

农药胁迫下溞类生物量与水体中 NAGase 活性的关系

郭丹丹, 李少南*

(浙江大学农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

摘要:为探索游离态 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(简称 NAGase, 又称壳二糖酶)作为农药对水生节肢动物胁迫效应指示因子的可行性, 将大型溞、多刺裸腹溞、老年低额溞作为受试生物, 虱螨脲、丁醚脲、乙螨唑作为受试药剂, 研究了游离于水中的 NAGase 的活性与溞类生物量之间的对应关系。以全部 63 个被暴露群体的生物量为自变量(x), 以相应群体释放到水中的 NAGase 的活性为应变量(y), 得到回归方程 $y=0.000\ 603x+0.004\ 33$, 该方程的 r 值和 P 值分别为 0.687 和 0.00。两者之间的对应关系证明了利用水中 NAGase 活性来预测被暴露群体生物量的可行性。进一步的研究显示, 作为胁迫因子, 乙螨唑在高浓度($1.6\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)下促使溞类群体萎缩, NAGase 活性下降则相对滞后。涉及 10 种农药的离体试验表明, 农药直接影响 NAGase 活性的最低浓度远高于其在野外水体中可能存在的最高浓度, 说明农药实际上不可能通过直接影响酶活性(无论是诱导, 还是抑制)来干扰被暴露群体的生物量预测。

关键词:枝角类; 壳二糖酶; 生物量; 农药

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2014)04-0664-09 **doi:** 10.11654/jaes.2014.04.007

Daphnid Biomass and Activity of Free-living NAGase Under Pesticide Stresses

GUO Dan-dan, LI Shao-nan*

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Free β -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase, or chitinase) may be an indicator of aquatic arthropod with respect to pesticide stresses. In this experiment, three species of *Daphnids*, i.e. *Daphnia magna* Straus, *Moina macrocopa*, and *Simocephalus vetulus* and three pesticides, lufenuron, diafenthiuron, and etoxazole, were used to study the arthropod biomass and free-living NAGase activity. It was found that arthropod biomass (x) and NAGase activity (y) had significant correlation ($y=0.000\ 603x+0.004\ 33$, $r=0.687$ and $P=0.00$), suggesting the feasibility of using free-living NAGase activity to predict the biomass of the exposed arthropod populations. *In vitro* studies with 10 pesticides, i.e. lufenuron, diafenthiuron, and etoxazole, butachlor, trazodone, chlorpyrifos, fenvalerate, imidacloprid, pymetrozine, and chlorantraniliprole, showed that their minimal concentrations at which the activity of free-living NAGase was directly affected were much higher than the highest concentrations found in water bodies. These results suggest that the biomass could be predicted without underestimation by NAGase activity.

Keywords: *daphnids*; chitinase; biomass; pesticides

农药对于水生节肢动物的影响是人们一直关注的问题。通过收集相关物种种类及其生物量方面的信息来评价农药对水生生态系统的影响, 不但要消耗大量的时间和人力, 而且调查结果极易受到取样地点、取样方式, 甚至样品分类方式的影响, 所得数据往往因为变异系数大而难以进行统计分析^[1]。为此, 在涉及

农药生态效应的田间毒理学研究中, 有必要引入一些能够在一定程度上反映物种生物量的指示因子。

NAGase 是几丁质酶的一种。按照酶切位点的不同, 几丁质酶可分为几丁质内切酶(Endochitinase)、几丁质外切酶(Exochitinase)和 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, 简称 NAGase, 又称壳二糖酶)^[2-3]。

生活于水中的节肢动物在脱皮过程中会将富含 NAGase 的脱皮液释放到水中。水生节肢动物个体数量越多, 体型越大, 其 NAGase 的体外释放量越高^[4-5],

收稿日期: 2013-09-15

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12B07008)

作者简介: 郭丹丹(1988—), 女, 硕士, 研究方向为农药生态毒理。

E-mail: guodanxue@163.com

* 通信作者: 李少南 E-mail: snli@zju.edu.cn

因此从理论上讲,NAGase具备作为水生节肢动物生物量指示因子的前提条件。NAGase体外释放量与水生节肢动物生物量之间的对应关系在一些室内试验中得到证实^[6-8];野外调查的结果也在一定程度上确认了这种关系的存在^[8-10]。

为了弄清NAGase释放量与水生节肢动物生物量之间的对应关系是否因为农药的介入而发生改变,本论文以虱螨脲、丁醚脲和乙螨唑作为受试药剂,以发育进程中的大型溞、裸腹溞和低额溞作为受试生物,研究被暴露群体释放到水中的NAGase的活性随着药剂浓度而发生的变化,并且测量农药对于NAGase活性的直接影响,以期NAGase作为农药胁迫指示因子的实际应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 受试溞类

大型溞(*Daphnia magna*)溞种来源于中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所,属于62DM生物株。老年低额溞(*Simocephalus vetulus*)和多刺裸腹溞(*Moina macrocopa*)均采自浙江大学校园,纯化后在实验室条件下培养3个月以上。以螺旋藻粉作为食物,保证 $0.15\text{ mg C}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{溞}^{-1}$,水温 $(21\pm1)^{\circ}\text{C}$,光照黑暗比为16 h:8 h,光强1500~2500 lx,以充分曝气的自来水作为培养液。

1.2 受试农药及试剂

乙螨唑原药(Etoxazole,纯度98%,南通泰禾化工有限公司)、丁醚脲原药(Diafenthiuron,纯度95%,江苏绿叶农化有限公司)、虱螨脲原药(Lufenuron,纯度98%,浙江世佳科技有限公司)、丁草胺原药(Butachlor,纯度92.7%,江苏常隆化工有限公司)、三唑酮原药(Trazodone,纯度98.5%,江苏剑牌农化有限公司)、毒死蜱原药(Chlorpyrifos,纯度98.2%,浙江新农化工有限公司)、氰戊菊酯(标准品,德国Dr. Ehrenstorfer公司)、吡虫啉(标准品,德国Dr. Ehrenstorfer公司)、吡蚜酮(标准品,德国Dr. Ehrenstorfer公司)、氯虫苯甲酰胺(标准品,德国Dr. Ehrenstorfer公司)、4-甲基伞形酮-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷(4-MUF-NAG, Sigma公司)、4-甲基伞形酮(MUF, Sigma公司),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 酶液制备

取20 mL培养液,使其通过砂芯过滤装置中的无菌增强纤维素滤膜(孔径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$,天津博纳艾杰尔

科技有限公司)以除去细菌和藻类遗骸。滤液冷藏,待测。

1.3.2 NAGase活性测量

根据Sastri and Roff^[8]报道且由Hanson and Lagadic^[11]修改的方法。在96孔聚苯乙烯板中加入50 μL 含 $0.31\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MUF-NAG的pH5.5的柠檬酸磷酸盐缓冲液(作为底物),然后加入150 μL 过滤后的水样(作为酶源),在 37°C 下温育1 h。用50 μL 0.25 M的NaOH终止反应。空白是将底物、水样和NaOH同时加入。采用GENios读板机(TECAN Group Ltd.,奥地利)在激发波长360 nm、发射波长465 nm下测定荧光值。由标准曲线转换成MUF的生成量。

1.3.3 蛋白含量测定

收集培养容器内的溞类个体,沥干水分,加入4倍体积PBS($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.4),用ULTRA-TUR-RAXT10[®] basic高速分散机(德国IKA)匀浆30 s,在 4°C 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心30 min,取上清液,采用考马斯亮蓝G-250法^[16]测定样品的蛋白含量(以牛血清蛋白为标准蛋白)。

1.4 试验设计

1.4.1 被暴露群体生物量和NAGase释放量的协同变化

以大型溞、低额溞和裸腹溞作为受试生物,以丁醚脲、乙螨唑、虱螨脲作为受试农药。根据急性毒性试验的结果确定给药浓度。在每只500 mL烧杯中放400 mL稀释液和20头初次怀卵的母溞(F_0)。用丙酮将药剂配成系列浓度的工作液,等体积($0.1\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入到培养液中得到目标浓度的稀释液,对照组以丙酮代替。每个浓度组(包括对照组)设4个重复。试验历时7 d,试验期间不更换稀释液,每天喂食。试验结束后从各烧杯中采集水样,按照“1.3.1”的方法制成酶液(酶活性的测定方法见“1.3.2”),来不及测定的酶液在 -20°C 冰箱内保存,采集水样的同时收集并记录各烧杯中的溞类个体,按照“1.3.3”的方法制备上清液并测量其中的总蛋白含量。

1.4.2 药剂浓度和水样采集方式对NAGase活性测量结果的影响

1.4.2.1 药剂浓度

参照Duchet等^[11]的方法,以裸腹溞和低额溞作为受试生物,以乙螨唑作为受试药剂。用丙酮将药剂配成系列浓度的工作液,等体积($0.1\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入培养液得到目标浓度的稀释液,裸腹溞 0.01 、 0.02 、 0.04 、 0.08 、 $0.16\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,低额溞 0.10 、 0.20 、 0.40 、 0.80 、 $1.60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,对照组以丙酮代替。烧杯中加入100 mL稀释液,

每个浓度(包括溶剂对照)设5个重复,每个重复(烧杯)放10只0~24 h的幼蚤。试验历时13 d,试验期间每天喂食。试验采用半静态方法,每2 d更换1次稀释液,换液时采集水样、挑除幼蚤、记录 F_0 的存活数以及 F_0 所产幼蚤的数量。按照“1.3.1”的方法将采集的水样制成酶液(酶活性测定方法见“1.3.2”),来不及测定的酶液置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

1.4.2.2 水样采集方式

参照 Duchet 等^[11]的方法,试验历时14 d,在500 mL的烧杯中进行,每只烧杯中放400 mL培养液,试验在没有农药的条件下进行。以初次怀卵的大型蚤作为母蚤(F_0),试验设2个大组,即每个烧杯分别放15只和40只 F_0 。每个大组再分4个小组:(1)每2 d换水,换水时采集水样、挑除幼蚤、记录 F_0 的存活数以及 F_0 所产幼蚤的数量;(2)每2 d换水但不挑除幼蚤,换水时采集水样并记录 F_0 及其所产的幼蚤的数量;(3)不换水但每2 d挑除幼蚤,同时采集水样、记录 F_0 的存活数以及 F_0 所产幼蚤的数量;(4)不换水且不挑除幼蚤,每2 d采集水样1次,采集水样的同时记录 F_0 及其所产的幼蚤的数量。每个试验小组设3个重复。试验历时14 d,每天喂食。按照“1.3.1”的方法将采集的水样制成酶液(酶活性测定方法见“1.3.2”),来不及测定的酶液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

1.4.3 游离态 NAGase 对农药的敏感性研究

以大型蚤、低额蚤和裸腹蚤作为受试生物,以虱螨脲等10种农药作为受试药剂。将蚤类置于培养液中培养。当其种群密度达到 $150\text{ 只}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$ 时,取培养液,按“1.3.1”的方法制备酶液。用丙酮将药剂配成不同浓度的工作液,等体积加入到酶液当中,对照组以等体积丙酮替代,每个浓度组(包括对照组)设4个重复。加药后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下温育1 h,按“1.3.2”的方法测定酶液的NAGase活性。

1.5 数据分析

(1)差异显著性分析:应用DPS[®]数据处理软件,按照“试验统计”→“完全随机设计”→“单因素试验统计分析”→“Duncan 新复极差法”的路径分析各处理组与对照组之间生物效应的差异显著性。

(2)回归分析:应用DPS[®]数据处理软件,按照“数学模型”→“一元线性回归模型”→“结果输出”的路径求取方程的 a 、 b 以及 r 、 F 、 P 。

(3) IC_{50} :应用DPS[®]数据处理软件,按照“专业统计”→“生物测定”→“数量型数据几值分析”的路径做回归分析,求得 IC_{50} 。

2 结果与分析

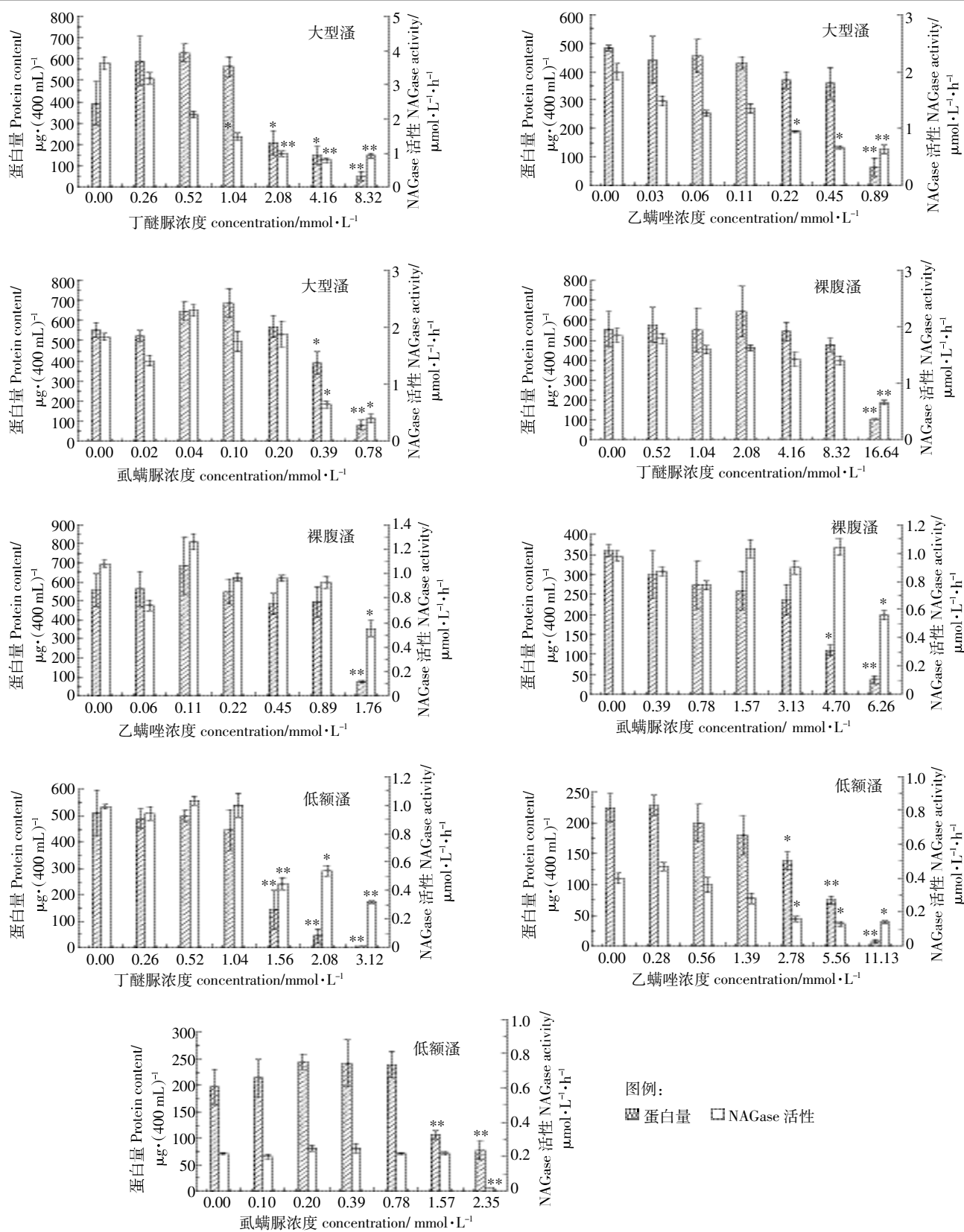
2.1 被暴露群体生物量和 NAGase 释放量的协同变化

本文以虱螨脲、丁醚脲、乙螨唑作为受试药剂,以大型蚤、裸腹蚤和低额蚤作为受试生物,检测了被暴露群体所释放的NAGase活性随药剂浓度而发生的改变,以及这种改变与群体生物量之间的对应关系。其结果如图1所示。不考虑药剂的品种和受试生物的物种,以全部63个被暴露群体的生物量(试验结束时每个烧杯中蚤类群体的总蛋白含量)作为自变量(x),以相应群体所释放的NAGase的活性(试验结束时培养液中的NAGase活性)作为应变变量(y),利用DPS[®]建立回归方程,得到 $y=0.000\ 603x+0.004\ 33$,该方程的 r 值和 P 值分别为0.687和0.00。这说明根据游离NAGase活性来预测蚤类群体在农药胁迫下的生物量,其结果具有一定准确性。依照不同药剂和受试生物而划分的试验组,再按组别分别建立回归方程,得到的结果如表1所示。可以看出,在所开展的9组试验中,有8组 $r>0.5$,其中5组 $P\leq 0.05$,3组 $P>0.05$; $r<0.5$ ($=0.475$)的1组,其 $P>0.05$ 。这说明线性方程的预测功能可能会因药剂和生物的种类而发生变化。

2.2 药剂浓度和水样采集方式对 NAGase 活性测量结果的影响

在乙螨唑暴露下检测裸腹蚤和低额蚤的群体生物量和培养液中NAGase活性随时间而发生的变化。试验结束后,以群体生物量(以“母蚤个体数+ Σ 幼蚤个体数”表示,其中“ Σ 幼蚤个体数”为当次和之前历次测得的幼蚤个体数之和)为自变量(x),以NAGase活性(该活性以培养液中“ Σ 酶活性”表示,“ Σ 酶活性”为当次和之前历次测得的酶活性之和)为因变量(y),利用DPS[®]建立线性方程,其结果见表2。可以看出,12组试验中,有1组 r 值为负(-0.852),其余各组 r 值介于0.867~0.970之间, P 值介于0.005 0~0.066 3之间。其中裸腹蚤的6组试验, r 值介于0.868~0.941之间, P 值介于0.005 0~0.024 9之间;低额蚤的6组试验,有1组 r 值为负(-0.852),其余各组介于0.867~0.970之间, P 值介于0.006 1~0.066 3之间。

在不同培养方式和水样采集方式下检测大型蚤群体生物量和培养液中NAGase活性随时间而发生的变化。试验结束后,以群体生物量(在不挑除幼蚤的试验中,生物量以“母蚤个体数+幼蚤个体数”计;在挑除幼蚤的处理中,生物量以“母蚤个体数+ Σ 幼蚤个体数”之和计,其中“ Σ 幼蚤个体数”以当次和之前



“*”表示数据与对照之间差异显著($P<0.05$);“**”表示数据与对照之间差异极显著($P<0.01$)。

“*” and “**” indicate that the values are different from their respective controls at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

图 1 农药对溞类群体蛋白量(生物量)和游离态 NAGase 活性的影响

Figure 1 Influence of pesticides on protein content(biomass) of daphnids and free-living NAGase activity

表 1 被暴露群体生物量(y)与游离态 NAGase 活性(x)之间的线性关系

Table 1 Linear relationships between biomass of exposed daphnids(y) and free-living NAGase activity(x)

杀虫剂	受试物种	线性关系 $y=ax+b$	r 值	F 值	P 值
丁醚脲	大型蚤	$y=0.000\ 761x+0.187$	0.620	3.12	0.137 0
	裸腹蚤	$y=0.000\ 517x+0.115$	0.929	31.4	0.002 5
	低额蚤	$y=0.000\ 318x+0.091\ 2$	0.966	71.3	0.000 4
乙螨唑	大型蚤	$y=0.000\ 632x+0.063\ 3$	0.737	5.95	0.058 5
	裸腹蚤	$y=0.000\ 179x+0.133$	0.637	3.42	0.123 8
	低额蚤	$y=0.000\ 362x+0.015\ 0$	0.884	17.9	0.008 3
虱螨脲	大型蚤	$y=0.000\ 755x-0.007\ 66$	0.893	19.4	0.006 7
	裸腹蚤	$y=0.000\ 179x+0.179$	0.475	1.47	0.281 3
	低额蚤	$y=0.000\ 222x+0.007\ 56$	0.750	6.42	0.137 0

表 2 乙螨唑胁迫下蚤类生物量(y)与游离态 NAGase 活性(x)之间的线性关系

Table 2 Linear relationships between daphnid biomass(y) and free-living NAGase activity(x) under stress of etoxazole

受试物种	药剂浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	线性关系 $y=ax+b$	r 值	F 值	P 值
裸腹蚤	对照	$y=0.001\ 28x-0.037\ 6$	0.915	20.6	0.010 5
	0.01	$y=0.001\ 01x-0.020\ 6$	0.891	15.5	0.016 9
	0.02	$y=0.019\ 9x-0.111$	0.941	31.4	0.005 0
	0.04	$y=0.001\ 18x-0.000\ 396$	0.885	14.4	0.019 0
	0.08	$y=0.001\ 37x-0.049\ 9$	0.868	12.6	0.023 6
	0.16	$y=0.001\ 91x+0.024\ 2$	0.871	12.2	0.024 9
低额蚤	对照	$y=0.006\ 85x+0.408$	0.867	9.14	0.056 6
	0.10	$y=0.005\ 56x+0.223$	0.889	11.3	0.043 7
	0.20	$y=0.006\ 51x+0.237$	0.899	12.7	0.037 6
	0.40	$y=0.016\ 1x-0.332$	0.970	48.5	0.006 1
	0.80	$y=0.024\ 3x-0.473$	0.906	13.8	0.033 8
	1.60	$y=0.041\ 4x+2.25$	-0.852	7.99	0.066 3

历次测得的幼蚤个体数之和表示)为自变量(x),以 NAGase 活性(在不换水的试验中,NAGase 活性以培养液中的酶活性表示;在换水的处理中,NAGase 活性以“Σ 酶活性”表示,“Σ 酶活性”为当次和之前历次测得的酶活性之和)为因变量(y),利用 DPS[®]建立线性方程,其结果见表 3。可以看出,(x)和(y)之间的线性关系在“换水且挑除幼蚤”的试验组最为明显:以 15 只 F₀ 为起点的试验组,其 r 值和 P 值分别为 0.985 和 0.00;以 40 只 F₀ 为起点的试验组,两者分别为 0.961 和 0.000 5。尽管相关程度不及“换水且挑除幼蚤”的试验组,从 r 值和 P 值上看,(x)和(y)之间的线性关系同样存在于“不换水且不挑除幼蚤”的试验组:以

表 3 不同取样方式下大型蚤群体生物量(y)与游离态 NAGase 活性(x)之间的线性关系

Table 3 Linear relationships between biomass of *Daphnia magna*(y) and free-living NAGase activity(x) relating different sampling methods

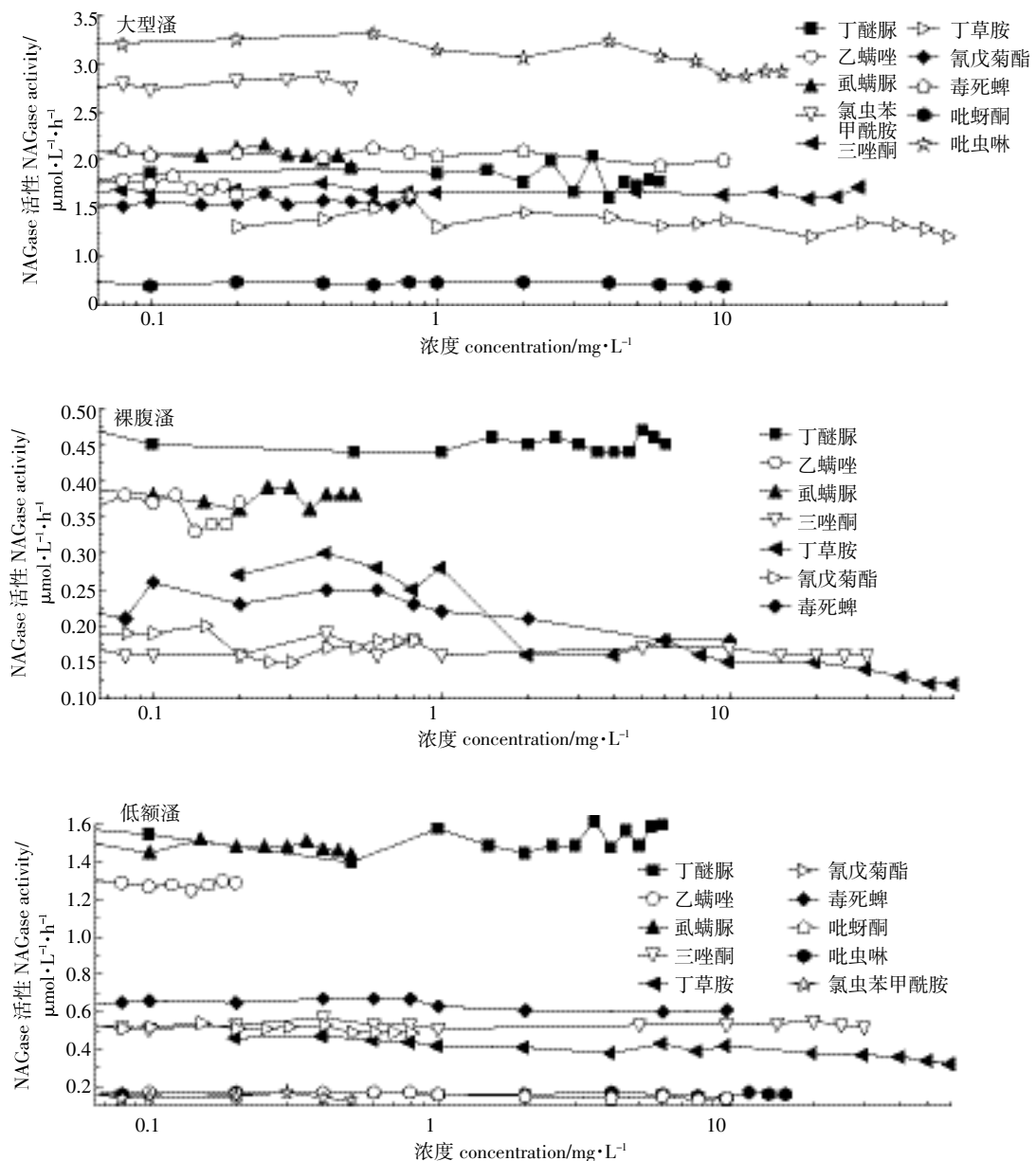
起始	处理方式	线性关系 $y=ax+b$	r 值	F 值	P 值
15 只 F ₀	不换水挑除幼蚤	$y=0.136x+0.997$	0.296	—	—
	换水挑除幼蚤	$y=0.007\ 72x+0.418$	0.985	171	0.000 0
	换水不挑除幼蚤	$y=0.016\ 3x-0.343$	0.851	13.2	0.014 9
40 只 F ₀	不换水不挑除幼蚤	$y=0.005\ 08x+0.818$	0.675	4.20	0.095 6
	不换水挑除幼蚤	$y=0.012\ 9x+1.45$	0.574	2.46	0.177 1
	换水挑除幼蚤	$y=0.003\ 90x-0.259$	0.961	61.2	0.000 5
	换水不挑除幼蚤	$y=0.011\ 0x-0.025\ 3$	0.515	1.81	0.235 2
	不换水不挑除幼蚤	$y=0.008\ 37x-0.496$	0.888	18.7	0.007 5

15 只 F₀ 为起点的试验组,其 r 值和 P 值分别为 0.675 和 0.095 6;以 40 只 F₀ 为起点的试验组,两者分别为 0.888 和 0.007 5。

2.3 农药对游离态 NAGase 的影响

图 2 显示除草剂丁草胺、杀菌剂三唑酮,以及虱螨脲等 8 种杀虫剂对大型蚤、裸腹蚤和低额蚤所释放的 NAGase 活性的直接影响。可以看出,丁醚脲、乙螨唑、三唑酮和氯虫苯甲酰胺在试验浓度下对酶活性均无显著影响。虱螨脲仅在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对大型蚤的酶有显著抑制,对裸腹蚤和低额蚤释放的酶则无显著影响。对裸腹蚤而言,丁草胺在 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度组对酶活性有极显著抑制;对低额蚤而言,丁草胺在 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度组对酶活性有显著抑制;对大型蚤而言,丁草胺在试验浓度下对酶活性无显著影响。对裸腹蚤而言,毒死蜱在 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度组对酶活性有显著抑制。对低额蚤而言,吡蚜酮在 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度组对酶活性有显著抑制。对大型蚤而言,吡虫啉在 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度组对酶活性有极显著抑制。综上所述,丁醚脲、乙螨唑、虱螨脲、三唑酮、丁草胺、氰戊菊酯、毒死蜱、吡蚜酮、吡虫啉、氯虫苯甲酰胺 10 种农药对 3 种蚤游离 NAGase 的影响阈值(单位 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)分别为:>6、>0.2、0.47、>6、1.4、0.25、3.5、4.9、10、>0.5。

GENEEC 是美国 EPA 发布的一款暴露分析软件。它可以在一定的使用剂量和使用方式下,根据理化性质和环境化学参数模拟得出农药使用后的水体残留量。将此数据与毒性数据比较,即可判断农药是否会对水生非靶标生物构成威胁。本文用 GENEEC 来估算上述 10 个农药品种在稻田中使用后经由地表径



以“*”标注的点,其所代表的数据与对照之间差异显著($P<0.05$),以“**”标注的点,其所代表的数据与对照之间差异极显著($P<0.01$)

Points marked by “*” and “**” represent significant differences from their respective controls at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively

图 2 农药对于游离态 NAGase 活性的直接影响

Figure 2 Direct influence of pesticides on activity of free-living NAGase

流、漂移等途径而对池塘水所造成的污染,其结果如表 4 所示。可以看出,10 个农药品种在池塘水中的最高污染浓度(单位 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)分别为 0.07、0.66、0.19、8.05、33.3、1.00、5.38、1.98、1.81、1.49,远远低于图 2 所示的这些农药对 NAGase 活性的影响阈值。

3 讨论

处于生长和繁殖过程中的溞类群体,一方面不断向水中释放 NAGase,另一方面,已释放的 NAGase 又

会不断降解,所以酶的释放量与生物量之间原本存在复杂的对应关系^[7]。图 1 所示的药剂试验选用线性模型来预测被暴露群体的生物量,在此应被视为一种简化处理。从表 3 可以看出,在“不换水挑除幼溞”、“换水挑除幼溞”、“换水不挑除幼溞”、“不换水不挑除幼溞”4 个试验组中,“换水挑除幼溞”试验组的线性关系最好,“不换水不挑除幼溞”的次之。值得注意的是,图 1 所示的药剂试验正是采用了“不换水不挑除幼溞”试验设计。基于这一点,表 3 的结果从一个侧面印

表 4 农药在农田附近地表水中的模拟最高残留^a
Table 4 Simulated maximum of pesticide residues in surface waters near farmlands

农药名称		丁醚脲	乙螨唑	虱螨脲	三唑酮	丁草胺	氰戊菊酯	毒死蜱	吡蚜酮	吡虫啉	氯虫苯甲酰胺
输入参数 ^b	登记作物	十字花科蔬菜	柑橘	番茄	黄瓜	水稻	十字花科蔬菜	水稻	水稻	水稻	水稻
	防治对象	小菜蛾	红蜘蛛	夜蛾	白粉病	稗草	蚜虫	稻飞虱	稻飞虱	稻飞虱	螟虫
	施药量/gai·hm ⁻²	900	112.1 ^c	37.5	225	1275	180	720	120	45	42
	施药次数/次·a ⁻¹	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	K _{oc}	43 546	6650	41 182	300	700	5273	8151	1510	225	362
	土壤有氧降解半衰期/d	0.5	7.2	256	26	11.5	77	21	35.5	174	204
	径流发生于施药后的天数/d	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	施药方式	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾
	雾滴大小	小-中	小-中	小-中	小-中	小-中	小-中	小-中	小-中	小-中	小-中
	施药时是否保留“安全带”	否	否	否	否	否	否	否	否	否	否
	水溶性/mg·L ⁻¹	0.06	0.07	0.046	70	20	0.001	1.05	270	610	0.88
	水中降解半衰期/d	451	1.45	112	12	23	115	25.5	6	30	23.5
	水中光解半衰期/d	—	17	0.75	0.8	—	9.2	29.6	6.8	0.2	0.31
	结果输出										
	最高污染浓度/μgai·L ⁻¹	0.07	0.66	0.19	8.05	33.3	1.00	5.38	1.98	1.81	1.49
	影响阈值 ^d /μgai·L ⁻¹	>6×10 ³	>2×10 ²	4.7×10 ²	>6×10 ³	1.4×10 ³	>8×10 ²	3.5×10 ³	4.9×10 ³	8.9×10 ³	>5×10 ²

注:a.采用 GNEEC (Version 2.0) 进行模拟。它以一块面积为 10 hm² 的农田作为“目标区域”,以一方面积为 1 hm²、深度为 2 m 的池塘作为“非目标区域”。b.其中的“登记作物”和“施药量”,除特别指出外,均来自农业部“农药电子查询服务系统”;农药理化参数和环境化学参数,除特别指出外,均来自英国“University of Hertfordshire”的“Pesticide Properties DataBase”。c.采用“住友化学(上海)有限公司”提供的数据。d.以数据差异性分析(ANOVA)确定的受试物的最低效应浓度(LOEC)和最高无效应浓度(NOEC)的几何平均数来表示,其中 LOEC 和 NOEC 的取值以大型蚤、裸腹蚤、低额蚤 3 个受试物种当中最为敏感的为准。

证图 1 所示的药剂试验所采的水样的酶活性在一定程度上反映了系统生物量的真实状况。

暴露于农药或其他有毒化学品的蚤类中一些个体的死亡,可能因为农药的毒作用,也可能因为生理或其他方面的原因。为弄清这些因素对生物量预测结果的影响,本文以裸腹蚤和低额蚤作为受试生物,以乙螨唑作为受试药剂,开展为期 13 d 的养殖试验。试验期结束时,对于裸腹蚤,各组的 F₀ 均已经死亡过半,但是就 *r* 值和 *P* 值而言,裸腹蚤与低额蚤没有显著差别(表 2),说明蚤类个体的自然死亡不会显著影响人们对群体生物量变化趋势的判断。至于农药,从表 2 中可以看出,当乙螨唑浓度由 0 增加到 0.8 μg·L⁻¹ 时,低额蚤方程的 *r* 值在 0.867~0.970 的范围内变动,但当药剂浓度由 0.8 μg·L⁻¹ 提高到 1.6 μg·L⁻¹ 时,方程的 *r* 值由 0.906 变为-0.852。究其原因,当药剂浓度提高到 1.6 μg·L⁻¹ 时,种群中的个体在短时间内大量死亡。这种情形下,NAGase 即丧失了对于生物量的预测功能(尽管这种丧失是暂时的)。

溶解于水的农药,如果对游离态 NAGase 的活性有直接影响(抑制或激活),将会干扰人们对于被暴露群体生物量的准确判断。为了排除这种可能性,本文

以图 1 所示农药浓度作为自变量(*x*),分别以被暴露群体在相应浓度下相对于对照组的酶活性抑制率和被暴露群体在相应浓度下相对于对照组生物量的抑制率作为因变量(*y*),用 DPS[®] 建立“剂量-效应”方程,分别求出 3 种农药对于大型蚤酶活性和生物量的 IC₅₀ 及其 95% 置信限。前者分别为 3.32×10⁻¹ (2.57×10⁻¹~4.29×10⁻¹) μg·L⁻¹、7.10×10⁻² (4.93×10⁻²~1.02×10⁻¹) μg·L⁻¹、1.85×10⁻¹ (1.36×10⁻¹~2.53×10⁻¹) μg·L⁻¹, 后者分别为 9.54×10⁻¹ (6.99×10⁻¹~1.30) μg·L⁻¹、1.64×10⁻¹ (9.11×10⁻²~2.95×10⁻¹) μg·L⁻¹、2.82×10⁻¹ (1.97×10⁻¹~4.04×10⁻¹) μg·L⁻¹, 两者属于同一数量级并且分别大幅度低于图 2 所示的 3 种农药对大型蚤 NAGase 的影响阈值(>6.0、>0.2、0.47 mg·L⁻¹)。据此可以推断,在图 1 所示的药剂试验中,游离态 NAGase 的活性随农药浓度而发生变化的主要原因是被暴露群体生物量(因农药的存在)发生了改变,而不是因为水中农药对游离态 NAGase 的活性产生了影响。

以水中 NAGase 活性来预测农药胁迫下的蚤类群体的生物量,其结果出现偏差的可能原因不外乎以下几方面:(1)水样采集方式不合理。这种可能性可以排除,正如表 3 所示“不换水不挑除幼蚤”的试验组,

NAGase活性与溞类生物量之间的线性关系相对较好。(2)农药毒作用导致酶活性与群体生物量变化趋势不一致。出现这种情况的可能性在表2所列的方程中得到了证明。(3)溞类生理原因导致酶活性与群体生物量变化趋势不一致。这种可能性也可以排除,因为表2所列方程显示溞类个体在试验过程中的自然死亡不至于显著影响酶活性与生物量的变化趋势。(4)其他生物来源的NAGase对于溞类酶活性测量的干扰。由于试验并非在无菌环境下进行,而且试验期间需要周期性喂食,于是形成这种干扰。前人研究表明,除了水生节肢动物外,细菌、藻类、原生动物等均可能成为水中NAGase的重要来源^[12-15]。为避免这方面干扰,可以研究开发针对节肢动物某一物种或某一类群的NAGase的测定方法,如免疫化学测定法^[16]。

已有研究表明,水产养殖用的消毒药物^[17]、有机酸^[18]、重金属^[19-20]、苯酚^[21]等均会影响(抑制或激活)水生节肢动物NAGase活性。本文以丁醚脲、乙螨唑、虱螨脲、三唑酮、丁草胺、氰戊菊酯、毒死蜱、吡蚜酮、吡虫啉、氯虫苯甲酰胺10个农药品种作为受试药剂,分别检测了它们对大型溞、裸腹溞、低额溞所释放的NAGase活性的影响,其结果如图2所示。这说明如果按照登记用量和方法使用,农药在水中的浓度不可能达到显著影响溞类所释放的NAGase活性的水平,因而也不会从这方面来干扰人们对于生物量的准确判断。

4 结论

本项研究的结果表明,利用线性模型来预测农药胁迫下的溞类群体的生物量,其结果具有一定的可靠性。在接近或超过致死剂量时,农药会暂时性地干扰被暴露群体的生物量判断。研究结果表明,溞类在生长过程中的自然死亡不会改变酶活性与生物量之间的协同关系。尽管农药在高浓度下对于离体的NAGase有直接影响(即抑制或诱导其活性),按照推荐剂量和方法使用,它们在水体中能够达到的浓度远不足以将这种影响转化为现实,故农药不可能直接影响群体生物量的预测结果。

参考文献:

- [1] Hanson M, Lagadic L. Chitinase activity as an indicator of aquatic ecosystem health[J]. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 2005, 8(4):441-450.
- [2] 谢晓兰,王勤,陈清西.产物类似物对南美白对虾N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活性的影响[J].厦门大学学报(自然科学版),2004,43(增刊):24-27.
- [3] XIE Xiao-lan, WANG Qin, CHEN Qing-xi. Inhibitory effects of some product analogues on the β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 43(Suppl):24-27.
- [3] 张继平.锯缘青蟹N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的性质及活力调控的研究[D].厦门:厦门大学,2006.
- ZHANG Ji-ping. Studies on the properties and the activity regulation of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase from Green Crab (*Scylla serrata*) [D]. Xiamen: Xiamen University, 2006.
- [4] Vrba J, Macháček J. Release of dissolved extracellular β -N-acetylglucosaminidase during crustacean molting[J]. *Limnology and Oceanography*, 1994, 39(3):712-716.
- [5] Espie J P, Roff J C. Characterization of chitinase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux[J]. *Physiological Zoology*, 1995, 68(5):727-748.
- [6] Oosterhuis S S, Baars M A, Klein Breteler W C M. Release of the enzyme chitinase by the copepod *Temora longicornis*: Characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 196:195-206.
- [7] Sastri A R, Roff J C. Rate of chitinase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, 57(10):1965-1968.
- [8] Sastri A R, Dower J F. Field validation of an instantaneous estimate of in situ development and growth for marine copepod communities[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2006, 63(12):2639-2647.
- [9] Conley J M, Schorr M S, Hanson M L, et al. Is ambient chitinase activity a monitoring tool for impacts on secondary production in lotic systems?[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2009, 66(8):1274-1281.
- [10] Avila T R, de Souza Machado A A, Bianchini A. Estimation of zooplankton secondary production in estuarine waters: Comparison between the enzymatic(chitinase) method and mathematical models using crustaceans[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2012, 416-417:144-152.
- [11] Duchet C, Inafuku M M, Caquet T, et al. Chitinase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to spinosad and di-flubenzuron[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(4):800-810.
- [12] Vrba J, Šimek K, Nedoma J, et al. 4-Methylumbelliferyl- β -N-acetylglucosaminide hydrolysis by a high-affinity enzyme, a putative marker of protozoan bacterivory[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(9):3091-3101.
- [13] Vrba J, Kofroňová-Bobková J, Pernthaler J, et al. Extracellular low-affinity (β -N-acetylglucosaminidases) linked to the dynamics of diatoms and crustaceans in freshwater systems of different trophic degree [J]. *International Review of Hydrobiology*, 1997, 82(2):277-286.
- [14] Vrba J. Comment to Sherr and Sherr(1999): "Is there any appropriate way to distinguish different β -N-acetylhexosaminidase activities in

- aquatic environments?"[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 33:81-84.
- [15] Vrba J, Callieri C, Bittl T, et al. Are bacteria the major producers of extracellular glycolytic enzymes in aquatic environments? [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2004, 89(1):102-117.
- [16] Peters G, Saborowski R, Mentlein R, et al. Isoforms of an N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the Antarctic krill, *Euphausia superba*; Purification and antibody production[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1998, 120(4):743-751.
- [17] 谢晓兰, 黄乾生, 魏晓倩, 等. 养殖常用消毒药物对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(4):108-111.
XIE Xiao-lan, HUANG Qian-sheng, WEI Xiao-qian, et al. The effects of some aquacultural disinfectors on the activity of NAGase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(4):108-111.
- [18] Xie X L, Hu Y H, Wang L L, et al. Inhibitory kinetics of citric acid on β -N-acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29:674-678.
- [19] 谢晓兰, 黄乾生, 陈清西. 不同组织来源的凡纳滨对虾 NAGase 的性质比较[J]. 泉州师范学院学报(自然科学), 2007, 25(6):91-94.
XIE Xiao-lan, HUANG Qian-sheng, CHEN Qing-xi. Comparison of the properties of NAGase from the different organs of Prawn (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Journal of Quanzhou Normal University (National Science)*, 2007, 25(6):91-94.
- [20] 杨学敏, 谢进金, 张继平, 等. 金属离子对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3):343-346.
YANG Xue-min, XIE Jin-jin, ZHANG Ji-ping, et al. Effects of metal ions on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*) [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2006, 25(3):343-346.
- [21] Zhang J P, Yan Y W, Xie J J, et al. Inhibitory kinetics of phenol on the enzyme activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 40(2):139-143.