

鲫鱼脑 AChE 活性对水体中石油污染土壤和孔雀石绿的响应

王媛媛, 周启星, 范亚维

(南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要:在室内模拟条件下,通过 20 d 的暴露实验,研究了鲫鱼(*Carassius auratus*)幼体脑乙酰胆碱酯酶(AChE)活性对水体中存在的石油污染土壤以及孔雀石绿污染的响应。结果表明,水体中低浓度石油污染土壤或孔雀石绿存在时,均会导致鲫鱼脑 AChE 的活性的增加。随着水体中石油污染土壤数量的增加,AChE 活性的变化趋势是先快速升高,降低后又有显著升高。在较低暴露水平(1.000 和 5.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)下,AChE 活性显著高于对照组;当暴露水平大于 5.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,其 AChE 活性开始降低,于 20.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露水平时降到对照水平,然后开始升高。50.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的石油污染土壤作用下,AChE 活性最强,是对照组的 1.6 倍。水体中的石油污染土壤对鲫鱼脑 AChE 活性总体表现为诱导作用。相反,鲫鱼脑 AChE 的活性随孔雀石绿浓度的升高的变化趋势表现为,先缓慢升高,然后快速降低。当暴露浓度为 0.023 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,AChE 活性最大,但激活率仅为 13%,与对照组相比没有显著差异。从 0.058 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始,AChE 活性开始降低;到 0.116 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,AChE 活性降到最低,为对照组的 79%。总体来说,在所设置的浓度范围内,孔雀石绿对鲫鱼脑 AChE 的影响不大。从变化趋势上看,水体中孔雀石绿污染对鲫鱼脑 AChE 活性的抑制效果大于诱导。总之,鲫鱼脑 AChE 对水体中石油污染土壤较敏感,是较适宜的生物标志物。

关键词:水环境;石油污染土壤;孔雀石绿;鲫鱼(*Carassius auratus*);乙酰胆碱酯酶

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)03-0466-05

Responses of Brain Acetylcholinesterase (AChE) Activity in *Carassius auratus* to Crude-Oil-Contaminated Soil and Malachite Green in Aquatic Environment

WANG Yuan-yuan, ZHOU Qi-xing, FAN Ya-wei

(Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Under the indoor stimulant conditions, the responses of brain acetylcholinesterase (AChE) activity in larval *Carassius auratus* to different doses of crude-oil-contaminated soil and malachite green in aquatic environment were studied. After a 20-day exposure experiment, results showed that the present of low doses of crude-oil-contaminated soil and malachite green would increase the activity of brain AChE. With the increase amount of crude-oil-contaminated soil in aquatic environment, the AChE activity was first quickly increased, and then significantly induced after a reduction. The activity of AChE was highly induced even in low exposure doses (1.000 and 5.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). After that it began to decrease and restored to the control level in 20.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dose group. And then the activity of AChE was sharply increased and reached maximum at 50.000 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, which was 1.6 times of the control group. As a whole, the activity of brain AChE in *Carassius auratus* was induced by the crude-oil-contaminated soil. On the contrary, the response tendency of AChE activity to elevating malachite green was first appreciably increased and then fast decreased. The highest AChE activity was found at 0.023 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and it had no significant difference compared to the control, with induction rate merely of 13%. The AChE activity began to decrease from 0.058 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and reached minimum at 0.116 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 79% of the control group. The activity of brain AChE in *Carassius auratus* was not significantly influenced by malachite green at concentrations tested (0~0.116 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). As a whole, the activity of AChE was suppressed in the test groups exposed to malachite green.

收稿日期:2008-06-18

基金项目:高等学校科技创新工程培育项目(707011);863 重点项目(2007AA061201)

作者简介:王媛媛(1983—),女,河南郑州人,在读硕士,主要从事环境生物学方面的研究。E-mail:wangyy@mail.nankai.edu.cn

通讯作者:周启星 E-mail:Zhouqx@nankai.edu.cn

In conclusion, responses of brain AChE activity in *Carassius auratus* to crude-oil-contaminated soil were sensitive, and the activity of AChE could be the suitable early monitoring index and biomarkers of the existence of oil pollution in aquatic ecosystem.

Keywords: aquatic environment; crude-oil-contaminated soil; malachite green; *Carassius auratus*; acetylcholinesterase (AChE)

在污染生态毒理学研究中,能迅速指示环境污染的敏感生物标记物的筛选是一项十分重要的工作。乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)作为生物神经传导中一种关键性的酶和较为灵敏的生物标记物,最早专门用于评价、指示水体中有机磷农药的污染以及生态毒性。然而,越来越多的研究发现,重金属、醚类、酯类等污染物,都对其活性有重要影响^[1-2]。因为,在这些污染物的胁迫下,AChE 对乙酰胆碱的降解过程受到干扰,致使乙酰胆碱与神经后膜的乙酰胆碱受体的作用无法正常终止,造成生物长期处于神经兴奋状态,生理生化过程失调,最终导致死亡^[3-4]。

近年来,随着石油的开采和土壤环境石油污染的日益加剧,特别在油田区以及城市地区,大量的石油污染土壤随地表径流进入水体,对水生生态系统构成了直接的污染胁迫。但是,石油污染土壤进入水体后,对水生生物的毒性尚未见报道。孔雀石绿作为一种化工原料曾被广泛用于纺织业和作为细胞化学染色剂,后来在生产实践中发现其治疗鱼类真菌病有效,被许多国家广泛采用预防与治疗各类水产动物的疾病。不过目前,包括中国在内的许多国家,已经将孔雀石绿列为水产养殖禁用药物。但是,令人遗憾的是,许多贩运商为了延长鱼的生存时间,获取更大的利润,在运输前都要用孔雀石绿溶液对车厢进行消毒,而且不少储放活鱼的鱼池和酒店为了延长鱼的存活时间,也投放孔雀石绿进行消毒。可见,为了在渔业生产和消费中实施全面的孔雀石绿监控,迫切需要寻求一种能够快速灵敏指示其污染存在的生物标记物。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:Hettich 32R 低温高速冷冻离心机(购自德国 Hettich 公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(购自北京普析通用仪器有限责任公司);试剂:孔雀石绿为分析纯(购于天津市赢达稀贵化学试剂厂),酶反应试剂为分析纯或优级纯级别。

1.2 实验动物

幼体鲫鱼(*Carassius auratus*)购自天津市塘沽区花鸟鱼虫市场,选择平均体长(11.3 ± 0.5) cm、体重平均为(13.16 ± 0.92) g 的鱼体进行实验。养鱼用水为充

分曝气 24 h 的脱氯自来水。幼鱼购买后于实验室驯养 1 周(期间死亡率低于 5%),驯养期间每天喂食 1 次,实验前 24 h 停止喂食。实验用鱼采用行动活泼、鱼鳍完全舒展、逆水性强和食欲好的健康鲫鱼。

1.3 暴露浓度与条件

石油污染土壤取自山东东营胜利油田,土壤含水率 30.5%。略微阴干后过 10 目筛,取一定量污染土放入 50 cm×30 cm×30 cm 鱼缸中,加水至 35 L,使其中的石油污染土壤浓度分别为 1.000、5.000、10.000、20.000、25.000、50.000 g·L⁻¹,同时设置不加入石油污染土壤的空白对照。每日用玻璃棒搅动一次模拟自然界中自然扰动。每 5 d 更换全部水和污染土。孔雀石绿精确称量后配制成母液,逐级稀释为 6 个浓度梯度,分别是 0.002、0.005、0.023、0.039、0.058、0.116 mg·L⁻¹,同时设置不投加孔雀石绿的空白对照。根据前期试验的结果,所设置的最低浓度为 LC₅₀ 的 1/100,最高浓度为 LC₅₀ 的 1/2。实验期间采用静态置换法,每天更新 25 L 孔雀石绿溶液。

每组随机加入大小均匀的鱼 12 条,暴露时间为 20 d,期间用曝气机连续充气,上罩纱网以防鱼跃出。每天投喂饵料。水温控制为(15 ± 2)℃;pH 值为 6~8。

1.4 取样和样品处理

暴露 20 d 后取样:每个浓度随机取出 3 条鱼,活体解剖,取出鱼脑,用生理盐水冲洗血液,滤纸轻轻吸去表面液,铝箔纸包裹置于-20℃冰箱中保存。

样品处理:鱼脑称重,立即置于玻璃匀浆器中,以 1:4(W:V)的比例加入预冷的含 Trion X-100 的磷酸盐缓冲液(pH=8, 100 mmol·L⁻¹),冰浴下匀浆。匀浆液经高速冷冻离心机在 4℃、10 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min 后,上清液即为粗酶液,保存于-20℃冰箱中待测。

1.5 AChE 活性的测定方法

AChE 活性的测定采用 Ellman(1961)的方法^[5]并稍作修改。底物碘化硫代乙酰胆碱被 AChE 分解成为乙酸和硫代胆碱,硫代胆碱与 DTNB 反应,生成一种黄色络合物,于波长 410 nm 处比色,用酶促反应的初速度来确定酶的活性。

取 3 mL 磷酸盐缓冲液(pH=8, 200 mmol·L⁻¹)于 10 mL 比色管内,30℃保温 10 min,然后依次加入 20 μL 碘化硫代乙酰胆碱(75 mmol·L⁻¹),100 μL DTNB 溶液

(20 mmol·L⁻¹)。混合后加入 20 μL 酶提取液,反应终体积为 3.14 mL。于波长 410 nm 处用 1 cm 比色皿比色,测定时每隔 30 s 读数,连测 5 min,酶活定义为每克脑组织每分钟水解底物的 μmol 数,即:

$$\text{酶活力(U)} = V \times A \times 10^6 / (v \times K \times L \times C) \quad (1)$$

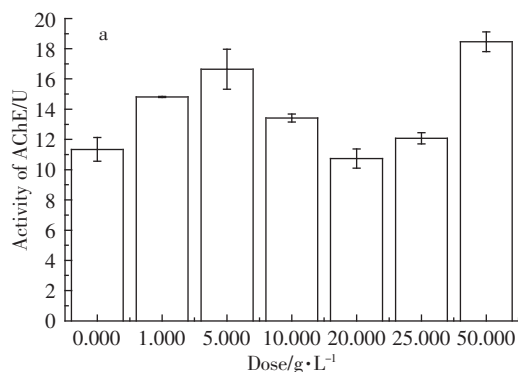
式中:V 为反应体系的总体积,mL;A 为吸光度随时间的变化率,OD·min⁻¹;v 为酶活力测定时所加入的粗酶液体积,μL;K 为消光系数,L·mmol⁻¹·mm⁻¹,K=1.36;L 为比色皿光程,10 mm;C 为粗酶液中脑组织的浓度,mg·mL⁻¹。

1.6 数据分析

实验结果表示为平均数±标准误差(Mean±SDE)。使用 SPSS 13.0 统计软件和单边 ANOVA 法对组间数据进行差异显著性分析,*P*<0.05 表明差异显著。

2 结果

2.1 鲫鱼脑 AChE 活性对水体中存在的石油污染土壤的响应



当石油污染土壤投入水中,即当水体中的鲫鱼暴露于石油污染土壤的作用,其脑 AChE 活性总的变化趋势是:先快速升高,降低后又有显著升高(图 1a)。对于 1.000 g·L⁻¹ 和 5.000 g·L⁻¹ 浓度组,鲫鱼脑 AChE 活性都显著(*P*<0.05)高于对照组,分别为对照组的 131%和 147%(图 1b)。低浓度下就被显著激活,说明 AChE 活性的变化对水体中石油污染的存在很敏感。浓度大于 5.000 g·L⁻¹ 后,其 AChE 活性开始降低,于 20.000 g·L⁻¹ 浓度时降到对照水平,然后开始升高。特别是 50.000 g·L⁻¹ 浓度暴露下,其 AChE 活性最强,是对照组的 1.6 倍(图 1b)。单边 ANOVA 分析表明,其 AChE 活性显著(*P*<0.05)高于对照组。总体来说,水体中的石油污染土壤对鲫鱼脑 AChE 活性起到诱导作用。

2.2 鲫鱼脑 AChE 活性对水体中孔雀石绿污染的响应

当孔雀石绿投入水体中,即鲫鱼对水体中孔雀石绿污染暴露的响应,其脑 AChE 活性总的变化趋势是:先缓慢升高,然后快速降低(图 2a)。当水体中孔

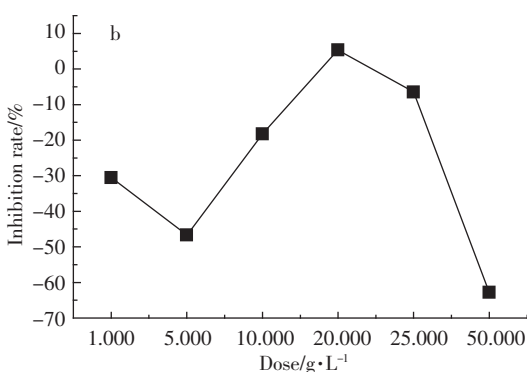


图 1 鲫鱼脑 AChE 活性对水体中不同浓度石油污染土壤暴露 20 d 的响应及抑制率(**P*<0.05)

Figure 1 Responses of the activity of *Carassius auratus* brain AChE to different doses of crude-oil-contaminated soil in aquatic environment after a 20-day exposure and the inhibition rate(**P*<0.05)

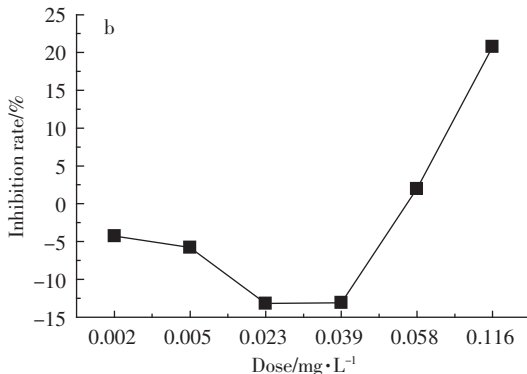
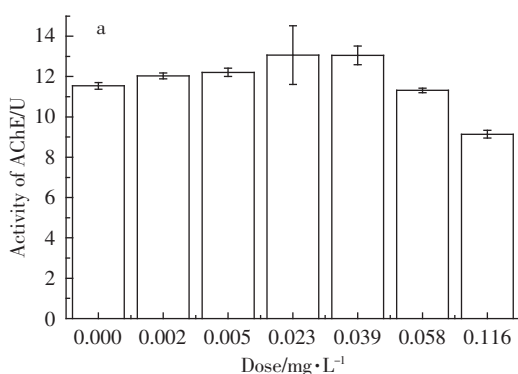


图 2 鲫鱼脑 AChE 活性对水体中不同浓度孔雀石绿暴露 20 d 的响应及抑制率(**P*<0.05)

Figure 2 Responses of the activity of *Carassius auratus* brain AChE to different doses of malachite green in aquatic environment after a 20-day exposure and the inhibition rate(**P*<0.05)

孔雀石绿浓度为 $0.023 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其 AChE 活性最大, 但是激活的程度不大, 激活率仅为 13%, 与对照组相比没有显著差异 ($P>0.05$)。当水体中孔雀石绿浓度从 $0.023 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $0.039 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其 AChE 的活性变化很小; 从水体中孔雀石绿浓度为 $0.058 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始, AChE 活性开始降低; 到 $0.116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其 AChE 活性降到最低, 为对照组的 79%。但是, 与对照组相比, 似乎没有显著差异 ($P>0.05$)。AChE 的活性随水体中孔雀石绿浓度的升高, 降低阶段的变化速率明显比上升阶段的变化速率要快得多 (图 2b)。总体来说, 在所设浓度范围内, 水体中孔雀石绿污染对鲫鱼脑 AChE 的抑制或诱导, 均没有与对照组达到显著差异 ($P>0.05$), 说明孔雀石绿对鲫鱼脑 AChE 的影响不大。从变化趋势上看, 水体中孔雀石绿污染对鲫鱼脑 AChE 活性的抑制效果大于诱导。

3 讨论

鲫鱼是广泛分布于中国大部分地区的经济鱼种, 易于获得, 易于养殖, 具有代表性, 在生态系统中占据重要的地位。鲫鱼对污染物敏感, 被广泛采用做试验生物^[6-7]。探讨污染物对其生理生化指标的影响和敏感的生物标志物是非常有意义的。有研究表明, 持续接触低浓度的污染物, 会使鲫鱼脑组织中的 AChE 含量升高, 这是由于污染物的刺激导致了脑组织中酶蛋白的加速合成, 这是一种应激反应^[8]。本研究中, 较低浓度的石油污染土壤和孔雀石绿均能诱导鲫鱼脑 AChE 活性增加 (图 1b, 2b), 也说明上述这种应激反应是存在的。

相对于孔雀石绿, 石油污染土壤对 AChE 的诱导程度较大, 1.000 、 5.000 和 $50.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组, 其脑 AChE 活性均显著高于 ($P<0.05$) 对照组。 $50.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导程度最大, 可达对照组的 160%。王晶等^[9]也研究发现, 水体中存在的石油烃的作用是一种神经毒剂, 会对生物的神经系统造成影响, 其对沙蚕 AChE 的抑制率大于 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 。当脑 AChE 活性长期受到抑制, 神经传导受到阻断, 会导致生物死亡^[10-11]。但是, 在本试验所研究的浓度范围内, 水体中石油污染土壤的存在对鲫鱼脑 AChE 活性起到了诱导的作用, 几乎都是高于对照组, 没有被抑制的下降趋势, 说明不会由于 AChE 受到抑制而导致鲫鱼的死亡。但是, 其 AChE 活性长期受到诱导, 对鲫鱼的影响也不容忽视。在极低浓度下 ($1.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 石油污染土壤存在的条件下, 其 AChE 的活性就被显著诱导 ($P<0.05$), 说

明鲫鱼脑 AChE 活性对水体中石油污染土壤的存在很敏感, 是水体中低浓度石油烃存在的良好的生物标志物。

孔雀石绿对许多生物都具有毒性作用, 尤其是对水生生物毒性很强^[12]。但在所研究的浓度范围内, 孔雀石绿对鲫鱼脑 AChE 活性的影响, 无论是诱导或是抑制, 都没有达到与对照差异显著 ($P>0.05$)。其变化表现为仅有很小的诱导就呈现出快速抑制的趋势。因此用鲫鱼脑 AChE 活性作为水体中孔雀石绿污染暴露的检测指标和生物标志物似乎不太合适。孔雀石绿对生物的毒性作用主要表现为其代谢产物的致癌、致突变性, 和对免疫系统的毒性^[13-14]。鲫鱼脑 AChE 活性的降低, 不是由于孔雀石绿对神经系统的干扰, 而是由于对孔雀石绿污染的应激超过它的耐性阈值后, 生物受到严重伤害, 导致的酶活性下降^[15]。

从变化趋势来看, 不同浓度的孔雀石绿对鲫鱼脑 AChE 活性的影响呈现出较简单的先升高后降低的变化趋势。而水体中存在的石油污染土壤导致鲫鱼脑 AChE 活性产生了更复杂的变化。在水体中石油污染土壤达到 $20.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 鲫鱼脑 AChE 活性下降到空白对照组水平, 后来又上升。这与鲫鱼对水体中的污染物存在多种吸收机制有关, 水体中石油污染土壤的浓度不同, 占优势的吸收途径不同, 导致毒性反应的变化^[16]。

4 结论

(1) 水体中低浓度石油污染土壤或孔雀石绿存在时, 均会导致鲫鱼脑 AChE 的活性的增加。

(2) 鲫鱼脑 AChE 的活性随着水体中石油污染土壤数量的增加的变化趋势是先快速升高, 降低后又有显著升高。在较低暴露水平 (1.000 和 $5.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 下, AChE 活性即显著高于对照组; 当暴露水平大于 $5.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 其 AChE 活性开始降低, 于 $20.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露水平时降到对照水平, 然后开始升高。 $50.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的石油污染土壤作用下, AChE 活性最强, 是对照组的 1.6 倍。水体中的石油污染土壤对鲫鱼脑 AChE 活性总体表现为诱导作用。

鲫鱼脑 AChE 的活性随孔雀石绿浓度升高的变化趋势表现为, 先缓慢升高, 然后快速降低。当暴露浓度为 $0.023 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, AChE 活性最大, 但激活率仅为 13%, 与对照组相比没有显著差异。从 $0.058 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始, AChE 活性开始降低; 到 $0.116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, AChE 活性降到最低, 为对照组的 79%。在所设置的浓度范围

内,孔雀石绿对鲫鱼脑 AChE 的影响不大。从变化趋势上看,水体中孔雀石绿污染对鲫鱼脑 AChE 活性的抑制效果大于诱导。

(3)鲫鱼脑 AChE 对水体中石油污染土壤较敏感,是较适宜的生物标志物。

参考文献:

- [1] 钱芸,朱琳,刘广良.几种农药对鲤鱼脑 AChE 的联合毒性效应[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(4):27-32.
- QIAN Yun, ZHU Lin, LIU Guang-liang. The toxicity effect of pesticide mixtures on acetylcholinesterase(AChE)[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2000, 1(4):27-32.
- [2] 贾秀英,董爱华. Cd、Cr(VI)及其复合污染对鲫鱼脑组织乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3):337-339.
- JIA Xiu-ying, DONG Ai-hua. Single and combined pollution on acetylcholinesterase activity in brain of *Carassius auratus*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(3):337-339.
- [3] 张宁,周启星,李婷,等.氧化型染发剂对沙蚕的毒性效应及对部分酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(1):65-71.
- ZHANG Ning, ZHOU Qi-xing, LI Ting, et al. Ecotoxic effects of oxidation hair dyes on *Perinereis aibuhiteusis Grube* and its enzyme activities[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(1):65-71.
- [4] Vieira L R, Sousa A, Frasco M F, et al. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 395(2-3):87-100.
- [5] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7(2):88-90.
- [6] 刘慧,王晓蓉,张景飞,等.铜及其 EDTA 配合物对彭泽鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响[J]. 环境化学, 2004, 23(3):263-267.
- LIU Hui, WANG Xiao-rong, ZHANG Jing-fei, et al. Effects of copper and its EDTA complex(Cu-EDTA) on the antioxidant system of *Carassius auratus* liver[J]. *Environmental Chemistry*, 2004, 23(3):263-267.
- [7] Luo Y, Sui Y X, Wang X R, et al. 2-chlorophenol induced hydroxyl radical production in mitochondria in *Carassius auratus* and oxidative stress—an electron paramagnetic resonance study[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7):1260-1268.
- [8] Kaufer D, Friedman A, Seidman S, et al. Anticholinesterases induce multigenic transcriptional feedback response suppressing cholinergic neurotransmission[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, 119-120:349-360.
- [9] 王晶,周启星,张倩茹,等.沙蚕暴露于石油烃、Cu²⁺和 Cd²⁺毒性效应及乙酰胆碱酯酶活性的响应[J]. 环境科学, 2007, 28(8):1796-1801.
- WANG Jing, ZHOU Qi-xing, ZHANG Qian-rui, et al. Toxic effects of petroleum hydrocarbons, copper and cadmium on polychaete *Perinereis aibuhiteusis Grube* and on its responses in acetylcholinesterase activity[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(8):1796-1801.
- [10] 万良庐. 鱼脑乙酰胆碱酯酶(AChE)在水体监测中的指示作用[J]. 环境科学, 1982, 3(6):65-70.
- WAN Liang-lu. The indication function of fish brain acetylcholinesterase (AChE) in water monitoring[J]. *Environmental Science*, 1982, 3(6):65-70.
- [11] 吴海花,杨美玲,郭亚平,等.不同中华稻蝗种群对马拉硫磷的敏感性 & 乙酰胆碱酯酶特性的比较[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(1):179-183.
- WU Hai-hua, YANG Mei-ling, Guo Ya-ping, et al. Comparisons of susceptibility to malathion and properties of acetylcholinesterase among different populations of *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: actididae) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(1):179-183.
- [12] Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66(3):319-329.
- [13] Culp S J, Blankenship L R, Kusewitt D F, et al. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, 122(3):153-170.
- [14] Kucukkilinc T, Ozer I. Inhibition of human plasma cholinesterase by malachite green and related triarylmethane dyes; mechanistic implications[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 440(2):118-122.
- [15] 陆雷达,金叶飞,施维林,等. LAS 与 Cu²⁺单一及符合污染对泥鳅肝脏 SOD、CAT 活性的影响[J]. 水产科学, 2007, 26(12):648-651.
- LU Lei-da, JIN Ye-fei, SHI Wei-lin, et al. Effects of single and complex pollutions of linear alkylbenzene sulfonates(LAS) and Cu²⁺ on activities of SOD and CAT in liver of oriental weather fish *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(12):648-651.
- [16] 张瑞安. 油污染对渔业生态影响严重[J]. 海洋信息, 1997(6):21.
- ZHANG Rui-an. Oil pollution significantly affected fishery ecosystems[J]. *Marine Information*, 1997(6):21.