

金藻(*Isochrysis galbana*)培养液中 铜锌离子的最佳活度*

曲克明 袁有宪 张渡溪 高成年

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 本文研究了铜、锌离子在球等鞭金藻的培养液中最佳存在活度。采用了一种新的海水处理方法, 除去海水中的重金属离子。同时, 计算了培养液中铜、锌离子活度。结果表明, 金藻培养液中, 铜、锌离子的最佳活度为 $10^{-13.57}$ — $10^{-8.80}$ mol/L 和 0 — $10^{-6.00}$ mol/L; 铜离子表现了对金藻生长繁殖的必需性, 而锌离子未表现出对金藻生长繁殖的必需性; 当铜、锌离子活度分别大于 $10^{-8.80}$ 和 $10^{-6.00}$ mol/L 时, 对金藻产生毒性, 铜离子毒性大于锌离子毒性, 通过加入螯合剂 EDTA, 能够消除其毒性。

关键词 金藻, 铜, 锌, 离子活度

前 言

海洋单胞藻的培养是海水养殖育苗的重要环节。就对虾人工育苗而言, 丰富的单胞藻饵料是幼体培育的基本保证。金藻为目前广泛使用的单胞藻种类之一, 在对虾育苗系统中使用收到了良好效果。因而, 金藻是对虾育苗生态系统中的生物种类之一。

海水中痕量金属元素对浮游植物的营养作用, 四十年代末期就开始提及^[1,5,7,8]。但真正定量研究始于七十年代中期以后^[4,6,10]。国内研究^[2]多从污染影响角度出发, 定量研究金属离子的营养作用及对生态的影响尚未见报导。

为研究铜、锌离子对对虾育苗系统的生态调节防病作用及单胞藻培养中铜锌离子的营养作用, 本文研究了铜、锌离子对常用单胞藻球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)的培养液中最佳存在活度。旨在为保持对虾育苗系统中适宜的铜、锌离子浓度提供基础数据。

材 料 与 方 法

(一)实验材料及试剂

球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)藻种由本所养殖生态室提供。

铜、锌离子标准溶液分别用硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和氯化锌(ZnCl_2)配制而成。

收稿日期: 1994-03-09。

* 本所马志珍副研究员提供藻种, 谨表谢意。

2000mg/L, 酸化后贮存, 用时稀释成 $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 。EDTA 二钠盐 (乙二胺四乙酸二钠) 溶液配制成 $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 。所用试剂均为分析纯, 洗涤用水为混床去离子水。

(二)海水的去重金属处理

取青岛大麦岛海水 (盐度 29-30, pH8.0-8.1), 贮存于聚乙烯塑料桶中, 用 0.45μ 微孔滤膜抽滤, 除去浮游生物、颗粒、胶体及有机碎屑。用长 48cm, 内径 2.2cm 的层析柱, 内装高分子重金属吸附剂 (本实验室自合成), 用 1mol/L 硝酸处理后, 用去离子水冲洗干净。以流速 10-20ml/min 流过滤膜过滤海水, 除去离子态、不稳定有机和无机络合态重金属离子。最后收集于三角瓶中煮沸杀菌。

所用容器及玻璃器皿均用 1mol/L 硝酸浸泡过夜后, 用去离子水冲洗干净。

(三)实验方法

在 1000ml 三角瓶中, 加适量处理海水, 加入量根据藻种密度而定, 使最终体积为 500ml。加入一定浓度铜或锌溶液, 同一浓度水平组中一组加入 $\text{EDTA} 10^{-5} \text{mol/L}$ 。每组平行 3 个样。加入等鞭金藻藻种使起始密度为 60 万细胞/毫升左右。温度保持 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 。用四支并列 40W 日光灯为光源, 光照为 4000Lux (用江苏沛县测光仪器厂产 ZD-III 型照度计测定)。光照时间昼: 夜为 10:14。每天随机调换三角瓶位置并摇匀 3-4 次。每天取样记数, 用 UV-365 自记分光光度计 (日本岛津) 在 550nm 处用 1cm 比色皿, 以海水为参比测定吸光度, 换算出细胞数。取 3 个样品平均值评估铜锌离子的作用。不同浓度的影响用单纯分类方差分析法 (Single-classification analysis of variant, ANOVA) 分析, 同一浓度不同形态的影响用双向方差分析法 (Two-way analysis, ANOVA) 分析。用学生检验 (t) 检验。

结 果

(一)铜、锌离子活度的计算

用 Sunda^[9,10] 提出的热力学方程计算铜锌离子活度。方程式为:

$$M_T = \frac{A_M}{R_M} + \frac{\text{EDTA}_T A_M K_{\text{MEDTA}}}{A_M K_{\text{MEDTA}} + A_{\text{Ca}} K_{\text{CaEDTA}} + A_{\text{Mg}} K_{\text{MgEDTA}}} \quad (1)$$

这里 M_T 、 A_M 和 R_M 分别为给定金属总浓度、游离离子活度和总无机活度系数。 K_{MEDTA} 为给定金属元素与 EDTA 的络合稳定常数。 K_{CaEDTA} 和 K_{MgEDTA} 分别为钙和镁和 EDTA 的络合稳定常数, 分别为 11.89 和 9.99。 A_{Ca} 和 A_{Mg} 为海水中钙和镁的活度, 由无机活度系数 R_{Ca} 和 R_{Mg} 及海水中钙镁浓度计算。 R_{Ca} 和 R_{Mg} 分别为 0.21 和 0.26^[11], 青岛近岸海水钙、镁浓度为 9.44×10^{-3} 和 $5.25 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ ^[12], 则 A_{Ca} 和 A_{Mg} 分别为 0.0020 和 0.014mol/L。

对锌而言, 有

$$\text{Zn}_T = \frac{A_{\text{Zn}}}{10^{-1.0}} + \frac{\text{EDTA}_T A_{\text{Zn}} \cdot 10^{16.50}}{A_{\text{Zn}} 10^{16.50} + 0.0020 \times 10^{11.89} + 0.014 \times 10^{9.99}} \quad (2)$$

对铜而言, 有

$$Cu_T = \frac{A_{Cu}}{10^{-1.8}} + \frac{EDTA_T A_{Cu} 10^{18.80}}{A_{Cu} 10^{18.80} + 0.0020 \times 10^{11.89} + 0.014 \times 10^{9.99}} \quad (3)$$

用方程 (2) 和 (3) 计算加入不同浓度铜锌后的离子活度 (表 1)。

表 1 铜锌离子活度计算

Table 1 Calculation of copper and zinc ion activities

铜 Copper			锌 Zinc		
加入浓度 Added concentration (mol/L)	活 度 Activity (mol/L)		加入浓度 Added concentration (mol/L)	活 度 Activity (mol/L)	
	有 EDTA Presence of EDTA	无 EDTA Absence of EDTA		有 EDTA Presence of EDTA	无 EDTA Absence of EDTA
0	0	0	0	0	0
10^{-9}	$10^{-13.57}$	$10^{-10.80}$	10^{-7}	$10^{-9.30}$	$10^{-8.00}$
10^{-8}	$10^{-12.57}$	$10^{-9.80}$	10^{-6}	$10^{-8.25}$	$10^{-7.00}$
10^{-7}	$10^{-11.56}$	$10^{-8.80}$	10^{-5}	$10^{-6.68}$	$10^{-6.00}$
10^{-6}	$10^{-10.53}$	$10^{-7.80}$	10^{-4}	$10^{-5.05}$	$10^{-5.00}$

(二)铜离子活度对球等鞭金藻繁殖速度的影响

图 1 为铜离子对球等鞭金藻繁殖速度影响的实验结果。表 2 为铜离子对球等鞭金藻第七天生长量的影响结果。以第七天结果分析, 当加入铜在 10^{-9} – 10^{-7} mol/L, 无 EDTA 存在时离子活度为 $10^{-10.80}$ – $10^{-8.80}$ mol/L 各组, 与加入浓度为 0 组和加入浓度为 10^{-6} mol/L, 离子活度为 $10^{-7.80}$ mol/L 组比较, 细胞数显著 ($P < 0.05$) 提高。而这几组之间比较无显著 ($P > 0.05$) 差异。加入浓度为 10^{-6} mol/L 的组, 有 EDTA 存在时离子活度为 $10^{-10.53}$ mol/L, 无 EDTA 存在时离子活度为 $10^{-7.80}$ mol/L, 细胞数差异显著 ($P < 0.05$)。当加入浓度为 10^{-9} – 10^{-6} mol/L, 有 EDTA 存在时, 活度为 $10^{-13.57}$ – $10^{-10.53}$ mol/L, 各组之间无显著 ($P < 0.05$) 差异, 但与加入浓度为 0 组比较仍有显著 ($P < 0.05$) 差异。即铜离子活度为 $10^{-13.57}$ – $10^{-8.80}$ mol/L 时, 金藻繁殖生长良好。

表 2 铜离子对球等鞭金藻第七天生长量的影响

Table 2 The effect of copper on the number of *Isochrysis galbana* at 7th.

加入浓度 Added concentration (mol/L)	细胞数 Number of cells ($\times 10^4$ cells/ml)		P
	有 EDTA 存在 Presence of EDTA	无 EDTA 存在 Absence of EDTA	
0	497.9 $\pm$ 4.6	499.1 $\pm$ 7.6	> 0.05
10^{-9}	520.9 $\pm$ 5.7	511.6 $\pm$ 14.6	> 0.05
10^{-8}	527.4 $\pm$ 4.7	522.4 $\pm$ 9.7	> 0.05
10^{-7}	513.4 $\pm$ 8.7	509.3 $\pm$ 4.1	> 0.05
10^{-6}	504.0 $\pm$ 11.7	463.0 $\pm$ 6.0	< 0.05

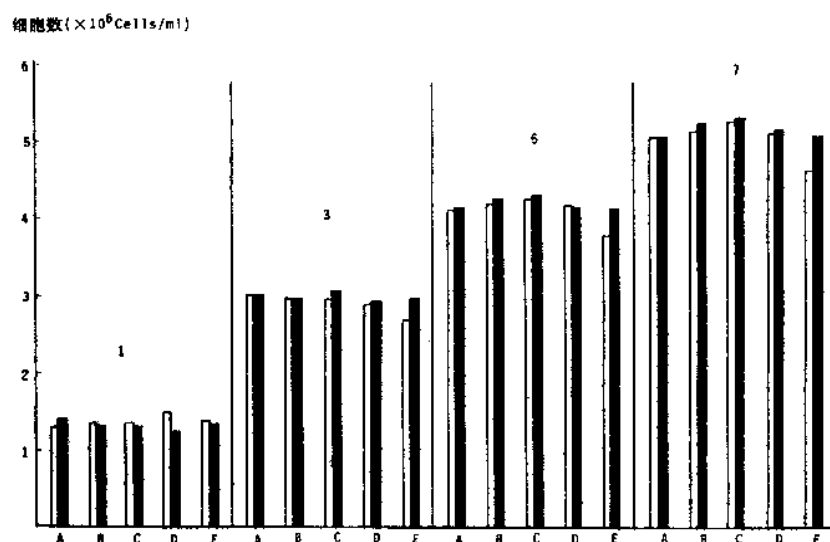


图 1 铜离子对球等鞭金藻繁殖速度的影响

Fig. 1 Effect of copper ion on reproduction of *Isochrysis galbana*

1、3、5、7 分别为第一、三、五、七天的结果。A、B、C、D、E 分别为加入铜浓度 0 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L。空白柱为无 EDTA 存在。黑柱为有 EDTA 存在。EDTA 浓度为 10^{-5} mol/L。(1993 年 8 月 12-19 日)

(三) 锌离子活度对球等鞭金藻繁殖速度的影响

图 2 为锌离子对球等鞭金藻繁殖速度的影响。表 3 为锌离子对球等鞭金藻第七天生长量的影响结果。仍以第七天各组细胞数分析不同活度的锌离子的影响。当锌的加入浓度为 $0-10^{-5}$ mol/L, 有 EDTA 存在时, 离子活度为 $0-10^{-6.68}$ mol/L, 无 EDTA 存在时, 离子活度为 $0-10^{-6.00}$ mol/L, 各组细胞数均无显著 ($P > 0.05$) 差异。当加入浓度为 10^{-4} mol/L, 无 EDTA 存在时, 离子活度为 $10^{-5.00}$ mol/L, 细胞数较低浓度组中最少的还显著 ($P < 0.05$) 减少; 尽管有 EDTA 存在, 但离子活度为 $10^{-5.05}$ mol/L, 细胞数较其他各组显著 ($P < 0.05$) 减少。加入浓度为 10^{-4} mol/L 组比较, 有无 EDTA 存在细胞数无显著 ($P > 0.05$) 差异。

表 3 锌离子对球等鞭金藻第七天生长量的影响

Table 3 The effect of zinc on the number of *Isochrysis galbana* at 7th.

加入浓度 Added concentration (mol/L)	细胞数 Number of cells ($\times 10^4$ cells/ml)		P
	有 EDTA 存在 Presence of EDTA	无 EDTA 存在 Absence of EDTA	
0	426.4 ± 6.5	434.2 ± 6.0	> 0.05
10^{-7}	442.8 ± 7.5	442.8 ± 7.5	> 0.05
10^{-6}	455.3 ± 5.2	454.4 ± 4.3	> 0.05
10^{-5}	450.3 ± 5.6	443.4 ± 7.8	
10^{-4}	388.7 ± 1.9	367.9 ± 19.7	< 0.05

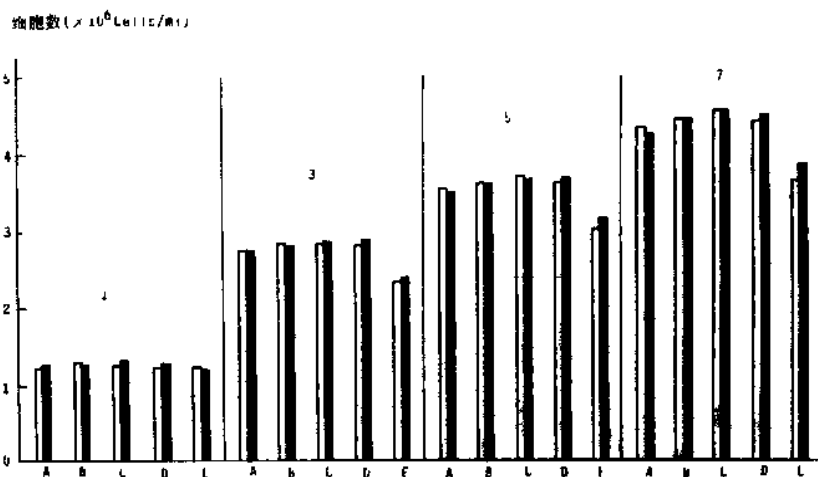


图2 锌离子对球等鞭金藻繁殖速度的影响

Fig.2 Effect of zinc ion on reproduction of *Isochrysis galbana*

1、3、5、7分别为第一、三、五、七天的生长结果。A、B、C、D、E分别为加入锌浓度0、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L。空白柱为无EDTA存在，黑柱为有EDTA存在。EDTA加入浓度为 10^{-3} mol/L。(1993年9月2-9日)

从图2结果可以看出，不管有无EDTA存在，锌离子活度为 $0-10^{-6.00}$ mol/L时，对球等鞭金藻生长繁殖无影响。锌离子活度高于 $10^{-6.00}$ mol/L，不利于生长繁殖。

讨 论

本文采用高分子吸附剂去除了海水中重金属离子^[3]，添加螯合剂EDTA能较准确地得到铜锌元素的离子活度，测定了铜、锌元素的离子态和螯合态对球等鞭金藻的影响。前人的工作均在未对海水进行处理^[1,2]，直接用了近岸海水，而近岸海水中所含的微量金属元素的浓度基本可满足单胞藻生长的需要，因此，得不到金属元素是必需微量成分的结果。国外学者^[10]为避免这种结果出现，采用了大洋海水或深海海水，因大洋海水和深海海水金属元素浓度远远低于近岸海水，但得到的结果仍会存在不准确因素。另一方面，对选定的元素进行研究时，不管采用近岸海水、大洋海水或深海海水，均避免不了其它共存离子的影响。

从本文得到的实验结果看，铜元素在活度低于 $10^{-13.57}$ mol/L时，不利于球等鞭金藻的生长繁殖，尽管有螯合态离子存在时也是如此。铜离子活度为 $10^{-13.57}-10^{-8.80}$ mol/L范围内均能满足生长繁殖的需要。铜离子活度等于或高于 $10^{-7.80}$ mol/L时，会产生毒性。首次通过实验得到铜离子对单胞藻生长的必需性，而这种必需性仅与活度有关。

锌离子的情况则不同，低的离子活度未表现出对球等鞭金藻的必需性，只是高的离子活度对生长繁殖不利。离子活度保持在 $10^{-6.00}$ mol/L以下时，不会产生不利影响。说明锌离子并非为球等鞭金藻所必需。

不管铜或锌元素, 螯合剂 EDTA 均能消除其对球等鞭金藻的影响。铜、锌离子比较而言, 球等鞭金藻对铜离子的毒性更为敏感, 产生相同毒害程度, 铜离子活度约仅为锌离子活度的百分之一。

本文的研究结果为进一步确定对虾育苗系统中铜、锌离子的保持浓度, 用铜、锌离子的化学生态调节作用及单胞藻培养液中铜、锌离子的最佳浓度提供了极为有用的数据。

参 考 文 献

- [1] 朱树屏等, 1964. 土壤浸出液, 维生素B12及钴对新月氏藻生长繁殖的影响。水产学报, 1: 19-38。
- [2] 陈真奇, 1985. 四种重金属对牟氏角毛藻生长率和叶绿素含量的影响。海洋学报, 7: 342-352。
- [3] 袁有亮等, 1992. 高分子吸附剂出去海水中重金属离子的研究。海洋水产研究, (13): 133-138。
- [4] Brand, L. E. *et al.*, 1983. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 1182-1198.
- [5] Harvey, H. W., 1947. Manganese and the growth of phytoplankton. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 26: 562-579.
- [6] Manahan, S. E. and M. J. Smith, 1973. Copper micronutrient requirement for algae. *Environ. Sci. Technol.*, 7: 829-833.
- [7] Ryther, J. H. and R. R. Cuillard, 1959. Enrichment experiments as a means of studying nutrients limiting to photo plankton production. *Deep-Sea Res.*, 6: 65-69.
- [8] Ryther, J. H. and D. D. Kramer, 1961. Relative iron requirement of some coastal and offshore plankton algae. *Ecology*, 42: 444-446.
- [9] Sunda, M. G. and P. A. Gillespie, 1979. The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity in seawater. *J. Mar. Res.*, 37: 761-777.
- [10] Sunda, M. G. and R. R. Guillard, 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 34: 511-529.
- [11] Whiffeld, M., 1975. Seawater as an electrolyte solution. *Chemical Oceanography*. Vol. 1, 2nd ed: p. 43-71. Ed by J. P. Ridey and G. Skirrow. New York, Academic Press.
- [12] Yuan Youxian, 1988. *Simultaneous spectrophotometric determination of calcium and magnesium with chlorophosphazo III by flow injection analysis*. *Anal. Chim. Acta*, 212: 291-295.

OPTIMUM IONIC ACTIVITIES OF COPPER AND ZINC IN SEAWATER FOR CULTURE OF *ISOCHRYSIS GOLBANA*

Qu Keming Yuan Youxian Zhang Duxi Gao Chengnian

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The optimum ionic activities of copper and zinc in seawater for the culture of *Isochrysis galbana* were studied in this paper. A new method of seawater treatment was used in removal of heavy metal ions from seawater. The ionic activities of copper and zinc were determined from thermodynamic calculation. The results show that the optimum ionic activities of copper and zinc are $10^{-13.57}$ - $10^{-8.80}$ and 0 - $10^{-6.00}$ mol/L

respectively for the culture of *Isochrysis galbana*. Copper ion is essential to the reproduction of *Isochrysis galbana*, but zinc ion is not. When ionic activities of copper and zinc are higher than $10^{-8.80}$ and $10^{-6.00}$ mol/L respectively, they have harmful effects on *Isochrysis galbana*. The toxicity of copper ion is greater than that of zinc ion, however, the toxicities can be eliminated by adding EDTA.

KEYWORDS *Isochrysis galbana*, Copper, Zinc, Ion activity