

李晓梅,郭体环,张来军,等. 海洋酸化背景下铅胁迫对近江牡蛎溶菌酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):297-299.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.092

# 海洋酸化背景下铅胁迫对近江牡蛎溶菌酶活性的影响

李晓梅,郭体环,张来军,李由明

(琼州学院热带生物与农学院,海南三亚 572022)

**摘要:**为探讨在未来海洋酸化背景下重金属对贝类免疫的影响,在实验室条件下设置 0.05、0.50、5.00 mg/L 3 种硝酸铅质量浓度,以 0 mg/L 作为对照,比较正常海水(pH 值 8.0)与酸化海水(pH 值 7.6)条件下铅胁迫对近江牡蛎组织溶菌酶含量的影响。结果表明,低 pH 值高铅质量浓度组[pH 值 7.6,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  质量浓度 5.00 mg/L]的鳃组织溶菌酶含量随时间的延长直线下降,其余各试验组的鳃组织溶菌酶含量总体呈先下降、后上升、再下降的变化趋势。至 30 d 时,对照组[pH 值 8.0,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  质量浓度 0.00 mg/L]的溶菌酶含量显著高于其他组( $P < 0.05$ ),而低 pH 值高铅质量浓度组显著低于其他组( $P < 0.05$ ),酸化组的近江牡蛎鳃组织溶菌酶含量均低于正常海水组,差异显著( $P < 0.05$ )。在 2 种 pH 值条件下,近江牡蛎鳃组织溶菌酶含量均随硝酸铅质量浓度的增加而降低。研究表明,近江牡蛎长时间暴露于低 pH 值、铅胁迫或低 pH 值与铅胁迫共存的环境下,均导致其鳃组织溶菌酶含量降低、免疫力下降;海洋酸化和铅对近江牡蛎具有联合毒性效应。

**关键词:**海洋酸化;铅;鳃;溶菌酶;近江牡蛎

**中图分类号:** X55      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0297-03

溶菌酶(lysozyme)别称 *N*-乙酰胞壁质聚糖水解酶,是一种小分子量的碱性蛋白水解酶,参与机体内多种免疫反应,在机体正常防御和非特异免疫中具有重要作用,是生物体内重要的非特异性免疫因子,常作为评价机体免疫水平的重要指标之一<sup>[1-2]</sup>。

重金属是一类典型的环境污染物。环境中重金属污染的来源主要是化工、采矿、金属冶炼及加工、电镀、轮船制造等行业,以及农用杀虫剂、生活污水、垃圾渗滤液等。对于生物体而言,重金属包括必需金属和非必需金属。铅(lead, Pb)属于非必需金属,不参与有机体的代谢活动,组织内含有较低浓度时便对有机体产生显著的毒性<sup>[3-4]</sup>。

近年来,随着我国工业的发展,工业废弃物的排放随之增加,重金属污染越来越严重,严重危害着包括人类在内的各种生命体的健康与生存。在所有已知重金属毒性物质中,由铅引起的污染和危害事件数量较多,从而备受关注。生物体即使摄入极少量的铅,也会造成极大损害。

海洋酸化已被广泛确认为  $\text{CO}_2$  浓度上升导致的又一重大环境问题<sup>[5]</sup>。化石燃料的使用等人类活动导致大气中  $\text{CO}_2$  浓度不断升高,可能已经导致了全球变暖和气候异常等<sup>[6]</sup>,海洋不断从大气中吸收  $\text{CO}_2$ ,对缓解全球变暖起着重要作用<sup>[7]</sup>。然而,自工业革命以来,海洋大量吸收人类排放的  $\text{CO}_2$ ,已导致上层海水的 pH 值下降了 0.1<sup>[8]</sup>。根据 IPCC 预测模型(A1F1)的推测,至 2100 年大气  $\text{CO}_2$  浓度将升高至 800 ~ 1 000  $\mu\text{L/L}$ ,表层海水 pH 值将下降 0.3 ~ 0.4,这种酸

化速度在过去 3 亿年间的任何时期均未曾有过<sup>[9]</sup>。海洋酸化引起的海洋化学变化(碳酸盐系统及物质形态)正在改变海洋生物赖以生存的化学环境,海洋生物的代谢过程会受到影响,海洋生态的稳定性会发生变化<sup>[10]</sup>。海洋酸化引起的海水 pH 值降低会改变海洋生物的多项生理功能,使海洋生物抵抗不良环境胁迫与疾病等的能力降低,致使胁迫或疾病对海洋生物造成更严重的损伤,甚至在较低胁迫强度下造成生物个体死亡。另外,海洋酸化还可导致已经稳定在沉积物中的重金属二次释放。在 pH 值呈碱性和中性的条件下,重金属溶解很少,但在 pH 值为 6 的处理条件下,6 ~ 18 d 期间镉的释放量为 4 ~ 13  $\mu\text{g/L}$ ,19 ~ 21 d 期间达到 40 ~ 50  $\mu\text{g/L}$ ;19 ~ 21 d 期间铅的释放量达到 100 ~ 370  $\mu\text{g/L}$ ;锌的释放量最高可达 160  $\mu\text{g/L}$ <sup>[11]</sup>。

近江牡蛎(*Crassostrea rivularis* Gould)是我国主要的牡蛎养殖品种之一,隶属于软体动物门(Mollusca)瓣鳃纲(Lamellibranchia)珍珠贝目(Pterioidea)牡蛎科(Ostridae),属于半咸水种类,主要分布于我国华南沿海众多的河口地带。由于近江牡蛎生活在河口区域,不断有淡水经此流入海洋,再加上潮汐、海浪等的影响,近江牡蛎的生活环境经常发生剧烈变化;而且,近江牡蛎固定在岩石或其他物体上生活,不像其他海洋生物可以移动和趋利避害,从而使近江牡蛎自身形成了一系列应对环境胁迫的适应机制,因此近江牡蛎是用于研究环境胁迫响应的良好材料。

目前,有关海洋酸化和铅对贝类生物学影响的研究多为单一因素的影响,包括海洋酸化对贝类受精、发育、免疫、摄食、繁殖的影响<sup>[12-14]</sup>,以及铅对贝类免疫的影响<sup>[15]</sup>等,很少有研究关于铅和海洋酸化共存的复合胁迫对贝类的影响。本试验通过研究海水酸化和铅双重胁迫对近江牡蛎溶菌酶活性的影响,为近江牡蛎的健康养殖、栖息地环境检测、防治污染、海洋环境保护等提供依据。

收稿日期:2015-10-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260139);海南省自然科学基金(编号:314086);海南省教育厅高校科研项目(编号:Hjk2013-39)。

作者简介:李晓梅(1975—),女,硕士,副教授,主要从事海洋生物学研究。E-mail: xiaomeili1215@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料

供试近江牡蛎于 2015 年 3 月购自海南省昌江县昌化镇, 采捕后立即送至试验场地, 洗刷干净后置于 4.0 m×4.0 m×1.5 m 的室内水泥池暂养 7 d。经测定, 近江牡蛎采集地和试验地海水中的铅含量均小于 0.01 mg/L, 无显著性差异 ( $P>0.05$ )。暂养期间采用静态换水法, 每天换水 1 次。养殖用水为过滤海水, 主要水环境因子按采样地调控, 水温 ( $27 \pm 1$ )℃, pH 值 8.0、盐度 3‰, 以金藻和青岛大扁藻作为饵料, 24 h 连续充氧。暂养结束后, 死亡率 <1%, 符合试验要求, 挑选大小均匀的近江牡蛎个体作为受试动物, 其质量为 ( $10.36 \pm 1.83$ ) g/只。

本试验所用硝酸铅为分析纯, 购自恒兴化工。使用硝酸铅作为污染物, 将其配制成 10 mg/mL 的母液, 按需要稀释至相应质量浓度来进行铅胁迫试验。

1.2 海水处理

试验前, 采用醋酸调配 pH 值为 7.6 的酸化海水。为防止酸化海水在使用过程中 pH 值升高, 经反复试验, 最终采用输液管匀速缓慢地向试验容器中滴加醋酸以稳定水体 pH 值。以 pH 值为 8.0 的正常海水作为对照。

1.3 试验分组

中华人民共和国国家标准 (UCD 551463) 海水水质标准 (GB 3097—1997) 四类海水、农业部无公害食品海水养殖用水水质标准 (NY 5052—2001) 中均规定铅含量  $\leq 0.05$  mg/L, 本试验以此为依据, 按等比数列分别设立 0.05、0.50、5.00 mg/L 3 个硝酸铅质量浓度组, 以 0 mg/L 作为对照组, 每组均设置 3 个平行。各试验组海水的 pH 值及硝酸铅质量浓度见表 1。试验在 150 L 的塑料桶中进行, 每桶加入 100 L 试验溶液, 每组放入 50 只经暂养的近江牡蛎。试验期间每 24 h 更换 1 次试验溶液, 以金藻和青岛大扁藻作为饵料, 将条件控制在水温 ( $27 \pm 1$ )℃、盐度 3‰, 24 h 连续充氧。

1.4 样品制备

试验开始的当天记为 0 d, 分别于试验开始后 5、10、15、20、25、30 d 从各桶随机取 3 只近江牡蛎, 每组 9 只。取鳃组织并称质量, 按 1 g:9 mL 比例添加预冷的生理盐水, 冰上匀浆, 于 4℃、5 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液, 置于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.5 溶菌酶活性的测定

采用 A050 型溶菌酶检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所研制) 测定溶菌酶活性, 按照试剂盒使用说明书进行操作。

表 2 不同 pH 值和硝酸铅质量浓度下鳃组织溶菌酶含量

组别	溶菌酶含量 (g/L)					
	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
1	81.21 ± 0.51ab	77.79 ± 6.05a	78.63 ± 4.91ab	76.63 ± 4.58b	81.04 ± 2.75a	78.83 ± 3.97a
2	72.58 ± 3.13b	65.04 ± 2.88b	81.88 ± 3.60ab	82.54 ± 3.76ab	81.29 ± 3.40a	72.38 ± 4.67ab
3	78.79 ± 8.42ab	74.50 ± 2.88a	75.71 ± 2.12bc	82.08 ± 6.42ab	69.67 ± 7.34bc	67.92 ± 2.95bc
4	74.38 ± 11.67b	79.71 ± 2.77a	68.96 ± 4.23c	82.83 ± 1.35ab	61.58 ± 3.51cd	61.50 ± 1.33cd
5	91.42 ± 1.56a	64.17 ± 4.56b	84.33 ± 5.86a	80.96 ± 1.61b	68.79 ± 3.43bc	68.21 ± 2.34bc
6	82.46 ± 9.88ab	63.58 ± 2.53b	75.38 ± 3.31bc	90.13 ± 7.94a	77.08 ± 5.94ab	70.63 ± 9.92b
7	79.67 ± 12.38ab	77.83 ± 4.65a	69.21 ± 5.01c	82.00 ± 5.46ab	74.13 ± 4.42ab	56.50 ± 0.38de
8	79.25 ± 9.42ab	75.67 ± 1.63a	74.46 ± 0.52bc	65.54 ± 2.10c	58.21 ± 4.13d	49.88 ± 2.10e

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

表 1 各试验组海水的硝酸铅质量浓度及 pH 值

组别	硝酸铅质量浓度 (mg/L)	pH 值
1	0.00	8.0
2	0.05	8.0
3	0.50	8.0
4	5.00	8.0
5	0.00	7.6
6	0.05	7.6
7	0.50	7.6
8	5.00	7.6

作, 每个待测样品测试 3 次。

1.6 数据分析

试验数据以“平均值 ± 标准误”表示。采用 Excel、SPSS 等软件进行单因素方差分析并制作图表。

2 结果与分析

由图 1、表 2 可知, 在 pH 值相同的情况下, 5、15、25、30 d 时近江牡蛎的鳃组织溶菌酶含量均随硝酸铅质量浓度的增加而降低; 10 d 时溶菌酶含量随硝酸铅质量浓度的增加而先降后升。20 d 时不同 pH 值条件下, 溶菌酶含量随硝酸铅质量浓度的变化趋势出现较大差异, pH 值为 8.0 时, 各组溶菌酶含量无显著差异 ( $P>0.05$ ); pH 值为 7.6 时, 溶菌酶含量随硝酸铅质量浓度增加先升后降, 相邻各组间差异显著 ( $P<0.05$ ), 0.00 mg/L 与 0.50 mg/L 间差异不显著 ( $P>0.05$ )。

各处理间差异随时间的延长而增大, 5 d 时仅组 2、组 4 与组 5 间存在显著性差异 ( $P<0.05$ ), 其余各组均无显著差异 ( $P>0.05$ ); 随着时间的延长, 存在显著差异的组越来越多, 30 d 时差异达到最大。

由图 1 可知, 对照组 (组 1) 鳃组织溶菌酶含量在整个试验过程中稳定在 ( $79.02 \pm 3.91$ ) g/L ( $P>0.05$ ), 至 30 d 时对照组溶菌酶含量显著高于其他组 ( $P<0.05$ ), 表明近江牡蛎长时间暴露在低 pH 值、铅胁迫或低 pH 值与铅胁迫共存的环境

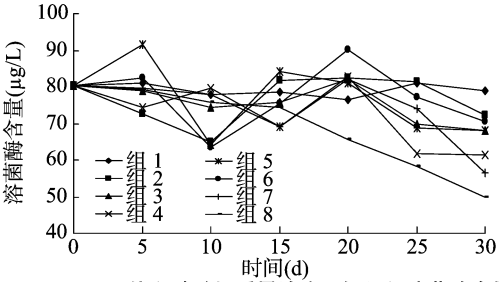


图 1 不同 pH 值和硝酸铅质量浓度下鳃组织溶菌酶含量随时间延长的变化趋势

境下均会使鳃组织溶菌酶基因的表达受到抑制,导致溶菌酶含量降低。组 8 的鳃组织溶菌酶含量自 20 d 开始随时间的延长几乎呈直线下降趋势,至 30 d 时溶菌酶含量显著低于其他组 ( $P < 0.05$ ),表明低 pH 值与高质量浓度铅 (5.00 mg/L) 共同胁迫时,近江牡蛎鳃组织溶菌酶的表达受到明显抑制。其余各试验组的鳃组织溶菌酶含量总体呈先下降、后上升、再下降的变化趋势,表明低刺激强度下近江牡蛎在一定时期内具有一定代谢适应能力。

由图 2 可知,30 d 时在各硝酸铅质量浓度下,酸化组近江牡蛎的鳃组织溶菌酶含量均低于正常 pH 值组,硝酸铅质量浓度分别为 0.00、0.50、5.00 mg/L 时差异显著 ( $P < 0.05$ ),0.05 mg/L 时差异不显著 ( $P > 0.05$ );在 2 种 pH 值条件下,近江牡蛎鳃组织溶菌酶含量均随硝酸铅质量浓度的增加而降低。

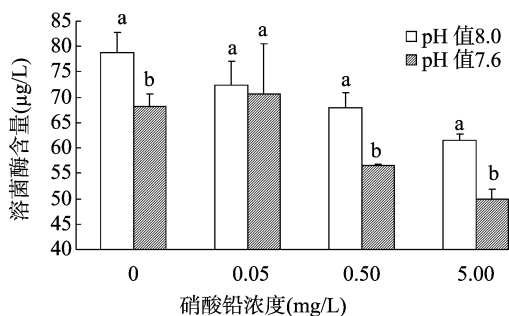


图2 30 d 时相同硝酸铅质量浓度不同 pH 值对鳃组织溶菌酶含量的影响

### 3 结论与讨论

McHenery 等以 30 种贝类为研究对象,在其消化腺、外套膜、鳃、肌肉中均能检测到溶菌酶活性<sup>[16]</sup>。本研究中,所有处理组的近江牡蛎鳃中均能检测到较高含量的溶菌酶,而溶菌酶是生物体内重要的非特异免疫因子之一,在机体免疫过程中不仅能催化水解细菌细胞壁而导致细菌溶解死亡,还可诱导调节其他免疫因子的合成与分泌<sup>[2]</sup>。可见,包括近江牡蛎在内,贝类的鳃在防止病原微生物入侵方面起着重要作用。近江牡蛎受到 pH 值降低和铅胁迫后,鳃组织溶菌酶含量呈先下降、后上升、再下降的趋势。近江牡蛎在遭遇外界胁迫时,代谢受到抑制,溶菌酶含量降低;而后由于适应性代谢加强,溶菌酶含量逐渐上升,甚至超过原有水平;随着时间的延长,胁迫依然没有解除,长时间的环境刺激超出近江牡蛎的适应范围,导致溶菌酶含量逐渐降低,免疫力下降。在养殖生产过程中,应尽量避免养殖水体 pH 值过低、铅含量过高,一旦发现应及时调整,以保证近江牡蛎的免疫力维持在正常水平,减少病害的发生。

本研究表明,海洋酸化使近江牡蛎鳃中的溶菌酶含量降低,免疫力下降。Bibby 等研究表明,海洋酸化对贝类的免疫系统具有很大影响;他们认为可能的原因是 pH 值降低使  $\text{CaCO}_3$  难以沉积,导致体内  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的改变影响细胞的信号通路,进而影响其新陈代谢和功能<sup>[17]</sup>。这只是一种可能性推断,还需通过分子生物学等手段进一步验证。目前,海洋酸化对贝类免疫功能影响的研究相对较少,其影响的生理生化及分子机制等尚待进一步研究。

试验结果表明,pH 值为 8.0 时,各硝酸铅浓度组溶菌酶

含量的变化幅度小于 pH 值为 7.6 时,即酸化条件下,铅对近江牡蛎鳃组织溶菌酶含量的影响大于正常 pH 值条件时。当 pH 值为 7.6 时,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  5.00 mg/L 组的鳃组织溶菌酶含量随时间的延长几乎呈直线下降趋势,至 30 d 时溶菌酶含量显著低于其他组 ( $P < 0.05$ )。可见,酸化可加强铅对近江牡蛎的毒性效应,同时,铅也可增强酸化对近江牡蛎的毒性效应,二者具有联合毒性效应。

### 参考文献:

- [1] 陈 艳,江明锋,叶煜辉. 溶菌酶的研究进展[J]. 生物学杂志, 2009,26(2):64-66.
- [2] 郑清梅,吴锐全,叶 星. 水生动物溶菌酶的研究进展[J]. 上海水产大学学报,2006,15(4):483-487.
- [3] 孙翰昌,徐敬明,甘桂云. 4 种重金属对禾花鱼胚胎的毒性效应[J]. 水生态学杂志,2013,34(1):92-95.
- [4] Rainbow P S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment[J]. Marine Pollution Bulletin,1995,31:183-192.
- [5] Doney S C, Fabry V J, Feely R A. Ocean acidification: the other  $\text{CO}_2$  problem[J]. Annual Review of Marine Science,2009,1:169-192.
- [6] Solomon S, Plattner G K, Knutti R A. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2009,106(6):1704-1709.
- [7] Sabine C L, Feely R A, Gruber N, et al. The oceanic sink for anthropogenic  $\text{CO}_2$  [J]. Science,2004,305:367-371.
- [8] Orr J C, Fabry V J, Aumont O, et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms[J]. Nature,2005,437:681-686.
- [9] Hoenisch B, Ridgwell A, Schmidt D N, et al. The geological record of ocean acidification[J]. Science,2012,335(672):1058-1063.
- [10] Fabry V J, Seibel B A, Feely R A, et al. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes[J]. ICES Journal of Marine Science,2008,65(3):414-432.
- [11] Atkinson C A, Jolley D F, Simpson S L. Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments [J]. Chemosphere,2007,69(9):1428-1437.
- [12] Kurihara H, Asai T, Kato S, et al. Effects of elevated  $\text{pCO}_2$  on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Aquatic Biology,2009,4(3):225-233.
- [13] Talmage S C, Gobler C J. The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercuraria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. Limnology and Oceanography,2009,54(6):2072-2080.
- [14] 何盛毅,林传旭,何毛贤,等. 海洋酸化对马氏珠母贝胚胎和早期幼虫发育的影响[J]. 生态学杂志,2011,30(4):747-751.
- [15] 江天久,牛 涛. 重金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  胁迫对近江牡蛎 SOD 活性的影响研究[J]. 生态环境,2006,15(2):289-294.
- [16] McHenery J G, Allen J A, Birkbeck T H. Distribution of lysozyme-like activity in 30 bivalve species[J]. Comp Biochem Physiol B, 1986,85:581-584.
- [17] Bibby R, Widdicombe S, Parry H, et al. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. Aquatic Biology,2008,2(1):67-74.