

# 有机污染场地浅层地下水对斑马鱼胚胎发育的生物毒性研究

周艳<sup>1,2,3</sup>, 徐建<sup>2,3</sup>, 冯艳红<sup>2,3</sup>, 赵欣<sup>2,3</sup>, 万金忠<sup>2,3</sup>, 林玉锁<sup>2,3①</sup> (1. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏南京 210095; 2. 环境保护部南京环境科学研究所, 江苏南京 210042; 3. 国家环境保护土壤环境管理与污染控制重点实验室, 江苏南京 210042)

**摘要:** 以斑马鱼为受试生物,对某有机污染场地危险品仓库车间(1号样点)、氯化石蜡车间(2号样点)和厂区外(3号样点)3个不同区域的土壤浅层地下水进行斑马鱼急性毒性试验和胚胎发育毒性试验。结果表明,1号水样对斑马鱼成鱼的 $\varphi(72\text{ h}, \text{LC}_{50})$ 为79.12%,2和3号水样对斑马鱼成鱼的 $\varphi(72\text{ h}, \text{LC}_{50})$ 均大于100%。3种水样对斑马鱼胚胎具有不同程度的发育毒性效应,对斑马鱼胚胎的24 h卵凝结率、20 s内无自主性活动和72 h孵化率都存在剂量-效应关系。3种水样对斑马鱼均具有一定的致畸效应,对斑马鱼胚胎的毒性由大到小依次为1、2和3号水样。胚胎毒性试验灵敏度高于成鱼急性毒性试验,且简单快速,可用于污染场地水样污染毒性的快速诊断,为场地的进一步危害识别与风险评估提供依据。

**关键词:** 污染场地; 浅层地下水; 斑马鱼胚胎; 生物毒性; 污染诊断

**中图分类号:** X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673 - 4831(2012)06 - 0700 - 06

**Bio-Toxicity of Shallow Groundwater in Organic Pollutants Contaminated Site to the Development of Embryos of Zebrafish.** ZHOU Yan<sup>1,2,3</sup>, XU Jian<sup>2,3</sup>, FENG Yan-hong<sup>2,3</sup>, ZHAO Xin<sup>2,3</sup>, WAN Jing-zhong<sup>2,3</sup>, LIN Yu-suo<sup>2,3</sup> (1. College of Resource and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China; 3. State Environmental Protection Key Laboratory of Soil Environmental Management and Pollution Control, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** Zebrafish was chosen as a subject in tests on shallow groundwaters (GW1, GW2 and GW3) sampled from 3 different sites, a hazardous chemical storage, chlorinated paraffin workshop and a place outside the chemical plant, for acute toxicity to zebrafish and toxicity affecting the development of zebrafish embryos. Results show that to adult zebrafish  $\varphi(72\text{ h}, \text{LC}_{50})$  of GW1 was 79.12%, and of GW2 and GW3 both greater than 100%. Different degrees of toxic effects of the three shallow groundwaters on development of zebrafish embryos were recorded. The biotoxicity indices, like egg coagulation rate in 24 h, non-spontaneous movement within 20 s and hatching rate in 72 h, were found to be closely related to dosage of the pollutant. The waters also had certain teratogenic effects on zebrafish, which would display pericardial cyst, spinal curvature, tail curvature or lack of melanin. The waters followed an order of GW 1 > GW 2 > GW 3 in biotoxicity. It is suggested that the toxicity test on zebrafish embryos is higher in sensitivity than the acute toxicity test. Moreover, the former is simple and rapid, and hence can be used in rapid screening of contaminated groundwater, which provides scientific basis for further hazard identification and risk assessment.

**Key words:** contaminated site; shallow groundwater; zebrafish embryo; bio-toxicity; pollution diagnosis

随着城市化和工业化进程的加快,各类退役的化工企业污染场地带来的环境问题日渐突出。这类场地大多受到有毒有害物质的严重污染,当场地土地利用功能发生变化时,会导致对人体健康和生态环境的风险<sup>[1-3]</sup>。目前,场地污染调查通常以化学测试为主,难以直观和全面地反映各种有毒有害物质对周边环境或生物的综合影响<sup>[4]</sup>。因此,有必要对污染场地污染介质进行生物毒性诊断研究,得出并确定以生物毒性试验结果为依据而表现出的污染场地不同区域各污染介质的综合毒性效应,初步诊断污染场地的生物毒性,为进一步开展污染场

地的危险识别与风险评价提供必要的技术支持<sup>[5]</sup>。

常见的水体生物毒性诊断方法以斑马鱼成鱼急性毒性试验为主<sup>[6]</sup>,近年来斑马鱼胚胎毒性试验以其特有的优势正逐步成为传统成鱼急性毒性试验的替代手段。OECD在1996年将斑马鱼胚胎发育方法列入测定单一化学毒性的标准方法之一,并

收稿日期: 2012 - 06 - 06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2009AA063103); 环保公益性行业科研专项(200809100,200909075)

① 通信作者 E-mail: lys@nies.org

制定了详细的操作指南。该项技术的最大优势是可以在 72 h 内对近 20 种不同表现的反应指标进行观察和分析,来判断污染物的毒性作用类型(如遗传毒性、神经毒性、物理作用等)<sup>[7]</sup>。斑马鱼胚胎发育技术已被广泛应用于化学混合物的急性慢性毒性检测以及重金属的生物积累效应研究等<sup>[8]</sup>。但是,将斑马鱼胚胎毒性测试试验应用于污染场地浅层地下水的生物毒性诊断却鲜有报道。

该研究以斑马鱼为受试生物,以斑马鱼受精卵为试验材料,取某废弃有机污染场地浅层地下水进行斑马鱼成鱼急性毒性试验和胚胎毒性试验,观察胚胎发育期间地下水暴露所导致胚胎形态及 72 h 孵化率、畸形率的变化,得到胚胎毒理数据,初步诊断该污染场地浅层地下水的生物毒性,探讨该浅层地下水对斑马鱼胚胎可能产生的致毒机理,为进一步开展场地浅层地下水的危害识别和风险评估提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试样品

供试污染水样取自某有机污染场地,该污染场地主要生产氯化石蜡等,将分别采自危险品仓库车间、氯化石蜡车间和厂区外 3 个不同区域的土壤浅层地下水编号为 1、2 和 3。3 种浅层地下水的采集参考美国环境保护署制定的《场地风险评价导则与程序》<sup>[9]</sup>所规定的采样方法,采用美国 Geoprobe Direct Push 取样系统的钻孔设备开孔取样,3 个水井的井深分别为 9、6 和 6 m,筛管长度都为 3 m。采用溶解氧测定仪和 pH 计测定 3 种水样的基本理化性质(表 1)。

表 1 水样的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the water samples

水样编号	采样区域	pH 值	$\rho$ (溶解氧)/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	颜色、气味
1	危险品仓库	6.43	4.25	黄色、强烈刺激性气味
2	生产车间	7.32	6.05	无色、轻微气味
3	厂区外	7.78	6.15	无色、轻微气味

依据该污染场地污染源特征,采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS, Agilent 7890)对采集的 3 种水样中污染物的主要成分进行定性和定量检测,气相色谱柱为 DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu\text{m}$ ),载气为高纯氮气,柱流量 1 mL · min<sup>-1</sup>,不分流进样,进样量 1  $\mu\text{L}$ ,检出结果见表 2。1 号水样中污染

物种类最多,2 号次之,3 号最少。化学检测结果显示,水样中绝大多数污染物属于我国水中优先控制污染物,其中苯是公认的致癌物,其他 3 种苯系物也都具有不同程度的“三致”作用,对人体健康和水生生物有一定危害。其中,1 号水样中检测出我国地表水中检出率较高的农药——林丹。由于这 3 种水样中污染物种类和浓度均不一样,根据化学检测结果较难判断这 3 种水样的综合毒性,因此需结合以下生物毒性数据判断水样的综合毒性。

表 2 水样中主要污染物检测结果

Table 2 Major pollutants detected in the water samples

检出物类型	检出物名称	不同水样中检出物的 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$		
		1	2	3
苯系物	苯	515.49	92.29	412.07
	甲苯	120.05	8.11	78.36
	氯苯	nd	134.88	283.87
	乙苯	5.67	nd	nd
	对-二甲苯和间-二甲苯	3.67	nd	nd
	2-氯甲苯	129.59	560.24	106.54
	对氯甲苯	101.96	570.10	124.56
烃类	1,2-二氯乙烷	47.88	6.10	nd
农药	林丹	2.63	nd	nd

nd 表示未检出。

### 1.2 试验生物

斑马鱼购自南京大学模式生物研究中心,为正规饲养的成年斑马鱼,试验前在斑马鱼实验系统中驯养 2 周以上。暴露试验开始前 2 d,选择健康且性成熟的斑马鱼,按雌雄个体数量比 1:1 放入水温保持在(26.0 ± 1.0) °C 的曝气水中混合饲养,  $t$ (光):  $t$ (暗) = 14:10,自然交配产卵。根据 SCHULTE 等<sup>[9]</sup>的方法收集受精卵,并迅速用统一配制、温度为(26.0 ± 1) °C 的胚胎培养液清洗鱼卵以除去残留物,在全自动体式显微镜下挑选分裂正常的受精卵进行毒性试验。

### 1.3 试验仪器与试剂

FAG360D ZT350 静态鱼(斑马鱼)毒实验研究系统(美国 AQUA NEERING Inc); Zeiss-discoveryV12 全自动体式显微镜(Zeiss Microscope); PRX-450B 智能人工气候箱(宁波赛福公司); 24 孔细胞培养板;超纯水系统 Milli-Q Element(美国密理博 Millipore);用于配置胚胎培养液的 NaCl 购自美国 Sigma 公司,其纯度  $w = 99.5\%$ 。

### 1.4 试验方法

试验时分别使用稀释水将 1、2 和 3 号 3 种水样稀释到所需要的试验浓度。斑马鱼成鱼试验所用稀释水为 Milli-Q 超纯水,胚胎毒性试验用水为统

一配制的细胞培养液,即  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液。根据预试验结果,3种水样的成鱼急性毒性试验和胚胎毒性试验均设置相同的浓度梯度,设置水样的  $\varphi$  分别为 5%、25%、50%、75% 和 100%,即  $V(\text{原水}) : V(\text{稀释水})$  分别为 1:19、1:3、1:1、3:1 和 1:0,并以 0% 为对照组。

斑马鱼成鱼急性毒性试验参照文献[10]建议的成鱼急性毒性试验方法进行。随机挑选 10 条斑马鱼为 1 组,采用半静态法,分别置于各稀释水样中。试验过程中若有鱼死亡则及时捞出,并记录 24、48 和 72 h 的死亡个体数。每个浓度组设置 3 个平行。

斑马鱼胚胎毒性试验参照 OECD 建议的方法进行<sup>[11]</sup>,每个浓度组设置 3 个平行。挑选发育正常的受精卵,在 2.5~3 h(囊胚期初期)<sup>[12]</sup>前后进行暴露试验,暴露试验持续 72 h。试验于 24 孔细胞培养板中进行,每孔容积为 3 mL,20 孔为同一试验浓度梯度处理组,其余 4 孔为对照组,试验时每孔加入 2 mL 配制水样和 1 枚随机选取的正常受精卵。试验期间细胞培养板置于  $(26.0 \pm 1.0) \text{ } ^\circ\text{C}$  恒温光照培养箱中培养, $t(\text{光}) : t(\text{暗}) = 14 : 10$ ,每隔 24 h 更换一半染毒液。每隔 24 h 记录一次各稀释浓度水样组胚胎的凝结、畸形和孵化情况。计算胚胎发育至 72 hpf(hpf 指斑马鱼受精后的时间单位,相当于 h)的孵化率和畸形率。

## 2 结果与分析

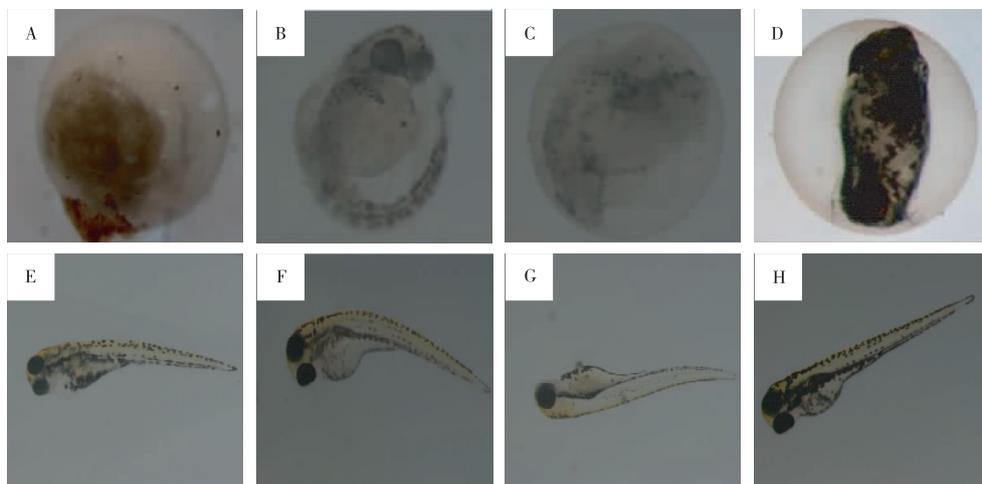
### 2.1 斑马鱼成鱼的急性毒性效应

1 号水样(原水)对斑马鱼具有明显的急性毒性作用,症状为游动不自然、侧游、失去平衡直至死亡,其对斑马鱼的 24 h 死亡率为 100%。2 号水样(原水)和 3 号水样(原水)对斑马鱼没有急性毒性作用,在 72 h 的试验周期内对斑马鱼的死亡率均为 0%。利用 SPSS 13.0 软件计算得出 1 号水样对斑马鱼成鱼的  $\varphi(24 \text{ h}, \text{LC}_{50})$ 、 $\varphi(48 \text{ h}, \text{LC}_{50})$ 、 $\varphi(72 \text{ h}, \text{LC}_{50})$  分别为 79.12%、76.68% 和 74.69%,2 和 3 号水样对斑马鱼成鱼的  $\varphi(72 \text{ h}, \text{LC}_{50})$  均大于 100%。

### 2.2 斑马鱼胚胎的发育毒性效应

#### 2.2.1 斑马鱼胚胎的形态学观察

在受精后不同时间段(8、24、48 和 72 hpf)观察斑马鱼胚胎的发育变化,统计各试验组斑马鱼胚胎死亡数、孵化数并观察各种发育缺陷情况。在显微镜下可观察到 1 号水样的暴露试验中,有部分黄色物质覆盖在受精卵表面并侵蚀细胞膜,导致胚胎分裂中的细胞发生自溶,随后发生卵凝结,抑制斑马鱼胚胎原肠胚的形成。而 2 和 3 号水样的受精卵表面则未观察到有物质覆盖。在 3 组水样中均观察到斑马鱼胚胎发生的各种发育缺陷情况,包括脊柱弯曲、尾巴弯曲、围心囊水肿和发育不全等(图 1)。对照组则没有观察到上述现象。



A—胚胎自溶; B—提前孵化; C—停止发育; D—尾部未发育,停止发育;  
E—围心囊水肿,脊柱弯曲; F—心包水肿,脊柱弯曲; G—黑色素减少,尾巴弯曲; H—正常仔鱼。

图 1 各水样暴露下斑马鱼胚胎发育畸形现象

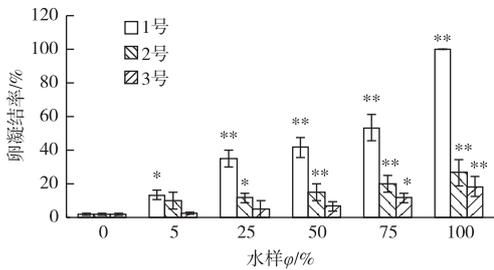
Fig. 1 Deformities of the embryos of zebrafish exposed to the water samples

#### 2.2.2 斑马鱼胚胎的 24 h 卵凝结率

水样暴露试验中,斑马鱼胚胎 24 h 卵凝结状况

与各水样稀释浓度的关系见图 2。各水样处理组斑马鱼胚胎的 24 h 卵凝结率均随水样  $\varphi$  的增大而升

高,存在剂量-效应关系。其中,斑马鱼胚胎在1号水样(原水)中染毒24 h后全部凝结,凝结率达到100%,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。2号水样染毒试验中,5%染毒组卵凝结率与对照组相比差异未达显著水平,25%染毒组卵凝结率与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ),其余各染毒组与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。3号水样染毒试验中,75%染毒组与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ),100%染毒组与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ),其余各组卵凝结率与对照组相比差异未达显著水平。凝结卵停止发育,肉眼观察呈白色,显微观察呈黑色。试验中还观察到胚胎的卵凝结均发生在染毒24 h以内,而在染毒24 h以后未出现凝结卵。由此推断,3种水样对斑马鱼胚胎发育的早期阶段影响较大。3种水样对斑马鱼胚胎24 h卵凝结的毒性由大到小依次为1、2和3号水样。



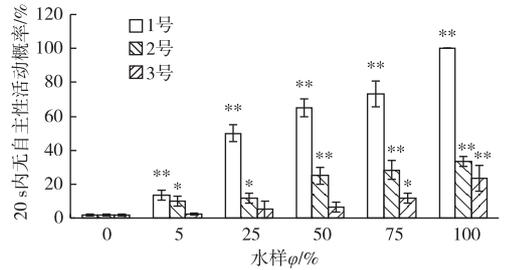
\* 和 \*\* 分别表示同一水样染毒试验中,不同稀释浓度处理组与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )和差异极显著( $P < 0.01$ )。

图2 各水样对斑马鱼胚胎24 h卵凝结率的影响  
Fig. 2 Effects of the water samples on 24 h coagulation rate of zebrafish embryos

2.2.3 斑马鱼胚胎的20 s无自主性活动

在染毒试验进行24 h后,分别观察3种水样暴露液中斑马鱼胚胎发育非致死性毒理学指标:20 s内无自主性活动。24 hpf时胚胎的自主性活动是斑马鱼胚胎发育过程中最早能观察到的毒理学指标<sup>[13]</sup>。试验中除了卵凝结的胚胎,在各水样高浓度染毒组依然存活的胚胎中会观察到20 s内胚胎无自主性活动。20 s内无自主性活动数据统计结果包括卵凝结数。当1号水样φ为25%时,在依然存活的胚胎中开始出现20 s内无自主性活动这一现象,且概率随着φ的增大而升高(图3),与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。但在1号水样(原水)暴露试验中,由于胚胎在24 h后全部凝结,卵凝结掩盖了20 s内无自主性活动这一非致死性反应,因此胚胎20 s内无自主性活动仍为100%。2号水样中,当水样φ为50%时,在存活的胚胎中开始观察到20

s内无自主性活动这一现象,且概率随着水样φ的增大而升高,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。而在3号水样中,只有当水样φ为100%时,在存活的胚胎中才出现20 s内无自主性活动现象,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。

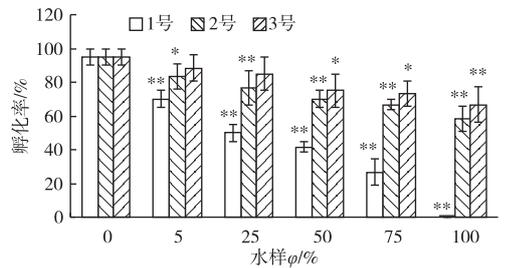


\* 和 \*\* 分别表示同一水样染毒试验中,不同稀释浓度处理组与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )和差异极显著( $P < 0.01$ )。

图3 各水样对斑马鱼胚胎20 s无自主性活动概率的影响  
Fig. 3 Effects of the water samples on non-spontaneous movement frequency of zebrafish embryos

2.2.4 斑马鱼胚胎的72 h孵化率

孵化率是斑马鱼发育过程中重要的毒理学终点<sup>[14]</sup>。在染毒试验进行48 h时,胚胎几乎不孵化,故选择在染毒72 h时观察胚胎72 h孵化率<sup>[15]</sup>,并将72 h孵化率作为孵化率的最终观察指标。各水样对斑马鱼胚胎72 h孵化率的影响见图4。



\* 和 \*\* 分别表示同一水样染毒试验中,不同稀释浓度处理组与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )和差异极显著( $P < 0.01$ )。

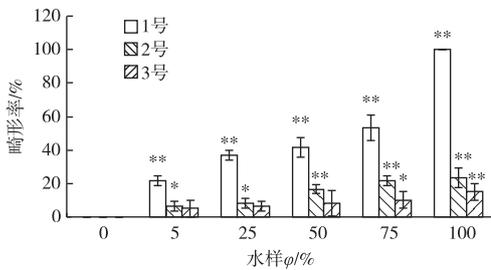
图4 各水样对斑马鱼胚胎72 h孵化率的影响  
Fig. 4 Effects of the water samples on hatching rate of zebrafish embryos at 72 h

图4显示,各水样稀释浓度与斑马鱼72 h孵化率之间存在明显的剂量-效应关系。对照组胚胎在72 h时孵化率达到90%以上。但在各水样高浓度处理组均有一些不能孵化的卵,这些卵在显微镜观察下有的显示畸形,有的无血液循环,成为死亡的卵。图4还显示,随着各水样φ的增加,斑马鱼胚胎孵化率逐渐降低。由于高浓度1号原水中的胚胎在24 h时已全部凝结,因此该暴露组胚胎孵化率为

0%,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。在2和3号原水中,胚胎的72 h孵化率分别为58%和67%。各水样对斑马鱼胚胎孵化的毒性由大到小依次为1、2和3号水样。

### 2.2.5 斑马鱼胚胎的畸形率

在水样的暴露试验中,水样中污染物质会引起斑马鱼胚胎发生各种中毒症状,如卵凝结、围心囊水肿、脊柱弯曲、尾巴弯曲和黑色素细胞减少等异常现象。在染毒72 h后观察斑马鱼胚胎的各种畸形现象并做记录与统计(图5),发现对照组胚胎未出现畸形现象。如图5所示,随着各水样 $\varphi$ 的增加,斑马鱼胚胎畸形率逐渐升高。1号原水中,胚胎畸形率达到100%,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。在2和3号原水暴露下,斑马鱼胚胎畸形率分别为23%和15%。由此可见,各水样致斑马鱼畸形的毒性由大到小依次为1、2和3号水样。此外,孵化后的畸形仔鱼平衡能力下降,出现侧游、挣扎性窜动现象,有些畸形仔鱼很快死亡。



\*和\*\*分别表示同一水样染毒试验中,不同稀释浓度处理组与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )和差异极显著( $P < 0.01$ )。

图5 各水样对斑马鱼胚胎畸形率的影响

Fig. 5 Effects of the water samples on deformity rate of zebrafish embryos

3种水样对胚胎暴露后不同毒理学终点的观测表明,2和3号水样对胚胎的上述各毒理学终点的半效应 $\varphi$ 均大于100%,1号水样对胚胎各毒理学终点的半效应 $\varphi$ ( $EC_{50}$ 值)<sup>[16]</sup>见表3。

表3 1号水样胚胎暴露后不同毒理学终点的半效应稀释浓度

Table 3  $EC_{50}$  concentration at different toxicological ends after embryos being exposed to water sample GW. 1

毒理学终点	$\varphi$ ( $EC_{50}$ )/%	$\varphi$ (95%置信区间)/%
24 h 卵凝结	38.44	23.734 ~ 61.187
20 s 内无自主性活动	23.94	18.742 ~ 29.471
72 h 孵化	18.23	9.847 ~ 27.550
72 h 畸形	34.08	17.641 ~ 62.155

由表3可知,各指标敏感性由大到小依次为72 h孵化、20 s内无自主性活动、72 h畸形和24 h卵凝结。斑马鱼胚胎对1号水样最敏感的毒理学终点是72 h孵化。

## 3 讨论

1号水样对斑马鱼成鱼的 $\varphi$ (24 h,  $LC_{50}$ )为79.12%,但对胚胎的24 h卵凝结 $\varphi$ ( $EC_{50}$ )为38.44%。2和3号水样对斑马鱼成鱼无急性毒性作用,但是对胚胎却有毒性作用,造成胚胎的卵凝结和不同程度的畸形,降低胚胎孵化率。与成鱼急性毒性试验相比,胚胎毒性试验灵敏度高,可重复性较好,更能准确诊断浅层地下水生物毒性的危害程度。此外,目前较成熟的急性毒性方法还有15 min发光菌毒性实验,虽然其实验周期大大缩短,但发光菌实验也有细胞发光强度本底差异大和实验再现性差等缺点<sup>[17]</sup>。而笔者所选择的斑马鱼胚胎毒性技术则是考虑到污染场地浅层地下水可能流经的场地区域对周围水生生物可能有较大影响的因素,且这项技术是各国际标准组织认可的标准毒性测定方法之一。该项技术虽然比发光菌实验持续时间长,但成本低,易操作,灵敏度高,特别是具有可记录多项毒性指标的特点。

笔者试验结果表明采自该有机污染场地3个不同区域的浅层地下水对斑马鱼胚胎发育具有明显的毒性。造成上述现象的主要原因是3种水样成分复杂,含有较多的有毒有害物质。3种水样中均检测出苯系物和烃类污染物。有研究表明, $\varphi = 0.105\%$ 的甲苯单一暴露组造成胚胎的死亡率为12%(156 hpf)<sup>[18]</sup>;氯苯会造成斑马鱼胚胎水肿,其毒性效应可能是氯苯在胚胎内富集所致<sup>[19]</sup>。此外1号水样中检测出农药类污染物——林丹,林丹具有环境内分泌干扰物特性,在低浓度暴露条件下可对斑马鱼的生长发育和繁殖产生一定抑制影响<sup>[20]</sup>,有研究表明林丹对斑马鱼胚胎的 $c$ (48 h,  $LC_{50}$ )为8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[21]</sup>。胚胎毒性试验得出1号水样对斑马鱼胚胎的毒性最大,胚胎在1号原水中染毒24 h后全部凝结,停止发育。2和3号水样对斑马鱼胚胎发育具有一定毒性,在染毒24 h后,2和3号水样对胚胎的凝结率分别为27%和18%(图2);对胚胎的72 h孵化率分别为58%和67%(图4)。依据各毒理学数据,得出3种水样对斑马鱼胚胎的毒性由大到小依次为1、2和3号水样。与各水样的化学测试结果相结合,得知1号水样综合毒性最大,2号次之,3号最小。

与正常的斑马鱼胚胎和仔鱼相比, 试验中观察到胚胎发育延迟和停滞, 24 h 时 20 s 内无自主性活动, 无或较少黑、黄色素, 心包囊和卵黄囊水肿, 高浓度染毒使胚胎凝结、自溶。暴露胚胎孵化出的仔鱼出现心包水肿和围心囊水肿、脊柱弯曲和尾巴弯曲以及体短等一系列反应。这些畸形现象说明该污染场地地下水对不同发育成长阶段的斑马鱼胚胎均有毒性作用。但由于暴露试验进行 24 h 后, 胚胎凝结率不再变化, 推断该场地地下水对斑马鱼胚胎发育的早期阶段影响最大。由于试验中观察到水样中有污染物质覆盖在细胞膜表面并侵蚀卵膜, 因而推断水样中污染物质并不是直接导致胚胎畸形甚至死亡, 而有可能是有毒有害物质在胚胎体内蓄积, 严重影响了胚胎发育和器官分化, 最后导致胚胎死亡或胚胎畸形。

## 4 结论

(1) 采自有机污染场地的 3 种浅层地下水对斑马鱼胚胎均有发育毒性效应, 其毒性由大到小依次为采集自危险品仓库车间、氯化石蜡车间和厂区外的水样。

(2) 暴露在各水样中的斑马鱼胚胎会出现不同程度的畸形现象, 如心包水肿、围心囊水肿、脊柱弯曲、尾巴弯曲、黑色素减少和体节数减少等。这些畸形现象反映出该污染场地浅层地下水对周围生态环境已构成潜在危害。

(3) 应用斑马鱼胚胎发育毒性试验能更加直观准确地反映场地浅层地下水的生物毒性。斑马鱼胚胎毒性试验作为一种快速而实用的方法, 对于此类污染区域或目标污染物不明确的污染场地, 可用于场地污染危害识别和生态风险筛选, 帮助诊断其对周围生态环境或生物产生的危害程度。

## 参考文献:

- [1] 周友亚, 颜增光, 郭观林, 等. 污染场地国家分类管理模式与方法[J]. 环境保护, 2007(10): 32-35.
- [2] Love Canal: An Introduction[EB/OL]. [2012-03-20]. <http://onlineethics.org/environment/lcanal/in-dex>.
- [3] KEINTH B H. Superfund Risk Assessment in Soil Contamination Studies[M]. 3rd Vol. USA: ASTM International, 1998: 100-108.
- [4] 徐建, 林玉锁, 金鑫, 等. 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.
- [5] 宋晓威, 徐建, 张孝飞, 等. 废弃农药厂污染场地浅层地下水生态毒性诊断研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(1): 42-48.
- [6] 徐建. 有机污染场地水体生物毒性诊断方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008: 58-68.
- [7] 刘红玲, 周宇, 许妍, 等. 氯代酚和烷基酚类化合物对斑马鱼发育影响的研究[J]. 安全与环境学报, 2004, 4(4): 32-36.
- [8] HUANG Keng-hang, LIN Yu-cheng, SU Kai-chun, et al. An Electroporation Microchip System for the Transfection of Zebrafish Embryos Using Quantum Dots and GFP Genes for Evaluation[J]. Biomedical Microdevices, 2007, 9(5): 15-23.
- [9] SCHULTE C, NAGEL R. Testing Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, as Alternative to the Acute Fish Test: Preliminary Results[J]. Alternatives to Laboratory Animals, 1994, 22(1): 12-19.
- [10] 国家环境保护总局. 化学品测试方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 188-193.
- [11] OECD. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Draft Proposal for a New Guideline, OECD Draft Guideline[S]. 2006.
- [12] GEORG G, JAN H. Effect of Age on the Susceptibility of Zebrafish Eggs to Industrial Wastewater[J]. Water Research, 2001, 35(15): 3754-3757.
- [13] 黄凯, 林匡飞, 张卫, 等. 水溶性 CdTe 量子点对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. 环境科学学报, 2001, 31(4): 854-859.
- [14] 王蕊, 殷浩文. 斑马鱼胚胎发育中适宜的毒理学指标分析[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(2): 88-89.
- [15] 朱琳, 史淑洁. 斑马鱼胚胎发育技术在毒性评价中的应用[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 252-254.
- [16] 刘在平, 张松林. 城市污水对斑马鱼胚胎的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(12): 2911-2915.
- [17] 邓铁柱. 乙草胺、丁草胺与重金属对发光菌及斑马鱼胚胎的联合毒性效应研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006: 35-40.
- [18] 李佳, 周珍, 梁勇, 等. 助溶剂甲苯和二甲亚砜对斑马鱼胚胎发育的复合毒性效应[J]. 环境化学, 2009, 28(6): 833-837.
- [19] 吴迪, 单正军, 韩志华, 等. 林丹短期暴露对斑马鱼生长发育和繁殖的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2011, 27(1): 49-53.
- [20] 周宇, 于红霞, 丁翔, 等. 氯代苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效应的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3): 340-344.
- [21] GORGE G, NAGEL R. Toxicity of Lindane, Atrazine, and Deltamethrin to Early Life Stages of Zebrafish (*B. rerio*)[J]. Ecotoxicology Environmental Safety, 1990, 20(3): 246-255.

作者简介: 周艳(1988—), 女, 江苏句容人, 硕士生, 主要研究方向为污染场地毒理诊断。E-mail: zhyan0703@sina.com