

SDS 与取代芳烃多元混合体系联合毒性作用研究

董玉瑛¹, 雷炳莉², 张春宝¹, 张凤杰¹

(1. 大连民族学院环境工程系国家民委生物化学工程重点实验室, 大连 116600; 2. 河南师范大学化学与环境科学学院河南省环境污染控制重点实验室, 新乡 453002)

摘要: 测定了阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)和 3 种取代芳烃苯酚、硝基苯、甲苯对发光菌的单一毒性, 以及等浓度配比下 SDS 与 3 种取代芳烃二元、三元及四元混合体系的联合毒性效应, 并基于常见的 4 种联合作用评价方法, 对混合体系的联合毒性作用进行了评价研究. 结果表明, 4 种不同的评价方法对 SDS 与苯酚、甲苯和硝基苯的联合效应评价结果具有较好的一致性, 即在以 SDS 为底物的混合体系中, 除 SDS 与硝基苯联合毒性表现为弱拮抗作用外, 其它的二元、三元及四元混合体系的毒性均表现为不同程度的协同作用, 且甲苯的协同程度最强. 在选择联合研究体系中, 以毒性单位法获得参数的数值较大, 判定灵敏度较高. 根据发光菌发光原理 SDS 的分子结构特征和芳烃类化合物取代基的不同, 可对联合毒性作用的机理进行初步探讨.

关键词: SDS; 取代芳烃; 联合毒性; 毒性评价; 发光菌

中图分类号: X503.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)08-1643-04

Joint Toxicity on Multi-Component Mixtures of SDS and Substituted Aromatic Compounds

DONG Yu-ying¹, LEI Bing-li², ZHANG Chun-bao¹, ZHANG Feng-jie¹

(1. State Nationalities Affairs Commission Biochemical Engineering Key Laboratory, Department of Environmental Engineering, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China; 2. The Key Laboratory of Environmental Science and Technology of Henan Education Committee, School of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The toxicity to *Photobacterium phosphoreum* of different mixture systems of sodium dodecyl sulfate (SDS) and three substituted aromatic compounds according to equiconcentration ratio of 1:1, as well as individual toxicity, were determined respectively. The joint toxicity was evaluated by toxicity unit (TU), additive index (AI), similarity parameter (λ), and mixtures toxicity index (MTI). Four evaluating methods were compared and the modes of joint action of different systems were analyzed primarily. The coherent results were obtained from four different evaluating methods. Conclusions can be drawn that the binary joint effects of phenol and toluene mixed with SDS showed weak synergistic, while the other joint effects of SDS and substituted aromatic compounds were antagonistic. Of the evaluating methods, Toxic Unit is most sensitive with higher value of its parameter. Mechanisms of joint toxicity action could be discussed according to luminescence principle of *Photobacterium phosphoreum* and molecule structures of the mixture components.

Key words: SDS; substituted aromatic hydrocarbons; joint toxicity; toxicity evaluation; *Photobacterium phosphoreum*

表面活性剂是一类重要精细化工产品, 因其广泛用于家庭洗涤、纺织、塑料、橡胶、造纸、石油、医药和食品等行业而大量进入环境, 严重干扰自然生态系统正常的物理、化学和生物过程^[1,2]. 在使用的表面活性剂中, 阴离子表面活性剂占 40%, 其中十二烷基硫酸钠(SDS)常被应用于洗涤、医药、卫生等行业^[3]; 芳烃类化合物是重要的化工原料或中间体, 在染料、炸药、农药等的生产中占有重要地位, 被列入我国优先污染物的黑名单. 以往研究多是针对 SDS 与芳烃类单个物质进行^[4~6], 常忽略两者共存时对生物的复合生态效应, 因此进行阴离子表面活性剂 SDS 与苯酚、甲苯、硝基苯三种芳烃类化合物二元及多元混合体系对发光细菌的联合毒性作用研

究, 具有重要的现实意义, 可为 2 类化合物共存时环境标准的制定和环境复合生态效应风险评价提供基础数据.

本研究结合发光菌快速、灵敏、价廉的优点, 应用其为指示生物测定了十二烷基硫酸钠(SDS)、硝基苯、甲苯和苯酚对发光菌的单一毒性, 和在等浓度配比下 SDS 与苯酚、甲苯和硝基苯的二元、三元及四元混合体系的联合毒性. 采用毒性单位(TU)、相加指数(AI)、相似性参数(λ)和混合毒性指数(MTI)法等 4 种联合毒性评价方法, 对其复合生态

收稿日期: 2005-09-20; 修订日期: 2005-10-25

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目(21841013)

作者简介: 董玉瑛(1968~), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为污染环境行为与修复, E-mail: dongy@dlnu.edu.cn

毒性效应进行评价,对 4 种评价方法进行了分析比较,并结合发光菌发光原理 SDS 和取代芳烃的分子结构特征初步分析了联合毒性作用机理。

1 材料与方法

1.1 仪器

DXY-2 型生物毒性测试仪(中国科学院南京土壤研究所制造);85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂);THZ-82 气浴恒温振荡器(江苏金坛仪器厂);DHP-9082 电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);LDZX-40CI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);不同量程的精密移液器(Thermo 公司);SJH 型洁净工作台(沈阳市净化仪器厂二分厂);常规玻璃仪器。

1.2 试剂

SDS、甲苯、苯酚、硝基苯均为分析纯,用 3% NaCl 溶液配制相应的系列浓度梯度,待用。

1.3 菌种的培养

明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)冻干粉购自中国科学院南京土壤研究所微生物室。发光菌冻干粉剂的复苏、斜面菌种的培养、摇瓶菌液的培养、工作菌液的制备等过程见文献[7]。

1.4 单一毒性 EC_{50} 的测定

在预实验的基础上,将待测化合物配成适当的 6 个浓度梯度,各取不同梯度的溶液 2mL 加入具塞磨口比色管($\phi 1.5\text{cm}$, $H 6\text{cm}$)中,以 2mL 3% NaCl 溶液作空白对照,取 0.2mL 工作菌液于各比色管中,加塞上下振荡均匀,去塞,暴露 15min,测定发光强度。每个浓度梯度设 3 组平行,保证标准偏差低于 10%。

1.5 联合毒性 EC_{50} 的测定

按等浓度比($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)配制十二烷基硫酸钠(SDS)与苯酚、甲苯、硝基苯的二元及多元混合体系,根据预实验结果设 6 个浓度梯度(半数抑制率附近),测定混合体系对发光菌的联合毒性 EC_{50} 值,实验步骤与单一毒性 EC_{50} 测定相同,控制 3 组平行的实验标准偏差低于 10%。

1.6 结果计算

相对抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照发光强度} - \text{样品发光强度}}{\text{对照发光强度}} \times 100\%$$

鉴于污染物浓度与其对应发光抑制率的关系在半数抑制率附近多呈现较好的线性关系,故本实验采用 Origin6.0 统计软件,将化合物浓度和相对抑

制率进行回归分析,求得回归方程(相关系数 R^2 大于 99%): $y = a + bx$ (其中 y 为相对抑制率, x 为化合物浓度),根据回归方程求出相对抑制率为 50% 时所对应的化合物浓度,即为 EC_{50} 。

1.7 联合毒性评价方法

本文采用毒性单位法(TU)、加和指数法(AI)、混合毒性指数法(MTI)和相似性参数法(λ)。4 种联合毒性评价方法中各参数的计算和意义见文献[8]。

2 结果与讨论

2.1 单一毒性的测试结果

测定的 SDS、苯酚、甲苯、硝基苯对发光菌的单一毒性,结果如表 1,由表 1 可以看出,阴离子表面活性剂 SDS 的 $EC_{50}(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 值最小,说明它对发光细菌的毒性最大;苯酚、甲苯、硝基苯 3 种取代芳烃对发光菌的 $-\lg EC_{50}(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 分别为 2.65、3.27、3.21,与文献值 2.63^[9]、3.20^[10]、3.26^[9] 具有较好的一致性。好的单一毒性测试结果是确保联合毒性试验结果准确的前提。

表 1 单一毒性测试结果

化合物	回归方程	R^2	EC_{50} / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$-\lg EC_{50}$ / $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
SDS	$y = -63.282 + 4.629x$	0.994	24.472	4.07
苯酚	$y = 14.479 + 0.167x$	0.992	212.473	2.65
甲苯	$y = 24.055 + 0.553x$	0.990	46.917	3.27
硝基苯	$y = 20.584 + 0.388x$	0.996	75.812	3.21

图 1 显示了 SDS 对发光菌发光抑制率在 17.7%~99.8% 范围内的变化趋势线。可以看出,SDS 的浓度在 0~20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内增长时,对发光菌发光的抑制提升缓慢;但在 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,对发光菌发光的抑制随 SDS 浓度升高而急剧增加;在浓度达到 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对发光菌发光的抑制已达到了 80% 以上。可见表面活性剂 SDS 对生物的毒害程度与其在环境中的浓度存在着很大的关系。La Farré 等人^[11]在研究废水中非离子表面活性剂对发光菌的毒性影响时得到了相似的抑制曲线。胡建安等人^[12]在研究 SDS 对绿藻生长的影响时,也指出当 SDS 的质量浓度小于 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对绿藻生长的抑制较小,当浓度在 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,抑制作用急剧增加,且细胞结构被破坏,当 SDS 的浓度增为 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,绿藻的生长会完全受到抑制。刘红玉等人^[13]在研究阴离子表面活性剂 LAS 对水生植物的影响时也得到了类似的结论。

综合比较 SDS 对生物毒性效应的各项研究,观

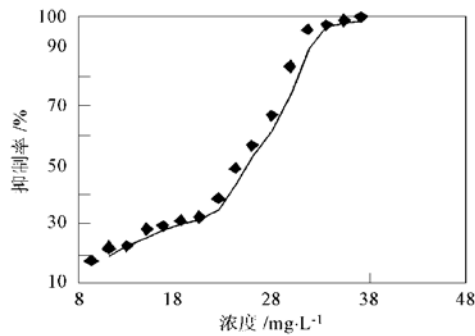


图 1 SDS 对发光菌发光强度的抑制曲线

Fig. 1 Inhibition curve of SDS to *Photobacterium phosphoreum*

察到剂量-毒性效应曲线呈现单调的非线性递增关系, 从对发光菌发光的抑制提升缓慢转入急剧增加, 且毒性陡增变化部分所对应 SDS 的浓度范围较窄. 因此, 评价 SDS 在环境中是否安全、毒害程度是困

难的, 系统研究其对不同生物受体的影响是非常必要的.

2.2 SDS 与取代芳烃二元混合体系的联合毒性评价

二元混合体系的 EC_{50} 值和联合毒性评价结果见表 2. 从表 2 可以看出, 联合毒性 EC_{50} 值大小顺序为: SDS+ 硝基苯> SDS+ 苯酚> SDS+ 甲苯. 联合毒性顺序与对应的单一毒性相比发生了变化, 这可能是由于 SDS 与 3 种取代芳烃不同的相互作用机制引起的. 应用 4 种联合作用评价方法对二元混合体系联合毒性评价, 所得结果具有较好一致性, 即 SDS 与苯酚和甲苯表现为协同作用, 与硝基苯的二元混合体系的联合毒性则表现为弱拮抗作用. 进一步分析发现, SDS+ 甲苯的协同强度要大于 SDS+ 苯酚的协同强度, 说明取代基不同, 芳烃类化合物与 SDS 的协同程度也不同.

表 2 二元混合体系的 EC_{50} 值和联合毒性评价参数及作用类型

Table 2 Joint toxicity evaluating parameters and types for different binary systems

化合物	$EC_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TU_i	M_0	M	AI	λ	MTI	作用类型
SDS+ 苯酚	17.891	0.731 0.084	1.115	0.815	0.226	1.489	1.443	协同
SDS+ 甲苯	11.133	0.454 0.237	1.523	0.691	0.447	1.559	1.879	协同
SDS+ 硝基苯	24.878	1.016 0.328	1.323	1.344	- 0.344	0.265	- 0.056	弱拮抗

2.3 SDS 与取代芳烃的多元混合体系的联合毒性评价

SDS 与取代芳烃的三元及四元混合体系的联合毒性 EC_{50} 值和采用 4 种联合作用评价方法对联合毒性评价结果列于表 3. 从表 3 可以看出 SDS 与 3 种取代芳烃的三元及四元体系的联合毒性作用均表

现为协同效应, 并且 4 种评价方法对多元混合体系的协同强弱评价结果呈现出一致的顺序, 即是 SDS + 苯酚+ 甲苯> SDS + 甲苯+ 硝基苯> SDS+ 苯酚 + 甲苯+ 硝基苯> SDS + 苯酚+ 硝基苯, 可以看出有甲苯存在的混合体系协同作用增强.

2.4 4 种联合毒性评价方法的比较分析

表 3 多元混合体系联合毒性评价参数和作用类型

Table 3 Joint toxicity evaluating parameters and types for multir mixture systems

化合物	$EC_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TU_i	M_0	M	AI	λ	MTI	作用类型
SDS+ 苯酚+ 甲苯	7.470	0.305 0.035 0.159	1.637	0.500	1.001	1.741	2.408	协同
SDS+ 甲苯+ 硝基苯	8.235	0.337 0.109 0.176	1.844	0.621	0.611	1.464	1.779	协同
SDS+ 苯酚+ 硝基苯	16.591	0.678 0.219 0.078	1.438	0.975	0.258	1.032	1.070	弱协同
SDS+ 苯酚+ 甲苯+ 硝基苯	8.974	0.367 0.191 0.118 0.042	1.960	0.719	0.392	1.275	1.491	协同

为了比较 4 种不同的评价方法, 对表 3 中的数据依照方法原理^[8]做进一步处理, 认为 M_0-M 、 AI 、 $\lambda-1$ 、 $MTI-1$ 的数值大小可以代表评价联合作用的强度(图 2)。由图 2 可以看到, 毒性单位法参数的数值(M_0-M)均较大, 判定灵敏度较高, 为该研究体系的推荐评价方法; 相似性参数法的参数数值($\lambda-1$)最小, 判定灵敏度最低。同时图 2 亦直观地反映了 SDS + 苯酚 + 硝基苯三元体系协同作用较弱。

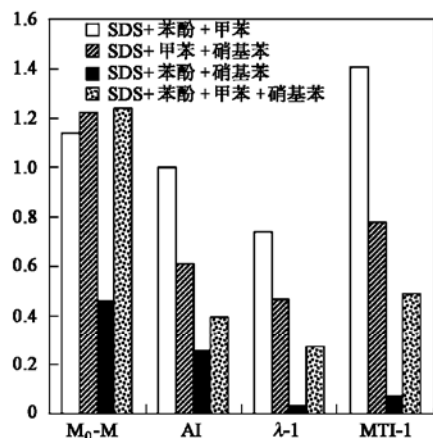


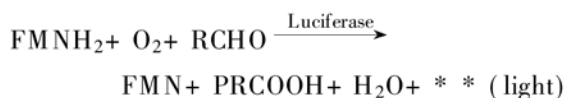
图 2 4 种不同评价方法的比较

Fig. 2 Compare among the four types of evaluating methods

2.5 毒性作用机制的初步探讨

综合分析二元、三元及四元混合体系联合毒性评价结果可以看出, SDS+ 甲苯的协同程度最强, 而 SDS+ 苯酚+ 硝基苯的混合体系协同程度最弱(接近于相加), 并且 SDS 与硝基苯的混合体系表现出了弱拮抗效应。对于呈现的这些不同的联合作用效应, 可从发光菌发光原理 SDS 的分子结构特征和芳烃类化合物取代基的特性及其相互作用, 进行初步的联合毒性机理分析。

明亮发光杆菌的发光反应如下:



在这个反应中, 黄素单核苷酸是重要的辅酶, 它的还原形式(FMNH_2)与氧化形式(FMN)之间的转化起到了传递氢的作用。如研究的化合物可与 FMNH_2 分子以氢键结合, 阻碍了 FMNH_2 对氢的传递作用, 从而干扰了正常的发光反应, 致使发光细菌的发光受到抑制。

表面活性剂 SDS 是可溶的, 具亲脂、亲水两性的特殊脂类化合物, 其分子中的疏水性长碳氢链, 容易插入细胞膜的磷脂双分子层, 引起膜结构伤害, 同时又带有负电荷的极性基团硫酸根, 易与蛋白质结

合, 致使功能丧失。本文联合作用研究表明, 当 SDS 与甲苯、苯酚共同存在时会较大程度地增加该类物质的毒性。目前由于认识水平、研究方法和技術上的限制, 对于联合作用机制尤其是多元混合体系的联合作用机制的了解尚不够充分。

3 结论

(1) SDS 与硝基苯表现为弱拮抗作用外, 其它的二元、三元及四元混合体系的毒性均表现为不同程度的协同作用。

(2) 4 种评价方法对混合体系的联合效应评价结果具有较好的一致性, 都是联合毒性评价的可行性方法。其中以毒性单位法获得参数的数值较大, 判定灵敏度较高, 为该研究体系的推荐评价方法。

(3) 对于呈现的不同联合作用效应, 可从发光菌发光原理 SDS 的分子结构特征和芳烃类化合物取代基的特性及其相互作用, 进行初步的联合毒性机理分析, 其真实的毒性作用机制还需要通过毒物对生物生理生化反应等进行深入研究。

参考文献:

- [1] Liwarska-Bizukojc E, Miksch K, Malachowska-Jutsz, et al. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants[J]. *Chemosphere*, 2005, **58**: 1249~ 1253.
- [2] Nalecz-Jawecki G, Grabińska-Sota E, Narkiewicz P. The toxicity of cationic surfactants in four bioassays [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, **54**: 87~ 91.
- [3] 雷鸣, 廖柏寒. 表面活性剂的生态毒理学及其研究进展[J]. *安全与环境学报*, 2004, **4**: 27~ 30.
- [4] 张育红, 于红霞, 韩朔睽, 等. 部分取代芳烃对绿藻毒性的研究和 QSAR 分析[J]. *环境化学*, 1995, **14**(2): 140~ 144.
- [5] 禾治宇, 冯彩英. 阴离子主表面活性剂的生态学及毒性评估[J]. *日用化学工业*, 2000, **30**(4): 22~ 24.
- [6] Jawecki N G, Sota E G, Narkiewicz P. The toxicity of cationic surfactants in four bioassays [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, **54**: 87~ 91.
- [7] 南京大学环境生物教研室. 环境生物学实验技术与方法[M]. 南京: 南京大学出版社, 1989.
- [8] Xu S, Nirmalakhandan N. Use of QSAR models in prediction joint effects in multi-component mixtures of organic chemicals [J]. *Wat. Res.*, 1998, **32**(8): 2391~ 2399.
- [9] 袁星, 赵晓明, 赵元慧, 等. 硝基苯、苯酚衍生物对发光菌毒性定量构效关系研究[J]. *中国环境科学*, 1997, **17**(5): 426 ~ 428.
- [10] 魏东斌, 翟丽华, 董春宏, 等. 取代苯化合物对发光菌急性毒性的测定及预测[J]. *环境科学*, 2002, **23**(增刊): 1~ 5.
- [11] La Farré M, Gardá M J, Tirapu L. Wastewater toxicity screening of nonionic surfactants by Toxalert and Microtox bioluminescence inhibition assays[J]. *Analytica Chimica. Acta*, 2001, **427**: 181~ 189.
- [12] 胡建安, 彭平安, 盛国芳. 一些被广泛使用的表面活性剂的生态风险性和环境行为[J]. *环境科学进展*, 1999, **7**(12): 106~ 113.
- [13] 刘红玉, 周朴华, 杨仁斌, 等. 阴离子型表面活性剂(LAS)对水生植物生理生化特性的影响[J]. *农业环境保护*, 2001, **20**(5): 341~ 344.