

文章编号: 1004 - 7271(2002)04 - 0388 - 05

·研究简报·

Cu^{2+} 对亚心形扁藻的致毒效应

Toxicity of Cu^{2+} to *Platymonas subcordiformis*

万利勤, 臧维玲, 江敏

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

WAN Li-qin, ZANG Wei-ling, JIANG Min

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: Cu^{2+} ; 亚心形扁藻; 致毒效应; 蓄积

Key words: Cu^{2+} ; *Platymonas subcordiformis*; toxicity; accumulation

中图分类号: S912 文献标识码: A

随着社会生产力发展,含有重金属的废水的排放量日益增多,此类废水一旦流入天然水域,将影响水生生物的生长与繁殖。藻类是水体的初级生产者,也是污染水体中首当其冲的受害者。以往曾有不少关于重金属对藻类毒性方面的报道,但较多地集中在三角褐指藻和小球藻等^[1-11],对亚心形扁藻的报道很少。而亚心形扁藻因其生长周期短、适口性好、含有较高的动物必需氨基酸等特点,是生产中为人们广泛采用的优良海产饵料^[12]。本文详细研究了不同浓度 Cu^{2+} 对亚心形扁藻生长的影响以及 Cu^{2+} 在扁藻体内的蓄积,所得结果可为养殖业与环境保护提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

亚心形扁藻取自上海水产大学渔业学院藻种库;硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)为分析纯。

1.2 毒性试验条件

(1) 试验海水取自杭州湾漕泾地区河口水,用盐卤调配成试验所需盐度 29 ± 1 ,经过滤、加热煮沸处理后待用。试验水温度为 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 为 8.29。

(2) 白天采用自然光照,夜晚用碘钨灯补光,光照强度为 5500 - 7000Lx。

(3) 培养液配方:参照 F/2 配方配置^[13]。

(4) Cu^{2+} 母液的配制

准确称取 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5716g,用去离子水溶解、定容至 1000mL,配制成浓度为 0.40g/L 的 Cu^{2+} 母液。 Cu^{2+} 中毒试验以此母液按试验要求稀释而成。

(5) 扁藻接种所用的工具和器皿均进行严格消毒。

1.3 毒性试验方法

试验共设四种浓度,容器为 250mL 锥形瓶。试验时,向锥形瓶中分别加入已加营养盐的海水

收稿日期:2002-07-15

基金项目:上海市农业重点攻关项目[农科攻字(2001)第 5-5 号],上海市教委青年基金项目(科 00 - 101)。

作者简介:万利勤(1973 -),女,河南洛阳人,上海水产大学 2000 级硕士研究生,专业方向为渔业水域环境及其调控。

220mL, 然后加入预先培养的同一批藻液 30mL, 接种密度为 $1 \sim 1.5 \times 10^4$ 个/mL。除作空白对照组的锥形瓶外, 其他各瓶均按试验需要分别加入相应体积的 Cu^{2+} 母液, 使试液中 Cu^{2+} 达到试验所需浓度(详见表 1)。

表 1 亚心型扁藻培养液中铜的浓度(mg/L)

Tab.1 The concentration of copper in culture medium for *Platymonas subcordiformis*

组 别	1	2	3	4	5
Cu^{2+}	0.00	0.05	0.15	0.30	0.40

亚心形扁藻的生长情况, 用显微镜观察, 血球计数板计数, 密度单位为 $\times 10^4$ 个 cell/mL。每隔 24 小时取样观察一次, 每隔 2 小时振摇一次, 培养周期 6 天。上述各组试验均设三个平行和对照。

1.4 扁藻体内铜蓄积量测定

采用规格为 81cm \times 50cm \times 80cm 的玻璃缸, 加入一定体积的海水及相应体积的 Cu^{2+} 母液, 使试液中 Cu^{2+} 达到试验所需浓度, 接种比例为 1:10, 接种密度与试验管理同上(1.3)。

在第六天收获玻璃缸中培养的四种浓度的 Cu^{2+} 中毒后的藻液, 5000r/m 离心 10min, 所得浓缩藻液 -20℃ 冷冻保存。后经冷冻干燥, 得到干样进行消化。消化方法参照海洋监测规范(第六部分: 生物体分析)^[14]。采用原子吸收分光光度计(惠普上海分析仪器有限公司 3500G 原子吸收分光光度计 石墨炉系统工作站)于 324.7nm 处测定各样品及分析空白试液的吸光值。

1.5 计算

1) 将试验所得数据按下式计算生长阻碍率:

$$\mu = \ln(N_t/N_0)/(t - t_0) \text{ 即 } \mu = (\ln N_t - \ln N_0)/(t - t_0)$$

μ : 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。

$$\text{阻碍率} = [(\mu_b - \mu_{tox})/\mu_b] \times 100$$

μ_b : 对照组的相对最大生长速度, μ_{tox} : 试验组的相对最大生长速度。

2) 将测得的数据按下式计算生物样品中铜含量: $W_{\text{Cu}} = P \cdot V/M$

式中:

W_{Cu} ——生物体干样中铜含量, $\mu\text{g/g}$

P ——从标准曲线上查得铜的浓度, $\mu\text{g/mL}$

V ——样品制备液体积, mL

M ——样品称取量, g

3) 将计算结果按下式计算蓄积倍数: $AT = W_{\text{Cu}}/S_{\text{Cu}}$

W_{Cu} ——生物体干样中铜的含量, $\mu\text{g/g}$

S_{Cu} ——相应海水介质的铜含量, mg/L

2 结果与讨论

2.1 Cu^{2+} 对亚心形扁藻生长的影响

Cu^{2+} 对扁藻的不同浓度系列试验结果取平均值, 扁藻在不同浓度 Cu^{2+} 培养液中其细胞数随时间的变化情况见表 2, Cu^{2+} 对扁藻的生长阻碍率见表 3。

从表 2 和表 3 可以看出: 接种后 48h, 生长在 Cu^{2+} 各浓度组的扁藻均没有出现停滞期, 但和空白对照组相比, 扁藻的生长和增殖还是受到了一定的抑制, 细胞数量均低于对照组, Cu^{2+} 对扁藻的生长阻碍率高达 46%。

表2 铜对亚心型扁藻生长的影响

Tab.1 Relationship between relative number of cells of *Platymonas subcordiformis* and different concentration of Cu in the medium

Cu ²⁺ (mg/L)	× 10 ⁴ cell/mL				
	0.00	0.05	0.15	0.30	0.40
0h	1 ± 0.58	1 ± 0.58	1 ± 0.58	1 ± 0.58	1 ± 0.58
24h	6 ± 1.53	3 ± 1.00	5 ± 3.20	4 ± 1.00	4 ± 1.53
48h	13 ± 1.00	7 ± 1.00	9 ± 2.08	10 ± 2.52	4 ± 2.08
72h	18 ± 2.08	39 ± 6.11	23 ± 4.16	17 ± 3.05	15 ± 2.31
96h	33 ± 1.53	28 ± 0.58	34 ± 5.86	21 ± 1.53	18 ± 2.52
120h	23 ± 2.52	30 ± 2.00	28 ± 1.53	18 ± 1.53	16 ± 1.53

表3 铜对扁藻的生长阻碍率

Tab.3 Growth inhibition ratio of Cu²⁺ on *Platymonas subcordiformis*

Cu ²⁺ (mg/L)	0.05	0.15	0.30	0.40
阻碍率 24h	39%	10%	23%	23%
阻碍率 48h	24%	14%	10%	46%
阻碍率 72h	-27%	-9%	2%	6%
阻碍率 96h	5%	-1%	13%	17%
阻碍率 120h	-8%	-6%	8%	12%

但到 72h 时,生活在低浓度组中的藻体已经解除了 Cu²⁺ 对自身的抑制,细胞迅速增殖,其生长阻碍率为负值。Cu²⁺ 0.05mg/L 中的藻不但比对照组提前 24h 到达指数生长期,且细胞密度是对照组的 1.2 倍;Cu²⁺ 0.15mg/L 组的扁藻在 96h 时也解除了 Cu²⁺ 的抑制,细胞数量也到达其最高值,和对照组同一天到达指数生长期,但又略优于对照组。如:指数生长期时对照组的细胞密度为 33 × 10⁴ 个/mL,而前者为 34 × 10⁴ 个/mL,是对照组的 1.0 倍。

生长在高浓度铜(Cu²⁺ 0.30mg/L 和 0.4mg/L)介质中的扁藻,细胞数量明显少于对照组及其他低浓度组,Cu²⁺ 对扁藻的生长阻碍率明显高于其他组。其细胞最高密度仅为对照组的 64% 和 55%。之所以细胞没有停止增殖,可能是因为扁藻个体大且细胞壁较厚,对 Cu²⁺ 的耐受力较强的缘故。本试验所设的高浓度组虽然不致于杀死藻体,但已经明显抑制了其生长和增殖。

总之,在本试验设置浓度范围内,Cu²⁺ 浓度对扁藻的生长产生一定影响。0.05mg/L Cu²⁺ 就对扁藻生长产生抑制。随着介质中 Cu²⁺ 浓度升高,其抑制作用越明显。但扁藻可利用自身的一些生理机制,在 4~5d 内迅速解除低浓度 Cu²⁺ (Cu²⁺ ≤ 0.15mg/L) 对其的生长抑制作用,使 Cu²⁺ 对藻体不至于造成大的毒害;而对高浓度的 Cu²⁺ (Cu²⁺ ≥ 0.30mg/L) 的解抑制就需要较长时间。朱卓洪等^[2] 认为,Cu²⁺ 0.02 mg/L 就对扁藻生长表现出抑制,这和本试验结果有一定的相似性;但他的 0.30mg/L 已基本使扁藻全部致死的结论和本试验结果相差甚远。这可能是由于本试验所用海水取自杭州湾且为调配海水,而朱卓洪等所用水为直接采集于现场珠江河口水。二者在硬度、盐度等指标方面均有差异,而即使相同的重金属在不同水域对同种藻类的毒害效应的差异也是极其显著的,这个结论已被众多学者所论证^[2-4,10,11]。

2.2 Cu²⁺ 在扁藻体内的蓄积

扁藻对介质中不同浓度 Cu²⁺ 的蓄积量和蓄积倍数见表 4,试验所得数据经 STATISTICA 软件处理 (Duncan test, P < 0.05),结果见图 1。

表4 扁藻对介质中铜的蓄积(mg/g)

Tab.4 Accumulation of Cu²⁺ in the *Platymonas subcordiformis*

Cu ²⁺ (mg/L)	0.00	0.05	0.15	0.30	0.40
蓄积量	0.000	0.391 ± 0.009	1.501 ± 0.011	1.720 ± 0.145	2.855 ± 1.740
蓄积倍数	0.00	7.82	10.01	5.73	7.14

从表 4 和图 1 中可以看出,扁藻对不同浓度 Cu^{2+} 的蓄积量之间存在显著差异。并且对铜的蓄积呈现一定的规律:随水体中 Cu^{2+} 浓度的增大,藻体对铜的蓄积量明显升高;但当蓄积量到 1.720mg/g 时,蓄积倍数却随介质中 Cu^{2+} 浓度增大开始降低。生长在 $\text{Cu}^{2+} 0.4\text{mg/L}$ 中的扁藻对 Cu^{2+} 的蓄积量高达 2.855mg/g ,是生长在 $\text{Cu}^{2+} 0.05\text{mg/L}$ 蓄积量 (0.391mg/g) 的 7.3 倍;而生长在 $\text{Cu}^{2+} 0.15\text{mg/L}$ 和 0.30mg/L 两个浓度中的扁藻对 Cu^{2+} 积累量比较接近,但相对于其介质中 Cu^{2+} 浓度来说,其蓄积倍数却相差甚远,前者是后者的近 2 倍。这和 Riley 和 Roth(1971)^[15] 以及蔡阿根等^[16] 的研究结果相似:蓄

积量随介质中重金属浓度升高而增加,蓄积倍数(或转移率)随介质中重金属浓度升高而降低。因为藻体内铜积累量到一定程度后,削弱了藻类正常的新陈代谢作用,从而降低对铜的转移能力。另外,藻类对微量元素的生物富集是个复杂的物理与化学过程,是各种机理共同作用的结果。陈小霞^[17]、蔡阿根等^[16] 认为表面吸附占将近 80%,主动运输占近 20%,但其作用机理尚待进一步探讨。

2.3 蓄积量与毒性的关系

从图 1 和表 2 中可以看出,扁藻对 Cu^{2+} 的蓄积倍数与扁藻的生长趋势有一定关系。低浓度 Cu^{2+} ($\text{Cu}^{2+} \leq 0.15\text{mg/L}$) 在后期有利于藻的生长,也有利于扁藻对 Cu^{2+} 的蓄积,尽管其本身介质中 Cu^{2+} 浓度较低,其蓄积量不大,但蓄积倍数却较高;而高浓度 Cu^{2+} ($\text{Cu}^{2+} \geq 0.30\text{mg/L}$) 虽然一直不利于扁藻生长,也不利于藻对铜的转移,但因其对重金属的被动吸附,导致藻体内 Cu^{2+} 的蓄积量被动增加,蓄积倍数却显著降低。但在试验后期,却出现一异常现象:生长在 $\text{Cu}^{2+} 0.4\text{mg/L}$ 和 $\text{Cu}^{2+} 0.30\text{mg/L}$ 中的扁藻的生长情况很接近,这可能是本试验所设置的这两个浓度梯度过于接近所致。但前者对铜的蓄积倍数略优于 $\text{Cu}^{2+} 0.3\text{mg/L}$ 组,此原因还有待探讨。

3 结论

通过本次试验,可以得出以下几点结论:

亚心形扁藻的生长与介质中 Cu^{2+} 的浓度密切相关。 $\text{Cu}^{2+} 0.05\text{mg/L}$ 就已经对扁藻的生长产生抑制,介质中 Cu^{2+} 浓度越高,生长抑制越明显。但扁藻能够迅速解除低浓度的 Cu^{2+} ($\text{Cu}^{2+} \leq 0.15\text{mg/L}$) 对其生长和增殖的抑制作用。

亚心形扁藻对介质中的 Cu^{2+} 有很强的吸收和蓄积能力。在本试验设置的浓度梯度内,表现出随 Cu^{2+} 浓度升高,蓄积量增加,但蓄积倍数降低的特点。

Cu^{2+} 在亚心形扁藻体内的蓄积量和毒性效应的关系为,铜的蓄积量越大,对亚心形扁藻产生的毒性效应越明显。

本试验在样品冷冻干燥和铜测定过程中得到了横山雅仁先生、杨鸿山老师、钟霞云老师的帮助,另外也得到戴习林老师的指导,在此一并表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] 矿建军,夏宜铮,惠阳. 重金属对藻类的致毒效应[J]. 水生生物学报,1996,20(3):277-282.
- [2] 朱卓洪,李飞永,陈金斯. 珠江口铜、锌、铬和镉对单细胞藻类生长的影响[J]. 热带海洋,1992,11(2):31-37.
- [3] 张首临,刘明星,李国基,等. 四种重金属离子对海洋三角褐指藻生长影响的研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(6):582-585.
- [4] 陈贞奋. 四种重金属对牟氏角毛藻生长率和叶绿素含量的影响[J]. 海洋学报,1985,7(3):342-352.

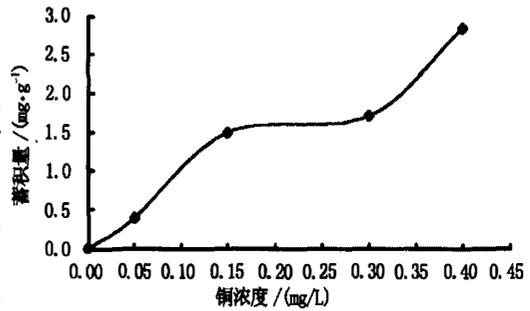


图 1 蓄积量和铜浓度的关系

Fig.1 The relation between the concentration of copper and quantities of accumulation

- [5] 陈金堤,王文雄.重金属对褶牡蛎胚胎及幼体发育的毒性效应[J].厦门大学学报(自然科学版),1985,24(1):96-101.
- [6] 吴玉霖,赵鸿儒,侯兰英.重金属对牙鲆胚胎和仔鱼的影响[J].海洋与湖沼,1990,21(4):386-391.
- [7] 林汝榕,李少菁.重金属对桡足类的急性毒性及其对排粪的生理效应[J].海洋环境科学,1988,7(3):7-15.
- [8] 安育新,何志辉.海水中四种重金属对蒙古裸腹溞的毒性[J].水产学报,1991,15(4):273-282.
- [9] 邹栋梁,高淑英.铜、锌、镉、汞、锰和铬对斑节对虾仔下急性致毒的研究[J].海洋环境科学,1994,13(3):13-18.
- [10] Lasheen M R, Shehata S A, Ali G H. Effect of Cd, Cu And Cr on the growth of Nile water algae[J]. Wat Air soil Pollut. 1990,50(12):19-30.
- [11] Richard P. Influence of copper and zinc on the growth of a freshwater algae[J]. *Scenedesmus quadricauda* the significance of chemical speciation. Environ Sci Technol. 1982,16(8):443-447.
- [12] 王渊源.海产植物性活饵料的比较培养[J].水产学报,1984,8(4):259-273.
- [13] 陈明耀主编.生物饵料培养[M].北京:中国农业出版社,1997.49,65-71.
- [14] 国家海洋局.海洋监测规范(第六部分,生物体分析)[M].北京:海洋出版社,1998.435-437.
- [15] Riley J P, Roth I. The distribution of trace elements in some species of phytoplankton grown in culture[J]. Jour Mar Biol ASS U K, 1971,(51):63-72.
- [16] 蔡阿根,陈伟琪,李文权,等.铜在海洋食物链中的积累转移和致毒效应[J].厦门大学学报(自然科学版),1992,31(3):269-274.
- [17] 陈小霞,吴振强,梁世中.藻类对微量元素的生物富集及其机理探讨[J].食品与发酵工业,1999,25(4):56-60.