

硝基苯和间苯二酚对 3 种海洋微藻的毒理效应

王洪斌¹, 花文凤¹, 李信书¹, 李士虎¹, 阎斌伦²

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 通过研究硝基苯和间苯二酚对海洋微藻的毒理效应, 旨在提示化工废水污染对水环境破坏的严重性, 揭示海洋微藻类净化废水的潜在应用。本试验用塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)和绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)为供试藻种, 以微藻生长量及叶绿素 a 的变化为参数, 研究不同质量浓度的硝基苯和间苯二酚对 3 种海洋微藻的毒理效应。结果表明: 硝基苯对塔玛藻和巴夫藻的生长具有一定的抑制作用, 质量浓度为 12mg/L 时抑制率分别为 22.9% 和 20.04%, 但对海链藻的生长在一定程度上有促进作用。间苯二酚对海链藻和巴夫藻的生长具有抑制作用, 质量浓度为 12mg/L 时其抑制率分别为 26.11% 和 23.6%, 对塔玛亚历山大藻的生长有一定的促进作用。对塔玛亚历山大藻和巴夫藻而言, 在硝基苯质量浓度为 3mg/L 时, 叶绿素 a 含量均达到最低, 其叶绿素 a 含量分别为对照组的 68.6% 和 50.9%, 对于海链藻, 硝基苯对其叶绿素 a 的影响波动不大。间苯二酚对 3 种海洋微藻叶绿素 a 含量的影响为绿色巴夫藻>海链藻>塔玛亚历山大藻, 其叶绿素 a 含量分别是对照组的 1.1%, 24.9%, 88%。

关键词: 硝基苯; 间苯二酚; 海洋微藻; 叶绿素 a; 毒理效应

中图分类号: Q89 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)05-0039-06

藻类作为海洋和内陆水体中重要的初级生产者, 在整个生态系统中有着举足轻重的地位。微藻具有很重要的生态价值^[1-2], 微藻在海洋生物中约占 40.86%, 其比重非常之大。微藻中固定碳的量约占全球有机物中的 50%^[3]。同时很多天然的产品都来源于微藻^[4]。近年来, 化工废水污染越来越严重, 已经威胁到人类的生存环境, 化学物质通过各种途径污染水体, 第一个受害者就是藻类生物。从环境学角度来看, 研究化学物质对藻类的毒理效应至关重要。自从 20 世纪 60 年代以来, 国外许多学者在这方面进行了大量的工作, 积累了丰富的资料, 并取得了较为满意的结果。在水环境中, 藻类一旦富集化学物质, 便进入食物链, 经过生物逐级放大, 将危及水生动物和人类的健康。

本文以塔玛亚历山大藻、海链藻和绿色巴夫藻作为供试藻种, 通过 2 种不同浓度的化学试剂对 3 种海洋微藻的生长及叶绿素 a 合成的影响, 研究其对微藻的毒理效应, 旨在提示化学物质污染对水体危害的严重性, 揭示海洋微藻净化废水的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

藻种塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)、绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)均为淮海工学院海洋学院海藻实验室保存种。海水培养液采用 f/2 加富海水, 微藻培养所用海水采自连云港高公岛海域(盐度约 31.00~32.00)涨潮时, 醋酸纤维薄膜过滤, 在 121℃ 下 20 min 灭菌待用。

硝基苯溶液: 取 0.025mL 硝基苯于 100mL 烧杯中, 加适量蒸馏水溶解, 转至 100mL 容量瓶, 定容至 100mL, 然后移至 250mL 锥形瓶备用。

间苯二酚溶液: 称取 0.03g 间苯二酚于 100mL 烧杯中, 加适量蒸馏水溶解, 转至 100mL 容量瓶, 定容至 100mL, 然后移至 250mL 锥形瓶备用。

收稿日期: 2012-06-25; 修回日期: 2012-12-22

基金项目: 国家科技部“十二五”科技支撑项目(2011BAD13B03); 江苏省科技厅苏北科技发展计划项目(BN2011035)

作者简介: 王洪斌(1966-), 男, 博士研究生, 副教授, 研究方向为微生物生物技术及基因工程, E-mail: lygwhbly@126.com

1.2 方法

1.2.1 微藻培养方法

藻种在 f/2 培养液中培养到指数生长期接种物。微藻不通气静止培养, 采用 f/2 海水培养液, 在无菌条件下将 20 mL 处于对数期的藻种接种于装有 180 mL f/2 培养液的 500 mL 的锥形瓶中, 光照度为 3000 lx, 明暗周期 12 h /12 h, 每日定时摇动 3 次, (23 ± 1) °C 下培养^[5]。

1.2.2 微藻生长测定

取培养至第 4d 的藻液 200 mL, 分别加入 0mL、1 mL、2 mL、4 mL、8 mL 已配好的硝基苯溶液, 使硝基苯质量浓度分别为 0、1.5、3、6、12mg/L 5 个梯度, 间苯二酚实验同硝基苯, 采用吸光度法定时对其生长进行测定。每个实验设 3 个平行组。

吸光度的测定: 以接种时刻为初始时间开始测定, 每天取出 5 mL 藻液。以蒸馏水为空白对照, 分别在 680 nm 波长下测定每种藻 A 值。连续 7d。

比生长速率计算: $K = (\ln N_t - \ln N_0) / T$ 。其中 K 为比生长速率, N_0 为藻液起始浓度, N_t 为培养 t 时间后的藻液浓度, T 为培养时间(h)。

1.2.3 微藻叶绿素 a 含量测定

采用热乙醇萃取分光光度法^[6]取 10mL 培养至 20d 的共培养藻液, 5000r/min 离心 5min, 弃上清液, 取沉淀-20 °C 下冷冻 12h。取出后迅速用 9mL 95%乙醇(80 °C 预热)于 80 °C 热水浴萃取 2min, 超声波清洗仪超声振荡处理 10min, 于 4 °C 黑暗静置 6h 后, 5000r/min 离心 5min, 取上清, 用分光光度计于波长 665nm 和 750nm 分别测定 A 值, 加入 1mol/L 盐酸酸化, 于波长 665nm 和 750nm 处再分别测定 A 值, 按下列公式计算叶绿素含量。

$$\text{Chla}_{\text{乙醇}} = 27.9 \times [(E_{665} - E_{750}) - (A_{665} - A_{750})] \times V_{\text{乙醇}} / V_{\text{藻样}}$$

式中, $\text{Chla}_{\text{乙醇}}$ 为乙醇法测定的叶绿素 a 质量浓度 ($\mu\text{g/L}$); E_{665} 为乙醇萃取液于波长 665nm 的吸光值; E_{750} 为乙醇萃取液于波长 750nm 的吸光值; A_{665} 为乙醇萃取液酸化后于波长 665nm 的吸光值; A_{750} 为乙醇萃取液酸化后于波长 750nm 的吸光值; $V_{\text{乙醇}}$ 为乙醇萃取液的体积(mL); $V_{\text{藻样}}$ 为藻样的体积(L)。

2 结果与分析

2.1 硝基苯对 3 种海洋微藻生长量的影响

2.1.1 塔玛亚历山大藻 (*A. tamarensis*)

低质量浓度的硝基苯对 *A. tamarensis* 抑制作

用不明显, 随着培养时间的延长, *A. tamarensis* 的生长量虽然都在增长, 但硝基苯质量浓度越高, *A. tamarensis* 的比生长速率越小。对照组生长最好, 在硝基苯质量浓度为 12mg/L 时抑制现象最为明显, 与对照组比较, 抑制率达 22.3%, 这与杜庆才等^[7]和沈洛夫等^[8]的研究结论一致。结果见图 1。

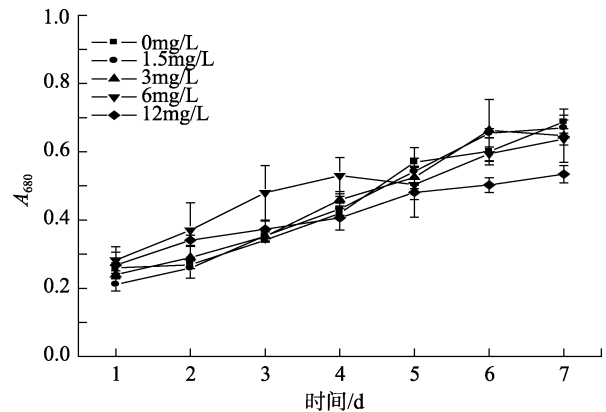


图 1 不同质量浓度硝基苯对 *A. tamarensis* 生长量的影响
Fig. 1 Effect of different concentration of nitrobenzene on the growth of *A. tamarensis*

2.1.2 海链藻 (*T. weissflogii*)

随着培养时间的增加, 不同质量浓度的硝基苯条件下, *T. weissflogii* 的生长量有一个先降后升的趋势, 这可能是微藻对硝基苯有一个短暂的适应期。整体来看, 硝基苯对 *T. weissflogii* 的抑制现象不及另外 2 种藻明显, 从其生长曲线图(图 2)可以看出, 它反而有一定的促进作用, 这与杜庆才等^[7]的研究结论不一致, 可能由于海洋微藻得的种属差异对硝基苯

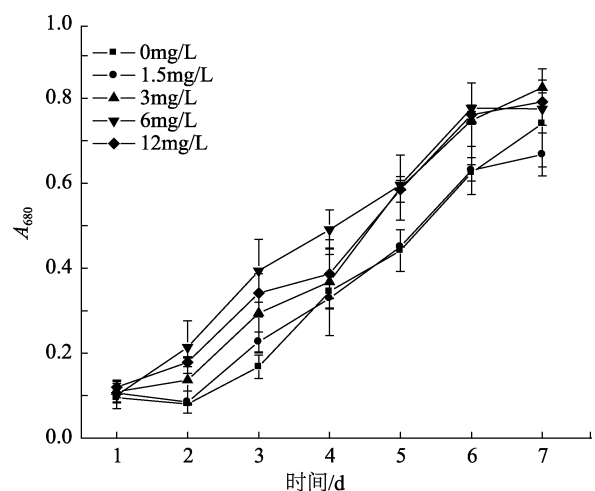


图 2 不同质量浓度硝基苯对 *T. weissflogii* 生长量的影响
Fig. 2 Effect of different concentration of nitrobenzene on the growth of *T. weissflogii*

的毒性作用产生差异, 尚有待进一步研究。硝基苯质量浓度的增大对 *T. weissflogii* 的比生长速率影响不明显, 由图 2 可以看出, 对照组及 1.5mg/L 组在第 7 天时生长量最低, 其他 3 组均高于对照组水平。

2.1.3 绿色巴夫藻(*P. viridis*)

由图 3 可知, 对照组生长最好, 硝基苯的添加对 *P. viridis* 的生长有抑制作用, 随着硝基苯质量浓度的增大, 对 *P. viridis* 的生长量抑制越明显。硝基苯质量浓度为 12mg/L 时, 抑制率相对于对照组达到了 20.04%, 在其他质量浓度下, 相对于对照组的抑制率都在 9% 左右。所以, 对于 *P. viridis*, 硝基苯抑制作用呈现剂量效应。

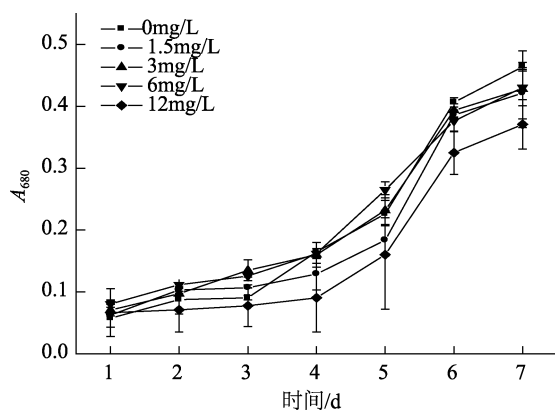


图 3 不同质量浓度硝基苯对 *P. viridis* 生长量的影响

Fig. 3 Effect of different concentration of nitrobenzene on the growth of *P. viridis*

2.2 间苯二酚对 3 种海洋微藻生长量的影响

2.2.1 塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*)

加间苯二酚后, *A. tamarense* 的生长并没有和预计的一样受到明显抑制, 反而是添加一定量的间苯二酚, 其生长更好, 不同质量浓度的间苯二酚对其均有一定的促进作用, 且在间苯二酚质量浓度为 3mg/L 时, *A. tamarense* 的生长量高于对照组 13.26%。此结论与许文武等^[9]有差异, 是否说明 *A. tamarense* 在生长代谢过程中能利用间苯二酚有待证实, 但揭示了海洋微藻在处理化工废水方面有潜在的应用前景。由图 4 可知, 在质量浓度为 3mg/L 时, 第 7 天生长量达到了最高, 高于对照组 13.26%, 间苯二酚质量浓度高于 3mg/L 时, 它的促进率又有所下降。

2.2.2 海链藻(*T. weissflogii*)

由图 5 可知, 除个别数据外, 随着间苯二酚质量浓度的增加, *T. weissflogii* 的生长量整体受到抑制,

质量浓度越大, 抑制现象越明显。间苯二酚的质量浓度为 12mg/L 时, 第 7 天时生长量相对于对照组的抑制率最大, 生长量只有对照组的 73.9%。

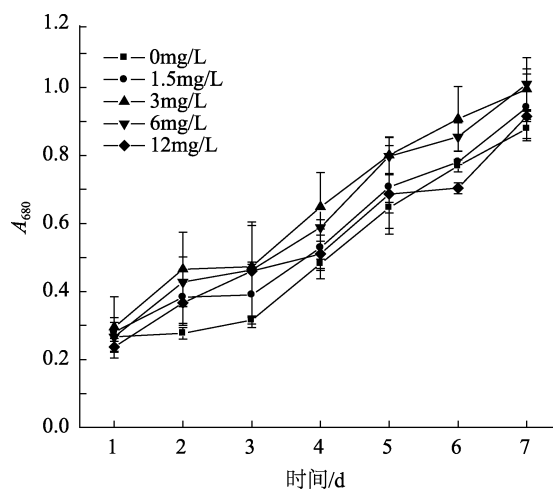


图 4 不同质量浓度间苯二酚对 *A. tamarense* 生长量的影响

Fig. 4 Effect of different concentration of resorcinol on the growth of *A. tamarense*

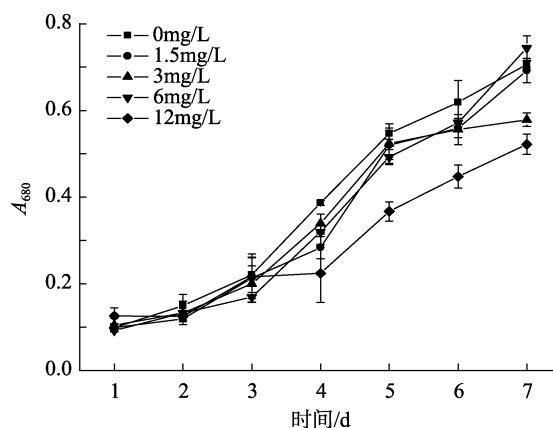


图 5 不同质量浓度间苯二酚对 *T. weissflogii* 生长量的影响

Fig. 5 Effect of different concentration of resorcinol on the growth of *T. weissflogii*

2.2.3 绿色巴夫藻(*P. viridis*)

由图 6 可知, 对照组如预期的一样生长的最好, 随着间苯二酚质量浓度的增加, *P. viridis* 的生长量相对于对照组的抑制率逐渐增大, 当间苯二酚的质量浓度为 6mg/L 时, 生长量是对照组的 76.4%, 相对于其他实验组抑制率最大。

2.3 硝基苯对 3 种海洋微藻叶绿素 a 的影响

加硝基苯的实验组相对于对照组, *A. tamarense*

叶绿素 a 的含量均有下降趋势,波动较大,在 3mg/L 实验组,叶绿素 a 含量最低,仅为对照组的 68.6%, 1.5mg/L 实验组叶绿素 a 的含量相对最高,为对照组的 89.7%; 硝基苯对 *T. weissflogii* 叶绿素 a 的抑制现象不明显,而在 6mg/L 实验组,还促进了 *T. weissflogii* 叶绿素 a 含量增长,高出对照组的 0.7%,在硝基苯质量浓度为 12mg/L 时,叶绿素 a 含量受到抑制,为对照组的 89.17%,与上述的生长量实验结论是一致的; *P. viridis* 所有实验组中,叶绿素 a 含量均小于对照组,也就是说硝基苯对 *P. viridis* 叶绿素 a 起到了抑制作用,在 12mg/L 时,抑制率最大,叶绿素 a 的含量达到最低,仅为对照组的 41%。硝基苯对 3 种海洋微藻叶绿素 a 含量的影响(图 7)主要表现在降低叶绿素 a 的合成量,其中对 *A. tamarensis* 和 *P. viridis* 叶绿素 a 含量的影响呈现一定的剂量效应,而对于 *T. weissflogii*, 硝基苯对

其叶绿素 a 的影响波动不大,结论与相关文献报道不一致,有待深入研究。

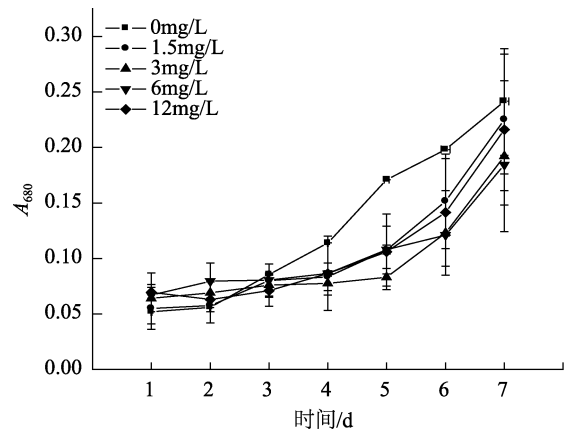


图 6 不同质量浓度间苯二酚对巴夫藻生长量的影响
Fig. 6 Effect of different concentration of resorcinol on the growth of *P. viridis*

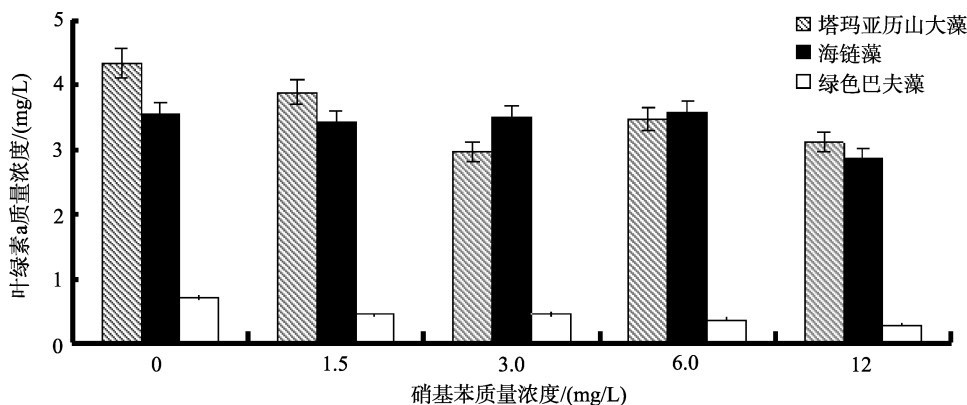


图 7 不同质量浓度硝基苯对 3 种微藻叶绿素 a 含量的影响
Fig. 7 Effect of different concentration of nitrobenzene on the content of Chlorophyll a of 3 marine microalgae

2.4 间苯二酚对三种海洋微藻叶绿素 a 的影响

由图 8 可知,加间苯二酚后,各实验组 *A. tamarensis* 的叶绿素 a 含量均小于对照组,但影响不明显,6mg/L 组与 12mg/L 组的叶绿素 a 的含量分别为对照组的 90.14%、92%,与上述生长量结论一致。间苯二酚对 *T. weissflogii* 叶绿素 a 含量的影响随质量浓度的增大而增大,与对照组相比, *T. weissflogii* 各实验组叶绿素 a 含量均有所下降,6mg/L 组与 12mg/L 组的叶绿素 a 的含量分别为对照组的 58%、52%。相比较 *A. tamarensis* 和 *T. weissflogii*, 间苯二酚对 *P. viridis* 叶绿素 a 的影响更明显,随着间苯二酚质量浓

度的增加,叶绿素 a 的含量在逐渐下降,且在质量浓度为 12mg/L 时,叶绿素 a 含量最低,仅为对照组的 1.1%。

3 结论

不同质量浓度的 2 种化学物质对供试的 3 种海洋微藻的生长均有一定程度的影响。其中硝基苯对 *A. tamarensis* 和 *P. viridis* 的生长抑制作用随硝基苯质量浓度的增加抑制越明显。硝基苯对 *T. Weissflogii* 生长有一定的促进作用。间苯二酚对 *T. weissflogii* 和 *P. viridis* 的生长抑制作用随间苯二酚质量浓度的增加抑制越明显。而对于 *A. tamarensis*, 不同质量浓度的间苯二酚对其生长均有一定的促进作用。

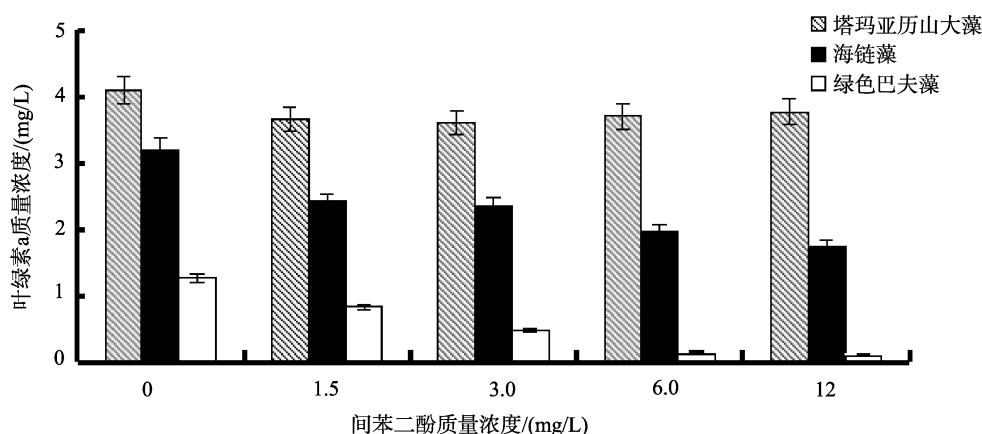


图 8 不同质量浓度间苯二酚对 3 种微藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 8 Effect of different concentration of resorcinol on the content of Chlorophyll a of 3 marine microalgae

硝基苯对 *A. Tamarensis* 和 *P. Viridis* 叶绿素 a 含量的影响呈现一定的剂量效应, 对 *T. Weissflogii* 叶绿素 a 的影响不大; 间苯二酚对 3 种海洋微藻叶绿素 a 含量影响程度有所差异, 其中对 *A. tamarensis* 影响极不明显。

T. Weissflogii 和 *A. tamarensis* 在含硝基苯和间苯二酚组分的化工废水处理方面具有一定的潜在应用价值。

参考文献:

- [1] 曹春晖, 孙世春, 麦康森, 等. 30 株海洋绿藻的总脂含量和脂肪酸组成[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 428-434.
- [2] 江红霞, 郑怡. 8 种微藻抗菌活性研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2002, 18(2): 117-120.
- [3] Field C B, Behrenfeld M J, Randerson J T, et al. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components [J]. Science, 1998, 281(5374):

237-240.

- [4] Richmond A. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology [M]. USA: Blackwell Publishing Company, 2003: 359-360.
- [5] 王洪斌, 成明, 盛菊, 等. 6 种微藻生长及脂肪累积对氮含量变化的响应[J]. 水产科学, 2012, 31(2): 79-82.
- [6] 陈宇炜, 高锡云. 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较测定[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2): 185-188.
- [7] 杜庆才, 张德禄, 王高鸿, 等. 莱茵衣藻生长和光合作用对硝基苯的响应[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2007, 43(3): 71-74.
- [8] 沈洛夫, 姜建国, 林庆生, 等. 硝基芳烃类物质对盐藻的毒性试验及比较[J]. 海洋科学, 2006, 30(5): 15-17.
- [9] 许文武, 孟菁, 胡威, 等. 5 种酚类化合物对 3 种水生生物的毒性作用[J]. 环境化学, 2011, 30(10): 1751-1757.

The toxicological effects of nitrobenzene and dihydroxybenzene on three kinds of marine microalgae

WANG Hong-bin¹, HUA Wen-feng¹, LI Xin-shu¹, LI Shi-hu¹, YAN Bin-lun²

(1. Marine College, HuaiHai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China)

Received: Jun.,25,2012

Key words: nitrobenzene; dihydroxybenzene; marine microalgae; Chlorophyll a; Toxicological effect

Abstract: The investigation of toxicological effects of nitrobenzene and dihydroxybenzene on marine microalgae was designed to tip the severity of damage by chemical wastewater pollution in the aquatic environment and revealed potential application of marine microalgae in the purification of wastewater. Using the *Alexandrium tamarense*, *Thalassiosira weissflogii* and *Pavlova viridis* as tested species, microalgae growth and chlorophyll a changes as parameters, the toxicological effects of different concentrations of nitrobenzene and dihydroxybenzene on these three kinds of marine microalgae were studied. The results showed that nitrobenzene had inhibitory effect on the growth of *A. tamarense* and *P. viridis* and the inhibition rates were 22.9% and 20.04%, respectively at the concentration of 12 mg/L, but had stimulative effect on the growth of *T. weissflogii* in some extent. Dihydroxybenzene had inhibitory effect on the growth of *T. weissflogii* and *P. viridis* and the inhibition rates were 26.11% and 23.6% at the concentration of 12 mg/L, but had a stimulative effect on the growth of *A. tamarense*. The content of chlorophyll a in the *A. tamarense* and *P. viridis* reached the minimum at the nitrobenzene concentrations of 3 mg/L, and they were 68.6% and 50.9% of the control group respectively, but less effect on that of *T. weissflogii*. Dihydroxybenzene had some effect on the content of chlorophyll a in the three kinds of marine microalgae: *P. viridis* > *T. weissflogii* > *A. tamarense*, with chlorophyll a concentration of 1.1%, 24.9%, 88% respectively of the control group.

(本文编辑: 梁德海)