

17β-雌二醇光降解效果测试的微藻生物实验方法

葛利云, 曾 丽, 吴 峰, 邓南圣

(武汉大学环境科学系, 湖北 武汉 430072)

摘 要: 采用室内培养的方法, 从藻的生长, 藻的叶绿素 a、b 及类胡萝卜素含量这四个方面研究了藻类对水体中 17β-雌二醇的光降解的影响。结果发现, 光降解前 17β-雌二醇对普通小球藻的生长有明显的抑制作用, 也会引起光合色素浓度的降低; 光降解后其抑制作用有所减缓。此结论表明光降解对减弱 17β-雌二醇的生物毒性是有效的, 但光降解过程还需进一步优化。

关键词: 光降解; 17β-雌二醇; 普通小球藻; 光合色素

中图分类号: X131.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2004)02-0404-04

Microalgal Bioassays as a Test of Photodegradation Efficiency of 17β-estradiol

GE Li-yun, ZENG Li, WU Feng, DENG Nan-sheng

(Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Effects of chlorella vulgaris on the photodegradation rate of 17β-estradiol in aqueous solutions were investigated through examining the growth and the photosynthetic pigments content (including chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids) of Chlorella vulgaris. The results showed that 17β-estradiol could restrain the growth of Chlorella vulgaris and reduce their photosynthetic pigments content, but the effects of photodegraded 17β-estradiol on Chlorella vulgaris (exposed to high pressure Hg-lamp (250W, $\geq 365\text{nm}$)) tended to decrease. Hence, using photodegradation to decrease the biologic toxicity of 17β-estradiol is effective, but this process need be optimized.

Keywords: photodegradation; 17β-estradiol; Chlorella vulgaris; photosynthetic pigments

近年来, 关于环境雌激素干扰人类和动物的内分泌系统、影响健康和生殖的研究与日俱增^[1]。环境雌激素对内分泌系统、生殖与发育和免疫系统都会产生影响, 并有致癌作用和神经系统毒效应^[2]。普通的水处理方法不能很有效地去除水中的雌激素^[3, 4]。目前采取的环境雌激素对策除了停止生产或减少使用含有扰乱内分泌作用的化学物质外, 迫切需要其他的方法对环境雌激素进行分解和消除。目前, 通过催化降解, 如催化水解等^[4, 5]消除环境雌激素已成为重要的研究课题。其他的方法还有高温熔解、微生物分解法、机械化学法和电解法等。

对于这些方法的处理效果的测试, 目前常用的还是化学测试法^[6, 7], 生物测试方法的报道较少。2001年, Rioboo 等人采用普通小球藻和衣藻对两种常见除

草剂(百单枯和羟基二甲苯基苯并呋喃醇)光降解效率进行了微藻生物测试^[8]。用两个生态毒性研究的常用参数—藻类的生长速率和光合色素含量来对这两种农药作出响应。

本文研究了普通小球藻对 17β-雌二醇光降解效果的微生物测试。在城市废水处理厂的排水及河流、水库、湖泊等水域均发现有这类物质的存在, 废水的一级和二级处理很难将其全部除去, 本课题组利用光化学方法来处理雌二醇, 取得较好的处理效果。选用单细胞藻类作为测试生物, 是因为它们是水体营养链能量流动的要素, 被用于毒性生物测定有许多优点, 如对有机污染物很敏感, 易于操作, 生命周期很短。

17β-雌二醇(17β-estradiol, E2), 其分子结构式如图 1 所示。

1 仪器与试剂

仪器: LD5-2A 型低速离心机, UV-9100 型紫

收稿日期: 2003-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(20177017)

作者简介: 葛利云(1979—), 女, 硕士研究生, 目前从事藻参与环境光化学过程研究。

联系人: 吴 峰, E-mail: envchem@whu.edu.cn

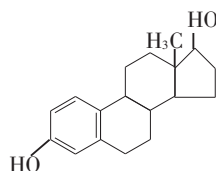


图 1 17β-雌二醇的分子结构

Figure 1 Molecular structure of 17β-estradiol

外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), 250 W 自镇流式高压汞灯($\lambda_{\max} \geq 365$ nm), HY-8 型调速振荡器(国华电器有限公司), HGP300 型恒温光照培养箱, PHS-3C 数字精密酸度计。

试剂: 17β-雌二醇(分析纯, Sigma 公司), 普通小球藻藻种, 抗坏血酸(分析纯), 无水乙醇和 NaOH 均为分析纯; 水生 4 号培养基。

2 实验方法

2.1 普通小球藻的培养

按照水生 4 号培养基的标准配制普通小球藻培养液。用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液调节 pH 值为 7.0~7.2。灭菌 20 min, 冷却后, 无菌条件下进行接种, 再放入恒温培养箱内进行培养。温度为 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。

2.2 普通小球藻的生长曲线的测试

用血球记数板每天对培养中的普通小球藻进行计数, 并用 UV-9100 型紫外可见分光光度计对藻液进行吸光度同步测定, 连续测量 5 d, 得出吸光度—小球藻个数的关系式:

$$Y = -0.0149 + 0.09714X, r = 0.99957, n = 5$$

式中: Y 为吸光度 (ABS); X 为普通小球藻个数 ($\times 10^{10}$ 个 $\cdot \text{L}^{-1}$)。

2.3 普通小球藻悬浮液的预处理

胶状的氢氧化铁颗粒自身具有光敏化作用, 本次实验用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抗坏血酸清洗藻类悬浮液, 去除藻类培养基中可能吸附在藻细胞上氢氧化铁^[9]。对藻类悬浮液采用离心方法进行清洗后, 经检测知, 留在溶液中培养基中铁的浓度将小于 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 即可排除其影响。

具体步骤为: 用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸调节悬浮液的 pH=3, 轻度搅拌 30 min, 离心 20 min, 转速为 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。然后倒出上层清液, 加蒸馏水清洗 3 次。对清洗后的藻液进行定容, 并计数。

2.4 普通小球藻色素的提取方法

从样品中取出 20 mL 溶液, 分别放在 5 mL 离心

管中, 放入离心机中离心 10 min, 转速 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 倒掉上层清液, 加 90% 丙酮溶液, 摇匀, 进行萃取。在暗处抽提 24 h 后取出, 利用分光光度计分别测量 630 nm, 645 nm, 665 nm 波长下的吸光度, 运用 Parsons 和 Strickland 提出的 (1968 年) 的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素计算公式分别计算出藻的色素含量^[10]。计算公式如下:

$$C_{\text{叶绿素 a}} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = (11.6 \times D_{665} - 1.31 \times D_{645} - 0.14 \times D_{630}) \times v \times l^{-1} \times V^{-1}$$

$$C_{\text{叶绿素 b}} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = (20.7 \times D_{645} - 4.34 \times D_{665} - 4.42 \times D_{630}) \times v \times l^{-1} \times V^{-1}$$

$$C_{\text{类胡萝卜素}} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = (55 \times D_{630} - 4.64 \times D_{665} - 16.3 \times D_{645}) \times v \times l^{-1} \times V^{-1}$$

式中: v 为丙酮溶液的体积, mL; l 为比色皿的光径, cm; V 为藻液的体积, L。

2.5 17β-雌二醇的光降解溶液制备

取一定量的 17β-雌二醇溶液, 加入相同量的微囊藻, 配制成浓度分别为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 在高压汞灯下光照 4 h, 取出冷却, 得到 E2 的光降解溶液, 以备后续实验所用。

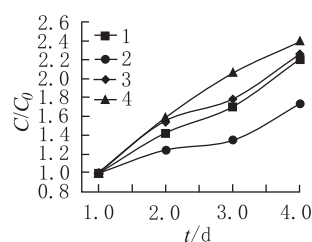
将上述预处理好的微囊藻藻液在高压汞灯下光照 4 h, 取出冷却, 离心后得到 E2 光降解体系本底溶液, 以备后续实验所用。

分别取 E2 溶液、E2 的光降解后的溶液、微囊藻的光降解体系本底溶液各 10 mL, 加入到培养液中, 总体积为 200 mL。然后进行培养。

3 结果与讨论

3.1 光降解对普通小球藻生长速率的影响

从图 2 中可以看出, 加入初始浓度为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的光降解前后的 E2 时, 经过 96 h 培养, 光降解前的 E2 使得普通小球藻的生长量降低了 21.3%, 光降解后 E2 加入使小球藻生长速率有小幅

图 2 普通小球藻的生长速率 k (/d)

(E2 浓度为 $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 2 The growth rate of *Chlorella vulgaris* k (/d)

(the concentration of E2 was $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

度增长。利用回归分析计算了小球藻的生长速率 k , 结果列于表 1。比较 k 值可以发现, 未光降解时 E2 抑制了小球藻的生长, 光降解后则较大幅度促进了小球藻的生长。考虑到光降解体系本底物质(包括培养基、作为催化剂的微囊藻的分泌物等)可能对小球藻的生长有影响, 为此做了相应的对照实验。结果表明光降解体系本底对小球藻生长也有明显促进作用, 使得小球藻的生长速率从 0.390/d 增长到 0.405/d, 但是这一增长幅度仍然小于 E2 光降解后对小球藻生长的促进效率(后者生长速率达到 0.465/d)。

表 1 不同条件下普通小球藻生长速率 k (/d)
Table 1 The growth rate of Chlorella vulgaris k under different conditions (/d)

E2 初始浓度	对照	E2	E2 光降解	光降解体系本底
$3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.390	0.232	0.465	0.405
$6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	—	—	0.252	—

从表 1 的数据可以看出, 当 E2 初始浓度提高 1 倍时($6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), E2 光降解后对小球藻的生长有着明显的抑制作用, 生长速率仅为 0.252/d, 但是这一生长速率仍然略高于 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 存在下小球藻生长速率 0.232/d。从污染物浓度与毒性关系考虑, $6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 会使得小球藻生长速率低于 0.232/d。所以可以得出结论: $6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 光降解后使得其对小球藻生长的抑制作用减弱。当然由于 E2 的光降解效率一般低于 50%, $6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 光降解后参与浓度高于 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这就使得 $6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ E2 光降解后对小球藻生长的影响不同于较低浓度 ($3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的情况, 即没有促进反而抑制。

有文献报道, E2 的光降解使得其分子中的苯环结构发生氧化、断裂, 产生了低分子羧酸产物^[11], 这些产物的毒性较小, 而如果光降解效率更高, 浓度更大, 则会使得 E2 发生矿化生成水和二氧化碳, 这样就能实现无害化处理了。因此, 从本实验结果也可以推断, E2 光降解减弱了 E2 对普通小球藻的毒性。

3.2 光降解对普通小球藻光合色素浓度的影响

除了直接用小球藻生长量和生长速率来判断有机物光降解前后的毒性变化, Rioboo 等^[8]还通过测定藻细胞光合色素浓度来说明上述问题。本实验也测定了光降解前后的 E2 对普通小球藻细胞光合色素浓度的影响, 结果如表 2 所示。与对照实验相比, 光降解前后都导致了细胞中叶绿素 a、b 及类胡萝卜素含量的降低, 而光降解体系本底实验却引起了色素含量的增

加, 此现象可能是由于普通小球藻细胞数量增加引起的。

表 2 不同条件下普通小球藻的光合色素浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{细胞}$)
Table 2 The photosynthetic pigments content of Chlorella vulgaris under different conditions ($\mu\text{g} \cdot \text{cells}$)

	对照实验	E2	E2 光降解	E2 光降解体系本底
E2 浓度	$3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
叶绿素 a	0.457	0.155	0.238	0.605
叶绿素 b	0.129	0.054	0.083	0.178
类胡萝卜素	0.072	0.026	0.065	0.082
E2 浓度	$6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
叶绿素 a	—	0.165	0.078	—
叶绿素 b	—	0.064	0.035	—
类胡萝卜素	—	?	0.046	—

注: ? 表示不必要进行的对照实验。

比较表 2 中不同初始浓度 E2 光降解前后对普通小球藻光合细胞色素浓度的影响可以看出, 随着浓度的提高 ($6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 光降解前后都呈现抑制效果, 因为 E2 自身降解效率较低, 即使降解后 E2 的浓度仍然高于 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度。因此从本实验结果也可以断定光降解作用使得 E2 对普通小球藻的毒性减弱了。

4 结论

本实验研究表明, E2 在低浓度时, 对普通小球藻的生长及其色素浓度都有一定的抑制作用; 随着浓度的提高, 抑制作用会有明显加强的趋势; 经光降解后, 对小球藻生长有一定的促进作用, 但促进效率不是很高。对于光合色素浓度的影响, 在低浓度时, 光降解前产生抑制作用, 光降解后则有一定促进效果; 随着浓度的提高, 光降解前后都呈现抑制效果。因为 E2 自身降解效率较低, 即使降解后 E2 的浓度仍然高于低浓度, 因此浓度提高后, 光降解后要比光降解前的光合色素浓度低, 而呈现出抑制作用。说明通过光解可以在一定程度上减弱雌二醇的生物毒性, 以达到无害化处理的目的, 但是光降解过程需要进一步优化。

参考文献:

[1] 世界资源研究所, 联合国环境规划署, 联合国开发计划署, 等. 世界资源报告 - 环境变化与人体健康(1998 ~ 1999)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999. 3.
[2] 郑刚. 环境雌激素对机体的影响[J], 国外医学卫生学分册, 2001, 28(4): 197 - 201.
[3] Snyder S A, Keith T L, Verbrugge D A, et al. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures[J].

- Environ Sci Technol*, 1999, 33 (16): 2814 – 2820.
- [4] Coleman H M, Eggins B R, Byme J A, et al. Photocatalytic degradation of 17- β -estradiol on immobilized TiO₂ [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2000, 24(1): L1 – L5.
- [5] Franke R, Franke C. Model reactor for photocatalytic degradation of persistent chemicals in ponds and wastewater [J]. *Chemosphere*, 1999, 39 (15): 2651 – 2659.
- [6] 刘清,王子健,汤鸿霄. 重金属形态与生物毒性及生物有效性关系的研究进展[J],环境科学,1996,17(1):89 – 92.
- [7] 钱黎明,钟育彬,林伟华. 水源水细菌遗传毒性与化学污染强度的比较[J]. 癌变·畸变·突变,1999,11(4):188 – 191.
- [8] C Rioboo, D Franqueira, M L Canle, et al. Microalgal bioassays as a test of pesticide photodegradation efficiency in water[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2001, 67: 233 – 236.
- [9] Zepp R G, Schlotzhauer P F. Influence of algae on photolysis rates of chemicals in water[J]. *Environ Sci Technol*, 1983, 17(8): 462 – 468.
- [10] Strickland J D H, Parson T R. A practical handbook of seawater analysis: Pigment analysis. *Bull Fish Res Bd Canada*, 1968. 167.
- [11] Bin Liu, Feng Wu, Nan – sheng Deng. UV – light induced photodegradation of 17 β – ethynylestradiol in aqueous solution[J], *Journal of Hazardous Materials*, 2003, B98: 311 – 316.