

# 农药废水对秀丽隐杆线虫毒性效应及其主要有毒组分

王晓祎<sup>1</sup>, 王大勇<sup>2</sup>, 李爱民<sup>1</sup>, 于红霞<sup>1</sup>, 刘晓华<sup>1</sup>

(1.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, 江苏 南京 210093; 2.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, 江苏 南京 210009)

**摘要:**应用 battery 生物测试法,检测研究农药废水对秀丽隐杆线虫的生命周期、繁殖速率、生殖能力、头摆和身体弯曲频率等影响的生物毒性,及其引发生物毒性的主要有机污染物。结果表明,在已经达到国家废水排放标准[GB 8978—1996]情况下,处理出水对受试动物仍然存在致毒效应;线虫的世代周期对进水的毒性最为敏感,产卵数量对出水的毒性最为敏感;进水毒性主要来自易受酸性调节影响的有机污染物,出水毒性主要来自易受碱性调节影响的有机污染物。结果表明,该项生物测试的毒性参数,可用于指示存在于低 COD<sub>Cr</sub> 废水中的生物毒性;所用的毒性鉴别评价(TIE)方法,可用于鉴别废水中引发致毒效应的关键污染物。废水中悬浮颗粒污染物的生物毒性至关重要,尚未研究,有待继续。

**关键词:**农药废水; 秀丽隐杆线虫; 生物测试; 毒性评价; 主要致毒物

**中图分类号:**X592   **文献标志码:**A   **文章编号:**1672-2043(2009)07-1392-05

## Toxicity of A Pesticide Wastewater on *Caenorhabditis elegans*

WANG Xiao-yi<sup>1</sup>, WANG Da-yong<sup>2</sup>, LI Ai-min<sup>1</sup>, YU Hong-xia<sup>1</sup>, LIU Xiao-hua<sup>1</sup>

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

**Abstract:** The toxicities of influent and effluent for a pesticide wastewater treatment system on the model animal, *Caenorhabditis elegans*, were measured for identification of the target organic pollutants with the approach of toxicity identification evaluation(TIE). Although the effluent quality could met the limit as the list in Chinese Integrated Wastewater Discharge Standard[GB 8978—1996], both the influent and effluent still revealed their toxicities on *C. elegans* proved in the battery bioassays with the parameters including life span, generation time, brood size, head thrashes and body bends. The generation time for *C. elegans* was sensitive to the influent and the brood size of *C. elegans* was sensitive to the effluent. The major toxicants in the influent were acidic organic compounds but in the effluent were alkaliescent organic chemicals. The results indicated that the bioassay methods could be used to test the toxicity existed in the low COD<sub>Cr</sub> wastewater and the approach of toxicity identification evaluation should be effective for discovering target toxicants.

**Keywords:** pesticide wastewater; *C. elegans*; bioassay; toxicity evaluation; major toxicants

我国是农药生产大国,农药的生产、运输和使用过程都会给环境带来一定的污染,尤其是农药废水的排放。化学法是目前我国工业废水监测的主要手段,

而且主要有赖于 COD 等极少参数,对可能存在的关

键毒物及其去除效果均不清楚。  
20 世纪 90 年代,由美国 EPA 率先开发的复合污染环境样品的毒性鉴别方法——毒性鉴别评价法(Toxicity Identification Evaluation, TIE)得到广泛的应用,其实验程序不断得到完善<sup>[1]</sup>。该法是在进行化学分析之前,首先通过毒理实验对比样品经各种处理后毒性的变化,鉴定有毒化学组分存在并推断所存在毒物的理化特性和所属类别,然后将有毒组分有针对分离出来进行化学分析,从而简化水样的化学分析过

收稿日期:2008-09-25

基金项目:江苏省科技计划项目(BS2007050);南京大学研究生科研创新基金资助项目(2007CL11);江苏省环境监测科研基金项目(0710);江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(CX07B\_170z)

作者简介:王晓祎(1980—),女,博士生,主要研究方向为生态毒理学。  
E-mail:uptoyou66@sina.com

通讯联系人:于红霞 E-mail:yuhx@nju.edu.cn

程,显著降低分析费用和人力投入。TIE 程序由毒物特征实验(Phase I)、毒物鉴别(Phase II)和毒物确认实验(Phase III)3个阶段组成<sup>[2-4]</sup>。修正的 TIE 程序已经用于废水、地表水、地下水和沉积物间隙水中毒物的追踪<sup>[5-9]</sup>。

秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)是模式生物中最为简单、遗传和发育背景了解较为清楚的物种之一。秀丽隐杆线虫在试验条件下容易培养,对各种环境应激比较敏感,从卵发育到成虫只需 60 h 左右,可以在短时间内方便地观察到生殖能力、头部摆动频率、身体弯曲频率、体长等变化的多个亚致死效应指标。线虫毒性实验具有快速、简便、费用低廉等特点,因此线虫已成为生态毒性检测系统极具吸引力的生物<sup>[10]</sup>,已应用于重金属和有机化合物的毒性检测中<sup>[11-14]</sup>,适用于液体介质和沉积物毒性的检测<sup>[15]</sup>。

本文尝试引入模式动物线虫,并利用线虫多个亚致死效应指标检测追踪,经 TIE 毒物特性实验(Phase I)中的过滤、pH 调节和固相萃取(SPE,  $C_{18}$ )处理前后废水毒性的变化,初步判断废水中毒物的种类,并评价这一系列毒性检测方法是否适用于废水的生态毒性评价;利用 GC-MS 定性分析废水中有机污染物种类,以为废水毒性消减和有效控制有机毒物排放提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

Finnigan-MAT GC-MS(USA);旋转蒸发仪(上海亚荣);SPE  $C_{18}$  柱(1 g, 6 mL, Supelco 公司, USA);正己烷、二氯甲烷(农残级, Tedia 公司, USA);无水硫酸钠(农残级, Sigma 公司, 德国)。

秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)品系为野生型  $N_2$ ,由国际线虫遗传中心(CGC)赠送。

### 1.2 试验水样及其处理程序

试验水样为某农药厂废水处理设施的进水和经处理后的出水,水样到达实验室后立即进行基本水质参数的分析。基本水质参数分析表明:进水水样 pH10.25,电导率  $5.50 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\text{COD}_{\text{Cr}} 2578 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;出水水样 pH 7.18,电导率  $6.36 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\text{COD}_{\text{Cr}} 54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

试验水样在采集的当日按照 TIE 技术中的过滤、pH 调节、 $C_{18}$  柱萃取洗脱的处理程序分级分离进、出水,处理程序及所得样品编号参见图 1。具体处理过程如下:进出水各 1 500 mL 经  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜过滤,并将滤后进出水样分别分成 3 个 500 mL 水样。鉴于

进水 pH 太高,不利于 TIE 程序中的理化处理和生物实验,因此在通过  $C_{18}$  固相提取前分别将进水的 3 个 500 mL 水样的 pH 值分别调成 pH<sub>3</sub>、pH<sub>7</sub> 和 pH<sub>9</sub>;出水的 2 个 500 mL 水样的 pH 值分别调成 pH<sub>3</sub> 和 pH<sub>9</sub>,另 1 份 500 mL 出水 pH 保持不变(pH<sub>i</sub>)。将进出水各 3 个经 pH 调节的 500 mL 水样分别通过固相萃取小柱富集其中的有机物,使用前用甲醇和去离子水活化固相萃取柱;过柱流速约为  $3 \sim 5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,收集  $C_{18}$  柱后液,进水柱后液 pH 调至 pH<sub>7</sub>,出水柱后液 pH 调至出水初始 pH 值-pH<sub>i</sub>。并在当日将处理所得样品用于毒理试验。

将进出水各 500 mL 依次经过滤和固相萃取柱富集后得到的  $C_{18}$  萃取柱负压真空干燥后,用 50 mL 正己烷/二氯甲烷(4:1)淋洗。淋洗液经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  除水并旋转浓缩,轻柔氮气吹至 0.5 mL,  $-20^\circ\text{C}$  保存待仪器分析。

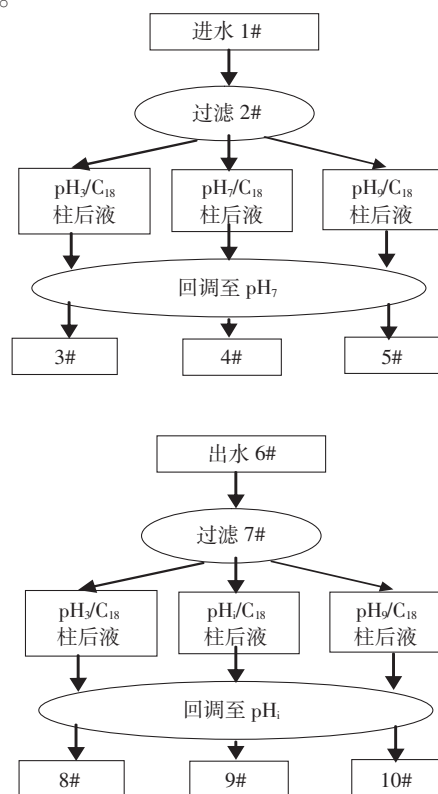


图 1 农药废水处理流程

Figure 1 Flow chart of TIE technique used in evaluating the pesticide plant wastewater

### 1.3 化学分析和毒性试验

#### 1.3.1 化学分析

仪器条件:色谱条件,DB-5HS 色谱柱,  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ 。进样口温度为  $260^\circ\text{C}$ ; 传输线温度为

260 ℃;程序升温为 60 ℃保持 2 min,以 4 ℃·min<sup>-1</sup> 的速度升至 280 ℃;载气为氦气,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,不分流进样,进样体积 2 μL。质谱条件,电离模式为电子轰击源(EI),能量为 70 eV;离子源温度为 210 ℃;电子倍增器电压为 1 300 V;质谱采样时间为 5~55 min;扫描方式为窗口确定和保留时间确定时使用全扫描模式(FULLSCAN),质量数为 25~600。

1.3.2 毒性暴露试验

秀丽线虫培养在含有大肠杆菌 OP50 的琼脂培养基(NMG)上,采用处于 L<sub>4</sub> 幼虫发育阶段的线虫进行毒性试验。试验在线虫培养的培养皿中进行。受试组每个培养皿中注入 200 μL 的水样,对照组不添加任何水样。同时设置 1 个对照组和 3 个平行受试组进行相关毒性试验。

后代数目、世代时间、寿命的测定方法参考 Swain 等的报道<sup>[16]</sup>。头部摆动频率和身体弯曲次数的测定方法参考 Tsalik 等的报道<sup>[17]</sup>。各对照组、暴露组的测定数目均为 15~20 条线虫。

1.4 数据处理

用 SPSS 统计软件(Version 10.0)进行分析,用 *t* 检验法对组间数据进行差异显著性分析。\* 表示 *P*<0.05,差异显著;\*\* 表示 *P*<0.01,样品与空白对照相

比差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 进、出水对线虫生命周期中多个生命指标的影响

生命周期的半致死数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;线虫世代周期和母体产卵数分别反映了线虫的生殖速度和生殖能力;线虫身体行为的改变主要依靠其头部摆动频率和身体弯曲次数进行表征。将线虫暴露于进出水及其相应 TIE 程序处理水样(1#~10#)中,观察线虫生命周期、世代周期、母体产卵数、头部摆动频率和身体弯曲频率等多个生命指标的变化,结果见表 1 和表 2。

为了探明废水中引起毒性的有机污染物种类,我们将毒性效应指标检测贯穿于 TIE 程序的不同理化处理过程中,并通过对比处理前后样品毒性的消减,推断所存在毒物的种类。表 1 的结果显示,进水原水(1#)能够影响线虫生命周期的急性致死和亚致死多项指标,经过滤后的 2# 水样除对线虫的生命周期有显著影响外,对其生殖和行为则无显著影响,这说明进水中存在颗粒态毒物。进水经 pH<sub>3</sub> 调节/C<sub>18</sub> 富集,柱后液被调回至 pH<sub>7</sub> 的 3# 水样,能够明显影响线虫的生命周期、世代周期和产卵数目 3 种毒理学效应指

表 1 进水及其处理水样对线虫生命周期、生殖和行为的影响  
Table 1 Effects of input water from a pesticide plant and treated samples on the life span, procreation and behavior of *C.elegans*

| 毒性效应指标 |                            | 进水( $\bar{x}\pm SD$ ) |           |           |           |            |           |
|--------|----------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
|        |                            | 空白对照 $\bar{x}\pm SD$  | 1#        | 2#        | 3#        | 4#         | 5#        |
| 生命周期   | 半致死天数/d                    | 11.2±0.8              | 9±0.2*    | 7.5±0.1*  | 6.5±0.3*  | 9.5±0.8    | 10±0.2    |
|        | 世代周期/h                     | 64.7±0.65             | 66.8±1.5* | 66.8±0.76 | 66.8±1*   | 67.7±0.29* | 67±0.5*   |
|        | 产卵数目/个                     | 241±37                | 95±15**   | 223±23    | 139±16*   | 153±37     | 171±12    |
| 行为     | 头部摆动频率/次·min <sup>-1</sup> | 137±12                | 79±12*    | 121±16    | 108±15    | 116±4      | 127±15    |
|        | 身体弯曲次数/次·min <sup>-1</sup> | 17.3±2.08             | 9±2.64*   | 12.7±3.51 | 12.6±1.53 | 12.3±2.08  | 14.3±2.08 |

注:\* 表示 *P*<0.05,\*\* 表示 *P*<0.01,下同。

表 2 出水及其处理水样对线虫生命周期、生殖和行为的影响  
Table 2 Effects of output water from a pesticide plant and treated samples on the life span, procreation and behavior of *C.elegans*

| 毒性效应指标 |                            | 出水( $\bar{x}\pm SD$ ) |            |           |          |          |            |
|--------|----------------------------|-----------------------|------------|-----------|----------|----------|------------|
|        |                            | 空白对照 $\bar{x}\pm SD$  | 6#         | 7#        | 8#       | 9#       | 10#        |
| 生命周期   | 半致死天数/d                    | 11.2±0.8              | 9.5±0.3*   | 12±0.5    | 8.5±0.4* | 7.5±0.3* | 5.5±0.4**  |
|        | 世代时间/h                     | 64.7±0.65             | 63.8±3.8   | 60.7±0.35 | 65±0.29  | 62±2     | 61.5±0.5** |
|        | 产卵数目/个                     | 241±37                | 99±40*     | 108±9*    | 221±5    | 134±13*  | 193±38     |
| 行为     | 头部摆动频率/次·min <sup>-1</sup> | 137±12                | 111±14     | 130±12    | 139±3    | 115±5    | 113±6      |
|        | 身体弯曲次数/次·min <sup>-1</sup> | 17.3±2.08             | 9.33±0.58* | 18.3±3.21 | 12±2     | 11±1     | 17.3±2.52  |



标;经  $\text{pH}_7$  调节/ $\text{C}_{18}$  富集的柱后液(4#)和经  $\text{pH}_9$  调节/ $\text{C}_{18}$  富集柱后液被调回至  $\text{pH}_7$  的处理水样(5#)仅引起1种毒理学效应变化。由此推测,1#~5#水样毒性大小顺序为:进水(1#)>酸性  $\text{C}_{18}$  柱后液(3#)>>碱性  $\text{C}_{18}$  柱后液(5#)≈过滤液(2#)≈中性柱后液(4#)。

出水毒性较处理前的进水有所削减,并且出水经滤膜过滤去除颗粒态污染物后(7#),毒性效应明显下降,5个毒性指标均未产生显著性变化,表明出水中也存在颗粒态毒物。直接经  $\text{C}_{18}$  柱富集的柱后液(9#)和经  $\text{pH}_3$  调节/ $\text{C}_{18}$  柱富集柱后液毒性与滤后水(7#)相比,毒性变化不大;但经  $\text{pH}_9$  调节/ $\text{C}_{18}$  柱富集柱后液毒性较滤后水变大,对线虫半致死天数和世代周期均产生了显著影响。上述进出水经过滤、 $\text{pH}$  调节和固相萃取(SPE,  $\text{C}_{18}$ )程序处理后样品毒性试验结果的变化均表明,颗粒态毒物对进出水的毒性有一定的贡献率;进水中含有易受酸性调节影响的碱性有机毒物,出水中含有易受碱性调节影响的酸性有机毒物。

从检测指标的敏感性来看,不同亚致死指标的敏感性不同。从表1的结果来看,线虫对进水及其4种处理后共5个样品中有4个样品可对线虫的世代周期产生影响,而对线虫的行为指标——头部摆动频率和身体弯曲次数大都没有显著影响。这说明线虫对进水及其4种处理后水样的亚致死效应最敏感指标为线虫世代周期,头部摆动和身体弯曲行为是最不敏感的指标。表2则揭示,对出水及其4种处理后水样的亚致死效应最敏感指标为产卵数目,头部摆动和身体弯曲行为仍然是最不敏感的指标。

## 2.2 进、出水中有机毒物的 GC-MS 分析

线虫一系列亚致死指标检测结果说明进出水中含有有毒有机物,因此将进出水  $\text{C}_{18}$  柱萃取并洗脱的浓缩液进行 GC-MS 分析,追踪其中可能存在的有毒有机物就显得尤为必要。进出水经 GC-MS 定性分析,进水中检测出40多种有机化合物,出水中检出20多种;从 GC-MS 图谱库检索结果来看,进出水中共检出的卤代烃类、氯苯类、硝基苯类、取代酚类和邻苯二甲酸酯类有机化合物;根据同种化合物的峰高响应可知,进水中的浓度稍低于出水中的浓度。

综合线虫毒性检测和 GC-MS 分析结果,进水经  $\text{pH}$  酸性调节的  $\text{C}_{18}$  柱后液毒性变化较大,推断其中的机制可能是  $\text{C}_{18}$  是非极性疏水固定相,而在碱性条件下,酸性物质如酚类主要以离子态存在,易溶于水易穿透  $\text{C}_{18}$  柱,碱性物质如苯胺类常以分子态存在,

易被  $\text{C}_{18}$  柱吸附而去除,当碱性柱后液被调回至  $\text{pH}_7$  时,酸性有机物将保持其特定  $\text{pH}$  下的分子与离子比例形态,未被吸附的碱性分子态有机物也据其  $\text{pK}_a$  值转变成分子-离子共存态,通过这样一系列的物理和化学过程,不难看出碱性有机污染物可能是进水中重要的毒作用贡献者。当然,还需要通过其他试验来进一步确认这一结果。

## 3 结论

本研究表明,由于不同类型的废水所含化合物种类和性质迥异,因此对废水的评价不应仅仅局限于1~2种生物检测方法,或是仅仅依靠化学分析进行。为得到对废水生物效应的全面评价,引入多种生物检测方法也是很有必要的。研究结果表明,线虫的多个亚致死效应检测方法适用于农药废水的毒性检测;线虫的一系列亚致死检测指标中世代周期是对进水最敏感的指标,产卵数目标标是对出水最敏感的指标;身体弯曲和头部摆动身体行为指标是最不敏感的指标。当然考虑到系列生物检测方法的外推性,对不同类型废水的生物检测,可根据研究的目的,有针对性地选择不同的生物检测方法。

毒物特性程序的应用,初步揭示了该农药厂废水进水毒性主要来源是易受酸性调节影响的有机毒物,出水毒性主要来源是易受碱性调节影响的有机毒物。进出水中颗粒物的毒性贡献率也不容忽视,在今后的研究中应重视水中颗粒物分析和毒性检测。

本研究中只应用毒性鉴别评价方法中的毒物特征程序对废水中的有机物毒性进行了追踪,为全面了解废水的毒性,在今后的研究中应同时结合 TIE 经典方法中通过添加 EDTA、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、梯度  $\text{pH}$  调节等处理程序同时追踪废水中的重金属、易氧化物质和易受  $\text{pH}$  影响的物质,确认这些物质是否也对毒性有贡献。

## 参考文献:

- [1] Norberg-King T J, Mount D, Amato J R, et al. Toxicity identification evaluation: characterization of chronic toxic effluents, phase I. EPA/600/6-91/005. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, 1991.
- [2] Norberg-King T J, Mount D, Durhan E, et al. Methods for aquatic toxicity identification evaluation: phase I. toxicity characterization procedures, 2nd edition. EPA/600/6-91/003. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, 1991.
- [3] Durhan E J, Norberg-King T J, Burkhard L P. Methods for aquatic toxicity identification evaluation: phase II. Toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity. EPA/600/R-92/080.

- US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, 1993.
- [4] Mount D I, Norberg-King T J. Methods for aquatic toxicity identification evaluation; phase III. toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity. EPA/600/R-92/081. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA, 1993.
- [5] Mount D R, Hockett J R. Use of toxicity identification evaluation methods to characterize, identify, and confirm hexavalent chromium toxicity in an industrial effluent[J]. *Water Res*, 2000, 34: 1379-1385.
- [6] Yang L, Yu H, Yin D, et al. Application of the simplified toxicity identification evaluation procedures to a chemical works effluent[J]. *Chemosphere*, 1999, 38: 3577-3671.
- [7] Reineke N, Bester K, Huhnerfuss H, et al. Bioassay-directed chemical analysis of River Elbe surface water including large volume extraction-sand and high performance fractionation[J]. *Chemosphere*, 2002, 47: 717-723.
- [8] Gustavson K E, Sonstagen S A, Crunkilton R A, et al. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses[J]. *Environ Toxicol*, 2000, 15: 421-430.
- [9] Carr R S, Nipper M, Biedenbach J M, et al. Sediment toxicity identification evaluation (TIE) studies at marine sites suspected of ordnance contamination[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 41, 298-307.
- [10] Reichert K, Menzel R. Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray[J]. *Chemosphere*, 2005, 61(2): 229-237.
- [11] Boyd W A, Williams P L. Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2003, 22(11): 2768-2774.
- [12] Tominaga N, Kohra S, Iguchi T, et al. Effects of perfluoro organic compound toxicity on nematode *Caenorhabditis elegans* fecundity[J]. *J Health Sci*, 2004, 50(5): 545-550.
- [13] Hasegawa K, Miwa S, Tsutsumiuchi K, et al. Extremely low dose of acrylamide decreases lifespan in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 152(2): 183-189.
- [14] Tominaga N, Kohra S, Iguchi T, et al. A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Health Sci*, 2003, 49(6): 459-463.
- [15] Traunspurger W, Haitzer M, Hoss S, et al. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda)-a method for testing liquid medium and whole-sediment samples[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1997, 16(2): 245-250.
- [16] Swain S C, Keusekotten K, Baumeister B, et al. *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis[J]. *J Mole Bio*, 2004, 341(4): 951-959.
- [17] Saeki A, Yamamoto M, Iino Y. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Experi Bio*, 2001, 204(10): 1757-1764.