

# EDTA 对罗非鱼嗅觉的影响及其解毒作用<sup>\*</sup>

柴敏娟 陈 荣 顾 勇<sup>\*\*</sup> 梁军荣

(厦门大学海洋系, 厦门, 361005)

<sup>\*\*</sup>(厦门大学生物系, 厦门, 361005)

**摘 要** 将 5 种浓度的 EDTA 和 9 种含有不同比例的重金属离子、EDTA 混合液分别灌注罗非鱼嗅囊, 观测这些溶液对甲硫氨酸引起的嗅电图(下简称 EOG)的影响, 研究 EDTA 对重金属染毒鱼解毒的可行性和最佳配方, 并探讨其可能机理。结果如下: (1) EDTA 对 EOG 有抑制和促进两方面影响。当浓度低于 372mg/dm<sup>3</sup> 时, EDTA 抑制 EOG 反应, 浓度越低, 抑制作用越明显。当浓度大于 372mg/dm<sup>3</sup> 时, 则促进 EOG 反应, 浓度越高, 促进作用越明显。(2) 当混合液中 EDTA 与 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 或 Cu<sup>2+</sup>+Zn<sup>2+</sup> 的比例为 1:2 时, EOG 反应虽均小于正常, 但都比不含 EDTA 的各种污染液的抑制作用小, 当其比例为 2:1 时, 解毒效果不甚明显; (3) 当混合液中两者比例为 1:1 时, EOG 振幅接近或略大于正常, 说明这个混合比例的解毒效果既佳又经济。

**关键词** EDTA 重金属 罗非鱼 EOG 解毒

**中国图书分类号** S949

EDTA 作为一种金属离子的螯合剂, 引入水生生物培养已有四十多年了, 如用于藻类和海洋无脊椎动物的培养和育苗中<sup>[1~5]</sup>, 发现它可起到保持某些元素溶解度及降低金属离子毒性的作用<sup>[6]</sup>, 故 EDTA 对水生生物的存活与生长有一定的作用。那么, EDTA 本身对生物生命活动是否有危害? 它对水质是否构成污染? 这在人们对它的运用中, 尚未作过专门的研究, 只是在水生生物的培育过程中, 观察到 EDTA 使用不当所造成的危害, 甚至成为成败的因素<sup>[6]</sup>。

EDTA 对成鱼的生命活动是否有影响, 对重金属染毒鱼是否也具有解毒作用? 这方面的研究不多, 尤其以鱼类灵敏感觉器官的嗅电图反应为指标的研究, 则更属鲜见。本实验以渔业养殖业常见鱼种罗非鱼为材料, 以嗅电图(下简称 EOG)为指标, 较系统地研究 EDTA 对 EOG 的影响, EDTA 作为重金属染毒鱼解毒剂的可行性及最佳配方, 并对其机制作初步探讨。

表 1 EDTA 溶液的浓度

Tab. 1 Concentrations of EDTA solution

组 别	1	2	3	4	5
EDTA 浓度(mg/dm <sup>3</sup> )	0.372	3.72	37.2	372	3720

## 1 材料与方法

• 福建省自然科学基金项目(C96005 号)。柴敏娟, 女, 1942 年 3 月出生, 副教授。

•• 现在中国科学院生物物理研究所(北京)

本文于 1997 年 10 月 13 日收到。

实验用 60 尾罗非鱼 (*Oreochromis sp.*) 捕自厦门大学芙蓉湖, 雌雄不限, 体重  $64.3 \pm 13.6$  g, 体长  $16.4 \pm 2.8$  cm, 暂养于室内水槽, 水温为  $26.7 \pm 1.3$  °C, pH 为 6.5~7.0, 待鱼生理状态正常后取用。

EDTA 和污染液的配制: EDTA 为 EDTA 二钠盐, 污染液采用  $\text{CuSO}_4$  和  $\text{ZnSO}_4$ , 分别用蒸馏水配制为  $37.2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 、 $1 \text{ mg}/\text{dm}^3$  和  $4 \text{ mg}/\text{dm}^3$  的母液, 配置后的 EDTA 母液置于棕色瓶内, 蔽光保存。实验时按表 1、2 配制后使用。电极制作、实验装置及记录方法均同前文<sup>[7]</sup>。数据送 486 计算机处理后绘图。

## 2 实验结果

### 2.1 不同浓度 EDTA 对 EOG 的影响

EOG 是嗅粘膜上记录到的一种缓慢的负电位变化, 它是由叠加电流通过嗅上皮细胞外阻抗形成的感受器电位。以正常鱼嗅觉感受细胞对标准甲硫氨酸 (DL-Met) 刺激的反应为 100%, 观察、比较在各种污染条件下, EOG 幅度的变化, 一般认为使 EOG 减小者, 能抑制嗅觉电反应, 反之, 则起了促进作用。

表 2 EDTA 与重金属混合液的组成

Tab. 2 Compositions of mixtures of EDTA and heavy metal

比 例	EDTA+Cu <sup>2+</sup>			EDTA+Zn <sup>2+</sup>			EDTA+Cu <sup>2+</sup> +Zn <sup>2+</sup>		
	1:2	1:1	2:1	1:2	1:1	2:1	1:2	1:1	2:1
Cu <sup>2+</sup> ( $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ )	40	40	40	—	—	—	40	40	40
Zn <sup>2+</sup> ( $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ )	—	—	—	400	400	400	400	400	400
EDTA ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	0.0465	0.093	0.186	0.465	0.93	1.86	0.512	1.023	2.046

将五种不同浓度 EDTA 分别灌注嗅上皮时, 使标准 Met 刺激引导的 EOG 有显著变化, 如图 1 所示,  $3720 \text{ mg}/\text{dm}^3$  EDTA 组 EOG 幅度最大, 约高于正常值的 60%;  $372 \text{ mg}/\text{dm}^3$  组在 100%~130% 间波动; 其余三组均低于正常, 依次为 70%、55% 和 30% 左右, 反映 EOG 大小与 EDTA 浓度呈正比关系。当浓度  $>372 \text{ mg}/\text{dm}^3$  时, EOG 幅度随着 EDTA 浓度的升高而增大, 反映此浓度范围 EDTA 能促进 EOG 反应; 而当浓度  $<372 \text{ mg}/\text{dm}^3$  时, EOG 幅度则小于正常值 (100%), 浓度越低, EOG 越小, 反映此浓度范围 EDTA 对 EOG 具抑制作用, 且抑制效应随 EDTA 浓度的降低而增大。可见 EDTA 对 EOG 是有影响的, 它的作用包括促进、抑制两个方面。

### 2.2 EDTA+Cu<sup>2+</sup> 混合液对 EOG 的影响

EDTA+Cu<sup>2+</sup> 混合液对 EOG 的影响如图 2。图中三条随中毒时间变化的曲线代表三种比例混合液对 EOG 的影响效果, 1:1 组位于上方, 1:2 组居中, 2:1 组位于下方。从图可见, 1:1 组自触毒至中毒 50min 期间, EOG 一直在 100% 上下波动, 之后 EOG 反应略增大, 基本上保持在 110% 上下, 说明此组反应颇接近正常。1:2 和 2:1 混合液组曲线都小于正常值 (100%) 分别约在 68% 和 42% 上下波动, 表明这两种混合液对 EOG 均具抑制作用, 两者相比, 1:2 组比 2:1 组对 EOG 的影响小些。揭示 Cu<sup>2+</sup> 和 EDTA 比例为 1:1 的解毒效果最好, 1:2 次之, 2:1 效果最差, 2:1 组甚至与等浓度的单一 Cu<sup>2+</sup> 的毒性相近<sup>[7]</sup>, 可以认为基本无解毒效应。

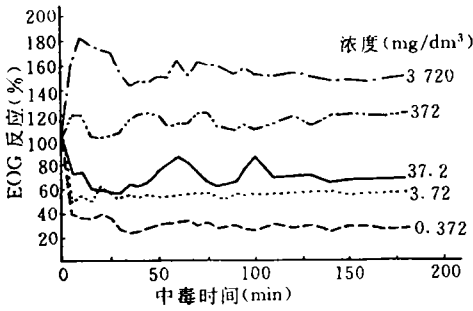


图 1 不同浓度 EDTA 对罗非鱼 EOG 的影响  
Fig. 1 Effects of EOG on *Oreochromis* sp. in different EDTA concentrations

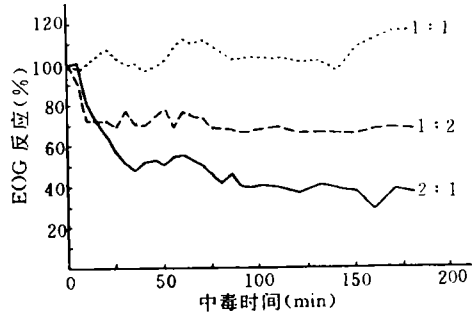


图 2 三种 EDTA 和 Cu<sup>2+</sup> 混合液对鱼 EOG 的影响  
Fig. 2 Effects of EOG on fish in three mixtures of EDTA and Cu<sup>2+</sup>

2.3 Zn<sup>2+</sup> + EDTA 混合液对 EOG 的影响

图 3 为 EDTA + Zn<sup>2+</sup> 混合液对 EOG 的影响,图中三条曲线的含义同图 2。由图可见,1 : 1 组在整个实验过程中,EOG 随时间变化曲线的趋势与 1 : 1 组 Cu<sup>2+</sup> 混合液相似,EOG 幅度基本在正常值上下波动,其他两组均使 EOG 减小,且 1 : 2 组比 2 : 1 组对 EOG 的抑制作用也小些,再次提示重金属离子和 EDTA 比例为 1 : 1 时,解毒效果最佳,比例为 2 : 1 时最差,后者若与等浓度单一 Zn<sup>2+</sup> 的抑制效应相比<sup>[7]</sup>,它的抑制作用还大些,说明此比例的 Zn<sup>2+</sup>、EDTA 混合液非但没有解毒作用,甚至在一定程度上还增加了污染液毒性。

2.4 EDTA + Cu<sup>2+</sup> + Zn<sup>2+</sup> 混合液对 EOG 的影响

EDTA 与两种金属离子混合后对 EOG 的影响如图 4 所示。由图可见,1 : 1 组自触毒 20min 起,其曲线基本在正常值上下波动,1 : 2 组在 62%、2 : 1 组在 48% 上下波动,说明后两组对 EOG 反应亦呈一定的抑制趋势。若与 Cu<sup>2+</sup> + Zn<sup>2+</sup> 混合液的实验结果相比<sup>[8]</sup>,1 : 2 组 EOG 幅度几乎增加约一倍,2 : 1 组幅度也较明显增大,反映金属混合液的抑制作用明显减弱,表明这三种比例的 EDTA 混合液都有一定的解毒效应,其中 1 : 1 比例效果仍然最好,1 : 2 次之,2 : 1 最差。

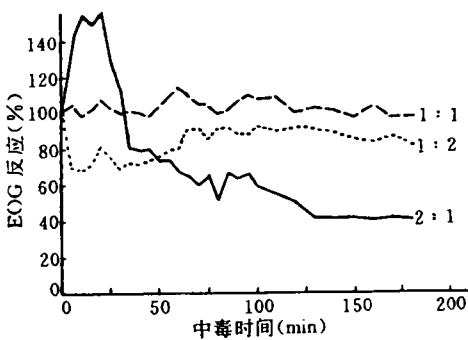


图 3 三种 EDTA 和 Zn<sup>2+</sup> 混合液对鱼 EOG 的影响  
Fig. 3 Effects of EOG on fish in three mixtures of EDTA and Zn<sup>2+</sup>

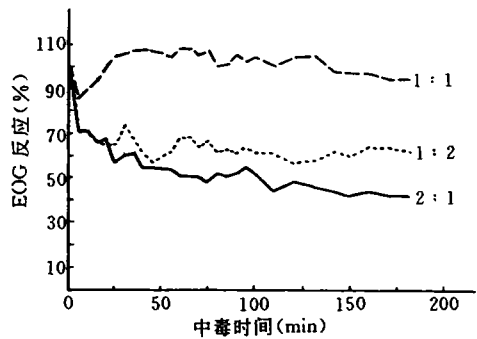


图 4 三种 EDTA 和 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 混合液对鱼 EOG 的影响  
Fig. 4 Effects of EOG on fish in three mixtures of EDTA and Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>

总之,EDTA 无论与单一金属离子(Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>)混合,还是与 Cu<sup>2+</sup> + Zn<sup>2+</sup> 混合,其解毒效果都是 1 : 1 最好,1 : 2 次之,2 : 1 最差,某些情况下 2 : 1 几乎没有解毒作用。

### 3 讨论

嗅电图(EOG)是一种感受器综合电位。当 DL-Met 刺激嗅上皮时, Met 分子和嗅觉感受器顶膜受体结合, 引起受体构象变化, 导致蛋白质本身特异离子通道的打开; 或者通过 G-蛋白偶联受体间接激活或失活一个不相连的离子通道<sup>[9]</sup>, 离子流动的结果, 改变了细胞膜的电位, 产生了 EOG。

嗅上皮细胞的外表通常覆盖一层粘液, 某些离子大量地存在于其中, 如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  等, 它们是产生膜电位的基础, 由于粘液的生化性质, 使这些离子所处的环境相对稳定, Yoshii、Kurihara 等曾用去离子水冲洗嗅上皮, 都没能使 EOG 反应完全消失, 但若采用 EDTA 和去离子水同时灌注, 则可完全抑制 EOG 的产生<sup>[10]</sup>, 这有力地证明了粘液中离子是细胞膜产生电位的基础。本实验用 EDTA 灌注嗅囊, 观察到由 Met 引起的嗅电图反应的变化, 在一定 EDTA 浓度范围内(浓度  $< 37.2 \text{mg}/\text{dm}^3$ ), 这种变化表现为 EOG 的减少。这可能由于 EDTA 与嗅上皮粘液中的离子络合, 减少粘液中有关离子浓度, 改变膜内外离子浓差所致。张怀成等也曾提出 EDTA 可以螯合存在于细胞膜外的  $\text{Cu}^{2+}$ , 所形成的配合物只存在于细胞外膜上<sup>[5]</sup>; 由此, 笔者推测 EDTA 有可能通过对嗅粘液层内离子浓度的影响, 起到改变 EOG 反应的效果; 当然, 这里不排斥 EDTA 螯合污染液中的金属离子, 从而降低其中所含金属离子浓度, 减小污染液毒性的可能。

EDTA 有无可能穿越胞膜, 进入细胞内影响 EOG 反应呢? 笔者认为, 也不能排除这种可能性的存在。因为 EDTA 是一种小分子的极性化合物, 它能在载体蛋白的协助下穿越质膜, George、Dufkova 等先后指出, EDTA 与金属离子形成络合物后, 可以 Me-EDTA 的形式存在于膜表面, 也可穿入细胞内<sup>[2,3]</sup>, 尽管这种途径进入胞内的量是有限的, 但仍不可排除这种影响的存在。

当 EDTA 浓度  $> 37.2 \text{mg}/\text{dm}^3$  时, 则出现了完全相反的现象, 即 EDTA 促进 EOG 反应。笔者认为, 这可能与采用的 EDTA 是它的二钠盐有关。EDTA 二钠盐的采用, 使 EDTA 溶液中含有较多  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  与膜的去极化密切相关, 是嗅电位产生的主要阳离子, 再者淡水鱼对  $\text{Na}^{+}$  浓度的变化十分敏感<sup>[11]</sup>, 所以, 当浓度  $> 37.2 \text{mg}/\text{dm}^3$  后, EOG 反应则随着 EDTA 二钠盐浓度的增加而增大。

重金属以游离态离子的毒性最大, 抑制鱼 EOG 反应的主要是金属离子的活度(activity)<sup>[12]</sup>, EDTA 与游离  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  络合形成不被生物所利用的螯合物时, 就起到了解毒作用。EDTA 与  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  络合的数量关系, 是可以根据络合物化学进行估算的, 由此配制本实验的三种比例混合液。在 1:1 组混合液中, EDTA 与  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  或  $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  基本上完全形成络合物, 故该液灌注嗅上皮时, EOG 反应基本正常。当 EDTA 与单一、混合重金属离子的比例为 1:2 时, 由于 EDTA 仅络合其中部分重金属离子, 尚未络合的金属离子仍对嗅上皮的电反应起抑制作用, 故 EOG 小于正常, 但又比单一重金属离子和它们混合物的毒性小, 故有一定的解毒作用。当其比例为 2:1 时, 形成了 EDTA 与金属离子络合后过剩的现象, 其剩余量属于  $0.0372 \sim 0.372 \text{mg}/\text{dm}^3$  范围, 而此浓度范围已被本实验证明是有抑制作用的, 所以解毒效果不明显, 至于 EDTA 与混合重金属离子以三种比例混合, 均对嗅觉有一定解毒作用, 可能与  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  间存在着拮抗作用<sup>[8]</sup>及 EDTA 用量较大有关。

由此可见, 在使用 EDTA 解除水域重金属污染时, 不是多多益善, 而应该科学地使用, 方

能既解除水环境中重金属离子毒性,又无碍于水生生物的生长发育。

### 参考文献

- 1 Castille F L, Lawrence A L. The effects of EDTA on the survival and development of shrimp nauplii and the interactions of EDTA with the toxicity of Cadmium, Calcium, and Phenol. *J. World Maricul. Soc.*, 1981, 12(2): 292~304
- 2 Dufkova V. EDTA in algae culture media. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 1984, 67: 479~492
- 3 George S G, Coombs T L. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 1977, 39: 261~268
- 4 刘士忠, 金彩杏. EDTA 对中国对虾、卵与无节幼体的毒性及对铜、铁、锌、砷离子毒性作用的影响. *浙江水产学报*, 1991, 10(1): 67~72
- 5 张怀成等. 重金属螯合剂以及铁、锰离子对叉多藻生长的影响及其混合效应. *青岛海洋大学学报*, 1990, 20(4): 59~66
- 6 袁有宪. 螯合剂 EDTA 的性质及其在水生生物培养与育苗中的作用. *水产学报*, 1991, 15(3): 260~171
- 7 柴敏娟, 潘丽婷. 重金属(Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>)对罗非鱼嗅电图反应的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1986, 35(1): 94~99
- 8 柴敏娟, 鲁波. 重金属混合液对罗非鱼嗅觉的毒性. *福建水产*, 1996, 3: 1~5
- 9 Buck L B, A novel multigene family may encode odorant receptors, *J. G. Physiol.* 1992, 99: 40~51
- 10 Yoshii K, Kurihrar K. Role of cations in olfactory reception. *Brain Res.* 1983, 274: 239~248
- 11 赵维信. *鱼类生理学*. 北京: 高等教育出版社, 1992. 62
- 12 Winbery S et al. The effect of Cu(II) on the electro-olfactogram (EOG) of the atlantic salmon (*Salmo salar*) in Artificial Freshwater of varying inorganic carbon concentrations. *Ecotoxic. and Environ. Safety*, 1991, 24: 167~178

## Effect of EDTA on EOG of *Oreochromis* sp. and its detoxifying feasibility

Chai Minjuan, Chen Rong, Gu Yong\* and Liang Junrong

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005)

\* (Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005)

### Abstract

The effects of EDTA and its mixture on the olfactory response of fish (*Oreochromis* sp.) are observed by perfusing five concentrations of EDTA and nine EDTA mixtures containing different heavy metal ions through the olfactory capsules. The electro-olfactogram (EOG) responses to the standard stimulant, DL-methionine are recorded. The feasibility and the optimal ratio of detoxification of EDTA are studied on heavy metal poisoned fish. The probable

mechanism is discussed. The results indicated that:①EDTA has double effects on EOG. In lower concentration than  $372 \text{ mg/dm}^3$ , EDTA inhibits EOG response, the lower the concentration, the heavier the inhibition. In higher concentration than  $372 \text{ mg/dm}^3$ , EOG response is prompted, the higher the concentration the more distinctive the promotion. ②When the ratios of EDTA to  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$  in the mixtures are 1 : 2, all the EOG responses are inhibited, but smaller than the solutions without EDTA. When ratio is 2 : 1, the detoxified effect of EDTA is not obvious. ③When ratio is 1 : 1, the amplitudes of EOG are near or slightly greater than normal. This indicates the ratio is economical and effective.

KEYWORDS EDTA, heavy metal, *Oreochromis* sp., EOG, detoxification