

# 硝基芳烃类物质对盐藻的毒性试验及比较

沈洛夫, 姜建国, 林庆生, 赖凤英

(华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:**通过国际经合组织(OECD)藻类生长抑制试验的国际标准方法,参照生活饮用水卫生标准(GB5749-85)设置毒物浓度进行试验,得到了2,4-二硝基苯胺、2,4-二硝基氯苯、间二硝基苯对盐藻(*Dunaliella salina*)的48h半数有效抑制浓度 $EC_{50}$ 值,2,4-二硝基苯胺的为0.018mmol/L,2,4-二硝基氯苯的为0.015mmol/L,间二硝基苯为0.027mol/L。其毒性大小为2,4-二硝基氯苯>2,4-二硝基苯胺>间二硝基苯。并探讨了其致变的原因。

**关键词:**盐藻(*Dunaliella salina*); 毒性; 硝基芳烃

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)05-0015-03

硝基芳烃类物质是一类重要的环境污染物,在江水中检出率很高,而且在饮用水中亦有少量的残余,是美国 Environmental Protection Agency (EPA) 的优先监测物<sup>[1]</sup>。

20世纪80年代末以来一些国家和国际组织相继提出了藻类测试的标准方法。盐藻(*Dunaliella salina*),由于富含 $\beta$ 胡萝卜素以及能忍受各种极端环境而近年来备受关注。但将盐藻作为受试生物进行毒性试验的研究却很少见于报道。作者按照国际经济合作与发展组织(OECD)所规定的藻类阻碍生长试验的标准方法<sup>[2]</sup>,利用盐藻作为试验藻种,研究硝基芳烃类物质对盐藻的毒性作用,为饮用水的致变性研究积累了数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

盐藻(*Dunaliella salina*)购于中国科学院水生生物研究所。试验毒物:2,4-二硝基苯胺、2,4-二硝基氯苯、间二硝基苯均为分析纯。盐藻培养液参见文献[3]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 盐藻的培养和计数

150 mL锥形瓶加入培养液45 mL,接种原始盐藻约500个/mL,用培养液定容到50 mL,自然光照,试验期间温度为25~30℃,每天震荡30 min。每隔24 h进行平板计数。

#### 1.2.2 毒性试验方案

按表1设置试验毒物浓度,每种化合物3种浓度组和一对照组。浓度设置参照《生活饮用水卫生标准》

GB5749-85<sup>[4]</sup>。在150 mL的锥形瓶中加入45 mL培养液和处于对数生长期的盐藻溶液,使得盐藻密度为约5000个/mL,按表1质量浓度加入毒物,然后定容到50 mL进行培养,48 h后进行平板计数(表2)。

表1 毒性试验方案

Tab 1 Scheme of toxicity experiment

水平	毒物质量浓度(mg/L)		
	2,4-二硝基苯胺	2,4-二硝基氯苯	间二硝基苯
1	0.36	0.41	0.34
2	1.08	1.23	1.01
3	3.24	3.69	3.03
4	9.74	11.88	9.09
5	29.16	35.64	27.27

#### 1.2.3 试验数据处理

数据处理公式如下<sup>[2,5]</sup>:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0} \quad (1)$$

式中, $\mu$ 为生长率, $N_0$ 为初始细胞数, $N_t$ 为 $t$ 时的细胞数, $t_0$ 为起始时间, $t$ 为终止时间。

收稿日期:2003-11-26;修回日期:2003-12-12

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(990874)

作者简介:沈洛夫(1973),男,湖南长沙人,研究方向:水污染毒理学,E-mail:johnjg@scut.edu.cn;姜建国,通讯作者,电话:020-87113849

表 2 盐藻 48h 平板计数及处理

Tab. 2 Numeration and analysis of cells of *Dunaliella salina* after 48h

组别	初始藻		48h 藻		生长率	阻碍率 (%)
	质量浓度 (mg/L)	密度 (个/mL)	密度 (个/mL)	密度 (个/mL)		
对照		4975	6800		0.0065	
2, 4-二硝基苯胺	0.36	4975	6570		0.0058	10.8
1.08	4960	6215		0.0047	27.7	
3.24	4950	5800		0.0033	49.2	
9.74	4980	5430		0.0018	72.3	
29.16	4990	5135		0.0006	90.8	
2, 4-二硝基氯苯	0.41	4980	6485		0.0055	15.4
1.23	4960	6070		0.0041	36.9	
3.69	4950	5715		0.003	53.8	
11.88	4975	5210		0.00096	85.2	
35.64	4990	5000		0.00004	99.4	
间二硝基苯	0.34	4950	6570		0.0059	9.2
1.01	4960	6275		0.0049	24.6	
3.03	4980	5945		0.0037	43.1	
9.09	4960	5540		0.0023	64.6	
27.27	4975	5205		0.0009	86.2	

$$\text{阻碍率}(\%) = \frac{\mu_b - \mu_1}{\mu_b} \times 100 \quad (2)$$

式(2)中,  $\mu_b$  为对照组生长速度,  $\mu_1$  为加测试物后盐藻的生长速度。

## 2 结果与讨论

培养期间盐藻的生长曲线见图 1。由图 1 根据表 2 数据和式(1)、式(2)可以求得物质的半阻碍浓度示于表 3。由表 3 可知, 3 种硝基芳烃类物质的毒性顺序为: 2, 4-二硝基氯苯 > 2, 4-二硝基苯胺 > 间二硝基苯(图 2)。

硝基芳烃对藻体可能是通过亲核取代或氧化反应而致变的。毒性的差异主要是受取代基的影响, 即  $\text{Cl} > \text{NH}_2 > \text{H}$  对苯环上的 2 个硝基的电子云分布的影响程度  $\text{Cl} > \text{NH}_2 > \text{H}$ , 从而使得硝基的亲核反应能力为: 2, 4-二硝基氯苯 > 2, 4-二硝基苯胺 > 间二硝基苯, 同时, 又由于亲核反应能力:  $-\text{Cl} > -\text{NH}_2 > -\text{H}$ , 两者积累, 导致此 3 种硝基芳烃的毒性顺序如上所叙。

用光学显微镜从盐藻的整体外观来看, 对照组的藻类色泽明显, 色鲜绿, 个体细胞不停地游走。而加入毒物的实验组随毒物浓度的增大, 外观颜色暗淡, 色素体不清, 细胞变小, 变细, 部分细胞呈三角形、球形、不规则形, 有的甚至破裂, 可见硝基芳烃类物质对细胞形态和内含物均有破坏作用。

利用盐藻的阻碍生长试验测定排放到环境中特别是饮用水中的有机毒物, 可以在很短的时间内准确地得到被测毒物的半有效阻碍浓度  $\text{EC}_{50}$ , 从而可以得知被测化合物的生物毒性, 可以作为一种饮用水污染测试行之有效的方法, 在水质污染监测和控制方面有着广阔的应用前景。

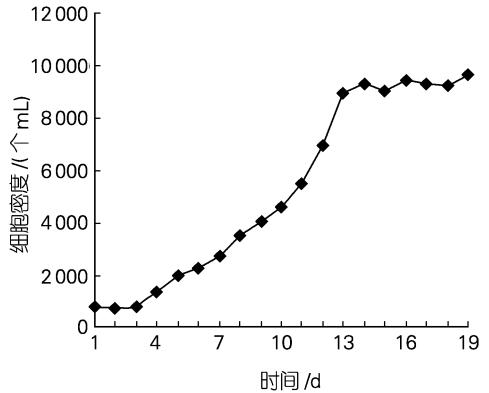


图 1 盐藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Dunaliella salina*

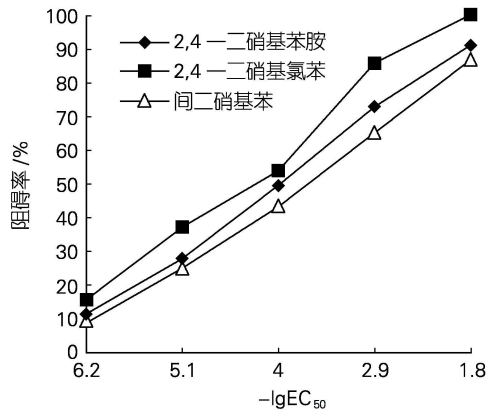


图 2 测试毒物阻碍率曲线

Fig. 2 Curve of EC of nitroaromatic hydrocarbons to *Dunaliella salina*

表 3 测试毒物的半阻碍率

Tab. 3 EC<sub>50</sub> of Nitryl aromatic hydrocarbons to *Dunaliella salina*

毒物	半阻碍	半阻碍浓度	
	浓度 (mmol/L)	置信区间 (mmol/L)	-lgEC <sub>50</sub>
2,4-二硝基苯胺	0.018	0.016~0.020	4.74
2,4-二硝基氯苯	0.015	0.014~0.016	4.82
间二硝基苯	0.027	0.025~0.029	4.57

参考文献:

[1] EPA (Environmental Protection Agency). Publishes final drinking water contaminant candidate list [J]. **Water Quality Professional**, 1998, 2(4): 6.

[2] OECD. Test guideline 201[R]. Paris: Decision of the Council C (81) 30 Final, 1981. 320-323.

[3] 姜建国, 姚汝华. 5种盐藻生化组成及β-胡萝卜素异构体分析[J]. 华南理工大学学报, 1997, 7: 38-41.

[4] GB5749-85. 生活饮用水卫生标准[S].

[5] 姜建国, 姚汝华. 盐浓度对盐藻生长及β-胡萝卜素积累的动力学过程[J]. 水生生物学学报, 1998, 24(4): 392-394.

## Test of toxicity of nitryl aromatic hydrocarbon to *Dunaliella salina*

SHEN Luo-fu, JIANG Jiar guo, LIN Qing-sheng, LAI Feng-ying

(College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Received: Nov., 26, 2003

Key words: *Dunaliella salina*; toxicity; nitryl aromatic hydrocarbon

**Abstract:** The algal growth test is the main method for the study of hydrophytic ecological toxicity. By using the standard method for algal growth inhibition test made by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), for algal the toxicity (48h, EC<sub>50</sub>) of hydroxybenzenes to *Dunaliella salina* was determined. In the test, the setting of consistencies was referring to Sanitary Standard for Drinking Water (GB5749-85). 2,4-Dinitroaniline's EC<sub>50</sub> was 0.018mmol/L, 2,4-Dinitrochlorobenzene's was 0.015mmol/L, m-Dinitrobenzene's was 0.027mmol/L. The toxicity ranked in a decreasing order was 2,4-Dinitrochlorobenzene's > 2,4-Dinitroaniline's > m-Dinitrobenzene's. In this article we can know the cause of causing toxicity. At the same time we can observe *Dunaliella salina*'s cells' changes when we use optic microscope to observe them, so we know that hydroxybenzenes can damage the cells.

(本文编辑:张培新)