

# 利用模式动物线虫追踪造纸厂废水中酸碱类毒物的研究

王晓祎<sup>1,2</sup>, 于红霞<sup>2\*</sup>, 王大勇<sup>1\*</sup>

(1. 东南大学基础医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 南京 210009; 2. 南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

**摘要:**在毒性鉴别评价技术 TIE 程序中引入模式动物线虫, 并通过寿命、半数致死天数、生殖速度、生殖能力、身体运动行为等指标进行造纸厂工业废水中酸碱类毒物的毒性评价研究. 结果表明, 对线虫生命周期的影响程度上: 2 号 > 4 号 > 1 号 > 3 号, 对世代时间的影响程度上: 2 号 > 1 号 > 3 号  $\approx$  4 号, 对产卵数目与头部摆动频率的影响效应相当: 1 号  $\approx$  2 号 > 3 号  $\approx$  4 号, 对身体弯曲次数的影响程度上: 1 号  $\approx$  2 号 > 3 号 > 4 号, 且 2 号水样对线虫所有指标皆呈极显著性影响 ( $p < 0.01$ ). 因此, 造纸废水中的易受酸性影响的碱类毒物毒性相对最强, 而易受碱性影响的酸类毒物以及颗粒状毒物只是对线虫具有一定程度的影响, 或者影响某一特定的方面.

**关键词:** 酸碱性毒物; 毒性鉴别评价技术; 线虫; 工业废水

中图分类号: X503.22 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)04-0876-05

## Evaluation of Toxicification in Acid and Alkaescent Industry Liquid Wastes from Paper Mill Using *C. elegans*

WANG Xiao-yi<sup>1,2</sup>, YU Hong-xia<sup>2</sup>, WANG Da-yong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Developmental Genes and Human Disease in Ministry of Education, Basic Medical College, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Model organism *C. elegans* was introduced into the toxicity identification evaluation (TIE) procedure to determine the toxicification of acid and alkaline industry liquid wastes from paper mill via analyzing the life span, days corresponding to 50% lethal, reproductive rate, reproductive capacity and locomotion behaviors in worms. Our data indicate that the toxic influence order of different samples on life span was: 2<sup>nd</sup> > 4<sup>th</sup> > 1<sup>st</sup> > 3<sup>rd</sup>, the toxic influence order of different samples on generation time was: 2<sup>nd</sup> > 1<sup>st</sup> > 3<sup>rd</sup>  $\approx$  4<sup>th</sup>, the toxic influence order of different samples on brood size and head thrashes was similar: 1<sup>st</sup>  $\approx$  2<sup>nd</sup> > 3<sup>rd</sup>  $\approx$  4<sup>th</sup>, the toxic influence order of different samples on body bends was: 1<sup>st</sup>  $\approx$  2<sup>nd</sup> > 3<sup>rd</sup> > 4<sup>th</sup>, and the 2<sup>nd</sup> sample always had more significantly toxic effects on different phenotypes. Thus, the toxicity of acid industry liquid waste from the paper mill relatively had the most severe multiple effects, whereas the toxicity of alkaline industry liquid and grain-like wastes only exhibited limited effects.

**Key words:** acid and alkaline toxic; toxicity identification evaluation; *C. elegans*; industry liquid waste

造纸厂的废水是对回收的废纸进行脱色处理及加工后产生的废水, 该废水经进一步絮凝、沉淀等处理后将排入附近的河流. 造纸厂废水中含有大量的有害化学物质, 但其中只有少量组分起着主要毒性贡献作用. 传统的毒物化学筛选法, 是根据优先污染物名单采用特殊的化学分析方法进行分析. 有时被测出的化合物浓度很高, 但它的毒性效应却很低; 或者被测出的某一污染物浓度很低, 甚至不能检出, 可废水的该毒物毒性却很高. 因此, 传统的化学方法在查明废水生态毒性的真正原因上存在一定缺陷<sup>[1,2]</sup>.

自 80 年代以来, 美国相关机构采用全废水毒性试验和复杂组分分级分离化学分析相结合的方法, 即毒性鉴别评价技术 (toxicity identification evaluation,

TIE), 开始有效地鉴别导致废水毒性的关键污染物<sup>[3,4]</sup>. 该技术简化了废水分析的复杂性, 减少了化学分析工作量, 提高了废水毒性原因鉴别的可靠性. TIE 技术已成功运用于研究有关氮、重金属、极性和非极性有机化合物在废水中的毒性鉴别<sup>[5-9]</sup>. 然而, TIE 技术鉴别评价的有效性很大程度上也取决于毒性评判生物体系的选择. 随着研究的深入, 研究人员越来越希望可以更有更为优越的模式生物体系的出现.

收稿日期: 2006-05-20; 修订日期: 2006-10-12

基金项目: 东南大学优秀青年教师资助计划项目 (4023001013)

作者简介: 王晓祎 (1980 ~ ), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境污染化学.

\* 通讯联系人, E-mail: dayongw@seu.edu.cn, yuhx@nju.edu.cn

秀丽线虫(*C. elegans*)是近些年生命科学领域研究十分深入的模式生物,生命科学中的很多基本问题的揭示,都得益于该模式生物的引入.国内外关于线虫的形态、分子、细胞转导等方面的研究报道较多<sup>[10~13]</sup>,并且在发育生物学和细胞生物学等方面,已经成为了解得最清楚的后生动物之一<sup>[10~13]</sup>,但关于将其应用于有毒有机工业废水毒性鉴别评价的生物标志物研究则鲜见报道.模式生物线虫自然条件下在土壤中生存,但在淡水或者培养液条件下也可以生存,因此也可以作为水生毒理学、水体污染方面研究的受试生物.与TIE程序中传统的受试生物大型蚤相比,线虫具有容易培养、生命周期短、多指标体系评价、遗传背景丰富等优点,其与毒性鉴别评价技术的结合将极大地扩大该技术的利用价值与范围.

本研究采用修正后的TIE技术,同时引入模式生物线虫作为检测用受试生物,针对未经处理的造纸厂工业废水中的酸碱类毒物进行生态毒性原因鉴别.本研究有效地对造纸厂工业废水中的酸碱性毒物的生态毒性进行了评价,同时该研究体系也将为其他相关废水的排放和治理研究提供重要的启示.

1 材料与方法

1.1 试验水样

试验水样于2005-11-11采集自南京地区造纸厂,并在采集的当天按照TIE技术中的“过滤/pH调节”程序进行处理,并在当天将处理过的水样进行线虫毒性实验.处理程序参见图1.

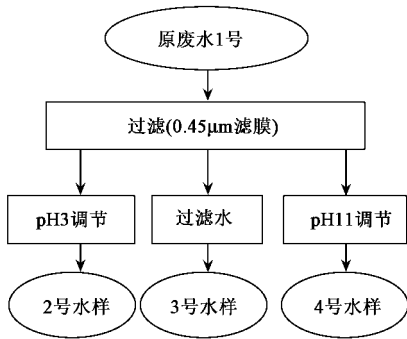


图1 废水水样处理流程

Fig.1 Flow chart of TIE technique used in evaluating the industry liquid waste

1.2 研究方法

1.2.1 受试生物

受试生物为模式生物秀丽线虫(*C. elegans*)野

生型品系N<sub>2</sub>.线虫的培养采用标准程序<sup>[14]</sup>.

1.2.2 毒性试验

该研究中,全部采用处于L4幼虫发育阶段的线虫进行毒性试验.实验在线虫培养的培养皿中进行.每个培养皿中注入200 μL的水样.每个样品设置100%、25%、3.125%这3个浓度梯度,每个浓度梯度同时设置1个空白对照组和3个平行进行相关毒性试验.空白对照组不添加任何水样.在分析中,1号水样又同时作为2、3、4号水样的对照.

本研究中,主要从以下几个方面进行毒性评价:①分析毒物对于线虫寿命与半数致死率的影响.半数致死率通过半数致死天数来反映.方法参见文献<sup>[15]</sup>.该分析中针对每个样品的每次测试应用15~20条线虫;②分析毒物对于线虫生殖的影响.具体分析上,分别选择世代周期长度来反映生殖速度,选择后代数目或母体产卵数目反映生殖能力.方法参见文献<sup>[15]</sup>.该分析中针对每个样品的每次测试应用15条线虫;③分析毒物对于线虫行为的影响.线虫身体运动行为的不正常,将反映出其肌肉系统与神经系统发育是否可能缺陷<sup>[17]</sup>.具体分析上,分别选择头部摆动频率与身体弯曲频率来反映身体运动行为.方法参见文献<sup>[17]</sup>.该分析中针对每个样品的每次测试应用20条线虫.

1.2.3 数据处理

实验结果使用SPSS统计软件(Version 10.0)进行分析用“平均数±标准偏差”表示.同时,用t检验法对组间数据进行差异显著性分析, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著, $p > 0.1$ 表示差异不显著.

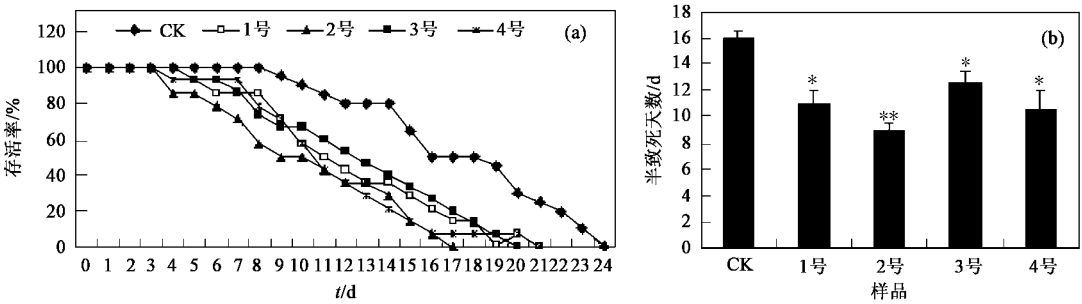
2 结果与讨论

2.1 造纸厂废水水样对线虫寿命及半数致死率的影响

寿命及半数致死率是针对包括线虫在内诸多受试生物进行毒性分析的首选指标.如图2所示,无论是针对线虫寿命还是半数致死天数进行分析,1号(原水样)、2号、3号、4号水样跟对照相比均显示出明显的毒性.其导致线虫中毒毒性的顺序为:4号>2号>1号>3号.其中,与未经水样暴露的对照(CK)与原水样样品1号相比,4号与2号水样表现出更为明显的毒性,尤其是2号水样毒性更强.即经过pH11与经过pH3调节处理的水样毒性不但没有降低,反而表现出更强的毒性,说明滤液中既含有易受酸性也含有易受碱性影响的物质,而且这些易受

酸性与碱性影响的毒物可能是这种造纸厂废水中的关键毒物.而 1 号和 3 号水样通过上述指标所表现

的毒性表明,经过滤处理后,原废水的毒性有所降低,表明原废水中可能还含有颗粒状毒物.



(a) 废水水样对线虫寿命的影响,(b) 废水水样对线虫半数致死率的影响,其中,\*表示有显著性差异,\*\*表示有极显著性差异,下同

图 2 废水水样对线虫寿命及半数致死率的影响

Fig.2 Effects of industry liquid waste on the life span and days corresponding to 50% lethal of *C. elegans*

2.2 造纸厂废水水样对线虫生殖的影响

2.2.1 造纸厂废水水样对线虫生殖速度的影响

线虫的生殖速度通过世代时间来反映.如图 3 所示,针对线虫的生殖速度进行分析,1 号(原水样)、2 号、3 号、4 号水样跟对照相比均显示出明显的毒性.其导致线虫中毒毒性的顺序为:2 号>1 号>3 号>4 号.而且,样品 2 号与 1 号的毒性具有浓度依赖性,浓度越高毒性越强,尤其是样品 1 号.而样品 3 号与 4 号的毒性则受自身浓度的影响不明显.从废水水样对线虫的生殖速度的影响结果来看,原水样中那些易受酸性影响的毒物严重影响线虫的生殖速度,其解释了该类工业废水导致线虫生殖速度严重缺陷的大部分影响.而与此相比,原水样中那些易受碱性影响的毒物与颗粒状毒物并不严重影响线虫的世代间生殖速度.

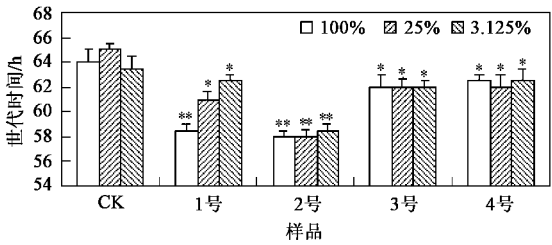


图 3 废水水样对线虫世代时间的影响

Fig.3 Effects of industry liquid waste on the generation time of *C. elegans*

2.2.2 造纸厂废水水样对线虫生殖能力的影响

线虫的生殖能力通过母体产卵数目来反映.如图 4 所示,针对线虫的生殖能力进行分析,1 号(原水样)、2 号、3 号、4 号水样跟对照相比均显示出明显的毒性.其导致线虫中毒毒性的顺序为:样品 1 号

与 2 号的毒性相似,样品 3 号与 4 号的毒性相似,样品 1 号与 2 号的毒性要强于样品 3 号与 4 号的毒性.而且,所有样品的毒性都具有浓度依赖性,浓度越高毒性越强.从废水水样对线虫的生殖能力的影响结果来看,原水样中无论易受酸性还是易受碱性影响的毒物,以及颗粒状毒物都严重影响线虫的生殖能力.其中,易受酸性影响的毒物对于线虫生殖能力的影响相对更严重.

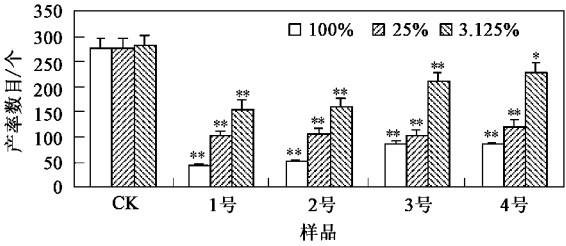


图 4 废水水样对线虫产卵数目的影响

Fig.4 Effects of industry liquid waste on the brood size of *C. elegans*

2.3 造纸厂废水水样对线虫行为的影响

2.3.1 造纸厂废水水样对线虫头部摆动频率的影响

分别选择线虫头部摆动频率与身体弯曲频率来考察其身体行为的缺陷.如图 5 所示,针对线虫的头部摆动频率进行分析,1 号(原水样)、2 号、3 号、4 号水样跟对照相比均显示出明显的毒性.其导致线虫中毒毒性的顺序为:样品 1 号与 2 号的毒性相似,样品 3 号与 4 号的毒性相似,样品 1 号与 2 号的毒性要强于样品 3 号与 4 号的毒性.此种趋势与废水水样对于线虫生殖能力的影响一致.其中,样品 1 号与 2 号的毒性具有浓度依赖性,浓度越高毒性越强.从

废水水样对线虫的头部摆动频率的影响结果来看,原水样中无论易受酸性还是易受碱性影响的毒物,以及颗粒状毒物都严重影响线虫的头部摆动频率.其中,易受酸性影响的毒物对于线虫头部摆动频率的影响相对更严重.

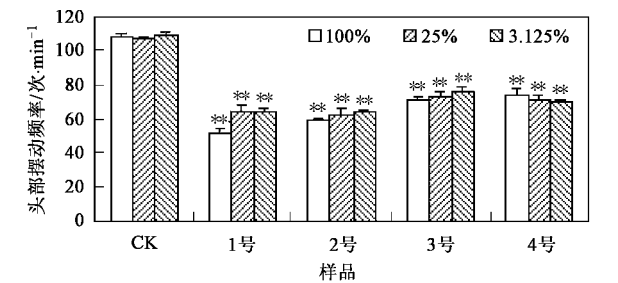


图5 废水水样对线虫头部摆动频率的影响  
Fig.5 Effects of industry liquid waste on the head thrashes of *C. elegans*

2.3.2 造纸厂废水水样对线虫身体弯曲频率的影响

如图6所示,针对线虫的身体弯曲频率进行分析,1号(原水样)、2号、3号、4号水样跟对照相比均显示出明显的毒性.其导致线虫中毒毒性的顺序为:样品1号与2号的毒性相似,样品1号与2号的毒性要强于样品3号与4号的毒性,样品3号的毒性要强于样品4号.此种趋势与废水水样对于线虫生殖能力以及的头部摆动频率影响基本一致.而且,所有的样品毒性均具有浓度依赖性,浓度越高毒性越强,尤其是样品2号和3号.从废水水样对线虫的身体弯曲频率的影响结果来看,原水样中无论易受酸性还是易受碱性影响的毒物,以及颗粒状毒物也都严重影响线虫的身体弯曲频率.其中,易受酸性影响的毒物对于线虫身体弯曲频率的影响相对更严重,而易受碱性影响的毒物对于线虫身体弯曲频率也有一定的影响.

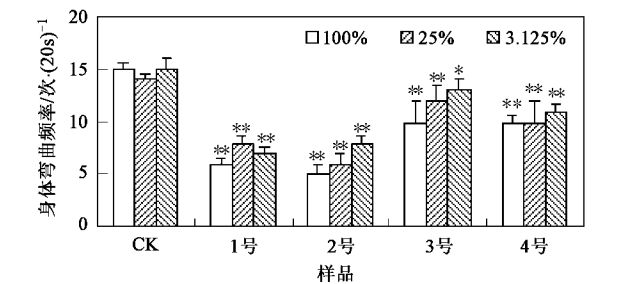


图6 废水水样对线虫身体弯曲频率的影响  
Fig.6 Effects of industry liquid waste on the body bends of *C. elegans*

物质,是分别指在酸性或碱性条件下可以表现出更为强烈毒性的物质.综合造纸厂废水各水样对线虫寿命、半数致死天数、生殖速度、生殖能力、身体运动行为等指标的影响,水样中易受酸性影响的毒物毒性相对最强,而易受碱性影响的毒物以及颗粒状毒物只是对线虫具有一定程度的影响,或者影响某一特定的方面.因为线虫通常只会对酸性或碱性产生反感或回避行为,不会产生本研究中表现出的这样强烈的各方面缺陷.因此,其中毒的原因可能是由于经过pH调节,导致原废水中的一些化合物溶解性、极性、挥发性、稳定性发生了相应改变;也可能是pH的变化导致一些有机物的酸碱性基团发生了变化;或者可能变成了另外一些物质,从而导致经过处理后的水样毒性发生了较大的变化.但是,这些分析与推测还需要进一步解析易受酸性或易受碱性影响的混合毒性物质中的具体物质以及这些物质之间毒性上的可能相互促进或制约作用.

3 结论

- (1)本研究将模式生物线虫引入TIE程序中,进行对污染工业废水中的毒物进行毒性评价.研究结果表明,该策略可行.
- (2)本研究所进行的线虫毒性试验中建立起来的多指标评价体系,与TIE程序中所用的传统受试生物-大型蚤的毒性指标 $LC_{50}$ 相比,分析更全面,可以考察毒物的多方面致毒特性,从而使TIE技术所获得的数据可信度得到提高.
- (3)对于所分析的造纸厂工业废水,其中易受酸性影响的毒物毒性相对最强,严重影响线虫的寿命、生殖与行为.易受碱性影响的毒物主要影响线虫的寿命,对线虫的生殖能力以及行为有一定影响,但不影响线虫的生殖速度.颗粒状毒物毒性与易受碱性影响的毒物毒性相似,但是其对于线虫寿命的影响没有易受碱性影响的毒物毒性强.
- (4)本研究中只进行了TIE程序中部分的毒物特性试验,且并未进行具体毒物鉴别和毒物确证试验,还有待于深入的研究与分析.

参考文献:

[1] Boxall A B A, Maltby L. The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff[J]. Wat. Res., 1995, 29: 2043 ~ 2050.

[2] Thomas N J. Use of biomonitoring to control toxic in the United States[J]. Wat. Sci. Tec., 1989, 20: 101 ~ 108.

[3] Amato J R, Mount D I, Durhan E J. An example of the identification of diazinon as a primary toxicant in an effluent[J]. Environ. Toxicol. Chem., 1992, 11: 209 ~ 216.

- [ 4 ] Ankey G T, Burkhard L P. Identification of surfactants as toxicants in primary effluents[J]. Environ. Toxicol. Chem., 1992, **11**: 1235 ~ 1248.
- [ 5 ] Burkard L P, Ankley G T. Identifying toxicants: NETAC toxicity-based approach[J]. Environ. Sci. Technol., 1989, **23**: 1438 ~ 1443.
- [ 6 ] Burkard L P, Durhan J J. Identification of nonpolar toxicants in effluents using toxicity-based fraction with gas chromatography/mass spectrometry[J]. Analyt. Chem., 1991, **63**: 277 ~ 283.
- [ 7 ] Burkhard L P, Jensen J J. Identification of ammonia, chlorine and diazinon as toxicants in a municipal effluent[J]. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1993, **25**: 506 ~ 515.
- [ 8 ] Jin H J. A case study on identifying the toxicant in effluent discharged from a chemical plant[J]. Marine Pollu. Bull., 1999, **39**: 122 ~ 125.
- [ 9 ] Jop K M, Askew A M. Toxicity identification evaluation using a short-term chronic test with *Ceriodaphnia dubia*[J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1994, **53**: 91 ~ 97.
- [ 10 ] Tiensuu T, Larsen M K, Vernersson E, *et al.* *lin-1* has both positive and negative functions in specifying multiple cell fates induced by Ras/MAP kinase signaling in *C. elegans* [J]. Dev. Biol., 2005, **286**: 338 ~ 351.
- [ 11 ] Lacoste C, Barthaux V, Iborra C, *et al.* MAU-8 is a phosphatase-like protein required for G protein signaling in *C. elegans* [J]. Dev. Biol., 2006, **294**: 181 ~ 191.
- [ 12 ] Grishok A. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans* [J]. FEBS Lett., 2005, **579**: 5932 ~ 5939.
- [ 13 ] Geldhof P, Molloy C, Knox D P. Combinatorial RNAi on intestinal cathepsin B-like proteinases in *Caenorhabditis elegans* questions the perception of their role in nematode biology [J]. Mol. Biochem. Parasit., 2006, **145**: 128 ~ 132.
- [ 14 ] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 1974, **77**: 71 ~ 94.
- [ 15 ] Swain S C, Keusekotten K, Baumeister B, *et al.* *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis [J]. J. Mol. Biol., 2004, **341**: 951 ~ 959.
- [ 16 ] Loria P M, Hodgkin J, Hobert O. A conserved postsynaptic transmembrane protein affecting neuromuscular signaling in *Caenorhabditis elegans* [J]. J. Neurosci., 2004, **24**: 2191 ~ 2201.
- [ 17 ] Tsalik E L, Hobert O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans* [J]. J. Neurobiol., 2003, **56**: 178 ~ 197.