

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200615001

李玲,李俊杰,王俊英,等. 手性农药水胺硫磷对浮游生物氧化应激的对映体选择性影响[J]. 生态毒理学报,2021,16(3): 264-272 Li L, Li J J, Wang J Y, et al. Enantiomeric selectivity of chiral pesticide isocarbophos on oxidative stress in plankton [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 264-272 (in Chinese)

手性农药水胺硫磷对浮游生物氧化应激的对映体选择 性影响

李玲*,李俊杰,王俊英,黄沛玲

华侨大学化工学院,厦门 361021 收稿日期:2020-06-15 录用日期:2020-08-03

摘要:用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法对水胺硫磷(isocarbophos, ICP)2 个对映体进行拆分与 制备,分别以浮游植物水华微囊藻(*Microcystis flos-aquae*)和浮游动物大型蚤(*Daphnia magna*)为实验生物,考察了 ICP 导致 2 种 浮游生物氧化损伤对映体选择性差异。结果显示:除了 10⁻⁴ mg·L⁻¹和 10⁻³ mg·L⁻¹,10⁻² ~1 mg·L⁻¹的(+)-ICP 对水华微囊藻 叶绿素 a 含量表现为抑制作用;而 10⁻⁴ ~10⁻¹ mg·L⁻¹的(-)-ICP 对水华微囊藻叶绿素 a 含量表现为促进作用。且在 10⁻⁴ ~1 mg·L⁻¹浓度范围内,(+)-ICP 使其超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性显著下降,且最大下降 31.2%, 而(-)-ICP 未 引起 SOD 活性发生明显变化;(+)-ICP 各浓度组诱导水华微囊藻的过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的上升程度显著高于(-)-ICP;2 个对映体未引起水华微囊藻发生脂质过氧化。此外,ICP 对大型蚤的毒性要远远高于水华微囊藻;在 1 ~20 μg·L⁻¹浓度范围内,(+)-ICP 未引起大型蚤 SOD 活性增加,而(-)-ICP 则引起大型蚤 SOD 活性显著增加,且最高增加 79.0%;2.5 ~10 μg·L⁻¹的(+)-ICP 诱导大型蚤 CAT 活性上升而(-)-ICP 则导致 CAT 活性下降;(+)-ICP 随着浓度的增加引起明显的脂质过氧化。研究表明,ICP 对 2 种浮游生物的氧化应激均存在对映体选择性差异,且对水华微囊藻和大型蚤的毒性均表现为(+)-ICP>rac-ICP>(-)-ICP,但是其对浮游动物的毒害风险远大于对浮游植物。 关键词:水胺硫磷;浮游生物;氧化应激;对映体选择性

文章编号: 1673-5897(2021)3-264-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Enantiomeric Selectivity of Chiral Pesticide Isocarbophos on Oxidative Stress in Plankton

Li Ling^{*}, Li Junjie, Wang Junying, Huang Peiling College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China **Received** 15 June 2020 **accepted** 3 August 2020

Abstract: Considering that the involvement of oxidative damage is implicated in the toxicities of various pesticides, the possibility of enantioselective oxidative stress induced by isocarbophos (ICP) on *Microcystis flos-aquae* and *Daphnia magna* was investigated in this study. Enantiomeric separation and preparation of ICP were performed on high performance liquid chromatography (HPLC). Our results demonstrate that inhibitory effect on growth of *Microcystis flos-*aquae on only (+)-ICP $10^{-2} \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, but not on (+)-ICP concentration of 10^{-4} and $10^{-3} \text{ mg} \cdot$

基金项目:手性有机磷农药水胺硫磷毒理效应的对映体选择性研究(JAT160029)

第一作者:李玲(1983—),女,博士,讲师,研究方向为环境毒理学,E-mail: liling19830826@hqu.edu.cn

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: liling19830826@hqu.edu.cn

L⁻¹. Meanwhile, $10^{-4} \sim 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of (-)-ICP displays promotion effect on growth of *Microcystis flos-aquae*. Within (+)-ICP concentration range of $10^{-4} \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, superoxide dismutase (SOD) activity is significant suppressed. The maximal decrease is shown to be 31.2%. In contrast, (-)-ICP does not cause significant changes in the SOD activity. The promotional effect of (+)-ICP in catalase (CAT) activity is more remarkable than that of the (-)-ICP. However, the two enantiomers do not cause significant lipid peroxidation of *Microcystis flos-aquae* and *Daphnia magna*. Furthermore, the toxicity of ICP on *Daphnia magna* is much higher than that on *Microcystis flos-aquae* and *Daphnia magna*. Furthermore, the toxicity of ICP on *Daphnia magna* is much higher than that on *Microcystis flos-aquae* and *Daphnia magna*. Furthermore, the toxicity of L⁻¹, (+)-ICP does not increase the SOD activity of *Daphnia magna*, while (-)-ICP causes significant increase of the SOD activity of *Daphnia magna*, with the maximal increase shown to be 79.0%; 2.5 ~ 10 μ g·L⁻¹ of (+)-ICP induces the CAT activity of *Daphnia magna*, while the identical concentration-dependent way. These results suggest that ICP induce enantioselective toxicity of plankton mediated by oxidative damage. The toxicity hierarchies of ICP to *Microcystis flos-aquae* and *Daphnia magna* are both shown to be (+)-ICP>rac-ICP>(-)-ICP. However, it should be noted that the toxic risk of ICP and its enantiomers for zooplankton are far great than that for phytoplankton.

Keywords: isocarbophos; plankton; oxidative stress; enantioselectivity

随着化工制造业的迅速发展,很多手性农药正 在不断开发。目前在中国,超过40%的农药是手性 的,预计这一比例还会增加^[1]。但是目前手性农药 对映体的分离和制备难度比普通化合物要高得多, 因此大部分手性农药仍以外消旋体形式生产、销售 和使用。而大量研究结果表明,当手性农药的对映体 进入生物体内时,由于生物体对各手性异构体识别能 力的差异,以及不同靶标位点对各异构体的匹配性不 同,使得异构体之间在生物活性、环境行为和毒理学 等方面均可能存在差异^[2]。因此,从对映体层面研究 手性农药的环境行为及生态效应具有重要意义。

水胺硫磷(isocarbophos, ICP)是一种高效广谱的 有机磷杀虫剂,对螨类及鳞翅目、半翅目害虫具有良 好的防治效果。ICP 具有一个磷手性中心,结构式 如图1所示。Lin 等^[2]研究(+)-ICP和(-)-ICP对大型 蚤的48 h-LC50 相差近50 倍。Lu 等^[3]通过测定藻类 生长抑制率、叶绿素含量、总可溶性蛋白质和超氧阴 离子自由基含量,发现 ICP 对斜生栅藻(Scenedesmus obliquus)在剂量-效应关系上具有对映体选择性 毒性。Liu 等[4]以 HepG2 细胞作为体外模型,研究 发现,(-)-ICP 对肝细胞的毒性比(+)-ICP 高 2 倍;还 发现(-)-ICP 上调 Bax 蛋白表达和下调 Bcl-2 的表 达水平,导致 Bax/Bcl-2 比值增加,继而导致细胞活 力降低和细胞凋亡。朱欣凯^[5]研究发现,(+)-ICP和 (-)-ICP 对东亚飞蝗(Locusta migratoria manilensis)的 LD₅₀分别为0.609 mg·kg⁻¹(虫体质量)和79.412 mg· kg⁻¹(虫体质量),相差 130 倍。由此可见,ICP 对水生



图 1 水胺硫磷(ICP)手性结构式 Fig. 1 The structure of isocarbophos (ICP)

生物可能会产生对映体选择性毒理效应。因此,从 对映体层面来研究手性农药 ICP 的环境行为及生态 效应具有重要意义。

水生生态系统中的初级生产者藻类对毒物比较 敏感,大型蚤是被国际公认的标准毒性试验生物。 本课题选择浮游植物水华微囊藻(Microcystis flosaquae)和浮游动物大型蚤(Daphnia magna)作为受试 生物,研究 ICP 对不同营养级浮游生物抗氧化酶毒 性的对映体选择性差异,为全面评估手性有机磷农 药残留对生态系统的生态毒理效应提供科学依据, 同时也为有机磷农药的合理利用与污染防治提供理 论支持。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 供试溶剂及仪器

ICP,纯度为99.5%,北京坛墨质检科技有限公司。ICP的2个对映体由实验室自制,两者纯度≥ 98.0%。丙酮、正己烷、异丙醇和乙醇均为色谱纯,购于国药集团化学试剂有限公司。80%磷酸、牛血 清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250 等,均为分析纯,购于 阿拉丁公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试 剂盒和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒,均购 自南京建成生物工程研究所。

高效液相色谱(日本岛津,LC-10AVP),气相色 谱(中国精科捷,GC-9160),Chiralcel OD-H 柱(上海 大赛璐药物手性技术有限公司),浮游植物分类荧光 仪(德国 Walz,Phyto-PAM)。

1.2 ICP 对映体的制备和定量

用 HPLC 法对 ICP 进行拆分与制备。色谱条件:流动相为 80:20(V:V)的正己烷/异丙醇,大赛璐 手性柱 Chiralcel OD-H,流速为 0.8 mL·min⁻¹,紫外 检测波长 230 nm,室温,进样量为每次 20 μL。在此 条件下,ICP 对映异构体的出峰顺序先后为(+)-ICP、 (-)-ICP^[2]。人工手动在检测器出口处收集液体,并 在室温下旋蒸浓缩。

利用气相色谱对 ICP 的 2 个对映体样品进行定量。色谱条件: HP-5 石英毛细管柱; 氮载气流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样口温度为 250 ℃, 升温程序为柱 温箱初始温度 180 ℃, 保持 2 min, 然后 20 ℃·min⁻¹ 升温到 280 ℃, 保持 10 min, NP 检测器温度是 300 ℃, 在不分流模式下对映体样品的进样量为 1 μ L。

1.3 实验生物的培养及染毒

1.3.1 水华微囊藻的培养及染毒

浮游植物水华微囊藻由中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库提供。按照藻类生长抑制试验的标准方法(GB/T 31270),采用 BG11 培养液培养。

当水华微囊藻进入对数生长期之后,并调节初 始接种藻密度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,用 ICP 及其对映体进 行染毒。浓度设置为 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 和1 mg· L⁻¹,并设置溶剂对照(0.03%丙酮),每组设置4个平 行。每天摇动3~4次,保持藻类悬浮生长。

1.3.2 大型蚤的培养及染毒

浮游动物大型蚤,购于中国科学院武汉水生生物研究所。大型蚤的培养液按照 OECD 规定⁶⁰进行培养。大型蚤敏感性试验采用国际标准《水质-大型 蚤运动抑制的测定》(ISO 6341:1996)^[7]进行。

不同日龄的蚤体内抗氧化酶活性不同,本文选 择4日龄的蚤染毒进行实验^[8-9],每个浓度实验蚤60 只,染毒溶液2L,每组设置3个平行。根据Lin 等^[2]研究中所得出的ICP及其对映体对大型蚤的48 h-LC₅₀,按(-)-ICP LC₅₀值的1/353~1/18的比例设 置染毒溶液浓度梯度,分别为1、2.5、5、10 和 20 μg· L⁻¹,并设置溶剂对照(0.03%丙酮)。染毒 48 h 后进 行氧化损伤指标测定。

1.4 叶绿素 a 含量的测定

水华微囊藻染毒 10 d 后,取 1 mL 藻液置于样 品杯中,在浮游植物分类荧光仪的 32 μmol·(m²· s)⁻¹ 光强下测定叶绿素 a 含量^[10]。实验重复 3 次。

1.5 酶源的制备

对水华微囊藻染毒 96 h 后,每瓶取 80 mL 藻 液,在4 ℃条件下5 000 r·min⁻¹冷冻离心 15 min,去 除上清液,用磷酸缓冲液冲洗,并于冰浴中超声破碎 15 min(工作3 s,间隔3 s)。

对大型蚤染毒48 h 后,取50 只蚤,吸干表面水分,放入离心管中,加入Tris-HCl 缓冲液置于冰浴中超声破碎5 min(工作3 s,间隔3 s)。

水华微囊藻和大型蚤在破碎完全后,于4℃条 件下12000 r・min⁻¹冷冻离心10 min,取上清液,即 为粗酶液样品。-80℃超低温保存待用。

1.6 蛋白含量及氧化损伤相关指标的测定

蛋白质含量采用考马斯亮蓝比色法测定^[11]; SOD、CAT 活性及 MDA 含量均根据南京建成生物 公司的试剂盒进行测定。实验均重复 3 次。

1.7 显著性检验

用 Office excel 和 Origin 8.5 进行数据的图表分析,用 SPSS16.0 软件进行相关显著性分析。

2 结果(Results)

2.1 ICP 对映体的拆分

ICP 液相色谱拆分条件为:流动相正己烷/异丙 醇 80:20,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱压为 5.0 MPa。ICP 这 2 个对映体的保留时间分别为 8.5 min 和 13.2 min,达到基线分离,对映体分离色谱图如图 2 所示。



Fig. 2 Chiral separation chromatogram of ICP enantiomers

2.2 ICP 对浮游植物水华微囊藻叶绿素 a 含量的 对映体选择性影响

ICP 及其对映体对水华微囊藻叶绿素 a 含量的 影响如图 3 所示,水华微囊藻在(+)-ICP 胁迫下, 10^{-4} mg·L⁻¹浓度组的叶绿素 a 含量均显著高于对照 组(P<0.05),而 $10^{-2} \sim 1$ mg·L⁻¹浓度组的叶绿素 a 含 量均显著低于对照组(P<0.05)。在(-)-ICP 胁迫下, $10^{-4} \sim 10^{-1}$ mg·L⁻¹浓度组的叶绿素 a 含量均显著高 于对照组(P<0.05),而 1 mg·L⁻¹的(-)-ICP 的叶绿素 a 含量与对照组相比则无显著性差异(P>0.05)。在 ICP 外消旋体(rac-ICP)胁迫下, $10^{-3} \sim 10^{-2}$ mg·L⁻¹浓 度组的叶绿素 a 含量均显著高于对照组(P<0.05),1 mg·L⁻¹ rac-ICP 浓度组的叶绿素 a 含量显著低于对 照组(P<0.05)。由以上结果可知,(+)-ICP 和(-)-ICP 对水华微囊藻叶绿素 a 含量影响存在对映体选 择性差异。

2.3 ICP 对浮游植物水华微囊藻氧化损伤的对映体选择性影响

2.3.1 ICP 对水华微囊藻 SOD 活性的对映体选择 性影响

ICP 及其对映体对水华微囊藻 SOD 活性的影响如图 4 所示,水华微囊藻在(+)-ICP 胁迫下,10⁻³~1 mg·L⁻¹浓度组的 SOD 活性均显著低于对照组 (P<0.05),与对照组相比分别下降了 15.4%、31.2%、 25.7%和 22.4%;而 10⁻⁴ mg·L⁻¹浓度组的 SOD 活性 与对照组无显著差异(P>0.05)。在(-)-ICP 胁迫下,各浓度组的 SOD 活性与对照组均无显著性差异(P>0.05)。在 rac-ICP 胁迫下,其 SOD 活性随着 rac-ICP 浓度的增加呈先上升后下降的趋势,其中,低浓度组 (10^{-4} 和 10^{-3} mg·L⁻¹)的 SOD 的活性与对照组相比 都上升了 10.0%(P<0.05);高浓度组($\geq 10^{-2}$ mg·L⁻¹)的 SOD 活性均显著小于对照组(P<0.05),且 1 mg·L⁻¹浓度组 的 SOD 活性与对照组 相比下降了 38.0%。由以上结果可知,(+)-ICP 和(-)-ICP 对水华 微囊藻 SOD 活性影响存在对映体选择性差异。

2.3.2 ICP 对水华微囊藻 CAT 活性的对映体选择 性影响

ICP 及其对映体对水华微囊藻 CAT 活性的影响如图 5 所示,在(+)-ICP 胁迫下,各浓度组的 CAT 活性随着(+)-ICP 浓度的增加而逐渐降低,且呈现剂 量效应关系。 $10^{-4} \sim 10^{-1}$ mg·L⁻¹浓度组的 CAT 酶 活性显著高于对照组(P < 0.05),与对照组相比分别上 升了 70.0%、40.0%、20.0%和 10.0%;而 1 mg·L⁻¹浓度

组的 CAT 活性显著低于对照组(P<0.05)。在(-)-ICP 胁迫下,水华微囊藻的 CAT 活性变化随着(-)-ICP 浓





注:rac-ICP 表示 ICP 的外消旋体;相邻条上不同的小写字母表示相同 浓度不同对映体之间存在显著差异;相同填充图案上

不同的大写字母表示相同对映体不同浓度之间存在显著差异; *表示与对照组相比有显著差异;P<0.05, n=3;下同。

Fig. 3 Effect of ICP and enantiomers on chlorophyll *a* of *Microcystis flos-aquae*

Note: rac-ICP stands for the racemate of ICP; different small letters above adjacent bars indicate significant differences between different enantiomers; different capital letters on the same pattern indicate significant differences between different concentrations of the same enantiomer; * indicates a significant difference compared with control; P<0.05, n=3; the same as follow.



歧化酶(SOD)活性的影响



度的增加呈现先上升后下降的趋势。10⁻⁴~10⁻³ mg •L⁻¹浓度组的 CAT 活性显著高于对照组(P<0.05); 10⁻²~1 mg•L⁻¹浓度组的 CAT 活性显著低于对照组 (P<0.05)。在 rac-ICP 的胁迫下,除了 10⁻³ mg•L⁻¹浓 度组的 CAT 活性与对照组无显著性差异(P>0.05), 其余浓度组的 CAT 活性均显著低于对照组(P< 0.05),与对照组相比分别下降了 28.8%、33.3%、 25.1%和 16.6%。由此可见,(+)-ICP 和(-)-ICP 对水 华微囊藻 CAT 活性影响存在对映体选择性差异。



Fig. 5 Effect of ICP and its enantiomers on catalase (CA1) activity of *Microcystis flos-aquae*

2.3.3 ICP 对水华微囊藻 MDA 含量的对映体选择 性影响

ICP 及其对映体对水华微囊藻 MDA 含量的影响如图 6 所示,在(+)-ICP 胁迫下,除了 10⁻³ mg·L⁻¹ 浓度组的 MDA 含量与对照组无显著差异(P>0.05), 其他浓度组的 MDA 含量均显著低于对照组(P< 0.05),且与对照组相比分别下降了 23.0%、26.8%、 26.8%和 9.2%。在(-)-ICP 胁迫下,除了 10⁻³ mg· L⁻¹浓度组的 MDA 含量与对照组无显著差异(P> 0.05),其余浓度组的 MDA 含量均显著低于对照组 (P<0.05),且与对照组相比分别下降了 29.0%、 23.1%、16.4%和 10.4%。在 rac-ICP 的胁迫下,各浓 度组的 MDA 含量均显著低于对照组(P<0.05),且与 对照组相比分别下降了 28.2%、13.7%、43.8%、 44.1%和 38.8%。由此可见,(+)-ICP 和(-)-ICP 对水 华微囊藻 MDA 含量的对映体选择性影响不明显。



丙二醛(MDA)含量的影响

Fig. 6 Effect of ICP and its enantiomers on malondialdehyde (MDA) content of *Microcystis flos-aquae*

2.4 ICP 对浮游动物大型蚤氧化损伤的对映体选 择性影响

2.4.1 ICP 对大型蚤 SOD 活性的对映体选择性影响

ICP 及其对映体对大型蚤体内 SOD 活性的影 响如图 7 所示,在(+)-ICP 胁迫下,5 μ g·L⁻¹浓度组 的 SOD 活性与对照组相比下降了 17.0% (*P*<0.05); 而 10 μ g·L⁻¹和 20 μ g·L⁻¹浓度组的 SOD 活性与对 照组无显著差异(*P*>0.05)。在(-)-ICP 胁迫下,各浓 度组大型蚤体内的 SOD 活性均显著高于对照组(*P*< 0.05),且(-)-ICP 浓度越高,SOD 的活性越大;其中 10 μ g·L⁻¹和 20 μ g·L⁻¹浓度组的 SOD 活性与对照 组相比分别上升了 68.0% 和 79.0%。在 rac-ICP 胁 迫下,5 μ g·L⁻¹浓度组的 SOD 活性与对照组无显著 差异(*P*>0.05);10 μ g·L⁻¹和 20 μ g·L⁻¹浓度组的 SOD 活性与对照组和比分别增加了 16.0% 和 24.0%。由 此可见,(+)-ICP 和(-)-ICP 对大型蚤 SOD 活性的影 响存在对映体选择性差异。

2.4.2 ICP 对大型蚤 CAT 活性的对映体选择性影响

ICP 及其对映体对大型蚤体内 CAT 活性的影响如图 8 所示,在(+)-ICP 胁迫下,除 1 μg·L⁻¹和 20 μg·L⁻¹浓度组的 CAT 活性与对照组相比分别下降 了 19.7%和15.2%,其余浓度组 CAT 活性均显著高 于对照组(P<0.05),且 2.5 μg·L⁻¹和 5 μg·L⁻¹浓度组 的 CAT 活性与对照组相比分别上升了 14.0%和 12.0%。在(-)-ICP 胁迫下,各浓度组 CAT 活性均显 著低于对照组(P<0.05),且活性下降范围是 17.2%~ 40.9%。在 rac-ICP 胁迫下,各浓度组 CAT 活性均显著低于对照组(P<0.05),且活性下降范围是 5.5% ~17.8%。由此可见,ICP 对大型蚤 CAT 活性的影响存在对映体选择性差异。



2.4.3 ICP 对大型蚤 MDA 含量的对映体选择性影响 ICP 及其对映体对大型蚤体内 MDA 含量的影 响如图 9 所示,在(+)-ICP 胁迫下,各浓度组的 MDA 含量随着(+)-ICP 浓度增加而上升;除了 1 μg·L⁻¹浓 度组的 MDA 含量显著低于对照组(P < 0.05),其余浓 度组均显著高于对照组(P < 0.05),且 5、10 和 20 µg· L⁻¹浓度组的 MDA 含量与对照组相比分别上升了 23.0%、52.0%和 139.0%。在(-)-ICP 胁迫下,各浓 度组大型蚤体内的 MDA 含量均显著低于对照组(P<0.05),在 1~5 µg·L⁻¹时,大型蚤体内 MDA 含量随 浓度增加而上升,而在 5~20 µg·L⁻¹时,MDA 含量 随浓度增加而下降(P < 0.05)。在 5 µg·L⁻¹浓度时, 虽然大型蚤体内 MDA 含量最高,但是与对照组相 比也下降了 8.0%。在 rac-ICP 胁迫下,1~5 µg·L⁻¹ 浓度组的 MDA 含量与对照组无显著性差异(P >0.05);而 10 µg·L⁻¹和 20 µg·L⁻¹浓度组的 MDA 含 量与对照组相比分别下降了 7.4%和 17.5%。由此 可见,ICP 对大型蚤 MDA 含量的影响存在显著的 对映体选择性差异。





3 讨论(Discussion)

叶绿素 a 是衡量植物生长状况的重要指标之 一,其含量可以反映浮游植物的存活情况^[12]。本研 究发现,对于(+)-ICP,最低浓度 10^{-4} mg·L⁻¹浓度组 对叶绿素 a 含量均表现为促进作用,而 $10^{-2} \sim 1$ mg· L⁻¹浓度组对叶绿素 a 含量均表现为抑制作用;而对 于(-)-ICP,除了最高浓度 1 mg·L⁻¹,其余浓度组对 水华微囊藻的叶绿素 a 含量均表现为促进作用。这 个结果说明 ICP 这 2 个对映体在一定的浓度范围对 水华微囊藻的叶绿素 a 含量表现出"低促高抑"的 现象,称为 Hormesis 效应^[13]。低促现象的出现一方 面可能是因为低浓度的 ICP 启动了水华微囊藻机体 内修复系统功能及过量修复;而另一方面也可能是 因为水华微囊藻利用了 ICP 中的 P 元素作为其营养 源,提高了叶绿素 a 的含量,从而促进了藻类生 长^[14]。然而,随着 ICP 对映体浓度的增加,可能抑制 了水华微囊藻光合色素的合成,从而对水华微囊藻 产生的综合效应逐渐从促进转变为抑制。本实验结 果与 Lu 等^[15]对 ICP 胁迫斜生栅藻藻密度的研究结 果基本一致。Smythers 等^[16]研究发现,小球藻暴露 在除草剂拿捕净后,光合色素合成酶活性受到抑制, 导致叶绿素 a 含量降低。此外,从水华微囊藻出现 抑制作用时的 ICP 及其对映体浓度也可以推出它们 的毒性大小顺序为:(+)-ICP>rac-ICP>(-)-ICP。这与 Lin 等^[2]研究中 ICP 及其对映体对大型蚤的 48 h 急 性毒性大小顺序一致。

正常生物机体内都有一套抗氧化防御系统(如 SOD 和 CAT),通过清除过多的自由基来防止氧化 及其代谢产物对机体的损伤。氧化和抗氧化系统的 平衡是决定细胞生存状态的关键因素。SOD 能够 催化超氧阴离子自由基(O₅·)生成 H₂O₂, 防止 O; ·在体内积累; 而 CAT 能将 H,O, 进一步分解成 H,O和O,,使机体免受H,O,的氧化损伤;所以机 体内的抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性代表了其清除氧 自由基的能力。另外 MDA 是脂质过氧化的产物, 它反映了活性自由基与生物膜的脂、酶和膜受体中 脂肪酸相互作用的结果。那么,当生物体受到环境 污染物的胁迫时,SOD、CAT 活性及 MDA 含量可以 综合反映生物机体内氧化和抗氧化系统的平衡状 态^[17]。本实验中, ICP 对水华微囊藻和大型蚤氧化 损伤的影响均表现出明显的对映体选择性差异。当 (+)-ICP 浓度≥10⁻³ mg·L⁻¹时,SOD 活性均低于对 照组,这可能是因为水华微囊藻在受到胁迫时,藻内 会产生的大量自由基,为了维持氧化与抗氧化之间 的平衡,SOD 作为抗氧化的第一道防线,当其清除 自由基时会优先被消耗,从而导致 SOD 活性下降。 Cao 等^[18]研究发现,刚毛藻在铅的胁迫下,会产生活 性氧自由基,刚毛藻的 SOD 优先被消耗。而在(-)-ICP 胁迫下,SOD 活性与对照组无显著差异,这可能 是因为(-)-ICP 毒性较低,在同样的浓度范围内,并 没有使水华微囊藻的氧化和抗氧化系统的平衡受到 干扰。Huang 等^[19]的研究表明,手性农药苯霜灵在 5 mg·L⁻¹浓度时会使斜生栅藻 SOD 活性降低,S- (+)-苯霜灵对斜生栅藻 SOD 活性的影响大于 R-(-)-苯霜灵。CAT 酶是调节 H₂O, 水平的最重要的诱导 酶,当H₂O₂水平过高时,可能会影响 CAT 酶活 性^[20]。ICP 这 2 个对映体对水华微囊藻 CAT 活性 的影响与 SOD 活性刚好相反。可能是因为在(+)-ICP 胁迫下,由于藻类 SOD 的大量消耗从而产生了 大量的 H,O,,H,O,在藻体生成后需要 CAT 将其分 解为H,O和O,使机体免受H,O,的氧化损伤,所 以诱导了 CAT 活性的增加; 而在(-)-ICP 胁迫下, 藻 类没有受到严重的氧化损伤,因此 CAT 活性仅仅表 现为略微下降。SOD 和 CAT 此消彼长的结果表 明,2种酶能相辅相成地协助机体抵抗外界胁迫,体 现了生物体防御体系功能的复杂性^[21]。另外, ICP 及其对映体处理组中水华微囊藻 MDA 含量下降的 可能因为是当藻体受到低毒物质胁迫时,脂质过氧 化作用减弱,从而导致 MDA 含量降低。而脂质过 氧化作用减弱的原因还待进一步研究。Zhang 等^[22] 研究发现,手性农药环唑醇4个对映体对小球藻 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响大小为:3-(-)-环唑醇>1-(+)-环唑醇>2-(+)-环唑醇>rac>4-(-)-环唑 醇,呈现对映体选择性差异。Liu 等^[23]研究发现,手 性农药灭菌唑(TRZ)浓度为1 mg·L⁻¹时,暴露 96 h 对小球藻的 SOD、CAT 活性和 MDA 含量的影响大 小为:R-(-)-TRZ>Rac-TRZ>S-(+)-TRZ。类似的结 果也出现在 Liu 等^[24]的研究中。

同样的,浮游动物大型蚤在受到(-)-ICP和 rac-ICP 的轻微胁迫时,通过诱导自身的 SOD 酶来增强 抗氧化能力。而毒性较大的(+)-ICP 对大型蚤的胁 迫可能已经过了 SOD 的诱导期,而 CAT 活性的增 加从侧面印证了这种推测,因为前期 SOD 的大量消 耗产生了大量的 H₂O₂,从而诱导了 CAT 活性的增 加^[25]。Hu 等^[26]研究发现,氯菊酯的 2 个对映体 1Rtris-PM 和1S-cis-PM 诱导了 PC12 细胞的 CAT 酶而 抑制了 SOD 酶。另外, ICP 及其对映体处理组中大 型蚤 MDA 含量变化说明了(+)-ICP 浓度的增加会 对大型蚤造成更大程度的脂质过氧化作用,而相同 浓度的(-)-ICP 和 rac-ICP 处理组的 MDA 含量未高 于空白组,结合 SOD 活性和 CAT 活性的结果,可知 (-)-ICP 和 rac-ICP 处理组并未引起大型蚤的氧化损 伤,而 MDA 含量减少可能是因为脂质过氧化作用 减弱。Li 等^[27]发现三氯杀虫酯中毒性更大的 S-(+)-AF 会导致 PC12 细胞中 SOD 活性降低,而 MDA 含 量上升。

因此,ICP 对浮游生物的氧化损伤存在对映体 选择性差异,且对于浮游植物和浮游动物,毒性顺序 都表现为(+)-ICP>(-)-ICP。除了浮游植物和浮游动 物,Di 等^[28]研究发现,对于 4 种陆生生物 ICP 的 2 个对映体的毒性指向性与本文一致,且(+)-ICP 和 (-)-ICP 的毒性相差 232 倍。除了 ICP 之外,很多文 献也都发现其他手性化合物会引起氧化损伤的对映 体选择性差异。Hu 等^[26]研究发现,氯菊酯胁迫下, 1R-cis-PM 和 1S-cis-PM 诱导了 PC12 细胞的 CAT 活性上升而使 SOD 活性显著下降。Li 等^[27]发现三 氯杀虫酯的 S-(+)-AF 使得 PC12 细胞的 SOD 和 CAT 活性降低,MDA 水平升高。Huang 等^[29]研究 发现,(+)-已唑醇对斜生栅藻 SOD 活性产生的胁迫 压力大于(-)-已唑醇;而在诱导 CAT 酶活性上,(-)-已唑醇大于(+)-已唑醇。

综上所述,手性农药在使用过程中,除了高效对 映体对靶标生物有明显作用之外,其他无效或低效 的对映体也会对非靶标生物造成不同程度的伤害。 而本文研究的 ICP 对映体通过液相色谱进行拆分, 对于水华微囊藻的叶绿素 a、水华微囊藻和大型蚤 的氧化损伤指标 SOD 活性、CAT 活性和 MDA 含量 毒性影响大小均为(+)-ICP>(−)-ICP,且在 ICP 浓度 ≥10⁻⁴ mg·L⁻¹时,对水华微囊藻的叶绿素 a 和氧化 损伤就有明显的对映体选择性差异;在 ICP 浓度≥1 μg·L⁻¹时,对大型蚤的氧化损伤就有明显的对映体 选择性差异。此项研究结果为手性农药的环境生态 风险评价提供科学依据。

参考文献(References):

- [1] Chen Z W, Zou Y Q, Wang J, et al. Phytotoxicity of chiral herbicide bromacil: Enantioselectivity of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Science of the Total Environment, 2016, 548-549: 139-147
- [2] Lin K D, Liu W P, Li L, et al. Single and joint acute toxicity of isocarbophos enantiomers to *Daphnia magna* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(11): 4273-4277
- [3] Lu D H, Huang L D, Diao J L, et al. Enantioselective toxicological response of the green alga *Scenedesmus obliquus* to isocarbophos [J]. Chirality, 2012, 24(6): 481-485
- [4] Liu H G, Liu J, Xu L H, et al. Enantioselective cytotoxicity of isocarbophos is mediated by oxidative stress-induced JNK activation in human hepatocytes [J]. Toxicology, 2010, 276(2): 115-121

- [5] 朱欣凯. 水胺硫磷对东亚飞蝗的对映选择毒性及其机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2016: 20-21
 Zhu X K. Study on the mechanism of the enantioselective toxicity of isocarbophos to *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016: 20-21 (in Chinese)
- [6] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 211: *Daphnia magna* reproduction test [S]. Paris: OECD, 2012
- [7] International Organization for Standardization (ISO). IS06341: 1996 (E): Water quality-determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)—Acute toxicity test [S]. Geneva: ISO, 1996
- [8] Lyu K, Zhu X X, Wang Q Q, et al. Copper/zinc superoxide dismutase from the Cladoceran *Daphnia magna*: Molecular cloning and expression in response to different acute environmental stressors [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(15): 8887-8893
- [9] Kim H, Kim J S, Kim P J, et al. Response of antioxidant enzymes to Cd and Pb exposure in water flea *Daphnia magna*: Differential metal and age—Specific patterns [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2018, 209: 28-36
- [10] Wang M X, Zhang Y X, Guo P Y. Effect of florfenicol and thiamphenicol exposure on the photosynthesis and antioxidant system of *Microcystis flos-aquae* [J]. Aquatic Toxicology, 2017, 186: 67-76
- [11] Liang Q Q, Li Y S. A rapid and accurate method for determining protein content in dairy products based on asynchronous-injection alternating merging zone flow-injection spectrophotometry [J]. Food Chemistry, 2013, 141 (3): 2479-2485
- [12] Wang X F, Miao J J, Pan L Q, et al. Toxicity effects of *p*choroaniline on the growth, photosynthesis, respiration capacity and antioxidant enzyme activities of a diatom, *Phaeodactylum tricornutu* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 169: 654-661
- [13] Calabreseci E J. Evidence that hormesis represents an "o-vercompensation" response to a disruption in homeostasis
 [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 42(2): 135-137
- [14] Liu C X, Liu S Z, Diao J L. Enantioselective growth inhibition of the green algae (*Chlorella vulgaris*) induced by two paclobutrazol enantiomers [J]. Environmental Pollution, 2019, 250: 610-617
- [15] Lu D H, Huang L D, Diao J L, et al. Enantioselective toxicological response of the green alga Scenedesmus

obliquus to isocarbophos [J]. Chirality, 2012, 24(6): 481-485

- [16] Smythers A L, Garmany A, Perry N L, et al. Characterizing the effect of poast on *Chlorella vulgaris*, a non-target organism [J]. Chemosphere, 2019, 219: 704-712
- [17] 张钰昆, 巩宁, 车程, 等. 纳米氧化镍颗粒对长牡蛎 (Crassostrea gigas)抗氧化防御体系的影响[J]. 生态毒理 学报, 2019, 14(2): 268-279
 Zhang Y K, Gong N, Che C, et al. Effects of nickel oxide nanoparticles on antioxidant defense system of Crassostrea gigas [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 268-279 (in Chinese)
- [18] Cao D J, Shi X D, Li H, et al. Effects of lead on tolerance, bioaccumulation, and antioxidative defense system of green algae, Cladophora [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 112: 231-237
- [19] Huang L D, Lu D H, Diao J L, et al. Enantioselective toxic effects and biodegradation of benalaxyl in *Scenedesmus obliquus* [J]. Chemosphere, 2012, 87(1): 7-11
- [20] 黄竻丹. 几种手性农药在栅藻和蝌蚪中的选择性富集 及毒性效应研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015: 57-60 Huang L D. Enantioselective bioaccumulation and toxicity effects of several chiral pesticides on *Scenedesmus obliquus* and *Rana nigromaculata* tadpoles [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015: 57-60 (in Chinese)
- [21] 方汉孙, 张磊, 段舜山. 有机磷农药敌敌畏对赤潮异弯 藻(*Heterosigma akashiwo*)的毒物刺激效应[J]. 生态环 境学报, 2010, 19(5): 1025-1029

Fang H S, Zhang L, Duan S S. Hormesis effect of organophosphorus pesticide dichlorvos on harmful algal bloom specie *Heterosigma akashiwo* [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(5): 1025-1029 (in Chinese)

- [22] Zhang W J, Cheng C, Chen L, et al. Enantioselective toxic effects of cyproconazole enantiomers against *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Chemosphere, 2016, 159: 50-57
- [23] Liu R, Deng Y, Zhang W J, et al. Enantioselective mechanism of toxic effects of triticonazole against *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 185: 109691
- [24] Liu H J, Xia Y L, Cai W D, et al. Enantioselective oxidative stress and oxidative damage caused by Rac-and Smetolachlor to *Scenedesmus obliquus* [J]. Chemosphere, 2017, 173: 22-30
- [25] Fonseca T G, Carriço T, Fernandes E, et al. Impacts of *in vivo* and *in vitro* exposures to tamoxifen: Comparative effects on human cells and marine organisms [J]. Environment International, 2019, 129: 256-272
- [26] Hu F, Li L, Wang C, et al. Enantioselective induction of oxidative stress by permethrin in rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cells [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010, 29(3): 683-690
- [27] Li L, Hu F, Wang C, et al. Enantioselective induction of oxidative stress by acetofenate in rat PC12 cells [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(12): 1980-1986
- [28] Di S S, Cang T, Qi P P, et al. Comprehensive study of isocarbophos to various terrestrial organisms: Enantioselective bioactivity, acute toxicity, and environmental behaviors [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 10997-11004
- [29] Huang L D, Lu D H, Zhang P, et al. Enantioselective toxic effects of hexaconazole enantiomers against *Scenedesmus obliquus* [J]. Chirality, 2012, 24(8): 610-614