

石油污染对东方小藤壶 (*Chthamalus challenger*) Ⅱ期无节幼虫的急性毒性效应

齐磊磊, 沙婧婧, 唐学玺

(中国海洋大学 海洋生命学院 生态系, 山东 青岛 266003)

摘要: 日益严重的海洋石油污染给海洋生态环境带来严峻考验, 为了获悉石油污染对海洋生物的急性毒性效应, 在实验生态条件下, 采用静态实验的方法, 研究了不同浓度的原油水溶成分 (Water-Accommodated Fraction, WAF) 对东方小藤壶 (*Chthamalus challenger*) Ⅱ期无节幼虫的影响。结果表明: (1) 孤二联原油的 WAF 胁迫 48 h, 对幼虫的存活率、发育率、过氧化氢酶 (CAT) 的酶活力均未产生显著影响 ($p > 0.05$)。 (2) 随着 WAF 胁迫浓度的升高, 幼虫的趋光性呈现先上升后下降的趋势, 超氧化物歧化酶 (SOD) 的酶活力呈现上升趋势, 但这两种变化趋势均不显著 ($p > 0.05$)。与对照组相比, 幼虫的趋光性和 SOD 的酶活力仅在最高浓度为 27 mg/L 的处理组发生显著变化 ($p < 0.05$)。 (3) 孤二联原油的 WAF 对藤壶幼虫毒性作用较小的原因, 可能是东方小藤壶 Ⅱ期幼虫对石油污染具有较强的抗性, 也可能是孤二联原油 WAF 中溶解的易挥发、低沸点的烃类物质较少。 (4) 与存活率、发育率和 CAT 酶活力相比, 幼虫的趋光性和 SOD 酶活力的变化能更加灵敏、准确地反映出 WAF 对藤壶幼虫的急性毒性效应, 因此幼虫的趋光性和 SOD 酶活力具有成为监测海洋石油污染的生物标志物的可能性。

关键词: 石油污染; 东方小藤壶; 趋光性; 发育率; 抗氧化酶

中图分类号: X55

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2015)03-0367-06

Acute toxic effects of crude oil pollution on Nauplius Ⅱ of *Chthamalus challenger*

QI Lei-lei, SHA Jing-jing, TANG Xue-xi

(Department of Ecology, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Oil pollution is a severe threat to the marine ecological environment. To figure out the acute toxic effect of oil pollution on marine organisms, the effects of water-accommodated fraction (WAF) of crude oil on nauplius Ⅱ of *Chthamalus challenger* were examined under the condition of the laboratory adopting the static test method. The results showed that: (1) The survival rate, developmental rate and Catalase (CAT) activity were not significantly affected after being stressed by WAF for 48 h ($p > 0.05$). (2) With the increasing of the concentration of WAF, phototaxis and Superoxide dismutase (SOD) activity did not show significant variation ($p > 0.05$). As a whole, the fluctuation of phototaxis of nauplius Ⅱ exhibited a downward trend after rising first and an upward trend was observed for the fluctuation of the SOD activity. Phototaxis and SOD activity were significantly changed only by WAF of 27 mg/L ($p < 0.05$). (3) The reason for the low toxic effects on the larvae might lie in the stronger resistance of larvae to oil pollution or the small amount of volatile and low boiling point hydrocarbon dissolved in WAF. (4) The phototaxis and

收稿日期: 2014-03-20, 修订日期: 2014-07-16

基金项目: 国家海洋局公益项目 (201305009, 201005007)

作者简介: 齐磊磊 (1985-), 男, 山东青岛人, 博士研究生, 主要从事海洋生态毒理学方面的研究, E-mail: oucquilei@163.com

通讯作者: 唐学玺, 教授, 博士生导师, E-mail: tangxx@ouc.edu.cn

SOD activity of nauplius II might be employed as monitor indicators for the pollution of oil in the ocean, because they were much more sensitive and precise to reflect the acute toxicity effects of WAF than that of survival rate, developmental rate and CAT activity.

Key words: oil pollution; *Chthamalus challengeri*; phototaxis; developmental rate; antioxidase

海上石油污染一直是全球比较关注的问题。近年来,伴随着海底石油的勘探、开采、运输,海上活动的增多,以及溢油事故的发生,海洋石油污染日趋严重,成为全球海洋环境的主要污染之一。由于石油污染具有传播速度快、扩散范围广、降解速率低、持续时间长等特点,既危害渔业养殖,造成巨大经济损失,又使海洋生物大量死亡,严重破坏海洋生态系统的稳定性。通过对海洋石油污染进行调查发现,我国近海区域石油污染的超标率为51.2%^[1],污染现象十分严重。在近岸海域和半封闭海域,海面上的油膜通常能存在几天甚至是数周^[2]。虽然石油在海水中的可溶组分的浓度极低,但石油污染可以在较长时间内对生态环境和海洋生物的生命活动造成影响^[3]。关于石油烃对海洋生物的毒性作用,国内外学者已经进行了许多研究,但多数集中于藻类、鱼类、虾类和贝类^[4-7],对藤壶的研究较少^[8-9],石油烃对东方小藤壶幼虫的毒性研究则尚未见报道。

藤壶是世界上数量最多、分布最广、且危害最大的一种海洋污损生物^[10],是防污研究(Anti-fouling, AF)的主要实验对象^[11]。东方小藤壶属于节肢动物门、颚足纲、无柄目、小藤壶科,是西北太平洋的特有藤壶种类,在我国海域均有分布^[12]。它的早期发育阶段营浮游生活,包括6个无节幼虫期和1个不进食状态的腺介幼虫期。各幼虫期在形态、大小、移动性等方面均有差异。与成虫相比,幼虫对环境的刺激更为敏感,且随着幼虫的逐步发育,幼虫对外界环境刺激的抗性也越来越强^[13]。研究表明,I期无节幼虫在21±1℃条件下通常仅存2~3 h^[14],II期无节幼虫发育到下一时期则需要3 d左右^[15],而且,II期幼虫在培养过程中投饵与否不会对它的生存与发育产生显著影响^[16];因此研究中常以II期无节幼虫作为实验对象^[17-18]。

本文选取东方小藤壶II期无节幼虫作为研究对象,从存活率、趋光性、发育率以及SOD和CAT的酶活力变化等方面研究了孤二联原油水溶性成分(water-accommodated fraction, WAF)对II期幼

虫的影响,以期弄清II期幼虫在受到WAF短期胁迫时表现出何种响应特征,并从中筛选出对石油污染最敏感的指标,为海洋石油污染监测提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验海水

海水取自青岛市鲁迅公园外侧海域,静置沉淀后,用孔径为0.45 μm的微孔滤膜过滤,待高压灭菌冷却后,充分曝气(12 h以上)备用。

1.1.2 受试生物

受试生物东方小藤壶(*Chthamalus challengeri*)取自青岛市第一海水浴场西侧潮间带。取样时,将东方小藤壶成虫连同其附着礁石一起带回实验室驯化培养。所用饵料包括牟氏角毛藻(*Chaetocero smuelleri*)、小球藻(*Chlorella vulgaris* Beij.)和小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*),3种饵料的比例为1:1:1,藻细胞数量为10⁵/mL。为保证所产幼虫的同步性,先用淡水刺激成虫,将其阴干后,放入新鲜海水中培养,4~8 h内即产生大量I期、II期幼虫,再用90 μm孔径的筛绢将幼虫从海水中滤出。在解剖镜下挑选活性好、体表无杂质粘连的II期幼虫作为实验对象。

1.1.3 WAF的制备

将孤二联原油(取自东营市胜利油田)与1.1.1中的海水按体积比1:9混合,用磁力搅拌器连续避光搅拌24 h,之后将混合液体转移到分液漏斗中避光静置4 h,待完全分层后,下层水相成分即为WAF母液,于4℃棕色试剂瓶中保存备用。通过紫外分光光度法测得其浓度为27.32 mg/L。具体方法参照《海洋监测规范》GB 17378.4-2007^[19]。

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验

使用24孔板作为实验容器,每个孔中放10只幼虫,WAF浓度依次设为0、3、9、15、21、27 mg/

L,各处理组均设3个平行。胁迫过程中光周期为12 h:12 h,温度为21℃^[20],不投喂任何饵料。待胁迫48 h结束后,在解剖镜下观察,统计幼虫存活率,研究WAF对Ⅱ期幼虫的致死效应。

1.2.2 趋光性对WAF的响应实验

幼虫胁迫处理同1.2.1。待胁迫结束后,用1.1.1中海水清洗幼虫,然后将幼虫分别转移到自制吸管(图1)的底部,轻轻放平吸管,并用垂直于吸管的光线照射吸管,在预实验的基础上选择光照4 h,然后统计吸管上半部中的幼虫数量,计算幼虫趋光性变化。

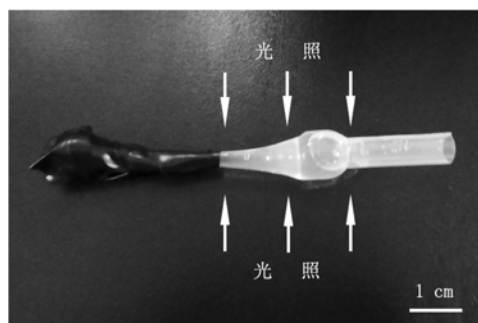


图1 检测Ⅱ期幼虫趋光性的装置

Fig. 1 Device used to test phototropic response of nauplius II

1.2.3 发育率对WAF的响应实验

幼虫胁迫处理同1.2.1。待胁迫结束后,用1.1.1中海水清洗幼虫,然后将其转移到新的24孔板中,饵料为牟氏角毛藻、小球藻和小新月菱形藻的混合藻液,藻细胞数量为 $10^5/\text{mL}$ 。于第5 d统计培养孔中幼虫蜕下的甲壳数量,计算其发育率。

1.2.4 酶活力实验

幼虫胁迫处理同1.2.1,样本数量为5 000只,每组3个平行,将过滤好的幼虫转移到0.8 mL生理盐水中,用超声波细胞破碎仪以100 W的功率破碎幼虫30次,每次工作10 s、间歇10 s,配成10%的匀浆,离心取其上清液作为待测样本。选用南京建成科技有限公司生产的超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(WST-1法)和过氧化氢酶(CAT)测试盒(可见光分光光度法)测定SOD酶和CAT酶的活力。

1.2.5 数据分析

使用SPSS 19.0数据分析软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)对数据进行显著性分析。若数据的方差齐性,进而选择最小显著差数法(LSD)比较对照组与各处理组的差异性;若方

差不齐性,则选择Tamhane's T2(M)法分析对照组与各处理组的差异性。显著性水平选择为0.05。绘图软件选用SigmaPlot 12.5,数据采用“平均数±标准差”表示。

2 结果与讨论

2.1 孤二联原油WAF对Ⅱ期幼虫的急性毒性

孤二联WAF胁迫48 h以后,Ⅱ期幼虫的存活率如图2所示,其中,对照组中幼虫的存活率为 $(96.67 \pm 5.77)\%$ 。由单因素方差分析得知方差不齐性,选择Tamhane's T2(M)法分析对照组与各处理组间的关系,得到 p 值依次为1.00,1.00,1.00,0.99和0.94,因此孤二联原油WAF胁迫48 h对东方小藤壶Ⅱ期幼虫的存活率无显著影响($p > 0.05$)。

Donahue等人研究发现,不同原油对藤壶(小藤壶属的*Chthamalus fragilis*和管藤壶属的*Fistulobalanus kondakovi*)幼虫的毒性致死效应差别很大,如2号燃油和曲轴箱润滑油的WAF能在1 h内迅速地杀死幼虫,而美国路易斯安那州原油、科威特原油以及委内瑞拉原油等对幼虫无致死效应^[8]。研究表明各种原油的WAF浓度相差很大,Malins等人发现的最大浓度为 12.7mg/L ^[21],而张传松等人发现的最大浓度为 305mg/L ^[22]。孤二联原油WAF的浓度介于二者之间,这可能是由原油中可溶组分的多少决定的。

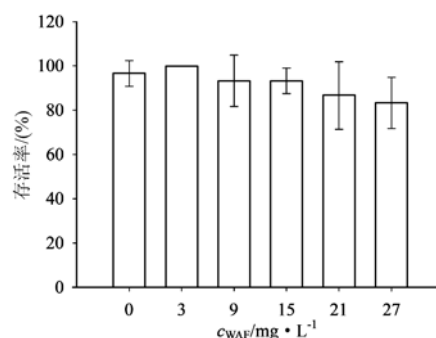


图2 WAF对Ⅱ期幼虫存活率的影响

Fig. 2 Effect of WAF on survival of nauplius II

2.2 趋光性对孤二联原油WAF的响应

孤二联WAF胁迫48 h后,对照组与各处理组中Ⅱ期幼虫的趋光率依次为 $(66.67 \pm 15.28)\%$ 、 $(70 \pm 17.32)\%$ 、 $(60 \pm 17.32)\%$ 、 $(56.67 \pm 15.28)\%$ 、 $(53.33 \pm 11.55)\%$ 和 $(36.67 \pm 15.28)\%$ 。与对照组相比,幼虫趋光性随着

WAF 浓度的增加呈现先上升后下降的变化趋势(见图3),但这种变化趋势并不显著($p > 0.05$);用 LSD 法对各组数据进行多重比较分析,结果表明仅 27 mg/L 处理组中幼虫的趋光率与对照组相比发生显著降低($p < 0.05$)。

Donahue 等人研究发现芳烃中易挥发、低沸点的烃类物质对海洋生物的毒性作用较强,如苯、菲、芴和萘的 WAF 能降低幼虫的趋光性,而蒽的 WAF 对幼虫的趋光性无影响^[8]。因此,孤二联原油 WAF 对藤壶幼虫毒性作用较小的原因,可能是东方小藤壶 II 期幼虫对石油污染具有较强的抗性,也可能是孤二联原油 WAF 中易挥发、低沸点的烃类物质较少。

此外,由于引起浮游动物的趋光性变化的毒物浓度远低于其 LC_{50} 值,且趋光性变化的检测具有耗时短、操作简单等优点,利用浮游动物的趋光性变化监测海洋环境污染成为国内外正在研究的一项新技术^[23-24],可能拥有广泛的应用前景。

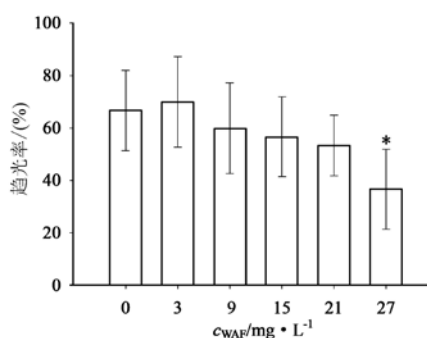


图3 WAF 对 II 期幼虫趋光性的影响

(* 代表在 0.05 水平上与对照组差异显著)

Fig. 3 Effect of WAF on phototaxis of nauplius II

(* represent significant difference with the control at the 0.05 level)

2.3 发育率对孤二联原油 WAF 的响应

在该实验中,幼虫的发育率随着胁迫浓度的加大呈现下降趋势,从对照组的 (66.67 ± 15.28)% 下降到最高浓度组的 (43.33 ± 11.55)% (见图4),但这种变化趋势并不显著($p > 0.05$)。由 LSD 法分析得知:各处理组中幼虫的发育率与对照组相比无显著变化(p 值依次为:0.81,0.47,0.47,0.16,0.11),即 WAF 各浓度对 II 期幼虫的发育过程均未产生显著影响($p > 0.05$)。

Qiu 等人研究了 Cu^{2+} 对纹藤壶 (*Balanus amphitrite*) 幼虫的影响,发现与死亡率相比,发育率对外界环境刺激更加敏感^[13]。比较幼虫趋光性

对 WAF 的响应,可以推测:幼虫的趋光性变化是比发育率更加敏感的指标。

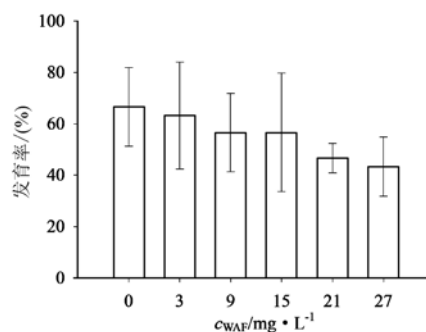


图4 WAF 对 II 期幼虫发育率的影响

Fig. 4 Effect of WAF on developmental rate of nauplius II

2.4 抗氧化酶活力的变化

2.4.1 SOD 酶活力的变化

幼虫被胁迫 48 h 后,其 SOD 的酶活力随着 WAF 浓度的增加,从对照组的 (126.30 ± 8.89) U/mg prot 逐渐上升到最高浓度组的 (151.61 ± 11.62) U/mg prot (见图5),但这种变化趋势并不显著($p > 0.05$)。用 LSD 法对各组数据进行多重分析,结果表明:与对照组相比,幼虫体内 SOD 酶活力仅在最高浓度组发生显著升高($p < 0.05$)。

许多研究表明,抗氧化酶的酶活力与污染物浓度之间存在相关性,在受试生物的耐受范围内,某些酶的酶活力通常会随着污染物浓度的增加而升高^[25],本研究中藤壶幼虫 SOD 的酶活力随 WAF 浓度的增加呈现逐渐升高的变化趋势,这与上述观点一致。当受试生物受到污染物的胁迫后,其体内的活性氧自由基会逐渐升高,活性氧浓度的变化激发受试生物的抗氧化系统,在一定阈值范围内,SOD 的酶活力会随着活性氧浓度的升高而升高,催化超氧自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 发生歧化反应生成 H_2O_2 ,这可能是藤壶幼虫受到孤二联原油 WAF 胁迫时 SOD 酶活力升高的原因。

2.4.2 CAT 酶活力的变化

在该实验中,随着 WAF 处理浓度的升高,CAT 的酶活力并未表现出明确的变化趋势(见图6),其中,对照组中幼虫体内 CAT 的酶活力为 (19.63 ± 5.44) U/mg prot。用 LSD 法对各组数据进行多重比较,结果表明对照组与各处理组的 p 值依次为:0.76,0.68,0.63,0.68,0.34,即:WAF 各浓度对 II 期幼虫的 CAT 酶活力均未产生显著影响($p > 0.05$)。

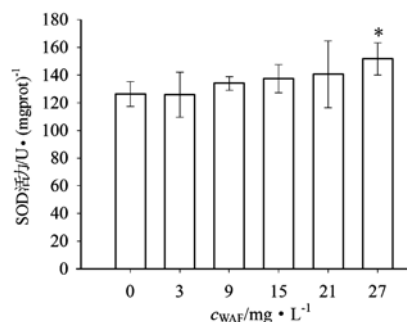


图5 WAF对Ⅱ期幼虫SOD活力的影响

(*代表在0.05水平上与对照组差异显著)

Fig. 5 Effect of WAF on enzyme activity of SOD in nauplius II
(* represent significant difference with the control at the 0.05 level)

有研究发现,当受试生物受到污染物胁迫时,其体内部分抗氧化酶的酶活力可能不会发生显著性变化^[26],这与本研究中WAF对藤壶幼虫体内CAT酶活力的变化无显著性影响相一致。究其原因:一方面,酶活力的变化在一定程度上与污染物的浓度有很大关系,本研究中幼虫CAT酶活力的变化不显著可能是因为孤二联原油的WAF浓度较低;另一方面,各种抗氧化酶在功能上既有独立性,又具有相关性^[27-28],当超氧自由基发生歧化反应后,产物H₂O₂的催化降解是由过氧化物酶(POD)和CAT共同完成的,这可能是幼虫体内CAT酶活力变化不显著的另一个原因。

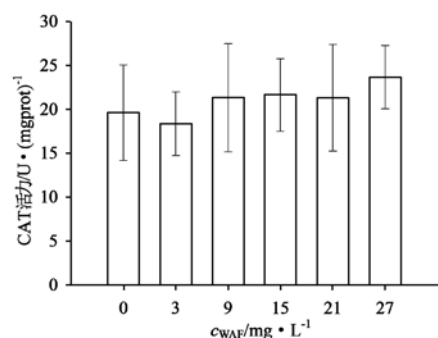


图6 WAF对Ⅱ期幼虫CAT活力的影响

Fig. 6 Effect of WAF on enzyme activity of CAT in nauplius II

3 结论

(1) 孤二联原油的WAF对东方小藤壶Ⅱ期幼虫表现出较低毒性,幼虫的存活率、发育率、趋光性、CAT酶活力以及SOD酶活力随着处理组WAF浓度的升高表现出一定程度的变化,但均不显著($p > 0.05$)。

(2) 孤二联原油的WAF对藤壶幼虫毒性作

用较小的原因,可能是东方小藤壶Ⅱ期幼虫对石油污染具有较强的抗性,也可能是孤二联原油WAF中溶解的易挥发、低沸点的烃类物质较少。

(3) 与对照组相比,在最高浓度为27 mg/L的WAF处理组中,幼虫的存活率、发育率和CAT酶活力均未发生显著性变化($p > 0.05$),而趋光性出现显著降低($p < 0.05$),SOD酶活力则出现显著升高($p < 0.05$),因此海洋石油污染监测的生物标志物可从Ⅱ期幼虫的趋光性和SOD酶活力中进一步筛选。

参考文献:

- [1] 姜朝军,乔庆林,周培根,等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)养殖水体中石油烃安全限量的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(5):14-19.
- [2] 高迎新,陆小华,邓皓. 石油烃在水面上蒸发过程的研究[J]. 油气田环境保护,2000,10(2):24-25.
- [3] PETERSON C H, RICE S D, SHORT J W, et al. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill[J]. Science, 2003, 302(5653):2082-2086.
- [4] 黄逸君,江志兵,曾江宁,等. 石油烃污染对海洋浮游植物群落的短期毒性效应[J]. 植物生态学报,2010,34(9):1095-1106.
- [5] 钟硕良,吴立峰,陈燕婷. 三都湾网箱养殖鱼类石油烃含量水平及其分布特征[J]. 台湾海峡,2006,25(3):407-413.
- [6] 姜朝军,乔庆林,蔡友琼,等. 菲律宾蛤仔对石油烃的污染动力学和阈值研究[J]. 海洋渔业,2006,28(4):314-320.
- [7] 张爱君,邹洁,马兆党,等. 石油污染对牡蛎超显微结构毒性效应的研究[J]. 海洋环境科学,2006,25(S1):6-10.
- [8] DONAHUE W H, WANG R T, WELCH M, et al. Effects of water-soluble components of petroleum oils and aromatic hydrocarbons on barnacle larvae[J]. Environmental Pollution, 1977, 13(3):187-202.
- [9] MCCOY D L, BROWN K M. Hydrocarbon pollutants alter short-term recruitment in the barnacle *Balanus eburneus* [J]. Marine Environmental Research, 1998, 45(3):209-224.
- [10] 刘晓军,刘贵昌,宋树军,等. Ca²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺对海洋污损生物的协同毒性效应[J]. 海洋环境科学,2010,29(5):733-735.
- [11] 马士德,谢肖勃,黄修明,等. 藤壶附着对海水中金属腐蚀的影响[J]. 中国腐蚀与防护学报,1995,15(1):74-78.
- [12] CHEANG C C, TSANG L M, NG W C, et al. Phylogeography of the cold-water barnacle *Chthamalus challenger* in the north-western Pacific: effect of past population expansion and contemporary gene flow[J]. Journal of Biogeography, 2012, 39(10):1819-1835.
- [13] QIU J W, THIYAGARAJAN V, CHEUNG S, et al. Toxic effects of copper on larval development of the barnacle *Balanus amph-*

- trite[J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 51 (8/9/10/11/12): 688-693.
- [14] SEMMLER H, HØEG J T, SCHOLTZ G, et al. Three-dimensional reconstruction of the naupliar musculature and a scanning electron microscopy atlas of nauplius development of *Balanus improvisus* (Crustacea: Cirripedia: Thoracica) [J]. Arthropod Structure & Development, 2009, 38(2): 135-145.
- [15] YAN Y, CHAN B K K. Larval development of *Chthamalus malayensis* (Cirripedia: Thoracica) reared in the laboratory [J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 2001, 81(4): 623-632.
- [16] LANG W H, MARCY M. Some effects of early starvation on the survival and development of barnacle nauplii, *Balanus improvisus* (Darwin) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1982, 60(1): 63-70.
- [17] LAM P K S, WO K T, WU R S S. Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin [J]. Environmental Toxicology, 2000, 15(1): 8-13.
- [18] 张语克, 冯丹青, 刘万民, 等. 5种重金属对白脊藤壶无节幼体的急性毒性研究[J]. 台湾海峡, 2007, 26(1): 133-140.
- [19] GB 17378.4-2007, 海洋监测规范 第4部分: 海水分析[S].
- [20] 铁镒, 刘贵昌, 刘晓军, 等. 环境温度对东方小藤壶 (*Chthamalus challenger*) 生命表征的影响[J]. 海洋环境科学, 2010, 29(2): 191-195.
- [21] MALINS D C. Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms [M]. New York: Academic Press, 1977: 256-260.
- [22] 张传松, 王修林, 石晓勇, 等. 东海赤潮高发区 COD 和石油烃分布特征及其与赤潮发生关系的初步研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1093-1096.
- [23] YUAN L, MICHELS E, DE MEESTER L. Changes in phototactic behavior of *Daphnia magna* clone C₁ 242 in response to copper, cadmium and pentachlorophenol [J]. Journal of Environmental Sciences, 2003, 15(6): 841-847.
- [24] 吴永贵, 袁玲, 黄建国. Cr⁶⁺ 的隆线蚤趋光指数与 LC₅₀ 急性毒性的比较[J]. 环境科学学报, 2004, 24(5): 905-909.
- [25] 马剑敏, 李今, 张改娜, 等. Hg²⁺ 与 POD 复合处理对小麦萌发及幼苗生长的影响[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 531-538.
- [26] VIGANÒ L, ARILLO A, FALUGI C, et al. Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea [J]. Marine Pollution Bulletin, 2001, 42(10): 887-894.
- [27] AHMAD I, HAMID T, FATIMA M, et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2000, 1523(1): 37-48.
- [28] KLUMPP D W, HUMPHREY C, Hong H S, et al. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. : II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish [J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 44(8): 761-769.