

4 种重金属离子对中华鳖(*Trionyx sinensis*)稚鳖的急性致毒效应*

王志铮¹ 吕敢堂¹ 施建军² 申屠琰² 毛文举¹

(1. 浙江海洋学院 舟山 316004; 2. 余姚市水产技术推广中心 宁波 315400)

提要 以 5 日龄中华鳖稚鳖为实验动物, 采用静水停食实验法, 在水温(27.4 ± 1.3) 条件下, 开展了 Hg²⁺、Cr⁶⁺、Cu²⁺、Zn²⁺对中华鳖稚鳖的急性毒性和加和等毒性强度联合毒性试验。结果表明, 4 种重金属离子对中华鳖稚鳖均呈现以蓄积为主导的急性毒发效应, Cr⁶⁺、Zn²⁺对中华鳖稚鳖的急性致毒高峰明显滞后于 Hg²⁺、Cu²⁺; 4 种重金属离子毒性大小依次为 Hg²⁺、Cu²⁺、Cr⁶⁺、Zn²⁺, 其对中华鳖稚鳖 96h 的半致死质量浓度分别为 5.98、16.42、28.90 和 91.88mg/L; 所构建的中华鳖稚鳖累积死亡概率与重金属质量浓度和实验时间之间的数学模型, 以及半致死时间-质量浓度回归方程, 可作为侦查和分析重金属离子排放时间和致中华鳖稚鳖大量死亡时间的重要计算工具; Hg²⁺、Cr⁶⁺、Cu²⁺、Zn²⁺离子两两组合在加和等毒性强度下对中华鳖稚鳖 96h 联合急性毒性所呈现的致毒特征与离子种类及其毒性强度匹配情形密切相关。

关键词 重金属离子, 急性毒性, 联合毒性, 中华鳖稚鳖
中图分类号 S912

重金属离子既是水域环保和渔业生产与管理中重要的水质监测指标, 也是开展水生生物生态毒理学研究的重要因子(周永欣等, 1989; 张志杰等, 1991; 廖自基, 1992)。近 20 年来, 随着养殖环境污染的加剧和食品安全问题的凸显, 研究水生生物对重金属离子的耐受与响应、积累与降减特征, 掌握重金属离子在水生生物体内传递与放大机制, 以便合理、有效控制水域中重金属的限量水平, 已成为保护与改善水域环境, 保障水生生物生态安全, 规避养殖风险的重要命题之一, 并已引起政府相关部门和业内学者的广泛关注和重视。

中华鳖(*Trionyx sinensis*)俗称鳖、甲鱼、团鱼等, 隶属于爬行纲、龟鳖目、鳖科、鳖属, 其肉味鲜美、营养丰富、食补具益气补虚、滋阴凉血之功效, 是一种经济价值很高的名贵珍肴和滋补佳品, 深受广大消费者喜爱。自 20 世纪 80 年代以来, 我国中华鳖养殖业获得了迅猛发展, 中华鳖现已成为我国最重要

的淡水养殖品种之一。目前, 国内外对中华鳖形态结构、生态生理、组织病理、抗生素体内残留、养殖模式与技术等(陈文银等, 1997; 周显青等, 1998; 杨振才等, 1999; 孙红祥等, 2002; 郝玉江等, 2002)开展了较为系统的研究, 并就常见消毒药物毒性影响(杨燕忠, 1997)有零星报道, 但迄今尚未见有关重金属离子对其存活影响的研究报道。鉴于此, 作者于 2009 年 7—8 月在浙江省余姚市马诸镇余姚市水产技术推广中心科研基地内开展了 Hg²⁺、Cr⁶⁺、Cu²⁺、Zn²⁺对中华鳖稚鳖急性致毒效应的实验研究, 以期中华鳖逆境生理生态研究积累有关资料, 为淡水养殖环境生态风险评估与管理以及相关渔业污染事故处理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究所用中华鳖(*Trionyx*

* 宁波市农业科技重大攻关项目, 2007C10025 号。王志铮, 研究员, E-mail: wzz_1225@163.com

收稿日期: 2009-09-06, 收修改稿日期: 2009-10-16

sinensis)稚鳖为购自宁波市明凤渔业有限公司中华鳖国家级良种场的5日龄稚鳖,运回实验基地后立即移入1m×2m×1.2m的简易网箱内,选取反应灵敏、无伤病、规格相近的健壮个体作为实验对象(具体规格为:甲长24.41±4.70mm、甲宽23.22±3.36mm、体重2.02±1.55g),驯养3—4天后备用。

1.1.2 试剂 $K_2Cr_2O_7$ 、 $HgCl_2$ 、 $Zn(C_2O_3H_5)_2$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 分别购自天津化学试剂三厂、上海四维化学试剂厂、宜昌第三化学试剂厂和国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。实验前用蒸馏水将各实验药物配成一定质量浓度母液备用。

1.1.3 理化条件 实验用水为经48h自然曝气的自来水,水温(27.4±1.3),pH 7.1,水质符合渔业水质标准(国家环境保护局,1989)。

1.2 试验方法

1.2.1 单一重金属对中华鳖稚鳖的急性毒性试验 经预备实验,确定各实验药物质量浓度范围(96h全活质量浓度下限和96h全致死质量浓度上限)后,在室温条件下,以自然状态为对照,以规格60cm×80cm×60cm的白色塑料箱为实验容器(实验实际容积为20L),按等差间距法设置若干质量浓度梯度组,采用静水停食实验法,开展单一重金属离子实验,每一质量浓度梯度各放实验动物20只,组内设3个重复,连续观察受试对象的活动状况,以躯体与四肢僵直且多次用镊子碰触完全无反应作为死亡判断标准,及时取出死亡个体,每隔1h记录1次平均死亡率,每24h换液并统计1次总体平均死亡率,实验结束时刻为多数实验梯度组平均死亡率超过50%时。为减少实验容器对重金属离子的吸附,实验前用对应的药物质量浓度浸泡12h以上。

1.2.2 两种重金属离子复配液对中华鳖稚鳖的急性毒性试验 以加和等毒性强度(本研究中以单一重金属96h半致死质量浓度 LC_{50} 值作为致死阈水平,计为1个毒性强度单位)方式设置两种重金属离子联合毒性质量浓度梯度,两种重金属离子联合毒性强度加和方式依次为A(0+1.0)、B(0.2+0.8)、C(0.4+0.6)、D(0.6+0.4)、E(0.8+0.2)、F(1.0+0)六个组合,其中A组合和F组合为对照组。各梯度组总毒性强度均为1个毒性强度单位,组内各设3个重复,连续观察受试对象的活动状况,及时取出死亡个体,每24h换液并记录1次总体平均死亡率。

1.3 数据处理

根据重金属离子对中华鳖稚鳖的急性毒性实验

结果,借助SPSS17.0分别建立不同观察时段死亡概率单位-质量浓度直线回归方程、半致死实验时间-质量浓度直线回归方程以及死亡概率单位与质量浓度、实验时间之间的数学模型,并采用Kendall秩相关系数法分别检验死亡概率单位与质量浓度间、半致死实验时间与质量浓度间的相关性($P<0.05$ 为显著水平),用 t 检验检验由死亡概率单位-质量浓度直线回归方程和半致死实验时间-质量浓度直线回归方程分别得出的各相应观察时段半致死质量浓度值的差异显著性($P<0.05$ 为显著水平),采用 R 相关系数($P<0.01$ 为显著水平)和 F 值($P<0.005$ 为显著水平)检验死亡概率单位与质量浓度、实验时间之间的数学模型的可靠性,并应用药物毒性蓄积程度系数 MAC (王志铮等,2007a)分析生物体对重金属离子的蓄积与降减动态。各重金属离子的安全质量浓度计算公式(周永欣等,1989)如下:

$$SC = 0.1 \times 96hLC_{50}$$

式中, SC 为安全质量浓度值, $96hLC_{50}$ 为中华鳖稚鳖染毒96h后的半致死质量浓度值。

两种重金属离子复配液对中华鳖稚鳖急性毒性的实验结果评价方法按王志铮等(2005a)。

2 结果与分析

2.1 中毒症状

观察发现,中华鳖稚鳖不仅在重金属离子不同实验质量浓度下出现不同的中毒反应,而且其对不同种重金属离子的耐受力也存在明显差异。实验初期,低质量浓度组的稚鳖活动状况与对照组基本相似,静伏实验容器底部并不时伴有攀爬容器壁和在水中缓慢游动等行为,48h内 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 低质量浓度组稚鳖无死亡现象发生且绝大多数个体活动状况几无变化, Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 部分低质量浓度组24h内便出现死亡个体且有部分个体活动略显异常;高质量浓度组稚鳖放入实验容器后即显躁动不安,与低质量浓度组相比出现较为明显的攀爬逃逸和抱团群聚现象, Cr^{6+} 质量浓度组尤甚,随着实验时间的延长,攀爬逃逸现象不再发生,抱团群聚行为逐渐消失,漂浮于水面个体逐渐增多,其中部分个体呼吸变得日益急促并头颈略向上,对外界刺激反应也变得较为迟钝,活力明显弱于低质量浓度组,48h内 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 高质量浓度组均出现死亡个体, Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 高质量浓度组则仅1—2组出现死亡。随着实验时间的进一步延长,各实验梯度组死亡个体不断增多,48h后 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 高质量浓度组

死亡速率明显赶超 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 高质量浓度。中华鳖稚鳖的中毒死亡过程表现为: 抱团群聚消失, 反应迟钝, 漂浮水面, 呼吸频率急促、不规则且头颈略向上但不伸出水面, 经短暂挣扎后沉入容器底部, 最后躯体和四肢僵直腹面朝上而亡, 解剖可见其呈现胃、肝、肺、肠等内脏有明显充血的中毒症状。

2.2 重金属离子对中华鳖稚鳖的急性毒性

由表 1、表 2 可见, 随着实验质量浓度的提高和实验时间的延长, 4 种重金属离子对中华鳖稚鳖的急性毒性效应均明显增强, 死亡率也明显升高, 但不同重金属离子对中华鳖稚鳖的急性毒性影响却不尽相同, 主要表现为: (1) 开始表露死亡的时间不同。 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 绝大多数质量浓度梯度组在 24h 内即出现不同程度的死亡, 其中 Hg^{2+} 10.00mg/L 梯度组在染毒 5h、15h 和 22h 时累积死亡率就分别达到 10%、20% 和 30%, Zn^{2+} 多数质量浓度梯度组在 24h 内未出现死

亡, 至 48h 尚有半数质量浓度梯度组还未出现死亡, Cr^{6+} 绝大多数质量浓度梯度组在 48h 内未出现死亡, 至 70h 后各质量浓度梯度组才全数出现死亡个体; (2) 死亡率增速不同。 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 质量浓度梯度组死亡率随时间的延长基本呈近等速增长, 而 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 质量浓度梯度组死亡率的高峰表露时段分别为 48—72h 时段和 72—96h 时段; (3) 离子毒性强度不同。从 96h 致死限区间、实验质量浓度范围以及不同观察时段对中华鳖稚鳖的急性毒性结果来看, Hg^{2+} 的毒性强度为最大, Cu^{2+} 、 Cr^{6+} 的毒性强度较相近, Zn^{2+} 毒性强度最低, 其中 Hg^{2+} 的毒性强度分别是 Cu^{2+} 、 Cr^{6+} 的 2—5 倍、 Zn^{2+} 的 15 倍左右。

2.3 重金属对中华鳖稚鳖的联合毒性效应

由表 3 可见, 离子两两组合在加和等毒性强度下对中华鳖稚鳖 96h 联合毒性所呈现的致毒特征, 与离子间毒性强度匹配情形密切相关。具体表现为: (1) Cr^{6+} -

表 1 不同观察时段 4 种重金属离子对中华鳖稚鳖的急性毒性
Tab.1 Acute toxicity of four heavy metal ions on *T. sinensis* juveniles

离子	实验质量浓度 (mg/L)	不同试验时间下的平均累积死亡率(%)				96h 致死限 区间(mg/L)
		24h	48h	72h	96h	
对照组	0.00	0	0	0	0	—
Zn^{2+}	60.00	0	0	15	15	[50, 150]
	70.00	0	0	20	20	
	80.00	0	0	20	30	
	90.00	0	5	30	50	
	100.00	5	15	45	60	
	110.00	10	25	60	75	
Cr^{6+}	15.00	0	0	5	20	[10, 45]
	20.00	0	0	10	30	
	25.00	0	0	10	40	
	30.00	0	0	15	50	
	35.00	0	0	20	60	
	40.00	0	0	35	80	
	45.00	15	20	80	100	
Cu^{2+}	5.00	0	5	5	10	[1, 35]
	10.00	5	10	10	30	
	15.00	5	15	25	50	
	20.00	10	30	50	60	
	25.00	10	35	60	80	
Hg^{2+}	2.00	0	0	5	5	[1, 15]
	4.00	10	20	30	35	
	6.00	10	30	40	50	
	8.00	20	40	60	65	
	10.00	30	50	80	80	

表2 4种重金属离子致中华鳖稚鳖不同累积死亡率的实验时间
Tab.2 The occurrence time of mortality of *T. sinensis* juveniles caused by four heavy metal ions in different concentrations

离子	质量浓度 (mg/L)	达到各累积死亡率所需的平均实验时间(h)									
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
Zn ²⁺	80.00	54	72	92	98	102					
	90.00	50	68	72	82	96					
	100.00	44	54	58	72	78	94	100			
	110.00	10	36	49	51	58	72	84	98		
Cr ⁶⁺	25.00	70	84	87	94	98					
	30.00	64	70	80	85	96					
	35.00	58	72	78	82	88	93				
	40.00	50	64	68	74	76	78	84	96		
Cu ²⁺	45.00	21	40	46	58	66	68	70	72	88	94
	10.00	40	74	88	98	102					
	15.00	27	58	74	84	96	100				
	20.00	22	37	46	68	72	92	98			
Hg ²⁺	25.00	14	26	36	52	64	70	81	93	100	
	4.00	20	42	66	98	106					
	6.00	14	30	46	70	92	104				
	8.00	8	22	36	48	58	70	100	103		
	10.00	5	15	22	36	44	52	63	71	98	101

Zn²⁺对中华鳖稚鳖的致死效果除D组(0.6+0.4)呈相互独立作用外,其余均表现为协同特征。即Cr⁶⁺-Zn²⁺联合对中华鳖稚鳖具毒性放大现象,这种现象仅在Cr⁶⁺毒性强度水平略高于Zn²⁺时达到低谷,表露相互独立作用;(2)Cr⁶⁺-Cu²⁺对中华鳖稚鳖的致死效果取决于Cr⁶⁺、Hg²⁺间毒性强度水平的对比,当Cu²⁺高于Cr⁶⁺时表露协同特征,该特征随Cu²⁺毒性强度水平的升高而增强,反之则随Cr⁶⁺毒性强度水平的升高致毒水平梯次由相互独立作用弱化为拮抗效应;(3)Cr⁶⁺-Hg²⁺对中华鳖稚鳖的致死效果也取决于Cr⁶⁺、Hg²⁺间毒性强度水平的对比,当Hg²⁺高于Cr⁶⁺时表露协同特征,该特征随Hg²⁺毒性强度水平的升高而降低,反之则表露相互独立作用;(4)Zn²⁺-Hg²⁺对中华鳖稚鳖的致死效果除E组(0.8+0.2)呈拮抗效应外,其

余均表现为协同特征。即Zn²⁺-Hg²⁺联合对中华鳖稚鳖具毒性放大现象,这种现象仅在Zn²⁺毒性强度水平明显高于Hg²⁺时达到低谷,表露拮抗效应;(5)Zn²⁺-Cu²⁺对中华鳖稚鳖的致死效果跟两者间的配比无关,均呈协同特征;(6)Cu²⁺-Hg²⁺对中华鳖稚鳖的致死效果取决于Cu²⁺、Hg²⁺间毒性强度水平的对比,当Hg²⁺高于Cu²⁺时表露相互独立作用,Cu²⁺略高于Hg²⁺时呈加和效应,而当Cu²⁺明显高于Hg²⁺时则表现为协同效应。

3 讨论

3.1 重金属离子对中华鳖稚鳖的急性致毒效应特征
从实验中毒症状来看,中华鳖稚鳖对重金属Cr⁶⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Hg²⁺的避毒均为先后通过攀爬逃

表3 4种重金属离子对中华鳖稚鳖的联合毒性
Tab.3 Joint toxicity of four heavy metal ions to *T. sinensis* Juveniles

离子复配组合	96h 两两重金属离子复配组合累积死亡率(%)					
	A	B	C	D	E	F
Cr ⁶⁺ -Zn ²⁺	50	65	55	45	75	50
Cr ⁶⁺ -Cu ²⁺	50	80	60	40	30	50
Cr ⁶⁺ -Hg ²⁺	50	55	75	35	40	50
Zn ²⁺ -Hg ²⁺	50	65	60	60	25	50
Zn ²⁺ -Cu ²⁺	50	55	60	65	75	50
Cu ²⁺ -Hg ²⁺	50	45	40	50	55	50

注:A为(0+1.0)组合,B为(0.2+0.8)组合,C为(0.4+0.6)组合,D为(0.6+0.4)组合,E为(0.8+0.2)组合,F为(1.0+0)组合

逸、抱团群聚以及漂浮水面等方式来展开, 中毒致死过程则依次由抱团群聚消失、活动和反应明显迟钝、呼吸急促头颈略向上、内脏(胃、肝、肺、肠)充血, 最后躯体与四肢僵直而亡来完成的。中华鳖作为次生性水生爬行动物, 水中呼吸主要依靠口咽腔呼吸(约 2/3)和皮肤呼吸(约 1/3)(杨振才等, 1999)。本研究认为, 其避毒方式可能与口咽腔呼吸受抑有关, 而中毒过程则是由重金属在体内不断累积致使呼吸受阻、代谢活动紊乱而共同引发, 其机理有待进一步研究。

重金属离子间物理与化学性质的差异, 以及实验生物间生理与代谢特征的差别, 必然导致实验生物对各重金属表现不同的耐毒能力。从本研究来看, 在染毒 96h 后死亡率相近的组别中(如 Zn^{2+} 90.00mg/L、 Cr^{6+} 30.00mg/L、 Cu^{2+} 15.00mg/L、 Hg^{2+} 6.00mg/L, 96h 死亡率均为 50%, 见表 1), 中华鳖稚鳖受 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫出现死亡的时间较 Zn^{2+} 提前 24h, 较 Cr^{6+} 提前 48h, 且致死率陡度呈现为 $Cr^{6+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Hg^{2+}$, 表明在相同急性毒性水平下, Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 对中华鳖稚鳖具有较强的后期毒发效应, 这可能与实验早期 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 明显较 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 在中华鳖稚鳖体内具有较高的侵入和蓄积速率, 并易于紊乱其生理与代谢机能所致。类似情形在重金属对黄姑鱼幼鱼(王志铮等, 2005b)、泥螺(包坚敏等, 2007)、彩虹明樱蛤(王志铮等, 2007b)等的研究中都有出现, 但在罗氏沼虾(江敏等, 2002)、鲫鱼(杨丽华等, 2003)、凡纳滨对虾(王志铮等, 2005a)等的研究中却不明显, 其原因和机理有待进一步研究。

3.2 4 种重金属离子在中华鳖稚鳖体内的蓄积与降减特征及其安全质量浓度评价

对表 1 数据作统计学处理得表 4。由表 4 可见, 4 种重金属离子在相同实验时间条件下, 不同实验质量浓度梯度组的致死效果存在显著差异, 通过建立死亡概率单位-质量浓度回归方程(Cr^{6+} 因 0—48h 时段有效数据太少, 该时段未建方程), 均显示出较好的拟合度(可决系数 R^2 均大于 0.7833), 死亡概率单位与质量浓度间具有较好的相关性(Kendall 秩相关系数 r 均为显著水平), 表明中华鳖稚鳖受重金属胁迫下的致死率与其实验质量浓度密切相关。

毒物在生物体内的蓄积与降减情形是评价毒物毒效和分析生物耐毒能力的基础。由表 4 可见, Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} MAC 值均为正值, 表明它们在中华鳖稚鳖体内蓄积作用较降减作用而言, 一直处于优势地位。但因离子间物理与化学性质的差异, 致使其 MAC 值

的变化不尽相同。 Zn^{2+} MAC 值随实验时间的延长渐次增大, 24—48h 时段 MAC 值与 48—72h 时段相近, 72—96h 时段达到最大, 此时呈现出较为显著的毒物蓄积情形, 并表露死亡高峰; Cu^{2+} MAC 值随实验时间的延长渐次降低, 24—48h 时段 MAC 值远高于 48—72h 和 72—96h 时段, 表现出较为显著的毒物蓄积情形, 并表露死亡高峰, 同时也为后续死亡率的明显上升奠定了基础; Hg^{2+} MAC 值变化介于 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 之间, 即 MAC 值虽随实验时间的延长渐次降低, 但 24—48h 时段 MAC 值却与 48—72h 时段相近, 并远高于 72—96h 时段, 表明 24—72h 时段呈现出较为显著的毒物蓄积情形, 为表露死亡高峰时段。以上分析与表 1 和表 2 结果一致。

由表 4 可见, Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 对中华鳖稚鳖半致死质量浓度 96h LC_{50} 值依次为 91.88、28.90、16.42 和 5.98mg/L, 按有毒物质对鱼类的毒性标准(张志杰等, 1991)进行评价, Hg^{2+} 对中华鳖稚鳖属中毒, Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 则均属低毒; 由此计算所得的安全质量浓度(Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 依次为 9.19、2.89、1.64 和 0.60mg/L)均远高于我国渔业水质标准(国家环境保护局, 1989)所规定的指标, 表明中华鳖稚鳖对 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 具有很强的耐受能力。经比对, 中华鳖除对 Cr^{6+} 的蓄积能力明显弱于泥鳅(高晓莉等, 2003)和鲫鱼(杨丽华等, 2003)外, 其对 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 的蓄积能力则均明显强于红螯螯虾(杨再福等, 2003)、泥鳅(王银兰等, 2003; 高晓莉等, 2003)、鲫鱼(杨丽华等, 2003)、泽蛙蝌蚪(陈孝宣等, 1999)、罗氏沼虾(江敏等, 2002)、草鱼(侯丽萍等, 2002)等主要淡水经济动物。基于重金属离子在食物链传递中的放大效应, 且中华鳖又是水域生态系统中的顶级消费者之一, 故应着重关注在混、套养养殖体系中中华鳖养成品种体内重金属离子的累积效应, 加强重金属离子含量检测, 以确保中华鳖食用消费安全。

3.3 重金属离子对中华鳖稚鳖致毒的时间效应特征

众所周之, 明晰毒物排放时间和致生物体大量死亡时间在渔业污染事故侦查和处理中具有重要价值, 但迄今国内外在水生生物毒理生态学领域尚未见与之相关的系统研究报道。生物体染毒致死的时间效应常呈“S”型曲线, 而半致死时间 LT_{50} 值则往往是该“S”型曲线的拐点值, 即为致生物体大量快速死亡时间的临界值。故可在分析、确定污染水域中毒物质量浓度和估算目标生物体实际死亡率的基础上, 运用累积死亡概率与重金属质量浓度和表露时间之间

表 4 不同观察时段四种重金属离子对中华鳖稚鳖急性毒性特征的分析
Tab.4 The acute toxicity of four heavy metal ions on *T. sinensis* juveniles in different intervals and doses

离子	t(h)	概率单位 - 质量浓度回归方程	R ²	df	F	r	LC ₅₀ 值及其 95% 置信区间 (mg/L)	MAC	SC (mg/L)
Zn ²⁺	24	y = 0.186x - 16.24	0.8218	3	4.61	1.000*	114.19±4.16	—	9.19
	48	y = 0.1359x - 9.998	0.7833	4	7.23	1.000*	110.36±2.73	0.17	
	72	y = 0.0254x + 2.3186	0.9274	6	51.07	1.000*	105.57±0.47	0.21	
	96	y = 0.0353x + 1.7565	0.9870	6	304.59	1.000*	91.88±0.64	0.61	
Cr ⁶⁺	72	y = 0.069x + 2.1257	0.8162	7	22.20	1.000*	41.66±0.70	—	2.89
	96	y = 0.0626x + 3.191	0.9742	6	60.78	1.000*	28.90±0.50	—	
Cu ²⁺	24	y = 0.0288x + 3.036	0.8000	4	8.00	1.000*	68.19±2.27	—	1.64
	48	y = 0.0652x + 3.048	0.9762	5	122.81	1.000*	29.94±1.94	0.74	
	72	y = 0.1012x + 2.814	0.9816	5	160.29	1.000*	21.61±2.16	0.16	
	96	y = 0.1002x + 3.355	0.9744	5	113.97	1.000*	16.42±2.39	0.10	
Hg ²⁺	24	y = 0.136x + 3.068	0.8996	4	17.93	1.000*	14.20±0.51	—	0.60
	48	y = 0.1359x + 3.621	0.9967	4	612.92	1.000*	10.15±0.50	0.49	
	72	y = 0.229x + 3.477	0.9753	5	62.02	1.000*	6.65±1.03	0.42	
	96	y = 0.204x + 3.782	0.9987	5	35.73	1.000*	5.98±1.05	0.08	

注：F_{0.05(1,3)} = 10.13; F_{0.05(1,4)} = 7.709; F_{0.05(1,5)} = 6.608; F_{0.05(1,6)} = 5.987; F_{0.05(1,7)} = 5.591。*表示显著水平 P<0.05

的数学模型推算毒物排放时间，借助半致死时间-质量浓度回归方程，获取该毒物质量浓度 LT₅₀ 值，推定致生物体大量死亡的时间。

基于以上分析，本研究对表 2 数据作统计学处理得表 5 和表 6。由表 5 可见，中华鳖稚鳖累积死亡概率与 4 种重金属离子质量浓度及其表露时间之间有良好的线性相关性，经 R 检验和 F 检验表明方程有意义，可作为推算毒物排放时间的重要计算工具。由

表 6 可见，中华鳖稚鳖半致死时间-质量浓度回归方程均显示出较好的拟合度(R² 均大于 0.9418)，半致死时间-质量浓度间具有较好的相关性(Kendall 秩相关系数 r 均为显著水平)，将验算所得的各时段 LC₅₀ 值(表 6)与概率单位-质量浓度回归方程计算所得的各时段 LC₅₀ 值(表 4)结果进行 t 检验分析均无显著差异的结果，从另外一个角度验证了概率单位-质量浓度回归方程的可靠性，同时也进一步表明中华鳖稚鳖受

表 5 中华鳖稚鳖累积死亡概率与重金属离子质量浓度和表露时间之间的相互关系

Tab.5 The relationships in the death cumulative probability and the concentration of heavy metal ions and the experimental time of *T. sinensis* juveniles

离子	回归方程	k	df	R ²	R 检验	F	F 检验
Zn ²⁺	z = 0.37x + 0.26y - 0.832	2	22	0.955	R _{0.01(2,22)} = 0.585	233.062	
Cr ⁶⁺	z = 0.84x + 0.40y - 1.295	2	30	0.885	R _{0.01(2,30)} = 0.514	115.790	F _{0.005(2,20)} = 6.986
Cu ²⁺	z = 0.72x + 0.23y + 1.805	2	24	0.962	R _{0.01(2,24)} = 0.565	306.160	F _{0.005(2,30)} = 6.355
Hg ²⁺	z = 0.169x + 0.20y + 2.405	2	25	0.921	R _{0.01(2,25)} = 0.555	146.260	

注：z 为死亡概率单位; x 为质量浓度; y 为实验表露时间

表 6 4 种重金属离子对中华鳖稚鳖急性毒性的半致死时间效应分析

Tab.6 The effect of the median lethal time of the acute toxicity of four heavy metal ions on *T. sinensis* juveniles

离子	半致死时间-质量浓度回归方程	R ²	df	F	r	LC ₅₀ 验算值 (mg/L)				t	t _{0.05}
						24h	48h	72h	96h		
Zn ²⁺	y = - 1.50x + 226.0	0.9542	4	41.67	1.000*	134.67	118.67	102.67	86.67	0.877	t ₍₃₎ = 3.182
Cr ⁶⁺	y = - 1.68x + 143.6	0.9525	5	60.14	1.000*	71.19	56.90	42.62	28.33	3.923	t ₍₁₎ = 12.706
Cu ²⁺	y = - 2.76x + 131.8	0.9418	4	32.39	1.000*	39.06	30.36	21.67	12.97	1.132	t ₍₃₎ = 3.182
Hg ²⁺	y = - 11.0x + 152.0	0.9680	4	60.20	1.000*	11.64	9.45	7.27	5.09	0.739	t ₍₃₎ = 3.182

注：F_{0.05(1,4)} = 7.709; F_{0.05(1,5)} = 6.608。*表示显著水平 P<0.05

重金属胁迫下的 LT_{50} 值与其实验质量浓度密切相关。

3.4 重金属离子两两复配对中华鳖稚鳖联合毒性效应特征

离子间物理与化学性质的差异, 以及实验生物间生理与代谢特征的差别, 是导致加和等毒性强度下同种生物在重金属离子不同配比和不同种生物在重金属离子相同配比时出现不同毒性效应的主要原因, 这已在许多研究中得到证实(修瑞琴等, 1996; 侯丽萍等, 2002; Feron *et al*, 2002; 高晓莉等, 2003; 赵红霞等, 2004; 王志铮等, 2005a, b, 2007b; 包坚敏等, 2007)。同时研究也表明, 重金属离子在生物体内的蓄积与降减取决于生物体内 MT 的含量及其被螯合程度, 当重金属离子与 MT 螯合达到饱和(螯合速率大于细胞内合成速率)后, 混合重金属离子对生物的致毒潜力将获得显著增强(蓝伟光等, 1990; 廖自基, 1992; George *et al*, 1996)。

由表 3 可见, Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 两两加和等毒性联合对中华鳖稚鳖的毒性效应结果与罗氏沼虾(江敏等, 2002)、凡纳滨对虾幼虾(王志铮等, 2005a)、黄姑鱼幼鱼(王志铮等, 2005b)、彩虹明樱蛤(王志铮等, 2007b)、泥螺(包坚敏等, 2007)等其它水生生物都存有一定差异。作者认为引起该差异的主要原因可能为: (1) 各重金属离子与实验动物细胞内 MT 的亲合力和螯合饱和度存有明显差异, 导致联合毒性过程中实验动物细胞内 MT 对自由离子的螯合消耗在量与质上有一定的先后秩序, 故自由离子间在联合毒性过程中所起作用的不平衡性为联合致毒效应差异的产生埋下了伏笔; (2) 重金属离子复配种类以及毒性强度配置比例, 将直接影响实验动物细胞内 MT 的合成速率, 进而改变其对重金属的螯合饱和度并表露联合致毒效应差异。这一特征已为许多研究所证实(Feron *et al*, 2002; 周启星等, 2003; 赵红霞等, 2004); (3) 同种生物对不同重金属的需求量和耐受力都不尽相同, 不同重金属对生物体的作用机制与方式也存在一定的差异(廖自基, 1992; 修瑞琴等, 1996; 吴贤汉等, 1999; 杨丽华等, 2003; 赵红霞等, 2004), 即不同实验生物在生理与代谢特征间存有较为显著的差别, 致使其对不同重金属离子的耐毒水平和抗毒行为与机制存有差异, 导致不同实验生物间联合致毒效应特征的差异。

致谢 余姚市水产技术推广中心提供实验场地和部分试验用具, 本校 2006 级水产养殖专业王海强、

方红雨、李波、阮波等同学参与本研究部分实验工作, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王志铮, 吕敢堂, 许俊等, 2005a. Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 对凡纳滨对虾幼虾急性毒性和联合毒性. 海洋水产研究, 26(2): 6—12
- 王志铮, 刘祖毅, 吕敢堂等, 2005b. Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 对黄姑鱼幼鱼的急性致毒效应. 中国水产科学, 12(6): 745—750
- 王志铮, 刘祖毅, 吕敢堂等, 2007a. 4 种消毒剂对麦瑞加拉鲑鱼幼鱼的急性毒性研究. 海洋水产研究, 28(3): 92—97
- 王志铮, 王伟定, 杨 阳等, 2007b. 4 种重金属对彩虹明樱蛤的急性致毒效应. 海洋与湖沼, 38(4): 373—378
- 王银兰, 张引梅, 赵东芹, 2003. 重金属铜、铅、锌对泥鳅和鲫鱼的毒性. 甘肃科学学报, 15(1): 35—38
- 包坚敏, 王志铮, 陈启恒等, 2007. 4 种重金属对泥螺的急性毒性和联合毒性研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 26(3): 252—256
- 江 敏, 臧维玲, 姚庆祯等, 2002. 4 种重金属对罗氏沼虾的毒性作用. 上海水产大学学报, 11(3): 203—207
- 孙红祥, 舒妙安, 2002. 中华鳖几种常见疾病病原的分离鉴定及药敏试验. 中国兽医学报, 12(2): 140—142
- 杨再福, 陈立侨, 陈华友, 2003. 重金属铜、镉对蝌蚪毒性的研究. 中国生态农业学报, 11(1): 102—103
- 杨丽华, 方展强, 郑文彪, 2003. 重金属对鲫鱼的急性毒性及安全浓度评价. 华南师范大学学报(自然科学版) (2): 101—106
- 杨振才, 牛翠娟, 孙儒泳, 1999. 中华鳖生物学研究进展. 动物学杂志, 34(6): 41—44
- 杨燕忠, 1997. 几种药物对中华鳖稚鳖的毒性试验. 水产科技 6: 24—26
- 吴贤汉, 江新霖, 张宝录等, 1999. 几种重金属对青岛文昌鱼的毒性及生长的影响. 海洋与湖沼, 30(6): 604—608
- 张志杰, 张维平, 1991. 环境污染生物监测与评价. 北京: 中国环境科学出版社, 69
- 陈文银, 印春华, 1997. 诺氟沙星在中华鳖体内的药代动力学研究. 水产学报, 21(4): 434—437
- 陈孝宣, 吴志新, 操玉涛等, 1999. 红螯螯虾苗对四种重金属离子的耐受性. 华中农业大学学报, 18(5): 476—478
- 国家环境保护局, 1989. GB 11607-1989 渔业水质标准. 北京: 中国标准出版社, 1—5
- 周永欣, 章宗涉, 1989. 水生生物毒性实验方法. 北京: 农业出版社, 1—157
- 周启星, 程 云, 张倩茹等, 2003. 复合污染生态毒理效应的定量关系分析. 中国科学(C 辑), 33(6): 566—573
- 周显青, 牛翠娟, 李庆芬等, 1998. 光照强度对中华鳖稚鳖摄食和生长的影响. 动物学报, 44(2): 157—161
- 赵红霞, 周 萌, 詹 勇等, 2004. 重金属对水生生物毒性的研究进展. 中国兽医杂志, 40(4): 39—41
- 郝玉江, 杨振才, 高永利等, 2002. 中华鳖生态养殖模式的原理、结构和特点. 生态学杂志, 21(2): 74—77

- 修瑞琴, 许永香, 1996. 铜、锌离子对斑马鱼的联合毒性. 卫生研究, 25(2): 101—102
- 侯丽萍, 马广智, 2002. 铜、锌对草鱼种的急性毒性和联合毒性研究. 淡水渔业, 32(3): 44—46
- 高晓莉, 齐风生, 罗胡英等, 2003. 铜、汞、铬对泥鳅的急性毒性和联合毒性实验. 水利渔业, 23(2): 63—64
- 蓝伟光, 吴永沛, 1990. 海水污染物对对虾毒性研究的进展 : 对虾的重金属毒性研究. 福建水产, 1: 41—45
- 廖自基, 1992. 微量元素的环境化学及生物效应. 北京: 中国环境科学出版社, 210—323
- Feron V J, Groten J P, 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. Food and Chemical Toxicology, 40(6): 825—839
- George S, Hodgson P, Todd K *et al*, 1996. Metallothionein protects against cadmium toxicity-proof from studies developing turbot larvae. Marine Environmental Research, 42: 52

ACUTE TOXIC EFFECTS OF FOUR HEAVY METALS ON *TRIONYX SINENSIS* JUVENILES

WANG Zhi-Zheng¹, LU Gan-Tang¹, SHI Jian-Jun², SHEN Tu-Yan², MAO Wen-Ju¹

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004; 2. Fishery Technology Extension Center of Yuyao, Ningbo, 315400)

Abstract Acute toxicity of Hg^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} and their joint toxicity on 5-day-old *Trionyx sinensis* juveniles in water temperature at (27.4 ± 1.3) were studied. Accumulative nature was revealed. The degree of toxicity was in the order of $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cr^{6+} > Zn^{2+}$ as the mortality occurred, from early to late; and the median lethal concentrations (LC_{50}) at 96h were 5.98, 16.42, 28.90, and 91.88mg/L. The joint toxicity of the four heavy metal ions at 96h was closely related to ion species and toxicity intensity. Mathematical model and regression equation were built on the death cumulative probability, the concentration of heavy metal ions, the massive death occurrence time, etc., and are important tools for detecting and forecasting the toxicity and mass mortality.

Key words Heavy metal ions, Acute toxicity, Joint toxicity, *Trionyx sinensis* juvenile