

重金属 Cu^{2+} 对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性研究

张小琴, 覃仙凤 (阿坝师范学院资源与环境学院, 四川汶川 623002)

摘要 为研究重金属 Cu^{2+} 对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性效应, 通过单一变量急性毒性试验研究其在室内条件(温度 16~20 °C、湿度 88.5% 左右)对棘腹蛙蝌蚪的毒性效应。结果表明:根据寇氏法原理, 得到 Cu^{2+} 对 2 月龄棘腹蛙蝌蚪在 24、48、72、96 h 时的半致死浓度 (LC_{50}) 分别为 1.160、1.136、1.191 和 0.870 mg/L。依据安全浓度计算公式, 计算出安全浓度为 0.087 mg/L。根据毒性评价标准, 比较了 Cu^{2+} 对不同种类蝌蚪的毒性程度, 发现棘腹蛙蝌蚪的耐受性较弱。该研究可为水环境监测以及其他相关重金属离子的毒性研究提供参考, 为更好地保护棘腹蛙蝌蚪提供基础数据材料。

关键词 Cu^{2+} ; 棘腹蛙蝌蚪; 急性毒性; 毒性评价; 半致死浓度 (LC_{50})

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)17-0115-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.17.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Acute Toxicity of Copper Ions to Tadpoles of *Quasipaa boulengeri*

ZHANG Xiao-qin, QIN Xian-feng (College of Resources and Environment, Aba Teachers University, Wenchuan, Sichuan 623002)

Abstract In order to study the acute toxic effects of heavy metal Cu^{2+} on the tadpoles of *Quasipaa boulengeri*, a single-variable acute toxicity test was conducted to study the toxic effects of indoor conditions (temperature 16–20 °C, humidity 88.5%) on the tadpoles. The results showed that the semi-lethal concentration (LC_{50}) of heavy metal Cu^{2+} at 24, 48, 72 and 96 h were 1.160, 1.136, 1.191, 0.870 mg/L, respectively. According to the safe concentration calculation formula, the safe concentration was calculated to be 0.087 mg/L. According to the toxicity evaluation criteria, the toxicity degree of Cu^{2+} to different species of tadpoles was compared, and the tadpoles of *Q. boulengeri* were weakly tolerated. This study can provide references for water environment monitoring and other related heavy metal ion toxicity studies, and provide basic data materials for better protection of *Q. boulengeri*.

Key words Cu^{2+} ; Tadpoles of *Quasipaa boulengeri*; Acute toxicity; Toxicity evaluation; Semi-lethal concentration (LC_{50})

由于汶川地质灾害及洪涝灾害引发化工原料泄露、环保设施破坏等环境问题, 使得土壤水域中富含重金属, 如 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 等^[1]。当水环境中的重金属含量超过蝌蚪的耐受程度, 会对生活在汶川的两栖类动物特别是棘腹蛙蝌蚪有一定影响。棘腹蛙俗名石蛙、石鸡、梆梆鱼等, 棘腹蛙在食用、药用、科研、生态环境等方面的价值极高, 但最近几年人为因素及环境因素导致棘腹蛙个体数量大幅度减少, 1920 年确定棘腹蛙 (*Quasipaa boulengeri*) 亦称棘胸蛙 (*Quasipaa tibetanus*), 属于同物异名。棘腹蛙已经先后被列入《中国濒危物种红皮书》和《中国物种红色名录》。棘腹蛙蝌蚪皮肤渗透性强, 对外界环境的毒性影响异常敏感, 在这一阶段试验的最大致毒浓度与外界环境颇为相似。国内外有关重金属对棘腹蛙蝌蚪的毒理研究较少, 国内有学者研究了棘胸蛙在氨氮胁迫条件下毒理试验^[2], 也有学者研究了重金属 Cu^{2+} 胁迫对棘腹蛙存活、行为和体重增长的影响^[3], 但缺少 Cu^{2+} 对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性研究。其中水环境中的 Cu^{2+} 易致早期的棘腹蛙蝌蚪大量死亡, 从而造成棘腹蛙个体的成活率大幅度降低。笔者探究了重金属 Cu^{2+} 对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性影响, 旨在为水环境检测以及其他相关重金属离子对棘腹蛙蝌蚪的毒性研究提供参考, 以更好地保护棘腹蛙蝌蚪。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试验试剂。硫酸铜 (CuSO_4)、冰乙酸 (CH_3COOH)。

基金项目 阿坝师范学院校级项目 (ASA18-03); 大学生创新创业项目 (201806048, S201910646075, S201910646076)。

作者简介 张小琴 (1982—), 女, 四川新都人, 讲师, 硕士, 从事动物生理生态研究。

收稿日期 2020-01-03; 修回日期 2020-02-14

1.1.2 试验器材。透明方箱 (28.0 cm×19.5 cm×16.5 cm)、烧杯、电子天平、pH 试纸、游标卡尺、温度计、小米米家智能摄像机等, 均由阿坝师范学院资源与环境学院实验室提供。

1.1.3 试验动物及分组。棘腹蛙蝌蚪购自雅安市林溪地棘胸蛙养殖专业合作社, 随机选择大小均匀、食欲强、活动能力强的 2 月龄棘腹蛙蝌蚪 500 尾 (平均体长 3.97 cm, 平均体重 0.41 g), 分为试验组和对照组。

1.1.4 水处理。饲养蝌蚪用水为阿坝师范学院后山小溪取得, 将溪水通风静置 2 d 后使用, 以沉淀泥沙, 避免对棘腹蛙蝌蚪的试验结果造成影响。

1.2 试验方法

1.2.1 试验溶液的配制。准确称量 CuSO_4 0.1 g, 将其溶于 100 mL 水中, 再加入适量的冰乙酸, 抑制 Cu^{2+} 的水解, 配制质量浓度为 1.0 mg/L 的母液, 备用。

1.2.2 蝌蚪的饲养。投放熟饲料、熟白菜交替喂养, 每隔 24 h 换 1 次水以及喂食。

1.2.3 预试验。参考相关文献^[3], 在较大范围内对少量蝌蚪进行试验。各试验组试验溶液浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、3.0、4.0 mg/L, 同时设置空白对照组 (试验溶液浓度为 0 mg/L), 每个浓度梯度下设置 1 个平行对照组。在每个容器中加入 1 L 处理后的水, 分别加入不同浓度梯度的硫酸铜溶液, 每个容器中放入 10 尾蝌蚪。试验溶液 pH 为 7, 水温为 17.3~20.5 °C, 室内温度为 16~20 °C, 湿度为 75.9%, 每隔 24 h 换试验溶液 1 次, 并喂食。试验开始时安装摄像机, 观察蝌蚪的中毒症状, 并分别记录 4、12、24、48、72、96 h 时蝌蚪死亡数量。根据预试验结果, 得出试验的最小致死浓度和最大安全浓度, 从而确定正

式试验的浓度范围。

1.2.4 正式试验。根据预试验结果,按等差质量浓度梯度设置各试验组试验溶液浓度分别为0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 mg/L。每个浓度梯度均设置3个平行组,同时设置了3个空白对照组(试验溶液浓度为0 mg/L),贴好标签纸。在每个容器中加入1 L水,用吸量管取适量的配制好的母液滴入对应容器中。随机选取蝌蚪10尾,放养于容器中。测量并记录水温、pH、室内温度和湿度等。采用静止试验法^[4],试验开始后观察蝌蚪的中毒情况,前4 h进行连续观察,并及时捞出死亡个体,以免污染水质(死亡标准以用玻璃棒触动蝌蚪时,其身体无反应),随后观察并记录12、24、48、72、96 h时的死亡数量。试验期间注重观察蝌蚪的平衡、游动及体色状态。

1.2.5 数据统计与分析。半致死浓度(LC₅₀)采用寇氏法原理来计算;安全浓度(SC)采用公式 $SC = 96 \text{ h } LC_{50} \times 0.1$ 来计算;最后,对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 预试验 根据预试验结果得知,试验溶液pH为7.0,水温为17.3~20.5℃,室内温度为18~20℃,湿度为75.9%。在24 h内浓度分别为3和4 mg/L的试验组蝌蚪全部死亡,在96 h内浓度为2 mg/L的蝌蚪全部死亡。根据以上结果,确定最小致死浓度为2 mg/L,最大安全浓度为1 mg/L。因此,确定正式试验的浓度梯度为0.8~2.2 mg/L。在前4 h内,浓度0.1~1.0 mg/L的试验组蝌蚪无明显中毒症状,而浓度2~4 mg/L试验组蝌蚪表现出明显的中毒症状(明显出现头晕,身体摆动剧烈,不定向运动,在水中侧翻后又恢复正常,悬浮在水中,连续以往动作,不久后身体失衡侧翻或仰卧在水中)。

2.2 正式试验

2.2.1 中毒症状。在试验溶液pH 7.0,水温18.4~19.2℃,室内温度16~20℃,湿度88.5%的条件下,Cu²⁺对蝌蚪的中毒症状结果如图1~3所示。



图1 中毒前

Fig.1 Before poisoning

使用摄像设施连续观察蝌蚪的行为变化。从图1~3可以看出,中毒前,蝌蚪的体色正常,活跃能力强;中毒后,蝌蚪运动强烈,尾末端摆动明显,上下翻腾,体表有分泌物,体色变淡,试液混浊,不久后身体彻底失衡,仰卧于水中,死亡的



图2 中毒后

Fig.2 After poisoning

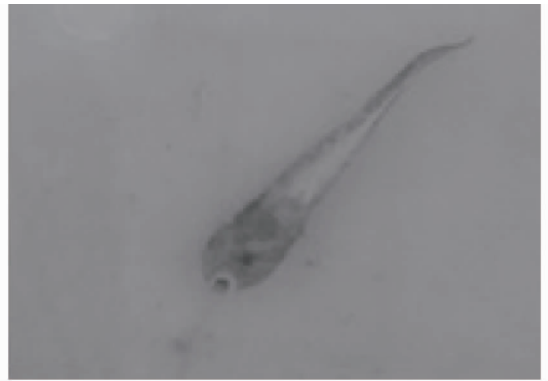


图3 死亡

Fig.3 Death

蝌蚪体表变灰,尾鳍透明,皮肤出现溃烂。

2.2.2 Cu²⁺对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性影响。在96 h内不同质量浓度的Cu²⁺处理后累计2月龄棘腹蛙蝌蚪死亡数及其急性试验结果如表1、2所示。

由表1可知,随着Cu²⁺浓度的增加及时间的延长,棘腹蛙蝌蚪数量死亡数增多。由于蝌蚪的体表渗透能力强,Cu²⁺浓度越大,对蝌蚪的刺激性越强,毒性越强;较小的个体先死亡。大多数水产养殖中常用0.7 mg/L CuSO₄溶液(含Cu²⁺0.178 mg/L)喷洒全池,为防治原动物疾病以及藻类生长而危及多数两栖动物的生长^[4]。由于棘腹蛙的LC₅₀低于0.178 mg/L,耐毒性极弱,对于棘腹蛙蝌蚪的伤害较大,表明此种喷洒方式对于2月龄棘腹蛙蝌蚪的疾病预防是不可行的。

由表2可知,随着Cu²⁺浓度的增加,在96 h内的累计2月龄棘腹蛙蝌蚪死亡数及死亡率逐渐增大,在2.0和2.2 mg/L浓度条件下累计死亡数及死亡率均达到最大值,蝌蚪全部死亡。

根据表1试验结果,再通过回归分析得出Cu²⁺对蝌蚪的急性毒性试验结果(表3)。在24、48、72、96 h Cu²⁺的LC₅₀分别为1.160、1.136、1.191和0.870 mg/L。依据SC计算公式,计算出SC为0.087 mg/L。根据《水生生物监测手册》中对鱼类(蝌蚪)毒性评价标准及我国化学物质毒性分级标准(96 h LC₅₀ < 1.0 mg/L时为急性毒性Ⅰ级,1.0 mg/L ≤ 96 h LC₅₀ < 10.0 mg/L为急性毒性Ⅱ级,10.0 mg/L ≤

96 h LC₅₀ ≤ 100.0 mg/L 为急性毒性Ⅲ级),可判定 Cu²⁺对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性等级为Ⅱ级;根据《水生生物监测手册》中农药对鱼类(蝌蚪)的毒性等级划分标准(剧毒,96 h LC₅₀ < 1.0 mg/L;高毒,1.0 mg/L ≤ 96 h LC₅₀ < 100.0 mg/L;中低毒,100.0 mg/L ≤ 96 h LC₅₀ < 1 000.0 mg/L;低毒,1 000.0 mg/L ≤

96 h LC₅₀ ≤ 10 000.0 mg/L;微毒或无毒,96 h LC₅₀ > 10 000.0 mg/L),判定 2 月龄棘腹蛙蝌蚪对 Cu²⁺的毒性等级为剧毒。在整个试验过程中,对照组中的蝌蚪正常游动,未出现任何中毒症状,无死亡个体;其他试验组均出现不同程度的中毒状况及死亡状态。

表 1 不同质量浓度梯度下各时间内的死亡数

Table 1 The death number of different mass concentration gradients at each time

组别 Group	试验溶液浓度 Test solution concentrations mg/L	蝌蚪数量 Number of tadpoles 尾	试验蝌蚪在各时间内累计死亡数 Cumulative death number of test tadpoles at each time//尾				
			8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
①	0	30	0	0	0	0	0
②	0.8	30	0	0	0	0	0
③	1.0	30	0	0	0	3	7
④	1.2	30	0	0	0	5	11
⑤	1.4	30	0	0	3	14	18
⑥	1.6	30	0	0	4	18	21
⑦	1.8	30	0	0	5	22	28
⑧	2.0	30	0	0	6	26	30
⑨	2.2	30	0	6	14	30	30

表 2 不同质量浓度梯度 Cu²⁺下棘腹蛙蝌蚪的死亡率Table 2 Mortality of *Q. bouleengeri* tadpoles at different mass concentration gradients of Cu²⁺

组号 Group	试验溶液浓度 Test solution concentrations mg/L	蝌蚪数量 Number of tadpoles 尾	试验蝌蚪在 96 h 内的累积死亡数 Cumulative death number of test tadpoles at 96 h//尾	试验蝌蚪在 96 h 内的死亡率 Mortality of test tadpoles at 96 h//%
②	0.8	30	0	0.00
③	1.0	30	7	0.23
④	1.2	30	11	0.37
⑤	1.4	30	18	0.60
⑥	1.6	30	21	0.70
⑦	1.8	30	28	0.93
⑧	2.0	30	30	1.00
⑨	2.2	30	30	1.00

表 3 Cu²⁺在不同时间对棘腹蛙蝌蚪的急性毒性试验结果Table 3 Results of acute toxicity test of Cu²⁺ to tadpoles of *Q. bouleengeri* at different time

时间 Time h	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient(R ²)	P	LC ₅₀ mg/L
24	Y=0.553 7x	0.333 3	>0.05	1.160
48	Y=2.181 8x	0.738 6	>0.05	1.136
72	Y=2.867 6x	0.993 6	<0.01	1.191
96	Y=3.710 8x	0.979 0	<0.01	0.870

3 结论与讨论

由 Cu²⁺对 2 月龄棘腹蛙蝌蚪的毒性试验结果可知,在同一质量浓度下,随着时间的延长,蝌蚪的死亡数增加,死亡率逐渐升高;在相同时间内,Cu²⁺的质量浓度越大,蝌蚪的死亡数越多,死亡率越大,并且当质量浓度达到一定浓度时,死亡速率极快;个体小的蝌蚪比个体大的蝌蚪先死亡。棘腹蛙蝌蚪对于 Cu²⁺的耐受性极弱,2 月龄棘腹蛙蝌蚪对 Cu²⁺的毒性等级为剧毒。重金属急性毒性试验对蝌蚪的行为形态、生长发育、机体酶活性、组织器官、遗传等方面均有

极大影响,从而使蝌蚪中毒。其中对蝌蚪的行为形态的影响最为明显,主要表现在以下方面:游动能力迟缓,游动方向不确定;侧翻或仰卧在水中,体色泛白,体呈僵直在水中;游动能力迟缓;游动方向不定向;皮肤溃烂,试验溶液混浊。Cu²⁺对蝌蚪的毒害主要通过破坏鳃结构来影响其呼吸方式,从而使其功能紊乱,中毒死亡;还因蝌蚪皮肤的渗透性强,溶液中的 Cu²⁺易渗进皮肤,破坏内脏器官功能,导致其中毒。经以上分析可知,蝌蚪对外界环境敏感,故蝌蚪可作为环境监测的重要指示动物。因此,该试验不仅可为水环境监测及棘腹蛙蝌蚪的相关研究提供参考,也可为保护棘腹蛙蝌蚪提供基础数据材料。

国内关于 Cu²⁺对两栖动物的急性毒性研究较少,这里列出国内已有的 Cu²⁺对不同两栖类蝌蚪的 LC₅₀(表 4),LC₅₀ 越大,毒性越小,蝌蚪耐受性更强。

不同种类的蝌蚪体长及质量与 LC₅₀ 并未呈现出线性关系。对于同一种蝌蚪,随着时间的延长,LC₅₀ 变小。这可能是随着时间的延长,体内毒性增强,耐受性减弱。

(下转第 121 页)

4 结论

微生物发酵马铃薯饲料部分代替精饲料对奶牛泌乳性能乳品质和血液生化指标均无显著影响,综合考虑用发酵马铃薯饲料替代精饲料饲喂奶牛的比例最好低于 20%。

参考文献

- [1] 闫晓波. 马铃薯渣和秸秆混合青贮对奶牛生产性能的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [2] 雒瑞端, 郭艳丽, 韩海珠, 等. 基于瘤胃模拟技术的马铃薯茎叶混合青贮料体外瘤胃发酵特性研究[J]. 动物营养学报, 2018, 30(3): 1185-1191.
- [3] ABUMWEIS S S, MARINANGELI C P, FROHLICH J, et al. Implementing phytosterols into medical practice as a cholesterol-lowering strategy: Overview of efficacy, effectiveness, and safety [J]. Canadian journal of cardiology, 2014, 30(10): 1225-1232.
- [4] MAYER F, HILLEBRANDT J O. Potato pulp: Microbiological characterization, physical modification, and application of this agricultural waste product[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48(4): 435-440.
- [5] 李伟, 刘学良, 郭春晖, 等. 马铃薯糟渣饲料部分替代玉米对奶牛产奶量的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(24): 72-74.
- [6] 马希景. 夏季高温季节泌乳牛饲喂马铃薯对产乳性能的影响[J]. 中国奶牛, 2003(3): 35-36.
- [7] 王典, 李发弟, 张养东, 等. 马铃薯淀粉渣-玉米秸秆混合青贮料对肉羊生产性能、瘤胃内环境和血液生化指标的影响[J]. 草业学报, 2012, 21(5): 47-54.
- [8] 汪张贵. 日粮核黄素添加水平对新扬州仔鸡免疫机能和血液生化指标

的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2005.

- [9] 陈文, 冯于明, 黄艳群. 玉米油和猪油对肉鸡生产性能、屠宰性能及血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(7): 1101-1108.
- [10] STANLEY C C, WILLIAMS C C, JENNY B F, et al. Effects of feeding milk replacer once versus twice daily on glucose metabolism in Holstein and Jersey calves[J]. Journal of dairy science, 2002, 85(9): 2335-2343.
- [11] 张宏福, 秦加华, 卢庆萍, 等. 断奶日龄对仔猪血清中几种生化成分的影响[M]//张宏福, 顾宪红. 仔猪营养生理与饲料配制技术研究. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 234-239.
- [12] KANJANAPRUTHIPONG J. Supplementation of milk replacers containing soy protein with threonine, methionine, and lysine in the diets of calves [J]. Journal of dairy science, 1998, 81(11): 2912-2915.
- [13] 李建国, 孙凤莉, 李英, 等. 代乳粉对羔羊生产性能及血液生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2006, 18(1): 37-42.
- [14] CLAUDIA B, HARALD H, GOIVANNI L R, et al. Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and reared with Long-R3-insulin growth factor I and growth hormone[J]. Journal of animal science, 1998, 76(3): 758-766.
- [15] AHMED A F, CONSTABLE P D, MISK N A. Effect of feeding frequency and route of administration on abomasal luminal pH in dairy calves fed milk replacer[J]. J Dairy Sci, 2002, 85(6): 1502-1508.
- [16] 周顺伍. 动物生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [17] 王卓, 顾正彪, 洪雁. 马铃薯渣的开发与利用[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(2): 133-136.
- [18] 袁惠君, 赵萍, 李志忠. 马铃薯渣的开发利用价值及前景[J]. 甘肃科技纵横, 2004, 33(6): 67-68.

(上接第 117 页)

表 4 重金属 Cu²⁺对 7 种蛙类的毒性评价
Table 4 Toxicity evaluation of heavy metal Cu²⁺ to 7 species of frogs

试验动物 Test animals	LC ₅₀ //mg/L				SC mg/L	毒性 Toxicity	平均体长 Average body length//cm	体质量 Body mass//g
	24 h	48 h	72 h	96 h				
中国林蛙 ^[5] <i>Rana chinsinensis</i>	0.131	0.105	0.038	—	0.020	剧毒	0.567	0.046
东北林蛙 ^[6] <i>Rana dybowskii</i>	0.198	0.118	0.058	0.027	0.002	剧毒	1.376	0.102
泽蛙 ^[7] <i>Rana limnocharis</i> Boie	0.201	0.138	—	0.118	0.012	剧毒	1.180	0.250
中华大蟾蜍 ^[8] <i>Bufo bufogargarizans</i>	0.527	0.351	—	0.262	0.026	剧毒	—	0.800
日本林蛙 ^[9] <i>Rana japonica</i>	—	0.142	0.116	0.101	0.010	剧毒	—	—
蟾蜍 ^[10] Toad	—	0.211	0.228	0.273	0.027	剧毒	1.800~2.300	0.114
海陆蛙 ^[11] <i>Rana cancrivora</i> Gravenhorst	5.690	3.370	1.340	0.950	0.095	剧毒	2.333	0.134

参考文献

- [1] 冯光兴. 汶川震区清平镇生态环境特征及对策[J]. 山西建筑, 2019, 45(18): 153-155.
- [2] 郑晓静. 棘胸蛙(*Rana spinosa*)蝌蚪对氨氮的耐受与响应特征[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2015.
- [3] 郑燕倩, 雷瑾, 刘子明, 等. 重金属对石蛙蝌蚪存活、行为和体重增长的影响[J]. 丽水学院学报, 2015, 37(5): 21-25.
- [4] 杨再福, 陈立侨, 陈华友. 重金属铜、镉对蝌蚪毒性的研究[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(1): 102-103.
- [5] 石戈, 王健鑫, 武佳, 等. Cu²⁺和 Cr⁶⁺对中国林蛙蝌蚪的急性毒性[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2007, 39(2): 116-121.

- [6] 金鑫, 周丹, 于东. Cu²⁺对东北林蛙的急性毒性[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2014, 30(3): 129-132.
- [7] 贾秀英, 董爱华, 杨亚琴. 铜、锌和三唑磷对泽蛙蝌蚪的毒性研究[J]. 环境科学研究, 2005, 18(5): 26-29.
- [8] 杨再福. 铜(Cu²⁺)对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性试验[J]. 环境保护科学, 2000, 26(5): 37-38.
- [9] 姚丹, 万琳燕, 耿宝荣, 等. Cu²⁺对日本林蛙蝌蚪的急性毒性研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2004, 20(4): 117-120.
- [10] 王改芳, 郝之黎. 铜离子、汞离子对蟾蜍蝌蚪的联合毒性的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(11): 41-48.
- [11] 李春瑜. 重金属铜、镉对海陆蛙蝌蚪毒性作用的初步研究[D]. 海口: 海南师范大学, 2013.