

锌、铜离子对皱纹盘鲍(*Haliotis discus*) 幼体毒性的初步研究

刘士忠 潘智韬 程国宝

(浙江省海洋水产研究所)

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)属腹足类软体动物。在其人工育苗中,往往环境有害因子对鲍鱼幼体有明显的毒害作用。为克服这些有害因子,以利于人工育苗工作正常进行,我们开展了锌、铜离子对皱纹盘鲍幼体毒性试验工作。

浙江北部沿海与我国重要的上海经济区相邻,工业发达,人口密集,各种污水直接排入海。因此,研究各种污染物对海洋生物的毒性影响。在水产资源环境保护上具有重要意义。

各种污染物对海洋生物的毒害作用研究报导较多^[1],但有关有害物质对皱纹盘鲍的毒性研究报导不多。锌和铜是海洋污染的重要污染物之一。研究锌、铜离子对皱纹盘鲍的毒性影响无论在生产上,还是在保护环境提供参数上都有一定的意义。

一、材料与方 法

1. 试验用生物个体

(1) 受精卵:性成熟亲体采用贝类常用人工催产方法获得正常受精卵,供胚胎发育毒性试验和培育鲍鱼幼体用。1983—1986年试验期间获得的正常受精卵都在百万粒数量级以上。

(2) 担轮幼体:正常受精卵在18—20℃的正常海水中孵化培育10—12小时,能发育至担轮幼体,供第二阶段毒性试验和继续培育幼体用。

(3) 围口壳匍匐幼体:卵受精第四天后开始喂养藻类,培育至第十五天,幼体发育至围口壳期,供生长试验用。

2. 试验用稀释海水

配制试验液用的天然海水分别取自养殖海区附近外侧的天然海水,经48小时沉淀,200目筛绢过滤,贮存备用。海水比重1.020—1.023, pH=8.0—8.2,水温18—20℃,溶解氧饱和度都在90%以上。

3. 锌、铜离子贮备液

称取适量硫酸锌(G、R)或硫酸铜(A、R),用二次蒸馏水配制成含1毫克/毫升锌或铜离子浓度的贮备液。根据实验浓度要求,使用时用稀释海水当天配制。

4. 静态毒性试验法

受精卵及担轮幼体试验, 外加锌离子浓度按等对数间距设置。试验容器有100毫升和500毫升两种, 试验生物各100只。观察记录试验生物的成活、畸形和死亡之个体数。试验时不投喂、不换水。

围口壳至上足分化匍匐幼体的生长试验, 设置两个浓度组 and 对照组。在直径7厘米培养皿中, 放置5—8只鲍鱼幼体。加入11毫升试验溶液和2毫升塔胞藻溶液, 每天早晨和傍晚换水, 同时加藻液。在傍晚换水前, 用显微摄影拍摄鲍体幼体。在照片上测量幼体的长与宽度, 计算其椭圆形面积, 作为描述鲍鱼幼体生长情况的参数。投喂的藻类属于无约束的食物供给(Unrestricted food supply)^[2]方法。

用概率单位回归法进行数据处理和常规数理统计方法^[2,3,4], 百分率概率单位尺度—外加离子浓度常用对数图解与回归计算两种方法同时求得半数致死浓度(LC_{50}), 并计算得 LC_{50} 值的标准误差 S_m , 95%置信限为 $LC_{50} \pm 1.96S_m$ 。用10%和90%死亡率表示鲍鱼幼体对锌铜离子的最小耐量和最大耐量。

二、结果与讨论

(一) 锌、铜离子对鲍鱼受精卵孵化率的影响

100粒正常受精卵在不同的外加锌离子浓度(20、50、100、160微克/升)中的孵化情况结果表明, 外加锌离子在160微克/升浓度范围内, 受精卵都能发育至担轮幼体, 没有观察到明显的畸形幼体, 与对照组获得的结果相同, 说明在这个浓度范围内对鲍鱼受精卵的发育没有明显的毒性影响。

依同样方法做铜对受精卵的毒性试验, 外加铜的浓度是20、40、60、100微克/升, 结果列于表1, 从表中可见, 铜离子在60微克/升浓度范围内, 受精卵孵化率较高, 都在90%以上、100微克/升组, 孵化率为零, 概率单位法内插估计其50%孵化率的铜浓度为73微克/升。此外, 尽管在60微克/升浓度内孵化率都很高, 但在此浓度范围内, 随着铜离子浓度的增加, 出膜担轮幼体畸形率都明显增加, 在60微克/升组的畸形率达36%。

表1 外加铜离子对鲍鱼受精卵孵化率的影响

浓 度	对 照 组		20微克/升		40微克/升		60微克/升		100微克/升	
项 别	个 体 数 (个)		体 积 (ml)							
	500	100	500	100	500	100	500	100	500	100
正 常 个 数	95	96	87	86	80	84	61	58	0	0
畸 形 个 数	—	—	6	6	13	10	33	34	—	—
未 孵 化 个 数	5	4	7	8	7	6	6	8	100	100
孵 化 率 (%)	95.5		92.5		93.5		93		0	
畸 形 率 (%)	—		6		13		36		—	

比较铜、锌两种离子对鲍鱼受精卵的毒性影响, 显然同样浓度的铜离子的毒性要明显大

于锌离子的毒性。

(二) 锌、铜离子对鲍鱼担轮幼体一面盘幼体的急性毒性试验。

在15—60微克/升锌离子浓度范围设置四个浓度组,各加入100只担轮幼体,观察幼体畸形死亡情况。经四天发育,出膜担轮幼体经过初期面盘幼体(可见部分薄而透明的贝壳)和扭转后的面盘幼体(面盘顶上可以看到眼点,下面生有足和厣,幼体壳也完全形成)而发育至初期匍匐幼体,96小时毒性试验观察结果,用图解法(图1)和计算获得的半数致死浓度(96hr-LC₅₀)都是36微克/升。95%置信限33.0—40.6微克/升。最小和最大耐量分别等于16微克/升和84.5微克/升。

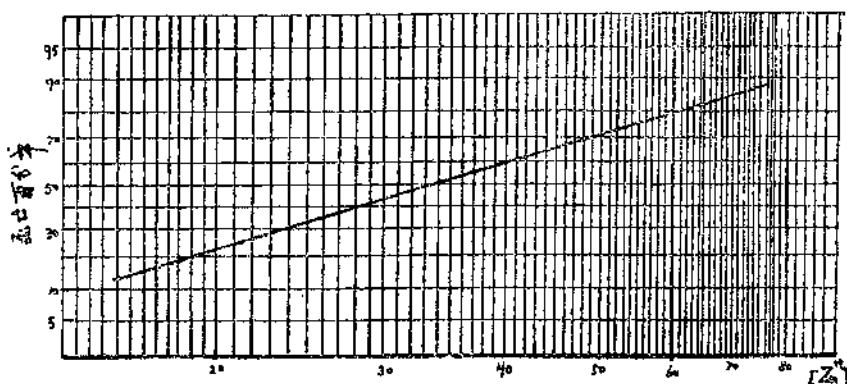


图1 不同锌浓度下鲍鱼担轮一面盘幼体死亡曲线

铜的毒性浓度设置是:在20—60微克/升范围设置4个浓度组,观察其48小时和96小时的畸形死亡个数,图解、计算得48小时半数致死浓度(48hr-LC₅₀)为44.5微克/升,96hr-LC₅₀为28.7微克/升。它们的95%置信限分别为40.9—48.0微克/升和27.4—29.9微克/升。48小时最小耐量24微克/升,最大耐量81.6微克/升,96小时最小耐量21.7微克/升,最大耐量37.8微克/升。

(三) 锌、铜离子对鲍鱼围口壳—上足分化匍匐幼体生长的影响

取两组外加锌或铜离子浓度组,同时设对照组,每组5—8只鲍鱼幼体。组1为对照组,组2、组3分别为40和80微克/升锌或铜浓度。幼体在容器中,依次加入锌或铜溶液和塔胞藻液;组4是在40微克/升锌或铜溶液中,先加入塔胞藻混和数分钟后再加入到装有幼体的容器中,取试验开始和第一、四、七、十天的测量结果,来计算幼体的生长情况。

1. 幼体生长曲线的回归

根据测定结果,分别采用 $y = A + Bx$ 和 $y = Ae^{Bx}$ 方程回归,图示于图2、3、4、5。

我们首先检验了这两组十四个回归方程回归系数的差异显著性问题^[3], t 检验的 t 值在13.0—21.3之间,非常明显地大于 t 临界值(3.55, $\alpha = 0.001$, $n = 40$) 这些方程描述的鲍鱼幼体的生长都是很明显的。那么,哪一类型的曲线拟合更为合适呢?我们用方差分析检验了这两类方程差异的显著性^[3], 检验结果,对照组80微克/升铜浓度组,和先加藻类的40微克/升铜、锌组 F 值都大于临界值,自然对数回归显著优于直线回归;80微克/升锌组没有显著性差异,而40微克/升的铜、锌组都是直线型明显优于自然对数回归曲线。这就是说,用自然对数增长型描述鲍鱼幼体生长是比较合适的。40微克/升浓度组,由于锌、铜离子明显

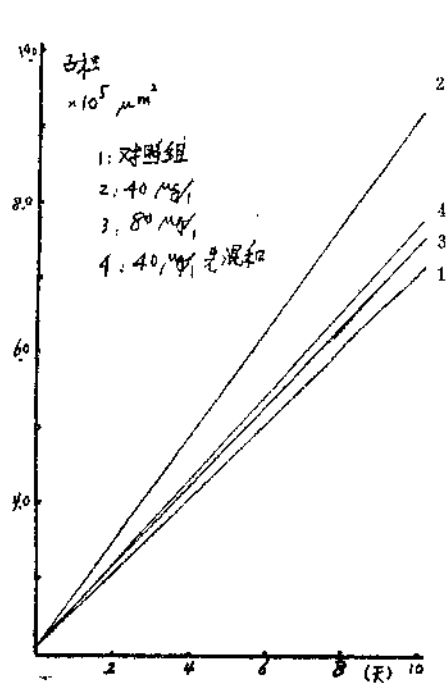


图2 不同铜浓度下的生长曲线

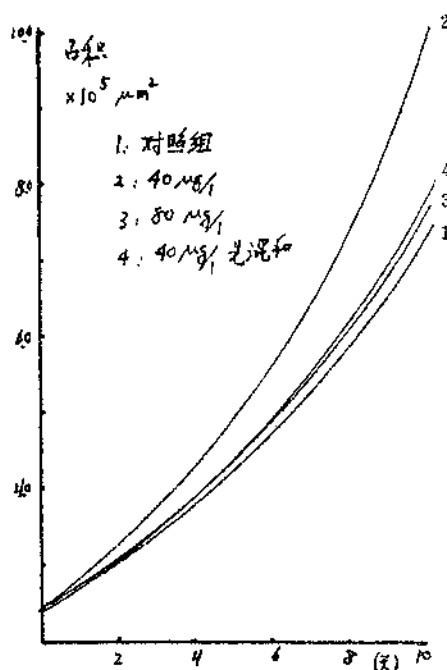


图3 不同铜浓度下的生长曲线

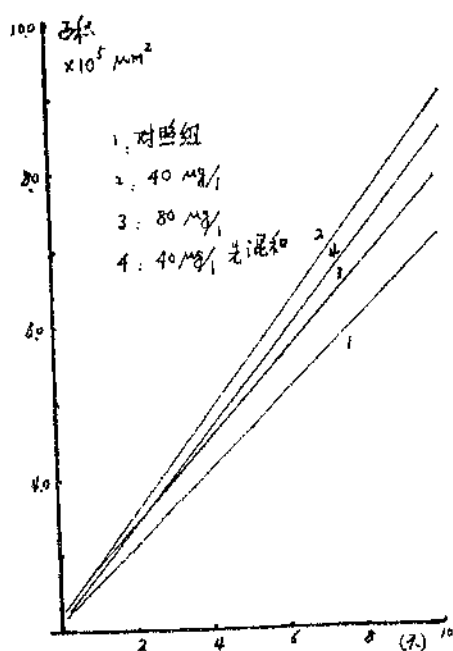


图4 不同锌浓度下的生长曲线

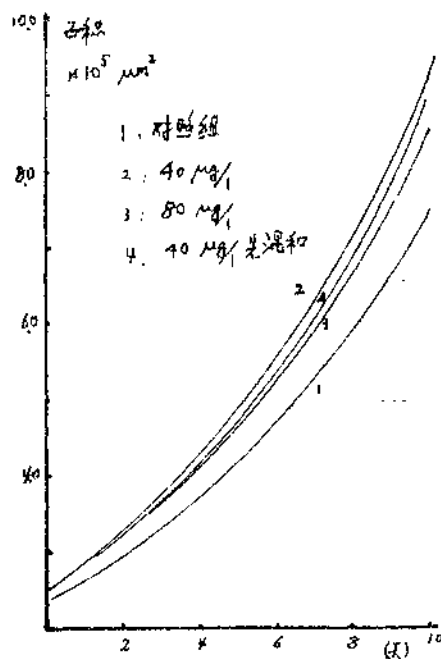


图5 不同锌浓度下的生长曲线

刺激生长的作用,造成鲍鱼幼体的生长呈直线型增长。这些方程列于表 2。

表 2 不同锌或铜浓度下鲍鱼幼体生长方程

	锌 试 验	铜 试 验
对 照 组	$y_1 = 2.369 \times 10^5 e^{0.1127x}$	
40微克/升组(一)	$y_2 = 2.472 \times 10^5 e^{0.1340x}$ $y'_2 = 2.220 \times 10^5 + 6.640 \times 10^4 x$	$y_2 = 2.483 \times 10^5 e^{0.1384x}$ $y'_2 = 2.181 \times 10^5 + 6.490 \times 10^4 x$
80微克/升组	$y_3 = 2.486 \times 10^5 e^{0.1232x}$	$y_3 = 2.436 \times 10^5 e^{0.1154x}$
40微克/升组(二)	$y_4 = 2.438 \times 10^5 e^{0.1202x}$	$y_4 = 2.395 \times 10^5 e^{0.1202x}$

2. 不同条件下鲍鱼幼体生长情况的比较

比较四种条件下鲍鱼幼体的生长曲线,就总的生长趋势而言,锌和铜的递增变化趋势相同。40微克/升浓度组鲍鱼幼体的壳面积增长最快,先与塔胞藻混和的40微克/升组稍次之,80微克/升组第三。这三组都大于对照组,但变化大小不同,锌中间两组靠近40微克/升,而铜的中间两组则靠近对照组,它们的回归系数依次下降:铜 $B_2(0.1384) >$ 锌 $B_2(0.1340) >$ 锌 $B_4(0.1287) >$ 锌 $B_3(0.1232) >$ 铜 $B_4(0.1202) >$ 铜 $B_3(0.1154) >$ $B_1(0.1127)$ 。

我们进一步采用数理统计方法^[4]来检验这些鲍鱼幼体生长差异的显著性问题(主要是检验回归系数B的差异显著性)。检验结果,曲线的回归标准误差的差异都不显著;回归系数在一定水平上表现出差异。锌、铜的40微克/升浓度组与对照组,都有显著性差异,铜更明显些[铜 t 检验值(2.27) $> t_{0.05}(2.01) >$ 锌 t 检验值(1.88) $> t_{0.10}(1.68)$ ($n=46$)。说明外加40微克/升铜或锌离子对鲍鱼幼体的生长都有明显的刺激作用。先与藻类混和的40微克/升锌组也有某种程度的刺激作用, ($t=1.49$ 介于 $t_{0.10}=1.68$, $t_{20}=1.30$, $n=40$)。80微克/升锌组和其他铜组与对照组比较,都没有表现出明显差异。

从上述不同的锌、铜浓度对生长的影响来看,超过80微克/升的某个锌和铜浓度,将会对鲍鱼幼体的生长起抑制作用或有害影响。也就是说,锌和铜离子在一定的浓度范围内,对鲍鱼幼体的生长有某种刺激生长的作用。超过一定浓度范围却是有害的。根据G. 伯特兰德(Bertrand)的最适营养浓度定律,可以认为锌和铜离子应该是鲍鱼幼体生长所必需的微量营养元素。此外,从塔胞藻加入的顺序不同所导致的不同结果来看,可以认为生长差异是因摄取途径与化学形式不同引起的。因为藻类能吸收锌、铜等重金属离子。由于藻类的吸收作用,使铜、锌进入鲍鱼体内存在明显的两条途径:一是直接从水体中摄取,一是经食物链摄取。幼体直接从水体中吸取铜、锌离子,从而造成对幼体生长的影响比后者明显。同时,该过程是很快的,铜离子的影响要大于锌离子,在这里还存在塔胞藻对铜、锌离子吸收的差异。

(四) 锌、铜离子对鲍鱼幼体不同发育阶段毒性影响的比较

从选取的三个生活阶段的毒性试验结果看,担轮幼体受铜、锌离子的有害影响的浓度最低,因此,担轮幼体一面盘幼体生长期是鲍鱼幼体甚至是鲍鱼生活史中对锌、铜离子最为敏感的生长期。鲍鱼发育至担轮幼体并冲出卵膜后,其幼体壳还没形成,体表没有明显的保护层。它的摄食行为比较弱,据此,这时幼体与水体的物质交换是较为明显和重要的。在幼体壳形成并开始营匍匐生活之后,长出吻能频繁舔食藻类,明显地靠食物链摄取营养,维持生

命。虽然这时仍存在直接从水体中交换所需物质^[6]，但经水体途径摄取营养在总的营养需求中的比重比担轮幼体要小。因此，担轮幼体与环境的关系最为直接，它对环境的影响变化也应该最为敏感。

鲍鱼幼体受锌、铜离子毒害的浓度都在 10^2 微克/升数量级。这在对锌铜较敏感的众多的海洋生物中，特别是甲壳类、软体动物、鱼类等属于同一数量级^[1]。因此，鲍鱼幼体也应属于对锌和铜的毒性较为敏感的生物之一。

(五) 锌、铜离子对鲍鱼幼体的综合毒性影响

一组铜离子浓度 5、10、15 微克/升、锌离子浓度 20、40、60 微克/升，用二要素三水平正交表 $L_9(3^4)$ 配制试验；另一组用铜、锌离子各为 6、12、18、24 微克/升四种浓度，用 $L_{16}(4^2)$ 配制试验。记录它们 48、96 小时死亡率，所得试验获得的实验值对理论计算值（从单因子试验回归的概率单位回归直线求得的相应浓度下的死亡率，在假定独立作用的联合条件下死亡率，按 $P = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - P_i)$ ^[5] 计算得）作图，结果如图 6。从图 6 看出，试验结果明显

地划分二条相关直线：在铜离子浓度 ≤ 10 微克/升时，死亡率实验值 $P = 0.0041 + 1.181P'$ ($r = 0.9997$)；其他浓度时 $P = 0.8705 + 0.3554P'$ ($r = 0.7087$)。将这两条直线的截距、斜率和单因子独立作用联合的直线 ($A = 0, B = 1$ ，图 6 中虚线) 进行比较，前者与虚线很接近，后者有明显不同。说明在 ≤ 10 微克/升铜浓度时，铜、锌离子的综合作用属于相加作用 (addition)，在其他浓度下， $A \gg 0, B < 1$ ，两个离子的相互作用比它们各自毒性相加要大得多，属于协同效应 (synergism)，但随着离子浓度的增加，综合毒性有降低的趋势。

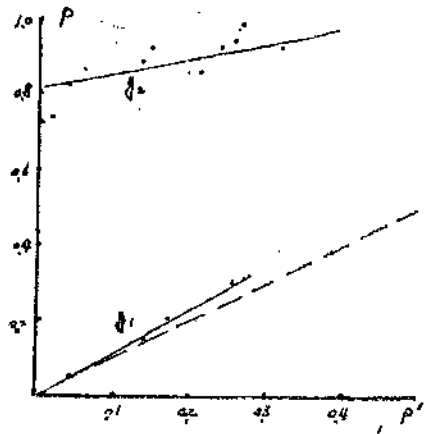


图 6 铜锌对鲍鱼幼体的综合毒性影响

(六) EDTA 在锌和铜对鲍鱼幼体的毒性试验中的作用

在外加 20、40、60、80 和 100 微克/升锌或铜离子浓度中，都加入 0.22 微摩尔/升浓度的 EDTA，然后加入 100 个鲍鱼担轮幼体，按实验二的方法，求得 0.22 微摩尔/升浓度存在时的 48、96 小时半致死浓度值：61.4 微克/升铜浓度 (48 小时 LC_{50}) 和 58 微克/升锌浓度 (96 小时 LC_{50})，与不加 EDTA 有明显的差异。

EDTA 与锌或铜离子形成的水溶性络合物分子数比是 1:1^[8]，如果按此比例计算锌或铜与加入的 EDTA 络合的部分是 $0.22 \times 63.5 = 14.0$ 微克/升铜和 $0.22 \times 65 = 14.3$ 微克/升锌，加与不加 EDTA，锌、铜对鲍鱼幼体的半致死浓度差值 $61.4 - 44.5 = 16.9$ 微克/升铜， $58 - 36 = 22$ 微克/升锌。这实验值与上面的理论计算值相当接近。因此，可以认为加入 EDTA 的重要作用之一是它与金属离子的络合，从而降低了锌、铜离子对鲍鱼幼体的毒性作用。

现场海水中高达 10 毫克/升 EDTA，对鲍鱼幼体也没有造成毒害影响。

(七) 铜、锌及其协同毒性是鲍鱼育苗失败的主要因素

据有关调查资料，在浙江北部海域水体中，铜、锌的含量都是 $10^0 - 10^1$ 微克/升且锌的含量

比铜高。水体中离子态和不稳态锌和铜的含量 $(0.85 \pm 0.25) \times 10^{-7} \text{M}$, 分别为 $(1.6 \pm 0.40) \times 10^{-8} \text{M}^{[1]}$, 即相应为 5.5 ± 1.6 微克/升, 1.0 ± 0.3 微克/升, 铅、镉等含量还要低1—2个数量级。由于本海域地处长江入海海域, 有机物含量较高, 其有机络合态金属含量占相当比重^[10]。

几年来在这样水体中培育幼体的情况是鲍鱼受精卵能有相当一部分发育至担轮幼体, 担轮幼体在未来2天里大部分都畸形死亡, 极少数能发育至匍匐幼体以至幼鲍。根据我们对幼体的毒性试验结果看, 受精卵受毒害的浓度远高于现场环境的浓度, 因此受精卵并没受到毒害。发育至担轮幼体时就不同了。现场水体中单独的铜、锌的浓度与它们对幼体产生毒害影响的浓度属同一个数量级, 离子态和不稳定态虽尚未达到对幼体产生影响的最小耐量。但是两种情况都增加了它们的毒性。一是在这低浓度下, 铜、锌离子的协同效应, 显然增加了它们对幼体的毒害作用。二是尽管有机络合剂存在会改变它们的生物学有效性, 但是配位体不同改变的程度也不同, 但估计现场环境中有一部分有机金属络合物的稳定常数会远小于能明显改变其生物学有效性的数量级(10^{10-18})。由于以上两个因素造成了锌、铜对担轮幼体的毒害。而现场的铜锌浓度对幼体的生长是没有影响的。这就是毒性试验结果与现场所产生的情况极为相似之处, 因此, 可以认为现场条件下锌和铜及其协同毒性效应是使担轮幼体畸形死亡并导致鲍鱼人工育苗失败的主要因素。

三、小 结

1. 外加锌、铜离子对鲍鱼受精卵、担轮幼体和围口壳三个生活阶段毒性试验结果表明, 担轮幼体一面盘幼体是鲍鱼幼体对锌铜离子的毒性反应最为敏感的生活阶段。这个生活阶段的幼体对锌的96小时半致死浓度是36微克/升, 95%置信限锌浓度33.0—40.6微克/升, 最小耐量16微克/升, 最大耐量84.5微克/升。对铜的48、96小时半致死浓度是44.5和28.7微克/升, 95%置信限分别是40.9—48.0和27.4—29.9微克/升, 最小耐量是21.7微克/升, 160微克/升锌浓度对受精卵没有明显毒性影响; 40微克/升锌铜离子浓度对围口壳幼体生长有明显的刺激作用, 80微克/升锌铜浓度仍没表现出对生长的毒性影响。由于鲍鱼担轮幼体一面盘幼体对锌铜离子的毒性较敏感, 使得鲍鱼也属于海洋生物中对铜、锌的毒性较为敏感的生物之一。

2. 铜、锌离子的相互作用呈协同毒性, 毒性试验与现场发生情况的一致性, 表示铜、锌离子的协同毒性是引起现场海区鲍鱼幼体畸形的重要因素。

3. 由于EDTA与锌、铜离子的络合作用, 能降低它们的生物学毒性, 可以用加入EDTA的方法来有效地抑制锌、铜离子对鲍鱼幼体的毒性影响。加入EDTA的浓度可以根据EDTA与锌、铜络合时的数量计算获得, 考虑到与其他金属的络合, 在浙北海域, 加入1毫克/升浓度的EDTA就能消除锌、铜对鲍鱼幼体的毒害作用。10毫克/升浓度的EDTA对鲍鱼的生命过程仍无明显影响。

4. 锌、铜是鲍鱼幼体的必要微量营养元素之一, 幼体也能“摄取”某些有机结合态的锌和铜, 这可能跟它们的有机络合物的稳定常数有关。