

用鱼脑胆碱酯酶活力监测有机磷农药 对水体的污染

湖北省水生生物研究所第六室毒理生态组

USE OF FISH BRAIN ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY AS A MONITOR FOR PHOSPHOROUS INSECTICIDE POLLUTION OF WATER BODIES

SECTION OF TOXICOLOGY AND ECOLOGY, SIXTH LABORATORY, INSTITUTE OF
HYDROBIOLOGY, HUPEI PROVINCE

提 要

本文报道了6种有机磷农药(马拉硫磷、敌敌畏、对硫磷、敌百虫、乐果和杀螟松),6种非有机磷毒物(西维因、氯化高汞、滴滴涕、六六六、三硝基甲苯和苯酚)分别对我国淡水养殖鲤科鱼类的急性致毒试验,以及不同水体中不同种类和年龄的鱼的脑胆碱酯酶活力的测定,证实有机磷农药可以特异地抑制鱼脑胆碱酯酶活力,其抑制程度与农药浓度相关。

在有机磷农药对鱼类慢性致毒试验中发现:水中有机磷农药浓度和水温对鱼脑胆碱酯酶活力的恢复和鱼体残毒释放的速度有影响。

六六六和对硫磷联合致毒对鱼脑胆碱酯酶活力的影响也进行了初步探讨。

有机磷农药杀虫效率高,对植物的毒害小,因此近年来国内外均已广泛使用。但是在农药的生产、使用过程中,难免地会有一部分药物经由农药厂的废水以及使用农药的农田、鱼池而流入天然水体,从而毒害水生生物,甚至影响人体健康。

1947年 Chadwick 等发现有机磷酸酯对昆虫的毒理作用机制是抑制胆碱酯酶的活性,并以此作为生产有机磷农药杀虫剂的药理指标^[1]。1958年 Weiss 提出用鱼脑胆碱酯酶活力的抑制来监测水体中有机磷农药污染的想法^[2]。由于有机磷农药对胆碱酯酶的抑制作用十分灵敏,在一般化学分析难以测定时,如在水中浓度为0.1ppm时即可产生明显的抑制作用,而在数周后才能恢复正常,因而他认为可以根据鱼脑胆碱酯酶活力下降现象来查知水体现时或过去一定时间内被有机磷污染的情况。

1969年 Gibson 等研究了用鱼脑胆碱酯酶作为水体污染监测手段的误差来源,他指出每批正常鱼的活力可差20%,脑不同部位酶活力亦有差异,他们强调用脑胆碱酯酶作为水体监测指标必须慎重^[3]。1972年 Coppage 进一步提出鱼脑胆碱酯酶活力下降到正常值的

1976年7月6日收到。

87% 以下才能证明污染的存在, 他认为酶活力为正常值的 17.7% 是鱼不致死的下限^[4]。

虽然近来已广泛研究有机磷农药对鱼脑胆碱酯酶的抑制作用^[5,6], 但是大多数只限于测定实验室内的小型鱼(如金鱼、鲫鱼等)对有机磷的反应, 而对渔业水体中有经济价值的鱼类的脑胆碱酯酶活力正常值及其在有机磷农药作用下的变化规律都研究甚少, 而且国外一些实验偏重于单因子的分析。天然水体情况复杂, 对各种因素如温度、鱼龄、鱼的种类、生态条件以及多种毒物综合作用等对鱼脑胆碱酯酶活力的影响却研究得很不够。目前关于水温是否对脑胆碱酯酶有影响尚有争论^[7], 有关低浓度农药慢性中毒的资料亦少。

针对上述情况, 我们分析了我国主要淡水养殖鱼类(白鲢、鲤鱼等)脑胆碱酯酶在不同外界因素下的活性及其个体变异范围, 并研究了有机磷农药急性及慢性致毒对鱼脑胆碱酯酶抑制的规律。为了检查有机磷农药对鱼脑胆碱酯酶抑制作用的特异性, 我们还检验了非有机磷毒物对胆碱酯酶活力的影响。天然水体污染常常是综合因子的影响; 因此又对复合因子对鱼脑胆碱酯酶的影响进行了初步探索。希望通过这些工作为水体有机磷污染的生物监测提供科学依据。

材 料 和 方 法

取材 测定正常鱼脑胆碱酯酶活力用的鱼, 取自未曾发现被有机磷农药污染的天然水体, 用刺网或围网捕获后立即取活鱼脑测定; 其中某湖鱼肉经化学检查未测出含有有机磷农药。

毒性实验用的鱼种取自本所鱼池、东西湖养殖场及花马湖养殖场, 鱼体健康。白鲢体重 0.15—5.9 克, 体长 2—7 厘米; 团头鲂体重 0.435—1.55 克, 体长 3.4—4.2 厘米; 鲤鱼体重 0.15—0.43 克, 体长 1.9—3.5 厘米; 金鱼体重 1.5—3.8 克, 体长 2.7—3.6 厘米。

养鱼条件 鱼在室内暂养一周以上, 并饲以面粉及黄豆饼粉做的混合饵料。养鱼用的自来水经 24 小时静置脱氯; 水质为 pH 8.18, 溶氧 5.48 ppm, 总硬度 5.6 H°, 电导率 283 微欧姆/厘米。毒性实验期间每 24 小时换一次药水, 对照组换清水。急性致毒实验期间不喂饵料, 每缸装 30 升水, 放 20 尾白鲢, 实验时水温 25—29℃。慢性实验用金鱼作材料, 每缸装 40 升水, 放 15 尾金鱼。关于慢性试验的其它情况, 另有专文报告。

鱼脑保存 取活鱼脑立即测定酶活力或包在锡纸内迅速冻至 -20—-15℃ 保存数天后测定。在 -20℃ 干冰或冰箱中保存脑子 3 天至数周仍可保持酶活力。但在 4℃ 冰箱内保存鱼脑 3 天活性稍有降低, 常温下酶活力迅速丧失。取脑前抽血会使活力稍有增加, 但经统计学 t 值检查与未抽血鱼脑活力相比没有显著差别。结果见表 1。

表 1 处理方式与酶活力的关系

处 理 方 式	先抽血再取脑	立 即 测 定	-15℃剥脑保存三天	4℃ 冰箱保存三天
酶 活 力 (微克分子/毫克/小时)	2.58	2.37	2.32	2.17

酶匀浆的制备: 测定前取出全脑, 用滤纸吸去表面水分, 称湿重, 加 pH 7.2 的 0.01M 磷酸缓冲液, 用玻璃匀浆器研磨。整个操作在 4℃ 左右进行。最后用上述缓冲液稀释成每毫升含脑组织 2 毫克。实验证明匀浆在 5—7℃ 保存 5 小时活力变化甚微。

胆碱酯酶活力的测定：取 1 毫升酶匀浆加至 1 毫升 0.004M 溴化(或氯化)乙酰胆碱溶液中，30℃ 水浴保温 20 分钟。然后根据 Hestrin 法^[8]显色，用国产 72 型分光光度计于 525 毫微米波长比色测定剩余的乙酰胆碱量。与此同时配制样品对照管、标准管以及试剂空白管。

酶活力单位：以每毫克鲜脑组织每小时所水解乙酰胆碱微克分子数表示：微克分子/毫克/小时。或以每毫克蛋白质每小时所水解的乙酰胆碱微克分子数表示：微克分子/毫克/蛋白质/小时。

脑组织中蛋白质用 Folin-酚法^[9]用 500 毫微米波长比色测定。

所用的农药皆我国农药厂生产的原油或原粉。所用溶剂大部分为 5% 吐温-80 丙酮溶液。氯化汞、敌百虫为水溶液。经实验证明吐温-80 丙酮溶液对鱼脑胆碱酯酶活力无影响。

结 果

(一) 影响正常鱼脑胆碱酯酶活力的因素

1. 鱼的年龄和体重

我们从 1974 年—1975 年捕获 10 批白鲢共 96 尾，年龄为 1 至 5 龄，体重 145—10,750 克，鱼脑胆碱酯酶活力没有显著差别，但是体长 2—7 厘米、体重 0.2—5 克的鱼种比成鱼脑胆碱酯酶活力高。在 8° 与 12℃ 时捕获的三批鱼所得结果见表 2。

表 2 白鲢鱼龄体重与脑胆碱酯酶的关系

鱼 龄	体重(克)	体长(厘米)	鱼数(条)	胆碱酯酶活力*(微克分子/毫克/小时)
当年鱼种	0.19—5.9	2—6.9	8	2.66±0.307
一 龄	145—700	20.2—35.5	13	2.43±0.554
二 龄	1,050—1,900	39—45	23	2.20±0.402
三 龄	1,950—2,050	45—47	4	2.42±0.263

* 酶活力是平均值±标准差 S

2. 鱼的种类

我们从一个湖泊，两个水库捕获了白鲢 81 尾(1—4 龄)，鲤鱼 27 尾(1—7 龄)，鲫鱼 37 尾(1—5 龄)，每尾鱼分别测定其脑胆碱酯酶活力，结果见表 3。由结果看出天然水体捕获的白鲢脑胆碱酯酶比鲤鱼、鲫鱼活力高，不同鱼种酶活力却相似。成年鲤鱼、鲫鱼脑

表 3 不同种类鱼脑胆碱酯酶活力

鱼 的 种 类	当 年 鱼 种 酶 活 力		成鱼酶活力*微克分子/毫克/小时
	微克分子/毫克/小时	微克分子/毫克蛋白质/小时	
白 鲢	2.53(40)**	61.9(40)	1.94±0.670(81)
鲤 鱼	2.24(40)	57.4(40)	1.62±0.42(27)
鲫 鱼	—	—	1.50±0.52(37)
团 头 鲂	2.25(40)	62.4(40)	—

* 酶活力是平均值±标准差 S

** 括号中为鱼数

胆碱酯酶活力偏低可能是由于它们的脑量较大。如 17 斤鲤的鱼脑重为 2.4 克, 18.5 斤白鲢脑重 0.52 克, 二者虽然体重相近, 但鲤鱼脑比白鲢脑重 5 倍, 而脑越大其中非神经组织越多, 单位重量脑组织酶活力就偏低^[3]。

3. 水温

实验是用白鲢, 鱼种体重 0.2—5 克, 体长 2.1—6.9 厘米, 养在实验室养鱼池内, 在不同季节, 不同水温时, 测定其脑胆碱酯酶活力。共测了 200 尾鱼, 每次取 5 个鱼脑的混合样测定。

第一组测定是 1973 年 11 月至 74 年 2 月, 第二组在 1975 年 6 月至 75 年 8 月, 水温分别为 13—17℃ 和 25—29℃。酶活力分别为 2.71 ± 0.215 和 2.66 ± 0.076 微克分子/毫克/小时, 经 t 值检查, 两组鱼脑酶活力在统计上没有显著性差别。

4. 不同水体

我们取了一个南方湖泊, 一个南方水库和一个北方水库三个水体中的白鲢、鲤鱼和鲫鱼进行测定。虽然它们的地理条件不同, 生态环境也不同, 同种鱼脑胆碱酯酶活力虽有一些变化, 但经统计学 t 值检查无显著差异(表 4)。

表 4 不同水体鱼脑胆碱酯酶活力*(微克分子/毫克/小时)

鱼种类	地 点	南 方 湖 泊	南 方 水 库	北 方 水 库
白 鲢		$1.92 \pm 0.633(67)**$	—	$1.46 \pm 0.36(26)$
鲤 鱼		$1.64 \pm 0.46(10)$	—	$1.66 \pm 0.52(19)$
鲫 鱼		$1.72 \pm 0.632(18)$	$1.42 \pm 0.48(27)$	$1.51 \pm 0.25(8)$

* 酶活力为平均值±标准差 S

** 括号中为鱼数

(二) 有机磷农药对鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

1. 不同种类有机磷农药对白鲢鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

不同种类有机磷农药对白鲢鱼种 96 小时急性致毒作用过程中, 胆碱酯酶抑制程度是不同的(表 5), 若以农药浓度的对数与酶活力的对数作图(图 1), 则可以看到随农药浓度升高酶活力降低呈直线关系, 其中对硫磷毒性最大, 依次是敌敌畏、马拉硫磷、敌百虫、杀螟松、乐果。若以农药 96 小时 TLm 浓度与酶的相对活力%作图(图 2), 可以看出除杀螟松外, 酶活力抑制程度与农药浓度呈倒 S 型曲线关系。在农药浓度低时, 浓度增加酶活力显著下降, 但在浓度高时, 酶活力下降达到一个极限值, 浓度再增加酶活力变化不大。这可能由于有机磷农药与脑中胆碱酯酶活性基团结合, 在高浓度下达到饱和, 以致再增加浓度时, 抑制也不会加深。由图 2 可以看到, 当农药浓度达鱼死亡一半时, 酶抑制程度已达恒定值。以农药对鱼 96 小时 TLm 浓度来比较胆碱酯酶抑制程度, 敌敌畏最高, 依次是马拉硫磷、对硫磷、敌百虫、乐果、杀螟松。杀螟松对酶活力抑制不高时即可造成鱼的死亡。

上述六种农药急性致毒时都可以使鱼产生有机磷中毒症状: 开始鱼过度兴奋, 继而平衡失调, 头向下钻, 团团转, 甚至腹部朝天, 高浓度组陆续产生死亡。六种农药中马拉硫磷和对硫磷使鱼产生明显的弯体症状, 有的鱼尾部脊柱折断、充血、肿胀。

表 5 不同有机磷农药对鱼脑胆碱酯酶活力的抑制作用

农 药 品 种	浓度 ppm	相当 96 小时 TLm 浓度	酶活力微克分子/毫 克/小时*	相对酶活力 %
马 拉 硫 磷	10	0.835	0.223	6.91
	6	0.5	0.309	9.57
	1.2	0.1	0.981	30.4
	0.6	0.05	1.70	52.6
敌 敌 畏	9.4	1	0.188	5.81
	4.7	0.5	0.355	10.96
	0.94	0.1	0.472	14.6
	0.47	0.05	1.47	45.4
对 硫 磷	1	0.6	0.457	18.2
	0.5	0.3	0.516	20.6
	0.1	0.06	1.053	41.5
	0.05	0.03	1.66	65.5
敌 百 虫	40	1	0.375	11.6
	20	0.5	0.501	15.8
	4	0.1	0.613	19
	2	0.05	1.67	51.8
乐 果	120	0.76	0.507	15.7
	79.25	0.5	0.997	30.8
	15.85	0.1	2.44	75.6
	7.925	0.05	2.52	78.2
杀 螟 松	4	1.16	2.21	68.4
	1.73	0.5	2.47	76.5
	0.345	0.1	2.84	87.8
	0.173	0.05	2.64	81.9
对 照	0		3.23	100%

* 酶活力为两次实验结果平均值

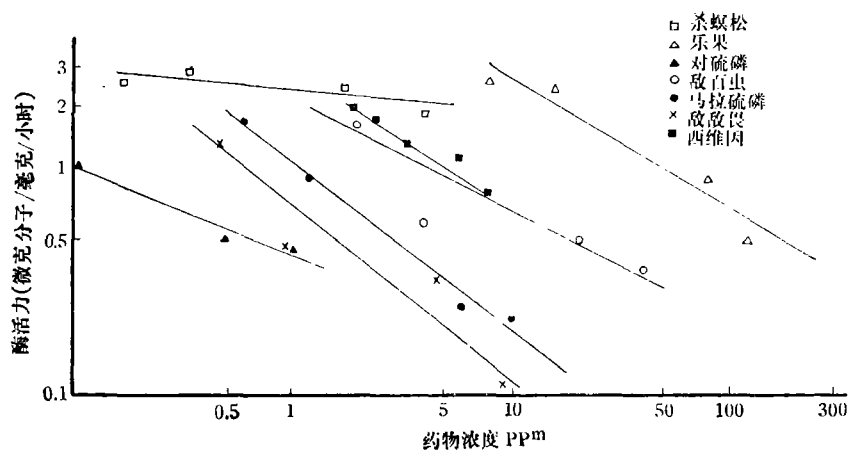


图 1 几种农药对白鲢脑胆碱酯酶的抑制作用

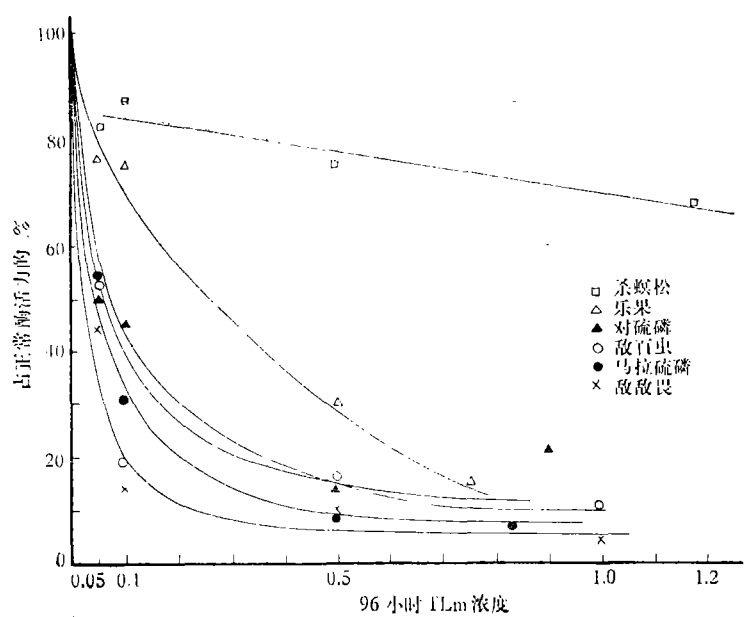


图 2 不同有机磷农药对白鲢鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

2. 对硫磷对不同种类鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

用不同浓度对硫磷对白鲢、团头鲂、鲤鱼鱼种进行 96 小时急性中毒实验。每个浓度在同一养鱼缸中放三种鱼各 10 尾。结果见表 6，并以对硫磷浓度的对数对酶活力对数作图(图3)。由结果看出鲤鱼对对硫磷中毒最敏感,其次团头鲂和白鲢在低浓度对硫磷中毒时,鲤鱼脑胆碱酯酶抑制程度最大,在高浓度时测各种鱼酶的抑制程度相近。这个结果与

表 6 对硫磷对不同种类鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

鱼 种 类	对 硫 磷 浓 度 (ppm)	酶 活 力* (微克分子/毫克/小时)	相 对 酶 活 力 (%)
白 鲢	1	0.457	18.1
	0.5	0.516	20.6
	0.1	1.053	41.5
	0.05	1.66	65.5
	0	2.53	100
团 头 鲂	1	0.42	18.7
	0.5	0.803	35.7
	0.1	0.987	44
	0.05	1.34	59.6
	0	2.25	100
鲤 鱼	1	0.37	16.5
	0.5	0.575	25.6
	0.1	0.689	30.6
	0.05	0.735	32.7
	0	2.24	100

* 酶活力为两次实验平均值

上述高浓度时酶抑制变化不大的结果相似。

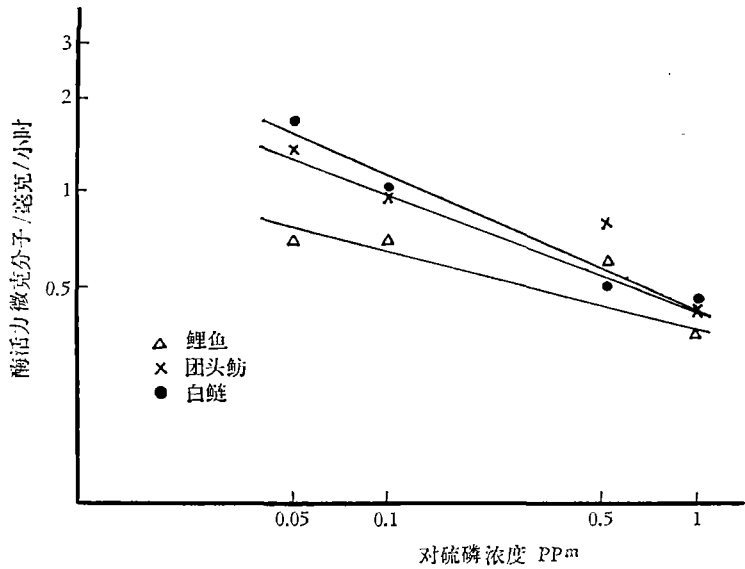


图 3 对硫磷对不同种鱼的脑胆碱酯酶的抑制作用

3. 对硫磷和马拉硫磷对白鲢的急性致毒作用及中毒后恢复时脑胆碱酯酶活力的变化
0.84 ppm (0.5 TLm) 对硫磷和 6 ppm (0.5 TLm) 马拉硫磷对白鲢鱼种 96 小时致毒期间,不同时间,脑胆碱酯酶活力变化结果见表 7 及图 4。由结果看出在急性致毒时随着

表 7 对硫磷和马拉硫磷使白鲢中毒和恢复期间脑胆碱酯酶活力的变化

组 别	农药种类·浓度	时 间	酶 活 力 微克分子/毫克/小时	相对酶活力(%)
I	对硫磷 0.84 ppm (0.5×TLm)	6 小时	0.853	33.3
		24 小时	0.765	28.3
		48 小时	0.379	16.1
		72 小时	0.437	14.8
		96 小时	0.380	15.0
	换 清 水	8 天	1.83	72.3
II	马拉硫磷 6ppm (0.5×TLm)	6 小时	0.504	19.7
		24 小时	0.427	15.75
		48 小时	0.155	6.57
		72 小时	0.112	3.82
		96 小时	0.086	3.39
	换 清 水	8 天	1.33	51.8
III	对 照 (清 水)	6 小时	2.563	100
		24 小时	2.71	100
		48 小时	2.36	100
		72 小时	2.92	100
		96 小时	2.56	100

时间增加,酶活力下降,中毒第 2,3 天酶活力下降达平衡数值。两种农药所达平衡值不同,马拉硫磷对活力的抑制较强,为对照组活力的 3.39%,对硫磷为对照组的 15%,中毒 4 天后换成清水养鱼 8 天,对硫磷致毒鱼脑胆碱酯酶恢复为对照值的 72.3%,而马拉硫磷中毒鱼脑酶活力恢复仅为对照值的 51.8%,可见马拉硫磷致毒后的鱼恢复较慢。

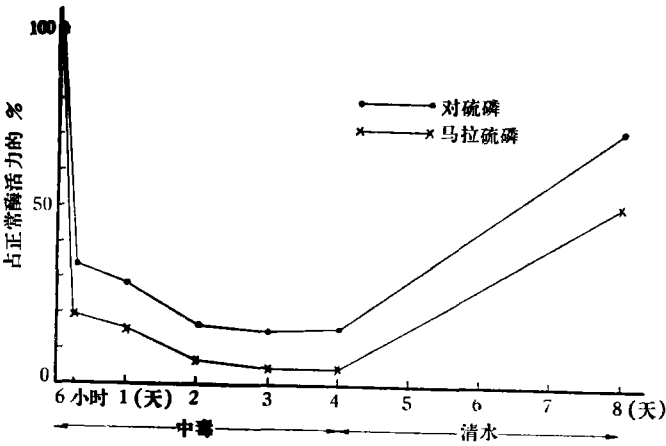


图 4 对硫磷和马拉硫磷使白鲢中毒及恢复期间脑胆碱酯酶活性的变化

4. 马拉硫磷对白鲢亚急性致毒及中毒后恢复时脑胆碱酯酶的变化

用 1.12ppm 及 0.56ppm 两个浓度马拉硫磷的水养鱼 30 天, 然后转入清水。饵料是实验室培养的硅藻, 水温 15℃, 中毒初期鱼呈现有机磷中毒症状, 数日后渐趋正常, 但摄食比较对照组少, 高浓度组尤其明显。中毒一个月后鱼脑胆碱酯酶抑制达 90% 左右。转入清水后 10 天, 酶活力显著回升, 但经过 50 天尚未恢复到正常水平(表8)。

表 8 马拉硫磷对白鲢鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

处 理	组 别	马拉硫磷浓度(ppm)	酶 活 力 (微克分子/毫克/小时)	相对酶活力(%)
中 毒 一 个 月	1	1.12	0.3	11.1
	2	0.56	0.3	11.1
恢 复 10 天	1	0	1.2	53.4
	2	0	1.5	66.8
恢 复 50 天	1	0	1.5	42.5
	2	0	2.1	60.7

5. 不同浓度对硫磷对金鱼慢性致毒及鱼中毒后恢复时脑胆碱酯酶活力的变化

金鱼养在 0.18, 0.072, 0.036, 0.0072 ppm 浓度对硫磷的溶液中, 每天换药水一次, 133 天后转入清水, 每天喂人工混合颗粒饵料(蛋粉、面粉、豆饼粉、麸皮)以及浮游动物。水温在13—25℃, 详细实验条件, 金鱼生长、繁殖情况另有报告。与白鲢亚急性中毒结果相似, 鱼中毒初期活动异常, 出现明显的有机磷中毒症状, 摄食减少, 高浓度组有个别鱼死亡。中毒数周后, 渐趋正常, 摄食量也有所增加, 但行动仍较迟缓。中毒 40 天、133 天, 以及转入清水 14 天后分别取鱼测定脑胆碱酯酶活力, 结果见表 9 及图 5。中毒初期胆碱酯酶急剧下降, 最高浓度组甚至降到正常活力的 2.58%, 这是历次急性致毒实验从未达到的

低水平。但随着中毒时间延长,酶活力有所回升。这与鱼的活动渐趋正常是一致的。慢性致毒时,低浓度的有机磷农药,例如 0.0072ppm 对硫磷(相当于 96 小时 TLm 值的百分之一),在 133 天之后会使鱼脑胆碱酯酶活力降至正常酶活力的 34.9%。鱼在一般认为是对硫磷的安全浓度(即 96 小时 TLm 值的十分之一,0.072ppm)中经过 133 天会使酶活力降至 18.6%,这与急性致毒实验结果是不同的。在中毒后换成清水,在 25℃ 时作恢复实验,可以看到抑制程度越深,恢复越慢;清水中 14 天高浓度组(0.18ppm 对硫磷)鱼脑胆碱酯酶活力仅恢复达正常值的 41.8%,而低浓度组(0.0072ppm 对硫磷)酶活力恢复达 76.4%。

表 9 对硫磷慢性致毒对金鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

处 理 天 数 对 硫 磷 浓 度		中 毒 40 天		中 毒 133 天		清 水 恢 复 14 天	
ppm	相当 96 小时 TLm 浓度	酶 活 力 (微克分子/毫 克/小时)	相 对 活 力 (%)	酶 活 力	相 对 活 力 (%)	酶 活 力 (微克分子/毫 克/小时)	相 对 活 力 (%)
0.18	0.25	0.094	2.58	0.31	14.2	0.856	41.8
0.072	0.1	0.328	9.02	0.406	18.6	1.11	54.2
0.036	0.05	0.225	6.19	0.57	26.1	1.49	73.0
0.0072	0.01	0.845	23.2	0.764	34.9	1.56	76.4
对 照	0	3.61	100	2.18	100	2.05	100

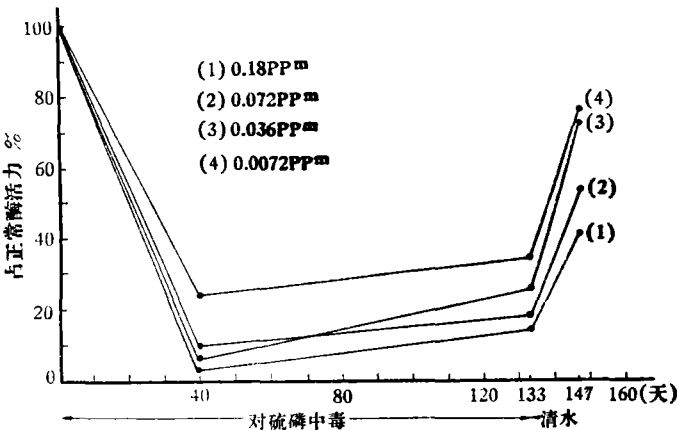


图 5 金鱼在对硫磷慢性致毒及恢复期间脑胆碱酯酶活力的变化

6. 温度对有机磷农药致毒的鲫鱼脑胆碱酯酶活力恢复的影响

有机磷农药中毒的鲫鱼,鱼肉中含 1.3—1.4ppm 对硫磷,鱼脑胆碱酯酶活力为 0.32 微克分子/毫克/小时,转至室外清水鱼池,在 4 月 21 日至 8 月 21 日这段时期中,水温为 20—24℃,当鱼养了一个月,肌肉中已测不出对硫磷残毒,脑胆碱酯酶活力也恢复正常。但是,同样有机磷农药中毒的鲫鱼,脑胆碱酯酶活力相似(0.34 微克分子/毫克/小时),冬季在室内水泥池中用流动清水养了一个月(试验从 12 月 28 日开始),水温为 6.5℃,脑胆碱酯酶活力毫无恢复(表 10)。以后分成两组,一组加温至 13—17℃,另一组不加温,仍在 6.5—10℃ 水温中;仍用流动清水饲养,并加喂豆饼粉,继续恢复一个半月,比较两组鱼脑胆碱酯酶活力。结果加温组鲫鱼脑胆碱酯酶活力达正常值的 54.1%,而不加温组仅为正

常值的 35.2%，见表 10。经 t 值检查，这两组鱼脑胆碱酯酶活力有显著差别。

表 10 温度对有机磷中毒的鲫鱼脑胆碱酯酶活力恢复的影响

清水中恢复时间	次 数	温度(℃)	鱼数(条)	酶 活 力*	占正常值%
开 始 (4月21日) (12月28日)	I	20	20	0.32	15.6
	II	6.5	10	0.34±0.38	16.6
一个月 (5月21日) (1月28日)	I	20	10	2.16	105
	II	6.5	10	0.26±0.22	12.5
二个半月(7月5日) (3月10日)	I	20—24	10	1.55**	75.6
	II (1)	6.5—10	5	0.73±0.16	35.2
	II (2)	13—17	6	1.11±0.16	54.1
四个月 (8月21日) (4月28日)	I	20—24	10	2.05	100
	II (1)	14—18	10	1.65±0.41	80.5
	II (2)	18.5—23	10	1.88±0.39	92
五个月 (6月7日)	II	23—25	10	1.95	95

* 酶活力为平均值±标准差,单位是微克分子/毫克/小时

** 测定选用弯体鱼。

恢复二个半月时经本室化学组分析鱼体残毒,表明残留量与胆碱酯酶活力成反比关系,即温度高的一组,鱼体有机磷消失的快,残毒少(含对硫磷 0.637ppm),温度低的一组残毒高(含对硫磷 0.870ppm)。

这说明鱼体有机磷消失,与鱼的代谢活动密切相关,温度高时鱼体代谢速度快,残毒消失的快,相反温度低时鱼体代谢速度缓慢,残毒消失也慢。

鱼在清水中恢复四个月时,两组鲫鱼脑胆碱酯酶活力均恢复正常,无显著差别。鱼肉中也未测出有机磷残毒。

(三) 西维因及其他毒物急性致毒对鱼脑胆碱酯酶活力的影响

1. 西维因对鱼脑胆碱酯酶的抑制作用

不同浓度的氨基甲酸酯农药——西维因 96 小时致毒所引起的白鲢鱼种中毒症状,与有机磷农药相似:鱼活动明显地失去平衡、头向下,团团转、有的翻腹、侧游。也可以使鱼产生弯体,弯曲部位在尾部脊柱。

西维因对鱼脑胆碱酯酶的抑制作用见表 11。随着西维因浓度增加,酶活力下降。西维因浓度的对数与酶活力的对数呈直线关系。见图 1。

表 11 西维因对白鲢脑胆碱酯酶的抑制作用*

西 维 因 浓 度 (ppm)	酶活力微克分子/毫克/小时	相 对 酶 活 力 (%)
7.5	0.828	30
5.6	1.91	43
3.2	1.35	48.8
2.4	1.70	61.5
1.8	2.015	72.9

* 两次实验平均值,每次 20 尾鱼

2. 氯化高汞、酚、六六六、滴滴涕、三硝基甲苯 (TNT) 急性致毒对白鲢脑胆碱酯酶的

影响

据报导, 酚能影响胆碱酯酶活力^[1], 而我们过去的实验表明汞也会抑制鱼血清胆碱酯酶活力。因此我们观察了氯化高汞、滴滴涕、六六六、苯酚、三硝基甲苯在其 0.5×96 小时 TLm 值浓度中致毒 7 天对白鲢鱼种脑胆碱酯酶活力的影响。其中苯酚致毒 4 天, 三硝基甲苯浓度低于 $0.5 \times$ TLm 值。

实验鱼体重 145—366 克, 体长 20—27.2 厘米, 每缸养 6 尾鱼, 水温 20—24℃。结果见表 12。可以看出除苯酚可抑制脑胆碱酯酶达正常值的 56.1% 外, 其余毒物在 $0.5 \times$ TLm 的浓度下都不影响脑胆碱酯酶的活力。

表 12 非有机磷毒物对白鲢脑胆碱酯酶活力的影响

毒物名称	浓度 (ppm)	酶活力 (微克分子/毫克/小时*)	相对酶活力(%)
氯化高汞	0.12	2.18±0.57	102
滴滴涕	0.004	1.98±0.58	93
六六六	0.292**	2.37±0.59	110
三硝基甲苯	0.32	2.25±0.68	105
苯酚	12	1.2 ±0.55	56.1
对照	0	2.14±0.39	100

* 酶活力为四次实验的平均值±标准差 S

** 六六六浓度按丙体含量计算

(四) 六六六与对硫磷联合致毒对鱼脑胆碱酯酶活性的影响

天然水体中存在的毒物常常不是一种而是多种, 并可能对鱼有综合影响。我们选了两种常用的农药六六六与对硫磷, 测定二者联合致毒 96 小时对白鲢鱼种脑胆碱酯酶活力的影响(表 13)。我们发现虽然六六六并不抑制鱼脑胆碱酯酶的活性, 但是六六六可以增加对硫磷抑制脑胆碱酯酶的效应, 而且当对硫磷浓度固定时, 随着六六六浓度的增加, 抑制作用加强(图 6)。若以 96 小时 TLm 值为一个毒性单位, 则从鱼死亡情况也可以看出, 在相同毒性单位浓度下, 高浓度六六六与对硫磷联合作用比单独用六六六或对硫磷时死亡

表 13 六六六与对硫磷联合致毒对白鲢脑胆碱酯酶的影响

农药种类	浓度 (ppm)	毒性单位 (Tu)	酶活力 (微克分子/毫克/小时)	相对酶活力 (%)
对照	0	0	2.04	100
六六六	0.292	0.5	2.24	109
对硫磷	0.168	0.1	0.807	42.5
对硫磷 + 六六六	0.168 0.0584	0.1 + 0.1	0.755	39.7
对硫磷 + 六六六	0.168 0.147	0.1 + 0.25	0.729	38.4
对硫磷 + 六六六	0.168 0.295	0.1 + 0.5	0.228	12

* 六六六用含 14.45% 丙体的原粉, 以 10% 吐温-丙酮为溶剂配制, 浓度以丙体计算

增加。本实验经重复一次,结果相似。

讨 论

(1) 有机磷农药在化学稳定性及在生物体内积累方面都不如有机氯农药明显,因此它对鱼类的毒害作用往往没有受到应有的重视。有机磷农药对鱼类的主要毒理作用是抑制鱼体内胆碱酯酶的活力,造成中枢和外周神经系统以及神经肌肉接点功能失调,从而广泛影响鱼的生存能力(如摄食、避敌、抗病等等)。在马拉硫磷对白鲢鱼种的亚急性实验中,鱼中毒后摄食减少,肠道内食物少于对照组。我们也曾作了一次对硫磷对白鲢鱼种的亚急性致毒实验,由于鱼感染寄生虫病而中断实验。在上述几组实验中我们发现鱼脑胆碱酯酶活力的抑制程度和自然感染疾病的敏感性都随着药物浓度的提高而增加。药物浓度分别为 96 小时 TL_m 值的 10% 及 50% (均超过一般规定的安全浓度)时,两组实验开始 10 天后鱼发病,19 天死光,另两组药物浓度为 96 小时 TL_m 值的 5% 及 1% (均在安全浓度以下),鱼 13 天才发病,22 天死光。而对照组 22 天才发病,25 天死光。

在对硫磷对金鱼的慢性致毒实验中,也发现高浓度组的鱼神经麻痹,运动迟缓。

以上资料说明有机磷农药在亚致死浓度条件下,虽然不会直接造成鱼死亡,但是显然降低鱼的生存能力。

(2) 测定正常鱼脑胆碱酯酶活性,发现鱼的种类、年龄,水温及不同水体的影响不大。除酚及氨基甲酸酯农药西维因以外,其它非有机毒物如氯化高汞、六六六、滴滴涕、三硝基甲苯在 $0.5 \times \text{TL}_m$ 浓度下,都对鱼脑胆碱酯酶活力影响不大。所以用鱼脑胆碱酯酶的抑制作为监测有机磷农药及氨基甲酸酯农药污染是一个较专一的、有实用价值的指标。

(3) 我们测得的正常白鲢、鲤鱼脑胆碱酯酶活力与 Weiss^[2,5]、Gibson^[3] 和 Coppage^[4] 所测得的正常鱼脑数值相近。关于酶活力正常值,Weiss 认为有 12—15% 的变动范围,Coppage 认为至少抑制 13% 才表明污染存在。我们测定了实验室暂养的白鲢鱼种个体标准差 S 为 0.34,在这样的 S 值情况下,酶活力下降 15% 即可表明存在污染。但是天然水体鱼脑胆碱酯酶活力个体差异较大,标准差高达 0.67,这样,酶活力抑制须达 30% 以上才能确定存在污染。要减少误差需适当增加取鱼数。为了减少测定次数,可以每次测定 5 个鱼脑混合样。实验室暂养的鱼种,脑胆碱酯酶变动范围不大,所以若有条件,宜用污染的水,在实验室内用同一规格、同一种类和经过暂养 1—2 周的鱼种来检查污染情况,结果可以更加准确。

(4) 白鲢、鲤鱼、团头鲂和金鱼脑胆碱酯酶活性都是有规律地随着有机磷农药浓度增高而抑制加强,因此可以因地制宜,任选其中一种鱼作为监测用。其中鲤鱼对有机磷农药反应较敏感,它属于底层鱼类,而一般情况是水体底质的污染程度较水中为高,故可优先选择鲤鱼作监测指标的指示生物。

(5) Coppage 认为在有机磷农药急性中毒的情况下,鱼脑胆碱酯酶抑制到活力仅为正常值的 17.7% 是致死水平,低于此值鱼会死亡,并认为此值有普遍意义。我们的急性致毒实验中有些有机磷农药也得到类似的结果,中毒 4 天酶活力抑制达一定的平衡值。但是有些农药如杀螟松,使酶活力仅降低到 68% 即可出现死亡,而敌敌畏引起死亡时,酶活力可低至 5.8%。

在慢性实验中,鱼长期连续中毒,会使胆碱酯酶抑制更深。用含 0.072ppm 对硫磷的水养鱼 133 天后,存活的鱼的脑胆碱酯酶可以低到仅为正常值的 18.6%。这与 Gibson 的实验结果是一致的。高浓度短时间对硫磷致毒比低浓度长时间致毒对脑胆碱酯酶抑制程度要小, Gibson 的结论是抑制程度不一定与抑制剂量和时间相关。我们认为这种解释是不够全面的。因为金鱼慢性实验证明在同样的长时间中毒情况下,高浓度组比低浓度组抑制要深。急性实验也证明,同一浓度随着时间延长、抑制程度也增加。从急性、慢性中毒结果综合分析,有机磷农药浓度与致毒时间两个因素都会影响酶活力抑制程度。

天然水体污染常常是低浓度长时间的慢性作用,由于时间长,虽然浓度低也会使鱼脑胆碱酯酶活力显著受到抑制,由此可以用鱼脑胆碱酯酶敏感地测出天然水体被有机磷污染的情况。而且由于酶的抑制状况可以持续数周,还可以用此法追查以往一段时间内的污染。

在对硫磷使金鱼慢性致毒实验中,本室化学组分析了鱼肉中对硫磷的残留量。中毒 133 天使有机磷农药在鱼体内积累比天然水体中的鱼高达 74.4—234 倍,这个结果是值得注意的。水中对硫磷浓度为 0.18、0.072、0.036、0.0072ppm 时,鱼肉含对硫磷相应为 14.0、6.52、2.68、1.69ppm 脑胆碱酯酶相对活力相应为 14.2、18.6、26.1、34.9%。在清水中恢复 14 天后鱼肉含对硫磷残毒相应下降至 0.08、0.07、—(没有测定)0.027ppm,其相对酶活力相应为 41.8、54.2、73.0、76.4%。由上看出,鱼体中对硫磷残毒与鱼脑胆碱酯酶活力成反比关系,因此我们有可能从鱼脑胆碱酯酶的抑制程度来推测鱼体残毒的含量。

(6) 鱼发生有机磷农药慢性中毒时测定鱼脑胆碱酯酶活力变化,发现随着时间的延长,酶活力降至一定水平后略有回升,这和鱼的中毒症状有所减轻是一致的,这种现象可能与鱼体产生适应,脑中代偿功能增加有关。但其作用机制有待进一步研究。

(7) 有机磷农药急性、亚急性和慢性中毒的鱼,养于清水若干天以后,酶活力均有所恢复,这结果与 Weiss 作的关于金鱼急性中毒后恢复的报道是一致的。我们的实验进一步表明恢复的程度与农药的性质、浓度以及水温有关。鱼脑胆碱酯酶抑制越深,恢复越慢。金鱼经 0.0072ppm 对硫磷致毒 133 天后,脑胆碱酯酶活力为正常值的 34.9% 鱼体内有机磷农药残毒积累达 1.69ppm,但是转入清水养 14 天后酶活力可恢复达正常值的 70% 以上,体中残毒降至 0.027ppm,而高浓度组则需更长时间才恢复。

考虑到有机磷不稳定性及酶活力的可恢复性,在污染水体中捕获的鱼如果放在 20℃ 以上清水中暂养约一个月,当可达到食用标准。但在低温时需延长时间。这个问题在污染水体的治理及控制有机磷农药污水排放周期时应予考虑。

(8) 六六六与对硫磷联合致毒结果表明,虽然六六六本身对脑胆碱酯酶没有抑制作用,但是高浓度六六六会增加对硫磷对胆碱酯酶的抑制作用,六六六与对硫磷联合致毒的结果增加了对硫磷的毒性。这与 Triolo 等人用艾氏剂、异狄氏剂喂小鼠,1 小时后可增加对硫磷的毒性的结果是一致的。这种增加毒性的原因尚不清楚,有机氯艾氏剂增高对氧磷的毒性是由于它影响水解对氧磷的 A-酯酶,以致破坏对氧磷的水解,使毒性增加^[10]。这类情况是否能用于解释六六六的增毒效应还有待进一步的研究。但是从高浓度六六六增加对硫磷对鱼脑胆碱酯酶的抑制作用来看,制定渔业水质指标的安全浓度必须慎重,不能仅凭单因子的毒物实验结果,还要考虑综合因素的影响,才能制定出更符合实际情况的

排放标准。

结 论

(1) 鱼脑胆碱酯酶的活力受鱼龄、鱼的种类、水温以及水体地理条件等自然因素的影响不大,可以作为监测水体污染的指标。

(2) 鱼脑胆碱酯酶,特异地受有机磷农药及氨基甲酸酯类农药如西维因的抑制,抑制程度与鱼的种类、农药性质、浓度和作用时间长短相关。

(3) 鱼在有机磷农药急性、慢性中毒后,转入清水饲养数周可以使酶活力有所恢复。恢复的程度与抑制程度和恢复时间的长短及温度相关。

(4) 六六六与对硫磷联合致毒时,高浓度六六六可增加对硫磷抑制胆碱酯酶的作用。

参 考 资 料

- [1] Chadwick, L. E. & D. L. Hell, 1947. *J. Neurophysiol.*, **10**: 235.
- [2] Weiss, C. M., 1959. Response of fish to sublethal exposures of organic phosphorus insecticides. *Sewage & Industr. wastes*, **31** (5): 508.
- [3] Gibson, J. R. et al., 1969. Sources of error in the use of fish-brain acetylcholinesterase activity as a monitor for pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **4**: 17.
- [4] Coppage, D. L., 1972. Organophosphate pesticides: specific level of brain Acetylcholinesterase Inhibition related to death in sheepshead minnows. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **101**: 534.
- [5] Weiss, C. M., 1958. The determination of cholinesterase in the brain tissue of three species of freshwater fish and its inactivation in vivo. *Ecology*, **39**: 194.
- [6] Holland, H. T. et al., 1967. Use of fish brain Acetylcholinesterase to monitor pollution by organophosphorus pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2**(3): 156.
- [7] Hogan, J. W., 1970. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **5**: 347.
- [8] Hestrin, S., 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.*, **180**: 249.
- [9] Lowry, O. H. et al., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- [10] 医学科学译丛——农药中毒与农药毒理学专辑 1964。26 页。
- [11] Mukherjee, S. & S. Bhattacharyee, 1974. Effect of some industrial pollutants on fish brain cholinesterase activity. *Environ. Physiol. & Biochem.*, **4** (5): 226.
- [12] Triolo, A. J. et al., 1966. Toxicologic interactions of chlorinated hydrocarbon and organophosphate insecticides. *J. Agr. Food Chem.*, **14**(6):549.