

络合物在缢蛭早期生活史中的作用

王文雄 许振祖

(厦门大学亚热带海洋研究所)

摘 要

本文研究了两种络合物对缢蛭 (*Sinonovacula constricta*) 幼体和稚贝生长发育的影响。结果表明, 所有测试的EDTA浓度均能促进幼体的生长, 其中以1.0 ppm浓度最为显著, 低浓度EDTA (0.5 ppm) 也有利于幼体存活率的提高; 而在稚贝发育期, 能明显加快稚贝生长的EDTA浓度为2.0 ppm; 另一种络合物——酒石酸钾钠在稚贝试验期间内对生长无明显的刺激作用。络合物对幼体和稚贝生长系数的影响包含了促进和抑制两个不同作用过程。此外, 本文还就络合物的可能作用机制进行了讨论。

近年来, 使用络合物 (主要为EDTA) 处理自然海水已成为改善水质条件的新途径。在海洋双壳类人工育苗中, 关于络合物的研究已报道了对长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 胚胎发育的影响^[1], 此外, EDTA对中国对虾 (*Penaeus orientalis*) 和褐对虾 (*P. aztecus*) 受精卵和幼体生长发育的影响也进行过研究^[2]。至于缢蛭方面, 虽然国内有的单位已经利用EDTA络合物处理自然海水, 借以改善水化性质, 但是对于EDTA用量的最佳化以及加入EDTA后生物所可能出现的效应仍缺乏定量的认识。

为此, 本文在室内条件下测定了两种络合物 (EDTA、酒石酸钾钠) 对缢蛭幼体、稚贝生长发育的影响, 目的在于弄清促进幼体、稚贝生长发育所使用的络合物的最适用量, 并根据络合物的动力学作用过程, 进一步认识络合物对幼体、稚贝生长发育的可能作用机制, 为今后生产实践提供参考数据。

一、材料与方 法

1. 幼体实验

缢蛭面盘幼体系人工催产所获得的受精卵经发育1天后的材料。在日光灯下准确挑出200只幼体投入内含15ppt海水75ml (经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜抽滤) 的有机玻璃瓶内, 用 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ EDTA原液分别配制下列4个试验浓度组: 0.5, 1.0, 2.0, $5.0\text{mg}/\text{l}$ (ppm), 每个浓度组设两个重复组, 并总设两个对照组, 不加入EDTA化合物。全部试验瓶置于 25°C (水温) 空调室培养, 光照 2400lx , 光照周期12:12小时。幼体饵料为钙质角毛藻 (*Ch-*

aetoceros calcitrans) 和湛江叉鞭金藻 (*Dicrateria zhanjiangensis*) 混合饵料, 前两天的饵料密度为2.5万个/ml, 随后提高到5.0万个/ml. 每两天全换水一次, 换水后从各个试验组取10只幼体标本, 经福尔马林固定后在显微镜下测量壳长. 本试验共进行6天.

实验结束后, 在倒置生物显微镜下计算变态稚贝数和空壳数, 并计算幼体变态率和存活率, 同时取出一部分标本经福尔马林固定后测量壳长, 作为幼体生长指标.

2. 稚贝实验

由浮游幼体培养6天后的变态稚贝经继续培养1—2天后, 作为实验稚贝材料.

挑选稚贝100只置于内含200ml 15ppt 膜滤海水的烧杯中(稚贝密度0.5只/ml), 两种络合物(EDTA和酒石酸钾钠)的浓度设置为0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/l, 各种浓度均用1.0mg/ml原液配制, 每个浓度组设两个重复组, 对照组总设4个. 全部稚贝均不加任何底质于25℃(水温)的空调室内培养, 培养条件和幼体实验相同. 稚贝的饵料密度从实验早期的5.0万个/ml逐渐增加至后期的20万个/ml. 稚贝每两天全换水一次, 并重新加入络合物和饵料. 每隔4天在倒置显微镜下测量稚贝壳长, 每次测量个体数超过15只. 本实验共进行16天, 实验结束后, 测量50%以上的稚贝标本壳长, 并计数存活的个体, 换算为存活率.

幼体、稚贝生长的数理检验均采用 F 值检验法.

二、结 果

1. EDTA络合物对缢蛏幼体生长发育的影响

缢蛏幼体在不同EDTA试验浓度下每隔两天壳长的增长见表1.

表1 缢蛏幼体生长和EDTA络合物的关系*

壳 长 (μm)		浓 度 (ppm)				
		对 照 组	0.5	1.0	2.0	5.0
培 养 时 间 (d)	2	194.5 \pm 9.1	195.7 \pm 6.4	190.7 \pm 10.3	191.6 \pm 10.3	180.0 \pm 16.2
	4	207.7 \pm 5.8	209.6 \pm 11.3	207.9 \pm 6.9	204.7 \pm 16.7	206.4 \pm 16.3
	6	229.6 \pm 7.4	238.7 \pm 23.7	262.8 \pm 22.7	244.4 \pm 23.2	241.3 \pm 22.5

6天后各个EDTA浓度组与对照组生长之间的方差分析

浓度组(PPm)	方差 S^2	自由度 d_f	F'	显著性	p
0.5	561.70	20.5	2.4	不显著	0.05
1.0	515.29	20.8	34.6	显著	0.01
2.0	538.24	20.6	6.6	显著	0.05
5.0	506.25	25.5	5.2	显著	0.05

* 幼体起始壳长150.2 \pm 8.1 (μm).

表 1 结果表明, 在实验前两天, 低浓度 (0.5ppm) 的 EDTA 对幼体生长的影响不显著, 超过 0.5ppm 却出现抑制作用, 并且在 5.0ppm 组这种抑制效应达到最大, F 方差分析发现 5.0ppm 组与对照组幼体壳长之间的差异是显著的 ($p < 0.05$), 这可能是由于幼体起先置于高浓度的 EDTA 环境中难以适应的缘故, 因而无论是在正常活动或是在生理代谢方面都可能受到一定程度的抑制; 4 天后, 随着幼体的各项活动代谢恢复正常, EDTA 对生长的刺激作用已初步显示, 并同两天前对生长的抑制作用相互补偿而表现出各个浓度组同对照组之间的差异变小; 在实验结束后, 这种生长促进作用愈加明显, 除了 0.5ppm 组同对照组之间差异不显著外, 其他 3 个浓度组均在不同检验水平上明显大于对照组, 其中又以 1.0ppm 组幼体生长最快, 其差异置信度在 99%。值得注意的是, 2.0, 5.0ppm 两个高浓度组之间幼体壳长差别不大。

以生长系数 k 值作为幼体生长指标更能形象地描述 EDTA 的生长效应过程 (图 1)。

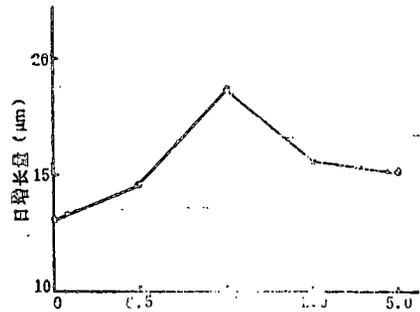
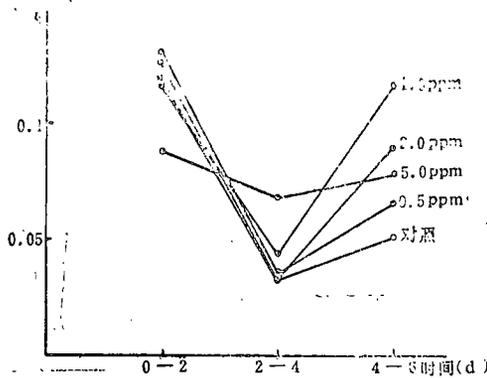


图1 不同浓度EDTA对缢蛏幼体生长系数的影响 图2 缢蛏幼体壳长日增长量同EDTA浓度的关系

$$k = \frac{l_n l_t - l_n l_0}{t}$$

其中 l_t 为 t 时间时幼体的壳长, l_0 为起始壳长, t 为培养时间

不难发现, 虽然在前两天幼体因加入 EDTA 络合物而使生长速度低于对照组, 但随后幼体的生长速度逐渐加快, 并且在实验结束后, 所有 EDTA 浓度组中幼体的 k 值都明显超过对照组。比较各个浓度组对幼体 k 值的影响, 以 1.0ppm 的刺激作用最为显著。从幼体在 6 天培养时间内的壳长日增长量同 EDTA 络合物浓度的关系中也清楚地表明了这一趋势的存在 (图 2)。

以缢蛏幼体空壳数作为死亡指标, 计算幼体的变态率和存活率, 其结果见表 2。

可见, 能显著提高幼体变态率的 EDTA 浓度为 0.5 和 1.0ppm, 它们的变态率分别高达 74.8%、74.9%; 2.0ppm 组幼体变态率也明显高于对照组, 但不如前面两个低浓度组; 在更高浓度下, 虽然变态率与对照组相近, 其未变态率也同样大大低于对照组。在幼体存活率方面, 低浓度 EDTA (0.5ppm) 可以提高存活率, 当浓度超过 1.0ppm, 存活率开始出现下降的趋势, 并在 5.0ppm 级下降到最低值 (77.7%), 而对照组却高达 92.0%。

表2 EDTA对缢蛏幼体发育的影响

浓 度 (ppm)	对 照	0.5	1.0	2.0	5.0
变 态 率 (%)	50.0	74.8	74.9	65.0	49.8
死 亡 率 (%)	8.0	6.7	9.2	13.8	22.3
存 活 率 (%)	92.0	93.3	90.8	86.2	77.8
未 变 态 率 (%)	42.0	18.6	15.8	21.2	27.9

2. EDTA、酒石酸钾钠对缢蛏稚贝生长发育的影响

稚贝生长试验结果见表3, 表4.

从表3可以看到, 除了2.0ppm浓度组外, 其他3个EDTA浓度组的稚贝生长均在培养前4天开始超越对照组, 随着稚贝的继续培养, EDTA的这种促进作用将更加显著. 但是,

表3 EDTA络合物对缢蛏稚贝生长的影响*

壳 长 (μm)	浓 度 (ppm)					
	对 照	0.5	1.0	2.0	5.0	
培 养 时 间 (d)	4	371.8 \pm 34.5	384.9 \pm 22.7	375.7 \pm 47.9	365.9 \pm 36.7	392.6 \pm 56.0
	8	599.5 \pm 97.9	803.6 \pm 87.8	809.7 \pm 80.6	788.5 \pm 60.5	815.4 \pm 117.6
	12	1 010.2 \pm 211.7	1 167.0 \pm 199.4	1 319.4 \pm 243.0	1 257.8 \pm 302.4	1 280.2 \pm 238.6
	16	1 377.6 \pm 268.8	1 439.2 \pm 366.2	1 518.7 \pm 385.3	1 661.0 \pm 404.3	1 469.4 \pm 371.8

16天后EDTA各个浓度组与对照组壳长之间的方差分析

浓度组(ppm)	方差 S^2_x	自由度 d_f	F'	显著性	p
0.5	134 102.44	66.1	0.67	不显著	0.05
1.0	148 450.07	31.5	2.19	不显著	0.05
2.0	163 458.49	83.5	15.22	显著	0.01
5.0	138 235.24	89.8	1.92	不显著	0.05

* 稚贝起始壳长235.3 \pm 11.9 (μm).

自第8天开始, 几个EDTA浓度组中稚贝壳长的实际增长量却较对照组为低. 从实验结束后的方差分析发现仅2.0ppm组同对照组之间的差异是显著的 ($p < 0.01$), 另外3个浓度组尽管其稚贝绝对壳长均大于对照组, 可是在0.05检验水平其差异并不显著. 计算稚贝

在不同培养时间内生长系数 k 值进一步表明EDTA对缢蛏稚贝生长的促进作用只表现在稚贝培养前期(0—8天)(图3),当培养时间超过8天,EDTA反而抑制稚贝的生长,这表现在各个浓度组的 k 值均低于对照组。

表4证明另一种络合物酒石酸钾钠($C_4H_4O_6KNa$)对缢蛏稚贝生长的最终影响不明显。经16天培养后,各个浓度组稚贝壳长与对照组水平较为接近,在 $p=0.05$ 水平上无显著差异。值得注意的是,稚贝在不同时间所呈现的 k 值波动趋势和EDTA络合物极为相似

表4 酒石酸钾钠对缢蛏稚贝生长的影响*

壳长 (μm)		浓 度 (ppm)				
		对 照	0.5	1.0	2.0	5.0
培 养 时 间 (d)	4	371.8 \pm 34.5	341.3 \pm 64.0	357.0 \pm 55.1	332.0 \pm 47.1	384.6 \pm 66.3
	8	599.5 \pm 97.9	675.4 \pm 113.1	698.6 \pm 117.6	687.7 \pm 96.3	647.1 \pm 113.1
	12	1010.2 \pm 211.7	992.3 \pm 304.6	1080.8 \pm 262.1	1143.5 \pm 209.4	1076.3 \pm 255.4
	16	1377.6 \pm 268.8	1391.0 \pm 287.8	1305.9 \pm 314.7	1494.1 \pm 330.4	1384.3 \pm 282.2

16天后酒石酸钾钠浓度组同对照组壳长之间的方差分析

浓度组(ppm)	方差 S^2/\ast	自由度 d_f	F'	显著性	p
0.5	82828.84	37.1	0.03	不显著	0.05
1.0	99036.09	83.0	1.37	不显著	0.05
2.0	109164.16	78.0	3.02	不显著	0.05
5.0	79636.84	77.4	0.01	不显著	0.05

* 稚贝起始壳长235.3 \pm 11.9 (μm)。

(图4),两者所不同的是,酒石酸钾钠在实验前4天除了5.0ppm组外,对稚贝的生长却产生抑制效应,随之它也经历了促进和抑制两个不同的作用过程,这3个连续的作用过程最终导致了稚贝生长和正常个体的相近。

两种络合物对稚贝存活率及壳长日增长量的影响见图5,图6。

可见所有的EDTA测试浓度都能提高稚贝的存活率,而使存活率达到最大的浓度为1.0ppm,超过该浓度级,稚贝死亡率逐渐提高。但2.0ppm浓度却能极大地促进了稚贝的迅速生长,其壳长日增长量在所有测试组中为最大。与此相比,高浓度(2.0, 5.0ppm)的酒石酸钾钠不利于稚贝的存活状况,唯有低浓度才能提高存活率,但其程度弱于EDTA,很明显,该络合物组中稚贝的壳长日增长量同存活率是成负相关的,如2.0ppm浓度使稚贝壳长日增长量达到最大,存活率趋于最小;而1.0ppm浓度却使存活率达到最大,日增长量为最小。

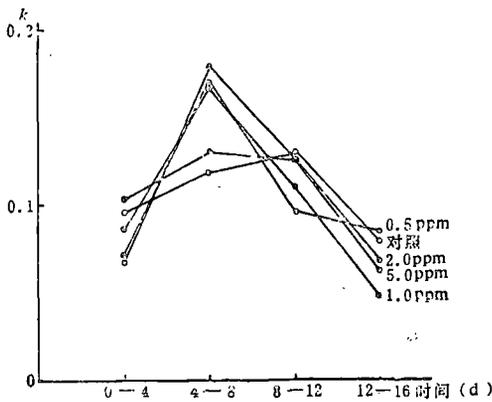


图3 缢蛏稚贝在不同EDTA浓度下生长系数 k 随时间的变化关系

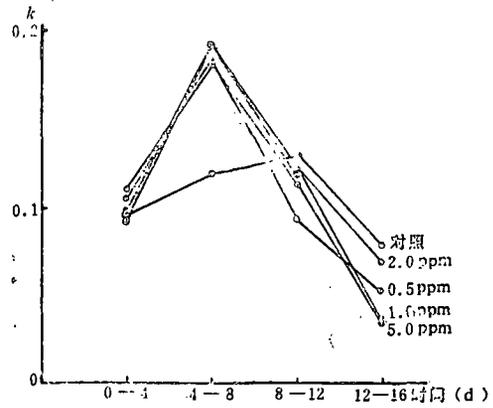


图4 缢蛏稚贝在不同酒石酸钾钠浓度下生长系数 k 随时间的变化关系

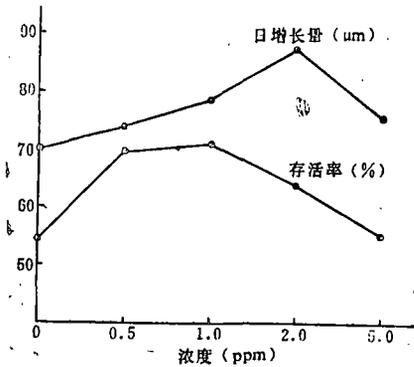


图5 缢蛏稚贝存活率、壳长日增长量同EDTA的关系

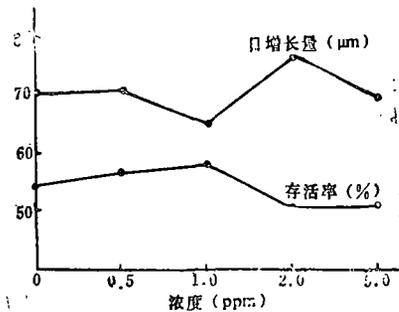


图6 缢蛏稚贝存活率、壳长日增长量同酒石酸钾钠的关系

比较 EDTA 和酒石酸钾钠两种络合物对缢蛏稚贝生长发育的影响可以发现它们均在 1.0ppm 水平对提高稚贝存活率的效应最为明显，而在 2.0ppm 水平却使稚贝的生长最为迅速。但是，后者的影响不如前者那么强烈。

三、讨论

水质问题是海洋双壳类人工育苗的一大关键，特别是海水中存在的天然和人为污染物以及浮游植物的大量繁殖更是幼体培育的潜在危险，在这种环境下，幼体常常表现出发育异常或滞育、生长受抑制、死亡率提高等现象^[3-6]。因而，使用各种化合物处理自然海水以改善水化环境已成为水产养殖的新手段之一^[1]。

1. 络合物对于促进缢蛏幼体、稚贝生长发育的用量选择

本文使用了 EDTA 和酒石酸钾钠两种络合物处理自然海水，可以证明 EDTA 对于缢

蛭幼体、稚贝的生长发育均有显著效应，而酒石酸钾钠虽对稚贝壳长无明显的效应，但低剂量 (0.5, 1.0ppm) 对其存活率的提高仍有一定的作用，考虑到大面积育苗的经济效益问题，可以不必使用该络合物，现将EDTA络合物的最适选用量简述如下。

1) 幼体发育期

1.0ppmEDTA 对幼体生长速度的刺激作用最大，经 6 天培养后幼体壳长迅速增长到 262.8μm，而对照组仅为 229.6μm；该浓度组幼体的存活率也仅略低于对照组和 0.5ppm 组。从变态率指标看，1.0ppm 也表现出最大值。因此在缢蛭人工育苗中，使用 1.0ppm 浓度级的 EDTA 对于促进幼体的生长发育均能收到最佳效率，超过该浓度尽管对幼体生长也具促进作用，但因死亡率过高而不宜采用。值得指出的是，0.5ppm 对幼体生长效应不如其他浓度组，却能提高幼体存活率，因而若育苗过程过分强调存活率的提高，则用 0.5ppmEDTA 处理海水也是可行的。

2) 稚贝发育期

在 4 个测试的 EDTA 浓度中，只有 2.0ppm 组稚贝的生长有显著的提高，而其他 3 个组别经检验统计难以发现有明显的差异，尽管它们的壳长日增长量也都高于对照组。同时，2.0ppm 组的稚贝存活率可达 64.0%，大于对照组 (54.8%)，但却低于 0.5ppm (70.0%) 和 1.0ppm (71.0%)。因此，在缢蛭稚贝培养时建议使用 2.0ppm 浓度的 EDTA 处理海水，同样若单纯从存活率的提高出发，也可使用 1.0ppm 浓度处理，但稚贝生长将不如 2.0ppm 组明显。

2. 络合物在缢蛭早期生活史中的作用

幼体、稚贝生长系数 k 值的波动情况可以提供生长动力学的详细过程，从而对络合物的作用机制以及不同发育期对络合物产生的反应作出比较形象的描述和比较。

k 值大小很明显是随培养时间而波动的。缢蛭幼体在前两天迅速生长，随后 k 值急剧下降，4 天后又趋于上升，整个 k 值波动曲线呈“V 型”。造成这种波动的原因仍不能肯定，但是幼体在试验开始时由卵黄性营养转化为浮游生物营养则可能刺激了幼体的迅速生长，随之而来的贝壳膨大却可能在一定程度上限制了生长活动。此外，从幼体在各个试验组的 k 值波动曲线可以表明 EDTA 对幼体生长的效应经历了抑制和促进两个阶段，它们分别历时 2 天和 4 天 (图 7)。

与此形成明显对照的是，稚贝的 k 值曲线呈“Λ”型，加入络合物后 k 值曲线倾斜度甚至更高。EDTA 的影响在前 8 天表现为刺激作用，而且作用程度是逐渐加大的，后 8 天却转化为抑制作用，从而经历了促进和抑制两个截然相反的过程。酒石酸钾钠的生长效应在前 4 天基本为抑制，随后的过程和 EDTA 络合物类似 (图 7)。

表 5 比较了两种络合物对稚贝生长系数的影响，酒石酸钾钠无论是刺激作用或是抑

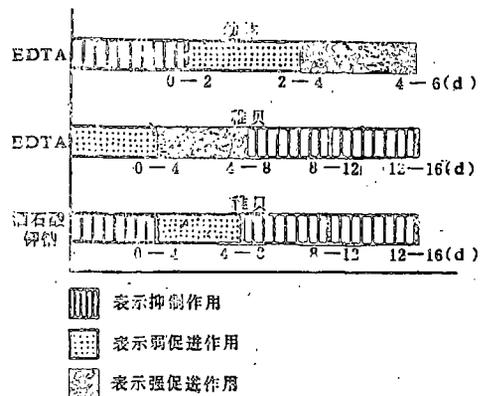


图 7 两种络合物在不同时间内对缢蛭稚贝生长产生的效应过程

制作用均不如EDTA强烈，但是从 k 值曲线却可以认为这两种络合物的作用机制是基本类似的。

表5 在两种络合物作用下缢蛏稚贝生长系数 k 的差异*

k		浓 度 (ppm)				
		对 照	0.5	1.0	2.0	5.0
培	0—4	0.096	0.105	0.098	0.092	0.110
		0.096	0.074	0.086	0.068	0.104
养	4—8	0.119	0.184	0.192	0.192	0.183
		0.119	0.171	0.167	0.182	0.130
时	8—12	0.130	0.093	0.122	0.117	0.113
		0.130	0.096	0.110	0.127	0.127
间	(d)	0.078	0.052	0.035	0.070	0.034
		0.078	0.084	0.047	0.067	0.063

*虚线上方为EDTA组；虚线下方为酒石酸钾钠组。

3. 络合物的可能作用机制

络合物对双壳类幼体生长发育的有益效应机制尚不清楚^[1]。但在对虾幼体培养中，EDTA的作用被认为是在于它对水体中有害金属的螯合，从而减弱了它们对生物体的毒性作用^[2]。然而，Utting和Helm(1985)^[1]利用原子吸收光谱法测定了经1.0ppmEDTA处理后自然海水中的各种金属含量的变化，其中Zn和Pb浓度均有大幅度下降，而另一种重金属Cu的含量却上升，据报道，Cu对双壳类胚胎和幼体发育的毒性效应较前两者严重^[3,4]。而实质上，他们所使用的未经处理的自然海水中的重金属浓度尚不足以构成对长牡蛎胚胎发育的毒性作用。因此络合物的这种螯合环境中的重金属而促进幼体的生长发育的机制还难能肯定。值得注意的是，对于长牡蛎的胚胎发育，EDTA不可能起着营养盐的促进作用，而只能发挥环境因子的作用。

从本文中络合物的作用过程也难以支持他们螯合环境金属以提高生长发育率的假说，特别是EDTA所表现的不同效应阶段以及不同发育期对EDTA呈现的不同反应都不可能单纯利用这一假说加以说明。但是，EDTA和酒石酸钾钠对缢蛏稚贝作用机制的基本类似又可以归结于它们的络合性质。对于已能吸收外界营养而进行生长发育的缢蛏幼体和稚贝而言，作者认为络合物的这种作用可能是当它们被生物体吸收进体内后，与体内金属发生螯合作用，从而促使重金属向体外排泄，或改变了生物体内金属的存在形式，其最终目的就是使生物处于最佳的代谢环境中。实际上，作为以摄食浮游植物为主的海洋双壳类幼体是很容易聚集一定量的金属成分的，但目前仍缺乏有关的基本数据。在高等动物方面，根据这种原理利用螯合剂治疗重金属中毒症已在医学上得到了广泛的应用。

EDTA的另一种可能作用机制在于它们被吸收入体内后与金属酶竞争金属离子,从而改变了酶的活性中心结构,并进一步影响到生物体的代谢过程,但这种作用机制还需量子生物学加以证明。

本文的实验结果也基本符合这些假说。从实验时间看,无论是缢蛏的幼体期或是稚贝期,EDTA均能在前6—8天刺激生物的生长,其间可能包括了螯合体内重金属的作用过程。然而,随着螯合作用的持续,一些生物必需微量金属也将随之流失,并表现在后期稚贝生长的抑制。作为络合常数最大的络合物之一,EDTA对生物体的影响也较酒石酸钾钠明显。另外,在幼体实验结束后,曾发现EDTA浓度组中幼体和稚贝的贝壳表面较对照组粗糙,也进一步证明EDTA参与体内代谢这一假说。

使用EDTA培育缢蛏稚贝更具有特殊意义。海洋沉积物经常是各种金属的最终归宿^[7],其重金属含量明显高于海水中的含量,因而栖息于海泥表层的缢蛏稚贝也将不可避免地遭受到重金属污染的潜在威胁,所以在生产实践中络合物的使用将有助于减除生物污染的可能产生。

参 考 文 献

- [1] Utting, S.D. and M.M.Helm, Improvement of sea water quality by physical and chemical pre-treatment in a bivalve hatchery, *Aquaculture*, 44 (1985), 133—144.
- [2] 张正斌等, 海洋化学(下), 上海科学技术出版社, 1984, 191—193.
- [3] 陈金堤等, 重金属对褶牡蛎胚胎及幼体发育的毒性效应, 厦门大学学报(自然科学版), 24(1985), 96—101.
- [4] Calabrese, A. et al, Survival and growth of bivalve larvae under heavy metal stress, *Mar. Biol.*, 41 (1977), 179—184.
- [5] Helm, M.M., The effect of sea water quality on the laboratory culture of *Ostrea edulis* larvae, *ICES C.M.* 1971/K, 28 (1971), 8.
- [6] Millar, R.H. and J.M.Scott, An effect of water quality on the growth of cultured larvae of the oyster, *Ostrea edulis* L, *J.Cons.Int.Explor.Mer.*, 32 (1968), 123—130.
- [7] Swartz, R.C. et al, Sediment toxicity and the distribution of amphipods in Commencement Bay, Washington, USA, *Mar.Pollut.Bull.*, 13 (1982), 359—364.