

乙酰胆碱酯酶和发光菌检测有机磷农药毒性研究

贾玉玲¹, 蔡强¹, 彭惠民², 钟平方⁴, 何苗³, 施汉昌³

(1. 浙江清华长三角研究院生态环境研究所, 嘉兴 314000; 2. 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016; 3. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084; 4. 重庆三大伟业制药有限公司, 重庆 402460)

摘要:有机磷农药(organophosphorus pesticides, OPs)污染形势严峻. 研究采用乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)和T₃发光菌2种生物检测法,在急性毒性实验基础上,研究了几种有机磷农药的联合毒性,为今后OPs检测标准的制定提供参考. 实验结果表明,在最佳反应条件下,AChE对不同OPs的敏感性不同,敌敌畏 > 敌百虫 > 乙酰甲胺磷 > 氧乐果 > 三唑磷,对5种OPs的检出浓度分别为1.69、3.78、4.03、7.32和8.03 μg/mL;利用T₃发光菌检测有机磷农药的单一毒性,表明发光菌相对发光率与OPs浓度呈负相关,相关系数在0.93~0.98,OPs对T₃发光菌的半数效应浓度(EC₅₀)分别为0.398、0.712、0.152、0.094、0.140 mg/mL,毒性大小顺序为:乙酰甲胺磷 > 三唑磷 > 氧乐果 > 敌敌畏 > 敌百虫;利用2种方法评价5种OPs的联合作用,表明OPs二元混合物联合作用方式为协同作用和部分相加作用.

关键词:有机磷农药;乙酰胆碱酯酶;发光菌;急性毒性;联合毒性

中图分类号:X502 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)06-1820-05

Detection of the Toxicity of Organophosphorus Pesticide with Acetylcholinesterase and Luminescent Bacterium

JIA Yu-ling¹, CAI Qiang¹, PENG Hui-min², ZHONG Ping-fang⁴, HE Miao³, SHI Han-chang³

(1. Department of Environmental Technology and Ecology, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Zhejiang Jiaxing 314000, China; 2. Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 4. Chongqing SAN-DA Pharmaceutical Company, Chongqing 402460, China)

Abstract: Organophosphorus pesticides(OPs) can lead to serious environmental pollution problems. Whose bioeffect of multi-OPs is still lack of consideration although single component has been studied. To evaluate joint acute toxicity of OPs, two bioassay, AchE and T₃ luminous bacterium, were studied, The result shows that: The sensitivity of AchE to different OPs are different: dichlorvos > trichlorfon > acephate > omethoate > triazophos, the detection limit of five kinds of OPs are 1.69, 3.78, 4.03, 7.32 and 8.03 μg/mL. Detecting the single toxicity of OPs with method of T₃ luminous bacterium, the relationship between luminous efficiency of luminous bacterium and the concentration of OPs is negatively correlated, and the correlation coefficient is between 0.93 and 0.98, the EC₅₀ value of OPs to T₃ luminescent bacterium are 0.398, 0.712, 0.152, 0.094, 0.140 mg/mL, the toxicity order of OPs to T₃ luminous bacterium is: acephate > triazophos > omethoate > dichlorvos > trichlorfon; Using such two kinds of methods to evaluate the joint toxicity of OPs showed that the joint mode action of binary mixtures of OPs includes the synergy effect and partial additive effect.

Key words: organophosphorus pesticides (OPs); acetylcholinesterase; luminescent bacteria; acute toxicity; joint toxicity

农药是用于预防、消灭或控制病、虫、草和其他有害生物以及调节植物、昆虫生长的一种物质或几种物质的混合物^[1]. 有机磷农药因相对于有机氯农药容易降解,在环境中残留时间较短,20世纪80年代后被大量用于病虫害的防治.

有机磷农药(organophosphorus pesticides, OPs)是一类含有C—P键或C—O—P、C—S—P、C—N—P键的磷酸酯类或硫代磷酸酯类,是一类神经性毒物^[2]. 各种OPs毒性不同,但大多属剧毒和高毒类.

常见的仪器检测方法可精确定量样品中污染物的种类和含量,如气相色谱法、高效液相色谱法

等^[3],但这些方法检测成本较高,样品前处理复杂,不能直接判断环境中污染物毒性大小,在毒性快速预警方面的应用受到限制. 酶抑制法是目前最为常用的快速检测有机磷农药含量及毒性的方法之一,目前在国内外已被广泛应用,例如试纸条、酶生物传感器等,但其检测灵敏度略低于仪器检测法. 常用于检测环境中OPs的酶主要为乙酰胆碱酯酶

收稿日期:2010-07-13;修订日期:2010-10-11

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA062419);浙江省重点科技计划项目(2006C23069);浙江省自然科学基金项目(Y507081);浙江省重大科技项目(2007C13010)

作者简介:贾玉玲(1984~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境监测, E-mail: archer200224@163.com

(acetylcholinesterase, AChE), 其检测原理是有机磷农药的抑制作用^[4,5]. 发光菌毒性检测法的检测原理是根据反应前后发光菌发光强度的变化率确定有毒物毒性大小, 具有成本低、操作简单、反应灵敏等优点, 因此被广泛应用于各种工业废水^[6,7]和地表水^[8]的毒性监测.

为了能够准确及时反映水体中有机磷农药的污染状况, 实现在线预警监测, 需要将确证性检测与毒性检测方法结合起来. 酶检测方法一方面具有检测成本低、易于操作等优点, 另外还可实现半定量分析, 因此满足在线预警监测需求; 发光菌检测法是目前应用最广泛的毒性评价检测方法, 也满足在线预警监测需要.

本研究利用自制的 AChE 首先测定了 5 种 OPs 的急性毒性, 之后测定其联合毒性, 并与发光菌毒性检测结果做比较, 以期今后 OPs 检测方法的选择及运用提供研究基础, 也为今后饮用水在线监测预警体系的建立提供基础.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高速冷冻离心机(湘仪, TGL-20M), 紫外可见分光光度计(岛津, UV-Probe2450), AL204-IC 电子天平(Mettler-Toledo); 6173 酸碱度/氧化还原/温度-台式测试仪(Jenco); Milli-Q Academic 超纯水器(Millipore); 88-I 型定时恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); 水质毒性快速检测仪(BHP9511, 北京滨松光子技术股份有限公司); 电热恒温培养箱(SHP-150); 立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-50FA); 净化工作台(SW-CJ-1D); 微量振荡器(MH2).

实验所用试剂: 自制 AChE [酶比活为 458.43 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, 实验每次用 20 μL]; 明亮发光杆菌(*photobacterium phosphoreum*) T_3 变种, 中国科学院南京土壤研究所; 胰蛋白胨, 琼脂粉, 酵母提取物, 均购自国药集团. 牛血清白蛋白(BSA), 考马斯亮蓝 G-250, 二硫代二硝基苯甲酸(DTNB), 硫代乙酰胆碱(ATCh), 硫代丁酰胆碱(BTCh), 均购自 SIGMA 公司. 80% 敌敌畏(dichlorvos) (湖北沙隆达), 30% 乙酰甲胺磷(acephate) (湖北沙隆达), 40% 氧乐果(omethoate) (沙隆达郑州农药), 90% 敌百虫(trichlorfon) (南通江山农药化工), 30% 三唑磷(triazophos) (湖北沙隆达). 数据分析采用 Origin 8.0.

1.2 实验方法

1.2.1 乙酰胆碱酯酶毒性实验

将 5 种农药稀释为不同浓度梯度(8 000 ~ 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液, 按酶活测定方法^[9], 加入底物后迅速加入 20 μL 不同浓度农药和显色剂混匀, 412 nm 处测定吸光度值的变化. 以农药浓度对数值为 X 轴, 抑制率为 Y 轴作图. I 为抑制率(%); E_1 为无农药抑制时的酶液活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$]; E_2 为某一浓度农药抑制时酶液的活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$].

$$\text{抑制率 } I(\%) = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 100\%$$

实验采用 Mansour 等^[10]提出的等毒法评价 5 种 OPs 二元混合物的联合抑制效应, 通过共毒系数的计算, 评价混合物的联合作用. 计算 5 种 OPs 对 AChE 的半数抑制浓度值 IC_{50} , 将 5 种 OPs 按照其 IC_{50} 值一半的浓度两两混合, 则预期抑制率应该是 50%, 那可由实际测得抑制率和预期抑制率计算共毒系数.

$$\text{共毒系数} = \frac{\text{实测抑制率} - \text{预期抑制率}}{\text{预期抑制率}} \times 100$$

如果共毒系数在 10 ~ 20 之间, 表示有弱的协同作用, 当其 > 20 时, 表示有协同作用; 共毒系数在 -20 ~ -10 之间时, 说明 2 种有毒物有弱的拮抗作用, 而当其 < -20 时, 表示为拮抗作用; 当共毒系数值在 -10 ~ 10 之间时, 表示为简单的相加作用^[11].

1.2.2 T_3 发光菌毒性试验

T_3 发光菌培养基和培养方法参照文献 [12, 13].

利用 3% NaCl 配制系列浓度的有机磷农药, 各吸取 2 mL 于比色管中, 用 2 mL 3% 的 NaCl 溶液作空白对照, 每个浓度做 3 个平行, 然后迅速吸取 50 μL T_3 发光菌液^[14], 比色管中摇匀, 采用已经改进的毒性检测方法^[15], 15 min 后用生物毒性测试仪测定发光强度, 计算相对发光率^[16].

$$\text{相对发光率} = \frac{\text{样品发光强度}}{\text{对照发光强度}} \times 100\%$$

根据预实验, 找出抑制率为 50% 时的浓度, 再按照等对数间距设置 5 ~ 8 个浓度梯度, 计算发光菌发光抑制率为 50% 时的农药浓度, 然后对农药浓度和相对发光率进行回归分析, 计算半数效应浓度 $EC^{[17]}$.

关于联合毒性评价, 采用毒性单位法(由 Sprague 和 Ramsay 提出)、相加指数(1977 年由 Marking 提出)和混合毒性指数法(1981 年由

Kobnemann 提出)^[18]. 将 5 种 OPs 按照等浓度 (mg/mL) 混合, 测定各混合物对发光菌的毒性, 回归分析求得 EC_{50} (方法同发光菌单一毒性测定), 根据上述联合毒性评价方法评价 OPs 的联合毒性.

2 结果与讨论

2.1 乙酰胆碱酯酶毒性试验

根据分析结果可知, 5 种 OPs 对鱼脑 AChE 的毒性不同. 敌敌畏对 AChE 活性的抑制作用最大 (图 1). 据报道^[19], 以酶活性抑制率 16% 为标准, AChE 对敌敌畏最敏感, 检出浓度为 $1.69 \mu\text{g/mL}$, 敌百虫检出浓度为 $3.78 \mu\text{g/mL}$, 2 种 OPs 的检出浓度均低于已有研究结果. AChE 对乙酰甲胺磷、氧乐果及三唑磷的检出浓度分别为 4.03 、 7.32 和 $8.03 \mu\text{g/mL}$. 不同 OPs 对鱼脑 AChE 的毒性作用和敏感性不同: 敌敌畏 > 敌百虫 > 乙酰甲胺磷 > 氧乐果 > 三唑磷.

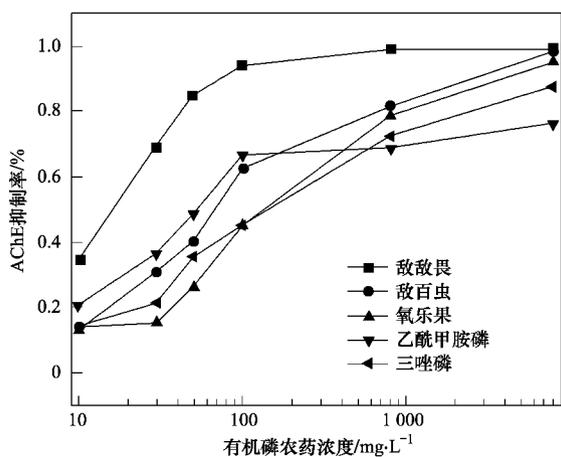


图 1 5 种有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制曲线

Fig. 1 Inhibition curve of five kinds of OPs to AChE

AChE 对不同 OPs 的敏感性存在差异, 可能是由于 AChE 对不同种类的 OPs 化学结合力不同, 即分子结构不同造成的. 敌敌畏是 5 种农药中毒性极高、残留时间长的高毒物质, 并且在我国已经被明令禁止使用. 据研究一般含有手性原子的 OPs 比不含手性原子的农药毒性强, 且对 AChE 的抑制力也强, 而含有手性磷原子的农药又比含有手性碳原子的毒性强, 分别含有一个手性碳原子和手性磷原子的 OPs 毒性最强. 敌百虫和氧乐果只含有一个手性碳原子, 乙酰甲胺磷分别含有一个手性碳原子和手性磷原子, 三唑磷均没有 2 种手性原子, 所以毒性乙酰甲胺磷 > 氧乐果 > 三唑磷, 敌百虫毒性之所以大于乙酰甲胺磷, 可能是由于敌百虫在 PBS 缓冲液中 ($\text{pH} = 8.0$) 反应时, 部分转

化为毒性更强的敌敌畏^[20].

在上述实验结果基础上, 通过计算 IC_{50} , 求共毒系数, 结果如表 1. 根据表 1 可知, 5 种有机磷农药两两组合, 10 种二元混合物的共毒系数均在 37 ~ 45 之间, 表现为协同作用.

表 1 有机磷农药混合物联合作用结果

Table 1 Results of the joint effects of the mixture

混合物组成	预期抑制率	实测抑制率	共毒系数 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	作用结果
敌敌畏 + 敌百虫	0.5	0.697	39.4	协同作用
敌敌畏 + 氧乐果	0.5	0.721	44.2	协同作用
敌敌畏 + 乙酰甲胺磷	0.5	0.686	37.2	协同作用
敌敌畏 + 三唑磷	0.5	0.699	39.8	协同作用
敌百虫 + 氧乐果	0.5	0.716	43.2	协同作用
敌百虫 + 乙酰甲胺磷	0.5	0.695	39.1	协同作用
敌百虫 + 三唑磷	0.5	0.697	39.5	协同作用
氧乐果 + 乙酰甲胺磷	0.5	0.724	44.9	协同作用
氧乐果 + 三唑磷	0.5	0.709	41.9	协同作用
乙酰甲胺磷 + 三唑磷	0.5	0.686	37.2	协同作用

根据上述结果可知: ①5 种有机磷农药的 10 种二元混合物, 联合作用方式表现为协同作用, 且共毒系数越大 (37 ~ 45 之间), 协同作用也越大. ②根据实验结果可知, 原本毒性弱于敌敌畏的 4 种 OPs, 其二元混合物的共毒系数都大于敌敌畏与它们之间的共毒系数, 表明即使毒性较低的有机磷农药混合后, 其联合毒性也会高于 2 种农药毒性之和, 对环境威胁更大. OPs 抑制 AChE, 主要在于它与 AChE 的酯解部位丝氨酸共价结合, 改变了其周围电子效应, 而电子效应又通常与化学反应关系密切, 所以 OPs 的电性结构对 AChE 的抑制作用也有影响^[21]. 分子最低未占轨道能 E_{lumo} 可以衡量分子对电子亲和力的大小, 一般负值越大, 该分子接受电子的能力越强^[22]. 敌百虫的 E_{lumo} 为 -0.150 eV , 氧乐果的 E_{lumo} 为 -0.065 eV , 三唑磷的 E_{lumo} 为 -1.968 eV , 当其两两混合, 其 E_{lumo} 的绝对值都增大, 即亲电能力得到了增强, 所以混合后更容易与 AChE 反应, 即毒性越大, 联合作用形式为协同作用.

2.2 T_3 发光菌毒性实验

通过农药对发光菌发光的抑制实验, 得到不同浓度敌敌畏、敌百虫、氧乐果、乙酰甲胺磷和三唑磷对发光菌的相对发光率, 然后将二者进行线性回归, 通过 SPSS 软件求得 EC_{50} 值. 5 种 OPs 对发光菌发光率均有不同程度的抑制, 并且随着作用时间的延长, 其对发光强度的抑制率增加, 实验选择 15 min 为测定时间, 结果如表 2 所示.

通过上述实验结果可知, 发光菌的相对发光率

与有机磷农药的浓度呈负相关,相关系数在 0.93 ~ 0.98 之间,确定了敌敌畏、敌百虫、氧乐果、乙酰甲胺磷、三唑磷对发光菌的半数效应浓度分别为:0.398、0.712、0.152、0.094、0.140 mg/mL,5 种 OPs 对 T_3 发光菌毒性大小顺序为:乙酰甲胺磷 > 三唑磷 > 氧乐果 > 敌敌畏 > 敌百虫。

表 2 有机磷农药对 T_3 发光菌的毒性作用

Table 2 Toxicity of five kinds of OPs on T_3 bacterium

农药名称	时间 /min	线性方程 ¹⁾	相关系数(R^2)	EC_{50} /mg·mL ⁻¹
敌敌畏	15	$Y = -0.0022X + 1.3848$	0.953	0.398
敌百虫	15	$Y = -0.0080X + 1.0610$	0.972	0.712
乙酰甲胺磷	15	$Y = -0.0040X + 0.9189$	0.939	0.094
氧乐果	15	$Y = -0.0019X + 0.8547$	0.980	0.152
三唑磷	15	$Y = -0.0050X + 1.2462$	0.955	0.140

1) Y : 发光强度抑制率, %; X : 有机磷农药浓度, mg·mL⁻¹

根据发光菌实验结果 EC_{50} 值看出,发光菌对 5 种有机磷农药的敏感性次于 AChE,说明与 OPs 的特异性反应不如 AChE。发光菌对 5 种 OPs 的敏感性顺序为乙酰甲胺磷 > 三唑磷 > 氧乐果 > 敌敌畏 > 敌百虫,说明发光菌对乙酰甲胺磷的毒性最为敏感,此结果与 AChE 检测结果不同,一方面由于 2 种检测方法的基本原理不同,其反应会存在差异;另外实验过程中使用了甲醇作为助溶剂,其本身对发光菌的发光强度有一定的抑制作用^[23]。

实验测定了 5 种 OPs 的二元混合物在等浓度配比下的联合毒性,采用毒性单位法、相加指数法及混合毒性指数法对联合毒性作用评价,结果如表 3。

利用 3 种方法对有机磷联合毒性进行评价,10 种二元混合物联合毒性作用具有不同的表现方式。结果表明,只有敌敌畏/乙酰甲胺磷组 $M > M_0$, $AI < 0$, $MTI < 0$, 3 种评价方法均为拮抗作用;其余各组 $M < 1$, $M_0 > M > 1$, 表现为协同作用、部分相加作用; $AI > 0$, 表现为协同作用;敌敌畏/氧乐果的 $0 < MTI < 1$, 表现为部分相加作用;其余组合 $MTI > 1$, 表现为协同作用。虽然 3 种评价方法在结果上略有差异,但总体上表明 OPs 混合物的联合毒性表现为协同作用或部分相加作用。

3 结论

(1) 2 种方法检测 OPs 二元混合物的联合作用,结果表明联合作用方式基本为协同作用和部分相加作用,OPs 混合物毒性不是简单相加作用,其联合毒性大于两者单一毒性之和。

(2) 联合毒性试验结果表明,在制定毒性评价

表 3 有机磷农药混合物对发光菌的联合毒性

Table 3 Joint toxicity of mixture on T_3 luminescent bacterium

有机磷农药	EC_{50} /mg·mL ⁻¹	TU_i ¹⁾	M_0 ²⁾	M ³⁾	AI ⁴⁾	MTI ⁵⁾
敌敌畏	0.108	0.271	1.381	0.981	1.059	0.890
氧乐果		0.710				
敌敌畏	0.101	0.253	1.561	0.395	1.532	3.085
敌百虫		0.142				
敌敌畏	0.685	1.721	1.236	9.008	-8.008	-9.37
乙酰甲胺磷		7.287				
氧乐果	0.075	0.493	1.213	0.598	0.672	3.662
敌百虫		0.105				
氧乐果	0.054	0.355	1.617	0.93	0.075	1.151
乙酰甲胺磷		0.575				
敌百虫	0.063	0.088	1.131	0.758	0.319	3.250
乙酰甲胺磷		0.670				
敌敌畏	0.054	0.136	1.352	0.522	0.915	3.155
三唑磷		0.386				
乙酰甲胺磷	0.037	0.394	1.670	0.658	0.519	1.816
三唑磷		0.264				
氧乐果	0.043	0.283	1.921	0.59	0.695	0.680
三唑磷		0.307				
敌百虫	0.037	0.052	1.197	0.316	2.164	7.406
三唑磷		0.264				

1) TU_i 为混合物第 i 组分毒性单位, $TU_i = c_i/EC_{50,i}$, c_i 是混合物在半数效应第 i 组分浓度; 2) M 表示混合物毒性单位, $M = \sum TU_i$; 3) $M_0 = M/TU_{i\max}$ ($TU_{i\max}$ 指混合物中毒性单位的最大值); 4) 相加指数法 AI ; 当 $M \leq 1$ 时, $AI = 1/M - 1$; 当 $M > 1$ 时, $AI = 1 - M$; 5) 混合毒性指数法 MTI , $MTI = 1 - \lg M/\lg M_0$

标准时,以单一物质的毒性研究为依据不甚合理,也应该考虑化合物之间联合作用;另外,由单一毒性检测结果可知,AChE 对 OPs 更敏感,其检测浓度可达 $\mu\text{g/mL}$ 。

参考文献:

- [1] 林铮,黄金祥.全球农药中毒概况[J].中国工业医学杂志,2005,18(60):376-379.
- [2] 纽伟民,赵晓联,赵春城,等.有机磷农药检测方法综述[J].江苏食品与发酵,2001,1(14):28-30.
- [3] GB/T 5009.199-2003.蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量的快速检测[S].
- [4] 郭晶,高菊芳,唐振华.乙酰胆碱酯酶的动力学机制及应用[J].农药,2007,4(1):22-25.
- [5] 魏福祥,王振川,王金梅.乙酰胆碱酯酶生物传感器法测定蔬菜水果中有机磷农药残留[J].食品科学,2007,57(2):211-213.
- [6] 黄正,王家玲.细菌发光实验及 Ames 试验检测工业废水急性毒性及致突变性的研究[J].环境科学,1994,15(6):70-72.
- [7] 董玉瑛,冯霄,王宗爽.发光细菌法测定有机工业废水综合毒性[J].化工环保,2005,25(1):65-67.
- [8] 薛建华,王君辉,黄纯农.发光细菌应用于监测水环境污染的研究[J].科技通报,1998,14(5):339-342.

- [9] 仪美芹,于彩虹,杨明,等. 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 体内胆碱酯酶的组织分布及其对氨基甲酸酯类杀虫剂敏感度[J]. 安全与环境学报,2006,6(3):57-60.
- [10] Mansour N A, Eldefrawi M E. Potentiation and antagonism of organophosphorus and carbamate insecticides [J]. Journal of Economic Entomology,1966,59:307-311.
- [11] Broderius S J, Kahl M D, Elonen G E, *et al.* A comparison of the lethal and sublethal toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry,2005, 24(12):3117-3127.
- [12] GB/T 15441-1995. 水质急性毒性的测定发光细菌法[S].
- [13] 魏东斌,翟丽华,董春宏,等. 取代苯化合物对发光菌急性毒性的测定及预测[J]. 环境科学,2002,23(增刊):1-5.
- [14] Ivask A, Green T, Polyak B, *et al.* Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain[J]. Biosens Bioelectron,2007,22(7):1396-1402.
- [15] 林志芬,于红霞,许士奋,等. 发光菌生物毒性测试方法的改进[J]. 环境科学,2001,22(2):114-117.
- [16] Fulladosa E, Murat J C, Martnez M, *et al.* Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 46 (2):87-98.
- [17] Toussaint M W, Brennan L M, Rosencrance A B, *et al.* Acute toxicity of four drinking water disinfection by-products to japanese medaka fish [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2001,66 (2):135-154.
- [18] 林春,康立娟,苏丽敏. 2,4-二硝基甲苯与硝基苯衍生物对发光菌的联合毒性[J]. 吉林大学学报(理学版),2002,40(4):98-101.
- [19] 刘世文,侯云修,陈佳荣,等. 纯化乙酰胆碱酯酶抑制法测定游离有机磷[J]. 现代检验医学杂志,2005,20(2):7-9.
- [20] 周润福. 有机磷旋光异构体与生物活性的关系[J]. 农药,1983,(3):42-45.
- [21] Becerro M A, Thacker R W, Turon X, *et al.* Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses[J]. Oecologia,2003, 135(1):91-101.
- [22] 颜冬云,蒋新,余贵芬,等. 有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制作用及其机理分析[A]. 见:第三届全国环境化学学术大会论文集[C]. 2005. 573-574.
- [23] 董玉瑛,雷炳莉,马静,等. 助溶剂对发光菌生物毒性测试的影响[J]. 化工学报,2006,15(3):170-173.