

· 监测技术 ·

# 基于荧光素酶发光体系测试饮用水中农药的综合毒性

姚冰, 王莉, 柴春彦, 刘海峰, 刘晓芳, 李锋, 刘国艳\*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:** 利用农药对荧光素酶催化的发光反应具有非常显著的抑制作用, 对甲拌磷、乐果、毒死蜱、百草枯等 4 种农药分别进行单一毒性和等比混合法联合毒性测试, 建立了一种快速检测饮用水中农药综合毒性的生物学方法。试验结果表明, 单一农药乐果、甲拌磷、百草枯和毒死蜱的  $EC_{50}$  值分别为 7.56 mg/L、12.7 mg/L、19.0 mg/L 和 65.3 mg/L, 毒性强弱顺序为乐果 > 甲拌磷 > 百草枯 > 毒死蜱, 相关系数 0.995; 将 4 种农药以等比方式配制成两两混合液后, 当质量浓度为 20.0 mg/L ~ 100 mg/L 时, 除百草枯与毒死蜱表现为毒性协同外, 其他两两混合农药的毒性以拮抗作用为主。

**关键词:** 荧光素酶; 发光体系; 农药; 综合毒性; 饮用水

**中图分类号:** O657.3

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1006-2009(2010)01-0037-04

## Determination of Synthetic Toxicity of Pesticides in Drinking Water Based on Inhibition of Bioluminescence from Luciferase Reacting System

YAO Bing, WANG Li, CHAI Chun-yan, LU Hai-feng, LU Xiao-fang, LI Feng, LU Guo-yan\*

(Agricultural and Biological Institute of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** A fast determination method was established for synthetic toxicity in drinking water. Four pesticides (thimet, cygon, chlorpyrifos and paraquat) were used to investigate single toxicity and synthetic toxicity by classic method of equal dose-effect experiment with inhibition of bioluminescence from luciferase reacting system. Results showed that  $EC_{50}$  were thimet 7.56 mg/L, cygon 12.7 mg/L, chlorpyrifos 19.0 mg/L and paraquat 65.3 mg/L respectively. Toxicity level order of the pesticides was following: cygon > thimet > paraquat > chlorpyrifos. The related coefficient was 0.995. When any two of the pesticides from range of 20.0 mg/L to 100 mg/L were mixed based on equal toxicity of single pesticide, antagonistic effect was manifested except that mixture of paraquat and chlorpyrifos showed the synergetic effect.

**Key words:** Luciferase; Luminescence system; Pesticides; Synthetic toxicity; Drinking water

农药是现代农业生产中防治植物病虫害不可缺少的生产资料, 但由于不合理的使用、排放或非法应用人工合成的化工类农药, 对人类赖以生存的水土食物链生态安全造成了严重影响, 从而直接或潜在危害人类健康<sup>[1]</sup>。现有调查资料表明, 饮用水源遭受农药污染的情况屡见不鲜<sup>[2-3]</sup>。传统的水质安全检测方法费时费力, 且水体中的农药成分复杂, 不能直接判定其综合毒性大小<sup>[4-5]</sup>。目前常用的生物监测技术以藻类、哺乳类、鱼类、水蚤等为受试对象, 代价高, 周期长, 操作繁琐, 难以满足饮用水中农药综合毒性评价快速、灵敏的要求<sup>[6-8]</sup>。因此, 建立快速检测饮用水中农药综合毒性的方法

是当前迫切需要解决的问题。

相关报道指出, 荧光素酶对环境中的痕量有毒有害物质非常敏感, 当环境中存在毒物时, 会改变其活性, 且反应产生的光强度随毒物含量而改变<sup>[9-10]</sup>。目前仅有研究报道某些金属离子和非金属离子会在不同程度上抑制荧光素酶活性<sup>[11]</sup>, 国

收稿日期: 2009-06-09; 修订日期: 2009-11-20

基金项目: 国家科技支撑计划世博科技专项基金资助项目 (06d05825)

作者简介: 姚冰 (1985—), 女, 江苏南通人, 在读硕士, 研究方向为食品安全检测与控制。

\* 通讯作者: 刘国艳

内外还没有利用荧光素酶发光体系测试饮用水中农药综合毒性的相关研究。今以常用的 4 种农药(甲拌磷、乐果、毒死蜱、百草枯)为对象,研究了荧光素酶的急性毒性,发现不同种类的农药对荧光素酶催化的发光反应均具有非常显著的抑制作用,从而建立了一种快速检测饮用水中农药综合毒性的生物学方法,为今后利用荧光素酶发光体系评价水质农药综合毒性奠定了基础。

## 1 试验

### 1.1 主要仪器与试剂

RL-1 型超微弱化学发光生物发光检测仪,西安瑞迈分析仪器有限公司。

荧光素酶(Luciferase)、D-荧光素(D-Luciferin)、5'-三磷酸腺苷(ATP)、二巯基苏糖醇(DTT)、N-三羟甲基甘氨酸(Tricine),美国 Sigma 公司;牛血清蛋白(BSA),西班牙 Hualvyuan 生物科技有限公司;氯化镁(分析纯),上海凌峰化学试剂有限公司;甲拌磷、乐果、毒死蜱、百草枯,上海化学试剂采购供应站。

### 1.2 荧光素酶反应体系的建立

(1) 复合保存缓冲液:称取 12 mg BSA、48.8 mg  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  和 3 mg DTT,用 pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液定容至 10 mL。

(2) 底物应用液:将 10  $\mu$ L 0.5 g/L D-Luciferin 溶液、900  $\mu$ L 复合保存缓冲液、100  $\mu$ L 0.25 g/L Luciferase 酶液混匀。

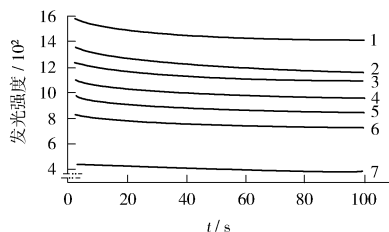
(3) 酶液稀释:取 100  $\mu$ L 底物应用液,先用 pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液尝试性稀释 2~10 倍,以控制其在加入  $6.5 \times 10^{-2}$  g/L ATP 应用液后的起始荧光发光强度为 900~1200 来确定酶液的稀释倍数,并将该质量浓度的稀释酶液作为反应酶液。

(4) 毒物测定:在反应杯中加入 250  $\mu$ L pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液、100  $\mu$ L 毒物和 50  $\mu$ L 应用稀释酶液,反应 15 min,加入 100  $\mu$ L ATP 应用液后测试,同时用 100  $\mu$ L pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液代替毒物做空白试验,控制反应液总体积为 500  $\mu$ L。每个质量浓度平行测试 3 次,从而得出不同质量浓度农药对荧光素酶反应的抑制率,抑制率 = (空白发光强度 - 样品发光强度) / 空白发光强度  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应机理

将甲拌磷用 pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液配制成不同质量浓度梯度,用荧光素酶反应体系对其进行毒性测试,反应 15 min 后,空白值为 1436;当甲拌磷质量浓度从 3.00 mg/L 上升至 200 mg/L 时,荧光素酶反应的相对发光强度由 1221 降至 414,见图 1。乐果、毒死蜱、百草枯的变化趋势也与甲拌磷一致,由此判断荧光素酶对农药非常敏感。研究发现,  $Mg^{2+}$  能与带负电荷的磷酸根离子结合,形成与荧光素酶-荧光素聚合物有高亲和力的 ATP- $Mg^{2+}$  复合物,这种复合物与聚合物上的活性位点有非常好的结合能力,最终生成的产物催化 D-荧光素并释放出荧光<sup>[12]</sup>。农药很可能是因为与该复合物竞争性结合荧光素酶-D-荧光素聚合物上的活性位点,从而使催化 D-荧光素的反应受到抑制,导致该反应所产生的光强度随着环境中农药的含量而改变。



1—空白; 2—3.00 mg/L; 3—12.0 mg/L; 4—25.0 mg/L;  
5—50.0 mg/L; 6—100 mg/L; 7—200 mg/L。

图 1 甲拌磷对 Luciferase-Luciferin-ATP 体系的影响

Fig 1 Influence on Luciferase-Luciferin-ATP system from cygon

在建立该荧光素酶反应体系的过程中发现,荧光酶的最适反应 pH 值为 7.8,与国内外的相关研究结果相一致<sup>[12]</sup>,当 pH 值 <6 或 >9 时,荧光素酶的活性急剧下降。酶促反应必须在相对稳定的缓冲体系中进行,试验发现 pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液体系的效果优于同等 pH 值条件下的 PBS 缓冲液和 B-R 缓冲液,酶促反应效率最高。根据酶的化学结构和性质,该试验选择 BSA 和 DTT 为荧光素酶的保护剂。添加 BSA 后,荧光素酶的活性增强,抑制趋势更加明显,但反应基线稳定性不佳,加入 DTT 后,荧光素酶得到了更好的保护,反应基线也变得稳定。

通过以上探索,建立了一种比较理想的荧光素酶反应体系和操作方法。随着农药质量浓度增加,

荧光素酶催化发光反应的能力越来越低,利用该体系可对常用的 4 种农药进行单一和联合毒性测试。

### 2.2 单一毒性测试

将甲拌磷、乐果、毒死蜱、百草枯 4 种农药用 pH 值 = 7.8 的 Tricine 缓冲液配制成不同质量浓度梯度,分别为 3.00 mg/L、6.00 mg/L、12.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L。用荧光素酶反应体系对单个农药进行毒性测试,获得农药质量浓度与抑制率之间的线性关系,求出回归方程。

应用 Origin 6.0 中的 Boltzmann 公式,将不同质量浓度农药对荧光素酶反应的剂量 - 效应数据拟合,拟合曲线公式为:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + A_2$$

式中, y 表示质量浓度为 x 时的抑制率。4 种

农药的回归方程见表 1,剂量 - 效应曲线见图 2 (a) (b) (c) (d)。

将荧光素酶催化的发光反应抑制率为 20% 时对应的农药质量浓度定义为检测限,即 EC<sub>50</sub> 值。应用直线内插法计算 EC<sub>50</sub> 值,见表 1。

表 1 4 种农药的回归方程与 EC<sub>50</sub> 值

农药	回归方程	p	R <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
甲拌磷	$y = \frac{15.1 - 67.92}{1 + e^{(x - 5.29)/0.71}} + 67.92$	<0.05	1.000	12.7
百草枯	$y = \frac{17 - 72.14}{1 + e^{(x - 6.25)/0.7}} + 72.14$	<0.05	0.995	19.0
毒死蜱	$y = \frac{1.67 - 49.29}{1 + e^{(x - 6.31)/0.59}} + 49.29$	<0.05	0.997	65.3
乐果	$y = \frac{18.56 - 64.25}{1 + e^{(x - 5.35)/0.71}} + 64.25$	<0.05	0.999	7.56

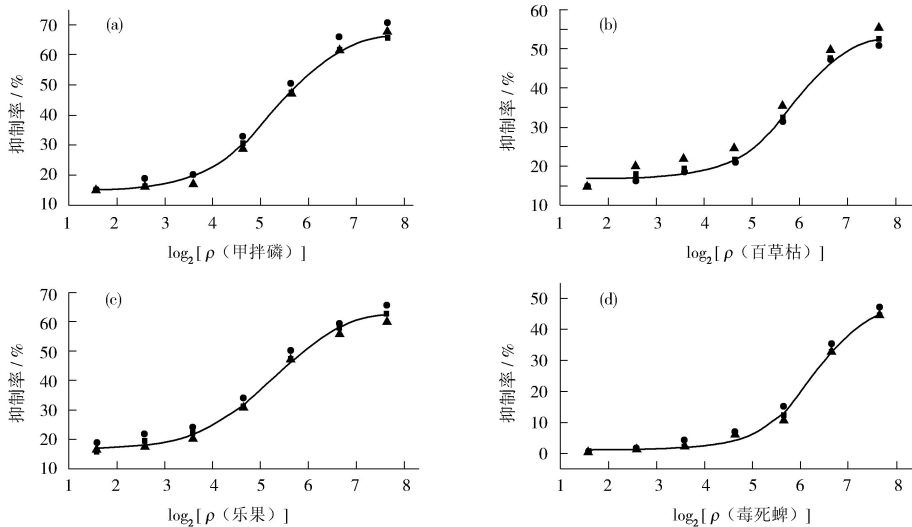


图 2 4 种农药的剂量 - 效应曲线

Fig 2 Dose-effect curves of four pesticides

试验结果表明,荧光素酶体系发光强度随着农药质量浓度增加而下降,即荧光素酶催化的发光反应抑制率与农药质量浓度成正相关,相关系数为 0.995 ~ 1.000, p 值显著水平 < 0.05。4 种农药对荧光素酶的急性毒性强度也不同,就反应 15 min 后的 EC<sub>50</sub> 值而言,毒性强弱为乐果 > 甲拌磷 > 百草枯 > 毒死蜱。

### 2.3 联合毒性测试

二元农药的联合毒性作用测试,可将其分别配制成 6 个质量浓度梯度: 3.00 mg/L、6.00 mg/L、

12.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L、100 mg/L (> 100 mg/L 在现实快速检测中意义不大)。根据单一农药的 EC<sub>50</sub> 值,按毒性单位 1:1、1:4 的方式,将 4 种农药两两混合,使配制的单个农药质量浓度梯度与混合液中总农药的质量浓度梯度相同,以测试 4 种农药两两混合后的联合毒性。测试结果表明,4 种农药的相互作用特征为:在较低质量浓度下,协同或拮抗作用不明显;在较高质量浓度 (> 20.0 mg/L) 下,除百草枯与毒死蜱表现为毒性协同外,其他两两混合农药的毒性以拮抗作用为主。

农药混合物对荧光素酶反应体系的抑制作用见图 3(a) (b) (c) (d) (e) (f)。

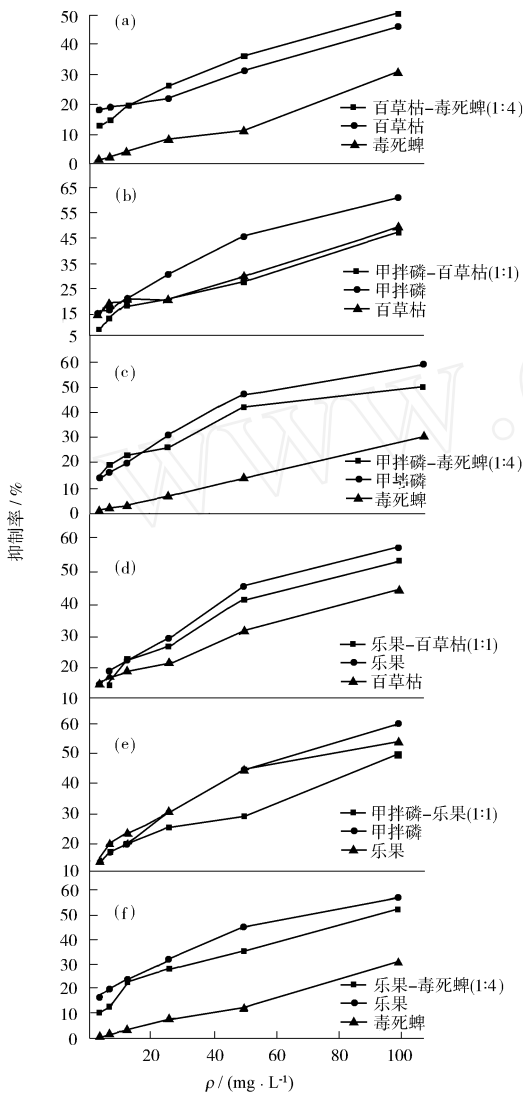


图 3 农药混合物对荧光素酶反应体系的抑制作用  
Fig 3 Inhibition effect of pesticide mixture from luciferase reacting system

### 3 结语

(1) 农药能有效抑制荧光素酶活性, 使反应发光强度下降, 且随着农药质量浓度增加, 荧光素酶催化发光反应的能力越来越低。

(2) 乐果、甲拌磷、百草枯、毒死蜱 4 种农药对于荧光素酶的毒性强度不同, 就  $EC_{50}$  值而言, 毒性强弱为乐果 > 甲拌磷 > 百草枯 > 毒死蜱。

(3) 将 4 种农药以等比方式配制成两两混合液后, 当质量浓度为 20.0  $\text{mg/L}$  ~ 100  $\text{mg/L}$  时, 除百草枯与毒死蜱表现为毒性协同外, 其他两两混合农药的毒性以拮抗作用为主。

### [参考文献]

- [ 1 ] 张青, 周国强. 农药对我国农产品污染的现状与控制对策 [J]. 洛阳大学学报, 2007, 22 (2): 46 - 49.
- [ 2 ] CHRISTEN K. Pesticide mixtures ubiquitous in U. S. streams [J]. Environmental Science and Technology, 2006, 40 (11): 3446 - 3453.
- [ 3 ] STACKELBERG P E, KAUFFMAN L J, AYERS M A, et al. Frequently co-occurring pesticides and volatile organic compounds in Public supply and monitoring wells, southern New Jersey, USA [J]. Environmental Toxicology Chemistry, 2001, 20 (4): 853 - 865.
- [ 4 ] 康长安, 何娟, 杨柳, 等. 色谱、光谱及联用技术在多农药残留检测中的应用 [J]. 环境监测管理与技术, 2007, 19 (4): 9 - 14.
- [ 5 ] MONOSSON E. Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment [J]. Environment Health Perspectives, 2005, 113: 383 - 390.
- [ 6 ] 刘小卫, 陆光华. 主动生物监测技术在水环境风险评价中的应用 [J]. 环境监测管理与技术, 2008, 20 (3): 12 - 15.
- [ 7 ] TOUSSANT M W, BRENNAN L M, ROSENCRANCE A B, et al. Acute toxicity of four drinking water disinfection by-products to Japanese medaka fish [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2001, 66: 255 - 262.
- [ 8 ] GIANCARLO S. Surface and ground waters characterization in Tuscany (Italy) by using algal bioassay and pesticide determinations: comparative evaluation of the results and hazard assessment of the pesticides impact on primary productivity [J]. Chemosphere, 2005 (58): 571 - 578.
- [ 9 ] ALEXANDER D C, COSTANZO M A, GUZZO J, et al. Bazing-towards the next millennium: luciferase fusions to identify genes responsive to environmental stress [J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2000, 123: 81 - 94.
- [ 10 ] DELUCA M. Firefly luciferase [J]. Adv Enzymol, 1976, 44: 37 - 38.
- [ 11 ] RODRIGUEZ N S, PETUSHKOV V N. Effect of different salts and detergents on luciferin-luciferase luminescence of the enchytraeid Fridericia heliota [J]. JPPB: Biology, 2006, 83: 123 - 128.
- [ 12 ] 蒋宇扬, 金振华, 王书锦, 等. 萤火虫荧光素酶的分离纯化及其特性的研究 [J]. 清华大学学报 (自然科学版), 1998, 10 (6): 16 - 19.