Vol. 7,2012 No. 3,312-316

石油污染土壤对蚯蚓的致死效应及回避行为的影响

黄盼盼,周启星*

南开大学环境科学与工程学院 环境污染过程与基准教育部重点实验室/天津城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071

摘要: 土壤石油污染对生态系统和人类健康有严重影响 其毒害诊断和风险评价的研究日益受到重视。以赤子爱胜蚓(Eisenia foetida) 为受试生物 利用受石油污染的实际土壤 将高浓度污染的土壤与清洁土壤混合 配制成不同污染水平的石油污染土壤,通过直接暴露的方式 分别以蚯蚓急性毒性死亡率和回避反应作为测试终点,评价了石油污染土壤对蚯蚓的生态毒性。结果显示 石油烃污染土壤对蚯蚓的 $7~d-LC_{50}$ 和 $14~d-LC_{50}$ 分别为 32.5~和 29.4~g \cdot kg $^{-1}$,而土壤中石油烃的浓度为8.0~g \cdot kg $^{-1}$ 时,蚯蚓即有明显回避反应(回避率达 80%) 前两者为后者的 3.7~4.1 倍。可见 与急性毒性实验的测试终点 LC_{50} 相比 行为测试终点对石油烃的响应更灵敏。蚯蚓的回避反应可更加及时地反映出土壤受石油污染的状况,发挥更好的指示作用。

关键词: 石油烃; 污染土壤; 蚯蚓; 致死效应; 回避行为

文章编号: 1673-5897(2012)3-312-05 中图分类号: X171.5; X53 文献标识码: A

Effects of Petroleum-Contaminated Soil on Lethality and Avoidance Behavior of the Earthworm *Eisenia foetida*

Huang Panpan Zhou Qixing*

Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria of Ministry of Education , Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control , College of Environmental Science and Engineering , Nankai University , Tianjin 300071 , China

Received 17 January 2012 accepted 7 February 2012

Abstract: The contamination of petroleum hydrocarbons in soil is now seriously threatening ecosystem safety and human health, and therefore the diagnosis and risk assessment of petroleum-contaminated soil is becoming one of the hot topics in the field of environmental science. In this study, the earthworm Eisenia foetida was exposed to the soil contaminated with different concentrations of petroleum, which was obtained by mixing the natural contaminated soil with the clean background soil. The acute lethality and avoidance response were adopted as endpoints to evaluate the toxic effects of petroleum-contaminated soil on earthworms. Results showed that the values of 7d-LC₅₀ and 14d-LC₅₀ were 32.5 and 29.4 g•kg⁻¹, respectively. However, when the concentration of petroleum hydrocarbons in the soil achieved 8.0 g•kg⁻¹, the earthworm showed significant avoidance behavior (avoidance rate = 80%). The former two endpoints were 3.7 to 4.1 times as much as the latter one. It was demonstrated that the avoidance endpoint was more sensitive than the mortality endpoint while evaluating ecological risk of petroleum-contaminated soil. The avoidance response of Eisenia foetida can serve as a sensitive indicator for assessing the petroleum pollution of soil.

收稿日期: 2012-01-17 录用日期: 2012-02-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(21037002;40930739); 国家环保公益性行业科研专项(201009032)

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhouqx@nankai.edu.cn

Keywords: petroleum hydrocarbon; contaminated soil; earthworm; lethal effect; avoidance behavior

石油作为全球最主要的能源之一,在世界经济 发展中发挥着极其重要的作用。石油在开采、贮运、 炼制、加工和使用过程中所导致的落地石油污染是 土壤受到石油污染的主要原因[1]。石油污染后的土 壤,自然修复周期很长,即便采取相应的修复措施, 仍难以彻底恢复,土壤中仍会有不同程度的石油烃 残留。一方面,石油污染严重影响土壤的通透性,使 土壤肥力降低,进而对土壤环境中的动植物和微生 物产生毒害作用;另一方面,石油类污染物是由烷 烃、环烷烃和芳香烃组成的混合物,具有致癌、致畸 和致突变作用[2] 生物富集性很强,可通过食物链的 富集和放大,对人类健康产生危害。目前,国内外对 石油烃污染的研究主要集中在微生物对石油的降 解、石油在土壤中的转移和对土壤生物的影响等几 个方面[1-3]。研究表明,土壤中原油含量为3100 mg•kg⁻¹时,玉米减产10%; 当原油含量达5000 mg•kg⁻¹时,玉米中苯并芘残留量超标,不能食用^[4]。 石油烃对黄豆的生长有明显毒害作用,当土壤中石 油烃的浓度为 10 g•kg-1时,黄豆幼苗叶绿素含量减 少 10.8% ,丙二醛(MDA) 含量增加 12.4% ,超氧化 物歧化酶(SOD)活性降低 9.8% [5]。石油烃对沙蚕 表现出较强的毒性 3 d-LDso为 117.5 µL·L·1 暴露 5 d 后,沙蚕体内 SOD 的活性低于对照组[6]。

蚯蚓作为陆生生物食物链的最底层,以土壤中动植物碎屑为食,对大部分污染物都有富集作用^[3]。蚯蚓是污染物由土壤到生物,进而向食物链更高营养级转移的重要环节。蚯蚓个体变化所引发的群落变化将对整个生态系统产生很大的影响,因此,蚯蚓可作为一种早期预警生物,评价土壤污染状况和生态功能^[7-8]。迄今,利用蚯蚓来指示环境污染状况,已经成为土壤污染生态毒理学的一个重要方法^[9]。目前,蚯蚓的毒性暴露实验已成功用于评价土壤中重金属、抗生素和农药等污染物的毒性^[10-13],而石油污染土壤对蚯蚓的毒性效应在国内外相关文献中尚少有报道。

已有的关于石油烃毒性效应的研究报道中,大部分均使用自制的人工土壤进行暴露实验,即用原油、汽油和柴油等污染物与背景土壤混合后制备出受试的污染土壤。本研究以蚯蚓为受试生物,利用受到石油污染的实际土壤,将高浓度污染的土壤与清洁土壤混合,配制成不同污染水平的石油污染土

壤 通过直接暴露的方式 ,分别以蚯蚓急性毒性死亡率和回避反应作为测试终点 ,评价了石油污染土壤对蚯蚓的生态毒性 ,旨在为石油污染土壤的毒害诊断和风险评价提供方法指导和数据支持。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

实验所用赤子爱胜蚓(Eisenia foetida) 为国际标准(OECD 207) 实验蚓种之一 $[^{14}]$ 购于天津贾立明蚯蚓养殖有限公司。将蚯蚓于 20° 、无光照的生化培养箱中驯化后,选择体质量 400 mg 左右,环带明显且大小一致的健康蚯蚓洗净,放入垫有湿润滤纸的烧杯中,用保鲜膜封口并用针扎孔,于 20° 、无光照的生化培养箱中清肠 24 h,清肠后选择仍然健康的蚯蚓作为正式实验用蚓 $[^{15}]$ 。

实验用石油污染土壤采自山东省胜利油田现河 采油厂($37^{\circ}7^{\circ}N$, $118^{\circ}22^{\circ}E$) ,清洁土壤采自附近无污染的农田。经测定 ,清洁土壤的有机质含量为 $59.0~\mathrm{g}$ • kg $^{-1}$,pH 为 8. 3; 污染土壤的有机质含量为 $275.3~\mathrm{g}$ • kg $^{-1}$,pH 为 8. 4。

1.2 土壤中总石油烃含量的测定

土壤中总石油烃含量的测定方法主要包括重量法、荧光分光光度法和红外光度法等^[16-17]。对于石油浓度较高的土壤,目前尚无统一的标准方法,应用较普遍的是重量法^[18]。重量法包括超声萃取法和索氏萃取法。本文采用索氏萃取法测定土壤中石油烃的含量。

将石油污染土壤自然风干后过 2 mm 筛。称取 $5.00~\mathrm{g}$ 过筛后的土样 ,用滤纸包好 将其放入索氏提取器中。加入 $150~\mathrm{mL}$ 二氯甲烷 ,于 $55~\mathrm{C}$ 水浴萃取 $24~\mathrm{h}$ 。抽提完成后 ,取下圆底烧瓶 $55~\mathrm{C}$ 旋转蒸发至干 ,在通风橱内挥发至恒重 ,称重。同时做 $3~\mathrm{C}$ 个平行。经测定 石油污染土壤中总石油烃的含量为 $110~\mathrm{g}$ kg^{-1} 。

1.3 毒性暴露实验

将清洁土壤风干后过 2 mm 筛 ,与过筛后的石油 烃污染土壤按不同比例充分混合 ,配制成不同浓度 的污染土壤。按照 OECD(1984) 推荐的标准方法进行实验^[14]。

1.3.1 石油烃对蚯蚓的致死效应实验

 LC_{50} 是毒理学重要的基本数据之一,是毒性分级的依据,为进一步开展亚急性毒性实验提供依据和

实验基础^[19]。致死效应实验的研究目的主要是探求石油烃的致死剂量,为初步评估其对人类潜在的毒害提供依据。实验选用1L的烧杯,每个烧杯中放入500g混匀的土壤样品,调节土壤含水量为最大持水量的60%,平衡24h后将土壤搅拌均匀,将10条已经清肠的蚯蚓放入烧杯中,于20℃、无光照的生化培养箱中培养。根据预实验结果,正式实验浓度设置为22.5、25.0、27.5、30.0、32.5、35.0、37.5和40.0g•kg⁻¹。对照组用清洁土壤,每组设4个重复。实验方法参照了OECD规定的自然土壤法^[15]。以蚯蚓对针刺无反应为死亡标准,记录7和14d时蚯蚓的死亡数以及中毒症状。

1.3.2 蚯蚓的回避实验

实验选用长 25 cm、宽 15 cm、高 12 cm 的容器,容器中间放一隔板 将容器分为 2 部分,一部分放入清洁土壤,另一部分放入不同浓度的污染土壤。调节土壤含水量为最大持水量的 60%,然后将隔板抽开将 10 条已经清肠的蚯蚓放到原先隔板处,用保鲜膜封口并扎孔,放入生化培养箱中培养。48 h后将隔板插到原位置,挑出两侧的蚯蚓并分别计数,当蚯蚓在隔板处时,每边按 0.5 条计算[11]。每个浓度设置 3 个重复。通过预实验,设置回避反应中石油烃浓度为 0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 和 20.0 g•kg⁻¹,并设有对照组,每个组合实验重复 5 次。

当洁净土壤中蚯蚓数目占到实验投加蚯蚓总数的 80%时 表明污染土壤不适合蚯蚓生存,即存在回避行为^[20]。回避率计算公式如下^[21]: NR = [(C-T) / N] × 100% 其中,NR 为回避率,C 为清洁土壤中蚯蚓数目,T 为污染土壤中蚯蚓数目,N 为加入土壤中的蚯蚓总数。

1.4 数据处理

采用 SPSS 18.0 和 Excel 软件进行数据分析 ,数据表示为平均数 \pm 标准偏差(AV \pm SD) 。利用单位概率回归分析法得出蚯蚓半数致死浓度(LC_{50}) 。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 石油烃对蚯蚓的致死效应

急性毒性实验结束时,对照组中蚯蚓无死亡现象。石油烃污染土壤中蚯蚓的中毒症状表现为:环带肿大,充血,身体脱水,有段节现象,活体蠕动伸缩能力明显减弱。

染毒 7 d 后 ,22.5 g • kg $^{-1}$ 处理组中蚯蚓全部存活 ,25.0 g • kg $^{-1}$ 处理组中蚯蚓开始出现死亡 ,最大浓度 ,40.0 g • kg $^{-1}$ 处理组中 ,蚯蚓死亡率达 ,100% 。 染

毒 14 d 后,所有处理组都有蚯蚓死亡现象: 22.5 g*kg^{-1} 处理组中蚯蚓的死亡率为 15% ,当浓度增至 37.5 g*kg^{-1} 时,该处理组中蚯蚓死亡率达 100%。统计结果表明 石油烃污染土壤对蚯蚓的 $7 \text{ d} - \text{LC}_{50}$ 和 14 d-LC_{50} 分别为 32.5 和 29.4 g*kg^{-1} 。 石油烃污染土壤对蚯蚓有较强的毒性作用。随着染毒浓度的提高,蚯蚓的死亡率逐渐增加;随着染毒时间的延长,各处理组蚯蚓的死亡率逐渐增加; LC_{50} 随染毒时间的延长而降低。可见,石油烃污染土壤对蚯蚓的致死毒性与染毒浓度和时间均有关。因此,石油烃污染土壤对蚯蚓的毒性表现出一定的蓄积性。

剂量-效应关系一直是生态毒理学和生态风险评价研究的基本问题之一^[19]。图1展示了染毒时间为7和14 d 时 石油烃在土壤中引起蚯蚓死亡的剂量-效应关系。可知 在相对较窄的剂量范围内 ,石油烃对蚯蚓的毒性快速增强 ,各污染组的死亡率均显著增加。实验中发现 ,在引起蚯蚓死亡的石油烃污染土壤中 ,蚯蚓几乎全部停留在土壤表面 ,这表明蚯蚓在实验早期就有试图逃离高污染土壤的倾向 ,这也为蚯蚓对石油烃污染土壤的回避反应的存在提供了证据。

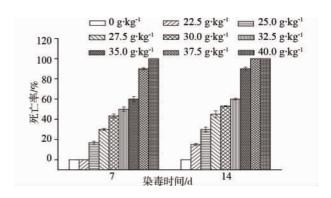


图 1 石油烃污染土壤对蚯蚓的急性致死毒性

Fig. 1 Acute lethal toxicity of petroleum-contaminated soil to Eisenia foetida

2.2 蚯蚓对石油烃污染土壤的回避反应

在 48 h 的回避反应实验中,对照组和处理组中均未观察到蚯蚓死亡。实验开始,低浓度处理组($0 \sim 0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)中, 蚯蚓未出现任何症状,而高浓度处理组($20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)中,部分蚯蚓与石油烃污染土壤

接触几分钟后 就有弹跳和扭动行为 部分蚯蚓在选择进入高浓度污染土壤时出现中途退出和重新选择的现象。可见 部分蚯蚓在接触较高浓度石油烃污染土壤的早期 就可感受到土壤中存在污染并快速做出回避反应。

随着土壤中石油烃浓度的升高,选择进入其中的蚯蚓数量趋于减少,这说明高浓度石油烃污染的土壤的生态功能受到削弱或发生改变。同时发现,不同浓度石油烃污染的土壤中,蚯蚓的回避反应不同。

实验结果表明 48~h 后所有处理组中蚯蚓的回避率都是正数。随着石油烃浓度的升高 ,蚯蚓的回避率提高(图2)。当洁净土壤中蚯蚓的数目达到实验投加蚯蚓总数的 80% 时 ,表明该污染土壤已不适合蚯蚓生存。当石油烃浓度升至 $8.0~g^{\bullet}kg^{-1}$ 时 ,蚯蚓的回避率达 80%。推算出 ,石油烃浓度为 6.0~a $17.1~g^{\bullet}kg^{-1}$ 时 ,蚯蚓回避率分别为50% 和 100%。

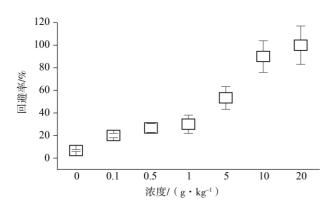


图 2 不同浓度的石油烃污染土壤中蚯蚓的回避率 Fig. 2 Avoidance rate of Eisenia foetida exposed to petroleum-contaminated soil with different concentrations

3 讨论(Discussion)

石油烃毒性很大,其中多环芳烃(PAHs)组分毒性最强,许多PAHs具有致癌、致畸和致突变性,且生物累积性高,可长期留存于环境中^[24]。进入土壤环境的石油烃,可通过迁移引发下层土壤和地下水的污染。土壤由各种颗粒状矿物质和有机物等组成,因此可有效吸附石油烃类污染物;同时,石油烃中的不同组分之间还会发生化学反应,转化成其他有毒物质^[3]。

与急性毒性实验的测试终点 LC_{50} 相比,行为测试终点对石油烃的响应更灵敏。蚯蚓有明显回避反应时所对应的石油烃浓度为 $8.0~{\rm g} \cdot {\rm kg}^{-1}$,而石油烃污

染土壤对蚯蚓的 7 d-LC_{50} 和 14 d-LC_{50} 分别为32.5和 29.4 g-kg^{-1} ,后两者为前者的 $3.7 \sim 4.1$ 倍。徐冬梅 等 $^{[25]}$ 研究全氟辛烷磺酸 (PFOS) 对蚯蚓的急性毒性 和回避行为的影响时发现 ,当 PFOS 浓度为 160 mg-kg^{-1} 时 ,蚯蚓表现出显著的回避行为 ,而 PFOS 的 14 d-LC_{50} 为 $542.08 \text{ mg-kg}^{-1}$,后者为前者的 3.5 倍左右 ,这与本研究结果相似。在三硝基甲苯 (TNT) 和重 金属等污染物的毒理学研究中也发现 ,回避行为实验的敏感性高于急性毒性实验 ,也高于亚急性毒性实验中的生殖毒性实验 $^{[11.20]}$ 。

ISO 于 2005 年制定了化学物质对蚯蚓行为效应的测试方法草案^[17],蚯蚓回避行为实验已广泛应用于污染土壤的生态风险评价中,所涉及的污染物包括矿物油、重金属、TNT 和农药等^[1142 20]。本研究结果表明,蚯蚓的回避行为实验在石油污染土壤的毒害诊断和风险评价方面也展现出良好的应用前景,比较适用于在紧急或者突发事件中对石油污染土壤进行快速风险筛选和诊断。

通讯作者简介: 周启星(1963一) 男 博士 教授 主要研究领域 为复合污染环境学、生态毒理化学和污染环境生态修复等。

参考文献:

- [1] 孙铁珩,周启星,李培军.污染生态学[M].北京:科学出版社,2004:57
- [2] Gogoi B K, Dutta N N, Goswami P, et al. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil soil spill site [J]. Advances in Environmental Research, 2003, 7(4): 767-782
- [3] Gaur J P, Kumar H D. Growth response of four micro-algae to three crude oils and a furnace oil [J]. Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological, 1981, 25(1): 77-85
- [4] 吕志萍,程龙飞.石油污染土壤中石油含量对玉米的影响[J].油气田环境保护,2001,11(1):36-37
 - Lv Z P, Cheng L F. The influence on corn growth caused by petroleum concentration of soil contaminated by petroleum [J]. Environmental Protection of Oil & Gas Fields, 2001, 11(1): 36-37 (in Chinese)
- [5] 李春荣,王文科,曹玉清,等.石油污染土壤对黄豆成长的生态毒性效应[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(1):116-120
 - Li C R , Wang W K , Cao Y Q , et al. Eco-toxicity of petroleum-contaminated soil on the growth of soybean [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition , 2008 , 36(1): 116 – 120 (in Chinese)

- [6] 孙福红,周启星,张倩如.石油烃、Cu²⁺对沙蚕的毒性效应及对其抗氧化酶系统的影响[J].环境科学, 2006,27(7):1415-1419
 - Sun F H , Zhou Q X , Zhang Q R. Toxic effects of petrole—um hydrocarbons and copper on polychaete Nereis diversicolor and on its antioxidant enzyme systems [J]. Environmental Science , 2006 , 27(7): 1415 1419 (in Chinese)
- [7] McInerney M, Little DJ, Bolger T. Effect of earthworm cast formation on the stabilization of organic matter in fine soil fractions [J]. European Journal of Soil Biology, 2001, 37(4): 251-254
- [8] Puurtinen H M, Martikainen E A T. Effect of soil moisture on pesticide toxicity to an enchytraeid worm, enchytraeus sp. [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1997, 33(1): 34-41
- [9] Spurgeon D J, Weeks J M, Van Gestel C A M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology: The 7th International Symposium on Earthworm Ecology Cardiff Wales 2002 [J]. Pedobiologia, 2003, 47 (5 – 6): 588 – 606
- [10] Loureiro S, Soares A M V M, Nogueira A J A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination [J]. Environmental Pollution, 2005, 138 (1): 121-131
- [11] Achazi R K. Invertebrates in risk assessment development of a test battery and of short term biotests for ecological risk assessment of soil [J]. Journal of Soils and Sediments, 2002, 2(4): 174-178
- [12] Schaefer M. Assessing 2 A 6-trinitrotoluene (TNT) -contaminated soil using three different earthworm test methods [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety , 2004 , 57(1): 74 80
- [13] International Organization for Standardization. Soil Quality: Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behavior-Part 1: Test with Earthworms (Eisenia fetida and Eisenia Andrei). ISO/DIS 17512-I [S]. Geneva: International Organization for Standardization, 2005
- [14] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for Testing of Chemicals No. 207. Earthworm, Acute Toxicity Test [S]. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 1984
- [15] Abdul Rida A M M , Bouché M B. Earthworm toxicology: From acute to chronic tests [J]. Soil Biology Biochemistry , 1997 , 29(3-4): 699 - 703
- [16] 唐松林. 红外光度法测定土壤中的石油类 [J]. 中国

- 环境监测,2004,20(1):36-38
- Tang S L. Using the method of infrared luminosity to determine the petroleum in soil [J]. Environmental Monitoring in China, 2004, 20(1): 36-38 (in Chinese)
- [17] Daghbouche Y, Garrigues S, Guardia M de la. Liquid chromatography-Fourier transform infrared spectrometric determination of cholesterol in animal greases [J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 354(1-3): 97 – 106
- [18] Risdon G C , Pollard S J T , Brassington K J , et al. Development of an analytical procedure for weathered hydrocarbon contaminated soils within a UK risk-based framework [J]. Analytical Chemistry , 2008 , 80 (18): 7090 7096
- [19] 周启星,罗义. 污染生态化学[M]. 北京: 科学出版 社,2011: 532
- [20] International Organization for Standardization. Draft: Soil Quality-Avoidance Test for Evaluating the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals-Part 1: Test with Earthworms (Eisenia fetida/andrei) [S]. Geneva: International Organization for Standardization , 2004
- [21] Amorim M J B , Römbke J , Soares A M V M. Avoidance behaviour of Enchytraeus albidus: Effects of benomyl , carbendazim , phenmedipham and different soil types [J]. Chemosphere , 2005 , 59(4): 501 510
- [22] Jones K C , Stratford J A , Tidridge P , et al. Polynuclear aromatic hydrocarbon in an agriculture soil: Long term changes in profile distribution [J]. Environmental Pollution , 1989 , 56(4): 337 – 351
- [23] 刘伟,朱鲁生,王军,等. 毒死蜱、马拉硫磷和氰戊菊酯对赤子爱胜蚓(Eisenia foetida)的急性毒性[J]. 生态毒理学报,2009,4(4):597-601
 - Liu W , Zhu L S , Wang J , et al. Acute toxicological dosages of chlorpyrifos , malathion and fenvalerate on earthworm Eisenia foetida [J]. Asian Journal of Ecotoxicology , 2009 , 4(4): 597 601 (in Chinese)
- [24] Pérez P , Fernández E , Beiras R. Use of fast repetition rate fluorometry on detection and assessment of PAH toxicity on microalgae [J]. Water , Air & Soil Pollution , 2010 , 209(1-4): 345-356
- [25] 徐冬梅,文岳中,李立,等. PFOS 对蚯蚓急性毒性和 回避行为的影响[J]. 应用生态学报,2011,22(1): 215-220
 - Xu D M, Wen Y Z, Li L, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate on acute lethality and avoidance behavior of earthworm [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(1): 215 220 (in Chinese) ◆