

## 蛋白水解肽-Fe<sup>2+</sup> 配合物对克氏原螯虾体内 Cd<sup>2+</sup> 的脱除效果

史周荣<sup>1</sup>, 张 宾<sup>1\*</sup>, 杨会成<sup>2</sup>, 孙继鹏<sup>3</sup>, 邓尚贵<sup>1</sup>

(1. 浙江海洋学院浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江省海洋开发研究院, 浙江 舟山 316021;

3. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 为探讨克氏原螯虾体内重金属 Cd<sup>2+</sup> 残留的脱除方法, 采用基础饲料中添加制备的蛋白水解肽-Fe<sup>2+</sup> 配合物 (TPH-Fe<sup>2+</sup>) 进行饲喂, 检测螯虾不同组织器官中 Cd<sup>2+</sup> 含量变化情况。结果显示, 染毒后螯虾不同器官中 Cd<sup>2+</sup> 富集量依次为内脏团 > 肠 > 鳃 > 腹部肌肉 > 螯足肌肉, 且在 0~12 d 自然净化过程中, 无显著性下降趋势。添加 400、800 和 1 200 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup> 饲喂螯虾, 内脏团、鳃、肠及腹部肌肉中 Cd<sup>2+</sup> 含量均有不同程度下降; 饲喂 12 d 后, 螯虾不同器官中 Cd<sup>2+</sup> 脱除率为肠 > 内脏团 > 鳃 > 腹部肌肉, 脱除率分别为 40.60%、36.13%、33.36% 和 10.15%; TPH-Fe<sup>2+</sup> 对螯虾螯足肌肉中 Cd<sup>2+</sup> 含量无显著性影响。研究表明, 蛋白水解肽-Fe<sup>2+</sup> 配合物能有效脱除螯虾体内 Cd<sup>2+</sup> 残留, 可作为一种螯虾养殖饲料添加剂在基础饲料中加以应用。

**关键词:** 克氏原螯虾; 水解肽; Fe<sup>2+</sup>; 配合物; 镉; 脱除

**中图分类号:** TS 254.1

**文献标志码:** A

工业“三废”的排放、城市生活垃圾产量的增长和含重金属的农药、化肥的不合理使用, 使得大量金属元素特别是人体非必需的重金属通过各种途径进入地表。2010年,《第一次全国污染源普查公报》报道, 随污水排放的重金属总量已达 900 t<sup>[1]</sup>。镉 (Cd<sup>2+</sup>) 作为环境中常见的金属污染物, 是已知生物体内最易积累的毒物之一, 已被美国毒理管理委员会列为第 6 位危及人体健康的有毒物质。Cd<sup>2+</sup> 在体内形成 Cd<sup>2+</sup>-硫蛋白, 进而通过血液到达全身, 并选择性地蓄积于肾、肝等组织中, 从而影响正常酶系统功能, 引发机体急性或慢性中毒。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 是目前全世界养殖范围最广的淡水螯虾种类, 在我国长江中下游地区均有养殖。近年来, 由于国内外需求量的不断上升, 致使其养殖总量逐年增大。螯虾对环境适应能力很强, 对养殖水质要求也不高, 尤其对外界重金属离子 (如 Cd<sup>2+</sup>) 富集

能力也比一般水生动物强。2010年, 南京暴发的“龙虾门事件”使人们对螯虾的食用安全性心存疑虑, 并引发人们对螯虾重金属富集及代谢排放研究的关注<sup>[2-3]</sup>。本研究以 Cd<sup>2+</sup> 作为代表性有害重金属, 以养殖克氏原螯虾为研究对象, 重点探讨制备的水解肽-Fe<sup>2+</sup> 配合物对螯虾内脏团、鳃、腹部肌肉、螯足肌肉及肠中 Cd<sup>2+</sup> 残留的脱除作用, 为开发对甲壳类动物具有重金属脱除作用的饲料添加剂提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

**实验材料** 克氏原螯虾, 平均体长 (7.3 ± 0.3) cm, 平均体质量 (15.5 ± 0.6) g。首先, 将螯虾于玻璃水族箱 [规格 100 cm × 50 cm × 50 cm, 15 尾/箱, 水深控制在 (5.0 ± 0.2) cm, 箱底内间隔设置瓦片和树枝为遮蔽物] 内驯养 2 周后, 挑选健康活泼、体色正常、螯足完整的实验个体, 进行

收稿日期: 2015-01-19 修回日期: 2015-03-31

资助项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (31201452); 国际科技合作项目 (2015DFA30980); 浙江省自然科学基金 (LY15C200017); 舟山市科技计划 (2013C41015)

通信作者: 张 宾, E-mail: zhangbin\_ouc@163.com

后期  $\text{Cd}^{2+}$  染毒及脱除实验。带鱼 (*Trichiurus lepturus*) 加工副产物(具体含鱼头、内脏、鱼骨及碎肉等)购于浙江兴业集团有限公司。染毒试剂为  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (AR), 购于天津市凯信化学工业有限公司。

**实验仪器** U-2800 紫外分光光度计, 日本 Hitachi 公司; MDF-U53V 超低温冰箱, 日本 SANYO 公司; SHAB 恒温水浴振荡器, 常州国华有限公司; 实验室纳滤膜分离设备, 上海朗极膜分离设备工程有限公司; CF16RX 冷冻离心机, 日本日立公司; FreeZone 4.5 真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; ED36 电热消解仪, 美国 Labtech 公司; AA-7000 原子吸收光谱仪, 日本岛津公司。

## 1.2 实验分组及处理

**水解肽- $\text{Fe}^{2+}$  配合物 ( $\text{TPH-Fe}^{2+}$ ) 制备** 采用张宾等<sup>[4]</sup>、王晓玲等<sup>[5]</sup>报道的方法, 稍加改进。带鱼加工副产物约 20 g, 置于 200 mL 去离子水中, 调节混合体系 pH 值为  $6.5 \pm 0.1$ ,  $40^\circ\text{C}$  保温 10 min; 以 20 000 U/g 比例加入木瓜蛋白酶,  $45^\circ\text{C}$  水浴、搅拌酶解 8 h; 每隔 2 h 调节体系 pH 值为  $6.5 \pm 0.1$ ; 酶解结束后,  $85^\circ\text{C}$  水浴 10 min, 钝化木瓜蛋白酶; 快速冷却至  $4^\circ\text{C}$ ,  $5\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 20 min, 获得中间清液为蛋白水解肽。将水解肽溶液以 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0, 按体积的 2.0% 加入 1 mol/L  $\text{FeCl}_2$  溶液(同时加入少量 Vc),  $30^\circ\text{C}$  水浴振荡 30 min,  $10\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 20 min, 获得上清液。采用实验室纳滤膜分离设备, 截留获得分子量  $< 1\ 500\ \text{u}$  水解肽- $\text{Fe}^{2+}$  配合物, 经冷冻干燥后, 即为蛋白水解肽- $\text{Fe}^{2+}$  配合物(记为  $\text{TPH-Fe}^{2+}$ )。

**克氏原螯虾饲料的制备 制备及组成**<sup>[5]</sup> 具体为鱼粉 37.0%、豆粕 28.0%、大豆油 2.5%、鱼油 2.5%、玉米粉 10.0%、小麦粉 15.0%、复合维生素及各种矿质元素 3.0% (每 kg 预混料中, 含维生素 A 40 000 IU、维生素 D 2 050 IU、维生素 E 140 mg、维生素  $\text{B}_1$  100 mg、维生素  $\text{B}_2$  350 mg、维生素  $\text{B}_6$  40 mg、维生素  $\text{B}_{12}$  100 mg、维生素 K 60 mg、烟酸 120 mg、泛酸 150 mg、叶酸 85 mg、硫酸铜 2.6 g、硫酸铁 28.5 g、硫酸锌 24.5 g、硫酸锰 8.0 g、亚硒酸钠 0.04 g、碘化钾 0.3 g、氯化钴 0.1 g)、羧甲基纤维素钠 2.0%。经测定, 基础饲料营养水平为粗蛋白 28.5%、粗脂肪 6.2%、碳水化合物 41.9%、粗灰分 8.1%。制备方法: 将以上

各组分粉碎至 60 目, 混合均匀, 分别添加 0、400、800 和 1 200 mg/kg  $\text{TPH-Fe}^{2+}$ , 加少量水搅拌。采用双螺杆压条机制成直径 1~2 mm 颗粒饲料, 经  $55^\circ\text{C}$  熟化烘干 2 h, 室温晾干后于  $4^\circ\text{C}$  保存、备用。

**实验分组及管理 养殖条件:** 采用 3%~4% NaCl 溶液对驯养螯虾浴洗 10 min, 进行虾体消毒(采用相同溶液对养殖箱进行消毒)。实验期间, 养殖水体 pH 7.8~8.0、温度 ( $25 \pm 0.2$ )  $^\circ\text{C}$  (水中  $\text{Cd}^{2+}$  含量  $< 0.5\ \mu\text{g}/\text{L}$ ); 静水连续充氧, 水深 ( $5.0 \pm 0.2$ ) cm, 每日定时更换 3/4 体积水, 并清洁吸污。每天投喂螯虾体质量 2.0%~2.2% 饲料, 以维持其生长所需; 每天定时 (06:30、12:30 和 18:30)、定点(分布均匀, 避免争食)投喂 3 次, 同时观察螯虾进食、活动状况。

**暴露染毒** 采用含  $\text{CdCl}_2$  静水交换法。将驯养螯虾置于含 0.30 mg/L  $\text{CdCl}_2$  水体中, 进行为期 10 d 的  $\text{Cd}^{2+}$  暴露实验(饲喂及养殖条件同上)。每天定时更换含相同浓度的  $\text{CdCl}_2$  水体, 暴露第 10 天随机取样进行解剖, 分离获得螯虾内脏团、鳃、腹部肌肉、螯足肌肉、肠 5 部分, 分别进行电热消化, 原子吸收光谱法测定  $\text{Cd}^{2+}$  含量。

**$\text{Cd}^{2+}$  脱除及分组**  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  添加浓度, 参考课题组前期文献<sup>[5]</sup>。①空白组 1: 不含  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  的基础饲料饲喂未染毒螯虾; ②空白组 2: 不含  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  的基础饲料饲喂染毒螯虾; ③  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  饲喂组 1: 添加 400 mg/kg  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  的基础饲料饲喂染毒螯虾; ④  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  饲喂组 2: 添加 800 mg/kg  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  的基础饲料饲喂染毒螯虾; ⑤  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  饲喂组 3: 添加 1 200 mg/kg  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  的基础饲料饲喂染毒螯虾。以上各组均包含 6 个平行饲养箱, 15 尾螯虾/箱。  $\text{Cd}^{2+}$  脱除实验为期 12 d, 每天投喂螯虾体质量 2.0%~2.2% 的饲料(含不同浓度  $\text{TPH-Fe}^{2+}$ ), 第 2、4、6、8、10、12 天随机取样进行解剖, 分离获得螯虾内脏团、鳃、腹部肌肉、螯足肌肉、肠 5 部分, 分别进行电热消化, 原子吸收光谱法测定  $\text{Cd}^{2+}$  含量。

## 1.3 实验测定与分析

**$\text{Cd}^{2+}$  含量测定** 将样品匀浆后称取 0.800~1.200 g, 加入  $\text{HNO}_3$  12.0 mL、 $\text{HClO}_4$  3.0 mL, 混匀后消解。消解程序: 升温至  $100^\circ\text{C}$ , 保持 30 min; 至  $130^\circ\text{C}$ , 保持 60 min; 再升温至  $150^\circ\text{C}$ , 至消解完成; 最后升温至  $180^\circ\text{C}$ , 赶酸至样品容量约

2 mL。冷却至室温,超纯水定容至 50 mL,原子吸收分光光度法测定 Cd<sup>2+</sup>含量(mg/kg,湿重)。

**数据分析与统计** 以上实验及测定至少包含 3 个平行样品。数据分析与统计采用 SPSS 13.0 分析软件,结果为平均值 ± 标准差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 TPH-Fe<sup>2+</sup>对螯虾内脏团中 Cd<sup>2+</sup>含量的影响

未经 Cd<sup>2+</sup>染毒(空白组 1)、经 Cd<sup>2+</sup>染毒螯虾(空白组 2)内脏团中 Cd<sup>2+</sup>含量依次为 0.14 ~ 0.19 和 20.99 ~ 23.06 μg/g,在 0 ~ 12 d 净化脱除(基础饲料饲喂)过程中,均未出现显著性下降趋势,表明仅通过暂养或常规饲料饲喂螯虾,其内脏团中富集的 Cd<sup>2+</sup>无法通过自然代谢而有效脱出(表 1)。该结果与张振燕等<sup>[2]</sup>研究报道相一致,即 Cd<sup>2+</sup>在螯虾内脏团中具有强烈生物富集效应,且其生物代谢半衰期较长。400 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup>饲喂螯虾 12 d,其内脏团中 Cd<sup>2+</sup>含量由 21.78 μg/g 下降至 17.38 μg/g, Cd<sup>2+</sup>脱除率为 20.20%;800 和 1 200 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup>饲喂螯虾,内脏团中 Cd<sup>2+</sup>含量分别降低至 15.39 和

14.25 μg/g,脱除率分别为 31.48% 和 36.13%,脱除效果显著( $P < 0.05$ )。此外,在 TPH-Fe<sup>2+</sup>饲喂螯虾 6 ~ 12 d 期间,800 和 1 200 mg/kg 饲喂组内脏团中 Cd<sup>2+</sup>含量显著低于 400 mg/kg 饲喂组( $P < 0.05$ )。

研究表明,Cd<sup>2+</sup>在甲壳类动物不同组织中富集程度不同,一般在内脏团中富集程度最高,如螯虾内脏团中 Cd<sup>2+</sup>富集量可高出肌肉 10 倍以上<sup>[6]</sup>。Cd<sup>2+</sup>在内脏团中表现出如此高蓄积量,是由于 Cd<sup>2+</sup>主要与内脏团中金属硫蛋白(metallothioneins,MTs)、类金属硫蛋白、含氮杂环水分子化合物、离子或低分子络合离子等物质结合<sup>[7]</sup>,形成 Cd<sup>2+</sup>-MTs 配合物而起到 Cd<sup>2+</sup>解毒作用。因此,Cd<sup>2+</sup>在甲壳动物体内的代谢排出速率,与解毒蛋白(MTs)诱导生成量及活性恢复速率、动物体内是否有与 MTs 具有更强结合能力的配体(如金属离子)存在及数量等因素有关<sup>[8]</sup>。本实验中,采用低分子量水解肽(载体)与 Fe<sup>2+</sup>形成的配合物饲喂螯虾,起到脱除内脏团中 Cd<sup>2+</sup>的作用:小分子水解肽可被螯虾直接吸收进入体内循环,进而可争夺内脏团 Cd<sup>2+</sup>-MTs 配合物中的 Cd<sup>2+</sup>,起到恢复 MTs 活性、加速解毒的作用。

表 1 饲喂 TPH-Fe<sup>2+</sup>对克氏原螯虾内脏团中 Cd<sup>2+</sup>含量的影响  
Tab.1 Effect of TPH-Fe<sup>2+</sup> feeding on Cd<sup>2+</sup> concentrations in visceral mass of *P. clarkii*

实验处理组 treatment	添加浓度/ (mg/kg) concentration	脱除实验期间螯虾内脏团中 Cd <sup>2+</sup> 含量/(μg/g) concentration of Cd <sup>2+</sup> in visceral mass during the depuration period						
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
空白组 1 control 1	-	0.15 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.14 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.16 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.14 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>A</sup>
空白组 2 control 2	-	22.35 ± 2.42 <sup>Aa</sup>	23.06 ± 3.03 <sup>Aa</sup>	21.44 ± 2.19 <sup>Ab</sup>	22.78 ± 1.65 <sup>Ac</sup>	23.07 ± 2.84 <sup>Ac</sup>	20.99 ± 3.75 <sup>Ad</sup>	21.50 ± 2.29 <sup>Ad</sup>
	400	21.78 ± 3.30 <sup>Da</sup>	22.06 ± 2.61 <sup>Da</sup>	21.15 ± 3.06 <sup>Db</sup>	20.11 ± 1.89 <sup>Cb</sup>	20.25 ± 2.03 <sup>Cb</sup>	18.35 ± 3.12 <sup>Bc</sup>	17.38 ± 1.89 <sup>Ac</sup>
TPH-Fe <sup>2+</sup>	800	22.46 ± 2.49 <sup>Ea</sup>	21.56 ± 2.05 <sup>Da</sup>	20.89 ± 2.34 <sup>Db</sup>	18.28 ± 3.76 <sup>Ca</sup>	18.88 ± 3.02 <sup>Ca</sup>	16.79 ± 2.18 <sup>Bb</sup>	15.39 ± 2.31 <sup>Ab</sup>
	1 200	22.31 ± 3.08 <sup>Ea</sup>	22.44 ± 2.85 <sup>Ea</sup>	20.12 ± 1.99 <sup>Da</sup>	18.75 ± 2.56 <sup>Ca</sup>	18.32 ± 3.12 <sup>Ca</sup>	15.58 ± 1.87 <sup>Ba</sup>	14.25 ± 2.40 <sup>Aa</sup>

注:表格中同行肩标不同大写字母表示显著性差异( $P < 0.05$ ),同列肩标不同小写字母表示显著性差异( $P < 0.05$ )。空白组 1:未经 Cd<sup>2+</sup>染毒螯虾;空白组 2:经 Cd<sup>2+</sup>染毒螯虾。下表同

Notes:in the same row, values with different capital letter superscripts mean significant differences( $P < 0.05$ ),in the same column, values with different lowercase letter superscripts mean significant differences( $P < 0.05$ ),control 1:crayfish are not exposed to Cd<sup>2+</sup>;control 2:crayfish are exposed to Cd<sup>2+</sup>. The same with the following

### 2.2 TPH-Fe<sup>2+</sup>对螯虾鳃中 Cd<sup>2+</sup>含量的影响

在 0 ~ 12 d 净化脱除过程中,染毒螯虾(空白组 2)鳃中 Cd<sup>2+</sup>含量范围为 10.52 ~ 12.60 μg/g,且未出现显著性下降趋势( $P > 0.05$ );经过 12 d 饲喂后,400、800 和 1 200 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup>将螯虾鳃中 Cd<sup>2+</sup>含量分别降低至 9.29、9.01 和 7.35 μg/g,脱除率依次为 17.93%、25.90% 和 33.36%

(表 2)。同时,高剂量(1 200 mg/kg)TPH-Fe<sup>2+</sup>饲喂对螯虾鳃中 Cd<sup>2+</sup>脱除效率显著优于低剂量(400 和 800 mg/kg)饲喂组( $P < 0.05$ ),该结果与螯虾内脏团中 Cd<sup>2+</sup>脱除结果相似。此外,本实验中染毒螯虾鳃中 Cd<sup>2+</sup>含量(10.52 ~ 11.12 μg/g)显著低于内脏团中(20.99 ~ 23.06 μg/g)( $P < 0.05$ )。

鳃作为外界金属离子进入甲壳类动物体内的主要通道之一,也是金属离子(如  $\text{Cd}^{2+}$ ) 在生物体内暂存的富集器官,即富集在鳃组织中较高浓度的  $\text{Cd}^{2+}$ ,可通过代谢作用转移到机体的消化腺、肝脏、脾脏及其他器官<sup>[9]</sup>。此外,甲壳类动物鳃组织中的  $\text{Cd}^{2+}$  含量往往随着养殖季节、水体环境及温度等的不同而产生较大的波动,这也可能是本实验螯虾鳃组织中  $\text{Cd}^{2+}$  含量显著低于内脏团中的原因之一,该结果与 Chandurvelan 等<sup>[10]</sup> 报道结果相一致。研究表明,甲壳类动物在  $\text{Cd}^{2+}$  暴露下,可激发机体内如鳃中多种免疫性酶如 CAT、

GSH-Px 和 SOD 等的大量表达,以减弱  $\text{Cd}^{2+}$  的毒性作用;同时,生物体内保护性免疫酶活性也可被过量的  $\text{Cd}^{2+}$  所抑制或钝化。本实验制备的 TPH- $\text{Fe}^{2+}$  经体外检测发现,具有较强清除自由基能力,即具有较强的体外抗氧化活性<sup>[11]</sup>。在螯虾体内实验中,TPH- $\text{Fe}^{2+}$  可能是借助 TPH 的转运吸收机制,携带  $\text{Fe}^{2+}$  到达螯虾鳃及其他组织中,通过寡肽提高机体营养物质利用的同时,再结合  $\text{Fe}^{2+}$  作用,增强了机体保护性酶如 Fe-SOD 活力等<sup>[5]</sup>,起到协同提高  $\text{Cd}^{2+}$  脱除效果的作用。

表 2 饲喂 TPH- $\text{Fe}^{2+}$  对克氏原螯虾鳃中  $\text{Cd}^{2+}$  含量的影响  
Tab. 2 Effect of TPH- $\text{Fe}^{2+}$  feeding on  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations in gill of *P. clarkii*

实验处理组 treatment	添加浓度/ (mg/kg) concentration	脱除实验期间螯虾鳃中 $\text{Cd}^{2+}$ 含量/( $\mu\text{g/g}$ ) concentration of $\text{Cd}^{2+}$ in gill during the depuration period						
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
空白组 1 control 1	-	0.09 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.08 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>A</sup>
空白组 2 control 2	-	10.52 ± 1.11 <sup>Aa</sup>	11.44 ± 1.81 <sup>Aa</sup>	12.60 ± 1.04 <sup>Ac</sup>	10.78 ± 1.70 <sup>Ad</sup>	10.65 ± 3.44 <sup>Ac</sup>	11.16 ± 1.55 <sup>Ad</sup>	12.12 ± 1.37 <sup>Ad</sup>
	400	11.12 ± 2.13 <sup>Ca</sup>	10.79 ± 2.05 <sup>Ca</sup>	10.95 ± 2.16 <sup>Cb</sup>	10.08 ± 2.12 <sup>Bc</sup>	9.77 ± 2.08 <sup>ABb</sup>	9.34 ± 1.99 <sup>Ac</sup>	9.29 ± 1.77 <sup>Ac</sup>
TPH- $\text{Fe}^{2+}$	800	10.81 ± 1.34 <sup>Da</sup>	11.09 ± 1.32 <sup>Da</sup>	9.53 ± 2.04 <sup>Ca</sup>	9.46 ± 1.25 <sup>Cb</sup>	8.35 ± 1.45 <sup>Ba</sup>	8.06 ± 1.89 <sup>ABb</sup>	8.01 ± 2.23 <sup>Ab</sup>
	1 200	11.03 ± 1.98 <sup>Da</sup>	10.82 ± 2.06 <sup>Da</sup>	9.89 ± 1.59 <sup>Ca</sup>	8.59 ± 1.29 <sup>Ba</sup>	8.49 ± 1.99 <sup>Ba</sup>	7.18 ± 1.05 <sup>Aa</sup>	7.35 ± 2.12 <sup>Aa</sup>

### 2.3 TPH- $\text{Fe}^{2+}$ 对螯虾腹部肌肉和螯足肌肉中 $\text{Cd}^{2+}$ 含量的影响

染毒螯虾腹部肌肉、螯足肌肉中  $\text{Cd}^{2+}$  含量依次为 1.25 ~ 1.39 和 0.78 ~ 0.85  $\mu\text{g/g}$ ,显著低于内脏团和鳃( $P < 0.05$ );在整个净化脱除过程中,未出现显著性下降趋势(表 3,4),与文献报道结果一致<sup>[12]</sup>。400 ~ 1 200 mg/kg TPH- $\text{Fe}^{2+}$  饲喂螯虾,在整个实验期内,螯足肌肉中  $\text{Cd}^{2+}$  含量未出现显著性下降趋势(表 4)( $P > 0.05$ ),可见螯虾螯足肌肉中结合的  $\text{Cd}^{2+}$  十分稳定、较难脱除。1 200 mg/kg TPH- $\text{Fe}^{2+}$  饲喂螯虾 12 d,腹部肌肉中  $\text{Cd}^{2+}$  含量降低至 1.15  $\mu\text{g/g}$ , $\text{Cd}^{2+}$  脱除率为 10.15%,显著低于空白组 2,以及 400 和 800 mg/kg TPH- $\text{Fe}^{2+}$  饲喂组( $P < 0.05$ )。

重金属  $\text{Cd}^{2+}$  对甲壳类动物各组织器官毒性较强,可引发机体肌肉中活性氧自由基的大量积聚(氧化损伤)以及破坏体内必需金属离子(如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ )平衡等<sup>[13-14]</sup>。生物体所必需的金属离子(如  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  及  $\text{Mn}^{2+}$  等),可在寡肽或氨基酸配位体的保护下,降低与体内其他物质生成难溶无机盐数量,从而可减少金属离子的营

养物质损失,并增强其吸收利用效率<sup>[15]</sup>。此外,小分子水解肽与金属元素形成的配合物,还具有抗菌、激素、酶的抑制、免疫、生理调节等功能<sup>[16]</sup>。De 等<sup>[17]</sup> 研究证实, $\text{Fe}^{2+}$  螯合肽可有效增强  $\text{Fe}^{2+}$  在生物体内的吸收及生物利用效率。本实验中应用的水解肽分子量较小( $< 1\ 500\ \text{u}$ ),其与  $\text{Fe}^{2+}$  结合形成配合物后,通过水解肽在生物体内的转运、吸收通道,被螯虾所吸收并达到相关靶向部位。在达到靶向部位后,经机体的代谢利用释放所携带的  $\text{Fe}^{2+}$ ,从而可有效提高  $\text{Fe}^{2+}$  在螯虾体内的生物利用效率<sup>[15]</sup>。

### 2.4 TPH- $\text{Fe}^{2+}$ 对螯虾肠中 $\text{Cd}^{2+}$ 含量的影响

染毒螯虾肠内  $\text{Cd}^{2+}$  含量较高,达到 14.72 ~ 16.44  $\mu\text{g/g}$ (表 5)。采用 400、800 和 1 200 mg/kg TPH- $\text{Fe}^{2+}$  饲喂 12 d,肠中  $\text{Cd}^{2+}$  含量分别降低至 10.58、9.18 和 9.26  $\mu\text{g/g}$ , $\text{Cd}^{2+}$  脱除率分别为 32.95%、38.92% 和 40.60%。综上可知,TPH- $\text{Fe}^{2+}$  对螯虾不同器官中  $\text{Cd}^{2+}$  的脱除作用,由强到弱依次为肠 > 内脏团 > 鳃 > 腹部肌肉 > 螯足肌肉。

表 3 饲喂 TPH-Fe<sup>2+</sup> 对克氏原螯虾腹部肌肉中 Cd<sup>2+</sup> 含量的影响  
 Tab.3 Effect of TPH-Fe<sup>2+</sup> feeding on Cd<sup>2+</sup> concentrations in abdomen muscle of *P. clarkii*

实验处理组 treatment	添加浓度/ (mg/kg) concentration	脱除实验期间螯虾腹部肌肉中 Cd <sup>2+</sup> 含量/(μg/g) concentration of Cd <sup>2+</sup> in abdomen muscle during the depuration period						
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
空白组 1 control 1	-	0.03 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>A</sup>
空白组 2 control 2	-	1.29 ± 0.07 <sup>Aa</sup>	1.35 ± 0.10 <sup>Aa</sup>	1.36 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.39 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	1.30 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.25 ± 0.08 <sup>Ab</sup>	1.34 ± 0.02 <sup>Ab</sup>
	400	1.31 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	1.33 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	1.29 ± 0.07 <sup>Aa</sup>	1.34 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	1.29 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	1.30 ± 0.02 <sup>Ab</sup>	1.29 ± 0.04 <sup>Ab</sup>
TPH-Fe <sup>2+</sup>	800	1.35 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	1.38 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	1.32 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	1.30 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	1.36 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	1.28 ± 0.05 <sup>Ab</sup>	1.29 ± 0.03 <sup>Ab</sup>
	1 200	1.28 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	1.30 ± 0.05 <sup>Ba</sup>	1.34 ± 0.04 <sup>Ba</sup>	1.37 ± 0.03 <sup>Ba</sup>	1.39 ± 0.05 <sup>Ba</sup>	1.14 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	1.15 ± 0.02 <sup>Aa</sup>

表 4 饲喂 TPH-Fe<sup>2+</sup> 对克氏原螯虾螯足肌肉中 Cd<sup>2+</sup> 含量的影响  
 Tab.4 Effect of TPH-Fe<sup>2+</sup> feeding on Cd<sup>2+</sup> concentrations in cheliped muscle of *P. clarkii*

实验处理组 treatment	添加浓度/ (mg/kg) concentration	脱除实验期间螯虾螯足肌肉中 Cd <sup>2+</sup> 含量/(μg/g) concentration of Cd <sup>2+</sup> in cheliped muscle during the depuration period						
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
空白组 1 control 1	-	0.01 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>A</sup>
空白组 2 control 2	-	0.81 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>Aa</sup>	0.79 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	0.78 ± 0.09 <sup>Aa</sup>	0.85 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	0.85 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.79 ± 0.06 <sup>Aa</sup>
	400	0.85 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	0.80 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	0.79 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	0.81 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.80 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	0.83 ± 0.07 <sup>Aa</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>Aa</sup>
TPH-Fe <sup>2+</sup>	800	0.79 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	0.78 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.81 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	0.83 ± 0.07 <sup>Aa</sup>	0.79 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.81 ± 0.05 <sup>Aa</sup>
	1 200	0.83 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	0.80 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>Aa</sup>	0.80 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	0.83 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	0.81 ± 0.01 <sup>Aa</sup>

表 5 饲喂 TPH-Fe<sup>2+</sup> 对克氏原螯虾肠中 Cd<sup>2+</sup> 含量的影响  
 Tab.5 Effect of TPH-Fe<sup>2+</sup> feeding on Cd concentrations in intestine of *P. clarkii*

实验处理组 treatment	添加浓度/(mg/kg) concentration	脱除实验期间螯虾肠中 Cd <sup>2+</sup> 含量/(μg/g) concentration of Cd <sup>2+</sup> in intestine during the depuration period						
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
空白组 1 control 1	-	0.09 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.08 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>A</sup>
空白组 2 control 2	-	15.52 ± 2.72 <sup>Ba</sup>	16.44 ± 1.99 <sup>Bb</sup>	16.10 ± 2.51 <sup>Bc</sup>	15.53 ± 2.52 <sup>Bc</sup>	16.11 ± 2.53 <sup>Bc</sup>	14.72 ± 3.15 <sup>Ac</sup>	14.81 ± 2.23 <sup>Ac</sup>
	400	15.38 ± 2.32 <sup>Da</sup>	15.16 ± 2.45 <sup>Da</sup>	15.42 ± 3.00 <sup>Db</sup>	14.79 ± 1.59 <sup>Db</sup>	12.98 ± 2.11 <sup>Cb</sup>	11.26 ± 1.68 <sup>Bb</sup>	10.58 ± 1.77 <sup>Ab</sup>
TPH-Fe <sup>2+</sup>	800	15.03 ± 3.11 <sup>Da</sup>	15.29 ± 2.14 <sup>Da</sup>	14.17 ± 1.98 <sup>Ca</sup>	14.22 ± 2.12 <sup>Cb</sup>	12.04 ± 1.78 <sup>Ca</sup>	10.85 ± 2.22 <sup>Ba</sup>	9.18 ± 2.02 <sup>Aa</sup>
	1 200	15.59 ± 1.97 <sup>Ea</sup>	15.08 ± 3.22 <sup>Ea</sup>	14.09 ± 2.32 <sup>Da</sup>	13.26 ± 1.59 <sup>Ca</sup>	12.95 ± 2.36 <sup>Cb</sup>	10.77 ± 2.39 <sup>Ba</sup>	9.26 ± 1.25 <sup>Aa</sup>

研究表明,金属离子胁迫可诱导机体 MTs 蛋白的分泌表达,通过组织切片观察发现金属胁迫螯虾肝胰腺出现了大量异常的颗粒物质,且在肠道内也存在与肝胰腺中相似的颗粒物质,从而证实了摄入体内多余的金属离子可通过肠道排出体的可能性<sup>[18]</sup>,王建国等<sup>[19]</sup>研究结果也验证了此观点。此外,也有研究表明,虾体内多种金属离子拮抗作用发生的主要部位为肠道,即部分金属离子竞争性地结合 MTs 形成配合物<sup>[20]</sup>,因此可推测,适当摄入部分有益金属离子时,可拮抗重金属 Cd<sup>2+</sup> 在肠道内与 MTs 的结合,从而降低其吸收效率及对机体的毒性作用。制备的蛋白水解肽,除小肽 N 端氨基、C 端羧基及氨基酸侧链基团可供配位之外,羰基和亚氨基也可参与配位。因此,利用小分子肽较强的配合特性,与肠道内

Cd<sup>2+</sup> 结合形成 TPH-Cd<sup>2+</sup>,从而可将 Cd<sup>2+</sup> 通过肠道排出体外(体外实验发现,制备的 TPH-Cd<sup>2+</sup> 为非水溶性,便于 Cd<sup>2+</sup> 脱除后在水体中沉淀析出)。

### 3 结论

以克氏原螯虾为实验动物,在养殖饲料中添加不同浓度带鱼蛋白水解肽-金属配合物(TPH-Fe<sup>2+</sup>),探讨了 TPH-Fe<sup>2+</sup> 对克氏原螯虾不同组织器官中 Cd<sup>2+</sup> 残留的脱除效果。结果表明,400、800 和 1 200 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup> 饲喂,对螯虾内脏团、鳃、腹部肌肉及肠中 Cd<sup>2+</sup> 具有一定脱除作用,尤其以 1 200 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup> 饲喂组脱除效率最佳。研究中采用的蛋白水解肽,除 N 端氨基、C 端羧基及氨基酸侧链基团可作为结合金属离子的配位之外,羰基和亚氨基也可参与配位。TPH-

$\text{Fe}^{2+}$  对螯虾体内  $\text{Cd}^{2+}$  的脱除作用,可能是利用了小分子水解肽(载体)在螯虾体内特殊的转运、吸收及金属离子配合物机制,将  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  运送至特定靶向器官,通过小分子水解肽螯合  $\text{Cd}^{2+}$ 、金属离子间拮抗作用及增强机体免疫能力(保护性酶活)等方面,加速了  $\text{Cd}^{2+}$  在螯虾不同组织器官中的排出效率。另一方面,进入螯虾机体内的小分子水解肽,有可能参与争夺与 MTs 结合的  $\text{Cd}^{2+}$ ,起到恢复 MTs 活性、加速解毒效率作用。

本研究中, $\text{TPH-Fe}^{2+}$  对螯虾肌肉中  $\text{Cd}^{2+}$  含量未表现出显著脱除作用,其原因可能与  $\text{Cd}^{2+}$  在肌肉中结合方式、结合物质、结合力及  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  在肌肉中转运、吸收机制影响有关。此外,螯虾腹部肌肉和螯足肌肉对外界  $\text{Cd}^{2+}$  的生物富集能力较弱,且富集量往往相对较低(超标现象较少),因此,饲喂  $\text{TPH-Fe}^{2+}$  虽对螯虾肌肉中  $\text{Cd}^{2+}$  脱除能力较弱,但仍具有一定应用前景,尤其可对螯虾免疫增强剂(饲料添加物)开发、双壳贝类体内  $\text{Cd}^{2+}$  脱除技术研究提供参考。蛋白水解肽-金属元素配合物对螯虾等甲壳类动物肌肉组织中重金属元素脱除效果及机制仍需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ministry of Environmental Protection, National Bureau of Statistics, Ministry of Agriculture. The first national census sources of pollution [ R ]. Beijing: Ministry of Environmental Protection, National Bureau of Statistics, Ministry of Agriculture, 2010. [ 环境保护部,国家统计局,农业部. 第一次全国污染源普查公报. 北京:环境保护部,国家统计局,农业部,2010. ]
- [ 2 ] Zhang Z Y, Zhang M Q, Wu Y, *et al*. Biological accumulation and release of Cd and Cu in *Procambarus clarkii* [ J ]. Food Science, 2014, 35 ( 17 ): 250 - 254. [ 张振燕,张美琴,吴瑛,等. 重金属 Cd 与 Cu 在克氏原螯虾体内富集与释放规律. 食品科学,2014,35(17):250-254. ]
- [ 3 ] Wang S L. The effects of  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on the growth and enrichment of red swamp crayfish [ D ]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012. [ 王书莉.  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  浓度对克氏原螯虾生长及其体内富集的影响. 扬州:扬州大学,2012. ]
- [ 4 ] Zhang B, Deng S G, Lin H M. The preparation and application of an agent used for removing of heavy metals in live marine organism: China, 201110197874. 7 [ P ]. 2014 - 03 - 04. [ 张宾,邓尚贵,林慧敏. 一种水产品中重金属脱除剂的制备方法及应用:中国,201110197874. 7. 2014 - 03 - 04. ]
- [ 5 ] Wang X L, Zhang B, Ma L K, *et al*. Effect of protein hydrolysate- $\text{Fe}^{2+}$  complex on the growth performances and non-specific immune parameters of *Procambarus clarkii* [ J ]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30 ( 11 ): 71 - 78. [ 王晓玲,张宾,马路凯,等. 蛋白水解肽- $\text{Fe}^{2+}$  配合物对克氏原螯虾生长及非特异性免疫的影响. 现代食品科技,2014,30(11):71-78. ]
- [ 6 ] Naqvi S M, Howell R D, Sholas M. Cadmium and lead residues in field-collected red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and uptake by alligator weed, *Alternanthera philoxiroides* [ J ]. Journal of Environmental Science and Health Part B. 1993, 28 ( 4 ): 473 - 85.
- [ 7 ] Roméo M, Frasila C, Gnassia-Barelli M, *et al*. Bio-monitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis* [ J ]. Water Research, 2005, 39 ( 4 ): 596 - 604.
- [ 8 ] Zhang B, Shi Z R, Wang X L, *et al*. Depuration of cadmium from blue mussel (*Mytilus edulis*) by hydrolysis peptides and chelating metal elements [ J ]. Food Research International. Doi: 10. 1016/j. foodres. 2014. 12. 043.
- [ 9 ] Perceval O, Couillard Y, Pinel A B, *et al*. Linking changes in subcellular cadmium distribution to growth and mortality rates in transplanted freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) [ J ]. Aquatic Toxicology, 2006, 79 ( 1 ): 87 - 98.
- [ 10 ] Chandurvelan R, Marsden I D, Gaw S, *et al*. Impairment of greenlipped mussel (*Perna canaliculus*) physiology by waterborne cadmium: Relationship to tissue bioaccumulation and effect of exposure duration [ J ]. Aquatic Toxicology, 2012, 124 - 125, 114 - 124.
- [ 11 ] Lim H M, Zhang B, Deng S G, *et al*. Free radical scavenging activities and antibacterial activity of enzymatic hydrolysates protein ferrous chelates peptides from several low value fish of Zhoushan sea area [ J ]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12 ( 1 ): 19 - 24. [ 林慧敏,张宾,邓尚贵,等. 舟山海域 4 种低值鱼酶解蛋白亚铁螯合物自由基清除活性与抑菌活性研究. 中国食品学报,2012,12(1):19-24. ]
- [ 12 ] Geffard A, Amiard J C, Amiard T C. Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated

- estuary [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2002, 131(3), 281 - 293.
- [ 13 ] Biagioli M, Pifferi S, Ragghianti M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis [ J ]. Cell Calcium, 2008, 43 ( 2 ) : 184 - 195.
- [ 14 ] Leung P T Y, Wang Y, Mak S S T, *et al.* Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide [ J ]. Aquatic Toxicology, 2011, 105(1 - 2) : 49 - 61.
- [ 15 ] Apines A M J S, Satoh S, Caipang C M A, *et al.* Amino acid-chelate: A better source of Zn, Mn and Cu for Rainbow trout, *Oncorhynchus Mykiss* [ J ]. Aquaculture, 2004, 240(1 - 4) : 345 - 358.
- [ 16 ] Guo L, Harnedy P A, Li B, *et al.* Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement [ J ]. Trends in Food Science and Technology, 2014, 37 ( 2 ) : 92 - 105.
- [ 17 ] De la Hoz L, Nunes da S V S, Morgano M A, *et al.* Small peptides from enzymatic whey hydrolyzates increase dialyzable iron [ J ]. International Dairy Journal, 2014, 38(2), 145 - 147.
- [ 18 ] Wang Q, Wang J G, Lu H D, *et al.* Chronic toxicity of zinc sulphate in *Procambarus clarkia* [ J ]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19 ( 1 ) : 126 - 137. [ 王权, 王建国, 陆宏达, 等. 硫酸锌慢性毒性胁迫下克氏原螯虾的组织病理. 中国水产科学, 2012, 19(1) : 126 - 137. ]
- [ 19 ] Wang J G, Wang Q, Lu H D, *et al.* Bioaccumulation of Zn by red swamp crayfish *Procambarus clarkii* under the dtress of Zinc dulfate [ J ]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2013, 29 ( 1 ) : 91 - 97. [ 王建国, 王权, 陆宏达, 等. 硫酸锌胁迫下克氏原螯虾对重金属锌的富集. 生态与农村环境学报, 2013, 29(1) : 91 - 97. ]
- [ 20 ] Lu K J, Wu J K, Wang Z H, *et al.* Determination of heavy metals in Antarctic krill (*Euphausia superba*) [ J ]. Science and Technology of Food Industry. 2013, 34(2) : 64 - 67. [ 卢坤俊, 吴继魁, 汪之和, 等. 南极磷虾中重金属含量的测定. 食品工业科技, 2013, 34(2) : 64 - 67. ]

## Removal effect of cadmium from red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) by hydrolysis peptides-Fe<sup>2+</sup> complexes

SHI Zhourong<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>1\*</sup>, YANG Huicheng<sup>2</sup>, SUN Jipeng<sup>3</sup>, DENG Shanggui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316021, China;

3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate the effects of prepared hydrolysis peptides-Fe<sup>2+</sup> complexes (TPH-Fe<sup>2+</sup>) on the depuration of cadmium (Cd<sup>2+</sup>) from red swamp crayfish (*P. clarkii*) tissues. The results indicated that the concentration of Cd<sup>2+</sup> in crayfish tissues from high to low was visceral mass > intestine > gill > abdomen muscle > cheliped muscle respectively, all of which were not significantly decreased during the 12 days of depuration. However, significant differences were observed in groups feeding by 400, 800, and 1 200 mg/kg TPH-Fe<sup>2+</sup> added into basal feed after 12 day's feeding. The Cd<sup>2+</sup> concentrations in intestine, visceral mass, gill, and abdomen muscle were significantly decreased by 40.60%, 36.13%, 33.36%, and 10.15%, respectively. Nevertheless, the variables of Cd<sup>2+</sup> concentrations in heliped muscle treated with 400 – 1 200 mg/L TPH-Fe<sup>2+</sup> showed no significant differences from controls at any point during the experimental period. For these reasons, TPH-Fe<sup>2+</sup> can be recommended as depuration agent in crayfish feed to decrease the Cd<sup>2+</sup> concentrations in tissues.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; hydrolysis peptide; Fe<sup>2+</sup>; complex; cadmium; removal

**Corresponding author:** ZHANG Bin. E-mail: zhangbin\_ouc@163.com