

氧化乐果对静水椎实螺急性毒性和酶活性的影响

宋志慧, 丛林 (青岛科技大学环境与安全工程学院, 山东青岛 266042)

摘要 [目的] 探究有机磷农药氧化乐果对水生生物的毒性效应。[方法] 测定了氧化乐果对静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)的急性毒性, 并研究了氧化乐果对静水椎实螺组织中乙酰胆碱酯酶(AChE)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。[结果] 氧化乐果对静水椎实螺的96 h- LC_{50} 为19.22 mg/L, 安全浓度为1.92 mg/L。静水椎实螺暴露于氧化乐果中5 d, AChE活性明显下降, SOD活性在0.53、1.06 mg/L浓度下上升不明显, 在2.65、5.30 mg/L浓度下呈明显下降。[结论] 为氧化乐果的使用和及其污染防治提供了理论依据。

关键词 氧化乐果; 静水椎实螺; 乙酰胆碱酯酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号 S482.3⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)06-02534-02

Acute Toxicity and Influence on Enzyme Activities in *Lymnaea stagnalis* Exposed to Omethoate

SONG Zhi-hui et al (College of Environment and Safety Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042)

Abstract [Objective] The aim was to explore toxic effects of omethoate on aquatic specials. [Method] The acute toxicity of omethoate against *Lymnaea stagnalis* was measured, and the effects of omethoate on acetylcholinesterase (AChE) and superoxide dismutase (SOD) in the tissues of *L. stagnalis* were studied. [Result] The 96 h median lethal concentration of omethoate against *L. stagnalis* was 19.22 mg/L, and the safety concentration was 1.92 mg/L. After *L. stagnalis* was exposed to omethoate for five days, the activity of AChE in the tissues of *L. stagnalis* decreased obviously, while the activity of SOD increased in the concentrations of 0.53 and 1.06 mg/L slightly and decreased in the concentrations of 2.65 and 5.30 mg/L obviously. [Conclusion] The research result provides theoretical basis for the application and pollution control of omethoate.

Key words Omethoate; *Lymnaea stagnalis*; Acetylcholinesterase; Superoxide dismutase

有机磷农药目前已取代有机氯农药成为我国生产量最大、使用最广泛的一类农药。农药通过各种传输途径对位于农业用地附近的静水栖息地造成复发性污染, 如喷洒、表面或地下径流、排水系统或干湿沉降^[1]。氧化乐果是一种被全世界广泛使用的有机磷农药, 化学名为O,O-二甲基-S-[2-(甲氨基)-2-氧代乙基]硫代磷酸酯, 是一种高毒性的广谱杀虫剂、杀螨剂。随着氧化乐果的广泛应用, 该种非持久性农药在一定条件下也会有较长的残存期^[2], 对人和动物造成损伤。有机磷农药的毒性不仅能够抑制胆碱酯酶的活性, 造成神经递质乙酰胆碱在胆碱能神经突出的积累, 而且能引起氧化应激, 造成活性氧的过多产生及改变抗氧化系统和清除系统^[3]。

静水椎实螺属软体动物门腹足纲肺螺亚纲, 是水生食物链中的重要环节。它们壳口无厣, 对水中毒物不能回避, 在有毒物质的积累和转移过程中起重要作用。椎实螺栖息地相对固定, 生活周期长, 繁殖率高, 故其种类组成、生物量和密度的变动能有效反映环境条件的变化, 成为理想的环境指示生物^[4]。有研究表明, 椎实螺目前在应对杀虫剂的种群响应和生活史等生态毒理问题是典型^[5], 同时也适合在研究毒剂对生物演化影响和人为干扰对淡水生态系统造成的影响方面作为模型^[6]。为初步评估氧化乐果的风险性, 笔者研究了氧化乐果对静水椎实螺的急性毒性和对螺体内酶(AChE和SOD)活性的影响, 以期对氧化乐果的使用和及其污染防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂。FA1204B型电子分析天平和756型紫外可见分光光度计均为上海精密科学仪器有限公司生产; TGL-16G型高速台式离心机为上海安亭科学仪器厂生产。40%氧化乐果乳油为山东大成农药股份有限公司产品。

1.1.2 供试动物。将从山东省青岛市中山公园中采集到的静水椎实螺[平均体长(0.8±0.1)cm, 平均体重(0.3±0.1)g]以合适数量置于各个层析缸中, 放入一定量水草和曝气水, 于室温(25±1)℃、光照/黑暗(12:12h)条件下驯养, 每天定时换水、喂食并及时挑出死螺。驯养7d后, 挑选个体健壮、大小均一、行为活泼的螺进行试验。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性试验。设置7个试验浓度组(2.65、5.30、10.60、21.20、53.00、106.00、212.00 mg/L)和1个对照组, 并设置1个平行试验, 在每一试验浓度组与对照组中放入螺10只。试验期间温度、光照同驯养期, 不投食。根据概率单位图解法^[7]求出96h半致死浓度(96h- LC_{50})。

1.2.2 酶源上清液的制备。染毒5d后从各组中选取存活的静水椎实螺, 低温致死后去壳, 用滤纸将其表面的试验液吸干后称重。放入匀浆器中, 按1:5(W/V)加入冷藏的磷酸缓冲提取液(pH 8.0), 进行匀浆(冰浴, 以保持酶的活性), 6000 r/min离心10 min。取上清液用磷酸缓冲溶液稀释20倍, 制成稀释比为1:100(W/V)的提取液, 即为酶源上清液, 低温保存。

1.2.3 AChE活性的测定^[8]。用移液管准确移取0.2 ml酶源上清液和3.0 ml 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 8.0)于25 ml比色管中, 摇匀, 于30℃下预热10 min。然后依次加入0.1 ml 5 mmol/L 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)和0.1

作者简介 宋志慧(1972-), 男, 辽宁法库人, 副教授, 博士, 从事环境生物毒理学及环境生物控制研究, E-mail: songhui@qust.edu.cn。

收稿日期 2013-02-01

ml 15 mmol/L 碘化硫代乙酰胆碱 (ATChI), 迅速摇匀转移至比色皿中, 在 412 nm 波长下测定吸光度, 每隔 30 s 读数 1 次。空白以磷酸缓冲液代替酶源液。AChE 单位定义: 1 mg 组织蛋白 1 min 催化分解 1 μ mol 底物为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.4 SOD 活性的测定。

1.2.4.1 邻苯三酚自氧化速率的测定。取 10.0 ml Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 于 25 ml 比色管中, 置于 25 $^{\circ}$ C 下水浴 20 min。加入 0.1 ml 9 mmol/L 邻苯三酚, 迅速混匀转入 1 cm 比色皿中, 并开始计时, 于 325 nm 波长下测定吸光度, 每 30 s 测定 1 次, 连续测定 4 min, 空白以 Tris-HCl 缓冲溶液代替邻苯三酚。以吸光度(A)对时间作图, 直线的斜率即为邻苯三酚的自氧化速率。

1.2.4.2 SOD 活性的测定。在 25 ml 比色管中加入 10.0 ml 的 Tris-HCl 缓冲液和 4.0 ml 酶液, 混匀后加入 0.1 ml 9 mmol/L 邻苯三酚, 其余步骤同“1.2.4.1”。SOD 单位定义^[9]: 一定条件下使 1 ml 反应液自氧化速率抑制 50% 的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

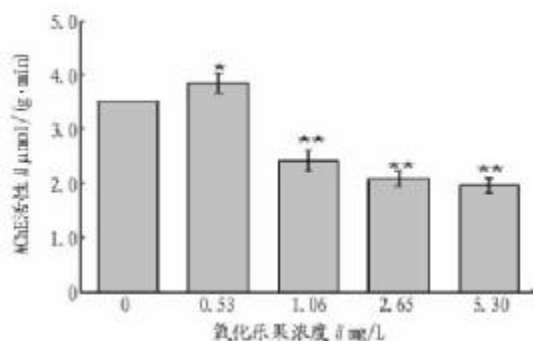
1.3 数据处理 采用 SPSS 16.0 统计分析软件对 AChE 和 SOD 活性进行单因素方差分析, 并用 Origin 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 氧化乐果对静水椎实螺的急性毒性 结果表明, 氧化乐果对静水椎实螺 96 h 的毒力回归方程为: $y = 3.2275 + 1.3807x$, $r^2 = 0.9716$, 96 h- LC_{50} 为 19.22 mg/L, 其 95% 置信区间为 9.26 ~ 39.92 mg/L, 安全浓度(1/10 LC_{50}) 为 1.92 mg/L。

2.2 氧化乐果对静水椎实螺酶活性的影响

2.2.1 对静水椎实螺 AChE 活性的影响。由图 1 可知, 0.53 ml/L 浓度组静水椎实螺组织 AChE 活性显著高于对照组; 而 1.06、2.65、5.30 mg/L 浓度组 AChE 活性均极显著低于对照组, 且氧化乐果处理浓度越高, AChE 活性下降越明显。氧化乐果对静水椎实螺表现出显著的剂量-效应关系, 在外界不良环境的刺激下 AChE 活性均表现为下降。

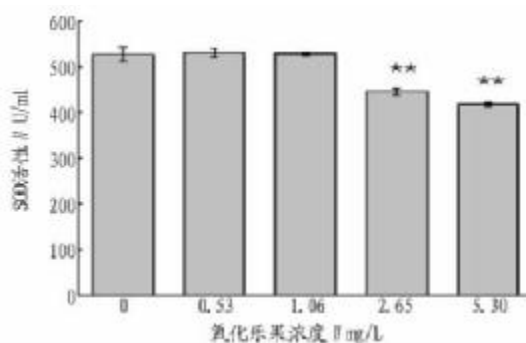


注: 与对照相比, * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

图1 氧化乐果对静水椎实螺体内 AChE 活性的影响

2.2.2 对静水椎实螺 SOD 活性的影响。由图 2 可知, 0.53、1.06 mg/L 浓度组静水椎实螺 SOD 活性与对照组比较差异不显著; 2.65、5.30 mg/L 浓度组静水椎实螺 SOD 活性极显著低于对照组。由此可见, 当浓度低于安全浓度(1.92 mg/L)时, 氧化乐果对静水椎实螺 SOD 活性不存在剂量-效应关系; 当浓度高于安全浓度(1.92 mg/L)时, 氧化乐果对静

水椎实螺 SOD 活性存在极显著剂量-效应关系, 在外界不良环境的刺激下 SOD 活性表现为极显著下降。



注: 与对照相比, * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$ 。

图2 氧化乐果对静水椎实螺体内 SOD 活性的影响

3 讨论

3.1 氧化乐果毒性分析 参照鱼类急性毒性试验中化学物质急性毒性分级^[10], 氧化乐果对静水椎实螺 96 h- LC_{50} 约为 19.22 mg/L, 在 1 ~ 100 mg/L 浓度范围内属于高毒药物。Tripathi 等^[11]研究了乐果和西维因对椎实螺的急性毒性, 结果显示, 乐果和西维因对椎实螺 96 h- LC_{50} 分别约为 10.80 和 14.20 mg/L。由此可知, 上述药剂对椎实螺的急性毒性大小依次为氧化乐果、西维因、乐果。杨帆等^[12]研究了氧化乐果对黄颡鱼幼鱼的急性毒性, 96 h- LC_{50} 约为 66.67 μ g/L。可见, 静水椎实螺对氧化乐果的毒性更敏感。

3.2 氧化乐果对椎实螺神经系统的影响 AChE 能够将神经系统突触部位传导神经兴奋的化学物质乙酰胆碱分解为乙酸和胆碱, 以维持神经系统的正常生理功能, 当 AChE 抑制剂与正常底物争夺 AChE 结合部位时可形成稳定的抑制剂-AChE 复合物, 使酶失活。AChE 活性抑制是有机磷农药的作用机制, 常常用于判断有机磷农药中毒的程度。有研究表明, AChE 活性抑制可作为生物标志物反映环境中有机磷和氨基甲酸酯类农药的污染^[13]。

葛士林等^[14]研究发现, 氧化乐果对红裸须摇蚊 4 龄幼虫体内 AChE 活性影响呈显著质量浓度-时间相关性, 随着氧化乐果处理质量浓度和时间的增加, 红裸须摇蚊幼虫体内的 AChE 活性抑制逐渐降低。该研究表明, 螺体暴露于不同浓度氧化乐果中 5 d, 在受到外界胁迫情况下椎实螺体内 AChE 活性显著下降, 表现出对外界不良刺激的敏感, 具有对外界不良环境的预警作用。

3.3 氧化乐果对椎实螺抗氧化系统的影响 在逆境情况下, 生物体内自由基增多, 细胞膜就会产生过氧化, 从而导致细胞的损伤和破坏。SOD 与过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)都是生物体内清除超氧自由基的关键酶, 能保护细胞膜脂免受氧化损伤。该类酶与生物体的抗污染、抗病等抗性有关, 很多研究都将其作为判定污染程度的生物标志物。

Musa 等^[15]研究了将青蛙暴露于氧化乐果 10 和 20 mg/L 剂量下, 青蛙各组织中抗氧化系统(GSH-Px, GST, SOD)酶活性随着时间的延长的变化, 结果显示青蛙体内各种酶活性均

(下转第 2538 页)

照,且与对照形成显著差异($P < 0.05$)。根中 P 含量增长尤为明显,各接种组与对照组相比,提高了 50.00% ~ 231.25%。

从对 K 的影响看,菌根接种处理较 CK 处理,叶片中的 K 含量均产生显著性差异。而茎和根中的 K 含量并无显著性差异。

3 结论

(1)接种外生菌根显著提高了栓皮栎幼苗的菌根化水平,且差异达到了显著水平($P < 0.05$),其中未接种菌根菌的栓皮栎侵染率为 0,而接种了菌根菌的栓皮栎侵染率达到了 74.8% ~ 90.9%,不同菌根菌对栓皮栎根系侵染率的影响有所不同,侵染率从大到小依次为:S.l > L.l > G.v > B.e > S.g。

(2)外生菌根菌促进了栓皮栎的生长,与对照相比提高了栓皮栎的苗高、地径及生物量($P < 0.05$)。L.l、S.l、G.v、B.e 等 4 个菌株显著促进了栓皮栎苗高、地径等方面的生长,与对照相比差异达到显著水平($P < 0.05$)。G.v、L.l、S.l 均明显提高了栓皮栎幼苗的生物量,与对照存在显著差异($P < 0.05$)。而 S.g 虽然苗高、地径较对照均有不同程度的提高,但与对照相比生物量降低,尤其地下部分较对照有所降低。S.g 虽然能够与栓皮栎形成共生关系,但在观察期内没有促进栓皮栎幼苗根部的生长,说明菌根菌 S.g 可能不是促进栓皮栎生长的优良菌种。G.v、L.l、S.l 这 3 个菌株能在较短期内显著促进植物生长,可能是适合栓皮栎生长的菌根菌。

(上接第 2535 页)

表现为下降的趋势。该试验发现,在低于安全浓度的 2 个浓度组中,SOD 活性与对照组比较上升幅度较小,说明低浓度氧化乐果激发螺体内酶活响应机制^[16],但不明显。在高于安全浓度的 2 个浓度组中,SOD 活性与对照组比较表现出极显著下降趋势,说明高浓度氧化乐果对静水椎实螺抗氧化系统造成损伤。

综上所述,有机磷杀虫剂被认为是一种经典的神经毒物,椎实螺在氧化乐果的胁迫下体内 AChE 活性受到明显抑制。暴露在不同浓度下,椎实螺体内的 SOD 酶活响应机制被激发以抵抗外界氧化乐果的胁迫,保护细胞免受损伤,随着浓度的升高,细胞受到损伤,SOD 活性下降。该试验结果说明,椎实螺对氧化乐果的胁迫有较敏感的反应,因此,椎实螺可作为有机磷污染的敏感生物标志物。

参考文献

- [1] LIESS M. Population response to toxicants is altered by intraspecific interaction[J]. Environ Toxicol Chem, 2002, 21: 138 - 142.
- [2] 张波,徐光翠. 氧化乐果对小鼠精子 DNA 损伤的研究[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(8): 622 - 624.
- [3] MILATOVIC D, GUPTA R C, ASCHNER M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress[J]. Science World Journal, 2006, 6: 295 - 310.
- [4] 盛似春,桂和荣,张明群. 淮河水系淮南段椎实螺类生态学研究[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(5): 563 - 565.
- [5] COUTELLE M A, LAGADIC L. Effects of self-fertilization, environmental

(3)接种菌根菌促进了栓皮栎幼苗对 N、P 等营养元素的吸收,而且对地上部分和地下部分生物量的分配影响不同,促进了地上部分生物量的积累,这也与试验得到的根冠比的数据结果是一致的。

综上所述,接种菌根菌能够有效促进栓皮栎幼苗菌根的形成,并且显著促进幼苗的生长,说明菌根化育苗是一种能够有效提高栓皮栎苗木质量的途径,而如何将菌根化应用于工厂化育苗需要进一步研究。

参考文献

- [1] 郑万钧. 中国树木志 第二卷[M]. 北京:中国林业出版社, 1985.
- [2] 中国森林编辑委员会. 中国森林 第三卷[M]. 北京:中国林业出版社, 2000.
- [3] 张文辉,卢志军. 栓皮栎种群的生物学生态学特性和地理分布研究[J]. 西北植物学报, 2002, 22(5): 1093 - 1101.
- [4] 弓明钦,陈应龙,仲崇祿. 菌根研究及应用[M]. 北京:中国林业出版社, 1997.
- [5] 孟繁荣,邵景文,武继连. 林木菌根学[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 1996.
- [6] 赵忠,刘西平,王真辉. 外生菌根与 VA 菌根混合接种对毛白杨光合及蒸腾特性的影响[J]. 西北林学院学报, 1997, 12(3): 63 - 68.
- [7] 阎秀峰,王琴. 接种外生菌根对辽东栎幼苗生长的影响[J]. 植物生态学报, 2002, 26(6): 701 - 707.
- [8] 石青莲,郭素娟,尹伟伦. 不同菌根菌对板栗容器苗生长和形态指标的影响[J]. 山东林业科技, 2004(2): 3 - 6.
- [9] GONG M Q, CHEN Y, WANG F Z, et al. Inhibitory effect of ectomycorrhizal fungi on bacteria wilt of *Eucalyptus* [J]. For Res, 1999, 12(4): 339 - 345.
- [10] 黄艺,李婷,费颖恒. 外生菌根真菌对油松幼苗根际土壤重金属赋存的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2007, 23(3): 70 - 76.

- stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* [J]. Ecotoxicology, 2006, 15: 199 - 213.
- [6] MARIE-AGNE'S COUTELLE, MARC COLLINET, THIERRY CAQUET. Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* [J]. Ecotoxicology, 2011, 20: 524 - 534.
- [7] 国家环境保护总局. GB/T 13266-91 水质 物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S]. 北京:中国标准出版社, 1991.
- [8] 宋志慧,王庆伟. 三苯基锡和五氯酚胁迫斑马鱼生理生化影响[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(1): 99 - 104.
- [9] 李永利,张焱. 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(6): 673.
- [10] 卢玲,宋福. 鱼类急性毒性实验[J]. 生物学通报, 2002, 37(7): 52 - 53.
- [11] TRIPATHI P K, SINGH A. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on protein metabolism of the freshwater snail *Lymnaea acuminata* [J]. Environmental Contamination and Toxicology, 2003, 71(3): 535 - 542.
- [12] 杨帆,邹容. 3 种有机磷农药对黄颡鱼幼鱼的急性毒性试验[J]. 安徽农业科学, 2012, 38(4): 1872 - 1873.
- [13] 陈嘉,周志俊,顾祖维. 乙酰胆碱酯酶研究进展对更新有机磷毒作用机理的认识[J]. 劳动医学, 2003, 18(1): 551.
- [14] 葛士林,曹传旺,王志英. 3 种农药对红须须摇蚊体内蛋白质质量分数和 AChE 活性的影响[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(1): 108 - 109, 126.
- [15] MUSA ISNAS, ESREF YEGIN, ISMAIL CELIK. Effects of omethoate on certain oxidative biomarkers in various tissues of frogs (*Rana ridibunda*) at acute exposure [J]. Toxicology and Industrial Health, 2012, 28(1): 27 - 34.
- [16] 吕林兰,杨家新,董学兴. 马拉硫磷对双齿围沙蚕乙酰胆碱酯酶和过氧化氢酶的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(3): 431 - 436.