

尾草履虫毒性试验的研究

陈 天 乙

(南开大学化学系环保专业)

随着水污染的日益严重,作为水生食物链中重要一环的原生动物,愈来愈受到重视,用原生动物作毒性试验的报道也逐年增多。

利用原生动物作为毒性试验材料具有许多优点:作为单细胞生物它与周围介质能够充分接触,与多细胞生物相比,对毒物的反应一般更为灵敏;水生原生动物一般都是世界性分布,在自然水体中很易采到,而且许多种类可以在实验室内单种培养和长期保存,所以试验可以不受季节影响,而且可以控制较一致的试验条件;原生动物繁殖快,在适宜的条件下,一天就可以繁殖几代,所以用它来研究有毒物质对种群生长的影响也是比较理想的实验动物。

本文采用二种试验方法:1.半致死浓度 Median Lethal Concentration (LC_{50}) 2.半抑制限 Median Inhibitory Limits (IL_m) 来研究几种重金属化合物:氯化汞、硫酸铜、硫酸锌和重铬酸钾对尾草履虫的毒性作用。

尾草履虫是一种常用的单细胞实验动物,个体比较大(长度:180—300微米),在解剖显微镜下计数方便;这个种在鉴定上也较简便,鉴别要点是:外形、大小和具有一个致密的小核。用醋酸甲基绿染色,能使小核显现;另外尾草履虫的采集、培养与种株在实验室内长期保存都比较容易,所以是作毒性试验的较好的材料。

一、 LC_{50} 试验

(一)原理 LC_{50} 表示在确定的试验时间内杀死半数受试动物的浓度,它代表了受试动物对毒物的平均忍受限。生物个体对任何毒物的敏感性均遵循着一种分配规律,即其中少数个体表现出高度的敏感或极强的抗性,而大多

数个体的致死浓度却在一个相当窄的范围内,因此死亡率曲线呈“S”形,若药物浓度采用对数间距来配制,就可以出现直线关系,利用半对数坐标纸,用直线内插法就可以求得半致死浓度。

用鱼类作急性毒性试验,试验时间通常规定为24、48、96小时;用单细胞原生动物作试验,如果也用这么长的时间,那是非常困难的,因为在常温(20℃)下作试验,尽管虫体预先经几次清洗和饥饿;24小时内,还会出现细胞分裂,除非温度控制在15℃以下,才能延长细胞分裂周期。另外被毒物杀死后的虫体,2小时后就开始解体,这两种情况,势必影响计算死亡率的准确性,所以我们选择试验时间为2小时以内(国外的研究报告,试验时间最长的是96小时,最短的仅几分钟)。

(二) 材料与与方法

1. 试验动物 草履虫种株系由自然水体采回后,经实验室单个个体分离培养所得。培养液配法:稻草5克、麦粒10克,加1000毫升水煮沸半小时,冷却后,用纱布过滤,去除沉渣。培养液用三角烧瓶盛装,每份100毫升,接种草履虫500个左右,在25℃下培养一周,取出后,先用纱布过滤,去除菌膜,然后离心浓缩(转速大约在每分钟1000—1500转之间),离心5—10分钟后,将上部培养液迅速吸出弃之,再向离心管内加入蒸馏水,放在室温下搁置1天(使虫子尽量饥饿),就可作试验用。

2. 试验步骤

(1) 预备试验 预备试验是必不可少的,可以用较大的浓度间距探索大概的致死浓度范围(方法同正式试验)。

(2) 正式试验 先按对数间距,用蒸馏水

稀释,配制好试验液,对照组为蒸馏水(pH 6)。试验液用5毫升小试管盛装,每管装2毫升,然后用微吸管吸取试验液,将在底玻片上已数好的草履虫(30—50个),一次冲入试管中(草履虫带水的体积不超过0.01毫升,所以可以忽略不计),草履虫在试验水中上下游动,自然地与毒物很快发生接触,试验分1小时与2小时二组,每组三个平行样。检查草履虫死活的方法是用吸管由上层逐渐往下吸,分2—3次吸尽吸出的试验液放在透明的塑料薄膜小室中,在解剖镜(15—30×)下检查死活,活虫游在上层,先被吸出,失去游泳能力或已死的虫体,则沉在管底,最后被吸出,这对计数非常有利,死细胞完全不动,呈药物固定状,很易分辨。

表1 四种重金属化合物对尾草履虫的半致死浓度(LC₅₀)

化合物	1 小时	2 小时
氯化汞 HgCl ₂	0.21ppm (含 Hg ⁺⁺ 0.15毫克/升)	0.16 ppm (含 Hg ⁺⁺ 0.12毫克/升)
硫酸铜 CuSO ₄ ·4H ₂ O	0.29 ppm (含 Cu ⁺⁺ 0.08毫克/升)	0.20 ppm (含 Cu ⁺⁺ 0.05毫克/升)
硫酸锌 ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9.2 ppm (含 Zn ⁺⁺ 2.48毫克/升)	4.5 ppm (含 Zn ⁺⁺ 1.2毫克/升)
重铬酸钾 K ₂ Cr ₂ O ₇	74ppm (含 Cr ⁶⁺ 26.16毫克/升)	33ppm (含 Cr ⁶⁺ 11.67毫克/升)

表2 其它原生动动物毒性试验资料(一)

化合物	试验动物	试验时间	致死浓度 (ppm)
1. 氯化汞 HgCl ₂	混合种群:包括喇叭虫及其它5种缘毛目纤毛虫。	3 小时	0.2—0.3 (LC ₅₀)
2. 同上	梨形四膜虫	96 小时	3.12(硬水) (LC ₅₀)
3. 同上	梨形四膜虫	96 小时	1.85(软水) (LC ₅₀)
4. 硫酸锌 ZnSO ₄	梨形四膜虫	96 小时	5.77(蒸馏水) (LC ₅₀)
5. 铜 Cu ⁺⁺	草履唇滴虫	10 分钟	0.056 (LC ₁₀₀)
		3 小时	0.024 (LC ₁₀₀)
6. 铬 Cr ⁶⁺	草履唇滴虫	10 分钟	1000 (LC ₁₀₀)
		3 小时	>18 (部分死亡)

注: 见参考文献 3, 7。

(三) 结果与讨论

根据3次试验,求得平均值,然后在半对数座标纸上用直线内插法求出毒物的半致死浓度,结果见表1。结果表明,四种毒物对草履虫的毒性,由大到小顺序为铜离子、汞离子、锌离子、铬离子。从其它原生动动物毒性试验资料中(见表2)可以看出,因试验动物种类不同和试验方法的不统一,其结果差别甚大,很难进行比较。

用原生动动物做急性致死试验,虽然有许多优点,但是在试验方法上,显然存在着许多困难,如必须借助显微镜;细胞在短时间内就要分裂繁殖;细胞死后很快会解体等,所以目前对原生动动物毒性试验的研究倾向于研究其繁殖率,而不是直接致死作用。

二、ILm 试验

(一) 原理 ILm 表示在一定试验时间内,抑制(降低)种群繁殖率50%的毒物浓度。从生态学观点看它是非常有意义的,因为它直接提供了影响种群增长与群落平衡的数据,这种方法尤其适合于繁殖快的单细胞生物。

草履虫的无性繁殖为二分裂法,所以繁殖率可以用下式表示:

$$K = \log_2(N_t - N_0) / (t - t_0)$$

N_0 : 种群的起始个体数

N_t : 经过时间“t”后,种群的个体数

$t - t_0$: 试验时间

(二) 材料与方法

毒性试验进行之前,首先要研究试验条件下该生物种群的增长规律,以及起始种群大小对繁殖率的影响误差。根据我们设计的试验条件(见正式试验)分别以5个虫、10个虫和100个虫三个组作为起始种群进行培养,研究其增长规律,培养48小时后三组都进入对数增长后期,其中5个虫与10个虫组,平行样误差较小,而100个虫组,误差较大。因此,我们选用10个虫作为起始种群,试验时间定为48小时。

草履虫的来源与种株分离培养,同LC₅₀试验。试验液配方:9份培养液(pH 7.5)加1份毒物溶液,使浓度成对数间距,对照组为

100% 的培养液。

试验同样要先做预备试验。正式试验的方法：用移液管吸试验液 2 毫升，注入小试管中，每组 3 个平行样，然后用微吸管吸试验液，将数好的 10 个草履虫一次冲入试管内，管口用纸套加封，放入培养箱内(27°C ± 1)培养 48 小时，取出后立即用福尔马林将虫杀死固定，然后用吸管吸出，注入浮游动物计数框(容积约 2 毫升)内，在解剖镜下计数，根据 3 个平行样求出平均值。

(三) 结果与讨论

根据繁殖率公式，求出各组的繁殖率，以对照组繁殖率为 100%，将各组繁殖率数据在半对数坐标纸上用直线内插法求出 ILm，结果见表 3。

ILm 与 LC₅₀ 两种试验方法获得一致的效应，至于 ILm 明显高于 LC₅₀，显然是因为培养液中有有机成分对重金属的毒性起到了降解作用(认为水中有机物与重金属离子作用，形成有

表 3 三种重金属化合物对尾草履虫的 48 小时半抑制限 (ILm)

化合物	硫酸铜 CuSO ₄ ·4H ₂ O	氯化汞 HgCl ₂	硫酸锌 ZnSO ₄ ·7H ₂ O
ILm (ppm)	0.98 (含 Cu ⁺⁺ 0.27)	1.05 (含 Hg ⁺⁺ 0.77)	20.05 (含 Zn ⁺⁺ 4.53)

表 4 其它原生动动物毒性试验料 (二)

重金属离子	试验动物	96 小时 ILm(ppm)
1. Cu ⁺⁺	小口钟虫	0.25
	弯豆形虫	0.23
	盖纤虫	0.27
2. Hg ⁺⁺	沟内管虫(鞭毛虫类)	0.018
3. Zn ⁺⁺	Crisligora sp. (一种海洋纤毛虫)	0.125 (降低 8.3%)

注：见参考文献 3、5、7。

生动物毒性试验资料相比较(见表 4)，显然纤毛虫类结果比较接近，而鞭毛虫类则相距很大。

在试验中我们体会到两种试验方法各有优缺点，LC₅₀ 的优点是试验适用于任何形式的试验水(包括含有机营养成分的有毒水)；缺点是只能进行短时间的急性致死试验，仅能反映个体水平上的生物效应。而 ILm 的优点是试验更符合自然情况，它反映了种群水平上的生物效应，提供的数据具有较重要的生态学意义；缺点是不适合对含有有机营养物的有毒水进行试验，因为营养物的存在，对培养液起干扰作用，使试验条件变得复杂化。由此认为，在许可的条件下，如果两种方法配合进行，互相弥补，就可能得到意义更大的数据。

参 考 文 献

- [1] American Public Health Association: 1976 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14ed Washington, D. C.
- [2] Burbank, W. D., and Spoon, D. M. 1976 The use of sessile ciliates collected in plastic Petri dishes for rapid assessment of water pollution. *J. Protozool.*, 14 (4): 739.
- [3] Carter, J. W., et al., 1973 Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tetrahymena pyriformis*. *Wat. Res.*, 7 (7): 951.
- [4] Dive, D. and H. Leclere 1975 Standardized test method using Protozoa for measuring water pollutant toxicity. *Progress in Water Technology* 7: 2.
- [5] Bringmann, G. et al., 1980 Comparison of the toxicity thresholds of water Pollutants to Bacteria, Algae, and Protozoa in The cell multiplication inhibition test. *Wat. Res.*, 14: 231—241.
- [6] Robert, A. Honig, et al., 1980 Toxicity tests of aquatic pollutants using *Chilomonas paramecium Ehrenberg (Flagellata)* populations. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 25: 169—175.
- [7] Sudo, R., and S. Aiba. 1973 Effect of copper and hexavalent Chromium on the Specific growth rate of ciliate isolated from activated sludge. *Wat. Res.*, 7(9): 1301.

机螯合物，使重金属离子失去毒性)。与其它原