

Die effek van heksavalente chroom by 'n variërende water-pH op die koolhidraatmetabolisme van *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae)

V. Wepener*, J.H.J. van Vuuren en H.H. du Preez

Navorsingseenheid vir Akwatiese en Terrestriële Ekosisteme, Randse Afrikaanse Universiteit, Posbus 524, Aucklandpark 2006

Ontvang 6 November 1991; aanvaar 13 Julie 1992

UITTREKSEL

'n Ondersoek is geloods om die invloed van subletale konsentrasies van heksavalente chroom Cr(VI) by verskillende pH's op die koolhidraatmetabolisme van varswatervis te bepaal. Die toetsorganisme, *Tilapia sparrmanii*, is vir korttermyn- sowel as langtermyn tydperke aan Cr(VI) blootgestel, waarna die bloedglukosevlakke en die aktiwiteite van piruvaatkinase, isositraatdehidrogenase en glukose-6-fosfaatdehidrogenase bepaal is. Daar is gevind dat blootstellings by 'n lae pH tot 'n toename in energieproduksie lei. Langtermynblootstelling veroorsaak dat die koolhidraatreserwes uitgeput word en dat daar 'n toename in pentosefosfaatweg-aktiwiteit voorkom.

ABSTRACT

The effect of hexavalent chromium at different pH values on the carbohydrate metabolism of Tilapia sparrmanii (Cichlidae)

The effect of hexavalent chromium at different pH values on the carbohydrate metabolism of Tilapia sparrmanii was investigated. The indicator organisms were exposed to Cr(VI) for short and long-term exposures, after which the blood glucose levels and activities of pyruvate kinase, isocitrate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase were determined. It was found that short-term exposures of Cr(VI) at an acidic medium caused an increase in energy production and glucose concentrations. Long-term exposures led to exhaustion of carbohydrate reserves, which necessitated the formation of additional energy compounds.

INLEIDING

Die mens se vernietigende invloed op die akwatiese omgewing het in die vorm van subletale besoedeling, toestande van kroniese spanning geskep. Subletale effekte van besoedelstowwe is gewoonlik biochemies van aard, aangesien dit reageer met ensieme en metaboliete van ensimatisiese reaksies, of aan membraansisteme of ander sellulêre komponente bind en interaksies daarmee toon. Hierdie primêre interaksies tussen besoedelstowwe en verskillende sellulêre komponente gee aanleiding tot 'n sameloop van funksionele en strukturele veranderinge wat op 'n hoër vlak van biologiese organisasie (byvoorbeeld 'n afname in noodsaaklike funksies soos osmoregulerings, hormoonregulerings en respirasie) gemanifesteer word.¹ Veranderinge wat voorkom in koolhidraatreserwes en ensiemaktiwiteite van die koolhidraatmetabolismewê kan as belangrike indikatore van besoedelingsgeïnduseerde spanning dien.^{2,3}

In die huidige toksikologiese studie is die invloed van heksavalente chroom Cr(VI) by 'n variërende water-pH op die veranderinge in glukosevlakke en aktiwiteite van ensieme van die verskillende koolhidraatmetabolismewê in die plasma van die toetsorganisme bestudeer. Blootstellings is by verskillende pH-waardes uitgevoer, aangesien veranderinge in die water-pH die toksisiteit van swaar metale beïnvloed.⁴ Die aktiwiteite van piruvaatkinase (PK, E.C: 2.7.1.40), isositraatdehidrogenase (IDH, E.C: 1.1.1.42) en glukose-6-fosfaatdehidrogenase (G-6-PDH, E/C: 1.1.1.49) is tydens die studie bepaal.

MATERIAAL EN METODEDES

Die toetsorganismes, *Tilapia sparrmanii* (vleikurper), is vanaf die Provinsiale Vissery te Lydenburg verkry. Visse van verskillende groottes (40 – 120 g) is vir twee maande toegelaat om onder laboratoriumtoestande by 'n konstante temperatuur van 24 ± 0.5 °C te akklimatiseer. Na afloop van die akklimatisasietydperk is *T. sparrmanii* aan subletale konsentrasies van Cr(VI) blootgestel. Korttermynblootstellings van 96 uur is by pH-waardes van 5, 7.4 en 9 uitgevoer. 'n Langtermynblootstelling van vier weke is ook uitgevoer sonder dat die pH van die blootstellingsmedium gemanipuleer is. Die bioëssai vir sowel die korttermyn- as langtermynblootstellings is by 24 °C in 'n deurvloei-sisteem uitgevoer soos deur Wepener *et al*⁵ beskryf is. Die Cr(VI) is as 'n 0.1 mg.l⁻¹ kaliumdichromaatoplossing by die water van die deurvloei-sisteem gevoeg. Die waterkwaliteit van die blootstellingsmedium word in tabel 1 weergegee.

TABEL 1
Waterkwaliteit gedurende die blootstellings

pH	6.95
Konduktiwiteit (mS/m) by 25 °C	16.4
Totale alkaliniteit as CaCO ₃ , mg.l ⁻¹	52
Totale hardheid as CaCO ₃ , mg.l ⁻¹	61
Kalsium mg.l ⁻¹	10.9
Magnesium mg.l ⁻¹	8.3
Natrium mg.l ⁻¹	3.8
Bikarbonate mg.l ⁻¹	63
Chloriede mg.l ⁻¹	6.1
Sulfate mg.l ⁻¹	2
Nitrate mg.l ⁻¹	1.8
Fluoriede mg.l ⁻¹	0.3

*Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

Na afloop van elke blootstellingstydperk is die bloed van die toetsorganismes versamel. ⁵ Slegs plasma wat heeltemal vry van hemolise was, is vir die bepaling van glukose-konsentrasies en ensiemaktiwiteite gebruik. Die glukose-konsentrasies is spektrofotometries met behulp van die Glukose GOD-PAP-toetskombinasie (Boehringer-Mannheim) bepaal. Die plasma-aktiwiteite van PK en IDH is onderskeidelik volgens die metodes van Gutman en Bernt ⁶ en Bernt en Bergmeyer ⁷ bepaal, terwyl die G-6-PDH-aktiwiteite met behulp van 'n Boehringer-Mannheim-toetskombinasie bepaal is. Alle aktiwiteite is spektrofotometries by 340 nm in kwarts mikrokuvette met behulp van 'n "Hitachi 150-20"-spektrofotometer bepaal.

Statistiese analise is op gepaarde waardes van onbesoedelde vis teenoor besoedelde vis uitgevoer deur van die Student t-toets gebruik te maak. ⁸ Statisties beduidende afwykings is op die 95% betroubaarheidskaal ($P \leq 0.05$) beskou.

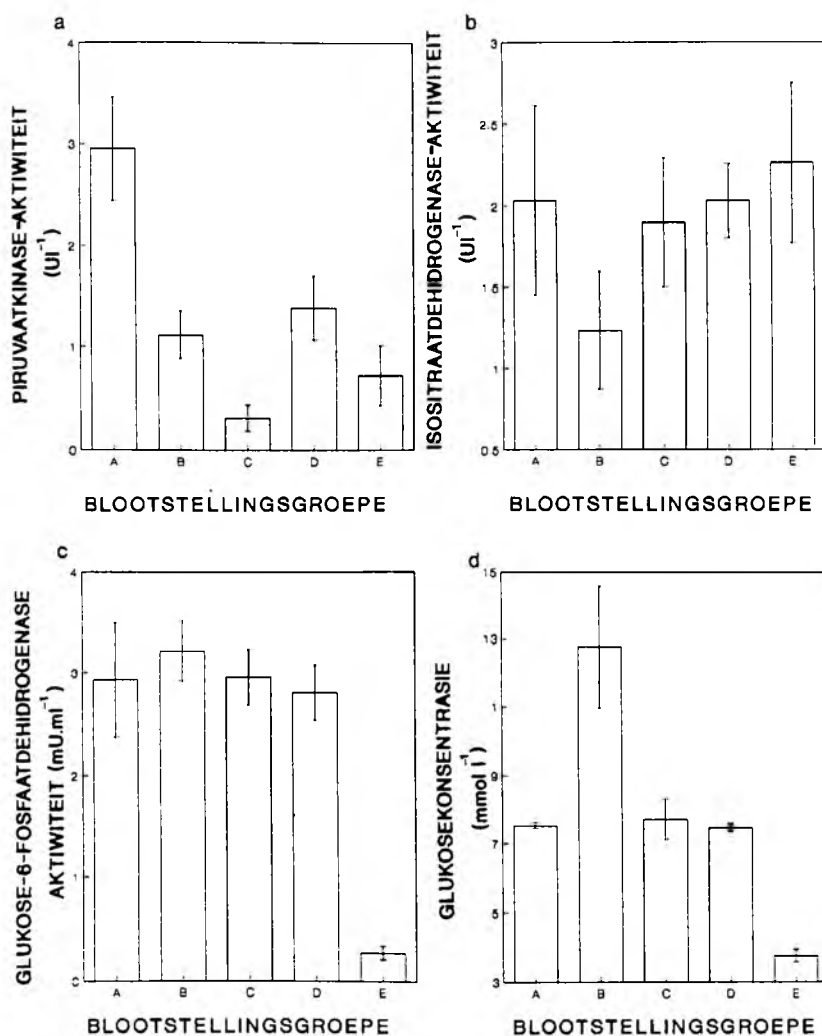
RESULTATE

Heksavalente chroom kom hoofsaaklik as okso-anione en hidroksiede by lae pH-waardes voor. By pH 5 is die okso-anioon HCrO_4^{-1} in groter konsentrasies as CrO_4^{-2} aanwesig.

By die neutrale en hoë pH-waardes is die divalente CrO_4^{-2} -anioon dominant.

Geen mortaliteite is by die kontrole groep of by die pH 7.4- en pH 9-blootstellingsgroepe waargeneem nie. Daar is egter vyf mortaliteite by die pH 5-blootstellingsgroep en 19 by die langtermynblootstellingsgroep aangeteken. In al die figure word die kontrolegroep as blootstellingsgroep A weergegee, terwyl die korttermynblootstellings van 96 uur by pH 5, 7.4 en 9 onderskeidelik as blootstellingsgroepe B, C en D voorgestel word. Die langtermynblootstellingstydperk van vier weke word as blootstellingsgroep E voorgestel.

Na blootstelling aan Cr(VI) het al die blootstellingsgroepe beduidende afnames ($P \leq 0.005$) in PK-aktiwiteit (fig. 1a) getoon. Die IDH-aktiwiteite (fig. 1b) van groepe B, C en D toon geringe dalings, terwyl die IDH-aktiwiteit van groep E 'n geringe styging getoon het. Blootstellingsgroep E toon egter 'n beduidende afname ($P \leq 0.005$) in G-6-PDH-aktiwiteit (fig. 1c) vanaf die kontrolewaarde, terwyl die korttermynblootstellingsgroepe geen veranderinge in G-6-PDH-aktiwiteit toon nie. Die bloedglukosekonsentrasies (fig. 1d) van groep B neem beduidend toe ($P \leq 0.005$) teenoor die kontrolegroep, terwyl groep E 'n beduidende afname ($P \leq 0.005$) toon. Blootstellingsgroepe C en D toon geen verandering vanaf die kontrolewaarde nie.



FIGUUR 1 a – d: Ensimatiese aktiwiteite en bloedglukosekonsentrasies na blootstelling aan chroom by verskillende pH-waardes waar A = Kontrole, B = pH 5, C = pH 7.4, D = pH 9 en E = langtermynblootstelling (gemiddeld $\pm$ standaardfout : $n = 10$).

BESPREKING

By visse is 'n toename in glukosevlakke in die bloed en 'n afname in lower- en spierglikogeeninhoud tipiese effekte wat besoedelstowwe op die koolhidraatmetabolisme uitoefen.⁹ Die statistiese beduidende toename in die glukosekonsentrasies by groep B is in reaksie op die skade wat deur die monovalente HCrO_4^- -vorm van Cr(VI) aan die kieu van die toetsorganisme aangerig is.⁵ Indien die spanningstoestande vir dae sou aanhou, sal die adenohipofise, adrenokortikotropiese hormoon (AKTH) afskei, wat die sekresie van glukokortikoïede (primêre kortisol) verhoog.¹⁰ Die hiperglisemiese toestande wat waargeneem is, kan aan 'n verhoogde afskeiding van kortisol en katesjolamiene, soos adrenaliene, toegeskryf word.¹¹ Hierdie spanningshormone stimuleer die prosesse van glikogenolise wat die benutting van reserwe glikogeen vanuit die lower- en spierweefsel bevorder¹² en glukoneogenese wat aminosure en vetsure na bloedglukose omskakel.¹³ Die beduidende afnames in die bloedglukosevlakke tydens die langtermynblootstellingstydperk is waarskynlik deur uitputting van sowel die glikogeenreserwes as beskikbare bloedglukose, veroorsaak.

Die aanwesigheid van sellulêre ensieme in die plasma (as een van die ekstrasellulêre kompartemente van *T. sparrmanii*) het geen metaboliese funksie nie, maar dien as 'n sensitiewe indikator van die sellulêre toestande wat deur een of ander patologiese toestand veroorsaak is.¹⁴ Die voorkoms van sellulêre ensieme in die ekstrasellulêre kompartemente word deur 'n relatiewe of absolute verlies van energie in die selle veroorsaak. Die funksionering van kationpompe word gehinbeer deur die oksidatiewe aksie van Cr(VI) , met die gevolg dat die selle begin swel. As gevolg van die inhibering van die kationpompe sal daar 'n toename in die intrasellulêre kalsiumkonsentrasies voorkom.¹⁴ Dit sal tot 'n toename in membraanvesikels, wat met 'n verhoogde membraanpermeabiliteit geassosieer word, lei. Indien die selle in noue kontak met die sirkulatoriese sisteem is, kan die ensieme uit die selle in die bloedstroom diffundeer.¹³ 'n Ander roete waarmee ensieme in die bloed kan beland, is om deur die kapillêre membraan te diffundeer, of om via die limf na die bloed vervoer te word.¹⁴ Die toename in sellulêre ensiemaktiwiteit in die plasma kan dus as 'n afname in aktiwiteit van die betrokke ensiem in die selle of weefsel waar dit aktief is, geïnterpreteer word. 'n Afname in sellulêre ensiemaktiwiteit in die plasma kan volgens Gerlach¹⁵ as 'n toename in die kataboliese of anaboliese aktiwiteit van die betrokke ensiem in die weefsel waar dit aktief funksioneer, beskou word.

Die beduidende afname in die aktiwiteit van PK in die plasma dui op die moontlikheid dat daar 'n toename in PK-aktiwiteit elders in die vis is. Dit kan 'n aanduiding wees dat daar 'n toename in glikolise in die spierweefsel voorkom.¹⁶ Die toename in PK-aktiwiteit in die spierweefsel lei tot die katalise van die vorming van piruvaat vanaf fosfoënl-piruvaat. Nath en Kumar¹⁷ vind dat chroom 'n toename in bloedpiruvaatvlakke veroorsaak en dit kan aan 'n toename in glikolise en/of 'n stadiger benutting van piruvaat deur die sitroensuursiklus toegeskryf word. Volgens Singh en Srivastava¹⁸ is die toename in piruvaatvlakke as gevolg van 'n afname in piruvaatbenutting, sekondêr tot die inhibering van een of meer reaksies van die sitroensuursiklus.

Isositraatdehidrogenase (IDH) is een van die oksidatiewe ensieme wat vir die afbraak van piruvaat in die sitroensuursiklus verantwoordelik is. Die effense dalings en stygings in die IDH-aktiwiteit wat by *T. sparrmanii* waargeneem is, dui daarop dat die sitroensuursiklus se werking nie nadelig deur Cr(VI) in dié geval beïnvloed word nie. Die daling ($0.05 \geq P \leq 0.25$) wat by blootstellingsgroep B waargeneem is, dui op 'n geringe toename in die oksidasie van piruvaat wat energie aan *T. sparrmanii* verskaf. Die konstante funksionering van IDH en die drastiese verhoging in glikolise bied dan ook 'n verklaring vir die styging in bloedpiruvaatvlakke na blootstelling aan Cr wat deur Nath en Kumar¹⁷ waargeneem is.

Die statistiese beduidende afname in die G-6-PDH-aktiwiteit by blootstellingsgroep E kan moontlik 'n aanduiding van die stimulerende van die pentosefosfaatweg, om addisionele energierike verbindings te produseer, wees. Hierdie aanname is gemaak na aanleiding van die verhoging in G-6-PDH-aktiwiteit wat by *Oreochromis mossambicus* gevind is, wat 'n gepaardgaande toename in die produksie van energierike NADPH via die pentosefosfaatweg voorstel.¹⁹ Die toename in pentosefosfaatweg-werking vind plaas om energie aan *T. sparrmanii* tydens langtermynblootstelling aan Cr(VI) te verskaf. Die korttermynblootstellings toon egter geen veranderinge teenoor die kontrole-aktiwiteit nie en hierdie verskynsel, asook die konstante handhawing van die IDH-aktiwiteit, kan volgens Buhler *et al.*²⁰ toegeskryf word aan die feit dat veranderinge in ensiemaktiwiteite eers na langtermynblootstelling aan Cr(VI) voorkom. Alternatiewelik vind inhibering van mikrosomale en oplosbare ensieme deur chroom eers plaas nadat Cr(VI) na Cr(III) gereduseer is. By visse vind hierdie proses egter baie stadig plaas.²¹

Subletale konsentrasies van heksavalente chroom het dus geen nadelige effek tydens korttermynblootstellings op die koolhidraatmetabolisme van die eksperimentele vleikurpers gehad nie. 'n Toename in sowel glikolitiese as sitroensuursiklusaktiwiteit het tydens blootstellings by 'n suurmedium voorgekom, wat daarop dui dat addisionele energie verskaf is om osmoregulatoriese wanbalanse wat deur Cr(VI) veroorsaak is, op te hef. Daar is verder gevind dat langtermynblootstelling aan subletale konsentrasies van Cr(VI) tot uitputting van die koolhidraatreserwes en gevolglik die dood van die toetsorganismes kan lei.

LITERATUURVERWYSINGS

1. Larsson, A., Haux, C. & Sjöbeck, M.J. (1985). Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 9, 250 – 281.
2. Giesy, J.P., Versteeg, D.J. & Graney, R.L. (1988). A review of selected clinical indicators of stress-induced changes in aquatic organisms. In *Toxic Contaminants and Ecosystem Health: A Great Lakes Focus*, Evans, M.S. ed. (John Wiley & Sons, New York).
3. Larsson, A., Lehtinen, K.J.H. & Haux, C. (1980). Biochemical and hematological effects of titanium dioxide industrial effluent on fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25, 427 – 435.
4. Goss, G.G. & Wood, C.M. (1989). The effects of acid and aluminium exposure on circulating plasma cortisol levels and other blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.*, 32, 63 – 76.
5. Wepener, V., Van Vuren, J.H.J. & Du Preez, H.H. (1991). The effects of hexavalent chromium at different pH values on the haematology of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C(2), 375 – 381.
6. Guttman, I. & Bernt, E. (1974). Pyruvate kinase assay in serum and erythrocytes. In *Methods of Enzymatic Analysis Vol. II*, Bergmeyer, H.U.

- ed. (Academic Press Inc., New York).
7. Bernt, E. & Bergmeyer, H.U. (1974). Isocitrate dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. ed. (Academic Press Inc., New York).
 8. Zar, R.H. (1984). *Biostatistical Analysis* (Prentice-Hall, New York).
 9. Wedemeyer, G. (1972). Some physiological consequences of handling stress in coho salmon (*Onchorynchus kisutch*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*), *J. Fish. Res. Board Can.*, 29, 1780 – 1783.
 10. Donaldson, E.M. (1981). The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In *Stress in Fish*, Pickering, A.D. ed. (Academic Press, London).
 11. Swallow, A.C. & Flemming, G. (1970). The effect of oxaloacetate, ACTH and cortisol on the glycogen levels of *Tilapia mossambica*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 36, 93 – 97.
 12. Ghosh, T.K. & Chatterjee, S.K. (1985). The effect of chromium on tissue energy reserve in a freshwater fish, *Environ. Ecol.*, 3, 178 – 179.
 13. Heath, A.G. (1987). *Water Pollution and Fish Physiology* (C.R.C. Press, Inc., Boca Raton).
 14. Friedel, R., Diederichs, F. & Lindena, J. (1979). Release and extra-cellular turnover of cellular enzymes. In *Advances in Clinical Enzymology*, Schmidt, E., Schmidt, F.W., Trautschold, I. & Friedel, R. eds. (S. Krager, Basel).
 15. Gerlach, U. (1978). Enzymaktivitäten im serum bei krankheiten der leber und gallenwege. In *Praktische Enzymologie*, Schmidt, ed. (Huber, Bern).
 16. Knox, D., Walton, M.J. & Conwey, C.B. (1980). Distribution of enzymes of glycolysis and glyconeogenesis in fish tissues, *Mar. Biol.*, 56, 7 – 10.
 17. Nath, K. & Kumar, N. (1987). Toxic impact of hexavalent chromium on the blood pyruvate of *Colisa fasciatus*, *Acta Hydrochim. hydrobiol.*, 5, 531 – 534.
 18. Singh, N.N. & Srivastava, A.K. (1982). Effect of formothion on carbohydrate metabolism in Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*, *Environ. Res.*, 28, 335 – 339.
 19. Bhaskar, M. & Govindappa, S. (1985). Tissue compensatory metabolic profiles in *Tilapia mossambica* (Peters) on acclimation to sublethal acidic and alkaline media. Gill and glycogen metabolism, *Arch. int. Physiol. Biochim.*, 93, 59 – 63.
 20. Buhler, D.R., Stokes, R.M. & Caldwell, R.S. (1977). Tissue accumulation and enzymatic effects of hexavalent chromium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *J. Fish. Res. Board Can.*, 34, 9 – 18.
 21. Feldman, F.J. (1968). State of chromium in biological materials, *Fed. Proc.*, 27, 482.