

双酚 A 和壬基酚对河蚬呼吸代谢和抗氧化酶活性的影响

曾丽璇, 张悦君, 康园, 张秋云

华南师范大学化学与环境学院/教育部环境理论化学重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 为了研究双酚A(Bisphenol A, BPA)和壬基酚(Nonylphenol, NP)对河蚬(*Corbicula fluminea*)呼吸代谢能力和抗氧化酶活性的影响,探讨BPA和NP对河蚬的毒性作用。以河蚬为受试生物,采用半静态染毒法,研究了BPA和NP对河蚬的单一毒性等级、联合毒性作用类型和对河蚬耗氧率、排氮率以及抗氧化酶系统中SOD、CAT活性的影响。结果显示:① BPA、NP对河蚬的半致死质量浓度(96 h-LC₅₀)分别为6.34和1.09 mg·L⁻¹,毒性顺序为NP > BPA,二者均为高毒物质;② BPA-NP对河蚬毒性作用类型为协同作用;③亚急性毒性指标耗氧率、排氮率以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)对BPA、NP及二者混合物均比较敏感,在本试验的质量浓度范围内(BPA: 0.63、0.79、1.59、3.17 mg·L⁻¹; NP: 0.109、0.136、0.271、0.542 mg·L⁻¹; BPA+NP: (0.078 2+0.029)、(0.097 8+0.036 3)、(0.196+0.072 5)、(0.391+0.145) mg·L⁻¹),河蚬耗氧率、排氮率以及两种酶活性变化均呈现先下降后上升再下降的趋势,其中在BPA、NP和二者混合物的质量浓度较低时,河蚬的耗氧率和排氮率、SOD和CAT活性只有微小降低,随着质量浓度的升高,河蚬耗氧率和排氮率、两个酶活性相对均有所升高,而在质量浓度极高时其耗氧率和排氮率以及两个酶活性才又受到显著性或极显著性的抑制。实验结果显示河蚬耗氧率、排氮率和SOD、CAT活性对水体中酚类内分泌干扰物反应敏感,具有较好的一致性和规律性,耗氧率、排氮率和SOD、CAT活性与其他敏感性指标一起可以作为酚类内分泌干扰物污染的一项早期监测指标。

关键词: 双酚 A; 壬基酚; 河蚬; 耗氧率; 排氮率; SOD; CAT

中图分类号: X503.225

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2014) 01-0122-07

引用格式: 曾丽璇, 张悦君, 康园, 张秋云. 双酚 A 和壬基酚对河蚬呼吸代谢和抗氧化酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2014, 23(1): 122-128.

ZENG Lixuan, ZHANG Yuejun, KANG Yuan, ZHANG Qiuyun. Effects of BPA and NP on respiratory metabolism and antioxidant enzymes in *Asian calm* [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2014, 23(1): 122-128.

酚类内分泌干扰物(Phenolic endocrine disrupting chemicals, pEDCs)是内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)中,具有1-2个苯酚基团、苯环上结合了不同化学结构取代基的化合物。其中的壬基酚(Nonylphenol, NP)和双酚A(Bisphenol A, BPA)因在环境中广泛存在而备受关注(牛海岗等, 2009; Vandenberg 等, 2007)。

BPA、NP在环境中一般共存于水体、土壤和食品中(NASU等, 2001; LAGAN等, 2004; ZHANG等, 2011),通过接触进入机体。目前关于BPA、NP对鱼类、水蚤和海洋贝类等水生动物毒性效应的研究较多,但均为单一染毒的资料(Canesi等, 2007; Segner等, 2003; 庄惠生和杨光, 2005; Hasselberg等, 2004; LI, 2008),关于二者混合对双壳贝类的毒性研究相对较少。

河蚬(*Corbicula fluminea*)原产我国,是一种主要栖息于淡水及咸淡水的江河、湖泊及入海口中常见的双壳贝类,现已广泛分布于世界各地的水域

中,主要以水中的浮游生物(如硅藻、绿藻、原生动物、轮虫等)为食料(Way等, 1990)。已有报道用河蚬作为指示生物进行生态毒理学等的研究(Marie等, 2006; Vidal等, 2001)。

动物耗氧率(Oxygen Consumption Rate, OCR)和排氮率(Ammonia Excretory Rate, AER)的大小及变化能够反映其呼吸代谢能力的高低及变化规律,因而常作为衡量动物能量消耗的一个指标,可以作为反映某些污染物毒性大小的敏感指标(Cheung 和 Cheung, 1995)。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)是生物体内广泛存在的2个重要的抗氧化防御系统酶,它们的活性可作为生物逆境生理和衰老生理指标(Wang等, 1989)。

为真实反映BPA和NP在环境中共存对双壳贝类可能造成的毒性作用,本研究应用同批河蚬在同条件下同时进行了BPA、NP单一染毒和混合染毒试验,并通过不同质量浓度的BPA、NP和二者混合

基金项目: 国家自然科学基金项目(21147003)

作者简介: 曾丽璇(1972年生),女,副教授,博士,研究方向为环境生态及水污染治理。E-mail: zenglx@senu.edu.cn

收稿日期: 2013-10-11

物对河蚬抗氧化酶SOD和CAT活性，以及耗氧率和排氨率的大小的变化，来探明BPA、NP及二者混合物对河蚬抗氧化酶系统和呼吸代谢能力的毒性影响，以期为酚类内分泌干扰物水质标准的制定和建立早期生态预警体系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器：BSA1245S-CW 电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)；UV-3100PC 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)；玻璃匀浆器。

试剂：双酚 A(国产分析纯)；壬基酚(国产分析纯)；乙醇(国产分析纯)。

1.2 试验动物

试验所用河蚬来自珠江三角洲河网中水质较好的增江。选取壳长(25.0±2.0) mm，壳高(19.40±0.20) mm，体质量为(4.00±0.40) g 的健康河蚬用于试验。河蚬用经过 3 d 自然脱氯和已充分曝气的自来水在试验室暂养 1 周，暂养期间水温为(20±1) °C，自然光照。

1.3 试验方法

1.3.1 急性毒性试验

急性毒性采用半静态换水式试验，每 24 h 更换 1 次试验液，换水后加入 BPA 至初始质量浓度。试验容器为定制的容积为 1 L 的玻璃水族箱，每升水中放 10 只河蚬，试验期间不喂食，试验条件控制在水温(20±1) °C，pH 值为 7.5~8.0，溶解氧为 7~8 mg·L⁻¹。预试验设置 3 个间隔较大的质量浓度梯度，每组设 3 个平行，求出 48 h 的 100%死亡、无死亡和大致半致死质量浓度。正式试验按照预试验所得结果设置 4 个质量浓度试验组和 1 个空白对照组、1 个溶剂对照组($\varphi=0.1\%$ 的乙醇)，每组设 3 个平行。试验期间连续观察受试对象的活动情况，及时清除死亡的河蚬和代谢物，每隔 24 h 记录河蚬的死亡情况。判断个体死亡的标准：河蚬外膜收缩、刺激时腹足不能收缩、双壳张开，多次用镊子适度敲击壳体，并夹紧双壳而没有自动闭壳反应作为死亡判断标准。暴露 96 h 后计算其半致死质量浓度(Median lethal concentration, LC₅₀)。然后按下式计算安全质量浓度(SC)：SC = 96 h-LC₅₀ × 0.01。

1.3.2 联合急性毒性试验

根据已有的实验结果，BPA和NP对河蚬的96 h-LC₅₀分别为6.34 mg·L⁻¹和1.09 mg·L⁻¹。联合毒性作用类型采用等效应曲线法进行评价，将BPA和NP的96 h-LC₅₀数值比为1:1时定义为一个毒性单位，分别配置0.25、0.50、0.75和1.00个毒性单位的混合染毒液，不同毒性单位的混合染毒液按照下式进行配置：

X毒性单位的混合染毒液=X(LC₅₀-A+LC₅₀-B)

A、B 代表对河蚬进行联合毒性试验的 2 种污染物 X代表试验中所使用的混合液配比 X为0.25、0.50、0.75 和 1.00。

1.3.3 亚急性毒性试验

亚急性毒性试验以单一污染物和2种污染物混合液96 h-LC₅₀的1/10、1/8、1/4和1/2设置4个质量浓度组，另设1个溶剂对照组($\varphi=0.1\%$ 的乙醇)，每组设3个平行，对河蚬进行为期7 d的亚急性染毒试验，试验采用半静态换水，暴露期间的实验方法与96h-LC₅₀急性毒性试验相同，每天观察记录河蚬的死亡情况，并及时清除死亡的河蚬和代谢物。

1.3.4 耗氧率和排氨率的测定

耗氧率和排氨率的测定采用刘其根等(1999)的方法进行测定。根据试验前后代谢瓶内水中的溶解氧及氨氮含量，按下列公式计算河蚬的耗氧率和排氨率：

$$OR=[(DO_0-DO_t) \times V]/(W \times t) \quad (1)$$

式中：OR为单位体质量耗氧率，mg·g⁻¹·h⁻¹；DO₀和DO_t为试验开始、在t时间结束时水中DO的含量，mg·L⁻¹；V为代谢瓶中水的体积，L；W为河蚬质量，g；t为试验持续时间，h。

$$NR=[(N_t-N_0) \times V]/(W \times t) \quad (2)$$

式中：NR为单位河蚬个体质量排氨率，mg·g⁻¹·h⁻¹；N₀和N_t为试验开始、在t时间结束时水中NH₃-N的质量浓度，mg·L⁻¹；V为代谢瓶中水的体积，L；W为河蚬质量，g；t为试验持续时间，h。

1.3.5 酶活性的测定

亚急性毒性试验结束后，从各组中各取出数只河蚬尽快剖开，用滤纸对其吸干后，称取软体组织0.50 g用6.7×10⁻³ mol·L⁻¹磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0) 3.0 mL进行匀浆，匀浆液倒入离心管中，加3 mL磷酸盐缓冲溶液冲洗匀浆器后，也倒入离心管中，在4 000 r·min⁻¹离心30 min，取上清液为粗酶液。

1) SOD活性的测定

SOD活力测定采用邹国林等(1986)改进的邻苯三酚自氧化法，波长λ=325 nm，酶活性单位定义为：每毫升反应液中，每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达50%的酶量定义为一个酶活性单位。

2) CAT活性的测定

CAT活性测定采用徐镜波和袁晓凡(1997)的紫外分光光度法进行测定，波长λ=240 nm，酶活性定义为：一个过氧化酶单位相当于在规定条件下，于25 °C、pH=7.0，每分钟分解1 μmol过氧化氢所需的酶量。

3) 总蛋白含量的测定

蛋白质含量测定采用Bradford (1976)的方法，

即考马斯亮蓝法。10.00 mL Bradford染色液加入0.30 mL待测蛋白,混匀后在595 nm处检测吸光度。以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白做出的标准曲线计算各样本蛋白含量。

1.4 数据处理

试验数据使用 SPSS16.0 软件进行统计分析,试验数据均以 3 次平均数 $\pm$ 标准偏差(mean $\pm$ SD)表示;组间数据利用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 检验法在 $P=0.05$ 的置信水平进行差异性分析;试验所得结果用 Origin8.0 绘图。

2 结果

2.1 单一急性毒性试验

单一急性毒性试验结束后,空白对照组以及溶剂对照组均无死亡。观察发现,试验期间未死亡个体的活动能力下降,用镊子适度敲击河蚬壳体时,其闭壳速度缓慢,用玻璃棒刺激河蚬的腹足时,其收缩速度缓慢,而且其外套膜边缘有黏性絮状物包裹。BPA、NP 对河蚬的急性毒性结果见表 1。

在同一质量浓度试验组中,试验时间与河蚬的死亡率呈正相关关系,即随着暴露时间的延长河蚬死亡率均呈现出逐渐增加的趋势。根据表 1 的试验结果,可得到 BPA 对河蚬的 96 h-LC₅₀ 为 6.34 mg·L⁻¹,其安全质量浓度为 0.063 mg·L⁻¹;NP 对河蚬的 96 h-LC₅₀ 为 1.09 mg·L⁻¹,其安全质量浓度为 0.0109 mg·L⁻¹。以单一化合物 96 h-LC₅₀(mg·L⁻¹) 为毒性大小评判标准,2 种酚类有机物的毒性大小顺序为:NP > BPA。

2.2 联合急性毒性试验

BPA 和 NP 对河蚬的联合急性毒性结果见表 2, BPA 和 NP 的联合毒性作用等效效应曲线见图 2。

由图 1 可知 BPA-NP 对河蚬联合作用的 96 h-LC₅₀ 落于 95% 置信区间下限线下侧,故 BPA-NP 对河蚬联合作用的类型为协同作用。

表 1 BPA、NP 对河蚬 96 h 的半致死质量浓度

Table 1 96 h-LC₅₀ values of BPA and NP to Asian clam

暴露物质	暴露时间/h	96 h-LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	95%置信区间/(mg·L ⁻¹)	安全质量浓度/(mg·L ⁻¹)
BPA	96h	6.34	4.55~7.77	0.063
NP	96h	1.09	0.542~1.618	0.0109

表 2 BPA-NP 对河蚬 96h 的半致死质量浓度

Table 2 96 h-LC₅₀ values of BPA-NP to Asian clam

BPA/NP 配比		96 h-LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)			
BPA/NP1:1	BPA	95%置信区间	NP	95%置信区间	
	1.782	0.378~2.591	0.290	0.0613~0.423	

2.3 亚急性毒性试验

亚急性毒性试验以 BPA、NP 和 2 种污染物混合

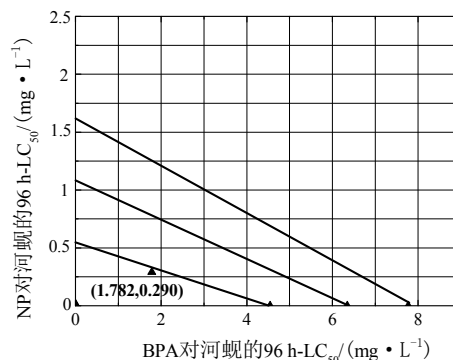


图 1 BPA-NP 联合毒性作用等效效应曲线

Fig.1 The joint toxic effect of equivalent curve for BPA-NP

液 96 h-LC₅₀ 的 1/10、1/8、1/4 和 1/2 设置 4 个质量浓度组,即 0.63、0.79、1.59、3.17 mg·L⁻¹ 和 0.109、0.136、0.271、0.542 mg·L⁻¹ 以及 (0.0782 $\pm$ 0.029)、(0.0978 $\pm$ 0.0363)、(0.196 $\pm$ 0.0725)、(0.391 $\pm$ 0.145) mg·L⁻¹, 7 d 的亚急性毒性试验结束后,溶剂对照组均无死亡,其他质量浓度组死亡率均低于 5%。

2.3.1 BPA、NP 及二者混合物对河蚬 SOD 活性的影响

BPA、NP 及二者混合物对河蚬 SOD 活性的影响结果显示(图 2):在 BPA、NP 单一污染和混合污染暴露下,河蚬软体组织 SOD 活性均表现为随着污染物质量浓度的升高 SOD 活性先降低后升高再降低。在质量浓度为 1/10 LC₅₀ 时,BPA、NP 单一胁迫的 SOD 活性均接近对照组水平,与对照组无显著差异($P > 0.05$),但此时混合物胁迫的 SOD 活性显著低于对照组($P < 0.05$);在质量浓度为 1/8 LC₅₀ 时,BPA、NP 单一胁迫的 SOD 活性均显著低于对照组($P < 0.05$),而此时混合物胁迫的 SOD 活性极显著低于对照组($P < 0.01$);在质量浓度为 1/4 LC₅₀ 时,BPA 单一胁迫的 SOD 活性显著高于对照组($P < 0.05$),NP 单一胁迫的 SOD 活性接近对照组

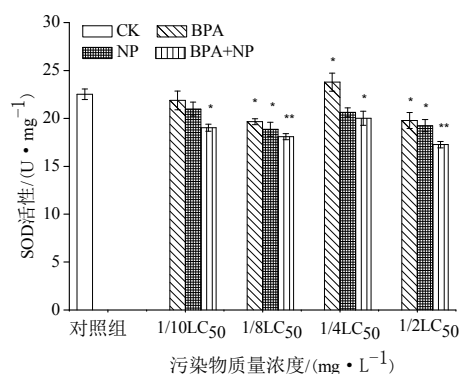


图 2 BPA 和 NP 对河蚬 SOD 活性的影响

Fig.2 Effects of BPA and NP on SOD activities of clams

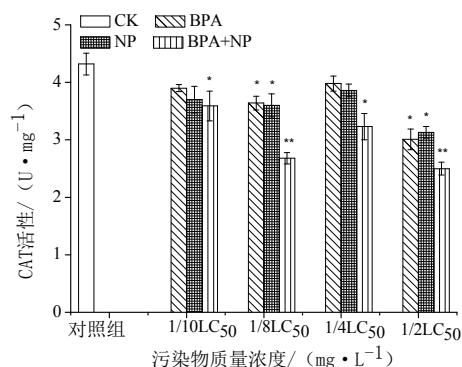


图3 BPA 和 NP 对河蚬 CAT 活性的影响

Fig. 3 Effects of BPA and NP on CAT activities of clams

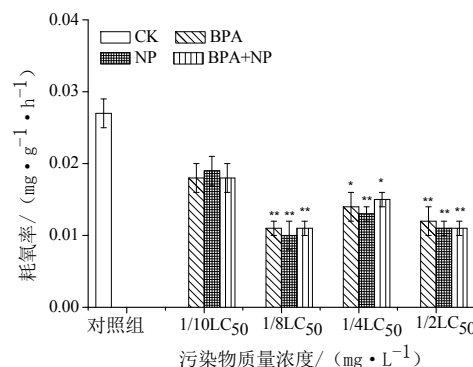


图4 BPA 和 NP 对河蚬耗氧率的影响

Fig.4 Effects of BPA and NP on OCR of clams

水平,与对照组无显著差异($P > 0.05$),但此时混合物胁迫的 SOD 活性显著低于对照组($P < 0.05$);在质量浓度为 $1/2 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫的 SOD 活性均显著低于对照组($P < 0.05$),但此时混合物胁迫的 SOD 活性极显著低于对照组($P < 0.01$)。

2.3.2 BPA、NP 及二者混合物对河蚬 CAT 活性的影响

BPA、NP 及二者混合物对河蚬 CAT 活性的影响结果显示(图 3):在 BPA、NP 单一污染和混合污染暴露下,总体趋势均为随着污染物质量浓度的升高 CAT 活性先降低后升高再降低,各质量浓度组中 CAT 活性均低于对照组。在质量浓度为 $1/10 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫的 CAT 活性均低于对照组,与对照组无显著差异($P > 0.05$),但此时混合物胁迫的 CAT 活性显著低于对照组($P < 0.05$);在质量浓度为 $1/8 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫的 CAT 活性均显著低于对照组($P < 0.05$),而此时混合物胁迫的 CAT 活性极显著低于对照组($P < 0.01$);在质量浓度为 $1/4 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫的 CAT 活性均低于对照组,但与对照组无显著差异($P > 0.05$),而此时混合物胁迫的 CAT 活性显著低于对照组($P < 0.05$);在质量浓度为 $1/2 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫的 CAT 活性均显著低于对照组($P < 0.05$),但此时混合物胁迫的 CAT 活性极显著低于对照组($P < 0.01$)。

2.3.3 BPA、NP 及二者混合物对河蚬耗氧率的影响

BPA、NP 及二者混合物对河蚬耗氧率的影响结果显示(图 4):在 BPA、NP 单一污染和混合污染暴露下,总体趋势为随着污染物质量浓度的升高耗氧率先降低后升高再降低,各质量浓度组中耗氧率均低于对照组。在质量浓度为 $1/10 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫和混合物胁迫的耗氧率均接近对照组水平,与对照组无显著差异($P > 0.05$);在质量浓度

为 $1/8 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫和混合物胁迫的耗氧率均极显著低于对照组($P < 0.01$);在质量浓度为 $1/4 LC_{50}$ 时,BPA 单一胁迫和混合物胁迫的耗氧率显著低于对照组($P < 0.05$),NP 单一胁迫的耗氧率极显著低于对照组($P < 0.01$);在质量浓度为 $1/2 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫和混合物胁迫的耗氧率均极显著低于对照组($P < 0.01$)。

2.3.4 BPA、NP 及二者混合物对河蚬排氨率的影响

BPA、NP 及二者混合物对河蚬排氨率的影响结果显示(图 5):在 BPA、NP 单一污染和混合污染暴露下,总体趋势为随着污染物质量浓度的升高排氨率先降低后升高再降低,各质量浓度组中排氨率均低于对照组。在质量浓度为 $1/10 LC_{50}$ 时,BPA 的排氨率接近对照组水平,与对照组无显著差异($P > 0.05$),NP 单一胁迫和混合物胁迫则显著低于对照组($P < 0.05$);在质量浓度为 $1/8 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫和混合物胁迫的排氨率均极显著低于对照组($P < 0.01$);在质量浓度为 $1/4 LC_{50}$ 时,BPA、NP 单一胁迫和混合物胁迫的排氨率均显著低于对照组($P < 0.05$);在质量浓度为 $1/2 LC_{50}$ 时,BPA 单一胁迫和混合物胁迫的排氨率显著低于对照组(P

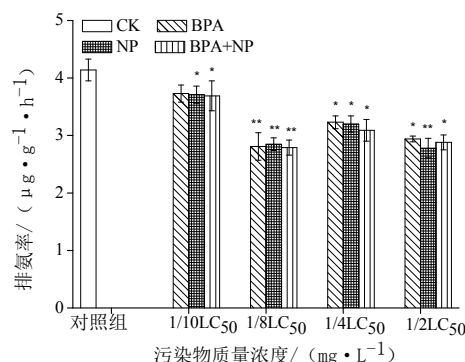


图5 BPA 和 NP 对河蚬排氨率的影响

Fig.5 Effects of BPA and NP on AER of clams

< 0.05), NP 单一胁迫的排氮率极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 BPA、NP 对河蚬的 96 h-LC₅₀

BPA对河蚬的96 h-LC₅₀为6.34 mg·L⁻¹; NP对河蚬的96 h-LC₅₀为1.09 mg·L⁻¹, Pascoe等 (2002)报道了BPA对水螅96 h-LC₅₀为6.9 mg·L⁻¹; 郭匡春和谢平 (2009)报道了BPA对隆线蚤和微型裸腹蚤48 h-LC₅₀分别为11.64、9.63 mg·L⁻¹, NP对隆线蚤和微型裸腹蚤48 h-LC₅₀分别为0.159、0.126 mg·L⁻¹。由此可知受试生物不同, 相同污染物对水生生物的LC₅₀不同; 不同污染物对同种水生生物的LC₅₀也不同, 这是由于不同水生生物对污染物的耐受性不同, 相同水生生物对不同污染物的耐受性不同造成的。

化学物质对生物的毒性作用可根据其96 h-LC₅₀分为4个等级(国家环境保护总局, 2004): LC₅₀<1 mg·L⁻¹为极高; LC₅₀=1~10 mg·L⁻¹为高毒; LC₅₀=10~100 mg·L⁻¹为中毒; LC₅₀>100 mg·L⁻¹为低毒。参照此毒性分级标准, BPA (96 h-LC₅₀为6.34 mg·L⁻¹)和NP (96 h-LC₅₀为1.09 mg·L⁻¹)对河蚬均属于高毒等级。河蚬对BPA和NP的耐受顺序为: BPA > NP。

3.2 BPA、NP对河蚬的联合作用

BPA-NP对河蚬的96 h-LC₅₀联合作用的类型为协同作用。在质量浓度均为一定比例的BPA、NP和二者混合物的96 h-LC₅₀条件下, 河蚬呼吸代谢能力差异不明显, 但其抗氧化酶活性已有显著区别。BPA、NP单一暴露的情况下, 河蚬的SOD和CAT活性与对照组相比略有不同, 但是差异并不十分明显。而一旦在两种污染物联合暴露下, 会极其显著地抑制河蚬抗氧化酶活性。说明两种污染物的协同作用最先表现在对机体抗氧化酶系统的破坏, 进而影响生物体的呼吸代谢能力。

3.3 BPA、NP及二者混合物对河蚬抗氧化酶和呼吸代谢能力的影响

在污染物胁迫下, 生物体内会产生大量活性氧等自由基, 若不及时清除, 会破坏生物体内的活性氧平衡, 从而对生物体造成氧化损伤, 进而影响生物体呼吸代谢能力。SOD和CAT作为生物体抗氧化应激的第一道防线, 通常会共同起作用, 用以清除生物体内因污染胁迫产生的自由基。SOD酶是一类以O²⁻为底物的金属酶, 是抗氧化防御系统酶中最先起作用的一环, 能够催化生物体内超氧阴离子自由基(O²⁻)发生歧化反应: $2O^{2-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$, 使自由基分解成小分子产物, 从而抑制了O²⁻向活性最高的自由基·OH的转化(KEHRER, 2000), 而CAT酶作为过氧化物酶中的代表酶, 可以将SOD酶

的分解产物H₂O₂继续分解成对机体无害的产物H₂O和O₂: $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$, 从而起到保护机体免受外界氧化损伤的作用。

早有研究报道, 生物体内呼吸代谢和抗氧化成分等会因污染胁迫的存在而改变(Cheung 和 Cheung, 1995; Rodriguez-Ariza 等, 1993)。前人曾经做过 BPA、NP 短期暴露影响水生生物呼吸代谢和酶学指标的研究。为研究 BPA 对生物抗氧化还原系统的影响, 意大利的研究者 Canesi 等 (2007)研究了注射 BPA (3~60 ng/g dw tissue) 24 h 之后, 海产双壳贝类 *Mytilus galloprovincialis* Lam. 的氧化还原状况的变化时发现, BPA 改变了包括 CAT 酶、GST 酶的活性以及总谷胱甘肽的含量。Li Mei-Hui 研究了包括壬基酚在内的 8 种离子和非离子表面活性剂对一种淡水涡虫的急性毒性及 CAT 酶、SOD 酶以及胆碱酯酶活性的影响, 结果显示, 0.5 mg·L⁻¹ 的壬基酚使 SOD 酶及胆碱酯酶的活性受到抑制(Li, 2008)。本研究结果发现, 在本试验的质量浓度范围内, BPA、NP 及二者混合物均可对河蚬抗氧化酶及呼吸代谢能力产生一定的抑制作用, 这与前人的研究结果较为一致。

本试验的质量浓度范围内, 在 BPA、NP 单一暴露及联合暴露下, 河蚬耗氧率和排氮率、SOD 和 CAT 活性均呈现出先下降后上升再下降的趋势, 其中在 BPA、NP 和二者混合物的质量浓度较低时, 河蚬的耗氧率和排氮率、SOD 和 CAT 活性只有微小降低, 随着质量浓度的升高, 河蚬耗氧率和排氮率、两个酶活性相对均有所升高, 而在质量浓度极高时其耗氧率和排氮率以及两个酶活性才又受到显著性或极显著性的抑制, 这可能是由于在较低的质量浓度暴露下, 活性氧等自由基, 包括氧自由基(O²⁻)、氢过氧自由基(HO₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(OH·)等在体内不断积累, 导致细胞受到一定程度的氧化损伤, 而此时机体内抗氧化酶防御系统等功能尚未被激活, 从而导致机体酶活性降低, 而自由基积累, 加剧了膜脂过氧化, 使膜的结构和功能遭到破坏, 因而引起一系列生理生化代谢紊乱, 机体生理代谢功能降低(Cheung 和 Cheung, 1995), 表现为河蚬耗氧率和排氮率的降低; 当污染物的质量浓度逐渐升高时, 体内抗氧化作用的酶防御系统(如 SOD 酶和 CAT 酶)通过细胞应激作用产生大量的酶蛋白, 从而使得体内相关酶活性有所升高, SOD 酶和 CAT 酶活力的提高可以清除代谢中产生的 H₂O₂, 使生物体不受到较大的氧化损伤, 呼吸排泄能力亦有所增强; 但当污染物的质量浓度再次升高并达到一定阈值时, 推测由于机体所含有的自由基已远远高于酶系统的清除能力, 导致体内自

由基不断积累,细胞受到更为严重的损伤,与此同时机体抗氧化作用的酶防御系统也濒于崩溃,表现为机体相关酶活性的降低,生理代谢功能下降。

4 结论

1) BPA 和 NP 对河蚬属于高等毒性的物质,且 NP 对河蚬的毒性高于 BPA。

2) BPA和NP共存时,对河蚬联合作用为毒性增加的协同作用。

3) 实验研究了在BPA、NP单一暴露及联合暴露下,河蚬抗氧化酶活性和呼吸代谢能力的变化规律,探讨了以抗氧化酶和耗氧率、排氮率作为污染监测指标的可能性。结果表明,在BPA和NP的单一作用及二者联合作用下,SOD、CAT活性和耗氧率、排氮率均表现出相似的变化趋势,具有较好的一致性和规律性,而且对BPA和NP的反应都比较敏感。因此,可以联合河蚬呼吸和排泄过程中的耗氧率和排氮率以及两种酶活性变化作为BPA和NP单一污染及联合污染的一项早期监测指标,用来反映水体中BPA和NP的污染状况。

参考文献：

- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- CANESI L, BORGHINI C, CIACCI C, et al. Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007, 276(1): 36-44.
- CHEUNG S G, CHEUNG R Y H. Effects of heavy metals on oxygen consumption and ammonia excretion in green-lipped mussels (*Perna viridis*) [J]. Marine Pollution Bulletin, 1995, 31(4): 381-386.
- HASSELBERG L, MEIER S, SVARDAL A. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. Aquatic Toxicology, 2004, 69(1): 95-105.
- KEHRER J P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity[J]. Toxicology, 2000, 149(1): 43-50.
- LAGAN A, BACALONI A, LEVA I De, et al. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 501(1): 79-88.
- LI M H. Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian[J]. Chemosphere, 2008, 70(10): 1796-1803.
- MARIE V, BAUDRIMONT M, BOUDOU A. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient[J]. Chemosphere, 2006, 65(4): 609-617.
- NASU M, GOTO M, KATO H, et al. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants[J]. Water Science and Technology, 2001, 43(2): 101-108.
- PASCOE D, CARROLL K, KAMTANUT W, et al. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 43(1): 56-63.
- RODRIGUEZ-ARIZA A, PEINADO J, PUEYO C, et al. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1993, 50(12): 2568-2573.
- SEGNER H, NAVAS J M, SCHAFERS C, et al. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 54(3): 315-322.
- VANDENBERG L N, HAUSER R, MARCUS M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. Reproductive Toxicology, 2007, 24(2): 139-177.
- VIDAL M L, BASSERES A, NARBONNE J F. Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea* [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2001, 9(3): 87-97.
- WANG J H, LIU H X, XU T. The role of superoxide dismutase (SOD) in stress physiology and senescence physiology of plant [J]. Plant Physiology Communications, 1989, 1.
- WAY C M, HORNBAUGH D J, MILLER-WAY C A, et al. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) [J]. Canadian Journal of Zoology, 1990, 68(1): 115-120.
- ZHANG Y Z, SONG X F, KONDOH A, et al. Behavior, mass inventories and modeling evaluation of xenobiotic endocrine-disrupting chemicals along an urban receiving wastewater river in Henan Province, China[J]. Water Research, 2011, 45(1): 292-302.
- 郭匡春, 谢平. 双酚 A 和壬基酚对隆线蚤和微型裸腹蚤的毒性[J]. 水生生物学报, 2009, 33(3): 492-497.
- 国家环境保护总局. HJ/T 154-2004 新化学物质危害评估导则[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 12.
- 刘其根, 沈和定, 周洪琪, 等. 河蚬的耗氧率和排氮率[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(4): 298-303.
- 牛海岗, 王宏元, 张育辉. 双酚 A 对中国林蛙蝌蚪生长发育的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 408-414.
- 徐镜波, 袁晓凡. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73-76.
- 庄惠生, 杨光. 双酚 A 对鲤鱼急性和亚急性毒性的研究[J]. 环境化学, 2005, 24(6): 682-684.
- 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌. 一种 SOD 的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4(4): 71-73.

Effects of BPA and NP on respiratory metabolism and antioxidant enzymes in *Asian clam*

ZENG Lixuan, ZHANG Yuejun, KANG Yuan, ZHANG Qiuyun

Key Laboratory of Theoretical Chemistry of Environment, Ministry of Education, School of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

Abstract: In the present study, the effect of BPA and NP on respiratory metabolism and antioxidant enzymes in Asian clam (*Corbicula fluminea*) including oxygen consumption rate (OCR), the ammonia excretory rate (AER), and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)) were studied by semi-static method test. The results showed that: ① the 96 h-LC₅₀ of BPA and NP were 6.34 and 1.09 mg·L⁻¹, respectively, and they were both categorized as high toxic substances; ② BPA and NP had a synergistic effect on chronic and acute toxicity; ③ In the range of the experimental concentrations (BPA : 0.63, 0.79, 1.59, 3.17 mg·L⁻¹; NP : 0.109, 0.136, 0.271, 0.542 mg·L⁻¹; BPA+NP : (0.078 2+0.029), (0.097 8+0.036 3), (0.196+0.072 5), (0.391+0.145) mg·L⁻¹), the response of OCR, AER, SOD and CAT to BPA and NP showed a typical pattern. There was only a minor decrease for the OCR, AER, SOD and CAT at low concentrations of BPA, NP and the mixture, and these activities were up-regulated as the concentrations of pollutants were increased, but they were significantly inhibited when the concentration of pollutants were increased up to 1/2 LC₅₀. The present studies indicated that the OCR, AER, SOD and CAT in clams could be considered as an indicator for pEDCs pollution in early stage.

Key words: bisphenol a; nonylphenol; Asian clam (*Corbicula fluminea*); oxygen consumption rate (OCR); ammonia excretory rate (AER); superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT)