



五种重金属离子对俄罗斯卤虫的联合毒性研究

张青田, 胡桂坤

(天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 研究 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 5 种重金属离子对俄罗斯卤虫的急性毒性效应. 对卤虫无节幼体的 24 h, 48 h 和 72 h 实验结果以及卤虫成体的 24 h 实验结果分别进行分析, 得到回归方程. 选用的 5 种重金属离子对俄罗斯卤虫的死亡均表现出直接或者联合的影响, 联合作用包括金属离子间的协同或者拮抗作用; 不同发育阶段卤虫对重金属离子的耐受情况不同, 金属离子间的相互作用也有差异. 不同发育阶段的卤虫对 5 种重金属离子的耐受性不同, 在研究毒性作用或建立环境监测的数学模型时, 必须注意卤虫的发育时期. 对回归方程的验证实验表明, 所得方程基本能够反映重金属离子对卤虫的毒性作用, 但是有些仅死亡率分布趋势相似, 结果仍有差异.

关键词: 卤虫; 重金属离子; 联合毒性

中图分类号: Q954.3; X17 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)02-0026-04

Studies on Joint Toxicity of Five Heavy Metal Ions to *Artemia*

ZHANG Qing-tian, HU Gui-kun

(Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Acute toxicity effects of five heavy metal ions, Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} and Cd^{2+} , on *Artemia* of Russia were studied. The stepwise regression equations of nauplii(24 h, 48 h and 72 h) and adult(24 h) acute toxicity experiments were obtained. These five heavy metal ions have joint toxicity to *Artemia* of Russia, and the joint toxicities vary in different development stages of *Artemia*. Those results show that *Artemia* has different tolerances for the five heavy metal ions when it is in different growth period, and the interaction of heavy metal ions varied with growth period. Therefore the growth period of *Artemia* must be paid attention to when the toxicity is studied or when the mathematic model for environmental monitoring is built. The validating experiments indicate that those regressive equations are capable of reflecting the toxicity of heavy metal ions to the *Artemia*, though some results are difference except similar distributing trend.

Keywords: *Artemia*; heavy metal; joint toxicity

卤虫 (*Artemia*) 是一类世界性分布的广温、耐高盐的小型甲壳动物, 其自然的生活环境为内陆的盐湖和沿海的盐田. 卤虫是水产动物种苗生产中十分重要的生物饵料, 同时也是生物学教学中重要的活体实验材料. 而且, 卤虫近来被认为是一种极好的生物毒性测试种类, 应用卤虫进行急性毒性实验的 96 h LC_{50} 和 24 h LC_{50} 等的实验已经经过国际会议确定并标准化^[1], 国内外开展了金属离子、油类等物质对

卤虫的毒性研究, 为环境监测、孵化和生态养殖提供可靠数据^[2-6].

国内外关于重金属离子对卤虫毒性的研究较多, 涉及了多种金属离子, 但是对于重金属离子联合作用的研究较少. 郭琪等^[7]利用 ARC-Test 法测定 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Se^{6+} 和杀虫脒对卤虫幼体的急性毒性. 结果表明, 4 种毒物的 LC_{50} 值差异明显, 毒性大小顺序为: $\text{Cr}^{6+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Se}^{6+} >$ 杀虫脒. 韩希福等^[8]研究了稀土

收稿日期: 2009-07-19; 修回日期: 2009-12-09

基金项目: 天津科技大学引进人才科研启动基金资助项目 (20090413)

作者简介: 张青田 (1974—), 男, 天津人, 副教授, 博士, qzhang@163.com.

元素镧与铈对盐卤虫的急性致毒效应. 经过 12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的毒性实验发现稀土元素镧、铈对盐卤虫属低毒物质. Chen 等^[6]研究多种金属离子对卤虫的毒性作用,包括铜、亚砷酸盐、亚硒酸盐、汞、镉、硒酸盐、锌、锰和镍等.

上述几项研究基本都是采用单因素实验设计,反映了一些金属离子类元素对卤虫某发育阶段的毒性大小. 但是在现实环境中往往是多因素联合对生物起作用;并且环境因子间可能会有协同、拮抗等作用,因而毒性作用会有所改变. 李娜等^[3]采用动态活法研究了 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 5 种重金属离子对卤虫无节幼体的毒性效应及联合毒性作用. 结果表明 5 种重金属离子具有单独毒性,毒性由强至弱依次为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$; 而且 Hg^{2+} - Cu^{2+} 、 Cu^{2+} - Mn^{2+} 对卤虫幼体的联合作用表现为拮抗作用; Pb^{2+} - Cu^{2+} 、 Pb^{2+} - Mn^{2+} 、 Mn^{2+} - Cd^{2+} 则为协同作用. 但是,该研究的重金属离子关联是通过重金属离子间两两组合得到的,实验量很大,不便分析更多因素的综合影响. 均匀设计具有实验次数少,便于对有交互作用的因素进行分析的优点,适于进行多因素综合作用的研究^[9-11].

本文选取海洋污染物中常见的 5 种重金属离子 (Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+}) 为实验要素,研究了这 5 种常见重金属离子对处于不同发育阶段俄罗斯卤虫的联合毒性效应. 利用均匀设计实验的优势,不但能够了解多种重金属离子对处于不同发育阶段俄罗斯卤虫的综合作用情况,而且结果有助于研究卤虫监测环境的数学建模.

1 材料与方法

1.1 实验材料

进口卤虫卵(俄罗斯 Yaroyoe 湖)由天津科技大学海洋科学与工程学院张波老师提供.

1.2 实验设计

选用渤海常见的 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 5 种重金属离子进行实验,以 HgCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 配制实验用试剂,所用药品均为分析纯. 各实验要素设置的浓度水平见表 1. 选用优化的 $U^*_{10}(10^8)$ 均匀设计表(表 2)用于实验设计;根据 $U^*_{10}(10^8)$ 均匀设计表的使用表(表 3)要求,将 5 个实验因素 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 依次安排在该表的 1、3、4、5、7 列(D 值 0.241 4)^[9].

表 1 实验因素的浓度水平

Tab.1 Concentrations of heavy metal ions in the experiments

浓度水平	离子质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	Hg^{2+}	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Mn^{2+}	Cd^{2+}
1	0	0	0	0	0
2	0.004	0.5	0.5	5	5
3	0.008	1.0	1.0	10	10
4	0.012	1.5	1.5	15	15
5	0.016	2.0	2.0	20	20
6	0.020	2.5	2.5	25	25
7	0.024	3.0	3.0	30	30
8	0.028	3.5	3.5	35	35
9	0.032	4.0	4.0	40	40
10	0.036	4.5	4.5	45	45

表 2 选用的均匀设计表 $U^*_{10}(10^8)$

Tab.2 The selected Uniform design table $U^*_{10}(10^8)$

实验处理号	列号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	2	3	4	5	7	9	10
2	2	4	6	8	10	3	7	9
3	3	6	9	1	4	10	5	8
4	4	8	1	5	9	6	3	7
5	5	10	4	9	3	2	1	6
6	6	1	7	2	8	9	10	5
7	7	3	10	6	2	5	8	4
8	8	5	2	10	7	1	6	3
9	9	7	5	3	1	8	4	2
10	10	9	8	7	6	4	2	1

表 3 均匀设计表 $U^*_{10}(10^8)$ 的使用表

Tab.3 Assistant table for $U^*_{10}(10^8)$ uniform design table

因素量	列号							D 值
2	1	6						0.112 5
3	1	5	6					0.168 1
4	1	3	4	5				0.223 6
5	1	3	4	5	7			0.241 4
6	1	2	3	5	6	8		0.299 4

1.3 实验方法

取适量卤虫卵放入盐度为 30‰ 的人工海水中, 25℃ 恒温培养箱孵化, 光照度 1 500 lx. 孵化 24 h 后选取一定量的卤虫幼虫进行无节幼虫实验^[8], 实验期间不投饵. 剩余卤虫幼虫继续培养, 培养条件同孵化条件, 2 d 后投喂杜氏藻 (*Dunaliella* sp.). 培养约 6 d, 卤虫进入 12 令期^[12], 进行卤虫成体的联合毒性实验, 实验期间不投饵.

选用 250 mL 三角瓶作为实验容器, 每瓶加人工海水 100 mL, 然后依实验设计处理添加各类重金属离子. 每瓶中放入约 40 只卤虫无节幼虫, 或者 20 只卤虫成体. 每个处理设置 2 个平行样, 实验条件同培养条件. 记录无节幼虫 24 h、48 h 及 72 h 的死亡数,

以及成体 24 h 死亡数. 卤虫死亡标准以附肢 10 s 内不动为死亡. 采用 Uniform Design 2.10 软件(王玉方, 2006 版)对死亡率进行逐步回归分析, 得到各实验的回归方程^[7]. 根据已有报道和经验, 由于重金属离子的浓度水平差异大, 直接进行回归分析往往得不到满意的结果. 本研究对重金属离子浓度值求对数后进行逐步回归分析. 为了了解回归方程的适用性, 选用表 1 中第 3、5、7、9 行所列金属离子浓度, 按照不同回归方程分别进行死亡率验证. 用 SPSS 软件对实际测定死亡率和方程预测死亡率进行二相关样品分析, 检验二者差异.

2 结果及分析

2.1 死亡率统计

对实验各处理的死亡率进行统计, 结果如表 4 所示. N24 h, N48 h 和 N72 h 依次代表无节幼虫 24 h, 48 h 和 72 h 毒性实验; A24 h 代表成体 24 h 毒性实验(后同).

表 4 各实验处理死亡率统计

Tab.4 Statistic of mortality in each experimental control

实验处理号	死亡率/%			
	N24h	N48h	N72h	A24h
1	7.5	18.0	35.0	100
2	7.5	25.0	32.0	100
3	5.0	18.0	32.0	70.0
4	12.5	23.0	35.0	100
5	20.0	25.0	100	100
6	12.5	12.5	42.0	81.0
7	7.5	28.0	70.0	100
8	7.5	35.0	59.0	100
9	10.0	16.0	80.0	81.0
10	7.5	48.0	100	100

不同实验的死亡率表明随着实验时间的延长, 卤虫死亡数增加较快. 例如实验处理 10 中, 卤虫幼体死亡率由 24 h 的 7.5% 迅速增加到 72 h 的 100%. 不同处理的死亡率变化规律不同, 表明不同发育阶段的卤虫对重金属离子毒性的反应也存在一定差异. 成体和幼体的 24 h 毒性实验结果表明, 成体对重金属离子毒性的耐受力明显降低.

2.2 卤虫无节幼虫实验回归分析

以重金属离子浓度(取以 10 为底的对数)和死亡率分析得到回归方程.

(1) 无节幼体 24 h 实验回归方程为

$$y = -0.12 \times \lg[\text{Cu}^{2+}] \times \lg[\text{Cd}^{2+}] + 14.6, R = 0.750$$

该方程说明 24 h 急性毒性实验中, Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 联合

呈现出毒性效应, 二者间有拮抗作用.

(2) 无节幼体 48h 实验回归方程为

$$y = 9.53 \times \lg[\text{Hg}^{2+}] - 13.6 \times \lg[\text{Hg}^{2+}] \times \lg[\text{Cu}^{2+}] + 4.49 \times \lg[\text{Hg}^{2+}] \times \lg[\text{Mn}^{2+}] - 7.07 \times \lg[\text{Hg}^{2+}] \times \lg[\text{Cd}^{2+}] + 0.954 \times \lg[\text{Pb}^{2+}] \times \lg[\text{Cu}^{2+}] + 41.1, R = 0.999$$

结果显示: Hg^{2+} 的毒性作用较大, 并与 Mn^{2+} 呈现出协同作用; Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 存在拮抗作用; Hg^{2+} 与 Cd^{2+} 呈现出较弱的拮抗作用; Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 呈现出微小的协同作用.

(3) 无节幼虫 72h 实验回归方程为

$$y = 1.92 \times \lg[\text{Hg}^{2+}] + 25.0, R = 0.787$$

结果显示, 连续进行 72 h 实验后, 仅有 Hg^{2+} 表现出毒性效应, 对卤虫具有很大的毒性影响.

2.3 卤虫成体实验回归分析

卤虫成体 24 h 实验回归方程为

$$y = 22.5 \times \lg[\text{Cu}^{2+}] - 0.07 \times \lg[\text{Pb}^{2+}] \times \lg[\text{Mn}^{2+}] + 70.5, R = 0.982$$

结果表明, Cu^{2+} 的毒性作用较大, 与成体的死亡率是正相关的; Pb^{2+} 和 Mn^{2+} 呈现出微弱拮抗作用.

2.4 方程验证实验

进行验证实验, 通过上述方程预测死亡率. 对预测死亡率和实测死亡率, 用 SPSS 软件进行了非参数的二相关样品检验, 结果见表 5.

表 5 方程与实验结果比较

Tab.5 Compare of equation and experimental results

实验	预期死亡率/%	实测死亡率/%	显著性
N24h	14.60	18.67	0.068
	14.55	28.33	
	14.52	49.67	
	14.48	76.15	
N48h	26.53	11.13	1.000
	37.45	35.06	
	42.56	50.15	
	45.62	56.05	
N72h	20.97	36.03	0.068
	21.55	47.67	
	21.89	67.17	
	22.13	88.67	
A24h	70.50	68.13	0.465
	77.25	76.07	
	81.19	84.05	
	83.98	88.99	

显著性结果表明: 方程预测结果和实测结果无显著差异(均 $P > 0.05$); 不过应该看到, 一些显著性值很接近 $P = 0.05$ 的判断阈值; 有些死亡率的分布趋势相似, 但是结果仍有一定的差异.

3 讨论

选用的5种重金属离子对俄罗斯卤虫的死亡表现出直接或者联合的影响,联合作用包括金属离子间的协同或者拮抗作用;Hg²⁺表现出了较大的毒性,以及对其他重金属离子毒性的影响.不同发育阶段卤虫对重金属离子的耐受情况不同.实验用俄罗斯卤虫在刚孵化出时和器官发育完善时,对卤虫有毒性的金属离子数量较少,而孵化48h时则有较多金属离子对卤虫有毒性.这和卤虫发育情况基本吻合,刚孵化时,卤虫靠卵黄营养维持生活,消化道等结构未形成,受外界影响较小;成体时器官发育逐步完善,对外界因素抵抗力也会增强.而在消化道等结构形成,转为从外界吸收养分时易受外界影响^[5,12].由此可知在分析毒性影响时应该考虑卤虫的发育阶段.在使用卤虫建立环境监测的数学模型时必须分别对待.

目前关于重金属离子毒性的结果还存在差异,有些结论甚至相反.这里重点关注多因素实验的分析.本研究中,重金属离子对不同发育阶段的卤虫毒性不同,有些金属离子没有表现出毒性,联合作用也和以往研究结果存在差异.除去单因子实验,本研究结果和李娜等的联合实验结果也有差异.相同之处是Pb²⁺和Cu²⁺表现出协同作用,Hg²⁺和Cu²⁺的拮抗作用;Pb²⁺和Mn²⁺也存在交互作用,但结论相反.本研究结果还表现出了Cu²⁺和Cd²⁺,以及Hg²⁺与Cd²⁺间拮抗作用.这可能和卤虫品系及实验设计有关.已有研究表明,不同品系卤虫发育过程中生物学差异明显,则其生态学特性也可能存在差异^[12-13],表现出对外界因素的耐受情况不一.宁卓等^[14]对不同品系卤虫无节幼体的生物学特征进行了分析,李娜等所用的新疆艾比湖卤虫和本研究所用的俄罗斯卤虫具有不同的生物学特征值.外部特征或者参数的不同,可能预示着生理或者耐受性的差异.因而,选择的研究对象不同,可能导致结果差异.这也提示我们,研究和编制卤虫毒性标准时应注明所用卤虫品系.

此前的毒性实验多以单因素的形式进行,对金属离子间的联合作用研究较少.生物是受外界因素综合影响的,仅凭单因素实验可能无法表现客观条件下的毒性影响.比如,存在协同作用时会增大某因素毒性,而拮抗作用则会减弱,甚至掩盖某些因素的作用.因此,大力开展多因素联合实验是有必要的.

回归方程的预测结果和实测结果还是有一定差异的,这可能和多方面原因有关.除了前面所述的二

因素交互作用,这里强调更多因素的综合作用.例如无节幼虫72h实验方程只显示了Hg²⁺的作用,可是实验是在多因素情况进行的;与单因素实验结果存在不同,说明了其他因素的作用可能没有体现,例如三因素之间的交互作用.一般的正交实验分析很少涉及3个因素以上的联合作用,因为数理统计相当复杂.限于条件,本研究回归方程也只是分析了二因素间关系.不同方程间的差异预示着多因素(3个因素以上)间很可能存在联合作用.这是进行多因素实验应该关注的一个问题.已有的联合毒性实验设计基本都是二因素实验^[3,6,15],虽然优于单因素实验,但是与因素众多的实际情况仍相差较大.利用均匀设计的优势,增加实验处理数也将会增加方程的可信度.完善实验设计和分析软件,进行更多因素的联合分析也可作为今后研究的一个方向.

总之,利用均匀设计实验的优势,开展多因素的影响分析将有助于了解各因素的综合作用,更好地预测卤虫存活率和反映水体环境的状况.

致谢:本校海洋科学专业的本科生穆茜和麦杰轩参与了部分实验,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 刘琦. 卤虫对毒物毒性监测方法研究[J]. 环境科学与技术, 2000(4): 35-37.
- [2] Vanhaecke P, Leger B. Research on the development of a short term standard toxicity test with *Artemia nauplii* [J]. The Brine Shrimp *Artemia*, 1980, 1: 263-285.
- [3] 李娜, 石玉新, 齐树亭, 等. 渤海主要重金属污染物对卤虫无节幼体的毒性[J]. 河北渔业, 2006(2): 14-16.
- [4] 王建梅, 任伟, 王维娜, 等. 金属离子 Ni²⁺ 和 Co²⁺ 对卤虫孵化率和变态率的影响[J]. 水产养殖, 2003, 24(1): 34-35.
- [5] 孙建华, 张青田. 氨氮对不同发育阶段卤虫的急性毒性研究[J]. 海洋科学, 1998(1): 3-5.
- [6] CHEN B L, Chien P K, DU N S, et al. Acute toxicity of heavy metal ions, Se, As, compounds on *Artemia Franciscan* [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 1996(增刊): 84-92.
- [7] 郭琪, 郑静, 许永香, 等. 四种毒物对卤虫幼体的急性毒性实验研究[J]. 生态科学, 1992(2): 67-69.
- [8] 韩希福, 王军萍, 刘存歧. 稀土元素镧(III)与铈(III)对盐卤虫的急性致毒效应[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 1998, 18(1): 68-71.
- [9] 方开泰, 王元. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学

(下转第44页)