Luo Y F, Yin G F, Gan T T, *et al*. Movement space size on the behavior and toxic response of *Daphnia magna* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(3): 032612. [骆云飞, 殷高方, 甘婷婷, 等. 大型溞运动空间尺寸对其行为及毒性响应的影响 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(3): 032612.]

大型溞运动空间尺寸对其行为及毒性响应的影响

骆云飞[1, 2, 3] 殷高方[2, 3, 4*] 甘婷婷[2, 3*] 秦飞虎[2, 3] 谭小璇[1, 2, 3]
叶紫琪[2, 3] 赵南京[1, 2, 3, 4]

(1. 中国科学技术大学环境科学与光电技术学院, 合肥 230026; 2. 中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所, 中国科学院环境光学与技术重点实验室, 合肥 230031; 3. 安徽省环境光学监测技术重点实验室, 合肥 230031; 4. 合肥综合性科学中心环境研究院, 合肥 230601)

摘要: 文章以不同孔径(6、10.5、15、20、28、37.5 mm)的多孔板作为空间约束工具, 系统研究了空间尺寸变化对大型溞在无毒和敌百虫(Trichlorphon, TCF)毒性胁迫下运动参数(平均速度、平均加速度、分形维数)的影响规律, 并采用硫酸铜($CuSO_4$)和氟西汀(Fluoxetine, FLX)进行验证, 以明确空间尺寸对大型溞在无毒性胁迫时的运动基线及在毒性胁迫时毒性响应的影响, 并建立兼顾灵敏度、稳定性与通量的标准测试条件。结果表明, 在无毒性胁迫下, 20 mm孔径下大型溞在35min运动时间内的平均速度变化率(3.98%)和分形维数变化率(0.63%)最低, 且平均速度的相对标准偏差(RSD=30.1%)较6 mm孔径显著降低(降幅 32.5%), 表明该尺寸下大型溞的运动基线最平稳、组内差异最小; 在6.8 μg/L 的 TCF 毒性暴露下, 20 mm孔径时大型溞的运动表现出了最强的毒性响应信号: 平均速度抑制率达41.3%, 响应效能指数(REI)最高为 1.65; 通过以 $CuSO_4$ 和 FLX 验证, 进一步证实20 mm孔径能实现最大的响应幅度(变化率分别为–38.6%和–29.3%)和最低的 RSD (28.0%和24.3%), 由此确定20 mm孔径是消除空间干扰的临界阈值, 能有效兼顾检测的敏感性与数据稳定性。本研究为建立基于大型溞运动行为的水质生物毒性检测方法(特别是在空间尺寸参数的设定上)提供了关键的理论依据和实验支撑。

关键词: 运动行为; 空间尺寸; 毒性效应; 大型溞

中图分类号: Q178 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)03-032612-12

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0290 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0290

水环境作为生命之源与生态系统的核心载体, 日益严重的水污染正威胁着这一基础[1]。短时间暴露在低浓度污染中水生物不会即时死亡, 但其运动行为可能会受到干扰, 而这种行为扰动往往是生理毒性的早期信号, 预示着潜在的生态风险[2, 3]。因此, 研发可捕捉污染物暴露早期行为异常的快速、灵敏、可靠的水质生物毒性检测技术, 对保障水环境安全与生态系统健康至关重要[4]

大型溞(*Daphnia magna*)是水生生态系统中能量转化和物质循环的关键物种。由于其对环境污染物高度敏感、繁殖周期短, 并能通过孤雌繁殖方式获得遗传背景一致的克隆群体, 该物种已成为毒理学研究中备受推荐的水生模式生物, 目前被广泛应用于各类水生毒性实验中[5]。通常, 在大型溞急

收稿日期: 2025-08-31; **修订日期:** 2025-10-22

基金项目: 国家自然科学基金 (62375270); 国家工程研究中心开放基金(2024KFJJ0108); 安徽省自然科学基金(2508085MD078); 珠海市产学研合作项目(2320004002782); 合肥综合性科学中心环境研究院科研团队建设项目(HYKYTD2024004); 皖江新兴产业技术发展中心科研项目(WJ23CYHXM03)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (62375270); Open Fund Project of National Engineering Research Center (2024KFJJ0108); Anhui Provincial Natural Science Foundation (2508085MD078); Zhuhai University-Industry-Research Collaboration Project (2320004002782); Institute of Environmental Hefei Comprehensive Science Center Research Team Construction Project (HYKYTD2024004); Scientific Research Project of Wanjiang Emerging Industry Technology Development Center (WJ23CYHXM03)]

作者简介: 骆云飞(2000—), 男, 硕士研究生; 主要研究方向为水质生物毒性检测方法。E-mail: yunfeiluo@mail.ustc.edu.cn

通信作者: 殷高方, 男, 研究员; E-mail: gfyin@aiofm.ac.cn 甘婷婷, 女, 副研究员; E-mail: ttgan@aiofm.ac.cn *共同通信作者

©The Author(s) 2026. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

性毒性研究中所观察到的效应是致死率或在致死之前出现的其他一些表现, 如无法活动[6], 然而, 一种无法致死效应的物质仍可能具有毒性, 并妨碍水生生物的重要代谢和行为过程, 从而对生态系统健康产生负面影响。

但是, 以大型溞为受试生物的传统急性毒性试验和慢性生长实验因耗时较长, 可达数天至数周, 难以满足水污染快速响应与早期预警的迫切需求。相比之下, 大型溞的运动行为受生理、感知、神经和肌肉系统等多方面影响, 复杂多变、参数多样[5], 被视为最敏感的毒性生物标志物之一。因此, 发展基于其运动行为的检测方法, 能弥补传统毒性试验不足, 对污染快速响应与早期预警具有重要意义。图像采集和计算机视觉技术的进步促进了基于大型溞的运动行为作为毒性检测指标的发展, 已有多种运动行为指标被提出并被应用于以大型溞为受试生物的毒性检测中[7]。大型溞运动行为作为水质生物毒性检测终点, 较传统毒理学终点对毒性响应更快速、敏感, 可在污染早期检测低剂量污染物的亚致死效应, 快速反映水质生物安全状况[2]。在众多运动行为参数中, 大型溞的运动速度是应用最广泛、最可靠的参数之一[8]; Hansen等[9]还提出加速度作为相关参数; 本研究引入的分形维数, 作为量化路径空间填充复杂性与自相似性的指标(介于 1—2, 数值越高表明轨迹越复杂), 进一步丰富了行为毒性评估的维度[10]。

尽管大型溞运动行为在毒性检测中优势显著, 但相关检测常需借助多孔板观测其行为特征。作为重要观测载体, 多孔板的空间大小直接影响大型溞的运动范围及行为特征[11], 是制约其用于水质生物毒性检测的关键因素。然而, 空间尺寸是否干扰大型溞运动行为, 从而影响毒性测量结果的准确性与可靠性, 目前尚且未知[12]。鉴于此, 本文通过分析不同运动空间下非毒性及毒性胁迫下大型溞的运动参数变化特征, 筛选出有利于开展水质生物毒性检测的最佳运动空间尺寸, 为建立基于大型溞运动行为的水质生物毒性快速检测方法提供重要依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料和仪器

所用大型溞购自广东省实验动物监测所, 其培养用水为经0.7 μm 玻璃纤维滤纸(Whatman GF/F, 上海, 中国)过滤后再曝气 48h 以上的自来水[pH7.0—8.5, 溶解氧为 4 mg/L 以上, 硬度为(250±22) mg/L]。大型溞培养条件根据国家标准《GB/T 21830-2008 化学品 溞类急性活动抑制试验》, 设置为温度(22±1)℃、光暗比 16h∶8h、光照强度 1200 lx, 培养用水每周更换 2 次, 每天定时投喂1次密度为 10^5 cell/mL 的蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*), 投喂体积以使培养液呈现青苹果色为宜。每次实验时, 在前 1 天将此批亲溞与幼溞分离, 将分离后亲溞所产的幼溞用于实验, 实验开始时所用幼溞均来自至少经过3个月连续培养驯化的纯种雌性大型溞, 并通过孤雌繁殖的方式获得的非第一批子代, 溞龄在6—24h。

研究所用敌百虫(Trichlorphon, TCF)、硫酸铜($CuSO_4$)、氟西汀(Fluoxetine, FLX)均购自阿拉丁公司(分析纯试剂, 纯度≥99%)。实验用水均使用 Molecular 超纯水机(Molelement1805A, 北科恒信, 北京, 中国)制备的超纯水。

1.2　大型溞急性毒性实验

参照 OECD202:2012 标准方法[13]开展 TCF 对大型溞的急性毒性暴露实验。在急性毒性实验中, 设置 1 个空白对照组及 9 个毒性暴露组, 毒性暴露组中 TCF 的浓度分别为0、1、2、5、8、10、20、50、100、200 μg/L, 每组均设置 3 个平行样, 每个样品中随机加入10只幼溞, 毒性暴露实验期间不投喂、不更换实验溶液, 暴露 24h 后分别记录每个烧杯中幼溞的活动抑制率, 以轻微晃动后 15s 无明显游动判断为幼溞活动受到明显抑制, 结果采用 Logistic[14]进行曲线拟合。

1.3　大型溞运动行为毒性暴露实验

本研究以 TCF 对大型溞的 24h 半数运动抑制浓度(24h-EC_{50}=6.8 μg/L)为基准, 设置空白对照组(0)、EC_{50}组(6.8 μg/L)及EC_{50}组(1.7 μg/L)三个暴露梯度。选用孤雌生殖繁殖的第3到第5胎、出生 6—24h 内的健康幼溞, 于标准培养液中预先驯养≥1h 并剔除活动异常个体。将幼溞随机分配至 6 种孔径(6、10.5、15、20、28、37.5 mm)的多孔板中, 每组浓度设置 12 个平行样, 每孔单只放置。在实验开始后, 首先向各孔注入洁净培养液使幼溞适应 5min 以消除应激; 为排除多孔板透光性与吸附作用的干扰, 本研究采用同一批次的U型透明有机玻璃板以确保光学性质一致, 并采用底部均匀冷光源照明。在毒性暴露前, 使用对应浓度的暴露液润洗孔壁 2 次, 彻底清除残留培养液对暴露浓度的干扰并且稳定孔壁对污染物的吸附, 最大限度减少其对暴露浓度的干扰; 最后加入新鲜暴露液至标准液面高度, 在 (22±1)℃恒温、1200 lx 恒定光照条件下, 通过视频追踪系统连续记录 35min 的运动行为。$CuSO_4$ 和 FLX 验证实验方法同上。

1.4 行为观测平台

本研究采用实验室搭建的大型溞目标跟踪系统观测大型溞的运动行为, 该系统由硬件采集系统和软件分析系统两部分组成, 硬件采集系统如图 1所示, 由连续可变焦相机(HXJ-AF200T, 华显光学, 深圳, 中国)、U形有机玻璃多孔板、LED底部冷光源及器材支架组成, 软件分析系统基于YOLOX 目标检测算法与 ByteTrack 多目标跟踪算法, 对大型溞运动视频进行逐帧的目标识别和跟踪。在对大型溞的运动进行观测时, 通过 SLView 软件对大型溞进行运动行为视频记录, 视频分辨率为 1920×1080P, 帧率为 30 Hz, 格式为 MP4, 为了避免因大型溞游泳姿态变化和移动可能会导致短暂的目标丢失, 而造成运动轨迹缺帧或多帧[15], 影响瞬时运动参数计算的准确性, 本研究在按照帧率计算运动参数之后, 以每 5min 为一个数据单元进行运动参数分析。通过平均速度、平均加速度、分形维数等运行参数分析空间尺寸对大型溞运动行为及水质生物毒性分析的影响。

1.5 数据分析

本研究中采用Microsoft Excel 2024进行数据记录和整理, 利用 Python 3.13 进行运动参数(平均速度、平均加速度)和分形维数的计算, 所有数据结果表示为(平均值±标准误差)。使用Cui等[16]提到的基于盒计数法计算分形维数, 如公式(1)所示:

$$\mathrm{FD}=\lim_{s\to 0}\frac{\log_2 N(s)}{\log_2\left(\frac{1}{s}\right)} \tag{1}$$

式中, s代表盒子尺寸, $N(s)$代表覆盖轨迹所需的最小盒子数量, FD表示分形维数。

本研究使用 IBM SPSS Statistics 22 进行数据分析, 对于剂量−效应数据采用 Logistic 模型进行拟合; 针对组间比较数据, 在通过 Shapiro-Wilk 检验(正态性)和 Levene 检验(方差齐性)证实符合参数检验前提后, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 及最小显著差异法 (LSD) 事后检验进行显著性分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

本研究采用 IBM SPSS Statistics 22 进行统计学分析, 通过 Logistic 回归拟合剂量−效应曲线; 采用 Shapiro-Wilk 检验与 Levene 检验分别评估数据的正态性与方差同质性, 对满足参数检验假设的数据, 进一步使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及最小显著差异法 (LSD) 事后检验进行组间比较, 以 $P<0.05$为差异具有统计学意义; 最终利用 Origin 2023 进行数据可视化, 并采用 Adobe Illustrator 2024 完成图表优化与整合。

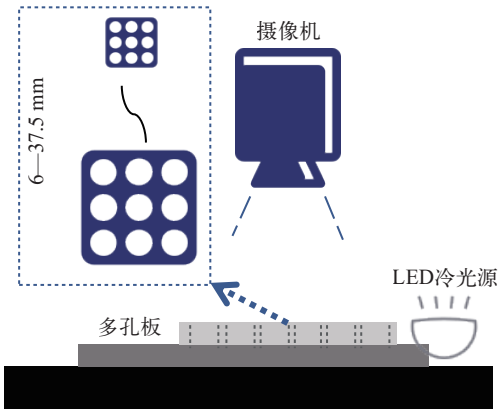

图 1 行为观测平台

Fig. 1 Locomotion Observation Platform

2 结果与讨论

2.1 不同空间尺寸中大型溞自由活动轨迹特征

以多孔板的尺寸表示大型溞运动空间的大小, 在30—35min观测期内, 非毒性胁迫下大型溞于6—37.5 mm间不同尺寸空间中自由活动轨迹如图 2所示。可以看出, 在不同尺寸空间下, 大型溞运动轨迹分布特征明显不同: 小尺寸空间下(≤15 mm), 如图 2a—2c, 位置点呈高度局域化分布, 表现为6与10.5 mm空间尺寸中形成密集簇状聚集, 表明因空间受限, 大型溞会发生高频边界碰撞导致的折返行为, 15 mm尺寸下运动轨迹虽呈现离散团状扩散, 但整体仍表现为边界聚集模式, 表明个体在有限空间内尝试自由探索但却被迫反复转向; 相比之下, 大尺寸空间时(≥20 mm), 如图 2d—2f所示, 空间约束效应显著减弱, 20 mm空间尺寸下位置点覆盖区域较大, 且各个方向呈现均匀分布, 表明基础自由游动能力未受空间约束所影响; 28—37.5 mm空间尺寸下位置点全域均匀分散, 边界碰撞现象消失, 表明趋触性行为(动物行为中有接触固体的倾向)[17]几乎消失, 运动模式趋近自然生境状态。由此可见, 运动空间大小对大型溞运动行为与过程具有显著影响, 是基于大型溞运动行为进行水质生物毒性检测需重点关注的条件要素。

2.2 不同空间尺寸中无毒性胁迫大型溞运动参数和分形维数特征

在 6、10.5、15、20、28、37.5 mm不同空间尺寸下, 35min观测时间内无毒性胁迫下大型溞平均速度、平均加速度及分形维数如图 3所示, 三者的统计结果如表 1所示。由图 3a 可以看出, 在6、10.5、15、20、28、37.5 mm空间尺寸下, 大型溞在35min内平均速度的均值分别为1.64、1.71、2.23、2.16、2.24、2.38 mm/s, 其随空间尺寸的增加呈现

增大趋势; 在不同空间尺寸下, 平均速度随观测时间的变化规律也有所不同, 如在6、10.5、15 mm小空间尺寸内时, 大型溞的平均速度随着观测时间的增加呈显著下降趋势; 而在20、28、37.5 mm的大空间尺寸内, 大型溞的平均速度随观测时间增加并未明显下降, 整体趋势稳定, 不存在显著性差异。同时实验还观察到大型溞平均速度最大值普遍出现在观测早期(5min或10min), 最小值则多出现在观测中后期(25min、30min、35min), 表明大型溞在观测初期阶段活动较为剧烈, 而在观测的后期运动活性区域减弱[18]。Nasyrova等[19]研究结果中提到, 大型溞在二维平面上存在着先探索后适应的过程, 这与本研究结果表现一致。由表 1也可以看出, 当大型溞所在空间尺度由6 mm增加到37.5 mm时, 大型溞在整个观测时间内平均速度最大值与最小值间的相对变化率$\Delta\overline{V}$及平均速度间的相对标准偏差$RSD_{\overline{V}}$总体均呈先递减再递增的变化趋势, 其中当空间尺度为20 mm时, $\Delta\overline{V}$ 及$RSD_{\overline{V}}$最小, 分别为3.98% 和30.1%, 表明在 20 mm 尺度空间内, 大型溞运动过程速度最为稳定, 不同大型溞个体间运动状态也具有较好的一致性。导致上述结果的原因, 可能是由于在≤15 mm的小空间尺寸内, 大型溞运动受到了一定的空间约束, 其平均速度小于≥20 mm大空间尺寸, 同时在<20 mm的小尺度空间内, 大型溞因其具有趋触性[17], 在运动过程中多次碰撞容器壁, 导致其平均速度逐渐降低, 运动状态极不稳定; 虽然37.5 mm大尺寸空间下大型溞的平均速度变化不存在统计学上显著性差异, 但是其直观数据具有一定的波动性, $\Delta\overline{V}$ 为16.42%, 显著大于20和28 mm孔径下的 $\Delta\overline{V}$, 证明在大空间尺寸(>20 mm)中大型溞的运动状态仍具有较大波动性。$RSD_{\overline{V}}$在小孔径(如6、15 mm)普遍较高(44.6%、33.4%), 进一步证实小空间尺寸下个体间运动状态差异较大、稳定性差; 而在20 mm孔径时$RSD_{\overline{V}}$相对较低(30.1%), 表明此时个体运动状态一致性较好。

图 3b 结果表明, 在小空间尺寸(≤15 mm)范围内, 大型溞的平均加速度随观测时间延长呈现显著降低趋势(P<0.05), 小孔径环境对其加速运动形成明显空间限制; 当空间尺寸达到 ≥20 mm 时, 大型溞在观测期内的平均加速度未出现明显下降, 表明此时空间限制作用显著减弱, 已基本满足其加速运动所需的空间范围。与运动速度变化特征类似, 加

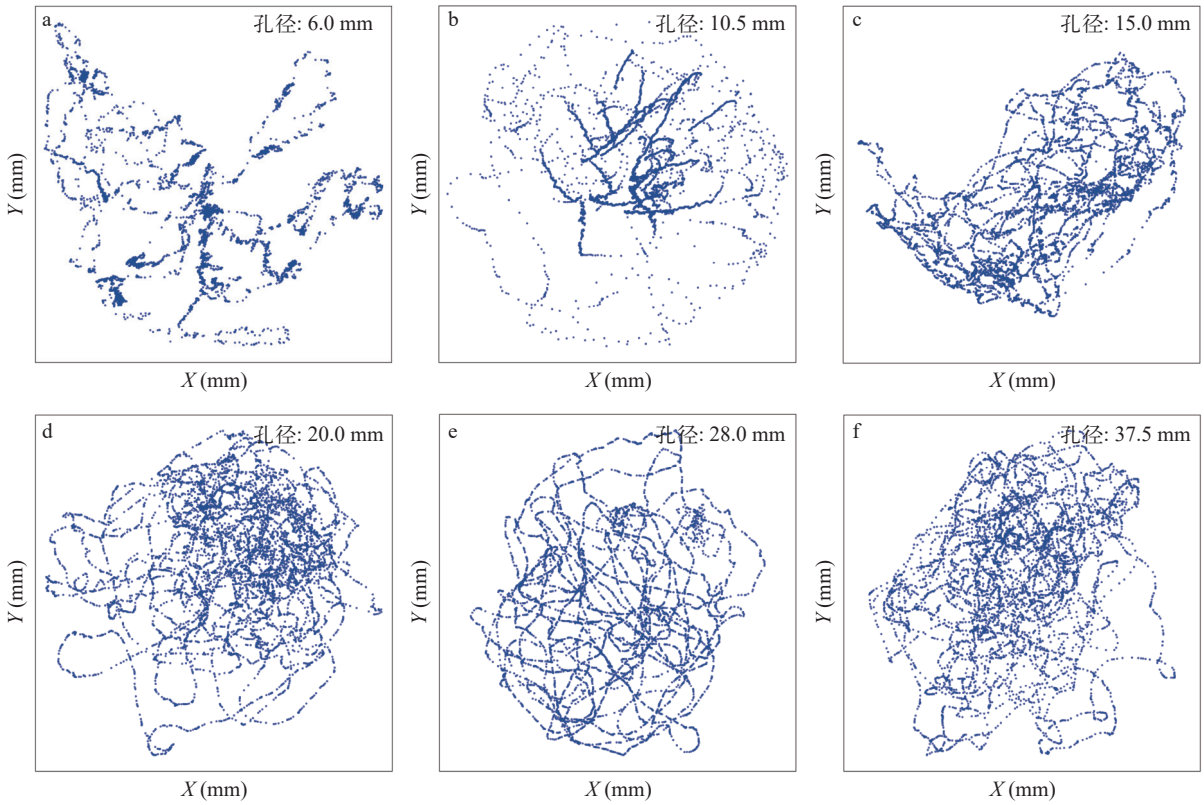

图 2　不同空间尺寸下无毒性胁迫的大型溞在30—35min 内的运动轨迹

Fig. 2　Movement trajectories of *Daphnia magna* under non-toxic conditions within 30—35min across different spatial dimensions

a. 6 mm 孔径; b. 10.5 mm 孔径; c. 15 mm 孔径; d. 20 mm 孔径; e. 28 mm 孔径; f. 37.5 mm 孔径 (n=12)

a. 6 mm aperture; b. 10.5 mm aperture; c. 15 mm aperture; d. 20 mm aperture; e. 28 mm aperture; f. 37.5 mm aperture (n=12)

速度的最大值普遍出现于观测早期(5min或10min), 而最小值则多分布于观测中后期(25min、30min、35min), 这一规律反映出大型溞在适应环境初期运动状态调整剧烈, 后期逐渐趋于平缓的共性特征。

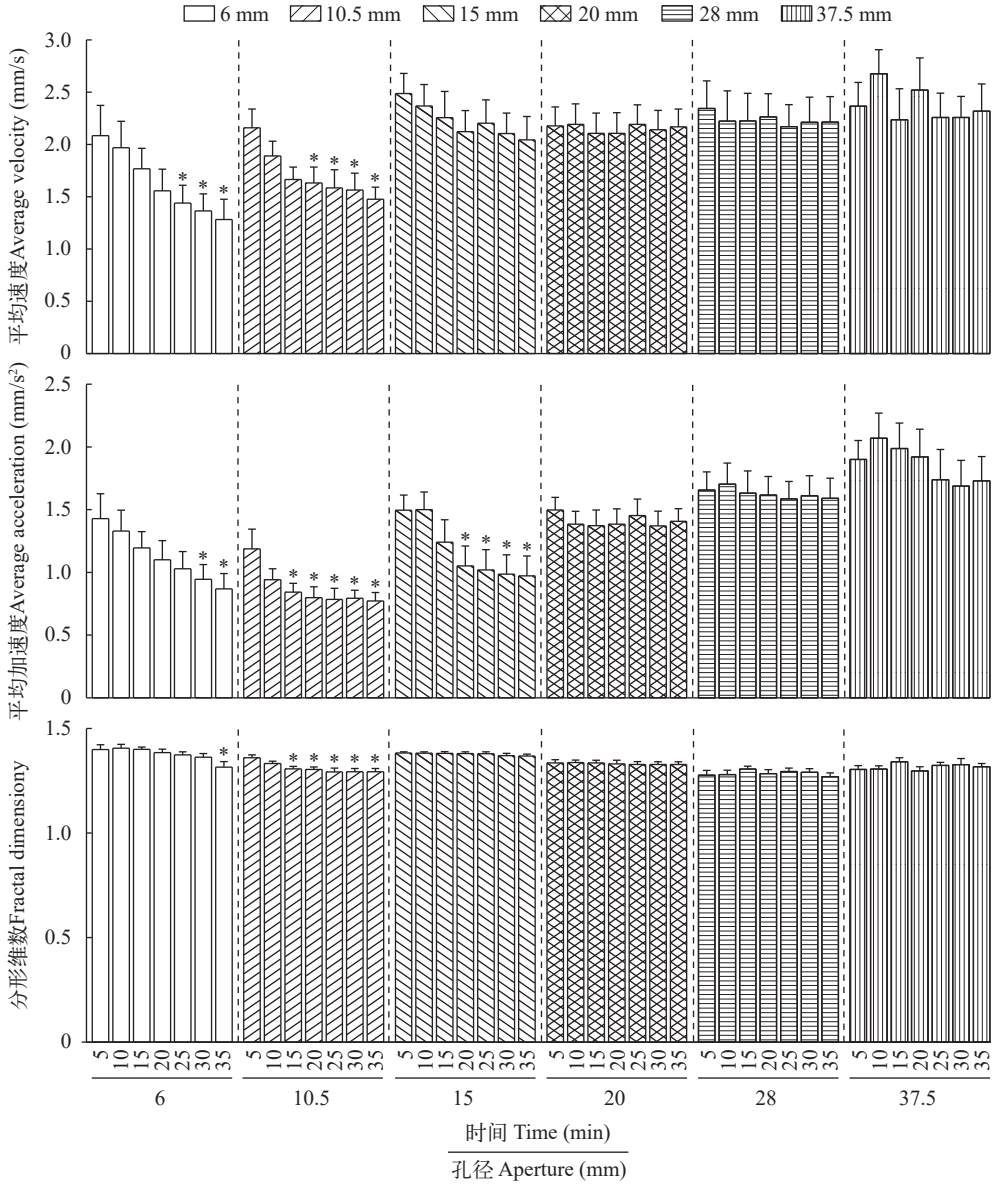

图 3 不同尺寸空间中无毒性胁迫的大型溞运动参数随时间的变化(n=12), * 表示具有显著性差异(P<0.05)

Fig. 3 Temporal variation in locomotion parameters of *Daphnia magna* under non-toxic conditions across different spatial dimensions (n=12); * indicates significant difference (P<0.05)

表 1 不同空间尺寸下无毒性胁迫的大型溞运动参数的变化率和相对标准偏差

Tab. 1 Change rates and relative standard deviations of locomotion parameters for *Daphnia magna* under non-toxic conditions across different spatial dimensions (n=12)

孔径 Aperture (mm)	$\overline{V}$			$\overline{A}$			$\overline{FD}$		
	Max/Min (mm/s)	$\Delta\overline{V}$ (%)	$RSD_{\overline{V}}$	Max/Min (mm/s^2)	$\Delta\overline{A}$ (%)	$RSD_{\overline{A}}$ (%)	Max/Min	$\Delta\overline{FD}$ (%)	$RSD_{\overline{FD}}$ (%)
6	2.08/1.28	38.50	44.6	1.43/0.87	39.11	45.0	1.41/1.32	6.42	4.6
10.5	2.16/1.48	31.59	30.3	1.19/0.77	34.87	34.5	1.36/1.29	4.97	3.7
15	2.49/2.04	17.83	33.4	1.50/0.97	35.24	46.9	1.38/1.38	1.04	2.1
20	2.19/2.11	3.98	30.1	1.50/1.37	8.43	28.0	1.34/1.33	0.63	3.7
28	2.35/2.17	7.43	38.2	1.70/1.59	6.96	33.3	1.31/1.27	2.83	5.0
37.5	2.68/2.24	16.42	36.6	2.07/1.69	18.46	37.9	1.34/1.30	3.29	4.9

进一步分析表 1 数据可见, 在整个观测时段内, 大型溞平均加速度最大值与最小值间的相对变化率 $\Delta\overline{A}$ 6 mm最小空间尺寸下达到最高(39.11%), 凸显了极端空间限制条件下运动状态的不稳定性; 当空间尺寸增至10.5和15 mm时, $\Delta\overline{A}$呈现下降趋势(分别为34.87%和35.24%); 在20 mm空间尺寸下, 该变化率降至8.43%, 进一步证实此时大型溞的加速运动状态更为稳定; 当空间尺寸继续增大至28和37.5 mm时, $\Delta\overline{A}$ 分别为 6.96% 和 18.46%, 其变化幅度仍显著小于小空间尺寸组。同时, 小尺寸空间(6、15 mm)下平均加速度间的相对标准偏差$RSD_{\overline{A}}$亦处于较高水平(45.0%、46.9%), 进一步印证了小空间环境中个体运动动态(如启动、停止、转向等)存在显著差异; 在6—37.5 mm的空间尺寸梯度中, 20 mm时大型溞$RSD_{\overline{A}}$最低(仅28.0%), 表明该空间尺寸下个体运动的稳定性最优。

如图 3c所示, 分形维数在6、10.5 mm空间尺寸下存在显著性变化($P<0.05$), 表明在此空间尺寸下大型溞的游泳轨迹模式发生了较为明显的改变[10], 在较大空间尺寸中(≥15 mm), 大型溞的分形维数并没有发生显著性变化, 由表 1可知, 在20 mm孔径时, 分形维数变化率 $\Delta\overline{FD}$ 最低(0.63%), 表明此空间尺寸下大型溞的运动模式在观测时间内保持着良好的一致性; 与$RSD_{\overline{V}}$和$RSD_{\overline{A}}$相比, 分形维数的RSD 值$RSD_{\overline{FD}}$普遍很低(2.1%—5.0%), 表明大型溞运动路径的复杂程度(分形维数)在个体间差异小, 且在整个实验过程中(35min内)保持相对高度稳定, 受空间尺寸变化的影响相对较弱。

上述非毒性胁迫下不同空间尺寸中大型溞运动特征的差异性揭示了空间尺寸大小是对自由活动大型溞运动影响的关键要素。大型溞在较小空间尺寸(≤15 mm)下, 其平均速度和平均加速度随时间呈下降规律, 运动参数变化率高且相对偏差大, 表明其运动状态不稳定, 这可能是由于大型溞主要利用第二触角进行游动, 当空间过小时, 频繁的触壁行为导致其第二触角损伤, 降低了游泳能力[20]; 随着孔径增大至 20 mm, $\Delta\overline{V}$、$RSD_{\overline{V}}$和$RSD_{\overline{A}}$降至最低, $\Delta\overline{A}$ 也达到次低水平, 运动达到较稳定状态, 超过此范围(28、37.5 mm), 运动稳定性略有下降, 但仍优于小孔径环境, 这表明20 mm是最优空间尺寸, 在此空间内大型溞能维持较平稳的运动状态。在不同空间尺度下运动参数的变化规律方面, 大型溞的平均速度(图 3a)和平均加速度(图 3b)存在高度相似性, 而大型溞运动路径的复杂度即分形维数(图 3c)则表现出固有的时间稳定性和对空间约束的相对不敏感性, 因此在后续以平均速度进一步研究毒性胁迫下大型溞在不同空间尺度下的运动特征。

2.3　TCF 胁迫下大型溞平均速度变化特征

TCF 作为一种选择性有机磷杀虫剂, 中文名敌百虫, 广泛用于水产养殖寄生虫防治[21, 22], 作为一种神经性毒剂, TCF 会严重抑制乙酰胆碱酯酶, 导致神经信号传导紊乱、肌肉痉挛或瘫痪, 影响生物体运动性能[23], 对水源区生态环境、饮用水安全及非目标生物构成严重威胁。值得注意的是, 美国环境保护署数据显示敌百虫在地表水和地下水中分别检出179和0.027 μg/L浓度, 证实其对水生生物存在明确暴露风险[23]。因此, 本研究选择 TCF 作为毒性物质, 通过对毒性胁迫下大型溞运动行为的观测, 探究空间约束与 TCF 暴露对大型溞运动行为的双重影响及其响应特征。通过对大型溞的急性毒性试验, 获得 TCF 的24h-EC_{50}为6.8 μg/L。据此采用 2 种 TCF 浓度分析毒性胁迫下大型溞在不同空间尺度下的运动行为特征, 低浓度胁迫组浓度为1.7 μg/L, 高浓度胁迫组浓度为6.8 μg/L。

在35min观测时间内, 毒性胁迫下大型溞的平均速度及其相对于空白对照组的相对变化率如图 4所示。

由图 4可知, 低浓度TCF (1.7 μg/L)胁迫下大型溞平均速度表现出了强烈的空间环境依赖性, 如图 4a—4c, 在小孔径(≤15 mm)环境中, 空间尺寸约束本身显著压制了大型溞在无毒性胁迫时的平均速度(运动基线), 表现为平均速度随时间下降。低浓度 TCF 暴露反而导致平均速度出现一定程度的上升。在 Nicole Egan[24]的研究中发现, 低剂量毒物有时会引发“兴奋效应”, 这种现象在大型溞暴露于吡虫啉(Imidacloprid)和氯虫苯甲酰胺(Chlorantraniliprole)混合物时亦被观察到, 此外, 有机磷类还可影响能量代谢酶系, 如抑制ATP合酶活性和线粒体膜电位, 进一步削弱肌肉活动能力[25]。这些结果表明, 低浓度的某些农药或其混合物可能会促进大型溞的运动。在本研究中, 低浓度毒物可能诱导了更剧烈的应激性挣扎或“探索−回避”行为[26], 部分刺激行为克服了空间限制对运动的抑制效应, 导致观测到的平均速度暂时超过受限的对照组平均速度水平, 毒性刺激在此环境下掩盖了空间约束的主导作用; 然而, 在空间约束解除的大空间尺寸(≥20 mm)中, 对照组的平均速度较高且随时间具有稳定性, 低浓度 TCF 暴露却导致平均速度显著下降(−16.37%至−23.80%), 这表明, 在解除强空间胁迫的环境中, 即使低剂量毒物也可能引起大型溞体内能量向解毒或稳态维持的分配, 或引发警戒行为, 其活动减

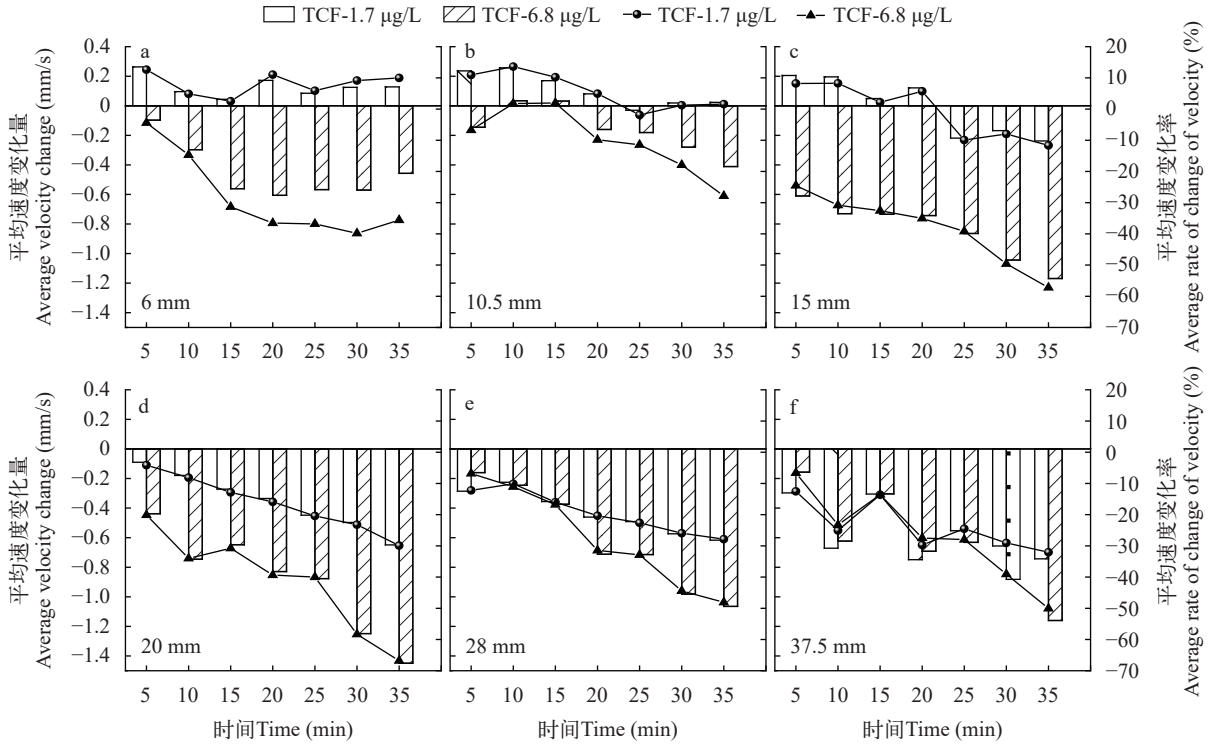

图 4 TCF胁迫时大型溞在不同空间尺寸下平均速度及其与空白对照组相对变化率随时间的变化趋势(n=12)

Fig. 4 Average velocity of *Daphnia magna* under TCF stress across different spatial dimensions and its relative change rate compared to the blank control group over time (n=12)

柱状图代表变化的值(左轴), 折线图代表变化率(右轴); 下同

The bar chart represents the changing values (left axis), and the line chart represents the rate of change (right axis); The same applies below

缓的程度在原本高活跃度的平均速度基线下被更清晰地凸显出来[27]。因此, 低浓度毒物的行为效应强度可能取决于其作用的环境背景: 在低平均速度基线下(小空间尺寸), 其刺激效应可能被放大; 而在高平均速度下(大空间尺寸), 其潜在的抑制效应则更易被检测和放大。

进一步分析 TCF 胁迫时大型溞在不同空间尺寸下平均速度及其与空白对照组相对变化率, 如图 5所示, 在高浓度 TCF 胁迫下, 空间尺寸对大型溞运动抑制率的影响呈现非单调性, 其中20 mm空间尺寸下平均速度变化率(−41.33%)显著大于其他孔径。这种差异可能源于空间尺寸在20 mm时, 没有强烈的空间约束, 不同时刻运动较为稳定, 空白对照组平均速度基线中等, 此时高浓度神经毒剂TCF[28]导致大型溞运动能力从峰值急剧崩溃, 产生最大的相对下降幅度(高抑制率)。与之相比, 在更大的空间尺寸(28、 37.5 mm)中, 尽管平均速度变化率(−27.36%、−26.87%)小于6 mm时(−28.46%), 但其相对变化的数值(−0.608、−0.636)仍大于6 mm时的变化值(−0.451)。如图 4c—4e所示, 随时间推移, 高浓度TCF胁迫下大型溞的平均速度在这些空间(15、20、28 mm)中均呈现稳定下降趋势, 而小空

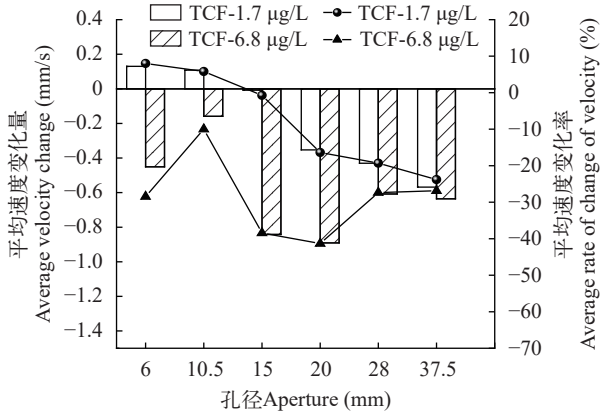

图 5 TCF胁迫时大型溞在不同空间尺寸下35min内平均速度及其与空白对照组相对变化率(n=12)

Fig. 5 Average velocity of *Daphnia magna* within 35min under TCF stress across different spatial dimensions and its relative change rate compared to the blank control group (n=12)

间尺寸(≤10.5 mm)下抑制率随时间未有明显增大, 表明其抑制效应是空间约束与毒性作用的叠加结果, 小空间尺寸的限制本身已显著压制空白对照组平均速度, 减少了毒物胁迫下平均速度的下降空间[29], 最终导致相对抑制率难以达到大空间尺寸(如20 mm)中高平均速度下的显著降幅。

上述结果证明, 空间尺寸与TCF毒性对大型溞运动行为存在交互作用。低浓度TCF(1.7 μg/L)的效应呈现空间依赖性: 在≤15 mm限制性尺寸中, 物理约束显著降低运动基线, 导致毒性暴露引发反常速度上升; 而在≥20 mm大尺寸空间中, 稳定的高运动基线使低浓度抑制效应(−16.37%—−23.80%)被显著放大。高浓度TCF (6.8 μg/L)的响应特征进一步表明: ≥20 mm的大空间尺寸能有效规避小尺寸的基线压制效应, 在≤10.5 mm空间中毒性抑制被削弱, 而大尺寸环境(≥20 mm)则普遍呈现更高抑制强度, 其中20 mm空间因维持中等运动基线, 使高浓度毒性抑制率最大化。综合表明: 当空间尺寸≥20 mm时, 通过减少空间约束对运动基线的干扰, 能实现: (1)低浓度毒性抑制效应的可靠检测; (2)高浓度毒性响应信号的显著增强; (3)规避小空间尺寸对毒性响应的压制作用, 为水质生物毒性监测提供了兼具灵敏度与稳定性的实验条件。

2.4　TCF 胁迫下大型溞运动行为的稳定性及其 REI

在不同空间尺寸下, 每组 12 个大型溞平行样间在每5min所获得的平均速度相对标准偏差(RSD)如表 2所示。可以看出, 随着空间尺寸的增大(尤其是达到 20 mm 及以上), 平行样间运动速度的稳定性显著提升, 表现为 RSD 系统性降低, 这一规律在对照组和低浓度 TCF 胁迫组尤为突出, 例如对照组平均 RSD 从 6 mm 孔径的 44.6% 降至 20 mm 的 30.1%, 降幅达 32.5%, 而 1.7 μg/L TCF胁迫组平均 RSD在 20 mm孔径时 (21.3%)较 10.5 mm空间(56.1%)降低62%。毒物浓度升高会加剧运动变异性, 如6.8μg/L高浓度 TCF 胁迫组的 RSD 普遍高于对照组, 但在大孔径环境下该效应却被缓冲, 20 mm空间下高浓度胁迫组平均 RSD (39.8%)仅比对照组高32.2%, 而6 mm 孔径下同等比较增幅达76.4%。从时间上看, 高浓度 TCF 胁迫在小空间尺寸中引发 RSD 随时间持续上升(如10.5 mm 尺寸 35min RSD 达71.9%), 而 20 mm 以上尺寸即使在高浓度 TCF 胁迫下 RSD 仍能维持在 40% 以下; 特别是, 20 mm 孔径在 1.7 μg/L 低毒环境中表现出独特的时序稳定效应, RSD 从 5min的20.2%持续降至30min的 14.4%, 降幅达 28.7%, 并且在 20 mm 孔径时, 所有浓度毒物胁迫组的平均 RSD 在21.3%—39.8%, 且随时间波动范围最小, 表明在20 mm空间尺寸下, 不同大型溞个体间具有高度一致性, 水质生物毒性测试结果的稳定性显著提高。

为综合评估大型溞在 TCF 毒性胁迫下的行为响应特征, 本研究将平均速度变化率平均值的绝对

表 2　不同浓度TCF毒性胁迫时大型溞在不同空间尺寸下平均速度的相对标准偏差

Tab. 2　Relative standard deviations of the average velocity for *Daphnia magna* under TCF stress at different concentrations and spatial dimensions (%, *n*=12)

孔径Aperture (mm)	浓度Toxic concentration (μg/L)	相对标准偏差Relative standard deviation (RSD)								
		Time (min)							Average RSD	
		5	10	15	20	25	30	35		
6	Control	48.1	44.6	38.7	45.9	41.0	41.4	52.3	44.6	43.8
	TCF-1.7 μg/L	42.2	45.4	36.5	32.2	56.1	74.8	44.0	47.3	
	TCF-6.8 μg/L	54.9	49.7	41.4	17.6	32.4	35.6	44.4	39.4	
10.5	Control	35.3	30.7	32.1	39.8	42.3	40.2	36.3	36.7	48.3
	TCF-1.7 μg/L	50.8	46.2	47.5	62.2	61.5	63.0	61.6	56.1	
	TCF-6.8 μg/L	42.2	40.6	42.7	55.9	50.2	61.0	71.9	52.1	
15	Control	26.9	30.1	38.6	33.0	35.1	32.2	37.9	33.4	35.0
	TCF-1.7 μg/L	26.5	29.1	19.9	23.5	30.9	41.3	43.7	30.7	
	TCF-6.8 μg/L	44.6	45.7	44.8	39.1	29.5	38.4	44.5	40.9	
20	Control	28.8	30.8	31.7	32.6	29.7	30.0	27.1	30.1	30.4
	TCF-1.7 μg/L	20.2	20.9	23.0	22.1	24.7	24.0	14.4	21.3	
	TCF-6.8 μg/L	36.4	30.1	32.5	35.4	34.2	53.6	56.5	39.8	
28	Control	30.2	37.6	36.1	32.7	31.9	34.3	34.4	33.9	32.2
	TCF-1.7 μg/L	17.0	18.1	20.3	22.0	24.5	26.4	22.2	21.5	
	TCF-6.8 μg/L	29.9	29.9	42.6	42.5	43.1	48.7	51.1	41.1	
37.5	Control	30.9	27.9	44.0	40.7	33.9	29.7	37.7	35.0	31.1
	TCF-1.7 μg/L	25.7	23.6	28.2	23.6	29.8	22.4	18.8	24.6	
	TCF-6.8 μg/L	21.1	24.7	22.8	31.1	38.4	45.0	53.9	33.8	

值与相对标准偏差(RSD)的平均值之比定义为响应效能指数(Response efficacy index, REI), 该指数融合了“强效应”(敏感性)与“低变异”(稳定性), 用于表征在毒性胁迫下, 大型溞能否产生有效且稳定的行为响应, 该指数值越高, 表明大型溞对毒性的行为响应强度越大, 且个体间一致性越好。 在不同浓度TCF胁迫下大型溞在7个时段(5—35min)中REI结果如图6所示。可以看出, 在低浓度(1.7 μg/L)TCF胁迫下, 大空间尺寸(≥20 mm)的REI均高于小空间尺寸(≤15 mm); 结合图4b可知, 在15 mm孔径下, 大型溞受低浓度TCF胁迫时存在小空间导致的促进效应与毒性物质导致的抑制效应, 导致平均速度变化率的平均值偏低, 进而使其REI (0.024)处于较低水平; 而在高浓度(6.8 μg/L)TCF胁迫下, 15与20 mm空间尺寸的REI分别为最高和次高, 表明在高浓度毒性胁迫下, 这两种空间尺寸能更优地平衡毒性响应敏感性与稳定性。从全时间段TCF胁迫下大型溞的平均REI看, 大空间尺寸(≥20 mm)仍优于小空间尺寸(≤15 mm)。因此, 在利用大型溞开展水质生物毒性检测时, ≥20 mm的大空间尺寸为优选方案, 以确保对未知浓度毒性物质的响应灵敏性与稳定性; 结合图6可知, 在20 mm孔径下, 无论是低浓度还是高浓度的TCF毒性胁迫, 大型溞都具有最高的响应效能指数。结合上述研究表明, 在20 mm孔径下, 大型溞的运动不受到物理空间的约束, 因此确定20 mm空间尺寸是不同浓度毒性物质胁迫下兼顾毒性响应敏感度和稳定性的最佳空间尺度。

2.5 验证实验

为了验证上述所优选出的20 mm空间尺寸对不同类型污染物的毒性检测是否都具有很好的普适性, 本研究选取重金属、抗抑郁药两种不同种类毒性污染物$CuSO_4$和FLX进行验证。根据Arambašić等[30]和Nielsen等[31]研究中两种毒性物质的48h-EC_{50} ($CuSO_4$: 0.184 mg/L, FLX: 0.94 mg/L), 本研究在不同空间尺寸下以0.2 mg/L $CuSO_4$和1 mg/L FLX对大型溞开展毒性暴露实验, 每组12个平行样, 计算35min运动行为观测时间内大型溞的平均速度变化率、RSD和REI (图7)。从图7a可以看出, 在$CuSO_4$和FLX的胁迫下, 大空间尺寸(≥20 mm)下大型溞的平均速度变化率均大于小空间尺寸(≤15 mm), 同时均在20 mm空间尺寸下有最大的变化率, 分别为−38.6%和−29.3%, 都表现出优于其他空间尺寸的毒性响应情况。并且发现FLX胁迫的大型溞, 在不同空间尺寸下的平均速度变化率均值均小于$CuSO_4$胁迫情况, 说明在短时间内FLX对大型溞运动行为的毒性高于$CuSO_4$。这可能是由于氟西汀作为选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI), 干扰大型溞正常内分泌和代谢过程, 影响生长、运动等生理行为, 具有缓慢和长期影响的特性[32], 表现为运动速度下降与趋避行为迟缓; 相较之下, 而硫酸铜作为一种重金属毒性物质, 相关研究[33]表明其中Cu^{2+}主要与离子调节干扰相关, 可抑制大型溞鳃细胞中细胞质的碳酸酐酶和基底外侧的Na+、K+、-ATP酶活性, 并且可能通过氧化应激、破坏细胞膜完整性等途径加剧毒性, 其影响大型溞的运动行为更加快速。这些结果说明, 不同污染物通过神经传导或能量代谢通路调控运动行为, 而实验空间大小决定了这些效应能否在行为层面充分表现。20 mm空间尺寸可被视为大型溞在实验条件下的“生理自由界限”, 既保证其自然行为表达, 又放大毒性响应信号。该结果为未来修订溞类毒性标准提供了新的实验参数建议, 强调实验空间应作为关键控制变量以提升结果的生态相关性与跨实验室可比性。

由图7b可知, 在$CuSO_4$和FLX胁迫下, 大型溞平均速度的RSD值均随孔径增大呈先下降后上升的趋势, 在20 mm处达到最低, 分别为28.0%和24.3%, 显著低于其他孔径, 即在20 mm孔径下测试结果的数据变异最小、稳定性最高。为评估不同孔径对毒性效应检测效能的综合影响, 本研究进一步计算了REI (图7c), $CuSO_4$和FLX的REI值均在20 mm空间尺寸下达峰值, 分别为1.38和1.21, 均高于其他孔径, 两种物质的平均REI (1.292)比次优孔径(37.5 mm)高出23.9%, 表明20 mm空间尺寸在

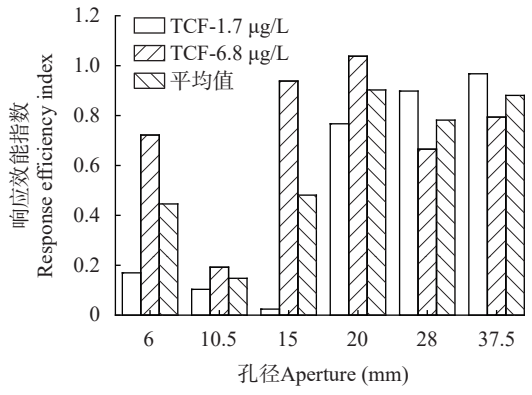

图6 不同浓度TCF毒性胁迫时大型溞在不同空间尺寸下的响应效能指数(|平均速度变化率|/相对标准偏差)

Fig. 6 Response efficacy index (|relative change rate of average velocity|/relative standard deviation) of *Daphnia magna* under TCF stress at different concentrations and spatial dimensions (n=12)

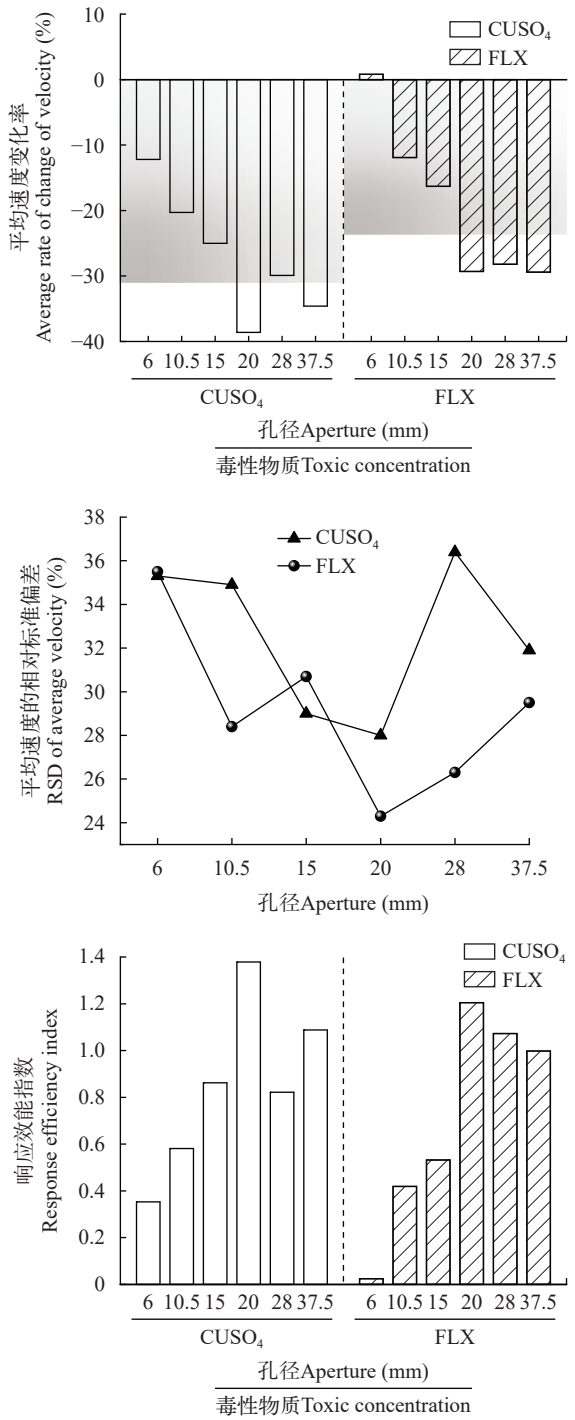

图 7　在不同空间尺寸下 $CuSO_4$ 与 FLX 对大型溞运动行为的影响

Fig. 7　Effects of $CuSO_4$ and FLX on the locomotion behavior of *Daphnia magna* under different spatial dimensions

a. 平均速度的变化率; b. 相对标准偏差; c. 响应效能指数(n=12)

a. Change rate of average velocity; b. Relative standard deviation; c. Response efficacy index (n=12)

保证数据稳定性(RSD最低)的同时, 具有最优的毒性响应灵敏度。不同物质毒性验证实验结果表明, 20 mm 孔径是最优的大型溞运动空间尺寸。

3　结论

本文开展了大型溞运动空间尺寸对其运动行为及毒性响应的影响研究, 结论: (1) 当空间尺寸≤15 mm时, 空间约束显著影响大型溞运动稳定性。在6 mm空间下, 平均速度与加速度波动分别达38.5% 和39.1%, 个体差异增大(RSD>0.45)。此种机械与代谢应激削弱了毒性响应灵敏度, 在1.7 μg/L TCF胁迫下, 平均速度较无毒性条件反而上升8.0%; (2) 当孔径扩大至20 mm及以上时, 空间约束效应基本解除, 运动模式趋近自然, 平均速度 RSD 明显下降。20 mm空间下 24h-EC_{50}-TCF 抑制率为 41.3%, 低、高浓度下 REI 分别为0.98与1.65, 毒性响应最为显著且数据最稳定。在$CuSO_4$与FLX暴露实验中, 平均速度变化率分别为−38.6%和−29.3%, RSD 最小(28.0% 与 24.3%), REI 最高(1.38与1.21), 进一步验证了该尺寸下检测灵敏度的普适性; (3) 20 mm 被确定为大型溞行为毒性检测的生理自由界限, 可抑制运动基线波动(<4%), 放大毒性信号并保持较高实验通量。该研究揭示了“空间−行为−毒性”的耦合机制, 为构建灵敏、稳定的水质生物毒性实时监测体系提供关键参数参考, 对完善大型溞毒性检测方法与保障淡水生态安全具有重要科学意义。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

[1] Bak M P, Kroeze C, Janssen A B G, *et al*. Modelling future coastal water pollution: impacts of point sources, socio-economic developments & multiple pollutants [J]. *Environmental Research Letters*, 2024, **19**(6): 064028.

[2] Lopes R M, Akari M, De La Cruz L T, *et al*. Analysis of swimming trajectories in *Daphnia similis* as an environmental impact assessment tool [J]. *Journal of Plankton Research*, 2024, **47**(2): fbae015.

[3] López-Valcárcel M E, del Arco A, Araújo C V M, *et al*. Reduced avoidance behaviour in *Daphnia magna* due to agrochemical-induced vulnerability [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2025(291): 117673.

[4] Qu M J, Cheng X, Zeng Z M, *et al*. Advances in glyphosate exposure in surface water and its toxicity testing to aquatic photosynthetic organisms [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2024, **19**(3): 109-123. [瞿梦洁, 程璇, 曾梓明, 等. 地表水中草甘膦暴露及其对水生光合生物毒性测试研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2024, **19**(3): 109-123.]

[5] Bownik A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: a review [J]. *Science of the Total Environment*, 2017(601/602): 194-205.

[6] Oliveira Pereira E A, Labine L M, Kleywegt S, *et al*. *Daphnia magna* sub-lethal exposure to phthalate pollutants elicits disruptions in amino acid and energy metabolism [J]. *Aquatic Toxicology*, 2023, 257: 106432.

[7] Kim J, Yuk H, Choi B, *et al*. New machine learning-based automatic high-throughput video tracking system for assessing water toxicity using *Daphnia magna* locomotory responses [J]. *Scientific Reports*, 2023, **13**: 3530.

[8] Li Q, Li S Y, Xiong X, *et al*. Study on acute toxicity of microplastic to *Daphnia magna* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(2): 292-298. [李勤, 李尚谕, 熊雄, 等. 微塑料对大型溞的急性毒性研究 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(2): 292-298.]

[9] Hansen L R, Roslev P. Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016(**179**): 36-43.

[10] Shimizu N, Ogino C, Kawanishi T, *et al*. Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay [J]. *Environmental Toxicology*, 2002, **17**(5): 441-448.

[11] Wang Y, Gao X, Cheng Y, *et al*. Nano-TiO_2 modifies heavy metal bioaccumulation in *Daphnia magna*: A model study [J]. *Chemosphere*, 2023(312): 137263.

[12] Dodson S I, Ryan S, Tollrian R, *et al*. Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones [J]. *Journal of Plankton Research*, 1997, **19**(10): 1537-1552.

[13] Oecd. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test [M]. Paris: OECD, 2012.

[14] Ribeiro C, Gomes C, Pérez-Pereira A, *et al*. Enantioselectivity in the ecotoxicity of amphetamine using *Daphnia magna* as the aquatic model organism: morphophysiological, behavioral, reproductive and biochemical parameters [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2023, **42**(8): 1743-1754.

[15] Qin F, Zhao N, Yin G, *et al*. Rapid response of *Daphnia magna* motor behavior to mercury chloride toxicity based on target tracking [J]. *Toxics*, 2024, **12**(9): 621.

[16] Cui T, Wang T. Exact box-counting and temporal sampling algorithms for fractal dimension estimation with applications to animal behavior analysis [J]. *Results in Engineering*, 2025(25): 103755.

[17] Chen Y R, Li D W, Wang H P, *et al*. The impact of thigmotaxis deprivation on the development of the German cockroach (*Blattella germanica*) [J]. *iScience*, 2022, **25**(8): 104802.

[18] González-Olalla J M, Vila-Duplá M, Cabrerizo M J, *et al*. How does increasing temperature affect the toxicity of bisphenol A on *Cryptomonas ovata* and its consumer *Daphnia magna* [J]? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024(285): 117090.

[19] Nasyrova E I, Nikitin O V. The swimming behavior of *Daphnia magna* ensemble in two-dimensional space from the diffusion motion point of view [J]. *IOP Conference Series*: *Earth and Environmental Science*, 2020, **459**(4): 042027.

[20] Wang Z, Wang Y, Qin S, *et al*. Polystyrene microplastics weaken the predator-induced defenses of *Daphnia magna*: Evidences from the changes in morphology and behavior [J]. *Environmental Pollution*, 2023(316): 120657.

[21] Lopes R B, Paraiba L C, Ceccarelli P S, *et al*. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) [J]. *Chemosphere*, 2006, **64**(1): 56-62.

[22] Zhang X P, Li W X, Ai T S, *et al*. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea) [J]. *Aquaculture*, 2014(420/421): 302-307.

[23] Shi Q, Yang H, Chen Y, *et al*. Developmental neurotoxicity of trichlorfon in zebrafish larvae [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(13): 11099.

[24] Egan N, Stinson S A, Deng X, *et al*. Swimming behavior of *Daphnia magna* is altered by pesticides of concern, as components of agricultural surface water and in acute exposures [J]. *Biology*, 2023, **12**(3): 425.

[25] Lee J S, Oh Y, Lee J S, *et al*. Acute toxicity, oxidative stress, and apoptosis due to short-term triclosan exposure and multi- and transgenerational effects on *in vivo* endpoints, antioxidant defense, and DNA damage response in the freshwater water flea *Daphnia magna* [J]. *Science of the Total Environment*, 2023(864): 160925.

[26] Biswas S, Tiwari P K, Bona F, *et al*. Modeling the avoidance behavior of zooplankton on phytoplankton infected by free viruses [J]. *Journal of Biological Physics*, 2020, **46**(1): 1-31.

[27] Qin F, Zhao N, Yin G, *et al*. Toxicity response and swimming speed regularity in *Daphnia magna* after short-term exposure to diuron [J]. *Toxics*, 2025, **13**(5): 395.

[28] da Silva H C M, da Silva A G, Idalino J J S, *et al*. Trichlorfon acute lethal toxicity to juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) [J]. *Aquaculture Research*, 2020, **51**(2): 863-866.

[29] Tesson S V M, Sha Y. Population connectivity, dispersal, and swimming behavior in *Daphnia* [J]. *Ecology and Evolution*, 2021, **11**(6): 2873-2885.

[30] Arambašić M B, Bjelić S, Subakov G. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: Comparative investigations and the practical applications [J]. *Water Research*, 1995, 29(2): 497-503.

[31] Nielsen M E, Roslev P. Behavioral responses and starvation survival of *Daphnia magna* exposed to fluoxetine and propranolol [J]. *Chemosphere*, 2018(**211**): 978-985.

[32] Atli G, Sevgiler Y. Binary effects of fluoxetine and zinc on the biomarker responses of the non-target model organism *Daphnia magna* [J]. *Environmental Science and*

Pollution Research, 2024, **31**(19): 27988-28006.
[33] Okamoto A, Yamamuro M, Tatarazako N. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna* [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2015, **35**(7): 824-830.

MOVEMENT SPACE SIZE ON THE BEHAVIOR AND TOXIC RESPONSE OF *DAPHNIA MAGNA*

LUO Yun-Fei[1, 2, 3], YIN Gao-Fang[2, 3, 4], GAN Ting-Ting[2, 3], QIN Fei-Hu[2, 3], TAN Xiao-Xuan[1, 2, 3], YE Zi-Qi[2, 3] and ZHAO Nan-Jing[1, 2, 3, 4]

(1. *School of Environmental Science and Optoelectronic Technology*, *University of Science and Technology of China*, *Hefei* 230026, *China*; 2. *Key Laboratory of Environmental Optics and Technology*, *Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics*, *Hefei Institutes of Physical Science*, *Chinese Academy of Sciences*, *Hefei* 230031, *China*; 3. *Anhui Province Key Laboratory of Environmental Optical Monitoring Technology*, *Hefei* 230031, *China*; 4. *Hefei Comprehensive Science Center Environmental Research Institute*, *Hefei* 230601, *China*)

Abstract: *Daphnia magna* is a key model organism in aquatic toxicology and water quality assessment. Behavioral responses in *D. magna* provide a more rapid and sensitive indicator of toxicant exposure compared to conventional endpoints, making them valuable for Real-time biomonitoring. However, the lack of standardized testing conditions-particularly concerning the spatial dimensions of exposure vessels-undermines the reliability and comparability of toxicity evaluations. In this study, multi-well plates with varying well diameters (6, 10.5, 15, 20, 28, and 37.5 mm) were used to systematically examine how spatial confinement influences locomotor parameters (average velocity, average acceleration, and fractal dimension) in *D. magna*, both under non-toxic conditions and upon exposure to trichlorfon (TCF). Additional validation tests were conducted using copper sulfate ($CuSO_4$) and fluoxetine (FLX). The study aimed to clarify how movement space affects baseline behavior in non-toxic settings and modulates toxic responses under chemical stress, ultimately identifying optimal conditions that balance sensitivity, stability, and throughput. Results indicated that under non-toxic conditions, the 20 mm diameter wells produced the most stable baseline locomotion, with minimal rates of changes in average velocity and fractal dimension over 35 minutes (3.98% and 0.63%, respectively). Moreover, the relative standard deviation of average velocity (RSD =30.1%) was significantly reduced (by 32.5%) compared to that observed in 6 mm wells. When exposure to 6.8 μg/L TCF, 20 mm well elicited the strongest toxic response, with an average velocity inhibition rate of 41.3% and the highest response efficacy index (REI=1.65). Validation experiments with $CuSO_4$ and FLX further confirmed that the 20 mm condition induced the greatest response magnitude (rates of change is –38.6% and –29.3%, respectively) and the lowest RSD values (28.0% and 24.3%, respectively). Therefore, a well diameter of 20 mm is identified as a critical threshold that minimizes spatial constraints while optimizing detection sensitivity and data stability. This study provides essential theoretical and experimental support for standardizing behavioral bioassays in *D. magna*, particularly in defining appropriate spatial parameters.

Key words: Locomotor behavior; Spatial dimensions; Toxic effect; *Daphnia magna*