

庆大霉素废水对斑马鱼的急性毒性效应

孟静文^{1,2}, 解卫方^{1,2}, 董雨欣^{1,2}, 沈洪艳^{1,2*}

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北省药用分子化学重点实验室, 河北石家庄 050018)

摘要 [目的]探讨庆大霉素废水对斑马鱼的急性毒性效应。[方法]采用静水式直接接触致毒法,研究庆大霉素废水对斑马鱼的急性毒性效应。根据斑马鱼在各时间段的死亡率求出半致死浓度(LC₅₀),根据LC₅₀判断庆大霉素废水的毒性等级。[结果]预试验结果表明,斑马鱼暴露于庆大霉素体积百分比为30%的废水中24 h 100%死亡(24 h LC₁₀₀)和体积百分比为10%的废水96 h零死亡(96 h LC₀)。急性毒性试验结果表明,在(22±1)℃下,庆大霉素废水4、8、12、24、48、72、96 h的LC₅₀分别为23.975%、21.210%、19.050%、18.395%、16.779%、16.779%、16.779%。庆大霉素废水不同时间段的LC₅₀为10%~50%,Tua值为2~10,毒性等级为中等毒性。[结论]研究结果可以为庆大霉素废水对水生生物的亚急性毒性研究提供相关数据。

关键词 环境毒理学;庆大霉素废水;斑马鱼;急性毒性;半致死浓度

中图分类号 S949 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)24-0097-04

Acute Toxic Effects of Gentamicin Wastewater on Zebrafish

MENG Jing-wen^{1,2}, XIE Wei-fang^{1,2}, DONG Yu-xin^{1,2}, SHEN Hong-yan^{1,2*} (1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018; 2. Medical Molecular Chemistry Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract [Objective] To discuss the acute toxic effects of gentamicin wastewater on zebrafish. [Method] The acute toxicity effects of gentamicin wastewater to zebrafish were determined by using hydrostatic contact test methods. The median lethal concentration (LC₅₀) was calculated according to the mortality of zebrafish in each period, and gentamicin wastewater's toxicity grade was judged according to LC₅₀. [Result] The pre-test showed that 24 h LC₁₀₀ and 96 h LC₀ for zebrafish exposing to gentamicin wastewater were 30% and 10% respectively. The acute toxicity test indicated that 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 h LC₅₀ for zebrafish at (22±1)℃ were 23.975%, 21.210%, 19.050%, 18.395%, 16.779%, 16.779%, 16.779% respectively. The research showed that LC₅₀ values were 10%~50%, Tua values were between 2 and 10, the toxicity grade was moderate toxicity. [Conclusion] The research results can provide some data for studying the subacute toxicity of gentamicin wastewater to aquatic organisms.

Key words Environmental toxicology; Gentamicin wastewater; Zebrafish; Acute toxicity; LC₅₀

抗生素废水不仅是pH变化趋势大、色度很高、气味比较刺鼻,而且是含有残留抗生素等难降解有机物以及高浓度生物毒性物质的一种有机废水。近年来,国内外报道了很多抗生素对藻类、蚤类、发光菌、鱼类的急性毒性试验^[1-5]。孟文娜等^[6]研究了土霉素对日本锦鲤肝脏抗氧化防御系统的影响,但关于抗生素废水对斑马鱼的致毒效应研究较少,尤其是庆大霉素废水。鱼类对于水环境的变化反应是尤为灵敏的,当水体污染达到一定浓度时,鱼类就会产生一系列中毒反应,如出现行为异常、生理功能紊乱,直至死亡^[7]。鱼类急性毒性试验不仅用于测定化学物质毒性强度和水质污染程度,检测废水处理效果,而且也为制定水质标准、评价环境质量和废水排放提供了重要技术支撑。斑马鱼(Zebrafish)在常规毒性试验、分子及细胞生态毒理、生物致突变效应检测和环境激素测试等生态毒理领域中已被广泛应用^[8]。在急性毒性试验中,通常采用半致死浓度(LC₅₀)来表示受试物的急性毒性大小。笔者以斑马鱼为受试生物,以庆大霉素废水为受试毒物,将斑马鱼暴露于庆大霉素废水中,测定其在恒定状态下4、8、12、24、48、72、96 h的LC₅₀值,观察庆大霉素废水对水生生物的急性毒性效应,旨在为其后续的

亚急性毒性研究提供相关数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验生物。受试生物斑马鱼(Zebrafish)购于石家庄市某花鸟鱼虫市场,体长为(25±3)mm,体质量(0.20±0.05)g,试验前在实验室环境下驯养7d,自然死亡率不得超过5%,试验前48h以及在急性毒性试验期间(96h),不对斑马鱼进行喂食。

1.1.2 仪器与耗材。曝气泵;温度计;量筒;酸度计(FE20);溶解氧测定仪(JPBJ-608);水质硬度计(YD300);5L玻璃鱼缸等。

1.1.3 试验水样。庆大霉素废水来自某制药企业污水处理厂进水(生产过程中的排放水)。水样保存在0~4℃的冰柜中备用,4h与96h水质发生了物理变化。前者水样呈深灰色,刺激性气味,有大量的深灰色絮状物;后者水样呈浅灰色,气味仍然刺鼻,絮状物明显减少(图1)。试验前对水样的COD、TOC、TN、pH等常规性指标进行了测定,结果见表1。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计。(1)预试验。在5L玻璃水族缸中盛放4L试液,设置5个试验暴露组,体积分数分别为10.00%、30.00%、50.00%、70.00%和90.00%,不设平行,每24h更换试液1次,每个暴露组放入5尾斑马鱼,试验连续进行96h,筛选出24h 100%死亡浓度(24h LC₁₀₀)和96h零死亡浓度(96h LC₀)。

基金项目 河北省自然科学基金项目(B2014208068)。

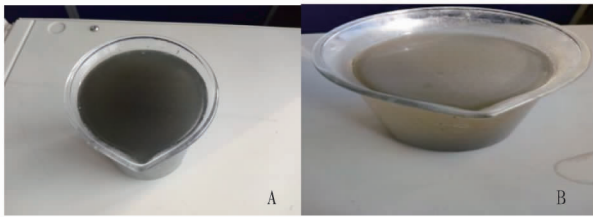
作者简介 孟静文(1993—),女,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向:环境污染行为及效应研究。*通讯作者,教授,硕士生导师,从事污染物环境行为及效应研究、环境规划与评价工作。

收稿日期 2017-06-26

(2)急性毒性试验。根据预试验得出的结果,按等对数间距设置5个试验暴露组。试验设置2个平行组,同时设置1个空白试验组,试验最后得出鱼类96 h半致死浓度(96 h LC₅₀)。每个暴露组随机放入12尾斑马鱼,试验周期为96 h。

每天检测试验溶液的pH、溶解氧(DO)和温度,pH维持在7.4~7.6,DO值为5 mg/L,温度控制在(22±1)℃,试验期间需连续曝气,试验方式为静水式(每24 h更换试液1次^[9])。试验时间为96 h,分别在4、8、12、24、48、72、96 h观察斑马鱼的死亡数,确定半致死浓度。

急性毒性试验中的斑马鱼质量控制符合《水和废水监测分析方法》中鱼类毒性试验方法的要求,即对照组死亡率不得高于10%,试验用鱼在与试验相同的环境条件下提前驯养14 d^[10]。试验期间,空白对照组试验斑马鱼均表现正常,并未出现死亡或中毒反应,水质监测结果表明试验溶液的溶解氧含量均在5 mg/L以上。



注:A.4 h;B.96 h

图1 4 h与96 h庆大霉素废水水样观察

Fig. 1 The observation on gentamicin wastewater samples at 4 h and 96 h

表1 庆大霉素废水水质测定

Table 1 Determination of gentamicin wastewater quality

项目 Items	测定值 Measured value	限定值 Limited value	分析方法 Analytical method
COD//mg/L	1 368	120(100)	重铬酸钾法
氨氮 Ammonia nitrogen//mg/L	117.4	35(25)	纳氏试剂-分光光度法
TOC//mg/L	530.6	40(30)	岛津 TOC-Vcpn 分析仪
TN//mg/L	150	70(50)	岛津 TOC-Vcpn 分析仪
pH	6.48	6~9	实验室 pH 计
SS	7 946	80	色度的测定

注:排放限值根据《发酵类制药工业水污染物排放标准(GB 21903—2008)》得出

Note: The emission limited values were obtained according to *Discharge Standards of Water Pollutants for Pharmaceutical Industry Fermentation Products Category*(GB 21903—2008)

1.2.2 数据统计与分析。半致死浓度(LC₅₀):根据概率单位加权回归(Bliss)法,又称图解法,包括求剂量反应曲线方程和半致死浓度的95%置信区间^[11]。

(1)求剂量反应直线方程。以试验浓度对数值 x 为横轴,以死亡概率单位 y 为纵轴,绘制散点图,得到回归曲线。从回归曲线上死亡概率单位为5的点作垂线与横轴相交,读数即为lgLC₅₀,取lgLC₅₀的反对数即可得到LC₅₀值。

(2)半致死浓度的95%置信区间。通常以总体LC₅₀的95%置信区间,为可接受的LC₅₀范围。

①标准误差的计算: $S_{lgLC_{50}} = \frac{S}{\sqrt{(N'/2)}}$ 。式中,回归曲线

的斜率倒数用 S 表示;死亡概率单位4~6范围内各组试验动物数之和用 N' 表示。②总体LC₅₀的95%置信区间的对数值($lgLC_{50} - 1.96S_{lgLC_{50}}, lgLC_{50} + 1.96S_{lgLC_{50}}$)对上述结果取反对数,即得到总体LC₅₀的95%置信区间。

2 结果与分析

2.1 预试验结果 庆大霉素废水对斑马鱼的预试验持续96 h,得出24 h 100%死亡浓度(24 h LC₁₀₀)为30%,96 h无死亡浓度(96 h LC₀)为10%。

2.2 急性毒性试验结果 当斑马鱼处于庆大霉素废水中时,10%、13%浓度组的斑马鱼在染毒后有轻微的中毒症状:浮于水面游动缓慢、倒游、竖立于水中^[12],约10 h后行动恢复正常,但24 h后出现死亡;16.90%、21.90%、28.56%浓度组的斑马鱼在染毒1 h后中毒症状明显,呼吸加剧、失衡、活力减弱,鱼体侧卧,轻触鱼背,抽搐、向上跳跃最后出现麻痹甚至死亡状态^[13]。空白对照组中斑马鱼均表现正常,出现零中毒和零死亡现象。

2.3 不同体积分数的庆大霉素废水对斑马鱼的急性毒性效应 随着庆大霉素废水体积分数的增加,对斑马鱼呈现的急性毒性效应也逐渐增强(表2),表现为斑马鱼死亡率明显升高,当庆大霉素废水体积分数达28.56%时,24 h内受试斑马鱼累积死亡率达100%。这与武晨虹^[14]在研究青霉素废水对斑马鱼的急性毒性效应时也得出随着青霉素废水浓度的增加,斑马鱼的死亡数目增多,死亡率也随之增大的结论相一致。从图2可以看出,在不同体积分数的庆大霉素废水中斑马鱼死亡率与试验浓度对数值存在明显的剂量-效应关系^[15],随着暴露浓度的增加,斑马鱼的死亡率显著上升。在整个试验中,庆大霉素废水对斑马鱼的暴露浓度对数值-死亡率曲线均呈不规则的S形^[16],即斑马鱼死亡率随着暴露浓度的升高而升高,但最初急速升高,后来缓慢上升。

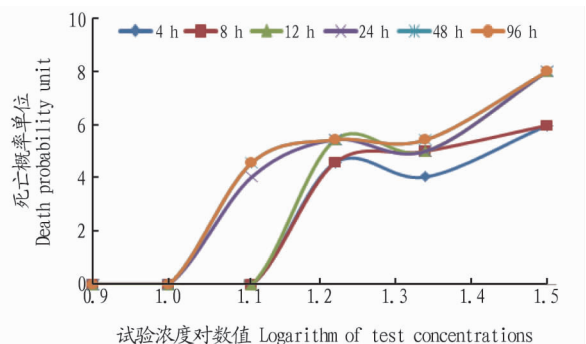


图2 庆大霉素废水对斑马鱼4、8、12、24、48和96 h的回归曲线
Fig. 2 The regression curves of gentamicin wastewater to zebrafish at 4, 8, 12, 24, 48 and 96 h

2.4 庆大霉素废水对斑马鱼的急性毒性效应参数分析 依据斑马鱼在4、8、12、24、48、72、96 h的死亡率,通过建立死亡概率单位(y)与试验浓度对数值(x)的回归方程,各时段均显示出较强的正相关性($R^2 > 0.810$),计算出LC₅₀、Tua值和95%置信区间。

由表 3 可知,随着暴露时间的延长,LC₅₀呈现下降趋势,庆大霉素废水的毒性逐渐增强。在整个试验周期内,试验时间越长,LC₅₀值越小,庆大霉素废水的毒性越大,即废水对斑马鱼的毒性大小受试验时间的影响^[17]。24 h 后,随试验时间的延长,LC₅₀值下降缓慢,表明随着试验时间的延长,废水

致毒能力缓慢增长。48~96 h 内 LC₅₀均为 16.779%,表明在这个时段内庆大霉素废水对斑马鱼的毒性不再增强。胡青云等^[18]在研究染发废水对鲤鱼的急性毒性试验中发现,试验鱼致死时间主要集中在 24 h 内,24~48 h 内死亡率缓慢增长,48~96 h 死亡率不再变化。

表 2 庆大霉素废水对斑马鱼的急性毒性试验结果

Table 2 The acute toxicity test results of gentamicin wastewater to zebrafish

体积百分比 Volume percent // %	不同试验时间斑马鱼的累积死亡率 Cumulative mortality of zebrafish at different test time // %						
	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0	0	0	0	0	0	0
10.00	0	0	0	0	0	0	0
13.00	0	0	0	16.7	33.3	33.3	33.3
16.90	33.3	33.3	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
21.90	16.7	50.0	50.0	50.0	66.7	66.7	66.7
28.56	83.3	83.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

表 3 庆大霉素废水对斑马鱼急性毒性的特征参数

Table 3 The characteristic parameters of acute toxicity on gentamicin wastewater to zebrafish

受试时间 Test time h	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	LC ₅₀ // %	Tua	95% 置信区间 95% confidence interval // %
4	$y = 3.832 + 0.161x$	0.812	23.975	4.17	21.261 ~ 28.089
8	$y = 3.369 + 0.159x$	0.885	21.210	4.71	18.722 ~ 24.433
12	$y = 4.036 + 0.211x$	0.859	19.050	5.25	16.389 ~ 22.502
24	$y = 3.283 + 0.178x$	0.958	18.395	5.44	15.994 ~ 21.300
48	$y = 3.071 + 0.182x$	0.958	16.779	6.96	14.428 ~ 19.436
72	$y = -3.071 + 0.182x$	0.932	16.779	5.96	14.428 ~ 19.436
96	$y = -3.071 + 0.182x$	0.932	16.779	5.96	14.428 ~ 19.436

注:表中概率单位值由百分数概率单位对照表换算得出^[19];Tua = 1/LC₅₀;n = 12

Note: Probability unit was conserved according to parallel table between percentage and probability unit;Tua = 1/LC₅₀;n = 12

2.5 庆大霉素废水的毒性等级 根据工业废水毒性等级划分标准^[20-22],庆大霉素废水在 96 h 内各观察时间段的 LC₅₀均介于 10%~50%,Tua 值也均在 2~10(表 4),属于中毒废水。

表 4 工业废水毒性等级划分标准

Table 4 The grade division standards for industrial wastewater's toxicity

毒性等级 Toxicity grades	LC ₅₀ // %	Tua
极毒 Virulent	<1	>100
高毒 High toxicity	1 ~ <10	10 ~ 100
中毒 Medium toxicity	10 ~ <50	2 ~ <10
低毒 Low toxicity	50 ~ 100	1 ~ <2
微毒或无毒 Slight toxicity or no toxicity	NTA	<1

注:当 Tua < 0.3 时,排放废水对接纳水体的水生生物无急性毒性

Note: When Tua was less than 0.3, emission wastewater had no acute toxicity on aquatic organisms

3 结论

(1) 预试验结果表明,庆大霉素废水在 96 h 周期试验中,24 h LC₁₀₀和 96 h LC₀试液中废水浓度分别为 30%和 10%;急性毒性试验结果表明,96 h LC₅₀为 16.779%,庆大霉素废水在 96 h 内各观察时间段的 LC₅₀均介于 10%~50%,

Tua 值为 2~10,属于中毒性废水。

(2) 回归曲线表明,斑马鱼死亡率与庆大霉素废水浓度和暴露时间(试验时间)成正比。庆大霉素废水浓度越大、暴露时间越长,斑马鱼的死亡数量越多,死亡率也随之增大,毒性越大。

参考文献

- [1] 毕田田,赵海燕,张双灵. 氧氟沙星乳酸诺氟沙星和恩诺沙星对金鱼的急性毒性试验研究[J]. 农产品加工,2015(8):31-33,37.
- [2] 于振洋,张晶,张洪昌,等. 盐酸四环素对秀丽线虫(*C. elegans*)的急性与多代毒性研究[J]. 生态毒理学报,2010,5(3):320-326.
- [3] 丛永平,姜蕾,王婷,等. 典型抗生素二元混合物对明亮发光杆菌的急性联合毒性[J]. 环境化学,2013,32(7):1348-1352.
- [4] 王慧珠,罗义,徐文青,等. 四环素和金霉素对水生生物的生态毒性效应[J]. 农业环境科学学报,2008,27(4):1536-1539.
- [5] 徐冬梅,王艳花,饶桂维. 四环素类抗生素对淡水绿藻的毒性作用[J]. 环境科学,2013,34(9):3386-3390.
- [6] 孟文娜,刘舒婷,王晓蓉,等. 土霉素对日本锦鲤肝脏抗氧化防御系统的影响[J]. 农业环境科学学报,2010,29(5):833-838.
- [7] 黄晓容,钟成华,邓春光. 苯胺·二甲苯和硝基苯对白鲢的急性毒性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(25):10908-10909.
- [8] 朱丽珍. 两种芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂对斑马鱼毒性效应及作用机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2016.
- [9] 沈洪艳,曹志会,赵月,等. 抗生素药物诺氟沙星对锦鲤的毒性效应[J]. 安全与环境学报,2015,15(4):380-385.
- [10] 邱郁春. 水污染鱼类毒性实验方法[M]. 北京:环境科学出版社,1992:50-61.

- [11] 周永欣,章宗涉.水生生物毒性试验方法[M].北京:农业出版社,1989:192-231.
- [12] 王丽新.链霉素废水诱导斑马鱼氧化应激反应与生态风险评价研究[D].石家庄:河北科技大学,2014.
- [13] 沈洪艳,宋存义,甄芳芳,等.对氯硝基苯对锦鲤鱼的急性毒性效应[J].河北师范大学学报(自然科学版),2007,31(4):514-517.
- [14] 武晨虹.生物标志物法判别抗生素废水毒性及其生态风险评价研究[D].石家庄:河北科技大学,2013.
- [15] VERSTEEG D J,RAWLINGS J,BOZSO E,et al.The acute and chronic toxicity of hexadecyl and heptadecyl sulfate to aquatic organisms[J].Archives of environmental contamination and toxicology,2006,51(1):43-53.
- [16] SVECEVICIUS G.Acute toxicity of hexavalent chromium to European freshwater fish[J].Bulletin of environmental contamination and toxicology,

- 2006,77(5):741-747.
- [17] SUNDERAM R M,PATRA R W,JULLI M,et al.Use of the up-and-down acute toxicity test procedure to generate LC₅₀ date for fish[J].Bulletin of environmental contamination and toxicology,2004,72(5):873-880.
- [18] 胡青云,吕伟娅.染发废水对鲤鱼急性毒性试验研究[J].河北农业科学,2010,14(5):88-90.
- [19] 国家环保局《水生生物监测手册》编委会.水生生物监测手册[M].南京:东南大学出版社,1992:259.
- [20] 周秀艳,孙洪雨,韩桂春.辽宁典型工业废水生物毒性综合评价[J].毒理学杂志,2005,19(S1):309-310.
- [21] 刘大胜,赵岩,傅莹,等.工业废水排放环境监管中的新手段:鱼类急性毒性试验应用[J].环境保护,2008(14):50-52.
- [22] 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.

(上接第73页)

可以看出,在同样条件下,聚苯胺-氧化石墨烯对染料的吸附效果以甲基橙最好,亚甲基蓝最差,但由于铬黑T对环境污染程度更严重及处理过程更为繁琐,且铬黑T吸附性能也高达95.06%,因此,该试验测试对铬黑T的吸附性能有重要意义。

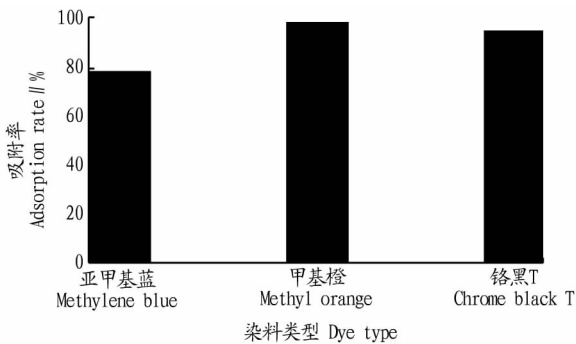


图5 聚苯胺-氧化石墨烯对不同染料的吸附率比较

Fig. 5 Comparison of adsorption rates of PANI-GO oxide composites for different dyes

2.5 聚苯胺及其复合物吸附性能比较 在100 mL 5 mg/L亚甲基蓝溶液中,分别加入0.1 g聚苯胺及聚苯胺-氧化石墨烯,室温下搅拌24 h,倒出吸附后液体,在离心机中离心振荡(4 000 r/min,10 min)后取上层清液,测定亚甲基蓝的残留浓度,并计算吸附率。试验结果显示,在同样条件下,在染料溶液中分别加入聚苯胺及其复合物,聚苯胺对染料吸附率达63.63%,而聚苯胺经复合后,吸附效果显著提升,可达80.42%。

3 结论

该试验通过原位聚合合法合成聚苯胺-氧化石墨烯,并对染料的吸附性能进行了探究。结果表明,该复合物对染料具有较好的吸附性能,在吸附剂用量为1.2 g/L、搅拌时间为50 min、pH为4的情况下,对铬黑T吸附率高达94.04%。在研究复合物对不同染料的吸附中,发现对各类染料均有吸附

效果,一定条件下对甲基橙的吸附率可达98.35%,且在原料及其复合物对亚甲基蓝的吸附性能研究中,发现复合物的吸附效率较之单一材料提升了15%,因此该试验方法对染料的吸附提供了一定理论依据。

参考文献

- [1] AL-GHOUTI M A,KHRISHEH M A M,ALLEN S J,et al.The removal of dyes from textile wastewater:A study of the physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth[J].Journal of environmental management,2003,69(3):229-238.
- [2] WARANG T,PATEL N,FERNANDES R, et al.Co₃O₄ nanoparticles assembled coatings synthesized by different techniques for photo-degradation of methylene blue dye[J].Applied catalysis B:Environmental,2013,132/133:204-211.
- [3] KRAKAUER T,LI B Q,YOUNG H A.The flavonoid baicalin in inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines[J].FEBS letters,2001,500(1/2):52-55.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:第2册[S].北京:人民卫生出版社,1993:65.
- [5] LASZLO J A.Preparing an ion exchange resin from sugarcane bagasse to remove reactive dye from wastewater[J].Textile chemist and colorist,1996,28(5):13-17.
- [6] WU J N,EITEMAN M A,LAW S E.Evaluation of membrane filtration and ozonation processes for treatment of reactive dye wastewater[J].Journal of environmental engineering,1998,124(3):272-277.
- [7] VINODGOPAL K,KAMAT P V.Enhanced rates of photocatalytic degradation of an azo dye using SnO₂/TiO₂ coupled semiconductor thin films [J].Environmental science & technology,1995,29(3):841-845.
- [8] PEARCE C I,LLOYD J R,GUTHRIE J T.The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells:A review[J].Dyes and pigments,2003,58:179-196.
- [9] 马非.重金属离子吸附材料的制备及性能研究[D].太原:太原理工大学,2012.
- [10] 徐静,闻宏亮,欧阳建波,等.氧化石墨烯-壳聚糖复合材料对甲基蓝的吸附动力学[J].上海大学学报(自然科学版),2013,19(4):400-404.
- [11] NEUDECK A,PETR A,DUNSCH L.Redox mechanism of polyaniline studied by simultaneous ESR-UV-vis Spectroelectrochemistry[J].Synthetic Met,1999,107(3):143-158.
- [12] 杨熙.氧化石墨烯和石墨烯纳米材料制备及其重金属吸附性能研究[D].武汉:华中师范大学,2012.
- [13] 罗志虹.聚苯胺/石墨烯复合物的可控制备及其电化学电容性质[D].武汉:华中科技大学,2014.