

日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 胚胎和卵黄期仔鱼对镉的敏感性

刘腾腾, 董晓晓, 苗明升, 付荣恕*

山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

摘要: 物理化学方法对镉的监测忽略了其生物可利用性, 生物监测可以有效地弥补这种不足。本研究测试了日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 胚胎和卵黄期仔鱼对镉的敏感性。结果表明: 日本青鳉胚胎和卵黄期仔鱼的蛋白含量对镉表现出较高的敏感性, 卵黄期仔鱼的蛋白含量在 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镉暴露后就出现显著降低; 氯化镉对卵黄期仔鱼脊柱畸形的 EC_{50} 低于国家地表水环境质量标准规定的 II 类水标准; 脊柱畸形率与镉浓度之间存在的线性关系, 可为定量监测镉污染提供理论依据; 脊柱畸形可以在 48 h 之内被 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镉极显著地诱导, 因此这种潜在的生物监测模型很有希望应用到水环境污染的快速预警中。通过对国内主要水体中镉污染水平的分析发现, 卵黄期仔鱼的蛋白含量变化和脊柱畸形率对部分水体的镉污染可以实现生物监测。因此, 利用日本青鳉胚胎和卵黄期仔鱼对低水平镉污染的高度敏感性, 能够建立起 1 种简易廉价并且有效的水环境中低水平镉污染的生物监测模型。

关键词: 生物监测; 急性毒性; 日本青鳉; 镉

文章编号: 1673-5897(2012)2-177-05 中图分类号: X835 文献标识码: A

Sensitivity of Embryo and Yolk-sac Fry of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) to Cadmium

Liu Tengting, Dong Xiaoxiao, Miao Mingsheng, Fu Rongshu*

College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Received 11 November 2011 accepted 19 December 2011

Abstract: The bioavailability of cadmium was ignored in monitoring cadmium using physical and chemical method, however, biological monitoring is able to effectively make up for this disadvantage. The sensitivity of the early life stage of Japanese medaka to cadmium was determined in this study. Results exhibited that the protein content of embryo and yolk-sac fry were highly sensitive to cadmium. After exposed to $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium, the content of protein significantly decreased, indicating that sensitivity of yolk-sac fry was high. EC_{50} value of spinal deformity of yolk-sac fry for cadmium was less than the upper value of cadmium in II value of the water quality standard GB3838-2002. A linear relationship between the ratio of spinal deformity and cadmium concentration can be used to quantitatively monitor cadmium. Furthermore, spinal deformity could be significantly induced by $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium in 48 h, which make yolk-sac fry promising to be used in fast response to cadmium in water. Both changes of protein content and ratio of spinal deformity of yolk-sac fry could be used to monitor cadmium concentration in several main waters in China. Therefore, the embryo and yolk-sac fry could act as the sensitivity models for biological monitoring low level cadmium pollution.

Keywords: biological monitoring; acute toxicity; Japanese medaka; cadmium

收稿日期: 2011-11-11 录用日期: 2011-12-19

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07209-006)

作者简介: 刘腾腾 (1984-) 男, 硕士, 研究方向: 水生态毒理学; E-mail: china_liuteng@hotmail.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: furshu@hotmail.com

重金属在环境中以多种化学形态存在,其中的很多形态,如与天然配体形成的络合物、在胶体表面吸附等会显著影响重金属的生物可利用性^[1],因此利用物理和化学的方法获得的水体重金属总量不能真实反映重金属的实际生态和环境效应。生物监测的结果来源于有机体与重金属之间的直接作用,可以真实反映环境污染物的生态效应和生物毒性。

生物正在暴露于更加低水平的环境污染物中^[2]。这些污染物如重金属,一般处于生物的亚致死水平,不易看到显著的生物毒性效应。在环境重金属污染水平相对较低的背景下,选择敏感的生物指示物是进行生物监测的前提。虽然相对敏感的分子标记物,如金属硫蛋白(metallothioneins)可以很好地反映水体的重金属污染水平,但是由于一般需要复杂的检测手段和先进的仪器设备,因此不易实现广泛的实际应用。

大量重金属生态风险评价结果表明,水体中的镉浓度普遍存在较高的潜在生态风险^[3-5]。镉是典型的遗传毒物,其在基因水平上的损伤会在蛋白质水平上表现出来。因此通过生物在蛋白水平的变化来间接地评价镉的遗传毒性具有生物学基础。

鱼类早期生命阶段对污染物的敏感性比幼鱼或成鱼更高^[6-8]。为了利用鱼类早期生命阶段的敏感性,建立敏感易行的生物监测模型,本文利用日本青鳉的胚胎和卵黄期仔鱼为实验生物,探讨具有较高生态风险的暴露污染物镉对它们的急性毒性。

1 材料与方法(Material and methods)

1.1 配制实验液

将 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,国药集团) 用去离子水溶解配制成 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (按镉离子计算) 贮存液,室温保存。根据实验要求,用去离子水稀释至所需浓度,并调节 $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$, 得到实验液。

1.2 胚胎急性毒性

配制以下浓度梯度的暴露液: 0、50、100、150、200 和 $250\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 90 mm 加盖培养皿为暴露容器,暴露液体积为 50 mL。鱼卵受精 50 h 后,挑选发育正常的个体用去离子水漂洗。为了保证所有胚胎同时开始暴露,先在每个相应浓度的暴露液中放置大约 80 枚卵,再从中随机选出 20 枚分散到每个平行组中。每个浓度组设 3 个平行,恒温 25°C ,每日光照 16 h。每 24 h 记录 1 次胚胎死亡情况,将死亡胚胎去除,同时更新暴露液。暴露 96 h 后测定胚胎的总蛋白含量。

1.3 卵黄期仔鱼急性毒性

配制以下浓度梯度的暴露液: 0、1、2、4、8 和 $16\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 100 mL 烧杯为暴露容器,暴露液体积为 60 mL。选择孵化出膜 1 d 以内的仔鱼随机分配到暴露液中。每个浓度组设 3 个平行,每个平行放 10 尾仔鱼。恒温 25°C ,每日光照 16 h。每 24 h 检查 1 次,去除死亡的仔鱼。96 h 后测定仔鱼总蛋白含量。

再进行同样的实验设置,每 24 h 记录 1 次脊柱畸形仔鱼的数目。

1.4 指标测试方法

胚胎和卵黄期仔鱼蛋白含量的测定采用南京建成生物工程研究所的考马斯亮蓝试剂盒。

1.5 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,对胚胎和卵黄期仔鱼的总蛋白含量和脊柱畸形率的变化情况进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Tukey 检验;利用机值分析计算脊柱畸形率的 96 h- EC_{50} ,并用 MS Excel 软件绘图(在以下各图中,*、** 分别表示:与对照组相比, $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

2 实验结果(Results)

2.1 胚胎蛋白含量

96 h 暴露后所有浓度组均没有出现死亡现象。胚胎蛋白含量随浓度的升高有下降趋势(图 1)。胚胎蛋白含量变化与暴露浓度有极显著的浓度-效应关系(ANOVA: $F = 10.225$, $p = 0.001 < 0.01$)。低浓度氯化镉不能显著诱导蛋白含量的变化, $150\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上浓度组可以显著降低胚胎蛋白含量(ANOVA: Tukey

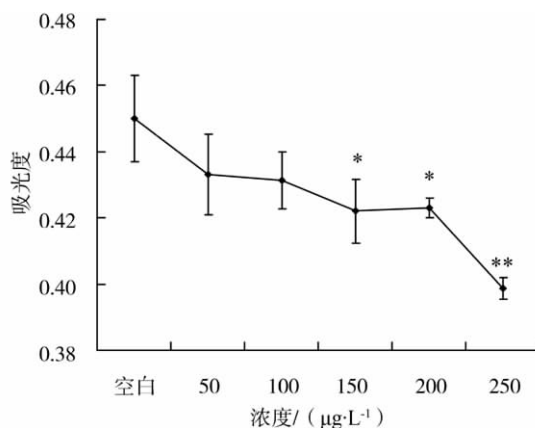


图1 96 h 氯化镉暴露后胚胎蛋白含量随浓度的变化
Fig. 1 Protein content of embryos after 96 h exposure to cadmium with different concentrations

检验 处理浓度 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p = 0.274 > 0.05$; 处理浓度 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p = 0.198 > 0.05$; 处理浓度 $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p = 0.026 < 0.05$; 处理浓度 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p = 0.032 < 0.05$; 处理浓度 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p < 0.01$ 。

2.2 仔鱼蛋白含量

除最高浓度组出现 1 尾死亡仔鱼外,其他浓度组均未出现死亡。卵黄期仔鱼的蛋白含量变化趋势与胚胎大致相同(图 2)。与对照组比较 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镉即可以显著降低仔鱼的蛋白含量,高浓度组仔鱼蛋白含量发生了极显著的降低(ANOVA: $F = 94.346$, $p = 0.000 < 0.01$; Tukey 检验,处理浓度 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p = 0.049 < 0.05$; 处理浓度 $8, 16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p < 0.01$)。

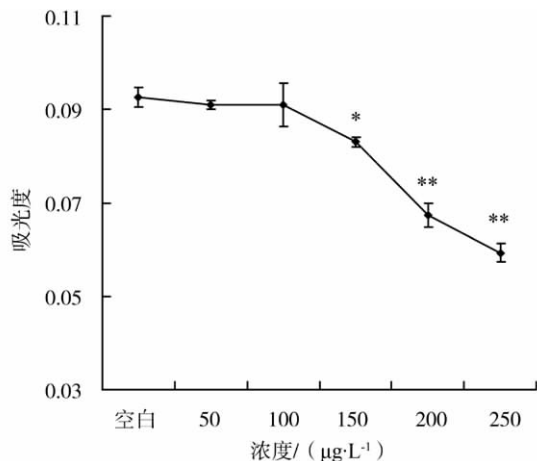


图 2 96 h 氯化镉暴露后卵黄期仔鱼蛋白含量随浓度的变化

Fig. 2 Protein content of yolk-sac larvae after 96 h exposure to cadmium with different concentrations

2.3 仔鱼脊柱畸形率

除 $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有 1 尾仔鱼死亡外,其他浓度组和对照组均没有出现死亡现象。如图 3 所示,与对照组比较,脊柱畸形可以极显著地被极低浓度($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的氯化镉诱导,并且随浓度的增加畸形率有增加的趋势(ANOVA: Tukey 检验,处理浓度 $4 \sim 16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $p = 0.000 < 0.01$)。利用 SPSS 的机值分析得到氯化镉对脊柱畸形的 $\text{EC}_{50} = 3.58 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 95% 置信区间为 $(1.86 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}, 7.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ 。SPSS 对脊柱畸形率与浓度之间的线性拟合结果为: $y = 6.276x + 11.458$, $R^2 = 0.834$, $F = 20.11$, $p = 0.011 < 0.05$ 。卵黄期仔鱼脊柱畸形率与氯化镉浓度之间呈一定的线性关系。

图 4 表明 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镉可以在 48 h 时极显著地诱导脊柱畸形(ANOVA: Tukey 检验, $p = 0.000 <$

0.01) 并且脊柱畸形率与暴露时间存在显著的时间-效应关系(ANOVA: $F = 79.417$, $p = 0.000 < 0.01$)。

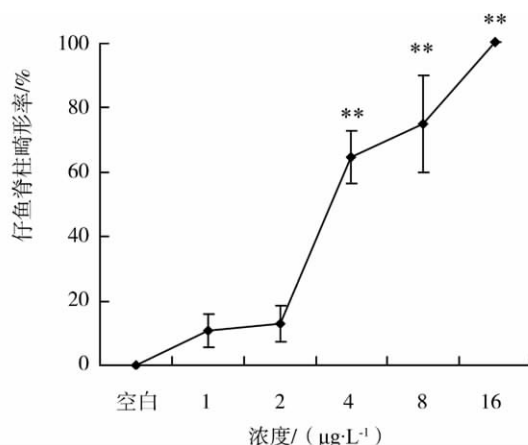


图 3 96 h 暴露后卵黄期仔鱼脊柱畸形率随浓度的变化

Fig. 3 Ratio of spine deformity in yolk-sac fry after the 96 h exposure to different concentrations of cadmium

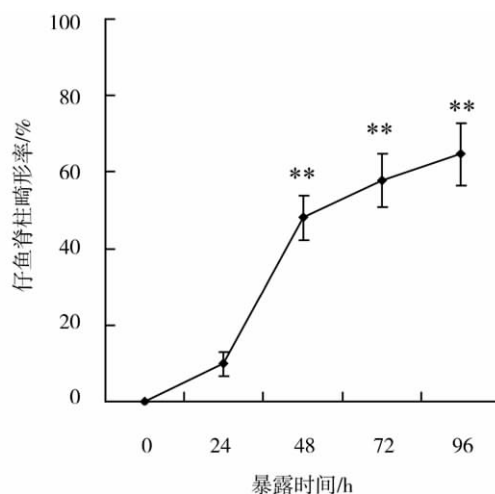


图 4 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组脊柱畸形率随暴露时间的变化

Fig. 4 Ratio of spine deformity of yolk-sac fry exposed to $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ cadmium

3 讨论 (Discussion)

镉在很多水体中表现出较高的生态风险^[4,9-10]。这些风险评价大多建立在利用物理化学方法获得的镉总量的基础上,在一定程度上忽略了环境中镉的化学形态对其生物可利用性的影响。利用生物监测可以有效地避免这个问题。

笔者查阅了近期文献中报道的我国水体重金属污染物情况,结合国家地表水环境质量标准,分析得出我国主要水体中镉的环境浓度相对较低,除个别

水体中镉浓度超过国家 V 类水质标准 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ,基本都在 II 类水质标准 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 以上(表 1)。但是镉浓度超标的水体大多集中在工业集中和人口稠密的生活区,这势必对人们的生产生活造成潜在的威胁。矿区水体是镉污染最严重的区域。有报道表明大宝山铜铁矿区的镉富集浓度达到地表水质环境质量 III 类标准的 10 000 倍^[9]。

日本青鳉的早期生命阶段对氯化镉表现出很高的敏感性。亚致死水平的氯化镉对幼年鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 急性和慢性暴露均没有显著改变器官总蛋白质的含量^[17],但在本研究中,胚胎和卵黄期仔鱼的总蛋白含量在较低浓度的镉溶液中就显著减少。尤其卵黄期仔鱼蛋白含量的变化最为敏感, $4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化镉即可以显著降低仔鱼的蛋白含量,这个浓度已经低于国家地表水环境质量的 II 标准 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。这可能与胚胎和卵黄期仔鱼处于发育的早期阶段,具有很高的代谢速率有关。卵黄期仔鱼的脊柱畸形率也对氯化镉表现出很高的敏感性。氯化镉对仔鱼脊柱畸形的半数抑制浓度 96 h- EC_{50} 低于 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。脊柱畸形率与镉浓度存在一定的线性关系 ($R^2 = 0.862$),这为利用脊柱畸形率定量监测镉污染提供了必要的理论依据。脊柱畸形可以在很短的时间内被低浓度的镉诱导,这说明这种潜在的生物监测模型具有一定程度的快速预警能力。

受人类活动的影响,我国部分水体中的镉污染水平较高。由于卵膜对胚胎的保护作用, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上浓度的镉才能显著诱导胚胎蛋白含量的变化^[18],因此在污染极其严重的地区如矿区,胚胎蛋白

含量的变化可以作为生物监测模型使用。在我国,镉污染水平在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (GB3838-2002 V 类水标准) 的水体仍然占有一定的比例,如湘江干流和双台子河河口(表 1)。氯化镉对卵黄期仔鱼蛋白含量变化和脊柱畸形的显著效应浓度均在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下。卵黄期仔鱼蛋白含量变化和脊柱畸形率对该水平的环境镉污染具有一定的监测能力。

综上所述,利用日本青鳉胚胎和卵黄期仔鱼对低水平镉污染的高度敏感性,能够建立起 1 种简易廉价并且有效的水环境低水平镉污染的生物监测模型。另外,本研究中的实验用水为去离子水,与环境水介质的复杂性有明显不同。环境中的污染物不仅趋向于低水平,而且正在由单一污染向联合污染转变。要实现日本青鳉胚胎和卵黄期仔鱼生物监测模型对镉污染监测的实际应用,还需要进一步研究镉与其他重金属联合作用的生物毒性效应,以及有机污染对镉毒性的影响。

致谢:感谢山东师范大学生命科学学院付秀娥同学的帮助与支持。

通讯作者简介:付荣恕(1956—),男,博士,教授,主要研究方向为退化生态系统修复和动物生态学,发表学术论文 30 余篇。

参考文献:

- [1] 罗小三,周东美,李连祯,等. 水、沉积物和土壤中重金属生物有效性/毒性的生物配体模型研究进展[J]. 土壤学报, 2008, 45(3): 535-543
- [2] Luo X S, Zhou D M, Li L Z, et al. Prediction of bioavailability and toxicity of heavy metals in water, sediment and soil environments using biotic ligand model [J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(3): 535-543 (in Chinese)
- [3] Eggen R I L, Behra R, Burkhardt-Holm P, et al. Peer reviewed: Challenges in ecotoxicology [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(3): 58A-64A
- [4] 陆继龙,郝立波,赵玉岩,等. 第二松花江中下游水体重金属特征及潜在生态风险[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(5): 168-172
- [5] Lu J L, Hao L B, Zhao Y Y, et al. Contents and potential ecological risk of heavy metals in middle and lower reaches of second Songhua River [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(5): 168-172 (in Chinese)
- [6] 孙书涵,王冬艳,胡克,等. 双台子河口区水中重金属污染评价及其生态效应分析[J]. 世界地质, 2007, 26(1): 75-79

表 1 镉在主要水体中的环境浓度

Table 1 Environmental concentrations of cadmium in several main waters of China

主要水体	水质级别	镉/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	文献
巢湖河口	I~II	ND~1.19	[10]
三峡香溪河	I	0.029~0.128	[11]
北京市饮用水源	I	0.34~0.82	[12]
第二松花江	I	0.04~0.13	[3]
黄浦江干流	I	0.08~0.47	[13]
双台子河口区	I~V	0.4~16.6	[4]
湘江干流	I~V	0~9	[14]
长江铜陵段	I	0.19~0.21	[15]
黄河内蒙古段	I	0.060~0.430	[16]
沈阳地区河水	I	0.01~0.66	[5]

^a ND, 未检出。

- Sun S H , Wang D Y , Hu K , et al . , Evaluation on pollution of heavy metal in the water and its analysis of ecological effect in Shuangtaizi estuary district [J]. *Global Geology* , 2007 , 26(1) : 75 - 79 (in Chinese)
- [5] 吴学丽, 杨永亮, 汤奇峰, 等. 沈阳河水、地下水及沉积物中重金属的生态风险评价及来源辨析[J]. *生态学杂志* , 2011 , 30(3) : 438 - 447
- Wu X L , Yang Y L , Tang Q F , et al . Ecological risk assessment and source analysis of heavymetals in river waters , groundwater along river banks , and river sediments in Shenyang [J]. *China Journal of Ecology* , 2011 , 30(3) : 438 - 447 (in Chinese)
- [6] Witeska M G , Jezierska B , Chaber J. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae [J]. *Aquaculture* , 1995 , 129(1-4) : 129 - 132
- [7] Stasiūnaitė P. Long-term heavy metal mixture toxicity to embryos and levins of rainbow trout (*Orhynchus mykiss*) [J]. *Acta Zoologica Lituanica. Hydrobiologia* , 1999 , 9(2) : 40 - 46
- [8] Scholz S , Fischer S , Gündel U , et al . The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—Applications beyond acute toxicity testing [J]. *Environmental Science and Pollution Research* , 2008 , 15(5) : 394 - 404
- [9] 杨振, 胡明安. 大宝山采矿活动对环境的重金属污染调查[J]. *环境监测管理与技术* , 2006 , 18(6) : 21 - 24
- Yang Z , Hu M A. Environment investigation of heavy metal pollution from mining in Dabaoshan [J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring* , 2006 , 18(6) : 21 - 24 (in Chinese)
- [10] 李国莲, 刘桂建, 姜萌萌, 等. 巢湖表层沉积物与上覆水体中重金属分配特征及其相关性研究[J]. *中国科学技术大学学报* , 2011 , 41(1) : 9 - 15
- Li G L , Liu G J , Jiang M M , et al . , Partition characteristics and correlation of heacy metal between sediment and surface water from Chaohu Lake [J]. *Journal of University of Science and Technology of China* , 2011 , 41(1) : 9 - 15 (in Chinese)
- [11] 张晓华, 肖邦定, 陈珠金, 等. 三峡库区香溪河中重金属元素的分布特征[J]. *长江流域资源与环境* , 2002 , 11(3) : 269 - 273
- Zhang X H , Xiao B D , Chen Z J , et al . Characteristics of the distribution of Cu , Pb , Cd , Cr , Zn in Xiangxi River [J]. *Resoures and Environment in the Yangtze Basin* , 2002 , 11(3) : 269 - 273 (in Chinese)
- [12] 高继军, 张力平, 黄圣彪, 等. 北京市饮用水源水重金属污染物健康风险的初步评价[J]. *环境科学* , 2004 , 25(2) : 47 - 50
- Gao J J , Zhang L P , Huang S B , et al . Preliminary health risk assessment of heavy metals in drinking waters in Beijing [J]. *Environmental Science* , 2004 , 25(2) : 47 - 50 (in Chinese)
- [13] 程晨, 陈振楼, 毕春娟, 等. 上海市黄浦江水源地重金属铅、镉多介质富集特征分析[J]. *长江流域资源与环境* , 2009 , 18(10) : 948 - 953
- Cheng C , Chen Z L , Bi C J , et al . , Accumulate characteristics of Lead , Cadmium in drinking water sources of Huangpu River , Shanghai [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin* , 2009 , 18(10) : 948 - 953 (in Chinese)
- [14] 孙树青, 胡国华, 王勇泽, 等. 湘江干流水环境健康风险评估[J]. *安全与环境学报* , 2006 , 6(2) : 12 - 15
- Sun S Q , Hu G H , Wang Y Z , et al . Water environmental health risk assessment of Xiangjiang River [J]. *Journal of Safety and Environment* , 2006 , 6(2) : 12 - 15 (in Chinese)
- [15] 张敏, 王德淑. 长江铜陵段表层水中重金属含量及存在形态分布研究[J]. *安全与环境学报* , 2003 , 3(6) : 61 - 64
- Zhang M , Wang D S. Investigation on heavy metal elements distribution on surface water of Tongling section along the Yangtse River [J]. *Journal of Safety and Environment* , 2003 , 3(6) : 61 - 64 (in Chinese)
- [16] 赵锁志, 刘丽萍, 王喜宽, 等. 黄河内蒙古段上覆水-悬浮物和底泥重金属特征及生态风险研究[J]. *现代地质* , 2008 , 22(2) : 304 - 312
- Zhao S Z , Liu L P , Wang X K , et al . Characteristics and ecological risk of heavy metals in overlying water , suspended particles and bedmud in the inner Mongolia stretch of the Yellow River [J]. *Geoscience* , 2008 , 22(2) : 304 - 312 (in Chinese)
- [17] De Smet H , Blust R. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 2001 , 48(3) : 255 - 262
- [18] Shazili N A M , Pascoe D. Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals [J]. *Earth and Environmental Science* , 1986 , 36(1) : 468 - 474