

氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究

熊 丽 吴振斌 况琪军 夏宜 贺 锋

(淡水生态与生物技术国家重点实验室; 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 研究了农药氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性效应, 结果显示: 以丙酮为溶剂时, 其 96 h EC₅₀ 为 112.45 mg/L; 以乙酸乙酯为溶剂时, 其 96 h EC₅₀ 为 112.81 mg/L。同时也研究了氯氰菊酯对斜生栅藻的光合色素含量、色素光谱、可溶性蛋白质含量和超氧化物歧化酶活性的影响。

关键词: 氯氰菊酯; 斜生栅藻; 毒性

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)01-0066-08

拟除虫菊酯是一类含有苯氧烷基的环丙烷酯, 由于具有杀虫高效性, 自 70 年代以来已得到广泛应用^[1]。氯氰菊酯(Cypermethrin)又称灭百可、兴棉宝, 是拟除虫菊酯类的广谱性杀虫剂, 为一种神经轴突毒剂, 适用于棉花、水稻、蔬菜、果树和茶叶等多种作物上害虫的防治^[2]。施于环境中的农药, 不仅作用于靶生物以防治病害, 而且对非靶生物也产生影响, 从而导致生态系统结构改变, 功能破坏。

拟除虫菊酯虽然对哺乳动物等非靶生物低毒, 但它对鱼类、水蚤等水生动物的毒性却很高^[3—6]。藻类作为水生态系统的初级生产者, 其种类的多样性和初级生产量直接影响水生态系统的结构功能。因而成为监测评价水环境质量的重要指标^[7]。斜生栅藻对毒物敏感、易获得、个体小、繁殖快, 在较短时间内可得到化学物质对其许多世代及种群水平的影响评价, 是一种很好的测试生物。但一般地说, 栅藻、小球藻对农药的抗性较强^[8], 故恢复较快, 不同天数的 EC₅₀ 值有较大差别。本实验选择极常见的浮游藻类斜生栅藻作为实验生物, 研究氯氰菊酯对其毒性, 以期为探讨农药对藻类的毒理积累科学依据, 同时为国家制定水质标准提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料和化学药品 斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* Kütz)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供, 编号 FACHB39。氯氰菊酯为白色晶体, 纯度为 96.4%, 由湖北省农业科学研究院国家农药检测中心提供。

收稿日期: 2000-10-10; 修订日期: 2000-10-25

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(39925007); 欧盟国际合作项目(ERBIC18CT 960059)

作者简介: 熊丽(1968—), 女, 湖北省十堰市人; 讲师, 博士生; 环境生物学专业, 从事生态毒理学研究。华中师范大学 2000 级硕士研究生袁静参加了部分工作, 特此致谢

通讯作者: 吴振斌

1.2 驯化培养 斜生栅藻在无菌条件下转移至水生4号(HB-4)人工培养液中^[9], 培养至对数生长期进一步扩大培养。培养条件为: 温度25—28℃; pH7—8; 白色日光灯, 光暗比12h:12h, 光强为3000lx左右; 静止培养, 每天定时人工摇动三次。

1.3 溶剂 NOEC 值的测定 分别以丙酮和乙酸乙酯为溶剂设置5个浓度组和一个空白对照组, 96h后用血球计数板显微计数, 测定藻细胞的密度(个/mL), 计算各自的NOEC值。

1.4 以丙酮和乙酸乙酯为溶剂测定 EC₅₀ 以丙酮和乙酸乙酯为溶剂配制氯氰菊酯母液, 根据预实验的结果设置5个浓度组和一个空白对照组, 每个组设三个平行样, 测定氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性。每隔24h取样, 用血球计数板显微计数, 测定藻细胞的密度(个/mL), 并测定650nm波长处的光密度值。用概率单位-浓度对数法^[10]分别计算出96h半效应浓度(EC₅₀)。以生物量为实验终点计算的50%抑制浓度记为EC₅₀。最大特定生长率(U)按以下公式计算:

$$U = (L_N t - L_N 0) / (t - t_0)$$

N₀, N_t: 分别为开始期(t₀)和t时刻(t)的细胞数。

$$\text{抑制率}(I\%) = (U_{ck} - U_{tox}) / U_{ck} * 100$$

U_{ck}: 对照组的生长速度, U_{tox}: 有供试化合物时的生长速度。

根据抑制率的机率单位和相应的浓度对数, 用直线回归法得到浓度效应方程, 计算出半效应浓度(EC₅₀)。并将回归方程进行X²检验, 结果P<0.05, 表明结果可靠, 统计分析用STATISTICA软件进行。

1.5 氯氰菊酯对斜生栅藻生理特性的影响 根据以上测得的EC₅₀, 设置两个浓度组, 一个以丙酮为溶剂; 另一个以乙酸乙酯为溶剂。同时设置两个溶剂对照组和一个空白对照组。每隔24h取样, 测定藻细胞浓度。96h后, 五个试样组均按以下步骤操作。取10mL藻液, 过孔径0.8μm醋酸纤维素滤膜, 真空抽滤后, 剪碎滤膜, 转移到10mL具塞试管中, 加80%丙酮5mL, 置黑暗中抽提24h, 4000r/min离心5min, 取上清置于1cm石英比色杯中, 于紫外-可见光分光光度计(岛津, UV-1601型), 以80%丙酮为参比, 记录350—750nm波长范围内色素吸收光谱。

测定藻类色素含量采用分光光度法。具体方法为: 取20mL藻液, 4000r/min离心10min, 去上清, 直接加入5mL80%的丙酮, 摆匀, 在黑暗处抽提24h。再分别于663nm, 645nm和440nm波长处测定抽提液的吸光值。96h后, 离心收集藻细胞, 真空冷冻干燥, 低温保存, 用于测定可溶性蛋白质含量和超氧物歧化酶(SOD)活性。蛋白质含量用Folin-酚法测定^[11], 以小牛血清蛋白作标准曲线。SOD活性测定用NBT光还原反应法^[12]。

2 结果与分析

2.1 溶剂 NOEC 值的测定

不可见效应浓度(No Observed Effect Concentration, NOEC)值可以用下述方法确定:(1)通过方差分析, 与空白试验组没有显著性差异的最高浓度, 可以认为是NOEC值。

(本实验即采用此法)。(2)根据实验得到的良好的浓度-效应关系,与空白实验组相比,影响程度低于10%的浓度,也可以当做NOEC值。

2.1.1 丙酮的NOEC值的测定 分别以0.1%, 0.15%, 0.20%, 0.50%和1%的丙酮处理斜生栅藻,结果显示,96h后,与对照组相比,0.1%及以下浓度的丙酮对斜生栅藻的生长有促进作用,0.50%和1%的丙酮有明显的抑制作用,经方差分析,丙酮对斜生栅藻的NOEC值为0.15%,即正式实验中丙酮的浓度应低于0.15%。

2.1.2 乙酸乙酯的NOEC值的测定 同上以0.1%, 0.15%, 0.20%, 0.50%和1%的乙酸乙酯处理斜生栅藻,结果表明其NOEC值为0.20%。

2.2 氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性效应

2.2.1 氯氰菊酯对斜生栅藻生长的影响 用不同浓度的氯氰菊酯处理(乙酸乙酯为溶剂),以藻细胞密度为指标所作的生长曲线见图1。由图1可以看出,加了氯氰菊酯的各试样组中,藻细胞的生长受到不同程度的抑制,且抑制程度与氯氰菊酯的浓度呈正相关,显示明显的浓度-剂量相关性。另一方面,镜检过程中,在氯氰菊酯高浓度时,可以观察到部分藻细胞体积增大,子细胞出现畸形分裂,出现人字形和裤形,这种现象和其它作者在高温和城市污水对栅藻细胞形态所产生的影响有相似之处^[13, 14],说明氯氰菊酯使斜生栅藻的生长与分裂产生一定的脱偶联作用。

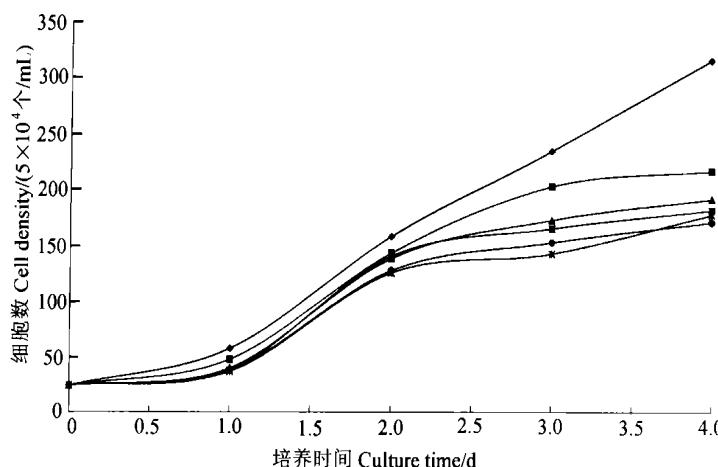


图1 不同浓度的氯氰菊酯对斜生栅藻生长的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of Cypermethrin on growth of *S. obliquus*

◆ 0 □ 50 ▲ 100 ■ 150 ● 200 * 250

由图1的数据,用前面所介绍的方法得到不同时间的概率单位-浓度对数曲线方程,如下:

$$\text{概率单位}(Y) = b \times \text{浓度对数}(X) + a$$

经统计分析,确定各时间(24h、48h、72h、96h)的EC₅₀值及其95%置信区间,如表1所示。

表 1 氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性

Tab. 1 The toxicity of Cypermethrin to *S. obliquus*

	回归方程	EC ₅₀	r	Up	Down
24h	y = 0.6346x + 2.4547	55.20	0.976	65.56	44.70
48h	y = 0.9795x - 0.1304	188.25	0.994	228.59	147.53
72h	y = 1.0894x - 0.2193	120.42	0.994	135.10	106.38
96h	y = 1.1545x - 0.4521	112.45	0.998	122.24	103.44

96h 的 EC₅₀ 为 112.45 mg/L, 由表 1 可见以乙酸乙酯做溶剂时, 氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性较低。另一方面, 随着天数增加, EC₅₀ 急剧上升, 且数值较大。显示斜生栅藻抗性较大, 恢复很快。同样测得以丙酮为溶剂的 EC₅₀ 为 112.81 mg/L。结果见表 2。

表 2 氯氰菊酯在不同溶剂中的 EC₅₀Tab. 2 EC₅₀ of Cypermethrin dissolved in different solvents

	回归方程	EC ₅₀	r	Up	Down
96Hrs	y = 1.1545x - 0.4521	112.45	0.998	122.24	103.44
96Hrs	y = 1.0624x - 0.0206	112.81	1.000	120.78	108.31

2.2.2 在两种不同溶剂中的毒性对比试验结果 由图 2 可见, A、B 两组栅藻的生长均低于对照组, 但 A 组(以乙酸乙酯为溶剂)藻细胞的生长情况比 B 组(以丙酮为溶剂)好。说明在两种情况下, 氯氰菊酯对斜生栅藻生长的抑制作用不同, 以丙酮为溶剂时的抑制作用较大。

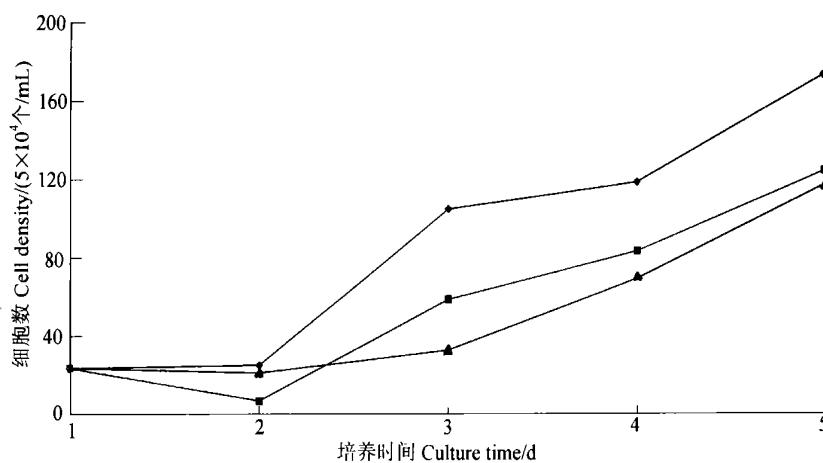


图 2 不同溶剂中氯氰菊酯对斜生栅藻生长的影响

Fig. 2 Effects of Cypermethrin dissolved in different solvents

◆ CK ■ A(乙酸乙酯溶) ▲ B(丙酮溶)

2.3 氯氰菊酯对斜生栅藻的生理生化特性的影响

2.3.1 氯氰菊酯对斜生栅藻的光合色素含量的影响 将 96h 藻液的叶绿素 a(C-a), 叶绿素 b(C-b), 叶绿素总量(C-a+b) 和类胡萝卜素(C-k) 含量以及叶绿素 a/叶绿素 b 列于表 3。

表 3 氯氰菊酯对斜生栅藻光合色素的影响

Tab. 3 Effect of Cypermethrin on the pigment in *S. obliquus*

Chl	CK	B 丙酮	A 乙酸乙酯
C-a	3.74	1.59	3.27
C-b	1.32	0.66	1.25
C-a+b	5.07	2.25	4.51
C-k	1.73	0.92	1.75
C-a/C-b	2.83	2.41	2.62

由表 3 可看出, 不论用何种溶剂, 氯氰菊酯均显著减少斜生栅藻的光合色素含量。其中对叶绿素 a 影响最大, B 组(丙酮溶)的叶绿素 a 含量比对照组减少了 57.5%; A 组(乙酸乙酯溶)比对照组减少 12.7%。叶绿素 k 对环境变化最敏感, B 组叶绿素 k 比对照组减少 46.7%, 而 A 组叶绿素 k 则比对照组增加 1.1%。叶绿素 a/b 值亦有变化, 表明叶绿素的结构受到一定损害。

2.3.2 氯氰菊酯对斜生栅藻色素光谱的影响 实验分别选用空白组(CK)、B 组和 A 组的三种藻细胞作为测定色素吸收光谱的样品, 结果见图 3。结果表明, 在 96h 内, 斜生栅藻各样品吸收光谱带完全相似, 在红光区 663nm 处和蓝光区 430nm 处均出现明显的峰, 不同的处理明显影响了峰值的大小, 这与光合色素含量的变化是一致的。

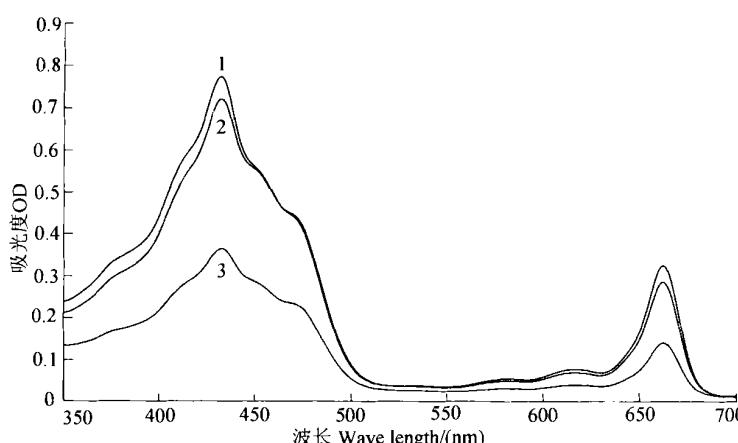


图 3 斜生栅藻 96h 色素的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectrum of *S. obliquus* after 96h

1. 对照 2. 处理 A 3. 处理 B

2.3.3 氯氰菊酯对斜生栅藻可溶性蛋白质含量的影响 斜生栅藻在不同条件下培养96h后, 其可溶性蛋白含量如图4。总体上, 不论何种处理, 有氯氰菊酯存在下栅藻的蛋白质含量均比对照组低。但(丙酮溶)比处理A(乙酸乙酯溶)的蛋白质含量降低更多, 可见处理B对斜生栅藻的毒性更大。另外, 不同浓度处理, 蛋白质含量亦有不同, 但变化不显著。

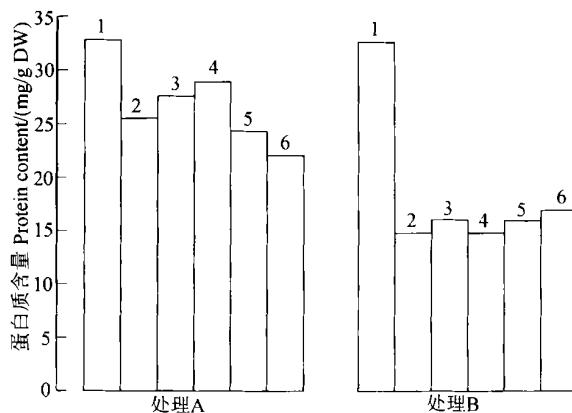


图4 氯氰菊酯对斜生栅藻可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 4 Effect of cypermethrin on soluble protein content of *S. obliquus*

1. 对照 2. 50mg/L 3. 100mg/L 4. 150mg/L 5. 200mg/L 6. 250mg/L

2.3.4 氯氰菊酯对斜生栅藻SOD活性的影响 96h后, 斜生栅藻的SOD活性的变化如图5。从图中可看出, 随着氯氰菊酯浓度的升高, 不论何种处理, SOD活性均迅速上升, 50mg/L处理时, SOD活性即达到最高值, 而后各处理SOD活性变化不显著, 但仍维持较高水平。两种溶剂处理的SOD活性有较大差异, 丙酮为溶剂的氯氰菊酯处理组, 其SOD活性均高于乙酸乙酯为溶剂的处理, 显示明显的应激反应。

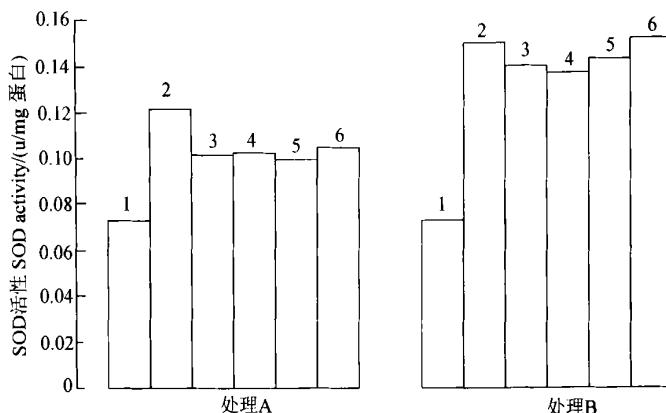


图5 氯氰菊酯对斜生栅藻SOD活性的影响

Fig. 5 Effect of Cypermethrin on SOD activity of *S. obliquus*

1. 对照 2. 50mg/L 3. 100mg/L 4. 150mg/L 5. 200mg/L 6. 250mg/L

3 讨论

氯氰菊酯对斜生栅藻 96h 的 EC₅₀ 为 112.45mg/L, 而在其它资料^[15] 中记载的一般农药对栅藻的 EC₅₀ 都较低, 如林丹的为 2.5mg/L(96h), 单甲脒的为 6.5mg/L(96h), 甲基对硫磷的为 15mg/L(72h)。相比较可见氯氰菊酯对非靶生物中的水生藻类也是低毒的。如今, 氯氰菊酯被广泛用于农用杀虫药剂和家用驱蚊剂。本实验表明, 氯氰菊酯对水生态系统中的藻类也是安全的, 值得推广。斜生栅藻对不同溶剂中的氯氰菊酯的抗性不同。以乙酸乙酯为溶剂的情况下, 藻的抗性很高, 恢复较快。以丙酮为溶剂情况下, 藻的抗性低, 恢复慢。这表现在以丙酮为溶剂时, 氯氰菊酯的长期毒性较高些。

由于许多农药难溶于水, 在毒性试验中常使用佐剂(农药的溶剂和乳化剂), 佐剂与农药对藻类的复合毒性表现为加合、协同或拮抗效应^[15]。本试验中, 乙酸乙酯与农药表现出拮抗作用。由于乙酸乙酯是酯溶性的, 估计其与氯氰菊酯对细胞膜通道有竞争作用。而丙酮与农药表现出协同作用。Stratton^[16]发现丙酮对藻类有毒性, 并且认为其毒性在于破坏膜的结构。因而, 当丙酮破坏了细胞膜结构后, 细胞严重损伤, 抵抗能力减弱。在这种情况下即使低毒性的氯氰菊酯也可能对有机体造成很大的细胞损伤, 从而使两种受试物在生物效应上表现出协同效应。氯氰菊酯对栅藻光合色素含量亦有影响, 三种色素(叶绿素 a, 叶绿素 b 和类胡萝卜素)的含量均有所下降, 表现明显的毒性作用。其中叶绿素 a 和类胡萝卜素变化更为敏感, 可作为生理毒性指标^[17]。

斜生栅藻的可溶性蛋白含量的变化和其生长的变化趋势一致, 但 SOD 活性的变化比生长的变化超前, SOD 活性的变化, 是生物对环境的应激反应, 对生物本身有保护作用。可以说, 细胞内 SOD 活性变化可以从一个侧面反映生物所处的环境状况。当 SOD 活性明显升高, 说明了环境中污染物含量有所增加, 此时细胞内解毒酶系统被诱导^[18]。由于这种应激反应是发生在细胞内分子水平上, 其变化要比生物的生长或繁殖对环境的变化更灵敏; 且环境中能诱导产生活性氧的污染物很多, 因此, 反映污染物的范围更广。可见 SOD 活性是灵敏的生化指标之一, 可作为污染的早期预警。

参考文献:

- [1] 农药新品种及使用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1985, 106—159
- [2] 郑永权. 拟除虫菊酯类农药的开发[J]. 世界农业, 1998, 230: 35—37
- [3] 王朝晖, 尹伊伟, 许忠能. 常见拟除虫菊酯(原药、商品)及助溶剂对水生生物毒性的比较[J]. 暨南大学报(自然科学版), 1997, 18(1): 98—103
- [4] 龚瑞忠. 拟除虫菊酯对水生生物的毒性评价研究[J]. 环境科学研究, 1988, 1(4): 39—44
- [5] 翟良安. 溴氰菊酯对鱼类毒性研究[J]. 淡水渔业, 1990, 156: 10—13
- [6] 翟良安. 八种农药对鱼类和大型蚤毒性致毒研究[J]. 淡水渔业, 1989, 149: 18—20
- [7] Kobraei M E, White D S. Effects of 2, 4-Dichloroheoxyacetic acid on Kentucky algae: simultaneous laboratory and field toxicity testings[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1996, 31: 571—580
- [8] Zablotowica R M. Algal transformation of fluometuron and atrazine by n-dealkylation [J]. J Environ Sci Health, Part B, 1998, 33(5): 511—528
- [9] 黎尚豪、朱蕙、夏宜, 单细胞绿藻的大量培养实验[J]. 水生生物学集刊, 1959, (4): 463—472

- [10] 黄国兰, 戴树桂, 孙红文. 有机污染物对藻类毒性的测定[J]. 环境化学, 1994, 13(3): 259—262
- [11] Lowry D. H., Protein measurement with Folin phenol reagent[J]. J. Biol. Chem., 1951, 193: 267—270
- [12] 唐学玺, 李永祺. 久效磷对海洋微藻毒性机理的初步研究. 超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性的变化[J]. 环境科学学报, 1998, 18(2): 204—207
- [13] 夏宜, 况琪军. 综合生物塘中的藻类研究 [J]. 水生生物学报, 1993, 17(1): 75—82
- [14] 夏宜. 栅藻高温品系的培育及其在环境监测中的应用[J]. 水生生物学集刊, 1975, 5(3): 380—386
- [15] 严国安, 沈国兴, 严雪. 农药对藻类的生态毒理学研究: 毒性效应[J]. 环境科学进展, 1999, 7(5)
- [16] Stratton G W. Effect of the solvent acetone on membrane integrity in the green algae Chlorella pyanoidose [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1989, 42: 754—760
- [17] 高尚德, 吴以平, 赵心玉. 有机锡对海洋微藻的生理效应. 三苯基锡和三丁基锡对光合色素含量的影响[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(3): 259—265
- [18] 孔繁翔, 胡伟, 李继军. 低pH值, 锌及钙铝比对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)谷胱甘肽含量影响研究[J]. 环境化学, 1998, 17(5): 422—427

STUDIES ON THE TOXICITY OF CYPERMETHRIN TO *SCENEDESMUS OBLIQUUS*

XIONG Li, WU Zhen-bin, KUANG Qi-jun, XIA Yi-cheng and HE Feng

(State Key Laboratory of Fresh water Ecology and Biotechnology; Institute of Hydrobiology,

The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: In this paper, the toxicity of cypermethrin on *Scenedesmus obliquus* Kütz is studied. It indicated that the 96h EC₅₀ is 112.45mg/L in acetone, and 112.81mg/L in ethyl acetate. Meanwhile, the contents of the pigments, their absorption spectrum, soluble protein and the activity of SOD are also studied.

Key words: Cypermethrin; *Scenedesmus obliquus* Kütz; Toxicity