

杀虫剂硫丹对中国虎纹蛙的毒性效应： 存活率、红细胞核异常及酶活性

邵伟伟 马力 雷焕宗 韦力* 林植华*

丽水学院生态学院 丽水 323000

摘要：农药的使用对水生动物有直接和间接的影响。本文研究了有机氯杀虫剂硫丹对中国虎纹蛙 (*Hoplobatrachus chinensis*) 蝌蚪的毒性效应。具体而言，首先检测了硫丹的安全浓度 (SC)，并在急性毒性实验中评估了硫丹的毒性等级。然后检测了外周血液中红细胞核形态异常，并在慢性毒性实验中测定了酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性。结果表明，在急性毒性中，随着硫丹溶液浓度的增加和染毒时间的延长，蝌蚪的平均死亡率显著增加，即蝌蚪存活率取决于农药剂量和染毒的时长。硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪的 96 h 半致死浓度 LC_{50} 值为 23.38 $\mu\text{g/L}$ ，安全浓度为 2.34 $\mu\text{g/L}$ ，为剧毒性农药。在血液红细胞核异常实验中，观察到 5 种不同类型的细胞核异常：核碎裂、双核、不等分裂、核凹陷和核空洞。血液红细胞核异常率与农药浓度呈正相关。在酶活性检测中，三种酶的活性均受硫丹浓度的影响。与对照组相比，酸性磷酸酶 (ACP) 和碱性磷酸酶 (AKP) 活性随硫丹浓度的增加而降低，乳酸脱氢酶 (LDH) 活性随着硫丹浓度的增加呈先升高后降低。研究结果表明，硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪具有很高的毒性，并证明了血液红细胞核异常和特定的代谢酶可以作为环境监测的生物标志物。

关键词：硫丹；毒性；存活率；核异常；酶活性；中国虎纹蛙

中图分类号：Q955 **文献标识码：**A **文章编号：**0250-3263 (2020) 05-583-10

Toxic Effects of Insecticide Endosulfan on Chinese Tiger Frog (*Hoplobatrachus chinensis*): Survival, Erythrocyte Nuclear Abnormality and Enzyme Activity

SHAO Wei-Wei MA Li LEI Huan-Zong WEI Li* LIN Zhi-Hua*

College of Ecology, Lishui University, Zhejiang 323000, China

Abstract: The utilization of various agricultural pesticides has both direct and indirect effects on aquatic animals. The toxic effects of organochlorine insecticide endosulfan on tadpoles of the Chinese tiger frog

基金项目 浙江省自然科学基金项目 (No. LY19C040001, LQ20C030001), 生态环境部生物多样性调查、观测和评估项目 (No. ZDGC2019-008, XYDC20-04-01), 丽水市重点研究项目 (No. 202000407);

* 通讯作者, E-mail: zhlin1015@126.com, weiliveili2007@163.com;

第一作者介绍 邵伟伟, 女, 实验师; 研究方向: 动物学; E-mail: shaoweivei2005@163.com。

收稿日期: 2020-05-11, 修回日期: 2020-07-01 DOI: 10.13859/j.cjz.202005006

(*Hoplobatrachus chinensis*) were investigated in this study. Specifically, we first examined the safe concentration (SC) and evaluated the toxic rank of endosulfan in an acute toxicity assay. We then examined the blood biomarker (erythrocyte nuclear abnormality) and determined the metabolic enzyme activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) and lactate dehydrogenase (LDH) in a chronic toxicity test. In terms of the acute toxicity, the average mortality percentage of tadpoles significantly increased with increasing concentrations and exposure duration of endosulfan solution, indicating dose- and time-dependent lethality of this drug (Table 1). The half lethal concentration (LC₅₀ value) of endosulfan for *H. chinensis* tadpoles at 96 h was 23.38 µg/L and the safe concentration was 2.34 µg/L (Table 2). Five different types of erythrocyte nuclear abnormalities were observed: broken nucleus, binucleated, unequal division, karyopyknosis and anucleated (Fig. 1). The total frequencies of abnormal erythrocytes were positively correlated with pesticide concentrations (Table 3). Activities of all three enzymes were influenced. Compared with the control treatment, the activities of both ACP and AKP were decreased with increased endosulfan concentrations, while LDH activity was first increased and then decreased (Table 4). These findings suggest that endosulfan has a high toxicity for *H. chinensis* tadpoles and that the erythrocyte nuclear abnormality and particular metabolic enzymes may be considered as biomarkers for environmental monitoring.

Key words: Endosulfan; Toxicity; Survival; Nuclear abnormality; Enzyme activity; *Hoplobatrachus chinensis*

大量的证据表明, 在世界许多地区两栖动物的种群数量正呈现着大幅度的下降 (Devi et al. 2013, Menezes et al. 2017)。其中, 来自农业和城市的环境污染被认为与这种下降有关 (Strong et al. 2016)。为获得农产品的丰收, 在发达国家和发展中国家的农业地区, 各种农药和化学品被广泛使用 (Leong et al. 2007, Mesléard et al. 2016)。因此, 各种农药的广泛应用及其对非靶标物种的毒性影响已经引起了许多生态学家的关注。相关研究结果表明, 在农药频繁使用的农业区中, 两栖类物种的丰富度和多样性比其相邻的非农业区要低, 甚至在农业区的一些地方直接导致两栖类物种的灭绝 (Bonin et al. 1997)。农药污染物通常在雨后流入农场附近的两栖类繁殖地而使其暴露在农药之中 (Relyea 2009)。例如, 已有研究指出, 杀虫剂和其他污染物在加利福尼亚黄腿蛙 (*Rana muscosa*) 数量减少中起了重要作用 (Fellers et al. 2004)。由于两栖动物独特的生活史和皮肤的高渗透性, 使得它们对污染物的作用非常敏感 (Venturmo et al. 2003)。因此, 农药及其他化学物所产生的污染物会对两栖动

物造成致死和亚致死的影响, 包括提高死亡率、免疫抑制、畸形和异常行为等 (Denoël et al. 2012, Lavorato et al. 2013, Bernabó et al. 2016)。基于这些原因, 两栖动物被认为是良好的环境质量指示物, 并已成功地用于研究农药对水生生态系统和农业生态系统的影响 (Denoël et al. 2012, Strong et al. 2017)。

硫丹是一种剧毒的广谱有机氯杀虫剂和杀螨剂 (Menezes et al. 2017)。因硫丹高效杀虫的特性而被广泛使用 (Weber et al. 2010)。由于硫丹具有半挥发性和环境稳定性, 因此被列为有害有机污染物而被禁止使用 (Lavorato et al. 2013)。尽管硫丹在全世界范围内被禁止使用, 但在一些发展中国家 (如印度和中国) 硫丹仍被使用 (Huang et al. 2014, Sánchez et al. 2018)。已有研究表明, 硫丹对非靶标生物如哺乳动物 (Sánchez et al. 2018)、鱼类 (Anil et al. 2017) 和两栖动物 (Svartz et al. 2016) 均有显著影响。综上这些研究表明, 硫丹的急性毒性和慢性毒性都能对动物的生存和发育 (Jones et al. 2009, Svartz et al. 2014)、形态 (Bernabà et al. 2008, Ezemonye et al. 2010)、生理 (Preud'homme

et al. 2015)、行为 (Denoël et al. 2012) 甚至遗传 (Lajmanovich et al. 2005) 等方面产生严重影响。

中国虎纹蛙 (*Hoplobatrachus chinensis*) 属于无尾目 (Anura) 蛙科 (Ranidae) 的大中型两栖动物, 主要栖息在农田和沟渠等生境中 (费梁等 2012)。由于中国虎纹蛙及多数其他无尾两栖动物的繁殖及其幼期生长发育时间与农作物生长期重叠, 因此它们经常面临各种农药的胁迫。此外, 由于其较大的体型和可食性, 加上近几十年来的过度捕捉, 造成了我国中国虎纹蛙的野生种群数量急剧下降, 现已被列为国家 II 级保护野生动物 (国家重点保护野生动物名录 1988)。为进一步探究农田及其附近水域生境中农药污染物对中国虎纹蛙的潜在毒性影响, 本研究以中国虎纹蛙蝌蚪为研究对象, 运用静态换水法研究有机氯杀虫剂硫丹对该物种的毒性效应, 计算硫丹急性毒性的 96 h 半致死浓度 LC_{50} 值、安全浓度 (safe concentration, SC) 及其毒性评价; 观察硫丹引起中国虎纹蛙蝌蚪外周血液红细胞核异常情况, 检测硫丹对中国虎纹蛙的细胞毒性; 测定硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪的酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性的影响, 探讨中国虎纹蛙应对农药污染物的生理响应机制。

1 材料与方法

1.1 动物采集及实验农药浓度配制

成体中国虎纹蛙取自丽水学院两栖爬行动物实验室养殖池, 把抱对个体置于不透明的塑料箱子 (长 66 cm × 宽 40 cm × 高 35 cm) 并加入 20 cm 深的曝气水用于收集卵团。次日, 产卵后移走成蛙并在自然条件下孵化。孵化 2 d 后把蝌蚪转到新的干净箱子饲养并投喂商用饲料。实验前, 挑选发育历期为 G26 或 G27 (Gosner 1960) 体型相似的蝌蚪, 体重 (29.8 ± 5.3) mg、体长 (15.96 ± 2.17) mm ($n = 400$)。

从农药市场购买硫丹原液 (有效成分含量 350 g/L), 量取 5 ml 硫丹原溶液, 加入 500 ml 容量瓶并加蒸馏水至刻度, 配成浓度 3.5 mg/L 的母液用于后续实验。本研究经丽水市地方政府批准, 按照中国现行动物福利和研究法进行。

1.2 急性毒性实验

室温条件下选用硫丹浓度为 3、10、30、60、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的水体进行预实验, 每个浓度组随机分配 5 尾实验蝌蚪到盛有 800 ml 实验药水的容量为 1 000 ml 圆形塑料盒中, 重复 2 次。48 h 后记录每个实验盒中蝌蚪死亡数, 确定蝌蚪全部死亡 (LC_{100}) 的最低浓度和全部存活 (LC_0) 的最高浓度, 并在这两种浓度之间进行急性毒性实验的设计 (Wei et al. 2015)。

根据预实验的结果, 在室温条件下, 用静态换水法进行硫丹的急性毒性实验。设置了 4 种不同的硫丹浓度处理组: 10、25、50 和 100 $\mu\text{g/L}$, 另设置 0 $\mu\text{g/L}$ 为对照组。每个浓度组随机分配 10 尾实验蝌蚪, 各重复 3 次。实验药水用量与预实验相同, 为 800 ml, 对照组加等量的曝气水。每 24 h 记录每个浓度组实验蝌蚪的死亡数量, 持续记录 4 d, 共 96 h。若发现蝌蚪翻肚皮浮于水面或沉于盒底部不动且用玻璃棒触碰尾部不动, 则认为蝌蚪死亡 (Wei et al. 2015)。急性毒性实验期间不喂食, 每 2 d 换水一次。

参照概率单位法求得硫丹对中国虎纹蛙 24、48、72 和 96 h 的半致死浓度 LC_{50} 值 (陈娜等 2007)。采用经典公式 $C_S = 0.3B^3/A^2$ (其中, C_S 为安全浓度, A 为 24 h 半致死浓度, B 为 48 h 半致死浓度) 或用 96 h 半致死浓度 LC_{50} 的 1/10 计算安全浓度 (safe concentration, C_S) (Ezemonye et al. 2010)。硫丹对中国虎纹蛙的毒性评价根据该农药的安全浓度值来确定: 当 $C_S \geq 10.0$ mg/L 时, 为低毒性; 当 $C_S \leq 1.0$ mg/L 时, 为剧毒性; 当 $1.0 < C_S < 10.0$ mg/L 时, 为中等毒性 (张云龙等 2011)。

1.3 血液红细胞核异常实验设计

依据急性毒性实验结果, 在安全浓度范围

内选择 0.25、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/L}$ 4 个硫丹浓度梯度组, 对蝌蚪进行短时间染毒, 另加 1 个对照组 (0 $\mu\text{g/L}$)。每个浓度组随机放入 8 尾实验蝌蚪, 各重复 4 次。实验药水为 800 ml, 与预实验相同, 对照组加等量的曝气水。每个浓度组分别在 24、48、72 和 96 h 时随机选出 5 尾蝌蚪进行血液取样。用手术刀剪开蝌蚪尾部肌肉取血 1 至 2 滴, 滴在有 Alsvet 溶液的载玻片上, 均匀涂布后自然干燥, 滴加甲醇覆盖血膜, 固定细胞 10 min, 滴加 1 或 2 滴 Giemsa 染色液染色 15~20 min, 然后用超纯水从玻片的一侧冲去染液, 待血涂片自然干燥后, 在显微镜 (物镜 100 \times , BA2100Digital, 麦克奥迪实业集团有限公司) 下进行血液红细胞观察。每个个体观察 500 个血红细胞, 记录红细胞核异常情况和比例 (Guilherme et al. 2008, Wei et al. 2015)。

1.4 酶活性实验设计

酶活性实验在慢性毒性条件下进行, 4 个硫丹浓度的设置及其重复次数与 1.3 方法相同。每个实验处理组各个实验盒子随机分配 6 尾实验蝌蚪, 所有实验盒子随机摆放在实验室桌面上, 用商业饲料投喂, 每隔 2 d 更换一次新鲜配制的实验农药水, 实验持续进行 20 d。在第 20 天时, 每个实验组随机选取 5 尾蝌蚪, 用解剖针立即扎死后放入离心管置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于后续酶活性测定。

酶活性测定前, 将所有蝌蚪组织样品进行解冻。电子天平[AL204, 梅特勒-托利多仪器(上海), 精确到 0.000 1 g]称量组织样品, 将其放入含有 1 ml 预冷生理盐水 (pH = 7.0) 的试管中, 并放在冰盒上。然后用玻璃匀浆器将蝌蚪进行匀浆并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 条件下离心 10 min。离心后将上清液 (即可溶性蛋白质酶原液) 转入新的试管中, 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。本研究测定的三种酶分别为酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP) 和乳酸脱氢酶 (LDH), 其中 ACP 和 AKP 活性的具体测定和换算方法参照高举等 (2008) 的研究方法进行, LDH 活

性的具体测定和换算方法参照韦力等 (2020) 的研究方法进行。

1.5 数据统计

数据统计前, 检测数据的正态性和方差同质性。对于急性毒性实验, 将蝌蚪存活率进行对数转换。分析不同硫丹浓度在同一染毒时间对蝌蚪存活率以及酶活性的影响时, 主要采用单因素方差 (One-way ANOVA) 及 Tukey 多重比较进行计算。为进一步确定不同实验浓度、不同染毒时间以及两者间的交互作用对蝌蚪死亡率的影响, 采用重复方差分析 (repeated measures ANOVA) 进行统计。所有数据用 STATISTICA 6.0 软件进行统计, 数据主要以平均值 (Mean) \pm 标准差 (SD) 来表示, 显著性水平设为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 急性毒性实验结果

在急性毒性实验中, 中国虎纹蛙蝌蚪死亡率随着硫丹浓度的增大而增加, 且各实验处理组的差异显著 (one-way ANOVA, 所有 $P < 0.01$, 表 1)。同时, 硫丹的半致死浓度也随着染毒时间 (24、48、72 和 96 h) 的增加而增大, 其安全浓度为 2.338 $\mu\text{g/L}$ (表 2)。根据国家环境保护局对化学农药环境安全评价试验准则 (1989) 得知, 硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪表现为剧毒性。重复方差分析结果表明, 硫丹浓度 ($F_{4,10} = 13.290$, $P < 0.01$) 和染毒时间 ($F_{3,30} = 12.255$, $P < 0.01$) 均对中国虎纹蛙蝌蚪死亡率的影响显著。但是, 两者的交互作用对蝌蚪死亡率影响不显著 ($F_{12,30} = 1.639$, $P > 0.05$)。

2.2 血液红细胞核异常实验结果

共观察到 5 种不同类型的血液红细胞核异常: 核碎裂、双核、核凹陷、核空洞以及不等分裂 (图 1)。所有实验处理组的血液红细胞核异常率均高于对照组, 表明血液红细胞核异常率与实验农药浓度呈正相关 ($Y = 2.814x + 4.85$, $R^2 = 0.779$, 变量 x 和 Y 分别为硫丹浓度和红细胞核总异常率) (表 3)。

表 1 急性毒性实验中硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪死亡率的影响 ($n = 10$)Table 1 Mortality of *Hoplobatrachus chinensis* tadpoles in the acute toxicity test exposure to endosulfan

硫丹浓度 Endosulfan concentration ($\mu\text{g/L}$)	蝌蚪死亡率 Mortality of tadpoles (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0.00	0.0 ± 0.0^b	6.7 ± 1.3^b	6.7 ± 1.3^b	6.7 ± 1.3^b
10.0	6.7 ± 1.3^b	20.0 ± 0.7^{ab}	23.3 ± 0.5^b	30.0 ± 0.2^a
25.0	40.0 ± 0.3^a	53.3 ± 0.3^a	63.3 ± 0.3^{ab}	76.7 ± 0.1^a
50.0	43.3 ± 0.2^a	63.3 ± 0.2^a	73.3 ± 0.2^a	80.0 ± 0.1^a
100.0	70.0 ± 0.2^a	80.0 ± 0.2^a	86.7 ± 0.1^a	100.0 ± 0.0^a
方差分析 One-way ANOVA	$F_{4,10} = 15.405^*$	$F_{4,10} = 7.257^*$	$F_{4,10} = 8.372^*$	$F_{4,10} = 10.660^*$

* 表示各浓度组间的比较差异显著, 显著性概率 $P < 0.05$ 。上标不同字母表示差异显著 (Tukey's test, $\alpha = 0.05$, $a > b$), 含有相同上标字母表示差异不显著。

* indicated comparisons among different concentration groups, $P < 0.05$. Types with different superscripts differed significantly (Tukey's test, $\alpha = 0.05$, $a > b$), while types with identical superscripts indicated no difference.

表 2 硫丹对中国虎纹蛙的半致死浓度及安全浓度

Table 2 The half lethal concentration (LC_{50}) and safe concentration (SC) of endosulfan on *Hoplobatrachus chinensis* tadpoles

染毒时间 Exposure time (h)	拟合方程 Simulation equation	拟合度 Degree of fit (r^2)	半致死浓度 Half lethal concentration ($\mu\text{g/L}$)	安全浓度 Safety concentration ($\mu\text{g/L}$)
24	$Y = 0.041x + 2.217$	0.543	67.878	
48	$Y = 0.021x + 4.004$	0.800*	47.429	2.338
72	$Y = 0.023x + 4.104$	0.773*	38.957	
96	$Y = 0.048x + 3.878$	0.950*	23.375	

* 表示显著相关, $P < 0.05$ 。拟合方程中的变量 x 和 Y 分别为硫丹浓度和蝌蚪死亡率。

* indicated significantly correlated, $P < 0.05$. The variables x and Y in the simulation equation showed endosulfan concentration and tadpole mortality probability, respectively.

表 3 硫丹在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 分别对中国虎纹蛙蝌蚪红细胞核异常的影响结果

Table 3 Effects of endosulfan on abnormality of erythrocytes of *Hoplobatrachus chinensis* tadpoles exposed at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, respectively

硫丹浓度 Endosulfan concentration ($\mu\text{g/L}$)	染毒时间 Exposure time (h)	蝌蚪数 N Tested tadpoles	红细胞观察总数 n Observed erythrocytes	红细胞核异常数 Total numbers of abnormal erythrocyte nucleus observed	红细胞核异常率 Frequency of abnormal erythrocyte nucleus observed (%)	细胞核总的异常率 Total frequency of abnormal erythrocyte nucleus observed (%)
0.25	24	5	2 500	35	1.40	8.92
	48	5	2 500	43	1.72	
	72	5	2 500	72	2.88	
	96	5	2 500	73	2.92	
0.50	24	5	2 500	35	1.40	9.80
	48	5	2 500	49	1.96	
	72	5	2 500	74	2.96	
	96	5	2 500	87	3.48	
1.00	24	5	2 500	44	1.76	10.88
	48	5	2 500	52	2.08	
	72	5	2 500	80	3.20	
	96	5	2 500	96	3.84	
2.00	24	5	2 500	97	3.88	17.94
	48	5	2 500	103	4.12	
	72	5	2 500	127	5.08	
	96	5	2 500	128	5.12	
对照组 Control	48	5	2 500	6	0.24	0.24

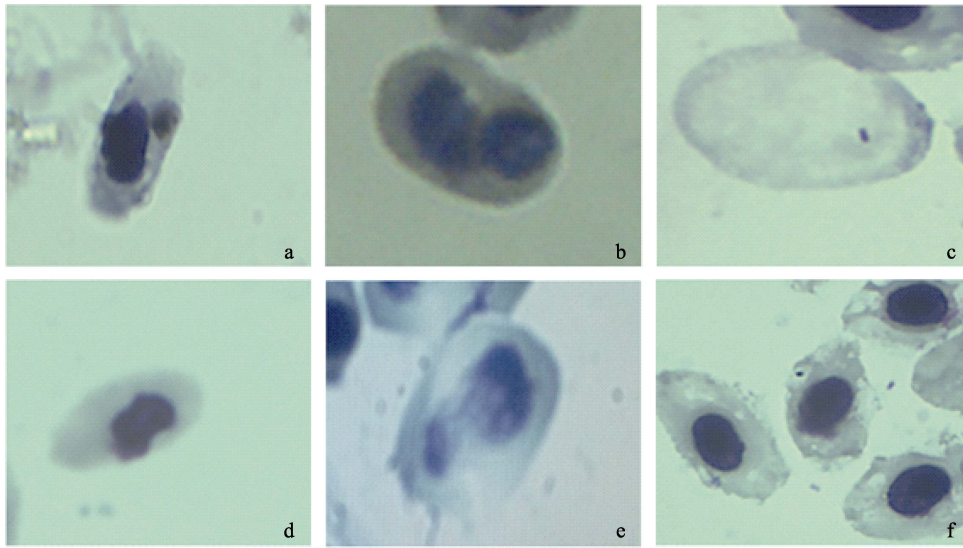


图 1 硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪血液红细胞核异常的毒性影响

Fig. 1 The toxic effects of endosulfan on erythrocyte nuclear abnormalities in *Hoplobatrachus chinensis* tadpoles

a. 核碎裂; b. 双核; c. 核空洞; d. 核凹陷; e. 不等分裂; f. 正常红细胞。

a. Broken nucleus; b. Binucleated; c. Anucleated; d. Karyopyknosis; e. Unequal division; f. Normal cell.

2.3 酶活性实验结果

酸性磷酸酶 (ACP) 活性 ($Y = -0.0732x + 0.5004$, $R^2 = 0.848$, 变量 x 和 Y 分别为硫丹浓度和酸性磷酸酶活性) 和碱性磷酸酶 (AKP) 活性 ($Y = -0.273x + 1.8838$, $R^2 = 0.753$, 变量 x 和 Y 分别为硫丹浓度和碱性磷酸酶活性) 与硫丹浓度呈负相关, 而乳酸脱氢酶 (LDH) 活性呈现 U 型 (表 4)。三种酶的活性在不同浓度组间的比较, 均出现显著性差异: ACP ($F_{4,24} =$

17.097 , $P < 0.01$)、AKP ($F_{4,24} = 22.076$, $P < 0.01$) 和 LDH ($F_{4,24} = 8.974$, $P < 0.01$) (表 4)。

3 讨论

本研究开展的硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪的急性毒性、慢性毒性及细胞毒性的研究表明, 硫丹能够影响其存活、红细胞核形态及酶活性, 该结果与前期对两栖动物及鱼类的毒性研究结果相一致 (Lajmanovich et al. 2005,

表 4 慢性毒性实验中三种酶活性的比较 ($n = 5$, U/mg)

Table 4 Activities of three types of enzymes in the chronic toxicity test

硫丹浓度 Endosulfan concentration ($\mu\text{g/L}$)	酸性磷酸酶 Acid phosphatase	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase
0.00	0.476 ± 0.111^a	1.904 ± 0.399^a	15.034 ± 3.537^{cb}
0.25	0.286 ± 0.051^b	1.076 ± 0.211^b	15.784 ± 3.357^b
0.50	0.262 ± 0.054^b	0.942 ± 0.148^{bc}	23.432 ± 2.886^a
1.00	0.254 ± 0.065^b	0.650 ± 0.135^c	15.704 ± 4.563^b
2.00	0.126 ± 0.031^c	0.752 ± 0.190^c	10.648 ± 2.486^c

* 上标不同字母表示差异显著 (Tukey's test, $\alpha = 0.05$, $a > b > c > d$), 含有相同上标字母表示差异不显著。

* Types with different superscripts differed significantly (Tukey's test, $\alpha = 0.05$, $a > b > c > d$), while types with identical superscripts indicated no difference.

Preud'homme et al. 2015, Anil et al. 2017)。在急性毒性研究中, 各浓度实验组蝌蚪死亡率随硫丹浓度的增加而增加, 表明中国虎纹蛙蝌蚪死亡率与实验浓度呈正相关, 显示剂量依赖性存活和浓度等级致死性 (Ezemonye et al. 2010, Svartz et al. 2014)。本研究中, 硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪的 96h LC₅₀ 值为 23.38 μg/L 及其安全浓度为 2.34 μg/L。综合危害等级和安全浓度, 硫丹可归类为剧毒农药。与其他研究结果比较, 发现本研究中硫丹的 96 h LC₅₀ 值与先前在其他两栖动物中测试的结果不同 (表 5)。以上这些研究结果表明, 这些差异可能是由于在每项研究中所采用的实验方法、生物体的体型和生活阶段等方面的差异引起的 (Wei et al. 2015)。另一种可能的解释是, 测试生物的农药敏感性可能与其家族和系统发育有关 (Jones et al. 2009)。

本研究结果表明, 硫丹对中国虎纹蛙蝌蚪产生了明显的染色体畸变 (clastogenic effect), 即产生不同类型的细胞核形态异常, 这与 Lajmanovich 等 (2005) 用该农药对雨蛙 (*Hyla pulchella*) 蝌蚪进行血红细胞微核试验的诱变

结果相似, 并证明了硫丹能引起无尾两栖类蝌蚪血红细胞的遗传毒性作用。本研究中, 血红细胞核异常率随着硫丹浓度的增加而增加, 表明存在剂量依赖性反应, 这与其他研究物种染毒于其他农药的情况一致。例如, 高效氯氟氰菊酯对牛蛙 (*R. catesbeiana*) 红细胞核异常率呈现剂量依赖性 (Campana et al. 2003)。环磷酰胺和草甘膦对变态后的南美蟾蜍 (*Rhinella arenarum*) 的毒性研究中, 发现其红细胞核异常率与农药浓度呈正相关 (Bosch et al. 2011)。类似的结果还见于通过不同的研究方法检测了农药对两栖动物的遗传毒性, 如 Geng 等 (2005) 用彗星实验法研究了敌敌畏和丁草胺对斑腿泛树蛙 (*Rhacophorus megacephalus*) 蝌蚪的遗传毒性, 发现 DNA 损伤程度与农药剂量呈正相关。然而, 农药 artea 330EC 对突尼斯绿蛙 (*Rana saharica*) 蝌蚪的遗传毒性仅在高浓度 (100 和 150 μl/L) 且染毒时间 (12 d) 较长时才出现核异常效果 (Berrebbah et al. 2009)。表明这些观察到的差异可能与农药的特定性、剂量和时间有关 (Ezemonye et al. 2010)。

表 5 硫丹对不同两栖动物成体和幼体的 96 h 半致死浓度及安全浓度比较 (μg/L)

Table 5 Comparisons of 96 h LC₅₀ values and safe concentrations in different amphibian species at adult and larval stages tested with endosulfan

物种 Species	生活阶段 Life stage	96 h 半致死浓度 Half lethal concentration in 96 h	安全浓度 Safe concentration	文献 Reference
小蟾蜍 <i>Bufo regularis</i>	成体 Adult	730	73	Ezemonye et al. 2010
欧洲蟾蜍 <i>B. bufo</i>	蝌蚪 Tadpole	430	43	Bernabà et al. 2008
敏林蛙 <i>Rana dalmatina</i>	蝌蚪 Tadpole	74	7.4	Lavorato et al. 2013
倭蛙 <i>Pseudacris crucifer</i>	蝌蚪 Tadpole	120	12	Jones et al. 2009
灰树蟾 <i>Hyla versicolor</i>	蝌蚪 Tadpole	9.0	0.9	
太平洋树蛙 <i>Pseudacris regilla</i>	蝌蚪 Tadpole	21.4	2.14	
西方蟾蜍 <i>B. boreas</i>	蝌蚪 Tadpole	76.1	7.61	
绿蛙 <i>R. clamitans</i>	蝌蚪 Tadpole	3.2	0.32	
林蛙 <i>R. cascadae</i>	蝌蚪 Tadpole	15.0	1.5	
牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	蝌蚪 Tadpole	1.3	0.13	
陆蛙 <i>Fejervarya</i> sp.1	蝌蚪 Tadpole	46.715	4.67	Devi et al. 2013
陆蛙 <i>F. teraiensis</i>	蝌蚪 Tadpole	6.596	0.66	
陆蛙 <i>Fejervarya</i> sp.2	蝌蚪 Tadpole	3.015	0.30	

由农药引起的水生生态系统污染不但会抑制动物的生长发育,还会影响动物的新陈代谢,改变酶的活性,引致组织、器官受损和功能失调 (Oasman et al. 2010, Sangeetha et al. 2016, Menezes et al. 2017)。毒物对酶活性的影响是机体受到胁迫时最重要的生化指标之一 (Sangeetha et al. 2016)。当有毒物质引起器官代谢紊乱时,由于活性部位变性或扭曲,酶的活性将会增加或减少 (Sangeetha et al. 2016, Sánchez et al. 2018)。磷酸酶是与蛋白质合成相关的关键代谢酶之一 (Okolie et al. 2000)。乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种四聚体酶,被认为是评估化学品毒性的潜在标志 (Suneetha 2012)。Inyang 等 (2011) 用二嗪农对革胡子鲶 (*Clarias gariepinus*) 的毒性研究发现,该农药对碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性产生了明显的抑制作用。氰化铜降低了卡特拉鲃鱼 (*Catlacatla catla*) 鳃、肌肉和肝组织的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶活性 (Dube et al. 2014)。同样,染毒于硫丹、毒死蜱和胺甲萘后,三角招潮蟹 (*Uca triangularis*) 的鳃、眼柄、胸神经节、肌肉和脑组织中乳酸脱氢酶及酸性磷酸酶活性升高,而碱性磷酸酶活性降低 (Sangeetha et al. 2016)。本研究中,0.25、0.50、1.00 和 2.00 $\mu\text{g/L}$ 的慢性毒性暴露对中国虎纹蛙蝌蚪有明显的不良影响。随着硫丹浓度的增加,酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性均降低,而乳酸脱氢酶活性先升高后降低。这可能是因为蝌蚪降低了新陈代谢率,以确保最初有足够的能量解毒,但在较高浓度的硫丹胁迫下,可能会对机体的细胞和组织造成损害 (唐婉琴等 2018)。

致谢 本研究在实验过程中得到了陈晓晓和邓海玉同学帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- Anil P, Reddy P. 2017. Endosulfan induced oxidative stress in *Tilapia mossambica*. *Life Sciences International Research Journal*, 4(1): 209–214.
- Bernabà I, Brunelli E, Berg C, et al. 2008. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. *Aquatic Toxicology*, 86(3): 447–456.
- Bernabó I, Guardia A, Machele M, et al. 2016. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*, 172(3): 56–66.
- Berrebah N, Devaux A, Rouabhi R, et al. 2009. Micronucleus induction in erythrocytes of tadpole *Rana saharica* (green frog of North Africa) exposed to artea 330EC. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 1(1): 7–12.
- Bonin J, DesGrange J L, Rodrigue M, et al. 1997. Anuran species richness in agricultural landscapes of Quebec: foreseeing long-term results of road call surveys // Green D M. *Amphibians in Decline: Canadian Studies of a Global Problem*. St. Louis, Missouri: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 141–149.
- Bosch B, Manas F, Gorla N, et al. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(6): 155–163.
- Campana M, Panzeri A, Moreno V, et al. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 99–103.
- Denoël M, D'Hooghe B, Ficetola G F, et al. 2012. Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology*, 21(4): 1240–1250.
- Devi N, Gupta A. 2013. Toxicity of endosulfan to tadpoles of *Fejervarya* spp. (Anura: Dicroglossidae): mortality and morphological deformities. *Ecotoxicology*, 22(9): 1395–1402.
- Dube P, Shwetha A, Hosetti B. 2014. Impact of copper cyanide on the key metabolic enzymes of freshwater fish *Catlacatla catla* (Hamilton). *Biotechnology in Animal Husbandry*, 30(3): 499–508.
- Ezemonye L, Tongo I. 2010. Acute toxic effects of endosulfan and diazinon pesticides on adult amphibians (*Bufo regularis*). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 2(5): 73–78.

- Fellers G, McConnell L, Pratt D, et al. 2004. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the sierra nevada mountains of California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(9): 2170–2177.
- Geng B, Yao D, Xue Q. 2005. Genotoxicity of the pesticide dichlorvos and herbicide butachlor in *Rhacophorus megacephalus* tadpole. *Acta Zoologica Sinica*, 51(3): 447–454.
- Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3): 183–190.
- Guilherme S, Válega M, Pereira M, et al. 2008. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3): 411–421.
- Huang T, Guo Q, Tian H, et al. 2014. Assessing spatial distribution, sources, and human health risk of organochlorine pesticide residues in the soils of arid and semiarid areas of northwest China. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9): 6124–6135.
- Inyang I, Daka E, Ogamba E. 2011. Effect of diazinon on acid and alkaline phosphatase activities in plasma and organs of *Clarias gariepinus*. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(3): 191–194.
- Jones D, Hammond J, Relyea R. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9): 1939–1945.
- Lajmanovich R, Cabagna M, Peltzer P, et al. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research*, 587(1/2): 67–72.
- Lavorato M, Bernabò I, Crescente A, et al. 2013. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: Quantitative developmental and behavioural analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(2): 253–262.
- Leong K, Benjamin T, Mustafa A. 2007. Contamination levels of selected organochlorine and organophosphate pesticides in the Selangor River, Malaysia between 2002 and 2003. *Chemosphere*, 66: 1153–1159.
- Menezes R, Qadir T, Moin A, et al. 2017. Endosulfan poisoning: An overview. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 51: 27–33.
- Mesléard F, Gauthier-Clerc M, Lambret P. 2016. Impact of the insecticide alphacypermetrine and herbicide oxadiazon, used singly or in combination, on the most abundant frog in French rice fields, *Pelophylax perezi*. *Aquatic Toxicology*, 176(7): 24–29.
- Oasman A, Abd-El Reheem A, Abuelfadl K, et al. 2010. Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. *Natural Science*, 2(11): 1302–1311.
- Okolie N, Osagie A. 2000. Differential effects of chronic cyanide intoxication on heart, lung and pancreatic tissues. *Food and Chemical Toxicology*, 38(6): 543–548.
- Preud'homme V, Milla S, Gillardin V, et al. 2015. Effects of low dose endosulfan exposure on brain neurotransmitter levels in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 120(2): 357–364.
- Relyea R. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2): 363–376.
- Sánchez M, Sedó C, Chaufan G, et al. 2018. In vitro effects of endosulfan-based insecticides on mammalian sperm. *Toxicology Research*, 7(1): 117–126.
- Sangeetha S, Rani S. 2016. Enzymatic alterations in the fresh water fiddler crab, *Uca triangularis* exposed to endosulfan, chlorpyrifos and carbaryl. *World Journal of Zoology*, 11(2): 104–109.
- Strong R, Halsall C, Ferenčík M, et al. 2016. Biospectroscopy reveals the effect of varying water quality on tadpole tissues of the common frog (*Rana temporaria*). *Environmental Pollution*, 213: 322–337.
- Strong R, Martin F, Jones K, et al. 2017. Subtle effects of environmental stress observed in the early life stages of the common frog, *Rana temporaria*. *Science Report*, 7: 44438.
- Suneetha K. 2012. Effects of endosulfan and fenvalerate on carbohydrate metabolism of the freshwater fish, *L. rohita* (Ham). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1): 262–268.
- Svartz G, Aronzon C, Coll C. 2016. Combined endosulfan and

- cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 79(5): 1–13.
- Svartz G, Wolkowicz H, Coll C. 2014. Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the south American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4): 875–881.
- Venturmo A, Rosenbaum E, De Casho AC, et al. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, 28(3/4): 167–186.
- Weber J, Halsall C, Muir D, et al. 2010. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of The Total Environment*, 408(15): 2966–2984.
- Wei L, Ding G, Guo S, et al. 2015. Toxic effects of three heavy metallic ions on *Rana zhenhaiensis* tadpoles. *Asian Herpetological Research*, 6(2): 132–142.
- 陈娜, 郝家胜, 王莹, 等. 2007. 铜、铅、镉、锌、汞和银离子复合污染对水螅的急性毒性效应. *生物学杂志*, 24(3): 32–35.
- 费梁, 叶昌媛, 江建平. 2012. 中国两栖动物及其分布彩色图鉴. 成都: 四川科学技术出版社.
- 唐婉琴, 张江惠, 袁伦强. 2018. 水体锰暴露对草鱼碱性磷酸酶、酸性磷酸酶及代谢率的影响. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 35(3): 69–74.
- 韦力, 王海燕, 邵伟伟, 等. 2020. 葡萄糖和维生素 C 对镇海林蛙蝌蚪生长及其三种酶活性的影响. *动物学杂志*, 55(2): 229–237.
- 张云龙, 袁娟, 陈丽萍, 等. 2011. 三种重金属对鲫鱼苗的急性毒性和联合毒性试验. *河北渔业*, 39(2): 24–27.