

化工废水中非挥发性有机污染物 对鱼类危害的研究

中国水产科学研究院
珠江水产研究所环保室
一九九四.七

课题组人员名单

主持人：余瑞兰 郭叶华

成 员：蔡 荔^{*} 杜永记^{*} 叶美茜

^{*} 1993年已调离本单位

参加工作的还有关耀初

目 录

一、课题总试验报告

(一) 前言

(二) 材料与方法

(三) 试验结果

1. 化工废水中有机成份GC/MS/DS分离鉴定

2. 四种化工废水对鱼类急性毒性

3. 四种化工废水中非挥发性有机污染物对鱼类的慢性毒性

① 鱼类胚胎发育的毒性影响

② 鱼苗生长发育毒性影响

③ 鱼类免疫功能的影响

④ 鱼类酶(碱性磷酸酶)活力的影响

⑤ 鱼类组织器官病理分析

4. 四种化工废水中非挥发性有机污染物对鱼类饵料生物生长繁殖的毒性影响

5. 四种化工废水中非挥发性有机污染物致突变性试验

① 体外基因致突变试验: Ames法, SOS显色法

② 体内细胞微核试验: 鱼类外周血红细胞微核率

(四) 结束语

(五) 参考文献

二、专题研究论文

1. 化工废水中有机污染物的分析(待发表)

2. 印染、合成橡胶、炼油、塑料四种工业废水对淡水养殖鱼类的危害

珠江水产(20) 1994

3. 化工废水中非挥发性有机浓集物对鱼类胚胎发育的影响 珠江水产(20) 1994

4. 化工废水中非挥发性有机污染物对鱼类的危害——鱼类生长发育、免疫功能、酶活力的毒性影响 珠江水产(20) 1994

5. 化工废水中非挥发性有机污染物对鱼类饵料生物的毒性影响 珠江水产(20) 1994

6. 化工废水中非挥发性有机污染物致突变性的研究 癌变, 畸变, 突变 6(6) 1994

《化工废水中非挥发性有机污染物对鱼类危害的研究》是农业部重点课题之一(渔85-91-11-04), 科研时间为三年(91-93年)。

前 言

六十年代各国面临严峻和突出的问题是有毒无机物特别是重金属对环境的污染; 随着重金属污染问题的逐步控制和渐趋缓和, 从八十年代起有毒有机物对环境的污染成为世界上日益尖锐迫切而必需认真对待的问题。

现今世界上天然与合成的化合物多达400多万种, 常见的约7万多种, 而每年新合成的化合物约1000种以上, 在这品种繁多的化合物中, 有机化合物的数量最多, 这些有机化合物通过各种渠道进入环境中, 给生态环境造成极大的危害, 成为当今世界“三大环境问题”之首; 经济发达国家在70年代已相继颁布了控制排放的“黑色”污染物名单, 1977年美国环保局(简称EPA)颁布129种优先控制的污染物, 其中114种为有机物(占总数88.4%), 可能引起三致(致畸、致突、致癌)作用的有机物约占一半; 中国环境监测总站于八十年代也提出了中国环境优先监控的“黑名单”共68种, 其中有毒有机物58种(占总数85.29%)。

实践证明, 进入水环境的有机污染物有些在短期内对生物机体造成急性毒性危害, 而相当部分在水中含量低, 短时间内对生物无明显的毒性影响, 但由于食物链的浓缩放大, 由量变到质变引起中毒; 有一部分有机污染物以低浓度长期持续侵入机体经过

一定的潜伏期后显露慢性毒性危害，产生“三致”或遗传缺陷；还有一些有机污染物在环境中虽浓度很低，但有强烈的“三致”作用。

现已查明，不少工业发达国的淡水湖泊中的高等水生生物特别是底栖鱼类常出现畸变或癌变⁽¹⁾；我国沱江也检出 173 种有机污染物，其中 11 种属美国 EPA 优先监控之列，有多种有“三致”作用⁽²⁾；第二松花江的鱼体检出 57 种有机污染物，其中 21 种为“三致”危险物，这些有机物在鱼肉的富集系数平均为 7.8×10^2 ⁽³⁾；因此，当前普遍采用的常规评价方法，以 COD、BOD 等指标代表水中的有机污染程度的方法已不能反映水污染的实质。

在生命科学的研究深入到分子水平的今天，人类对有毒有机物的认识已从形态学的范畴深入到化学组成，从量与作用关系上更准确地认识和区别，对毒性的研究已不限于能引起明显的急性和慢性毒性的研究，还包括一些引起“三致”作用的遗传毒理学研究，研究有机毒物的远期效应。

鉴于目前渔业环境保护工作深入发展的需要，以及江河湖泊有些名特鱼类品种出现濒危绝迹或品质劣化等现象，本课题对化工废水中非挥发性（即不能随水蒸气挥发）有机污染物进行较系统的环境毒理学以及遗传毒理学研究，并应用色谱质谱联用技术分离鉴定废水中的有机成份，以探讨水域有机污染对水生生物产生的危害及其机理，为全面制订渔业水质标准和化工废水的排放标准以及有机污染治理对策，发展渔业生产尤其是名特优品种的优育提供科学依据。

材料和方法

一、试验生物：

1. 白鲢 *Hypophthalmichthys molitrix* (受精卵; 鱼种体长3.7-5.2厘米, 体重0.8-1.0克);

2. 草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* (受精卵; 鱼种体长2.6-5厘米, 体重0.3-0.7克);

3. 野鲮 *Labeo rohita* (鱼种体长2.5-3.2厘米, 体重0.4-0.5克);

4. 东北鲫鱼 *Carassius auratus gibelis* (鱼种体长3-7厘米, 体重0.35-4克; 成鱼体长14-19厘米, 体重150-250克);

5. 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* TA₉₈, TA₁₀₀;

6. 大肠杆菌 *Escherichia Coli* PQ₃₅, PQ₃₇;

7. 溶壁微球菌 *M. Lysodeikeicus*

8. 方形网纹溞 *Ceriodaphnia quadrangula*

9. 斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus*

二、化工废水种类：

印染工业废水、炼油工业废水、合成橡胶工业废水、塑料工业废水；以上废水均取自工厂废水处理池排水口或排水沟。

三、试验方法：

1. 废水中非挥发性有机污染物的富集基本按王家玲等人的方法⁽⁴⁾，用大孔树脂(DA4)吸附，有机溶剂洗脱，浓缩干燥。

2. 有机成分的分离鉴定：

应用GC/MS/DS 联用技术。

3. 鱼类急性毒性试验：基本按周永欣等人的方法⁽⁵⁾采用

换水式(24h全换试液)进行试验,结果用 LC_{50} (24、48、96h)表示化工废水的急性毒性。

4. 鱼类亚急性和慢性毒性试验:

(1). 鱼类胚胎发育毒性试验:按周永欣等人的方法⁽⁵⁾进行,试验结果以胚胎的孵化率、畸形率、存活率表示。

(2). 鱼苗的生长发育试验基本按周永欣等人的方法⁽⁵⁾,每天更换试液1/3,定量投喂红虫,结果以生长率表示。

(3). 鱼类非特异性免疫功能测定,基本按温天佑等人的方法⁽⁶⁾,采用琼脂平板法,结果以溶菌酶活性表示。

(4). 鱼类碱性磷酸酶(AKP)活力测定按《临床生化检验》⁽⁷⁾ β -甘油磷酸法。

(5). 鱼类组织器官病理分析:活体解剖取中毒鱼的肝和鳃,按常规生物组织切片制作程序制片,观察细胞和组织器官的形态结构变化。

5. 鱼类饵料生物(溞类、藻类)生长繁殖毒性试验:

(1). 方形网纹溞生活周期毒性试验,参照庄德辉等人的方法进行⁽⁸⁾,试验结果以产溞胎数、幼溞总数等指标表示毒性影响程度。

(2). 斜生栅藻毒性试验基本按《环境监测技术规范》进行⁽⁹⁾,试验结果以半数有效浓度(EC_{50})和生长率表示毒性影响的大小。

6. 致突变试验:

(1). 体外基因突变试验:

Ames法按1983年Ames新修订的方法⁽¹⁰⁾,选用 TA_{98} 、 TA_{100} 两菌株在加与不加 S_0 活化系统的条件下采用平板掺入法,试验结果以回变率(MR)表示, $MR > 2$ 并呈现剂量反应关系为阳性结果。

SOS显色法参照陈中孚等人的方法⁽¹¹⁾, 选用PQ₉₅、PQ₉₇两菌株在加与不加S₀条件下进行诱变试验, 结果用光密度计算诱导系数(R), 当R>2并呈现剂量关系为阳性反应。

(2). 体内细胞微核试验: 参照刘爱华等人的方法⁽¹²⁾, 选用淡水养殖敏感品种东北鲫鱼为试验材料, 结果以外周血红细胞微核率表示。

试验结果

(试验结果详见各专题研究论文)

一、化工废水有机成份分离鉴定结果 (见表 1)

四种化工废水的有机污染物用大孔树脂富集, 经GC/MS/DS分离鉴定, 结果如下:

1. 印染废水检出13类以上共58种有机化合物, 其中有联苯胺等10种属美国EPA129种优先监控污染物之列。

2. 炼油废水检出11类以上共65种有机化合物, 其中有苯等9种属美国EPA监控之列。

3. 合成橡胶废水检出10类以上共42种有机化合物, 其中有七氯丁二烯等7种属美国EPA监控之列。

4. 塑料废水检出7类以上共37种有机化合物, 其中有邻苯二甲酸二(2-乙基)乙酯等8种属美国EPA监控之列。

二、四种化工废水 (原液) 对鱼类的急性毒性

废水的主要理化性状

废水名称	pH值	溶氧(mg/l)	化学耗氧(mg/l)	感 观
炼油	6.9	3.81	6.59	色呈淡黄褐色, 有油污味
印染	11.6	1.2	>10000	有大量紫红色沉淀物
合成橡胶	12.0	<0.5	>10000	浓稠乳白色, 有豆浆味
塑料	7.1	3.1	29.8	有浅黄褐色沉淀物和油污

表2. 四种工业废水(原液)对鱼类的急性毒性

废 水 名 称	炼油废水			印染废水			合成橡胶废水			塑料废水		
	24	48	96	24	48	96	24	48	96	24	48	96
小时 Lc50 (%) 鱼 名												
东北鲫鱼	35.3	32.7	29.6	10.0	6.8	4.9	0.62	0.53	0.50	--	98.1	86.2
草 鱼	30.3	26.6	24.1	7.6	6.6	4.2	0.59	0.51	0.47	--	100	92.0
白 鲢	29.0	25.2	21.9	5.6	4.0	3.2	0.36	0.35	0.34	100	96.4	90.0
野 鲮	32.3	27.2	25.1	6.6	5.6	4.2	0.35	0.34	0.32	--	98.2	87.8

由表 2 看出，合成橡胶废水对四种鱼的急性毒性最大，96h Lc_{50} 为 0.32%；其次是印染废水，96h Lc_{50} 为 4.23%；塑料废水的急性毒性最小，其 96h Lc_{50} 为 87.8%；四种化工废水对鱼类急性毒性大小顺序依次为：合成橡胶 > 印染 > 炼油 > 塑料。

三、鱼类慢性毒性试验结果

1. 鱼类胚胎发育毒性试验结果：

表 3. 白鲢、草鱼胚胎的起始半致死浓度

废水名称 \ 鱼名	白 鲢	草 鱼
合成橡胶废水	9.7%	12.5%
炼 油 废 水	19.0%	17.2%
印 染 废 水	59.2%	69.6%

由表 3 看出，四种化工废水中的有机污染物对两种胚胎的毒性以合成橡胶最大，其对白鲢、草鱼胚胎的起始半致死浓度分别为 9.7% 和 12.5%；四种化工废水对胚胎发育的毒性影响依次为橡胶 > 炼油 > 印染 > 塑料。

表 4. 草鱼、白鲢胚胎致毒试验结果 水温：25-29℃

废水名称	印 染 废 水				塑 料 废 水				合成橡胶废水				炼 油 废 水			
	浓度 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)	存活率 (%)	浓度 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)	存活率 (%)	浓度 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)	存活率 (%)	浓度 (%)	孵化率 (%)	畸形率 (%)	存活率 (%)
草 鱼	100	0.0	—	—	100	88.0	8.0	95.5	32	0.0	—	—	32	0.0	8.0	—
	80	34.0	0.0	52.9	80	90.0	4.0	100	16	24.0	20.0	58.3	16	82.0	6.0	47.9
	40	82.0	0.0	92.6	60	88.0	2.0	100	8	86.0	8.0	97.7	8	88.0	8.0	84.2
	20	86.0	0.0	95.4	40	88.0	2.0	94.7	4	92.0	6.0	100	4	90.0	0.0	97.8
	10	92.0	0.0	93.5	20	92.0	0.0	100	2	88.0	2.0	97.7	2	92.0	2.0	95.5
	0.0	95.0	0.0	100	0.0	95.0	0.0	100	0.0	95.0	0.0	100	0.0	95.0	0.0	100
白 鲢	100	8.0	0.0	50.0	100	82.0	13.0	87.0	32	0.0	—	—	32	0.0	—	—
	80	22.0	0.0	54.6	80	88.0	8.7	88.0	16	0.0	—	—	16	48.0	10.6	0.0
	40	80.0	0.0	87.5	60	88.0	8.7	86.4	8	92.0	6.5	82.6	8	90.0	10.6	64.4
	20	92.0	0.0	87.0	40	94.0	4.3	85.3	4	92.0	0.0	91.3	4	96.0	4.3	79.2
	10	94.0	0.0	93.8	20	96.0	4.3	87.6	2	96.0	4.3	90.0	2	96.0	2.2	87.6
	0.0	94.0	0.0	89.6	0.0	94.0	0.0	89.6	0.0	94.0	0.0	89.6	0.0	94.0	0.0	89.6

注：1. 浓度即为有机浓度相当原废水的百分含量；

2. 孵化率、畸形率、存活率的计算方法如下：

$$\text{孵化率} = \frac{\text{仔鱼孵出数}}{\text{受精卵数}} \times 100\% ; \quad \text{畸形率} = \frac{\text{畸形胎数}}{\text{受精卵数}} \times 100\% ;$$

$$\text{存活率} = \frac{\text{进入螺形成期仔鱼数}}{\text{仔鱼孵出数}} \times 100\% ;$$

由表 4 看出，四种化工废水中的有机污染物对白鲢、草鱼胚胎的孵化率、畸形率和存活率均有不同程度的毒性影响；

孵化率以橡胶、炼油废水浓集物的毒性影响最大，16%的橡胶废水即中止白鲢胚胎发育，孵化率为 0，草鱼胚胎孵化率只有 24%；32%的炼油废水中止两种胚胎发育，孵化率均为 0。

畸形率同样以炼油、橡胶废水中的有机污染物毒性最大；2%的废水均对胚胎发育产生致畸作用，8%炼油废水分别致使白鲢、草鱼胚胎产生 10.6% 和 8.0% 的畸形率，8%的橡胶废水分别致使白鲢、草鱼胚胎产生 6.5% 和 8.0% 的畸形率；除印染废水外，其余三种废水的致畸作用均呈现剂量效应关系；畸形胎以围心腔膨大、尾部短缺或弯曲为主（见专题研究论文附图）。

存活率：出膜后的胚体由于废水的毒性出现不同程度的死亡现象，死亡率与浓度呈正相关关系，8%的炼油废水中，白鲢、草鱼胚胎的存活率分别为 64.4% 和 84.2%，16%白鲢和草鱼的存活率分别为 0 和 47.9%；塑料废水对两种胚胎的存活无明显的毒性影响。

2. 鱼苗生长发育毒性试验结果（见表 5）

四种化工废水中的有机污染物在一定的浓度范围内对草鱼、野鲮鱼苗的生长发育有抑制作用，其中以炼油、印染废水的抑制作用较大，合成橡胶和塑料废水次之。

草鱼苗在 15%，30%炼油废水、印染废水的有机污染物作用下，经 20 天后其生长率分别下降 46.26%、89.68% 和 33.83%、43.87% 在 40% 合成橡胶废水和塑料废水有机污染物作用下，20 天后其生长率分别下降 48.40%、46.84%；而两种废水含量 20% 对草鱼苗的生长发育影响不大。

表5. 草鱼、野鲮鱼苗生长情况统计

鱼名	废水名称	废水浓度 (%)	试验时间 (天)	鱼尾数	鱼存活率 (%)	平均每尾鱼增加体重 (克)	生长率	生长率下降百分率 (%)
草 鱼	对照	0	20	20	100	0.83	0.0281	
	炼油	15	20	20	95	0.30	0.0151	46.26
		30	20	20	95	0.10	0.0029	89.68
	橡胶	20	20	20	100	0.73	0.0254	9.61
		40	20	20	90	0.21	0.0145	48.40
	对照	0	20	20	100	0.92	0.0269	
	印染	15	20	20	90	0.67	0.0178	33.83
		30	20	20	90	0.23	0.0151	43.87
	塑料	20	20	20	100	0.86	0.0263	2.23
		40	20	20	95	0.34	0.0143	46.84
野 鲮 鱼	对照	0	20	20	95	0.82	0.0318	
	炼油	15	20	20	95	0.42	0.0251	21.07
		30	20	20	90	0.15	0.0159	50.0
	橡胶	20	20	20	100	0.79	0.0303	4.72
		40	20	20	100	0.26	0.0111	65.09
	对照	0	20	20	95	0.76	0.0270	
	印染	15	20	20	100	0.70	0.0254	5.93
		30	20	20	90	0.28	0.0096	64.44
	塑料	20	20	20	100	0.81	0.0280	(上升)
		40	20	20	95	0.51	0.0197	27.04

注：废水浓度为富集物相当废水的百分含量（以下均相同）

表6. 血清溶菌酶活力测定结果

鱼类名称	废水名称	染毒时间 (小时)	浓度 (%)	酶活力 (微克/毫升)	方差分析	P
东北 鲫鱼	炼油	48	对照	10.57 ± 1.68	$F_{0.05}=3.38$	$P < 0.01$
			20.0	13.85 ± 1.83	$F_{0.01}=5.42$	
			40.0	18.05 ± 1.60	$F=33.79$	
	合成橡胶	48	对照	10.16 ± 1.60	$F_{0.05}=5.14$	$P < 0.01$
			30.0	15.06 ± 1.08	$F_{0.01}=10.92$	
			60.0	15.30 ± 1.04	$F=18.18$	
	印染	48	对照	10.74 ± 1.22	$F_{0.05}=5.14$	$P < 0.05$
			20.0	10.88 ± 0.46	$F_{0.01}=10.92$	
			40.0	12.86 ± 1.01	$F=5.36$	
		96	20.0	9.10 ± 0.44	$F=2.30$	$P > 0.05$
			40.0	9.34 ± 1.18		
	塑料	48	30.0	9.70 ± 1.23	$F=2.07$	$P > 0.05$
			60.0	9.02 ± 0.53		

野鲮鱼苗在 15%、30% 炼油废水, 30% 印染废水, 40% 合成橡胶和塑料废水中有机污染物作用下, 其生长发育同样有明显的抑制作用。

3. 鱼类非特异性免疫功能试验结果

免疫功能是机体重要的保护性防御机能, 外来化合物对机体的损害作用常影响免疫功能, 其影响包括兴奋诱导 (增高) 和消退抑制 (下降) 两个方面; 由表 6 可见, 东北鲫鱼在炼油、合成橡胶、印染废水中的有机污染物作用 48 小时后其血清溶菌酶活性升高,

即免疫功能产生兴奋诱导，但印染废水继续作用 96 小时后，东北鲫鱼的免疫功能消退抑制；塑料废水对免疫功能的影响在 48 小时内不显著。

4. 鱼类血清碱性磷酸酶测定结果

表7. 碱性磷酸酶活力测定结果

鱼类名称	废水名称	染毒时间 (小时)	浓度 (%)	酶活力 (鲍氏单位/100ml血清)	酶活力下降 %
东北鲫鱼	空白对照			18.64 ± 1.62	
	炼油	48	20.0	5.16 ± 1.60	72.32
			40.0	5.54 ± 2.73	70.28
	合成橡胶	48	30.0	13.32 ± 1.37	28.36
			60.0	5.14 ± 1.84	72.42
	空白对照			25.58 ± 0.92	
	印染	48	20.0	18.21 ± 1.34	28.81
			40.0	18.15 ± 0.72	29.05
		96	20.0	10.65 ± 2.20	58.37
			40.0	5.28 ± 3.16	79.36
	塑料	48	30.0	14.62 ± 1.70	42.85
			60.0	12.05 ± 1.36	52.89

由表 7 看出，四种化工废水中的有机污染物对东北鲫鱼血清碱性磷酸酶的活力均有毒性影响；炼油、橡胶、塑料废水染毒 48 小时后酶活力大幅度下降，降幅随浓度升高而增大；印染废水的毒性需经过 96 小时的染毒才有明显的抑制作用。

血清碱性磷酸酶活力变化说明，鱼体的细胞生物膜受损害，肝、肾生理功能失常。

5. 鱼类组织器官毒性影响病理分析结果

东北鲫鱼分别经过四种废水有机提取物浸泡染毒七天后，肝

脏切片可见清晰的肝细胞膜，胞浆较疏松，肝细胞完整，未见明显的病变。25%炼油、印染废水，50%橡胶、塑料废水对鱼鳃均产生明显的损伤作用，部分鳃小片排列紊乱、肿胀、糜烂或消失，有部分鳃小片上皮细胞脱落、鳃片结缔组织高度疏松，有轻度炎症细胞浸润（详见专题研究论文附图）。

四、^蚤鱼料饵料生物生长繁殖试验结果

1. 方形网纹蚤生活周期毒性试验结果：

由表8、9可见，四种废水中的有机污染物对方形网纹蚤的生长繁殖有毒性影响，影响程度随废水浓度加大而升高，并呈现浓度效应关系；四种废水中以炼油、印染、合成橡胶废水的影响较大，塑料废水次之；以七天一生活周期产幼蚤总数为统计指标，炼油、橡胶、印染、塑料废水对网纹蚤生长繁殖的无影响浓度依次为：12.5%、20.0%、12.5%、31.5%；最大允许浓度依次为：12.5-20.0%、20.0-31.5%、12.5-20.0%、31.5-50.0%。

2. 斜生栅藻毒性试验结果

由表10看出，炼油、合成橡胶、印染、塑料四种废水含有机物对斜生栅藻生长繁殖的半数有效浓度依次为：52.2%、67.8%、38.12%、67.55%，以印染废水的毒性影响较大，炼油废水次之；定量的藻细胞培养于定量的不同浓度的富集物中，经七天的培养结果高浓度对藻细胞有明显的毒性影响，31.5%炼油废水、79.0%合成橡胶、31.5%印染废水、50.0%塑料废水中有机成分影响藻体的正常发育，其生长率分别下降为对照组的62.8%、34.7%、63.93%、67.85%，差异非常显著（ $P < 0.01$ ）。