

水生生态毒理学实验

宋志慧 编



化学工业出版社

据突环阻的酸水时，虫体皱缩，膨胀，将卵，中体突等照准志至至木下解介并本
据突环阻的酸水时，虫体皱缩，膨胀，将卵，中体突等照准志至至木下解介并本
据突环阻的酸水时，虫体皱缩，膨胀，将卵，中体突等照准志至至木下解介并本
据突环阻的酸水时，虫体皱缩，膨胀，将卵，中体突等照准志至至木下解介并本

水生生态毒理学实验

宋志慧 编



化学工业出版社

北京

本书介绍了水生生态毒理学实验中,浮萍、颤蚓、摇蚊幼虫、淡水螺的应用和实验方法,介绍了这些物种的生物学特点及在实验室进行培养的方法以及各物种的毒性实验方法,包括各种生理生化指标的测定。最后介绍了一些水生微宇宙的建立及实验方法。

本书适于科研机构相关实验人员使用,也可供大专院校的环境科学专业的教师、实验室技术人员、学生阅读参考并可用于教材。

图书在版编目(CIP)数据

水生生态毒理学实验/宋志慧编. —北京:化学工业出版社, 2008.6

ISBN 978-7-122-02971-3

I. 水… II. 宋… III. 水环境-环境毒理学-实验
IV. R994.6-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第074969号

责任编辑:满悦芝
责任校对:徐贞珍

文字编辑:朱 恺
装帧设计:王晓宇

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:北京云浩印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张5¼ 字数90千字 2008年8月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:18.00元

版权所有 违者必究

前 言

水生生态毒理学是环境生物学中的一个重要分支。对水生生态毒理学的研究，离不开对实验生物的选择与培养。本书是编者进行多年水生生态毒理学研究中对所选择的实验生物（浮萍、颤蚓、摇蚊幼虫及淡水螺类）进行实验方法的总结。

本书分为五章。第一章，介绍了浮萍的生物学习性及在生态毒理学中的应用进展。第二章介绍了颤蚓的分类及生物学习性，介绍了颤蚓的培养和样品的制作，描述了颤蚓的一般毒性实验方法，重点介绍了颤蚓的底质回避实验方法。第三章介绍了摇蚊的生物学习性及相关研究，介绍了摇蚊幼虫的培养方法，着重介绍了摇蚊幼虫口器致畸实验方法。第四章介绍了淡水螺的分类、生物学习性、胚胎发育过程及相关研究，介绍了螺的胚胎毒性实验方法、螺的生命周期实验方法，并特别介绍了螺的回避实验方法。第五章简要介绍了水生微宇宙的实验设计与研究方法。

通过对不同水生生物进行各具特点的实验方法介绍，希望能够起到抛砖引玉的作用。

本书在编写过程中，学生刘培、刘歌、闫宾萍、吴兵、贾丽、吴晓云等人进行了资料收集与整理。

本书得到了青岛科技大学教材立项的资助。

限于编者的水平，书中疏漏难免，恳请读者予以批评指正。

编者

2008年5月

第一章 浮萍的生物学特性及生态毒理学应用	20
一、浮萍的生物学特性	20
二、浮萍的生态毒理学应用	21
第二章 颤蚓的分类及生物学特性	21
一、颤蚓的分类	21
二、颤蚓的生物学特性	22
三、颤蚓的生态毒理学应用	22
第三章 摇蚊的生物学特性及生态毒理学应用	22
一、摇蚊的生物学特性	22
二、摇蚊的生态毒理学应用	23
第四章 淡水螺的分类及生物学特性	23
一、淡水螺的分类	23
二、淡水螺的生物学特性	25
第五章 水生微宇宙的实验设计与研究方法	25
一、水生微宇宙的概念	25
二、水生微宇宙的实验设计	27

目 录

参考文献	70
第一章 浮萍的生态毒理学实验	1
第一节 浮萍的生物学概述	1
一、青萍	1
二、紫萍	1
三、品萍	2
第二节 浮萍的采集与培养	2
一、浮萍的采集	2
二、浮萍的实验室培养	3
第三节 浮萍在环境生物毒理学中的应用	4
一、有机物对浮萍植物的毒性	4
二、重金属对浮萍的毒性作用	5
三、浮萍作为环境监测生物的研究	7
四、浮萍的其他应用	8
第四节 浮萍的生态毒理学实验方法	8
一、生长抑制毒性实验	8
二、生理生化指标的检测	10
第二章 颤蚓的生态毒理学实验方法	20
第一节 颤蚓的物种分类及其生物习性	20
一、生态与分布	20
二、外部形态	21
三、运动及结构	21
四、取食与营养	22
五、呼吸	22
六、神经与感官	22
七、颤蚓的繁殖	23
八、寡毛纲的分类	25
第二节 颤蚓的采集与培养	27

一、颤蚓的采集	27
二、颤蚓的培养	29
三、颤蚓的固定	29
四、颤蚓样品的制作	30
第三节 颤蚓的生态毒理学实验方法	31
一、颤蚓急性毒性实验	31
二、泥沙的回避的实验方法	31
第三章 摇蚊幼虫的毒理学实验方法	34
第一节 摇蚊幼虫的生物习性	34
一、摇蚊幼虫的分类	34
二、摇蚊幼虫的生态习性	36
三、摇蚊幼虫的发育	37
四、摇蚊幼虫的培养	37
五、摇蚊的相关研究	38
第二节 摇蚊幼虫的毒性实验方法	48
一、一般毒性实验方法	48
二、四龄幼虫口器的致畸作用	48
第四章 淡水螺的毒理学实验	52
第一节 淡水螺的生物习性	52
一、螺的分类	52
二、生态习性	54
三、螺的胚胎发育	55
四、螺的采集与培养	58
五、螺的固定、保存与制片	60
第二节 淡水螺的毒理学实验方法	60
一、一般毒性实验方法	60
二、污染物对胚胎发育的毒性实验	61
三、幼螺的毒性实验	64
四、螺的回避反应实验	64
第五章 水生微宇宙法	66
一、池塘微宇宙	66

二、池塘中宇宙	67
三、模型水陆生态系统	68
参考文献	70

第一章 浮萍科生态学初步

第一节 浮萍的生物学概述

浮萍科植物是种子植物，属于被子植物。浮萍目，浮萍科，浮萍属，广泛分布在世界各地；我国各地池塘、湖泊内常见，我国主要的浮萍种类有青萍 (*Lemna minor* L.)、浮萍 (*Lemna rotundifolia* L.) 和蕹萍 (*Spirodela polyrrhiza* L.)。

青萍 (*Lemna minor* L.) 浮萍科植物。根1条，长1-2cm，叶扁，卵形或椭圆形，长0.5-1cm，宽0.2-0.3cm，叶面光滑，叶背有气孔，具平行的3脉纹。花单性，雌雄同株，雄花位于叶背，雌花位于叶面。果实球形，直径约1mm，具3棱，棱上具刺。果实成熟后，果实与叶柄分离，果实沉入水中，果实沉入水中后，果实吸水膨胀，果实沉入水中后，果实吸水膨胀，果实沉入水中后，果实吸水膨胀。

我国南北各省均有分布，主要分布于池塘、湖泊、沼泽地区。在池塘、湖泊或静水中，青萍生长茂盛，有时可形成一层，影响水质，也可作家畜饲料和肥料。

二、蕹萍

蕹萍 (*Spirodela polyrrhiza* L.)，细小草本。根1条，长1-2cm，叶扁，卵形或椭圆形，长1-1.5cm，宽0.5-0.7cm，叶面光滑，叶背有气孔，具平行的3脉纹。花单性，雌雄同株，雄花位于叶背，雌花位于叶面。果实球形，直径约1mm，具3棱，棱上具刺。果实成熟后，果实与叶柄分离，果实沉入水中，果实沉入水中后，果实吸水膨胀，果实沉入水中后，果实吸水膨胀，果实沉入水中后，果实吸水膨胀。



图1-1 青萍

第一章 浮萍的生态毒理学实验

第一节 浮萍的生物学概述

浮萍科植物是种子植物，属单子叶植物纲，天南星目，浮萍科，浮萍属，广泛分布于世界各地；我国各地池塘、湖泊内常见。我国主要的浮萍种类有青萍 (*Lemna minor* L.)，品萍 (*Lemna trisulca* L.) 和紫萍 (*Spirodela polyrhiza* L.)。

一、青萍

青萍 (*Lemna minor* L.)，浮水小草本 (见图 1-1)。根 1 条、长 3~4cm，纤细，根鞘无附属物，根冠钝圆或截切状。叶状体对称，倒卵形、椭圆形或近圆形，长 1.5~6mm，两面平滑，绿色，不透明，具不显明的 3 脉纹。花单性，雌雄同株，生于叶状体边缘开裂处，佛焰苞囊状，内有雌花 1 朵，雄花 2 朵；雄花花药 2 室，花丝纤细；雌花具 1 雌蕊，子房 1 室，胚珠单生。果实圆形近陀螺状，无翅或具窄翅。种子 1 粒，具凸起的胚孔和不规则的凸脉 12~15 条。

我国南北各省区均有；分布几遍全世界温暖地区。生池沼、湖泊或静水中。全草供药用，有发汗、利水、消肿之效；也可作家禽饲料和稻绿肥。

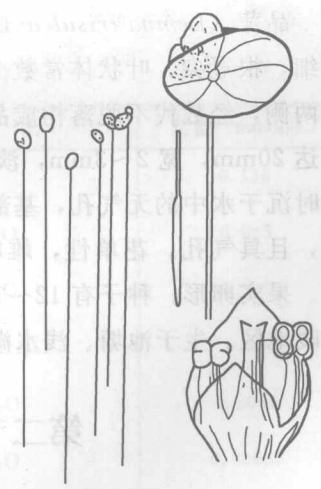


图 1-1 青萍

二、紫萍

紫萍 (*Spirodela polyrhiza* L.)，细小草本 (见图 1-2)，飘浮水面；根 5~11 条束生，纤维状，在根的着生处一侧产新芽，新芽与母体分离之前由一细弱的柄相连结。叶状体扁平，倒卵状圆形，长 4~10mm，1 个或 2~5 个簇生，上面稍向内凹，深绿色，下面呈紫色，具掌状脉 5~11 条。花单性，雌雄同株，生于叶状体边缘的缺

刻内，佛焰苞呈袋状，内有1雌花及2雄花；雄花：花药2室，花丝纤细；雌花：子房1室，具2直立胚珠，花柱短。果实圆形，边缘有翅。

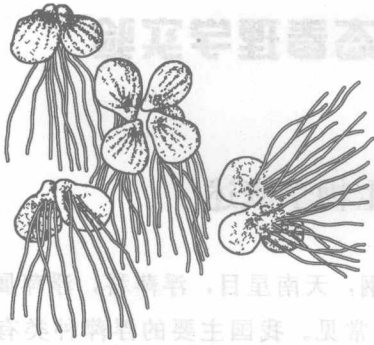


图 1-2 紫萍

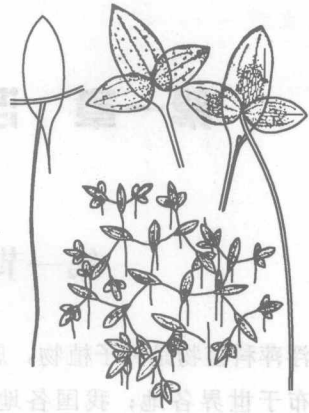


图 1-3 品萍

我国南北各省区均有；南北两半球热带及温暖地区广布。生于池沼、湖泊或静水中，为常见的浮水植物。全草供药用，为发汗、行水、祛风、散湿药；也是良好的猪、鸭饲料和稻田肥料。

三、品萍

品萍 (*Lemna trisulca* L.)，多年生沉水或浮水草本 (见图 1-3)。根一条，纤细，根冠尖。叶状体常数个相连成簇或连珠状，细嫩的叶状体常生在老状体的两侧，经数代不脱落构成品字形；叶状体椭圆形至卵状披针形，长 3~7mm，可达 20mm，宽 2~3mm，淡绿色，半透明，全缘或向上部有不整齐的锯齿，越冬时沉于水中的无气孔，基部狭长成细柄，稍具 3 条显明的纹脉，开花时浮于水面，且具气孔。花单性，雌雄同株，着生在叶状体的开裂处；花丝细，花药 2 室。果实卵形；种子有 12~15 条凸起的脉纹。广布于我国南北各省区及世界上温暖地区。生于池塘、浅水湖泊和泉水中。

第二节 浮萍的采集与培养

一、浮萍的采集

在北方，浮萍一般 4 月中旬出现在清洁的静水和湖泊中，并随着温度的升高逐渐生长扩大，在夏季，许多水体表面都覆盖一层浮萍。采集浮萍时，尽量选取清洁的水体，这样的浮萍受到的污染比较少，在实验室培养时，可以生长得更加

健康。

在4月份采集到的浮萍的品种主要是青萍和紫萍。由于4月份浮萍刚刚开始生长,植株体比较小,要在实验室培养一段时间,才能区分开青萍和紫萍。从形态上区分青萍和紫萍是非常容易的,紫萍叶片的大小是青萍的7、8倍,并且一株紫萍有多条根,而一株青萍只有一条根,紫萍的背部有明显的紫色,而青萍没有。

二、浮萍的实验室培养

在实验室中培养浮萍,需要配制相应的培养液,主要的种类有1/2 Hongland 和 Hunter 培养液,这两种培养液的配方见表1-1和表1-2。

表1-1 Hongland 培养液配方 (100mL)

药 品	用量/g	药 品	用量/g
KNO ₃	15.165	FeSO ₄ ①	0.5
CaCl ₂	11.099	EDTA①	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12.3235	土壤浸出液	一份菜园土加两份水(质量比),搅匀后煮沸10min,静置1天,取上清液即成
KH ₂ PO ₄	3.4323		

① EDTA 加热溶解完全后,冷却到室温后,用此溶液将硫酸亚铁溶解,定容为500mL。

取储备液各2mL,用蒸馏水定容到1000mL,即为1/2Hongland 培养液。

表1-2 Hunter 培养液的配方

药 品	用量/(mmol/L)	药 品	用量/(mmol/L)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.75	H ₃ BO ₃	0.115
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.045
NH ₄ NO ₃	1.25	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.115
K ₂ HPO ₄	1.15	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.045	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0016
EDTA	0.85	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.00035
KOH	1.8		

培养条件是光照强度在2000 lx左右,温度在25℃左右。

在实验室中,浮萍的生长速率很快,两天可以增加一倍的叶片数。培养液应该隔一段时间换一次,以保证浮萍的正常生长。

第三节 浮萍在环境生物毒理学中的应用

一、有机物对浮萍植物的毒性

Hartman 等人使用除莠剂（如草不绿、阿特拉津）和杀虫剂（如虫螨威）对浮萍、蚤状蚤、眼子菜进行毒性研究，测定在有悬浮物和无悬浮物情况下的药物安全性指标（ EC_{50} ）。草不绿在有或无悬浮物的情况下对浮萍的 EC_{50} 为 $10\mu\text{g/L}$ ，而虫螨威在有或无悬浮物的情况下，当浓度为 10mg/L 时对浮萍的生长不产生影响。阿特拉津在有或无悬浮物的情况下浓度为 $100\mu\text{g/L}$ 时对浮萍无作用。虫螨威、草不绿、阿特拉津在无悬浮物时对蚤状蚤的 EC_{50} 依次为 $35.0\mu\text{g/L}$ 、 10.4mg/L 和 36.5mg/L 。从以上结果中可以看出，浮萍与蚤状蚤对不同的化学药品的反应有较大的差别。Nitschke 等人研究了四种杀虫剂 [异丙隆 (isoprotruron)，特丁津 (terbutylazine)，甲氯丙酸 (mecoprop)，苯嗪草酮 (metamitron)] 在生物降解过程中对浮萍、藻和大型蚤的毒性作用。其中浮萍实验的结果显示 isoprotruron 和 terbutylazine 比 mecoprop 和 metamitron 毒性更大，同时大型蚤对这四种杀虫剂的敏感性小于植物的敏感性。这些研究表明，单靠一种实验生物对化学药品制定环境标准是不充分的。

Caux 等人研究了利谷隆 (linuron) 对水体的影响，指出浮萍在水中中对利谷隆的敏感性是最高的， 70mg/L 的利谷隆抑制浮萍的生长。Albert 等人研究了三氟乙酸 (TFA) 对浮萍的 7 天无作用浓度 (NOEC) 为 300mg/L 。

Jonsson 等人通过研究农药氯胺 (clomazone) 对浮萍的毒性作用指出，clomazone 对非靶植物一个重要的毒性作用是对植物光合作用的抑制作用。

Verdissón 等人研究了三种病原性真菌的杀菌剂腐霉利 (procymidone)、咯菌腈 (fludioxonil) 和嘧霉胺 (pyrimethanil) 对非靶生物——浮萍的毒性作用。其中，pyrimethanil 对浮萍的 6 天半数生长抑制率 (IC_{50}) 为 46.16mg/L ，其他两种杀菌剂的 IC_{50} 超过了 100mg/L 。

环境因子影响有害物质的行为，改变其理化性质，对生物产生不同的作用。许多学者利用浮萍研究了光修饰下的多环芳烃的毒性作用。Mcconkey 等人研究了菲及其光导产物 9, 10-菲醌对浮萍的毒性作用，研究发现，在暗处，两者对植物的 EC_{50} 为 0.53mg/L 和 0.57mg/L 。而在含有紫外线的光源的照射下，菲醌和菲对浮萍的 EC_{50} 为 5.7mg/L 和 10.8mg/L ，说明，在光诱导下菲所产生的产物——菲醌比母体化合物更加有毒。Becker 等人研究了底泥中所含的菲是否可以通过浮萍叶片的下表面或根进入植物体内。结果表明，水中所含的菲与底泥中

所含的非对浮萍产生相似的抑制效应，并且可以在水相中检测出底泥中多环芳烃的光诱导毒性作用。Duxbury 等人研究了浮萍对多环芳烃的生物富集作用。实验表明，在黑暗状态下，多环芳烃的积累高于在有光条件下的积累，并且多环芳烃对植物的微粒体和类囊体有损害作用。Huang、Krylov 等人研究表明，紫外线加强多环芳烃的毒性。以新叶片产生速率为指标，紫外线照射下多环芳烃 LC_{50} 小于自然光下的 LC_{50} ，说明毒性增加。多环芳烃的光修饰过程出现在光合系统 PSI 附近，这样就中断了光合系统中 PSI 到 PSII 的电子传递。长期的暴露，对 PSII 的毒性大于对 PSI 的毒性，并且可以在 PSI 光修饰作用与生长抑制之间建立线性关系，建议用叶绿素 a 的荧光强度作为多环芳烃对植物毒性作用的生物指示物 (bioindicator)。他们对浮萍的光敏因子与多环芳烃的光修饰因子的比较，得出了多环芳烃的结构活性相关关系 (QSAR)，该模式可以很好地解释多环芳烃的毒性作用。另外，他们以浮萍为对象，进一步研究了多环芳烃在叶片与水之间的两室模型中的 QSAR，指出在黑暗状态下，多环芳烃的毒性在实验中可以忽略，而叶片组织吸收多环芳烃的速率大于多环芳烃的光修饰速率。可以就暴露时间、多环芳烃初始浓度、光的相对吸收等，建立多环芳烃的毒性模型。Mallakin 等人研究了蒽对浮萍的光诱导毒性作用，结果表明，蒽通过光诱导产生的产物比母本化合物更加有毒；在太阳光的诱导下，蒽可以形成蒽醌、安息香酸、安息香醛和酚；蒽的光诱导过程是一个拟一级反应，半减期为 2h。这说明多环芳烃的光诱导的生化机理是多途径的。

Hanson 等人通过微宇宙实验，指出现今在环境中存在的氟氯乙酸对大型水生植物（如浮萍）不产生任何风险性的影响。

二、重金属对浮萍的毒性作用

重金属和类金属作为环境毒物的重要组成部分，历来是各学科学者关注的热点。对重金属毒性的研究已经相当深入，而利用浮萍研究重金属对植物的影响也有了较大进展。

Wang 等人研究了钡、镉和铬对浮萍的毒性作用。在这些研究中，使用了去离子水、河水、去离子水加河水、河水加过滤河水和过滤河水加去离子水等几种不同的水质样品。钡在去离子水中对浮萍的 EC_{50} 为 26mg/L；而在河水中，浓度达到 50mg/L 也不对浮萍造成明显损害。这种显著差别可能是由于金属在河水中有两条去毒途径：被颗粒组分吸附和被溶解组分改变。这些机制事实上是改变了钡的生物利用性或将钡转变成无毒形式。在进一步的实验中表明溶解组分是去毒作用的主要组成部分。Cd 对浮萍的毒性极大，在浓度为 0.05mg/L 时，显著抑制浮萍生长，去离子水中抑制率为 25%，河水中抑制率为 8%。在浓度为

0.25mg/L时,抑制去离子水中浮萍生长60%,河水中浮萍生长的27%,相差33%。实验表明河水中颗粒物和其他离子态物质对Cd的去毒作用不大,这也许是由于Cd在水体中是非常活跃的金属。Liebert指出,培养介质与温度影响Cd对浮萍科植物的毒性作用。Devi等人研究发现,Cd对浮萍的 EC_{50} 为 $800\mu\text{g/L}$ 。在Cd的浓度为 $2.24\mu\text{g/L}$ 时,7天后,有98.5%的Cd被浮萍吸收。用Cd处理14天的浮萍喂饲螯虾,螯虾的乙酰胆碱酯酶的活性受到抑制,同时测出,在螯虾体内Cd的浓度有放大效应,说明Cd可以通过这样的食物链进行生物放大传递,影响高营养级的生物。

Borek等人研究了pH值影响Pb对浮萍的毒性。随着酸度的增加,Pb的毒性不断增大,48h中,pH值为4.0、5.7、7.5时,Pb对浮萍的生长抑制率分别达到66.7%、45.2%和48.3%。酸度的增加导致Pb吸收的增加,从而加大了铅对浮萍的毒性。Miranda等人指出高浓度的Pb导致浮萍蛋白质含量的下降。

Mohan等人研究了稳定塘中Pb和Cd对浮萍的毒性作用。实验结果表明,Pb和Cd显著地刺激过氧化物酶活性,但极大地抑制了过氧化氢酶的活性,糖含量、蛋白质含量及叶绿体数目出现下降趋势,而脯氨酸的含量却增加了。另外,研究中还指出,长周期的浮萍实验可以得到更多有价值的数

据。Dzilgen研究了pH值和EDTA对Cr对浮萍毒性作用的影响。表明当Cr的浓度为 10.0mg/L ,pH值为5.0、6.0和7.0时,浮萍生长的抑制率分别为23%、32%和54%。当EDTA存在,pH值为7.0,Cr的浓度超过 2.0mg/L 时,浮萍才出现生长抑制现象,实验同时表明,随着Cr浓度的升高,植物体内金属的浓度也有增高的趋势,并且受到pH值的影响。实验说明,EDTA可以降低Cr的毒性,而pH值的高低可以改变Cr的生物可利用性。Neylan等人研究了不同形态的Cr、Cu和Zn的联合毒性作用。结果表明, Cr^{3+} 在浮萍中的积累很小,因而浮萍生长较快; Cr^{6+} 在浮萍中的积累较大,导致对生长的毒性也较大;Cr、Cu和Zn之间的联合作用随Cr氧化态的不同而呈现出协同、拮抗和相加作用。

Singh等人研究表明螯合剂(EDTA、EDDHA、FeNaEDTA、EDEDHA和柠檬酸铁)可以减小Hg对浮萍的生长和鲜重的不良作用。

Severi研究了Al对浮萍的毒性作用。表明当Al存在时,浮萍的生长受到抑制,过氧化物酶活性和脂质过氧化作用出现增高现象。实验结果说明柠檬酸的螯合作用是保护浮萍不受Al毒害的有效途径。

Teisseire等人研究了Cu、灭菌丹(folpet)对浮萍的毒性作用。实验结果表明,Cu对浮萍的7天 IC_{50} 为 0.16mg/L ,灭菌丹对浮萍的7天 IC_{50} 为 7.50mg/L ,

并且 Cu 和灭菌丹之间有轻微的协同作用。数据还显示, 在 24h 之内, Cu 和灭菌丹刺激了过氧化氢酶的活性。他们认为过氧化氢酶可以作为监测化合物污染的生物标识物 (biomarker)。

Prasad 等人研究了 Cd 和 Cu 进行生物积累的过程中浮萍的生理反应。Cu 的浓度在低于 Cd 浓度 1000 倍的情况下就可以对浮萍产生显著的毒性作用; Cd 对浮萍的毒性作用表现在气体交换和净光合作用的下降, 而这些生理反应与叶绿素和类胡萝卜素等光合色素含量的下降有相关性, 同时也观察到光合作用中 PS II 系统的荧光性下降。Cd 在叶片中的积累导致出现两种小的多肽, 而 Cu 在积累的过程中并没有表现出叶片中蛋白质的积累或特殊蛋白质的形成; 这些数据表明 Cd 与 Cu 对浮萍的毒害机理是有区别的。

Artetxe 等人研究了不同的光照强度对浮萍的保护作用。结果表明, 在中高强度的光照射后, Cd 和 Zn 对浮萍的生长都产生抑制作用; Cd 可以导致抗坏血酸的积累, 而 Zn 则导致谷氨酸的积累; 另外, 在进行低强度的光照射后, Cd 和 Zn 对浮萍的影响显著变小, 这一结果还有待进一步研究。

Severi 研究了硒酸钠和亚硒酸钠对浮萍生长、色素含量和过氧化物酶活性的影响, 结果表明, 两者浓度在 $1\sim 256\mu\text{m}$ 之间时, 均对这些生理指标产生毒害作用, 同时指出在高浓度硫酸盐存在时, 亚硒酸钠比硒酸钠的毒性更强, 而在低浓度硫酸盐存在时, 硒酸钠比亚硒酸钠更加有毒害作用。

金属可以在环境中通过生物代谢形成有机金属化合物, 其毒性与无机金属化合物相比有很大的不同。Song 等人研究了二丁基锡和三苯基锡对浮萍的毒性作用。结果表明, 有机锡化合物对浮萍的生长速率、叶绿素含量有明显的抑制作用, 同时还可以影响过氧化物酶和叶绿体的活性, 对浮萍叶片糖含量也产生毒害作用。

三、浮萍作为环境监测生物的研究

Wang 等人应用浮萍研究了在工业废水的毒物筛选和生物监测中植物毒性实验。实验中检测了 8 个废水样品 (A1、A2、A3、B1、C1、A4、B2、C2), 将其分成两组, 并且加水稀释。利用浮萍叶子生长数目的多少来表示废水毒性大小。实验结果表明, 在实验的 48h 中浮萍的死亡率接近 100%, 指出浮萍是一种对废水比较敏感的水生植物, 该实验非常简便、快速, 并且经济有效。

Ven 等人调查的纸浆废水对受纳水体的环境影响。表明以浮萍和鱼类为代表的水生生物的密度下降了 20%~40%。

Tkalec 等人研究了含石油的海水对浮萍的影响。通过对生长速率、鲜重、干重、总叶片表面积和紫萍的花青素含量等指标的测定。发现低浓度的石油含量

可以促进浮萍的生长,但高浓度就抑制其生长,同时当石油含量低时,增加花青素的含量,石油浓度高时,减小花青素的含量。

Lakatos 等人采用浮萍等测试方法检测了蒂萨河(东欧)底泥氰化物和重金属的污染状况,测试浮萍的生长量和叶绿素含量,研究指出重金属长期作用的底泥和附着水生植物是进行生物监测的重要因素。Kiss 采用多种生物测试方法监测蒂萨河的污染状况。实验结果表明,污染物对浮萍的毒性作用结果可以为人们提供生物栖息地污染的特定指示作用。

Cleuvers 研究了浮萍和大型蚤检测复合药剂(毒品)的毒性作用。结果表明,浮萍对药剂的敏感程度高于大型蚤;单个药剂对生物的毒性作用各不相同,但是长期存在于环境中的毒品的复合作用是值得科学工作者加以注意的。

四、浮萍的其他应用

Ketil 等人利用浮萍进行市政固体废物的沥出液 COD 和 NH_4^+-N 的去除,结果表明,浮萍在处理系统中可以加强氧气的补充,从而使处理系统处在富氧的状态下,并且有良好地去除 NH_4^+-N 的效率。Korner 等人研究了浮萍在处理废水中对 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+-\text{N}$ 的耐受幅度。结果表明,当废水中 N 的浓度在 8mg/L 以下, pH 值在 7.8 时,浮萍可以在高浓度的含氮废水中生长。

综上所述,浮萍具有体积小、易于饲养和繁殖快速的优点,在环境水生毒理学的研究中是非常有用的实验材料,在国内的水生生态毒理学研究中有着广泛的应用前景。

第四节 浮萍的生态毒理学实验方法

一、生长抑制毒性实验

首先需要确定受试物的理化性质和水溶解性和挥发性。对于水溶解性不高的化学物质要事先用适当的有机溶剂配制成高浓度的储备液,实验中,再用浮萍培养液稀释到所选择的实验浓度,同时要要进行有机溶剂的对照组实验。由于浮萍培养液中存在镁、铁、钙及硫酸根等离子,因此要注意受试物是否与这些离子产生沉淀反应而影响实验,如果有沉淀反应的存在,需要调节 pH 值或改变离子浓度以减少沉淀反应的发生。挥发性高的受试物需要在实验期间频繁更换实验液以保证受试物的浓度稳定。在对培养液的配方进行修改时,需要将浮萍在修改的培养液中培养一段时间,观察浮萍的生长状态是否良好,只有浮萍在无受试物的培养液中生长状态良好,叶片饱满,才能进入下一步骤的实验。

下面以浮萍的生长抑制毒性实验为例。

浮萍的毒性实验一般遵循环境生物毒理学实验的通用方法，观察指标包括叶片数与叶绿素含量等。其中急性毒性实验是浮萍环境生物毒理学实验的基础性实验，是慢性实验、蓄积实验、联合毒性实验和其他实验的基础，为这些实验的设计与控制提供受试物的毒性作用的初步信息。慢性毒性实验可以检测受试物对浮萍生理生化指标的影响以及浮萍对受试物的蓄积能力。如果建立以浮萍为生产者的食物链，可以观察受试物在食物链上的生物放大现象。

① 急性毒性实验步骤。急性毒性实验一般分为预备实验和正式实验两个阶段。

预备实验阶段 选择较少的几个受试物浓度梯度，低浓度以刚刚出现毒性作用为准，高浓度以全部受试植物死亡为准，再取中间 1~2 个浓度值，了解受试物对浮萍产生毒性伤害的大致浓度区间范围，同时掌握受试物溶剂对浮萍的影响。

正式实验阶段 依据预备实验阶段了解的受试物对浮萍毒性作用的浓度范围，选择受试物的 5~7 个浓度，并且浓度呈对数比例增长，低浓度组以浮萍出现较小程度的毒性反应为准，高浓度组以浮萍出现较强程度的毒性反应为准，并且在毒性反应指标 50% 上下的浓度组各占一半。每一浓度做至少 3 个平行样，这样可以减小实验中出现的随机误差，有利于进行数据的统计分析。

根据实验的目的和内容，实验时间可以持续 4~8 天。光周期可以是全光照或选择不同比例的明/暗周期。

② 慢性毒性实验。以急性毒性实验的数据为依据，选择较低的受试物浓度，其他实验条件和急性毒性实验相同，实验时间可以持续 1 个月或更长，由于浮萍数目的增长很快，因此慢性毒性实验中，浮萍的数目会非常大，因此必须仔细记数浮萍的叶片数。

数据记录 每两天更换实验液，同时计数浮萍的叶片数和植株体数。当可以看到叶的边缘时，即计为一片叶子。在实验结束时，将浮萍叶片用吸水纸吸干水分，称重，测定叶片的叶绿素含量。

③ 数据处理。浮萍急性毒性实验所得的数据，可以计算出受试物对浮萍的半数生长抑制率 (IC_{50})。计算方法如下。

生长速率 v_n 计算：

$$v_n = \frac{\ln(N_t/N_0)}{t}$$

抑制百分率计算：

$$I_n = \frac{(v_0 - v_n)}{v_0} \times 100\%$$

式中, t 为时间, 天; N_t 为 t 时间时浮萍的叶片数和实验结束时提取液中叶绿素含量; N_0 为实验初始时的浮萍的叶片数和初始时叶绿素含量; I_n 为染毒组的抑制百分率; v_0 为对照组的生长速率; v_n 为染毒组的生长速率。将 I_n 和实验液化合物浓度的对数进行线性回归, 求出半抑制浓度 (IC_{50})。

二、生理生化指标的检测

浮萍属于水生维管束植物, 可以应用一般的植物生理学方法进行生理生化指标的检测。本书主要介绍以下几种指标的检测方法。由于浮萍体积较小, 给生理生化指标的检测造成一定程度的困难和测量误差, 因此尽可能地采集数量多的浮萍是保证测量结果准确的良好方法。

(一) 硝酸还原酶活性的测定

1. 原理

硝酸还原酶存在于细胞质内, 属于胞内酶, 硝酸还原成亚硝酸的反应是在细胞质中完成的。产生的 NO_2^- 可以从组织内渗透到外界溶液中, 并积累在溶液中, 测定反应溶液中 NO_2^- 的含量, 即可表明酶活性的大小。测定 NO_2^- 含量的方法是用磺胺比色法, 这种方法非常灵敏, 能测定每毫升 $0.5\mu\text{g}$ 的 $NaNO_2$ 。

2. 主要试剂

磺胺: 15% HCl 含 1% 磺胺。

乙二胺: 15% HCl 含 0.01% N-1-萘乙二胺盐酸盐。

分光光度计。

3. 测定方法

(1) 亚硝酸钠浓度标准曲线的绘制 将 1g $NaNO_2$ 溶于 1000mL 蒸馏水中, 得到 1g/L 的溶液, 用时稀释为每毫升分别含 $NaNO_2$ 1.0 μg 、2.0 μg 、5.0 μg 、8.0 μg 、10.0 μg 、15.0 μg 、20.0 μg , 取上述溶液各 1mL 于比色管中, 加 2mL 磺胺溶液、2mL 乙二胺溶液, 混合均匀, 静置 30min, 以 1mL 蒸馏水为空白对照, 在 520nm 波长处测定吸光度。以吸光度与亚硝酸钠浓度作线性回归, 得到亚硝酸钠标准曲线。

(2) 硝酸还原酶活性的测定 取实验液 1mL, 加入磺胺和乙二胺试剂各 2mL, 显色 15min, 在分光光度计上测定 520nm 处的吸光度。

以 $\mu\text{g}NaNO_2/(L \cdot A_{520})$ 作为酶活单位。 $NaNO_2$ 的浓度可根据亚硝酸钠标准曲线计算得到。

将染毒组的酶活与对照组的酶活相比, 得出相对酶活。

抑制百分率 I_U 的计算: