

萘及其衍生物对普通小球藻的毒性效应*

沈国兴 严国安^{**} 余新

(武汉大学环境科学与工程系, 武汉 430072)

刘永定 宋立荣 徐立红

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 本文研究了萘及其衍生物(萘、1-萘酚、2-萘酚和1-萘胺)对普通小球藻的生长、叶绿素含量、光合强度和呼吸强度的影响。萘、1-萘酚和1-萘胺在低浓度下能促进普通小球藻的生长, 高浓度则抑制藻的生长; 2-萘酚在实验浓度下都抑制藻的生长。萘、1-萘酚、2-萘酚和1-萘胺的96hEC₅₀分别为98.06、11.87、13.39和6.95mg/L。萘及其衍生物对叶绿素含量和光合强度的影响比对生长的影响强, 而对叶绿素含量的影响又比对光合强度的影响强。可以这样认为: 萘及其衍生物对普通小球藻生长的抑制是通过抑制藻叶绿素a的形成, 进而降低光合强度实现的。低浓度的萘和1-萘酚增强普通小球藻的呼吸强度, 而高浓度则减弱; 与此相反, 低浓度的2-萘酚对藻的呼吸强度影响不大, 高浓度能显著增强; 在实验浓度下的1-萘胺使藻呼吸强度明显减弱, 但随着时间的推移, 呼吸强度出现回升, 且高浓度回升较快。

关键词 萘及其衍生物, 普通小球藻, 毒性, 叶绿素, 光合强度, 呼吸强度

萘及其衍生物作为有机合成原料, 常应用于塑料、石油和煤加工工业、制革、纺织和皮革生产中, 也用于染料和制药工业, 其生产废水中皆发现存在有萘及其衍生物。全世界许多水体都发现有萘及其衍生物的存在^[1,2]。萘是石油的最大水溶性组分, 大量的萘随着石油泄漏、船舶废油排放而进入水体。萘及其衍生物不但是有毒有机物, 而且有些为致癌物或为可疑致癌物^[3]。美国环保局(EPA)把萘和2-氯萘列入56种环境优先污染物。我国也把萘列入环境优先污染物。

目前对于包括萘及其衍生物在内的多环芳烃(PAHs)对动物和细菌的毒性效应, 国内外已进行了大量研究, 而对于藻类的毒性效应研究较少。藻类作为水生生态系统的初级生产者, 能通过光合作用, 为无脊椎动物、鱼类、水鸟等生物提供O₂、食物等。其种类多样性和初级生产量直接影响水生态系统的结构和功能。因此, 研究萘及其衍生物对藻类的毒性效应不仅对于藻类而言是重要的, 而且对于萘及其衍生物在水生态系统中的迁移和转化, 并对其进行生态风险评价亦具有重要意义。藻类作为评价化学品毒性的重要指示生物类群, 许多国家和国际组织都规定化学品对藻类的毒性是测试化学品毒性的必需指标, 还制

* 国家自然科学基金(39870152)和淡水生态及生物技术国家重点实验室开放课题基金资助

** 通讯联系人

1999-09-06 收到; 1999-09-17 修回

定了一系列藻类毒性测试的标准方法^[4]。本文研究了萍藻、1-萍酚、2-萍酚和1-萍胺对普通小球藻的生长、叶绿素含量、光合强度和呼吸强度的影响,以从生理特性方面揭示其毒性机制并为其生态风险评价提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 藻种及其培养 普通小球藻(*Chlorella vulgaris* Beij)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供,采用水生四号培养基^[5]。按照国家环保局《化学品测试准则》中的“藻类生长抑制实验”^[4]进行培养,培养温度22±1℃,pH 6.8,连续24h光照,光照强度3000±200lx,静置培养,每天定期摇动三次。

1.2 化合物及其配制 萍藻、1-萍酚、2-萍酚、1-萍胺,都为分析纯。由于四种物质都难溶于水,因此使用二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂。为避免DMSO对藻类毒性实验的干扰,正式实验前需确定DMSO作为溶剂的浓度。

为确定化合物的实验浓度,首先以1, 10, 50, 75和100mg/L的浓度进行预实验,最后确定实验浓度为:

萍藻:10, 25, 50, 75和100mg/L;1-萍酚:1, 2, 5, 10和20mg/L;2-萍酚:1, 5, 10, 25和40mg/L;1-萍胺:0.5, 1, 2, 5和10mg/L。

1.3 毒性的测定 在藻的指数生长期即浓度达10⁵~10⁶个/ml时加入实验有机物,设五个浓度梯度及对照。从接种时起计时,每隔24h取样,用血球计数板进行细胞计数,同时测定藻液在650nm处的吸光值,建立细胞数与吸光度之间的关系。公式如下:

$y = 0.877 + 69.14x$, 这里y为细胞数(10⁵个/ml);x为650nm处(1cm)的吸光值;根据细胞数量计算得生长速率(k),公式如下:

$k = (\ln N_1 - \ln N_0) / (T_1 - T_0)$, 其中N₀和N₁分别为起始和T₁时间的细胞数,以概率单位法计算得EC₅₀值。

1.4 藻类叶绿素含量的测定 测定藻类叶绿素含量采用分光光度法^[6],并加以改进。具体方法为:取20ml藻液,4000r/min,离心10min,去上清,直接加入5ml丙酮,摇匀,在黑暗处抽提24h,再分别于663nm和645nm波长处测定抽提液的吸光值。根据公式:

$$C_A = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$$

计算得叶绿素a的含量。

在测定叶绿素a含量的同时,测出藻液的吸光值及对应的细胞干重。干重的称量方法如下:取一定量的藻液,离心得藻,在95℃烘24h,至恒重。吸光值与细胞干重的关系公式:

$$y = 0.596 + 46.946x \quad (10^{-2} \text{ mg 干细胞/ml 藻液}), y \text{ 为藻细胞的干重}; x \text{ 为 } 650\text{nm} \text{ 处}(1\text{cm}) \text{ 的吸光值}.$$

1.5 藻类光合强度和呼吸强度的测定 藻类光合强度和呼吸强度以测定溶解氧的方法测得,测定溶解氧采用叠氮化钠改良法^[7]。具体方法如下:于2个250ml的碘量瓶分别加入藻液20ml,而后加入培养液至满瓶,水封,一瓶置于黑暗处,一瓶置于光亮处,放置24h后,测定溶解氧的量。光照条件下,溶解氧的增加即为藻类的净光合作用所释放。黑暗条件下,藻类仅进行呼吸作用,溶解氧含量的减少即为呼吸所消耗。

2 结果和分析

2.1 萍及其衍生物对普通小球藻的生长影响及毒性

2.1.1 DMSO 对普通小球藻生长的影响

表 1 DMSO 对普通小球藻生长速率的影响

Tab. 1 Effect of DMSO on the growth of *Chlorella vulgaris*

DMSO 浓度 (V/V)	普通小球藻的生长速率(h^{-1})						
	24	48	72	96	120	168	240
对照	0.420	0.235	0.248	0.280	0.224	0.207	0.191
0.067%	0.440	0.248	0.242	0.272	0.221	0.205	0.190
0.1%	0.414	0.248	0.260	0.267	0.220	0.221	0.193
0.2%	0.437	0.246	0.262	0.297	0.238	0.214	0.187

DMSO 被认为是对藻类毒性较小的溶剂。在本实验中,三个浓度的 DMSO 对普通小球藻的生长并无影响(表 1)。在实验中使用的 DMSO 浓度为 0.067%。

2.1.2 萍及其衍生物对普通小球藻生长的影响

萍(图 1)和 1-萍酚(图 2)对普通小球藻生长的影响相似。低浓度促进普通小球藻的生长。萍即使在刺激生长的浓度(10 和 25mg/L)下,对生长的影响也有差异:10mg/L 组在较短时间内(48h),藻的生长就受到明显的促进,随后(120h)生长又放慢;而在 25mg/L 组,萍首先表现出毒性,之后(72h)才表现出促进作用。低浓度的 1-萍酚(1 和 2mg/L)则在整个实验过程中,都促进普通小球藻的生长。高浓度的萍和 1-萍酚对藻的生长有明显的抑制,100mg/L 的萍在 24h 使藻的生长速率下降 83%;藻在 20mg/L 1-萍酚中的生长速率更低,甚至只有对照组藻生长速率的 5%。两种物质的毒性都随着时间的推移而减小,而萍毒性减小的幅度比 1-萍酚大(表 2)。

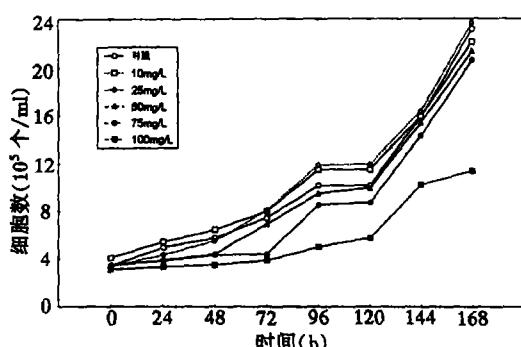


图 1 萍对普通小球藻生长的影响

Fig. 1 Effect of naphthalene on the growth of *C. vulgaris*

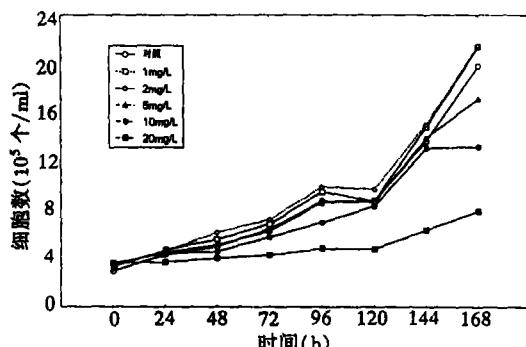


图 2 1-萍酚对普通小球藻生长的影响

Fig. 2 Effect of 1-naphthol on the growth of *C. vulgaris*

2-萍酚虽与 1-萍酚仅有一个取代位置的差别,但对普通小球藻的毒性差异较大(表 2),2-萍酚在各实验浓度下都表现出对藻的生长的抑制(图 3),即使在 1mg/L,也呈现出较好的剂量—效应关系,而且其毒性呈不断加深的趋势(表 2)。1-萍胺在低浓度(0.5 和

1mg/L)时, 促进普通小球藻的生长, 96h 后则抑制生长, 高浓度下都表现出明显的抑制作用(图 4). 与 2-萘酚相似, 1-萘胺的毒性也随时间延长而不断加深, 但幅度不大, 其 96h 的毒性仅比 24h 毒性增大约 35%.

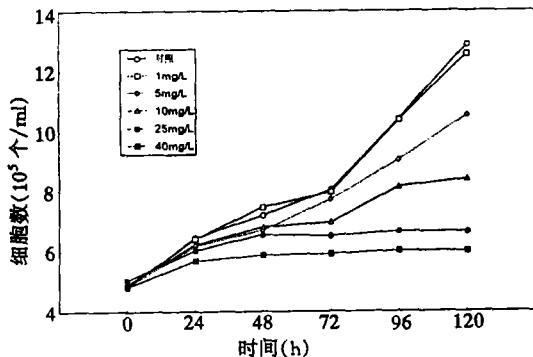


图 3 2-萘酚对普通小球藻生长的影响

Fig. 3 Effect of 2-naphthol on the growth of *C. vulgaris*

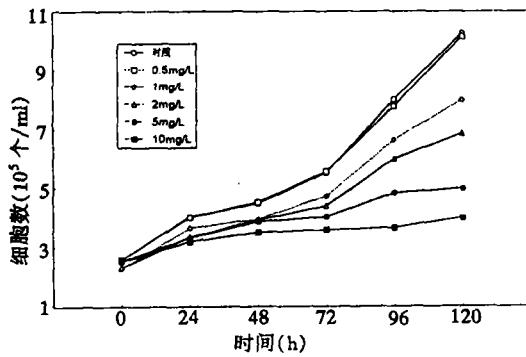


图 4 1-萘胺对普通小球藻生长的影响

Fig. 4 Effect of 1-naphthylamine on the growth of *C. vulgaris*

表 2 萍及其衍生物对普通小球藻的 EC₅₀ 值

Tab. 2 EC₅₀ of naphthalene and its derivants toxicity to *C. vulgaris*

	不同时间普通小球藻的 EC ₅₀ 值 (h)						
	24	48	72	96	120	168	240
萘	31.68	64.27	80.13	98.06	106.38	152.68	—
1-萘酚	6.63	8.82	10.34	11.87	12.38	17.78	16.03
2-萘酚	73.33	59.15	18.35	13.39	11.18	—	—
1-萘胺	10.74	11.95	6.84	6.95	5.16	—	—

2.2 萍及其衍生物对普通小球藻叶绿素含量的影响

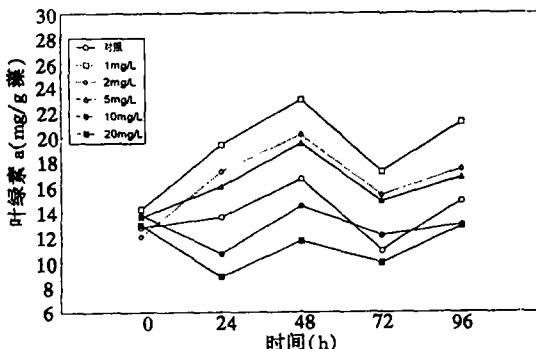


图 5 萍对普通小球藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 5 Effect of naphthalene on chlorophyll a content of *C. vulgaris*

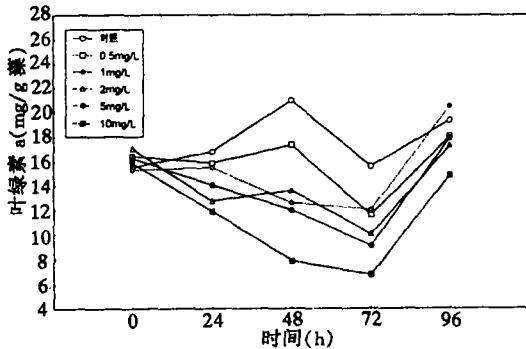


图 6 1-萘酚对普通小球藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 6 Effect of 1-naphthol on chlorophyll a content of *C. vulgaris*

萘对普通小球藻叶绿素a含量的影响在实验浓度范围内(1~20mg/L)并不明显(图5).低浓度的萘(1、2和5mg/L)使叶绿素a含量有较为明显的增加(24h,分别增加45.82%、28.85%和19.63%).而高浓度(10和20mg/L),藻叶绿素a含量则有明显的下降,72h之后有所缓解.各个浓度的1-萘酚都抑制普通小球藻的叶绿素a的产生(图6).抑制程度随浓度加大而增高,尤以48h为甚,抑制率分别为17.4%、40.0%、35.1%、42.9%和62.0%.96h,抑制有了较大的缓解.

2-萘酚(图7)和1-萘胺(图8)对藻叶绿素a的影响相似,对藻叶绿素a有较大的抑制.抑制程度与浓度呈较好的剂量—效应关系,而且抑制程度随时间变化不断加深,2-萘酚和1-萘胺96h抑制率分别达到20.5%、23.3%、36.3%和51.8%及44.2%、51.0%、77.6%、78.8%和83.8%.

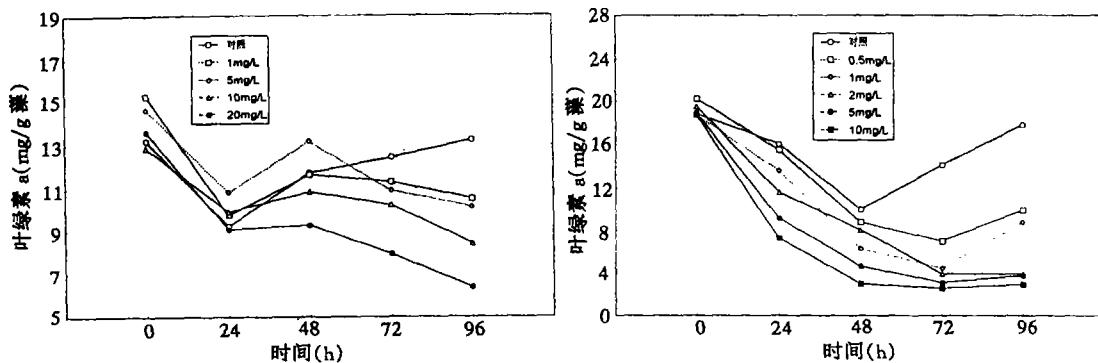


图7 2-萘酚对普通小球藻叶绿素a含量的影响

Fig. 7 Effect of 2-naphthol on chlorophyll a content of *C. vulgaris*

图8 1-萘胺对普通小球藻叶绿素a含量的影响

Fig. 8 Effect of 1-naphthylamine on chlorophyll a content of *C. vulgaris*

2.3 萘及其衍生物对普通小球藻光合强度的影响

低浓度的萘(1, 2 和 5mg/L)增强普通小球藻的光合强度, 96h 的光合强度分别比对照组增强了34.9%、22.8% 和 7.6%; 高浓度(10 和 20mg/L)降低藻细胞的光合强度, 但随着时间的延长, 光合强度的减弱作用逐渐消失, 至 96h 与对照组相比, 光合强度的差异已不明显.

1-萘酚除了 1mg/L(24, 48 和 96h)及 5mg/L(24h)对藻光合强度稍有增强外, 其余各实验浓度下, 都减弱藻的光合强度. 与萘的作用相似, 1-萘酚对藻光合强度的减小也随时间延长而减弱, 25 和 40mg/L 组在 24h 时的下降率为 12.5% 和 13.6%; 而 96h 的为 6.5% 和 9.5%.

2-萘酚在各实验浓度下, 都降低藻的光合强度(图11), 但随着时间的延长降低的程度略有下降. 唯有 40mg/L 组的抑制作用一直较强, 且不断增强.

1-萘胺在各个浓度下都减弱普通小球藻的光合强度, 且表现出良好的剂量—效应关系, 96h 抑制率分别为: 17.0%、38.7%、51.7%、60.6% 和 82.5%. 1-萘胺对光合强度的减弱作用不断增强.

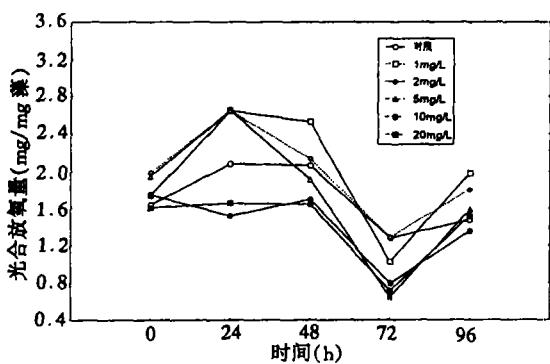


图 9 萍对普通小球藻光合强度的影响

Fig. 9 Effect of naphthalene on intensity of photosynthesis of *C. vulgaris*

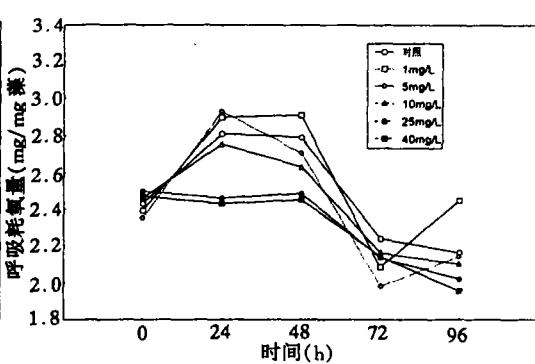


图 10 1-萘酚对普通小球藻光合强度的影响

Fig. 10 Effect of 1-naphthol on intensity of photosynthesis of *C. vulgaris*

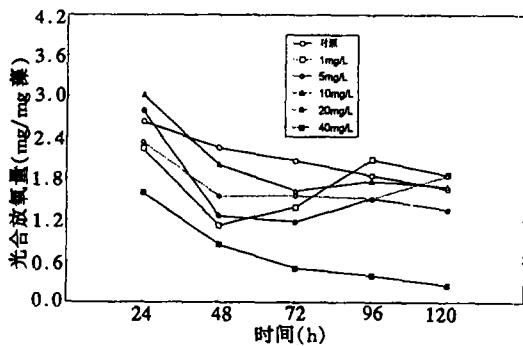


图 11 2-萘酚对普通小球藻光合强度的影响

Fig. 11 Effect of 2-naphthol on intensity of photosynthesis of *C. vulgaris*

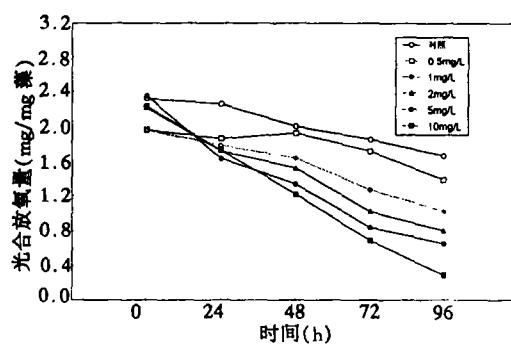


图 12 1-萘胺对普通小球藻光合强度的影响

Fig. 12 Effect of 1-naphthylamine on intensity of photosynthesis of *C. vulgaris*

2.4 萍及其衍生物对普通小球藻呼吸强度的影响

萍在各实验浓度下, 对普通小球藻的呼吸除了有很小的促进外, 并没有什么太大影响(图 13). 1-萘酚除了在 10mg/L 明显减弱普通小球藻的呼吸强度外, 其余各浓度藻的呼吸都加强, 其中 2mg/L 组增幅最大, 48h 的呼吸强度是对照组的 2 倍. 5mg/L 组 96h 后也出现减弱的趋势, 幅度为 10.0%. 高浓度的 2-萘酚(25 和 40mg/L)促进藻的呼吸, 低浓度对藻的呼吸强度的影响并不大, 1, 5 和 10mg/L 组有 44.6%、43.4% 和 17.1% 的增加.

1-萘胺对藻的呼吸强度, 首先(24h)表现为减弱, 并且其程度与浓度呈较好的剂量—效应关系; 随后(48 和 72h), 高浓度组抑制有所缓解, 而低浓度组的抑制作用则持续加强; 最后(96h), 高浓度组的呼吸强度甚至超过了对照组; 5mg/L 增强了 5.2%, 10mg/L 增强了 89.6%, 低浓度组的抑制作用也有所缓解.

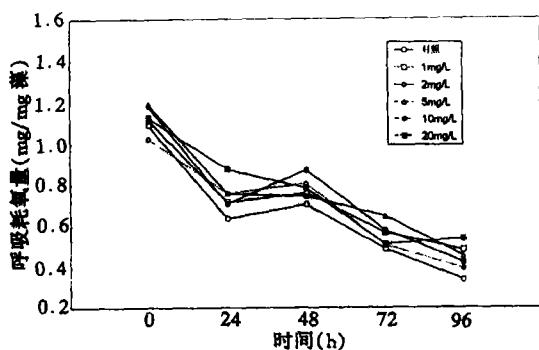


图 13 萘对普通小球藻呼吸强度的影响

Fig. 13 Effect of naphthalene on intensity of respiration of *C. vulgaris*

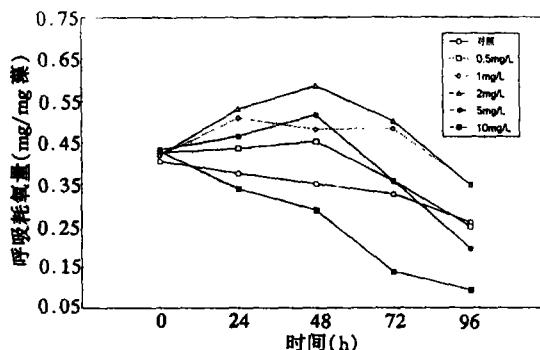


图 14 1-萘酚对普通小球藻呼吸强度的影响

Fig. 14 Effect of 1-naphthol on intensity of respiration of *C. vulgaris*

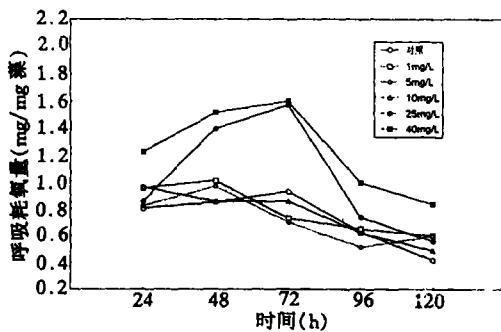


图 15 2-萘酚对普通小球藻呼吸强度的影响

Fig. 15 Effect of 2-naphthol on intensity of respiration of *C. vulgaris*

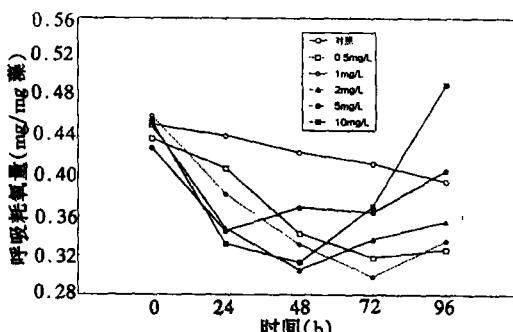


图 16 1-萘胺对普通小球藻呼吸强度的影响

Fig. 16 Effect of 1-naphthylamine on intensity of respiration of *C. vulgaris*

3 讨论

在有机物毒性实验中常使用溶剂,一般认为溶剂与有机物可以表现出复合毒性,表现为:加和、协同和拮抗效应.Caux 等^[8]发现成品农药常比其活性组分对藻的毒性更大,因而认为是溶剂在起作用,并发现其原因可能在于溶剂增加了藻类生物膜的流动性,从而使活性组分能更顺利穿过细胞膜,进入反应靶位.这与 El jay^[9]研究的 DMSO 对普通小球藻和羊角月芽藻的毒性相似.Hess^[10]的 DMSO 对衣藻(*Chlamydomonas eugametos*)的毒性实验,也发现只有 DMSO 浓度高于 1% 时衣藻的生长才受到明显的抑制.

有人实验发现萘对小球藻的 6dEC₅₀ 为 33mg/L^[11],与本实验的结果,5dEC₅₀ 106.38mg/L 相差约 3 倍.这与实验条件和实验方法不同有关.而其 1-萘胺的 6dEC₅₀ 为 4.6mg/L^[11],与本实验的 5dEC₅₀ 5.16mg/L 相差不大.萘和 1-萘酚在低浓度时促进藻的生长,这是由于普通小球藻能以萘和 1-萘酚作为生长的碳源,而高浓度则由于对藻的毒

害使生长下降。萍藻和1-萘酚毒性都随着时间的推移而减小,可能是由于(1)普通小球藻的生物降解,(2)萍藻和1-萘酚的光化学降解,(3)生物的适应,(4)进入细胞的量的减少^[12]。2-萘酚和1-萘胺的毒性随时间延长而增大,是由于2-萘酚和1-萘胺难于被藻利用,或虽能利用但降解产物的毒性更大,同时有机污染物更多地被藻富集。

此四种物质对普通小球藻的毒性差异很大,这是由物质本身的理化性质决定的,而藻类富集有机物的能力及有机物穿过细胞膜进入活性部位的能力,是决定有机物毒性的主要因素。萍藻较低的生物富集系数(12600)^[11]可能是萍藻毒性较低的一个重要原因。Shubert等^[13]认为藻类对有机物的毒害作用可能有七种不同反应:(1)随着浓度增加藻类对有机物的敏感性急剧增加;(2)在低浓度时有抗性,高浓度时敏感;(3)在有机物存在之初藻类较敏感,随后产生抗性,藻类能继续生长;(4)在高浓度时也有抗性,随后则藻细胞受毒害,脱色;(5)在有限的低浓度范围内促进藻类生长;(6)在高浓度时藻类的生长明显受刺激;(7)对有机物有完全抗性。

比较萍藻及其衍生物对普通小球藻生长、叶绿素含量和光合强度的影响,可以发现,在藻生长没有受到抑制,甚至有促进作用的浓度下,藻叶绿素a的含量明显下降,光合强度显著减弱,而且藻叶绿素a的含量下降的程度大于光合强度减弱的程度。从而可以这样认为:萍藻及其衍生物对普通小球藻生长的抑制是通过抑制藻叶绿素a的形成,进而降低光合强度实现的。Pandey^[14]在研究敌稗对藻的毒性时,发现敌稗抑制藻叶绿素a的合成,进而抑制光合作用。

本实验中,在萍藻(1~20mg/L),1-萘酚(0.5,1和2mg/L),2-萘酚(25和40mg/L)及1-萘胺(10mg/L)的作用下,普通小球藻的呼吸强度增大。许多研究^[15,16,17]也表明有机污染物对藻类产生毒害时,藻的呼吸强度会增大。呼吸强度的增大可能在于启动一系列对有机污染物的防御保护机制^[18]。小球藻与衣藻、纤维藻、裸藻和栅藻通常被认为是对有机污染物抗性较强的藻类。其原因可能也就在于在有机污染物的作用下,刺激呼吸作用,增强呼吸强度,从而为一系列防御保护机制的启动、作用提供能量基础。

参 考 文 献

- [1] Li A N et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of the Milwaukee Harbor Estuary, Wisconsin USA. *Water Air and Soil Pollution*. 1998, 101(1/4): 417~434
- [2] 田世忠等. 东湖水及其自来水中非挥发性致突变有机物的来源研究. 中国环境科学, 1993, 13(2): 100~105
- [3] 国家环境保护局有毒化学品管理办公室等编. 化学品毒性法规环境数据手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1992
- [4] 国家环境保护局. 化学品测试准则. 北京: 化学工业出版社, 1990
- [5] 黎尚豪等. 单细胞绿藻的大量培养实验. 水生生物学集刊, 1959, (4): 462~472
- [6] 朱广廉等编. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990
- [7] APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edn. Washington: American Public Health Association, 1985
- [8] Caux Pierre-Yves et al. Comparative study of the effects of MCPA: butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environ Pollut*, 1996, 92(2): 219~225
- [9] El Jay A. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1996, 57: 191~198
- [10] Hess F D. A Chlamydomonas algal bioassay for detecting growth inhibitor herbicides. *Weed Sci*, 1980, 28: 515~520

- [11] 金相灿. 有机化合物污染化学——有毒有机物污染化学. 北京: 清华大学出版社, 1990
- [12] Mohapatra P K and Mohanty R C. Growth pattern changes of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena doliolium* due to toxicity of dimethoate and endosulfan. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1992, **49**: 576 - 581
- [13] Shubert L L. Algae as ecological indicators. London: Academic Press, 1984
- [14] Pandey A K. Effect of propanil on growth and cell constituents of *Nostoc calcicola*. *Pestic Biochem Physiol*, 1985, **23**: 157 - 162
- [15] Marco E et al. Physiological alterations induced by the organophosphorus insecticide trichlorfon in *Anabaena PCC7119* grown with nitrates. *Environ and Exp Botany*, 1990, **30**(2): 119 - 126
- [16] Yamano T and Morita S. Effect of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria and microsomes. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1993, **25**: 271-278
- [17] Bhunia A K et al. Biochemical effects of carbaryl on nitrogen assimilating enzymes of cyanobacteria *Nostoc muscorum*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1994, **52**: 886 - 892
- [18] Davis J and Smith D I. Plasmid determined resistance to antibacterial agents. *Ann Res Microbiol*, 1978, **32**: 464 - 518

THE TOXIC EFFECTS OF NAPHTHALENE AND ITS DERIVANTS ON *CHLORELLA VULGARIS*

Shen Guoxing, Yan Guoan and Yu Xin

(Department of Environmental Science and Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072)

Liu Yongding, Song Lirong and Xu Lihong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract In this paper, it was studied that the effects of naphthalene and its derivants (naphthalene, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-naphthylamine) on growth, chlorophyll a content, intensity of photosynthesis and respiration of *C. vulgaris*. Naphthalene, 1-naphthol and 1-naphthylamine in low concentrations stimulated the growth of *Chlorella vulgaris*, but these chemicals in higher concentrations inhabited its growth significantly. 2-naphthol inhabited the growth in all concentrations (1 to 40 mg/L) tested. The EC₅₀ of naphthalene, 1-naphthol, 2-naphthol and 1-naphthylamine were 98.06, 11.87, 13.39 and 6.95mg/L, respectively. The toxic effects of naphthalene and its derivants on chlorophyll a content and intensity of photosynthesis were stronger than those of growth. Naphthalene and 1-naphthol in low concentrations, intensity of respiration of *C. vulgaris* were of stimulative effects, but at higher concentrations, the intensity reduced. On the contrary, 2-naphthol did not affect intensity of respiration of *C. vulgaris* at low concentrations, the intensity increased significantly. 1-Naphthylamine reduced respiration intensity of *C. vulgaris*, but then increased slowly.

Key words Naphthalene and its derivants, *Chlorella vulgaris*, Toxicity, Chlorophyll a, Intensity of photosynthesis, Intensity of respiration.