

# 污染食物喂养实验中铜对白符跳毒性的连续监测<sup>①</sup>

李晓勇<sup>1,2</sup>, 骆永明<sup>1\*</sup>, 柯欣<sup>1,3</sup>, 田晔<sup>1</sup>

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 湖南工业大学长株潭“两型”社会研究院, 湖南株洲 412008; 3 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所, 上海 200032)

**摘要:** 土壤弹尾目昆虫是土壤环境的重要指示生物, 在污染环境的生态评估研究中日益受到重视。本文的污染食物喂养实验的连续观测结果显示, *F. candida* 成虫无死亡, 生长率和繁殖率随着酵母食物中 Cu 浓度的增加而显著减小 (21 天生长率:  $R^2 = 0.9302$ ,  $F_{1,7} = 25.2$ ,  $p < 0.01$ ; 繁殖率:  $R^2 = 0.9459$ ,  $F_{1,7} = 17.2$ ,  $p < 0.01$ ), 暗示 *F. candida* 生长率和繁殖率是相对死亡率更敏感的指示重金属污染环境的指标参数。在较高 Cu 暴露浓度下, 随着暴露时间的延长, *F. candida* 的生长率相对对照降低更加明显 ( $p < 0.01$ ), 说明暴露时间和暴露浓度一样对 *F. candida* 的生长有明显的负作用。*F. candida* 产卵时间相对对照发生了延迟现象 ( $F_{1,7} = 3.69$ ,  $p < 0.05$ )。 *F. candida* 体内 Cu 的积累与食物中 Cu 浓度呈明显的剂量-效应关系, 并且在高的 Cu 暴露浓度下, *F. candida* 体内 Cu 的积累可以达到较高的程度, 说明 *F. candida* 可能对 Cu 具有较高的耐受性, 这些可能是培养皿食物暴露实验中导致 *F. candida* 成虫的生长率和繁殖率明显降低以及 *F. candida* 产卵时间发生延迟现象的内在原因。

**关键词:** 白符跳; 毒性; 铜; 食物喂养; 连续监测

**中图分类号:** X53; X83

随着土壤环境重金属污染的加剧, 有关重金属污染土壤的风险评估和修复受到全世界的关注。利用土壤无脊椎动物来评估土壤化学物质的生态毒性得到广泛的运用, 采用蚯蚓和跳虫等来检测土壤毒性的标准程序已经建立<sup>[1-3]</sup>。土壤弹尾目昆虫作为土壤中的优势物种之一, 是土壤环境的重要指示生物, 在污染环境的生态评估研究中得到越来越多的重视。*F. candida* (白符跳) 可以通过表皮、腹管和内脏等吸收水和食物以获取土壤中的毒素<sup>[4]</sup>。*F. candida* 自然界的主要食物成分是真菌类物质(如酵母等)<sup>[5]</sup>, 这些物质吸收/吸附积累重金属的能力远远高于其它物质<sup>[6-7]</sup>, 因此食物暴露可能是重要的暴露途径。ISO<sup>[2]</sup>和 OECD<sup>[3]</sup>给出了 *F. candida* 人工土壤暴露实验的标准程序, 但该方法只能观测到实验前后各参数的变化, 对培养过程中 *F. candida* 的生长率, 产卵时间等现象无法监测<sup>[8-9]</sup>, 而培养皿食物暴露实验则可以弥补这些不足, 当前关于食物暴露实验的研究不多<sup>[9-13]</sup>。因此本文通过重金属 Cu 污染食物暴露实验, 连续监测土壤重金属污染物对 *F. candida* 生理行为的影响, 积累和完善有害害化学品的基础毒性和生物学资料, 为土壤生态风险评估提供更全面的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试污染物为重金属 Cu, 为分析纯  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  试剂。主要仪器设备有生物培养箱, 硬质塑料培养器皿, 无灰定性滤纸, 手动真空泵(吸虫器)。

### 1.2 供试跳虫

*Folsomia candida* 培养方法参考 OECD<sup>[3]</sup>: 试验前放置在培养皿(90 mm × 13 mm)中, 培养皿底部覆盖有 0.5 cm 厚的一层石膏/活性炭基质(由熟石膏、活性炭和蒸馏水按 8:1:6 比例混合而成), 在 20℃ 生物保温箱内进行预培养, 12 h 光照与 12 h 黑暗间隔(400 ~ 800 lux), 间隔 3 ~ 5 天容器要加入适量蒸馏水以保持湿润。实验前跳虫需要同步化处理。*F. candida* 同步化步骤参照李晓勇等<sup>[14]</sup>: 从贮存 4 ~ 8 周的培养皿中选择成虫转移至新的培养皿中, 每个容器 150 ~ 200 只成虫, 并加入 15 mg 干酵母, 20℃ 生物保温箱中培养, 培养 7 ~ 10 天后, 将卵用针和小铲仔细收集并转移至卵片纸上(浸在熟石膏/炭浆态小块滤纸), 放入新的培养皿中。在 3 天内每隔 12 h 将卵片移入新的培养皿中, 在原皿中得到 0 ~ 3 天年龄大小的幼虫, 在皿中加入酵母, 培养 8 ~ 9 天后用于实验。

①基金项目: 国家自然科学基金项目(40671105, 40432005)和江苏省博士后基金项目(No. 0802030C)共同资助。

\* 通讯作者(luoym@issas.ac.cn)

作者简介: 李晓勇(1973—), 男, 江西上饶人, 博士后, 主要从事土壤动物学研究。E-mail: xyli@issas.ac.cn

### 1.3 培养皿喂养实验

食物中 Cu<sup>2+</sup> 配制：称取一定量的 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 固体颗粒于 20 ml 蒸馏水中，配成不同浓度 Cu<sup>2+</sup> 溶液，然后与一定量的干酵母混合均匀，配成 0、150、270、485、872、1 565、2 803、5 002 μg/g 酵母 Cu<sup>2+</sup> 溶液；将 150 ml 左右的 Cu<sup>2+</sup> 混染的酵母混合溶液加入到各新配的培养皿中的小盖玻片上，加入同步化跳虫 10 头（9~11 天大小），每浓度重复 3 次，放入 20℃ 生物培养箱，光暗周期 12h:12h 条件下保存 21 天。在 0、7、14、21 天分别记录个体体长和繁殖状况，实验结束后，测量跳虫体内 Cu 含量，测量方法参照李晓勇等<sup>[14]</sup>。

### 1.4 统计方法

试验结果采用 Statistica6.0 数据处理软件进行 ANOVA 分析（F 检验）和 t 检验，计算不同重金属处理和对照之间的差异性。利用 SAS version13.0<sup>[15]</sup>非线性混合模型（NLMIXED procedure）计算繁殖率和生长率 EC50 值，利用线性和多元回归统计分析模型建立重金属浓度和毒性终点的相关关系。

## 2 实验结果与分析

实验结束后，从观测结果可知，所有培养皿中未发现 *F.candida* 的死亡。在相同 Cu 暴露浓度下，喂养实验中不同 Cu 处理的 *F.candida* 成虫体长相对对照处理显著变短，特别在高 Cu 暴露浓度下，这种体长差异性更为明显（ $p < 0.01$ ）。在暴露时间 7、14 和 21 天时 *F.candida* 的生长率总体上都表现出相似的变化趋势，即生长率随着酵母食物中 Cu 浓度的增加而显著减小

（7 天时： $R^2 = 0.767 0$ ， $F_{1,7} = 9.43$ ， $p < 0.01$ ；14 天时： $R^2 = 0.895 9$ ， $F_{1,7} = 22.0$ ， $p < 0.01$ ；21 天时： $R^2 = 0.930 2$ ， $F_{1,7} = 25.2$ ， $p < 0.01$ ），特别在较高和最高 Cu 暴露浓度 2 803 μg/g 和 5 002 μg/g 时，*F.candida* 的生长率降低十分明显（ $p < 0.01$ ）。并且在较高 Cu 暴露浓度下，随着暴露时间的延长，*F.candida* 的生长率相对对照处理降低更加明显（图 1、图 2a）。计算得到不同暴露时间（7、14、21 天）生长率的半数有效浓度 EC50 分别为 2 564 μg/g（EC50 变化范围：1 769 ~ 3 258 μg/g），2 459 μg/g（EC50 变化范围：2 184 ~ 2 798 μg/g）和 2 325 μg/g（EC50 变化范围：2 146 ~ 2 752 μg/g）。

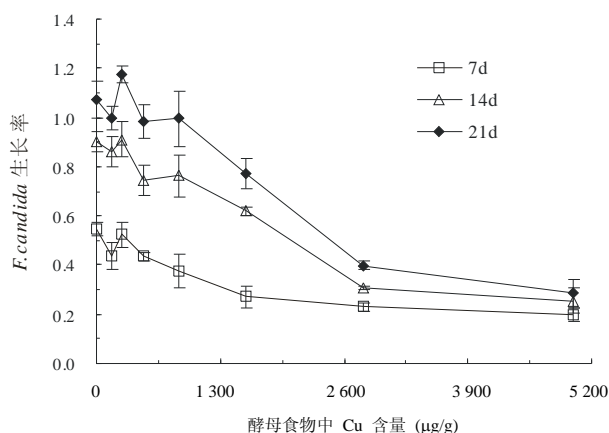


图 1 不同暴露时间下酵母食物中 Cu 浓度与 *F.candida* 生长率相关关系

Fig. 1 Correlations between growth of *F. candida* and Cu in the yeast food under different exposed times

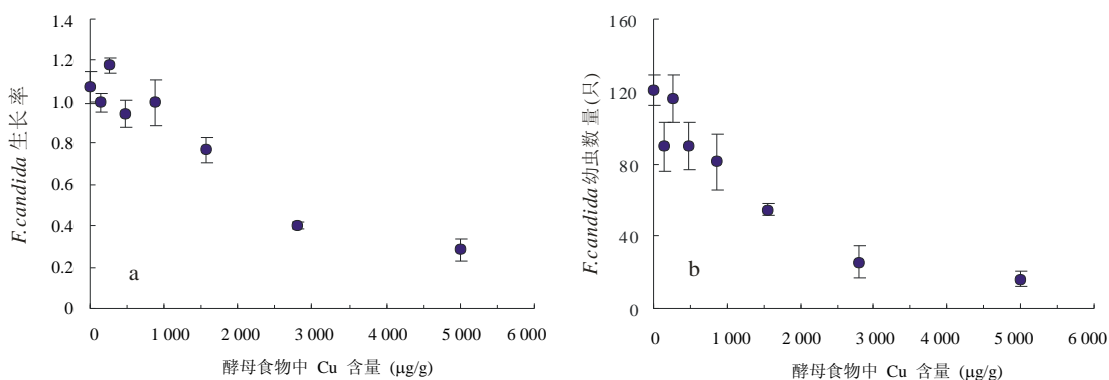


图 2 培养皿实验下酵母食物中 Cu 浓度与 *F.candida* 生长率 (a) 和繁殖率 (b) 相关关系

Fig. 2 Dose-response relationships for the effects of Cu on growth rate (a) and reproduction (b) of *Folsomia candida* exposed to yeast food contaminated by Cu

在实验过程中，通过连续地观察，发现高 Cu 暴露浓度处理中，*F. candida* 产卵时间相对对照处理发生了延迟现象（ $F_{1,7} = 3.69$ ， $p < 0.05$ ）（表 1）。但是无论是对照处理还是 Cu 污染处理的培养皿里都发现幼虫

存在，在高 Cu 暴露浓度下（2 800 和 5 002 μg/g），*F.candida* 的繁殖率相对对照处理明显减少（ $p < 0.01$ ），并且随着 Cu 暴露浓度的增加，*F.candida* 繁殖率呈现明显降低的趋势（ $R^2 = 0.945 9$ ， $F_{1,7} = 17.2$ ， $p < 0.01$ ）

(图 2b)。通过计算得到 21 天暴露时间下 *F. candida* 的繁殖率半数有效浓度  $EC_{50} = 1\ 175\ \mu\text{g/g}$  ( $EC_{50}$  变化范围: 839 ~ 1 510  $\mu\text{g/g}$ )。

*F.candida* 体内 Cu 含量测试结果表明, *F.candida* 体内 Cu 含量与酵母食物 Cu 暴露浓度表现出明显的剂量效应关系, 即随着酵母食物中 Cu 暴露浓度的增加, *F.candida* 体内 Cu 含量明显增加 ( $R^2 = 0.885\ 3$ ,  $p < 0.01$ ) (图 3a)。在土壤最高 Cu 暴露浓度 5 002  $\mu\text{g/g}$  时, 其对应的 *F.candida* 体内积累了最高的 Cu 含量 384  $\mu\text{g/g}$ , 而且 *F.candida* 体内 Cu 含量与跳虫的繁殖率存在明显的负相关关系 ( $R^2 = 0.810\ 9$ ,  $p < 0.01$ ) (图 3b)。

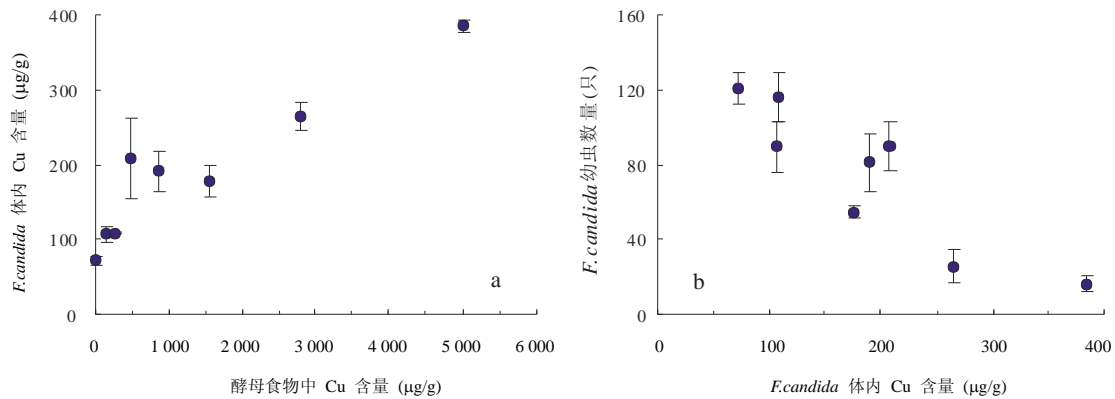


图 3 培养皿实验中 *F.candida* 体内 Cu 含量与酵母食物中 Cu 含量 (a) 及与繁殖率 (b) 的关系

Fig. 3 Correlations between Cu in *F. candida* bodies and Cu in the yeast food (a) and reproduction of *Folsomia candida* (b)

### 3 结论与讨论

在培养皿食物暴露实验中, 我们连续几个星期对重金属污染的 *F.candida* 反应进行了观察, 发现 *F.candida* 没有成虫死亡, *F.candida* 死亡率对 Cu 污染不敏感, 不适合作为指示参数用于生态毒理评估。而 *F.candida* 生长率随着酵母食物中 Cu 浓度的增加而显著减小, 暗示生长率是相对死亡率更敏感的指示重金属污染环境的指标参数。而且在高的 Cu 暴露浓度下, 暴露时间长 (21 天) 的 *F.candida* 生长率降低比暴露时间短 (7 天) 的要显著得多 ( $p < 0.01$ ), 与 Fountain1 和 Hopkin<sup>[9]</sup> 研究结果相类似, 这说明暴露时间和暴露浓度一样对 *F.candida* 的生长有明显的负作用, 这些与 *F.candida*  $EC_{50}$  随暴露时间延长而降低的结果相符合。与我们的标准土壤实验结果相比, 相同 Cu 暴露浓度下喂养实验中 *F.candida* 成虫体长相对较

表 1 培养皿暴露实验中酵母食物 Cu 浓度对 *F.candida* 产卵时间的影响  
Table 1 Effects of different Cu concentrations in yeast food on oviposition time of *F. candida* in food exposure

Cu 浓度处理 ( $\mu\text{g/g}$ )	产卵时间 (d)	Std. error
0	5.33	0.33
150	5.67	0.33
270	4.67	0.33
485	6.67	0.33
872	7.00	0.00
1 565	8.33	0.88
2 803	12.6	2.85
5 002	9.33	2.33

注: 产卵时间为从暴露实验开始到产卵的时间。

短, 特别在高暴露浓度下, 这种体长差异性更为明显。而且相同 Cu 暴露浓度下培养皿食物暴露实验中 *F.candida* 生长率增加幅度比标准土壤实验中的要低得多, 同样培养皿食物暴露实验中 *F.candida*  $EC_{50}$  比标准土壤实验中的要低得多<sup>[16]</sup>。这些结果表明重金属污染的食物相对污染土壤对 *F.candida* 的生长率毒害效应更大。Pedersen 等<sup>[12]</sup> 研究表明, 在未受污染的土壤上加入重金属污染的酵母食物造成跳虫生长率的降低程度比重金属污染土壤的要高, 但比本研究培养皿重金属污染酵母食物喂养实验中 *F.candida* 生长率降低程度则低得多, 这些暗示 *F.candida* 的生境可能对 Cu 的生物有效性有影响, 从而影响 *F.candida* 生长率的变化。*F.candida* 体内 Cu 的积累与 Cu 的暴露浓度都呈明显的剂量-效应关系, 说明 *F.candida* 体内 Cu

含量与土壤污染程度有密切关系。并且在高的 Cu 暴露浓度下, *F.candida* 体内 Cu 的积累可以达到较高的程度, 说明 *F.candida* 可能对 Cu 具有较高的耐受性。这些可能是培养皿食物暴露实验中 Cu 暴露浓度下 *F.candida* 成虫的体长比标准土壤实验的短得多的原因之一, 也是导致 *F.candida* 产卵时间发生延迟现象和繁殖率降低的内在原因。

#### 参考文献:

- [1] ISO. Soil Quality - Effects of Pollutants on Earthworms (*Eisenia fetida*)-Part 2: Determination of Effects on Reproduction. No. 11268-2-1998. Geneva: International Organisation for Standardisation, 1998: 1-20
- [2] ISO. Soil Quality - Effects of Soil Pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for Determination of Effects on Reproduction. No.11267. Geneva: International Organisation for Standardisation, 1999: 1-24
- [3] OECD. Toxicity Testing with the Collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the Results of a Ringtest. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2008: 1-28
- [4] Pedersen BM, Temminghoff EJM., Marinussen, MPJC, Elmegaard N, Van Gestel CAM. Copper accumulation and fitness of *Folsomia candida* Willem in a copper-contaminated sandy soil as affected by pH and soil moisture. *Applied Soil Ecology*, 1997, 6: 135-146
- [5] Van Straalen, Van Meerendonk NM. Biological half-lives of lead in *Orchesella cincta* (L.) (Collembola). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1987, 38: 213-219
- [6] Bengtsson G, Gunnarsson T, Rundgren S. Growth changes caused by metal uptake in a population of *Onychiurus armatus* (Collembola) feeding on metal polluted fungi. *Oikos*, 1983, 40: 216-225
- [7] Chettri MK, Sawidis T, Karataglis S. Lichens as a tool for biogeochemical prospecting. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 38: 322-335
- [8] Scott-Fordsmand JJ, Krogh PH, and Weeks JM. Sublethal toxicity of copper to a soil-dwelling springtail *Folsomia metaria* (Collembola: Isotomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16: 2 538-2 542
- [9] Fountainl MT, and Hopkin SP. Continuous Monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a Metal Exposure Test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 48: 275-286
- [10] Crommentuijn T, Doornekamp A, Van Gestel CAM. Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia Candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Applied Soil Ecology*, 1997, 5: 261-271
- [11] Smit CE, Van Gestel CAM. Influence of temperature on the regulation and toxicity of zinc in *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 37: 213-222
- [12] Pedersen BM, Cornelis, Van Gestel AM, and Elmegaard N. Effects of copper on reproduction of two collembolan species exposed through soil, food, and water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(10): 2 579-2 588
- [13] Van der Zee SEATM, Temminghoff EJM, Marinussen MPJC. Competition effects for copper between soil, solution and yeast in bioassay for *Folsomia candida* Willem. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2004, 23(7): 1 743-1 750
- [14] 李晓勇, 骆永明, 柯欣, 孙明明. 土壤铜污染对弹尾目的急性毒性实验的初步研究. *土壤学报*, 2011, 48(1): 195-199
- [15] SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA, 2004: 1-44
- [16] 李晓勇. 重金属污染土壤的弹尾目昆虫的响应机制(博士后出站报告). 南京: 中国科学院南京土壤研究所, 2010: 6-17

## Acute Toxicity Tests of Cu Pollution on *Folsomia candida* of Collembolan

LI Xiao-yong<sup>1,2</sup>, LUO Yong-ming<sup>1</sup>, KE Xin<sup>1,3</sup>, TIAN Ye<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

2 Institute of Two Features of Social Construction in CZT, Hunan University of Science and Technology, Zhuzhou, Hunan 412008, China;

3 Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** *Folsomia candida* is commonly used in the bioassays as a representative collembolan species because of its large proportion of biomass in edaphic ecosystems and important index creature in soil environment. This research results showed that no mortality in *F. candida* was found in food exposure test, and significant effects of Cu on the growth and reproduction of *F. candida* were observed in food exposure (Growth 21 days  $R^2 = 0.9302$ ,  $F_{1,7} = 25.2$ ,  $p < 0.01$ ; Reproduction:  $R^2 = 0.9459$ ,  $F_{1,7} = 17.2$ ,  $p < 0.01$ ), and dose-effect relation models of population characteristics of *F. candida* against Cu in soil and food exposure were established, thus the parameters such as reproduction and growth rates were more sensitive to Cu in food exposure test than mortality. The longer exposure time was, the more significantly the growth rates reduced at high Cu exposure concentrations compared to the control during continuously monitoring ( $p < 0.01$ ), and the appearance of eggs delayed at the highest exposure concentrations ( $F_{1,7} = 3.69$ ,  $p < 0.05$ ), suggesting that exposure time and Cu exposure concentration also had negative effect on *F. candida*. *F. candida* can accumulate Cu in high concentration when exposed to high Cu concentrations, and significant toxic effects of Cu in *F. candida* on the reproduction of *F. candida* were observed ( $R^2 = 0.8109$ ,  $p < 0.01$ ), indicating *F. candida* had a high resistance to Cu, which might be reason of the significant reduction of growth and reproduction and the delay of oviposition.

**Key words:** *F. candida*, Toxicity, Cu, Food culture, Continuous monitoring