

六氯化苯对汤氏纺锤水蚤毒性影响的比较研究

陈民山

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266003)

Flemming Møhlenberg

(Marine Pollution Laboratory, Danish National Agency of Environmental Protection, DK-2920)

提要 本文通过1987年6月在丹麦国家环保局海洋污染实验室进行的六氯化苯(γ -HCH)对桡足类汤氏纺锤水蚤(*Acartia tonsa*)的急性、亚急性和生命周期试验,评价了六氯化苯对汤氏纺锤水蚤的毒性。试验结果表明, γ -HCH对汤氏纺锤水蚤的96h LC_{50} 为17 μ g/L。当 γ -HCH浓度为3 μ g/L时,产卵量明显受到影响。在生命周期试验中,当 γ -HCH浓度为10 μ g/L时,从无节幼体V1期到成体,汤氏纺锤水蚤的生长会受到明显影响,而对雌性成体的半数影响浓度(EC_{50})为0.8 μ g/L。通过对试验方法和结果的比较分析文中认为,汤氏纺锤水蚤的生命周期试验,敏感性高、操作简便、费用相对较低,将会是化学物质危害性评价中一个很有用的方法。

海洋中的浮游桡足类,因其生态学上的重要性及生物学上的特点(生命周期较短、体小、对污染物敏感),是毒理试验较为理想的材料。近十年来,桡足类室内培养技术不断发展和成熟,实验室内已完全可以长期稳定地进行培养。因此,许多桡足类动物如*Acartia tonsa* (APHA, 1981), *Nitocra spinipes*^[1] 等都被推荐为毒性试验标准方法的试验材料。

本文选用六氯化苯(γ -HCH, 俗称六六六)作为试验毒物,对桡足类汤氏纺锤水蚤(*Acartia tonsa*)进行了急性、亚急性和生命周期试验。通过对采用的试验方法和结果的比较,以期提出一个较为简单有效的生命周期试验方法。

一、材料与方 法

1. 试验生物

汤氏纺锤水蚤取自丹麦渔业海洋研究所。同一源种在室内培养已达5a(约70代)。培养温度和盐度分别为17 $^{\circ}$ C和28S,光照周期为L:D = 12:12。本试验条件与培养条件相同。

2. 母液的配置

把10.8mg的 γ -HCH(纯度为99.9%)溶于0.22ml的丙酮中,加过滤海水至1L。再次过滤后存放于冷藏柜中(4 $^{\circ}$ C)。样品先用异辛烷萃取,然后用Varian 3500型气相色谱仪分析测定 γ -HCH的浓度。

3. 急性试验

采用 96h 半静水试验。盛有 200ml 试验液的烧杯,放汤氏纺锤水蚤 5 个,加波海红细胞藻 (*Rhodomonas baltica*) 饵料 10 000Cells/ml。γ-HCH 的设置浓度为对照组,1, 2.4, 3.8, 10, 24, 30 和 100μg/L。试验设有平行组。试验期间每隔 24h 更换试验液一次,并记录生物的死亡数。试验结束后,用概率单位分析法^[2]求出 96h LC₅₀。

4. 亚急性试验

试验开始前,试验生物先经过 2—3d 的暂养,投喂充足的饵料(波海红细胞藻约为 5×10^4 Cells/ml),以保证试验开始时,即有一个较高的产卵量。

根据急性试验的结果,设置试验浓度为对照组,1, 3, 10 和 30μg/L。每个试验组由 4 个 300ml 带有螺纹盖的玻璃瓶组成。每瓶放入健康成熟的雌性汤氏纺锤水蚤 5 个,蚤龄为 3—4 星期,加波海红细胞藻 5×10^4 Cells/ml。然后用塑料粘膜封住瓶口,扭紧盖子,置于恒温室(18℃)中的旋转轮上,转速为 0.5r/min。每隔 24h,更换试验液一次,并检查各试验组的死亡数、产卵量。具体方法是,先把瓶中的试验液倒入带有上下两层筛绢、半浸在烧杯中的塑料圆筒中,然后把存留在上层筛绢(180μm)上的水蚤小心地冲入玻璃培养皿中,检查并记录死亡数。存活的雌性水蚤用玻璃吸管移入换有新的试验液和饵料的玻璃瓶中,继续进行试验。再把停留在下层筛绢(40μm)上的卵(或无节幼体)用水冲入小烧杯中,注入几滴鲁哥氏碘液(LIS)进行染色,经用微孔滤膜过滤,最后在倒置显微镜下对滤膜上的卵(或无节幼体)进行计数。

试验进行 96h,计算得出各试验组中每个存活的汤氏纺锤水蚤每天的平均产卵量,并以对照组产卵量的百分数表示。

5. 生命周期试验

试验在 4 个 10L 的带有充气装置玻璃瓶中进行。γ-HCH 的设置浓度为对照组,1, 3 和 10μg/L。在每个试验瓶中加入大约 1 万个新产的蚤卵,48h 后加入波海红细胞藻 5×10^4 Cells/ml。试验进行 24d。每星期每个浓度组定期取样 3 次,每次 1L 加 LIS 染色。然后在倒置显微镜下对水样中的生物数、发育期及体长进行测试。每次取样后,试验瓶中分别再加入 1L 的试验液。同时根据试验瓶中饵料的实际浓度(经用 TA II 颗粒计数器测定),再加入不同量的波海红细胞藻,使其达到 5×10^4 Cells/ml。3 个星期后,当纺锤水蚤完全发育成熟,雌性已开始产卵数天,再从每个试验瓶中挑选出 20 个雌性汤氏纺锤水蚤,另外再进行 48h 的亚急性产卵试验,方法同前。

生命周期试验结束后,采用方差分析法来比较评价各浓度组与对照组差异的显著性。

二、试验结果

1. 急性试验

试验结果经计算得出 γ-HCH 对汤氏纺锤水蚤 96h LC₅₀ 为 17μg/L (图 1)。对照组死亡率为 0。

2. 亚急性试验

试验结果(表 1)表明,所有 γ-HCH 浓度组中的汤氏纺锤水蚤的产卵量都比对照组少。3μg/L 浓度组在 72h 以及 10μg/L 浓度组在 96h 的产卵量与对照组有显著差异

($P < 0.05$), $3\mu\text{g/L}$ 浓度组在 72h 减少最大, 为对照组的 71.5%。须要指出的是, $30\mu\text{g/L}$ 浓度组的产卵量非常低, 而且组内差异很大。这是因为该浓度组中的死亡率太高, 平均产卵量只是根据少数存活的雌性水蚤计算得出的。故试验结果未与对照组比较。

3. 生命周期试验

试验结果见表 2。汤氏纺锤水蚤的生长以体长表示, 无节幼体期为全长、桡足幼体期和成体为头胸长。

从表 2 可以看出, 在各试验浓度组中, 从无节幼体 I 期(N_I)—V 期(N_V), 体长的变化与对照组无明显区别。从无节幼体 VI 期(N_{VI})—桡足幼体 VI 期(C_{VI}), 当 γ -HCH 浓度为 $10\mu\text{g/L}$ 时, 汤氏纺锤水蚤的体长比对照组有非常显著的差异($P < 0.01$)。而雌性水蚤在 γ -HCH 浓度分别为 $1\mu\text{g/L}$ 和 $3\mu\text{g/L}$ 时, 体长变化即明显小于对照组 ($P < 0.05$)。

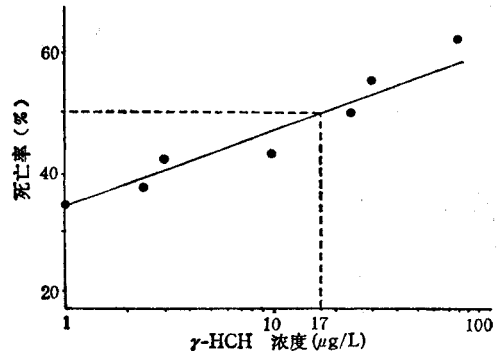


图 1 不同浓度 γ -HCH 中的汤氏纺锤水蚤 96h 的死亡率
Fig. 1 Mortality of *Acartia tonsa* exposed to different concentrations of γ -HCH for 96h

表 1 不同浓度的 γ -HCH 对汤氏纺锤水蚤产卵量 (eggs/d) 的影响

Tab. 1 Effect of different concentrations of γ -HCH on the egg production (eggs/d) of *Acartia tonsa*

时间 (h)	浓度 ($\mu\text{g/L}$)				
	对照组	1	3	10	30
72	31.6 ± 1.9	29.2 ± 3.3	22.6 ± 1.7 ①	23.9 ± 4.2	(8.4 ± 7.9)
96	40.9 ± 3.1	31.7 ± 4.7	28.4 ± 4.3	29.8 ± 3.2 ①	(10.3 ± 8.8)

① 表示与对照组有显著差异, $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度的 γ -HCH 对不同发育期的汤氏纺锤水蚤体长(mm)的影响

Tab. 2 Effect of different concentrations of γ -HCH on the body length (mm) of *A. tonsa* in various stages

发育期	浓度 ($\mu\text{g/L}$)			
	对照组	1	3	10
N_I	$0.13 \pm 0.005 (n = 11)$	$0.14 \pm 0.003 (n = 20)$	$0.14 \pm 0.003 (n = 20)$	$0.14 \pm 0.002 (n = 20)$
N_{IV}	$0.17 \pm 0.003 (n = 15)$	$0.17 \pm 0.003 (n = 15)$	$0.17 \pm 0.003 (n = 15)$	$0.17 \pm 0.002 (n = 15)$
N_{VI}	$0.25 \pm 0.007 (n = 15)$	$0.24 \pm 0.010 (n = 15)$	$0.24 \pm 0.007 (n = 15)$	$0.22 \pm 0.005 (n = 15)$ ②
C_I	$0.41 \pm 0.001 (n = 10)$	$0.38 \pm 0.001 (n = 10)$	$0.38 \pm 0.001 (n = 10)$	$0.34 \pm 0.001 (n = 10)$ ②
C_{II}	$0.48 \pm 0.024 (n = 12)$	$0.46 \pm 0.023 (n = 12)$	$0.47 \pm 0.017 (n = 12)$	$0.43 \pm 0.014 (n = 12)$ ②
$C_{VI} \text{♀}$	$0.83 \pm 0.013 (n = 12)$	$0.78 \pm 0.013 (n = 12)$ ①	$0.78 \pm 0.015 (n = 13)$ ①	$0.77 \pm 0.014 (n = 13)$ ②
♂	$0.73 \pm 0.006 (n = 12)$	$0.73 \pm 0.006 (n = 12)$	$0.71 \pm 0.012 (n = 12)$	$0.70 \pm 0.009 (n = 12)$ ②

① 表示与对照组有显著差异, $P < 0.05$;

② 表示与对照组有非常显著差异, $P < 0.01$ 。

取自同一起来源的汤氏纺锤水蚤,在非常低的饵料浓度下的试验证实,雌性汤氏纺锤水蚤的最小体长为 0.74mm。如果把这一体长作为最大影响值(或最大反应率),则可利用概率单位法^[2],计算得出 γ -HCH 对雌性汤氏纺锤水蚤体长的半数影响浓度 EC_{50} 为 0.8 μ g/L。

生命周期试验后进行的产卵试验(表 3),进一步证实了第一次产卵试验的结果。同时也表明,第二代的汤氏纺锤水蚤对 γ -HCH 要更为敏感。在 γ -HCH 的浓度为 3 μ g/L 时,48h 后的产卵量即比对照组有显著地减少,为对照组的 65.9%。

表 3 γ -HCH 对生命周期试验后的汤氏纺锤水蚤产卵量(eggs/d)的影响

Tab. 3 Effect of γ -HCH on the egg production (eggs/d) of *A. tonsa* after life-cycle test

时间 (h)	浓度 (μ g/L)			
	对照组	1	3	10
24	28.5 \pm 2.3	22.8 \pm 1.2	23.8 \pm 0.6	20.1 \pm 1.8 ^①
48	42.0 \pm 3.0	34.5 \pm 1.5	27.7 \pm 3.3 ^①	25.1 \pm 3.8 ^①

① 表示与对照组有显著差异, $P < 0.05$ 。

三、讨论与结语

急性试验的主要目的是评价有毒物质的毒性,或生物对毒物的敏感性。由于该试验时间较短、有一简单的试验终点,因而简便易行,精确度较高。但现实性很差,很难用来预测实际环境可能会受到的影响。作为另外一种试验体系,如模拟生态系(MERL)或可控生态系污染实验(CEPEX),最接近现实环境,可直接用于实际环境的污染预测中。但该实验复杂、费用昂贵。在这两种方法之间的是单一生物的亚急性和慢性试验。通过仔细地选择试验生物,慢性试验的预测性会是较高的。

1. 亚急性试验中的产卵量

桡足类的产卵量对物理化学环境变化反应十分敏感^[4],在严格的可控条件下定量地测定产卵量已成为评价环境质量很有用的生物测试方法。在本试验中,对照组的产卵量与已报道过的几乎同样试验条件下的产卵量相似^[3]。而各浓度组的产卵量则随 γ -HCH 的浓度增大而减少。有统计意义的显著性差异发生在浓度 3 μ g/L 和 10 μ g/L。很显然,较之急性试验产卵试验更为敏感。

2. 生命周期试验中生长的测试

生长是生物对环境适应性的一个非常敏感的指标,是生物的生理、生化和细胞活动的一种综合反应。在生命周期试验中,汤氏纺锤水蚤生长的测试,可以在个体水平上,或者在群体水平上(包括死亡率)进行。但因 10 μ g/L 浓度组的死亡率太高,这种试验组中死亡率的不均匀性,使得死亡率的评价会显示出很大差异。这样,群体的生长(即每一发育期的生物个体的生长和该发育期生物量乘积之和)就会表现出难以接受的差异。因此,生长的测定在个体水平上进行。

生命周期试验结果表明, γ -HCH 对汤氏纺锤水蚤的生长(体长)有抑制作用。其影响随不同的发育期变得更为明显,而雌性表现更为显著。至于雄性敏感性较小的原因,还

有待于进一步探讨。如把 γ -HCH 对雌性汤氏纺锤水蚤生长的半数影响浓度 EC_{50} 的值与急性试验和亚急性试验的结果作一比较, 则可看到, 前者比后两者的敏感性分别高约 20 倍和 4 倍。由于汤氏纺锤水蚤的产卵量与雌性的大小直接相关, 所以对体长的抑制也会直接影响产卵量, 从而最终导致生物量的减少。事实上, 在生命周期试验中, 培养于 $1\mu\text{g/L}$ 浓度组中的汤氏纺锤水蚤的产卵量 (34.5eggs/d) 小于对照组的产卵量 (42eggs/d), 就完全可以培养在该浓度组中雌性汤氏纺锤水蚤的体长 (0.78mm) 明显小于对照组的体长 (0.83mm) 这一事实作出解释, 即: $34.5:(0.78)^3 \approx 42:(0.83)^3$ 。

3. 结语

汤氏纺锤水蚤生命周期试验, 敏感性高、操作较简便、费用低(如可把试验的终点限定在只测试雌性的体长上)、以及测试的指标易用生态学的观点解释, 因此会成为化学物质危害性评价中的一个非常有用的方法。

参 考 文 献

- [1] Bengtsson Bengt-Erik, 1978. Use of a harpacticoid copepod in toxicity tests. *Mar. Pollut. Bull.* 9: 238--241.
- [2] Finney, D. J., 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, Lond, pp. 333.
- [3] Kjørbor, T., F. Møhlenberg and K. Hamburger, 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26: 85--97.
- [4] Parrish, K. K. and D. F. Wilson, 1978. Fecundity studies on *Acartia tonsa* (copepoda: calanoida) in standardized culture. *Mar. Biol.* 46: 65--81.

COMPARATIVE STUDY OF THE TOXICITY OF γ -HCH TO *ACARTIA TONSA*

Chen Minshan

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266003)

Flemming Møhlenberg

(Marine Pollution Laboratory, Danish National Agency of Environmental Protection, DK-2920)

ABSTRACT

Toxicity of γ -HCH to the copepod *Acartia tonsa* was assessed in acute test, sublethal egg production test and life-cycle test (from egg to egg) in the laboratory. The 96 h LC₅₀ of γ -HCH to *A. tonsa* was found to be 17 $\mu\text{g/L}$. The egg production of *A. tonsa* was significantly reduced at 3. $\mu\text{g/L}$ after 72h exposure. In life-cycle test significant reduction in body length was found in Naupliar stage VI through copepodid stages to adult at 6.2 $\mu\text{g/L}$, while female cephalothorax length was significantly reduced even at 0.8 $\mu\text{g/L}$ (EC₅₀).

Depending on the parameters analysed, life-cycle test may be very time consuming even if organisms with relatively short generation times are used. This usually restricts the use of life-cycle tests. However, the parameters analysed in life-cycle test are of ecological importance, and the data produced are very useful in predicting "safe" concentrations. If easily measurable but sensitive parameters are selected, the cost-benefit of life-cycle test can be very good.

In this study individual growth and developing process from egg to adult through 12 stages were observed in *A. tonsa* exposed to γ -HCH, and growth was quantified by measuring the length of *A. tonsa* in various stages. The effect of γ -HCH on body length, hence growth, was compared with the acute toxicity of γ -HCH and the impairment on egg production in females. It is demonstrated that the growth of *A. tonsa* as expressed in length of females seems to be a very sensitive parameter. Besides, reduction in growth rate is readily interpretable.

Due to its high sensitivity, simple performance, relatively low cost, with parameters being easy to interpret in ecological context, the life-cycle test presented seems to be very promising, and might be a very useful tool in hazard evaluation of chemicals.