

二氯甲烷和二氯乙烷对蛋白核小球藻的毒性影响研究

吴石金, 俞翔, 吴尔苗, 陈建孟*

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032)

摘要:研究了二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长和生化指标的毒性效应。结果表明,二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻生长有影响。随着 2 种毒物浓度的增大,其对藻生长的抑制越明显,藻细胞密度均呈现下降的趋势。二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷抑制蛋白核小球藻生长的 96 h-EC₅₀ 分别为 550.1 mg/L 和 276.0 mg/L,1,2-二氯乙烷的毒性要稍强于二氯甲烷。2 种毒物联合作用时基本表现为拮抗作用。叶绿素 a 含量随毒物浓度增加而迅速下降,SOD 和 CAT 的活性随毒物浓度升高呈现先升高后下降的“钟形曲线”。MDA 的含量随毒物浓度升高而急剧上升,膜脂过氧化加剧。表明毒物通过产生活性氧自由基引起生物大分子的氧化损伤可能是其对蛋白核小球藻产生毒性效应的主要原因。

关键词:蛋白核小球藻;二氯甲烷;1,2-二氯乙烷;生态毒性;急性毒性

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)06-1655-07

Toxic Effects of Dichloromethane and Dichloroethane to *Chlorella pyrenoidosa*

WU Shi-jin, YU Xiang, WU Er-miao, CHEN Jian-meng

(College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: The acute toxic and biochemical effects of dichloromethane and 1, 2-dichloroethane to *Chlorella pyrenoidosa* were assessed. The experimental results showed that dichloromethane and 1, 2-dichloroethane had some inhibition to growth of the algae. With increasing concentration of the organic toxicant, the cell density decreased. The 96 h-EC₅₀ of dichloromethane to *Chlorella pyrenoidosa* was 550.1 mg/L; the 96 h-EC₅₀ of 1, 2-dichloroethane to *Chlorella pyrenoidosa* was 276.0 mg/L, toxicity of 1, 2-dichloroethane is a little stronger than that of dichloromethane; the joint toxicity of two organic toxicants was showed as antagonism. Content of chlorophyll a, activities of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) and content of malondialdehyde(MDA) in algae had been significantly affected under the organic toxicant exposure. The activities of SOD and CAT were increased at first and then decreased remarkably with the increasing concentration of the organic toxicant, showed as “Bell Shaped Curve”. The content of malondialdehyde(MDA) flared up and lipid peroxidant aggregated with the increasing concentration of the organic toxicant. The results suggested that the primary mechanism of two organic toxicants on *Chlorella pyrenoidosa* cells may be related to oxidation damage of lipid and other biological large molecules caused by dichloromethane and 1,2-dichloroethane.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*; dichloromethane; 1,2-dichloroethane; ecotoxicity; acute toxicity test

二氯甲烷和二氯乙烷均属优良的有机溶剂,在工业生产中,二氯甲烷常用来代替易燃的石油醚、乙醚等有机溶剂,并可用作牙科局部麻醉剂、制冷剂和灭火剂等;二氯乙烷主要用作蜡、脂肪、橡胶等的溶剂,还用于制造氯乙烯和聚碳酸酯以及谷仓的熏蒸和土壤的消毒等。随着它们的广泛应用,其对生态环境的负面影响也越来越突显,逐渐受到国内外有关部门的高度重视。资料表明,在爱尔兰海东南侧的利物浦湾附近所检出的 1,2-二氯乙烷浓度为 0.2 ~ 10.5 ng/L^[1],英格兰和美国的大部分河口水域所检出的二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷浓度均在 25.0 ng/L 以下^[2]。据中国地质调查局 2007 年的地下水污染调查研究,仅在我国长三角地区的地表水、浅层地下水和深层地下水中均检出多种有机污染物,其中 1,2-二氯乙烷、甲苯、二氯甲烷和氯仿等的检出率高居首位。这些有机溶剂在环境中具有长期残留性、生物积蓄性和高毒性,一旦进入食物链后通过生物的富集

放大作用,对生态环境和人类健康造成很大的影响^[3]。对这些有机溶剂开展环境毒理学研究成为非常有意义的课题。

环境生物与人类健康之间的联系是环境风险评估中外推的假定前提条件。许多在细胞和亚细胞水平上的机制,人类与环境生物在一定程度上也是相重合的。对高频率使用的毒物对环境生物的毒理学研究,在评估环境对人类影响的过程中起到“岗哨”作用,这种作用是不容忽视的。作为水域生态系统的初级生产者,藻类种类的多样性和初级生产量直接影响水域生态系统的结构和功能^[4,5]。此外,藻类对毒物敏感、易获得、个体小、繁殖快,当有机物大量进

收稿日期:2009-08-02;修订日期:2009-10-12

基金项目:国家自然科学基金项目(20977087);浙江省自然科学基金项目(Y5090054)

作者简介:吴石金(1971~),男,博士,副教授,主要研究方向为环境生物技术,E-mail:wujian28@zjut.edu.cn

* 通讯联系人,E-mail:jchen@zjut.edu.cn

入水体后,虽然在水中的浓度很低,但藻体内生物大分子即可做出相应反应,在较短时间内可以得到指示物质用于对藻类传代乃至种群水平的影响评价.由此,藻类已成为监测评价水环境质量的重要指标.开展二氯甲烷和二氯乙烷等有机溶剂对藻类生长作用的毒理学研究,对监测有机污染物的污染和环境修复,保持水域生态系统的平衡及生态风险评价都有着十分重要的意义.

本研究测定了二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对一般水体中常见的蛋白核小球藻的毒性效应,探讨了二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对叶绿素含量、蛋白质含量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性等指标的影响,旨在为此类有机物的环境安全性评价、探索监测水生态系统有机物污染的生态指标以及为揭示该类化合物对蛋白核小球藻的毒性机制提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)购自中国科学院水生生物研究所.

在无菌条件下将蛋白核小球藻接种至朱氏十号人工培养液中.培养条件为:温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, pH 7~8,白色日光灯,光强2 500~3 000 lx,光暗比 12 h:12 h,用 4 层无菌纱布封口静置培养,每天定时人工摇动 3~5 次,当进入对数生长期(大约在 $5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个/mL)时,转接至下一代,预培养 3 代,镜检细胞正常.将每 100 mL 培养基分装在 250 mL 的三角烧瓶中,灭菌,用传代后的藻种进行接种,待其进入对数生长期时加入毒物.分别在 0、24、48、72 和 96 h 5 个时间进行取样并测定相关生理生化指标,每组 3 个平行.

1.2 试剂

二氯甲烷,纯度(质量分数) $\geq 99.5\%$,购自杭州双林化工试剂厂.1,2-二氯乙烷,纯度(质量分数) $\geq 99.0\%$,购自上海凌峰化学试剂有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 急性毒性实验方法

本实验分别进行二氯甲烷、1,2-二氯乙烷的单一毒性实验和 2 种毒物的联合毒性实验.

(1)二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷的单一毒性 在预实验所得的 2 种毒物的 96 h- EC_{50} 基础上,根据浓度对数等间距原则设置 2 种毒物的系列浓度.2 种毒物均设置零浓度开放式培养对照组(即

以 4 层纱布封住三角烧瓶口,此为开放式培养;以下其余各组均用塑胶塞密封三角烧瓶口,此为封闭式培养).其它,二氯甲烷浓度每组分别为 0、221、299、403、550、735、992 mg/L;共 8 组,每组 3 个平行,进行 96 h 急性毒性实验;1,2-二氯乙烷浓度为每组分别为 0、192、260、351、472、639、863 mg/L;共 8 组,每组 3 个平行,进行 96 h 急性毒性实验.

(2)2 种毒物的联合毒性 在单一毒性实验的基础上,以二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷的 96 h- EC_{50} 作为参照,设置二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷的混合物,体积为 45.0 μL ,并且按体积比分别为 1:3、1:2、1:1、2:1 和 3:1 设置 5 个梯度,其它实验操作过程与单一毒性实验相同.

1.3.2 生物量的测定

使用血球计数板对培养的小球藻液进行计数,然后对计数数据进行统计学分析^[6].本实验选用抑制小球藻 50% 生长的半浓度(96 h- EC_{50}),最低有显著影响有效浓度(LOEC)、最高无显著影响有效浓度(NOEC)以及最大可接受毒性浓度(MATC)值作为评价指标.

1.3.3 叶绿素的提取与含量的测定

叶绿素的提取与含量的测定参见文献[7].

1.3.4 粗酶液的提取

取 30 mL 96 h 的藻液放入离心管(50 mL)中,在 4 000 r/min 下离心 20 min,弃上清液,管中加入 3 mL 0.1 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液振荡,转入 10 mL 离心管,在 10 000 r/min 下离心 3 min,弃上清液,加入 3 mL 缓冲液重复离心,弃上清,加入 1 mL 缓冲液振荡,转入研钵,再加入石英砂冰浴下研磨 5 min(研磨至水化状),转移至另外的离心管内用 1 mL 缓冲液洗研钵(重复 1 次),最后经 10 000 r/min 冷冻离心 12 min 后,将所得上清液(酶液)保存在 -80°C 冰箱中待用,进行后续的测定^[8].

1.3.5 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)活力测定根据 Giannopolitis 和 Ries 的方法以抑制 NBT 光化学还原的能力来衡量,采用 Beauchamp 所建立、Bewley 等改进的氮蓝四唑光化学还原反应法^[9,10]:

$$\text{SOD 单位} = [(\text{对照组 } D \text{ 值} - \text{样品 } D \text{ 值}) / 50\% \text{ 对照组 } D \text{ 值}] \times \text{样品稀释倍数}$$

1.3.6 过氧化氢酶(CAT)活性的测定

本实验采用紫外吸收法,对 CAT 的活性进行测定.其中以 1 min 内 A_{240} 减少 0.1 的酶量为一个酶活

单位(U)^[9].

1.3.7 丙二醛(MDA)含量的测定

膜脂过氧化用硫代巴比妥酸(TBA)比色法,用丙二醛(MDA)含量来表示.取 1.5 mL 粗酶液加入 2 mL 0.6% 硫代巴比妥酸(用 20% 三氯乙酸配制)中,混匀,沸水浴反应 15 min,迅速冷却,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液测定 532、600、450 nm 处的吸光度.利用双组分分光光度计法计算 MDA 的浓度^[9,11].

2 结果与分析

2.1 蛋白核小球藻生物量的测定

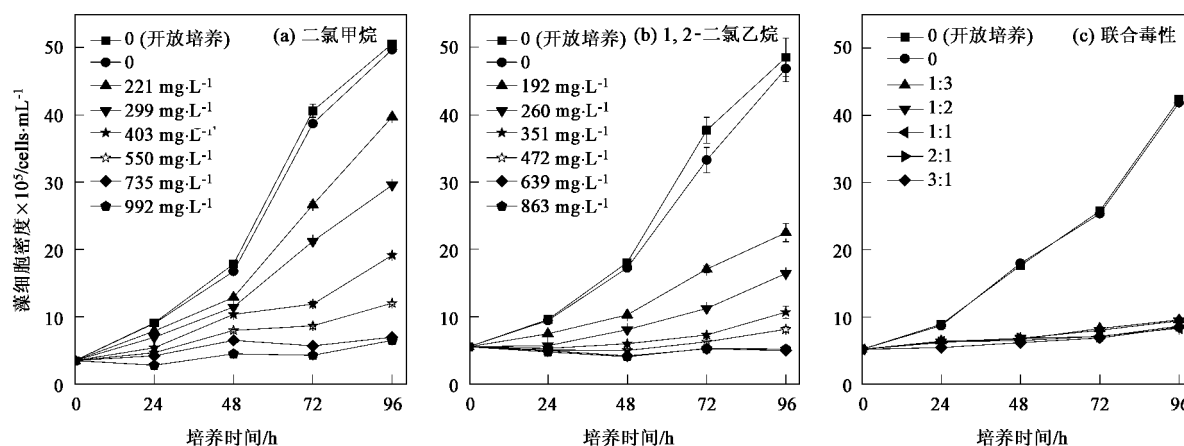


图 1 在二氯甲烷和二氯乙烷暴露下蛋白核小球藻细胞数的变化

Fig. 1 Changes in the cell number of *C. pyrenoidosa* exposed to dichloromethane and dichloroethane

对于暴露在联合毒物下的蛋白核小球藻,由于 2 种毒物的单一毒性有相似性,所以各组对藻生长的影响较为接近;即使两者有不同的配比,各组之间也没有明显的差异.各浓度组的蛋白核小球藻生长趋势,接近于在二氯甲烷单一毒性 550 ~ 735 mg/L 下和二氯乙烷单一毒性 472 ~ 639 mg/L 下藻的生长趋势.

2.1.2 二氯甲烷和二氯乙烷单一毒性暴露下 EC_{50} 的测定

经概率单位-浓度对数法^[11]计算各时间点时 2 种毒物分别对于蛋白核小球藻的半数有效量即 EC_{50} ^[12,13],如图 2 所示.随着时间的延长,二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷的 EC_{50} 均逐渐有所上升,说明蛋白核小球藻对这 2 种毒物的耐药性均会随着时间的延长而增加.并且从图 2 可知,二氯甲烷对于蛋白核小球藻的 EC_{50} 高于 1,2-二氯乙烷,说明 1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻的毒性要高于二氯甲烷.

表 1 为单一毒性实验 96 h 时,NOEC、MATC、LOEC、 EC_{50} 的统计计算.最高无显著影响有效浓度

2.1.1 毒物暴露下蛋白核小球藻生物量的变化

分别用不同浓度的二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷处理蛋白核小球藻,细胞密度作为指标所作的生长曲线如图 1 所示.对于不加毒物的小球藻,在 96 h 内,无论开放式培养还是封闭式培养,其生长状态是极为相似的,两者没有明显的差异,封闭与否对其生长的影响并不显著.对于暴露在单一毒物下的小球藻,2 种毒物对于蛋白核小球藻均有不同程度的抑制作用,表现出一定的浓度和时间相关性,且二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对小球藻生长的影响表现出基本相同的趋势.

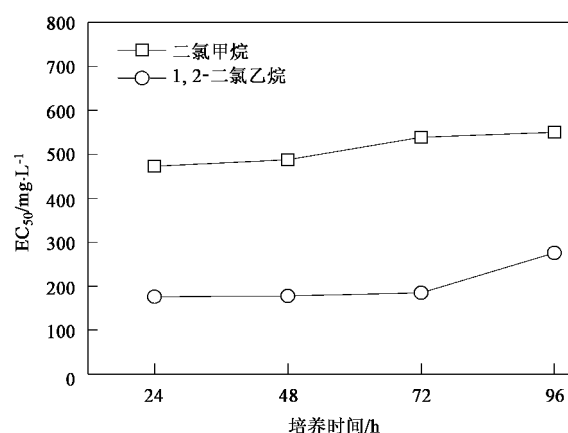


图 2 二氯甲烷和二氯乙烷的 EC_{50}

Fig. 2 EC_{50} of dichloromethane and dichloroethane

(NOEC)是毒物不对藻类产生毒性的浓度上限;最大可接受毒性浓度(MATC)是藻类对毒物能忍耐的最大剂量;最低有显著影响有效浓度(LOEC)是毒物对藻类产生影响的下限.96 h 时二氯甲烷的 EC_{50} 为 550.1 mg/L,1,2-二氯乙烷的 EC_{50} 为 276.0

表 1 二氯甲烷和二氯乙烷 96 h 时 NOEC、MATC、LOEC、EC₅₀

Table 1 NOEC, MATC, LOEC, EC₅₀ of dichloromethane and dichloroethane at 96 h

试剂	实验时间 /h	回归方程	相关系数 <i>R</i> ²	NOEC /mg·L ⁻¹	MATC /mg·L ⁻¹	LOEC /mg·L ⁻¹	EC ₅₀ /mg·L ⁻¹
二氯甲烷	96	$y = 36.447x - 179.930$	0.995 4	183.1	210.6	242.3	550.1
1,2-二氯乙烷	96	$y = 56.465x - 297.640$	0.973 9	134.0	147.0	161.0	276.0

mg/L. 通过比较发现,1,2-二氯乙烷的各项数值均低于二氯甲烷,这进一步说明 1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻的毒性更强.

2.1.3 二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻的联合毒性

对于二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻的联合毒性作用本研究用 4 种评价方法进行评价(表 2),分别是毒性单位法(M)、相加指数法(AI)、混合毒性指数法(MTI)和毒性增大指数(TEI)^[14-16].

用毒性单位法(M)评价时,混合物的 M、M₀ 值均大于 1,且在配比为 1:3、1:2、1:1 时 M > M₀,表现为拮抗作用;配比为 2:1、3:1 时 M < M₀,表现为部分相加作用.用相加指数法(AI)评价时,AI 值均小于

0,均为拮抗作用.用混合毒性指数法(MTI)评价时,结论为拮抗和部分加和作用.混合物的毒性增大指数(TEI)在 0.68 ~ 0.80 之间,且呈逐渐增大的趋势,说明混合物的毒性由拮抗逐渐变为部分相加.根据以上 4 种方法的评价结果可以看出,与单一毒性相比,二氯甲烷和 1,2-二氯乙烷混合后对蛋白核小球藻的毒性有所减弱,不同体积配比下的联合作用方式基本表现为拮抗作用.

混合物的组成不同,其毒性大小也有所不同.本实验结果验证了文献[17,18]的研究结果.无论用哪一种方法进行评价,其结果均具有一定的规律性.当混合物中 1,2-二氯乙烷所占比例增加时,拮抗作用越发明显,当混合物中二氯甲烷所占比例增加时,拮抗作用减弱并发生部分相加作用.

表 2 毒物对蛋白核小球藻的联合毒性

Table 2 Joint toxicity of the toxicants to *C. pyrenoidosa*

组别	配比	M	M ₀	结论	AI	结论	MTI	结论	TEI
1	1:3	1.850	1.170	拮抗	-0.460	拮抗	-2.930	拮抗	0.680
2	1:2	1.730	1.290	拮抗	-0.420	拮抗	-1.140	拮抗	0.700
3	1:1	1.570	1.550	拮抗	-0.360	拮抗	-0.030	拮抗	0.740
4	2:1	1.410	1.960	部分相加	-0.290	拮抗	0.490	部分相加	0.780
5	3:1	1.340	1.650	部分相加	-0.250	拮抗	0.410	部分相加	0.800

2.2 叶绿素含量变化的测定

单一和联合毒性处理 96 h 之后测定藻液中的叶绿素 a 含量,结果见图 3. 不加毒物的 2 个对照组,其叶绿素 a 含量的差异并不明显.在单一毒性实

验中,随着毒物浓度的升高,叶绿素 a 的含量呈明显的下降趋势,呈现一定的浓度-效应关系.在联合毒物暴露下,由于各浓度组中混合毒物总体积都相同(45.0 μL),所以各组叶绿素 a 的含量比较接近.

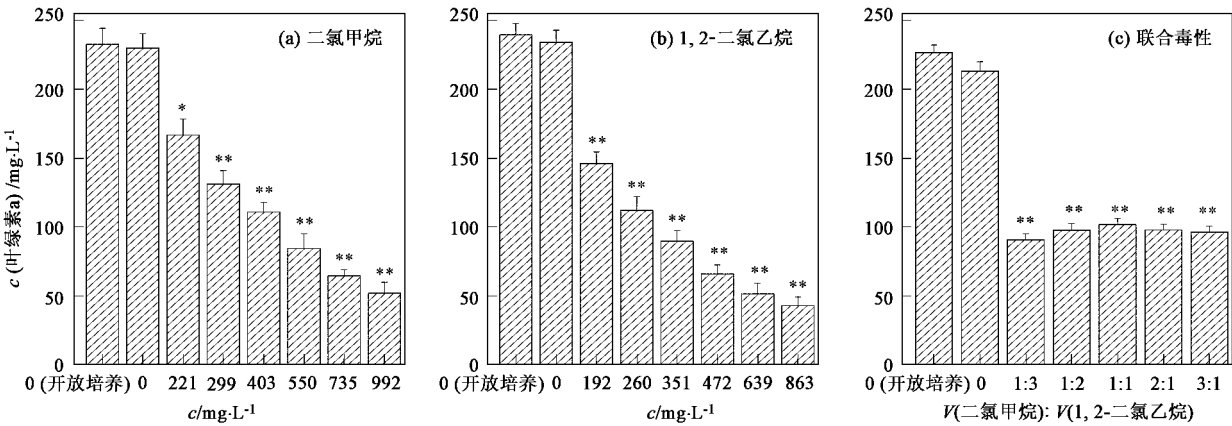


图 3 96 h 时在二氯甲烷和二氯乙烷暴露下蛋白核小球藻叶绿素 a 的含量

Fig. 3 Effects of dichloromethane and dichloroethane on chlorophyll a content of *C. pyrenoidosa* at 96 h

2.3 SOD 和 CAT 活性的测定

蛋白核小球藻以二氯甲烷、1,2-二氯乙烷单一毒性和联合毒性处理 96 h 之后测定藻液中的 SOD 和 CAT 的活性,结果见图 4、5。在单一毒性实验中,96 h 时,无论是用二氯甲烷还是 1,2-二氯乙烷处理,SOD 和 CAT 均呈现出在低毒物浓度时活性上升,在高毒物浓度时活性下降的趋势。这与其他研究者所得出的结论较为相同^[19,20]。

但是,2 种酶的变化又不完全相同。如图 4 所示,当二氯甲烷的浓度达到 550 mg/L 时,SOD 的活性达到最大(0.507 U/mL),比不受毒物胁迫的酶活高出 64%;当二氯乙烷的浓度达到 351 mg/L 时,SOD 的活性达到最大(0.461 U/mL),比不受毒物胁迫

的酶活高出 60%。CAT 活性的变化与 SOD 的稍有不同,如图 5 所示,当二氯甲烷的浓度达到 299 mg/L 时,CAT 的活性便达到最大,比不受毒物胁迫的酶活高出 180%;当 1,2-二氯乙烷的浓度达到 351 mg/L 时,CAT 的活性达到最大,比不受毒物胁迫的酶活高出 78%。

对于暴露在联合毒物下的蛋白核小球藻,各浓度组对藻生长的影响较为接近,即使 2 种毒物有不同的配比,各组之间的酶活也没有明显的差异。由于混合毒物总浓度为 580 mg/L,接近二氯甲烷的 96 h- EC_{50} ,所以其 SOD 和 CAT 的活性高于不受毒物胁迫的酶活。

2.4 MDA 含量的测定

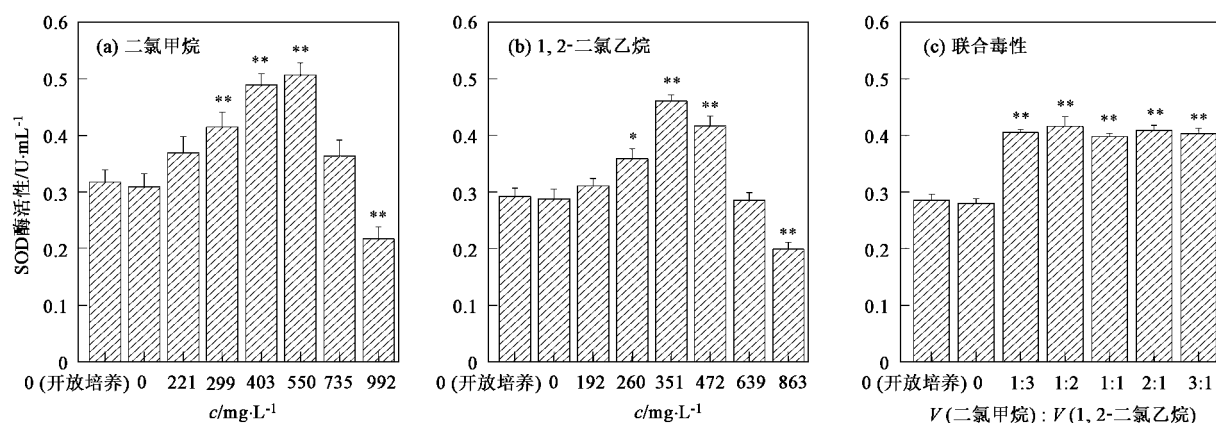


图 4 96 h 时在二氯甲烷和二氯乙烷暴露下蛋白核小球藻 SOD 的活性

Fig. 4 Effects of dichloromethane and dichloroethane on SOD activity of *C. pyrenoidosa* at 96 h

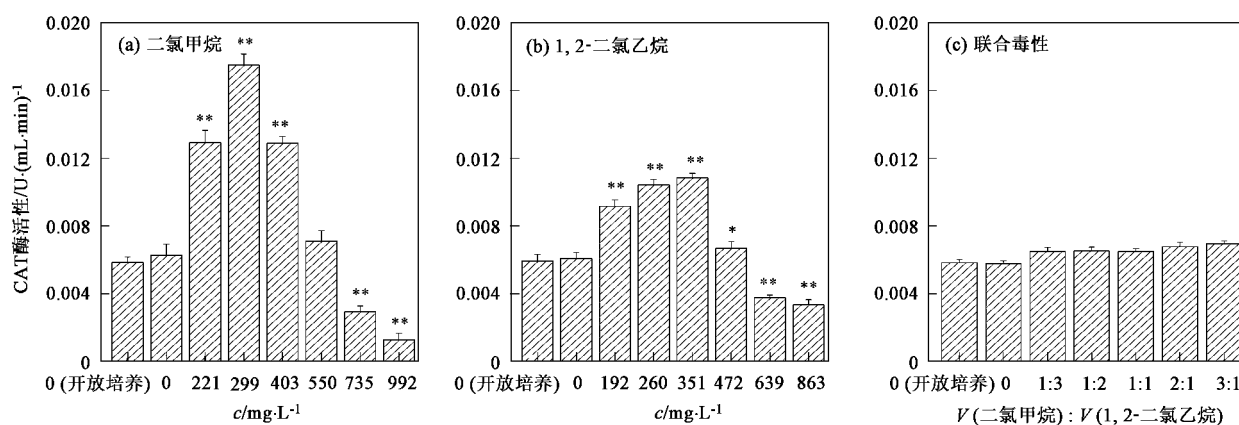


图 5 96 h 时在二氯甲烷和二氯乙烷暴露下蛋白核小球藻 CAT 的活性

Fig. 5 Effects of dichloromethane and dichloroethane on CAT activity of *C. pyrenoidosa* at 96 h

丙二醛 (MDA) 是脂质过氧化的产物的一种,MDA 的含量的高低可以反映细胞膜脂过氧化的程度。如图 6 所示,在二氯甲烷、1,2-二氯乙烷单一毒物胁迫下,随着毒物浓度的升高,MDA 含量上升,最高时分别高出对照组 32.6% 和 35.6%。说明高浓

度的毒物造成了藻膜脂过氧化加剧,导致细胞受到严重损害;当毒物浓度继续升高时,MDA 含量开始有所下降。在联合毒性影响下,由于各组的毒物总浓度相同,所以各组的 MDA 含量差异并不明显,其含量平均比对照组高出 27.2%。

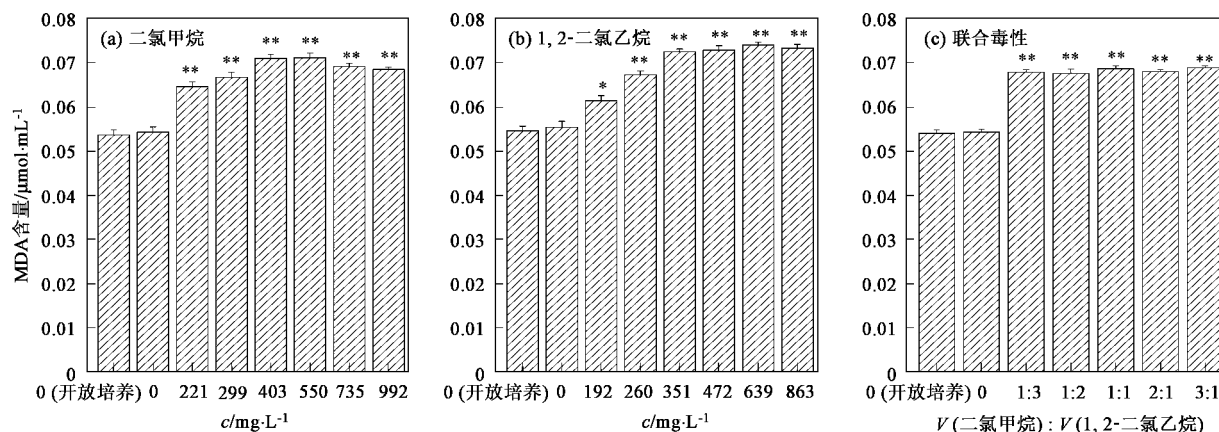


图6 96 h时在二氯甲烷和二氯乙烷暴露下蛋白核小球藻MDA的含量

Fig. 6 Effects of dichloromethane and dichloroethane on MDA content of *C. pyrenoidosa* at 96 h

3 讨论

藻类毒理学研究认为,不同的有机毒物对藻类的作用机制有所不同^[21].在本实验中,暴露在单一毒物下的小球藻,2种毒物对蛋白核小球藻表现出较为明显的浓度-效应相关性,且二氯甲烷和1,2-二氯乙烷对小球藻生长的影响表现出基本相同的趋势.1,2-二氯乙烷对于蛋白核小球藻的毒性较强于二氯甲烷,毒性的差异可能是由于它们对于蛋白核小球藻的毒性机制的不同.

当毒物浓度较低时($< EC_{50}$),其对藻类产生了一定的抑制作用,并未出现能够轻微刺激蛋白核小球藻生长的现象,即“兴奋效应”^[22];当毒物浓度接近 EC_{50} 时,藻类的生长开始时受到明显抑制,但随着时间的延长,藻类可对毒物逐渐适应,其毒性降低,其 EC_{50} 会相对升高(图2),其它研究者所做的毒性实验中也有类似的现象^[4];当毒物浓度较高时($> EC_{50}$),二氯甲烷和1,2-二氯乙烷对藻细胞的生长有严重的破坏作用,生长完全受到抑制.有机污染物首先破坏藻细胞膜,使细胞膜透性增加,使毒物更顺利地进入细胞并与某些生命活性物质发生反应^[23].

在研究二元混合物的联合作用时,目前较为公认和普遍采用的是Plackett等^[24]所采用的划分方法:相加作用,也称加和作用(addition);协同作用,也称增强作用(synergism or potentiation):即大于相加(more than additive);拮抗作用(antagonism):即小于相加(less than additive);独立作用(independence):即无相互作用(noninteractive).在评价混合物联合作用的方法中,国内外应用最多、最为经典的评价方法主要有毒性单位法(M)、相加指数法(AI)、混合毒性指数法(MTI)、毒性增大指数(TEI).在本实验中,通过比

较和分析发现:与单一毒性相比,二氯甲烷和1,2-二氯乙烷混合后,其对蛋白核小球藻的毒性有所减弱.同时,4种评价方法的结果均一致说明混合体系中随着二氯甲烷所占比例的增加,混合物的毒性由拮抗逐渐变为部分相加.关于联合作用的机制及规律仍需进一步的研究和探讨.

最近几年来,植物体内有效清除活性氧的保护机制得到了广泛深入的研究,而其中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸氧化酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等作为植物体内清除活性氧、保护植物细胞免受伤害的保护性酶更是研究的重点.研究结果表明,植物体在受到轻度的环境胁迫时SOD和CAT等的活性会有所升高,以增强其对活性氧的清除能力;但是这些酶的含量和活性都在一定的毒物范围内升高,当细胞受到重度逆境胁迫时它们的含量活性又会急剧下降,造成活性氧的积累和细胞的伤害^[25].在本实验中,对于SOD和CAT的研究也有类似的实验结果.如图4~6所示,在低质量浓度的二氯甲烷和1,2-二氯乙烷作用下,SOD和CAT活性受到明显诱导,并随着毒物浓度增大而升高,此时MDA作为膜脂过氧化产物已有较大幅度的提高,说明体内活性氧的清除是多种活性成分协同作用的过程;随着毒物质量浓度继续增加,SOD、CAT受胁迫导致其合成或结构受破坏而引起含量与活力下降,藻清除活性氧的能力亦下降,膜脂过氧化进一步加剧,超过了细胞的耐受极限时,脂质过氧化带来的损伤大于细胞自身的修复能力,SOD和CAT抗氧化酶活性下降并渐渐失活,自由基产生和消除之间的平衡被破坏,细胞开始受到毒害,小球藻生长受到明显抑制.SOD和CAT呈现出低浓度诱导,高浓度

抑制现象,即表现为“钟形曲线”.这种现象在其他的毒物的藻类实验中也有相类似的结果^[20,26].

许多外源化学物对靶标生物具有直接毒性作用,而另外一些毒物的毒性主要是由于参与靶标生物的代谢引起的.最为多见的情况是,外源化合物不加区别的与靶细胞上带有易感功能基团的内源性分子反应,从而产生亲电物质(electrophiles)、自由基(free radicals)、亲核物(nucleophiles)、氧化还原性反应物(redoxactive reductants)等对生物体造成更大的伤害^[27].暴露在毒物下的生物体,一旦受到毒物胁迫,便自发的开始对这些毒物展开所谓的解毒过程.其胞内外均会发生一系列的生理生化反应,原有的平衡被打破,新的平衡开始逐渐建立.这其中细胞内自由基含量或过氧化氢含量以及MDA、GSH、GST、SOD、CAT等含量的变化各有其特点和趋势,在研究中找出其中的联系对于揭示该类化合物对藻的毒性机制有重要的作用.

4 结论

(1) 二氯甲烷和1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻生长有一定影响.随着2种毒物浓度的增大,其对蛋白核小球藻生长的抑制越发的明显,该效应表现出一定的浓度和时间相关性.二氯甲烷对蛋白核小球藻的96 h-EC₅₀为550.1 mg/L,1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻的96 h-EC₅₀为276.0 mg/L,1,2-二氯乙烷的毒性要稍强于二氯甲烷.2种毒物联合对蛋白核小球藻作用时基本表现为拮抗作用.

(2) 二氯甲烷和1,2-二氯乙烷对蛋白核小球藻体内叶绿素a含量、SOD活性、CAT活性和MDA含量产生明显的影响.96h时,叶绿素a含量随毒物浓度增加而迅速下降,呈现一定的浓度-效应关系.SOD和CAT的活性变化随毒物浓度升高,呈现先升高后下降的“钟形曲线”.MDA的含量随毒物浓度升高而增大.

参考文献:

- [1] Bravo-Linares C M, Mudge S M, Loyola-Sepulveda R H. Occurrence of volatile organic compounds (VOCs) in Liverpool Bay, Irish Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2007, **54**:1742-1753.
- [2] Dewulf J, Van-Langenhove H. Chlorinated C1- and C2-hydrocarbons and monocyclic aromatic hydrocarbons in marine waters: an overview on fate processes, sampling, analysis and measurements[J]. Water Research, 1997, **31**(8):1825-1838.
- [3] Ashley D L, Bonin M A, Cardinali F L, et al. Blood concentrations of volatile organic compounds in a nonoccupationally exposed US population and in groups with suspected exposure[J]. Clin Chem, 1994, **40**:1401-1404.
- [4] 欧晓明,雷满香,王晓光,等.新杀虫剂HNPC-A9908对蛋白核小球藻生理生化特性的影响[J].农业环境科学学报, 2004, **23**(1):154-158.
- [5] 沈宏,周培疆.环境有机污染物对藻类生长作用的研究进展[J].水生生物学报, 2002, **26**(5):529-535.
- [6] 陈川平,张庭廷,何梅,等.苯胺、苯酚对淡水藻类生长的影响[J].应用生态学报, 2007, **18**(1):219-223.
- [7] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社, 2006.190-191.
- [8] 熊丽,吴振斌,况琪军,等.氯氟菊酯对斜生栅藻的毒性研究[J].水生生物学报, 2002, **26**(1):66-73.
- [9] 叶宝兴,朱新产.生物科学基础实验[M].北京:高等教育出版社, 2007.439-442.
- [10] 唐学玺,李永祺.久效磷对海洋微藻毒性机理的初步研究Ⅲ.超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性的变化[J].环境科学学报, 1998, **18**(2):204-207.
- [11] 许长成,赵世杰,邹琦.植物组织内丙二醛的分离与鉴定[J].植物生理学通讯, 1992, **28**(4):288-290.
- [12] 阎海,叶常明,雷志芳.酚类化合物抑制斜生栅藻的毒性效应[J].环境化学, 1998, **17**(2):127-130.
- [13] 江玉,吴志宏,韩秀荣,等.多环芳烃对海洋浮游植物的生物毒性研究[J].海洋科学, 2002, **26**(1):46-50.
- [14] Sprague J B, Ramsay B A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon[J]. Fish Res Bd Can, 1965, **22**:425-432.
- [15] Marking L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. Aquatic toxicology and hazard evaluation [C]. ASTMST Publication, 1977, **634**:99-108.
- [16] Konemann H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results[J]. Toxicology, 1981, **19**:229-238.
- [17] Vasseur P, Dive D, Sokar Z, et al. Interactions between copper and some carbarnates used in phytosanitary treatments [J]. Chemo, 1988, **17**:767-782.
- [18] Spliid H, Trsl J. Statistical analysis of joint toxicity in biological growth experiments[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 1994, **28**:181-192.
- [19] 欧晓明,雷满香,黄明智,等.新除草剂HNPC-C9908对小球藻生长的影响研究[J].农药学报, 2003, **5**(3):16-23.
- [20] 聂湘平,鹿金雁,李潇,等.蛋白核小球藻对叔丁基对羟基茴香醚的毒性响应[J].暨南大学学报, 2007, **28**(5):513-517.
- [21] Leboulanger C, Rimet F, Lacotte M H, et al. Effect of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae [J]. Environment International, 2001, **26**:131-135.
- [22] Wang Y, Tang X X, Li Y Q, et al. Stimulation effect of anthracene on marine microalgae growth[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, **13**(3):343-346.
- [23] Tang X X, Li Y Q, Huang J. Damage of parathion on *Platymonas* sp. and *Dunaliella* sp. by membrane lipid peroxidation and deesterification [J]. Oceanologia Limnologia Sinica, 1999, **30**(3):295-299.
- [24] Plackett R L, Hewlett P S. Quantal responses to mixtures of poisons[J]. J R Statist Soc B, 1952, **14**:141-154.
- [25] 唐学玺,李永祺.久效磷对海洋微藻毒性机理的初步研究[J].环境科学学报, 1998, **18**(2):204-207.
- [26] 殷培杰,李培军,刘宛.氯苯甲酸植物毒性实验中抗氧化酶变化的量化研究[J].环境科学研究, 2005, **15**(5):21-25.
- [27] Klaassen C D. 卡萨瑞特·道尔毒理学[M].北京:人民卫生出版社, 2005.121-122.