

毒死蜱和三唑磷对斑马鱼头部 AChE 活性影响及在鱼体内的富集

余向阳, 赵于丁, 王冬兰, 侯方浩, 刘贤进

(江苏省农业科学院 食品质量安全与检测研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:采用半静态法,测定了在 96 h-LC₅₀ 的 1/10、1/20、1/40 及 1/80 作用剂量下慢性暴露,毒死蜱和三唑磷对斑马鱼头部乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的抑制及两种农药在鱼体的富集作用,并研究解除 30 d 后酶活性的恢复。结果表明,随暴露剂量增大、暴露时间延长,农药对 AChE 活性抑制越强。在 96 h-LC₅₀ 的 1/10 作用剂量下连续暴露 30 d,毒死蜱和三唑磷处理组斑马鱼头部 AChE 活性分别为对照的 42.25%和 31.80%。毒死蜱不同剂量处理组酶活性在解除药剂后 30 d 均可恢复到对照的 90%以上,而三唑磷高剂量处理组(96 h-LC₅₀ 的 1/10 和 1/20)分别只有对照的 74.91%和 71.46%。毒死蜱极易在鱼体富集,慢性暴露 30 d 富集系数达 260.91~1 320.03 L·kg⁻¹,而三唑磷仅为 8.23~26.84 L·kg⁻¹。

关键词:乙酰胆碱酯酶(AChE);毒死蜱;三唑磷;生物富集

中图分类号:X592 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2452-04

Impact on the Activity of Acetylcholinesterase(AChE)in Head and Bioconcentration in Zebrafish(*Brachydanio rerio*)After Chronic Exposure to Chlorpyrifos and Triazophos

YU Xiang-yang, ZHAO Yu-ding, WANG Dong-lan, HOU Fang-hao, LIU Xian-jin

(Institute of Food Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The acetylcholinesterase(AChE)activities in zebrafish(*Brachydanio rerio*)head was studied after chronic exposure at sublethal concentrations(1/10, 1/20, 1/40 or 1/80 of 96 h-LC₅₀)of chlorpyrifos and triazophos, and the bioconcentration of these pesticides in fish was investigated as well. The results showed that the AChE activity gradually reduced with increasing of the exposure time and concentrations. When the concentrations of the pesticides were 1/10 of 96 h-LC₅₀ and exposed for 30 days, the activities of AChE in zebrafish head were 42.25% and 31.80% of control for chlorpyrifos and triazophos, respectively. The recovery activities of AChE by chlorpyrifos were all over 90% of control in all the treatments 30 days after the pesticide was removed. However, the recovery activities of AChE inhibited by triazophos were 74.91% and 71.46% of control at the high concentration exposures (1/10 and 1/20 of 96 h-LC₅₀). Chlorpyrifos could be easily taken up and concentrated by zebrafish from water, and the bioconcentration factors (BCF_{30d})were 260.91~1 320.03 L·kg⁻¹ after exposure of 30 days, while for triazophos ranged 8.23~26.84 L·kg⁻¹.

Keywords: acetylcholinesterase(AChE); chlorpyrifos; triazophos; bio-concentration

农药的大量使用造成对水环境污染问题已越来越受到关注。水体的农药污染不仅危及水生生物安全,导致生态平衡被破坏,还可在生物体内富集浓缩,并通过食物链传递对人类的健康带来潜在的威胁^[1]。

因此,应加强农药对水生生物,特别是对鱼类的危害评价研究,以指导农药的合理使用。乙酰胆碱酯酶(AChE)是有机磷和氨基甲酸酯类农药的作用靶标酶,也是用于评价水生生物对于神经毒剂化合物暴露效应中一种重要生物标志物,是对有机磷和氨基甲酸酯类农药污染的有效诊断工具^[2-4]。生物体内 AChE 活性被抑制对其活动、取食、产卵以及躲避捕食天敌等均有不同程度的影响^[5-9]。研究农药对鱼体 AChE 活性的影响对评价农药对鱼类的安全性及建立水体污染快速诊断方法具有重要意义。

收稿日期:2008-02-16

基金项目:国家“十一五”支撑计划(2006BAK02A04);江苏省社会发展基金(BS2007096);江苏省农科院创新人才基金(6510709)

作者简介:余向阳(1972—),男,湖北浠水人,博士,副研究员,主要从事农药污染评价及治理技术研究。

E-mail: yu981190@jaas.ac.cn

毒死蜱和三唑磷在我国应用广泛,并且是作为替代甲胺磷、对硫磷等高毒有机磷类农药的两个主要有机农药品种,被推荐用于水稻、棉花等农作物的害虫防治^[10]。关于这两种农药对水生生物的安全性及生物富集作用研究有待深入开展。本研究以斑马鱼为试鱼,测定了亚致死作用剂量下连续暴露 30 d,毒死蜱和三唑磷对斑马鱼头部 AChE 活性的抑制作用及酶活性的恢复,以及这两种农药在体内的富集浓缩作用,为评价这两种农药对水生生物的安全性提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试生物:斑马鱼(*Brachydanio rerio*)采购于南京夫子庙花鸟鱼市场,大小一致,平均体长 2~3 cm。试验前在室内驯养 7 d 以上,自然死亡率应小于 2%,试验前 1 d 停止喂食,急性毒性测定试验期间不喂食,慢性暴露试验期间每 48 h 定期定量喂食 1 次。

仪器及试剂:Angilent 6890N 气相色谱仪(Angilent,美国),组织匀浆器(IKA T18 基本型),低温高速离心机(Beckman),酶标仪(Thermo Multiskan MK3)。毒死蜱、三唑磷标准品(含量>98%,均购自国家标准物质研究中心),乙酰胆碱酯酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所第一分所),标准牛血清蛋白(BSA)和考马斯亮蓝 G-250 均为 SIGMA 公司产品,乙腈等化学试剂均为 AR 级(上海化学试剂有限公司产品),无水硫酸钠(分析纯,使用前 650 ℃烘烤 4 h 以上),氟罗里硅土(100~200 目)。试验用水:用曝气去氯处理 24 h 后的自来水,pH 为 6.8~7.5,试验期间保证水中溶氧量为 5 mg·L⁻¹ 以上。

1.2 试验方法

1.2.1 急性毒性试验

参照 OECD 推荐的半静态法^[11]。在 200 cm×300 cm×200 cm 的玻璃缸中,按每 1 L 药液投放 1 条鱼的比例进行试验。试验期间保持水温(20±2)℃,每隔 48 h 更换全部药液。每浓度处理重复 3 次,每重复试鱼 10 条,并设 1 个不加农药的对照处理。于试验开始后 24、48、72、96 h 记录死鱼数,计算死亡率。

1.2.2 慢性暴露试验

参照 OECD 推荐的半静态法^[12]。分别以急性毒性试验测定两种农药 96 h-LC₅₀ 值的 1/10、1/20、1/40 及 1/80 的剂量连续暴露处理 30 d,然后用不含农药的水继续恢复饲养 30 d。于受药后 10、20、30 d 及恢复 30

d 后取样,分别测定头部 AChE 活性及鱼体残留农药浓度。除试验期间需定期喂食外,慢性暴露处理方法和条件同急性毒性试验。

1.2.3 乙酰胆碱酯酶活性测定

匀浆制备:取试鱼整个头部,去掉鳃盖和鱼鳃后称重,加入 3 mL 预冷匀浆缓冲液(0.05 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液 pH7.4)冰浴下充分匀浆。然后在 4 ℃下,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液用于 AChE 活力和蛋白质含量测定。

生化测定:AChE 活性采用南京建成生物工程研究所乙酰胆碱酯酶测定试剂盒进行测定,该试剂盒根据 Ellman 原理,乙酰胆碱酯酶水解乙酰胆碱生成胆碱和乙酸,通过胆碱与巯基显色剂反应生成 TNB 黄色化合物,在 412 nm 下进行比色分析,根据水解产物胆碱的量反应乙酰胆碱酯酶活力。蛋白质含量的测定采用 Bradford^[13]法。

1.2.4 斑马鱼体内农药残留量测定方法

提取:将试验鱼分装于 10 mL 玻璃试管中,称重并按每 1 g 样品加 1 g 无水硫酸钠,充分混匀后加入 5 mL 乙腈,匀浆 2 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,残渣再用 2 mL 乙腈重复提取 1 次,合并提取液,40 ℃氮气吹干后,用 1 mL 正己烷定容,氟罗里硅土小柱净化。

净化:在内径 1.5 cm、长 15 cm 左右的聚乙烯层析柱依次填入 1 cm 无水硫酸钠、3 cm 高氟罗里硅土和 1 cm 无水硫酸钠,用 5 mL 正己烷活化。将上述 1 mL 提取液加入到柱顶,用 5 mL 正己烷洗涤后,再用 5 mL 正己烷+二氯甲烷(7+3)进行洗脱,收集洗脱液,氮气吹干并用丙酮定容,气相色谱定量检测。

气相色谱测定条件:载气:氮气(纯度 99.999%);流速:3.4 mL·min⁻¹;色谱柱:DB-17(30.0 m×530 μm×1.0 μm);进样口温度:250 ℃,不分流进样;柱温程序:初始温度 220 ℃,保持 1 min,以 10 ℃·min⁻¹ 升温至 250 ℃,保持 5 min,然后以 20 ℃·min⁻¹ 升温至 280 ℃,并保持 4.5 min;检测器温度:230 ℃;氢气流速:75.0 mL·min⁻¹;空气流速:100 mL·min⁻¹;尾吹气流速:30 mL·min⁻¹;在上述色谱条件下,毒死蜱保留时间为 5.561 min,三唑磷保留时间为 11.823 min。

1.3 数据分析

急性毒性测定数据用 DPS 软件(浙江大学)计算毒力回归方程及 LC₅₀ 值。乙酰胆碱酯酶活性测定数据用 DPS 软件进行 Duncan's 方差分析。

2 结果与讨论

2.1 毒死蜥和三唑磷对斑马鱼急性毒性

从表 1 中农药对斑马鱼急性毒性测定结果可以看出, 毒死蜥和三唑磷对斑马鱼 96 h-LC₅₀ 分别为 0.52 和 4.90 mg·L⁻¹。根据我国《化学农药环境安全评价试验准则》^[14]的评价标准,毒死蜥对斑马鱼高毒,三唑磷对斑马鱼中毒。

表 1 毒死蜥和三唑磷对斑马鱼的急性毒性
Table 1 Acute toxicity of chlorpyrifos and triazophos to zebrafish

农药 Pesticides	时间/h Duration	毒力回归式(Y=) Regression	致死中浓 LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	95%可信限 95%confidence interval
毒死蜥 chlorpyrifos	24	5.569 5+5.693 1x(0.963 2)	0.79	0.72~0.88
	48	5.575 2+4.267 6x(0.942 1)	0.73	0.65~0.83
	72	5.700 1+3.655 8x(0.950 4)	0.64	0.54~0.74
	96	5.976 1+3.421 0x(0.961 7)	0.52	0.38~0.61
三唑磷 triazophos	24	11.804 2x-5.062(0.961 7)	7.12	6.64~7.78
	48	9.409 8x-2.552 4(0.974 8)	6.35	5.81~6.89
	72	12.789 8x-4.671(0.989 9)	5.70	5.09~6.15
	96	8.683 8x-0.994 3(0.934 6)	4.90	4.02~5.50

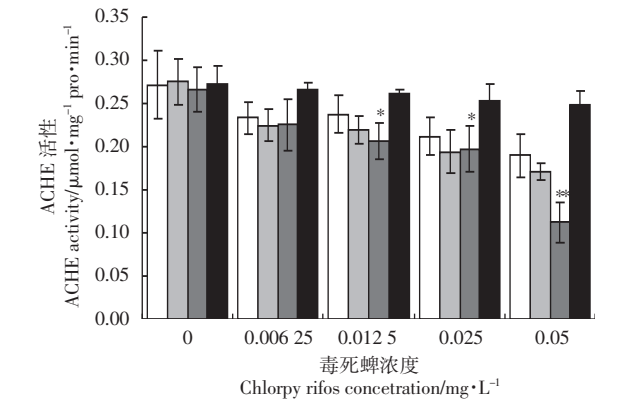
注:括号内数值为相关系数。The data between the brackets showed the correlated coefficient of the regression.

2.2 毒死蜥和三唑磷慢性暴露对斑马鱼头部 AChE 活性抑制及其恢复

农药慢性暴露试验期间, 各药剂浓度处理组试鱼死亡率均低于 10%,与对照处理无显差异。从图 1 和图 2 中 AChE 活性测定结果可以看出,亚致死剂量毒死蜥和三唑磷连续暴露均可抑制斑马鱼头部 AChE 活性,且随农药剂量增大、暴露时间越长,斑马鱼头部 AChE 活性逐渐降低。在 96 h-LC₅₀ 的 1/10 作用剂量下,持续暴露 30 d,毒死蜥和三唑磷处理组斑马鱼头部 AChE 活性分别只有对照的 42.24%和 36.92%。根据图 1 和图 2 中结果进行 Duncan 氏差异显著性分析($P<0.05$),在亚致死作用剂量连续暴露 30 d 后,毒死蜥对斑马鱼头部 AChE 活性抑制的最低作用剂量(LOEC)为 0.012 5 mg·L⁻¹,三唑磷为 0.062 5 mg·L⁻¹。

在解除药剂并连续用清水饲养 30 d 后,被抑制的斑马鱼头部 AChE 活性均有不同程度恢复。在清水恢复 30 d 后,受毒死蜥亚致死作用剂量抑制的 AChE 活性均可恢复到对照的 90%以上(图 1),而受三唑磷 96 h-LC₅₀ 的 1/10 和 1/20 剂量抑制的 AChE 活性分别只有对照的 74.91%和 71.46%(图 2),与对照差异显著。

AChE 是有机磷和氨基甲酸酯类农药的作用靶标,当生物体内 AChE 活性被抑制可导致生物过度兴奋并引发一系列的异常表现(取食降低、行动缓慢、躲避天敌能力减弱等)^[15-16]。本研究表明,在亚致死作用剂量下(96 h 致死中浓度的 1/10~1/80),虽然毒死蜥和三唑磷对斑马鱼存活无明显影响,但均可对斑马鱼头部 AChE 活性产生不同程度抑制,并且随作用剂量和暴露时间增加,抑制作用逐渐增强。本文研究结果表明在亚致死作用剂量下慢性暴露,两种农药均可能对斑马鱼存在潜在的危害,具体的危害还有待于进一步研究。



□处理 10 d,▒处理 20 d,■处理 30 d,■恢复 30 d;图中数值为 6 条斑马鱼测定结果的平均值;*表示该结果与对照在 $P<0.05$ 水平差异显著;**表示该结果与对照在 $P<0.01$ 水平差异显著,下同。
□exposed 10 d, ▒exposed 20 d, ■exposed 30 d, ■recovery for 30 d; Values of AChE activity are the mean of enzyme activities of 6 zebrafish;*shows different from control group at $P<0.05$;** shows significantly different from control group at $P<0.01$, the same as below.

图 1 毒死蜥慢性暴露对斑马鱼头部 AChE 活性影响
Figure 1 Inhibition and recovery of brain AChE activity of zebrafish after chronic exposure to chlorpyrifos

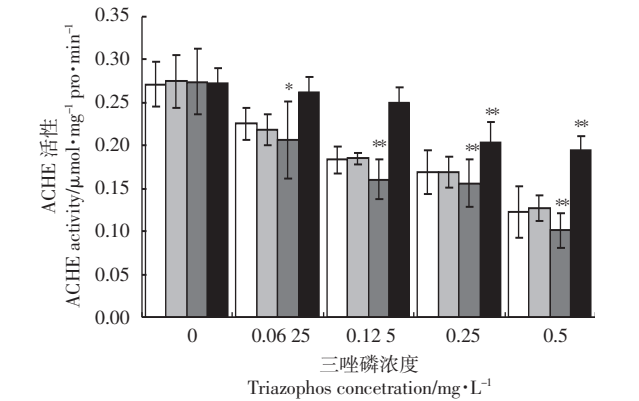


图 2 三唑磷慢性暴露对斑马鱼 AChE 活性影响
Figure 2 Inhibition and recovery of AChE activity of zebrafish head after chronic exposure to triazophos

2.3 斑马鱼对毒死蜥和三唑磷的富集

斑马鱼在不同浓度农药溶液中饲养 30 d 后鱼体内农药残留量测定结果见表 2。从表 2 中结果可以看出,斑马鱼对毒死蜥的富集远远高于三唑磷。毒死蜥在鱼体的强富集性可能主要与其较高的脂溶性有关。由于毒死蜥在鱼体的强富集作用,田间用药造成对水体的污染极有可能导致水生生物体内毒死蜥残留。据 US EPA 1992 年从全美国采集的 362 份鱼样测定结果显示,有 32%样本中毒死蜥残留量超过 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,最高残留量达到 $344\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [17]。因此,田间使用毒死蜥时应尽量避免对水产养殖区域的污染。

表 2 连续饲养 30 d 斑马鱼对毒死蜥和三唑磷的富集
Table 2 Bioconcentration of chlorpyrifos and triazophos by zebrafish from water after 30 d

农药 Pesticide	水中浓度/ mg·L ⁻¹ Pesticides concentration in water	鱼体残留量 ±SD mg·kg ⁻¹ Pesticides residue in fish	生物富集系数 **/ BCF _{30 d}
毒死蜥 chlorpyrifos	0.006 25	1.63±0.36	260.91
	0.012 5	12.26±1.66	980.90
	0.025	33.00±3.98	1 320.03
	0.05	53.68±2.29	1 073.69
三唑磷 triazophos	0.062 5	1.68±0.14	26.84
	0.125	1.96±0.57	15.65
	0.25	2.06±0.25	8.23
	0.5	4.80±0.91	9.59

注:* 鱼体农药残留量为 4 条鱼测定的平均值,The value was the mean residue of pesticide in zebrafish;** BCF_{30 d}=鱼体残留农药量/水中农药浓度,BCF_{30 d}=Pesticide residues in fish/ Pesticides concentration in water

3 结论

(1)分别在 96 h-LC₅₀ 的 1/10、1/20、1/40 或 1/80 作用剂量下慢性暴露,毒死蜥和三唑磷对斑马鱼头部乙酰胆碱酯酶均有不同程度的抑制。随农药暴露剂量增加、暴露时间延长,对 AChE 活性抑制作用逐步增强。在供试农药作用剂量下,受毒死蜥抑制的斑马鱼头部 AChE 活性在 30 d 后均可恢复到对照的 90%以上,但受三唑磷 96 h-LC₅₀ 的 1/10 和 1/20 剂量抑制的 AChE 活性分别只有对照的 74.91%和 71.46%。

(2)毒死蜥对斑马鱼高毒,且鱼体富集作用强。毒死蜥对水体的污染极容易引起在水生生物体内富集浓缩,造成对水产品的残留污染,建议田间使用毒死蜥时尽量避免对水产养殖区域的污染。

参考文献:

[1] 刘锋章. 农药对自然环境和人类社会的负面影响及危害[J].山东环

境, 1998, 85:70-71.
LIU Feng-zhang. Impacts of pesticides on the natural environment and hunman society[J]. *Shandong Environment*, 1998, 85:70-71.
[2] Cajaraville M P, Bebianno M J, Blasco J, et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach[J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 247:295-311.
[3] Dembele K, Haubruge E, Gaspar C. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2000, 45(1):49-54.
[4] Bakry N M, Osman K A, El-Aswad A F, et al. Biomonitoring of pesticide contamination from the pesticide industry[J]. *J Egypt Soc Toxicol*, 2001, 24:107-111.
[5] Richmonds C, Dutta H M. Effect of malathion on the brain acetylcholinesterase activity and optomotor behavior of bluegill sunfish *leptomis machrochirus*[J]. *Am Zool*, 1989, 29(4):133.
[6] Erwin W M Roex, Rineke Keijzers, Cornelis A M Van Gestel. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion[J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 64:451-460.
[7] Canty M N, Hagger J A, Moore R T B, et al. Sublethal impact of short term exposure to the organoposphate pesticide azamethiphos in the marine mollusk *mytilus edulis*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54:396-402.
[8] Richmonds C R, Dutta H M. Effect of malathion on the brain acetylcholinesterase activity of blue gill sunfish *leptomis machrochirus* [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1992, 49:431-435.
[9] Jarvinen A W, Nordling B R, Henry M E. Chronic toxicity of dursban (chlorpyrifos)to the fathead minnow (*Pimephales promelas*)and the resultant acetylcholinesterase inhibition[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1983, 7:423-434.
[10] 安徽省严格监管高毒农药[EB/OL]. 中国农药信息网. <http://www.chinapesticide.gov.cn/filesmx.asp?xh=04071408>.
[11] OECD. Fish, acute toxicity test. OECD guideline for testing of chemicals 203[M].1992. 7.
[12] OECD. Fish, prolonged toxicity test; 14-day study. OECD guideline for testing of chemicals 204[M].1984. 4.
[13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
[14] 蔡道基, 杨佩芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[S]. 国家环保局, 1989.
CAI Dao-ji, YANG Pei-zhi, GONG Rui-zhong, et al. Guidline for the environmetal safety assessment of pesticides[S]. State Environmental Protection Administration, 1989.
[15] Banas W P, Sprague J B. Absence of acclimation to parathion by rainbow trout during sublethal exposure[J]. *Water Research*, 1986, 20:1229-1232.
[16] Detra R L, Collins W J. The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae(*Chironomidae*:*Diptera*)[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1991, 10:1089-1095.
[17] US EPA. National study of chemical residues in fish[G]. EPA 823-R-92-008 a & b. U. S. environmental protection agency, Office of Science and Technology, Washington, DC. 1992.