

石油分散液对马粪海胆受精及胚胎发育的影响

吕福荣^{1,2} 熊德琪¹ 张金亮¹ 公维民¹

(¹ 大连海事大学环境科学与工程学院, 116023)

(² 大连大学环境与化学工程学院, 116622)

摘要 采用马粪海胆胚胎为试验材料, 研究了0[#]柴油、船用柴油和船用重质燃料油分散液(WAF)对卵细胞、精子及胚胎发育的毒性效应, 并通过色谱-质谱对3种油品分散液进行了组分分析。结果显示, 石油烃使精卵受精能力下降, 使整个受精过程完成的时间延后。马粪海胆精子对石油烃污染比卵细胞更为敏感, 可以作为海洋石油污染的指示生物。3种油品分散液使得胚胎发育至2细胞期、4细胞期、8细胞期、16细胞期和囊胚期的时间延后, 这种延后的现象随着发育进程和油品分散液浓度升高而愈发明显。可以推断3种油品分散液对于海胆胚胎生长发育过程的毒性顺序为: 0号柴油>船用柴油>船用重质燃料油。

关键词 石油分散液 海胆 胚胎发育 浮游幼虫 毒性效应

中图分类号 X52;S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0067-07

Effects of petroleum hydrocarbon pollutants on fertilization and embryos development of Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*

LV Fu-rong^{1,2} XIONG De-qi¹ ZHANG Jin-liang¹ GONG Wei-min¹

(¹ College of Environmental Science and Engineering, Dalian Maritime University, 116023)

(² College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian University, 116622)

ABSTRACT The paper aims at the toxic effect of water-accomodated fractions (WAFs) of petroleum hydrocarbon pollutants such as No. 0 diesel oil, maritime diesel oil and maritime heavy fuel oil on eggs, sperms and embryos of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* by adopting embryonic development technology. The results indicate that the fertilization rate decreased and time delayed with the increasing concentration of WAFs. The sperms were more sensitive to the three kinds of oil WAFs than the eggs, which can be taken as indicator organism. The three kinds of oil dispersions inhibited the development from fertilized eggs to 2-, 4-, 8-, 16-cell and blastocyst stage. The effect increase along with the growth of embryos and oil concentration. Toxicity of the oils is in the order of No. 0 diesel oil > maritime diesel oil > maritime fuel oil. And meanwhile an analysis on the components has been carried out by way of GC-MS.

KEY WORDS Petroleum dispersion liquid Sea urchin Embryo development
Larvae Toxic effect

国家自然科学基金项目(40476046/D0608)资助

收稿日期:2007-10-14;接受日期:2008-03-15

作者简介:吕福荣(1971-),女,副教授,博士研究生,主要从事环境毒理学研究。E-mail:lvfurong@163.com, Tel:13354007851

石油污染是海洋环境中主要污染物之一。石油是由各种烃类和非烃类化合物所组成的复杂混合物,烃类按其结构又可以分为直链和支链烷烃,环烷烃,多环芳香烃和不饱和烃。油污染在海洋环境中存在3种形式:(1)漂浮在海面的油膜;(2)溶解分散态,包括溶解和乳化状态;(3)凝聚态的残余物,包括海面漂浮的焦油球以及在沉积物中的残余物。在石油污染对海洋生物的毒性作用方面,国内外学者研究大多数都是集中在藻类、鱼类、虾类、贝类和牡蛎等物种(张蕾等 2002;蒋艾青等 2006;姜朝军等 2006;Sara *et al.* 2002)。本实验选取的对象——马粪海胆 *Hemicentrotus pulcherrimus*,隶属棘皮动物门 Echinoidea,海胆纲 (Echinoidea),球海胆科 (Strongylocentrotidae),在我国主要分布在黄、渤海沿岸,成体栖息于水深不超过 4m、受风浪影响小的沙砾和海藻繁茂的岩礁间,主要食大型底栖海藻。生长于大连海域的马粪海胆 1 年中有两个繁殖季节,春季 5~6 月份,秋季 9~11 月份,适宜繁殖水温 10~20℃。海洋环境污染物对海胆的毒性作用的研究,仅见于国外学者的文献报道中。目前,日本、加拿大和美国等国家已采用海胆的胚胎和幼虫来检测重金属的毒性和监测海洋环境的污染状况(Juan *et al.* 2005;Phillips *et al.* 2003;Julie *et al.* 2002;Amro *et al.* 2002;Larrain *et al.* 1999),但是石油污染对海胆胚胎发育的影响,尚未见文献报道。本文以马粪海胆为研究对象,研究 0 号柴油、船用柴油和船用重质燃料油的分散液(WAF)对海胆胚胎发育的毒性作用,对海洋石油污染监测及水产养殖等都具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验用海胆

处于生殖期的性成熟的马粪海胆采于大连碧龙海珍品有限公司养殖区。选取未受损伤的、个体较大的性成熟海胆用于实验。

1.2 实验用油分散液的制备

1.2.1 过滤海水

取自大连市星海湾,经沉淀过滤后用于实验。温度为(24±2)℃,盐度为 31.35,电导率为 47.3,pH 值为 8.13。

1.2.2 油分散液 WAF 的制备

将受试油品与过滤海水按体积比 1:9 混合,电动低速搅拌机连续搅拌 24 h,在分液漏斗中静置 4 h 后,分离下层水相即为母液。母液置于冰箱 4℃保存,实验前稀释。用紫外分光光度法测定其浓度(毛跟年等 2004)。

1.3 实验方法和步骤

1.3.1 精卵的获得

将海胆用洁净的海水清洗两遍,放入培养皿中,通过围口膜注射 1~2ml 0.5 mol/L KCl 溶液,诱导其排精(卵)。将开始排精的雄海胆另换入一个干的培养皿,以收集纯净的精液原液备用。把纯净的精液放入冰箱中,4℃保存。将开始排卵的雌海胆另放入一个盛有洁净海水的烧杯中,反口面向下,使海水淹没生殖孔,让卵直接排入海水中,排出的卵逐渐沉入皿底。待排卵结束后,移去海胆,小心用海水洗涤两次,倾去上层海水。向盛卵的烧杯中加入海水,均匀轻微搅拌,使悬浮液中卵的密度为 20~30 个/ml,备用。

1.3.2 染毒对受精的毒性作用实验

按照国外相关文献报道和 ASTM 海胆纲毒性实验标准导则(ASTM 2004)的指导设计毒性实验。

将收集的精液用海水稀释后经过 37μm 的滤膜过滤,以除去粪便等杂质。将其用不同浓度的受试液稀释(每只雄海胆可排精子 10 亿个左右,用 100 ml 受试液稀释),染毒 1 h 后与正常的卵子受精。同样,移取一定数量的卵细胞于受试液中染毒 1 h 后与正常精子受精。受精过程为:将适量精液倾注于盛卵细胞的烧杯中,略作晃动,以保证精子和卵细胞有充分相遇的机会。授精 30 min 后吸取 1.0 ml 试液于血球计数板上,在低倍

显微镜下观察形态并计数。在卵质膜外周形成1层透明的受精膜,脱离卵质膜而举起,是卵受精成功的标志。以正常卵细胞与精子在海水中受精的试验组做为对照组。

1.3.3 染毒对胚胎发育的毒性作用实验

实验是在250 ml的烧杯中进行的。将10 ml精液倾注于盛卵细胞(密度为20~30个卵细胞/ml)的烧杯中,检查受精率。WAF母液按一定浓度梯度稀释成1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg/L,作为受试液。受精后10 min,移取20 ml的受精卵悬浮液放入20 ml不同浓度的受试液中进行培养,水温为17℃,初期培养密度约为15~20个/ml。用保鲜膜将烧杯封面以避免挥发改变实验浓度。在不同时间,取1 ml悬浮液于Nikon倒置显微镜下观察海胆胚胎的各典型时期发育情况。每个浓度实验重复4次。试验设空白对照组1个。

1.4 石油分散液的色谱-质谱分析

将石油分散液用二氯甲烷萃取,收集萃取液,用旋转蒸发器使二氯甲烷蒸发,采用HP6890 GC/HP5973MS气相色谱-质谱联用仪,对浓缩液进行组分分析。

1.5 数据统计分析

采用SPSS12.0数据分析软件,对数据进行单因素方差分析,当 $P \leq 0.05$ 时为差异显著, $P \leq 0.01$ 时为差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 石油烃污染对海胆卵子及精子受精率的影响对比

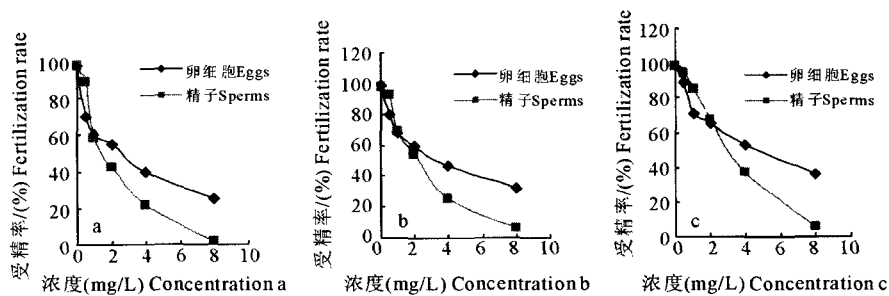
将海胆的卵细胞和精子分别暴露于浓度为0.5、1.0、2.0、4.0和8.0 mg/L的0号柴油、船用柴油和船用重质燃料油分散液中,1 h后按照1.3.2的步骤使其与未染毒的海胆精子受精。结果如图1所示。实验结果表明,正常的卵细胞与精子在海水中受精,大约1 min后受精膜开始举起,3 min查受精率即可达到98%以上。而染油1 h后的卵细胞,与正常精子受精后,低浓度组3 min后有少数受精膜举起,待10 min后观察,受精率有所提高,至30 min时受精率不再变化,为70%~89%。浓度升高使受精率大幅度降低,以0号柴油为例,8 mg/L实验组受精率为25%,仅是对照组的1/4左右,与低浓度组也有极显著差异。染毒后取少量精液镜下观察,部分精子出现游动速度减慢,畸形,死亡的现象;将其与正常卵子受精3 min后镜下观察,0号柴油组没有受精膜举起,另外两种分散液实验组此时也很少有受精膜举起,随时间延长受精率有所增加,待至30 min时受精率亦基本不再变化。但是随着受试液浓度的增加,尤其是2 mg/L以上时,受精率明显下降,实验组与对照组存在极显著差异。对于3种受试液,当浓度达到8.0 mg/L时,精子在其中染毒1 h后,均无法受精或受精率接近0。比较3种石油分散液对卵子或精子毒性作用的差异:卵细胞染毒后,相同浓度时,0号柴油与船用柴油实验组之间无显著差异,0号柴油与船用重质燃料油实验组间存在显著差异;精子染毒后,在1~8 mg/L的范围内,0号柴油与船用重质燃料油实验组之间存在极显著差异,浓度为1和2 mg/L时,0号柴油与船用柴油实验组存在显著差异,8 mg/L时二者之间存在极显著差异,其余浓度时0号柴油与船用柴油实验组之间无显著差异。总体来说,对精子或卵细胞毒性大小的顺序为:0号柴油>船用柴油>船用重质燃料油。

由图1可见,通过比较染油1 h后的卵细胞与正常精子的受精率以及染油1 h后精子与正常卵细胞受精的受精率,可以看出,海胆精子和卵细胞对石油烃的耐受程度不同。总的来说,曝油卵子的受精率大于曝油精子的受精率,尤其当受试液浓度大于1.0 mg/L时,染毒精子的受精能力比染毒卵子有明显下降,不及卵子的1/2。这说明与卵子相比,精子对石油烃分散液更加敏感,可以作为海洋石油污染的指示生物。

2.2 石油分散液对海胆胚胎各发育时期的影响

根据廖承义(1985)的有关报告,海胆的一生分为胚胎发育、浮游幼体、幼海胆和成海胆4个主要的发育阶段。胚胎发育阶段是指从受精卵分裂开始至纤毛囊胚形成之阶段,根据胚胎的细胞数量等,本阶段又包

括2细胞期、4细胞期、8细胞期、16细胞期……囊胚期等；破膜上浮期，原肠期，然后进入棱柱幼虫期，二腕幼虫期，四腕幼虫期等。本实验将试验组中海胆胚胎发育到达2细胞期、4细胞期、8细胞期等5个时期的时间与空白对照组的发育情况做比较，来揭示石油烃污染对海胆胚胎发育的影响，实验结果见表1~表3。从表1~表3中可以看出，对照组的海胆胚胎发育正常；当海胆胚胎染毒后，发育明显滞后，且随着石油分散液浓度的增加，这种滞后效应愈加明显。例如在低浓度时，油分散液对受精卵的发育与对照组没有显著差异。对于第1次卵裂来说，对照组需要100 min，而经0号柴油分散液染毒的海胆胚胎，0.5 mg/L和1.0 mg/L浓度组所需时间与对照组相同，都是100 min；而对于高浓度组（如8.0 mg/L、16.0 mg/L）进行2-细胞分裂的时间为120 min和130 min，与对照组存在显著差异。表1~表3中数据还显示出对于一定浓度的石油烃受试液，其对海胆胚胎的毒性效应随着发育进程的延长而更加显著。这大概是石油烃在胚胎内累积造成毒性效应加强的结果。同时，实验中观察到暴露于WAF分散液中的海胆胚胎，畸形率均大于对照组。以发育至4细胞期为例，对照组中90%的胚胎分裂正常，畸形率低；而0号柴油WAF染毒组，0.5 mg/L时，84%的胚胎分化正常；而4.0 mg/L，36%以上的受精卵呈现不分裂、畸形卵裂（不全裂或不等裂）、发育停止等情况。对比相同浓度下，3种染毒液中的胚胎发育到不同时期所历经的时间，可以发现3种石油分散液对海胆胚胎发育的滞后作用为：0号柴油>船用柴油>船用重质燃料油。海胆胚胎不同发育时期所历经的时间长短不同，而毒性成分进入胚胎代谢的形式、量和时间与胚胎发育阶段有关，因此石油分散液对不同发育时期的毒性效应强弱还有待进一步研究。



a: 0号柴油分散液；b: 船用柴油分散液；c: 船用重质燃料油分散液

a; No. 0 diesel oil; b; Maritime diesel oil; c; Maritime heavy fuel oil

图1 石油烃分散液对海胆卵子及精子受精率的影响对比

Fig. 1 Effect of Petroleum hydrocarbon disperse solution on fertilization of sea urchin

表1 0号柴油分散液中海胆胚胎发育到各阶段所需要的时间(min)

Table 1 The time of sea urchin embryo development in No 0 diesel oil(min)

浓度(mg/L)	2细胞期	4细胞期	8细胞期	16细胞期	囊胚期
Concentration	Two-cell stage	Four-cell stage	Eight-cell stage	16-cell stage	Blastula stage
空白	100	150	200	250	720
0.5	100	160	220	270	780
1.0	100	165	220	275	810
2.0	105	172	225	280	840
4.0	110	180	230	290	870
8.0	120	190	240	300	930
16.0	130	205	245	310	990

表 2 船用柴油分散液中的海胆胚胎发育到达各个时期的时间(min)
Table 2 The time of sea urchin embryo development in maritime diesel oil(min)

浓度(mg/L) Concentration	2 细胞期 Two-cell stage	4 细胞期 Four-cell stage	8 细胞期 Eight-cell stage	16 细胞期 16-cell stage	囊胚期 Blastula stage
空白	100	150	200	250	720
0.5	100	155	205	265	750
1.0	100	160	210	270	810
2.0	100	165	215	275	840
4.0	105	170	225	280	860
8.0	110	175	230	290	900
16.0	120	195	240	300	960

表 3 船用重质燃料油分散液中的海胆胚胎发育到达各个时期的时间(min)
Table 3 The time of sea urchin embryo development in maritime heavy fuel oil(min)

浓度 (mg/L)Concentration	2 细胞期 Two-cell stage	4 细胞期 Four-cell stage	8 细胞期 Eight-cell stage	16 细胞期 16-cell stage	囊胚期 Blastula stage
空白	100	150	200	250	720
0.5	100	150	205	260	750
1.0	100	155	210	265	780
2.0	100	160	210	270	810
4.0	105	170	220	275	840
8.0	110	170	225	280	870
16.0	115	180	234	290	930

2.3 3 种石油分散液的组分分析及毒理探讨

在毒性试验中,实际评定的是油在分散液中溶解的成分和在水中稳定存在的小油珠的部分对生物毒性大小的影响,因此本试验参照 ASTM 6081-98 的方法制备石油分散液 WAF(ASTM 6081-98 1998)。国外学者进行毒性试验,按此法制备的受试液,均称为 WAF,而将其过滤后的组分称为 WSF(Singer 2000;Jorunnet al. 1999);但是在国内文献中,大多使用 WSF 这一名称,其制备方法同 WAF(陈 荣等 2005;余 群等 2000)。对于 WAF 受试液的化学组成,国外学者通过 GC-MS 手段,进行了分析,并且选用不同种的鱼类进行了毒性作用研究。Jorunn 等(1999)指出,WAF 中的半挥发性有机物(>C9)主要是由萘和酚组成。3 个环以上的多环芳烃的含量并不高,最多占总量的 0.1%。同时指出分散液中若重组分含量增加,挥发性组分减少,会导致受试液的毒性变小。NRC 通过研究各种石油水溶性馏分的浓度,总结得出分子量大于烷基萘的大分子化合物的毒性效应较小,基本可以忽略,因此低分子量芳香族化合物,通常是研究油类摄入毒性效应的重要化学物质(王晓伟等 2006)。这些可溶性组分,与细胞内壁的脂肪层相结合,从而改变细胞活性,细胞内外的物

质交换停止,蛋白质和酶都会受到影响,DNA也会受到损伤。Sara等(2002)研究了轻质油的WAF组分含量,芳香族化合物占45%,小分子量的单环芳烃是主要的毒性成分。Carmel等(2002)指出,与芳香族化合物相比,WAF中的脂肪族化合物基本可以认为是无毒的。原油中1.5%是多环芳烃,其中萘占65%。总之,多数学者在对石油烃分散液的毒性分析中认为,决定毒性大小的关键因素是其中芳烃的含量。

本文通过3种石油分散液的总离子流色谱图,样品经计算机检索与标准谱图核对,确定出各组分结构并用面积归一化法得各组分质量分数。油类分散液中的成分主要包括烷烃及其取代物、芳香烃及其取代物等。0号柴油分散液中,苯、萘、茚等芳烃及其取代物含量约占总成分的22.1%,烷烃近50%左右,其余苯甲酸、酚、杂环化合物等;船用柴油中苯、萘、茚等芳烃及其取代物含量约为18.2%,烷烃近35%左右。船用重质燃料油芳烃约为11.3%,烷烃约占40%。通过色谱比较分析可知芳香族化合物的含量:0号柴油>船用柴油>船用重质燃料油。另外,从WAF受试液对马粪海胆受精率及胚胎的发育时间来看,也可以得出0号柴油毒性最大,船用柴油次之,船用重质燃料油毒性较小的结论。这一结果也表明了芳烃的含量是影响毒性大小的重要因素,与文献中观点一致。这些芳香族化合物,在化学致畸作用机理尚未完全清楚地情况下,通常认为可能有如下致毒机制:(1)使胚胎细胞死亡或细胞增殖速度减慢;(2)胚胎细胞代谢障碍;(3)染色体变异引起胚胎发育异常;(4)胚胎发育过程的不协调。这有待于通过进一步的实验证实。

3 结论

本文分别研究了石油烃分散液对马粪海胆卵细胞、精子及胚胎的毒性作用,得出以下结论:

(1)石油烃对海胆精子和卵细胞的受精能力影响程度明显:空白组的3 min精卵受精率均可达98%以上,而在染油的情况下,3 min精卵受精率均在5%以下。石油烃使精卵受精能力下降,使整个受精过程完成的时间延后。

(2)30 min时测定受精率,不同浓度的染毒液使受精率不同程度下降,马粪海胆精子对石油烃污染比卵细胞更为敏感,可以作为海洋石油污染的指示生物。

(3)石油分散液能够显著地影响海胆胚胎的发育。3种油品分散液使得胚胎发育至2细胞期,4细胞期,8细胞期,16细胞期,囊胚期的时间延后,这种延后的现象随着时间的递增而愈发明显。油品分散液浓度越高,对胚胎发育的延迟时间越长,滞后作用越明显。

(4)3种油品对于海胆卵细胞、精子及胚胎发育过程的毒性顺序为:0号柴油>船用柴油>船用重质燃料油,随时间延长,0号柴油与船用重质燃料油之间毒性差异显著。

参 考 文 献

- 王晓伟,李纯厚,沈南南. 2006. 石油污染对海洋生物的影响. 南方水产, 2(2):76~80
- 毛跟年,许牡丹,黄建文. 2004. 环境中有毒有害物质与分析检测. 北京:化学工业出版社, 281~283
- 余群,郑微云,翁妍,彭荔红,郁昂. 2000. 0#柴油水溶性成分对真鲷幼体抗氧化酶活性的影响. 环境科学学报, 20(增刊):171~175
- 张蕾,王修林. 2002. 石油烃污染对海洋浮游植物生长的影响. 青岛海洋大学学报, 32(5):804~810
- 陈荣,郑微云,郁昂. 2005. 0#柴油水溶性成分对僧帽牡蛎 *Ostreacuculata* 谷胱甘肽硫转移酶活性的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 44(增刊):219~221
- 姜朝军,乔庆林. 2006. 菲律宾蛤仔对石油烃的污染动力学和阈值研究. 海洋渔业, 28(4):314~320
- 蒋艾青,肖克宇,郑陶生. 2006. 潇湘平湖水质污染及其对鱼类影响的研究. 水产科学, 25(11):552~555
- 廖承义. 1985. 马粪海胆人工育苗的初步研究. 山东海洋学院学报, 15(4):71~74
- Amro, M. H., and Fred, J. G. 2002. Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter. *Aquatic Toxicology*, 61:127~140
- ASTM Designation: E1563-98. 2004. Standard guide for conducting static toxicity test with echinoid embryos.
- ASTM 6081-98. 1998. Standard practice for aquatic toxicity testing of lubricants; sample preparation and results interpretation
- Carmel, A. P. 2002. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the crimson potted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52:180~189

- Jorunn nerbè Hokstad, Per S, Daling, Melania Buffagntå. 1999. Chemical and ecotoxicological characterisation of oil water systems. *Spill Science & Technology Bulletin*, 5(1): 75~80
- Juan Bellas, and Ricardd Beiras. 2005. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae. *Ecotoxicology*, 14: 337~353
- Julie Marc, Cé'cile Maguer, and Robert Belle. 2002. Sharp dose- and time-dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos. *Arch Toxicol*, 76: 388~391
- Larrain, A., Riveros, A., Silva, J., and Bay-Schmith, E. 1999. Toxicity of metals and pesticides using the sperm cell bioassay with the sea urchin *spatuligera*. *Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 749~757
- Phillips, B. M., Nicely, P. A., and Hunt, J. W. 2003. Toxicity of Cadmium-Copper- Nickel- Zinc mixtures to larval purple sea urchins (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 70: 592~599
- Sara, M. L., and Douglas, A. H. 2002. Acute toxicity of crude and dispersed oil to *Octopus pallidus* (Hoyle, 1885) hatchlings. *Water Research*, 36: 2 769~2 776
- Singer, M. M., Aurandå, D., and Bragin, G. E. 2000. Standardization of the reparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11): 1 007~1 016