

## 探討亞致死濃度銅暴露對吳郭魚仔魚鈉與鈣離子平衡之時間效應

黃千倫 吳淑美\*

國立嘉義大學水產生物學系

(收稿日期：2005.5.26，接受日期：2005.6.22)

### 摘 要

將孵化一天的吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*) 仔魚以 0 及 100  $\mu\text{g/L}$  之銅處理 11 天，分別在 0、1、3、5、7、12、24、48、96、120、168、240、264 小時等不同之時間點，測定仔魚體內鈣及鈉離子含量的變化。結果顯示：當仔魚暴露銅水中，12 小時內其體內之鈉離子尚無明顯之變化，但是 12 小時~11 日之間，處理組顯著的低於對照組，從 5~11 日鈉離子之降低幅度趨緩，雖有回升但仍舊比對照組低，無法恢復正常之濃度，同時亦沒有死亡的現象產生。至於鈣離子之變化，在銅處理後第 2~11 日，處理組之仔魚體內鈣離子濃度開始顯著的低於對照組，隨著暴露時間之延長，處理組與對照組之鈣離子濃度的差距維持在一定之範圍，而且有再現性。我們推論在亞致死濃度之銅處理下之吳郭魚仔魚，於短時間內 (12 小時~2 日) 其鈣及鈉離子濃度處在一個調節階段，當延長銅暴露時間時，仔魚成長雖然受到抑制，但是它仍然可維持體內在低鈣 (hypo-calcium) 及低鈉狀態 (hypo-sodium) 下而存活在銅水中。

關鍵詞：吳郭魚仔魚，銅，離子，緊迫

### 緒 言

台灣地區近年來由於礦場與油井的開採，以及電鍍加工廠、皮革鞣廠及化學工廠等所產生工業廢水，這些廢水若無適當處理就排入公共水域中，將會造成河川之重金屬污染，其中鉛、汞、銅、鎘、鋅等都是目前臺灣較為嚴重之有毒重金屬。銅在水域中的毒性強度會受到水域環境的物理及化學條件所影響。例如在酸性環境中，魚類對銅有較高之忍耐力 (Cusimano and Brakke, 1986)；當水的硬度較高時，銅對魚類的影響較小 (Reid and McDonald, 1988) 等，這些因子都會影響重金屬在魚體內的累積。

當魚類受到重金屬危害時會導致其生長受到抑制及生理的異常表現，另一方面，人類攝取長期暴露在亞致死濃度銅污染環境下的魚類，可能會由魚體內銅的累積之轉移，而影響人體之生理的平衡或是造成重金屬的中毒事件。此外在台灣的水產養殖業者常使用硫酸銅

除去藻類或治療魚病等，這些銅在水產養殖環境上可能也會造成嚴重的污染。因此截至目前探討有關銅對水產生物影響的研究很多，然而大部分是針對成魚的研究 (Taylor *et al.*, 1996, Nussey *et al.*, 1996, Svecevicus and Vosyliene 1996, Li *et al.*, 1998, Priya *et al.*, 1999, Perschbacher and Wurts 1999, Dethloff 1999, McGeer *et al.*, 2000)，其中也包括吳郭魚 (Dang *et al.*, 1999)。然而，仔魚對於重金屬毒之反應比成魚敏感，可利用作為污染之指標 (Westernhagen, 1988)，但在銅毒對仔魚生理與成長上的影響的探討較少，Wu *et al.* (2003) 發現硫酸銅會抑制吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*) 仔魚之成長與離子的平衡，而銅對吳郭魚稚魚則會抑制其鰓上之  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  之活性 (Ding and Wu, 2005)，但是這些研究所觀察的結果是以日為單位，對於 24 小時內的影響如何則不清楚。

當魚類面對銅的污染時，由於銅會阻礙鈉離子之吸收 (Lauren and McDonald, 1986)，也會

\*通訊作者：吳淑美(Su Mei Wu); Fax: 886-5-2717847; E-mail: sumei@mail.ncyu.edu.tw

影響鈣、鉀、氯離子之含量，同時也會使魚類之滲透壓失去平衡 (Wu *et al.*, 2003)。因此，在亞致死濃度的銅緊迫 (stress) 下，魚類可藉由內分泌或是生化反應來調整體內離子的濃度。此時魚類是處在一個修復與傷害 (repair-damage) 之間的調整，因而在低濃度短時間內會出現補償作用 (compensation) (McDonald and Wood 1993)，例如過去我們的研究已經發現當吳郭魚仔魚暴露在 50  $\mu\text{g/L}$  的銅水中，在 24 小時之後，其體內的鈉、鉀離子會有增加的現象，但到了 72~96 小時其處理組之離子濃度則顯著下降 (Wu *et al.*, 2003)。一般的實驗證據皆顯示，當魚類初期暴露在重金屬之環境中，若轉移到乾淨的環境下，就有機會使其組織修復並且恢復功能 (Cerqueira and Fernandes, 2002)。但是魚類若持續暴露在重金屬之下最後是否也能適應 (accumulation) 下來？由於上述之研究只觀察到 96 小時內之變化，因此無法得知。本研究的主要目的就是要探討亞致死濃度之銅暴露下之仔魚，從小時 (0~12 時) 到日 (1~11 日) 的時間內，其體內鈣及鈉離子變化，並配合其對死亡率和對成長之影響，判斷仔魚之適應。

## 材料與方法

### 實驗魚

吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*) 之種魚來自台南海水繁養殖中心，帶回後飼養在本系之溫室中，水溫控制在 26~28°C，光線控制 12 小時光 12 小時黑暗，每日投餵人工飼料一次，待母魚口孵後三日，取出發眼卵，以人工打氣方式使之孵化，並孵化後 24 小時內進行實驗。

### 銅水之配製

硫酸銅先以去離子水配成 1000  $\text{mg/L}$  之貯存液，實驗進行前才用曝氣過之自來水配成 100  $\mu\text{g/L}$  之銅水，各取 1L 分配在試驗燒杯中，並以原子吸收光譜儀 (AA, Z-8100, Hitch) 檢定確實濃度，實驗進行期間每日更新銅水，以確定浸泡濃度維持在 100  $\mu\text{g/L}$ 。

### 採樣方法

因為同一胎仔魚大約 120-150 個優良受精卵，因此取二胎仔魚進行實驗，而為了避免採樣造成仔魚之緊迫而影響實驗之結果，因此將一胎仔魚平均分在 10 個 1L 的燒杯中，分別在 0、1、3、5、7、12、24、48、96、120 小時採樣，另一胎則分配在 6 個燒杯，分別在 0、96、120、168、240、264 小時等不同之時間點採樣，採樣時仔魚先以去離子水反覆沖洗 5 分鐘後，再將每尾仔魚裝入 1.5 ml 之塑膠離心管中，秤體重後，放入 -20°C 的冰箱中儲存直到分析，每組樣品採樣 8-10 尾，此試驗並且重複三次。

### 仔魚體內離子含量之測定

將所有仔魚樣本秤重後放入烘箱，以 65°C 烘乾 48 小時後。加入 200  $\mu\text{l}$  分析級硝酸，再放回烘箱以 45°C 消化 24 小時。最後加入去離子水至總體積為 1 ml (硝酸濃度 20%)，經震盪均勻後即可測量。最後以原子吸收光譜儀 (AA, Z-8100, Hitch) 測定仔魚體內的鈣及鈉離子的濃度。

### 仔魚成長抑制之判斷

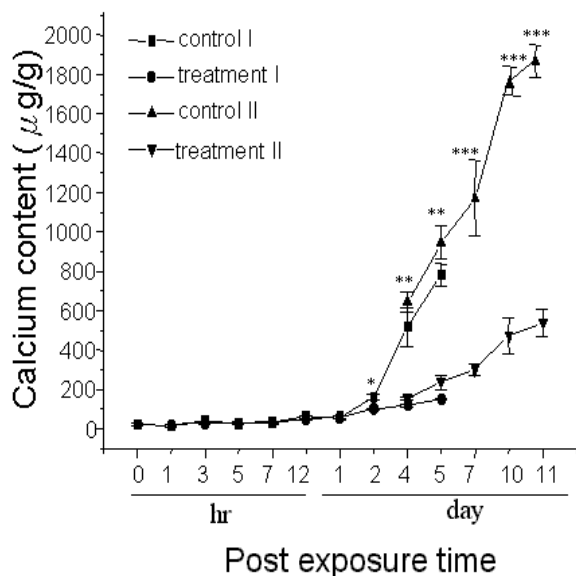
將對照組與處理組之仔魚，於 100  $\mu\text{g/L}$  之銅溶液浸泡 7 日後，在解剖顯微鏡下觀察卵黃大小並照相。

### 統計方法

使用 Microsoft Excel 之 t-測定 統計實驗所得的數據，計算不同濃度之實驗組與對照組相對應值，並以 Origin 繪圖。

## 結果

當仔魚暴露在 100  $\mu\text{g/L}$  銅中，短時間 (24 hr) 內處理組與對照組體內鈣離子含量無顯著之變動，然而在 48 小時之後開始呈現極顯著 ( $p < 0.001$ ) 之差異，處理組顯著低於對照組，但是兩組之鈣離子含量皆隨著成長有逐漸上升，直到第 11 日之銅暴露。觀察第 4、5、7、10、11 日之銅暴露後，在同一個成長期兩組之鈣含量差距愈來愈小，對照組的鈣含量變化分別是處理組的 4.2, 4.0, 3.9, 3.8 和 3.6 倍之差距 (圖一)。鈉離子濃度在 12 小時內處理組與對照組幾乎無差異，之後才顯出極顯著之差異性，到了銅暴露之第五日，處理組之鈉濃度隨著發育又出現上



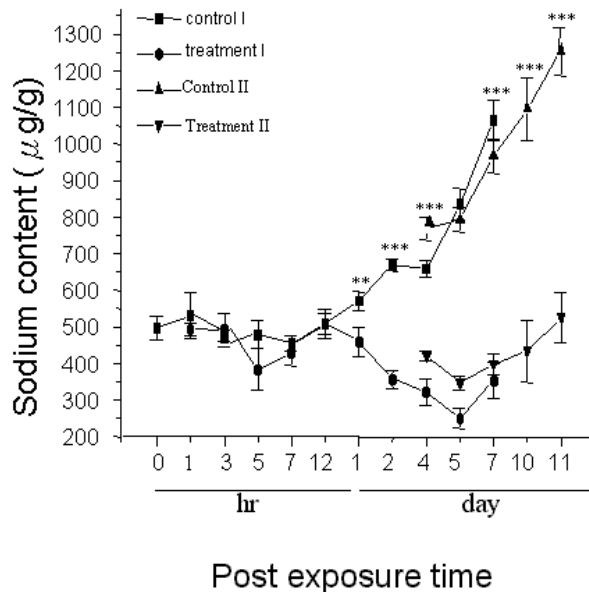
圖一、銅對吳郭魚仔魚鈣離子含量 (µg/g wet body weight) 之影響。孵化 1 日之仔魚暴露於 0 和 100 µg/L 的銅水後，體內鈣離子含量之時間序列變化，應用unpair- t-test之檢定，\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  ，表示對照組顯著高於處理組，圖內之I和II則代表不同次之實驗結果。

Figure 1. The changes of calcium content were detected following copper exposure time. Tilapia larvae were exposed to 0 (control) and 100 µg/L (treatment) copper for during hours to days. Statistic assay with student's t-test and \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  appeared a significant difference between treatment and control, I and II in the figure indicated the samples were collected from different test.

升之景況 (圖二)。當仔魚持續暴露在 100 µg/L 銅水中經過 11 日之觀察，同時發現其體內的鈣及鈉離子之降低幅度趨緩，鈉離子最後雖有回升但仍舊比對照組低，然而沒有死亡的現象產生。銅處理第七日後處理組卵黃直徑明顯的比對照組大，顯示其卵黃被吸收的程度較對照組低 (圖三)。

## 討論

從過去許多相關的研究可以看出，銅對於魚類生理之影響包括：離子平衡之干擾以及抑制離子的輸入。當虹鱒暴露在濃度 55 mg/g 的銅水中會抑制鈉離子 55% 之輸入 (Lauren and McDonald, 1987)；當持續暴露在銅水中，在 24 小時內會抑制其體內鈉離子的轉移和滲透，以及抑制魚類鉀離子及氯離子之吸收 (Priya et al., 1999)。McGeer 等人 (2000) 的研究中提出，



圖二、銅對吳郭魚仔魚鈉離子含量 (µg/g wet body weight) 之影響。孵化 1 日之仔魚暴露於 0 和 100 µg/L 的銅水後，體內鈉離子含量之時間序列變化。應用unpair- t-test之檢定，\*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  ，表示對照組顯著高於處理組，圖內之I和II則代表不同次之實驗結果。

Figure 2. The changes of sodium content were detected following copper exposure time. Tilapia larvae were exposed to 0 (control) and 100 µg/L (treatment) copper for during hours to days. Statistic assay with student's t-test and \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  appeared a significant difference between treatment and control, I and II in the figure indicated the samples were collected from different test.

若虹鱒長期暴露在亞致死濃度的銅水中，虹鱒的游泳速度明顯下降、鰓上的 $Na^+/K^+ ATP_{ase}$ 的活性會增加，其體內的鈣及鈉離子含量也因受到干擾而下降。然而這些報告大都侷限在成魚或是其他的水產生物的研究，至於在仔魚方面是否有相同的情形則並不清楚。因此本研究即針對吳郭魚仔魚暴露在銅水中，其體內鈣及鈉離子含量的變化來探討。

當魚類面臨環境緊迫時，會有三種現象產生。首先會出現“震盪”階段 (shock phase)；然後是一個回復階段 (recovery phase) 以調節體內離子濃度；最後魚類則會增加忍耐力 (tolerance) 以適應環境的壓迫 (McDonald and Wood, 1993)。目前已許多的研究結果也都有此種現象。McGeer 等人 (2000) 發現虹鱒體內的鈣及鈉離子受到干擾之後，其含量會明顯的下降，但是在二天後即會恢復與對照組相同的含量。Postlethwaite 和 McDonald (1995) 的研究



圖三、銅對吳郭魚仔魚成長之影響。孵化 1 日 (H1) 的吳郭魚仔魚暴露於 0 (a) 與 100 µg/L (b) 的銅水中 7 日後，觀察卵黃囊之大小 (箭頭所指之區域)，處理組明顯的比對照組大，表示銅會抑制仔魚之成長。

**Figure 3.** Morphology of tilapia larvae treated without (a) and with 100 µg/L copper (b) for 7 days. The size of yolk sac in treated larval was larger than that control was. The result exhibited that ambient copper should inhibit the growth of tilapia larvae.

也指出，當虹鱒受到重金屬緊迫時，在 7 小時之內鈉離子的輸入會減少 40%，而在 24 小時內則會回復與對照組相近。由於這些研究都是在成魚之觀察結果，成魚似乎比仔魚對重金屬有更大的耐受力，因此可以在數日內恢復，而吳郭魚仔魚暴露在 50 µg/L 銅中在 24 小時後，其體內的鈉、鉀離子會有增加的現象，但到了 72~96 小時其處理組之離子濃度仍顯著下降，而若暴露在 100 µg/L 銅中，離子不但沒有增加反而持續下降 (Wu *et al.*, 2003)。

過去的實驗紀錄顯示吳郭魚仔魚在硫酸銅暴露中的 96 小時的半致死濃度是 264 µg/L，因此本試驗選擇 100 µg/L 銅為暴露條件以了解亞致死濃度對仔魚之影響為何？從本研究的結果中可以發現，暴露在 100 µg/L 銅水中的仔魚在 12~24 小時內，其鈉及鈣離子濃度幾乎沒變

動，分別在 12 小時與 48 小時之後明顯下降，最後處理組與對照組之變化趨緩，在此過程中，魚體之成長雖然受到抑制但沒有死亡，並維持體內在低鈣 (hypocalcium) 及低鈉狀態 (hyposodium) 的狀態直第 11 日。所以我們推測在短時間內的鈣及鈉離子含量沒變動，是處在一種調整的階段的反應，然而到了銅處理之較長時間時，其鈣及鈉離子含量顯著下降，但其變化幅度趨緩，而且其含量皆隨著成長有逐漸增加，表示仔魚對亞致死濃度銅可達適應情況，固由此結果顯示 (1) 當吳郭魚仔魚受到銅之生理干擾時，在短時間之內其鈣及鈉離子含量不會有明顯之改變。(2) 長時間之亞致死濃度之銅暴露則會抑制吳郭魚仔魚體內鈣及鈉離子之含量，但是仔魚仍能適應。

## 誌謝

此計畫之完成感謝嘉義大學提供部分經費，感謝涂育真小姐和劉致宏先生飼養吳郭魚種魚，並提供仔魚作為本研究實驗材料，也感謝涂藝宣與張心怡小姐協助實驗的進行。

## 參考文獻

- Cerquerira CCC and Fernandes MN. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 52:83-91.
- Cusimano RF and Brakke DF. 1986. Effects of PH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:1497-1503.
- Ding HR and Wu SM. 2005. Effects of ambient copper on the activity of Na/K-ATPase of gill in tilapia juvenile (*Oreochromis mossambicus*). VII INDO-PACIFIC Fish conference, 16-21 May, Taipei Taiwan. P. 239.
- Dang ZC, Robert AC, Lock F, Gert ES and Wendelaar B. 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Amer. Physiol.* 277:320-331.
- Dethloff GM, Schlenk D, Jonathan TH and Bailey HC. 1999. Alteration in physiological

- parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 42:253-264.
- Lauren DJ and McDonald DG. 1986. Influence of water hardness, pH, and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 43:1488-1496.
- Lauren DJ and McDonald DG. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 44:99-104.
- Li JES, Quabius ES, Wendelaar Bonga SE, Flik G and Lock RAC. 1998. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aqua. Toxicol.* 43:1-11.
- McDonald D.G and Wood CM. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In Rankin JC and Jensen FB (eds), *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp. 297-321.
- McGeer JC, Szebedinszky C, McDonald DG and Wood CM. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Ion-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aqua. Toxicol.* 50: 231-243.
- Nussey G, Van Vuren JHJ and Du Preez HH. 1996. Acute toxicity tests of copper on juvenile Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae), at different temperatures. *South Africa J. Wildlife Res.* 26:47-55.
- Perschbacher PW and Wurts WA. 1999. Effects of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 172:275-280.
- Postlethwaite EK and McDonald DG. 1995. Mechanisms of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> regulation in freshwater adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *J. Exp. Biol.* 198:295-304.
- Priya K, Dinesh KPB, Ramesh M. and Manavalaramanujam R. 1999. Impact of copper sulphate toxicity on plasma electrolytes of a freshwater teleost fish, *Cyprinus carpio var communis*. *Indian J. Fish* 46:73-177.
- Reid SD and McDonald DG. 1988. pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45:244-253.
- Svecevicus G. and Vosyliene MZ. 1996. Acute toxicity of copper to common freshwater fishes of Lithuania. *Ekol. Ehol. Ecology* 2:17-21.
- Taylor EW, Beaumont MW, Butler PJ, Mair J and Mujallid MSI. 1996. Lethal and sublethal effects of copper upon fish: a role for ammonia toxicity. In Taylor EW. (eds). *Toxicology of aquatic pollution: physiological, cellular and molecular approaches*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 85-113.
- Westernhagen HV. 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In Hoar WS and Randall D. (eds), *Fish Physiology*, Vol. XI. The physiology of Developing Fish, Part A. Eggs and larvae. Academic Press, San Diego, pp. 253-346.
- Wu SM, Jong KJ and Kuo SY. 2003. Effects of copper sulfate on ion balance and growth in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:357-363.

## Exposure to Sublethal Concentrations of Copper Affecting Ion Balance in Tilapia Larvae (*Oreochromis mossambicus*)

Chian-Luen Hwang, Su Mei Wu\*  
Department of Biosciences, National Chiayi University  
Chiayi, Taiwan

(Received: 26 May 2005, accepted: 22 June 2005)

### ABSTRACT

Tilapia larvae (post-hatch, 1-day stage) were exposed with 0 (control) and 100 µg/L (treatment) for 11 days, and the whole body of the calcium and sodium content was detected after copper exposure at 0, 1, 3, 5, 7, 12 hr and 1, 2, 5, 7, 10, 11 days. The present data show it didn't undergo significant change during 0~12 hr and 0~48 hr of copper exposure for the sodium content and calcium content, respectively. The sodium content was significantly decreased to compare with the control group 12 hr after copper exposure. It was still lower on treatment than the control group. However, the range of the sodium content between treatment and control became narrower during 5~11 days of copper exposure. Besides, the range of the calcium content was smaller and smaller following the copper exposure time. No larvae died during this study, but both the Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> levels increased gradually following the larvae growth. According to these data, we suggest that the larvae acclimated in the hypo-sodium and hypo-calcium states, and even the growth rate of the larvae was inhibited by ambient copper.

**Key words:** tilapia larvae, copper, ions, stress