

红裸须摇蚊幼虫生物标志物系统对苯酚的响应*

葛士林¹ 曹传旺^{1**} 方国飞² 王志英¹⁽¹⁾ 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; ⁽²⁾ 国家林业局森林病虫害防治总站, 沈阳 110034)

摘要 以红裸须摇蚊4龄幼虫为对象,测定了苯酚对摇蚊幼虫急性毒性、体质量、化蛹率及体内保护酶和解毒酶活性的影响.结果表明:苯酚对摇蚊4龄幼虫6、24、48、72和96h半致死浓度 LC_{50} 分别为222.52、134.86、67.74、47.39和35.76 $mg \cdot L^{-1}$;亚致死剂量苯酚(0.4、4和40 $mg \cdot L^{-1}$)处理降低摇蚊4龄幼虫干湿质量和化蛹率;摇蚊4龄幼虫暴露于苯酚液72h,过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)和羧酸酯酶(CarE)均对苯酚暴露做出响应,且随着浓度增加和暴露时间的延长呈现一定的剂量-时间效应,而摇蚊体内酸性磷酸酯酶(ACP)和碱性磷酸酯酶(ALP)对苯酚暴露响应较迟钝,仅高浓度(40 $mg \cdot L^{-1}$)长时间(48h和72h)的胁迫才会产生显著抑制作用.表明摇蚊体质量、化蛹率和CAT、SOD、GST、CarE可作为监测苯酚水体污染的生物标志物.

关键词 红裸须摇蚊 苯酚 急性毒性 生长发育 酶活性 生物标志物

文章编号 1001-9332(2011)07-1900-07 **中图分类号** X835 **文献标识码** A

Responses of biological markers of larval *Prosilocerus akamusi* to phenol. GE Shi-lin¹, CAO Chuan-wang¹, FANG Guo-fei², WANG Zhi-ying¹ (¹*School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China*; ²*General Station of Forest Pest Control, State Administration of Forestry, Shenyang 110034, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(7): 1900-1906.

Abstract: Taking the 4th-instar larval *Prosilocerus akamusi* as test object, this paper studied the acute toxicity of phenol, and the body mass, pupation rate, protective enzyme activities, and detoxifying enzyme activities of the larvae under exposure to phenol. The LC_{50} value of phenol to the larvae after exposure for 6, 24, 48, 72, and 96 h was 222.52, 134.86, 67.74, 47.39, and 35.76 $mg \cdot L^{-1}$, respectively, and the dry mass, fresh mass, and pupation rate of the larvae decreased under the exposure of 0.4, 4, and 40 $mg \cdot L^{-1}$. During 72 h exposure to phenol, the larval catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), and carboxylesterase (CarE) activities responded to phenol in concentration- and time-dependent way, while the acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (ALP) activities responded slowly and were only inhibited significantly under the exposure to 40 $mg \cdot L^{-1}$ of phenol for 48 and 72 h, respectively. It was suggested that the body mass, pupation rate, and CAT, SOD, GST, and CarE activities of 4th-instar larval *P. akamusi* could be used as the biological markers to monitor the phenol pollution of water body.

Key words: *Prosilocerus akamusi*; phenol; acute toxicity; growth and development; enzyme activity; biological marker.

随着化学合成工业的发展,有机污染物的排放与日俱增,这些污染物通过大气降水和地表水最终进入江、河、湖、海等水生态系统中,对水体造成严重污染.水体中的污染物一方面会对水生动植物造成

直接损害;另一方面通过污染水体环境进而对水生生物的生长发育产生不可逆的影响,最终这些效应通过食物链的迁移危及到人体健康^[1-2].苯酚是我国优先控制污染物黑名单中常见的一种污染物,其主要源于石油化工和造纸工业的污水排放^[3].苯酚及其衍生物中带有苯环增加了它的脂溶性,对水生生物有很多潜在毒性效应,如三致效应(致畸、致癌、致突)、生物难降解性和生物富集作用^[4-5].国内外

* 哈尔滨市科技创新人才专项基金项目(2010RFQXS055)、中国科学院环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金项目(KF-2008-23)和东北林业大学研究生论文资助项目资助.

** 通讯作者. E-mail: chuanwangcao@yahoo.com.cn
2010-12-07 收稿,2011-04-14 接受.

已报道很多关于苯酚对水生生物的影响: 受试生物主要集中在发光菌、藻类、大型蚤类、甲壳类、鱼类等, 研究内容主要集中在急慢性毒性、生长发育和生理代谢影响三方面^[5-9], 而有关酚类化合物对生物体组织细胞产生的生化及分子毒理学效应研究甚少, 尤其是对底栖动物的研究未见报道。

摇蚊是一种分布广泛且种类数量众多的底栖生物, 常作为水体质量监测的重要指示生物^[9]。摇蚊幼虫又称血虫或红虫, 隶属昆虫纲双翅目 (Diptera) 摇蚊科 (Tendipedidae), 为完全变态类昆虫, 具有容易饲养、生活周期短、解毒能力低、对污染物的暴露敏感等特性^[10-11]。红裸须摇蚊 (*Prosilocerus akamusi*) 是摇蚊中的优势种, 广泛分布于我国的淡水环境中, 在水生生态系统食物链中占有重要地位^[12]。生物标志物 (biomarker) 是生物体受到环境污染物胁迫后、未发生严重损伤之前, 在分子、细胞、个体或种群水平上表现出异常变化的信号指标。一种生物标志物能敏感有效地反映出生物体发生严重损伤之前的生物变化, 并能准确评估生物体所处的污染状态及其潜在危害^[13]。但单一的生物标志物生态相关性较低, 只能从某一层次上片面推测出污染物的生态效应, 而建立一组能反映生物体主要生理过程变化的生物标志物系统 (biomarkers system) 能更全面地评价污染条件下环境和生物体的健康状况^[13-14]。本文从生物标志物系统的角度出发, 研究了苯酚对红裸须摇蚊急性毒性、体质量、化蛹率和体内保护酶及解毒酶活性的影响, 旨在从生理生化水平上寻找苯酚污染物暴露的敏感靶点, 为红裸须摇蚊作为一种指示生物用于水体环境监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

红裸须摇蚊购自哈尔滨大发花鸟虫鱼市场, 于室内用暴晒除氯 3 d 的自来水 (pH 7.58, 溶解氧 $6.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总硬度 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、水温 (25 ± 1) °C、自然光照饲养, 驯化 3 d 后挑选健壮、大小和颜色一致的 4 龄幼虫用于试验。

1.2 主要试剂

考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白 (BSA)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、二硫苏糖醇 (DTT)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、核黄素 (VB₂)、还原型谷胱甘肽 (GST)、对硝基苯酚磷酸二钠 (PNPP) 和对硝基苯酚 (p-Nitrophenol) 均购自 Amresco 公司; 1-氯-2,4-二硝基苯 (CDNB)、毒扁豆碱 (eserine)、固蓝 B 盐 (Fast blue B

salt) 购自 Sigma 公司; α -乙酸钠酯 (α -NA)、L-甲硫氨酸 (Met)、苯酚 (phenol)、硝基氮蓝四唑 (NBT) 和过氧化氢 (hydrogen peroxide) 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 摇蚊急性毒性测定

采用药液培养法进行毒性测定。将苯酚用蒸馏水配成 7 个浓度梯度, 以蒸馏水为空白对照, 将供试摇蚊 4 龄幼虫放入盛有 50 mL 药液的透明塑料杯中, 每处理 20 头, 每浓度 3 次重复, 观察摇蚊的中毒症状并及时挑出死亡个体, 分别于 6、24、48、72 和 96 h 统计死亡数, 以探针触动摇蚊尾部, 对机械刺激无反应者视为死亡。

1.4 染毒处理与体质量、化蛹率测定

以苯酚对红裸须摇蚊 4 龄幼虫 48 h LC₅₀ 为基准, 用蒸馏水配制 0.4、4 和 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚致死浓度, 以蒸馏水为空白对照, 将供试摇蚊 4 龄幼虫放入盛有 500 mL 药液的冰盘 (20 cm × 15 cm) 中, 每处理 100 头, 每浓度 5 次重复, 随机选取 3 次重复用于观察幼虫化蛹率, 每 24 h 统计幼虫化蛹情况, 直至冰盘中的幼虫死亡或全部化蛹为止。剩余 2 次重复用于染毒取样, 染毒 6、24、48 和 72 h 后, 从每个浓度中随机挑取活泼的幼虫 20 头, 蒸馏水润洗, 吸水纸吸干, 称量后冷冻于 -80 °C 冰箱中用于酶活性测定。干湿质量测定的染毒时间为 48 h, 每浓度 3 次重复, 每重复 20 头, 幼虫取出用蒸馏水润洗 2 次, 吸水纸吸干水份立即称量鲜质量, 然后放入 50 °C 烘箱内烘 4 h, 再升温至 120 °C 烘至恒量后称其干质量。干湿质量均用相对值表示, 相对干 (湿) 质量 = [处理组干 (湿) 质量 / 对照组质量] × 100%。

1.5 酶液制备

随机挑取 5 头摇蚊 4 龄幼虫加 1 mL 预冷的提取液, 玻璃匀浆器冰浴充分匀浆, 于 4 °C 高速离心, 上清液即为酶液。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (CAT)、酸性磷酸酯酶 (ACP)、碱性磷酸酯酶 (ALP)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和羧酸酯酶 (CarE) 所用匀浆液和离心参数如下: 保护酶系 SOD 和 CAT 匀浆液为 0.05 mol · L⁻¹ PBS (含 1% PVP、0.04% 苯基硫脲和 10 mmol · L⁻¹ EDTA, pH 7.8); 离心力为 15079 × g, 离心 30 min。GST 匀浆液为 0.1 mol · L⁻¹ PBS (含 1 mmol · L⁻¹ EDTA-Na₂、0.2 mmol · L⁻¹ PMSF 和 0.2 mmol · L⁻¹ DTT, pH 7.0); 离心力为 10000 × g, 离心 30 min。磷酸酯酶匀浆液为 0.1 mol · L⁻¹ PBS (pH 7.0); 离心力为 10000 × g, 离心 15 min。CarE 匀浆液为 0.04 mol · L⁻¹

PBS(pH 7.0);离心力为12000×g,离心15 min.

1.6 酶活性测定

蛋白质含量测定参照 Bradford^[15]的考马斯亮蓝 G-250 法. SOD 酶活性测定参照 Beauchamp 和 Fridovich^[16]方法略加改进. 将 3 mL 反应液(含 50 mmol · L⁻¹ PBS, pH 7.8, 13 mmol · L⁻¹ Met, 0.1 mmol · L⁻¹ EDTA, 75 μmol · L⁻¹ NBT)、0.02 mL 酶液和 0.6 mL 0.5 mmol · L⁻¹ 核黄素混匀后,放入光照培养箱中(25 °C、4000 lx)处理 15 min,立即避光测定 OD₅₆₀ 值. CAT 活性测定参照 Cohen 等^[17]方法. 将 3 mL H₂O₂ 底物溶液与 0.02 mL 酶液混匀,立即于 240 nm 下每隔 30 s 记录 1 次 OD₂₄₀ 值,记录 3 min. SOD 和 CAT 活性以每毫克蛋白每分钟的 OD 值变化表示(ΔOD · min⁻¹ · mg⁻¹ protein). GSTs 活性测定参照兰亦全和赵士熙^[18]方法略加改动. 将 2.3 mL 0.1 mol · L⁻¹ PBS (pH 6.5)、0.5 mL 9 mmol · L⁻¹ 还原型谷胱甘肽(GSH)、0.02 mL 酶液和 0.1 mL 45 mmol · L⁻¹ CDNB 底物混匀,每隔 0.5 min 测定 1 次 OD₃₄₀,记录 3 min. CarE 活性测定参照兰亦全和赵士熙^[18]方法略有改动. 将 0.05 mL 酶液与 2 mL 3×10⁻⁴ mol · L⁻¹ α-NA 混匀,30 °C 水浴保温 15 min,加入 1 mL 显色剂(1% 固蓝 B 盐;5% 十二烷基酸钠;2:5)终止反应,测定 OD₆₀₀ 值. 磷酸酯酶活性测定参照马红梅等^[19]方法. ACP 测定管中加入 2.3 mL 0.1 mol · L⁻¹ 醋酸缓冲液、0.5 mL 7.5×10⁻³ mol · L⁻¹ PNPP (pH 4.6) 和 0.08 mL 酶液,混匀,37 °C 水浴振动保温 30 min,加入 2 mL 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 终止反应,测定 OD₄₀₀ 值. ALP 活性缓冲液为 0.4 mol · L⁻¹ 巴比妥钠-HCl 缓冲液(pH 9.6),其余测定方法同酸性磷酸酯酶. GST、CarE、ACP、ALP 活性均以每毫克蛋白质每分钟分解底物的纳摩尔数表示(nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ protein).

1.7 数据处理

采用 POLO 软件计算苯酚对摇蚊幼虫半致死浓度(LC₅₀)及 95% 置信区间. 利用经验公式 96 h LC₅₀ × 0.01 计算苯酚对摇蚊幼虫的安全浓度. 运用 SPSS 16.0 软件对同一时间处理下不同浓度对酶活性影响采用 Tukey 方法进行显著性分析(α=0.05).

2 结果与分析

2.1 苯酚对摇蚊幼虫的急性毒性

从表 1 可以看出,苯酚对 4 龄幼虫 6、24、48、72 和 96 h 的 LC₅₀ 分别为 222.52、134.86、67.74、47.39 和 35.76 mg · L⁻¹,毒性作用随时间增加逐渐增强,

表明随着处理时间的延长,红裸须摇蚊幼虫对苯酚的敏感性增大. 苯酚在水体中的安全浓度为 0.36 mg · L⁻¹. 试验中观察发现高浓度苯酚致摇蚊中毒症状明显,当苯酚达到 60 mg · L⁻¹ 时,部分虫体出现麻痹症状,做“8”字运动的幅度减小,频率减慢,表皮粘性增加;当浓度达到 220 mg · L⁻¹ 时,处理 24 h 后,85.2% 幼虫中毒而死,死虫虫体僵直,部分幼虫体色由红变为黄白色.

2.2 苯酚对摇蚊体质量、化蛹率的影响

与对照相比,0.4、4 和 40 mg · L⁻¹ 苯酚处理组摇蚊 4 龄幼虫干湿质量均降低,且与浓度呈正相关. 0.4、4、40 mg · L⁻¹ 苯酚处理组摇蚊幼虫干和湿质量分别比对照降低 13.7%、16.4%、19.8% 和 19.8%、24.9%、33.8% (图 1).

在试验条件下,0.4、4 和 40 mg · L⁻¹ 苯酚处理组摇蚊幼虫累计化蛹率显著低于对照,分别为对照的 64.3%、42.9% 和 35.7%,表明摇蚊幼虫化蛹率随苯酚浓度增加抑制作用增强(图 2).

2.3 苯酚对摇蚊幼虫体内保护酶活性的影响

从图 3 可以看出,苯酚处理摇蚊幼虫 6 h 后,体

表 1 苯酚对摇蚊 4 龄幼虫急性毒性

Table 1 Toxicity of phenol applied to 4th-instar larval chironomid (mean±SE)

时间 Time (h)	n (df)	LC ₅₀ (95% 置信区间) LC ₅₀ (95% Confidence interval)(mg · L ⁻¹)	斜率 Slope	卡方值 χ ²
6	400(18)	222.52 (178.60 ~ 264.36)	3.21±0.59	26.02
24	380(17)	134.86 (85.48 ~ 164.12)	4.72±0.92	21.33
48	360(16)	67.74 (26.31 ~ 99.18)	2.48±0.52	18.87
72	380(17)	47.39 (28.47 ~ 61.59)	2.36±0.51	8.27
96	360(16)	35.76 (22.40 ~ 45.81)	2.63±0.63	8.14

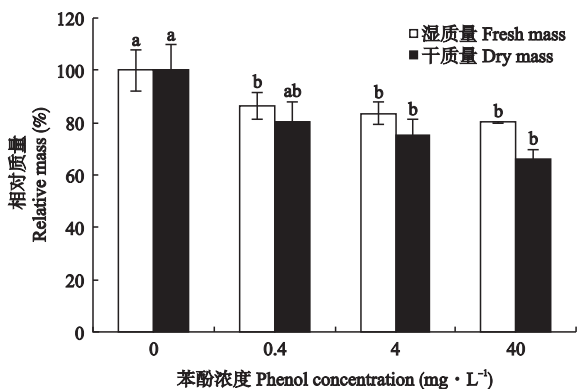


图 1 苯酚对摇蚊 4 龄幼虫干湿质量的影响

Fig. 1 Effects of phenol on dry mass and fresh mass of 4th-instar larval chironomid (mean±SE).

不同字母表示同一时间不同浓度间差异显著(P<0.05) Different letters showed significantly difference at 0.05 level at the same time among different phenol concentrations. 下同 The same below.

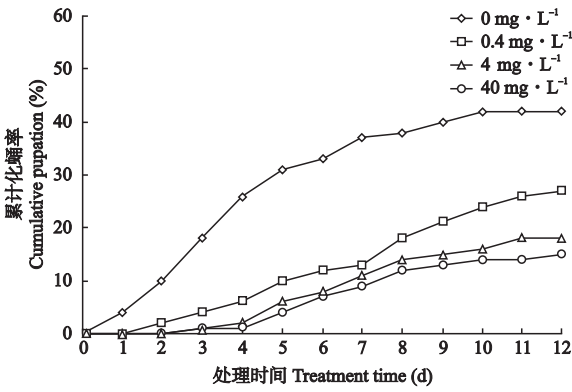


图2 苯酚对摇蚊4龄幼虫化蛹率的影响

Fig.2 Effects of phenol on pupation rate of 4th-instar larval chironomid.

内 CAT 活性均高于对照,且随着浓度增加活性增大,40 mg·L⁻¹苯酚处理组 CAT 活性为对照的 1.66 倍.暴露 24 h 后,低浓度(0.4 mg·L⁻¹)苯酚诱导 CAT 活性增加,为对照的 1.27 倍,高浓度(4 和 40 mg·L⁻¹)苯酚抑制 CAT 活性,分别为对照的 0.82 和 0.93 倍.苯酚处理 48 h,摇蚊幼虫体内 CAT 活性均高于对照,分别为对照的 1.19、1.09 和 1.37 倍;但暴露 72 h 后,CAT 活性变化与 24 h 相似,表现为低浓度诱导和高浓度抑制.

摇蚊 4 龄幼虫暴露于苯酚 6 和 24 h 后,体内 SOD 活性显著低于对照,最大抑制率分别为 82.2% 和 58.9%.暴露 48 h,4 和 40 mg·L⁻¹苯酚处理组 SOD 活性分别为对照的 1.69 和 1.73 倍.暴露 72 h,0.4、4 和 40 mg·L⁻¹苯酚处理组 SOD 活性分别为对照的 1.23、2.23 和 1.49 倍.随着处理时间的延长,

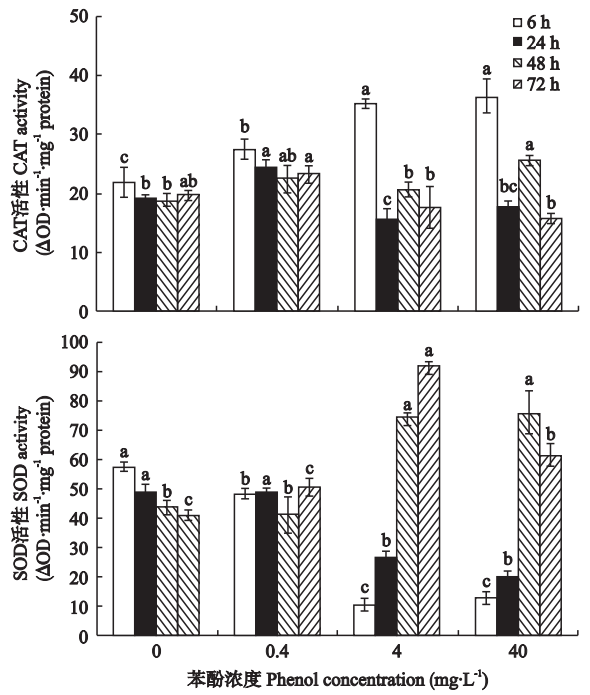


图3 亚致死剂量苯酚对摇蚊4龄幼虫CAT和SOD活性的影响

Fig.3 Effects of sublethal phenol on CAT and SOD activities of 4th-instar larval chironomid (mean±SE).

低浓度(0.4 mg·L⁻¹)处理的幼虫体内 SOD 活性始终表现为先降后升,高浓度(4 和 40 mg·L⁻¹)的幼虫体内保护酶活性随着暴露时间的延长而持续增高,其中暴露于 4 mg·L⁻¹苯酚溶液中 72 h 的幼虫酶活性是 6 h 的 8.91 倍.

2.4 苯酚对摇蚊幼虫体内解毒酶活性的影响

从图 4 可以看出,除 40 mg·L⁻¹苯酚处理 48 和

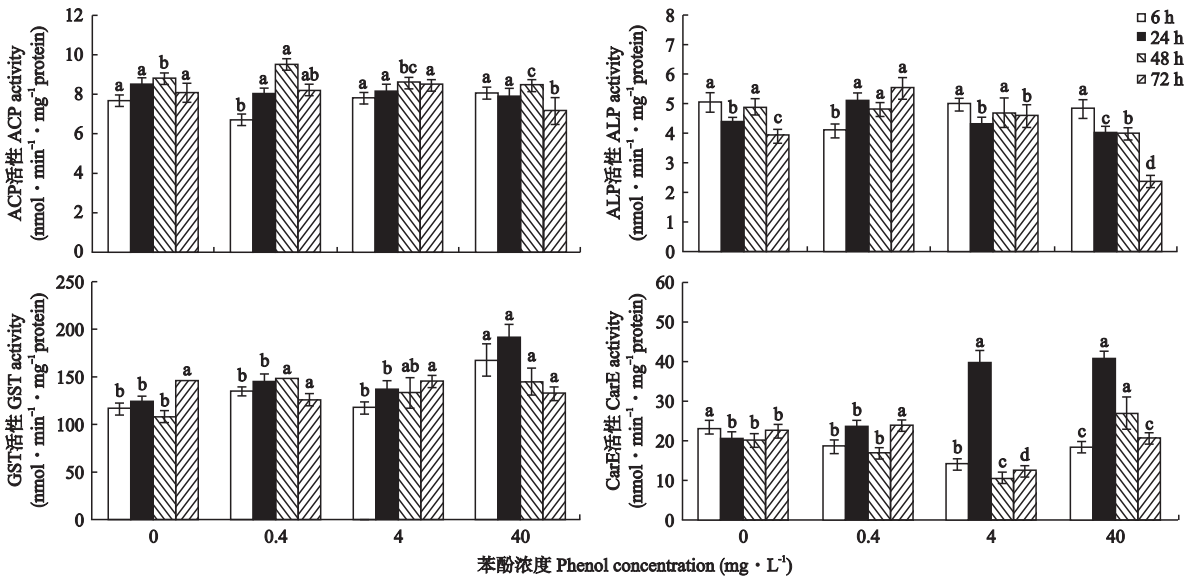


图4 亚致死剂量苯酚对摇蚊4龄幼虫体内ACP、ALP、GST和CarE活性的影响

Fig.4 Effects of sublethal phenol on ACP, ALP, GST and CarE activities of 4th-instar larval chironomid (mean±SE).

72 h 的 ACP 活性显著低于对照,表现出显著抑制外,其余各浓度苯酚对 ACP 活性影响均无显著差异. 亚致死剂量苯酚对摇蚊幼虫体内 ALP 影响与 ACP 的结果类似,40 mg · L⁻¹ 苯酚处理 48 和 72 h, ACP 活性被显著抑制,抑制率分别为 18.6% 和 40.4%. 摇蚊 4 龄幼虫体内 ACP 和 ALP 对于苯酚暴露的响应较迟钝,只有高浓度(40 mg · L⁻¹)长时间的胁迫才会产生显著抑制作用.

苯酚处理摇蚊 4 龄幼虫 6 和 24 h,0.4、4 和 40 mg · L⁻¹ 苯酚处理组 GST 活性均高于对照,其中 40 mg · L⁻¹ 苯酚被显著诱导增加,分别为对照的 1.43 和 1.54 倍;苯酚 48 h 处理组,各浓度处理 GST 活性显著高于对照组,分别为对照的 1.35、1.22 和 1.37 倍;但暴露 72 h,各处理组酶活性均低于对照组,但差异不显著($P>0.05$).

暴露于苯酚药液 6 h,摇蚊幼虫体内 CarE 活性被显著抑制,0.4、4 和 40 mg · L⁻¹ 苯酚抑制率分别为 20.6%、39.2% 和 21.6%;暴露 24 h 的 CarE 活性显著高于对照,且随浓度的增加诱导增强,分别为对照的 1.14、1.91 和 1.97 倍. 暴露 48 h,0.4、4 和 40 mg · L⁻¹ 苯酚处理组 CarE 活性分别为对照的 0.83、0.51 和 1.34 倍;暴露 72 h,CarE 活性随着浓度的增大表现为先升后降的趋势,分别为对照的 1.06、0.56 和 0.91 倍.

3 讨 论

有机污染物按其毒性作用分为麻醉性和反应性毒性两类^[20]. 麻醉性毒性化合物对生物的毒性较低,通常表现为不同程度致麻醉性的基本毒性作用. 麻醉性毒性又分为非极性麻醉和极性麻醉,极性麻醉性化合物分子结构中具有强失电子氨基、羟基的芳烃化合物,其毒性作用高于基本毒性^[7]. 由于苯酚中含有羟基(-OH),其在生物体中运转过程中会与受体靶分子发生相互作用,不仅可通过脂溶作用产生毒性效应,还可通过氢键结合加大毒性. 根据红裸须摇蚊幼虫的中毒症状及上述研究成果推断,苯酚属于极性麻醉性化合物. 苯酚对红裸须摇蚊 4 龄幼虫 96 h 的 LC₅₀ 为 35.76 mg · L⁻¹,参考《化学农药环境安全评价试验准则》^[21]中对鱼类的毒性等级划分标准可知,苯酚对红裸须摇蚊幼虫的毒性为低毒,但其对红裸须摇蚊幼虫的毒性高于对剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[8]和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[7]. 从化学物质对水生生物急性毒性数据考虑,使用 96 h 的 LC₅₀ × 0.01 计算安全浓度^[22],苯

酚对红裸须摇蚊的安全浓度为 0.36 mg · L⁻¹,该研究结果可为生态风险评价提供毒理学数据,并为制定渔业环境质量标准提供参考.

半致死浓度常作为最可信的毒性效应指标,而实际水体环境中苯酚浓度通常达不到 35.76 mg · L⁻¹ (96 h LC₅₀),需要更敏感的指标来检测水环境质量. 环境指示生物在生理水平上的一些变化,如生长发育、行为异常等常作为慢性毒性的毒理学指标^[23]. 因此在急性毒性 48 h LC₅₀ 和安全浓度 (96 h LC₅₀ × 0.01) 基础上,选择 3 个剂量 (0.4、4 和 40 mg · L⁻¹) 水平研究苯酚对红裸须摇蚊 4 龄幼虫干湿质量及化蛹率的影响. 结果发现,苯酚在安全浓度就会降低摇蚊幼虫的体质量,且随着浓度增大作用效果增强. 试验过程中没有投食,干湿质量的下降可能与苯酚胁迫所导致的能量支出过多有关. 本试验红裸须摇蚊 4 龄幼虫正常化蛹期约 12 d,化蛹率为 42.0%,这与 *Chironomus tentans* 化蛹率 (43.5%) 基本一致,但化蛹期远短于 *Chironomus tentans* (29 d)^[23],这可能是摇蚊种类和试验条件的差异所致. 苯酚对红裸须摇蚊幼虫的化蛹具有抑制作用,随着浓度增加化蛹率逐渐降低,这可能是苯酚干扰红裸须摇蚊体内脱皮激素的正常代谢导致幼虫化蛹过程受阻. 表明红裸须摇蚊幼虫化蛹过程对有机毒物苯酚敏感,可将化蛹率作为毒性效应指标.

现代毒理学认为,污染物对生态系统影响的最初作用必然是从对个体分子水平上的作用开始,然后逐步在细胞、器官、个体、种群、群落、生态系统各个水平上反映出来^[24]. 研究低浓度苯酚对摇蚊体内生物化学标志物 (CAT、SOD、GSTs、CarE、ACP/ALP) 的影响,明确水体中苯酚类污染物浓度与主要酶活性的关系,能更早、更准确地对苯酚的暴露做出预警. CAT 和 SOD 是生物体内抗氧化防御系统中的关键酶类,可以清除体内多余的活性氧,从而防止机体的氧化损伤. SOD 主要将细胞内的超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 氧化为 H₂O₂,然后 CAT 将 H₂O₂ 转化为 H₂O. 当机体受到外源性物质的氧化胁迫时,其活性会出现不同程度的改变. 因此,SOD 和 CAT 常作为指示环境污染胁迫的重要生化标志物^[25]. 本研究中,CAT 和 SOD 的最低可观察效应浓度均为 0.4 mg · L⁻¹,且随着浓度增加,酶活性变化显著;在 4 和 40 mg · L⁻¹ 浓度下,CAT 活性随着作用时间的延长表现为先升高后逐渐恢复至对照水平,而 SOD 表现为先降低再急剧升高最后恢复至对照水平. 根据 CAT 和 SOD 随着暴露时间延长不同的变化趋势

可以推测: 当摇蚊幼虫受到苯酚胁迫时在较短时间内 H_2O_2 先出现大量积累, H_2O_2 增多, 一方面会抑制 SOD 将 O_2^- 氧化为 H_2O_2 进而抑制了 SOD 活性, 另一方面激活 CAT 的合成进而诱导 CAT 活性增强. SOD 活性的降低、CAT 活性的增大, 会使细胞内 H_2O_2 含量减低, O_2^- 含量增大, 随着 O_2^- 的积累, SOD 活性会被激活来清除体内过多的 O_2^- , 最后 CAT、SOD 和其他抗氧化防御的酶处于一种动态平衡状态, 使自由基维持在一个较低水平.

通过体内的解毒酶来催化完成异生化学物质的代谢解毒是生物主要而常见的一种适应机制. 磷酸酯酶、谷胱甘肽-S-转移酶和羧酸酯酶是摇蚊体内 3 种重要的解毒酶, 常用作水体监测的生物标志物. 磷酸酯酶分为 ACP 和 ALP, 主要通过参与磷酸化作用的离子转运, 分解外源毒物, 保证其生理生化反应的正常进行, 国内外有关水生物磷酸酯酶的研究主要集中在农药和金属离子方面^[26-27]. 本研究表明, 红裸须摇蚊体内的 ACP 和 ALP 对于苯酚暴露的响应具滞后性, 只有在高浓度 ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 长时间 (72 h) 的胁迫才会对摇蚊体内的磷酸酯酶产生抑制, 表明磷酸酯酶对苯酚胁迫不敏感. GST 具有消除体内自由基和解毒的双重功能, 其活性的大小可反映机体抗氧化能力的高低, 同时 GST 可催化谷胱甘肽 (GSH) 与化学物质的亲电基团结合, 最终形成硫醚氨基酸排出体外, 起到解毒作用^[28]. 苯酚各处理组 GST 活性均被诱导增加, 随着浓度增大诱导作用增强. $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组 GST 活性随着时间变化表现为先升高后逐渐降低至对照水平的变化趋势, 这说明在苯酚浓度很低时, 摇蚊体内正常的 GST 水平可以保证消除脂质过氧化等带来的次级产物, 随着污染胁迫的加重, GST 活性受到短暂激活, 以消除更多的氧化产物; 随着污染胁迫的进一步加重, GSH 严重耗竭, GST 活性重新下降至原来水平. 这与瞿建宏等^[28]在研究苯酚胁迫下罗非鱼组织中 GST 活力表现出低促高抑的变化趋势相近, 可见 GST 作为一种生物标志物其活力会发生改变, 可作为水环境中有机污染物污染的生化标记^[29-30]. 羧酸酯酶属丝氨酸酶, 是昆虫体内重要的水解酶之一, 广泛存在于各种昆虫体内, 参与内源或外源有毒物质的代谢解毒过程. 国外关于水生动物 CarE 研究主要集中在有机磷、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类杀虫剂等方面^[31-32]. 来有鹏等^[33]研究表明, CarE 活性测定在农药对河虾的安全性评价中可作为一个标志物, 来反映农药对河虾的毒性程度. 本研究结果表明, 摇蚊暴

露于苯酚中 24 h 后, 体内的酶活表现为诱导增加, 且随浓度的增加诱导增强, 分别为对照的 1.14、1.91、1.97 倍, 说明解毒酶 CarE 也参与到苯酚的毒性代谢中.

本研究结果表明, 苯酚对摇蚊具有一定的毒性效应, 并随时间增加其 LC_{50} 逐渐降低, 表明随着处理时间延长, 红裸须摇蚊幼虫对苯酚的敏感性增大; 亚致死剂量苯酚对摇蚊体质量和化蛹率具有很大影响; 此外, 苯酚还影响摇蚊体内 CAT、SOD、GST 和 CarE 活性, 并随着浓度增加和暴露时间的延长呈现一定的剂量-时间效应, 表明这些酶参与了摇蚊幼虫对苯酚的应答机制. 因此, 摇蚊体内 CAT、SOD、GST 和 CarE 活性的改变可作为水体环境质量的早期预警信号, 而有关这些酶系基因水平与苯酚浓度的关系还有待进一步研究.

参考文献

- [1] Chen C-P (陈传平), Zhang T-T (张庭廷), He M (何梅), et al. Effects of aniline and phenol on freshwater algae growth. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2007, **18**(1): 219-223 (in Chinese)
- [2] Saha NC, Bhunia F, Kaviraj A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, **63**: 195-202
- [3] Zhou W-M (周文敏), Fu D-Q (傅德黔), Sun Z-G (孙宗光). Determination of black list of China's priority pollutants in water. *Research of Environmental Sciences (环境科学研究)*, 1991, **6**(4): 1-3 (in Chinese)
- [4] Xue L-Y (薛良义), Li L (李卢), Nie S-P (聂松平). Studies on DNA damage of the blood cells in *Carrassius auratus* induced by phenol and hydroquinone. *Acta Hydrobiologica Sinica (水生生物学报)*, 2006, **30**(2): 241-243 (in Chinese)
- [5] Hori TSF, Avilez IM, Iwama GK, et al. Impairment of the stress response in matrix juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2008, **147**: 416-423
- [6] Gao H (高会), Zhang S-H (张硕慧), Xiong D-Q (熊德琪), et al. Study on acute toxicities of phenol and aniline to two marine organisms. *Marine Environmental Science (海洋环境科学)*, 2006, **25**(suppl. 1): 33-36 (in Chinese)
- [7] Li T-J (李铁军), Guo Y-M (郭远明), You J-J (尤炬炬), et al. A study on acute toxicity of phenol aniline chlorobenzene and nitrobenzol on *Portuns trituberculatus* (Miers). *Journal of Modern Fisheries Information (现代渔业信息)*, 2009, **24**(1): 15-17 (in Chinese)
- [8] Wang H (王宏), Shen Y-W (沈英娃), Lu L (卢玲), et al. Acute toxicity of typical hazard chemicals to three kinds of aquatic organisms. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology (应用与环境生物学报)*, 2003, **9**(1): 49-52 (in Chinese)
- [9] Tang Z-Q (唐自强), Feng C-C (冯长君). Acute tox-

- icity of substituted phenols to *Daphnia Magna* Straus at different pH values by Kier's shape index. *Journal of Wuhan University (Natural Science)* (武汉大学学报·理学版), 2006, **52**(6): 685-689 (in Chinese)
- [10] Choi J, Roche H, Caquet T. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: Potential biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, **19**: 495-500
- [11] Crane M, Sildanchandra W, Kheir R, et al. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, **53**: 361-369
- [12] Zheng X-Y (郑先云), Long W-M (龙文敏), Guo Y-P (郭亚平), et al. Acute toxicities of Cd²⁺ on *Rospiloceris akamusi* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2008, **27**(1): 86-91 (in Chinese)
- [13] Regoli F, Gorbi S, Frenzilli G, et al. Oxidative stress in ecotoxicology: From the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, 2002, **54**: 419-423
- [14] Wang Y (王悠), Jiang S (姜爽), Zhao X-W (赵晓玮), et al. Effects of two organic pollutants on biomarker system of fish *Lateolabrax japonicus* and the pollution assessment. *Environment Science* (环境科学), 2010, **31**(3): 801-807 (in Chinese)
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-254
- [16] Beauchamp CO, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamidase gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, **44**: 276-287
- [17] Cohen GP, Dembieck D, Marcus J, et al. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 1970, **34**: 30-38
- [18] Lan Y-Q (兰亦全), Zhao S-X (赵士熙). Resistance mechanisms of *Spodoptera exigua* (Hübner) to fenvalerate and alpha-cypermethrin. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21**(1): 203-208 (in Chinese)
- [19] Ma H-M (马红梅), Chen H-Y (陈海婴), Liu X-Q (柳小青), et al. The relationship between the activities of glutathione S-transferase and phosphatase and pesticide resistance in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Chinese Journal of Vector Biology and Control* (中国媒介生物学及控制杂志), 2008, **19**(5): 422-425 (in Chinese)
- [20] Ji G-D (籍国东), Sun T-H (孙铁珩), Sui X (隋欣). Toxicity effect of substituted benzenes in oilfield wastewater by molecular orbital method. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2002, **13**(4): 471-475 (in Chinese)
- [21] State Environmental Protection Administration of China (国家环境保护局). Environmental Safety Assessment of Chemical Pesticides. Beijing: China Standards Press (in Chinese)
- [22] Yao Z-F (姚志峰), Zhang L-Z (章龙珍), Zhuang P (庄平), et al. Effects of antioxidant enzyme in liver and acute toxicity of Cu²⁺ on juvenile Chinese sturgeon. *Journal of Fishery Sciences of China* (中国水产科学), 2010, **17**(4): 731-738 (in Chinese)
- [23] Lee SW, Choi J. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2009, **28**: 269-274
- [24] Xu L-H (徐立红), Zhang Y-Y (张雨元), Chen Y-Y (陈宜瑜). The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection. *Acta Hydrobiologica Sinica* (水生生物学报), 1995, **19**(2): 171-184 (in Chinese)
- [25] Geracitano L, Monserrat JM, Bianchini A. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laoneireis acuta* (Polychaeta, Nereidiidae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, **277**: 145-156
- [26] Li J (李静). Effects of Pollutant on Feeding, Digestive Enzymes and Alkaline Phosphatase of *Marsupenaeus japonicus* Larvae. Master Thesis. Qingdao: Ocean University of China, 2004 (in Chinese)
- [27] Li Y-X (黎艳霞), Yang J-M (杨俭美). Comparison of the toxicity and the influence of enzyme activity of four kinds of insecticides to *Daphnia magna*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinesis* (北京大学学报·自然科学版), 1997, **33**(2): 197-202 (in Chinese)
- [28] Huo J-H (瞿建宏), Chen J-C (陈家长), Hu G-D (胡庚东), et al. Dynamic changes of catalase and glutathione-S-transferase in the different tissues of tilapia exposed to phenol. *Ecology and Environment* (生态环境), 2006, **15**(4): 687-692 (in Chinese)
- [29] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment; A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, **13**: 57-149
- [30] Park K, Park J, Kim J, et al. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2010, **151**: 439-446
- [31] Yan J-G (闫建国), Ru S-G (汝少国), Wang W (王蔚). On effects of monocrotophos on AChE, CarE, ALP and ACP activities of *Monopterus albus*. *Journal of Safety and Environment* (安全与环境学报), 2006, **6**(3): 61-63 (in Chinese)
- [32] Krisoff G, Guerrero NRV, Cochón AC. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. *Aquatic Toxicology*, 2010, **96**: 115-123
- [33] Lai Y-P (来有鹏), Liu X-J (刘贤进), Yu X-Y (余向阳), et al. Application of the CarE and GSTs in safety assessment of insecticides. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (江苏农业学报), 2008, **24**(6): 944-947 (in Chinese)

作者简介 葛士林,男,1987年生,硕士研究生.主要从事环境毒理学研究. E-mail: gslnefu@163.com

责任编辑 肖红