

## 重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻和斜生栅藻的毒性效应

赵榆, 刘中华, 杨海荣, 韩雪 (沈阳化工研究院有限公司, 辽宁沈阳 110021)

**摘要** [目的]研究重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻和斜生栅藻的毒性效应。[方法]以羊角月牙藻和斜生栅藻为试验绿藻,进行了重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚为参比物的 72 h 毒性试验。[结果]重铬酸钾对羊角月牙藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 1.02 mg/L, 95% 置信区间为 0.98~1.06 mg/L;  $EryC_{50}$  为 2.48 mg/L, 95% 置信区间为 2.25~2.74 mg/L。3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 1.12 mg/L, 95% 置信区间为 1.08~1.16 mg/L;  $EryC_{50}$  为 2.41 mg/L, 95% 置信区间为 2.22~2.62 mg/L。重铬酸钾对斜生栅藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 0.43 mg/L, 95% 置信区间为 0.42~0.43 mg/L;  $EryC_{50}$  为 1.07 mg/L, 95% 置信区间为 1.02~1.12 mg/L。添加不同初始藻浓度, 初始量为  $0.5 \times 10^4$  个/mL 时, 3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 1.68 mg/L, 95% 置信区间为 1.63~1.72 mg/L;  $EryC_{50}$  为 1.43 mg/L, 95% 置信区间为 1.42~1.44 mg/L。初始量为  $1.0 \times 10^4$  个/mL 时, 3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 1.55 mg/L, 95% 置信区间为 1.51~1.60 mg/L;  $EryC_{50}$  为 1.39 mg/L, 95% 置信区间为 1.38~1.40 mg/L。[结论]重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚可以作为参比物来评价绿藻的敏感度。

**关键词** 羊角月牙藻; 斜生栅藻; 重铬酸钾; 3,5-二氯苯酚

**中图分类号** X835 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)03-0058-03

**Toxic Effects of Potassium Bichromate and 3,5-Dichlorophenol on Growth of *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus obliquus***  
ZHAO Yu, LIU Zhong-hua, YANG Hai-rong et al (Shenyang Research Institute of Chemical Industry, Shenyang, Liaoning 110021)

**Abstract** [Objective] To study toxic effects of potassium bichromate and 3,5-dichlorophenol on growth of *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus obliquus*. [Method] Growth inhibition test of potassium bichromate and 3,5-dichlorophenol was conducted with *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus obliquus* over the 72-hour test period. [Result] Based on the results, the 72-hour  $EyC_{50}$  of Potassium bichromate to *Selenastrum capricornutum* was 1.02 mg/L and 95% confidence limit was 0.98-1.06 mg/L. The 72-hour  $EryC_{50}$  was 2.48 mg/L and 95% confidence limit was 2.25-2.74 mg/L. The 72-hour  $EyC_{50}$  of 3, 5-dichlorophenol to *Selenastrum capricornutum* was 1.12 mg/L and 95% confidence limit was 1.08-1.16 mg/L. The 72-hour  $EryC_{50}$  was 2.41 mg/L and 95% confidence limit was 2.22-2.62 mg/L. The 72-hour  $EyC_{50}$  of Potassium bichromate to *Scenedesmus obliquus* was 0.426 mg/L and 95% confidence limit was 0.418-0.434 mg/L. The 72-hour  $EryC_{50}$  was 1.07 mg/L and 95% confidence limit was 1.02-1.12 mg/L. For the initial biomass ( $0.5 \times 10^4$  ind/ml) in the test cultures, the 72-hour  $EyC_{50}$  of 3, 5-dichlorophenol to *Scenedesmus obliquus* was 1.68 mg/L and 95% confidence limit was 1.63-1.72 mg/L. The 72-hour  $EryC_{50}$  was 1.43 mg/L and 95% confidence limit was 1.42-1.44 mg/L. For the initial biomass ( $1.0 \times 10^4$  ind/ml) in the test cultures, the 72-hour  $EyC_{50}$  of 3, 5-dichlorophenol to *Scenedesmus obliquus* was 1.55 mg/L and 95% confidence limit was 1.51-1.60 mg/L. The 72-hour  $EryC_{50}$  was 1.39 mg/L and 95% confidence limit was 1.38-1.40 mg/L. [Conclusion] Potassium bichromate and 3,5-dichlorophenol can be used as reference compound on evaluating sensitivity of green alga.

**Key words** *Selenastrum capricornutum*; *Scenedesmus obliquus*; Potassium bichromate; 3, 5-dichlorophenol

在环境评价领域,传统的理化测试指标存在一些缺陷,因此,需要寻找合适的测试生物作为环境污染的评价指标。藻类个体小、繁殖快、比表面积大(仅次于细菌),对毒物敏感。在研究毒物对水生生态系统的影响时,人们都把藻类测试作为一项重要内容<sup>[1]</sup>,藻类有着独特的生物监测优点,与理化监测互补,可进一步提高预测生态系统反应的能力,藻类作为环境监测指示生物方面的研究已被各国学者所广泛关注<sup>[2]</sup>。

当前我国生产和销售的化学品已达 30 000 余种,各种化学品在生产和使用过程中必将进入环境,而水域往往是它们的最终归宿。我国是一个农业大国,大量使用农药,农药污染对水生生态系统有着严重影响<sup>[3]</sup>。目前在环境监测中一般采用理化监测和生物监测的方法。藻类是水生态系统的初级生产者,是水食物链的基础,它具有生命力强、繁殖快等特点,近年来利用藻类检验污染物的毒性并研究具体的防治措施日益受到重视<sup>[4]</sup>。藻类作为水生生态系统的初级生产者,其种类的多样性和初级生产量直接影响水生生态系统的结构功能。因而,成为监测评价水环境质量的重要指标<sup>[5-6]</sup>。

目前,应用藻类监测环境废水、农药等方面急性毒性已有文献报道,但有关该方法的质控方法研究鲜见报道。笔者以重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚作为参比物,研究了羊角月牙藻和斜生栅藻的毒性效应,筛选出阳性参比毒物。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料 供试药剂与仪器见表 1、2。

表 1 供试参比物信息

Table 1 Information of tested reference compounds

参比物名称 Reference compound	CAS 登记号 CAS registration No.	纯度 Purity	厂家 Manufacturer	批号 Batch No.
重铬酸钾 Potassium bichromate	7778-50-9	≥99.8%	国药	20140425
3,5-二氯苯酚 3,5-dichlorophenol	591-35-5	98.0%	西亚试剂	A03927

**1.2 测试绿藻品种** 羊角月牙藻 (*Selenastrum capricornutum*) 和斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 购自中国科学院水生生物研究所,以 OECD 藻类培养基保存于 4 °C 冰箱中备用。

**1.3 培养方法** 用 OECD201 藻类培养基在 250 mL 三角瓶中振荡培养,振荡频率为  $(100 \pm 20)$  r/min,持续光照,光照强度 4 440~8 880 lx,温度  $(23 \pm 1)$  °C。待大量繁殖后 (72~96 h 转接 1 次),取 0.5~1.0 mL 绿藻再次接入新鲜培养液

**作者简介** 赵榆(1982—),女,辽宁沈阳人,工程师,硕士,从事环境毒理研究。

**收稿日期** 2016-11-18

中(100 mL)培养。反复 3~5 次,镜检细胞生长正常后用作供试绿藻。试验周期为 72 h。

表 2 试验仪器设备  
Table 2 Equipment for test

序号 Serial No.	仪器名称 Instrument	型号规格 Model specification
1	全温度光照振荡培养箱	Innova 43R 型
2	血球计数板	0.1 mm <sup>3</sup> , 编号:02270113/26270108
3	双目生物显微镜	Nikon Eclipse E200 型
4	照度计	柯尼卡美能达 T-10M
5	pH 计	梅特勒托利多 SG2
6	电热干燥箱	DHG-9123A 型
7	高压灭菌锅	三洋 MLS-3780
8	电子分析天平	Mettler Toledo AL204-IC/Sartorius BS124S

## 1.4 试验方法

**1.4.1 试验浓度设计。**重铬酸钾对羊角月牙藻试验的设计浓度为 0.30、0.53、0.95、1.96、3.00 mg/L, 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻试验的设计浓度为 0.50、0.80、1.20、1.90、3.00 mg/L。重铬酸钾对斜生栅藻试验的设计浓度为 0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 mg/L, 3,5-二氯苯酚对斜生栅藻试验的设计浓度为 0.50、0.78、1.22、1.92、3.00 mg/L。采用母液稀释法,分别配制 100 mg/L 重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚母液,依次吸取母液,稀释成相应试验液,定容至 500 mL,分装成 3 个重复,每个重复 100 mL 试验液。设置空白对照组。试验接种量为  $1.0 \times 10^4$  个/mL。

**1.4.2 不同初始生物量对毒性效应的影响。**3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的毒性影响试验中,分别加入藻液为  $1.0 \times 10^4$  和  $0.5 \times 10^4$  个/mL,比较添加不同绿藻生物量对毒性效应的影响。设计浓度为 0.50、0.78、1.22、1.92、3.00 mg/L。

**1.5 测试指标** 试验开始后 24、48、72 h 时,从每个瓶中取样,使用血球计数板在显微镜下计数,测定藻细胞的生长。血球计数板型号:  $V = 0.1 \text{ mm}^3$ ,  $16 \times 25$  大格。藻细胞数(个/mL) = 每小格的平均藻数  $\times 4\,000\,000 \times$  稀释倍数。

## 1.6 数据分析

**1.6.1 生物量增长的抑制百分率。**处理组藻类生物量增长的抑制百分率按以下公式计算:

$$I_y = \frac{Y_c - Y_t}{Y_c} \times 100$$

式中,  $I_y$  为处理组生物量增长的抑制百分率,%;  $Y_c$  为空白对照组测定的藻类单位生物量,个/mL;  $Y_t$  为处理组测定的藻类单位生物量,个/mL。

**1.6.2 生长率的抑制百分率。**处理组藻类生长率的抑制百分率按以下公式计算:

$$I_r = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

式中,  $I_r$  为处理组藻类生长率的抑制百分率,%;  $\mu_c$  为空白对照组生长率的平均值;  $\mu_t$  为处理组生长率平均值。其中  $\mu$  按以下公式计算:

$$\mu_{j-i} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

式中,  $\mu_{j-i}$  为在时间点  $i \sim j$  的平均生长率;  $X_i$  为  $i$  时的藻类单位生物量,个/mL;  $X_j$  为  $j$  时的藻类单位生物量,个/mL。

**1.6.3  $EyC_{50}$  和  $EryC_{50}$  的计算。**用概率单位法计算  $EyC_{50}$  和  $EryC_{50}$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 重铬酸钾对羊角月牙藻的毒性效应** 从图 1 可以看出,随着重铬酸钾浓度的升高,抑制率明显增大。最低浓度 0.30 mg/L  $I_y$  在 24、48 和 72 h,以生长量为基础抑制率分别达到 1.7%、0.3% 和 2.6%,大于以生长率为基础的  $I_r$  的 0.7%、0.1% 和 0.5%;最高浓度 3.00 mg/L, 48、72 h  $I_y$  分别达到 94.6%、97.9%,明显大于  $I_r$  的 66.8% 和 67.7%。经计算,重铬酸钾对羊角月牙藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 1.02 mg/L, 95% 置信区间为 0.98 ~ 1.06 mg/L;重铬酸钾对羊角月牙藻的 72 h  $EryC_{50}$  为 2.48 mg/L, 95% 置信区间为 2.25 ~ 2.74 mg/L。

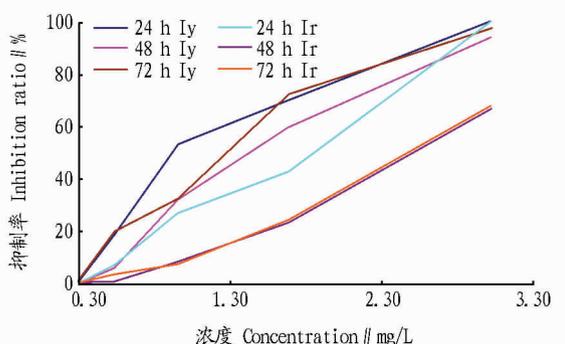


图 1 重铬酸钾对羊角月牙藻的抑制率

Fig. 1 Inhibition rate of potassium bichromate on *Selenastrum capricornutum*

**2.2 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻的毒性效应** 从图 2 可以看出,随着 3,5-二氯苯酚浓度的升高,抑制率明显增大。最低浓度 0.3 mg/L, 24、48、72 h 以  $I_y$  分别达到 10.3%、13.6%、10.2%,  $I_r$  分别达到 4.2%、3.6%、2.0%;最高浓度 3.00 mg/L, 24 和 48 h  $I_y$  抑制率均达到 100%, 72 h 抑制率为 99.0%; 24 h  $I_r$  的抑制率均为 100%, 72 h 抑制率为 79.3%。经计算, 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 1.12 mg/L, 95% 置信区间为 1.08 ~ 1.16 mg/L; 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻的 72 h  $EryC_{50}$  为 2.41 mg/L, 95% 置信区间为 2.22 ~ 2.62 mg/L。

**2.3 重铬酸钾对斜生栅藻的毒性效应** 从图 3 可以看出,随着重铬酸钾浓度的升高,抑制率明显增大。最低浓度 0.10 mg/L, 24、48 和 72 h  $I_y$  分别为 0、1.1% 和 1.0%, 24、48 和 72 h  $I_r$  分别为 0、0.3% 和 0.3%;最高浓度 1.60 mg/L, 24、48 和 72 h  $I_y$  抑制率分别达到 100%、99.9% 和 97.7%; 24、48 和 72 h  $I_r$  抑制率分别为 100%、79.3%、70.2%。经计算,重铬酸钾对斜生栅藻的 72 h  $EyC_{50}$  为 0.43 mg/L, 95% 置信区间为 0.42 ~ 0.43 mg/L;重铬酸钾对斜生栅藻的 72 h  $EryC_{50}$  为 1.07 mg/L, 95% 置信区间为 1.02 ~ 1.12 mg/L。

**2.4 添加不同初始生物量对毒性效应的影响** 从图 4 可以

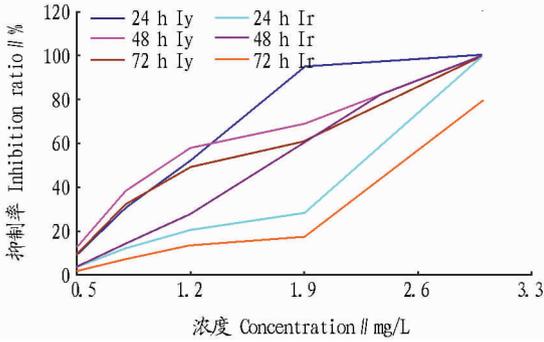


图2 3,5-二氯苯酚对羊角月牙藻的抑制率

Fig. 2 Inhibition rate of 3,5-dichlorophenol on *Selenastrum capricornutum*

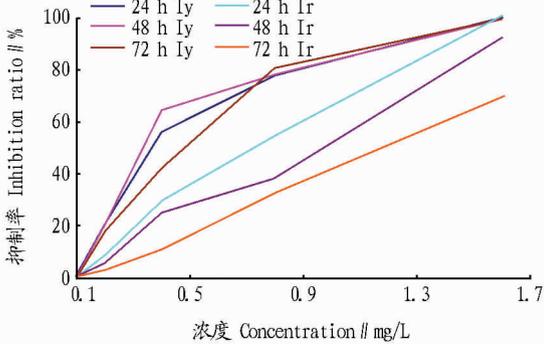


图3 重铬酸钾对斜生栅藻的抑制率

Fig. 3 Inhibition rate of potassium bichromate on *Scenedesmus sobliquus*

看出,添加  $0.5 \times 10^4$  个/mL 初始绿藻生物量时,除最低浓度  $0.50 \text{ mg/L}$  外,其余浓度 24 h Iy 的生长抑制率均超过 50%,  $1.22, 1.92$  和  $3.00 \text{ mg/L}$  生长抑制率均为 100%,抑制效应不显著,48 和 72 h 时抑制才出现明显的浓度效应。经计算,3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的 72 h  $EyC_{50}$  为  $1.68 \text{ mg/L}$ ,95% 置信区间为  $1.63 \sim 1.72 \text{ mg/L}$ ;3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的 72 h  $EryC_{50}$  为  $1.43 \text{ mg/L}$ ,95% 置信区间为  $1.42 \sim 1.44 \text{ mg/L}$ 。

从图 5 可以看出,添加  $1.0 \times 10^4$  个/mL 初始生物量时,各阶段均出现抑制情况,随着浓度的升高抑制率增大。经计算,3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的 72 h  $EyC_{50}$  为  $1.55 \text{ mg/L}$ ,95% 置信区间为  $1.51 \sim 1.60 \text{ mg/L}$ ;3,5-二氯苯酚对斜生栅藻的 72 h  $EryC_{50}$  为  $1.39 \text{ mg/L}$ ,95% 置信区间为  $1.38 \sim 1.40 \text{ mg/L}$ 。

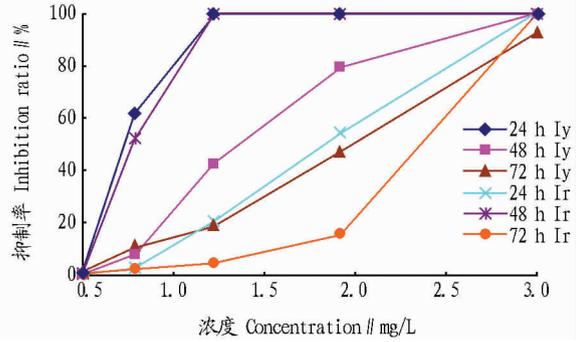


图4 添加生物量为  $0.5 \times 10^4$  个/mL 的抑制率

Fig. 4 Inhibition rate by adding biomass of  $0.5 \times 10^4$  ind/mL

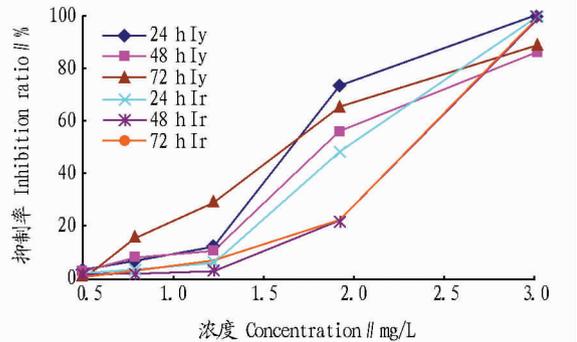


图5 添加生物量为  $1 \times 10^4$  个/mL 的抑制率

Fig. 5 Inhibition rate by adding biomass of  $1 \times 10^4$  ind/mL

### 3 结论

该研究表明,斜生栅藻和羊角月牙藻以重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚的毒性范围 72 h  $EryC_{50}$  和  $EyC_{50}$  均在中毒范围内,并且与添加量影响不大,因此,重铬酸钾和 3,5-二氯苯酚可以作为参比物来评价绿藻的敏感度。

### 参考文献

- [1] 蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京:中国环境科学出版社,1999: 18.
- [2] 卢雁,张顺意. 藻类急性毒性实验阳性参比毒物的筛选[J]. 辽宁城乡环境科技,1999(2):37-39.
- [3] 宋志慧,刘冰. 氧化乐果对小球藻的毒性研究[J]. 生态毒理学报,2014, 9(3):483-489.
- [4] 党亚爱,王国栋,辛宝平,等. 几种染料抑制斜生栅藻生长的毒性效应[J]. 西北植物学报. 2003,23(2):332-335.
- [5] 李义刚,刘滨扬,彭颖,等. 三氯生对羊角月牙藻生长及其抗氧化系统的影响[J]. 生态毒理学报,2013,8(3):357-365.
- [6] 高礼,石丽娟,袁涛. 典型抗生素对羊角月牙藻的生长抑制及其联合毒性[J]. 环境与健康杂志,2013,30(6):475-478.

(上接第 51 页)

- [9] 李亚新,杨建刚. 微量元素对甲烷菌激活作用的动力学研究[J]. 中国沼气,2000,18(2):8-11.
- [10] KOTSYURBENKO O R, FRIEDRICH M W, SIMANKOVA M V, et al. Shift from acetoclastic to  $H_2$ -dependent methanogenesis in a West Siberian peat bog at low pH values and isolation of an acidophilic Methanobacterium strain[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(7): 2344-

2348.

- [11] DHAKED R K, SINGH P, SINGH L. Biomethanation under psychrophilic conditions[J]. Waste Manag, 2010, 30(12): 2490-2496.
- [12] CONRAD R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments[J]. FEMS Microbiol Ecol, 1999, 28(3): 193-202.