

氯化镉和敌敌畏突发胁迫下斑马鱼的行为差异

黄毅¹, 张金松^{1,2,*}, 韩小波^{2,3}, 黄廷林¹

1. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 715000

2. 深圳水务集团, 深圳 518000

3. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 采用计算机摄像跟踪技术,以正常水体中斑马鱼的行为变化为基础,比较突发性氯化镉和敌敌畏污染胁迫下斑马鱼的个体行为(游动速度、深度、转弯次数和加速度)和鱼群行为(平均距离和分散度)的变化规律。研究结果表明:斑马鱼在两种污染物突发性胁迫下,行为反应快速且敏感,游动行为响应与污染物种类和暴露时间直接相关;两种不同类型的污染胁迫下,斑马鱼的行为变化趋势基本符合环境压力模型,但其响应方式存在差异。氯化镉突发性胁迫下,斑马鱼有明显的过度活跃行为现象,游动深度显著下降,而敌敌畏突发性胁迫下,行为强度直接降低,鱼群聚集且停留在水面附近。斑马鱼的行为响应敏感、迅速,是实现在线水质监测的有效手段。

关键词: 生物监测; 回避反应; 游动速度; 游动深度

文章编号: 1673-5897(2012)6-671-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Behavioral Differences of Zebrafish under Sudden Stress of Dichlorvos and Cadmium Chloride

Huang Yi¹, Zhang Jinsong^{1,2,*}, Han Xiaobo^{2,3}, Huang Tinglin¹

1. College of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 71500, China

2. Shenzhen Water Group, Shenzhen 518031, China

3. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 8 May 2012 **accepted** 24 September 2012

Abstract: Based on the behavior response of zebrafish, the effects of sudden exposure to dichlorvos and cadmium chloride on the behavioral responses of zebrafish, including individual endpoints (swimming speed, depth, turning frequency and acceleration) and the endpoints of fish school (distance and dispersion), were investigated by a system with computer-imaging technique. Results showed that zebrafish were sensitive to sudden exposure of CdCl₂ and DDVP, expressed by the quickly behavioral responses of zebrafish. The behaviors of zebrafish depended on the kinds of chemicals and exposure time. The stress behavioral responses were in accordance with the stepwise stress model, however, the responses were changed with the different chemicals. Sudden exposure to CdCl₂, fish was hyperactivity (increased swimming speed and turning frequency) and their swimming depth significantly decreased. When sudden exposure to DDVP, fish gathered with decrease swimming activity and stayed near the water surface. The behavior responses of zebrafish under environment stress could be available to monitor the accidental pollution.

收稿日期: 2012-05-08 录用日期: 2012-09-24

基金项目: 国家“十一五”水专项——城区水库型水源地污染监控与安全调配(2008ZX07423-001-003)

作者简介: 黄毅(1987-),女,博士生,研究方向:水质生物预警与污染控制对策研究,E-mail: huangyi4643@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author),E-mail: zhangjinsong@waterchina.com

Keywords: biomonitoring; avoiding reaction; swimming speed; swimming height

饮用水生产过程中可能因为水源污染或人为投毒使水质发生突发性的变化,以鱼类暴露于污染物中的行为变化监测水质突发性污染是水质在线生物预警的主要方式之一。当外界环境变化时,生物体对环境的适应性最先表现出的就是行为改变,通过行为调节保持体内环境的相对稳定与其他水生生物相比,鱼类因其更好的续航能力,可实现连续 30 d 的不间断监测,被认为是原位在线监测突发性水体污染的理想生物^[1]。早在 1929 年, Belding 就应用鱼的呼吸行为对水中毒物进行预警。随后,鱼的游泳行为、正趋流性和选择行为等相继得到应用。到目前为止,以鱼类行为变化为基础的水质在线生物预警系统主要利用一些回避行为的设计、摄像跟踪技术或非接触类电场感应等方法捕捉鱼类行为受污染物影响而引起的变化,监测指标主要包括运动行为^[2](游泳速度、高度、分散程度和分形维数等)、呼吸行为^[3](呼吸频率、呼吸深度等)、逃避行为^[4](浮头行动、急速游动和回避次数等)。鱼类受污染物刺激而发生的行为变化已经作为一个重要指标应用于水质监测中。

重金属和农药是两类最重要的水体突发性污染物质。同一类物质中的大多数对生物体的作用具有相似的作用机理,如有机磷农药主要抑制生物体内胆碱酯酶,使其失去分解乙酰胆碱的能力,而多数重金属则主要与抑制水生生物的抗氧化酶系统有关。相同的作用机理影响下,鱼类的行为变化模式也相似。刘勇等^[5]证明,敌百虫和对硫磷两种作用机制相似的有机磷农药对日本青鳉鱼的行为反应差异不明显;黄东龙等^[6]的研究则表明,在 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 的突发性胁迫中,斑马鱼的行为反应快速且敏感,并表现出比较相似的行为变化规律。污染物不同的作用机理会影响鱼类行为的变化,任宗明等^[7]比较了溴氰菊酯和氯化镉对青鳉鱼的活动强度的影响,结果表明,镉等器官损伤性污染物引起的行为毒性效应在阶段性暴露中是可恢复的,而氰戊菊酯等神经损伤性污染物的暴露下则不可恢复。

为进一步研究不同种类的污染物因作用机理不同对鱼类行为变化影响的差别,本研究采用计算机视频追踪技术,通过监测斑马鱼的游泳速度、高度、转弯次数、分散度和平均距离加速度 6 项指标的变化,以正常水体中斑马鱼的行为变化为基础,模拟并

比较镉($CdCl_2$, 重金属代表物质)和敌敌畏(DDVP, 有机磷农药代表物质)这两种典型污染物质突发性胁迫下斑马鱼的行为响应方式的差异。

1 实验材料和方法 (Materials and methods)

1.1 斑马鱼的培养

斑马鱼由中国科学院武汉水生所提供,本实验室饲养繁殖。采用流水式培养,养殖用水为脱氯自来水,水温为 $(28 \pm 1)^\circ C$,溶解氧为 $(6.5 \pm 0.2) mg \cdot L^{-1}$,光照周期为 10 h: 14 h,每天投食 2~3 次。选择鱼龄为 6~8 个月,体长为 $(30 \pm 0.2) mm$,体重为 $(300 \pm 0.2) mg$ 的斑马鱼,每组实验用鱼 5 条,雌雄比例为 3:2,实验前 24 h 不喂食。

1.2 实验试剂

氯化镉,分析纯(阿拉丁)。敌敌畏(80%乳油,山东大成农药股份有限公司);药品先配制成母液,实验室再稀释到所需浓度。

1.3 实验设计

采用水质毒性在线检测仪(RTB,深圳水务集团研制)进行 $CdCl_2$ 和 DDVP 突发性暴露下斑马鱼的个体和群体行为变化的定量监测。在一个尺寸为 $400 \times 75 \times 300 mm$ 的测试箱前设置一个 CCD 摄像头,利用摄像追踪和图像分析技术,实时跟踪记录每条鱼的多种行为变化,如图 1 所示。通过软件转换计算出 5 条鱼在 5 min 内的个体行为参数:平均游泳速度、深度、转弯次数、加速度,群体行为参数:平均距离和分散度,见表 1。

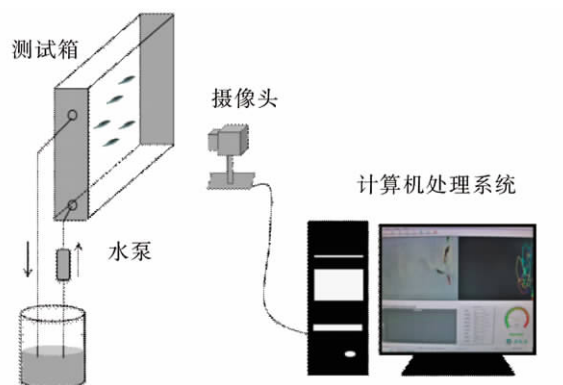


图1 测量斑马鱼行为变化的实验装置设计图

Fig. 1 Experimental setup for behavioral measurement of zebrafish

实验用水采用半静态式流水实验,控制进水流速为 $1\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$,水温为 25°C ,尽量减少人为、噪音等非水质因素的干扰,投加染料观察测试箱内水力流态证明,经水泵提升水由测试箱底部进入,由下至上均匀扩散至顶端出水口。同时,为减少斑马鱼昼夜生物钟现象对游泳行为的影响,实验进行时间为每天 9:00—16:00,共运行 7 h。其中 2 h 为空白实验,记录该组斑马鱼在正常水质状况下的游泳行为,从第 3 个小时开始时,即第 120 分钟时加入化学物质,模拟实际水体突发性突然事件,记录斑马鱼的行为变化。

据赵晓燕等^[8]的研究报道,氯化镉和敌敌畏对斑马鱼的 $\text{IC}_{50-96\text{h}}$ 半致死剂量分别为 6.8 和 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验设定 CdCl_2 和 DDVP 分别暴露在 7 和 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度中。每组实验的行为数据由 5 条鱼的平均数求得,每个质量浓度进行 5 组平行,结果以 5 组平行实验组的平均值 $\pm$ 标准误差显示。

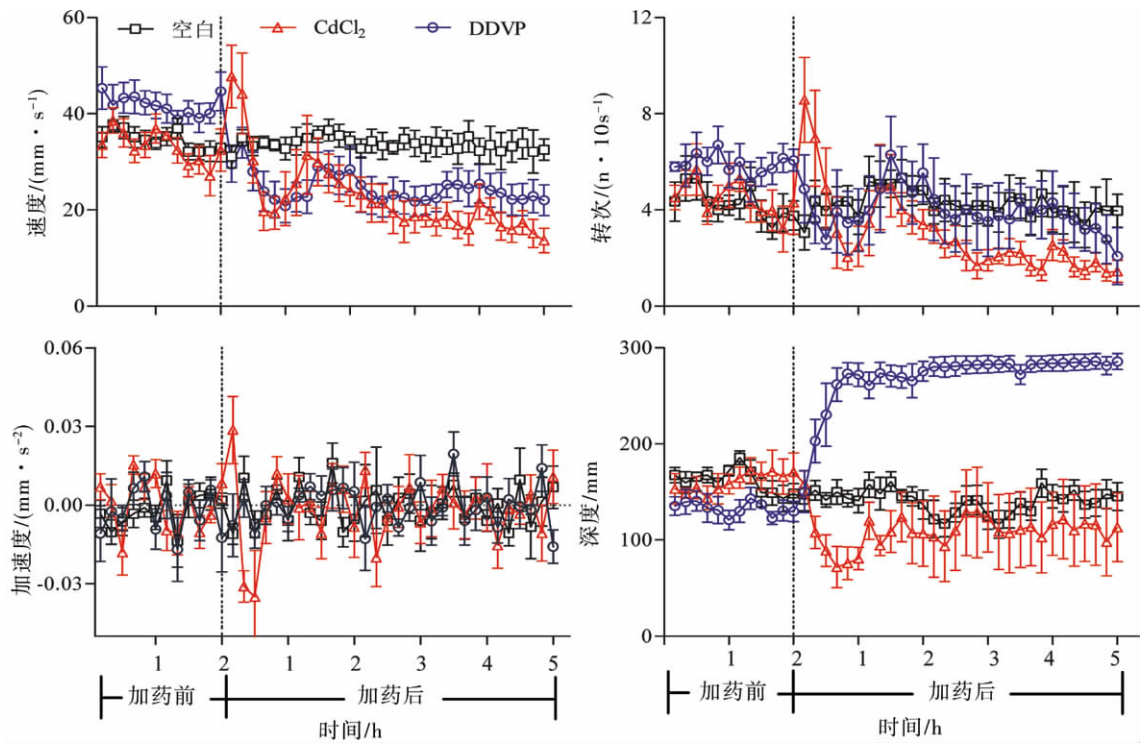


图 2 突发性氯化镉和敌敌畏污染暴露下斑马鱼个体运动行为的变化

Fig. 2 Individual endpoints changes of zebrafish sudden exposed to CdCl_2 or DDVP

本保持一致,斑马鱼的个体行为参数与第 1 小时相比均无显著差异,见表 2。

由图 2 可知,在突发性污染物暴露下斑马鱼有明显的行为调节,个体行为参数均在 10 min 内发生

表 1 个体和群体行为监测指标		
Table 1 Swimming endpoints of individuals and fish group		
项 目	监测指标	指标定义
个体行为	速度	单位时间内斑马鱼的运动速度
	深度	斑马鱼所处位置离测试箱底部的距离
	转弯次数	单位时间内运动轨迹大于 90 度的次数
	加速度	单位时间内斑马鱼的运动加速度
群体行为	平均距离	每 2 条斑马鱼之间的距离的平均值
	分散度	5 条斑马鱼围成的多边形面积占测试箱总面积的百分比

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 斑马鱼个体行为的变化

在一定的水质和环境因素条件下斑马鱼的个体行为和群体行为都具有规律性,是用于突发性污染条件下斑马鱼行为变化的可靠依据^[9]。如图 2 所示,前 2 h 的正常水体暴露中,个体行为参数都在一定范围内稳定变化,各组斑马鱼的个体行为参数没有显著差异。空白组在持续暴露的 7 h 内,水质基

变化。游泳速度、转弯次数及加速度随暴露时间的延长具有相同的变化趋势,但不同的污染物暴露下却有所不同。投加 CdCl_2 后,斑马鱼立刻出现快速不安地游动,速度和转弯次数持续增大,分别增大约

42% 和 100% ,10 min 后又急剧下降 ,与暴露前相比下降约 42% 和 50% 。游动加速度在接触到污染物后和速度在同一时间变化 ,40 min 内突然增大又降低的过程。而投加 DDVP 后 ,斑马鱼的游泳速度和转弯次数并没有增大过程而是在 1 h 内持续下降约 50% ,与暴露前相比差异显著 ,见表 2。

表 2 斑马鱼暴露于 CdCl_2 和 DDVP

前后个体行为参数显著性差异分析

Table 2 Variance analysis for individual changes before and after exposure to CdCl_2 or DDVP

组别	监测指标	时间间隔/h						
		加药前/h		加药后/h				
		0~1	1~2	0~1	1~2	2~3	3~4	4~5
空白	速度	—	0.999	0.190	1.000	0.554	0.460	0.200
	深度	—	0.927	0.647	0.815	0.268	0.340	0.501
	转次	—	0.961	0.203	0.773	0.826	0.876	0.382
	加速度	—	0.155	0.203	0.217	0.093	0.288	0.267
CdCl_2	速度	—	0.036	0.995	0.037	0.000*	0.000*	0.000*
	深度	—	0.045	0.000*	0.006*	0.407	0.148	0.230
	转次	—	0.156	0.000*	0.977	0.000*	0.000*	0.000*
	加速度	—	0.556	0.964	0.835	0.690	0.987	0.606
DDVP	速度	—	0.040	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
	深度	—	1.000	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
	转次	—	0.388	0.023	0.003*	0.000*	0.000*	0.000*
	加速度	—	0.997	0.983	0.423	1.000	0.968	1.000

注:暴露组实验分为暴露前 2 h 和暴露后 5 h,故每组都与暴露前第 1 小时做差异性分析。* 表示差异性显著($p < 0.01$)。

速度和转弯次数是衡量行为强度的重要指标。在受到污染物刺激后,斑马鱼的游动速度在短时间内突然增大,这一“回避反应”是水生生物对水环境污染所产生的第一层次行为变化,其表现形式和所维持的时间长短受暴露化合物的种类及浓度的影响,并呈现明显规律^[10]。敌敌畏等有机磷农药的主要毒性作用是可以抑制生物胆碱酯酶(AChE)的活性,使其失去水解乙酰胆碱的能力,从而造成生物体体内乙酰胆碱的积累、阻断兴奋传入感受器^[8];而重金属暴露则

主要导致氧自由基或活性氧(ROS)产物的增加,从而引起抗氧化酶(抗氧化防御酶 SOD 和 CAT 等)活力变化或非酶物质(谷胱甘肽 GSH 等)含量的变化^[11]。由此可知,同样单位毒性突发暴露下,斑马鱼对神经毒性的刺激表现出的过度活跃行为更加明显。

根据环境压力模型,当斑马鱼受到外界刺激时,其行为强度主要经历刺激、适应、调整、甚至再调整,直至产生明显行为毒性效应的过程^[12]。暴露于两种物质 1 h 后,速度和转弯次数在 20~30 min 内有调节增大的趋势, CdCl_2 暴露组甚至逐渐恢复到暴露前水平,这一次明显的行为调节的主要原因可能是基于生物节律的生物内在行为调节。暴露后期活动强度又持续下降,速度低至 $20 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,转弯频率低至 $2 \text{ n} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$,与暴露前 1 h 相比差异显著。两种物质在暴露的 5 h 内,斑马鱼的各行为参数都调节经历了明显的行为适应和调整过程,而后持续稳定在一定范围内,表现出毒性效应,变化趋势基本符合这一模型。

斑马鱼游动深度的变化主要和呼吸系统的损伤有关^[13]。虽然两种污染物质都是对斑马鱼的呼吸系统阻碍,进而产生游动深度的变化,但因其作用途径不同,产生的效果也不一样。水质正常的情况下,斑马鱼游动轨迹均匀的分布在整個水箱,游泳深度 5 min 内的平均值在 100~200 mm 之间,而水质环境发生变化时,斑马鱼的游泳深度也会发生变化,且 CdCl_2 和 DDVP 暴露下两种不同物质突发性暴露下明显不同,见图 2。 CdCl_2 暴露下斑马鱼游泳深度不断降低,每个小时在水箱底部($< 100 \text{ mm}$)停留时间超过 40 min,而 DDVP 暴露下游泳深度却不断的增大,斑马鱼的游动几乎全部集中的水箱上部($> 200 \text{ mm}$),与暴露前水平差异显著,见图 3。

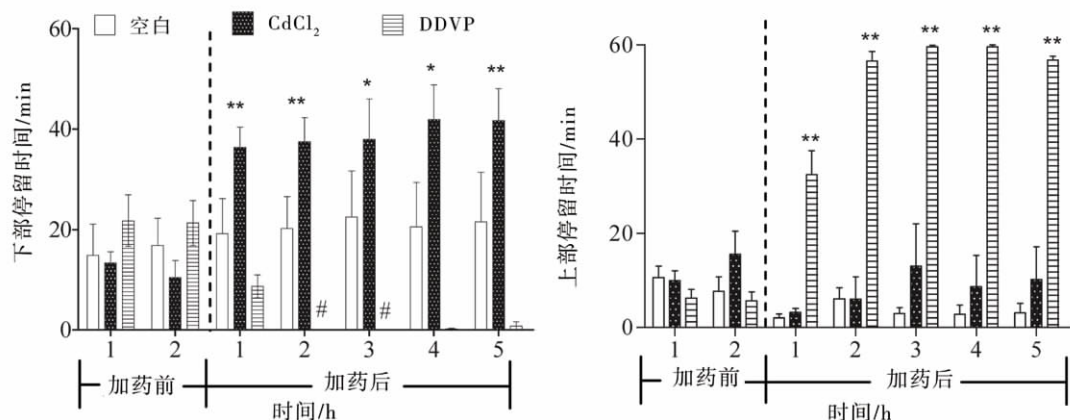


图 3 突发性氯化镉和敌敌畏污染暴露下斑马鱼在检测箱上部和下部停留时间

Fig. 3 Duration time of zebrafish near the upper or lower water column

2.2 斑马鱼群体分布的变化

斑马鱼是一种群游鱼类,和个体相比集群之后能快速获得更大的感知范围,可以互相沟通,快速传导信息,及时侦测到危险的讯号^[14]。受到某些环境中污染物的刺激后,鱼类会在惊慌慌乱或静止在某个角落的状态下使鱼群失去原有的分布和变化规律。Chew 等^[2]研究表明,鱼群分布的变化是监测鱼类受到外界刺激后发生“逃避反应”的有效指标。正常水体中,鱼群的运动轨迹分布整齐且有规律,而当测试箱中的环境改变时,为了逃避环境中污染物的刺激,

鱼表现出慌乱不安的过度活跃而使运动轨迹改变。由图 4 可知,在 DDVP 的突发性暴露下,斑马鱼在改变个体运动行为的同时,群体行为也会失去原有的规律。受到污染物刺激后的鱼群有明显的聚集现象,平均距离和分散度在 1 h 内有明显降低,平均距离从暴露前 120 mm 左右低至 80 mm,分散度由暴露前 15% 下降到 5%,均降约 30%。鱼群分布在暴露 1 h 后与暴露前有显著差异。随着暴露时间的增长,群体分布逐渐恢复到暴露前水平,而 CdCl₂ 突发性暴露下,平均距离和分散度均于暴露前无显著差异。

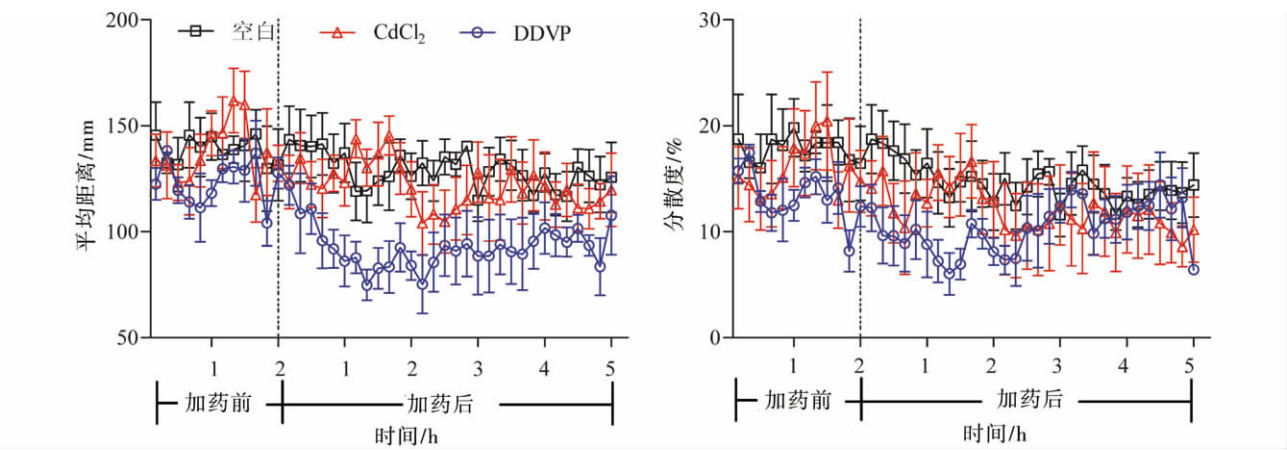


图 4 突发性氯化镉和敌敌畏污染暴露下斑马鱼鱼群运动行为的变化
Fig. 4 Fish school changes of zebrafish sudden exposed to CdCl₂ and DDVP

表 3 斑马鱼暴露于 CdCl₂ 和 DDVP 前后
群体行为参数显著性差异分析

Table 3 Variance analysis for fish group changes
before and after exposure to CdCl₂ or DDVP

组 别	参 数	时间间隔/h						
		加药前/h		加药后/h				
		0~1	1~2	0~1	1~2	2~3	3~4	4~5
空白	平均距离	—	0.943	1.000	0.060	0.369	0.236	0.032
	分散度	—	0.157	0.109	0.269	0.275	0.275	0.285
CdCl ₂	平均距离	—	0.993	0.917	0.999	0.045	0.526	0.165
	分散度	—	0.902	0.951	1.000	0.146	0.295	0.127
DDVP	平均距离	—	0.977	0.144	0.000*	0.000*	0.001*	0.000*
	分散度	—	1.000	0.968	0.005*	0.012	0.798	0.897

注: 暴露组实验分为暴露前 2 h 和暴露后 5 h, 故每组都与暴露前第 1 小时做差异性分析。* 表示差异性显著 ($p < 0.01$)。

斑马鱼的游动行为能灵敏、准确地反映突发性氯化镉和敌敌畏污染。实验所监测的 6 项指标中, 斑马鱼游动速度、深度、转次和平均距离较为敏感, 在正常水质环境中变化稳定, 而在突发污染暴露下短时间内就发生明显的变化, 是用于水质预警的可

靠指标。
不同种类的胁迫因子对鱼体造成一定程度的伤害有所不同, 环境胁迫产生的应激行为反应机理十分复杂, 它涉及到神经系统、内分泌系统及免疫系统的一系列活 机体通过神经和内分泌途径几乎动员了所有的器官和组织来应付应激源的刺激^[15]。敌敌畏等有机磷农药主要抑制生物的神经毒性, 而氯化镉在生物体内有明显的蓄积作用, 能损伤鱼类的肝脏和肾脏等器官。在两种不同种类的污染物胁迫下, 斑马鱼的行为强度在急剧增大或减小后都出现了明显的调节适应过程, 基本符合环境压力模型, 但斑马鱼对两种物质的行为响应方式存在显著差异。在 7 mg L⁻¹ 的氯化镉暴露下, 斑马鱼的个体行为参数调节明显, 接触到污染物后有明显的行为强度增大过程, 游动深度显著下降。而在 20 mg L⁻¹ 的 DDVP 的暴露实验中, 斑马鱼则没有过度活跃的行为现象, 而是直接降低, 鱼在水面停留时间明显增长。且鱼群分布变化明显。

在后续的研究中,应从污染物作用机理和效果入手,采用不同的模型和计算方法,根据斑马鱼的行为反应差异区分污染物的类型,进一步提高在线生物预警系统在水质预警中的应用。

参考文献:

- [1] Zongming R, Zijian W. Differences in the behavior characteristics between *Daphnia magna* and Japanese medaka in an on-line biomonitoring system [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(5): 703 – 708
- [2] Chew F B, Eng H L, Myo T. MVA 2009 IAPR Conference on Machine Vision Applications [C]. Yokohama, Japan: 2009
- [3] William H, Van Der S, Tommy R, et al. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2001, 16(7): 457 – 465
- [4] Kang I J, Oshima Y, Kinimaru H, et al. Development of An On-line Biological Early Warning System Using Japanese medaka (*Oryzias latipes*) for Monitoring a Mixture of Toxic Chemicals in Water Supplies [C]. USA: Abstracts, 4th, SETAC World Congress, Portland, OR, 2004
- [5] 刘勇, 付荣恕, 任宗明. 2种有机磷农药联合胁迫下日本青鳉的逐级行为响应[J]. 环境科学, 2010, 31(5): 1328 – 1331
Yong L, Rongshu F, Zongming R. Stepwise behavioral responses of the Japanese medaka under the joint stress of two organophosphorus pesticides [J]. Environmental Science, 2010, 31(5): 1328 – 1331
- [6] 黄东龙, 周勤. 水体突发性重金属污染胁迫下斑马鱼的行为反应分析[J]. 环境监测管理与技术, 2011, 4(23): 27 – 31
Donglong H, Qin Z. Behavior response analysis of zebrafish *Danio rerio* under sudden heavy metal stress [J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2011, 4(23): 27 – 31 (in Chinese)
- [7] 任宗明, 李志良, 饶凯峰, 等. 溴氰菊酯和氯化镉暴露下日本青鳉的行为反差[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(6): 563 – 569
Zongming R, Zhiliang L, Kaifeng R, et al. The differences of the behavioral responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in the exposure of fenvalerate and cadmium chloride [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(6): 563 – 569 (in Chinese)
- [8] 赵晓燕. 城市水源地典型污染物的生物监测与预警研究[D]. 广州: 暨南大学, 2009
Xiaoyan Z. Study of Biological Monitoring and Early Warning for Typical Pollutants in Urban Water Source [D]. Guangzhou: Jinan University, 2009 (in Chinese)
- [9] 任宗明, 马梅, 王子健. 饮用水生产中突发性有机磷农药污染事故的在线生物监测[J]. 给水排水, 2006, 32(2): 17 – 20
Zongming R, Mei M, Zijian W. On-line bio-monitoring of organophosphorous pesticides in case of accidental contamination of drinking water [J]. Water and Wastewater Engineering, 2006, 32(2): 17 – 20 (in Chinese)
- [10] Zongming R, Zijian W, et al. The avoidance responses of *Daphnia magna* to the exposure of organophosphorus pesticides in an on-line biomonitoring system [J]. Environmental Modeling and Assessment, 2009, 14(3): 405 – 410
- [11] Stochs S T, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1995, 18(2): 321 – 336
- [12] Gerhardt, A, Bisthoven, L D, Soares M A. Evidence for the stepwise stress model *gambusia holbrooki* and *daphnia magna* under AMD and ARWS [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(11): 4150 – 4158
- [13] Fukuda S J, Kang I J, Moroishi J, et al. The application of entropy for detecting behavioral responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to different toxicants [J]. Environmental Toxicology, 2010, 25(5): 446 – 455
- [14] Parrishjk, Viscidos, Grunbumd. Selforganized fish schools: An examination of emergent properties [J]. The Biological Bulletin, 2002, 202(3): 296 – 305
- [15] 洪磊. 环境胁迫对鱼类生理机能影响的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004
Lei H. 2004. Primary Study on the Physiological Function of the Fish under the Environmental Stress [D]. Qingdao: Ocean University of China (in Chinese)