

污水处理厂尾水对金鱼生命早期生长和发育的影响

张海珍, 陆光华*

(河海大学环境科学与工程学院, 浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 南京 210098)

摘要:研究了污水处理厂尾水对金鱼(*Carassias auratus*)生命早期的影响。吸水膨胀后的金鱼受精卵分别暴露于一系列渐变的尾水浓度中 30 d 后, 金鱼孵化率和幼鱼存活率随着尾水浓度的升高而降低, 而畸形率却随着尾水浓度的升高而增加。暴露于污水处理厂尾水(浓度 $\geq 20\%$)的幼鱼生长受到抑制, 体长和体重显著下降($p < 0.05$)。所有设置浓度的污水处理厂尾水均诱导了幼鱼体内卵黄蛋白原(Vtg)的生成, 但是剂量-效应关系不明显。20%的尾水对幼鱼体内 Vtg 合成的诱导效应最为明显, 但是浓度高于 20% 的尾水暴露下, Vtg 的诱导效应降低。经过一段时间清水恢复阶段后, 鱼体重和体长显著增加, 金鱼 Vtg 水平显著降低($p < 0.05$)。研究表明污水处理厂尾水的生命早期暴露存在导致鱼类雌性化的风险。金鱼早期生命阶段的敏感性, 使其适用于评价水中内分泌干扰物的生态影响。

关键词:污水处理厂尾水; 金鱼; 生命早期; 卵黄蛋白原; 雌性化

中图分类号: X174; X503.225 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)05-1333-06

Effects of the Effluent from a Wastewater Treatment Plant in Early Life Stage on Development and Growth of Goldfish(*Carassias auratus*)

ZHANG Hai-zhen, LU Guang-hua

(Key Laboratory of Integrated Regulation and Resources Development of Shallow Lakes, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: The present study was conducted to assess the effects of effluent from a wastewater treatment plant (WWTP) on goldfish in early life stage. Fertilized eggs of the goldfish were exposed to a serial of graded concentrations of the effluent for 30 d. The hatching and survival rates of goldfish were decreased and the freaky rate was elevated with increased effluent concentrations. Additionally, the growth of fry was inhibited, and both body length and body weight were significantly decreased at $\geq 20\%$ of effluent ($p < 0.05$). vitellogenin(Vtg) in fry was induced by all exposure concentrations. However, concentration dependence was not apparent. The highest Vtg induction was observed at the exposure of 20% effluent, whereas the induction effects of Vtg were decreased at $> 20\%$ of effluent. After a period of culture in clean water, both body length and body weight of fish were significantly increased, and Vtg levels were significantly decreased ($p < 0.05$). The result demonstrates that the exposure of WWTP effluents in early life stage can cause a risk of fish feminization. Goldfish seem to be suitable in assessing environmental impact of endocrine-disrupting chemicals due to their sensitivity in early life stage.

Key words: effluents of wastewater treatment plant; *Carassias auratus*; early life stage; vitellogenin(Vtg); feminization

环境雌激素是指一类具有雌激素样作用的化合物, 能模拟或干扰生物体内内源性雌激素的生理、生化作用, 对生物体产生各种毒效应, 包括干扰体内正常激素的合成、分泌、运输、代谢、激素与受体的结合、功能的表达并且因此影响生物的平衡、发育、生殖和行为^[1,2]。其种类包括天然的雌激素(如雌二醇, E_2)、植物雌激素和真菌雌激素、人工合成的雌激素[如炔雌醇(EE_2)以及环境化学污染物质(如农药 DDT、树脂增塑剂双酚 A、洗涤剂及表面活性剂(壬基苯酚)、多氯联苯(PCBs)、多环芳烃(PAHs)、二噁英以及重金属 Hg、Pb、Cd 等]^[3]。1994 年, Purdom 等^[4]报道了污水处理厂(WWTP)的尾水对鱼有雌性化作用, 从而引发各国对污水处理厂尾水中环境雌激素的关注。例如, 在英国, 研究发现暴露

于污水处理厂尾水中的野生彩虹鲷(*Oncorhynchus mykiss*)性腺组织发生了不利的改变^[5]。暴露于日本东京湾(接受大量工业和生活污水)的野生牙鲆(*Pleuronectes yokohamae*)、荷兰工业海港(接受污水处理厂尾水)的淡水乌鲂(*Abramis brama*)和河口牙鲆(*Platichthys flesus*)以及美国南加州海湾(城市污水处理厂排污口附近)的双斑美大菱鲆(*Pleuronichthys verticalis*)均出现了雌性化现象^[6-8]。此外暴露于德国巴伐利亚区域污水处理厂尾水中的两栖动物 *Xenopus laevis* 和 *Rana temporaria* 的性别

收稿日期: 2009-07-12; 修订日期: 2009-09-07

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(109076); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418203)

作者简介: 张海珍(1975~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为有机污染化学及环境毒理学, E-mail: zhanghaizhen0@126.com

* 通讯联系人, E-mail: ghlu@hhu.edu.cn

比例明显偏向雌性^[9]. 鉴于雌性化效应可能对水生生态系统产生深远的负面影响,对污水处理厂尾水中环境雌激素的监控及其生态环境安全评价已成为当今环境科学研究的前沿和热点.

鱼类的整个生长和繁殖过程都是在雌激素的调节下进行的,环境雌激素对胚胎、胎体和新生幼体的影响与其对成体的影响可以完全不同. 对处于发育中的个体来说,激素的微小变化就会导致严重后果. 由于胚胎发育的阶段性和不同时期接触会导致不同的后果. 已有研究表明鱼类早期发育阶段的胚胎期和仔鱼期是鱼类对外界环境最为敏感的阶段^[10,11]. 鲤科金鱼具有地域分布广、生长快、易饲养、性成熟早等特点,一龄金鱼即可产卵繁殖,并且对雌激素物质具有较强的敏感性,是一种较好的检测和筛选雌激素类物质的模型动物^[12,13]. 因此,本研究以金鱼为受试生物,分析污水处理厂尾水的生命早期暴露对其生长发育的影响.

1 材料与方法

1.1 实验动物

鲤科鲫属金鱼卵取自南京市郊区某金鱼养殖场刚进行人工受精后吸水膨胀的受精卵,挑选发育正常的胚胎用于实验.

1.2 试剂

纯化的金鱼卵黄蛋白原(Vtg)和兔抗金鱼 Vtg 多克隆抗体由中国海洋大学汝少国教授提供;用碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(H + L)购自 Sigma 公司;肝素钠、Tween-20 和酶抑制剂(PMSF)购自南京生兴生物技术有限公司;脱脂奶粉购自武汉博士德生物有限公司;牛血清蛋白 BSA 购自上海惠生生化试剂有限公司;考马斯亮蓝 G-250 购自国药集团化学试剂有限公司;其余化学试剂购自成都科龙化工试剂厂.

1.3 暴露实验

污水取自南京市江心洲污水处理厂排水口. 在前期的 YES 实验中已经发现江心洲污水处理厂的尾水是南京市所有污水处理厂的尾水中雌激素效应最强的尾水,其基本特征如下:处理量为 $64 \times 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$;以生活污水为主;COD 为 $85.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;二级处理方法为 A/O 法. 暴露用的水样为一系列稀释的污水处理厂尾水,占稀释水的体积分数分别为 5%、10%、20%、40% 和 50%,稀释水为充分曝气的城市自来水. 同时设清水对照. 鱼卵在 $12 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 的培养皿中进行孵化,每皿 80 ~ 100 个,设平行

组. 胚胎期每 12 h 更换 1 次水样,出膜后为减少对仔鱼的影响,改为每 24 h 更换 1 次水样. 胚胎期间每 24 h 观察记录 1 次受精卵的孵化情况,取出死亡卵. 孵出的仔鱼转入 2 L 鱼缸,继续暴露. 仔鱼期为第 1 尾仔鱼破膜而出至卵黄囊消失. 先作 8 h 连续观察,以后每 24 h 观察并记录仔鱼的畸形和死亡情况. 暴露 30 d 和 60 d 后各取 10 尾鱼测量体长、体重,计算健康状态因子(CF). 然后将鱼体于 -80°C 保存,用于测定全鱼 Vtg 含量. 其余的鱼转入自动循环缸,清水饲养至性腺成熟期,取 20 尾测其体长、体重,计算健康状态因子(CF). 尾部采血,测血清中 Vtg 含量. 解剖取性腺,称重,计算性肉指数(GSI).

实验期间水温为 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, pH 为 7.0 ± 0.3 ,溶解氧为 $(5.5 \pm 0.1) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (碘量法).

1.4 测定方法

(1) 血清中 Vtg 的测定 血清中 Vtg 的测定采用酶联免疫吸附实验(ELISA)竞争法,测定步骤见文献[14].

(2) 全鱼 Vtg 的测定 将鱼解冻后,加入 2 mL 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS, pH = 7.5),于冰浴下匀浆. 匀浆液 4°C 离心 15 min ($10\,000 \text{ r/min}$),采用酶联免疫吸附实验(ELISA)竞争法测定上清液中 Vtg 含量. 测定步骤同血清中 Vtg 的测定.

(3) 蛋白质含量的测定 蛋白质含量的测定采用 Bradford 法,取适量的血清,加入考马斯亮蓝,当其与蛋白质结合后,由游离时的棕黑色变为蓝色,以此通过测定 595 nm 下的吸光值来确定血清的蛋白质含量.

1.5 CF 和 GSI 的计算

$$\text{CF} = \frac{\text{鱼体重}(\text{g})}{\text{鱼体积}(\text{cm}^3)} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{GSI} = \frac{\text{性腺重}(\text{g})}{\text{鱼体重}(\text{g})} \times 100\% \quad (2)$$

1.6 数据处理

实验数据由平均值 $\pm$ 标准偏差表示. 采用 SPSS 13.0 进行数据分析,通过单因素方差分析法检验处理组与对照组之间以及处理组之间的差异显著性,当 $p < 0.05$ 时,则判定存在显著差异.

2 结果与讨论

2.1 形态学观察指标

与对照组相比,高浓度尾水暴露的部分胚胎由于严重畸形而不能孵化出膜,或者比正常仔鱼晚 2 ~ 3 d. 仔鱼的畸形症状主要表现为身体短小不对

称、弯体或弯尾,眼部变形如单眼、出血、围心腔肿大、卵黄囊膨大等.

2.2 生命早期暴露对金鱼生长发育的影响

金鱼吸水膨胀后的受精卵分别在污水处理厂尾水中暴露 30 d 和 60 d,以确定暴露至少要坚持多长时间,才能对仔鱼的体长、体重及 V_{tg} 的诱导产生明显的影响. 30 d 和 60 d 的暴露对金鱼孵化、存活及仔鱼生长发育的影响结果见表 1 和表 2.

表 1 尾水暴露 30 d 对金鱼受精卵孵化、仔鱼存活及生长发育的影响 ¹⁾						
Table 1 Effects of WWTP effluents on hatching rate, survival rate and growth of the goldfish after 30 d of exposure						
暴露浓度 (体积分数)/%	孵化率 /%	畸形率 /%	存活率 /%	体长 /cm	体重 /g	CF
对照	80.0 ± 7.3	4.40 ± 2.8	75.6 ± 1.5	2.02 ± 0.18	0.17 ± 0.04	2.06 ± 0.34
5	75.1 ± 5.5	17.2 ± 3.7 *	55.6 ± 2.9 *	1.95 ± 0.18	0.13 ± 0.03	1.75 ± 0.22
10	74.5 ± 2.0	23.5 ± 2.6 *	43.9 ± 1.2 *	1.85 ± 0.15	0.12 ± 0.03	1.87 ± 0.03
20	68.6 ± 2.7	28.8 ± 1.9 *	39.8 ± 1.8 *	1.66 ± 0.13 *	0.08 ± 0.03 *	1.77 ± 0.07
40	65.9 ± 1.6 *	39.3 ± 2.9 *	24.6 ± 2.4 *	1.59 ± 0.36 *	0.07 ± 0.04 *	1.65 ± 0.61
50	58.2 ± 4.7 *	47.7 ± 3.1 *	10.4 ± 2.1 *	1.52 ± 0.18 *	0.05 ± 0.03 *	1.48 ± 0.07 *

1) * 表示与对照组有显著差别($p < 0.05$),下同

表 2 尾水暴露 60 d 对金鱼受精卵孵化、仔鱼存活及生长发育的影响 ¹⁾						
Table 2 Effects of WWTP effluents on hatching rate, survival rate and growth of goldfish after 60 d of exposure						
暴露浓度 (体积分数)/%	孵化率 /%	畸形率 /%	存活率 /%	体长 /cm	体重 /g	CF
对照	80.0 ± 7.3	6.90 ± 4.1	72.9 ± 1.6	2.87 ± 0.15	0.48 ± 0.06	2.04 ± 0.06
5	75.1 ± 5.5	30.5 ± 2.7 *	40.4 ± 1.8 *	2.69 ± 0.25	0.33 ± 0.20	1.71 ± 0.37
10	74.5 ± 2.0	39.8 ± 1.6 *	34.6 ± 2.4 *	2.52 ± 0.14 *	0.29 ± 0.07 *	1.79 ± 0.09
20	68.6 ± 2.7	46.6 ± 0.6 *	22.0 ± 2.1 *	2.43 ± 0.29 *	0.24 ± 0.20 *	1.65 ± 0.57
40	65.9 ± 1.6 *	50.7 ± 1.3 *	10.2 ± 2.9 *	2.39 ± 0.17 *	0.20 ± 0.03 *	1.51 ± 0.14 *
50	58.2 ± 4.7 *	57.4 ± 2.3 *	0	ND	ND	ND

1) ND 表示未检出

从表 1 可知,尾水暴露 30 d,金鱼卵的孵化率和幼鱼存活率随着尾水浓度(体积分数)的升高而降低,而畸形率随着尾水浓度的升高而升高.与对照相比,浓度 $\geq 40\%$ 的尾水使鱼卵孵化率显著下降,而所有暴露浓度都使幼鱼存活率明显降低($p < 0.05$).暴露 30 d 后,存活的幼鱼生长发育受到抑制,浓度 $\geq 20\%$ 的尾水暴露使幼鱼体长和体重显著降低($p < 0.05$).同时从 CF 值的变化可以看出,50%的尾水暴露下幼鱼健康状态明显下降($p < 0.05$).从表 2 可见,60 d 暴露期内幼鱼的存活率明显低于 30 d 暴露期.在浓度为 50%的尾水暴露 60 d 后,幼鱼全部死完.同时与对照相比,除最低暴露浓度外(5%),其他浓度暴露 60 d,存活幼鱼的体重和体长显著降低($p < 0.05$).此外,浓度 $\geq 40\%$ 尾水的暴露导致幼鱼健康状态明显下降($p < 0.05$),其余组与对照无显著差异.

有文献报道,幼鱼阶段进行 V_{tg} 的合成会消耗大量的能量,可能把生长的能量转化成 V_{tg} 的能量源,并由此对肝、肾等器官产生损害,因而是导致幼鱼死亡和生长迟缓的一个重要原因^[10].但是金鱼在 $\geq 40\%$ 浓度的尾水暴露 30 d 后, V_{tg} 诱导并不明显

(见图 1),而体长和体重却受到明显抑制.这可能是由于尾水中的毒性物质,如氨的明显抑制,而导致对肝脏功能的损害和对食物吸收的减少,健康状态不断下降,最终导致死亡率的显著上升^[15].健康状态因子或肥满度(CF)通常是测量营养状况和健康状态的指标.本研究表明,污水处理厂尾水的生命早期暴露可明显抑制金鱼幼鱼生长,并使其死亡率显著上升,这与国内外的相关报道一致. Panter 等^[16]研究发现,黑呆头鱼(*Pimephales promelas*)持续暴露于 56、180 和 560 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-戊基酚和 10 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EE_2 107 d 后,雌鱼的 CF 值与对照组相比显著降低.廖涛等^[17]研究发现,污水处理厂进水和一级出水对稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)仔鱼的体长、体重和 CF 均有较显著的影响,同时伴有死亡现象发生.日本青鳉(*Oryzias latipes*)暴露于浓度高于 5%的尾水后,体长和体重都明显降低^[18].化学分析表明江心洲污水处理厂的尾水中含有 E_1 27.63 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 E_2 8.04 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、OP 117.14 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NP 1 141.5 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 BPA 61.3 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$.而将日本青鳉在交配前后持续暴露于 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的辛基酚,可导致仔鱼畸形率升高 20% ~ 30%;暴露浓度为 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时仔

鱼生长明显受到抑制,子代雌雄比例由 42:58 变为 57:40^[19].

2.3 生命早期暴露对幼鱼 Vtg 的诱导

30 d 和 60 d 的污水处理厂尾水暴露对幼鱼 Vtg 的诱导结果见图 1. 可以看出, Vtg 在所有的浓度下都有诱导,但是剂量-效应关系不明显. 暴露 30 d 后,与对照相比,10% 和 20% 的尾水明显诱导了幼鱼体内 Vtg 的合成(分别高于对照 100% 和 300%). 但是浓度高于 20% 的尾水暴露下, Vtg 的诱导效应降低(分别高于对照 45% 和 10%). 以前的研究也观察到高浓度的尾水($\geq 40\%$)暴露导致 Vtg 诱导效应降低的现象^[18, 20]. 尾水暴露 60 d 对金鱼 Vtg 的诱导趋势与 30 d 结果相似,只是诱导程度不同. 浓度在 5% ~ 40% 之间的尾水暴露对金鱼 Vtg 有显著诱导(分别高于对照 349%、589%、1107% 和 614%). 结果表明江心洲污水处理厂的尾水中含有环境雌激素类物质,能够诱导金鱼幼鱼产生 Vtg. 研究结果还表明金鱼 30 d 暴露于 WWTP 尾水中即可诱导幼鱼产生 Vtg. 因此本研究以 30 d 作为尾水暴露的敏感阶段.

已有研究表明幼鱼对环境雌激素污染响应更为敏感,如暴露于三级污水处理尾水中的彩虹鲷幼鱼体内 Vtg 水平明显高于对照^[21];将成年雄性底鳉(*Fundulus heteroclitus*)和幼年阳光鲈鱼(*Morone saxatilis* × *Morone chrysops*)暴露于纽约大型污水处理厂的未氧化的尾水中(75% 尾水和 25% 海水)21 d 后,幼年阳光鲈鱼血清 Vtg 高于对照 1730%,而底鳉血清中没有检测到 Vtg^[22]. 但是 Harries 等^[5]的研究发现,英国 25% 的 WWTP 尾水完全失去了诱导雄性鳉鱼产生 Vtg 的能力. 这种不同可能跟个体的生长和/或种属差异对污水处理厂尾水中的雌激素物质的响应不同,以及污水处理厂尾水中环境雌激素的组成和浓度以及污水处理的程度不同有关.

2.4 清水期后金鱼生长发育的恢复

30 d 金鱼生命早期暴露后,清水养至性腺成熟,所得体长、体重及性腺指数结果见表 3. 经过清水恢复后,高浓度尾水处理过的鱼死亡率较高,其中 50% 的尾水暴露过的鱼全部死亡,存活率按尾水浓度由低到高依次为: $(98.5 \pm 1.1)\%$ 、 $(97.2 \pm 2.4)\%$ 、 $(87.3 \pm 1.8)\%$ 、 $(74.1 \pm 4.7)\%$ 、 $(65.9 \pm 2.1)\%$ 及 0. 但是低浓度尾水暴露过的金鱼,经过清水阶段的恢复后,雄鱼和雌鱼的体重和体长均显著增加;与对照相比,除雄鱼 20% 的尾水暴露组外,其余各组对金鱼的体重和体长的影响均无明显差异

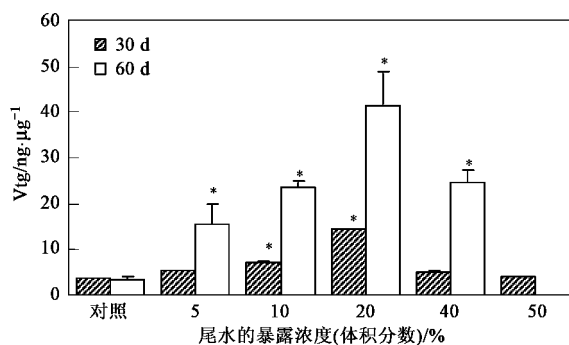


图 1 暴露 30 d 和 60 d 后幼鱼 Vtg 的诱导效应

Fig. 1 Induction of Vtg in fry after 30 and 60 days of effluents exposure

($p > 0.05$). 与对照相比,无论是雌鱼还是雄鱼,所有的尾水暴露组的 CF 均无明显差异($p > 0.05$),表明在经过清水饲养期后,金鱼的健康状况基本恢复. CF 可能对生殖发育有很大的影响,同时影响 GSI. 鱼类由于食物数量和质量的季节变化,体重也存在明显的差异,并且这种变化趋势与鱼体内脂肪贮存量的变化相一致,因此,体重增加预示着鱼类有较好的营养状态,并将影响雌性的繁殖成功率^[23].

清水恢复期后金鱼血清 Vtg 的测定结果见图 2. 从表 3 和图 2 可知,清水饲养使之前的尾水暴露对金鱼 Vtg 合成的影响显著降低($p < 0.05$). 与对照相比,20% 的尾水暴露组雄鱼 Vtg 显著增加($p < 0.05$),GSI 显著下降($p < 0.05$). 除此之外,其余各暴露组雄鱼和雌鱼的 GSI 和 Vtg 与对照组无显著差别($p > 0.05$). 表明在经过一段时期的清水恢复后,生命早期暴露导致的 Vtg 诱导效应有所减轻,但不能完全消除. 已有研究也表明雄鱼由外源性雌激素诱导产生的 Vtg 在干净水体中恢复后是可逆的^[24-27]. Rodgers-Gray 等^[27] 研究发现斜齿鳊

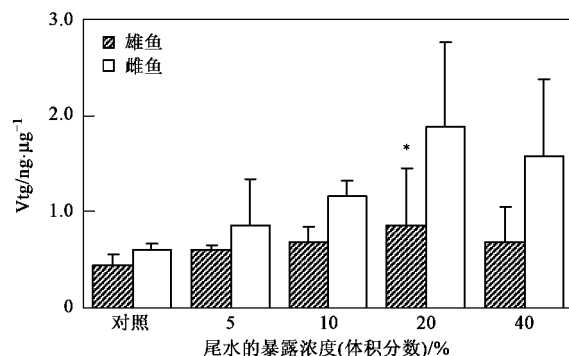


图 2 生命早期暴露对成鱼体内 Vtg 诱导的影响

Fig. 2 Effects of the effluents exposure in early life stage on Vtg induction in adult fish

表 3 早期生命阶段暴露对金鱼成鱼生长、性腺指数的影响
Table 3 Effects of WWTP effluents exposure in early life stage on growth and GSI of goldfish after clean water exposure

分类	暴露浓度 (体积分数)/%	体长/cm	体重/g	CF/%	GSI/%
雄鱼	对照	11.02 ± 1.05	10.84 ± 1.37	0.81 ± 0.18	2.23 ± 0.17
	5	10.40 ± 1.25	9.18 ± 1.35	0.82 ± 0.15	2.12 ± 0.39
	10	9.79 ± 0.85	7.05 ± 1.05	0.75 ± 0.08	2.07 ± 0.77
	20	9.05 ± 0.56 *	5.24 ± 1.15 *	0.58 ± 0.14	1.78 ± 0.23 *
	40	10.97 ± 1.13	8.43 ± 1.02	0.64 ± 0.16	1.93 ± 0.28
雌鱼	对照	10.05 ± 1.04	9.63 ± 0.63	0.96 ± 0.21	8.46 ± 1.29
	5	9.67 ± 0.48	9.10 ± 1.3	1.01 ± 0.01	7.31 ± 1.77
	10	9.50 ± 1.16	8.28 ± 1.07	0.97 ± 0.19	7.94 ± 1.82
	20	9.28 ± 0.49	7.06 ± 0.91	0.88 ± 0.03	8.13 ± 1.94
	40	10.38 ± 0.31	10.17 ± 1.34	0.91 ± 0.03	8.37 ± 1.31

(*Rutilus rutilus*) 在早期阶段暴露于含雌激素的尾水中后诱导产生的 Vtg 在 100 d 的净化后部分去除。

3 结论

(1) 金鱼受精卵暴露于污水处理厂尾水 30 d 后,孵化率和幼鱼存活率随着尾水浓度升高而降低.幼鱼生长受到明显抑制,对体内 Vtg 产生明显诱导效应.

(2) 鱼卵受精后 30 d 是对环境雌激素污染的敏感时期,江心洲污水处理厂尾水的生命早期暴露可能导致对鱼类雌性化风险.

(3) 经清水恢复期后,成鱼血清的 Vtg 水平显著降低,表明生命早期雌激素暴露对 Vtg 的影响是可逆的.

致谢:本研究采用的纯化金鱼卵黄蛋白原(Vtg)和兔抗金鱼 Vtg 多克隆抗体由中国海洋大学汝少国教授惠赠.采集水样工作得到南京市江心洲污水处理厂的支持,在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] Yuan L. Research progress of environmental estrogens effect male reproductive vice[J]. Urology and Nephrology FMS, 2005, **25**: 216-219.

[2] 邴欣,汝少国,姜明. 久效磷对金鱼的环境雌激素效应的研究[J]. 高技术通讯,2006,**16**(11):1195-1199.

[3] 樊静. 环境激素类污染物若干分析新方法研究[D]. 广州:中国科学院广州地球化学研究所, 2007.

[4] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, *et al.* Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works[J]. Chem Ecol, 1994, **8**:275-285.

[5] Harries J E, Janbakhsh A, Jobling S, *et al.* Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom[J]. Environ Toxicol Chem, 1999, **18**:932-937.

[6] Hashimoto S, Bessho H, Hara A, *et al.* Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male

flounder (*Pleuronecties yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan[J]. Environ Res, 2000, **49**:37-53.

[7] Vethaak A D, Later J, Kuiper R V, *et al.* Estrogenic effects in fish in the Netherlands: some preliminary results [J]. Toxicology, 2002, **181-182**:147-150.

[8] Deng X, Rempel M A, Annstrong J, *et al.* Seasonal evaluation of reproductive status and exposure to environmental estrogens in Hornyhead Turbot at the municipal wastewater outfall of Orange County, CA [J]. Environ Toxicol, 2007, **22**:464-471.

[9] Bogi C, Schwaiger J, Ferling H, *et al.* Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria* [J]. Environ Res, 2003, **93**:195-201.

[10] Herman R L, Kincaid H L. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout[J]. Aquaculture, 1988, **72**:165-172.

[11] 钟雪萍,徐盈,梁勇,等. 稀有鮎鲫生命早期的己烯雌酚暴露对生长发育与繁殖的影响[J]. 水生生物学报, 2005, **29** (6): 667-672.

[12] Ishibashi H, Tachibana K, Tsuchimoto M, *et al.* In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. J Health Sci, 2001, **47**:213-218.

[13] Spanó L, Tyler C R, Aerle R, *et al.* Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Aquat Toxicol, 2004, **66**: 369-379.

[14] Rempel M A, Reyes J, Steinert S, *et al.* Evaluation of relationships between reproductive metrics, gender and vitellogenin expression in demersal flatfish collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA [J]. Aquat Toxicol, 2006, **77**:241-269.

[15] Garric J, Vollat B, Nguyen D K, *et al.* Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents[J]. Water Sci Technol, 1996, **33**: 83-91.

[16] Panter G H, Hutchinson T H, Hurd K S, *et al.* Development of chronic tests for endocrine active chemicals part 1. an extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Aquat Toxicol, 2006, **77**:279-290.

- [17] 廖涛, 金士威, 惠阳, 等. 城市污水处理厂进出水中类雌激素暴露影响评价[J]. 环境化学, 2007, **26**(6): 819-822.
- [18] Ma T W, Wan X Q, Huang Q H, *et al.* Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Chemosphere, 2005, **59**:281-288.
- [19] Knorr S, Braunbeck T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2002, **51**(3):187-196.
- [20] Sepulveda M S, Quinn B P, Denslow N D, *et al.* Effects of pulp and paper mill effluents on reproductive success of largemouth bass[J]. Environ Toxicol Chem, 2003, **22**:205-213.
- [21] Xie L, Sapozhnikova Y, Bawardi O, *et al.* Evaluation of wetland and tertiary wastewater treatments for estrogenicity using *in vivo* and *in vitro* assays[J]. Environ Contam Toxicol, 2004, **48**:81-86.
- [22] McArdle M, Elskus A, McElroy A, *et al.* Estrogenic and CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent[J]. Marine Environmental Research, 2000, **50**:175-179.
- [23] Stansley W, Washuta E J. Initial survey of plasma vitellogenin and gonadal development in male carp (*Cyprinus carpio*) from three locations in New Jersey, USA [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2007, **78**:181-185.
- [24] Brion F, Triffault G, Palazzi X, *et al.* Effect of estradiol on vitellogenesis and reproductive parameters in Zebrafish (*Danio rerio*) [A]. In: Proceedings of the Third World Congress of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry [C]. Brighton, UK; 21-25 May 2000.
- [25] Allen Y, Matthiessen P, Scott A P, *et al.* The extent of oestrogenic contaminants in the UK estuarine and marine environments? further surveys of flounder[J]. Sci Total Environ, 1999, **233**:5-20.
- [26] Schultz I R, Orner G, Merdink J L, *et al.* Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17 α -ethynylestradiol [J]. Aquat Toxicol, 2000, **51**:305-318.
- [27] Rodgers-Gray T P, Jobling S, Kelly C, *et al.* Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development[J]. Environ Sci Technol, 2001, **35**:462-470.