

Zn²⁺、Cr⁶⁺胁迫对水螅的急性毒理作用及对可溶性蛋白的影响

潘 林, 张艳馥, 金忠民

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要: 为探讨 Zn²⁺、Cr⁶⁺ 对水螅的急性毒性作用及其联合毒性作用, 采用静水法生物测试, 测定了经 Zn²⁺ 和 Cr⁶⁺ 胁迫后水螅体内可溶性蛋白含量的变化。结果表明, Cr⁶⁺ 毒性大于 Zn²⁺。Zn²⁺ 和 Cr⁶⁺ 对水螅 24、48、72、96 h 的半数致死质量浓度(LC₅₀)分别是 1.037 5、0.947 6、0.628 6、0.533 3 mg/L 和 0.594 7、0.475 0、0.264 7、0.121 4 mg/L; 二者的安全质量浓度分别为 0.053 3 mg/L、0.012 1 mg/L。Zn²⁺、Cr⁶⁺ 对水螅的联合毒性大于单一毒性, 表现为协同作用。随着重金属离子浓度的增高, 水螅体内的可溶性蛋白质的含量表现为先上升后下降。

关键词: 水螅; Zn²⁺; Cr⁶⁺; 急性毒性; 可溶性蛋白

中图分类号: S949 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)09-0120-04

Effects of Zn²⁺ and Cr⁶⁺ Stress to *Hydra* Acute Toxicity and Soluble Protein

PAN Lin, ZHANG Yan-fu, JIN Zhong-min

(School of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161000, China)

Abstract: The acute toxicity and the joint toxicity of Zn²⁺ and Cr⁶⁺ on *Hydra* (LC₅₀) were studied and the change of soluble protein of *Hydra* after stressed by Zn²⁺ and Cr⁶⁺ was determined by the static test method. The results showed that the toxicity sequence of two heavy metals ions to *Hydra* was Cr⁶⁺ > Zn²⁺. The LC₅₀ of 24, 48, 72 and 96 h for Zn²⁺ to *Hydra* were 1.037 5, 0.947 6, 0.628 6 and 0.533 3 mg/L, while for Cr⁶⁺, the LC₅₀ were 0.594 7, 0.475 0, 0.264 7 and 0.121 4 mg/L, respectively. The safe concentrations of Zn²⁺ and Cr⁶⁺ were 0.053 3 mg/L and 0.012 1 mg/L, respectively. The toxicity of combined Zn²⁺ and Cr⁶⁺ was greater than the individual toxicity, representing a result of the synergetic effect. The soluble protein content of *Hydra* was increased first and then decreased accompanying with the raised Zn²⁺ and Cr⁶⁺ concentration.

Key words: *Hydra*; Zn²⁺; Cr⁶⁺; acute toxicity; soluble protein

重金属污染对生态系统的影响, 已成为当今世界上普遍关注的环境问题之一。近年来, 随着工农业生产的迅速发展, 大量含重金属的废水排入自然水域, 污染了水螅赖以生存的环境, 不仅可能对水螅及其他水生生物产生直接毒害作用引起死亡, 而且有可能在水螅及其他水生生物体内蓄积, 对人类产生间接、潜在的毒害作用。由于水螅对水环境敏感, 其已

被用作淡水水域污染的一类环境指示生物, 是快速检测水环境污染物的良好试验材料; 且在生态学领域, 其在环境检测方面的重要价值也得以体现^[1-3]。有关水螅毒理方面的研究较多, 但重金属离子胁迫对水螅蛋白质的影响研究较少。本研究利用不同质量浓度 Zn²⁺ 和 Cr⁶⁺ 对水螅进行急性毒性试验, 为研究重金属离子对水生生物的影响提供参考。

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 黑龙江省自然基金项目(C201240)

作者简介: 潘 林(1964-), 男, 黑龙江克东人, 高级实验师, 硕士, 主要从事动物生态学研究。E-mail: plin@163.com

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

水螅购于齐齐哈尔市花鸟鱼市场,培养于烧杯中。培养用水为用充氧泵充氧 48 h 以上的自来水,温度控制在 $18 \sim 22^\circ\text{C}$,每天喂剑水蚤或水丝蚓 1 次。为保证水螅体表及水体的清洁,及时清除水螅排泄物和水蚤的残体,大约 1 周换水 1 次。水螅饥饿 24 h 后,选取健康、未出芽的大小相近的水螅个体作为试验材料。

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 、考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白、磷酸均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 试验预处理与分组 将 2 种重金属离子配制成较大范围的质量浓度,用水螅进行预试验,以确定 96 h 全活的最大质量浓度和 96 h 全死的最小质量浓度^[1],在这个范围内选取试验质量浓度。正式试验时设 1 个对照组和 5 个不同质量浓度梯度组,每组设 3 个平行,各 20 只水螅,死亡结果取平均值。

1.2.2 急性毒性试验方法 采用静水法生物测试^[2],期间不换水。根据预试验结果,设置 2 种重金属离子的质量浓度,即 Zn^{2+} : 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mg/L; Cr^{6+} : 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L。

试验过程中随时捞出死亡个体,观察并记录水螅中毒后的症状和 24、48、72、96 h 死亡个体数。用直线内插法,求出各自的半数致死质量浓度(LC_{50})及 95% 的置信区间,并按公式: $A = (96 \text{ h}) \text{LC}_{50} \times 0.1$,计算出安全质量浓度^[3-5]。

1.2.3 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 胁迫 24 h 对水螅的联合毒性作用 联合毒性试验采用加和等毒性溶液法,将 24 h 时的 LC_{50} 作为 1 个毒性单位,用每种重金属 24 h 时的 LC_{50} 分别乘以 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 的比例系数,即 Zn^{2+} 的质量浓度分别为 $a_1(0\text{LC}_{50})$ 、 $a_2(0.2\text{LC}_{50})$ 、 $a_3(0.4\text{LC}_{50})$ 、 $a_4(0.6\text{LC}_{50})$ 、 $a_5(0.8\text{LC}_{50})$ 、 $a_6(1.0\text{LC}_{50})$; Cr^{6+} 的质量浓度分别为 $b_1(0\text{LC}_{50})$ 、 $b_2(0.2\text{LC}_{50})$ 、 $b_3(0.4\text{LC}_{50})$ 、 $b_4(0.6\text{LC}_{50})$ 、 $b_5(0.8\text{LC}_{50})$ 、 $b_6(1.0\text{LC}_{50})$ 。这 2 种溶液混合相加后配成的等毒性溶液组合为: A(a_1-b_6)、B(a_2-b_5)、C(a_3-b_4)、D(a_4-b_3)、E(a_5-b_2)、F(a_6-b_1)。其中 A、F 组为参照组,若各组中水螅 24 h 时的死亡率相同,表明这 2 种重金属离子为相加效应;若 B-E 组各自的死亡率均高于 A 组或 F 组,表明这 2 种重金属离子为协同作用;若其死亡率低于 A 或 F 组,则为拮抗作用^[6]。测定期为 24 h,期间及时清理试验个体的排泄物。

1.2.4 可溶性蛋白含量的测定 用 Bradford 考马斯亮蓝 G-250 法测定可溶性蛋白含量^[7-8]。

1.2.4.1 蛋白质质量浓度标准曲线制作 取 0.1 g 牛血清白蛋白溶于 100 mL 蒸馏水中即得到 0.001 g/mL 的标准蛋白液,即每 1 mL 中含 1 000 μg 蛋白质。取 8 只试管分别加入标准蛋白液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,再对应加入蒸馏水 1.0、0.9、0.8、0.7、0.6、0.4、0.2、0 mL,即每一试管中溶液总体积为 1.0 mL。然后在各个试管中分别加入考马斯亮蓝 4 mL,反应 2 min 后,用 722 分光光度计在波长为 595 nm 处测定各试管的吸光度即 OD 值,以 OD 值为纵坐标,蛋白质质量浓度为横坐标作图,可得蛋白质标准曲线方程为: $y = 0.0004x + 0.0119$,如图 1。

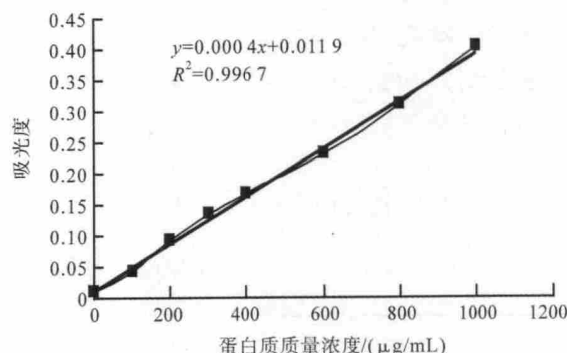


图1 可溶性蛋白质质量浓度与吸光度的标准曲线

1.2.4.2 样品蛋白质含量测定 所测定样品为不同质量浓度的 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 溶液处理 24 h 后的水螅。取水螅样品各 10 条,先用清水快速冲洗一次,置于滤纸上吸去多余的水分后称体质量(W),然后在每个样本里分别加入 0.5 mL 预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8),用玻璃组织研磨器磨成匀浆, 4°C 、1 500 r/min 离心 15 min,取上清液 0.5 mL,加入 1 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.8),作为样品蛋白质待测液, 4°C 保存备用。测试时取每个样品蛋白质待测液 1 mL,各加入考马斯亮蓝 G-250 染液 4 mL 混匀,反应 2 min 后,用 722 分光光度计在波长为 595 nm 处分别测定各个样本的吸光度,根据蛋白质标准曲线方程求出各样本的蛋白质含量。

1.3 LC_{50} 的计算方法

将胁迫离子质量浓度作为横坐标,水螅死亡率作为纵坐标。在 Excel 表格中将胁迫离子各质量浓度和相应的水螅死亡率制成散点图,得到线性回归方程和相关系数 r 。半致死质量浓度处的水螅死亡率为 50%,将其代入方程,计算质量浓度 x 的值即半数致死质量浓度。

1.4 数据处理

应用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 统计分析软件处理,以确定重金属离子的质量浓度变化对水螅死亡率及可溶性蛋白质活性的影响。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 对水螅的急性毒性作用

试验发现,2 种离子致水螅中毒后,其身体和活

力均发生明显变化,表现为水螅的身体和触手略微收缩,触手的远端开始解体,呈白絮状,胃区部原本致密平整的表层开始腐蚀,随后触手完全解体,胃区部腐蚀更加严重,然后胃区部开始溶解,并且从口中喷出大量的体腔液,最后水螅身体萎缩死亡。

Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 胁迫使水螅中毒的过程基本相同,但 Cr^{6+} 使水螅表现出中毒症状的速度比 Zn^{2+} 快。随药剂质量浓度的增加,水螅死亡率均呈逐渐上升的趋势(表 1)。

表 1 不同处理下 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 对水螅死亡率的影响

重金属离子	质量浓度/(mg/L)	24 h		48 h		72 h		96 h	
		死亡数/条	死亡率/%	死亡数/条	死亡率/%	死亡数/条	死亡率/%	死亡数/条	死亡率/%
Zn^{2+}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.40	0	0	2	10	5	25	6	30
	0.50	1	5	3	15	5	25	8	40
	0.60	3	15	5	25	8	40	12	60
	0.70	5	25	6	30	13	65	16	80
	0.80	6	30	8	40	15	75	20	100
Cr^{6+}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.10	1	5	2	10	5	25	9	45
	0.20	2	10	2	10	7	35	12	60
	0.30	4	20	6	30	11	55	16	80
	0.40	7	35	8	40	15	75	18	90
	0.50	8	40	11	55	18	90	20	100

从表 2 可知,相同染毒时间,2 种重金属的毒性表现为 $Cr^{6+} > Zn^{2+}$ 。24、48、72、96 h 时水螅 Zn^{2+} 的半致死浓度分别是 Cr^{6+} 的 1.74、1.99、2.37、4.39 倍,

Cr^{6+} 的毒性在染毒 96 h 后表现最明显;各胁迫时间段水螅死亡率与胁迫离子质量浓度的回归方程相关系数均大于 0.961 0,显示出显著的相关性。

表 2 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 对水螅的 LC_{50} 、安全质量浓度及线性回归分析

重金属离子	胁迫时间/h	回归方程	相关系数 r	LC_{50} /(mg/L)	安全质量浓度/(mg/L)	置信区间/95%
Zn^{2+}	24	$y=80x-33$	0.992 3	1.037 5		0.974 4~1.049 9
	48	$y=75x-21$	0.993 4	0.946 7		0.932 5~0.961 7
	72	$y=140x-38$	0.961 5	0.628 6		0.618 4~0.638 9
	96	$y=180x-46$	0.993 9	0.533 3	0.053 3	0.526 4~0.540 3
Cr^{6+}	24	$y=95x-6.5$	0.985 1	0.594 7		0.576 1~0.613 9
	48	$y=120x-7$	0.973 3	0.475 0		0.458 0~0.492 6
	72	$y=170x+5$	0.994 8	0.264 7		0.254 8~0.288 6
	96	$y=140x+33$	0.989 9	0.121 4	0.012 1	0.117 7~0.125 2

2.2 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 对水螅的联合毒性作用

由表 3 可知,B-E 组 Cr^{6+} - Zn^{2+} 对水螅的联合毒性作用结果均表现为死亡率 $\geq 50\%$,因而 Cr^{6+} - Zn^{2+} 的联合毒性作用为协同作用。其中参照组 A、F 组死亡率均为 50%;在 B 组中, Cr^{6+} 在组

合中所占的比例较小(20%),死亡率也为 50%;而 E 组中, Cr^{6+} 在组合中所占的比例较大(80%),死亡率为 65%。表明,在 Cr^{6+} - Zn^{2+} 对水螅的联合毒性作用中, Cr^{6+} 起主要作用, Cr^{6+} 的毒性大于 Zn^{2+} 。

表 3 加和等毒性强度下联合离子不同质量浓度胁迫水螅的死亡率

项目	离子组合					
	A	B	C	D	E	F
Cr^{6+} - Zn^{2+} /(mg/mL)	0-1.037 5	0.118 9-0.830 0	0.237 9-0.622 5	0.356 8-0.415 0	0.475 8-0.207 5	0.594 7-0
24 h 死亡率/%	50	50	55	60	65	50

2.3 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 胁迫对水螅可溶性蛋白含量的影响

由图2、图3可以看出, Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 胁迫对水螅可溶性蛋白含量的影响趋势基本相同, 在2种离子胁迫下, 水螅均表现为低质量浓度下可溶性蛋白含量升高, 随着离子质量浓度的升高, 可溶性蛋白含量下降, 高质量浓度表现出明显的毒理影响。

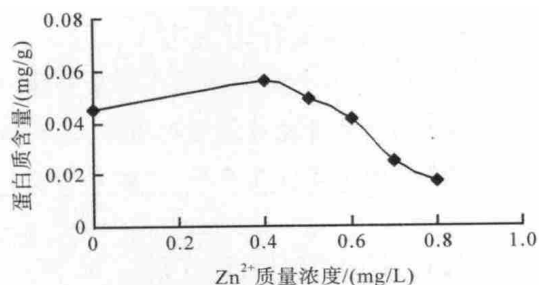


图2 Zn^{2+} 胁迫对水螅可溶性蛋白含量的影响

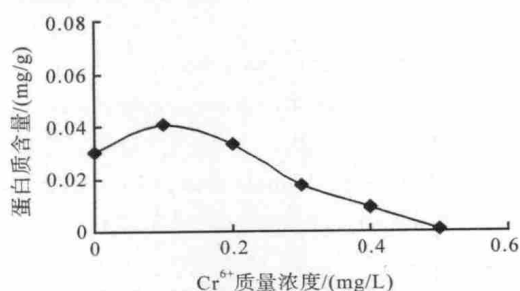


图3 Cr^{6+} 胁迫对水螅可溶性蛋白含量的影响

3 结论与讨论

Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 对水螅 24、48、72、96 h 的 LC_{50} 分别是 1.037 5、0.947 6、0.628 6、0.533 3 mg/L 和 0.594 7、0.475 0、0.264 7、0.121 4 mg/L; Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的安全质量浓度分别为 0.053 3 mg/L、0.012 1 mg/L。水螅受2种离子单一的胁迫程度随药物质量浓度的增加而逐渐增高, 且 Cr^{6+} 的毒性大于 Zn^{2+} 的毒性。这与周光锋等^[9]、江敏等^[10] 及卜艳珍等^[11] 的研究结果一致, 而与包坚敏等^[12] 的研究结果相反, 可能是不同的水生动物由于形态结构、生理机能的不同以及在不同的环境条件下, 各种生物对重金属离子胁迫的适应能力各不相同造成的。

Zn^{2+} - Cr^{6+} 对水螅的联合毒性作用表现为协同作用, 这与江敏等^[10] 的研究结果一致, 而与陈娜等^[13] 的研究结果相反, 这是因为, 由于种群、生存环境以及地域的不同, 即使是同一类水生生物, 其形态结构及生理机能也可能发生变化, 表现出对相同的重金属离子污染产生不同的生态毒理效应。

蛋白质作为生命活动的物质基础, 是构成组织细胞的重要成分。它不仅具有形成和构建新生组织、修补损伤组织和排除外源物质及坏死组织的作

用, 而且, 作为酶和部分激素, 在代谢调控和生理生化反应方面也具有重要作用。一旦其受到破坏, 会严重影响生物有机体, 甚至死亡。

本研究发现, 经低质量浓度 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 胁迫后, 水螅体内可溶性蛋白含量升高。这可能是因为低剂量重金属离子可以作为一种信号分子, 使体内 R 基因受到刺激而激活, 进而产生可溶性蛋白(金属巯基蛋白)和调控蛋白。但随着重金属离子质量浓度升高, 重金属离子在体内的积累量逐渐增加, 体内的可溶性蛋白会与重金属离子发生螯合反应。且在高质量浓度的重金属刺激下, 可溶性蛋白进一步分解为氨基酸, R 基因也不再产生可溶性蛋白, 从而导致体内的可溶性蛋白质含量逐渐减少, 最终导致水螅死亡^[13]。

参考文献:

- [1] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社, 1989: 49-57.
- [2] 吴邦灿, 费龙. 现代环境监测技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999: 252-254.
- [3] 曾海祥, 竺俊全, 丁理法. 重金属镉和锌对可口革囊星虫的毒性试验[J]. 水利渔业, 2006, 26(2): 96-98.
- [4] 谢湘筠, 林勇斌, 柯才焕, 等. 重金属铅、镉对方斑东风螺幼体的急性毒性试验[J]. 漳州师范学院学报: 自然科学版, 2007, 20(4): 93-96.
- [5] 张学艳, 龙塔, 刘开永. 马钱子对雏鸡的急性毒性作用[J]. 河南农业科学, 2010(12): 129-130.
- [6] 朱庆红, 李莉, 赵昭. 6种水产药物对金鱼苗的急性毒性试验[J]. 河南农业科学, 2012, 41(1): 151-155.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [8] 孟紫强. 环境毒理学[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2000: 128-140.
- [9] 周光锋, 王志铮, 杨阳, 等. 4种重金属离子对厚壳贻贝幼体的急性毒性[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2007, 26(4): 391-394.
- [10] 江敏, 藏维玲, 姚庆祯, 等. 四种重金属对罗氏沼虾仔虾的毒性作用[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 203-207.
- [11] 卜艳珍, 杨晓丽. 4种重金属对金鱼幼体的急性毒性[J]. 水利渔业, 2007, 27(1): 84-85.
- [12] 包坚敏, 王志铮, 杨阳, 等. 4种重金属离子对三疣梭子蟹大眼幼体的急性毒性[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2007, 26(4): 395-398.
- [13] 陈娜, 郝家胜, 王莹, 等. 铜、铅、镉、锌、汞和银离子复合污染对水螅的急性毒性效应[J]. 生物学杂志, 2007, 24(3): 32-35.