

重金属对草鱼、鲢鱼胚胎发育的影响

姜礼藩 黄穆桂

(国家水产总局长江水产研究所)

研究毒物对鱼类胚胎发育的影响,对于水体污染的生物监测和制定渔业水质标准都有一定的意义。

近年来,国内外有关资料表明,对应用化学毒物的胚胎毒性研究已日益受到重视,但研究对象大多数是哺乳类动物,对鱼类的胚胎毒性研究比较少。本文仅着重介绍重金属汞、镉、铅、锌、铜、铬、银、砷等八种毒物,分别对草鱼、鲢鱼胚胎急性中毒的实验研究结果,结合应用组织学方法观察鱼胎畸变及发育迟缓等情况。现将实验方法和结果介绍如下。

材料与方 法

实验鱼卵与容器

实验鱼卵,采自湖北荆州地区水产技术推广站和本所试验场经人工催产出草鱼(*ctenopharyngodon idellus*)、鲢鱼(*hypophthalmichthys molitrix*)的受精鱼卵。由于草、鲢鱼卵属于半漂浮性卵,孵化期比较短(水温22至25℃经30—36小时化苗),尤其是草鱼卵胚,于发育初期有明显的淡蓝色,比鲢卵胚的淡灰色易于观察。卵胚孵化容器要求经过消毒的玻璃培养皿或磁皿,可盛液300毫升。

实验毒物与处理

实验的重金属毒物,属分析试剂的二氯化汞(HgCl_2)、硫酸铜(CuSO_4)、硫酸铅 $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$ 、三氧化二砷(As_2O_3)、硫酸镉(CdSO_4)、

重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、硫酸锌(ZnSO_4)及硝酸银(AgNO_3)等八种。毒液制备,按重金属离子成分稀释成贮备液使用。鱼胚胎的毒物处理分以下三种方式。

一、把实验的八种毒物,分别配制成为不同浓度的实验液,浓度范围铜、汞、银为0.1—1毫克/升,铅、镉0.1—10毫克/升,砷、锌1—20毫克/升,铬1—100毫克/升。于每种浓度中均分别放入鱼卵实验孵化。

二、把实验的鱼卵分别在高浓度(10毫克/升)的汞、银、铅溶液中处理0.5、1.5及2.5小时后,取出卵胚,用清水处理三分钟,移至未污染的水中实验孵化。

三、把鱼卵分配在八组重金属的混合液中实验孵化。

以上三种实验方式均同时设置平行浓度,每浓度放入鱼卵20粒。

实验水质与观察

实验用水取自经除氯的自来水。pH值6.7—7.5,硬度8.75度,溶氧不少于5毫克/升,实验水温21—25℃。

实验要求连续观察鱼胚胎发育,划分阶段:囊胚期、原肠期、神经胚期、嗅板期、尾芽期、听囊期、眼晶体形成期、肌肉效应期及孵化期等。发现卵胚畸变,发育迟缓及胚胎不正常的,均予记录及取样固定;死卵及时清除,以防变坏水质,影响实验。

[12] Hersch, P., Douringer, R., *Anal. Chem.*, **35**, 897 (1963).

[13] Lindqvist, *Analyst*, **97**, 549 (1972).

[14] N. W. Washington, *Ozone Chemistry and*

Technology, American Chemical Society, (1959).

[15] 山县登、大喜多敏一编,中土井隆著,环境污染分析法,7, 123页,大日本图书株式会社,1973.年

组织学检查

定时取出实验卵胚与孵出的鱼苗。前者用史密斯液固定,后者用波恩氏液固定。固定后经50%酒精处理,存于70%酒精中。石腊切片,厚度8微米。用苏木精、伊红染色。

实验结果

一、对草鱼胚胎发育影响的实验结果

草鱼卵分别在汞0.1和1毫克/升,铜0.16和1毫克/升,铅1和10毫克/升,铬60.24和100毫克/升,锌10和20毫克/升,银0.1和

10毫克/升的浓度中,其早期发育期(囊胚期)与对照组胚胎孵化比较,均表现有发育迟缓和囊胚形成率降低的趋势。其中银0.1、1毫克/升和汞、铜1毫克/升为明显,囊胚形成率分别为20%与85%;银、汞1毫克/升中鱼胚发育均未过肌肉效应期而全部致死,见表1。

草鱼胚胎发育和器官分化过程中,于汞0.01和0.1毫克/升,铅1和10毫克/升,镉10毫克/升,铬60.24和100毫克/升及银0.1毫克/升溶液中进行畸变的迹象已经显露;铅10毫克/升和铬100毫克/升中,于尾芽期至眼

表1 八种重金属对草鱼胚胎发育影响

毒物名称	发育阶段 浓度(毫克/升)	进入囊胚期胚 胎成活率(%)	进入神经胚期胚 胎成活率(%)	进入嗅板期胚 胎成活率(%)	进入肌肉效应期 胚胎成活率(%)	进入卵孵化期胚 胎成活率(%)	孵化率 (%)
汞	1	囊胚期 85	原肠中期 75	神经胚期 70	全死亡 0	—	0
	0.1	囊胚期 95	原肠晚期 75	尾芽出现期 70	眼晶体初形成 65	胚膜皱褶胚体活动	0
	0.01	囊胚期 100	神经胚期 85	嗅板期 80	眼晶体初形成 80	活动强烈有畸形	50
铜	1	囊胚期 85	原肠中期 75	原肠期 75	尾芽期 60	未出膜	0
	0.16	囊胚期 95	原肠晚期 90	肌节出现 85	听囊期 80	未出膜	70
	0.01	囊胚期 100	原肠晚期 100	肌节出现 85	听囊期 80	出膜 25%	75
铅	10	囊胚期 90	原肠中期 45	原肠晚期 45	尾芽期 45	有畸形胚体	20
	1	囊胚期 100	原肠晚期 60	神经胚期 60	眼晶体初形成 55	膜收缩胚体弯曲	50
	0.1	囊胚期 100	原肠晚期 80	神经胚期 75	眼晶体初形成期 75	未出膜、活动强烈	70
砷	20	囊胚期 90	原肠晚期 80	神经胚期 80	眼晶体初形成期 75	未出膜、活动强烈	55
	11.46	囊胚期 95	原肠晚期 80	神经胚期 80	眼晶体初形成期 75	未出膜、活动强烈	70
	1	囊胚期 100	原肠晚期 85	神经胚期 85	眼晶体初形成期 75	未出膜、活动强烈	70
镉	10	囊胚期 100	原肠晚期 60	神经胚期 60	眼晶体初形成期 55	胚体微动畸形	0
	2.77	囊胚期 100	原肠晚期 65	神经胚期 60	眼晶体初形成期 60	出膜 5%	40
	1	囊胚期 100	原肠晚期 70	神经胚期 65	眼晶体初形成期 60	出膜 5%	50
铬	100	囊胚期 95	原肠晚期 75	神经胚期 75	眼晶体初形成期 65	有畸形	50
	60.24	囊胚期 100	原肠晚期 80	神经胚期 75	眼晶体初形成期 70	有畸形	65
	1	囊胚期 100	肠原晚期 80	神经胚期 75	眼晶体初形成期 70	出膜 30%	65
锌	20	囊胚期 90	原肠晚期 65	神经胚期 65	眼晶体初形成期 65	未出膜	20
	10	囊胚期 90	原肠晚期 65	神经胚期 65	眼晶体初形成期 65	未出膜	30
	0.5	囊胚期 100	原肠晚期 75	神经胚期 70	眼晶体初形成期 70	出膜 10%	60
银	1	囊胚期 20	全致死 0	—	—	—	0
	0.1	囊胚期 90	原肠晚期 90	神经胚期 20	眼晶体初形成期 20	有畸形	10
	0.01	囊胚期 100	原肠晚期 95	神经胚期 75	眼晶体初形成期 75	未出膜	35
对照		囊胚期 100	神经胚期 95	嗅板期 95	肌肉效应期 95	出膜	90

晶体初形成期间,表现卵膜收缩,胚体弯曲;
汞0.1毫克/升浓度中有的胚胎眼泡形成非常
紧靠及胚胎呈不规则状。银0.1毫克/升浓度
中还显现鱼体尾部上翘等形状。结果见表1
及图3—10。

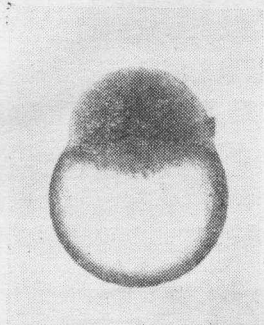


图1 草鱼卵胚正常发育至囊胚期



图2 草鱼卵胚在银10毫克/升浓度内
处理半小时后发生崩溃分解

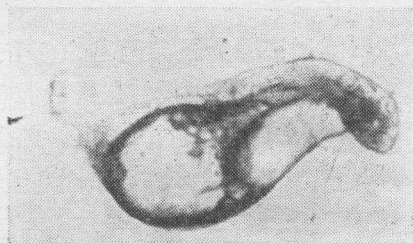


图5 草鱼卵胚在银0.1毫克/升浓度内孵化出畸形苗

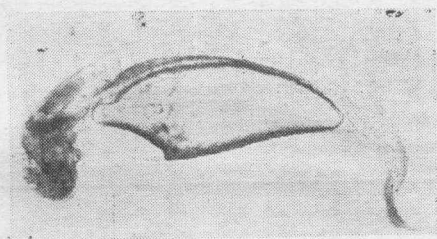


图6 草鱼卵胚在铬100毫克/升浓度内孵化出畸形苗

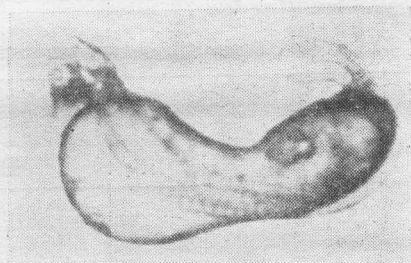


图7 草鱼卵胚在铜0.1毫克/升加镉2.5
毫克/升浓度内孵化出畸形苗

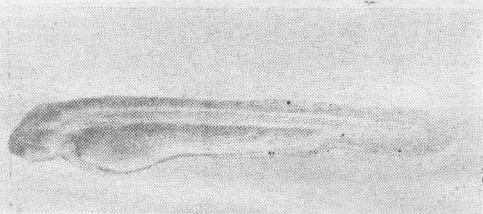


图3 对照组孵化的正常草鱼苗

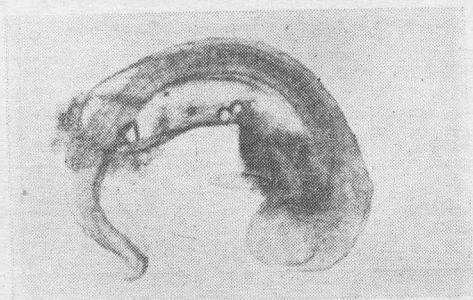


图4 草鱼卵胚在铅10毫克/升浓度内孵化出畸形苗

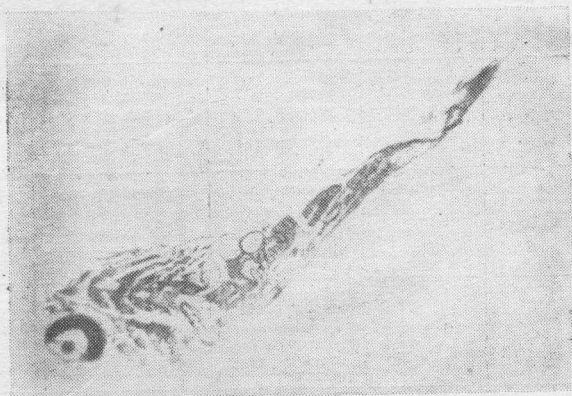


图8 草鱼卵胚在铅10毫克/升浓度内
孵化出畸形鱼苗的全身切片

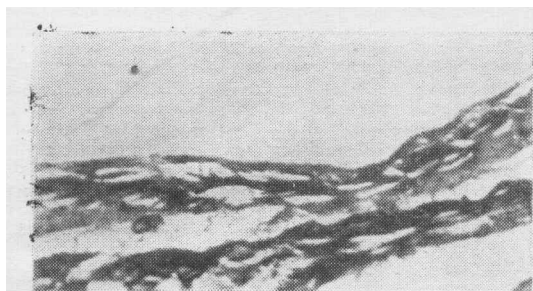


图9 畸形草鱼苗弯体部分切片, 所示肌肉纤维不整齐的排列

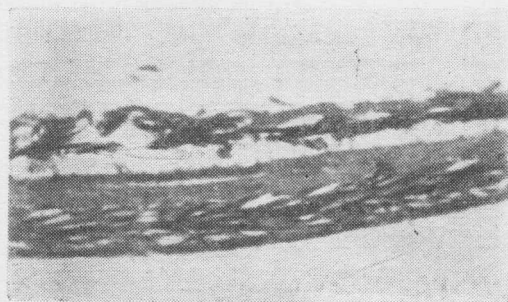


图10 正常草鱼肌肉纤维整齐排列

二、对白鲢胚胎发育影响的实验结果
白鲢受精卵是发育到肌节出现时分别移入试验液。其胚胎发育除在镉 10 毫克/升和

汞 1 毫克/升、铜 1 毫克/升不久全致死以外, 铜 0.01 和 0.16 毫克/升, 铅 1 和 10 毫克/升, 砷 11.46 和 20 毫克/升, 镉 1 和 2.7 毫克/升,

表2 八种重金属对白鲢胚胎发育影响

毒物名称	发育情况 浓度(毫克/升)	进入听囊期胚 胎存活率	进入肌肉效应 期胚胎存活率	进入孵化期	孵化率 (%)
汞	1	全致死 0	— 0	—	0
	0.1	听囊期 50	心脏搏动 40	部分胚出苗、有畸形	10
	0.01	听囊期 100	心脏搏动 95	大部分胚胎出膜	90
铜	1	全致死 0	— 0	—	0
	0.16	尾芽期 95	肌肉效应期 90	出膜(胚胎内活动弱)	85
	0.01	尾芽期 100	肌肉效应期 95	出膜(胚胎内活动强)	95
铅	10	尾芽期 80	听囊期 60	出膜(胚胎内活动弱)	40
	1	尾芽期 90	肌肉效应期 90	出膜(胚胎内活动强)	85
	0.1	听囊期 100	肌肉效应期 100	出膜(胚胎内活动强)	95
砷	20	尾芽期 100	听囊期 95	出膜孵化	90
	11.46	尾芽期 100	肌肉效应期 95	出膜孵化	90
	1	听囊期 100	肌肉效应期 95	出膜孵化	95
镉	10	全致死 0	— 0	—	0
	2.7	尾芽期 60	肌肉效应期 40	出膜(胚内活动弱)	15
	1	尾芽期 80	眼晶体形成期 85	出膜(胚内活动弱)	70
铬	100	尾芽期 100	肌肉效应期 95	出膜有畸形	90
	60.24	尾芽期 100	肌肉效应期 95	出膜	90
	1	听囊期 100	肌肉效应期 95	出膜	95
锌	20	尾芽期 70	尾鳍出现期 50	出膜(胚苗卷曲)	45
	10	尾芽期 95	尾鳍出现期 90	出膜(胚苗卷曲)	85
	0.15	听囊期 100	肌肉效应期 95	出膜(胚苗卷曲)	90
银	1	全致死 0	— 0	—	0
	0.1	听囊期 80	肌肉效应期 70	出膜	10
	0.01	听囊期 90	肌肉效应期 80	出膜	40
对照	0	听囊期 100	肌肉效应期 100	大部分出膜至孵出苗、良好。	95

铬 60.24 和 100 毫克/升及锌 10 和 20 毫克/升浓度中, 与对照组胚胎发育比较均表现有发育迟缓和听囊期形成率降低。但其胚胎的畸变率比草鱼卵胚发育出现得少。(见表 2)。

三、草鱼卵胚在高浓度(10 毫克/升)汞、银、铅内不同处理时间的实验结果

草鱼受精卵分别在高浓度(10 毫克/升)汞、银、铅溶液内处理半小时以后, 移至清水中孵化四小时表明: 在前两种浓度内卵胚的存活率分别为 5% 与 40%; 后一种浓度内胚胎全存活, 但孵化出苗有畸形。于汞、银浓度内处理 1.5 小时以上胚胎内的细胞质发生凝固变成白色, 或胚胎崩溃分解。(见表 3 及图 1—2)

四、草鱼卵胚在重金属混合液内孵化的实验结果。

草鱼受精卵分别在八组重金属混合液中孵化结果表明, 除第六组不久全致死外, 与对照组的胚胎发育比较, 也有出现发育迟缓和畸形鱼苗(表 4)。

五、组织学检查结果

鱼胎内组织结构的变化不及孵出的鱼苗明显, 因为鱼胎细胞的分化和器官形成不及鱼苗完备。在汞 0.1 毫克/升、银 0.1 毫克/升及铅 10 毫克/升溶液中, 胚胎卵黄内常可见到许多液泡。由切片观察表明, 液泡的大小不一, 而且看来充满着液体, 直到孵化出苗的卵黄囊内尚可发现。这是否由毒物的处理而引

表 3 草鱼卵在高浓度(10 毫克/升)汞、银、铅内不同处理时间的发育影响

毒物名称	处理时间(小时)	发 育 情 况			
		4 小时后	6 小时后	21 小时后	31 小时后
汞	0.5	原肠中期存活率 5%	原肠晚期存活率 5%	听囊期存活率 5%	出苗 5%, 苗不活动
	1.5	细胞质凝固、全死亡	—	—	—
	2.5	胚胎崩解、全死亡	—	—	—
银	0.5	囊胚早期 存活率 40%	原肠中期存活率 5%	全致死	—
	1.5	细胞质凝固变白存活率 10%	全致死	—	—
	2.5	胚胎崩溃分解	—	—	—
铅	0.5	原肠中期全存活	原肠晚期全存活	听囊期存活率 90%	出膜, 有畸形
	1.5	原肠中期全存活	原肠晚期存活率 55%	听囊期存活率 55%	出膜, 有畸形
	2.5	原肠中期全存活	原肠晚期存活率 50%	听囊期存活率 30%	出膜, 有畸形

表 4 草鱼卵胚在重金属混合液内孵化实验的结果

组别	混合液内重金属离子浓度(毫克/升) Cu ⁺⁺ /Hg ⁺⁺ /Zn ⁺⁺ /Pb ⁺⁺ /Ag ⁺ /Cd ⁺⁺	进入原肠期	进入神经胚期	进入原基心脏期	进入孵化期	孵化率 (%)
1	0.1/0.1/0/0/0/0	原肠中期	神经胚期	原基心脏期 有明显畸形	胚内鱼体弯曲有畸形	60
2	0.1/0/0.5/0/0/0	原肠中期	神经胚期	原基心脏期	开始出膜	50
3	0.1/0/0/1/0/0	原肠中期	神经胚期	原基心脏期	出 膜	75
4	0.1/0/0/0/0.1/0	原肠早期	原肠早期	尾芽期	听囊期	10
5	0.1/0/0/0/0/2.7	原肠中期	原肠晚期	原基心脏期	有畸形, 苗腹部膨大	35
6	0/0/0/0/0.1/2.7	原肠早期	全致死	—	—	—
7	0.01/0/0.5/0.1/0/0	原肠中期	肌节出现期	尾芽期	出 膜	15
8	0.01/0.01/0/0/0.01/0	原肠中期	神经胚期	嗅板期	尾鳍出现期	30
9	0/0/0/0/0/0	原肠中期	神经胚期	原基心脏期	出 膜	95

起体内液压的改变,值得研究。

由0.1毫克/升汞和10毫克/升铅中孵出的畸形苗,从畸形的部位切片看,表皮细胞受到压迫,肌节纤维排列不齐,尤其在严重弯曲的部位为甚(见图8—10)。由于鱼体畸变,体轴弯曲,体腔内的脏器也受到不同程度的压迫,从而出现了消化道压缩、移位等种种不正常的现象。

讨 论

从有关资料表明,重金属对鱼类和鱼胎均具有明显的毒性。汞、镉、银、铜等在水中浓度分别低至0.005—0.01毫克/升尚能引起鲦鱼、刺鱼、鲑鱼卵等发育不良或死亡(Judith 1977, Benoit 1976., Wilber 1971 及 Jones 1964)。据我们的毒性实验结果表明,0.112毫克/升氯化汞能使草鱼卵胚九小时内死亡率达到30%,3毫克/升的醋酸苯汞使卵胎全部死亡;铜和银0.16毫克/升,铅1毫克/升及镉10毫克/升等,均能引起草鱼、鲑鱼胚胎发育迟缓与出现怪胎及畸形鱼苗。

重金属混合物对鱼类及其胚胎毒性,看来往往比它们单一的成分具有更大的危害。例如铜、锌;铜、镉及铜、汞、银等三种混合液,对草鱼的胚胎发育与相同浓度的单一重金属比较,孵化率下降5%至10%左右(见表4),有协同的作用。美国学者 Wilber (1971)也曾报道铜、锌混合物能增强对鱼类的毒性,而 Eisler (1972)还利用铜、锌、镉等不同浓度的混合物,分别对底鳉的毒性实验得出类似的结果。

重金属对鱼类的致畸性,据 Judith(1977)使用底鳉研究认为,其胚胎发育在汞0.01至0.1毫克/升的浓度内能导致视觉器官畸变;0.1—10毫克/升的铅使胚体出现弯曲;10毫克/升镉,则未见重大的影响。然而,据 Pascoe、Mattey (1977) 及 Euton 等 (1978) 应用三棘刺鱼和条鱼的研究认为,水中镉浓度分别低至0.001与0.057毫克/升,尚能使它们发生

畸变。据我们的实验结果表明:10毫克/升镉,0.01、0.1毫克/升汞,1、10毫克/升铅,60.24、100毫克/升铬及0.1毫克/升银,均能使草鱼胚胎和器官形成中显示出缺陷和畸形。这种畸形的出现和遗传因素是无关的。

鱼胎发育中引起的畸变与接触外来毒物的种类、时间及剂量等有着密切的关系。就本实验来看,以汞、银、铅、镉等四种毒物的致畸性比较高,特别以汞、铅浓度分别在0.1毫克/升与10毫克/升时为最高,而且大多数的畸变发生于卵胚早期细胞分裂至囊胚为甚。细胞分化至原肠期即可见胚盘边缘向植物极方向推进速度不一。发育到肌肉效应期与心脏原基期时,分裂滞缓的部分便可见胚体的缺陷或暴露出畸变的萌芽。然而在胚胎发育至肌节期之后,在汞、铅等溶液中处理,致畸可以减少。这与美国学者 Judith (1976) 利用底鳉胚胎毒性实验所得结果,基本上是一致的。

从组织学检查结果也可以看出:在汞、铅中孵出的畸形鱼苗,前后体轴弯曲,背腹肌受压,肌肉纤维排列不齐,而体内器官也受到不同程度的压迫及产生种种不正常的现象。

在高浓度银、铅、汞等实验结果:10毫克/升汞、10毫克/升银中草鱼卵经处理半小时以后,将遭致全部死亡;铅10毫克/升浓度内胚胎虽然也能发育化苗,但引起许多怪胎及畸形鱼苗。我们认为在这种高浓度条件下的实验,对于评价局部天然水域受重金属废水污染而提出保护鱼类繁殖将有一定的参考价值。

重金属的鱼胎毒性, Wilber (1971) 认为,银的毒性约为锌的八倍,铜的20倍,汞的10倍。这是 Echinoderm 胚胎的实验结果。根据本实验结果认为,对草、鲑鱼胚胎毒性,最大的为银,汞,铜,其次为镉,砷,锌,再次为铬。

主 要 参 考 资 料

- [1] Benoit, D. A., *Trans. Am. Fish Soc.*, **105**, 580 (1976).

鲤鱼对汞、六六六、DDT 的积累

中国科学院动物研究所水生生态组

汞、六六六、DDT 在工农业上应用广泛,是污染环境的几种常见污染物。由于它们毒性大,易于积累,所以对生物和人体健康带来一定的危害。

大量资料表明,鱼类对汞、有机氯农药有很强的积累能力^[2-3]。有人认为,鱼直到中毒为止,可一直吸收水中的汞。水中汞浓度很低也能被鱼吸收,没有吸收的低限^[4]。鱼类对汞、六六六、DDT 的吸收,积累及代谢、降解规律是一个相当复杂的问题,迄今尚未完全搞清,仍需深入进行研究。

我们在进行几种毒物混合毒性实验的过程中,初步观察到鲤鱼对汞、六六六、DDT 的积累情况。现将有关资料整理出来,供进一步研究的参考。

材料与 方法

1. 试液的配制 实验分四个浓度组,每个浓度组都含有汞、六六六、DDT,黄磷及氯化物,惟各组浓度不同。各种毒物的浓度系参考天津市水产研究所所作的毒性实验资

料,以比较敏感的梭鱼对上述各种毒物的 96TLm 值,分别乘以 0.2、0.1、0.01、0.005 制定的。其中六六六为丙体六六六,DDT 为 $\rho\rho'$ -DDT 纯粉,由本所药剂毒理室提供。在实验过程中抽测各组汞、六六六、DDT 和氯化物的浓度。其中 DDT 因方法灵敏度所限未能检出,其它毒物实测浓度与计划配制浓度相近。另外设一个对照组。各组毒物的浓度见表 1。

2. 实验方法 实验在玻璃水族箱中进行,每组试液体积 60 升。每箱规格相近,放养健康的小鲤鱼 25 尾。实验在 1977 年 11 月 30 日开始,历时 65 天。实验水温控制在 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。实验期间每天换液一次,每箱换 50 升。换液后水中氧气在 5 毫克/升以上,氧气下降后,进行充氧,使水中溶氧保持在 3 毫克/升以上,基本保证试验鱼正常呼吸的需要。换液后,各箱投喂等量的未被污染的干鱼虫,除第 I 浓度组外,各组试验鱼吃食基本正常。

实验水族箱的内壁很容易生长各种细菌

表 1 各实验组毒物的浓度(毫克/升)

毒物名称	I	II	III	IV	V(对照)	国家规定浓度
汞*	0.0164	0.0085	0.0018	0.0008	0.0003	0.001
六六六*	0.0305	0.0216	0.0031	0.0022	0.0008	0.02
DDT	0.0004	0.0002	0.00004	0.00002	—	0.001
黄磷	0.0030	0.0015	0.0003	0.00015	—	(0.002)
氯化物	1500	1500	1500	1500	1500	—

* 汞、六六六为实测浓度。

- [2] Pascoe, et al., *J. Fish Biol.*, **11**, 207 (1977).
[3] Eisler, R. et al., *J. Fish Biol.*, **5**, 131 (1973).
[4] Smith, B. P. et al., *Bull. of Environ. Contami. Toxicology*, **15**(3), (1976).

- [5] Weis, J. S. et al., *J. Fish Biol.*, **51**, 49 (1977).
[6] Wilber, C. G., *The Biological Aspects of Water Pollution*, (1971).