

偶氮染料对斜生栅藻的毒性作用及结构活性相关性研究*

孙红文 黄国兰 王春节 宋文华

(南开大学环境科学系, 天津 300071 E-mail: sunhong @ public.tjue.com.cn)

摘要 为了揭示不同结构染料对水生生态系统的毒性作用, 研究9种偶氮类及2种蒽醌类染料对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 的生长抑制作用, 并通过剖析毒性与结构之间的相关关系, 探讨了偶氮染料的毒作用机理. 11种染料对斜生栅藻的48h EC₅₀在1.09—41.22mg·L⁻¹之间. 偶氮染料分子中所包含偶氮键的个数及芳香环上取代基的亲水性和电性均影响染料的毒性. 进一步证实偶氮染料的毒作用机理为 N=N 键还原为—NH₂后, 形成 N⁺ 离子活性形式与生物大分子发生结合.

关键词 偶氮染料, 斜生栅藻, 生长抑制, 结构活性, 相关性.

Toxic Effect of Azo Dyes to *Scenedesmus obliquus* and Relationship between Structure and Activity

Sun Hongwen Huang Guolan Wang Chunjie Song Wenhua

(Department of Environmental Science, Nankai University, Tianjin 300071 E-mail: sunhong @ public.tjue.com.cn)

Abstract In order to disclose the toxic effect of structurally different dyes on aquatic ecosystem, inhibition on the growth of green algae *Scenedesmus obliquus* of nine azo dyes and two anthraquinone dyes was studied. The mechanism of toxic effect was discussed by analyzing the relationship between toxicity and structure. 48h EC₅₀ of the 11 dyes was between 1.09—41.22mg·L⁻¹. The number of N=N in an azo molecule and the hydrophilicity and the electronic property of substituted groups can affect the toxicity of azo dyes. The toxicity mechanism was further confirmed that N=N is first reduced to —NH₂ and then activated to N⁺ ion which is the active form and combine with biomacromolecules.

Keywords azo dyes, *Scenedesmus obliquus*, inhibition of growth, structure-activity, relationship.

目前染料的品种和数量不断增加, 对水生生态系统产生严重影响^[1]. 单细胞藻类是整个水生生态系统的基础, 它本身易受染料的毒害, 并可通过食物链将染料传递给整个生态系统, 且目前发现藻类对偶氮染料有一定的降解作用^[2]. 最近 Greene J. C. 等研究了46种染料(44种阴离子染料和2种阳离子染料)对淡水绿藻 *Selenastrum capricornutum* 的96h 生长抑制作用. 2种阳离子染料的 EC₅₀ 小于 1mg·L⁻¹; 而阴离子染料的 EC₅₀ 均大于 1mg·L⁻¹^[3].

目前对偶氮染料毒作用的研究主要集中在其对细菌和哺乳动物的致突变性和致癌性等方面^[4,5]. 关于其对藻类的毒性研究的不多. 刘金齐等^[6]曾研究了2种偶氮染料铬蓝 CE 和铬黑 T 对小球藻的毒性影响. 2种偶氮染料对小球藻的生长分裂, 光合作用及 ATP 酶均有一定程

* 国家自然科学基金和天津二十一世纪青年基金资助项目 (Project Supported by National Natural Science Foundation of China and Science Committee of Tianjin)

孙红文: 女, 30岁, 博士, 副教授

收稿日期: 1997-12-26

度影响. 本研究选定常见的淡水绿藻斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 作为受试生物, 研究了11种不同结构的染料对其48h 生长抑制作用, 通过剖析毒性大小与分子结构之间的相关关系, 探讨了偶氮染料的毒性作用机理.

1 材料与方法

1.1 实验生物

纯种斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 由中国科学院武汉水生生物研究所提供. 在无菌操作下由固体培养基上将藻种转移至水生四号培养液中逐步扩大培养.

1.2 化学药品

本实验所选用的11种染料为: 酸性橙, 直接湖蓝5B, 碱性艳蓝 BO, 酸性黑10B, 活性艳蓝 KNR, 直接黄 R, 直接深棕 NM, 直接耐晒黑 G, 酸性媒介红 B, 活性艳蓝 K-2BP, 直接橙 S. 所用染料均为工业品, 未经纯化. 实验前用水生四号培养液配制成 $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液.

1.3 染料对斜生栅藻生长抑制试验

试验在250ml 锥形瓶中进行, 试验液为含有一定浓度染料的水生四号培养液, 用无菌膜封口. 高压灭菌并冷却后, 接种处于对数生长期的纯种斜生栅藻, 使试验液总体积为50ml, 藻种初始密度 $45\text{--}55\text{万个}\cdot\text{mL}^{-1}$.

其它实验条件为温度 25 ± 0.60 ; 光照强度为 4000lx ; 光暗周期为12h 光照, 12h 黑暗, 并在光照期间每隔3h 摇瓶充气. 实验进行48h, 在0h、24h、48h 分别对试验液中的藻进行观察和计数. 首先进行预备试验, 染料浓度分别为0、1、10、100、500、 $800\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 找出最小完全抑制浓度和最大完全不抑制浓度. 然后按等对数间隔取6个浓度, 1个对照做正式实验, 每个浓度做2个平行. 可根据下列公式求出不同浓度染料中斜生栅藻的生长率 R 和生长受抑制率 PI :

$$R = \ln(N_t/N_0)/t \quad (1)$$

$$PI = (R_0 - R_x)/R_0 \quad (2)$$

式中 N_t 和 N_0 分别为 t 时刻和0时刻藻的密度, t 为时间, R_0 和 R_x 分别为染料浓度为0和 x 时藻的生长率.

2 结果与讨论

2.1 染料对斜生栅藻的生长抑制

图1为不同浓度直接橙 中斜生栅藻的48h 生长曲线. 随着染料浓度的增加, 其对斜生栅藻的生长抑制作用明显增强, 至 $260\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 斜生栅藻的生长基本停止.

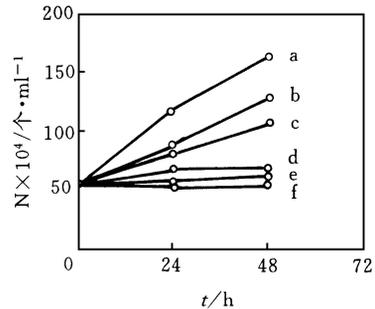


图1 不同浓度直接橙 中斜生栅藻的48h 生长曲线

a. $0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ b. $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ c. $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
d. $35\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e. $135\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ f. $260\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

不同浓度直接橙 中斜生栅藻的生长率 R 及生长受抑制率 PI 列于表1. PI 对 $\lg c$ 进行一元线性回归得方程 (式3), 并可求得生长半数抑制有效浓度 EC_{50} 和毒性值 T .

$$PI = 53.65 \lg c - 31.42 \quad (3)$$

$$r = 0.9590 \quad EC_{50} = 32.93\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$T = MW/EC_{50} = 10.64\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$$

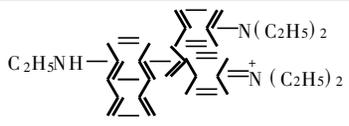
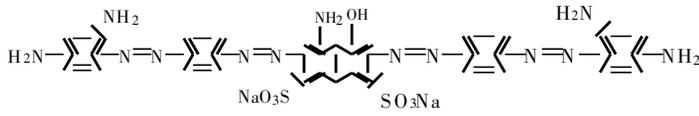
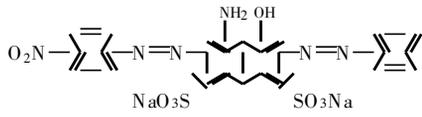
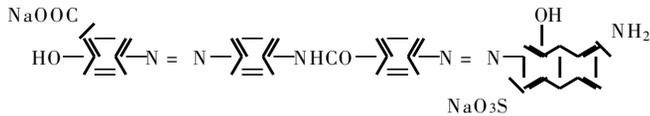
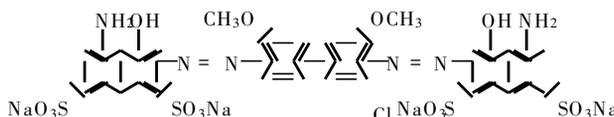
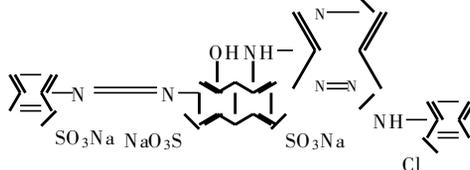
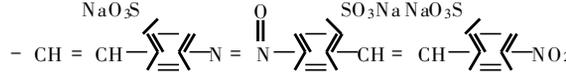
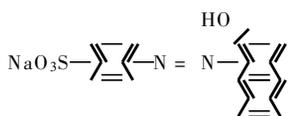
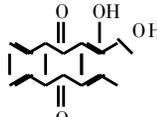
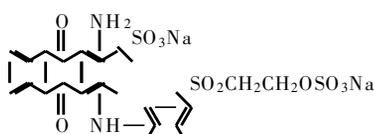
表1 不同浓度直接橙 中斜生栅藻的生长率 R 及生长受抑制率 PI

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	10	20	35	135	260
$R/\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	231	196	150	75	42	15
$PI \times 100$	0	15.15	35.06	67.53	81.81	93.51

其它染料对斜生栅藻的生长抑制作用大致相同. 按上述方法计算出毒性值 T 在 $10.64\text{--}436.75\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$ 之间 (表2), 相差几十倍. 图2为不同结构染料对斜生栅藻的生长抑制毒性比较框图. 从图2中可见, 不同结构的偶氮染料毒性相差很大. 根据毒性值大小, 可将11种染料分为5组. 第 组毒性最大, 只包含一个染料碱性艳蓝 BO, 它是唯一一个在分子结构中包含 N^{\oplus} 离子的染料. 第 组化合物毒性较大, 其中直

接耐晒黑 G 含有4个偶氮键,而酸性黑10B只 基—NO₂. 第 组的4个化合物均包
包含2个偶氮键,但其芳香环上有强吸电子取代 含2个偶氮键,组内毒性的差异与染料中亲水

表2 11种染料分子结构及 EC₅₀和 T 值

编号	名称	结 构	EC ₅₀ / mg·L ⁻¹	T / L·mmol ⁻¹
1	碱性艳蓝 BO		1.09	436.75
2	直接耐晒黑 G		4.66	180.22
3	酸性黑10B		3.51	175.50
4	直接深棕 NM		8.37	80.05
5	直接橙 S		13.61	55.57
6	直接湖蓝5B		18.24	54.36
7	活性艳蓝 K-2BP		16.27	49.69
8	直接黄 R		33.79	12.61
9	酸性橙		32.93	10.64
10	酸性媒介红 B		15.05	15.96
11	活性艳蓝 KNR		41.22	15.19

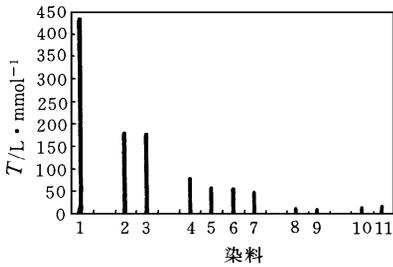


图2 11种染料毒性值比较(染料的编号与表2中一致)

基团—SO₃Na、—OH、—COONa的多少相关。第一组染料只含有1个偶氮键,毒性较小。第二组为2个蒽醌类染料,其毒性与第一组相当。可见染料分子结构中是否含有N⁺离子及N=N键个数是决定染料毒性的关键因素,芳香环上取代基的电性和亲水性也影响其毒性。

2.2 偶氮染料对藻类的毒性作用机理

偶氮染料致毒的致癌和致突变分子水平研究表明^[7,8],偶氮染料可以分为3类,第一类偶氮染料的毒性来自于芳香胺的毒性,偶氮染料在生物体内首先还原为相应的芳香胺,并遵循芳香胺体内活化机制,最终形成N⁺离子活性形式。第二类偶氮染料不需N=N键还原,本身具有直接毒性。第三类偶氮染料含有较多的一SO₃Na等亲水基团,易被排出体外,毒性较小。笔者通过对偶氮染料毒性与其分子结构相关关系的分析,认为偶氮染料对藻类的毒作用机理与其致癌致突变机理相似,毒性作用发生需经2步:首先染料由水环境进入藻体内,具有较多亲水基团的染料不易进入藻细胞,因而具有较小的毒性。第二步偶氮染料在藻细胞内,偶氮键首先被还原为—NH₂后,再形成N⁺离子活性形式与生物大分子的电负中心(如DNA碱基中的N、O及蛋白质中的—SH、—OH和咪唑基等)发生结合,使其丧失其应有的功能。如果偶氮染料分子结构中含有N⁺离子,不需体内活化,直接发生毒性作用,则会表现出较大的毒性。像碱性艳蓝BO一类的碱性染料分子结

构中都含N⁺离子,具有较大的毒性。其它的偶氮染料分子所形成N⁺离子的数目越多,正电荷密度越高,毒性则越大。

3 结语

偶氮染料和蒽醌类染料对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)有一定的毒性作用,48h EC₅₀在1.09—41.22mg·L⁻¹之间。毒性值随分子结构不同而发生变化。偶氮染料对藻类的毒作用机理为N=N键还原为—NH₂后,再形成N⁺离子活性形式,最终与生物大分子发生结合。所以一个偶氮染料分子越易产生N⁺离子,产生N⁺离子越多,且所产生N⁺离子正电荷密度越高,其生物毒性往往越大。另外芳香环上取代基的亲水性对染料的毒性也有一定影响,亲水基团越多,生物毒性越低。目前偶氮染料生产向具有多个偶氮键的趋势发展,因而生物毒性更大,对水生生态系统的危害越大。

参 考 文 献

- 1 朱乐辉,蒋展鹏.染料废水及治理.环境开发,1994,9(3):321
- 2 刘厚田等.藻菌系统降解偶氮染料的机理研究.环境科学学报,1993,13(3):332
- 3 Greene J C, Baughman G L. Toxic Effects of 46 dyes on population of freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. Text. Chem. Color, 1996, 28(4): 23
- 4 Kaur A et al. Screening of azo dyes for mutagenicity with Ames/ *Salmonella* assay. Environ. Mol. Mutagen, 1993, 22(3): 188
- 5 Sobti R C et al. Evaluation of genotoxicity of certain azo and azoxy compounds through chromosomal aberrations; sister chromatid exchanges and sperm head abnormality assays. Med. Sci. Res., 1992, 20(10): 373
- 6 刘金齐,刘厚田.偶氮染料对小球藻的毒性研究.环境科学研究,1993,3(4):23
- 7 King Thom Chung et al. The significance of azo reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. Mut. Res., 1983, 114: 269
- 8 Brown M A et al. Predicting azo dye toxicity. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 1993, 23(3): 249