

# 1,4-二氯苯的细胞毒性效应及在角毛藻中的富集

石瑛<sup>1</sup>, 杜青平<sup>2</sup>

1. 太原师范学院生物系, 山西 太原 030001; 2. 广东工业大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510006

**摘要:**以 1,4-二氯苯(1,4-DCB)处理后,角毛藻 *Chaetoceros mulleri* 的生长状况,藻体细胞的形态改变,及角毛藻中对 1,4-DCB 的富集能力,来检测 1,4-DCB 对海洋微藻的毒性效应。结果表明:1,4-DCB 对角毛藻的生长有一定抑制作用,该效应表现出一定的质量浓度和时间依赖性;1,4-DCB 处理后,角毛藻细胞能明显富集 1,4-DCB,该富集能力与环境 1,4-DCB 的质量浓度有关;而且角毛藻藻细胞形态受到 1,4-DCB 的损伤。这表明 1,4-DCB 污染后能在角毛藻细胞内富集并对其产生细胞毒害效应,且受有机物污染后藻类作为饵料的价值降低。

**关键词:** 1,4-二氯苯;角毛藻;富集;细胞形态

**中图分类号:** X503.225

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1674-5906 (2009) 06-2023-04

1,4-二氯苯(1,4-DCB)是一种氯代芳香烃类化合物,主要用作防蛀剂和除臭剂等的生产原料和中间体<sup>[1-2]</sup>,在水体中广泛存在,对水生态环境有巨大影响<sup>[3-4]</sup>。藻类作为水生态系统的初级生产者,对生态系统处于平衡和稳定状态起着极其重要的作用。而藻类也因生长周期短、易于分离培养和直接观察细胞水平的毒性症状,是一种较理想的试验材料<sup>[5-6]</sup>。目前角毛藻 *Chaetoceros mulleri* 是海水养殖经济动物生产中最常用的天然优质饵料。在育苗的生产实践中,水体消毒或防治病害等都会用到农药和其它添加剂,而其中 1,4-DCB 是一种主要的有机污染物。研究发现,1,4-DCB 对皮肤具有一定的刺激作用,长时间,高浓度接触 1,4-DCB 有肝、肾毒性<sup>[7]</sup>,也可能损害甲状腺<sup>[8]</sup>,并具有潜在的“三致”作用<sup>[9]</sup>。在水生环境中,1,4-DCB 会导致蛋白核小球藻叶绿素和蛋白质含量的改变<sup>[10]</sup>,引起金鱼藻抗氧化酶活性的改变<sup>[11]</sup>,但是有关 1,4-DCB 对藻类细胞形态及其在藻类细胞中的富集作用的研究还未见报道。因此本实验研究了角毛藻对 1,4-DCB 的富集及 1,4-DCB 对藻类细胞产生的毒性症状,为进一步研究 1,4-DCB 的细胞毒性作用机理提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**实验藻种:**角毛藻 *Chaetoceros mulleri* 由中国科学院南海海洋研究所提供。经实验室驯化培养后,取指数生长期的健康藻种。

**仪器:**HP6890 气相色谱仪,配以化学工作站及 <sup>63</sup>Ni 型电子捕获检测器(ECD);旋转蒸发器(Heidolph Laborota 4000);冷冻干燥仪;光学显微镜。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 藻种培养与药物处理

实验用海水取自深圳大亚湾水域的天然海水,经沉淀、滤膜过滤,煮沸消毒后备用;实验淡水用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,配成实验用海水,最后进行高压消毒。

培养液成分采用 f/2 配方。培养容器为 500 mL 的三角烧瓶。实验中 1,4-DCB 的添加量分别为 0(对照组)、1、5、10、15 mg·L<sup>-1</sup>;每个质量浓度各设 3 个平行组。取处于指数生长期的藻种,在(28±2)℃、530~1200 lx 的条件下进行培养。光周期为 10 h:14 h,海水盐度 27‰。培养期间每天定时摇藻 3 次,培养 5 d。

#### 1.2.2 富集实验

将经过驯化培养达到稳定期的角毛藻离心浓缩,使藻胞密度达到 1×10<sup>8</sup>~1×10<sup>9</sup> 个/mL。于 10 mL 具塞试管中加入 2 mL 藻液及一定量的受试化合物,并加培养液使总体积达到 10 mL。受试物的质量浓度为 1~5 mg/L(约为 48 h 半数抑制质量浓度的 10%~50%)。以未加藻液的加药试管为对照。每个样品及对照设 4 个平行。所有样品置于恒温振荡器中振荡培养(25±1)℃。分别于 0, 1, 5, 10, 20 h 取出 8 支试管(含 4 个对照),高速离心 5 min 以去除藻胞。从每支试管中取出 5 mL 上清液,加入 1 mL 正己烷萃取 10 min,用气相色谱仪(GC)测定 1,4-DCB 的含量。生物富集量(mg/g)=(对照组含量-样品组含量)/藻胞干质量。

#### 1.2.3 藻的干质量测定

取一定体积已知藻密度藻液于 0.45 μm 滤膜过

**基金项目:**国家自然科学基金项目(30470118);山西省高校科技开发项目(2007147)

**作者简介:**石瑛(1974年生),女,副教授,研究方向为植物资源与环境保护。

\*通讯作者, E-mail: qpdu2008@126.com; lucia0812@sohu.com

**收稿日期:** 2009-10-07

滤, 滤膜在 103 °C 烘箱内干燥至恒质量后, 计算出藻的干质量。

#### 1.2.4 气相色谱条件

GC-ECD 分析: 仪器带  $^{63}\text{Ni}$  电子俘获监测器, 毛细柱为(AC5), 柱长 30 m, 内径为 0.25 mm, 固定相膜厚 0.22  $\mu\text{m}$ ; 载气为高纯氮气(纯度  $\geq 99.999\%$ ), 柱子流量为 1.25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 补充气流量 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 隔点吹扫流量 3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样口柱压为 120 kPa, 进样口温度 250 °C, 程序升温: 初始温度 50 °C (稳定 3 min), 以 2 °C/min 程序升温至 80 °C; 再以 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  上升至终温 250 °C, 保持 10 min。进样量: 2  $\mu\text{L}$ 。数据采集与处理使用: HW-2000 型色谱工作站 2.07 版<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.5 细胞形态观察

经 1,4-DCB 处理 48 h 后, 分别在光学显微镜下观察细胞形态的改变, 记录毒性效应的特征。

### 1.3 实验数据的统计与分析

试验重复 3 次, 每次每组 3 个重复样品, 对所得数据数据采用  $(\bar{x} \pm s)$  表达, 用 SPSS10.0 软件进行  $t$  检验, 检测不同质量浓度处理组与阴性对照组间的差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 1,4-DCB 对角毛藻生长的影响

不同质量浓度 1,4-DCB 处理后, 角毛藻的生长曲线发生改变, 结果见图 1。

从图 1 可见, 随着 1,4-DCB 处理时间延长, 各密度组的藻细胞生长变化趋势不同。在低质量浓度 1,4-DCB (1, 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组) 处理后, 细胞生长速度在 3 d 内高于对照组, 在 3 d 后细胞生长速度减慢。表明低质量浓度的 1, 4-DCB 对藻细胞生长表现出短暂的“兴奋效应”。1,4-DCB 高质量浓度组 ( $> 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 细胞的生长从第 2 天就受到较强的抑制, 尤其是 15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  1,4-DCB 组, 藻细胞的生长

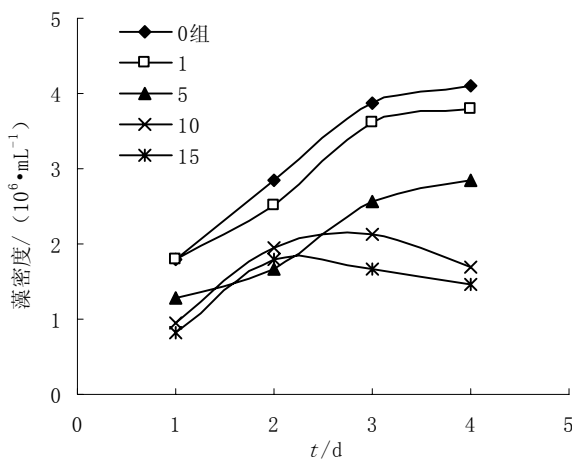


图1 1,4-DCB 对角毛藻生长的影响  
Fig.1 Effect of 1,4-DCB on the growth of *Chaetoceros mulleri*

速度缓慢, 甚至随着药物处理时间延长, 细胞的死亡速度大于生长速度, 细胞数量开始减少。这种抑制作用呈现一定的时间—效应和剂量—效应的关系(图 2)。用概率单位法计算 1,4-DCB 对角毛藻生长的 48h- $\text{EC}_{50}$  为 10.72  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 96h- $\text{EC}_{50}$  为 9.12  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

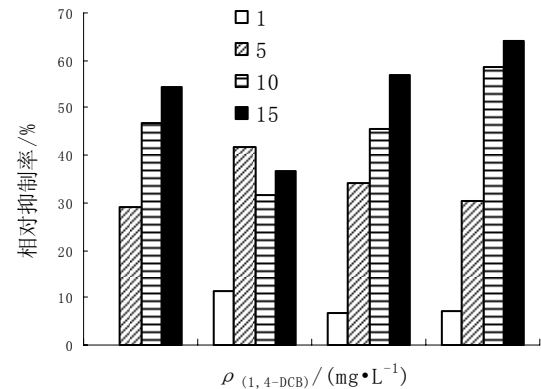


图2 1,4-DCB 对角毛藻生长的抑制率  
Fig.2 Inhibition rate of 1,4-DCB on *Chaetoceros mulleri* growth

### 2.2 角毛藻对 1,4-DCB 的富集

角毛藻受不同质量浓度 1,4-DCB 处理后, 会在藻细胞内富集代谢, 其生物富集曲线见图 2。

从图 2 可见, 角毛藻对 1,4-DCB 具有明显的富集作用, 但其富集量的变化因 1,4-DCB 质量浓度而异。角毛藻藻细胞对初始质量浓度为 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  各组处理溶液中 1,4-DCB 的富集在 5 h 之前富集速度比较快。随着处理时间延长, 富集速度稍有下降, 但是富集量持续上升。产生这种富集趋势的原因可能是低质量浓度时 1,4-DCB 不仅对藻的毒性相对较低, 而且还具有一定的刺激生长作用, 但是随着时间延长藻体细胞对 1,4-DCB 富集, 与藻体对 1,4-DCB 降解能力发生变化以及藻细胞密度增大等有关。

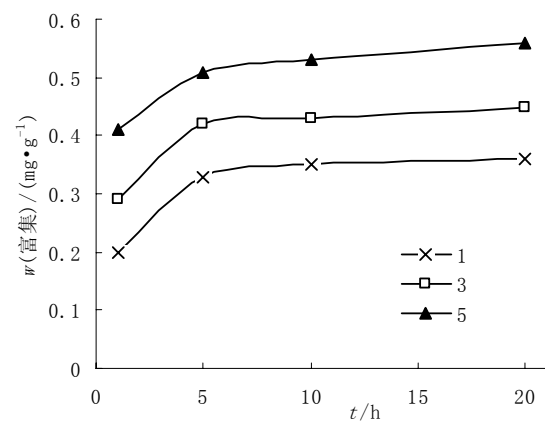


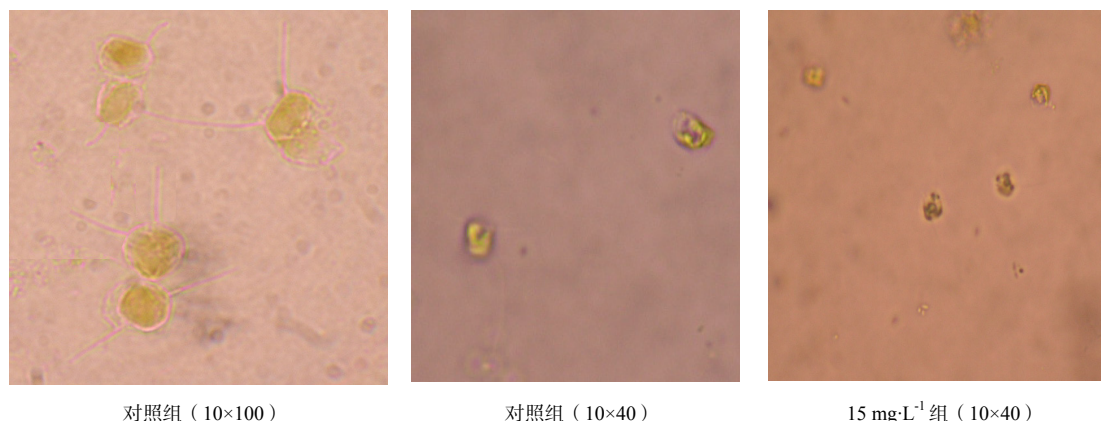
图3 角毛藻对 1,4-DCB 的富集  
fig.3 Bioconcentration of 1,4-DCB in *Chaetoceros mulleri*

### 2.3 1,4-DCB 对角毛藻细胞形态的毒性效应

在光学显微镜下(10×40倍)对1,4-DCB处理后的藻体细胞形态进行观察,发现在1,4-DCB作用下,角毛藻细胞形态发生了变化。

从图4中可见,对照组的角毛藻都具有明显的

角毛,运动能力强;而1,4-DCB处理后,毒性主要表现在(1)有的角毛藻的角毛脱落,运动能力下降。(2)受伤害的角毛藻细胞质膜不完整,甚至细胞质基质成分外流,尽余细胞壁或者细胞壁残体,细胞的生命活动终止;(3)有些胞质中有色质



对照组(10×100)

对照组(10×40)

15 mg·L<sup>-1</sup>组(10×40)

图4 光学显微镜下1,4-DCB处理后,角毛藻的细胞形态改变

Fig.4 The cellular morphological changes of *Chaetoceros mulleri* treated by 1,4-DCB

体多聚集一边,类囊体片层稀疏、模糊解体,有些质体破损,游离到培养液中,藻液颜色变淡。

### 3 结论

单胞藻的培养是养殖育苗的重要环节,丰富的单胞藻饵料是虾类和贝类幼体培育的基本保证。而有机物对环境的污染使藻类作为饵料的营养价值受到影响。本文对1,4-DCB处理后,角毛藻的生长状况、藻细胞对1,4-DCB的富集能力,藻细胞形态改变进行了研究。结果表明,1,4-DCB处理对藻类的生长有一定的抑制作用,藻类生长的相对抑制率随着1,4-DCB处理质量浓度的增大而增大。而且藻细胞能够富集1,4-DCB,1,4-DCB使角毛藻的细胞形态损伤,细胞的生活能力下降。

本论文结果提示1,4-DCB污染后不但直接使角毛藻的质量降低,而且1,4-DCB在藻体中积累和转移。受1,4-DCB毒害的藻类作为贝类和部分虾类的饵料生物,对食物链的其他生物具有潜在的危害。这表明有机物的污染会降低藻类作为饵料的利用价值。

### 参考文献:

[1] 刘征涛. 持久性有机污染物的主要特征和研究进展[J]. 环境科学研究, 2005, 18(3): 93-102.  
LIU Zhengtao. Environmental Behavior Characteristics and Research Progress of Persistent Organic Pollutants. Research of Environmental Sciences, 2005, 18(3): 93-102.

[2] IPCS. Environmental health criteria 128. Chlorobenzenes other than hexachlorobenzene. Geneva: International programme on chemical safety[R]. World Health organization, 1991.

[3] 杜青平, 魏泰莉, 李适宇, 等. 氯苯类化合物在珠江水系的西江(广

东段)水体和水草中的分布现状[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(6): 93-97.

DU Qingping, WEI Taili, LI Shiyu, et al. Distribution of chlorobenzenes in water and waterseeds of Xijiang Branch(Gangdong section) of the Pearl River[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2007, 46(6): 93-97.

[4] 魏泰莉, 贾晓珊, 杜青平, 等. 珠江口水, 沉积物及水生动物中氯苯类有机物的含量及分布[J]. 环境科学学报, 2007, 27(10): 1717-1726.

WEI Taili, JIA Xiaoshan, DU Qingping, et al. Chlorobenzenes in the waters, sediments and aquatic animals from the Pearl River Estuary [J]. Acta Scientia Circumstantiae, 2007, 27(10): 1717-1726.

[5] MOSTAFA M E, KOTKAT H M, HAMMOND O H E. Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1994, 29(3): 349-358.

[6] 沈国兴, 严国安, 彭金良, 等. 农药对藻类的生态毒理学研究 II: 毒性机理及其富集和降解[J]. 环境污染治理技术与设备, 1999, 7(6): 131-139.

SHEN Guoxing, YAN Guoan, PENG Jinliang, et al. Study on ecotoxicology for pesticides to algae ii: toxic mechanism and accumulation, degradation[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution control, 1999, 7(6): 131-139.

[7] YOUNIS H S, PARRISH A R, SIPES I G. The role of hepatocellular oxidative stress in Kupffer cell activation during 1,2-dichlorobenzene induced hepatotoxicity[J]. Toxicological Science, 2003, 76: 201-211.

[8] McPHERSON C A, TANG A, CHAPMAN P M, et al. Toxicity of 1,4-dichlorobenzene in sediments to juvenile polychaete worms[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 44: 1405-1414.

[9] 李明, 徐敏秋, 朱霞, 等. 职业性接触对二氯苯遗传毒性的研究[J]. 中华劳动卫生职业病, 2002, 28(5): 377-379.

LI Ming, XU Minqiu, ZHU Xia, et al. Study of heredity toxicity in the workers occupationally exposed to manganese[J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2002, 28(5): 377-379.

- [10] 石瑛, 杜青平, 谢树莲. 1,4-二氯苯对蛋白核小球藻的毒性效应[J]. 环境科学研究, 2007, 3(20): 133-136.  
SHI Ying, DU Qingping, XIE Shulian. The toxic effects of 1,4-dichlorobenzene on *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Research of Environmental Sciences, 2007, 3(20): 133-136.
- [11] MONFERRAN M V, WUNDERLIN D A, NIMPTSCH J, et al. Biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene biotransformation and antioxidant response in *Ceratophyllum demersum* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene[J]. Chemosphere, 2007, 68:2073-2079.
- [12] 杜青平, 贾晓珊, 吴迪. 生物样品中氯苯类化合物的提取和测定[J]. 生态环境学报, 2009, 18(1): 201-204.  
DU Qingping, JIA Xiaoshan, WU Di. Extraction and determination of chlorobenzenes in biological samples [J]. Ecology and Environmental Science, 2009, 18(1): 201-204.

## The cellular toxic effects of 1,4-dichlorobenzene and concentration in *Chaetoceros mulleri*

SHI Ying<sup>1</sup>, DU Qingping<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030001, China;

2. Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

**Abstract:** Toxic effects of 1,4-dichlorobenzene (1,4-DCB) on *Chaetoceros mulleri* were studied through the changes of growth and the cellular morphological changes of *Chaetoceros mulleri*, even the bioconcentration contents of 1,4-DCB in *Chaetoceros mulleri*. The results showed the growth of *Chaetoceros mulleri* was inhibited by the 1,4-DCB in treated time-response and dose-response manners. There were bioconcentration effects in *Chaetoceros mulleri* treated by 1,4-DCB, and cellular morphology of *Chaetoceros mulleri* was changed by 1,4-DCB. The results suggested that the pollution of 1,2-DCB affected the growth of *Chaetoceros mulleri* and decreased the values of *Chaetoceros mulleri* as the feedstuff.

**Key words:** 1,4-dichlorobenzene; *Chaetoceros mulleri*; bioconcentration; cellular morphology