

酞酸酯对龙须菜的生态毒理研究

吴志辉¹, 杨宇峰¹, 聂湘平¹, 李桂英², 李凯彬³

(1. 暨南大学 水生生物研究所, 广东 广州 510632; 2 中国科学院 广州地球化学研究所, 广东 广州 510640; 3. 中国水产科学院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要: 研究了酞酸酯类化合物对龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 生长的影响以及酞酸酯在龙须菜体内的积累状况。结果表明, 在邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)、邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP) 4 种酞酸酯混合质量浓度为 0.05, 0.10, 0.20 和 0.40 mg/L 的暴露条件下, 龙须菜的相对生长速率和叶绿素 a 含量均受到了明显影响。与对照组比较, 在高质量浓度处理组 (0.1~0.4 mg/L) 中, 两指标分别下降了 18.4%~21.3% 和 10.4%~15.3%, 致毒效应与酞酸酯暴露浓度呈正相关。在受控水体的暴露试验中, 利用气相色谱 (GC-FID) 分析表明, 4 种酞酸酯类 (DMP, DEP, DBP 和 DEHP) 在龙须菜体内均有一定程度的积累, 其残留量分别为 0~0.14 mg/kg, 0~0.83 mg/kg, 0.11~1.89 mg/kg, 0.01~10.4 mg/kg, 其积累程度与酞酸酯分子结构相关, 侧链较长的酞酸酯比侧链较短的积累量要大, 并随处理浓度的增加和时间推移呈增加趋势。

关键词: 酞酸酯; 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*); 致毒效应; 积累

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)06-0046-05

酞酸酯 (Phthalate esters, PAEs) 是一类广泛用于塑料和橡胶生产中的改性添加剂。已有研究表明 PAEs 为一种内分泌干扰物, 对生物具有毒性, 并具有“三致”效应, 可在生物体内富集^[1-3]。美国环保总署将邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)、邻苯二甲酸二辛酯 (DOP)、邻苯二甲酸丁基基酯 (BBP) 和邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP) 列为环境优先污染物。我国环境优先污染物的名单上也有 DMP, DBP 和 DOP。这些酞酸酯与塑料分子由氢键或范德华力联接, 彼此间保留各自相对独立的化学性质, 因此随着使用时间的推移, 这些酞酸酯可从塑料中转移到环境中, 造成环境的污染。中国的大气、水体、生物等各种环境样品中已广泛检出了 PAEs^[4-6]。有关酞酸酯对浮游动植物^[7,8]、陆生植物^[9,10] 和水生动物^[11] 等生物的毒性作用以及植物对酞酸酯的吸收积累方面开展了较多的工作, 但对大型海藻的影响却未见报道。

龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 属红藻门江蓠属, 是一种重要大型海藻养殖品种。龙须菜的生产力很高, 在生长过程中可大量吸收氮和磷等生源要素, 在水生生态系统碳循环和减缓近岸海域富营养化方面有很重要的作用, 是重要的生态环境材料^[12]。

此外, 龙须菜可以食用, 作为饲料、工业原料和有机肥料, 具有较高的经济价值^[13,14]。作者选择了 4 种典型酞酸酯类, 研究了该类物质在大型海藻龙须菜中的吸收、积累及龙须菜对该类物质的毒性响应, 以评价 PAEs 的环境行为及其生态影响。

1 材料与 方法

1.1 实验材料

试验前期处理于 2005 年 5~7 月在汕头大学海洋生物实验室南澳临海试验站进行。从养殖海区采集龙须菜运回实验站用沙滤海水暂养。供试酞酸酯类包括邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP), 均为分析纯, 购自天津市化学试剂厂。酞酸酯标准品购自美国 AccuStandard 公司。

收稿日期: 2006-02-23; 修回日期: 2006-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40473046; 40471118); 有机地球化学国家重点实验室开放基金资助项目 (OGE-200306); 国家 973 计划资助项目 (2002GB412405)
作者简介: 吴志辉 (1980), 男, 广东人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生态学; 聂湘平, 通讯联系人, 电话: 020-85225808, E-mail: txpnjie@jnu.edu.cn

1.2 实验方法

1.2.1 酞酸酯对龙须菜生长和生理代谢影响的研究

根据预备实验设以下 4 个处理质量浓度: 0.05, 0.1, 0.2 和 0.4 mg/L 和空白对照组, 每个处理组设 3 个重复; 取质量为 2 g 处于生长期的新鲜龙须菜置于 1 L 的锥形瓶中, 用过滤海水并以 f/2 配方加富氮和磷, 在 4 000 lx (光暗周期 12 h: 12 h), 25~ 28℃ 的条件下培养 14 d 后测定其相对生长速率 (Relative Growth Rate, R_{RG}) 和叶绿素 a (Chl a) 含量。相对生长速率 (%/d) 由公式 $R_{RG} = [100 \ln(N_t/N_0)]/t$ 求得^[15], 其中 N_0 是初始时的质量, N_t 是 t 天后的质量; 叶绿素 a 含量则以 DMF (N, N 二甲基甲酰胺) 法^[16] 测定: 准确称取 0.5 g 鲜藻剪碎后以 25 mL N, N 二甲基甲酰胺在暗处提取 2 h 后测其提取液的吸光度, 由经验公式 $c(\text{Chla}, \mu\text{g/g}) = 11.85A_{664} - 1.54A_{647} - 0.08A_{630}$ 求得, 其中 A_{664} , A_{647} 和 A_{630} 分别为提取液在 664, 647 和 630 nm 处的吸光度。

1.2.2 酞酸酯在龙须菜藻体中积累的研究

根据预备实验设以下 4 个处理质量浓度: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/L 和空白对照组, 每个处理组设 3 个重复; 取 50 g 处于生长期的新鲜龙须菜置于 15 L 的玻璃缸中, 用过滤海水, 在室内 (2 000~ 3 000 lx, 光暗周期 12 h: 12 h, 温度 25~ 28℃) 的条件培养 30 d, 分别在第 10 天、第 20 天和第 30 天取一定质量 (15 g) 藻样进行气相色谱 (GC FID) 分析。分析过程如下:

1.2.2.1 样品预处理

准确称取 1~ 2 g 经冷冻干燥后的干样品以乙醚进行索氏抽提 24 h, 提取液在旋转蒸发仪上水浴 40℃, 90 kPa 真空度和转速 30 r/min 的条件浓缩至 1 mL, 再过硅胶柱净化, 柱条件为: 10 mm × 300 mm 规格柱, 柱底填一薄玻璃纤维层, 该柱以 15 g (60~ 100 目) 经 120℃ 烘箱过夜的硅胶 (分析纯, 购自上海化学试剂厂) 填充, 上端再填以 1 cm 厚的无水硫酸钠。洗脱条件为: 先以 50 mL 二氯甲烷洗脱, 再以 30 mL 20: 80 的丙酮/正己烷混合液洗脱, 两馏分经氮气吹干后以正己烷溶解合并, 最终定容至 1 mL 进行气相色谱测定。上述所用试剂皆为分析纯, 除乙醚外都经双蒸处理; 所用玻璃仪器经超声波清洗器洗净并在 120℃ 的条件下烘干后再以正己烷冲洗。

1.2.2.2 标准样品

PAEs 的混合标准溶液: 包括 DMP, DEP, DBP 和 DEHP 共 4 种化合物。工作标准液的质量浓度除 DEHP 外, 其他 3 种皆为 10, 5, 1, 0.5 和 0.1 mg/L, 其中 DEHP 工作标准液的浓度为 100, 80, 40, 10 和

8 mg/L。

1.2.2.3 GC 条件

气相色谱仪为 HP 6890, FID 检测器; 色谱柱为 HP 5 30.0m 柱; 载气为高纯氦气, 初始压力为 0.56 kPa, 载气流速为 40 mL/min; 不分流进样, 体积为 2 μ L; 升温程序: 80℃ (1 min) → 150℃ (20℃/min) → 290℃ (4℃/min, 保留 5 min), 进样口温度为 290℃。

2 结果

2.1 酞酸酯对龙须菜的致毒效应

不同处理浓度条件下龙须菜的相对生长速率和叶绿素 a 含量的变化分别见图 1 和图 2。从图 1、2 上可以看到, 混合状态下 4 种酞酸酯类化合物对龙须菜的相对生长速率和叶绿素 a 含量都产生影响: 随着酞酸酯处理浓度的增加, 龙须菜的相对生长速率和叶绿素 a 含量都呈下降趋势, 当处理浓度进一步增加时, 两者的下降趋势趋于平缓。与空白对照组相比, 当酞酸酯为高处理浓度时 (0.1~ 0.4 mg/L), 龙须菜的相对生长速率和叶绿素 a 含量分别下降了 18.4% ~ 21.3% 和 10.4% ~ 15.3%。

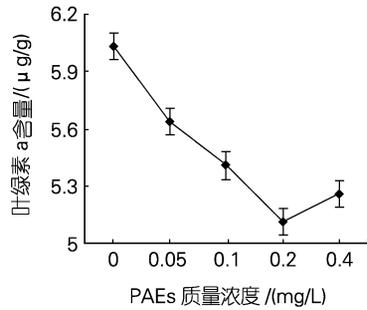


图 1 不同处理浓度下龙须菜藻体叶绿素 a 含量的变化
Fig. 1 Chl a content changes of *Gracilaria lemaneiformis* under different treatments

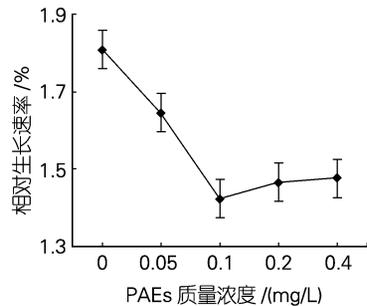


图 2 不同处理浓度下龙须菜相对生长速率 (R_{RG}) 的变化
Fig. 2 R_{RG} changes of *Gracilaria lemaneiformis* under different treatments

2.2 酞酸酯在龙须菜藻体内的积累

不同处理浓度条件下 DMP, DEP, DBP 和 DEHP 的含量在龙须菜藻体内随时间的动态变化见图 3(结果均扣除对照处理组)。从图上可以看到,随着酞酸酯侧链长度(DMP < DEP < DBP < DEHP)的增加,它们在龙须菜组织内的积累量呈增加趋势: DMP (0~0.14 mg/kg) < DEP (0.23~0.83 mg/kg) < DBP (0~1.32 mg/kg) < DEHP (0.38~9.72 mg/kg)。侧链最长的 DEHP 在龙须菜藻体内的含量随处理浓度的增

加和时间推移都呈增加的趋势;而侧链较短的 DBP,其在龙须菜组织内的含量在第 20 天最多,第 10 天和 30 天的含量则相差不大,曲线呈倒“V”型;侧链最短的两种酞酸酯, DMP 和 DEP,其在龙须菜藻体内的含量在 0.05~0.4 mg/L 处理组间的差异不显著,0.05, 0.1 和 0.2 mg/L 的处理组在 10 d 后其含量都开始下降,而最高浓度处理 0.4 mg/L 在 20 d 后有上升的趋势。

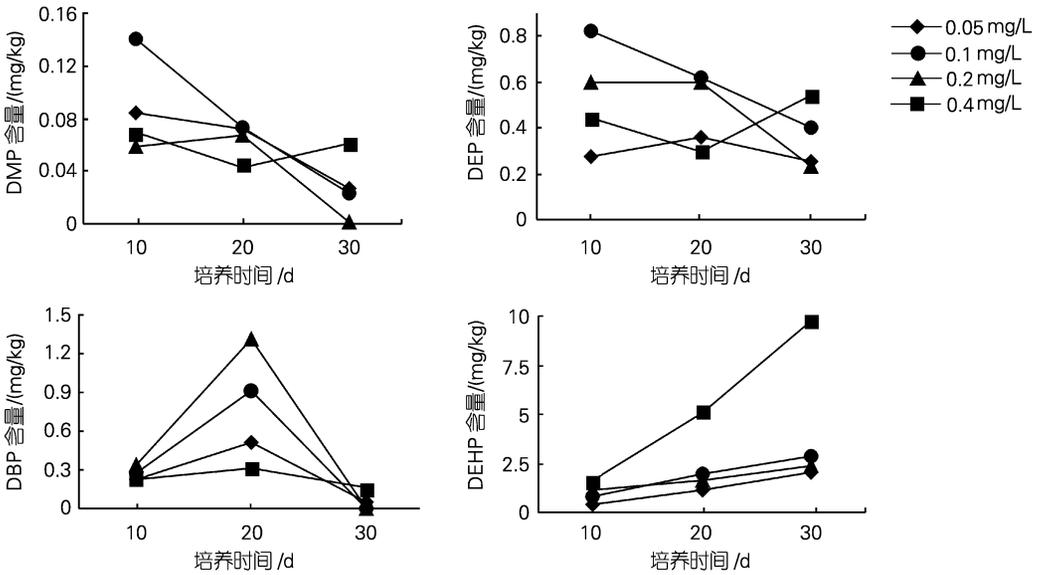


图 3 不同处理浓度下 PAEs 的含量在龙须菜藻体内的动态变化

Fig. 3 Dynamics changes of PAEs in *Gracilaria lemaneiformis* under different treatments

3 讨论

由于酞酸酯的广泛使用,这类化合物对生物毒性及其在环境中的归趋已引起了人们的极大关注。本研究表明酞酸酯不仅使龙须菜的相对生长率下降、叶绿素 a 含量降低,且在藻体内有明显的残留。尹睿^[17]报导土壤里 DBP 和 DEHP 的污染能影响蔬菜的品质,如维生素 C 含量下降,糖酸比提高等,并认为这些指标的变化是由于植物吸收了 DBP 和 DEHP 而引起的。相对生长速率可作为植株生长能力的指标,叶绿素 a (Chla) 是植物进行光合作用的最主要的光合色素,其含量的变化可以敏感地反映环境因子对植物生长的影响。实验结果中两项指标的下降表明酞酸酯对龙须菜确有致毒效应。酞酸酯的这种毒性效应,一方面可能是因为酞酸酯降低了叶绿

素含量,影响光合作用,导致细胞受损。况琪军^[8]报道 DBP 对斜生栅藻的致毒效应表现为降低该藻的叶绿素 a 含量,使藻细胞老化,破坏细胞内含物,阻止细胞分裂;另一方面是酞酸酯作为一种环境激素,可能干扰了植物的生理生化代谢活动。王晓娟^[18]报道 DBP 能造成拟南芥茎段细胞分化和再分化过程延迟。酞酸酯类化合物的这种激素效应在其它生物上也有发现^[19]。

有资料报道植物能吸收酞酸酯类化合物^[10,17]。本实验结果显示长链酞酸酯比短链酞酸酯的积累量大且呈现出一定规律: DMP 和 DEP 含量一直处于低水平,高质量浓度(0.4 mg/L)处理组在 20 d 后有上升趋势; DBP 的含量曲线在 30 d 的试验周期内呈倒“V”型; DEHP 含量随处理浓度的增加和时间推移都呈增加的趋势。龙须菜积累酞酸酯呈现的这种规律

一方面是与这类化合物本身的理化性质有很大关系^[20]：侧链较短的酞酸酯，其分子量小，正辛醇/水分配系数 K_{ow} 值小，水溶性高，其侧链短且结构简单，在环境中较易转化和降解；侧链较长的酞酸酯，其分子量大， K_{ow} 值大，水溶性低，其侧链长且结构复杂，在环境中停留时间长，难转化和降解，容易被吸附和在生物体内富集。曾巧云^[21]报道用经过 DEP、DBP 和 DEHP 处理的土壤来栽种菜心，其根系中 DBP 和 DEHP 的含量都随 DBP 和 DEHP 的处理浓度呈正相关，而 DEP 则没被检测到，这与本实验的结果相似。另一方面是因为酞酸酯类化合物可被降解^[22]，而且生物降解是酞酸酯类化合物发生转化的主要方式。阎海^[23, 24]报道斜生栅藻能降解 DEP 和 DMP 并呈直线下降型的降解曲线，而蛋白小球藻降解 DEP 的曲线呈倒“V”型。这和本实验 DBP 积累表现有类似之处。可能在时间上龙须菜对中等长度侧链的酞酸酯如 DBP 的分解作用滞后于它的积累作用，最后呈现出这种倒“V”型积累曲线。可以推论这 4 种酞酸酯类在龙须菜藻体内的积累情况可能是上述两方面综合作用的结果，关于其机理还需要做进一步的研究。

据报道酞酸酯在海水中的质量浓度为 10~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[25]。作者认为在自然水体中酞酸酯对龙须菜的毒性作用不大，但它在龙须菜藻体内有一定程度的积累，特别是侧链较长的酞酸酯类可能通过食物链进入了人体，就会对人体健康构成潜在威胁，并且这类化合物的生产量每年都在增长，因此必须重视酞酸酯类化合物对海洋环境的污染。

4 结论

(1) 酞酸酯对龙须菜有一定致毒效应，这种致毒效应与酞酸酯的浓度呈正相关，随着混合的 DMP、DEP、DBP、DEHP 四种酞酸酯处理浓度的增加，龙须菜的相对生长率和叶绿素 a 含量都呈下降趋势。

(2) DMP、DEP、DBP 和 DEHP 4 种酞酸酯类在龙须菜体内有一定程度的积累，并且这种积累效应呈现一定的规律：侧链较长的酞酸酯比侧链较短的积累量要大。DEHP 在龙须菜藻体内的积累量随处理浓度的增加和时间推移都呈增加的趋势；DBP 的含量曲线在 30 d 的试验周期内呈倒“V”型；DMP 和 DEP 的含量一直处于低水平，高质量浓度 0.4 mg/L 处理组在 20 d 后有上升趋势。

致谢：特别感谢汕头大学海洋生物实验室南澳临海试验站陈伟州老师对本研究前期试验的大力支持和帮助。

参考文献：

- [1] 刘慧杰, 舒为群. 邻苯二甲酸酯类化合物的毒理学效应及对人群健康的危害[J]. 第三军医大学学报, 2004, 10: 1778-1781.
- [2] Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 361: 20-29.
- [3] Babich M A, Chen S B, Greene M A, *et al.* Risk assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from children's products [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004, 40: 151-167.
- [4] 胡晓宇, 张克荣, 孙俊红, 等. 中国环境中邻苯二甲酸酯类化合物污染的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 2: 9-14.
- [5] Yuan S Y, Liu C, Liao C S, *et al.* Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments [J]. *Chemosphere*, 2002, 49: 1295-1299.
- [6] 张蕴晖, 陈秉衡, 郑力行, 等. 环境样品中邻苯二甲酸酯类物质的测定与分析[J]. 环境与健康杂志, 2003, 9: 283-286.
- [7] 黄国兰, 孙红文, 高娟, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对大型蚤(*Daphnia magna*)的毒性作用研究[J]. 环境化学, 1998, 9: 428-433.
- [8] 况琪军, 赵文玉, 邓萍. DBP 对斜生栅藻及天然混合藻类致毒效应研究[J]. 水生生物学报, 2003, 1: 103-105.
- [9] 王曙光, 林先贵, 尹睿. 土壤中酞酸酯(PAEs)对丛枝菌根化植物生长的影响[J]. 农村生态环境, 2003, 19(1): 31-35.
- [10] Dueck T A, Van Dijk C J, David F, *et al.* Chronic effects of vapour phase di-*n*-butyl phthalate (DBP) on six plant species [J]. *Chemosphere*, 2003, 53: 911-920.
- [11] Chen W L, Sung H H. The toxic effect of phthalate esters on immune responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 74: 160-171.
- [12] 杨宇峰, 宋金明, 林小涛, 等. 大型海藻栽培及其在近海环境的生态作用[J]. 海洋环境科学, 2005, 8: 77-80.
- [13] 杨宇峰, 费修纛. 大型海藻对富营养化海水养殖区生物修复的研究与展望[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 1: 53-57.
- [14] Troell M, Halling C, Nilsson A, *et al.* Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariiales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output [J]. *Aquaculture*, 1997, 156: 45-61.
- [15] 邹定辉, 高坤山, 阮祚禧. 高 CO_2 浓度对石莼光合作用及营养盐吸收的影响[J]. 青岛海洋大学学报,

- 2001, 11: 877-882.
- [16] 于志刚, 张经, 张耀红, 等. 提取测定大型海藻叶绿素 a 的新方法[J]. 海洋科学, 1997, 5: 1-2.
- [17] 尹壑, 林先贵, 王曙光. 土壤中 DBP/DEHP 污染对几种蔬菜品质的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 1-5.
- [18] 王晓娟, 陈家宽. 环境激素 DBP 对拟南芥试管形态发生的影响[J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 1889-1893.
- [19] 解玮, 蒋颂辉, 屈卫东, 等. DEHP/DBP 内分泌干扰活性的实验研究[J]. 中国环境科学, 2004, 24(1): 45-48.
- [20] 国伟林, 王西奎. 环境中酞酸酯的分析测定及其迁移、转化研究[J]. 山东建材学院学报, 1996, 9: 39-42.
- [21] 曾巧云, 莫测辉, 蔡全英, 等. 菜心对邻苯二甲酸酯 PAEs 吸收途径的初步研究[J]. 农业工程学报, 2005, 8: 137-141.
- [22] Chang B V, Yang C M, Cheng C H, *et al.* Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains[J]. *Chemosphere*, 2004, 55: 533-538.
- [23] 阎海, 叶常明, 雷志芳, 等. 蛋白核小球藻与 DEP 的相互作用[J]. 环境科学, 1995, 10: 23-25.
- [24] 阎海, 雷志芳, 叶常明. 斜生栅藻降解邻苯二甲酸二甲酯和苯胺的动力学研究[J]. 环境科学学报, 1998, 3: 216-220.
- [25] 甘健彪. 邻苯二甲酸酯的环境激素行为与测定[J]. 福建环境, 2002, 10: 50-51.

Study on the ecological toxicology of PAEs to seaweed *Gracilaria lemaneiformis*

WU Zhihui¹, YANG Yufeng¹, NIE Xiangping¹, LI Guirong², LI Kaibin³

(1. Institute of the Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Received: Feb., 23, 2006

Key words: phthalate esters; *Gracilaria lemaneiformis*; toxic effect; accumulation

Abstract: The effects of phthalate esters (PAEs) on the growth of *Gracilaria lemaneiformis*, as well as the accumulation of PAEs in the seaweed, were studied by a series of indoor experiments. Results showed that the relative growth rate (R_{GR}) and the chlorophyll a (Chl a) content of *G. lemaneiformis* were notably affected when exposed to the mixture of Dimethyl phthalate (DMP), Diethyl phthalate (DEP), Dibutyl phthalate (DBP) and Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) at the concentrations of 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 mg/L and the toxic effect of PAEs on the seaweed increased with the increasing of concentrations of PAEs. When the concentration of PAEs was 0.1~0.4 mg/L, the RGR and Chl a contents decreased by 18.4%~21.3% and 10.4%~15.3%, respectively, as compared to control treatment. Analysis by means of gas chromatography (GC) showed that these four PAEs were accumulated in the seaweed to some extent, and the residues of DMP, DEP, DBP and DEHP were 0~0.14 mg/kg, 0.23~0.83 mg/kg, 0~1.32 mg/kg and 0.38~9.72 mg/kg, respectively. Results indicated that the molecular structure of PAEs had a significant relationship with the accumulation of PAEs in sea algae, longer side chain PAEs were accumulated more in *G. lemaneiformis* than the shorter ones did, and the amounts of these PAEs increased with increasing the exposed concentrations and time.

(本文编辑:张培新)