

孔雀石绿对两种藻类的毒性*

李红霞^{1, 2} 那广水¹ 伍筱琳^{1, 2} 周传光¹ 付云娜¹ 姚子伟^{1*, *}

(1 国家海洋环境监测中心, 大连, 116023 2 大连水产学院, 大连, 116023)

摘 要 考察了孔雀石绿对小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 和金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 生长的影响, 并研究了孔雀石绿对小球藻中叶绿素含量的影响. 结果表明, 孔雀石绿对两种藻类的生长具有较强的抑制效应, 96 h 的半抑制效应浓度 (EC₅₀) 分别为 0.133 mg·L⁻¹ 和 0.017 mg·L⁻¹ 时属于高毒, 而且对金藻的毒性大于小球藻. 小球藻中叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量随孔雀石绿浓度的增加而明显下降.

关键词 孔雀石绿, 小球藻, 金藻, 叶绿素.

孔雀石绿是一种三苯甲烷类化工染料, 其潜在的致癌、致畸、致突变性受到广泛关注^[1-3], 孔雀石绿引起的药物残留及对靶生物的影响已有大量文献报道^[4-9], 但关于孔雀石绿对非靶生物的影响还缺乏足够的认识.

本文选取孔雀石绿对小球藻和金藻的生长以及两种藻类在吸收代谢孔雀石绿的过程中的毒性进行研究, 探讨孔雀石绿药物残留对藻类的影响.

1 材料与方法

1.1 供试生物及其培养

小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 和湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*) 由大连水产学院生理实验室提供. 试验用培养基及所有器皿均经过 121℃ 高压灭菌 15 min. 营养液的配制采用 f/2 营养盐改良配方. 藻种置于 1000 mL 锥形瓶中培养, 培养量 400 mL 明暗周期为 1:1, 温度: 16—18℃; 每天定时摇瓶.

1.2 急性毒性实验

根据预实验结果设 6 个浓度组, 每组三个平行: 小球藻: 0, 0.02, 0.06, 0.18, 0.54, 1.62 和 2 mg·L⁻¹; 金藻: 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.4 mg·L⁻¹.

孔雀石绿暴露后 0, 24, 48, 72 和 96 h 定时取样, 用血球计数板计数细胞密度, 采用分光光度计法测定叶绿素的含量.

叶绿素的浓度 (mg·L⁻¹) 计算:

$$\begin{aligned} \text{叶绿素 a} &= 12.7 \text{ OD}_{663} - 2.69 \text{ OD}_{645} \\ \text{叶绿素 b} &= 22.9 \text{ OD}_{645} - 4.68 \text{ OD}_{663} \\ \text{叶绿素总量} &= \text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b} = 20.2 \text{ OD}_{645} + 8.02 \text{ OD}_{663} \\ \text{类胡萝卜素} &= 4.70 \text{ OD}_{440} - 0.27 (\text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b}) \end{aligned}$$

比生长率 (μ) 的计算:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$$

式中, N_t 和 N_0 分别为 t 时刻 (t) 和开始时 (t_0) 的细胞数.

$$\text{抑制率} (\%) = (\mu_{\text{对照组}} - \mu_{\text{处理组}}) / \mu_{\text{对照组}} \times 100\%$$

根据抑制率的概率单位 (y) 与相应的浓度对数 (x), 用直线回归法得到浓度效应方程.

$$y = b \times x + a$$

将回归方程进行 r 检验 ($\alpha = 0.05$). 抑制率的概率单位为 5 时, 得到的浓度对数取反对数即为所求半抑制效应浓度 EC₅₀.

2008 年 4 月 17 日收稿.

* 国家 908 专项 (908-02-04-02). * * 通讯联系人, E-mail: zwyao@nmemc.gov.cn

2 结果与讨论

2.1 两种藻类的生长曲线

图 1 分别显示了孔雀石绿浓度为 $0.133\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时对小球藻和 $0.017\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时对金藻生长 (96 h EC_{50}) 的影响. 从图 1 可见, 对金藻的毒性大于小球藻, 属于高毒. 以下实验选择小球藻为靶生物.

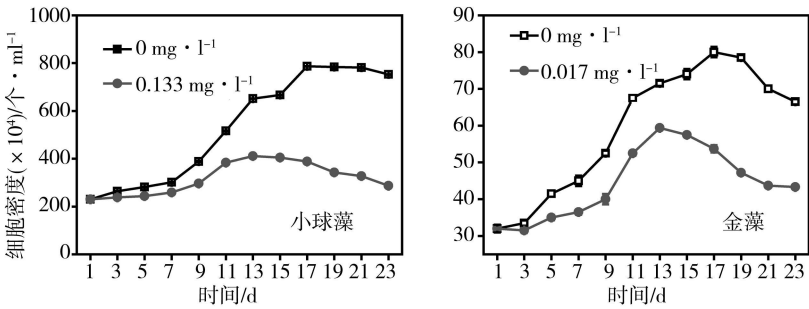


图 1 小球藻和金藻的生长曲线

Fig 1 Growth curve of *Chlorella pyrenoidosa* and *Isochrysis zhanjiangensis*

2.2 半抑制效应浓度 (EC_{50})

在孔雀石绿暴露下, 显微镜观察到部分小球藻和金藻的细胞形态发生变化. 在高浓度组 ($1.62\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 小球藻藻体亮度降低, 金藻在高浓度组 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) 的藻体活性降低, 部分藻体出现细胞肿胀现象, 个别藻体细胞壁破坏, 藻体开始破裂.

孔雀石绿对小球藻的毒性试验 (图 2) 显示, 空白组在 24—48 h 之间细胞数量变化不明显, 但从 96 h 空白组和图 1 小球藻空白组的生长曲线来看, 小球藻没有出现生长暂停现象, 这可能是误差造成的. $0.02\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $0.06\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 浓度组 24—48 h 的细胞密度略高于空白组, 表现为对小球藻的生长有一定的刺激作用, 这与文献报道的低浓度有机物暴露时对藻类生长有刺激作用相符^[10-11]. 96 h 后孔雀石绿对小球藻细胞密度的影响很小; 孔雀石绿浓度为 $2.00\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 72h 时细胞开始出现死亡.

金藻对孔雀石绿的敏感性明显强于小球藻, 孔雀石绿对金藻生长的抑制随浓度的增加而增加 (图 2). 在孔雀石绿浓度为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时已经有大量细胞开始死亡, 表明金藻对孔雀石绿的耐受性远小于小球藻, 这与其它研究报道的金藻类对化学药物的耐受性远小于其它藻类相一致^[12-13].

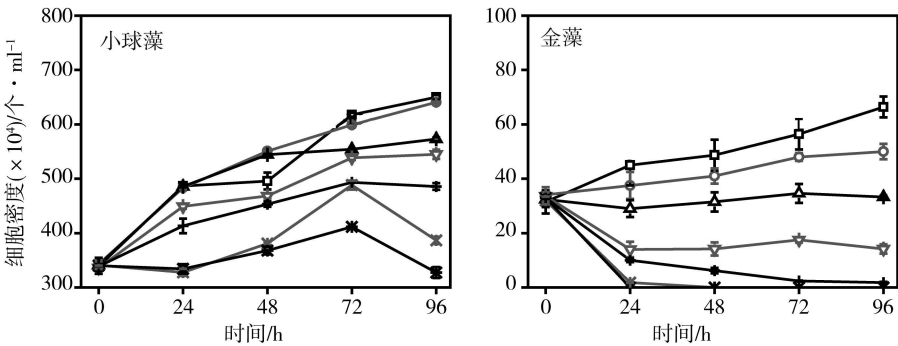


图 2 孔雀石绿对小球藻和金藻生长的影响

小球藻: —□— $0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —○— $0.02\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —△— $0.06\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —▽— $0.18\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —+— $0.54\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —x— $1.62\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —*— $2.00\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
金藻: —□— $0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —○— $0.0125\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —△— $0.025\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —▽— $0.05\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —+— $0.1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —x— $0.2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ —*— $0.4\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Fig 2 Effects of Malachite Green on growth of *Chlorella pyrenoidosa* and *Isochrysis zhanjiangensis*

孔雀石绿对两种藻类不同时间段抑制率的概率单位-浓度对数曲线方程和 EC_{50} 如表 1 所示. 从表 1 看出, 孔雀石绿对小球藻的 EC_{50} 值在 24—48 h 和 72—96 h 之间处于升高状态, 而在 48—

72 h时 EC_{50} 值明显降低, 出现这种情况可能是随着暴露时间的增加, 藻体通过富集作用, 使体内孔雀石绿的浓度逐渐升高, 造成一些活性氧自由基或一些亲电子刺激产物在藻体内的积累, 积累到一定程度时导致藻体中谷胱甘肽硫转移酶 (GST)被诱导, 促使谷胱甘肽 (GSH)与其结合, 藻体表现为对毒物毒性的解除或降解^[14]。孔雀石绿对金藻的 EC_{50} 值则随药物暴露时间的增加而逐渐升高。

表 1 孔雀石绿对小球藻和金藻的概率单位-浓度对数曲线方程和 EC_{50}

Table 1 Regression curve of probit concentration logarithm and EC_{50} of malachite green to *Chlorella pyrenoidosa* and *Isochrysis hanjiangensis*

藻类名称	时间 /h	浓度对数曲线方程	相关系数 (<i>r</i>)	EC_{50} / $mg \cdot L^{-1}$
小球藻	24	$y = 4.302x - 5.323$	0.918	0.058
	48	$y = 1.674x - 1.487$	0.983	0.129
	72	$y = 0.967x - 0.907$	0.968	0.115
	96	$y = 0.791x - 0.694$	0.918	0.133
金藻	24	$y = 3.540x - 2.570$	0.985	0.007
	48	$y = 2.854x - 5.884$	0.984	0.009
	72	$y = 2.413x - 4.659$	0.991	0.012
	96	$y = 2.707x - 4.807$	0.997	0.017

2.3 小球藻光合色素含量的变化

孔雀石绿浓度对类胡萝卜、叶绿素 a 叶绿素 b和叶绿素总含量的影响见图 3 从图 3孔雀石绿对小球藻生长的影响来看, 在 24—48 h内, $0.02 mg \cdot L^{-1}$ 和 $0.06 mg \cdot L^{-1}$ 浓度组的细胞密度略高于空白组, 藻类的生长没有受到抑制, 甚至有促进作用, 但空白组藻体内的叶绿素 a 叶绿素 b 叶绿素总含量以及类胡萝卜素的含量都明显高于浓度组, 因此, 可以认为孔雀石绿对藻类生长的影响是通过抑制叶绿素的形成, 进而抑制光和作用来实现的。

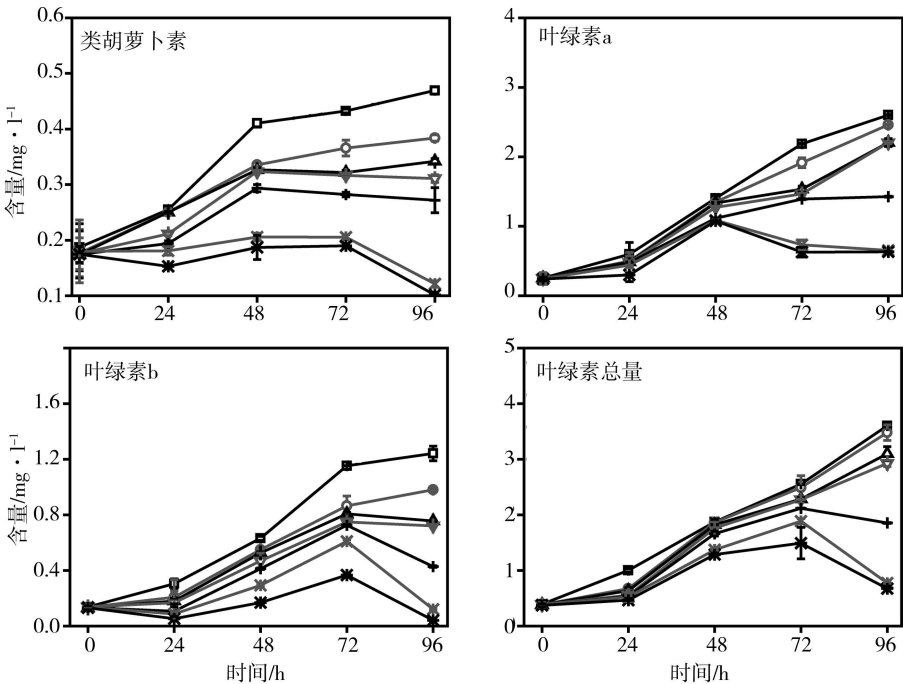


图 3 孔雀石绿浓度对小球藻中类胡萝卜素、叶绿素 a 叶绿素 b和叶绿素总含量的影响

$\square$ 0 $mg \cdot L^{-1}$ $\circ$ 0.02 $mg \cdot L^{-1}$ $\triangle$ 0.06 $mg \cdot L^{-1}$ ∇ 0.18 $mg \cdot L^{-1}$ $+$ 0.54 $mg \cdot L^{-1}$ $\times$ 1.62 $mg \cdot L^{-1}$ $*$ 2 $mg \cdot L^{-1}$

Fig 3 Effects of malachite green concentration on carotenoids, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll contents in *Chlorella pyrenoidosa*

小球藻中叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量在 24h 后低于对照组, 孔雀石绿浓度为 $0.54\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1.62\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 和 $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 组, 96h 时叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量低于 0h, 培养液颜色变浅, 说明孔雀石绿在藻体内达到一定浓度时可降解叶绿素 b 和类胡萝卜素. 叶绿素总量与细胞密度有很好的相关性.

3 结论

孔雀石绿对两种藻类的致毒试验结果显示, 孔雀石绿在低浓度时能促进小球藻的生长, 孔雀石绿对两种藻类的 24h、48h、72h、96 h 的半抑制效应浓度 (EC_{50}) 远小于水生生物标准 (低毒性 96 h 的 $\text{EC}_{50} > 3.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$; 中毒性 96 h 的 $\text{EC}_{50} = 3.0\text{--}0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$; 高毒性 96 h 的 $\text{EC}_{50} < 0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 属于高毒. 两种藻类对孔雀石绿的敏感度较高, 金藻对孔雀石绿的敏感性较小球藻强.

参 考 文 献

[1] 翟毓秀, 耿霞, 宁劲松, 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展. 中国海洋大学学报, 2007, 37 (1): 27—32

[2] 侯瑜琼, 朱伟杰, 孔雀石绿对 Fas/FasL 诱导的小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响. 生殖与避孕, 2006, 26 (12): 707—711

[3] 周艳红, 吴永魁, 李乾学, 渔药孔雀石绿致穿梭质粒 pSP189 靶基因突变研究. 毒理学杂志, 2006, 20 (3): 163—165

[4] Daneshvar N, Ayazloo M, Khataee A R. Biological Decolorization of Dye Solution Containing Malachite Green by *Microalgae Cosmarium* sp. *Biores. Technol.*, 2007, 98: 1176—1182

[5] 高露姣, 蔡友琼, 姜朝军等, 孔雀石绿及其主要代谢产物在欧洲鳗鲡肌肉中的蓄积及消除规律. 水产科学, 2007, 31: 104—108

[6] Alborali L, The Persistence of Malachite Green in the Edible Tissue of Rainbow Trout *Rin. Ital. Acquacolt.* 1997, 32: 45—60

[7] 邱绪建, 林洪, 王联珠等, 孔雀石绿及其代谢物无色孔雀石绿在鲫鱼肌肉中的代谢规律. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2006, 36 (5): 745—748

[8] 周艳红, 吴永魁, 李乾学等, 渔药孔雀石绿致穿梭质粒 pSP189 靶基因突变研究. 毒理学杂志, 2006, 20 (3): 163—165

[9] Sandra J C, Lonnie R B, Donna F K et al, Toxicity and Metabolism of Malachite Green and Leucomalachite Green during Short-Term Feeding to Fischer 344 Rats and B6C3F1 Mice. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, 122: 153—170

[10] 沈国兴, 严国安, 余新, 蔡及其衍生物对普通小球藻的毒性效应. 水生生物学报, 1999, 23 (5): 460—468

[11] 杨志强, 董波, 吴进才, 普通小球藻对噻草酮、骠马和甲草胺的敏感性研究. 应用生态学报, 2004, 15 (9): 1621—1625

[12] 高尚德, 吴以平, 赵心玉, 有机锡对海洋微藻的生理效应. 海洋与泥沼, 1994, 25 (4): 362—366

[13] 唐学玺, 李永祺, 李春雁等, 有机磷农药对海洋微藻致毒性的生物学研究. 海洋环境科学, 1995, 14 (2): 1—5

[14] 聂湘平, 鹿金雁, 李潇等, 诺氟沙星对蛋白核小球藻生长及抗氧化酶活性的影响. 生态毒理学报, 2007, 2 (3): 327—332

STUDY ON TOXICITY OF MALACHITE GREEN ON TWO SPECIES OF ALGAE

LI Hong-xia^{1, 2} NA Guang-shui¹ WU Xiao-lin^{1, 2} ZHOU Chuan-guang¹
FU Yun-na¹ YAO Ziwei¹

(1 National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian, 116023, China; 2 Dalian Fisheries University, Dalian, 116023, China)

ABSTRACT

The study investigated the effects of malachite green on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* and *Isochrysis zhanjiangensis* and the chlorophyll content of *Chlorella pyrenoidosa*. The data were processed with the method of probability units-logarithm concentration. The results indicated that the toxicity of malachite green to *Isochrysis zhanjiangensis* was higher than *Chlorella pyrenoidosa*, and the 96 h EC_{50} of malachite green to the two algae were $0.133\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and $0.017\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively. The contents of chlorophyll b and carotenoid in *Chlorella pyrenoidosa* decreased significantly with increasing of malachite green concentration.

Keywords malachite green, *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis zhanjiangensis*, chlorophyll