

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20121010002

吴寅,吴永贵,马岚,等. 水体酸化条件下 Cu(II) 对斑马鱼胚胎的毒性效应[J]. 生态毒理学报,2013,8(3): 389-394

Wu Y, Wu Y G, Ma L, et al. Toxic effect of Cu(II) on zebrafish embryos under water acidification condition [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 389-394 (in Chinese)

水体酸化条件下 Cu(II) 对斑马鱼胚胎的毒性效应

吴寅, 吴永贵*, 马岚, 熊宇霏, 张枢, 陈琴

贵州大学应用生态研究所, 贵阳 550025

摘要: 为评价由酸雨、酸性矿山排水等环境污染导致的水体酸化及水体重金属联合作用对水生生物的生态毒性效应, 研究了不同 pH 值(pH = 3、4、5、6、7 和 7.8) 条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎发育的影响。结果表明, 酸性水体及 Cu^{2+} 单一存在时, 酸对斑马鱼胚胎 24 h 半数效应浓度值 EC_{50} 为 pH = 3.65, Cu^{2+} (pH = 7.8) 对斑马鱼胚胎 24 h- EC_{50} 为 0.267 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 当水体酸化及水体中的 Cu^{2+} 共存时, 较低的 pH 对 Cu^{2+} 的生物毒性起协同作用, 表现为随溶液 pH 的降低, 各浓度 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的 24 h 凝结率显著增高($P_{24\text{h致死率}} = 0.001$), 而斑马鱼胚胎 96 h 孵化率显著降低($P_{96\text{h孵化率}} = 0.002$), 且不同浓度的 Cu^{2+} 之间的生物毒性效应存在显著性差异($P_{24\text{h致死率}} = 0.0321$; $P_{96\text{h孵化率}} = 0.0028$)。这说明酸性水体和 Cu^{2+} 都显著影响斑马鱼胚胎的发育, 且 Cu^{2+} 在酸性水体中对斑马鱼胚胎的毒性显著增强。因此, 在受重金属 Cu^{2+} 污染的地区, 如同时受到酸雨或酸性矿山排水等较低 pH 值和 Cu^{2+} 的双重胁迫, 较低浓度的 Cu^{2+} 就能够对水生生物的生殖发育及水生生态系统产生严重的影响和危害。

关键词: 水体酸化; Cu^{2+} ; 斑马鱼胚胎; 联合生物毒性

文章编号: 1673-5897(2013)3-389-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxic Effect of Cu(II) on Zebrafish Embryos under Water Acidification Condition

Wu Yin, Wu Yonggui*, Ma Lan, Xiong Yufei, Zhang Shu, Chen Qin

Institute of Applied Ecology, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Received 10 October 2012 accepted 20 November 2012

Abstract: To assess ecotoxic effects of Cu^{2+} in acid solution caused by acid mine drainage and acid rain on aquatic organisms, zebrafish were used as test organism to study the effects of different concentrations of Cu^{2+} on zebrafish embryonic development under different pH (pH = 3、4、5、6、7、7.8). Under acid solution and Cu^{2+} stress independently, the values of 24 h- EC_{50} for acidity and Cu^{2+} (pH = 7.8) were pH = 3.65 and 0.267 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. When the solutions were acid, the biotoxicity of Cu^{2+} to zebrafish increased. Specifically, with the decrease of pH, the condense ratio of embryos under different concentrations of Cu^{2+} increased significantly ($P_{24\text{h}} = 0.001$), and the incubation ratio after 96 h decreased significantly ($P_{96\text{h}} = 0.002$) and significant differences of biotoxicity existed among different concentrations of Cu^{2+} ($P_{24\text{h}} = 0.0321$; $P_{96\text{h}} = 0.0028$). It can indicate that both

收稿日期: 2012-10-10 录用日期: 2012-11-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(20977020); 贵州省重大科技专项(黔科合重大专项字[2012]6009-7号); 贵州大学 211 重点学科建设项目(211KST200902); 贵阳市重大科技专项项目(2010 筑科农 5-11)

作者简介: 吴寅(1986-) 男, 硕士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: wuywll@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author) E-mail: ygwu72@126.com

acid solution and Cu^{2+} can affect the development of embryos, and the toxicity of Cu^{2+} in acid solution to embryos increased significantly. Therefore, affected by acid rain or acid mine drainage and polluted by Cu^{2+} , even when the concentration of Cu^{2+} is very low, the reproduction and development of aquatic organisms and aquatic ecosystem were seriously influenced.

Keywords: water acidification; Cu^{2+} ; zebrafish embryos; joint-biototoxicity

随着我国社会经济的迅速发展,金属冶炼、化工生产及矿山开采等所产生的富含重金属等污染物的废弃物通过不同方式进入水环境,使水体重金属污染问题十分突出,导致江河湖库底质重金属的污染率高达80.1%^[1]。同时,我国的酸雨污染也日益严重,自20世纪80年代中国就已经成为继欧洲和北美之后的世界第3大酸雨区^[2],且根据我国环境保护部公布的《2011年中国环境状况公报》显示,在全国468个进行酸雨监测的县市中出现酸雨的县市占48.5%(达到227个),酸雨进入江河湖库等水体,导致水体环境常常受酸和重金属协同污染。此外,煤炭和金属等矿产资源开采过程中,往往会因伴生还原性硫化物风化氧化产生富含重金属的大量酸性矿山排水(acid mine drainage, AMD)^[3]经地表径流进入水体,也会使酸及重金属共同作用于水体环境。因此,由酸性矿山排水及酸雨带来的水体酸化和重金属复合污染已成为当前重要的水体环境问题之一^[4-5]。郭宪光等^[6]研究了酸性水体环境对鱼类的影响,并指出了我国水体酸化的严峻形势及对渔业的潜在威胁。贾秀英等^[7]研究了水体 Cu^{2+} 对蟾蜍蝌蚪组织氧化损伤和DNA损伤。赵娜等^[8]研究了不同pH条件下 Cr^{6+} 对3种藻类的毒性效应。这些针对酸和重金属污染的研究主要集中在单一生物毒性效应方面,而关于不同酸度条件对重金属环境生物效应所起的协同作用或拮抗作用的研究相对较少,尚无更多的资料可供参考。

斑马鱼受精卵透明性很好,可对约20种效应指标进行观察分析,与成鱼致死率这个单一指示终点相比,更有利于揭示污染物的毒性作用机制。因此,斑马鱼胚胎实验广泛用于各种污染物的毒性调查^[9]。通过研究不同pH值条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎发育的影响,揭示了酸性环境条件下重金属的生物毒性状况。以期受酸雨或酸性矿山废水影响地区酸性条件下重金属生物效应的监测、预警和评价提供科学依据,并为环境水体中pH和 Cu^{2+} 的水质基准和标准的制订提供理论数据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验生物与方法

实验用斑马鱼为实验室驯化培养后的性成熟

体,鱼龄为300~350 d,体长4~5 cm。培养条件:(26 ± 1) °C,光照强度为1 000 lx,14 h:10 h的光照/黑暗周期。饲养亲鱼用水为经曝气脱氯的自来水,氧饱和度大于80%;实验用水根据ISO7346-3准备,其中每1 000 mL水含 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.3 mg、 CaCl_2 22.2 mg、KCl 0.6 mg、 NaHCO_3 6.5 mg,硬度为375 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (按 CaCO_3 计算),电导率EC为532 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$,调节pH至 7.8 ± 0.1 ,实验前充氧至饱和。

斑马鱼胚胎收集:胚胎毒性实验前夜,在暗室内将自制产卵器放入鱼缸,亲鱼按1:2雌雄比放入产卵器内,下方放置鱼卵收集器,次日清晨给光30 min刺激斑马鱼产卵。取出鱼卵收集器,用阔口胶头滴管(管口直径大于卵径)将卵吸出,然后用ISO7346-3标准稀释水清洗鱼卵数次,以除去粪便等杂质,在倒置显微镜(BDS200,重庆奥特光学仪器有限公司)下挑选出正常的受精卵备用。

1.2 实验设计

斑马鱼胚胎实验按OECD规定的标准方法^[10],并结合参考文献的方法^[11-12]进行实验。预实验以96 h斑马鱼胚胎的最高全存活浓度和最低全致死浓度确定正式实验的溶液浓度下限和上限。在预实验的基础上,正式实验设置3组实验,其中实验1设置pH=3、4、5、6、7、7.8(空白对照)共6个pH梯度下的斑马鱼胚胎毒性实验,以考察不同酸度对受试生物的毒性效应;实验2按等对数间距设置0、0.009、0.016、0.028、0.05、0.09、0.16、0.28和0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 共9个 Cu^{2+} 浓度梯度(其中 Cu^{2+} 为 CuSO_4 溶液,并以 Cu^{2+} 计),并用硫酸将各浓度 Cu^{2+} 溶液的pH调至为7.8后进行斑马鱼胚胎毒性实验,以考察在pH中性条件下不同浓度 Cu^{2+} 对受试生物的生物毒性;实验3为进一步研究不同酸度条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的毒性,将实验2中各浓度 Cu^{2+} 溶液用硫酸调节pH分别为3、4、5、6、7和7.8,观察不同酸度条件下重金属与酸的联合毒性。以上溶液全部用ISO7346-3标准稀释水配制,在规定的实验条件下,记录胚胎在24 h的卵凝结,72 h和96 h的孵化情况。

1.3 数据处理与分析

所有数据分析采用 DPS2000 统计分析软件进行^[13], 剂量-效应关系曲线采用 logistic 模型进行拟合^[14], 并采用 Origin 8.0 作图。

Logistic 曲线:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

式中 y 为致死率或孵化率, x 为 pH 值或 Cu^{2+} 的浓度值, A_1 为最大反应值, A_2 为本底值, x_0 、 p 均为拟合为参数。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 不同时段 pH、 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎发育的影响

正常斑马鱼胚胎如图 1a、b、c 所示, 在 0~96 h 的持续染毒过程中, 不同 pH、 Cu^{2+} 浓度及两者联合作用对斑马鱼胚胎的毒性效应主要呈现为: 24 h 卵凝结 (图 1d), 尾部不脱离卵黄囊, 20 s 内无运动; 而在 48 h 表现为血液循环减弱或心率减慢, 色素减少 (图 1e); 72 h 和 96 h 表现为心胞水肿 (图 1f), 色素减少, 个别胚胎有尾畸 (图 1f) 等现象。

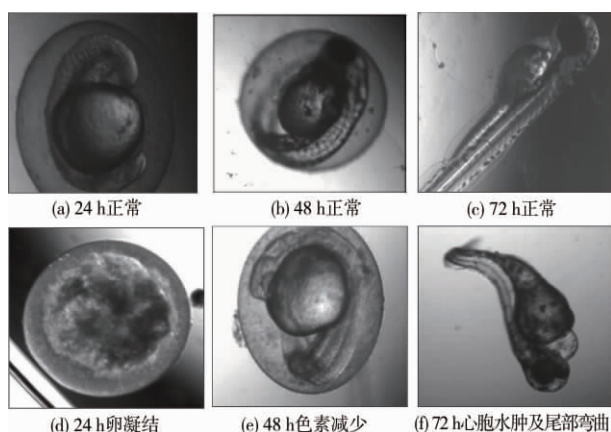


图1 对照组(a, b, c)与受污染胁迫(d, e, f)的斑马鱼胚胎和仔鱼对比

Fig. 1 Comparison of zebrafish embryo and larva between control groups (a, b, c) and groups under pollution stress (d, e, f)

2.2 pH 对斑马鱼胚胎的生物毒性

斑马鱼胚胎暴露于不同 pH 的溶液时, 在前 24 h 最敏感, 呈现出极强的致死作用。通过图 2A 可以看出, 随着时间的延长, 胚胎的死亡率无显著变化, 半数效应浓度 EC_{50} 分别为 pH = 3.65、3.69 和 3.71, 三者之间无明显差异; 但随着时间的延长, 对斑马鱼

胚胎呈现出一定的致畸效应, 如血液循环减弱及心胞水肿等, 可见绝大多数的斑马鱼胚胎的死亡均发生在前 24 h, 这与前人研究得出的“临界窗口”(critical window) 现象一致^[15]。

pH 显著影响斑马鱼胚胎的孵化, 存在明显的剂量-效应关系。从图 2A 中可以看出, 胚胎的 24 h 凝结率随 pH 值的降低而显著增加 ($P = 0.0001$), 其中对照组 (pH = 7.8) 的 24 h 凝结率仅为 1.67%, 而在 pH = 3 的条件下斑马鱼胚胎 24 h 全部卵凝结; 从图 2B 中可以看出, 胚胎的 72 h 孵化率表现出完全相反的变化趋势, 水体 pH 值的降低显著降低斑马鱼胚胎的 72 h 孵化率 ($P = 0.0001$), 其中 EC_{50} 为 pH = 3.83, 与致死率的 EC_{50} 略有不同, 原因是少数胚胎出现了致畸效应, 没有孵化成功。酸性水体引起斑马鱼胚胎死亡及孵化率降低, 可能是由于酸性水体引起胚胎孵化酶活性降低, 钙代谢紊乱, 蛋白质沉积和卵膜变硬所致^[16]。

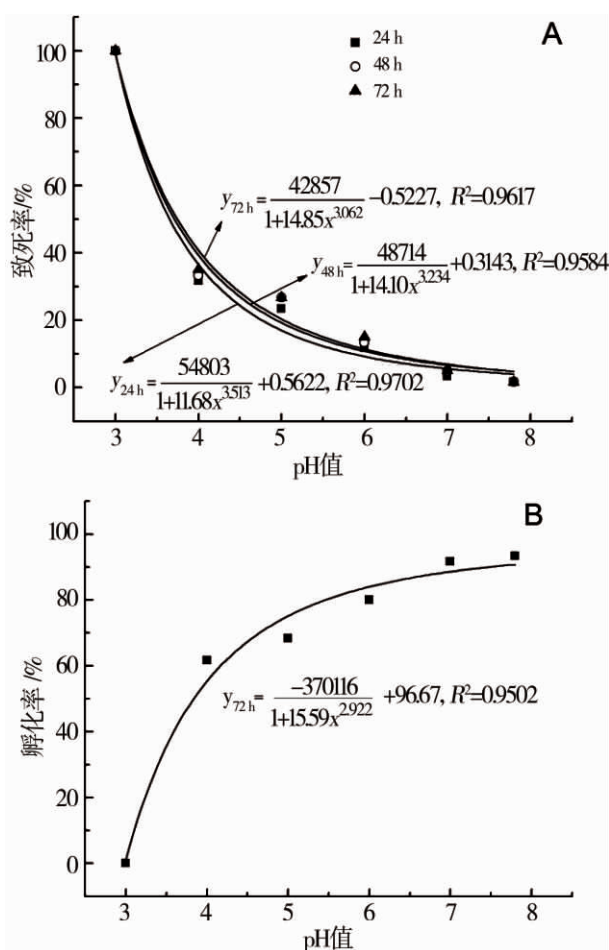


图2 不同 pH 对斑马鱼胚胎死亡率(A)和孵化率(B)的影响
Fig. 2 pH effect on mortality (A) and hatching rate (B) of zebrafish embryos

2.3 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的毒性效应

由图3可以看出, Cu^{2+} 显著影响斑马鱼胚胎的孵化, 存在着明显的剂量-效应关系。随着 Cu^{2+} 浓度的提高, 斑马鱼胚胎的24 h凝結率显著增加 ($P = 0.0001$), 斑马鱼胚胎的96 h孵化率显著降低 ($P = 0.0001$)。

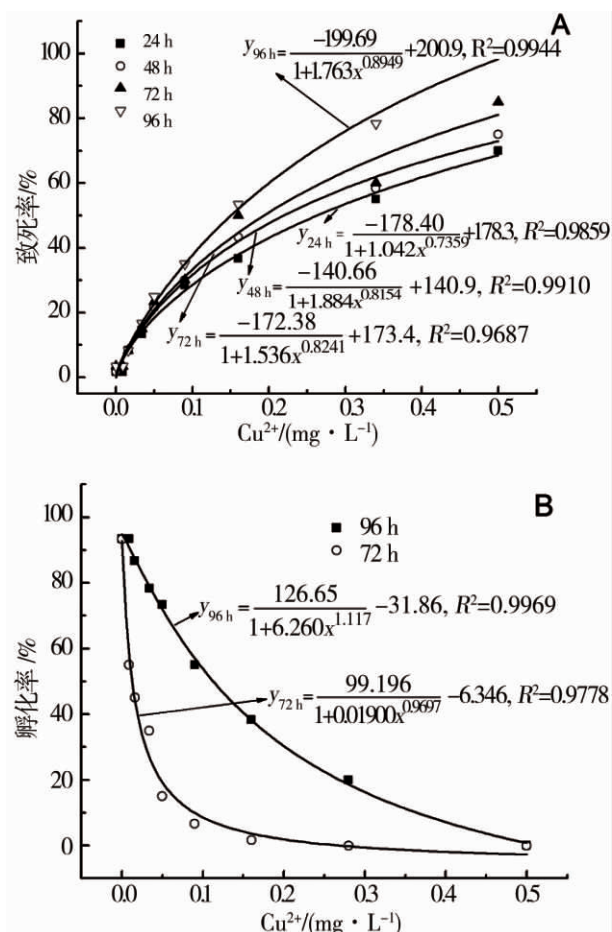


图3 不同浓度 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的死亡率 (A) 和孵化率 (B) 的影响 ($\text{pH} = 7.8$)

Fig. 3 Cu^{2+} effect on mortality (A) and hatching rate (B) of zebrafish embryos ($\text{pH} = 7.8$)

从图3A中可以看出, 斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的 Cu^{2+} 溶液中时, 同样是前24 h最为敏感, 表现出明显的致死效应。随着染毒时间的延长, 胚胎的死亡率存在一定的差异, 其中24、48、72和96 h致死率的 EC_{50} 分别为0.267、0.220、0.195和0.150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明随着染毒时间的延长, Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的生物毒性有所增加, 致使胚胎发生卵凝結、色素减少和胚胎心胞水肿等效应。从图3B中可以看出, 当 Cu^{2+} 达到一定浓度后能显著延长斑马鱼胚胎的孵化时间 ($P = 0.0001$), 其中72 h胚胎孵化率的

EC_{50} 为0.013 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 仅是96 h胚胎孵化率的 EC_{50} (0.110 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的1/9, 两者存在明显的差异。此外, 色度减少的胚胎最后基本都能孵化成功, 但尚未有文献报道色素减少的胚胎孵化后的健康状况, 有待进一步研究。

Yamamoto等^[17]研究表明, Cu^{2+} 能干扰卵壳孵化酶的活性或者抑制其分泌, 进而影响卵壳孵化酶降解卵壳的膜环的作用, 同时 Cu^{2+} 还能阻止鱼卵卵壳内的蛋白质水解酶的水解作用^[18], 从而延缓胚胎孵化。胚胎的孵化通常是生化作用(各种酶)、生理作用(胚胎作用力)和渗透作用共同产生作用的结果^[19-20], Cu^{2+} 通过对胚胎的酶活性、渗透作用以及其他一系列的生理作用产生负面影响^[21-22], 进而对胚胎产生毒性效应, 以及延缓胚胎发育过程。

2.4 不同 pH 条件对 Cu^{2+} 的斑马鱼胚胎毒性效应的影响

由于 Cu^{2+} 能阻止斑马鱼胚胎卵壳内的蛋白质水解酶的水解作用, 从而延缓胚胎孵化, 因此本实验部分同样要观察96 h。从表1中可以看出, 随着 pH 的升高, Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的 EC_{50} 逐渐增加, 表明随着 pH 的升高, Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的毒性逐渐降低; 以24 h- EC_{50} 为例, 对照组 ($\text{pH} = 7.8$) 中 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎 EC_{50} 值为0.267 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接近 $\text{pH} = 4$ 条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎 EC_{50} 值的10倍, 两者差异显著。结果表明, 不同 pH 条件可显著影响 Cu^{2+} 的生物毒性 ($P_{24h\text{致死率}} = 0.001$; $P_{96h\text{孵化率}} = 0.002$)。

表1 不同 pH 条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎的生物毒性

Table 1 Biototoxicity of Cu^{2+} to zebrafish embryos at different pH values

($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				
pH 值	24 h- EC_{50}	95% 置信区间	96 h- EC_{50}	95% 置信区间
3	0	—	0	—
4	0.0300	0.0187 ~ 0.0496	0.0100	0 ~ 0.0305
5	0.116	0.0845 ~ 0.183	0.0455	0.0103 ~ 0.0864
6	0.176	0.104 ~ 0.334	0.0707	0.0443 ~ 0.142
7	0.222	0.162 ~ 0.364	0.0960	0.0632 ~ 0.169
7.8	0.267	0.184 ~ 0.417	0.116	0.0924 ~ 0.192

由图4可以看出, 同 pH 条件下, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 斑马鱼胚胎的致死率显著提高, 96 h孵化率显著降低, 且不同浓度 Cu^{2+} 之间的生物毒性存在显著差异 ($P_{24h\text{致死率}} = 0.001$; $P_{96h\text{孵化率}} = 0.002$)。同

条件下 24 h 致死半数效应浓度与 96 h 孵化半数效应浓度存在差异是因为随着时间的延长, 混合溶液对斑马鱼胚胎的生物毒性有所增加。

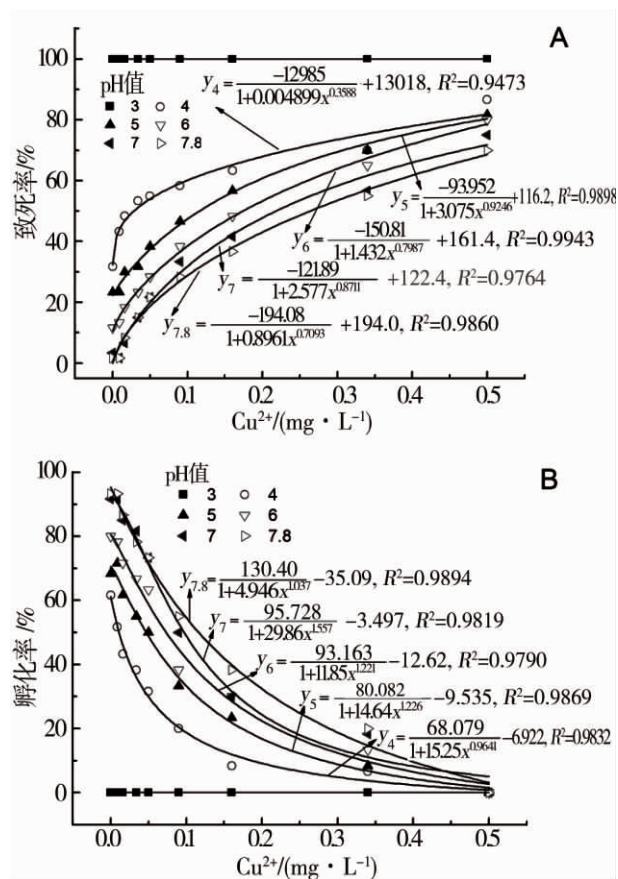


图4 不同 pH 条件下 Cu^{2+} 对斑马鱼胚胎 24 h 死亡率 (A) 和 96 h 孵化率 (B) 的影响

Fig. 4 Cu^{2+} effect on 24 h-mortality (A) and 96 h-hatching rate (B) of zebrafish embryos at different pH values

Wang 等^[23]的研究表明, 随着溶液 pH 值降低, Cu^{2+} 的毒性逐渐升高, 因为 pH 能改变溶液中毒性物质 $CuOH^+$ 浓度, 从而影响 Cu^{2+} 的毒性, 这与本研究结果一致。这说明, 在重金属污染地区, 如果受到酸雨或酸性矿山排水影响, 即使存在较低浓度的重金属也会对水生生物的生殖发育及水生生态系统产生严重的危害。同时, 较低 pH 条件下可以显著导致环境中重金属离子的溶出^[24-25], 将会造成更为显著的环境污染和生态危害。

致谢: 感谢贵州大学资源与环境工程学院付天岭博士的帮助和支持。

通讯作者简介: 吴永贵 (1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要致力于污染生态效应、污染生态控制及环境生态修复方面的研究工作, 发表论文 90 篇。

参考文献:

- [1] 周怀东, 彭文启. 水环境与水环境修复 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 5–150
- [2] 张新民, 柴发合, 王淑兰, 等. 中国酸雨研究现状 [J]. 环境科学研究, 2010, 23(5): 527–532
Zhang X M, Chai F H, Wang S L, et al. Research progress of acid precipitation in China [J]. Research of Environmental Sciences, 2010, 23(5): 527–532 (in Chinese)
- [3] 丛志远, 赵峰华. 酸性矿山废水研究的现状 & 展望 [J]. 中国矿业, 2003, 12(3): 15–18
Cong Z Y, Zhao F H. Current situation and prospect of the research on acid mine drainage [J]. China Mining Magazine, 2003, 12(3): 15–18 (in Chinese)
- [4] 王俭, 吴永贵, 刘方, 等. 贵州省典型煤矿区水体水质分析及其急性生物毒性 [J]. 环境科学与技术, 2011, 34(4): 68–73
Wang J, Wu Y G, Liu F, et al. Water quality analysis and acute toxicity to *Daphnia carinata* of various water samples from typical coal mining areas in Guizhou Province [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(4): 68–73 (in Chinese)
- [5] Tang C Y, Wu P, Tao X Z, et al. The basin acidification affected by AMD: A case study in Xingren County, Guizhou, China [J]. Carsologica Sinica, 2009, 28(2): 135–142
- [6] 郭宪光, 张耀光, 陈达丽, 等. 酸性水对鱼类的影响 [J]. 淡水渔业, 2003, 33(1): 46–49
- [7] 贾秀英, 施蔡雷. 水体二价铜离子致蟾蜍蝌蚪 DNA 损伤和氧化损伤 [J]. 环境科学学报, 2008, 28(10): 2095–2100
Jia X Y, Shi C L. Exposure of *Bufo gargarizans* tadpoles to water-borne copper (II) leading to DNA damage and oxidative damage [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(10): 2095–2100 (in Chinese)
- [8] 赵娜, 朱琳, 冯鸣凤. 不同 pH 条件下 Cr^{6+} 对 3 种藻的毒性效应 [J]. 生态毒理学报, 2010, 5(5): 657–665
Zhao N, Zhu L, Feng M F. The Toxicological effects of Cr^{6+} on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa* at different pH values [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(5): 657–665 (in Chinese)
- [9] 张亚辉, 刘征涛, 王一喆, 等. Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎早期发育的联合毒性 [J]. 环境科学研究, 2010, 23(11): 1415–1420
Zhang Y H, Liu Z T, Wang Y Z, et al. Joint toxicity of

- Cu^{2+} and Cd^{2+} to early development of zebrafish embryos [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23 (11): 1415–1420 (in Chinese)
- [10] OECD. Fish, Short-Term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. OECD Guideline for Testing of Chemicals, OECD TG212 [R]. Paris: OECD, 1998
- [11] Braunbeck T, Bottecher M, Hollert H, et al. Towards an alternative for the acute fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – An update [J]. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten*, 2005, 22(2): 87–102
- [12] Lammer E, Carr G J, Wendler K, et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(2): 196–209
- [13] 唐启义. DPS 数据处理系统—试验设计、统计分析及数据挖掘 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 82–87, 364–376
- [14] 雷丽萍, 陈世宝, 孙聪, 等. 溶液 Ca、K 浓度和 pH 对烟草 Cd 毒性的影响 [J]. *中国烟草科学*, 2012, 33(4): 79–84
Lei L P, Chen S B, Sun C, et al. Influence of Ca, K concentration and pH value in solution on Cd toxicity to tobacco in solution culture [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2012, 33(4): 79–84 (in Chinese)
- [15] Chow E S H, Cheng S H. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis [J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 73 (1): 149–159
- [16] Hunn J B, Cleveland L, Little E E. Influence of pH and aluminum on developing brook trout in a low calcium water [J]. *Environmental Pollution*, 1987, 43(1): 63–73
- [17] Yamamoto M, Yamagami K. Electron microscopic studies on choriolysis by the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes* [J]. *Developmental Biology*, 1975, 43 (2): 313–321
- [18] Schoots A F, Stikkelbroeck J J, Bekhuis J F, et al. Hatching in teleostean fishes: Fine structural changes in the egg envelope during enzymatic breakdown in vivo and in vitro [J]. *Journal of Ultrastructure Research*, 1982, 80(2): 185–196
- [19] Brock J A, Bullis R. Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp [J]. *Aquaculture*, 2001, 197(1–4): 137–159
- [20] Selman C, McLaren J S, Himanka M J, et al. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(8): 1279–1285
- [21] Johnson A, Carew E, Sloman K A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84 (4): 431–438
- [22] van Bostel A L, Kamstra J H, Fluittsma D M, et al. Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 244(2): 156–161
- [23] Wang X D, Hua L, Ma Y B. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for barley (*Hordeum vulgare*): Influence of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH [J]. *Chemosphere*, 2012, 89(1): 89–95
- [24] 郭朝晖, 廖柏寒, 黄昌勇. 酸雨对污染环境中重金属化学行为的影响 [J]. *环境污染治理技术与设备*, 2003, 4(9): 7–11
Guo Z H, Liao B H, Huang C Y. Chemical behaviors of heavy metals in contaminated environment affected by acid rain [J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2003, 4(9): 7–11 (in Chinese)
- [25] 戴树桂. 环境化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 193–204