

文章编号: 1000-3851(2008)06-0118-05

人工控制水化学条件下培养的鲤鱼耳石 微观形貌的 SEM 观察

高永华, 冯庆玲*, 李 卓, 金哲辉

(清华大学 材料科学与工程系, 先进材料教育部重点实验室, 北京 100084)

摘 要: 鱼耳石是一种典型的由碳酸钙和有机质构成的天然生物材料。为了查明其微观形貌特征, 作者对实验室不同水介质条件下养殖鲤鱼的未经处理、经过碱洗和 Na_2EDTA 处理及经过打磨后再经碱洗和 Na_2EDTA 处理的耳石样品分别进行了 SEM 观察。结果表明, 组成微耳石的文石呈六边形或假六边形有规则排布成板片状或者柱状; 星耳石则由球状或豆状的球文石晶体组成。对耳石进行打磨抛光再利用 NaOH 和 Na_2EDTA 处理表面后, 不仅可以更加清晰地观察到耳石的晶体形态, 还能够较清楚地分辨其日轮, 日轮宽度约为 $2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m}$ 。不同水化学条件下耳石的晶体微形貌特征差异并不大, 初步推断, 水体中的元素含量差异对耳石晶体形态的影响并不显著。

关键词: 鱼耳石; 微观形貌; 日轮; SEM; 水化学

中图分类号: O741⁺² **文献标志码:** A

SEM observation of carp otolith raised under controlled water conditions

GAO Yonghua, FENG Qingling*, LI Zhuo, JIN Zhehui

(Laboratory of Advanced Materials, Department of Materials Science and Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Otolith is a typical biomaterial which is composed of calcium carbonate and organic matrix. In order to study the micro-morphology of otolith, SEM observation was taken under different water conditions and of several treatment method otoliths. The otolith samples included fresh otoliths, alkali treated otoliths, Na_2EDTA treated otolith, and sliced otoliths under alkali and Na_2EDTA treatment. The result shows the lapillus is composed of hexagon or sham-hexagon aragonite which formed sheet or cylindrical structure, while asteriscus is composed of ball or bean-shaped vaterite crystal. The polished otolith which was dealt with NaOH and Na_2EDTA can be distinguished as the crystal structure. The width of the daily increment is $2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m}$. The crystal structure of otoliths in different conditions show little difference, and as could be preliminarily inferred, the element content in water makes little effects on the crystal structure of otolith.

Keywords: otolith; micro-morphology; daily increment; SEM; hydrochemistry

生物矿化作用是自然界广泛发生的一种作用, 与地质上的矿化作用明显不同的是无机相的结晶严格受生物分泌的有机质的控制^[1]。生物矿化往往能形成有序排列的、结构非常优异的天然有机-无机复合材料。鱼耳石就是这样一种典型的天然生物材料, 它是鱼体内的一种重要的以碳酸钙晶体为主要无机成分的高度矿化的生物矿物, 由约 96 wt% 的碳酸钙、3 wt% 的蛋白质和约 1 wt% 的微量元素组成。作为鱼类平衡和听力的主要器官, 鱼耳石具有

很独特的晶型构成。硬骨鱼内耳中共有微耳石(Lappillae)、矢耳石(Sagittae)和星耳石(Asteriscacae)各一对。鱼耳石发育有明显的年轮、季轮和日轮, 为每年、每季和每天鱼类个体自然生长和年龄的记录^[2]。耳石日生长轮由增长带和间歇带组成, 前者宽而透明, 主要成分是碳酸钙; 后者窄且不透明, 主要成分为有机质^[3]。目前, 对于鱼耳石研究还限于对鱼类的生命过程研究, 对于鱼耳石的矿物学研究很少。

收稿日期: 2008-03-25; 收修改稿日期: 2008-05-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2007CB815604); 国家自然科学基金(50672052)

通讯作者: 冯庆玲, 教授, 研究方向为生物材料 E-mail: biomater@mail.tsinghua.edu.cn

作者前期曾开展了对几个不同水域中野生鲤鱼耳石的成因矿物学研究,从北京密云水库和黑龙江连环湖两水域的鲤鱼耳石中分别识别出粒文石和柱文石 2 种自组装微晶体类型,初步查明 2 种纳米级文石形态差异可能与水域的平均温度有关。同时初步查明耳石对多数水体中的微量元素有强烈的富集作用,鱼耳石中的部分元素与它所生长的水体中的元素浓度存在着较好的相关性,与水域化学(污染或非污染)有较明显的耦合关系^[4]。

鉴于此,作者进一步开展了实验室中的人工控制水化学条件的鲤鱼养殖实验,目的是更加细致地研究耳石矿化过程的生物大分子调控作用机制和生物大分子与水环境的协同作用,分析水环境和生物大分子对耳石自组装结构的贡献,确定水介质中的元素含量差异对耳石的矿物形态有无影响。之前尽管很多学者相继开展了对耳石日轮生长、耳石大小与鱼体大小的关系等诸多方面的研究,但是对耳石矿物的显微形貌的研究报道却十分鲜见。

本文中利用扫描电子显微镜(SEM)对实验室中人工控制水化学条件的鲤鱼耳石的显微结构特征进行观察,并对其特征进行了初步讨论。

1 实验

1.1 样品准备

在实验室中准备 6 个水槽,其中 4 个水槽分别加入一定浓度含有毒重金属 Pb、Cr、Cd、Hg 等元素的水介质,而另 2 个水槽为正常水介质。除了 Pb、Cr、Cd、Hg 的浓度不同外,其他养殖条件如光照、温度、投饵时间、饵料种类、投饵量均完全一致。在这 6 个水槽中对取自北京锦鲤养殖基地的锦鲤仔鱼进行为期 3 个月的培养。

未处理:在鲤鱼内耳囊中取出星耳石和微耳石各 1 对(矢耳石样品十分细小,很难采样),在超声波水盆中用乙醇清洗 15 min、浸泡 24 h,然后自然风干。

磨片处理:将按上述方法清洗好的样品依次用 500[#]、800[#]、1000[#] 和 2000[#] 的砂纸在自动磨样机上进行打磨,至中心核刚好出现,此过程配合光学显微镜进行,以免打磨不够或打磨过度。

碱洗和 Na₂EDTA 处理:将用于耳石表面形貌观察的样品置于直径 5 cm 的 200 mL 的玻璃烧杯中,注入少量质量分数为 4% 的 NaOH 溶液(没过耳石即可),2 min 后用镊子轻轻取出样品,在去离

子水中清洗 2 遍,另用一镊子夹取少许脱脂棉,蘸取 1 g/15 mL 的 Na₂EDTA 溶液,在所观察的样品表面擦拭 6 次。腐蚀后的耳石样品取出后,马上用去离子水再冲洗 2 遍,然后在乙醇中浸润清洗,空气中晾干。

1.2 仪器

SEM 观察采用清华大学物理系的 LEO-1530 型热场发射扫描电镜,仪器的技术指标为电镜分辨率:1 nm(20 kV);衍射分析系统:取向分辨率 $\geq 1^\circ$;晶体尺寸分辨率 $\geq 0.1 \mu\text{m}$ 。

2 SEM 表征结果

2.1 未经处理的耳石微形貌特征

将未处理的微耳石和星耳石用导电胶粘在金属载样台上,凹面向上,真空喷碳,置于扫描电镜下观察。观察结果显示,组成微耳石的文石呈六边形或假六边形有规则排布成板片状或者柱状,晶体间胶结有少量有机质,晶体粒径大小为 $0.5 \mu\text{m} \sim 3 \mu\text{m}$ 。未经处理的微耳石样品的扫描电镜照片观察不到耳石的轮纹(图 1),不同水介质条件下生长的鲤鱼微耳石的矿物形态差别不大。

星耳石不象微耳石可以明显地在 SEM 下观察到晶体形态。星耳石由排列非常紧密的球状或豆状球文石晶体组成,球文石晶体颗粒较小,粒径大约为 100 nm(图 2),晶体间胶结有少量有机质。未经处理的星耳石样品的扫描电镜照片同样观察不到耳石的日轮,不同水介质条件下生长的鲤鱼星耳石的矿物形态差别也不大。

2.2 经过处理的耳石微形貌特征

由于未经处理的星耳石在扫描电镜下微观形态并不清楚,因此将星耳石进行碱洗和 Na₂EDTA 处理后(NaOH 用以去除蛋白质,Na₂EDTA 用以腐蚀晶界,处理方法见“实验部分”)再置于扫描电镜下观察。图 3 为经过处理的星耳石样品扫描电镜照片,可以看出,经过处理的星耳石样品较之未处理的表面形貌更加清晰,晶界更加明显,相比于未经过处理的耳石的表面,耳石样品表面还可见一些裂痕,这可能是碱洗导致的蛋白质缩张的结果。

2.3 耳石轮纹的观察

为了能够观察到微耳石和星耳石的日轮,将磨制后的耳石分别用碱洗和 Na₂EDTA 处理后(处理方法见“实验部分”),将磨制面向上置于扫描电子显微镜下观察。图 4 为经过弱碱蚀刻和 Na₂-EDTA

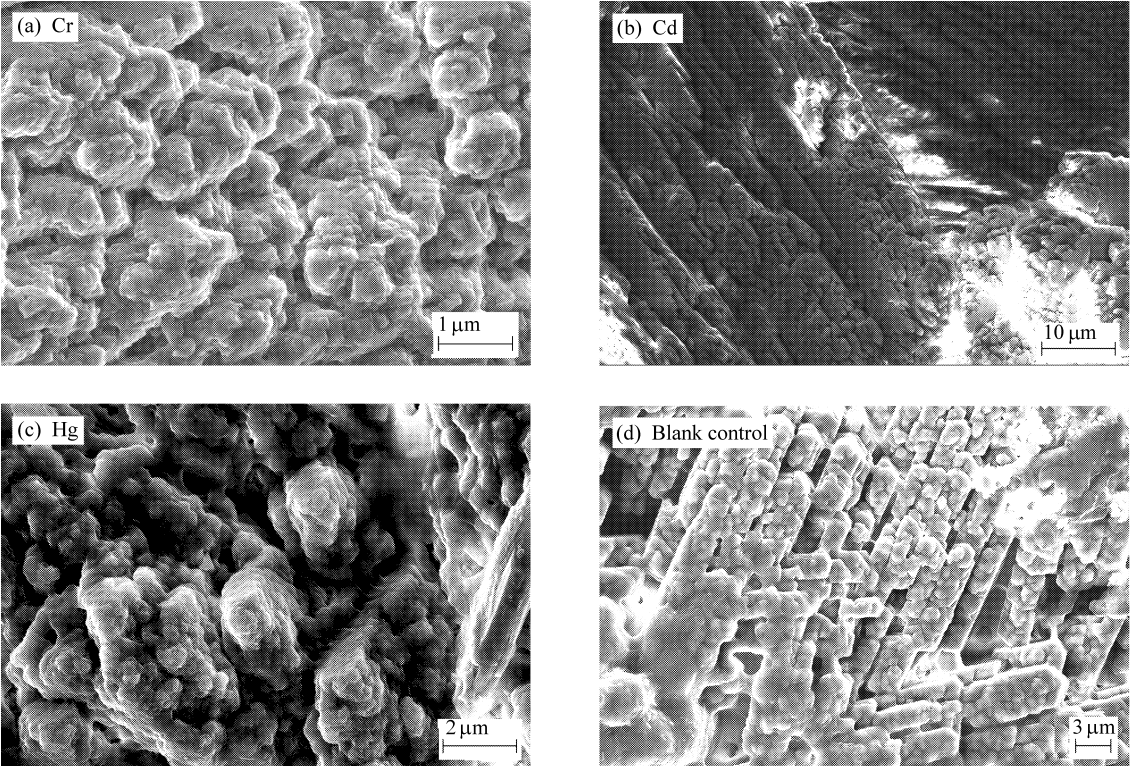


图 1 未处理的微耳石样品的 SEM 照片
Fig. 1 SEM images of the fresh lapillus

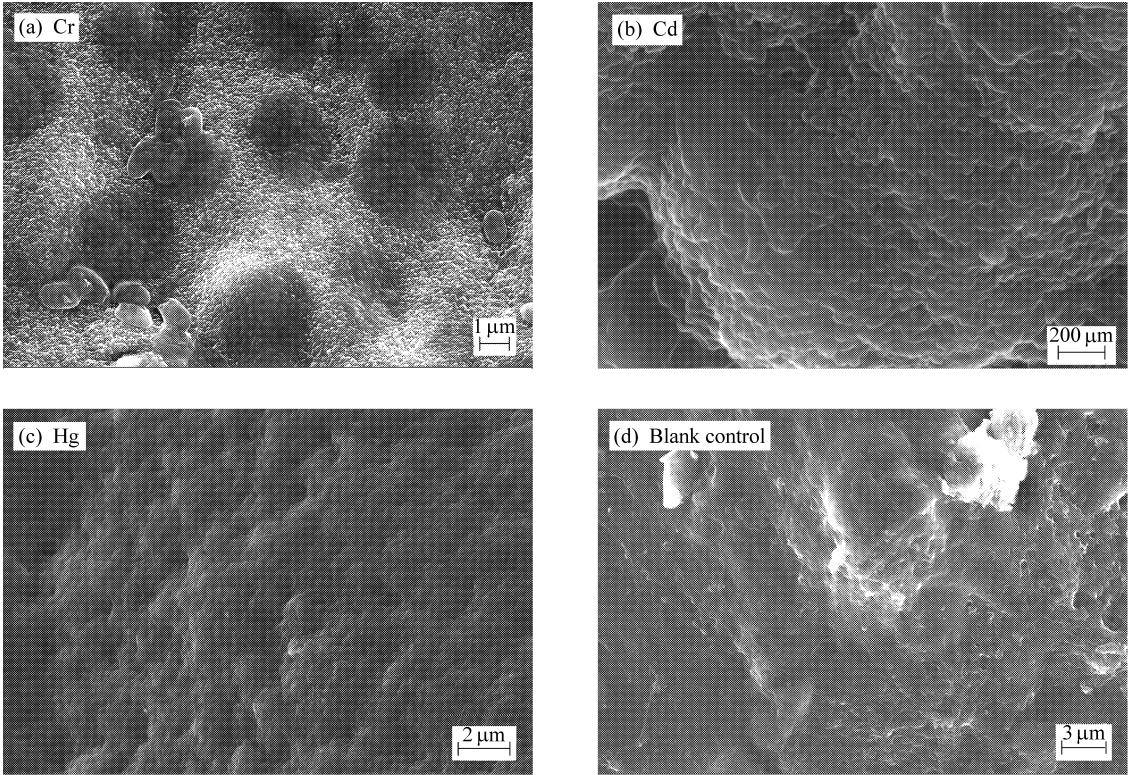


图 2 未处理的星耳石样品的 SEM 照片
Fig. 2 SEM images of the fresh asteriscus

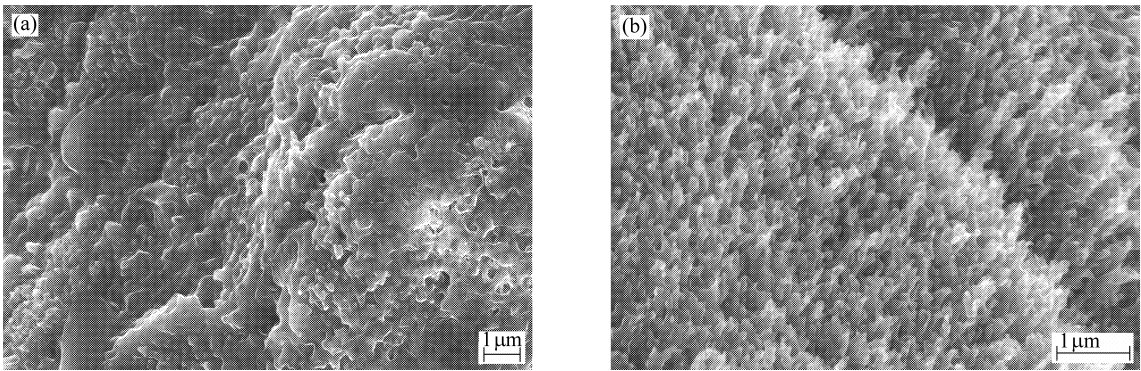


图 3 经过处理的星耳石样品的 SEM 照片
Fig. 3 SEM images of treated asteriscus

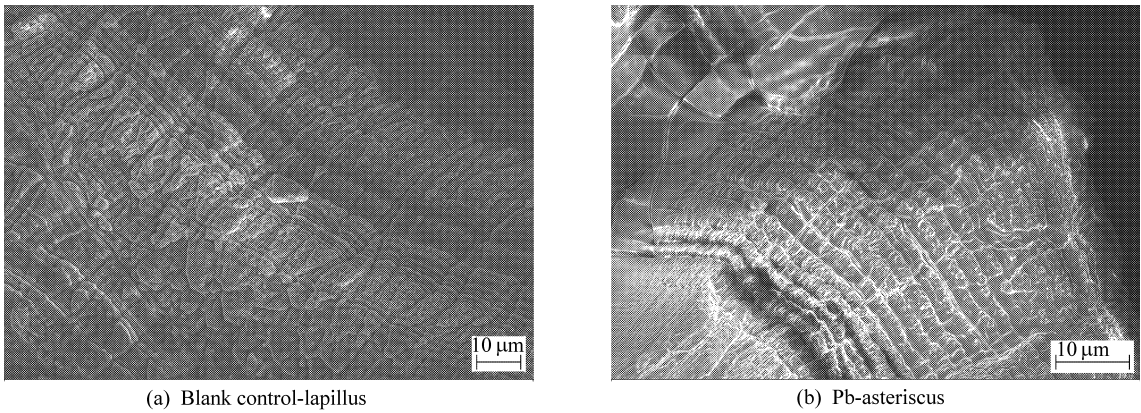


图 4 经过处理的星耳石和微耳石样品截面的 SEM 照片
Fig. 4 SEM images of cross section of treated asteriscus and lapillus

处理后的星耳石和微耳石磨制剖面的 SEM 照片。这样处理后的耳石样品在扫描电镜下可以非常清楚地观察到日轮，由明亮的碳酸钙增长带和暗色的有机质间歇带有序地排列组成，其生长方式是围绕着原基以同心圆环的方向生长。轮宽约为 $2\text{ }\mu\text{m}\sim 3\text{ }\mu\text{m}$ ，其中碳酸钙晶体组成亮带宽度约为 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ ，有机物组成的暗带宽度约为 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 。

在鱼耳石的研究中，耳石的日轮观察非常重要，它直接关系到对鱼耳石成因的分析以及与环境各因子之间关系的探讨，而在鱼耳石日轮的观察中，鱼耳石的磨片技术和效果又直接影响到耳石日轮识别、计数和分析的结果。传统观察耳石日轮的方法是利用水磨砂纸打磨耳石切面，然后置于显微镜下观察。尽管这种方法成本很低，但由于分辨率和对比度的关系，光学磨片的方法对于轮间间隔 $\leq 1\text{ }\mu\text{m}$ 的耳石日轮观察常会出现误差，如图 5 所示，这将会导致耳石日轮分析与统计的错误。本次实验中使用磨片后再经过碱洗和 Na_2EDTA 去除耳石中

蛋白质的方法得到的日轮 SEM 图片比用传统方法得到的清晰很多，对比度也有所加强，因此可以利用该方法对耳石进行处理，并配合使用鱼耳石日轮的计算机自动识别和分析系统对耳石日轮进行计数与分析^[5]，将更有效地减少误差，增强日轮识别的准确度，能够更清晰地展示耳石的日轮结构。

3 讨 论

鱼耳石作为典型的生命矿物文石的载体，它的碳酸钙晶体与地质作用形成的碳酸钙晶体在形成方式上既有很强的相似性，又存在着一定的区别。Krampitz 曾指出^[1]，生物矿化作用与地质上的矿化作用明显不同的是无机相的结晶严格受生物分泌的有机质的控制，生物体内有机基质诱导矿物晶体的成核、生长和聚集，使得生物矿物具有特定的形貌、取向和组装方式。欧阳健明在对生物矿物及其矿化过程进行研究时也指出，生物体内碳酸钙的矿化过程受有机基质的调控。有机基质提供碳酸钙成

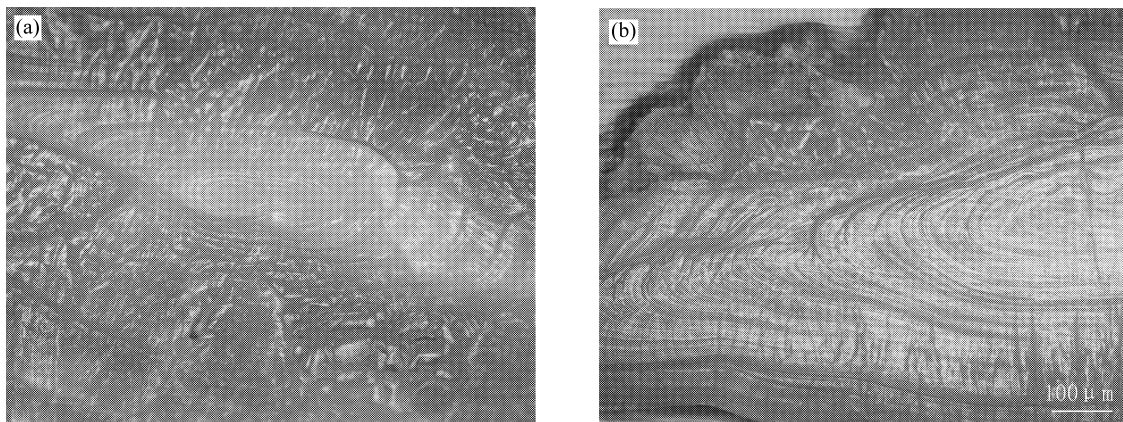


图5 传统方法磨制的微耳石的光学显微镜照片

Fig. 5 Optical microscope images of lapillus clitellum by traditional method

核和生长的模板,调控碳酸钙晶体的结晶学取向、晶型和形貌,使形成的碳酸钙晶体具有特定的理化性质^[6]。同时,一些决定耳石矿化的有机基质已经被证实^[7-8]。以上这些研究都证实,有机质对无机晶体的成核、生长、晶形及结晶学定向等的控制是客观存在的。

4 结 论

(1) 微耳石由呈六边形或假六边形有规则排布成板片状或者柱状的文石晶体组成,晶体粒径大小为 $0.5\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m}$;星耳石则由呈现球状或豆状的球文石晶体组成,晶粒大约为 $100\ \text{nm}$,晶体间均胶结有少量蛋白质;耳石中的文石晶体和球文石晶体在尺寸上要比无机成因文石的晶体小,这可能是由于生物矿物中有机基质的存在限制了晶体的发育所导致的。

(2) 对鱼耳石的 SEM 观察需要对表面进行轻微的腐蚀以增加结构衬度,实验结果表明,利用碱洗和 Na_2EDTA 对星耳石表面处理后,星耳石表面形貌更加清晰,晶界也更加明显。

(3) 对经过打磨的微耳石和星耳石进行碱洗和 Na_2EDTA 处理后观察其截面,可以十分清晰地观察到星耳石和微耳石的日轮,日轮宽度约为 $2\sim 3\ \mu\text{m}$ 。

(4) 不同水化学条件下耳石的晶体微形貌特征差异并不大,结合前人对生物碳酸钙的研究,认为水体的温度、光照、饵料的丰富度等外界因素可以影响鱼体的新陈代谢作用,而新陈代谢作用又影响了鱼体的内分泌,继而又影响耳石中有机质的沉积,最终对耳石中无机矿物晶体的生成形态产生影

响。在只有水化学条件不同的情况下,水体中的元素含量差异较之以上各个环境因子对鱼体新陈代谢的影响要小些,因而,对耳石晶体形态的影响作用也要小一些。

参考文献:

- [1] Krampitz G, Graser G. Molecular mechanism of biomineralization in the formation of calcified shells [J]. *Angew Chem*, 1988, 27: 1145-1156.
- [2] Pannella G. Fish otoliths: Daily growth layers and periodical patterns [J]. *Science*, 1971, 173: 1124-1126.
- [3] Campana S E, Neilson J D. Microstructure of fish otoliths [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1985, 42: 1014-1032.
- [4] 高永华. 黑龙江地区野生鲤鱼耳石的成因矿物学研究 [D]. 北京: 中国地质大学, 2006.
- [5] 朱 旗, 夏立启, 常剑波. 鱼类耳石微结构的计算机自动识别 [J]. *水生生物学报*, 2002, 26(6): 600-604.
Zhu Qi, Xia Liqi, Chang Jianbo. Computer identification on otolith microstructure of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(6): 600-604.
- [6] 欧阳健明. 基质调控碳酸钙生物矿化过程及其体外模拟的研究进展 [J]. *功能材料*, 2005, 36(2): 173-180.
Ouyang Jianming. Research progress on biomineralization process of calcium carbonate mediated by organic matrix and its simulation [J]. *Journal of Functional Materials*, 2005, 36(2): 173-180.
- [7] Murayama E, Herbolmel P, Kawakami A, et al. Otolith matrix proteins OMP-1 and otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae [J]. *Mechanisms of Development*, 2005, 122: 791-803.
- [8] Sumanas S, Larson J D, Miller B M, et al. Zebrafish chaperone protein GP96 is required for otolith formation during ear development [J]. *Developmental Biology*, 2003, 261(2): 443-455.