

基于斑马鱼行为变化的苯酚监测研究

周绍辉¹, 杜娟娟¹, 孙中训¹, 李梅^{1*}, 逯南南², 宋武昌²

(1. 山东建筑大学市政与环境工程学院, 山东济南 250101; 2. 山东省城市供排水水质监测中心, 山东济南 250021)

摘要 [目的]探究一种可行的水体苯酚监测预警技术。[方法]以斑马鱼作为模式生物,采用半静态试验法,考察了苯酚对斑马鱼的急性毒性及行为强度影响。[结果]苯酚对斑马鱼毒性为中毒物质;与对照组相比,苯酚试验组斑马鱼行为强度变化极显著,苯酚对斑马鱼的毒性呈明显的时间-效应和剂量-效应关系。苯酚胁迫下,斑马鱼行为变化符合环境压力模型。苯酚浓度越高,斑马鱼行为强度变化越显著。[结论]基于斑马鱼行为变化的生物在线监测技术是实现水体苯酚预警的有效手段。

关键词 斑马鱼;苯酚;急性毒性;行为变化

中图分类号 S912 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)01-0083-03

Research of Phenol Monitoring Based on the Behavior Changes of *Brachydanio rerio*

ZHOU Shao-hui, DU Juan-juan, SUN Zhong-xun, LI Mei* et al (School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan, Shandong 250101)

Abstract [Objective] To explore a feasible technology for phenol early warning in water body. [Method] Acute toxicity and behavioral changes of *Brachydanio rerio* (as a model organism) were studied under phenol stress using semi-static test methods. [Result] The results showed that phenol is mildly toxic to *Brachydanio rerio*; compared with the control group, behavioral changes of *Brachydanio rerio* in the phenol test group were extremely significant. Phenol toxicity tests on *Brachydanio rerio* showed an obvious time-effect and dose-effect relationship. Under phenol stress, behavior changes of *Brachydanio rerio* fit with the environmental stress model. Behavior changes of *Brachydanio rerio* were more significant under higher concentration of phenol. [Conclusion] Online monitoring technology based on the behavior changes of *Brachydanio rerio* is an effective way to realize phenol early warning in water body.

Key words *Brachydanio rerio*; Phenol; Acute toxicity; Behavior changes

苯酚是一类中等毒性的有机化学污染物,进入生物体后会发生一些列生物反应^[1],并通过生物链积累对人体和水生生物产生不同程度的急性或慢性毒性效应^[2-4],严重威胁着人体健康及水生生态系统稳定。苯酚被多个国家列为优先监测污染物,我国明确规定饮用水中挥发酚(以苯酚计)含量不得超过0.002 mg/L^[5]。因此,开展水中突发性苯酚污染在线预警技术研究,对于实现突发污染事件的早期预报和及时应对意义重大。目前,基于斑马鱼行为变化的生物在线监测技术已广泛应用于水质安全在线监测系统,借助计算机和生物传感器等技术将斑马鱼行为学指标变化转化成相应的信息和数据可以实时监测水质安全。笔者通过苯酚对斑马鱼的急性毒性及行为强度影响试验,分析苯酚与斑马鱼行为强度的效应关系,以期为在线监测苯酚污染提供基础数据和分析方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验生物:斑马鱼(购自国家斑马鱼资源中心),在实验室(25℃)水族箱内驯养14 d;定期更换水族箱的水,保证水体含氧量 ≥ 4 mg/L, pH为7~8,硬度为6~8 mg/L^[6];每天喂食并清理缸底粪便和残余饵料,试验前24 h停止喂食;规律照明,光照黑暗比为10 h:14 h。

供试药剂:苯酚,用蒸馏水配成1 g/L的母液,缠好封口膜,保存于4℃冰箱,母液每月更换1次,试验溶液均用标准稀释水稀释母液;标准稀释水,参照《水质-物质对淡水鱼

(斑马鱼)急性毒性测定方法》配置要求配制, pH为7.8±0.2,硬度为250 mg/L左右(以碳酸钙计)。

供试仪器:中国科学院生态环境研究中心开发研制的水质安全在线生物预警系统BEWs, LA系实验室pH计,溶解氧测定仪(JYD-IA), QY系列移液枪,水族箱曝气头,烧杯(2 L)、玻璃棒、容量瓶等玻璃器皿, JA系列分析天平。

1.2 试验方法

1.2.1 斑马鱼急性毒性试验。①按照《水质-物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性的测定方法》中的要求进行急性毒性预试验来确定斑马鱼0~100%估计致死量。根据预试验结果,选定6个苯酚浓度进行正式试验,分别为5、10、20、30、40、50 mg/L,每组3个平行,每组投放大小相似斑马鱼5条。②实验室内温度保持在25℃,试验时长96 h。③采用静态置换法每天更新溶液的50%^[7-8],保证溶液浓度,并记录更换前后染毒液的pH、温度、溶解氧(DO)。④记录12、24、48、72、96 h死鱼数及中毒症状,并及时捞出死鱼。

1.2.2 信号波监测苯酚对斑马鱼行为强度试验。采用水质安全在线生物预警系统(BEWs),研究0.5 Hz频率下不同浓度苯酚胁迫前后斑马鱼的综合行为强度变化,以期建立苯酚与斑马鱼行为学变化的剂量-效应关系。同时,为了排除自身变量等因素对试验结果的影响,采用斑马鱼自身对照。具体方法步骤:①根据苯酚对斑马鱼急性毒性试验结果,确定染毒药剂的浓度梯度。以48 h半致死浓度(48 h LC₅₀)为1个染毒单位(TU),浓度梯度设定为染毒单位的0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00倍,所对应的苯酚浓度分别为0.18、0.90、1.80、9.00、18.00、36.00 mg/L。②每个密闭管放置大小相似的斑马鱼2条,试验采用蠕动泵连续注水进行半静态流水试验,进水流速保持2 L/h,染毒药剂由装置底部进水口

基金项目 直饮水科技惠民示范工程(2013GS370202)。
作者简介 周绍辉(1991—),男,山东蓬莱人,硕士研究生,研究方向:给水处理技术。*通讯作者,教授,硕士生导师,博士,从事水处理理论与技术研究。
收稿日期 2016-11-11

进入,在蠕动泵作用下向上经过密闭管后进入排水管,测定不同染毒单位下斑马鱼综合行为强度变化。③试验期间保持水温(25±1)℃,试验时长48 h。④暴露试验过程中,空白对照组和试验组不能有鱼死亡。

2 结果与分析

2.1 苯酚对斑马鱼急性毒性试验结果

2.1.1 斑马鱼中毒特征及行为表现。观察不同浓度苯酚胁迫下斑马鱼的急性中毒反应,结果见图1、2。低浓度试验组(5、10 mg/L)苯酚暴露下,鱼体基本可以正常游动,24 h以后开始出现斑马鱼死亡现象;高浓度组(20~50 mg/L)斑马鱼表现出剧烈的异常反应,在烧杯中急速游动,鱼体上下翻滚,四处乱窜,鱼体失去平衡,摆尾摆鳍频率明显加快;30 min后斑马鱼活动量开始减少,游动行为逐渐减缓直至死亡。鱼体死亡后表现为鱼鳃、心脏部出现红色出血症状,体表产生白色黏液,鱼体脊柱后弯(图1、2)。这可能是由于苯酚刺激斑马鱼的皮肤,使其分泌黏液,同时损害鳃的呼吸上皮细胞,鱼鳃出现出血症状。



图1 高浓度苯酚胁迫下斑马鱼中毒特征

Fig.1 Toxicity symptom of *Brachydanio rerio* under high concentration of phenol



图2 斑马鱼死后特征

Fig.2 Characteristics after *Brachydanio rerio* died

2.1.2 苯酚对斑马鱼毒性。通过记录各时间段斑马鱼死亡数,利用SPSS软件计算得到苯酚对斑马鱼不同时间的半致死浓度(LC₅₀),结果见表1。由表1可知,苯酚对斑马鱼作用时间越长,苯酚的毒性就愈明显,说明苯酚对斑马鱼的毒性大小受暴露时间的影响,二者呈明显的时间-效应关系。根据鱼类急性毒性试验毒性分级标准^[9],苯酚对斑马鱼毒性为

中等毒性物质。有研究表明,苯酚对莫桑比克罗非鱼、奥尼罗非鱼、白鲢、中华鲟的LC_{50-96h}分别为28.49、28.09、25.50、71.00 mg/L^[9,10-12],均比苯酚对斑马鱼的LC_{50-96h}高。表明斑马鱼对苯酚的耐受力较低,对苯酚的敏感性高于其他淡水养殖鱼类,以斑马鱼作为受试生物可行性较高。

表1 不同暴露时间下苯酚对斑马鱼的急性毒性试验结果

Table 1 Acute toxicity of phenol to *Brachydanio rerio* under different exposure time

作用时间 Action time//h	LC ₅₀ mg/L	95%置信区间 95% confidence interval//mg/L	安全浓度(SC) Safe concentration//mg/L
12	28.696	15.353~33.671	1.355
24	24.247	16.654~31.255	
48	18.548	10.429~26.905	
72	15.511	6.679~23.386	
96	13.554	10.891~16.719	

从图3可见,在40、50 mg/L苯酚胁迫下,染毒开始的12 h内,斑马鱼死亡率为80%以上;30 mg/L苯酚暴露下,斑马鱼48 h致死率接近100%;96 h内,5、10、20 mg/L浓度组斑马鱼致死率均较小。这表明暴露的苯酚浓度越高,斑马鱼致死率越高,两者呈明显的剂量-效应关系。

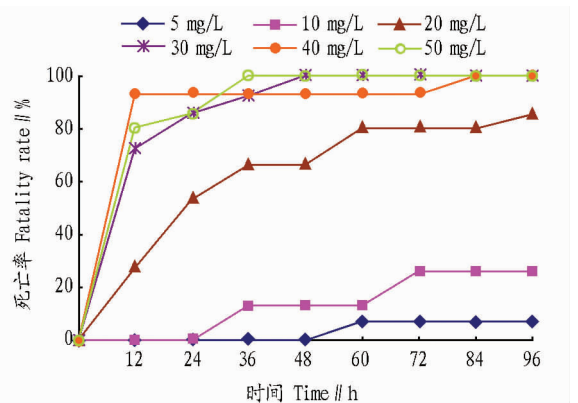


图3 不同暴露时间下不同浓度苯酚对斑马鱼的致死率

Fig.3 *Brachydanio rerio* fatality rate in different concentrations of phenol under different exposure time

2.2 苯酚对斑马鱼行为强度试验结果由表2可知,不同浓度苯酚胁迫下,对照组斑马鱼行为强度变化基本稳定,波动范围在15%~25%,表明斑马鱼在水质安全在线预警系统中的行为变化基本不受外界干扰,所测数据可以用来分析苯

表2 不同浓度苯酚胁迫下斑马鱼行为强度

Table 2 *Brachydanio rerio* behavior strength under different concentrations of phenol

苯酚浓度 Phenol concentration mg/L	对照组 Control group	试验组 Test group
0.18	0.554 14 ± 0.094 16	0.485 50 ± 0.118 74 **
0.90	0.664 89 ± 0.116 53	0.541 24 ± 0.123 19 **
1.80	0.487 26 ± 0.101 73	0.348 55 ± 0.073 77 **
9.00	0.675 75 ± 0.077 54	0.561 26 ± 0.080 40 **
18.00	0.380 93 ± 0.067 08	0.233 60 ± 0.050 27 **
36.00	0.569 55 ± 0.098 42	0.371 63 ± 0.178 45 **

注: ** 表示处理间差异极显著

Note: ** stands for extremely significant differences between treatments

酚对斑马鱼的行为学影响。与对照组相比,试验组斑马鱼行为强度极显著减弱($P < 0.01$),苯酚浓度在 0.18 mg/L(0.01 TU)及以上时,通过对 48 h 内斑马鱼行为强度变化分析可实现水体污染的监测预警。

从图 4 可以看出,正常水体中斑马鱼行为强度基本稳定,不同浓度苯酚胁迫下斑马鱼的行为强度均发生显著变化,几乎都经历先增大后减小再恢复的过程。这表明无论浓度高低,斑马鱼均感知到水体污染物的刺激,表现出明显的

“回避行为”,综合行为强度短时间内突然增大,均高于对照;随着染毒时间延长和斑马鱼机体积极适应水体环境变化,中等浓度(1.80、9.00 mg/L)和高浓度组(18.00、36.00 mg/L)均在 10 h 后行为强度变化趋于稳定,这种行为调节符合环境压力模型^[13];苯酚浓度越高,斑马鱼行为强度变化波动幅度越大,行为强度与苯酚浓度呈明显的剂量-效应关系。因此,根据斑马鱼行为强度变化可以在线监测分析水体苯酚污染程度。

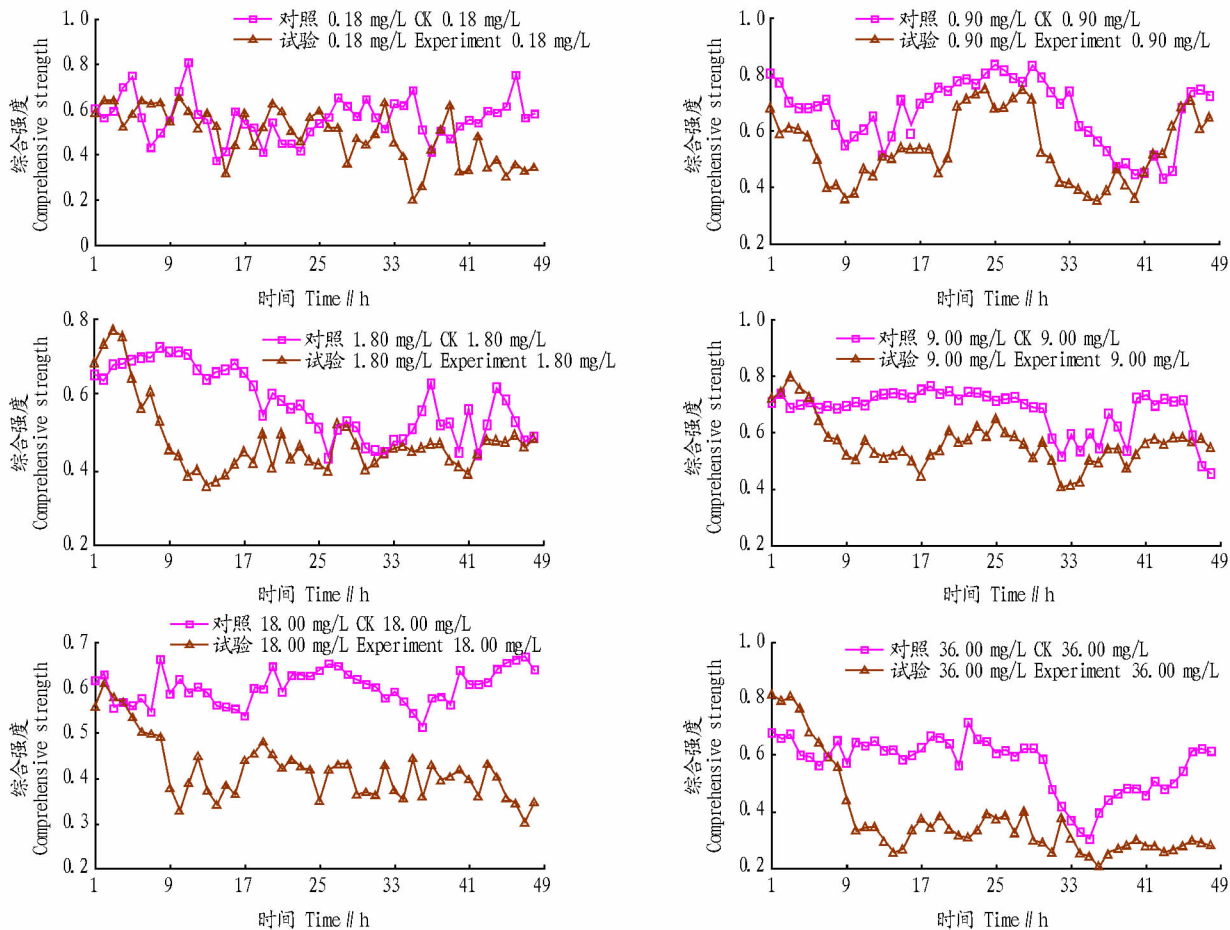


图 4 不同暴露时间下不同浓度苯酚胁迫下斑马鱼的行为强度

Fig. 4 *Brachydanio rerio* behavior strength in different concentrations of phenol under different exposure time

3 结论

(1) 苯酚对斑马鱼属于中毒物质,苯酚对斑马鱼的毒性呈明显的时间-效应和剂量-效应关系,暴露时间越长,苯酚浓度越高,斑马鱼死亡率越高。

(2) 苯酚胁迫下,斑马鱼行为变化符合环境压力模型,1~4 h行为强度增大,之后逐渐减弱并趋于稳定。苯酚浓度为 0.18~36.00 mg/L 时,试验组斑马鱼行为强度与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),苯酚浓度为 0.18 mg/L 时,水质安全在线监测系统可监测出水体污染,并及时报警。

(3) 斑马鱼在苯酚胁迫下反应明显,行为响应敏感、迅速,利用斑马鱼在线监测水质变化,是实现生物在线安全预警的有效手段。

参考文献

[1] 倪芳. 在线监测不同污染物对鱼类运动行为的影响[D]. 大连:大连理

工大学,2014:6.

- [2] 严莎. 苯系物对我国典型鱼类和水生植物的毒害效应及其水质基准的研究[D]. 天津:南开大学,2012.
- [3] 李汝. 基于斑马鱼行为学的水质监测预警技术试验研究[J]. 济南:山东建筑大学,2015:6.
- [4] 邢军. 苯、氯苯、苯酚、4-氯酚对斑马鱼、孔雀鱼、剑尾鱼的急性毒性[J]. 生态环境学报,2011,20(11):1720-1724.
- [5] 中华人民共和国卫生部,国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准:GB 5749—2006[S/OL]. [2016-09-21]. <http://www.51zgz.com/biaozhun/36161.html>.
- [6] 北京市环境保护监测中心. 水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法:GB/T13267—91[S/OL]. [2016-09-20]. <http://www.51zgz.com/biaozhun/2178.html>.
- [7] 吴声敢,吴长兴,陈丽萍,等. 两种有机硅表面活性剂和3种农药对斑马鱼的急性毒性与联合毒性研究[J]. 农药学报,2009,11(1):145-148.
- [8] 吴声敢,吴长兴,陈丽萍,等. 4种有机硅表面活性剂对斑马鱼的急性毒性与安全评价[J]. 浙江农业学报,2009,21(4):395-398.

(下转第 93 页)

和 2.80% ; 国家禁止的 3 种农药均有检出, 分别为甲基对硫磷、对硫磷、甲胺磷, 其中甲基对硫磷检出率和超标率最高, 分别为 2.20% 和 2.10%。亚胺硫磷、伏杀硫磷、倍硫磷 3 种限用农药均有检出, 但未超标, 检出最高的为亚胺硫磷, 其次为伏杀硫磷和倍硫磷, 检出率分别为 0.43%、0.24% 和 0.05%。

表 4 2076 份蔬菜水果中有机磷农药使用情况

Table 4 Application of organophosphorus pesticides in 2076 fruits and vegetables

农药种类 Pesticide types	检出批次 Detection batch	检出率 Detection rate//%	超标批次 Exceeding standard batch	超标率 Exceeding standard rate//%
甲胺磷 Methamidophos	19	0.91	19	0.91
甲基对硫磷 Methyl parathion	45	2.20	44	2.10
对硫磷 Parathion	14	0.67	12	0.58
毒死蜱 Chlorpyrifos	221	10.60	40	1.90
辛硫磷 Phoxim	115	5.50	59	2.80
氧乐果 Folimat	76	3.70	68	3.30
水胺硫磷 Isocarbophos	37	1.80	27	1.30
甲拌磷 Phorate	20	0.96	9	0.43
甲基异柳磷 Isufenphos-methyl	25	1.20	23	1.10
三唑磷 Triazophos	51	2.50	10	0.48
乙酰甲胺磷 Orthene	57	2.70	16	0.77
二嗪磷 Diazinon	49	2.40	8	0.38
敌敌畏 Dichlorvos	35	1.70	12	0.58
倍硫磷 Fenthion	1	0.05	0	0
乐果 Dimethoate	39	1.90	12	0.58
丙溴磷 Phosphorus bromide	7	0.34	1	0.05
杀螟硫磷 Fenitrothion	9	0.43	1	0.05
马拉硫磷 Carbofos	32	1.50	2	0.10
亚胺硫磷 Phosmet	9	0.43	0	0
伏杀硫磷 Phosalone	5	0.24	0	0

3 结论与讨论

该研究抽取的农产品主要来自西安市各区县无公害基地, 少部分为批发市场和农贸市场, 以外地农产品为主。根据 2013—2015 年 3 年间不同种类蔬菜水果中有机磷农药残留情况分析得出, 检出率较高的样品种类为鳞茎类、食用菌类、芸苔属类, 主要超标的蔬菜样品为西兰花、香菇、菜花、甘蓝、葱, 超标的农药种类为水胺硫磷、辛硫磷、氧乐果等; 检出超标的水果样品为草莓、橘子、葡萄, 超标的农药种类是辛硫磷、水胺硫磷。不同季节采收的蔬菜水果中, 1 月份农药残留检出率和超标率居高, 检出的样品主要为甘蓝、大白菜、菜花、西兰花、豇豆、韭菜、油麦菜 7 种; 4 月份农药残留检出较

多的样品为香菇、生菜、紫甘蓝、西红柿、甘蓝、西葫芦 6 种; 7 月份农药残留检出较多的样品为茼蒿、青菜、芹菜、菜花、西兰花、葡萄 6 种; 10 月份农药残留检出较多的样品为豇豆、白菜、青菜、紫甘蓝、香菇、菠菜、油麦菜、芹菜、菜心、甘蓝、橘子 11 种。

由季节规律性总结得出, 农药残留检出较多的样品为甘蓝、香菇、韭菜、芹菜、青菜。所以广大市民在日常食用此类蔬菜水果时, 必须要经过多次清洗处理, 尽量减少这些蔬菜水果中可能存在的有机磷农药残留对身体健康带来的危害^[5]。

西安市批发市场和农贸市场中蔬菜水果农药残留超标率大于无公害基地, 主要因为市场监管不力。虽然目前在批发市场和农贸市场都设有农产品质量安全检验检测点, 但在出入购销台账、进货的数量、产地、农产品的流向等方面^[6], 管理比较混乱。所以各大检测点应在农产品出售之前, 做好农药残留的检测工作, 确保安全的农产品上市。

综合以上分析得出, 有机磷农药容易在植物性食品, 尤其是蔬菜水果中残留, 大量残留在蔬菜水果中的农药不仅对人体产生直接毒害^[7], 而且对生态环境造成污染。所以要将健全农产品质量安全追溯平台放在首要位置, 通过加强农产品生产过程监控、质量安全信息及时查询、“三品一标”产品宣传展示等, 连结生产者、消费者、监管者, 提高农产品从田间到餐桌各个环节的透明度。同时加快西安市各区县“三品”认证步伐, 及时对不同种类上市蔬菜进行农药残留抽样检测, 扩大蔬菜水果基地的种植规模, 大力推广无公害蔬菜^[8], 减少蔬菜水果有机磷农药残留, 真正实行“从田头到餐桌”全过程的安全质量管理, 提高农产品质量。

参考文献

- [1] 徐云龙, 孙珏. 杭州市余杭区 2007 年 - 2011 年市售水果蔬菜农药残留检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(10): 2349 - 2350, 2360.
- [2] 孙鑫贵, 吴国华, 薛颖, 等. 北京市蔬菜、水果中有机磷农药残留现状调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(6): 536 - 538.
- [3] 何国平, 杨慎华, 李本长. 南昌市蔬菜水果中拟除虫菊酯类农药残留的现状调查研究[C]//中国毒理学会第七次全国毒理学会大会暨第八届湖北科技论坛论文集. 北京: 中国毒理学会, 2015.
- [4] 徐映明, 朱文达. 农药问答[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 104 - 105.
- [5] 杨学昌, 王真, 高宣德, 等. 蔬菜水果农药残留处理的新方法[J]. 清华大学学报(自然科学版), 1997, 37(9): 13 - 15.
- [6] 何丽芳, 王芳宇, 邹征欧, 等. 衡阳市蔬菜水果农药残留现状、原因与对策[J]. 衡阳师范学院学报, 2012, 33(3): 82 - 85.
- [7] 杨智华. 浅谈蔬菜农药残留超标对人体健康的危害及对策[J]. 农业开发与装备, 2015(6): 83 - 84.
- [8] 马秋玲. 绍兴地区蔬菜和水果中农药残留污染及其原因分析和控制对策[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.

(上接第 85 页)

- [9] 国家环境保护总局. 新化学物质危害评估导则: HJ/T 154 - 2004[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
- [10] 高会, 张硕慧, 熊德琪, 等. 苯酚、苯胺对两种海洋生物的急性毒性研究[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(S1): 33 - 36.
- [11] 余坦健, 简纪常, 黄郁葱, 等. 苯酚和十二烷基苯磺酸钠对奥尼罗非鱼的急性毒性及安全评价[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(3): 100 -

102.

- [12] SAHA N C, BHUNIA F, KAVIRAJ A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1999, 63(2): 195 - 202.
- [13] 黄东龙, 周勤. 水体突发性重金属污染胁迫下斑马鱼的行为反应分析[J]. 环境监测管理与技术, 2011, 23(4): 27 - 31.