

铜、镉对中华哲水蚤氨基酸含量影响的实验研究*

林汝榕** 李少菁

(厦门大学, 361005)

提要 在室内进行了铜、镉对中华哲水蚤 (*Calanus sinicus* Brodsky) 氨基酸含量影响实验。结果表明, 当外加重金属浓度较低时 ($\text{Cu}, 2-10\mu\text{g/L}$; $\text{Cd}, 10-150\mu\text{g/L}$), 动物各种氨基酸含量明显提高, 总氨基酸含量比对照组约增加 10—31%; 重金属浓度提高时, 动物氨基酸含量则出现下降趋势, 说明较低浓度重金属对动物有刺激效应, 此时摄食活动加强, 增加了从摄食获得的营养成分; 浓度提高则产生抑制效应。因此, 氨基酸含量的变化, 可作为桡足类对外界重金属污染物作出生理反应的指标之一。文中对某些特殊氨基酸含量的变化及机制也进行了讨论。

国外曾报道了重金属毒物对鱼、贝、虾等动物体内生化组分的影响研究^[1], 由动物对污染物产生的生理反应而引起体内某些生化组分的变化, 可作为对环境胁迫起敏感反应的指标。桡足类在海洋食物链中占有重要地位^[1,2], 研究重金属对桡足类体内生化组分的影响, 具有重要的现实意义。本文通过室内实验, 初步探讨了海区污染中两种常见的重金属(铜、镉)对桡足类(中华哲水蚤)氨基酸含量的影响。

一、材料和方法

1. 样品的采集

于 1984 年 4 月夜间高潮前后用大型浮游动物网(网口直径 40cm, 长度 100cm, 筛绢 GG36, 底部用宽口玻璃瓶收集)在厦门海关码头随潮拖曳。采得的动物用现场海水稀释, 在半小时内带回实验室进行分离。选出健康, 运动能力强, 大小一致的雌性个体, 置于与采集现场相似的温盐度环境下培养。

2. 重金属实验液、培养海水的制备及饵料生物的培养

实验前, 将 $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (A. R.) 和 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (C. P.) 分别配制成 $100\mu\text{g/ml}$, 1mg/ml 的贮备液(用重蒸水配制), 实验时稀释成各种不同外加重金属浓度的海水。培养海水一律先经干净海砂沉淀过滤, 再用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 用摩尔-克纽森法测定氯度, 按 $S = 1.807\text{Cl}\%$, 计算海水盐度值, 并调至 26‰。用作饵料的三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornerutum*) 置于窗台光照下自然繁殖, 定时向藻液加入营养盐, 扩大培养, 并

* 上海生物化学研究所王家平同志帮助分析样品, 厦门大学海洋系郑重教授、李松副教授对本文提出宝贵意见, 作者深表谢意。

** 现在国家海洋局第三海洋研究所。

收稿日期: 1989 年 9 月 1 日。

计算藻密度。

3. 实验安排及氨基酸分析处理

将中华哲水蚤(♀)先在 $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的培养海水中驯化一天(20 只/L), 三角褐指藻密度为 3×10^4 个/ml, 然后置于不同的外加重金属浓度的海水中(外加 Cu 浓度分别为 2, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/L}$; 外加 Cd 浓度分别为 10, 30, 100, 150, 300 $\mu\text{g/L}$), 水体不充气, 每天全换水加饵, 置于暗处。每种情况均设对照组平行实验。培养 5d, 然后换水不投饵, 让动物排粪 12h。

(1) 氨基酸分析的前处理 取出经上述步骤培养的动物, 用蒸馏水淋洗, 接着依次用 30, 50, 75, 95% 的乙醇脱水半小时, 两次用无水乙醇各脱水半小时, 动物样品在 60°C 恒温干燥 24h, 然后置于真空干燥器中, 用 P_2O_5 作干燥剂于真空干燥 5—8h 至恒重, 在微量天平上(分度值为 0.01mg)称重后, 放入安瓿管中, 加入 6mol/L HCl 和适量硫基乙酸, 用氩气除氧 1—2min 后封管, 于 160°C 恒温消化水解 24h。

(2) 氨基酸分析 上柱前以消化液水洗蒸干, 加入缓冲液至一定体积, 以茚三酮为显色剂, 在日立 835-50 型氨基酸自动分析仪上进行分析。

同时分析采集后经 12h 排粪的现场动物氨基酸含量, 以作比较。

二、实验结果

1. 现场与培养组动物氨基酸含量的测定结果

分析结果见图 1。由图 1 可见, 与现场动物相比, 经室内培养的动物除丝氨酸、谷氨酸、赖氨酸含量下降相对明显外, 其它氨基酸仅表现为略有上升或下降, 反映出在正常情

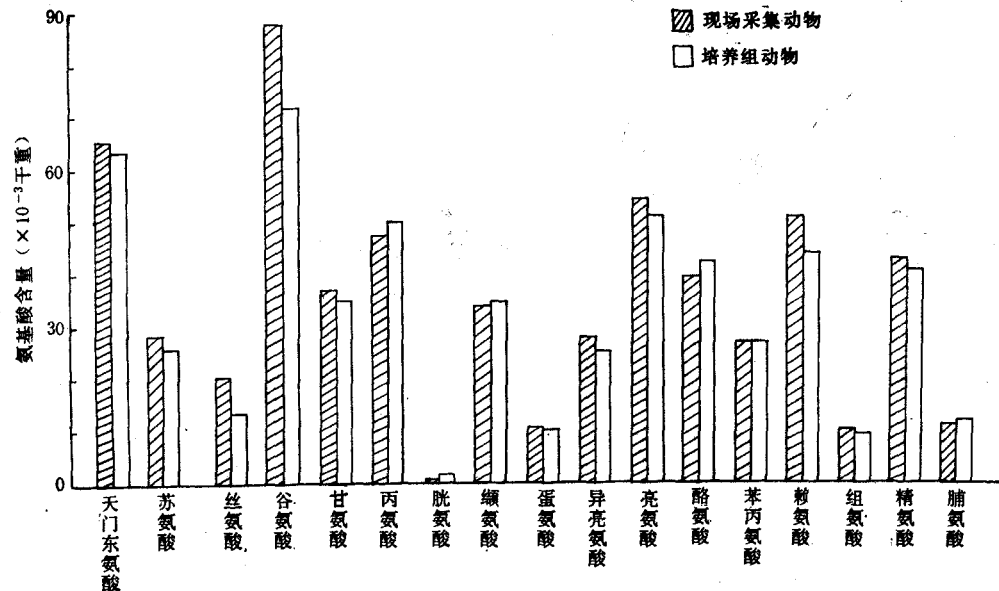


图 1 现场动物与培养组动物氨基酸含量

Fig. 1 Comparison of amino acid contents between collected and cultured samples of *Calanus sinicus*

表 1 铜、镉对中华哲水蚤氨基酸含量的影响 (与对照组比较,%)

Tab. 1 Influences of Cu and Cd on amino acid contents in *Calanus sinicus* (compared with contrast,%)

氨基酸	外加铜浓度 ($\mu\text{g/L}$)					外加镉浓度 ($\mu\text{g/L}$)				
	2	5	10	20	50	10	30	100	150	300
天门冬氨酸	120	118	106	94	98	125	113	104	104	96
苏氨酸	131	127	117	101	101	135	122	111	113	101
丝氨酸	186	173	161	140	106	185	184	149	146	119
谷氨酸	142	141	127	113	98	147	139	120	120	104
甘氨酸	133	132	121	104	96	140	126	117	119	108
丙氨酸	113	114	103	91	97	122	108	103	104	98
胱氨酸	105	88	76	114	153	68	118	118	140	129
缬氨酸	118	122	108	73	99	122	108	105	106	102
蛋氨酸	129	124	105	102	99	134	133	111	114	101
异亮氨酸	133	135	117	102	98	132	140	109	110	102
亮氨酸	124	131	112	99	96	130	119	109	109	100
酪氨酸	115	125	106	92	97	121	114	104	104	98
苯丙氨酸	112	121	101	91	96	115	108	100	103	98
赖氨酸	125	128	112	103	97	130	127	109	107	104
组氨酸	126	153	125	108	97	138	127	122	108	116
精氨酸	117	127	109	96	98	126	112	107	107	103
脯氨酸	97	103	97	80	104	113	95	102	107	101

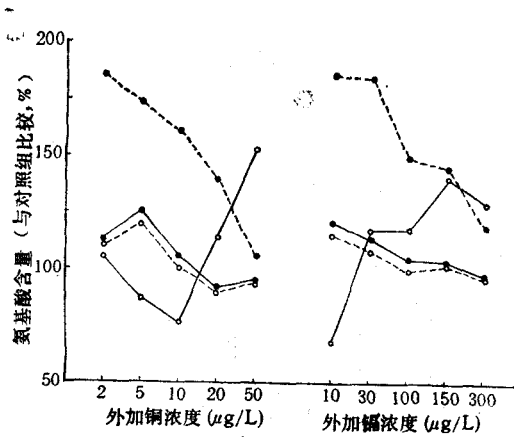


图 2 在铜、镉的不同浓度下中华哲水蚤某些特殊氨基酸含量的变化

Fig. 2 Changes of some special amino acid contents in *Calanus sinicus* incubated in seawater with different levels of Cu or Cd

—●— 丝氨酸; —○— 胱氨酸;
—●— 酪氨酸; —○— 苯丙氨酸。

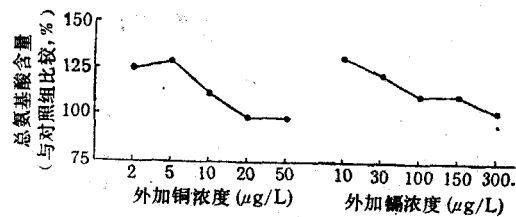


图 3 铜、镉对中华哲水蚤总氨基酸含量的影响

Fig. 3 Influences of Cu and Cd on the total amino acid contents in *Calanus sinicus*

况下,以摄食浮游植物为生的中华哲水蚤体内的氨基酸含量保持相对稳定。

2. 铜、镉对中华哲水蚤氨基酸含量的影响

两种重金属对中华哲水蚤氨基酸含量的影响结果见表 1、图 2—3。显然,在较低重金属浓度下(外加 Cu, 2—10 $\mu\text{g/L}$; Cd, 10—150 $\mu\text{g/L}$), 动物大多数氨基酸量的增加相当可观,其中最显著的是丝氨酸(几乎成倍增加),其次是谷氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、天门冬氨酸,精氨酸增加的百分数相对小些。某些特殊氨基酸含量的变化情况值得注意(见图 2),如丝氨酸在所有重金属浓度下,含量均是增加的,但增加的比例是随浓度的增加而减少;酪氨酸、苯丙氨酸含量在浓度较低时略有增加,随着浓度的增高,含量出现下降;胱氨酸在浓度较低时含量减少,而浓度较高时含量反而增加;脯氨酸总的看来变化不大,保持相对稳定。

动物总氨基酸含量的变化也相应表明,当外加的铜、镉浓度较低时,动物总氨基酸含量提高,约比对照组动物增加 10—31% [总氨基酸量达 $(609-725) \times 10^{-3}$ 干重]; 而重金属浓度进一步提高时,动物总氨基酸含量出现下降趋势(图 3),这种由重金属引起氨基酸含量增加和减少的现象,与实验观察到的重金属对该动物摄食、排泄的刺激和抑制效应是比较一致的^[4]。

三、讨 论

1. 桡足类氨基酸含量的比较及营养价值

根据测定结果,中华哲水蚤的各种氨基酸成分齐全,总氨基酸含量相当高,约占体重的 55—60% (按干重计),因此是理想的天然动物性饵料。另一方面,由于桡足类富含蛋白质,象苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸等人体必需氨基酸,在桡足类中含量可达 33%,因此也是值得开发利用的。

在分析的样品中,谷氨酸含量最高,天门冬氨酸、亮氨酸、赖氨酸次之,蛋氨酸、脯氨酸、组氨酸含量较少,而胱氨酸含量最少,这和 Cowey, Raymont 等人结果一致(表 2)^[6,8]。根据王渊源的分析结果表明,三角褐指藻除蛋氨酸、胱氨酸含量低而无法测出外,其它各种氨基酸成分都具备,且含量较高^[2]。用三角褐指藻喂养 5d 的中华哲水蚤的各种氨基酸成分和含量大小顺序与三角褐指藻的较一致,但前者总氨基酸含量为后者的二倍多。根据这几种浮游生物中各种氨基酸占总氨基酸的百分数相当接近的事实,可看出它们有较一致的氨基酸组成比例。

2. 重金属对桡足类体内生化组分的作用机制探讨

当桡足类处于含铜的海水中时,动物可通过体表对铜离子的吸附作用或通过摄食途径使铜进入体内。进入体内的铜可能刺激了蛋白酶活性或动物体内发生某些生物化学过程,从而使蛋白酶的合成量增加。分析结果表明,在铜、镉浓度较低的海水中,动物丝氨酸含量显著增加,而丝氨酸是许多蛋白酶活性中心的重要成分,酶活性受刺激或酶的合成量增加,促进动物的摄食强度提高,动物可从增加摄食中获得更多的营养成分,因而动物的氨基酸含量提高。我们的另一实验结果已表明,重金属浓度较低时对桡足类的摄食有刺激作用,从动物排出粪块大大增加的事实,可看出动物体内的代谢活动显著加强^[4]。若是蛋白酶的合成量增加,则必定与动物体内的核酸代谢有关,因为酶的合成和核糖核酸的关系密切。Barron 等人曾发现重金属能对动物体内的生物大分子(如 RNA, DNA, 蛋白质

表 2 几种浮游生物氨基酸含量的比较 (10^{-3} , 干重)

Tab. 2 Comparisons of amino acid contents in several species of planktons

氨基酸	中华哲水蚤		飞马哲水蚤	锐唇角水蚤	三角褐指藻
	现场采集标本	经室内培养 5(d)	(A)	(B)	(C)
天门冬氨酸	65.72 (11.05)	62.90 (11.32)	45.04 (9.15)	48.8 (9.1)	32.24 (12.27)
苏氨酸	28.53 (4.80)	25.72 (4.63)	21.34 (4.33)	23.9 (4.5)	14.31 (5.45)
丝氨酸	20.92 (3.52)	13.59 (2.45)	20.13 (4.09)	25.4 (4.7)	13.05 (4.97)
谷氨酸	87.57 (14.73)	71.20 (12.82)	61.83 (12.56)	73.1 (13.6)	38.66 (14.71)
甘氨酸	37.35 (6.28)	34.99 (6.30)	34.46 (7.00)	42.4 (7.9)	15.10 (5.75)
丙氨酸	47.08 (7.92)	49.99 (9.00)	30.36 (6.17)	41.0 (7.7)	21.60 (8.22)
胱氨酸	0.89 (0.15)	1.48 (0.27)	3.26 (0.66)	9.4 (1.8)	—
缬氨酸	34.13 (5.74)	34.79 (6.26)	28.75 (5.84)	29.3 (5.5)	20.30 (7.73)
蛋氨酸	10.23 (1.72)	9.94 (1.79)	10.04 (2.04)	15.8 (2.9)	—
异亮氨酸	27.51 (4.63)	24.88 (4.48)	25.71 (5.22)	22.8 (4.3)	13.31 (5.07)
亮氨酸	53.88 (9.06)	50.87 (9.16)	43.44 (8.82)	36.5 (6.8)	21.13 (8.04)
酪氨酸	39.50 (6.64)	42.58 (7.67)	28.39 (5.77)	30.4 (5.7)	8.03 (3.06)
苯丙氨酸	27.16 (4.57)	27.16 (4.89)	24.96 (5.07)	19.2 (3.6)	14.70 (6.00)
赖氨酸	50.86 (8.56)	43.94 (7.91)	41.61 (8.45)	45.4 (8.5)	14.78 (5.63)
组氨酸	9.74 (1.64)	8.71 (1.57)	10.54 (2.14)	14.2 (2.7)	4.28 (1.63)
精氨酸	43.03 (7.24)	41.16 (7.41)	34.02 (6.91)	46.8 (8.7)	13.39 (5.10)
脯氨酸	10.42 (1.75)	11.64 (2.10)	28.53 (5.79)	11.4 (2.1)	17.85 (6.79)
总量(Σ)	594.52	555.54	492.41	535.8	259.80 ^①

注: 括号内数值表示此氨基酸占总量的百分数。(A), (B), (C) 分别参考 [6], [10], [3]。

① 原文有误, 应为 262.73。

等)作用^①。镉虽然不是动物体内的必需元素, 但它与铜一样是二价阳离子, 在动物体内可能和铜离子有相同的作用位点, 从而表现出类似的生物效应。当外界环境重金属浓度过高时, 可能破坏了动物在一定重金属浓度范围内所能作出的自身生理调节过程, 导致抑制效应的发生。重金属物具体如何作用于桡足类体内的生物大分子, 其生化机制如何? 有待实验进一步探讨。

在不少实验中已表明, 铜、镉等重金属能刺激海洋无脊椎动物(如龙虾, 软体动物等)体内大量合成金属硫蛋白或作用类似的小分子蛋白质^[7,9,10]。这些蛋白质的显著特点是半胱氨酸含量多(约占 30%), 而缺少芳香族氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸), 它们能大量结合进

人体内过多的重金属离子,从而在一定程度上减轻重金属的毒性作用。这类蛋白质的另一特点是分子量小(一般小于 12 000),有利动物体内快速合成。Viarengo 等人的实验指出,贻贝培养在 80 $\mu\text{g/L}$ 铜浓度的海水中,经 48h 就可诱导动物大量合成这种蛋白质^[10]。我们的实验中,中华哲水蚤在较高的外加铜、镉浓度下,胱氨酸的含量是增加的,同时伴随着酪氨酸、苯丙氨酸含量下降,有些迹象表明栉足类存在这种解毒机制,但需实验进一步证实。

3. 栉足类及其氨基酸含量变化作为监测海洋环境污染的指标的适宜性

应用生物监测方法,首先应考虑所选用的生物是否具有代表性,选择的生理指标是否敏感?栉足类在海洋环境中是数量大、地位重要的生物类群,且一年四季均可大量采集,分析方便。另一方面,我们的实验表明,栉足类对重金属物的反应较灵敏,能对环境胁迫迅速作出反应。当外界重金属浓度提高时(仅 $\mu\text{g/L}$ 数量级)就导致其氨基酸含量发生明显变化,特别是使其某些特殊氨基酸发生变化,从而便于观察和快速分析,有环境生物监测的实用价值。由此可见,栉足类氨基酸含量的变化作为一个反映环境重金属污染的指标,是值得考虑采用的。

参 考 文 献

- [1] 郑重、张松踪、李松等,1965。中国海洋浮游栉足类(上卷)。上海科学技术出版社,36—50 页。
- [2] 郑重、陈栢云,1982。九龙江口生态系统调查研究绪论。厦门大学学报(自然科学版) 21(3): 351—358。
- [3] 王渊源,1984。常用海产植物性活饵料氨基酸的测定。海洋学报 6(4): 505—511。
- [4] 林汝榕、李少菁,1988。重金属对栉足类的急性毒性及其对排粪的生理效应。海洋环境科学 17(3): 7—15。
- [5] Barron, M. G. & I. R. Adelman, 1984. Nucleic acid, protein content and growth of larval fish sublethally exposed to various toxicants. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 141—150.
- [6] Cowey, C. B. & E. D. S. Corner, 1963. Amino acids and some other nitrogenous constituents in *Calanus finmarchicus*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 43: 485—493.
- [7] Ishiguro, T., K. Kitajima and M. Chiba et al., 1982. Studies on Cd-binding proteins in short-necked clam. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 48(6): 793—798.
- [8] Raymont, J. E. G., R. J. Morris and C. F. Ferguson et al., 1975. Variation in amino acid composition of lipid-free residues of marine animals from the Northeast of Atlantic. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 17(3): 261—267.
- [9] Roesijadi, G., 1981. The significance of the low molecular weight M-like proteins in marine invertebrates: current states. *Mar. Environ. Res.* 4(3): 167—180.
- [10] Viarengo, A., M. Pertica and G. Mancinelli et al., 1981. Synthesis of Cu-binding proteins in different tissues of Mussels exposed to the metal. *Mar. Pollu. Bull.* 12(10): 347—350.

**AN EXPERIMENTAL STUDY OF EFFECTS OF COPPER AND
CADMIUM ON AMINO ACID CONTENTS IN A COPEPOD
CALANUS SINICUS BRODSKY**

Lin Rurong and Li Shaojing

(Xiamen University, 361005)

ABSTRACT

The effects of copper and cadmium on the amino acid contents in *Calanus sinicus* were studied under the laboratory condition. Results showed that the various amino acid contents in animals were obviously increased, with the total amino acid increasing by 10—31% when the animals were exposed to the lower metal levels (added Cu^{2+} —10 $\mu\text{g}/\text{L}$ or Cd —150 $\mu\text{g}/\text{L}$), whereas amino acid contents appeared a declining tendency when the animals were incubated in seawater with higher metal levels. These indicated that lower metal levels could cause a stimulative effect on copepod, which made the animals strengthen their ingestive activity and absorb more nutrients from the diet, and higher metal levels could result in an inhibitory effect on copepod. Therefore, the changes of amino acid contents in marine copepod might be used as one of the indicators reflecting physiological state of the animals in seawater with heavy metal pollutants.