

四种金属离子对中国对虾无节幼体生长的毒性影响^{*}

刘明星 李国基 张首临 包万友 顾宏堪

(中国科学院海洋研究所)

对虾工厂化育苗在我国沿海已经普及,对虾人工养殖也在沿海地区蓬勃发展,到1992年养殖面积已达200多万亩,人工育苗场全国约有上千个。养殖对虾已成为我国水产业中规模最大、经济效益最高的水产品。但近几年来沿海地区的工业飞速发展,沿岸海水均受到了不同程度的污染,各对虾育苗场卵孵化率普遍下降。今年我国养殖对虾又出现了大面积暴发性死亡,原因是复杂的,但作者认为,治虾病之本应是治水质。众所周知,一切生物的幼体阶段都是最敏感的时期,海水中的金属离子对对虾幼体生长的影响已有报道(吴彰宽等, 1988; Lawrence *et al.*, 1981),但其实验环境、方法及条件各有不同。作者于1992年5月至1993年4月在海阳育苗场作了现场实验,本文根据实验结果分析和研究了Zn、Cd、Pb、Cu金属离子对中国对虾受精卵及无节幼体生物毒性的影响;不同pH值海水加入不同浓度的混合金属离子,对无节幼体生长的毒性影响;不同盐度的海水加入不同浓度的混合金属离子对无节幼体生长毒性的影响。

一、金属离子对中国对虾受精卵孵化的影响

1. 实验材料 海阳育苗场中国对虾(*Penaeus chinensis*)的受精卵。从虾池中取出黎明前产的卵,放入事先加入原池海水的玻璃缸中,从中挑选出发育正常的受精卵供实验用。

2. 实验条件及方法 将已经消毒的实验杯排列编组,每杯注入原池海水200mL,再分别加入不同浓度的Zn、Cd、Pb、Cu金属离子标准。该标准溶液用纯金属(光谱纯级)配制。

空白对照实验杯不加任何试剂,其他实验条件均相同。在上述各杯中分别加入发育正常的受精卵200粒。实验用的海水盐度为32.5, pH为 8.1 ± 0.1 ,海水温度为 $19.6^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。实验中定时通气,不换水,30h后观测记录各实验杯内受精卵的孵化情况。上述实验均在育苗场对虾育苗车间进行。

3. 实验结果 空白实验分双样平行进行,两组均加入卵子200粒,第一组30h孵

^{*} 中国科学院海洋研究所调查研究报告第2315号。

国家自然科学基金资助项目,49176272号。

收稿日期: 1993年12月3日。

出无节幼体 177 尾,孵化率为 88.5%; 第二组 30 h 孵出 174 尾,孵化率为 87.0%,平均为 87.5%。

从实验可看出,中国对虾受精卵在 Zn^{2+} 浓度为 0.165 mg/L 的环境中,有 50% 卵能正常孵出无节幼体;其浓度接近 1 mg/L 时,受精卵基本不能孵化。在 Cd^{2+} 的浓度为 0.072 mg/L 时,有 50% 卵能孵出无节幼体;当浓度接近 0.5 mg/L 时,卵基本不能孵化。 Pb^{2+} 的浓度在 1.88 mg/L 时,受精卵的孵化率为 50%;当浓度超过 3 mg/L 时,卵的孵化率极低,且海水渐渐出现混浊,有微量絮状物出现。而 Cu^{2+} 的浓度达到 0.0065 mg/L 时,有 50% 的受精卵能孵化,当浓度接近 0.3 mg/L 时,其受精卵就基本不能孵化。

表 1 四种金属离子对中国对虾受精卵的孵化影响比较

金属离子	浓度 (mg/L)	实验用卵数(粒)	30h 孵出无节幼体(尾)	孵化率 (%)	说明
Zn^{2+}	0.030	200	151	76	膜内幼体难破膜 肢芽很难形成 卵球变浊白
	0.050	200	148	74	
	0.10	200	130	65	
	0.30	200	40	20	
	0.50	200	22	11	
	1.00	200	0	0	
Cd^{2+}	0.0010	200	154	77	肢芽很难形成 卵球混浊变白
	0.010	200	141	71	
	0.050	200	129	65	
	0.10	200	62	31	
	0.25	200	17	9	
	0.50	200	3	2	
Pb^{2+}	0.0010	200	172	86	有白色絮状物沉淀析出 死卵混浊
	0.010	200	167	84	
	0.10	200	164	82	
	0.20	200	162	81	
	0.50	200	158	79	
	1.00	200	115	58	
	3.00	200	46	23	
	5.00	200	17	9	
Cu^{2+}	0.0025	200	145	73	肢芽难以形成 死卵混浊 死卵变白
	0.0050	200	108	54	
	0.010	200	82	41	
	0.020	200	76	38	
	0.050	200	29	15	
	0.10	200	6	3	
	0.30	200	0	0	
空白对照	1	200	177	88.5	
	2	200	174	87.0	

Zn、Cd、Pb、Cu 四种不同浓度的金属离子对受精卵的孵化影响见表 1。

上述实验结果表明,在正常的海水环境中,四种金属离子对中国对虾受精卵的孵化毒性影响依次为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。

用上述方法将四种金属离子对受精卵孵出的无节幼体 (III—IV 期),再进行生物毒性实验,结果是 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 对无节幼体 24 h 的 LC_{50} (半致死浓度)值分别为 0.178 mg/L, 0.282mg/L, 0.870mg/L 及 2.08 mg/L。这一结果说明无节幼体对金属离子的耐毒性比卵子高,这是由于卵膜很容易被毒物渗透,因而极易使卵细胞中毒。

二、四种金属离子对中国对虾无节幼体生长的毒性影响

1. 实验材料 从育苗池中取出刚孵出的无节幼体,放入装有原池海水的大实验杯中,进行通气暂养。

2. 实验条件及方法 将消毒的 200 mL 玻璃实验杯排列编组,各杯内注入原池海水,挑出健壮的王节幼体 (III—IV 期)放入杯中。各杯内按要加入不同浓度的 Zn、Cd、Pb、Cu 金属离子标准。每天换一次相同金属浓度的新海水,每杯更换 1/2。换水后各杯金属离子的浓度标定用极谱分析法(顾宏堪等,1980)。实验时通入小气流,定时少量投喂单胞藻。实验海水盐度为 30.3 ± 0.5 , pH 为 8.10—8.18,海水温度为 $20.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

空白对照实验:取双样作空白实验,每杯加入无节幼体数与各实验杯相同,杯中不加任何金属标准,其他所有实验条件均相同。各实验系列同步进行。

各实验杯放入无节幼体 40 尾,各组实验均为双样平行实验。上述实验均在育苗车间现场进行。作金属离子对无节幼体毒性实验,各实验杯分别加入的不同金属离子的浓度见表 2。

表 2 四种金属离子实验用液的浓度

浓度 (mg/L) / 金属	编号	实 验 杯					
		1	2	3	4	5	6
Zn^{2+} 实验组		0.030	0.050	0.10	0.50	1.00	1.50
Cd^{2+} 实验组		0.010	0.050	0.10	0.50	1.00	1.50
Pb^{2+} 实验组		0.010	0.050	0.10	0.50	1.00	3.00
Cu^{2+} 实验组		0.0050	0.010	0.050	0.10	0.50	1.00

3. 实验结果 毒性实验结果以半致死浓度 LC_{50} 表示,即用概率单位法(国家海洋局,1991)以半对数作图计算。 LC_{50} 的 95% 可信限用下列公式计算:

$$\lg LC_{50} \pm 1.96 \times \frac{2S}{\sqrt{2N}}$$

空白对照实验结果取两组平行实验平均值,24 h 死亡率为 0, 48 h 死亡率为 2.5%, 72 h 为 3.7%, 96 h 为 6.2%。

四种不同浓度的金属离子对无节幼体生长的毒性影响见图 1—4。

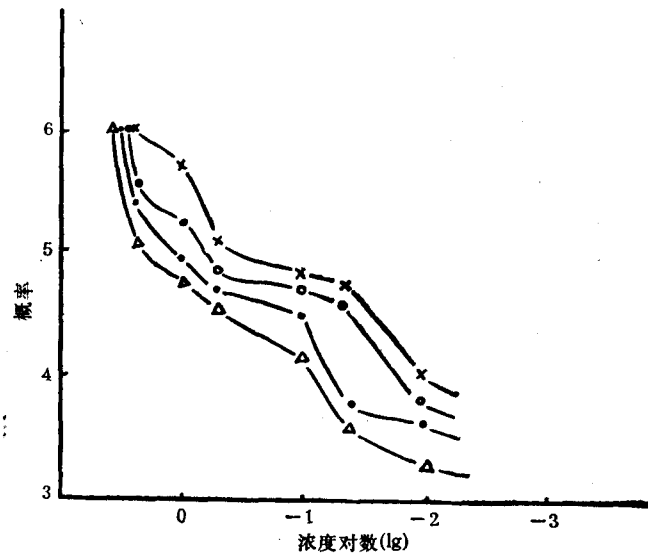


图1 Cu^{2+} 对中国对虾无节幼体的生长影响曲线
 Δ 24h, $\bullet$ 48h, $\circ$ 72h, $\times$ 96h (下同)

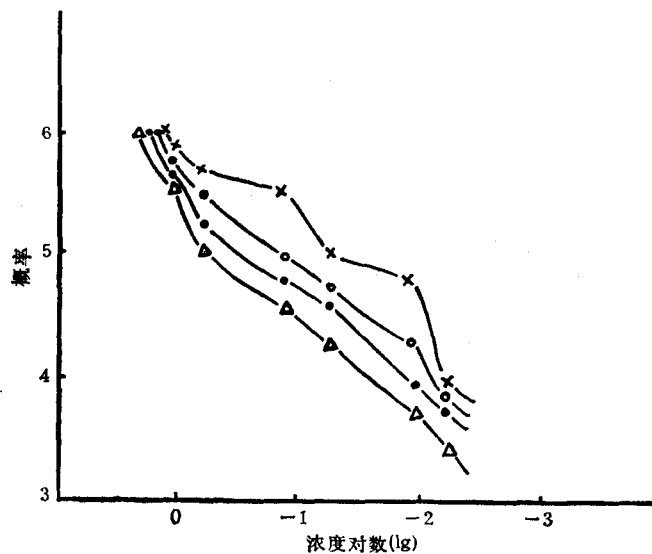


图2 Cd^{2+} 对中国对虾无节幼体的生长影响曲线

由图可看出,金属离子的浓度越大,对生物生长的毒性愈大,无节幼体的死亡率也就愈高。

四种金属离子对中国对虾无节幼体的生物毒性实验结果见表3。

生物毒性实验(周永欣等,1983)普遍认为进行四天为一周期, Zn 、 Cd 、 Pb 、 Cu 金属离子对中国对虾无节幼体 96 h 的 LC_{50} 值分别为 0.048 mg/L, 0.033 mg/L, 0.173 mg/L 及 0.018 mg/L。四种金属离子对中国对虾无节幼体毒性顺序是 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$

目前比较普遍采用的生物生长安全浓度公式为 $96h LC_{50} \times 0.1$ 。

四种金属离子对中国对虾无节幼体的安全浓度及国家海水水质标准(国务院环保组, 1982)的对照见表 4。

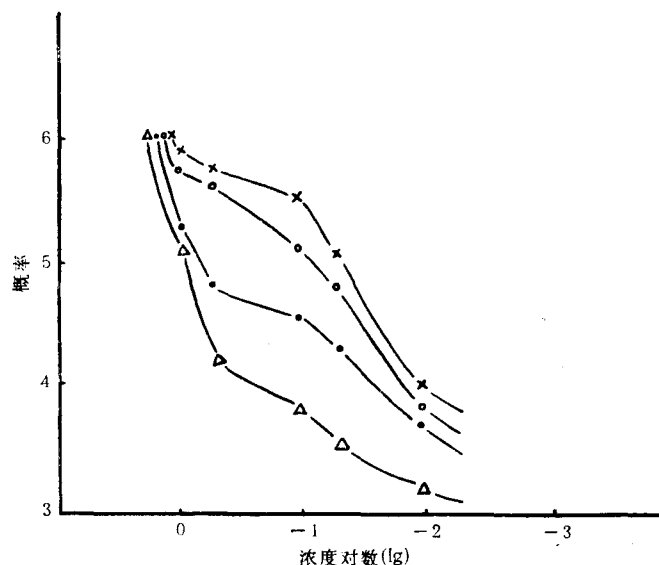


图 3 Zn^{2+} 对中国对虾无节幼体的生长影响曲线

表 3 金属离子对中国对虾无节幼体 (III—IV) 的毒性实验结果

金属离子 半致死浓度(mg/L)		Zn^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}	Cu^{2+}
实验 时间 (h)					
24	LC_{50}	0.870	0.282	2.08	0.178
	95% 可置信限	0.579—1.31	0.192—0.412	1.45—3.02	0.120—0.263
48	LC_{50}	0.645	0.141	0.933	0.085
	95%可置信限	0.416—1.00	0.089—0.224	0.724—1.20	0.052—0.138
72	LC_{50}	0.087	0.079	0.630	0.052
	95% 可置信限	0.057—0.132	0.055—0.138	0.380—1.05	0.033—0.083
96	LC_{50}	0.048	0.033	0.174	0.018
	95%可置信限	0.033—0.068	0.020—0.054	0.105—0.298	0.012—0.027

实验结果表明, 对照国家规定的一类海水水质标准, Cu 的浓度已超出本实验 对虾无节幼体安全生长浓度的 5.6 倍, Cd 已超出 1.5 倍, Zn 浓度超出 21 倍, Pb 超出约 3 倍。

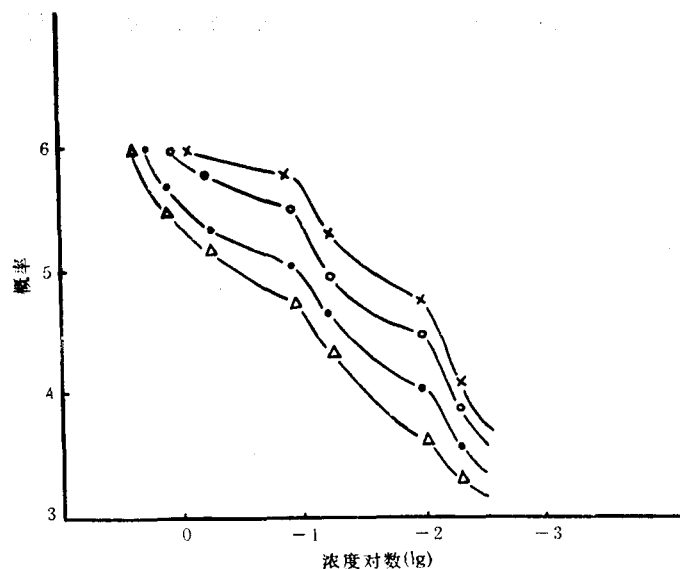
图4 Pb^{2+} 对中国对虾无节幼体的生长影响曲线

表4 四种金属离子对中国对虾无节幼体生长的安全浓度

金属名称	安全浓度 (mg/L)	国家海水水质标准 (mg/L)
Cu^{2+}	0.0018	0.010
Cd^{2+}	0.0033	0.0050
Zn^{2+}	0.0048	0.100
Pb^{2+}	0.0174	0.050

三、不同 pH 值海水加入不同浓度混合金属离子对对虾无节幼体生长的毒性影响

1. 实验材料 实验材料取自对虾人工育苗场, 采用中国对虾受精卵孵化的无节幼体。在消毒的玻璃实验杯中注入原池海水, 选一批健壮的王节幼体放入, 通气暂养备实验用。

2. 实验条件及方法 将已消毒的实验杯排列编组, 注入 100 mL 原池海水, 按实验要求分别在各杯中加入不同浓度的 Zn, Cd, Pb, Cu 金属标准 (表 5)。实验分四个 pH 值系列进行, 即 pH 值为 7.5, 8.0, 8.5 及 9.0。每组 pH 实验系列都作空白对照, 作空白对照的实验杯只加原池海水, 调准 pH 值, 不加任何试剂标准。原池海水盐度为 30.2, 水温为 $20 \pm 0.5^\circ C$ 。在各个实验杯中加入 40 尾健壮的无节幼体, 实验开始即通气, 并适当投喂少量三角褐指藻, 上述实验均在育苗场现场进行。

3. 实验结果 在 pH 值不同的海水中, 对虾无节幼体在各种不同混合金属离子浓

表5 pH 值相同的实验系列(盐度相同)加入不同的混合金属离子浓度

加入浓度 (mg/L) 金属离子	实验杯 编号	0	1	2	3	4	5	6
Zn^{2+}		0	0.0250	0.050	0.10	0.25	0.50	1.00
Cd^{2+}		0	0.00050	0.0010	0.0020	0.0050	0.010	0.020
Pb^{2+}		0	0.0010	0.0017	0.0033	0.0066	0.0165	0.033
Cu^{2+}		0	0.0035	0.0070	0.014	0.035	0.070	0.140

注: 表中 0 号杯为空白, 不加任何金属标准。

1 号杯加入的 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 标准, 各约为天然海水本底值的 5 倍; 2 号杯加入的上述标准约为海水本底值的 10 倍; 3 号杯加入的上述金属标准约为海水本底值的 20 倍; 4 号杯加入的上述金属标准约为海水本底值的 50 倍; 5 号杯加入的上述金属标准约为海水本底值的 100 倍; 6 号杯加入的上述金属标准约为海水本底值的 200 倍; 另外, 1—6 号杯加入 Pb^{2+} 标准浓度, 分别约为海水本底值的 30, 50, 100, 200, 500, 1000 倍。

表6 pH 值不同的海水(盐度相同)加入不同浓度混合金属对无节幼体毒性的影响

海水 pH 值	加入幼 体数 (尾)	成活数 (尾) 观测时间(h)	实验 杯号	实验杯号(与表 5 编号相一致)						
				0	1	2	3	4	5	6
7.5	40	12		34	32	30	19	11	4	0
		24		28	25	17	8	0		
		36		25	22	15	4			
		48		10	6	2	0			
		72		8	4	0				
		96		4	1					
8.0	40	12		38	34	29	26	11	5	0
		24		36	32	26	11	3	0	
		36		36	31	24	9	1		
		48		35	28	22	8	0		
		72		34	27	19	2			
		96		33	25	14	0			
8.5	40	12		38	30	25	20	9	5	1
		24		35	27	23	10	2	0	
		36		32	22	18	6	0		
		48		27	20	11	3			
		72		26	18	4	0			
		96		25	17	3				
9.0	40	12		30	22	9	0			
		24		19	13	0				
		36		17	6	0				
		48		13	5	0				
		72		10	2	0				
		96		6	0					

度的影响下,其生长情况见表 6。

实验表明,从 pH 值为 7.5 的实验组中可看出,海水的 pH 值偏低对无节幼体生长不利,加入的 Cu、Cd、Zn 金属离子为海水本底的 5 倍以上及 30 倍的 Pb 离子时,就会加速无节幼体的死亡。当 Cu、Cd、Zn 为海水本底 50 倍及 Pb 离子达到 200 倍时,无节幼体不能生存。海水 pH 值为 8.0 的实验组,当加入的 Cu、Cd、Zn 离子为海水本底的 20 倍, Pb 达到 100 倍时,幼体 24 h 成活率仅为 27.5%,而 96 h 时全部死亡。海水 pH 值为 8.5 的实验组,当 Cu、Cd、Zn 离子加到海水本底的 20 倍时,24 h 幼体成活率为 25%,96 h 全部死亡。海水 pH 值为 9.0 的实验组,当 Cu、Cd、Zn 离子加到海水本底的 20 倍时,24 h 无节幼体全部死亡,说明在这个 pH 值的海水环境中对无节幼体生长不利。

四、不同盐度的海水加入不同浓度的混合金属离子对 对虾无节幼体生长的毒性影响

1. 实验材料 取中国对虾健壮的无节幼体放入大实验杯内暂养,4 h 后再从中择优者供实验用。

2. 实验条件及方法 将消毒的实验杯排列编组,根据原池海水之盐度计算,配成四个不同盐度的海水系列,为 10,20,30,40。在每组盐度相同的海水中分别加入不同浓度的混合金属(Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+})标准。空白对照实验不加任何试剂。每杯加入 40 尾无节幼体,定时通气,各杯投喂少量三角褐指藻。实验海水 pH 值为 8.0—8.2,海水温度为 19—20℃。全部实验均在育苗车间进行。

各个不同盐度系列的海水样品中,实验杯中所加入的不同浓度混合金属离子标准与表 5 中各号实验杯所加各离子浓度相一致。

3. 实验结果 在不同盐度的海水加入不同浓度的混合金属离子标准对无节幼体生长的毒性影响见表 7。

实验结果指出,在盐度为 10 的海水实验系列中(从空白到含有各个不同金属浓度实验杯)无节幼体的活力极差,游动很慢,12 h 全死。其主要原因是盐度太低,从高盐到低盐幼体不适宜。盐度为 20 的海水系列中幼体能游动,但动作缓慢,而且大都沉于杯底,该组空白实验,24 h 成活率为 50%,96 h 成活率为 25%。1 号杯 24 h 成活率为 17.5%,2 号杯 24 h 成活率为 7.5%,96 h 即全死。说明该实验组除了盐度偏低的影响外,加入了海水本底 5 至 10 倍的四种混合金属离子也产生了毒性作用。盐度为 30 的海水实验系列,幼体活动敏捷,且大都在表面向光游动。空白实验 24 h 成活率为 90%,96 h 成活率为 75%。1 号杯 24 h 成活为 80%,96 h 为 62.5%。2 号杯 24 h 成活率为 67.5%,96 h 为 55%。当加入的 Cu、Cd、Zn 混合离子浓度达到海水本底的 5—10 倍,加 Pb 达到 30 倍时,96 h 幼体成活率为 55%。当前 3 种离子达到海水本底 20 倍,加入的 Pb 离子达到 100 倍时,96 h 幼体成活率为 0。海水盐度为 40 的实验组,幼体加入后浮在表层慢动,几小时后沉于杯底,且游动缓慢。该组空白对照实验,24 h 成活率为 55%,72 h 成活率为 0。实验表明,高盐对无节幼体生长不利,海水盐度为 40,无节幼体 72 h 全

死。加入海水本底 5 倍量的混合金属离子, 24 h 成活率只有 50%, 而 48 h 即全死。

表 7 不同盐度海水 (pH 值相同) 中加入不同的浓度金属离子对无节幼体毒性影响

海水盐度	加入幼体数(尾)	成活数 (尾) 观测时间(h)	实验杯号	实验杯号(与表 5 的编号相一致)						
				0	1	2	3	4	5	6
10	40	6		6	0					
		12		0						
20	40	12		29	12	9	2	0		
		24		20	7	3	1	0		
		36		18	6	0				
		48		15	3	0				
		96		10	0					
30	40	12		38	35	28	25	7	0	
		24		36	32	27	24	3	0	
		36		35	28	26	21	3	0	
		48		35	27	24	18	2		
		96		30	25	22	16	0		
40	40	12		28	22	18	3	0		
		24		22	20	12	0			
		36		16	9	0				
		48		5	0					
		72		0						

五、讨 论

1. 在正常的海水环境中, 加入四种金属离子后, 对中国对虾受精卵的毒性影响依次为: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。对虾无节幼体对上述金属离子的耐毒性较受精卵高。

2. 单一金属离子对中国对虾无节幼体的毒性影响随金属离子浓度的增加对生物的毒性影响愈大。四种金属离子对无节幼体生长的安全浓度应为 Cu^{2+} , 0.0018mg/L; Cd^{2+} , 0.00033mg/L; Zn^{2+} , 0.0048mg/L; Pb^{2+} , 0.174mg/L。

3. 海水的 pH 值过低对无节幼体生长不利。pH 为 7.5 时, 加入海水本底 5 倍以上的混合金属离子, 由于金属共存有协同效应 (Khangarot, 1981), 会加速无节幼体死亡。但 pH 值过高(9)时, 同样不利于幼体成活, 加入海水本底 5 倍以上的 Cu、Cd、Zn 混合离子及 30 倍 Pb 离子, 96 h 内无节幼体死亡率为 100%。

4. 低盐 (10) 的海水中加入本底 5 倍的混合金属离子, 对虾无节幼体在 12 h 内即全部死亡。而盐度为 30 时, 加入的 Cu、Cd、Zn 离子为本底的 5—10 倍, 加 Pb 离子 30 倍时, 96 h 无节幼体成活率为 55%。当前三种金属离子达到海水本底约 50 倍时, 96 h 无节幼体全部死亡。

参 考 文 献

- 吴彰宽等, 1988, 二十三种有害物质对对虾急性致毒试验, 海洋科学, 4: 36—40。
国务院环保组, 1982, 中华人民共和国海水水质标准, 技术标准出版社, 4。
国家海洋局, 1991, 海洋监测规范, 海洋出版社, 779。
周永欣等, 1983, 水生生物与环境保护, 科学出版社, 110。
顾宏堪, 刘明星, 包万友, 1980, 电极防吸附膜研究, 化学学报, 38(4): 381—386。
Khangarot, B. S., 1981, Effect of Zinc, Copper and Mercury on channa marulius (Hamilton), *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 9(6):639—649。
Lawrence, A. L., J. Fox and F. L. Jr. Castille, 1981, Decreased toxicity of copper and manganese ions to shrimp nauplii (*Penaeus stylirostris* Stimpson) in the Presence of EDTA, *J. World Maricul. Soc.*, 12:271—280。

INFLUENCE OF TOXICITY OF METAL IONS ON SURVIVAL OF LARVAL OF *PENAEUS ORIENTALIS**

Liu Mingxing, Li Guoji, Zhang Shoulin, Bao Wanyou and Gu Hongkan
(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT

This paper summarizes the influence of toxicity of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} on eggs hatching and survival of nauplius of *Penaeus orientalis* from the Haiyang Hatchery under different pH and salinity

The 50% egg hatchability concentrations were 0.165mg/L for Zn^{2+} , 0.072mg/L for Cd^{2+} , 1.88mg/L for Pb^{2+} and 0.0065mg/L for Cu^{2+} .

The LC_{50} 96h (Median Lethal Tolerance Limit) of the four heavy metal ions for nauplius of *Penaeus orientalis* tested 0.048mg/L for Zn^{2+} , 0.033mg/L for Cd^{2+} , 0.174mg/L for Pb^{2+} and 0.018mg/L for Cu^{2+} .

The results showed the toxic order of these metals to be $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ for the hatching of eggs and the survival of nauplius.

* Contribution No. 2315 from Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.