

有机磷农药对缢蛏 [*Sinonovacula constricta* (Lamarck)] 显微结构的影响

薛秀玲^{1, 2} 袁东星^{2*}

(1 华侨大学材料科学与工程学院, 泉州, 362021; 2 厦门大学环境科学研究中心, 厦门, 361005)

摘 要 在实验室模拟缢蛏的生长环境, 研究乐果和三唑磷对缢蛏的毒性效应. 以气相色谱法测定缢蛏体内有机磷农药的含量, 并通过光镜观察有机磷农药对缢蛏鳃和消化腺显微结构的影响. 结果表明: 缢蛏体内乐果和三唑磷的含量随着水体中有机磷农药的增加而增加, 有很好的剂量-效应关系, 但是无线性相关性. 乐果和三唑磷对缢蛏鳃显微结构的影响是: 鳃丝变短, 鳃丝间隔和基底膜结缔组织增生, 鳃孔、血管腔堵塞; 不同的是: 在乐果胁迫下, 上皮细胞纤毛脱落严重, 而三唑磷胁迫下, 上皮细胞纤毛增生. 乐果和三唑磷对缢蛏消化腺显微结构的影响主要表现为腺细胞界限模糊, 腺泡水肿变形、部分坏死; 结缔组织增生, 细胞间质疏松, 出现许多空泡; 有机磷农药的浓度高时消化腺细胞变性、坏死, 细胞质囊泡化.

关键词 乐果, 三唑磷, 缢蛏, 气相色谱, 显微结构, 毒理效应.

近年来, 随着有机磷农药 (OPs) 在滩涂养殖中的频繁使用, 污染事故陆续出现, 乐果和三唑磷是极可能对滩涂养殖环境造成严重影响的两种典型 OPs, 其理化性质相差很大, 是研究 OPs (强水溶性和强脂溶性的 OPs) 对生物毒性效应的代表性农药. 有研究表明, 鱼类某些特定的疾病和组织损伤是特定污染物毒理效应的可靠生物指标^[1].

本文通过化学分析和组织形态学的观察, 研究乐果和三唑磷对缢蛏的毒性效应, 初步揭示了 OPs 对贝类的中毒机制.

1 材料与方法

1.1 缢蛏中 OPs 残留的萃取

缢蛏 (*S. constricta*) 购自厦门龙海西边养殖区, 一年龄, 壳长 4—6cm, 体重 4.5—6.5g, 以反渗透水冲洗缢蛏外壳, 取出软组织, 用家用食物搅拌机搅碎、混匀, 制成浆状鲜样, 放入聚乙烯塑料袋内, 封口, 速冻.

将样品解冻, 置于滤纸上将水吸干, 准确称取 10.0g 组织样品置于 80ml 离心管中. 然后依次加入适量无水硫酸钠、0.5ml 10mg·l⁻¹ 磷酸三丁酯和 0.1ml 10mg·l⁻¹ 磷酸三苯酯. 再加入 15ml 乙酸乙酯, 超声波萃取 10min, 于 3000r·min⁻¹ 离心 5min, 倾出上清液, 将残渣再萃取一次, 合并两次上清液, 倒入装有无水硫酸钠的漏斗, 以少量乙酸乙酯洗涤漏斗, 收集滤液于 50ml 收集管中, 于 40℃ 水浴中用氮气吹脱溶剂至约 0.5ml, 用乙酸乙酯转移入样品瓶, 定容至 1.0ml, 气相色谱分析.

1.2 气相色谱分析

Agilent 6890 气相色谱仪: SPB-1701 毛细管色谱柱, 30m × 0.25mm, 涂层厚 0.5μm; 进样口温度 250℃; 火焰光度检测器 (FPD, 磷滤光片) 温度为 300℃, 氢气流速为 75ml·min⁻¹, 空气流速为 100ml·min⁻¹; 载气为高纯氮气, 流速 1.5ml·min⁻¹; 无分流进样, 进样量 1.0μl.

三唑磷浓度分析: 柱箱起始温度 90℃, 以 40℃·min⁻¹ 升温至 220℃, 保持 1min; 再以 30℃·min⁻¹ 升温至 260℃, 保持 6min; 三唑磷的保留时间为 9.96min, 替代物磷酸三苯酯的保留时间为 10.24min.

乐果浓度分析: 柱箱起始温度 120℃, 保持 1min; 再以 30℃·min⁻¹ 升温至 270℃, 保持 6min; 乐果的保留时间为 6.62min, 内标物磷酸三丁酯的保留时间为 5.58min.

* 联系人.

1.3 组织切片的制作与观察

有机磷农药暴污后第 14d 将各浓度组的缙蛭解剖, 取出鳃和消化腺, 用 Bouin's 液固定, 乙醇逐级脱水后, 经二甲苯透明、透蜡、石蜡包埋、切片 (厚度 7 μ m), 用苏木精-伊红 (hematoxylin-erosin, H. E.) 染色, 用 Olympus 显微镜观察并拍照^[2].

2 结果与讨论

2.1 缙蛭体内蓄积乐果和三唑磷的含量

按照三唑磷 96h LC₅₀ 的 1‰, 5‰和 50‰, 设定三唑磷毒性实验的浓度分别为 0.005, 0.025 和 0.25mg·l⁻¹, 同时设 1 个空白对照. 暴污 14d 后, 缙蛭体内三唑磷的含量分别为 0.045 ± 0.010, 0.026 ± 0.017 和 0.379 ± 0.031mg·kg⁻¹.

按照乐果 96hLC₅₀ 的 0.1‰, 0.5‰和 1‰, 设定乐果毒性实验的浓度分别为 0.01mg·l⁻¹, 0.05mg·l⁻¹ 和 0.1mg·l⁻¹, 同时设 1 个空白对照. 染毒后第 14d 采样, 缙蛭体内乐果的含量分别为 0.003 ± 0.001, 0.007 ± 0.001 和 0.021 ± 0.003mg·kg⁻¹.

由此可见, 缙蛭体内三唑磷和乐果随水体中农药浓度的增加呈增加趋势, 有很好的剂量-效应关系, 但无良好的线性关系.

2.2 鳃显微结构的变化

对照组缙蛭的鳃见图 1-1. 鳃丝排列整齐, 上皮细胞完整, 纤毛整齐地附着在鳃丝上皮的细胞上; 鳃丝和鳃丝间隔的血管腔正常, 血细胞分散于其中; 鳃内腔被瓣间隔分隔成许多与鳃丝平行的水管腔, 管腔内上皮细胞完整. 缙蛭暴污于乐果和三唑磷后, 则产生一系列慢性的病理变化, 鳃的病变见图 1-(2-5).

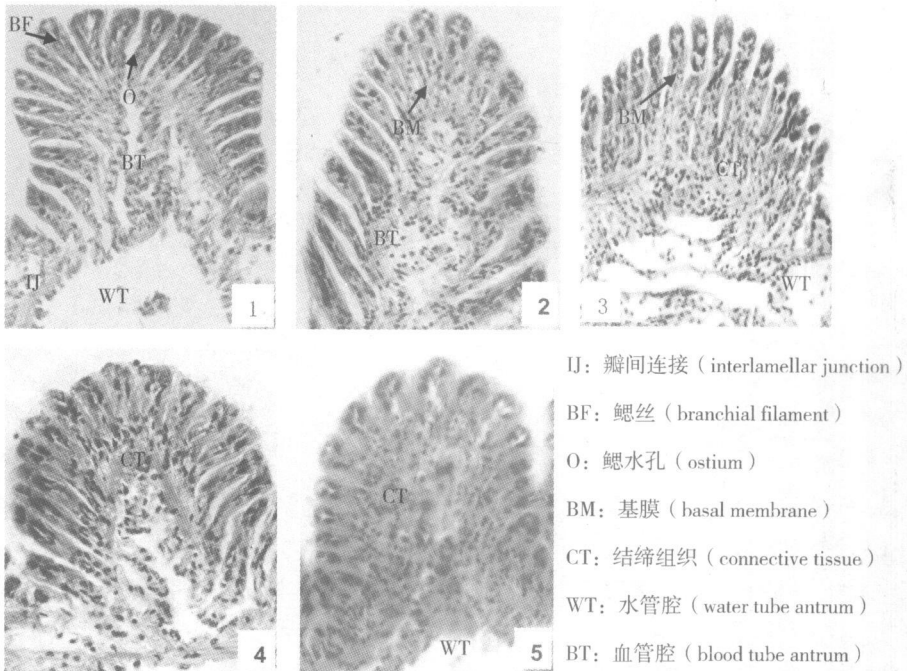


图 1 乐果和三唑磷染毒后缙蛭一个鳃丝簇显微结构的变化

对照组 (HE × 400): 正常的鳃丝簇 (上皮细胞, 丝间隔, 基底膜).

. 01mg·l⁻¹乐果 (HE × 400): 正常的上皮细胞, 丝间隔, 基底膜结缔组织有轻微的增生, 鳃内腔变小, 变窄.

. 1mg·l⁻¹乐果 (HE × 400): 鳃丝变短, 纤毛脱落, 丝间隔和基底膜结缔组织增生严重, 几乎堵塞鳃孔, 血管腔变小.

. 025mg·l⁻¹三唑磷 (HE × 400): 侧纤毛有增生现象, 丝间隔和基底膜结缔组织略有增生, 血管腔正常, 鳃内腔变小, 变窄.

. 25mg·l⁻¹三唑磷 (HE × 400): 鳃丝变短, 纤毛增生严重, 丝间隔和基底膜结缔组织增生非常严重, 鳃孔、血管腔几乎被堵塞.

Fig 1 Microstructure change in gill of *S. constricta* exposed to dimethoate and triazophos

2.3 消化腺显微结构的变化

缙蛭的消化腺（又称消化盲囊）为复管泡状腺，由导管、腺泡、疏松结缔组织组成。对照组缙蛭消化腺见图 2-1。缙蛭的消化腺呈深褐色，腺上皮排列整齐，腺泡与腺泡间界限清晰，腺泡内“Y”形导管清晰可见。当缙蛭暴露于乐果和三唑磷后，消化腺的颜色变成红褐色，并产生一系列慢性的病理变化，主要表现为结缔组织增生，农药浓度高时还导致消化腺细胞变性、坏死，细胞质囊泡化。见图 2-(2-6)。

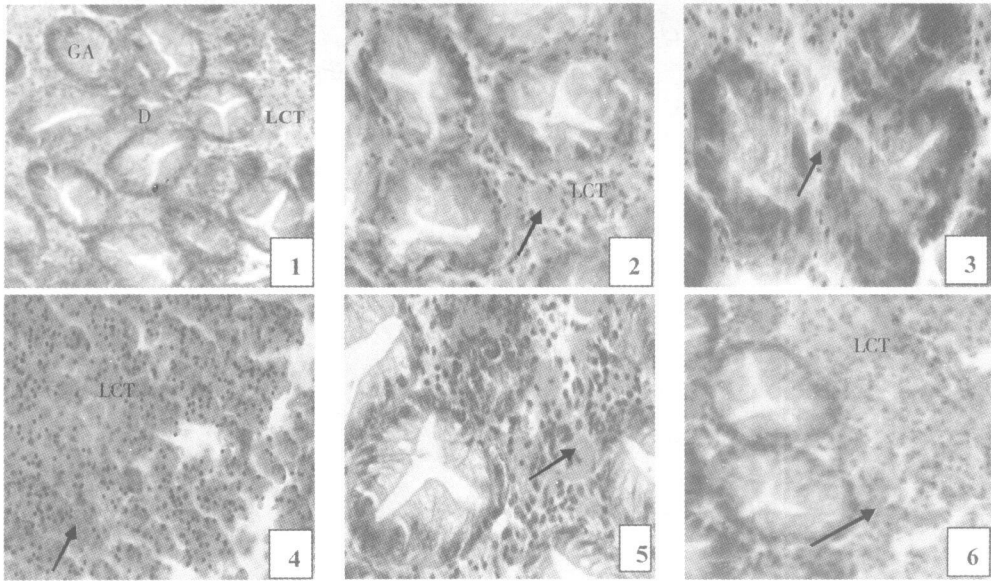


图 2 乐果和三唑磷染毒后缙蛭消化腺的显微结构变化

(D: 导管 (duct), GA: 腺泡 (gland alveolus), LCT: 疏松结缔组织 (loose connective tissue), : 指示炎性细胞)

1. 对照组 (HE × 100): 腺上皮排列整齐, 腺泡间界限清晰, 腺泡内“Y”形导管清晰可见。
2. 0.01 mg · l⁻¹乐果 (HE × 400): 有炎性细胞 (淋巴细胞, H. E. 染色呈红色) 浸润到细胞间质; 腺泡间的结缔组织有轻微的增生现象。
3. 0.1 mg · l⁻¹乐果 (HE × 400): 腺细胞界限模糊, 腺泡水肿变形, 部分坏死; 结缔组织增生严重, 消化腔有很多粘液和纤维素渗出物。
4. 0.1 mg · l⁻¹乐果 (HE × 400): 细胞间质中有许多被伊红染色小颗粒, 怀疑是炎性细胞浸润到细胞间质, 使纤维变性。
5. 0.025 mg · l⁻¹三唑磷 (HE × 400): 消化盲囊腺泡整齐, 腺细胞界限分明, 导管清晰; 有炎性细胞 (淋巴细胞, HE 中呈红色) 浸润到细胞间质; 腺泡间的结缔组织增生较严重。
6. 0.25 mg · l⁻¹三唑磷 (HE × 400): 消化盲囊腺泡界限模糊, 导管清晰。

Fig 2 Microstructure change in digestive gland of *S. constricta* exposed to dimethoate and triazophos

2.4 缙蛭对有机磷农药的富集作用

暴露 14d 后测定发现, 缙蛭对三唑磷的富集倍数高于乐果。从农药的理化性质分析可知, 三唑磷的 K_{ow} 值 3.34 高于乐果的 0.7, 脂溶性大于乐果, 是缙蛭对三唑磷的富集倍数高于乐果的主要原因。另外, 也与三唑磷分子量大, 水溶性小, 结构中含有苯环和环状结构, 在生物体内不易降解代谢有关。研究发现, 缙蛭体内乐果和三唑磷的量与水体中农药的浓度无线性关系, 主要原因是沉积物的存在。缙蛭是滩涂养殖的穴居动物, 不仅与水接触, 也与沉积物接触, 通过外套膜的渗透, 富集沉积物中的有机磷农药。

有机磷农药在沉积物上存在着复杂的溶解-吸附平衡, 沉积物中的微生物也能使有机磷农药降解。种种原因导致缙蛭富集三唑磷的量与水体中三唑磷的量之间的关系复杂。

2.5 有机磷农药对缙蛭鳃显微结构的影响

水生生物的鳃是污染物进入体内的第一位点, 是对污染物最敏感的器官。有关有机磷农药胁迫对鱼、虾的鳃组织形态影响的研究报道很多。如魏渲辉^[3]指出久效磷对美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*)

鳃显微结构的损伤表现为鳃小片基部粘连, 鳃小片上皮细胞角质化, 鳃小片上皮细胞水肿、变厚即增生. Dutta等^[4]报道经亚致死浓度的马拉硫磷暴露后, 鳃鱼鳃上皮细胞坏死破裂, 并与毛细血管脱离, 粘液分泌增多, 氯细胞增殖, 淋巴管肿胀. 然而未见有关有机磷农药引起双壳贝类组织病变的研究.

在本研究中, 有机磷农药对缢蛭鳃显微结构的影响主要表现为鳃丝变短, 丝间隔和基底膜结缔组织增生, 鳃孔、血管腔堵塞. 随着乐果和三唑磷浓度的增加, 鳃的显微结构的损伤逐渐加深. 不同的是, 三唑磷胁迫下, 上皮细胞纤毛增生, 而乐果胁迫下, 上皮细胞纤毛脱落严重. 贝类的鳃是接收外界离子、气体进入血液的器官, 鳃的损伤必然会造成贝类的呼吸困难和摄水、摄食功能的下降, 进一步导致复杂的生理问题.

2.6 有机磷农药对缢蛭消化腺显微结构的影响

张宝东等^[5]研究了氯化三丁基锡对鲤鱼肝脏和胰脏线粒体的影响, 发现细胞异常, 细胞质不均匀, 细胞器减少, 线粒体极少, 在残存线粒体中外膜界限消失, 线粒体上的嵴消失. GoH等^[6]报道被石油烃和重金属污染的美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的消化囊管的损伤表现在 hemocytic 细胞坏死和增生; 结缔组织和腺管中的血细胞增加; 其损伤的程度与镉浓度的增加呈线性相关. Nasci等^[7]也指出, 移植到高度城市工业化的亚热带河口的蛤, 结缔组织发生了严重的血细胞浸润. Wedderburn等^[8]发现重金属暴露下, 紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的消化腺导管出现囊泡化, 且粒细胞瘤出现的机率增高.

本研究有机磷农药对缢蛭消化腺显微结构的影响主要表现为: 腺细胞界限模糊, 腺泡水肿变形、部分坏死; 结缔组织增生, 细胞间质疏松出现许多空泡; 有机磷农药的浓度高时消化腺细胞变性、坏死, 细胞质囊泡化. 比较乐果与三唑磷染毒后缢蛭消化腺的显微结构变化, 发现在农药浓度较低时, 缢蛭产生一定的免疫性, 有应激反应; 而当农药浓度较高时, 缢蛭免疫功能丧失, 细胞发生变性、坏死, 受到严重破坏. 与乐果相比, 三唑磷对缢蛭鳃和消化腺的毒性效应更明显, 组织切片上显示出更大的伤害, 这与农药的分子结构和物化性质有关.

3 结论

在有机磷农药的胁迫下, 缢蛭体内的 AChE 受到抑制, 但 AChE 活性与有机磷农药并无明显的剂量-效应关系; 且由于贝类体内的 AChE 活性比哺乳动物中的低得多, 有机磷农药胁迫后更不易测定. 若结合组织病理变化和贝类组织器官内有机磷农药含量的化学分析, 研究有机磷农药对缢蛭的毒性效应, 可初步揭示有机磷农药对贝类的中毒影响机制.

参 考 文 献

- [1] Au D W T. The Application of Histocytological Biomarkers in Marine Pollution Monitoring—a Review. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, **48**: 817—834
- [2] 郑国锷. 生物显微技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1979, 12—112
- [3] 魏渲辉, 汝少国, 姜明等. 久效磷对美国红鱼鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活性和超显微结构的影响 [J]. 应用生态学报, 2003, **14** (12): 2289—2294
- [4] Dutta H M, Munshi J S D, Roy P K et al. Ultra-Structural Changes in the Respiratory Lamellae of the Catfish, *Heteropneustes Fossilis* after Sublethal Exposure to Malathion. *Environmental Pollution*, 1996, **92** (3): 329—341
- [5] 张宝东, 张清敏, 张毓琪等. 氯化三丁基锡对鲤鱼肝胰脏线粒体的影响 [J]. 交通环保, 2005, **16** (2): 26—27
- [6] GoH B G, Sina A R, Zapata-Perez O et al. Histopathological Effects of Petroleum Hydrocarbons and Heavy Metals on the American Oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, **31**: 439—445
- [7] Nasci C, Da-Ros L, Campana G, et al. Clam Transplantation and Stress-related Biomarkers as Useful Tools for Assessing Water Quality in Coastal Environments. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, **39**: 255—260
- [8] Wedderburn J M F, Adzen J, Sanger R C et al. The Field Application of Cellular and Physiological Biomarkers in the Mussel *Mytilus edulis* in Conjunction with Early Life Stage Bioassays and Adult Histopathology. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, **40**: 257—267

MICROSTRUCTURAL LESIONS OF *SINONOVACULA CONSTRICTA* EFFECTED BY DIMETHOATE AND TRIAZOPHOS

XUE Xiu-ling^{1, 2} YUAN Dong-xing²

(1 College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

(2 Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT

The toxic effects of two typical organophosphorous pesticides, dimethoate and triazophos, on *Sinonovacula constricta* (Lamarck) living in the intertidal sediment were investigated in this study. *S. constricta* were cultured in the laboratory simulating the razor living surrounding. Samples were taken at 14d after exposed to dimethoate and triazophos and triazophos. The concentrations of dimethoate and triazophos were determined with GC. Microstructure changes in gill and digestive gland of *Sinonovacula constricta* were also observed. The concentrations of dimethoate and triazophos in *S. constricta* increased with the increasing dimethoate and triazophos in water. There was a good dose-effect but no linear relationship. The microstructure of gill was destroyed when exposed to dimethoate and triazophos. Symptoms included the shortening of branchial filament, hyperplasia of interfilamentary junction and the basal membrane connective tissues, and the jam of water tube and blood tube. Cilia were falling from the epithelium when exposed to dimethoate, while hyperplastic under the triazophos exposure. When *S. constricta* were exposed to dimethoate and triazophos, the microstructure of digestive gland changed. Gland alveolus showed edema, malformation and partial necrosis. And the boundary between gland alveolus was blurred. The hyperplasia could be found in connective tissue. Many vacuoles were observed in the loose cytoplasm. Denatured and necrotic digestive cells and vacuolation of cytoplasm could be found when exposed to high concentration of dimethoate and triazophos.

Keywords dimethoate, triazophos, *Sinonovacula constricta* (Lamarck), GC, microstructural lesions, toxic effect