:1) 浓度混合原则设计试验方案, 以 IC_{50} 值为基准设置各浓度组和 1 个空白对照组, 试验操作与单一重金属毒性试验相同.

AI 指数的计算公式如下:

$$S = \frac{am}{an} + \frac{bm}{bn} + \frac{cm}{cn} + \dots$$

式中, S 为毒性相加之和; an 、 bn 、 cn 分别为 a 、 b 、 c 等单一重金属的 IC_{50} 值; am 、 bm 、 cm 分别为混合重金属的 IC_{50} 值.

当 $S \leq 1$ 时, $\text{AI} = 1/S - 1.0$;

当 $S > 1$ 时, $\text{AI} = 1.0 - S$;

采用 AI 指数评价重金属的联合毒性效应时: $\text{AI} > 0$ 时为协同作用; $\text{AI} < 0$ 时为拮抗作用; $\text{AI} = 0$ 时为相加作用.

1.3.3 影响因素分析

天然水体成分复杂, 新的毒性测试方法要应用于实际环境样品, 必须考虑水质条件变化对测试结果的影响, 为使实验结果更具有广泛适用性, 探讨了水体 pH 值和 COD 这 2 项因素对腰鞭毛虫发光和重金属生物毒性的影响.

1.4 实验质量控制

本实验严格按照 ASTM 标准 E1218-04 执行, 实验环境洁净, 无污染, 各项实验至少保证 2 次重复.

2 结果与讨论

2.1 单一重金属评价结果

主要测定了 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 As^{5+} 、 Pb^{2+} 和 Mn^{2+} 的 IC_{50} 值, 实验结果见图 1 和表 1.

由图 1 可知, 利用腰鞭毛虫测定的生物毒性 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{As}^{5+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$, 马梅^[10]用 Q67 发光菌测定重金属的生物毒性, 同样也获得了 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ 的结论, 腰鞭毛虫与 Q67 发光菌保持一致. 一般认为金属的毒性与其和硫的亲合力 (sulfur affinity hypothesis) 有关, Hg 和 Cu 与硫的亲合力较强, 因此有显著的生物毒性. 陈海柳等^[11]测定几种淡水海藻对 Cr^{6+} 的 EC_{50} 范围是 4.96 ~ 20.89 mg/L, 可见腰鞭毛虫生物毒性测试比淡水藻类敏感性要好. 同时由几种金属毒性顺序还可以看出, 随着金属化合价的升高, 生物毒性呈下降趋势, 二价金属毒性比其他价态稍高些.

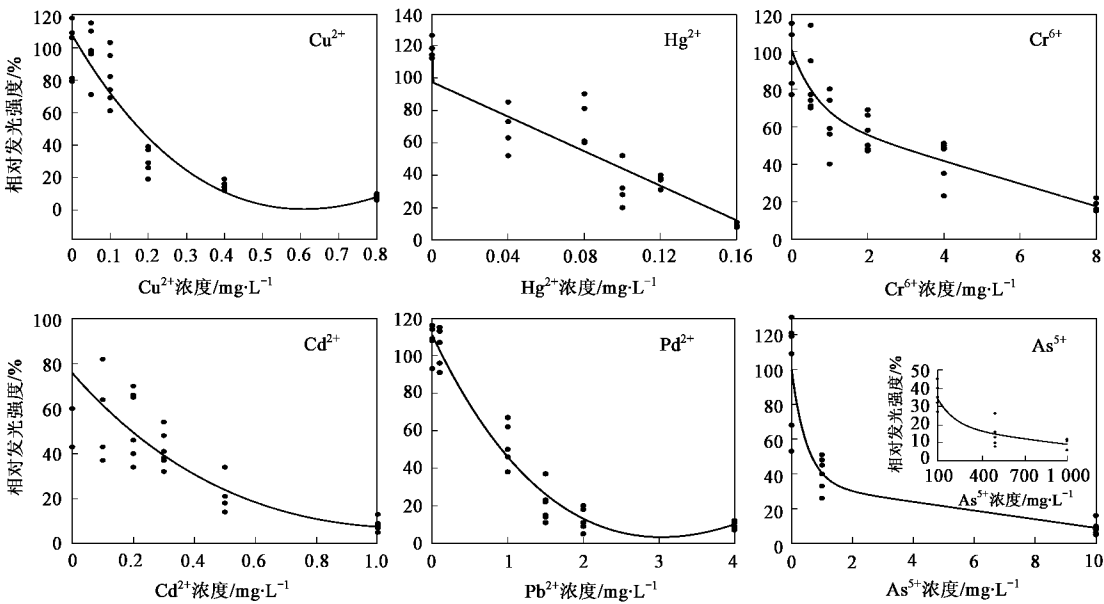


图 1 6 种重金属对腰鞭毛虫发光抑制的影响

Fig.1 Luminescence inhibition of six heavy metals to dinoflagellates

表 1 单一重金属 IC₅₀ 值测定结果/mg·L⁻¹

Table 1 IC ₅₀ of six heavy metals to dinoflagellates/mg·L ⁻¹						
IC ₅₀ 值	Cu	Hg	Cr	Cd	Pb	As
数值	0.16	0.13	2.92	0.23	0.90	0.84
范围	0.06 ~ 0.16	0.07 ~ 0.13	2.88 ~ 2.92	0.14 ~ 0.26	0.90 ~ 1.78	—

由表 1 可知,腰鞭毛虫对大部分重金属的响应范围较窄,如腰鞭毛虫响应的 Cu²⁺ 浓度范围为 0 ~ 0.8 mg/L,而发光细菌对 Cu²⁺ 响应的浓度范围为 0 ~ 6.4 mg/L^[12],这一点要优于发光细菌法.

腰鞭毛虫对 Cu²⁺、Hg²⁺、Cd²⁺、Cr⁶⁺ 的响应关系曲线下下降趋势明显,重复实验结果表明数据的重复性较好,变异系数(CV)均在可接受范围内,因此将这 4 种金属选定为标准毒物进行下一步的联合毒性实验.腰鞭毛虫对 Pb²⁺ 的响应曲线线性关系虽然较好,但是重复实验结果表明 Pb²⁺ 的 IC₅₀ 值会在一个较宽的浓度范围内波动,重现性较差.As⁵⁺ 在很宽的浓度范围内测定时可得 IC₅₀ 值,当缩小浓度范围时,由于各点波动较大,无法得到 IC₅₀ 值.对 Mn²⁺ 的 IC₅₀ 值进行测定结果显示:Mn²⁺ 在 500 mg/L 仍未显出较强毒性,因此可以认为腰鞭毛虫不适合测定 As⁵⁺、Mn²⁺ 生物毒性.

2.2 联合毒性研究结果

重金属的联合毒性与不同重金属加入的时间间隔、加入顺序、浓度大小都有关系.本研究根据不同金属的 IC₅₀ 值确定加入浓度,选择同一时间同时加

入的方式测定联合毒性.实验选择 4 种敏感性、重复性较好的金属 Cu²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺ 和 Cd²⁺,测定 2 种、3 种和 4 种重金属混合时的联合毒性,并采用 Marking 的相加指数法评价,评价结果见表 2 及表 3.

表 2 2 种重金属混合毒性关系

Table 2 Mixture toxicity for mixture of two heavy metals to dinoflagellates				
重金属	混合 IC ₅₀	S	AI	联合毒性效应
Cu ²⁺ + Hg ²⁺	0.28 IC ₅₀	0.56	0.81	协同作用
Hg ²⁺ + Cr ⁶⁺	0.35 IC ₅₀	0.70	0.43	协同作用
Cu ²⁺ + Cr ⁶⁺	0.49 IC ₅₀	0.98	0.02	相加作用
Cu ²⁺ + Cd ²⁺	0.70 IC ₅₀	1.40	-0.40	拮抗作用
Hg ²⁺ + Cd ²⁺	0.36 IC ₅₀	0.72	0.50	协同作用
Cr ⁶⁺ + Cd ²⁺	0.39 IC ₅₀	0.78	0.26	协同作用

表 3 3 种及 4 种重金属混合毒性关系

Table 3 Mixture toxicity for mixture of three or four heavy metals to dinoflagellates				
重金属	混合 IC ₅₀	S	AI	联合毒性效应
Cu ²⁺ + Hg ²⁺ + Cr ⁶⁺	0.25 IC ₅₀	0.75	0.33	协同作用
Hg ²⁺ + Cr ⁶⁺ + Cd ²⁺	0.23 IC ₅₀	0.69	0.45	协同作用
Cu ²⁺ + Cr ⁶⁺ + Cd ²⁺	0.41 IC ₅₀	1.23	-0.23	拮抗作用
Cu ²⁺ + Hg ²⁺ + Cd ²⁺	0.22 IC ₅₀	0.66	0.52	协同作用
Cu ²⁺ + Hg ²⁺ + Cr ⁶⁺ + Cd ²⁺	0.32 IC ₅₀	1.28	-0.28	拮抗作用

重金属的联合毒性可以分为协同作用、拮抗作用、独立作用和相加作用.有研究^[13]认为,金属共同存在时,细胞膜的通透性增加,因而毒性增强产生协同作用,也有学者^[14]认为,协同作用可能是由于一种化合物促进了另一种化合物的吸收,阻止了另一化合物的代谢解毒或排泄或者使代谢转化趋向于形成毒性更高的物质.拮抗作用可能是功能拮抗、化学拮抗、受体拮抗、干扰拮抗或由于存在位点竞争所引起的.研究结果表明,4 种金属 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Cr^{6+} 对腰鞭毛虫的联合毒性以协同作用为主,个别有拮抗现象,但不是特别明显.如果从金属离子与藻类的亲和性考虑^[15],当几种金属共存时,可能是一种离子干扰破坏或增强了另一种离子与藻类的亲和性所致,具体机制尚待研究.还可看出,随着混合组分增加, IC_{50} 值降低,毒性效应增强,说明每种重金属组分即使以很低浓度存在也会有严重的毒性效应.

3 影响因素分析

3.1 pH 值影响

pH 值会影响金属的存在形态,从而影响金属的生物有效性和水质的综合毒性,由于 ESM 介质中的沉淀问题,无法达到过高的 pH 值,因此本研究选取 pH 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 这 10 种情况进行实验,在测试前 2 d 用 1 mol/L HCl 或 0.4 mol/L NaOH 调节 pH 值,但是由于 ESM 的缓冲作用,很难调节 pH 值完全与目标设定值相等.参照 Craig 等^[16]研究结果,控制试样 pH 值为 8.0 ± 0.2 .在测试 pH 对重金属生物毒性影响关系曲线前,需先测定各类金属 4 h 的 IC_{50} 值,在此浓度上调节各 pH 值,金属离子加入 4 h 后即测定发光量变化.

腰鞭毛虫及其与重金属相应关系的 pH 值影响曲线如图 2 和图 3 所示,图 4 表征了测试前后溶液 pH 值的变化规律.

由图 2 可知,在极高和极低的 pH 值 1.21、2.08、3.19、9.12、10.02 下,腰鞭毛虫发光受 pH 值抑制影响较大,部分藻类可能已经死亡.在 pH 值 4 ~ 9 范围内对腰鞭毛虫的发光影响不大.因为大多数天然水体 pH 值在 6.5 ~ 8.5 之间^[17],所以可以不调节 pH 值直接测定天然水体的生物毒性.

由图 3 可知, Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 的生物毒性受 pH 影响较大,与控制试样 pH 值 8.0 相比,表现为在酸性环境下发光量剧增,有学者^[18]认为,重金属的生物毒性随 pH 值的降低而增加,可能是由于酸度变化改变了金属的形态分布,进而导致金属的生物有效性

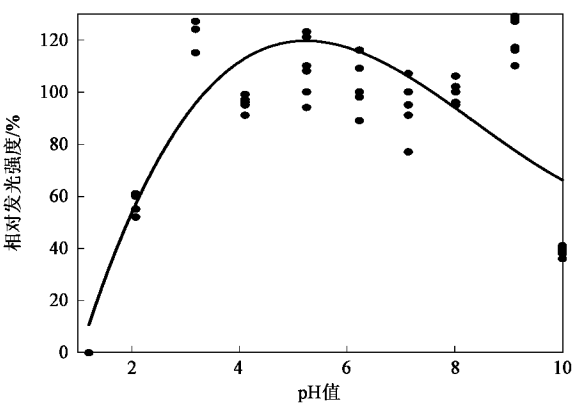


图 2 pH 对腰鞭毛虫的发光强度影响
Fig.2 Effects of pH on dinoflagellates bioluminescence

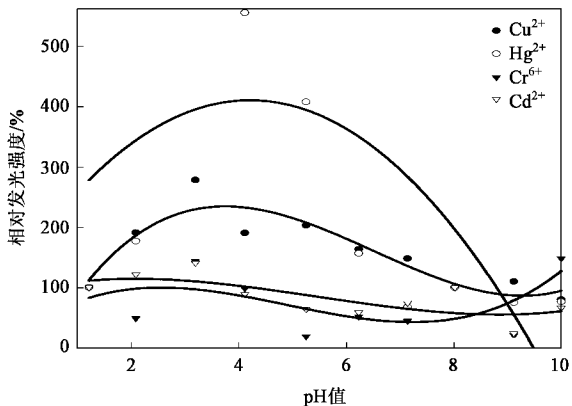


图 3 pH 对重金属生物毒性的影响
Fig.3 Effects of pH on biological toxicity of heavy metals

改变.如随着 pH 值增大,游离态铜浓度降低,导致铜的生物毒性降低. Hg^{2+} 曲线上各点的离散度较大,可能腰鞭毛虫并不适合测试 Hg^{2+} 的生物毒性. Cr^{6+} 在偏酸性环境中发光量降低,可能是由氢离子和金属离子在吸附位上的竞争所引起的^[19]. Cd^{2+} 受 pH 值影响不大,考虑到腰鞭毛虫适宜的 pH 范围,测试 Cd^{2+} 生物毒性时,需要扣除 pH 值的影响.

由图 4 可知,测试前后溶液的 pH 值发生规律性变化,在较低的 pH 值下,测试后 pH 增大趋势不明显,在 pH 值 8.0(3%海盐水 pH 值)左右,如 pH 值为 6 ~ 10 时,测试后 pH 值有增加或减小到 8.0 左右的趋势,这一结论与 Craig 等^[16]的研究结果一致.

3.2 营养物质影响

用发光细菌法直接测试城市污水毒性时,马梅等^[20]认为所得数据是毒性物质和水样中营养物质共同作用的结果.符成泽^[12]在实验中也发现,不同营养物质存在时对生物发光的影响不同,有的表现出抑制效应,有的表现出增强效应,所以会有相对发

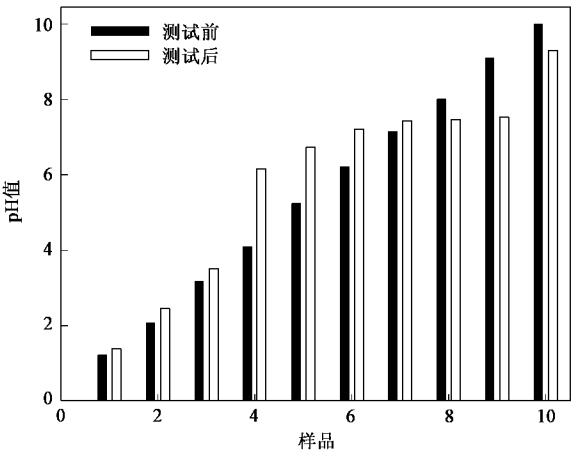


图 4 测试前后溶液 pH 值变化

Fig.4 Change in pH before and after measurements

光强度 > 100% 的情况发生. 本实验将葡萄糖 ($C_6H_{12}O_6$) 折合成 COD 值来研究营养物质对腰鞭毛虫发光的影响, 参考城市污水 COD 浓度范围, 用影响因子(I)来评价营养物质对毒性测试结果的影响程度, 影响因子定义如下:

$$I = \frac{\text{加入营养物质后的相对发光度}}{\text{加入营养物质前的相对发光度}}$$

式中, $I > 1$ 时为正影响, $I < 1$ 时为负影响.

COD 对腰鞭毛虫及其与重金属响应关系的影响如图 5 和图 6 所示.

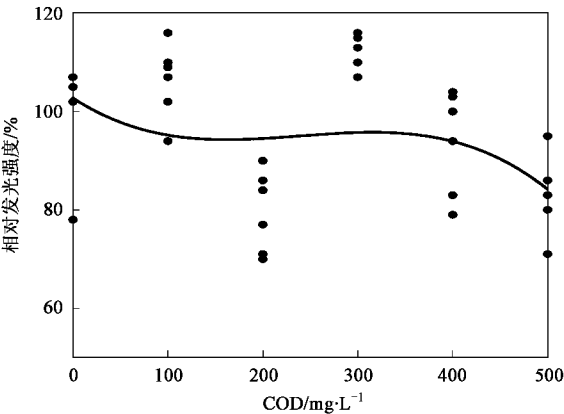


图 5 COD 对腰鞭毛虫的影响

Fig.5 Effects of COD on dinoflagellates' bioluminescence

由图 5 可知, COD 对腰鞭毛虫发光量变化影响不显著, 因此在测试水体中重金属毒性时, 如果营养物质浓度不高, 则可以不必考虑营养物质的影响.

由图 6 可知, COD 对 Cu^{2+} 、 Cr^{6+} 与腰鞭毛虫的响应关系影响不大, 较高的 COD 浓度对 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 与腰鞭毛虫的响应关系影响显著, 因此用腰鞭毛虫测

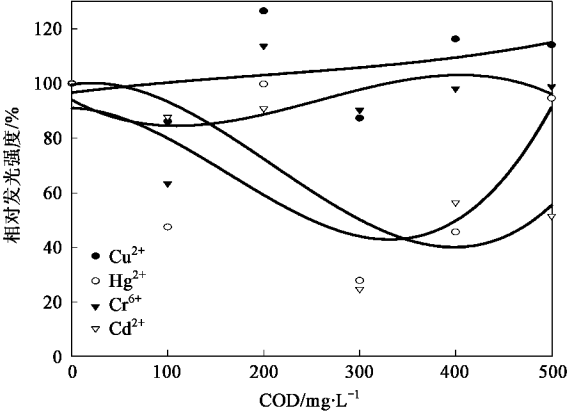


图 6 COD 对重金属生物毒性的影响

Fig.6 Effects of COD on biological toxicity of heavy metals

试 Hg^{2+} 或 Cd^{2+} 的生物毒性时, 需要扣除 COD 对这 2 类离子生物毒性的影响, 否则会高估水体中重金属的生物毒性.

4 结论

(1) 单一重金属对腰鞭毛虫的生物毒性 $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > As^{5+} > Pb^{2+} > Cr^{6+}$; 由于腰鞭毛虫对 As^{5+} 、 Mn^{2+} 的响应曲线线性关系不好, 且重复实验结果差异较大, 因此不适合测定这 2 类金属的生物毒性; 2 种、3 种和 4 种重金属联合毒性基本以协同作用为主, 个别有拮抗现象.

(2) pH 对腰鞭毛虫影响不显著, 可以直接测定天然水体生物毒性, 但是 pH 对 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 的毒性影响较大, 测定这 2 类离子时需扣除 pH 影响.

(3) 腰鞭毛虫对水中营养物质不敏感, COD 对腰鞭毛虫与 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 的响应关系影响显著.

致谢: 本研究得到香港亚太水业有限公司科研资助计划支持, 提供 QwikLite™ 200 毒性测试仪和 dinoflagellates 发光生物, 并感谢郭文谦和丘学纬先生对本研究的支持.

参考文献:

[1] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 52-55.

[2] GB/T 15441-1995, 水质急性毒性的测定发光细菌法[S].

[3] Lapota D, Galt C, Losee J R, et al. Observations and measurements of planktonic bioluminescence in and around a milky sea[J]. Exp Mar Biol Ecol, 1988, **119**: 55-81.

[4] Okamoto O K, Shao L, Hastings J W, et al. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellates Gonyaulax polyedra[J]. Comparative Pharmacology and Toxicology, 1999, **123**: 75-83.

- [5] Heimann K, Matuszewski J M, Klerks P L. Effects of metals and organic contaminants on the recovery of bioluminescence in the marine dinoflagellate *Pyrocystis lunua* (Dinophyceae) [J]. *Phycol*, 2002, **38**: 482-492.
- [6] Lapota D, Liu C H, Rosenberger D E. Use of a rapid bioluminescent bioassay(QuikLite™) using dinoflagellates to assess potential toxicity on pore waters from sediment at Navy sites [A]. In: Society of Environmental Toxicity and Chemistry, 18th Annual Meeting, 16-20 November, 1997, San Francisco, CA.
- [7] Lapota D, Robayo O A, Liao C B, *et al*. The use of bioluminescent dinoflagellates as an environmental risk assessment tool [J]. *Mar Pollut Bull*, 2007, **54**(12): 1857-1867.
- [8] 刘国光, 王莉霞, 徐海娟, 等. 氛戊菊酯和锐劲特对原生动物群落的联合毒性试验研究 [J]. *环境科学学报*, 2005, **25**(1): 86-89.
- [9] Marking L L. An Approach for Additive Toxicity of Chemical Mixtures [A]. In: Mayor L L, Hamelink J L (eds). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* [C]. Philadelphia: ASTM STP 634 American Society for Testing and Material, 1977. 99.
- [10] 马梅. 新的生物毒性测试方法及其在水生态毒理研究中的应用 [D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2002.
- [11] 陈海柳, 潘纲, 闫海, 等. 六价铬抑制淡水蓝绿藻生长的毒性效应 [J]. *环境科学*, 2003, **24**(2): 13-18.
- [12] 符成泽. 发光细菌法和硝化速率法测定污水毒性的可行性研究 [D]. 上海: 同济大学, 2005.
- [13] Cairns J J. Single Species Toxicity Tests Alone Adequate for Estimating Environmental Hazard [J]. *Hydrobiologia*, 1983, **100**: 47-57.
- [14] 张永春, 林玉锁, 孙勤芳, 等. 有害废物生态风险评价 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 144.
- [15] 闫海, 王杏君, 林毅雄, 等. 铜锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的毒性效应 [J]. *环境科学*, 2001, **22**(1): 23-26
- [16] Craig J M, Klerks P L, Heimann K, *et al*, Effects of salinity, pH and temperature on the re-establishment of bioluminescence and copper or SDS toxicity in the marine Dinoflagellate *Pyrocystis lunula* using bioluminescence as an endpoint [J]. *Environmental Pollution*, 2003, **125**: 267-275.
- [17] 陈静生. 水环境化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1987. 62-64.
- [18] 刘清. 水环境中重金属形态与毒性关系的研究 [D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 1996.
- [19] Meador J P. The Internation of pH dissolved organic carbon and total copper in the determination or ionic copper and toxicity [J]. *Aquatic Toxicity*, 1991, **19**(1): 13-32
- [20] 马梅, 王毅, 王子健. 城市污水生物处理过程中有毒有机污染物浓度及毒性变化的规律 [J]. *工业水处理*, 1999, **19**(6): 9-12.