

水体突发性重金属污染胁迫下斑马鱼的行为反应分析

黄东龙, 周勤*

(华南理工大学环境科学与工程学院, 工业聚集区污染控制与生态修复教育部
重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 研究了斑马鱼在不同程度突发性的 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 胁迫下的行为反应, 采用计算机视觉技术量化研究斑马鱼游动行为数据。结果表明, 在 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 的突发性胁迫中, 斑马鱼的行为反应快速且敏感, 游动行为与污染物种类、质量浓度和暴露时间直接相关, 并表现出比较相似的行为变化规律。随着胁迫程度的增加, 斑马鱼游动速度的变化幅度增大, 反应时间缩短, 且其变化曲线符合生物行为的环境压力模型。斑马鱼的行为变化远远提前于生物的病理损伤或死亡, 可利用斑马鱼暴露于污染物时的行为变化实现在线水体突发性重金属污染事故的监测预警。

关键词: 斑马鱼; 游动速度; 计算机视觉; 突发性重金属污染; 行为反应

中图分类号: X174 文献标识码: B 文章编号: 1006-2009(2011)04-0027-05

Behavior Response Analysis of Zebrafish *Danio rerio* under Sudden Heavy Metal Stress

HUANG Dong-long, ZHOU Qin*

(The Key Lab of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of
Education, College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology,
Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: The data of swimming behavior was obtained by a computer vision system to study behavior response of zebrafish *Danio rerio* under sudden Zn^{2+} and Cr^{6+} stress. Result showed that the behavior response of zebrafish *Danio rerio* was sensitive to sudden Zn^{2+} and Cr^{6+} exposure, the behavioral responses of zebrafish *Danio rerio*, in accordance with the Stepwise Stress Model, were depended on exposure quality, concentration and exposure time directly. Increasing concentration resulted in more intensive swimming velocity of zebrafish *Danio rerio* with more short response time, which could be described by Stepwise Stress Model. The avoidance behavior was observed long before the injury or death of organisms so that behavioral responses under environment stress could be available to monitoring accidental pollution of heavy metal.

Key words: Zebrafish *Danio rerio*; Swimming velocity; Computer vision; Sudden heavy metal pollution; Behavior response

近年来, 化学物质的泄漏及人为投毒等突发性事故的发生, 给公众健康和生态安全造成了很大的危害^[1-2]。 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 是常见的重金属污染物, 主要来自矿山开采、冶炼加工、机械制造及电镀、仪器仪表、化工等工业的排放^[3]。目前, 国内的大部分饮用水生产为敞开式水源, 由此更增加了突发性事故发生的可能性。

水生生物的行为变化既是生物适应环境的表

现, 也可以是污染物对生物体细胞损害、生理损害、病理损伤或死亡以前的反应。通过观察水生生物

收稿日期: 2011-03-17; 修订日期: 2011-04-20

基金项目: 广东省重大项目基金资助项目 (2009A080209002);
广东省科技攻关基金资助项目 (2010B010900032)

作者简介: 黄东龙 (1985-), 男, 广东普宁人, 硕士生, 从事水环境监测与分析工作。

* 通讯作者: 周勤 E-mail: ceqzhou@scut.edu.cn

行为的非正常变化,可以推断水质污染的程度^[4]。鱼类作为水生生物的高级类群,位于食物链的上方,可客观反映水环境的状况,有很好的代表性。当水中有毒物质含量突发性变化时,鱼类对环境的适应性最先表现出的是行为改变^[5]。有研究表明,水质突变时,污染物对鱼类行为的影响是由多种生理系统相互作用而产生的,鱼类的行为反应可作为描述外界胁迫的一种重要的综合生物指标^[6],能比较直观、快速地反映水质的变化。在鱼类的多种行为指标中,游动行为是毒性评价中敏感度最好的行为指标^[7-8]。

斑马鱼(*Zebrafish Danio rerio*)是标准实验生物之一,广泛用于环境毒性评价研究^[9-10]。现选择斑马鱼作为指示生物,采用计算机视觉技术^[11]量化分析斑马鱼的游动行为。

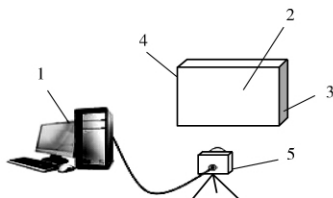
1 实验材料和方法

1.1 指示生物培养

斑马鱼购自某花鸟鱼市场,体长 3 cm ~ 4 cm,质量 0.3 g ~ 0.6 g。实验用水与培养驯化用水为充分曝气脱氯的自来水,pH 值为 6.5 ~ 7.5,温度(24 ± 2)°C。自然光照,实验前斑马鱼驯养一周以上,驯养期间每天换水和喂食一次,斑马鱼的死亡率 < 5%。

1.2 检测装置及原理

监测用水槽材质为有机玻璃(尺寸为 70 cm × 50 cm × 15 cm,水深 40 cm),前端透明,其他部分均经磨砂处理。水流通过一个合适的水泵注入暴露装置内,流速以不影响斑马鱼的正常行为活动为准。一台 CCD 摄像头置于玻璃水槽前方对斑马鱼的行为进行实时拍摄,水槽及摄像头的方向和位置保持不变。摄取图像时要保持恒定的照明条件。实验装置见图 1。



1—计算机; 2—水槽; 3—进水口; 4—出水口; 5—CCD摄像头。

图 1 监测系统的结构

Fig. 1 Schematic representation of monitoring system

系统采用一台 CCD 摄像机获取鱼群的实时运动视频,将连续采集的多帧图像分割处理,以鱼体的形心点为参考点,进行速度计算。两帧相邻图像之间的时间间隔可能很小,可近似认为在此时间间隔内,鱼体作匀速直线运动,通过计算这段时间内形心点的移动距离计算鱼体运动速度。精确地跟踪多个目标,准确地计算出各条鱼的游速很困难,也没有必要,获取整个鱼群的特征是重点。某时间段内的鱼群运动轨迹见图 2。

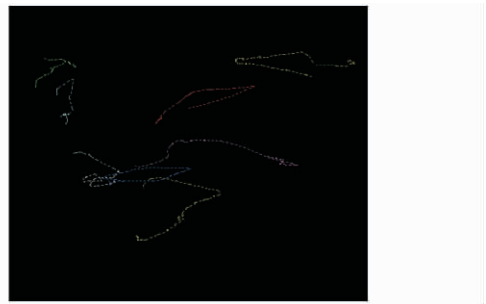


图 2 鱼群运动轨迹

Fig. 2 Motion trajectory of fish shoal

通过获取斑马鱼的平均游速反映鱼群的游动行为,记录每帧图像的鱼体形心点的位置,绘制出鱼群运动轨迹图。

1.3 实验设计

将 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $K_2Cr_2O_7$ 按照要求配制成 3 000 mg/L 的母液,再根据需要稀释成相应的实验所用质量浓度。

实验采用流水暴露,原水通过泵连续注入装有斑马鱼的监测装置,每次实验使用斑马鱼 8 条,暴露前通入充分曝气脱氯的自来水,鱼在其中适应 24 h,以消除容器变化带来的行为改变,实验期间不喂食,实验条件尽量保持一致,除了添加染毒溶液外尽量减少水流速度、声响等外界因素的干扰。从染毒溶液进入开始连续监测 6 h,每 1 组行为数据由 8 条鱼的平均数据求得。为保证生物行为监测实验的平行性,监测实验投毒的时间开始于第 1 天 12:00 结束于第 3 天 10:00。经用染料模拟,毒物在装置内的扩散过程为毒物由底部进水口进入,逐步由下往上流经整个装置后从另一侧位于上部的溢流口流出。

实验参照《物质对淡水鱼(斑马鱼)急性致死毒性的测定》(ISO 73461-3),直线内插法获得

Zn²⁺ 对斑马鱼的 96 h 半数致死质量浓度 LC₅₀₋₉₆ 为 30 mg/L, Cr⁶⁺ 对斑马鱼的 96 h 半数致死质量浓度 LC₅₀₋₉₆ 为 70 mg/L。在此基础上, 设置不同的质量浓度研究斑马鱼在不同程度的胁迫下的游动行为变化。每个质量浓度组设两个平行, 实验结果以 2 组平行结果的平均值显示。设置空白对照组, 设置染毒溶液污染物质量浓度为配制时的质量浓度, 而不是污染物进入之后水槽中污染物的质量浓度。实验前后取水样测定 pH 值、氧浓度及 Zn²⁺ 质量浓

度, 重复测定 3 次取平均值。

2 结果与分析

以 ZnSO₄ · 7H₂O、K₂Cr₂O₇ 的 LC₅₀₋₉₆ 作为斑马鱼的一个毒性参考点, 并以空白为对照, 在不同亚致死质量浓度重金属突发胁迫下斑马鱼的平均游动速度变化情况, 曲线为每 min 的平均值, 见图 3 (a) (b)。

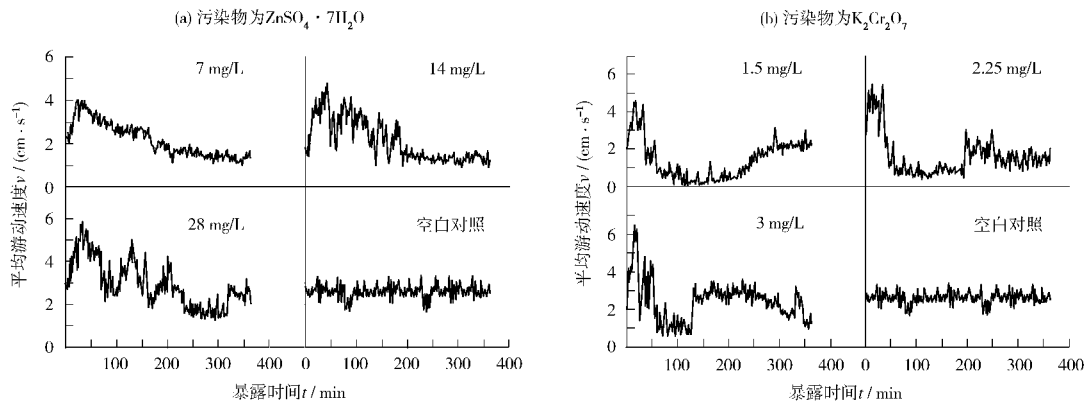


图 3 摇不同突发胁迫条件下斑马鱼的游动速度变化曲线

Fig. 3 摇Swimming velocity of Zebrafish in different accidental environmental stress (all the parameters were averaged by every minute)

摇空白对照组在监测期间水质保持一致, 没有外来刺激, 斑马鱼的平均速度在整个过程中都比较稳定, 其行为的强度基本保持不变, 波动不大, 平均速度为 2.60 cm/s, 标准偏差为 0.34。由此可见, 斑马鱼在水质稳定的条件下的平均速度具有规律, 比较稳定, 试验结果可以用于与水质突变条件下斑马鱼的行为进行分析比较, 具有一定的可靠性。

染毒溶液由泵引入监测水槽后, 斑马鱼的行为立刻受到污染物的影响, 此时鱼群的行为表现为快速不安地游动, 速度激增, 这是一种积极应对应激的策略^[12]。

由游动速度变化曲线可知, 在不同的重金属压力胁迫下, 斑马鱼的运动行为表现出相对一致性。主要表现为平均速度在短时间内突然持续增大, 并且强度明显高于对照组的游动速度。在生物行为生态学中, 这一段时间内的行为变化为水生生物的“回避行为”。

“回避行为”是水生生物对水环境污染所产生的第一层次行为变化^[13]。不同质量浓度 Cr⁶⁺ 和

Zn²⁺ 胁迫下斑马鱼所达到平均速度最大值 (v_{max})、激增至对照组平均值的 150% 所需要的时间 (t_1) 及达到最大值所需要的时间 (t_2) 对于 t_1 的判断标准是: 从引入污染物开始至连续 3 个平均速度值达到对照组平均值的 150% 所需要的时间, 见表 1。

表 1 摇斑马鱼在不同突发胁迫下平均速度达到的最大值及不同程度变化所需的时间

Table 1 摇Maximal average velocity and time needed to reach each level of change under different accidental environmental stress

污染物	ρ (暴露) / (mg · L ⁻¹)	v_{max} / (cm · s ⁻¹)	t_1 /min	t_2 /min
Cr ⁶⁺	28	5.91	14	33
	14	4.83	35	43
	7	4.03	— ^①	25
Zn ²⁺	3	6.53	5	15
	2.25	5.51	6	13
	1.5	4.55	11	17

①该浓度组中的数据没有达到 t_1 的判断标准。

虽然斑马鱼在回避过程中其行为具有不确定性,但其行为强度变化与环境污染物质之间表现出的剂量—效应关系明显,在不同的污染物质质量浓度胁迫下,其平均速度所能达到的变化幅度随着质量浓度增加而增大,而增大至同等速度值(如平均速度的 150%)所需要的时间则随着质量浓度的增加而减少。

在污染物暴露过程中,斑马鱼的平均速度在经历第一时间的行为增大,快速增大达到最高点以后,其行为强度都出现剧烈降低,在短时间内回复下降,随后又出现一个强度恢复状态。

不同的胁迫,其强度恢复的过程有一定的区别。图 3 (a)中除了 7 mg/L 以比较缓和的方式逐渐恢复至正常状态外,在其他两个胁迫浓度下,平均速度曲线波动较大,有多个强烈的行为调解过程。较高质量浓度的胁迫下(28 mg/L, 14 mg/L)行为曲线趋于稳定所需要的时间大约为 200 min。

与 Cr^{6+} 的胁迫情况不同,图 3 (b)中可以看出,在 Zn^{2+} 胁迫下,在其行为调解之前,斑马鱼的活性降低,大部分停留在底部不动,以减少活动,降低新陈代谢来减少体力消耗,大约在 200 min 之后才出现比较强烈的行为调解。

上述行为变化的差异可能主要归因于不同污染物对斑马鱼的毒性效应作用机制不同^[4-16]。这同时也可以看出,在鱼类的回避阶段,鱼的机体本身并未受到损伤,只是一种“有目的性逃跑”行为。

鱼类暴露于一定程度的污染水环境以后,要经历一个经过行为变化后的毒性作用过程^[13],而在此过程中,存在明显的行为调节,平均速度在起伏中逐步下降,同时会通过自身各生理机能的调节,努力去适应新的环境。

综合上述游动行为分析,斑马鱼在一定浓度的污染物胁迫下,游动速度的变化与时间存在相关性,且其变化的幅度与水环境中污染物质量浓度成比例。在亚致死质量浓度重金属突发胁迫下,斑马鱼的行为反应强度随时间的变化过程基本一致,行为刺激期、行为适应期及行为调整期/行为再调整期,该过程与日本青鳉在胁迫下的行为相似,符合环境逐级胁迫阈模型,并且变化过程基本相同^[17-18]。

3 讨论

应激反应机理十分复杂,涉及到神经系统、内

分泌系统及免疫系统的一系列活动,机体通过神经、内分泌途径几乎动员了所有的器官和组织来应付应激源的刺激^[19]。在不同的胁迫下,斑马鱼群的平均速度变化曲线趋势基本一致,都符合环境压力模型,见图 4。

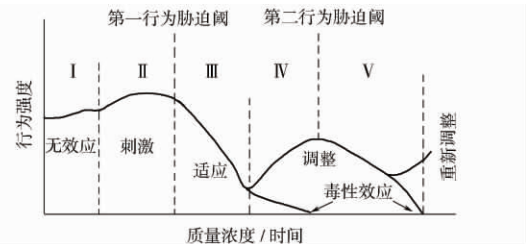


图 4 环境压力模型

Fig. 4 Stepwise Stress Model (SSM)

即在不同程度的重金属胁迫下斑马鱼的游动行为都会随着时间的变化而变化,经过稳定、急剧变化、恢复等过程^[17-20]。污染物质量浓度越大,游动速度的变化幅度越大,发生剧烈行为变化所需要的时间也越短,表明污染物的毒性也在增加^[17]。

环境压力模型将生物的行为反应随着时间划分为 5 个不同的部分, I 和 II 两个阶段是在污染物胁迫的初期,是斑马鱼的游动速度持续增大,达到一定强度并持续一段时间的过程,是一种逃避水环境污染并逐步去适应外界环境的过程,也就是图 3 中不同胁迫下斑马鱼游动速度持续增加并在最大值附近波动的过程。这是斑马鱼对污染环境的“适应期”,这段时间实际上应该是斑马鱼通过行为机制逐渐适应污染环境而导致的行行为强度的变化,而不是因为环境污染物进入斑马鱼体内所导致的毒性反应。

经过这一阶段之后,斑马鱼通过对自身行为和生理机能的调节,逐步适应了外界环境的压力,也就是度过了环境压力模型中的“第一行为胁迫阈”。这时斑马鱼的游动行为会经历一个强度降低的过程。

由于所采用的胁迫质量浓度都为亚致死质量浓度,斑马鱼均度过了“第一压力阈”。在恢复的过程中,由于污染物的毒性作用机制不同,其速度曲线有较大的区别。图 3 (a)中斑马鱼在回避期后其游动速度在剧烈波动中逐步下降,逐渐回复到对照组中的活动强度。而图 3 (b)斑马鱼游动速度快速下降,并以抑制行为活动对抗外界胁迫,后期其

行为强度才逐渐恢复。

斑马鱼是一种群游鱼类,和个体相比集群之后能快速获得更大的感知范围,可以互相沟通,快速传导信息,快速侦测到危险的讯号^[21],因此在监测容器允许的情况下,适当增加群体的数量可使预警结果具有稳定性与可靠性。

然而,系统采用的是二维的计算机视觉技术,随着指示生物数量的增加,相互之间的遮挡会影响指示生物的认识及数据的采集,另一方面也受到软件本身的限制,指示生物数量的增多,会导致软件图像分析的效率及稳定性有一定程度的下降。这方面存在的缺陷将在后续的软件算法中逐步改进。

指示生物所表现出来的“回避行为”远远提前于生物的病理损伤或死亡,能够在污染物出现后的1 h内便出现比较强烈的行为改变,具有较高的重复性及可靠性。根据指示生物在第一时间产生的“回避行为”实现对重金属突发性污染的在线生物监测预警。

4 结语

利用计算机视觉技术获取行为信息是一种不损害斑马鱼,不产生应激的方法,可以对其行为连续现场监测。

斑马鱼的“回避行为”远远提前于机体的病理损伤或死亡,且在一定环境压力下的运动行为变化呈现规律性,可以直观、便捷地得到生物在一定环境压力下的行为变化,实现水体突发性污染的在线生物监测预警。

在后续的研究中,应逐步改进软件算法,提高稳定性及效率,且有必要对其他种类污染物单独或联合作用压力环境下的行为反应进行研究,并通过大量的重复试验建立斑马鱼在一定环境压力下的运动行为变化模型,并对运动行为模型作进一步阐释,为实现对大多数污染物的在线生物监测预警提供理论基础。

【参考文献】

- [1] 洪维民. 加强预警监测体系建设提高应对突发生态环境问题[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(2): 1-3.
- [2] 邱祖楠. 完善应急监测网络提高环境管理能力[J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20(2): 4-6.
- [3] 曾丽璇, 陈桂珠, 余日清, 等. 水体重金属污染生物监测的研究进展[J]. 环境监测管理与技术, 2003, 15(3): 12-15.
- [4] PUTMAN R J, WRATTEN S D. Principles of ecology [J]. London and Canberra, 1984, 70(3): 444-445.
- [5] KANE A S, SALIERNO J D, BREWER S K. Fish models in behavioral toxicology automated techniques [J]. Methods in Aquatic Toxicology, 2005, 20(5): 559-590.
- [6] EISSA B L, OSSANA N A. Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: Fish responses to waterborne cadmium [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, 58(4): 1032-1039.
- [7] SVECEVIUS G. Use of behavioral responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in identifying sublethal exposure to hexavalent chromium [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 82(5): 564-568.
- [8] LITTLE E E, FINGER S E. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1990, 9(1): 13-19.
- [9] HILL A J, TERAOKA H. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(1): 6-19.
- [10] MCGRATH P, LI C Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(10): 394-401.
- [11] KANE A S, SALIERNO J D. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish [J]. Water Research, 2004, 38(18): 3993-4001.
- [12] IWAMA G. Stress in fish [J]. Annals of the New York Academy of Science, 1998, (851): 304-310.
- [13] 任宗明. 在线生物监测技术在饮用水安全预警中的应用研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2005.
- [14] 杨丽华. 重金属(镉、铜、锌和铬)对鲫鱼的生物毒性研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2003.
- [15] 孙德文, 詹勇, 许梓荣. 重金属对鱼类的危害作用[J]. 水产养殖, 2002, 23(5): 38-42.
- [16] 黄玉霖, 吴鼎勋, 柴敏娟. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对罗非鱼鳃盖运动的影响[J]. 台湾海峡, 1994, 13(1): 21-25.
- [17] 刘勇, 张高生, 陈琳琳, 等. 2种除草剂联合胁迫下日本青鲮的逐级行为响应[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(1): 32-37.
- [18] 任宗明, 饶凯锋, 王子健. 水质安全在线生物预警技术及研究进展[J]. 供水技术, 2008, 2(1): 5-7.
- [19] 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(1): 114-121.
- [20] 刘勇, 付荣恕, 任宗明. 2种有机磷农药联合胁迫下日本青鲮的逐级行为响应[J]. 环境科学, 2010, 31(5): 1328-1332.
- [21] PARRISH J K, VISCIDO S, GRUNBAUM D. Self-organized fish schools: an examination of emergent properties [J]. Biol. Bull., 2002, 202(2): 296-305.

本栏目责任编辑李文峻 薛光璞