

全氟辛酸(PFOA)对蚯蚓的毒性作用

徐冬梅^{1,*}, 李婵丹², 王艳花¹

1. 浙江树人大学生物与环境工程学院, 杭州 310015

2. 浙江大学环境科学研究所, 杭州 310058

摘要: 为考察全氟化合物的土壤生态毒性, 以赤子爱胜蚓为模式生物, 通过人工土壤染毒方法研究全氟辛酸(PFOA)对蚯蚓急性毒性、回避行为和 SOD、CAT 等抗氧化酶活性的影响。结果表明, PFOA 对蚯蚓的急性毒性作用与染毒时间和染毒浓度相关, 实验求得 PFOA 对蚯蚓毒性作用 7 和 14 d 的 LC_{50} 值分别为 816.58 和 792.50 $mg \cdot kg^{-1}$; 蚯蚓在 160 $mg \cdot kg^{-1}$ PFOA 暴露浓度下表现出明显的回避反应。在 10 ~ 120 $mg \cdot kg^{-1}$ PFOA 长时间暴露下, 蚯蚓体内 SOD 出现“低促高抑”的变化趋势, 而 GSH-Px 则总体上被 PFOA 所抑制。

关键词: PFOA; 蚯蚓; 急性毒性; 回避行为; 抗氧化酶

文章编号: 1673-5897(2012)5-532-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxicity of Perfluorooctanoic Acid to Earthworms (*Eisenia foetida*)

Xu Dongmei^{1,*}, Li Chandan², Wang Yanhua¹

1. College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China

2. Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Received 19 August 2012 accepted 21 September 2012

Abstract: To investigate the soil ecotoxicity of perfluorinated compounds (PFCs), artificial soil test was adopted to study the effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on the acute lethality, avoidance behavior and the activities of antioxidant enzymes. The results showed that the acute toxicity of PFOA on earthworm was related to the exposure time and concentration of PFOA. The 7 d and 14 d of LC_{50} of PFOA on earthworm were 816.58 and 792.50 $mg \cdot kg^{-1}$, respectively. At the maximum test concentration of 160 $mg \cdot kg^{-1}$, the earthworm showed significant avoidance behavior. After a long period of exposure to 10 ~ 120 $mg \cdot kg^{-1}$ PFOA, the antioxidant enzymes in earthworms such as SOD exhibited allelopathic inhibition under high concentration and allelopathic stimulation under low concentrations. But the GSH-Px was inhibited by PFOA.

Keywords: PFOA; earthworm; acute toxicity; avoidance behavior; antioxidant enzymes

全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)是全氟化合物(PFCs)的代表性物质, 也是其前驱体和衍生物类产品在环境中最稳定的转化产物。由于其具有优良的热稳定性、化学稳定性、高表面活性及疏水疏油性能而被大量应用于洗涤剂、润滑剂、油漆、农药、医药品和日用品等工业和民用生产过程^[1]。据估计, 1951—2004 年期间, 全球 PFOA 的总生产量约

为 3 600 ~ 5 700 t, 其中约有 400 ~ 700 t 被排入环境^[2]。目前 PFOA 的环境浓度和生态毒性研究主要集中于水环境^[3-5]。事实上, 水、大气等环境介质中的 PFOA 可能通过富集和吸附等作用归趋到沉积物和土壤中^[6]。目前, PFOA 在土壤中的含量及其生态毒理效应已受到广泛关注^[7]。田海霞等研究证明^[8], PFOA 可显著抑制土壤脱氢酶活性。而

收稿日期: 2012-08-19 录用日期: 2012-09-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(20907046)

作者简介: 徐冬梅(1974-), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为生态毒理学, E-mail: dm25xu@163.com

PFOA 对土壤动物的毒性作用目前还不清楚。

蚯蚓作为土壤中生物量最大的动物类群,在维持土壤生态系统功能中起着不可替代的作用。同时,因其自身生理特性、数量和种群变化与土壤中污染物的污染程度存在一定的相关性,在污染土壤生态风险评价研究中受到关注^[9,10]。本文以蚯蚓毒理实验广泛采用的赤子爱胜蚓为模式生物,参照田海霞等的 PFOA 对土壤酶活性影响的浓度设置,在预实验初步结果的基础上,考察 PFOA 对蚯蚓急性毒性和回避行为的影响。进而在蚯蚓未出现回避反应的较低浓度范围内研究 PFOA 长期暴露对蚯蚓抗氧化酶活性的影响,为深入揭示 PFOA 的蚯蚓毒性作用机理和全面评价 PFOA 对土壤生态系统的影响提供一定的科学基础。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料

实验选用由浙江某蚯蚓养殖场提供的赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),挑选2月龄以上,体重为0.3g左右,环带明显的健康成蚓,实验前放于人工气候箱中驯服7d;全氟辛酸(PFOA)购自日本东京化成工业株式会社(纯度>98%),实验所用试剂均为分析纯;供试人工土壤根据 OECD Guideline No. 207 标准方法配制,由10%的草炭土,20%的高岭粘土,69%的工业石英砂(含50%以上0.05~0.2mm的细小颗粒)和1%的CaCO₃(化学纯)组成,pH为7.0左右。

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验

根据预实验确定的 PFOA 对蚯蚓产生毒性反应的浓度范围设置6个浓度梯度560、640、720、800、880和960 mg·kg⁻¹,加入蒸馏水保持含水量35%,在人工气候箱中黑暗平衡1d后取10条体长和体重基本相同的清肠后蚯蚓放入人工土壤中培养,用纱布封口并加盖,以保持湿度和空气的通透性。实验气候箱内恒温(20±1)℃,相对湿度80%~85%,光照时间为16h:8h(光照:黑暗)。实验7和14d各计数1次,记录死亡数及中毒症状,14d后结束实验。每一浓度设置3个重复,同时设置不含PFOA的蒸馏水对照组。

1.2.2 回避行为实验

一容器中央放置一隔板,将其分成两部分,在左侧加入空白对照土壤200g(干重),右侧加入含有已知浓度PFOA的土壤200g(干重),抽去隔板,将10条清肠后的赤子爱胜蚓放入原隔板处,以纱布封顶防止蚯蚓

逃出反应容器,48h后将隔板插入原位置,阻止蚯蚓进一步逃逸,手动挑出两侧土壤中的蚯蚓。在48h内,蚯蚓反应体系温度保持在(20±1)℃,相对湿度80%~85%,光照时间为16h:8h(光照:黑暗)。PFOA浓度设置为10、20、40、80和160 mg·kg⁻¹5个浓度梯度,每一浓度设置3个平行。

1.2.3 蚯蚓抗氧化酶活性

按照急性毒性实验方法,在蚯蚓未表现出回避反应的浓度范围内设置6个浓度梯度(0、10、20、40、80和120 mg·kg⁻¹)进行抗氧化防御反应实验。分别于暴露2、7、14、28和42d后将蚯蚓取出,记录存活状况后清肠、称重并测定酶活性。每个处理的3个平行各取存活蚯蚓5条,按体重1:4加入Tris-HCl缓冲液(100 mmol·L⁻¹,pH 7.5),匀浆后用冷冻高速离心机于9000g、4℃下离心30min后取上清液,置于-80℃冰箱中待测酶活性。总蛋白含量、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定。

1.2.4 数据分析

应用SPSS软件中的Probit模块求得PFOA对蚯蚓7和14d急性毒性LC₅₀值;蚯蚓回避率计算如下:NR=[(C-T)/N]×100%(其中NR为净回避率,C为洁净土壤中蚯蚓的数目,T为污染土壤中蚯蚓数目,N为加入土壤中蚯蚓总数)。以回避率NR=0为界限,当NR为正数,计算回避率,当回避率大于80%,则表明具有回避反应;当NR为负数,表明无反应。实验数据用SPSS统计软件进行统计分析,数据结果采用means±SD的形式表示。处理组和对照组之间的差异性进行t-检验。

2 结果(Results)

2.1 PFOA对蚯蚓的急性毒性

PFOA对蚯蚓急性毒性实验结果如图1所示。在整个实验周期内,空白组蚯蚓健康无死亡现象。由图可见,染毒7d后,最低浓度560 mg·kg⁻¹PFOA暴露组蚯蚓即开始出现死亡,除720 mg·kg⁻¹处理组外,蚯蚓死亡率基本上随PFOA浓度的增大而上升,至最大浓度960 mg·kg⁻¹时,蚯蚓死亡率达96.7%;暴露14d后,相同PFOA浓度处理组蚯蚓死亡率较7d稍有增大,其中最高浓度960 mg·kg⁻¹暴露组蚯蚓死亡率达到100%。PFOA对蚯蚓7和14d急性毒性LC₅₀值分别为816.58和792.50mg·kg⁻¹,95%置信区间分别为732.82~

959.40 mg·kg⁻¹和 722.77 ~ 883.08 mg·kg⁻¹。相关分析结果表明, 7 和 14 d 暴露组蚯蚓死亡率与 PFOA 浓度相关系数分别为 93.6% 和 95.8%。PFOA 暴露下的蚯蚓中毒症状主要表现为环带肿大, 充血; 身体萎缩, 有断节现象等。

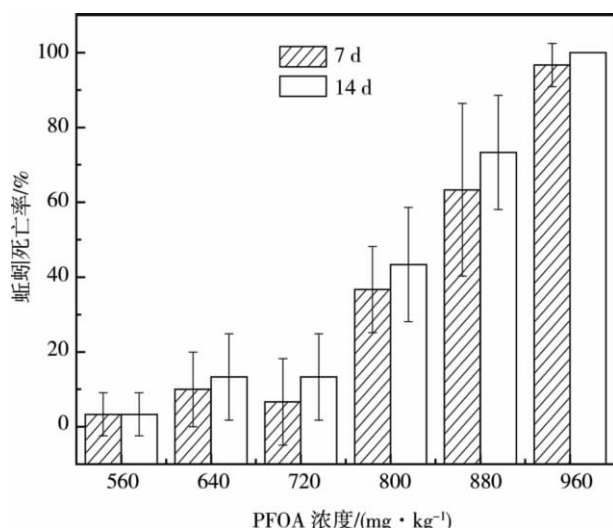


图1 PFOA 对蚯蚓的急性致死作用

Fig. 1 Lethal toxicity of earthworm exposed to PFOA

2.2 PFOA 对蚯蚓回避行为的影响

蚯蚓回避实验以蚯蚓的行为为检测终点, 用以评价土壤生态功能和污染物对蚯蚓的行为效应, 自

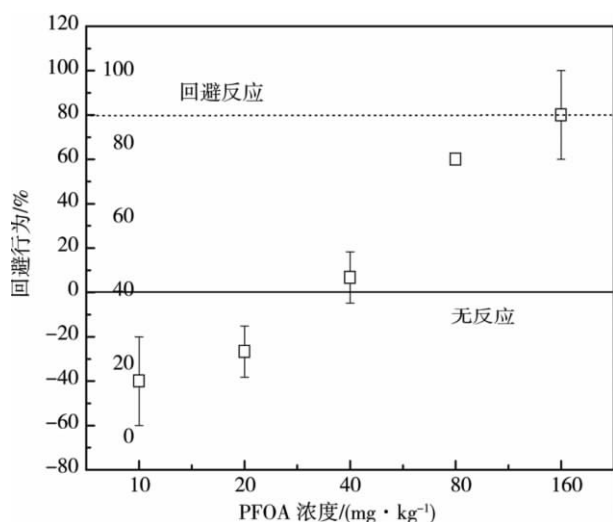


图2 PFOA 作用下蚯蚓的回避行为

Fig. 2 Avoidance behavior of earthworm exposed to PFOA

2005 年国际标准化组织(ISO)制定了化合物对蚯蚓行为效应的测试方法草案后^[11], 蚯蚓回避行为实验

已被广泛应用于污染土壤生态风险评价当中并且显示了其广阔的应用前景。图2为蚯蚓在PFOA污染人工土壤中的回避行为实验结果。在48h的实验期内, 没有观察到蚯蚓的死亡和逃逸现象。由图可见, 蚯蚓于PFOA中暴露48h后, 除10和20 mg·kg⁻¹浓度组蚯蚓回避率为负数外, 随PFOA浓度增加蚯蚓回避率逐渐增大, 至最大浓度160 mg·kg⁻¹时, 回避率达到80%, 即在此浓度下蚯蚓表现出明显的回避反应。

2.3 PFOA 暴露对蚯蚓抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶系是生物体内重要的活性氧清除系统, 其中SOD能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应产生H₂O₂和O₂; CAT则通常与GSH-Px发生协同作用, 将SOD歧化自由基的产物H₂O₂转变成无害的水和氧, 从而消除H₂O₂对机体造成的毒害。图3~图5分别为PFOA暴露后蚯蚓体内抗氧化酶系超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的变化情况。由图3可见, 从PFOA暴露14d开始, 随着暴露时间的延长, 蚯蚓SOD活性呈现抑制-激活-恢复的变化过程。

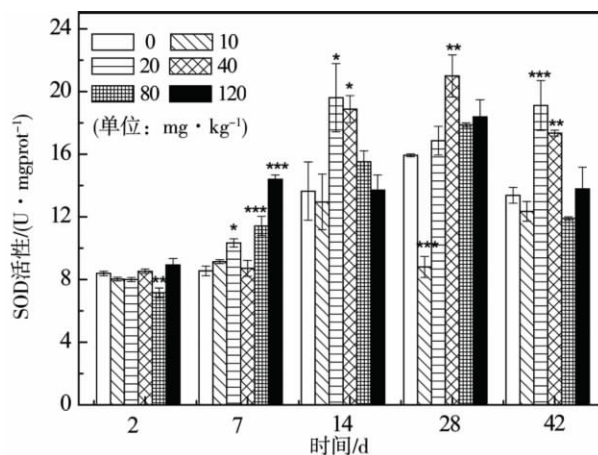


图3 PFOA 对蚯蚓体内 SOD 活性的影响

注: 与对照组的显著性差异* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 下同

Fig. 3 Effect of PFOA on SOD activity of E. fetida

由图4和图5 PFOA对蚯蚓CAT和GSH-Px活性的影响可见, 除28d部分暴露组外, PFOA对蚯蚓GSH-Px活性总体上表现为抑制作用; 而PFOA暴露下蚯蚓CAT活性变化无明显规律性。

随着工农业生产的发展, 新型持久性有机污染物PFOA已被证明在环境中广泛存在并且具有产

生各个层次不良生态效应的潜在风险。毒理学研究证明,PFOA 暴露水生生物和哺乳动物可以导致多系统的毒性效应,包括肝脏毒性^[12]、免疫毒性^[13]、生殖发育^[14]及神经毒性^[15]等。以蚯蚓为代表的土壤动物在土壤物质能量迁移转化过程中具有特殊的功能和作用。然而随着各种持久性有机污染物在土壤中的不断富集,污染严重的土壤生态环境受到严重破坏,蚯蚓等土壤动物受到毒害作用^[16]。

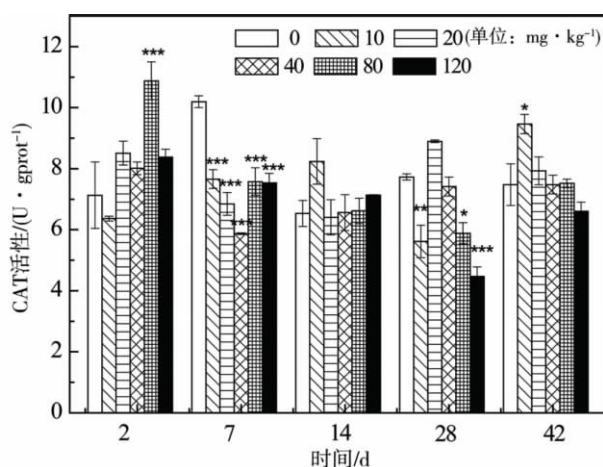


图4 PFOA对蚯蚓体内CAT活性的影响

Fig. 4 Effect of PFOA on CAT activity of *E. fetida*

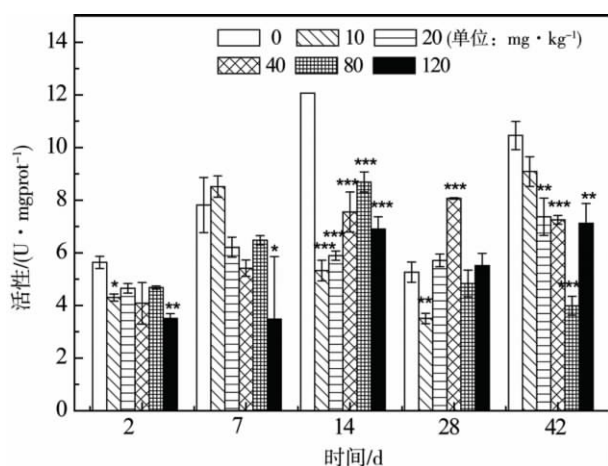


图5 PFOA对蚯蚓体内GSH-PX活性的影响

Fig. 5 Effect of PFOA on GSH-PX activity of *E. fetida*

3 讨论 (Discussion)

本文PFOA对蚯蚓的急性毒性实验结果表明,随着PFOA实验浓度的增加,蚯蚓死亡率逐渐增大,实验求得14 d LC_{50} 值为 $792.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。相比之下, $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的PFOA暴露浓度下蚯蚓即表

现出明显的回避反应,即蚯蚓对PFOA表现出回避反应的浓度仅相当于急性毒性实验14 d半数致死浓度 LC_{50} 的1/5。这表明与急性毒性实验的 LC_{50} 相比,蚯蚓行为测试终点对PFOA的反应更为敏感,这一结果也已被很多研究所证实^[17,18]。而在低于蚯蚓出现回避行为的较低浓度PFOA长期暴露下,蚯蚓SOD和GSH-Px酶活性变化亦较为明显。这可能是PFOA致蚯蚓体细胞产生如过氧离子或超氧阴离子等活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的结果。Panaretalis等研究证实^[19],PFOA能诱导人肝癌细胞HepG2产生ROS,导致氧化损伤从而诱导肿瘤发生。为防止ROS损伤机体,蚯蚓SOD和CAT在一定程度上被诱导激活,这是生物用以增强自身对活性氧的清除能力,以防止PFOA破坏作用的一种自我保护机制。随着PFOA暴露浓度的进一步增大,蚯蚓SOD和CAT活性又开始下降,表明蚯蚓自身抗氧化防御系统再无能力清除PFOA胁迫诱导产生的过量ROS,细胞内多种功能受到破坏,生理代谢紊乱,SOD等抗氧化酶活性反而受到抑制^[20,21]。已有研究表明,在PFOA作用下,淡水罗非鱼原代培养肝细胞SOD被诱导激活,而GSH-Px活性则显著下降^[22],这与本文的研究结果相类似。Lardinois等将这种现象解释为过量的超氧阴离子灭活了GSH-Px活性,从而可能对生物产生毒害作用^[23]。

参考文献:

- [1] 祝凌燕,林加华.全氟辛酸的污染状况及环境行为研究进展[J].应用生态学报,2008,19(5):1149-1157
Zhu L Y, Lin J H. Pollution trend and environmental behavior of perfluorooctanoic acid: A review [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(5): 1149 - 1157 (in Chinese)
- [2] Prevedouros K, Cousins I T, Buck R C, et al. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(1): 32-44
- [3] McLachlan M S, Holmström K E, Reth M, et al. Riverine discharge of perfluorinated carboxylates from the European Continent [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(21): 7260-7265
- [4] Yamashita N, Kannan K, Taniyasu S, et al. A global survey of perfluorinated acids in oceans [J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 51(8-12): 658-668
- [5] Ji K, Kim Y, Oh S, et al. Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid on freshwater

- macroinvertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) and fish (*Oryzias latipes*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(10): 2159 – 2168
- [6] Houde M, Bujas T A D, Small J, et al. Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(13): 4138 – 4144
- [7] Washington J W, Henderson W M, Ellington J J, et al. Analysis of perfluorinated carboxylic acids in soils II: Optimization of chromatography and extraction [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1181(1-2): 21 – 32
- [8] 田海霞, 和文祥, 孔龙, 等. 全氟辛酸铵盐(PFOA)对土壤酶活性影响的初步研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(5): 936 – 941
- Tian H X, He W X, Kong L, et al. The effect of perfluorooctanoic acid ammonium salt on soil enzyme activities [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(5): 936 – 941 (in Chinese)
- [9] Fent K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites [J]. *Toxicology Letters*, 2003, 11(140-141): 353 – 365
- [10] Li M, Liu Z, 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(5): 621 – 625
- [11] ISO. Soil Quality-Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour. Part 1: Tests with Earthworms (*Eiseniafetida* and *Eiseniaandrei*). ISO/DIS 17512-1 [S]. Geneva: International Organization for Standardization, 2005
- [12] Seacat A M, Thomford P J, Hansen K J, et al. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctane sulfonate in rats [J]. *Toxicology*, 2003, 183(1-3): 117 – 131
- [13] Yang Q, Xie Y, Eriksson A M, et al. Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 62(8): 1133 – 1140
- [14] Wei Y, Dai J, Liu M, et al. Estrogen-like properties of perfluorooctanoic acid as revealed by expressing hepatic estrogen-responsive genes in rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(11): 2440 – 2447
- [15] Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice [J]. *Neurotoxicology*, 2008, 29(1): 160 – 169
- [16] Garcia M, Scheffczyk A, Garcia T, et al. The effects of the insecticide lambda-cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* under experimental conditions of tropical and temperate regions [J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(2): 398 – 400
- [17] Schaefer M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology evaluation of different test systems in soil toxicity assessment [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2003, 3(2): 79 – 84
- [18] Renoux A Y, Sarrazin M, Hawari J, et al. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in soil in the presence of the earthworm *Eisenia andrei* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(6): 1473 – 1480
- [19] Panaretakis T, Shabalina I G, Grandér D, et al. Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid [J]. *Toxicology and Applied pharmacology*, 2001, 173(1): 56 – 64
- [20] Calabrese E J. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences [J]. *Environmental Pollution*, 2005, 138(3): 378 – 411
- [21] Yang J H. Perfluorooctanoic acid induces peroxisomal fatty acid oxidation and cytokine expression in the liver of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemosphere*, 2010, 81(4): 548 – 552
- [22] Liu C S, Yu K, Shi X J, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 82(2): 135 – 143
- [23] Lardinois O M. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide [J]. *Free Radical Research*, 1995, 22(3): 251 – 274 ◆