

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210912002

杨淳翔, 刘春生. 环境相关浓度五氯苯酚全生命周期暴露对大型溞的毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(3): 244-255

Yang C X, Liu C S. Whole-life-stage toxic effects of pentachlorophenol in *Daphnia magna* at environmentally relevant concentrations [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(3): 244-255 (in Chinese)

环境相关浓度五氯苯酚全生命周期暴露对大型溞的毒性效应研究

杨淳翔^{1,2}, 刘春生^{1,2,*}

1. 湖北洪山实验室, 武汉 430070

2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

收稿日期: 2021-09-12

录用日期: 2021-11-02

摘要: 水环境是众多化学污染物的归宿地, 因此水生生物, 尤其是生命周期短的浮游动物, 可能在整个生命阶段均处于污染物的暴露中并受到相应的环境危害。五氯苯酚(pentachlorophenol, PCP)是一种典型的持久性有机污染物, 其在自然水体中的浓度从几 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 至几十 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 不等。已有的毒理学研究探究了 PCP 对水生生物部分生命阶段的慢性毒性效应, 而对其全生命周期的环境危害鲜有报道。因此, 本研究以浮游模式动物——大型溞(*Daphnia magna*)为受试生物, 探究了环境相关浓度 PCP 全生命周期暴露对其存活、生长、生殖、心率、游泳行为和基因表达的影响。环境相关浓度(1.74 ± 0.05)、(16.84 ± 1.13)和(166.11 ± 9.47) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 暴露显著抑制了大型溞的游泳行为、心率、个体生长和生殖, 引起了大型溞群体的过早死亡。基因转录结果显示 PCP 暴露显著上调了大型溞生命晚期与心脏疾病和神经递质相关途径的基因表达, 表明大型溞在生命晚期阶段存活率的下降可能与心脏功能障碍和神经活动抑制有关。此外, 本研究发现随着暴露时间的延长, 大型溞各毒性指标的最低观察有效应浓度(lowest observed effect concentration, LOEC)呈下降趋势, 表明污染物全生命周期暴露对大型溞具有更大的环境危害。综上所述, 本研究结果表明化学品部分生命周期的暴露实验可能低估了环境污染物的环境危害, 因此将来开展浮游动物的全生命周期暴露实验评估化学品的环境危害是有必要的。

关键词: 环境污染物; 浮游动物; 全生命周期暴露; 环境相关浓度

文章编号: 1673-5897(2022)3-244-12

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Whole-Life-Stage Toxic Effects of Pentachlorophenol in *Daphnia magna* at Environmentally Relevant Concentrations

Yang Chunxiang^{1,2}, Liu Chunsheng^{1,2,*}

1. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Received 12 September 2021

accepted 2 November 2021

Abstract: The water environment is the destination of many chemical pollutants, so aquatic organisms, especially zooplanktons with short life span, may be exposed to pollutants and suffer related environmental hazards in the whole life stage. Pentachlorophenol (PCP) is a typical persistent organic pollutant. The concentrations of PCP in natural water ranged from a few $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ to dozens of $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Previous toxicological studies have evaluated the

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2019YFD1100501)

第一作者: 杨淳翔(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: 879092618@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: cliu@mail.hzau.edu.cn

chronic toxic effects of PCP in partial life stage of aquatic organisms, but the environmental hazards to its whole life stage have been rarely reported. Therefore, in this study, the zooplankton model animal, *Daphnia magna* (*D. magna*), was used to evaluate the effects of PCP exposure at environmentally relevant concentrations on its survival, growth, reproduction, heart rate, swimming behavior and gene expression. Exposure of PCP at environmentally relevant concentrations (1.74 ± 0.05), (16.84 ± 1.13) and (166.11 ± 9.47) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly inhibited swimming behavior, heart rate, individual growth and reproduction of *D. magna*, resulting in premature death of *D. magna*. The results of gene transcription showed that PCP exposure significantly up-regulated the expression of genes included in pathways related to heart disease and neurotransmitters during the stage of death, indicating that the decrease of survival rate of *D. magna* during the stage of death might be related to cardiac dysfunction and inhibition of neural activity. In addition, this study found that with the extension of exposure time, the lowest observed effect concentration (LOEC) of each toxicity index tested of *D. magna* decreased, indicating that the whole-life-stage exposure of pollutants might have greater environmental hazards to *D. magna*. To sum up, these results show that partial-life-stage exposure experiments of chemicals might underestimate environmental hazards of environmental pollutants. Therefore, it might be necessary to carry out the whole-life-stage exposure experiments of zooplanktons to assess environmental hazards of chemicals in the future.

Keywords: environmental pollutant; zooplankton; whole-life-stage exposure; environmentally relevant concentrations

五氯苯酚(pentachlorophenol, PCP)由于具有良好的抑菌特性,广泛用作除草剂、杀菌剂、防腐剂和防霉剂等,其生产和使用过程中不可避免地会释放到环境中,在各种环境介质中被高频检出^[1]。水环境是污染物的最终归宿地,PCP 主要是通过农业污水、生活污水以及径流方式排放到水体中。有研究对中国七大流域水体中 PCP 进行全面调查,在 600 多个采样点地表水中有 85.4% 检测出 PCP,浓度中位数为 $50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,其中洞庭湖水体 PCP 的浓度最高,为 $103.7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;与此同时水体沉积物中检测出 PCP 浓度范围为 $0.01 \sim 178.19 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (以干质量计)^[2]。在美国的一个木材加工厂附近地表水和地下水检测出 PCP 浓度可达 $0.07 \sim 31.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \sim 23 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[3]。所以 PCP 对于水生生物的危害不可忽视。先前的研究主要关注 PCP 对于鱼类的富集和毒性效应,例如 Li 等^[4]在底特律河附近的多种远洋鱼类血浆中检出 PCP,其浓度范围为 $0.21 \sim 1.62 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (以湿质量计)。有研究发现在 $0.1 \sim 1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PCP 暴露下,斑马鱼(*Danio rerio*)的突触素 I (synaptophysin, SYN)、碘甲腺原氨酸脱碘酶 III 型(recombinant deiodinase, iodothyronine, type III, DIO3)、甲状腺激素受体 α (thyroid hormone receptor α , Thr- α)和甲状腺激素受体 β (thyroid hormone receptor β , Thr- β)的相对 mRNA 表达量增加,这表明,PCP 暴露可能会影响鱼类中枢神经系统发育的时间和协调

性,并通过干扰甲状腺激素调节途径改变甲状腺激素水平^[5]。鱼类处于水生食物网的顶端,属于高级消费者,然而现有研究鲜有关关注 PCP 对于水生生态系统初级消费者的影响。并且,目前 PCP 在全球自然水体中的浓度通常从几 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 到几十 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 不等^[6-7],而现有关于 PCP 对水生生物毒理学研究大都采用高浓度暴露,环境浓度毒理学研究相对匮乏。因此,急需开展环境相关浓度 PCP 对低营养级水生生物的毒性评估研究。

大型溞(*Daphnia magna*)是一种典型的浮游甲壳动物,在水生态系统中广泛分布,作为初级消费者,其在水生食物网中占据重要位置,并且拥有重要的生态位,由于其对环境污染物质比较敏感,已被用作生态毒理学研究中的模式生物^[8-13]。先前有学者开展了 PCP 对于大型溞的毒性研究,发现 $0.0002 \sim 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PCP 暴露大型溞 21 d 后,其可以显著影响大型溞的母代和子代体长,说明其对大型溞可能具有发育毒性及生殖毒性^[14]。但是水生生物终生生活在水中,所以其应该一直处于暴露当中,但是部分生命周期的暴露实验,无法更加真实、准确、全面地反映污染物对水生生物的毒性效应,以至于在污染物评价中由于暴露时间不够而忽视了污染物的生态风险。基于大型溞寿命较短(50 ~ 80 d)的特点,本研究尝试开展大型溞的全生命周期 PCP 暴露实验,最终探究环境相关浓度 PCP 对于大型溞的影响。

综上所述,本研究以模式生物大型蚤为受试物种,在环境相关浓度 PCP 暴露条件下,探寻对大型蚤存活、生长、生殖、心率、行为和基因表达的影响,并比较大型蚤部分生命周期暴露和全生命周期暴露的毒性效应。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验试剂

五氯酚钠(sodium pentachlorophenol, PCP-Na)购自 Ehrenstorfer 公司(德国),纯度 99.9%。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司(美国),纯度 99.9%。TRIzol 试剂、反转录试剂盒和 SYBR 荧光定量试剂盒购自 Takara 公司(中国)。本研究中使用的所有试剂均为分析纯级。

1.2 PCP 暴露液的配制

用万分之一天平准确称取一定量的 PCP 于玻璃瓶内,记录质量,溶于 DMSO,配制成母液,随后使用 DMSO 将母液按照梯度稀释的方法,依次稀释得到 1 500、150、15 和 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液。分别取 10 μL 母液加入到 100 mL 的暴露液中,即可分别得到 PCP 暴露浓度为 150、15、1.5 和 0.15 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的暴露体系,对照组中加入等体积的 DMSO 作溶剂对照,每个浓度设置 3 个平行暴露装置。DMSO 在暴露液中体积占比为 0.01%。

1.3 大型蚤的实验室培养

大型蚤的培养方法基于先前文献报道^[15]。简言之,大型蚤在温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照周期为 16 h 光照:8 h 黑暗的恒温培养箱中培养。大型蚤养殖水为连续曝气 48 h 以上的过滤自来水。自来水的过滤系统使用安吉尔 J1205-ROB12 型净水器(中国)。用小球藻(*Chlorella vulgaris*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)混合饲喂大型蚤。大型蚤开始生殖前的喂食密度为 2.5×10^6 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ (培养液),开始生殖后喂食密度增加至 5.0×10^6 cells $\cdot \text{mL}^{-1}$ (培养液)。在本实验的培养条件下,大型蚤只营孤雌生殖。细胞密度的统计采用的是 Nexcelom Cellometer 全自动细胞计数仪(美国)。大型蚤每天饲喂 1 次,每隔 1 d 更换 1 次养殖水。

1.4 PCP 全生命周期暴露及取样

本研究使用环境浓度的 PCP 开展暴露实验,浓度分别为 0、0.15、1.5、15 和 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,以溶剂对照作为空白对照,每个浓度设置 3 个平行暴露装置。每个平行 50 只出生时间 < 12 h 的幼蚤,养殖密度为 50 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 。每天上午喂食新鲜的小球藻与斜生栅

藻的混合液,每次换水完成后在培养箱内随机摆放烧杯的位置,以排除光照不均等因素对实验造成的误差。每天记录每个烧杯幼蚤的存活个体数,计算累积产蚤数和存活率。由于 PCP 的暴露导致了大型蚤的死亡,累积产蚤数用大型蚤的存活个体数进行修正。基于先前大型蚤全生命周期的化学品发育生殖毒性评估方法^[16],将其全生命周期分为出生、生长、生殖和衰亡 4 个生命阶段,由于第 62 天时其种群基本消亡,而第 46 天时大型蚤的存活率开始下降,因此选择在大型蚤的生长阶段(第 21 天)、生殖阶段(第 32 天)和衰亡阶段(第 46 天)测量其体长、心率和平均游泳速度,并在暴露的第 32 天和第 46 天时收集大型蚤样品,并加入 TRIzol 试剂,然后匀浆,并置于 -80°C 下保存以用于基因表达的分析。用 Leica DMIRB 型显微镜(德国)测量体长。将 Camtasia Studio 与 Leica DMIRB 连接,通过录制视频(50 fps)来测定大型蚤的心率,通过用慢速度播放视频,统计 60 s 内大型蚤的心率。平均游泳速度参数使用 NOLDUS 公司的 Ethovision XT 13 软件(荷兰)测量,监测大型蚤 1 h 内的游泳活动,并对其平均速度进行分析。

1.5 水样中 PCP 含量的测定

在暴露实验的中间阶段采集水样,以确定 PCP 的暴露浓度。在换水前后的每个暴露组和对照组中收集暴露液。前处理方法为:将 1 mL 水样与 10 μL 甲酸混合,加入二氯甲烷萃取,然后将收集的有机层溶液转移到 2 mL 棕色进样瓶中。重复上述操作,将收集的有机层溶液合并,并使用氮气将其吹干。最后将样品重新溶解在 200 μL 色谱纯甲醇中^[17]。使用 Waters 公司的超高效液相色谱串联三重四级杆质谱联用仪(Acquity UPLC I-Class Plus/Xevo TQ-XS MS) (美国)进行定量分析。色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] C18 (粒径 1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm) (美国),流动相为 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵(A)和甲醇(B),流速为 0.3 mL $\cdot \text{min}^{-1}$ 。负极模式下 ESI 源如下:离子喷雾(ion spray, IS)电压为 $-4\ 500$ V,气帘气体(curtain gas, CUR)为 137 895 Pa,氮气碰撞气体(nitrogen collision gas, CAD)为 55 158 Pa,雾化气体(nebulizer gas, GS1)为 275 790 Pa,辅助气体(auxiliary gas, GS2)为 275 790 Pa,离子源温度为 400°C ,PCP 的检出限为 1.92 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,信噪比为 3。

1.6 基因表达检测

根据先前建立的大型蚤阶段特异性 PCR array,

探究可能的致毒机制,其中包含调控大型溞生殖的 5 条关键代谢通路的 24 个基因,调控大型溞衰亡的 5 条关键代谢通路的 17 个基因^[6]。本研究分别用 PCP 暴露第 32 天和第 46 天所取得的样品来探究 PCP 对大型溞生殖阶段和衰亡阶段关键代谢通路中基因表达的影响。这 10 条代谢通路名称及包含的基因如表 1 所示。

使用 Takara 公司的 TRIzol 试剂盒,并按照使用说明分离样品的总 RNA。检测 RNA 的纯度和浓度,提取总 RNA 500 ng,使用 Takara 公司的 Prime Script RT 试剂盒进行逆转录。cDNA 合成后,使用 Takara 公司的 SYBR Green PreMix Ex TaqII 试剂盒进行实时定量 PCR。用溶解曲线和标准曲线分别评价 PCR 反应的质量保证(quantity assurance, QA)和质量控制(quality control, QC)。基因 *bal2* (蛋白 DAPPUDRAFT2_311135)在大型溞不同发育阶段和不同暴露组中表达稳定,因此作为内参基因使用^[6]。使用 Primer Premier 6 软件(加拿大)设计基因的引物序列。本研究中使用的所有引物的扩增效率为 95% ~ 103%^[16]。RT-qPCR 反应扩增程序为:95 ℃, 2 min;95 ℃、15 s,60 ℃、1 min,共扩增 40 个循环;60 ℃、10 min。目的基因的表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对表达量的分析^[18]。每个浓度设置 3 个平行组。

1.7 数据分析

数据统计使用的软件是 SPSS 25.0(美国,纽约,阿蒙克),数据的正态分布和同质性分别使用 Kol-

mogorov-Smirnov 和 Levene's 检验,在必要时将数据进行对数转换。暴露组与对照组之间差异性的检验使用的是单因素方差分析法(one-way analysis of variance, ANOVA),相关性分析采用 Spearman 分析法。在本实验中所有分析的显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。使用 GraphPad Prism 8.0(美国,加利福尼亚,圣地亚哥)绘制统计图。

2 结果(Results)

2.1 暴露液中 PCP 的含量测定

PCP 的名义浓度分别为 0、0.15、1.5、15 和 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实测中,换水前不同暴露组 PCP 浓度分别为(0.01±0.01)、(0.17±0.02)、(1.75±0.01)、(17.39±0.78)和(166.22±8.47) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,换水后不同暴露组 PCP 浓度分别为(0.01±0.01)、(0.17±0.01)、(1.72±0.07)、(16.29±1.30)和(165.95±14.66) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在换水前后没有观察到 PCP 的严重损失,PCP 的平均浓度分别是(0.01±0.01)、(0.17±0.02)、(1.74±0.05)、(16.84±1.13)和(166.11±9.47) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1)。

2.2 PCP 全生命周期暴露对大型溞存活、生长和生殖的影响

PCP 暴露对大型溞存活的影响如图 2 所示。(166.11±9.47) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PCP 暴露后第 42 天,大型溞的存活率显著下降,第 63 天时大型溞种群消亡,而对照组和其他暴露组在第 70 天时大型溞才出现全部死亡的情况。该结果表明随着暴露时间的延长,环境相关浓度 PCP 暴露使大型溞的寿命显著缩短。

表 1 大型溞的阶段特异性 PCR array 包含的代谢通路和基因
Table 1 List of genes and corresponding pathways in the stage-specific PCR array of *D. magna*

生命阶段 Life stage	通路 Pathways	基因 Genes
生殖阶段 Stage of reproduction	慢性粒细胞白血病 Chronic myeloid leukemia	<i>runx1, shc1, abl1, cdk6, pik3c</i>
	细胞周期 Cell cycle	<i>mcm2, ccnb, ccne, cdc25c, cdk6</i>
	癌症中的转录失调 Transcriptional misregulation in cancer	<i>etv6_7, utx, flt1, prom1, yan</i>
	剪接体 Spliceosome	<i>hnmpk, hspa1_8_1, hspa1_8_2, snmp200, hspa1_8_3</i>
	轴突导向 Axon guidance	<i>ablim, sgrap, plxna, smo, ptch1</i>
衰亡阶段 Stage of death	GABA 能突触 GABAergic synapse	<i>slc6a1_1, gnao, slc6a1_2, plcl1, slc32a</i>
	扩张型心肌病 Dilated cardiomyopathy	<i>sgcd, tpm3, actb_g1, adcy5_1</i>
	神经活性配体-受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	<i>grik2, sstr5, glra1, takr2, crhr1</i>
	肥厚型心肌病 Hypertrophic cardiomyopathy	<i>sgcd, tpm3, actb_g1</i>
	血清素能突触 Serotonergic synapse	<i>ddc, gnao, cacna1b, slc18a1_2, adcy5_1</i>

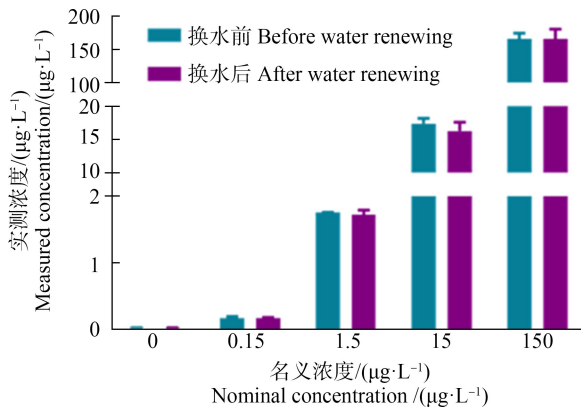


图1 换水前后暴露体系中五氯苯酚(PCP)的名义浓度和实测浓度

注:所有数据表示平均值±标准差,每个浓度有3个平行组。

Fig. 1 Nominal and measured concentrations of pentachlorophenol (PCP) in the exposure medium before and after water renewing

Note: Values are expressed as mean±SD, and each concentration group had three replicate tanks.

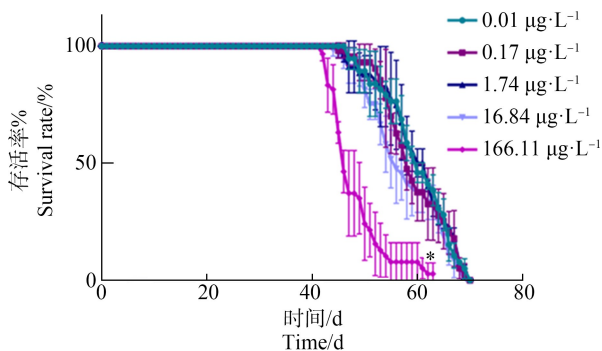


图2 不同浓度PCP全生命周期暴露对大型溞存活率的影响

注:所有数据表示平均值±标准差,每个浓度有3个平行组;

*代表 $P<0.05$,表示与对照组相比有显著差异。

Fig. 2 Effects of different concentrations of PCP on survival rate of *D. magna* after the whole-life-stage exposure

Note: Values are expressed as mean±SD, and each concentration group had three replicate tanks; * represented that the exposure group had significant difference at $P<0.05$ level when compared with control.

环境相关浓度PCP全生命周期暴露显著抑制了大型溞的生长。在第32天和第46天,大型溞的体长在 $(166.11\pm9.47) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露组与对照组相比出现显著降低,分别降低至 $(2.845\pm0.042) \text{mm}$ 和 $(2.985\pm0.032) \text{mm}$ 。而 $(1.74\pm0.05) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(0.17\pm0.02) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露对其第21天的体长没有显著影响。PCP暴露对大型溞生长的LOEC在第32天和第46日均为 $(166.11\pm9.47) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (图3)。本

研究发现环境相关浓度PCP暴露对大型溞具有一定的发育毒性。

环境相关浓度的PCP暴露除了对大型溞的存活和生长具有抑制作用外,同时也能显著抑制其生殖。暴露于不同浓度的PCP并没有显著改变大型溞的累积产溞数(图4(a)),但 $(166.11\pm9.47) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露显著降低大型溞子代的体长,在暴露的第21天,大型溞子代体长从对照组的 $(0.828\pm0.006) \text{mm}$ 降至 $(0.733\pm0.019) \text{mm}$;在第32天,其子代体长从对照组的 $(0.839\pm0.033) \text{mm}$ 降至 $(0.771\pm0.018) \text{mm}$;在第46天,其子代体长从对照组的 $(0.844\pm0.013) \text{mm}$ 降至 $(0.780\pm0.014) \text{mm}$ (图4(b))。此外,PCP暴露对幼溞体长的LOEC由第21天和第32天的 $(166.11\pm9.47) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至第46天的 $(16.84\pm1.13) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该结果说明环境相关浓度PCP暴露能对大型溞造成一定生殖毒性。

2.3 PCP全生命周期暴露对大型溞心率和游泳行为的影响

在心率方面,环境相关浓度PCP暴露对不同生命阶段大型溞的心率影响不同。在生长阶段(第21天)和生殖阶段(第32天),不同浓度的PCP暴露均能显著促进其心率上升;而在衰亡阶段(第46天),对照组的心率为 $(312.31\pm7.416) \text{beat}\cdot\text{min}^{-1}$, $(16.84\pm1.13) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(166.11\pm9.47) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露对其心率产生显著的抑制效应,心率分别为 $(290.07\pm5.882) \text{beat}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $(276.91\pm6.000) \text{beat}\cdot\text{min}^{-1}$ (图5)。

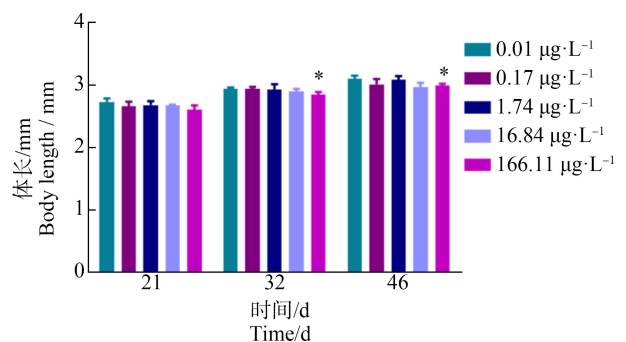


图3 不同浓度PCP全生命周期暴露对大型溞体长的影响

注:所有数据表示平均值±标准差,每个浓度有3个平行组;

*代表 $P<0.05$,表示与对照组相比有显著差异。

Fig. 3 Effects of different concentrations of PCP on body length of *D. magna* after the whole-life-stage exposure

Note: Values are expressed as mean±SD, and each concentration group had three replicate tanks; * represented that the exposure group had significant difference at $P<0.05$ level when compared with control.

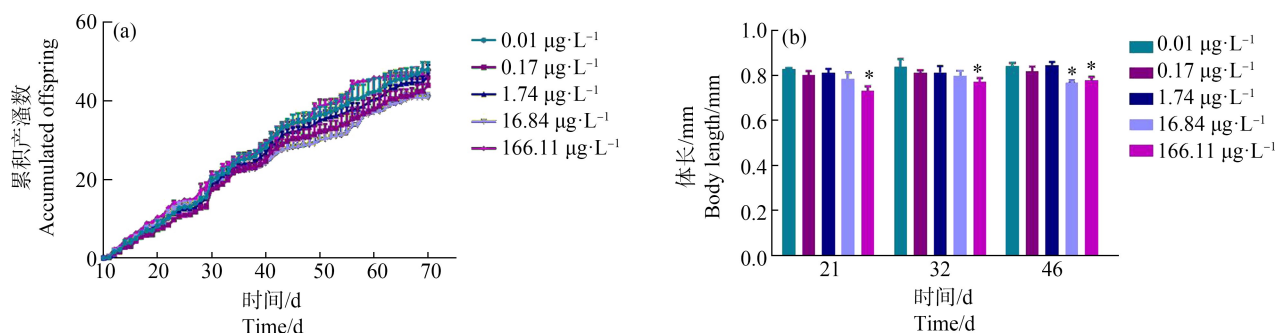


图4 PCP全生命周期暴露对大型溞生殖的影响:大型溞全生命周期的累积产溞数(a)和子代体长(b)

注:所有数据表示平均值±标准差,每个浓度有3个平行组;*代表 $P<0.05$,表示与对照组相比有显著差异。

Fig. 4 Effects of PCP on reproduction of *D. magna* after the whole-life-stage exposure: The accumulated offspring number (a) and neonate body length (b)

Note: Values are expressed as mean±SD, and each concentration group had three replicate tanks;

* represented that the exposure group had significant difference at $P<0.05$ level when compared with control.

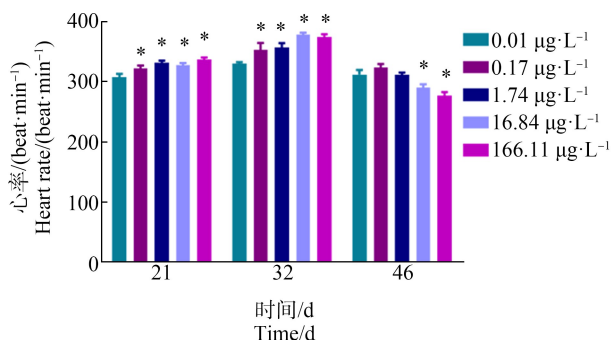


图5 不同浓度PCP全生命周期暴露对大型溞心率的影响

注:所有数据表示平均值±标准差,每个浓度有3个平行组;

*代表 $P<0.05$,表示与对照组相比有显著差异。

Fig. 5 Effects of different concentrations of PCP on heart rate of *D. magna* after the whole-life-stage exposure

Note: Values are expressed as mean±SD, and each concentration group had three replicate tanks; * represented that the exposure group had significant difference at $P<0.05$ level when compared with control.

对于大型溞的游泳行为,(1.74 ± 0.05) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(166.11 ± 9.47) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露显著降低了大型溞各取样时间点的平均游泳速度,而暴露于(16.84 ± 1.13) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP组的大型溞的平均游泳速度仅在第21天和第46天出现显著降低。各取样时间点的LOEC均为(1.74 ± 0.05) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (图6)。本研究的结果表明,环境相关浓度PCP暴露能够对大型溞的游泳行为造成一定的抑制作用。

2.4 PCP全生命周期暴露对大型溞基因表达的影响

调控大型溞生殖阶段的5条关键代谢通路包含的24个基因,在PCP暴露的第32天,并没有引

起大型溞相关基因的表达量发生显著性变化(图7)。调控大型溞衰亡阶段的5条关键代谢通路包含的17个基因,在暴露的第46天, (166.11 ± 9.47) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露引起大型溞衰亡阶段的13个基因表达量显著上调,其中基因主要富集在 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能突触、扩张型心肌病、神经活性配体-受体相互作用和血清素能突触4条通路上。较低浓度组(16.84 ± 1.13)、(1.74 ± 0.05)和(0.17 ± 0.02) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCP暴露并没有引起大型溞衰亡阶段相关基因的表达量发生显著性变化(图8)。

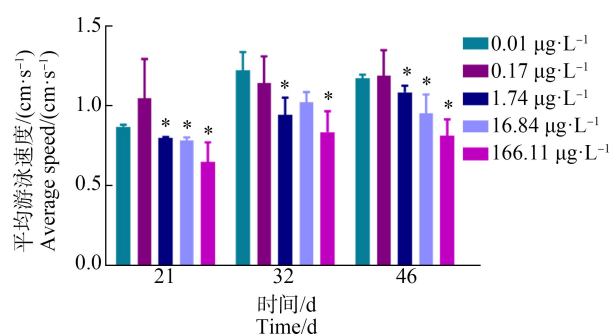


图6 不同浓度PCP全生命周期暴露对大型溞平均游泳速度的影响

注:所有数据表示平均值±标准差,每个浓度有3个平行组;

*代表 $P<0.05$,表示与对照组相比有显著差异。

Fig. 6 Effects of different concentrations of PCP on average swim speed of *D. magna* after the whole-life-stage exposure

Note: Values are expressed as mean±SD, and each concentration group had three replicate tanks; * represented that the exposure group had significant difference at $P<0.05$ level when compared with control.

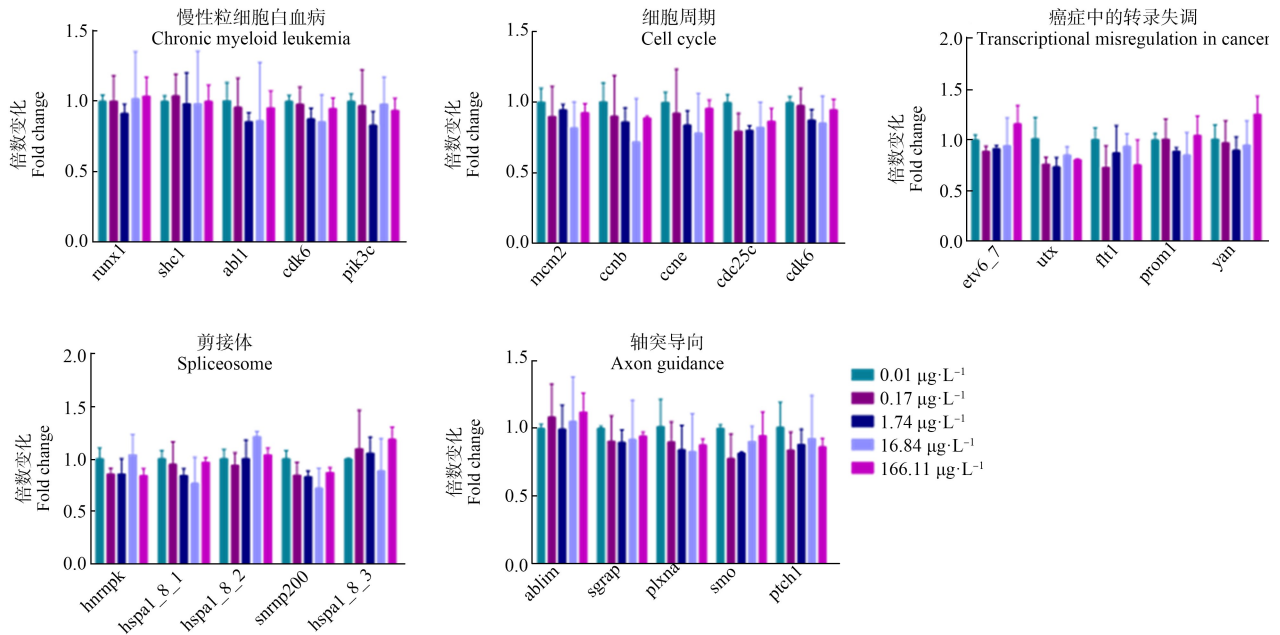


图 7 不同浓度的 PCP 暴露 32 d 后,大型溞生殖阶段关键代谢通路中基因的表达量

注:所有数据表示平均值 $\pm$ 标准差,每个浓度有 3 个平行组;*代表 $P < 0.05$,表示与对照组相比有显著差异。

Fig. 7 Effects of different concentrations of PCP on the expression of genes selected at the reproduction stage of *D. magna* after exposure for 32 d

Note: Values are expressed as mean $\pm$ SD, and each concentration group had three replicate tanks;

* represented that the exposure group had significant difference at $P < 0.05$ level when compared with control.

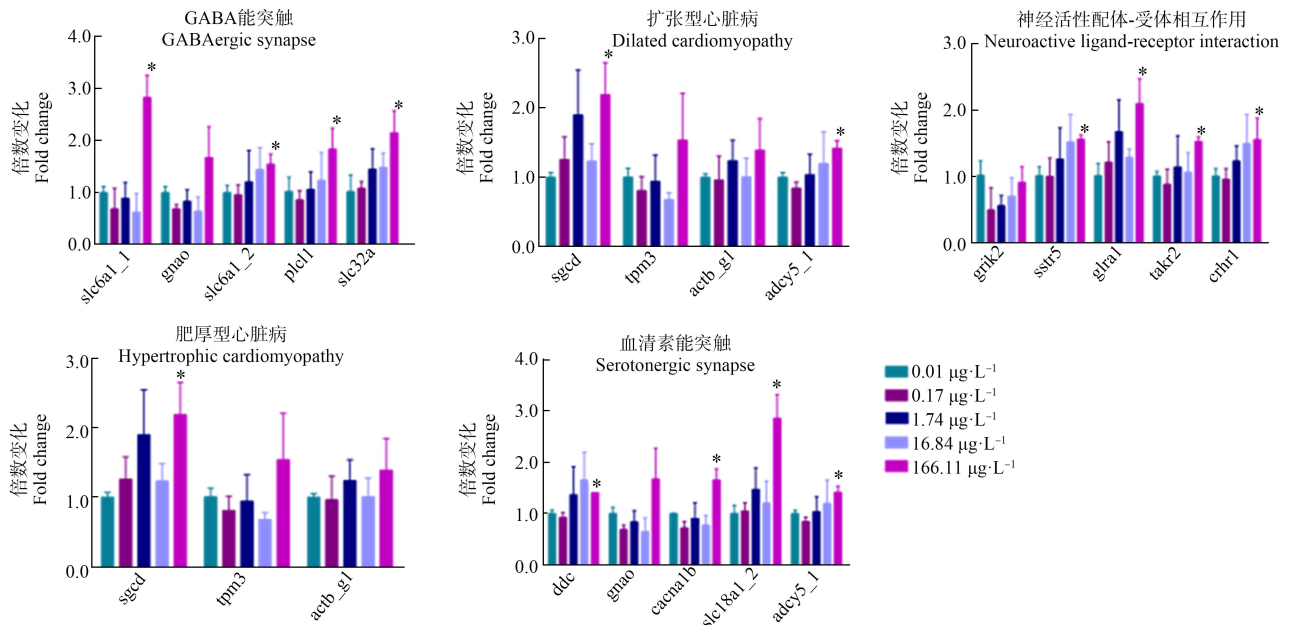


图 8 不同浓度的 PCP 暴露 46 d 后,大型溞死亡阶段关键代谢通路中基因的表达量

注:所有数据表示平均值 $\pm$ 标准差,每个浓度有 3 个平行组。

Fig. 8 Effects of different concentrations of PCP on the expression of genes selected at the death stage of *D. magna* after exposure for 46 d

Note: Values are expressed as mean $\pm$ SD, and each concentration group had three replicate tanks.

2.5 相关分析

通过分析大型溞衰亡阶段的心率、平均游泳速度和基因表达量的相关性(表 2),发现与大型溞衰亡阶段有关的 13 个显著上调的基因中有 8 个与心率和平均游泳速度显著相关($P<0.05$)。并且,平均游泳速度与心率呈显著相关($P<0.01$)。

3 讨论 (Discussion)

本研究中,采用的 PCP 暴露浓度均为环境相关浓度,在换水前后 PCP 的暴露浓度没有发生显著变化,说明 PCP 基本没有发生降解,暴露体系是可靠的。环境相关浓度的 PCP 暴露导致了大型溞群体的过早死亡。相比之下,一项研究表明,暴露于 $746\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PCP 也显著降低了大型溞的存活率,使其寿命缩短^[19]。此外,本研究发现环境相关浓度 PCP 暴露显著抑制了大型溞的体长。先前有研究报道 PCP 的发育毒性,Chen 等^[20]发现 $532.66\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或更高浓度的 PCP 21 d 暴露显著降低了大型溞的体长。值得注意的是,在本研究中 PCP 在第 21 天的暴露后才对大型溞的生长造成了抑制,而不是在快速生长阶段(0 ~ 12 d)产生抑制,这可能是由于 PCP

对大型溞蜕皮过程的抑制所致,蜕皮是控制大型溞生长发育的重要生理过程,发生在其全生命周期中^[21]。另外,最近的研究表明,PCP 可以显著下调土壤跳虫白符跳(*Folsomia candida*)蜕皮相关基因的表达量^[22],但 PCP 对大型溞生长的抑制作用是否与其蜕皮过程有关,有待进一步研究。本研究发现环境相关浓度 PCP 的暴露显著抑制了大型溞的子代体长,而没有显著改变子代的数量,推测可能是大型溞在抵御 PCP 暴露的压力上投入了更多的能量,而分配给生殖的能量较少,从而产生了较小的幼溞。这一假设得到了前人研究的支持^[23-25]。例如,由于能量资源重新分配带来的负反馈适应结果,在长期镉(Cd)暴露后,大型溞的子代数量显著下降。同时,上述结果也表明,在大型溞的生殖指标中,生殖质量可能比生殖数量更加敏感,这与先前的研究结果相一致^[15]。综上所述,环境相关浓度的 PCP 暴露对大型溞的生长和存活率有显著抑制作用,且随着暴露时间的延长,PCP 暴露对大型溞造成发育毒性、生殖毒性和存活率的 LOEC 出现降低,与部分生命周期暴露相比,环境相关浓度 PCP 暴露对其全生命周期生

表 2 大型溞衰亡阶段心率、平均游泳速度和基因表达量的 Spearman 相关分析
Table 2 Spearman correlation analysis of heart rate, average swimming speed and gene expression in the stage of death of *Daphnia magna*

相关分析 Correlation analysis		心率 Heart rate	<i>P</i>	平均游泳速度 Average swimming speed	<i>P</i>
基因 Gene	<i>slc6a1_1</i>	-0.300	0.624	-0.300	0.624
	<i>slc6a1_2</i>	-1.000**	<0.0001	-1.000**	<0.0001
	<i>plcl1</i>	-1.000**	<0.0001	-1.000**	<0.0001
	<i>slc32a</i>	-0.900*	0.037	-0.900*	0.037
	<i>sgcd</i>	-0.500	0.391	-0.500	0.391
	<i>adcy5_1</i>	-1.000**	<0.0001	-1.000**	<0.0001
	<i>sstr5</i>	-1.000**	<0.0001	-1.000**	<0.0001
	<i>glra1</i>	-0.800	0.104	-0.800	0.104
	<i>takr2</i>	-0.900*	0.037	-0.900*	0.037
	<i>crhr1</i>	-1.000**	<0.0001	-1.000**	<0.0001
	<i>ddc</i>	-0.900*	0.037	-0.900*	0.037
	<i>cacna1b</i>	-0.300	0.624	-0.300	0.624
	<i>slc18a1_2</i>	-0.800	0.104	-0.800	0.104
宏观指标 Macroscopic index	心率 Heart rate	1.000	-	1.000**	<0.0001
	平均游泳速度 Average swimming speed	1.000**	<0.0001	1.000	-

注:*代表 0.05 水平相关性显著(双尾);**代表 0.01 水平相关性显著(双尾)。
Note: * represented that correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); ** represented that correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

长、生殖和存活率影响更加明显,这与先前关于环境相关浓度磷酸三(1,3-二氯异丙基)酯(TDCIPP)对大型溞生长、生殖和存活率影响的结果相一致^[15-16],以上结果说明了天然水域中 PCP 可能会对寿命短并且全生命周期生活于自然水体中的浮游动物造成潜在风险。

据报道,大型溞的肌源性心脏结构与人类心脏较为相似,对外源化学物质的反应与人类心脏也有相似之处,在一些研究中,大型溞的心率常被用作生理效应的指标^[26-28]。有研究发现,大量的外源化学物质会对大型溞的心率产生显著影响^[29-31]。心率的变化可能反映了污染物对水生动物能量代谢和血液循环系统的影响^[29]。而化学物质对大型溞心率的影响并不总是一致的。例如,在 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醛和 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氢嘧啶的混合暴露体系中,随着暴露时间的增加,大型溞的心率显著降低^[32]。而暴露于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁会导致其心率显著增加^[33]。在本研究中,心率是一个相对敏感的参数,PCP 暴露对大型溞心率的 LOEC 为 $(0.17 \pm 0.02) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,这表明暴露于环境相关浓度的 PCP 对大型溞的心率具有显著影响,因此,推测大型溞的心率可能对 PCP 较为敏感。游泳速度在浮游动物中是一个重要的行为参数。先前的研究表明,PCP 能够改变浮游动物的游泳行为^[34-36]。最近的一项研究表明,暴露于 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PCP 3 h 可剂量依赖性地抑制大型溞的趋光行为^[34],而暴露于 $190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PCP 48 h 可导致淡水轮虫的游泳速度受到抑制^[35]。此外,在污染物 PCP 的胁迫下,蚤状溞(*Daphnia pulex*)的游动速度也有所下降^[36]。这些结果与本研究结果是一致的。此外,有研究发现大型溞的游泳速度随体型的不同而不同,任何影响其体型的因素都会对游泳速度产生影响^[13,37]。这与本研究中 PCP 暴露影响大型溞平均游泳速度与体长的关系结果一致,证实了其体型与游泳速度的直接关系。同时,大型溞的游动行为改变也影响着其捕食行为,从而可能增加其一定的饥饿死亡风险^[38]。综上所述,环境相关浓度 PCP 暴露对大型溞的心率和游泳行为产生显著影响,虽然与部分生命周期暴露相比,随着暴露时间的延长,LOEC 没有出现降低的趋势,但相较于生长和生殖指标 LOEC 显示出更低趋势,这表明,大型溞的心率和游泳行为指标可能相比生长和生殖指标更为敏感。

在本研究中, $(166.11 \pm 9.47) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PCP 暴露

没有显著改变大型溞生殖阶段多条关键信号通路中相关基因的表达,但是使大型溞衰亡阶段多条关键信号通路中相关基因的表达量显著上调,说明 PCP 可能会显著影响大型溞死亡的基因调控,而对其生殖的调控较弱。与上述宏观指标对比后也发现大型溞不同生命阶段对 PCP 的敏感性有所不同,可能对其衰亡阶段的影响更大。有研究显示,扩张型心肌病是引起肌源性心脏功能紊乱导致心力衰竭的最常见原因,并能造成大型溞群体的过早死亡^[39-41],本研究中 PCP 的暴露显著上调了大型溞扩张型心脏病通路相关基因的表达,进而可能造成其心脏功能紊乱,心率下降,最终导致其群体死亡时间提前,这也与大型溞存活率指标的结果相一致,但与其存活率下降的具体联系仍需进一步研究。GABA 是动物中枢神经系统中含量最丰富的抑制性神经递质^[35]。在无脊椎动物中,GABA 介导的神经控制周围肌肉,而且总 GABA 的增加会导致心血管活动的减少,造成无脊椎动物的运动能力下降甚至死亡^[36,42]。同形溞(*Daphnia similis*)暴露于阿维菌素可导致其与 GABA 受体结合,激活突触后膜上的氯离子通道,导致不可逆转的超极化,从而抑制神经冲动的传递^[43]。血清素(serotonin)水平过高与动物心脏和肺部疾病有关,血清素能突触在动物感知疼痛、运动和内分泌等生理功能中发挥重要作用^[37]。在甲壳类动物中,血清素能神经元(serotonergic neuron)参与控制行为和代谢,有研究指出,通过增加大型溞体内血清素水平,会导致其耐低氧能力降低、更加强烈的趋光行为以及基础运动能力的减退,这不利于大型溞的捕食^[44-45]。本研究中,PCP 暴露导致大型溞 GABA 能突触和血清素能突触通路相关基因上调,可能干扰两者突触的功能,进而使大型溞 GABA 和血清素体内水平上升,抑制了与其运动相关的神经元活动,最终导致大型溞游泳距离的下降,但具体机制有待进一步研究。本研究将大型溞衰亡阶段显著上调的基因与心率、平均游泳速度进行了相关性分析,发现呈彼此呈显著负相关关系,说明与大型溞心脏病和神经递质相关的通路在衰亡阶段确实与心率下降和游泳速度下降有关,但具体关联机制需要进一步研究。因此,本实验推测由于环境相关浓度 PCP 暴露导致与大型溞扩张型心肌病、血清素能突触和 GABA 通路相关基因的表达量显著上调,大型溞在衰亡阶段心率下降可能与心脏功能障碍有关,引发其

心力衰竭,加速其过早死亡;并且大型溞游泳运动能力下降可能与其神经活动抑制有关,造成其捕食效率和躲避天敌的能力下降,最终两者可能共同导致其种群发生过早消亡的情况。此外,神经活性配体-受体相互作用通路中相关基因表达量也出现显著上调,仍需要进一步研究其与大型溞存活率下降的关系。

综上所述,本研究利用先前建立的基于大型溞全生命周期的化学品毒性评估方法^[16],研究PCP对大型溞暴露的毒性效应。结果表明,环境相关浓度PCP暴露对大型溞的生殖、生长、存活、心率和游泳行为产生了负面影响,并且对大型溞心率和游泳行为负面影响更为明显,这可能会导致大型溞引发心脏疾病,并且抑制运动相关的神经元,造成其平均寿命的缩短以及基础活动的减弱,使其群体过早死亡,致使大型溞种群衰退,最终对淡水生态系统生物多样性造成一定影响,推测可能的原因是大型溞衰亡阶段关键通路的相关基因上调致使其心脏功能障碍并抑制了其神经活动。此外,随着暴露时间的延长,上述部分生理指标的LOEC呈下降趋势,这表明,全生命周期暴露相较部分生命周期暴露显示出更显著的毒性效应,因此全生命周期的毒性评估方法具有更好的环境风险评价优势。

通讯作者简介:刘春生(1982—),男,博士,教授,主要研究方向为水生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] Zheng W W, Wang X, Yu H, et al. Global trends and diversity in pentachlorophenol levels in the environment and in humans: A meta-analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(11): 4668-4675
- [2] Zheng W W, Yu H, Wang X, et al. Systematic review of pentachlorophenol occurrence in the environment and in humans in China: Not a negligible health risk due to the re-emergence of schistosomiasis [J]. Environment International, 2012, 42: 105-116
- [3] Zha J M, Wang Z J, Schlenk D. Effects of pentachlorophenol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Chemico-Biological Interactions, 2006, 161(1): 26-36
- [4] Li H X, Drouillard K G, Bennett E, et al. Plasma-associated halogenated phenolic contaminants in benthic and pelagic fish species from the Detroit River [J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(5): 832-839
- [5] Cheng Y, Ekker M, Chan H M. Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 112: 7-14
- [6] Muir J, Eduljee G. PCP in the freshwater and marine environment of the European Union [J]. The Science of the Total Environment, 1999, 236(1-3): 41-56
- [7] Gifford J S, Buckland S J, Judd M C, et al. Pentachlorophenol (PCP), PCDD, PCDF and pesticide concentrations in a freshwater lake catchment [J]. Chemosphere, 1996, 32(11): 2097-2113
- [8] Anderson B G, Jenkins J C. A time study of events in the life span of *Daphnia magna* [J]. The Biological Bulletin, 1942, 83(2): 260-272
- [9] Adema D M M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests [J]. Hydrobiologia, 1978, 59(2): 125-134
- [10] Schechter V. Effect of heparin and of vitamin K on the life span of *Daphnia magna* [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine, 1950, 74(4): 747-748
- [11] Crosby D G, Tucker R K, Aharonson N. The detection of acute toxicity with *Daphnia magna* [J]. Food and Cosmetics Toxicology, 1966, 4: 503-514
- [12] Postmes T J, Nacken G, Nelissen R G. An electronic method for measuring the heart frequency of the waterflea: *Daphnia pulex* [J]. Experientia, 1974, 30(12): 1478-1480
- [13] Stollewerk A. The water flea *Daphnia*—A ‘new’ model system for ecology and evolution? [J]. Journal of Biology, 2010, 9(2): 21
- [14] Chen Y, Huang J, Xing L Q, et al. Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(1): 234-243
- [15] Li H, Su G Y, Zou M, et al. Effects of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate on growth, reproduction, and gene transcription of *Daphnia magna* at environmentally relevant concentrations [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(21): 12975-12983
- [16] Li H, Yuan S L, Su G Y, et al. Whole-life-stage characterization in the basic biology of *Daphnia magna* and effects of TDCIPP on growth, reproduction, survival, and transcription of genes [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(23): 13967-13975
- [17] Jiang H P, Zhang Y H, Chen X G, et al. Simultaneous determination of pentachlorophenol, niclosamide and fenpropathrin in fishpond water using an LC-MS/MS method

- for forensic investigation [J]. *Analytical Methods*, 2013, 5 (1): 111-115
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [19] Sánchez P, Alonso C, Fernández C, et al. Evaluation of a multi-species test system for assessing acute and chronic toxicity of sediments and water to aquatic invertebrates: Effects of pentachlorophenol on *Daphnia magna* and *Chironomus prasinus* (6 pp) [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2005, 5(1): 53-58
- [20] Chen Y, Huang J, Xing L Q, et al. Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2014, 21(1): 234-243
- [21] Martin-Creuzburg D, Westerlund S A, Hoffmann K H. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: Determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 151(1): 66-71
- [22] 张倩倩, 乔敏. 五氯酚对土壤跳虫代谢转化酶基因和蜕皮相关基因表达的影响[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12 (5): 72-78
- Zhang Q Q, Qiao M. Effects of pentachlorophenol on expression of metabolic enzyme genes and molt-related genes of soil collembolan [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(5): 72-78 (in Chinese)
- [23] Levitan D R. Density-dependent size regulation and negative growth in the sea urchin *Diadema antillarum* Philippi [J]. *Oecologia*, 1988, 76(4): 627-629
- [24] Muysen B T A, Messiaen M, Janssen C R. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: Physiological and sub-cellular effects [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(5): 735-742
- [25] Knops M, Altenburger R, Segner H. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 53(2): 79-90
- [26] Ream R A, Theriot J A, Somero G N. Influences of thermal acclimation and acute temperature change on the motility of epithelial wound-healing cells (keratocytes) of tropical, temperate and Antarctic fish [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(Pt 24): 4539-4551
- [27] Bekker J M, Krijgsman B J. Physiological investigations into the heart function of *Daphnia* [J]. *The Journal of Physiology*, 1951, 115(3): 249-257
- [28] Pirtle T J, Carr T L, Khurana T, et al. ZD7288 and mibefradil inhibit the myogenic heartbeat in *Daphnia magna* indicating its dependency on HCN and T-type calcium ion channels [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2018, 222: 36-42
- [29] Villegas-Navarro A, Rosas-L E, Reyes J L. The heart of *Daphnia magna*: Effects of four cardioactive drugs [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 136(2): 127-134
- [30] Podosinovicova N P, Ezhov N F, Saikina N A, et al. Heart rate in *Daphnia magna* as a functional test for assessing efficacy of chemical agents [J]. *Eksperimental' Naia i Klinicheskaia Farmakologiya*, 2008, 71(3): 54-56
- [31] Clemenson C, Ekwall B. Overview of the final MEIC results: I. the *In vitro*—*In vitro* evaluation [J]. *Toxicology in Vitro*, 1999, 13(4-5): 657-663
- [32] Bownik A, Stepniewska Z. Ectoine alleviates behavioural, physiological and biochemical changes in *Daphnia magna* subjected to formaldehyde [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(20): 15549-15562
- [33] Corotto F, Ceballos D, Lee A, et al. Making the most of the *Daphnia* heart rate lab: Optimizing the use of ethanol, nicotine & caffeine [J]. *The American Biology Teacher*, 2010, 72(3): 176-179
- [34] Yuan L, Michels E, De Meester L. Changes in phototactic behavior of *Daphnia magna* clone C1 242 in response to copper, cadmium and pentachlorophenol [J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2003, 15(6): 841-847
- [35] Preston B L, Snell T W, Dusenbery D B. The effects of sublethal pentachlorophenol exposure on predation risk in freshwater rotifer species [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 47(2): 93-105
- [36] Yu G, Kong D, Li B. Study on swimming behavior change of *Daphnia pulex* under stress of four toxic substances [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 42(1): 112-118
- [37] Baillieul M, Blust R. Analysis of the swimming velocity of cadmium-stressed *Daphnia magna* [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 44(4): 245-254
- [38] Lovern S B, Strickler J R, Klaper R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(12): 4465-4470
- [39] Towbin J A, Lorts A. Arrhythmias and dilated cardiomyopathy common pathogenetic pathways? [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, 57(21): 2169-2171

- [40] Araco M, Merlo M, Carr-White G, et al. Genetic bases of dilated cardiomyopathy [J]. Journal of Cardiovascular Medicine, 2017, 18(3): 123-130
- [41] Davili Z, Johar S, Hughes C, et al. Succinate dehydrogenase deficiency associated with dilated cardiomyopathy and ventricular noncompaction [J]. European Journal of Pediatrics, 2007, 166(8): 867-870
- [42] Lopes C, Charles S, Vollat B, et al. Toxicity of ivermectin on cladocerans: Comparison of toxic effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(10): 2160-2166
- [43] Novelli A, Vieira B H, Cordeiro D, et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio* [J]. Chemosphere, 2012, 86(1): 36-40
- [44] Rivetti C, Campos B, Piña B, et al. Tryptophan hydroxylase (TRH) loss of function mutations induce growth and behavioral defects in *Daphnia magna* [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 1518
- [45] Bellot M, Faria M, Gómez-Canela C, et al. Pharmacological modulation of behaviour, serotonin and dopamine levels in *Daphnia magna* exposed to the monoamine oxidase inhibitor deprenyl [J]. Toxics, 2021, 9(8): 187 ◆