

2种有机磷农药联合胁迫下日本青鳉的逐级行为响应

刘勇^{1,2}, 付荣恕¹, 任宗明^{2*}

(1. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003)

摘要:采用水质安全在线生物预警系统(BEWs)记录行为强度数据,探讨了2种有机磷农药敌百虫和对硫磷联合胁迫下,不同暴露浓度、不同暴露时间日本青鳉的行为响应。在不同浓度比例的农药暴露中,20、10、5、1和0.1TU的暴露浓度下行为反应时间分别为:1.4、4.8、6.4、32.2和43.0h,并且每个浓度不同配比之间行为反应时间差异不明显。结果表明,在2种有机磷农药的暴露下,日本青鳉的逐级行为响应既受化合物浓度高低的影响,又受暴露时间的影响,但每个浓度的不同配比之间的行为响应时间差异不明显,而且每个浓度2种药物不同配比暴露下的青鳉鱼的逐级行为响应基本一致,即2种作用机制相似的有机磷农药对日本青鳉的行为毒性是简单的相加作用。

关键词:农药;联合作用;日本青鳉;逐级行为响应

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)05-4328-05

Stepwise Behavioral Responses of the Japanese Medaka Under the Joint Stress of Two Organophosphorus Pesticides

LIU Yong^{1,2}, FU Rong-shu¹, REN Zong-ming²

(1. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: In this study, stepwise behavioral responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) under the joint stress of two organophosphorus pesticides (Trichlorfon and Parathion) were discussed. BEWs was used to record the data of behavior strength, to analyze behavioral response of Japanese medaka. The differences of the behavioral responses time in 20, 10, 5, 1 and 0.1 TU were: 1.4, 4.8, 6.4, 32.2 and 43.0 h separately, which were significant. And evident difference of the behavioral responses time was not detected in different proportions of the pesticides. The results suggested that the stepwise behavioral responses of Japanese medaka were affected by both chemical concentration and exposure time. But the stepwise behavioral responses in different proportions of two organophosphorus pesticides were almost the same as each other, and the evident difference of the behavioral responses time was not detected. It proved that the toxicity effects of the joint stress of two organophosphorus pesticides on the stepwise behavioral responses of Japanese medaka were simple additivity.

Key words: pesticide; joint toxicity; Japanese medaka (*Oryzias latipes*); stepwise behavioral responses

有机磷农药作为杀虫剂开发应用已历经了半个多世纪,它的普遍应用却导致众多河流湖泊及其他水体不同程度的污染,严重威胁环境安全和人类身体健康^[1]。

在一定环境胁迫下,生物行为反应是生物对外界环境和内部生理变化适应的外在体现,所以当外界环境变化时,生物体对环境的适应性最先表现出行为改变,并通过行为调节机制保持体内环境相对稳定。如果水生生物行为的非正常变化能被观察到,可以推断外界环境内某一种或一些因子的变化超出了适应水生生物生存的正常值,并由此推断水质变化的程度^[2]。但是通常情况下,水体不仅仅受到某一种化合物的污染,而是几种化合物联合作用的结果,因此生物不可避免地同时或先后暴露于多种化合物,产生不同于单一种类化合物毒性的联合作用。

日本青鳉(*Oryzias latipes*)隶属鳉科,个体小,全

长2.5~5.0cm,可以耐受低溶氧和较宽的水温和盐度范围。由于其生物学背景研究非常充分,自从Denny^[3]对青鳉饲养管理与实验操作进行了规范化后,青鳉作为实验动物被多数世界组织认可^[4],并于20世纪80年代被国际标准化组织列为毒性实验受试种之一。目前,日本青鳉的行为变化已经作为一个重要指标被广泛地应用到水质监测中^[3,5]。

本研究利用日本青鳉行为变化分析2种有机磷农药联合作用下的环境胁迫导致的生物逐级行为响应,以期结合不同化合物的联合作用研究,分析在实

收稿日期:2009-07-13;修订日期:2009-11-06

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07209-005,2009ZX07527-002);环保公益性行业科研专项(200809147);中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室专项(08K07ESPCR)

作者简介:刘勇(1983~),男,硕士研究生,主要研究方向为水生态毒理学,E-mail:biolyqh@yahoo.com.cn

* 通讯联系人,E-mail:zmren@yic.ac.cn

际污染环境下受试生物的行为响应机制,发展一定环境胁迫下生物行为逐级胁迫模型。

1 材料与方法

1.1 监测系统

在日本青鲈行为在线监测中,采用水质安全在线生物预警系统(BEWs,中国科学院生态环境研究中心研制)^[6]。

不同的生物个体大小采用相匹配的传感器:日本青鲈行为监测过程中,采用直径为5cm,长7cm的圆柱形生物传感器。

1.2 生物培养

日本青鲈采用流水繁殖,繁殖水温为 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照周期16L:8D。刚孵出2d内,无需投喂饵料。2d后使用刚孵出丰年虫作为开口饵料,每天2~3次饱食投喂。15d后即使用配合饲料投喂,每天投喂2次,保持密度为每L水2~3条^[7]。

1.3 实验设计

本实验采用流水环境监测日本青鲈逐级行为反应。在化合物暴露实验过程中,选取目前比较常用的有机磷农药:敌百虫、对硫磷。其标准样品从中国标准样品中心购买。将化合物对日本青鲈的48h半数致死剂量(50% Lethal Concentration of 48h), LC_{50-48} 作为1个毒性单位(toxic unit, TU)^[8],每种农药组合设定5个浓度组,分别为0.1、1、5、10和20TU。每个相同浓度组的2种农药按照下列比例混合($c_T:c_P$):10:0、7:3、5:5、3:7、0:10,进行2种有机磷农药的联合作用对日本青鲈逐级行为响应研究。每种比例的化合物联合作用进行3组平行,结果以3组平行结果的平均值显示。

实验过程中,为了明确生物综合行为的变化,采用生物综合行为强度(behavior strength)来反映其行为变化^[8]。在此过程中,判断日本青鲈行为发生剧烈变化的标准是:变化前连续5次行为强度平均值与变化后连续5次行为强度平均值的相对差值降低达到20%以上^[9],而低浓度(1TU和0.1TU)则需要10%的行为强度降低为显著变化。

在日本青鲈流水实验过程中,每通道保持3条2.5~3.0cm体长的健康日本青鲈,直至实验结束。实验过程中不投加食物,并控制每个通道水体流速2L/h^[10]。

实验用水为充分曝气的自来水,温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,溶解氧 $>8\text{ mg/L}$,硬度以 CaCO_3 计 $250\text{ mg/L} \pm 25\text{ mg/L}$,控制光照周期16h:8h(白天:黑夜,白

天04:00~20:00,夜间20:00~04:00),为保证生物行为监测平行,每次行为监测实验开始于第1d16:00,第3d16:00结束。空白采用国际标准化组织规定的标准水(standard reference water, SRW)^[11],pH值为 7.8 ± 0.2 ,硬度以 CaCO_3 计为 $250\text{ mg/L} \pm 25\text{ mg/L}$ 。

2 结果与分析

2.1 行为强度与化合物浓度的关系

结合Nishiuchi等^[12]在1967年的研究报道,2种有机磷农药对日本青鲈 LC_{50-48} 分别为对硫磷 2.9 mg/L 和敌百虫 10 mg/L 。本研究中,以上述化合物的 LC_{50-48} 作为日本青鲈的1个毒性单位(1TU),并以SRW为对照,研究一定化合物暴露下日本青鲈的综合行为强度变化。

不同浓度敌百虫和对硫磷联合作用下日本青鲈48h的行为强度变化如图1所示。对照组内日本青鲈行为强度基本维持在0.7左右,但其最大值位于0.8左右,最小值位于0.5左右,尤其在暴露以后8h左右(I,黑暗)和32h左右(II,黑暗),日本青鲈行为强度比20h左右(III,光照)和40h左右(IV,光照)明显降低[图1(a)]。产生对照组行为强度变化的原因可能在于日本青鲈行为变化的内在节律,即生物钟现象(biological clock)^[13-15]。因此,在不同浓度敌百虫和对硫磷联合作用下日本青鲈的行为强度变化结果分析中,应该考虑到生物钟现象对日本青鲈行为变化的影响。

在暴露组中,不管 $c_T:c_P$ 的值为多少,随着暴露浓度的逐渐升高,日本青鲈行为强度会明显降低。在较高浓度(5、10和20TU)暴露中,日本青鲈行为强度变化在经历一个逐渐降低过程以后,逐渐趋于0。而在此过程中,存在明显的行为调节:在未完全丧失行为能力之前,日本青鲈行为强度变化最明显的是在大约暴露20h左右,出现一次明显的行为恢复过程,该过程产生的主要原因可能是基于生物行为节律的生物内在行为调解。在较低浓度(1和0.1TU)暴露中,日本青鲈行为变化主要以调整为主,并且其调整过程基本符合对照组内日本青鲈的行为过程,具有明显内在节律性。但是,该浓度组中日本青鲈的行为强度在暴露后期出现明显的降低,其中,在1TU暴露中,暴露后期平均行为强度为0.3左右,最低行为强度达到0.2,而在0.1TU暴露中,暴露后期平均行为强度为0.4左右,最低行为强度达到0.3。该现象与对照组相比较,行为强度差异明显。由此可见,

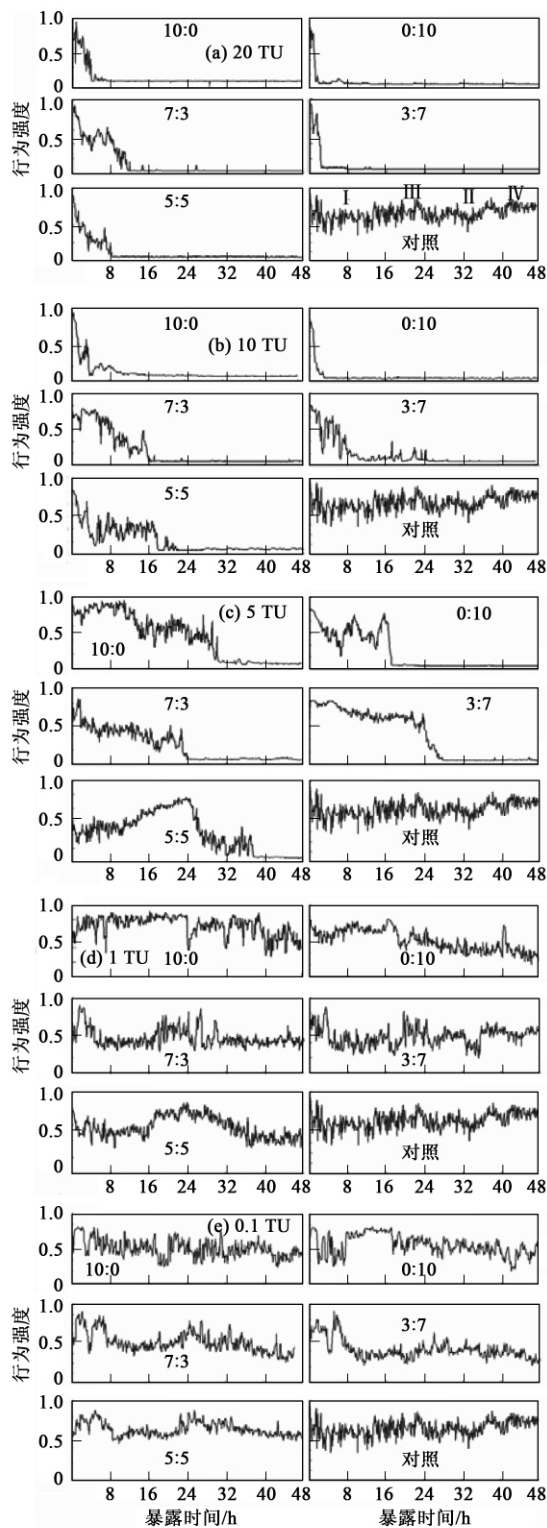


图1 不同浓度敌百虫和对硫磷联合作用下日本青鳉48 h行为强度变化

Fig. 1 Joint effects of different proportions of trichlorfon and parathion on the behavior strength of Japanese medaka in 48 hours exposure

敌百虫和对硫磷对日本青鳉联合毒性作用与 $c_T:c_P$

的比例大小无明显关系,而主要与敌百虫和对硫磷暴露的浓度直接相关。

化合物浓度增高,日本青鳉行为变化剧烈。随暴露化合物浓度降低,日本青鳉行为过程增加,发生的调解行为增多。暴露结束,日本青鳉行为强度也从高浓度的零值升高到0.4左右。上述分析表明,日本青鳉行为强度变化与暴露化合物浓度密切相关,在暴露时间确定情况下,日本青鳉行为强度变化直接受环境内化合物浓度的影响,并且2种作用机制相似的有机磷农药对日本青鳉的行为毒性是简单的相加作用。

2.2 行为强度与暴露时间的关系

在不同浓度化合物48 h的联合作用下,日本青鳉行为强度变化受暴露时间影响明显。在图1(a)中,20TU化合物联合暴露初期,日本青鳉行为强度能够在0.5以上变化,但随暴露时间增加,尤其在2~5 h以后,日本青鳉行为强度逐渐降低,在此过程中,行为调节不明显。大约在8 h左右,行为强度接近零,行为能力丧失。而在10 TU[图1(b)]的化合物联合暴露中,上述过程所需时间分别为4~6 h和10~16 h,同时,调解行为明显多于20TU暴露。同样,随暴露化合物浓度逐渐降低,行为调节过程更明显。

根据实验设计中判断日本青鳉行为发生剧烈变化的标准,日本青鳉在不同浓度配比的化合物暴露下的行为强度明显变化所需时间见表1。

表1 日本青鳉在不同浓度配比的敌百虫和对硫磷暴露下的行为强度明显变化所需时间

Table 1 Exposure time of Japanese medaka under different proportions of the two organophosphorus pesticides till the significant behavior strength decrease

暴露浓度 /TU	不同 $c_T:c_P$ 下行为强度明显变化时间/h					平均
	10:0	7:3	5:5	3:7	0:10	
20	2.4	1.6	1.3	1.0	0.8	1.4
10	9.0	7.6	3.5	2.6	1.5	4.8
5	10.1	7.4	3.7	5.7	3.8	6.4
1	24.1	28.1	36.5	32.1	40.2	32.2
0.1	41.8	45.1	43.3	43.9	41.9	43.0

不同浓度的暴露中,在日本青鳉发生行为强度明显变化以后,行为过程会产生明显不同。在较高浓度中,日本青鳉行为强度会逐渐降低至消失;而在较低浓度中,日本青鳉行为强度变化经历明显降低后,会产生明显的行为调节过程,尤其是在1TU和0.1TU暴露中,该过程与几乎发生在暴露20 h左右,与对照的行为生物钟现象相对应。

结果同时显示,随 2 种有机磷农药浓度的增加,行为强度明显变化时间呈明显下降趋势,它们的联合作用剂量与其毒性效应具有明显的正相关,其联合毒性(7:3、5:5 和 3:7)效应趋势与单一污染物(10:0 和 0:10)效应一致。结果表明,暴露浓度越低,日本青鲈行为强度发生明显变化所需时间越长,并且,从总体变化趋势分析,改变化时间长短与 $C_T:C_P$ 无直接联系。

由此进一步得出结论:作用机制相同的 2 种有机磷农药敌百虫和对硫磷对日本青鲈的行为毒性应该是简单的相加作用。

3 讨论

从日本青鲈行为强度变化与化合物浓度和暴露时间关系分析,在一定浓度的有机磷农药暴露中,其行为强度变化与暴露时间直接关联,而在暴露时间确定的情况下,行为强度变化与暴露浓度相关。同时,日本青鲈暴露于一定污染环境以后,其行为变化主要经历行为刺激、行为适应、行为调整、甚至再调整,直至产生明显行为毒性效应^[16]。在上述行为调节过程中,环境胁迫阈对生物行为变化起非常大的决定作用。

结合前期一定浓度单一污染物暴露下大型蚤行为变化与暴露时间之间的关系^[17],在不考虑生物行为内在节律性前提下,本研究构建了如图 2 所示的相同作用机制污染物联合胁迫下日本青鲈的逐级行为模型。

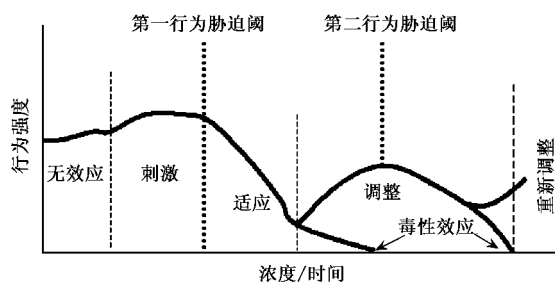


图 2 相同作用机制污染物联合胁迫下日本青鲈的逐级行为模型

Fig. 2 Stepwise stress model of Japanese medaka under the joint exposure of different chemicals with same toxic characteristics

在一定有机磷农药暴露浓度下,行为强度随暴露时间延长呈现明显规律性,并且在暴露时间确定的情况下,日本青鲈行为强度变化与暴露化合物浓度直接相关,同时,在大部分暴露过程中,日本青鲈

行为强度会经历明显的行为适应和调节过程,因此,日本青鲈逐级行为响应既受化合物浓度大小影响,又与暴露时间密切相关。结合上述分析,其行为强度变化主要经历行为刺激、行为适应、行为调整、甚至再调整,直至产生明显行为毒性效应,行为趋势符合如图 2 所示的逐级行为模型。

结合行为强度与化合物浓度和暴露时间之间关系分析,在作为乙酰胆碱酶(AChE)的活性抑制剂的有机磷农药^[18,19]联合胁迫下日本青鲈的逐级行为模型中,无效行为变化和刺激组成的行为强度变化过程(回避行为过程)受所维持的时间长短主要受暴露化合物浓度影响,并呈现明显规律性^[9],并由此决定环境胁迫导致第一行为胁迫阈发挥作用的时间和强度。环境胁迫越大,回避行为过程越短,第一行为胁迫阈对日本青鲈产生的胁迫越强,在行为适应失败以后,可能直接导致日本青鲈的毒性效应。在较强的环境胁迫下,日本青鲈可能会在经历行为适应和调整过程后,遭受第二行为胁迫阈的直接影响。因此,日本青鲈在一定环境胁迫下,会产生明显的逐级行为调整过程,直至其行为毒性效应产生。日本青鲈逐级行为调整,尤其是在回避行为产生以后,既受环境化合物浓度影响,又与暴露时间相关。

4 结论

(1) 作为乙酰胆碱酶(AChE)的活性抑制剂,所有有机磷农药的作用机制是一致的。研究结果证明,在敌百虫和对硫磷 2 种有机磷农药联合暴露下,日本青鲈的逐级行为响应既受化合物浓度大小的影响,又受暴露时间的影响,但每个浓度的不同配比之间的行为反应时间差异不明显。而且每个浓度 2 种药物不同配比暴露下青鲈的逐级行为响应基本一致。这证明了 2 种作用机制相似的有机磷农药对日本青鲈的行为毒性是简单的相加作用,同时表明日本青鲈逐级行为响应既受化合物浓度大小影响,又与暴露时间密切相关。

(2) 针对日本青鲈在产生行为过程中的明显生物钟现象,为了进一步明确行为调解与行为内在节律之间关系,在后续水生生物行为强度变化研究中,有必要考虑生物钟现象对生物行为调节的影响。

参考文献:

- [1] Quandt S A, Arcury T A, Rao P. Agricultural and residential pesticides in wipe samples from farmworkers family residences in North Carolina and Virginia [J]. Environ Health Perspect, 2004, 112: 382-387.

- [2] Putman R J, Wratten S D. Principles of Ecology. Groom Helm [M]. London and Canberra ,1984.
- [3] Denny J S. Guidelines for the culture of fathead minnows for use in toxicity tests [M]. Environmental Research Laboratory , Duluth , Minn Epa/600/3-87/001 ,1987.
- [4] Yamamoto T. Medaka (Killifish): Biology and Strains Keigaku [M]. Pub Co ,Tokyo , 1975.
- [5] Shioda T, Wakabayashi M. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Chemosphere , 2000 ,**40**: 239-243.
- [6] 任宗明,马梅,查金苗,等. 在线生物安全预警技术用于典型农药突发性污染的研究[J]. 给水排水,2007,**33**(3): 20-23.
- [7] Teather K, Harris M, Boswell J, et al. Effects of Acrobat MZ and Tatto C on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) development and adult male behavior [J]. Aquatic Toxicology , 2001 ,**51**: 419-430.
- [8] Ren Z, Ma M, Wang Z. Behavioral responses of *Daphnia magna* to stresses of contaminants with different toxic mechanisms [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology , 2009 ,**82**: 310-316.
- [9] Ren Z, Li Z, Zha J, et al. The avoidance responses of *Daphnia magna* to the exposure of organophosphorus pesticides in an on-line biomonitoring system [J]. Environmental Modeling and Assessment , 2009 ,**14**: 405-410.
- [10] Guilhermino L, Diamantino T, Silva M C, et al. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety , 2000 ,**46**: 357-362.
- [11] ISO. Water Quality -Determination of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) [M]. ISO 6341. Geneva ,Switzerland ,1996.
- [12] Nishiuchi Y, Hashimoto Y. Toxicity of pesticide ingredients to some fresh water organisms [J]. Science of Pest Control ,1967 ,**32**(1): 5-11.
- [13] Binkley S A, Riebm J B, Reilly K B. The pineal gland: a biological clock in vitro [J]. Science ,1978 ,**202**: 1198-1120.
- [14] Wang G, Fu C, Li J, et al. Circadian rhythms and different photoreponses of Clock gene transcription in the rat suprachiasmatic nucleus and pineal gland [J]. Acta Physiologica Sinica , 2006 ,**58**: 359-364.
- [15] 任宗明,王子健. 大型蚤和日本青鳉在水质在线生物安全预警应用中的比较[J]. 给水排水,2009,**35**(5):32-36.
- [16] Ren Z, Ma M, Wang Z, et al. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna* [J]. Environmental Monitoring and Assessment , 2007 ,**134**: 373-383.
- [17] 任宗明,付荣恕,王子健. 饮用水中余氯对大型蚤的急性和慢性毒性[J]. 给水排水,2005,**31**(4): 26-28.
- [18] Eldefrawi A T. Acetylcholinesterases and anticholi [A]. In: Kerhut G A, Glibert L I (eds). Comparative insects physiology , biochemistry , and pharmacology [M]. Oxford: Pergamon Press , 1985. 115-130.
- [19] 李志良,任宗明,马梅,等. 利用大型蚤运动行为变化预警突发性有机磷农药污染事件[J]. 中国给水排水,2007,**23**(12): 73-75.