

水体生态系统对不同浓度水平苯酚污染的急性毒性响应^{*}

张建英^{1,2,3**} 丁腾达^{1,3} 梁璐怡² 王凤平² 陈 瑾^{1,3}

(1. 浙江大学环境科学研究所, 杭州, 310058; 2. 浙江大学环境与资源实验教学中心, 杭州, 310058;
3. 浙江省有机污染过程与控制重点实验室, 杭州, 310058)

摘 要 针对浙江某地苯酚泄漏事件,结合实地监测和实验室研究,探索苯酚的水体污染化学行为对水生生态系统的影响和急性毒性效应.本研究选取水生生态系统中明亮发光杆菌 T3、优势藻四尾栅藻 *Scenedesmus quadricauda* 以及模式鱼斑马鱼 *Brachydanio rerio* 为研究对象,探索水体中生产者、消费者及分解者等整个生态系统对不同苯酚浓度胁迫下的生态响应.结果表明,水生生物对苯酚污染浓度的生态响应差异显著,虽然苯酚对发光细菌、四尾栅藻及鱼体都具有一定的毒性影响,但四尾栅藻抑制率与苯酚浓度之间并没有良好的线性关系.发光细菌的相对发光率与苯酚浓度的关系表明,0.2—25 mg·L⁻¹ 苯酚浓度对水体会产生低毒作用,而 30—100 mg·L⁻¹ 苯酚浓度对水体会产生中毒作用.苯酚对四尾栅藻的影响主要表现为光合作用的暗反应破坏,高浓度苯酚处理组中四尾栅藻会将残余苯酚浓度作为自身碳源而短暂地促进其生长.斑马鱼在苯酚浓度高于 15 mg·L⁻¹ 时,会发生体重下降、死亡率上升、呼吸急促、游动迅速以及导致水质变坏等现象,并且在 100 mg·L⁻¹ 苯酚浓度处理下,鱼体内富集大量苯酚,通过食物链进而对人类健康产生影响.

关键词 苯酚, 明亮发光杆菌 T3, 四尾栅藻, 斑马鱼, 生态响应.

苯酚由羟基与苯环共价结合形成,其在大气和水体中浓度分别为 40 μg·L⁻¹ 和 1—8 mg·L⁻¹ 时就能被人体感知^[1],由于其具有较高的负电荷密度,能在水溶液中稳定存在^[2].苯酚的辛醇-水分配系数为 1.46^[1],易富集于生物体有机质中,其富集量随着暴露浓度的升高而增大,鱼类暴露于 100 mg·L⁻¹ 苯酚下,5 d 后出现最大富集量 156 μg·g⁻¹^[3].但其对水生生物的毒性危害也不容忽视,Saha 等^[4] 研究表明苯酚对鱼类的毒性主要是通过呼吸应激,24 h 暴露观察发现鱼鳃盖的平均开合速率随着苯酚浓度升高而加快.另外,微生物对维持水生生态系统平衡起到重要作用,苯酚对微生物的毒性影响是水生生态系统安全的重要参考依据.研究表明,高浓度苯酚(>75 mg·L⁻¹)会导致四膜虫细胞形态、移动性和液泡收缩活性发生改变^[5].藻类作为水体重要的初级生产者,对苯酚的耐受性会因其种类不同而有所不同,其中绿藻对苯酚的耐毒性较高^[6].苯酚对藻类的毒性主要表现在对其光合作用和呼吸作用的抑制效应^[7-8].

本文结合浙江某地苯酚泄漏事件,利用半静态实验方法,研究苯酚在新安江水体中的污染化学行为以及其对细菌、藻类及鱼类等构成的整个水生生态系统的影响,探索化学品泄漏的水体生物健康风险评估方法.

1 材料与方法

1.1 研究区域

浙江某地苯酚泄漏区段河流,水质在 1991—2000 年整个河段水质均达到或优于地表水 II 类标准^[9].水生生物种类丰富,包括绿藻门、硅藻门、蓝藻门和裸藻门的 40 余种藻类以及原生动物、轮虫、枝角类、桡足类 28 属等 43 种浮游动物^[10-11].

1.2 模拟苯酚废水配制

采用苯酚(分析纯,中国国药集团化学试剂有限公司),配制含 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、2.0、

2011 年 9 月 21 日收稿.

^{*} 国家自然科学基金项目(21177106)资助.

^{**} 通讯联系人, Tel:0571-88982056; E-mail:zjy@zju.edu.cn

3.0、4.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、100.0 mg·L⁻¹ 苯酚模拟废水,进行半静态实验.

1.3 微生物培养

明亮发光杆菌 T₃ 小种由中国科学院南京土壤研究所提供,活化后即可使用. 四尾栅藻购买于中国科学院武汉水生生物研究所,室温下在 BG11 培养基中进行生长. 斑马鱼为浙江大学生命科学院所培育.

1.4 分析方法

发光细菌相对发光率、藻类生物量和鱼类生长量在试验期间内分别采用 GB/T 15441—1995《水质急性毒性的测定 发光细菌法》、GB/T 21805—2008《化学品藻类生长抑制试验》等方法测定,其中鱼体内苯酚含量测定参照水产行业标准(SC/T 3031—2006). 鱼类体重和水体溶解氧每 24 h 测定 1 次,苯酚浓度利用分光光度法测定.

2 结果与讨论

2.1 发光细菌在水体不同苯酚浓度水平下相对发光率的变化

基于发光细菌的相对发光度与水样毒性组分总浓度之间呈现显著的负相关($P < 0.05$), 图 1 表示了发光细菌相对发光率与水体苯酚浓度之间的关系,并根据发光细菌急性毒性试验评价标准(表 1),对系列浓度的苯酚溶液下水体毒性进行判定. 可以发现,随着苯酚浓度的增高,发光细菌的相对发光率逐渐下降,表明苯酚能对水体产生显著的毒性效应. 浓度在 0.1 mg·L⁻¹ 以下的苯酚溶液,其相对发光率 L 大于 90%, 毒性级别为无毒,说明该微浓度苯酚溶液可能不会对发光细菌的呼吸、生长以及新陈代谢产生影响,其中浓度在 0.005 mg·L⁻¹ 以下的处理组中细菌相对发光率 L 大于 100%,可能是由于检测周期内发光细菌的发光强度存在自然变化以及不可避免的误差造成的. 随着苯酚浓度上升至 0.2—25 mg·L⁻¹ 时,其相对发光率 L 在 70%—90% 的范围内, 毒性级别为低毒,而当苯酚浓度为 30—100 mg·L⁻¹,其相对发光率 L 在 50%—70% 的范围内,判定毒性级别为中毒.

表 2 比较本研究结果与其它研究结果之间的差异,发现不同的供试菌种对苯酚的敏感性不同且不同的反应时间和反应体系也会造成结果差异,表明水体受苯酚污染时,对水体的毒性大小会因水体中细菌种类的不同而有所差别.

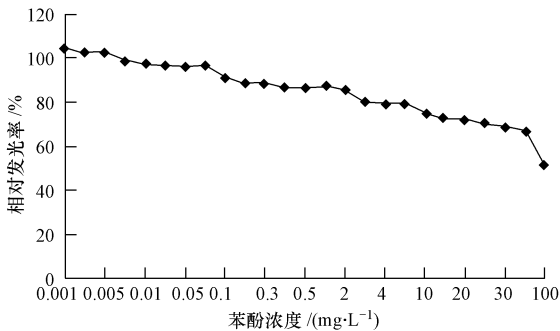


图 1 苯酚浓度与水体发光细菌相对发光率之间的关系
Fig. 1 Relationships between phenol concentration and relative luminosity factor of *P. phosphoreum*

表 1 发光细菌急性毒性试验评价标准

Table 1 Evaluation criteria for acute toxicity experiment of <i>P. phosphoreum</i>		
等级	相对发光率 L / %	毒性级别
0	$L > 90$	无毒
I	$70 < L \leq 90$	低毒
II	$50 < L \leq 70$	中毒
III	$30 < L \leq 50$	重毒
IV	$0 < L \leq 30$	高毒
V	$L = 0$	剧毒

表 2 苯酚在不同供试菌种及不同反应条件下的毒性差异

Table 2 The toxicity variations of phenol on different test bacteria and reaction conditions

苯酚浓度 /(mg·L ⁻¹)	供试菌种	相对发光率 /%	反应条件	参考文献
100	明亮发光杆菌 T3	51.13	10 μL 菌液 + 2 mL 待测液, 反应 15 min	本研究
300	明亮发光杆菌 502	52.9	100 μL 菌液 + 900 μL 待测液, 反应 15 min	马勇等 ^[12]
83.65	502 海水发光细菌	50	10 μL 菌液 + 2 mL 待测液, 反应 20 min	李娟英等 ^[13]

2.2 不同浓度苯酚污染下藻类生长效应

通过发光细菌相对发光率与苯酚浓度之间的关系分析可知,本研究苯酚浓度范围内对水体的确产生了毒性作用,四尾栅藻作为新安江水体中优势藻种以及重要水体生产者,是研究苯酚对 新安江水体毒性的 重要对象. 表 3 表示了四尾栅藻在 72 h 暴露实验中,其生长率与苯酚浓度之间的关系. 研究表明,低浓度苯酚 (< 1 mg·L⁻¹) 在 48 h 内对四尾栅藻基本上没有任何毒害作用,高浓度苯酚对四尾栅藻的生长呈现低毒害作用. 而暴露 72 h 后,各处理组中四尾栅藻的生长率都受到一定的抑制,表现低毒或中毒作用.

表 3 不同苯酚浓度污染下四尾栅藻 72 h 内的生长率

Table 3 The growth rate (%) of *S. quadricauda* at different phenol concentration pollution levels during 72 h exposure time

苯酚浓度 /(mg·L ⁻¹)	细胞浓度 (×10 ⁴) / (个·mL ⁻¹)		细胞浓度 (×10 ⁴) / (个·mL ⁻¹)		细胞浓度 (×10 ⁴) / (个·mL ⁻¹)	
	24 h	生长率/%	48 h	生长率/%	72 h	生长率/%
对照	33.3	100	43.3	100	61.7	100
0.1	43.3	130	38.3	89	41.7	68
0.2	23.3	70	40	93	28.3	46
0.3	31.7	96	38.3	89	41.7	68
0.4	33.3	100	40	93	51.7	84
0.5	31.7	96	26.7	62	30	49
1	31.7	96	43.3	100	38.3	62
2	36.7	111	31.7	74	30	49
3	28.3	85	38.3	89	31.7	52
4	30	90	38.3	89	33.3	54
5	25	75	43.3	100	36.7	60
10	26.7	81	46.7	108	40	65
15	25	75	43.3	100	40	65
20	16.7	51	40	93	45	73
25	23.3	70	36.7	85	33.3	54
30	31.7	96	23.3	54	30	49
35	18.3	55	35	81	25	41
100	23.3	70	11.7	27	38.3	62

图 2 分别表示了高浓度 (> 5 mg·L⁻¹) 和低浓度 (< 5 mg·L⁻¹) 苯酚对四尾栅藻生长的影响,暴露 72 h 后,可以发现低浓度苯酚对四尾栅藻生物量有一定的毒性影响,但二者之间没有显著的相关性;而高浓度苯酚在暴露 72 h 后四尾栅藻生物量反而增加,可能是由于四尾栅藻将残余的苯酚作为自身的碳源而促进其生长,相关性分析也表明藻类生长率与高浓度苯酚之间具有良好的相关性($r^2 = 0.650$). 这表明了在该实验苯酚浓度(100 mg·L⁻¹) 范围内可能阻碍四尾栅藻光合作用中暗反应的发生,但高浓度苯酚处理组中,残余苯酚浓度可能被四尾栅藻当作碳源而短暂地促进其生长.

2.3 苯酚对鱼类的生态效应

图 3 是苯酚浓度与暴露 96 h 后斑马鱼的死亡率之间的关系,二者之间呈现显著的线性关系. 随着苯酚浓度的增大,斑马鱼的死亡率增大. 苯酚浓度与鱼类在水体中的活动行为也有明显的关系,100 mg·L⁻¹ 苯酚处理组中,鱼在水体表面剧烈的窜动,数分钟后投入的斑马鱼全部死亡;苯酚含量为

20、25、30 及 35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体中,斑马鱼在初次投入时和每次换水后,鱼群聚集于水体表面,游动剧烈,有部分鱼窜出水面,呼吸急促;苯酚含量为 10.0、15.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体,每次换水后,斑马鱼在水体的表面迅速游动;而当苯酚含量为 0.1、0.5、1.0、3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体中,斑马鱼放入后无明显的刺激反应,鱼群均匀地分布于水体的上中下水层,游动自然. 这表明高浓度(浓度 $\geq 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的苯酚水体对斑马鱼的刺激效应明显,斑马鱼在水中的活动受到较大的影响,而低浓度(浓度 $< 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的苯酚水体对斑马鱼在水中的活动无明显影响.

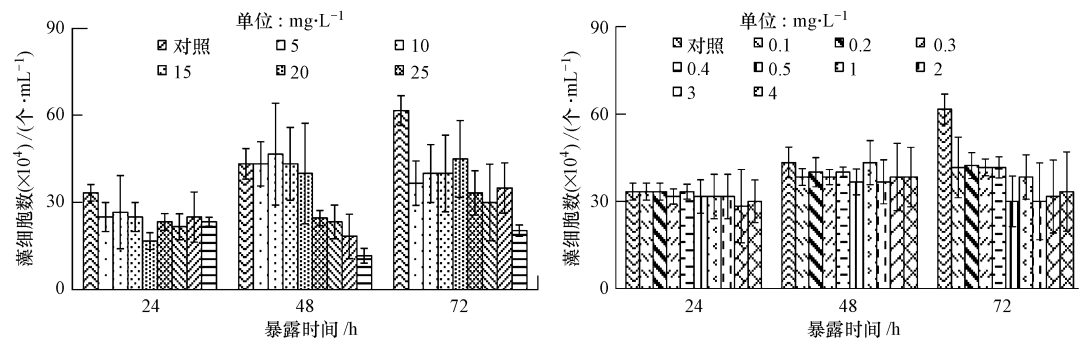


图2 四尾栅藻(*S. quadricauda*)在0.1—100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列浓度苯酚暴露下的生长抑制效应
Fig.2 The growth inhibition effect of phenol concentration at 0.1—100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ on *S. quadricauda*

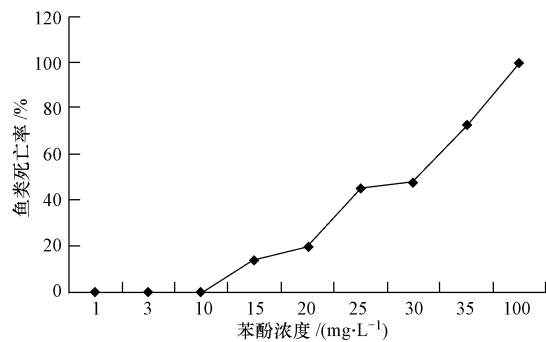


图3 暴露96 h后斑马鱼死亡率与苯酚浓度之间关系
Fig.3 Relationships between death rate of *Brachydanio rerio* and phenol concentration after 96 h exposure

另外,试验过程中还发现苯酚浓度与水体水质好坏也有很大关系,培养斑马鱼 24 h 后,苯酚浓度大于 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体明显变得浑浊,35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体浑浊现象特别明显,水体中有大量粘稠的乳白色絮状物,且水底有大量的排泄物存在;而低浓度的苯酚水体较为清澈,无明显浑浊,且水底只有少量的排泄物. 这表明,高浓度(浓度 $\geq 15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的苯酚水体会刺激斑马鱼的皮肤,使其分泌大量的粘液来减缓苯酚的刺激作用,同时也会加快自身的代谢作用,以适应不利环境.

为了进一步研究苯酚浓度对斑马鱼生长的影响,通过斑马鱼的体重变化来观察苯酚对斑马鱼的生长效应(图4). 经过 120 h 的培育后,发现苯酚浓度与斑马鱼平均体重之间呈现线性下降的关系,苯酚浓度为 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体中,斑马鱼体重开始下降(初始体重为 $(0.295 \pm 0.10)\text{g}$),并且随着水体中苯酚浓度增高,斑马鱼体重下降加快,35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组中的每条斑马鱼的体重约为初始体重的 63% 左右,相对于初始体重减少了 0.1 g 左右,这表明了高浓度的苯酚水体中,斑马鱼的生长受到了很强的抑制,斑马鱼进食少、代谢快共同导致了其体重减少. 图 5 是 35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组中斑马鱼在不同培育时间的体重变化. 研究表明,在开始的 72 h 内斑马鱼体重减小幅度较大,可能是由于斑马鱼受到较高浓度苯酚的毒性刺激后机体不能维持正常的生长过程导致的.

通过上述分析可知,水体中苯酚浓度高于 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,将会导致斑马鱼的正常生长发育发生障碍,并且会导致水体水质变差. 然而,研究表明苯酚易富集于生物体有机质中^[1],苯酚对鱼类生长的影响可能不仅是由于对皮肤的刺激等作用,还会是其直接进入鱼体内使其某些内部器官内大量蓄积而导致死亡. 图 6 表明了鱼体内苯酚含量与苯酚浓度之间的关系,鱼体内苯酚含量会随着苯酚浓度的增高而变

大,但二者之间并不呈现线性关系,100 mg·L⁻¹的试验组中鱼体的苯酚含量明显高于 35 mg·L⁻¹试验组 (10 倍),说明了水体中苯酚浓度的升高,会导致其在鱼体中富集含量加快增长,通过食物链对人类产生更大影响.

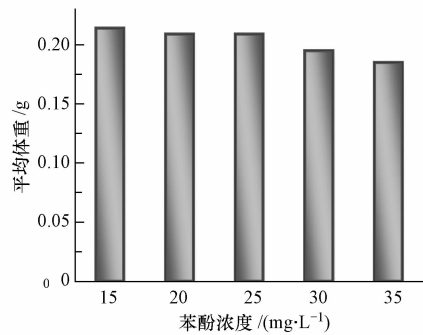


图 4 斑马鱼幼体在不同苯酚含量的水体中培育 120 h 后平均体重值

Fig. 4 The average weight of *Brachydanio rerio* in waters containing different contents of phenol after 120 h culture

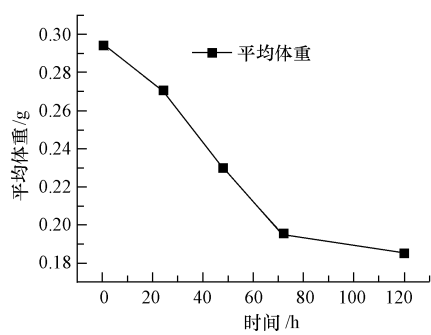


图 5 苯酚浓度为 35 mg·L⁻¹ 的水体中, 不同培育时间鱼的体重变化

Fig. 5 The variations of fish weight with culture time in waters containing 35 mg·L⁻¹ phenol

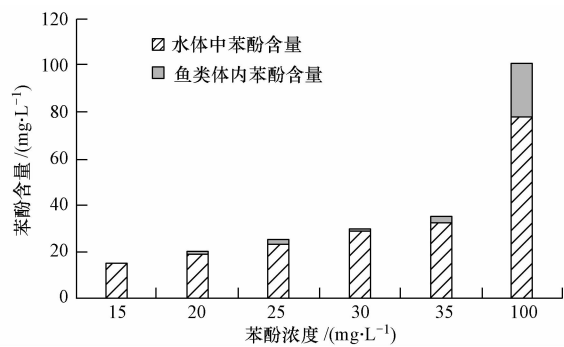


图 6 鱼体内富集的苯酚含量与苯酚浓度之间的关系

Fig. 6 Relationship between total phenol concentration and accumulated contents in fish

3 结论

通过上述实验可以得到以下结论:(1) 发光细菌的相对发光率随着苯酚浓度增大而增大,苯酚浓度高于 0.2 mg·L⁻¹时,水体就表现出毒性;(2) 苯酚可能会阻碍四尾栅藻光合作用中的暗反应过程,但高浓度苯酚处理下,四尾栅藻能将残余的苯酚作为自身碳源而暂时促进生长;(3) 斑马鱼在苯酚浓度高于 15 mg·L⁻¹时,会发生体重下降、死亡率上升、呼吸急促、游动迅速以及导致水质变坏等现象,在 100 mg·L⁻¹苯酚浓度处理下,鱼体内富集大量苯酚,可能对人类健康产生影响. 研究结果表明水生生态系统中不同营养级生物对苯酚污染浓度存在不同响应,需要建立综合评价方法简明表达苯酚等化学品的水生生态系统风险.

参 考 文 献

[1] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Phenol (Update)[R]. Public Health Service, U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 1998

[2] Versar, Inc. Water related environmental fate of 129 priority pollutants. Part II. Halogenated ethers, monocyclic aromatics, phthalate esters, polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosamines, and miscellaneous compounds. Draft report[R]. U. S. Environmental Protection Agency, 1979

[3] Kobayashi K, Akitake H, Kimura S. Studies on the metabolism of chlorophenols in fish. VI. Turnover of absorbed phenol in goldfish[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1976, 42: 45-50

- [4] Saha N C, Bhunia F, Kaviraj A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1999, 63:195-202
- [5] Schultz T W, Dumowr J N. Cytotoxicity of synthetic fuel products on *Tetrahymena pyriformis* I. Phenol[J]. J Eukaryot Microbiol, 1977, 24(1): 164-172
- [6] Kostyaev V Y. Effect of phenol on algae[J]. Tr Inst Biol Vnutr Vod, Akad Nauk SSSR, 1973, 24(27): 98-113
- [7] Dedonder A, Van Sumere C F. The effect of phenolics and related compounds on the growth and the respiration of *Chlorella vulgaris*[J]. Z Pflanzenphysiol, 1971, 65: 70-80
- [8] Lukina G A. Effect of small doses of phenol on the photosynthesis of *Chlorella*[J]. Tr Inst Biol Vnutr Vod, Akad Nauk SSSR, 1973, 24(27): 114-118
- [9] 文军, 罗献宝, 李剑, 等. 新安江、富春江区域水质变化的风险分析.[J] 水土保持研究, 2007, 14(2): 224-230
- [10] 张慧冲, 方建新, 涂友琴. 新安江屯溪水力自控翻板坝蓄水期浮游植物的变化研究[J]. 生物学杂志, 2010, 27(4): 65-67
- [11] 唐鑫生, 梁俊. 新安江(新溪口段)浮游动物调查报告[J]. 生物学杂志, 1999, 16(3): 29-30
- [12] 马勇, 黄燕, 贾玉玲, 等. 发光细菌急性毒性测试方法的优化研究[J]. 环境污染与防治, 2010, 32(11): 48-52
- [13] 李娟英, 高峰, 陈洁, 等. 酚类化合物对发光细菌的急性毒性和对 ETS 的抑制研究[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(1): 111-115

Response of aquatic ecosystem to phenol pollution at different concentration levels

ZHANG Jianying^{1,2,3*} DING Tengda^{1,3} LIANG Luyi² WANG Fengping² CHEN Jin^{1,3}

(1. Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China;

2. Laboratory for Teaching in Environment and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China;

3. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Organic Pollution Process and Control, Hangzhou, 310058, China)

ABSTRACT

The effect of phenol on aquatic ecosystem was investigated by combining field monitoring and laboratory studies. *Photobacterium phosphoreum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Brachydanio rerio* were selected in this study to explore the ecological response of producers, consumers and decomposers in the aquatic ecosystem to different concentrations of phenol stress. The results showed that toxic effects of phenol on luminescent bacteria, algae and fish were found, but there was no good linear relationship between inhibition rate of *S. quadricauda* and phenol concentration. Relationship of phenol concentration with the relative luminous efficiency of luminous bacteria indicated that the toxicity effect occurred at phenol concentrations higher than $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The toxic effect of phenol on *S. quadricauda* may be mainly due to the destruction of the dark reaction in photosynthesis. High concentration phenol promoted the growth, probably because phenol may be regarded as a carbon source for *S. quadricauda*. The weight loss, increased mortality, shortness of breath, swimming speed increase of zebra fish and deterioration of water quality were found after treatment of phenol concentration higher than $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The accumulated concentration of phenol in fish at $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ exposure concentration was high, which could cause serious threat to human health through food chain.

Keywords: phenol, *P. phosphoreum*, *S. quadricauda*, *Brachydanio rerio*, ecological response.