

4 种重金属离子对海水青鳉胚胎发育及仔鱼的急性毒性研究

杨志艳^{1,2}, 薛雅芳^{1,2}, 徐永健^{1,2*}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832)

摘要: 为研究重金属对海洋生物的毒性影响及敏感性, 本文以海水模式鱼——海水青鳉(*Oryzias melastigma*)为对象, 分析 4 种代表性海水重金属污染物铜、镉、铅、汞对其胚胎发育和仔鱼生长期的 24 h 急性毒性。结果显示: 海水青鳉发育阶段对 4 种重金属离子都很敏感, 且都产生明显毒性影响。 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对海水青鳉胚胎发育期 24 h LC_{50} 最低值分别为 $2.34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I 期)、 $0.72 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IV 期)、 $22.65 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I 期)、 $27.32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I 期), 对青鳉胚胎发育毒性大小的排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ 。 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对海水青鳉仔鱼期 24 h LC_{50} 最低值分别为 $0.018 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (7 日龄)、 $0.48 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (8 日龄)、 $1.87 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (6 日龄)、 $1.86 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 日龄), 对青鳉仔鱼毒性大小的排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。由此得出重金属对海水模式鱼的胚胎和仔鱼发育的敏感期, 并经实验得到其最低敏感浓度, 也为进一步开展海水重金属的生物监测提供了参考依据。

关键词: 海水青鳉; 胚胎发育; 仔鱼; 胚胎; 重金属; 急性毒性

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2021) 05-0009-07

水污染是当今社会面临的主要环境问题之一, 已引起了全球的特别关注^[1-3]。在海洋环境污染中, 重金属有着来源广、持久性、长期毒性和生物蓄积性等特征^[4-5], 被称为环境中具有潜在危害性、高度危害性和难治理性的重要污染物^[6]。海洋生物能够直接或间接地从水和食物链中积累重金属, 当积累到一定浓度时, 重金属会严重破坏水域生态平衡^[7], 并且各种重金属也会严重影响海洋生物的生长发育、生理功能、死亡和繁殖^[8]。

对于海域环境重金属污染的监测, 与过程复杂繁琐、仪器昂贵、检测数据不具代表性的常规化学分析方法相比, 生物监测具有灵敏度高、快速、价格低廉、能反映污染物活性部分的生物学效应及污染物之间交互作用的优点, 能充分反映出重金属在水环境中的动态情况。在生物监测中, 可以采用活的生物体来指示环境污染的不利影响, 这些生物个体对环境的变化反映敏感是环境污染的指示生物。鱼类被广泛用作生物监测的指示生物, 被认为是评估污染物毒性的有用动物^[9]。其中, 海

水青鳉(*Oryzias melastigma*)是近些年被认可的用于海水生态毒理研究的模式物种之一^[10]。

海水青鳉作为盐水及咸淡水中少数的几种模式生物种类之一, 具有个体小, 产卵率高, 世代周期短, 受精卵透明, 易于观察且不易破碎, 基因组小以及盐度适应广等特点^[11]。近些年, 有很多工作涉及该物种的环境生态毒理研究和应用^[12-13], 尤其是侧重于胚胎和幼体的毒理研究, 也可用以评估环境污染物对鱼类的影响^[14-15]。本文主要通过研究海水青鳉在汞、镉、铜、铅等 4 种重金属离子胁迫下的胚胎发育和仔鱼生长情况, 以期了解海水青鳉在这个阶段中对重金属的特殊敏感时期及敏感浓度, 为进一步开展海水重金属的生物监测提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

试验动物海水青鳉为宁波大学校内水产养殖

收稿日期: 2020-12-17.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市自然科学基金(2017A610282); 教育部重点科技项目(212070); 宁波大学学科开放基金(XKZSC1508)。

第一作者: 杨志艳(1996-), 女, 重庆开州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 环境毒理学。E-mail: 13896919243@163.com

*通信作者: 徐永健(1975-), 男, 浙江台州人, 教授, 主要研究方向: 动物行为生态与养殖技术。E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

基地培育. 养殖条件: 盐度 30‰、温度(27.5±0.5)℃、光强约 100 lx、光周期 14L:10D. 让亲鱼自然受精后产出受精卵, 用虹吸方法分离受精卵并转移至孵化缸中, 用于后述胚胎发育毒性试验. 受精卵在盐度 30‰、温度(27.5±0.5)℃、光周期 14L:10D 条件下, 孵化约 9 d 后, 青鲮仔鱼密集出膜, 用于后述仔鱼生长毒性试验.

1.1.2 试验试剂

氯化汞(HgCl₂)、硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)、氯化铅(PbCl₂)、氯化镉(CdCl₂·H₂O)均购于上海国药集团, 均为化学纯级别. 上述 4 种重金属盐预先用消毒海水分别配置成母液, 0.1 μm 微孔滤膜过滤后保存备用. 实验用海水采用海水晶(海佳牌, 上海)加蒸馏水配制, 煮沸消毒并滤膜过滤备用.

1.2 试验方法

1.2.1 重金属离子浓度设计

根据海水青鲮胚胎及仔鱼预实验结果和各金属离子在海水体系中的溶解度, 设计海水青鲮鱼胚胎及仔鱼 24 h 急性试验浓度, 推算出 4 种重金属 24 h 的最小全致死(100%死亡)浓度和最大全不致死浓度的大致范围. 在此范围内, 由于海水青鲮胚胎中浓度范围相差较小, 故按等对数间距设置 4 个浓度组, 仔鱼期按等对数间距设置 6 个浓度组, 同时均分别设置 1 个空白对照组, 每组 3 重复. 取不同体积各试剂母液, 稀释成相应表 1 实验浓度.

1.2.2 胚胎急性毒性试验

通过解剖镜镜检判断海水青鲮胚胎发育的 8 个不同时期, 分别为受精卵激活期(I)、胚盘形成期(II)、卵裂期(III)、囊胚期(IV)、原肠胚期(V)、神经胚期(VI)、器官形成期(VII)、孵化出膜期(VIII), 各

期胚胎发育特征参照陈漪等^[16]的研究. 分别从各期中挑选发育同期的 10 枚胚胎细胞, 均放置于 14 cm 培养皿, 各浓度梯度的试验溶液 20 mL, 每个浓度梯度设置 3 个平行. 胚胎急性毒性试验采用半静态暴露方式, 同时设置人工海水组的空白对照组. 各试验组中胚胎在重金属离子中的暴露时间为 24 h, 观察各个发育时期处理中的胚胎发育及生命活动情况, 统计胚胎死亡数. 以受精卵不透明、心跳停止等特征作为胚胎急性毒性试验中的测定和判断胚胎死亡的依据. 计算各期胚胎的死亡率及 24 h 半数致死浓度(24 h LC₅₀).

1.2.3 仔鱼急性毒性试验

收集 8:00~10:00 时间段内孵出的初孵仔鱼, 作为仔鱼 1 期(1 日龄), 转移到消毒后的水族玻璃缸中培育, 再从中分别挑选健康有活力的 1~10 d 的 10 期仔鱼进行急性毒性试验. 每个烧杯中放入 10 条仔鱼, 试验溶液为 150 mL, 每期设置 3 个平行. 同样采用半静态暴露试验方式, 以人工海水作为空白对照组. 试验在光照培养箱中进行, 条件仔鱼暂养. 各试验组中仔鱼在重金属离子中的暴露时间为 24 h, 试验期间每天(10:00)投喂初孵卤虫无节幼体, 投喂密度约为 1 个·mL⁻¹. 每天定时观察各试验组仔鱼的生长情况及生命活动, 分别统计各期试验组中的仔鱼死亡数, 计算各组中仔鱼死亡率及相关半数致死浓度(LC₅₀).

1.3 数据处理

根据机率单位法原理, 利用 Excel 对结果进行分析, 并计算半数致死浓度, 公式如下^[17-18].

$$Z = (2\pi)^{-1/2} e^{-1/(2(Y-5))}, \quad (1)$$

式中: Z 为权重系数公式中的参数; Y 为校正死亡率

表 1 各重金属离子的实验质量浓度设置

mg·L⁻¹

发育阶段	重金属离子	实验质量浓度梯度						
胚胎期	Cd ²⁺	0	0.147	0.294	0.588	1.176		
	Hg ²⁺	0	0.024	0.048	0.096	0.192		
	Pb ²⁺	0	0.020	0.200	0.400	0.800		
	Cu ²⁺	0	1.000	1.970	3.870	7.620		
仔鱼期	Cd ²⁺	0	0.02	0.10	0.38	1.50	6.00	24.00
	Hg ²⁺	0	0.01	0.02	0.10	0.38	1.50	6.00
	Pb ²⁺	0	0.50	2.00	5.00	10.00	20.00	—
	Cu ²⁺	0	0.50	2.00	5.00	10.00	20.00	50.00

注: “—”表示超出了 Pb²⁺在海水中的溶解范围, 故仔鱼期仅选用 6 个浓度组(包括空白对照组).

的正态等差.

$$w = Z^2 / (PQ), \quad (2)$$

式中: w 为权重系数; P 为死亡率, $Q = 1 - P$.

$$SE_m = \left(b^{-2} \times \left(\left(\sum nm \right)^{-1} + \left(m - \bar{x} \right)^2 \times \left(\sum nw(m - \bar{x}) \right)^{-1} \right) \right)^{1/2}, \quad (3)$$

式中: SE_m 是 m 的标准误差, $m = \lg LC_{50}$; $\bar{x}$ 为浓度对数平均值; n 为某浓度供试总数.

$$SE_{10,m} = 10^m (\ln 10 \times SE_m), \quad (4)$$

式中: $SE_{10,m}$ 为 LC_{50} 的标准误差.

LC_{50} 的置信限为 $10^{(\lg LC_{50} \pm 1.96 \times SE_m)}$.

2 结果与分析

2.1 胚胎毒性试验结果

胚胎暴露于 Hg^{2+} 中(图 1). 在胚胎发育的 8 期中, 除出膜期(VIII 期)外, 其他各期对 Hg^{2+} 表现出敏感. 第一阶段(第 I~III 期), 大概是胚胎发育开始的前 5 h, 受精卵对 Hg^{2+} 异常敏感, 表现为各期的 24 h LC_{50} 值很低($<15 \mu g \cdot L^{-1}$), 最低是 I 期, 仅为 $2.34 \mu g \cdot L^{-1}$, 表明该期对 Hg^{2+} 最为敏感. 随着胚胎的发育, 受精卵对 Hg^{2+} 敏感的浓度在逐渐增加, 至第二阶段(第 IV~VI 期), 各期 Hg^{2+} 的 24 h LC_{50} 值都在 $100 \mu g \cdot L^{-1}$ 左右, 远远高于第一阶段($P < 0.05$), 但各组两两间差异不显著($P > 0.05$). 至第三阶段的第 VII 期达到最大的 24 h LC_{50} 值, 为 $173.65 \mu g \cdot L^{-1}$, 显著高于第二阶段各期($P < 0.05$).

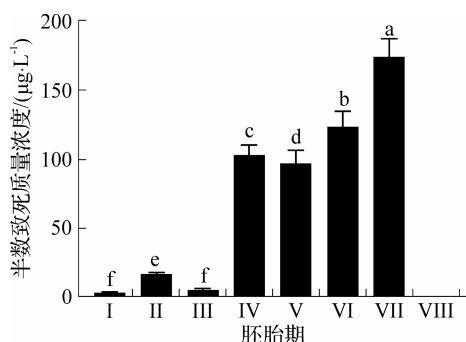


图 1 海水青鳉胚胎发育各期暴露于 Hg^{2+} 的 24 h LC_{50} 值

胚胎暴露于 Cu^{2+} 中(图 2). 仅在发育的第二阶段, 即囊胚期(第 IV 期)、原肠胚期(第 V 期)、神经胚期(第 VI 期)对 Cu^{2+} 较为敏感. 试验中发现, 第一阶段的 3 期(I~III)都对 Cu^{2+} 基本无表现, 这 3 期中各组胚胎的死亡率与对照组相比差异不显著($P >$

0.05); 在敏感的 IV~VI 期中, 各组 24 h LC_{50} 值随着胚胎发育而显著提高, 即胚胎对 Cu^{2+} 的敏感性逐渐降低. IV~VI 期的 24 h LC_{50} 值分别为 0.72、4.13、 $8.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 各期两两间存在显著性差异($P < 0.05$). 胚胎发育的第三阶段对 Cu^{2+} 也不敏感.

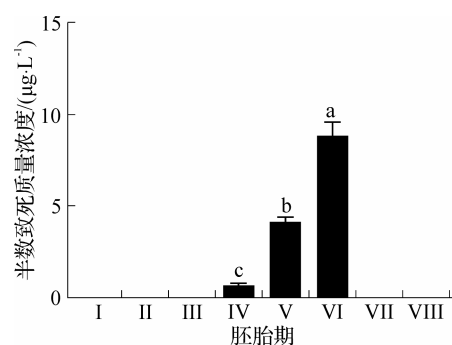


图 2 海水青鳉胚胎发育各期暴露于 Cu^{2+} 的 24 h LC_{50} 值

胚胎暴露于 Pb^{2+} 中(图 3). 发育的第一阶段表现最为敏感, 尤其是其中的 I 期和 III 期, 其 24 h LD_{50} 值都较低, 分别为 22.65 和 $45.78 \mu g \cdot L^{-1}$, 而第 II 期为 $163.37 \mu g \cdot L^{-1}$, 远高于 I 期和 III 期($P < 0.05$); 但总体上都低于第二阶段的各期, 第 IV 至 VI 期的 24 h LC_{50} 值分别为 247.65 、 608.47 、 $792.34 \mu g \cdot L^{-1}$, 各期两两间存在显著性差异($P < 0.05$). 至第三阶段, 即器官形成期(第 VII 期)和孵化出膜期(第 VIII 期), 该阶段对 Pb^{2+} 不敏感.

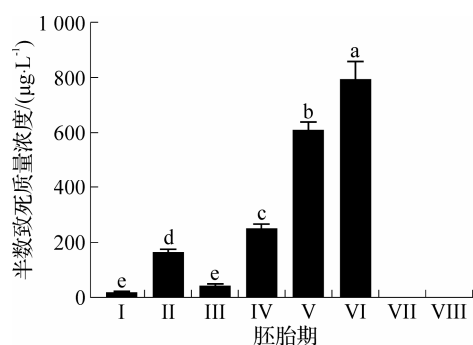


图 3 海水青鳉胚胎发育各期暴露于 Pb^{2+} 的 24 h LC_{50} 值

胚胎暴露于 Cd^{2+} (图 4) 中的表现类似于 Pb^{2+} , 区别在于胚胎对于 Cd^{2+} 敏感性是随着发育时期逐渐降低的, 即各期的 24 h LC_{50} 值在逐渐上升. 第 I 期最低($27.32 \mu g \cdot L^{-1}$), 至第 VI 期最高($1283.34 \mu g \cdot L^{-1}$), 各期两两间存在显著性差异($P < 0.05$). 与 Pb^{2+} 相类似, 第 3 阶段的胚胎对 Cd^{2+} 也不敏感.

2.2 仔鱼毒性试验结果

仔鱼暴露于 Hg^{2+} 中(图 5). 其中前 3 d 情况也延

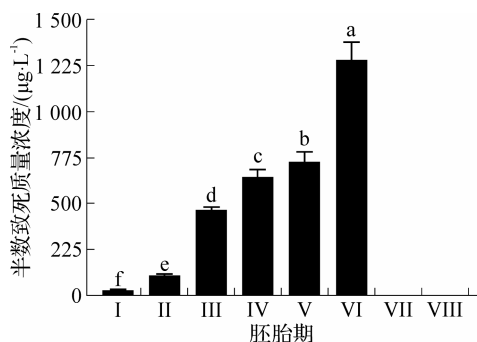


图4 海水青鲷胚胎发育各期暴露于 Cd²⁺ 的 24 h LC₅₀ 值

续了胚胎发育后期的特点, 试验浓度范围内对仔鱼基本上无影响, 直到第 4、5 天时才略有毒性效应, 但 24 h LC₅₀ 值比较大. 到后 5 d 阶段, 尤其是暴露于 Hg²⁺ 中的 7~9 日龄仔鱼有异常敏感反应, 24 h LC₅₀ 值都在 0.02 mg·L⁻¹ 左右, 远低于前 5 d 值 ($P < 0.05$), 与胚胎发育第 VII 期的 24 h LC₅₀ 值接近 ($P > 0.05$).

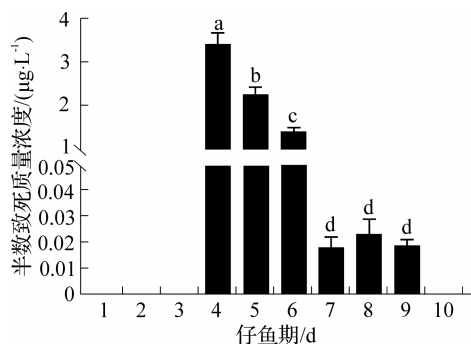


图5 海水青鲷仔鱼各期暴露于 Hg²⁺ 的 24 h LC₅₀ 值

仔鱼暴露于 Cu²⁺ 中(图 6). 前 5 d 阶段类似于 Hg²⁺ 的反应, 其中前 4 d 延续胚胎期特点基本无影响, 5 日龄时略有毒性效应, 不过其 24 h LC₅₀ 值超过了 10 mg·L⁻¹. 后 5 d 阶段, 其中 5 日龄~9 日龄的仔鱼对 Cu²⁺ 较敏感. 期间随着仔鱼生长增加, 24 h LC₅₀ 值逐渐降低, 至 8 日龄时出现最低值(0.48

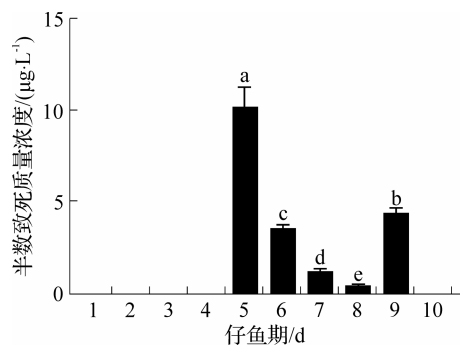


图6 海水青鲷仔鱼各期暴露于 Cu²⁺ 的 24 h LC₅₀ 值

mg·L⁻¹), 而后, 9 日龄仔鱼又有大幅上升, 最后 10 日龄基本上也是不敏感.

仔鱼暴露于 Pb²⁺ 中(图 7). 在前 5 d 阶段, 仅 2、3 日龄的仔鱼对 Pb²⁺ 有所敏感, 其 24 h LC₅₀ 值都在 10 mg·L⁻¹ 以上; 其余 1、4、5 日龄仔鱼对 Pb²⁺ 都无表现. 至后 5 d 阶段, 尤其是 6~8 日龄仔鱼表现为对 Pb²⁺ 较敏感, 最低 24 h LC₅₀ 值出现在 6 日龄组, 为 1.87 mg·L⁻¹; 而后逐渐升高, 7、8 日龄组为 4 mg·L⁻¹, 9 日龄组约 10 mg·L⁻¹.

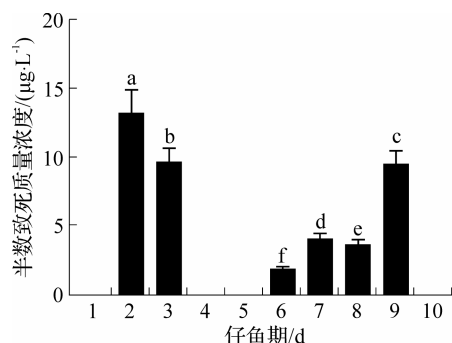


图7 海水青鲷仔鱼各期暴露于 Pb²⁺ 的 24 h LC₅₀ 值

仔鱼暴露于 Cd²⁺ 中(图 8). 仔鱼对 Cd²⁺ 敏感从第 3 日龄开始表现, 3~5 日龄仔鱼随着日龄增加, 24 h LC₅₀ 值逐渐降低, 5 日龄最低(1.86 mg·L⁻¹); 而后 5~8 日龄仔鱼的 24 h LC₅₀ 值又呈显著升高的趋势. 经比较, 3 日龄和 7 日龄间差异不显著 ($P > 0.05$), 其余各组间两两有显著性差异 ($P < 0.05$), 至 8 日龄时有最高的 24 h LC₅₀ 值(21.66 mg·L⁻¹).

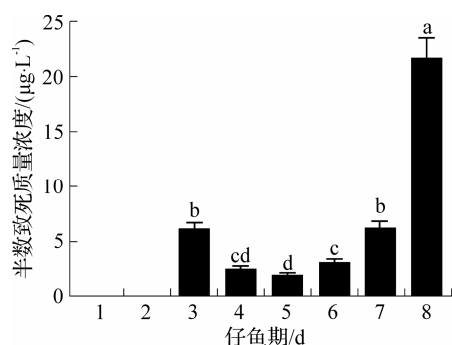


图8 海水青鲷仔鱼各期暴露于 Cd²⁺ 的 24 h LC₅₀ 值

3 讨论

重金属是目前较为关注的一类环境污染物, 生物毒性大. 长期处于低浓度重金属暴露下的生物, 其生长、发育、繁殖和代谢等都受严重影响, 并且重金属还能在一些重要器官富集, 产生一系列

毒性效应^[19]。不同的生物对不同重金属开展的毒性研究报道很多, 由于生物生理和重金属特性差异, 所得结果往往难以与实际应用比较。此外, 哪怕是同一生物对于同一种重金属的毒性试验, 结果也是难以应用到实际工作中, 进而开展有效的生物监测。个中原因可能是难以把握重金属作用的敏感时间点及敏感浓度。

一般来说, 鱼类的早期发育阶段对重金属特别敏感。王洪盼等^[20]报道日本青鳉(*Oryzias latipes*) 在胚胎期对重金属最为敏感, 比仔鱼和成鱼易感染有毒物质^[21]。此外, 研究者对胚胎发育不同时期的敏感性也有研究, 一般认为在受精初期到原肠期阶段, 卵膜的透性高, 易受重金属影响。如虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*) 胚胎在眼点形成期和孵化期都对 Mn 离子较为敏感^[22], 且在氯化镍作用下, 其胚胎受精初期比眼点形成期还要敏感^[23]。可以说受精初期对重金属是最为敏感的时间点。本文得出海水青鳉胚胎对 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 各离子的最低 24 h LC_{50} 值分别为 $2.34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I 期)、 $0.72 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IV 期)、 $22.65 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I 期)、 $27.32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (I 期)。结果发现重金属离子在海水青鳉受精卵激活期的 24 h LC_{50} 最低, 远低于仔鱼期(除 Cu 外), 说明胚胎发育最初阶段对于重金属离子最为敏感, 最易受重金属伤害。现有很多工作也得出相同的结论^[24-26]。但胚胎发育初期阶段持续时间过短的不足给研究工作带来了许多不便, 造成开展生物监测应用的难度很大。

此外, 通过比较 4 种重金属最低 LC_{50} , 我们可以得出 4 种重金属对海水青鳉的胚胎发育毒性大小的排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ 。有报道指出鱼类对常见重金属离子的敏感性大小为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$ ^[27]。此前该方面研究工作开展较多^[24-33], 但所得结果却差异大。其中有客观的原因, 如试验物种不同^[28,30]、金属离子间相互影响等^[34], 也有一些主观性的原因造成不同结果间可比性不强。但是, 各研究对重金属作用机理的推测较一致。在早期胚胎形成阶段, 重金属对胚胎的作用是通过与绒毛膜结合或改变细胞膜通透性而产生毒性。那么明确绒毛膜最薄时刻就是重金属作用最敏感的时间点, 也能测出相应的敏感浓度。本试验中海水青鳉胚胎的受精卵激活阶段是敏感时

间点, 是因为此时的受精卵卵壳外绒毛膜逐渐变薄和硬化, 重金属离子最易于透过而进入胚胎^[35]。因而该期所得的 24 h LC_{50} 值为敏感浓度。敏感浓度一般为敏感期的最低 LC_{50} 或 EC_{50} 值。总体上看, 4 种重金属离子 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 都能影响海水青鳉的胚胎发育, 但不同的重金属所作用的胚胎发育期有所不同, 所作用的敏感浓度也有所不同。也就是说青鳉胚胎发育的不同时期对不同重金属的敏感性不一样, 最小作用浓度也有所不同。但不管如何, 对胚胎影响的有效浓度基本上是随着胚胎发育的进展而逐渐上升的。

重金属对于仔鱼影响的研究也很多, 影响的主要表现有影响初孵仔鱼的个体大小、多种器官的畸形率(头颅、卵黄囊、脊柱、眼部、尾部)、卵黄囊的吸收作用以及初孵仔鱼的生长发育速率等, 进而影响到初孵仔鱼正常游泳和行为, 甚至会导致鱼类完全吸收卵黄囊的营养后而死亡。本研究中测得 4 种重金属离子对海水青鳉仔鱼的最低 24 h LC_{50} 值分别为 $0.018 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (7 日龄)、 $0.48 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (8 日龄)、 $1.87 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (6 日龄)、 $1.86 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 日龄), 对海水青鳉仔鱼生长的毒性大小排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。总体上看, 4 种重金属离子 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 都能影响海水青鳉仔鱼发育, 但不同重金属的作用不同, 敏感浓度也不同。从结果看, 重金属离子对仔鱼的作用期主要在 6~8 日龄阶段, 也就是主要发生在后 5 d 阶段(除 Cd^{2+} 外)。与胚胎期比较发现, 除 Cu^{2+} 的 24 h LC_{50} 值略有降低外, 其余 3 种重金属的 24 h LC_{50} 值都大幅度提高, 升高了 10~85 倍。一般来说, 仔鱼对于重金属的敏感性不如胚胎。不过本试验中的 Cu^{2+} 在海水青鳉仔鱼期(8 日龄)出现了最低的 24 h LC_{50} 值。说明对于 Cu^{2+} 胁迫来说, 仔鱼期比胚胎期更为敏感。也有少量工作支持此结果^[30,36]。这可能是由于水环境中 Cu^{2+} 的浓度过高, 仔鱼直接接触 Cu^{2+} 离子, 不像有卵膜保护的胚胎有足够时间发育来降低重金属的毒害作用。此外, 仔鱼不同发育阶段对重金属毒性的敏感性也不同, 如外源性营养阶段极易受外界环境的影响^[37]。本试验中发现, 最开始几天的青鳉仔鱼能延续胚胎状态, 而后才显示出毒性效应, 因此仔鱼对重金属的敏感期在第 5~8 天(5~8 日龄), 且不同金属种类各有相应的敏感时间点。5~8 d 时间段内,

一般是卵黄囊油球刚刚全部消耗完成,开始从内源性营养转向外源营养的过渡阶段。而此时的仔鱼生长需要营养支撑,但身体的各项功能尚未发育完全,因而在获得营养的同时给了污染物可趁之机,致使重金属对鳃上皮细胞造成损害,造成中毒死亡^[38]。

综上,本研究通过海水青鳉胚胎及仔鱼急性毒性实验结果,明确了海水青鳉早期发育阶段的敏感期及敏感浓度,这对于海水鱼类在海洋环境的生物监控具有重要意义,但对其机理的研究需要进一步深入。

参考文献:

- [1] Ali H, Khan E. Environmental chemistry in the twenty-first century[J]. Environmental Chemistry Letters, 2017, 15(2):329-346.
- [2] 闫启仑, 马德毅, 郭皓. 锦州湾油污沉积物急性毒性的海洋端足类检验[J]. 海洋环境科学, 1999, 30(6):629-634.
- [3] 张效龙, 徐家声, 金永德, 等. 天津永定新河口海区海底表层沉积物的污染[J]. 海洋地质动态, 2006, 22(5): 11-14.
- [4] Zhang Y, Lu X, Wang N, et al. Heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and their potential human health risk in Bohai Bay, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(17):17801-17810.
- [5] Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation[J]. Journal of Chemistry, 2019(4):1-14.
- [6] 陈静生, 邓宝山, 陶澍, 等. 环境地球化学[M]. 北京: 海洋出版社, 1990:196-235.
- [7] Paul S, Mandal A, Bhattacharjee P, et al. Evaluation of water quality and toxicity after exposure of lead nitrate in fresh water fish, major source of water pollution[J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2019, 45(4):345-351.
- [8] Ebrahimi M, Taherianfard M. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River[J]. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2011, 10(1):13-26.
- [9] Lee B Y, Park J C, Kim M S, et al. The genome of the Java medaka (*Oryzias javanicus*): Potential for its use in marine molecular ecotoxicology[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 154:111118.
- [10] Kinoshita M, Murata K, Naruse K, et al. Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols[M]. New York: John Wiley & Sons, 2009.
- [11] Ni X M, Wan L, Liang P P, et al. The acute toxic effects of hexavalent chromium on the liver of marine medaka (*Oryzias melastigma*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2020, 231:108734.
- [12] 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 and Pharmacology, 2009, 149(2):161-167.
- [13] Kong R Y C, Giesy J P, Wu R S S, et al. Development of a marine fish model for studying in vivo molecular responses in ecotoxicology[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 86(2):131-141.
- [14] Wang R F, Zhu L M, Zhang J, et al. Developmental toxicity of copper in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos and larvae [J]. Chemosphere, 2020, 247:125923.
- [15] Dong W, Liu J, Wei L, et al. Developmental toxicity from exposure to various forms of mercury compounds in medaka fish (*Oryzias latipes*) embryos[J]. PeerJ, 2016, 4:2282.
- [16] 陈漪, 王晓杰, 冉皓宇, 等. 海水模式种青鳉鱼(*Oryzias melastigma*)的胚胎发育观察 [J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(1):71-82.
- [17] 张志祥, 徐汉虹, 程东美. EXCEL 在毒力回归计算中的应用[J]. 昆虫知识, 2002, 39(1):67-70.
- [18] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定[M]. 北京: 科学出版社, 1988:369-372.
- [19] Gonzalez-Doncel M, Larrea M, Sanchez-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.
- [20] 王洪盼, 赵艳民, 秦延文, 等. Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对日本青鳉(*Oryzias latipes*)早期发育阶段的急性毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(4):793-802.
- [21] Barrett, J R. Asking the right questions: How early-life exposures influence later development of disease[J]. Environmental Health Perspect, 2012, 120(10):a403.
- [22] Lewis M. Effects of low concentrations of manganous sulfate on eggs and fry of rainbow trout[J]. Chinese Medical Journal, 1976, 38(2):63-65.
- [23] Nebeker A V, Savonen C, Stevens D G. Sensitivity of rainbow trout early life stages to nickel chloride[J].

- Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 1985, 4(2):233-239.
- [24] 吴鼎勋, 洪万树. 4种重金属对鲢状黄姑鱼胚胎和仔鱼的毒性[J]. 台湾海峡, 1999, 18(2):186-191.
- [25] 段彪, 黄文清. 4种重金属离子对淡水石斑胚胎及仔鱼的毒性试验[J]. 南方农业, 2008, 2(7):19-20.
- [26] 何斌, 何利君, 杜军, 等. 4种重金属离子对淡水石斑胚胎及仔鱼急性毒性的研究[J]. 水利渔业, 2006(4):94-95; 106.
- [27] 李志涛. 重金属(铜、锌、锡和汞)对军曹鱼幼鱼的生物毒性研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2009.
- [28] 修瑞琴, 许永香. 铜和锌离子对斑马鱼的联合毒性[J]. 卫生研究, 1996(2):101-102.
- [29] 柳敏海, 陈波, 罗海忠, 等. 五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.
- [30] 柳学周, 徐永江, 兰功刚. 几种重金属离子对半滑舌鳎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.
- [31] 曾晨. 汞、镉、铅、砷对斑马鱼早期胚胎发育的复合毒性效应及标志基因筛选[D]. 北京: 中国环境科学研究院, 2018.
- [32] 陈玉翠, 陈锦云. 重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 对斑马鱼胚胎发育的毒性效应[J]. 南方水产科学, 2016, 12(3):35-42.
- [33] 邢胜男. 斑马鱼胚胎发育毒性试验评价重金属联合生物毒性[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.
- [34] Barbara J, Katarzyna L, Malgorzata W. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2009, 35(4):625-640.
- [35] 穆景利, 王莹, 王新红, 等. 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[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(4):352-360.
- [36] 叶素兰, 余治平. Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 对鳙胚胎和仔鱼的急性致毒效应[J]. 水产科学, 2009, 28(5):263-267.
- [37] 黄伟, 曹亮, 窦硕增. 重金属对鱼类早期发育的生态毒理效应[J]. 水产学报, 2016, 40(8):1272-1288.
- [38] 崔建斌, 孙朝徽, 赵雅贤, 等. Cr^{6+} 对牙鲆仔幼鱼的急性毒性效应研究[J]. 海洋渔业, 2019, 41(1):82-90.

Effects of four heavy metal ions on embryonic development and larval growth of *Oryzias melastigma*

YANG Zhiyan^{1,2}, XUE Yafang^{1,2}, XU Yongjian^{1,2*}

(1.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 2.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: In order to study the toxicity and sensitivity of heavy metals to marine organisms, the model of marine fish (*Oryzias melastigma*) was used in this study. A total of 24 hour acute toxicity was assessed in four representative seawater heavy metal pollutants (Cu、Cd、Pb、Hg), including embryonic development and larval growth of *Oryzias melastigma*. The results showed that the embryonic development stage was very sensitive to the four heavy metal ions, and they all had obvious toxic effects. The lowest 24 hour LC50 values of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Cd^{2+} at the 2 hour embryonic developmental stage of *Oryzias melastigma* were $2.34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Phase I), $0.72 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Phase IV), $22.65 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Phase I), $27.32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Phase I), respectively. The order of embryo development toxicity was $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. The lowest 24 hour LC50 values of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Cd^{2+} to larval stage of *Oryzias melastigma* were $0.018 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (7 days old), $0.48 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (8 days old), $1.87 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (6 days old), $1.86 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 days old), respectively. The order of toxicity to *Oryzias melastigma* larvae was $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$. In summary, the sensitive period of heavy metals to the embryonic and larval development of marine model fish was determined in this experiment. The lowest effective concentration was calculated to provide a reference for further biological monitoring of marine heavy metals.

Key words: *Oryzias melastigma*; embryonic development; larval; embryo; heavy metals; acute toxicity

(责任编辑 章践立)