

苯并[a]芘对马氏珠母贝D型面盘幼虫发育的影响

杨宝¹, 刁晓平^{*}, 谢嘉, 赵春风, 周海龙[#]

海南大学农学院 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海口 570228

摘要: 苯并[a]芘(B[a]P)已广泛分布于海洋环境中,低等海洋无脊椎动物从受精卵开始整个生长发育过程都面临着B[a]P等多环芳烃类污染物(PAHs)的威胁。本实验以热带海洋优势贝类马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)作为材料,研究B[a]P对马氏珠母贝D型面盘幼虫发育的影响。将幼虫暴露于不同浓度(1、2、4、10和15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) B[a]P中,在暴露后第12、24、36、48、72、84小时,分别测定其D型面盘幼虫的死亡率和畸形数。结果表明: B[a]P对D型面盘幼虫死亡率的影响明显,死亡率与时间呈正相关,其中4和10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的响应最敏感。在1~10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,死亡率与浓度呈正相关; B[a]P暴露对马氏珠母贝D型面盘幼虫的形态也有显著影响,且随着浓度的增大产生畸形个体的时间越短。另外, B[a]P对马氏珠母贝D型面盘幼虫的半数致死浓度(LC₅₀)随着时间的推移逐渐降低后趋于稳定,48 h时LC₅₀趋于稳定,为21.56 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究表明, B[a]P对马氏珠母贝D形幼虫的发育具有不利影响,并可能影响其种群结构。

关键词: 马氏珠母贝; 苯并[a]芘; 畸形; 死亡率; 半数致死浓度(LC₅₀)

文章编号: 1673-5897(2012)2-215-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Impacts of B[a]P on the Development of *Pinctada martensii* D-shaped Veliger Larvae

Yang Bao¹, Diao Xiaoping^{*}, Xie Jia, Zhao Chunfeng, Zhou Hailong[#]

Hainan Provincial Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource, College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China

Received 12 January 2012 accepted 17 February 2012

Abstract: B[a]P is the most studied polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which widely exists in the marine environment. Invertebrates are threatened by PAHs in their whole life. In this paper, the impacts of B[a]P on the development of D-shaped veliger larvae of *Pinctada martensii* were studied. When fertilized eggs grew up to D-shaped veliger larvae, they were exposed to B[a]P at six different concentrations of 0, 1, 2, 4, 10 and 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The mortality and aberration rate were calculated after D-shaped veliger larvae exposed for 12, 24, 36, 48, 72, and 84 hours. Results showed that the mortality was positive to exposure time. B[a]P has a significantly toxic effect on D-shaped veliger larvae of *Pinctada martensii*. Larvae in 4 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ groups were much more sensitive than that in other groups. The mortality was positive to the concentration of B[a]P in the range of 1~10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. B[a]P could significantly deform D-shaped veliger larvae. Moreover, exposed to high concentration of B[a]P resulted in the early appearance of the abnormal individual. Additionally, LC₅₀ gradually decreased then kept a constant. 48h-LC₅₀ was 21.56 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The results indicated that B[a]P had negative effects on the development

收稿日期: 2012-01-12 录用日期: 2012-02-17

基金项目: 国家自然科学基金(31160126, 41161077), 海口市重点科技项目(2009-47), 海南省自然科学基金项目(309010), 海南大学重点科技项目(hd09xm51), 海南大学211工程建设项目(QNJS-2011-13), 海南大学博士启动基金(kyqd1102)

作者简介: 杨宝(1986-)男, 硕士研究生, 研究方向: 生态毒理学; E-mail: yangbao88888@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: diaoxip@hainu.edu.cn;

#共同通讯作者(Co-Corresponding author), E-mail: hlongzhou@gmail.com

of D-shaped veliger larvae of *Pinctada martensii* and their populative structure.

Keywords: *Pinctada maetensii*; B[a]P; malformation; mortality; half lethal concentration

苯并[a]芘(B[a]P)是多环芳烃类的一种重要代表性污染物,是由1个苯环和1个芘分子结合而成的多环芳烃类化合物^[1];主要来源于煤焦油和石油等的不完全燃烧。在水体中,B[a]P主要以吸附于悬浮颗粒相或沉积物相、溶解于水中或胶体3种形式,继而随着食物链进入生物体内。大量研究表明,B[a]P具有“三致性”,进入生物体内后,会降解为毒性较高的高环中间产物^[2],B[a]P及其代谢物诱导活性氧自由基产生,最后对海洋动物产生毒害作用。软体动物为沿海生态系统中的优势物种,且具有较高的经济价值^[3]。而在软体动物的生活史中,胚胎和早期幼虫发育是重要的组成部分,因此,早期幼虫数量的变动将影响成体的数量。

马氏珠母贝(*Pinctada martensi*),又名日本合浦珠母贝,海产软体动物,瓣鳃纲(*Lamellibranchia*)珍珠贝目(*Pterioida*),珠母贝科(*Pteriidae*)是国内生产海水珍珠的主要种类。马氏珠母贝广泛分布于热带和亚热带沿海,属于热带海洋环境中的优势贝类,且具有重要的经济价值。马氏珠母贝只有发育成幼虫时才开始进食^[4],王鹏飞等报道马氏珠母贝在D型面盘幼虫阶段对外界环境的影响较敏感^[5-6]。His等^[7]研究表明,有机污染物对紫贻贝幼虫有较明显影响。但是,目前针对B[a]P对马氏珠母贝早期发育毒性作用的相关研究尚未见报道。因此研究B[a]P污染对马氏珠母贝胚胎发育的毒理效应,探讨其对马氏珠母贝种群发育的影响,可为评估B[a]P污染对海洋动物的影响提供科学依据。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

仪器: BX41/45 显微镜(Olympus公司,日本)

试剂: 苯并[a]芘(Sigma公司,美国)、二甲基亚砜(DMSO)(Amresco公司,美国)等均为分析纯。

1.2 实验材料

实验动物为马氏珠母贝,购自海南省陵水县黎安镇贝类养殖场,贝龄约为2年,壳高为 3.21 ± 0.24 cm,性腺成熟,实验用海水均取海南陵水黎安港无污染区域,经100目筛绢网过滤处理后待用。

1.3 实验方法

根据国内外自然海区中B[a]P的污染情况^[7-9],B[a]P设置1、2、4、10和 $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 5个浓

度,同时设置DMSO(0.01%)对照组和海水空白对照组。通过人工受精^[10],然后在盐度为33‰、pH值为8.2、温度为 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 的海水中待发育到D形期时,将马氏珠母贝胚胎转移到不同B[a]P浓度的海水中进行暴露试验,同时设置3个平行。每个处理胚胎初始密度为 $2.5 \sim 4$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。然后,分别于12、24、36、48、60和72 h各取100 mL D型面盘幼虫,在 25°C 2 000 rpm条件下,离心5 min,然后将其铺于载玻片上,计正常胚胎和畸形胚胎数量,在显微镜下统计死亡数和畸形数。其评价标准参考His^[11]等的报道: D型幼虫畸形包括凹进绞合线、锯齿状贝壳边缘、不完全壳和凸出覆盖物的个体。死亡率计算方法参考金启增^[4]等,死亡率=(初始密度(个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)-D型期密度(个 $\cdot \text{mL}^{-1}$))/初始密度(个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)。最后计算其死亡率、畸形率和 LC_{50} 。

1.4 数据处理

采用直线回归法(概率单位-浓度对数法)^[2]计算B[a]P对马氏珠母贝的半致死浓度(LC_{50}),并制表分析。采用SPSS 17.0统计分析软件,在 $p=0.05$ 的置信水平对死亡率和畸形率进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),*和**分别表示:与对照组相比, $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 。

2 结果(Results)

2.1 B[a]P对D型面盘幼虫死亡率的影响

在B[a]P暴露下,D型面盘幼虫死亡率情况如表1所示。随着时间的推移,D型面盘幼虫死亡率不断增加,呈现出明显的时间-效应关系。4和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组在初始12 h时死亡率与空白对照组差异显著($p < 0.05$)。上述结果说明,B[a]P污染对马氏珠母贝D型面盘幼虫死亡率有明显影响,且与时间呈正相关。4和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的影响较其他浓度组明显。另外,在 $1 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,B[a]P对D型面盘幼虫死亡率的影响随着浓度的升高而增大,与浓度呈正相关。

2.2 B[a]P对D型面盘幼虫畸形率的影响

由表2可知,DMSO(0.01%)溶剂对照组与海水空白对照的畸形率无显著差异($p > 0.05$),各B[a]P处理组畸形率与空白对照均差异显著($p < 0.05$),其中12~48 h期间高浓度组($15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)与空白对照差异极显著($p < 0.01$),36~72 h期间中浓度($4 \mu\text{g}$

表 1 各期 D 型面盘幼虫的死亡率

Table 1 D-larvae mortality at different phases

(%)

B[a]P 浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	84 h
空白对照	1.39 ± 1.05	1.58 ± 0.55	2.15 ± 1.81	2.31 ± 1.96	7.02 ± 1.54	6.66 ± 0.87
DMSO (0.01%)	1.39 ± 1.08	2.69 ± 0.11	3.32 ± 0.20	3.38 ± 2.32	8.81 ± 2.89	10.42 ± 3.17
1	3.60 ± 1.54	12.27 ± 3.25*	18.90 ± 7.59*	23.38 ± 7.69*	31.59 ± 7.20*	35.06 ± 7.97*
2	3.55 ± 2.88	9.27 ± 3.59	17.40 ± 1.32**	22.01 ± 2.40**	28.71 ± 1.06**	39.69 ± 0.78**
4	14.41 ± 2.12*	22.71 ± 3.90*	32.29 ± 5.09**	37.56 ± 5.95**	41.35 ± 0.89**	47.83 ± 2.60**
10	9.78 ± 3.38*	14.47 ± 3.67*	21.83 ± 6.63*	30.93 ± 2.53**	43.76 ± 5.36**	52.38 ± 9.18**
15	6.78 ± 2.47	11.42 ± 4.34	16.98 ± 5.28*	23.53 ± 3.53*	41.78 ± 3.76**	51.32 ± 4.06**

注: 表内数据为平均值 ± 标准误差 (Mean ± SE); “*” 表示与对照组相比具有显著差异 ($p < 0.05$),

“**” 表示与对照组相比具有极显著差异 ($p < 0.01$), 下表同。

表 2 D 型面盘幼虫各期畸形率

Table 2 Results of D-larvae abnormalities percentage rate at different phases

(%)

B[a]P 浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	84 h
空白对照	0.00	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.34	0.49 ± 0.15	0.83 ± 0.13	0.51 ± 0.14
DMSO (0.01%)	0.59 ± 0.23	1.31 ± 0.77*	0.60 ± 0.44**	1.03 ± 0.86	2.92 ± 1.45	2.10 ± 1.05
1	3.66 ± 0.11*	2.52 ± 0.44*	4.10 ± 1.04*	4.93 ± 0.38**	5.72 ± 0.53**	6.85 ± 1.70*
2	2.91 ± 0.90*	3.10 ± 0.60*	3.84 ± 1.07*	6.45 ± 1.15*	7.71 ± 1.70*	4.36 ± 1.11*
4	5.30 ± 2.34*	5.34 ± 1.56*	5.74 ± 0.52**	5.40 ± 0.63**	6.96 ± 0.58**	3.91 ± 0.54**
10	4.29 ± 0.75*	4.49 ± 1.68*	5.27 ± 1.61*	4.95 ± 0.64*	6.57 ± 1.85*	5.69 ± 0.80**
15	5.34 ± 0.78**	4.07 ± 0.10**	4.16 ± 0.45**	4.59 ± 0.58**	5.14 ± 0.42**	4.76 ± 1.45*

$\cdot\text{L}^{-1}$) 组与空白对照组差异极显著 ($p < 0.01$)。48 h 时低浓度 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组与空白对照差异极显著 ($p < 0.01$)。结果表明 0.01% DMSO 对马氏珠母贝 D 型面盘幼虫无显著影响, B[a]P 暴露对马氏珠母贝 D 型面盘幼虫的形态有明显影响, 且随着浓度的增大畸形个体出现的时间越早。

在实验中观察到以下几种畸形个体形态: 壳缘内凹、绞合线内凹、不完全的壳和锯齿状的壳缘 (见图 1)。

2.3 B[a]P 对 D 型面盘幼虫的半数致死浓度 (LC_{50})

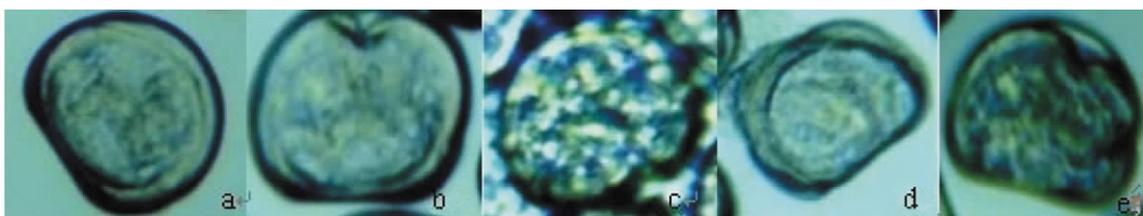
在 B[a]P 暴露下, 通过计算, 由图 2 可知, 随着时间的推移 LC_{50} 呈逐渐下降趋势, 12、24、36、48、72

和 84 h 的 LC_{50} 分别为 543.76、119.74、31.90、21.56、24.36 和 $20.31 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。48 h 后趋于稳定, LC_{50} 为 $21.56 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。48、72 和 84 h 3 个时间点的 LC_{50} 无显著性差异 ($p > 0.5$)。

3 讨论 (Discussion)

3.1 B[a]P 对 D 型面盘幼虫的致畸性

双壳类软体动物幼虫壳的形成一般受到特殊组织—壳腺的控制, 马氏珠母贝在担轮幼虫后期形成壳腺, 在面盘幼虫初期壳腺才开始分泌并逐渐形成第 1 原壳, 这一过程称为钙化^[4]。B[a]P 暴露致使 D 型面盘幼虫出现畸形个体。李秀秀等^[12]发现农利灵



a 正常 D 型幼虫 b 壳缘内凹 c 绞合线内凹 d 不完全的壳 e 锯齿状的壳缘

图 1 D 型幼虫的几种畸形形态 (100 ×)

Fig. 1 Abnormalities of D-larvae (100 ×)

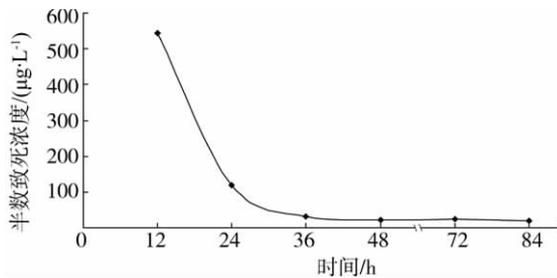


图2 D型面盘幼虫半数致死浓度 LC_{50}

Fig. 2 Half lethal concentration of D-larvae of *Pinctada maetensi* exposed to B[a]P

对斑马鱼胚胎也有明显的致畸性。另外, CO_2 酸化的海水 (pH 值为 7.4 左右) 对双壳类的牡蛎和紫贻贝幼虫也具有明显的致畸性^[13-14], D 型面盘幼虫期生命力和抵抗力是胚胎发育最弱的时期^[15]。在 B[a]P 暴露下, 观察到 D 型面盘幼虫畸形形态, 包括壳缘内凹、绞合线内凹、不完全的壳和锯齿状的壳缘, 以及有些幼虫个体偏小等现象, 此外, B[a]P 暴露组畸形率比与对照组有显著差异性。B[a]P 暴露对马氏珠母贝 D 型面盘幼虫期有明显致畸性, 但致畸的机理和过程有待进一步研究。

3.2 B[a]P 对 D 型面盘幼虫死亡率的影响

B[a]P 暴露对 D 型面盘幼虫的影响不仅表现为致畸性, 而且对死亡率也有明显的影响, 且死亡率与时间呈正相关。4 和 10 $\mu g \cdot L^{-1}$ 浓度组幼虫受到的影响较其他浓度组明显。有研究报道, 烷基酚和氯代酚使最初 72 h 内发育的斑马鱼胚胎出现死亡, 且这种影响表现出剂量-效应正相关性^[16-17]。PAHs 中的菲 (PHE) 在高浓度下对斑马鱼表现出类似的毒性, 造成部分胚胎死亡。而 B[a]P 暴露对马氏珠母贝肝脏有明显损伤^[18], B[a]P 与 PHE 都是多环芳烃类物质, 但 B[a]P 毒性强于 PHE。本实验结果表明, 在 1~10 $\mu g \cdot L^{-1}$ 浓度间, B[a]P 对 D 型面盘幼虫死亡率的影响随着浓度的升高而增大, 与浓度呈正相关。这说明 B[a]P 暴露对 D 型面盘幼虫死亡率有明显影响, 且在一定浓度范围内随着 B[a]P 浓度的增加幼虫死亡率升高。引起死亡率升高的原因可能是: (1) 随着浓度的增加, B[a]P 暴露对幼虫组织结构的破坏力增大; (2) 畸形个体的基本功能受阻导致其存活率大大降低, 从而影响死亡率。随着时间的推移, B[a]P 暴露对马氏珠母贝 D 型面盘幼虫的 LC_{50} 呈逐渐下降趋势, 48 h 后趋于稳定, 这说明染毒 48 h 之前, D 型面盘幼虫对 B[a]P 的响应敏感。B[a]P

暴露对马氏珠母贝 D 型面盘幼虫的毒性有可能是通过对幼虫机体功能的破坏实现的, 确切毒性机理和过程还有待进一步研究。 LC_{50} 在 48 h 时趋于常数, 值为 21.56 $\mu g \cdot L^{-1}$, 这表明暴露 48 h 是一个非常敏感而又关键的时期, 同时发现在 72 h 时其 LC_{50} 为 24.36 $\mu g \cdot L^{-1}$, 而在 84 h 时 LC_{50} 则为 20.31 $\mu g \cdot L^{-1}$, 出现这种现象的原因很可能是由于当毒性作用 48 h 后, 马氏珠母贝 D 型面盘幼虫启动了自身的损伤修复机制, 从而提高了对 B[a]P 毒性作用的抵抗能力。

综上所述, B[a]P 对马氏珠母贝 D 型面盘幼虫的死亡率和畸形率都具有明显的影响, 存在显著的浓度-时间-效应关系。该研究为进一步揭示 B[a]P 对马氏珠母贝早期发育毒理机制打下一定基础, 同时为评价 B[a]P 的生态风险提供了科学依据。

通讯作者简介: 刁晓平, 女, 博士, 教授, 主要研究方向为生态毒理学和污染生物化学, 发表学术论文 30 余篇。

周海龙, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向是海洋环境生物学, 发表论文 20 多篇。

参考文献:

- [1] 张景智, 陈荣, 李东晓. 苯并芘对褐鳃鲷肝细胞 DNA 交联的影响[J]. 台湾海峡, 2010, 29(4): 446-451
- [2] 刘林华, 蒋义国. 反式-7,8-二羟-9,10-环氧苯并芘诱导恶变细胞中 miR-494 和 miR-22 的功能及 PTEN 的表达[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(5): 379-382
Liu L H, Jiang Y G. Function of miR-494, miR-22 and expression of PTEN in transformed cells induced by anti-BPDE [J]. Journal of Environment and Health, 2010, 27(5): 379-382 (in Chinese)
- [3] Gutiérrez J L, Jones C G, Strayer D L, et al. Mollusks as ecosystem engineers: The role of shell production in aquatic habitats [J]. Oikos, 2003, 101(1): 79-90
- [4] 金启增, 魏贻尧, 郭澄联, 等. 珍珠贝种苗生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 1992, 50
- [5] 王鹏飞, 王梅芳, 余祥勇, 等. 马氏珠母贝胚胎和早期幼虫冷冻的研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(1): 25-28
Wang P F, Wang M F, Xu X Y, et al. Study on cryopreservation of embryo and early larvae of *Pinctada martensii* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(1): 25-28 (in Chinese)
- [6] 何盛毅, 林传旭, 何毛贤, 等. 海洋酸化对马氏珠母贝胚胎和早期幼虫发育的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(4): 747-751
He S Y, Lin C X, He M X, et al. Impacts of ocean acidifica-

- tion on the development of *Pinctada martensii* embryo and early larva [J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(4): 747-751 (in Chinese)
- [7] Stein E D, Tlefenthaler L L, Schiff K. Watershed-based sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban storm water [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(2): 373-385
- [8] 朱文锋. 广东省沿海表层沉积物中多环芳烃研究[D]. 广州: 中国科学院广州地球化学研究所, 2007
- [9] 罗孝俊. 珠江三角洲河流、河口和邻近南海海域水体、沉积物中多环芳烃与有机氯农药研究[D]. 广州: 中国科学院广州地球化学研究所, 2004
- [10] Hiromi O, Takayuki K, Kiyoshi I, et al. Motility of spermatozoa obtained from testes of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* [J]. Fisheries Science, 2007, 73(1): 107-111
- [11] His E, Seaman M N L, Beiras R. A simplification of the bi-valve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment [J]. Water Research, 1997, 31(2): 351-355
- [12] 李秀秀, 杨新军, 闻洪涛. 农利灵对斑马鱼胚胎发育的毒性[J]. 环境与职业医学, 2008, 25(4): 378-380
- Li X X, Yang X J, Hong H T. Study on embryo toxicity of vinclozolin in zebrafish [J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2008, 25(4): 378-380 (in Chinese)
- [13] Kurihara H, Kato S, Ishimatsu A. Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas* [J]. Aquatic Biology, 2007, 1(1): 91-98
- [14] Kurihara H, Asai T, Kato S, et al. Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Aquatic Biology, 2008, 4(3): 225-233
- [15] 张才学. 马氏珠母贝人工育苗的若干关键技术[J]. 水产科技情报, 2005, 32(3): 102-104
- [16] 刘红玲, 周宇, 许妍, 等. 氯代酚和烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎发育影响的研究[J]. 安全与环境学报, 2004, 4(4): 3-17
- Liu H L, Zhou Y, Xu Y, et al. Investigation of toxicity effect for chlorophenols and alkyl phenols on zebrafish embryos [J]. Journal of Safety and Environment, 2004, 4(4): 3-17 (in Chinese)
- [17] 周宇, 于红霞, 丁翔, 等. 氯代苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效应的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3): 340-344
- Zhou Y, Yu H X, Ding X, et al. of Combined toxicity of chlorobenzenes on zebrafish embryo [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2003, 22(3): 340-344 (in Chinese)
- [18] 张先勇, 刁晓平, 杨宝. 苯并[a]芘暴露对马氏珠母贝肝组织抗氧化酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(2): 171-175
- Zhang X Y, Diao X P, Yang B. Effects of B[a]P on activity of antioxidant enzyme in liver of *Pinctada martensi* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(2): 171-175 (in Chinese) ◆