

土壤 B[a]P 多次累积污染对蚯蚓体内 谷胱甘肽-S-转移酶活性的影响

张 伟¹, 马静静¹, 郑 彬¹, 葛高飞², 檀华蓉², 郜红建^{1*}

(1. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036)

摘 要: 采用土壤多次叠加污染与一次污染的方法研究 B[a]P 对赤子爱胜蚓组织细胞谷胱甘肽-S-转移酶(GST) 的毒性效应。结果表明, 随着土壤中 B[a]P 培养时间的延长, 土壤中 B[a]P 含量和蚯蚓组织细胞 GST 活力呈现初期下降速率较快, 尔后下降速率减小的趋势; 蚯蚓组织细胞 GST 活力与蚯蚓体内 B[a]P 富集量之间呈极显著正相关($P < 0.01$)。在整个培养时间内(1~56 d), 多次累积污染土壤中 B[a]P 的 Tenax 提取含量和蚯蚓体内 B[a]P 富集总量比一次污染显著降低 13.34%~27.98% ($P < 0.05$)与 22.58%~46.81% ($P < 0.05$)。B[a]P 多次累积污染条件下蚯蚓组织细胞 GST 活力比一次污染低 3.01%~33.07% ($P < 0.05$)。这表明土壤中 B[a]P 多次累积污染对蚯蚓的毒性低于一次污染。研究结果为蚯蚓在土壤 B[a]P 叠加污染条件下的生态毒性效应评价提供理论依据。

关键词: B[a]P; 累积污染; 蚯蚓; GST

中图分类号: X53

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)04-0647-07

Effects of Benzo(a)pyrene one-time and multiple-time superimposed pollution on glutathione-S-transferase activities of earthworm

ZHANG Wei¹, MA Jingjing¹, ZHENG Bin¹, GE Gaoifei², TAN Huarong², GAO Hongjian¹

(1. School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Biotechnology Center of Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Benzo(a)pyrene (B[a]P), one of the most persistent organic pollutants, is gradually accumulating in the soil and becoming a serious threat to soil environment. However, the long-term toxic effects of B[a]P on soil organisms including earthworms remains unknown. Responses of earthworms to the one-time or multiple-time superimposed B[a]P pollution are still unclear. Using multiple-time superimposed and one-time pollution methods, the effect of B[a]P on glutathione-S-transferase(GST) activity in earthworms was investigated. Results showed that the content of the available B[a]P in the soil and the B[a]P quantity in earthworms sharply declined in the first 28 d (0-28 d) and then slowly decreased between 28 and 56 d in both the multiple-time and one-time addition methods. The GST activity in earthworms sharply declined in the first stage (1-28 d) and then slowly decreased between 28 and 56 d in both addition methods. A significantly positive correlation ($p < 0.01$) between the quantity of B[a]P accumulated and the GST activity in earthworms was detected. Moreover, the available B[a]P in soil and the B[a]P accumulated in earthworms in multiple-time addition treatment were ranged from 13.34% to 27.98% and from 22.58% to 46.81%, respectively, which was lower than those in the one-time pollution treatment. The activity of GST in earthworm's tissue cells under multiple-time superimposed pollution was 3.01% to 33.07% lower than that in one-time pollution treatment during the whole incubation time. This results indicated that the soil available B[a]P and it's toxicity to earthworms in the multiple-time polluted soil was lower than that in the one-time polluted soil.

Key words: B[a]P; superimposed pollution; earthworm; GST

收稿日期: 2013-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(41071158)资助。

作者简介: 张 伟, 硕士研究生。E-mail: zhangwei9201314@126.com

* 通信作者: 郜红建, 博士, 教授。E-mail: hjgao@ahau.edu.cn

蚯蚓是陆地生态系统中重要的分解者, 约占土壤总生物量的 60%~80%^[1], 蚯蚓通过体表及消化系统直接暴露于土壤污染物中, 能够反映污染物浓度的变化, 常被作为污染土壤生态监测的指示生物^[2]。蚯蚓对土壤污染物的有效性监测包括生物蓄积和毒性测定两种方式^[3]。随着生态毒理诊断研究的深入开展, 常用的生存、生长、繁殖指标已不能满足亚致死浓度污染条件下土壤生态毒理诊断的需要。为此, 土壤污染生态毒理学研究要寻求新的更敏感试验终点。

作为生物体内的第 2 阶段代谢酶, 谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 在生物代谢及防御污染物毒害方面发挥着重要作用^[4], 可从微观分子水平反映环境介质(土壤、沉积物和水体等)亚致死污染的状态, 成为环境污染早期预警的生物标记物。有关 GST 的生物指示效应, 已在不同生物体内得到了证实^[5-7], 然而对于土壤低剂量多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 的污染诊断, GST 是否与土壤中真实的 PAHs 含量密切相关, 目前尚缺少足够的证据。

苯并[a]芘(Benzo[a]pyrene, B[a]P)是美国环境保护署优先控制有机污染物黑名单中典型的代表性多环芳烃类有机污染物, 在环境中普遍存在^[8]。由于 B[a]P 在土壤中的半衰期长, 辛醇-水分配系数 ($K_{ow} \approx 1 \times 10^6$) 大, 导致其在土壤中难以降解。目前常用化学方法和生物学方法评价土壤 PAHs 的生物有效性, 化学方法常用污染物提取浓度来评价其环境毒性, 可能会高估其生态风险^[9], 目前, 用温和试剂萃取方法模拟和预测土壤中 PAHs 生物有效性方法得到不断的发展^[10]。生物方法中利用蚯蚓体内的生化指标对土壤 B[a]P 的毒性效应进行评价已有少数研究。王磊^[6]阐明了 B[a]P 对蚯蚓抗氧化酶系

(SOD、CAT、GST) 的毒性作用机制; 张薇^[7]发现蚯蚓暴露于低剂量芘污染土壤时, 其内脏中各生化酶系对此产生了不同程度的响应, 其中 GST 活性对污染物暴露的指示最为敏感。然而, 一些研究采用一次污染或急性毒性的方式进行, 对于阐明 B[a]P 对蚯蚓的毒性效应有一定的作用, 但与土壤 B[a]P 逐步污染的过程有一定差异, 较难真实反映土壤 B[a]P 污染物对蚯蚓的毒性效应。

本试验采用多次累积的方法模拟土壤 B[a]P 的污染过程, 以赤子爱胜蚓为供试生物, 研究 B[a]P 在一次与多次累积污染条件下对蚯蚓组织 GST 活力的影响, 通过对土壤中 B[a]P 含量、蚯蚓富集量及其与 GST 活性的相关性分析, 分析土壤 B[a]P 多次累积污染对蚯蚓的毒性效应, 旨在为低浓度 B[a]P 逐步累积污染的生态毒性诊断提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品和仪器

B[a]P 标样 (色谱纯) 购自美国 Supelco 公司; GST 试剂盒购自南京建成生物研究所; 液相色谱级乙腈购自德国 Sigma 公司; 硅藻土购于阿拉丁公司。其他药品均购自国药集团化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪(Waters 601 controlle); 荧光检测器(Waters 2475 multi Fluorescence Detector)购自美国 Waters 公司; PAHs 专用色谱柱(25 cm × 4.6 mm × 5 μm) 和固相萃取柱(solid phase extraction, SPE) 购自美国 Supelco 公司; 加速溶剂萃取仪(ASE300) 购自美国戴安公司; 紫外分光光度计(UV-1800) 购自日本岛津公司; 低温高速离心机(Z36HK) 购自德国 Hermle 公司; 生化培养箱(SPX-150B-2 型) 购自上海博讯实业公司; 减压旋转蒸发仪(senco R 系列) 购自上海申生科技有限公司。

表 1 供试土壤的理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of the tested soils

采样深度/cm Sampling depth	pH	有机质/g·kg ⁻¹ Organic matter	全氮/g·kg ⁻¹ Total N	碱解氮/mg·kg ⁻¹ Available N	有效磷/mg·kg ⁻¹ available P	速效钾/mg·kg ⁻¹ Rapidly available K	B[a]P /μg·kg ⁻¹
0~20	6.76	11.78	0.69	61.39	10.25	175.49	10.61
20~40	6.65	6.17	0.37	28.04	9.18	150.93	8.21

1.2 试验蚯蚓与土壤

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*) 购自合肥某蚯蚓养殖中心。在实验室环境下驯养 2 周, 选用 2~3 月龄, 体重 300~500 mg, 带有环带的健康蚯蚓供试。将蚯蚓洗净后放入铺有湿润灭菌纱布的玻璃皿中, 用解剖针扎孔的铝箔纸封口置于 20℃±2℃ 恒温培养

箱中暗室培养 24 h, 以清除蚯蚓肠内的排泄物。

供试土壤(0~20 cm 和 20~40 cm) 采自安徽农业大学高新农业示范园, 土壤类型为黄褐土, 分别采 0~20 cm 和 20~40 cm 表层土壤, 除去植物根系和石块后, 过 2 mm 尼龙筛, 在 4℃ 下保存, 备用。另取部分土壤自然风干, 磨碎, 参照鲍士旦^[11]的方法,

分析理化性质(表 1)。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤 B[a]P 叠加污染方法 土壤污染多通过低剂量长期累积形成的, 土壤中的多环芳烃通过干湿沉降、污泥灌溉、污泥农用等途径进入, 并逐步累积^[12]。土壤 B[a]P 累积污染采用郑彬等^[13]的方法: 取一定量的风干土样制备成高浓度($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) B[a]P 污染的土壤。叠加污染时, 分别取 0~20 cm 和 20~40 cm 相当于 1 kg 风干土重的新鲜土样, 高温灭菌后, 加入一定量 B[a]P 高浓度($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 污染的土壤, 使 B[a]P 的初始污染浓度达到 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 充分混匀后移至无菌培养室内避光培养(25°C)。在第 2 周、4 周、6 周……22 周后, 采用相同的方法向初始污染浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤中再添加一定量的 B[a]P 高浓度污染土壤 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 使初始污染浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤中 B[a]P 的浓度依次增加 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 通过 12 次叠加污染后, 土壤 B[a]P 的最终添加浓度达到 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。当 B[a]P 叠加污染到 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 同时制备 B[a]P 一次污染的土壤。另取相当于 1 kg 风干土重的新鲜土样, 一次加入一定量的高浓度 B[a]P 污染的土壤($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 使 B[a]P 浓度一次达到 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。当土壤中 B[a]P 多次添加浓度累积达到 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和一次添加浓度达到 $1200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 分别为多次叠加污染和一次污染过程的结束。污染土壤充分混匀后, 在恒温(25°C)、无菌条件下避光培养。每 3 d 用称重差减法补充去离子水, 以保持土壤含水量的恒定(田间最大持水量的 50%)。土壤 B[a]P 叠加污染和一次污染的试验均设 3 次重复, 同时以没有污染的土壤作为空白对照。

1.3.2 蚯蚓培养试验 多次叠加累积污染和一次污染结束后的第 1、7、14、28 和 56 天, 分别取出 60 g 土壤放入 100 mL 的烧杯中, 取蚯蚓 5 条(每条 0.3~0.5 g)放入烧杯中, 用扎孔的铝箔纸封口以保证蚯蚓正常呼吸并且不至于逃跑, 在 $25^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$ 人工培养箱中避光培养 7 d, 为了保持土壤的含水率, 每 3 d 加一次去离子水。暴露结束后, 全部实验组对照组蚯蚓全部成活, 将蚯蚓取出, 清理肠胃 48 h, 冷冻干燥后磨碎进行测定。每个处理均设 3 次重复。

1.3.3 B[a]P 提取与测定 ASE 法提取土壤和蚯蚓体内 B[a]P。在叠加污染和一次污染结束后的第 1、7、14、28 和 56 d, 分别取相当于 10 g 风干土的新鲜污染土样与硅藻土充分混匀, 转移到 33 mL 萃取池, 加速溶剂萃取仪提取, 条件参考郑彬等^[13]的方法。萃取液用减压旋转蒸发器(40°C)浓缩至 2 mL,

待纯化、测定。

Tenax 法提取土壤中 B[a]P。土壤 B[a]P Tenax 法提取含量采用实验室优化的提取法进行, 详见郑彬等^[13]的方法。土壤与 Tenax~TA 按 5:1 比例置于水中旋转振荡 6 h。将溶液中 Tenax~TA 冲洗至小烧杯中, 风干后分 4 次加入 20 mL 丙酮得到丙酮萃取液, 并用减压旋转蒸发器把丙酮萃取滤液浓缩至 2 mL 待纯化。

1.3.4 B[a]P 的纯化与测定 土壤 B[a]P 可提取含量与有效含量采用固相萃取法纯化, 详见郑彬^[13]的方法。B[a]P 的测定采用 Supelco PAHs 专用色谱柱分离($25 \text{ cm}\times 4.6 \text{ mm}\times 5 \mu\text{m}$), 乙腈和去离子水梯度淋洗, HPLC-FLD 检测分析。色谱条件为: 在 0~12 min 时, 乙腈和水的流动体积比为 50%:50%, 12~22 min 乙腈和水的流动体积比为 100%:0%, 22~25 min 乙腈和水的流动体积比为 50%:50%。流速 $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 进样量 $20 \mu\text{L}$, 激发和发射波长为 294/430 nm; 外标法定量分析。

1.3.5 谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活力测定 取蚯蚓组织制备组织匀浆, 参照姚芹等^[14]的方法, 采用酶联免疫吸附法测定 GST 活力, 测定的试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。以 412 nm 处吸光度变化速度计算 GST 活性。

1.4 数据分析方法

在土壤与蚯蚓中 B[a]P 含量样品分析过程中进行方法空白、平行样和加标回收率测定, 在土壤和蚯蚓样品中添加 B[a]P 标样 ($1200 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 采用 ASE 提取法和 Tenax 提取法测定回收率。土壤和蚯蚓的加标的加标回收率分别大于 83%和 76%, 相对标准偏差 (RSD) <10%。蚯蚓中 GST 含量以每 mg prot 蚯蚓组织中所含酶含量的 U 表示($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ prot}^{-1}$), 每个处理中蚯蚓培养、测定均设置 3 次重复, 取 3 次重复的平均值。数据和图表经 Excel 2010 和 SPSS 18.0 进行统计分析, 采用 Duncan'法单因素方差分析和双变量因子相关分析。

2 结果与分析

2.1 B[a]P 在土壤中随时间变化规律

在一次和多次累积污染土壤中, B[a]P 的 ASE 法和 Tenax 法的提取含量均随培养时间的延长而逐渐下降, 其中在前期 (1~28 d) 内下降较快, 此后下降速度较慢(图 1 和图 2)。总体来看, 土壤 B[a]P 的 Tenax 法提取量随老化时间延长而下降的程度比 ASE 法提取量明显。

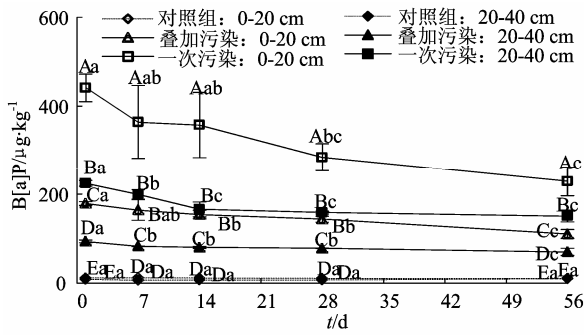


图 1 土壤 B[a]P 的 ASE 法提取含量随时间变化规律
Figure 1 Temporal changes of ASE extractable B[a]P in soil

A、B、C、D、E 表示不同处理在同一时间内土壤 B[a]P 提取含量的差异性显著 ($P < 0.05$);
a、b、c、d、e 字母表示相同处理在不同时间内 B[a]P 提取含量的差异性显著 ($P < 0.05$)。下同

图 2 土壤 B[a]P 的 Tenax 法提取含量随时间变化规律
Figure 2 Temporal changes of Tenax extractable B[a]P in soil

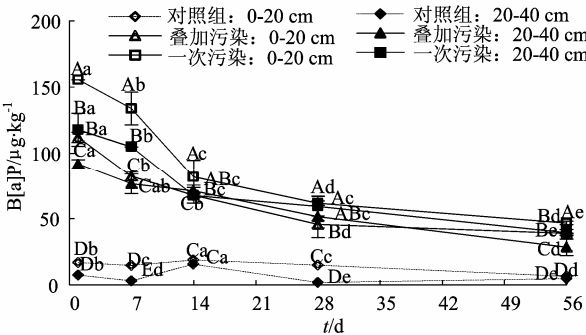


图 3 蚯蚓体内 B[a]P 富集量随时间变化规律
Figure 3 Temporal changes of B[a]P accumulated in earthworms

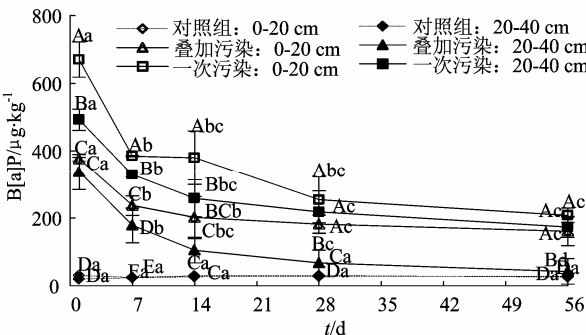


图 4 蚯蚓体内 B[a]P 含量与土壤中 B[a]P 提取含量之间关系
Figure 4 Correlations between contents of the extractable B[a]p in soil and accumulation in earthworms

51.44 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别比初始(1 d) Tenax 法的提取含量 (112.06、91.66 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 分别降低 59.26% 和 43.87%。一次污染时, 0~20 cm 和 20~40 cm 土壤中 B[a]P 在 28 d 时 ASE 法提取含量 (284.39 和 158.61 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 Tenax 法提取含量 (61.70 和 59.36 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 分别比初始(1 d) ASE 法提取含量 (441.36 和 224.59 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 Tenax 法提取含量 (155.60 和 117.83 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 降低 35.36%、29.38% 和 60.35%、49.62%。在第 56 天 时, 叠加污染和一次污染条件下, 0~20 cm 土壤中 B[a]P 的 ASE 法提取含量分别为 110.25 和 229.28 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别比 20~40 cm 土壤中 B[a]P 的 ASE 法的提取含量高 57.67% 和 52.44%, 而 0~20 cm 土壤中 B[a]P 的 Tenax 法提取含量分别为 38.81 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 46.79 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别比 20~40 cm 土壤中 B[a]P 的 Tenax 法提取含量高 36.26% 和 18.68%。

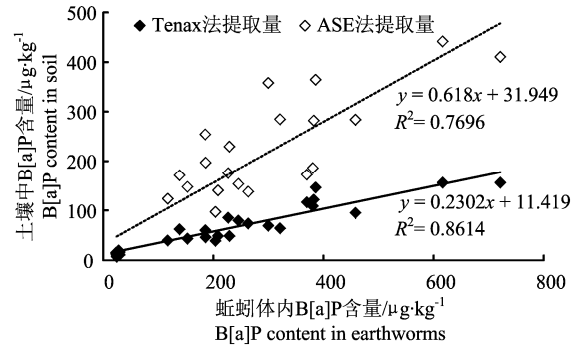
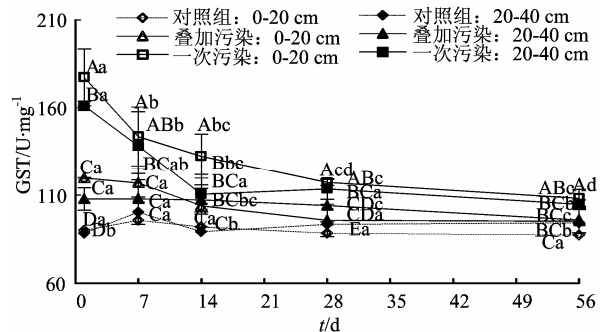


图 5 蚯蚓细胞 GST 随时间变化规律
Figure 5 Temporal changes of GST in earthworms



在多次累积污染土壤中, 第 1 天 0~20 cm 和 20~40 cm 土壤中 B[a]P 的 Tenax 法提取含量约为 ASE 法提取含量的 62.64% 和 98.19%。在培养到第 28 天时, 多次累积污染时, 0~20 cm 和 20~40 cm 土壤中 B[a]P 的 ASE 法提取含量分别为 143.65 和 78.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别比初始(1 d) ASE 法提取含量 (178.90、93.35 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 降低 19.70% 和 16.44%; 而土壤中 B[a]P 的 Tenax 法提取含量分别为 45.66 和

土壤中 B[a]P 的 ASE 法提取含量和 Tenax 法提取含量随着培养时间的延长而显著降低, 且初始下降速率大, 尔后减少的规律, 这与前人的研究结果一致。高学晟^[15]等的研究表明, PAHs 的生物有效性与其在土壤中的时间成反比, 且下降速率逐渐减小; 张静^[16]的研究证实, 菲、芘和 B[a]P 在土

壤中的可提取率随时间的延长而逐渐降低。这可能是因为 B[a]P 随培养时间延长而逐渐进入土壤颗粒中难解吸的位点^[17]或者部分 B[a]P 被土壤中微生物降解的结果。Yang^[18]的实验证实,菲、芘等多环芳烃的进入土壤方式的不同,会影响其多环芳烃的生物有效性。本研究结果表明,在叠加污染下, B[a]P 的 ASE 法提取含量比一次污染条件下低了 49.49%~59.47%; Tenax 法提取含量比一次污染条件下低了 13.34%~27.98%, 整体呈现多次污染土壤中 B[a]P 的含量小于一次污染的趋势。这可能是因为: 在一次污染土壤的方式下, B[a]P 与土壤相互作用时间相对较短, 老化作用较弱, 被有机质等土壤组分固定的少, 土壤中 B[a]P 有效含量和可提取含量较高, 生物有效性较强^[19-20]。而在叠加污染方式下, B[a]P 与土壤颗粒相互作用时间长, 老化作用强, 使 B[a]P 被充分的分布到土壤各个吸附位点, 或 B[a]P 与土壤组分形成共价键或者被土壤有机质和晶格的物理“俘获”^[21-22], 使得土壤可提取 B[a]P 数量减少。

土壤有机质的数量和性质是影响污染物生物可利用性的最主要的因素^[23]。本研究结果表明, 0~20 cm 土壤中, ASE 法提取含量比 20~40 cm 土壤中的提取含量高 54.44%~115.70%; Tenax 法提取含量比 20~40 cm 土壤中的提取含量高 7.53%~36.26%。这可能是因为 0~20 cm 和 20~40 cm 土壤中有机质含量和性质不同造成的: 土壤有机质一般分为水溶性有机碳和非水溶性有机碳, 对污染物的残留起着截然相反的作用。Cornelissen 等指出, 在水溶性有机质存在条件下, 多氯联苯和氯苯缓慢解吸的量明显增加^[24]; 而 Conte 等研究表明, 土壤中非水溶性有机质含量较高时, 多环芳烃在土壤中残留量增加^[25]。0~20 cm 中 B[a]P 的 ASE 和 Tenax 法提取含量分别高于 20~40 cm 土壤, 这可能是因为 0~20 cm 土壤中含有的水溶性有机质含量高于 20~40 cm 土壤, 而非水溶性有机质含量低于 20~40 cm 土壤, 从而增加了 B[a]P 在表层土壤中的解析量。

2.2 B[a]P 在蚯蚓体内的富集量与不同提取方法之间的相关性

在多次累积污染和一次污染条件下, 蚯蚓体内 B[a]P 的富集量在试验初始的 1~28 d 内下降速度较快, 且达显著差异水平($P<0.05$); 在随后的 28~56 d 内, 蚯蚓体内 B[a]P 的蓄积量下降趋势减缓。在多次累积污染时, 0~20 cm 和 20~40 cm 土壤中蚯蚓体内 B[a]P 在第 28 天的蓄积量分别为 181.57 和 67.29 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别比第 1 天蚯蚓体内 B[a]P 的蓄积量 (375.96、336.96 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 下降了 14.38%和 35.80%,

在整个培养时间内(1~56 d), 多次污染条件下蚯蚓体内 B[a]P 的蓄积量分别比一次污染低 22.58%~46.81%。在一次污染时, 0~20 cm 和 20~40 cm 土壤中蚯蚓体内 B[a]P 在第 28 天的蓄积量分别为 253.94 和 217.78 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别比第 1 天蚯蚓体内 B[a]P 的蓄积量 (669.55、492.32 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 下降了 62.07%和 55.76% (图 3)。这说明, 随着 B[a]P 在土壤中培养时间的延长, 其对蚯蚓的生物有效性逐渐下降, 蚯蚓体内的蓄积量逐渐降低。

进一步分析表明 (图 4), 土壤中 B[a]P 的 ASE 法和 Tenax 法提取含量与蚯蚓生物蓄积量之间呈显著线性正相关, 相关系数(R^2)分别为 0.7987($P<0.01$)和 0.8791 ($P<0.01$), 这说明土壤中 B[a]P Tenax 法提取含量与蚯蚓生物蓄积量之间相关性高于 ASE 法提取含量与蚯蚓生物蓄积量之间的相关性。这可能是因为: 由于老化现象的影响, 传统的溶剂萃取的方法(如 ASE 法)提取出的有机污染物的量与其生物有效性存在较大差异^[26], 而温和法(如 Tenax 法)提取含量更能准确预测土壤中有机污染物生物可利用性^[27]。

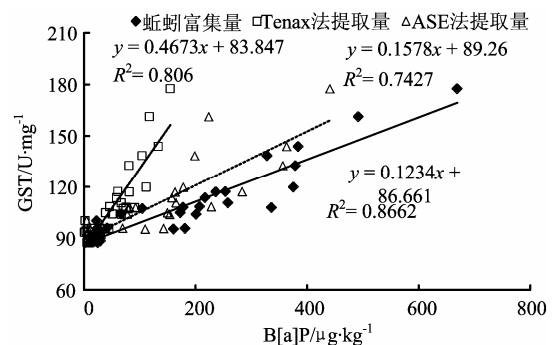


图 6 蚯蚓 GST 活力与土壤 B[a]P 提取量及蚯蚓富集量之间的关系

Figure 6 Correlations between GST and B[a]P contents in soils and earthworms

2.3 蚯蚓细胞 GST 含量随时间变化及与蚯蚓和土壤中 B[a]P 含量之间的相关性

GST 活力随着培养时间的延长呈现逐渐降低趋势(图 5), 即在蚯蚓培养开始的 1~28 d 内, GST 活力降低较快, 尔后(28~56 d)逐渐减缓。在 0~20 cm 和 20~40 cm 的对照土壤中, 蚯蚓体内 GST 活力保持相对稳定, 活力范围在 87.32~100.22 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 之间。一次污染条件下: 蚯蚓体内 GST 活性在 0~20 cm 土壤中最高, 在 108.3~177.3 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 之间, 分别比对照土壤中蚯蚓体内 GST 活力高 24.1%~97.5%。培养到第 28 天 时, 蚯蚓体内 GST 活力比实验初始时(1 d)

下降了33.9%，尔后下降速率逐渐减缓。在20~40 cm土壤中，蚯蚓体内GST活力在104.9~161.9 U·mg⁻¹之间，比20~40 cm对照土壤中蚯蚓体内GST活力高11.4%~82.6%。在1~56 d的培养时间内，20~40 cm土壤中蚯蚓体内GST活力分别比0~20 cm土壤中蚯蚓体内GST活力3.0%~16.5%。在叠加污染条件下，蚯蚓体内GST活力在95.2~119.8 U/mg之间。0~20 cm土壤中蚯蚓体内GST活力比对照土壤高8.3%~33.2%，而比一次污染土壤低6.5%~34.5%。20~40 cm土壤中蚯蚓体内GST活性比对照土壤中高1.9%~22.3%，而比一次污染土壤中低11.3%~82.6%。在第28天时，0~20 cm和20~40 cm土壤中蚯蚓体内GST活力分别比一次污染低18.42%(达显著性差异 $P<0.05$)和8.40%，在整个培养时间内(1~56 d)，多次叠加污染条件下蚯蚓体腔细胞GST活力为一次污染的66.93%~96.99%，达显著性差异水平($P<0.05$)。

进一步分析表明(图6)，蚯蚓体内B[a]P的富集量与蚯蚓GST活力呈极显著正相关($P<0.01$)。蚯蚓体内GST活力与蚯蚓体内B[a]P富集量、土壤Tenax法提取量和ASE法提取量之间分别符合方程 $y = 0.1234 x_1 + 86.661$ ， $y = 0.4673 x_2 + 83.847$ ， $y = 0.1578 x_3 + 89.26$ (y 代表GST活力， x_1 ， x_2 和 x_3 分别代表蚯蚓体内B[a]P富集量、土壤Tenax法提取量和ASE法提取量)，相关系数(R^2)分别为0.8662、0.806和0.7427。这表明蚯蚓体内GST活力随蚯蚓体内B[a]P富集量的增加而显著升高。这与B[a]P在土壤中的生物有效性的变化有关。在暴露初期的0~28 d时间内，B[a]P的生物有效性较高，蚯蚓体内富集量较高，诱导了GST的合成，使其活性上升；随着时间延长，土壤对B[a]P的固定和老化作用加强，其有效性降低，蚯蚓体内积累量减少，降低了GST合成，使其活性下降。张薇等^[28]发现芘污染土壤中蚯蚓GST活力与芘的浓度和暴露时间均相关；王磊^[6]探明了在低剂量B[a]P暴露时GST活性被显著诱导。这均与本研究结果一致。

3 结论

随着培养时间的延长，土壤中ASE法和Tenax法提取B[a]P的含量呈初始(1~28 d)下降速率较快，后期(28~56 d)呈减缓的趋势；在B[a]P多次累积污染土壤中的ASE法和Tenax法提取含量显著低于一次污染。Tenax法提取B[a]P的含量小于ASE法提取B[a]P的含量，0~20 cm土壤中B[a]P的含量大于20~40 cm土壤中。

蚯蚓体内B[a]P的富集量与土壤培养时间成反比，且在多次累积污染条件下的富集量低于一次污染。蚯蚓体内B[a]P的富集量与土壤Tenax提取含量的相关性大于ASE提取含量，即Tenax法提取B[a]P含量更适合预测土壤中B[a]P的生物有效性。

蚯蚓GST活力随着B[a]P在土壤中培养时间的延长逐渐降低。土壤B[a]P多次累积污染对蚯蚓GST活力诱导效应低于一次污染。

参考文献:

- [1] Li M, Liu Z T, Xu Y, et al. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta) [J]. *Chemosphere*, 2009, 74: 621-625.
- [2] 郝桂玉, 黄民生, 徐亚同, 等. 蚯蚓及其在生态环境保护中的应用[J]. *环境科学研究*, 2004, 17(3): 75-77.
- [3] Lanno R, Wells J, Conder J, et al. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 57(1): 39-47.
- [4] 雷安平, 陈欢, 黎双飞, 等. 谷胱甘肽-S-转移酶的功能、应用及克隆表达[J]. *环境科学与技术*, 2009, 32(12): 85-91.
- [5] Lee R F. Glutathione S-transferase in marine invertebrates from Langesundfjord[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1988, 46(1): 33-36.
- [6] 王磊, 宋玉芳, 张薇, 等. 蚯蚓(*Eisenia fetida*)细胞色素P450及抗氧化酶系对环境浓度苯并(a)芘的响应[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(2): 337-342.
- [7] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩. 多环芳烃菲污染土壤的蚯蚓细胞色素P450生物标记诊断[J]. *毒理学杂志*, 2005, 19(增刊): 311-312.
- [8] 宋超, 胡庚东, 范立民, 等. 环境中多环芳烃(PAHs)的生物标志物的功效分析[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(6): 589-594.
- [9] Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants[J]. *Environmental Science & Technology*, 2000, 34(20): 4259-4265.
- [10] 吕正勇, 杨兴伦, 王芳, 等. Tenax提取预测老化土壤中多环芳烃的生物有效性[J]. *中国环境科学*, 2011, 31(4): 647-656.
- [11] 鲍士旦. 土壤与农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 25-114.
- [12] Tao S, Cui Y H, Xu F L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)in agricultural soil and vegetables from Tianjin[J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 320(1): 11-24.
- [13] 郑彬, 马静静, 葛高飞, 等. B[a]P累积污染对土壤呼吸强度的影响[J]. *农业环境科学*, 2013, 32(2): 259-266.
- [14] 姚芹, 吴顺华, 汤红英, 等. 亚硝酸钠亚慢性染毒对小鼠体内谷胱甘肽S-转移酶活力及其基因表达的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2010, 33(12): 1385-1387.
- [15] 高学晟, 姜霞, 区自清. 多环芳烃在土壤中的行为[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(4): 501-504.
- [16] 张静, 马丽丽, 焦加国, 等. 菲、芘在单一和复合污染条件下不同老化阶段的提取率及其生物有效性[J]. *土壤*, 2010, 42(3): 385-389.

- [17] 张聪恺, Cheema, Muhammad I K, 等. 温和提取法评估老化前后土壤中菲的生物有效性[J]. 土壤学报, 2011, 48(1): 78-82.
- [18] Yang Y, Zhang N, Xue M, et al. Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in soils[J]. Environmental Pollution, 2010, 158: 2170-2174.
- [19] Gao Y Z, Xiong W, Ling W T, et al. Impact of exotic and inherent dissolved organic matter on sorption of phenanthrene by soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 140(1/2): 138-144.
- [20] Comelissen G, Van N P, Grovers H. Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents[J]. Environmental Science and Technology, 1998, 32(20): 3124-3131.
- [21] 郜红建, 蒋新. 土壤中结合残留态农药的生态环境效应[J]. 生态环境, 2004, 13(3): 399-402; 413.
- [22] Sverdrup L E, Jensen J, Krogh P H, et al. Studies on the effect of soil aging on the toxicity of pyrene and phenanthrene to a soil-dwelling springtail[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, 21(3): 489-492.
- [23] Murphy E M, Zachara J M, Smith S C. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds[J]. Environmental Science & Technology, 1990, 24(10): 1507-1516.
- [24] Comelissen G, van Noort P C M, Grovers H A J. Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents[J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32(20): 3124-3131.
- [25] Conte P, Zena A, Pilidis G, et al. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances[J]. Environmental Pollution, 2001, 112(1): 27-31.
- [26] Bosma T N P, Middeldorp P J M, Schraa G, et al. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability[J]. Environmental Science & Technology, 1996, 31(1): 248-252.
- [27] Sun H W, Li J G. Availability of pyrene in unaged and aged soils to earthworm uptake, butanol extraction and SFE[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2005, 166(1-4): 353-365.
- [28] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 土壤低剂量花污染对蚯蚓若干生化指标的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(9): 2097-2103.