

消油剂处理 120#燃料油对海水青鳉(*Oryzias melastigma*)胚胎抗氧化酶活性影响的研究

高翔, 丁光辉, 钱怡婷, 姜玲玲, 熊德琪

(大连海事大学 环境科学与工程学院, 辽宁 大连 116026)

摘要: 以海水青鳉(*Oryzias melastigma*)胚胎为研究对象, 比较了 120#燃料油分散液(water-accommodated fractions, WAFs)与乳化液(biologically enhanced water-accommodated fractions, BE-WAFs)的急性毒性效应, 并研究了不同浓度(40、100、250 mg/L)下 WAFs、BE-WAFs 对胚胎内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性的影响。结果表明: 在受到石油烃的氧化胁迫后, 海水青鳉胚胎内 3 种抗氧化酶活性变化明显。随着石油烃浓度的升高和暴露时间的延长, 3 种酶表现出程度不同的诱导效应和抑制效应。其中受石油烃污染影响最为明显的为 SOD 酶; 而 GST 酶则对消油剂单独暴露表现较为敏感。实验证明, 海水青鳉体内 SOD 酶活性对石油烃污染反应最为敏感, 适合作为监测石油烃污染程度的生物标志物。

关键词: 海水青鳉(*Oryzias melastigma*); 石油烃; 消油剂; 抗氧化酶; 120#燃料油
中图分类号: X55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2016)08-0018-09
doi: 10.11759/hyxx20151224001

近年来, 随着海上石油开采和运输业的发展, 各类溢油事故频发, 石油烃的大量输入使海洋生物和海洋生态系统都受到了前所未有的威胁^[1-2]。石油烃能够通过食物链在生物体内富集, 进入人体后会健康造成持续的负面影响, 危害极大^[3-4]。为了在短时间内将溢油事故的影响降到最低, 海事部门将喷洒消油剂作为处理海上溢油事故的常用应急措施, 以加速油滴分散^[5]。本研究选取的 120#船用燃油为国内常用的船用燃油, 屡次出现在中国近海的溢油事故当中^[6-7]。其在波浪作用下形成的分散液以及与消油剂共同作用形成的乳化液也成为了中国海上溢油的污染源之一。

目前大多数国内外研究表明, 溢油经过消油剂处理后, 水中溶解或分散态的油浓度更高, 从而增加了对生物的暴露毒性^[8-10]。也有一些学者认为溢油分散剂会使石油的生物毒性降低, 如黄逸君等^[11]通过对中国近海常见的 10 种浮游挠足类生物的 72 hLC50 的研究, 得到对海洋挠足类的毒性大小顺序为 WAF>DWAF>消油剂; Hemmer 等^[12]研究发现, 路易斯安那原油在加入溢油分散剂 Corexit 9500A 后, 对糠虾(*Opossum shrimp*)的急性毒性有所降低; Long 和 Holdway^[13]研究得到 Bass 原油 WAF 及使用 Corexit 9527 消油剂后的 DWAF 对章鱼(*Octopus*)鱼卵孵化的

48h 半抑制浓度分别为 0.39×10^{-6} 和 1.83×10^{-6} ; Gulec^[14]在对 Corexit 9527 的研究中发现, 在原油水溶性成分中添加消油剂后, 对生物的半致死浓度大为降低。

抗氧化酶活性的变化可为污染物胁迫下机体的氧化应激反应提供敏感信息。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)三种酶作为水生生物抗氧化酶系统的重要组成部分, 对污染物胁迫十分敏感。因此, 常被作为分子生物标志物广泛用于环境污染的早期预警^[9, 15-16]。而目前国内外学者对海水中石油烃的毒性效应的研究主要集中在浮游植物和成年鱼贝类^[17-23], 对生物胚胎涉及较少。而胚胎处于生物生长发育的初期, 对污染物的响应更加敏感。鉴于此研究现状, 本研究以国内常用的船用 120#燃料油作为受试油品, 选择海洋模式生

收稿日期: 2015-12-24; 修回日期: 2016-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(41276105/D0608); 交通运输部应用基础研究项目(2013329225250); 中央高校基本科研业务费(3132015081)
 [Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.41276105/D0608; Application Basic Research Project of Ministry of Transport, No.2013329225250; Fundamental Research Funds for the central Universities, No.3132015081]

作者简介: 高翔(1988-), 男, 山东潍坊人, 主要从事环境毒理学方面研究, 电话: 18640968956, E-mail: neo880205@163.com; 熊德琪, 通信作者, 博士, 教授, 电话: 0411-84729615, E-mail: xiongdaq@dlmu.edu.cn

物——海水青鳉(*Oryzias melastigma*)胚胎作为受试生物,从生物抗氧化酶入手研究消油剂处理溢油对海洋生物所造成的毒性效应。旨在探讨其生理指标作为生物标志物的可行性,为开展海洋环境的生物监测提供基础实验数据,并为消油剂的优化管理使用以及其海洋生态安全性评估提供依据。

1 实验材料和方法

1.1 受试生物

本实验选择海水青鳉胚胎作为受试生物。实验所用海水青鳉均已于实验室培养数代,性状稳定。实验中海水青鳉胚胎均在正常受精后 2~3 h 内收集。为保证其活性正常,胚胎取得后首先静水培养 48 h,观察并选择活性正常的个体用于实验。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:匀浆仪(美国 PRO200 型)、酶标仪(MDC-SpectraMax M5 型)、恒温磁力搅拌器(GL-3250A 型)、光照培养箱(MGC-400B 型)、万分之一电子分析天平(FA1004 型)、基因研究型纯水仪(FJY2002-UVF-P 型)、数控超声清洗器(KQ5200DE 型)、高速冷冻离心机(Legend Micro 17R)、水浴槽(DK-8D)。

主要试剂:SOD 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);CAT 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);GST 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);红外测油专用四氯化碳(天津光复精细化工研究所)。

1.3 受试溶液的制备

1.3.1 实验所用油品及消油剂

本研究选择 120#船用燃料油(RMD15)作为实验油品,来源于中国船舶燃料有限责任公司。所选消油剂为北京威业源生物科技有限公司生产的微普紧急泄露处理液,符合国家标准要求^[24],是交通部海事局认可的合格消油剂产品。实验所用消油剂由大连市海事局提供。

1.3.2 实验海水

实验海水取自大连市星海湾,经沉淀过滤后用于实验。盐度 31.35,电导率 47.3 ms/cm, pH 8.13。

1.3.3 120#燃料油分散液(WAFs)及乳化液(BE-WAFs)的制备

120#燃料油分散液(简称 WAFs)的制备:将 120#

燃料油与过滤海水按质量体积比 25 g/L 混合,置于下口瓶中封口避光,磁力搅拌器低速搅拌 18 h,控制涡度为 25%~30%(即漩涡高度为总体系高度的 25%~30%)。静置 6 h 后,分离下层水相即为 WAFs 母液。将母液置于 4℃环境中避光保存,实验前稀释至所需浓度。

120#燃料油乳化液(简称为 BE-WAFs)的制备:将 120#燃料油与过滤海水按质量体积比 25 g/L 混合,并向体系中加入质量为油品质量 20%的消油剂,搅拌静置后,分离下层水相即为 BE-WAFs 母液。置于 4℃环境中避光保存,实验前稀释至所需浓度。

1.3.4 WAFs 及 BE-WAFs 中总石油烃(total petroleum hydrocarbon, 简称 TPH)的测定

本实验参照 HJ 637-2012 所介绍的红外分光光度法测定母液中的总石油烃浓度^[25]: 1)用 CCl₄ 萃取水体中的石油烃; 2)将萃取液通过活化的硅酸镁进行吸附脱除动植物油类; 3)将所得萃取液转移至比色皿,置于红外测油仪中,以 CCl₄ 作参比溶液,于 2930、2960、3030 cm⁻¹ 处测量其吸光度 A_{2930} 、 A_{2960} 、 A_{3030} ,计算石油烃浓度。计算公式为:

$$\rho = [X \cdot A_{2930} + Y \cdot A_{2960} + Z(A_{3030} - \frac{A_{2930}}{F})] \cdot \frac{V_0 \cdot D}{V_w}$$

式中, ρ 为溶剂中石油烃浓度; X 、 Y 、 Z 、 F 为校正系数; V_0 、 V_w 分别为萃取溶剂体积和样品体积; D 萃取液稀释倍数。

1.4 暴露实验

按照预实验结果将 120#燃料油 WAFs、BE-WAFs 设置为 3 个浓度水平:每个浓度组共计投放海水青鳉胚胎约 2.0 g,并分为 3 个平行组进行暴露。胚胎置于 6 孔板中,在 28℃±1℃,光暗比为 14 h:10 h 条件下,采用半静态法进行培养,每 24 h 更换一半受试液。暴露时长为 96 h,之后为恢复期。分别于暴露 24、48、96 h 和恢复 24、96 h 后进行取样和测定分析。

1.5 酶含量的测定

将提取的海水青鳉胚胎用预冷的生理盐水清洗,除去杂质。用滤纸吸干水分并称重约 0.1 g,置于 1.5 mL 离心管中,并加入 9 倍质量的 0.86%生理盐水进行稀释。然后用匀浆仪将其冲捣为 10%胚胎匀浆,并在 4℃环境下,以 3000 r/min(约为 644 g)的速度离心 10 min,取上清液,置于 4℃环境中保存。

SOD、CAT、GST 酶活性及蛋白质含量(考马斯亮蓝法)的测定均按照试剂盒方法进行。测定组

织中酶活性时, 所采用单位为: $U \cdot mgprot^{-1}$, 表示每毫克蛋白质中的活力单位。

1.6 数据处理

1.6.1 数据统计分析

数据以平均值±标准差(Means±SD)表示, 并采用 SPSS 17.0 数据分析软件对数据进行单因素方差分析: $P \leq 0.05$ 时认为差异显著; $P \leq 0.01$ 时认为差异极显著。

1.6.2 诱导率及抑制率计算方法

诱导率= $(N_i - N) / N \times 100\%$ 抑制率= $(N - N_s) / N \times 100\%$
 式中, N_i 为受诱导后酶的活性; N_s 为受抑制后酶的活性; N 为对照组酶的活性。

2 实验结果与分析

2.1 WAFs 与 BE-WAFs 各浓度组 TPH 含量

按照实验设计将 WAFs、BE-WAFs 设置为 3 个浓度水平: 40、100、250 mg/L。采用逐级稀释的方式分别将 WAFs、BE-WAFs 母液(油水质量体积比: 25 g/L)稀释至所设置的浓度水平, 并对各组 TPH 含量进行测定。各浓度组 TPH 含量如下表所示。

表 1 WAFs 及 BE-WAFs 各浓度水平 TPH 含量
 Tab. 1 TPH concentrations of WAFs and BE-WAFs

油水质量体积比(mg/L)	WAFs(mg/L)	BE-WAFs(mg/L)
40	0.235±0.033	0.323±0.063
100	0.489±0.107	0.621±0.190
250	1.174±0.175	1.598±0.221

2.2 WAFs 与 BE-WAFs 对海水青鳞胚胎 SOD 酶活性的影响

不同浓度的 WAFs 对海水青鳞胚胎的 SOD 酶活性的影响结果如图 1-A 所示。由图可知: 整个实验周期中海水对照组的 SOD 酶活性基本不变。WAFs 中的 40、100 mg/L 浓度组在暴露 24 h 后 SOD 活性即开始增大, 并同时在 96 h 达到最大值, 且 100 mg/L 浓度组 SOD 活性在暴露阶段始终较其他两组更高, 其峰值为海水空白组的 194.85%, 停止暴露 24 h 后, 100、40 mg/L 浓度组的 SOD 活性均恢复到正常水平; 对 250 mg/L 浓度组而言, 酶活性变化幅度明显小于其他两组, 在暴露 48 h 之后, 酶活性达到最大值, 并在 96 h 时有所下降, 经过恢复期恢复到正常水平。由实验结果可知: 3 组浓度组 SOD 酶活性随时间的变化基本上都遵循先升高后降低的规律, 时间-效应变

化比较明显。其中, 250 mg/L 浓度组的峰值出现时间较其他浓度组更早。在恢复阶段, 3 组 SOD 活性均恢复到空白组水平。

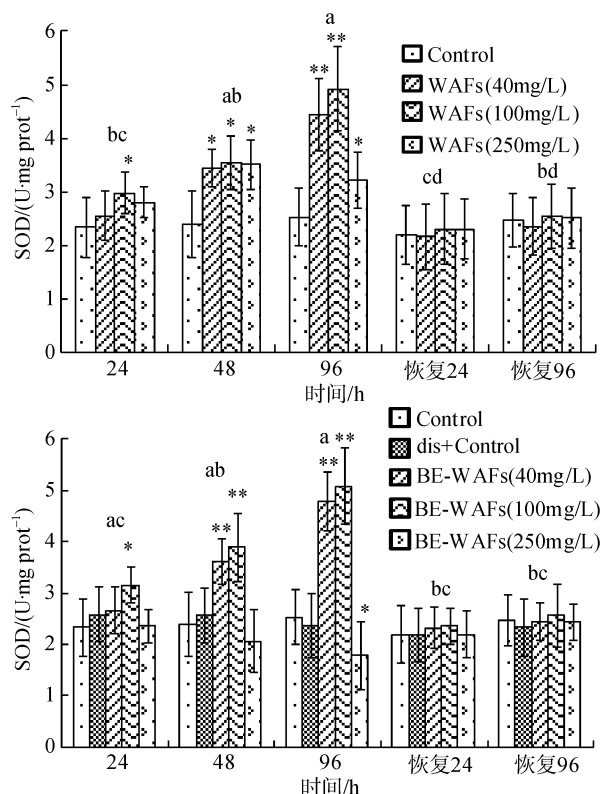


图 1 120#燃料油 WAFs、BE-WAFs 影响海水青鳞胚胎 SOD 活性的时间-效应曲线

Fig. 1 Effect of WAFs and BE-WAFs on SOD activity in *Oryzias melastigma* embryos

注: 图中数据为平均值±标准误差($n=9$), SOD 活力单位为 $U \cdot mgprot^{-1}$; “*”表示对该组数据和相应对照组数据进行单因素方差分析结果表明差异显著($P \leq 0.05$), “***”表明差异极显著($P \leq 0.01$); 图中字母表示各时间点之间的组间差异显著性, 下同。

Note: Error bar: mean ± SD ($n = 9$); unit of SOD: $U \cdot mgprot^{-1}$; “*”: significant differences between this treatment group and its control group in one-way analysis of variance ($P \leq 0.05$); “***”: extremely significant differences between this treatment group and its control group in one-way analysis of variance ($P \leq 0.01$); letters in the figure indicate difference between the treatment groups with different durations of exposure.

BE-WAFs 对海水青鳞胚胎 SOD 酶活性的影响结果如图 1-B 所示。在整个实验过程中, 海水空白组与消油剂空白组 SOD 酶活性水平基本一致。在暴露阶段, 40、100 mg/L 浓度组 SOD 酶活性变化趋势基本一致, 在暴露 24 h 至 96 h 酶活性呈现线性上升, 并于 96 h 达到峰值, 分别为海水空白组的 189.2% 和 201.03%, 在结束暴露后迅速回落; BE-WAFs 中 250 mg/L 浓度组 SOD 酶活性在暴露 24 ~ 96 h 阶段酶活性呈现降低

趋势, 经过恢复期后逐渐恢复到正常水平。由实验结果可知: 在暴露阶段, 40、100 mg/L 浓度组的 SOD 酶活性受到诱导, 且上升幅度与暴露时间呈线性关系, 组间差异较大, 时间-效应比较明显; 250 mg/L 浓度组的 SOD 酶活性则在暴露阶段一直呈现下降趋势。经过恢复期, 各浓度组 SOD 酶活性与空白组基本一致。

通过 WAFs 与 BE-WAFs 中 SOD 酶活性的比较, 可以看到: 消油剂空白组中 SOD 酶活性波动并不明显, 且活性大小与空白组基本一致; WAFs 与 BE-WAFs 的 40、100 mg/L 浓度组 SOD 酶活性变化规律相似, 且 BE-WAFs 中 SOD 酶活性较 WAFs 偏高; 而 BE-WAFs 的 250 mg/L 浓度组 SOD 酶活性相对于 WAFs 却明显偏低。

2.3 WAFs 与 BE-WAFs 对海水青鳞胚胎 CAT 酶活性的影响

不同浓度的 WAFs 对海水青鳞胚胎的 CAT 酶活性的影响结果如图 2-A 所示。由图可知: 整个实验周期中海水对照组的 CAT 酶活性基本不变。在暴露 24 h 后, 各浓度组的 CAT 酶活性基本呈现线性上升的趋势, 并在 96 h 时达到峰值, 诱导率分别为 33.38%、48.02%、22.44%; 在停止暴露 24 h 后酶活性下降到空白组水平, 之后略有上升并趋于一致。由实验结果可知: 在 WAFs 3 个浓度组中, 海水青鳞胚胎的 CAT 酶活性均出现先升高后降低的趋势, 尤其以 40、100 mg/L 浓度组的时间-效应关系更加明显。当恢复 96 h 后完成恢复实验时, 3 组浓度的 CAT 酶活性基本趋于一致。

不同浓度的 BE-WAFs 对海水青鳞胚胎的 CAT 酶活性的影响结果如图 2-B 所示。在实验过程中, 消油剂空白组 CAT 酶活性水平基本与海水空白组保持一致。在暴露阶段, 40、100 mg/L 浓度组中 CAT 的酶活性均随着暴露时间的延长而升高, 上升幅度十分明显且与其余组别差异较大, 其峰值分别达到了海水空白组的 158.07%和 168.49%, 停止暴露后酶活性水平开始回落并最终恢复到正常水平; 250 mg/L 浓度组 CAT 酶活性暴露后上升幅度较小, 在 48 h 即达到峰值, 其诱导率为 14.46 %, 并在暴露 96 h 出现酶活抑制现象; 在恢复阶段逐渐回升并与空白组趋于一致。由实验结果可知: 40、100 mg/L 浓度组的 CAT 酶活性随时间的变化基本上遵循先升高后回落的规律, 时间-效应比较明显; 250 mg/L 浓度组在暴露初期呈现上升趋势, 峰值出现时间早于其他浓度组, 并在暴露后期出现酶活抑制现象。当完成恢复实

验时, 3 组的 CAT 酶活性已趋于一致, 并与海水空白组相持平。

通过对比 WAFs 与 BE-WAFs 中 CAT 酶活性水平, 可以知道: 在暴露初期, BE-WAFs 浓度组中, 40、100 mg/L 浓度组的海水青鳞胚胎的 CAT 酶活性均高于 WAF 中的对应浓度组, 并随着暴露时间的延长, 差异逐渐明显; 暴露阶段消油剂的添加使得 250 mg/L 浓度组 CAT 酶活性在暴露后期出现下降趋势, 这可能由于其中的石油烃含量过高且作用时间过长从而导致胚胎产生中毒反应。

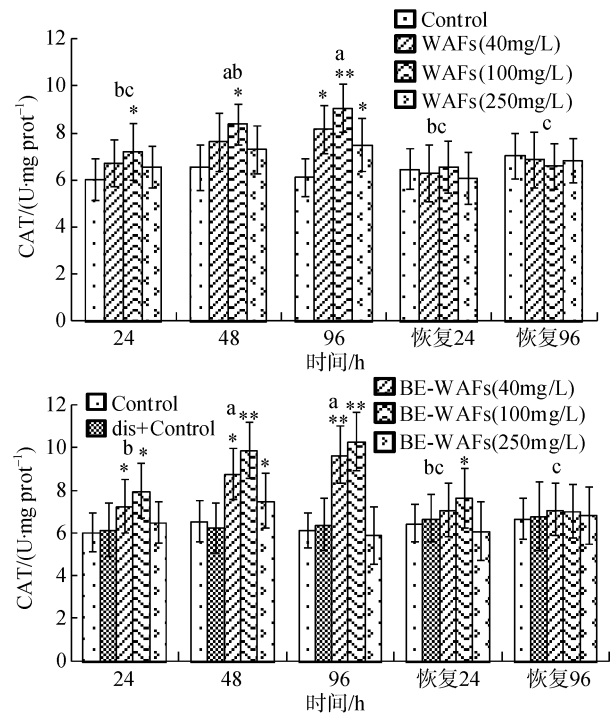


图 2 120#燃料油 WAFs、BE-WAFs 影响海水青鳞胚胎 CAT 活性的时间-效应曲线

Fig. 2 Effect of WAFs and BE-WAFs on CAT activity in *Oryzias melastigma* embryos

2.4 WAFs 与 BE-WAFs 对海水青鳞胚胎 GST 酶活性的影响

不同浓度的 WAFs 对海水青鳞胚胎的 GST 酶活性的影响结果如图 3-A 所示。由图可知: 实验中海水空白组的 GST 酶活性基本不变。在暴露 24 h 后, 各浓度组 GST 酶活性变化不大, 直到 48 h 后才出现较为明显的升高, 并同时于暴露 96 h 时达到峰值。在暴露阶段, 100 mg/L 浓度组酶活性始终较 40、250 mg/L 浓度组更高。停止暴露 24 h 后, 各浓度组的 GST 活性明显下降, 且略低于海水空白组水平, 恢复期后

各浓度组酶活性恢复正常水平。由实验结果可知：WAFs 各浓度组中 GST 酶活性随着暴露时间的延长，呈现先增高后降低的趋势，时间-效应关系较明显，其中尤以 100 mg/L 浓度组最为显著；当恢复 96 h 完成恢复实验时，实验组 GST 酶活性已恢复到空白组水平。

BE-WAFs 对海水青鳞胚胎的 GST 酶活性的影响结果分析如图 3-B 所示。在实验过程中，空白组 GST 酶活性基本保持不变，而消油剂空白组在暴露期出现升高趋势，96 h 时诱导率达到 17.92 %。暴露阶段 BE-WAFs 的 40、100 mg/L 浓度组呈现相同的趋势，其 GST 活性均较空白组偏高并随着时间的延长愈加显著，其中以 100 mg/L 浓度组诱导率更高，96 h 时已达到 44.4 %；而 250 mg/L 浓度组则出现先诱导后抑制的现象。在结束暴露后，3 个浓度组的酶活性均恢复到正常水平。由实验结果可知；BE-WAFs 中 40、100 mg/L 浓度组海水青鳞胚胎中 GST 酶活性随着实验时间的延长，均呈现先增高后降低的趋势，时间-效应关系明显；250 mg/L 浓度组则出现先升后降的规律，但是酶活性波动幅度有限。当完成恢复实验时，各组 GST 酶活性趋于正常。

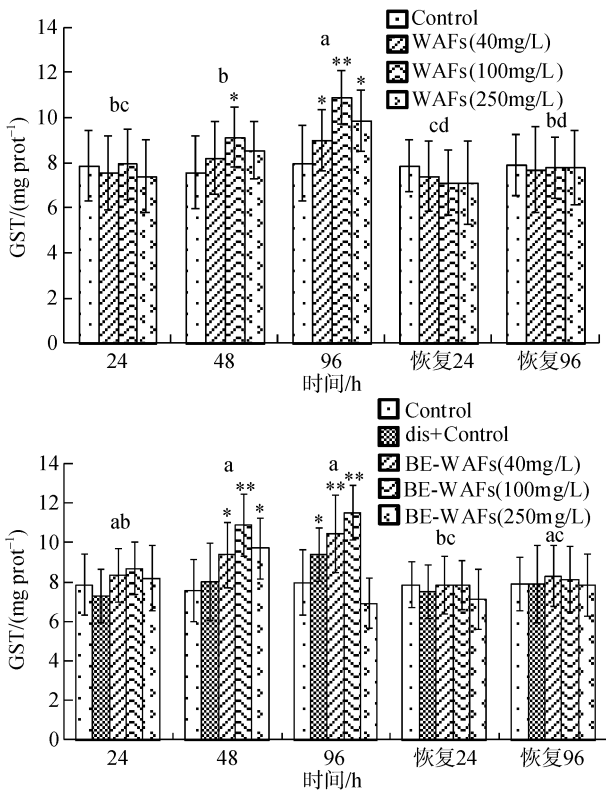


图 3 120#燃料油 WAFs、BE-WAFs 影响海水青鳞胚胎 GST 活性的时间-效应曲线
Fig. 3 Effect of WAFs and BE-WAFs on GST activity in *Oryzias melastigma* embryos

将 WAFs 与 BE-WAFs 中 GST 酶活性水平进行对比，可以发现：在暴露初期相较于 WAFs，BE-WAFs 的 40、100 mg/L 浓度组 GST 酶活性受诱导更加显著，并随着时间的延长，差别愈加明显；BE-WAFs 中 250 mg/L 浓度组 GST 在暴露前期受到诱导，活性明显高于 WAFs 组，而后于暴露 96 h 时受到抑制，低于空白组水平，这可能与高浓度石油烃长时间暴露，毒性影响超出生物耐受阈值有关。

2.5 120#燃料油 WAFs、CE-WAFs 暴露下酶活性变化规律比较

为了直观地对比不同浓度下 120#燃料油 WAFs、CE-WAFs 暴露对 SOD、CAT、GST3 种酶活性影响，将暴露期间胚胎内各种酶活性变化情况列于表中，由表 2 可见：

(1) 当海水青鳞胚胎暴露于 WAFs 后，体内 SOD、CAT、GST 酶活性发生明显变化：暴露初期，3 种抗氧化酶活性受到石油烃诱导而明显上升。这主要是由于海水青鳞胚胎在受到较低浓度石油烃产生的氧化胁迫后，体内活性氧含量增加，使机体处于氧化应激状态，从而产生适应性诱导反应^[26]。这是生物体应对外源污染物引起氧化压力的一种自我保护调节机制^[27]。在对鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、鲷鱼(*Liza aurata*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)、翡翠贻贝(*Perna viridis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和毛蚶(*Scapharca subcrenata*)的研究中曾经得出相似的结论^[28-33]。

(2) 在 BE-WAFs 的暴露试验中，水体中石油烃含量上升使得诱导效应更加显著(表现为峰值升高、峰值出现时间提前)。暴露前期 3 种酶活性呈现上升趋势，且诱导率随石油烃浓度升高而增大。随着暴露时间延长，在 BE-WAFs 中 250 mg/L 浓度组 3 种抗氧化酶的活性均出现了不同程度的下降。这是由于当石油烃持续作用产生的氧化胁迫超出了机体适应性反应的抵御能力时，会使生物体产生中毒反应，进而抑制抗氧化酶的合成，导致酶活性降低。吕福荣等^[34]研究消油剂处理 0#柴油对马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)的毒性效应，赵元凤、沈鑫绿等^[35-36]分别研究石油烃污染对毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)抗氧化酶活性的影响，Cheung 等^[37]研究苯并[a]芘暴露对翡翠贻贝(*Perna viridis*)的抗氧化系统的影响，Richardson 等^[38]研究多环芳烃暴露下的贻贝(*Perna viridis*)体内抗氧化酶的变化，都得到了相似的结论。

表 2 WAFs、BE-WAFs 对酶活性影响的比较
Tab. 2 Effects of WAFs and BE-WAFs on three enzymes

酶	浓度 (mg/L)	最大诱导量出现时间(h)		最大诱导率(%)		抑制出现时间(h)		最大抑制率(%)	
		WAFs	BE-WAFs	WAFs	BE-WAFs	WAFs	BE-WAFs	WAFs	BE-WAFs
SOD	40	96	96	75.36	89.2	—	—	—	—
	100	96	96	94.85	101.03	—	—	—	—
	250	96	24	46.86	0.99	—	48	—	29.72
CAT	40	96	96	33.38	58.07	—	—	—	—
	100	96	96	48.02	68.49	—	—	—	—
	250	96	48	22.44	14.46	—	96	—	3.8
GST	40	96	96	12.64	30.87	24	—	4.08	—
	100	96	96	36.67	44.4	—	—	—	—
	250	96	48	24	28.21	24	96	5.72	13.17

(3) 在实验过程中, 3 种酶表现出的诱导或抑制程度均不相同。其中以对 SOD 酶的诱导最为明显, 其次为 CAT 酶, 而对 GST 酶的诱导则出现一定的滞后性, 诱导程度也最小; 从抑制率来看, 在加入消油剂后, 250 mg/L 浓度组的 3 种酶均出现酶活抑制现象, 其中以 SOD 酶活性出现抑制的时间最早, 抑制率最大, GST 酶次之, CAT 酶受到的抑制最小。由此可见: 3 种抗氧化酶中 SOD 酶对石油烃暴露最为敏感, 也最适合作为监测石油烃污染的指标。王晓艳、蒋凤华等^[39-40]的研究结果也分别验证了这一结论。

(4) 在消油剂单独暴露的实验中发现: GST 相较于 SOD、CAT 表现出更大的敏感性, 在暴露阶段持续受到诱导, 活性呈现线性上升趋势; 而在对 SOD、CAT 的消油剂单独暴露实验中, 没有出现这一现象。这可能是由于消油剂空白组中含有的石油烃降解微生物导致的。研究表明: 谷胱甘肽转移酶(GST)在 PAHs 降解菌中起着重要的作用, Lloyd 等人^[41-42]已经将 GST 酶作为分子探针用于鉴别 PAHs 降解菌的存在。

3 结论

本文研究了 120#号燃料油 WAFs、BE-WAFs 对海水青鳞胚胎中 SOD、CAT、GST3 种抗氧化酶活性的影响, 得到如下结论:

(1) 机体中的抗氧化酶既可以在石油烃暴露下产生适应性诱导使活性上升, 也可以受毒性抑制导致活性下降; 石油烃浓度越高, 产生的诱导或抑制效应越强。

(2) BE-WAFs 中抗氧化酶活性的诱导或抑制效应均高于对应浓度的 WAFs。说明消油剂的添加使得石油烃污染对海水青鳞胚胎的氧化胁迫进一步增强。

(3) 石油烃暴露后, 3 种抗氧化酶活性变化的剂量-效应和时间-效应关系显著。尤其以 SOD 表现最为敏感, 适合作为监测石油烃污染的生物标志物。

(4) GST 酶在消油剂单独暴露中出现一定程度的活性变化, 表现较为敏感。表明 GST 酶对于该生物型消油剂的污染监测具有一定价值。

参考文献:

- [1] Ko Jae-Young, Day John W. A review of ecological impacts of oil and gas development on coastal ecosystems in the Mississippi Delta[J]. *Ocean & Coastal Management*, 2004, 47(11-12): 597-623.
- [2] 田立杰, 张瑞安. 海洋油污染对海洋生态环境的影响[J]. *海洋湖沼通报*, 1999, 23(2): 15-19.
Tian Lijie, Zhang Ruian. The effect of offshore oil pollution marine ecological environment[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1999, 23(2): 15-19.
- [3] Lee Jeongae, Kim Min-hwa, Ha Mina, et al. Urinary metabolic profiling of volatile organic compounds in acute exposed volunteers after an oil spill in Republic of Korea[J]. *Biomedical Chromatography*, 2010, 24(5): 562-568.
- [4] Pérez-Cadahía B, Lafuente A, Cabaleiro T, et al. Initial study on the effects of Prestige oil on human health[J]. *Environment International*, 2007, 33(2): 176-185.
- [5] 溥文虹, 周季鑫, 杨帆, 等. 海上溢油防治技术研究进展[J]. *海洋科学*, 2005, 29(6): 73-76.
Pu Wenhong, Zhou Lixin, Yang Fan, et al. Progress in oil spill recovery technology[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(6): 73-76.
- [6] 尹晓楠. 基于三维荧光光谱和小波分析的油品种类识别技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Yin Xiaonan. Studies on the identification of oil types base on 3D fluorescence spectroscopy and wavelet analysis[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.

- [7] 吴运吾. 我国船用燃料油市场分析[J]. 当代石油石化, 2011(10): 36-41.
Wu Yunwu. The analysis of China's marine fuel oil market[J]. Petroleum & Petrochemical Today, 2011(10): 36-41.
- [8] Adeyemo O K, Kroll K J, Denslow N D. Developmental abnormalities and differential expression of genes induced in oil and dispersant exposed *Menidia beryllina* embryos[J]. Aquatic toxicology, 2015, 168: 60-71.
- [9] Hannam M L, Bamber S D, Galloway T S, et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*[J]. Chemosphere, 2010, 78(7): 779-784.
- [10] Nahrgang J, Camus L, Gonzalez P, et al. PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene[J]. Aquatic Toxicology, 2009, 94(4): 309-319.
- [11] 黄逸君, 陈全震, 曾江宁, 等. 原油和消油剂对海洋桡足类的急毒性效应[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(4): 566-571.
Hang Yijun, Chen Quanzhen, Zeng Jingning, et al. Acute toxicity of crude oil and dispersant to marine copepods[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2010, 16(4): 566-571.
- [12] Hemmer M J, Barron M G, Richard M, et al. Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(10): 2244-2252.
- [13] Long S M, Holdway D A. Acute toxicity of crude and dispersed oil to *Octopus pallidus* (Hoyle, 1885) hatchlings[J]. Water Research, 2002, 36(11): 2769-2776.
- [14] Gulec I, Leonard B, Holdway D A. Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails [J]. Spill Science & Technology Bulletin, 1997, 4(1): 1-6.
- [15] Luqing P, Jiayun R, Jing L. Effects of benzo (k) fluoranthene exposure on the biomarkers of scallop *Chlamys farreri*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2005, 141(3): 248-256.
- [16] Oliveira M, Pacheco M, Santos M A. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene[J]. Science of the Total Environment, 2008, 396(1): 70-78.
- [17] 袁萍, 吕振波, 周革非. 石油烃胁迫下 3 种微藻的生长动力学研究[J]. 海洋科学, 2014, 38(10): 46-51.
Yuan Ping, Lü Zhenbo, Zhou Gefei. Growth kinetics of 3 species of microalgae treated with petroleum hydrocarbon[J]. Marine Sciences, 2014, 38(10): 46-51.
- [18] 刘凤娇, 李顺兴, 郑凤, 等. 近海污染物对海洋浮游植物生长及生化组成影响的比较研究[J]. 海洋科学, 2014, 38(5): 66-71.
Liu Fengjiao, Li Shunxing, Zheng Feng, et al. Comparison of the effects of coastal pollutants on the growth and biochemical composition of marine phytoplankton[J]. Marine Sciences, 2014, 38(5): 66-71.
- [19] Martínez-Gómez C, Fernández B, Valdés J, et al. Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the Prestige oil spill (N Spain)[J]. Chemosphere, 2009, 74(5): 613-620.
- [20] Thomas R E, Lindeberg M, Harris P M, et al. Induction of DNA strand breaks in the mussel (*Mytilus trossulus*) and clam (*Protothaca staminea*) following chronic field exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from the Exxon Valdez spill[J]. Marine Pollution Bulletin, 2007, 54(6): 726-732.
- [21] Frantzen M, Regoli F, Ambrose W G, et al. Biological effects of mechanically and chemically dispersed oil on the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 127: 95-107.
- [22] Martinović R, Kolarević S, Kračun-Kolarević M, et al. Genotoxic potential and heart rate disorders in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to Superdispersant-25 and dispersed diesel oil[J]. Marine Environmental Research, 2015, 108: 83-90.
- [23] Tissier F, Dussauze M, Lefloch N, et al. Effect of dispersed crude oil on cardiac function in seabass *Dicentrarchus labrax*[J]. Chemosphere, 2015, 134: 192-198.
- [24] 国家质量技术监督局. GB 18188.1-2000—溢油分散剂技术条件[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
The State Bureau of Quality and Technical Supervision. GB 18188.1-2000—Oil Spill Dispersant technical condition[S]. Beijing: Standards Press of China, 2000.
- [25] 国家环境保护部. HJ637-2012—水质 石油类和动植物油类的测定 红外分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
The Ministry of Environmental Protection. HJ637-2012—The measure of water quality, petroleum, animal and vegetable oil Infrared spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012.
- [26] Livingstone D R, Garcia M P, Michel X, et al. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs[J]. Functional Ecology, 1990, 4(3): 415-424.
- [27] Matthieu D, Morgane D, Stephane L F, et al. Innate immunity and antioxidant systems in different tissues of seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to crude oil dispersed mechanically or chemically with Corexit 9500[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 120(6): 270-278.

- [28] Milinkovitch T, Imbert N, Sanchez W, et al. Toxicological effects of crude oil and oil dispersant: Biomarkers in the heart of the juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 88(2): 1-8.
- [29] 许贻斌, 郑惠东, 陈宇, 等. 石油烃分散液对华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)的急性毒性影响[J]. *福建水产*, 2014, 36(6): 446-452.
Xu Yibin, Zheng Huidong, Chen Yufeng, et al. Acute toxic effects of petroleum hydrocarbon water-accommodated fractions on *Chlamys nobilis*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2014, 36(6): 446-452.
- [30] 杨涛, 陈海刚, 蔡文贵, 等. 翡翠贻贝内脏团抗氧化酶活性及脂质过氧化物含量对苯并(b)荧蒽胁迫的生物响应研究[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(5): 539-545.
Yang Tao, Chen Haigang, Cai Wengui, et al. Response of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation levels in visceral mass of green-lipped mussel (*Perna viridis*) to Benzo[b] fluoranthene stress[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(5): 539-545.
- [31] 蔡立哲, 马丽, 高阳, 等. 蒽、菲、芘、蒎混合液对菲律宾蛤仔抗氧化酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2005, 29(8): 47-52.
Cai Lizhe, Ma Li, Gao Yang, et al. The effects of anthracene, Phenanthrene, Pyrene and Chrysene on activity of antioxidant enzyme of *Ruditapes philippinarum*[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(8): 47-52.
- [32] 陈建华, 阎斌伦, 高焕, 等. Cd²⁺、Cu²⁺及石油烃对毛蚶谷胱甘肽 S-转移酶活性的影响[J]. *水产科学*, 2012, 31(3): 137-142.
Chen Jianhua, Yan Binlun, Gao Huan, et al. Influences of Cadmium, Copper and Petroleum Hydrocarbons on Activity of Glutathione S-transferase in Marine Clam (*Scapharca subcrenata*)[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(3): 137-142.
- [33] 吕福荣, 熊德琪. 消油剂对马粪海胆污染效应的影响[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(3): 328-331.
Lü Furong, Xiong Deqi. Effect of dispersant and No. 0 diesel oil pollution on sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*)[J]. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(3): 328-331.
- [34] 赵元凤, 吕景才, 李丹彤, 等. 海洋污染对毛蚶超氧化物歧化酶影响的研究[J]. *海洋学报*, 2003, 25(3): 77-81.
Zhao Yuanfeng, Lü Jingcai, Li Dantong, et al. Effects of marine pollution on the activity of superoxide dismutase in *Scapharca subcrenata*[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(3): 77-81.
- [35] 沈盎绿, 沈新强. 柴油对斑马鱼超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的影响[J]. *海洋渔业*, 2005, 27(4): 314-318.
Shen Anglü, Shen Xinqiang. Effects of diesel fuel on the superoxide dismutase and catalase of zebra fish[J]. *Marine Fisheries*, 2005, 27(4): 314-318.
- [36] Cheung C C C, Siu W H L, Richardson B J, et al. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*[J]. *Environmental Pollution*, 2004, 128(3): 393-403.
- [37] Richardson B J, Mak E, Luca-Abbott S B D, et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses?[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 57 (s 6-12): 503-514.
- [38] 王晓艳, 冯丽娟, 蒋凤华, 等. 原油水溶性成分对栉孔扇贝抗氧化酶活性和丙二醛含量的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2013, 43(7): 45-50.
Wang Xiaoyan, Feng Lijuan, Jiang Fenghua, et al. Effects of Water-Soluble Fraction of Crude Oil on the Activity of Antioxidant Enzyme and Malondialdehyde Content of *Chlamys farreri*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2013, 43(7): 45-50.
- [39] 蒋凤华, 高伟, 赵美丽, 等. 原油污染对栉孔扇贝抗氧化酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2012, 36(7): 28-33.
Jiang Fenghua, Gao Wei, Zhao Meili, et al. Effect of crude oil on the activity of antioxidant enzyme of scallop *Chlamys farreri*[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(7): 28-33.
- [40] Lloyd J G, Pck L. Glutathione S-transferase-encoding gene as a potential probe for environmental bacterial isolates capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1997, 63 (8): 3286-3290.
- [41] Lloyd J G, Laurie A D, Hunter D W F, et al. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 1999, 29(1): 69-79.

Effects of dispersant and #120 fuel oil exposure on antioxidant enzyme activity of *Oryzias melastigma* embryos

GAO Xiang, DING Guang-hui, QIAN Yi-ting, JIANG Ling-ling, XIONG De-qi
(Dalian Maritime University, Dalian 116026, China)

Received: Dec. 24, 2015

Key words: *Oryzias melastigma*; petroleum hydrocarbons; dispersant; antioxidant enzyme; #120 fuel oil

Abstract: In this paper, we consider the acute toxicities of #120 fuel oil water-accommodated fractions (WAFs) and biologically enhanced water-accommodated fractions (BE-WAFs) on *Oryzias melastigma* embryos. Specifically, in our study, we investigated the effects of WAFs and CE-WAFs with different concentrations on the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST). The results show that the activities of SOD, CAT, and GST vary significantly after experiencing oxidative stress from petroleum hydrocarbons. With increasing the TPH concentration and duration of exposure, the activities of SOD, CAT, and GST showed various degrees of inductive and inhibitory effects. Of the three enzymes, the activity of SOD varied most significantly when exposed to petroleum hydrocarbons. GST also showed sensitivity when exposed to a dispersant alone. These study results indicate that the SOD in *O. melastigma* has the highest sensitivity to pollution from petroleum hydrocarbons and is suitable for use as a biomarker for monitoring marine oil pollution.

(本文编辑: 康亦兼)