

Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 对黑点青鳉 (*Oryzias melastigma*) 早期生活阶段的毒性效应研究

穆景利^{1,2}, 王莹¹, 王新红², 王菊英^{1,*}

1. 国家海洋环境监测中心, 大连 116023

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门大学环境科学中心, 厦门 361005

摘要: 近岸海域重金属污染不容乐观, 作为“一种潜在的海洋模式鱼种”黑点青鳉 (marine medaka, *Oryzias melastigma*) 对不同重金属胁迫的响应水平却鲜有报道。为探究并比较海水鱼种黑点青鳉早期生活阶段对 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 等不同重金属胁迫的响应, 在实验室通过半静态方式, 对黑点青鳉受精卵和初孵仔鱼分别进行了 14 d 短期毒性和 96 h 急性毒性实验。结果显示: 当 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 浓度分别高于 $147 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $235 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 4 种重金属离子对黑点青鳉胚胎发育具有显著的毒性效应, 可显著降低胚胎的孵化能力和心脏跳动, 并导致初孵仔鱼的发育畸形; Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 对黑点青鳉初孵仔鱼的 96 h- LC_{50} 分别为 $1.12 (0.496 \sim 2.306) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.097 (0.042 \sim 0.196) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.456 (0.547 \sim 3.242) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $>20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 与其他海洋鱼种相比, 4 种重金属离子对黑点青鳉初孵仔鱼的 LC_{50} 相对较低, 表明该鱼种对重金属胁迫具有较强的敏感性。此外, 该鱼种具有个体小, 易于实验室长期培养, 世代周期短和对内分泌干扰物敏感等多项优势, 因此, 笔者推荐将黑点青鳉作为潜在的海洋模式鱼种用于生态毒理学研究。

关键词: 海水青鳉; 重金属; 鱼类早期生活阶段; 胚胎毒性

文章编号: 1673-5897(2011)6-352-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxic Effects of Cadmium, Mercury, Chromium and Lead on the Early Life Stage of Marine Medaka (*Oryzias melastigma*)

Mu Jingli^{1,2}, Wang Ying¹, Wang Xinhong², Wang Juying^{1,*}

1. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Received 13 January 2011 accepted 8 July 2011

Abstract: The situation of heavy metal pollution in coastal waters in China is not optimistic. However, few studies have reported the toxic effects of heavy metal on marine medaka (*Oryzias melastigma*) as a new marine test fish. In order to explore and compare the toxicity responses of marine medaka at its early life stage under the exposure of Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} and Pb^{2+} , static-renewal acute toxicity tests (96 h) on the embryo and short-term toxicity tests (14 d) on the larvae were investigated. Results showed that, when the concentrations of Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} and Pb^{2+} were higher than $147 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $235 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, these metal ions caused significant toxic effects on the hatchability and heartbeat of the embryos, and caused the deformity of the lar-

收稿日期: 2011-01-13 录用日期: 2011-07-08

基金项目: 海洋公益性行业科研专项 (No. 200805090); 国家“863”项目 (No. 2007AA09Z126) 资助

作者简介: 穆景利 (1979-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为污染物海洋环境效应、基准和生态风险评价, E-mail: jilmu@nmemc.gov.cn;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jywang@nmemc.gov.cn

vae. The 96 h-LC₅₀ values for marine medaka larvae exposed to Cd²⁺, Hg²⁺, Cr⁶⁺ and Pb²⁺ were 1.12 (0.496–2.306) mg·L⁻¹, 0.097 (0.042–0.196) mg·L⁻¹, 1.456 (0.547–3.242) mg·L⁻¹ and >20 mg·L⁻¹, respectively. Compared with other marine fish species, the LC₅₀ values of the four metal ions to the marine medaka larvae were relatively low, indicating that the fish species has relatively high sensitivity to heavy metal stress. Additionally, this fish species has many other advantages including a small size, easy cultivation in the laboratory, a short generation cycle and relatively high sensitivity to endocrine disrupting chemicals. Based on these results, marine medaka is highly recommended as a marine test fish for ecotoxicological tests and researches.

Keywords: marine medaka; heavy metal; early life stages of fish; embryo toxicity

我国近岸海域的主要污染物80%以上来自陆源排污,每年上百亿t的工业和生活污水将大量污染物携带入海,严重影响了邻近海洋功能区的生态功能,造成了近岸海域环境不断恶化^[1]。近年来,尽管我国加强了对陆源入海排污中多种重金属及少数有机污染物的监管和排放控制,并取得了显著成效,但仍存在个别重金属严重超标排放的问题,如镉、汞和砷等在海洋环境的不同介质中被普遍检出^[1-2],这对海洋生物的健康及海洋生态系统的安全造成了严重的威胁。已有研究表明:重金属,包括镉、汞、铬和铅等,具有较强的生物富集性,对海洋生物可产生直接或间接的胚胎毒性和致畸效应,影响其正常生长、发育、繁殖和成活等,并通过食物链的传递对人类健康造成威胁^[3-5]。

在淡水领域,斑马鱼(*zebrafish*, *Danic rerio*)和日本青鳉鱼(*Japanese medaka*, *Oryzias latipes*)已成为国际公认的淡水模式鱼种,而在海水领域目前尚缺乏国际公认的海洋模式鱼种。黑点青鳉(*marine medaka*, *Oryzias melastigma*)在中国、朝鲜、日本及印度等海域均普遍存在,成鱼个体长约3.5~4.0 cm,世代周期约为3个月,该鱼种具有基因组较小(只有斑马鱼基因组的1/2,约800 Mb),产卵率高,易于观察,盐度适应范围广等特点。目前中国、日本和韩国等研究学者及相关机构已将其作为新的测试鱼种,开展了多项生态毒理学研究和应用,证明该鱼种对雌二醇和雌激素酮等内分泌干扰物具有较强的敏感性,并将其推荐为“一种理想的海洋模式鱼种”^[6-8]。尽管针对黑点青鳉已开展的研究较多,但研究多集中在考察其对有机污染物的敏感性方面,而探究并比较黑点青鳉对不同重金属胁迫的响应的研究鲜有报道。

鉴于当前我国近岸海域重金属污染现状及黑点青鳉作为潜在模式鱼种的优势,本研究选取鱼类对污染物胁迫最为敏感的早期发育阶段作为Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和Pb²⁺的毒性暴露对象,比较研究了4

种重金属离子对黑点青鳉早期发育的毒性大小及其影响水平,分析了该鱼种对重金属胁迫的敏感程度,期冀为海水水质基准/标准的制定与修订,以及海洋资源环境的保护提供借鉴,同时也有助于进一步了解黑点青鳉作为新的海洋测试鱼种的优势,探究其成为海洋模式鱼种的潜力。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验生物

黑点青鳉鱼来源于台湾地区的商业性养殖场,由香港大学 Kenneth Leung 教授 2008 年赠予,目前已在实验室驯化和繁殖 5 代之多,可每日稳定提供上千枚鱼卵及上百条仔鱼。黑点青鳉饲养于美国 Aquatic Habitats 流水式养殖系统中,水质条件:盐度为(30±2)‰,温度为(28±2)℃,光周期为14 h:10 h(光照:黑暗),每天投喂3~5次无节卤虫,系统每天自动更新总水量的1/10。

1.2 受精卵和仔鱼的收集

在满足上述饲养条件下,每天每尾雌鱼在开灯1 h内产卵20~30枚,受精卵沉于孵化盒底部。用塑料吸管将受精卵吸出,通过解剖镜观察选取发育正常的达64个细胞期的胚胎用于暴露实验。

黑点青鳉受精卵在盐度(30±2)‰,温度(28±2)℃,光周期14 h:10 h(光照:黑暗)条件下,孵化时间约为14 d。在14 d出膜密集的时间段,选取2 h内孵出发育正常的仔鱼用于暴露实验。

1.3 毒性暴露实验

1.3.1 暴露浓度设置

实验溶液为人工海水,人工海水由进口研究级海盐(Instant ocean,购自Aquarium Systems公司,美国)用超纯水配制而成,盐度为30‰。

氯化镉(CdCl₂,天津光复精细化工研究所),氯化汞(HgCl₂,天津市化学试剂一厂),硝酸铅(Pb(NO₃)₂,天津金铂兰精细化工有限公司)和重铬酸钾(K₂Cr₂O₇,天津市化学试剂一厂)均为分析纯,实

验前用人工海水将各化合物配制成一定浓度的母液,然后根据预实验结果和各金属离子在海水体系中的溶解度,取不同体积的各试剂母液,将其稀释成相应的实验浓度,具体浓度设置如表1所示。

表1 各重金属离子实验浓度设置
Table 1 Concentrations of heavy metal ions in each exposure experiment

发育阶段	重金属离子	实验加标浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)						
胚胎	Cd^{2+}	0	147	294	588	1176		
	Hg^{2+}	0	24	48	96	192		
发育期	Cr^{6+}	0	117.5	235	470	940		
	Pb^{2+}	0	20	200	400	800		
		实验加标浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)						
初孵	Cd^{2+}	0	0.02	0.1	0.38	1.5	6	24
	Hg^{2+}	0	0.01	0.02	0.1	0.38	1.5	6
仔鱼期	Cr^{6+}	0	0.1	0.38	1.5	6	24	96
	Pb^{2+}	0	0.5	2	5	10	20	-

注“-”超出了 Pb^{2+} 在海水中的溶解范围,故仅选用6个浓度组(包括空白对照)。

1.3.2 重金属对胚胎的毒性实验

将挑选后的受精卵分别放入6孔培养板(购自Corning公司,美国)中,每孔放20枚,实验溶液20 mL,每组3个平行,同时设置人工海水对照。采用半静态暴露方式,每天更换实验溶液一次,温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$,光周期为14 h:10 h(光照:黑暗),暴露周期为14 d。在暴露5~9 d时,各实验组每天定期随机选取10枚卵观察并统计胚胎心率的变化;同时,在暴露14 d期间,每天统计和观察胚胎初孵仔鱼的死亡率、孵化率和畸形特征等指标。

1.3.3 重金属对仔鱼的急性毒性实验

仔鱼急性毒性实验在100 mm培养皿(购自Corning公司,美国)中进行,每个培养皿放10条正常的初孵仔鱼,实验溶液40 mL,每组3个平行并设置人工海水对照,实验期间温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$,光周期为14h:10h(光照:黑暗),暴露周期为96 h,每天更换1次实验溶液,同时观察各实验组仔鱼生长、畸形和死亡等情况并及时清除死亡的仔鱼。

1.4 数据处理与分析

采用SPSS 13.0软件对结果进行分析,由概率法计算半致死浓度(LC_{50});组内采用Student-t检验;组间采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验, $p < 0.05$ 为显著差异。

各重金属离子的安全质量浓度根据以下公式计

算获得:安全浓度(SC) = $96 \text{ h}\cdot\text{LC}_{50} \times 0.01$ 。

2 结果(Results)

2.1 重金属对黑点青鳉孵化率和畸形率的影响

在温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下,黑点青鳉孵化周期一般为10~14 d,正常情况下14 d后可完全孵化出膜。图1所示为 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 暴露对黑点青鳉胚胎孵化率和畸形率的影响,总体上, Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 均不同程度地降低了黑点青鳉胚胎的孵化率,并在一定程度上造成了初孵仔鱼的发育畸形。

从图1可知:暴露14 d后对照组胚胎已基本全部孵化,孵化率达 $(86.7 \pm 5.8)\%$ 。在 Cd^{2+} 影响下胚胎的孵化率和初孵仔鱼畸形率分别呈缓慢下降和逐渐上升的趋势,当 Cd^{2+} 浓度高于 $147 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,孵化率显著低于对照组($p < 0.05$)。在 $294 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时初孵仔鱼的畸形率开始显著高于对照组,并导致初孵仔鱼卵黄囊水肿和脊椎弯曲等畸形效应(如图2中4-6所示);在 Cr^{6+} 高于 $235 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时孵化率呈急剧下降趋势,与对照组相比表现为显著性差异,初孵仔鱼的畸形率也在该浓度下开始显著高于对照组($p < 0.05$),并呈缓慢上升趋势,至 $940 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时畸形率为33.3%,并造成初孵仔鱼脊椎弯曲、卵黄囊水肿和体色发黑等畸形效应(如图2中7-9所示); Hg^{2+} 各暴露组均显著降低了胚胎的孵化率(各浓度组均为 $p < 0.01$),并在高于 $48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时造成初孵仔鱼显著的发育畸形,在 $48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $96 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $192 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的畸形率分别可达56.7%、53.3%和66.7%,表现出较强的致畸效应,致使初孵仔鱼无法破膜,卵黄囊水肿和脊椎弯曲等(如图2中10-12所示);在 Pb^{2+} 高于 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,胚胎孵化率和仔鱼畸形率与对照组相比均差异显著($p < 0.05$),并分别呈缓慢下降和缓慢上升趋势,并导致初孵仔鱼脊椎弯曲和卵黄囊水肿等。4种重金属离子对黑点青鳉孵化率和畸形率的影响程度从大到小排序为: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$ 。

2.2 重金属对黑点青鳉胚胎心率的影响

在正常情况下,黑点青鳉胚胎在发育第2天心脏出现,循环系统启动,到第5天血液循环系统达到尾鳍,心脏跳动稳定,到第9天胚胎达到孵化阶段,并分泌孵化酶,尾部开始出膜。图3所示为 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 对胚胎心跳的影响,总体上,各重金属离子均不同程度地降低了黑点青鳉胚胎的心率,并表现出显著的剂量-效应关系。

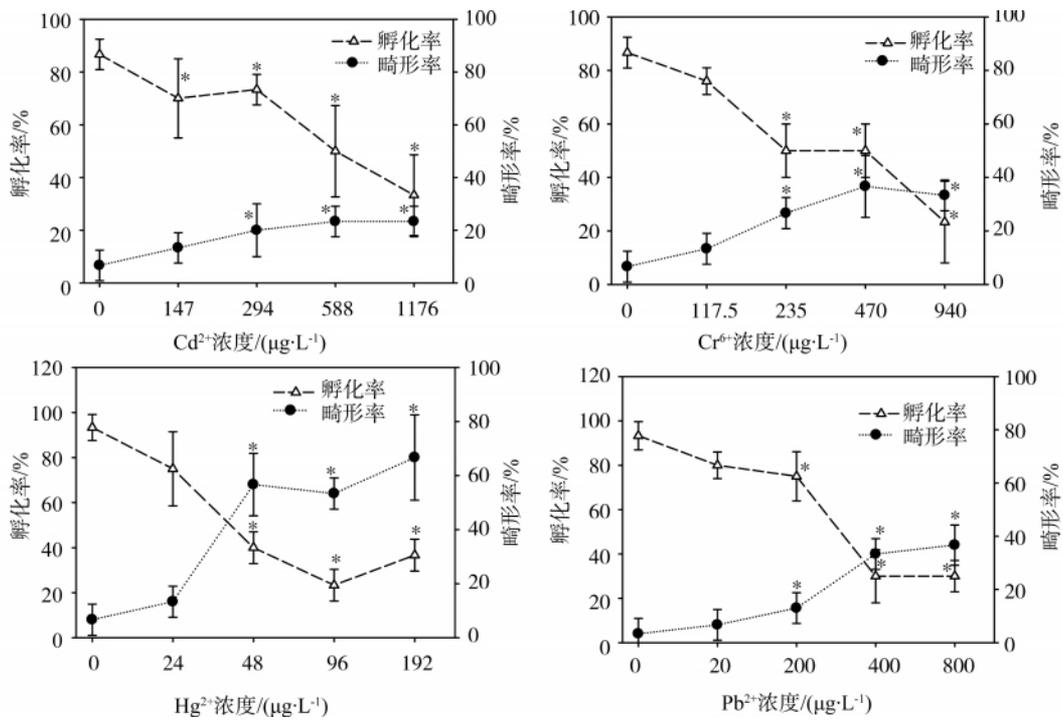


图1 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺ 4种重金属离子对黑点青鳉胚胎孵化率和发育畸形率的影响

注: * 表示与各自对照组相比 $p < 0.05$

Fig. 1 Effects of Cd²⁺, Hg²⁺, Cr⁶⁺ and Pb²⁺ on hatching rate and deformity rate of *Oryzias melastigma*

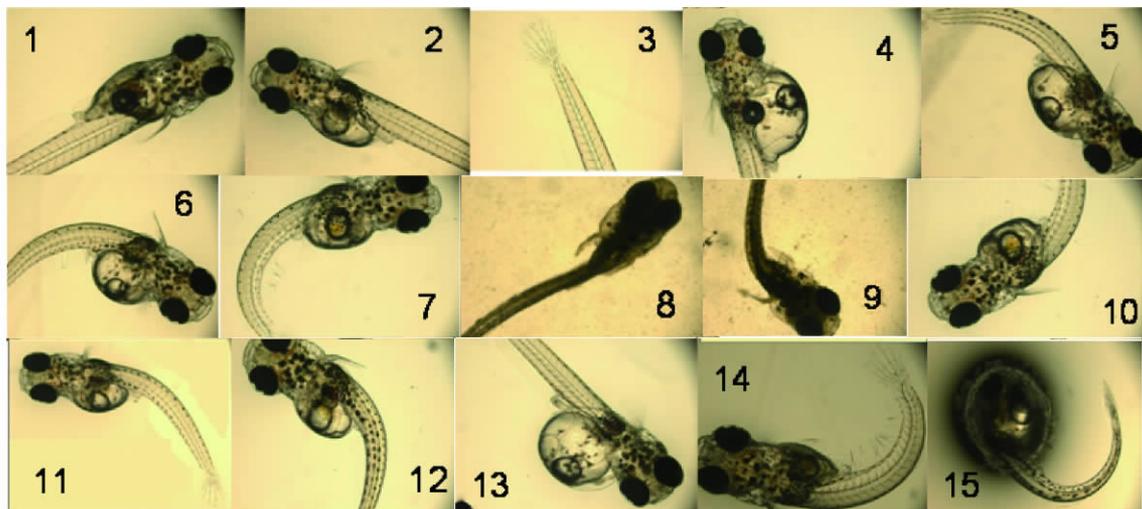


图2 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺ 4种重金属离子对黑点青鳉初孵仔鱼发育的影响

Fig. 2 Effects of Cd²⁺, Hg²⁺, Cr⁶⁺ and Pb²⁺ on the development of newly-hatched larvae of *Oryzias melastigma*

注: 1-3: 正常发育的初孵仔鱼;

4-6: 294 ~ 1 176 μg·L⁻¹ Cd²⁺ 暴露, 其中 4 显示卵黄囊水肿, 5-6 显示脊椎弯曲, 卵黄囊水肿;

7-9: 234 ~ 940 μg·L⁻¹ Cr⁶⁺ 暴露, 其中 7 显示脊椎弯曲, 卵黄囊水肿, 8-9 显示仔鱼死亡身体呈 L 形且体色发黑;

10-12: 200 ~ 400 μg·L⁻¹ Pb²⁺ 暴露, 其中 10-12 均为身体消瘦, 脊椎弯曲呈 V 或 U 形, 卵黄囊水肿;

13-15: 48 ~ 192 μg·L⁻¹ Hg²⁺ 暴露, 其中 13 显示卵黄囊水肿, 14 显示脊椎弯曲, 15 显示仔鱼无法破膜, 脊椎弯曲。

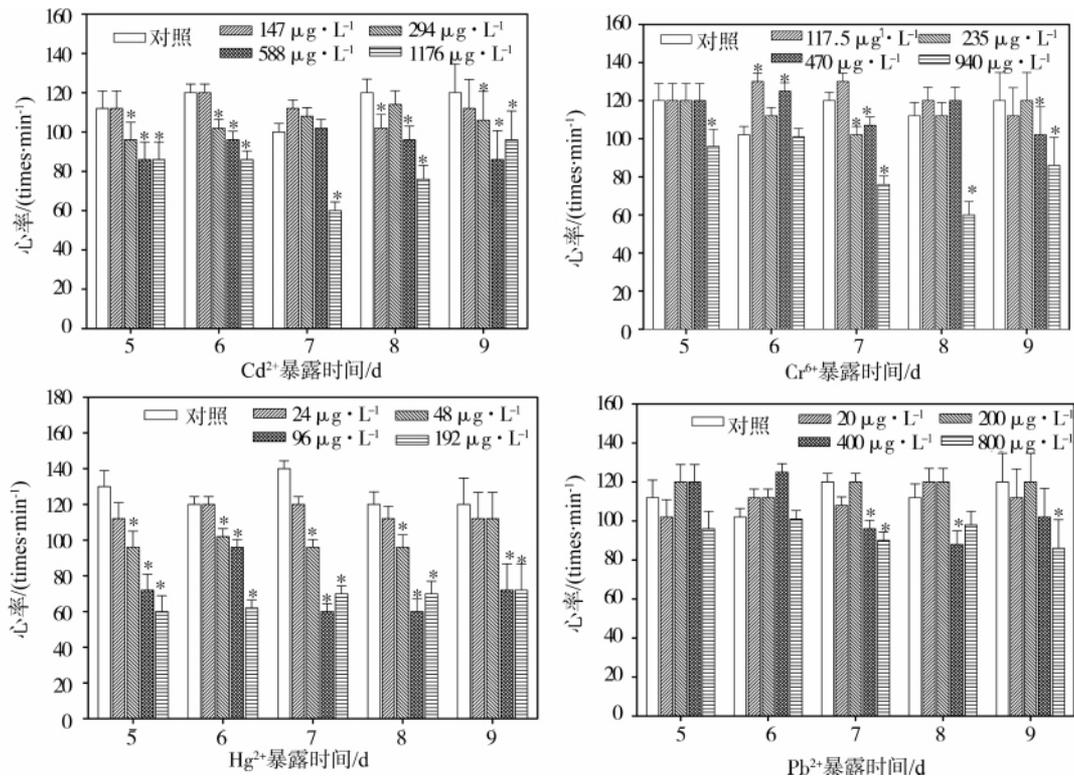


图3 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和Pb²⁺ 4种重金属离子对黑点青鳉胚胎心率的影响

注: * 表示与各自对照组相比 $p < 0.05$

Fig. 3 Effects of Cd²⁺, Hg²⁺, Cr⁶⁺ and Pb²⁺ on heart rate of *Oryzias melastigma* embryos

图3结果显示: Cd²⁺暴露下的黑点青鳉胚胎的心率随 Cd²⁺浓度的升高而逐渐降低,当 Cd²⁺浓度高于 294 μg·L⁻¹时显著低于对照组。随着暴露时间的延长,胚胎心率呈现出先下降再上升的变化趋势,具有一定的时间-效应和剂量-效应关系;低浓度 Cr⁶⁺ (117.5 μg·L⁻¹和 235 μg·L⁻¹)对黑点青鳉胚胎心率的影响相对不显著,而高浓度(940 μg·L⁻¹)在 5~9 d间均对胚胎心率产生了显著的抑制作用;Hg²⁺对胚胎心率的影响相对较大,在 5~8 d间其浓度高于 48 μg·L⁻¹时均显著降低了胚胎的心率,并随浓度的升高心率急剧下降,呈现出显著的剂量-效应关系;Pb²⁺对胚胎心率的影响相对较弱,在暴露 7 d后 400 μg·L⁻¹和 800 μg·L⁻¹浓度组的心率显著低于对照组,随着暴露时间的延长,仅有 800 μg·L⁻¹浓度组显著降低黑点青鳉的心率。

2.3 重金属对黑点青鳉仔鱼急性毒性

Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺对初孵仔鱼的急性毒性结果如图4所示,初孵仔鱼的死亡率随暴露浓度的升高和暴露时间的延长呈不断上升趋势,具有明显的剂量-效应关系。Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺在 96

h对初孵仔鱼的 LC₅₀分别为 1.12 mg·L⁻¹(置信区间为 0.496~2.306 mg·L⁻¹)、0.097 mg·L⁻¹(置信区间为 0.042~0.196 mg·L⁻¹)、1.456 mg·L⁻¹(置信区间为 0.547~3.242 mg·L⁻¹)和 >20 mg·L⁻¹。可见 4种重金属离子对初孵仔鱼的急性致死毒性大小排序为 Hg²⁺ > Cd²⁺ > Cr⁶⁺ > Pb²⁺。Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和 Pb²⁺对黑点青鳉初孵仔鱼的安全浓度分别为 11.2 μg·L⁻¹、9.7 μg·L⁻¹、14.56 μg·L⁻¹和 >200 μg·L⁻¹。

3 讨论(Discussion)

3.1 重金属对黑点青鳉胚胎发育毒性

海水体系中的重金属对海洋生物毒性效应取决于金属的化学性质和存在形态、盐度、pH和生物生长条件及它们对金属的适应过程等多种因素,且有研究表明,以游离态存在的金属毒性最强^[9-10]。重金属是一类非降解富集性较强的污染物,在低浓度暴露下即可在鱼类脑、肾和肝等器官中富集并对其产生分子、生理生化等诸多毒性,从而影响鱼类的生长、发育、繁殖和代谢等^[11]。前人已广泛开展了重金

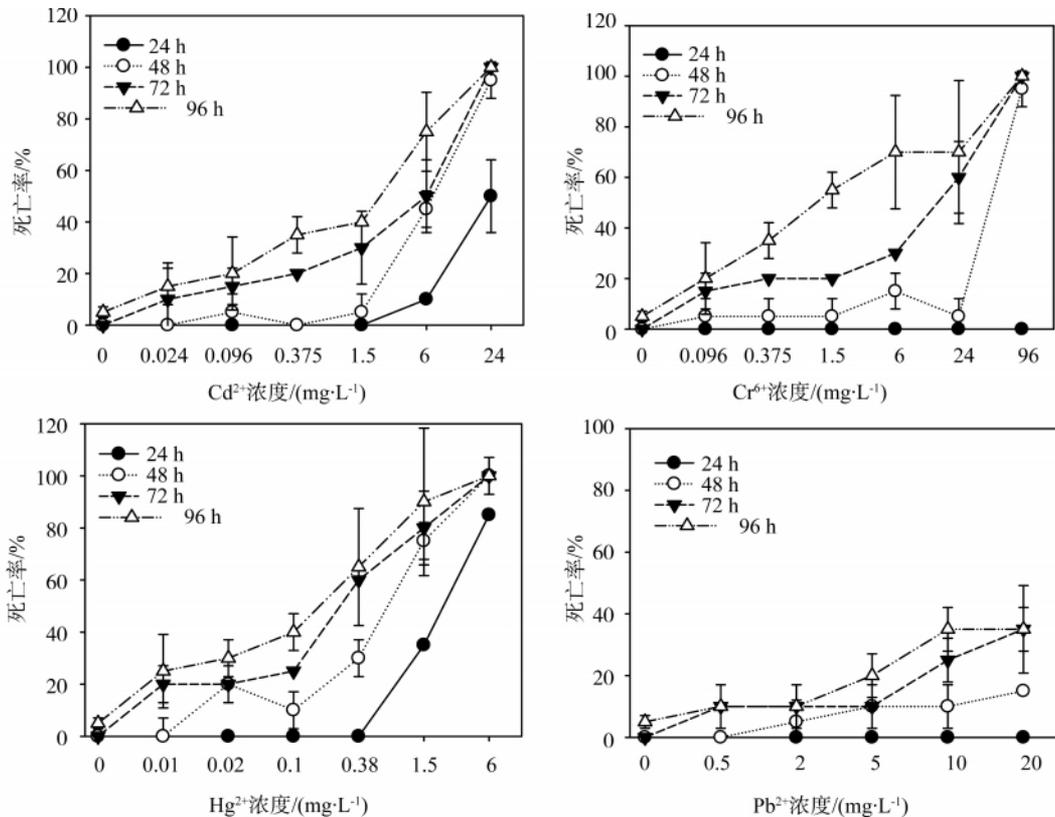


图 4 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺ 和 Pb²⁺ 4 种重金属离子对黑点青鳉仔鱼死亡率的影响

注: * 表示与各自对照组相比 $p < 0.05$

Fig. 4 Effects of Cd²⁺, Hg²⁺, Cr⁶⁺ and Pb²⁺ on mortality of larval *Oryzias melastigma*

属对鱼类早期生活阶段的毒性研究, 并发现鱼类在早期生活阶段对重金属胁迫较为敏感^[4]。本研究考察并比较了 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺ 和 Pb²⁺ 对黑点青鳉胚胎发育和初孵仔鱼的毒性效应及水平。结果表明: 4 种重金属离子在较低浓度下即可对黑点青鳉的心脏系统、卵黄囊发育、骨骼生长和孵化出膜能力造成影响, Hg²⁺ 浓度为 24 μg·L⁻¹ 时即可显著抑制胚胎的孵化能力, 并降低心脏跳动频次, 且导致初孵仔鱼出现显著的发育畸形, 如引起仔鱼脊椎弯曲和卵黄囊水肿等; Cd²⁺、Cr⁶⁺ 和 Pb²⁺ 与 Hg²⁺ 相比, 毒性相对较弱, 分别当浓度为 147 μg·L⁻¹、235 μg·L⁻¹ 和 200 μg·L⁻¹ 时对胚胎孵化能力、心率和初孵仔鱼致畸等方面造成显著毒性; 对 4 种重金属离子对黑点青鳉孵化率和畸形率影响大小进行比较, 毒性强弱依次为: Hg²⁺ > Cd²⁺ > Pb²⁺ > Cr⁶⁺。吴鼎勋等^[12] 研究 Hg、Cu、Zn 和 Cr 对黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 胚胎发育和仔鱼存活的影响, 结果表明, 各金属离子均显著降低胚胎的孵化率, 并对初孵仔鱼产生不同程度的致畸效应, 毒性强弱依次为 Hg > Cu > Zn > Cr;

周立红等^[13] 对泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 研究发现, 泥鳅胚胎对 Hg、Cu、Zn 和 Pb 的耐毒性强于仔鱼, 4 种金属离子对仔鱼的毒性强弱依次为 Hg > Cu > Zn > Pb; Jezierska 等^[14] 研究 Cd、Pb 和 Cu 对鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 胚胎发育的毒性发现, 3 种金属离子均可在鲤鱼胚胎体内富集, 并引起胚胎死亡、孵化时间的延长和初孵仔鱼身体的畸形等, 毒性大小排序依次为: Pb > Cd > Cu; 柳学周等^[15] 通过重金属对半滑舌鳎胚胎发育的毒性研究发现, Hg、Cu、Zn、Cd 和 Pb 均可在不同程度上减慢胚胎孵化速率, 并在胎发育过程中引起多种致畸效应, 如眼睛残缺, 胚胎异常死亡, 脊椎弯曲, 初孵仔鱼不能破膜以及卵黄囊水肿等, 对胚胎的毒性大小依次为 Cu > Hg > Cd > Zn > Pb; 柳敏海等^[16] 报道重金属对早繁鳊鱼 (*Michthys smiiuy*) 胚胎的毒性效应大小依次为 Cu²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺ > Pb²⁺ > Cr⁶⁺; 本研究所发现的毒性效应与上述研究结果具有一定的相似性, 但各别离子对胚胎毒性强弱排序并不完全相同。经 Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺ 和 Pb²⁺ 分别暴露后, 黑点青鳉胚胎孵化

能力显著下降,这与胚体运动和孵化酶有关。黑点青鲈孵化周期为 14 d,该期间各离子均可能有效地突破绒毛膜进入胚胎,并且由于胚胎阶段代谢转化系统发育不健全,致使重金属在体内不断蓄积,从而抑制或破坏胚胎孵化酶的合成以及某些代谢酶的活性等,同时导致细胞凋亡,从而造成心脏系统及胚体活动能力下降,最终导致孵化失败。本研究所发现的 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 对黑点青鲈心率的影响结果似乎佐证了上述推论。但鉴于重金属离子在胚胎及生物体内的形态、分布、转化和致毒机理十分复杂,目前尚未有明确的结论,各重金属离子对黑点青鲈胚胎发育的毒性机制还有待于进一步深入研究。值得指出的是,在实验中各测试组初孵仔鱼的畸形率均较高,且较高浓度暴露组初孵仔鱼出膜后活力很弱且存活时间较短,这意味着无论在实验室条件下还是在海洋自然环境中,长期的重金属污染可能会导致其种群的生态平衡紊乱甚至是种群灭绝。鉴于此,我们认为有关重金属的监测、防治与危害评估需注重长效性。

3.2 重金属对黑点青鲈初孵仔鱼急性毒性

McKim 等^[17]在总结了 34 种污染物对 4 种鱼类的 56 次生活周期的毒性实验结果后指出,鱼类胚胎、仔鱼和早期幼鱼生活阶段是最为敏感的阶段,由胚胎、仔鱼或早期幼鱼实验估计的最大允许有害浓度与通过更多发育阶段或全生活周期的毒性实验所

获得的结果一致。许多学者也强调在水质评价和环境标准制定中,利用鱼类胚胎和仔鱼阶段进行毒性测试的重要性和必要性。本研究通过对 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 对黑点青鲈初孵仔鱼安全浓度计算发现,除 Cr^{6+} 的安全浓度比国家海水水质标准 4 类水质标准限值 ($50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 要低外,其余 3 种重金属离子均高于该标准限值。上述结果表明,在我国铬浓度相对过高的海域,可能存在对海洋鱼类或生态系统“欠保护”的现象,建议有关部门在环境标准与基准的研究中提高对铬的重视度,并修订和完善相关标准,加强对铬污染的危害和预防的研究。

值得指出的是,通过对黑点青鲈初孵仔鱼的 Pb^{2+} 急性毒性研究获得的安全浓度为 $> 200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,而 Pb^{2+} 浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可显著降低胚胎的孵化率,并导致初孵仔鱼的显著发育畸形等毒性效应,此结果表明,仅由急性毒性数据获得的安全浓度值并不完全安全, Pb^{2+} 对海洋生物的低剂量长期暴露的慢性毒性效值得关注。

3.3 黑点青鲈初孵仔鱼敏感性分析

生物对污染物胁迫响应的敏感程度受其自身进化程度、栖息环境、代谢能力及发育状况等多种因素影响。在众多生物中探寻敏感生物的敏感阶段,并对其开展广泛的生态毒理学研究,这对于筛选和建立国际公认的模式生物而言是一项基本且重要的工作。本研究总结了国内外有关重金属对海洋鱼类的

表 2 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 4 种重金属离子对海洋鱼类的急性毒性数据
Table 2 Acute toxicity of Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{6+} and Pb^{2+} to marine fishes

鱼种	受测阶段	暴露时间/h	水质条件			暴露方式	LC ₅₀ 浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)				文献
			温度/ $^{\circ}\text{C}$	盐度/ ‰	pH		Cd^{2+}	Pb^{2+}	Cr^{6+}	Hg^{2+}	
花斑溪鲈 (<i>Rivulus marmoratus</i> , Estuarine Hermaproditic)	仔鱼	96	25 ± 1	10 ± 0.5	8.0	静态	0.8	85.3	14.3	-	[20-21]
紫红笛鲷 (<i>Lutjanus argentimaculatus</i> , Red snapper)	幼稚鱼	96	27 ± 1	34	8.2	静态	6.3	-	91	0.112	[22-23]
尖吻鲈 (<i>Lates calcarifer</i> , Sea bass)	仔鱼	96	26	30	8.4	静态	3.7	138	-	0.0835	[20]
底鲈 (<i>Fundulus heteroclitus</i> , Killifish)	仔鱼	96	20 ± 1	30	-	半静态	2.3	-	-	0.068	[20]
大西洋银鱼 (<i>Menidia menidia</i> , Atlantic silverside)	仔鱼	96	20 ± 1	30	-	半静态	5.6	-	12.4	-	[20]
鲈鱼 (<i>Priopichthys marianus</i> , Glass perch)	幼稚鱼	96	30	36	-	半静态	-	140	31	0.35	[20]
鲷鱼 (<i>Liza vaigienensis</i> , Square tail mullet)	幼稚鱼	96	20	36	-	半静态	-	98	20.1	0.38	[22]
半滑舌鲷 (<i>Cynoglossus semilaevis</i> , Günther)	初孵仔鱼	96	23 ± 1	32	8.0	半静态	0.178	1.026	-	0.045	[15]
真鲷 (<i>Pagrosomus major</i> , Red sea bream)	仔鱼	96	18	30	-	半静态	5.6	-	-	-	[24]
真鲷 (<i>Pagrosomus major</i> , Red sea bream)	初孵仔鱼	96	25 ± 1	30	-	半静态	0.53	-	-	-	[25]
黑鲷 (<i>Sparus macrocephalus</i> , Black sea bream)	初孵仔鱼	96	25 ± 1	30	-	半静态	0.3	-	-	-	[25]
黑点青鲈 (<i>Oryzias melastigma</i> , Marine medaka)	初孵仔鱼	96	28 ± 2	30	-	半静态	1.12	>20	1.456	0.097	本研究结果

注“-”为无相关记录或未测定。

急性毒性结果 特别关注了分布于亚洲海域且处于敏感期的 LC₅₀数据情况(见表2),旨在了解黑点青鳉对重金属胁迫响应的敏感程度,为其成为模式化生物提供借鉴。

表2结果显示,Cd²⁺、Hg²⁺、Cr⁶⁺和Pb²⁺对海水鱼类仔鱼期 LC₅₀范围分别为:0.178~6.3 mg·L⁻¹、0.045~0.38 mg·L⁻¹、1.456~91 mg·L⁻¹和1.026~140 mg·L⁻¹,而4种重金属离子对黑点青鳉初孵仔鱼 LC₅₀分别为:1.12 mg·L⁻¹、0.097 mg·L⁻¹、1.456 mg·L⁻¹和>20 mg·L⁻¹。可见,黑点青鳉对上述几种重金属离子的胁迫具有相对较强的敏感性。

模式鱼种应满足以下几个条件:全年易于获得;易于保存驯养;个体较小便于实验;基因组小;具有一定的经济及生态学上的代表性。在淡水环境保护领域中,斑马鱼已广泛用于环境污染及生态毒理研究,体现出了较大的科学价值,而转基因斑马鱼已被用于饮用水质的监控。海洋模式鱼类研究相对滞后,目前尚没有理想的模式鱼种用于海洋环境保护的研究中。近年日本和中国香港等多位学者试图将黑点青鳉开发为海洋模式生物用于海洋环境保护的相关研究中,并已测定了该鱼种的全基因组,研发出转基因黑点青鳉以用于监测水体中内分泌干扰污染物等,这些研究成果为黑点青鳉成为模式鱼种奠定了坚实的技术基础。本研究重点关注了4种重金属离子对黑点青鳉早期发育的毒性情况,初步发现黑点青鳉对重金属胁迫有较强的敏感性,并易于实验室长期培养和繁殖,且世代周期短,可用于污染物的全生命周期测试。此外,Imai等^[18-19]研究已表明,该鱼种对内分泌干扰物具有相对较强的敏感性。因此,我们推荐将黑点青鳉作为潜在的海洋模式鱼种用于生态毒理学研究,尤其是将其应用于亚洲地区。但需要指出的是,确定一种模式生物需要大量的科学研究工作,而目前针对黑点青鳉的研究还尚显不足,尤其在基因组和蛋白组学方面的研究还有待进一步加强和深化,围绕模式鱼种的确立需重点开展黑点青鳉基因资源库和突变体资源库的构建工作,强化基因功能活体检测技术的研发及应用,培养转基因黑点青鳉,并开发其在海洋环境保护中的应用技术。

通讯作者简介:王菊英(1967—),女,博士,研究员,主要从事海洋环境监测与评价及环境质量标准与基准的研究。

参考文献:

- [1] 国家海洋局. 2008年中国海洋环境质量公报[R]. 北京: 国家海洋局, 2009
- [2] 国家海洋局. 2010年中国海洋环境状况公报[R]. 北京: 国家海洋局, 2011
- [3] Bertin G, Averbeck D. Cadmium: Cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) [J]. *Biochimie*, 2006, 88(11): 1549–1559
- [4] Clark R. *Marine Pollution* [M]. New York: Oxford University Press, 2001: 62–69
- [5] Gaetke L M, Chow C K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients [J]. *Toxicology*, 2003, 189(1–2): 147–163
- [6] Au D W T, Mok H O L, Elmore L W, et al. Japanese medaka: A new vertebrate model for studying telomere and telomerase biology [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(2): 161–167
- [7] Inoue K, Takei Y. Asian medaka fishes offer new models for studying mechanisms of seawater adaptation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 635–645
- [8] Koyama J, Kawamata M, Imai S, et al. Java medaka: A proposed new marine test fish for ecotoxicology [J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 23(4): 487–491
- [9] Beattie J H, Pascoe D. Cadmium uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* eggs and alevins [J]. *Journal of Fish Biology*, 1978, 13(5): 631–637
- [10] Behra R. *In vitro* effects of cadmium, zinc and lead on calmodulin-dependent actions in *Oncorhynchus mykiss*, *Mytilus* sp., and *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, 24(1): 21–27
- [11] González-Doncel M, Larrea M, Sánchez-Fortún S, et al. Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs [J]. *Chemosphere*, 2003, 52(1): 75–83
- [12] 吴鼎勋, 洪万树. 4种重金属对Mian状黄姑鱼胚胎和仔鱼的毒性[J]. 台湾海峡, 1999, 18(2): 186–191, T001
Wu D X, Hong W S. Study on toxicity of four heavy metals to embryo and larval of *Nibea miichthioides* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1999, 18(2): 186–191, T001 (in Chinese)
- [13] 周立红, 陈学豪, 秦德忠. 4种重金属对泥鳅胚胎和仔鱼毒性的研究[J]. 厦门水产学院学报, 1994, 16(1): 11–19
Zhou L H, Chen X H, Qin D Z. The study on the toxicity of

- four kinds of heavy metal to *Misgurnus anguillicaudatus* embryo and juvenile fish [J]. Journal of Xiamen Fisheries College, 1994, 16(1): 11-19 (in Chinese)
- [14] Jezierska B, Ługowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2009, 35(4): 625-640
- [15] 柳学周, 徐永江, 兰功刚. 几种重金属对半滑舌鲷胚胎发育和仔稚鱼的毒性效应[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 33-42
- Liu X Z, Xu Y J, Lan G G. Toxic effects of several heavy metals on the embryos, larvae of *Cynoglossus semilaevis* Günther [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 33-42 (in Chinese)
- [16] 柳敏海, 陈波, 罗海忠, 等. 5种重金属对早繁鳊鱼胚胎和仔鱼的毒性效应[J]. 海洋渔业, 2007, 29(1): 57-62
- Liu M H, Chen B, Luo H Z, et al. Toxic effects of five heavy metals on the embryos and larvae of *Miichthys miiuy* Basilewsky during early developing stages [J]. Marine Fisheries, 2007, 29(1): 57-62 (in Chinese)
- [17] McKim J M. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1977, 34(8): 1148-1154
- [18] Imai S, Koyama J. Effects of estrone on full life cycle of Java medaka (*Oryzias javanicus*), a new marine test fish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, 26(4): 726-731
- [19] Imai S, Koyama J, Fujii K. Effects of 17 β -estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species [J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 51(8-12): 708-714
- [20] Sulaiman N, Hamid N H A. Aquatic toxicity testing of copper, cadmium and ammonia on seabass, *Lates calcarifer* [C]//Vigers G A, Ong K S, McPherson C, et al. ASEAN Marine Environmental Management: Quality Criteria and Monitoring for Aquatic Life and Human Health Protection. Penang, Malaysia: Proceedings of the ASEAN-Canada Technical Conference on Marine Science, 1996: 8-13
- [21] Sulaiman N. Larval fish survival and growth test of cadmium [C]//ASEAN-Canada Cooperative Programme on Marine Science-Phase II (CPMS-II). Bangsaen, Thailand: Regional Workshop on Chronic Toxicity Testing, Institute of Marine Science, Burapha University, 1995: 112-115
- [22] Denton G R W, Burdon-Jones C. Environmental effects on toxicity of heavy metals to two species of tropical marine fish from Northern Australia [J]. Chemistry and Ecology, 1986, 2(3): 223-249
- [23] Chumnantana R, Sanguansin J, Koyama J. Study on acute toxicity test of cadmium to red snapper juvenile, *Lutjanus argentimaculatus* [J]. Thai Marine Fisheries Research Bulletin, 1992, 3: 55-59
- [24] Cao L, Huang W, Shan X J, et al. Cadmium toxicity to embryonic-larval development and survival in red sea bream *Pagrus major* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(7): 1966-1974
- [25] 杨玻, 郑微云, 陈明达, 等. 重金属对真鲷幼鱼和黑鲷幼鱼的毒性效应[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1994, 33(增刊): 28-30
- Yang B, Zhen W Y, Chen M D, et al. The toxicities of Cu, Zn, Cd on larval red sea bream and larval black sea bream [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 1994, 33(S1): 28-30 (in Chinese) ◆