

饵料中的铜对中国对虾的影响*

刘发义 梁德海 孙凤 李荷芳 兰信

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 于1986年7—9月进行了饵料中不同浓度的铜对中国对虾生长和肝胰脏细胞色素氧化酶的影响,以及铜在肝胰脏中的积累和亚细胞分布的研究。用花生饼、鱼粉、玉米面、白薯面和麸皮为主要原料,加入硫酸铜,制成含有不同铜浓度的饵料,在水族箱中饲喂对虾。结果表明,随着饵料中铜浓度的增加,对虾生长率先上升,而后又降低,当铜浓度为53和78mg/kg时,对虾增长率最高。实验虾肝胰脏中细胞色素氧化酶的活性随着饵料中铜浓度的增加,也是先增加后降低,当铜浓度为53mg/kg时,其比活性最高。对肝胰脏中的铜含量测定发现,当饵料中的铜浓度高于53mg/kg时,铜会在肝胰脏中大量蓄积。根据上述结果,认为饵料中的铜含量以53mg/kg为宜。肝胰脏中铜的亚细胞分布的研究表明,细胞液中的小分子含铜络合物与铜在该组织中的蓄积有关。

铜是一种必需微量元素,它是虾类血液中的氧载体——血蓝蛋白的中心原子^[1],又是细胞色素氧化酶、酪氨酸酶、过氧化物歧化酶等许多酶类的重要组成部分;过量的铜会引起生物中毒,则是人们所共知的。铜作为必需微量元素对水生生物的作用,目前报道的还不多,其对虾类的影响,则研究得更少。本文报道了饵料中的铜对不同体长对虾的生长和某些生化成分的影响,探讨饵料中的铜对中国对虾的营养和毒理学问题。

一、材料和方法

1. 养殖实验

一共进行了两次养殖实验。所用对虾 *Penaeus orientalis* 于1986年7月上旬和9月上旬取自青岛市黄岛区对虾养殖场,平均体长分别为6.85和8.80cm,平均体重分别为3.87和8.67g。对虾运回后,经过暂养,测量体长和体重,随机置于12个120cm × 70cm × 100cm的玻璃钢水族箱中,在露天条件下进行养殖实验。水族箱中水深为70cm,水体约0.6m³,每箱放养对虾50条左右,通气,常流水。12个箱分为6组,分别投喂6种含不同浓度铜的配合饵料,每组2箱,由抽签方式确定各箱投饵的种类。每天早、中、晚各投饵一次,均过量投喂。每天早上投饵之前清除剩余的残饵和排泄物。实验中发现死虾及时捞出。每次实验进行三周。

2. 配合饵料的成分和加工

本实验所用的配合饵料,除铜以外,其基本成分见表1。将基本成分粉碎、充分混匀,分成6组,按每公斤原料分别加入0,80,160,240,320,400mg的量称取CuSO₄ · 5H₂O,先溶解于少量的蒸馏水,然后顺序加入1—6组原料中,充分混匀,再将CMC先用水调成糊

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1748号。

收稿日期: 1988年12月10日。

表1 实验饵料的基本成分

Tab. 1 Basic composition of the experimental diets

原 料	用量(%)	原 料	用量(%)
秘鲁鱼粉	25	麸 皮	10
花生饼	40	混合无机盐 ^①	1.8
玉米面	10	混合维生素 ^②	0.2
白薯面	10	CMC ^③	3

① 混合无机盐组成: KH_2PO_4 10%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%, CaCO_3 70%, MgCl_2 5%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.8%, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ 1.2%, KI 0.2%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.4%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.4%。

② 混合维生素组成: 含维生素 A, B, D, E, K 和泛酸钙、烟酸、噻乙醇(烟台兽药厂生产)。

③ CMC: 羧甲基纤维素, 用作粘合剂。

状, 加入各组原料中混匀, 用绞肉机成形为颗粒状, 晒干, 装于塑料袋中备用。

3. 元素分析

饵料样品和对虾样品在 105°C 烘干至恒重, 研碎后, 称取适量粉末, 用浓硝酸和浓硫酸湿法消化, 以 WFD-Y₂ 型原子吸收分光光度计(北京第二光学仪器厂)测定其中的铜、锌等重金属含量。

4. 细胞色素氧化酶活性的测定

取虾肝胰脏, 在 0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 ($\text{pH} = 7.4$) 中用玻璃匀浆器匀浆, 用高速离心机(Tomy Seiko CoLTD)于 4°C 条件下, 先用 $1000 \times g$ 离心 10min, 上清液再用 $15000 \times g$ 离心 20min, 取后者的沉淀部分重新悬浮于磷酸缓冲液中, 即得粗酶液。然后按文献[5]方法测定其中细胞色素氧化酶的活性, 同时用双缩脲法测定其蛋白质含量^[2], 求出比活性。

5. 凝胶层析和离子交换层析

取对虾肝胰脏, 在 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH} = 8.0$) 中匀浆, 然后用 TGL-16B 高速台式离心机于 $16000 \times g$ 离心 20min, 上清液用预先经 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液平衡过的 Sephadex G-75 柱 ($\phi 2 \times 70\text{cm}$) 进行凝胶层析。另取一份上清液用 CM-32 阳离子交换柱 ($\phi 2.5 \times 12\text{cm}$) 进行层析, 该柱先用 0.01mol/L 磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 6.0$) 平衡, 待样品液流完后, 用相同缓冲液淋洗, 然后用 0.01mol/L PO_4^{3-} ($\text{pH} = 6.0$) 和 0.2mol/L PO_4^{3-} ($\text{pH} = 8.0$) 两种缓冲液形成的线性梯度洗脱液洗脱。上述层析的流速均为 30ml/h , 每管 4ml 分部收集, 用原子吸收分光光度计直接测定各管中的铜和锌。

二、结果和讨论

1. 对生长的影响

用不同铜浓度的饵料饲喂对虾, 两次养殖实验的结果列于表 2。表中的存活率和体长(重)增长率分别按下两式计算出:

$$\text{存活率} = \frac{\text{对虾}_{\text{尾}} \text{尾数}}{\text{对虾}_{\text{始}} \text{尾数}} \times 100\%$$

$$\text{体长(重)增长率} = \frac{\text{对虾}_{\text{尾}} \text{的平均体长(重)} - \text{对虾}_{\text{始}} \text{的平均体长(重)}}{\text{对虾}_{\text{始}} \text{的平均体长(重)}} \times 100\%$$

表 2 养殖实验结果

Tab. 2 Results of the growth experiments

饵料编号		1	2	3	4	5	6	
饵料中铜含量 (mg/kg)		19	28	53	67	74	82	
第一次实验	实验前	对虾尾数	100	100	100	100	100	
		对虾平均体长 (cm)	6.89	6.88	6.90	6.80	6.90	6.89
		对虾平均体重 (g)	3.82	3.76	4.03	3.76	3.93	3.90
	实验后	对虾尾数	83	75	86	87	91	75
		对虾平均体长 (cm)	7.57	7.60	7.72	7.60	7.56	7.63
		对虾平均体重 (g)	4.78	4.71	5.14	4.88	4.74	4.96
第二次实验	实验前	对虾尾数 ^①	90	90	90	90	50	100
		对虾平均体长 (cm)	8.71	8.78	8.82	8.86	8.76	8.86
		对虾平均体重 (g)	8.70	8.68	8.62	8.80	8.49	8.57
	实验后	对虾尾数	76	75	78	72	42	69
		对虾平均体长 (cm)	8.89	9.01	9.17	9.12	8.85	9.02
		对虾平均体重 (g)	9.37	9.39	9.76	9.97	8.69	9.47
	存活率 (%)	85	84	87	80	84	69	
	体长平均增长率 (%)	3.0	2.7	3.9	3.0	1.0	1.8	
	体重平均增长率 (%)	7.9	8.2	13.2	13.3	2.4	10.8	

① 第二次养殖试验, 1—4 号饵, 实验前一个水族箱对虾为 40 尾, 另一个为 50 尾; 5 号饵, 有一箱因断水造成大部分虾死亡, 该箱数据未被采用。

式中, 对虾_终为实验终了时的对虾; 对虾_始为实验开始时的对虾。

从表 2 看出, 两次实验中, 各组的存活率虽有差异, 但看不出规律性的变化, 方差分析也表明各组之间没有显著差异, 说明这些变化是随机误差引起的。

就增长率来看, 在第一次实验中, 随着饵料中铜浓度的增加, 对虾的体长和体重增长率先是增加, 而后又降低, 当铜浓度分别为 53mg/kg(3 号饵)和 67mg/kg(4 号饵)时, 体长和体重增长率最好, 铜浓度高于和低于这些值时, 增长率都较小。经方差分析, 各组增长率的差异虽不显著, 但无论是体长还是体重的增长都呈现规律性的变化, 而且对 1 号饵(对照组)和 3 号饵饲养的虾实验前后的体长进行 *t* 检验, 发现实验前这两组虾体长均值无显著差异, 而实验后有显著差异, 说明 3 号饵饲养的虾增长率显著高于 1 号饵的虾; 再参考肝胰脏中细胞色素氧化酶活性的变化规律(后面将要介绍), 可以确定这些差异是由于饵料中铜浓度的不同引起的, 而不是随机误差造成的。第二次实验的结果不十分理想, 但仍可看出, 3 号饵和 4 号饵饲养的虾增长效果较其他各组好, 而且也呈类似规律性的变化。

关于对虾对铜的需要量, 弟子丸修(1978)曾对日本对虾进行过一些研究, 但只笼统地提出需要在饵料中添加微量元素, 我们无法与其进行比较, 其它关于对虾对铜的需要的研究, 我们尚未见到报道。

2. 对组织中铜含量的影响

养殖实验结束后, 分别测定了各组对虾肌肉和肝胰脏中的铜、锌和其它一些元素的含

量,结果列于表 3。从表 3 看出,第一次实验中,当饵料中铜的浓度高于 53mg/kg 时,肝胰脏中铜的含量大量增加,4 号饵的虾肝胰脏中铜的浓度比 3 号饵的虾高 1 倍以上;以后饵料中的铜进一步增加,但肝胰脏中的铜含量增加不多,这可能是其中能与铜结合的配位体基本达到了饱和的程度。第二次实验也有类似结果,但第二次实验虾肝胰脏中铜的含量都明显地低于第一次实验虾的,这种差异可能是由于两批虾肝胰脏中原来铜的含量不同所致,也可能是不同生长阶段虾的生理特性不同引起的。究竟是何种原因,需作进一步研究。肌肉中铜的含量在两次实验中都没有发现明显的变化。

表 3 实验对虾组织中 Cu 和 Zn 的含量 (mg/kg, 干重)

Tab. 3 Cu and Zn contents in the prawn (*Penaeus orientalis*) tissues (mg/kg, dry W)

饵料编号			1	2	3	4	5	6
第一次实验	肝胰脏	Cu	707.36	636.16	659.15	1426.20	1637.94	1637.19
		Zn	87.76	72.03	73.19	73.54	94.10	81.46
	肌肉	Cu	30.82	26.38	23.41	26.38	25.64	23.41
		Zn	75.10	50.78	39.28	30.69	32.40	30.76
第二次实验	肝胰脏	Cu	441.88	105.66	270.06	527.36	578.19	514.78
		Zn	89.01	89.86	95.92	83.77	88.71	69.35
	肌肉	Cu	21.97	23.19	43.94	20.75	18.38	21.97
		Zn	47.84	47.22	37.28	39.82	82.06	37.69

通常铜和锌在生物体内的积累是相互颞颥的,但在本实验中,饵料中的铜在 19—82 mg/kg 范围内变动时,无论是在肝胰脏还是在肌肉中,都看不出其中锌的含量受到明显影响;铁、钙、镁和钾等元素的含量(数据未列出)也未发生明显的变化。

3. 对细胞色素氧化酶活性的影响

在第二次养殖实验结束时,测定了各组对虾肝胰脏细胞色素氧化酶的活性,结果示于表 4。从表 4 可见,随着饵料中铜含量的增加,肝胰脏细胞色素氧化酶的活性先是逐渐增加,当铜浓度达到 53mg/kg 时,酶活性达到最大,然后又逐渐降低。这种变化规律与对虾增长率的变化是一致的,酶活性大的,增长率高,反之亦然。这表明,当饵料中的铜含量比较低时,其中的铜对细胞色素氧化酶起到激活作用。这种酶是细胞呼吸链末端的特征酶,在氧化磷酸化过程中起传递电子作用,对这种酶的激活可以促进对虾的生长。但铜过量又会抑制该酶的活性,使对虾生长受到影响。这种酶活性的变化与肝胰脏中铜的积累有相关性,当铜积累突然增高很大时,酶活性就随之开始下降。

对脊椎动物的研究表明,铜缺乏会引起小牛肝脏、空肠、回肠和结肠等组织中的细胞色素氧化酶活性降低;有人把这种酶活性的变化作为铜引起小牛心脏肥大的主要生化反映^[4]。本实验的结果表明,对虾肝胰脏中细胞色素氧化酶活性的变化也有可能作为对虾是否缺乏铜的生化指标。另外,在关于海水中的铜在对虾体内的积累和致毒效应的研究中^[5],我们发现,当海水中的铜引起对虾发生大量蜕皮甚至死亡等中毒现象时,其肝胰脏细胞色素氧化酶的活性较低,据此我们提出了用这种酶活性的变化作为海水中的铜引起

表 4 肝胰脏细胞色素氧化酶活性^①Tab. 4 Activities of cytochrome oxidase in the prawn (*Penaeus orientalis*) hepatopancreas

饵料编号	水族箱编号	酶比活性 (U/mg) ^②	酶活性平均值 (U/mg)
1	8	9.348	9.240
	12	9.097	
2	5	9.562	9.545
	11	9.527	
3	6	19.012	19.313
	10	19.614	
4	2	13.764	13.972
	9	14.180	
5	4	—	5.614
	7	5.614	
6	1	3.278	3.292
	3	3.306	

① 测定酶活性用虾每次均为 6 尾。

② 酶活性单位 U 以 $\log_{10} \Delta A_{550nm} = 0.01/\text{min}$ 表示。酶比活性指每 mg 蛋白质中的酶活性。

对虾致毒的生化指标的可能性。在本实验中发现,当饵料中的铜含量高到一定程度时,即使对虾仅出现生长迟缓而尚未出现明显中毒现象,其肝胰脏细胞色素氧化酶的活性亦发生明显降低。这进一步证明,用这种酶活性的变化作为铜引起对虾致毒的生化指标是完全可能的,而且具有反应灵敏、能在早期和较轻污染的情况下出现等特点。

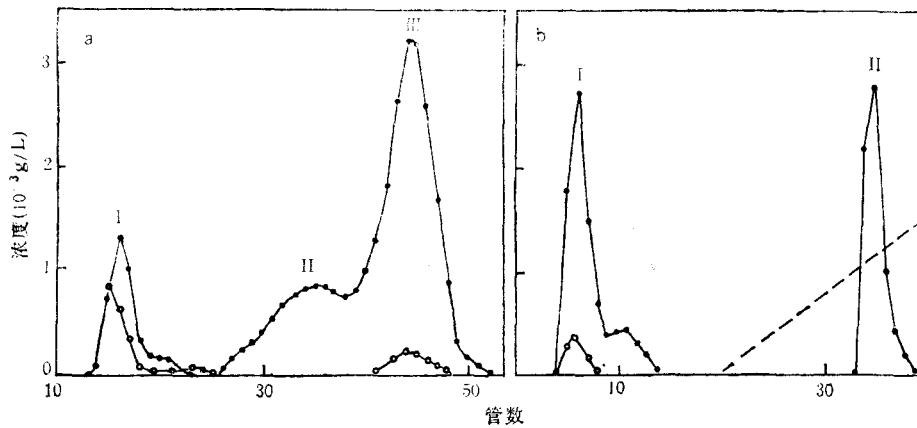


图 1 肝胰脏上清液在 Sephadex G-75(a) 和 CM-32(b) 上的层析曲线

Fig. 1 Sephadex G-75(a) and CM-32(b) chromatography of the prawn (*Penaeus orientalis*) hepatopancreas cytosol

●—○—○ Zn, ●—●—● Cu。a. I 为大分子物质, II 为类金属硫蛋白, III 为小分子物质; b. I 为未被阳离子交换剂吸附的含铜物质, II 为被吸附的含铜物质, ----- 洗脱液 pH 梯度。

4. 铜在肝胰脏细胞中分布的变化

在第二次实验中, 各组对虾的肝胰脏匀浆经高速离心后所得的上清液, 分别用 Sephadex G-75 和 CM-32 进行了层析, 结果见图 1。不同组对虾肝胰脏中的铜在不同分子量物质库中, 以及在离子交换层析所得的峰 I 和峰 II 中分布的变化, 如表 5 所示。凝胶层析的结果表明, 肝胰脏上清液中的铜分布在小分子物质库中的量, 随着该组织铜含量的增加而增加, 分布在大分子物质库中的铜则逐渐减少, 而类金属硫蛋白库中变化不明显。从阳离子交换柱的分析结果看出, 能被阳离子交换剂吸附的铜(峰 II)的量在上清液中所占的比例也随肝胰脏中铜含量的增加而增加, 但 6 号饵的偏低, 这也许是由于这种能与铜结合的物质已被铜饱和, 多余的铜与别的配位体结合, 形成不能被吸附的络合物, 使得峰 II 中的铜所占的比例相对较低。上述结果进一步证明了我们以前提出的看法^[1], 即铜在对虾肝胰脏中的积累和贮存与其在细胞液中形成小分子量铜络合物有相关性。

表 5 肝胰脏上清液中铜的分子分布(%)

Tab. 5 Cu molecular distribution in the prawn (*Penaeus orientalis*) hepatopancreas cytosol (%)

饵料编号	肝胰脏铜含量 (mg/kg)	Sephadex G-75 层析结果			CM-32 层析结果	
		峰 I	峰 II	峰 III	峰 I	峰 II
2	99	38	22	40	97	3
3	256	31	17	52	83	17
4	502	13	21	66	70	30
5	578	8	18	74	54	45
6	661	—	—	—	69	31

三、结 论

通过本实验研究, 可以得出如下几点结论:

1. 铜是中国对虾所必需的, 饵料中添加适量的铜可以促进对虾的生长。在本实验条件下, 以花生饼、鱼粉、玉米面、白薯面、麸皮等为基本原料的饵料中添加硫酸铜, 饵料中铜的含量以 53mg/kg 左右为宜。
2. 肝胰脏中细胞色素氧化酶的活性随饵料中铜含量的变化而变化。在本实验条件下, 饵料中铜含量为 53mg/kg 时, 该酶的活性最高, 此时对虾生长也最好。该酶有可能作为对虾体内铜是否缺乏或过量引起中毒的生化指标。
3. 饵料中的铜在肝胰脏中的积累和贮存, 与其在细胞液中形成的小分子量铜络合物有关。

参 考 文 献

- [1] 刘发义、吴玉霖、赵鸿儒、侯兰英、孙凤, 1988。铜在中国对虾体内的积累和致毒效应。海洋与湖沼 19(2): 133—139。
- [2] 蔡武城等, 1982。生物物质常用化学分析法。科学出版社, 96 页。

- [3] Owen, C. A., Jr., 1982. Biochemical Aspects of Copper. Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, U. S. A., pp. 41—44.
- [4] Paynter, D. I. and J. D. Allen, 1982. Copper-superoxide dismutase and copper deficiency in ruminants. *In Trace Element Metabolism in Man and Animals*, ed. by J. M. Gawthorne, et al. Springer-Verlag, Berlin, pp. 374—377.
- [5] Smith, L., 1954. *Methods in Enzymology*, volume LIII, ed. Fleischer, S. and L. Packer. Academic Press, New York, pp. 45—47.

EFFECTS OF DIETARY COPPER ON THE PRAWN *PENAEUS ORIENTALIS**

Liu Fayi Liang Dehai Sun Feng Li Hefang and Lan Xin

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

ABSTRACT

Six experimental diets containing 0,19,28, 53,67,74 and 82 mg/kg of copper were fed to prawn *Penaeus orientalis*, in 12 glass fibre tanks (containing 600L water) for 21 days. The basic composition of the diets was peanuts cake, fish meal, corn meal, sweat potato meal and wheat bran. Growth and survival rates for each diets were compared. Activity of cytochrome oxidase, as well concentration and molecular distribution of copper in hepatopancreas of the test prawn were determined. The experiment was carried out on two body length groups: 6.85 cm and 8.80 cm.

The results of the experiments indicated that, of the diets tested, two diets containing 53 and 78 mg/kg copper, respectively, produced optimum growth. Activity of the cytochrome oxidase in hepatopancreas of the test prawn fed on the diet containing 53 mg/kg copper was highest. Copper content in the tissue increased very significantly when the prawn was fed on the diets containing more than 53 mg/kg copper. Based on these facts, it is proposed that 53 mg/kg copper in the diet is suitable for the prawn. In addition, the study on molecular distribution of copper in hepatopancreas cytosol shows that copper in very low molecular weight fraction of the cytosol rose significantly with the increase of copper concentration in the diets, and that accumulation of dietary copper in the hepatopancreas was related with its binding to the very low molecular weight substances. One of the substances had been isolated from the hepatopancreas and the characters of the complex are now under investigation in our laboratory.

* Contribution No. 1743 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.