

Toxic Effects of Simulated Printing and Dyeing Wastewater on *Ruditapes philippinarum*

Xiping Zhou^{1,2}, Huaiyang Chen¹, Yaqi Huang¹

¹School of Environmental Science and Engineering, Xiamen University Tan Kah Kee College, Zhangzhou Fujian

²Key Laboratory of Estuarine Ecological Security and Environmental Health, Fujian Province University, Tan Kah Kee College, Zhangzhou Fujian

Email: zoeyzhou@xujc.com

Received: Mar. 3rd, 2017; accepted: Mar. 19th, 2017; published: Mar. 22nd, 2017

Abstract

To evaluate the toxicity effect and metabolic effect of printing and dyeing wastewater to marine life, the 24 h acute toxicity tests and 9 h static respiratory metabolism tests were conducted with *Ruditapes philippinarum*, exposing under different concentration of methylene blue solution which represented simulated printing and dyeing wastewater, in order to provide a reference for the establishment of printing and dyeing wastewater discharge standards. The 24 h acute toxicity tests showed that the lethal concentration of 50% (LC₅₀) was 8.56 mg/L concerning simulated printing and dyeing wastewater to the *Ruditapes philippinarum*. Respiratory metabolism study showed that the concentration of methylene blue was inversely proportional to the oxygen consumption rate of *Ruditapes philippinarum*, while ammonia nitrogen content in the water got higher along with time variation, and ammonia nitrogen content increased with increasing concentration of methylene blue during the same periods in the water.

Keywords

Methylene Blue, *Ruditapes philippinarum*, Acute Toxicity, Metabolism

模拟印染废水对菲律宾蛤仔的毒性作用

周细平^{1,2}, 陈淮阳¹, 黄亚奇¹

¹厦门大学嘉庚学院环境科学与工程学院, 福建 漳州

²厦门大学嘉庚学院河口生态安全与环境健康福建省高校重点实验室, 福建 漳州

Email: zoeyzhou@xujc.com

收稿日期: 2017年3月3日; 录用日期: 2017年3月19日; 发布日期: 2017年3月22日

摘要

为有效评价印染废水对海洋生物的毒性效应和代谢作用影响, 本研究以菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)为受试生物, 以不同浓度的亚甲基蓝溶液模拟印染废水, 试验采用静水法分别研究其对菲律宾蛤仔的24 h急性毒性效应和9 h内对菲律宾蛤仔的呼吸代谢影响, 以为印染废水排放相关标准的制定提供参考。急性毒性研究表明: 模拟印染废水对菲律宾蛤仔24 h的半数致死浓度 LC_{50} 为8.56 mg/L。呼吸代谢研究表明: 亚甲基蓝浓度与菲律宾蛤仔的耗氧率成反比, 水体中氨氮含量随着时间的推移越来越高, 相同时间段水体中的氨氮含量随着亚甲基蓝的浓度增加而增加。

关键词

亚甲基蓝, 菲律宾蛤仔, 急性毒性, 代谢作用

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

进入21世纪以来, 我国染料和印染工业发展迅速, 染料产品的年产量已达90万t, 占全球总产量的60%左右[1]。随着染料废水排放量的迅速增加, 大量难以生化降解处理的有机物污染物被排放进入水体, 造成了严重的水体污染。据估计, 在染料生产过程中, 约有90%的无机原料和30%的有机原料被排放进入水体。染料废水具有成分复杂、有机物浓度和色度高、难生化降解等特点[2]。这不仅对水生生物的生存带来危险, 同时也对当地居民的生活甚至是生命带来了很大的危害。目前学者在印染废水对海洋生物质量的影响方面已进行了探索研究[3][4]。

亚甲基蓝在印染废水中大量存在, 它是常见的染料和染色试剂。为探明这一大量存在于印染废水之中的有机物对生物的潜在威胁, 国内外学者就亚甲基蓝在水生生物中的残留检测方面进行了报道, 也在亚甲基蓝在动物体内的毒性作用及呼吸代谢影响进行了相关研究。主要集中在对水生生物的急性毒理研究, 如刘建勇等[5]在亚甲基蓝对南美白对虾(*Pemaeus vannamei*)幼体的毒性研究中发现其24 h半数致死浓度为2.56 mg/L; 徐亚超[6]进行了亚甲基蓝对孔雀鱼(*Poecilia Reticulata*)的急性毒性试验, 殷华等[7]求得亚甲基蓝对水丝蚓(*Limnodilus hoffmeisteri*)的24 h半数致死浓度为31.6 mg/L。此外, 呼吸与排泄是动物进行能量代谢的基础生理活动, 它不仅反映了动物的生理状态, 也反映了环境条件的影响。耗氧率和排氮率及其变化规律作为呼吸代谢研究的重要内容, 一直受到人们的重视[8]。有关印染废水或亚甲基蓝对菲律宾蛤仔的呼吸代谢作用影响尚未见报道。

随着纺织、印染产业的发展和印染废水泄露事故和不规范排放事件逐年增多, 加强印染废水的生物毒性作用研究和试验生物的筛选具有十分重要的意义。本文通过静水试验研究亚甲基蓝对菲律宾蛤仔的急性毒性作用和呼吸代谢作用, 既可为筛选适于监测水体中印染废水污染的受试动物提供依据, 又可为贝类动物的食品安全影响提供参考。

2. 实验材料与方法

2.1. 实验材料

实验中使用盐度计(EUTECH Instruments SAT6+)测量海水盐度、pH 仪(Sartorius PB-10)测量实验溶液的 pH 和温度。

实验对象为菲律宾蛤仔, 选择大小均匀、饱满、壳长(3.41 ± 0.2) cm、壳宽(2.30 ± 0.2) cm、湿重(8.60 ± 2.0) g 范围内的健康个体进行分组实验, 数量将近 200 个。实验前简单清洗, 使用天然海水驯养 2 h。挑选活性好的菲律宾蛤仔进行正式实验。

实验试剂为广泛应用于印染行业当中、在印染废水中大量存在的亚甲基蓝。

实验海水取自漳州港海域天然海水。

2.2. 实验方法

2.2.1. 菲律宾蛤仔 24 小时急性毒性实验方法

实验步骤如下:

a. 实验设置 5 个浓度组和 1 个对照组, 每个浓度组设 3 个平行组。根据预实验结果, 在最小 100% 死亡浓度与最大无死亡浓度范围内, 按等间距设置, 分别设置 3 mg/L、6 mg/L、9 mg/L、12 mg/L 和 15 mg/L 5 个浓度组。

b. 正式实验时先配置亚甲基蓝标准储备液(浓度为 100 mg/L), 而后分别添加天然海水稀释至上述 5 个浓度。使用一次性餐盒(500 mL)作为实验组的反应容器, 实验在水温为(24.7 ± 2.0) $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 8.09、盐度为 24‰的条件下进行, 每个平行组放置 10 只菲律宾蛤仔。实验期间保持观察, 并于 12 h 通过应激行为和外壳的开张情况来判断实验对象是否死亡并记录, 及时取出死亡个体。24 h 染毒结束, 对餐盒当中的菲律宾蛤仔进行生理活性观察, 同时进行死亡记录。

2.2.2. 呼吸代谢实验方法

基于 24 h 急性毒性试验结果, 9 h 呼吸代谢实验中亚甲基蓝浓度分别设置为 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L 和 8 mg/L, 同时设置一组空白对照。溶解氧(DO)的测定采用碘量法, 氨氮的测定采用纳氏试剂比色法, 根据试验始末溶解氧及氨氮浓度变化计算耗氧率和排氨率。实验期间水体保持密闭, 避免空气中的氧气对实验结果造成影响, 实验过程中菲律宾蛤仔没有发生个体死亡的现象。实验在水温 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 7.5、盐度 24‰的条件下进行, 分别在 3 h、6 h 和 9 h 这 3 个时间段对试验水样进行溶解氧和氨氮的测量, 记录实验数据。

3. 实验内容与结果

3.1. 亚甲基蓝对菲律宾蛤仔的毒性作用

黄南建[8]在南海流花原油和 0#柴油对 3 种水产经济种类的毒性效应研究中指出, 菲律宾蛤仔的中毒表现症状有: 双壳张开, 斧足外伸, 或出现假死状态。因此本研究观察时将双壳张开刺激后不再闭合、斧足伸出刺激后无法自由伸缩及双壳紧闭单独检出放回自制的实验海水中也无生命反应的菲律宾蛤仔记为死亡个体。除了死亡, 实验期间同时观察菲律宾蛤仔的其他肉眼可识别的生理反应, 通过对菲律宾蛤仔的观察记录, 将 12 h 及 24 h 的结果整理如下表 1。

3.2. 亚甲基蓝对菲律宾蛤仔的致死效应及其与不同海洋生物的毒性效应比较

美国试验与材料学会(ASTM)提出了水生生物急性毒性试验质量控制要求: 对照的死亡率 $\leq 10\%$, 本

Table 1. Observation records and death statistics of *Ruditapes philippinarum* under 12 h, 24 h**表 1.** 菲律宾蛤仔 12 h 和 24 h 活性及死亡情况

污染物	浓度组(mg/L)	平均死亡率(%)	12 h 观察	24 h 观察
亚甲基蓝	0	3.3%	斧足全部都伸出来, 生命力活跃, 无死亡个体	除死亡个体, 其余生命力活跃, 斧足伸出, 溶液清澈
	3	6.7%	斧足全部都伸出来, 生命力活跃, 无死亡个体	死亡个体双壳紧闭, 内脏变蓝色, 其余生命力活跃, 斧足伸出
	6	46.7%	斧足全部都伸出来, 生命力活跃, 无死亡个体	存活个体伸出斧足, 活性较差, 死亡个体双壳紧闭, 足无法收回壳内, 内脏变蓝色, 半数个体死亡
	9	40.0%	斧足全部都伸出来, 生命力活跃, 无死亡个体	存活个体伸出斧足, 活性较差, 死亡个体双壳紧闭, 足无法收回壳内, 内脏变蓝色, 半数个体死亡
	12	90.1%	伸出短斧足, 反应慢, 活性较差, 无死亡个体	存活个体极少, 活性极差, 应激触碰, 缓慢伸缩斧足, 死亡个体大多双壳紧闭, 足无法收回壳内, 部分个体开壳死亡, 内脏变蓝色
	15	76.7%	伸出短斧足, 反应慢, 活性较差, 无死亡个体	存活个体极少, 活性极差, 应激触碰, 缓慢伸缩斧足, 死亡个体大多双壳紧闭, 足无法收回壳内, 部分个体开壳死亡, 内脏变蓝色, 溶液发臭且浑浊

文的试验满足上述要求, 对照组死亡率全部 $\leq 10\%$ 。利用 Excel 对菲律宾蛤仔的死亡个数和亚甲基蓝溶液不同浓度组作相关线性分析, 结果如下图 1 及表 2 所示。通过直线内插法求得亚甲基蓝溶液对菲律宾蛤仔染毒 24 h 的半数致死浓度为 8.56 mg/L 。进一步分析可知, 随浓度的增加, 死亡个数增长, 变化趋势呈现正相关。结合实验过程中观察得知: 亚甲基蓝的浓度在低剂量的条件下, 其表现与对照组的菲律宾蛤仔的生理活性没有明显区别, 但浓度达到一定的程度时, 菲律宾蛤仔会出现大量的死亡。由此可见, 亚甲基蓝本身具有毒性, 该物质会对水生生物造成一定的危害, 对于排放入水体应该给予特别注意。

本文研究结果表明亚甲基蓝混合溶液对菲律宾蛤仔 24 h LC_{50} 为 8.56 mg/L , 高于其对南美白对虾 (*Pemaeus vannamei* Boon) [5] 24 h 毒性的半数致死浓度, 而低于对水丝蚓的半数致死浓度 (表 2)。

3.3. 亚甲基蓝对菲律宾蛤仔代谢作用的影响

3.3.1. 亚甲基蓝对菲律宾蛤仔耗氧率的影响

根据碘量法测量水样中的溶解氧, 标定硫代硫酸钠方法进行滴定并记录与计算, 不同时间的水样中溶解氧浓度, 试验结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出各浓度组的起始溶解氧浓度大致相同。不同浓度组随时间推移, 水样中溶解氧均逐渐下降。而在同一时间段内, 高浓度亚甲基蓝的水样中溶解氧浓度下降速率低, 表明高浓度亚甲基蓝溶液使菲律宾蛤仔的呼吸速率降低。

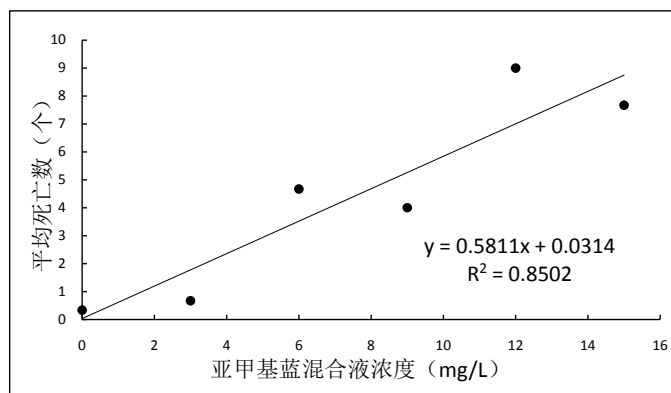
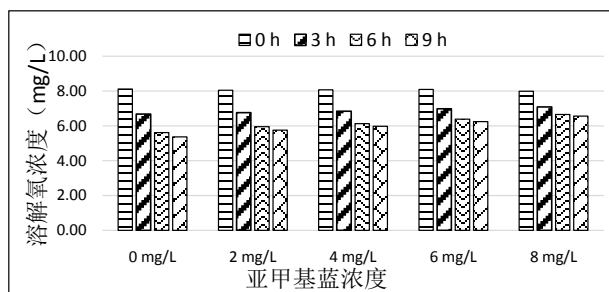
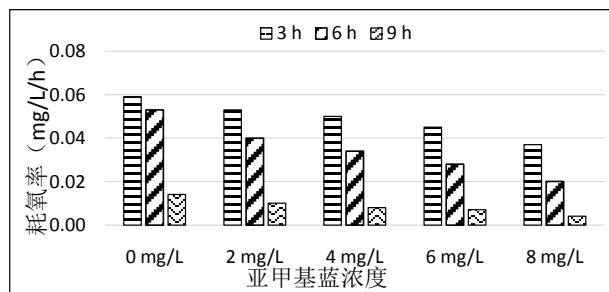
根据耗氧率的计算公式计算出耗氧率如图 3 所示。由图 3 可以看出在 3 h、6 h 和 9 h 相同时间段内浓度越高的亚甲基蓝所在的水样中的菲律宾蛤仔的耗氧率越低, 表明在一定浓度范围内菲律宾蛤仔的耗氧速率和亚甲基蓝浓度成反比。

3.3.2. 亚甲基蓝对菲律宾蛤仔氨氮排放的影响

采用纳氏试剂分光光度法测定水样的氨氮含量, 测定并记录空白组和 2 mg/L 、 4 mg/L 、 6 mg/L 和 8 mg/L 亚甲基蓝溶液下水样中的氨氮吸光度。由此计算出不同浓度组分别在 3 h、6 h 和 9 h 时水体中氨氮含量, 根据试验结果绘制水体中氨氮含量的柱状图, 结果如图 4 所示。由图 4 可以看出同一个时间段亚甲基蓝浓度越高菲律宾蛤仔的氨氮排放量越多, 同一浓度的亚甲基蓝随着时间的推移菲律宾蛤仔的氨氮排放量越多。

Table 2. Comparison of acute toxicity of methylene blue on different species**表 2.** 亚甲基蓝对不同生物的急性毒性效应对比

受试物	LC ₅₀	参考来源及时间
菲律宾蛤仔(<i>Ruditapes philippinarum</i>)	24 h LC ₅₀ 为 8.56 mg/L	本文, 2016
南美白对虾(<i>Pemaeus vannamei</i> Boon)	24 h LC ₅₀ 为 2.56 mg/L 48 h LC ₅₀ 为 4.06 mg/L	刘建勇等[5], 2005
孔雀鱼(<i>Poecilia Reticulata</i>)	96 h LC ₅₀ 为 273.5 mg/L	徐亚超[6], 2014
水丝蚓(<i>Limnodilus hoffineisteri</i>)	24 h LC ₅₀ 为 31.6 mg/L	殷华[7], 2007

**Figure 1.** 24 hours of acute lethal effect of methylene blue mixed solution on *Ruditapes philippinarum***图 1.** 亚甲基蓝混合溶液对菲律宾蛤仔的 24 h 急性致死效应**Figure 2.** Dissolved oxygen concentration in water samples at different time**图 2.** 不同时间的水样中溶解氧浓度**Figure 3.** Oxygen consumption rate of different concentration groups at 3 h, 6 h and 9 h**图 3.** 不同浓度组在 3 h、6 h、9 h 时的耗氧率

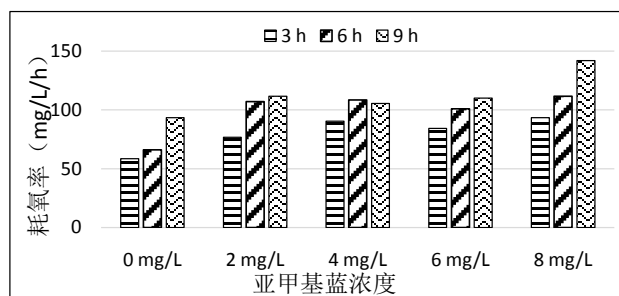


Figure 4. The content of ammonia nitrogen in different concentration groups under 3 h, 6 h and 9 h, respectively

图 4. 不同浓度组分别在 3 h、6 h、9 h 时水体中氨氮含量

4. 讨论分析

4.1. 亚甲基蓝对水生生物急性毒性作用的比较

菲律宾蛤仔是毒理学研究中一种常用的受试生物，但其研究较多集中于重金属染毒，以印染废水作为染毒试剂的方面研究较少。本文研究表明亚甲基蓝混合溶液对菲律宾蛤仔 24 h LC_{50} 为 8.56 mg/L，高于其对南美白对虾(*Pemaeus vannamei* Boon) [5] 24 h 毒性的半数致死浓度，而低于对水丝蚓的半数致死浓度—31.6 mg/L。菲律宾蛤仔因其独特的滤食习性，对污染物具有较强富集能力，在受污海域被污染的菲律宾蛤仔体内会衍生有害物质[9]，使菲律宾蛤仔能耐受污染物在其体内以较高浓度出现，并且这些有害物质可通过食物链进入人体，并且能够保持持久性、迁移性、积累性和高毒性，对人和海洋生物都危害巨大。殷华[7]在亚甲基蓝对水丝蚓的急性毒性研究中发现水丝蚓的死亡率与亚甲基蓝浓度呈现正相关，亚甲基蓝在一定的浓度范围内会对水生生物造成胁迫，影响动物正常行为以至危害生命。这和本文的实验结果是一致的，同时也说明亚甲基蓝对不同的生物的毒性作用是不尽相同的，在同种生物中也存在着个体之间的差异。

4.2. 亚甲基蓝对菲律宾蛤仔的呼吸代谢影响

呼吸和代谢是生物体最基本和最重要的新陈代谢活动之一，而耗氧率和排氨率是其代谢活动强弱的直接反应，不仅反映了动物的生理状态，也反映了环境条件的变化。目前国内外学者对于海洋双壳类呼吸代谢方面进行了许多有益的研究[10]-[20]，但主要集中在温度、盐度、pH 和体重等因素对双壳类呼吸代谢的影响，涉及印染废水排放后对海洋双壳类呼吸代谢的影响尚未见报道。本文研究表明：在一定的浓度范围下菲律宾蛤仔的耗氧率与亚甲基蓝浓度呈反比，表明亚甲基蓝对菲律宾蛤仔的呼吸代谢能产生抑制作用。分析认为，菲律宾蛤仔暴露在低剂量有毒有害的物质时能主动通过加快自身的代谢作用来积极进行排泄，但当亚甲基蓝浓度过高时，浓度越高的亚甲基蓝浓度中菲律宾蛤仔的耗氧率逐渐减少，则表明亚甲基蓝会对菲律宾蛤仔体内器官或组织造成不可逆损伤，抑制其呼吸代谢作用，甚至导致个体死亡。研究结果还表明，在一定浓度范围下，浓度越高的亚甲基蓝溶液中试验水体的氨氮含量越高。贝类的排泄产物主要有氨、尿酸、尿素和氨基酸等，其中氨占总排泄物的 70%或更高[21] [22]。分析认为随着代谢时间的增加，水体环境中氨的浓度增加，而贝类体内也会产生多种生理反应，当环境中氨浓度超过一定范围，贝类的氨排泄率会上升，但生长会明显下降，这是生物对不利环境的一种适应。也就是说，菲律宾蛤仔可以对亚甲基蓝这种有毒有害的物质进行积极排泄。但水体中氨氮含量过高会损坏水体生物的呼吸代谢器官，高于正常值时会引起无法进食和呼吸以及正常代谢活动，直至死亡。

以上结果和因素综合起来，表明亚甲基蓝对菲律宾蛤仔存在较强的毒性作用和呼吸代谢抑制作用，

且由于生物个体对有毒物质的敏感性存在差异,作用程度与其他动物类群存在差异。

参考文献 (References)

- [1] 丁春生,毛凌俊,吴杰,等.微波改性活性炭深度处理亚甲基蓝染料废水的研究[J].工业水处理,2015,35(1):68-71.
- [2] 任南琪,周显娇,郭婉茜,等.染料废水处理技术研究进展[J].化工学报,2011,64(1):85-94.
- [3] 李磊,蒋玫,沈新强,等.印染排放尾水对几种海洋生物幼体的毒性研究[J].上海海洋大学学报,2015,24(5):712-718.
- [4] 原居林,胡大雁,杨卫明,等.印染废水对3种水生生物的毒性作用[J].生态与农村环境学报,2012,28(2):209-212.
- [5] 刘建勇,彭树锋.亚甲基蓝对南美白对虾(*Pemaeus vannamei* Boon)幼体的毒性研究[J].海洋湖沼通报,2005(1):50-53.
- [6] 徐亚超.三种药物对孔雀鱼的急性毒性试验[J].河北渔业,2014(5):1-3.
- [7] 殷华,阚晓微.亚甲基蓝对水丝蚓的急性毒性[J].哈尔滨师范大学学报(自然科学版),2007,23(4):80-82.
- [8] 马媪,等.石油污染物对菲律宾蛤仔的一般毒性作用[J].泉州师范报,2016,34(2):27-31.
- [9] 袁秀堂,张升利,刘述锡,等.庄河海域菲律宾蛤仔底播增值区自身污染[J].应用生态学报,2011,22(3):785-792.
- [10] 栗志民,刘志刚,谢丽,等.体重和温度对华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)耗氧率和排氨率的影响[J].海洋与湖沼,2010,41(1):99-105.
- [11] 黄洋,黄海立,林国游,等.盐度,pH和规格对尖紫蛤(*Soletellina acuta*)耗氧率和排氨率的影响[J].海洋与湖沼,2013,44(1):120-125.
- [12] 赵文,王雅倩,魏杰,等.体重和盐度对中国蛤蚧耗氧率和排氨率的影响[J].生态学报,2011,31(7):2040-2045.
- [13] 刘建业,喻达辉,李金碧.盐度和pH对合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)耗氧率和排氨率的影响[J].海洋与湖沼,2011,42(4):603-607.
- [14] 栗志民,刘志刚,徐法军,等.体重,温度和盐度对皱肋文蛤耗氧率和排氨率的影响[J].海洋科学进展,2011,29(4):512-520.
- [15] 张媛,方建光,毛玉泽,等.温度和盐度对橄榄蚶耗氧率和排氨率的影响[J].中国水产科学,2007,14(4):690-694.
- [16] 郭海燕,王昭萍,于瑞海,王芳,林志华.温度,盐度对大西洋浪蛤耗氧率和排氨率的影响[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2007,37(S1):185-188,244.
- [17] 栗志民,刘志刚,谢丽,梁家群.企鹅珍珠贝耗氧率和排氨率的研究[J].海洋学报(中文版),2009,31(6):129-135.
- [18] 刘其根,沈和定.河蚬的耗氧率和排氨率[J].上海水产大学学报,1999(4):298-303.
- [19] 范德朋,潘鲁青,马牲,董双林.盐度和pH对缢蛏耗氧率及排氨率的影响[J].中国水产科学,2002,9(3):234-238.
- [20] Saucedo, E., Lucía, O., Mario, M., et al. (2004) Effect of Temperature on Oxygen Consumption and Ammonia Excretion in the Calafia Mother-of-Pearl Oyster. *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Aquaculture*, **229**, 377-387.
- [21] Carefoot, T.H. (1989) A Comparison of Time/Energy Budgeting in Two Species of Tropical Sea Hares *Aplysia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **131**, 267-282.
- [22] Griffiths, C.L. and Griffiths, R.J. (1987) *Animal Energetics*. Academic Press, New York, 2-88.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ams@hanspub.org