

多氯联苯对蛋白核小球藻和 斜生栅藻生长影响的研究^{*}

聂湘平¹, 蓝崇钰¹, 林 里¹, 黄铭洪²

(1. 中山大学生命科学学院/生物防治国家重点实验室, 广东 广州510275;

2. 香港浸会大学生物系, 香港 九龙塘)

摘 要: PCB₁₂₅₄ 对蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* 和斜生栅藻为 *Scenedesmus obliquus* 2 种藻类的生长有比较明显的影响, 在低质量浓度时 (< 0.4 ng/mL) 有轻微的刺激作用, 高质量浓度 (> 2.0 ng/mL) 时表现明显的抑制作用。2 种藻类的生长 96 h 有效半抑制质量浓度 (EC₅₀) 分别为 7.73 和 21.62 ng/mL。在 PCB₁₂₅₄ 作用下, 蛋白核小球藻和斜生栅藻的两种抗氧化关键酶: 超氧化物歧化酶 (SOD) 与过氧化物酶 (POD), 均有较明显的变化, 在低质量浓度作用下, 2 种酶活性都略有升高; 高质量浓度时明显受抑制, 活性逐渐下降。其中 SOD 对 PCB₁₂₅₄ 作用更为敏感。不同藻类对 PCB₁₂₅₄ 作用响应不一样, 其中斜生栅藻表现出对 PCB₁₂₅₄ 更好的耐受性。

关键词: 多氯联苯; 蛋白核小球藻; 斜生栅藻; 生长; 超氧化物酶; 过氧化物酶

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 01-0068-04

20 世纪 90 年代以来, 随着化学分析手段的提高和分子生物学的迅猛发展, 越来越多的研究者关注到一些如多氯联苯 (PCBs)、酞酸脂类 (PES)、多环芳烃 (PAHs) 这类痕量有机微污染物对生物体激素代谢及致畸、致突变、致癌方面的作用, 引起人们对这类物质在环境影响方面的重新评价和研究。这些有机物一般在自然水体中含量很微小 (一般在 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 数量级上), 但因为它们一般很难或很缓慢降解, 易在生物体内富集, 并且通过食物链传播、放大, 一旦人类等一些高营养级生物食用这些含有机物的生物, 便会受到这类物质的危害, 或有暴露于这类物质的危险之中, 对这类物质的研究也再次成为当今国际环境科学所关注的焦点之一。藻类作为水生生态系统的第一营养级对于其生态系统的平衡和稳定起着极其重要的作用。在水生生态毒理研究中, 生物测试中的藻类测试往往因为其为单细胞生物, 不仅生长周期短, 而且对许多毒物比其他高等生物更为敏感、直接, 是较理想的试验材料。国内关于多氯联苯对淡水藻类生长影响及毒性机理研究还不多^[1], 本文探讨了多氯联苯 (PCBs) 对两种淡水藻类: 蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* 和斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 生长的影响。

1 材料与方法

(1) 试剂与仪器: PCB₁₂₅₄ 由香港浸会大学生物系提供 (AccuStandard Inc. USA), 丙酮溶解配成母液储存待用, 实验前再用蒸馏水配置一系列浓度 (ng/mL): 0, 0.08, 0.4, 2.0, 10.0, 50.0; 光照培养箱; 细胞破碎仪; 恒温振荡器; 紫外分光光度计; 显微镜, 血球计数板。

(2) 试验材料: 蛋白核小球藻、斜生栅藻, 由中国科学院水生生物研究所提供藻种。

(3) 实验条件: 实验容器 500 mL 三角瓶, 培养体积 200 mL, 每个浓度设置 3 个平行样, 温度 (24 ± 1) °C; pH 7.8; 培养基参照文献 [2]; 光照周期 16 h : 8 h (L:D), 光照强度 3000 lx; 藻类接种初始密度 5×10^5 个/mL, 置光照培养箱静止培养, 每天震荡 3 次, 每次 10 min。

(4) 生物量测定: 分别于培养 24, 48, 72, 96, 120 h 后, 取样通过显微镜下血球计数板进行藻类计数和在波长 650 nm 下测定藻类光密度, 建立不同藻类细胞密度和光密度之间线性关系, 以计数的藻细胞浓度和光密度表示藻生物量, 通过二者线性关系进行检验。

(5) 藻类生长阻碍率: 按照国际经合组织

* 收稿日期: 2001-06-01;

基金项目: 香港 R.G.C 项目科研基金资助

作者简介: 聂湘平 (1966—) 男, 博士生; 通讯联系人, 蓝崇钰; Email: ls04@zsu.edu.cn

(OECD) 规定的藻类生长阻碍率标准方法^[3]:

$$\mu_i = \ln(N_i/N_0) / (t_i - t_0)$$

$$\rho_i = \frac{\mu_0 - \mu_i}{\mu_0} \times 100$$

式中 N_i 为某一时间后细胞浓度; N_0 : 细胞起始浓度; μ_i 为某一时间后细胞生长速度; μ_0 为对照细胞生长速度; ρ_i 为某一时间某一浓度的阻碍率。

(6) 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定^[4,5]: 本实验采用四氮唑蓝 (NBT) 光化学还原反应法, 反应总体积为 5 mL, 其中 5×10^{-3} mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH 7.8), 75×10^{-6} mol/L 四氮唑蓝, 13×10^{-3} mol/L DL-甲硫氨酸; 2×10^{-6} mol/L 核黄素, 1×10^{-6} mol/L EDTA; 藻细胞酶提取液 0.2 mL, 荧光灯光照 15 min 后于 560 nm 测定其吸光度。

$$\text{SOD 单位} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}} \times 50\%} \times \text{样品稀释倍数}$$

(7) 过氧化物酶 (POD) 测定^[6]: 参照 X. H. 波钦诺克方法测定。采用改进愈创木酚法, 反应体系包括 2.80 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液, 1.0 mL $\varphi = 2\%$ H_2O_2 , 1.0 mL 0.05 mol/L 愈创木酚和 0.2 mL 酶提取液, 反应 15 min 后, 与 470 nm 下测定反应体系吸光度变化。酶活性单位定义为: 每 min 内 ΔA_{470} 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活力单位。 ΔA_{470} 为反应时间内吸光度的变化; w 为藻类新鲜质量, g; t 为反应时间, min。

$$\text{酶比活力} = \frac{\Delta A_{470}}{0.01 \text{ wt}} \times \text{样品稀释倍数}$$

2 结果与讨论

2.1 PCBs 对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长的影响

由图 1 可以看出, 随 PCBs 质量浓度加大, 蛋白核小球藻与斜生栅藻藻细胞总数量呈逐渐下降趋势, 藻类生长逐渐受到抑制, 在较低质量浓度 (0.08, 0.4 ng/mL) 时其相对生长速率稍有增加, 表现出轻微的刺激生长作用, 在较高质量浓度 (> 10 ng/mL) 藻细胞增长缓慢, 甚至为负增长, 外观上藻液变黄或无色, 显微镜下观察, 叶绿体解体, 细胞结构也不完整, 破碎细胞残体比率高, 至 50 ng/mL 时完全停止生长。2 种藻 96 h 半抑制质量浓度 (EC_{50}) 分别为 7.73 ng/mL 和 21.62 ng/mL, 其中斜生栅藻生长速率下降较缓慢; 对两种藻抑制作用达 90% 以上时的 PCBs 质量浓度为 13.67 ng/mL。

和 37.94 ng/mL; 在实验过程中, 加有 PCBs 的藻液培养 24 h 后 2 种藻的生长速率有所下降, 尤其在较高质量浓度 PCBs 中, 生长速率急剧下降, 但 48 h 后其生长逐渐恢复, 这可能与藻细胞刚接种到新环境有一适应过程有关, 待细胞适应后开始快速增殖。

在 24 ~ 120 h 的培养过程中, 随培养时间的延长, 细胞分裂旺盛, 进入对数生长期, 藻细胞数量逐渐增加。在较低质量浓度 (0.08, 0.40 ng/mL) 随时间延长, 藻细胞数量增长较快, 蛋白核小球藻和斜生栅藻相对生长速率在各质量浓度培养液中, 在 48 h 之前有一较大的增长, 其后随时间延长变化不大。其中蛋白核小球藻生长速率远大于斜生栅藻, 其相对生长速率在 48 h 后达到最大, 以后略有下降; 斜生栅藻到 72 h 后其生长速率才达到最大。

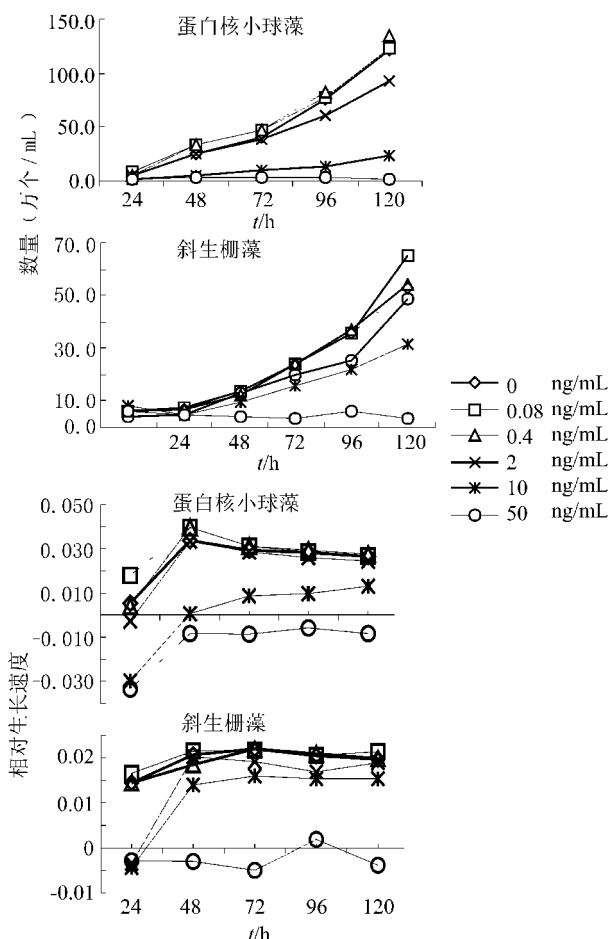


图 1 PCB₁₂₅₄ 不同质量浓度作用下 2 种藻类数量及其相对生长速率变化

Fig 1 Changes of algae densities and relative growth rates under different concentrations of PCB₁₂₅₄

在表 1 可以更清楚的看出 2 种藻类的这种剂量—效应和时间—效应的变化。在较低质量浓度处理中蛋白核小球藻 ($<0.08, 0.40\text{ ng/mL}$), 斜生栅藻 ($<0.40\text{ ng/mL}$), 其生长阻碍率甚至为负值, 随质量浓度增加, 阻碍率逐步增强; 除 24 h 处理外, 其他质量浓度处理随时间延长, 其阻碍率逐步增加。

表 1 PCB₁₂₅₄ 不同质量浓度
作用下藻类生长阻碍率变化

Tab 1 Changes of algae growth inhibition rates
under different PCBs concentrations %

藻类	t/h	$\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$					
		0	0.08	0.40	2.00	10.0	50.0
蛋白核小球藻	24	0.000	-241.5	23.85	155.1	675.4	744.0
	48	0.000	-17.70	-18.13	0.41	98.37	125.1
	72	0.000	-5.91	-6.45	2.77	70.39	129.8
	96	0.000	-0.32	-3.15	8.35	65.87	120.9
	120	0.000	-0.60	-3.36	8.15	50.55	131.5
斜生栅藻	24	0.000	-14.62	0.000	124.1	130.5	120.0
	48	0.000	-3.901	10.746	2.517	32.591	114.4
	72	0.000	1.312	0.000	12.92	27.42	122.5
	96	0.000	-0.621	-2.530	17.47	24.88	90.7
	120	0.000	-8.819	-1.032	3.604	22.00	119.4

2.2 PCBs 对藻类 SOD 和 POD 的影响

从图 2 可看出不同浓度的 PCBs 对藻类 SOD、POD 有着明显的作用。在较低质量浓度时 2 种藻类 SOD 和 POD 活性有所增加; 随质量浓度加大, 其活性逐步降低。据报道^[7]植物体在受到轻度逆境胁迫时, SOD、POD 活性会有所升高, 而受到重度逆境胁迫时其活性会有急剧下降, 在本实验中, 以蛋白核小球藻和斜生栅藻为材料也得到类似的结果。

研究表明^[4], 外源性化合物进入生物细胞后会 导致大量自由基产生, 包括 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{OH}^{\cdot-}$ 等。许多化合物对生物体的毒性机理都与诱导体内自由基反应有关, 一般正常生理条件下, 生物体内各种活性氧自由基的产生与清除处于一种动态的平衡, SOD 与植物体内 POD、谷胱甘肽还原酶、维生素 C、维生素 E、辅酶 Q 等组成了细胞的抗氧化防御系统, 能有效的清除各种代谢过程中产生的活性氧等各种自由基, 防止细胞膜系统发生过氧化作用。此时一般自由基含量很低, 一旦受到逆境胁迫(如各种射线、病害、污染、药物毒害等), 这种平衡就会破坏, 造成各种氧自由基的积累而引起毒害。唐学

玺等研究结果表明^[7,8], 有机磷农药主要通过降低藻细胞的抗氧化系统 SOD、POD 关键酶的活性, 使细胞内自由基过量积累而造成藻细胞伤害。

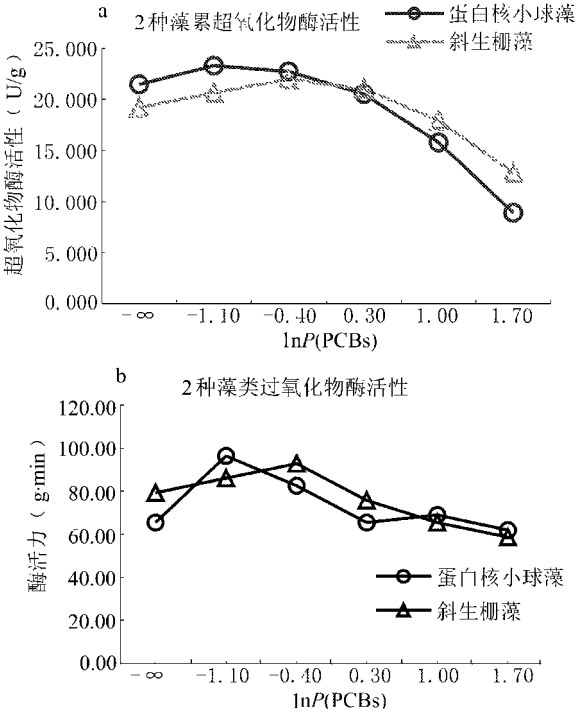


图 2 PCB₁₂₅₄ 不同质量浓度作用下
2 种藻类 SOD 和 POD 的变化

Fig 2 Changes of SOD and POD of two algae
under different PCB₁₂₅₄ concentrations

从图 3 也可看出, PCB₁₂₅₄ 对两种藻类生长阻碍率和超氧化物酶活性影响有比较明显的负相关性, 随质量浓度增加两种藻类的超氧化物酶活性逐步下降。当酶活性下降不足以消除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 活性氧, 导致 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累, 同时 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累进而引起 H_2O_2 积累。在叶绿体中, H_2O_2 活性氧的清除是通过 SOD 酶来催化完成的; H_2O_2 的清除是通过过氧化物酶体系, 当这种清除体系遭到破坏时, 导致 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 积累, 进而引起 H_2O_2 积累, 就会导致膜脂质过氧化, 从而破坏叶绿体结构, 致使叶绿素含量下降, 细胞生长受阻。有资料报道^[9,10], 膜损伤是影响藻细胞分裂、繁殖, 抑制藻类生长的一主要原因。在本实验中, 随浓度增加藻类的生长阻碍率逐步增强, 除了 SOD、POD 关键酶的活性的变化, 高浓度处理组也可看到藻细胞结构的破坏、叶绿素含量下降, 藻液变黄的等现象, 说明氧自由基的积累, 致使膜系统脂质过氧化而破坏细胞和叶绿体等细胞器膜结构可

能是多氯联苯毒害藻类的途径之一。

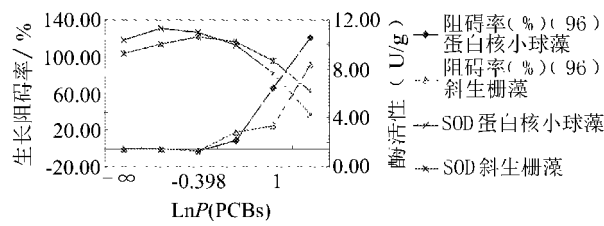


图 3 PCB₁₂₅₄ 不同质量浓度作用下
2 种藻类生长阻碍率和 SOD 变化

Fig 3 Changes of growth-inhibition rates and SOD of
the two algae under different PCB₁₂₅₄ concentrations

3 结 论

(1) PCB₁₂₅₄对蛋白核小球藻和斜生栅藻 2 种藻类的生长有比较明显的影响，在较低质量浓度时(<0.4 ng/mL) 有轻微的刺激作用，较高质量浓度(>2.0 ng/mL) 时表现明显的抑制作用，至 10 h 生长完全停止。对蛋白核小球藻和斜生栅藻 2 种藻类的生长 96 h EC₅₀ 分别 7.73 ng/mL 和 21.62 ng/mL。PCB₁₂₅₄对两种藻类的生长作用表现出较明显的剂量—效应关系。

(2) 在 PCB₁₂₅₄作用下，蛋白核小球藻和斜生栅藻的 2 种抗氧化关键酶：SOD 与 POD 均有较明显的变化，在较低质量浓度作用下，2 种酶活性都略有升高；较高质量浓度时明显受抑制，活性逐渐下降。

其中 SOD 对 PCB₁₂₅₄作用响应更为敏感。

(3) 不同藻类对 PCB₁₂₅₄作用响应不一样，其中斜生栅藻表现出对 PCB₁₂₅₄更好的耐受性。

参考文献:

[1] 李永祺, 丁美丽. 海洋污染生物学[M] . 北京: 海洋出版社, 1991: 389.

[2] 华汝成. 单细胞藻类培养与利用[M] . 北京: 农业出版社, 1987: 286.

[3] 刘静铃, 郎佩珍. 硝基芳烃类对斜生栅藻的毒性及中毒症状[J] . 环境科学, 1995, 16(2): 7—10.

[4] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M] . 北京: 科学出版社, 1989: 94.

[5] 庞战军, 周玫, 陈媛. 自由基医学研究方法[M] . 北京: 人民卫生出版社, 2000: 117—119.

[6] X H. 波钦诺克. 植物生物化学分析方法[M] . 北京: 科学出版社, 1981: 197—201.

[7] 唐学玺, 李永祺. 久效磷对海洋微藻的毒性机理的初步研究[J] . 环境科学学报, 1998, 18(2): 204—207.

[8] 唐学玺, 李永祺. 久效磷对叉鞭金藻的毒性[J] . 水产学报, 1999, 23(2): 132—137.

[9] 唐学玺, 李永祺, 黄健. 对硫磷对扁藻和杜氏藻膜脂过氧化与脱脂化伤害[J] . 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 295—298.

[10] WINSTON G W, DIGIULIO R T. Peroxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J] . Aquatic Toxicology, 1991, 19: 137—161.

The Effects of Aroclor 1254 on the Growth of
Chlorella pyrenoidosa and *Scenedesmus obliquus*

NIE Xiang ping¹, LAN Chong yu¹, LIN Li¹, HUANG Ming hong²

(1. School of Life Sciences //State Key Laboratory for Biocontrol,
Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275; China;

2. Biology Department, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong, China)

Abstract: The results showed that PCB₁₂₅₄ had evident effects on the growth of two algae species (*Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*). Soft stimulation effect appeared in lower concentration and strong inhibition effect in higher concentration. The EC₅₀ upon *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* was 7.73 ng/mL and 21.62 ng/mL respectively. The superoxidase (SOD) and peroxidase (POD) in two algae also related to the PCB₁₂₅₄ to some extent. The activity of two enzymes rose lightly with the increase of concentration of PCB₁₂₅₄ but dropped distinctly in higher concentrations. Of that, the SOD showed more sensitive to PCB₁₂₅₄. *Scenedesmus obliquus* showed stronger resistance than *Chlorella pyrenoidosa* to PCB₁₂₅₄.

Key words: polychlorinated biphenyls (PCB₁₂₅₄); *Chlorella pyrenoidosa*; *Scenedesmus obliquus*; growth; superoxidase; peroxidase