

# 孔雀绿对湛江叉鞭金藻的毒性效应

吴以平 赵素达<sup>1</sup> 吴国新 高尚德  
(青岛海洋大学海洋生命学院, 266003)  
(青岛教育学院生化系, 266071)<sup>1</sup>

**摘 要** 在 20℃和 30℃下,用含有不同浓度(0.02~0.10 μg/L)孔雀绿的海水,在室内用一次培养法培养湛江叉鞭金藻,测定了 4 天内金藻的生长速率、叶绿素 a、胡萝卜素和蛋白质含量。结果表明,0.02 μg/L 的孔雀绿对金藻有轻微影响,浓度≥0.04 μg/L 的孔雀绿能使金藻的生长速率、叶绿素 a、胡萝卜素和蛋白质含量明显减少。温度对孔雀绿的毒性有明显影响,温度越高,毒性越大。

**关键词** 孔雀绿, 湛江叉鞭金藻, 毒性

孔雀绿又叫孔雀石绿(Malachite Green),是一种三苯甲烷染料,由于其具有很强的毒性,多年来在鱼虾疾病的防治中经常使用。在对虾养殖中,防治丝状细菌,使用  $5 \times 10^{-6}$  (2min) 的浓度进行药浴,防治褐斑病使用  $0.2 \times 10^{-6}$  的浓度就有明显疗效[张伟权 1991]。孔雀绿直接进入水生环境作为一种杀菌剂在水产养殖中使用了多年,然而对整个水生生态系统的影响至今很少引起人们的注意,研究极少。作者试图以海洋中常见的金藻为材料,研究不同浓度的孔雀绿对水生环境一级食物链的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

孔雀绿为市售,分子式  $C_{23}H_{25}N_2Cl$ ,实验前用蒸馏水配制成 10 μg/L 的母液。

湛江叉鞭金藻(*Dicrateria zhanjiangensis*,下称金藻),由本校微藻研究室提供。在进行正式实验前,先在 20℃恒温光照下培养,至对数生长期时用于实验。

海水为取自青岛近岸鲁迅公园的天然海水,使用前用脱脂棉过滤,加热煮沸后冷却备用。

### 1.2 实验方法

培养液参照 f/2 的配方配制[Stein 1973],在 1 000 mL 消毒海水中加入以下营养盐:  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  5.66mg,  $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$  15~30mg,  $NaNO_3$  74.8mg,  $VB_1$  0.1mg,  $VH$  0.5 μg,  $VB_{12}$  0.5 μg,微量元素母液 0.1mL。

培养条件:在恒温光照培养箱中培养。温度为  $(20 \pm 1)^\circ C$  和  $(30 \pm 1)^\circ C$ ,光强为 6 000 lx,  $L:D=14:10$ 。

接种密度和孔雀绿浓度:藻液密度以 OD<sub>680nm</sub> 表示,各实验组中藻的接种密度 OD = 0.01,接种后活化培养 24h,然后用 10 μg/L 的孔雀绿母液,配制成浓度分别为 0, 0.02, 0.04,

0.06, 0.08, 0.10  $\mu\text{g/L}$  的六个实验组, 每个浓度重复一次。每次实验观察 4 天, 整个实验重复三次。

### 1.3 测定方法

生长速率的测定: 生长速率以单位水体细胞密度变化作指标。为测定方便和提高结果的准确度, 本实验用 OD 值间接表示细胞密度。为了解 OD 值和细胞密度的关系, 实验前将藻液稀释成不同的浓度梯度, 用 721 分光光度计在 680nm 处测各浓度组的 OD 值, 并将藻液用鲁戈氏碘液固定后用血球计数板计数。结果表明, 其 OD 值与细胞数线性关系良好。

叶绿素 a 和胡萝卜素含量的测定: 取藻液 10mL, 经孔径 0.8  $\mu\text{m}$  的玻璃纤维滤膜过滤, 用 90% 丙酮低温暗中萃取 24h, 叶绿素和胡萝卜素的含量分别用荧光法[国家海洋局 1991] 和 Jensen 法[Jensen 1978] 测定。

蛋白质含量的测定: 取藻液 30mL, 加甲醛固定, 待细胞沉淀后, 弃上清液, 加 2mL 浓硫酸, 用微量凯氏定氮法测定[中山大学生物系 1978]。

对以上所有测定结果统计并计算标准差, 用平行插入法计算孔雀绿的半效应浓度。

## 2 实验结果

### 2.1 孔雀绿对金藻生长的影响

室内培养实验结果表明, 孔雀绿对金藻生长速率有明显影响(图 1)。孔雀绿在 0.02 ~ 0.10  $\mu\text{g/L}$  范围内除 0.02  $\mu\text{g/L}$  浓度组金藻的生长速率高于或等于对照组外, 其他各组的生长速率均低于对照组, 出现了抑制作用, 其抑制程度随孔雀绿浓度增加而逐步增加。说明孔雀绿在 0.02  $\mu\text{g/L}$  对金藻无毒害作用, 浓度  $\geq 0.04$   $\mu\text{g/L}$  毒害作用明显, 且浓度越大毒性越大。孔雀绿对金藻生长的 48h 和 96h  $\text{Ec}_{50}$ , 20  $^{\circ}\text{C}$  时分别为 0.080  $\mu\text{g/L}$  和 0.072  $\mu\text{g/L}$ ; 30  $^{\circ}\text{C}$  时分别为 0.060  $\mu\text{g/L}$  和 0.056  $\mu\text{g/L}$ 。

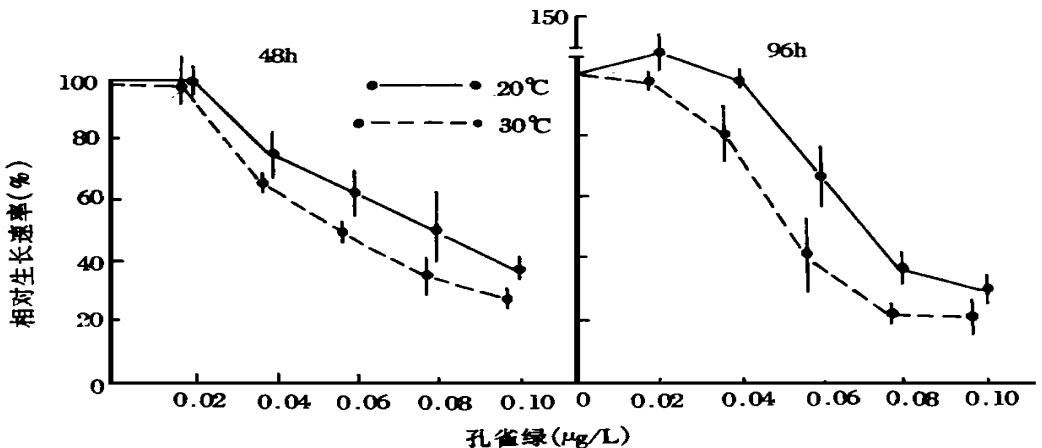


图 1 孔雀绿对金藻生长速率的影响

Fig. 1 Effects of malachite green on growth rate of *Dicrateria zhanjiangensis*

## 2.2 孔雀绿对金藻叶绿素 a 含量的影响

和对照组相比, 孔雀绿对叶绿素 a 含量的影响明显(图 2)。除 20℃下 0.02 μg/L 的孔雀绿对叶绿素 a 的含量有促进作用外, 其他各浓度组叶绿素的含量均有不同程度的减少, 浓度越大和温度越高, 减少越多。孔雀绿对金藻叶绿素 a 减少的 48h 和 96hEC<sub>50</sub>, 20℃时分别为 0.08 μg/L 和 0.07 μg/L; 30℃时分别为 0.06 μg/L 和 0.055 μg/L。

## 2.3 孔雀绿对金藻胡萝卜素含量的影响

图 3 表示了不同温度下, 不同浓度的孔雀绿对金藻胡萝卜素含量的影响。从图中看出孔雀绿对胡萝卜素含量的影响与叶绿素 a 一样, 也表现为 0.02 μg/L 的孔雀绿在 20℃下使胡萝卜素含量有所增加, 其他各浓度组胡萝卜素含量均不同程度减少, 浓度越大减少越多。孔雀绿对金藻胡萝卜素减少的 48h 和 96hEC<sub>50</sub>, 20℃时 48h 减少不到一半, 96h 为 0.070 μg/L; 30℃时分别为 0.074 μg/L 和 0.056 μg/L。

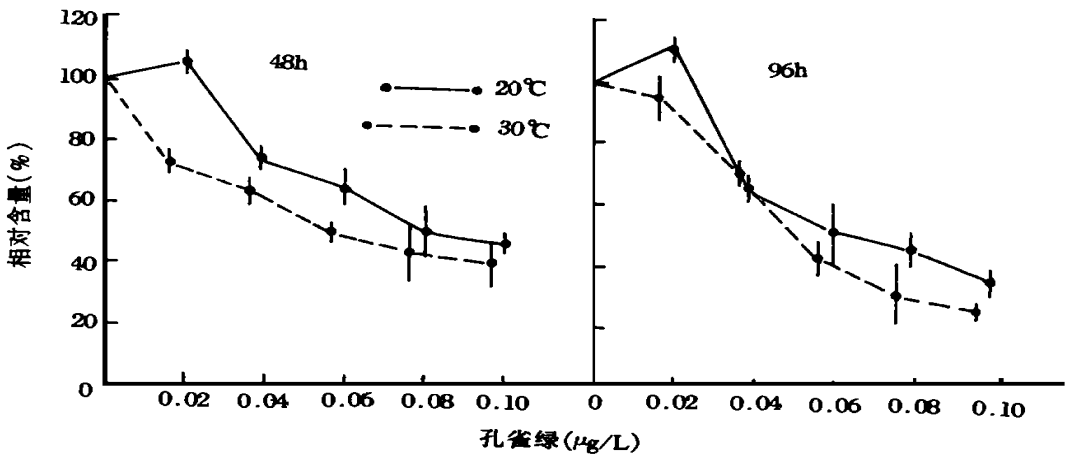


图 2 孔雀绿对金藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 2 Effects of malachite green on chlorophylla content of *Dicteria zhanjiangensis*

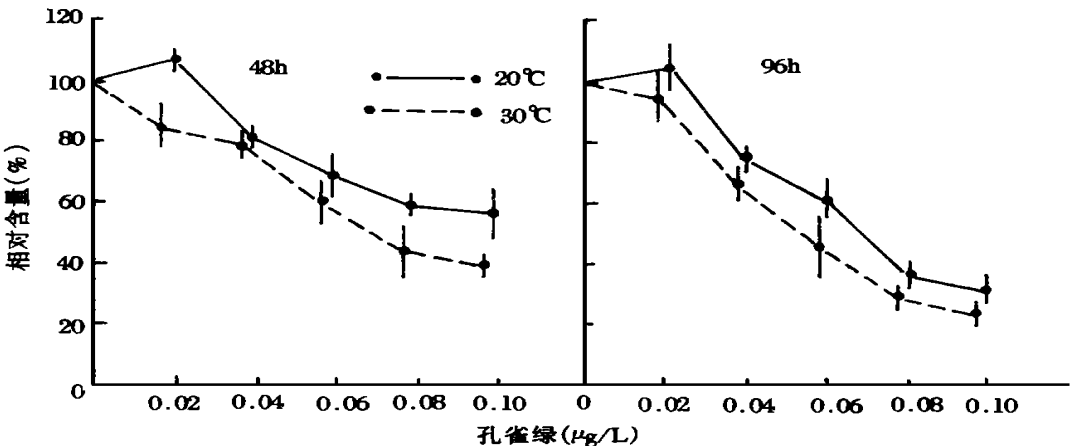


图 3 孔雀绿对金藻胡萝卜素含量的影响

Fig. 3 Effects of malachite green on carotene content of *Dicteria zhanjiangensis*

## 2.4 孔雀绿对金藻蛋白质含量的影响

通过对各浓度组金藻蛋白质含量的测定结果表明,用  $0.02 \mu\text{g/L}$  的孔雀绿在  $20^\circ\text{C}$  下培养金藻 48h~96h 蛋白质含量高于对照组,其余各浓度组总的趋势是随孔雀绿浓度增加蛋白质的含量相应减少(图 4)。各浓度组蛋白质的含量和细胞数量密切相关,蛋白质数量减少,说明细胞数量减少,由此更进一步证明,在孔雀绿作用下,金藻的生长受到了抑制。

金藻用不同浓度的孔雀绿处理后,生长速率、叶绿素 a、胡萝卜素和蛋白质含量的测定结果,采用多重比较的 Dunnett 法,5 种浓度分别与对照的差异显著性检验,除  $0.02 \mu\text{g/L}$  浓度组外,其他各组以上各项指标差异均非常显著( $P < 0.01$ )。

## 2.5 温度对孔雀绿毒性的影响

不同温度下孔雀绿对金藻的毒性影响不同。在  $0.02 \sim 0.10 \mu\text{g/L}$  浓度范围内培养 4 天结果表明,生长速率、叶绿素 a 和胡萝卜素含量在  $20^\circ\text{C}$  下均大于  $30^\circ\text{C}$  下的含量,说明在较高温度下孔雀绿的毒性较大(图 1、图 2 和图 3)。孔雀绿对金藻蛋白质含量的影响,与以上结果稍有不同,在两天内和以上结果一致,即在  $30^\circ\text{C}$  下蛋白质含量低于  $20^\circ\text{C}$ ,但在第四天  $30^\circ\text{C}$  下有的浓度组高于  $20^\circ\text{C}$  下的蛋白质含量(图 4)。

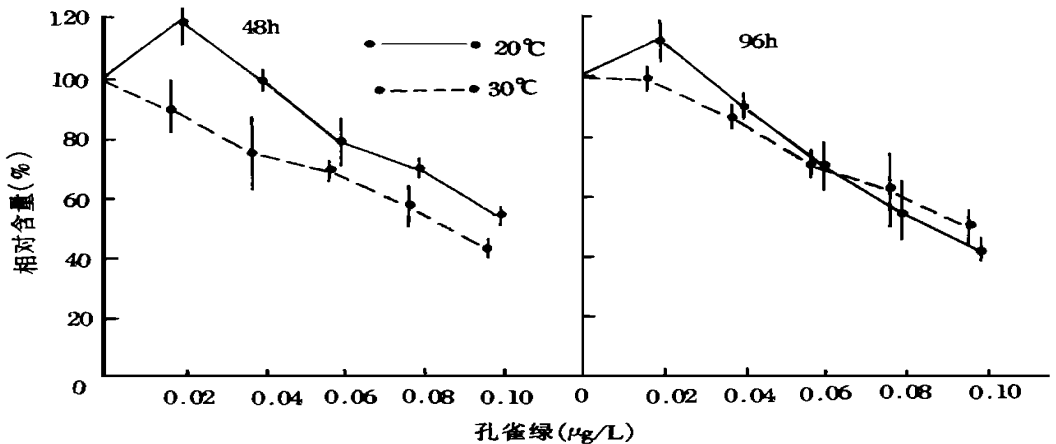


图 4 孔雀绿对金藻蛋白质含量的影响

Fig. 4 Effects of malachite green on protein content of *Dicrateria zhanjiangensis*

## 3 结论和讨论

$0.02 \mu\text{g/L}$  浓度的孔雀绿对金藻有轻微的影响,浓度等于或大于  $0.04 \mu\text{g/L}$  能使金藻的生长速率、叶绿素 a、胡萝卜素和蛋白质的含量比对照组明显减少,差异非常显著( $P < 0.01$ ),并且孔雀绿浓度越大减少越多。说明  $0.04 \mu\text{g/L}$  微量的孔雀绿对金藻有较大的毒性。

$0.02 \mu\text{g/L}$  的孔雀绿,在  $20^\circ\text{C}$  的温度下,金藻的生长速率、光合色素和蛋白质含量与对照组相比均稍有增加,出现了促进作用,这一现象在不少研究中都曾经出现过[高尚德等 1994, Stebbing 1982]。认为毒物在低浓度下的促进作用是“毒物兴奋效应”。

温度对孔雀绿的毒性有明显的影响,在  $30^\circ\text{C}$  下用浓度  $\geq 0.02 \mu\text{g/L}$  的孔雀绿海水培养金

藻,其生长速率、叶绿素 a 和胡萝卜素含量均低于 20 °C 下培养的。以上表明,孔雀绿在较高温度下毒性较大。这可能是较高温度下藻类细胞透性较大,孔雀绿进入细胞较快的结果,此外,也可能 20 °C 是金藻生长的较适温度(金藻生长适温是 23 °C),在此温度下生活力较强,抗性较强,而在 30 °C 下生活不适,抗性较弱的结果。

养虾池中施用的孔雀绿浓度对微藻有明显毒害作用。孔雀绿用于治疗对虾褐斑病、白斑病、眼球坏死病,其用药浓度为 0.1~0.2 μg/L,治疗丝状细菌病及固着性纤毛虫和吸管虫病,其用药浓度为 5 μg/L [张伟权 1991],以上浓度对金藻来说已大大高于半致死浓度。以 0.2 μg/L 为例计算,假如每天按 1/4 常规换水,4 天时水体孔雀绿浓度仍为 0.084 μg/L 左右。本实验表明在此浓度下孔雀绿对金藻的生长速率、叶绿素 a、胡萝卜素和蛋白质含量均出现了明显的抑制甚至破坏作用。20~30 °C 温度范围正是对虾养成过程中养虾池的水温变化范围,因而在养虾池中如何施用孔雀绿,使得既能防治虾病,又不致严重污染环境,使一级食物链不被破坏,是养虾生产中值得注意的一个问题。

### 参 考 文 献

- 中山大学生物系. 1978. 生化技术导论. 北京:人民教育出版社. 34~35.
- 张伟权. 1991. 对虾养成期疾病及其防治. 海洋科学, (1): 2~7.
- 国家海洋局. 1991. 海洋监测规范 HY/T 003. 9~91.
- 高尚德, 吴以平, 赵心玉. 1994. 有机锡对海洋微藻的生理效应. 海洋与湖沼, 25(3): 259~265.
- Jensen A. 1978. Chlorophylls and Carotenoids. In: Hellebust J A, Craigie T S, ed. Handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods. New York: Cambridge University Press. 59~70.
- Stebbing A R D. 1982. Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Sci Tot Envir, 22: 213~234.
- Stein J R. 1973. Handbook of phycological methods; Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge. 37.

## THE TOXIC EFFECTS OF MALACHITE GREEN ON *DICRATERIA ZHANJIANGESIS*

WU Yi-Ping, ZHAO Su-Da<sup>1</sup>, WU Guo-Xin, GAO Shang-De  
(Ocean life College, Ocean University of Qingdao, 266003)  
(Department of Biochemistry, Education College of Qingdao 266071)<sup>1</sup>

**ABSTRACT** Under the temperature between 20 °C and 30 °C, *Dicrateria zhanjiangensis* was cultured in the seawater containing different concentrated (0.02~0.10 μg/L) Malachite green, within 4 days, the Malachite green of 0.02 μg/L has a slight effect on *Dicrateria*, and in the concentrations  $\geq 0.04 \mu\text{g/L}$ , with concentration of Malachite green increasing, the growth rate, content of chlorophylla, carotene and protein of *Dicrateria* were reduced markedly. Temperature has an evident effect on toxicity of Malachite green, the higher the temperature is, the greater the toxicity will become.

**KEYWORDS** Malachite green, *Dicrateria zhanjiangensis*, Toxicity