

稀有鮡鲫亚慢性毒性试验

胡 炜 成水平 周永欣

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要 研究了一种快速评价有毒化学品对稀有鮡鲫慢性毒性的试验方法。选择 < 3d 龄的稀有鮡鲫幼鱼开始暴露, 试验药物为国际标准参比毒物 Cu^{+2} , Cr^{+6} , Zn^{+2} 和 PCP; 试验温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 每天更换试验液一次, 试验持续 5d。以现存量测试指标, Cu^{+2} , Cr^{+6} , Zn^{+2} 和 PCP 对稀有鮡鲫的无可观察效应浓度 [NOEC] 为 20, 2500, 100, 40 $\mu\text{g} / \text{L}$; 最低可观察效应浓度 [LOEC] 为 40, 5000, 200, 80 $\mu\text{g} / \text{L}$, 与 7d 亚慢性毒性试验结果相接近。试验结果表明, 稀有鮡鲫亚慢性毒性试验可从 7d 缩短为 5d。

关键词 稀有鮡鲫, 5d 亚慢性毒性, 重金属, PCP

探索如何缩短鱼类亚慢性毒性试验周期, 用较短时间的试验结果来预测有毒化学品和工业废水的慢性毒性一直是环境科学工作者十分关注的问题之一。周永欣等在 USEPA 规定的试验条件下进行了稀有鮡鲫 7d 亚慢性毒性试验^[1], 在试验中发现 USEPA 推荐的试验方法存在着一些问题, 并对这些问题进行了研究, 从而为进一步缩短鱼类亚慢性毒性试验周期奠定了基础。为此, 本文就如何进一步缩短鱼类亚慢性毒性试验周期进行了探索研究。

1 材料和方法

1.1 稀有鮡鲫幼鱼的混合营养期研究 稀有鮡鲫 (*Grobicypris rarus*.) 由本所提供, 随机挑选来自同一对亲鱼所产的刚孵出的幼鱼, 分为若干组, 每组 10 尾幼鱼, 分别以鸡蛋黄和 $\leq 24\text{h}$ 的卤虫 (*Artemia salina*) 为饲料, 每天上下午各投喂一次, 试验温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 然后分别于幼鱼孵出后 12h, 24h, 36h, 48h, 56h, 72h 及 4d, 5d 等时间吸出幼鱼, 以 30% 戊二醛固定, 于解剖镜下检查, 研究该温度条件下稀有鮡鲫幼鱼孵出后摄食的起始时间及其卵黄囊全部消失所需时间。此外, 为防止水质变坏, 每天换水并吸尽饲料残渣。

1.2 稀有鮡鲫 5d 亚慢性毒性试验 上述试验确定稀有鮡鲫幼鱼孵出后 2—3d 为其混合营养期, 因此, 以 < 3d 龄稀有鮡鲫幼鱼开始暴露。被试验化合物采用国际上常用的 Cu^{+2} , Cr^{+6} , Zn^{+2} 和 PCP 等标准参比毒物, 试验持续 5d, 试验方法及条件和数据处理依文献 [1] 进行。

本研究系淡水生态与生物技术重点实验室 (FEBL) 资助项目的部分研究内容, 并得到了王剑伟博士的大力帮助, 谨表谢意。

1997-03-03收到; 1998-01-07修回

2 结果

2.1 稀有鮕鲫幼鱼的混合营养期研究(表 1)

表1 不同时间稀有鮕鲫幼鱼开始摄食的百分率

Tab. 1 Percentage of *G. rarus* larvae beginning to feed at various time after hatched at 25±1℃

饲料 Foods	孵 出 时 间 hatched time					
	12h	24h	36h	48h	56h	72h
卤虫 Artemia	0	0	0	40	80	100
鸡蛋黄 Yolk	0	0	0	40	100	100

从表中可以看出,25±1℃下,稀有鮕鲫幼鱼 2d 龄(48h)时,方有 40% 的幼鱼开始摄食,而孵出 3d 后(72h),无论是以卤虫还是以鸡蛋黄为饲料稀有鮕鲫幼鱼均全部摄食,因此,稀有鮕鲫幼鱼孵出后 48h 有 40% 的个体进入混合营养期,而到 72h 则全部发育到混合营养期。此外,研究中还发现在继续投喂饲料的条件下,稀有鮕鲫幼鱼卵黄囊完全吸收,单纯依赖外源营养所需时间为孵出后 4—5d。

2.2 稀有鮕鲫 5d 亚慢性毒性试验

2.2.1 铜、铬 稀有鮕鲫幼鱼经铜与铬暴露 5d 时的累计死亡率、每尾干重及现存量列入表 2,3。

表2 稀有鮕鲫幼鱼经铜暴露5d时的死亡率、干重及现存量

Tab.2 Mortality, dry weight and standing crop of *G. Rarus* larvae after 5-d exposed to Copper

Cu ⁺² 浓度 (ug/L) Concentration	死亡率 (%) Mortality	每尾干重 (mg) Dry weight	现存量 (mg) Standing crop
对照Control	0	0.33±0.03	4.96±0.07
5	2.23±3.87	0.33±0.02	4.79±0.41
10	0	0.32±0.01	4.82±0.16
20	2.23±3.87	0.32±0.02	4.38±0.47
40	0	0.19±0.01*	2.89±0.09*
80	64.3±21.4*	—	0.44±0.35*

注: * 存在着显著性差异 (p<0.05); —: 未计算。

数据统计处理表明,80ug / L 浓度组的死亡率与对照组存在着显著性差异 (p < 0.05),而 40ug / L 及其以下浓度组的死亡率则与对照组均无显著性差异 (p > 0.05)。因此,由死亡率确定的对稀有鮕鲫的 NOEC 和 LOEC 分别为 40ug / L 和 80ug / L。而由平均每尾干重和现存量的分析表明,对照组与 20ug / L 浓度组无显著性差异,自 40ug / L 始则与对照组差异显著,因此,依生长和现存量求得的 Cu + 2 对稀有鮕鲫的 NOEC 和 LOEC 分别为 20ug / L 和 40ug / L。

由死亡率指标求得的铬对稀有鮕鲫的 NOEC 和 LOEC 分别为 20mg / L 和 40mg / L。2.5mg / L 浓度组与对照组的每尾干重和现存量都无显著性差异 (p > 0.05),而 5mg / L 及

表3 稀有鮎鲫幼鱼经铬暴露5d时的死亡率、每尾干重及现存量
Tab.3 Mortality, dry weight and standing crop of *G. rarus* larvae after 5d exposed to Chromium

Cr ⁺² 浓度 (mg/L)	死亡率 (%)	每尾干重 (mg)	现存量 (mg)
Concentration	Mortality	Dry weight	Standing crop
对照	6.67±11.5	0.30±0.01	4.16±0.48
2.5	4.47±3.87	0.30±0.02	4.35±0.04
5	2.23±3.87	0.24±0.02 [*]	3.49±0.03 [*]
10	4.47±3.87	0.11±0.02 [*]	1.54±0.25 [*]
20	6.67±6.65	0.06±0.05 [*]	0.87±0.13 [*]
40	95.57±6.27 [*]		
80	100 [*]		

注: * 存在着显著性差异 (p<0.05)

其以下浓度组则与对照组差异显著 (p < 0.05)。因此,由每尾干重和现存量确定的 Cr⁺²对稀有鮎鲫的 NOEC 和 LOEC 分别为 2.5mg / L 和 5mg / L。

2.2.2 锌 稀有鮎鲫幼鱼经锌暴露 5d 时,对照组与 100ug / L 浓度组的死亡率、每尾干重及现存量都无显著性差异 (p > 0.05),而 200ug / L 浓度组则与对照组存在显著差异 (p < 0.05),依据此三个指标求得的锌对稀有鮎鲫的 NOEC 和 LOEC 均分别为 100ug / L 和 200ug / L (表 4)。

表4 稀有鮎鲫幼鱼经锌暴露5d时的死亡率与生长数据
Tab.4 Mortality, dry weight and standing crop of *G. rarus* larvae after 5d exposed to Zinc

Zn ⁺² 浓度 (ug/L)	死亡率, %	每尾干重, mg	现存量, mg
Concentration	Mortality	Dry weight	Standing crop
对照	2.23±3.87	0.28±0.02	4.20±0.26
50	4.47±3.87	0.27±0.08	4.07±0.39
100	0	0.27±0.01	3.96±0.16
200	35.6±7.7 [*]	0.13±0.04 [*]	1.24±0.39 [*]
400	93.3±6.7 [*]		
800	100 [*]		

注: * 存在着显著性差异 (p<0.05)

表5 稀有鮎鲫幼鱼经五氯酚暴露5d时的死亡率、每尾干重及现存量
Tab.5 Mortality, dry weight and standing crop of *G. rarus* larvae after 5d exposed to PCP

PCP浓度 (ug/L)	死亡率 (%)	每尾干重 (mg)	现存量 (mg)
Concentration	Mortality	Dry weight	Standing crop
对照Control	2.23±3.86	0.34±0.02	4.79±0.25
20	4.47±3.87	0.35±0.01	5.03±0.20
40	0	0.31±0.02	4.72±0.31
80	6.67±6.65	0.27±0.01 [*]	3.82±0.28 [*]
160	8.9±3.8 [*]	0.23±0.04 [*]	2.81±0.32 [*]
320	86.7±6.65 [*]	0.09±0.05 [*]	0.19±0.17 [*]

注: * 存在着显著性差异 (p<0.05)

2.2.3 五氯酚(PCP) 由死亡率指标求得的 PCP 对稀有鮡鲫的 NOEC 和 LOEC 分别为 80ug / L 和 160ug / L。平均每尾干重, 40ug / L 浓度组与对照组都无显著性差异 ($p > 0.05$), 从 80ug / L 浓度组开始随着浓度的递增而减少, 而且与对照组差异显著 ($p < 0.05$), 现存量的情况亦如此。因此, 由生长和现存量确定的 PCP 对稀有鮡鲫的 NOEC 和 LOEC 分别为 40ug / L 和 80ug / L(表 5)。

3 讨论

3.1 Norberg 和 Mount 提出的黑头软口鲮 7d 亚慢性毒性试验因其试验结果与慢性试验结果吻合度好, 重复性高, 从而能迅速而又有效地预测有毒化学品和工业废水的慢性毒性, 经不同实验室验证后, 由 USEPA 加以正式推荐, 目前已成为试验周期最短的鱼类亚慢性毒性试验方法, 这一点已为众多学者所公认^[2-4]。然而, 混合营养期是鱼类早期发育最为敏感的生活阶段^[5], 一般而言, 幼鱼孵出后先依赖于内源营养, 经一段时间后才进入混合营养期。作者利用稀有鮡鲫的研究发现, 25℃ 时, 进入混合营养期的时间为幼鱼孵出后 2—3d(表 1), 因此, 选用已发育到混合营养期的幼鱼开始试验, 而不是从 < 1d 龄的尚处于自营养期的幼鱼开始暴露, 也许 5d 暴露时间就已足够, 这就是鱼类亚慢性毒性试验周期从 7d 缩短至 5d 的理论上的基础。Mount 等亦曾进行了黑头软口鲮 5d 亚慢性毒性试验, 以探索 5d 暴露的可行性, 遗憾的是, 也许正是因为他们仍然选择 < 1d 龄的幼鱼开始暴露, 而忽略了混合营养期的起始时间, 因而试验未达到预期目的。

3.2 在 USEPA 规定的试验条件下进行了稀有鮡鲫 7d 亚慢性毒性试验, 结果表明, 稀有鮡鲫是一种较好的亚慢性毒性试验材料。Cu⁺, Cr⁶⁺, Zn⁺ 和 PCP 对稀有鮡鲫的无可观察效应浓度 NOEC 为 10, 2500, 200, 和 80ug / L; 最低可观察效应浓度 LOEC 为 20, 5000, 400, 160ug / L。而采用新的 5d 暴露方式求得上述标准参比毒物的 NOEC 为 20, 2500, 100 和 40ug / L; LOEC 为 40, 5000, 200, 80ug / L(表 2—5)。5d 暴露与 7d 暴露结果相接近, 这就从试验上支持了这种猜想, 因而稀有鮡鲫亚慢性毒性试验可从 7d 缩短为 5d。

3.3 在研究中还发现, 稀有鮡鲫幼鱼从进入混合营养期到完全依赖外源营养所需时间为幼鱼孵出后 4—5d。作者认为有可能存在着亚慢性毒性试验时最敏感的起始效应时间与幼鱼混合营养期发育的同步性, 如果再次选择更适当的暴露起止时间, 稀有鮡鲫亚慢性毒性试验周期有可能进一步缩短, 从而为评价有毒化学品提供更快速有效的试验方法。这一研究思想, 正是本文作者们目前尚在深入探索研究的内容之一。

参 考 文 献

- [1] 周永欣, 成水平, 胡炜. 稀有鮡鲫(*Grobicypis rarus.*) 七天亚慢性毒性试验. 环境科学学报, 1995, 15(3): 375—380
- [2] Norberg T J, Mount D I. A new fathead minnow (*pimephales promelas*) subchronic toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 1985, 4(8): 711—718
- [3] Norberg-King, T J. An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimation chronic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 1989, 8(11): 1075—1089
- [4] DeGraeve G M, et al. Variability in the performance of the seven-day fathead minnow (*pimephales promelas*) larval survival and growth test: An intra- and interlaboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.*

1991, 10(9):1189—1203

- [5] Sprague J B. Current status of sublethal test of pollutants on aquatic organisms. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. 1976, 33(9):1988—1992

FIVE-DAY SUBCHRONIC TOXICITY TEST FOR *GROBIOCYPRIS RARUS*

Hu Wei, Cheng Shuiping and Zhou Yongxin

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract A rapid approach was described to estimate the chronic toxicity of toxicants to the *Grobiocypris rarus*. Tests were initiated using < 3d old *G. rarus* larvae and were run for 5d under static-renewal conditions at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The No Observable Effect Concentrations (NOEC) and Lowest Observable Effect Concentrations (LOEC) of Cu^{+2} , Cr^{+6} , Zn^{+2} and PCP were 20, 2500, 100, 40ug / L and 40, 5000, 200, 80ug / L, respectively, when standing crop was used as endpoint. Compared with 7d subchronic test using the same reference toxicants, the results agreed well, which indicate that short-term methods for estimating the chronic toxicity to freshwater fish may be shorten from 7d to 5d.

Key words *Grobiocypris rarus*, 5-d suchronic test, Heavy metals, PCP.