

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00182

Cu²⁺对缢蛏稚贝的急性毒性及对抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响

刘浩明^{1,2}, 董迎辉², 霍礼辉², 林志华², 王昭萍¹

1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

摘要: 研究了 Cu²⁺对缢蛏稚贝的急性毒性并进行安全评价; 根据 96 h LC₅₀ 值设定 10、30、40 μg/L 3 个 Cu²⁺质量浓度梯度进行暴露实验, 以缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamark)稚贝软体组织中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量为指标, 研究 Cu²⁺污染对缢蛏稚贝的毒性作用。结果表明, Cu²⁺对缢蛏稚贝 96 h LC₅₀ 为 309.742 μg/L; 不同浓度 Cu²⁺胁迫下, 96 h 内缢蛏稚贝抗氧化酶(CAT、SOD)活力发生显著的变化($P < 0.05$), 除最高组 40 μg/L 在 48 h 时 CAT 活力被显著抑制($P < 0.05$)外, 96 h 内绝大部分时间点与沙滤海水对照组相比, 各暴露组抗氧化酶(CAT、SOD)活性处于诱导状态; 96 h 内各暴露组缢蛏稚贝丙二醛(MDA)含量均明显高于对照组($P < 0.05$)。研究认为, CAT、SOD 活性及 MDA 含量变化可反映缢蛏稚贝受 Cu²⁺伤害的程度, 可用作缢蛏安全性风险评价的参考依据。

关键词: Cu²⁺; 缢蛏; 稚贝; CAT; SOD; MDA

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0182-06

随着世界人口的激增, 工农业生产和海洋开发的蓬勃发展, 近岸海域特别是河口、内湾的污染已经成为威胁海洋生物资源和人体健康的因素之一。重金属污染来源广, 残留时间长, 有蓄积性, 能沿着食物链转移富集, 污染后不易察觉且难以恢复^[1], 已成为非常棘手的环境问题。如何合理、有效地控制与治理水域中重金属, 已经成为保护与改善水域环境、保障水生生物生态安全的热点问题之一。

缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamark)是生活在河口、内湾滩涂的埋栖型经济贝类, 易受含铜工业废水排放的直接危害^[2]。稚贝期是缢蛏幼体向成体生活的过渡阶段, 对毒物十分敏感^[3]。铜作为必需的微量元素参与生物体内多种酶的形成, 但是过量的铜对许多水生生物包括藻类、甲壳类、环节动物、软体动物、鱼类都有显著的毒性, 然而关于 Cu²⁺对于缢蛏稚贝毒理效应的研究报告很

少, 仅陈金堤^[2]研究了 Cu²⁺对缢蛏幼虫生长发育的影响及 EDTA 的解毒作用。本研究在研究 Cu²⁺对缢蛏稚贝急性毒性的基础上, 重点研究了不同浓度 Cu²⁺胁迫对稚贝软体组织中过氧化氢酶 CAT、超氧化物歧化酶 SOD 活性以及脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量的影响。旨在了解 Cu²⁺污染的作用机理, 从而为环境监测、环境污染的预防与治理、水质标准的制定、生态保护以及海洋贝类健康养殖等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验对象缢蛏稚贝取自浙江省宁波甬盛水产种业有限公司, 壳长(0.54±0.05) cm, 为防止摄食的影响, 实验前 1 d 停止投喂。实验用的海水为天然海水, 经沉淀、砂滤, 符合国家渔业水质标准, 其中 Cu²⁺含量为 1.1~1.3 μg/L, 实验中各组 Cu²⁺

收稿日期: 2011-05-06; 修订日期: 2011-08-15.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2009BADB7B02); 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-48).

作者简介: 刘浩明(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事贝类遗传育种研究. E-mail: haoming104@163.com

通信作者: 林志华, 研究员, 从事海洋贝类生物学研究. E-mail: zhihua9988@126.com

的质量浓度值不包括海水本底值。水温为 18~20℃, 海水比重为 1.010, pH 为 8.2, 溶解氧大于 5 mg/L, 氨氮小于 0.05 mg/L。

Cu(NO₃)₂·3H₂O 为分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司生产。用蒸馏水配成 1.000 g/L 的母液备用。总蛋白、SOD、CAT 和 MDA 均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行测定。

1.2 实验设计

根据预实验结果, 按对数梯度设计 5 个 Cu²⁺ 剂量组依次为 100、178、316、562、1 000 μg/L, 以砂滤海水作为对照, 每个梯度 3 个平行。以 250 mL 烧杯为实验容器, 实验液 100 mL, 稚贝密度为 2 个/mL, 水环境参数同 1.1。连续暴露于不同浓度的重金属中, 持续时间为 96 h, 实验期间不充气, 不投饵。每 24 h 更换实验液, 并统计其死亡率, 每个平行组观察的数目 ≥ 50。以显微镜下双壳张开大于 50 μm, 不见鳃部滤水, 组织发黑、颗粒化作为判定死亡的标准。为减少实验容器对重金属的吸附, 实验前用对应浓度实验液浸泡 24 h 以上。

根据急性毒性实验结果, 设计 3 个 Cu²⁺ 剂量组依次为 10、30、40 μg/L, 以砂滤海水作为对照, 每个处理 2 个平行。以 2.5 L 广口塑料盆为实验容器, 实验液 2 L, 稚贝密度为 2~3 个/mL, 水环境因素同 1.1。暴露时间为 96 h, 实验期间不充气, 不投饵, 每 6 h 搅动实验液, 每隔 24 h 更换实验液。分别于实验开始后 0、6、12、24、48、72、96 h 从每个暴露组中随机取样, 每组约 0.25 g, 用 300 目筛绢过滤, 砂滤海水冲洗, 吸水纸吸干, 置于冻存管内, 液氮速冻, 于 -80℃ 的冰箱中保存备用。

1.3 抗氧化酶(CAT、SOD)活力和脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量测定

取出保存的样品, 准确称量待测样品的质量, 按质量体积比加 4℃ 预冷的 0.86% 生理盐水制备成 5% 的组织匀浆液, 冰浴条件下用组织匀浆机 18 000 r/m 匀浆 2 min。匀浆混合物用冷冻离心机离心 4℃, 1 000 g, 离心 10 min 取上清测定总蛋白含量; 4℃, 12 000 g, 离心 10 min, 取上清液测定抗氧化酶(CAT、SOD)活力; 4℃, 10 000 g, 离心 10 min, 取上清液进行脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量测

定。以上指标均于 12 h 内测定。

样品上清液总蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝染色法, CAT 测定采用紫外分光法, SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法, MDA 测定采用 TBA 法。CAT 和 SOD 活性的测定结果用 U/mg(prot)表示; MDA 的含量采用 nmol/mg(prot)表示。

1.4 数据分析

所有数据均用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 利用 SPSS18.0 统计软件对所有数据进行分析。采用概率单位法计算出 96 h 的 LC₅₀, Cu²⁺ 的安全浓度 $SC=f \times 96h LC_{50}$ (Cu²⁺ 属于难分解、蓄积性强、毒性大的物质, 所以 f 值取 0.01); 采用单因子方差分析(One-way ANOVA)的 Duncan's multiple 法对 SOD、CAT 活性以及 MDA 含量进行组间差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 Cu²⁺对缢蛏稚贝的急性毒性

不同时间点, 各浓度 Cu²⁺ 暴露组缢蛏稚贝死亡率见表 1。实验期间, 空白对照组随机取样观察, 96 h 内无个体死亡。实验结果显示, 随着浓度的增加和暴露时间的延长, Cu²⁺ 对缢蛏稚贝的急性毒性明显增强, 死亡率显著增高。100 μg/L 和 178 μg/L 暴露组 96 h 内始终保持较高的存活率; 316 μg/L、562 μg/L 和 1 000 μg/L 暴露组, 72~96 h 的死亡率骤增。采用概率单位法, 对 96 h 的实验数据进行分析, 得出 Cu²⁺ 质量浓度对数(X)与死亡率(P)的线性回归方程为 $P=4.949X-12.401$ ($R^2=0.983$); 96 h 的半数致死浓度 LC₅₀=309.742 μg/L (95% 置信区间为 286.981~334.371 μg/L); 安全浓度为 3.097 μg/L。

2.2 Cu²⁺对缢蛏稚贝 CAT 和 SOD 活性的影响

缢蛏稚贝暴露于不同浓度的 Cu²⁺ 溶液中, CAT 活力均产生明显的变化, 呈现升高 → 降低 → 升高的动态变化趋势(图 1)。对照组缢蛏稚贝 CAT 活性在 96 h 内没有显著性变化 ($P > 0.05$), 表明在没有外源 Cu²⁺ 干扰下, 其 CAT 活性相对稳定。10 μg/L Cu²⁺ 暴露组, 随暴露时间的延长, 其 CAT 活力逐渐升高, 12~24 h CAT 活力显著提高 ($P < 0.05$), 24 h 达到最高值, 为 (80.18 ± 2.74) U/mg, 是对照

表 1 Cu²⁺暴露不同时间缢蛭稚贝的死亡率
Tab.1 Mortality rate of *Sinonovacula constricta* juveniles exposed to Cu²⁺

$n \geq 50; \bar{x} \pm SD; \%$

Cu ²⁺ 质量浓度 /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Cu ²⁺ concentration	暴露时间/h exposure time			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
100	0.61±1.05	0.67±0.58	1.33±0.58	2.00±0.00
178	2.67±2.30	3.42±1.24	6.14±0.77	8.67±1.15
316	6.00±0.00	7.67±0.29	17.07±1.20	53.33±4.05
562	8.07±0.65	13.35±1.62	20.98±6.98	88.97±2.61
1000	8.29±0.51	34.16±2.28	42.17±13.28	100.00±0.00

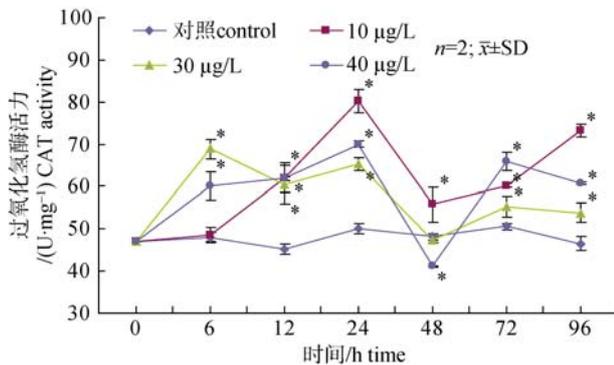


图 1 Cu²⁺对缢蛭稚贝过氧化氢酶(CAT)活性的影响
*表示暴露组与对照组之间具有显著差异($P < 0.05$)。

Fig.1 Effect of Cu²⁺ on activity of catalase in *Sinonovacula constricta* juveniles

* indicates significant difference compared with control($P < 0.05$)

组的 1.71 倍; 随后开始下降, 48 h 下降到最低, 但仍明显较对照组高, 随后又逐渐升高。30 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组, CAT 活力在 6 h 达到最高值, 随后开始下降, 48 h 下降到最低, 略低于对照组水平, 随后逐渐升高。40 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组, 随暴露时间的延长, CAT 活力逐渐升高, 24 h 达到最高值, 随后开始下降, 48 h CAT 活力被显著抑制($P < 0.05$), 随后逐渐升高, 至 72 h 达第 2 个峰值。

不同质量浓度的 Cu²⁺对 SOD 活力均产生不同程度的诱导作用(图 2)。对照组缢蛭稚贝 SOD 活力在 96 h 内变化不大, 表明在没有外源 Cu²⁺干扰下, 其 SOD 活力含量相对稳定。10 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组, 随暴露时间的延长, 其 SOD 活力逐渐升高, 12~24 h SOD 活力显著提高($P < 0.05$), 随后开始下降, 48 h 后逐渐升高, 至 96 h 达最高值。30 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组, 呈现升高→降低→升高的动态变化趋势, 96 h 达最高值。40 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组,

SOD 活力在 24 h 达到最高值, 随后开始下降, 变化趋势呈抛物线状态, 72 h 内均高于 10 $\mu\text{g/L}$ 、30 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组, 至 96 h 低于该两组。

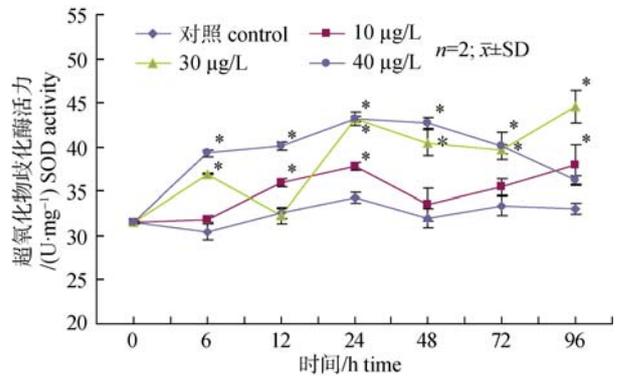


图 2 Cu²⁺对缢蛭稚贝超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响
*表示暴露组和对照组之间具有显著差异($P < 0.05$)。

Fig.2 Effect of Cu²⁺ on activity of SOD in *Sinonovacula constricta* juveniles

* indicates significant difference compared with control ($P < 0.05$).

2.3 Cu²⁺对缢蛭稚贝 MDA 含量的影响

48 h 内对照组缢蛭稚贝体内 MDA 的含量基本保持不变, 随后有所下降(图 3)。96 h 内不同质量浓度的 Cu²⁺对稚贝脂质过氧化作用均产生明显的影响, 各暴露组 MDA 的含量均明显高于对照组($P < 0.05$)。10 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组 MDA 含量随暴露时间延长逐渐增加, 24 h 达最高值, 而后逐渐降低, 48 h 后又开始增加。30 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组 MDA 含量变化与 10 $\mu\text{g/L}$ 暴露组相似, 均变现为升高→降低→升高的动态变化趋势, 48 h 达最高值。40 $\mu\text{g/L}$ Cu²⁺暴露组 MDA 含量 72 h 内均高于其他两组, 随后逐渐降低, 96 h MDA 含量低于其他两组, 其含量变化呈升高→降低→升高→降低的趋势, 48 h 达最高峰值, 随后逐渐下降。

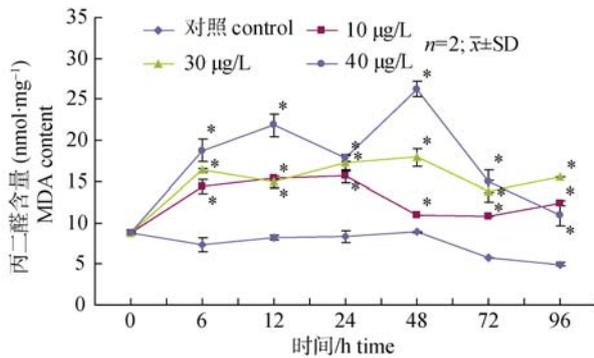


图3 Cu^{2+} 对缢蛏稚贝丙二醛(MDA)含量的影响

*表示暴露组和对照组之间具有显著差异($P < 0.05$)。

Fig.3 Effect of Cu^{2+} on content of MDA in *Sinonovacula constricta* juveniles

* indicates significant difference compared with control(ANOVA, $P < 0.05$).

3 讨论

3.1 Cu^{2+} 对缢蛏稚贝的致毒效应及安全浓度

Cu^{2+} 是易被海洋生物富集的污染元素之一, Cu^{2+} 对生物体的致毒作用不仅取决于浓度, 而且与蓄积时间密切相关, 无论蓄积性毒物通过何种途径进入机体, 只要生物体内 Cu^{2+} 的蓄积到达致死或中毒阈值浓度时, 必然会导致机体的死亡或者病变^[2]。急性毒性实验结果表明, 随着浓度的增加和暴露时间的延长, Cu^{2+} 对缢蛏稚贝的毒性明显增强, 与陈金堤^[2]的结果类似, 但两实验结果有较大的差异。陈金堤^[2]研究发现, 缢蛏稚贝暴露于 400 $\mu\text{g/L}$ 和 160 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 中, 分别在第 4 和第 6 天全部死亡, 而本研究中 316 $\mu\text{g/L}$ 和 178 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 暴露组第 4 天的死亡率分别为 55.33%和 8.67%。首先, 与陈金堤^[2]实验设计相比较, 本实验稚贝个体较大、水温低、海水比重较小、实验对象密度小等因素造成缢蛏稚贝对 Cu^{2+} 的耐受性高; 其次, 本实验期间并未投喂饵料, 也是造成两实验结果不相同的主要原因之一。

本实验的结果表明, Cu^{2+} 对缢蛏稚贝的安全浓度为 0.003 mg/L , 明显低于《中国渔业水质标准》(GB11607-89)的 0.01 mg/L , 可见缢蛏稚贝对 Cu^{2+} 的耐受性较低。在大部分海域, 污染物浓度虽然达不到使其死亡的浓度, 但却会影响幼虫的生长, 延迟其发育过程, 从而影响双壳贝类种群的补充^[4]。“全国海岸带及海涂资源综合调查

(1980-1986)”表明, 1978 年东海海水 Cu^{2+} 质量浓度多数站位超过 10 $\mu\text{g/L}$, 最大值达 305 $\mu\text{g/L}$, 出现于长江口附近和杭州湾; “我国专属经济区、大陆架勘测(126 专项)(1998-1999)”调查表明, 1998 年 8 月东海区 Cu^{2+} 质量浓度介于 0.13~7.77 $\mu\text{g/L}$ ^[5]。因此, 由重金属毒性作用造成的幼虫以及其后发育阶段的延迟发育与水产养殖业的发展休戚相关^[4], 应加强海洋环境污染的监测与治理工作, 从而为缢蛏等水生生物提供良好的生存环境。

3.2 Cu^{2+} 对缢蛏稚贝抗氧化酶活力的影响

生物体在分子水平上的改变能够反映污染物对生物的早期影响, 因此可以作为灵敏的指标用于检测污染物对生物个体、种群的早期影响, 从而在保护生物种群和生态系统上具有重大的预测价值^[6]。抗氧化防御系统各成分和脂质过氧化物对污染物胁迫非常敏感, 其活性(或含量)变化可反映污染胁迫下的机体氧化应激情况, 因此可作为指示环境污染的早期预警^[7-8]。

本研究发现, 缢蛏稚贝暴露于不同浓度 Cu^{2+} 中, 其软体组织抗氧化酶(CAT、SOD)活力在 6 h 内或者 6~12 h 间就发生显著变化, 表明抗氧化酶系统对于重金属胁迫因子具有快速反应机制。除最高质量浓度组(40 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+})在 48 h 时软体组织中 CAT 活性被显著抑制($P < 0.05$)外, 96 h 内绝大部分时间点与对照组相比, 各暴露组抗氧化酶(CAT、SOD)活性处于诱导状态。

国内外许多研究都发现, 小剂量毒物对生物体代谢有一定的“促进”刺激效应, 称之为“毒物兴奋效应”^[9-10]。有关重金属对双壳贝类的毒理效应也发现相同的结果, 如地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)在受到亚致死浓度 Cu^{2+} 胁迫后, 其体内 SOD 活力升高^[11]。程华胜^[12]研究发现, 不同浓度 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对近江牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould)鳃和消化腺组织 SOD 活性均表现出不同程度的诱导作用。Almeida 等^[13]将贻贝(*Perna perna*)暴露在多种重金属中, 发现暴露结束时所有暴露组 CAT 活性均有所升高。珠母贝(*Pinctada fucata*)在受到亚致死浓度 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫 24 h 后, 外套膜 SOD 酶的活力会显著增加^[14]。

Bathymodiolus azoricus 暴露于 100 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫 144 h 后, 外套膜内 SOD、CAT 和 Se-GPx 酶活力显著增加^[15]。但是有关重金属对双壳贝类幼虫体内抗氧化酶活力影响的研究较少^[4]。本实验研究发现, 虽然不同浓度 Cu^{2+} 胁迫下缢蛭稚贝抗氧化酶(CAT、SOD)活力在绝大部分时间点均显著增加, 但是在某些时间点反而被显著抑制, 或者较对照没有明显的变化。Vlahogianni 等^[11]通过研究亚致死浓度 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Fe^{2+} 胁迫对地中海贻贝抗氧化酶活性的影响, 发现 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 暴露组 CAT 活力降低, 而 Fe^{2+} 暴露组 CAT 活力上升; Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Fe^{2+} 胁迫后 SOD 活力呈现极高的可变性。因此, “毒物兴奋效应”理论似乎不能完全用来描述抗氧化酶活力的变化趋势。

本实验抗氧化酶(CAT、SOD)活力与 Cu^{2+} 浓度没有明显的剂量-效应关系。自然环境中生物体抗氧化酶的活性随季节而发生变化^[16], 同时还会受到生物种属年龄、性别、生长发育阶段以及环境中其他污染物的影响, 所以对水生生物来说, 抗氧化酶是一类敏感的分子生态毒理学指标, 获得重金属胁迫与抗氧化酶活力之间的剂量-效应关系比较困难, 从而限制了抗氧化防御酶在环境监测中的应用。因此, 将抗氧化酶例如 SOD、CAT、GST 用作指示环境污染的早期预警生物标志物, 需考虑多种因素的综合影响, 在实验条件的操作上应严格控制, 尽量减少可能产生的误差, 以确保实验结果的真实可靠^[17]。

3.3 Cu^{2+} 对缢蛭脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量的影响

重金属影响机体内活性氧(ROS)的变化, 氧自由基能攻击生物膜中多不饱和脂肪酸(PUFA)影响机体脂质过氧化作用, 造成脂质过氧化产物含量发生变化^[18]。脂质过氧化物含量的变化, 尤其是丙二醛(MDA)含量的变化, 能够反映脂质过氧化程度及重金属对机体损伤程度, 间接地反映环境中重金属污染的程度, 可作为环境污染胁迫的生物标志物。

众多研究发现, Cu^{2+} 胁迫经常会导致水生生物, 如软体动物^[11, 19]、两栖类^[20]、纽形动物^[21]、

鱼类^[22]等脂质过氧化水平的提高。本实验研究也发现, 各 Cu^{2+} 暴露组缢蛭稚贝丙二醛(MDA)含量均明显高于对照组, 尤其是 6 h 内 MDA 的含量显著增加, 并且与 Cu^{2+} 浓度呈正相关趋势, 说明 Cu^{2+} 加快了缢蛭稚贝体内脂质过氧化作用。Viar-engo 等^[19]研究发现 40 $\mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 能增加地中海贻贝机体内 MDA 的含量。Vlahogianni 等^[11]通过研究亚致死浓度 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Fe^{2+} 胁迫对地中海贻贝脂质过氧化作用的影响, 发现均能增加其体内 MDA 的含量。但是重金属离子对生物体内脂质过氧化作用的影响, 因生物种类的不同、实验条件的不同, 研究的结论也不一致^[18-21], 建议利用生物体内 MDA 含量的变化来检测外界重金属污染状况的相关研究中, 应该在实验初期就开始检测 MDA 的含量, 并与其他生理指标如抗氧化防御物质等相结合, 才能更好地反映重金属污染状况^[21]。

参考文献:

- [1] 赵红霞, 詹勇, 许梓荣. 重金属对水生动物毒性的研究进展[J]. 内陆水产, 2003(1): 38-40.
- [2] 陈金堤. Cu^{2+} 对缢蛭幼虫生长发育的影响及 EDTA 的解毒作用[J]. 台湾海峡, 1989, 8(3): 242-246.
- [3] 李国基, 刘明星, 张首临, 等. Zn 等金属离子对栉孔稚贝成活的毒性影响[J]. 海洋环境科学, 1994, 13(2): 13-16.
- [4] 王清. 几种重金属和有机污染物对文蛤 *Meretrix meretrix* 生态毒理效应的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010.
- [5] 王长友. 东海 Cu、Pb、Zn、Cd 重金属环境生态效应评价及环境容量估算研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [6] 徐立红, 张雨元, 陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 171-184.
- [7] Livingstone D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms[J]. Mar Pollut Bull, 2001, 42: 656-666.
- [8] 王晓蓉, 罗义, 施华宏, 等. 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的应用[J]. 环境化学, 2006, 25(3): 320-325.
- [9] Sagan L A. What is hormesis and why haven't we heard about it before[J]. Health Phys, 1987, 52: 521-525.
- [10] 龚春梅, 综述, 庄志雄, 等. 浅议毒物兴奋效应[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版, 2007, 28(4): 24-34.

- [11] Vlahogianni T, Valavanidis A . Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*[J]. Chem Ecol, 2007, 23(5): 361–371 .
- [12] 程华胜 . 重金属在近江牡蛎体内的动力学及其生理效应研究[D] . 广州: 暨南大学, 2004 .
- [13] Almeida E A D, Miyamoto S, Bainy A C D, et al . Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase(PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals[J] . Mar Pollut Bull, 2004, 49: 386–392 .
- [14] Jing G, Li Y, Xie L P, Zhang R Q . Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster(*Pinctada fucata*) exposed to copper[J] . Comp Biochem Physiol, 2006, 144C: 184–190 .
- [15] Company R, Serafim A, Cosson R, et al . The effect of cadmium on antioxidant responses and the susceptibility to oxidative stress in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*[J] . Mar Biol, 2006, 148: 817–825 .
- [16] Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M J, et al . Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece[J] . Mar Pollut Bull, 2007, 54(9): 1361–1371 .
- [17] 王晓蓉, 罗义, 施华宏, 等 . 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的应用[J] . 环境化学, 2006, 25(3): 320–325 .
- [18] Roméo M, Bermani N, Gnassia-Barelli M, et al . Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*[J] . Aquat Toxicol, 2000, 48: 185–194 .
- [19] Viarengo A, Canesio L, Perticari M, et al . Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam[J] . Comp Biochem Physiol, 1990, 97C: 37–42 .
- [20] Papadimitriou E, Loumbourdis N S . Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione[J] . Bull Environ Contam Toxicol, 2002, 69: 885–891 .
- [21] 吴海一, 孙世春 . 重金属对扁额细首纽虫金属硫蛋白的影响[J] . 中国海洋大学学报, 2009, 39(1): 53–55 .
- [22] 曹亮 . 铜、镉对褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)早期发育阶段的毒理效应研究[D] . 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010 .

Acute toxicity of Cu²⁺ and its effects on antioxidant enzymes in *Sinonovacula constricta* juveniles

LIU Haoming^{1,2}, DONG Yinghui², HUO Lihui², LIN Zhihua², WANG Zhaoping¹

1. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Zhejiang Wanli University, College of Biological and Environmental Sciences, Ningbo 315100, China

Abstract: We evaluated the acute toxicity of Cu²⁺ and its effects on antioxidant enzymes in *Sinonovacula constricta* juveniles. The results of acute toxicity test showed that the median 96 h lethal concentration (LC₅₀) for Cu²⁺ was 309.74 µg/L. We also measured catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in the soft tissue of clams exposed to 10, 30, or 40 µg/L Cu²⁺, respectively, at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h of exposure. CAT activity of the maximum exposed group was lower after 48 h relative to the controls whereas both CAT and SOD activity of all exposure groups were higher at 6, 24, 72 and 96 h. The MDA content was higher in fish exposed to Cu²⁺ than in the control group after 96 h. Our results suggest that exposure to Cu²⁺ causes oxidative damage in *S. constricta* juveniles.

Key words: Cu²⁺; *Sinonovacula constricta* juveniles; CAT; SOD; MDA

Corresponding author: LIN Zhihua. E-mail: zhihua9988@126.com