

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2014.06.008

异源铜盐对仿刺参幼参急性毒性及组织形态学影响

刘天红, 于晓清, 郭萍萍, 王志刚, 吴志宏,
孙元芹, 孙福新, 王娟, 麻丹萍
(山东省海洋生物研究院, 山东 青岛 266002)

摘要: 采用急性毒性试验方法研究异源铜盐对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参的毒性影响, 通过24 h、48 h、72 h和96 h的致死数量统计分析硫酸铜(CuSO_4)/氯化铜(CuCl_2)对幼参的半致死质量浓度(LC_{50})和安全质量浓度(SC); 利用石蜡切片显微定性观察不同铜盐对刺参幼参后肠的毒性情况。结果表明, CuSO_4 来源的 Cu^{2+} 对幼参24 h、48 h和72 h的 LC_{50} 均大于 CuCl_2 来源的 Cu^{2+} 对幼参24 h、48 h和72 h的 LC_{50} , 而 CuCl_2 对幼参96 h LC_{50} 大于 CuSO_4 对幼参96 h LC_{50} ; 异源铜盐在暴露前48 h内对刺参的毒性影响极其显著, 随着暴露时间的延长其对刺参的毒性影响不显著; 2种铜盐(以铜离子质量浓度为 $0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 计)对幼参的消化道均有不同程度的腐蚀作用, 导致结缔层与上皮层分离, CuCl_2 对刺参肠道的毒性(类似腐蚀作用)大于 CuSO_4 的毒性; 不同的阴离子对 Cu^{2+} 的毒性有拮抗作用。

关键词: 硫酸铜; 氯化铜; 幼参; 半致死质量浓度; 肠组织学

中图分类号: S 968.9

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2014)06-0058-08

Effect of different copper salts on acute toxicity and histomorphology of juvenile sea cucumbers

LIU Tianhong, YU Xiaoqing, GUO Pingping, WANG Zhigang, WU Zhihong,
SUN Yuanqin, SUN Fuxin, WANG Juan, MA Danping
(Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266002, China)

Abstract: The toxic effect of different copper salts on juvenile sea cucumbers was studied by acute toxicity test. LC_{50} and safety concentration of two copper ions (CuSO_4 and CuCl_2) were determined by statistical analysis of dead numbers of juvenile sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) after treatments of 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, respectively. The toxic effect of different copper salts on foregut of juvenile sea cucumbers were observed on paraffin section with microscope. The results show that LC_{50} s of CuSO_4 on juvenile sea cucumbers after treatment of 24 h, 48 h and 72 h were higher than that of CuCl_2 , while LC_{50} of CuCl_2 was higher than that of CuSO_4 after 96 h treatment. The difference of toxic effect of juvenile sea cucumbers exposed to the two copper ions within 48 h was very significant, but was not significant as the exposure time. Corrosive actions were observed in digestive tracts of juveniles treated with two kinds of salts (with concentration of $0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ as copper ion), which resulted in connective tissue layer separating from the epithelial layer. The toxicity (corrosive action) of CuCl_2 on digestive tracts of sea cucumbers was greater than that of CuSO_4 . Different anions of copper salts had antagonistic effect to copper toxicity.

Key words: CuSO_4 ; CuCl_2 ; juvenile sea cucumber; LC_{50} ; digestive tract histomorphology

收稿日期: 2014-03-26; 修回日期: 2014-05-08

资助项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目(201305005); 山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新团队建设项目(SDATIT-08-011-04)

作者简介: 刘天红(1982-), 女, 助研, 从事水产品安全与质量控制研究。E-mail: ouethl@126.com

通信作者: 孙福新(1960-), 男, 研究员, 从事水产养殖和海洋生物研究。E-mail: sunfx817@126.com

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*), 俗称海参、刺参, 属棘皮动物门、海参纲、楯手目、刺参科、仿刺参属的种类^[1]。在中国和马来西亚, 刺参被认为是有很好的滋补效果的补品, 对高血压、哮喘病、风湿、阳痿、便秘等疾病有治疗作用^[2-4]。刺参市场需求量增大, 掀起了刺参养殖的热潮, 但养殖过程中使用的饲料、各种抗菌药和消毒剂也给环境带来了不同程度的污染^[5-6]。铜盐一般作为消毒剂用于消除池塘、水田、水渠和河湖中的绿藻污染^[7], 铜(Cu)也是水产动物必需的微量元素之一^[8], 对机体的生理功能和生长发育起着十分重要的作用。然而, 当水体中的铜离子(Cu^{2+})超出一定的范围, 易引起Cu在生物机体内特别是肝脏的大量积蓄^[9-10], 各国研究学者一般从Cu对水生动物细胞膜毒性和组织质量分数变化及分布规律等方面进行研究^[8,11-12]。BUNDRIDGE^[13]发现海参(*Pentacta anceps*)和绿刺参(*Stichopus chloronotus*)消化道能分泌一种消化酶消化饲料中的化合态铜, 使其成为单体铜并积累到体壁组织中。高浓度Cu将变成一种抑制物或毒性物质, 且在生态系统中不被分解或消除^[14-15]。该研究以硫酸铜(CuSO_4)和氯化铜(CuCl_2)2种异源铜盐对幼参进行攻毒试验, 确定2种不同来源的 Cu^{2+} 对幼参的半致死质量浓度(LC_{50})和安全质量浓度(SC), 观察两者对幼参肠道组织学影响, 初步探讨刺参 Cu^{2+} 中毒机理, 为制定不同铜盐作为消毒剂或兽药使用标准提供数据支持, 也可用于刺参养殖环境评价学研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

仿刺参幼参由国家海洋科研基地内山东省海洋生物研究院海水良种繁育中心提供, 所有幼参为同一批孵化, 挑取体质量为3~5g的健康个体暂养7d, 暂养期间每天按参总质量3%辅以3倍干海泥(水分7.90%)投喂商品饲料(YSB), 定时吸污更换海水, 试验前1d不投饵。

1.2 试验方法

1.2.1 试验的理化条件 在山东省海洋生物研究院中试实验室进行; 水温(16 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 溶解氧质量浓度即时测定值 $\geq 6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 24h不间断充氧; pH为7.96~8.20, 试验过程中每天8:00和15:00测定2次pH; 盐度 31.18 ± 0.34 ; 海水来自青岛团

岛海域, 经沙滤池过滤, Cu^{2+} 的本底质量浓度为 $0.001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 符合GB 11607-89中铜质量浓度 $< 0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的限量。

1.2.2 急性毒性试验 采用文献[16]~[18]的方法, 根据预试验给出的 CuSO_4 和 CuCl_2 ($\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为分析纯)100%致死的最低浓度与0%致死的最大浓度结果, 按浓度对数的等差比例设5个浓度组, 1个对照组, 设有3个平行组, 每组投放平均体质量在(3.88 ± 0.32)g的刺参10只进行攻毒试验。采用静水法, 试验期间不投饵, 观察记录24h、48h、72h和96h各组刺参的死亡数, 随时捞出死亡个体(取体壁匀浆 -18°C 保存, 用于刺参体内 Cu^{2+} 质量分数测定)或其他污物(主要指内脏)。结合文献[19]和试验观察, 刺参死亡判断标准为萎缩, 翻吻破肚, 排脏, 部分或全身发白、发蓝, 溃烂, 最后溶化。

1.2.3 刺参后肠组织学观察试验 根据1.2.2的结果选取 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 急性毒性试验中间浓度进行试验, 设对照组1组, 每组10只刺参, 攻毒24h后活体解剖刺参。取后肠固定于波恩氏(Bioun's)溶液中, 固定24h后经冲洗、系列梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、做连续切片(厚度为7 μm)苏木精-伊红染色、中性树胶封片, 显微镜下观察其组织结构, 数码显微照相。

1.2.4 刺参体内 Cu^{2+} 质量分数测定 参照GB/T 5009.13-2003食品中铜的测定。

1.3 数据处理

使用SPSS 13.0数理统计软件计算求出24h、48h、72h和96h的 LC_{50} 及各自的95%置信区间, 采用单因素方差分析, 显著水平为 $P < 0.05$ 时采用Tukey检验进行多重比较, 试验数据以平均值 \pm 标准误差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。

安全质量浓度计算公式^[20]:

$$\text{SC} = \frac{\text{LC}_{50}^{48} \times 0.3}{\left(\frac{\text{LC}_{50}^{24}}{\text{LC}_{50}^{48}}\right)^2} \quad (1)$$

式中 LC_{50}^{24} 为生物24h LC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); LC_{50}^{48} 为生物48h LC_{50} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

$$\text{富集系数}^{[21-22]}; \text{BCF} = \frac{C_w}{C_0} \quad (2)$$

式中 C_w 为幼参体内 Cu^{2+} 质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C_0 为暴露质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2 结果与分析

2.1 异源铜盐攻毒刺参幼参后的中毒症状

使用 CuSO_4 和 CuCl_2 对刺参幼参攻毒后, 幼参出现了不同程度的中毒现象, 即根据浓度不同化皮程度也不同, 部分刺参出现摇头现象, 继而逐渐死亡, 但 2 组均没有吐肠现象。 $\rho_{\text{CuSO}_4}^{\text{Cu}^{2+}} > 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 攻毒 24 h 后全部刺参沉入箱底, 刺激无反应, 化皮率 100%; $\rho_{\text{CuSO}_4}^{\text{Cu}^{2+}} > 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 攻毒 24 h 后大部分刺参活动迟缓, 管足不能附壁, 沉入箱底, 有 3 只幼参出现化皮现象, 96 h 后全部 10 只幼参完全化皮, 刺激后反应微弱或无反应; $\rho_{\text{CuCl}_2}^{\text{Cu}^{2+}} > 0.075 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 攻毒 24 h 后即有 2 只幼参出现化皮, 48 h 后 10 只幼参全部出现化皮现象且刺激无反应; $\rho_{\text{CuCl}_2}^{\text{Cu}^{2+}} > 0.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 攻毒 24 h 后受试幼参全部化皮, 溃烂。由此可以初步推断 CuCl_2 对幼参的急性毒性大于 CuSO_4 , 这可能是实际生产中通常采用 CuSO_4 溶液来灭藻杀菌而不采用 CuCl_2 的原因。

2.2 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 对幼参后肠毒性组织学观察结果

Cu^{2+} 暴露液质量浓度为 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 幼参经过 24 h 暴露后体表有溃烂白点, 肠道组织切片结果见图 1。对照组健康刺参肠道由内到外分别为肠上皮、单层粘膜层、粘膜下层、较窄的纵层、较宽的环层、浆膜层构成(图 1-a), 对照组健康刺参的血小窦通过间皮细胞连接(图 1-b)。图 1-c~e 分别显示的 CuCl_2 攻毒刺参后肠 40 倍放大的图片, 通过组织切片观察, CuCl_2 和 CuSO_4 2 组刺参的血小窦均已脱落成游离状态, 图 1-c 中箭头所指部位为刺参后肠粘膜上层细胞皱襞脱落, 刺参后肠粘膜上皮细胞死亡分解, 血窦内皮与粘膜层脱落(图 1-d), 粘膜下层结缔层与肌肉层分离, 疏

松结缔层内细胞已经死亡分解(图 1-e); 图 1-f~h 分别显示的 CuSO_4 攻毒刺参后肠 400 倍放大图片, 其中刺参肠道上皮细胞死亡(图 1-f), 生发层有大量嗜碱性细胞生成, 显示的是刺参肠道上皮细胞正在分解(图 1-g), 粘膜上层与结缔层正在分离, 结缔层生有大量嗜酸性细胞(图 1-h)。通过组织切片的解析可以看出, CuSO_4 和 CuCl_2 试验组的刺参肠道均有不同程度的损伤, 表现为刺参肠道粘膜上层脱离粘膜下层结缔组织, 结缔组织中出现许多吞噬变形细胞用于解毒。同一攻毒时间后的 CuCl_2 攻毒组的刺参肠道粘膜下层结缔层与肌肉层分离(图 1-e), 而 CuSO_4 攻毒组的粘膜上层与结缔层正在分离(图 1-h), 由此可见, CuCl_2 对刺参肠道的毒性(类似腐蚀作用)大于 CuSO_4 的毒性。但刺参真正的致死原因是由于体表腐蚀作用, 或是肠道腐蚀作用亦或是双重作用, 有待进一步研究, 以便用于指导刺参养殖过程中受到重金属污染时作出及时正确的补救措施。吞噬变形细胞属于刺参体腔细胞, 其在棘皮动物免疫过程中具有重要作用。刺参体腔受到刺激后会产生相应的反应, 体腔细胞开始合成或分泌多种效应因子, 李霞等^[23]发现虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)有 2 种体腔细胞, 变形吞噬细胞具有吞噬酵母的功能, 色素细胞可释放色素颗粒参与体液免疫反应。孙永欣^[24]研究发现高剂量的黄芪多糖(APS)会刺激刺参体腔内的吞噬细胞增多, 用于吞噬外源 APS, 与该研究的结果类似。

2.3 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 对幼参半致死浓度计算结果

急性毒性浓度设置和死亡数量记录见表 1。根据试验结果利用浓度对数-概率回归方程, 计算出 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 对幼参的不同时间 LC_{50} 和 95% 置信区间, 结果见表 2。

表 1 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 来源的 Cu^{2+} 对幼参急性毒性试验浓度设计与死亡结果($n=3$)

Tab. 1 Analysis of concentrations of different copper ions on juvenile sea cucumber

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

暴露时间/h exposure time	$\rho(\text{CuSO}_4)(\text{Cu}^{2+})$					$\rho(\text{CuCl}_2)(\text{Cu}^{2+})$				
	0.25	0.16	0.10	0.06	0.04	0.19	0.12	0.075	0.05	0.03
24	9	6	3	0	0	9	6	3	0	0
48	10	9	6	2	0	10	9	9	2	1
72	10	10	8	7	4	10	10	10	4	3
96	10	10	10	8	7	10	10	10	6	5

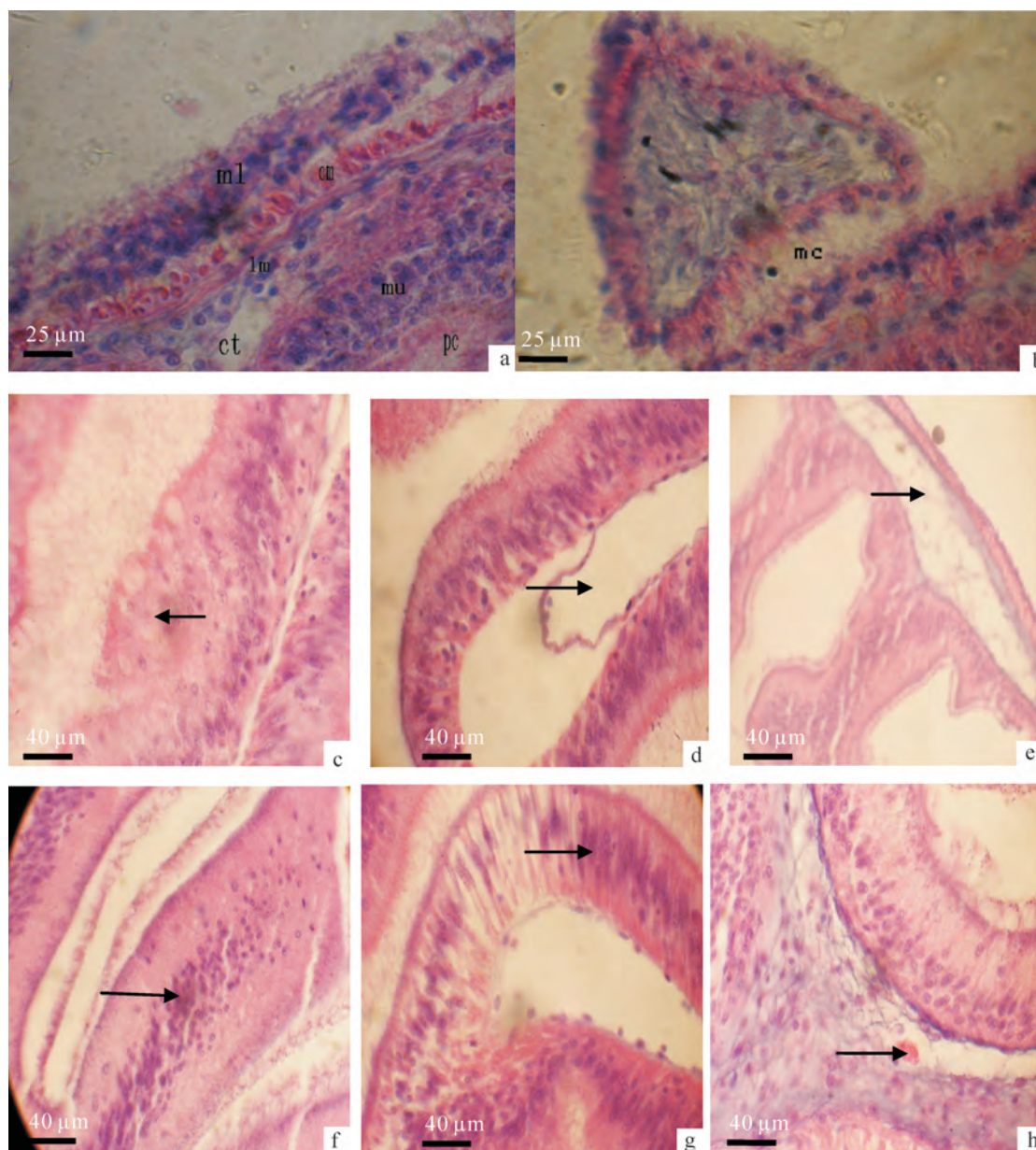


图1 对照组与硫酸铜/氯化铜攻毒组刺参后肠组织切片图

a. 对照组刺参后肠(×1 000); b. 对照组血小窦(×1 000); c~e. CuCl₂ 攻毒刺参后肠(×400); f~h. CuSO₄ 攻毒刺参后肠(×400); ml. 黏膜层; cm. 环肌; lm. 纵肌; ct. 结缔组织; mu. 粘膜上皮层; pce. 假复层纤毛柱状上皮; mc. 间皮细胞

Fig. 1 Intestinal tissue slices of sea cucumber of control group and CuSO₄/CuCl₂ toxic group

a. hindgut 1 000 times micro-amplification; b. blood sinus 1 000 times micro-amplification of control group; c~e. hindgut 400 times micro-amplification of CuCl₂ toxic group; f~h. hindgut 400 times micro-amplification of CuSO₄ toxic group; ml. mucous layer; cm. circular muscle; lm. longitudinal muscle; ct. connective tissue; mu. Mucosa; pc. pseudostratified ciliated columnar epithelium; mc. mesothelial cells

采用 ANOVA 方差分析 2 种铜盐对幼参在不同时间的 LC₅₀ 组间差异显著, 采用 Tukey 进行双重检验, 结果见表 2。CuSO₄ 来源的 Cu²⁺ 对幼参 24 h、48 h 和 72 h 的 LC₅₀ 均大于 CuCl₂ 来源的 Cu²⁺ 对幼参 24 h、48 h 和 72 h 的 LC₅₀, CuCl₂ 对幼参 96 h LC₅₀ 大于 CuSO₄ 对幼参 96 h LC₅₀; 但 2 种铜盐在

24 h 和 48 h 的 LC₅₀ 之间差异极其显著, 而 72 h 和 96 h 的 LC₅₀ 差异不显著; 由此可见在暴露初期, 前 48 h 内 Cu²⁺ 来源不同对刺参的毒性影响极其显著, 随着暴露时间的延长 Cu²⁺ 来源的不同对刺参的毒性影响不显著。

分别将 2 种铜盐对幼参的暴露时间和 LC₅₀ 结果

拟合后发现, CuSO_4 对幼参的 LC_{50} 与暴露时间满足对数函数关系, 而 CuCl_2 对幼参的 LC_{50} 与暴露时间满足幂函数关系, 且相关系数都较高(表 3); 分别

对暴露时间和 LC_{50} 进行 t 检验, 发现 CuSO_4 的暴露时间对 LC_{50} 差异不显著 ($P = 0.05$), 而 CuCl_2 的暴露时间对 LC_{50} 差异显著 ($P < 0.05$)。

表 2 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 来源的 Cu^{2+} 对幼参急性毒性试验统计结果 ($n = 3$)

Tab. 2 Result of different copper ions on juvenile sea cucumber in acute toxicity test

时间/h time	硫酸铜/氯化铜 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$	浓度对数-概率回归方程 regression equation	半致死质量浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LC_{50}	相对标准偏差 $\text{RSD}_{\text{LC}_{50}}$	95% 置信区间/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 95% confidence interval	P
24	CuSO_4	$P = 5.29x + 4.53$	0.140	0.005 0	0.110 ~ 0.180	0.001
	CuCl_2	$p = 5.58x + 5.52$	0.100	0.005 0	0.097 ~ 0.130	
48	CuSO_4	$p = 5.72x + 5.97$	0.090	0.008 0	0.072 ~ 0.110	0.003
	CuCl_2	$p = 4.19x + 5.01$	0.064	0.008 0	0.053 ~ 0.076	
72	CuSO_4	$p = 3.62x + 4.81$	0.047	0.008 0	0.023 ~ 0.063	0.966
	CuCl_2	$p = 4.14x + 5.74$	0.041	0.009 0	0.028 ~ 0.053	
96	CuSO_4	$p = 4.18x + 6.24$	0.032	0.003 0	1.2×10^{-23} ~ 0.045	0.933
	CuCl_2	$p = 5.37x + 7.75$	0.036	0.004 0	0.029 ~ 0.042	

表 3 $\text{CuSO}_4/\text{CuCl}_2$ 对幼参的暴露时间和半致死浓度回归参数一览表

Tab. 3 Expose time and LC_{50} of juvenile with different copper ions

铜来源 source	回归方程 regression equation	R^2	t
硫酸铜 CuSO_4	$y = -0.08 \ln(x) + 0.1411$	0.99	0.053
氯化铜 CuCl_2	$y = 0.110 3x^{-0.836}$	0.99	0.034

2.4 异源铜盐对幼参毒性限量与相关标准对比结果

根据 1.3 中式(1)得出异源铜盐对幼参的 SC 为: $\text{SC}_{\text{CuSO}_4} = 0.011 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{SC}_{\text{CuCl}_2} = 0.006 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{SC}_{\text{CuSO}_4}$ 是 $\text{SC}_{\text{CuCl}_2}$ 的 1.69 倍, 说明 CuCl_2 对幼参的毒性大于 CuSO_4 对幼参的毒性。

通过中国不同海水水质标准对铜的限量(表

4), 可以看出关于海水水质的相关标准均是强制性的, 但是标准中的 Cu^{2+} 没有针对来源进行规定。文章研究得出的 CuSO_4 对幼参 SC 为 $0.010 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 与《无公害食品海水养殖用水水质》、《海水水质标准》二类标准和《渔业水质标准》中的铜限量一致; CuCl_2 对幼参 SC 为 $0.006 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 介于《海水水质标准》一类标准和二类标准之间。

表 4 国内不同标准中水环境铜限量汇总表^[11-13]

Tab. 4 Table of different standards of copper maximum limit in seawater in China

标准名称 standard name	标准类型 type	最高限量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ maximum limit		
NY 5052-2001	强制性	≤ 0.010		
GB 3097-1997	强制性	第一类	第二类	第三类、第四类
		≤ 0.005	≤ 0.010	≤ 0.050
GB 11607-1989	强制性	≤ 0.010		

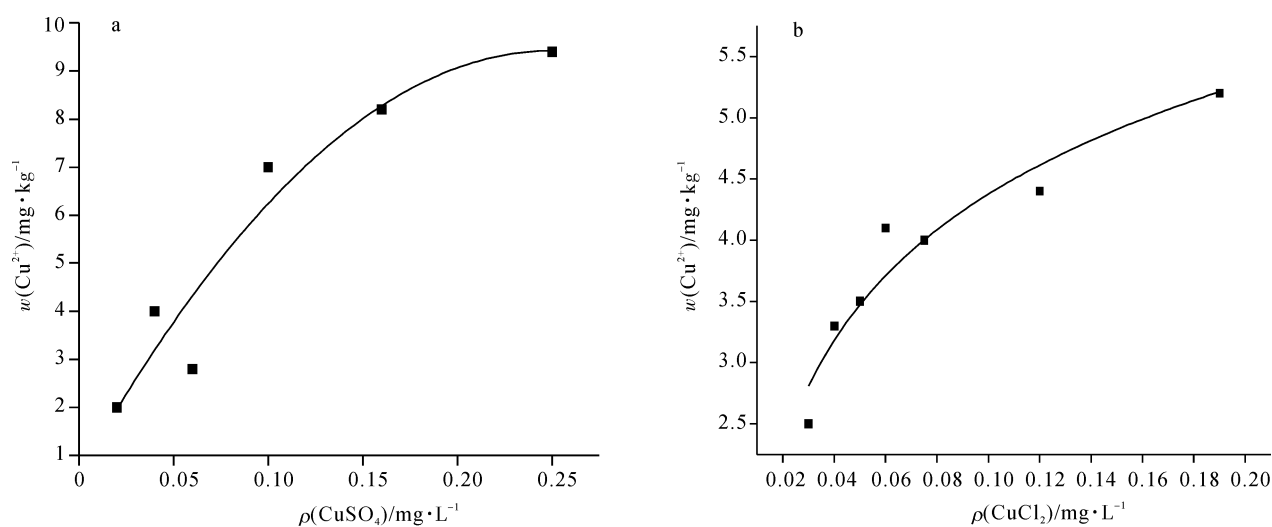


图2 暴露水体中铜离子质量浓度与刺参体内壁铜质量分数关系图

Fig. 2 Copper concentration in tissue of juvenile after exposure

2.5 幼参体壁内 Cu^{2+} 质量分数与暴露液中 Cu^{2+} 质量浓度的关系

刺参幼参体壁中 $w(\text{Cu}^{2+})$ 随暴露水体中 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ (CuSO_4 来源) 的增大呈现逐渐升高的趋势, 两者的关系满足多项式 $y = -141.03x^2 + 70.58x + 0.5932$ ($R^2 = 0.92$) (图 2-a); 对于 CuCl_2 来源的刺参幼参体壁中 $w(\text{Cu}^{2+})$ 随暴露水体中 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 的变化也呈现同样的趋势, 但两者的关系满足对数关系 $y = 1.302 \ln(x) + 7.3737$ ($R^2 = 0.93$) (图 2-b)。

因此, 刺参幼参对不同来源的 Cu^{2+} 的富集效果是不一样的。

刺参幼参对不同来源 Cu^{2+} 的 96 h 内富集系数不同, 利用 AVONA 分析得出, 两者差异不显著 ($P = 0.56 > 0.050$), 但幼参对 CuSO_4 来源的富集系数小于 CuCl_2 来源的富集系数 (表 5)。 CuSO_4 对刺参幼参的毒性小于 CuCl_2 , 因此, 渔业养殖中可采用 CuSO_4 杀灭水质中的微生物或其他藻类。

表5 刺参幼参对异源铜离子 96 h 富集系数

Tab. 5 96 h bioconcentration factor of juvenile with different copper ions toxicity

铜来源 source of copper ion	暴露质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ exposure concentration	96 h 富集系数 96 h bioconcentration factor
硫酸铜 CuSO_4	0.020 ~ 0.25	27.37 ~ 100
氯化铜 CuCl_2	0.030 ~ 0.19	37.60 ~ 132.50

国家标准中不再对 Cu^{2+} 进行限量 (表 6), 但 NRJAGU^[25] 认为 Cu 是所有生物都需要的微量元素, 它对生物生长的抑制效应是浓度的两步函数, 浓度过低会抑制生物的生长, 甚至死亡, 但过高会产生毒性效应。孙元芹等^[22] 认为文蛤 (*Meretrix meretrix*) 暴露在 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 富集 30 d 后体内 $w(\text{Cu}^{2+})$ 达 $0.44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 (鲜质量) 文蛤全部死亡。刘天红等^[26] 前期研究认为 Cu^{2+} 对于 12 月龄栉孔扇贝 (*Chlamys Farreri*) 属于剧毒类物质。程波等^[27] 认为低浓度的 Cu^{2+} 对于凡纳滨对虾

(*Litopenaeus vannamei*) 具有重要的作用, 可以作为他们的营养元素、血蓝蛋白成分, 且在许多生物酶的组成和功能上也发挥着重要的作用, 但是过量的 Cu^{2+} 对于对虾来说却有害, 甚至会致死。由于金属能被海洋生物富集, 沿食物链转移后最终影响人类健康^[28-29], 因此, 建议应该结合具体的养殖环境及食品安全毒理学评价数据, 加强对水产品中 Cu^{2+} 限量的研究, 而不只是参考国际食品法典标准。

表6 关于铜限量的食品安全标准

Tab. 6 Food safety standards maximum limit of copper

标准名称 standard name	标准类型 type	最高限量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ maximum limit
GB 2733-2005《鲜冻动物性水产品卫生标准》	强制性	/
GB 2762-2005《食品中污染物限量》	强制性	/
GB 15199-1994《食品中铜限量卫生标准》*	强制性	≤ 50

注：* . 根据2011年第3号中国国家标准公告，已废止

Note: * . According to announcement of No. 3 National Standard of P. R. China of 2011 which was abolished.

表7 有毒物质对水产类的毒性标准

Tab. 7 Toxicity criteria of toxicants for fish

等级 scale	剧毒 extremely toxic	高毒 highly toxic	中毒 toxic	低毒 low toxic
半数耐受限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TLm	< 0.10	$0.10 \sim 1$	$1 \sim 10$	> 10

根据张志杰和张维平^[30]的毒物毒性分级表(表7), 对不同来源的 Cu^{2+} 对刺参幼参毒性进行定性分析, 半数耐受限(median tolerance limit, TLm)和 LC_{50} 在大部分情况是等价^[22]。 CuSO_4 对刺参幼参96 h的 LC_{50} 为 $0.032 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, CuCl_2 对刺参幼参96 h的 LC_{50} 为 $0.036 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 通过与表7比对, 认为 CuSO_4 、 CuCl_2 对于幼参均属于剧毒类物质。刘存岐等^[31]认为 Cu^{2+} 对日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的毒性较强, 可能影响其体内酶的功能。程波等^[27]认为可能是 CuCl_2 、 CuSO_4 阴离子的不同引起凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)蜕皮率和死亡率有所不同, 但具体原因有待进一步研究。其他学者^[32-33]也研究了 Cu^{2+} 毒性, 但缺乏定性分析。

3 结论

1) CuSO_4 和 CuCl_2 对刺参幼参急性毒性效果不同, CuSO_4 对刺参幼参的24 h、48 h、72 h和96 h的 LC_{50} 分别为 $0.14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.09 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.047 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.032 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; CuCl_2 对刺参幼参的24 h、48 h、72 h和96 h的 LC_{50} 分别为 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.064 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.041 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.036 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 其中 CuSO_4 和 CuCl_2 对刺参幼参的24 h和48 h LC_{50} 差异极其显著; 72 h和96 h差异不显著。

2) CuSO_4 和 CuCl_2 对刺参幼参的SC分别为 $0.011 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.065 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 对于刺参幼参属于剧毒物质。

3) 2种来源 Cu^{2+} 对刺参肠道均有不同程度的损伤, 表现为刺参肠道粘膜上层脱离粘膜下层结缔组织, 结缔组织中出现许多吞噬细胞用于解毒。

4) 暴露溶液中 CuSO_4 来源的 Cu^{2+} 与 CuCl_2 来源的 Cu^{2+} 都是水合铜离子, 主要不同的是暴露溶液中的阴离子, 试验说明不同的阴离子对 Cu^{2+} 的毒性有拮抗作用。

5) 建议应该结合具体的养殖环境及食品安全毒理学评价数据, 加强对水产品中 Cu^{2+} 限量的研究。

参考文献:

- [1] 朱文嘉, 王联珠. 优劣干海参的鉴别[J]. 科学养鱼, 2011(5): 68-69.
- [2] TAIYEB T B, ZAINUDDIN S L, SWAMINATHAN D, et al. Efficacy of gamadent to othpaste on the healing of gingival tissues: a preliminary report[J]. J Oral Sci, 2003, 45(3): 153-159.
- [3] 王淑娟, 叶海斌, 于晓清, 等. 海参的免疫机制研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(25): 12553-12555.
- [4] SUN W H, LENG K L, LIN H. et al. Analysis and evaluation of chief nutrient composition in different parts of *Stichopus japonicus* [J]. Chin J Animal Nutr, 2010, 22(1): 212-220.
- [5] 谷阳光, 林钦, 王增焕, 等. 柘林湾及邻近海域沉积物重金属分布与潜在生态风险[J]. 南方水产科学, 2013, 9(2): 32-37.
- [6] WANG H, DONG Y H, YANG Y Y, et al. Changes in heavy metal contents in animal feeds and manures in an intensive animal production region of China[J]. J Environ Sci, 2013(12): 2435-2442.
- [7] 张伟, 阎海, 吴之丽. 铜抑制单细胞绿藻生长的毒性效应

- [J]. 中国环境科学, 2001, 21(1): 4-7.
- [8] ROSA G C, LUCIA L V, ALEXANDRA P, et al. Sublethal zinc and copper exposure affect acetylcholinesterase activity and accumulation in different tissues of *leporinus obtusidens*[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2013, 90(1): 12-6.
- [9] 朱国霞, 季延滨, 孙学亮. Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 及铜铁合剂对血鸚鵡幼鱼的急性毒性试验[J]. 中国水产, 2013(8): 56-58.
- [10] 李华, 李磊. 铜离子对栉孔扇贝幼贝几种免疫因子的影响[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(8): 31-34.
- [11] KARAYAKAR F, CICIK B, CIFTCI N. Accumulation of copper in liver, gill and muscle tissues of *Anguilla Anguilla* (Linnaeus, 1758)[J]. J Anim Vet Adv, 2010, 9(17): 2271-2274.
- [12] GASPAR M C D M, FERNANDA B I, JAIME D M E, et al. Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus* acclimated to different salinities: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. Aquat Toxicol, 2010, 101(1): 88-99.
- [13] BUNDRIGE J. A comparison of bioaccumulation and digestive enzyme solubilization of copper in two species of sea cucumbers with different feeding habits[D]. East Tennessee State, US: East Tennessee State University, 2003: 49.
- [14] 马莉芳, 蒋晨, 高春生. 水体铜对水生动物毒性的研究进展[J]. 江西农业学报, 2013, 25(8): 73-76.
- [15] GUDRUN D B, WOUTER M, WIM D C, et al. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carrasius auratus gibelio*)[J]. Aquat Toxicol, 2004, 70(3): 179-88.
- [16] 周永欣, 王士达, 夏宜琤. 水生生物与环境保护[M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [17] 张丽岩, 宋欣, 高玮玮, 等. Cd^{2+} 对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 的毒性[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 418-421.
- [18] 刘天红, 孙福新, 王颖, 等. 无机镉对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 急性毒性研究及其安全评价[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 161-165.
- [19] 肖培华, 唐永新, 于乐河, 等. 刺参病害细菌感染试验[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(6): 26-27.
- [20] 刘国光, 王莉霞, 徐海娟, 等. 水生生物毒性试验研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2004(6): 67-69.
- [21] 孙福新, 李晓, 王颖, 等. 栉孔扇贝对无机砷的富集与排出特征研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(4): 85-90.
- [22] 孙元芹, 吴志宏, 孙福新, 等. 文蛤对重金属 Cu 的富集与排出特征[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 128-134.
- [23] 李霞, 王斌, 刘静, 等. 虾夷马粪海胆体腔细胞的类型及功能[J]. 中国水产科学, 2003, 11(5): 30-34.
- [24] 孙永欣. 黄芪多糖促进刺参免疫力和生长性能的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [25] NRJAGU J O. Zincin environment part II [M]. New York: Wiley, 1980: 415-438.
- [26] 刘天红, 孙福新, 王颖, 等. 硫酸铜对栉孔扇贝急性毒性胁迫研究[J]. 水产科学, 2011, 30(6): 11-14.
- [27] 程波, 刘鹰, 杨红生. Cu^{2+} 在凡纳滨对虾组织中的积累及其对蜕皮率、死亡率的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008(5): 403-407.
- [28] 孙云明, 刘会峦. 海洋中的主要化学污染物及其危害[J]. 化学教育, 2001(7/8): 2-5.
- [29] FUNES V, ALHAMA J, NAVAS J I, et al. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish south Atlantic littoral[J]. Environ Pollut, 2005, 139(2): 214-223.
- [30] 张志杰, 张维平. 环境污染生物监测与评价[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1991: 78-102.
- [31] 刘存歧, 安通伟, 张亚娟, 等. Cu^{2+} 对日本沼虾的毒性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(28): 227-228.
- [32] 李国基, 刘明星, 张首临, 等. Zn 等金属离子对栉孔稚贝成活的毒性影响[J]. 海洋环境科学, 1994, 13(2): 13-16.
- [33] 刘亚杰, 王笑月. 锌、铜、铅、镉金属离子对海湾扇贝稚贝的急性毒性试验[J]. 水产科学, 1995, 14(1): 10-12.