

# 芘对蚯蚓的生物有效性和抗氧化酶的影响\*

马丽丽 李伟明 胡 锋 李辉信<sup>†</sup>

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

**摘 要** 以室内模拟试验研究了芘在土壤中的老化行为及其在蚯蚓体内的生物富集规律, 及芘胁迫下蚯蚓体内抗氧化酶的变化规律。试验结果表明, 芘的可提取态含量随其老化时间延长而呈现先快后慢的下降趋势。在不同浓度的芘污染土壤中, 蚯蚓的生长抑制率在前 60 d 均大于对照, 150 d 时无显著差异 ( $p < 0.05$ )。蚯蚓体内芘浓度随土壤中芘浓度的增大而增加, 但蚯蚓肠道中芘浓度均高于表皮, 表明蚯蚓主要通过主动吞食土壤颗粒作用富集土壤中的芘而非表皮的被动穿透, 然随着芘的老化, 蚯蚓表皮和肠道中的芘浓度表现出下降规律, 在前 60 d 和 150 d 表现出显著的差异 ( $p < 0.05$ )。蚯蚓体内 SOD 活性随着芘的老化, 污染处理组的促进作用逐渐减弱, 150 d 时与对照相比, 表现出显著抑制 ( $p < 0.05$ )。CAT 活性在 100 mg kg<sup>-1</sup> 浓度的芘污染处理组中, 前 60 d 被显著促进 ( $p < 0.05$ ), 150 d 时无显著差异, 而丙二醛 (MDA) 含量也随芘的老化而逐渐与对照表现出差异, 150 d 时 50 和 100 mg kg<sup>-1</sup> 浓度的芘污染组均表现出显著差异 ( $p < 0.05$ )。

**关键词** 芘; 老化; 蚯蚓; 生物有效性; 抗氧化酶

**中图分类号** S154.38

**文献标识码** A

芘是在土壤环境中普遍存在, 且已被美国环境保护署列入优先控制多环芳烃黑名单中的典型代表物之一<sup>[1]</sup>。蚯蚓是土壤生态系统中重要的动物之一, 约占土壤总生物量的 60%~80%, 故其常作为土壤污染的指示生物<sup>[2]</sup>, 其中, 赤子爱胜蚓是污染物生态毒理评价中使用最为广泛的供试物种。此外, 在逆境条件下, 蚯蚓体内会积累大量的活性氧、过氧化氢和脂质过氧化物。研究表明, 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性高低能反映出蚯蚓体内抗氧化能力的强弱<sup>[3]</sup>, 丙二醛 (MDA) 含量高低可表示膜脂质过氧化程度和对逆境反应的强弱<sup>[4]</sup>。

对于前者, 目前多数研究常通过测定整个蚯蚓体浓度的方式评价土壤中多环芳烃的生物有效性<sup>[5]</sup>, 但对于蚯蚓表皮和肠道污染物浓度等方面缺乏深入研究, 而此项研究能为蚯蚓吸收多环芳烃的途径提供一定的理论依据。对于后者, 目前研究主要集中于通过测定蚯蚓体内的抗氧化酶指标来判断多环芳烃对蚯蚓的危害程度<sup>[6]</sup>, 而关于老化的芘对蚯蚓生态毒理的研究相对薄弱。因此, 本文以芘为供试污染物, 蚯蚓为供试动物, 系统地研究不同老化时间芘在土壤中的老化规律及其在蚯蚓表皮和肠道的富集规律, 以及芘胁迫下蚯蚓体内几种酶

活性的变化规律, 以期能为土壤中多环芳烃的老化行为及蚯蚓吸收多环芳烃的机理提供理论依据, 为老化的多环芳烃污染土壤毒理诊断提供新的手段。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试材料

供试土壤为江苏省南京市的黄棕壤 (0~20 cm)。其理化性质如下: 土壤 pH 6.12 (pH 计测定, 土: 水 = 1: 2.5); 土壤有机碳含量 15.3 g kg<sup>-1</sup> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 氧化法测定); 土壤阳离子交换量 20.6 cmol kg<sup>-1</sup> (醋酸铵法测定); 黏粒含量 65.5 g kg<sup>-1</sup> (沉降法测定)。

供试蚯蚓为赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*)。试验前, 蚯蚓在室温、黑暗条件下于实验室培养箱内培养两周, 期间用牛粪饲养并保持土壤含水量为田间持水量的 70%。两周后, 每条蚯蚓均具有成熟环带, 平均体重为 0.25~0.30 g。

试验所用芘纯度 ≥ 98% (购自 Alfa Aesar 公司), 分子量为 202.3 g mol<sup>-1</sup>, 25℃ 纯水中溶解度为 0.12 mg L<sup>-1</sup>, 辛醇-水分配系数 (logK<sub>ow</sub>) 为 5.18<sup>[7]</sup>。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、甲醇 (色谱纯) 购于南京生兴生物技术有限

\* 国家自然科学基金项目 (41101292)、国家环境保护公益项目 (201009032)、江苏省教育厅的优势学科计划 (PAPD) 资助

<sup>†</sup> 通讯作者, E-mail: huixinli@njau.edu.cn

作者简介: 马丽丽 (1981—), 女, 山西运城人, 博士研究生, 主要从事土壤生态学方面的研究。E-mail: malifeng19830615@126.com

收稿日期: 2012-05-03; 收到修改稿日期: 2012-09-03

公司。其他酶活性的测定试剂为分析纯。

## 1.2 试验设计

**1.2.1 芘的老化试验** 土壤经风干、过 2 mm 筛后,分别称取 100.0 g 装入若干 100 ml 带盖玻璃瓶中,瓶盖内衬有铝箔以防止多环芳烃的吸附。采用<sup>60</sup>Co $\gamma$ -射线辐射灭菌(辐射剂量为 2.5 Mrad)后,于无菌操作台染毒。染毒步骤为:(1)将 2 ml 配制好的芘丙酮储备液逐滴加入各玻璃瓶中,使芘的初始浓度为 0、10、50、100 mg kg<sup>-1</sup>(干土重),待充分摇匀后敞口置于无菌操作台 24 h,使丙酮充分挥发。(2)加入无菌水,调节土壤水分至田间最大持水量的 70%,旋紧瓶盖后用石蜡密封,确保微域的无菌环境。染毒后将玻璃瓶放入(22 ± 1)℃、黑暗避光的培养箱内培养,然后分别于 0、30、60、150 d 破坏性采样并测定芘的浓度,每个处理设置 4 个重复。采样时,用小部分土壤放在胰蛋白大豆琼脂培养基上检测,未发现有微生物生长。

**1.2.2 芘的生物有效性试验** 将采取的土样混匀后,称取 3.0 g 测定土壤中芘的浓度,余下移至 150 ml 三角瓶内。每个三角瓶中放入 8 条蚯蚓,以铝箔封住瓶口,留 8 个针孔通气,然后将三角瓶在(22 ± 1)℃ 黑暗条件下培养。蚯蚓放入前,需放置装有潮湿滤纸的培养皿中 24 h,以清空肠道。7 d 后,将蚯蚓从三角瓶中全部拿出放置 24 h,待其排空体内的代谢物后,称其鲜重,并从中挑选出 3 条大小相近的蚯蚓,洗净擦干,放入蜡盘中解剖<sup>[8]</sup>,分离出表皮和肠道。然后,将分离后的表皮和肠道分别称其重量,并分别加入 3.0 g 无水硫酸钠研磨,测定不同部位的芘含量。余下的蚯蚓用于测定酶活性及 MDA 含量。

## 1.3 萃取与分析

**1.3.1 土壤和蚯蚓中芘的萃取** 取 3.0 g 混匀的土壤(加入 3.0 g 过 20 目筛的无水硫酸钠)和研磨好的表皮、肠道样品分别于 35 ml 的玻璃离心管中,混匀后加入 15 ml 二氯甲烷,盖紧,在超声冰浴中超声 2 h,以 2 500 r min<sup>-1</sup>离心 10 min,取 3 ml 上清液过 3 g 硅胶柱净化,并用 1:1 的二氯甲烷和正己烷溶液洗脱。将洗脱液收集至旋转蒸发瓶,40℃ 恒温下浓缩至干,用甲醇定容至 5 ml,过 0.22 μm 孔径滤膜后上高效液相色谱测定<sup>[9]</sup>。

**1.3.2 蚯蚓体内酶活性和 MDA 含量的测定** 蚯蚓称重后放入研钵中,加入 10 ml 50 mmol L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(pH = 7.0),于冰浴中用玻璃研磨器将其细胞破碎后,在低温(4℃)超速离心机上 10 000 r min<sup>-1</sup>离

心 10 min,所得上清液用于测定蚯蚓抗氧化酶活性和 MDA 含量。CAT 活性测定采用 Xu 等<sup>[10]</sup>的方法,其单位为 U g<sup>-1</sup>蛋白质,一个酶活力单位(U)定义为:25℃,100 s 内使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解 1/2 时的酶蛋白量;SOD 活性测定采用氮蓝四唑法<sup>[11]</sup>,其单位为 U g<sup>-1</sup>蛋白质,一个酶活力单位(U)以抑制 NBT 光化学反应的 50% 来表示;MDA 含量测定采用硫代苯巴比妥酸(TBA)比色法<sup>[10]</sup>,其单位为 μmol g<sup>-1</sup>蛋白质。上述指标的测定均采用紫外-可见分光光度计。

**1.3.3 芘的分析方法** 高效液相色谱分析采用日本岛津公司生产的 LC-20AT,SPD-20A/20AV 紫外检测器和一个 C<sub>18</sub> 反相柱(4.6 mm × 12.5 mm),柱子具有 12.0 μm 的孔径,同时安装 30℃ 控温计。流动相是 100% 的甲醇,流速为 1 ml min<sup>-1</sup>;检测波长为 254 nm;柱温为 30℃;进样量为 20 μl。芘的回收率为 89.49%,相对标准偏差为 4.05% (n = 5),检测限为 50.2 pg。

## 1.4 数据统计分析

数据处理采用 Microsoft Excel。统计与显著性检测采用 SPSS 软件,单因素方差分析采用 Duncan 法,以 p < 0.05 作为显著性差异水平。

## 2 结果

### 2.1 芘在土壤中的老化规律

由图 1 可知,10、50、100 mg kg<sup>-1</sup> 芘污染的土壤,在 0 到 60 d 内,芘的浓度分别从 7.55、45.14、87.45 mg kg<sup>-1</sup> 降低至 3.30、32.93、69.83 mg kg<sup>-1</sup>,分别降低了 4.25、12.21、17.62 mg kg<sup>-1</sup>,而在 60 ~ 150 d,芘的浓度仅分别降低了 1.24、2.14、14.25 mg kg<sup>-1</sup>。这表明,芘的老化速度随着时间的推移而逐渐减慢,60 d 前老化速度较快,60 d 后老化速度慢。

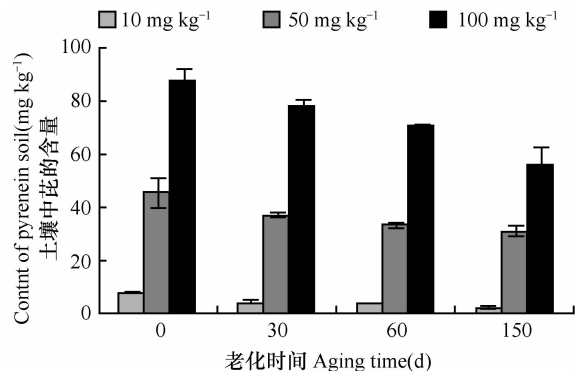


图 1 芘土壤中的老化规律

Fig. 1 Aging of pyrene in soil

## 2.2 芘的老化对蚯蚓生长抑制率的影响

蚯蚓生长抑制率指蚯蚓暴露7 d后的体重减去其暴露前的体重,再除以其暴露前的体重。由图2可知,总体而言,芘的老化时间越长,蚯蚓的生长抑制率越低。前60 d内,芘对蚯蚓生长抑制率有较大影响,污染处理组均高于对照。其中,0 d和30 d时,各污染处理均显著高于对照( $p < 0.05$ );60 d时,高浓度的污染处理(50和100 mg kg<sup>-1</sup>)显著高于对照,低浓度处理组(10 mg kg<sup>-1</sup>)却未表现出显

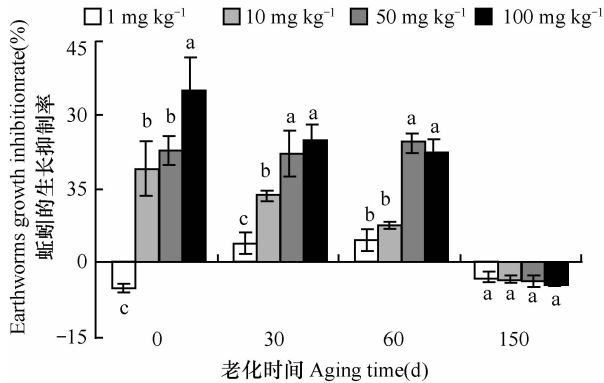


图2 芘的老化对蚯蚓生长抑制率的影响

Fig. 2 Effects of pyrene aging on earthworm growth inhibition rate  
注:同一老化时间点不同字母代表不同处理间的差异达到显著水平( $p < 0.05$ ) Note: The different letters represent significant differences between treatments at a same aging time at 0.05 level

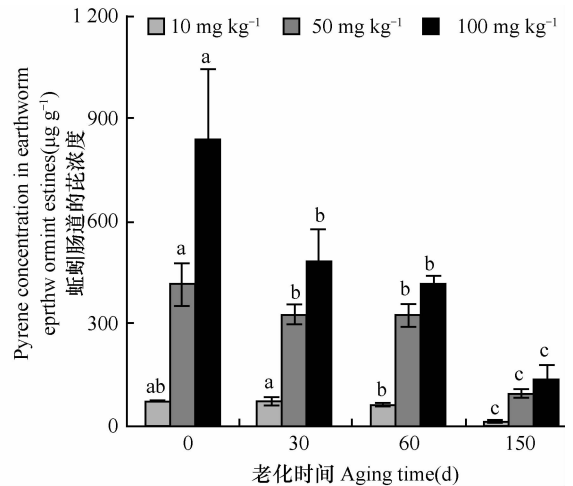
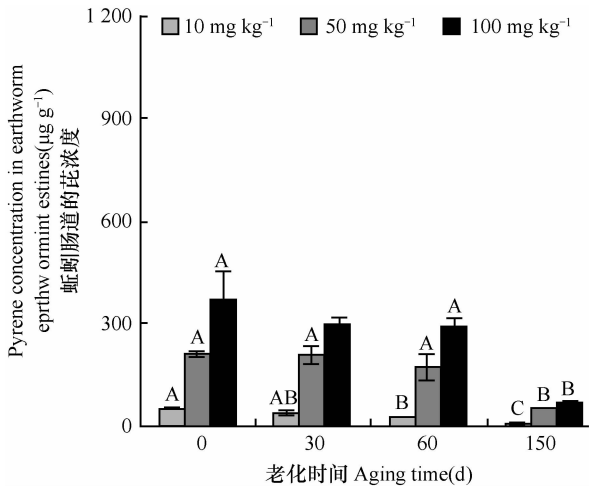


图3 老化时间对蚯蚓组织的芘浓度的影响

Fig. 3 Effects of pyrene aging on pyrene concentration in earthworm tissues

注:不同大写字母代表不同老化时间蚯蚓表皮芘浓度处理间的差异显著,不同小写字母代表不同老化时间肠道芘浓度处理间的差异显著( $p < 0.05$ ) Note: The different uppercase letters represent significant differences between treatments in pyrene concentration in earthworm epidermis at different aging time, the different lowercase letters represent significant differences between treatments in pyrene concentration in earthworm intestines at different aging time at 0.05 level

著差异。而在150 d时,所有污染处理均无显著差异。可见,老化时间越长,芘对蚯蚓的毒性越低。

## 2.3 芘的老化对其在蚯蚓体内富集的影响

不同老化时间的芘在蚯蚓体内的富集见图3。蚯蚓表皮和肠道积累的芘浓度随土壤中芘浓度的增加而增加。但随着老化时间的延长,芘浓度均呈现降低的趋势。肠道中芘的浓度均高于表皮,但随着老化时间的延长,肠道-表皮的浓度差基本呈现下降趋势(表2)。150 d时,肠道-表皮的浓度差远低于前面的老化时间。0 d至60 d,降低速度较慢;随后的90 d,降低速度较快。60 d时,10、50、100 mg kg<sup>-1</sup>的芘污染土壤中的蚯蚓表皮和肠道芘的浓度分别为29、170、290 μg g<sup>-1</sup>和67、360、460 μg g<sup>-1</sup>,较0 d时分别降低了21、40、83 μg g<sup>-1</sup>和6、3、47 μg g<sup>-1</sup>。150 d时,蚯蚓表皮和肠道的浓度分别下降至11、55、65 μg g<sup>-1</sup>和14、110、150 μg g<sup>-1</sup>,较60 d时分别降低了18、120、230 μg g<sup>-1</sup>和52、250、310 μg g<sup>-1</sup>。蚯蚓表皮和肠道的芘浓度在前60 d的显著性差异均高于150 d时。但在50、100 mg kg<sup>-1</sup>芘污染的土壤中,蚯蚓表皮的浓度在0至60 d间均未表现出显著的差异,肠道的浓度在0 d显著高于30和60 d ( $p < 0.05$ )。

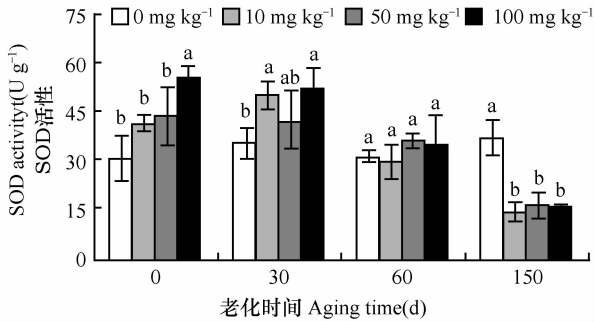
**表 1** 老化时间对蚯蚓体内芘的肠道和表皮浓度差  
(肠道浓度-表皮浓度)的影响

**Table 1** Effect of aging of pyrene on difference in pyrene concentration between intestines and epidermis of the earthworm ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

老化时间 Aging time (d)	浓度差 Difference in pyrene concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
	10 mg kg <sup>-1</sup>	50 mg kg <sup>-1</sup>	100 mg kg <sup>-1</sup>
0	22.16	246.4	555.2
30	46.76	152.3	230.7
60	37.69	186.5	167.5
150	3.010	50.80	82.85

## 2.4 芘的老化对蚯蚓体内酶活性和丙二醛含量的影响

**2.4.1 芘的老化对蚯蚓体内超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响** 如图 4 所示:除 150 d 时外,污染处理组的蚯蚓体内的 SOD 活性高于对照。0 d 时,100 mg kg<sup>-1</sup>组蚯蚓的 SOD 活性显著高于对照,是对照的 1.79 倍;30 d 时,10、100 mg kg<sup>-1</sup>组的 SOD 活性均显著高于对照,分别为 1.41 倍和 1.46 倍;60 d 时,各处理组的 SOD 活性与对照相比均无显著差异;而 150 d 时,10、50 和 100 mg kg<sup>-1</sup>组的 SOD 活性均显著被抑制,分别为对照的 39.9%、44.6% 和 42.7%。



图四 芘的老化对蚯蚓体内 SOD 活性的影响

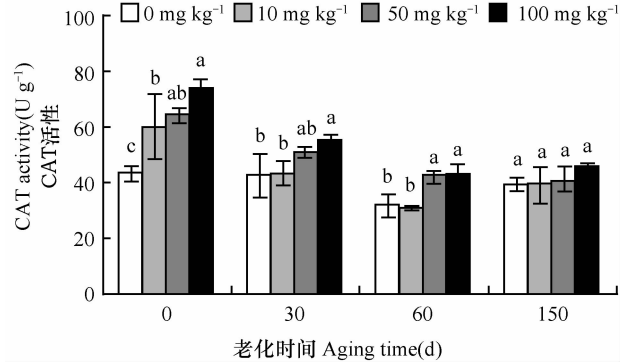
Fig. 4 Effects of pyrene aging on SOD activity in earthworms

注:同一老化时间点不同字母代表不同处理间的差异达到显著水平( $p < 0.05$ )。下同 Note: The different letters represent significant differences between treatments at a same aging time at 0.05 level. The same below

**2.4.2 芘的老化对蚯蚓体内过氧化氢酶(CAT)活性的影响** 如图 5 所示:总体上,与对照相比,老化的芘对蚯蚓体内 CAT 活性均表现为诱导作用。

0 d 时,10、50 和 100 mg kg<sup>-1</sup>组的蚯蚓体内 CAT 活性被显著诱导,分别是对照的 1.39 倍、1.48 倍、1.70 倍;30 d 时,100 mg kg<sup>-1</sup>组的 CAT 活性被显著诱导,为对照的 1.29 倍;60 d 时,50、100 mg kg<sup>-1</sup>组

的 CAT 活性仍被显著诱导,分别为对照的 1.33 倍和 1.39 倍;但至 150 d 时,所有的 CAT 活性逐渐得以恢复,与对照相比均无显著差异。

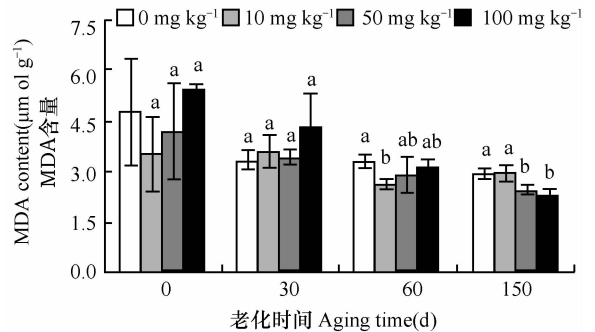


图五 芘的老化对蚯蚓体内 CAT 活性的影响

Fig. 5 Effects of pyrene aging on CAT activity in earthworms

**2.4.3 芘的老化对蚯蚓体内丙二醛(MDA)含量的影响** 如图 6 所示:随着老化时间的延长,污染处理组的蚯蚓体内的 MDA 含量逐渐与对照表现出显著差异。

与对照相比,0 d 和 30 d 时,10、50 和 100 mg kg<sup>-1</sup>组的蚯蚓体内 MDA 含量差异不显著,而 60 d 时 MDA 含量均低于对照,分别为对照的 80.7%、87.6% 和 93.8%;150 d 时,只有 50 和 100 mg kg<sup>-1</sup>组的蚯蚓体内 MDA 含量逐渐表现出显著差异,分别为对照的 83.2% 和 77.5%。



图六 芘的老化对蚯蚓体内 MDA 活性的影响

Fig. 6 Effects of pyrene aging on MDA content in earthworms

## 3 讨论

多环芳烃的老化进程主要受土壤有机质的数量和特性影响<sup>[12]</sup>。本试验结果是芘在土壤中的老化呈现先快后慢的变化态势,这是因为土壤有机质主要分为结构柔软的橡胶态和结构刚硬的玻璃态两大类。多环芳烃最先迁移至前者并被其快速吸

附,这致使可提取态的芘的降低速率加快,但随着老化时间的推移,多环芳烃渐渐进入后者并被其缓慢吸附,而玻璃态对芘的吸附速率显著低于橡胶态,由此造成可提取态的芘的降低速率趋缓<sup>[13]</sup>。郜红建<sup>[14]</sup>和沈超峰<sup>[15]</sup>等的研究结果也表明,随着时间延长,可提取态的 DDTs(o,p-DDT、p,p'-DDT、o,p'-DDE、p,p'-DDE、p,p'-DDD)和菲在土壤中的老化速率呈现下降趋势,且这一趋势也是先快后慢。

芘在土壤中的老化态势影响了蚯蚓的生长。试验表明,随着污染物(芘)老化后毒性的降低,蚯蚓体内表皮、肠道内芘的富集程度有所下降。Jager 等<sup>[16]</sup>的研究也表明,菲、芘、荧蒹和苯并(a)芘老化 7 d,可降低其对蚯蚓的毒性。这在于芘被土壤吸附后,其部分从生物有效性高的结合位点迁移至低的结合点,致使芘的生物有效性进一步下降<sup>[17-18]</sup>。Alexander<sup>[19]</sup>的研究也发现,多环芳烃在老化中逐渐被土壤紧密吸附,难以被蚯蚓吸收。此外,对试验中的蚯蚓体内表皮、肠道内芘的含量的测定表明,蚯蚓肠道积累的芘量均高于表皮。这主要在于蚯蚓通过表皮的被动吸收和肠道的主动摄食来富集土壤中的多环芳烃<sup>[20-21]</sup>。研究表明,蚯蚓表皮对芘的被动吸收与芘在土壤固相、土壤液相及蚯蚓体表之间的浓度梯度有关<sup>[22]</sup>,而多环芳烃的疏水性限制了其在蚯蚓表皮的富集,导致表皮内芘的浓度较低;由于蚯蚓肠道主动摄取的是富含有机质的土壤(包括土壤吸附的多环芳烃)<sup>[23]</sup>,其中吸附在土壤上的多环芳烃,经过肠道微生物作用后被释放,成为肠道可直接吸收利用的形态<sup>[24]</sup>,而肠道内的分泌物(如黏液)能使蚯蚓脏器内液相物质的极性降低,也利于疏水性的多环芳烃在蚯蚓肠道内的累积<sup>[25]</sup>,由此导致肠道内芘的浓度高于表皮。但是,由于多环芳烃的老化程度影响到肠道对其吸收,老化时间越短,吸收越多,老化时间越长,吸收越少。随着芘的老化进程,表皮对老化的芘的被动吸收与肠道的吸收虽差别不大,但肠道对老化的芘的吸收已不占主导地位,这从而导致了肠道-表皮的芘浓度差逐渐缩小。

试验还表明,芘胁迫下蚯蚓体内的 SOD、CAT 活性和 MDA 含量有变化。SOD 在老化前期(0 d 至 60 d)高于对照,在老化后期(150 d)低于对照。这是因为 SOD 可有效清除生物体内过量的氧自由基,维持细胞内氧代谢平衡<sup>[26]</sup>。这既是蚯蚓受到胁迫后的一种应激性体现,也是其受到胁迫时的一种自我保护机制。张薇等<sup>[27]</sup>的研究也表明,芘胁迫下的

蚯蚓体内 SOD 活性,也随芘的老化而呈现“先诱导后抑制”的响应模式。CAT 活性的变化最初受土壤中芘浓度的影响,与对照相比均被显著诱导,但随着芘的老化,至 150 d 时 CAT 的活性与对照相比均无显著差异,表明 CAT 的活性得以恢复。这一变化规律可能与多环芳烃老化后的毒性降低有关。因为,CAT 的功能是有效清除生物体内过量的  $H_2O_2$ ,维持细胞内  $H_2O_2$  平衡<sup>[26]</sup>,而芘的毒性越大,其越可能促使蚯蚓产生过多的  $H_2O_2$ ;至 150 d 时,CAT 趋于稳定,可能在于芘的毒性降低导致蚯蚓体内的  $H_2O_2$  的量减少,还可能由于本试验未研究的 POD 也协同参与了清除细胞内的  $H_2O_2$ <sup>[27]</sup>。MDA 含量的变化既受土壤中芘浓度的影响,也受芘老化速率的影响,其表现是 30 d 时高于对照,60 d、150 d 时基本低于对照。这在于,MDA 能指示蚯蚓体内的脂质过氧化物的含量的高低,而脂质过氧化物是由氧自由基的过氧化得来的<sup>[26]</sup>。30 d 时高于对照,可能在于,经过 SOD 调节后,蚯蚓体内仍有过剩的氧自由基,这些氧自由基引起膜的过氧化,使 MDA 含量上升;至 60 d、150 d 时,随着蚯蚓体内的过量氧自由基被 SOD 的清除,MDA 含量也由此下降。

## 4 结 论

本试验表明,芘在土壤中的老化表现出初始速率较快,而后逐渐减慢的特征。蚯蚓的生长抑制率结果表明老化时间越长,芘对蚯蚓的毒性越低。蚯蚓主要通过主动吞食作用富集土壤中的芘,致使肠道里的芘的浓度均高于表皮,但随着芘的老化,肠道和表皮的芘浓度均表现出逐渐降低的趋势,表明芘老化后其生物有效性降低。随着芘的老化,芘对 SOD 和 CAT 活性的促进作用逐渐减弱,说明蚯蚓体内的活性氧和  $H_2O_2$  含量降低,但至 150 d 时,MDA 含量低于对照,证明蚯蚓体内多余的活性氧已被大量的清除。可见,虽然老化能使芘在蚯蚓体内的含量降低,但仍有一定的富集,故生态风险依然存在。

## 参 考 文 献

- [1] United States Environmental Protection Agency. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). 2008, <http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm>
- [2] 张宁,廖燕,孙福来,等. 不同土地利用方式下的蚯蚓种群特征及其与土壤生物肥力的关系. 土壤学报, 2012, 49(2): 364—372. Zhang N, Liao Y, Sun F L, et al. Earthworm popu-

- lation characteristics in soils different in land use and their relationships with biological fertility of the soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2012, 49(2): 364—372
- [ 3 ] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 土壤低剂量蒽蒎胁迫下蚯蚓的抗氧化防御反应. *土壤学报*, 2007, 44(6): 1049—1057. Zhang W, Song Y F, Sun T H, et al. Antioxidizing defensive responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low dosage of fluoranthene in soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(6): 1049—1057
- [ 4 ] Tuomas L, Mirka T, Markus S, et al. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: Differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environ Pollut*, 2004, 129(3): 377—386
- [ 5 ] Lanno R, Wells J, Conder J, et al. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotox Environ Safe*, 2004, 57(1): 39—47
- [ 6 ] Saint-Denis M, Labrot F, Narbonne J F, et al. Glutathione, glutathione related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1998, 35(4): 602—614
- [ 7 ] Yaws C L. Chemical properties handbook. New York: McGraw-Hill Book Co, 1999: 340—389
- [ 8 ] 李志强, 王彬彬, 聂俊华. 铜污染对蚯蚓体重的影响与其铜富集特征. *生态学报*, 2009, 29(3): 1—7. Li Z Q, Wang B B, Nie J H. Effects of copper on earthworm in body weight and its copper accumulating characteristics (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(3): 1—7
- [ 9 ] 高彦征, 朱利中, 凌婉婷, 等. 土壤和植物样品的多环芳烃分析方法研究. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5): 1003—1006. Gao Y Z, Zhu L Z, Ling W T, et al. Analysis method for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in plant and soil samples (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(5): 1003—1006
- [ 10 ] Xu J B, Yuan X F, Peizhen L. The determination of enzymic activity and its inhibition on catalase by ultraviolet spectrophotometry. *Environ Chem*, 1997, 16(1): 73—76
- [ 11 ] Luo Y, Zang Y, Zhong Y, et al. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. *Chemosphere*, 1999, 39(13): 2347—2356
- [ 12 ] Reid B J, Jones K C, Semple K T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments—A perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ Pollut*, 2000, 108(1): 103—112
- [ 13 ] Gunasekara A, Xing B. Sorption and desorption of naphthalene by soil organic matter: importance of aromatic and aliphatic components. *J Environ Qual*, 2003, 32(1): 240—246
- [ 14 ] 郜红建, 蒋新, 王芳, 等. DDTs 在土壤中的老化规律及生物有效性. *土壤学报*, 2007, 44(1): 79—83. Gao H J, Jiang X, Wang F, et al. Aging and bioavailability of DDTs in soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(1): 79—83
- [ 15 ] 沈超峰, 唐先进, 申开丽, 等. 温和提取法评估老化前后土壤中菲的生物有效性. *土壤学报*, 2011, 48(1): 78—82. Shen C F, Tang X J, Shen K L, et al. Assessment of phenanthrene bioavailability in soils before and after aging with mild extraction method (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(1): 78—82
- [ 16 ] Jager T, Francisco A, Antón S, et al. Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei (oligochaeta)* using spiked soil. *Environ Toxicol Chem*, 2000, 19(4): 953—961
- [ 17 ] Reeves W R, McDonald T J, Bordelon N R, et al. Impacts of aging on in vivo and in vitro measurements of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbon availability. *Environ Sci Technol*, 2001, 35(8): 1637—1643
- [ 18 ] 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. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21(3): 489—492
- [ 19 ] Alexander M. Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(20): 4259—4265
- [ 20 ] Krauss M, Wilcke W, Zech W. Availability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) to earthworm in urban soils. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(20): 4335—4340
- [ 21 ] Stroo H F, Jensen R, Loehr R C, et al. Environmentally acceptable endpoints for PAHs at a manufactured gas plant site. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(18): 3831—3836
- [ 22 ] Conell D W, Markwell R D. Bioaccumulation in the soil to earthworm system. *Chemosphere*, 1990, 20(1/2): 91—100
- [ 23 ] Gevao B, Mordaunt C, Semple K T, et al. Bioavailability of non-extractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environ Sci Technol*, 2001, 35(3): 501—507
- [ 24 ] Belfroid A, Meiling J, Sijm D, et al. Uptake of hydrophobic halogenated aromatic-hydrocarbons from food by earthworms (*Eisenia foetida*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 1994, 27(2): 260—265
- [ 25 ] Jager T, Fleuxen R, Hogendoom E A, et al. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia Andrei (Oligochaeta)*. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(15): 3399—3404
- [ 26 ] Song Y, Zhu L S, Wang J, et al. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41(5): 905—909
- [ 27 ] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 土壤低剂量芘污染对蚯蚓若干生化指标的影响. *应用生态学报*, 2007, 18(9): 2097—2103. Zhang W, Song Y F, Sun T H, et al. Effects of low dosage pyrene pollution on biochemical characters of earthworm (*Eisenia fetida*) in soil (In Chinese). *Chin J Appl Ecol*, 2007, 18(9): 2097—2103

**BIOAVAILABILITY AND EFFECT OF PYRENE ON ANTIOXIDASES IN EARTHWORMS**MaLili Li weiming Hu feng Li Huixin<sup>†</sup>*(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)*

**Abstract** Aging behavior in soil, bioaccumulation and effect on antioxidases in earthworms of pyrene were investigated in the lab. Results indicate that its aging rate was rather high at the initial stage, and then slowed down with the time passing by. Its effect inhibiting earthworms growth was rather significant in the first 60 d, but turned to be insignificant on the 150th day in all the pyrene treatments ( $p < 0.05$ ). The higher the pyrene concentration in the soil, the higher its concentration in the earthworm. However, pyrene concentration was higher in earthworms' intestines than in the epidermis throughout the entire experiment, suggesting that earthworms accumulate pyrene mainly by ingesting it with soil particles rather than by pyrene penetrating through their epidermis. The concentration of pyrene in earthworms' epidermis and intestines decreased as the incubation went on, showing a significant difference between the determinations on the 60th day and the 150th day ( $p < 0.05$ ). The effect of pyrene promoting SOD activity in earthworm gradually weakened with pyrene aging on, and turned to be inhibiting SOD activity on the 150th day ( $p < 0.05$ ). Compared with CK, Treatment Pyrene ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was significantly higher in CAT activity in earthworm in the first 60 days ( $p < 0.05$ ), and was found almost the same on the 150th day, while MDA content decreased with pyrene aging on and was found to be much lower on the 150th day in both Treatments Pyrene ( $50$  and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ).

**Key words** Pyrene; Aging; Earthworm; Bioavailability; Antioxidase

(责任编辑: 卢 萍)