

Cr⁶⁺ 和乙草胺对少根紫萍的毒性效应

湛灵芝^{1,2}, 铁柏清¹, 毛晓茜¹, 袁 敏¹, 孙 健¹

(1. 湖南农业大学资源与环境学院, 湖南 长沙 410128; 2. 长沙环境保护职业技术学院, 湖南 长沙 410004)

摘要:采用水培实验方法,研究了重金属 Cr⁶⁺ 和除草剂乙草胺对少根紫萍 (*Spirodela oligorrhiza* L.) 生长的单一毒性和联合毒性效应。结果表明, Cr⁶⁺ 和乙草胺对少根紫萍 96 h 生长抑制的 IC₅₀ 分别为 15.4 和 6.95 mg · L⁻¹, 在质性和联合毒性效应。结果表明, Cr⁶⁺ 和乙草胺对少根紫萍 96 h 的 IC₅₀ 为 3.14 mg · L⁻¹, 二者为协同作用。随着 Cr⁶⁺ 和量浓度 1:1 的情况下, Cr⁶⁺ 与乙草胺共存对少根紫萍 96 h 的 IC₅₀ 为 3.14 mg · L⁻¹, 二者为协同作用。随着 Cr⁶⁺ 和乙草胺处理浓度的增加, 少根紫萍叶绿素 a 浓度下降, 复合污染对叶绿素 a 的影响明显大于单一污染, 也表现为协乙草胺处理浓度的增加, 少根紫萍叶绿素 a 浓度下降, 复合污染对叶绿素 a 的影响明显大于单一污染, 也表现为协同作用。另外, 还对少根紫萍生长抑制实验进行了探讨, 建议使用植物个体数和重复间的偏差作为衡量实验质量的指标。

关键词：少根紫萍；铬；乙草胺；毒性效应

文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2005)03-0037-05

中图分类号：X173 文献标识码：A 文章页码：1

Toxic effects of Cr⁶⁺ and acetochlor on *Spirodela oligorrhiza* L. ZHAN Ling-zhi^{1,2}, TIE Bo-qing¹, MAO Xiao-qian¹, YUAN Min¹, SUN Jian¹ (1. College of Resources and Environment, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. Changsha Environmental Protection College, Changsha 410004, China). *J. Plant Resour. & Environ.* 2005, **14**(3): 37-41

Abstract: The single toxic and joint toxic effects of Cr⁶⁺ and acetochlor on *Spirodela oligorrhiza* L. were studied. The results showed that the IC₅₀ of Cr⁶⁺ and acetochlor to *S. oligorrhiza* for 96 h were 15.4 and 6.96 mg · L⁻¹ respectively, the IC₅₀ of the joint toxicity of Cr⁶⁺-acetochlor for 96 h to *S. oligorrhiza* was 3.14 mg · L⁻¹ in concentration 1:1. The additive index (AI) of Cr⁶⁺ and acetochlor was 0.28, the combined toxicities were the synergism action. With the increasing of the treatment concentration of Cr⁶⁺ and acetochlor, the content of chlorophyll a decreased. The toxicity of combined pollution of Cr⁶⁺ and acetochlor on *S. oligorrhiza* are obviously greater than those of single pollution, also being the synergism action. In addition, the quality control request of *S. oligorrhiza* growth inhibition test was discussed. It is suggested that the number of frond and the deviation of repeat are to be quality indexes of growth inhibition test of *S. oligorrhiza*.

Key words: *Spirodela oligorrhiza* L.; Cr⁶⁺; acetochlor; toxicity effect

随着工农业生产的发展,水体中农药和重金属造成的危害时有发生。关于农药和重金属对水生动物和藻类毒性效应的研究已有一些报道^[1~3],但对高等水生植物的研究较少,且一般为单一因子对水生植物的毒性效应研究。在水体中实际存在着多种污染物,它们的作用无疑是综合的,用重金属和农药的单一毒性的实验结果往往不能客观反映污染物共存时对水生植物的危害程度,因而必须研究污染物的联合毒性效应。

少根紫萍 (*Spirodela oligorrhiza* L.) 为浮萍科 (Lemnaceae) 紫萍属 (*Spirodela* L.) 植物, 在中国分布较广^[4,5], 生长于稻田、池沼、水塘、湖泊等水体中。初步培养结果表明, 该种植物不仅对培养条件

要求较低,而且生长非常迅速,生长期很长,一年四季可得。大量的实验证明浮萍类植物是一类现实、有效的环境监测类植物^[6~8],具有操作简便、灵敏、经济和可操作性等一系列的优点。目前,国内外的研究集中于单一毒物对浮萍(*Lemna minor L.*)的生长抑制实验^[8~10],关于农药与重金属复合污染对浮萍生长抑制实验的研究鲜有报道,而针对少根紫萍的研究则更为少见。

收稿日期：2005-02-23

基金项目: 中日合作日本丰田基金项目(Toyota Fund D01-B3-010)

作者简介:湛灵芝(1979-),女,湖南岳阳人,硕士,讲师,主要从事环境毒理学及环境评价的研究。

本文以使用较为广泛的除草剂乙草胺及常见的重金属污染物铬为代表,以少根紫萍为研究对象,探讨了 Cr^{6+} 和乙草胺单一与复合处理下对少根紫萍生长的影响,以期为利用少根紫萍监测水体污染提供新的理论依据,并进一步丰富生态毒理学的内容。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料的采集和培养 从野外自然水体采集少根紫萍(*Spirodela oligorrhiza* L.),将其放入曝气澄清的自来水中驯养3 d后,放入搪瓷盘中,加入Hoaglandy培养液^[1]预培养7 d,光照强度3 000 lx,温度(25±2)℃,隔天向盘内添加Hoaglandy培养液以保持液面高度。于实验前取外形完好、形状和大小都相近的三叶状萍体进行实验。

1.1.2 试剂 K_2CrO_4 (AR)用蒸馏水配成浓度为100 mg·L⁻¹的 Cr^{6+} 母液;乙草胺(山东侨昌化学有限公司生产的50%乙草胺乳油)用蒸馏水稀释至500 mg·L⁻¹,现用现配。

1.2 实验方法

1.2.1 处理方法 单一毒性实验: Cr^{6+} 处理浓度为0、7.9、10.0、12.6、15.8、20.0、25.1和31.6 mg·L⁻¹,乙草胺处理浓度为0、2.5、4.0、6.3、10.0、15.8、25.1和39.8 mg·L⁻¹,以Hoaglandy培养液为稀释液。于培养皿内放入上述各处理液,每个培养皿中放入15个植物体(5个三叶状体),每处理设3个重复。于(25±2)℃,光照强度3 000 lx条件下加盖连续培养,分别在24、48、72和96 h进行计数。

联合毒性实验是在单一毒性实验的基础上,分别配制浓度为0、2.5、4.0、6.3、10.0、15.8和20.0 mg·L⁻¹的 Cr^{6+} 及乙草胺溶液,再按1:1体积混合后配制成联合毒性处理液用于联合毒性实验,实验方法和观测指标同单一毒性实验。

1.2.2 指标测定

1.2.2.1 生长指标统计 每日记录少根紫萍的植物个体数,为了避免主观判断,只要新的植物体伸出母体边缘,就计算在内,而老化死亡及失去色素且变白变黄的个体则不记录。少根浮萍植物个体数的增加表示其生长。各浓度组与对照组的差值表示毒性效应。将数据代入下列公式求各处理组的生长速率和生长抑制率^[8]:

生长速率(V) = $\ln(N/N_0)/t$;生长抑制百分率(I) = $[(V_0 - V_n)/V_0] \times 100\%$ 。式中: N 为时间 t 时的植物个体数; N_0 是初始植物个体数; V_0 是对照组生长速率; V_n 是浓度组 n 的生长速率。用 I 和浓度的对数组求回归方程,并计算出对少根紫萍生长的半数抑制浓度 IC_{50} 。

1.2.2.2 叶绿素a含量测定 将每一培养皿中的少根紫萍全部置于研钵中,加80%丙酮研磨5 min,充分匀浆。将匀浆液转入离心管中,用少量80%丙酮洗涤研钵,合并入离心管,然后用80%丙酮稀释至5 mL,置于4℃静置提取72 h,取出,于2 000 r·min⁻¹离心10 min。取上清液于波长630、645、663和750 nm处测定光密度值,光程为1 cm。叶绿素a含量以匀浆液中叶绿素a浓度(Ca)表示,用下列公式计算: $Ca = 0.10 \times OD_{630} - 2.16 \times OD_{645} + 11.64 \times OD_{663} + 9.58 \times OD_{750}$ 。

2 结果和分析

2.1 Cr^{6+} 和乙草胺单一及联合毒性实验对少根紫萍生长的影响

在不同浓度 Cr^{6+} 、乙草胺和 Cr^{6+} -乙草胺处理液中少根紫萍96 h的生长曲线见图1、图2和图3。实验结束时,各处理组植物个体数的平均值见表1。结果表明, Cr^{6+} 和乙草胺对少根紫萍生长抑制的影响随着浓度的增加而增强。以实验浓度对数值作自变量(X),少根紫萍生长抑制率 I 为因变量(Y)求得96 h的回归方程分别为: Cr^{6+} : $Y = 2.4851X + 2.0487$

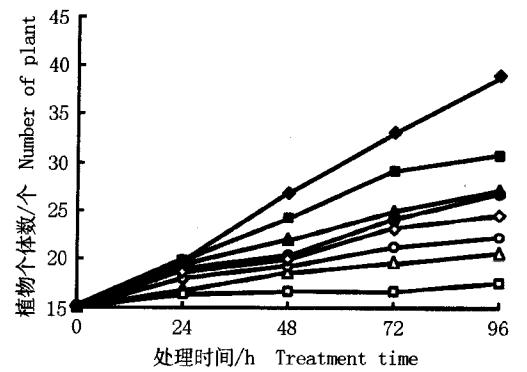


图1 不同浓度 Cr^{6+} 处理对少根紫萍生长的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of Cr^{6+} on the growth of *Spirodela oligorrhiza* L.

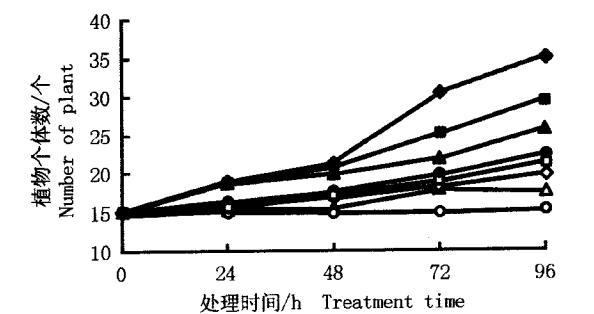


图2 不同浓度乙草胺处理对少根紫萍生长的影响
Fig. 2 Effects of different concentrations of acetochlor on the growth of *Spirodela oligorrhiza* L.

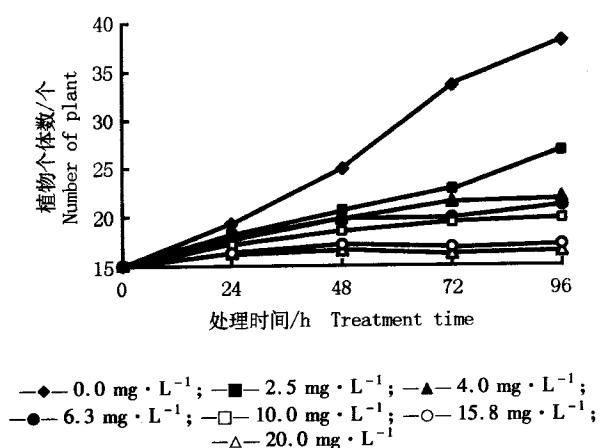


图3 Cr⁶⁺与乙草胺共存时对少根紫萍生长的影响
Fig. 3 Effect of Cr⁶⁺-acetochlor on the growth of *Spirodela oligorrhiza* L.

($r = -0.9783$)；乙草胺: $Y = 2.0284X + 3.2925$ ($r = -0.9602$)；Cr⁶⁺-乙草胺: $Y = 1.5657X + 4.1039$ ($r = -0.9751$)。Cr⁶⁺和乙草胺96 h IC₅₀值及95%的置信区间分别为15.4 mg·L⁻¹(11.99~19.78)和6.95 mg·L⁻¹(5.11~9.45)；Cr⁶⁺-乙草胺对少根紫萍的96 h IC₅₀值及95%的置信区间为3.14 mg·L⁻¹(2.43~5.75)。根据联合毒性相加指数法^[11]求得AI值为0.28, 大于零, 表明Cr⁶⁺和乙草胺对少根紫萍的毒性为协同作用。

2.2 Cr⁶⁺与乙草胺单一及联合毒性实验对少根紫萍叶绿素a含量的影响

实验结束时, Cr⁶⁺和乙草胺单一及联合毒性实验中各处理组少根紫萍叶绿素a含量的测定结果见表2。

表1 不同浓度Cr⁶⁺和乙草胺处理对少根紫萍生长率的影响¹⁾
Table 1 Effects of different concentrations of Cr⁶⁺ and acetochlor on the growth rate of *Spirodela oligorrhiza* L.¹⁾

处理 Treatment	浓度 /mg·L ⁻¹ Conc.				
		\bar{X}	SD ²	V/%	I/%
Cr ⁶⁺	0.0	39.00	28.00	13.6	0.0
	7.9	31.00	7.00	8.5	24.0
	10.0	27.33	5.33	8.4	37.2
	12.6	27.00	9.00	11.1	38.5
	15.8	24.67	4.33	8.4	47.9
	20.0	22.33	4.33	9.3	58.4
	25.1	20.67	8.33	14.0	66.4
	31.6	17.67	4.01	11.3	82.8
Acetochlor	0.0	35.33	4.33	5.9	0.0
	2.5	30.00	4.00	6.7	19.1
	4.0	26.00	4.00	7.7	35.8
	6.3	22.67	0.33	2.7	51.8
	10.0	21.67	6.33	11.1	57.0
	15.8	20.00	4.00	10.0	66.43
	25.1	17.67	2.33	8.6	80.9
	39.8	15.33	0.33	3.8	97.5
Cr ⁶⁺ -acetochlor	0.0	38.33	0.33	1.5	0.0
	2.5	27.00	3.00	6.4	37.4
	4.0	22.00	1.00	4.5	59.2
	6.3	21.33	0.33	2.7	62.5
	10.0	20.00	0.00	0.0	69.3
	15.8	17.33	2.33	8.8	84.6
	20.0	16.67	0.33	3.5	88.7

¹⁾ \bar{X} : 各处理组的植物个体数的平均值(个) The mean of the number of fronds of every treatment group; SD²: 各平行样本的方差 The variance of each parallel sample; V: 偏差 Deviation; I: 各处理组相对对照组的生长抑制率 The growth inhibitory rate contrasting with the control.

从表2可以看出, 随Cr⁶⁺及乙草胺浓度的增加, 叶绿素a的含量下降,Cr⁶⁺与乙草胺共存时对叶绿素a的伤害要大于单一污染, 表现为协同作用。叶绿素作为植物进行光合作用的主要色素, 其含量的高低能够反映光合作用水平的强弱。严重玲等^[12]认为叶绿素含量减少是衡量叶片衰老的重要生理指标; Somashekaraish等^[13]认为叶绿素含量降低的原因主要是外来因子作用于叶绿素生物合成途径中几种酶的肽链中富含-SH的部分, 抑制了酶的活性从而阻碍了叶绿素的合成。本研究结果表明, Cr⁶⁺和乙草胺对叶绿素a具有显著的破坏作用, 且Cr⁶⁺和乙草胺复合污染对少根紫萍叶绿素a的破坏作用更大, 说明复合污染加剧了对少根紫萍叶绿素

a的破坏作用。

表2 不同浓度 Cr^{6+} 和乙草胺对少根紫萍叶绿素a含量的影响
Table 2 Effects of different concentrations of Cr^{6+} and acetochlor on the content of chlorophyll a in *Spirodela oligorrhiza* L.

处理 Treatment	浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc.	\bar{X}	SD^2	V/%
Cr^{6+}	0.0	7.022 4	1.267 7	16.0
	7.9	6.078 7	0.644 0	13.2
	10.0	5.534 4	0.482 1	12.5
	12.6	4.694 0	0.450 9	14.3
	15.8	4.979 3	0.348 9	11.8
	20.0	4.012 9	0.272 1	13.0
	25.1	3.694 0	0.482 6	18.8
	31.6	3.214 0	0.171 3	12.9
Acetochlor	0.0	5.330 0	0.204 7	8.5
	2.5	4.640 3	0.167 4	8.9
	4.0	4.486 0	0.188 1	9.7
	6.3	4.249 2	0.112 5	7.9
	10.0	4.076 1	0.320 9	13.9
	15.8	3.926 9	0.182 0	10.9
	25.1	3.582 3	0.105 9	9.1
	39.8	3.181 8	0.024 9	5.0
Cr^{6+} -acetochlor	0.0	6.454 0	0.181 0	6.6
	2.5	4.803 5	0.198 7	9.3
	4.0	4.514 4	0.101 2	7.0
	6.3	4.189 5	0.105 5	7.8
	10.0	3.859 5	0.012 2	2.9
	15.8	3.665 2	0.191 7	12.0
	20.0	3.078 4	0.084 5	9.4

¹⁾ \bar{X} : 各处理组叶绿素a含量的平均值($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) The mean of chlorophyll a content of every treatment group; SD^2 : 各平行样本的方差 The variance of each parallel sample; V: 偏差 Deviation.

3 讨 论

目前,关于少根紫萍生长抑制实验的质量控制要求还缺乏统一的标准。本文采用生长量和重复间的偏差作为衡量实验质量优劣的2个重要指标^[8],如果生长量较低,表明少根紫萍培养条件不适宜,不能将污染物的毒性作用敏感地反映出来;如果偏差大,则说明实验的重复性不好,结果可靠性低,要增加样本容量。

据报道^[8],经4 d培养后浮萍的植物个体数增加130%~140%。本研究中3组对照组的少根紫萍增长率分别为160%(Cr^{6+})、136%(乙草胺)和156%(Cr^{6+} -乙草胺),平均达151%,稍高于文献报道值,说明本研究的条件是合适的。

有关的研究表明^[14],在4 d试验中,如果各重

复的初始植物体数为20,实验结束时植物个体数的偏差则为18%;初始植物个体数为40,偏差则达到9%。本研究中各重复组的初始植物个体数为15,实验结束时 Cr^{6+} 、乙草胺及 Cr^{6+} -乙草胺各处理的对照组各重复间植物个体数的偏差分别为13.6%、5.9%和1.5%;叶绿素a含量的偏差分别为8.5%、16.0%和6.6%。所有实验处理组重复间的植物个体数偏差为0%~14%;叶绿素a含量的偏差为3%~18%(仅有1个浓度组为18.8%)。由此可见,本研究各重复间的偏差比较小,不大于初始植物个体数为20时的偏差。因此,实验时每一重复的初始植物个体数选用15个是比较合适的。

根据实验结果可以看出, Cr^{6+} 对少根紫萍生长的影响小于乙草胺,用相加指数法(AI)进行评价,求得其相加指数大于0,表现为协同作用。 Cr^{6+} 和乙草胺单一及联合处理不同程度地减少了少根紫萍的叶绿素a含量,而联合处理的毒害效应明显大于相应的单一处理,显示出明显的协同效应。因此只用单一污染物的含量去判断水污染后的毒性危害是不可靠的,必须考虑毒物的联合毒性。

协同作用的机制可能是:1) Cr^{6+} 与乙草胺发生了某种化学作用或络合或鳌合作用,形成了毒性更强的化合物;2)乙草胺是酰胺类除草剂,它的毒性机理是抑制植物根系的生长;影响细胞膜透性;通过干扰卵磷脂合成,抑制胆碱向磷脂和卵磷脂的渗入,从而造成细胞膜的结构与功能破坏,导致膜渗漏、养分外渗及膜丧失完整性^[15]。 Cr^{6+} 是氧化态,它对植物的毒害是^[16,17]通过破坏正常细胞活性氧代谢的平衡,直接触发氧化胁迫,导致膜结构和功能的改变,膜脂过氧化加重。因此可以推测, Cr^{6+} 与乙草胺对少根紫萍的伤害是由于它们均能破坏细胞膜的结构与功能。由于其中的一种污染物对细胞膜的作用,使得另一种污染物更容易进入植物体内,加剧了对植物细胞的伤害,从而表现出协同作用。当然,混合污染物对生物的毒性效应是十分复杂的,受多种因素的影响。因此,要探讨混合污染物对水生植物的影响还需进行深入细致的实验研究。

利用浮萍进行有毒有害化学品的毒性评价已在发达国家成为化学品毒性评价的标准方法,因此,在中国开展这方面的工作也是必然的、急迫的。少根紫萍个体小,繁殖快,对培养条件的要求极为简单,增长非常迅速,对污染物敏感,是一种良好的毒理实

验材料。

参考文献:

- [1] 修瑞琴, 许永香, 高世容, 等. 砷与镉、锌离子对斑马鱼的联合毒性实验[J]. 中国环境科学, 1998, 18(24): 349-352.
- [2] 谢荣, 唐学玺, 李永琪. 有机磷农药和重金属对海洋微藻的联合毒性研究[J]. 海洋环境科学, 1999, 18(2): 16-19.
- [3] 戴家银, 郑微云, 王淑红. 重金属和有机磷农药对真鲷和平鲷幼体的联合毒性研究[J]. 环境科学, 1997, 18(5): 44-46.
- [4] 李天煜. 稀脉萍 (*Lemna aequinoctialis*) 和紫萍 (*Spirodela polyrrhiza*) 的重金属生态毒理学研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2003.
- [5] 何报作, 郑俊华, 樊立勇. 中药浮萍同混淆品少根紫萍、青萍的理化鉴别[J]. 中国中医药科技, 1998, 5(5): 300-302.
- [6] Wang W. Review: literatures review on duckweed toxicity testing [J]. Environ Rev, 1990, 52: 7-22.
- [7] Wang W. Literature review on higher plants for toxicity testing [J]. Wat, Air and Soil Pollut, 1991, 59: 381-400.
- [8] 张彤, 金洪钧. 用浮萍试验检测 4 种污染物的植物毒性 [J]. 中国环境科学, 1995, 15(4): 266-270.
- [9] Fairchild J F, Ruessler D S, Hverland P S, et al. Comparative sensitivity *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1997, 57: 353-357.
- [10] 张莉, 王友保, 刘登义. 利用浮萍检测 Cu, As 及其复合污染的植物学毒性[J]. 安徽师范大学学报, 2001, 24(4): 392-395.
- [11] 修瑞琴, 许永香, 高世容, 等. 水生毒理联合效应相加指数法[J]. 环境化学, 1994, 13(3): 269-271.
- [12] 严重玲, 李瑞智, 钟章成. 模拟酸雨对绿豆、玉米生理生态特性的影响[J]. 应用生态学报, 1995, 6(增刊): 124-131.
- [13] Somashekaraish B V, Padmaja K, Prasad R K. Phytoxicity of cadmium ions on germination seeding of mung bean: involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation [J]. Physiol Plant, 1992, 85: 85-89.
- [14] Wang W. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed[J]. Environ Pollut, 1986, 11: 1-14.
- [15] 苏少泉, 周景恺. 乙草胺的作用原理及使用技术[J]. 现代化农业, 1990(3): 3-4.
- [16] 仁安芝, 高玉葆, 刘爽. 铬、铅胁迫对青菜叶片几种生化指标的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 112-116.
- [17] 胡韧, 林秋奇, 张小兰. Cr³⁺, Cr⁶⁺ 及其复合污染对狐尾藻的毒害作用[J]. 生态科学, 2003, 22(4): 327-331.

(责任编辑:惠红)

2006 年《林产化工通讯》征订启事

《林产化工通讯》(双月刊)是国家科学技术委员会批准面向国内外公开发行的全国林产化工行业惟一的技术类刊物(国内统一连续出版物号 CN 32 - 1328/S, 国际标准连续出版物号 ISSN 1005 - 3433)。是《中国学术期刊(光盘版)》、“中国期刊网”、“中文科技期刊数据库”、“万方数据——数字化期刊群”全文收录期刊、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊,《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊,在 2002 年“第四届江苏省质量评估分级”中被评为一级期刊。

本刊坚持为经济建设服务、为基层服务的办刊宗旨,坚持以刊登新技术、新工艺、新设计、新设备、新材料为主要内容的办刊方针,突出技术类期刊的特点,注重稿件的时效性。主要栏目有研究报道、企业纵横、技改园地、开发探索、技术讲座、国外信息和国内简讯等固定栏目,以及专利快递、市场行情、开发指南等小栏目。适于松香、松节油、胶粘剂、制浆

造纸、木材热解、活性炭、木材水解、栲胶、紫胶、森林资源、香精香料、日用化工、环保、医药、土产、商业、外贸、商检等部门从事科研、生产、教学和管理的相关人士阅读。

欢迎积极投稿、踊跃订阅或来人来函联系广告业务!

本刊可通过邮局订阅,邮发代号 28 - 205, 单月 25 日出版。每册定价 4.50 元, 全年 27.00 元。也可直接向本刊编辑部订阅。

地址:南京市锁金五村 16 号 林产化工研究所内(邮编:210042);银行信汇户头:中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 账号:4301012509001028549, 开户行:工商银行南京板仓分理处;电话:025 - 85482492;传真:025 - 85413445;http://lchg.chinajournal.net.cn; E-mail: lchg@chinajournal.net.cn