

中国对虾(*Penaeus chinensis*)卵子孵化和无节幼体变态水环境中锌离子的最佳活度*

高成年 曲克明 张渡溪 袁有宪

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 本文研究了海水环境中锌对中国对虾卵子孵化和无节幼体变态的影响。结果表明, 可溶性锌对卵子孵化和无节幼体变态的作用只与游离离子活度有关, 而不是与其总浓度有关。锌离子活度在 $10^{-7.30}$ mol/L 以下时, 不影响卵子的孵化率; 高于此浓度会显著 ($P < 0.05$) 降低孵化率; 在 $10^{-5.00}$ mol/L 时卵子完全不能孵化。锌离子活度在 $10^{-7.60}$ mol/L 时, 不影响无节幼体的生长变态; 高于此浓度时, 明显 ($P < 0.05$) 减少变态率; 高于 $10^{-6.00}$ mol/L 时, 无节幼体完全不能存活。讨论了锌离子对对虾育苗系统的影响, 认为育苗过程中锌离子的最佳活度为 $10^{-7.60}$ mol/L。

关键词 锌, 离子活度, 卵子孵化, 无节幼体, 变态, 中国对虾

前 言

海水环境中痕量及微量重金属元素是影响水产养殖动物卵子孵化和幼体生长的因素之一。对铜、锌元素而言, 主要表现在两个方面, 一是在高浓度下产生毒性, 另一方面是在低浓度下为生物所必需。海水中的重金属元素是以不同形态存在的。已有文献^[5,6,7,8]报道, 铜锌对某些海洋生物的作用, 主要是与其离子活度有关。

在对虾育苗系统中, 为降低重金属离子的毒性, 广泛采用合成或天然螯合剂改变其存在形态。然而高浓度螯合剂的加入, 使游离重金属离子不复存在, 失去了生物活性, 不仅使养殖生物不能吸收利用, 更重要的是使对这些离子毒性敏感的敌害生物(细菌、纤毛虫等)泛滥^[5,7], 导致育苗失败。因而, 保持海水环境中一定活度的重金属离子, 起到生态学生态调节作用, 对提高育苗生产率是一条有效的途径。

关于重金属离子对中国对虾作用的报道^{1)[1]}均以在海水中加入的浓度值为实验值。由于没有考虑到海水中重金属离子的背景值, 加入的起始浓度均较高, 掩盖了某些离子的必需性; 没能考虑重金属元素的存在形态, 不能真实地反映出试验元素离子的行为。袁有宪等^[2]在对重金属离子毒性消除方法比较研究时发现某些重金属离子对中国对虾幼体生

收稿日期: 1994-03-09。

* 本文曾在中国水产学会成立三十周年庆祝大会上宣读, 一九九三年十二月, 北京。

1) 曹登宫等, 1982。Zn²⁺对对虾幼体发育的影响及EDTA钠盐的降解效应。全国海、淡水养殖苗种及饵科学术讨论会论文报告汇编。中国水产学会。

长是必需的, 并进一步证实了对铜离子的需要^[11]。

本文旨在确定中国对虾卵子孵化和幼体变态的最佳锌离子活度, 以充分利用重金属离子的生态调节作用, 为建立对虾育苗系统中重金属离子最佳存在模型, 提供必要的基础数据。

材 料 与 方 法

(一)实验材料及试剂

越冬亲虾所产卵子取自即墨市古阡育苗场; 海捕亲虾所产卵子和无节幼体 (N_1) 取自即墨市海珍品增殖站。

锌离子标准溶液用氯化锌 ($ZnCl_2$) 配制成 2000mg/L , 酸化后贮存, 用时稀释成 $2.5 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 。氨三乙酸 (NTA) 溶液配制成 $2.5 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 。所用试剂均为分析纯, 洗涤用水为混床去离子水。

(二)海水去重金属处理

取青岛崂山湾海水 (盐度 30–31, pH 8.0–8.1) 贮存于聚乙烯塑料瓶中。用 0.45μ 微孔滤膜抽滤, 除去浮游生物、颗粒、胶体及有机碎屑。用长 48 厘米, 内径 2.2 厘米的层析柱, 内装高分子重金属吸附剂 (本实验室自合成), 用 1mol/L 硝酸处理后, 用去离子水冲洗干净。以流速 $10\text{--}20\text{ml/min}$ 流过滤膜过滤海水, 除去离子态不稳定有机和无机络合态锌。

所用容器及玻璃器皿均用 1mol/L 硝酸浸泡过夜后, 用去离子水洗涤干净。

(三)实验方法

在 2000 毫升烧杯中, 加处理海水 1800 毫升, 放入经处理海水洗涤三次的对虾卵子或无节幼体 (N_1)。用微型充气泵连续充气使搅拌均匀, 用 5 毫升移液管 (末端破碎) 吸取 5 毫升计数, 取 9 次以上计数的平均值为实验数量。在 500 毫升烧杯中, 加 250 毫升处理海水, 加一定浓度锌离子, 或再加 10^{-5}mol/L 的 NTA。吸取 5 毫升卵子或无节幼体 (N_1) 置入。在卵子孵化时, 保持水温 $19 \pm 1^\circ\text{C}$; 无节幼体变态时, 保持水温 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 。每个锌的浓度水平平行 8 (6) 个样。卵子孵化约经过 40–50h 后记孵出幼体数; 无节幼体 (N_1) 变态经过约 90–100h 后记变态的蚤状幼体 (Z_1) 数。计算孵化率和变态率。用平均孵化率和平均变态率分析、评估锌离子活度对对虾卵子孵化和无节幼体的变态影响。不同活度的锌对孵化率和变态率的影响用单纯分类方差分析法 (Single-classification analysis of variance, ANOVA) 分析; 不同形态相同浓度的影响用双向方差分析法 (Two-way ANOVA) 分析。用学生检验 (t) 检验。

在显微镜下检查各组幼体发育阶段及形态。

(四)锌离子活度 (A_{Zn}) 的计算。

根据 Sunda^[7,9] 提出的热力学方程计算锌离子活度 (A_{Zn})。方程为:

$$Zn_T = \frac{A_{Zn}}{R} + \frac{A_{Zn} NTA_T 10^{10.45}}{A_{Zn} 10^{10.45} + A_{Ca} 10^{6.41} + A_{Mg} 10^{5.41}} \quad (1)$$

其中 Zn_T 和 NTA_T 分别为可溶性锌的总浓度和加入 NTA 的浓度; A_{Zn} 、 A_{Ca} 和 A_{Mg} 分别为海水中锌、钙和镁的离子活度; $10^{10.45}$ 、 $10^{6.41}$ 和 $10^{5.41}$ 分别为 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 与 NTA 络合的稳定常数; R 为锌的总无机活度系数, 通常海水中为 $10^{-1.0}$ [3], 方程 (1) 右边的前一项代表锌离子活度与海水中无机络合物浓度的比值; 后一项为锌离子与有机络合剂 NTA 作用的结果, 当无络合剂存在时为零。按海水中钙和镁与无机组分作用的活度系数为 0.21 和 0.26 [10], 青岛近岸海水中钙和镁浓度分别为 9.44×10^{-3} 和 $5.25 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ [12], 计算海水中 A_{Ca} 和 A_{Mg} 分别为 0.0020 和 0.014 mol/L。

结 果

(一) 锌对对虾卵子孵化的影响

1. 离子态锌的影响 越冬亲虾产卵子和海捕亲虾产卵子受离子态锌的影响的结果示于表 1 和表 2。越冬亲虾产卵子的实验结果表明, 当加入锌浓度为 $0 \sim 10^{-6.3} \text{ mol/L}$, 锌的

表 1 离子态锌对越冬亲虾产卵子孵化的影响
(平均放卵数为 115.0 粒, 平行 8 个样, 1992 年 4 月 2 日)

Table 1 Effects of ionic zinc on hatching of egg produced by parent prawn artificially cultured
(Mean number of egg per beaker: 115.0, 8 replicates, April 2, 1992)

加入锌量(mol/L) Added concentration of zinc	计算 A_{Zn} (mol/L) Calculated concentration of zinc	孵化率 (%) Hatching rate
0	0	40.9 ± 2.9
10^{-9}	$10^{-10.00}$	41.7 ± 8.8
10^{-8}	$10^{-9.00}$	39.8 ± 4.1
10^{-7}	$10^{-8.00}$	39.7 ± 4.1
$10^{-6.3}$	$10^{-7.30}$	40.7 ± 13.0
10^{-6}	$10^{-7.00}$	34.7 ± 6.3
10^{-5}	$10^{-6.00}$	21.6 ± 5.2
10^{-4}	$10^{-5.00}$	0.0 ± 0.0

表 2 离子态锌对海捕亲虾产卵子孵化的影响
(平均放卵数量为 56.0 粒, 平行 8 个样, 1992 年 4 月 30 日)

Table 2 Effects of free ionic zinc on hatching of egg produced by captured parent prawn
(Mean number of egg per beaker: 56.0, 8 replicates, April 30, 1992)

加入锌量(mol/L) Added concentration of zinc	计算 A_{Zn} (mol/L) Calculated concentration of zinc	孵化率 (%) Hatching rate
0	0	50.0 ± 6.8
10^{-9}	$10^{-10.00}$	53.3 ± 10.5
10^{-8}	$10^{-9.00}$	51.4 ± 8.8
10^{-7}	$10^{-8.00}$	47.1 ± 5.0
$10^{-6.3}$	$10^{-7.30}$	41.3 ± 5.2
10^{-6}	$10^{-7.00}$	27.7 ± 3.6
10^{-5}	$10^{-6.00}$	2.5 ± 2.5
10^{-4}	$10^{-5.00}$	0.0 ± 0.0

活度 (A_{Zn}) 为 $0-10^{-7.30}$ mol/L, 孵化率之间无显著 ($P>0.05$) 差异; 当加入浓度高于 10^{-6} mol/L, A_{Zn} 大于 $10^{-7.00}$ mol/L 时, 孵化率明显 ($P<0.05$) 降低; 加入浓度为 10^{-4} mol/L, A_{Zn} 为 $10^{-5.00}$ mol/L 时, 胚胎发育停止, 完全不能孵化。海捕亲虾产卵子和越冬亲虾产卵子的实验结果完全相同, 即在 A_{Zn} 为 $0-10^{-7.30}$ mol/L 时, 各水平组孵化率之间无显著 ($P>0.05$) 差异; A_{Zn} 为 $10^{-7.00}$ mol/L 以上时, 明显 ($P<0.05$) 受到锌离子毒性的影响; A_{Zn} 为 $10^{-5.00}$ mol/L 时, 全部卵子不能孵化。

2. 不同形态的锌影响的比较 表 3 为离子态和络合态锌在相同条件下的实验结果。当加入锌浓度为 $0-10^{-7}$ mol/L 时, 未加络合剂 NTA 组的 A_{Zn} 为 $0-10^{-8.00}$ mol/L, 有 NTA 存在时的实验组 A_{Zn} 为 $0-10^{-8.62}$ mol/L, 孵化率之间无显著 ($P>0.05$) 差异。当加入锌浓度为 10^{-6} mol/L 时, 未加 NTA 的一组 A_{Zn} 为 $10^{-7.00}$ mol/L, 有 NTA 存在的一组 A_{Zn} 为 $10^{-7.60}$ mol/L, 两组的孵化率之间差异显著 ($0.05>P>0.025$), 后一组高于前一组, 但 A_{Zn} 数值相近的两组比较, 加入浓度为 10^{-7} mol/L 离子态组 A_{Zn} 为 $10^{-8.00}$ mol/L, 加入浓度为 10^{-6} mol/L 的络合态组 A_{Zn} 为 $10^{-7.60}$ mol/L, 两者的孵化率无显著 ($P>0.25$) 差异。可以看出, 不管加入锌为多高浓度, 只要离子活度相近时, 孵化率之间均无显著 ($P>0.25$) 差异。

表 3 Zn 的不同形态对卵子孵化的影响

(平均放卵数量为 117.2 粒, 平行 6 个样, NTA 的浓度为 10^{-5} mol/L, 1992 年 5 月 9 日)

Table 3 Effects of variant speciation of zinc on egg hatching
(Mean number of egg per beaker: 117.2, 6 replicates, Concentration
of NTA in seawater: 10^{-5} mol/L, May 9, 1992)

加入锌量 (mol/L) Added concentration of zinc	离子态 (Ionic)		螯合态 (Chelated)		P
	计算 A_{Zn} Calculated activity of zinc (mol/L)	孵化率(%) Hatching rate	计算 A_{Zn} Calculated activity of zinc (mol/L)	孵化率(%) Hatching rate	
0	0	63.7 ± 9.0	0	63.3 ± 8.5	$P>0.25$
10^{-9}	$10^{-10.00}$	63.6 ± 11.4	$10^{-10.63}$	63.0 ± 13.2	$P>0.25$
10^{-8}	$10^{-9.00}$	59.2 ± 3.0	$10^{-9.63}$	60.2 ± 9.5	$P>0.25$
10^{-7}	$10^{-8.00}$	60.0 ± 9.2	$10^{-8.62}$	57.8 ± 5.3	$P>0.25$
10^{-6}	$10^{-7.00}$	50.6 ± 3.2	$10^{-7.60}$	57.3 ± 8.3	$0.05>P>0.025$

(二) 锌对无节幼体变态的影响

1. 离子态锌对无节幼体变态的影响 表 4 为离子态锌对无节幼体变态影响实验的结果。可以看出, 当加入浓度为 $0-10^{-7}$ mol/L, A_{Zn} 为 $0-10^{-8.00}$ mol/L 时, 各组变态率之间无显著 ($P>0.05$) 差异; 当加入浓度为 10^{-6} mol/L, A_{Zn} 为 $10^{-7.00}$ mol/L 时, 较以上各组变态率明显 ($P<0.05$) 降低。当加入浓度为 10^{-5} mol/L, A_{Zn} 为 $10^{-6.00}$ mol/L 时, 无节幼体全部死亡。

2. 不同形态锌的影响的比较 表 5 列出离子态和络合态锌在同一条件下对无节幼体变态影响的实验结果。数据分析表明, 当锌的加入浓度小于 10^{-7} mol/L 时, 离子态组和络合态组的变态率之间均无显著 ($P>0.25$) 差异; 当加入浓度为 10^{-6} mol/L, 离子态组 A_{Zn}

为 $10^{-7.00}$ mol/L, 络合态组 A_{Zn} 为 $10^{-7.60}$ mol/L, 离子态组的变态率显著 ($P < 0.005$) 降低, 而络合态组与活度低于此值的各组比较, 仍无显著 ($P > 0.05$) 差异。当加入浓度为 10^{-5} mol/L 时, 离子态组 A_{Zn} 为 $10^{-6.00}$ mol/L, 络合态组 A_{Zn} 为 $10^{-6.14}$ mol/L, 两组的无节幼体均不能存活。

表 4 离子态锌对无节幼体变态的影响

(无节幼体平均数量为 89.0 尾, 平行 8 个样, 1992 年 5 月 4 日)

Table 4 Effects of free ionic zinc on nauplius metamorphosis
(Mean number of nauplius per beaker: 89.0, 8 replicates, May 4, 1992)

加入锌量 Added concentration of Zinc (mol/L)	计算 A_{Zn} Calculated Activity of zinc (mol/L)	变态率 (%) Hatching rate
0	0	96.0 ± 5.2
10^{-9}	$10^{-10.00}$	93.8 ± 5.7
10^{-8}	$10^{-9.00}$	95.6 ± 5.4
10^{-7}	$10^{-8.00}$	97.7 ± 6.7
10^{-6}	$10^{-7.00}$	10.8 ± 3.4
10^{-5}	$10^{-6.00}$	0.0 ± 0.0

表 5 不同形态锌对无节幼体变态影响

(无节幼体平均数量为 98.5 尾, 平行 6 个样, NTA 浓度 10^{-5} mol/L, 1992 年 5 月 24 日)Table 5 Effects of variant speciation of zinc on nauplius metamorphosis
(Mean number of nauplius per beaker: 98.5, 6 replicates, Concentration
of NTA in seawater: 10^{-5} mol/L, May 24, 1992)

加入锌量 Add. C_{Zn} (mol/L)	离子态 (Ion)		络合态 (Chelated)		P
	计算 A_{Zn} Calculated activity	变态率 (%) Metamor- phosis rate	计算 A_{Zn} Calculated activity	变态率 (%) Metamor- phosis rate	
0	0	86.6 ± 6.7	0	83.5 ± 13.7	$P > 0.25$
10^{-9}	$10^{-10.00}$	89.6 ± 17.6	$10^{-10.63}$	88.7 ± 8.1	$P > 0.25$
10^{-8}	$10^{-9.00}$	90.3 ± 16.2	$10^{-9.63}$	90.6 ± 11.8	$P > 0.25$
10^{-7}	$10^{-8.00}$	93.4 ± 13.9	$10^{-8.62}$	89.6 ± 10.0	$P > 0.25$
10^{-6}	$10^{-7.00}$	8.8 ± 4.8	$10^{-7.60}$	85.8 ± 9.3	$P < 0.005$
10^{-5}	$10^{-6.00}$	0.0 ± 0.0	$10^{-6.14}$	0.0 ± 0.0	

讨 论

(一)海水的去重金属处理

海水中重金属离子的存在, 分为可溶性、不可溶性和胶体, 仅可溶性部分, 又可和无机成分及有机络合剂、有机碎屑、藻类表面等形成络合物。而对生物毒性而言, 是以离子态表现的。因此, 用加入重金属的浓度来描述重金属离子的毒性或必需性, 是极不恰当的。另一方面, 不同海域的水质不同, 天然络合容量不同, 所以, 以加入浓度作为实验浓

度,所得出的实验结果会不一致。

本文采用 0.45μ 微孔滤膜去除了海水中的颗粒、胶体颗粒状重金属;用螯合树脂除去游离态、不稳定有机和无机络合态,以及部分稳定有机和无机态重金属^[4],使重金属元素的总浓度降至最低水平,使得实验数据尽可能地接近实际情况。

由于海水中重金属元素的浓度属痕量水平,实验过程中极易受到污染。本实验用硝酸浸泡洗涤,并将实验用卵子和无节幼体用处理海水充分洗涤,最大限度地减少了污染的影响。

(二)锌离子的最佳活度

从实验结果可知,不管越冬亲虾产的卵子或海捕亲虾产的卵子,在海水中直接加无机态锌,计算锌离子的活度为 $10^{-7.30}\text{mol/L}$ 以下时,不影响孵化率;高于此值时锌离子的毒性已经表现出来。用加入有机络合态锌并与加入无机态锌在同一条件下对比,得到的结果也是一致的,即在锌离子活度为 $10^{-7.60}\text{mol/L}$ 时不影响卵子孵化。还说明,在络合态锌浓度为 $0\sim 10^{-6}\text{mol/L}$,不影响孵化率。因此,可结论锌对对虾卵子孵化的影响是以离子态而表现的,与络合态无关,锌离子活度保持在 $10^{-7.30}\text{mol/L}$ 以下为佳。

无节幼体阶段是对虾幼体对水环境最敏感的阶段^[2]。对无节幼体实验表明;在加入无机态锌时,计算锌离子活度在 $10^{-8.00}\text{mol/L}$ 以下时,不影响无节幼体的生长变态。在加入有机态锌时,计算锌离子活度为 $10^{-7.60}\text{mol/L}$,不受影响。也就是说,在对虾无节幼体生长时,保持锌离子活度为 $10^{-7.60}\text{mol/L}$ 以下时为佳。无节幼体阶段较卵子孵化阶段对锌离子的作用更为敏感。

在对虾育苗系统中,在蚤状幼体阶段开始投喂单胞藻或其他微颗粒代用饵料,这些饵料表面均能吸附或络合部分重金属离子,可降低其活度;在仔虾以后阶段对虾对重金属离子的忍耐力大大提高。所以,在对虾育苗系统中保持锌离子活度在 $10^{-7.60}\text{mol/L}$,不会对整个育苗过程造成不良影响。但由于浮游纤毛虫在锌离子浓度 10^{-11}mol/L 时,已开始受到抑制^[5],不可加入过量络合剂使锌离子活度降至再低。

与铜离子对对虾卵子孵化和无节幼体生长的作用^[11]比较,低浓度锌并未表现出对卵子和幼体有益。

参 考 文 献

- [1] 吴彰宽、陈国江, 1988. 二十三种有害物质对对虾的急性致毒试验. 海洋科学, 4: 36-40.
- [2] 袁有宪等, 1993. 重金属离子对中国对虾幼体的影响及其消除方法比较. 海洋学报, 15: 82-89.
- [3] Brand, L. E., *et al.*, 1983. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 1182-1198.
- [4] Forstner, U. and G. T. W. Wittmann, 1977. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*, 87, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- [5] Stocker, D. K., *et al.*, 1986. Effects of copper and zinc on two planktonic ciliates. *Mar. Biol.*, 92: 21-29.
- [6] Sunda, W. G., 1990. Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.*, 6: 411-442.
- [7] Sunda, W. G. and P. A. Gillespie, 1979. The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity in seawater. *J. Mar. Res.*, 37: 761-777.
- [8] Sunda, W. G. and S. A. Huntsman, 1987. Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods. *Mar. Biol.*, 94: 203-210.
- [9] Sunda, W. G., *et al.*, 1978. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes*

- pugio: Importance of free cadmium ion. Environ. Sci. Technol., 12: 409-413.
- [10] Whitfield, M., 1975. Seawater as an electrolyte solution. In: Chemical Oceanography. Vol. 1, 2nd ed. p. 43-171.
- [11] Yuan Youxian *et al.*, 1992. Seawater environment copper requirements of egg hatching and nauplius metamorphosis of *Penaeus chinensis*. Second International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Abstracts. Zhongshan University, Guangzhou, 14.
- [12] Yuan Youxian, 1988. Simultaneous spectrophotometric determination of calcium and magnesium with chlorophosphoazo-III by flow injection analysis. Anal. Chim. Acta, 212, 291-295.

OPTIMUM ZINC ION ACTIVITY IN SEAWATER FOR EGG HATCHING AND NAUPLIUS METAMORPHOSIS OF *PENAEUS CHINENSIS*

Gao Chengnian Qu Keming Zhang Duxi Yuan Youxian

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The effects of zinc in seawater on egg hatching and nauplius metamorphosis of *Penaeus chinensis* were studied. The results indicated that actions of dissolved zinc on egg hatching and nauplius metamorphosis are only relative to free zinc ion activity, not to total concentration of dissolved zinc. The egg hatching was not affected by zinc at activities of $0-10^{-7.30}$ mol/L, and was significantly ($P < 0.05$) decreased of activities higher than $10^{-7.30}$ mol/L; no egg could hatch zinc at activity of $10^{-5.00}$ mol/L. The nauplius metamorphosis was not affected by zinc at activities lower than $10^{-7.60}$ mol/L, and was significantly ($P < 0.05$) decreased at activities higher than $10^{-7.60}$ mol/L; no nauplii could live at zinc ion activity of $10^{-6.00}$ mol/L. The effects of zinc ion on the system of seedling-rearing of *P. chinensis* were discussed and it is believed the optimum zinc ion activity in the system of seedling-rearing of *P. chinensis* is $10^{-7.60}$ mol/L.

KEYWORDS Zinc, Ion activity, Egg hatching, Nauplius, Metamorphosis, *Penaeus chinensis*