

有机砷添加剂对蛋白核小球藻及

大型蚤的急性毒性研究

王付民^{1,2}, 张璐³, 陈杖榴¹

(¹华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642; ²广东省野生动物救护中心,

广东广州 510520; ³华南农业大学林学院, 广东广州 510642)

摘要: 为评估有机砷添加剂对水环境的影响, 以蛋白核小球藻、大型蚤为研究对象, 研究了洛克沙砷、阿散酸对蛋白核小球藻和大型蚤的急性毒性。结果表明: 洛克沙砷、阿散酸对蛋白核小球藻的 24、48、72、96 h 的半数有效抑制浓度 (EC₅₀) 分别为: 190.55、263.03、346.74、389.05 mg·L⁻¹; 239.88、308.18、418.12、410.40 mg·L⁻¹ (以原型药物计); 均大于 100 mg·L⁻¹, 在水环境中为低毒级化合物 (急性化学物质以下)。对大型蚤 24 h—EC₅₀ 分别是 49.77、83.70 mg·L⁻¹; 48 h—EC₅₀ 分别是 39.00、57.48 mg·L⁻¹, 48 h—LC₅₀ 分别是 44.19、61.97 mg·L⁻¹ (均以原型药物计); 依据蚤类急性活动抑制毒性分级标准, 它们属于中毒级化合物。

关键词: 有机砷添加剂; 蛋白核小球藻; 大型蚤; 急性毒性

中图分类号: S859.79 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0103-04

Studies on Acute Toxicity of Organoarsenics to *Chlorella*

pyrenoidosa and *Daphnia magna*

WANG Fu-min^{1,2}, ZHANG Lu³, CHEN Zhang-liu¹

(¹ College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

² Guangdong Province Wildlife Rescue and Rehabilitation Center, Guangzhou 510600, China;

³ College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to evaluate impact of organoarsenics on aquatic system, the acute toxicity of organoarsenics to *Chlorella pyrenoidosa* and *Daphnia magna* was examined in this study. The 24, 48, 72, 96 h-EC₅₀ (effective concentration for 50% reduction in growth) of roxarsone and arsanilic acid to *C. pyrenoidosa* was 190.55, 263.03, 346.74, 389.05 mg·L⁻¹, and 239.88, 308.18, 418.12, 410.40 mg·L⁻¹ (present as archetypal compound), respectively, which were all more than 100 mg·L⁻¹, so the two organoarsenical compounds had low toxicity to *C. pyrenoidosa*. The 24 h-EC₅₀ of roxarsone and arsanilic acid to *D. magna* was 49.77, 83.70 mg·L⁻¹ (present as archetypal compound), respectively. The 48 h-LC₅₀ (lethal concentration for 50%) of the two compounds to *D. magna* was 44.19, 61.97 mg·L⁻¹ (present as archetypal compound), respectively, and that of the 48 h-EC₅₀ was 39.00, 57.48 mg·L⁻¹, respectively. According to toxicity standard to *D. magna*, the two compounds were median toxic to *D. magna*.

Key words: organoarsenics; *Chlorella pyrenoidosa*; *Daphnia magna*; acute toxicity

有机砷饲料添加剂洛克沙砷和阿散酸具有抗寄生虫病、促进动物生长、改善动物生产品质等多重作用, 在畜牧养殖业中被大量使用^[1]。因而, 大量的砷随动物的排泄物进入环境中。据报道这些含砷的排

收稿日期: 2006-10-20

作者简介: 王付民 (1977—), 男, 博士; 通讯作者: 陈杖榴 (1937—), 教授, E-mail: chenzt@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30130140)

泄物或以有机肥料进入农田,或直接排至鱼塘、河流,将对我们的生存环境产生重大影响^[2-3].目前,国内外已对有机胍饲料添加剂引起的水生生态毒性非常关注,但研究资料很少.藻类是水生生态系统的初级生产者,对生态环境的稳定和平衡起着非常重大的作用;水蚤属甲壳纲、鳃足亚纲的枝角类浮游生物,广泛分布于淡水中,是淡水生态系统中重要的一环.二者生长繁殖迅速,对毒物敏感,是研究水生生态毒理学的很好的测试生物^[4].本文以蛋白核小球藻、大型蚤为研究对象,研究洛克沙胍对这两种水生生物的毒性,旨在为评估有机胍添加剂对水环境的安全提供资料.

1 材料与方法

1.1 主要仪器

人工气候箱:HPG-350H型,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;紫外分光光度计:Lambda Bio40, Perkin Elmer公司;可调微量移液器等.

1.2 试验生物

蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa*、大型蚤 *Daphnia magna*:源自中国科学院武汉水生生物研究所.

1.3 药品及试剂

洛克沙胍原粉: $w = 96.3\%$ [$w(\text{砷}) = 28.5\%$],批号 004030;阿散酸原粉: $w = 99.1\%$ [$w(\text{砷}) = 34.5\%$],批号 004010;广州惠华动物保健品有限公司.藻类培养液见文献[5].大型蚤试验用水见文献[6].

1.4 试验生物的培养

蛋白核小球藻及大型蚤的培养按文献[5-6]方法.

1.5 预备试验

预备试验步骤见文献[5-6].

1.6 正式试验

1.6.1 蛋白核小球藻生物量的测定 通过在显微镜下用血球记数板进行藻细胞记数,以及在波长 650 nm 下测定藻液光密度,建立不同藻细胞含量和光密度之间的线性关系,试验中以测定的光密度和根据线性方程计算出的藻细胞含量表示生物量.

1.6.2 有机胍对蛋白核小球藻急性毒性试验 取6个200 mL的锥形瓶加入 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的藻液 50 mL,另外加入 50 mL 含有机胍药物的培养液,使其质量浓度分别为:0、50、100、200、300、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个质量浓度设3个平行,置于人工气候箱中培养,光照强度 4 000 lx,温度 $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,每天光照 12 h,定时振荡3次;在0、24、48、72、96 h时,吸取3 mL

的藻液,在紫外分光光度计上测 $D_{650 \text{ nm}}$ 值.

1.6.3 有机胍对大型蚤的急性毒性试验 取6个100 mL的小烧杯加入30 mL的标准试验用水,另加入30 mL含有机胍的标准试验用水,使其质量浓度分别为:10、20、40、80、160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个质量浓度设3个平行,在每个烧杯中加入幼蚤10个,在人工气候箱中培养,光照强度 4 000 lx,温度 $(25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,每天光照 12 h;在24、48 h后观察水蚤的活动情况,轻轻晃动烧杯,水蚤在15 s内不能游动作为受抑制的标志,记下受抑制的水蚤数;48 h后将蚤吸出,在显微镜下观察,以蚤类心跳停止,大触角和刚毛不弹动为死亡标志,记录死亡的水蚤数.

1.7 半数有效抑制浓度 (EC_{50}) 及半数致死浓度 (LC_{50}) 的计算方法

根据抑制率的机率单位和相应的质量浓度对数,用直线回归法得到质量浓度效应方程,计算出 EC_{50} 、 LC_{50} ^[5].

1.8 统计分析方法

采用统计分析软件 Statistica^[7] 进行回归分析.

2 结果与分析

2.1 有机胍对蛋白核小球藻及大型蚤的预试验

根据预备试验结果确定洛克沙胍、阿散酸对蛋白核小球藻及大型蚤正式试验的质量浓度系列分别为:50、100、200、300、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;10、20、40、80、160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2 有机胍对蛋白核小球藻急性毒性

2.2.1 蛋白核小球藻细胞含量与光密度的回归分析

在不同藻细胞含量下,通过计数得到的藻细胞含量 (y) 与 $D_{650 \text{ nm}}$ (x) 之间的线性关系良好,其回归方程为: $y = 60.815x - 0.617$ ($r^2 = 0.9903$; $P < 0.001$).

2.2.2 有机胍对蛋白核小球藻的 EC_{50}

图1和图2分别是洛克沙胍、阿散酸在蛋白核小球藻藻液中质

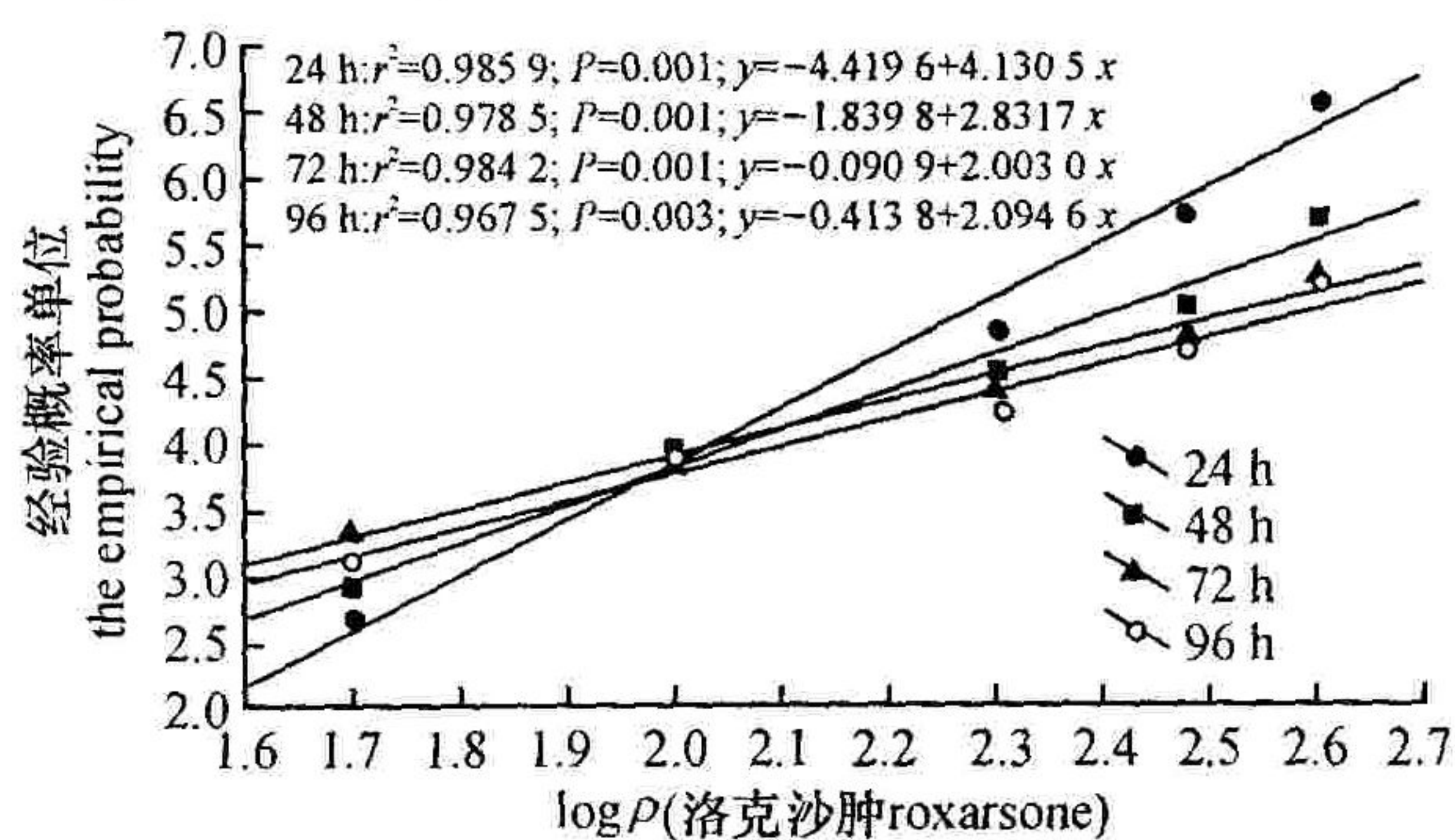


图1 洛克沙胍质量浓度的对数与经验概率单位的回归曲线 (蛋白核小球藻)

Fig. 1 Regression curves of the logarithm of the roxarsone concentration and the empirical probability (*C. pyrenoidosa*)

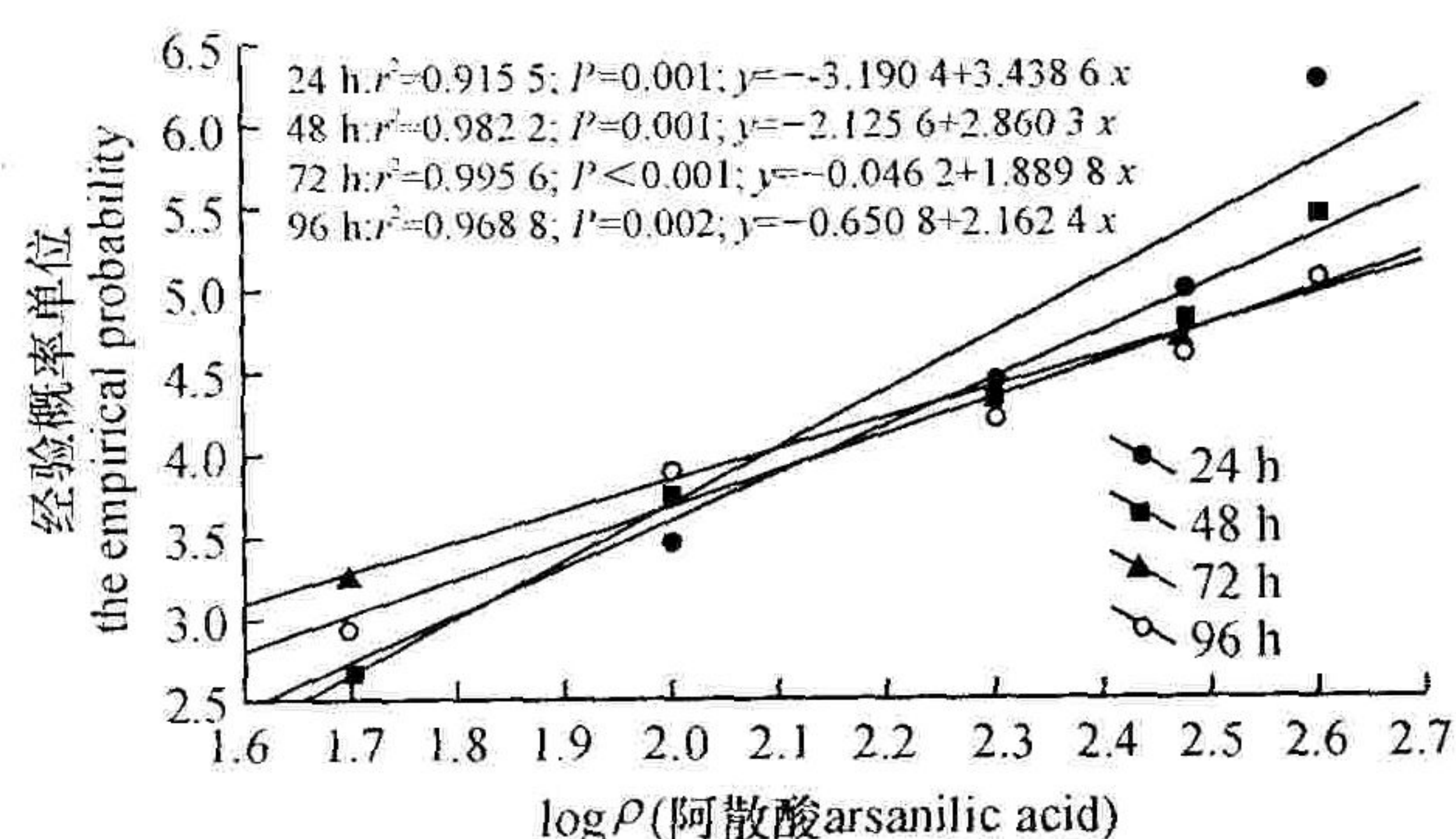


图2 阿散酸质量浓度的对数与经验概率单位的回归曲线 (蛋白核小球藻)

Fig.2 Regression curves of the logarithm of the arsanilic acid concentration and the empirical probability (*C. pyrenoidosa*)

量浓度的对数与经验概率单位的拟合回归曲线. 由24、48、72、96 h的各线性回归方程计算出 EC_{50} (概率单位为5时), 结果见表1. 由表1可以看出, 洛克沙肿、阿散酸对蛋白核小球藻的 EC_{50} 随着时间的延长而逐渐增加, 说明蛋白核小球藻对洛克沙肿、阿散酸的耐受性逐渐增大; 另外, 洛克沙肿在24、48、72、96 h对蛋白核小球藻的 EC_{50} 比阿散酸对蛋白核小球藻的 EC_{50} 要低一些, 说明洛克沙肿对蛋白核小球藻的毒性要比阿散酸大一些.

表1 洛克沙肿、阿散酸对蛋白核小球藻的 EC_{50}

Tab.1 The EC_{50} of roxarsone and arsanilic acid to *Chlorella pyrenoidosa*

t(处理 treatment) / h	$EC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$	
	洛克沙肿 roxarsone	阿散酸 arsanilic acid
24	190.55	239.88
48	263.03	308.18
72	346.74	418.12
96	389.05	410.40

2.3 有机砷对蚤的急性毒性

图3和图4分别是洛克沙肿、阿散酸对大型蚤抑制浓度的对数与经验概率单位的拟合回归曲线.

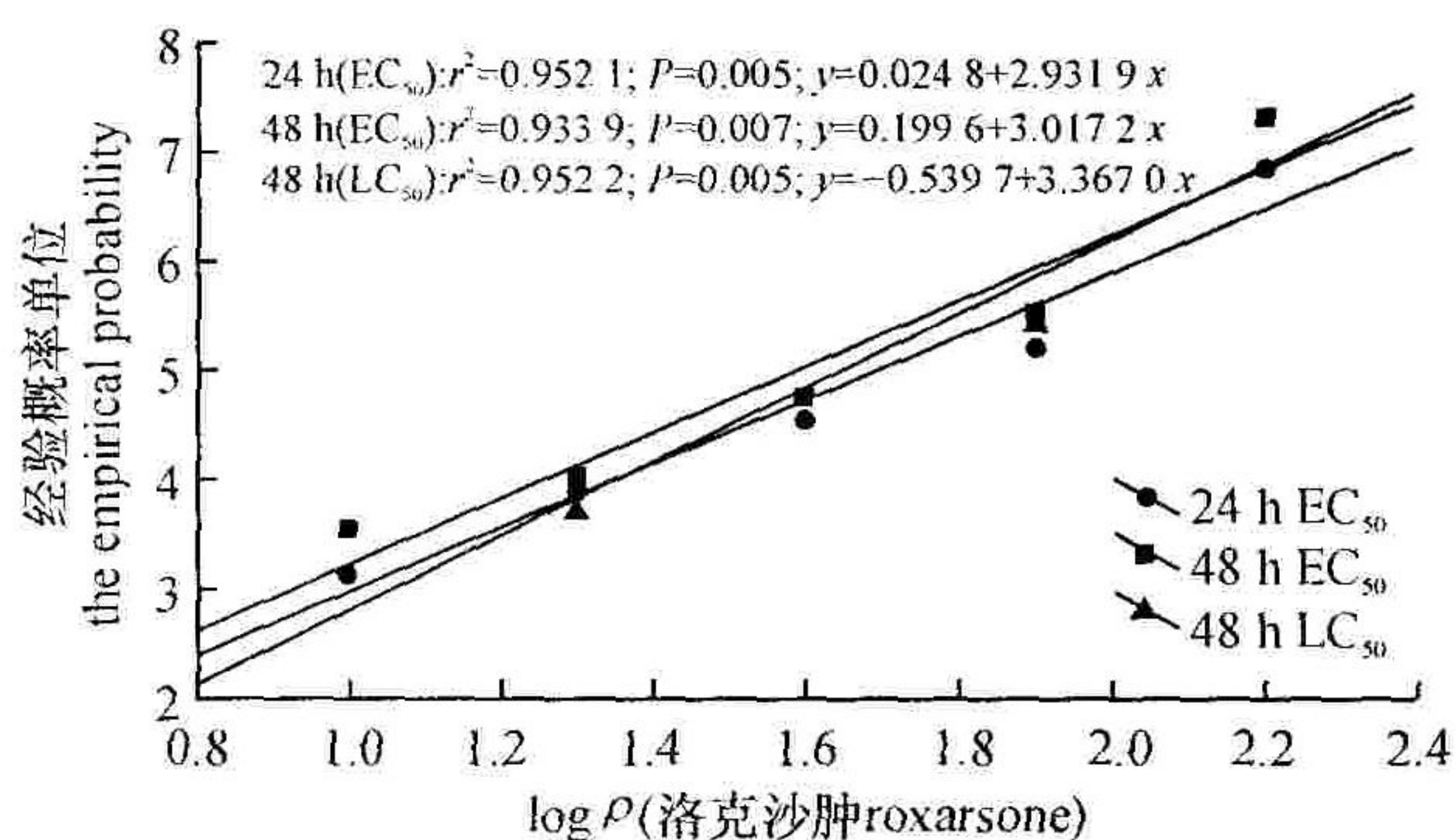


图3 洛克沙肿质量浓度的对数与经验概率单位的回归曲线 (大型蚤)

Fig.3 Regression curves of the logarithm of the roxarsone concentration and the empirical probability (*D. magna*)

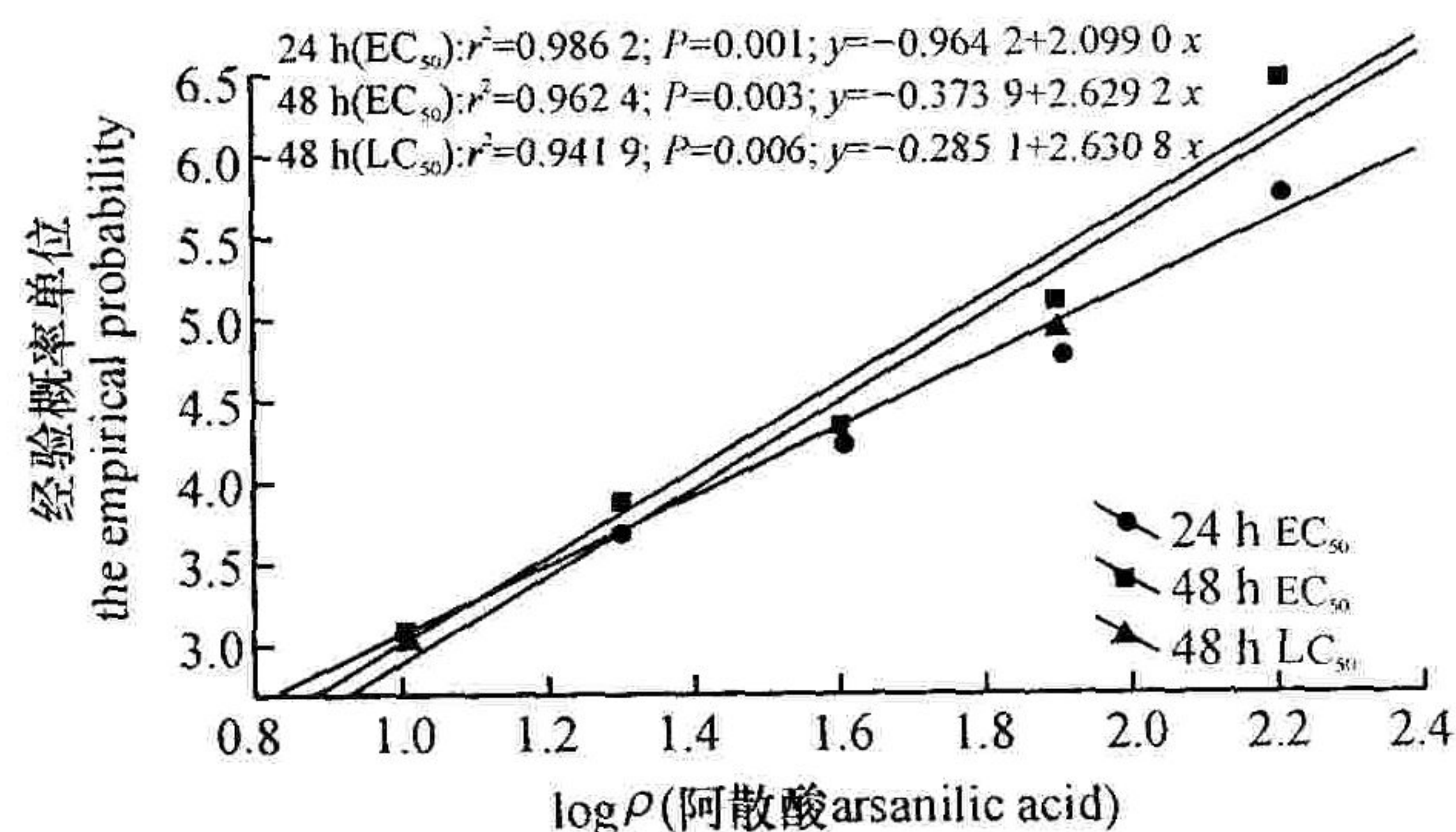


图4 阿散酸质量浓度的对数与经验概率单位的回归曲线 (大型蚤)

Fig.4 Regression curves of the logarithm of the arsanilic acid concentration and the empirical probability (*D. magna*)

由24、48 h的线性回归方程计算出 EC_{50} (概率单位为5时), 结果见表2. 由表2可以看出, 洛克沙肿、阿散酸对大型蚤48 h- EC_{50} 低于24 h- EC_{50} , 说明大型蚤随处理时间的延长其耐受性降低; 另外, 洛克沙肿在24、48 h对大型蚤的 EC_{50} 和 LC_{50} 值比阿散酸对大型蚤的 EC_{50} 和 LC_{50} 要低一些, 说明洛克沙肿对大型蚤的毒性要大一些.

表2 洛克沙肿、阿散酸对大型蚤的 EC_{50} 和 LC_{50}

Tab.2 The EC_{50} and LC_{50} of roxarsone and arsanilic acid to *D. magna*

药物 drug	$EC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$		$LC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$	
	24 h	48 h	24 h	48 h
洛克沙肿 roxarsone	49.77	39.00		44.19
阿散酸 arsanilic acid	83.70	57.48		61.97

3 讨论与结论

3.1 洛克沙肿、阿散酸对蛋白核小球藻及大型蚤的毒性

洛克沙肿、阿散酸对蛋白核小球藻的24、48、96 h- EC_{50} 均大于 $100 mg \cdot L^{-1}$; 根据 OECD^[8] 制订的一套水环境化学危害物分类标准, 这2种有机砷化合物在水环境中为低毒级化合物(急性Ⅲ化学物质以下). 另外, 根据农药对环境安全的评价指标, 即以农药对绿藻的96 h- EC_{50} 值的大小作为毒性分级参考标准^[9]: $EC_{50} > 3.0 mg \cdot L^{-1}$ 为低毒性, EC_{50} 介于 $0.3 \sim 3.0 mg \cdot L^{-1}$ 为中毒性, $EC_{50} < 0.3 mg \cdot L^{-1}$ 为高毒性, 则这2种有机砷化合物在水环境中也为低毒级化合物. 洛克沙肿、阿散酸对大型蚤的毒性要比对蛋白核小球藻强得多, 这2种有机砷化合物对大型蚤48 h- LC_{50} 分别是44.19、61.97 $mg \cdot L^{-1}$, 依据蚤类急

性活动抑制毒性分级标准,它们属于中毒性化合物.

3.2 有机砷进入水环境后的风险评估

洛克沙砷、阿散酸对蛋白核小球藻与大型蚤的急性毒性结果均表明,当水体中达到较高质量浓度时才能对蛋白核小球藻与大型蚤产生毒性;另外,孙永学等^[10]及曲薏薏等^[11]研究表明,洛克沙砷、阿散酸对鲫鱼的毒性也较小,其96 h-LC₅₀分别为176.57、520.75 mg·L⁻¹.然而,要在养殖场周边环境的水体(河流、池塘)中达到如此高的质量浓度显然不可能.但这并不意味着低质量浓度的洛克沙砷、阿散酸对水生态环境的稳定和平衡就不产生影响,这主要存在以下几方面因素:有研究表明,这些有机砷在环境中降解成毒性更高的其他的有机或无机砷化合物^[12-14],其可能对水生浮游生物及鱼类产生较大的毒性;水生浮游生物及鱼类对有机或无机化合物均有较强的富集能力^[15-16],这些原型或降解的砷化物可能在这些浮游生物体内大量富集,对水生态环境的稳定和平衡起到破坏作用,进而有可能通过水生食物链传递危害人类;低质量浓度的洛克沙砷、阿散酸有可能对水生浮游生物及鱼类产生慢性毒性作用.

3.3 结论

洛克沙砷、阿散酸对蛋白核小球藻的24、48、96 h-EC₅₀均大于100 mg·L⁻¹,在水环境中为低毒级化合物(急性Ⅲ化学物质以下);洛克沙砷、阿散酸对大型蚤的毒性要比对蛋白核小球藻强得多,这2种有机砷化合物对大型蚤48 h-LC₅₀分别是44.19、61.97 mg·L⁻¹,依据蚤类急性活动抑制毒性分级标准,它们属于中毒性化合物.

参考文献:

- [1] CHAPMAN H D, JOHNSON Z B. Use of antibiotics and roxarsone in broiler chickens in the USA: analysis for the years 1995 to 2000[J]. Poultry Science, 2002, 81: 356-364.
- [2] HAN F X, KINGERY W L, SELIM H M, et al. Arsenic solubility and distribution in poultry waste and long-term amended soil[J]. Science of the Total Environment, 2004, 320: 51-61.
- [3] SIMS J T, WOLF D C. Poultry waste management: agricultural and environmental issues[J]. Advances in Agronomy, 1994, 52: 1-83.
- [4] FERNANDEZ C A, FERRANDO M D, ANDREU-MOLINER E. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 1994, 27: 82-89.
- [5] 黄玉瑶. 内陆水域污染生态学:原理与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 106-119.
- [6] 国家环境保护局科技标准司. BG/T 13266-91. 水质物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [7] STATSOFT Inc. STATISTICA for Windows: Computer program manual[CP/DK]. Tulsa: Statsoft Inc, 1997.
- [8] PACYNA J M, SCHOLTZ M T. Harmonized integrated hazard classification system for human health and environmental effects of chemical substances[C]// FERRANDO M E. As endorsed by the 28th joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals in November. Paris: OECD, 1998: 64.
- [9] 王德铭. 水生生物监测手册[M]. 南京: 东南大学出版社, 1998: 57-60.
- [10] 孙永学, 陈杖榴, 陈展飞, 等. 洛克沙砷对鲫鱼暴露胁迫的毒性效应[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(3): 101-104.
- [11] 曲薏薏, 孙立伟, 厉以强, 等. 兽药添加剂阿散酸和土霉素的毒理学研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 240-242.
- [12] BEDNAR A J, GARBARINO J R, FERRER I, et al. Photodegradation of roxarsone in poultry litter leachates[J]. Sci Total Environ, 2003, 302: 237-245.
- [13] RUTHERFORD D W, BEDNAR A J, GARBARINO J R, et al. Environmental fate of roxarsone in poultry litter: part II: Mobility of arsenic in soils amended with poultry litter[J]. Environ Sci Technol, 2003, 37: 1515-1520.
- [14] BROWN B L, SLAUGHER A D, SCHREIBER M E. Controls on roxarsone transport in agricultural watersheds[J]. Appl Geochem, 2005, 20: 123-133.
- [15] SLEJKOVEC Z, BAJC Z, DOGANOC D Z. Arsenic speciation patterns in freshwater fish [J]. Talanta, 2004, 62: 931-936.
- [16] JARKKO A, JUSSI K. Biotransformation and bioconcentration of pyrene in daphnia magna: Aquatic toxicology[J]. Aquatic Toxicology, 2003, 64: 53-61.

【责任编辑 柴 焰】