

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00973

三聚氰胺对藻类的毒性效应研究

裴国凤¹ 刘国祥²

(1. 中南民族大学微生物与生物转化实验室, 武汉 430074; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 以近头状伪蹄形藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)为材料, 利用藻类生长抑制试验测定了三聚氰胺对藻类的毒性效应。结果表明, 三聚氰胺对两种藻的生长存在不同程度的抑制效应, 浓度越高, 抑制效应越强; 对斜生栅藻的毒性效应还随处理时间的延长而增强。以生物量计, 三聚氰胺抑制近头状伪蹄形藻和斜生栅藻生长的 72h E_bC_{50} 值分别是 537.67 和 485.17 mg/L, 均为较低的毒性效应。两种藻的生长率均随处理浓度的增加而逐渐降低; 依据估算的 EC_{20} 和 EC_{10} 值推断, 斜生栅藻对三聚氰胺较为敏感, 而且还具有明显的慢性毒性效应。

关键词: 近头状伪蹄形藻; 斜生栅藻; 三聚氰胺; 生长抑制; EC_{50}

中图分类号: X171 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)05-0973-06

三聚氰胺是一种重要的氮杂环有机化工原料, 主要用于生产三聚氰胺-甲醛树脂, 同时广泛用于木材加工、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气、医药等行业^[1]。调查发现在动物饲料中添加三聚氰胺, 会导致猫狗等宠物中毒死亡^[2], 说明三聚氰胺的不合理应用不仅对养殖业具有不良影响, 还对人类健康存在着潜在危害。因其用途广, 使用量大, 若处置不当, 会成为水污染的潜在污染源, 成杰民等^[3]研究表明三聚氰胺废渣是一种降解极为缓慢的缓释氮肥。目前, 有关三聚氰胺对经济鱼类的急性毒性研究已有相关报道^[4], 但是三聚氰胺对水环境的影响如何尚不清楚。作为水生生态系统的初级生产者, 藻类处于水生食物链的始端, 是连接非生命物质和生命有机体的纽带, 对维持水环境的生态平衡和稳定起着极其重要的作用^[5]。其中单细胞绿藻因其生活周期短, 对污染物反应灵敏, 易于分离培养和直接观察细胞水平上的中毒症状等优点^[6], 成为水生生态毒理学研究中的理想实验材料。所以在研究有毒物或废水对水环境的影响时, 藻类测试常被用作毒性测定^[7]。本文利用国际标准组织^[7]标准藻类生长抑制试验方法测定了三聚氰胺对近头状伪蹄形藻

(*Pseudokirchneriella subcapitata*) 和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)生长的毒性效应, 以了解三聚氰胺对水生浮游藻类群落的潜在危害, 进而为三聚氰胺对水生生态系统的影响研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的藻种由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB)提供, 分别为近头状伪蹄形藻 FACHB-271 (*Pseudokirchneriella subcapitata* = *Selenastrum capricornutum*, FACHB-271)和斜生栅藻 FACHB-245 (*Scenedesmus obliquus* FACHB-245), 其中近头状伪蹄形藻是国际标准组织指定用于藻类生长抑制试验研究的藻种, 斜生栅藻是我国水污染研究中常用的试验生物。三聚氰胺(分析纯), 国药集团公司生产。

1.2 试验方法

参照国际标准方法(ISO 8692, 1989; OECD, 1984)^[8,9], 将适量的藻液接种到新鲜无菌的 BG₁₁ 培养基中, 进行预培养 2—3d, 达到对数生长期后再次转接到新鲜培养基中, 制备藻类试验液。培养温

收稿日期: 2009-06-08; 修订日期: 2010-03-15

基金项目: 国家 863 项目(2008 ZX07104-005); 国家自然科学基金面上项目(30970550); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009- ZX07104-005)资助

作者简介: 裴国凤(1969—), 女, 湖北随州人; 博士, 副教授; 主要从事藻类生态学研究。E-mail: peigf@scuec.edu.cn

通讯作者: 刘国祥, E-mail: liugx@ihb.ac.cn

度(22±2)℃, 光源为日光灯冷光源, 光照强度约为 6000 lx 左右, 光照周期是 14h(光): 10h(暗), 静止培养, 每天定时人工摇动 4 次, 并随机改变各锥形瓶的位置。

试验设置 6 个浓度梯度, 三聚氰胺含量分别为 0(对照组)、94、188、375、750、1500 和 3000 mg/L, 每组设 3 个平行样, 将经过预培养镜检处于对数生长期的藻液接入 250 mL 锥形瓶中, 培养液的体积均为 100 mL, 两种试验藻种的初始细胞浓度均为 5×10^4 ind./L, 培养条件与预培养相同, 试验周期是 72h。在试验开始后的第 0、24、48、72 h 取适量的藻液, 用 0.1 mL 的藻类计数框在显微镜下进行视野法计数, 测定藻细胞浓度(生物量)的变化。

1.3 试验数据的处理与统计分析

生长抑制率的计算 生长曲线下面所包围面积的比较: 生长曲线以下的面积可以按下式计算:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

式中: A —生长曲线以下的面积; N_0 — t_0 时刻每毫升藻液中的细胞数; N_1 — t_1 时刻每毫升藻液中所测得的细胞数; N_n — t_n 时刻每毫升藻液中所测得的细胞数; t_0 —试验起始的时间; t_1 —试验开始后第一次计数的时间; t_n —试验开始后第 n 次计数的时间。

每一受试物浓度细胞生长抑制的百分率 I_A 是对照组生长曲线下面所包围的面积(A_C)与每个受试物浓度生长曲线下面所包围的面积 A_t 之差计算得到。

$$I_A = \frac{A_C - A_t}{A_C} \times 100$$

生长率的计算 对数生长期藻类平均特定生长率(μ)用下式计算:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

EC_{50} 值是藻细胞生长抑制率为 50% 时受试物的浓度, 参照 ISO 8692 的标准规范, 根据不同回归方程估算出 24、48、72h 的 E_bC_{50} 、 E_bC_{20} 、 E_bC_{10} 值及其 95% 置信区间, 24h、24—48h、48—72h 的 E_rC_{50} 、 E_rC_{20} 、 E_rC_{10} 值。用 SPSS 12.0 统计软件进行统计计算和分析。

2 结果

2.1 三聚氰胺对两种藻生长的影响

试验期间, 和对照相比, 三聚氰胺的最高浓度(3000 mg/L)对近头状伪蹄形藻的生长产生明显的抑制作用。培养 24h 后, 细胞的死亡速度大于生长速度, 细胞数目开始减少, 这种毒性效应随着处理时间的延长而增强; 750、1500 mg/L 浓度处理组在 24h 后细胞分裂减少, 导致生长减慢; 48h 后的抑制浓度范围是 188—3000 mg/L (图 1A)。培养 72h 后, 94 mg/L 的浓度组也开始出现抑制效应。三聚氰胺对近头状伪蹄形藻的生长抑制效应表现为在一定范围内, 浓度越高, 毒性越强。随着处理浓度的增加, 斜生栅藻的生长也存在不同程度的减慢。高浓度处理组(≥ 375 mg/L)的藻细胞在培养 24h 后, 其生长明显受到抑制, 藻细胞的数量增长明显低于对照组; 随着处

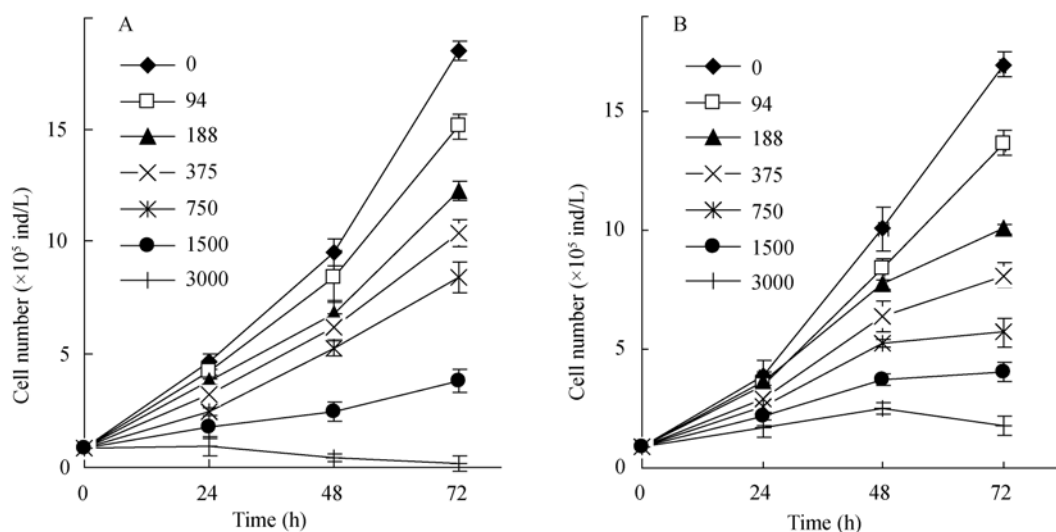


图 1 三聚氰胺对近头状伪蹄形藻(A)和斜生栅藻(B)生长的影响

Fig. 1 The influence of melamine on *P. subcapitata* (A) and *S. obliquus* (B) growth

理时间的延长，三聚氰胺对斜生栅藻生长的抑制效应继续增强，而且处理浓度越高，毒性效应越明显，其中最高浓度处理组(3000 mg/L)的藻细胞在培养 48h 后出现负增长效应(图 1B)。培养 48h 后，188 mg/L 浓度处理组的细胞生长也开始减慢，出现抑制效应，说明三聚氰胺对斜生栅藻的生长还具有明显的慢性毒性效应。

根据对照组和各处理浓度组生长曲线下所包围的面积计算两种藻 72h 的生长抑制率，得其回归曲

线和方程(图 2)，结果显示两者之间具有良好的显著相关性($P<0.001$)，可用概率回归方程计算两种藻生长抑制率为 50%时三聚氰胺的浓度，即 E_bC_{50} 。

伪蹄形藻和斜生栅藻的生长率均随三聚氰胺处理浓度的增加而逐渐降低(表 1)，除 94 mg/L 浓度处理组的三聚氰胺对两种藻的生长率没有明显影响外，其他浓度处理组的生长率明显降低($P<0.05$)，不同浓度($\geq 750\text{mg/L}$)的三聚氰胺对生长率的影响也存在显著差异($P<0.05$)。

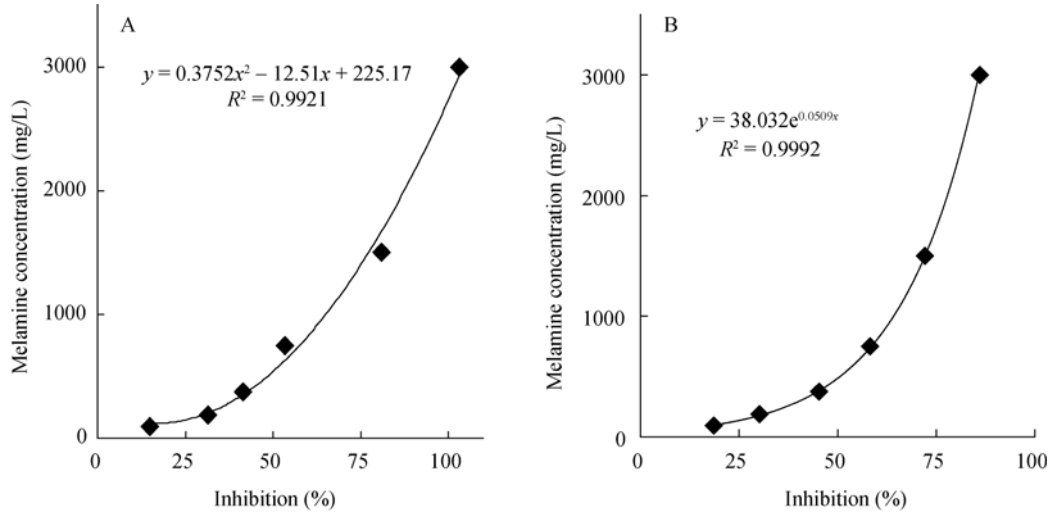


图 2 近头状伪蹄形藻(A)和斜生栅藻(B)72h 的生长抑制率与不同浓度三聚氰胺的回归曲线
Fig. 2 Regression curve of inhibition rates of melamine on *P. subcapitata* (A) and *S. obliquus* (B) growth for 72h

表 1 不同三聚氰胺浓度对近头状伪蹄形藻和斜生栅藻 72h 生长率的影响 (单因素方差分析, LSD 法)
Tab. 1 Growth rate (/d) of the *P. subcapitata* and *S. obliquus* when exposed to various melamine concentrations for 72h (One-way ANOVA, LSD)

Concentration (mg/L)	Growth rate(d)	
	<i>P. subcapitata</i>	<i>S. obliquus</i>
0	1.37±0.10 ^a	1.21±0.16 ^a
94	1.31±0.14 ^{ab}	1.11±0.13 ^a
188	1.24±0.13 ^{bc}	1.04±0.01 ^b
375	1.18±0.07 ^c	0.97±0.05 ^b
750	1.11±0.04 ^c	0.85±0.09 ^c
1500	0.85±0.06 ^d	0.73±0.08 ^d
3000	0.41±0.08 ^e	0.46±0.15 ^e

注：字母不相同表示有显著差异($P<0.05$)
Note: Significantly difference among different letters ($P<0.05$)

2.2 三聚氰胺的毒性效应评价

表 2 显示了 24、48、72h 的藻细胞生物量抑制率为 50%、20%和 10%时三聚氰胺的浓度及其 95%

的置信区间，分别表示为 E_bC_{50} 、 E_bC_{20} 、 E_bC_{10} 值。在用三聚氰胺处理近头状伪蹄形藻的 72h 内，其 E_bC_{50} 值变化幅度不大，相对平稳，其中 72h 的 E_bC_{50} 值是 537.67 mg/L；24h 和 48h 的 E_bC_{20} 和 E_bC_{10} 浓度分别相等，虽然 72h 的略有下降，但其 95%的置信区间范围和 48h 的比较接近，表明在一定的浓度范围内，低浓度的三聚氰胺对近头状伪蹄形藻的生长具有极微小的影响。和近头状伪蹄形藻相比，三聚氰胺对斜生栅藻的毒性效应更强，其 72h E_bC_{50} 值是 485.17 mg/L；随着三聚氰胺对斜生栅藻作用时间的延长， E_bC_{50} 、 E_bC_{20} 和 E_bC_{10} 均减小，表明斜生栅藻对三聚氰胺较为敏感，其毒性效应随作用时间的延长而增强。该结果说明三聚氰胺对斜生栅藻细胞的生长产生了不可逆的破坏作用，生长完全受到抑制。依据藻类生长抑制毒性评价的分级标准^[10]，三聚氰胺对近头状伪蹄形藻和斜生栅藻均属低毒。

根据不同浓度与对照相比所得到的生长率下降

表 2 三聚氰胺对两种藻的 E_bC 和 E_rC 值及其 95% 的置信区间
Tab. 2 E_bC , E_rC values and associated 95% confidence limits (CLs) of two algae for melamine

时间 Time (h)	近头状伪蹄形藻 <i>P. subcapitata</i>			斜生栅藻 <i>S. obliquus</i>		
	E_bC_{50}	E_bC_{20}	E_bC_{10}	E_bC_{50}	E_bC_{20}	E_bC_{10}
24	518.64 (329.07—817.43)	157.34 (96.54—256.43)	105.72 (63.33—176.49)	913.71 (326.72—2555.34)	196.93 (67.90—571.15)	118.07 (38.17—365.21)
48	497.44 (248.45—995.95)	157.05 (74.48—331.17)	106.94 (48.93—233.72)	703.64 (373.75—1326.14)	149.04 (75.34—294.83)	88.84 (42.87—184.13)
72	537.67 (310.38—859.95)	139.18 (60.91—318.00)	94.16 (39.49—224.56)	485.17 (429.40—548.20)	105.30 (91.78—120.82)	63.28 (54.60—73.35)
	E_rC_{50}	E_rC_{20}	E_rC_{10}	E_rC_{50}	E_rC_{20}	E_rC_{10}
0—24	1389.16 (895.64—1882.69)	383.86 (0—884.65)	48.76 (0—565.95)	2298.23 (671.25—饱和)	342.84 (111.96—1049.88)	181.83 (56.15—588.81)
24—48	—	—	—	2228.37 (476.93—饱和)	325.60 (79.77—1328.96)	171.45 (38.84—757.21)
48—72	>饱和	286.27 (105.94—773.52)	105.10 (34.07—324.18)	305.18 (85.67—1087.15)	116.93 (28.18—485.24)	84.93 (18.70—385.68)
0—72	1496.80 (1163.49—1830.11)	509.34 (250.92—767.75)	180.18 (0—446.19)	1095.61 (382.58—3137.57)	241.00 (83.71—693.81)	145.48 (47.83—442.46)

注: “—”无显著回归关系

Note: “—” No significantly regression relationship

百分数与相应浓度之间的回归关系求出 0—24h、24—48h、48—72h 生长率的抑制分别为 50%、20% 和 10% 时的三聚氰胺浓度, 即 E_rC_{50} 、 E_rC_{20} 、 E_rC_{10} 值(表 2)。近头状伪蹄形藻和斜生栅藻的 0—72h E_rC_{50} 分别是 1496.80 和 1095.61 mg/L; 试验期间, 不同时间段的 E_rC 值并不相同, 其中斜生栅藻的 E_rC 浓度均随作用时间的延长而变小, 说明三聚氰胺对斜生栅藻生长率的抑制随时间而增强。

2.3 三聚氰胺对细胞形态结构的毒性效应

镜检三聚氰胺处理 72h 的藻培养物, 可以观察到近头状伪蹄形藻细胞出现粘连和聚集现象, 子细胞分裂畸形, 和对照相比(图 3A-C), 细胞体颜色变浅(图 3D, E), 部分细胞体积增大(图 3E), 细胞内含物颗粒明显(图 3D, E), 荧光显微照片显示细胞内的叶绿素被破坏(图 3F)。培养 72h 的对照斜生栅藻细胞为扁平的定型群体, 由 4 个或 8 个细胞组成, 呈直线或轻微交错排列, 细胞为纺锤形, 两端尖细, 细胞内具有明显的蛋白核突起, 细胞分裂旺盛(图 3G, H); 三聚氰胺处理 72h 后, 游离的细胞数量增加, 细胞明显交错排列, 部分细胞的颜色也由正常的绿色变浅或几乎无色, 内含物颗粒也变得明显(图 3J, K), 色素体明显损伤, 荧光显微照片下显示只有少数细胞残存部分色素体(图 3L)。从这些藻细胞形态结构的变化可以推断三聚氰胺使藻细胞叶绿体的结构或功能受损是其致毒机理之一。

3 讨论

根据标准试验, 未经三聚氰胺处理的对照组, 细胞数目在 72h 内至少应该增加 16 倍^[7]。本试验中对照组的近头状伪蹄形藻和斜生栅藻在培养 72h 时, 细胞数目分别增加了 21 和 19 倍, 符合标准试验的要求。试验期间, 在添加三聚氰胺的各处理组中, 近头状伪蹄形藻和斜生栅藻的细胞生长均存在不同程度的减慢, 对两种藻的抑制效应均随处理浓度的增加而增强, 而斜生栅藻的 E_bC 和 E_rC 浓度均随作用时间的延长而变小(表 2), 说明三聚氰胺对斜生栅藻的抑制效应还与其作用持续的时间有关, 其毒性效应随处理时间的延长而增强。近头状伪蹄形藻的 72h E_bC_{50} 和 E_rC_{50} 值也均比斜生栅藻的大, 表明斜生栅藻对三聚氰胺更敏感, 这与其他一些农药抑制藻类生长的研究结果相一致, 即斜生栅藻对有毒物质表现得更为敏感^[11,12]。三聚氰胺对藻类生长的影响也可以通过生长率的变化来体现, 两种藻的生长率随三聚氰胺处理浓度的增加而降低, 这和其他学者用农药处理藻类得到的结果是相符的^[13]。本试验仅从藻细胞的形态结构变化方面简单探讨了三聚氰胺的毒性机理, 其真正毒性机理还有待于进一步研究。

三聚氰胺在生产过程中会产生大量的工业废水, 该废水为三聚氰胺、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸二酰胺等的饱和溶液, 颜色为乳白色, 有轻微的氨味, 其氨氮和总氮严重超标^[14]。若这些废水不经处理或

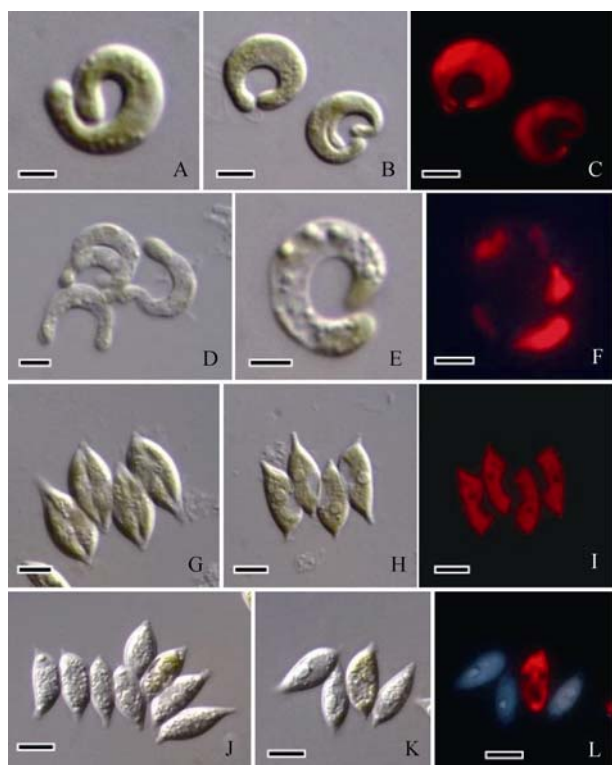


图 3 近头状伪蹄形藻和斜生栅藻经三聚氰胺处理 72h 的形态变化

Fig.3 Morphologic variation of *P. subcapitata* and *S. obliquus* exposed to melamine for 72h

A-F. 近头状伪蹄形藻; A-C. 对照细胞; D-F. 3000 mg/L 三聚氰胺处理的细胞, 其中 C 和 B、E 和 F 是同一组细胞图; C 和 F 是自发荧光照片, 显示色素体; G-L. 斜生栅藻; G-I 为对照处理, J-L 为 3000 mg/L 三聚氰胺处理的细胞, 其中 H 和 I、K 和 L 分别是同一组细胞; 图 I 和 L 为自发荧光照片, 显示色素体; 比例尺=2.5 μm

A-F. *P. subcapitata*; A-C. control cells; D-F. cells exposed to 3000 mg/L melamine, Fig. C and B, Fig. E and F are same group cells, Fig. C and F are fluorescence microscopy, showing the morphology of chloroplasts; G-L. *S. obliquus*; G-I. control cells; J-L. Cells exposed to 3000 mg/L melamine, Fig. H and I, Fig. K and L are same group cells, Fig. I and L are fluorescence microscopy, showing the morphology of chloroplasts. Bars=2.5 μm

处理不达标而排放于环境水体中, 不仅会导致水体的富营养化, 还可能对水体中的浮游生物造成一定的损害。有毒物质对藻类细胞造成的损害, 通常以半数生物受影响的浓度 EC_{50} 来表示, 它是评价有毒物对环境安全的一个重要指标。参照文献[15]和本试验的结果, 三聚氰胺对浮游藻类而言, 属低毒性物质, 虽然目前还没有相关文献报道三聚氰胺在自然水环境中的分布情况及大致的浓度范围, 但是从其对代表藻类的低毒性效应来看, 可能不会对水环境中浮游藻类群落的生长产生较大的危害, 然而,

它对一些藻类存在的慢性毒性(如斜生栅藻)和其他不确定或未知的危害性仍然是一个值得研究的问题。

4 结 论

(1) 不同浓度的三聚氰胺处理后, 两种藻的生长存在不同程度的减慢, 表现为浓度越高, 生长抑制效应越强; 对斜生栅藻的毒性效应还随处理时间的延长而增强。(2) 三聚氰胺对近头状伪蹄形藻和斜生栅藻的 72h EC_{50} 值分别是 537.67 和 485.17 mg/L, 均具有较低的毒性效应。(3) 显微结构观察显示三聚氰胺使两种藻的色素体明显受到损伤。

参考文献:

- [1] Gong X M, Dong J, Sun J, *et al.* Determination of melamine in vegetable materials by high performance liquid chromatography [J]. *Food Science*, 2008, **29**: 321—323 [宫小明, 董静, 孙军, 等. HPLC 法测定植物性原料中三聚氰胺. 食品科学, 2008, **29**: 321—323]
- [2] Lin X M, Wang J F, Jia G L, *et al.* The toxicity study of Melamine [J]. *Journal Toxicology*, 2008, **22**(3): 612—615 [林祥梅, 王建峰, 贾广乐, 等. 三聚氰胺的毒性研究. 毒理学杂志, 2008, **22**(3): 612—615]
- [3] Cheng J M, Chen X, Gong Y, *et al.* Feasibility of application of melamine waste on agriculture [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, **22**(2): 194—198 [成杰民, 陈学, 龚勇, 等. 三聚氰胺废渣农用的可行性研究. 农业环境科学学报, 2003, **22**(2): 194—198]
- [4] Liu H Y, Zhang W, Xue M, *et al.* Acute toxicity study for melamine on Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(2): 157—162 [刘海燕, 张伟, 薛敏, 等. 三聚氰胺对花鲈的急性毒性实验研究. 水生生物学报, 2009, **33**(2): 157—162]
- [5] Smith D W. Phytoplankton and catfish culture [J]. *Aquaculture*, 1988, **74**: 169—189
- [6] Gao Y R. Toxic study of monoformamidine insecticide on green algae [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1995, **15**(1): 92—97 [高玉荣. 杀虫剂单甲脒对绿藻的毒性研究. 环境科学学报, 1995, **15**(1): 92—97]
- [7] Burkiewicz K, Synak R, Tukaj Z. Toxicity study of three insecticides in a standard algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* [J]. *Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, **74**: 1192—1198
- [8] International Organization for Standardization. Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella subcapitata* [M]. International Standard 8692, Geneve (Switzerland). 1989
- [9] Organisation for Economic Co-operation and Development. Draft guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures [S]. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No.

23. 2000
- [10] Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals 201 [M]. Paris: OECD Publications. 1984, 246—259
- [11] Kent R A and Currie D. Predicting algal sensitivity to pesticide stress [J]. *Environmental Toxicological Chemistry*, 1995, **14**: 983—991
- [12] Wu Y H, Cai L M, Wang J, *et al.* Growth inhibition of herbicide atrazine to the seven algae [J]. *Agrochemicals*, 2007, **46**: 48—50 [吴颖慧, 蔡磊明, 王捷, 等. 除草剂莠去津对 7 种藻类的生长抑制. 农药, 2007, **46**: 48—50]
- [13] Sabater C and Carrasco J M. Effects of the organophosphorus insecticide fenitrothion on growth in five freshwater species of phytoplankton [J]. *Environmental Toxicology*, 2001, **16**: 314—320
- [14] Chen J J, Liu Q Y, Liu Z L. Experimental study on treatment of melamine wastewater [J]. *Journal of Hangzhou Dianzi University*, 2008, **28**: 81—83 [陈建军, 刘勤亚, 刘振鲁. 三聚氰胺废水治理的实验研究, 杭州电子科技大学学报. 2008, **28**: 81—83]
- [15] Kühn R and Pattard M. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test [J]. *Water Research*, 1990, **24**: 31—38

TOXIC EFFECTS STUDY OF MELAMINE ON ALGAE

PEI Guo-Feng¹ and LIU Guo-Xiang²

(1. Laboratory of Microorganism and Biotransformation, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072, China)

Abstract: Melamine is an organic nitrogen heterocyclic compound. It becomes a big problem to the health of people and pets because it is an additive to pet-foods and milks for illegality profits. If melamine releases into the environment, it maybe disturb water ecosystem balance by direct toxic effects on plants and animals, so it should meet the requirements for hazard assessment. Planktonic algae have fundamental importance in proper structure and function of the whole ecosystem, it plays an essential role in the water environment. Moreover, planktonic algae are sensitive indicators for testing different effects of substances discharged into the water. Therefore, the investigations on the influence of toxic substance on unicellular algae have been generally accepted. The purpose of this test is to determine the effects of melamine on the growth of fresh water microalgae (green algae). Exponentially growing test algae were exposed to the melamine in batch cultures over a period of normally 72h, growth inhibition were quantified from measurements of the algal biomass density as a function of time. In the algae reproduction inhibition test, the 94-3000 mg/L concentrations of melamine were applied, melamine was examined to determine the effect concentration (EC) and EC_{50} (0—72h) values calculated concentrations that would inhibit growth by 50% as compared to the control treatment, they were estimated based on growth curve area (E_bC_{50}) and growth rate (E_rC_{50}).

Toxic effects of melamine to algae were determined in an algal growth inhibition test with *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus obliquus*. The results indicated that the growth of two species was inhibited in different degree by melamine; the higher the concentration used, the greater the toxic effect; the toxic influence of melamine to *S. obliquus* increased with exposure duration. E_bC_{50} values for 72h of melamine on inhibition of *P. subcapitata* and *S. obliquus* growth were 537.67 and 485.17 mg/L respectively, it appeared to be a low harmful substance. Two algae species growth rates were decreased with an increase of melamine concentration; according to estimated EC_{20} and EC_{10} values, it concluded that *S. obliquus* was more susceptible to melamine as compared to *P. subcapitata*, and appeared to be a clearly creeping effect.

Key words: *Pseudokirchneriella subcapitata*; *Scenedesmus oblique*; Melamine; Growth inhibition; EC_{50}