

微囊藻毒素对褶皱臂尾轮虫的毒性效应和种群增长影响

陈艳¹, 王金秋², 王阳³, 俞顺章¹ (1.复旦大学公共卫生学院流行病学教研室, 上海 200032; 2.复旦大学生科院遗传学研究所, 上海 200433; 3.复旦大学环境科学与工程系, 上海 200433)

摘要: 研究了微囊藻毒素(MC-LR)对咸淡水褶皱臂尾轮虫的急性毒性效应.采用克隆培养法,通过编制生命表计算内禀增长率(r_m)、周限增长率(λ)、净生殖率(R_0)和世代时间(T),研究 MC-LR 的浓度在 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间对轮虫种群增长参数的影响.结果表明,MC-LR 的 24h LC₅₀ 为 124.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$;各实验组轮虫的存活率和繁殖率及种群增长参数均低于对照组,其中以 R_0 的改变最明显,对照组是实验组的 2.4~3.8 倍;实验组轮虫的雄体发生率是对照组的 2 倍以上.研究还显示了轮虫对 MC-LR 有较强的耐受能力;MC-LR 能降低轮虫的生命周期、繁殖和种群增长率;MC-LR 能诱导轮虫雄性个体的发生.

关键词: 微囊藻毒素; 轮虫; 褶皱臂尾轮虫; LC₅₀; 种群增长参数

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2002)03-0198-04

Toxicity and population growth effects of microcystin on the rotifer *Brachionus plicatilis*. CHEN Yan¹, WANG Jin-qiu², WANG Yang³, YU Shun-zhang¹ (1. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China). *China Environmental Science*. 2002,22(3): 198~201

Abstract: The acute toxicity of microcystin(MC-LR) on the rotifer *Brachionus plicatilis* in salt and fresh water were studied. Using clonal culture and through compilation of life tables to calculate intrinsic increase rates (r_m), finite increase rates(λ), net reproductive rates (R_0) and generation times(T), the effects of MC-LR in its concentration of 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the rotifer population growth parameter were studied. Results showed the 24h LC₅₀ value for MC-LR was 124.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Survival and reproductive rates and population growth parameter of rotifer at each test group was lower than the control group, while R_0 changed most distinctly, with its values ranged from 2.4 to 3.8 times lower at test groups as compared to the control group. Male rotifer occurrence rate of test groups was over 2 times larger than that of the control group. These results indicated that: Rotifer showed rather strong tolerant capacity toward MC-LR; MC-LR could decrease lifespan, fecundity and population growth rates of the rotifer; and MC-LR could lead to the occurrence of male rotifer.

Key words: microcystin; rotifer; *Brachionus plicatilis*; LC₅₀; population growth parameter

随着水体富营养化的加剧,蓝藻成为大多数淡水生态系统的浮游植物优势种群,其产生的内源性毒素与哺乳动物、鱼类、鸟类和无脊椎动物等的中毒死亡有关^[1,2].在已有关于蓝藻及其毒素的描述中,微囊藻水华及其产生的微囊藻毒素(Microcystin, MC)对水体环境和人类健康的潜在危害备受关注.国内研究人员在其产毒株的生长及其基因序列测定方面作了不少前沿工作^[3,4].MC 是一组环七肽肝毒素,目前已知的异构体有 60 余个,以 MC-LR 较为常见^[5].已有不少 MC 对鱼类和枝角类等水生动物的毒理学研究^[1,6,7],而

轮虫作为浮游动物的重要成员,相关的研究资料仍比较缺乏.

本研究以咸淡水褶皱臂尾轮虫为对象,研究 MC-LR 的急性毒性效应,计算半致死浓度(LC₅₀);同时编制生命表,研究不同浓度的 MC-LR 对种群增长参数的影响,该项研究目前国内外尚未见报道.

收稿日期: 2001-09-17

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39730380); 复旦大学 Med-X 基金资助项目(EXF201307)

1 材料与方法

1.1 轮虫

实验用的褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*,简称轮虫)来自上海水产大学,实验室连续培养。

1.2 饵料

选用海水微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)作为轮虫的饵料。藻种购于中国科学院水生生物研究所,实验条件下培养至指数增长期,经离心浓缩后至4℃冰箱中冷藏待用。采用F/2培养液,24h光照,光照强度为1000~1200lx,培养温度为25~30℃。

1.3 轮虫的预培养

海水微绿球藻的投喂密度为 $10\times10^6\text{cells/mL}$ 。400mL的烧杯为培养容器,培养液体积200mL。轮虫接种密度为2个/mL;光照强度1000~1200lx;控制温度25℃,预培养48h。取活泼健壮带孤雌生殖卵的雌体置入另外同样条件的烧杯中培养,观察卵的孵出情况,取2h内孵出的幼体作为以下实验材料。

1.4 微囊藻粗毒素

微囊藻粗毒素MC-LR由中国科学院水生生物研究所宋立荣博士提供,毒素纯度为12% (文中的浓度值均已转换为理论上的纯毒素含量)。毒素用20%消毒海水配成储存液,临用时按所需浓度稀释。

1.5 急性毒性实验

将MC-LR配置成50,80,120,160和200μg/mL的5个浓度组,每组设置3个平行组。每组10个轮虫,对照组仅添加饵料。分别置于盛有500μL毒素溶液的24孔培养板中,25℃下无光照培养24h,实验终止时用解剖镜观察轮虫的存活情况。轮虫纤毛和体内运动停止判定为死亡。采用概率单位法计算半致死浓度LC₅₀及其95%置信限。

1.6 生命表的编制方法

将MC-LR配置成0,1,2,5,10和20μg/mL 6个浓度组,饵料添加密度为 $12\times10^6\text{cells/mL}$ 。采用克隆培养法,将单个轮虫分别放入盛有1mL海水微绿球藻的24孔培养板中,每组实验轮虫9~12

个;每间隔24h更换1次培养液,同时计数并分离出轮虫幼体,直至轮虫全部自然死亡。

1.7 研究参数及其定义

通过公式(1)~(4)计算各种群增长参数的近似值。

$$R_0 = \sum l_x m_x \quad (1)$$

$$T = \sum x l_x m_x / \sum l_x m_x \quad (2)$$

$$r_m = \ln R_0 / T \quad (3)$$

$$\lambda = e^{r_m} \quad (4)$$

式中: l_x (特定年龄存活率)为x年龄组开始时存活个体的百分数; m_x (特定年龄繁殖率)为x年龄组平均每个个体产雌数; r_m (内禀增长率)为某种群在特定实验条件下的最大增长率; λ (周限增长率)为一段时间内的种群增长倍数; R_0 (净生殖率)为个体一生中所产雌性后代的数量; T (世代时间)为亲代出生到子代出生所经历的时间。

2 结果

2.1 急性毒性实验

轮虫在50,80,120,160和200μg/mL MC-LR溶液中24h死亡率分别为0.6.7%,36.7%,86.7%和100%。MC-LR对褶皱臂尾轮虫的24h LC₅₀为124.87μg/mL,其95%置信限为114.88~134.41μg/mL。

2.2 轮虫的特定年龄存活率和繁殖率

不同浓度MC-LR条件下轮虫的存活率和繁殖率见图1。对照组轮虫的存活率在5d内都保持在1.0左右,之后缓慢下降,而各实验组存活率均较对照组低,且下降幅度大。对照组的繁殖高峰维持时间较长,其峰值接近2.0,各实验组繁殖率高峰在1.0~1.7之间。

2.3 轮虫的种群增长参数

MC-LR不同浓度时轮虫种群的 r_m 、 λ 、 R_0 和 T 的计算结果见表1。从表1中可知,MC-LR浓度在1~20μg/mL时均对轮虫的增长参数有影响,各参数数值均小于对照组。以 R_0 的改变最明显,对照组是实验组的2.4~3.8倍。

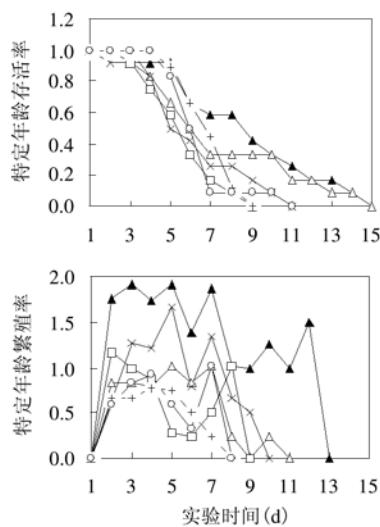


图 1 不同浓度 MC-LR 下轮虫的特定年龄存活率和繁殖率

Fig.1 Age-specific survival rate and age-specific reproductive rate of population of *Brachionus plicatilis* under different concentrations of MC-LR

—▲— 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ —△— 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ —×— 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ —□— 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
—+— 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ —○— 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

表 1 不同浓度 MC-LR 下轮虫的种群增长参数

Table 1 Parameter of population growth of *Brachionus plicatilis* in different concentrations of MC-LR

MC-LR ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样本数	r_m (d^{-1})	λ (d^{-1})	R_0 (ind)	T (d)
0	12	0.4620	1.5874	10.7500	5.1395
1	12	0.3241	1.3827	3.9167	4.2128
2	12	0.3516	1.4213	4.5000	4.2778
5	12	0.3456	1.4129	3.1667	3.2632
10	9	0.3003	1.3502	3.2222	3.8966
20	12	0.2585	1.2949	2.8333	4.0294

2.4 后代中雄体的发生率

实验组轮虫后代中的雄体发生率是对照组的 2 倍以上,但是在 1~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 毒素添加量范围内,各组雄体发生率无明显变化。

3 讨论

3.1 轮虫对 MC-LR 的耐受能力

MC-LR 对多种动物均有致死作用。小鼠和

大鼠各种途径暴露于 MC-LR 的 LD₅₀ 范围在 36~122 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间^[5]。鱼类对 MC-LR 的敏感性比哺乳动物低。文献报道草鱼、白鲢和罗非鱼 MC-LR 纯毒素腹腔注射的 LD₅₀ 分别为 110、350 和 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6]。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)MC-LR 纯毒素腹腔注射的 26h LD₅₀ 在 400~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间^[7]。MC-LR 纯毒素对枝角类浮游动物多蚤溞(*Daphnia pulicaria*)、透明溞(*Daphnia hyalina*)、蚤状溞(*Daphnia pulex*)和 *Daphnia birgei* 的 48h LC₅₀ 分别为 21.4、11.6、9.6 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[8]。本研究中 MC-LR 粗毒素对轮虫的 24h LC₅₀ 为 124.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 表明其毒素耐受能力较强。

3.2 实验温度和饵料的选择

实验温度在有毒蓝藻对轮虫的毒性研究中起重要的作用^[9]。有研究发现,在低温(12~14°C)、中温(19°C)和高温(25~26°C)下长期培养的轮虫对有毒蓝藻及其毒素的易感性随温度上升有显著增高,低温培养的轮虫其周限增长率比高温条件下的高 1.5~2 倍,表明水温的季节性变化,气候变暖可能促进有毒蓝藻对轮虫的不利影响。本实验温度选择 25°C 是因为自然界水华通常在气候温暖的季节发生。

饵料密度对实验结果可能有影响。有研究表明,产毒水华束丝藻能明显降低低密度饵料培养下轮虫的生命周期和繁殖能力^[10]。本研究是采用微绿球藻为饵料,实验选用轮虫最适生长饵料密度 12×10⁶ cells/mL。

3.3 毒素的选择

虽然已有不少有毒蓝藻对轮虫的生态毒理学研究报道,但是目前国内外尚无直接以肝毒性的微囊藻毒素为材料研究对轮虫种群增长参数的影响。产生神经生物碱毒素—变性毒素 a (anatoxin-a)的水华束丝藻能抑制萼花臂尾轮虫的繁殖,0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 藻干重即出现抑制作用。虽然轮虫对溶解的毒素不敏感,但由于能够有效摄入丝状物,萼花臂尾轮虫可能是对蓝藻较为易感的动物^[11]。有毒蓝藻能降低轮虫的生命周期、繁殖和种群增长率,本研究结果与之一致^[10]。本研究

中不同浓度的 MC-LR 均可使轮虫的种群增长参数降低,其中 R_0 是一个比较敏感的指标,当 MC-LR 浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 即出现该指标的明显变化。

3.4 轮虫生殖方式的转变

一般认为当环境条件恶化时,轮虫由孤雌生殖雌体产生两性生殖雌体进而产生雄体转向两性生殖。本研究结果显示,毒素浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 时雄体发生率即出现增高,这表明 MC-LR 是轮虫生殖方式转变的有效诱导因子,但雄体发生率并不随着毒素浓度的上升而增高。

4 结论

微囊藻毒素(MC-LR)对咸淡水褶皱臂尾轮虫的急性毒性和种群增长试验结果表明,MC-LR 对轮虫 24h 的 LC_{50} 为 $124.87\mu\text{g}/\text{mL}$, 轮虫对 MC-LR 有较强的耐受能力,MC-LR 能降低轮虫的生命周期、繁殖和种群增长率,并且 MC-LR 能诱导轮虫雄性个体的发生。

参考文献:

- [1] Penalosa R, Rojas M, Villa I, et al. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis* sp. to zooplankton and fish [J]. Freshwater Biol., 1990, 24:233~240.
- [2] Falconer I R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria [J]. Environ. Toxicol. Water Qual. Int J., 1991, 6:177~184.
- [3] 雷腊梅,宋立荣,刘永定.铜锈微囊藻两种表型的生长生理特性及毒素组成比较分析 [J]. 水生生物学报,2001,25(3):205~209.
- [4] 陈月琴,何家莞,庄 历,等.二种淡水微囊藻 rDNA16S-23S 基因间隔区的序列测定与分析 [J]. 水生生物学报,1999,23(1):41~46.
- [5] Dawson R M. The toxicology of microcystins [J]. Toxicol., 1998, 36: 953~962.
- [6] 何家莞,何振荣,郭琼林.有毒铜绿微囊藻对鱼和溞的毒性 [J]. 湖泊科学,1997,9(1):49~55.
- [7] Kotak B G, Semalulu S, Fritz D L, et al. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Toxicol., 1996,34: 517~525.
- [8] DeMott W R, Zhang Q X, Carmichael W W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia* [J]. Limnol Oceanogr, 1991, 36:1346~1357.
- [9] Gilbert J J. Effect of temperature on the response of planktonic rotifers to a toxic cyanobacterium [J]. Ecology, 1996,74:1174~1180.
- [10] Gilbert J J. Effect of food availability on the response of planktonic rotifers to a toxic strain of the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* [J]. Limnol Oceanogr, 1996,41: 1565~1572.
- [11] Gilbert J J. Susceptibility of planktonic rotifers to a toxic strain of *Anabaena flos-aquae* [J]. Limnol Oceanogr, 1994, 39(6):1286~1297.

作者简介: 陈 艳(1972-),女,江西南昌人,复旦大学公共卫生学院流行病学教研室在读博士生,主要从事蓝藻毒素生物富集与人群健康效应研究工作,发表论文 3 篇。