

# 应用斑马鱼和凡纳对虾诊断污染场地污水的生物毒性

徐建<sup>1,2</sup>, 林玉锁<sup>2</sup>, 金鑫<sup>1,2</sup>, 张胜田<sup>2</sup>, 田猛<sup>2</sup>, 张孝飞<sup>2</sup>, 刘鹏<sup>1,2</sup>

(1. 南京农业大学资源与环境学院, 江苏 南京 210095;

2 国家环境保护部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

**摘要:**应用斑马鱼 (*B rachydanio rerio*) 和凡纳对虾 (*P enaeus vannam ei*) 对某废弃有机污染场地中有毒有机废弃物堆积产生的污水 (1号塘污水) 和场地及周边地表径流积水 (2号塘污水) 的生物毒性进行了试验。结果表明, 1号塘污水对斑马鱼和凡纳对虾 96 hLC<sub>50</sub> 分别为 46.2% 和 59.6%, 2号塘污水的毒性试验中两种试验生物的死亡率皆为 0。化学检测表明, 1号塘污水中的主要污染物为苯酚类和酞酸脂类物质, 而 2号塘污水中均未检出有机污染物。化学检测结果与毒性试验结果具有较好的相关性。

**关键词:** 污染场地; 斑马鱼; 凡纳对虾; 生物毒性; 污染诊断; 风险评估

**中图分类号:** X835 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2008)05-0052-04

## Diagnosis of Bio-toxicity of Sewage from Contaminated Sites with Zebrafish and *P enaeus Vannam ei*

XU Jian<sup>1,2</sup>, L N Yu-su<sup>2</sup>, J N Xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Sheng-tian<sup>2</sup>, TIAN Meng<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-fei<sup>2</sup>, L U Peng<sup>1,2</sup>

(1. College of Resource and Environment Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 Njing Institute of Environmental Sciences, State Environmental Protection Administration, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

**Abstract:** Bio-toxicity test of sewage was made from a discarded organic contaminated site adopting Zebrafish (*B rachydanio rerio*) and *P enaeus vannam ei*. The sewage was collected from pond 1 in which organic solid waste was stacked and pond 2 that holded runoff water. Results showed the 96 hLC<sub>50</sub> of sewage from pond 1 on the Zebrafish and *P enaeus vannam ei* were 46.2% and 59.6% respectively. The test of sewage from pond 2 caused no mortality. Chemical analysis results showed that the main pollutions were phenols and phthalate esters in sewage from pond 1, and no organic pollutions were detected in sewage from pond 2. The bio-toxicity test was highly related to the chemical analysis.

**Key words:** Contaminated sites; Zebrafish (*B rachydanio rerio*); *P enaeus vannam ei*; Bio-toxicity; Pollution diagnosis; Hazard assessment

随着我国经济的快速发展与工业产业结构的调整, 已搬迁或废弃的工业污染场地环境安全问题已引起广泛关注<sup>[1-5]</sup>, 对污染场地的状况进行调查、诊断及危害识别刻不容缓, 而我国在该领域的研究和实践刚刚起步<sup>[6-8]</sup>。虽然采用化学分析方法能定量分析污染场地土壤、水体和大气中污染物主要成分的质量浓度, 但却难以直接和全面地反映各种有毒物质对环境的综合影响, 而生物毒性试验能够弥补理化检测的不足, 能够提供污染介质的综合毒性。因此, 将其应用于诊断污染场地对生态环

境的危害是一种很有效的方法。

用于毒性试验水生生物主要有: 鱼<sup>[9-12]</sup>、藻类<sup>[13]</sup>、大型溞类<sup>[14]</sup>、虾<sup>[15]</sup>等, 选择国际标准化组织 (ISO) 推荐的试验鱼种斑马鱼及该污染场地常见水生物种凡纳对虾为试验生物, 对某废弃有机工

收稿日期: 2008-01-30; 修订日期: 2008-06-14

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“九七三”基金资助项目 (2002CB410805); 全国土壤现状调查及污染防治专项基金资助项目

作者简介: 徐建 (1983—), 男, 江苏淮安人, 硕士研究生, 从事污染场地调查与修复研究。

业污染场地产生的污水进行急性毒性试验,初步诊断了该场地污水的生物毒性,为进一步开展危害识别和风险评估提供了试验依据。

### 1 材料方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 试验生物

斑马鱼 (*B rachydanio rerio*),真骨鱼总目,鲤科。试验鱼体长 (30 ±5)mm, (0.3 ±0.1)g,选自同一驯养池中规格大小一致的幼鱼,在相同试验环境下,连续曝气的水中驯养 2 周。试验前 24 h 停止喂食,每天清除粪便及食物残渣。驯养期间无一尾鱼死亡。凡纳对虾 (*Penaeus vannamei* Boone, 1931),十足目,对虾属。虾体长 (60 ±50)mm, (5 ±1)g,在相同试验环境下,连续曝气的水中驯养 1 周。驯养期间死亡率小于 10%。

##### 1.1.2 试验器材

化学惰性材料制成的水族箱,高 5 cm,长 30 cm,宽 15 cm。实验容器使用前彻底洗净。pH 计,溶氧仪。

#### 1.2 条件

试验用水为经人工曝气去氯后的自来水,溶解氧 6 mg/L ~7 mg/L, pH 值为 7.1。每天光照 12 h ~16 h。试验期间水温保持在 (23 ±1) 。采用经曝气的标准稀释水, pH 值为 (7.8 ±0.2),硬度约 250 mg/L (以 CaCO<sub>3</sub> 计),溶解氧质量浓度达空气饱和值 (ASV)。试验前 24 h 停止给试验鱼 (虾) 喂食,整个试验期间亦不喂食。

#### 1.3 样品

该污染场 20 世纪 70 年代开始使用,原为工业废旧桶处置场地,加工过程中产生的涮废液和废渣长期堆积,直接暴露于土壤表面和地表水中。样品分别采自该场地东、西 2 个水塘,其中 1 号塘污水主要为有机固废堆积产生的污水,颜色发黑,有强烈气味;2 号塘污水为地及周边地表径流水。水样密闭在 4 下保存。试验前,1 号塘污水的 pH 值为 7.03 ~7.49,2 号集水塘水样的 pH 值为 7.45 ~7.69。

#### 1.4 试验方法<sup>[16-19]</sup>

从 24 h 预备试验中杀死全部鱼的原塘水最低体积分数与未毒死鱼的原塘水最低体积分数之间,选择试验体积比, V (稀释水) / V (1 号塘污水原水) 分别为 9 1、4 1、2 3、3 2、4 1。配比水总体积为

3 000 mL, 每个容器中放 10 尾鱼 (虾),设置 5 个体积分数组 (10%、20%、40%、60% 和 80%) 和 1 个空白对照组,每个体积分数组设 3 个平行。试验采用换水式,每 12 h 更换 1 次试验液,持续 96 h,每天记录死鱼 (虾) 数及中毒症状,并将死鱼 (虾) 及时取出。

#### 1.5 统计方法

使用 SPSS 13.0,采用概率单位分析 (probit analysis) 估算 LC<sub>50</sub> 及其 95% 置信区间。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 两种污水毒性的比较

1 号塘水稀释 10 倍以上,对试验鱼群无明显影响;稀释 5 倍以上,对凡纳对虾无明显影响。原塘水污染物质量浓度较高时,对斑马鱼和凡纳对虾均具有急性毒性作用,能致其对外界反应迟钝、游动不自然、侧游、失去平衡甚至失去游动能力 (斑马鱼) 及反应迟钝、行动缓慢甚至昏厥 (凡纳对虾),96 h LC<sub>50</sub> 分别为 46.2% 和 59.6%, 见图 1、图 2,而 2 号塘水原水对斑马鱼和凡纳对虾均无急性毒性。

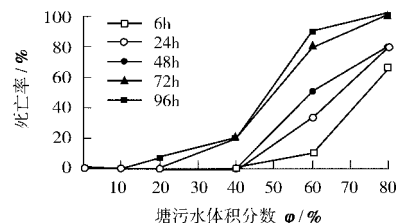


图 1 1 号塘污水对斑马鱼的剂量 - 效应关系

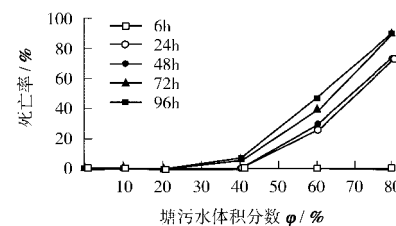


图 2 1 号塘污水对凡纳对虾的剂量 - 效应关系

参照由国际标准化组织 (ISO) 推荐的方法,利用斑马鱼的 96 h LC<sub>50</sub> 的范围及急性毒性单位 (Tua) 对工业废水毒性等级划分,1 号塘污水达中毒等级,2 号塘污水为微毒或无毒等级。Tua = 1 / LC<sub>50</sub>,若 Tua > 0.3 表示对环境有影响。1 号塘污水的生物毒性

远远大于 2 号塘污水,工业废水毒性等级的划分方法见表 1<sup>[9]</sup>。

表 1 工业废水毒性等级划分标准

毒性等级 Toxicity rank	96 hLC <sub>50</sub>	Tua
极毒 Terribly	<1	>100
高毒 Highly	1 ~ 10	10 ~ 100
中毒 Moderately toxic	10 ~ 50	2 ~ 10
低毒 Lowly toxic	50 ~ 100	1 ~ 2
微毒或无毒 Tiny or innocuity	NAT	<1

### 2.2 不同暴露时间对生物毒性的影响

在相同暴露时间下,1 号塘污水对斑马鱼的 LC<sub>50</sub>均低于凡纳对虾,且随着暴露时间的增加,斑马鱼 LC<sub>50</sub>的降低趋势更为显著。由此可见,同一污染物对不同水生生物毒性存在差异,斑马鱼对 1 号塘污水毒性的敏感性高于凡纳对虾,更适合该类型污染的毒性诊断。

某些农药对斑马鱼的 96 hLC<sub>50</sub>与 24 h 和 48 h LC<sub>50</sub>相近<sup>[20]</sup>,而场地污水对试验生物不同时间的 LC<sub>50</sub>相差较大,表明在测试污染场地生物急性毒性时,24 hLC<sub>50</sub>和 48 hLC<sub>50</sub>有时并不能代替 96 h 的结果,应选择 96 hLC<sub>50</sub>作为生物试验的急性毒性指标。

### 2.3 水样毒性试验与化学检测结果的相关性

为验证斑马鱼和凡纳对虾对该场地两种污水的急性毒性试验结果,对采集的污水中污染物的主要成分进行了定性、定量检测。依据该场地污染源特征,采用 GC/MS 方法检测挥发性有机物 (VOC) 和半挥发性有机物 (SVOC)。结果表明,2 号污水中未检出有机污染物,而 1 号塘的污水中检测出的有机污染物,以苯酚类和酞酸酯类为主,其中苯酚类居多,见表 2。

表 2 1 号塘污水检出的主要污染物结果

化合物类别	化合物名称	$f(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
苯酚类	苯酚	30.1
	2-氯苯酚	1.00
	2-甲基苯酚	69.4
	3-甲基苯酚, 4-甲基苯酚	21.6
	2-硝基苯酚	75.0
	2,4,6-三氯苯酚	1.66
	2,4,5-三氯苯酚	0.94
酞酸酯类	邻苯二甲酸二丁酯	4.18
	邻苯二甲酸二(2-乙基己酯)	66.8

苯酚类对斑马鱼有较高的毒性<sup>[21-22]</sup>,其中酞酸酯类化合物中,随着苯环上氯取代基的增加,毒性显著增大,2,4-二氯苯酚和五氯苯酚对斑马鱼的 48 hLC<sub>50</sub>分别为 4.62 mg/L 和 0.102 mg/L,且其作用为协同,对斑马鱼的联合毒性远远大于单一毒性;酞酸酯类物质对斑马鱼也具有较高毒性,邻苯二甲酸二丁酯对斑马鱼的 48 hLC<sub>50</sub>为 8.51 mg/L;同时,根据 EPA 制定的有害废弃物危害性分级系统,2-甲基苯酚、2,4,6-三氯苯酚、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二(2-乙基己酯)都为强持久毒性化合物<sup>[23]</sup>。化学检测和生物毒性试验的结果均表明,1 号污水塘受污染较为严重,毒性较大。水样生物毒性试验与化学检测结果存在较好相关性。

### 3 结论

应用斑马鱼和凡纳对虾毒性试验,能判定有机污染场地的污水对水生生物的毒性,帮助诊断其危害程度。它作为一种快速而实用的方法,可用于场地污染危害识别和生态风险筛选。

#### [参考文献]

[1] US EPA. National oil and hazardous substance pollution contingency plan [S/OL]. Washington DC: Proposed Rule, 53 Federal Register 51394 [2004-06-20]. <http://www.epa.gov>

[2] US EPA. Guidelines for exposure Assessment [S/OL]. Washington DC: Federal Register [2004-06-20]. <http://www.epa.gov>

[3] COLN C F. Assessing risk from contaminated sites: Policy and practice in 16 European countries [J]. Land contamination and reclamation, 1999, 7(2): 33-54.

[4] National environmental protection council (NEPC). Guideline on health risk assessment method [EB/OL]. [2004-06-20]. <http://www.ephc.gov.au>, 1999.

[5] State of the environment Australia. Australia State of the Environment 2001 [EB/OL]. [2004-06-20]. <http://www.deh.gov.au/soe/2001/glossary.html>

[6] 张胜田,林玉锁,华小梅,等. 中国污染场地管理面临的问题及对策 [J]. 环境科学与管理, 2007, 32(6): 5-7.

[7] 刘志全,李丽和,李秀金,等. 石油化工污染土壤中萘的生态风险评价 [J]. 中国环境科学, 2006, 27(6): 746-750.

[8] 李丽和,曹云者,李秀金,等. 典型石油化工污染场地多环芳烃土壤指导限值的获取与风险评价 [J]. 环境科学研究, 2007, 20(1): 30-35.

[9] 李丽君,刘振乾,徐国栋,等. 工业废水的鱼类急性毒性效应研究 [J]. 生态科学, 2006, 25(1): 43-47.

[10] 端正花,郑敏,朱琳. 五氯酚和双酚 A 联合作用对斑马鱼胚

- 胎发育的毒性 [J]. 中国环境科学, 2006, 26 (S1): 121 - 124.
- [11] 王桂燕, 周启星, 胡筱敏, 等. 四氯乙烯和对二氯苯对草鱼的联合毒性 [J]. 中国环境科学, 2007, 27 (3): 387 - 390.
- [12] SCHURE C, NAGEL R. Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish (*B rachydanio rerio*) as an alternative to the acute fish test [J]. Preliminary results, 1994, 22 (2): 12 - 19.
- [13] 洪华常, 周海云, 蓝崇钰. 五氯酚对斜生栅藻的毒性效应研究 [J]. 环境科学研究, 2003, 16 (6): 23 - 25.
- [14] 罗岳平, 邱振华, 李建国. 用水蚤监测水质 [J]. 环境监测管理与技术, 2002, 14 (1): 12 - 16.
- [15] 窦亚卿, 成永旭. 糠虾作为毒性试验标准生物的应用与研究进展 [J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23 (3): 47 - 53.
- [16] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性实验方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [17] 国家质量检验检疫总局. GB/T 13267 - 1991 水质 物质对淡水鱼 (斑马鱼) 急性毒性测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [18] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 725 - 728.
- [19] 国家环境保护总局. 化学品测试方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 188 - 193.
- [20] 潘力军, 高世荣. 几种农药污染的饮用水生物毒性试验 [J]. 中国卫生工程学, 2007, 6 (1): 5 - 7.
- [21] 杨露云, 刘征涛, 王宏, 等. 五氯苯酚与邻氯苯酚和 2, 4 - 二氯苯酚对斑马鱼的联合毒性 [J]. 环境科学研究, 2006, 19 (6): 145 - 148.
- [22] 李文英, 熊丽, 刘荣, 等. 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 对斑马鱼 (*B rachydanio rerio*) 生理生化特性的影响 [J]. 生态毒理学报, 2007, 2 (1): 117 - 122.
- [23] 国家环保局有毒化学品管理办公室. 化学品毒性法规环境数据手册 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992: 230 - 445.

(上接第 19 页)

#### [参考文献]

- [1] 王凤林, 毕彤, 刘振山. 突发性环境污染事故大气扩散数学模型初探 [J]. 环境保护与循环经济, 2004, 20 (2): 35 - 37.
- [2] 潘旭海, 蒋军成. 危险性物质泄露事故扩散过程模拟 [J]. 劳动保护科学技术, 2001, 21 (3): 44 - 46.
- [3] 张明广, 蒋军成, 潘旭海. 基于 GIS 的重大危险源风险管理辅助决策系统 [J]. 天然气工业, 2007, 27 (7): 115 - 119.
- [4] 陈宏坤, 李兴春, 李春晓. GIS 与大气污染扩散模型的整合研究 [J]. 油气田环境保护, 2007, 17 (1): 47 - 50.
- [5] 沈立峰, 赵凌宇. 大气污染事故预测系统的研究 [J]. 污染防治技术, 2006, 19 (5): 3 - 6.
- [6] ARYSTANBEKOVA N K H. Application of Gaussian plume models for air pollution simulation at instantaneous emissions [J]. Mathematics and Computers in Simulation, 2004 (3), 67: 451 - 458.
- [7] RICHARDS M, GHANEM M. Grid-based analysis of air pollution data [J]. Ecological Modelling, 2006, 194 (3): 274 - 286.
- [8] 郑光辉, 黄克龙. 运用克里金空间插值技术进行土地级别划分 [J]. 南京师大学报, 2007, 30 (1): 112 - 116.
- [9] 帅方敏, 卢进登, 王新生. 基于 GIS 空间插值方法的长湖水水质评价 [J]. 环境监测管理与技术, 2007, 19 (4): 40 - 42.
- [10] 国家环境保护局. GB/T 13201 - 1991 制定地方大气污染物排放标准的技术方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [11] 林肇信. 大气污染控制工程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 103 - 106.

本栏目责任编辑 李文峻 薛光璞

· 征订启事 ·

## 欢迎订阅 2009 年《水资源保护》

全国中文核心期刊 中国科技核心期刊

《水资源保护》是河海大学和环境水利研究会主办的科学技术期刊。本刊 1985 年创刊, 统一刊号: CN32 - 1356/TV, 现为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊和江苏省一级期刊, 双月刊, 96 页, 国内外公开发行。

《水资源保护》主要刊登与水资源保护有关的基础研究, 应用技术, 工程措施, 综述述评, 专题讲座, 国外动态, 书刊评介, 科技简讯, 水资源管理、评价、监测、优化配置, 节水技术, 水环境污染控制等方面的文章。近年来, 本刊重点关注与水有关的生态环境领域中的研究方向, 新增设相关的基础研究、防治技术、城市水环境治理等内容。主要读者对象: 全国从事与水资源保护工作有关的工程技术人员、科研人员、管理干部以及大专院校的师生。

邮发代号: 28 - 298, 双月刊, 8 元/期, 全年 48 元, 每逢单月 30 日出版。欲订购者, 请径向当地邮局订购。若无法从邮局订阅, 亦可与编辑部联系索取征订单。

地址: 南京市西康路 1 号河海大学《水资源保护》编辑部 邮编: 210098 电话: (025) 83786642 电子信箱: bh@hhu.edu.cn