

燃料油、苯酚和硫化钠对
新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)
生长繁殖及叶绿素a含量的影响

中国水产科学研究院东海水产研究所

一九八七年一月

燃料油、苯酚和硫化钠对新月菱形藻

(*Nitzschia closterium*)

生长繁殖及叶绿素a含量的影响

摘

要

1984年5月11日巴拿马籍“海利”轮在浙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,本实验即针对这一事件,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。结果表明:苯酚的毒性最大, $20^{\#}$ 燃料油次之。此两种物发对新月菱形藻生长的有影响浓度分别为3.2—10.0毫克/升和82.0—320毫克/升。另外,苯酚对其叶绿素a含量最影响的216小时- EC_{50} 为6.739毫克/升。 $20^{\#}$ 燃料油影响其细胞分裂繁殖的144小时- EC_{50} 为46.13毫克/升。实验证明,高浓度燃料油对新月菱形藻的生长繁殖及叶绿素a含量有抑制作用,而低浓度的则对其生长繁殖有促进作用。硫化钠在6天的毒性试验中,其最大比生长率随浓度增大而进增

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,其在海洋中的存在与否关系到整个海洋食物链的循环

及海洋生态系的平衡。新月菱形藻 (*Nitzschia cloostertum*)

这类单细胞生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,因而对污染物的反应较为明显和迅速。

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导,〔4〕〔9〕〔13〕〔14〕〔15〕〔16〕,苯酚对其影响的报导亦有所见〔8〕,但有关硫化钠对其影响的报导尚未见到。本文就这三种化学物质对新月菱形藻生长繁殖及叶绿素a含量的影响作一定程度的探讨。

材料与方法

一、材料:

藻种

新月菱形藻 (*Nitzschia cloostertum* (Ehrenberg)
W. Smith).

培养液

取自江苏省海洋水产研究所东凌试验场的海水 (1.020) 经暗沉淀、过滤和高温消毒后,加入一定比例的营养盐类,冷却后备用。参照培养液配方〔7〕我们稍加了改动: NaNO_3 , 50mg/L; K_2HPO_4 , 5mg/L; $\text{FeC}_2\text{H}_3\text{O}_6$, 0.5mg/L; $2\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$, 11mg/L; Na_2SiO_3 , 10mg/L; Vit. B₁₂, 200ng/L。所用试剂皆为分析纯试剂。

毒物

20 # 燃料油经超声处理成乳化油液,再用红外测油仪 (柳水

0.1L——102) 测定其含量后供实验用。苯酚和硫化钠均由分析纯试剂经蒸馏水溶解、标定，稀释至所需浓度后使用。

二、方法：

藻种在实验前暂养3—4天，以获得指数生长期的藻种。室温20°——24℃。以荧光灯为光源，2500——3140Lux，24小时光周期。实验期间随机交换各试样瓶位置，尽量减少各试样瓶间的光照误差。实验容器均为100毫升三角烧瓶，试样量为40毫升。为防止在实验过程中受污染，以消毒滤纸和橡皮筋封口。

生物量检测分别用光密度值、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} ($u = \ln(X_2 / X_1) / t_2 - t_1$ (天⁻¹)⁽²⁾， $U_{max} = \max(u)$ 。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#燃料油试样组的细胞数，以(10^4 个细胞/毫升)为单位，每个试样重复计数10次，取平均值。起始接种浓度为 8.625×10^4 个细胞/毫升。每隔24小时取样一次，为期6天。每天定时震荡试样3次，以补充部分CO₂，并防止藻体沉底。

2. 光吸收法

用721型分光光度计在630纳米处检测试样的光密度，比色皿光径1厘米。每一浓度组的样品，20#燃料油的检测2次，苯酚和硫化钠的检测3次，均取平均值。起始接种浓度的光密度值为：20#燃料油(0.058)；苯酚(0.038)；硫化钠(0.027)。接种后每隔24小时取样检测，持续6天。实验期间20#燃料油的试

样每天震荡3次。对苯酚和硫化钠的试样，则每隔8或12小时，用80—1型离心沉淀机，以2500—3000转/分的速度，离心10分钟。倾去上清液，用新鲜培养液将沉淀物洗入原先的试样瓶。按既定的毒物浓度滴加新配制的毒物溶液并定容至40毫升。

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^[2]进行叶绿素的提取，并参照UNESCO的公式^[10]，叶绿素a的浓度 $chl. a = 1164 OD_{663} - 216 OD_{645} + 0.10 OD_{630}$ ($\mu g/ml$)，由此来计算叶绿素a的含量 ($= chl. a \times V/V$) (毫克/米³)。

三、数据处理：

用一般数理统计方法处理数据^{[1][6][7]}。

结 果

一、20#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)的方差分析结果见表1。

表1 20#燃料油 影响新月菱形藻生长的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均 方	F 值	显著性
组内 S_1	0.06780	5	0.01356	26.40	**
组间 S_2	0.00308	6	0.00051		
总 和	0.07088	11			

由表 1 得到 $F = 2640$ ，其均数间的差别非常显著 ($P < 0.01$)

**.

20 # 燃料油对新月菱形藻生长的影响结果见表 2。

表 2 20 # 燃料油组的最大比生长率 U_{max} (天⁻¹)

浓度 (mg/L)	U_{max}	95%置信限
对 照	0.5175	0.4896 ~ 0.5455
0.032	0.5665	0.4153 ~ 0.7177
0.32	0.5658	0.1363 ~ 0.9953
3.20	0.5071	0.3991 ~ 0.6151
32.0	*0.4625	0.3456 ~ 0.5794
320	*0.2487	-0.0385 ~ 0.5359

*与对照组比, $P < 0.05$ 。

经 t 检验得, 对新月菱形藻无影响的浓度为 0.032 —— 32 mg/L, 阻滞或停止其细胞生长的浓度为 320 —— 320 mg/L。

2. 对繁殖的影响

20 # 燃料油在 6 天试验中, 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 10 mg/L 浓度组起有明显减少, 320 mg/L 和 100 mg/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都呈波浪形 (前者更明显), 并不呈指数生长曲线形。144 h —— $EC_{50} = 46.13 \pm 1.01$ mg/L (回归方程 $y = -0.55 + 1.19x$,

$r = 0.9685$)。但图1中 0.032mg/L 浓度组的生长曲线则几乎始终高于其它浓度组的(包括对照组的)。

表3 20#燃料油组最大细胞分裂频率 $U_{\max}$ (天 $^{-1}$)

及其出现时间

浓度(mg/L)	对 照	0.032	1.00	320	1000	3200
$U_{\max}$	0.6639	0.6241	0.6445	0.5754	0.4769	0.5496
出现时间(天)	1~2	2~3	1~2	1~2	2~3	2~3

1000	3200
0.2765	0.1633
2~3	2~3

由表3中的 $U_{\max}$ 值及其出现时间亦可看出,与对照组比,从 1000mg/L 起其差异才较为显著。

3. 对细胞内含物及形态的毒性效应影响

实验的第1天, 320mg/L 浓度组的试样中可观察到絮状沉淀,显微镜检可见部分异常细胞,显现出藻体不饱满,色素体变小;第2天起, 320mg/L 和 100mg/L 浓度组的试样中均出现异常细胞, 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完全无正常细胞;第4天, 100mg/L 的试样中也有部分细胞失去色素。第5天,第6天的情况与第4天无太大变化。但是尽管 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,却未能杀死全部微藻细胞。

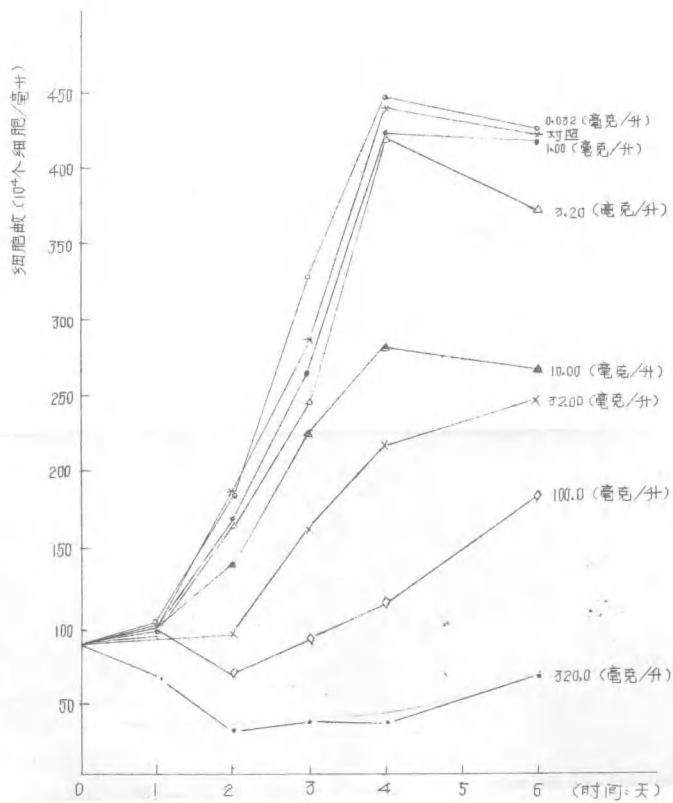
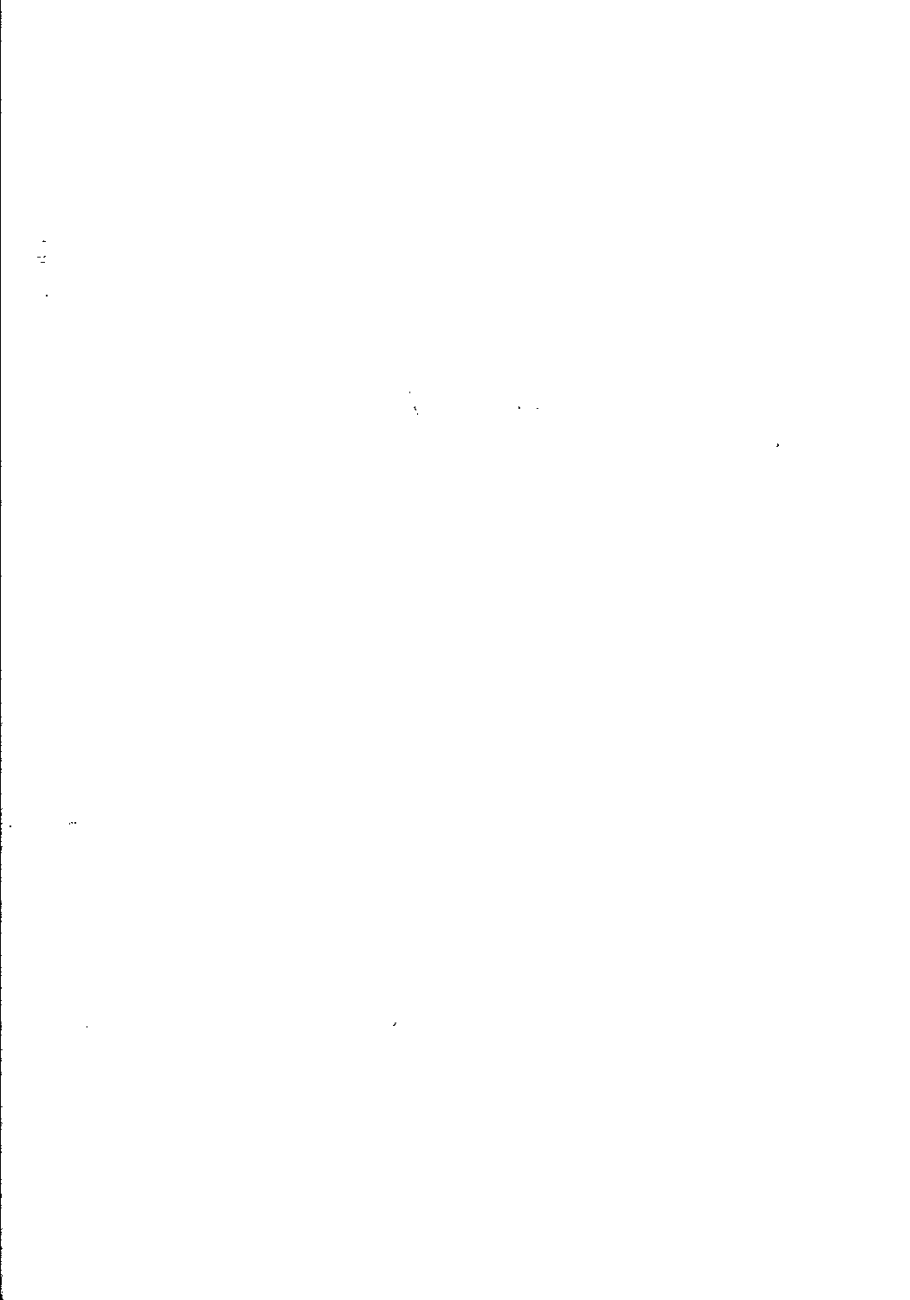


图1 20# 燃料油对新月菱形藻 (*N. closterlam*)
细胞分裂繁殖的影响 (1~6天)



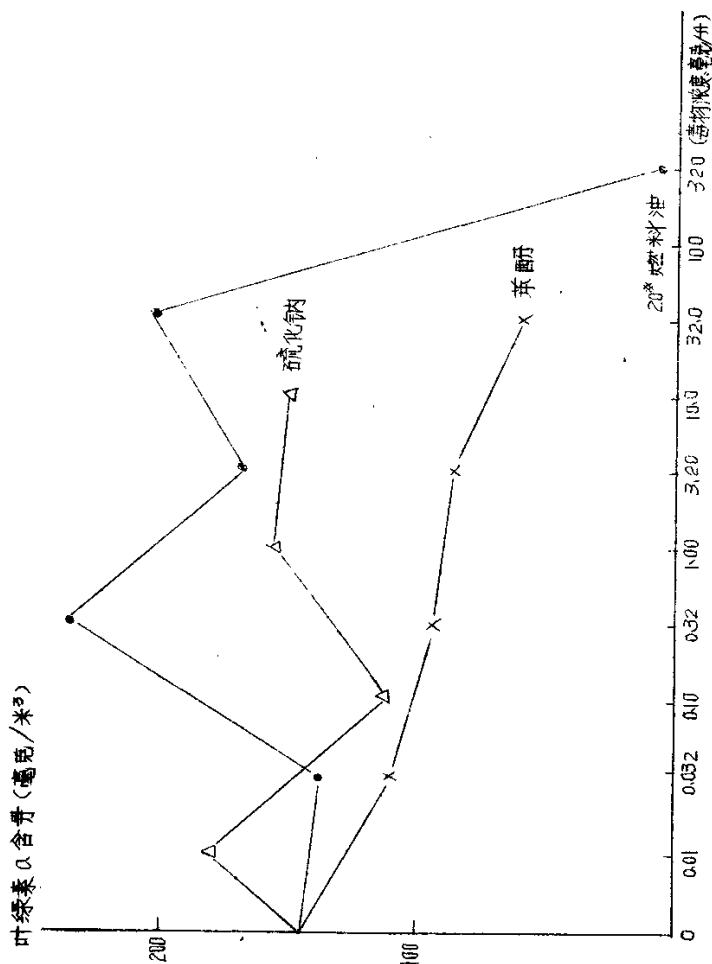


图2 20#燃料油、苯酚和硫化钠对新月菱形藻
(*N. closterium*) 叶绿素a含量的影响
(实验第9次)

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含量的影响见图2。由图2可得, 20#燃料油使新月菱形藻叶绿素a含量与对照相比降低50%的浓度为22.769mg/L。

二、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)的方差分析见表4。

表4 苯酚影响新月菱形藻生长的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
组内 S_1	0.07142	5	0.01190	39.53	**
组间 S_2	0.00331	11	0.00030		
总和	0.07473	17			

由表4得, $F = 39.53$, 其均数间差别非常明显 ($P < 0.01$) **。

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。

表5 苯酚组的最大比生长率 U_{max} (天^{-1})

浓度 (mg/L)	U_{max}	95%置信限
对 照	0.8089	0.7622 ~ 0.8556
0.032	0.8586	0.8422 ~ 0.8750
0.10	0.8503	0.7737 ~ 0.8269
0.32	0.8285	0.7358 ~ 0.9212
1.00	0.7595	0.6832 ~ 0.8358
3.20	*0.8739	0.5438 ~ 0.8040
10.0	*0.6859	0.5271 ~ 0.7447

* 与对照组比, $P < 0.05$ 。

经 t 检验可得, 苯酚对新月菱形藻生长的无影响浓度是 0.032 — 1.00 mg/L , 阻滞或停止其细胞生长的浓度为 3.2 — 10.0 mg/L 。

2. 对叶绿素 a 含量的影响

由图2容易看出, 苯酚对新月菱形藻叶绿素 a 含量的影响最为强烈, 曲线随浓度递增而不断下降。其 216h — $EC_{50} = 6.739 \pm 0.003 \text{ mg/L}$ (回归方程 $y = 366 + 0.35x$, $r = 0.9637$)。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 (见表6), 除 0.032 mg/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。

表 6 20[#] 燃料油组和苯酚组叶绿素 a 含量比较表

浓度 (mg/L)	燃料油	苯 酚	苯酚 / 燃料油 × 100 %
0.032	0.140	0.115	82.14 %
0.32	0.235	0.095	40.43 %
3.20	0.170	0.090	52.95 %
32.0	0.205	0.055	26.83 %

单位: mg/m³

三、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, 结果见表 7。

表 7 硫化钠影响新月菱形藻生长的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均 方	F 值	显著性
组内 S ₁	0.01542	5	0.00308	425	*
组间 S ₂	0.00871	12	0.00726		
总 和	0.02413	17			

由表 7 得 $F = 425$, 均数间差别极为显著 ($0.01 < P < 0.05$)

。

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。

表8 硫化钠组最大比生长率 U_{max} (天⁻¹)

浓度 (mg/L)	U_{max}	95%置信限
对 照	0.9128	0.7708 ~ 1.0548
0.01	0.9324	0.7973 ~ 1.0675
0.032	0.9984	0.8797 ~ 1.1171
0.10	0.9981	0.8586 ~ 1.1376
0.32	*1.0300	0.9862 ~ 1.1238
1.00	*1.0732	0.9893 ~ 1.1571

* 与对照组比, $P < 0.05$ 。

经 t 检验得, 硫化钠对新月菱形藻生长的无影响浓度为 0.01—0.10 mg/L, 影响浓度为 0.32—1.00 mg/L。但表 8 中 U_{max} 值随硫化钠浓度的递增而不断增大。

叶绿素 a 含量介于 20[#] 燃料油组和苯酚组之间, 且与对照相比, 其降低值不超过 50% (见图 2)。

讨 论

表 1、表 4 和表 7 的结果告诉我们, 作为实验室的测量, 20[#] 燃料油、苯酚和硫化钠对新月菱形藻生长的影响均显著。Patin 等 (1982) 指出, 实验室试验的对象常可用来代替自然条件下的现象和过程进行研究。因此我们完全可以认为, 这三种化学物质对新月菱形藻的生长是有影响的, 且前二者有显著影响。

一、20[#] 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(包括对照组的),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。这是因为低浓度能刺激微藻的生长繁殖,而高浓度则抑制其生长繁殖,这与一些报导结果相一致[13]。此外,其144h—— $EC_{50} = 4613 \pm 101 \text{ mg/L}$,这与人们提出的,在短期试验中与对照组比,使其细胞分裂降低50%或更多的石油产品浓度为5——50mg/L的报导结果相吻合[15]。

观察表3中 U_{max} 的值,不难看出,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多比对照组长。因为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[16](生长速率比生长率或称细胞分裂频率的又一称谓)。

显微镜检结果表明,即使很高的油浓度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引起的。尽管我们用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状态的藻细胞混杂其中。衰老期的藻细胞在有毒培养液中率先死亡,新分裂的藻细胞则抗性最强[8]。

从叶绿素a含量看,在227.69mg/L处,20#燃料油方便新月菱形藻的叶绿素a含量降低50%,证明高浓度烃对微藻的光合作用亦有抑制作用:[4]。

二、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。一些资料指出[3][11],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很高的毒性。这些资料从不同的侧面证实了我们的实验结果。

苯酚对藻类的危害机制是使其细胞质变性。酚系细胞原浆毒物类, 属高毒物质, 亦是急性毒物之一。浓度低时能使蛋白质变性, 浓度高时能使蛋白质沉淀, 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, 而一元酚较多元酚易于生化分解。由于羟基(-OH)易于置换, 被藻类代谢时所吸收, 结果使细胞质变性而受毒害。

三、硫化钠的影响

硫化物是急性毒物的一种, 水解后生成硫化氢。硫化物的毒性主要来自硫化氢(H_2S), 而非 HS^- 或 S^{2-} 。硫化钠组的最大比生长率 U_{max} 出现的时间很早(在实验的第0~1天间), 说明其生长延迟期非常短。此外, 表8中硫化钠的 U_{max} 随其浓度的增大而不断递增。这些现象表明, 硫化钠对新月菱形无不利影响。有资料指出, [12], 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作供氢体, 并按下式进行光合作用。

$CO_2 + 2H_2 \xrightarrow{X} CH_2O + 2X + H_2O$ (此处 H_2 , X 是任何还原性大于 H_2O 的分子)。

参 考 文 献

〔1〕 中国科学院数学研究所统计组编, 1979. 常用数理统计方法. 科学出版社.

〔2〕 宋仁元等译, 美国公共卫生协会编著. 1985. 水和废水标准检验法, 第15版, 中国建筑工业出版社.

〔3〕 陈静生等, 1981. 环境污染与保护简明原理. 商务印书馆.

〔4〕 林凤翔译, (西) J. Fabregaa 等著, 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, 1985, 4: 52-54

〔5〕 杨纪珂等, 1983, 应用生物统计. 科学出版社.

〔6〕 杨纪珂等译, (美) R. G. D. steel 等著, 1979. 数理统计的原理和方法. 科学出版社.

〔7〕 湛江水产专科学校主编, 1980. 海洋饵料生物培养. 农业出版社.

〔8〕 曾昭琪、陈子涛著, 酚类对栅列藻细胞的影响, 实验生物学报, 1984, 17 (1): 1-11

〔9〕 ANDERSON, J. W., NEFF, J. M. & PETROCELLI, S. R. 1974. Sublethal effects of oil, heavy metals and PCBs on marine organisms. Surv. Toxic. Environ., N. Y., PP. 83-121

〔10〕 Anonymous, 1966. Determination of Photosynthesis Pigments in seawater. Monogr. Oceanogr. Methodol., UNESCO.