

紫海胆急性毒性试验方法标准化探讨

赖素群, 余露军, 吴美慧, 曾 进, 李建军

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

[摘要] 目的 研究紫海胆急性毒性试验条件, 为紫海胆急性毒性试验方法的标准化提供依据。方法 将紫海胆受精卵置于 20℃、22℃、24℃、26℃、28℃和 30℃水温下培育, 观察统计紫海胆胚胎和幼虫的发育时间和死亡率, 统计不同起始日龄紫海胆浮游幼虫的 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 、3,5-二氯苯酚、十二烷基硫酸钠 96 h 毒性试验结果及其变异系数。结果 水温 24~26℃时, 紫海胆幼虫成活率较高且发育速度较快; Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 、3,5-二氯苯酚、十二烷基硫酸钠对受精后 12 日龄幼虫的 96 h 的半数致死浓度(LC_{50})分别为 1.40 mg/L、1.69 mg/L、3.60 mg/L 和 3.95 mg/L; 12 日龄紫海胆敏感性适中且其毒性试验结果变异系数较低。结论 紫海胆浮游幼虫急性毒性试验适宜水温为 24~26℃, 最佳起始试验日龄为受精后 12 d, 紫海胆是一种适于海洋污染物毒性测试物种。

[关键词] 紫海胆; 急性毒性; 标准化; 变异系数

[中图分类号] Q95-336 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)01-0065-05

由于工业三废、城镇生活垃圾、农业养殖使用的化肥、农药和禽畜粪便、海洋油气开采、运输船舶排放、海上事故、近海养殖等污染, 我国渤海、东海和黄海等海域的生态系统大部分处于亚健康、甚至不健康的状态, 而且还有进一步恶化的趋势^[1]。环境污染常是多来源、多种类的复合污染, 存在拮抗、叠加或协同作用, 生物测试可综合多种有毒物质的相互作用, 判定有毒物质的质量浓度和生物效应之间的直接关系, 为水质的监测和综合评价提供科学依据^[2]。筛选合适的海洋污染评价生物、建立标准化毒性试验方法是目前我国亟待解决的一个问题。

海胆具有个体相对小、生命力强、适应性广, 在实验室控制条件下容易饲养、繁殖周期相对短、能分批产卵或连续产卵和产卵量大等特

点, 日本、加拿大、新西兰和美国等国家已广泛采用海胆监测海洋环境的污染状况^[3,4], 我国海胆毒性试验也开展较多^[5-7], 海胆已成为海洋生态毒理学研究的模式生物。

紫海胆(*Anthocardia crassispina*)属棘皮动物门, 海胆纲, 正形目, 长海胆科, 紫海胆属。普遍分布在我国浙江、福建和广东各地海岸及日本南部沿海, 栖息在浅海的岩礁砂石海底^[8], 营养丰富, 药用价值高, 是我国东南沿海重要的经济品种^[9]。

海胆毒性试验受试对象包括胚胎^[5]、浮游幼虫^[6]、幼(稚)海胆^[7,10]、成海胆^[11]等, 其中胚胎期和幼虫期是海胆生命中对污染物最敏感的时期, 美国材料与试验协会(ASTM)于 1995 年制定《用海胆纲胚胎做静态剧毒试验的标准指南》, 并于 1998 年、2003 年、2012 年修订。胚胎毒性试验观察指标包括致死率、致畸率、生长发育速度等, 对实验操作人员的技术要求较高。而海胆浮游幼虫急性毒性试验方法比较简单, 可能具有较好的应用前景。

[收稿日期] 2019-04-24

[基金项目] 广东省科技计划项目(2017B030314171)

[作者简介] 赖素群(1992-), 女, 技术员, 研究方向: 生物学。

E-mail: 13751742796@163.com

[通信作者] 李建军, 正高级工程师, 研究方向: 实验动物与生态毒理学。E-mail: lj@gdiami.com

试验方法的标准化是决定毒理学安全性评价结果是否可靠的关键所在。影响毒性作用的因素包括毒物因素、机体因素与环境因素三个方面。参比毒物试验可以评估受试生物对毒物的敏感性、试验条件、试验的适合度,为实验室内和实验间数据比较提供了一个质量控制标准^[12],也可评估毒性试验的稳定性和准确性^[13]。本研究采用的重铬酸钾^[14]、硫酸锌^[15]、3,5-二氯苯酚^[16]、十二烷基硫酸钠(SDS)^[17]为国际上广泛认可和推荐的参比毒物,以降低毒性试验条件优化过程中毒物因素的影响。本文在其它机体、环境因素近似的条件下(如实验幼虫来自同一对亲胆,水质因子、饵料和投喂量等基本一致),研究水温和适宜毒性试验的起始日龄等影响紫海胆急性毒性试验结果的关键因子,以期为紫海胆毒性试验方法的标准化提供依据。

1 材料与方法

1.1 紫海胆

紫海胆亲本来源于惠州大亚湾,实验室驯养2个月以上。用注射器将1~3 mL 0.5 mol/L的氯化钾溶液由围口膜注入亲胆,将亲胆反口面向下放置于盛满过滤海水的烧杯上,使海水淹没生殖孔,收集排放的精卵人工授精,洗卵3~5次,移入幼虫养殖缸培育。

1.2 试剂与仪器

重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$, 含量 $\geq 99.8\%$,分析纯,广州化学试剂厂)、七水硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 含量 $\geq 99.5\%$,分析纯,广州化学试剂厂)、3,5-二氯苯酚(98.15%,分析纯,上海麦克林生化科技有限公司)、十二烷基硫酸钠(SDS, 含量 $\geq 99.0\%$,美国Sigma进口分装)。

电子天平(ME204E)购自梅特勒-托利多公司,显微镜(莱卡DM1000)购自德国莱卡公司,电导率仪(梅特勒SG3)、pH计(梅特勒-托利多SG2)购自梅特勒-托利多公司,溶氧仪(YSI 550A-2)购自美国YSI公司,人工气候箱(HSW-436)购自嘉兴市中新医疗仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 胚胎发育 6组人工气候箱,箱内温度分别设置为20℃、22℃、24℃、26℃、28℃

和30℃,各水温下,天然海胆受精卵,在盐度29~30、pH 8.1、光强30~100 lx的海水中培育,幼虫孵出24 h后开始投喂本实验室自繁的角毛藻,饵料密度为8 000~10 000个/mL。每3 h由各气候箱随机取40个胚胎或幼虫在显微镜下观察,记录。

1.3.2 毒性试验 参照GB/T 18420.2-2009^[18]中卤虫试验方法,用等比稀释法配制试验溶液,设定5个等比浓度组和1个空白对照组,等比系数不大于2.0,每个试验组设定4个重复。试验容器采用100 mL烧杯,试验液体积为40 mL,每个容器放入10个海胆幼虫。持续时间为96 h。试验环境因子:水温24~26℃,盐度28~30。每日投喂一次浓缩角毛藻,保持溶液中角毛藻密度约10 000~12 000个/mL。以死亡为观测指标,显微镜下观测沉于容器底部的海胆,15 s内腕足停止运动判定为死亡。

1.4 统计学分析方法

采用概率单位法计算致死中浓度(LC₅₀);实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS19.0统计软件进行独立样本的 t 检验、 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

变异系数的计算公式为:变异系数 $C \cdot V = (\text{标准偏差 SD} / \text{平均值 Mean}) \times 100\%$

2 结果

2.1 海胆胚胎发育观察

不同水温条件下紫海胆发育至相应阶段所需时间见表1,当水温为28℃或30℃时,168 h出现大量幼虫沉底死亡,其中30℃幼虫全部死亡;当水温为20℃时,幼虫无法正常变态附着,直至观察到397 h,所有幼虫死亡。试验结果表明,24~26℃时孵化成活率较高且孵化速度较快,在此条件下,受精卵孵化至二腕幼虫、四腕幼虫、六腕幼虫、八腕幼虫、出现管足所需时间分别为29 h、48 h、122 h、182 h和269 h。

2.2 毒性试验

表2~5分别为SDS、 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 、3,5-二氯苯酚对不同日龄海胆幼虫的毒性试验结果。经统计分析,每种参比毒物对4日龄、6日龄、8日龄、10日龄、12日龄海胆幼虫的96 h LC₅₀均

表 1 不同水温下紫海胆发育至相应阶段所需时间 h

发育阶段	水温 /℃					
	20	22	24	26	28	30
二腕幼虫	47	36	30	28	18	18
四腕幼虫	71	60	49	47	36	32
六腕幼虫	175	145	124	121	99	95
八腕幼虫	253	223	189	175	142	134
出现管足	—	351	277	261	239.5	—

无显著性差异($P>0.05$)。各参比毒物对不同日龄海胆幼虫 LC_{50} 的变异系数为 3.7%~100.9%，其中 12 日龄海胆幼虫 LC_{50} 的变异系数较低。

2.3 参比毒物毒性大小比较

基于海胆浮游幼虫急性毒性试验，参比毒物对海胆幼虫的毒性顺序为： $Cr^{6+}>Zn^{2+}>3,5-$ 二氯苯酚 $>SDS$ 。

表 2 SDS 对紫海胆幼虫的 96 h 急性毒性

日龄	不同批次毒性试验 $LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$			$\bar{x} \pm s$	变异系数 /%
	1	2	3		
4	4.085 6	3.285 1	2.658 8	3.34 ± 0.72	21.4
6	4.657 8	5.832 1	2.108 1	4.20 ± 1.90	45.3
8	4.198 6	4.105 4	2.263 7	3.52 ± 1.09	31.0
10	2.327 5	4.530 8	3.054 4	3.30 ± 1.12	34.0
12	4.499 5	3.906 4	3.429 1	3.95 ± 0.54	13.6

表 3 Cr^{6+} 对紫海胆幼虫的 96 h 急性毒性

日龄	不同批次毒性试验 $LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$			$\bar{x} \pm s$	变异系数 /%
	1	2	3		
4	1.405 9	1.225 0	1.481 1	1.37 ± 0.13	9.6
6	2.628 3	1.741 1	1.667 1	2.01 ± 0.53	26.6
8	1.569 2	1.564 4	2.227 0	1.79 ± 0.38	21.3
10	0.671 3	1.640 8	1.701 3	1.34 ± 0.58	43.2
12	1.414 2	1.346 0	1.447 3	1.40 ± 0.05	3.7

表 4 Zn^{2+} 对紫海胆幼虫的 96 h 急性毒性

日龄	不同批次毒性试验 $LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$			$\bar{x} \pm s$	变异系数 /%
	1	2	3		
4	2.377 7	0.956 4	0.821 9	1.39 ± 0.86	62.2
6	3.127 4	1.474 2	1.226 7	1.94 ± 1.03	53.2
8	2.638 9	1.459 9	1.078 9	1.73 ± 0.81	47.1
10	1.069 9	2.116 0	1.386 6	1.52 ± 0.54	35.2
12	1.770 7	1.751 1	1.545 9	1.69 ± 0.12	7.4

表 5 3,5-二氯苯酚对紫海胆幼虫的 96 h 急性毒性

日龄	不同批次毒性试验 $LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$			$\bar{x} \pm s$	变异系数 /%
	1	2	3		
4	6.372 8	2.931 2	3.968 5	4.42 ± 1.77	39.9
6	10.905 1	2.592 2	4.467 0	5.99 ± 4.36	72.8
8	16.245 0	2.265 7	4.082 2	7.53 ± 7.60	100.9
10	3.729 2	2.104 1	5.892 1	3.91 ± 1.90	48.6
12	3.535 5	1.895 1	5.367 2	3.60 ± 1.74	48.3

3 讨论

水温是海胆生长发育最主要的影响因子之一^[19], 陈锤^[20]研究表明, 紫海胆适宜生长水温为 15~30 °C, 冯雪等^[21]通过对紫海胆呼吸代谢的研究, 认为紫海胆生长最适温度为 22~27 °C, 其正常生理耐受温度亦在 22~27 °C, 当水温超过正常耐受温度时, 正常生理活动受到破坏。不同水温下(15~31 °C)紫海胆的活力与摄食实验^[9]表明, 紫海胆最适摄食水温为 23~27 °C。本研究表明, 当水温为 28 °C 和 30 °C 时, 浮游幼虫出现大量沉底死亡, 水温低于 20 °C, 幼虫无法变态附着, 24~26 °C 时孵化成活率较高且孵化速度较快, 是紫海胆生长发育的最适水温, 与上述研究结果一致。

变异系数(CV), 又称“离散系数”, 是概率分布离散程度的一个归一化量度, 其定义为标准差与平均值之比, 常用于比较多个样品重复测定的误差(不精密度水平)^[22]。如重铬酸钾对稀有鮑鲫 18 次重复实验的 96 h 的 LC₅₀ 值在 105.24~288.43 mg/L, CV<35%; 3,4-二氯苯胺对稀有鮑鲫 18 次重复实验的 96 h LC₅₀ 值在 4.42~8.75 mg/L, CV<20%^[14]。一般来说, CV 越小, 可重复性越强。本研究中, 不同日龄海胆幼虫的 96 h 急性毒性试验结果 CV 差别较大, 为确保毒性试验结果的可重复性和可靠性, 一般应选择 CV 较小的实验条件。根据本研究, 海胆急性毒性试验适宜的起始日龄为 12 d。

本研究结果表明, 紫海胆对水环境污染物质敏感, 如 SDS 对受精后 12 日龄紫海胆的 96 h LC₅₀ 为 3.95 mg/L, 而对 4~6 日龄黑褐新糠虾^[23]和卤虫^[24]的 96 h LC₅₀ 分别为 11.6 mg/L 和 13.9 mg/L; Cr⁶⁺ 对 12 日龄紫海胆的 96 h LC₅₀ 为 1.40 mg/L, 而对体长为(3.0 ± 1.0) cm 稀有鮑鲫^[14]和体长为(2.7 ± 0.4) cm 斑马鱼^[25]96 h LC₅₀ 分别为 32.22 mg/L 和 23.60 mg/L; Zn²⁺ 对 12 日龄紫海胆的 96 h LC₅₀ 为 1.69 mg/L, 而对体质量为(0.48 ± 0.13) g 中华绒螯蟹仔蟹和体质量为(0.014 4 ± 0.003 1) g 克氏原螯虾幼虾的 96 h LC₅₀ 分别为 5.84 mg/L 和 2.60 mg/L^[26], 3,5-二氯苯酚对 12 日龄紫海胆 96 h LC₅₀ 为 3.60 mg/L, 而对沙蚕(*Platynereis dumerilii*)

幼虫 48 h LC₅₀ 值为 3.64 mg/L, 此外, 且紫海胆个体小、易于实验室饲养、繁殖周期短、分批产卵、生殖力强, 是我国东南沿海生态系统中的重要物种, 因此, 紫海胆是一种较理想的海洋污染物毒性测试生物。

参考文献:

- [1] 张苏昆. 我国海洋污染问题、防治现状及对策探究[J]. 科技风, 2018, 23:156.
- [2] 沈燕飞, 张咏, 厉以强. 水质生物毒性检测方法的研究进展[J]. 环境科技, 2009, 22(2):68-72.
- [3] 李娇, 王姮, 韩昭衡, 等. 8种常见农药对海胆胚胎各发育期的急性毒性[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(2):255-261.
- [4] 余若祯, 穆玉峰, 王海燕, 等. 排水综合评价中的生物毒性测试技术[J]. 环境科学研究, 2014, 27(4):390-397.
- [5] 王摆, 于喆, 吕涵, 等. 5种重金属对光棘球海胆胚胎的毒性作用[J]. 水产科学, 2012, 31(5):254-258.
- [6] 吕福荣, 熊德琪, 丁士强, 等. 石油烃分散液对马粪海胆浮游幼虫的急性毒性效应[J]. 大连海事大学学报, 2008, 34(2):24-27.
- [7] 张金亮, 熊德琪, 吕福荣, 等. 0#船用轻质柴油和船用重质燃料油对幼海胆的急性毒性[J]. 大连海事大学学报, 2007, 33(增刊):5-7.
- [8] 梁永成, 钟春雨. 南方紫海胆人工育苗试验[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(2):5-6.
- [9] 聂永康, 陈丕茂, 周艳波, 等. 南方紫海胆摄食习性的初步研究[J]. 南方水产科学, 2016, 12(3):1-8.
- [10] 王波, 陈爱萍, 张朝晖, 等. 中间球海胆稚胆对敌百虫的耐受力测试[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(1):30-31.
- [11] 夏重大, 王媛, 柴晓杰, 等. 三苯基锡和三丁基锡对海胆的急性毒性研究[J]. 河北渔业, 2014, 246(6):6-9.
- [12] USEPA Environmental response team. Standard operating procedures.7-Day standard reference toxicant test using larval[Z]. Sop2020. 2001.
- [13] National Institute of Water and Atmospheric Research. Standard Methods for Whole Effluent Toxicity Testing: Development and Application[Z].1998.
- [14] 张京佶, 殷浩文, 赵华清. 稀有鮑鲫对重铬酸钾和3,4-二氯苯胺急性毒性研究[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2):57-61.
- [15] 杜丽娜, 薛金玲, 余若祯, 等. 对《水质急性毒性的测定发光细菌法》的改进和探讨[J]. 中国环境监测, 2013, 29(6):123-127.
- [16] 李肇丽, 赵汉卿. 3,5-二氯苯酚对穗状狐尾藻的毒性影响[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(5):85-86, 95.
- [17] 王国栋, 徐科凤, 黄韧, 等. Cu²⁺ 和十二烷基硫酸钠对裸

- 项栳鰕虎鱼仔鱼急性毒性影响[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(6):37-42.
- [18] GB/T 18420.2-2009. 海洋石油勘探开发污染物生物毒性 第2部分: 检验方法[S].
- [19] 李正良. 水温、饵料对紫海胆生长的影响[J]. 福建水产, 2004(2):26-28.
- [20] 陈锤. 紫海胆的生物学与养殖[J]. 海洋与渔业, 2007, 7: 32.
- [21] 冯雪, 陈丕茂, 秦传新, 等. 温度和体重对南海野生紫海胆(*Anthocardis crassispina*)呼吸代谢的影响[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23):123-125.
- [22] 徐晖, 彭长华, 王昌富. 医学研究论文中变异系数假设检验的应用错误辨析[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(7):557-558.
- [23] 周名江, 颜天, 李钧, 等. 黑褐新糠虾的急性毒性测试方法及在钻井液毒性评价中的作用[J]. 海洋环境科学, 2001, 20(3):1-4.
- [24] 郑琰晶, 陈琳, 陈燕平, 等. 十二烷基硫酸钠对水生生物的急性毒性影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊): 496-498.
- [25] 黎东怡, 杜青平, 屈嘉仪, 等. 重铬酸钾对斑马鱼的急性毒性及组织过氧化氢酶活性的影响[J]. 广东科技, 2014, 2:168-169.
- [26] 王建国, 陆宏达. 硫酸锌对4种水生动物的急性毒性作用[J]. 淡水渔业, 2009, 39(6):28-33.

Probe into Standardization of Acute Toxicity Test Method for Sea Urchin (*Anthocardis crassispina*)

LAI Suqun, YU Lujun, WU Meihui, ZENG Jin, LI Jianjun

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Key Laboratory of Guangdong Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the sea urchin (*Anthocardis crassispina*) acute toxicity test conditions and provide the scientific basis for standard test methods. **Methods** Cultivate sea urchins at a water temperature of 20 °C, 22 °C, 24 °C, 26 °C, 28 °C and 30 °C respectively, and record the larval development time and mortality. Calculate the 96 h LC₅₀ and the coefficient of variation of Cr⁶⁺, Zn²⁺, 3,5-Ddichlorophenol, Sodium dodecyl sulfate on the larvae at different developmental stages. **Results** In 24-26 °C water temperature, the survival rate was higher and the larval were growing more rapidly. The 96 h LC₅₀ of 12 day-old sea urchin for Cr⁶⁺, Zn²⁺, 3,5-Ddichlorophenol, Sodium dodecyl sulfate were 1.40, 1.69, 3.60 and 3.95 mg/L respectively. The sensitivity of 12 day-old sea urchin was moderate and the coefficient of variation of toxicity test was low. **Conclusion** The suitable temperature of acute toxicity test for sea urchin larvae is 24-26 °C, and the best starting day age for the test is 12 days age. *Anthocardis crassispina* is a species suitable for marine pollutant toxicity test.

[Key words] Sea urchin(*Anthocardis crassispina*); Acute toxicity; Standardized; Coefficient of variation