

# 基于微藻运动性的海洋污染物生态毒性效应研究

韩双<sup>1</sup>, 汪林<sup>1</sup>, 袁英兰<sup>2</sup>, 王云华<sup>1</sup>, 魏俊峰<sup>1</sup>, 郑国侠<sup>1</sup>

(1. 大连大学 环境与化学工程学院 环境微全分析实验室, 大连 116622; 2. 沈阳环境科学研究院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 海洋污染生态毒性效应研究是认识和评价海洋环境质量现状及其变化趋势的重要依据。发展快速、有效的测试方法和指标对于防治污染、保护海洋环境具有重要意义。作者以海洋微藻运动性作为生理指标研究了典型海洋污染物的生态毒性效应。在本实验所测试的浓度范围内, 铜(0~4.41 μmol/L)和苯酚(0~9.03 mmol/L)分别在 2 h 内对亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)的能动性, 包括运动方式、运动能力和游泳速度产生了一定的影响, 且都呈现良好的剂量-效应关系。经 Logistic 模型拟合分析求得铜和苯酚对亚心型扁藻的 2 h-EC<sub>50</sub> 分别为 2.21 μmol/L~2.65 μmol/L 和 4.47 mmol/L~5.71 mmol/L。在联合毒性实验中, 铜和苯酚混合后, 对亚心型扁藻的 2h-EC<sub>50</sub>>1TU, 其联合毒性效应方式表现为拮抗作用。上述结果与传统毒性试验(包括微藻 72 h 生长抑制试验, 24 h~48 h 大型蚤静止试验和 96 h 鱼类死亡试验)结果均是可比的, 但相对所需测试时间较短, 表明微藻运动性作为一种新型的生物测试指标可以对海洋污染物生态毒性(包括单一和联合毒性)进行快速、有效的评价。

**关键词:** 运动性; 海洋微藻; 单一毒性; 联合毒性; 海洋污染

**中图分类号:** Q945      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3096(2019)06-0034-08

**DOI:** 10.11759/hyxx20190404001

近年来随着工农业的发展, 海洋环境正在受到严重的破坏, 重金属、石油、有机物等对海洋的污染率在不断地增加。其中, 苯酚是最简单的酚, 也是水体中酚类污染物的最主要成分。铜是植物生长发育必需的微量元素, 但超过一定浓度会对生物产生毒害作用, 是水体中广泛存在的金属类污染物<sup>[1]</sup>。这些污染物的种类不同、物理化学性质不同, 对生物体的毒作用机制也不同。同时, 各类污染之间的相互作用极为复杂, 可能存在处置拮抗、受体拮抗或诱导受体表达加剧毒性等生理效应<sup>[2]</sup>。因此, 无论是对海水质量标准加以完善还是对受污海域进行风险评估都需要了解污染物生态毒性效应, 包括单一和联合毒性效应。

海洋微藻是海洋初级生产力的重要组成部分, 是海洋食物链的基础。研究污染物对海洋微藻的毒害作用, 是研究它们对海洋生态系统影响的前提。众多研究者在过去的几十年中进行了大量的污染物海洋微藻生物毒性效应研究, 建立了一系列生理测试指标(主要包括生长抑制、光合作用、呼吸作用、ATP、酶活性和叶绿素荧光参数等)<sup>[3-5]</sup>。除了上述指标之外, 能动行为也是海洋微藻常见的生理特征。大量研究证明, 海洋真光层内浮游微藻基本是能动的, 尤其是 90%以上的赤潮种都具有很强的游泳能力<sup>[6-7]</sup>, 从

而与一系列重要的海洋生态学现象, 如垂直迁移、种群成层、斑块状分布、逃避分布等相关联<sup>[8-11]</sup>, 对海洋生态系统及整体生物圈起到重要的宏观调节作用。能动行为是海洋微藻显著的生理特征, 同鱼类腮动、回避行为、水蚤游泳行为、摄食行为这些应急测试指标类似, 同样属于表观行为指标, 具有明显的直观性。更重要的是微藻能动行为能够从亚细胞水平与海洋宏观的生态学现象相关联, 不仅敏感, 而且具有强烈的生态学指示意义。然而相对于其他测试指标, 以海洋微藻行为作为有害物质检测指标的研究却鲜见报道。作者以中国沿海常见能动微藻亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)为测试物种, 研究两种典型海洋污染物(苯酚和铜)在单一和混合情况下的对藻类运动速度的抑制作用, 并对两者的联合效应方式进行评估, 以期受污海水的早期预警和风险评估提供一定的科学依据。

收稿日期: 2019-04-04; 修回日期: 2019-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41006071, 41476085)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41006071, 41476085]

作者简介: 韩双 (1992-), 女, 辽宁大连人, 硕士研究生, 主要从事环境污染生物测试方法研究, E-mail: haa811@126.com; 郑国侠, 通信作者, E-mail: guoxiazheng2685@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试验藻种及培养

亚心型扁藻由中国科学院海洋研究所生物室提供; f/2 培养液培养, 温度(20±0.5)°C, 光照 55 μmol/(m<sup>2</sup>/s), 光暗比 12 h : 12 h。选择生长良好的指数生长前期藻液进行试验。

### 1.2 铜和苯酚的单一毒性试验

为了尽量减少计算 2 h EC<sub>50</sub> 时的误差, 提前进行预实验, 以便优化试验浓度。经过预实验, 铜和苯酚对微藻运动影响的实验浓度按等差间距设置, 两者的浓度梯度分别为: 0(对照)、0.63、1.26、1.89、2.52、3.15、3.78、4.41 μmol/L 和 0(对照)、1.29、2.58、3.87、5.16、6.45、7.74、9.03 mmol/L, 每组 3 个平行。实验使用 96 孔板, 实验体积为 200 μL, 接种密度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL。实验进行 2 h 后, 取样 30 L, 于载玻片上, 盖上盖玻片置于显微镜 Nikon5100 下(100×放大倍数率), 随机选择视野 CCD 录像 30 s 用于分析微藻运动性。

### 1.3 铜和苯酚的联合毒性试验

苯酚和铜的联合毒性实验参照 Charles<sup>[12]</sup> 的方法进行。根据 1.2 的实验结果, 分别得到苯酚和铜对亚心型扁藻的 EC<sub>50</sub> 值后, 定义 0.5×EC<sub>50</sub>(苯酚)+0.5×EC<sub>50</sub>(铜)=1 个毒性单位(TU)。两者的联合毒性实验梯度(按毒性单位 TU)设为: 0(对照), 0.325, 0.65, 0.975, 1.3, 1.625, 1.95, 2.275 (TU), 每组 3 个平行。实验使用 96 孔板, 实验体积为 200 μL, 接种密度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL。实验进行 2 h 后, 取样 30 μL, 于载玻片上, 盖上盖玻片置于显微镜 Nikon5100 下(100×放大倍数率), 随机选择视野 CCD 录像 30 s 用于分析微藻运动性。

### 1.4 数据分析与处理

将毒性试验 1.2 和 1.3 中采集的 30 s 视频以 Image J 软件(CASA 计算插件)来分析计算微藻的运动性参数, 具体包括能动百分比(Percent motile cells of total cells, MOT%), 曲线运动速度(Curvilinear velocity, VCL), 平均路径速度(Velocity of average path, VAP)和直线运动速度(Velocity of straight-line, VSL)。各参数具体物理学意义及测量计算方式见表 1。然后在 OriginPro 8.0.下以藻的运动性参数对污染物浓度作图, 以 Logistic 模型进行拟合, 从而计算亚心型扁

藻对待测毒物的响应:

$$f(x) = \frac{a}{1 + e^{b(x-x_0)}}$$

其中,  $f(x)$  是实验组微藻运动性参数, 具体包括 MOT%, VCL, VAP 和 VSL;  $x$  是污染物浓度;  $a$  是对照组微藻运动性参数;  $b$  是曲线坡度参数;  $x_0$  是实验组微藻运动性降为对照组微藻运动性一半时的污染物浓度, 即为该物质对微藻的 EC<sub>50</sub> 值。污染物的检出限(LOD)是以拟合曲线计算的实验组微藻运动性降为对照组微藻运动性 10% 时的污染物浓度。污染物的联合毒性作用采用相加指数法(Addition Index)来评价<sup>[12]</sup>, 即(1:1)毒性混合后的 EC<sub>50</sub><1TU, >1 TU 和=1 TU 表示联合毒性作用方式分别为协同、拮抗和简单的相加作用。实验结果以平均值±标准方差( $n=3$ )表示。应用 Student's *t*-test 检验不同试验浓度组和对照中海洋微藻运行速度的差异性,  $P<0.05$  视为具有显著性差异。

表 1 运动参数物理学意义及测量计算方式

Tab. 1 Physical parameters of motion parameters and measurement calculation methods

|                    |   |
|--------------------|---|
| 能动百分比 (MOT, %)     | 分析时段内, 视野中捕捉到的保持运动状态微藻, 归一化后微藻中保持运动的百分比(%);   |
| 曲线运动速度 (VCL, μm/s) | 分析时段内, 视野中所有捕捉到的微藻在所有视频帧中位置点与位置点连线总距离的平均值, 计算为每秒钟移动的距离  |
| 平均路径速度 (VAP, μm/s) | 分析时段内微藻运动平均路径上的速度, 由视频帧速的 1/6 的微藻平均位置的漫游距离生成, 这样每个位置点都是由 VCL 路径上一组位置的坐标平均值生成的(例如使用每秒 25 fps 的视频, 每 4 帧中微藻的位置平均为生成 1 个 VAP 点)。第一点表示帧 1~4, 第二点帧 2~5), 计算为每秒钟移动的距离 |
| 直线运动速度 (VSL, μm/s) | 分析时段内, 所有微藻在视频段中从第一个 VAP 点到最后一个 VAP 点之间移动的最大直线距离的平均值, 计算为每秒钟移动的距离   |

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 微藻运动形式对污染物响应

污染物对亚心型扁藻运动形式的影响如图 1 所示。图中每一条黑色的路径对应于 1 个微藻的运动轨迹。大量研究证明, 海洋真光层内浮游微藻基本是

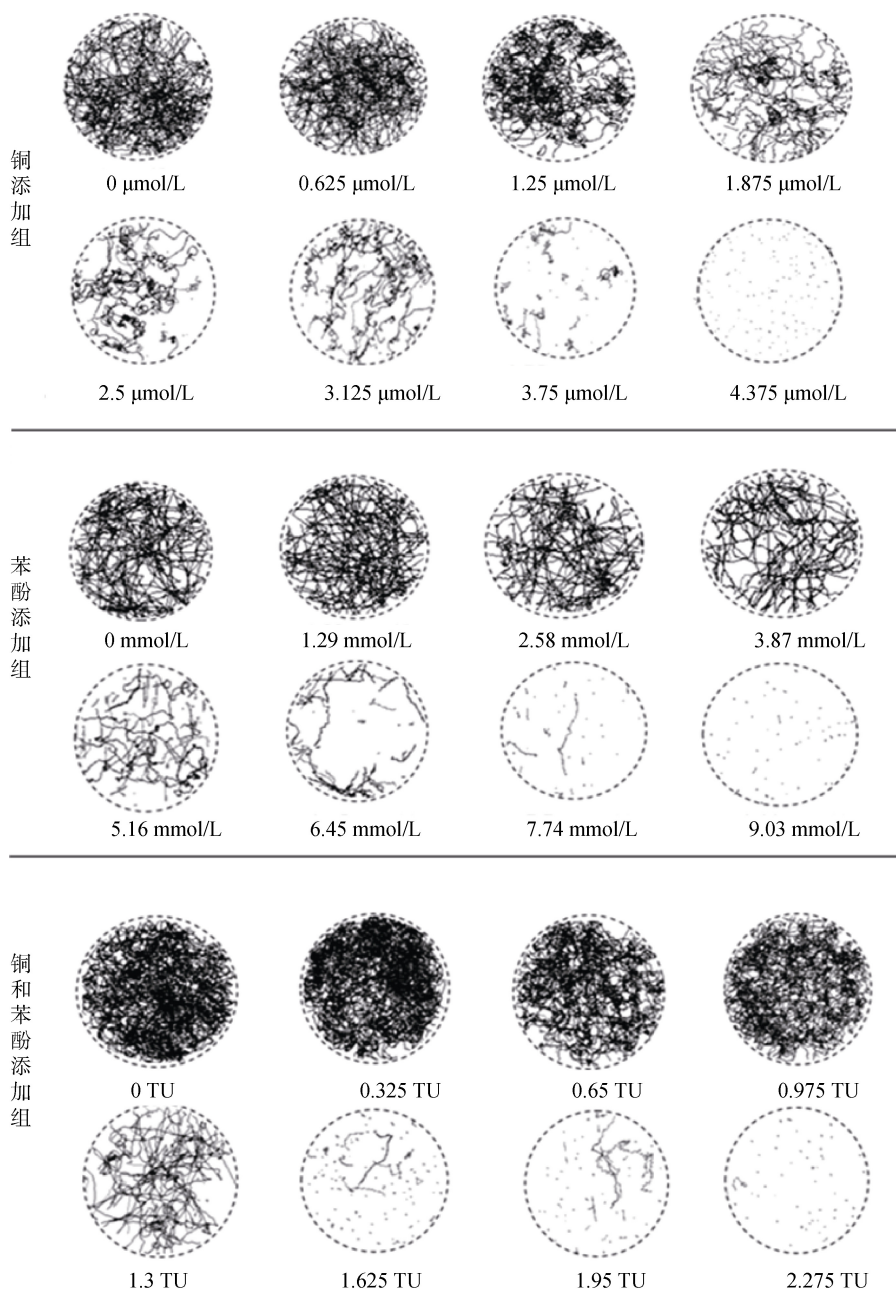


图 1 污染物作用下亚心型扁藻的运动模式变化

Fig. 1 Swimming patterns of *P. subcordiformis* under the stress of pollutants

能动的<sup>[6, 7]</sup>, 它们靠着挥舞 1 到数根鞭毛, 或直行或翻滚, 完成游泳行为, 从而显示出一种无目的随机运动状态<sup>[13]</sup>。从图 1 中对照组的运动路径图来看, 亚心型扁藻在未受到污染物毒害的情况下, 也表现为上述运动形式。而当水体受到铜、苯酚或二者联合污染后, 自由翻转不再顺畅。藻类单位时间运动距离缩短(即运动速度下降), 并且缩短程度与污染物浓度呈现明显的剂量-效应关系。当藻类进一步受到毒害, 单位时间内运动距离进一步下降, 甚至开始原

地打转、震颤直到完全不动。

## 2.2 苯酚和铜的单一毒性

借助现代机器智能识别系统偶联计算机细胞跟踪技术, 在海洋微藻细胞动态跟踪的基础上, 将亚心型扁藻 2 h 时能动百分比和运动速度参数(VCL, VAP 和 VSL)分别对铜和苯酚浓度进行 Logistic 模型进行拟合(图 2、图 3), 其拟合曲线方程及方法检出限见表 2。

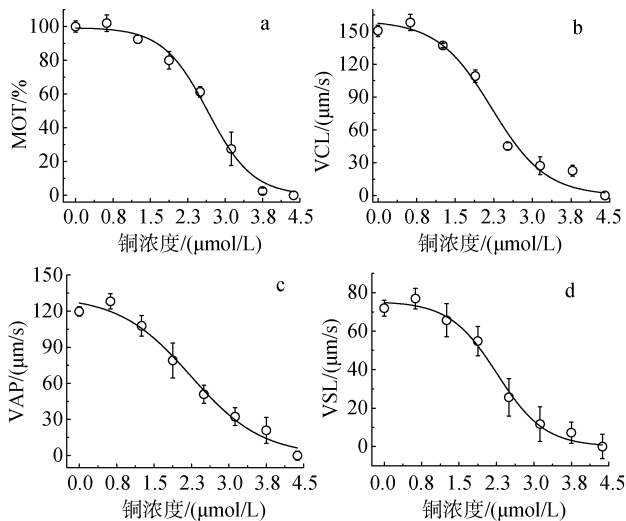


图 2 不同浓度的铜离子对亚心型扁藻运动性参数  
Fig. 2 Effects of copper at different concentrations on swimming motility parameters

a. MOT%; b. VCL; c. VAP; d. VSL 的影响  
a. MOT%; b. VCL; c. VAP; d. VSL of *P. subcordiformis*

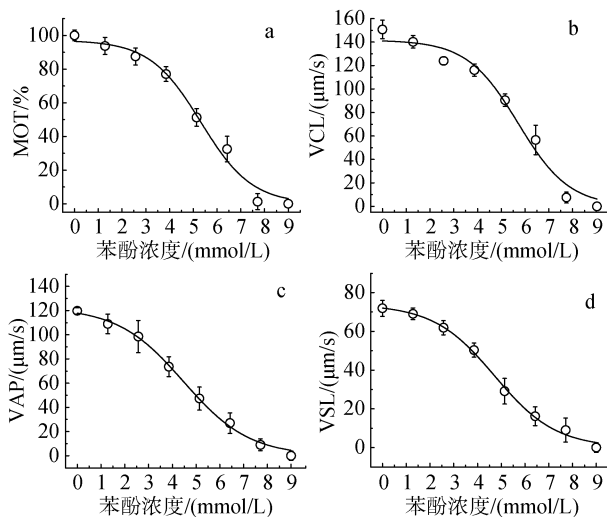


图 3 不同浓度的苯酚对亚心型扁藻运动性参数  
Fig. 3 Effects of phenol at different concentrations on swimming motility parameters

a. MOT%; b. VCL; c. VAP; d. VSL 的影响  
a. MOT%; b. VCL; c. VAP; d. VSL of *P. subcordiformis*

由图 2 和图 3 可见, 海洋微藻的所有运动性参数对铜和苯酚在 2h 之内即可做出显著的剂量-效应反应。图 2a 和图 3a 为不同浓度的铜离子和苯酚对亚心型扁藻能动百分比影响实验结果, 当铜和苯酚累积到一定浓度时, 对微藻的运动能力产生明显的抑制作用, 当铜离子浓度达到 3.78 μmol/L 时, 微藻彻底丧失运动能力, 当苯酚浓度达到 7.74 mmol/L 时, 微藻不再游动。图 2b~2d 为不同浓度的铜离子对亚心

型扁藻运动速度影响的实验结果。由图 2b~2d 可见, 较低铜离子浓度(0.63 μmol/L)实验组(图 2b~2d)其 2 h 时的运动速度(包括 VCL, VAP 和 VSL)均略高于对照组(海水, 0 μmol/L 作为空白对照)。表明较低浓度的铜离子对亚心型扁藻存在一定的增益作用。但当铜离子浓度升高至 1.26 μmol/L 时, 微藻运动速度开始明显低于对照组( $P < 0.05$ )。图 3b~3d 为不同浓度的苯酚对亚心型扁藻运动速度的抑制作用。如图 3b~3d 所示, 随着苯酚浓度的升高, 亚心型扁藻 2 h 时的运动速度(包括 VCL, VAP 和 VSL)逐渐降低, 在浓度为 2.58 mmol/L 时, 微藻运动速度开始明显低于对照组(海水, 0 μmol/L 作为空白对照)( $P < 0.05$ )。对于铜和苯酚, 以运动性参数作为指标的 2 h-LOD 分别为 0.66 μmol/L~1.66 μmol/L 和 1.42 mmol/L~2.96 mmol/L (表 2)。

鞭毛是能动藻类的主要运动器官, 它们靠着挥舞 1 到数根鞭毛, 或直行或翻滚, 从而获得十几甚至上百 μm/s 的惊人游泳速度。例如, 本研究中的亚心型扁藻的游泳速度约为 150.75 μm/s。鞭毛振动是一个高度耗能的过程, 其运动性依赖于 ATP 含量。因此所有能够干扰 ATP 生成途径的因素(有些能够直接干扰光合作用及其电子传递链的功能, 或者干扰细胞分解代谢获取能量的过程, 有些则通过这些生理过程的调控信号传导通路来发挥间接的干扰作用等), 都有可能抑制鞭毛运动, 从而在微藻游泳能力上做出敏感反应<sup>[14]</sup>。不同的污染物可能具有相同的、也可能具有不同的作用靶点。此外, 污染物还可能通过引起鞭毛损伤使微藻直接丧失游泳能力<sup>[15]</sup>。Soretino<sup>[16]</sup>等通过试验发现铜能够进入细胞叶绿体使光和磷酸化解偶联, 抑制光合作用。Pätsikkä<sup>[17]</sup>等认为, 铜对藻体 PSII 活性位点造成破坏, 产生的 ROS 可使 PSII 中放氧复合体蛋白(D1)受到破坏, 从而影响电子传递的正常进行, 抑制光反应。研究表明, 苯酚对藻类的毒性主要表现在对其光合作用和呼吸作用的抑制效应<sup>[18, 19]</sup>。张建英<sup>[20]</sup>等认为, 苯酚对藻类的影响主要表现为光合作用中的暗反应破坏。对于亚心扁藻, 铜和苯酚很可能从上述途径干扰 ATP 的合成, 从而引起该藻运动速度的下降。对于铜, 以运动性参数作为指标的 2 h-EC<sub>50</sub> 值为 2.21 μmol/L~2.65 μmol/L; 对于苯酚为 4.47 mmol/L~5.71 mmol/L。这些数值与文献中报道的微藻 72 h 生长抑制, 大型蚤静止试验和鱼类死亡试验结果均是可比的(表 3), 但

相对所需较短的测试时间。从而表明微藻的运动性参数(包括能动百分比和运动速度)可以作为有效的、

快速的海洋微藻生物测试指标来进行海洋污染物的毒性评价。

表 2 亚心型扁藻运动性对不同污染物的响应方程与检出限

Tab. 2 Dose-response equations of *P. subcordiformis* motility to different pollutants and corresponding detection limits

| 受试物                    | 效应参数 $f(x)$ | 剂量-效应方程                                    | $R^2$ | 检出限                    |
|------------------------|-------------|--|-------|------------------------|
| 铜( $\mu\text{mol/L}$ ) | MOT(%)      | $f(x)=99.43/(1+\exp(2.22\times(x-2.65)))$  | 0.990 | 1.66 $\mu\text{mol/L}$ |
|                        | VCL         | $f(x)=159.90/(1+\exp(1.90\times(x-2.21)))$ | 0.976 | 1.05 $\mu\text{mol/L}$ |
|                        | VAP         | $f(x)=132.42/(1+\exp(1.40\times(x-2.23)))$ | 0.980 | 0.66 $\mu\text{mol/L}$ |
|                        | VSL         | $f(x)=75.50/(1+\exp(2.07\times(x-2.26)))$  | 0.988 | 1.20 $\mu\text{mol/L}$ |
| 苯酚( $\text{mmol/L}$ )  | MOT(%)      | $f(x)=97.13/(1+\exp(0.93\times(x-5.32)))$  | 0.982 | 2.96 $\text{mmol/L}$   |
|                        | VCL         | $f(x)=141.63/(1+\exp(0.93\times(x-5.71)))$ | 0.973 | 2.93 $\text{mmol/L}$   |
|                        | VAP         | $f(x)=122.57/(1+\exp(0.72\times(x-4.47)))$ | 0.996 | 1.42 $\text{mmol/L}$   |
|                        | VSL         | $f(x)=73.85/(1+\exp(0.78\times(x-4.73)))$  | 0.995 | 1.91 $\text{mmol/L}$   |
| 铜+苯酚(TU)               | MOT(%)      | $f(x)=94.85/(1+\exp(8.24\times(x-1.27)))$  | 0.995 |                        |
|                        | VCL         | $f(x)=142.53/(1+\exp(5.23\times(x-1.46)))$ | 0.989 |                        |
|                        | VAP         | $f(x)=115.56/(1+\exp(3.53\times(x-1.38)))$ | 0.992 |                        |
|                        | VSL         | $f(x)=74.78/(1+\exp(2.88\times(x-1.27)))$  | 0.980 |                        |

表 3 基于微藻运动性测试的 2 h-  $\text{EC}_{50}$  值及其他测试方法的  $\text{EC}_{50}$  值

Tab. 3  $\text{EC}_{50}$  values based on algal motility parameters in this study and corresponding  $\text{EC}_{50}$  values from the literature measured using a variety of other assay systems

| 受试物      | $\text{EC}_{50}$  | 试验方法             | $\text{EC}_{50}$  | 试验方法  | 文献                                  |
|----------|---|------------------|---|---|-------------------------------------|
| 铜        | 2.65 <sup>a</sup> , 2.21 <sup>b</sup> , 2.23 <sup>c</sup> , 2.26 <sup>d</sup> ( $\mu\text{mol/L}$ ) | 亚心型扁藻/2 h, 运动性试验 | 2.2, 0.9, 5.2 ( $\mu\text{mol/L}$ )                         | 微拟球藻( <i>Nannochloropsisgaditana</i> ), 球等鞭金藻( <i>Isochrysisgalbana</i> ), 朱氏四片藻( <i>Tetra-selmischuii</i> )/72 h, 生长抑制试验 | [21]                                |
|          |   |                  | 6.28 <sup>1</sup> , 3.78 <sup>2</sup> ( $\mu\text{mol/L}$ ) | 大型蚤( <i>Daphnia magna</i> )/24 h, 48 h 静止测试   | <sup>1</sup> [22] <sup>2</sup> [23] |
|          |   |                  | 4.72( $\mu\text{mol/L}$ )                                   | 金鱼( <i>Cyprinuscarpio</i> )/96 h, 死亡率试验   | [24]                                |
| 苯酚       | 5.32 <sup>a</sup> , 5.71 <sup>b</sup> , 4.47 <sup>c</sup> , 4.73 <sup>d</sup> ( $\text{mmol/L}$ )   | 亚心型扁藻/2 h, 运动性试验 | 4.62, 4.13 ( $\text{mmol/L}$ )                              | 蛋白核小球藻( <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ), 斜生栅藻( <i>Scenedesmusobliquus</i> )/72 h, 生长抑制试验                                   | [25]                                |
|          |   |                  | 5.12( $\text{mmol/L}$ )                                     | Shk1 assay/细菌发光试验   | [26]                                |
| 铜和苯酚的混合物 | 1.27 <sup>a</sup> , 1.46 <sup>b</sup> , 1.38 <sup>c</sup> , 1.27 <sup>d</sup> (TU)                  | 亚心型扁藻/2 h, 运动性试验 | >1TU  | 大型蚤( <i>Daphnia magna</i> )/48 h 静止测试   | [27]                                |

a. 由 MOT 计算得出, b. 由 VCL 计算得出, c. 由 VAP 计算得出, d. 由 VSL 计算得出

### 2.3 苯酚和铜的联合毒性作用

图 4 为铜离子与苯酚按(1:1)毒性混合后对亚心型扁藻能动百分比和运动速度影响的实验结果。经过 Logistic 模型拟合计算(表 2)的铜和苯酚混合后对亚心型扁藻的 2 h  $\text{EC}_{50}$  为 1.27 TU~1.46 TU(表 3), 均大于 1 TU, 因此铜和苯酚混合后对亚心型扁藻的联合毒性效应方式表现为拮抗作用。如果毒性物质混合后, 总毒性高于或低于单一物质毒性的相加, 存在两种可能: 首先物质间相互作用改变了它们的化学结构或化学特性, 从而改变了对生物的毒性; 其次与有机体对物质的生物转化作用相关, 如果物

质混合后改变了机体对其中某一物质的吸附/吸收、排泄及其他生物转化活动, 也会改变它们对生物的毒性<sup>[27]</sup>。苯酚和铜之间的拮抗作用应该是由上述前一种作用方式引起的。一般而言, 非离子型有机物对于水生生物的毒性作用取决于其透膜性的高低。苯酚能够与铜离子形成苯酚--铜--苯酚配合物, 分子半径增大, 透膜能力下降<sup>[27]</sup>。此外, 具有生物活性的自由铜离子浓度也由于上述配合物的形成而降低, 从而苯酚和铜离子混合的毒性效应方式表现为拮抗作用。研究表明, 48 h 水蚤致死率实验显示了与上述相同的实验结果<sup>[27]</sup>。以上结果初步显示了以微藻运动

性进行海洋污染物联合毒性快速检测的可行性。

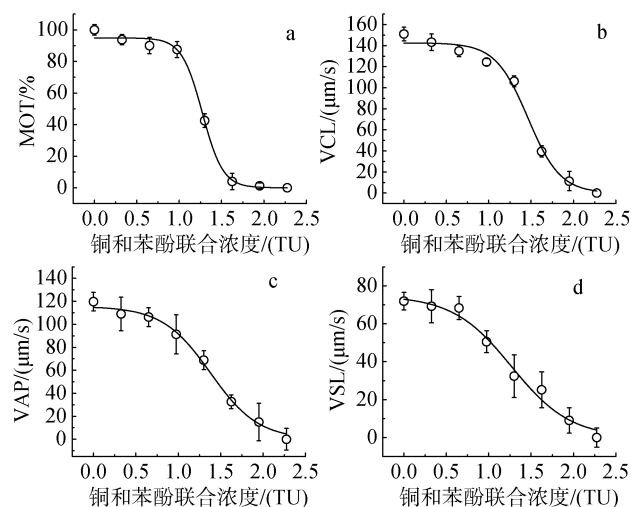


图 4 苯酚与铜离子混合对亚心型扁藻运动性参数  
Fig. 4 Combined effects of copper and phenol on swimming motility parameters

a. MOT; b. VCL; c. VAP; d. VSL 的影响  
a. MOT; b. VCL; c. VAP; d. VSL of *P. subcordiformis*

### 3 结论

借助现代机器智能识别系统偶联计算机细胞跟踪技术分析发现, 在铜、苯酚单一或联合作用下, 藻类单位时间运动距离缩短(即运动速度下降), 自由翻转不再顺畅, 甚至原地打转、震颤直到完全不动。海洋微藻的运动速度对铜和苯酚在单一或联合作用下 2 h 之内即可做出显著的浓度-效应反应。基于运动参数(MOT%, VCL, VAP 和 VSL)测试的铜和苯酚对海洋微藻亚心型扁藻 2 h-EC<sub>50</sub> 分别为 2.65、2.21、2.23、2.26 和 5.32、5.71、4.47、4.73 mmol/L。铜和苯酚混合后对亚心型扁藻的 2 h-EC<sub>50</sub> 均大于 1 TU, 两者的联合毒性效应方式表现为拮抗作用。

综上, 微藻能动性可以作为一种快速有效的污染物生态毒性, 包括单一和联合毒性测试指标, 如果能进一步拓展其污染物测试范围, 将有望被应用于海水污染毒性效应的实验室研究或现场快速检测中。

#### 参考文献:

[1] Hadjoudja S, Vignoles C, Véronique D, et al. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry[J]. Aquatic Toxicology, 2009, 94(4): 255-264.  
[2] Fernandezalba A R, Hernando M D, Piedra L, et al. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling

biocides measured with acute toxicity bioassays[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 456(2): 303-312.  
[3] Stauber J L. Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae[J]. Australasian Journal of Ecotoxicology, 1995, 1(1): 15-24.  
[4] Conrad R, Büchel C, Wilhelm C, et al. Changes in yield of in-vivo fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring[J]. Journal of Applied Phycology, 1993, 5(5): 505-516.  
[5] Adams M S, Stauber J L. Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalgae[J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 23(8): 1957-1968.  
[6] Ross O N, Sharples J. Swimming for survival: A role of phytoplankton motility in a stratified turbulent environment[J]. Journal of Marine Systems, 2008, 70(3): 248-262.  
[7] William M D. Phytoplankton in flow[D]. USA, Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 2012.  
[8] Erga S R, Dybwad M, Frette O, et al. New aspects of migratory behavior of phytoplankton in stratified waters: Effects of halocline strength and light on *Tetraselmis* sp. (*Prasinophyceae*) in an artificial water column[J]. Limnology and Oceanography, 2003, 48(3): 1202-1213.  
[9] Durham W M, Kessler J O, Stocker R, et al. Disruption of vertical motility by shear triggers formation of thin phytoplankton layers[J]. Science, 2009, 323(5917): 1067-1070.  
[10] Seymour J R, Marcos S R. Resource patch formation and exploitation throughout the marine microbial food web[J]. American Naturalist, 2009, 173(1): E15-29.  
[11] Harvey E L, Menden-Deuer S. Predator-induced fleeing behaviors in phytoplankton: a new mechanism for harmful algal bloom formation[J]. Plos One, 2012, 7(9): 1-8.  
[12] Charles A L, Markich S J, Ralph P. Toxicity of uranium and copper individually, and in combination, to a tropical freshwater macrophyte (*Lemna aequinoctialis*)[J]. Chemosphere, 2006, 62(8): 0-1233.  
[13] Inouye I, Hori T. High-speed video analysis of the flagellar beat and swimming patterns of algae: possible evolutionary trends in green algae[J]. Protoplasma, 1991, 164(1-3): 54-69.  
[14] 吉图. 鞭毛和纤毛拍击机制的理论研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.  
Ji Tu. The theoretical study on mechanism of beating of the flagellum and cilia[D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2009.  
[15] Wong D, Olivesra L. Effects of selenite and selenate on the growth and motility of seven species of marine microalgae[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1991, 48(7): 1193-1200.

- [16] Sorentino C. The effects of heavy metals on phytoplankton: A review[J]. *Phykos*, 1979, 18: 149-161.
- [17] Pätsikkä E, Aro EM, Tyystjarvi E. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 113: 142-150.
- [18] Dedonder A, Van Sumere C F. The effect of phenolics and related compounds on the growth and the respiration of *Chlorella vulgaris*[J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1971, 65: 70-80.
- [19] Lukina G A. Effect of small doses of phenol on the photosynthesis of *Chlorella*[J]. *Tr Inst Biol Vnutr Vod, Akad Nauk SSSR*, 1973, 24(27): 114-118.
- [20] 张建英, 丁腾达, 梁璐怡, 等. 水体生态系统对不同浓度水平苯酚污染的急性毒性响应[J]. *环境化学*, 2012, 31(5): 5-9.  
Zhang Jianying, Ding Tengda, Liang Luyi, et al. Response of aquatic ecosystem to phenol pollution at different concentration levels[J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 31(5): 5-9.
- [21] Debelius B, Jesús M. Forja, ángel DelValls, et al. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2009, 72(5): 1503-1513.
- [22] Guilhermino L C, Diamantino T C, Silva M C, et al. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 46(3): 357-362.
- [23] Kovacs A, Abdelhameid N A, Acs A, et al. A novel protocol for assessing aquatic pollution, based on the feeding inhibition of *Daphnia magna*[J]. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 2012, 404(7): 1-7.
- [24] Alam M K, Maughan O E. The effect of malathion, diazinon, and various concentrations of zinc, copper, nickel, lead, iron, and mercury on fish[J]. *Biological Trace Element Research*, 1992, 34(3): 225-236.
- [25] 陈传平, 张庭廷, 何梅, 等. 苯胺、苯酚对淡水藻类生长的影响[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(1): 219-223.  
Chen Chuanping, Zhang Tingyan, He Mei, et al. Effect of aniline and phenol on freshwater algae growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(1): 219-223.
- [26] Ren S, Frymier P D. Estimating the toxicities of organic chemicals to bioluminescent bacteria and activated sludge[J]. *Water Research*, 2002, 36(17): 4406-4414.
- [27] Kim K T, Lee Y G, Kim S D. Combined toxicity of copper and phenol derivatives to *Daphnia magna*: effect of complexation reaction[J]. *Environment International*, 2006, 32(4): 487-492.

# Study on the ecological toxicity effect of marine pollutants based on microalgal motility trait

HAN Shuang<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, YUAN Ying-lan<sup>2</sup>, WANG Yun-hua<sup>1</sup>, WEI Jun-feng<sup>1</sup>, ZHENG Guo-xia<sup>1</sup>

(1. Chemical and Environmental Engineering Institute, Environmental Micro-Total-Analysis Lab., Dalian University, Dalian 116622, China; 2. Shenyang Academy of Environmental Sciences, Shenyang 110016, China)

**Received:** Apr., 4, 2019

**Key words:** motility; marine microalgae; single toxicity; combined toxicity; marine pollutants

**Abstract:** Analyzing the ecological toxicity effects of marine pollution forms an important basis for the reorganization and evaluation of marine environment quality and its trend. The development of rapid and efficient bioassay methods and indicators is extremely significant for preventing pollution and protecting the marine environment. This study investigated the toxicity of typical marine pollutants using the motility of marine microalgae as a physiological trait. When *Platymonas subcordiformis* was exposed to single copper (0–4.41  $\mu\text{mol/L}$ ) or phenol (0–9.03  $\text{mmol/L}$ ), the algal motility, including the movement mode, the mobile ability, and the swimming speed, demonstrated a good dose–response relationship. The 2 h  $\text{EC}_{50}$  values of copper and phenol to *P. subcordiformis* obtained by logistic model simulation were 2.21–2.65  $\mu\text{mol/L}$  and 4.47–5.71  $\text{mmol/L}$ , respectively. In the combined toxicity test, when *P. subcordiformis* was exposed to the mixture of phenol and copper at different TUs, the 2 h  $\text{EC}_{50}$  values were larger than 1 TU. This result indicated that the interaction between copper and phenol in terms of their toxicity to *P. subcordiformis* was antagonistic. These findings were found to be generally consistent with the toxicity data derived from traditional tests (e.g., 72 h microalgal growth inhibition, *Daphnia* immobility, and 96 h fish mortality). Compared with such lengthy toxicity tests, investigating toxicity based on motility requires a shorter test time. Therefore, this new indicator can be a rapid and effective bioassay trait to measure both single and combined toxicities of marine pollutants.

(本文编辑: 谭雪静)