

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019081602

李珊珊, 李萍萍, 陈彪, 等. 利用大型溞评估离子液体 $[C_8mim]Cl$ 生物毒性初探[J]. 环境化学, 2020, 39(11): 3024-3029.

LI Shanshan, LI Pingping, CHEN Biao, et al. Preliminary study on the biotoxicity evaluation of $[C_8mim]Cl$ by using *Daphnia magna* [J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(11): 3024-3029.

利用大型溞评估离子液体 $[C_8mim]Cl$ 生物毒性初探*

李珊珊 李萍萍 陈彪 薛春叶 董京伟 李斌 邓祥元**

(江苏科技大学生物技术学院, 镇江, 212018)

摘要 为评估1-辛基-3-甲基咪唑氯盐($[C_8mim]Cl$)的生物毒性,本研究以大型溞(*Daphnia magna*)为实验对象,通过急性毒性实验分析了不同日龄大型溞对 $[C_8mim]Cl$ 的敏感性,并以存活率、产溞能力和蜕皮次数为指标研究了 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞的慢性毒性效应,这将为评估离子液体的毒性效应提供科学依据.结果表明, $[C_8mim]Cl$ 对1、2、4日龄大型溞的48 h半致死浓度(LC₅₀)分别为208.9、182.7、178.6 $\mu g \cdot L^{-1}$,表明随着大型溞日龄的增加, $[C_8mim]Cl$ 对大型溞的毒性效应逐渐增大并趋于稳定.此外, $[C_8mim]Cl$ 对大型溞生活史中的初次产溞时间、总产溞数目、总产溞次数和蜕皮次数等影响不显著,但显著影响大型溞的存活率和初次产溞个数,因此,大型溞的存活率和初次产溞个数是评估 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞慢性毒性效应的两个较为敏感的指标.
关键词 大型溞, 1-辛基-3-甲基咪唑氯盐, 急性毒性, 慢性毒性.

Preliminary study on the biotoxicity evaluation of $[C_8mim]Cl$ by using *Daphnia magna*

LI Shanshan LI Pingping CHEN Biao XUE Chunye DONG Jingwei
LI Bin DENG Xiangyuan**

(College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, 212018, China)

Abstract: In order to evaluate the biotoxicity of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride ($[C_8mim]Cl$) to *Daphnia magna*, the sensitivity of *D. magna* aged different days to $[C_8mim]Cl$ was studied through acute toxicity experiments. The survival rate, capacity of producing, and exuviate times were used as indicators to investigate the chronic toxic effects of $[C_8mim]Cl$ on *D. magna*, which would provide scientific evidences for further evaluating the toxic effects of ionic liquids. The results showed that the 48 h-LC₅₀ values of $[C_8mim]Cl$ to *D. magna* aged 1, 2 and 4 days macrophages were 208.9, 182.7, 178.6 $\mu g \cdot L^{-1}$, respectively, indicating that the toxic effects of $[C_8mim]Cl$ on *D. magna* increased as the day-age *D. magna* increased and then stabilized. Moreover, it was showed that $[C_8mim]Cl$ had no significant effects on the first-generation time, total number and times, and total exuviate times of *Daphnia magna*, but the ionic liquid significantly inhibited the survival rate and the the first-generation number of *Daphnia magna*, suggesting that the survival rate and the first-generation number of *Daphnia magna*, would be the two sensitive indicators for evaluating the chronic toxic effects of $[C_8mim]Cl$ on *D. magna*.

2019年8月16日收稿(Received: August 16, 2019).

* 江苏省第十五批“六大人才高峰”高层次人才选拔培养项目(SWYY-025)和镇江市重点研发计划项目(SH2019004)资助.

Supported by the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (SWYY-025) and Key Research & Development Project of Zhenjiang (SH2019004).

** 通讯联系人, Tel: 0511-85639697, E-mail: dengxy2016@foxmail.com

Corresponding author, Tel: 0511-85639697, E-mail: dengxy2016@foxmail.com

Keywords: *Daphnia magna*, 1-octyl-3-methylimidazolium chloride, acute toxicity, chronic toxicity.

离子液体(ionic liquids, ILs)是指一类在室温或接近室温下为液态的、完全由阴阳离子所组成的盐,以不易燃、不挥发、导电性强、性质稳定、对许多无机盐和有机物具有良好的溶解性为优势,被广泛应用于生物催化、化工分离和有机合成等领域,有望成为传统挥发性有机溶剂的“绿色”替代者,拥有着良好的应用前景^[1-3].与有机溶剂相比,离子液体的“绿色”特性主要体现在其没有明显的蒸气压、热稳定性好和操作安全,但研究发现,在离子液体的合成、使用、纯化及回收等过程中都会有一部分离子液体流失到环境中^[4],这将对生态环境造成一定程度的危害.尽管目前尚无离子液体在环境中存在的报道,但研究表明离子液体会对生物体(藻类、微生物、植物、动物等)、组织器官、靶分子等产生毒性效应^[5-6].

目前,有关离子液体对生物体的毒性效应及其在生物体内的迁移转化等内容逐渐成为广大科研工作者的研究热点.Swatloski 等^[7]研究了咪唑类离子液体对秀丽线虫的毒性效应,结果显示离子液体对秀丽线虫的致死率随离子液体侧链碳原子数的增加而增加.Pretti 等^[8]评估了离子液体对斑马鱼的急性毒性效应,结果表明,在离子液体暴露下斑马鱼的活动受抑制,表现为平衡性丧失,移动缓慢甚至死亡.而另一项关于离子液体对斑马鱼毒性效应的研究中发现离子液体在水中可稳定存在,表明泄露进入环境中的离子液体将以持久性污染物的形式存在^[9].Jodynys-liebert 等^[10]研究了离子液体对老鼠的急(慢)性毒性效应,发现老鼠的肺薄壁组织产生肺泡,而且进食量轻微减少,体重出现增加减缓的现象,而中浓度作用下的雌鼠发生了轻微血液学变化.李效宇等^[11]分析了 1-辛基-3-甲基咪唑溴盐对大型溞摄食率和滤水率的影响及在恢复条件后子代大型溞摄食强度发生的变化,发现该离子液体对大型溞的摄食强度产生了严重的影响,说明该离子液体对水生生态系统的安全存在着潜在的威胁.

大型溞(*Daphnia magna*)是水生浮游动物的代表,是世界范围内分布最广的甲壳纲枝角类无脊椎动物,在水生生物食物链中扮演着重要角色,其初级生产量直接影响着水生生态系统的结构和功能,而且它对水体的净化也有着不可忽视的作用^[12-13].此外,大型溞能通过孤雌生殖方式获得较纯的品系,并具有个体小、数量大、营养价值高、对环境变化敏感性高、繁殖周期短和易培养等优点,现已被广泛应用于评估环境污染物(壬基酚聚氧乙烯醚^[14]、氯霉素^[15]、纳米氧化锌^[16]等)的生态毒理学研究中^[17].

本研究以大型溞为实验对象评估 1-辛基-3-甲基咪唑氯盐([C_8mim]Cl)的急性(48 h)和慢性(21 d)毒性效应,通过比较分析大型溞的生长繁殖情况,确定适合用于评估离子液体生物毒性效应的大型溞,并探讨离子液体对水生生物的毒性效应机理,评价其对水生生物的毒性大小和对水生生态系统的可能影响.这将为离子液体对水生生物毒性效应的相关数据资料进一步地丰富,并为保护水生生态系统以及人类的健康与安全提供了科学依据.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验生物

大型溞(*Daphnia magna*)为本实验室分离培养的健康亲溞孤雌生殖达 3 代以上的幼溞.幼溞个体健康、体型均匀且活泼.参考 OECD 211 准则^[18-19],用曝气除氯的自来水培养大型溞使其状态稳定,所用培养液的 pH 值为 7.0 ± 0.2 ,培养温度为 $(25 \pm 0.2)^\circ\text{C}$,光周期为 12 h L:12 h D,培养密度为 25 mL 培养液/只溞,每 2 d 更换 1 次培养液,同时清洗干净培养器皿^[20].以小球藻为饵料定期投喂,喂食的密度控制在每 mL 培养液中含有 1.0×10^5 — 3.0×10^5 个藻细胞.在正式实验开始前 3 周内,挑选出 50 只体型较大、卵泡较多且反应敏捷的健康母溞分别放置在 50 mL 烧杯中,并使用小球藻进行喂养,毒性实验选取这些母溞生产的 2—5 代健康活泼的幼溞.

1.2 离子液体

1-辛基-3-甲基咪唑氯盐([C_8mim]Cl)购自上海成捷化学有限公司.称取 0.05 g [C_8mim]Cl 加入到 1 L 容量瓶中,然后用蒸馏水定容至标线,将其配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液待用.

1.3 实验方法

1.3.1 急性毒性实验

首先通过预实验获得 [C_8mim]Cl 对大型溞急性毒性效应的浓度范围,然后参照 OECD202 的标准方

法^[21]进行 48 h 的急性毒性暴露实验.实验过程中,设置 7 个实验浓度组,分别为 30、60、90、120、150、200、300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [C_8mim]Cl,同时设置不含离子液体、曝气脱氯的自来水作为空白对照组;选用 1、2、4 日龄的大型蚤为研究对象,每个浓度组内加入 10 只健康的大型蚤,每个浓度组设置 6 个平行;在暴露 24 h 和 48 h 后观察、记录大型蚤的生长发育情况.在实验过程中饵料和培养液不需要投喂与更换.

1.3.2 慢性毒性实验

根据 [C_8mim]Cl 对大型蚤急性毒性的实验结果,参照 OECD211 的标准方法^[19]进行 21 d 的慢性毒性暴露实验.实验过程中,选择 2 日龄的大型蚤为研究对象;分别设置 0.9、1.2、1.8、3.6、18 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [C_8mim]Cl 等 5 个实验浓度,并设置 1 组不含离子液体、曝气脱氯的自来水作为空白对照组,每个浓度设置 8 个平行.实验时,用 50 mL 的烧杯配置不同浓度的离子液体,在每只烧杯中放入 1 只健康的 2 日龄幼蚤,在培养温度为 $(25\pm 0.2)^\circ\text{C}$,光周期为 12 h L:12 h D 的条件下连续培养 21 d,实验期间采用了半静态的实验系统^[22-23],为了保证大型蚤生活环境良好并且保证实验期间药剂浓度为起始浓度的 90% 以上,在整个实验期间需每 2 d 更换 1 次实验溶液并彻底清洗培养烧杯.在实验过程中,每天需记录大型蚤的蜕皮、怀卵和繁殖以及是否死亡等生长发育情况,如有蜕皮需及时清理掉褪下的皮,如有繁殖需对新繁殖出的幼蚤进行计数并移除.在整个实验期间,每天用新鲜小球藻定量喂食.实验结束后整理实验结果并计算出大型蚤的平均初次产蚤时间和个数、总产蚤个数和次数以及总蜕皮次数等数据.

1.4 数据处理

用 SPSS 17.0 和 Origin 8.5 等统计软件处理实验过程中获得的相关数据,并对其进行显著性分析.采用概率单位法计算半致死浓度 (LC_{50}),其方法为:将 [C_8mim]Cl 浓度换算成对数值 X ,将各浓度对应的死亡发生频率换算成概率单位 Y ,即将死亡发生的“S”型曲线直线化,再按照模型 $Y=a+bX$ 建立直线回归方程,在此基础上令 $Y=5$ 计算半致死浓度^[24].其更详细的运算方法可参考李翠萍等^[25]的报道.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 [C_8mim]Cl 对大型蚤的急性毒性效应

如图 1 所示,对照组中,1 日龄的大型蚤在实验开始后的 24 h 和 48 h 内均出现不同程度的死亡,表明环境因素对 1 日龄幼蚤的生长发育存在一定程度的影响,即幼蚤存活能力受环境因素的影响较大,这可能是由于 1 日龄大型蚤的自身生理功能还不完全,对自然环境的耐受力较差等原因导致其在 24 h 和 48 h 出现死亡现象.2 日龄的大型蚤则生长状态良好,未出现死亡现象,表明 2 日龄幼蚤对环境条件具有一定程度的适应能力,不易受环境因素的影响,因此,实验组不同浓度对幼蚤存活个数影响的实验结果也相对更加准确,随着浓度的逐渐增加,幼蚤的存活个数不断下降,48 h 的实验组结果更明显.而 4 日龄幼蚤因自身生长发育更完善,暴露 24 h 时其对低浓度的 [C_8mim]Cl 敏感程度较低.这与张榜军等^[26]的研究结果基本一致,他们在研究不同浓度 [C_8mim]Br 对 1、3、5、7、11 日龄大型蚤毒性效应的过程中发现,不同日龄的大型蚤对 [C_8mim]Br 的敏感性不同,其中 1 日龄和 3 日龄幼蚤的敏感性最高,5 日龄和 7 日龄大型蚤的敏感性最低,怀卵期 11 日龄大型蚤对 [C_8mim]Br 的敏感性再次提高.因此,在评估离子液体生物毒性的研究过程中,选择具有一定敏感性的实验生物是获得精确毒理学数据的关键,因为这关系到相关毒理学数据的准确性和可靠性.

此外,在不同浓度 [C_8mim]Cl 处理组中,1、2、4 日龄大型蚤的生长受到了不同程度的抑制,并出现死亡,抑制行为表现为蚤的个体胀大、行动缓慢且受抑制,死亡蚤表现为白色胀大并沉在水底,甚至出现涨裂现象.根据图 1 中的相关数据计算 [C_8mim]Cl 对 1、2、4 日龄大型蚤的 48 h 半致死浓度,结果分别为 208.9、182.7、178.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,表明随着大型蚤日龄的增加, [C_8mim]Cl 对大型蚤的毒性逐渐增大并趋于稳定.因此,在应用大型蚤评估离子液体 [C_8mim]Cl 生物毒性效应的过程中,应根据大型蚤的龄期及其对 [C_8mim]Cl 的敏感性、环境条件等因素来综合考虑,根据本研究结果,综合比较得出 2 日龄大型蚤对 [C_8mim]Cl 的敏感性较高且受环境影响较小,更适合被用来评估离子液体 [C_8mim]Cl 的生物毒性效应.

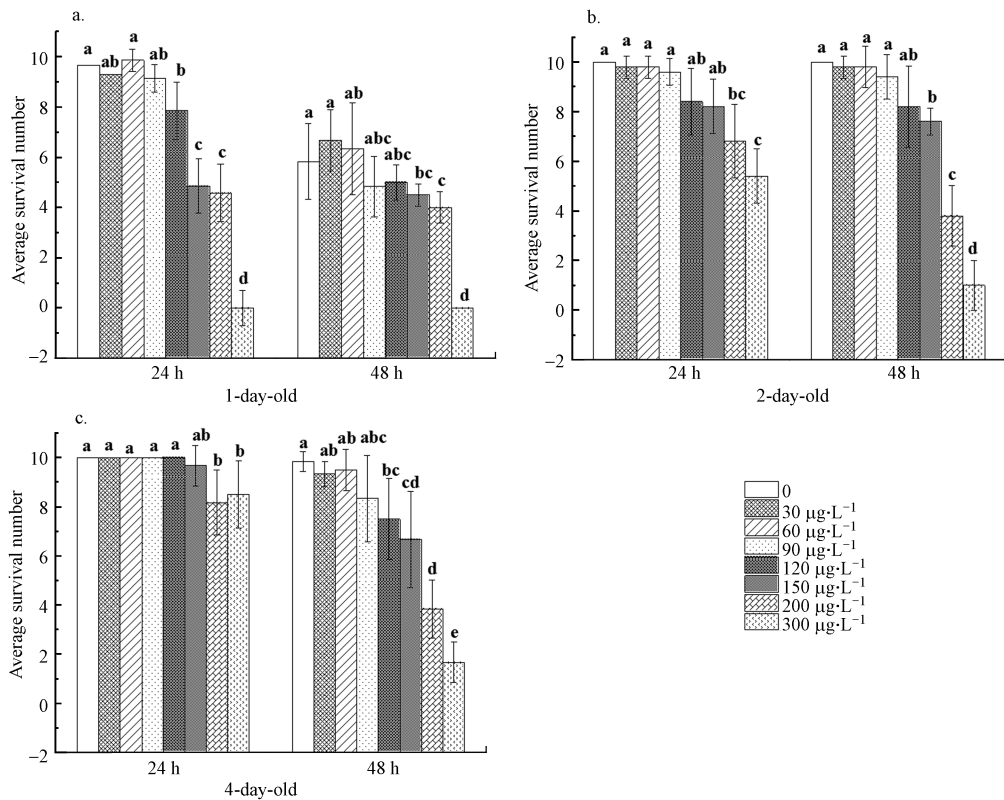


图1 在不同 $[C_8mim]Cl$ 浓度下暴露24 h和48 h后1日龄(a)、2日龄(b)和4日龄(c)大型溞的平均存活个数

Fig.1 Average survival rate. (a) 1-day-old macrophage, (b) 2-day-old macrophages, and (c) 4-day-old macrophages after 24 h and 48 h exposure at different $[C_8mim]Cl$ concentrations

2.2 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞的慢性毒性效应

2.2.1 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞存活率的影响

当2日龄的大型溞暴露在 $0.9\text{--}18\ \mu g \cdot L^{-1}$ $[C_8mim]Cl$ 中21 d后,低浓度 $[C_8mim]Cl$ ($0.9\text{--}1.8\ \mu g \cdot L^{-1}$)对大型溞的存活率无影响;当其浓度为 $3.6\ \mu g \cdot L^{-1}$ 时,大型溞的存活率降低;当其浓度为 $18\ \mu g \cdot L^{-1}$ 时,大型溞几乎不能存活,死亡率达100% (图2).该结果表明当离子液体浓度达到一定值后,其对大型溞的存活可产生一定程度的抑制,且随着离子液体浓度的增加,抑制程度逐渐加强.虽然目前关于 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞毒性的机理尚不清楚,但由于 $[C_8mim]Cl$ 是水溶性的,且其结构类似于表面活性剂,因此可以推测 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞的毒性效应机理类似于表面活性剂,即渗入细胞浆的类脂层和蛋白质中,改变细胞膜通透性,使细胞内容物外渗,同时凝固蛋白,使酶和结构蛋白变性,破坏细胞的代谢,导致细胞死亡等^[27].

2.2.2 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞产溞能力和蜕皮次数的影响

本研究以大型溞的初次产溞(时间、个数)、总产溞(个数、次数)和总蜕皮次数等3个方面的指标来分析 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞产溞能力和蜕皮次数的影响.由图3a和3b所示,在不同浓度 $[C_8mim]Cl$ 暴露下,大型溞的初次产溞时间在第6天左右,表明 $[C_8mim]Cl$ 对2日龄大型溞的初次产溞时间影响不显著;但随着 $[C_8mim]Cl$ 浓度的增加,大型溞的初次产溞个数逐渐下降,说明离子液体对大型溞的初次生

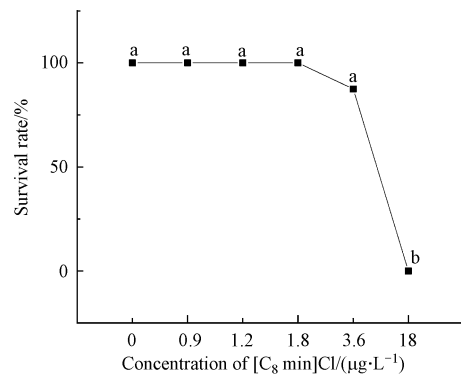


图2 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞存活率的影响

Fig.2 Effects of $[C_8mim]Cl$ on the survival rate of *Daphnia magna*

产繁殖能力有较大影响.图 3c 和 3d 展示了大型溞暴露在 $[C_8mim]Cl$ 中 21 d 的总产溞数目和次数,由图可知,大型溞的总产溞数目为 65—85 个,总产溞次数在 7 次左右,表明该离子液体对大型溞的总产溞数目和次数影响不显著.此外,由图 3e 所示,在不同浓度 $[C_8mim]Cl$ 暴露下,大型溞的总平均蜕皮次数为 11 次左右,说明 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞的蜕皮次数没有太大影响.因此, $[C_8mim]Cl$ 对大型溞生活史中的初次产溞时间、总产溞数目、总产溞次数、蜕皮次数等的影响均不显著,但显著影响大型溞的初次产溞个数,且暴露于较高 $[C_8mim]Cl$ 浓度下的大型溞的存活率也受到抑制.这与 Bernot 等^[28]的研究结果一致,他们将大型溞暴露于 4 种不同浓度的离子液体 ($[Bmim]Br$ 、 $[Bmim]Cl$ 、 $[Bmim]PF_6$ 、 $[Bmim]BF_4$) 中,发现大型溞的生活史发生了改变,第一代产溞数量显著减少,而且暴露于所有离子液体的大型溞的存活率受到抑制且呈浓度响应趋势.但目前有关离子液体影响大型溞繁殖发育的毒性机理尚不清楚,这将是未来的研究重点之一.

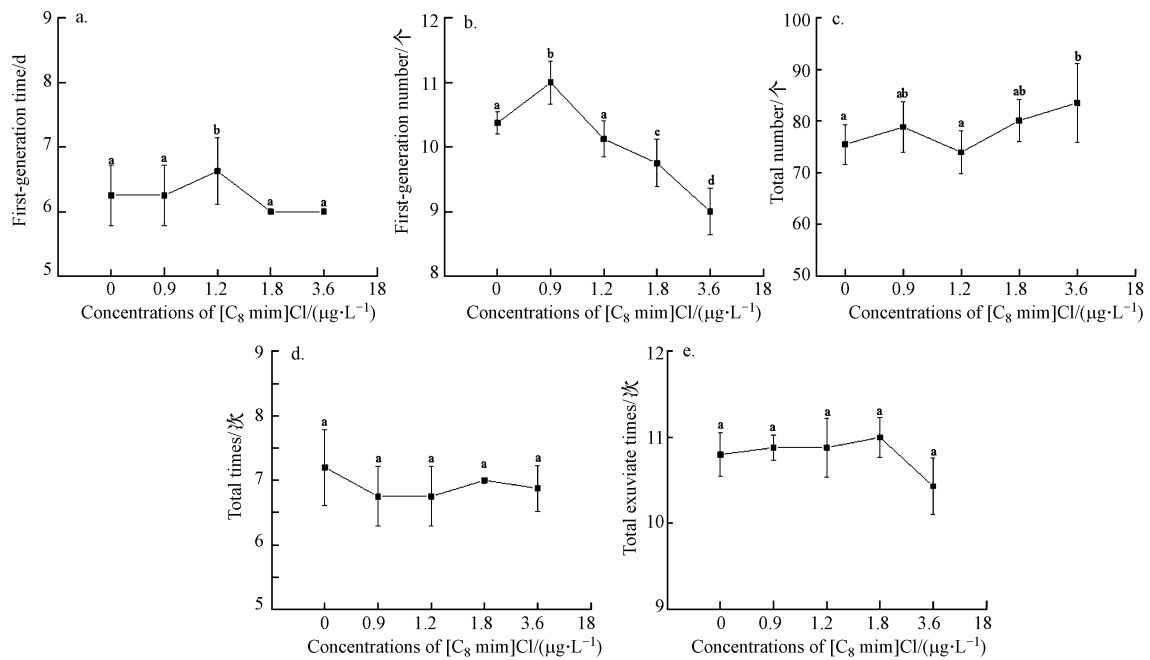


图 3 $[C_8mim]Cl$ 对大型溞初次产溞时间(a)、初次产溞个数(b)、总产溞数(c)、总产溞次数(d)和总蜕皮次数(e)的影响

Fig.3 Effects of $[C_8mim]Cl$ on the first-generation time (a) and number (b), total number (c) and times (d), and total exuviate times (e) of *Daphnia magna*

3 结论 (Conclusions)

通过应用大型溞来评估 $[C_8mim]Cl$ 的生物毒性,可获得如下结论:

(1) 2 日龄的大型溞因其对环境因素的适应能力较强,且对 $[C_8mim]Cl$ 的毒性更敏感,故更适合用来评估 $[C_8mim]Cl$ 等离子液体的生物毒性效应.

(2) 大型溞的存活率和初次产溞数量等指标对 $[C_8mim]Cl$ 的毒性效应较灵敏,而初次产溞时间、总产溞数目和次数、总蜕皮次数等指标的灵敏性较差.

(3) $[C_8mim]Cl$ 等离子液体的暴露对大型溞的生长、繁殖和发育具有一定程度的影响,因此,需对其生物环境风险进行评估,尽量避免其进入自然水体,以免对水生生物乃至人类健康产生危害.

参考文献 (References)

- [1] KESKIN S, KAYRAK-TALAY D, AKMAN U, et al. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2007, 43(1): 150-180.
- [2] 李国平, 薛娟琴, 杨婷, 等. $[Bmim]PF_6$ 离子液体支撑液膜迁移氟根的实验研究[J]. 环境化学, 2017, 36(6): 1226-1235.

- LI G P, XUE J Q, YANG T, et al. Treatment of cyanide wastewater by [Bmim] PF₆ supported ionic liquid membrane [J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(6): 1226-1235 (in Chinese).
- [3] BUBALO M C, RADOŠEVIĆ K, REDOVNIKOVIC I R, et al. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 99: 1-12.
- [4] 胡雪生, 余江, 夏寒松, 等. 离子液体的绿色合成及环境性质[J]. 化学通报, 2005, 68(12): 906-910.
- HU X S, YU J, XIA H S, et al. Green synthesis and environmental properties of ionic liquids [J]. Chemistry (Huaxue Tongbao), 2005, 68(12): 906-910 (in Chinese).
- [5] PHAM T P T, CHO C W, YUN Y S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review [J]. Water Research, 2010, 44(2): 352-372.
- [6] PAWŁOWSKA B, TELESIŃSKI A, BICZAK R. Phytotoxicity of ionic liquids [J]. Chemosphere, 2019, 237: 124436.
- [7] SWATLOSKI R P, HOLBREY J D, MEMON S B, et al. Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids [J]. Chemical Communications, 2004, 6: 668-669.
- [8] PRETTI C, CHIAPPE C, PIERACCINI D, et al. Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Green Chemistry, 2006, 8(3): 238-240.
- [9] ZHANG C, ZHU L, WANG J, et al. The acute toxic effects of imidazolium-based ionic liquids with different alkyl-chain lengths and anions on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 140: 235-240.
- [10] JODYNIS-LIEBERT J, NOWICKI M, MURIAS M, et al. Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyltrimethylammonium saccharinate, in rats [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010, 57(2/3): 266-273.
- [11] 李效宇, 苗晓青, 皇培培, 等. 离子液体溴化-1-辛基-3-甲基咪唑诱发金鱼血红细胞微核和核异常的研究[J]. 安全与环境学报, 2010, 10(2): 5-7.
- LI X Y, MIAO X Q, HUANG P P, et al. Micronuclei and nuclear anomalies in the erythrocytes of goldfish induced by ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium bromide [J]. Journal of Safety and Environment, 2010, 10(2): 5-7 (in Chinese).
- [12] 刘建梅, 刘济宁, 陈英文, 等. 四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的急性和慢性毒性[J]. 环境科学学报, 2015, 35(6): 1946-1954.
- LIU J M, LIU J N, CHEN Y W, et al. Acute and chronic toxicity of tetrabromobisphenol A and tribromophenol to *Daphnia magna* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(6): 1946-1954 (in Chinese).
- [13] 张丽彬, 王金鑫, 王启山, 等. 浮游动物在生物操纵法除藻中的作用研究[J]. 生态环境, 2007, 16(6): 1648-1653.
- ZHANG L B, WANG J X, WANG Q S, et al. Effect of zooplankton on removing algae in bio-manipulation [J]. Ecology and Environment, 2007, 16(6): 1648-1653 (in Chinese).
- [14] 蔡小宇, 姜锦林, 单正军, 等. 壬基酚聚氧乙烯醚对大型溞的急性和慢性毒性效应[J]. 生态与农村环境学报, 2018, 34(1): 81-86.
- CAI X Y, JIANG J L, SHAN Z J, et al. Acute and chronic toxicity of nonylphenol ethoxylates to *Daphnia magna* [J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2018, 34(1): 81-86 (in Chinese).
- [15] 杨灿, 沈根祥, 胡双庆, 等. 氯霉素对大型溞的急性和慢性毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 248-255.
- YANG C, SHEN G X, HU S Q, et al. Acute and chronic toxicity of chloramphenicol to *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 248-255 (in Chinese).
- [16] 刘倩, 杜青平, 刘涛, 等. 纳米氧化锌致大型溞的毒性效应特征[J]. 环境科学学报, 2019, 39(4): 1332-1339.
- LIU Q, DU Q P, LIU T, et al. Study on the toxicity effects of nanometer zinc oxide on *Daphnia magna* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(4): 1332-1339 (in Chinese).
- [17] WANG S, MECKLING K A, MARCONE M F, et al. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(3): 960-968.
- [18] OECD. Test Guideline No. 211. Effects on biotic systems test; *Daphnia magna* reproduction test [S]. Paris: OECD Publishing, 2008.
- [19] OECD. Test Guideline No. 211. Test guidelines for testing of chemicals: *Daphnia magna* reproduction test [S]. Paris: OECD Publishing, 1998.
- [20] STAUBER J L, FLORENCE T M. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Water Research, 1989, 23(7): 907-911.
- [21] OECD. Test Guideline No. 202. Test guidelines for testing of chemicals: *Daphnia* sp. acute immobilization test [S]. Paris: OECD Publishing, 2004.
- [22] U.S. EPA. Guidelines for deriving numerical water quality criteria for the protection of aquatic organism and their uses [S]. Washington: National Technical Information Service, 1985.
- [23] FRANCIS P C, GROTHE D W, SCHEURING J C. Chronic toxicity of 4-nitrophenol to *Daphnia magna* straus under statis-renewal and flow-through conditions [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1986, 36(5): 730-737.
- [24] 顾兵, 张政, 李玉萍, 等. 半数致死剂量及其计算方法概述[J]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 507-508, 511.
- GU B, ZHANG Z, LI Y P, et al. Summary of LD₅₀ and its calculation methods [J]. Chinese Occupational Medicine, 2009, 36(6): 507-508, 511 (in Chinese).
- [25] 李翠萍, 吴民耀, 王宏元. 3 种半数致死浓度计算方法之比较[J]. 动物医学进展, 2012, 33(9): 89-92.
- LI C P, WU M Y, WANG H Y. LC₅₀ calculated by kochi, probit analysis and linear regression methods [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(9): 89-92 (in Chinese).
- [26] 张榜军, 罗艳蕊, 范红军, 等. 离子液体 [C₈mim]. Br 对不同日龄大型溞的急性毒性[J]. 生态环境学报, 2008, 17(3): 1021-1023.
- ZHANG B J, LUO Y X, FAN H J, et al. The acute toxicity of 1 methyl-3-octylimidazolium bromide to *Daphnia magna* at different developmental stages [J]. Ecology and Environment, 2008, 17(3): 1021-1023 (in Chinese).
- [27] 李秀环, 李华, 陈澄宇, 等. 不同种类农药表面活性剂对大型溞的急性毒性[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8): 2319-2324.
- LI X H, LI H, CHEN C Y, et al. Acute toxicity of different type pesticide surfactants to *Daphnia magna* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(8): 2319-2324 (in Chinese).
- [28] BERNOT R J, BRUESEKE M A, EVANS-WHITE M A, et al. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24(1): 87-92.