

三苯基氯化锡对等鞭金藻生理功能的影响*

李正炎 周名江 李 钧 颜 天

(中国科学院海洋研究所)

有机锡化合物是迄今为止人为引入海洋环境中的毒性最大的物质之一。自本世纪 60 年代开始有机锡被大量用作海洋防污涂料的活性成分,它的广泛使用给世界各国沿海地区带来了一系列的生态灾难(周名江等, 1994)。国外关于有机锡对海洋动物的毒性影响已有大量的报道 (Bryan & Gibbs, 1986; Wade *et al.*, 1988; Axiak *et al.*, 1995), 而有机锡对海洋浮游植物的毒性研究则相对较少, 主要集中于有机锡对藻类生长、初级生产力 (Callow & Evans, 1981; Wong *et al.*, 1983) 等方面的影响。本文以等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 为实验生物, 系统研究了有机锡对等鞭金藻生长、光合、呼吸、细胞色素含量以及细胞 C, N, P 含量的影响, 为评价有机锡对海洋浮游植物的毒性效应提供了基础资料。

一、材料与方 法

1. 实验生物 等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 藻种由中国科学院海洋研究所藻类室提供, 在生物培养室中进行无锡污染单种培养。光源为 40W 白色荧光灯, 光照度 2000—2500Lx, 光暗周期 L:D = 12h:12h, 温度 16—18℃, 培养用海水 (pH = 8.1, 盐度 = 32) 取自青岛近岸, 经四层筛绢过滤、煮沸消毒, 冷却后按一定比例加入 N, P, K、微量元素、维生素等营养盐后用作培养液。各种营养成分的含量: N 为 10.65mg/L; P 为 0.899mg/L; K 为 24.30mg/L; Fe 为 87.36μg/L; Vb₁ 为 0.1mg/L; Vb₁₂ 为 0.5μg/L。

2. 实验药品 三苯基氯化锡 (Triphenyltin, TPTC), 分子式 (C₆H₅)₃SnCl, 分子量为 385.5, 含锡量为 30.4%, 纯度在 99.99% 以上, 白色粉末, 日本进口, 用分析纯丙酮配成 500mg/L 母液, 稀释后用于实验。

3. 实验方法 实验用容器为 3L¹三角瓶, 经 1:3 盐酸浸泡 12h, 冲洗干净后用于实验。每瓶移入一定量新鲜、煮沸、冷却的海水, 加入营养盐, 将正处于指数生长期的等鞭金藻接种到各三角瓶中, 接种密度为 10⁵ 细胞/mL, 再加入一定量的 TPTC, 使各瓶中 TPTC 浓度分别为 0, 0.15, 0.30, 0.60, 1.20, 2.40μg/L, 实验持续 96h, 培养条件为: 光暗比 L:D = 12h:12h, 光照强度为 3500Lx, 温度 18±1℃。在实验开始后 0—4h, 48—

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2740 号。

本课题为国家自然科学基金资助项目, 99290600 号。

收稿日期: 1995 年 9 月 7 日。

52h, 96—100h 时间区段内分别用 Winkler 溶氧法测定细胞光合和呼吸速率, 用丙酮提取三色法测定叶绿素 a 含量。在实验开始和结束时, 分别测定细胞 C, N, P 含量。细胞 C, N 含量测定方法为: 取一定量的藻液, 用预先在 460℃ 马弗炉中灼烧除有机碳并称重的玻璃纤维滤膜 (Whatman GFF) 过滤, 70℃ 烘干称重后用 PE240C 元素分析仪测定 (测定条件为氧化温度 $760 \pm 10^\circ\text{C}$, 还原温度 $600 \pm 10^\circ\text{C}$, 鉴定器为热导池, 进样量约 2mg)。细胞 P 含量测定采用过硫酸盐消化法, 分别测定藻液的总磷浓度和无机磷酸盐浓度, 两者之差除以细胞密度即为细胞磷含量。实验结束后发现, TPTC 对等鞭金藻细胞生理和生长的影响在 $1.2\text{--}2.4\mu\text{g/L}$ 之间出现一个拐点, 为了更精细地研究 TPTC 的毒性效应, 作者作了补充实验, 在 $1.2\mu\text{g/L}$ 和 $2.4\mu\text{g/L}$ 之间插入一个浓度值 $1.8\mu\text{g/L}$, 补充实验条件与第一次实验基本一致。

二、实验结果

1. 三苯基氯化锡对等鞭金藻光合速率的影响 表 1 和图 1, 2 反映了 TPTC 对等鞭金藻光合速率的影响。在 TPTC 处理 0—4h 内, 等鞭金藻光合速率略有下降 (图 1);

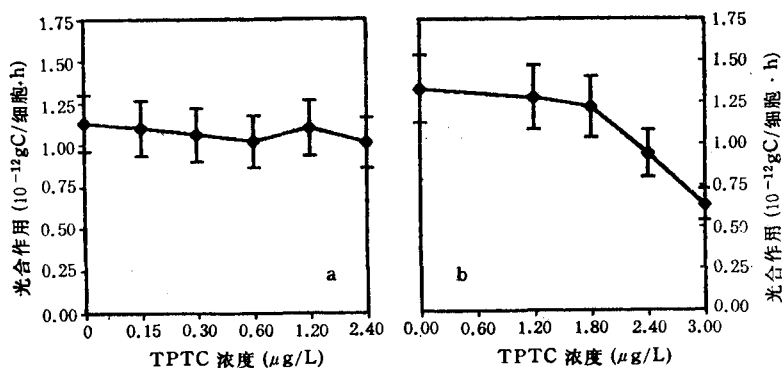


图 1 三苯基氯化锡对等鞭金藻光合作用的影响(0—4h)

a. 第一次实验; b. 第二次实验

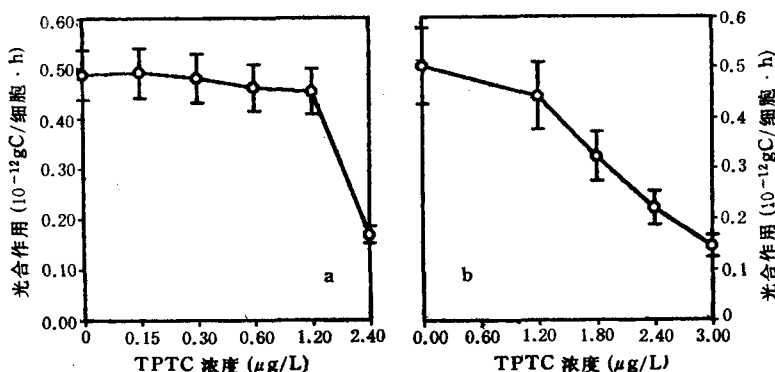


图 2 三苯基氯化锡对等鞭金藻光合作用的影响(96h)

a. 第一次实验; b. 第二次实验

实验进行 48h 后,低浓度 TPTC($<1.2\mu\text{g/L}$) 的处理组中光合速率与对照组无明显差别,当 TPTC 浓度大于 $1.2\mu\text{g/L}$ 时,光合速率明显下降(表 1);实验进行 96h 后,结果与 48h 基本相同;当 TPTC 浓度达到 $1.2\mu\text{g/L}$ 以上时,等鞭金藻光合速率显著受抑;当 TPTC 浓度达到 $2.4\mu\text{g/L}$ 时,光合速率只有对照组的 35% (图 2)。

以所列 1—4 图的右图作为补充实验结果,由于不是同一次实验,所以只作为原实验补充论证用,在文中未作讨论。

表 1 三苯基氯化锡对等鞭金藻光合速率、呼吸速率、叶绿素 a 含量及叶绿素光合效率的影响

时 间	TPTC 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	0	0.15	0.30	0.60	1.20	2.40
0—4h	光合速率 ($10^{-12}\text{gC}/\text{cell} \cdot \text{h}$)	1.13	1.10	1.06	1.02	1.02	0.86
	呼吸速率 ($10^{-12}\text{gC}/\text{cell} \cdot \text{h}$)	0.094	0.090	0.101	0.113	0.124	0.120
48h	光合速率 ($10^{-12}\text{gC}/\text{cell} \cdot \text{h}$)	1.56	1.53	1.56	1.50	1.49	0.47
	呼吸速率 ($10^{-12}\text{gC}/\text{cell} \cdot \text{h}$)	0.109	0.116	0.135	0.161	0.180	0.184
	叶绿素 a 含量 ($10^{-12}\text{g}/\text{cell}$)	0.136	0.142	0.163	0.182	0.203	0.073
	叶绿素 a 效率 ($\text{gC}/\text{gChla} \cdot \text{h}$)	11.5	10.8	9.60	8.20	7.30	6.50
96h	光合速率 ($10^{-12}\text{gC}/\text{cell} \cdot \text{h}$)	0.49	0.49	0.48	0.46	0.45	0.17
	呼吸速率 ($10^{-12}\text{gC}/\text{cell} \cdot \text{h}$)	0.044	0.045	0.047	0.052	0.056	0.060
	叶绿素 a 含量 ($10^{-12}\text{g}/\text{cell}$)	0.163	0.164	0.171	0.184	0.196	0.069
	叶绿素 a 效率 ($\text{gC}/\text{gChla} \cdot \text{h}$)	2.99	3.00	2.81	2.51	2.32	2.45

2. 三苯基氯化锡对等鞭金藻呼吸速率的影响 实验浓度范围内的 TPTC 均能增加等鞭金藻的呼吸速率。在 TPTC 处理 0—4h 范围内, $0.15\mu\text{g/L}$ 以上的 TPTC 均能促进等鞭金藻细胞的呼吸作用,当 TPTC 浓度达到 $2.4\mu\text{g/L}$ 时,细胞的呼吸速度开始下降;实验进行 48h 后, TPTC 处理组呼吸速率仍然高于对照组, $1.2\mu\text{g/L}$ 的 TPTC 处理组中,细胞呼吸速率为对照组的 165% (表 1);实验进行 96h 后, $1.2\mu\text{g/L}$ 的 TPTC 处理组中,细胞呼吸速率为对照组的 127%;当 TPT 浓度达到 $2.4\mu\text{g/L}$ 以上时,细胞呼吸速率基本不再上升(表 1)。

3. 三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞中叶绿素 a 含量的影响 表 1, 图 3 反映了三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞中叶绿素 a 含量的影响。实验进行 48h 后,低浓度的 TPTC ($1.2\mu\text{g/L}$ 以下)能促进细胞叶绿素 a 的合成, $1.2\mu\text{g/L}$ 的 TPTC 处理组中,叶绿素 a 含量为对照组的 150%,当 TPT 浓度达到 $2.4\mu\text{g/L}$ 以上时,叶绿素 a 的合成受到了抑制(表 1);实验进行 96h 后,低浓度的 TPTC ($1.2\mu\text{g/L}$ 以下)处理组中,细胞叶绿素含量仍然高于对照组,当 TPT 浓度达到 $2.4\mu\text{g/L}$ 时,叶绿素含量只有对照组的 42—62%,表现出下降趋势(图 3),这一结果与高尚德等(1994)的结论非常一致。

4. 三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞叶绿素 a 光合效率的影响 实验发现, TPTC 处理组中,叶绿素 a 的光合效率均低于对照组。总的趋势是,叶绿素 a 的光合效率随 TPTC 浓度的升高而下降。实验进行 48h 后, $1.2\mu\text{g/L}$ 的 TPTC 处理组中,叶绿素 a 的光合效率只有对照组的 63% (表 1);实验进行 96h 后, $1.2\mu\text{g/L}$ 的 TPTC 处理组中,叶绿素 a

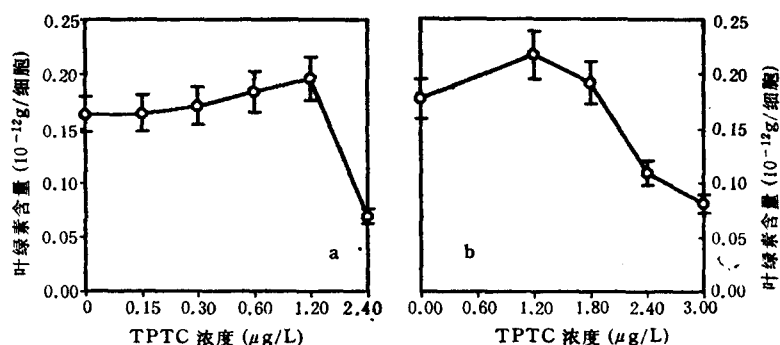


图3 三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞叶绿素 a 含量的影响(96h)

a. 第一次实验; b. 第二次实验

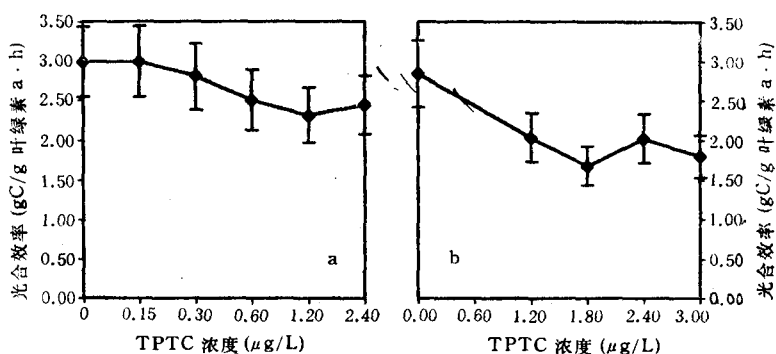


图4 三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞中叶绿素 a 光合效率的影响(96h)

a. 第一次实验; b. 第二次实验

表2 三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞中 C,N,P 元素含量及比例的影响

TPTC浓度(µg/L)	0	0.15	0.30	0.60	1.20	2.40
C(10 ⁻¹² g/cell)	8.859	8.458	8.07	7.596	7.218	6.704
N(10 ⁻¹² g/cell)	1.559	1.498	1.437	1.376	1.28	1.034
P(10 ⁻¹² g/cell)	0.157	0.149	0.14	0.132	0.121	0.1
C:N (in wt.)	5.682	5.648	5.616	5.519	5.639	6.485
C:P (in wt.)	56.43	56.77	57.64	57.98	59.65	67.04
N:P (in wt.)	9.930	10.054	10.264	10.424	10.579	10.34
C:N (in at.)	6.629	6.589	6.552	6.439	6.579	7.566
C:P (in at.)	145.8	146.7	148.9	149.8	154.1	180.2
N:P (in at.)	21.99	22.26	22.72	23.08	23.42	22.9
C:N:P (in at.)	145.8:21.99:1	146.7:22.26:1	148.9:22.72:1	149.8:23.08:1	154.1:23.42:1	180.2:22.9

的光合效率只有对照组的78% (表1, 图4)。

5. 三苯基氯化锡对等鞭金藻细胞中 C, N, P 元素含量及比例的影响 从表2可以

看出, TPTC 处理组中, 细胞 C, N, P 含量均有下降趋势, 其中 P 含量下降幅度最大。当 TPTC 浓度为 $2.4\mu\text{g/L}$ 时, 细胞 C, N, P 含量分别比对照组下降了 24%, 34% 和 36%。TPTC 也改变了藻细胞中各元素之间的比例, 与对照组相比, 各处理组中, 细胞 C:P 比值和 N:P 比值都有所升高, 而 C:N 比值变化无明显规律。

三、讨 论

(1) 试验开始后 0—4h 内, 等鞭金藻细胞的光合、呼吸速率相对较弱, 这可能是由于其细胞突然改变了生长环境而出现一段迟滞期, 细胞生理活动暂时受抑所致; 试验开始 48h 后, 细胞正处于指数生长期, 细胞快速分裂, 各项生理活动都处于旺盛阶段, 表现在光合、呼吸速率都加快; 试验进行 96h 后, 细胞开始进入稳定期, 分裂速度减慢, 表现在光合、呼吸速率都开始降低。在整个实验过程中, 细胞中叶绿素 a 含量逐渐升高, 这可能是随着实验的进行, 培养液中藻细胞密度逐渐增大, 细胞间相互遮荫, 每个细胞接收到的光能减少所致, 为了弥补这种损失, 细胞中叶绿素 a 的合成增加, 以适应光线的不足; 另外到了实验后期, 细胞的分裂速度减慢, 这也可能是细胞叶绿素 a 含量增加的一个原因。

(2) 当生物处于轻微染毒状态时, 为了加速毒物在体内的代谢, 生物体会出现生理亢奋状态 (Stebbing, 1982)。本实验也发现同样的现象, 在低浓度 TPTC ($1.2\mu\text{g/L}$ 以下) 处理组中, 藻细胞为了获得更多的能量以加速 TPTC 在细胞内的降解, 出现了呼吸增强现象; 当 TPTC 浓度达到 $2.4\mu\text{g/L}$ 以上时, 呼吸速率开始下降, 说明这时细胞线粒体的氧化磷酸化过程已经受到严重损伤。光合速率在 $2.4\mu\text{g/L}$ 以上的 TPTC 处理组中也开始下降, 说明藻细胞的叶绿体功能已经受到损伤。叶绿素 a 含量在低浓度 TPTC ($1.2\mu\text{g/L}$ 以下) 处理组中高于对照组, 这反映细胞的毒性亢奋状态, 也是细胞为了弥补叶绿素 a 光合效率下降而作出的适应性代谢调整; 当 TPTC 浓度超过 $2.4\mu\text{g/L}$ 时, 细胞机能受到严重损伤, 叶绿素 a 合成反应也受到抑制, 细胞中叶绿素 a 含量开始下降。从叶绿素 a 的光合效率来看, 总的趋势是随着 TPTC 浓度的升高, 叶绿素 a 光合效率下降, 但到了实验后期, 由于对照组和高浓度 TPTC 处理组中细胞密度差别较大, 对照组细胞出现遮荫效应, 因而缩小了对照组与高浓度 TPTC 处理组之间叶绿素 a 光合效率的差距。

(3) 从藻细胞的元素组成及比例来看, TPTC 处理组中, 细胞 C, N, P 含量均低于对照组, 而 P 含量下降更明显, 表现在 C:P 比值和 N:P 比值都随 TPTC 浓度的升高而增大。P 在细胞的物质代谢和能量代谢中起着重要的作用, 磷脂是细胞内膜结构的重要成分, 与膜的通透性有关, 也是原生质的重要成分之一。超微结构发现, TPTC 处理组中细胞的双层膜结构被破坏, 原生质出现空泡化, 这与胞内磷含量的降低是一致的。另外, 磷也是细胞内高能化合物三磷酸腺苷 (ATP) 的重要构件, 磷含量的降低很可能也与 ATP 代谢有关, 这还需要进一步深入地研究。

参 考 文 献

- 周名江等, 1994, 海洋环境中的有机锡及其对海洋生物的影响, 环境科学进展, 2(4): 67—76。
高尚德等, 1994, 有机锡对海洋微藻的生理效应 I. 三苯基锡和三丁基锡对光合色素含量的影响, 海洋与湖沼, 25(3):

- 259—265.
- Axiak, V. *et al.*, 1995, Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean, *Mar. Biol.*, **21**: 685—691.
- Bryan, G. W. & P. E. Gibbs, 1986, The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around Southwest England: Evidence for the effects of tributyltin from antifouling paints, *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, **66**: 611—640.
- Callow, M. E. & L. V. Evans, 1981, Some effects of tributyltin chloride on *Achnanthes subsessilis*, *Botanica Marina*, **24**: 201—205.
- Stebbing, A. R. D., 1982, Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors, *Sci. Tot. Envir.*, **22**: 213—234.
- Wade, T. L. *et al.*, 1988, Tributyltin contamination in bivalve from United States coastal estuaries, *Environ. Sci. Technol.*, **22**: 1488—1493.
- Wong, P. T. S. *et al.*, 1983, The use of algal batch and continuous techniques in metal toxicity study, *Aquatic Toxicology*, 449—466.

EFFECTS OF TRIPHENYLTIN CHLORIDE(TPTC) ON PHYSIOLOGY OF *ISOCHRYISIS* *GALBANA* CELLS*

Li Zhengyan, Zhou Mingjiang, Li Jun and Yan Tian
(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

Batch culture studies on the effects of triphenyltin chloride (TPTC) on photosynthesis, respiration, chlorophyll-a content and carbon, nitrogen, and phosphorus content of *Isochrysis galbana* cells showed that low levels of triphenyltin ($\leq 1.2 \mu\text{g/L}$) promoted the respiration rate, increased chlorophyll-a content and decreased photosynthetic efficiency of chlorophyll-a. Exposed to $1.2 \mu\text{g/L}$ triphenyltin for 96 h, the cells decreased photosynthetic rate by 8%, increased respiration rate by 27%, increased chlorophyll-a content by 20% and decreased photosynthetic efficiency by 27%. Exposed to $2.4 \mu\text{g/L}$ triphenyltin for 96 h, the algal cells showed weakening in all of these physiological functions. Triphenyltin decreased the content of carbon, nitrogen and phosphorus in the algal cells. Phosphorus content was the most severely decreased. Exposed to $2.4 \mu\text{g/L}$ triphenyltin for 96 h, the algal cells' content of C, N and P decreased by 24%, 34% and 36%, respectively.

* Contribution No. 2740 from the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.