

大型溞和日本青鳉在水质在线生物安全预警应用中的比较

任宗明^{1,2,3} 李志良³ 王子健²

(1 中国科学院烟台海岸带可持续发展研究所,烟台 264000; 2 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室,北京 100085; 3 山东师范大学生命科学学院,济南 250014)

摘要 讨论了利用大型溞和日本青鳉作为受试生物,通过在线监测两种受试生物行为变化反映水质变化状况的优缺点。结果表明:首先,大型溞对水体污染比日本青鳉更敏感,针对某些污染物的监测水平甚至高于国家地表水标准的限值,而日本青鳉反应水平处于 10 倍以上地表水标准;其次,在连续监测过程中,大型溞行为变化未表现明显的昼夜规律性,而日本青鳉行为变化具有更明显的生物钟现象;第三,在连续在线监测过程中,大型溞持续监测只能维持 7 天左右,其续航能力明显弱于日本青鳉的 30 天以上监测周期。

关键词 大型溞 日本青鳉 在线监测 行为变化 生物预警

Comparisons between applications of *Daphnia magna* and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) in the water quality on-line biomonitoring

Ren Zongming^{1,2,3}, Li Zhiliang³, Wang Zijian²

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research for Sustainable Development, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264000, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: In this study, *Daphnia magna* and Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) were discussed to evaluate the advantages and disadvantages of their application in the on-line biomonitoring of water qualities. The results suggested that: 1st, *Daphnia magna* was more sensitive than Japanese Medaka, and some monitoring results of *Daphnia magna* were lower than environmental quality standards for surface water, but the results of Japanese Medaka were 10 times more than the standards; 2nd, in the on-line biomonitoring, the behavioral responses of *Daphnia magna* showed no circadian rhythms, but the behavioral responses of Japanese Medaka were in strong accordance with the biological clock; 3rd, in the on-line biomonitoring, *Daphnia magna* could only last for 7 days, which was shorter than the 30 days period range of Japanese Medaka evidently.

Keywords: *Daphnia magna*; Japanese Medaka; On-line biomonitoring; Behavioral responses; Biological early warning

0 引言

水体突发性污染事故是指在瞬间或短时间内大

量排放污染物质,对水环境造成严重污染和破坏,给人民的生命和国家财产造成重大损失的恶性事故。它不同于一般的环境污染,具有发生突然、扩散迅速、危害严重等特点,有些甚至污染物不明^[1]。各种突发性事故以及化工厂的不正常运行都会导致不可

中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室开放项目(2008-006)支持。

预知的水体污染事故。有毒和危险化学品向水环境的意外泄漏,不仅会对人类造成重大危害,对生物的生存形成威胁,更会破坏水生态系统平衡。有效的水质预警技术不仅可以降低突发性环境污染物对水生态平衡的破坏,更有利于保障人类饮用水的安全。

目前,国内外科研工作者已经将生物运动作为监测对象,进行水体突发性污染事故的在线生物预警研究^[2~4]。生物可以通过行为调节机制保持体内环境的相对稳定^[5]。在一定环境胁迫下,生物行为反应是生物对外界环境和内部生理变化的外在体现^[6]。因此,通过监测生物行为变化实现水体突发性污染事故的在线安全预警是非常有研究前景的生物预警监测技术。

大型溞(*Daphnia magna*)对水体内化学物质的变化非常敏感^[7],用于运动的触角数量很多,其中第二对触角是主要的运动器官^[8],运动形式多样,且幅度大,因此大型溞可以用于作为在线生物监测的合适受试生物。日本青鳉(*Oryzias latipes*)隶属鳉科,个体小,全长2.5~5.0 cm,可以耐受低溶氧和较宽的水温和盐度范围^[9]。由于其生物学背景研究非常充分,自从Denny对青鳉饲养管理与试验操作进行了规范化后,青鳉作为试验动物被多数世界组织认可^[10],并于20世纪80年代被国际标准化组织列为毒性试验受试种之一。目前,日本青鳉的行为变化已经作为一个重要指标被广泛地应用到水质监测中^[11~13]。

本研究根据上述两种水生生物的特点,结合水质在线生物安全预警系统的在线生物行为分析,对大型溞和日本青鳉在水质安全预警中的应用做了详细比较,便于以后研究及水体在线生物预警实践,为水体污染的在线生物监测技术提供合适的受试生物。

1 材料与方法

1.1 监测系统

在大型溞和日本青鳉行为在线监测中,采用生物行为监测系统(BMS-1)^[14]的升级仪器水质安全在线生物预警系统(BEWs-21,中国科学院生态环境研究中心研制)进行。BEWs-21的行为采集及分析技术与BMS-1相似^[14]。

不同的生物个体大小采用相匹配的传感器:大

型溞行为监测过程中,采用直径为2 cm,长3 cm的圆柱形生物传感器;日本青鳉行为监测过程中,采用直径为5 cm,长7 cm的圆柱形生物传感器。

1.2 生物培养

大型溞的培养参照文献^[15,16]进行。培养温度 (22 ± 2) °C,光照强度3 000~4 000 lx,光照周期16L:8D。采用国际标准化组织规定的标准参比水(Standard Reference Water, SRW)^[17],pH为 7.8 ± 0.2 ,硬度以CaCO₃计为 $250\text{ mg/L}\pm 25\text{ mg/L}$,试验周期内喂食斜生栅藻(*Senedesmus obliquus*)。

日本青鳉采用流水繁殖,繁殖水温为 (25 ± 2) °C,光照周期16L:8D。刚孵出2天内,无需投喂饵料。2天后使用刚孵出丰年虫作为开口饵料,每天2~3次饱食投喂。15天后使用配合饲料投喂,每天投喂2次。保持密度为每升水2~3条^[18]。

1.3 试验设计

本试验采用流水环境监测大型溞和日本青鳉的行为反应。在污染物暴露试验过程中,分析纯敌敌畏、溴氰菊酯和氯化镉作为暴露化合物,分别测试有机磷农药、拟除虫菊酯类农药和重金属对大型溞和日本青鳉的行为毒性。在大型溞和日本青鳉昼夜交替规律性行为研究和续航能力比较试验中,采用不含污染物的标准水(SRW)进行。试验过程中,为了明确生物综合行为的变化,采用生物综合行为强度(Behavior Strength)来反映其行为变化^[19],在此过程中,判断生物行为强度发生剧烈变化的标准是:变化以前连续5次行为强度平均值与变化以后连续5次行为强度平均值差异达到20%以上^[14]。

在大型溞流水试验过程中,试验开始,每个通道保持5只出生后48~96 h大型溞,直至试验结束;在日本青鳉流水试验过程中,试验开始,每个通道保持3条体长2.5~3 cm的健康日本青鳉,直至试验结束。试验过程中不喂食物,并控制每个通道水流速 2 L/h ^[20]。

试验过程中生物暴露的污染物浓度结合文献报道的48 h半数效应浓度(EC₅₀₋₄₈),设置如下暴露: $1\times\text{EC}_{50-48}$ 、 $5\times\text{EC}_{50-48}$ 、 $10\times\text{EC}_{50-48}$,并以SRW为对照。监测周期为48 h。不同浓度污染物暴露过程中采用3组平行,并通过平均值反应大型溞和日本青鳉的行为反应,在此基础上,评价两种生物的敏感性。

大型蚤和日本青鳉行为变化规律性研究过程在 SRW 内进行, 并采用 3 组平行, 通过 BEWs - 21 分解以后的生物行为表示其行为变化。监测周期为 4 d。

大型蚤和日本青鳉在正常条件下的续航能力比较试验在 SRW 内进行, 采用 4 组平行。BEWs - 21 分解以后的生物行为表示其行为变化。生物维持时间的平均值表示该种生物在监测过程中的续航能力。监测周期为 30 d。

2 结果与讨论

2.1 生物敏感性比较

结合文献报道, 不同污染物对出生后 48~96 h 大型蚤的 EC_{50-48} 分别为: 敌敌畏 0.20 (0.16~0.25) $\mu\text{g/L}$ ^[21], 溴氰菊酯 0.45 $\mu\text{g/L}$ ^[22], 氯化镉 55 $\mu\text{g/L}$ ^[23]。不同污染物对体长 2.5~3 cm 日本青鳉 EC_{50-48} 分别为敌敌畏 1 mg/L^[24], 氯化镉 1.8 mg/L^[24]。溴氰菊酯对日本青鳉的 EC_{50-48} 未见报道, 但结合体长 2.41 cm 罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 的 48 h 暴露结果, 采用结果 15 $\mu\text{g/L}$ 的溴氰菊酯作为原始暴露浓度^[25]。因此, 本研究中, 以上述污染物原始暴露浓度作为暴露的毒性单位 (Toxic Unit, TU), 并以 SRW 为对照, 采用 1 TU、5 TU 和 10 TU 为暴露浓度, 分别研究一定污染物暴露下的大型蚤和日本青鳉的综合行为变化 (见图 1)。

在 48 h 暴露过程中, 对照组内大型蚤和日本青鳉行为未随时间的变化而发生行为强度的明显升高或降低。同时, 上述结果表明: 在同一种污染物暴露下, 生物行为强度随暴露时间变化而发生明显变化, 也会随暴露浓度的变化而变化。大型蚤和日本青鳉的上述行为强度变化结果符合一定环境胁迫下生物环境胁迫阈模型 (见图 2)^[15]。结合该模型分析, 生物暴露于一定污染环境以后, 其行为变化主要经历行为刺激, 行为适应, 行为调整, 甚至再调整, 直至产生明显行为毒性效应。在上述行为调节过程中, 环境胁迫阈对生物行为变化起非常大的决定作用。

除上述行为变化规律, 大型蚤和日本青鳉在一定环境暴露中的行为反应是相似的。但因为上述不同污染物对大型蚤和日本青鳉的 TU 值不同, 决定了两种生物敏感性不同。大型蚤明显比日本青鳉要敏感得多, 平均差异在一个数量级, 在有些污染物中的差距甚至达到两个数量级以上 (敌敌畏)。

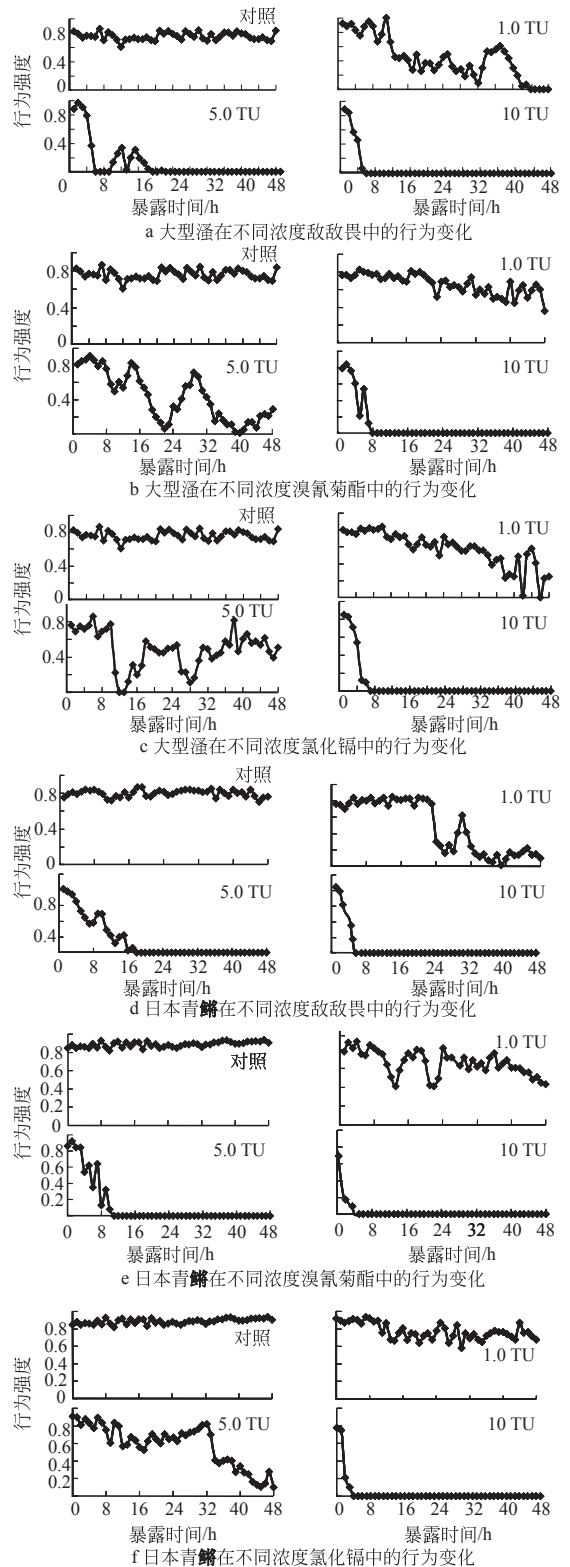


图 1 污染物暴露下大型蚤和日本青鳉的行为变化

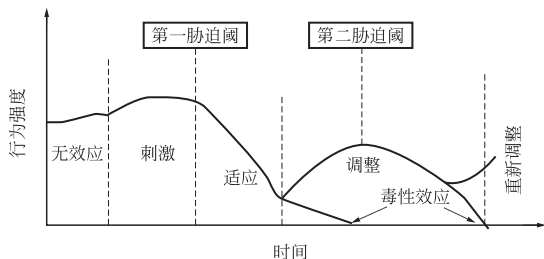


图2 一定环境胁迫下生物环境胁迫阈模型

同时,结合《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)的要求(敌敌畏 ≤ 0.05 mg/L;溴氰菊酯 ≤ 0.02 mg/L;镉 ≤ 0.01 mg/L)^[26],大型蚤监测水平甚至高于国家地表水标准的限值,而日本青鳉行为反应水平大部分处于10倍以上地表水标准(溴氰菊酯除外)。

2.2 正常行为变化规律研究

图3为大型蚤和日本青鳉在SRW中4天的连续行为监测结果。该结果由BEWs-21将综合行为分解后直接显示。

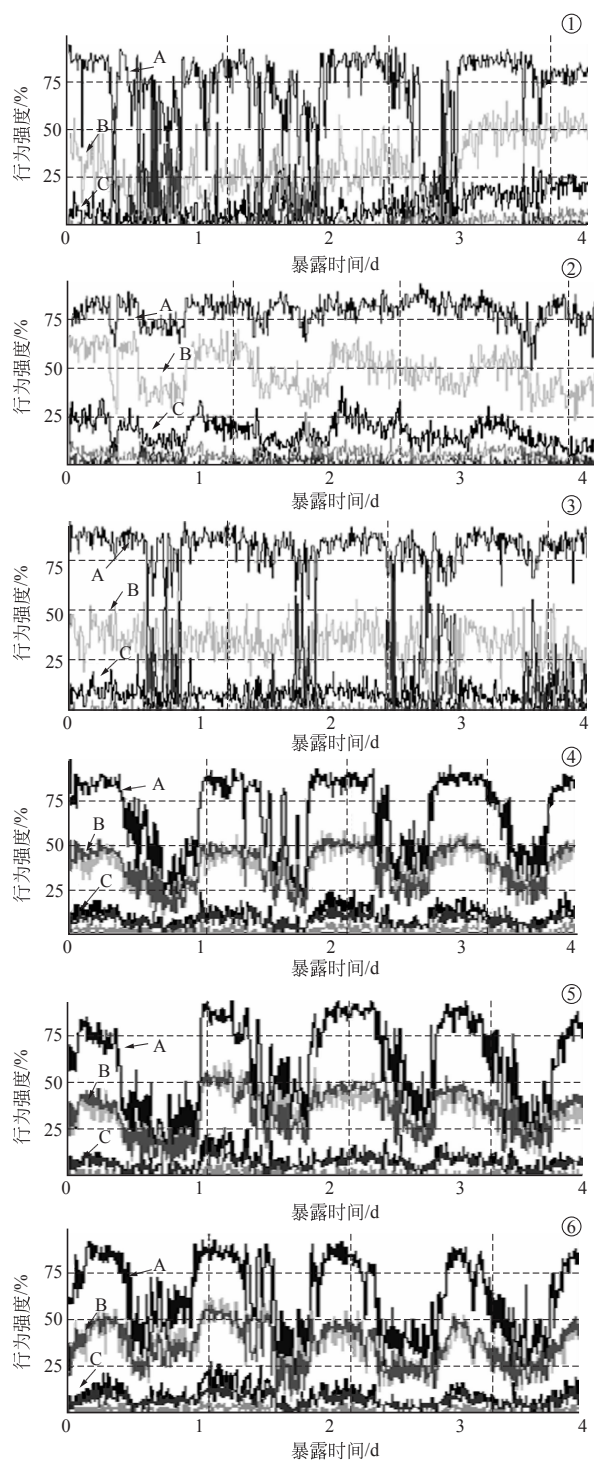
结果显示,在4天连续监测过程中,无论是大型蚤还是日本青鳉都表现出明显的规律性变化,尤其是日本青鳉,其不同频率行为变化程度比大型蚤更强烈。首先,生物行为变化表现24 h周期性。生物不同频率行为强度在夜间明显降低,其中低频行为变化最强。而到白天,生物行为会自然恢复;其次,不同频率行为强度明显不同,低频行为(0.5~1.0 Hz)强度高,中等频率行为(1.0~2.0 Hz)强度较高,而高频行为(2.0~8.0 Hz)强度最低;第三,日本青鳉行为周期性表现比大型蚤更明显,最高变化达到50%以上。

生物在行为表现过程中,受到环境光照的影响非常明显,具有明显的昼夜交替现象,并且表现为24 h的规律变化周期,生物的此种变化规律被称为生物钟(Biological Clock)现象^[27]。由此可见,大型蚤和日本青鳉都表现了明显的生物钟现象,并且日本青鳉表现尤为明显。

虽然两种生物都表现周期性行为变化规律,但大型蚤行为强度变化总体程度比日本青鳉低,但是,在进行水质在线生物监测过程中,依然考虑生物钟现象对监测结果造成的影响,并采取必要措施弥补生物行为周期性导致的行为强度差异。

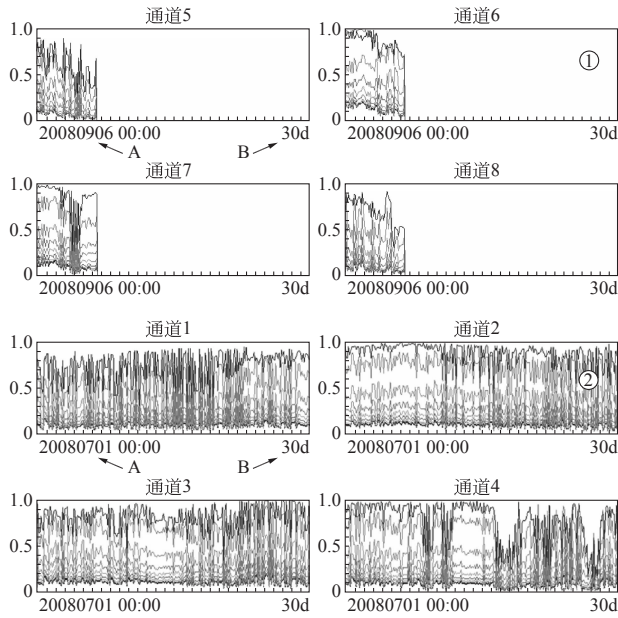
2.3 续航能力试验

图4为大型蚤和日本青鳉连续30天在SRW内行为变化结果。



①~③图为大型蚤在SRW中4天的变化,④~⑥图为日本青鳉在SRW中4天的变化;A为经过BEWs-21分解后频率较低(0.5~1.0 Hz)的行为,B为频率中等(1.0~2.0 Hz)的行为,C为频率较高(2.0~8.0 Hz)的行为

图3 大型蚤和日本青鳉在SRW中4天的行为变化



①图为大型蚤在SRW中30天的连续行为变化,②图为日本青鳉在SRW中30天的连续行为变化;横坐标为暴露时间,d;纵坐标为以单位1显示的行为强度;A为试验开始时间,B为监测时间(30d)

图4 大型蚤和日本青鳉在SRW中30天的行为变化

结果表明,在无食物添加的情况下,大型蚤续航能力为7天左右,并且在第5~7天之间,大型蚤行为强度出现明显的变化。后3天的平均行为强度明显低于前4天行为强度。在7天以后,几乎所有的大型蚤行为强度都降为零。图4-②结果表明:日本青鳉续航能力都超过30天。

在试验过程中,大型蚤和日本青鳉行为变化表现的生物钟现象与4天暴露结果保持一致:都表现生物钟现象,但是日本青鳉的生物钟现象明显于大型蚤。

3 结论

上述结果表明,大型蚤和日本青鳉在应用于水体在线生物监测过程中,分别具有不同的优缺点:首先,大型蚤对水体污染比日本青鳉更敏感,针对某些污染物的监测水平甚至高于国家地表水标准的限值,而日本青鳉反应水平处于10倍以上地表水标准;其次,在连续监测过程中,大型蚤行为变化未表现明显的昼夜规律性,而日本青鳉行为变化具有明显的生物钟现象;第三,在连续在线监测过程中,大型蚤持续监测只能维持7天左右,其续航能力明显弱于日本青鳉的30天监测周期。

结合上述结果,在基于生物行为强度进行的水

体在线生物监测过程中,大型蚤可以应用于针对饮用水源水质变化和工厂废水偷排偷放导致的河流水质变化。在监测过程中,首先要注意大型蚤生物钟现象,同时要保证在正常监测周期内更换大型蚤。日本青鳉可以应用于水体突发性污染事故的在线生物监测,在监测过程中,同时要注意生物钟现象对监测结果的影响。

参考文献

- 1 万本太,张力威,刘砚华,等. 突发性环境污染事故应急监测与处理处置技术. 北京:中国环境科学出版社,2006
- 2 Yachida M, Asada M, Tsuji S. Automatic analysis of moving images. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1981, 3: 12~20
- 3 van der Schalie W H, Shedd T R, Knechtges P L, et al. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. Biosensors and Bioelectronics, 2001, 16: 457~465
- 4 Gerhardt A, Janssens de Bisthoven Mo Z, Wang C, et al. Short-term responses of *Oryzias latipes* (Pisces) and *Neomysis awatschensis* (Crustacea) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: Survival, behaviors and biomarkers. Chemosphere, 2002, 47: 35~47
- 5 Putman R J, Wratten S D. Principles of Ecology. Groom Helm, London and Canberra, 1984
- 6 尚玉昌. 行为生态学. 北京:北京大学出版社,1998
- 7 Kari Y H, Lagerspetz. Thermal avoidance and preference in *Daphnia magna*. Journal of Thermal Biology, 2000, 25: 405~410
- 8 Ringelberg J. An account of a preliminary mechanistic model of swimming behavior in *Daphnia*: its use in understanding diel vertical migration. Hydrobiologia, 1995, 307: 161~165
- 9 Yamamoto T. Medaka (Killifish): Biology and Strains Keigaku Pub Co, Tokyo, 1975
- 10 Denny J S. Guidelines for the culture of fathead minnows for use in toxicity tests. Environmental Research Laboratory, Duluth, Minn. Epa/600/3-87/001. 1987
- 11 Shioda, T, Wakabayashi, M. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere, 2000, 40: 239~243
- 12 Teather K, Harris M, Boswell J G, et al. Effects of Acrobat MZ and Tatto C on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) development and adult male behavior. Aquatic Toxicology, 2001, 51: 419~430
- 13 Karen L G, Kevin L, T. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 54: 330~338