

污染物藻类生物测试法的研究

陈永立¹, 刘艳杰², 焦珍², 齐彩亚²

(1.河北省定州市环境保护局, 河北定州 073000; 2.河北瑞丰环保工程有限公司,
河北石家庄 050031)

摘要: 综述了藻类生物测试法的定义和测试指标, 介绍了藻类生物测试法在水生生态系统污染的检测、饮用水的安全性评价和水体的预警、应急监控方面的应用。

关键词: 藻类; 生物测试法; 污染物

中图分类号: X835

文献标识码: A

文章编号: 1006-8759(2013)01-0056-04

RESEARCH ON THE POLLUTANTS ALGAE BIOASSAY METHOD

CHEN Yong-li¹, JIAO Zhen²

(1. Dingzhou City Environmental Protection Bureau, Hebei 073000;

2. Shijiazhuang University of Economics, Hebei 050031)

Abstract: We reviewed the definitions and test index of the algal bioassay method and introduced the application of algal bioassay method to detecting aquatic ecosystem pollution, safety assessment on drinking water and water warning, emergency monitoring.

Keywords: Algae; bioassay; pollutant.

1 前言

生物测试法是利用生物对水环境中有毒化合物具有普遍的敏感性, 根据其特殊的生理生化反应变化来判断水质综合污染状况。传统的生物测试法常以鱼类、蚤类等多细胞生物为实验对象, 但其灵敏度较低、所需时间长, 不适于饮用水的快速安全评价。以藻类等生物为实验对象的藻类生物测试法在评价毒物的毒性大小方面呈现出优势, 有良好的研究和应用前景。

2 藻类生物测试法

藻类生物测试法是利用藻类为指示生物, 当水体中重金属或有机物等有毒物质抑制了藻类的光合作用、呼吸作用、酶的活性和生长等时^[1], 通过观察藻类生理机能的变化, 来确定毒物的安全浓

度。

2.1 藻类生物测试法的优点

以藻类为指示生物是因为藻类易于培养, 对毒物敏感, 并可直接观察细胞水平上的中毒症状^[2]。它能更直观、快速地反映污染水体对生物种群的综合毒性。

藻类毒性实验优势在于毒物对其作用具有非特异性, 能够实现水体中毒物的综合高通量检测, 而且由于选定的藻类本身没有危害性, 传统的培养技术又很成熟, 检测手段也相对简单, 因此, 在水质安全综合评价方面具有很大的研究和应用价值。

2.2 藻类生物测试法的指标

不同的毒物对藻类的影响部位、作用原理不同, 如毒物可以对细胞的生长产生抑制, 可以使细胞内相关的酶活性升高或降低, 可以抑制光合作用过程, 还可以破坏细胞形态和结构等, 因此, 不同的研究者从不同的方面对环境毒物进行检测,

收稿日期: 2012-11-06

作者简介: 陈永立, (1975-), 男, 河北省定州市人, 工程师, 主要从事环境管理和环境影响评价工作。

最常用的方法主要有以下几种。

2.2.1 藻类生长抑制指标

生长抑制实验是藻类急性毒性实验中最常用的一个方法,指的是藻类暴露在毒物环境中其生长速率比未经暴露的对照组低,可以用于受试物对藻类短期暴露效应的初评。1981年,国际经合组织(OECD)制定了藻类生长抑制试验的国际标准方法^[3]。利用24、48、72、96 h有毒物质对藻类生长的半数抑制效应的质量浓度(EC_{50})来表征急性毒性作用的程度。从而判断毒性的强弱。

袁春莹等^[4]研究了4种杀虫药物(虫敌、纤源净、马拉硫磷、虫水安)对斜生栅藻生长的影响。试验结果表明:当用纤源净和虫敌单独处理藻类培养液时,随着药物浓度的增加,对斜生栅藻抑制作用也随之增强。杀虫药对藻细胞有较大的破坏作用;用纤源净、虫敌、马拉硫磷和虫水安联合处理藻类培养液时,纤源净对藻类的抑制作用最强,其次为马拉硫磷,再次为虫水安,虫敌抑制作用最小。

以藻类的生长抑制效应作为测试指标的方法,准确可靠,但是工作量大,测定周期长。

2.2.2 藻类光合作用变化指标

水体中的环境毒素均能直接或间接抑制单细胞藻类的光合作用。光合作用效率的变化可以代表藻类的生长状态。

吕秀平等^[5]考察了在0~30 000 nmol/L浓度范围内, Fe^{3+} 对铜绿微囊藻的光合作用的影响。结果表明,缺铁条件下藻细胞光饱和的光合作用速率、暗呼吸速率和表观光合作用效率显著低于富铁条件,而补偿光强及饱和光强则高于富铁条件。结果显示 Fe^{3+} 是铜绿微囊藻生长的重要限制因子。

2.2.3 叶绿素和总蛋白含量变化指标

藻细胞中的蛋白质是藻细胞体的有机成分,而且一些作为酶和细胞生长调节成分的蛋白质,是藻细胞正常生理功能的物质保障,海洋浮游植物中蛋白质和叶绿素含量被认为是生物量的指标。所以,藻类的存活情况和生物量的多少可以由叶绿素、胡萝卜素和总蛋白含量的变化来反映。荆国华等^[6]采用室内培养法考察了十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)和十八烷基三甲基溴化铵(STAB)对四尾栅藻的叶绿素含量、蛋白质含量、脂质过氧化丙二醛(MDA)含量以及超氧化歧化酶(SOD)活性

的影响。实验结果表明:CTAC和STAB对四尾栅藻的生长抑制效应随浓度和时间变化显著,CTAC对四尾栅藻的毒性小于STAB,且CTAC和STAB作用4 d内,藻种蛋白质、叶绿素含量以及SOD酶活性均先上升后下降,MDA含量下降。

2.2.4 藻荧光量变化指标

藻类细胞内的叶绿素分子吸收光量子得到能量后,从基态(低能态)跃迁到激发态(高能态),并产生荧光。藻类在受到的某些极低浓度(10^{-10})的环境污染物刺激时,使光合活性明显下降,导致藻液荧光产量增加^[7]。水体中的农药、重金属、有机物等均能对单细胞藻类的光合作用产生影响,多数除草剂的除草原理就是抑制藻类的光合作用^[8]。

叶绿素荧光技术是目前检测活体植物光合作用变化的常规方法。活体叶绿素荧光不仅与光合作用的原初过程有关,也与电子传递、质子梯度的建立以及ATP合成和 CO_2 固定等过程密切相关,是光合作用的探针。能在不破坏样品的完整性的情况下快速、准确进行检测^[9]。

王丽等^[10]建立水中敌草隆的ToxY-PAM荧光检测方法。方法选择三角褐指藻作为指示生物,采用ToxY-PAM叶绿素荧光仪检测水样中敌草隆对藻液光合信号的抑制程度,测定水中敌草隆的含量。结果该方法的最低检出浓度为0.1 $\mu\text{g/L}$,标准曲线线性范围为0.1~0.5 $\mu\text{g/L}$,相关系数为0.99 93。

3 藻类生物测试法在环境毒物检测中的应用及其研究进展

3.1 藻类生物测试法在环境毒物检测中的应用

目前,在水环境毒物的检测中,藻类生物测试法主要可以检测重金属类、有机化合物类、农药类等有毒物质。

3.1.1 重金属类毒物的检测

重金属对藻类最主要的毒性是可以影响其生长代谢,抑制其光合作用。

姜闻新等^[11]研究了 Pb^{2+} 和 Ni^{2+} 对铜绿微囊藻生长的影响,以及铜绿微囊藻对这两种金属离子的吸收和吸附作用。结果表明, Pb^{2+} 和 Ni^{2+} 的3种浓度:0.1, 1, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对铜绿微囊藻的抑制作用与浓度成正比。相同浓度下, Ni^{2+} 的抑制作用比 Pb^{2+} 的更大。同时,铜绿微囊藻对 Pb^{2+} 和 Ni^{2+} 都有吸附作用,且对 Ni^{2+} 的吸附效果远小于 Pb^{2+} 。

阎海等^[12]运用藻类测试的标准实验方法,得出铜、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 5.5 mg/L , 抑制蛋白核小球藻生长的 96 h-EC₅₀ 分别为 67.3 $\mu\text{g/L}$ 、473.0 $\mu\text{g/L}$ 和 17.0 mg/L 。从实验结果可以看出无论安全浓度还是 96 h-EC₅₀, 都证明对蛋白核小球藻的毒性由大到小的顺序是铜>锌>锰。金属离子对蛋白核小球藻毒性强弱的主要原因是不同金属离子与藻细胞有不同的亲和性。

3.1.2 有机毒物的毒性检测

藻类的生长抑制试验及其他检测方法可以检测有机化合物的毒性。对水体中有机物的毒性检测也是目前研究最多的一个方面。

裴国凤等^[13]研究了用不同浓度三聚氰胺处理近头状伪蹄形藻和斜生栅藻的生长抑制情况,实验结果如下:两种藻的生长速度变慢,并且随着毒物浓度增高,生长抑制效应也随之增强;对斜生栅藻的毒性效应与接触时间成正比。对近头状伪蹄形藻和斜生栅藻的 72 h-EC₅₀ 值分别是 537.67 和 485.17 mg/L ,均具有较低的毒性效应。显微结构观察显示三聚氰胺使两种藻的色素体明显受到损伤。

3.1.3 农药的毒性检测

随着农药使用量和使用范围的不断加大,流失到水体中的农药不论是种类还是数量都在增加,因此,利用藻类生物测试法对水体中的农药进行毒性检测也成为近年来研究的热点。

贺鸿志等^[14]以稻田固氮蓝藻念珠藻 FACHB85 为供试藻种来研究除草剂莠去津和丁草胺的毒性效应。实验结果表明:莠去津对 FACHB85 的毒性剂量-效应关系明显,0.8 mg/L 莠去津可明显抑制藻体生长(抑制率为 25%,且藻体断裂严重);在试验期(15 d)内莠去津对 FACHB85 的 EC₅₀ 值为 0.035~0.080 mg/L ,12 d 后其 EC₅₀ 值达到稳定比前 5 d 的 EC₅₀ 值高;随莠去津浓度增加,FACHB85 的异形胞频率有减小趋势。丁草胺在试验浓度(0~640 mg/L)范围内对 FACHB85 的生长基本无影响,且不同浓度丁草胺处理 FACHB85 的异形胞频率无显著差异。由此可见,莠去津对 FACHB85 具有很强的毒性,而丁草胺对 FACHB85 的毒性较小。

范一文等^[15]以一种具有环境耐性的单细胞绿藻杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)作为受试生物,检

测杀虫剂敌百虫的毒性作用。实验检测了敌百虫对盐藻细胞生长、 β 胡萝卜素水平及超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性的影响。实验结果表明:当敌百虫浓度小于 0.050 g/L 时,细胞的毒性响应不大。当用浓度为 0.075~0.100 g/L 的敌百虫处理盐藻时,在处理初期发现细胞生长和 β 胡萝卜素水平有降低趋势,但是一段时间后恢复。当敌百虫浓度大于 0.125 g/L ,细胞生长和 β 胡萝卜素水平都会一直降低直至检测不到。敌百虫对杜氏盐藻的 10 d-IC₅₀ 是 0.179 g/L 。实验发现在低浓度下敌百虫会刺激 CAT 活性的增长。

3.1.5 纳米材料毒性检测

纳米材料是指几何尺寸在 100 nm 以下水平,当粒子的尺寸减小到纳米量级,将导致声、光、电、磁、热性能呈现新的特性。纳米材料的优点很多,具有独特的理化性质、强度高、电磁学性能好,所以在电子、磁学、光学、生物医学、化妆品、能源、传感器和催化等领域得到广泛应用。但是纳米材料可以通过各种途径进入环境及生物体内,对环境和人体健康造成潜在的危险。因此纳米材料的生物学效应和环境安全问题不可忽视。

作为一种新型污染物,纳米材料可进入各种受纳水体,对水生生态系统各级生物产生影响。杨晓静等^[16]采用藻类生物测试法的标准实验方法,研究了纳米二氧化钛和单壁碳纳米管对普通小球藻生长的抑制效应。结果结果表明:用 0.01~500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内的纳米二氧化钛处理,发现普通小球藻的生长抑制作用不明显,而单壁碳纳米管却对普通小球藻的生长存在明显的抑制效应,其 96 h 半效应浓度(96 h-EC₅₀)为 261.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。光学和电子显微镜观察发现,与纳米二氧化钛相比,单壁碳纳米管能够凝聚并吸附大量的普通小球藻胞,从而严重抑制了普通小球藻的正常生长。

3.1.6 抗生素类毒性检测

水环境中残留的抗生素会诱导微生物产生耐药性,给非靶生物带来危害,对生态环境造成压力;我国长江三角洲、珠江三角洲等地区的地下水、地表水、畜禽水产养殖废水以及饮用水中都检测到抗生素的存在,抗生素残留给人类、环境产生了诸多危害,现在这个问题已成为近年来国际上继 POPs 之后的又一个研究热点。

秦洪伟等^[17]研究了不同浓度的氧氟沙星对斜

生栅藻生长状况、叶绿素含量和蛋白质含量的影响。实验结果表明:用不同浓度氧氟沙星处理藻液 96 h 后,随氧氟沙星浓度增加,发现叶绿素 a 和类胡萝卜素含量不断下降,但叶绿素 a 的含量是三种色素中最高的;高浓度组($168 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 中叶绿素 a 和类胡萝卜素含量分别为对照的 34.69 % 和 36.96 %。叶绿素 a/b 处于下降趋势,并呈波动变化,表明氧氟沙星胁迫使藻细胞叶绿体结构受到损害;各处理组的蛋白质含量均低于对照组且差异极显著($p < 0.01$);

姜蕾等^[18]以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 为试验材料,研究了四环素对铜绿微囊藻光合作用的影响。实验结果显示, $0.80 \sim 35.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的四环素胁迫 4 d 时,抑制了铜绿微囊藻的叶绿素荧光和潜在最大电子的传递速率,抑制作用与四环素的浓度成正比,最大抑制率分别为 39.95 % 和 44.08 %;在暴露 7 d 时,两者最大抑制率分别升高至 59.48 % 和 91.90 %。可见,四环素暴露能够阻碍铜绿微囊藻光合作用,破坏抗氧化酶系统平衡,抑制藻类生物量的增长。

3.2 藻类生物测试法在水体的预警和应急监控方面的应用

藻类是一种水生植物,悬浮于水中生活,种类比较多,均含叶绿素,在显微镜下观察是带绿色的有规则的小个体或群体。水体被污染的程度可以通过藻类在水中的含量能间接地反映出来,及时对水体水质变化作出预警,并采取相应的预防措施,非常适用于太湖流域区域蓝藻多发时期的预警和应急监控。

董晓展等^[19]研究了两种地表水应急检测方法:2 h 固定沉降法和多参数水质分析仪,实验结果证明,这两种方法实用、简捷,虽精确度不及经典方法,但是时间短,分析结果当天即可报出,并能快速反映水体中藻类发展的趋势,及时对水体水质变化作出预警,有极高的实际应用价值。

4 总结

由上可以看出,藻类生物测试法有很广泛的应用领域,并延伸出各式各样的测试指标,但到目前为止还没有建立起公认的可被广泛接受的检测系统与标准。在实际应用中结合毒物类型及受试

藻种选择适当的方法和指标,制定全面、准确的检测方法和指标,建立完整、科学、标准的毒物测试系统也是目前要解决的问题之一。

参考文献

- [1] 孙红文,黄国兰.藻类与有机污染物间的相互作用研究[J].环境化学,2003,22(5):440-444.
- [2] 谢艳,李宗芸,冯琳等.藻类毒物检测方法及其应用研究进展[J].环境科学与技术,2008,31(12):77-83.
- [3] OECD.Test Guideline 201 [S].Paris:Decision of the Council C (81)30 Fina,1981:320-323.
- [4] 袁春营,崔青曼,邵强.4 种杀虫药物对斜生栅藻生长的影响[J].水产科学,2009,28,(9):525-527.
- [5] 吕秀平,张栩,康瑞娟等. Fe³⁺对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响[J].北京化工大学学报,2006,33(1):27-30.
- [6] 荆国华,卓静,李小林等.表面活性剂 CTAC 和 STAB 对四尾栅藻的毒性效应[J].生态学杂志,2010,29(8):1573-1577.
- [7] Schreiber,U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. Photosynth Res 1986,9:261-272.
- [8] Draber W, Tietjen K, Kluth J F, et al. Herbicides in photosynthesis research. Angew Chem,1991,3:1621-1633.
- [9] Bolanos L, Madrid V A, Ciencias F, et al. Differential toxicological response to Cd in Anabaena strain PCC-7119 growth with NO₃- of NH₄⁺ as nitrogen source [J]. J Plant Physiol,1992,140:345-349.
- [10] 王丽,应波,鄂学礼.水中敌草隆的叶绿素荧光检测法[J].环境与健康杂志,2008,25(6):539-541.
- [11] 姜闻新,贾永,王从彦等. Pb²⁺和 Ni²⁺对铜绿微囊藻生长的影响以及铜绿微囊藻对这两种重金属离子的吸附作用[J].环境化学,2010,29(3):551-552.]
- [12] 阎海,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.
- [13] 裴国凤,刘国祥.三聚氰胺对藻类的毒性效应研究[J].2010,34(9):973-978.
- [14] 贺鸿志,余景,李拥军等.2 种常用除草剂对 1 株稻田固氮蓝藻的毒性效应研究 [J].安徽农业科学,2011,39(8):4478-4481,4515.
- [15] 范一文,陈辉,姜建国.农业杀虫剂敌百虫对杜氏盐藻的毒性作用[J].现代食品科技,2011,27(8):877-880.
- [16] 杨晓静,陈灏,闫海等.纳米二氧化钛和单壁碳纳米管对普通小球藻生长的抑制效应[J].生态毒理学报,2010,5(1):38-43.
- [17] 秦洪伟,陈柳芳,鲁楠等.氧氟沙星对斜生栅藻的毒性效应[J].环境化学,2011,30(4):885-887.
- [18] 姜蕾,陈书怡,尹大强.四环素对铜绿微囊藻光合作用和抗氧化酶活性的影响[J].生态与农村环境学报,2010,26(6):564-567.
- [19] 董晓展,刘玉红,邹一飞.地表水中两种藻类应急检测方法[J].科技创新导报,2010,29:107-108.