

专论与综述

鱼脑乙酰胆碱酯酶 (AChE) 在水体监测中的指示作用*

万 良 庐

(江西大学生物系)

有机磷(Organophosphate, 简称 OP)和氨基甲酸酯农药大约包括 200 种化合物, 主要用作杀虫剂, 还可作为杀螨剂、驱虫剂、杀线虫剂、杀鼠剂、杀菌剂、除草剂、植物生产调节剂等。它的主要毒理作用是抑制生物体内乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, 简称 AChE) 的活性, 造成兴奋性神经递质——乙酰胆碱的过量积聚, 导致神经性中毒。OP 农药杀虫效率高, 半衰期短, 对脊椎动物的危害较无脊椎动物小, 得到了日益广泛的使用^[1]。但由于农药厂在生产过程中将大量未经处理的污水排入江河, 以及施药区域的农业径流也会进入水体, 使污染日趋严重, 从而危害鱼类等水生生物, 影响人体健康。因此, 在评价水质状况时, 水体中 OP 的含量是一个重要的指标。

近十余年来, 国内外研究用酶法监测水体 OP 污染, 进展很快。Weiss^[2] 首先提出用鱼脑 AChE 活性的抑制程度, 可以估价 OP 对水体的污染。Holland 等^[3] 首次根据鱼脑 AChE 的变化, 监测水体 OP 污染, 取得成功。

此法灵敏度高, 在一般化学分析难以测定时, 也表示出显著的抑制。如翻车鲀 (*Leptomis cyanellus*) 在 0.6ppbo-甲基-o-环己基磷酰氟中毒 24 小时, AChE 活性仅为正常值的 49.5%^[2]。分析工作所需设备简单, 花费不多, 操作迅速, 是一项极有前途的监测方法。目前, 此法已逐渐成熟, 在实际使用中获得了很高的评价。但对表明 OP 污染的 AChE

抑制临界值尚有争论。在减少实验误差, 提高监测精确性方面, 还需做进一步的工作。现将有关问题分几部分综述如下。

一、OP、氨基甲酸酯对 AChE 的特异性抑制

国内外许多研究者作了大量的体外实验和活体实验^[4-9]。结果表明, OP 和氨基甲酸酯能特异地抑制鱼 AChE 活性, 而其它种类的水体污染物, 如有机氯农药、有机金属化合物、重金属离子、无机盐的作用却很小。部分水体污染物的鱼 AChE I_{50} (抑制 50%) 值

表 1 部分水体污染物对鱼 AChE 的抑制 (体外实验)

OP 或氨基甲酸酯农药	$I_{50}(M)$	其它种类污染物	$I_{50}(M)$
虫草灵	4.9×10^{-8}	亚砷酸盐	3.2×10^{-5}
毒扁豆碱	3.2×10^{-7}	Cu^{2+}	1.6×10^{-4}
新斯的明	7.1×10^{-7}	Co^{2+}	5.7×10^{-4}
灭虫威	7.1×10^{-7}	Hg^{2+}	1.6×10^{-3}
吡啶威	8.9×10^{-7}	狄氏剂	2.2×10^{-3}
自克威	1.8×10^{-6}	甲基汞	5.0×10^{-3}
米特西尔*	3.9×10^{-6}	苯基汞	5.7×10^{-3}
西维因	3.9×10^{-6}	Pb^{2+}	7.1×10^{-3}
马拉氧磷	1.8×10^{-5}	艾氏剂	1.0×10^{-2}
马拉硫磷	5.7×10^{-5}	高丙体六六六	$> 1.0 \times 10^{-2}$
苯胺灵	8.0×10^{-5}	DDT	$> 1.0 \times 10^{-2}$

* 即 Mitacil, 国内尚无统一译名

引自 Olson 等^[4]、Abou-Donia 等^[7]

* 本文得到屠惠康讲师、洪瑞川讲师指导, 并承蒙水生所陈受忠副研究员、杨端老师, 本系邓宗觉教授、曾小鲁副教授、薛士良副教授、林光华副教授审阅全文, 谨致谢意。

列于表 1。可以看到, OP 和氨基甲酸酯的 I_{50} 值比其它种类约低几个数量级。

进一步的实验表明, 酶活性的抑制程度与药物浓度和致毒时间成正相关。图 1 为对

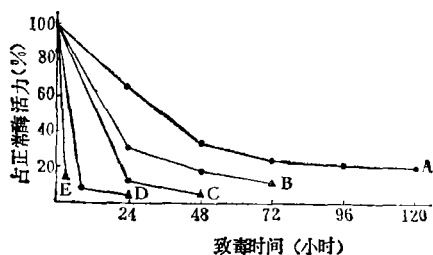


图 1 不同浓度对硫磷对鳊鱼脑 AChE 的抑制作用

●——没有死亡; ▲——发生死亡; A——5ppb;
B——10ppb; C——100ppb; D——2000ppb;
E——5000ppb.

引自 Coppage^[10].

硫磷对鳊鱼 (*Cyprinodon Variegatus*) 的急性中毒和慢性中毒实验结果^[10]。可以看到, 随着药物浓度增大, 酶的抑制程度加深, 在高浓度组发生死亡。酶的活性开始随致毒时间增加而急剧下降, 然后相对稳定在某一水平上。一般认为, 酶活性降至正常值的 17.7% 是鱼不致死的下限^[5,10], 但也有明显的例外。此外, 酶的抑制程度还与药物的种类, 及鱼对药物的敏感性有关。如果多种药物联合致毒, 常常有协同作用^[4,5]。因此, 在实际制订某种药物的安全浓度时, 必须考虑到这一点。鱼在有机磷中毒后, 最初的反应为游动时失去平衡, 继而反应迟钝, 甚至出现尾骨折断、畸形、弯尾等症状, 最终发生死亡^[5,11]。在亚致死浓度时, 虽然不会直接导致鱼的死亡, 但鱼对疾病的敏感性增加, 生存能力下降。

受 OP 抑制的鱼转入清水饲养数周, 酶的活力可以复原。酶活力恢复至正常水平所需要的时间, 与酶的抑制程度、鱼及药物的种类有关。用 *o*-甲基-*o*-环己基磷酰氟对金鱼 (*Carassius auratus*)、翻车鲀、鳊鱼致毒 24 小时, 酶活性分别降为正常值的 43%, 52%, 32%。转入清水 13 天后, 酶活性分别恢复至正常值的 62%, 100%, 93%。如果在恢复期

间再次致毒, 则 AChE 对 OP 的敏感性将显著增加^[2]。因此, 反复进行的慢性中毒效应可以累积。

虽然大多数 OP 及氨基甲酸酯农药对 AChE 都能产生特异性抑制, 但少数药物, 如苯胺灵的毒性却很小^[4]。而某些其它种类的水体污染物, 如亚砷酸盐^[4]、苯酚^[5]的抑制作用却较强。因此, 在用鱼 AChE 监测水体 OP 和氨基甲酸酯污染时, 还必须慎重。

二、AChE 在水体监测中的指示作用

鱼脑 AChE 含量丰富, 尤以间脑下叶酶活性最高, 依次为视叶、延髓、小脑、大脑^[12], 酶活性对水质变化敏感, 可作为 OP 和氨基甲酸酯农药污染的可靠指标。

鱼捕获后, 可斩头或用丙酮^[13]杀死, 取脑制备酶匀浆, 立即测定酶活性。如果不能立即测定, 必须将鱼脑尽快冷冻, 低温保存。-15℃ 干冰保存鱼脑至数周, 仍可保持酶活力不变。而在常温下, 由于酶的自溶及细菌作用, 酶活力将急剧下降^[2,3,5]。

酶活性的测定, 大多数研究者都采用 Ellman 等法, 或 Hestrin 氏法。Ellman 等^[14]法, 是在鱼脑酶匀浆中加入硫代乙酰胆碱作为酶的基质, 水解产物硫代胆碱与显色剂 DTNB [5,5'-二硫代-双(2-硝基苯甲酸)]作用, 生成黄色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸, 在 412mμ 下用分光光度法测定。这种方法不仅广泛用于手工分析, 还普遍运用于自动分析^[4,15,16]。Hestrin 氏法^[17]是为测定乙酰胆碱及其它短链 *o*-酰基衍生物而设计的。短链羧酸酯、内酯、酞能与羟胺在碱性溶液中专一性地定量反应, 生成肟酸。肟酸与显色剂三氯化铁在酸性条件下生成紫褐色肟酸铁络合物, 可在 520—540mμ 下比色定量。从鱼脑酶匀浆所加入的乙酰胆碱量中, 减去所得值, 即为酶所水解的量。酶的活力单位为: 每毫克鲜脑组织每小时所水解乙酰胆碱的微克分子数 (微克分子/毫克脑组织/小时); 或者每毫克脑蛋

白质每小时所水解乙酰胆碱的微克分子数(微克分子/毫克蛋白质/小时)。脑组织中蛋白质的含量可用 Folin-酚法^[18]测定。也有一些研究者通过测定样品在酶促反应中释放出来的乙酸^[13]、CO₂^[19]或-SH^[20]来确定 AChE 的水平。近年来,国外对 AChE 活性及蛋白质含量的分析已趋于自动化。例如使用美国 Technicon 仪器公司所生产的自动分析仪,每小时可分析样品 20—40 个。不仅速度快,而且可分析范围广,灵敏度高。

在将 AChE 作为 OP 污染的监测指标时,必须充分考虑各种因素,诸如鱼种、鱼龄、体重、性别、水温、季节等对酶活性的影响。用于水质监测的鱼应是丰富易得、敏感性高的种类。中国科学院水生所^[5]在研究了我国主要淡水养殖鱼类的酶活性后提出,白鲢、鲤鱼、团头鲂及金鱼的脑 AChE 都有规律地随着 OP 浓度的增加而被抑制,可任选一种作监测用。在用鱼酶活性监测同一水体不同区域的污染时,还必须考虑到鱼的迁移性^[21]。鱼龄及体重的增大,导致脑重增加,单位重量脑组织(或蛋白质)的酶活性也随着减小^[2,3]。这种变化是由于脑中非神经成分增多,神经突触在脑重中所占的比例减小。据报道,鱼的性别对酶活性无显著影响^[10,22],而季节与水温对酶活性的影响尚有争论^[5,10,11,22],这在一定程度上反映了自然水体的多样性、复杂性。

从目前的研究情况看来,对表明存在 OP 或氨基甲酸酯污染的鱼脑 AChE 抑制临界值,争论还较多,这是影响此法推广应用的一个主要问题。Nicholson^[23]提出,酶活性抑制 10%,即表明存在污染。Gibson 等^[12]分析了使用这种方法时,产生误差的可能来源,指出即使在细心控制实验条件的情况下,将下降 10%作为污染的依据,也会导致错误的结论。而 Coppage^[10]将抑制 13%作为污染的临界值。水生所^[5]认为,由于天然水体鱼脑 AChE 个体差异大,标准差高,酶活力抑制 30%以上才能确定有污染。造成这种分歧的原因可

能是多方面的。例如,不同种类鱼脑 AChE 对 OP 的敏感性不同;鱼脑中非神经成份的含量不定;鱼间脑下叶结构松散,取样时易于丢失;干冰中有时含有杂质;加上自然水体各种因素的变化,导致酶活性变异大,标准差高。因此,进一步研究实验误差产生的原因,设法减少标准差,以提高监测的精确性,是使此法更加完善的一个重要问题。许多研究者都指出,选择合适的实验鱼种,适当增大取样样本,多个鱼脑混合取样,在实验室内用被测水体的水来检查酶活性的抑制程度,都有助于达到上述目的。

下述几例用此法监测 OP 污染,都获得了良好的效果。

Holland 等^[3]于 1965 年 10 月至 1966 年 11 月,在美国南卡罗来纳州大西洋沿岸设置 43 个采样点,定期测定鱼脑 AChE 活性。发现 Ashley 河附近和特里尼蒂湾东边的酶活性分别只有正常值的 73—88%,75—84%。结果表明,Ashley 河畔有机磷农药厂所排放的污水,已造成了河水的污染。

Coppage^[21]于 1972 年 7 月、10 月,两次调查了农药厂对 Missouri 河的污染情况。他在 Missouri 河的污水排入口,及上、下游不同区域,分别测定了两种鲤鱼(*Cyprinus carpio*, *Carpoides* sp.)及大西洋鲱(*Dorosoma cepedianum*)的酶活性。结果表明,鲤鱼的抑制程度与采样地点毒物的浓度成正相关,可作为 OP 和氨基甲酸酯农药污染敏感、可靠的指标。而大西洋鲱的抑制程度比较稳定,因为它是迁移性强的鱼种。

水生所^[5]于 1974 年及 1975 年用此法评价湖北省鄂城县 YJ 湖及 GT 水库的水质。以未知有 OP 污染的武汉市东湖鲫鱼脑活性为本底值,测得 YJ 湖鲫鱼脑活性仅为正常值的 18.6%,GT 水库为 66.4%。化学分析表明,YJ 湖鲫鱼肉 OP 含量达 1.3—1.4ppm,GT 水库酚含量超标。

- [28] Galzigna, L. *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, 26, 391 (1969).
[29] Johnson, M. K., *J. Neurochem.*, 23, 785 (1974).

- [30] Heywood, R. *et al.*, *Toxicol. Lett.*, 2, 11 (1978).
[31] Lieske, C. N. *et al.*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 13, 205 (1980).

土壤氟污染及其危害

余 大 富

(中国科学院成都地理研究所)

一、土壤氟污染概述

1. 涵义 接受外源氟的土壤不一定发生氟污染, 因为一定限量的氟将有益于生命活动^[1,2]. 因此, 在缺氟地区, 少量氟进入土壤无异于增加了土壤中的微量营养元素. 大量氟进入土壤出现下述表征之一者可视为土壤氟污染^[3,4,5,6]: (1) 土壤氟的小范围异常富集, 并呈现出由表层向下逐渐减少的剖面变化趋势; (2) 土壤水溶性氟的绝对含量及其在全氟中的比例显著升高 (未污染的正常土壤水溶性氟通常含量为 0.3—0.5ppm^[12]); (3) 作物生长发育受到抑制, 收获物中氟残留量增高; (4) 局部地下水出现非其它原因的氟污染.

2. 污染概况 大多数土壤氟污染事例出自于炼铝厂、炼钢厂、磷酸盐生产和烧制砖瓦的工厂附近地区以及施用磷酸盐肥料的土地上. 例如苏格兰炼铝厂、捷克斯洛伐克炼铝厂、美国蒙大拿化工厂、瑞士伐累地区的炼铝厂和磷酸盐工厂、Ohio 炼铝厂等周围地区出现土壤氟污染的情况都已有报道^[5,8]. 土壤氟污染的程度受进氟形式和进氟强度 (数量和速率) 的影响. 据资料^[5], 捷克斯洛伐克炼铝厂附近土壤接纳的氟为 10.7 公斤/公顷·年. 美国宾夕法尼亚地区有代表性的施肥水平 (50—100 公斤 P_2O_5 /公顷·年) 使土壤净增氟 5—10 ppm/公顷·年^[9].

迄今, 我国的土壤氟污染以工业氟源附近为主, 特别是在数量多且分散于全国各地的磷肥厂附近. 据我们和其它单位^[3]对西南地区十几个磷肥厂附近地区的调查, 绝大多数厂附近或沿下风向 1—5 公里范围内都不同程度地出现了土壤氟污染. 规模较大的钢铁厂和炼铝 (铝制品) 厂虽为数较少, 但一旦发生土壤氟污染, 其范围比磷肥厂污染范围远得多^[7,10].

使用含氟污水灌溉可能导致土壤积累氟^[11], 但经脱氟处理的污水一般不致造成氟对土壤的污染.

3. 影响因素 风向、降水等级对土壤氟污染的强度、程度有显著影响. 下风向比上风向土壤污染严重, 降水量大而季节性明显的地区土壤氟污染较轻. 如苏格兰某炼铝厂下风向 7 英里处土壤含氟量为对照土壤的 4 倍, 而上风向 3 英里处就已接近对照土壤的含氟量了^[5]. 我们调查到了风向的类似影响^[4].

地形和植被对外源氟进入土壤和氟从土壤中排走或积累的过程有很大影响^[5,8,10], 土地利用形式的影响也很显著^[3]. 此外, 土壤含氟背景值在世界各地悬殊很大 (0—184,000ppm^[5], 常见浓度为 50—800ppm^[8]), 因此, 引起各地土壤氟污染的外源氟添加量显然也是很不相同的.