

辛硫磷农药对刺巴西甲螨体内酶系活性的影响*

程仕伟¹ 刘林德¹ 付荣恕^{2†}

(1 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

(2 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要 以刺巴西甲螨作为受试生物, 辛硫磷为污染物, 采用两个辛硫磷处理时间(48 h 和 96 h), 测定六种酶(乙酰胆碱酯酶、腺三磷酶、谷胱甘肽硫转移酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶)的活性随辛硫磷浓度变化的趋势。结果显示了刺巴西甲螨体内酶活性与辛硫磷浓度间存在一定的剂量-效应关系, 可为生物指示土壤辛硫磷农药污染提供参考依据。其中乙酰胆碱酯酶和腺三磷酶随辛硫磷浓度增加及处理时间延长表现为抑制效应, 而谷胱甘肽硫转移酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶的活性总体表现为诱导效应。

关键词 刺巴西甲螨; 辛硫磷; 酶活性; 农药污染

中图分类号 X131.3

文献标识码 A

生物标志物是在半致死效应变得明显之前对于化学压力敏感的指标。生物标志物的测定为低于个体水平的环境污染物暴露和效应早期评价提供了有力工具^[1]。近年来利用陆生无脊椎动物作为生物标志物评价化合物对土壤生态系统的负效应得到越来越多的重视^[2-4]。无脊椎动物经常以高的种群密度存在, 具有直接与土壤空隙水或食物暴露相接触的优越性, 其直接与土壤中污染物的生物可利用性分数相关, 能为土壤的实际危害提供更准确估计, 而不仅仅是测量土壤中总污染物的浓度^[5]。

甲螨(Oribatid mites)为栖居于土壤表层的小型节肢动物, 属蜱螨亚纲(Acari), 真螨目(Acariformes)、甲螨亚目(Oribatida), 是土壤动物中的主要类群(占土壤螨类的50%)^[6], 土壤环境的变化, 将会影响其生理生化指标, 进而影响其种群结构和数量。因此, 近年来甲螨作为环境检测的生物指标倍受重视, 尤其是有机污染物对其种群数量的影响研究方面已有众多文献^[7-9]。但是在环境污染物对其生理生化指标影响方面少见报道, 目前利用土壤无脊椎动物生理生化指标作为土壤污染的生物标志物多采用体型较大动物, 如蜗牛^[10]、蚯蚓等^[11]。酶活性变化指标可从生化水平表征毒物的毒性, 阐明致毒机理, 还可用来测定毒物在亚致死水平的效应, 并具有快速、准确的特点^[12]。本文以刺巴西甲螨为受试生物, 研究辛硫磷农药对其体内六种酶活性的影响, 为生物酶指标检测土壤农药污染提供理论参考依据。

*鲁东大学科研基金项目(LY20083305, 203-07000108)资助

† 通讯作者, E-mail: fursh@126.com

作者简介: 程仕伟(1976-), 男, 山东潍坊人, 博士, 讲师, 主要从事酶技术研究。E-mail: bioswch@yeah.net

收稿日期: 2010-07-08; 收到修改稿日期: 2011-02-20

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

40% 辛硫磷 山东临沂农药厂；谷胱甘肽硫转移酶 (GSTs)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒, 购自南京建成生物工程公司；其余试剂均为分析纯。

Tullgren 分离器, 自制；体视显微镜, 日本 OLYMPUS；恒温培养箱 (WMK—08), 山东潍坊医疗器械厂；紫外可见分光光度计 (DU640), BECKMAN 公司；高速冷冻离心机 (5417R), eppendorf 公司；玻璃匀浆器, 申江玻璃仪器。

1.2 辛硫磷处理刺巴西甲螨

将石膏粉、活性炭、水按 8 : 1 : 6 (质量比) 比例进行混合, 在石膏粉凝固前迅速倒入 1.5 ml 离心管中, 界面占管高度的 1/3 为宜, 风干后待用。

济南植物园竹林内采集土样, 用 Tullgren 干漏斗法烘烤收集刺巴西甲螨, 用解剖针挑取活动能力强、大小一致的 12 只刺巴西甲螨入培养界面上。

在培养界面上用胶头滴管滴入少量的水, 以保持界面的湿润, 并按蘑菇粉 : 猪肝粉 : 啤酒酵母 = 3 : 1 : 1 (质量比) 加入少许食物。确定刺巴西甲螨 96 h 的 LC_{50} 值 ($LC_{50} = 3.04 \text{ mg L}^{-1}$)^[13], 按等自然对数间距配制在 $1/2 LC_{50}$ 浓度下的辛硫磷农药试液, 分别为 0.088、0.125、0.264、0.46、0.84、1.48 mg L^{-1} 。每个浓度取 5 μl 加入供试昆虫组中, 立即盖好管盖, 对照用水代替。

培养箱 (温度 28 $^{\circ}\text{C}$) 中培养。48 h 和 96 h 后用显微镜观察刺巴西甲螨的存活情况。挑走死亡的个体, 剩余的用于测定酶活力, 每个实验指标重复 3 次。

1.3 酶活性测定

每浓度组取 10 只甲螨入匀浆器中, 加入 pH 7.2 缓冲液 1 ml, 冰浴匀浆 2 min 后冷冻离心 10 min (10 000 r min^{-1} , 4 $^{\circ}\text{C}$), 收集上清液用于酶活性测定。

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定参照陈长琨^[14]的实验方法, 催化乙酰胆碱水解成为胆碱和乙酸, 在 pH 7.2、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以每小时每毫克蛋白水解 1 μmol 乙酰胆碱为一个酶活力单位。

腺三磷酶 (ATPase) 可催化 ATP 水解生成 ADP 及无机磷。酶活力以在 pH 7.2、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 每小时每毫克蛋白水解 ATP 释放出的无机磷微摩尔数表示^[15]。

过氧化氢酶 (CAT) 的活性测定采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 滴定法, 酶活力单位定义为在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.8 条件下每小时每毫克蛋白酶促分解 H_2O_2 的微摩尔分子数表示。

谷胱甘肽硫转移酶 (GST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用南京建成生物工程公司的试剂盒测定。

1.4 数据分析

SPSS 软件分析数据, 不同时间而同浓度组酶活性用 independent-Samples T Test 分析; One-Way ANOVA 分析同一时间而不同浓度组间数据; 对同一时间对照组与处理组间比较用 LAD 过程分析;

U-N-K 法对相邻各组数据比较；回归方法分析剂量—效应关系。

2 结果与讨论

2.1 辛硫磷对乙酰胆碱酯酶活性的影响

乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 是神经突触部位清除乙酰胆碱, 维护神经正常传导的重要酶类, 其活性变化是衡量昆虫神经生理活性的主要指标之一^[14]。由图 1 可见, 随着辛硫磷浓度增加和处理时间延长, 刺巴西甲螨的 AChE 活性呈明显的递减变化, 表现为抑制效应, 两者呈近似的指数相关。AChE 活性与辛硫磷浓度之间存在剂量—效应关系, 样本在不同浓度下的酶活性差异显著 ($p < 0.01$), 48 h 和 96 h 均表现为负相关。在研究中还发现: 尽管处理过程中刺巴西甲螨的 AChE 活性已经被明显抑制, 但并未观察到刺巴西甲螨个体的死亡现象。

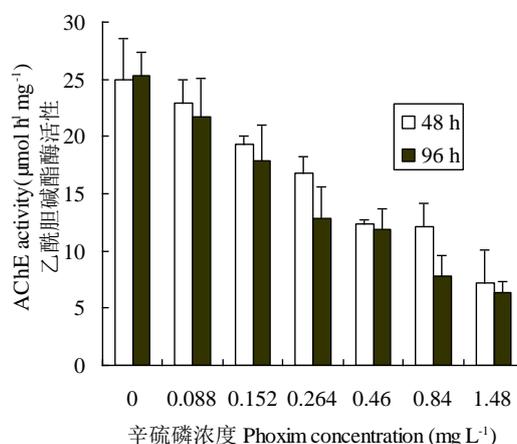


图 1 辛硫磷对 AChE 活性的影响

Fig.1 Effect of phoxim on activity of AChE

2.2 辛硫磷对腺三磷酶活性的影响

腺三磷酶 (Adenosinetriphosphatase, ATPase) 是神经突触体的标记酶, 广泛分布于细胞膜及内质网等膜成分之中, 是生物体内普遍存在的一种酶系, ATPase 对多种毒物敏感, 已成为毒理学领域中研究毒物毒性效应以及致毒机理的一种理想指标^[15]。辛硫磷对刺巴西甲螨的 ATPase 活性总体表现为抑制效应。48 h 时低剂量组 ATPase 的抑制幅度不大, 随浓度加大, 抑制效应明显; 96 h 时开始抑制幅度较大, 后抑制效应表现较缓慢 (图 2)。就 48 h 和 96 h 的效应比较, 96 h 的抑制效应明显高于 48 h 的同剂量组。在高浓度和长时间处理时抑制作用变化较缓慢, 说明辛硫磷对刺巴西甲螨 ATPase 活性的抑制效应存在一定的阈值, 当超过该值时刺巴西甲螨应表现为死亡。

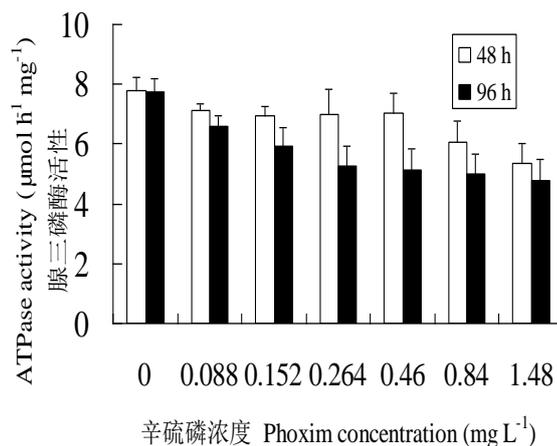


图2 辛硫磷对 ATPase 活性的影响

Fig.2 Effect of phoxim on activity of ATPase

2.3 辛硫磷对谷胱甘肽硫转移酶活性的影响

生物体解毒系统一个重要的特征是参与许多关键性解毒反应的酶可通过暴露被诱导，而许多污染物都是诱导物。谷胱甘肽硫转移酶（Glutathione-S-transferase, GSTs）是昆虫体内解毒系统 I 阶段的重要酶类，特别是在有机磷杀虫剂的代谢中起重要作用^[12]。由图 3 看出，48 h 和 96 h 时浓度组的 GSTs 活性均高于对照组，辛硫磷对刺巴西甲螨的 GSTs 活性有诱导作用，诱导作用均显著，这与 GSTs 的解毒机理是一致的。各浓度组之间 GSTs 活性虽有差异，但变化不明显。在低剂量的辛硫磷刺激时刺巴西甲螨的 GSTs 活性诱导作用明显，其解毒功能与对照相比大大加强，以便清除体内辛硫磷带来的危害。当辛硫磷的浓度继续升高时，GSTs 的诱导作用和低剂量组比较差别不大，说明刺巴西甲螨体内 GSTs 活性升高有一极限值，当到达该值时就不再升高。

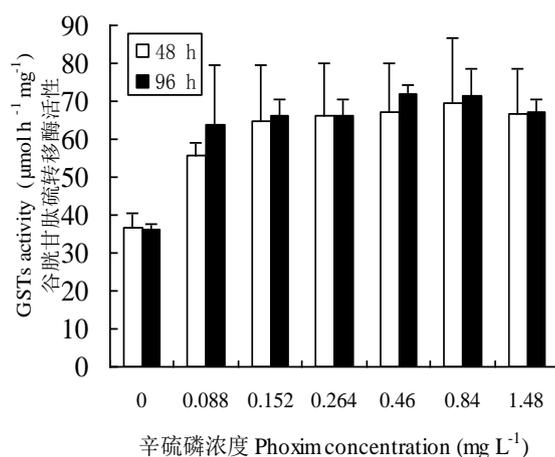


图3 辛硫磷对 GSTs 活性的影响

Fig.3 Effect of phoxim on activity of GSTs

2.4 辛硫磷对过氧化氢酶活性的影响

过氧化氢酶(Catalase, CAT)是所有需氧生物在长期进化过程中形成的过氧化防御系统的重要成份,其活性可作为毒物的敏感指示者,从分子水平上去揭示逆环境因子对生物带来的伤害^[16]。CAT在污染条件下出现的不同反应可能与氧化胁迫的阈值有关。当胁迫程度低于这个阈值时,酶活性升高,机体消除活性氧的能力增强;当胁迫严重,超过该阈值时,酶活性就可能因为中毒而受到抑制。由图4看出48 h时随着辛硫磷浓度增加刺巴西甲螨的CAT活性先升高后降低,后又逐渐升高,但高浓度组时又表现为酶活性降低,且CAT活性均高于对照,在辛硫磷浓度为0.84 mg L⁻¹时CAT活性最大,为对照组的1.76倍。96 h时的变化趋势表现为先升高后逐渐降低,且CAT活性均高于对照。刺巴西甲螨的CAT活性与辛硫磷的暴露存在一定的剂量-效应关系,对指示土壤辛硫磷农药污染有一定的参考价值。

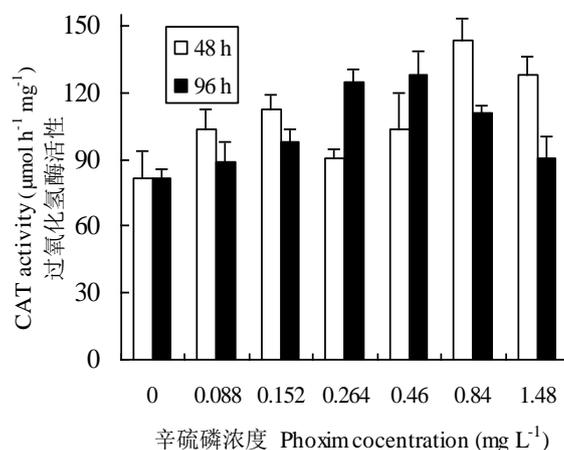


图4 辛硫磷对CAT活性的影响

Fig.4 Effect of phoxim on activity of CAT

2.5 辛硫磷对谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 是生物体内重要的抗氧化酶,在生物体内有效地消除氧自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)和脂质过氧化物^[17]。由图5看出,短时间(48 h)内整体表现为刺巴西甲螨的GPx活性先升高后降低,酶活性与辛硫磷浓度密切相关;长时间(96 h)时,GPx活性对辛硫磷暴露的变化趋势为先升高后逐渐降低,在高浓度时酶活性又缓慢升高,存在一定的规律性。就整体来看,其GPx活性变化表现为被诱导,且96 h时GPx活性低于48 h的GPx活性。GPx活性的上升可以看作生物体对污染物中毒的一种应答反应,GPx与其他抗氧化酶类协同调节,以保持生物体内自由基的平衡,保护细胞免受污染物的损伤。

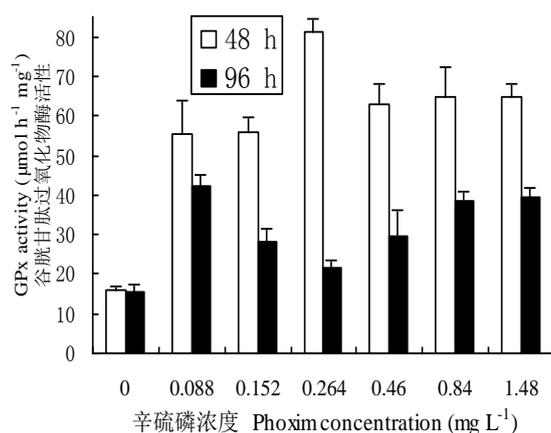


图5 辛硫磷对 GPx 活性的影响

Fig.5 Effect of phoxim on activity of GPx

2.6 辛硫磷对超氧化物歧化酶活性的影响

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是广泛存在于生物体内的抗氧化防御性功能酶, 其活性成分或含量可由于污染的胁迫而发生改变, 因而可间接反映环境中氧化污染的存在, 可作为环境污染胁迫的指标^[16]。辛硫磷对刺巴西甲螨 SOD 活性的暴露效应见图 6。短时间内 (48 h) 先被诱导后诱导减弱以致出现抑制效应, 但抑制效果不明显; 长时间 (96 h) 先诱导后活性降低, 在高浓度诱导作用再次加强, 但均表现为诱导作用。因此刺巴西甲螨的 SOD 活性与辛硫磷的暴露存在一定的剂量-效应关系。

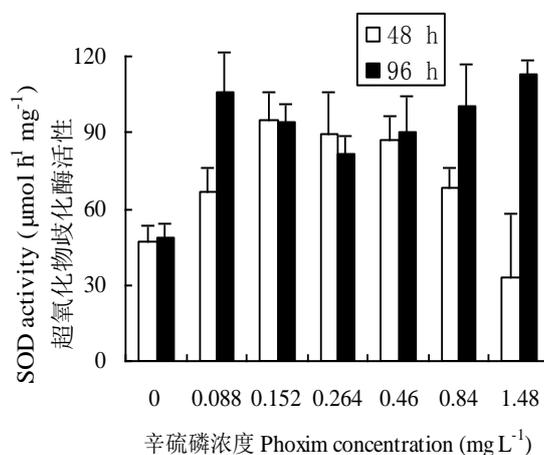


图6 辛硫磷对 SOD 活性的影响

Fig.6 Effect of phoxim on activity of SOD

3 结 论

作为早期预警系统或污染危害准确测量的有效工具, 生物标志物在生态毒理风险评价中得到广泛的应用。在刺巴西甲螨急性半致死浓度下, 采用两个辛硫磷处理时间段 (48 h 和 96 h), 通过测

定其体内六种酶 (AChE、ATPase、GSTs、GPx、CAT、SOD) 活性随辛硫磷浓度和处理时间的变化, 探讨酶指标作为土壤农药污染的可行性。结果显示刺巴西甲螨体内酶系对辛硫磷农药污染有良好的指示效应, 存在一定的剂量和效应关系。其中 AChE、ATPase 随辛硫磷浓度增加表现为抑制效应, 而 GSTs 活性表现为诱导效应, 抗氧化酶防御系统 (GPx、SOD、CAT) 随辛硫磷浓度变化总体表现为诱导效应, 在一定的条件下可为检测土壤辛硫磷农药污染提供参考依据。本文在实验室模拟土壤辛硫磷农药污染对刺巴西甲螨体内酶活性影响, 实际土壤环境中多种农药污染可能同时存在, 因此研究辛硫磷与其他农药对刺巴西甲螨体内酶活性的复合影响更具有实际意义, 相关研究正在深入进行。

参 考 文 献

- [1] Walker C H. The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1998, 40(1/2): 65-70
- [2] 唐玉姝, 魏朝富, 颜廷梅, 等. 土壤质量生物学指标研究进展. *土壤*, 2007, 39(2): 157-163. Tang Y S, Wei C F, Yan T M, et al. Biological indicator of soil quality: A review (In Chinese). *Soils*, 2007, 39(2): 157-163
- [3] 李志博, 骆永明, 宋静, 等. 土壤环境质量指导值与标准研究: 污染土壤的健康风险评估. *土壤学报*, 2006, 43(1): 142-151. Li Z B, Luo Y M, Song J, et al. Study on soil environmental quality guidelines and standards: Health risk assessment of polluted soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(1): 142-151
- [4] 章海波, 骆永明, 李志博, 等. 土壤环境质量指导值与标准研究: 污染土壤的生态风险评估. *土壤学报*, 2007, 44(2): 338-349. Zhang H B, Luo Y M, Li Z B, et al. Study on soil environmental quality guidelines and standards: Ecological risk assessment of polluted soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(2): 338-349
- [5] 钱芸, 刘广良, 戴树桂. 土壤生态毒理风险评价中的陆生无脊椎生物标志物. *土壤与环境*, 2002, 11(1): 70-74. Qian Y, Liu G L, Dai S G. Terrestrial invertebrate biomarkers used for soil ecotoxicological risk assessment (In Chinese). *Soil and Environmental Sciences*, 2002, 11(1): 70-74
- [6] Seastedt T R. The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annual Review Entomology*, 1984, 29: 25-46
- [7] Seniczak S, Klimek A, Gackowski G, et al. Effect of copper smelting air pollution on the mites (Acari) associated with young Scots pine forests polluted by a copper smelting works at Głogów, Poland. II. Soil mites. *Water Air Soil Pollution*, 1997, 97: 287-302
- [8] Seniczak S, Dabrowski J, Klimek A. Effect of alkaline deposition on the mites (Acari) associated with young Scots pine forests in Poland. *Water Air Soil Pollution*, 1999, 109: 407-428
- [9] Fujitai M, Fujiyama S. Comparison of soil fauna (Oribatids and Enchytraeids) between conventional and organic (tillage and no-tillage practices) farming crop fields in Japan. *Pedosphere*, 2001, 11(1): 11-20
- [10] Berger B, Dallinger R. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring Assessment*, 1993, 25: 65-84
- [11] 高岩, 骆永明. 蚯蚓对土壤污染的指示作用及其强化修复的潜力. *土壤学报*, 2005, 42(1): 140-147. Gao Y, Luo Y M. Earthworms as bioindicators of soil pollution and their potential for remediation of contaminated soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(1): 140-147
- [12] 孔繁翔. 环境生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000: 69-137. Kong F X. *Environmental biology* (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2003: 69-137

- [13] 程仕伟, 傅荣恕, 张蓬军. 辛硫磷毒性及对刺巴西甲螨数量动态的影响. 山东师范大学学报:自然科学版, 2004, 19(2): 92-95. Cheng S W, Fu R S, Zhang P J. Toxicity of phoxim and their effects on dynamic magnitude of *Brasilobates spinosus* Fujita (In Chinese). Journal of Shandong Normal University: Natural Science Edition, 2004, 19(2): 92-95
- [14] 陈长琨. 昆虫生理生化实验. 北京: 农业出版社, 1993: 124-127. Chen C K. Insect physiological and biochemical experiment (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1993: 124-127
- [15] 蒋志胜, 尚稚珍, 王晓博, 等. 美洲大蠊Na⁺-K⁺-ATPase作为筛选靶标的初步研究. 农药学报, 2000, 12(4): 28-32. Jiang Z S, Shang Z Z, Wang X B, et al. Preliminary study on the application of Na⁺-K⁺-ATPase in adult periplaneta americana as a screening target (In Chinese). Chinese Journal of Pesticide Science, 2000, 12(4): 28-32
- [16] 熊昀青, 由文辉. 苏州河底泥对铜锈环棱螺(*Bellamyia aeruginosa*)SOD 和 Cat 的影响. 华东师范大学学报:自然科学版, 2002, 4: 96-101. Xiong Y Q, You W H. Preliminary study on effects of SOD and Catalase of *Bellamyia aeruginosa* raised in Suzhou creek (In Chinese). Journal of East China Normal University: Natural Science Edition, 2002, 4: 96-101
- [17] 吕顺霖, 闵思佳, 丁春阳. 氟中毒家蚕幼虫血淋巴中谷胱甘肽过氧化物酶的活性. 蚕业科学, 2002, 28(1): 61-63. Lü S L, Min S J, Ding C Y. Studies on the activity of GSH- Px in the hemolymph of fluoride poisoning silkworm larvae (In Chinese). Sericulture, 2002, 28(1): 61-63

EFFECT OF PHOXIM ON ENZYME ACTIVITY IN *Brasilobates spinosus* Fujita

Cheng Shiwei¹ Liu Linde¹ Fu Rongshu^{2†}

(1 College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

(2 College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract *Brasilobates spinosus* Fujita collected from pollution-free soil by Tullgern method was used as subject in an experiment to explore effect of phoxim on activities of enzymes (acetylcholinesterase, adenosinetriphosphatase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase) in *B. spinosus* Fujita, 48 h and 96 h after treatment with phoxim. Results indicate that the activities of acetylcholinesterase and adenosinetriphosphatase declined obviously with increasing phoxim concentration and elapsing time, while the activities of the other four enzymes showed a reverse trend. A certain dose-effect relationship was found to be in existence between activities of the enzymes and concentration of phoxim, and the findings may serve as reference or basis for use of bio-indicator of phoxim pollution of soils.

Key words *Brasilobates spinosus* Fujita; Phoxim; Enzyme activity; Pesticide pollution