

# 燃料油、苯酚和硫化钠对新月菱形藻 生长繁殖及叶绿素 $a$ 含量的影响

陈亚瞿 荣 佩

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海, 200090)

**提要** 苯酚对新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*) 的毒性最大, 20# 燃料油次之。硫化钠组最大比生长率随浓度的增高而增大。20# 燃料油、苯酚和硫化钠影响其生长的最低觉察效应浓度—未觉察效应浓度 (LOEC—NOEC) 范围分别为 32.00—3.20 mg/L, 3.20—1.00 mg/L, 和 0.320—0.100 mg/L; 苯酚影响其叶绿素  $a$  含量的 216h-EC<sub>50</sub> 为  $6.739 \pm 0.003$  mg/L, 20# 燃料油影响其细胞分裂繁殖的 144h-EC<sub>50</sub> 为  $46.13 \pm 1.01$  mg/L, 高浓度燃料油抑制新月菱形藻的生长繁殖及叶绿素  $a$  含量, 低浓度的则刺激其生长繁殖。

浮游植物作为海洋初级生产者, 也是海洋中生态系统能量输入的基础, 其在海洋中的存在直接关系到整个海洋食物链的循环及海洋生态系的平衡。单细胞植物的代谢作用比较简单, 能自行制造有机物并能直接从海水中吸收或吸附污染物, 对污染物的反应较为明显与迅速。

近年来, 水生生物毒性测定常以浮游植物作为受试对象之一。石油及其产品对浮游藻类的影响已有不少报道<sup>[6,7,10,12-15]</sup>, 苯酚对其影响的报道亦有所见<sup>[4,12]</sup>, 但有关硫化钠对其影响的报道尚未见到。1984年5月11日巴拿马籍“海利”轮在浙江南江南麂群岛附近与我国“金线泉”轮相撞发生沉船事件, 污染了这一海区。本实验针对这一事件分别以不同浓度的20#燃料油、苯酚和硫化钠对常见的新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*) 进行毒性测试。

## 一、材料与方 法

### 1. 材料

(1) 藻种 新月菱形藻 [*Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith]。

(2) 培养液 取自江苏省海洋水产研究所东凌试验场的海水(比重 1.020), 经暗沉淀、过滤, 加  $\text{NaNO}_3$  50mg/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5mg/L,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5mg/L,  $2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$  10mg/L,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  10mg/L,  $\text{VitB}_{12}$  200ng/L (所用试剂除  $\text{VitB}_{12}$  为医用针剂外, 余皆为分析纯试剂), 配制成营养液。经微波炉(申华-650)高频灭菌, 冷却后备用。

(3) 化学物质 20# 燃料油经超声处理成乳化油液, 再用红外测油仪(柳本 OIL-102)测定其含量后备用。苯酚和硫化钠均由分析纯试剂经蒸馏水溶解, 标定并稀释至所

需浓度后使用。

## 2. 方法

实验前在室温(20—24℃)下,以荧光灯为光源,2 500—3 000lx,24h 光照,暂养藻种3—4d,以获得指数生长期的藻种。实验期间随机交换各试样瓶位置以减少其光照误差。实验容器均为100ml三角烧瓶,试样量为40ml。为尽量防止在实验过程中受污染,以滤纸和橡皮筋封口。所有器皿包括滤纸使用前均经微波炉高频灭菌。

生物量测定,分别以光密度值、细胞数和叶绿素 *a* 含量作指标,并根据前两者计算其最大比生长率(或称最大细胞分裂频率)  $U_{\max}[\mu = \ln(x_2/x_1)/(t_2 - t_1) (d^{-1})]^{[5,7,15]}$ ,  $U_{\max} = \text{Max}\{\mu\}$ 。分述如下:

(1) 显微镜细胞计数法 用 OLYMPUS 显微镜和 BX-K-25 型血球计数板计出 20<sup>#</sup> 燃料油试样组的细胞数,以  $10^4$  cells/ml 为单位,每个试样重复计数 10 次,取平均值。起始接种浓度为  $86.25 \times 10^4$  cells/ml。每隔 24h 取一次样,为期 6d。每天定时震荡试样 3 次,以补充部分 CO<sub>2</sub>, 并防止藻体沉底。

(2) 光吸收法 用 721 型分光光度计在 630nm 处检测试样的光密度,比色皿光径为 1cm。每一浓度组的样品,20<sup>#</sup> 燃料油组检测 2 次,苯酚和硫化钠组检测 3 次,均取平均值。起始接种浓度的光密度值为: 20<sup>#</sup> 燃料油,0.058; 苯酚,0.038; 硫化钠,0.027。接种后每隔 24h 取样检测,持续 6d。实验期间,20<sup>#</sup> 燃料油组试样每天振荡 3 次;苯酚、硫化钠组试样,则每隔 12 和 8h,以 2 500—3 000r/min 的速度离心 10min(80-1 型离心沉淀机),倾去上清液,更换新鲜培养液,按规定的试验浓度,分别滴加新配制的苯酚和硫化钠溶液并定容至 40ml。

(3) 叶绿素法 藻细胞在接种后的第 9 天处于相对生长稳定期时,用标准方法<sup>[9]</sup>进行叶绿素的提取。叶绿素 *a* 的浓度  $\text{Chl}a(\text{mg/L}) = 11.64\text{OD}_{663} - 2.16\text{OD}_{645} + 0.10\text{OD}_{630}$ , 式中 OD<sub>663</sub>, OD<sub>645</sub> 和 OD<sub>630</sub> 分别是在各自波长(1cm 光程)的校正光密度。每单位体积叶绿素  $a(\text{mg/m}^3) = \text{Chl}a \times v/V$ , 式中 *v* 为萃取液体积(L), *V* 为水样体积(m<sup>3</sup>)。

(4) 数据处理 用一般数理统计方法<sup>[2,11]</sup>。

## 二、结 果

### 1. 20<sup>#</sup> 燃料油的影响

(1) 对生长的影响 新月菱形藻第 6 天生长值(光密度值)的方差分析结果为  $F = 26.40$ , 其均数间差别非常显著( $p < 0.01$ ) (表 1)。20<sup>#</sup> 燃料油对该藻生长的影响结果,见表 2。

经 *t* 检验得,影响新月菱形藻生长的最低觉察效应浓度—未觉察效应浓度(LOEC—NOEC)范围为 32.00—3.20mg/L。

(2) 对繁殖的影响 20<sup>#</sup> 燃料油在 6d 的试验中,对新月菱形藻细胞分裂繁殖影响的结果见图 1 和表 3。由图 1 可见,实验组第 6 天的细胞数从 10mg/L 浓度组起有明显减少,320mg/L 和 100mg/L 浓度组对新月菱形藻细胞分裂繁殖的抑制非常强烈,此两浓度组的生长曲线均呈波浪形(前者更明显),并不呈指数生长曲线形。 $144\text{h-EC}_{50} = 46.13 \pm 1.01\text{mg/L}$  (回归方程  $y = -0.55 + 1.19x$ ,  $r = 0.9685$ )。但图 1 中 0.032mg/L 浓度组

表 1 20# 燃料油影响新月菱形藻生长的方差分析

Tab. 1 Variance analyses of effects of No. 20 fuel Oil on growth of *N. closterium*

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
组间 $S_1$	0.067 80	5	0.013 56	26.40	
组内 $S_2$	0.003 08	6	0.000 51		
总和	0.070 88	11			

表 2 20# 燃料油组的最大比生长率  $U_{\max}(d^{-1})$ Tab. 2 Maximum specific growth rates ( $U_{\max}$ ) of *N. closterium* in No. 20 fuel oil group ( $d^{-1}$ )

浓度 (mg/L)	$U_{\max}$	95% 置信限
对照	0.5175	0.489 6—0.545 5
0.032	0.5665	0.415 3—0.717 7
0.320	0.5658	0.136 3—0.995 3
3.20	0.5071	0.399 1—0.615 1
32.00	0.4625 <sup>①</sup>	0.345 6—0.579 4
32.00	0.2487 <sup>①</sup>	0.038 5—0.535 9

① 与对照组比,  $p < 0.05$ 。

的生长曲线则几乎始终高于其他浓度组的(包括对照组的)。由表 3 中的  $U_{\max}$  值及其出现时间亦可看出,与对照组比,从 10mg/L 起其差异才较为显著。

(3) 对细胞及其色素体的毒性效应影响 实验的第 1 天, 320mg/L 浓度组的试样中出现絮状沉淀, 显微镜检可见部分细胞异常, 藻体不饱满, 色素体萎缩, 从第 2 天起, 100mg/L 浓度组的试样中亦出现异常细胞, 320mg/L 浓度组的部分细胞死亡(细胞解体或失去色素); 第 3 天, 320mg/L 浓度组的试样中几乎全无正常细胞; 第 4 天, 100mg/L 浓度组的试样中也有部分细胞失去色素; 后两天的情况与第 4 天无大差异。尽管 320mg/L 和 100mg/L 对新月菱形藻有剧烈毒性, 在实验期间使其细胞数大幅度下降, 但却未能杀死全部藻体细胞。

(4) 对叶绿素 *a* 含量的影响 实验的三种化学物质对新月菱形藻叶绿素 *a* 含量的影响, 由图 2 可知, 使新月菱形藻叶绿素 *a* 含量与对照组相比降低 50% 的 20# 燃料油, 其浓度为 227.69mg/L。

## 2. 苯酚的影响

(1) 对生长的影响 对新月菱形藻第 6 天生长值(光密度值)的方差分析得出  $F = 49.58$ , 其均数间差别非常显著 ( $p < 0.01$ ) (表 4)。苯酚对新月菱形藻生长的影响结果见表 5。其最大比生长率  $U_{\max}$  均于实验的第 2—3 天出现。

经  $t$  检验, 苯酚影响新月菱形藻生长的 LOEC—NOEC 范围为 3.20—1.00 mg/L。

(2) 对叶绿素 *a* 含量的影响 苯酚对新月菱形藻叶绿素 *a* 含量的影响最为强烈。

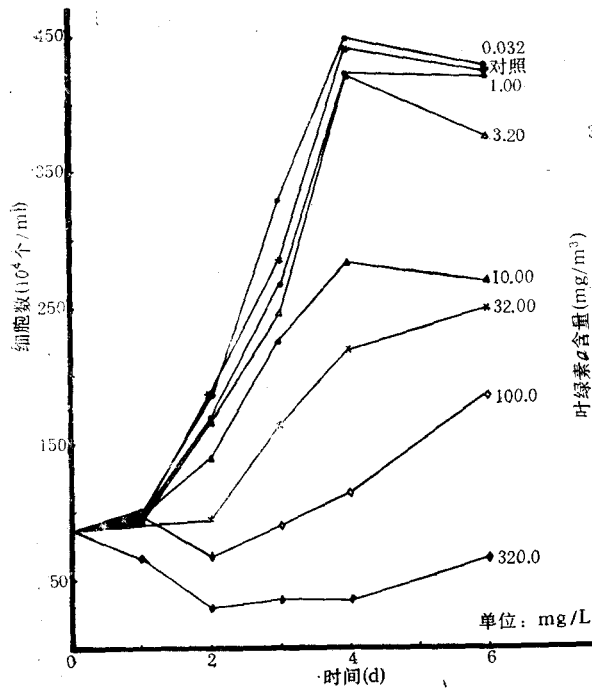


图1 20# 燃料油对新月菱形藻 *N. closterium* 细胞分裂繁殖的影响 (1—6d)

Fig. 1 Effect of No. 20 fuel oil on cell division of *N. closterium* (1—6d)

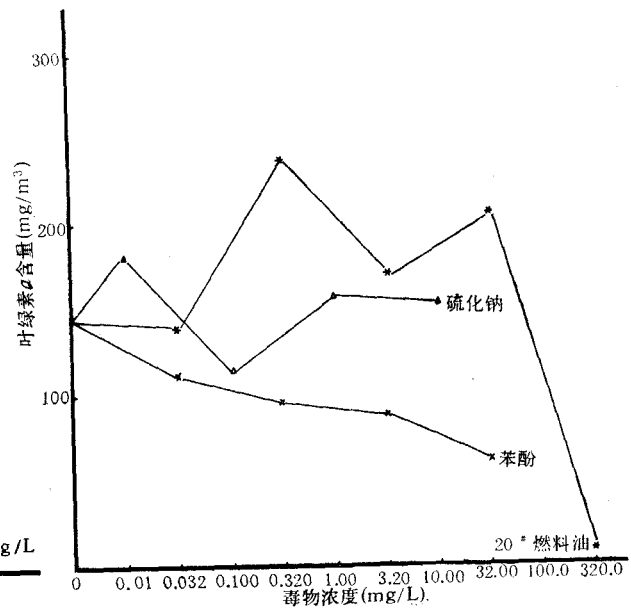


图2 20# 燃料油、苯酚和硫化钠对新月菱形藻 *N. closterium* 叶绿素 a 含量的影响 (实验第 9 天)

Fig. 2 Effect of No. 20 fuel oil, phenol and sodium sulphide on Chl. a content of *N. closterium* (The 9th d)

表3 20# 燃料油组最大细胞分裂频率  $U_{max}(d^{-1})$  及其出现时间 (d)

Tab. 3 Maximum cell division rates ( $U_{max}$ ) of *N. closterium* in No. 20 fuel oil group ( $d^{-1}$ ) and the time of appearance (d)

浓度 (mg/L)	对 照	0.032	1.00	3.20	10.00	32.00	100.0	320.0
$U_{max}$	0.663 9	0.624 1	0.544 5	0.575 4	0.476 9	0.549 6	0.276 5	0.163 3
出现时间	1—2	2—3	1—2	1—2	2—3	2—3	2—3	2—3

表4 苯酚影响新月菱形藻生长的方差分析

Tab. 4 Variance analyses of effects of phenol on growth of *N. closterium*

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
组间 $S_1$	0.071 42	6	0.011 90	49.58	
组内 $S_1$	0.003 31	14	0.000 24		
总和	0.074 73	20			

表 5 苯酚组的最大比生长率  $U_{max}$  ( $d^{-1}$ )Tab. 5 Maximum specific growth rates ( $U_{max}$ ) of *N. closterium* in phenol group ( $d^{-1}$ )

浓度 (mg/L)	$U_{max}$	95% 置信限
对照	0.808 9	0.762 2—0.855 6
0.032	0.858 6	0.842 2—0.875 0
0.100	0.850 3	0.773 7—0.929 6
0.320	0.828 5	0.735 8—0.921 2
1.00	0.759 5	0.683 2—0.835 8
3.20	0.673 9 <sup>①</sup>	0.543 8—0.804 0
10.00	0.685 9 <sup>①</sup>	0.627 1—0.744 7

①与对照组比,  $p < 0.05$ 。

曲线随浓度递增而不断下降 (图 2)。其  $216h-EC_{50} = 6.739 \pm 0.003mg/L$  (回归方程  $y = 3.66 + 0.35x$ ,  $r = 0.9637$ )。

用苯酚组的新月菱形藻叶绿素 *a* 含量与 20# 燃料油组的相比较 (表 6), 除 0.032mg/L 外, 其余各浓度组, 苯酚均使其叶绿素 *a* 含量下降 50% 左右或更多。显然, 苯酚对新月菱形藻叶绿素 *a* 含量的影响大于 20# 燃料油的影响。

表 6 20# 燃料油组和苯酚组叶绿素 *a* 含量 ( $mg/m^3$ ) 比较Tab. 6 The comparison of chl. *a* content ( $mg/m^3$ ) of *N. closterium* between No. 20 fuel oil and phenol groups

浓度 (mg/L)	20# 燃料油	苯酚	苯酚/20# 燃料油 $\times 100(\%)$
0.032	140	115	82.14
0.320	235	95	40.43
3.20	170	90	52.95
32.00	205	205	26.83

(3) 硫化钠的影响 对新月菱形藻第 6 天的生长值进行方差分析, 结果得  $F = 4.25$ , 其均数间差别较为显著 ( $0.01 < p < 0.05$ ) (表 7) 新月菱形藻在硫化钠影响下的最大比生长率出现在实验的第 0—1 天, 结果见表 8。经  $t$  检验得出硫化钠影响新月菱形藻生长的 LOEC—NOEC 范围为 0.320—0.100mg/L。  $U_{max}$  值随硫化钠浓度的递增而不断增大 (表 8)。

表 7 硫化钠影响新月菱形藻生长的方差分析

Tab. 7 Variance analyses of effects of sodium sulphide on growth of *N. closterium*

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
组间 $S_1$	0.015 42	5	0.003 08	4.25	
组内 $S_2$	0.008 71	12	0.000 73		
总和	0.024 13	17			

表 8 硫化钠组最大比生长率  $U_{max}(d^{-1})$ Tab. 8 Maximum specific growth rates ( $U_{max}$ ) of *N. closterium* ( $d^{-1}$ ) in sodium sulphide

浓度 (mg/L)	$U_{max}$	95% 置信限
对照	0.912 8	0.770 8—1.054 8
0.010	0.932 4	0.797 3—1.067 5
0.032	0.998 4	0.879 7—1.117 1
0.100	0.998 1	0.858 6—1.137 6
0.320	1.030 0 ①	0.936 2—1.123 8
1.00	1.073 2 ①	0.989 3—1.157 1

①与对照组相比,  $p < 0.05$ 。

对叶绿素  $a$  含量影响介于 20<sup>#</sup> 燃料油和苯酚组之间,且与对照相比,其降低值不超过 50% (图 2)。

### 三、讨 论

从表 1、表 4 和表 7 的结果可看出,作为实验室的测量,20<sup>#</sup> 燃料油、苯酚和硫化钠对新月菱形藻生长的影响均显著。

#### 1. 20<sup>#</sup> 燃料油的影响

图 1 中 0.032mg/L 浓度组细胞的分裂繁殖曲线高于其它浓度组的(包括对照组),并且 320mg/L 和 100mg/L 浓度组细胞的分裂繁殖曲线呈不规则波浪形。这是因为低浓度烃能刺激微藻的生长繁殖,而高浓度烃则抑制其生长繁殖,这与一些报道结果一致<sup>[6,14]</sup>。此外,其  $144h-EC_{50} = 46.13 \pm 1.01mg/L$ 。这与以往提出的,在短期试验中与对照组比,使其细胞分裂数降低 50% 或更多的石油产品浓度为 5—50mg/L 的报道结果相符合<sup>[14]</sup>。

从表 3 中的  $U_{max}$  值看出,实验组的  $U_{max}$  均小于对照组的  $U_{max}$ ,且实验组的  $U_{max}$  出现的时间大多迟于对照组的  $U_{max}$  出现的时间。这说明实验组新月菱形藻的生长前延迟期大多比对照组长。燃料油中的水溶性物质含有抑制微藻生长的成份,或引起生长前延迟期的延长,或降低其生长速率(即比生长率或细胞分裂频率)<sup>[16]</sup>。

显微镜检结果表明,即使油浓度很高(320mg/L 和 100mg/L)也未能将新月菱形藻全部杀死。这是由培养的非同步性所导致的。尽管我们用了处于指数生长期的藻细胞接种,但难免有衰老期、生长期和分裂期等不同生长周期状态的藻细胞混杂期间。衰老期的藻细胞在有毒培养液中率先死亡,新分裂的藻细胞抗性最强<sup>[4]</sup>。

从叶绿素  $a$  含量看,在 227.69mg/L 时,20<sup>#</sup> 燃料油使新月菱形藻的叶绿素  $a$  含量降低 50%。这说明高浓度烃对其叶绿素  $a$  含量亦有强烈的抑制作用。图 2 中,20<sup>#</sup> 燃料油和硫化钠对其叶绿素  $a$  含量的影响曲线呈不规则状态,波动较大,是实验误差或是可重复的现象,有待于进一步的实验来证实。

#### 2. 苯酚的影响

表 4,表 5 及图 2 均充分说明苯酚对新月菱形藻有非常强烈的毒性。有资料指出<sup>[1,2]</sup>,

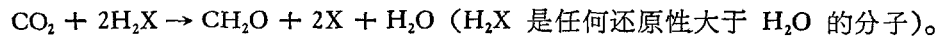
苯酚对栅列藻影响的极限浓度是 40mg/L, 且其对全年性浮游生物及季节性浮游生物皆具有很高的毒性。这些资料证实了我们的实验结果的合理性。

苯酚对藻类的危害机制是使其细胞质变性。酚系细胞原浆类毒物, 属高毒物质, 亦是急性毒物之一。浓度低时能使蛋白质变性, 浓度高时则使蛋白质沉淀, 对各种细胞有直接的损害。在天然水体中, 酚化合物的分解主要靠生化氧化, 且一元酚较多元酚易于生化分解<sup>[1]</sup>。由于羟基 (—OH) 易置换, 被藻类代谢时吸收, 结果使细胞质变性而使其受害<sup>[4]</sup>。

### 3. 硫化钠的影响

硫化钠组的  $U_{max}$  出现得很早(在实验的第 0-1 天), 这说明其生长前延迟期非常短。此外, 图 2 及表 8 中的  $U_{max}$  值随硫化钠浓度的增高而不断递增。这些现象均表明, 硫化钠对新月菱形藻的生长繁殖及叶绿素 *a* 含量不但无不利影响, 而且还刺激其生长繁殖。

硫化物也是急性毒物的一种, 其毒性主要来自水解后生成的硫化氢 ( $H_2S$ ), 而非  $HS^-$  或  $S^{2-}$ 。有资料指出<sup>[8]</sup>, 硫化氢及其它还原性的硫化物能作为一种能量来源。在某些环境中, 不同的单细胞生物利用诸如硫化氢之类的化合物供氢体, 并按下式进行光合作用:



虽然自第一次离心并更换培养液起, 便不能保证实验在无菌条件下进行, 但由于种群间的拮抗作用, 即使有同样也能利用硫化氢作供氢体进行化能合成的细菌存在, 在数量上占绝对优势的新月菱形藻也能在很大程度上制约其生长繁殖, 显微镜检观察结果也证实了这一点。因此, 细菌对所测得的新月菱形藻光密度值的影响是微不足道的。

### 参 考 文 献

- [1] 陈静生、陈易笃、周振惠等, 1981. 环境污染与保护简明原理。商务印书馆, 185—190 页。
- [2] 杨纪珂、孙长鸣、汤且林, 1983. 应用生物统计。科学出版社, 226—232, 278—291 页。
- [3] 湛江水产专科学校主编, 1980. 海洋饵料生物培养。农业出版社, 100 页。
- [4] 曾昭琪、陈子涛, 1984. 酚类对栅列藻细胞的影响。实验生物学报 17(1): 1—11。
- [5] APHA, AWWA, WPCF, (宋仁元等译), 1985. 水和废水标准检验法, 第 15 版。中国建筑工业出版社, 565—609 页, 883—914 页。
- [6] Fabregas, J. 等, (林凤翔译), 1985. 油和分散剂对微型海藻 (*Tetraselmis suecica*) 的生长及叶绿素 *a* 含量的影响。海洋译丛 4: 52—54。
- [7] Anderson, J. W., J. M. Neff & S. R. Petrocelli, 1974. Sublethal effects of oil, heavy metals and PCBs on marine organisms. Surv. Toxic. Environ., N. Y., pp. 83—121.
- [8] Barnes, R. K. & K. H. Mann, 1980. Fundamentals of Aquatic Ecosystems. Blackwell Scientific Publications, pp. 212—213.
- [9] Barnes, R. S. K. & R. N. Hughes, 1982. An Introduction to Marine Ecology. Blackwell Scientific Publications, pp. 42, 306—307.
- [10] Clark, R. B., 1986. Marine Pollution. Clarendon Press, pp. 51.
- [11] Finney, D. J., 1952. Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Limited, pp. 419—436.
- [12] Mironov, O. G., 1970. Division of some diatom algae in sea water containing oil products. Scientific Proceedings of Higher Schools of Learning. *Biologicheskii Nauki* 7: 69—72.
- [13] Mironov, O. G. & L. A. Lanskaya, 1968. Survival of some marine plankton algae in oil polluted sea water. *Bot. Zh.* 53(5): 550—552.
- [14] Patin, S. A., 1982. Pollution and the Biological Researches of the Oceans. Butterworth Scientific, pp. 82.

- [15] Stein, J. R., 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods & Growth Measurements. Cambridge University Press, pp. 289—312.
- [16] Winters, K., R. O'Donnell, J. C. Batterton & C. Van Baalen, 1976. Water-soluble components of four fuel oils: Chemical characterization and effects on growth of microalgae. *Marine Biology* 38: 269—276

## EFFECTS OF NO. 20 FUEL OIL, PHENOL AND SODIUM SULPHIDE ON GROWTH, REPRODUCTION AND CHLOROPHYLL *a* CONTENT OF *NITZSCHIA CLOSTERIUM*

Chen Yaqu and Rong Pei

(East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai, 200090)

### ABSTRACT

The ship "Sea Carrier" (Panamanian) wrecked on 1984 May 11 near Nanji islands (27°00'N, 121°13'E) and polluted this area with No. 20 fuel oil, phenol and sodium sulphide. To assess the pollutant effects of this accident on phytoplankton a series of bioassays have been carried out with *Nitzschia closterium* by hemacytometer counting as well as absorption and Chl.*a* detection.

The results showed that these three chemicals had obvious effects on *N. closterium*. Both No. 20 fuel oil and phenol were poisonous, and phenol had the greater effect. In the test period of six days, the maximum specific growth rate of *N. closterium* increased successively with the rise in concentration of sodium sulphide.

The ranges of lowest-observed effective concentration—no-observed effective concentration (LOEC—NOEC) of No. 20 fuel oil, phenol and sodium sulphide affecting the growth of *N. closterium* were 32.0—3.20 mg/L, 3.20—1.00 mg/L and 0.320—0.100 mg/L, respectively. On the other hand, for the Chl.*a* content the 216h-EC<sub>50</sub> of phenol was 6.739 ± 0.003 mg/L. For cell division and reproduction the 144h-EC<sub>50</sub> of No. 20 fuel oil was 46.13 ± 1.01 mg/L. No. 20 fuel oil in high concentrations inhibited the growth, reproduction and the Chl.*a* content of *N. closterium*. But the oil in lower concentrations improved the growth and reproduction of the organism.