

rac-甲霜灵及 R-甲霜灵对斑马鱼急性毒性和 ATP 酶活性的研究

姚 琨¹, 朱 琳^{1,2}, 陈中智¹, 端正花¹, 李 燕¹

(1.南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2.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:为探讨农药的“手性”特征对非靶生物的毒性,采用急性毒性试验和生化测定方法,研究了手性农药 rac-甲霜灵及 R-甲霜灵对模式生物斑马鱼的致死和亚致死(ATP 酶活性)效应。rac-甲霜灵对斑马鱼的 24 h 和 96 h 的 LC₅₀ 分别为 258.47、241.98 mg·L⁻¹, R-甲霜灵对斑马鱼的 24 h 和 96 h 的 LC₅₀ 分别为 237.67、227.38 mg·L⁻¹,都属于低毒农药。rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶的活性,在 96 h 的测定时间范围内都只表现出诱导效应,但 R-甲霜灵对其的诱导效应更为显著,诱导时间也较长;相同浓度下 R-甲霜灵比 rac-甲霜灵对 Na⁺,K⁺-ATP 酶的活性诱导时间长,并且在高浓度诱导效应开始的早。结果表明 R-甲霜灵比 rac-甲霜灵对斑马鱼的急性毒性稍大,但两者在亚致死效应上存在较为明显的差异,表明斑马鱼体内可能存在对映选择性。

关键词:手性农药;甲霜灵;斑马鱼;Na⁺,K⁺-ATP酶;Ca²⁺-ATP 酶;毒性评价

中图分类号:X592 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2456-05

Effects of Rac-metalaxyl and R-metalaxyl on Zebrafish (*Danio rerio*): Determination of Acute Toxicity and ATPase Activity

YAO Kun¹, ZHU Lin^{1,2}, CHEN Zhong-zhi¹, DUAN Zheng-hua¹, LI Yan¹

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin, 300071, China)

Abstract: Many studies indicated that enantiomers of chiral pesticides differed in biological activity, which meant single enantiomer pesticides might had different effects on non-target organisms relative to racemate. So far, few studies whether R-metalaxyl brings about the same environmental effects on aquatic organisms as rac-metalaxyl has been reported. In order to provide more information for aquatic risk about metalaxyl, 24 h and 96 h acute toxicity of rac-metalaxyl and R-metalaxyl to adult zebrafish (*Danio rerio*) were tested, and the variance of ATPase activity in zebrafish under sublethal concentrations was investigated. The results showed both of them belonged to low-toxic pesticides based on LC₅₀ values (24 h and 96 LC₅₀ for rac-metalaxyl were 258.47 mg·L⁻¹ and 241.98 mg·L⁻¹; for R-metalaxyl were 227.38 mg·L⁻¹ and 237.67 mg·L⁻¹), and had a little difference in acute toxicity to zebrafish between the two compounds. In the case of ATPase test, the induction of ATPase activity was observed during the 96 h-test, and no inhibition effects observed. Moreover, induction effect on Ca²⁺-ATPase for R-metalaxyl was more significant than rac-metalaxyl. For Na⁺, K⁺-ATPase, R-metalaxyl began a induction earlier in the highest concentration exposed (70 mg·L⁻¹), and had a longer time in induction than rac-metalaxyl. In general, the results showed a little difference in acute toxicity to zebrafish and a pronounced difference in effects on ATPase activity in zebrafish between rac-metalaxyl and R-metalaxyl. It is a possible explanation that enantioselective action occurred in zebrafish.

Keywords: rac-metalaxyl; R-metalaxyl; zebrafish; Na⁺,K⁺-ATPase; Ca²⁺-ATPase; toxic assessment

N-(2,6-二甲基苯基)-N-(甲氧基乙酰基)-丙胺

收稿日期: 2008-01-02

作者简介: 姚 琨 (1979—), 博士研究生, 研究方向为生态毒理学和环境化学。E-mail: darkme@mail.nankai.edu.cn

通讯作者: 朱 琳 E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

酸甲基酯,属于苯甲酰胺类农药,作为系统性杀真菌剂用于作物的病原性真菌防治有较好的效果^[1]。由于手性碳的存在而有 2 种光学异构体——R 体和 S 体,而起活性作用的主要是 R 异构体;其最早是以外消旋体的商品-“rac-甲霜灵”进行发售,但是目前其外

消旋体的商品正被以 R 体为主要成分的“精甲霜灵”所取代^[2-3]。

新型的手性农药的开发被认为是提高效率、减少用量的绿色化学之路^[4],对于农业生产和环境保护具有重要的意义。但是同时也有很多报道表明不同的光学对映体在不同的环境生物条件下会有不同的降解速度、生物活性以及环境风险^[5]。目前已经证实一些手性农药的不同对映体对非目标生物的短期和长期毒性效应存在着明显的差别,因而会导致不同的环境风险^[6-7]。而现在很多新型单一对映体手性农药的环境风险数据仅仅是建立在以往消旋体上,而缺乏对新型单一对映体手性农药的认识,甲霜灵就是其中之一。

目前有关 rac-甲霜灵与 R-甲霜灵对映选择性降解的研究较多^[8-9]。而对非目标生物的生物效应研究较少,尤其是 R-甲霜灵作为取代 rac-甲霜灵的产品,其环境风险的评估多是根据以往的 rac-甲霜灵的数据。因此本文以模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)为对象,研究了两者对其的急性毒性,以及在亚致死水平上体内 ATP 酶活性的影响,目的在于探讨两者是否对这种非目标生物具有明显的毒理学效应差异,旨在为精甲霜灵的水生生态风险准确、客观地评价提供更多的依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

外消旋甲霜灵(纯度 $\geq 98\%$;rac-甲霜灵)原药和精甲霜灵(纯度 $\geq 90\%$;R-甲霜灵)原药购于温州禾本农药有限公司;ATP 酶测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析级或生物级试剂。

1.2 试验生物

试验所用斑马鱼购于天津花鸟鱼虫市场,购回后放置于容积为 50 L 的水族箱中饲养,饲养条件为光暗比 14:10,温度(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,每隔 2 d 喂食一次;正式试验前 1 d 停止喂食,鱼体的平均体长为(2.68 ± 0.21)cm,平均体重(0.22 ± 0.08)g。

1.3 试验方法

1.3.1 急性毒性试验

斑马鱼 24 h 和 96 h 急性毒性试验,参照 OECD 203 的标准测试方法^[10],并做适当调整。预试验过程中选定不同的浓度,采用趋近法得到能引起斑马鱼致死的初始浓度(OLC),以及最低全部致死浓度。根据预试验的结果,分别选定 210、230、250、270、290 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

和 190、210、230、250、270 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 个浓度梯度作为 rac-甲霜灵 24 h 和 96 h 急性暴露浓度;同样,R-甲霜灵的 24 h 和 96 h 的暴露浓度分别为 195、211、227、243、269 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 179、195、211、227、243 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个浓度 3 个平行,每个平行 10 尾鱼,重复 3 次。

1.3.2 蛋白含量和 ATP 酶活性测定

根据斑马鱼 24 h 和 48 h 急性毒性试验的结果分别选定其亚致死浓度 5、20、50、70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为测试浓度。分别于 24、48、72、96 h 取鱼样,取出的斑马鱼迅速剪去头部后,然后准确称量鱼体的湿体质量。把鱼体置于冰浴环境中,先用眼科小剪剪碎鱼体组织,并按 1:9 的比例加入 pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液,在玻璃匀浆器内仔细研磨,并在超声细胞仪上进一步进行组织破碎。准备好的匀浆液在冷冻离心机上,温度 4 $^{\circ}\text{C}$,以 4 000 $\times$ g 离心 15 min,取上清液测定蛋白含量和酶活性。

蛋白含量依据考马斯亮兰法进行测定。 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶的测定均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,依据孔雀绿比色法进行酶促反应,测定反应产物中 P 的量。计算酶活力时,定义每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位,即微摩尔磷/毫克蛋白/小时($\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}\cdot\text{h}^{-1}$)。

1.3.3 数据分析

急性毒性试验的 LC_{50} 的值用概率单位法计算。酶活性测定结果用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,并用平均值 $\pm$ 标准误差表示,各浓度组酶活性数据与空白组的比较采用 AVONA-Dunnent 检验; $P<0.05$ 认为存在显著差异(*), $P<0.01$ 存在极显著差异(**)。

2 结果和讨论

2.1 rac-甲霜灵及 R-甲霜灵对斑马鱼成鱼 24 和 96 h 急性毒性

根据表 1 的结果,比较 24 h 和 96 h LC_{50} 值,R-甲霜灵要比 rac-甲霜灵毒性稍大。此外,96 h 的 LC_{50} 值低于 24 h 的 LC_{50} 表现出一定的效应和时间关系。两者的可观察到的 OLC 都较高,而且试验过程表明,当 R-甲霜灵浓度在 220~250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,rac-甲霜灵在 230~260 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时斑马鱼出现了较高的死亡率,致死区间的剂量范围较窄。美国 EPA 测定 rac-甲霜灵对一些鱼类的 LC_{50} 介于 18~270 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,属于低毒农药^[11-12]。而本文的结果,以国家标准评定,rac-甲霜灵及 R-甲霜灵属于急性 3 级,都可以归为低毒农药^[13]。由此可

表 1 rac-甲霜灵及 R-甲霜灵对斑马鱼成鱼 24 h 和 96 h 急性毒性

Table 1 Acute toxicity of rac-metalaxyl and R-metalaxy to adult zebrafish

种类	OLC /mg·L ⁻¹	24 h-LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	95%置信区间 /mg·L ⁻¹	回归方程	OLC /mg·L ⁻¹	96 h-LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	95%置信区间 /mg·L ⁻¹	回归方程
rac	195.0±17.3	258.47	249.68~269.14	$P=-6.177\ 27+0.239x$	180.0±14.1	241.98	224.78~252.54	$P=-6.583\ 4+0.029\ 44x$
R	172.5±18.9	237.67	220.44~246.91	$P=-6.619\ 7+0.0301\ 9x$	171.3±26.3	227.38	221.89~234.82	$P=-7.124\ 4+0.033\ 62x$

见,尽管 R-甲霜灵比 rac-甲霜灵的毒性要大一些,但并没有改变其急性毒性等级。

2.2 rac-甲霜灵及 R-甲霜灵对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶酶活性的影响

rac-甲霜灵对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶活性的影响如图 1a 所示。48 h 时,只有 70 mg·L⁻¹ rac-甲霜灵对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶活性有明显的诱导效应 ($P<0.05$),在其他测试时间,各浓度组与对照相比都无显著性的差异。

但是根据图 1b 的结果可知,R-甲霜灵在 72 h 之内对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶活性诱导效应显著,70 mg·L⁻¹ R-甲霜灵在 24 h 即表现出很强的诱导效果;48 h 后,各个暴露组酶活性都开始明显的增加;而在 72 h,各个染毒浓度组酶活力有下降的趋势,96 h 后基本与对照组无显著性差异。

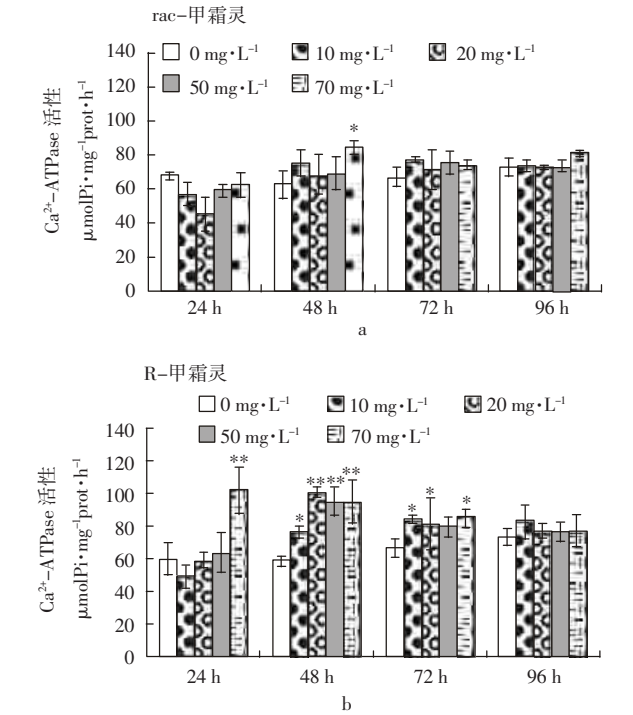


图 1 rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼体内的 Ca²⁺-ATP 酶活性的影响

Figure 1 Effects of rac-metalaxyl and R-metalaxyl on Ca²⁺-ATPase activity in adult zebrafish

2.3 rac-甲霜灵及 R-甲霜灵对斑马鱼 Na⁺,K⁺-ATP 酶活性的影响

根据图 2a,rac-甲霜灵对斑马鱼体内 Na⁺,K⁺-ATP 酶活性只在 96 h 表现出了整体的诱导作用,并且测试时段内没有发现抑制效应,而在 72 h 内,除了 20 mg·L⁻¹ 的 rac-甲霜灵,其他暴露组同对照相比都无显著性差异 ($P<0.05$)。20 mg·L⁻¹ 的 rac-甲霜灵在 72 h 表现出的诱导效应不同于其他高浓度组可能跟该组生物的特异性和实验误差有关。

由图 2b 可知,R-甲霜灵在 96 h 的测试时间段内,各个暴露浓度组表现出较强的诱导作用。24 h 时,70 mg·L⁻¹ 的暴露组跟对照组相比差异极显著 ($P<0.01$),表现出强烈的诱导效应,除此之外,其他 3 个浓度组跟对照相比无显著性的差异;而 48 h 之后,这 3 个浓度组开始表现出了一定的诱导效应,但诱导的强度基本一样;72 h 之后,70 mg·L⁻¹ 暴露组酶活性有

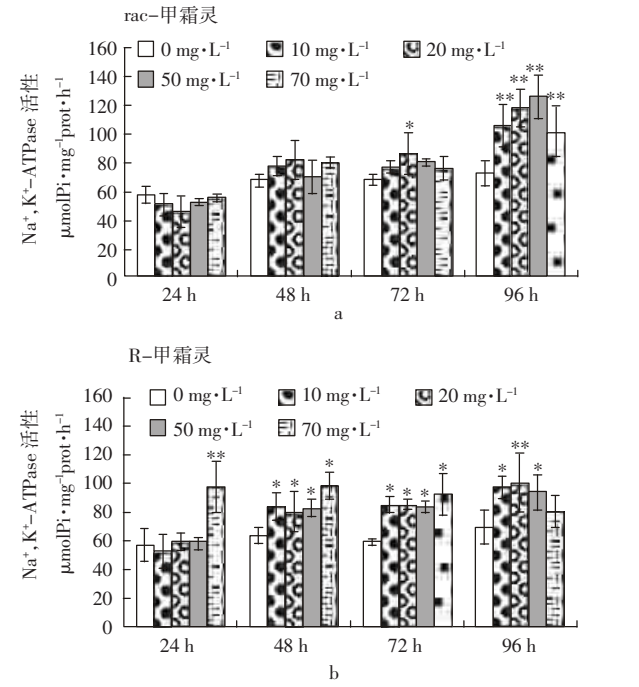


图 2 rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼体内的 Na⁺,K⁺-ATP 酶活性的影响

Figure 2 Effects of rac-metalaxyl and R-metalaxyl on Na⁺,K⁺-ATPase activity in adult zebrafish

下降的趋势,其他 3 个浓度组酶活性则继续增加。96 h 时,70 mg·L⁻¹ 暴露组与对照无显著性差异 ($P < 0.05$),而其他 3 组诱导率则达到最大,相当于 70 mg·L⁻¹ R-甲霜灵在 24 h 的诱导率。

2.4 差异分析

ATP 酶是生物体内重要的一类酶,其中 Na⁺,K⁺-ATP 酶在水生生物体内普遍存在,是横跨质膜的一种固有蛋白,也是组成 Na⁺,K⁺泵活性的主要部分,对维持细胞内离子的转运以及能量代谢有着重要作用^[14];Ca²⁺-ATP 酶是质膜上 Ca²⁺转运系统中最重要的一部分,可以利用 ATP 水解的能量维持细胞内外 Ca²⁺浓度^[15]。生物处于胁迫条件下时,供能活动和离子平衡等遭到破坏,酶活性会随之变化,而且,随着剂量和暴露时间的不同,可表现为或抑制,或诱导,也可以先抑制后诱导^[16-18];同时还能反映能量代谢、物质运输等生化过程的变化,因此无论那种方式都是生物对污染胁迫的一种内部反映,从分子生态毒理学的角度来看,ATP 酶是一项广泛用于评价污染压力的参数^[19]。

尽管 rac-甲霜灵和 R-甲霜灵化学结构相同,两者对斑马鱼致死毒性上还是表现出轻微的毒性差异,而且在亚致死水平上对 ATP 酶活性的诱导方式上也反映出较大差别。比较 rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶活性的作用(图 1),R-甲霜灵对斑马鱼 Ca²⁺-ATP 酶的诱导作用显著,而且作用时间长;相反 rac-甲霜灵基本对其没有明显的作用。而对于斑马鱼的 Na⁺,K⁺-ATP 酶(图 2),R-甲霜灵在 24 h 的时候高浓度组就表现出较强的诱导效应,48 h 时就已整体表现出诱导效应;而 rac-甲霜灵相比前者推后了 48 h 以上才表现出的诱导效应。

导致效应差异的原因可能是斑马鱼对其不同对映体(R-和 S-甲霜灵)的选择性作用。生物体内是一个复杂的手性环境,大量手性分子的存在导致手性选择作用的发生^[20]。已有报道证实在植物中 rac-甲霜灵的降解半衰期小于 R-甲霜灵^[21];此外,一些研究表明不同的土壤微生物会对 rac-甲霜灵的 S 和 R 对映体产生不同的选择性作用,从而导致降解速率的差异^[8]。rac-甲霜灵含有各 50%的 R 和 S 对映体,与以 R 体为主(≥90%)的 R-甲霜灵相比,斑马鱼可能对其中一种对映体具有更强的选择性,从而导致某一对映体在斑马鱼体内有更长的停留,从而带来的胁迫更强。ATP 酶活性的变化差异反映了两者在斑马鱼内部作用的差异,对映选择性的生化过程可能是原因之一。尽管 Na⁺,K⁺-ATP 酶是许多有机污染物进入生物

体作用的第一界面^[22],而且有研究表明农药的不同对映体会对非目标生物体内酶产生选择性作用,从而导致毒性的差异^[23]。但就目前的结果无法确定 rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼 Na⁺,K⁺-ATP 酶诱导方式的不同是因为直接作用的结果,因为 rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼 Na⁺,K⁺-ATP 酶诱导作用可能是生物对外源胁迫的一种普遍反映,对于目标靶位的作用还需要进一步的研究。

3 结论

(1)R-甲霜灵对斑马鱼的急性毒性比 rac-甲霜灵稍大,依据毒性评定标准,两者都属于低毒农药。

(2)rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼体内 Na⁺,K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性无论在诱导时间和诱导强度上都表现出不同的作用方式。

(3)rac-甲霜灵和 R-甲霜灵对斑马鱼效应差异的机理还需深入研究,尤其是通过分子毒理学的方法寻找导致效应差异的目标分子。

参考文献:

- [1] Worthing C R, Hance R J. The pesticide manual [M]. (9th ed), Farnham UK: British Crop Protection Council, 1991. 206-207, 554-555.
- [2] Leadbitter N. Fungicidal compositions comprising metalaxyl and fludioxonil; USA, WO 9601559[P]. 1998-12-01.
- [3] Hans-rudolf B, Markus D M, Thomas P, et al. Environmental behavior of the chiral acetamide pesticide metalaxyl: Enantioselective degradation and chiral stability in soil[J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(2): 221-226.
- [4] Garrison A W. On the issue of enantioselectivity of chiral pesticides: A green chemistry opportunity[J]. *Green Chemistry*, 2004, 6: G77-G78.
- [5] Garrison A W. Probing the enantioselectivity of chiral pesticides[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(1): 16-23.
- [6] Konwick B J, Fisk A T, Garrison A W, et al. Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *ceriodaphnia dubia*[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24(9): 2350-2355.
- [7] Liu W P, Gan J Y, Lee S J, et al. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24(8): 1861-1866.
- [8] Monkiedje A, Spiteller M, Bester K. Degradation of racemic and enantiopure metalaxyl in tropical and temperate soils[J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(4): 707-712.
- [9] Buerge I J, Poiger T, Müller M D, et al. Enantioselective degradation of metalaxyl in soils: Chiral preference changes with soil pH [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(12): 2668-2674.
- [10] OECD. 203 Fish, Acute Toxicity Test[S]. 1992.
- [11] USEPA. Reregistration eligibility decision (RED) metalaxyl[R]. Washington D C: Office of prevention, pesticides and toxic substances, 1994. 30-33.

- [12] USEPA. Ecotox release 4. 0[EB/OL].[2007-10-21]. <http://cfpub.epa.gov/ecotox>
- [13] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版), 北京:中国环境科学出版社, 2002. 727-728.
- State Environmental Protection Administration of China. Monitoring and analysis methods of water and wastewater[M]. (4th ed), Beijing: China Environmental Science Press, 2002. 727-728.
- [14] 徐镜波, 景体淞. 2, 4-DNT 对鲤鱼的急性和亚急性毒性[J]. 环境科学, 1998, 19(2):89-91.
- XU Jing-bo, JING Ti-song. The acute and subacute toxicity of 2, 4-DNT to carp[J]. *Environmental Science*, 1998, 19(2):89-91.
- [15] 洪水根, 汪德耀. 膜分子生物学[M]. 厦门:厦门大学出版社, 1995. 67-72.
- HONG Shui-gen, WANG De-yao. Molecular biology of the membranes[M]. Xiamen:Xiamen University Press, 1995. 67-72.
- [16] 叶继丹, 刘红柏, 赵吉伟, 等. 喹乙醇对鲤鳃组织 Na⁺、K⁺-ATP 酶活性及血浆生化指标的影响[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(2):197-202.
- YE Ji-dan, LIU Hong-bo, ZHAO Ji-wei, et al. Changes of body composition, plasma biochemical indices and Na⁺, K⁺-ATPase activity in gill after feeding diets with different doses of olaquinox to *cyprinus carpio* L[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2005, 24(2):197-202.
- [17] 叶央芳, 闵 航, 吕镇梅. 除草剂苯噻草胺污染对多食鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium multivolum*) 抗氧化酶和 ATP 酶的影响[J]. 环境科学学报, 2006, 26(1):151-156.
- YE Yang-fang, MIN-hang, LU Zhen-mei. Effect of herbicide mefenacet pollution on antioxidant enzyme and ATPase of *Sphingobacterium multivolum* Y1[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(1):151-156.
- [18] 韩力强, 康现江, 李双石, 等. 氨基对斑马鱼 2 种代谢酶类的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2005, 25(2):179-184.
- HAN Li-qiang, KANG Xian-jiang, LI Shuang-shi, et al. Effects of ammonia nitrogen on metabolic enzymes in *Brachydanio rerio*[J]. *Journal of Hebei University(Natural Science Edition)*, 2005, 25(2):179-184.
- [19] 徐立红, 张甬元, 王德铭. 用环境毒物对草鱼组织 ATPase 的影响作为生态毒理学指标的初步研究[J]. 水生生物学报, 1987, 11(3):194-201.
- XU Li-hong, ZHANG Yong-yuan, WANG De-ming. Using the effects of environmental toxicants on the ATPase activity of grass carp tissues as an ecotoxicological index-A preliminary study[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1987, 11(3):194-201.
- [20] Hegeman W J, Laane R W. Enantiomeric enrichment of chiral pesticides in the environment[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2002, 173:85-116.
- [21] Zadra C, Marucchini C, Zazzerini A. Behavior of metalaxyl and its pure R-enantiomer in Sunflower plants (*Helianthus annuus*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(19):5373-5377.
- [22] Monserrat J M, Martínez P E, Geracitano L A, et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2007, 146(1-2):221-234.
- [23] Nillos M G, Rodríguez-Fuentes G, Gan J, et al. Enantioselective acetylcholinesterase inhibition of the organophosphorous insecticides pro-fenofos, fonofos, and crotoxyphos[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26(9):1949-1954.