

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00528

毒死蜱(CPF)对河川沙塘鳢幼鱼的急性毒性

丁正峰^{1,2}, 薛晖¹, 王晓丰¹, 史阳白¹, 李潇轩¹

1. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017;

2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097

摘要: 采用静水生物测试法研究了毒死蜱(CPF)对河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)幼鱼的急性毒性效应并进行了安全评价。设定 0 mg/L、0.18 mg/L、0.36 mg/L、0.57 mg/L、0.86 mg/L 和 1.1 mg/L 6 个 CPF 质量浓度梯度进行急性暴露实验, 以肝超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和谷胱甘肽(GSH)含量为指标, 研究 CPF 污染对幼鱼肝抗氧化系统的影响。结果表明, CPF 浓度升高对实验鱼产生了较大毒性, 24 h、48 h 和 96 h LC₅₀ 分别为 (0.296±0.019) mg/L、(0.16±0.036) mg/L 和 (0.052±0.003) mg/L, 随着时间延长呈显著下降趋势, 符合双曲线衰减模型($R=0.999\ 9$, $P<0.000\ 1$), 安全浓度为 (0.014±0.003 1) mg/L; 低浓度染毒条件下, CAT 活性随时间变化较小, 在 0.57 mg/L CPF 染毒 96 h 后 CAT 活性达到最大值, 之后随药物浓度的升高而降低, CAT 活性随时间和药物浓度呈极显著变化($P<0.01$); SOD 活性变化与 CAT 相似, 在时间和不同浓度 CPF 的共同作用下, SOD 活性表现出显著差异($P<0.05$); 药物对 GSH 含量的影响不大, 在 0.36 mg/L 以上浓度组, 24 h 和 48 h 的含量有所下降, 96 h 的含量则维持在较高水平, GSH 含量随时间呈现极显著变化($P<0.001$); 由此可见, 肝 CAT、SOD 酶活性和 GSH 含量作为毒理学指标能较好地评价 CPF 毒性效应。组织病理观察发现, CPF 污染对河川沙塘鳢幼鱼的鳃、肝均造成严重损伤: 鳃丝紊乱、上皮细胞增生, 鳃小片肥大、充血, 鳃弓软骨细胞变性、溶解; 肝细胞发生实质空泡化, 细胞间隙增大, 胆管内皮细胞肥大隆起。

关键词: 毒死蜱; 河川沙塘鳢幼鱼; 急性毒性; 抗氧化系统; 组织病理

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0528-08

毒死蜱 (Chlorpyrifos, CPF), 又名乐斯本 (Lorsban), 化学名 O, O-二乙基-O-3, 5, 6-三氯-2-吡啶硫逐磷酸酯, 属世界卫生组织(WHO)Class II 中度危害杀虫剂, 是目前全球应用最广泛的农药之一^[1-2], 在中国, 2003 年 CPF 的销售额为 4.6 亿元, 居所有杀虫剂的首位^[3]。由于 CPF 的广泛使用, 在许多地区的土壤、大气、雨水、地下水等环境中均能检测到残留^[4], 因水体 CPF 污染造成鱼类死亡的事件也越来越多, 农药对其产生的危害最终会通过富集浓缩和食物链传递给人类^[2,5]。因此, CPF 对水产养殖品种及水环境的安全性越

来越成为人们关注的焦点。

河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)隶属虾虎鱼亚目、塘鳢科, 为一种淡水小型底栖肉食性鱼类, 广泛分布于长江、钱塘江和闽江等水系, 近年来随着其人工繁育技术的突破^[6-7], 人工养殖规模不断扩大, 已成为一种重要的经济养殖种类。CPF 对动物的危害性研究, 是近年来的研究热点之一, 但主要集中在大型蚤、轮虫、虾和小鼠等^[2,8-12], 对河川沙塘鳢的毒性研究尚未见报道。本研究采用静水生物法测试了 CPF 对河川沙塘鳢幼鱼的急性毒性, 研究了急性暴露对河川沙

收稿日期: 2011-09-02; 修订日期: 2011-11-25.

基金项目: 江苏省水产三项工程(J2009-42).

作者简介: 丁正峰(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事水产经济动物病害防治研究. E-mail: dingzf@yeah.net

通信作者: 薛晖, 高级工程师, 从事水产动物疾病学研究. E-mail: jsxuehui@163.com

塘鳢幼鱼肝抗氧化系统的影响及主要组织的病变情况, 为科学安全使用 CPF 农药、开展河川沙塘鳢的生态养殖和水产品质量安全控制提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用鱼取自江苏省淡水水产研究所禄口基地, 体质量(5.52 ± 0.41) g, 体长(8.1 ± 0.32) cm, 选取体质健壮、反应灵敏的个体进行实验, 驯养 7 d, 实验前 1 d 停止投喂。CPF(100%分析纯, 购自美国陶氏益农公司)是一种脂溶性有机磷酸脂类化合物, 水溶性很低, 但在溶媒二甲基亚砷(DMSO)中能够迅速且完全溶解^[8], 因此本实验采用 DMSO 助溶的方式进行药液配置($V/V=0.01\%$)。

1.2 实验条件

实验在 $80\text{ cm} \times 58\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ 的聚乙烯塑料水族箱中进行, 养殖用水为经曝气 3 d 的净化水, 每天采用便携式多参数水质分析仪(YSI-ADV6600)监测水质, pH 值 6.5~8.0, 总硬度 10~250 mg/L (以 CaCO_3 计), 实验温度为 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 溶解氧不低于 7 mg/L, 自然光照。为防止摄食的影响, 实验期间不投喂饵料, 驯养和实验期间幼鱼生长正常。

1.3 实验设计

根据静水生物测试法^[13], 实验期间不更换实验液, 为确定药液质量浓度的大致范围, 先进行预实验, 参照文献[10]设定预实验药物质量浓度为 0.125 mg/L、0.50 mg/L、1.1 mg/L 和 5 mg/L, 每个浓度组放 4 尾河川沙塘鳢幼鱼, 观察 24 h, 在最大耐受浓度和 100%致死浓度之间按等对数间距, 设置 5 个正式实验的药物质量浓度, 分别为 0 mg/L、0.18 mg/L、0.36 mg/L、0.57 mg/L、0.86 mg/L 和 1.1 mg/L。每个浓度设 2 个平行组, 另设空白对照组和助溶剂 DMSO 对照组($V/V=0.01\%$), 每个浓度组中投放河川沙塘鳢 20 尾, 在实验中观察其行为和中毒症状。中毒后, 经多次刺激无反应则判断为死亡, 将其捞出并记录死亡数。

在暴露 24 h、48 h 和 96 h 后, 每次每个浓度下取 3 尾鱼, 测定肝生化指标(SOD、CAT 和 GSH)。取材时用渔网将鱼迅速捞出, 尽量减少刺激, 并

用湿毛巾包裹, 在冰上取其肝, 转入冻存管, 置于 -70°C 超低温冰箱中保存待测。

1.4 组织匀浆制备及酶活性的测定

用 4°C 预冷的 0.86%生理盐水漂洗样品, 去除血液, 剪去表面附着的结缔组织, 再用滤纸吸去表面水分, 按质量: 体积=1:10 加入上述生理盐水, 冰浴条件下, 通过超声波进行匀浆。匀浆液用冷冻离心机(Eppendorf 5810R) 4 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液备用。酶活性的测定方法及活力单位(U)定义参见文献[14]。

1.5 组织病理观察

取 0.36 mg/L 浓度组感染 96 h 后的实验鱼 3 条, 分离鳃、肝组织, 经 Bouin's 液固定 24 h 后, 用体积分数为 75%的酒精浸洗, 并保存于该酒精中备用。固定后的组织经酒精脱水, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μm , 再用苏木精-伊红染色^[15], 中性树胶封片后在显微镜(Leica DMLB2 型)下观察, 并用 Leica DC300F 型数码摄像系统拍照。

1.6 数据处理

采用寇氏法(Karber)^[13]计算出 24 h、48 h 和 96 h 的 LC_{50} 以及 $\lg\text{LC}_{50}$ 的 95%置信限, 安全浓度 $=48\text{ h } \text{LC}_{50} \times 0.3 / (24\text{ h } \text{LC}_{50} / 48\text{ h } \text{LC}_{50})^{2[16]}$; 所有检测指标均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)进行表述, 通过统计软件 SPSS 16.0 对染毒鱼的死亡率及肝生化指标的多次测量值等数据进行重复测量方差(repeated measures)分析, 采用双因素方差(Two-Way ANOVA)分析时间和 CPF 浓度对河川沙塘鳢幼鱼肝抗氧化系统的交互影响, 通过 SigmaPlot 12.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 河川沙塘鳢幼鱼的中毒症状

急性毒性实验期间, 空白对照组、DMSO 对照组均未发现幼鱼中毒及死亡, 其他实验组在中毒初期, 鱼体向一侧倾斜, 在水中侧翻、打转, 急速游动或上下乱窜, 有些表现为腹部朝上, 随着中毒时间的延长, 呼吸速率变慢, 向箱壁撞击, 身体僵直、抽搐, 沉入水底, 但并未死亡, 持续数小时后头朝下、尾巴上翘, 逐渐丧失运动能力, 吻

部和腹部充血,鳃盖张开,最后躺卧箱底。

2.2 CPF 对河川沙塘鳢幼鱼的急性毒性效应

如图 1 所示,随着 CPF 浓度的增加,其毒性作用不断增强,沙塘鳢幼鱼死亡率逐渐上升。随着时间的延长,同一浓度 CPF 对幼鱼毒性作用亦随之增强。相同染毒时间内,浓度越高,幼鱼死亡率越高;相同浓度下,染毒时间越长,死亡率越高。

以 Karber 方程对实验结果进行统计处理,得出 24 h、48 h 和 96 h 的 LC_{50} 分别为 (0.296 ± 0.019) mg/L, (0.16 ± 0.036) mg/L, (0.052 ± 0.003) mg/L,安全浓度为 (0.014 ± 0.003) mg/L,半数致死浓度随着时间延长呈显著下降趋势,符合双曲线衰减模型

$$LC_{50} = \frac{0.7627 \times 28.8}{28.8 + X} - 0.126 \quad (R=0.9999, P<0.0001)。$$

式中 X 表示暴露时间。

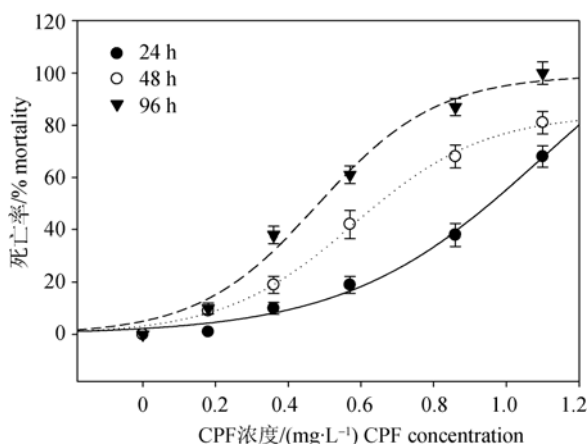


图 1 CPF 质量浓度和暴露时间对河川沙塘鳢幼鱼死亡率的影响

Fig.1 Impact of CPF concentration and exposure time on the mortality of *Odontobutis potamophila* juveniles

2.3 CPF 对河川沙塘鳢幼鱼肝抗氧化酶活性的影响

如图 2 所示,在低浓度(0.18 mg/L)染毒条件下,CAT 的活性随时间的延长基本没变化;当染毒 24 h 后,浓度为 0.36 mg/L 的 CPF 对 CAT 具有激活作用,酶活性较对照组和低浓度组高,但随药物浓度的继续升高,酶活性呈下降趋势;染毒 48 h 后,CAT 酶活性的变化与 24 h 变化趋势相似,但其活性较 24 h 低些;96 h CAT 的酶活性变化幅度较大,在 CPF 浓度为 0.57 mg/L 时,CAT 活性达到了最大值,之后随药物浓度的升高而降低。

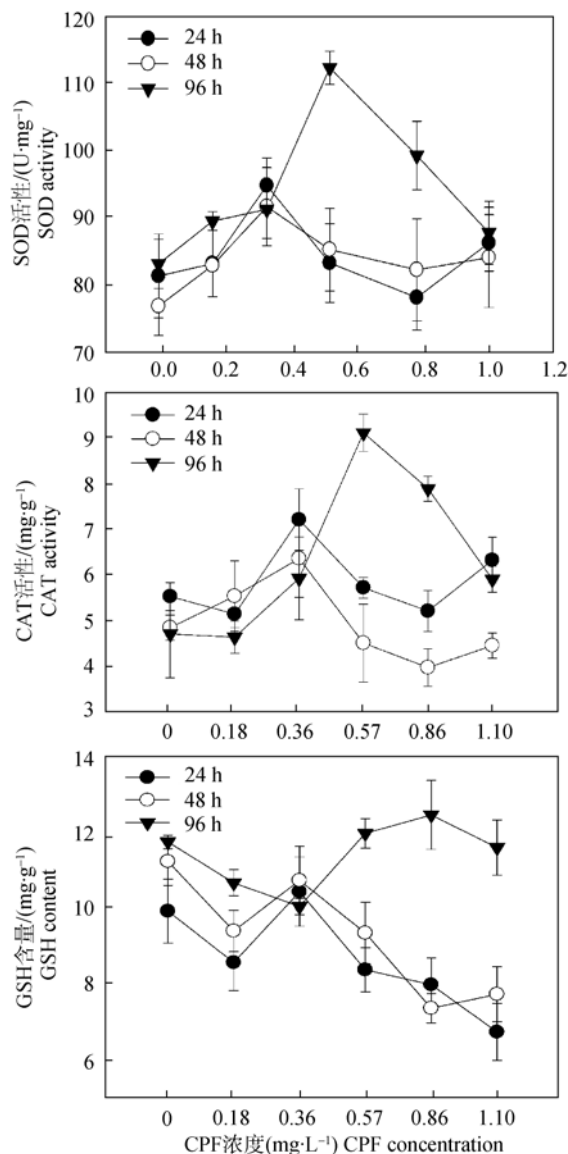


图 2 不同时间、CPF 浓度对河川沙塘鳢幼鱼肝 SOD, CAT 活性及 GSH 含量的影响

Fig. 2 Effect of CPF concentration and exposure time on activity of SOD, CAT, and GSH content in the liver of *Odontobutis potamophila* juveniles

CAT 活性随时间和药物浓度的变化呈极显著变化 ($P<0.001$, 表 1)。

SOD 的变化趋势与 CAT 相似,在染毒 24 h 和 48 h 时药物对酶活性的影响不显著;到 96 h 时,在 CPF 浓度为 0.57 mg/L 的条件下,SOD 的活性达到最大值之后随药物浓度升高其活性又下降 ($P<0.05$, 表 1)。

GSH 含量的变化如图 2 所示,药物浓度对 GSH 含量的影响不大,在低浓度组染毒条件下其

含量基本没变化; 当 CPF 浓度达到 0.36 mg /L 以上时, 其 24 h 和 48 h 的含量有所下降, 96 h 的含量则维持在较高水平。GSH 含量随暴露时间延长出现了极显著变化($P<0.01$, 表 1)。

2.4 组织病理观察

2.4.1 鳃 肉眼观察, 临死或刚死去病鱼的鳃丝一般都有不同程度的充血。切片观察, 正常鱼的鳃小片由上皮组织、结缔组织、毛细血管等构成, 其上皮组织中扁平细胞呈单层有序排列, 细胞核圆或椭圆, 结构完整。病鱼上皮细胞增生, 增生细胞有些聚集成大小不等的块状, 鳃丝紊乱, 部分脱落, 原有结构消失; 鳃小片增粗, 部分鳃血管内有大量血细胞凝结, 尖端膨胀; 鳃弓软骨细胞溶解、形成空泡, 软骨组织边缘有细胞脱落(图 3)。

2.4.2 肝 肉眼观察, 有的病鱼肝出现点状充血, 有的颜色泛黄或苍白。切片观察, 正常鱼的肝组织结构清晰, 肝索由中央静脉向四周呈放射状, 肝细胞呈多角状, 排列均匀规则。病鱼肝细胞肥大, 细胞间隙增大, 排列疏松, 肝细胞实质空泡化, 细胞解体, 形成肝细胞的局灶性坏死; 肝胆管上皮细胞异常, 细胞萎缩, 空隙较明显, 内皮细胞肥大隆起, 发生融合, 导致胆管壁粗糙不平(图 4)。

3 讨论

3.1 CPF 对河川沙塘鳢的急性毒性效应

急性毒性实验对阐明受试动物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义, 是药物安全评

价的重要指标。有毒物质对鱼类的毒性作用可分为 4 级^[17](表 2), 实验中 CPF 对河川沙塘鳢幼鱼的 96 h LC_{50} 为 (0.052 ± 0.003) mg/L, 属剧毒农药。CPF 对水生动物有极高毒性, 对新糠虾(*Neomysis integer*)、隆线蚤(*Daphnia carinata*)、罗非鱼(*Nile tilapia*)、乌鳢(*Channa punctatus*)等的急性毒性实验均有报道^[10-12,18], 其 96 h LC_{50} 分别为 0.13 μ g/L、0.24 μ g/L、1.57 mg/L 和 81.98 μ g/L; 与其他水生生物相比, 河川沙塘鳢对 CPF 的耐受性较低, 96 h LC_{50} 低于罗非鱼, 高于水蚤及糠虾等甲壳动物, 而与乌鳢最为接近, 分析是由于沙塘鳢和乌鳢同属鲈形目, 分类地位较近, 对药物的敏感性更为相似。

据调查, 2008 年台湾市场上 23%的鱼产品检测出 CPF 残留, 通过对 11 家养殖场的所有环节进行排查, 发现在所投喂的饲料中存在高 CPF 残留^[19], 每天投喂这些饲料使得农药在鱼体内大量积累; 研究还发现加强光照、提高温度与水体 pH, 能够有效促进 CPF 的降解^[3]。因此, 水产养殖场应加强水源、器械及饲料等的管理, 在养殖区域的田间应尽量避免连续施用 CPF, 同时应强化清塘管理, 降低水位后采用底泥暴晒与生石灰泼洒相结合的方式, 促进土壤及水体中的 CPF 降解。

3.2 CPF 对河川沙塘鳢肝抗氧化系统的影响

CPF 同其他有机磷类(OP)农药一样, 会对生物体造成氧化胁迫, 破坏氧自由基的代谢平衡, 造成机体损伤^[8]。而肝是机体最重要的解毒器官, 对 CPF 的亲合力较大, 药物会通过不断被摄取而

表 1 时间和 CPF 浓度对河川沙塘鳢幼鱼肝抗氧化系统的交互影响结果
Tab.1 Results of two-way ANOVA about the interaction between exposure time and CPF concentration on parameters of oxidative stress response in *Odontobutis potamophila* juveniles

项目 item	变量 source of variation	df	F	P
过氧化氢酶 CAT	时间 time	2	17.082	<0.001
	CPF 浓度 CPF concentration	5	6.457	<0.001
	时间×CPF 浓度 time×CPF concentration	10	8.349	<0.001
超氧化物歧化酶 SOD	时间 time	2	10.122	<0.001
	CPF 浓度 CPF concentration	5	1.477	0.231
	时间×CPF 浓度 time×CPF concentration	10	2.064	0.045
谷胱甘肽 GSH	时间 time	2	9.815	<0.001
	CPF 浓度 CPF concentration	5	2.036	0.097
	时间×CPF 浓度 time×CPF concentration	10	1.618	0.141

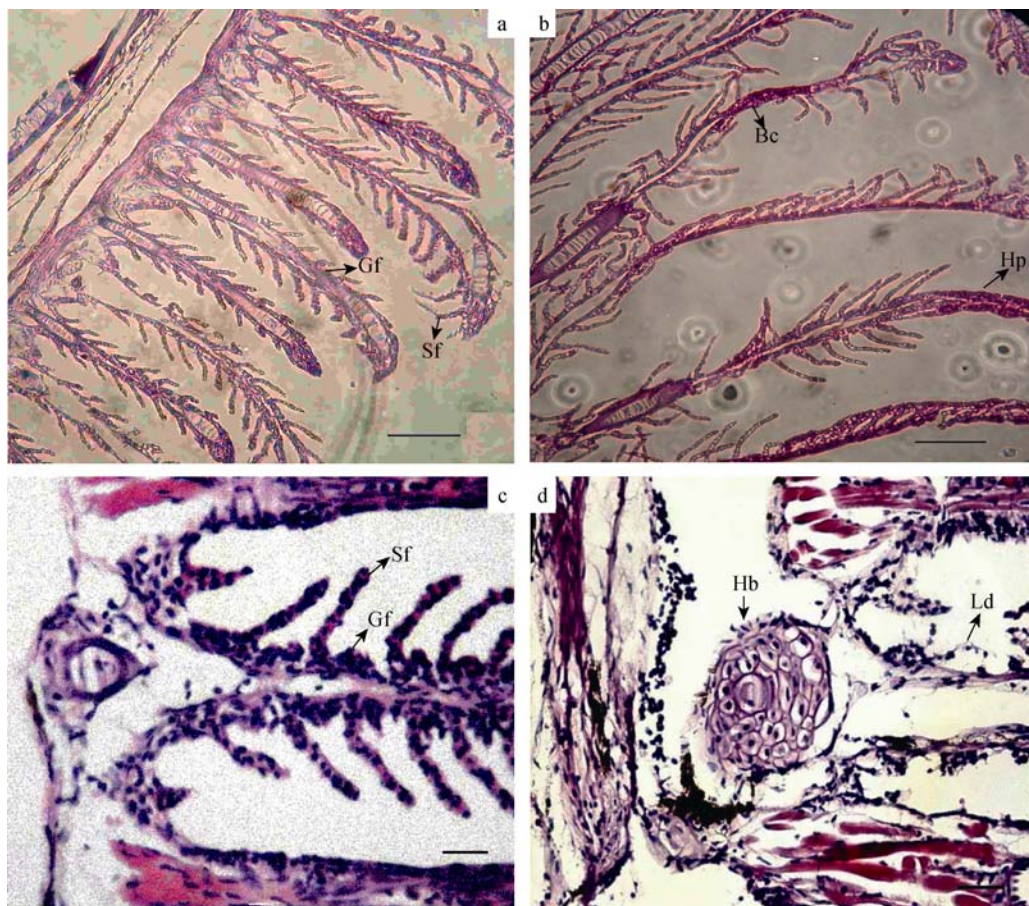


图 3 0.36 mg/L CPF 感染河川沙塘鳢幼鱼 96 h 后鳃的组织病理变化

a. 正常鱼鳃, 示鳃丝(Gf), 鳃小片(Sf), 结构完整; b. 感染鱼鳃, 示鳃丝增粗、尖端膨胀(Hp)、充血(Bc); c. 正常鱼鳃; d. 感染鱼鳃, 示鳃丝紊乱、鳃小片脱落(Ld)、上皮细胞增生成块状(Hb)、鳃弓软骨细胞溶解。标尺: a, b=100 μ m; c, d=30 μ m。

Fig 3 Histopathological changes of gill tissue in juvenile *Odontobutis potamophila* exposed to 0.36 mg/L CPF for 96 h
a. Structure of the normal gill filament (control), showing the gill filament(Gf) and secondary filament of gill (Sf); b. Infected gill filament, showing the hypertrophy(Hp) of secondary filament, blood congestion (Bc) on the top filament; c. Structure of the normal gill filament (control); d. Infected gill filament, showing the filaments disorder, lifting and detachment (Ld) of epithelial cells, hyperplasia cells together as blocks (Hb) and gills bow cells dissolved. Scale bar: a, b=100 μ m; c, d=30 μ m.

迅速积累^[20], 因此本实验选择河川沙塘鳢幼鱼肝组织, 通过检测 SOD、CAT、GSH 这 3 种脊椎动物体内重要的抗氧化酶组分^[21], 研究 CPF 对幼鱼抗氧化系统的损伤。

实验发现, 在低浓度 CPF 胁迫下, 河川沙塘鳢幼鱼肝组织内的 SOD 活性显著升高; 而随着 CPF 浓度的提高, 酶活性又降低, 即与 Beaumont 等^[21]的研究结果类似, 这种现象被称为“毒物兴奋效应”^[22], 当受到重度逆境胁迫时, SOD 活性通常会降低^[23-24]。此外, 由于在抗氧化系统中, CAT 与 SOD 协同发挥作用^[21], 因此变化趋势较为相似, 这与本实验结果一致, 两种酶活性均显示先

升后降的波动趋势。谷胱甘肽(GSH)含量是衡量机体抗氧化能力大小的重要指标, GSH 缺乏或耗竭会促使很多化学物质或环境因素产生毒害作用或加重其毒害作用^[25]。本实验中, 染毒后 24 h, 低浓度组(0.18 mg/L)GSH 含量明显降低, 分析是由于机体通过消耗体内 GSH 来抵御 CPF 引起的鱼体过氧化物堆积; 随着时间和药物浓度的提高, GSH 有所升高, 表明长时间、高浓度的 CPF 暴露对鱼体的抗氧化系统造成了损伤, 抑制了 GSH 的消耗, 表现为浓度上升。实验表明, SOD、CAT 活性和 GSH 含量变化可用做河川沙塘鳢安全性风险评价的参考依据。

3.3 CPF 急性暴露后河川沙塘鳢的组织病理变化

肝是主要的解毒器官, 动物长期暴露于毒物条件下, 必将引发肝的一系列病变。肝细胞空泡变性是鱼类肝对各种化学毒物的常见响应, 肝细胞中空泡增加表明肝细胞脂滴、水或肝糖含量增加^[26]。据报道, 牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)在 12 nmol/L 唑螨酯(Fenpyroximate)溶液中暴露 96 h 后, 肝胆管内皮细胞肥大隆起, 明显增厚^[27], 这与本实验观察到的结果极为相似, 关于 CPF 等有毒物质选择性地引起胆管内皮细胞增生的机理仍需进一步研究。

呼吸系统是鱼类与周围水环境最重要和最广

泛的接触界面, 因此, 鱼鳃通常首先受污染物影响, 且鳃细胞的应激敏感性较高, 解毒能力远远弱于肝、肾等细胞^[28], 因此在鱼体染毒时往往受损伤较大。鳃丝和鳃小片是鱼类进行气体交换的场所。本实验中, 中毒的幼鱼鳃丝增粗、充血、尖端膨胀, 部分鳃小片发生融合, 导致鱼的呼吸系统动态平衡失控, 减少了氧吸收的有效表面积, 对鱼类气体交换、离子代谢、渗透调节产生严重影响, 进而导致身体其他器官异常, 这可能是导致鱼体急性死亡的最重要原因之一。

相关研究还指出, 组织病理变化与染毒时间有关, 染毒时间越长, 其组织损伤程度越严重^[29]。

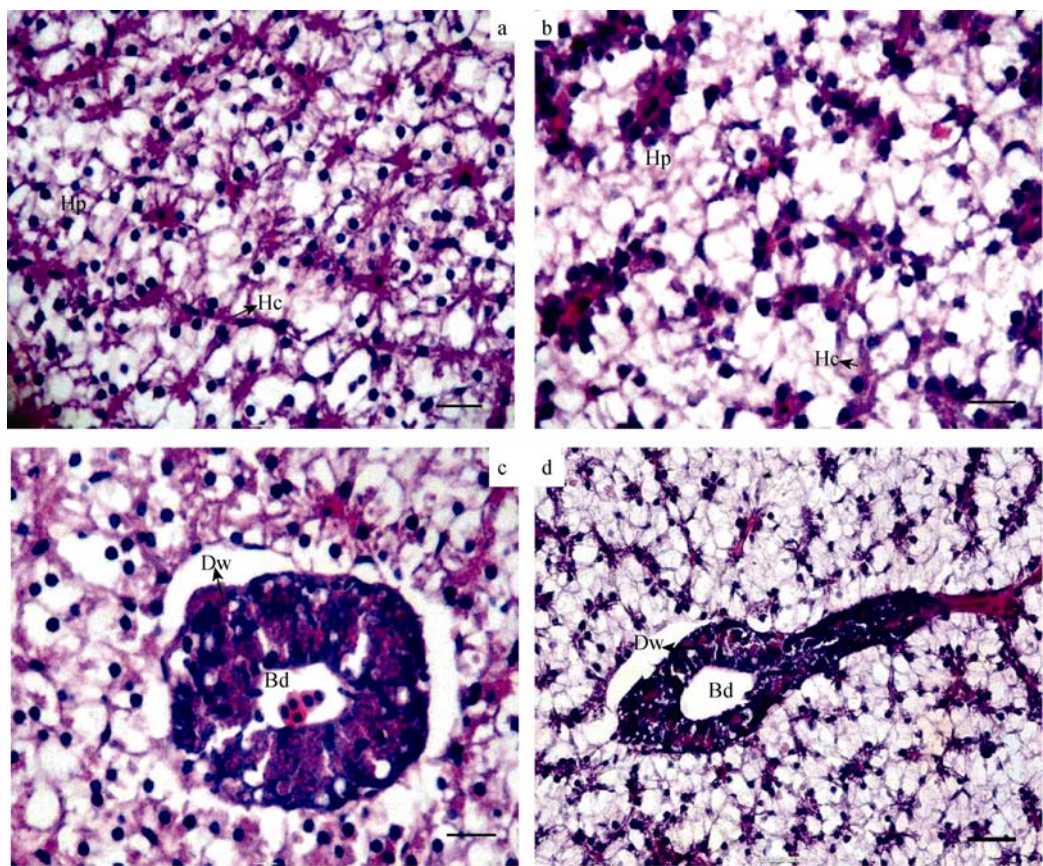


图 4 0.36 mg/L CPF 感染河川沙塘鳢幼鱼 96 h 后肝的组织病理变化

a.正常鱼肝, 示肝细胞(Hp)呈多角状, 排列均匀规则, 肝索(Hc)由中央静脉向四周呈放射状; b.感染鱼肝, 示肝细胞实质空泡化, 排列疏松, 肝索断裂; c.正常鱼肝, 示正常胆管(Bd)及胆管壁细胞(Dw); d.感染鱼肝, 示胆管上皮细胞萎缩, 空隙明显, 内皮细胞隆起, 胆管壁粗糙不平。标尺=30 μm。

Fig. 4 Histopathological changes of liver tissue in juvenile *Odontobatis potamophila* exposed to 0.36 mg/L CPF for 96 h
a. Structure of the normal liver (control), showing the polygonal hepatic parenchymal cells(Hp), hepatic cord(Hc) in radial pattern; b. Structure of the infected liver, showing the Hp vacuolized and Hc cracked; c. Structure of the normal bile duct(Bd) and bile duct wall cell(Dw) of liver; d. infected liver, showing the endothelial cells swelled and merged with one another, resulting in roughness and abnormality of the duct wall. Scale bar=30 μm.

表 2 有毒物质对鱼类的毒性标准^[17]
Tab.2 Toxicity criteria of toxic substances on fish^[17]

项目 item	毒性等级 toxicity classification			
	剧毒 extreme	高毒 high	中毒 middle	低毒 low
$\rho^*/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	<0.1	0.1-1	1-10	>10.0

注: *此质量浓度为 96 h 的 LC₅₀ 值。
Note: * is representative of the concentration of 96 h LC₅₀.

由此可见, 药物浓度和染毒时间均决定 CPF 对河川沙塘鲤的组织病理影响。因此建议在实际生产中, 水体 CPF 浓度应控制在安全浓度(0.014±0.003 1) mg/L 以下。

参考文献:

[1] WTO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009[M]. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2009: 24-26.

[2] Pamela D W, Joseph R B. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos [J]. Aquat Toxicol, 2008, 88: 9-18.

[3] 田芹, 周志强, 江树人, 等. 毒死蜱在环境水体中降解的研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(2): 289-293.

[4] 刘丰茂. 农药使用对地表水、地下水(饮用水)、雨水的污染监测研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2000.

[5] Kavitha P R, Venkateswara R A. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis* [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2008, 26: 192-198.

[6] 胡先成, 周忠良, 赵云龙, 等. 河川沙塘鳢孵化腺的发生及孵化酶的分泌[J]. 动物学报, 2007, 53(3): 511-518.

[7] 黄鲜明, 朱卫斌, 叶新根, 等. 沙塘鳢池塘养殖技术的初步研究[J]. 水利渔业, 2008, 28(1): 57-59.

[8] Filiz D, Fatma G U, Dilek D, et al. Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin [J]. Pestic Biochem Physiol, 2011, 99: 77-81.

[9] David S, Nico M, Agna K, et al. Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis* [J]. Ecotoxicol Environ Safety, 2008, 69: 421-427.

[10] Daoud A, Nagpurea N S, Sudhir K, et al. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and al-

kaline single-cell gel electrophoresis [J]. Chemosphere, 2008, 71(10): 1823-1831.

[11] Tanya C, He W X, Ravi N, et al. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water [J]. Water Res, 2007, 41(19): 4497-4503.

[12] AliGül. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae [J]. Chemosphere, 2005, 59(2): 163-166.

[13] 吴邦灿, 费龙. 现代环境监测技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999: 252-254.

[14] 姚志峰, 章龙珍, 庄平, 等. 铜对中华鲟幼鱼的急性毒性及对肝抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 731-738.

[15] Jones R, Reid L. The effect of pH on Alcian blue staining of epithelial acid glycoproteins: I Sialomucins and sulphomucins(Singly or in simple combinations)[J]. Histochem J, 1973, 5: 9-18.

[16] Yang W, Xiang F H, Liang L G, et al. Toxicity of ammonia and its effects on oxidative stress mechanisms of juvenile crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. J Freshw Ecol, 2010, 2(25): 297-302.

[17] 张志杰, 张维平. 环境污染生物监测与评价[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1991: 69.

[18] Roast S D, Widdows J, Jones M B. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos [J]. Aquat Toxicol, 2000, 47: 227-241.

[19] Sun F, Chen H S. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources [J]. Chemosphere, 2008, 71(10): 1866-1869.

[20] 侯方浩, 余向阳, 赵于丁, 等. 毒死蜱对锦鲤性腺的影响及其在鱼组织中的富集[J]. 江苏农业学报, 2009: 25(1) 188-191.

[21] Beaumont A R, Newman P B. Low levels of tributyltin reduce growth of marine microalgae [J]. Mar Pollut Bull, 1986, 17(10): 457-461.

[22] Stebbing A R. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitions [J]. Sci Tot Environ, 1982, 22(1): 213-234.

[23] 唐学玺, 张培玉. 葱对黑鳢超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 217-220.

[24] 金明红, 冯宗炜. 臭氧对冬小麦叶片膜保护系统的影响[J]. 环境科学, 2000, 20(3): 444-447.

- [25] Palacea V P, Brown S B, Baron C I, et al. An evaluation of the relationships among oxidative stress, antioxidant vitamins and early mortality syndrome(EMS) of lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario [J]. Aquat Toxicol, 1998, 43: 259–268.
- [26] Weater P W, Canton J H. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) and di-n-butyltin dichloride(DBTC) [J]. Aquat Toxicol, 1987, 10: 143–165.
- [27] Na N, Huarong G, Zhang S C, et al. In vitro and in vivo acute toxicity of fenpyroximate to flounder *Paralichthys olivaceus* and its gill cell line FG [J]. Aquat Toxicol, 2009, 92: 76–85.
- [28] 周群芳, 江桂斌, 刘稷燕. 三丁基锡化合物对稀有鮕鲫的急慢性毒理研究[J]. 中国科学 B 辑, 2003, 33(2): 150–156.
- [29] 汪开毓, 耿毅, 叶仕根, 等. 鲤慢性喹乙醇中毒的病理学和组织学残留[J]. 水产学报, 2003, 27(1): 75–82.

Acute toxicity of chlorpyrifos (CPF) to *Odontobutis potamophila* juveniles

DING Zhengfeng^{1, 2}, XUE Hui¹, WANG Xiaofeng¹, SHI Yangbai¹, LI Xiaoxuan¹

1. Freshwater Fisheries Research institute of Jiangsu Province, Nanjing, 210017, China;

2. Nanjing Normal University, College of Life Science, Nanjing, 210097, China

Abstract: We evaluated the acute toxicity of chlorpyrifos (CPF) to juvenile *Odontobutis potamophila*. Juvenile *O. potamophila* were exposed to 0, 0.18, 0.36, 0.57, 0.86, and 1.1 mg/L CPF in a static test. We measured SOD, CAT activity, and GSH content in liver. CPF was highly toxic with 24, 48, and 96 h LC₅₀ values of (0.296±0.019), (0.16±0.036), and (0.052±0.003) mg/L, respectively. The maximum safe concentration was (0.014±0.003 1) mg/L. The CPF LC₅₀ decreased significantly with time and fit a hyperbolic decay model with a high *R*. CAT activity did not change significantly at low CPF concentrations. Both sampling time and CPF concentration had a significant effect on CAT ($P<0.001$) and SOD activity ($P<0.05$). The concentration of CPF had little effect on GSH content. There was a significant change in GSH levels over time ($P<0.01$). GSH levels declined after 24 and 48 h in the group administrated with 0.36 mg/L CPF but were higher after 96 h. Our results suggest that the toxic effects of CPF can be evaluated by measuring liver CAT and SOD activity and GSH content. Exposure to CPF caused significant damage to the gill and liver, characterized by gill disorder, epithelial cell proliferation, hypertrophy, and blood congestion. Furthermore the liver endothelial cells swelled and merged with one another, resulting in roughness and abnormality of the liver duct wall. Our results can be used to guide development of protocols for the safe use of CPF and the development of eco-friendly farming techniques for *O. potamophila*.

Key words: chlorpyrifos (CPF); *Odontobutis potamophila*; acute toxicity; antioxidant defense system; histopathology

Corresponding author: XUE Hui. E-mail: jsxuehui@163.com