

新型杀虫剂对蚯蚓的毒理学研究*

钟 远 臧 宇 罗 屿 孔志明 沈进萍

(污染控制与资源化研究国家重点实验室,南京大学环境科学与工程系,南京 $y\alpha\alpha\alpha Z\alpha$)

摘 要 研究了吡虫啉与抑食肼对蚯蚓的急性毒性、生化毒性及对精子形态的影响。急性毒性结果表明,上述两种杀虫剂在不同暴露系统中,显现不同的毒性效应。吡虫啉在浓度低于 $\alpha\omega\gamma\upsilon\upsilon\partial$ 、抑食肼低于 $yB\upsilon\upsilon\partial$ 浓度范围内对蚯蚓纤维素酶活力有抑制作用。低浓度吡虫啉对蚯蚓超氧化物歧化酶活力有抑制作用,高浓度吡虫啉和抑食肼则有促进作用。两种杀虫剂对蚯蚓精子形态均有不同程度影响。

关键词 吡虫啉 抑食肼 蚯蚓 急性毒性 生化毒性 精子畸变试验

蚯蚓是维持土壤肥力的重要生物^s 它是陆生生物与土壤生物之间传递污染物的桥梁^s 是农田生态系统中土壤物质生物小循环中的重要一环^{lax}。因此,研究农药对蚯蚓的毒性作用,是评价农药对生态环境安全性的一个重要指标。新型杀虫剂吡虫啉和抑食肼将陆续进入市场^s 虽然根据农药登记规定已对其进行了某些毒性试验,但它们进入土壤后对蚯蚓的毒理学效应尚未见报道。蚯蚓体内纤维素酶对促进土壤物质的转化和循环,改良土壤肥力起着重要的作用。超氧化物歧化酶($s\phi P$) 是生物体内重要的氧自由基消除剂,精子的畸形能直接影响物种的种群数目。为了全面评价上述两种杀虫剂的毒性,从而为合理施用提供科学的实验依据,本文就其对蚯蚓的急性毒性、纤维素酶、抗氧化剂防御系统以及精子形态的影响进行了研究。

x 实验材料

xux 受试物

吡虫啉,化学名称 $x-(\Gamma-氯-z-吡啶基甲基)-\vartheta-硝基亚咪唑烷-y-基胺$ 。纯度 $Ez\%$ 。抑食肼,化学名称 $yn-苯甲酸-xm-特丁基苯甲酰肼$ 。纯度 $ZB\%$ (均由江苏省农药研究所提供)。

xuy 实验生物

赤子爱胜蚓($\Sigma\chi\sigma^2\chi T\theta\sigma\chi\theta\xi p$, 选择 z 月龄以上,体重约 $zBv\upsilon$ 左右的健康蚯蚓作受试生物。

y 试验方法

yux 蚯蚓的急性毒性试验

$yux\alpha E\varphi$ 溶液法

采用 $\theta\sigma\tau\theta\chi\rho$ 的方法^{lax},将清肠后蚯蚓冲洗干净,在滤纸上吸干水分。将蚯蚓放于加入 $x\partial$ 受试物的玻璃管($\phi z\pi_1 \times E\pi_1$) 中,进行染毒。另设对照。每组 Γ 个平行,于 $\theta\gamma\omega\pm x\rho\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养,于 $yA\varphi$ 、 $AE\varphi$ 各计数一次死亡数,死亡以对机械刺激无反应为标准。结果输入计算机^s 用 $\alpha s\Omega$ 程序进行处理,计算 $\partial\Pi_{B\omega}$ 。

$yuxy AE\varphi$ 滤纸法

参照国家环保局《化学品测试准则》^{lax} 和张壬午报道的方法^{lax}。在平底玻璃管($\phi z\pi_1 \times E\pi_1$) 内壁衬铺一层滤纸,受试物溶于丙酮,根据预试结果配成梯度溶液。吸取 $x\partial$ 受试物溶液加入玻璃管,对照为丙酮。滤

* 国家自然科学基金资助项目^{\theta} 编号为 $zZ\Gamma\alpha\alpha B\alpha\rho$

收稿日期 $HxZZE-\alpha Z-\alpha Z$

修改稿收稿日期 $HZZE-x\omega-y\gamma$

纸干后加x 1 0 蒸馏水以润湿滤纸。清肠后蚯蚓冲洗干净,吸干水分后放入瓶中,以下步骤同溶液法。

y u w u e x A ρ 人工土壤法

采用标准化人工土壤法^{0Bc}。按预试确定的剂量梯度将杀虫剂掺入人工土壤,装入x 0 广口瓶中。每瓶x w 条蚯蚓,置于v y w ± x p °C 的培养箱内。定期补充水分,保持湿度E w % 左右,并提供光照。于第z , Δ, x A ρ 各计数一次s 以针刺无反应为死亡标准。结果输入计算机s 计算∂ Π B w。

y u w 对蚯蚓体内酶的影响

采用溶液法进行染毒,吡虫啉和抑食肼均设z 个剂量组和对照组。为观察不同时间酶的变化,设不同暴露时相的实验组和对照组,每组Γ 条蚯蚓。

酶的提取参照ε χ φ⁸ ξ^{0Tκ} 的方法,并稍加改进。将蚯蚓冲洗干净,吸干水分,放入y u B 1 0 匀浆器中,加入冰冷的蒸馏水匀浆,再将匀浆液移入B 1 0 离心管,用冰冷蒸馏水稀释至z u B 1 0 y B a w⁶ v 1 χ² 离心x w 1 χ²。吸出上清液,移入另一离心管z w a a w⁶ v 1 χ² 离心B 1 χ²。取上清液备用。

y u w u 纤维素酶活力的测定

采用羧甲基纤维素法^{0Δc}。试管中加入x u w 1 0 已预热的Π ε Π - ∂ ξ 溶液和w u B 1 0 酶提取液, B w °C 水浴中糖化z w 1 χ²。反应完毕再加入w u B 1 0 P ∂ s 显色液,在沸水中加热x w 1 χ²,取出后流水冷却,每管加E u w 1 0 蒸馏水,摇匀后测定E B w。

y u w u y 超氧化物歧化酶活力的测定

采用硝基四氮唑蓝还原法^{0Bc}。试管中先加入z u B 1 0 磷酸缓冲液, w u B 1 0 Σ P α E, 酶提取液 w u a 1 0 o 对照用 w u a 1 0 蒸馏水 p, ε s w u B 1 0, 然后于黑暗中加入 w u y 1 0 核黄素和 w u y 1 0 ∂ ∂ O α, 总反应体积 B 1 0。在 y × A w δ 的日光灯下 x w π 1 y B °C 照 y w 1 χ², 立即测定 B Γ w² 处的吸光值。空白用煮沸 y w 1 χ² 的失活酶液代替。酶的活力采用抑制

∂ ∂ O α 光化还原 B w % 为一个活力单位表示。

y u e 蚯蚓精子畸变试验

采用人工土壤法进行染毒。根据 ∂ Π B w 设定不同剂量组,并设吐温-E w 阴性对照和环磷酰胺阳性对照,每组Γ 条蚯蚓。染毒 x w ρ 后将蚯蚓取出,用乙醇溶液 o Z B % 乙醇:蒸馏水 K x : Γ p 麻醉 B 1 χ²。将其固定于石蜡板上,背面向上。用眼科剪沿蚯蚓背中中线剪开,并向两侧分开,用大头针固定。在第 Z ~ x y 节处可见左右侧各有两对乳白色半透明的贮精囊。用 w u Δ B % 的无脊椎动物生理盐水冲洗剪开部位,洗去污物,并湿润内脏器官,以便分离贮精囊。在解剖镜下,用眼科镊取出贮精囊,放在滴加了生理盐水的载玻片上,用解剖针刺破贮精囊,用推片法制成涂片。甲醇固定, Γ χ¹ : τ ξ 染色。于 A x a w 倍光镜下观察精子形态。每条蚯蚓观察 x w a a w 个完整的精子,并求出精子畸变率。

z 结果与讨论

z u w 蚯蚓的急性毒性

两种农药对蚯蚓的急性毒性试验结果见表 x。

表 x 吡虫啉和抑食肼对蚯蚓的急性毒性

试验方法	吡虫啉		抑食肼	
	y A φ	A E φ	y A φ	A E φ
溶液法	∂ Π B w, o 1 v / ∂ p	x i y z	w u Δ Δ	A Δ B u a w A y z u E
滤纸法	∂ Π B w, o μ v / π 1 y p	w u a w	w u a A	Δ A E v
土壤法	∂ Π B w	Δ ρ	x A ρ	Δ ρ
	o 1 v / ω w 干土 p	z u E	y u e w	Δ z w u Γ A T Γ u B y

在滤纸法中s 由于抑食肼难溶于水和有机溶剂,在滤纸上的沉积量有限,所以未能得出确切的半数致死剂量 Δ E w μ v π 1 y 是抑食肼的滤纸最大沉积量,在该剂量下仍无死亡产生,因此可得出其 ∂ Π B w, Δ A E w μ v π 1 y 的结论。

比较两种毒物的急性毒性,吡虫啉显然较大。这主要由于吡虫啉与抑食肼的物理、

化学性质不一样,但土壤法($x A \rho \partial \Pi_{Bv}$ 相差 $y \alpha v$ 倍)与溶液法的结果($\partial \Pi_{Bv}$ 相差 $B B v$ 倍)相比,两者毒性的差距缩小了 x 倍多,这说明抑食胼经消化道比经皮肤摄入量,也更容易被吸收。实验表明,这两种农药在土壤中积累到一定的浓度,就会对蚯蚓产生毒害作用,引起种群数量下降,从而使土壤生态系统受到影响。

$z \omega y$ 两种农药对蚯蚓体内酶活力的影响

两种农药对蚯蚓体内纤维素酶和超氧化物歧化酶活力的影响见表 y 、表 z 、表 A 和表 B 。

结果表明,吡虫啉对蚯蚓纤维素酶活力有抑制作用。对照组蚯蚓体内的纤维素酶活力是 $o \omega \alpha B y \pm \omega \alpha B \rho \nu$ 葡萄糖 $v o \nu$ 蛋白 $\cdot \varphi \rho$, 随着吡虫啉剂量的增加,纤维素酶在蚯蚓体内的活力水平逐渐降低,在暴露浓度为 $\omega \alpha \nu \nu \partial$ 时酶活力已经有极显著性下降 ($\phi I \omega \alpha x$)。从纤维素酶活力变化与暴露时间的关系来看(表 z),这种抑制作用表现得更为明显 H 在暴露浓度为 $\omega y \nu \nu \partial$ 时,酶的活力随着暴露时间的加长而降低,在 $z \varphi$ 后

开始出现显著性差异 ($\phi I \omega \alpha B$)。然而,当吡虫啉的浓度增加到 $\omega B \nu \nu \partial$ 时,纤维素酶的比活力反而有所回升。这可能是由于高浓度吡虫啉对蚯蚓产生了致死效应,致使蚯蚓自溶产生葡萄糖引起的。

抑食胼对蚯蚓体内纤维素酶活力的影响与吡虫啉的影响相似,都是抑制作用。虽然也观察到了纤维素酶活力随抑食胼浓度和暴露时间的增加而降低的趋势,但统计学上没有显著差异。

由表 A 可见,低浓度吡虫啉对蚯蚓超氧化物歧化酶活力有抑制作用。对照组蚯蚓体内 $s \phi P$ 比活力是 $\omega \alpha B E B \beta v \nu$ 蛋白,而在 $\omega \alpha \nu \nu \partial$ 的吡虫啉仅 $A \varphi$ 酶活力就有极显著性下降 ($\phi I \omega \alpha x$),为 $\omega \alpha Z A \beta v \nu$ 蛋白。取 $\partial \Pi_{Bv}$ 的大约 $x v B$ 浓度 $\omega y \nu \nu \partial$ 来观察暴露时间对 $s \phi P$ 比活力的影响,发现在前 $z \varphi$ 内吡虫啉对 $s \phi P$ 都有抑制作用。但 $z \varphi$ 以后 s 或吡虫啉浓度超过 $\omega y \nu \nu \partial$ 时,超氧化物歧化酶的比活力反而有所回升。

表 A 吡虫啉和抑食胼浓度对蚯蚓体内超氧化物歧化酶比活力的影响
 o 暴露时间 $H A \varphi$, 酶比活力单位 $I \beta v \nu$ 蛋白 ρ

吡虫啉		抑食胼	
浓度 $o \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$	浓度 $o \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$
w	$\omega \alpha B E B \pm \omega \alpha A E A$	w	$\omega \alpha B \Delta y \pm \omega \alpha A E v$
$\omega \alpha$	$\omega \alpha Z A \pm \omega \alpha x \Gamma$	B	$\omega \alpha E y \nu \pm \omega \alpha x Z x$
ωy	$\omega \alpha B E E \pm \omega \alpha A E$	$y B$	$\omega \alpha x z \pm \omega \alpha x Z \Delta$
ωB	$\omega \alpha \Gamma A \pm \omega \alpha A E \Delta$	$B v$	$\omega \alpha Z \Delta Z \pm \omega \alpha A Z x$

表 y 吡虫啉和抑食胼浓度对蚯蚓体内纤维素酶比活力的影响 o 暴露时间 $H A \varphi s$
酶比活力单位 $H v$ 葡萄糖 $o \nu \nu$ 蛋白 $\cdot \varphi \rho \rho$

吡虫啉		抑食胼	
浓度 $o \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$	浓度 $o \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$
w	$\omega \alpha B y \pm \omega \alpha B E$	w	$\omega \alpha B Z \pm \omega \alpha E Z$
$\omega \alpha$	$\omega y B E \pm \omega \alpha x \Delta$	B	$\omega y Z B \pm \omega \alpha y \Gamma$
ωy	$\omega y z z \pm \omega \alpha y B$	$y B$	$\omega y \Delta x \pm \omega \alpha d Z$
ωB	$\omega y \Gamma B \pm \omega \alpha x x$	$B v$	$\omega \alpha \Gamma z \pm \omega \alpha d y$

表 z 吡虫啉和抑食胼暴露时间对蚯蚓体内纤维素酶比活力的影响
酶比活力单位 $H v$ 葡萄糖 $o \nu \nu$ 蛋白 $\cdot \varphi \rho$

吡虫啉		抑食胼	
o 暴露浓度 $H \omega y \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$	o 暴露浓度 $H B \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$
时间	$z \pm$	时间	$z \pm$
$w \varphi$	$\omega \alpha B y \pm \omega \alpha B E$	$w \varphi$	$\omega \alpha B Z \pm \omega \alpha E Z$
$x \varphi$	$\omega \alpha y B \pm \omega \alpha B \Delta$	$x \varphi$	$\omega \alpha z Z \pm \omega \alpha d \Gamma A$
$y \varphi$	$\omega y Z E \pm \omega \alpha A B$	$y \varphi$	$\omega \alpha y v \pm \omega \alpha d Z$
$z \varphi$	$\omega y B B \pm \omega \alpha B x$	$z \varphi$	$\omega y E A \pm \omega \alpha B Z$
$A \varphi$	$\omega y z z \pm \omega \alpha y B$	$A \varphi$	$\omega y \Delta x \pm \omega \alpha d x$

表 B 吡虫啉和抑食胼暴露时间对蚯蚓体内超氧化物歧化酶比活力的影响
 o 酶比活力单位 $I \beta v \nu$ 蛋白 ρ

吡虫啉		抑食胼	
o 暴露浓度 $H \omega y \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$	o 暴露浓度 $H B \nu \nu \partial \rho$	$z \pm$
时间	$z \pm$	时间	$z \pm$
$w \varphi$	$\omega \alpha B E B \pm \omega \alpha A E A$	$w \varphi$	$\omega \alpha B \Delta y \pm \omega \alpha A E v$
$x \varphi$	$\omega \alpha B v B \pm \omega \alpha A \Delta B$	$x \varphi$	$\omega \alpha d Z z \pm \omega \alpha x \Delta z$
$y \varphi$	$\omega \alpha \Gamma z \pm \omega \alpha A \Gamma A$	$y \varphi$	$\omega \alpha d \Gamma \Delta \pm \omega \alpha Z \Gamma$
$z \varphi$	$\omega \alpha A v \omega \pm \omega \alpha A \Delta y$	$z \varphi$	$\omega \alpha E x y \pm \omega \alpha x A x$
$A \varphi$	$\omega \alpha B E E \pm \omega \alpha A E$	$A \varphi$	$\omega \alpha x z z \pm \omega \alpha x Z \Delta$

