

日本鳗鲡幼体的耳石微化学分析及其环境指示元素筛选

郭弘艺, 张亚, 唐文乔*, 刘东, 张旭光, 吴嘉敏

(上海海洋大学鱼类研究室,上海市海洋动物系统分类与进化重点实验室,上海 201306)

摘要: 在长江口日本鳗鲡苗捕捞汛期,于长江靖江段采集日本鳗鲡幼体,采用同步辐射 X 射线荧光(XRF)定量分析方法测定了幼体矢耳石中 14 种元素的含量,分析了在海洋与淡水早期生活史阶段的微化学特征。结果显示,耳石中 Ca 和 Sr 为常量元素,Ba、Fe、Mn、Zn 的含量也为 1~10 $\mu\text{g/g}$,Cr、Ni、Se、Co、Cu、Au 则在 1 $\mu\text{g/g}$ 以下。Ni、Cu、Mn、Cr、Co、Zn 和 Sr 含量的稳定性较好,全部测量值的变异系数在 30% 以下;Se、Au 的含量低且极不稳定,变异系数达 40.8%~75.0%;Fe 在不同个体间存在显著的含量差异,但其他元素不存在个体差异。在海洋生活史阶段,Mn、Se、Co、Ba 为强富集元素($BCF_{a-e} > 1\ 000$),Sr、Fe、Zn、Ni、Cu 为中等富集元素(BCF_{a-e} 在 100~1 000)。除 Sr、Ba 和 Se 外,卵黄囊期和柳叶鳗期的耳石富集系数并无显著差异。在淡水生活史阶段,Sr 和 Co 为强富集元素($BCF_f > 1\ 000$),Se、Zn、Cu、Ba、Mn 为中等富集元素(BCF_f 在 100~1 000),Ni、Fe 为低富集元素(BCF_f 在 10~100)。与海水阶段相比,耳石在淡水阶段的 Fe、Ba、Mn、Se、Co、Ni 富集系数均大幅减小,而对 Sr、Zn、Cu 的富集能力有所增大。研究表明,耳石内的 Sr、Ba、Ni、Co 为环境强响应元素,Fe 和 Mn 为环境弱响应元素,Zn、Cu 和 Se 为环境负响应元素,幼鳗自海洋至淡水的迁徙过程中,前者存在明显的时滞效应,但后两者的日间含量波动较大,缺乏响应的规律性。研究表明,用作鱼类迁移行为或栖息地环境变化的指示元素,需要具备耳石富集效应强、时滞效应小、不同环境间含量差异大、稳定性好、且为非必需元素等特点,因此,只有 Sr 和 Ba 两种元素符合这些条件。

关键词: 日本鳗鲡; 矢耳石; 微化学; SRXRF 定量分析; 早期生活史; 长江口

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)是一种具有重要渔业价值的鱼类,也是一种具有复杂生活史的江海洄游鱼类。日本鳗鲡的产卵场位于菲律宾东部的马里亚纳(Mariana)海沟附近(14°N , $142^{\circ}\sim 143^{\circ}\text{E}$)^[1],伴随着数千公里的溯河索饵洄游,其生活史需要经历柳叶鳗、玻璃鳗、线鳗、黄体鳗和银色鳗等 5 个阶段。刚孵化的仔鱼称为柳叶鳗,随北赤道洋流和黑潮暖流漂流至中国、朝鲜、日本的大陆架,在沿岸变态成为玻璃鳗,并在河口水域变态成线鳗^[2]。线鳗进入河流后变态成黄体鳗,在淡水中生活 4~8 a,成为银色鳗后性即成熟。

鱼类耳石能吸收其所栖息的环境元素,元素

一旦被沉积就很难再被机体吸收,成为记录鱼类生活史足迹的元素指纹。因此,耳石的微化学分析可以重建鱼类的生活史历程或者揭示其特定生活史阶段所经历的水环境变化^[3-7]。已有的研究表明,洄游鱼类耳石中 Sr/Ca 比值可以反映其生活史处于淡水、半咸水和海水时期的生长环境,从而较为准确而直观地“回溯”生活史“履历”,“重建”其自然栖息环境^[3,8-9]。此外,耳石“指示元素”还涉及 Mg、Zn、Ba、Mn、Pb、Fe、Cu、Cd、Ni、S 等十几种元素^[10-13]。目前,对日本鳗鲡耳石 Sr/Ca 比值及其在生活史足迹构建中的应用已有一些报道^[14-21],也有较多的其他方面研究^[22-33],

收稿日期:2014-11-26 修回日期:2015-04-24

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201203065);国家自然科学基金(31472280);高等学校博士学科点专项科研基金(20123104110006);上海市农委科技攻关项目(2013-2-2)

通信作者:唐文乔,E-mail:wqtang@shou.edu.cn

但尚缺乏对早期生活史阶段耳石多元素分析及其在水环境指示中的应用报道。本实验采用先进的同步辐射 X 射线荧光分析 (SRXRF) 方法对日本鳗鲡幼体的耳石作了多元素分析,旨在研究其早期生活史阶段的耳石微化学特征,探明耳石元素对环境变化的响应,为筛选环境指示元素提供基础性资料。

1 材料与方法

1.1 标本采集及其发育阶段鉴定

2012 年 1 月 24 日、2 月 9 日、3 月 22 日和 4 月 19 日,在长江靖江段 (31°55'N, 120°09'E),分别从正在捕捞作业的“苏靖渔 11221”上采集 4 批鳗苗标本。同时对应采集水样用于水体背景值分析,固定方法同曹焯等^[11]。

鳗苗采集后立即放入装有冰块的双层封口保鲜袋内,带回实验室作发育时相分析。依据 Tesch 等^[33]对日本鳗鲡体表色素的评判标准,鉴定每尾鳗苗所处的色素发育期。其中 I~IV 期属于柳叶鳗, V_A~VI_{Aa} 期为玻璃鳗, VI_B 期为线鳗, VII 期为黄体鳗阶段。依据郭弘艺等^[27]日本鳗鲡日龄的描述和计数方法,制备矢耳石磨片并鉴定日龄。经鉴定,靖江段采集的日本鳗幼鱼均处于玻璃鳗阶段,随机选取 5 尾作为耳石微化学分析的样本 (表 1)。

表 1 玻璃鳗样本的色素发育期、日龄、全长、体质量和采样时间

Tab. 1 The pigmentation stages, daily age, total length, body weight and sampling date of Japanese glass eels collected in Jingjiang section of the Yangtze River

编号 sample code	采样时间 sampling date	色素发育期 pigmentation stages	日龄/d daily age	全长/mm total length	体质量/mg body weight
JJ-1	2012-1-24	VB ₂	167	59.73	134.5
JJ-2	2012-1-24	VA	145	59.73	126.2
JJ-3	2012-2-9	VA	160	59.46	131.1
JJ-4	2012-3-22	VIA ₀	162	56.53	122.2
JJ-5	2012-4-19	VIA ₀	160	57.26	123.0

1.2 耳石样品制备

统一选用左侧矢耳石作为耳石微化学分析材料。耳石经超声波去离子水清洗去污,干燥和环氧树脂包埋后,用 2 000 目砂纸打磨至耳石两侧核心均清晰可见为止,此时厚度约 100 μm。

随后用 8 000 目抛光液抛光,最后用超声波去离子水清洗干净,干燥后,保存在聚乙烯离心管中备用。

1.3 耳石元素的测定

在上海光源 (SSRF) 的硬 X 射线微聚焦线站 (BL15U1) 上,采用同步辐射 X 射线荧光定量分析 (SRXRF) 测定耳石元素的含量。将固定在靶架上的耳石磨片放入监控显微镜的视窗中 (图 1),在轮纹清晰部位,选取从耳石中心 (core, C) 至边缘 (edge, E) 的半径,以每点 3 μm 间隔进行线扫描,测试元素的组成和含量。为避免误差,每个耳石选取 3 条半径进行线扫描。扫描时,单点的测量时间为 100 s,样品放置位置与入射 X 射线的夹角为 45°,探测器水平方向与入射线夹角为 90°。测量介质为空气,入射 X 射线由波荡器产生,用 Si (111) 单色器选取 17.0 keV 的 X 射线,经 K-B 镜聚焦成 2.4 × 2.0 μm 光斑,用 Si 漂移单元探测器采集元素的特征 X 射线信号,用多道分析器记录。

采用 PyMca 软件分析数据,用美国国家标准局 (NIST) 的玻璃基痕量元素标样 (SRM 611) 进行标定,从而获得各测量点元素的绝对含量 (μg/g),精度为 0.1 μg/g,仪器测量及解谱累计误差为 15%。

1.4 早期发育时相的界定

耳石经 SRXRF 测定后,用 5% EDTA 处理,在 OLYMPUS BX-41 显微镜下,沿 SRXRF 扫描线,鉴定每尾样本的日龄。同时,根据我们前期的分析^[27],早期发育时相可与耳石的微结构特征相对应 (图 1): 卵黄囊期 (yolk-sac stage)——耳石核心至初次摄食轮; 柳叶鳗期 (leptocephalus stage)——初次摄食轮至变态轮起始; 柳叶鳗变态期 (metamorphosis stage)——变态轮起始至结束; 玻璃鳗期 (glass eel stage)——变态轮结束至耳石边缘。

选取卵黄囊期 (a)、柳叶鳗早期 (b)、柳叶鳗晚期 (c)、柳叶鳗变态早期 (d)、柳叶鳗变态晚期 (e) 和玻璃鳗期 (f) 等 6 个耳石对应区域,测定元素含量。每个测试点的元素含量由 3 条扫描线的均值构成,每个区域的对应日龄和测试点数见表 2。

1.5 水体元素背景值测定和富集系数计算

固定后的水样采用 PE5300DV 型电感耦合等

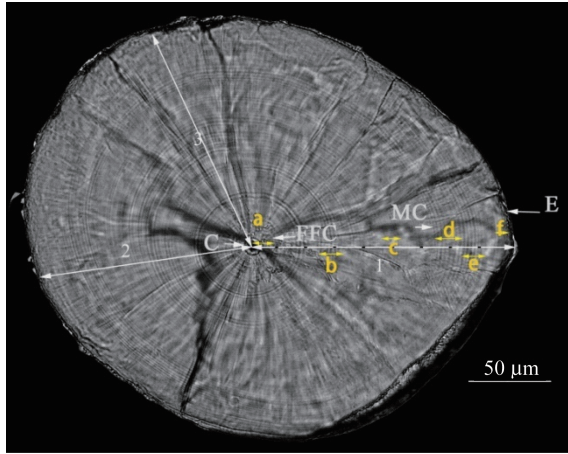


图 1 耳石微化学测量点取样示意图

C. 耳石核心; FFC. 初次摄食轮; MC. 变态起始轮; E. 耳石边缘; 1~3. 3 条扫描测试线; a~f. 早期生活史分析阶段

Fig. 1 Schematic diagram of analysis of otolith microchemistry

C. core; FFC. first feeding check; MC. metamorphosis check; E. otolith edge; 1 - 3. three scanning line; a - f. six early life phases on the scanning line

表 2 玻璃鳗早期发育时相对应的日龄和测试点数 (n)
Tab. 2 Scanning point number and corresponding daily age range of six early life phases.

编号 code	a	b	c	d	e	f
JJ1	0~5 (n=9)	20~30 (n=9)	50~60 (n=6)	99~109 (n=9)	113~123 (n=9)	157~167 (n=6)
JJ2	0~5 (n=9)	20~30 (n=9)	50~60 (n=6)	95~105 (n=6)	110~120 (n=9)	135~145 (n=6)
JJ3	0~5 (n=9)	20~30 (n=9)	50~60 (n=6)	90~100 (n=6)	100~110 (n=9)	150~160 (n=6)
JJ4	0~5 (n=9)	20~30 (n=9)	50~60 (n=6)	97~107 (n=6)	107~117 (n=9)	152~162 (n=6)
JJ5	0~5 (n=9)	20~30 (n=9)	50~60 (n=6)	100~110 (n=6)	110~120 (n=9)	150~160 (n=6)

离子光谱仪分析,以 4 次水样的测定均值作为长江靖江段的水体元素背景值,海洋元素含量引自文献[34-38](表 3)。

表 3 海水和长江下游水体中元素含量背景值

Tab. 3 The comparison of element mean concentrations in the seawater and freshwater

元素 element	Ca	Sr	Ba	Fe	Mn	Zn	Ni	Se	Co	Cu
* $M_{\text{海水}}$	400 000	8 080	5.76	18.1	0.41	8.2	3.0	0.08	0.048	1.17
$M_{\text{长江下游}}$	101 000	240	49	620	30	5.87	20	0.22	0.22	0.92

注: * 海水中 Ca 元素含量引自 Li^[34]; Sr、Ba、Se 元素含量分别引自 Nagaya 等^[35]、Esser 等^[36]和 Sugimur 等^[37]; Fe、Mn、Zn、Ni、Co 和 Cu 元素含量引自 Yabutani 等^[38]

Notes: * The element concentrations in the seawater were drawn from reference^[34-38]

将卵黄囊期(a)、柳叶鳗早期(b)、柳叶鳗晚期(c)、柳叶鳗变态早期(d)、柳叶鳗变态晚期(e)和玻璃鳗期(f)6个耳石对应区域的元素含量,分别除以海洋或靖江段水体的元素背景值,得到相应发育时相耳石的生物富集系数(bioconcentration factors, BCF)。

$$BCF = M_{\text{耳石}} / M_{\text{水体}} \times 1000 \quad (1)$$

式中, $M_{\text{耳石}}$ 为耳石中某元素的含量 ($\mu\text{g/g}$), $M_{\text{水体}}$ 为水体中该元素的含量 ($\mu\text{g/L}$)。

元素测量值变异系数 (coefficient of variation, CV) 的计算公式:

$$CV = S/M \times 100 \quad (2)$$

式中, M 为耳石线扫描全部测试点含量的均值 ($\mu\text{g/g}$); S 为全部测试点含量的标准差。

元素含量的差异性由 Kruskal-Wallis 分析检验。全部数据采用 Microsoft Excel 2007 软件和 SPSS 16.0 统计软件进行统计。

2 结果

2.1 耳石元素组成及其含量稳定性

由于 SRXRF 测试的介质为空气,原子序数在 19 以下的 Na、K 等元素,因其所激发的特征 X 射线可被空气吸收,不能作定量分析。分析测得玻璃鳗耳石中含有 Ca、Sr、Ba、Fe、Mn、Zn、Cr、Hg、Ni、Se、Co、Cu、Au、V 等 14 种元素,除 Hg 以外,其余 13 种元素的绝对含量可依据 SRM 611 标样进行标定。但由于个别测试点 V 的含量低于探测限 0.1 $\mu\text{g/g}$,故不纳入后续分析。

对 5 个矢耳石经 3 条线扫描测量,获得的 12 种元素的平均含量及其变异系数, Ca 的含量最高,平均为 $(262\ 880.0 \pm 21556.16) \mu\text{g/g}$; Sr 次之,平均为 $(2\ 330.51 \pm 684.41) \mu\text{g/g}$,这两种元素均属于生物学上的常量元素。其余 10 种元素的含量均很小,属于微量元素,含量从高至低依次

为 Ba、Fe、Mn、Zn、Cr、Ni、Se、Co、Cu、Au。其中, Ba、Fe、Mn、Zn 的平均含量在 1 ~ 10 $\mu\text{g/g}$, Cr、Ni、Se、Co、Cu、Au 在 0.1 ~ 1 $\mu\text{g/g}$ 。

全部测量点元素含量的变异系数从低至高依次为 Ca、Ni、Cu、Mn、Cr、Co、Zn、Sr、Fe、Ba、Au、Se。其中, Ca 的变异系数仅为 8.2%, 是矢耳石中最稳定的元素; Se 和 Au 的变异系数最大, 分别为 75.0% 和 55.9%; Ba 和 Fe 分别为 41.8% 和 40.8%; Ni、Cu、Mn、Cr、Co、Zn、Sr 等的变异系数接近, 在 19.3% ~ 30.1%。这表明, Ca 的含量不仅高而且很稳定, 而 Se 和 Au 的含量低且极不稳定(图 2)。

Kruskal-Wallis 差异性检验显示, 除 Fe 的含量存在显著性的个体差异以外($P=0.007 < 0.05$), 其余 Sr、Ba、Mn、Zn、Cr、Ni、Se、Co、Cu、Au 的含量均不存在显著性的个体差异性($P > 0.05$)。

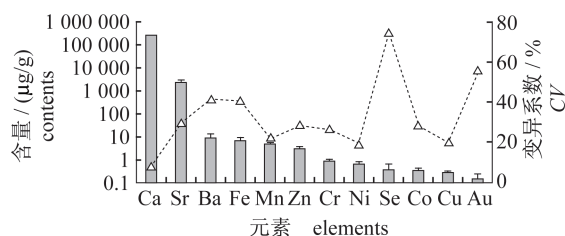


图 2 日本鳎鳃幼鱼耳石元素含量及变异系数

Tab.2 The otolith elements concentrations and coefficient of variation of *A. japonica* larval eels collected from Jingjiang section of the Yangtze River Estuary

2.2 耳石元素在各发育时相的含量变化及其富集效应

Kruskal-Wallis 检验显示, Fe、Mn、Zn、Cr、Cu、Au 平均含量在各发育时相均无显著差异($P > 0.05$), 而 Ca、Sr、Se、Ba、Co、Ni 平均含量则存在明显的差异($P < 0.05$)。Ca 在柳叶鳎变态起始期(d)之前一直保持稳定, 至柳叶鳎变态后期(e)开始增加, 直至玻璃鳎期(f)达到最高, 为 $(343\ 100.0 \pm 54\ 518.73) \mu\text{g/g}$, 是柳叶鳎期含量的 1.4 倍; Sr 在卵黄囊期(a)较低, 为 $(2\ 171.6 \pm 190.66) \mu\text{g/g}$, 柳叶鳎晚期(c)均值最大为 $(2\ 916.8 \pm 167.77) \mu\text{g/g}$, 变态开始后含量下降, 玻璃鳎期(f)降至最低为 $(1\ 086.9 \pm 378.33) \mu\text{g/g}$, 较柳叶鳎晚期降低了 62.7% (图 3)。

Se 与 Sr 的趋势一致, 表现为在卵黄囊期(a)

平均含量较低, 柳叶鳎期(b-c)逐步上升, 变态起始期(d)时达到最高或者保持较高含量, 变态后期(e)时则迅速下降, 至玻璃鳎期(f)降至最低; 而 Ba、Co、Ni 恰好相反, 表现为卵黄囊期(a)含量较高, 柳叶鳎期(b-c)较低, 变态时平均含量逐步增大, 至玻璃鳎期(f)增至最高。此外, 各元素在个体间的含量变化, 以柳叶鳎期(b-c)的标准差最小, 玻璃鳎期(f)的标准差最大。即表明在海洋生活史阶段, 耳石中各元素含量较为稳定, 而由长江口至靖江段迁徙过程中, 耳石中各元素含量波动较大(图 3)。

日本鳎早期生活史阶段耳石对海水中元素的富集强弱顺序: $\text{Mn} > \text{Co} > \text{Se} > \text{Ba} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Sr} > \text{Cu} > \text{Ni}$, 其中, Mn、Se、Co、Ba 为强富集元素($BCF_{a-e} > 1\ 000$), Sr、Fe、Zn、Ni、Cu 为中等富集元素(BCF_{a-e} 在 100 ~ 1 000)。除 Sr、Ba 和 Se 外, 各发育阶段(a-e)的耳石富集系数并无显著差异($P > 0.05$), 但卵黄囊期(a)耳石对 Ba、Fe、Mn、Zn、Ni、Co、Cu 的富集略强于柳叶鳎期(b-c), 变态期(d-e)耳石对 Ba、Mn、Ni 的富集也强于柳叶鳎期(b-c), 对 Sr、Fe、Zn 元素的富集减弱(表 4)。

耳石对淡水水体中元素的富集强弱顺序: $\text{Sr} > \text{Co} > \text{Se} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Ba} > \text{Mn} > \text{Ni} > \text{Fe}$, 其中, Sr 和 Co 为强富集元素($BCF_f > 1000$), Se、Zn、Cu、Ba、Mn 为中等富集元素(BCF_f 在 100 ~ 1 000), Ni、Fe 为低富集元素(BCF_f 在 10 ~ 100) (表 4)。与海水相比, 耳石对淡水中 Fe、Ba、Mn、Se、Co、Ni 的富集系数均大幅减弱, 而对 Sr、Zn、Cu 的富集有所增大。

2.4 耳石对环境元素的响应与时滞

相关性分析表明, 耳石各元素与柳叶鳎期(b-c)和玻璃鳎期(f)相应的生活史水体中, 对应的元素含量之间均存在线性正相关关系(图 4)。回归方程为柳叶鳎期: $\lg M_{\text{耳石}} = 0.733 \lg M_{\text{水体}} + 2.313$, ($R^2 = 0.819$), 玻璃鳎期: $\lg M_{\text{耳石}} = 0.729 \lg M_{\text{水体}} + 1.965$, ($R^2 = 0.622$)。由 R 值的大小比较可见, 柳叶鳎期耳石与水体诸元素的线性关系要明显好于玻璃鳎阶段, 不仅反映出海水的元素含量较淡水更为稳定, 同时也显示柳叶鳎期的生理状况也比刚进入河口的玻璃鳎期更稳定, 表明玻璃鳎在由海洋洄游到淡水的过程中正经历着一系列的生理适应过程。

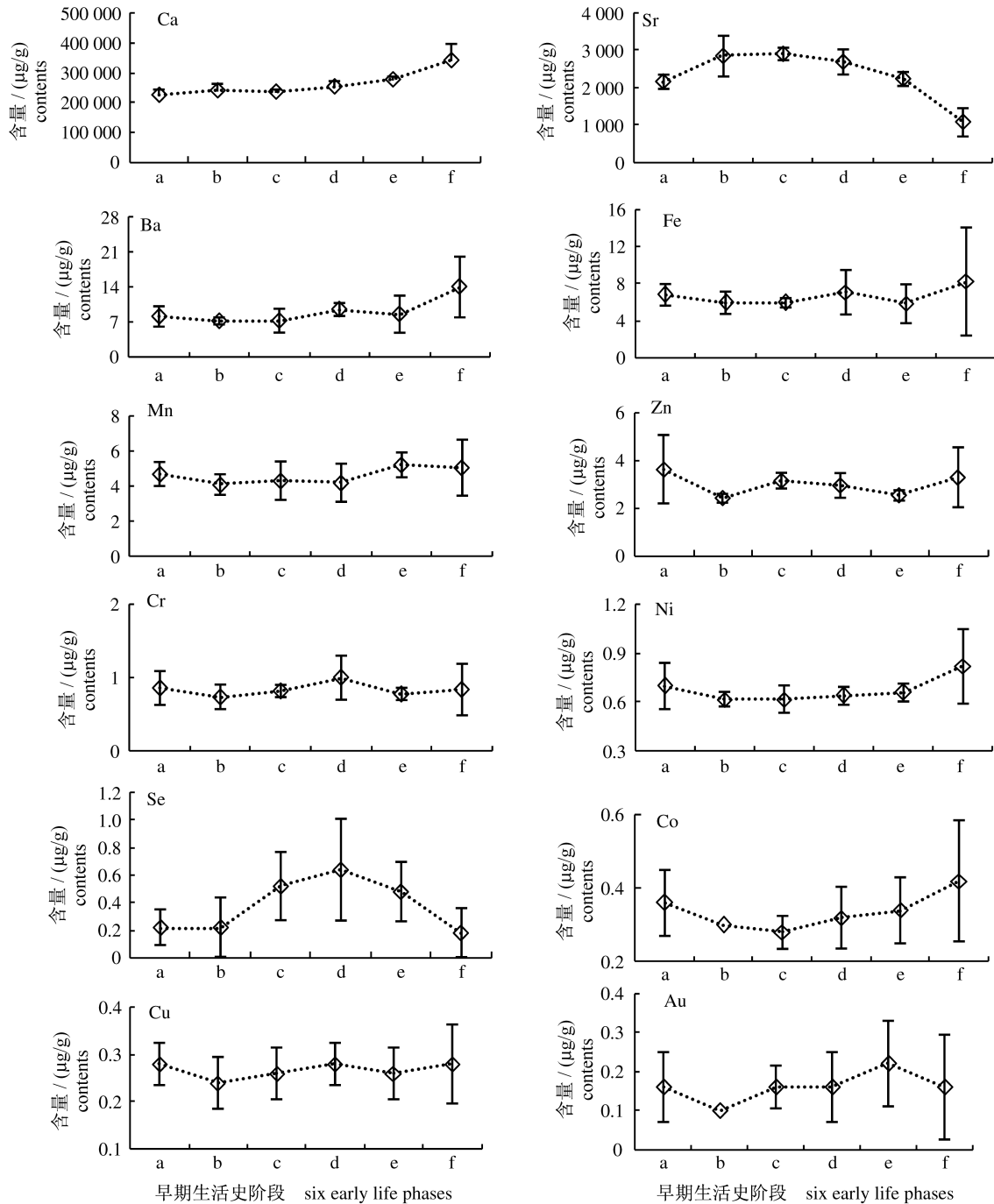


图3 日本鳗鲡幼体耳石内各元素在早期不同生活史阶段的含量比较

a:卵黄囊期; b:柳叶鳗早期; c:柳叶鳗晚期; d:柳叶鳗变态早期; e:柳叶鳗变态晚期; f:玻璃鳗期

Fig. 3 Comparison of sagittal otolith elemental concentrations in Japanese eel larvae six early life stages

a: yolk-sac stage; b: pre-leptocephalus stage; c: post-leptocephalus stage; d: pre-metamorphosis stage; e: post-metamorphosis stage; f: glass eel stage

比较显示, Sr、Zn、Cu 元素在海水中的平均含量大于淡水(比值 > 1), Ba、Fe、Mn、Ni、Co、Se 则相反(图 5)。而耳石中诸元素的平均含量, 仅 Sr 和 Se 为柳叶鳗期(b-c)高于玻璃鳗期(f), 其他元素均为玻璃鳗期高于柳叶鳗期。

根据柳叶鳗期(b-c)和玻璃鳗期(f)耳石元素含量及其相应生活水体中对应元素的比值(图 5), 可将耳石内元素分为 3 类。第 1 类为环境响应元素, 特征为 2 段生活史中耳石元素含量变化明显响应其生活水环境中相应元素的浓度梯度

表 4 日本鳗鲡早期生活史阶段耳石对水体中诸元素的富集系数

Fig. 4 Bioconcentration factors of elements in otolith from Japanese eel larvae early life stage

生活史 life stages	富集系数 bioconcentration factor	元素 element								
		Sr	Ba	Fe	Mn	Zn	Ni	Se	Co	Cu
海洋 ocean	BCF_a	268.8	1 406.3	375.7	11 463.4	439.0	233.3	2 500.0	8 333.3	256.4
	BCF_b	353.9	1 243.1	327.1	10 000.0	292.7	206.7	2 750.0	6 250.0	205.1
	BCF_c	361.0	1 253.5	327.1	10 536.6	382.9	206.7	6 500.0	5 833.3	222.2
	BCF_d	334.3	1 649.3	392.3	10 243.9	353.7	200.0	7 500.0	6 250.0	256.4
	BCF_e	278.0	1 475.7	320.4	12 682.9	304.9	233.3	6 250.0	6 250.0	256.4
	平均 mean		319.2	1 405.58	348.52	10 985.4	354.6	216.0	5 100.0	6 583.3
淡水 freshwater	BCF_f	4 528.8	285.7	13.2	170.0	562.2	40.0	909.1	1 818.2	326.1

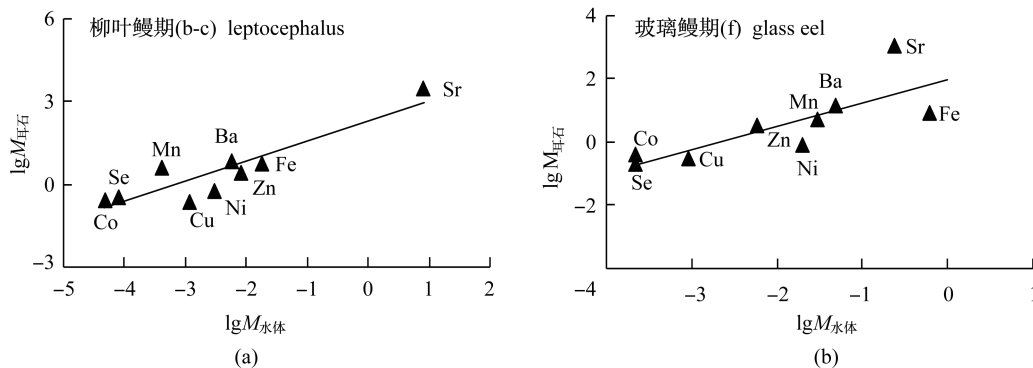


图 4 史柳叶鳗 (b - c) 和玻璃鳗期 (f) 生活水体-耳石中各元素平均含量对数值关系图

Fig. 4 Linear correlation diagram of elements in otolith and water corresponded to leptocephalus and glass eel life phases

变化,包括 Sr、Ba、Ni、Co。其中, Sr 在 2 段生活史水体和耳石中的差异均较大,海水中 Sr 含量是淡水中的 33.7 倍,耳石中柳叶鳗期 Sr 平均含量为玻璃鳗期的 2.7 倍; Ba、Co 和 Ni 在 2 段生活史水体中平均含量差异为 4.6 ~ 8.5 倍,耳石中差异达 1.3 ~ 1.9,这可作为迁徙的指示元素。

第 2 类为环境弱响应元素,特征为 2 段生活史中耳石元素含量变化微弱响应其生活水环境中相应元素的浓度变化,包括 Fe 和 Mn。表现为淡水中 2 元素含量分别为海水中 34.3 和 73.2 倍,但 2 段生活史耳石中 Fe 和 Mn 平均含量差异很小。

第 3 类为环境负响应元素,即 2 段生活史中耳石元素含量变化和其生活水环境中相应元素的浓度呈现反向变化,包括 Zn、Cu 和 Se 元素。其中, Zn 和 Cu 元素在海水中高于淡水 1.3 ~ 1.4

倍,但在耳石中的平均含量反而为淡水履历高于海水履历;而 Se 恰好相反,其在海水中的含量低于淡水,但在耳石内海洋履历含量为淡水履历的 1.9 倍。

耳石元素含量对环境履历的响应时间分析表明,自海洋至淡水履历,强环境响应元素存在明显的时滞效应。以 Sr 元素为代表的环境强响应元素分析显示(图 6),其含量从变态起始的(2 915.5 ± 449.41) μg/g,至变态完成点(图 6 箭头所指示点)的(2 244.7 ± 383.73) μg/g,最后降低至(1 053.9 ± 450.90) μg/g,前后降低了 63.9%。从变态起始直至被捕获,其含量呈持续平缓的下降趋势,而不是立即响应了其所栖息的水环境含量变化。环境弱响应元素(Fe、Mn)和负响应元素(Zn、Cu、Se)在耳石的日间含量波动较大,响应缺乏规律性。

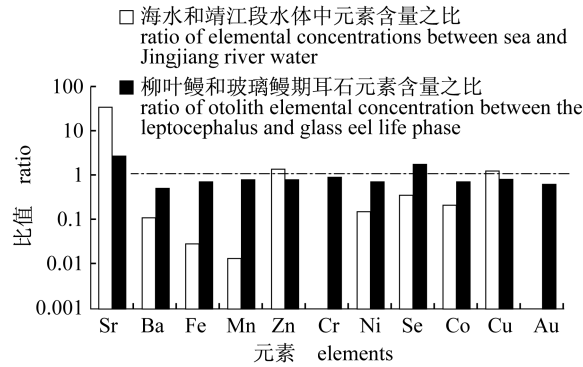


图5 日本鳗早期生活史柳叶鳗期和玻璃鳗期生活水体中与耳石中各元素之比
Fig. 5 Comparison of elemental concentrations in water and otolith between the leptocephalus and glass eel life phases

3 讨论

3.1 日本鳗鲡耳石对环境元素的响应

鱼类耳石中含有 30 多种元素,其中的 C、Ca、O 构成耳石的基质碳酸钙 (CaCO_3),其余大多为微量和痕量元素^[3]。耳石中元素主要来源于鱼类生活的水环境和食物,同时受发育阶段和生理因素等多方面影响,是一个复杂的生物地化过程 (biogeochemical process)。耳石的元素沉积包括 3 个环节:首先通过鳃和肠等将水体和食物中的元素吸收进入血液;接着通过血液细胞的转运,由血液进入内耳淋巴液;最终通过结晶作用将元素沉积在耳石中。但由于元素的性质不同,自水体达到耳石后,相对含量也出现差异。如耳石中 Sr/Ca 含量约为水体中含量的 50%,Ba/Ca 含量约为水体中含量的 25% 等^[3-4]。耳石的物相结构为文石(或球霏石),进入内耳淋巴液的元素可通过类质同象替换耳石 Ca^{2+} 离子,也可以晶格间隙占位以及与蛋白质分子多肽链相结合等途径沉积在耳石中^[3-4]。

本研究显示,日本鳗鲡早期生活史阶段耳石中 Ca 的含量最高,Sr、Ba、Fe、Mn、Zn 的含量在 $1 \mu\text{g/g}$ 以上,Cr、Ni、Se、Co、Cu、Au 在 $1 \mu\text{g/g}$ 以下。其中,各测量点 Ni、Cu、Mn、Cr、Co、Zn、Sr 含量的稳定性较好,变异系数在 30% 以下;但 Fe 元素含量在不同个体间即存在显著性差异 ($P = 0.007 < 0.05$)。由于元素本身的性质、机体的生理调节和外界环境等综合作用,可将耳石内的这些元素分为环境强响应 (Sr、Ba、Ni、Co)、环境弱响应 (Fe、Mn) 和环境负响应 (Zn、Cu、Se) 元素 3 类。

本研究也显示,幼鳗自海洋至淡水的迁徙过程中,环境弱响应元素和负响应元素的日间含量波动很大,缺乏规律性。但 Sr 等环境强响应元素含量,自柳叶鳗变态晚期(图 1 - e 区)直至玻璃鳗期(图 1 - f 区),一直呈平缓的下降趋势(图 6),显示出了明显的时滞效应。我们前期的研究已表明,长江口口门处九段沙采集的玻璃鳗平均日龄为 141 d,与上游靖江段采集的日本鳗幼体日龄相差 12 ~ 19 d,即从九段沙迁徙至上游的靖江段可能需要 15 d 左右^[39],但这一时段的 Sr 含量一直还在平缓的下降过程中。养殖实验也显示,幼鳗耳石内 Sr/Ca 比值对水体盐度变化的适应期为 10 d 或者以上^[40]。因此,日本鳗鲡幼体在海洋到淡水洄游的过程中,耳石内部分元素的含量变化并非立即被响应,而是存在着较长时间的时滞。也预示着环境强响应元素的含量,需要机体较长时间的生理调节,才能达到平衡状态。

3.2 耳石水环境指示元素的筛选

耳石伴随着鱼体生长的昼夜节律而出现日周轮,可以准确定时。同时由于耳石具有代谢惰性,元素一旦沉积就很难被机体吸收,可作为记录鱼类生活史的元素指纹。一些研究认为,条纹鲈 (*Morone saxatilis*) 耳石内的 Sr、Ba、Mn、Mg^[41],尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 耳石内的 Sr、Ba、Cu,大麻哈鱼 *Oncorhynchus keta* 耳石内的 Mg、Cr、Mn、Zn、Sr、Ba^[42],日本鳗鲡成体耳石内的 Ba、Sr、Cr、Mn^[43],鲤 (*Cyprinus carpio*) 耳石内的 Sr、Zn、As、Se、Fe、Co、Au、Ba、K、Na、Cr^[11],刀鲚 (*Coilia nasus*) 耳石内的 Sr、Ba^[10] 等元素含量变化,可用作指示栖息地环境的改变或鱼体本身的迁移行为。

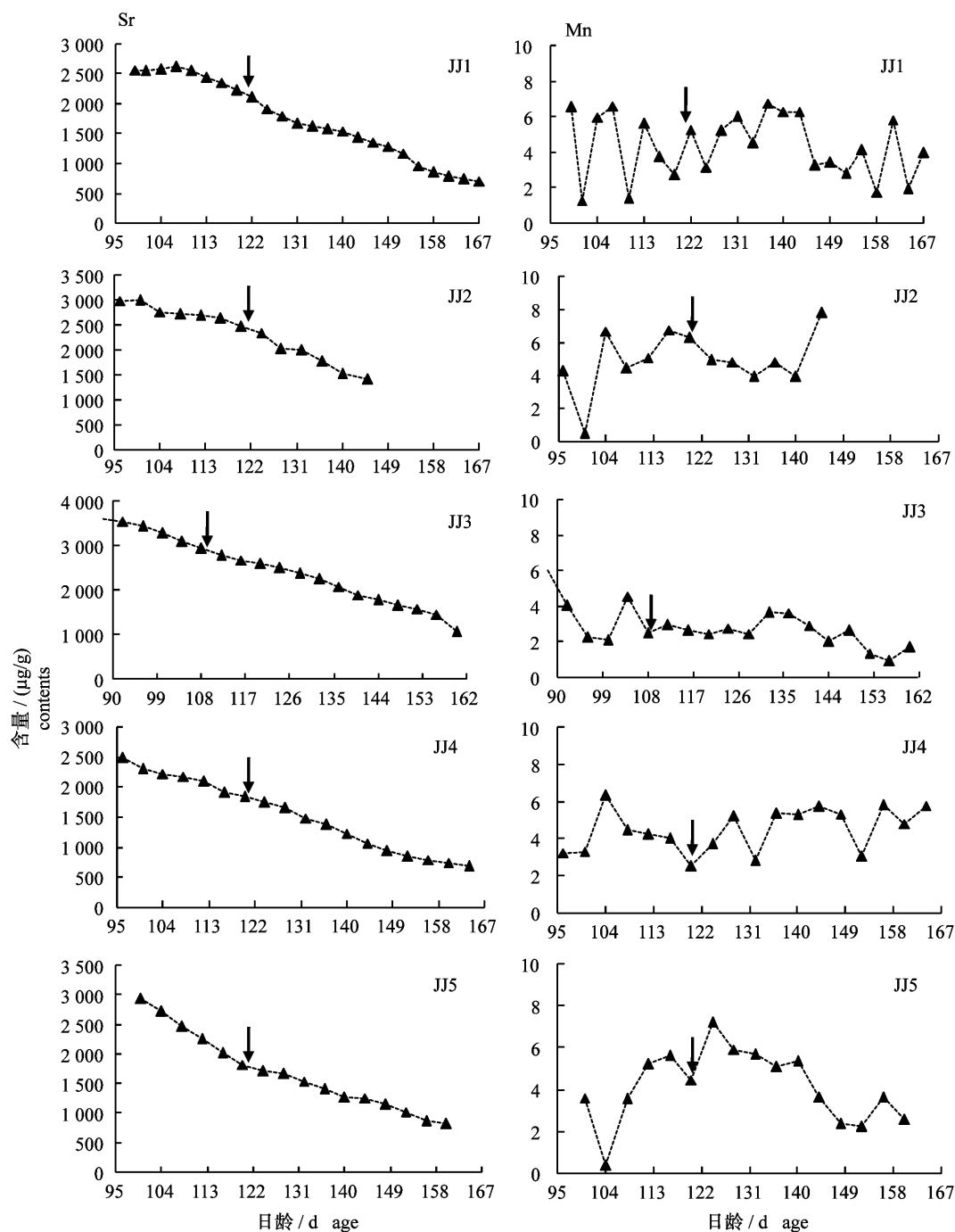


图6 柳叶鳗变态起始至耳石边缘的Sr和Mn元素含量变化

箭头指示柳叶鳗变态完成的位置

Fig. 6 Changes in Sr and Mn concentrations along life history transect from onset of metamorphosis to the edge in the sagittal otolith

Arrow indicates the end of leptocephalus metamorphosis.

但水环境中的金属元素除了被鳃、皮肤直接吸收外,还可通过食物进入鱼体,再经血液及内淋巴的输送,最后才沉积在耳石上。而有些金属元素还具有生理功能,在到达耳石之前可能已被其他组织所吸收。因此,研究元素在耳石与水环境

之间的含量关系,是开展耳石生物监测的基础。本研究显示,耳石中环境弱响应元素和负响应元素的含量无法体现其栖息水环境中的浓度变化,环境强响应元素也具有较长时间的时滞过程。鱼类耳石的元素分析,无法即时反映大多数水环境

元素的含量变化。

本实验认为,要用鱼类耳石元素分析指示鱼类的迁移行为或指示栖息地的环境变化,应该在具备①富集效应强、耳石中含量高;②不同水环境之间差异大、含量稳定性好;③非必需元素、生理作用影响小;④时滞效应小、及时性好;⑤耳石对元素的富集效应在不同发育时期或不同环境之间差异明显等特点的元素中去寻找。从本研究的结果看,耳石中 Sr、Ba 元素的含量虽具有一定的时滞效应,但由于含量较高而稳定,日间变化趋势明显,其含量及其与 Ca 的比值,可以较好地指示日本鳗鲡幼体的海洋和淡水履历,或作为栖息地水环境状况的指示元素,其他元素则均不适合作为栖息地变化或迁移行为的指示元素。

上海光源的和友研究员、张丽丽博士、张玲博士、王华博士、郑怡博士在 SRXRF 分析过程中给予热忱指导和帮助,特此致以真诚谢意!

参考文献:

- [1] Tsukamoto K. Oceanic biology: spawning of eels near a seamount [J]. Nature, 2006, 439 (7079): 929 - 929.
- [2] Tsukamoto K, Chow S, Otake T, et al. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific [J]. Nature Communications, 2011, 1174 (2): 179 - 187.
- [3] Campana S E. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications [J]. Marine Ecology Progress Series, 1999, 188: 263 - 297.
- [4] Campana S E, Thorrold S R. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2001, 58 (1): 30 - 38.
- [5] Fowler A J, Campana S E, Thorrold S R, et al. Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICPMS [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52 (7): 1431 - 1441.
- [6] Gillanders B. Using elemental chemistry of fish otoliths to determine connectivity between estuarine and coastal habitats [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2005, 64 (1): 47 - 57.
- [7] Thorrold S R, Shuttleworth S. In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2000, 57 (6): 1232 - 1242.
- [8] Jiang T, Zhou X Q, Liu H B, et al. Two microchemistry patterns in otoliths of *Coilia nasus* from Poyang Lake, China [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37 (2): 239 - 244. [姜涛, 周昕期, 刘洪波, 等. 鄱阳湖刀鲚耳石的两种微化学特征. 水产学报, 2013, 37 (2): 239 - 244.]
- [9] Xu G H, Gu R B, Liu H B, et al. Fluctuation of Sr/Ca in otoliths of *Coilia nasus* in the Yangtze River and the validation for the anadromous migratory history [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38 (7): 939 - 945. [徐钢春, 顾若波, 刘洪波, 等. 长江短颌鲚耳石 Sr/Ca 值变化特征及其江海洄游履历. 水产学报, 2014, 38 (7): 939 - 945.]
- [10] Dou S Z, Yu X, Cao L, et al. Multiple laser ablations on otolith nuclei for ICPMS to elementally fingerprint fish stocks: a case study [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 42 (6): 771 - 778. [窦硕增, 于鑫, 曹亮, 等. 基于多测点 LA-ICPMS 的耳石核区元素指纹分析技术及其在鱼类群体识别中的实证研究. 海洋与湖沼, 2012, 42 (6): 771 - 778.]
- [11] Cao Y, Li S R, Yang L F, et al. Micro-chemical characteristics of carp otoliths and their typomorphic significance in the evaluation of water quality in lakes and reservoirs— as exemplified by the Baiyangdian lake, Hebei province and the Miyun reservoir, Beijing [J]. Acta Mineralogica Sinica, 2009, 28 (4): 407 - 412. [曹焯, 李胜荣, 杨良锋, 等. 鱼耳石微化学特征在湖库水质评价中的标型意义——以河北白洋淀和北京密云水库野生鲤鱼为例. 矿物学报, 2009, 28 (4): 407 - 412.]
- [12] Edmonds J, Caputi N, Morita M. Stock discrimination by trace-element analysis of otoliths of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*), a deep-water marine teleost [J]. Marine and Freshwater Research, 1991, 42 (4): 383 - 389.
- [13] Gao Y, Feng Q, Ren D, et al. The relationship between trace elements in fish otoliths of wild carp and hydrochemical conditions [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2010, 36 (1): 91 - 100.
- [14] Cheng P, Tzeng W. Timing of metamorphosis and estuarine arrival across the dispersal range of the Japanese eel *Anguilla japonica*. [J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 131: 87 - 96.
- [15] Tsukamoto K, Arai T. Facultative catadromy of the

- eel Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats [J]. Marine ecology. Progress series, 2001, 220: 265 – 276.
- [16] Aoyama J. Life history and evolution of migration in catadromous eels (Genus *Anguilla*) [J]. Aqua-BioSci Monogr, 2009, 2 (1) : 1 – 42.
- [17] Kuroki M, Kawai M, Jónsson B, *et al.* Inshore migration and otolith microstructure/microchemistry of anguillid glass eels recruited to Iceland [J]. Environmental Biology of Fishes, 2008, 83 (3) : 309 – 325.
- [18] Otake T, Miller M J, Inagaki T, *et al.* Evidence for migration of metamorphosing larvae of *Anguilla japonica* in the Kuroshio [J]. Coastal Marine Science, 2006, 30 (2) : 453 – 458.
- [19] Kotake A, Arai T, Ozawa T, *et al.* Variation in migratory history of Japanese eels, *Anguilla japonica*, collected in coastal waters of the Amakusa Islands, Japan, inferred from otolith Sr/Ca ratios [J]. Marine Biology, 2003, 142 (5) : 849 – 854.
- [20] Kawakami Y, Mochioka N, Morishita K, *et al.* Determination of the freshwater mark in otoliths of Japanese eel elvers using microstructure and Sr/Ca ratios [J]. Environmental Biology of Fishes, 1998, 53 (4) : 421 – 427.
- [21] Guo H Y, Zheng Y, Tang W Q, *et al.* Behavioral migration diversity of the Yangtze River Japanese Eel, *Anguilla japonica*, based on otolith Sr/Ca ratios [J]. Zoological Research, 2011, 32 (4) : 442 – 450.
- [22] Guo H Y, Zhang Y, Tang W Q, *et al.* Pigmentation stages and body proportions of *Anguilla japonica* glass eels at the Yangtze River Estuary [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39 (1) : 197 – 202. [郭弘艺, 张亚, 唐文乔, 等. 长江口日本鳗鲡幼体色素发育时相及其体型变化. 水生生物学报, 2015, 39 (1) : 197 – 202.]
- [23] Zhi Y L, Hou J L, Zhang T, *et al.* Spatiotemporal distribution patterns of elver (*Anguilla japonica*) in the Yangtze River Estuary of China [J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32 (10) : 2750 – 2755. [智玉龙, 侯俊利, 张涛, 等. 长江口日本鳗鲡幼体时空分布特征. 生态学杂志, 2013, 32 (10) : 2750 – 2755.]
- [24] Gong X J, Li S F, Wang C H. Primary study on the genetic diversity of Japanese eel (*Anguilla japonica*) from the Yangtze River Estuary by RAPD analysis [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16 (3) : 201 – 206. [龚小玲, 李思发, 王成辉. 长江口日本鳗鲡群体遗传多样性 RAPD 初步分析. 上海水产大学学报, 2007, 16 (3) : 201 – 206.]
- [25] Chen Y Q, Jiang M, Han J D. A study on the temporal and spatial distributional features of juvenile *Anguilla japonica* and utilizing status of the resource in the Changjiang Estuary [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6 (5) : 37 – 40. [陈渊泉, 蒋玫, 韩金娣. 长江口鳗苗时空分布特征及资源利用现状研究. 中国水产科学, 1999, 6 (5) : 37 – 40.]
- [26] Li C H. Interrelationship among daily age, body length, birth date and sampling location at recruitment of *Anguilla japonica* elvers in the Chinese coast [J]. Acta Oceanologica Sinica, 1998, 20 (4) : 107 – 113. [李城华. 日本鳗鲡补充群体的日龄、全长、出生时间及耳石生长的变化. 海洋学报, 1998, 20 (4) : 107 – 113.]
- [27] Guo H Y, Wei K, Xie Z L, *et al.* Daily age and hatching time of Japanese eel elvers from southeast coastal estuaries of China [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35 (7) : 1050 – 1057. [郭弘艺, 魏凯, 谢正丽, 等. 中国东南沿海日本鳗鲡幼体的日龄及其孵化时间. 水产学报, 2011, 35 (7) : 1050 – 1057.]
- [28] Xie Y H, Li B, Fu L J, *et al.* Population structure of *Anguilla japonica* elvers from the estuaries of Chinese coast [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4 (5) : 34 – 39. [解玉浩, 李勃, 富丽静, 等. 中国沿海河口地区鳗苗群体结构的研究. 中国水产科学, 1997, 4 (5) : 34 – 39.]
- [29] Li C H. Research on larval otolith microstructure of Japanese eel [J]. Chinese Science Bulletin, 1995, 40 (14) : 1326 – 1328. [李城华. 日本鳗鲡早期阶段耳石显微结构的研究 [J]. 科学通报, 1995, 40 (14) : 1326 – 1328.]
- [30] Guang W B, Ting H T, Xuan F J, *et al.* Environmental effects on upstream migration of glass eels (*Anguilla japonica*) in Yangtze Estuary [J]. Marine Science Bulletin, 2009, 28 (2) : 65 – 70. [管卫兵, 丁华腾, 宣富君, 等. 长江口环境条件对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 鳗苗溯河洄游的影响. 海洋通报, 2009, 28 (2) : 65 – 70.]
- [31] Guo H Y, Wei K, Tang W Q, *et al.* Developmental stages and migratory routes of larvae Japanese eel from southeast coastal estuaries of China [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36 (12) : 1793 – 1801. [郭弘艺, 魏凯, 唐文乔, 等. 中国东南沿海日本鳗鲡幼体的发育时相及其迁徙路径分析. 水产学报, 2012, 36 (12) : 1793 – 1801.]
- [32] Yoshinaga T, Aoyama J, Shinoda A, *et al.*

- Occurrence and biological characteristics of glass eels of the Japanese eel *Anguilla japonica* at the Cagayan River of Luzon Island, Philippines in 2009 [J]. *Zoological Studies*, 2014, 53 : 1 - 6.
- [33] Tesch F W, White R J. The eel [M]. London: Blackwell Publishing, 2008.
- [34] Li Y H. Material exchange between the East China Sea and the Kuroshio Current [J]. *Terrestrial, Atmospheric and Oceanic Sciences*, 1994, 5 (4) : 625 - 631.
- [35] Nagaya Y, Nakamura K, Saiki M. Strontium concentrations and strontium-chlorinity ratios in sea water of the North Pacific and the adjacent seas of Japan [J]. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 1971, 27 (1) : 20 - 26.
- [36] Esser B K, Volpe A M. At-sea high-resolution chemical mapping: extreme barium depletion in North Pacific surface water [J]. *Marine Chemistry*, 2002, 79 (2) : 67 - 79.
- [37] Sugimura Y, Suzuki Y, Miyake Y. The content of selenium and its chemical form in sea water [J]. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 1976, 32 (5) : 235 - 241.
- [38] Yabutani T, Mouri F, Itoh A, *et al.* Multielement monitoring for dissolved and acid-soluble concentrations of trace metals in surface seawater along the ferry track between Osaka and Okinawa as investigated by ICP-MS [J]. *Analytical sciences*, 2001, 17 (3) : 399 - 405.
- [39] Zhang Y. Study on pigmentation developmental stages and morphological characteristics and otolith microchemistry of Japanese eels larvae, *Anguilla japonica*, collected in Yangtze River estuary [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [张亚. 长江口日本鳗鲡幼体的发育时相、形态特征和耳石化学研究. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [40] Yokouchi K, Fukuda N, Shirai K, *et al.* Time lag of the response on the otolith strontium/calcium ratios of the Japanese eel, *Anguilla japonica* to changes in strontium/calcium ratios of ambient water [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2011, 92 (4) : 469 - 478.
- [41] Mohan J A, Rulifson R A, Corbett D R, *et al.* Validation of oligohaline elemental otolith signatures of striped bass by use of *in situ* caging experiments and water chemistry [J]. *Marine and Coastal Fisheries*, 2012, 4 (1) : 57 - 70.
- [42] Arai T, Hirata T. Determination of trace elements in otoliths of chum salmon *Oncorhynchus keta* by laser ablation-ICP-mass spectrometry [J]. *Fisheries Science*, 2006, 72 (5) : 977 - 984.
- [43] Arai T, Hirata T. Differences in the trace element deposition in otoliths between marine-and freshwater-resident Japanese eels, *Anguilla japonica*, as determined by laser ablation ICPMS [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2006, 75 (2) : 173 - 182.

Analysis of otolith microchemistry and screening of environmental indicator elements in early life history of Japanese eels (*Anguilla japonica*)

GUO Hongyi, ZHANG Ya, TANG Wenqiao*, LIU Dong, ZHANG Xuguang, WU Jiamin
(Laboratory of Fishes, Shanghai Key Laboratory of Marine Animal System evolution and Classification,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Japanese eel (*Anguilla japonica*) larvae were collected from the Jingjiang Section in the lower reaches of the Yangtze River from January to April of 2012. The concentrations of fourteen elements were measured using synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXRF) to analyze the characteristics of otolith microchemistry in early life phase of the eels in ocean and freshwater. The results showed that Ca and Sr were macroelements in otolith. The contents of other elements ranged from 1 to 10 $\mu\text{g/g}$ (such as Sr, Ba, Fe, Mn and Zn), or were below 1 $\mu\text{g/g}$ (such as Cr, Ni, Se, Co, Cu and Au). Ni, Cu, Mn, Cr, Co, Zn and Sr were relatively stable in content and the coefficients of variation (CV) were less than 30%. While Se, Au, Ba and Fe were low and extremely unstable (CV = 40.8% - 75.0%). Kruskal-Wallis analysis indicated that the content of Fe significantly varied among individuals ($P = 0.007 < 0.05$). For eels in seawater life stage, Mn, Se, Co and Ba were highly enriched, and BCF_f was higher than 1 000; whilst Sr, Fe, Zn, Ni and Cu were moderately enriched ($100 < BCF_{a-e} < 1 000$). Except for Sr, Ba and Se, there were no significant differences in enrichment coefficients of otolith between yolk sac phase and leptocephalus life phases ($P > 0.05$). For eels in freshwater life stage, Sr and Co were highly enriched ($BCF_f > 1 000$), while Se, Zn, Cu, Ba and Mn were moderately enriched, under which circumstance, BCF_f ranged from 100 to 1 000. In addition, Ni and Fe were slightly enriched ($10 < BCF_{a-e} < 100$). Compared with seawater life stage, the enrichment of Fe, Ba, Mn, Se, Co and Ni in otolith drastically decreased in freshwater. These results indicate that Sr, Ba, Ni and Co are highly responsive to environmental conditions, while Fe and Mn are rarely responsive, and Zn, Cu and Se are negatively responsive. Because environmental high response elements required time lag to pass through physiological barriers before being incorporated into otoliths during migration from seawater to freshwater and because the contents of environmental weak response and negative response elements fluctuated greatly and lacked regular rules to respond to environmental conditions changes, we propose that the following characteristics could be used as the element indicator to reflect fish's migratory behaviors or monitor environmental hydrochemistry: high enrichments in otoliths, weak time-lag responsive to environmental changes, high concentration gradient between different water environment, stability of content and non-essentials and so on. Obviously, Sr and Ba conform to these conditions and could be used as the indicator elements.

Key words: *Anguilla japonica*; sagitta; microchemistry; synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis; early life history; Yangtze River Estuary

Corresponding author: TANG Wenqiao. E-mail: wqtang@shou.edu.cn