

不同 pH 下硫化物胁迫对中华绒螯蟹亲体卵巢发育的影响

顾顺樟, 洪美玲, 陈立侨, 李二超, 龙章强, 张璐, 张伟

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要:中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 亲体初始体质量为 (80.228 ± 6.270) g。实验采用 2×3 因子设计, 设置 pH 6.5 条件下的 3 个硫化物浓度组 LS_1 (0.1 mg/L)、 MS_1 (0.33 mg/L) 和 HS_1 (1.0 mg/L), 以及 pH 8.5 下的 3 个硫化物浓度组 LS_2 (0.1 mg/L)、 MS_2 (0.33 mg/L) 和 HS_2 (1.0 mg/L), 共 6 个处理组; 另设一个不添加硫化物的对照组 CTR (自然 pH 值为 7.5), 设 2 个平行处理, 分别在实验后第 10 天、20 天和 30 天取样, 以性腺指数 (GSI)、卵巢卵黄磷蛋白 (Lv) 含量、卵巢 Lv 总含量和卵巢蛋白质含量的变化为评判指标, 研究了硫化物胁迫对中华绒螯蟹亲体卵巢发育的影响。结果表明, 不同 pH 条件下各处理组的 GSI 在 30 d 时均低于对照组, 其中 HS 组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。在各取样时间点, 所有处理组蟹卵巢的 Lv 含量均低于对照组, 且 MS 和 HS 组在前 20 d 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但这种差异随着时间的推移而逐渐减小; 至暴露结束时仅 HS_1 组蟹的卵巢 Lv 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。各处理组蟹的卵巢 Lv 总含量始终低于对照组, 且这种差异随着时间的推移而逐渐增大; 第 10 天时仅 HS_1 组的 Lv 总量显著降低, 而时间延长至 30 d 后, 各处理组 Lv 总量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。结论认为, 慢性硫化物胁迫会抑制中华绒螯蟹雌体的卵巢发育, 相比之下, 弱酸条件下水体中硫化物的毒性作用有所增强。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 684–689]

关键词: 中华绒螯蟹; 硫化物; pH; 卵巢发育; 性腺指数; 卵黄磷蛋白

中图分类号: S9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005–8737–(2007)04–0684–06

硫化物对水生动物有较强的毒性, 且其毒性与环境中的理化因子尤其是水体 pH 等有密切的关系。在酸性条件下, 水体硫化物中硫化氢所占比例提高, 致使硫化物的毒性明显加强^[1–2]。

有关硫化物对水生动物的已有研究主要集中于亚急性毒性和急性毒性两方面, 如硫化物对北美底鳉 (*Fundulus parvipinnis*)^[3]、滨岸护胸鲃 (*Hoplosternum littorale*)^[4] 和大盖巨脂鲤 (*Colossoma macropomum*)^[5] 血液免疫、能量代谢的影响。关于甲壳动物的硫化物半致死浓度实验研究也有大量报道^[6–10], 但其慢性毒性的相关研究尚未见有相关报道。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 俗称河蟹, 是中国的一种重要经济蟹类。河蟹营底栖穴居生活, 长期处于养殖水体底层这一硫化物积累的主要场所^[11], 硫化物的慢性胁迫对其生长、发育和成熟有何不良影响, 迄今尚无详细的研究报道。本研究以河蟹雌性亲体为对象, 探讨两种 pH 下硫化物慢性胁迫对其卵巢发育的影响, 以期对河蟹的集约化健

康养殖提供必要的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用河蟹雌性亲体购自上海市铜川路水产市场, 选择附肢完整、活力强的健康个体为实验用蟹, 初始体质量为 (80.228 ± 6.270) g。经取样解剖判断, 雌蟹卵巢的性腺发育处于 III 期^[12]。

1.2 暴露实验

实验于 2005 年 10~11 月于华东师范大学生物系水生动物实验室内进行。将 200 余只实验用蟹置于 14 只 $50 \text{ cm} \times 67 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$ 的无毒聚乙烯塑料箱中暂养 2 周, 实验时每箱随机放养 14 只蟹。本课题前期实验结果已初步确定河蟹雌性亲体的硫化物半致死浓度是 3.0 mg/L (待发表), 因此在此基础上, 本实验采用 2×3 因子设计, 设置 pH 6.5 条件下的 3 个硫化物浓度组 LS_1 ($[S] 0.1 \text{ mg/L}$)、 MS_1 ($[S] 0.33 \text{ mg/L}$) 和 HS_1 ($[S] 1.0 \text{ mg/L}$), 以及 pH 8.5 下

收稿日期: 2006–10–23; 修订日期: 2007–01–25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271012, 30300265); 上海市优秀学科带头人计划项目 (05XD14005); 高等学校博士点专项基金 (20040269011).

作者简介: 顾顺樟 (1981–), 男, 硕士研究生, 主要从事水生动物营养免疫方面的研究. E-mail: gushzh@hotmail.com

通讯作者: 陈立侨. E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

的3个硫化物浓度组 LS_2 ($[S]$ 0.1 mg/L)、 MS_2 ($[S]$ 0.33 mg/L 和 HS_2 ($[S]$ 1.0 mg/L), 共6个处理组, 另设一个不添加硫化物的对照组 CTR (自然 pH 值为 7.5), 各实验组均含2个平行处理。

以 $[S]$ 1 g/L 的硫化钠溶液为母液调节水体硫化物浓度, 硫化物浓度的测定采用 N,N-对氨基二乙基苯胺比色法^[13], 每日 9:00 和 19:00 测定并补充硫化钠母液以调节养殖水体硫化物浓度。用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节水体 pH, 对照组则直接用曝气自来水 (pH 7.5)。实验为期 30 d, 期间采用自然室内光照, 水温 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 间歇充气, 溶氧量保持在 5 mg/L 以上, 养殖水体积约为 40 L。试验期间每日 8:00~9:00 吸污换水后投喂新鲜螺蛳肉。每次取样前 1 天停止喂食。

1.3 样品的采集和处理

实验前每组取 6 只蟹作为初始对照, 对照组及各处理组分别在试验开始后 10 d、20 d 和 30 d 取样, 每次从平行处理组中取蟹 6 只。取样前, 将蟹置于冰水混合物中麻醉, 用滤纸吸干蟹体表的水分后称重。解剖取性腺并精确称重至精确度为 0.01 g, 随即分装保存于 -70°C , 用于卵黄磷蛋白 (Lv) 浓度的测定。

1.4 样品测定及计算

卵巢卵黄磷蛋白 (Lv) 含量采用酶标记免疫吸附法^[14]进行测定。蛋白含量的测定按照 Lowry 法进行^[15], 以牛血清白蛋白 (BSA) 为参照。性腺指数和卵巢 Lv 总含量采用以下公式进行计算:

$$\text{性腺指数 (GSI)} = \frac{\text{卵巢湿重 (g)}}{\text{蟹体湿重 (g)}} \times 100$$

$$\text{卵巢 Lv 总含量 [mg/g (卵巢质量)]} = \text{Lv 含量 (mg/g)} \times \text{卵巢湿重 (g)}$$

1.5 数据处理与统计分析

所得数据均采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示。数据统计采用 SPSS 11.5 分析软件。硫化物对卵巢发育的影响采用单因子方差 ANOVA, 若差异显著, 则采用 LSD 多重比较法检验各浓度组间的差异; pH 值对卵巢发育影响的比较采用 t -检验。差异显著的临界值为 0.05。

2 结果与分析

2.1 硫化物对雌蟹卵巢发育的影响

不同硫化物浓度胁迫对河蟹性腺指数 (GSI) 影响的测定结果见表 1。从表 1 可见, 对照组蟹的 GSI 随时间推移而逐渐增大, 相应地各处理组 GSI 也呈

上升趋势。第 20 天时各处理组的 GSI 均与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。至第 30 天时, 处理组蟹的 GSI 随硫化物浓度的上升而下降, LS_1 、 LS_2 、 MS_1 、 MS_2 、 HS_1 和 HS_2 的 GSI 分别为对照组的 96%、88%、92%、87%、81% 和 80%, 且 HS_1 和 HS_2 组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 为不同硫化物浓度胁迫对河蟹卵巢 Lv 含量的影响。从实验结果来看, 所有处理组卵巢的 Lv 含量虽随试验时间延长而逐渐升高, 但在各取样时间点均低于对照组, 这种差异随时间的推移而逐渐减小。其中 MS_1 、 MS_2 、 HS_1 和 HS_2 组在前 20 d 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 分别为对照组的 53%、51%、48% 和 32%, 至暴露结束时仅 HS_1 组显著低于对照组 ($P < 0.05$), 为对照组的 54%, 而 MS_1 、 MS_2 和 HS_2 组分别为对照组的 92%、84% 和 79%。

从不同硫化物浓度胁迫下河蟹卵巢 Lv 总含量的测定结果来看 (表 3), 所有实验组蟹的卵巢 Lv 总含量随时间推移逐渐升高, 但上升的幅度随硫化物浓度的升高而下降。在实验期内, 各处理组卵巢 Lv 总含量始终低于对照组, 且差值随时间的推移而逐渐增大: 第 10 天时仅 HS_1 组显著低于对照组 ($P < 0.05$), 至 20 d 时各 MS 组和 HS 组显著降低 ($P < 0.05$), 30 d 后所有处理组卵巢 Lv 的总含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 仅分别为对照组的 68%、41%、62%、47%、37% 和 46%。

各实验组蟹的卵巢蛋白质含量无明显变化规律, 且与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 具体结果见表 4。

2.2 不同 pH 与硫化物胁迫效应的关系

经 t -检验表明, pH 对中、低硫化物浓度下的胁迫效应无显著影响, 即各指标在 LS_1 与 LS_2 之间以及 MS_1 与 MS_2 之间均无显著差异 ($P > 0.05$)。而 pH 值对高浓度硫化物的胁迫效应有一定的影响, 但仅表现在卵巢 Lv 含量和 Lv 总含量变化两个指标上, 而对 GSI 的影响不显著 ($P > 0.05$)。

实验至第 10 天时, HS_1 和 HS_2 组卵巢的 Lv 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 分别为对照组的 51% 和 56%; 至 30 d 时 HS_1 卵巢 Lv 含量为对照组的 54%, 仍显著低于对照组 ($P < 0.05$), 并显著低于对应的 HS_2 组卵巢 Lv 含量 ($P < 0.05$), 此时的 HS_2 组卵巢 Lv 含量与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 达到对照组的 79% (见表 2)。

表1 不同 pH 和硫化物对河蟹性腺指数的影响

Tab.1 Effects of different pH and sulfide contents on gonadosomatic index (GSI) of female *E. sinensis* $n = 6; \bar{X} \pm SD$ (FW)

处理 Treatment	实验时间 /d Experimental time		
	10	20	30
CTR	6.498 ± 0.409	6.670 ± 0.138	8.503 ± 0.416 ^a
LS ₁	6.115 ± 0.314	6.680 ± 0.622	8.168 ± 0.392 ^a
LS ₂	6.396 ± 0.400	6.203 ± 0.871	7.507 ± 0.527 ^a
MS ₁	6.742 ± 0.492	6.660 ± 0.436	7.853 ± 0.427 ^a
MS ₂	6.149 ± 0.845	5.821 ± 0.715	7.422 ± 0.602 ^a
HS ₁	6.410 ± 0.199	6.449 ± 0.759	6.887 ± 0.326 ^b
HS ₂	6.342 ± 0.169	5.900 ± 0.723	6.801 ± 0.443 ^b

注: 1) CTR: 对照组; LS₁: pH 6.5 [S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5 [S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5 [S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5 [S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5 [S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5 [S] 1.0 mg/L.

2) 实验初始性腺指数 (GSI) 为 5.088 ± 0.311 ($n = 6$).

3) 同一列数据不同上标字母代表有显著差异 ($P < 0.05$).

Note: 1) CTR: control; LS₁: pH 6.5 [S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5 [S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5 [S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5 [S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5 [S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5 [S] 1.0 mg/L.

2) GSI was 5.088 ± 0.311 at day 0 ($n = 6$).

3) Within the same column, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表2 不同 pH 和硫化物浓度对河蟹卵巢 Lv 含量的影响

Tab.2 Effects of different pH and sulfide contents on ovarian lipovitellin content of female *E. sinensis* $n = 6; \bar{X} \pm SD; \text{mg/g tissue}$ (FW)

处理 Treatment	实验时间 /d Experimental time		
	10	20	30
CTR	84.416 ± 15.567 ^a	175.377 ± 24.652 ^a	197.252 ± 34.672 ^{ab}
LS ₁	72.939 ± 11.349 ^{ab}	127.741 ± 19.646 ^{ab}	191.023 ± 21.294 ^{ab}
LS ₂	64.273 ± 8.738 ^{abc}	121.171 ± 25.339 ^{ab}	130.410 ± 26.524 ^{ab}
MS ₁	52.701 ± 6.736 ^{bc}	93.805 ± 12.010 ^{bc}	181.740 ± 18.925 ^b
MS ₂	56.381 ± 5.062 ^{bc}	89.803 ± 15.096 ^{bc}	165.348 ± 29.541 ^{ab}
HS ₁	42.852 ± 2.412 ^c	83.599 ± 17.599 ^{bc}	106.269 ± 20.554 ^{c*}
HS ₂	47.258 ± 3.441 ^c	56.971 ± 6.728 ^c	155.987 ± 11.132 ^{ab}

注: 1) CTR: 对照组; LS₁: pH 6.5 [S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5 [S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5 [S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5 [S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5 [S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5 [S] 1.0 mg/L.

2) 实验初始卵巢 Lv 含量为 (31.153 ± 4.110) mg/g 组织 ($n = 6$).

3) 同一列数据不同上标字母代表有显著差异 ($P < 0.05$).

4) “*”代表同等硫化物浓度下不同 pH 组之间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: 1) CTR: control; LS₁: pH 6.5 [S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5 [S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5 [S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5 [S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5 [S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5 [S] 1.0 mg/L.

2) Ovarian lipovitellin concentration was (31.153 ± 4.110) mg/g tissue at day 0.

3) Within the same column, values with different superscripts are significant different ($P < 0.05$).

4) Asterisk indicates significant difference ($P < 0.05$) between different pH groups under the same sulfide concentration.

试验从 10 d 起, HS₁ 的卵巢 Lv 总含量已显著低于对照组 (表 3), 为对照组的 56%, 并显著低于而此时间点 HS₂ 组卵巢的 Lv 总含量 ($P < 0.05$), 后者与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。暴露结束时 HS₁ 和 HS₂ 卵巢的 Lv 总含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 仅分别为对照组的 37% 和 46%。

3 讨论

3.1 硫化物胁迫对雌蟹卵巢发育的影响

本研究开展的时间为 2005 年 10 月至 11 月, 一

般情况下, 此时期河蟹雌性亲体的卵巢发育至 III 期前后, 此时卵子发生处于大生长期, 这是河蟹卵黄物质形成和积累的关键时期^[12]。因此, 在该时期进行暴露实验, 硫化物可能会对河蟹卵巢中卵黄物质的积累产生直接影响。本研究不仅选取性腺指数作为评价指标, 同时还测定了 Lv 含量的变化, 从而能更好地揭示硫化物对其卵巢营养物质积累的影响。甲壳动物卵巢中卵黄磷蛋白有胞内和胞外 2 种合成途径^[16]。在肝胰腺内的各种氨基酸、脂肪酸和维生素等小分子物质, 其中一部分直接经血淋巴转运至卵

巢,用于卵巢内自行合成 Lv,一部分则于肝胰腺内合成卵黄磷蛋白前体物质,然后转运至卵巢,在卵巢内合成卵黄磷蛋白并逐渐积累、贮存,导致卵巢成熟

过程中卵黄磷蛋白含量明显上升^[17]。因此,卵巢的卵黄磷蛋白含量能很好地反映亲体卵巢成熟过程中物质的合成和积累情况。

表3 不同 pH 和硫化物浓度对河蟹卵巢 Lv 总含量的影响

Tab.3 Effects of different pH and sulfide contents on ovarian total lipovitellin content of female *E. sinensis*

$n = 6; \bar{X} \pm SD; \text{mg/g tissue (FW)}$

处理 Treatment	实验时间/d Experimental time		
	10	20	30
CTR	465.743 ± 127.571 ^a	1 206.402 ± 268.802 ^a	1 973.388 ± 182.472 ^{ab}
LS ₁	386.407 ± 52.003 ^a	929.441 ± 189.708 ^{ab}	1 349.002 ± 122.549 ^b
LS ₂	399.083 ± 59.754 ^a	796.453 ± 209.790 ^{abc}	828.601 ± 129.420 ^b
MS ₁	319.824 ± 61.301 ^a	566.053 ± 76.794 ^{bc}	1 221.941 ± 127.797 ^b
MS ₂	321.503 ± 35.745 ^a	483.118 ± 127.593 ^{bc}	924.690 ± 171.931 ^{bc}
HS ₁	262.403 ± 25.429 ^b *	541.774 ± 153.078 ^{bc}	729.545 ± 141.690 ^c
HS ₂	285.128 ± 33.713 ^a	350.079 ± 50.965 ^c	915.307 ± 43.767 ^{bc}

注:1) CTR: 对照组; LS₁: pH 6.5[S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5[S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5[S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5[S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5[S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5[S] 1.0 mg/L.

2) 实验初始卵巢 Lv 总含量为 (130.668 ± 7.467) mg/g 卵巢 ($n = 6$).

3) 同一列数据不同上标字母代表有显著差异 ($P < 0.05$).

4) * 代表与相同硫化物浓度不同 pH 组之间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: 1) CTR: control; LS₁: pH 6.5[S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5[S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5[S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5[S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5[S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5[S] 1.0 mg/L.

2) Ovarian total lipovitellin content was (130.668 ± 7.467) mg/g ovary at day 0.

3) Within the same column, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

4) Asterisk indicates significant differences ($P < 0.05$) between different pH group under the same sulfide concentration.

表4 不同 pH 和硫化物浓度对河蟹卵巢蛋白质含量的影响

Tab.4 Effects of different pH and sulfide contents on ovarian protein content of female *E. sinensis*

$n = 6; \bar{X} \pm SD; \text{mg/g tissue (FW)}$

处理 Treatment	实验时间/d Experimental time		
	10	20	30
CTR	306.652 ± 14.167	300.323 ± 16.266	313.933 ± 21.250
LS ₁	304.753 ± 14.332	342.342 ± 25.977	296.795 ± 36.097
LS ₂	304.996 ± 9.433	338.716 ± 12.434	302.068 ± 10.748
MS ₁	301.921 ± 11.004	341.407 ± 5.210	287.959 ± 25.920
MS ₂	338.764 ± 17.420	308.831 ± 16.614	303.939 ± 10.886
HS ₁	324.227 ± 13.705	314.336 ± 10.750	307.146 ± 11.333
HS ₂	340.376 ± 7.657	301.732 ± 23.750	317.730 ± 12.984

注:1) CTR: 对照组; LS₁: pH 6.5[S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5[S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5[S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5[S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5[S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5[S] 1.0 mg/L.

2) 实验初始卵巢蛋白质含量为 (235.779 ± 27.104) mg/g 组织 ($n = 6$).

Note: 1) CTR: control; LS₁: pH 6.5[S] 0.1 mg/L; LS₂: pH 8.5[S] 0.1 mg/L; MS₁: pH 6.5[S] 0.33 mg/L; MS₂: pH 8.5[S] 0.33 mg/L; HS₁: pH 6.5[S] 1.0 mg/L; HS₂: pH 8.5[S] 1.0 mg/L.

2) Ovarian protein concentration was (235.779 ± 27.104) mg/g tissue at day 0.

硫化物是细胞色素 C 氧化酶的强抑制剂,能与氧化型细胞色素氧化酶的 Fe³⁺ 结合而阻碍其还原为含 Fe²⁺ 的还原型细胞色素 C 氧化酶,从而抑制电子传递和分子氧的利用,引起组织细胞缺氧,破坏机体正常能量代谢^[18]。推测硫化物对河蟹呼吸作用的抑制,将破坏机体正常能量代谢和物质的合成、积

累,进而干扰卵黄磷蛋白的合成和其在卵母细胞中的沉淀,从而影响河蟹的卵巢发育。Kumar 等^[19]认为,硫化物能造成鲤 (*Cyprinus carpio*) 卵巢和肝胰腺中胆固醇的过剩,引发卵巢中类固醇的缺乏,使性腺发育受抑制,导致 GSI 下降,并认为硫化物胁迫会紊乱物质的合成代谢,从而抑制河蟹的卵巢成熟。

此外, Enrique 等^[20]研究发现, 重金属镉作用于招潮蟹 (*Uca pugilator*) 的窦腺, 会导致性腺抑制激素 (GIH) 的分泌发生紊乱, 从而减缓卵母细胞的发育, 性腺指数 (GSI) 下降。提示硫化物也可以直接作用于窦腺、大颚器等激素分泌器官, 使调控卵巢发育的激素产生紊乱, 从而抑制雌体的卵巢发育。

胁迫根据强度的不同可分为适应性胁迫和非适应性胁迫。机体长期遭受高强度硫化物刺激引发非适应性胁迫, 导致机体能量物质的重新分配, 把维持正常生命活动诸如繁殖、生长所需的能量转移到为抵抗胁迫效应而增加的能量需求^[21]。本实验中, 第 30 天时硫化物高浓度组河蟹的 GSI、卵巢 L_v 浓度和卵巢 L_v 总含量均显著低于对照组, 即表现出非适应性胁迫效应。而中、低浓度组在第 30 天其 GSI 和卵巢 L_v 浓度与对照组相比无显著性差异, 尤其是蟹的 L_v 浓度在第 20 天显著低于对照组的情况下, 第 30 天却有所恢复, 与对照组相比无显著性差异, 表现出适应性的胁迫效应。机体在适应胁迫后通过其他途径如内分泌系统调节生殖, 虽造成一定程度的性腺发育滞后, 却能确保后期的繁殖力并维持正常的生殖行为。

对于适应性胁迫造成滞后发育的卵巢能否继续正常受精, 以及对受精后能否正常孵化直至子代的正常发育尚需进一步研究, 这样才能更全面地了解硫化物慢性胁迫对河蟹繁殖力等的影响。

3.2 不同 pH 与硫化物胁迫效应的关系

河蟹对环境的适应力强, 能够在很多地区包括部分盐碱地区的水域中生活, 主要喜生活于微碱的水环境中, 一般认为其适宜的 pH 为 7.5~8.5^[22]。潘鲁青^[23]研究表明, pH 6.5 对河蟹渗透压调节并没有明显的不良影响。本实验把 pH 值的范围设为 6.5~8.5, 主要目的是探讨在正常环境 pH 值下硫化物对河蟹卵巢发育的影响。

已有研究表明, 随着环境 pH 值的降低, 硫化物毒性则逐渐上升^[1-2]。本研究结果也证实了这一点, 与弱碱性相比, 酸性条件下硫化物的毒性明显增强。因为 pH 影响水体中硫化氢、HS⁻ 和 S²⁻ 的组成比例。普通海水的 pH 为 7.9~8.3, 硫化物的 3 种形式中 HS⁻ 所占质量分数大于 90%, 硫化氢小于 10%, S²⁻ 小于 0.01%。而海底空隙水附近 pH 值为 6.0~6.5, 硫化物的 3 种形式中 HS⁻ 所占质量分数小于 30%, 硫化氢大于 70%, S²⁻ 几乎不存在。水环

境中的硫化物基本以 HS⁻ 和硫化氢形式存在, 两者毒性各不相同, 其中硫化氢可以与线粒体细胞色素 C 氧化酶结合从而破坏其活性^[24], 直接影响水生动物的呼吸作用; 而 HS⁻ 作为线粒体硫解毒酶的底物能被降解, 因而毒性相对较弱^[25]。因此, 环境中硫化氢浓度在硫化物胁迫效应中起决定性的作用。本实验中, pH 变化范围在河蟹的适宜生长范围内, 硫化物浓度相同时, 由于 pH 轻微的变化导致硫化氢浓度差异较大。酸性条件下硫化物大部分以硫化氢形式存在, 其胁迫效应远高于碱性环境中硫化物的胁迫效应。在实际生产中, 养殖水体由于工业污水排放、酸雨和二氧化碳含量偏高等因素会造成 pH 降低, 这种降低与硫化物协同作用对中华绒螯蟹的性腺发育和生殖性能的影响可能会更加明显, 需给予足够的重视。

参考文献:

- [1] Smith L, Kruszyna H, Smith R P. The effect of methemoglobin on the inhibition of cytochrome c oxidase by cyanide, sulfide or azide [J]. *Biochem Pharm*, 1977, 26: 2 247-2 250.
- [2] Powell M A, Somero G N. Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: sites and mechanisms of detoxification and metabolism [J]. *Biol Bull*, 1986, 171: 274-290.
- [3] Bagarinao T, Vetter R D. Sulphide tolerance and adaptation in the California killifish, *Fundulus parvipinnis*, a salt marsh resident [J]. *Fish Bio*, 1993, 42: 729-748.
- [4] Affonoso E G, Polcz V L P, Corr a C F, et al. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale* (Siluriformes: Callichthyidae) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2004, 139C: 251-257.
- [5] Affonoso E G, Polcz V L P, Corr a C F, et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 133C: 375-382.
- [6] Theede H, Ponat A, Hiroki K, et al. Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen deficiency and hydrogen sulphide [J]. *Mar Biol*, 1969, 2: 325-337.
- [7] Caldwell R S. Hydrogen sulfide effects on selected larval and adult marine invertebrates [R]. Water Resources Research Institute, Oregon State University, USA, 1975.
- [8] Jayamanne S C. Toxicity of hydrogen sulphide to juveniles of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *J Natl Sci Counc Sri Lanka*, 1992, 20 (2): 191-199.
- [9] Kang J C, Matsuda O. Combined effects of hypoxia and hydrogen sulfide on early developmental stages of white shrimp *Metapenaeus monoceros* [J]. *J Fac Appl Biol Sci Hiroshima Univ*, 1994, 33 (1): 21-27.

- [10] 石俊艳,刘中,丁茂昌,等.亚硝酸盐、硫化物与氨对河蟹幼体的急性毒性实验[J].辽宁大学学报:自然科学版,1999,26(1):92-96.
- [11] 陈佳荣.水化学[M].北京:中国农业出版社,1996:243-244.
- [12] 薛鲁征,堵南山,赖伟.中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)雌性生殖系统的组织学研究[J].华东师范大学学报:自然科学版,1987(3):88-97.
- [13] 陈佳荣.水化学实验指导书[M].北京:中国农业出版社,1996:173-175.
- [14] Chen L Q, Jiang H B, Zhou Z L, et al. Purification of vitellin from the ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an antivitelin ELISA [J]. Comp Biochem Physiol, 2004, 138B: 305-311.
- [15] Lowry O H. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951 (193): 265.
- [16] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review [J]. J Shellfish Res, 1990, 99: 1-28.
- [17] Lee F Y, Chang C F. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117A (4): 433-439.
- [18] 韩志英,金复生.硫化氢中毒研究进展[J].工业卫生与职业病, 2006, 32 (2): 118-121.
- [19] Kumar V, Mukherjee D. Phenol and sulfide induced changes in the ovary and liver of sexually maturing common carp, *Cyprinus carpio* [J]. Aquat Toxicol, 1988, 13 (1): 53-59.
- [20] Enrique M R, Laura S L G, Milton F. Inhibition of ovarian growth by canmium in the fiddler crab, *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae) [J]. Ecotoxicol Environm Safety, 2000, 46: 202-206.
- [21] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroid [J]. Annu Rev Fish Dis, 1991, 1: 3-26.
- [22] 王克行. 虾蟹类增殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 275.
- [23] 潘鲁青. 环境因子对甲壳动物渗透调节与免疫力的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004: 67-71.
- [24] Nicholls P. The effect of sulfide on cytochrome aa₁ isosteric and allosteric shifts of reduced α -peak [J]. Biochem Biophys Acta, 1975, 396: 24-35.
- [25] Bagarinao T, Vetter R D. Oxidative detoxification of sulfide by mitochondria of the California killifish *Fundulus parvipinnis* and the speckled sabbddab *Citharichthys stigmnaeus* [J]. J Comp Physiol B, 1990, 160: 519-527.

Effects of sulfide stress on ovary development of female Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* under different ambient pH

GU Shun-zhang, HONG Mei-ling, CHEN Li-qiao, LI Er-chao, LONG Zhang-qiang, ZHANG Lu, ZHANG Wei
(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Six treatments of *Eriocheir sinensis* were set up at different Na₂S levels (LS1 ([S] 0.1 mg/L pH 6.5), MS1 ([S] 0.33 mg/L pH 6.5), HS1 ([S] 1.0 mg/L pH 6.5), LS2 ([S] 0.1 mg/L pH 8.5), MS2 ([S] 0.33 mg/L pH 8.5) and HS2 ([S] 1.0 mg/L pH 8.5) and one control group in all. Females were exposed to sulfide for 30 d and sampled on days 10, 20 and 30 post-exposure. Results showed that ovarian lipovitellin concentration and ovarian total lipovitellin content in all treatments were lower than those in control at all intervals. A significant decrease ($P < 0.05$) of GSI was registered in HS₁ and HS₂ on day 30, and a significant decrease ($P < 0.05$) of lipovitellin content of ovary was apparent in MS₁, MS₂, HS₁ and HS₂ on days 10 and 20, and HS₁ on day 30 compared with the control. The difference of ovarian total lipovitellin content between the control and the other treatments was increased gradually with time elapsed. Ovarian total lipovitellin content significantly decreased in HS₁ after 10d and in MS₁, MS₂, HS₁ and HS₂ at 20 d, and ovarian total lipovitellin content in all treatments were significantly lower than that in control at 30 d. The results indicated that sulfide stress inhibited the ovary development of female Chinese mitten-handed crab and the toxicity of sulfide was aggravated by the low pH. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 684-689]

Key words: *Eriocheir sinensis*; sulfide; pH; ovary; gonadosomatic index (GSI); lipovitellin

Corresponding author: CHEN Li-qiao. E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn