Cd²⁺和 Cu²⁺对泥蚶的急性毒性和联合毒性试验

王召根^{1,2}、吴洪喜^{2,3}、王琛华^{1,2}、周朝生^{2,3}、陈肖肖^{2,3}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325000;

3. 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室、浙江 温州 325005)

摘要:为了解重金属 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对泥蚶的毒害程度和泥蚶对重金属 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的解毒能力,用毒理学实验方法研究了 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对泥蚶($Tegillarca\ granosa$)的急性毒性和联合毒性效应。结果表明: Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 对泥蚶的 96 h 半致死质量浓度分别为 6.189、0.460 mg/L;安全质量浓度分别为 0.062、0.005 mg/L;相对毒性 Cu^{2+} > Cd^{2+} 。在 1:1 毒性单位的联合作用下, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对泥蚶 96 h 的半致死质量浓度分别为 1.984、0.147 mg/L;安全质量浓度分别为 0.020、0.001 mg/L。2 种重金属离子的联合毒性大于任一重金属离子的毒性,联合毒性表现为协同作用。

关键词: Cd²⁺; Cu²⁺; 泥蚶(Tegillarca granosa); 急性毒性; 联合毒性

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)08-0016-05

doi: 10.11759/hykx20130524001

泥蚶(Tegillarca granosa),俗称花蚶、血蚶、粒蚶等,生长于印度洋及太平洋的热带、亚热带近岸海域,在中国山东半岛以南诸海区均有分布。泥蚶因其味道鲜美,营养丰富,深受人们的欢迎。近年来,由于大量含有重金属残留的工业废水和生活污水排入海洋,对泥蚶等滩涂贝类的自身生存及其食用安全产生不可忽视的危害隐患[1]。

根据《2009年浙江省海洋环境公报》的数据,温州沿海部分海域的镉和铜有所趋重,达中度污染,研究 Cd²+和 Cu²+对泥蚶的急性毒性和联合毒性效应,了解重金属 Cd²+和 Cu²+对泥蚶的毒害程度和泥蚶对重金属 Cd²+与 Cu²+的解毒能力,对保障温州沿海泥蚶健康养殖和人类食用安全,科学制定贝类养殖水质标准具有十分重要的意义^[2]。目前,国内外有关镉、铜等对鱼类的急性毒性研究已有不少报道^[3-6],但在贝类的急性毒性方面研究很少。作者分析和讨论了 Cd²+和 Cu²+对泥蚶的急性毒性和联合毒性实验结果,供同行参考。

1 材料与方法

1.1 实验泥蚶及其暂养

实验泥蚶二龄,采自乐清湾海区,壳长(28.15 ± 1.59) mm,体质量(8.25 ± 1.65) g,体征正常,运动活泼。实验前用的规格为 61.8 cm×43.0 cm×31.3 cm 的聚乙烯水槽中暂养 7 d。暂养期间连续充气,每天上午

换水 1 次, 换水量 50%, 换水后投喂亚心型扁藻 ($Platymonas\ subcordiformis$), 投喂后, 水体中藻细胞密度约为 0.3×10^4 个/L, 实验前 1 天停止投饵。

1.2 实验试剂及其配置

主要试剂有 $CdC1_2 \cdot 2.5H_2O(AR)$ 和 $CuSO_4 \cdot 5H_2O(AR)$,均为国药集团化学试剂有限公司生产,先用去离子水分别配成含 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 质量浓度为 2 g/L的母液,然后用母液将实验用水中 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 质量浓度调节到实验设计的要求。

1.3 实验用的海水及其理化因子

实验用的海水取自乐清湾海域, 且经 24 h 以上沉淀、砂滤等处理, Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 的本底值分别为 0.13、 2.97 $\mu g/L$,均符合国家渔业水质标准的要求。水温 (29.8±0.6) $^{\circ}$ 、盐度 21, pH 8.05,溶解氧>6 mg/L。

1.4 预实验

预实验在规格为 61.8 cm×43.0 cm×31.3 cm 的聚 乙烯水族箱中进行,每个水族箱中加入海水 30L。重 金属离子浓度以 10 倍之差设计 5 个浓度梯度,每一

收稿日期: 2013-12-06; 修回日期: 2014-04-22

基金项目: 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室人才培养基金项目(2010F30003); 上海海洋大学研究生科研基金项目(A-2500-11-0013)

作者简介: 王召根(1987-), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向 为生态毒理学与水产增养殖, E-mail: scwzg163@163.com;吴洪喜, 通 信作者, 研究员, E-mail: whxchina@126.com

梯度分别放养来自随机采到的已经在实验室暂养 1 周的泥蚶 30 只, 预实验时间 24 h, 重复 3 次, 实验期间连续充气, 不投饵, 根据预实验结果, 确定重金属对泥蚶 100%致死的最小浓度和 100%存活的最大浓度。

1.5 单一重金属对泥蚶的毒性实验

根据预实验结果,在重金属对泥蚶 100%致死的最小浓度和 100%存活的最大浓度之间,按浓度对数值等间距划分 5 个浓度梯度(6 个浓度数值),另设 1 个空白对照,每组设 3 个平行。每一梯度和空白对照随机放养暂养过的泥蚶 30 只。实验期间不投喂,每天换水 50%,换水后添加母液保持实验水中重金属浓度恒定。实验中有泥蚶两壳长久张开,足异常伸展于体外,外套膜萎缩,多次刺激无反应的,视为已经死亡,并及时取出,整个实验历时96 h(表 1)。

表 1 单一重金属 Cd²⁺和 Cu²⁺对泥蚶急性毒性实验设计 Tab.1 Heavy mental acute toxicity experiments on Tegillarca granosa using single Cd²⁺ or Cu²⁺

	Co	d^{2+}	Cu ²⁺		
组别	质量浓度 质量浓度		质量浓度对	质量浓度	
	对数值	(mg/L)	数值	(mg/L)	
空白对照		0		0	
1	-1	0.100	-0.7	0.200	
2	-0.5	0.316	-0.3	0.501	
3	0	1.000	0.1	1.259	
4	0.5	3.162	0.5	3.162	
5	1	10.000	0.9	7.943	
6	1.5	31.622	1.3	19.952	

1.6 二重金属联合对泥蚶毒性实验

实验采用等毒性配比法^[7],即在单一重金属对泥蚶急性毒性实验的基础上,试验夜中 1 个镉 LC_{50} 浓度、一个铜 LC_{50} 浓度为 1 个联合毒性单位(TM 联合),其他浓度按相应比例混合。实验设置 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 联合毒性浓度为 0(空白对照)、 0.25、 0.50、 1.00、 2.00、 3.98 个联合毒性单位 5 组(表 2)。每组设 3 个平行,在与单一重金属毒性实验相同的条件下,进行 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 联合对泥蚶毒性实验(表 2)。实验过程中及时取出死亡个体,整个实验历时 96 h,统计实验 24 h 、48 h 、72 h 和 96 h 时的泥蚶死亡个体数。

表 2 Cd²⁺和 Cu²⁺联合对泥蚶急性毒性实验设计

Tab.2 Heavy mental acute toxicity experiments on Tegillarca granosa using combination of Cd²⁺ and Cu²⁺

组别	质量浓度	毒性单位	Cd ²⁺ 质量浓 Cu ²⁺ 质量浓		
	对数值	(TM 联合)	度(mg/L)	度(mg/L)	
空白对照		0	0	0	
1	-0.6	0.25	1.547	0.115	
2	-0.3	0.50	3.095	0.230	
3	0	1.00	6.189	0.460	
4	0.3	2.00	12.378	0.920	
5	0.6	3.98	24.632	1.831	

1.7 数据分析

用 SPSS 19.0 软件求出平均死亡率(换算成概率单位)与实验用水的重金属质量浓度对数的回归方程、泥蚶 96 h 的半致死浓度(LC₅₀)和 95%置信区间。

安全质量浓度由公式 $C_{\rm S}$ =96 h LC₅₀×f求出,由于 Cd²⁺、Cu²⁺属难分解、蓄积性强、毒性较大的物质,本 实验 f 值取 $0.01^{[1]}$; 运用 EXCEL 2007 对泥蚶死亡数 据作图。

联合毒性按 $S=(A_m/A)+(B_m/B)$ 公式计算, S 为联合毒性, A、B 分别为单一金属毒性的 LC_{50} 值, A_m 、 B_m 分别为混合液中重金属各自毒性的 LC_{50} 值。

联合毒性按 Marking 的相加指数法^[8]评价,相加指数 I_A =(1/S) –1(当 S<1 时)或 I_A = S×(–1) + 1(当 S>1 时)。 I_A <0 为拮抗作用, I_A =0 为毒性相加作用, I_A >0 为协同作用^[7]。

2 实验结果

2.1 泥蚶受重金属 Cd2+、Cu2+中毒的症状

泥蚶在不同浓度的重金属溶液中呈现出明显的中毒症状。实验开始时所有实验组泥蚶的贝壳都紧闭,一段时间后,所有实验组的泥蚶均张开贝壳呼吸。随着实验时间的延长,低浓度组的泥蚶受刺激后贝壳能够缓慢关闭,高浓度组的泥蚶斧足极度伸展,外套膜萎缩,受刺激后贝壳不能快速关闭,或有闭壳反应但不能完全闭合,随着实验时间的进一步延长,泥蚶贝壳完全张开,斧足完全外露,受刺激后没有任何反应。

2.2 单一重金属对泥蚶毒性实验结果

实验结果表明, 泥蚶在含有重金属 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 水体中, 不管实验时间 24 h、48 h 还是 96 h, 泥蚶的死亡率与重金属离子浓度均成正比, 且呈现出一定

的时间 - 效应关系, 实验结果也表明, Cu^{2+} 对泥蚶的毒性远大于 Cd^{2+} (图 1 和图 2)。

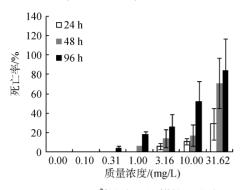


图 1 不同 Cd²⁺浓度下泥蚶的死亡率

Fig.1 Acute toxicity of Cd²⁺ on Tegillarca granosa

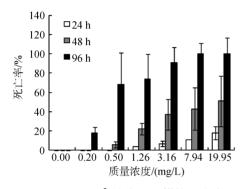


图 2 不同 Cu²⁺浓度下泥蚶的死亡率 Fig.2 Acute toxicity of Cu²⁺ on *Tegillarca granosa*

对 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 2 种重金属对泥蚶毒性的回归分析(表 3), 得出 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对泥蚶的毒性 96 h的 LC_{50} 值分别为 6.189 mg/L 和 0.460 mg/L, 安全质量浓度分别为 0.062 mg/L 和 0.005 mg/L。

2.3 Cd²⁺和 Cu²⁺对泥蚶的联合毒性实验结果

图 3 为 Cd²⁺和 Cu²⁺对泥蚶成体的联合毒性实验

表 3 Cd²⁺和 Cu²⁺对泥蚶毒性实验数据的回归分析

Tab.3 LC₅₀ and its confidence interval of individual Cd²⁺ and Cu²⁺ to *Tegillarca granosa* 概率单位-

重金属离子	概率单位- 质量浓度对数回归方程	相关系数 R	96h LC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ 的 95%置信区间	安全质量浓度 (μg/L)
Cd ²⁺	P=1.653X-1.308	0.935	6.189	5.108, 7.657	0.062
Cu^{2+}	P=1.875X+0.632	0.952	0.460	0.222, 0.747	0.005

注: P 为泥蚶死亡几率单位, X 为各重金属浓度的对数值

表 4 Cd2++Cu2+对泥蚶联合作用实验数据的回归分析

Tab.4 LC₅₀ and its confidence interval of combined Cd²⁺ and Cu²⁺ to Tegillarca granosa

重金属离子		概率单位- 质量浓度对数回归方程	相关系数 R	96h LC ₅₀ (mg/L)	LC ₅₀ 的 95%置信区间	安全质量浓 度(mg/L)
Cd ²⁺ -Cu ²⁺	Cd ²⁺	P=1.663X-5.485	0.947	1.984	3.482, 7.113	0.020
Cu -Cu	Cu^{2+}	P=1.663X-3.607	0.957	0.147	0.259, 0.529	0.001

注: P 为死亡几率单位, X 为各重金属浓度的浓度对数

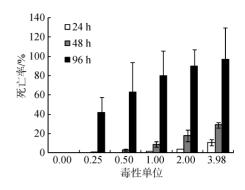


图 3 不同 Cd^{2+} + Cu^{2+} (联合)浓度下的泥蚶死亡率 Fig.3 Acute toxicity of Cd^{2+} - Cu^{2+} to Tegillarca granosa

结果, 泥蚶的死亡率同样随着联合重金属浓度的增加而升高, 呈现出一定的时间 - 效应关系。

对联合毒性的概率单位-浓度对数值进行线性回归分析(表 4),得到 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 共存时对泥蚶96 h 的联合半致死质量浓度分别为 1.984 mg/L、0.147 mg/L。 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 共存对泥蚶的联合毒性96 h 的相加指数(I_A)为 0.56,其联合毒性表现为协同作用, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的联合毒性大于单一的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的毒性。

3 讨论

3.1 Cd²⁺和 Cu²⁺对不同滩涂贝类的急性毒性及其比较分析

本实验结果表明, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对泥蚶的 96h LC_{50} 值分别为 6.189, 0.46 mg/L, 对泥蚶的急性毒性, Cu^{2+} > Cd^{2+} , 这与众多学者的研究结果基本一致。王晓宇等^[1]在研究镉和汞 2 种重金属离子对四角蛤蜊的急性毒性结果表明, Cd^{2+} 对四角蛤蜊的的 96h LC_{50} 为 2.383 mg/L; 王兴强等^[9]和刘浩明等^[10]的研究结

果表明, Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 对缢蛏的 96h LC_{50} 分别为 1.58、 0.232 mg/L; 张宜奎等^[11]通过研究重金属 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 对文蛤的急性毒性, 得出 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 对文蛤的 96h

 LC_{50} 分别为 13.18、0.12 mg/L(表 5)。至于 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 对不同滩涂贝类的 96h LC_{50} 不同,可能与不同滩涂贝类自身解毒能力和机理有关。

表 5 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对若干滩涂贝类 $96hLC_{50}$ 的比较分析 Tab.5 The $96h\ LC_{50}$ of Cd^{2+} and Cu^{2+} on several common bivalves

重金属	受试生物	水温(℃)	盐度	96h LC ₅₀ (mg/L)	文献来源	年份
Cd^{2+}	泥蚶	29.8±0.6	21	6.189	本文作者	2012
Cd^{2+}	四角蛤蜊	15.0 ± 2.0	33	2.383	[1]	1999
Cd^{2+}	缢蛏	24.0 ± 1.0	23	1.58	[9]	2006
Cu^{2+}	泥蚶	29.8 ± 0.6	21	0.460	本文作者	2012
Cu^{2+}	缢蛏	19.0 ± 1.0	22	0.232	[10]	2012
Cu^{2+}	文蛤	18.0 ± 2.0	31	0.120	[11]	2011

3.2 多种重金属对水生生物的联合毒性效应

本实验结果表明。 Cu^{2+} 与 Cd^{2+} 共存时对泥蚶的 96h 联合毒性表现为协同作用、类似的结果也见于其 他报道。Moraïtou-Apostolopoulou等[12]在研究Cu、 Cd 和 Cr 对 Tisbe holothuriae 的毒性效应时发现 3 种 重金属中任意2种混合均起协同作用,毒性最强,任 意 2 种重金属联合毒性>3 种重金属的联合毒性>单 一重金属毒性; Eaton[13]和修瑞琴等[14]曾分别用黑头 软口鲦(Pimephales promelas)和斑马鱼(Brachydanio rerio)研究了砷、镉和锌的联合毒性、都揭示了多种 毒物共存时复杂的毒性机理、认为决不能简单地由 各单一毒物毒性相加来计算联合毒性。事实上,水体 被多种重金属污染后,发生了复杂的联合毒性效应; 童建等[15]认为、有关重金属协同作用机理也有多种 可能, 多种毒物共存时其联合毒性机理是非常复杂 的。可见、用单一毒物的含量去判断水污染后的毒性 危害不是很科学的。

3.3 重金属对生物体的毒性机理

一般认为, 重金属对生物的毒性主要是它能与生物体的金属硫基蛋白结合, 使生物体蛋白质变性, 致畸、致癌或致突变^[16]。本实验所选择的 Cd 和 Cu 是生活中常见的重金属污染物, 也是无公害产品卫生质量要求中必检的参数。实验结果表明: Cu 或 Cd 对生物体毒性都不小, 小浓度就可能引起中毒, 相对而言, Cu 毒性较大, Cd 毒性较小, Cd 与 Cu 共存时, 其联合毒性更大。因泥蚶对 Cd 和 Cu 的吸收和耐受力不同, Cd 和 Cu 对泥蚶的毒性也有差异, 泥蚶对 Cu 比较敏感, 较低浓度的 Cu 就会导致泥蚶短期内死亡; 泥蚶对 Cd 相对不敏感, 只有较高浓度的 Cd 才会引起泥蚶死亡。贝类对环境中重金属的敏感程度与水

环境中的重金属浓度、暴露时间、体内靶位等有关。 镉在贝类生物体内虽然有较高的浓度,但依然可以 存活,但铜在贝类体内浓度较低时就会出现死亡, 这可能与重金属于体内靶位接触难易也有关。泥蚶 壳钙质,镉离子与钙离子的半径相差无几,泥蚶吸 收钙的同时可能也错误地吸收了镉。重金属对贝类 的中毒现象可能还与其特定的解毒机制有关,其真 正原因有待进一步研究与证实。

参考文献:

- [1] 王晓宇, 王清, 杨红生.镉和汞两种重金属离子对四角蛤蜊的急性毒性[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 24-29.
- [2] Laura F, Santiago A, Raúl A, et al. Acute toxicities of four metals on the early life stages of the crab *Chasm-agnathus granulatafrom* Bahía Blanca estuary, Argentina[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 65: 209-217.
- [3] 王瑞龙,马广智,方展强.铜、镉、锌对唐鱼的急性 毒性及安全浓度评价[J].水产科学,2006,25(3): 117-120.
- [4] 杨丽华, 方展强, 郑文彪. 重金属对鲫鱼的急性毒性 及安全浓度评价[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2003, 2: 101-106.
- [5] Taylor D, Maddock B G, Mance G. The acute toxicity of nine "grey list" metals (arsenic, boron, chromium, 28 copper, lead, nickel, tin, vanadium and zinc) to two marine fish species: Dab (*Limanda limanda*) and grey mullet (*Chelon labrosus*)[J]. Aquatic Toxicology, 1985, 7(3): 135-144.

- [6] Sanjay P, Ravindra K, Shilpi S, et al. Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus*(Bloch)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 61(1): 114-120.
- [7] 孙振兴, 王慧恩, 王晶等. 汞、镉、硒对刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参的单一毒性与联合毒性[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(2): 228-234.
- [8] 修瑞琴, 高世荣, 许永香, 等. 氟与硒对鱼类联合毒性的研究[J]. 中国环境科学, 1995, 15(5): 348-350.
- [9] 王兴强, 阎斌伦, 曹梅. 氯化镉、硝酸铅和氯化高汞 对缢蛏存活率的影响[J]. 水利渔业, 2006, 26(6): 82-83.
- [10] 刘浩明,董迎辉,霍礼辉等. Cu²⁺对缢蛏稚贝的急性 毒性及对抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响[J]. 中 国水产科学, 2012, 19(1): 182-187.
- [11] 张宜奎、宋秀凯、刘爱英、等. 重金属 Cd²⁺、Cu²⁺对

- 文蛤的急性毒性[J]. 海洋湖沼通报, 2011, 3: 51-56.
- [12] Moraïtou-Apostolopoulou M, Verriopoulos G. Individual and combined toxicity of three heavy metals, Cu, Cd and Cr for the marine copepod *Tisbe holothuriae*[J]. Hydrobiologia, 1987(1): 83-87.
- [13] Eaton J G. Chronic toxicity of a copper, cadmium and zinc mixture to the fthead minnow (*Pimcphale promelas*)[J]. Water Res Pergamon., 1973, 17: 1723-1736.
- [14] 修瑞琴, 许永香, 高世荣, 等. 砷与镉、锌离子对斑 马鱼的联合毒性实验[J]. 中国环境科学, 1998, 18(4): 349-352.
- [15] 童建, 冯致英. 环境化学物的联合毒性作用[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1994.
- [16] 叶寒青,杨祥良,周景炎,等.环境污染物镉毒性作用机理研究进展[J].广东微量元素科学,2001,8(03):9-12.

Acute toxic and joint toxic experiments of Cd²⁺ and Cu²⁺ on *Tegillarca granosa*

WANG Zhao-gen^{1, 2}, WU Hong-xi^{2, 3}, WANG Yao-hua^{1, 2}, Zhou Chao-sheng^{2, 3}, CHEN Xiao-xiao^{2, 3}

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325000, China; 3. Zhejiang Key Lab of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource, Wenzhou 325005, China)

Received: Dec., 6, 2013

Key words: Cd²⁺; Cu²⁺; *Tegillarca granosa*; acute toxicity; joint toxicity

Abstract: Acute toxicity and joint toxicity of Cd²⁺ and Cu²⁺ on *Tegillarca granosa* were studied using toxicological methods. The result indicated that Cu²⁺ had a stronger toxicity than Cd²⁺. The median lethal concentrations (LC₅₀) of Cd²⁺ and Cu²⁺ at 96 hours to the *T. granosa* were 6.189 mg/L and 0.460 mg/L respectively. The safe concentrations for *T. granosa* were 0.062 mg/L and 0.005 mg/L for Cd²⁺ and Cu²⁺, respectively. Additive index method was used to evaluate the joint toxic effects of Cd²⁺ and Cu²⁺ on the *T. granosa* and a combinative toxicity was observed. The median lethal concentrations (LC₅₀) of Cd²⁺ and Cu²⁺ at 96 hours to the *T. granosa* were 1.984 mg/L and 0.147 mg/L, respectively. The safe concentrations for *T. granosa* were 0.020 mg/L and 0.001 mg/L for Cd²⁺ and Cu²⁺, respectively. The joint toxicity of Cd²⁺ and Cu²⁺ on *T. granosa* was stronger than the individual toxicities, suggesting a synergetic action.

(本文编辑: 梁德海)