

重金属对日本对虾仔虾存活 及代谢酶活力的影响

李少菁 王桂忠 翁卫华 汤 鸿 林琼武

(厦门大学海洋系、厦门大学国家教委海洋生态环境开放实验室, 厦门, 361005)

摘 要 本研究测定了铜、锌、镉对不同盐度下日本对虾仔虾的 24h LC_{50} 、48h LC_{50} 、96h LC_{50} , 三种金属毒性大小依次为 $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$, 对次致死浓度下仔虾的碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、谷丙转氨酶(GPT)、及谷草转氨酶(GOT)的活性的测定结果表明: 重金属对 AKP、GPT、GOT 活性有不同程度的抑制作用; 且随着浓度的增高, 抑制作用越明显。但对 ACP 活性有激活作用, 且随着浓度的增高, 激活作用越明显。

关键词 重金属 盐度 日本对虾仔虾 半致死浓度 酶活力

中国图书分类号 Q556

随着工业的发展, 沿海地区的重金属污染日益严重, 这势必对水生生物的生长发育等造成极大的威胁。因此, 有关重金属影响虾蟹等养殖生物的研究受到国内、外学者的重视, 有关报道也日益深入^[1-3]。日本对虾(*Penaeus japonicus*)是我国沿海重要的养殖虾类之一, 但国内尚未开展重金属对其在不同盐度下的毒性效应及次致死浓度下影响其酶活性的研究。本文试图通过这方面的研究探讨, 为养殖生产及海洋环境水质的评价与监测提供科学资料。

1 材料与方法

日本对虾仔虾(0.90 ± 0.11 cm)取自厦门大学海洋系育苗场, 选用无伤病的个体, 试验前经缓慢驯化至所需的盐度。驯化培养使用砂滤海水(pH 为 8.2, DO 为 6.8~8.0mg/dm³)。

试剂 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$ 均为分析纯。先用去离子水配制为 1.000g/dm³ 的母液, 然后用砂滤海水稀释至所需的浓度。

1.1 急性致毒试验

先做预试验, 找出重金属的致死浓度。正式试验按等对数间距设置浓度。每种浓度均设三个盐度组(盐度分别为 19.1、26.1、35.6), 并设平行组和对照组。分别在每个盛有 800cm³ 试验液的烧杯中, 置入 20 只仔虾, 水温 $27 \pm 0.5^\circ C$, 昼夜充气培养。每隔 24h 观察、记录每组受试幼体的死亡数, 并更换试验的培养水体。

结果按浓度对数~死亡率(%)线性回归, 得出线性方程, 再计算各种重金属的半致死浓度(LC_{50})。

• 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目第 9438408 号。 李少菁, 男, 1931 年 2 月出生, 教授。
本文于 1997 年 10 月 17 日收到。

1.2 酶活性测定

将仔虾在重金属次致死浓度下驯养 24h 后取出,洗涤,在玻璃研钵中以预冷的重蒸水匀浆,0~4°C 下 10 000r/min 离心 10min,上清液用作酶活力测定。每种浓度均设三个平行组,并设对照组。

1.2.1 AKP、ACP 活力的测定 分别以 0.1mol、pH 为 9.9 的 NaHCO_3 - Na_2CO_3 缓冲液(测 AKP 活力)和 0.2mol、pH 为 4.4 的 NaAc - HAc 缓冲液(测 ACP 活力)配制成 2 mol PNPP (对硝基苯磷酸二钠)。每试管加 1.8cm³(含 1 mmol MgCl_2)2 mol PNPP 和 0.2cm³ 酶液,迅速混匀,于 37°C 水浴,准确反应 10min 后以 2.0cm³ 0.1mol 的 NaOH 终止反应。空白对照为底物先加 0.1mol NaOH 后再加酶液。反应生成的 PNP(对硝基酚)在 751G 型分光光度计 495nm 下比色。

定义粗酶液每毫克蛋白在 37°C、pH 为 9.9(AKP)或 pH 为 4.4(ACP)时,每分钟催化 PNPP 产生 1 μmol PNP 为 1 个 AKP 或 ACP 比活力单位。

1.2.2 GPT、GOT 活力测定 取 0.5cm³ GPT 或 GOT 基液,加 0.1cm³ 组织匀浆稀释液,混匀,于 37°C 水浴保温 30min 后再加 0.5cm³ 的 2,4-二硝基苯肼(1 mmol),并混匀,GOT 组另各滴 1 滴柠檬酸苯胺液,在 37°C 水浴保温 20min 后以 5.0cm³ 0.4mol 的 NaOH 终止反应,500nm 下比色。空白管水浴 30min 后才加酶液。标准液为丙酮酸。

定义粗酶液每毫克蛋白在 37°C、pH 为 7.4 时每分钟分解氨基酸产生 1 μmol 丙酮酸为 1 个酶比活力单位。

1.2.3 粗酶液蛋白质含量测定 采用酚试剂法,以牛血清白蛋白为标准物。

2 结果

2.1 在不同浓度下铜、锌、镉对日本对虾仔虾死亡率的影响

在三种盐度下,仔虾在铜、锌、镉不同浓度下死亡率与浓度对数的关系经线性回归(表 1)表明,死亡率 y 与重金属浓度 x 对数呈显著的正相关。各重金属 LC_{50} 随试验时间的延长而减小。三种重金属对日本对虾仔虾毒性大小依次为 $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。盐度对重金属对虾仔虾的毒性有一定影响:盐度为 26.1 这一组的仔虾耐重金属能力最强,另两个盐度组(19.1、35.6)的仔虾耐重金属能力相当,且前者略高于后者。可见,盐度在某一量值范围内将提高重金属毒性,在另一些量值范围内又会减弱重金属毒性,其具体范围尚待于进一步实验研究。

2.2 铜、锌、镉对日本对虾仔虾酶活力的影响

图 1 表明暴露于 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 24h 后,日本对虾仔虾 AKP 活性随着重金属浓度的增加而下降,但三种重金属对 AKP 活性抑制程度不同,抑制程度依次为: $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。

图 2 表明暴露于 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 24h 后,日本对虾仔虾 ACP 活性随着离子浓度的增加而呈上升趋势,但 Zn^{2+} 缓慢上升,而 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 上升迅速。

图 3 表明暴露于 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 24h 后仔虾 GPT 活性。重金属对仔虾 GPT 活性影响趋势与 AKP 大体相同,但低浓度的 Cu^{2+} ($0.78 \times 10^{-6} \text{mol}/\text{dm}^3$) 和 Cd^{2+} ($0.44 \times 10^{-6} \text{mol}/\text{dm}^3$) 对 GPT 活性的抑制作用非常显著($p < 0.02$),尔后随着浓度升高,GPT 活性下降程度较为减缓。 Zn^{2+} 在低浓度下,GPT 活力基本不变,但至较高浓度时($2.36 \times 10^{-6} \text{mol}/\text{dm}^3$),GPT 活力明显下降($p < 0.05$)。

图 4 表明暴露于 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 24h 后仔虾 GOT 活性。与 AKP、GPT 相似,随着重金

表 1 铜、锌、镉对日本对虾仔虾毒性试验数据的线性回归分析
Tab. 1 Linear regression analysis of acute toxicity of copper, zinc and cadmium to postlarvae of *Penaeus japonicus*

金属名称	盐度	试验时间 (h)	死亡率(%)~浓度($10^{-6}\text{mol}/\text{dm}^3$) 对数回归方程	LC_{50} ($10^{-6}\text{mol}/\text{dm}^3$)	相关系数 (r)
铜	19.1	24	$y = -9.039 + 37x$	39.41	0.997 4
		48	$y = -14.71 + 62x$	11.06	0.988 2
		96	$y = 8.862 + 54x$	5.178	0.954 6
	26.1	24	$y = -7.676 + 31.71x$	65.90	0.988 9
		48	$y = -13.03 + 42.51x$	30.39	0.985 5
		96	$y = -13.89 + 66.86x$	9.038	0.968 4
	35.6	24	$y = -19.29 + 46.86x$	30.11	0.962 0
		48	$y = 23.22 + 33.10x$	6.443	0.990 6
		96	$y = 37.46 + 39.22x$	2.088	0.988 2
锌	19.1	24	$y = -33.06 + 42.41x$	50.89	0.986 6
		48	$y = -46.04 + 60x$	39.87	0.990 6
		96	$y = -9.097 + 52.20x$	13.56	0.969 1
	26.1	24	$y = -28.22 + 53.43x$	218.7	0.954 8
		48	$y = -37.66 + 45.14x$	87.49	0.975 8
		96	$y = -47.24 + 74.59x$	20.12	0.983 6
	35.6	24	$y = 3.506 + 25.71x$	64.33	0.921 0
		48	$y = -0.815 + 33.14x$	34.15	0.975 5
		96	$y = 2.066 + 45.71x$	11.19	0.988 2
镉	19.1	24	$y = -9.094 + 52.77x$	13.18	0.933 8
		48	$y = 15.14 + 51.78x$	4.937	0.987 3
		96	$y = 26.32 + 46.85x$	3.202	0.986 0
	26.1	24	$y = -3.272 + 41.64x$	19.03	0.982 3
		48	$y = -6.82 + 60x$	8.851	0.974 4
		96	$y = -0.676 + 62.19x$	6.529	0.971 4
	35.6	24	$y = 6.352 + 39.73x$	12.55	0.979 8
		48	$y = 15.16 + 48.22x$	5.279	0.968 9
		96	$y = 47.98 + 38.64x$	1.128	0.966 1

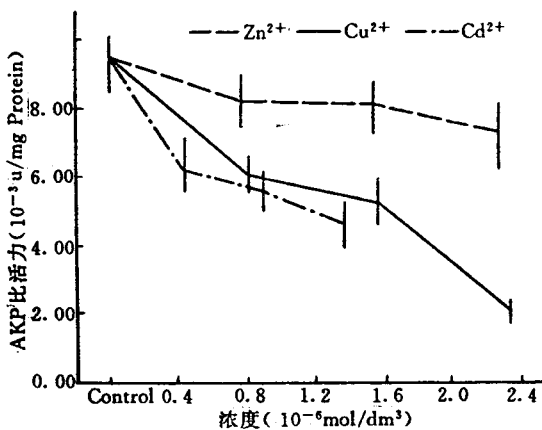


图 1 铜、锌、镉对日本对虾仔虾 AKP 活性的影响
Fig. 1 Effects of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} on AKP activities in postlarvae *Penaeus japonicus*

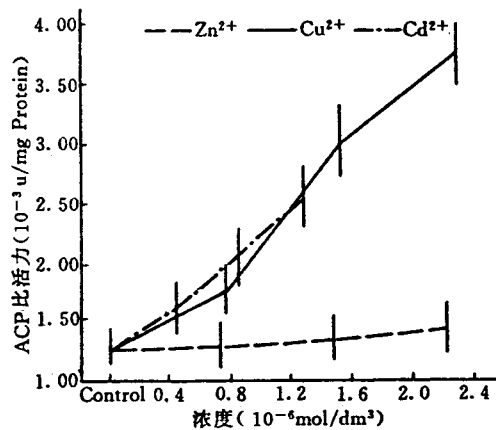


图 2 铜、锌、镉对日本对虾仔虾 ACP 活性的影响
Fig. 2 Effects of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} on ACP activities in postlarvae *Penaeus japonicus*

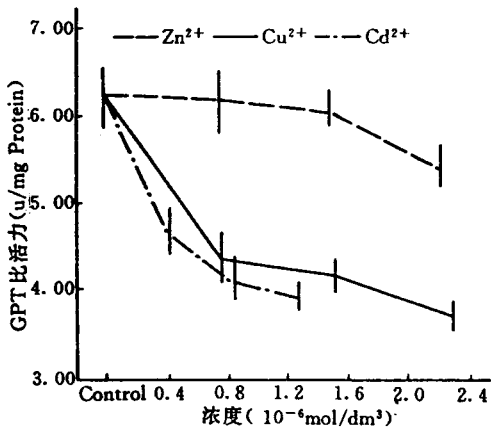


图3 铜、锌、镉对日本对虾仔虾 GPT 活性的影响
Fig. 3 Effects of Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ on GPT activities in postlarvae *Peneaus japonicus*

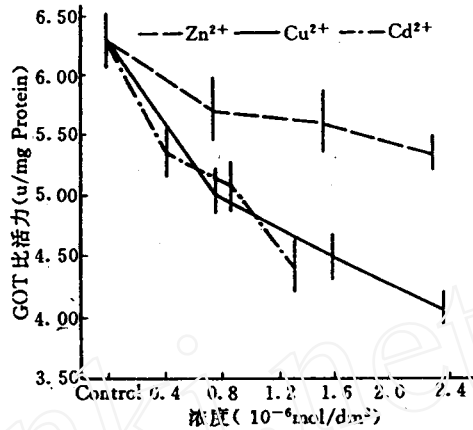


图4 铜、锌、镉对日本对虾仔虾 GOT 活性影响
Fig. 4 Effects of Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ on GOT activities in postlarvae *Peneaus japonicus*

属浓度的升高,仔虾 GOT 活性均下降,但 Zn²⁺在较低浓度时(0.79×10⁻⁵mol/dm³),GOT 活力已有所下降,这与 Zn²⁺低浓度时对 AKP、GTP 活力影响不明显有所不同。

3 讨论

一般来说,重金属可分为必需金属(Cu²⁺、Zn²⁺等)与非必需金属(Cd²⁺、Pb²⁺等)两大类。重金属溶于海水中,有多种络合态,金属离子通常只占总可溶金属的一部分,是唯一能与细胞膜载体蛋白结合的部分,具生物活性。本实验选用的三种重金属(铜、锌、镉)在水中均以二价阳离子为主要存在形式。因此,用溶液中铜、锌、镉的总浓度代表 Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺浓度具有一定的可行性和相互之间的可比性。

盐度是海水的一个重要的理化因子,盐度降低会减少海水中无机氯络合物。关于盐度对甲壳类存活率^[4]、重金属摄入^[5]等的影响,已有许多报道。某些动物适应低盐以后,能改变水和离子的通透性,从而改变金属的摄入速率。如棘沟虾(*Orchestia gammarellus*),盐度降低时它摄入锌和镉的速度增加^[6]。

日本对虾可在较宽的盐度范围内存活。本实验结果表明,日本对虾仔虾对离子的调节能力很强,它可通过一定的调节机制抵消盐度等理化因子对金属摄入速率的影响。但仍存在着一个最适盐度范围,在此范围内,它对重金属的耐受性最强。

重金属毒性的大小,除不同动物处于不同生长时期对重金属具有不同的耐受性外,还与其所处的盐度及暴露于重金属中的时间有关。此外,许多实验因子,如实验温度、培养动物容器的大小,以及暴露时间内是否喂食等的差异都会影响其半致死浓度。Dhavalé 研究指出,盐度与温度的单项或双项改变均明显影响重金属对锯缘青蟹的毒性^[7]。因此,为确切估测实际水体中重金属对日本对虾幼体的影响,需在多因素交互条件下,逐步深入研究加以论证。

金属离子穿过细胞膜后,以不同的方式与细胞质成分进行络合反应,并对胞液中特定的配位体、底物及酶的活性产物或酶本身产生极强的亲和力。现已证实,有毒金属与酶之间可能存在着两种作用形式:(1)有毒金属置换酶活性中心的必需金属;(2)有毒金属结合到酶分子中的

咪唑基、巯基、羟基、氨基、肽基等功能基团而导致酶失活^[8]。因此,以酶为指标考察重金属对生物代谢的影响得到许多学者的重视。如 Ozreti 等选用鲷鱼血液脱氢酶、谷氨酸脱氢酶和碱性磷酸酶作为鲷鱼肝中毒的潜在标记^[9]。刘发义、蓝伟光分别以细胞色素氧化酶^[10]和碱性磷酸酶^[11]作为检测重金属在动物体内的致毒效应的生化指标。

本实验结果显示,AKP、ACP、GPT、GOT 对重金属作用敏感,可作为监测重金属对日本对虾仔虾致毒效应的生化指标。受重金属的干扰,仔虾细胞氧化磷酸化过程受干扰,因此其 AKP 活性降低;ACP 是溶酶体的标志水解酶,其活力升高往往表明细胞的解体^[12];GPT、GOT 活力受重金属抑制而降低反映出机体蛋白质代谢受阻。

从三种金属的毒性大小来看,它们的 LC_{50} 依次为 $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$, 这与它们对酶活力的影响($Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$)相吻合。我们知道, Cd^{2+} 是非必需金属,它对多种酶活性有影响,较低剂量的 Cd^{2+} 对生物就有毒性影响。 Cu^{2+} 虽是必需金属,但因 $Cu(II)$ 络合物的相对稳定性,要求生物体液中活性铜保持在低浓度,否则它将取代其它必需金属或与大分子细胞结构络合而产生毒性。所以, Cu^{2+} 浓度稍高即可表现出毒性。与 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 相反, Zn^{2+} 通过结合到结构物上或通过抑制金属催化的脂质过氧化反应可使胞内原生质和内膜处于稳定状态^[8],所以 Zn^{2+} 对机体的毒性较弱。

参考文献

- 1 王安利,王维娜,李铁水等.铜、锌、锰和铬对中国对虾仔虾的急性致毒及相关关系的研究.海洋学报,1992,14(4):134~139
- 2 Liao I-Chiu & Hsisi-Shih. Toxicity of heavy metals to *Penaeus japonicus* I. Toxicities of copper, cadmium and zinc to *Penaeus japonicus*. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 1988, 15(2): 69~78
- 3 Macdonald J M, Shields J D and Zimmer-Faust R K. Acute toxicities of eleven metals to early life history stages of the yellow crab *Carcera anthonyi*. *Mar. Biol*, 1988, 98(2): 201~207
- 4 Shargaren D H. A study on the adaptation of marine organisms to changing salinities with special reference to the shore crab *Carcinus maenas* (L.), *Comp. Biochim. Physiol.*, 1974, 47A: 499~512
- 5 Nimmo D R, Lightner D V and Bahner L N. Effects of cadmium on the shrimp *Penaeus duorarum*. *Palaeomonetes vulgaris*, in Vernberg F J. et al. (eds.), *Physiological responses of marine biota to pollutants*, New York Acad. Press, 1977: 131~183
- 6 Rainbows P S. 海洋生物对重金属的积累及意义. 海洋环境科学, 1992, 11(1): 44~51
- 7 Dhavale D M. Environmental variables and heavy metal toxicity in crab *Scylla serrata* (Forskål), *Bull. Mar. Sci.*, 1990, 46(1): 244~245
- 8 吴坚. 微量金属对海洋生物的生物化学效应. 海洋环境科学, 1992, 10(2): 58~64
- 9 Ozretic B and Krajnovic-Ozretic M. Plasma sorbital dehydrogenases, glutamata dehydrogenase, and alkaline phosphatase potential indicators of liver intoxication in Grey Mullit (*Mugil auratus* Risso), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993, 50(4): 586~592
- 10 刘发义, 吴玉霖, 赵鸿儒等. 铜在中国对虾体内的积累与致毒效应. 海洋与湖沼, 1988, 19(2): 133~139
- 11 蓝伟光, 陈霓, 杨孙楷等. 重金属对真鲷生理生化作用的研究 I. 铜、锌、铬和硒对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性的综合影响. 海洋学报, 1993, 15(1): 92~97
- 12 傅朝君, 鲁太椿, 刘宪亭等. 草鱼卵球成熟、排放与碱性磷酸酶、酸性磷酸酶关系的研究. 淡水渔业, 1983, (1): 24~26

Effects of heavy metals on survival and metabolic enzyme activities of postlarvae *Penaeus japonicus*

Li Shaojing, Wang Guizhong, Weng Weihua, Tang Hong and Lin Qiongwu

(Department of Oceanography, Research Laboratory of SEDC of Marine Ecological Environment, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract

The 24h LC_{50} , 48h LC_{50} and 96 h LC_{50} values for copper, zinc and cadmium to the postlarvae of *Penaeus japonicus* in various salinity were determined. The toxicities of the metals were ranged as $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$. The specific activities of four metabolic enzyme (AKP, ACP, GPT, GOT) for the postlarvae of *Penaeus japonicus* exposed to sublethal concentrations of Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} were detected. It is showed that the activities were related to the concentrations and species of heavy metals. The activities of AKP, GPT, GOT were inhibited with increasing metal concentration and stimulated activities of ACP.

KEYWORDS Heavy metals, salinity, postlarvae of *Penaeus japonicus*, LC_{50} , enzyme activity