土壤弹尾目昆虫 *Folsomia candida* 对铜污染的急性毒理初步研究*

李晓勇[1,2]　骆永明[1†]　柯　欣[1,3]　孙明明[1]

（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 湖南工业大学环境工程与科学研究所，湖南株洲　412008）

（3 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所，上海　200032）

ACUTE TOXICITY OF COPPER POLLUTION TO *FOLSOMIA CANDIDA* (COLLEMBOLAN) IN SOIL

Li Xiaoyong[1,2]　Luo Yongming[1†]　Ke Xin[1,3]　Sun Mingming[1]

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

(2 *Institute of Enviromental Engineering and Science, Hunan University of Science and Technology, Zhuzhou, Hunan* 412008, *China*)

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

关键词　白符跳（*Folsomia candida*）；急性毒性；铜；土壤

中图分类号　X174　　**文献标识码**　A

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受到关注。对土壤质量评价的方法长期以来集中在检测重金属污染物质在土壤中的浓度及化学形态等方面，而对于重金属、土壤和生物之间的相互作用很少考虑，因而难以全面评估重金属对土壤环境的生态毒性效应[1]。重金属污染土壤的生物评价是对化学评价的有效补充和相互验证。土壤弹尾目昆虫（跳虫）作为土壤动物群落中的优势物种之一，是土壤环境的重要指示生物，在对污染环境的生态评估研究中得到越来越多的重视[2-5]。国外众多研究利用跳虫死亡率、繁殖率和生长率等指标来评估土壤污染物对跳虫的毒性效应[6-9]，实验多集中于土壤暴露途径。Heupel[10]和 Natal-da-LuzT 等[11]对跳虫在土壤中动态行为研究表明逃避实验可以作为土壤重金属污染的早期鉴定方法。但是有关弹尾目体内重金属含量与土壤污染状况的关联以及对跳虫的毒性的影响研究较少。我国虽然在弹尾目昆虫生物学特性、生理以及分类学等方面进行了大量的研究[12-13]，但关于跳虫的生态学毒理研究较少[4-5]。本研究选择弹尾目昆虫 *Folsomia candida*（白符跳）为供试昆虫，开展滤纸接触实验、逃避实验、标准土壤等急性毒性实验，研究水溶液和土壤两种暴露条件下重金属铜对跳虫的毒性效应，评估各实验途径的优劣，为土壤重金属污染的生态毒理诊断提供依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料

供试污染物以重金属 Cu 为代表，选用分析纯 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 试剂。主要仪器设备有生物培养箱，硬质塑料培养皿，无灰定性滤纸。

供试跳虫 *Folsomia candida* 最初来自丹麦奥胡斯大学陆地生态学院，在国内培养超过 1 年。培养方法参考 OECD [14]：试验前放置于培养皿（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，

* 国家自然科学基金项目（40971157，40671105，40432005）和江苏省博士后基金（No. 0802030C）共同资助

† 通讯作者，E-mail：ymluo@issas.ac.cn

作者简介：李晓勇（1973—），男，博士后。E-mail：xyli@issas.ac.cn

收稿日期：2009－05－15；收到修改稿日期：2009－09－24

12 h∶12 h 光照与黑暗循环(400 ~ 800 lux),间隔 3 ~ 5 d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(跳虫个体年龄差异不超过 3 d,以减少年龄和个体大小的差别对实验的影响)。

F. candida 同步化步骤如下: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 d 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 d 内每隔 12 h 将卵片移入新的培养皿中,在原皿中得到 0 ~ 3 d 年龄大小的幼虫,在皿中加入酵母,培养 8 ~ 9 d 后用于实验。

1.2 实验方法

1.2.1 滤纸实验 Cu^{2+}溶液配制:称取一定量的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 固体颗粒于 20 ml 蒸馏水中,参考 Krogh[15] 的方法,按几何级数(1.8 ~ 2 倍)配成 0、100、200、360、648、1 166、2 099、3 779、6 802 μg ml^{-1} Cu^{2+}溶液;在培养皿中铺垫上中性定性滤纸,加入不同浓度的 Cu^{2+}溶液,刚好浸透滤纸,每隔 24 h 加入微量蒸馏水补偿蒸发水分,以保持滤纸湿度。各培养皿中加入 10 头同步化的成虫,每个浓度重复 3 个,放入 20℃生物培养箱,光暗周期 12 h∶12 h 条件下保存;隔 4 h、10 h、22 h、46 h、72 h 观察记录死亡个数。

1.2.2 逃避实验 标准土壤的配制[14]:10% 泥炭 +20% 的高岭土 +70% 干工业沙(<40 目)充分混合,使之尽可能均匀(泥炭来自于东北的黑色泥炭(C/N = 83.3,pH 为 5.1 ± 0.2);高岭土为粉末状,高龄石含量 >30%;工业沙为一般的工业建筑使用的沙子);最大持水量约为 26.7%,pH 为 6.6 ± 0.5;Cu^{2+}溶液配制同上。将 40.0 g 标准土壤放入培养皿中,用铝片将土隔分为两部分[10],一半加入 3.3 ml蒸馏水,另一半加入不同浓度的 Cu^{2+} 溶液 3.3 ml,充分搅拌,使土壤处理浓度分别 0、59、107、192、346、624、1 122 μg g^{-1};各部分均用吸虫器吸取同步化的 *F. candida* 10 头于土壤表面,每个浓度重复 3 个。放入 20℃恒温生物培养箱保存 6 h,抽掉铝隔片,将中间土轻轻压实,再放入 20℃恒温生物培养箱保存 3 d,用水浮法分别计数各分隔部分保存存活跳虫的数量(成虫存活率 95% 以上)[10]。

1.2.3 标准土壤实验及 *F. candida* 体内 Cu 含量的测定 标准土壤及 Cu^{2+}溶液的配制同 1.2.2;称取 30.0 g 标准土壤于环刀中,加入5.0 ml不同浓度的 Cu^{2+}溶液于各样品中,充分搅拌,使之尽可能均匀,放入培养箱 12 ~ 24 h 后取出,各放入同步化的 *F. candida* 10 头(年龄 9 ~ 10d),加入约 15 mg 干酵母。每个浓度重复 3 个,放入 20℃恒温生物培养箱培养 28 d。每隔 1 周加入适量的蒸馏水,以补充蒸发水量,隔 2 周加一次酵母。实验结束后,用改进 Tullgren 漏斗烘虫设备烘虫 2 d,烘出的活成虫放入培养皿中,在恒温生物培养箱保存 12 h。为了了解 *F. candida* 体表吸附的 Cu 含量对测试体内 Cu 含量的可能影响,选用0.01mol L^{-1}EDTA 溶液提取 *F. candida* 体表吸附的 Cu 约 12 h,测试提取液中 Cu 最高含量为 0.15 μg g^{-1},低于 *F. candida* 体内 Cu 含量约几百倍,表明 EDTA 提取的 *F. candida* 体表的 Cu 含量相对体内 Cu 含量可以忽略不计。成虫从培养箱取出后用蒸馏水淋洗,然后用滤纸将虫体表面蒸馏水吸干,放入各三角瓶中,放入 50℃烘箱中过夜,取出冷却后称重。按 7∶1 比例加入 1.75 ml 的 HNO_3 和0.25 ml$HClO_4$ 至装虫的三角瓶中,瓶口覆以玻璃漏斗,然后置于电热板上 80℃加热 1 h、180℃加热 2 h、220℃加热 2 h,蒸至溶液近干,冷却锥形瓶,加入用双蒸水配制的 0.1% HNO_3溶液或双蒸水少许(1 ml 左右),冲洗玻璃漏斗,轻轻摇晃三角瓶以加速溶解残留物,重复 2 ~ 3 次,将溶液全量转入容量瓶,用双蒸水定容至 10 ml,用中性定性滤纸过滤,待测;过滤液中 Cu 含量用 Varian Spectr AA 220 型石墨炉原子吸收光谱仪测试。仪器工作中使用的基体改进剂为 0.5 mg L^{-1} NH_4NO_3 溶液。

1.3 统计方法

试验结果采用 Statistica 6.0 数据处理软件进行方差、相关性和多元回归统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同暴露时间、暴露浓度下白符跳的死亡率滤纸实验

对实验数据进行统计分析,暴露时间小于 10 h,白符跳死亡率没有明显变化;当暴露时间大于 10 h(特别是暴露时间大于 46 h),随着暴露时间和暴露浓度的增加,白符跳死亡率明显增加(图 1),暴露时间,暴露浓度与白符跳死亡率显著相关($p < 0.05$)。选取 46 h 和 72 h 暴露时间,计算得到一定时间死亡率和暴露浓度的线性回归方程:46 h:$y = -2E-08x^2 + 0.000\ 2x - 0.004\ 7$, $R^2 = 0.959\ 6$, $p < 0.01$;72 h:$y = -3E-08x^2 + 0.000\ 3x + 0.0464$, $R^2 = 0.969\ 1$, $p < 0.01$ (y 代表死亡率,x 代表暴露浓

度)。当死亡概率为 50% 时,求得其对应暴露浓度即半数致死浓度 LC_{50}(46 h) = 2 585 μg g^{-1}(LC_{50} 变化范围:2 015 ~ 3 083 μg g^{-1}); LC_{50}(72 h) = 1 579 μg g^{-1}(LC_{50}变化范围:1 104 ~ 1 911 μg g^{-1})。

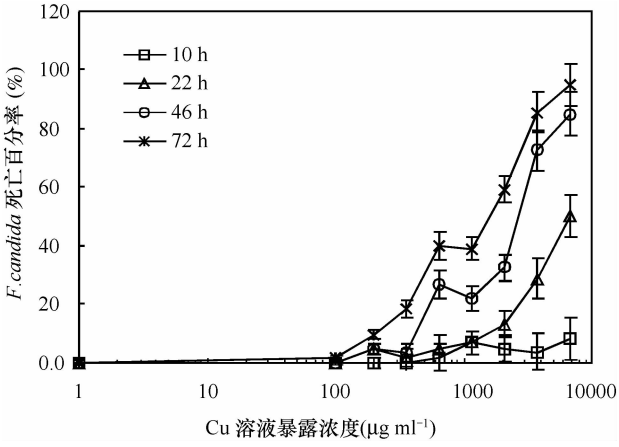

图 1　滤纸接触法的白符跳 Cu 急性毒性实验结果

2.2　不同暴露浓度下白符跳的标准土壤逃避实验

在未添加 Cu 污染物的对照标准土壤中,白符跳分布较为均匀;加入最高浓度 Cu 的标准土壤里,白符跳的逃避率最高。随着加入 Cu 污染物的浓度增高,白符跳的逃避率总体上也增高,表明白符跳对 Cu 污染物存在较高的敏感性,能够对低于 LC_{50}(甚至更低)的重金属含量产生反应(图 2)。

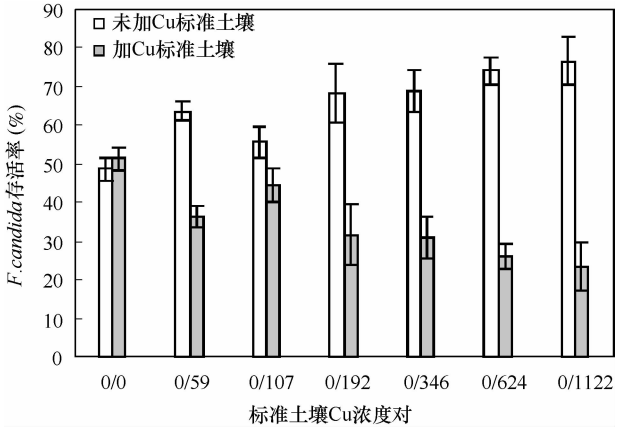

图 2　标准土壤中不同 Cu 暴露浓度(μg g^{-1}干土)下 *F. candida* 的逃避实验

2.3　标准土壤实验中 *F. candida* 体内 Cu 含量

F. candida 体内 Cu 含量测试结果表明,*F. candida* 体内 Cu 含量与土壤中 Cu 暴露浓度表现出数据统计意义上的较明显的剂量 - 浓度对应关系($p < 0.05$),即随着土壤中 Cu 暴露浓度的增加,体内 Cu 含量相对对照浓度(47.7 μg g^{-1})总体上显示出明显增加的趋势(图 3a);从图 3b 还可以知道,*F. candida* 的 Cu 富集因子 CF(CF = 体内 Cu 含量/土壤 Cu 浓度)随着土壤 Cu 浓度的增加而呈现下降的趋势。

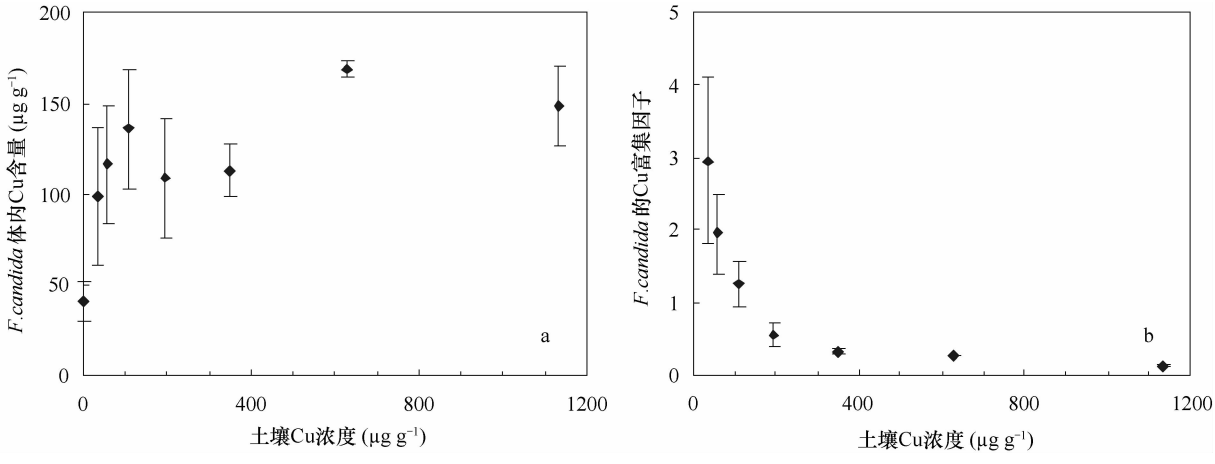

图 3　标准土壤实验中 *F. candida* 体内 Cu 含量(a)及富集因子(CF)(b)与土壤 Cu 浓度相关关系图

3　结论与讨论

滤纸接触法是一种皮肤染毒的方式,该方法方便快捷。通过实验结果可以初步证明高浓度重金属 Cu 对跳虫的毒性,该方法所计算得的重金属 Cu 对弹尾目 *F. candida* 的 LC_{50}值受暴露时间影响较大,其所显示的只是通过皮肤接触溶液所产生的毒性信息,因此很难反映重金属对环境的真实影响,但可以用于重金属对跳虫的潜在毒性的早期评估

实验。Pedersen 等[16]研究表明,土壤暴露实验可能较食物和溶液暴露实验更重要。Krogh[15]研究显示标准土壤实验中重金属 Cu 对弹尾目 *F. candida* 的 LC_{50}平均值为 1 541 μg g^{-1}(442 ~3 802),其实验有效性接近 80%,数据可靠;跳虫繁殖率的 EC_{50}也具有很高的有效性,数值差异基本在一个数量级上,说明在土壤污染生态风险评估方面,标准土壤实验的结果具有相当的可靠度。LC_{50}和 EC_{50}的变化表明实际环境中重金属对跳虫的毒性可能不仅取决于重金属及其化合物的本身毒性,同时还与重金属在土壤中的行为及在跳虫体内的代谢动力学密切相关。因此,使用人工土壤法能够尽可能模拟弹尾目跳虫生活的自然土壤环境,从而使实验结果尽可能真实地反映重金属在自然界中的实际影响。而且弹尾目*F. candida*主要生活在土壤和枯草叶层中,其与土壤水溶液接触并不直接密切,而主要与土壤和食物直接接触[16],因而,标准土壤实验测定的重金属毒性结论较滤纸接触法更具代表性,更加客观准确。

研究表明,跳虫能够"感知"土壤污染物的存在而发生迁移行为[17,18],逃避实验可以作为土壤污染的早期预警工具[10-11]。本研究中不同 Cu 暴露浓度下逃避实验显示白符跳总体上表现出对 Cu 污染的趋避行为,对于高浓度 Cu 污染的土壤有明显的逃避行为。其逃避反应的差异性可能与 Cu 在标准土壤的不均匀分布或土壤性质有关。总体而言,逃避实验所表现对重金属污染物的敏感度可能较死亡率或繁殖率实验的更高,类似于跳虫在有机污染土壤中的逃避实验结果[9]。逃避实验表明弹尾目 *F. candida* 对重金属 Cu 具有较强的敏感性,能够对低于 LC_{50}的重金属含量产生逃避反应,暗示其对重金属 Cu 的敏感度可能较死亡率实验的更高,可以用作土壤污染生态风险评估的早期预警工具。

总体上,*F. candida* 体内 Cu 含量与土壤中 Cu 暴露浓度表现出数据统计意义上的较明显的剂量-浓度对应关系,说明 *F. candida* 体内 Cu 含量与土壤污染程度有密切关系。*F. candida* 体内很高的 Cu 含量(最高 169 μg g^{-1})表明其具有特殊的耐受重金属机理。前人研究表明跳虫可能主要有两种排泄重金属方式:(1) 随着粪便直接将重金属排泄掉;(2) 被吸收的重金属主要赋存于中肠上皮细胞内,随着中肠上皮细胞脱落,重金属物质排出体外[18-19]。在土壤最高暴露浓度 1 133 μg g^{-1}时,*F. candida*体内 Cu 含量相对前一浓度有下降的趋势($p > 0.05$),这与 *F. candida* 食物喂养实验结果类似[20],可能因为 *F. candida* 对高浓度 Cu 逃避而减少了食物量,这可以从前面的逃避实验得到印证;或是因为在高浓度的 Cu 环境中,*F. candida* 可能具有更高的排除 Cu 的速率(如褪皮增多)[21-23]。*F. candida* 的 Cu 富集因子 CF 随着土壤 Cu 浓度的增加而呈现下降的趋势,进一步证明 *F. candida* 对高浓度 Cu 逃避或可能具有更高的排除 Cu 的速率。

参 考 文 献

[1] Leitgib L, Kalman J, Gruiz K. Comparison of bioassays testing whole soil and their water extract from contaminated sites. Chemosphere, 2007, 66: 428—434

[2] 尹文英. 中国土壤动物. 北京:科学出版社,2000

[3] Nursita A I, Singh B, Lees E. The effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tullberg (Collembola). Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 60(3):306—314

[4] 许杰,柯欣,宋静,等. 弹尾目昆虫在土壤重金属污染生态风险评估中的应用. 土壤学报,2007,44(3):544—549

[5] 陈建秀,麻智春,严海娟,等. 跳虫在土壤生态系统中的作用. 生物多样性,2007, 15 (2):154—161

[6] Fountain M T, Hopkin S P. *Folsomia candida* (Collembola): A standard soil arthropod. Annual Review of Entomology, 2005, 50: 201—222

[7] Menta C, Maggiani A, Vattuone Z. Effects of Cd and Pb on the survival and juvenile production of *Sinella coeca* and *Folsomia candida*. European Journal of Soil Biology, 2006, 42: 181—189

[8] Domene X, Alcaniz J M, Andres P. Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan *Folsomia candida*. Applied Soil Ecology, 2007, 35: 461—472

[9] Eom I C, Rast C, Veber A M, et al. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 67: 190—205

[10] Heupel K. Avoidance response of different collembolan species to Betanal. European Journal of Soil Biology, 2002, 38: 273—276

[11] Natal-da-Luz T, Ribeiro R, Sousa J P. Avoidance tests with Collembola and earthworms as early screening tools for site specific assessment of polluted soils. Environ Toxicol Chem, 2004, 23: 2 188—2 193

[12] 柯欣,赵立军,尹文英. 青冈林土壤跳虫群落结构在落叶分解过程中的变化. 生态学报,2001,21(6):982—987

[13] 柯欣,岳巧云,傅荣恕. 浦东滩涂中型土壤动物群落结构及土质酸碱度生物评价分析. 动物学研究,2002,23(2):129—135

[14] OECD. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest//Organisation for economic cooperation and development. Paris, France, 2008

[15] Krogh P H. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish

EPA Report Series, 2008, 1—44

[16] Pedersen M B, Cornelis A M, van Gestel, et al. 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

[17] Krogh P H. Does a Heterogeneous distribution of food or pesticide affect the outcome of toxicity tests with Collembola? Ecotoxicol. Environ. Safety, 1995, 30: 158—163

[18] Humbert W. Cytochemistry and X-ray microprobe analysis of the midgut of *Tomocerus minor* Lubbock (Insecta, Collembola) with special reference to the physiological significance of the mineral concretions. Cell Tiss Res, 1978, 187: 397—416

[19] Joossse E N G, Buker J B. Uptake and excrition of lead by litter-dwelling Collembola. Enviromental Pollution, 1979, 18: 235—240

[20] Michelle T, Fountain1, Steve P H. Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a metal exposure test. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 48: 275—286

[21] Filser J, Wittman R, Lang A. Response types in Collembola towards copper in the microenvironment. Environ. Pollut., 2000, 107: 71—78

[22] van Gestel C A M, Hensbergen P J. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. Environ. Toxicol. Chem., 1997, 16: 1 177—1 186

[23] Solomon K R, Sibley P. New concepts in ecological risk assessment: Where do we go from here? Marine Pollution Bulletin, 2002, 44: 279—285