

铅和锌混合液在菲律宾蛤仔体内的 的积累及其致毒效应*

戴家银¹⁾ 刘琼玉²⁾ 洪华生²⁾

(1)南京大学环境科学与工程系, 210093, 南京; (2)厦门大学环境科学研究中心, 361005, 厦门)

摘 要 研究了铅、锌对菲律宾蛤仔的急性毒性, 以及铅、锌混合液在菲律宾蛤仔体内的积累和对过氧化氢酶活性的影响。结果表明: 铅的毒性略大于锌的毒性(96hLC₅₀值分别为 14. 28, 16. 40mg/L); 铅、锌混合液对蛤仔体内的重金属吸收存在交互作用, 高浓度的锌(6mg/L)明显地抑制蛤仔对高浓度铅的吸收; 铅和锌的浓度为(3mg/L)时对蛤仔的重金属吸收均有促进作用; 高浓度的铅和锌混合液对蛤仔过氧化氢酶活性亦有显著的交互作用, 呈拮抗效应。

关键词 铅, 锌, 交互作用, 过氧化氢酶, 菲律宾蛤仔

分类号 X172

0 前 言

随着沿海地区工农业高速发展, 大量工业污水、生活废水排入近海, 给近海生态环境造成一定的影响。其中重金属对海水养殖造成的影响较为突出。在这方面国内已开展了很多研究工作, 但主要集中在单一重金属的急性毒性效应和积累的研究^[1-2]。而海水中实际存在着多种污染物, 它们的作用无疑是综合的。用单一毒性的试验结果, 往往不能客观地反映污染物共存时对海洋生物的危害程度, 必需研究毒物的混合效应。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes Philippinarum* A.) 是我国东南沿海滩涂的主要养殖对象, 也是福建省四大经济贝类之一。对菲律宾蛤仔的研究国内多数侧重其养殖学方面^[3]。由于菲律宾蛤仔生活于沿海滩涂, 沉积物及其水环境中重金属必然影响其生长发育, 但对其混合毒性效应的研究国内外未见报道。厦门西海域表层沉积物 Cu、Zn、Cd 和 Pb 的平均含量分别为 30. 2 μ g/g、144. 2 μ g/g、0. 7 μ g/g 和 77. 2 μ g/g^[4]。因此, 本文选择平均含量较高的铅、锌两种金属离子, 研究了它们的急性毒性和混合液在菲律宾蛤仔体内的积累、分布以及对组织过氧化氢酶活性的影响。可为海洋环境监测、污染物排放及人工育苗水质管理提供科学依据。

* 收稿日期: 1997-10-20

第一作者简介: 戴家银, 男, 1965 年 10 月生, 南京大学环境科学与工程系环境化学专业博士研究生, 已发表“重金属和有机磷农药对真鲷和平鲷幼体的联合毒性研究”等论文

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验用菲律宾蛤仔取自黄厝养殖场海滩(平均体长:3.0cm,平均体重:6.5g)。在实验室暂养4d后选择大小类似的个体进行实验。实验海水取自厦门大学海洋系育苗场,经砂滤、沉淀、暴气等处理(盐度 $20 \pm 2\%$, pH8.01)实验水温: 26 ± 1.5 C。

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验 按照急性毒性试验方法^[5],根据预实验的结果,按等对数间距设8个浓度组,每个浓度并设一平行组,一个对照组。每组放蛤仔30只,为防止饵料的影响,实验期间不喂食,连续充气。随时捞出死亡个体,记录24h、48h、96h死亡个体数。以直线内插法求48h、96hLC₅₀值。

1.2.2 铅和锌混合液的积累实验 根据急性毒性的实验结果,用正交试验法设计试验(正交表L₉(3³))包括九组处理组,一个对照组。实验条件同急性毒性试验。4d后从各实验组随机捞出生物3~5只。用去离子冲洗外壳,用洁净的不锈钢解剖刀及塑料镊子解剖。收集体液(包括外套腔液和体腔液),分离其鳃、软体部,用滤纸吸干后称重。样品加浓HNO₃:HClO₄(2:1)混酸于聚四氟乙烯消化罐(6ml/g湿重)中,在烘箱中130 C消化7h,然后,转移至聚四氟乙烯坩埚内在电热板上加热赶酸至2ml左右。稀释成一定倍数后,在PE-3030B型火焰原子吸收光度计测定铅、锌含量。铅、锌的检测限分别为0.008mg/L、0.007mg/L,标准样品回收率为85%~115%。

表1 正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of interaction test

元素	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
暴露铅 Pb(mg/L)	0	1	1	1	3	3	3	6	6	6
暴露铅 Zn(mg/L)	0	1	3	6	1	3	6	1	3	6

1.2.3 交互作用对过氧化氢酶活性的影响实验 试验设计和实验条件同积累实验。每组随机取出6只大小均匀的活个体,解剖取软体部,用滤纸吸干表面水分,称重后迅速置-18 C冰箱中冷冻待用。

1.2.4 过氧化氢酶活性的测定 样品处理及测定方法见文献^[6],酶活性单位以单位时间酶促分解H₂O₂的微克分子数表示($\mu\text{mol}/\text{min}$)。

2 结果与讨论

2.1 急性毒性作用 铅、锌对菲律宾蛤仔的LC₅₀值和它们的95%可信限见表2。铅、锌的48hLC₅₀值分别为14.28mg/L、16.40mg/L。48h内铅的毒性显著大于锌,96h内铅的毒性略大于锌。说明菲律宾蛤仔对铅和锌的吸收和耐受程度不同,对锌的耐受程度弱,且有一定的调节能力。Chan^[7]报道铅对翡翠贻贝的毒性小于锌的毒性。可见同为双壳类底栖生物对不同的金属的耐受力有所不同。蛤仔对铅和锌的耐受力比贻贝、扇贝对这两种金属离子的耐受力强得多。

2.2 铅和锌混合液在菲律宾蛤仔体内的积累与分布 菲律宾蛤仔暴露铅、锌混合溶液4d

后,各组织积累铅、锌的浓度见表 3.

表 2 铅、锌对菲律宾蛤仔的急性毒性
Table 2 The acute toxicity of Pb and Zn to *R. philippinarum*

元素	48hLC ₅₀ 值(mg/L)及 95%可信限	96hLC ₅₀ 值(mg/L)及 95%可信限
Pb	31.6(26.9~37.1)	14.28(11.6~17.6)
Zn	147.91(146.0~149.8)	16.40(14.4~15.5)

表 3 暴露铅、锌混合液 4d 后,菲律宾蛤仔体内积累铅、锌的量(μg/g 湿重)
Table 3 The level of Pb and Zn in tissues of clam after 4 days' exposure various mixtures of Pb and Zn

组织金属含量 (μg/g wet)	实验组编号(Pb×Zn)									
	0 (0,0)	1 (1,1)	2 (1,3)	3 (1,6)	4 (3,1)	5 (3,3)	6 (3,6)	7 (6,1)	8 (6,3)	9 (6,6)
鳃	9.04	64.77	98.24	78.29	482.78	1 100.18	1 079.89	1 562.25	2 430.70	1 401.89
Pb 含量	软体	6.05	115.05	73.12	40.65	126.87	144.03	144.58	188.67	333.13
	体液	2.34	8.56	5.80	3.60	8.17	4.62	3.53	8.00	4.44
鳃	49.19	61.08	121.99	159.84	106.24	162.43	230.51	96.70	167.53	168.61
Zn 含量	软体	29.31	47.70	65.77	103.22	50.05	72.43	135.36	56.88	91.53
	体液	26.82	40.82	41.94	34.54	47.76	39.73	43.11	42.91	35.77

从表 3 可见,铅和锌混合液在高浓度时出现很强的交互效应.高浓度的锌(6mg/L)明显地抑制蛤仔对高浓度铅的吸收,而高浓度的铅对蛤仔高浓度锌的吸收影响不明显:中间浓度的锌和铅(3mg/L)对蛤仔组织重金属的吸收均有促进作用;同单一浓度实验相比(见表 4),低浓度时交互作用不明显.总的看来,锌的存在对铅的吸收的影响效应要比铅对锌的影响大.Phillips^[8]的实验表明:高浓度锌(400μg/L)会抑制紫贻贝(*Mytilus edulis*)对镉的吸收;Elliott^[9]报道当两者浓度都很高时(200μg/L),锌会抑制紫贻贝对镉的吸收.以上结果表明:金属间交互作用是非常复杂的,高浓度时相互作用效应明显.

表 4 铅、锌在菲律宾蛤仔体内积累(μg/g 湿重)

Table 4 The level of Pb in tissues of clam after 4 days' exposure to different concentration of lead

暴露铅浓度 (mg/L)	组织含量(μg/g 湿重)			暴露锌浓度 (mg/L)	组织含量(μg/g 湿重)		
	软体部	鳃	体液		软体部	鳃	体液
对照组	6.05	9.04	2.34	对照组	29.31	49.19	26.82
1	66.96	75.68	3.68	1	30.20	62.67	28.52
3	234.82	1 080.52	5.68	3	37.54	86.15	30.53
5	257.14	1 394.83	6.75	5	82.51	83.68	40.50
7	295.24	2 838.17	8.63	7	88.95	105.20	44.58
9	421.35	4 422.54	9.76	9	104.76	161.65	54.39

从表 4 可看出,随着暴露浓度的增加,蛤仔鳃、软体部积累铅的能力显著增强,鳃积累铅的能力远比软体部大,在最大浓度组中,鳃积累铅的量是对照组的 489 倍,软体部积累铅的

量是对照组的 7 倍,体液中的低铅含量表明:一方面外套腔液对铅无预浓缩作用,另一方面铅的排出速率也很低。蛤仔对锌的积累远不如其对铅的积累显著,随外加锌浓度的增加,鳃的积累能力大于软体部,但鳃、软体部、体液中的锌的净积累量增加不显著。说明蛤仔是铅的强积累者,而对锌有一定的调节能力,能在生理控制下摄入和排出锌。这与牡蛎积累高浓度的颗粒态锌,是锌的强积累者相反(Philips)^[10],而同扇贝从肾脏排出大量的颗粒态锌是锌的弱积累者相似(George)^[11]。

2.3 铅和锌混合液对菲律宾蛤仔体内过氧化氢酶活性的影响 表 5、6 列出了铅和锌混合液对菲律宾蛤仔(软体部)过氧化氢酶活性影响的测定结果及方差分析结果。

表 5 铅和锌混合液对过氧化氢酶活性的影响结果

Table 5 The effect of mixtures of Pb and Zn on CAT activities

试验号	1 B(Zn) (mg/L)	2 A(Zn) (mg/L)	3 C (Pb×Zn)	4 D (Pb×Zn)	过氧化氢酶活性 ^a (μmol/min)
0	0	0	0	0	886.9±40.7
1	1(1)	1(1)	1	1	608.2±43.1 ^{**}
4	1(1)	2(3)	2	3	638.7±35.96 ^{**}
7	1(1)	3(6)	3	2	651.771.0 ^{**}
2	2(3)	1(1)	2	2	703.6±55.7 ^{**}
5	2(3)	2(3)	3	1	731.5±68.4 ^{**}
8	2(3)	3(6)	1	3	667.1±48.4 ^{**}
3	3(6)	1(1)	3	3	676.4±53.7 ^{**}
6	3(6)	2(3)	1	2	554.8±55.06 ^{**}
9	3(6)	3(6)	2	1	705.2±51.6 ^{**}
∑X _{1j}	1 898.6	1 988.2	1 830.1	2 044.9	总和 5 937.2
∑X _{2j}	2 102.2	1 925.0	2 047.5	1 910.1	
∑X _{3j}	1 936.4	2 024.0	2 059.6	1 982.2	
X _{1j}	632.9	662.7	610.0	681.6	
X _{2j}	700.7	641.7	682.5	636.7	
X _{3j}	645.5	647.7	686.5	660.7	
R _j	67.8	33	76.5	44.9	

• • P<0.01^a (6 次试验平均值±标准差)

方差分析结果表明, $F_{AB} \geq F_{0.05} > F_{0.01}(4, 45)$ (其中: $F_{0.01}(4, 45) = 2.21, F_{0.05}(4, 45) = 2.57$), 铅和锌对过氧化氢酶活性有很强的交互作用; 因此, 铅、锌共存时, 过氧化氢酶活性主要受交互作用的控制。从极差值看, $R_3 > R_2 > R_4 > R_1$, 可见交互作用下铅对过氧化氢酶活性的影响远远强于锌的影响。

过氧化氢酶是生物演化过程中建立起来的抗氧化损伤的关键酶之一, 普遍存在于耗氧

生物体内. 其作用是催化 H_2O_2 的分解. 在需氧代谢中, 不可避免地产生 O_2 的还原中间体— H_2O_2 ; 另外当生物受环境因素影响或受有机污染物胁迫, 机体进入氧应激态, 也产生大量的活性氧(O_2^- 、 H_2O_2)导致 DNA 或其它生物大分子损伤. 由于该酶含有丰富的巯基, 重金属可与酶的巯基或其它活性基团相互作用, 从而改变酶的活性, 呈致毒现象.

表 6 交互作用的方差分析表

Table 6 The analysis of variance for interaction between Pb and Zn

离差平方和	
总和	$Q = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^6 x_{ijk}^2 - \frac{T^2}{n} = 2.77 \times 10^5$
因素 A(Zn)	$Q_A = \frac{1}{nr} \sum_{i=1}^3 T_{i.}^2 - \frac{T^2}{n} = 1.01 \times 10^4$
因素 B(Pb)	$Q_B = \frac{1}{pr} \sum_{j=1}^3 T_{.j}^2 - \frac{T^2}{n} = 4.66 \times 10^4$
误差	$Q_c = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^6 x_{ijk}^2 - \frac{1}{r} \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 T_{ij}^2 = 1.34 \times 10^5$
交互作用	$Q_{AB} = Q - Q_A - Q_B - Q_c = 8.54 \times 10^4$

	自由度	方差	F 值
因素 A(Zn)	VA=2	SA ² =5 066	FA=1.70
因素 B(Pb)	VB=2	SB ² =23 299	FB=7.80
交互作用	VAB=4	SAB ² =21 356	FAB=7.15
误差	V _c =45	Se ² =2 988	

表 7 铅、锌对菲律宾蛤仔过氧化氢酶活性的影响

Table 7 The effect of Pb and Zn on activities of CAT in *R. philippinarum*

铅浓度 (mg/L)	酶活性 # ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	相对酶活性 (%)	锌浓度 (mg/L)	酶活性 #	相对酶活性 (%)
对照组	886.9±40.7	100	对照组	886.9±40.7	100
1	651.6±20.2**	73.5	1	581.2±57.3**	65.5
3	622.7±83.3**	70.2	3	603.7±81.5**	68.1
5	562.9±61.9**	63.5	5	645.8±27.9**	72.8
7	549.7±80.3**	62	7	726.3±81.1**	81.9
9	517.4±70.6**	58.3	9	496.0±75.7**	55.9

样品平均值±标准差(n=6) ** P<0.01

从表 6 可知, 对照组过氧化氢酶活性为 886.9, 各交互组过氧化氢酶活性均低于对照组. 锌、铅单一作用试验结果(见表 7)表明: 铅和锌对菲律宾蛤仔体内过氧化氢酶活性有强的抑制作用. 随浓度增加, 抑制作用增强, 但锌对过氧化氢酶活性的抑制作用较为特殊, 由于菲律宾蛤仔对锌浓度的变化更为敏感, 低浓度时有很强的抑制作用, 中间浓度锌的抑制

作用有所降低,其主要原因可能是金属硫蛋白的调节作用^[12],随着蛤仔体内锌的积累增加,其体内诱导合成一定量的金属硫蛋白使得大部分锌与金属硫蛋白结合而减轻其毒性,在最高浓度组,锌与金属硫蛋白结合达到饱和而“溢出”,锌同过氧化氢酶的巯基结合,抑制作用增强,另外锌同巯基结合能力比铅同巯基的结合力强,菲律宾蛤仔耐受铅的能力强,进入体内的铅可能以颗粒形式贮存,其毒性相对较低.与锌、铅单一作用试验比较,锌、铅混合液对蛤仔过氧化氢酶活性呈拮抗效应.当 $Pb=1mg/L$ 时,过氧化氢酶活性随锌含量的增加变化不明显;当 $Pb=3mg/L$ 时, Zn 也为 $3mg/L$ 时过氧化氢酶活性最强(为对照组的 82.5%);当 $Pb=6mg/L$ 时,锌含量变化对过氧化氢酶活性影响显著,高锌和低锌组过氧化氢酶活性分别为对照组的 76% 和 79.5%,但当锌为 $3mg/L$ 时,酶活性最低为对照组 62%,表现为强的抑制作用.对于交互组锌、铅($3mg/L, 6mg/L$),过氧化氢酶活性受抑制的原因可从积累实验得到解释,即中等浓度的锌($3mg/L$)在高浓度铅($6mg/L$)的情况下,促进蛤仔对铅的吸收;高浓度的铅又会抑制蛤仔对锌的吸收,造成该交互组蛤仔体内铅的含量最高,主要表现为铅的作用,故过氧化氢酶活性受到强的抑制,有别于其它交互组的结果.

参 考 文 献

- 1 李国基,刘明星,张首临等. Zn 等金属离子对栉孔成活的毒性影响. 海洋环境科学. 1994, 13(2): 13~17
- 2 王安利,王微娜,李铁水等. 铜、锌、锰和铬对中国对虾的急性致毒及相互关系的研究. 海洋学报. 1992, 14(4): 134~139
- 3 齐秋贞,杨明月. 菲律宾蛤仔的生长发育. 水产学报. 1988, 12(1): 1~11
- 4 刘石玉,潘皆能,何明海. 厦门西港员当湖排污口区底质环境要素的分布. 台湾海峡. 1997, 16(2): 195~200
- 5 国家环境保护局. 北京: 化学工业出版社. 1990. 189~196
- 6 南京大学环境科学系环境生物学教研室编. 环境生物学实验技术方法. 南京: 南京大学出版社. 1989. 85~89
- 7 Chan H M. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. . 1988, (48): 295~303
- 8 Phillips D J H. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper I. Effect of environmental variables on uptake of metals. Mar. Biol. 1976, (38): 59~69
- 9 Elliott N G, Swain R, Ritt D A. Metal interaction during accumulation by the mussel *Mytilus edulis planulatus*. Mar. Biol. 1986, 93: 395~399
- 10 Phillips, D J H, Yim W S. A comparative evaluation of oysters, mussels and sediments as indicators of trace metals in Hong Kong waters. Mar. Ecol. Prog. Ser. . 1981, 6: 285~293
- 11 George S G, Pirie, B J S. Metabolism of Zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L): a combined ultrastructural and biochemical study. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. . 1980, 60: 575~580
- 12 Lerch K. Crab metallothionein. Primary structures of metallothioneins 1 and 2. J. Biol. Chem. . 1982, 257(2): 2420~2426

ACCUMULATION AND TOXICITY OF MIXTURE OF LEAD AND ZINC IN CLAM RUDITAPES PHILIPPINARUM A.

*Dai Jiayin*¹⁾ *Liu Qionyu*²⁾ *Hong Huasheng*²⁾

(Department of Environ. Sci. & Engineer. . Nanjing University, Nanjing 210093;

2) Environ. Sci. Res. Center. Xiamen University, 361005, Xiamen . PRC)

Abstract Accumulation of mixture of lead and zinc and their toxic effect on the activities of Catalase (CAT) in clam following various exposure concentration were studied in laboratory. The 96h LC50 values of lead and zinc for clam were 14.28 mg/L, 16.40mg/L, respectively, the toxicities of two kinds of metals were in sequence of Pb>Zn. Lead and zinc bioaccumulated in the study showed that different organ has different capacities for accumulating metal, with high levels in the gill, followed by soft body, and comparative lesser amounts in the fluid of cavity. The ratio of accumulation of lead in gill and soft body was far larger than that of zinc. The clam was strong accumulator of lead, while was weak accumulator of zinc. The L₉(3¹)factor tests showed a significant interaction between Zn and Pb on the activities of CAT in clam, indicated the antagonistic effect of Pb and Zn of CAT activities.

Keywords Pb, Zn, interaction, Catalase, *R. philippinarum*