

纳米氧化铜对斑马鱼的半致死浓度测定和毒性研究

刘在平¹, 张松林², 罗娟花²

¹湖北万绿生态环境科技有限公司, 湖北 荆门

²西北师范大学地理与环境科学学院, 甘肃 兰州

收稿日期: 2024年3月3日; 录用日期: 2024年3月22日; 发布日期: 2024年4月9日

摘要

通过纳米氧化铜溶液对斑马鱼的急性毒性实验计算出纳米氧化铜对斑马鱼的半致死浓度, 为纳米氧化铜的水生生物毒性实验研究和安全使用提供参考资料。采用直线回归法得出浓度对数 - 死亡率的回归方程, 由于96 h、120 h、144 h、168 h的回归方程的R基本为0.95, 可求得纳米氧化铜对斑马鱼的96 h-LC₅₀、120 h-LC₅₀、144 h-LC₅₀、168 h-LC₅₀和最大容许浓度(MPC)。经计算纳米氧化铜对斑马鱼的96 h-LC₅₀是635.6194 mg·L⁻¹, MPC为6.3562 mg·L⁻¹; 120 h-LC₅₀是538.8838 mg·L⁻¹, MPC为5.3888 mg·L⁻¹; 144 h-LC₅₀是487.6510 mg·L⁻¹, MPC为4.8765 mg·L⁻¹; 168 h-LC₅₀是443.1020 mg·L⁻¹, MPC为4.4310 mg·L⁻¹。

关键词

纳米氧化铜, 斑马鱼, 半致死浓度, 毒性

The Determination of Half Lethal Concentration and Toxicity Research about Nano Copper Oxide towards Zebrafish

Zaiping Liu¹, Songlin Zhang², Juanhua Luo²

¹Hubei Wanlv Ecological Environmental Technology Co. Ltd., Jingmen Hubei

²College of Geography and Environmental Science, Northwest Normal University, Lanzhou Gansu

Received: Mar. 3rd, 2024; accepted: Mar. 22nd, 2024; published: Apr. 9th, 2024

Abstract

Through acute toxicity experiment of the nano copper oxide solution to zebrafish, half to death

文章引用: 刘在平, 张松林, 罗娟花. 纳米氧化铜对斑马鱼的半致死浓度测定和毒性研究[J]. 环境保护前沿, 2024, 14(2): 230-235. DOI: 10.12677/aep.2024.142031

concentration of nano copper oxide to zebrafish was calculated, which provided a reference for the experimental study of toxicity and safe use of nano copper oxide in aquatic organisms. Linear regression method was used to draw the regression equation of concentration logarithm-mortality, because the R of regression equation of 96 h, 120 h, 144 h and 168 h is basically 0.95, the 96 h-LC₅₀, 120 h-LC₅₀, 144 h-LC₅₀, 168 h-LC₅₀ and maximum permissible concentration of nano copper oxide to zebrafish can be obtained. 96 h-LC₅₀ of nano copper oxide to zebrafish is 635.6194 mg·L⁻¹ MPC is 6.3562 mg·L⁻¹; 120 h-LC₅₀ is 538.8838 mg·L⁻¹, MPC is 5.3888 mg·L⁻¹; 144 h-LC₅₀ is 487.6510 mg·L⁻¹, MPC is 4.8765 mg·L⁻¹; 168 h-LC₅₀ is 443.1020 mg·L⁻¹, MPC is 4.4310 mg·L⁻¹.

Keywords

Nano Copper Oxide, Zebrafish, Half Lethal Concentration, Toxicity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

根据欧盟委员会新修订的定义, 纳米材料是指由固体颗粒组成的自然的、偶然的或人造的材料, 这些颗粒既可以单独存在, 也可以作为可识别的组成颗粒存在于聚集体或结块中, 并且在基于数量的尺寸分布中, 这些颗粒的 50%及以上应满足以下至少一个条件: (1) 颗粒的一个或多个外部尺寸在 1 纳米至 100 纳米之间; (2) 颗粒具有细长的形状, 如棒状、纤维状或管状, 其中两个外部尺寸小于 1 纳米, 另一个尺寸大于 100 纳米; (3) 颗粒具有板状形状, 其中一个外部尺寸小于 1 纳米, 其他尺寸大于 100 纳米[1]。纳米材料颗粒的总数量在整个材料的所有颗粒总数中占 50%以上, 其尺度已接近光的波长, 加上其具有大表面的特殊效应。因此, 其所表现的熔点、磁性、光学、导热和导电等特性往往不同于该物质在整体状态时所表现的特性[2]。

纳米材料在环境保护、医药、电子工业、纺织工业和机械工业有很广泛的用途, 尤其是随着纳米技术的迅速发展, 具有独特物理化学性质的纳米金属及其氧化物, 在催化、涂料、电子、机械和生物医学领域被应用。在其给人们带来便利的同时, 其对环境以及人体健康的潜在影响和风险也引起各方面的广泛关注。纳米材料可通过直接排放、废弃物排放、常规使用等多种途径进入水环境, 在水体有机质的作用下具有较好的分散性和稳定性, 进入水环境的纳米颗粒可通过食物链在鱼类等水生生物体内富集并最终进入人体, 对人体健康构成威胁[3]。

关于纳米氧化铜的毒性效应, 学者主要对藻类及水稻、小麦和紫花苜蓿植物以及土壤微生物群落、肉鸡、人体肺细胞等毒性进行了分析研究[4]-[28]。王黎墨等[29] [30]研究了纳米氧化铜对斑马鱼生殖系统和甲状腺系统毒性效应, 实验结果表明, 斑马鱼经不同浓度纳米氧化铜悬浮液暴露之后, 会引起性激素水平失衡、性腺组织损伤、下丘脑 - 垂体 - 性腺轴相关基因表达紊乱等生殖毒性。不同粒径和形貌的纳米氧化铜对斑马鱼也有毒性影响, 李筱璇[31]使用球形、片状纳米氧化铜进行实验, 得出 150~250 nm 球形纳米氧化铜 96 h-LC₅₀ 为 641.4254 mg·L⁻¹, 40 nm 球形纳米氧化铜 530.5617 mg·L⁻¹; 片状纳米氧化铜 224.2424 mg·L⁻¹。崔雯[32]用不同浓度的纳米氧化铜(CK、10、50、100 mg·L⁻¹)对斑马鱼进行暴露实验, 实验结果发现经暴露后斑马鱼肝脏发生不同程度的损伤, 且暴露后各处理组中的胰岛素和胰高血糖素均上升, 而斑马鱼肝脏糖原、丙酮酸含量降低, 即糖代谢受到显著影响。但纳米材料对成年水生生物的急性毒性研究较少, 本文通过纳米氧化铜对成年斑马鱼的急性毒性实验计算出纳米氧化铜对斑马鱼的半致

死浓度, 探讨其对成年斑马鱼的毒性效应, 为纳米氧化铜的水生生物毒性实验研究及其安全使用提供参考资料, 该研究也有助于了解纳米氧化铜的生态毒性急性实验及相应机制, 为制订纳米氧化铜废水排放标准提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验生物

斑马鱼购于市场, 行为活泼, 反应灵敏, 体色光亮, 平均体长(2.5 ± 0.25) cm, 平均体重(0.3 ± 0.1) g。成鱼经 4% 的食盐水消毒后进入实验室, 实验前在实验室内驯养 7 d 以上, 驯养过程中水温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 每天喂食红线虫 1 次, 自然死亡率小于 0.5%, 挑选活泼和体形均匀的成鱼作为实验用鱼。

2.1.2. 实验物质

高纯纳米氧化铜, 40 nm, 球形, 纯度 $> 99.5\%$, 上海晶纯试剂有限公司。

2.1.3. 实验仪器

曝气装置、定时恒温磁力搅拌器、pH 计、溶解氧测定仪、解剖镜、解剖刀、鱼缸、烧杯和电子分析天平等。

2.1.4. 实验用水

为避免水质不均对实验造成误差, 整个斑马鱼毒性实验过程中的实验用水, 包括稀释水和清洁用水, 均为统一制备, 为充分曝气、除氯 3 d 的自来水, 温度保持(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 7, 硬度为(229.14 ± 0.45) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 质量浓度计), 水中 $\rho(\text{DO}) > 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2. 方法与步骤

2.2.1. 预实验

以等差间距设置 9 个纳米氧化铜浓度组: 100、300、500、700、900、1100、1300、1500 和 1700 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。采用 40 L 圆形玻璃鱼缸进行暴露预实验, 选取体长相近, 健康活泼的斑马鱼置于各缸中, 每缸 10 条鱼。每个浓度设三个平行组, 预实验设置曝气 3 d 的自来水为对照组(CK)。暴露预实验采用静态置换法[33], 每 24 h 更换纳米氧化铜溶液一次。纳米氧化铜易黏附和沉淀在鱼缸中, 因此, 在预实验过程中用磁力搅拌器搅拌溶液, 搅拌时控制转速, 使其不影响斑马鱼的正常活动。暴露 168 h, 预实验过程中每天喂食 1 次, 不曝气。预实验水温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 7, $\rho(\text{DO}) > 4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。暴露预实验开始时, 每隔 6 h 观察实验鱼是否出现身体不平衡、游动缓慢以及死亡等现象, 记录 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h 的死亡数, 并及时清除死鱼。

2.2.2. 正式实验

根据预实验所得结果, 鱼在预实验期间完全没有死亡的最高浓度和全部死亡的最低浓度分别是 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 700 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。所以实验以等差间距设置 9 个纳米氧化铜浓度组: 300、350、400、450、500、550、600、650、700 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。采用 40 L 圆形玻璃鱼缸进行暴露实验, 选取体长相近、健康活泼的斑马鱼置于各鱼缸中, 每个鱼缸 10 条鱼。每个浓度设三个平行组, 实验设置曝气 3 d 的自来水为对照组。实验方法和条件与预实验完全相同。暴露 168 h, 记录斑马鱼的异常行为情况, 如游动速度、呼吸状况、鱼体形态变化(如侧翻, 翻白肚、倒立等等), 记录 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h 的死亡数, 及时清除死鱼。

2.3. 数据处理

以直线内插法[34]得到浓度对数和死亡率的回归方程式, 将实验所得数据输入 SPSS 软件, 使用 SPSS22.0 软件计算不同时间的半致死浓度(LC₅₀), 统计检验水平设为 0.05, $P < 0.05$, 表示有显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异, SPSS 软件处理数据步骤: 进入 SPSS 数据编辑窗口“SPSSData Editor”, 首先单击窗口左下角“Variable View”标签定义变量, 在第 1, 2, 3 行的变量名(name)列中输入 concentration (浓度)、total (供试斑马鱼数)、response (死亡斑马鱼数), 然后再单击窗口左下角“Data View”标签进入数据视图窗口依次输入各组数据, 在数据视图主菜单中, 选择 Analyze→Regression→Probit, 调出“Probit Analyze”对话框, 将 concentration (浓度)选入 Covariate (s)栏中, total (供试斑马鱼数)选入“Total Observed”栏中, response (死亡斑马鱼数)选入“Response Frequency”栏中, 在 Covariate (s)栏下的“Transform”栏中选择“Log base 10”(对数转换)选项, 其它保持默认选项, 然后单击“OK”按钮, 即完成整个操作过程, 在“SPSS Viewer”窗口显示分析结果, 最后, 按照公式 $MPC = LC_{50}/100$ 求出最大容许浓度[35]。

3. 结果与分析

暴露 12 h 内各浓度组斑马鱼均表现出游动急切和结群等现象, 较高浓度组(500 mg·L⁻¹ 以上)斑马鱼出现游动缓慢, 身体逐渐失去平衡、侧游、仰游、呼吸微弱等现象。暴露 24 h 高浓度组(650 mg·L⁻¹ 以上)斑马鱼出现死亡现象, 死亡个体胸鳍和腹部出现发黑现象。观察死亡的斑马鱼, 能够发现斑马鱼的腹部颜色随着所暴露的纳米氧化铜的浓度不同而不同, 即浓度越大颜色越深。解剖死亡的斑马鱼, 在解剖镜下能够看到鱼体内的肝脏和肠明显比正常鱼的肝脏和肠黑, 这可能是由于蓄积了纳米氧化铜所致。观察鱼鳃, 没有明显发现纳米氧化铜的蓄积, 原因可能是鱼鳃呼吸作用所致, 且由于是急性毒性实验, 受暴露时间的限制, 所以短时间内鱼鳃部位没有明显蓄积现象。实验期间对照组(CK)无异常现象。由表 1 可知, 168 h 内随纳米氧化铜质量浓度的升高和暴露时间的增加, 斑马鱼死亡率逐渐升高, 浓度为 650 mg·L⁻¹ 时, 斑马鱼死亡率由 24 h 的 10% 升高到 168 h 的 90%, 浓度为 700 mg·L⁻¹ 时, 斑马鱼死亡率由 24 h 的 10% 升高到 168 h 的 100%。

Table 1. Experimental data recording of acute toxicity of nano copper oxide to zebrafish

表 1. 纳米氧化铜对斑马鱼的急性毒性实验数据记录

N-CuO 浓度 mg·L ⁻¹	经不同暴露时间后各浓度的累计死亡率(%)						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
300	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	10	10	10	20
400	0	0	0	10	20	20	30
450	0	0	10	30	30	50	70
500	0	0	20	40	50	60	70
550	0	10	20	40	50	70	80
600	0	10	30	40	60	70	80
650	10	20	30	50	60	70	90
700	10	30	50	60	80	90	100
0 (CK)	0	0	0	0	0	0	0

采用直线回归法得出纳米氧化铜浓度对数 - 死亡率回归方程, 见表 2。由于 96 h、120 h、144 h、168 h 的回归方程的相关系数 R 基本为 0.95, 可求得纳米氧化铜对斑马鱼 96 h-LC₅₀、120 h-LC₅₀、144 h-LC₅₀、168 h-LC₅₀, 经计算纳米氧化铜对斑马鱼 96 h-LC₅₀ 是 635.6194 mg·L⁻¹, 对斑马鱼的最大容许浓度为 6.3562

mg·L⁻¹; 120 h-LC₅₀ 是 538.8838 mg·L⁻¹, 最大容许浓度为 5.3888 mg·L⁻¹; 144 h-LC₅₀ 是 487.6510 mg·L⁻¹, 最大容许浓度为 4.8765 mg·L⁻¹; 168 h-LC₅₀ 是 443.1020 mg·L⁻¹, 最大容许浓度为 4.4310 mg·L⁻¹。

Table 2. Regression equation of semi-lethal concentration and toxicity of nano copper oxide to zebrafish

表 2. 纳米氧化铜对斑马鱼半致死浓度和毒性回归方程

暴露时间	毒性回归方程	相关系数 R	LC ₅₀ (mg·L ⁻¹)	最大容许浓度(mg·L ⁻¹)
96 h	$y = 68.562 \ln(x) - 392.54$	0.9463	635.6194	6.3562
120 h	$y = 90.556 \ln(x) - 519.55$	0.9695	538.8838	5.3888
144 h	$y = 106.34 \ln(x) - 608.20$	0.9491	487.6510	4.8765
168 h	$y = 116.96 \ln(x) - 662.73$	0.9435	443.1020	4.4310

4. 结论

本研究实验中观察到的斑马鱼出现异常行为和死亡现象, 且通过解剖, 在解剖镜下观察出纳米氧化铜在斑马鱼肝脏和肠里有蓄积。可见, 纳米氧化铜对成年斑马鱼具有急性毒性作用。

通过纳米氧化铜对斑马鱼的急性毒性实验计算出纳米氧化铜对斑马鱼的 96 h、120 h、144 h 和 168 h 半致死浓度及其最大容许浓度意义在于: 对可能进入水体的纳米氧化铜进行毒性分析, 以控制纳米氧化铜的使用量, 为纳米氧化铜水污染生物毒性评价提供科学依据, 之前学者对纳米氧化铜最大容许浓度研究很少, 甚至没有研究, 本研究获得了纳米氧化铜对斑马鱼的最大容许浓度, 这一研究结果为制订水质和纳米氧化铜废水排放标准提供参考。值得一提的是, 纳米氧化铜对成年斑马鱼的急性毒性机理及对斑马鱼胚胎和仔鱼毒性机理有待进一步深入研究。

基金项目

国家自然科学基金项目(51068025); 甘肃省教育厅基金项目(0801-08); 甘肃省自然科学基金(2007GS03614)。

参考文献

- [1] European Commission (2022) Chemicals: Commission Revises the Definition of Nanomaterials. Directorate-General for Environment.
- [2] 陈真. 金属纳米材料生物效应与安全应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 183-185.
- [3] 张学治, 孙红文, 张稚妍. 鲤鱼对纳米二氧化钛的生物富集[J]. 环境科学, 2006, 27(8): 1631-1635.
- [4] 车兴凯. 纳米氧化铜对藻类毒害的机理研究[D]: [博士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [5] 孙明礼. 纳米 CuO 对纤细裸藻的毒性效应及分子机制研究[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津农学院, 2021.
- [6] 方荣. 多壁碳纳米管和纳米氧化铜单一及复合体系对斜生栅藻的毒性效应[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南大学, 2022.
- [7] 刘佳. 纳米氧化铜对底栖动物铜锈环棱螺的生态毒理学效应[D]: [硕士学位论文]. 张家界: 吉首大学, 2012.
- [8] 崔静, 袁旭音, 刘泉, 等. 环境水体中纳米氧化铜对金鱼藻的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(5): 910-915.
- [9] 赵晓欢. 纳米铜、纳米氧化铜对两种游仆虫的毒性效应研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 华东师范大学, 2020.
- [10] 金盛杨, 王玉军, 汪鹏, 等. 不同培养介质中纳米氧化铜对小麦毒性的影响[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(6): 842-848.
- [11] 向垒, 莫测辉, 卢锡洪, 等. 纳米氧化铜对白菜种子发芽的毒害作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(9): 1830-1835.
- [12] Shi, J.Y., Abid, A.D., Kennedy, I.M., et al. (2011) To Duckweeds (*Landoltia punctata*), Nanoparticulate Copper Oxide Is More Inhibitory than the Soluble Copper in the Bulk Solution. *Environmental Pollution*, **159**, 1277-1282.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.028>

- [13] 杨远强. 纳米氧化铜的植物吸收累积与毒性效应初探[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [14] 刘振国, 王伟, 王天慧. 纳米氧化铜对紫花苜蓿种子发芽和幼苗生长的毒害作用[J]. 上海农业学报, 2014, 30(4): 47-51.
- [15] 方清, 晏士玮, 崔彩云. 纳米氧化铜对砷胁迫下水稻种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2020, 47(4): 826-831.
- [16] 王淑玲, 张玉喜, 刘汉柱, 等. 氧化铜纳米颗粒对水稻幼苗根系代谢毒性的研究[J]. 环境科学, 2014, 35(5): 1968-1973.
- [17] 刘涛. 纳米氧化铜在水稻幼苗体内的吸收转运及根系毒性效应[D]: [硕士学位论文]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [18] 张海. 溶解性有机质影响下氧化铜纳米颗粒对水稻根的致毒机制[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [19] 杨倩. 纳米氧化铜对小麦的毒性及调控研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 济南大学, 2023.
- [20] 付宇童. 铜及氧化铜纳米颗粒对土壤和小油菜(*Brassica chinensis* L.)的毒性效应及生态风险研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [21] 郭凯文. 不同浓度纳米氧化铜和纳米氧化锌对高粱根际土壤微生物群落的影响[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2024.
- [22] 颜椿. 纳米氧化铜的环境行为对植物及微生物群落的影响研究[D]: [硕士学位论文]. 成都: 成都理工大学, 2021.
- [23] 汤蕾, 李鑫, 李昕畅, 等. 纳米氧化亚铜和氧化铜的肺细胞毒性差异及影响因素[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(4): 478-485.
- [24] 常振宇, 董海龙, 张笑冰, 等. 纳米氧化铜对藏鸡生产性能及肝脏 c-Myc 表达的影响研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50(3): 17-23.
- [25] 高晨, 耿建芬, 张海容, 等. 纳米氧化铜对肉鸡急性毒性及蓄积毒性试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(3): 119-122, 163-164.
- [26] 张丽霞, 顾雯, 张宏伟, 等. 2 种方法测定氧化铜纳米颗粒对新生大鼠脑微血管内皮细胞毒性的比较研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(2): 133-137.
- [27] 张金波, 吕冬霞, 钟健, 等. 纳米氧化铜对人肝癌细胞的毒性作用[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(8): 1942-1945.
- [28] 赵康峰, 宋予晴, 顾雯, 等. 纳米 CuO 离子化水平及其对细胞毒性影响观察[J]. 环境卫生学杂志, 2018, 8(3): 163-167.
- [29] 王黎墨. 纳米氧化铜对斑马鱼生殖系统和甲状腺系统的干扰效应及机制研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- [30] 王黎墨, 薛永来, 高璐, 等. 纳米氧化铜对斑马鱼甲状腺系统的干扰效应[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 202-205.
- [31] 李筱璇. 不同粒径和形貌的纳米氧化铜对斑马鱼也有毒性影响[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2022.
- [32] 崔雯. 纳米氧化铜对人肝癌细胞 HepG2 细胞和斑马鱼能量代谢的影响及机制研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [33] 蔡道基, 杨佩芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[S]. 北京: 国家环保总局, 1989.
- [34] 彭涛. 水体中铅的浓度对南方鲇的生理生态学影响[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [35] 曹娜, 魏华, 吴陵广, 等. 双酚 A 对斑马鱼肝脏和性腺的作用[J]. 生态学杂志, 2010, 29(17): 2192-2198.