

焦化废水对蚕豆毒性的研究

董轶茹^{1,2}, 刘文丽²

(1 山西大学黄土高原研究所, 山西 太原 030006 2 山西省环境监测中心站, 山西 太原 030027)

摘要: 以 COD 作为主要参照指标, 研究了焦化废水在符合《钢铁工业水污染物排放标准》(GB 13456-92) 焦化一级、二级排放标准限值要求时, 对蚕豆幼芽、幼根生长和根尖细胞遗传损伤的影响。结果表明, 经处理达标后的焦化废水长时间作用于蚕豆时, 蚕豆幼芽和幼根质量会受到影响, 焦化废水会引起蚕豆细胞的遗传损伤。该废水诱导蚕豆根尖细胞微核率增加, 出现核固缩, 诱导蚕豆细胞根尖染色体断裂、粘连和染色体桥数量增加, 破坏染色体的结构和遗传稳定性。

关键词: 焦化废水; 蚕豆根尖细胞; 遗传损伤

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 1006-2009(2009)06-0024-05

Study on Coking Wastewater Toxicity to *Vicia faba* L

DONG Yi-ru^{1,2}, LIU Wen-li²

(1 Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006 China;

2 Shanxi Environmental Monitoring Central Station, Taiyuan, Shanxi 030027, China)

Abstract The effects of coking wastewater on the plumule, root growth and root tip cytogenetic damage of *Vicia faba* L were studied using Chemical Oxygen Demand (COD) as an important index. Results showed that the plumule and root growth were inhibited after exposure of coking wastewater; the tested coking wastewater caused significant increases of Pycnotic cell (PNC) and micronuclei (MCN). Compared with the negative control, the frequencies of chromosome sticking, bridge and chromosome fragment were higher in coking wastewater groups than that in control groups. The results indicated that the growth and the cytogenetic damage of *Vicia faba* L were caused with the tested coking wastewater in which COD levels reached the first/second grade of water pollutants discharge standard for iron and steel industry.

Key words Coking wastewater; *Vicia faba* L root tip cell; Cytogenetic damage

焦化废水的污染物成分复杂, 主要为酚、氰、氨氮等有毒、有害物质^[1-2], 此外, 还含有多环芳香族化合物及含氮的、含氧的、含硫的杂环化合物等, 是一种典型的含有难降解有机化合物的工业废水^[3-4]。大量排放这类废水, 不仅对环境造成严重污染, 而且会直接威胁到人体健康。现阶段, 国内外对焦化废水的研究集中在焦化废水的处理技术上, 主要采用 AQ、A²O、AO² 等方法生物处理, 但对焦化废水的生物危害性评价及生态毒性效应的研究很少报道。

环境污染能够引起植物体一系列的变化, 包括形态学、解剖学及生理学的变化和细胞遗传学的变异等效应。研究表明, 有些指标与污染程度具有很

好的对应关系, 可以作为环境监测的指标, 利用生物监测可将目标化合物的生物利用性与其在靶器官的浓度和内在毒性相结合, 直接反映污染物对生物及人体的影响^[5-6]。蚕豆是一种很好的细胞遗传学研究材料, 蚕豆的染色体组型为 6 对大染色体, 而且根尖含有较多的分裂相细胞, 适合显微镜观察。蚕豆根尖微核试验在 1986 年已被中国原环境保护局列为水环境生物测试的规范方法。

为此, 以经生化处理后达标排放的焦化废水

收稿日期: 2009-04-16 修订日期: 2009-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20877050)

作者简介: 董轶茹 (1971-), 女, 山西运城人, 高级工程师, 博士生, 从事环境监测工作。

COD 值作为参照指标, 采用北方常见植物物种蚕豆, 研究了在符合《钢铁工业水污染物排放标准》(GB 13456-92) 焦化一级、二级排放标准限值要求时, 焦化废水对蚕豆幼苗的生长毒性作用和遗传毒性作用, 从整体—细胞—分子水平上, 探讨焦化废水对蚕豆幼芽和幼根(以芽长、芽质量、根长和根质量作为指标) 生长和细胞超微结构(微核、核固缩和染色体变异) 特征的影响, 研究焦化废水的环境毒理效应及其作用机制, 为全面评价达标排放的焦化废水的生态毒性提供基础数据, 为进一步对焦化废水用于农林灌溉的可行性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试焦化废水

焦化废水: 取自焦化厂生化站废水出口。采用重铬酸钾法测定 COD 质量浓度^[7], 稀释水为自来水。经实验测得该焦化废水原水质量浓度为 192 mg/L, 根据《钢铁工业污染物排放标准》(GB 13456-92) 表 3 中焦化行业废水一级标准 COD 的值 100 mg/L, 二级标准 COD 的值 150 mg/L^[8] 及所采焦化废水原水, 设置 3 个不同质量浓度: 将水样用自来水稀释至其 COD 值分别为 192 mg/L、154 mg/L 和 96.0 mg/L。

1.1.2 供试植物

蚕豆 (*Vicia faba* L.): 购自山西省忻州市农科院。蚕豆种子经体积分数为 3% 的次氯酸钠溶液浸泡 20 min 后, 水冲洗, 于 25 °C 自来水浸泡 36 h, 湿纱布包裹催芽 24 h, 摆放于洁净的培养皿中, 底层垫脱脂棉, 保持水分。选已萌发的蚕豆放入垫有脱脂棉的培养皿中培养 36 h, 整个过程中, 每隔 12 h 换 1 次水。选根长为 1 cm ~ 1.5 cm, 粗细均一的蚕豆随机分组, 用于毒性实验。

1.2 试验方法

1.2.1 焦化废水对蚕豆幼芽、幼根生长影响的测定实验

对照组用自来水, 处理组用不同质量浓度焦化废水培养。实验设 3 个平行。每隔 12 h 换 1 次培养液。每隔 24 h 测量不同质量浓度处理组最长幼根的长度和幼苗的芽长, 计算各处理组的单株平均值, 作为各组幼苗的长度值; 同时每隔 24 h 用光电天平称量根系鲜质量和芽的鲜质量。每组任选 3 株幼苗作为一个处理组的根系鲜质量和芽鲜质量,

试验设 3 个平行, 计算各处理组的平均值, 作为该组的根系鲜质量和芽鲜质量。

1.2.2 焦化废水对蚕豆细胞遗传损伤影响的测定实验

(1) 染毒试验: 将根长为 1 cm ~ 1.5 cm, 粗细均一的蚕豆随机分为 3 大组, A 组、B 组、C 组, 每组蚕豆 60 粒以上。再将 A 组、B 组、C 组各分为 6 个小组, 每组蚕豆 10 粒以上, 将受试种子均匀摆放于垫有脱脂棉的培养皿中, 用于遗传毒性实验。每天向脱脂棉上补充处理液 2 次, 保持滤纸湿润。对照组蚕豆用自来水, 处理组蚕豆用不同质量浓度焦化废水培养。每隔 12 h 换 1 次培养液。各组均放在 (25 ± 1) °C 的恒温箱中。A 组、B 组、C 组的蚕豆染毒时间分别为 24 h、48 h、72 h。

(2) 根尖固定: 分别在处理 24 h、48 h 和 72 h 后, 迅速剪取植物根尖, 每次 10 个, 用卡诺氏固定液 [V(甲醇):V(冰醋酸)] = 3:1 固定 24 h 后, 转入体积分数为 70% 的乙醇中, 4 °C 保存。

(3) 根尖染色: 采用孚尔根 (Feulgen) 法染色。取固定好的幼根, 在青霉素小瓶中用蒸馏水浸洗 2 次, 每次 3 min, 吸净蒸馏水, 加入 1 mol/L 盐酸溶液适量, 放入 60 °C 水浴中水解幼根 12 min ~ 15 min, 吸净盐酸溶液, 加入室温下的盐酸溶液将根浸泡 1 min ~ 2 min, 吸净盐酸溶液, 用蒸馏水浸洗 2 次, 每次 2 min。在暗室或者光条件下加入 Schiff 试剂, 液面高出根尖 2 mm, 在遮光条件下染色 40 min ~ 60 min, 吸去染液, 用漂洗液浸洗 2 次, 每次 2 min, 之后用蒸馏水浸洗 2 次, 每次 3 min, 吸净水分, 加入蒸馏水, 放入 4 °C 冰箱内保存, 可供随时制片之用。

(4) 根尖细胞制片和镜检: 切取染色的根尖分生区约 1 mm 长, 加盖玻片, 常规压片。用光学显微镜 (Olympus, Japan) 放大 800 倍观察, 记录微核细胞、核固缩及其他异常细胞数目, 对细胞核中出现的染色体桥、后期粘连、中期染色体断片等异常情况记录。每组检查 5 棵 ~ 10 棵植株的幼根, 约 5 000 ~ 7 000 个细胞。

计算 5 000 个已观察细胞中微核细胞数及核固缩细胞数目出现的概率, 以及染色体桥、后期粘连、中期染色体断片等异常情况出现的概率。

2 结果与分析

2.1 焦化废水对蚕豆幼苗生长的影响

2.1.1 焦化废水对蚕豆幼芽生长的影响

在整个染毒阶段, 焦化废水各质量浓度对幼芽的生长表现出抑制作用, 但抑制作用不明显, 各处理组幼芽长度与对照组相比无显著性差异, 各处理组幼芽质量在处理 72 h 后低于对照组, 但质量浓度依赖效应不明显。焦化废水对蚕豆幼芽长度、幼芽质量的影响见图 1, 图 2。

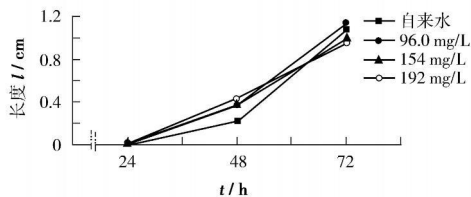


图 1 焦化废水对蚕豆幼芽长度的影响

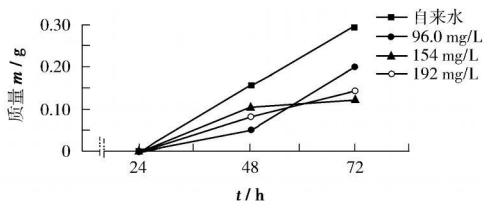


图 2 焦化废水对蚕豆幼芽质量的影响

2.1.2 焦化废水对蚕豆幼根生长的影响

在整个染毒阶段, 焦化废水各质量浓度对幼根根长的影响不大, 处理组与对照组根长生长基本保持一致; 不同质量浓度焦化废水处理蚕豆幼苗处理 72 h, 处理组幼根根质量才明显低于对照组。焦化废水对蚕豆幼根根长、幼根质量的影响见图 3, 图 4。

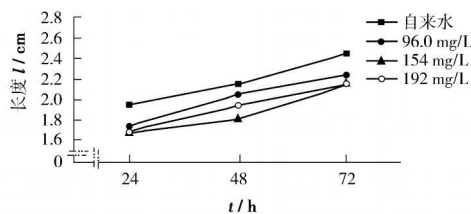


图 3 焦化废水对蚕豆幼根长度的影响

这表明: ①焦化废水长时间作用于蚕豆时, 蚕豆的生长也会受到影响; ②蚕豆的不同器官, 对焦化废水毒性的敏感性也不同, 芽部的敏感性大于根部的敏感性。

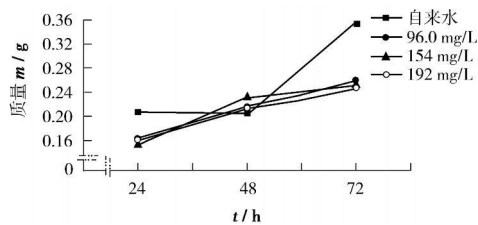


图 4 焦化废水对蚕豆幼根质量的影响

2.2 焦化废水对蚕豆细胞的遗传损伤作用

2.2.1 焦化废水诱发蚕豆细胞根尖微核

微核是染色单体或染色体的无着丝点断片, 或因纺锤体受损而丢失的整个染色体, 在细胞分裂后期, 仍然遗留在细胞质中。末期之后, 单独形成的一个或几个规则的次核, 微核能指示染色体或纺锤体的损伤。蚕豆根尖细胞微核实验的测试终点是一定数目的微核出现。

焦化废水可诱导蚕豆根尖细胞出现微核, 且微核率与处理质量浓度呈线性关系: 暴露时间为 24 h 时, $y = 0.1213x - 4.2163 (R^2 = 0.998)$; 暴露时间为 48 h 时, $y = 0.1367x - 4.8283 (R^2 = 0.996)$; 暴露时间为 72 h 时, 除最高质量浓度组外, 其余各组染毒质量浓度和微核率之间也呈现出线性关系, $y = 0.1169x - 0.6719 (R^2 = 0.968)$ 。在 24 h ~ 48 h 处理时间段内, 随着时间的延长, 微核率增大, 但在处理 72 h 后, 微核率急剧下降, 这可能是因为随着焦化废水质量浓度的增大、时间的延长, 对细胞的损伤加剧, 导致有丝分裂下降和染色体畸变的产生, 分裂细胞减少, 而且有效地阻止该细胞内纺锤丝微管蛋白的聚合作用而使细胞滞留在分裂期, 进而使微核率下降; 也可能由于焦化废水处理使得一些受损的细胞未完成有丝分裂过程或不能继续分裂, 导致微核率下降^[9]。蚕豆根尖细胞微核实验的测试终点微核出现的频率 $\pm s$ 值见表 1。

表 1 焦化废水溶液诱发蚕豆根尖细胞微核率

COD $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	(微核率 $\pm s$) %		
	24 h	48 h	72 h
自来水	0.06 \pm 0.022	0.05 \pm 0.09	0.04 \pm 0.02
96.0	0.76 \pm 0.11 ^①	0.86 \pm 0.06 ^①	0.20 \pm 0.07
154	1.42 \pm 0.21 ^①	1.58 \pm 0.07 ^①	0.44 \pm 0.07 ^①
192	1.93 \pm 0.36 ^①	2.18 \pm 0.12 ^①	0.26 \pm 0.08 ^②

① $p < 0.005$; ② $p < 0.05$ 。

2.2.2 焦化废水诱发蚕豆根尖细胞核固缩

核固缩是细胞凋亡或即将坏死的特征形态,能指示细胞 DNA 损伤严重,修复无望^[10]。

焦化废水溶液能诱导蚕豆根尖细胞产生核固缩,且该效应呈现质量浓度和时间的双重依赖性。对照组在染毒 48 h 后才出现极少的核固缩,而焦化废水染毒组的蚕豆根尖细胞中核固缩率明显增大,且各处理组和对照组之间均具有极显著性差异。一定暴露时间下,整个质量浓度范围内,随焦化废水质量浓度的增大,核固缩发生率增大。且核固缩发生率和焦化废水溶液质量浓度之间呈线性相关,质量浓度—反应曲线如下:暴露时间为 24 h $y = 0.0350x + 11.016 (R^2 = 0.9456)$; 暴露时间为 48 h $y = 0.0647x + 9.7906 (R^2 = 0.9850)$; 暴露时间为 72 h $y = 0.1052x + 7.9954 (R^2 = 0.9906)$ 。同一处理质量浓度下,随时间延长,核固缩发生率增大。焦化废水溶液诱发蚕豆根尖细胞核固缩率 $\pm s$ 值见表 2。

表 2 焦化废水溶液诱发蚕豆根尖细胞核固缩率

COD $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	(核固缩率 $\pm s$) %		
	24 h	48 h	72 h
自来水	0	0.001 ± 0.10	0.01 ± 2.1
96.0	1.46 ± 0.22 ^①	1.62 ± 0.26 ^①	1.84 ± 0.32 ^①
154	1.59 ± 0.44 ^①	1.93 ± 0.39 ^①	2.36 ± 0.47 ^①
192	1.81 ± 0.58 ^①	2.25 ± 0.46 ^①	2.86 ± 0.49 ^①

① $p < 0.005$

另外,镜检时还发现,高质量浓度处理组蚕豆幼根部分细胞没有主核,而只有数个大小不同的小核,核之间相互游离,大小相差悬殊,小核的数目 3 至十几不等,表现为核破碎或崩解,这些小核看不到内部网状结构,呈现均匀着色,核边增厚。部分细胞中核膜消失,染色质分散在整个细胞质中,呈不均匀疏散网状,周围游离几个被膜包被的小核,小核致密均匀着色,类似于固缩核。高质量浓度处理组在 24 h 可检测到核崩解,低质量浓度处理组在 48 h 才出现核崩解现象,核崩解效应具有剂量和时间依从性。

2.2.3 焦化废水对蚕豆细胞染色体的影响

染色体受到可诱导染色体畸变的污染物作用时,染色体或单体可发生断裂或出现裂隙,断裂后,无着丝粒的部分可与有着丝粒的部分分开,形成断片。同时也可导致细胞分裂后期的染色体粘连现

象,染色体断片和后期粘连是染色体在分裂期内所出现的一种异常现象。

染色体的异常断裂和融合是促进染色体不稳定性的重要机制之一,这种现象表现为细胞后期的异常形态——染色体桥^[11]。“桥”在染色体移向两极进入子细胞时被拉断,造成很大缺失,是动植物细胞染色体受损后发生的一种异常现象。

实验观察到经焦化废水染毒后的蚕豆根尖细胞中,有一些游离的、染色很深的条状或椭圆状物质存在于细胞中,它们通常会在细胞核周边,颜色跟核的颜色较为一致,这些游离物质就是“染色体断片”。

焦化废水对蚕豆根尖细胞染色体的致断裂作用具有质量浓度和时间的双重依赖性,即:染毒质量浓度越高,染毒时间越长,细胞中出现的断片越多。焦化废水溶液诱发蚕豆根尖细胞分裂期断片的情况见表 3。

表 3 焦化废水溶液诱发蚕豆根尖细胞分裂期断片

COD $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	分裂期断片 %		
	24 h	48 h	72 h
自来水	0	0	0
96.0	0.03	0.04	0.06
154	0.03	0.05	0.05
192	0.06	0.07	0.06

对照组在处理期间无后期粘连发生,而焦化废水处理组则出现不同程度的粘连,且具有质量浓度和时间的双重效应,即:染毒质量浓度越高,处理时间越长,后期粘连细胞越多。焦化废水诱发蚕豆根尖细胞染色体后期粘连的实验结果见表 4。

表 4 焦化废水溶液诱发蚕豆根尖细胞分裂后期的染色体粘连

COD $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	染色体粘连 %		
	24 h	48 h	72 h
自来水	0	0.03	0
96.0	0.10	0.08	0.08
154	0.16	0.17	0.11
192	0.22	0.23	0.23

焦化废水可以诱导蚕豆幼苗根尖染色体分裂后期“桥”的形成,而且这种效应具有质量浓度和时间的双重依赖性。随着染毒质量浓度的升高,

“染色体桥”数量逐渐增加;染毒时间越长,分裂后期细胞出现桥的概率也越高。这进一步证明了焦化废水对蚕豆细胞的遗传的毒性作用,见表 5。

表 5 焦化废水诱发蚕豆根尖细胞分裂后期染色体桥

COD $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	染色体桥 %		
	24 h	48 h	72 h
自来水	0	0.02	0
96.0	0.01	0.03	0.03
154	0.02	0.04	0.05
192	0.04	0.05	0.07

综上所述,焦化废水能引起蚕豆根尖细胞的遗传损伤,诱导蚕豆根尖细胞微核率增加,出现核固缩,同时诱导蚕豆细胞根尖出现染色体断裂、粘连和染色体桥数量增加,破坏染色体的结构和遗传稳定性。这表明焦化废水能够影响细胞内的蛋白质结构和功能,使染色体粘连、固缩,对有丝分裂器具有破坏作用,导致细胞质不能分裂,同时提示焦化废水诱导的蚕豆遗传损伤可能是其抑制蚕豆生长的一个主要原因。

COD 值主要反映水体中受还原性物质污染的程度,由实验结果可得,焦化废水 COD 越高,其对蚕豆的毒性作用越大,说明废水中较高含量的还原性物质会抑制蚕豆幼苗的生长,引起其根尖细胞的遗传损伤。

研究发现当焦化废水 COD 的质量浓度值分别为 96.0 mg/L 和 154 mg/L 时,会影响蚕豆幼芽和幼根的生长,并引起蚕豆根尖细胞的遗传损伤。这表明:经生化处理达标后 COD 值接近于《钢铁工业污染物排放标准》(GB 13456-92)表 3 中焦化行业废水一级、二级标准的焦化废水,其对蚕豆的毒性效应仍然存在。这为能否将焦化废水用于灌溉提供了一定的科学依据。

由实验结果可得:在一定质量浓度范围内,染色体畸变与焦化废水处理质量浓度间具有线性相关,因此,可将蚕豆根尖细胞的遗传损伤实验用于出厂前焦化废水和环境中焦化废水污染的监测工作中,同时,以蚕豆为实验材料考察焦化废水的影响,更能直接反映焦化废水排放对生物的毒性影响,对于外排焦化废水的安全度评价及行业排放标准的制定很有参考作用。

3 结论

(1)经生化处理后 COD 符合《钢铁工业污染物排放标准》(GB 13456-92)表 3 中焦化行业一级、二级标准的焦化废水,其对蚕豆的毒性效应仍然存在。

(2)经生化处理达标后的焦化废水长时间作用于蚕豆时,蚕豆幼芽和幼根的生长会受到影响,表现为:焦化废水处理蚕豆 72 h 后,处理组幼芽质量和幼根质量低于处理组。

(3)蚕豆的不同器官,对焦化废水毒性的敏感性也不同,芽部的敏感性大于根部的敏感性。

(4)经生化处理达标后的焦化废水可引起蚕豆细胞的遗传损伤,诱导蚕豆根尖细胞微核率增加,出现核固缩,同时诱导蚕豆细胞根尖出现染色体断裂、粘连和染色体桥数量增加,破坏染色体的结构和遗传稳定性。

[参考文献]

- [1] FISHER R. Progress in pollution abatement in European coke making industry [J]. Ironmaking and Steelmaking, 1992, 19 (6): 449-456
- [2] 国家环境保护总局. HJ/T 126-2003 炼焦行业清洁生产标准 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2003
- [3] LUNGEN H B. The situation of the Chinese coke making industry [J]. Stahl und Eisen, 2005, 125(11): S72-S74
- [4] NING P, BARTH J, JIANG Y J, et al. Treatment of organic pollutants in coke plant wastewater by the method of ultrasonic irradiation, catalytic oxidation and activated sludge [J]. Separation and Purification Technology, 2005, 41(2): 133-139
- [5] 刘小卫, 陆光华. 主动生物监测技术在水环境风险评价中的应用 [J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20(3): 12-15
- [6] 徐建, 林玉锁. 应用斑马鱼和凡纳对虾诊断污染场地污水的生物毒性 [J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20(5): 52-55
- [7] 国家环境保护局. GB 11914-89 水质 化学需氧量的测定 重铬酸盐法 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989
- [8] 国家环境保护局. GB 13456-92 钢铁工业水污染物排放标准 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992
- [9] RIVETTA A, NEGRINI N, COCCIM. Involvement of Ca^{2+} calmodulin in Cd^{2+} toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination [J]. Plant Cell Environment, 1997(20): 600-608
- [10] 张贵友, 田瑞华, 戴尧仁. 植物细胞凋亡的研究进展 [J]. 生物工程进展, 2001, 21(6): 22-27
- [11] SHIMIZU N, SHINGAKI K, KANEKO S Y, et al. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation [J]. Exp Cell Res, 2005(302): 233-243