

# 溞类急性毒性试验中阳性参比毒物的筛选

郁斯贻, 朱梦杰\*, 汤琳, 吴阿娜, 汪琴, 邓飞 (上海市环境监测中心, 上海 200235)

**摘要** 以硫酸锌、硫酸镉和苯酚作为受试毒物, 以大型溞为受试生物, 开展了急性毒性试验中阳性参比毒物的筛选试验, 测定了反应 24 和 48 h 后各浓度参比毒物中大型溞的抑制率, 确定硫酸锌和硫酸镉可作为大型溞急性毒性试验的阳性参比毒物。硫酸锌的 24 hEC<sub>50</sub> 和 48 hEC<sub>50</sub> 分别为 3.936 和 2.782 mg/L, 硫酸镉的 24 hEC<sub>50</sub> 和 48 hEC<sub>50</sub> 分别为 0.745 和 0.356 mg/L, 为今后溞类毒性试验的开展提供参考和依据。

**关键词** 溞类; 参比毒物; 毒性试验

中图分类号 X83 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)19-0091-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.19.026

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Screening of the Positive Reference Toxic Substance in the Acute Toxicity Test of Daphnia

YU Si-yi, ZHU Meng-jie, TANG Lin et al (Shanghai Environmental Monitoring Centre, Shanghai 200235)

**Abstract** Using zinc sulfate, cadmium sulfate and phenol as test toxic substances, *Daphnia magna* was selected as subjects test organism to conduct a screening study on positive reference toxic substances in acute toxicity test. The inhibition rates of test toxic substances at each concentration level to *D. magna* after 24 and 48 hours were recorded. And the results showed zinc sulfate and cadmium sulfate could be used as positive reference toxic substances for the acute toxicity tests of daphnia. 24 h EC<sub>50</sub> and 48 h EC<sub>50</sub> of zinc sulfate to *D. magna* were 3.936 and 2.782 mg/L respectively. 24 h EC<sub>50</sub> and 48 h EC<sub>50</sub> of cadmium sulfate to *D. magna* were 0.745 and 0.356 mg/L respectively. This research provided reference and basis for conducting the toxicity tests of daphnia in the future.

**Key words** Daphnia; Reference toxic substance; Toxicity tests

随着我国经济的快速发展和产业结构的调整, 环境问题也日益突出, 搬迁或废弃的工业、农业污染场地数量呈现不断上升的趋势<sup>[1-2]</sup>。这些遗留的场地存在较为严重的污染隐患, 若不进行有效的管理和修复, 它们将会对土壤、地表水、地下水和周边的环境造成危害。目前的场地污染调查以化学分析为主, 但化学方法较难直观、全面地反映各类有毒有害物质对环境或生物体的综合影响。生物毒性试验可以弥补这方面的不足, 能够直观地反映污染场地的综合生态毒性, 监测复杂污染物对环境所产生的综合效应<sup>[3-4]</sup>, 为进一步的场地污染风险评估提供数据支持。

溞类是甲壳动物枝角类的统称, 隶属节肢动物门, 体短, 呈卵圆形, 左右侧扁。溞类在淡水中分布较广, 在海水中也有少量的分布。溞类具有繁殖速度快、生活周期短、来源广、易培养等特点, 且对毒性物质敏感, 因而很多国家使用溞类开展生物毒性研究<sup>[5]</sup>。Biesinger 等<sup>[6]</sup>对无机汞和有机汞对大型溞的慢性毒性进行了研究。潘力军等<sup>[7]</sup>使用大型溞对工业废水和生活污水开展毒性监测。杨灿等<sup>[8]</sup>研究了氯霉素对溞类的急性和慢性毒性效应。

在农业和工业场地调查方面, 目前也已经有一些学者开展了相关的生物毒性试验。但是, 国内外有关溞类毒性试验中质控实验所选用的参比毒物报道很少。ISO 6341:2012《水质—大型水蚤(甲壳纲、枝角目)活动抑制的测定》中以重铬酸钾为参比毒物, 规定其 24 h EC<sub>50</sub> 为 0.6~2.1 mg/L<sup>[9]</sup>。国内有许多学者发现仅仅使用重铬酸钾测定溞敏感性的方法过于简单, 且实际测定出的 24 h EC<sub>50</sub> 值偏小<sup>[10]</sup>。参比毒物

是生物毒性试验中重要的质控措施, 因此对溞类参比毒物的筛选研究是非常有必要的。笔者对硫酸锌、硫酸镉和苯酚 3 种毒性物质开展了溞类急性毒性试验, 并对这 3 种物质是否可作为溞类毒性试验的阳性参比毒物进行了研究, 旨在为今后的农用地和工业用地场地调查中溞类毒性试验的开展提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** 受试生物大型溞(*Daphnia magna*), 购自中国科学院武汉水生生物所淡水库, 经笔者所在实验室保种培养, 表观健康。急性毒性试验所用的大型溞是经实验室培养的同健康亲溞孤雌生殖 3 代以上的幼溞, 溞龄不超过 24 h, 幼溞个体健康、体型均匀。试验使用经曝气的自来水对大型溞进行预培养, 培养期间每天滴加少量小球藻补充饵料。母溞的培养时间为 7~10 d, 培养温度为 18~22 ℃, 光暗比为 10 h:14 h, 光照强度为 1 000~1 500 lx。急性毒性试验期间不进行喂食。

小球藻(*Chlorella vulgaris*), 购自中国科学院武汉水生生物所淡水库, 在保种培养期间用于喂食大型溞。

试验所用的参比毒物硫酸锌(ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、硫酸镉(CdSO<sub>4</sub>·8/3H<sub>2</sub>O)、苯酚(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH)、乙醇均购自中国国药集团化学试剂有限公司, 为分析纯。

主要仪器为光照培养箱(BIC-400), 为上海博讯医疗生物仪器股份有限公司产品等。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 大型溞的培养方法** 将购置的怀卵大型溞在室温下(18~22 ℃)置于 500 mL 经曝气的自来水中进行单独培养, 培养期间每天滴加少量小球藻补充饵料。母溞的培养时间为 7~10 d, 在自然光照条件下进行培养。第 1 代幼溞转移至 1 000 mL 经曝气的水中继续培养, 以获得纯种的第 2 代幼

**作者简介** 郁斯贻(1989—), 女, 上海人, 助理工程师, 硕士, 从事生态环境监测、微生物及生物毒性试验研究。\*通信作者, 工程师, 从事土壤环境监测、生物毒性试验研究。

**收稿日期** 2019-06-21; **修回日期** 2019-07-08

蚤。将第2代幼蚤转移至2 000 mL经曝气的水中进行培养,获得纯种的第3代幼蚤作为试验用蚤。第1代和第2代幼蚤的培养条件均同母蚤。

**1.2.2 参比毒物的配制。**选用硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )、硫酸镉( $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ )、苯酚( $C_6H_5OH$ )作为参比毒物。以无菌水为溶剂,配制浓度10 g/L的硫酸锌和硫酸镉溶液母液以及浓度1 g/L的苯酚溶液母液。由于苯酚在常温条件下溶解度小,因而在配制苯酚溶液时添加少量的无水乙醇作为助溶剂。在进行预试验和正式的急性毒性试验时,可根据试验需求将配制好的母液稀释至一定浓度后使用。

**1.2.3 预试验。**在进行蚤类急性毒性试验前,先做预试验,设置间隔较大的4个浓度,从而确定正式急性毒性试验各参比毒物的浓度范围。预试验设置的4个浓度分别为100.0、10.0、1.0、0.1 mg/L,同时设置空白对照,苯酚组增设助溶剂对照,其助溶剂用量同最高浓度组(100 mg/L)。每种参比毒物每个浓度的烧杯中放入5只经实验室培养的幼蚤,不设置平行组。预试验在室温(18~22 ℃)、自然光照条件下进行。试验期间不进行喂食和更换试验溶液。试验开始后24和48 h,分别观察并记录大型蚤的活动抑制情况。

**1.2.4 急性毒性试验。**根据预试验结果,在各参比毒物对大型蚤急性活动完全不抑制的最高浓度和100%完全抑制的最低浓度范围内以几何级数设置浓度系列,同时设置空白对照。每个浓度设置4组平行,每组试验烧杯中放入5只幼蚤。试验条件和方法同“1.2.3”。试验开始后24和48 h分别观察并记录大型蚤的活动抑制情况。

## 2 结果与分析

**2.1 预试验结果** 由表1可知, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 在24和48 h内对大型蚤无活动抑制(24 h  $EC_{0}$ 、48 h  $EC_{0}$ )的最高浓度均为1 mg/L,100%活动抑制(24 h  $EC_{100}$ 、48 h  $EC_{100}$ )的最低浓度均为10 mg/L。 $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ 对大型蚤24 h  $EC_{0}$ 、48 h  $EC_{0}$ 的最高浓度均为0.1 mg/L,24 h  $EC_{100}$ 、48 h  $EC_{100}$ 的最低浓度分别为10和1 mg/L。 $C_6H_5OH$ 对大型蚤24 h  $EC_{0}$ 、48 h  $EC_{0}$ 的最高浓度均为10 mg/L,24 h  $EC_{100}$ 、48 h  $EC_{100}$ 的最低浓度均为100 mg/L。

表1 预试验结果

Table 1 The results of preliminary test

参比毒物 Reference toxic substance	试验浓度 Test concentration mg/L	大型蚤数量 Number of <i>D. magna</i> 只	24 h 抑制率 24 h inhibition ratio/%	48 h 抑制率 48 h inhibition ratio/%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100.0	5	100	100
	10.0	5	100	100
	1.0	5	0	0
	0.1	5	0	0
$CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$	100.0	5	100	100
	10.0	5	100	100
	1.0	5	60	100
	0.1	5	0	0
$C_6H_5OH$	100.0	5	100	100
	10.0	5	0	0
	1.0	5	0	0
	0.1	5	0	0

**2.2 急性毒性试验结果** 急性毒性试验结果见表2。采用SPSS Statistics 17.0中的Logit模型对数据进行概率单位回归分析。以各参比毒物试验浓度的对数值为横坐标,以抑制率为纵坐标,绘制回归曲线,得到线性回归方程 $y=Bx+A$ 、皮尔逊拟合优度卡方检验显著水平、24 h  $EC_{50}$ 、48 h  $EC_{50}$ 和95%置信区间。回归分析结果见表3。

表2 急性毒性试验结果

Table 2 The results of acute toxicity test

参比毒物 Reference toxic substance	试验浓度 Test concentration mg/L	大型蚤数量 Number of <i>D. magna</i> 只	24 h 抑制率 24 h inhibition ratio/%	48 h 抑制率 48 h inhibition ratio/%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10.13	20	100	100
	5.06	20	50	90
	3.38	20	45	50
	2.25	20	25	45
	1.50	20	5	15
	1.00	20	0	0
$CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$	3.04	20	100	—
	1.52	20	80	—
	1.01	20	60	100
	0.67	20	55	85
	0.45	20	25	60
	0.30	20	10	50
$C_6H_5OH$	0.20	20	0	10
	101.25	20	100	100
	67.50	20	90	90
	45.00	20	70	90
	30.00	20	20	35
	20.00	20	0	40
空白对照 Blank control	—	20	0	0
	—	20	0	0
乙醇对照 Ethanol control	—	20	0	0
	—	20	0	0

由表3可知, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ 24 h和48 h的皮尔逊拟合优度卡方检验的 $P$ 值均大于0.05,说明这2种参比毒物的试验数据拟合度较好,且 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ 具有方便易得、性质稳定等特点,因而是大型蚤急性毒性试验较为理想的阳性参比毒物。 $C_6H_5OH$ 48 h数据组的皮尔逊拟合优度卡方检验的 $P$ 值小于0.05,说明苯酚的试验数据拟合度较差,且苯酚在常温条件下微溶于水,实际操作时需添加少量乙醇作为助溶剂,操作较为复杂,因而不宜作为阳性参比毒物。

## 3 讨论与结论

该试验是以大型蚤作为受试生物开展的急性毒性试验,试验结果仅适用于大型蚤。在实际开展蚤类毒性试验时,还可以选用蚤状蚤、隆线蚤等对毒性物质敏感的其他蚤种。由于不同品种的蚤类对各毒物的敏感性不尽相同,所以在选择其他品种的蚤类作为受试生物开展研究时,需要进一步验证硫酸锌和硫酸镉是否适合作为其阳性参比毒物。

硫酸锌、硫酸镉是实验室较为常见的化学品,具有性质稳定、方便易得的特点。经大型蚤急性毒性试验发现, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$ 对大型蚤的24 h  $EC_{50}$ 分别为

(下转第98页)

**2.3 运行效果及成本** 初始运行前,需对湿地介质进行冲刷冲洗。运行1个月后,在河道水体pH为6~9,COD、NH<sub>3</sub>-N、TP平均浓度分别为60.23、4.21、1.30 mg/L的情况下,湿地出水水质为pH 6~9,COD、NH<sub>3</sub>-N、TP平均浓度分别为15.05、1.38、0.22 mg/L,污染物去除率分别为75.0%、67.2%、83.1%。经过湿地多次对河道水体的循环处理,河道水体各指标也达到了GB 3838—2002 IV类标准要求,优于设计的V类标准要求。

由于除水泵外无其他机械设备,故运行维护简单,只需定期清除杂草、枯死植株即可,对于生长茂盛或成熟后的植物要按时收割,以防枝叶遮挡其他植物的光照和湿地介质的晾晒。PKA人工湿地无泥土、表面不积水、无臭味,且外观看像生态家园,与周边环境协调统一。

投资和运营成本与水质水量、选取的组合工艺、排水标准以及地域等因素息息相关<sup>[15]</sup>。该项目中PKA人工湿地建设费造价131.2万元,其中配件1.2万元,比其他组合工艺深度处理的投资成本低<sup>[16]</sup>。运行成本主要包括电费、人工费,平均水处理成本为0.14元/m<sup>3</sup>。河道水体水质稳定后,可考虑延长循环周期,缩减运行成本。

### 3 结论

传统的生态浮岛、增氧曝气等技术对于污染较严重、流动性差、开放式流域的河道水体来讲,不能从根本上改善水体水质;PKA人工湿地技术作为一种生态处理技术,设计从下游布水、上游排水至河道的理念,强制性增强了河道水体的流动性,能有效地将污染严重的河道水质提升至IV类标准要求。该项目采用PKA人工湿地技术,设计总循环处理水量10 000 m<sup>3</sup>,日处理量1 000 m<sup>3</sup>/d,循环周期10 d/次,湿地

(上接第92页)

3.936和0.745 mg/L,48 h EC<sub>50</sub>分别为2.782和0.356 mg/L,且数据拟合度较好,可作为大型蚤急性毒性试验的参比毒

出水水质略优于IV类标准要求,对COD、NH<sub>3</sub>-N、TP去除率分别为75.0%、67.2%、83.1%。

### 参考文献

- [1] 陈长太,王雪,祁继英.国外人工湿地技术的应用及研究进展[J].中国给水排水,2003,19(12):105-106.
- [2] 翁益松,刘朝飞,陈铨.PKA人工湿地技术在生活污水处理中的试验研究[J].环境污染与防治,2014,36(6):47-50.
- [3] 魏改霞,吴连成,刘峻,等.中原地区农村污水处理工程设计与运行[J].工业水处理,2018,38(11):93-95.
- [4] 谭迪,雷鸣,龙九妹,等.运用无动力人工湿地分散式处理农村生活污水的研究[J].环境污染与防治,2018,40(4):455-459.
- [5] 尉家鑫,袁梅,史建锋,等.城市河道全域治理研究与实践[J].施工技术,2017,46(22):140-144.
- [6] 潘震,张勇,黄民生,等.生物栅-复合人工湿地系统对黑臭河水的中试处理[J].净水技术,2011,30(2):37-41.
- [7] 聂志丹,年跃刚,金相灿,等.3种类型人工湿地处理富营养化水体中试比较研究[J].环境科学,2007,28(8):1675-1680.
- [8] 袁东海,景丽洁,高士祥,等.几种人工湿地基质净化磷素污染性能的分析[J].环境科学,2005,26(1):51-55.
- [9] 刘春常,夏汉平,简曙光,等.人工湿地处理生活污水研究:以深圳石岩河人工湿地为例[J].生态环境,2005,14(4):536-539.
- [10] ROUSSEAU D P L, LESAGE E, STORY A, et al. Constructed wetlands for water reclamation[J]. Desalination, 2008, 218(1/2/3): 181-189.
- [11] THULLEN J S, SARTORIS J J, NELSON S M. Managing vegetation in surface-flow wastewater-treatment wetlands for optimal treatment performance[J]. Ecological engineering, 2005, 25(5): 583-593.
- [12] 项学敏,杨洪涛,周集体,等.人工湿地对城市生活污水的深度净化效果研究:冬季和夏季对比[J].环境科学,2009,30(3):713-719.
- [13] 崔丽娟,张曼胤,李伟,等.人工湿地处理富营养化水体的效果研究[J].生态环境学报,2010,19(9):2142-2148.
- [14] 李亚,孔令为,张义,等.人工湿地技术低温运行效果及对策[J].安徽农业科学,2018,46(17):195-197.
- [15] 胡洁,许光远,胡香,等.组合式人工湿地深度处理小城镇污水处理厂尾水[J].水处理技术,2018,44(11):120-122,132.
- [16] 管策,郁达伟,郑祥,等.我国人工湿地在城市污水处理厂尾水脱氮除磷中的研究与应用进展[J].农业环境科学学报,2012,31(12):2309-2320.

物。苯酚对大型蚤的急性毒性试验数据拟合度较差,不适合作为大型蚤急性毒性试验的阳性参比毒物。

表3 回归分析结果

Table 3 Results of the regression analysis

参比毒物 Reference toxic substance	时间 Time/h	A	B	P	EC <sub>50</sub> mg/L	95%置信区间 95% confidence interval/mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24	-3.899	6.552	0.224	3.936	3.284~4.869
	48	-3.300	7.427	0.339	2.782	2.352~3.312
CdSO <sub>4</sub> ·8/3H <sub>2</sub> O	24	0.728	5.692	0.619	0.745	0.615~0.911
	48	3.393	7.572	0.443	0.356	0.300~0.421
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	24	-19.673	12.295	0.666	39.817	34.881~45.340
	48	-11.340	7.741	0.045	29.170	16.803~46.839

### 参考文献

- [1] 周友亚,颜增光,郭观林,等.污染场地国家分类管理模式与方法[J].环境保护,2007(10):32-35.
- [2] HODDINOTT K B H. Superfund risk assessment in soil contamination studies; 3rd volume[M]. USA: ASTM International, 1998: 100-108.
- [3] 周艳,徐建,冯艳红,等.污染场地河道底泥浸出液对斑马鱼胚胎的毒性效应[J].生态毒理学报,2013,8(6):963-971.
- [4] 宋晓威,徐建,张孝飞,等.废弃农药厂污染场地浅层地下水生态毒性诊断研究[J].农业环境科学学报,2011,30(1):42-48.
- [5] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:中国环境科学出版社,2002:721.
- [6] BIESINGER K E, ANDERSON L E, EATON J G. Chronic effects of inorganic and organic mercury on *Daphnia magna*: Toxicity, accumulation, and loss[J]. Archives of environmental contamination and toxicology, 1982, 11(6): 769-774.
- [7] 潘力军,高世荣,孙凤英,等.应用大型水蚤和斑马鱼对几种工业废水和生活污水的毒性监测[J].环境科学与管理,2007,32(2):180-183.
- [8] 杨灿,沈根祥,胡双庆,等.氯霉素对大型蚤的急性和慢性毒性效应研究[J].生态毒理学报,2018,13(5):248-255.
- [9] International Organization for Standardization. Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)-Acute toxicity test; ISO 6341—2012[S]. Switzerland: IHS, 2012.
- [10] 国家环境保护总局.水生生物监测手册[M].南京:东南大学出版社,1993:70.