第35卷 第2期

2009年5月

Vol. 35 No. 2 May, 2009

文章编号:1006-7736(2009)02-0109-04

臭氧对摇蚊幼虫表皮和肌肉细胞超微结构的影响

摘要:为探讨臭氧对摇蚊幼虫的致毒机理,通过扫描电镜和 透射电镜,观察并分析了臭氧对摇蚊幼虫表皮和肌肉细胞超 微结构的影响.结果表明:臭氧处理后的摇蚊幼虫表皮由于 真皮细胞结构被破坏导致板层结构消失,真皮细胞层与内表 皮层相分离.真皮细胞的损害表现为核仁变形、染色质固缩; 真皮细胞内线粒体空泡化严重,形成大的电子透明区;细胞 内内质网减少,小池扩张,并出现水肿,表面核糖体脱落;脂 滴有空泡化现象.臭氧处理后肌原纤维无明显变化;肌细胞 核形状不规则,核仁变形;肌细胞中线粒体破坏严重,双层膜 变得模糊不清,内嵴减少,空泡化严重.

关键词:摇蚊幼虫;臭氧;表皮;肌肉细胞;超微结构 中图分类号:TU991.25 文献标志码:A

Effect of ozone on the ultrastructures of cuticle and muscle cells in chironomid larvae

SUN Xing-bin^{1,2}, CUI Fu-yi²

 (1. Department of Environmental Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract : To clarify the toxic mechanism of ozone in chironomid larvae, the effect of ozone on the ultrastructures of cuticle and muscle cells in chironomid larvae was detected under scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. Results show that the epidermis of treated larvae is destroyed, and the endocuticula separates from epidermis. The epidermis cells treated with ozone has an obvious ultrastructural variation. The nucleus becomes deformed, chromatin condenses, cristae of mitochondria disappears and mitochondria vesiculats. The endoplasmic reticulum decreases, endoplasmic reticulum cisterna expands and vesiculates, ribosomes fall down. In poisonous muscle cells the nucleus becomes deformed, the cristaes in mitochondria partially dissolve and mitochondria vesiculate seriously.

Key words:chironomid larvae; ozone; cuticle; muscle cells; ultrastructures

0 引 言

摇蚊幼虫在水库、湖泊类水源水中大量孳生,容 易使城市净水系统受到污染^[1-3].摇蚊幼虫大规模 暴发期,通常采用液氯来杀灭净水过程中出现的摇 蚊幼虫^[4].作为液氯的有效替代消毒剂,臭氧对摇蚊 幼虫具有更为显著的灭活效能^[5],但臭氧对摇蚊幼 虫超微结构的影响未见报道.本文通过扫描电镜和 透射电镜,对摇蚊幼虫在臭氧作用前后的表皮和肌 肉细胞超微结构的变化进行了比较,在此基础上,探 讨了臭氧对摇蚊幼虫的致毒机理.

1 材料与方法

1.1 材料

试验用摇蚊幼虫接种自野外,经标准方法培养 繁殖后供试验使用^[6].试验中依据各龄幼虫的头壳 宽度来划分摇蚊幼虫龄期,选择第4龄期摇蚊幼虫 作为测试对象.摇蚊幼虫的死亡标准为用玻璃棒轻 压摇蚊幼虫的尾部3次后,幼虫不做"8"运动^[7].

试验用臭氧采用高浓度臭氧发生器制备. 臭氧 产量为 3 g/h,臭氧质量浓度为 18~20 mg/L. 在臭氧 工作器稳定发生一段时间后,在一定的臭氧通入流 量情况下,作通入时间和溶液质量浓度的标准曲线. 根据实际通入时间对照标准曲线确定臭氧溶液的质 量浓度. 溶液中的臭氧质量浓度采用碘量法测量. 以

基金项目:国家自然科学基金资助项目(503780262);黑龙江省自然科学基金资助项目(E200812);中国博士后基金资助项目(20070420882);黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z06115). 作者简介:孙兴滨(1970-),男,哈尔滨人,副教授, Fmail:sunxingbin1025 @163.com.

^{*} 收稿日期:2008-12-08.

生产原水为试验水样,试验用水水质情况见表1. 表1 试验用水水质情况

pН	浊度/NTU	氨氮/ (mg L ⁻¹)	$COD_{Mn}/(mg L^{-1})$	藻类 /L
6.5	10.5	0.32	2.98	1.5×10^7

1.2 扫描电镜观察方法

取经臭氧处理的中毒幼虫和无处理的对照组 4 龄幼虫,用体积分数为 2 %的戊二醛(磷酸缓冲液配 制,pH=7.0)固定 150 min.配制 0.1 mol/L 磷酸缓 冲液 (pH = 7.0,0.2 mol/L NaH₂PO₄ 0.2 mol/L Na₂ HPO₄ H₂O = 78 122 200) 共 400 mL,用其将样 品漂洗 3 次,每次 10 min;配制体积分数为 30 %、 50 %、70 %、80 %、90 %系列乙醇溶液,依次将样品脱 水各 10 min,再用无水乙醇脱水两次各 20 min;用乙 酸异戊酯将乙醇进行置换 2 次,每次 20 min;采用 HCP-2 型临界点干燥仪进行 CO₂临界点干燥,干 燥温度为 40 ,压力为 8.8 MPa;将干燥好的样品粘 台、喷金后,用 HITACHI扫描电镜(型号为 S - 520) 观察.

1.3 透射电镜观察方法

将臭氧处理组的中毒幼虫和对照组的幼虫去掉 首尾,用体积分数为2.5%的戊二醛(pH7.2)初固 定2h;然后,用磷酸缓冲液(pH7.2)冲洗3次,每次 10min;用体积分数为2%的锇酸再固定1.5h,分别 用体积分数为50%、70%、80%、90%和100%的乙 醇进行逐级脱水,每次10~15min;用环氧树脂812 包埋,Ultrachut E型超薄切片机切片;醋酸铀、柠檬 酸铅双染色后,用JEM-1200EX透射电镜观察.

2 结果与分析

2.1 扫描电镜的观察

对4龄幼虫体表超微结构的扫描电镜观察结果 如图1所示.从图1(a)可以看出,对照组摇蚊幼虫体 壁表面呈凹凸不平的粗条形波浪状皱褶.从图1(b) 可见,臭氧处理过的幼虫,其体表结构排列较为疏 松,且彼此间空隙较大,轮廓不清晰.图1结果表明, 臭氧主要是通过体壁吸收进入幼虫体内,并对体表 结构造成一定程度的损害.

2.2 透射电镜的观察

对无处理的对照组摇蚊幼虫的透射电镜观察表 明:摇蚊幼虫体壁由基膜、真皮细胞层和表皮层组 成.表皮层排列整齐、致密,与真皮细胞层结合紧密 [图 2(a)、(b)];真皮细胞的核膜完整,细胞核内有电 子致密的核仁与电子致密度较低的染色质[图 2





(a) 对照组

图 1 臭氧处理对 4 龄幼虫体表超微结构的影响

(SEM ×3000)

(b)];细胞内线粒体内嵴发达,分布均匀[图2(c)]; 粗面内质网丰富,表面核糖体清晰可见[图2(c)、
(d)];脂滴的电子密度均匀[图2(e)];对照组中肌原 纤维致密、排列规则、明暗带清晰[图2(f)];肌细胞 核结构完整,染色质均匀,核仁居中,且形状规则[图 2(g)];肌肉细胞内线粒体十分丰富,为椭圆形,内嵴 发达、致密[图2(h)、(i)].



(g)肌细胞核×10000 (h)肌细胞线粒体×20000(i)肌细胞线粒体×30000

图 2 对照组摇蚊幼虫的形态学观察

对臭氧处理组摇蚊幼虫的透射电镜观察表明: 摇蚊幼虫表皮由于真皮细胞结构被破坏导致板层结 构消失,真皮细胞层与内表皮层相分离[图 3 (a)]; 真皮细胞核不规则,核内染色质固缩,核仁变形[图 3(b)];真皮细胞内线粒体空泡化严重,形成大的电 子透明区[图 3(c)];细胞内内质网减少,小池扩张, 并出现水肿,表面核糖体脱落[图 3(d)];脂滴有空 泡化现象[图 3(e)];臭氧处理后肌原纤维无明显变 化[图 3 (f)]; 肌细胞核形状不规则,核仁变形[图 3 (g)]; 肌细胞中线粒体被严重破坏,双层膜变得模糊 不清, 内嵴减少, 空泡化严重[图 3 (h)、(i)].



图 3 臭氧处理组摇蚊幼虫的形态学观察

3 臭氧对摇蚊幼虫的致毒机理

3.1 臭氧对摇蚊幼虫表皮的穿透机理

大量研究表明,昆虫体壁表皮可以有效保留杀 虫剂,所以昆虫表皮是阻止杀虫剂穿透的有力屏障. 一般情况下,杀虫剂的脂溶性越大,对昆虫表皮的穿 透性越强,尤其上表皮蜡层的穿透与脂溶性的关系 更密切.但是,杀虫剂的脂溶性还不能完全决定杀虫 剂真正穿透进入昆虫体.因为昆虫的内表皮很多是 亲水性的.杀虫剂穿透上表皮后,还必须具有一定的 水溶性才能穿透内表皮,否则,杀虫剂就可能被保留 在上表皮中,而不能有效地达到作用靶标,就失去了 对昆虫的毒杀作用.

臭氧具有良好的水溶性,但脂溶性较差,这就决 定了臭氧对摇蚊幼虫上表皮蜡层的穿透能力较弱, 而对内表皮却具有很好的穿透能力.透射电镜观察 证明,经臭氧处理后的幼虫表皮由于真皮细胞层被 破坏导致板层结构消失,真皮细胞层与内表皮层相 分离,说明臭氧主要是通过幼虫体壁吸收进入体内 的.此外,摇蚊幼虫表皮板层结构的破坏可以使表皮 丧失其应有的功能,例如,缺少应有的坚固度、弹性 和柔韧性,对肌肉的附着力降低或丧失,不能很好地 维持体腔内一定的内压等.

3.2 臭氧对细胞器的破坏机理

摇蚊幼虫经臭氧处理后,其体壁变化以及真皮 细胞的损伤表明,臭氧对摇蚊幼虫的毒杀作用主要 是触杀毒性,即通过进入摇蚊幼虫的体腔影响幼虫 的生理活动.细胞结构是功能的单位.细胞结构的损 伤必将导致功能的受损,功能的受损又反过来加速 细胞结构的损伤^[8].在细胞中细胞核是最大、最重要 的细胞器,也是细胞遗传代谢的调控中心,其内部的 核仁对于细胞生命活动具有重要作用,与蛋白质合 成关系密切.多方面资料表明,核仁的 RNA,即是核 糖体核糖核酸的前身,说明 RNA 主要在核仁中合 成^[9]. 线粒体普遍存在于真核生物的所有细胞中,是 细胞产生能量的重要构造,细胞内各项生化活动所 需能量大都由其提供,所以可视其为能量产生、储存 与能量供应的动力站.线粒体中包含有与该过程有 关的许多酶系、如细胞色素酶系、琥珀酸脱氢酶系和 ATP 酶等.内质网多分布于细胞的内质内,是在细 胞基质内由管状和泡状分枝构成的复杂网状系统. 内质网是以膜为界的囊泡、小管以及扁平的池. 膜表 面附有核糖体的内质网为粗面内质网,无核糖体的 称为滑面内质网.粗面内质网上的核糖体具有分泌、 合成蛋白质的功能.核糖体的形成及其附着于完整 的粗面内质网上,均为合成蛋白质的必要条件,臭氧 对真皮细胞的损伤主要表现为细胞器的变化.细胞 器中敏感部位是线粒体、细胞核和内质网. 臭氧处理 后线粒体空泡化严重,形成大的电子透明区;细胞内 内质网减少,小池扩张,并出现水肿,表面核糖体脱 落,细胞核内染色质固缩,核仁变形,这些可以抑制 摇蚊幼虫体内蛋白质合成,也可能影响其核酸代谢. 对线粒体的破坏可导致其功能丧失,能量代谢受到 抑制.内质网的严重破坏将造成机体合成和分泌蛋 白功能的降低.所以这些细胞器的损坏会使摇蚊幼 虫机体供能减少,破坏了机体正常的遗传、代谢水 平,并最终导致其死亡,

臭氧对摇蚊幼虫肌纤维损伤的主要靶部位是线 粒体和细胞核.线粒体的损伤,将导致ATP不能释 放能量,不能为肌原纤维提供能量,使肌肉失去正常 的运动功能.试验中观察到用臭氧处理后的摇蚊幼 虫身体蜷曲、运动失调.可见,摇蚊幼虫的运动失调 与臭氧对肌肉超微结构的毒理变化密切相关.

4 结 论

(1) 臭氧对摇蚊幼虫真皮细胞的损伤主要表现

为线粒体、细胞核和内质网等细胞器的变化;对肌肉 损伤的主要靶部位是线粒体和细胞核.这些细胞器 的损伤使摇蚊幼虫机体供能减少,破坏了正常的遗 传、代谢水平,导致摇蚊幼虫死亡.

(2) 臭氧处理后的摇蚊幼虫表皮由于真皮细胞 结构被破坏导致板层结构消失,真皮细胞层与内表 皮层相分离.真皮细胞核不规则,核内染色质固缩, 核仁变形;真皮细胞内线粒体空泡化严重,形成大的 电子透明区;细胞内内质网减少,小池扩张,并出现 水肿,表面核糖体脱落;脂滴有空泡化现象.臭氧处 理后肌原纤维无明显变化;肌细胞核形状不规则,核 仁变形;肌细胞中线粒体破坏严重,双层膜变得模糊 不清,内嵴减少,空泡化严重.

参考文献(References):

- [1] Van LIEVERLOO J H M, BOSBOOM D W, BAKKER G L, et al. Sampling and quantifying invertebrates form drinking water distribution mains [J]. Water Research ,2004, 38 (3):1101-1112.
- [2]SUN Xing bin, CUI Furyi, ZHANG Jim song. Inactivation of chironomid larvae with chlorine dioxide [J]. Journal of Hazardous Meterials, 2007, 142: 348-353.

- [3] SUN Xing-bin, CUI Furyi, ZHANG Jim song. Pilot-scle study of removal effect on Chironomid larvae with chlorine dioxide[J]. Journal of Environmental Sciences, 2005, 18
 (2): 248-253.
- [4]孙兴滨,崔福义. 二氧化氯对摇蚊幼虫的毒效试验及影响因素[J]. 环境科学,2007,28(11):2569-2573.
- [5]孙兴滨,崔福义,张金松,等.几种常见氧化剂对水中摇 蚊幼虫氧化杀灭效能的试验研究[J].环境科学学报, 2005,25(7):930-935.
- [6] CHOI J, ROCHE H, CAQUET T. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in Chironomus Riparius Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 2001, 130(6): 11-17.
- [7] 宋志慧,陈天乙,刘如冰.三丁基锡对摇蚊幼虫的毒性作用[J].环境科学,1998,19(2):87-88.
- [8]金春华,丁爱侠,王春琳. 漂白粉蓄积对日本鲟 4 种组 织超微结构的影响[J]. 水产科学,2005,24(5):11-16.
- [9]徐勤松,施国新,杜开和. Cd²⁺对苜草叶片保护酶活性 和细胞超微结构的毒害影响[J]. 水生生物学报,2003, 27(6):584-588.

(上接第 108 页)

参考文献(References):

- [1]蒋荣华,肖顺珍.砷化镓材料的发展与前景[J].世界有色 金属,2002,8:7-13.
- [2]王建利,孙强,牛沈军,等. VB 法生长低位错 GaAs 单晶 [J].人工晶体学报,2007,36(1):200-204.
- [3]MURDICK D A, ZHOU X W, WADLEY H N G. Analytic bond-order potential for the gallium arsenide system[J]. Phys Rev B, 2006,73: 045206.
- [4]STILL IN GER F H, WEBER T A. Computer simulation of local order in condensed of silicon[J]. Phys Rev B, 1995, 31 (8) :5262-5271.
- [5] GREIN C H, FAURIEJ P, BOUSQUET V, et al. Simulations of ZnSe/GaAs heteroepitaxial growth [J]. J Crystal Growth, 1997,178 (3) :258-267.
- [6] TERSOFF J. Modeling solid-state chemistry: interatomic potentials for multicomponent systems [J]. Phys Rev B, 1989 I,39 (8):5566.

- [7]ALBE K, NORDLUND K, NORD J, et al. Modeling of compound semiconductors: analytical bond-order potential for Ga, As, and GaAs [J]. Phys Rev B , 2002, 66: 035205.
- [8] FRENKE D, SMIT B. Understanding Molecular Simulation[M]. San Diego: Academic Press, 1996.
- [9]ZHOU X W, JOHNSON R A, WADL EY H N G. A molecular dynamics study of Nikel vapor deposition: temperature, incident angle, and adatom energy effects [J]. Acta Mater, 1997, 45(4):1513-1524.
- [10] ZHOU X W, MURDICK D A, GILL ESPIE B, et al. Atomic assembly during GaN film growth: molecular dynamics simulations[J]. Phys Rev B, 2006,73: 045337.
- [11] WENZL H, DAHLEN A, FATTAH A, et al. Phase relations in GaAs crystal growth[J]. J Cryst Growth, 1991, 109(1-4):191-204.