

亚硝酸钠和多聚磷酸钠对日本沼虾的毒性研究*

李志华 谢松 王维娜 王军霞

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要: 针对目前危害虾类养殖的水污染中比较严重的亚硝酸盐和多聚磷酸盐污染, 主要研究亚硝酸钠和多聚磷酸钠对日本沼虾的毒性影响。通过实验得出: 亚硝酸钠对日本沼虾 24、48、96 h 的半致死浓度分别为 46、26、13.33 mg/L, 多聚磷酸钠对日本沼虾 24、48、96 h 的半致死浓度分别为 1 233.33、1 180、1 080 mg/L。实验表明, 活性氧是随着亚硝酸钠和多聚磷酸钠的浓度增加而增加, 而超氧化物歧化酶的酶活力则是随着亚硝酸钠和多聚磷酸钠的浓度增加先稍微增加, 后又下降, 这表明虾的免疫系统对低浓度的毒物有一定的抵抗能力, 但随着毒物浓度增大, 虾的免疫系统会受到抑制, 虾的免疫功能下降, 抗病力降低, 导致染病死亡。

关键词: 日本沼虾; 亚硝酸钠; 多聚磷酸钠; 半致死; 超氧阴离子; 超氧化物歧化酶

中图分类号: Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)03-12-05

Toxicity of Nitrite-Na and Sodium Polyphosphate to the Shrimp *Macrobrachium nipponense*

LI Zhi-Hua XIE Song WANG Wei-Na WANG Jun-Xia

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The pollution of nitrite and sodium polyphosphate is a serious problem at present. The main aim of this study is to reveal the toxicity of nitrite-Na and sodium polyphosphate to the shrimp *Macrobrachium nipponense*. Results showed that the LC_{50} of nitrite-Na to the shrimp *M. nipponense* is 46, 26 and 13.33 mg/L, and the LC_{50} of sodium polyphosphate to the shrimp is 1 233.3, 1 180 and 1 080 mg/L at 24, 48 and 96 h, respectively. Results also showed that the quantity of ROS was also enhanced with the increase in the concentration of nitrite-Na and sodium polyphosphate, while the activity of superoxide dismutase was slightly increased but then decreased significantly. The results suggest that the immune system of the shrimp *M. nipponense* has some resistance to the low concentration of toxicants. However, as the concentration of toxicants increases, the immune system is prohibited, leading to death of the shrimp *M. nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; Nitrite-Na; Sodium polyphosphate; LC_{50} ; ROS; Superoxide dismutase

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 又名青虾, 由于其适应性强, 成活率高, 因此成为一种重要的淡水养殖对象。近年来, 在青虾养殖过程中, 因为水体中虾的排泄物、残饵以及有机碎屑氧化分解, 容易使氨的含量增高, 同时 pH

值增高, 这样会使亚硝酸盐积累, 造成亚硝酸盐

* 河北省教育厅资助项目 (No. 2002273);

第一作者简介 李志华, 男, 24岁, 硕士研究生; 研究方向: 鱼虾营养与病害免疫及生态; E-mail: lizhihua426@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2003-08-30, 修回日期: 2004-01-10

污染^[1]。另外,生活污水污染水环境,也是威胁虾类养殖的原因。我国目前洗衣粉的配方中含有17%左右的多聚磷酸钠(含磷量约为4.0%),当这种含磷废水在养虾的水域中超过一定值后,也会直接影响虾类的生长和繁殖。

随着甲壳动物养殖规模的扩大,对其病害和防治的研究、尤其是对其免疫机能的研究越来越重视。近年来的研究表明,甲壳动物的免疫机制以非特异性免疫反应为主^[2-4]。此外,甲壳动物的免疫因子主要是血淋巴中的各种酶,它包括溶菌酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶等等^[5,6]。尽管有人做了一些生态因子对水生甲壳类动物毒性作用的研究,但大多停留在估算半致死浓度、安全浓度方面,毒性毒理方面研究得不够深入。只有将生态和生理特征的研究有机结合起来,才更有意义。因此,本实验将毒物与日本沼虾生理特征结合起来,目的是找出亚硝酸钠与多聚磷酸钠对日本沼虾免疫系统有何影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验所用的日本沼虾购自白洋淀,为健康活泼个体。实验之前,先将虾暂养3 d。虾平均体长4.5~4.9 cm,体重3.14~3.35 g。试验时每缸放虾12尾。

1.2 实验方法

1.2.1 半致死浓度实验

(1)预实验:选定几个浓度范围进行实验,观察24、48 h的虾的反应,找出实验的正确浓度范围。

(2)正式实验:根据预实验的结果和半致死浓度(LC₅₀)的要求,对于亚硝酸钠在5 mg/L和50 mg/L之间选择6个浓度,多聚磷酸钠在800 mg/L和1 500 mg/L之间选择5个浓度,每个试验缸放虾12尾,每个浓度组分别设空白对照,每个浓度组及空白对照分别做平行。实验过程中充气并喂以少量饵料并及时去除死虾,每24 h更新实验用液。观察24、48和96 h虾的死亡数,用直线内插法求得亚硝酸钠和多聚磷酸钠的半致死浓度^[7]。

1.2.2 亚硝酸钠和多聚磷酸钠的影响

(1)急性应激作用:将虾在不同浓度毒物中应激24 h后捞出,取血测定超氧阴离子,后将虾用液氮迅速冷冻,放入-83℃冰柜储存。

(2)超氧阴离子的测定^[8]

A. 虾血中超氧阴离子测定:用卡介苗注射器先从虾的心脏中直接吸取虾血60 μl,再吸取60 μl 抗凝剂(0.25%半胱氨酸),一起注入1.5 ml离心管中,加入200 μl MHBSS培养基,半小时后,将上清液去除,再加入200 μl MHBSS培养基和100 μl的0.3% NBT,培养2 h。加入200 μl 甲醇,后在冷冻离心机中5 000 r/min离心15 min,去上清液,保留沉淀,用70%甲醇冲洗两次沉淀。在低温烘箱烘至完全干燥,用2 mol/L的KOH 600 μl和DMSO(二甲基亚砷)700 μl将沉淀溶解,在620 nm下进行比色测定。

B. 肌肉中超氧阴离子的测定:取虾的肌肉0.05 g,加入1 ml的pH值7.2的磷酸缓冲液,超声波匀浆,后5 000 r/min离心25 min,取50 μl上清液,加入100 μl MHBSS培养基和50 μl的0.3% NBT,培养2 h,加入200 μl 甲醇,后在冷冻离心机中5 000 r/min离心15 min,去上清液,保留沉淀,用70%甲醇冲洗两次沉淀。在低温烘箱烘至完全干燥,用2 mol/L的KOH 600 μl和DMSO 700 μl将沉淀溶解,在620 nm下进行比色测定。

(3)SOD的测定方法^[9,10]

A. 取样:取虾的肌肉0.2 g,加入2 ml pH值为6.5的磷酸缓冲液,用超声波匀浆机匀浆,再用冷冻离心机离心,转数为10 000 r/min。取上清液测定酶活。

B. 调A₀值:在一系列20 ml试管中加入9 ml Tris-HCl缓冲液,再加入40 μl邻苯三酚溶液,3 min后加入40 μl抗坏血酸溶液,立刻摇匀,在420 nm下进行比色测定,测得值若大于0.182,加2 mol/L的HCl,若测得值小于0.178,则加1 mol/L的Tris调缓冲液。直至邻苯三酚在这种缓冲液中的自氧化率为0.178~0.182。

C. 测酶活:在一系列20 ml试管中加入9 ml已经调好Tris-HCl的缓冲液,再加入400 μl粗

酶液,再加入 40 μl 邻苯三酚,3 min 后加入 40 μl 抗坏血酸终止邻苯三酚氧化,1 min 内用 3 cm 比色杯在 420 nm 下测定得出 OD 值即 A_s 。酶活计算:

$$\text{SOD 的活力单位} = (A_0 - A_s) \times N \times 18 / A_0 \times V \times P$$

N :样品的稀释倍数; V :加样体积(ml); P :所加样品体积中的蛋白含量; A_0 :未加酶液调节邻苯三酚自氧化率时的吸光值; A_s :加入酶液后测得的吸光值。

2 结果

2.1 半致死浓度实验结果 根据实验结果,用直线内插法求得亚硝酸钠对日本沼虾的 24、48 和 96 h 的 LC_{50} 分别为 46、26 和 13.33 mg/L(图 1),多聚磷酸钠对日本沼虾的 24、48 和 96 h 的 LC_{50} 分别为 1 233.33、1 180 和 1 080 mg/L(图 2)。

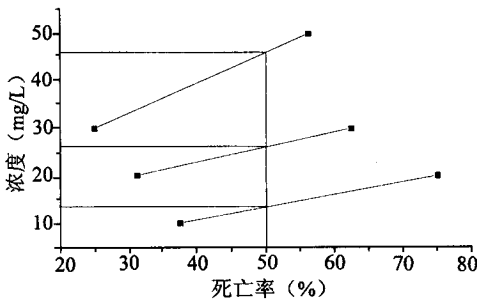


图 1 亚硝酸钠对日本沼虾的毒性

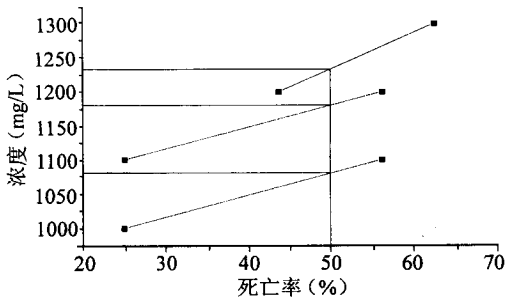


图 2 多聚磷酸钠对日本沼虾的毒性

2.2 超氧阴离子测定结果 以日本沼虾为实验动物,取其血和肌肉测其中的超氧阴离子,结果见图 3、4。实验结果表明,无论肌肉中的超氧阴离子还是血中的超氧阴离子的量都是随着亚硝酸钠和多聚磷酸钠浓度增加而增加,不过

血中的超氧阴离子比肌肉中的超氧阴离子变化趋势更明显。

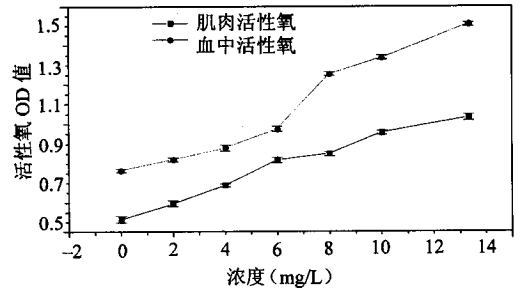


图 3 不同浓度亚硝酸钠对日本沼虾超氧阴离子的影响

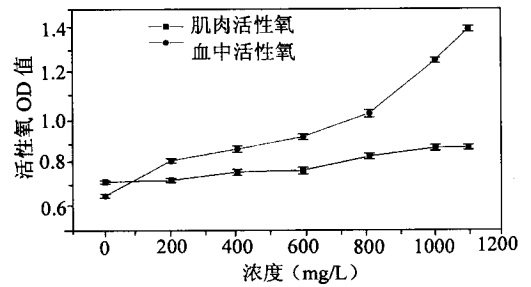


图 4 不同浓度多聚磷酸钠对日本沼虾超氧阴离子的影响

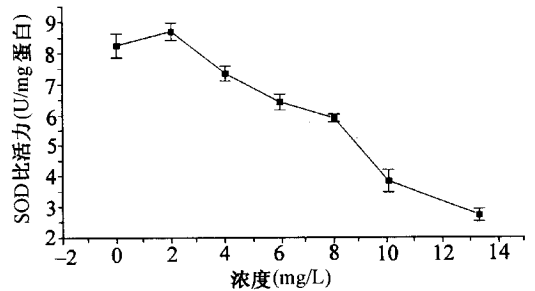


图 5 不同浓度亚硝酸钠对日本沼虾 SOD 的影响

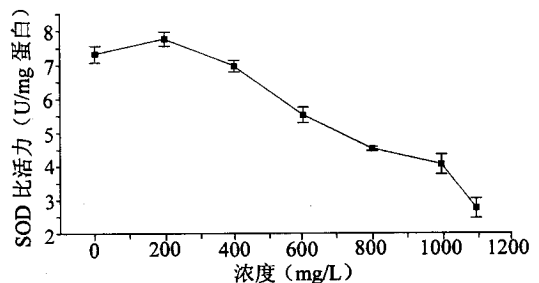


图 6 不同浓度多聚磷酸钠对日本沼虾 SOD 的影响

2.3 SOD 测定结果 以日本沼虾为实验动物,取其肌肉测其中的超氧化物歧化酶,结果见图 5、6。实验结果表明,随着亚硝酸钠和多聚磷酸钠浓度的升高,超氧化物歧化酶活性先稍有升高,后随之下降。

3 讨 论

3.1 对半致死浓度的影响 亚硝酸盐和多聚磷酸盐是当今虾类养殖中比较严重的污染物。此次实验测得亚硝酸钠对日本沼虾 24、48、96 h 的半致死浓度分别为 46、26、13.33 mg/L,多聚磷酸钠对日本沼虾 24、48、96 h 的半致死浓度分别为 1 233.33、1 180、1 080 mg/L。

亚硝酸盐是强氧化剂,动物吸入血液后会导导致血淋巴 pH 的下降,二氧化碳分压升高,扰乱了氮排泄、离子调节和呼吸气体的交换,使血红蛋白中的二价铁氧化成三价铁,降低了氧合血蓝蛋白水平导致低氧血症,使各组织缺氧。甲壳动物血液中含血蓝蛋白,其辅基是含铜的化合物,在亚硝酸盐作用下,可能会发生与血红蛋白相似的反应,从而引起缺氧和青紫症,进一步导致死亡^[1]。多聚磷酸盐对日本沼虾的毒性机理未见报道,它的半致死浓度偏高可能是因为多聚磷酸盐本身不具毒性,不直接对虾的生理机制造成影响,但它溶于水后会使水带有一定的粘性,这样会影响虾的呼吸系统,导致其呼吸受阻,缺氧死亡。

3.2 对超氧阴离子的影响 在正常情况下,超氧阴离子水平很低不会引起伤害,细胞内超氧阴离子产生与清除处于一种平衡状态^[11]。在毒物胁迫下,水生生物的抗氧化防御系统被破坏,导致机体内超氧阴离子含量过高,这种平衡被打破。一旦出现这种情况,就有可能产生伤害作用。其失衡原因是:自由基过多和机体对自由基的清除能力减弱,或两者兼而有之^[12]。

实验表明在血液和肌肉中超氧阴离子的量均随着毒物浓度增加而上升,但是血液的超氧阴离子变化幅度比肌肉的超氧阴离子明显,显示出血液系统对毒物反应比较敏感或者是血液中的抗氧化酶含量较低,不能快速清除产生的

超氧阴离子。而肌肉中各种抗氧化酶含量比血液中丰富,能快速清除体内产生的超氧阴离子,故在同样毒物胁迫条件下,肌肉中的超氧阴离子的变化不如血液中的明显。结果证明超氧阴离子量的变化反映出虾的免疫系统在有毒物侵入时功能的变化。

3.3 对超氧化物歧化酶的影响 超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内非常重要的一种抗氧化酶,对生物的抗氧化保护是十分明显的。它能清除超氧阴离子自由基,将超氧阴离子自由基转化为过氧化氢进而由过氧化氢酶分解,这样就可以将自由基保持在一个较低水平的平衡状态,以保护功能大分子不被氧化破坏。

实验中发现,随着污染物浓度增加,SOD 酶活起初降低比较缓慢,甚至酶活稍有升高。这可能是因为污染物浓度较低时,体内产生的超氧阴离子自由基较少,SOD 的底物增加,酶活相应提高,这样在污染物浓度较低时,虾可以清除体内过多的自由基,保持内环境的稳定。但随着污染物浓度增大,SOD 酶活逐渐降低,说明过高的污染物会产生较多的超氧阴离子,而过多的超氧阴离子会抑制 SOD 酶活。结果证明虾的免疫系统对低浓度的毒物有一定的抵抗能力,但随着毒物浓度增大,虾的免疫系统会受到抑制,虾的免疫功能下降。

参 考 文 献

- [1] 刘淑梅,孙振中,戚冀渊等.亚硝酸盐对罗氏沼虾幼体的毒性实验.水产科技情报,1999,26(6):281~283.
- [2] 孟凡伦,张玉臻,孔健等.甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统的研究评价.海洋与湖沼,1999,30(1):110~115.
- [3] Soderhall K, Vnjestam T. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity, the specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, 25:406~414.
- [4] Ashida M, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1984, 77B(1):21~26.
- [5] 刘树青,江晓路,牟海洋等.免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用.海洋与湖沼,1999,30(3):278~283.

- [6] 刘恒,李光友.免疫多糖对养殖有关白对虾作用的研究.海洋与湖沼,1998,29(2):113~118.
- [7] 周永欣,章宗涉.水生生物毒性实验方法.北京:农业出版社,1989,112~114.
- [8] Munoz M, Cedeeno R, Rodriguez J, *et al*. Measurement of reactive oxygen intermediat production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2000, 191:89~107.
- [9] Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47:469~474.
- [10] 静天玉,赵晓瑜.一种改进的邻苯三酚法测定超氧化物歧化酶活性的方法.生物化学与生物物理进展,1995,22(1):13~15.
- [11] 陈惠萍.活性氧的检测方法.华南热带农业大学学报,2000,6(2):14~17.
- [12] Winston G W, Digiulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 1991, 19:137~161.