

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2021.07.006

多点进水与弱电压刺激提高斑马鱼报警的精确度

刘国臣, 赵志伟, 梁志杰, 崔福义, 阳 春, 李秀麟, 陈 瑞
(重庆大学环境与生态学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400044)

摘 要: 为了提高斑马鱼在实际水质毒性监测应用中报警的准确性和稳定性,通过改进实验装置,在监测养殖箱左右 3 cm 处各安置一块上面带有直径为 1 cm 圆孔的铝板,改变污染物的扩散方式,同时在铝板左右加上变频电压而形成稳定电场,刺激中毒反应前后的斑马鱼。结果表明:多点进水方式下污染物可以更快更均匀地扩散到养殖箱中并与斑马鱼接触,提前约 10 min 报警,缩短了报警时间,提高了报警的灵敏度。可以选择电压为 10 V,间隔 10 min 刺激一次毒物暴露后的斑马鱼,刺激时长为 1 min 作为检验报警发生的真假,提高报警的准确度。在毒物暴露后的 0.5 ~ 1.5 h 之间设置间歇性的 10 V 电刺激,若斑马鱼的速度、转次变化行为明显低于空白,则认为报警为真。

关键词: 生物监测; 水质预警; 斑马鱼; 重金属离子

中图分类号: TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2021)07-0042-07

Improving the Accuracy of Zebrafish Alarm through Multi-point Water Intake and Weak Voltage Stimulation

LIU Guo-chen, ZHAO Zhi-wei, LIANG Zhi-jie, CUI Fu-yi, YANG Chun,
LI Xiu-lin, CHEN Rui

(Key Laboratory of Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment <Ministry of Education>,
School of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: In order to improve the accuracy and stability of zebrafish in actual water toxicity monitoring applications, an improved experiment was carried out. In the study, an aluminum plate with a 1 cm diameter hole was placed at 3 cm left and right of the monitoring breeding box to change the diffusion method of pollutants. At the same time, the frequency conversion voltage was added to the left and right of the aluminum plate to form a stable electric field and stimulate the zebrafish before and after the poisoning reaction. The results showed that in the multi-point water intake mode, the pollutants could diffuse into the breeding box more quickly and evenly, and contact with the zebrafish. The alarm was about 10 minutes in advance and improved the sensitivity of the alarm. A voltage of 10 V could be selected to stimulate the zebrafish after the poison exposure every 10 min, and the stimulation time was 1 min to check whether the alarm was true or false, and improved the accuracy of the alarm. Intermittent 10 V electrical stimulation was set between 0.5 - 1.5 h after exposure to the poison. If the speed and turnover behavior of the zebrafish was significantly lower than the blank, the alarm was considered true.

Key words: biological monitoring; water quality warning; zebrafish; heavy metal ions

近年来,随着科学技术的快速发展,将生物与计算机科学联合在一起的在线监测技术逐渐成为水体环境监测领域一种比较先进的方法。其中最受研究人员青睐的生物就是斑马鱼,一是因为它跟人类的基因达到了87%的相似度^[1],二是斑马鱼对水质变化非常敏感,基于以上两点,将斑马鱼用于水质监测领域的研究逐年兴起。

对于水环境水体监测而言其又可以分为理化检测和生物监测,二者各有利弊,理化检测方法能够准确定量有毒有害物质的浓度,但费时较长,而生物监测方法可以对水体水质进行实时在线监测,缺点是不能定量监测到水体中有害物质的浓度^[2]。相比于一般的理化检测,在线生物监测技术具有实时性好、敏感度高、长期性、综合性、费用低等优点,且易于保养和维护,并且克服了理化检测的局限性和连续取样的繁琐性^[3-6]。但是在实际的水体监测中,往往外界非毒性环境因素的干扰如噪声、光照强度、水温、溶解氧等也可以引起斑马鱼的过度活跃和应激反应^[7],且引起的斑马鱼响应方式与毒物突发胁迫暴露下的相似^[8],这样就会造成误报警的发生。因此,找到合理的方法识别斑马鱼的误报警进而提高报警的准确度尤其重要。

1 实验材料和实验设计

1.1 实验材料

研究所采用的斑马鱼是国际标准化组织(ISO)推荐的标准实验生物之一,购于重庆市沙坪坝花鸟市场中心,自行培养一段时间后用于本研究。将购买大小均一、无明显身体缺陷、活性强、年龄为5~6个月的成年斑马鱼置于实验室的养殖箱中饲养,每天定期更换养殖用水的1/2。养殖用水为除氯后的自来水,控制温度范围为25~30℃、光照周期为14h:10h,采用24h曝气的方法控制溶解氧为6~8mg/L,将养殖水的pH值控制在7~8,每天喂食斑马鱼1~2次,并及时清除养殖箱底部的粪便和剩余的鱼食^[9];用于实验的斑马鱼在养殖箱中驯化半个月,并保证死亡率小于5%,实验前24h停止对养殖箱中的斑马鱼进行喂食^[10]。

1.2 实验设计

斑马鱼行为监测实验整个过程采用流水方式。实验装置分为水处理模块、电刺激模块、光照系统、

监测系统、养殖箱五大部分,实验装置如图1所示。为了防止进入养殖箱中的水质影响到斑马鱼的运动行为,使斑马鱼有一个良好的监测环境,对进水进行简单的处理,使浊度、溶解氧、余氯、温度等达到最适宜斑马鱼生活的环境。过滤后的水样通过恒温控制模块将水温控制在25~30℃,采用蠕动泵控制进水流速在1L/h。

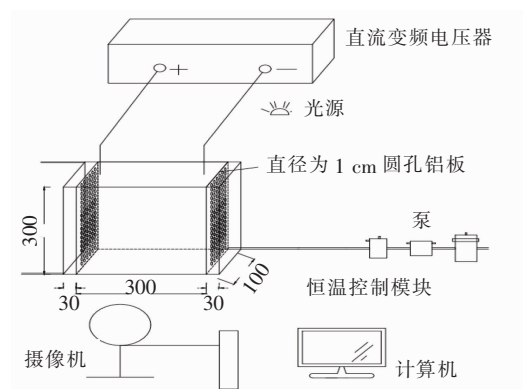


图1 实验装置示意

Fig. 1 Schematic diagram of experimental device

养殖箱采用亚克力透明有机玻璃制作,根据斑马鱼的游动范围确定其尺寸为360 mm×100 mm×300 mm,在养殖箱左右3 cm处各安置一块上面带有直径为1 cm圆孔的铝板。正常的情况下斑马鱼的作息时间跟人类一样,白天活动、晚上“睡觉”,如果在夜晚给予斑马鱼以白天同样强度的光照,斑马鱼也会像白天一样活动,并且第二天斑马鱼的活性丝毫不会减弱,这种活性可以一直持续一周左右,因此,将实验过程中的光照强度维持在300 lx,同时尽量避免人为噪声的干扰。

鱼类在电场中根据电压值的大小会表现出3种行为反应,即感电反应、趋阳反应、麻痹反应。在低电压的电场中,鱼体受到电压刺激后,会产生试图逃离电场的惊恐反应,即感电反应;在一定的直流电场中,鱼体受到电流刺激后,将身体转向阳极,并急速向阳极游去,甚至把电流方向转换,鱼类也会调转方向趋向阳极,即趋阳反应;如果继续加大电压值,鱼类会由于电压的强烈刺激而出现晕厥现象,即麻痹反应。因此,可以通过中毒前后斑马鱼在电场中的行为差异来判断误报警发生的真假。

首先控制直流变频电压器的电压为10 V,间隔

10 min 刺激一次正常水质条件下活动的斑马鱼,刺激时间为1 min,观察间歇性刺激下斑马鱼的惊恐反应过程;然后再以2、5、10、15、20 V 的电压梯度以同样的方式刺激正常活动下的斑马鱼,比较斑马鱼在各电压值刺激下反应程度的差异,以确定最佳的电压刺激值。采用0、0.1、0.5、0.75、1、2 TU 的 Cu^{2+} 突发胁迫斑马鱼(以 Cu^{2+} 对斑马鱼48 h 的 LC_{50} 值为一个毒性单位即1 TU),在突发胁迫前用最佳刺激电压值刺激一次,然后每隔10 min 再刺激一次,整个实验共运行120 min,其中前30 min 为正常水质条件以供斑马鱼适应水质环境,30 min 以后开始进行 Cu^{2+} 突发胁迫。观察对比斑马鱼的速度、转次运动行为参数的差异。多点进水实验设置分别采用0.1、0.5、0.75、1、2 TU 的 Cu^{2+} 突发胁迫斑马鱼,观察斑马鱼分别在实心铝板与带有直径为1 cm 圆孔的铝板下其运动行为的异同。

1.3 监测系统

在养殖箱前安置一个高清摄像头,24 h 记录斑马鱼的运动视频,通过连接视频分析软件(EthoVision XT)分析斑马鱼的运动行为。该监测系统可以将采集到的斑马鱼运动视频同步解析为运动轨迹,并显示在电脑屏幕上。可监测的斑马鱼运动行为参数包括速度、加速度、转次、移动距离、角速度、转角、活跃性等。可以离线也可以实时在线监测,并且报警条件可以自己设定。本实验主要研究斑马鱼的速度、转次等运动参数。

2 结果与分析

2.1 多点进水提高斑马鱼报警的灵敏度

分别比较斑马鱼在0.1、0.5、0.75、1、2 TU 的 Cu^{2+} 突发胁迫下正常进水与多点进水之间的运动行为差异,每组实验均运行120 min,其中前30 min 为空白对照,即监测斑马鱼在正常水质条件下各运动行为参数的变化范围,之后开始变换成 Cu^{2+} 突发胁迫,以模拟 Cu^{2+} 突发胁迫下斑马鱼各运动行为参数的变化情况。实验结果如图2所示。

不论是在正常进水条件下还是在多点进水条件下,斑马鱼在正常水质情况下的速度和转次都比较稳定,速度大致在3.5~4.6 cm/s 的范围内波动,转次在0.6~1.2 次/s 的范围内波动。 Cu^{2+} 突发胁迫后在两种进水条件下斑马鱼的速度与转次的改变量基本相同,即在0.1 TU 低浓度的突发胁迫下其速度与转次的改变不是很剧烈,而在0.5、0.75、1、2 TU

等高浓度 Cu^{2+} 的突发胁迫下其速度与转次的变化非常明显。两种进水条件下斑马鱼的行为变化不同的是其明显感知到污染物突发胁迫的时间与感受到刺激后所持续的时间。

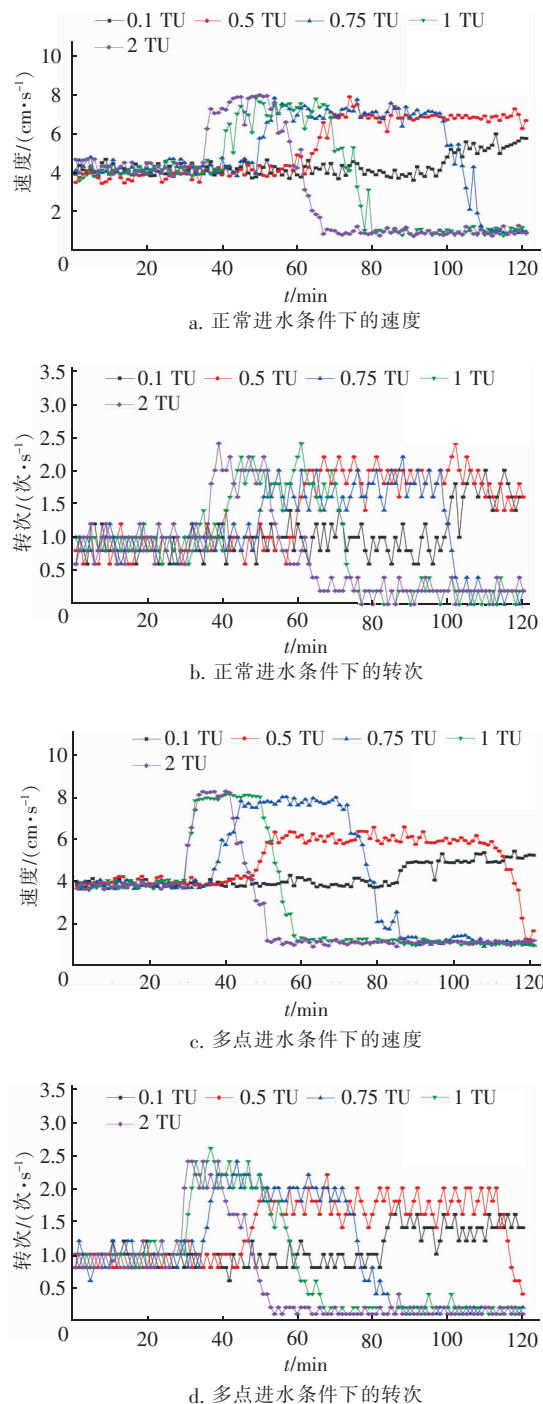


图2 不同进水条件下斑马鱼速度和转次的变化

Fig. 2 Changes in speed and turnover of zebrafish under normal and multi-point water intake conditions

正常进水条件下斑马鱼在0.1、0.5、0.75、1、2

TU 的 Cu^{2+} 突发胁迫下明显感受到 Cu^{2+} 胁迫的时间分别为 (69 ± 3.6) 、 (30.3 ± 2.5) 、 (23 ± 2.6) 、 (12 ± 2) 、 (6.7 ± 1.5) min,而在多点进水条件下斑马鱼明显感受到 Cu^{2+} 胁迫的时间分别为 (57.7 ± 2.5) 、 (17.7 ± 2.5) 、 (8.3 ± 1.5) 、 (1.7 ± 0.6) 、 (1.3 ± 0.6) min,即多点进水方式下斑马鱼明显感知 Cu^{2+} 突发胁迫的时间要明显比正常进水条件下的早,其中 0.75 TU 的 Cu^{2+} 突发胁迫下效果最明显,可以提前大概 15 min 报警,大大缩短了斑马鱼预警所需要的时间。而且斑马鱼在感知到高浓度 Cu^{2+} (0.5、0.75、1、2 TU) 突发胁迫后其持续活跃时间在两种进水方式下也有所不同,分别为 (75 ± 5) 、 (45.3 ± 5) 、 (32.3 ± 2.5) 、 (22.7 ± 2.5) min 和 (66.7 ± 2.9) 、 (33 ± 3) 、 (20 ± 2) 、 (10 ± 2) min。对比后发现在多点进水方式下斑马鱼感知到污染物后持续活跃的时间要比正常进水方式下少 10 min 左右。归其原因是多点进水方式下污染物可以更快更均匀地扩散到养殖箱中与斑马鱼接触,从而缩短报警时间及持续活跃时间,达到提前报警和提高报警灵敏度的目的。

2.2 最佳电压刺激值的确定

在多点进水方式下,用 2~20 V 不同强度的弱电压刺激正常水质下活动的斑马鱼,观察其速度与转次的变化情况。结果表明,在 2 V 电压刺激下,斑马鱼的速度、转次与正常运行条件下相比无明显变化,最大速度和最大转次只有 (4.67 ± 0.09) cm/s、 (1.07 ± 0.12) 次/s(见图 3)。在 5、10 V 电压刺激下,斑马鱼的速度、转次较正常情况下明显增大,且平均速度、最大速度、平均转次、最大转次均随着电压值的增大而增大,最大速度分别达到了 (6.92 ± 0.16) 、 (8.08 ± 0.24) cm/s,最大转次分别达到了 (1.87 ± 0.115) 、 (3.13 ± 0.116) 次/s。在 15 V 电压刺激下,斑马鱼的最大速度与平均速度分别为 (7.69 ± 0.42) 、 (5.97 ± 0.39) cm/s,最大转次与平均转次分别为 (1.73 ± 0.11) 、 (1.39 ± 0.08) 次/s,较正常运行情况下也有明显增大,但相对于 5、10 V 电压的刺激,速度和转次都有所下降。在 20 V 电压刺激下,斑马鱼的速度和转次较正常情况下明显降低,最大速度和平均速度分别只有 (0.93 ± 0.05) 、 (0.58 ± 0.09) cm/s,最大转次和平均转次分别只有 (0.33 ± 0.11) 、 (0.23 ± 0.05) 次/s。由此可知,较低或较高的电压都不能实现对斑马鱼的刺激作用,

斑马鱼感受不到 2 V 电压的刺激,而对于 20 V 的电压,斑马鱼在刺激的瞬间会出现晕厥的现象。对于 5、10、15 V 电压的刺激,虽然斑马鱼在刺激前后的速度和转次变化都有明显的差异,但相比较而言,10 V 电压刺激下引起的速度和转次变化更加显著且稳定,故确定 10 V 作为后期研究误报警的最佳电压刺激值。

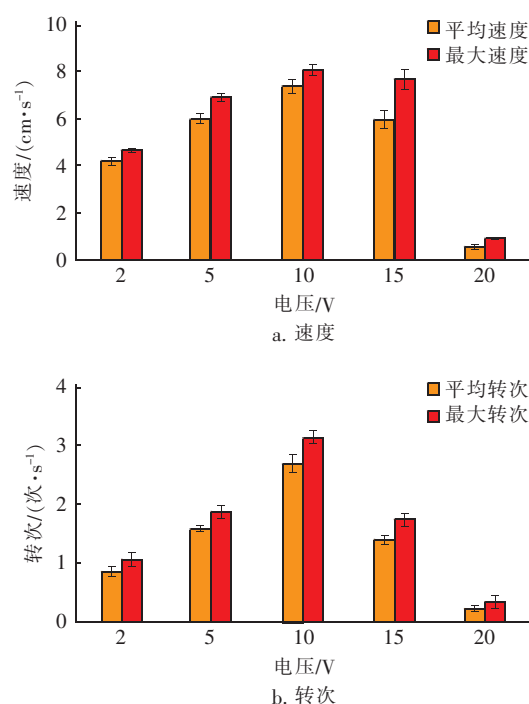


图3 正常水质及不同电压强度刺激下斑马鱼的速度、转次响应情况

Fig. 3 Responses in speed and turnover of zebrafish to voltage stimulation under normal water quality conditions

2.3 最佳电压下刺激时间及间隔的确定

在正常水质及多点进水方式下用 10 V 电压间歇性刺激斑马鱼,观察其速度与转次的响应情况,结果如图 4 所示。在突然打开电源的瞬间,斑马鱼即可感知到电压的存在,表现出明显的行为响应,且速度、转次明显增大,并且在刺激的 1 min 内速度、转次可达到最大值。在关闭电源后,斑马鱼的速度在 3 min 内就可恢复到原来的运动状态。在刺激的 11 次内斑马鱼速度的平均值可以达到 (7.42 ± 0.31) cm/s,转次的平均值可以达到 (2.49 ± 0.18) 次/s,断开电源后,3 min 内斑马鱼的运动速度和转次基本可恢复到原来的状态。由此可知,10 V 的电压对斑马鱼可以起到很好的刺激作用且不会对其身体产生结构性伤害。故最终确定最佳电压刺激值为 10

V,刺激间隔为10 min、每次刺激时长为1 min,以检验斑马鱼误报警发生的真假。

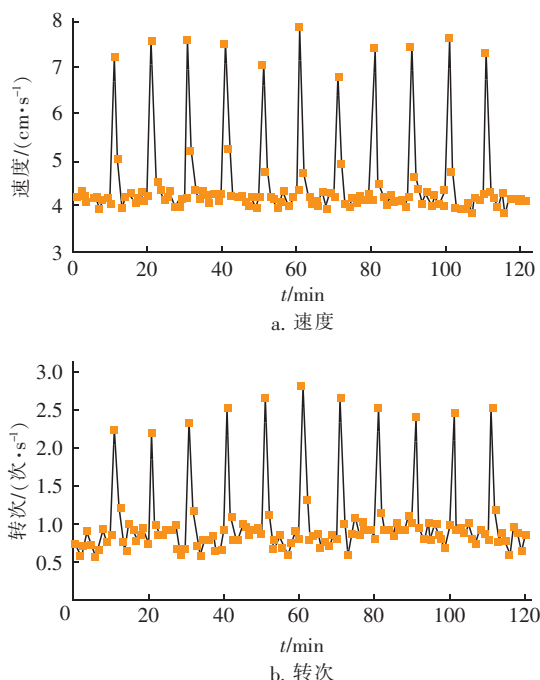


图4 正常水质及10 V电压刺激下斑马鱼的速度、转次响应情况

Fig. 4 Responses in speed and turnover of zebrafish under 10 V voltage stimulation and normal water quality conditions

2.4 Cu^{2+} 胁迫下斑马鱼对10 V弱电压刺激的反应

采用多点进水方式,不同浓度的 Cu^{2+} 突发胁迫污染下斑马鱼对10 V弱电压刺激的反应如图5、6所示。6组浓度梯度的斑马鱼在 Cu^{2+} 突发胁迫前的第一次电刺激下其最大速度、平均速度均超过了7 cm/s,最大转次、平均转次均超过了1.8次/s,远超过斑马鱼在正常水质条件下的速度和转次。在0.1 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下,在整个运行过程中,斑马鱼在电刺激作用下的速度和转次与0 TU并无明显差别,可能是较低浓度的 Cu^{2+} 对斑马鱼不会造成神经上的伤害,未影响到电刺激下斑马鱼的反应速度。在0.5 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下,在前80 min斑马鱼的速度对电刺激的响应比空白对照略快,之后才开始低于空白对照,可能是初期斑马鱼的神经系统在 Cu^{2+} 的作用下处于兴奋状态,对电刺激的响应更剧烈,而随着污染时间的推移,斑马鱼的神经系统受到了不可逆的损伤,对电刺激的响应开始变得迟缓。在0.75、1 TU浓度的突发胁迫下,斑马鱼在第一次电刺激后的速度略高于空白,此时斑马鱼的行

为响应表现为电刺激与 Cu^{2+} 的共同作用,而同样随着时间的推移,斑马鱼的神经系统受到了不可逆损伤,对电刺激的响应越来越弱。对于2 TU浓度的突发胁迫,斑马鱼在污染后的第一次刺激时就低于空白,说明高浓度的 Cu^{2+} 突发胁迫对斑马鱼的神经系统造成的伤害更大。综上可知,斑马鱼在不同浓度的 Cu^{2+} 突发胁迫下对电刺激的响应在不同的时间内有明显的差异。在0.1 TU的突发胁迫下,由于斑马鱼对电刺激的响应与空白对照无明显差别,用电刺激检验误报警效果不理想,而在0.5、0.75、1、2 TU等高浓度 Cu^{2+} 突发胁迫污染下,在污染后0.5~1.5 h设置间歇性的电刺激,若斑马鱼的速度、转次行为明显低于空白,则可认为报警为真。

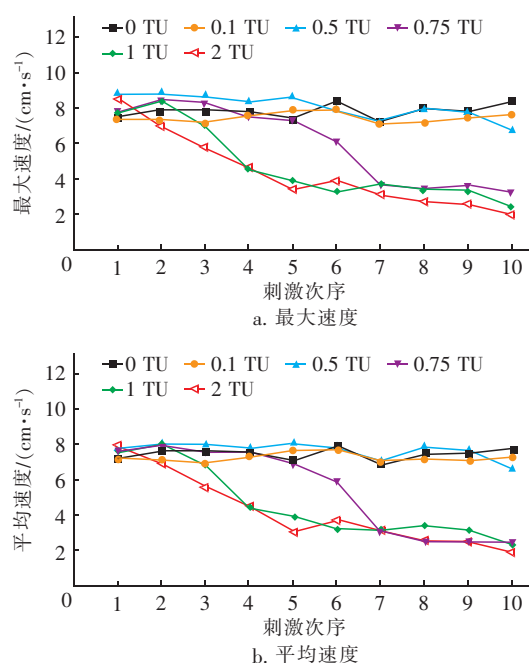
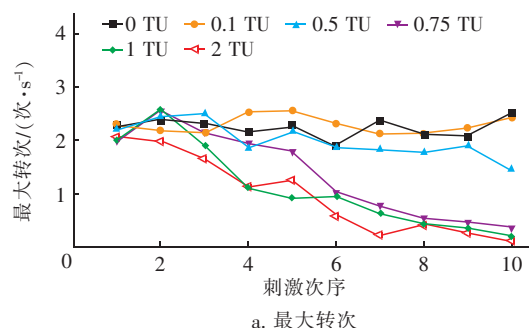


图5 不同浓度的 Cu^{2+} 突发胁迫下斑马鱼对弱电压(10 V)刺激的速度响应

Fig. 5 Speed response of zebrafish to weak voltage (10 V) stimulation under different concentrations of Cu^{2+} sudden stress



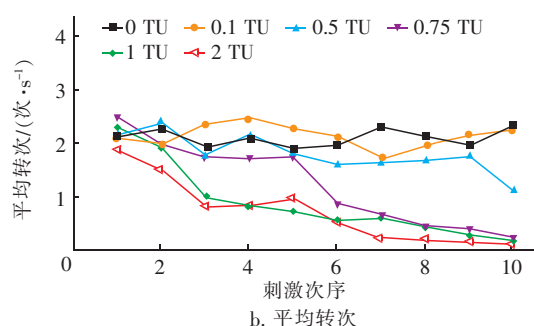


图6 不同浓度的 Cu^{2+} 突发胁迫下斑马鱼对弱电压(10 V)刺激的转次响应

Fig. 6 Turnover response of zebrafish to weak voltage (10 V) stimulation under different concentrations of Cu^{2+} sudden stress

2.5 斑马鱼误报警真假的判断

多点进水及不同浓度 Cu^{2+} 突发胁迫污染下,斑马鱼的速度、转次运动行为参数对10 V弱电压刺激的响应如图7所示。

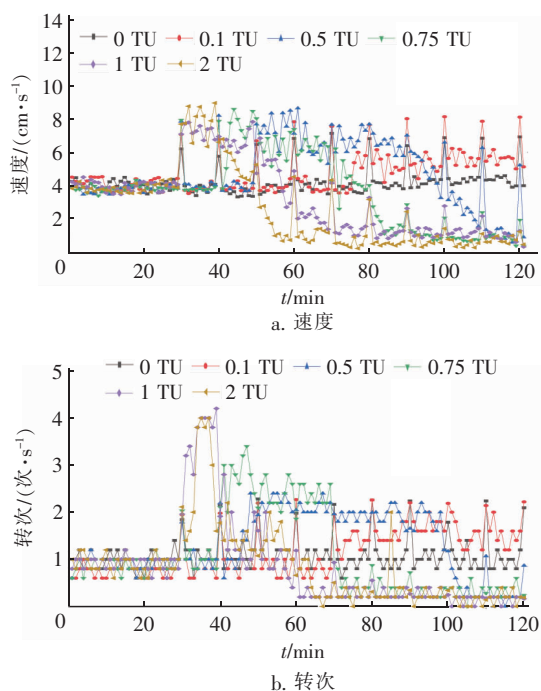


图7 Cu^{2+} 突发暴露及10 V电压刺激下斑马鱼的速度和转次响应情况

Fig. 7 Responses of speed and turnover of zebrafish under Cu^{2+} sudden exposure and 10 V voltage stimulation

在0、0.1 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下,斑马鱼在受到电压刺激的瞬间速度和转次都显著增大,且在受到电压刺激后,0.1 TU组的速度和转次要稍微高于0 TU组,此时, Cu^{2+} 毒性与电压刺激对斑马鱼的行为反应表现为协同作用。在0.5 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下,

在10 V电压刺激的前70 min,斑马鱼的速度和转次都显著增大,且比0.1 TU组要高,随着实验的运行,在第9、10次电刺激时,斑马鱼的速度和转次开始表现出降低的趋势。在0.75 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下,电压刺激的前30 min 斑马鱼的速度和转次都显著增大,且比0、0.1、0.5 TU组要高,随着实验的运行,在第5次及以后的电刺激时,斑马鱼的速度和转次显著降低,且低于0 TU组。在1、2 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下,在前两次电刺激时斑马鱼的速度和转次显著增大,但在第3次及以后的电刺激时,斑马鱼的速度和转次显著降低,基本对电刺激不会产生明显的行为反应,说明 Cu^{2+} 的毒性对斑马鱼的神经系统造成了不可逆的伤害,且 Cu^{2+} 浓度越大,效果越明显。

综上所述,采用10 V电压刺激污染物胁迫后的斑马鱼,通过分析其运动行为表现的差异来判断误报警发生的真假是可行的。

3 结论

① 在多点进水方式下斑马鱼明显感知 Cu^{2+} 突发胁迫的时间要比正常进水条件下的早,其中0.75 TU的 Cu^{2+} 突发胁迫下效果最明显,可以提前约15 min报警,并且在明显感知到污染物后持续活跃的时间要比正常进水方式的少10 min左右。

② 可以选择电压为10 V、间隔10 min刺激一次污染物暴露后的斑马鱼,以刺激时长为1 min作为检验报警发生的真假。

③ 在0.5、0.75、1、2 TU等高浓度 Cu^{2+} 暴露下,在暴露后的0.5~1.5 h设置间歇性的电刺激,若斑马鱼的速度、转次变化行为明显低于空白,则认为报警为真。而在0.1 TU低浓度的 Cu^{2+} 暴露下,用电刺激检验误报警效果并不是很理想。

参考文献:

- [1] 韩利文,孔浩天,史永平,等. 基于模式生物斑马鱼模型的中药药效物质筛选技术及应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2019,33(9):708-710.
HAN Liwen, KONG Haotian, SHI Yongping, et al. Screening technology and application of Chinese medicinal substances based on model biological zebrafish model [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2019, 33(9): 708-710 (in Chinese).
- [2] 杨培莎,朱艳华. 水质生物监测方法及应用展望[J]. 环境与发展, 2010, 22(2): 71-73.

- YANG Peisha, ZHU Yanhua. Water quality biological monitoring methods and application prospects [J]. Environment and Development, 2010, 22(2): 71 - 73 (in Chinese).
- [3] TAHEDL H, HADER D. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 48: 161 - 169.
- [4] 朱冬梅. 生物监测技术在水环境监测中的应用[J]. 中国资源综合利用, 2019, 37(3): 102 - 104.
ZHU Dongmei. Application of biological monitoring technology in water environment monitoring [J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2019, 37(3): 102 - 104 (in Chinese).
- [5] 谢颖嘉, 梁智伟, 黄艺芳. 生物监测技术在水环境监测中的应用[J]. 资源节约与环保, 2018(12): 44.
XIE Yingjia, LIANG Zhiwei, HUANG Yifang. Application of biological monitoring technology in water environment monitoring [J]. Resources Conservation and Environmental Protection, 2018(12): 44 (in Chinese).
- [6] 叶滴清. 浅析生物监测技术在环境监测中的应用[J]. 资源节约与环保, 2019(5): 46.
YE Diqing. Analysis of the application of biological monitoring technology in environmental monitoring [J]. Resource Conservation and Environmental Protection, 2019(5): 46 (in Chinese).
- [7] 黄东龙, 凌亮, 周勤. 基于视觉技术的水质安全在线生物预警系统设计[J]. 中国给水排水, 2014, 30(9): 113 - 117.
- HUANG Donglong, LING Liang, ZHOU Qin. Design of computer vision-based on-line biomonitoring and early warning system for sudden pollution in water [J]. China Water & Wastewater, 2014, 30(9): 113 - 117 (in Chinese).
- [8] SOH Z, MIYAMOTO K, HIRANO A, et al. A bioassay system for water-quality monitoring using a small fish [J]. IEEE Transactions on Electronics Information & Systems C, 2013, 133(8): 1616 - 1624.
- [9] 黄毅. 基于斑马鱼行为变化的水质预警研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2014.
HUANG Yi. Research on Early Warning of Water Quality Based on Zebrafish Behavior Changes [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2014 (in Chinese).
- [10] 高问, 武鹏鹏, 王雅学, 等. 土霉素废水对斑马鱼的生物毒性效应研究[J]. 河北科技大学学报, 2019, 40(1): 40 - 46.
GAO Wen, WU Pengpeng, WANG Yaxue, et al. Study of the biological toxicity of oxytetracycline wastewater on zebrafish [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(1): 40 - 46 (in Chinese).

作者简介: 刘国臣(1993 -), 男, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向为饮用水在线监测与风险预警评估。

E-mail: 978989003@qq.com

收稿日期: 2020 - 03 - 23

修回日期: 2020 - 05 - 20

(编辑: 李德强)

珍惜资源, 保护环境, 建设美丽中国