

垃圾渗滤液对斑马鱼的毒性及抗氧化酶活性的影响

梅丹¹, 周少奇^{1,2}

1. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510006;

2. 华南理工大学亚热带建筑科学国家重点实验室, 广东 广州 510640

摘要: 在室内模拟条件下, 以斑马鱼(*Danio rerio*)为受试动物, 探讨生活垃圾渗滤液对斑马鱼的急性毒性及其对鱼鳃、肝脏中的过氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)及 Na^+ , K^+ -ATP 酶等 3 种酶的影响。结果表明, 垃圾渗滤液对斑马鱼的 96 h LC_{50} 为 13.2%。垃圾渗滤液对斑马鱼的急性毒性相对较高, 斑马鱼对垃圾渗滤液毒性的敏感性强。慢性毒性测试结果显示, 垃圾渗滤液对斑马鱼肝脏中 SOD 活性和 GSH 质量分数的诱导作用明显, 对 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性影响并不明显; 垃圾渗滤液对斑马鱼鱼鳃中 SOD 活性影响显著($P<0.05$)。除 Na^+ , K^+ -ATP 酶外, 斑马鱼的抗氧化防御相关生物标志物对渗滤液染毒胁迫具有相对较高的敏感性, SOD 和 GSH 均可用作垃圾渗滤液慢性胁迫的有效生物标志物。

关键词: 斑马鱼; 渗滤液; 肝脏; 生物标志物; 抗氧化防御系统

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2012) 05-0902-05

随着城市化进程的加快和人们生活水平的提高, 城市生活垃圾的总产量剧增, 城市垃圾问题已经成为当今世界最严重的公害之一。城市生活垃圾处理常见的方法包括卫生填埋、焚烧、堆肥和综合利用等 3 种最常用的方法。垃圾卫生填埋由于具有运输管理方便、处理费用低、技术成熟等优点, 成为世界上大多数国家采用的固体废弃物处理方式之一^[1-2]。全世界几乎 70%的城市生活垃圾被填埋处置^[3], 这种处置的过程中产生的垃圾渗滤液的危害不容忽视。垃圾渗滤液, 又称渗滤液或浸出液, 是垃圾填埋处理后, 由于大气降水的淋溶及地表水、地下水的浸泡, 固体废弃物在物理、化学及微生物作用下, 产生的高浓度有机废水^[4], 垃圾渗滤液若处理不当, 对填埋场周围的地下水、地表水和土壤均会造成严重的污染^[5]。毒理学实验表明, 垃圾渗滤液对蚕豆根尖细胞微核^[6-7]、洋葱细胞的有丝分裂频率^[8]及小鼠精子畸形率^[9]等均会有不同程度的影响。在水生生物毒性研究方面, 目前常用到的生物有水蚤属、鱼类、发光细菌、浮萍等^[10-14]。

斑马鱼(*Danio rerio*), 是一种小型热带鱼。由于具有产卵量大、易收集、饲养简单等特点, 是毒理学研究的良好模式生物之一, 广泛用于环境毒性评价研究^[15-16]。渗滤液中含有多种有毒有害的污染物, 其处理和排放过程中均有可能进入环境中, 而其中绝大部分会经各种途径进入水体, 易对水生生物造成危害。此后, 可能通过生

物浓缩和食物链传递对人类健康产生深刻影响。由此可见, 研究垃圾渗滤液对水生生物的影响具有重要的现实意义。

本实验以斑马鱼(*Danio rerio*)为受试生物, 研究了不同暴露时间内反渗透膜处理后的浓缩垃圾渗滤液对斑马鱼的半致死效应体积分数(LC_{50})及其鱼鳃、肝脏中的过氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)及 Na^+ , K^+ -ATP 酶的影响, 以探讨垃圾渗滤液对水生生物的毒性效应, 对 SOD、GSH 及 Na^+ , K^+ -ATP 酶能否作为该类化合物早期监测预报的分子生物学指标的敏感性和可靠性进行验证, 并为进一步的慢性生态毒理学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 采样

渗滤液的采集及分析主要参照《生活垃圾填埋污染控制标准》(GB16889—1997)中 7.2.4 节执行^[17]。试验水样取自广州市某卫生填埋场经上流式厌氧污泥床(UASB), 序列间歇式活性污泥法(SBR), 连续微滤系统(CMF)和反渗透(RO)联合处理后, 反渗透膜(RO)截留的浓缩垃圾渗滤液。垃圾渗滤液的主要水质指标如表 1 所示。

1.2 受试生物

斑马鱼购自某花鸟鱼市场, 鱼种体长(3 ± 0.5) cm, 质量(0.3 ± 0.05) g, 实验用水与培养驯化用水为充分曝气脱氯的自来水, pH 值为 6.5~7.5, 温度(24 ± 2) °C, 自然光照, 在实验室内驯养 7 d 后

基金项目: 广州市重大科技项目 (2008DLB2080500)

作者简介: 梅丹 (1988 年生), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境毒理学。E-mail: meidandang@163.com

***通信作者:** 周少奇。E-mail: fesqzhou@scut.edu.cn

收稿日期: 2012-03-01

表 1 反渗透浓缩垃圾渗滤液的水质特征
Table 1 Characteristics of landfill leachate rejected
by reverse osmosis(RO)

指标	数值
pH	7.79
$\rho(\text{TOC})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	4 300
$\rho(\text{COD})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	5 620
$\rho(\text{BOD}_5)/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	63.1
$\rho(\text{BOD}_5/\text{COD})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0.01
$\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	63.2
浊度/NTU	17.5
$\rho(\text{碱度})(\text{以 CaCO}_3 \text{ 计})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	6 100

用于急性毒性实验，驯养期间每天换水和喂食 2 次，斑马鱼的死亡率<5%。试验前停止喂食 1 d，随机挑选个体差异不大，健康活泼的鱼苗进行试验。

1.3 仪器

UV-2800 A 型紫外可见分光光度计(上海 Unico 仪器有限公司); TGL-16 M 高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司); Synergy 2 多功能酶标仪(美国 Biotek 仪器有限公司); 蔗糖、Tris、EDTA-2Na 以及其它试剂均为国产分析纯; 超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 毒性实验及生理生化指标测定

1.4.1 急性毒性实验

96 h 急性毒性测试参照中华人民共和国国家标准急性毒性测定方法^[18]。试验采用换水方式进行，周期为 96 h。根据预实验结果，按照等比设置将垃圾渗滤液用曝气超过 24 h 自来水的稀释成 7 个体积分数梯度，分别是 10%、11.5%、13.2%、15.2%、17.5%和 20.1%，同时设置空白对照组，各处理设 3 个平行。以 5 L 的烧杯为容器，每个烧杯中加入 4 L 测试溶液和 10 条斑马鱼成鱼，每 24 h 观察并记录死亡情况，及时清除死亡的成鱼和代谢物。试验开始后的 1~6 h 内，对试验鱼的平衡、游动、呼吸及体色变化等中毒症状进行仔细观察。每天至少记录两次每个容器中的死鱼数目(用玻璃棒轻触鱼的尾部，没有反应即认为已死亡)，及时清除死鱼。用 SPSS16.0 软件计算半致死效应体积分数(LC₅₀)和 95%可信度。

1.4.2 暴露实验

参照斑马鱼 96 h LC₅₀ 值，用曝气超过 24 h 的自来水按不同体积分数进行稀释，分别加入 0.26%(1/50 96 h LC₅₀)渗滤液稀释液、0.66%(1/20 96 h LC₅₀)渗滤液稀释液、1.32%(1/10 96 h LC₅₀)渗滤液稀释液、2.65%(1/5 96 h LC₅₀)渗滤液稀释液

和 6.62%(1/2 96 h LC₅₀)渗滤液稀释液 5 个等级，用曝气后的自来水做对照处理组。在 5 L 烧杯中分别加入 4 L 试验溶液，每组投 8 尾斑马鱼。试验温度(24±2) °C，pH 6.5~7.5，光暗比 12 h : 12 h，试验期间不喂食，每 24 h 更换一半实验溶液，暴露 28 d。实验结束后立即将斑马鱼处死，解剖取肝脏、腮，冷生理盐水漂洗，滤纸充分吸干水分，称湿质量。每克样品加入 9 mL 匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.000 1 mol·L⁻¹ EDTA-2Na, 0.01 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.8% NaCl)，冰浴中用玻璃匀浆器制成 1%组织匀浆，4 °C 条件下 20 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液于-80 °C 冷藏，蛋白含量的测定采用 BCA 法；SOD、GSH 和 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶的具体测定操作和计算按南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行。

SOD 酶活力单位定义为：每 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个酶活力单位(U)。GSH 质量分数以每 g 组织蛋白中 GSH 的 mg 数来表示。 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活力以每小时每 mg 蛋白分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

1.5 数据处理与统计分析

毒理实验均设 3 个平行，实验结果表示为平均数±标准误差(Mean±SD)，实验数据采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析(One Way ANOVA)，多重比较检验法(LSD)进行组间差异显著性检验，差异显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 急性毒性结果

对照组所有实验鱼在整个实验过程中泳动、呼吸、觅食、对外界物理刺激(如轻敲缸壁)等行为无明显变化。在急性暴露实验渗滤液体积分数为 20.1%的处理组中，斑马鱼在实验开始 1 h 之内全部失去平衡，不自主环游，伴随尾部抽搐症状，并在 8 h 以后开始逐渐死亡，至 24 h 全部死亡。其它处理组斑马鱼暴露在渗滤液后短期内的主要中毒症状表现为急促游动，对外界物理刺激反应迟钝。在整个急性毒性暴露实验中，在体积分数为 11.5%的渗滤液稀释液及以下暴露组中的斑马鱼均没有出现死亡，也无明显的活动行为改变。表 2 给出了垃圾渗滤液对斑马鱼的急性毒性试验结果，垃圾渗滤液对受试鱼的 24、48、72、96 h 的 LC₅₀ 分别为 15.918%、14.320%、13.420%和 13.244%，急性毒性相对较高。

2.2 垃圾渗滤液对斑马鱼组织器官的中 SOD、 Na^+ 、 K^+ -ATP 活性和 GSH 质量分数的影响

不同处理条件下，斑马鱼鳃及肝脏中

表 2 垃圾渗滤液对斑马鱼急性毒性试验结果
Table 2 Experimental results of acute toxicity
of zebra fish exposed to landfill leachate

实验时间/h	LC ₅₀ /%	95%可信限/%	回归方程
4	15.918	15.358~16.509	$Y=-22.762x+18.939$
48	14.320	13.846~14.806	$Y=-25.429x+21.998$
72	13.420	12.992~13.856	$Y=-26.978x+23.922$
96	13.244	12.829~13.663	$Y=-28.296x+25.219$

SOD、Na⁺, K⁺-ATP 活性 GSH 质量分数见图 1~图 2。图 1 为经过 28 d 暴露处理后, 对不同稀释程度的垃圾渗滤液, 斑马鱼鱼鳃中 SOD、GSH 和 Na⁺, K⁺-ATP 酶的含量。从图中可以看出, 体积分数为 1.32%、2.65%和 6.62%的垃圾渗滤液对斑马鱼鱼鳃中 SOD 活性表现出明显的抑制效应, 分别为对照组的 69.66%、76.07%和 82.38%($P<0.05$)。而 0.26%、0.66%、1.32%这 3 个处理组对斑马鱼鱼鳃中 SOD 活性与空白对照组相比无统计学意义($P>0.05$)。28 d 暴露之后, 随着垃圾渗滤液体积分数的升高, 斑马鱼鱼鳃中的 GSH 和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性总体上先是受到抑制后逐渐诱导, 到最大体积分数组时, 两者的活性基本恢复到空白对照组水平。GSH 的活性在 0.26%处理组受到最大程度的抑制, 为对照组的 60.78%。斑马鱼鱼鳃中 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性各处理组之间无显著性差异, 说明垃圾渗滤液对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性无明显抑制或诱导作用。

图 2 为经过 28 d 暴露处理后, 暴露在不同体积分数的垃圾渗滤液中斑马鱼肝脏中 SOD、

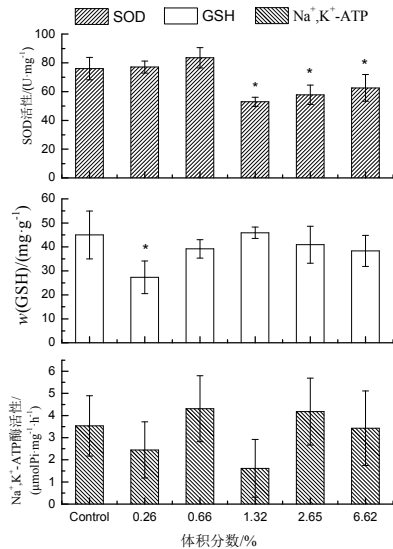


图 1 不同体积分数的垃圾渗滤液 28 d 暴露对斑马鱼鳃超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)和 Na⁺, K⁺-ATP 酶的影响(*表示 $P<0.05$)

Fig.1 Effects of various volume concentrations of landfill leachate on the SOD, GSH, Na⁺, K⁺-ATPase activity of gill of zebrafish following 28-d exposure(Treatments without same letter differed significantly, $P<0.05$)

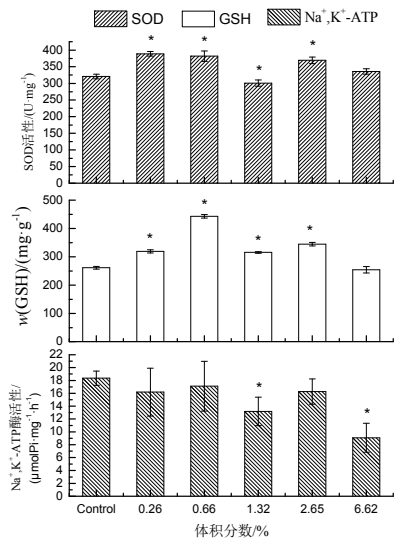


图 2 不同体积分数的垃圾渗滤液 28 d 暴露对斑马鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)和 Na⁺, K⁺-ATP 酶的影响(*表示 $P<0.05$)

Fig.2 Effects of various volume concentrations of landfill leachate on the hepatopancreatic SOD, GSH, Na⁺, K⁺-ATPase activity of zebrafish following 28 d exposure (Treatments without same letter differed significantly, $P<0.05$)

GSH 和 Na⁺, K⁺-ATP 酶含量变化。从图 2 可以看出, 28 d 暴露实验后, 垃圾渗滤液体积分数为 0.26%、0.66%、2.65%的 3 个处理组对 SOD 和 GSH 活性表现出明显的诱导效应($P<0.05$), 其中 0.26%处理组的 SOD 活性和 0.66%处理组的 GSH 受到最大程度的诱导, 为对照组的 121.25%、169.34%。在体积分数为 6.62%的处理组处, SOD 活性和 GSH 活性有变化但不显著。SOD 活性和 GSH 活性从整体上呈现先受诱导后被抑制, 在垃圾渗滤液大体积分数组时两者的活性基本与对照组相当。Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的变化规律总体上呈现下降趋势, 1.32%处理组及 6.62%处理组对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性(分别为对照组的 71.81%、49.53%)具有显著抑制作用($P<5\%$); 但其他处理组的 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性基本处于对照组水平, 说明受抑制但抑制并不明显无显著性差异。相对比之下, 受到垃圾渗滤液胁迫的情况下, 斑马鱼肝脏中 SOD 和 GSH 对其毒性响应更加明显, 而 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性变化相对较小。

3 讨论

生物体暴露于污染环境中, 毒物通过各种途径进入生物体后, 首先会产生一系列生化反应, 如酶活性诱导或抑制、细胞膜破坏、蛋白质合成受阻等, 而后引起一系列病理、生理的继发反应, 这时便可观察到整个机体的毒性反应^[19-20]。在急性暴露实验的 20.1%渗滤液稀释液中, 斑马鱼在实验开始 1 h 之内即出现中毒症状, 垃圾渗

滤液对受试鱼的 96 h 的 LC_{50} 是 13.244%, 表明垃圾渗滤液的水质综合毒性较高。这也同时说明了斑马鱼对垃圾渗滤液毒性的敏感性, 用斑马鱼作为毒性试验材料监测环境水质毒性是可行的。

SOD 能防止机体的氧化损伤, 是机体内抗氧化防御系统中的重要组成之一, 以自由基为底物, 在生物体内最先与 O_2^- 作用, 将其分解为 H_2O_2 和 O_2 , 对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用^[21]。其活性会在机体受到外源性物质的氧化胁迫时出现不同程度的改变。因此, SOD 常作为指示环境污染胁迫的重要生物标志物^[22]。在本研究中, 体积分数较低的垃圾渗滤液(0.26%)即可诱导斑马鱼肝脏 SOD 活性显著升高, 而 1.32% 垃圾渗滤液稀释液会对斑马鱼鱼鳃 SOD 酶活性产生显著抑制效应, 这说明斑马鱼肝脏 SOD 酶对垃圾渗滤液显示出较高的敏感性。这与斑马鱼对垃圾渗滤液中的污染物存在多种吸收机制有关, 垃圾渗滤液的体积分数不同, 占优势的吸收途径就不相同, 导致毒性反应的变化。

还原型谷胱甘肽(GSH)是生物体内重要的抗氧化损伤防御系统的成分之一, 在清除活性氧(如 H_2O_2)的过程中发挥着重要作用^[23]。GSH 与抗氧化酶一样, 暴露于污染物质中时可能产生适应性诱导反应, 其质量分数会上升, 也可能产生中毒反应, 即有机体内 GSH 质量分数降低^[24]。张景飞等^[25]报道低浓度 2,4-二氯苯酚(2,4-DCP)长期暴露(40 d)对鲫鱼(*Carassius auratus*)幼体肝脏抗氧化系统的还原型谷胱甘肽(GSH)质量分数几乎持续受到抑制; 王悠等^[26]将鲈鱼分别暴露于十二烷基苯磺酸钠(SDBS)和苯并[a]芘(B[a]P)中, 结果发现 B[a]P 胁迫能够显著诱导鲈鱼体内的 GSH 质量分数的变化($P < 0.05$)。这些暴露于污染物中的鱼类抗氧化酶的变化表明, 在污染胁迫下, 生物体可通过调节抗氧化酶水平来增强其清除活性氧的能力, 以减轻污染物的伤害。本实验中, 经过 28 d 的长期暴露, 与未受胁迫的对照组相比, 大多处理组的垃圾渗滤液对斑马鱼肝脏中 GSH 质量分数有显著诱导作用($P < 0.05$), 而鱼鳃中仅渗滤液体积分数为 0.26% 的处理组 GSH 活性受到显著抑制。因此说明垃圾渗滤液可引起肝脏细胞的损伤, 从而导致其胞浆内酶的异常漏出。垃圾渗滤液对肝脏中 GSH 质量分数影响更大, 这可能是不同物质在不同器官吸收的差异所造成。

Na^+ , K^+ -ATP 酶普遍存在于动物细胞膜上, 是主动运输所需要的特殊的运载酶, 主要集中在与外界进行气体和离子交换的器官或组织的细胞膜上, 其功能是保证组织或器官细胞膜上的离子

平衡, 调节离子跨膜运输^[27]。 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性中心有天冬氨酸, ATP 上的一个磷酸基团转移到 Na^+ , K^+ -ATP 酶的一个天冬氨酸残基上, ATP 磷酸化从而释放出能量, 满足生理生化需要, 并是多种毒物攻击的靶点^[28]。本研究表明, 不同体积分数的垃圾渗滤液对斑马鱼鱼鳃的 Na^+ , K^+ -ATP 酶浓度没有明显影响, 但 1.32% 和 6.62% 两个处理组对肝脏 Na^+ , K^+ -ATP 酶浓度与空白对照组有显著抑制($P < 0.05$)。这有可能是垃圾渗滤液中的污染物质进入斑马鱼体内以后会对肝脏细胞膜造成一定程度的损伤, 影响了鱼体内的离子平衡, 最终影响到了 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性。随着渗滤液体积分数的增大, 鱼鳃中 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性逐渐恢复至对照水平, 这是否表明鱼鳃 Na^+ , K^+ -ATP 酶对暴露环境有一定的适应, 此方面还有待进一步研究证实。

4 结论

(1) 垃圾渗滤液对受试鱼的 24、48、72、96 h 的 LC_{50} 分别为 15.918%、14.320%、13.420% 和 13.244%, 急性毒性相对较高, 这说明斑马鱼对垃圾渗滤液有较高的敏感性, 用斑马鱼作为毒性试验材料监测环境水质毒性是可行的。

(2) 利用不同体积分数的垃圾渗滤液对斑马鱼进行慢性毒性测试结果显示, 垃圾渗滤液会引起鱼体组织生理生化指标及免疫酶活性的变化, 使鱼体受损和生理机能下降。斑马鱼的抗氧化防御相关生物标志物对渗滤液染毒胁迫具有相对较高的敏感性, 除 Na^+ , K^+ -ATP 酶相对不敏感以外, SOD 和 GSH 均可用作垃圾渗滤液慢性胁迫的有效生物标志物。

参考文献:

- [1] 刘剑玉. 老龄垃圾渗滤液臭氧-曝气生物滤池处理及脱除总氮研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 1.
LIU Jianyu. Study on ozonation-BAF Process and total nitrogen removal treatment of mature landfill leachate[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010: 1.
- [2] RENOU S, GIVAUDAN J, POULAIN S, et al. Landfill leachate treatment: Review and opportunity[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 150(3): 468-493.
- [3] SLACK R, GRONOW J, VOULVOULIS N. Household hazardous waste in municipal landfills: contaminants in leachate[J]. Science of the Total Environment, 2005, 337(1/3): 119-137.
- [4] KURNIAWAN T. A, LO W H, CHAN G Y S. Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate[J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 129(1/3): 80-100.
- [5] CHRISTENSEN T H, COSSU R, STEGMANN R. Landfilling of Waste: Leachate[M]. New York: Elsevier Applied Science, 1992: 3-14.
- [6] 杨晓忠, 张黎军, 李杰. 卫生填埋场垃圾渗滤液对蚕豆根尖细胞及小鼠早期精细胞微核的影响[J]. 环境与健康杂志, 2006, 23(1): 61-62.

- YANG Xiaozhong, ZHANG Lijun, LI Jie. Micronuclei induced by landfill leachate in root-tip cells of vicia faba and early spermatids of mice[J]. Journal of Environment and Health, 2006, 23(1): 61-62.
- [7] 方满, 刘东, 匡毅. 垃圾渗滤液对蚕豆根尖细胞微核效应的研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6): 574-577.
- FANG Man, LIU Dong, Kuang Yi. Micronucleus effects of refuse leachate on root tip cells of vicia faba[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 1999, 5(6): 574-577.
- [8] BAKARE A. The potential mutagenic effect of the leachates of rural solid waste landfill on *Allium cepa* (L.)[J]. SINET: Ethiopian Journal of Science, 2004, 24(2): 283-291.
- [9] BAKARE A A, MOSURO A A, OSIBANJO O. An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology in mice by landfill leachates[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2005, 582(1/2): 28-34.
- [10] SECO J I, FERN NDEZ-PEREIRA C, VALE J. A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 56(3): 339-350.
- [11] 李志斐, 龚望宝, 谢骏, 等. 三甲基氯化锡对斑马鱼(*Danio rerio*)生理生化特性的影响[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(3): 255-260.
- LI Zhifei, GONG Wangbao, XIE Jun, et al. Effects of Trimethyltin Chloride on Physiological and Biochemical Characteristics of *Danio rerio*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(3): 255-260.
- [12] DAY K, HOLTZE K, METCALFE-SMITH J, et al. Toxicity of leachate from automobile tires to aquatic biota[J]. Chemosphere, 1993, 27(4): 665-675.
- [13] PIVATO A, GASPARI L. Acute toxicity test of leachates from traditional and sustainable landfills using luminescent bacteria[J]. Waste management, 2006, 26(10): 1148-1155.
- [14] CLEMENT B, MERLIN G. The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweed[J]. Science of the Total Environment, 1995, 170(1/2): 71-79.
- [15] HILL A J, TERAOKA H, HEIDEMAN W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity[J]. Toxicological Sciences, 2005, 86(1): 6-19.
- [16] MCGRATH P, LI C Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J]. Drug Discovery Today, 2008, 13(9/10): 394-401.
- [17] 国家环境保护局. GB16889—1997 生活垃圾填埋污染控制标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [18] 国家环境保护局. 中华人民共和国国家标准 GB/T 13266-91 水质: 物质对蚕类(大型蚕)和淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [19] BJORNSSON B T, HAUX C. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of estradiol-17 β treated rainbow trout[J]. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 1985, 155(3): 347-352.
- [20] 韩晓冬, 陈伟. 未成熟雌鲮鱼血液和肝脏中与卵巢发育有关的生化份测量[J]. 水产养殖, 1994, (5): 14-17.
- HAN Xiaodong, Chen Wei. The determination of the components related with the developing ovary in the blood and liver of immature Mugil cephalus[J]. Journal of Aquaculture, 1994, (5): 14-17.
- [21] 马陶武, 周科, 朱程, 等. 铜锈环棱螺对镉污染沉积物慢性胁迫的生物标志物响应[J]. 环境科学学报, 2009, 29(8): 1750-1756.
- MA Taowu, ZHOU Ke, Zhu Cheng, et al. Biomarker responses of *Bellamya aeruginosa* to the chronic stress of cadmium-contaminated sediment[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(8): 1750-1756.
- [22] GERACITANO L, MONSERRAT J M, BIANCHINI A. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 277(2): 145-156.
- [23] YAMAKOSHI Y, UMEZAWA N, RYU A, et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C_{60}) as potential medicines: $O_2^{\cdot-}$ versus 1O_2 [J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(42): 12803-12809.
- [24] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [25] 张景飞, 王晓蓉. 2, 4-二氯苯酚低浓度长期暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响[J]. 环境科学, 2003, 24(5): 136-140.
- ZHANG Jingfei, WANG Xiaorong. Effects of long-term exposure of low-level 2,4-Dichlorophenol on the antioxidant defense system in liver of *carassius auratus*[J]. Environmental Science, 2003, 24(5): 136-140.
- [26] 王悠, 姜爽, 赵晓玮, 等. 2种有机污染物对鲈鱼生化标志物系统的影响及作用评价[J]. 环境科学, 2010, 31(3): 801-807.
- WANG You, JIANG Shuang, ZHAO Xiaowei, et al. Effects of two organic pollutants on biomarker system of fish *lateolabrax japonicus* and the pollution assessment[J]. Environmental Science, 2010, 31(3): 801-807.
- [27] 卢建民, 卢玲, 蔺玉华, 等. 低 pH 对鲤鱼鳃组织 Na^+ , K^+ -ATPase 活性的影响[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 102-106.
- LU Jianmin, LU Ling, LIN Yuhua, et al. The effect of low pH on Na^+ , K^+ -ATPase activity of gill tissues of the common carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(1): 102-106.
- [28] 徐镜波, 景体淞. 2,4-DNT 对鲤鱼的急性性和亚急性毒性[J]. 环境科学, 1998, 19(2): 89-91.
- XU Jingbo, JING Tisong. The acute and subacute toxicity of 2, 4-DNT to carp[J]. Environmental Science, 1998, 19(2): 89-91.

Toxicity and immune-related enzymes effects on zebrafish exposed to landfill leachate

MEI Dan¹, ZHOU Shaoqi^{1,2}

1. College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. State Key Laboratory of Subtropical Building Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

Abstract: The effects of landfill leachate rejected from reverse osmosis (RO) on the acute toxicity, superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), Na^+ , K^+ -ATPase in the breathe-gill and liver of *Danio rerio* were investigated. The results showed that the 96 h LC_{50} of landfill leachate was 13.2%. There were relatively high acute toxicity effect on zebrafish. Moreover, the zebrafish has strong sensitivity to landfill leachate toxicity. Results of chronic toxicity tests indicated that landfill leachate had a promoting effect upon the induction of the activities of SOD and GSH content in zebrafish liver tissue, whereas no significant effects on Na^+ , K^+ -ATPase activities. In addition, the activities of SOD activity in zebrafish gill were significantly ($P < 0.05$). Biomarkers of antioxidant defense system of zebrafish had a relatively high sensitivity to leachate. except Na^+ , K^+ -ATPase, SOD activity and GSH content had had relatively high sensitivity to leachate except Na^+ , K^+ -ATPase, which showed that SOD and GSH can be used as effective biomarkers of landfill leachate chronic stress.

Key words: zebrafish (*Danio rerio*); landfill leachate; liver; biomarkers; antioxidant defense system