

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20191225001

谢希琳, 汪宁欣, 周美霞. 脉冲暴露下无机砷对大型溞急性毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 308-317

Xie X L, Wang N X, Zhou M X. Acute toxicity effect of inorganic arsenic on *Daphnia magna* under pulsed exposure [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 308-317 (in Chinese)

脉冲暴露下无机砷对大型溞急性毒性效应

谢希琳, 汪宁欣*, 周美霞

安徽工业大学能源与环境学院, 马鞍山 243032

收稿日期: 2019-12-25 录用日期: 2020-03-26

摘要: 相比传统的持续暴露模式, 脉冲暴露方式是污染物进入自然环境后较常见的暴露形式。为了更好地模拟水体中污染物浓度变化下生物暴露的情况, 采用脉冲暴露的方法, 以大型溞(*Daphnia magna*)作为受试生物, 研究2种无机砷(三价砷和五价砷)对大型溞的急性毒性效应。结果表明, 无论哪一种暴露方式, 三价砷(arsenite, As(III))对大型溞的毒性效应远高于五价砷(arsenate, As(V)); 而对于不同脉冲暴露模式(4、8和12 h间隔脉冲暴露)而言, 脉冲暴露时间间隔越长, 大型溞对无机砷的耐受性越强。12 h间隔脉冲暴露形式下, As(III)和As(V)对大型溞的48 h半数致死浓度(48 h-LC₅₀)分别为2.73 mg·L⁻¹和5.53 mg·L⁻¹, 明显高于4 h和8 h脉冲暴露形式以及持续暴露形式下48 h-LC₅₀值。对大型溞中砷富集浓度分析可知, 不同脉冲暴露方式的毒性差异并不能完全归结为砷的生物富集量不同, 而可能与暴露时间间隔为大型溞提供生理恢复的时间相关。一定时间的生理调节能在一定程度上降低无机砷对大型溞的毒性效应。研究结果为更加合理地评价无机砷对水生生物的毒性效应提供了科学数据, 同时也为更精确的砷风险评估提供了方法学的参考。

关键词: 无机砷; 大型溞; 急性毒性; 脉冲暴露

文章编号: 1673-5897(2020)6-308-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Acute Toxicity Effect of Inorganic Arsenic on *Daphnia magna* under Pulsed Exposure

Xie Xilin, Wang Ningxin*, Zhou Meixia

School of Energy and Environment, Anhui University of Technology, Ma' anshan 243032, China

Received 25 December 2019 accepted 26 March 2020

Abstract: Compared to the traditional constant exposure mode, pulse exposure is a more usual form for exposure of pollutants entered into natural environment. In order to get a better simulation of the biological exposure with the pollutant concentration changing in waterbody, different modes of pulse exposure including four groups of time intervals (0, 4, 8 and 12 h) were used in the present study, and *Daphnia magna* was used as the test organism for exploring the acute toxic effects of arsenite (As(III)) and arsenate (As(V)). The results showed that no matter which exposure method, As(III) exhibited a greater toxic effect on *Daphnia magna* than As(V). For different pulse exposure modes, we also found that the longer the interval time between pulse exposures, the greater the tolerance of *Daphnia magna* to inorganic arsenic. Based on the survival of *Daphnia magna* as the indicator of biological effect

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21507001); 安徽省教育厅重点项目(KJ2019A0089)

第一作者: 谢希琳(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水中污染物环境行为及生态效应, E-mail: 1946794617@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: xiyanglingsu@163.com

under different exposure patterns, it could figure out that the tolerance of *Daphnia magna* to inorganic arsenic was enhanced with the increase of interval time in pulse exposure. In 12 h interval pulse exposure, for instance, the 48 h half lethal concentration (48 h-LC₅₀) of As(III) and As(V) on *Daphnia magna* were 2.73 mg·L⁻¹ and 5.53 mg·L⁻¹, respectively. These values were significantly higher than the 48 h-LC₅₀ values under the other short pulse exposure forms of 4 h and 8 h, and the constant exposure. The results of arsenic bioaccumulation in *Daphnia magna* body suggested that the difference of biological effect under pulse exposure was not only caused by the arsenic bioaccumulation in *Daphnia magna*, but also the time intervals could supply a physiological recovery time. In hence, the physiological regulation for a certain period time could provide the *Daphnia magna* enough time to produce toxicity resistance, then reduce the toxicity of inorganic arsenic to *Daphnia magna*. These results provide relevant scientific data for a more reasonable evaluation of the toxic effects of inorganic arsenic on aquatic organisms, and also provide theoretical references for more accurate arsenic risk assessment in the future.

Keywords: inorganic arsenic; *Daphnia magna*; acute toxicity; pulsed exposure

砷(arsenic)的元素符号是 As, 在元素周期表中位于第四周期、第ⅤA族, 是一种有毒类金属^[1]。砷主要分为有机砷和无机砷两大类, 一般来说无机砷比有机砷毒性更大^[2]。水体中的无机砷主要是以五价砷(arsenate, As(V))和三价砷(arsenite, As(III))2种形式存在^[3]。人们长期接触无机砷化合物会导致多种疾病, 例如导致色素沉淀、外周血管系统和中枢神经系统疾病, 并且诱发皮肤、肝脏、膀胱和前列腺等各种癌症甚至会导致死亡^[4-5]。虽然, 世界卫生组织(WHO)将饮用水砷浓度标准设定为 10 μg·L⁻¹^[6], 但是在阿根廷、孟加拉国、智利、中国、印度、墨西哥和美国等很多国家仍然有不同程度的水体砷污染^[7-8]。

大型蚤(*Daphnia magna*)是实验室中一种较常见的模式生物, 因其个体小、繁殖快、产量多、易培养且对毒物的敏感性较高, 经常被用于环境中各类有毒有害物质的生态毒理学研究^[9]。郭婧颖等^[10]以大型蚤为受试生物, 研究了典型持久性有机物双酚 AF 对大型蚤的急性和慢性毒性。陈丽萍等^[11]研究了重金属离子 Hg²⁺、Ni²⁺和 Mn²⁺对大型蚤的 48 h 急性毒性, 结果表明, 3 种重金属离子对大型蚤毒性大小依次为 Hg²⁺ > Ni²⁺ > Mn²⁺。在新型环境污染物的研究中, 大型蚤仍有广泛应用。刘倩等^[12]以大型蚤作为受试生物, 研究纳米氧化锌对大型蚤致毒效应, 结果表明, 纳米氧化锌释放的锌离子对大型蚤具有一定的毒性。而 Dokyung 等^[13]研究了 2 种不同类型的微塑料和镍(Ni)对大型蚤的混合毒性。

目前的水生生物毒性测试大部分根据经济合作与发展组织(OECD)规定的毒性测试方法^[14]进行。其重要特点是将生物暴露于浓度持续稳定的环境条

件下。但是在自然水体环境中, 污染物浓度处于时刻变化的状态中, 而非保持稳定的状态^[15]。脉冲暴露的方式可以更好地模拟水体中污染物浓度变化下生物暴露的情况^[16]。脉冲暴露方式是污染物进入自然环境后较常见的暴露形式, 所以也受到了越来越多的关注。Widianarko 等^[17]的研究关注脉冲暴露条件下重金属锌(Zn)对孔雀鱼的毒性, 结果表明, 脉冲暴露条件相较于传统持续暴露可以更好地模拟现场条件。Naddy 和 Klaine^[18]通过慢性毒性实验发现, 在相同暴露时间内, 间隔较短、更频繁的脉冲暴露会减小毒死蜱对大型蚤的毒性。Hoang 和 Klaine^[19]以大型蚤为研究对象, 研究重金属硒(Se)脉冲方式暴露的毒性影响, 发现暴露时间间隔越长, Se 对大型蚤的毒性越小。然而, Van der Hoeven 和 Gerritsen^[20]在研究毒死蜱脉冲暴露方式对蚤状蚤的毒性时发现, 脉冲暴露的方式并不能降低蚤的死亡率。综上所述, 在脉冲暴露模式下, 一方面, 可能由于对环境的适应和生理的恢复等使受试生物的耐受性增强, 而导致毒性降低; 另一方面, 也可能由于能量的消耗和体内的累积等降低生物的耐受性, 而导致毒性增高^[21-22]。因此, 探讨脉冲暴露模式下受试生物对毒物的耐受性还有待进一步深入。

本研究选取大型蚤为受试生物, 运用不同的脉冲暴露方式, 研究 2 种无机砷对大型蚤的急性毒性作用及其生物效应。通过改良的 OECD 暴露方法, 探究不同暴露模式对大型蚤毒性的影响, 并且通过监测生物存活率以及砷的生物富集量来评估无机砷的毒性作用, 以期能为生态毒理学提供相关的科学数据, 为评价砷的环境风险提供更有效的信息。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 生物培养

所用的大型蚤来自中国科学院水生生物研究所,且均已在本实验室培养 3 代以上。培养大型蚤的自来水需要曝气 48 h 后用 0.45 μm 的 PC 膜抽滤而获得,放置于光照培养箱中。温度保持在 25 ℃ ±1 ℃,光暗循环比为 12 h:12 h,光强设置为 2 000 lux,pH 维持在 8.0±1.0。每 2 天更换一次培养用水,同时挑出新生的大型蚤。大型蚤每天喂食一次离心浓缩后的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*),喂食量为大蚤 1×10⁵ cells·mL⁻¹,小蚤 5×10⁴ cells·mL⁻¹。

喂食的莱茵衣藻来自中国科学院水生生物研究所,于 3 L 的锥形瓶中加入 2 L 蒸馏水经高压蒸汽灭菌锅 121 ℃ 灭菌 20 min,冷却后配制 WC 培养基^[23],培养基具体组分如表 1 所示。接入藻种后于恒温培养箱中静置培养,温度保持在 25 ℃ ±1 ℃,光暗循环比为 12 h:12 h,光强设置为 2 000 lux(单独设置一个台灯以增加光照强度),用空气泵对其进行曝气处理,加速藻的生长,培养至对数生长期,以 3 000 r·min⁻¹ 离心收集,放入 4 ℃ 的冰箱保存。

1.2 实验试剂及仪器

As(V)和 As(Ⅲ)标准溶液(o2si smart solutions, 百灵威科技有限公司,美国),消解所用硝酸(HNO₃) (BV-Ⅲ级,北京化学试剂有限公司,中国)和体积分数为 30% 的过氧化氢(H₂O₂)(分析纯,上海沃凯生物技术有限公司,中国)。

磁力搅拌器(PHS-25,上海仪电科学仪器股份有限公司,中国);电感耦合等离子体质谱(ICP-MS) (NexION300,珀金埃尔默股份有限公司,美国);人工气候培养箱(RGX-350B,上海坤天实验仪器公司,中国);隔膜真空泵(GM-0.33A,天津市津腾实验设备有限公司,中国);高速离心机(LXJ-IIB,上海安亭科学仪器厂,中国);立式高压蒸汽灭菌锅(LS-SOHD,江阴滨江医疗设备公司,中国);垂直送风净化工作台(SW-CJ-1D,上海鼎科公司,中国)。

1.3 实验设置

1.3.1 持续暴露急性毒性实验

实验所用大型蚤为同一母系同一批次生殖 7 d 左右的蚤。实验前将蒸馏水灭菌,冷却后配制培养基,采用 Elendt M 7 培养基^[24]简化后的 SM 7 培养基,培养基具体组分如表 2 所示,然后配制含砷的培

表 1 WC 培养基组分

Table 1 Chemical composition of WC medium

组分 Component	配制终浓度/(μmol·L ⁻¹) Final concentration/(μmol·L ⁻¹)	组分 Component	配制终浓度/(μmol·L ⁻¹) Final concentration/(μmol·L ⁻¹)
NaNO ₃	1 000	MnCl ₂	100
K ₂ HPO ₄	50	ZnSO ₄	10
MgSO ₄	150	Na ₂ MoO ₄	10
CaCl ₂	250	CuSO ₄	0.05
NaHCO ₃	150	CoCl ₂	5
Na ₂ SiO ₃	100	FeCl ₃	500
MOPS	5 000		

注:MOPS 为培养基中的缓冲液。
Note: MOPS means buffers in the WC medium.

表 2 SM 7 培养基组分

Table 2 Chemical composition of SM 7 medium

组分 Component	配制终浓度/(mg·L ⁻¹) Final concentration/(mg·L ⁻¹)	组分 Component	配制终浓度/(mg·L ⁻¹) Final concentration/(mg·L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	293.8	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	123.3	H ₃ BO ₃	0.175
K ₂ HPO ₄	0.184	KCl	5.8
NaNO ₃	0.274	KH ₂ PO ₄	0.143
NaHCO ₃	64.8		

养液。实验设置 6 个不同的砷浓度组,分别为 0、0.5、1.5、3、4.5、6 和 7.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度组设置 3 个平行样,调 pH 为 8.0 左右,倒入 50 mL 小烧杯中静置平衡 6 h 左右,每个处理组中放入 10 只大型蚤。加入大型蚤前 1 h 对大型蚤进行简单的预处理:将大型蚤放入干净的培养基中,使其适应并排空肠道中的食物。实验持续 48 h(即 0 h 脉冲暴露实验),实验期间不需要给大型蚤喂食也不需要更换培养基。实验过程中每 3 h 记录一次大型蚤的死亡个数,并及时将死亡大型蚤挑出烘干待测。实验结束后使用隔膜真空泵将大型蚤过滤出来,并使用配制的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗大型蚤表面残留的砷溶液,收集样品放入离心管中。PBS 缓冲液配制方法:使用 SM 7 培养基,1 L 中加入 2 mL 提前配制好的磷酸氢二钾(K_2HPO_4)溶液。采用 $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ 消解样品:向样品中加入 0.5 mL HNO_3 ,常温下静置 10 min,再转移入 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中消解 10 min,拿出冷却至室温后加入 2 mL 体积分数为 30% 的 H_2O_2 ,接着放入 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中消解 40 min,拿出冷却至室温后使用 Milli-Q 水(7146,赛默飞世尔公司,美国)定容至 10 mL。使用 ICP-MS 测量样品中富集的总砷含量。

1.3.2 脉冲暴露急性毒性实验

实验所用大型蚤的要求及浓度组的设置同持续暴露实验。实验前 1 h 对大型蚤进行简单的预处理,将大型蚤放入干净的 SM 7 培养基,使其适应并排空肠道中的食物。实验设计 4、8 和 12 h 这 3 种形式的脉冲暴露,如图 1 所示。其中,4 h 的脉冲暴露方式中包含了 0~4 h、8~12 h、16~20 h、24~28 h、32~36 h 和 40~44 h 的非脉冲暴露阶段以及 4~8 h、12~16 h、20~24 h、28~32 h、36~40 h 和 44~48 h 的脉冲暴露阶段,总共分为 12 个时间段;8 h 的脉冲暴露方式中包含了 0~8 h、16~24 h 和 32~40 h 非脉冲暴露阶段以及 8~16 h、24~32 h 和 40~48 h 脉冲暴露阶段,共 6 个时间段;12 h 的脉冲暴露包含了 0~12 h、24~36 h 非脉冲暴露阶段以及 12~24 h、36~48 h 脉冲暴露阶段,共 4 个时间段。3 种不同间隔脉冲暴露中,在非脉冲暴露阶段将培养基更换为不含无机砷的培养液(SM 7 培养液)。每隔 3 h 观察实验情况,及时挑出死亡蚤放入标记好的离心管中。实验结束后使用隔膜真空泵抽滤得到实验大型蚤,并使用配制好的 PBS 缓冲液冲洗大型蚤表面残留的砷溶液。收集好放入离心管中,消解后测样。

1.4 数据分析与处理

数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)的形式表示,数据分析采用统计软件 Sigmaplot 10.0 进行处理(Systat 国际软件公司)。数据中显著性差异分析使用 SPSS 25.0 软件中的 ANOVA 的方法来进行($P<0.05$ 时,差异显著)。

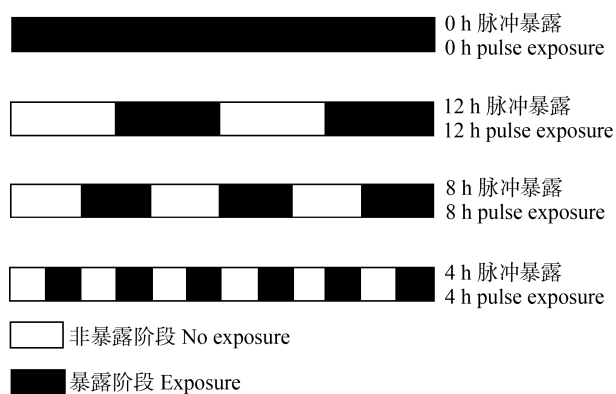


图1 脉冲暴露方式示意图

Fig. 1 Schematic diagram for pulse exposure mode

2 结果 (Results)

2.1 As(Ⅲ)对大型溞的急性毒性实验

实验开始后,每隔3 h记录大型蚤的存活情况,得到0、4、8和12 h脉冲暴露模式下As(Ⅲ)对大型蚤的急性毒性,其存活率随时间的变化如图2所示。由图2可知,不论哪种暴露方式,除空白组,所有处理组大型蚤的存活率均随着实验时间的增加不断降低;且存活率随着As(Ⅲ)浓度的增加而降低。以12 h脉冲暴露为例:暴露30 h时,As(Ⅲ)浓度为1.5、4.5和6 mg·L⁻¹时,大型蚤存活率分别为95.00%、31.67%和1.67%。以48 h终点死亡率作为毒性指标可知,与持续暴露的方式(即0 h脉冲暴露实验)相比,脉冲暴露模式一定程度上可以降低As(Ⅲ)对大型蚤的毒性。以3 mg·L⁻¹ As(Ⅲ)浓度组为例:在实验终点48 h处,12 h脉冲暴露方式下大型蚤的存活率为38.33%,而0 h脉冲暴露实验中大型蚤的存活率只有1.66%。As(Ⅲ)脉冲暴露的时间越长,其对大型蚤的毒性减弱作用也越明显。以As(Ⅲ)最高浓度组7.5 mg·L⁻¹浓度组为例:0 h脉冲暴露方式下,大型蚤在12 h全部死亡;8 h脉冲暴露方式下,大型蚤16 h时全部死亡;12 h脉冲暴露模式下,大型蚤100%死亡时间为24 h。

2.2 As(V)对大型溞的急性毒性实验

与 As(III)急性毒性实验相同,实验开始后每隔

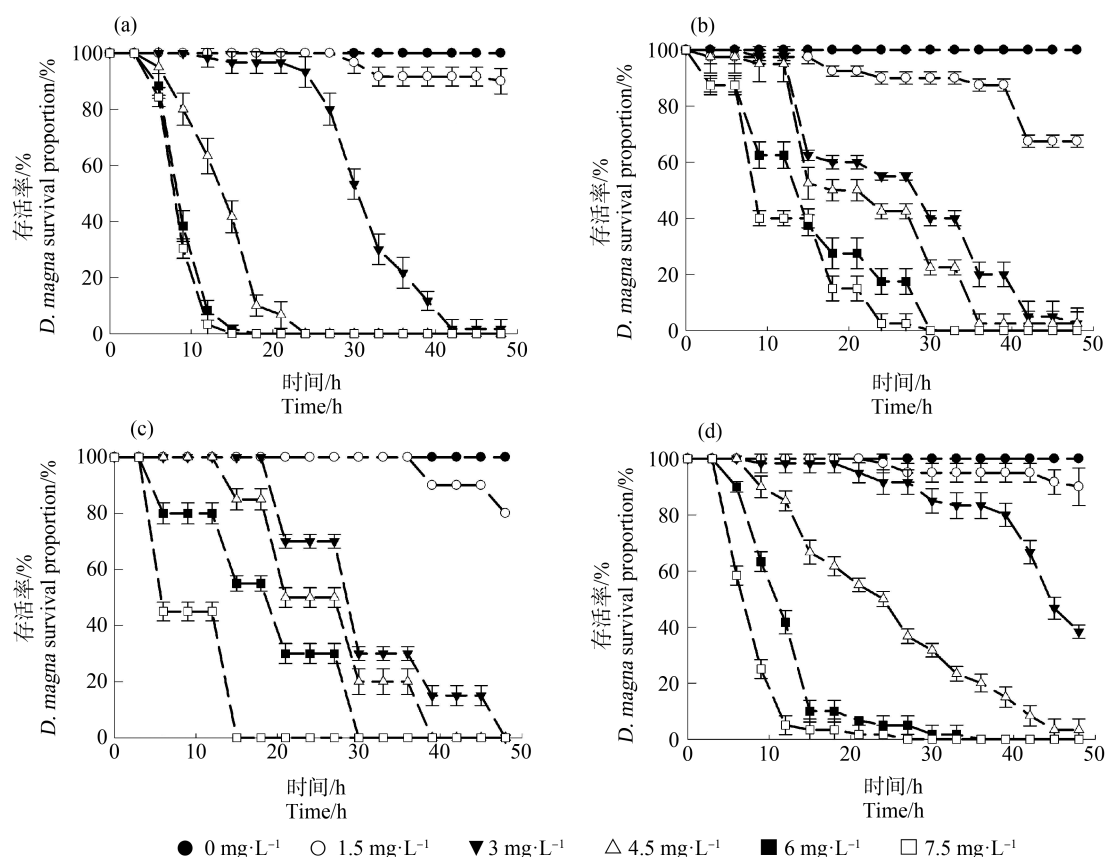


图2 4种暴露模式下As(Ⅲ)对大型溞存活率的影响

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别表示0、4、8和12 h脉冲暴露条件下的实验。

Fig. 2 The effect of As(Ⅲ) on *D. magna* survival under different exposure patterns

Note: (a), (b), (c) and (d) represent experiments under 0, 4, 8 and 12 h pulse exposure conditions.

3 h记录大型溞的存活情况,得到0、4、8和12 h脉冲暴露模式下As(V)对大型溞的急性毒性,其存活率随时间的变化如图3所示。4种脉冲暴露方式下,除空白组外,大型溞的存活率均随着时间的增加不断降低;且存活率均随As(V)浓度的增加而降低。当实验进行到24 h时,以8 h脉冲暴露为例,As(V)浓度分别为1.5、4.5和7.5 mg·L⁻¹时,大型溞存活率分别为100%、90%和50%。通过比较终点存活率可知,与持续暴露的方式相比,脉冲暴露模式同样在一定程度上可以减弱As(V)对大型溞的毒性。以4.5 mg·L⁻¹ As(V)浓度组为例:在实验终点48 h处,12 h脉冲暴露方式下大型溞的存活率为83.33%,而0 h脉冲暴露实验中大型溞的存活率为8.30%。与持续暴露的方式相比,As(V)脉冲暴露的时间间隔越长,其对大型溞毒性的降低作用也越明显。以As(V)最高浓度组7.5 mg·L⁻¹浓度组为例:4 h脉冲暴露方式下,大型溞在32 h全部死亡;8 h脉冲暴露方式下,大型溞在40 h时全部死亡;但是在12 h脉冲暴露模

式下,实验终点48 h处大型溞仍有8.33%的存活率。

2.3 大型溞中无机砷富集情况

通过拟合不同暴露方式下2种无机砷对大型溞48 h的剂量效应曲线来进一步比较对大型溞的毒性效应(图4)。如图4(a)所示,在As(Ⅲ)暴露实验中,0、4和8 h脉冲暴露模式下3条剂量效应曲线相隔较近,而12 h脉冲暴露模式下的剂量效应曲线则有明显右移,这说明,相较于持续暴露,短时间间隔的As(Ⅲ)脉冲暴露(4 h、8 h间隔)并未起到明显的降低毒性的作用,只有较长时间间隔的As(Ⅲ)脉冲暴露(12 h间隔)才能起到缓解毒性效应的作用。与As(Ⅲ)不同,在As(V)暴露下,4、8和12 h脉冲暴露模式都会使剂量效应曲线产生明显的右移(图4(b)),换言之,短时间间隔的脉冲暴露即能降低As(V)对大型溞毒性效应。

为了更进一步探究不同暴露模式下无机砷毒性效应不同的原因,48 h时分别测定了0 h脉冲暴露与12 h脉冲暴露实验中大型溞体内的砷富集量(图

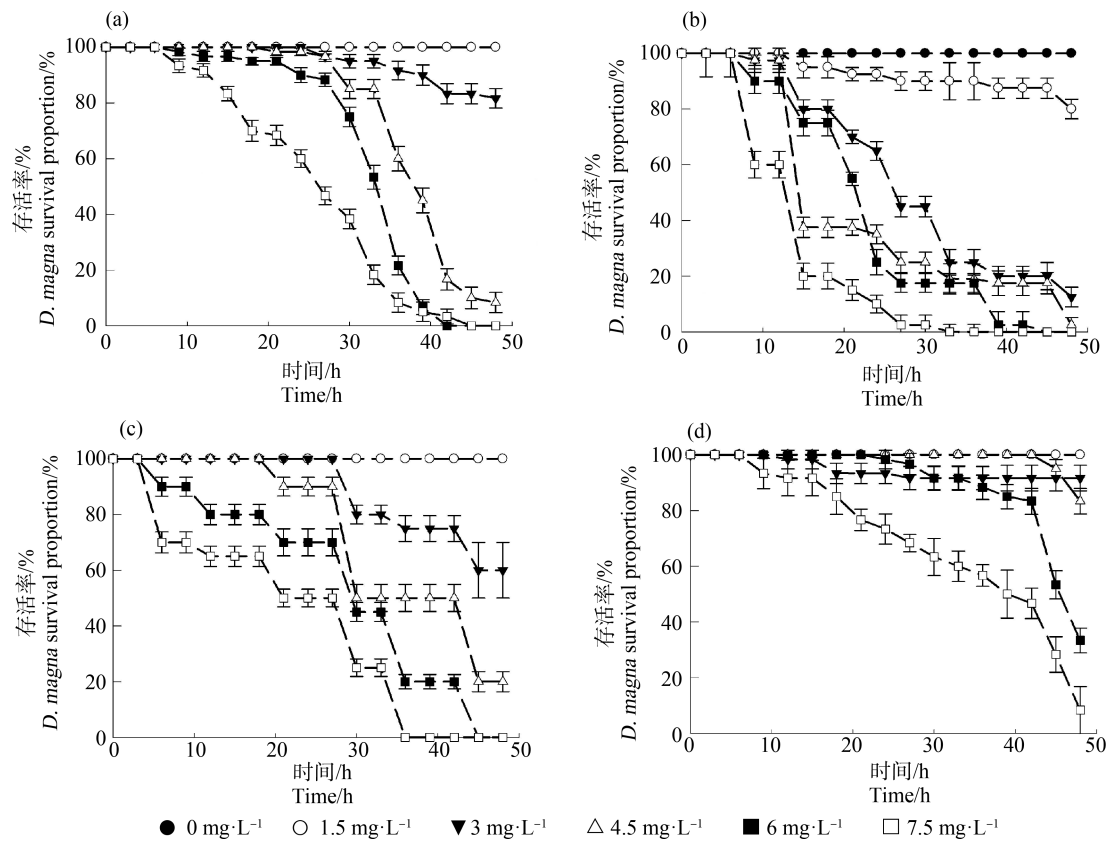


图 3 4 种暴露模式下 As(V) 对大型溞存活率的影响

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别表示 0、4、8 和 12 h 脉冲暴露条件下的实验。

Fig. 3 The effect of As(V) on *D. magna* survival under different exposure patterns

Note: (a), (b), (c) and (d) represent experiments under 0, 4, 8 and 12 h pulse exposure conditions.

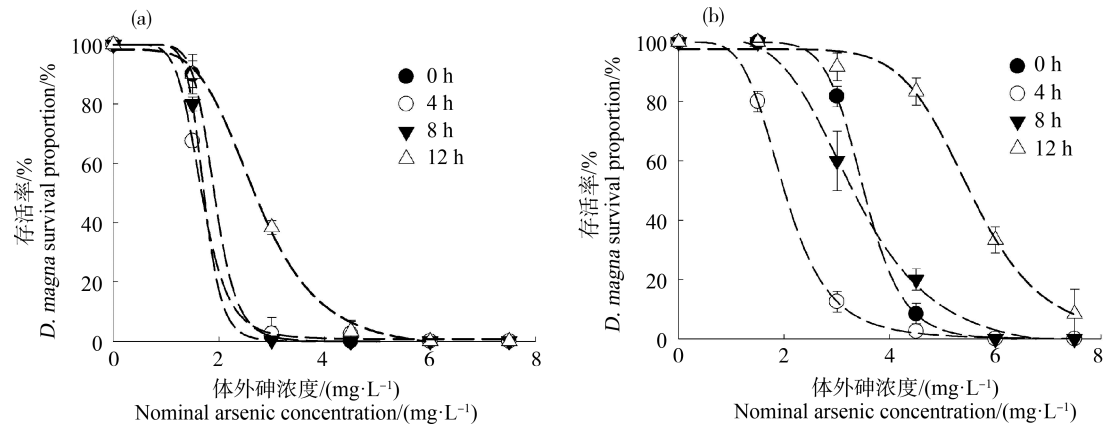


图 4 不同暴露方式下 As(III) (a) 和 As(V) (b) 对大型溞的剂量效应曲线

注:0 h、4 h、8 h 和 12 h 表示 0、4、8 和 12 h 脉冲暴露方式。

Fig. 4 The dose-effect curve of As(III) (a) and As(V) (b) to *D. magna* under different exposure patterns

Note: 0 h, 4 h, 8 h and 12 h means 0, 4, 8 and 12 h pulse exposure patterns.

5)。这 2 种暴露模式下,大型溞体内的无机砷含量随无机砷浓度的升高呈现出增加的趋势,体内富集的砷和溶液中的砷浓度之间的关系符合朗格缪尔方

程,其相关性系数(r^2)范围分别为 0.9574 ~ 0.9983 和 0.9830 ~ 0.9993。持续暴露条件下,比较 2 种无机砷在大型溞体内的富集量可知,As(III)暴露下的富集

量都小于 As(V) 暴露下的富集量,且这种差异随着浓度增加而增加。持续暴露实验中,2 种无机砷的 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组,As(III) 暴露下,大型溞体内无机砷的富集浓度为 $78.26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$,As(V) 暴露下,无机砷的富集浓度为 $93.09 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$;无机砷暴露浓度为 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,As(III) 和 As(V) 暴露下,大型溞体内无机砷的富集浓度为 $79.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ 和 $171.91 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ 。在 12 h 脉冲暴露条件下,As(III) 的富集量与 As(V) 富集量没有显著性差异性($P>0.05$)。

比较不同暴露模式下大型溞体内砷富集情况,发现持续暴露模式下,会有更多砷富集在大型溞体内,推测这也可能是造成持续暴露较脉冲暴露死亡率高

存活率随大型溞体内富集砷浓度变化的关系图(图 6)来进一步分析不同暴露模式对大型溞的毒性差异。0 h 脉冲暴露和 12 h 脉冲暴露下,以大型溞体内富集砷为指标得出的 As(III) 的半数致死浓度(LC_{50})值分别为 $5.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ 和 $1.75 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$,As(V) 的 LC_{50} 分别为 $10.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ 和 $2.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ 。这说明,不同暴露模式下对大型溞的毒性差异并不能单纯归结于体内富集砷浓度的不同,需要进一步比较不同暴露模式下大型溞生理生化条件的改变等因素。

2.4 不同暴露模式比较

运用 4 种暴露方式下 2 种无机砷对大型溞的 48 h- LC_{50} 值作出柱状图,进行更为直观的比较,如

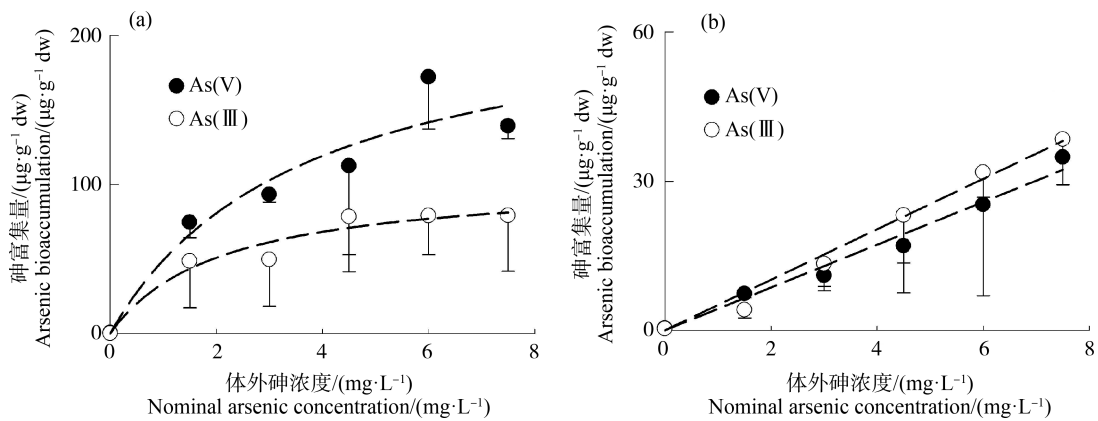


图 5 无机砷在大型溞体内的生物富集量

注:(a) 0 h 脉冲暴露(持续暴露);(b) 12 h 脉冲暴露。

Fig. 5 Inorganic arsenic bioaccumulation in *D. magna*

Note: (a) 0 h pulse exposure (continued exposure); (b) 12 h pulse exposure.

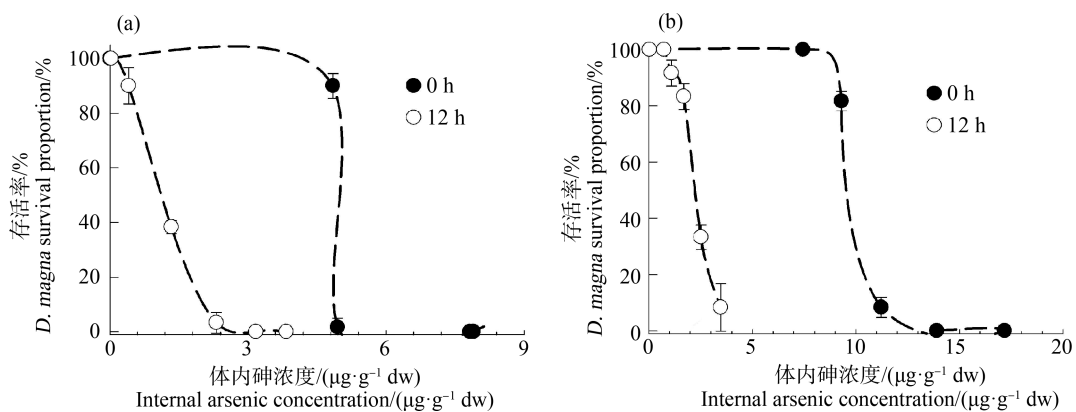


图 6 不同暴露方式下大型溞存活率随体内无机砷浓度变化关系图

注:(a) As(III);(b) As(V)。

Fig. 6 Relationship between survival proportion of *D. magna* and internal inorganic arsenic concentration under different exposure patterns

Note: (a) As(III); (b) As(V).

图7所示。通过对比As(Ⅲ)与As(V)对大型溞48 h-LC₅₀值可知,在相同浓度无机砷暴露下,短时间脉冲暴露所产生的毒性效应要高于长时间脉冲暴露所产生的毒性效应。以As(Ⅲ)为例,当脉冲暴露时间缩短至0 h时,As(Ⅲ)对大型溞的48 h-LC₅₀值为1.91 mg·L⁻¹,而当脉冲暴露的时间为12 h时,As(Ⅲ)对大型溞的48 h-LC₅₀值提高为2.73 mg·L⁻¹,即大型溞对As(Ⅲ)耐受性增强了。As(V)的脉冲暴露实验结果呈现出同样的趋势,12 h脉冲暴露会降低As(V)对大型溞的毒性。

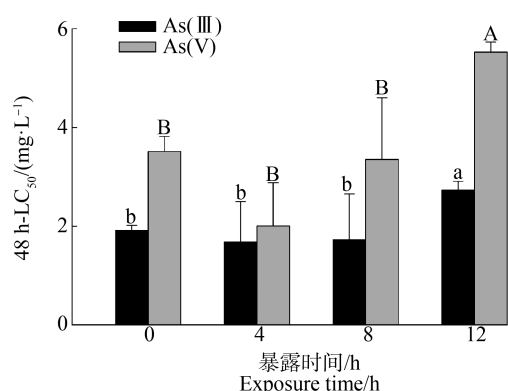


图7 4种暴露方式下2种无机砷对大型溞的48 h半数致死浓度(48 h-LC₅₀)

注:不同小写字母表示As(Ⅲ)暴露组别间的显著性差异,不同大写字母表示As(V)暴露组别间的显著性差异。

Fig. 7 The 48 h half lethal concentration (48 h-LC₅₀) of two inorganic arsenic to *D. magna* under different exposure patterns

Note: Different lowercase letters indicate the significant differences between groups exposed to As(Ⅲ) and different capital letters indicate the significant differences between groups exposed to As(V).

3 讨论 (Discussion)

2种无机砷相比,As(V)对大型溞的毒性小于As(Ⅲ)。Wang等^[25]的研究结果表明,As(V)和As(Ⅲ)对大型溞48 h-LC₅₀分别为3.51 mg·L⁻¹和1.91 mg·L⁻¹;李妍丽和柯林^[26]的研究结果表明,As(Ⅲ)对小球藻生长的毒性大于As(V)。Chowdhury等^[27]的研究结果表明,As(Ⅲ)对硅藻的毒性作用强于As(V)。产生这样毒性效应差异的原因可能与2种无机砷的致毒机理相关。As(V)并不直接与酶的活性位点反应,而是在生物体内还原为As(Ⅲ)后发挥毒性作用;As(V)与As(Ⅲ)都抑制线粒体的能量链功能,生物系统吸收As(Ⅲ)速度比As(V)快;As(Ⅲ)与蛋白质中的巯基有很高的亲和力,导致酶失活的速度更快^[28-30]。这些可以合理地解释本研究的结果。

持续暴露模式下砷的富集量显著高于脉冲暴露模式下的,As(V)暴露下大型溞对砷的富集程度明显高于As(Ⅲ)暴露下。Suhendrayatna等^[31]将大型溞暴露于2种不同浓度的无机砷溶液中,As(V)暴露下大型溞对砷的富集量高于As(Ⅲ)暴露下。黄飞等^[32]研究绿藻胞外聚合物对无机砷的生物累积时,发现蛋白小球藻细胞内As(V)吸收累积量显著高于As(Ⅲ)。这与本研究的结果是一致的。这可能由于As(V)比As(Ⅲ)更容易通过大型溞消化器官的膜组织并被吸收^[31]。持续暴露模式中大型溞体内无机砷的富集量明显高于脉冲暴露模式中,推测这也可能是造成持续暴露较脉冲暴露中大型溞死亡率高原因。0 h脉冲暴露和12 h脉冲暴露下,以大型溞体内富集砷为指标,As(Ⅲ)的LC₅₀分别为5.03 μg·g⁻¹ dw和1.75 μg·g⁻¹ dw,As(V)的LC₅₀分别为10.01 μg·g⁻¹ dw和2.25 μg·g⁻¹ dw。这说明,不同暴露模式下对大型溞的毒性差异并不能单纯归结于体内富集砷浓度的不同,而可能与不同暴露模式下大型溞生理生化条件的改变相关。而12 h脉冲暴露条件下,As(Ⅲ)暴露下与As(V)暴露下大型溞体内的无机砷富集量无显著差异性,出现这样现象的原因有待进一步研究。在脉冲暴露模式下,大部分吸附位点上,砷的富集符合朗格缪尔模型,这种情况下吸附浓度增长趋势近似于直线。这可能由于暴露时间的减少减缓了富集平衡过程。

相比于持续暴露,脉冲暴露模式下,暴露过程中的间隔时间可能为生物提供了生理恢复的机会,从而降低有毒物质的毒性效应。本实验中,短时间脉冲暴露(4 h、8 h)比长时间脉冲暴露(12 h)毒性效应大,这可能是由于短时间脉冲暴露的恢复时间短,使大型溞体内无机砷累积量超过了毒性阈值,在恢复期内恢复效应更弱。Naddy和Klaine^[18]、Hoang等^[15]都采用了不同时间间隔的脉冲暴露方式,研究Cu、Zn、Se和毒死蜱对大型溞的慢性毒性,发现大型溞的死亡率与实验组浓度和暴露间隔时间有关。Tsui和Wang^[33]研究汞(Hg)对大型溞的毒性时发现,在外界暴露浓度相同的情况下,脉冲暴露模式下大型溞的死亡率比持续暴露模式下低,Hg对大型溞的24 h-LC₅₀在脉冲暴露和持续暴露模式下分别为54.7 μg·L⁻¹提升至25.8 μg·L⁻¹。

当毒物累积的浓度超过生物的耐受量时生物体就会受到毒性作用,其作用的强烈程度与毒物的累积浓度有关。而毒物在生物体内的累积又取决于暴

露持续时间和浓度。本研究中大型蚤的存活率就相对地取决于脉冲暴露持续时间和浓度。以 As(V) 暴露实验为例,在 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ As(V) 的 4 h 脉冲暴露中,48 h 时大型蚤存活率为 80% (图 3(b)), 当 As(V) 暴露浓度倍增 ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 而脉冲暴露时间减少 (0 h 脉冲暴露) 时,48 h 时大型蚤存活率为 81.67% (图 3(a))。这说明,在 As(V) 的脉冲暴露中,脉冲暴露时间和暴露浓度的作用大体相同。这与 Hoang 和 Klaine^[34] 对 Se 脉冲暴露的研究结果一致。但是,在 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ As(V) 的 8 h 脉冲暴露中,48 h 时大型蚤存活率为 100% (图 3(c)), 当 As(V) 暴露浓度倍增 ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 而脉冲暴露时间减少 (4 h 脉冲暴露) 时,48 h 时大型蚤存活率为 12.5% (图 3(b))。这一结果表明,在 As(V) 的暴露实验中,暴露时间的作用要强于暴露浓度。As(III) 脉冲暴露实验与 As(V) 脉冲暴露实验结果较为类似。毒物的作用模式可能会影响暴露时间和暴露浓度对毒物毒性贡献的相对权重,并且毒物在生物体内累积程度所处的阶段也会对此产生一定影响。毒物在生物体内的累积量是否超过某一关键耐受量很重要,在这一关键耐受量的两侧,暴露时间和暴露浓度的作用可能不同。

综上所述,无论是持续暴露还是脉冲暴露,As(III) 对大型蚤的毒性效应高于 As(V)。脉冲暴露模式下,大型蚤死亡率与暴露间隔时间有关。脉冲间隔时间可能为大型蚤提供了生理条件恢复的机会,或脉冲暴露中的暴露阶段可能对大型蚤有驯化作用,使得大型蚤对无机砷产生了耐受性。脉冲暴露时间越短所产生的毒性效应越高。这种脉冲暴露的时间与毒性效应之间的关系以及砷脉冲暴露中的大型蚤体内酶活性改变及耐受性机制还有待进一步探讨。

通讯作者简介:汪宁欣(1988—),女,博士,讲师,硕士生导师,主要研究方向为重金属生态毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Mondal P, Majumder C B, Mohanty B. Laboratory based approaches for arsenic remediation from contaminated water: Recent developments [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 137(1): 464-479
- [2] Duker A A, Carranza E J, Hale M. Arsenic geochemistry and health [J]. Environment International, 2005, 31 (5): 631-641
- [3] Liu C P, Luo C L, Gao Y, et al. Arsenic contamination and potential health risk implications at an abandoned tungsten mine, southern China [J]. Environmental Pollution, 2009, 158(3): 820-826
- [4] Goessler W, Maher W, Irgolic K J, et al. Arsenic compounds in a marine food chain [J]. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1997, 359(4-5): 434-437
- [5] Bhattacharya P, Welch A H, Stollenwerk K G, et al. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry [J]. Science of the Total Environment, 2007, 379(2): 109-120
- [6] Anawar H M, Akai J, Komaki K, et al. Geochemical occurrence of arsenic in groundwater of Bangladesh: Sources and mobilization processes [J]. Journal of Geochemical Exploration, 2003, 77(2): 109-131
- [7] Matschullat J. Arsenic in the geosphere—A review [J]. Science of the Total Environment, 2000, 249(1): 297-312
- [8] Smedley P L, Kinniburgh D G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters [J]. Applied Geochemistry, 2002, 17(5): 517-568
- [9] Berge W F T. Breeding *Daphnia magna* [J]. Hydrobiologia, 1978, 59(2): 121-123
- [10] 郭婧颖, 刘建超, 李帅衡, 等. 双酚 AF 对大型蚤生殖、生长等生态行为的影响[J]. 中国环境科学, 2019, 39 (10): 4394-4400
- Guo J Y, Liu J C, Li S H, et al. Influences of bisphenol AF on the reproduction and growth of *Daphnia magna* [J]. China Environmental Science, 2019, 39 (10): 4394-4400 (in Chinese)
- [11] 陈丽萍, 吴长兴, 苍涛, 等. 3 种重金属离子对大型蚤的急性毒性效应[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(1): 46-48, 50
- [12] 刘倩, 杜青平, 刘涛, 等. 纳米氧化锌致大型蚤的毒性效应特征[J]. 环境科学学报, 2019, 39(4): 1332-1339
- Liu Q, Du Q P, Liu T, et al. Study on the toxicity effects of nanometer zinc oxide on *Daphnia magna* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39 (4): 1332-1339 (in Chinese)
- [13] Dokyung K, Yooeun C, Youn-Joo A. Mixture toxicity of nickel and microplastics with different functional groups on *Daphnia magna* [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(21): 12852-12858
- [14] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals and Pesticides [R]. Paris: OECD, 2012
- [15] Hoang T C, Gallagher J S, Klaine S J. Responses of *Daphnia magna* to pulsed exposures of arsenic [J]. Environmental Toxicology, 2007, 22(3): 308-317
- [16] 盛连喜, 李爽, 徐静波. 镉脉冲暴露中金属硫蛋白的诱导-恢复和代际效应[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2015, 16(3): 389-397

- Sheng L X, Li S, Xu J B. Induction of metallothioneins during pulsed cadmium exposure: Recovery and trans-generation effect [J]. Journal of Beihua University: Natural Science, 2015, 16(3): 389-397 (in Chinese)
- [17] Widianarko B, Kuntoro F X, Van Gestel C A, et al. Toxicokinetics and toxicity of zinc under time-varying exposure in the guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 20(4): 763-768
- [18] Naddy R B, Klaine S J. Effect of pulse frequency and interval on the toxicity of chlorpyrifos to *Daphnia magna* [J]. Chemosphere, 2001, 45(4): 497-506
- [19] Hoang T C, Klaine S J. Influence of organism age on metal toxicity to *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 26(6): 1198-1204
- [20] Van der Hoeven N, Gerritsen A A M. Effects of chlorpyrifos on individuals and populations of *Daphnia pulex* in the laboratory and field [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 1997, 16: 2438-2447
- [21] Zhao Y, Newman M C. Effects of exposure duration and recovery time during pulsed exposures [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 25(5): 1298-1304
- [22] Hoang T C, Gallagher J S, Tomasso J R, et al. Toxicity of two pulsed metal exposures to *Daphnia magna*: Relative effects of pulsed duration-concentration and influence of interpulse period [J]. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 2007, 53(4): 579-589
- [23] Guillard R R L, Lorenzen C J. Yellow-green algae with chlorophyllide [J]. Journal of Phycology, 2010, 8(1): 10-14
- [24] Samel A, Ziegenfuss M, Goulden C E, et al. Culturing and bioassay testing of *Daphnia magna* using Elendt M4, Elendt M7, and COMBO media [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 43(1): 103-110
- [25] Wang N X, Liu Y Y, Wei Z B, et al. Waterborne and dietborne toxicity of inorganic arsenic to the freshwater zooplankton *Daphnia magna* [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(15): 8912-8919
- [26] 李妍丽, 柯林. As(Ⅲ)和 As(Ⅴ)对小球藻(*Chlorella* sp.)的生长影响研究[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(12): 61-64, 70
- Li Y L, Ke L. Toxicity of arsenic species on growth of green microalgae *Chlorella* sp. [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 35(12): 61-64, 70 (in Chinese)
- [27] Chowdhury U K, Rahman M M, Mandal B K, et al. Groundwater arsenic contamination and human suffering in West Bengal, India and Bangladesh [J]. Environmental Science, 2001, 8(5): 393-415
- [28] Das D, Chatterjee A, Mandal B K, et al. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people [J]. The Analyst, 1995, 120(3): 917-924
- [29] Borstpauwels G W, Peter J K, Jager S, et al. A study of the arsenate uptake by yeast cells compared with phosphate uptake [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1965, 94(1): 312-314
- [30] Squibb K S, Fowler B A. Toxicity of Arsenic and Its Compounds [M]// Fowler B A. Biological & Environmental Effects of Arsenic. Elsevier Science, 1983: 233-269
- [31] Suhendrayatna, Ohki A, Nakajima T, et al. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms II. Accumulation and transformation of arsenic compounds by *Tilapia mossambica* [J]. Chemosphere, 2002, 46(2): 325-331
- [32] 黄飞, 周昉, 姜舒扬, 等. 绿藻胞外聚合物对无机砷生物累积特征的影响[J]. 环境化学, 2019, 38(5): 1021-1027
- Huang F, Zhou F, Jiang S Y, et al. Effects of extracellular polymeric substances on the bioaccumulation of inorganic arsenic by green microalgae [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(5): 1021-1027 (in Chinese)
- [33] Tsui M T, Wang W X. Acute toxicity of mercury to *Daphnia magna* under different conditions [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(12): 4025-4030
- [34] Hoang T C, Klaine S J. Characterizing the toxicity of pulsed selenium exposure to *Daphnia magna* [J]. Chemosphere, 2008, 71: 429-438