

硝基芳烃类对斜生栅列藻的毒性及中毒症状*

刘静玲 郎佩珍

(东北师范大学环境科学系, 长春 130022)

摘要 藻类实验是水生态毒理学研究中的主要方法。通过 OECD 标准藻类阻碍生长实验, 得到 25 种典型硝基芳烃化合物对斜生栅列藻(*Scenedesmus obliquus*)的 48 h 半数有效抑制浓度 EC_{50} 值。其毒性由高到低的顺序为: 二硝基氯苯 > 二硝基苯 > 二硝基苯胺 > 二硝基氯苯 = 二硝基甲苯 > 硝基溴苯 = 硝基氯苯 > 硝基甲苯 = 硝基苯甲醚 = 硝基苯酚 > 硝基苯胺 > 硝基苯。同时在光学显微镜下详细观察到斜生栅列藻的中毒症状: ① 似亲孢子释放受阻; ② 质壁分离; ③ 细胞核和细胞器解体; ④ 原生质体解体。

关键词 藻类阻碍生长实验, 斜生栅列藻, EC_{50} , 中毒症状。

藻类作为水生态系统的初级生产者对其处于平衡和稳定状态起着极其重要的作用, 生物测试中的藻类测试是水生态毒理学研究中必不可少的方法, 80 年代末一些国家和有关国际组织相继提出了藻类测试的标准方法^[3]。通过对大量生物测试结果进行分析, 发现藻类对于许多毒物比鱼类、甲壳类更为敏感^[4], 而且具有生长周期短、易于分离培养和可以直接观察细胞水平上的中毒症状等优点, 是较理想的毒性试验材料。硝基芳烃类化合物是工业废水中较常见的毒物, 对水生态环境产生巨大影响。本文按照国际经济合作与发展组织(OECD)所规定的藻类阻碍生长实验的标准方法^[1], 选用斜生栅列藻为试验藻种, 得到 25 种典型硝基芳烃化合物对斜生栅列藻的 48 h 半数有效抑制浓度 EC_{50} 值。同时观察到显微水平上的中毒症状, 通过对中毒症状和毒物浓度相互关系的分析, 初步探讨了硝基芳烃类化合物对斜生栅列藻的毒性机制。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

25 种硝基芳烃化合物(分析纯)。LRH-150 G 光照培养箱(广东省医疗器械厂)。CX-250 型超声清洗器(北京医疗设备二厂)。SHA-C 水浴恒温振荡器(常州国华仪器厂)。

1.2 实验材料与方法

斜生栅列藻(*Scenedesmus obliquus*)购自中国科学院武汉水生所。

实验方法严格按照 OECD 藻类阻碍生长实验标准方法。

1.3 实验条件

温度: $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 酸碱度: pH 值调至 7.2 ± 0.2 ; 照明: 白色日光灯连续照明, 平均光照度为 3600 lx。

培养液^[1,2]: 见表 1。

按表 1 配成 1000 倍的贮备液, 待用。

助剂: 1 ml/L 丙酮溶液。

在光照培养箱中静止培养, 每天震荡 3 次, 每次 30 min。

表 1 培养液配方

化合物	浓度 (mg/L)
NH_4Cl	15
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15
KH_2PO_4	1.6
NaHCO_3	50
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08
H_3BO_3	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
ZnCl_2	3×10^{-3}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.5×10^{-3}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7×10^{-3}
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10^{-5}

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1994-06-30

1.4 实验过程

按等浓度对数间距 0.2 设置毒物浓度，每一种化合物设 5 个浓度组和一个对照组，不同化合物浓度设置有一定的差异，以便使所测化

合物的最低浓度对藻类生长无阻碍，而最高浓度应使藻类生长受到 50% 的抑制或 100% 抑制，实验设计实例见表 2 (被测化合物以邻-二硝基苯为例)。

表 2 实验设计实例

实验组别	浓度梯度(-lgEC)	药量(ml)	培养液(ml)	蒸馏水(ml)	藻液(ml)	实验瓶数
0	空白对照	0	41.28	17.72	1	2
1	5.5	2.81	同上	14.91	1	2
2	5.3	4.45	同上	12.27	1	2
3	5.1	7.05	同上	10.67	1	2
4	4.9	11.18	同上	6.54	1	2
5	4.7	17.72	同上	0	1	2

实验器皿选用 250 ml 锥形瓶，每个锥形瓶中接入约 1×10^4 个/ml 处于对数生长初期^[5]的藻液 1 ml，等体积的培养液，不同体积的毒物，最后用蒸馏水补齐至 60 ml。每个被测化合物共计 6 组，设一平行，共计 12 瓶，依次置于光照培养箱内，48 h 后镜检。

1.5 实验数据处理

镜检所得数据按如下公式处理^[1,2]：

$$\mu = \ln(N_t/N_0)/t - t_0$$

式中， N_0 为初始细胞数， N_t 为 48 h 后细胞数。

$$\text{阻碍率}(\%) = [\mu(b) - \mu(\text{tox})]/\mu(b) \times 100$$

式中， $\mu(\text{tox})$ 为加测试化合物组的生长速度， $\mu(b)$ 为对照组的生长速度。

根据上述公式，将浓度与生长速度阻碍率作一元线性回归，求出 EC_{50} 值。

2 实验结果

2.1 25 种硝基芳烃化合物对斜生栅列藻的 EC_{50}

实验结果见表 3。25 种硝基芳烃化合物的毒性顺序为：二硝基氯苯 > 二硝基苯 > 二硝基苯胺 > 二氯硝基苯 = 二硝基甲苯 > 硝基溴苯 = 硝基氯苯 > 硝基甲苯 = 硝基苯甲醚 = 硝基苯酚 > 硝基苯胺 > 硝基苯。由此可知：硝基芳烃的毒性受取代基种类和取代基位置的影响。

2.2 斜生栅列藻的中毒症状

在光学显微镜下(10×40 倍)观察到，在硝

表 3 25 种硝基芳烃对斜生栅列藻的毒性

化合物名称	-lg EC ₅₀ (mol/L)
对-硝基甲苯	3.74
邻-二硝基苯	5.04
间-二硝基苯	4.85
对-二硝基苯	4.96
2, 4-二硝基甲苯	4.52
2, 6-二硝基甲苯	4.06
邻-硝基氯苯	3.94
间-硝基氯苯	3.95
对-硝基氯苯	4.01
硝基苯	3.26
3, 4-二氯硝基苯	4.52
2, 5-二氯硝基苯	4.31
2, 4-二硝基氯苯	5.52
邻-硝基苯胺	3.33
间-硝基苯胺	3.48
对-硝基苯胺	3.40
2, 4-二硝基苯胺	4.68
邻-硝基苯酚	3.51
间-硝基苯酚	3.75
对-硝基苯酚	3.57
邻-硝基苯甲醚	3.44
间-硝基苯甲醚	3.71
对-硝基苯甲醚	3.65
间-硝基溴苯	4.32
对-硝基溴苯	3.88

基芳烃类化合物的作用下，斜生栅列藻发生一系列细胞水平上的变化(见图 1, 2)。

(1) 母细胞内似亲孢子释放受阻 所测试的 25 种硝基芳烃化合物在斜生栅列藻生长阻碍率为 25% 左右时，如邻-二硝基苯：毒物浓度为 3.98×10^{-6} mol/L，藻生长阻碍率为 25.05%；

对-硝基甲苯: 毒物浓度 1.26×10^{-4} mol/L, 藻阻碍率 23.67%; 2,6-二硝基甲苯: 毒物浓度 3.2×10^{-5} mol/L, 阻碍率为 24.04%; 硝基苯: 毒物浓度 2.5×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 19.46%。部分藻胞明显表现为体积巨大, 母细胞内已经能够观察到有 3-4 个子细胞——似亲孢子的形成, 但释放受阻, 这时藻胞体积为正常藻胞的 3-4 倍(见图 1-a)。

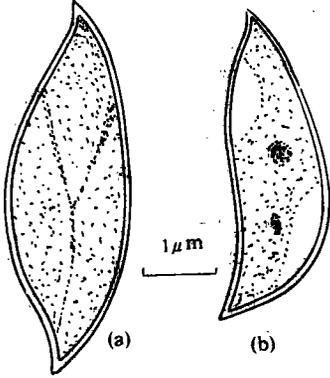


图 1 斜生栅列藻细胞变化

- a. 似亲孢子释放受阻(10×40倍)
b. 藻胞质壁分离(10×40倍)

(2) 藻胞发生质壁分离 在所测试的化合物中, 只有 2 种化合物在高浓度下发生此中毒症状。即 2,4-二硝基氯苯浓度大于 1×10^{-3} mol/L, 对-二硝基苯浓度为 3.98×10^{-2} mol/L 时, 它们在所测的化合物中均属毒性强的类型。视野中多数藻胞内部渗透压发生变化, 出现明显的质壁分离现象, 从而阻碍藻胞的生长和繁殖, 但此时细胞核和叶绿体仍没有解体(见图 1-b)。

(3) 细胞核和细胞器解体 所有被测化合物浓度达到藻胞生长阻碍率为 50% 左右时, 如邻-二硝基苯: 毒物浓度 1×10^{-5} mol/L, 阻碍率为 55.45%; 对-硝基甲苯: 毒物浓度 2×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 57.14%; 2,4-二硝基甲苯: 毒物浓度 3.16×10^{-5} mol/L, 阻碍率为 56.30%; 2,6-二硝基甲苯: 毒物浓度 1.26×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 51.95%; 硝基苯: 毒物浓度 6.31×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 45.32%; 邻-硝基氯苯: 毒物浓度为 1.58×10^{-4} mol/L, 阻

碍率为 46.06%; 间-硝基氯苯: 毒物浓度 1×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 45.07%。斜生栅列藻体积变小, 仅为正常藻胞的 $\frac{1}{3}$, 同时, 细胞核和细胞器解体, 藻胞原生质体呈现类似兰藻的均匀、透明的蓝绿色或淡绿色, 此时的藻胞已丧失生长繁殖的功能, 濒临死亡的边缘(见图 2-a)。

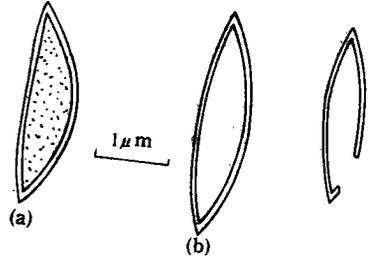


图 2 斜生栅列藻细胞变化

- a. 细胞核、细胞器解体(10×40倍)
b. 原生质体解体(10×40倍)

(4) 藻胞原生质体解体 所有被测化合物当浓度达到使藻胞生长阻碍率为 70%—100% 时, 例如, 间-二硝基苯: 毒物浓度为 2.5×10^{-5} mol/L, 阻碍率为 94.8%; 对-硝基甲苯, 毒物浓度为 3.16×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 73.97%; 2,4-二硝基甲苯, 毒物浓度 7.9×10^{-5} mol/L, 阻碍率 85.95%; 2,6-二硝基甲苯, 浓度为 2.0×10^{-4} mol/L, 阻碍率 94.5%; 硝基苯 1×10^{-3} mol/L, 阻碍率为 81.14%; 邻-硝基氯苯, 浓度为 2.5×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 93.95%; 间-硝基氯苯, 浓度为 2.5×10^{-4} mol/L, 阻碍率为 78.08%。斜生栅列藻部分藻胞出现原生质体解体现象, 藻胞仅余细胞壁或细胞壁残体, 细胞壁内原生质体全部解体, 标志着藻胞生命活动中止。而且, 随着毒物毒性和浓度的增大, 视野中原生质体解体的藻胞数量增多(见图 2-b)。

3 结论

(1) 利用藻类阻碍生长实验, 可以在短时间内准确得到被测毒物的半数有效抑制浓度 EC_{50} , 从而得知被测化合物的生物毒性和细胞水平的中毒症状。在生态毒理学和污染生态学研究中, 不失为一种经济快捷、反应敏感的生

物测试方法,在水质污染监测和治理方面有着广泛的应用前景。

(2) 所测 25 种硝基芳烃类化合物的一lg EC₅₀值在 3.26—5.52 之间,毒性最大的化合物是 2,4-二硝基氯苯,毒性最小的化合物是硝基苯。它们的毒性受取代基种类和取代基位置的影响。

(3) 当毒物浓度达到使藻胞生长阻碍率为 25%左右时,斜生栅列藻繁殖受到抑制,似亲孢子释放受阻。当斜生栅列藻生长阻碍率为 50%左右时,藻胞的细胞核、细胞器遭到破坏、解体。当藻胞生长阻碍率为 70%—100%时,藻胞原生质体解体。在所测化合物中,只有 2,4-

二硝基氯苯和对-二硝基苯在高浓度下观察到藻胞发生质壁分离现象。引起这些中毒症状与毒物在藻胞内与某些生命活性物质发生反应有关,从而抑制某些生命物质的合成。

致谢 王显久和陆光华同志参加了部分工作,表示感谢。

参考文献

- 1 OECE. Test Guideline 201. Paris, Decision of the Council C (81)30 Final, 1981; 320—323
- 2 Official Journal of the European Communities Nol 133. Paris, OJEC, 1988; 89—94
- 3 Maciorowski A F et al. Water Pollution. 1983, 55(3); 801
- 4 Walsh G E et al. Water Research. 1982, 13(4); 879
- 5 黄国兰等. 环境化学. 1994, 13(3); 259

(上接第 6 页)

工作中给予的指导和支 持,深表谢意。

参考文献

- 1 Schultzy T W et al. Toxicol. Lett.. 1987, 37(2); 121
- 2 Mcleese D W et al. Chemosphere. 1979, 8(2); 53
- 3 Kaiser K L E et al. QSAR in Toxicology and Xenobio-chemistry (Ed by Tichy M). Elsevier, Amsterdam, The Netherland; 1985; 27
- 4 Hermann R B. J. Phys. Chem.. 1972, 76(19); 2754

- 5 Silla E et al. J. mol. Struct. (Theochem). 1992, 254; 369
- 6 Doucette W J et al. Environ. Sci. Technol.. 1987, 21; 821
- 7 张大仁. 环境化学. 1991, 10(2); 21
- 8 Connolly M L. J. Appl. Crystallogr.. 1983, 16(5); 548
- 9 蒋明谦. 有机化合物的同系线性规律. 北京: 科学出版社, 1980; 345
- 10 Ribo J M et al. Chemosphere. 1983, 12(11/12); 1421
- 11 Veith G.D. State of the Art of Structure Activity. 1981, EPA-600/3-81-029, U. S. Environmental Research Lab.
- 12 Lipnick R L. Sci. Total Environ.. 1991, 109/110; 131

• 环境信息 •

来自给水的健康危险可能影响欧洲 8.5 亿人中的 1.1 亿人

来自世界卫生组织(WHO)欧洲 50 个成员国的部长们,最近在芬兰赫尔辛基一次会议上听到这一评估:大约 5%的人遭受超过 WHO 指标的 SO₂ 和颗粒物污染之苦,至少 200 万人曝露于大气中过量的铅。部长们同意 1997 年以前制定国家环境与健康行动计划。这次赫尔辛基会议是自苏联集团国家(那里存在多数环境问

题)成为成员国家以来首次召开的 WHO 欧洲最高级会议。国家行动计划将包括旨在实现 WHO1984 年所定目标的、短期、中期和长期目标。目的是确保到 2000 年“有效预防和控制环境健康危险,以及公平获得健康的环境”。下一次最高级会议将于 1999 年在伦敦召开。

淮海译自 ES&T, 1994, 28(9); 405A

Abstracts

Chinese Journal of Environmental Science

Effects of PCBs on the Electrolyte Balance in Blood of Crucian Carp. Xi Zhiqun et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085): *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(2), 1995, pp. 1-3
The effects of PCBs exposure on the concentrations of electrolytes (sodium, potassium, calcium, magnesium) in blood plasma of the crucian carp were examined. In the Crucian Carp, the plasma sodium concentration increased significantly during the exposure to an aqueous PCBs solution and the plasma sodium concentration increased as the concentration of PCBs increased. The plasma concentration of potassium decreased during the exposure to PCBs, and the plasma potassium concentration decreased as the concentration of PCBs increased. The Plasma concentrations of calcium and magnesium did not show any clear patterns.

Key words: PCBs, blood electrolyte balance, Crucian Carp.

QSAR of Substituted Phenol Derivatives. Zhang Daren (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085): *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(2), 1995, pp. 4-6

The molecular surface areas of 29 substituted phenol with 7 various substituents were calculated. In addition to molecular surface area and OH group's surface area, the substituent equivalent was pointed out to be necessary to be used as a descriptive variable. Using the three Parameters, a regression analysis was performed for the Microtox^R toxicities of above mentioned compounds, giving a meaningful regression equation with a correlation coefficient of 0.90. If 4-cyanophenol of them were regarded as an outlier and deleted from the above compounds in question, then the correlation coefficient was up to 0.94. The results show that these parameters were important in predicting the toxicity of some compounds.

Key words: substituted phenol derivatives, molecular surface area, substituent equivalent, Microtox^R.

Toxicities of Nitroaromatic Compounds to *Scenedesmus obliquus* and Toxic Symptoms. Liu Jingling et al. (Dept. of Environ. Sci., Northeast Normal Univ., Changchun 130024): *Chin.*

J. Environ. Sci., **16**(2), 1995, pp. 7-10
By using an OECD standard method for algal growth inhibition test, the toxicities (48 h, EC₅₀) of 25 nitroaromatic compounds to *Scenedesmus obliquus* were determined. their toxicities ranked in a decreasing order were: dinitrochlorobenzene > dinitrobenzene > dinitroaniline > dichloronitrobenzene ≐ dinitrotoluene > nitro-bromobenzene ≐ nitrochlorobenzene > nitrotoluene ≐ methoxynitrobenzene ≐ nitrophenol > nitroaniline > nitrobenzene. The toxicities of the compound to the algae varied depending on the concentrations and kinds of the compounds. Under the microscope (400 times), 4 kinds of toxic symptoms were observed, including the inhibition to the filial spore release; the separation of protoplasm form wall of cell; the disintegration of nucleus and organs; and the destruction of protoplast. The results show that the algae growth inhibition test would have a prospect of wide application in water quality monitoring and pollution control.

Key words: algal inhibition test, nitroaromatic compounds, *Scenedesmus obliquus*, EC₅₀, toxic symptoms.

Study on the Process and Modelling of Two-phase Granular Sludge UASB Reactor coupled with Anionic Exchange Units. Yang Hong et al. (Dept. of Bioscience and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, 200030): *Chin. J. Environ. Sci.*, **16**(2), 1995, pp. 11-14

The study on a novel process of Two Phase Granular Sludge UASB Reactor Coupled with Anionic Exchange Units (TP-UASB-AE) using glucose as a substrate showed that a very high volume loading rate [COD, 62 g/(L·d)] was reached when COD removal efficiency was 91.5%. A control mathematic model for each of TP-UASB-AE units was established separately. The whole TP-UASB-AE system was modelled through the combination of anionic exchange colume models and UASB models. The mean relative error between the system model calculating results and experimental results was 2.2%. The whole process can be exactly and conveniently controlled by using the system control model. It also provides a foundation for engineering scale-up and automatic control.