2015-10-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2015.03017 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 Chin J Appl Environ Biol 2015, 21 (5): 798-804

10种凝油剂的生物毒性评价*

文小龙[1] 崔志松[2**] 穆景利[3] 靳 非[3] 高 伟[2] 栾 晓[2] 郑 立[2] 孙承君[2] 詹天荣[1]
[1]青岛科技大学化学与分子工程学院 青岛 266042
[2]国家海洋局第一海洋研究所海洋生态研究中心 青岛 266061
[3]国家海洋环境监测中心 大连 116000

摘 要 为评价海洋溢油应急处置中所使用的凝油剂的环境安全性，以发光细菌（*Acinetobacter* sp. Tox2和*Acinetobacter* sp. RecA）和海水青鳉（*Oryzias melastigma*）幼鱼为受试生物，对10种凝油剂的急性毒性和遗传毒性进行检测. 结果显示，采用发光细菌法检测到FOA、GMN-01等两种凝油剂具有一定水平的急性毒性，其$HgCl_2$当量浓度分别为0.067 mg/L、0.084 mg/L；而NORSOREX凝油剂具有一定水平的遗传毒性，其丝裂霉素C（MMC）当量浓度达到0.307 mg/L. 然而，在鱼类暴露实验中并没有检测到上述样品明显的急性毒性或遗传毒性. 本研究表明，所选取的10种凝油剂在96 h内对高等生物（鱼类）均没有明显的急性毒性或遗传毒性，而发光细菌法在凝油剂生物毒性检测中的灵敏度更高；本研究结果可为凝油剂用于处理实际溢油污染的环境安全性指标提供参考. 图5 表4 参27

关键词 凝油剂；急性毒性；遗传毒性；发光细菌；海水青鳉
CLC X171.5

Toxicity evaluation of 10 oil gelling agents*

WEN Xiaolong[1], CUI Zhisong[2**], MU Jingli[3], JIN Fei[3], GAO Wei[2], LUAN Xiao[2], ZHENG Li[2], SUN Chengjun[2] & ZHAN Tianrong[1]
[1]*Institute of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology,* Qingdao 266042, China
[2]*Marine Ecology Research Center, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration,* Qingdao 266061, China
[3]*National Marine Environmental Monitoring Center,* Dalian 116000, China

Abstract Oil gelling agents are widely used in emergency response of marine oil spills. However, the biological toxicity of oil gelling agents is not well understood. This research aimed to evaluate the environmental safety of oil gelling agents used for rapid removal and cleanup of marine oil spills. We used luminescent bacteria (*Acinetobacter* sp. Tox2 and *Acinetobacter* sp. RecA) combined with exposure experiment using marine medaka (*Oryzias melastigma*) juveniles to detect the acute toxicity and genotoxicity of 10 oil gelling agents. As a result, a certain level of acute toxicity was detected from the oil gelling agent FOA and GMN-01 (the toxicity equivalent to 0.067 mg/L and 0.084 mg/L of $HgCl_2$, respectively), and a certain level of genotoxicity was detected from the oil gelling agent NORSOREX (the toxicity equivalent to 0.307 mg/L of MMC) by the luminescent bacteria test. However, no obvious acute toxicity or genotoxicity was detected from the above three oil gelling agents in fish-exposure experiments. Our results suggest that the 10 oil gelling agents have no obvious acute toxicity or genotoxicity to higher organisms (including marine medaka). The luminescent bacteria test is more sensitive in detecting biological toxicity of oil gelling agents. This study provides a reference for environmental safety evaluation of the oil gelling agents used in the cleaning up of the marine oil spills.

Keywords oil gelling agent; acute toxicity; genotoxicity; luminescent bacteria; marine medaka; *Oryzias melastigma*

石油在工业发展中起着不可替代的作用，然而石油污染问题也越来越严峻[1]. 尽管通过海洋微生物降解石油烃是一种处理溢油污染的有效途径[2-3]，但是在很多情况下溢油污染应急处置工作中仍需要处理周期短的技术手段. 因此，消油剂和凝油剂作为一种方便的除油剂仍被广泛使用. 但是，由于消油剂和凝油剂本身潜在的毒性作用，其环境效应和风险一直引人关注. 目前，国内外针对消油剂毒性开展了许多评价研究[4-6]，但是对凝油剂毒性的研究少有涉及，尤其是凝油剂对海洋微生物群落、鱼类、贝类以及藻类生存的影响研究，尚未见报道. 因此，评价常用凝油剂的生物毒性工作就显得尤为重要.

发光细菌法（Luminescence bacteria test，LBT）应用于环境样品生物毒性测试已日益成熟[7-8]，研究表明，毒物浓度与菌体发光强度呈一定的线性关系[9]. 因此，可根据发光细菌发光强度判断毒物的毒性大小[10]，用发光抑制率或诱导率

收稿日期 Received: 2015-03-16 接受日期 Accepted: 2015-05-24
*科技部科技基础性工作专项（2012FY130300）、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金（2014G12）和泰山学者海外创新人才资助 Supported by the Ministry of Science and Technology of China (2012FY130300), the Basic Scientific Fund for National Public Research Institutes of China (2014G12) and the Taishan Award for Innovative Overseas Scholars
**通讯作者 Corresponding Author (E-mail: czs@fio.org.cn)

来表征毒物的毒性大小[11]. 譬如, 宋一之等研发了可检测海水环境样品急性毒性的不动杆菌Tox2菌株(*Acinetobacter* sp. Tox2)和遗传毒性的不动杆菌RecA菌株(*Acinetobacter* sp. RecA)[12-13]. 其中, Tox2菌株可快速检测环境污染物的急性毒性[14], 其工作原理为急性毒性物质作用于Tox2菌株的呼吸系统, 影响细菌的呼吸链, 造成发光细菌的发光强度减弱, 其发光强度减弱与毒物的毒性大小成正比[15-16]; 而RecA菌株可快速检测环境污染物的遗传毒性[17], 其工作原理为遗传毒物作用于RecA菌株的遗传物质[18], 造成细菌的DNA损伤, RecA蛋白被活化为蛋白酶, 与阻遏蛋白LexA结合, 使后者裂解. 一旦LexA蛋白被裂解, 所有参与SOS反应的基因都将充分表达, 使细胞的修复得以发生[19-20]; 在参与SOS反应的基因后插入*luxCDABE*片段, 就会增强了荧光蛋白的表达, 根据发光强度的变化即可检测毒物的遗传毒性大小. 海水青鳉(Marine medaka, *Oryzias melastigma*), 在生物毒性检测中被广泛应用. 海水青鳉与斑马鱼类似, 具有体型小、繁殖快、易饲养、鱼卵透明等优点. 相比斑马鱼, 海水青鳉可适用于海洋环境下污染物的毒性研究. 基于上述优点, 海水青鳉已被国内外研究机构作为新的受试鱼种开展了多项生态毒理学研究及应用, 已证明该鱼种对雌二醇和雌激素酮等内分泌干扰物具有较强的敏感性, 并被推荐为“一种理想的海洋模式鱼种”. 譬如, 穆景利等利用海水青鳉对近岸海域的重金属离子进行了综合毒性评价[21], 初步发现海水青鳉对重金属离子具有较强的敏感性, 可用于污染物的全生命周期测试. 本研究主要采用发光细菌法检测凝油剂的急性毒性和遗传毒性, 并采用鱼类暴露实验对其进行验证以获得综合的生物毒性评价结果, 从而为凝油剂用于海洋溢油应急处置中的环境安全性指标提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 **仪 器** 微孔板式化学发光检测仪(Molecular Devices公司, SpectraMax M5e), 恒温磁力搅拌器(北京神泰伟业仪器设备有限公司, SZCL-4A), 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司, LRH-70), 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司, SW-CJ-1FD), 恒温培养摇床(上海一恒科学仪器公司, THZ-100 biuepard), 分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司, Unico WFJ2000), 自动灭菌锅(日本Tomy, SS-325), pH计(梅特勒–托利多仪器有限公司, FE20), 盐度计(EUTECH instruments, MQK-SA2).

1.1.2 **供试发光菌** 发光细菌: 急性毒性检测菌株*Acinetobacter* sp. Tox2; 遗传毒性检测菌株*Acinetobacter* sp. RecA, 由清华大学环境学院李广贺教授课题组提供.

1.1.3 **供试鱼种** 本实验所用的海水青鳉种源来自香港大学Kenneth Leung教授实验室. 目前已驯化和繁殖10代之多, 饲养于美国Aquatic Habitats标准化流水式养殖系统中, 水质条件为盐度30 ± 2, 温度为28 ℃ ± 2 ℃, 光周期为14 h/10 h(光照/避光). 每天投喂3次无节卤虫和2次合成饲料, 系统每天自动更新总水量的1/10. 正常情况下, 雌鱼每天产卵10-30枚. 为保证鱼卵的同步性, 全部鱼卵均在产卵开始的3-5 h内收集, 并利用体视镜对各卵进行筛查, 为保证实验用鱼的一致性, 应选用孵化后6-10 d、活力强且健康的幼鱼进行实验.

1.1.4 **细菌培养基** LB培养基: 蛋白胨(Oxoid, 英国) 10 g, 酵母粉(Oxoid, 英国) 5 g, 氯化钠(沪试, 分析纯) 10 g, 溶解到1 000 mL蒸馏水, 调节pH = 7.0. 121 ℃, 高压蒸汽灭菌15 min.

1.1.5 **模拟海水** 1 L的去离子水中加入35.949 g的市售普钙海盐(Instant Ocean), 盐度约为30, 调节pH = 7.6-7.8.

1.1.6 **凝油剂样品** 目前, 国内凝油剂产品多以高聚物、高级醇、天然胶等为主, 共收集到3种. 对于国外凝油剂产品, 主要收集了美国环保署(EPA)国家应急计划产品目录中所列的6种凝油剂(美国4种、加拿大1种、奥地利1种)的产品信息, 外加1种日本的凝油剂产品. 具体信息见表1.

1.1.7 **凝油剂样品的前处理方法** 参照《Standard practice for shake extraction of solid waste with water》[22]获得凝油剂浸出液以用于生物毒性测试, 具体如下: 在龙头瓶中的2 L模拟海水中各加入50 g不同凝油剂, 液固比为40:1, 磁力搅拌16 h, 静置8 h, 从龙头瓶下方取澄清液体作为待检实验样品, 4 ℃下保存待测.

1.1.8 **检测菌液的准备** 从冻存管中接种Tox2和RecA菌株并在LB平板划线培养得到单菌落. 然后从平板上挑取单菌落, Tox2菌株接种到含有200 μg/mL氨苄青霉素液体LB培养基中, RecA菌株接种到含有10 μg/mL卡那霉素的液体LB培养基中, 于30 ℃、150 r/min培养16 h至平台期, 此培养物为A液. 其中Tox2菌株的A液以2%的接种量接入新鲜LB培养基中, 在相同条件下培养8 h, RecA菌株的A液以2%的接种量接入新鲜LB培养基中, 在相同条件下培养16 h, 得到B液. 处于平台期菌液的$OD_{600\ nm}$值和相对发光单位(简称RLU)均为最大, 最

表1 10种典型凝油剂样品的信息
Table 1 Product information of 10 typical oil gelling agents

编号 Number	产品名称 Product name	产品类型 Product type	产地 Place of origin
NY1	FOA	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	中国 CHN
NY2	白元固油粉 Hakugen solid oil powder	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	日本 JAN
NY3	Oil solutions powder	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	美国 USA
NY4	OIL BOND	带交联剂的高聚物 Polymer crosslinking agent	美国 USA
NY5	GMN-01	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	中国 CHN
NY6	WOP	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	中国 CHN
NY7	IMBIBERBEADS (粉末 Powder)	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	美国 USA
NY8	IMBIBER BEADS (吸油毡 Suction felt)	高聚物吸着剂 Polymer sorbent	美国 USA
NY9	NORSOREX	带交联剂的高聚物 Polymer crosslinking agent	奥地利 AUS
NY10	ALSOCUP	交联剂 Crosslinking agent	加拿大 CAN

适于检测样品的急性毒性和遗传毒性. 取平台期的B液10 000 r/min离心10 min, 然后将Tox2菌株采用3% NaCl重悬, 将RecA菌株采用LB培养基重悬, 待用.

1.2 基于发光细菌的生物毒性测试方法

1.2.1 **样品测试体系** 以$HgCl_2$为急性毒性检测的阳性参比, 先用超纯水配制500 mg/L $HgCl_2$母液, 再将此母液用模拟海水稀释至以下梯度浓度: 0.2 mg/L, 0.15 mg/L, 0.1 mg/L, 0.05 mg/L, 0.02 mg/L. 以丝裂霉素C(MMC)为遗传毒性检测的阳性参比, 先用超纯水作配制200 mg/L MMC母液, 再将此母液用模拟海水稀释至以下梯度浓度: 2 mg/L, 1 mg/L, 0.5 mg/L, 0.2 mg/L, 0.1 mg/L, 0.02 mg/L. 以模拟海水为阴性对照(CK).

测试体系为200 μL(190 μL样品或对照处理+10 μL菌液), 每个处理设3个平行. 加完样品和菌液后立即上机测试, 检测温度应保持在30 ℃. 使用SpectraMax M5e进行测试, 在急性毒性测试中每5 min测一次, 连续测试2 h; 在遗传毒性测试中每15 min检测一次, 连续测试8 h.

1.2.2 **样品毒性计算方法** 相对发光抑制率(IR)的计算如下: $IR = 1 - L_{HgCl_2}/L_{CK}$. L_{HgCl_2}: 阳性对照($HgCl_2$)的相对发光单位(RLU); L_{CK}: 阴性对照的相对发光单位; 建立并检验$HgCl_2$浓度(C)与相对发光抑制率相关方程: $IR = a + bC_{HgCl_2}$.

相对发光诱导率(IF)的计算如下: $IF=L_{MMC}/L_{CK} - 1$. L_{MMC}: 阳性对照(MMC)的相对发光单位; L_{CK}: 阴性对照的相对发光单位; 建立并检验MMC浓度(C)与相对发光诱导率(IF)相关方程: $IR = a + bC_{MMC}$. 查相关系数显著水平(P值表), 检验所求R^2值的显著水平$P \leqslant 0.01$, 根据上述方程和样品的发光抑制率或发光诱导率计算出各个样品的$HgCl_2$或MMC当量浓度.

1.3 基于鱼类暴露实验的生物毒性测试方法

1.3.1 **急性毒性测试方法** 按照1.1.7操作获得的凝油剂浸出物原液用于海水青鳉幼鱼的暴露实验. 实验采用半静态暴露的方式进行, 具体方法参考《溢油分散剂 技术条件》[23]并稍作改动. 概括如下: 将海水青鳉幼鱼暴露在总体积为250 mL浸出液中, 并设置3个平行组, 每平行组中幼鱼为100枚, 保持温度为28 ℃ ± 2 ℃, 光周期为14 h/10 h(光照/黑暗), 暴露周期为96 h, 每隔24 h更换暴露水体一次. 96 h后, 统计死亡率.

1.3.2 **遗传毒性测试方法** 采用单细胞凝胶电泳(SCGE)对仔鱼进行DNA损伤评价[24]. 具体方法如下: 经样品处理后的10条仔鱼用磷酸盐缓冲液冲洗后制成单细胞悬液(全鱼); 配制好的单细胞悬液经一系列处理制成凝胶片; 采用CASP软件对彗星图像进行分析, 统计损伤率. 其中, 头部DNA和尾部DNA两组数据是根据荧光强度推算出的DNA绝对量. 尾部DNA含量、尾长、尾矩和Olive尾矩等指标使用SPSS 16.0软件进行统计学分析. 根据彗星尾部DNA含量将DNA损伤分为4级, DNA损伤分级方法见表2.

2 结果

2.1 基于发光细菌法的凝油剂生物毒性评价

2.1.1 **阳性参比的发光曲线** 由图1可见, 随时间推移, Tox2菌株发光强度逐渐降低, 且发光强度降低的程度与$HgCl_2$浓度成正比, 在15 min时0.2 mg/L $HgCl_2$处理的发光值已将至最低. 而随着随时间推移, RecA菌株发光强度逐渐上升, 且发光强度升高的程度与MMC浓度成正比, 在6 h时2 mg/L MMC处理的发光值已升至最高. 因此, 选取15 min的发光抑制率

表2 彗星试验中DNA损伤分级方法

Table 2 DNA damage classification from the COMET assay

损伤级数 Damage level	尾部DNA含量 Tail DNA content	损伤情况 Damage
0级 Level 0	尾部DNA含量≤5% Tail DNA content ≤ 5%	无损伤 No damage
1级 Level 1	5%<尾部DNA含量≤20% 5% < Tail DNA content ≤ 20%	轻度损伤 Mild damage
2级 Level 2	20%<尾部DNA含量≤40% 20% < Tail DNA content ≤ 40%	中度损伤 Moderate damage
3级 Level 3	40%<尾部DNA含量≤95% 40% < Tail DNA content ≤ 95%	严重损伤 Severe damage
4级 Level 4	尾部DNA含量 ⩾ 95% Tail DNA content ≥ 95%	完全损伤 Complete damage

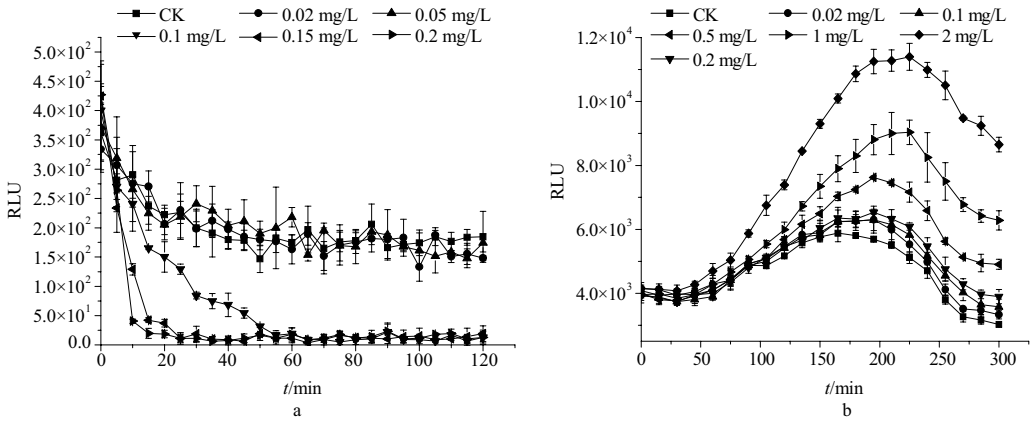


图1 发光细菌Tox2在不同浓度$HgCl_2$作用下的发光曲线(a)和发光细菌RecA在不同浓度MMC作用下的发光曲线(b). RLU: 相对发光单位.

Fig. 1 a. Luminescence curve of the inhibitory effect of $HgCl_2$ using luminescent bacteria *Acinetobacter* sp. Tox2; b. Luminescence curve of the inductive effect of MMC using luminescent bacteria *Acinetobacter* sp. RecA. RLU: relative luminescence units.

表征其急性毒性，选取6 h的发光诱导率表征其遗传毒性.

2.1.2 **阳性标准曲线及线性回归方程** 如图2所示，在急性毒性检测中，Tox2的发光抑制率与$HgCl_2$浓度呈明显的正相关关系，在15 min时，回归方程为$y = -27.16 + 631.24x$（$R^2 = 0.96$，$P < 0.01$），该方程可用于计算凝油剂浸出液样品的$HgCl_2$当量浓度，并对其急性毒性进行评价. 而在遗传毒性检测中，RecA的发光诱导率与MMC浓度呈明显的正相关关系，在6 h时，其回归方程为$y = 9.29 + 58.99x$（$R^2 = 0.98$，$P < 0.01$），该方程可用于计算凝油剂浸出液样品的MMC当量浓度，并对其遗传毒性进行评价.

2.1.3 **10种凝油剂的发光抑制率IR和诱导率IF** 由图3可见，凝油剂NY1和NY5对Tox2菌株的发光抑制作用较明显，其抑制率分别为14.6%和25.5%，表现出较明显的急性毒性. 而NY9对RecA菌株的发光诱导作用较明显，其诱导率为27.4%，表现出较明显的遗传毒性. 其它凝油剂对Tox2的发光抑制作用或对RecA的发光诱导作用均不明显，没有表现出相应的急性毒性或遗传毒性.

2.1.4 **10种凝油剂的毒性当量** 根据线性回归方程以及所测凝油剂浸出液样品的发光抑制率IR和诱导率IF，计算得到样品的$HgCl_2$和MMC当量浓度来分别表征其急性毒性和遗传毒性的大小（表3）. 当抑制率和诱导率为负值时，计算出的$HgCl_2$和MMC的当量浓度也是负值，此情况下表明该样品无急性毒性或遗传毒性.

表3 10种凝油剂样品的生物毒性当量

Table 3 Bio-toxicity equivalency of the 10 oil gelling agents

编号 Number	IR/%	$HgCl_2$ (ρ/mg L^{-1})	IF/%	MMC (ρ/mg L^{-1})
NY1	14.6	0.067	−52.2	< 0.020
NY2	−156.0	< 0.020	−7.0	< 0.020
NY3	−8.2	0.030	−23.0	< 0.020
NY4	−11.5	0.025	−38.4	< 0.020
NY5	25.5	0.084	−44.9	< 0.020
NY6	−20.5	0.011	−16.3	< 0.020
NY7	−33.5	< 0.020	−4.9	< 0.020
NY8	−126.0	< 0.020	2.7	< 0.020
NY9	−127	< 0.020	27.4	0.307
NY10	−3.7	0.037	−31.6	< 0.020

IR：抑制率；IF：诱导率.

IR: Inhibition ratio; IF: induction ratio.

由表3可见，在液固比为40:1的条件下，两种国产凝油剂产品NY1和NY5（即FOA和GMN-01）具有较高的急性毒性，其$HgCl_2$当量浓度分别为0.067 mg/L、0.084 mg/L，但

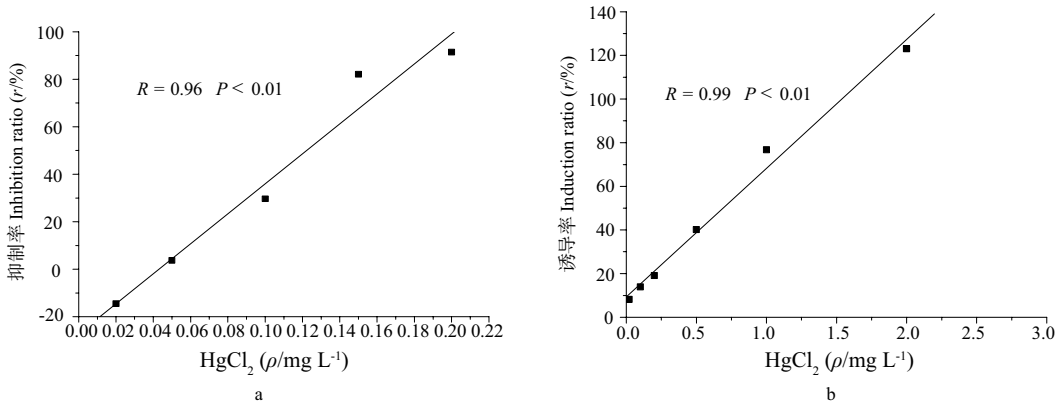


图2 基于发光细菌Tox2的急性毒性标准曲线（a）和基于发光细菌RecA的遗传毒性标准曲线（b）.

Fig. 2 a. Standard curve of the acute toxicity of $HgCl_2$ using luminescent bacteria *Acinetobacter sp.* Tox2; b. Standard curve of the genotoxicity of MMC using luminescent bacteria *Acinetobacter sp.* RecA.

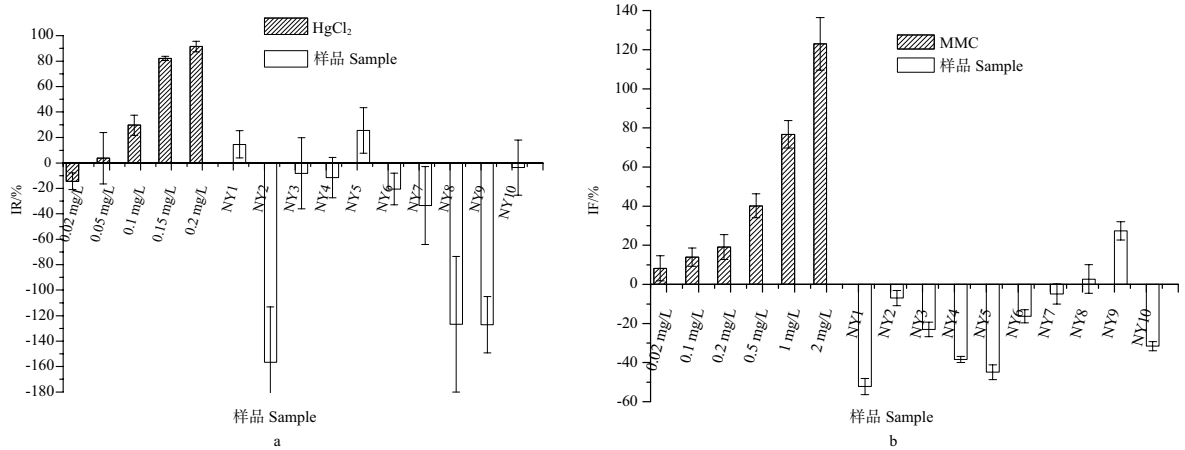


图3 10种凝油剂样品的发光抑制率（a）和10种凝油剂样品的发光诱导率（b）. IR：抑制率；IF：诱导率.

Fig. 3 a. Luminescence inhibition rates of 10 oil gelling agents for *Acinetobacter sp.* Tox2; b. Luminescence induction rates of 10 oil gelling agents for *Acinetobacter sp.* RecA. IR: Inhibition ratio IF: induction ratio.

没有检测出其明显的遗传毒性. 进口凝油剂产品NY9(即NORSOREX® APX)表现出中等水平的遗传毒性, 其MMC当量浓度达到0.307 mg/L, 但没有检测出其明显的急性毒性.

2 .2 基于鱼类暴露实验的凝油剂生物毒性评价

根据上述发光细菌法的生物毒性检测结果, 选取NY1、NY5和NY9等3种具有较明显生物毒性的凝油剂样品以及NY3(未检测到明显生物毒性的样品), 采用海水青鳉幼鱼暴露实验对其生物毒性进行验证.

2.2.1 $HgCl_2$对海水青鳉幼鱼的96 h急性毒性 由图4可见, 标准曲线符合线性回归分析. 在96 h时, 海水青鳉幼鱼的死亡率与$HgCl_2$浓度呈现明显的正相关关系, 其回归方程为$y = -5.43 + 43.21x$ ($R^2 = 0.98$, $P < 0.01$).

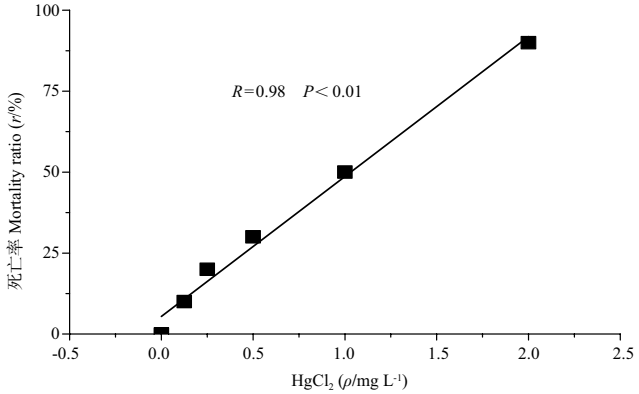


图4 不同浓度$HgCl_2$对海水青鳉幼鱼的96 h急性毒性.
Fig. 4 Standard curve of acute toxicity of $HgCl_2$ using marine medaka juveniles in 96 h.

2.2.2 4种凝油剂的急性毒性 分别经上述4种凝油剂浸出液暴露96 h后, 海水青鳉幼鱼的死亡率均为0, 表明4种凝油剂(NY1、NY3、NY5和NY9)对海水青鳉幼鱼不具有明显的急性毒性.

2.2.3 MMC对海水青鳉幼鱼细胞的DNA损伤 经不同浓度MMC暴露后, 海水青鳉幼鱼的DNA损伤情况如图5所示. 随MMC浓度升高, DNA损伤率、尾部DNA含量均呈上升趋势, 但仅尾部DNA含量与MMC浓度呈显著正相关性($R^2 = 0.95$, $P = 0.045$), 故在后续凝油剂的遗传毒性评价中以尾部DNA含量为主要评价指标.

2.2.4 4种凝油剂对海水青鳉幼鱼细胞的DNA损伤 通过彗星实验检测4种凝油剂样品对海水青鳉幼鱼的DNA损伤情况(表4).

结果显示, NY1、NY3、NY5和NY9对海水青鳉幼鱼细胞的DNA损伤率分别为36.8%、60.1%、22.2%和20.0%, 相应的尾部DNA含量分别为2.4%、2.4%、2.1%和1.8%. 可见, 以不同指标评价的凝油剂遗传毒性大小顺序略有不同, 按损伤率排序为NY3 > NY1 > NY5 > NY9, 而按尾部DNA含量排序为NY1 ≈ NY3 > NY5 > NY9. 尽管MMC和凝油剂均可对海水青鳉产生一定的损伤, 但根据DNA损伤等级评价方法, 4种凝油剂产品NY1、NY3、NY5和NY9对海水青鳉幼鱼DNA损伤等级均为0级(表2), 即无损伤, 均无明显的遗传毒性.

表4 4种凝油剂对海水青鳉幼鱼的DNA损伤结果
Table 4 DNA damage of 4 oil gelling agents on marine medaka

编号 Number	头部 DNA Head DNA	尾部DNA Tail DNA	头部DNA含量(r/%) Head DNA content	尾部DNA含量(r/%) Tail DNA content	损伤率(r/%) Damage ratio
0	256.0 ± 114.6	3.2 ± 1.1	98.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0
0.02 mg/L	99.6 ± 20.1	2.1 ± 1.6	97.9 ± 1.2	2.0 ± 1.2	11.1
0.2 mg/L	90.0 ± 32.2	2.9 ± 3.1	97.1 ± 2.1	2.8 ± 2.1	33.3
2.0 mg/L	79.7 ± 25.0	4.9 ± 1.7	94.8 ± 8.2	5.1 ± 2.2	58.8
NY1	142.0 ± 49.7	3.5 ± 1.7	99.1 ± 1.1	2.4 ± 1.1	36.8
NY3	121.9 ± 32.8	3.5 ± 1.1	99.5 ± 0.7	2.4 ± 0.8	60.1
NY5	107.5 ± 23.3	2.2 ± 0.9	99.4 ± 0.8	2.1 ± 0.8	22.2
NY9	109.8 ± 53.6	1.6 ± 0.6	99.4 ± 0.9	1.8 ± 0.7	20.0

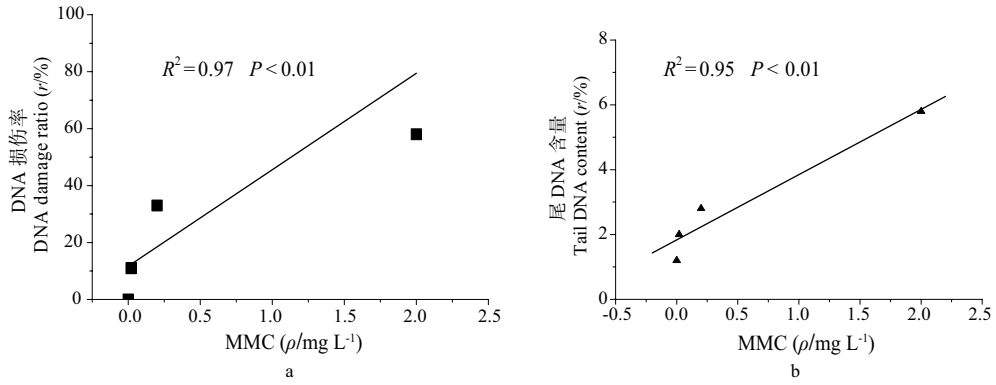


图5 MMC对海水青鳉幼鱼DNA的损伤率(a)和海水青鳉幼鱼尾部DNA含量与MMC的关系(b).
Fig. 5 a. DNA damage rates in cells of marine medaka juveniles caused by MMC; b. Relationship between tail DNA content in cells of marine medaka juveniles and MMC.

3 讨论

3.1 发光菌检测结果中出现的负值

发光菌检测生物毒性已被广泛应用，本文研究所采用的Tox2菌株和RecA菌株作为全细胞生物传感器，对很多毒性物质均较敏感. 然而，在凝油剂急性毒性检测中，一些凝油剂的浸出液样品促进了Tox2菌株的发光，即对Tox2菌株的发光抑制率为负值. 究其原因，绝大多数凝油剂样品为固态的高聚物，其中可能含有一些有机成分，不仅不会对细菌的呼吸系统产生影响，反而可作为碳源或氮源供细菌生长，因此促进了细菌的发光. 所以，发光菌检测急性毒性结果中发光抑制率为负值往往意味着该凝油剂样品的急性毒性很小或没有急性毒性. 另外，RecA菌株作为一种遗传毒性检测细菌，既具有可检测遗传毒性的DNA操纵子元件，也具有正常的呼吸系统. 所以，当细菌暴露于同时具有急性毒性和遗传毒性的毒物时，特别是当急性毒性较大的情况下，势必会抑制RecA菌株的发光，从而干扰正常的遗传毒性的表征. 因此，在后续研究中需要采用校正机制，以客观表征一些特定毒物的遗传毒性.

3.2 发光菌法与鱼类暴露实验检测结果的比较与差异

溢油应急处置中使用凝油剂产品需要多种方法进行综合评价. 总体上可分为两大类，即较为传统的基于不同实验动物的静水式暴露实验方法和较新的基于发光细菌法的生物毒性评价方法. 采用发光细菌法检测到FOA、GMN-01凝油剂具有一定水平的急性生物毒性，其$HgCl_2$当量浓度分别为0.067 mg/L、0.084 mg/L；NORSOREX凝油剂样品具有一定水平的遗传生物毒性，其MMC当量浓度达到0.307 mg/L. 然而，在鱼类暴露实验中并没有检测到上述样品的急性毒性（致死）或遗传毒性（DNA损伤），其结果有一定差异，这说明它们之间的毒性机理具有一定差异，发光菌是低等的生物，污染物对发光菌的毒性是通过抑制发光菌的生理发光过程而产生的毒性效应. 而鱼类是较为高等的生物，污染物对鱼类的毒性是通过影响鱼类正常生命活动产生的毒性效应，其检测原理不同导致发光菌和鱼类的检测结果存在差异. 尽管发光细菌法和鱼类暴露实验检测的结果存在一定差异，但两者之间总体的匹配度较好，其中鱼类暴露实验结果对于高等生物的借鉴意义更大.

3.3 不同凝油剂之间的毒性差异

目前，国内外尚未见凝油剂生物毒性的研究报道，本文通过两种不同受试生物研究、比较了不同凝油剂的急性毒性和遗传毒性. 研究发现，在鱼类暴露实验中并没有检测到10种凝油剂样品的急性毒性（致死）或遗传毒性（DNA损伤），在发光菌检测中发现有3种凝油剂具有一定水平的急性毒性或遗传毒性，但其毒性当量均很低. 由于凝油剂的组分以及各组分之间的配比一般为商业秘密而不可知，但一般为高聚物固体，其生物毒性相对较小. 本文的检测结果可为凝油剂在海洋溢油应急处置中的应用提供环境安全性的参考.

3.4 细菌与鱼类各自的优点

本研究发现，而通过发光细菌法检测生物毒性具有快速、操作简单、高通量、成本低廉等优点[25]，且发光细菌对凝油剂的生物毒性反应更敏感，周秀艳等利用发光菌和鱼类评价工业废水的生物毒性中得出发光菌具有更高的灵敏度[26]，而李彬等利用发光菌和斜生栏藻评价重金属污染土壤的生物毒性的试验中得出了相同的结论[27]. 而利用鱼类暴露实验方法检测生物毒性有综合性强的优点，其中利用污染物对鱼类的毒性暴露试验是最为直接的方法，能较为客观地反映出被测物的综合毒性.

4 结论

本文研究基于发光细菌法（*Acinetobacter* sp. Tox2和*Acinetobacter* sp.RecA）检测了国内外10种凝油剂的生物毒性，并通过海水青鳉幼鱼暴露实验对其进行验证. 该方法具有快速简便、灵敏和准确的优点，能客观反映国内外10种凝油剂的综合毒性情况. 从实验中可得出，采用发光细菌法检测到FOA、GMN-01、NORSOREX等3种凝油剂具有一定水平的生物毒性，但对较高等的生命体（鱼类）并没有明显的急性毒性或遗传毒性，即不足以导致仔鱼的死亡或造成仔鱼细胞DNA的损伤. 综上，采用单一受试生物进行急性毒性或遗传毒性测试可能达不到全面反映凝油剂的实际生物毒性的目的，而采用不同营养级的受试生物进行生物毒性综合测试并相互印证可以得到更为科学的毒性评估结果. 因此，该方法可用于快速筛选用于溢油应急响应的凝油剂产品，为合理应用凝油剂处理溢油污染提供了一定的参考.

参考文献 [References]

1 Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, Green SJ, Freyer G, Canion A, Delgardio J, Norton N, Hazen TC, Huettel M. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77** (22): 7962-7974

2 郑立, 崔志松, 高伟. 海洋石油降解菌剂在大连溢油污染岸滩修复中的应用研究[J]. 海洋学报, 2012, **34** (3): 163-172 [Zheng L, Cui ZS, Gao W. Field study of the bioremediation of oil-contaminated Dalian beach by marine oil-degrading bacterial agent [J]. *Acta Oceanol Sin*, 2012, **34** (3): 163-172]

3 牟颖, 严良政. 近岸海域石油污染生物修复技术的研究进展[J]. 工业安全与环保, 2012, **38** (5): 61-63 [Mou Y, Yan LZ. The research advances of bioremediation technology on the coastal petroleum pollution treatment [J]. *Ind Saf Environ Prot*, 2012, **38** (5): 61-63]

4 Gulec I, Leonard B, Holdway DA. Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails [J]. *Spill Sci Technol Bull*, 1997, **4** (1): 1-6

5 Shafir S, Van Rijn J. Rinkevich B. Short and long term toxicity of crude oil and oil dispersants to two representative coral species [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, **41** (15): 5571-5574

6 杨波, 关敏, 徐汉光. 几种常用消油剂对海洋生物的毒性影响[J]. 海洋环境科学, 1991, **10** (4): 14-20 [Yang B, Guan M, Xu HG. Toxic effects of several commonly used dispersants on marine life [J]. *Mar Environ Sci*, 1991, **10** (4): 14-20]

7 Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (*Khorramshahr provenance*) [J]. *Mar Pollut Bull*, 2014, **82** (1): 39-44

8 周启星, 孔繁翔, 朱琳. 生态毒理学[M]. 北京: 科学出版社, 2006 [Zhou

QX, Kong FX, Zhu L. Ecotoxicology [M]. Beijing: Science Press, 2006]

9 王兆群, 司皖甦, 严刚. 发光细菌法在环境检测中的应用[J]. 环境监控与预警, 2009, **1** (2): 14-17 [Wang ZQ, Si WS, Yan G. Application of luminescent bacteria techniques to environmental monitoring [J]. *Environ Monit & Forewarning*, 2009, **1** (2): 14-17]

10 那广水, 张月梅, 陈彤. 发光细菌法评价排污口污水中总有机污染物毒性[J]. 中国环境监测, 2010, **26** (5): 34-36 [Na GS, Zhang YM, Chen T. *Photobacterium* method for assessment of total organic pollutants toxicity of sewage outlets [J]. *Environ Monit Chin*, 2010, **26** (5): 34-36]

11 陈继红, 王富生, 舒易强. 发光细菌法在水质综合毒性在线检测中的应用[J]. 环境工程学报, 2013, **7** (10): 4144-4148 [Chen JH, Wang FS, Shu YQ. Application of luminous bacteria method in online test for comprehensive toxicity of water quality [J]. *J Environ Eng,* 2013, **7** (10): 4144-4148]

12 Song YZ, Li GH, Thornton SF, Thompson IP, Banwart SA, Lerner DN, Huang WE. Optimization of bacterial whole cell bioreporters for toxicity assay of environmental samples [J]. *Environ Sci Technol*, 2009, **43** (20): 7931-7938

13 宋一之, 黄巍, 张旭, 李广贺. 遗传毒性检测生物传感细胞的灵敏度及稳定性研究. 清华大学学报(自然科学版), 2010, **50** (11): 1880-1889 [Song YZ, Huang W, Zhang X, Li GH. Sensitivity and stability study of a whole-cell biosensor for geno-toxicity assessment [J]. *J Tsinghua Univ* (*Sci & Technol*), 2010, **50** (11): 1880-1889]

14 高小辉, 杨峰峰, 何圣兵. 水质的生物毒性检测方法[J]. 净水技术, 2012, **31** (4): 49-54 [Gao XH, Yang FF, He SB. Testing methods of biological toxicity detection for water quality [J]. *Water Purif Technol,* 2012, **31** (4): 49-54]

15 方战强, 陈中豪, 胡勇有. 发光细菌法在水质监测中的应用[J]. 重庆环境科学, 2003, **25** (2): 56-58 [Fang ZQ, Chen ZH, Hu YY. Application of luminescent bacteria in water quality monitoring [J]. *Chongqing Environ Sci*, 2003, **25** (2): 56-58]

16 Lopez-Roldan R, Kazlauskaite L, Ribo J, Ribo J, Riva MC, González S, Cortina JL. Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination [J]. *Sci Total Environ*, 2012, **4** (40): 307-313

17 Fulladosa E, Murat JC, Martinez M, Villaescusa I. Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2004, **46** (2): 176-182

18 黄新新, 何苗, 罗虹. pUCD-recA 重组发光菌构建及对遗传毒性污染物响应作用[J]. 环境科学, 2009, **30** (6): 1722-1726 [Huang XX, He M, Luo H. Construction of the pUCD-recA recombinate luminescence bacterium to evaluate the genetoxicty of environment pollutants [J]. *Environ Sci,* 2009, **30** (6): 1722-1726]

19 Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest: a review [J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 1993, **297** (3): 235-279

20 Horii T, Ogawa T, Ogawa H. Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *E. coli* [J]. *Cell*, 1981, **23** (3): 689-697

21 穆景利, 王莹, 王新红. Cd^{2+}, Hg^{2+}, Cr^{6+}和Pb^{2+}对黑点青鳉(*Oryzias melastigma*)早期生活阶段的毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2011, **6** (4): 352-360 [Mu JL, Wang Y, Wang XH. Toxic effects of cadmium, mercury, chromium and lead on the early life stage of marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Asian J Ecotoxicol,* 2011, **6** (4): 352-360]

22 ASTM D3987-2012. Standard practice for shake extraction of solid waste with water [S]

23 GB 18188.1-2000. 溢油分散剂 技术条件[S] [GB 18188.1-2000. Oil spill dispersant-Technical regulation [S]]

24 陈颖, 王磊, 王子健. 用彗星实验技术检测环境遗传毒性物质[J]. 土壤学报, 2006, **43** (4): 673-678 [Chen Y, Wang L, Wang ZJ. Development and application of comet assay for detecting genotoxic substances in environmental samples [J]. *Acta Pedol Sin*, 2006, **43** (4): 673-678]

25 杨翠芬, 李彬, 王晶. 重金属 Cd 污染土壤毒性的发光菌法评价[J]. 应用与环境生物学报, 1999, **19** (99): 10-15 [Yang CF, Li B, Wang J. Luminescent bacteria in soil toxicity of Cd pollution evaluation [J]. *Chin J Appl Environ Biol,* 1999, **19** (99): 10-15]

26 周秀艳, 王艳, 韩桂春. 工业废水生物毒性监测与综合评价[J]. 辽宁工程技术大学学报(自然科学版), 2007, **26** (2): 293-295 [Zhou XY, Wang Y, Han GC. Monitoring and integrated assessment of biological toxicity of industrial waste water [J]. *J Liaoning Technol Univ* (*Nat & Sci*), 2007, **26** (2): 293-295]

27 李彬, 李培军, 王晶. 重金属污染土壤毒性的发光菌法与斜生栅藻法诊断[J]. 土壤通报, 2003, **34** (5): 448-451 [Li B, LI PJ, Wang J. Toxicity assessment of soil contaminated by heavy metals using algae growth inhibition test and *Photobacterim phosphoreum* assay [J]. *J Soil Sci*, 2003, **34** (5): 448-451]