农业环境科学学报 2008,27(6):2440-2446
Journal of Agro-Environment Science

某火电厂余氯排放对附近牡蛎消瘦、死亡原因的分子诊断

沈盎绿[1], 姜红梅[1,2], 晁 敏[1], 王云龙[1], 沈新强[1]

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090;2.国家海洋局第二海洋研究所, 浙江 杭州 310012)

摘 要:采用随机扩增 DNA 多态性(RAPD)技术,通过现场调查和室内模拟试验相结合,研究了火电厂余氯排放对牡蛎养殖区牡蛎基因组 DNA 多态性的影响。结果表明,现场火电厂附近牡蛎与对照组牡蛎的生物学特性(平均壳长、平均壳宽、平均重量等)差异显著($P<0.05$),室内模拟试验中随着余氯污染浓度的增加,牡蛎死亡现象更加严重;随着余氯处理浓度的增加,牡蛎的 RAPD 谱带发生了明显的变化,主要表现为谱带的消失以及谱带荧光强度的减弱,即牡蛎的基因组模板稳定性(GTS)随着余氯处理浓度的增加而更加明显,两者之间存在着明显的剂量-效应关系,其相关性较好($y=-105.16x+102.98$, $R^2=0.978\ 8$),GTS 与牡蛎的死亡率相关性也较好,呈现出负相关($y=-0.742\ 2x+96.526$, $R^2=0.973$)。另外,火电厂附近牡蛎与余氯模拟曝露试验牡蛎的 GTS 及特征带谱比较发现,其 GTS 和死亡率正好介于 0.2~0.5 mg·L^{-1} 余氯处理组之间,牡蛎长期受到的余氯的影响程度相当于室内余氯短期模拟试验中 0.35 mg·L^{-1} 左右的余氯处理。研究结果也表明 DNA 多态性(RAPD)技术可用于相关的水生生态影响评价。

关键词:余氯; 牡蛎; 基因组模板稳定性; RAPD

中图分类号:X503.225 **文献标识码**:A **文章编号**:1672-2043(2008)06-2440-07

Molecular Diagnoses on the Death and Thinness of Oyster Living Round Power Plant

SHEN Ang-lv[1], JIANG Hong-mei[1,2], CHAO Min[1], WANG Yun-long[1], SHEN Xin-qiang[1]

(1.East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences; Key Lab of Marine and Estuary Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China;2. The Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was employed to investigate residual chlorine stress on DNA polymorphism in oyster. The results indicated that the biological characteristics (including the average length, width and weight of shell) showed significant differences between the oyster living round power plant and control group, and the phenomena of death of oyster was becoming more and more serious when the concentration of residual chlorine increased; The DNA bands changes of RAPD profiles of oyster following residual chlorine treatment included loss of normal DNA bands and appearance of new DNA bands and variation in DNA intensity in comparison to that of the normal oyster. Additionally, the genome template stability (GTS) and residual chlorine had good accord ($y=-105.16x+102.98$, $R^2=0.978\ 8$), GTS and death rate of oyster also showed good correlation. ($y=-0.742\ 2x+96.526$, $R^2=0.973$). Moreover, compared with the GTS and RAPD profiles between oyster living round power plant and test group in laboratory, the lasting effect of oyster living round power plant stressed by residual chlorine was equal to acute toxicity of residual chlorine which concentration was 0.35 mg·L^{-1}. The research results show that DNA polymorphisms detected by RAPD analysis could be used as a useful biomarker assay for the detection of genotoxic effects of residual chlorine pollution on aquatic animal, and which may be useful for risk assessment of environmental contamination.

Keywords: residual chlorine; oyster; genome template stability; RAPD

收稿日期:2007-12-13
基金项目:科技部社会公益研究专项(2005DIB3J021);上海市 908 专项(PJ1-1)
作者简介:沈盎绿(1980—),男,硕士,助理研究员,主要从事生态毒理学研究。E-mail: shenanglv@163.com
通讯联系人:沈新强 E-mail:xinqiang_shen@hotmail.com

褶牡蛎（*Crassostrea plicatula*）属于软体动物门(*Mollusca*)，瓣鳃纲(*Lamellibranchia*)，异柱目(*Anisomyaria*)，牡蛎科(*Ostridae*)。牡蛎在我国已有 2 000 多年的养殖历史，俗称 4 大养殖贝类之一，它在食用（鲜蚝、蚝干、蚝油）、药用（有治虚弱、解丹毒、止渴等药用价值）和工业（贝壳可供制石灰、水泥、电石等）均有较好的应用价值，其中褶牡蛎属于广温广盐性种（−3~32 ℃），主要分布在于我国东部、北部沿海潮间带。

随着沿海经济的快速发展，用电量增大，缺电现象十分严重，因此在我国沿海海湾周围陆续兴建火电厂。而我国的沿海海湾，通常也是海水养殖区域，电厂冷却的温排水和含有余氯的废水的大量排放会给海湾水产养殖业和水生生态系统带来了一定的影响[1−2]。最近位于某港湾的火电厂附近的牡蛎养殖区发现牡蛎比往年消瘦，产量下降。本试验通过分子生物学的手段，应用随机扩增多态性 DNA（简称 RAPD 分子标记技术）分析该海湾养殖区牡蛎消瘦、死亡的原因，进而从基因毒性角度分析牡蛎消瘦、死亡的原因。RAPD 技术具有快速、高效、高灵敏度、特异性强、不需要同位素标记和限制性酶切等优点，同时 RAPD 谱带可作为一种有效的分子生物标记物，及时检测出 DNA 的临时改变，因此 RAPD 分子标记技术比经典的遗传毒性测定方法更为灵敏[3−5]。目前 RAPD 技术被广泛应用于不同环境污染因子对生物的 DNA 损伤情况，RAPD 分子标记技术应用在环境毒理方面最近有不少报道，Atienzar 等[3−6]通过对环境中有毒有害物质如苯并(a)芘、紫外线辐射等对生物的影响研究时发现，利用 RAPD 技术可以发现这些污染物能诱导细胞内的 DNA 损伤和突变，陈家长等[7−8]、冷春梅等[9]研究表明 RAPD 技术可检测到农药对鱼类的基因突变情况，Conte C 等[10]、Mengoni A 等[11]和刘宛等[12]研究发现利用 RAPD 分析获得的 DNA 多态性变化可作为检测重金属污染对生物遗传毒性效应的生物标记物。目前，关于电厂温排水中余氯对水生生物基因组 DNA 的影响尚未见有报道。本研究中同时将室内模拟试验结果和现场调查的牡蛎基因组进行 RAPD 分析比较，并结合常规毒理学死亡率指标，最终评估余氯污染对牡蛎的损伤程度，希望可以为环境影响评价经济损益分析提供一种新方法。

1　材料与方法

1.1 材料

室内模拟试验材料褶牡蛎，取自距离电厂排水口较远的海湾养殖区（该水体内特征污染物余氯未检出，即为对照组，简称 D 站，以下同）。平均壳长（4.65 ± 0.42）cm，平均壳宽（3.19 ± 0.34）cm，平均体重（15.24 ± 4.03）g。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

现状调查取样分别为两个站点，取样时间为 2007 年 1 月，其中靠某电厂排水口区域（特征污染物余氯浓度为 0.07 mg·L^{-1}，简称 1 号站，以下同），采集 20 个牡蛎，测量生物学特性，同时保存 10 个个体，以备提取基因组 DNA，远离电厂排水口区域 D 站采集牡蛎方法同上。

室内模拟试验设定 3 个余氯浓度组和对照组，根据余氯在水体中的衰减特征，余氯在最初的 3 h 内衰减迅速，随着时间的延长，浓度衰减速率变缓，在较长的过程中光照的作用大于其他影响因素[13]，同时结合现场电厂排水口余氯的浓度，本次试验设置高浓度组（0.30~0.50 mg·L^{-1}，简称 0.5）、中浓度组（0.10~0.20 mg·L^{-1}，简称 0.2）、低浓度组（0.05~0.10 mg·L^{-1}，简称 0.1）和对照组（0.00 mg·L^{-1}，简称 D）；每组 70 个牡蛎，试验容器为 200 L 的整理箱，试验用海水 100 L，设一个平行组，试验在室内进行，无直射阳光，试验期间根据余氯在水体中的衰减特征，每隔 6 h 加入次氯酸钠以维持余氯试验浓度，视试验组水质情况不定期更换海水，每天投喂小球藻 2 次，藻类浓度为 3.5×10^6 个·mL^{-1}，每次 100 mL，平时随时记录牡蛎死亡情况，并统计死亡率，在试验进行的第 15 d 取样（高浓度组由于在接近第 10 d 时死亡较多，因此提前取样），取样 10 个存活个体，处理方法同上。

1.2.2 基因组 DNA 的制备

基因组 DNA 提取参照文献[14]的方法进行，取牡蛎斧足肌肉 100 mg，加 600 μL 抽提缓冲液（10 mmol·L^{-1}Tris−HCl, pH 8.0；100 mmol·L^{-1} EDTA, pH 8.0），剪碎组织，加入 SDS 和蛋白酶 K（终浓度分别为:1%和 200 μg·L^{-1}），55 ℃水浴消化至溶液透明。待冷却后，分别加入等体积酚、酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）、氯仿各抽提一次，两倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA，70%乙醇洗涤，自然干燥后将获得的基因组 DNA 沉淀溶于适量 ddH_2O 中，通过 proRNA/DNA 定量分析仪进行浓度测定。DNA 置于 4 ℃保存、备用，试验中基因组 DNA 为 10 个个体的基因组混合进行扩增。

1.2.3 引物的筛选

使用的 60 个 S 系列引物是由上海生物工程公司

合成的随机引物(扩增出特征谱带的引物具体序列见表1)。从 1 号站和 D 站各随机选取的 2 个个体进行 PCR 反应,选择可重复性好、谱带清晰且扩增结果好的引物进行 PCR 扩增。

表 1 用于特征污染带谱分析的 RAPD 引物序列

Table 1 Sequences of 8 primers used in this experiment

引物	引物序列	引物	引物序列
S113	GACGCCACAC	S177	GGTGGTGATG
S115	AATGGCGCAG	S178	TGCCCAGCCT
S118	GAATCGGCCA	S180	AAAGTGCGGC
S119	CTGACCAGCC	S181	CTACTGCGCT

1.2.4 RAPD 反应条件

扩增反应总体积为 25 μL,其中包括 10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL;$MgCl_2$(25 mmol·L^{-1})2.5 μL;DNA 模板(10 μg·mL^{-1})2 μL;Taq 酶(北京博大泰克生物技术公司,5 U·μL^{-1})0.2 μL;dNTP(大连宝生物技术公司,各 2.5 mmol·L^{-1})1 μL;RAPD 引物(10 μmol·L^{-1})1 μL;用 ddH_2O 补足体积。PCR 反应在 PTC-200 扩增仪上进行,94 ℃预变性 7 min 后进行 45 个循环,每个循环包括 94 ℃ 1 min、37 ℃ 1 min、72 ℃ 2 min,最后于 72 ℃再延伸 10 min。反应结束后 4 ℃保存,每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。

1.2.5 电泳检测

RAPD 产物用含有溴化乙锭的 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离,取 DNAmarker(DL2000,大连宝生物技术公司)作为标准,其大小为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp,由凝胶成像系统处理及保存,并进行数据整理。

1.2.6 数据分析

根据基因组模板稳定性(GTS)作为污染特征带谱比较分析,来说明余氯污染是否对褶牡蛎的基因组 DNA 产生影响程度,其中:

$$GTS(\%)=100-(100a/n)$$

式中:a 为处理组(或者现场污染组)牡蛎的 RAPD 多态性谱带,n 为对照组的总带数。多态性谱带是指与对照组相比较,处理组中新出现的 PCR 谱带与减少的 PCR 谱带之和[6]。为便于比较 GTS 与牡蛎死亡率的相关性,每项指标以其与对照组相比的百分率表示。

2 结果与分析

2.1 现场调查和余氯短期曝露试验牡蛎死亡情况

从表 2 中可以看出,现场调查中 1 号站牡蛎和 D 号站牡蛎各项生物学指标(平均壳长、壳宽、重量)相差显著($P<0.05$,$n=20$),说明靠近电厂排水口区域 1 号站牡蛎的生长较差,而远离电厂排水口区域的 D 号站牡蛎则没有受到影响,另外,近电厂排水口区域牡蛎的死亡率很高,加上牡蛎单位重量下降,此区域牡蛎的年产量大幅下降,而对照组只有个别牡蛎死亡,而且产量也很高。

表 2 1 号站和 D 号站养殖区牡蛎生物学结果

Table 2 The results of biology character between NO.1 and NO.D oyster

站位	生物学特征			
	平均壳长/cm	平均壳宽/cm	平均重量/g·个$^{-1}$	死亡率/%
1 号站	4.01±0.11^a	2.66±0.09^a	10.14±0.53^a	47.76
D 号站	4.65±0.09^b	3.19±0.08^b	15.25±0.90^b	1.21

注:表中同一列数据不同上标字母代表有显著差异($P<0.05$, $n=20$)。

Note: The different superscripts of the same column values are significantly different ($P<0.05$, $n=20$)

从室内模拟余氯污染试验的结果来看(见表 3),对照组和低浓度处理组(0.1 mg·L^{-1})在试验过程中没有出现死亡个体,浓度较高的两组(0.2 mg·L^{-1} 和 0.5 mg·L^{-1})在第 4 d 均出现死亡个体,从第 7 d 开始死亡个数增加较快,特别是高浓度组,到第 9 d 时已经超

表 3 不同时间内牡蛎的死亡数和死亡率情况

Table 3 The number and rate of death of oyster in different time

试验天数	余氯浓度/mg·L^{-1}			
	0	0.10	0.20	0.50
	死亡数/死亡率			
第 1 d	0/0	0/0	0/0	0/0
第 2 d	0/0	0/0	0/0	0/0
第 3 d	0/0	0/0	0/0	0/0
第 4 d	0/0	0/0	1/1.43%	1/1.43%
第 5 d	0/0	0/0	1/1.43%	1/1.43%
第 6 d	0/0	0/0	2/2.86%	5/7.14%
第 7 d	0/0	0/0	2/2.86%	12/17.14%
第 8 d	0/0	0/0	3/4.29%	27/38.57%
第 9 d	0/0	0/0	6/8.58%	41/58.57%
第 10 d	0/0	0/0	9/12.88%	45/64.29%
第 11 d	0/0	0/0	10/14.29%	—
第 12 d	0/0	0/0	10/14.29%	—
第 13 d	0/0	0/0	10/14.29%	—
第 14 d	0/0	0/0	10/14.29%	—
第 15 d	0/0	0/0	10/14.29%	—

注:“—”由于取样的原因第 10 d 时没有多余的试验个体。

Note: “—”the test had no redundant oyster after 10 d.

过半数死亡,因此,最高浓度组的牡蛎在第 10 d 时就取样提取 DNA 用。由此说明,较低浓度的余氯污染在较短时间内(15 d)影响不大,不会导致牡蛎死亡,但是当余氯污染浓度到达 0.20 mg·L^{-1} 左右时,在相当短的时间内(4 d)就能对牡蛎产生影响,使牡蛎陆续出现死亡,随着余氯污染浓度的增加,牡蛎死亡现象更加严重。

2.2 1 号站牡蛎与余氯模拟曝露试验牡蛎的 GTS 及特征带谱比较

据扩增产物的一致性和重复性,从 60 个 10 bp 随机引物中选取 24 个对余氯模拟曝露试验牡蛎进行扩增,其中有 8 个引物可以扩增出特异、稳定的 PCR 产物。对照组牡蛎基因组的 RAPD 图谱中可分辨出 36 条谱带,其分子量在 100~2 000 bp 之间,并且带谱清晰(图 1~8)。表明在此条件下的扩增较为理想。从表 4 和图 1~8 可以看出,较低浓度(0.05~0.10 mg·L^{-1})的余氯处理短时间内对牡蛎基因组 DNA 损伤的不大,其 GTS 为 97.22%,RAPD 谱带增加一条,并没有缺失,另外只是个别几条谱带表现为谱带荧光强度的改变(包括减弱和增加),说明其基因组模板稳定性较好,跟对照组相差不大。随着余氯处理浓度的增加,牡蛎的 RAPD 谱带发生了明显的变化,主要表现为谱带的消失以及谱带荧光强度的减弱,随着余氯处理浓度的增加而更加明显,两者之间存在着明显的剂量和效应关系,其相关性较好(y=−105.16x+102.98,R^2=0.978 8),另外牡蛎的 GTS 与牡蛎的死亡率相关性也较好,呈现出负相关(y=−0.742 2x+96.526,R^2=0.973)。通过对现场调查 1 号站的牡蛎进行分析发现,其 GTS 和死亡率正好介于 0.2~0.5 mg·L^{-1} 余氯处理组之间,同时对其进行相关性分析表明,GTS 和死亡率的相关性也较好(y=−0.707 2x+96.717,R^2= 0.965 2)。由此推算出 1 号站牡蛎长期受到的余氯的影响程度相当于室内余氯短期模拟试验中 0.35 mg·L^{-1} 左右的余氯处理。

3 讨论

3.1 电厂余氯排放对水生生物的影响

氯作为一种强氧化剂和杀菌剂,对防止水生物附着具有很好的效果,被广泛应用于我国火(核)电厂的冷却系统。余氯排入受纳水体后,对水环境的影响主要有两个方面:一是余氯对水生生物的影响,二是余氯与水中有机物形成有机氯化合物,具有长期的毒性。目前对于后者的研究鲜见报道,缺少系统、定量的研究结果[13]。黄洪辉等[15]对大亚湾核电站余氯排放对邻近海域环境影响研究得出,余氯对所选择用于试验的大亚湾经济养殖动物平鲷、黑鲷、斑节对虾和台浦珠母贝的生长和繁殖均有影响。曾江宁等(2005)[2]曾经比较系统综述了余氯对水生生物的影响,分别讲述了余氯对浮游植物、浮游动物、贝类和鱼类等影响程度和作用机理,其中浮游植物具有较强的恢复潜能,

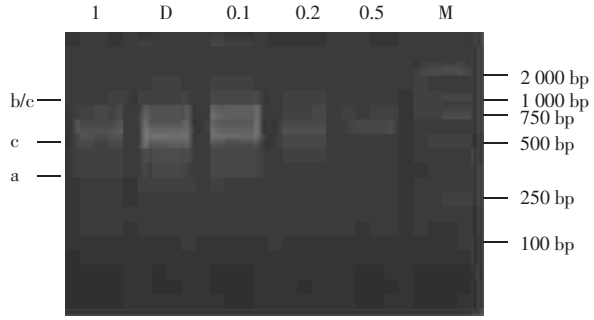
表 4 牡蛎基因组 DNA 的多态性变化

Table 4 Changes of total bands in control, and of polymorphic bands and varied bands in residual chlorine-contaminated oyster

引物编号	余氯浓度/mg·L^{-1}																
	0	0.1				0.2				0.5				1 号站			
		a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
S113	2	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	0	0	1	1	0
S115	5	0	0	5	0	0	1	4	0	0	2	3	0	0	2	3	0
S118	5	0	0	1	0	0	1	2	0	0	3	3	0	0	3	3	0
S119	5	0	0	0	3	0	1	4	0	0	1	4	0	0	0	0	2
S177	4	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0	1	1	1
S178	4	0	0	0	4	0	0	1	0	0	3	1	0	2	0	1	1
S180	7	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	5
S181	4	0	0	3	0	0	3	1	0	0	3	1	0	0	3	1	0
Total bands	36	1	0	10	10	0	7	14	0	0	18	19	0	2	10	10	9
a+b		1				7				18				12			
a+b+c+d		21				21				37				31			
GTS/%	100	97.22				80.56				50.00				66.67			

注:a 为新出现的谱带,b 为消失的谱带,c 为带强降低的谱带,d 为带强增高的谱带,以下同。a + b 为多态性谱带,a +b + c + d 为变化的谱带。

Note: a: indicates appearance of new bands, b: disappearance of normal bands, c: decrease in band intensities, d: increase in band intensities. a + b: denote polymorphic bands, a +b + c + d: varied band.



1:1 号站牡蛎; D:对照组牡蛎;0.1~0.5:浓度为 0.1~0.5 mg·L^{-1} 试验组牡蛎;M:DL-2000 标准分子量,下同

1:NO.1 group; D:control group;0.1~0.5:0.1~0.5 mg·L^{-1} group;M: DL-2000 molecular weight marker, the same below

图 1 引物 S113 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 1 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S113

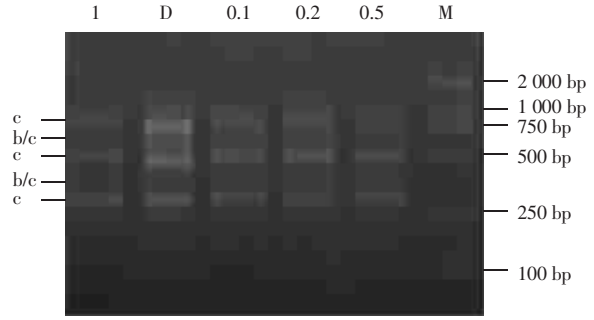


图 2 引物 S115 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 2 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S115

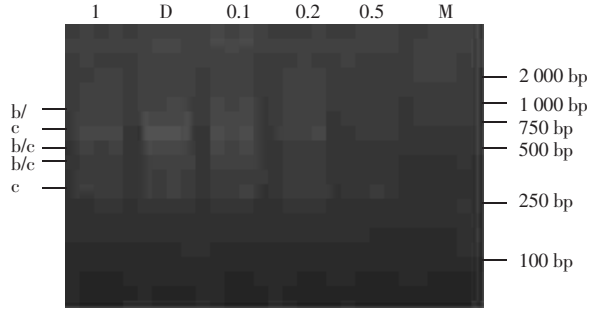


图 3 引物 S118 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 3 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S118

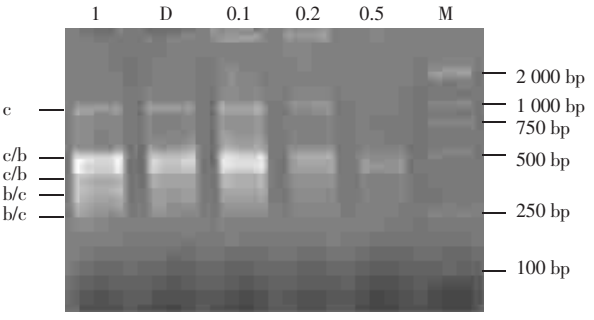


图 4 引物 S119 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 4 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S119

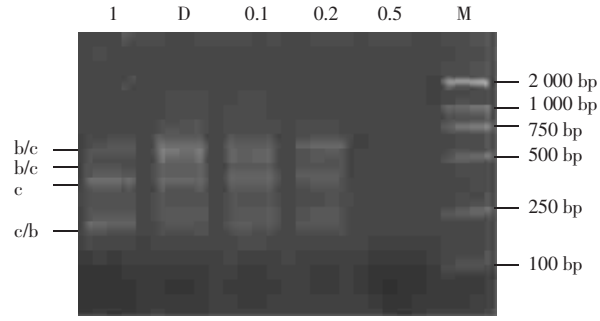


图 5 引物 S177 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 5 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S177

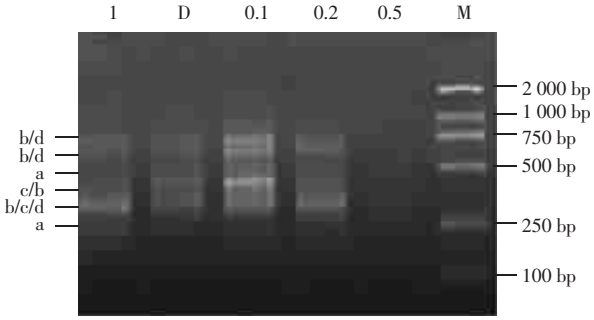


图 6 引物 S178 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 6 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S178

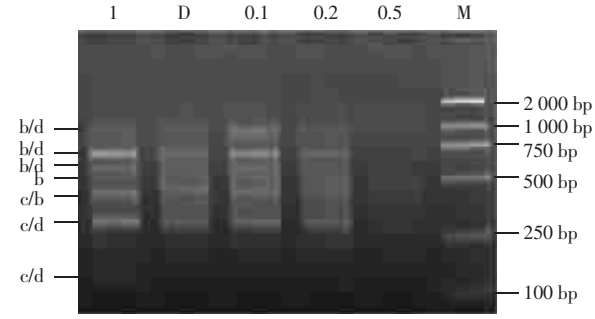


图 7 引物 S180 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 7 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S180

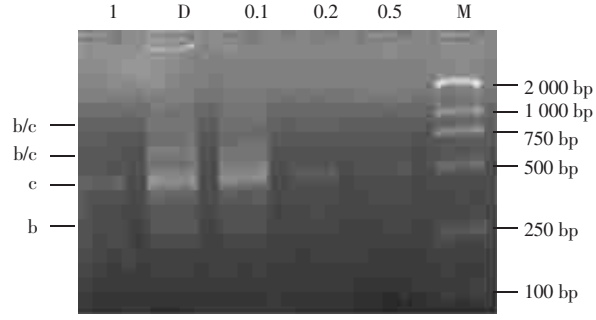


图 8 引物 S181 对牡蛎的扩增电泳图谱

Figure 8 Amplification of genomic DNA of oyster with primer S181

余氯对浮游植物的损伤能得到较快恢复,但恢复后的浮游植物种类组成发生变化; 浮游动物对余氯较敏感, 较低浓度的余氯即可对浮游动物产生明显的影响,浮游动物受氯连续暴露影响的浓度低于间歇暴露的浓度;余氯可造成贝类滤食率、足活动频率、外壳开闭频率、耗氧量、足丝分泌量、排粪量等亚致死参数的降低,从而使贝类失去附着能力,另外氯可以直接对贝类鳃上皮细胞造成伤害,由氯造成的氧化作用破坏贝类呼吸膜,也能导致其体内缺氧、窒息而死,甚至氯直接参加贝类酶系统的氧化作用从而破坏其酶系统;余氯对鱼鳃有损伤作用,使鱼鳃组织发生病变,还可能抑制正铁血红蛋白还原性酶的活性,从而导致血液运载氧的能力下降,但是有些鱼类可以通过自身的调节,对氯产生一定的抗性,提高自身对氯的忍耐力以及会对余氯产生回避作用从而减少影响。

本研究发现, 当余氯处理浓度上升到一定浓度,随着处理时间的延长, 牡蛎死亡的现象越来越严重,在 0.5 mg·L^{-1} 浓度组, 第 10 d 牡蛎的死亡率为 64.29%,同时牡蛎基因组模板的稳定性也越来越差,该浓度组牡蛎的 GTS 为 50.00%。说明随曝露时间的增加,余氯会严重影响到牡蛎的正常生长,从而会导致牡蛎出现大规模的消瘦、死亡。火电厂附近养殖的牡蛎消瘦、死亡可能是多种因素累积过程的集中反映,本研究结果表明,余氯对牡蛎的正常生长可产生不利影响,其影响程度取决于余氯的浓度和持续的时间。

3.2 RAPD 技术在环境影响评价中的应用价值

当某种污染物质在环境中长期存在时,可导致生活在此环境中的生物受到长期的毒害。当此类环境中存在大量经济养殖品种时就会对养殖业造成不少的损失。另外,此类污染物对养殖品种的影响往往是属于低浓度长期影响造成的慢性毒害作用,采用常规的急性毒性试验不能很好的反映实际情况,而传统的慢性毒性试验由于试验时间的关系不能及时地对环境污染作出经济损益分析。因此,本研究把急性毒性试验与现场调查同步进行, 采用较为先进、灵敏的 RAPD 技术,利用基因组模板的稳定性(GTS)作为一个半定量的指标,对环境污染作出较为合理的经济损益分析。

本试验结果表明,短期内低浓度余氯处理(浓度为 0.1 mg·L^{-1})对牡蛎影响不大,基因组模板的稳定性较好,GTS 为 97.1%,与对照组的差异不明显;随着余氯浓度的提高, 余氯对牡蛎的影响随之加大,GTS 值不断变小,与对照组相比,试验组牡蛎的 RAPD 诸带变化越发明显,这种变化主要表现为随着余氯浓度的上升,试验组牡蛎 RAPD 谱带的缺失更加严重,基因组模版的稳定性(GTS)也相应的变差。即余氯浓度越高,牡蛎基因组 DNA 损伤的程度越大,由表 4 可知,余氯处理浓度为 0.2 mg·L^{-1} 时,GTS 为 80.56%; 余氯处理浓度为 0.5 mg·L^{-1} 时,GTS 为 50.00%。在电厂排水口区域, 现场采集的牡蛎样品的 GTS 为 66.7%,该值介于余氯处理浓度 0.2 mg·L^{-1} 和 0.5 mg·L^{-1} 试验组之间。但实际情况是现场余氯浓度仅为 0.07 mg·L^{-1},而其对牡蛎 DNA 的损伤却超过 0.2 mg·L^{-1} 试验组,这说明长期低浓度余氯污染对牡蛎产生的影响要远远大于同等浓度下的急性试验。从本试验结果中可以初步得出,长期余氯浓度(0.07 mg·L^{-1} 左右)影响下造成的牡蛎 DNA 损伤程度与短期内余氯浓度 (0.2~0.5 mg·L^{-1})造成的损伤程度相当。另外,从表 3 可以看出, 在 0.2 mg·L^{-1} 浓度组, 第 10 d 牡蛎的死亡率为 14.29%;在 0.5 mg·L^{-1} 浓度组,第 10d 牡蛎的死亡率为 64.29%。由此可以推断现场牡蛎的死亡率应介于 14.29%~64.29%之间。电厂现场调查发现 1 号站牡蛎的死亡率为 47.76%,介于 14.29%~64.29%之间,实际与理论估计情况比较一致。从中也可以看出采用 RAPD 技术,利用急性毒性试验和环境污染现场实际采样分析结果可以比较合理地评估出环境污染造成的损失。

参考文献:

[1] 徐兆礼,张凤英,陈渊泉.机械卷载和余氯对渔业资源损失量评估初探[J].海洋环境科学,2007,26(3):246-251.
XU Zhao-li, ZHANG Feng-ying, CHEN Yuan-quan.Assessment on fishery resource loss owing to mechanical entanglement and residual chlorine[J]. *Marine Environmental Science*, 2007,26(3):246-251.

[2] 曾江宁,陈全震,郑　平,等.余氯对水生生物的影响[J].生态学报.2005,25(10):2717-2724.
ZENG Jiang-ning, CHEN Quan-zhen, ZHENG Ping, et al.Advanced in effect of residual chlorine on hydrobios[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(10):2717-2724.

[3] Atienzar F A, Cordi B, Donkin M E. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, Palnaria palnata[J].*Aqua Toxicol*, 2000,50:1-12.

[4] Atienzar F A, Cordi B, Evenden A J, et a1. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1999, 18: 2275-2282.

[5] Atienzar F A, Venier P, Jha A N, et al. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations[J]. *Mural Res*, 2002, 521:151-163.

[6] Atienzar F A, Billinghurst Z. Depledge M H 4-n-Nonylphenol and l7-β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae [J]. *Environ Pollution*, 2002, 120:735-738.

[7] 陈家长,董在杰,胡庚东,等.运用 RAPD 技术检测除草剂对草鱼的致突变作用[J].农业环境科学学报,2004,23(5):1037-1038.
CHEN Jia-zhang, DONG Zai-jie,HU Geng-dong, et a1. Detection on mutagenicity of herbicides to grass carp by RAPD technique [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(5):1037-1038.

[8] 陈家长,杨 林,胡庚东,等.除草剂骠马对草鱼遗传毒性的研究[J].农业环境科学学报,2006,25(2):295-300.
CHEN Jia-zhang, YANG Lin, HU Geng-dong, et a1. Genetic toxicity of the herbicide puilla super to grass carp[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006,25(2):295-300.

[9] 冷春梅,胡庚东,瞿建宏,等.低浓度溴氰菊酯连续暴露对罗非鱼 DNA 的影响[J].安全与环境学报,2006,6(5):31-35.
LENG Chun-mei, HU Geng-dong, QU Jian-hong ,et a1. Harmful efect of continuous exposure of low concentration deltamethrin on the DNA of tilapia[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2006,6(5):31-35.

[10] Conte C, Mutti I, Puglisi P, et a1. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution[J]. *Chemosphere*,1998,37:2739-2749.

[11] Mengoni A, Gonnelli C, Galardi F. Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L.(Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis [J]. *Mol Eeol*, 2000, 9(9): 1319-1324.

[12] 刘 宛,郑 乐,李培军,等.镉胁迫对大麦幼苗基因组 DNA 多态性影响[J].农业环境科学学报,2006,25(1):19-24.
LIU Wan,ZHENG Le,LI Pei-jun, et a1. Efects of cadmium stress on DNA polymorphism of genome in barley seedlings [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006,25(1):19-24.

[13] 刘兰芬,郝 红,鲁光四.电厂温排水中余氯衰减规律及其影响因素的实验研究[J].水利学报,2004,5:94-98.
LIU Lan-fen,HAO Hong,LU Guang-si. Experiment study on attenuation law of residual chlorine in cooling water discharged from thermal power plants[J]. *Journal of Water Conservancy*, 2004,5:94-98.

[14] 萨姆布鲁克,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T 著.金冬雁,黎孟枫译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1999.463-469.
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual [M].(2nd ed), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. 463-469.

[15] 黄洪辉,张 穗,陈浩如,等.余氯对大亚湾海区平鲷和黑鲷幼鱼的毒性研究[J].热带海洋,1999,18(3):38-44.
Huang Hong- hui, Zhang Sui, Chen Hao-ru, et a1. Studies on toxicity of residual chlorine to larvae of *Rhabdo sargus* and *Sparus macrocephalus* in Daya Bay[J]. *Tropic Oceanology*,1999,18(3):38-44.