

三唑磷对泥蚶急性毒性及血清 SOD, CAT 酶活性的影响

周常义^{1,2}, 严重玲², 黄成¹, 陈维权¹, 池信才³

(1. 集美大学 生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学 生命科学院, 福建 厦门 361005; 3. 厦门市水产局, 福建 厦门 361005)

摘要: 三唑磷对泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 的 48 h LC₅₀ 为 21.0 mg/L, 96 h LC₅₀ 为 10.2 mg/L, 依此设计三唑磷对泥蚶的胁迫质量浓度 (1.1, 2.2, 4.4, 22 mg/L), 分别于胁迫后第 0.5, 1, 2, 4, 8 天及解除胁迫后第 4 天采样, 研究三唑磷胁迫后泥蚶血清超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性的变化情况。结果表明, 随三唑磷胁迫浓度和时间的不同, 泥蚶血清蛋白质质量浓度无显著性差异; 在 0.5, 1 d 时各处理组的 SOD 无显著影响, 从第 2 天起, SOD 活性显著下降, 48 h 的 LC₅₀ 为 3.62 mg/L; CAT 的活性在第 1 天显著升高, 而后逐渐降低。三唑磷胁迫下, SOD, CAT 活性呈现一定的剂量效应与时间效应。胁迫解除后, 蛋白质、SOD 和 CAT 均得到不同程度的恢复, 表明泥蚶具有一定的生理调节机能。

关键词: 三唑磷; 泥蚶 (*Tegillarca granosa*); 血清; 超氧化物歧化酶 (SOD); 过氧化氢酶 (CAT); 胁迫

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)12-0043-06

三唑磷 (triazophos) 是一种新型农药, 化学名称为 0,0-二乙基-0-1-苯基-1,2,4-三唑基-3-硫代磷酸酯。主要用于果树、棉花、禾谷类作物, 具有广谱的杀虫作用。

泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 俗称血蚶, 是中国重要海产贝类, 多分布在山东以南沿海, 是山东、浙江、福建和广东等省的主要养殖对象^[1]。由于泥蚶在蚶苗和养成期易受凸壳肌蛤、红螺、玉螺、蟹类等敌害生物的危害, 而泥蚶对农药有较强的耐受性, 因此, 近年来在福建、浙江等省养殖海域中部分养殖户使用三唑磷以杀灭敌害生物。目前有关三唑磷对水生生物的毒性研究较少^[2,3], 对贝类酶活性的影响还未见报道。作者以泥蚶为实验对象, 测定三唑磷的急性毒性, 分析 1.1, 2.2, 4.4, 22 mg/L 4 个不同质量浓度胁迫下及解除胁迫后泥蚶血清超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性的变化情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂

20% 三唑磷乳油 (浙江新农化工有限公司产品), 其余试剂均为分析纯。

1.1.2 实验生物

泥蚶壳长 28.0 mm ± 1.0 mm, 壳宽 22.2 mm ± 1.0 mm, 体质量 9.33 g ± 1.33 g, 购于厦门市水产批发市场。

1.1.3 实验用水

取自集美大学海水养殖场, 经沉淀、沙滤、曝气后的海水, pH 7.3 ± 0.1, 盐度 28 ± 1, 密度 1.017。

1.2 实验方法

1.2.1 泥蚶急性毒性实验

按文献 [4] 的方法, 根据预实验的结果, 确定实验的质量浓度范围, 按照等对数间距设置 7 个浓度组和一个不加毒物的空白对照组, 并做平行实验。取暂养 7 d 后的泥蚶, 放入装有 4 L 海水的直径为 35 cm 的塑料容器中, 每盆 10 只, 充气。试验期间不投饵, 温度

收稿日期: 2003-07-02; 修回日期: 2004-03-12

作者简介: 周常义 (1971-), 女, 福建永春人, 讲师, 硕士, 研究方向: 水产动物疾病学、环境毒理学, E-mail: chyzhou1@sina.com

29.1 °C ± 1.2 °C。采用半静水式。以闭壳肌无力、张口、用玻璃棒轻敲其外壳许久不作出反应者定为死亡。

1.2.2 三唑磷胁迫处理

根据 LC₅₀数值, 设置 1.1, 2.2, 4.4, 22 mg/L 4 个质量浓度和一个不加毒物的空白对照组, 并做 3 组平行实验, 温度 29.1 °C ± 1.2 °C。分别于染毒后的 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 8 d 及连续胁迫 4 d 后转入沙滤清洁海水中解除胁迫 4 d 后取血。

1.3 样品预处理及酶活的测定

血样 4 °C 离心 (4 000 r/min, 5 min), 取上清液用于可溶性蛋白质、SOD、CAT 的测定。

可溶性蛋白质质量浓度测定: 采用 Folin- 酚试剂法, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

SOD 活性的测定: 参照文献[5], 采用邻苯三酚氧化法, 以每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定义为一个酶活力单位。

CAT 活性的测定: 参照文献[6], 采用碘滴定法。一个酶活单位 (U) 以单位时间酶促分解 H₂O₂ 的量 (μmol/L) 表示。

1.4 数据处理

急性毒性实验采用机率单位法计算 LC₅₀, 实验数据用统计学方法进行处理, 所给结果均为平均数 ± 标准误差; 用单因素方差方法分析, 组间数据的两两比较采用单尾 t- 检验法, P < 0.05 为差异显著, P < 0.01 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 三唑磷对泥蚶的急性毒性

处于污染水体中的泥蚶, 刚开始时紧闭双壳, 可长达 12 h 不张口, 以后逐渐开口滤食, 对外界的刺激仍较为敏感。随着染毒时间的延长和毒物质量浓度的升高, 泥蚶出现反应迟缓, 闭壳肌无力, 直至死亡。三唑磷对泥蚶的急性毒性结果见图 1。泥蚶的 48 h LC₅₀ 为 21.0 mg/L, 96 h LC₅₀ 为 10.2 mg/L。

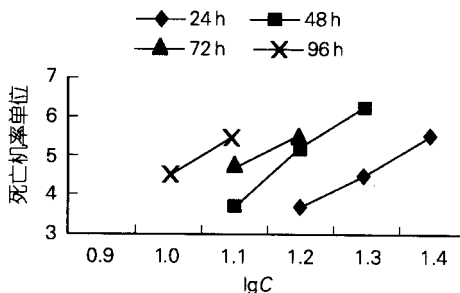


图 1 三唑磷对泥蚶的急性毒性试验

Fig.1 Acute toxicity test of triazophos to *Tegillarca granosa*
c 为三唑磷质量浓度 (mg/L)

2.2 三唑磷对泥蚶血清蛋白质质量浓度的影响

从图 2 中可看出, 用质量浓度为 1.1, 2.2, 4.4, 22 mg/L 的三唑磷胁迫泥蚶, 8 d 内泥蚶血清中蛋白质的质量浓度的变化均不显著; 在胁迫 4 d 后, 转入清洁的海水中连续解除胁迫 4 d, 除 22 mg/L 外其余各质量浓度组泥蚶血清中的蛋白质显著性增加。

2.3 三唑磷对泥蚶血清 SOD 的影响

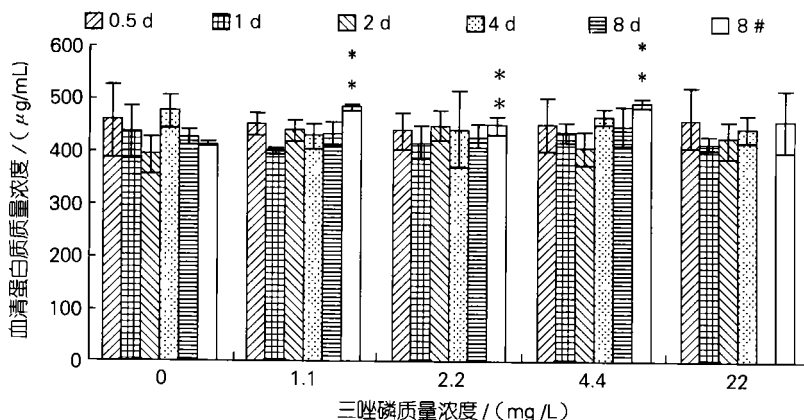


图 2 不同质量浓度的三唑磷对泥蚶血清蛋白质质量浓度的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of triazophos on protein in the blood serum of *Tegillarca granosa*
表示与对照组比较差异极显著, 8# 为解除胁迫组

2.3.1 剂量效应

如图 3 所示, 在三唑磷胁迫的 1 d 内各质量浓度组泥蚶血清中的 SOD 活性变化不大。2 d 后, SOD 活性随质量浓度的升高而逐渐下降, 高质量浓度组的下降幅度大于低质量浓度组。用单尾 *t*- 检验法分别将 1.1, 2.2, 4.4, 22 mg/L 质量浓度组与对照组的 SOD 活性进行两两比较, 结果表明差异都极显著。分别对同一时间不同三唑磷质量浓度之间的各组数据进行单因素方差分析, 结果表明, 从第 2 天起, 1.1 与 2.2,

4.4 mg/L 质量浓度组间差异极显著; 第 8 天时, 2.2, 4.4 mg/L 质量浓度组 SOD 活性分别是 1.1 mg/L 质量浓度组的 64.3%, 43.1%。以变化率为纵坐标 *y*, 以质量浓度为横坐标 *x*, 进行多项式回归, 胁迫 4 d 时 $y = -3.9747x^3 + 35.377x^2 - 103.75x + 143.04$ ($r^2 = 0.9311$)。

2.3.2 时间效应

从图 4 可看出, 在受胁迫的第 1 天内, 4.4 mg/L 质量浓度组的 SOD 活性略有上升, 这可能是机体内

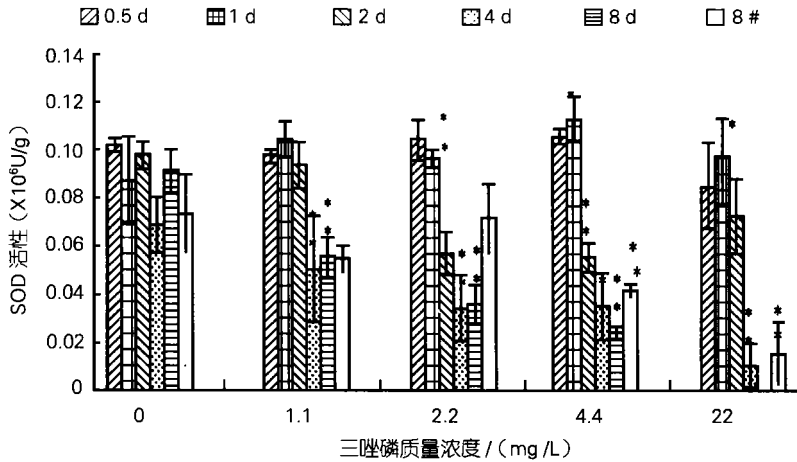


图 3 不同质量浓度的三唑磷对泥蚶血清 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of triazophos on SOD activities in the blood serum of *Tegillarca granosa*

* 表示与对照组比较差异显著; ** 表示与对照组比较差异极显著

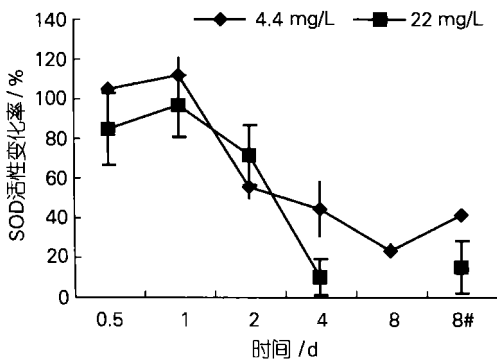


图 4 三唑磷对泥蚶血清 SOD 活性的时间效应

Fig. 4 Time-effects of triazophos on SOD activity in the blood serum of *Tegillarca granosa*

质量浓度组的 SOD 从一开始就受抑制, 到第 4 天时, SOD 活性仅剩余 20%。质量浓度为 4.4 mg/L 的胁迫组在第 1, 2, 4, 8 天时, SOD 活性变化分别是 113%, 56%, 45% 和 24%。以 SOD 变化率为纵坐标 *y*, 以时间为横坐标 *x*, 进行多项式回归, 4.4 mg/L 质量浓度组 $y = 2.5402x^3 - 30.381x^2 + 88.766x + 37.376$ ($r^2 = 0.9304$)。

2.3.3 解除胁迫后 SOD 活性的变化

为了解泥蚶在胁迫解除后血清中 SOD 活性的变化情况, 把其中的一组的泥蚶在暴露 4 d 后转入清洁的海水中, 4 d 后测其酶活性。与其他继续受胁迫的处理组比较, 可以看到 SOD 的活性出现了一些回升的趋势。但是还达不到对照组的水平。这说明了在胁迫解除后, 酶活性有一定程度的恢复, 但高质量浓度组恢复能力差。

2.4 三唑磷对泥蚶血清 CAT 的影响

2.4.1 剂量效应

防御系统被调动, 减少由胁迫产生的过多氧自由基的一种保护行为, 之后 SOD 活性大幅度下降。22 mg/L

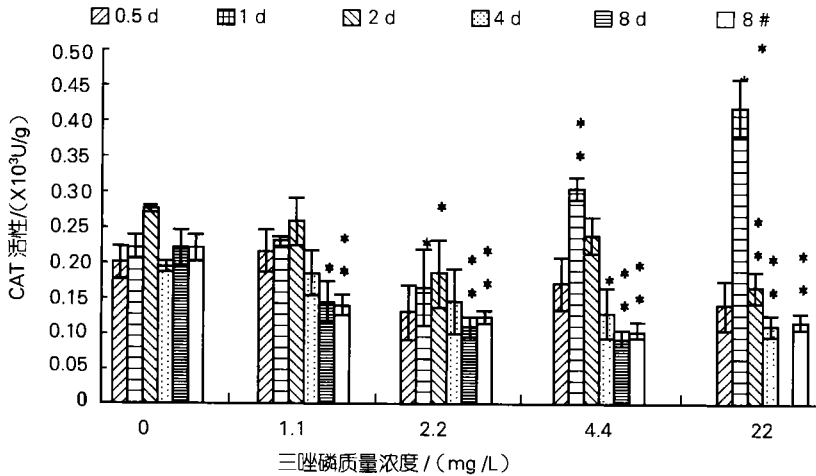


图 5 不同质量浓度的三唑磷对泥蚶血清 CAT 活性的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of triazophos on activities in the blood serum of *Tegillarca granosa*

* 表示与对照组比较差异显著; ** 表示与对照组比较差异极显著

从图 5 可见, 在实验的质量浓度范围内, 泥蚶血清 CAT 活性变化较大。在开始的第 1 天内, CAT 酶活性随着质量浓度的升高而增大, 说明了 CAT 的酶活性在开始受胁迫时被诱导。但从第 2 天起 CAT 的酶活性又逐渐被抑制, 特别是高质量浓度组的抑制作用更加显而易见。在第 2 天时, 质量浓度 2.2, 22 mg/L 暴露组的 CAT 活性与对照组比较差异极显著。以活性变化率为纵坐标 y , 以质量浓度为横坐标 x , 进行多项式回归, 胁迫 4 d 时 $y = 0.204x^2 - 12.067x + 110.04$ ($r^2 = 0.9628$)。

2.4.2 时间效应

如图 6 中所示, 在三唑磷的胁迫下, 0.5 d 时 CAT 活性降到了一个较低的水平; 1 d 后被诱导, 酶活显著上升, 但随着时间的延长, 上升到一定水平后 CAT 活性又开始下降。4.4 mg/L 质量浓度组在 1 d 时分别是对照的活性的 1.5 倍; 2.2 mg/L 质量浓度组的 CAT 活性在 2 d 时达到最高水平; 在 8 d 时质量浓度 2.2, 4.4 mg/L 暴露组的 CAT 活性是对照组的 0.5 倍。以 CAT 变化率为纵坐标 y , 以三唑磷胁迫时间为横坐标 x , 进行多项式回归, 4.4 mg/L 质量浓度组的回归方程为 $y = 2.1457x^3 - 30.085x^2 + 111.58x + 3.1785$ ($r^2 = 0.6867$)。

2.4.3 解除胁迫后 CAT 活性的变化

在胁迫解除 4 d 后 CAT 的酶活性恢复不显著, 这是否说明了 CAT 的活性的变化相对于环境因子的改

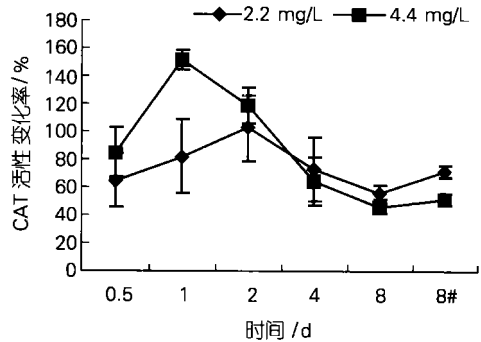


图 6 三唑磷对泥蚶血清 CAT 活性的时间效应

Fig. 6 Time effects of triazophos on CAT in the blood serum of *Tegillarca granosa*

变具有一定的“迟滞性”, 外界胁迫的环境因子已经消除, 但机体内还有所残留以致 CAT 的活性无法快速恢复。

3 讨论

金彩杏等^[3]研究三唑磷对鲈鱼、梭鱼、日本鳗鲡苗、大弹涂鱼等海洋鱼类的毒性, 48 h 的急性半致死质量浓度分别为 0.082, 0.004, 0.09, 0.009 mg/L; 丁跃平等^[7]报道三唑磷对中国对虾仔虾、日本大眼蟹的

48 h LC₅₀ 为 0.0016, 0.52 mg/L。结合本试验, 作者认为泥蚶对三唑磷的耐受力远高于上述水产动物, 如果对三唑磷的使用不加以有效的控制, 海洋生物的多样性和食物网将受到严重的破坏。

本试验中, 在三唑磷的胁迫下, 泥蚶血清的蛋白质质量浓度未发生明显的变化, 这可能是机体虽然启动了某些保护机制, 但在蛋白质的表达量上未能有明显的体现, 这也说明在有机磷农药污染检测中, 蛋白质的质量浓度不能作为生物检测的指标。胁迫解除后, 蛋白质显著性增加, 这可能是泥蚶试图恢复其生理机能的表现。

大量实验研究表明, 外源性化学物质进入生物细胞后, 会导致大量活性氧($O_2^{\cdot-}$, O_2 , $HO_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} 等)的产生, 从而对机体诱发多种损害, 导致机体内 DNA 断裂、脂质过氧化、酶失活等一系列氧应激, 而机体内同时存在着抗氧化作用的酶防卫系统, 如 CAT, SOD, P₄₅₀, GPx 等^[8,9]。唐学玺等^[10]研究认为, 久效磷胁迫下海洋微藻膜脂质过氧化物丙二醛质量浓度不断上升, 膜的通透性也逐渐增加, 二者的这种变化有显著的正相关性, 最终导致细胞膜结构的破坏和功能的丧失。Mather-Mihaich 等^[11]报道, 斑暴露于有机磷杀虫剂 DEF(0.056~1.4 mg/L)及其代谢产物 nBM(1.878~7.513 ng/L) 21 d, 抗氧化酶 SOD 和 CAT 活力未发现明显变化。他认为有可能是由于测定时间间隔过长以致无法检测出抗氧化酶在较短时间间隔中的细微变化。在本试验中, 随三唑磷胁迫时间和胁迫质量浓度的不同, 泥蚶血清的 SOD, CAT 的活性变化是一个动态的过程。从时间效应分析, SOD 和 CAT 在第 1 d 内受诱导, 这是由于机体内防御系统被调动起来以减少由胁迫产生的氧自由基带来的伤害, 但随着时间的延长, SOD 和 CAT 活性逐渐受抑制; 从剂量效应分析, 1, 1.2, 2 mg/L 质量浓度组在 1 d 内的酶活性变化规律较一致, 这可能与氧自由基量较少有关。4, 4, 22 mg/L 质量浓度组 SOD 活性在 1 d 内略低于其它质量浓度组, 第 4 天时显著低于其它质量浓度组, 说明随水体中三唑磷质量浓度增加和时间的延长, 产生的活性氧增加, SOD 和 CAT 活性随之降低, 机体受伤害大。这一点与彭晓春等^[12]报道的 Sportak 对湘云鲫肝脏 SOD 和 CAT 影响相类似。泥蚶血清 SOD, CAT 降低主要原因推测有二, 一是由于肝脏等器官严重瘀血, 产生大量氧自由基, 同时细胞处于激活状态, 氧耗增多, SOD, CAT 消耗也随之增多; 二是由于机体抵抗力显著降低, 抗氧化自由基防御能力

降低, 不能产生足够的 SOD 和 CAT。在实验条件下, 往往可以观察到抗氧化系统在污染暴露下的最初反应是诱导, 这是机体对污染的适应, 但抗氧化系统诱导能力终究是有限的, 在污染物质量浓度较高或者污染时间延长的情况下, 抗氧化系统参数被抑制, 表现出污染物的毒性作用。

22 mg/L 三唑磷胁迫第 0.5 天时 CAT 活性显著被诱导, 与 SOD 表现不一致。SOD, CAT 活性变化表现不相平行的例子不少, 如 Nasci 等^[13]将文蛤 (*Mercentaria mercenaria*) 移植到污染水域 15 d 后, 也发现 SOD 活性未被诱导, 而 CAT 活性显著增加。陈荣^[14]对僧帽牡蛎的研究中及 Elif 和 Nevin^[15]研究农药对罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 肝脏抗氧化酶活性的影响中都有类似的发现。SOD 是生物体内惟一种以自由基为底物的酶, 其作用底物是 O_2 , 可催化歧化反应生成 H_2O_2 , CAT 能将 H_2O_2 分解成为 H_2O 与 $O_2^{\cdot-}$ 。CAT 与 SOD 在活性表现不尽相同可能的原因是由于 H_2O_2 除来自于 SOD 的歧化作用外, 还可以来自于氨基酸或细胞色素 P₄₅₀ 氧化酶的反应。

三唑磷胁迫解除后, 泥蚶 SOD 和 CAT 均有所恢复, 但无法恢复到原有水平, 分析认为泥蚶具有一定的生理调节机能, 可能是由于三唑磷的残留等原因使其活性不能迅速恢复。

此外, 在实验中对照组泥蚶血清的 SOD, CAT 的活性都出现了不同程度的降低或升高, 表明了 SOD, CAT 的活性易受到毒物胁迫以外的其他环境因素如水体、饵料等的影响。在实验室或野外研究中, 应充分重视对照组的合理设置, 才能对实验结果作出正确的评估。

参考文献:

- [1] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1998. 275-292.
- [2] 李少南. 甲基异柳磷和三唑磷对几种淡水鱼的毒性比较[J]. 环境污染与防治, 1998, 20(3): 13-14.
- [3] 金彩杏, 丁跃平, 刘士忠, 等. 三唑磷农药对鲈鱼等鱼类的急性毒性试验[J]. 水产科技情报, 2002, 4: 23-25.
- [4] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社, 1989. 109-191.
- [5] 张德安. 生物大分子实验手册[M]. 吉林: 吉林出版社, 1991. 411-415.
- [6] 徐晓白, 戴树桂, 黄玉瑶. 典型环境污染物在环境中的变化及生态效应[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 384-386.

- [7] 丁跃平, 金彩杏, 郭远明, 等. 三唑磷对海水虾类、蟹类的急性毒性试验[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2002, 21(2): 116- 118.
- [8] DiGiulio R T, Washburn P C, Wenning R J, *et al.* Bio-chemical responses in aquatic animals: a review of detem in ants of oxidative stress[J]. **Environ Toxicol Chem**, 1989, 8: 1 103- 1 123.
- [9] 魏渲辉, 汝少国, 姜明, 等. 有机磷农药对鱼类的毒性效应及内分泌扰乱作用[J]. 海洋科学, 2002, 26(9): 28- 31.
- [10] 唐学玺, 于娟, 李永祺. 久效磷对海洋微藻细胞的活性氧伤害[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 155- 158.
- [11] Mather- Mihaich E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in Channel catfish exposed to DEF and N-Butyl Mercaptan[J]. **Comp Biochem Physiol**, 1986, 85C(2): 427- 433.
- [12] 彭晓春. Sportak 对湘云鲫肝脏 SOD 和 CAT 影响及其机制研究[J]. 农业环境保护, 2002, 21(2): 126- 129.
- [13] Nasci C, Da Ros L, Campesan G, *et al.* Clam trans-plantation and stress- related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments [J]. **Mar Pollut Bull**, 1999, 39: 255- 260.
- [14] 陈荣. 石油烃污染对僧帽牡蛎的氧化胁迫[D]. 厦门大学, 2001.
- [15] Elif O O, Nevin U. Combined effects of 2, 4- D and az- inphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*[J]. **Comp Biochem Physiol**, 2000, 127C: 291- 296.

Acute toxicity of *Tegillarca granosa* by triazophos and SOD, CAT activities shown in the blood serum

ZHOU Chang- yi^{1,2}, YAN Chong- ling¹, HUANG Cheng¹, CHEN Wei- quan¹, CHI Xin- cai³
 (1. School of Biotechnology , Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. School of Life Science, Xiamen University , Xiamen 361005, China; 3. Fishery Bureau of Xiamen, Xiamen City 361005, China)

Received: Jul., 2, 2003

Key words: triazophos; *Tegillarca granosa*; blood serum; SOD; CAT; stress

Abstract: 48 h LC₅₀ of triazophos on *Tegillarca granosa* was 21. 0 mg/ L , 96 h LC₅₀ was 10. 2 mg/ L. The effects of enzyme activity in the blood serum of *Tegillarca granosa* exposed to triazophos at concentrations of 1. 1, 2, 4, 22 mg/ L were studied in experimental conditions. Samples were collected after triazophos stress for 0. 5, 1, 2, 4, 8 d, and 4 d after triazophos was removed. The results showed that proteins in blood were not significantly different and the activities of SOD and CAT changed obviously with different concentrations and in different periods. The activity of SOD did not change significantly at the beginning, then was inhibited in different concentrations. The activity of SOD decreased obviously from 2nd day and 48 h LC₅₀ was 3. 62 mg/ L. The activity of CAT increased significantly at the 1st day and decreased afterwards. The experimental effect groups showed time and dose related effect on SOD and CAT activities responded to the pollutant. The protein, SOD and CAT activities were recovered to some extent, showing that the animal is capable of self- recovering and regulating physiologically.

(本文编辑: 张培新)