

除草剂诱发蟾蜍蝌蚪红细胞微核的研究

汤新慧 (盐城教育学院生物系, 盐城 224002)

文 摘 研究了 10 种常用稻田除草剂对中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)蝌蚪红细胞微核的诱突变效应。蝌蚪在各除草剂试验液中染毒 7d, 采心脏血制片。结果表明, 毒草胺、杀草丹等 8 种除草剂能诱发蝌蚪红细胞的微核细胞率显著增高, 最高达 11.5% (毒草胺 0.5mg/L), 与对照组(4.2%)比较, 差异极显著($P < 0.01$), 其中酰胺类、氨基甲酸酯类诱突变效应最强, 其 0.8mg/L 浓度组平均微核细胞率分别为 8.2% 和 6.5%。研究中还发现, 在一定范围内微核细胞率与除草剂浓度呈正相关, 使用浓度下杀草丹等 6 种除草剂具有明显诱突变效应。

关键词 除草剂 蝌蚪红细胞 微核试验

A study of micronucleus in erythrocytes of tadpole induced by weedicide. Tang Xinhui (Department of Biology, Yancheng Educational College, Yancheng 224002). *China Environmental Science*. 1998, 18(2): 162~ 165

Abstract—Micronucleus test of erythrocytes of tadpole (*Bufo bufo gargarizans*) was applied to study possible mutagenic activities of 10 kinds of weedicides. The tadpoles were exposed in various weedicide samples for 7 days. Smears of cardiac blood samples were prepared. It was found that 8 kinds of weedicides such as propachlor and benthicarb could induce significant increases in frequencies of micronucleated erythrocyte, the maximum frequency was 11.5% (propachlor, 0.5 mg/L), there was significant difference in comparison with the control group (4.2%, $P < 0.01$). Amide and carbamate of weedicide had great mutagenic activities with their mean frequencies of micronucleate cell of 8.2% and 6.5% (0.8mg/L) respectively. In addition, the frequency of micronucleated cell showed a dosage-dependent elevation, and 6 kinds of weedicides such as benthicarb in using concentration had significant mutagenic activities.

Key words: weedicide tadpole erythrocytes micronucleus test

随着工农业生产的发展, 环境污染问题日趋严重。目前, 作为捕虫能手、生态系统中不可缺少的重要组成成员—蟾蜍, 其数量在全球范围内呈急剧减少趋势。据分析和推测, 除草剂的大量使用可能是造成环境污染、引起蟾蜍数量减少的重要原因之一^[1]。为探讨除草剂对蟾蜍的毒害作用和毒性机制, 本文进行了除草剂诱发蟾蜍蝌蚪红细胞微核的研究工作。

自 70 年代以来, 国内外有关学者运用水生脊椎动物微核试验法研究了一些化学物质的致突变效应。Buckley^[2]、Hooftman 等人^[3,4]成功地用残余氯、甲基磺酸乙酯、苯并芘等诱发荫鱼、银大马哈鱼细胞微核的形成。国内学者也进行了类似的研究, 贺维顺^[5~7]、张瑞涛^[8]、楼允东^[9]、刘爱明^[10]等用泥鳅、黄鳝、蝌蚪等作实验动物检测污水、氟化物、环氧氯丙烷、环磷酰胺、

农药、洗衣粉等的诱突变活性, 但至今尚未见到除草剂诱发蝌蚪红细胞微核的报道。本研究使用 10 种常用稻田除草剂, 以中华大蟾蜍变态前的蝌蚪为材料进行血细胞微核试验, 探讨除草剂对蟾蜍蝌蚪红细胞的毒害作用和毒性机制, 研究结果可望为有关部门研制、生产除草剂, 保护蟾蜍、维持生态平衡提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 药剂

供试的药剂为 10 种常用稻田除草剂: 二甲四氯钠(20% 水剂, 浙江海盐农药厂)、杀草丹(90% 乳油, 宜兴市益农化工厂)、氟乐灵(48% 乳油, 大丰市农药厂)、稻乐思(72% 乳油, 瑞士汽

收稿日期: 1997-06-01

巴嘉基有限公司)、除草灵(18% 颗粒剂, 浙江东阳农药厂)、扫氟特(30% 乳油, 江苏汽巴农化有限公司)、苄甲黄隆(10% 粉剂, 南京梅山化工总厂)、毒草胺(20% 粉剂, 北京市农药二厂)、丁草胺(60% 乳油, 广州市农药厂)、禾大壮(72% 乳油, 美国施多福化学公司)。

1.2 实验动物

实验动物为中华大蟾蜍变态前的蝌蚪, 从盐城市东门附近无污染水塘中捕捞, 体重0.4~0.5g, 于染毒前两周养在符合饮用水标准的地下水(下称地下水)中, 每日上午投喂磨细的金鱼饵料1次, 每周换水2次。

1.3 实验方法

每种除草剂用地下水配成0.1、0.5、0.8mg/L 3个浓度, 并以地下水作对照, 每组15只蝌蚪, 试验溶液2.5L。蝌蚪在各试验液中染毒7d后转移至地下水中, 6h后处死, 取心脏血制片。制片时使蝌蚪腹部朝上, 小心剪开腹部皮肤, 暴露心脏, 取血加到预先滴有小牛血清的载玻片上, 与小牛血清混匀后作涂片并立即用电吹风吹干, 甲醇固定15min, 10% Giemsa 染液(pH=6.98)染色15min, 显微镜(油镜)下观察。每试验组观察10只蝌蚪, 每只蝌蚪观察2000个左右细胞, 记录具微核的细胞数, 观察结果以千分率(‰)表示。本文数据采用 X^2 检验和F检验进行统计学分析。

2 结果和讨论

捕捞蝌蚪在地下水中暂养2周后其红细胞自发微核细胞率无明显个体差异, 经不同浓度、不同种稻田除草剂试验液染毒的中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核细胞率的测定结果见表1。

2.1 8种除草剂诱发细胞微核的形式

由表1可知, 对照组蝌蚪红细胞微核细胞率为 4.2 ± 0.3 ‰, 供试的10种除草剂中杀草丹、氟乐灵、稻乐思、除草灵、扫氟特、毒草胺、丁草胺、禾大壮等8种能诱发蝌蚪红细胞微核的形成, 其0.1、0.5、0.8mg/L 3个浓度组计24个试

验点平均微核细胞率达6.6‰, 经 X^2 检验, 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。本试验31个数据点中微核率最高者(毒草胺, 0.5mg/L)达11.5‰, 为对照组的2.7倍, 这表明大部分除草剂能诱发细胞微核的形成。

供试10种除草剂的有效成分属酰胺类、氨基甲酸酯类、硝基苯胺类、苯氧羧酸类、磺酰脲类, 它们通过抑制杂草细胞呼吸作用、光合作用、抑制蛋白质、核酸、脂类合成、破坏酶的活性从而影响细胞生长和细胞正常分裂发挥除草功效。这些化合物中酰胺类、氨基甲酸酯类、硝基苯胺类达一定浓度时可进入蝌蚪体内, 通过某些机制最终引起遗传物质损伤, 影响细胞正常分裂, 诱发微核细胞率升高。

2.2 具诱突变活性的8种除草剂诱突变效应有差异

经方差分析可知, 8种除草剂对细胞微核的影响存在显著差异($\alpha = 0.005$, 表2)。

8种除草剂中毒草胺、丁草胺、扫氟特、稻乐思诱突变效应最强, 其0.8mg/L试验组平均微核细胞率达8.2‰, 其中毒草胺、丁草胺、扫氟特在0.1、0.5、0.8mg/L浓度下均能使微核细胞率显著上升($P < 0.01$, 表1)。从化学成分看, 它们均属酰胺类化合物, 其代谢产物偶氮苯因破坏动物体内一些酶的活性而具一定致癌、致变性^[11]。

杀草丹、禾大壮、除草灵诱突变效应次之。其0.8mg/L试验组平均微核细胞率达6.5‰, 其中杀草丹、除草灵0.5、0.8mg/L试验组微核细胞率有显著升高($P < 0.01$, 表1)。它们属于氨基甲酸酯类化合物, 能通过破坏水体营养条件或其它原因而造成对水生动物的遗传毒性作用^[11]。

氟乐灵仅0.8mg/L试验组能诱发蝌蚪微核细胞率显著升高($P < 0.01$, 表1)。它属二硝基苯胺类化合物, 关于此类物质对水生脊椎动物的遗传毒害作用尚未见报道, 本文证明了二硝基苯胺类物质亦具一定诱突变活性, 其机制有待于今后进一步探讨。

表 1 除草剂对蝌蚪红细胞微核细胞率的影响

Table 1 The effect of various weedicides on the micronucleus frequencies of erythrocytes in toad tadpole

名称	浓度 (mg/L)	观察细胞数 (个)	微核细胞数 (个)	微核细胞率 (%)	X ²	P
稻乐思 (酰胺类)	0.1	21130	90	4.3	8.70	< 0.01
	0.5	21391	117	5.5		
	0.8	21868	132	6.0		
扫氟特 (酰胺类)	0.1	19065	112	5.9	6.90	< 0.01
	0.5	18786	131	7.0	16.93	< 0.01
	0.8	20558	170	8.3	34.23	< 0.01
毒草胺 (酰胺类)	0.1	19032	140	7.4	21.38	< 0.01
	0.5	20126	231	11.5	87.94	< 0.01
	0.8	18654	201	10.8	72.85	< 0.01
丁草胺 (酰胺类)	0.1	19773	128	6.5	12.18	< 0.01
	0.5	21334	205	9.6	55.79	< 0.01
	0.8	19627	162	8.3	33.38	< 0.01
杀草丹 (氨基甲酸酯类)	0.1	18723	106	5.7	8.25	< 0.01
	0.5	19903	120	6.0		
	0.8	18735	130	6.9	16.50	< 0.01
除草灵 (氨基甲酸酯类)	0.1	18853	98	5.2	6.94	< 0.01
	0.5	21997	128	5.8		
	0.8	19304	127	6.6	13.07	< 0.01
禾大壮 (氨基甲酸酯类)	0.1	18006	73	4.1	6.82	< 0.01
	0.5	18112	86	4.8		
	0.8	18723	110	5.9		
氟乐灵 (二硝基苯胺类)	0.1	18806	101	5.4	10.29	< 0.01
	0.5	20936	120	5.7		
	0.8	20478	128	6.3		
二甲四氯钠 (苯氧羧酸类)	0.1	20235	95	4.7		
	0.5	20328	84	4.1		
	0.8	19963	104	5.2		
苄甲黄隆 (磺酰脲类)	0.1	20198	91	4.5		
	0.5	20063	93	4.6		
	0.8	18713	108	5.7		
对照		28322	118	4.2±0.3		

注: 表后两列只列出差异极显著的数据

表 2 不同除草剂诱发蝌蚪微核细胞率的方差分析

Table 2 Variance analysis of the frequencies of micronucleate in toad tadpole erythrocyte induced by different weedicides

变异来源	平方和	自由度	均方	F
浓度	15.08	2	7.54	13.23*
种类	57.79	7	8.26	14.49*
误差	8.04	14	0.57	
总和	80.91	23		

注: * α= 0.005

由表 1 可知, 苄甲黄隆、二甲四氯钠在试验条件下对蝌蚪细胞微核无显著影响。苄甲黄隆和二甲四氯钠分别属于磺酰脲类和苯氧羧酸类物质, 到目前为止, 尚未发现此两类除草剂对动物体具慢性毒性^[11]。研究进一步证实了这一点。但据研究, 在苯氧羧酸类除草剂合成过程中温度上升过高会生成 2, 3, 7, 8-四氯二苯对二, 它是一种强致癌和催畸毒物, 因此如果使用含有杂质 2, 3, 7, 8-四氯二苯对二 的苯氧羧酸类除草剂将引起水生动物致癌、致畸和致突

2.3 苄甲黄隆、二甲四氯钠无诱突变活性

变。

2.4 除草剂浓度影响诱突变效应

不同浓度除草剂对蝌蚪红细胞微核细胞率的影响存在显著差异($\alpha=0.005$, 表 2), 并且在 $0.1\sim 0.8\text{mg/L}$ 范围内, 大多数试验组微核细胞率与试验浓度呈正相关, 但毒草胺和丁草胺例外, 当试验浓度增加至 0.8mg/L 时微核细胞率反而下降(表 1)。这与楼允东等亚硝基胍诱发泥鳅红细胞微核的工作^[9]有相似的结论。表明微核细胞率与浓度有一定相关性, 但超出一定范围时因剂量过高可能会抑制或终止细胞的正常分裂活动, 因而微核细胞率有所下降。

2.5 使用浓度下 6 种除草剂诱发微核细胞率上升

10 种除草剂以使用浓度, 1/5 使用浓度、1/25 使用浓度 3 种试验液染毒蝌蚪 7d, 测定其红细胞微核细胞率。结果表明, 使用浓度下, 毒草胺、丁草胺、扫氟特、杀草丹、禾大壮、氟乐灵 6 种能诱发蝌蚪微核细胞率显著上升($P<0.01$), 其余 4 种无明显诱突变作用, 并且杀草丹诱突变效应最强, 这与表 1 中同一浓度下除草剂对红细胞微核诱发效应不相吻合, 其主要原因可能是各除草剂使用浓度相差较多。如杀草丹使用浓度为 5.6mg/L , 毒草胺使用浓度为 0.36mg/L , 杀草丹正常使用浓度是毒草胺的 15.5 倍, 显著高于杀草丹, 但使用浓度下, 杀草丹对微核的诱发效应强于毒草胺。

3 结论

运用蝌蚪红细胞微核试验方法, 检测了 10 种除草剂的遗传毒性, 结果表明, 大部分常用稻田除草剂具一定致突变活性, 并且酰胺类和氨基甲酸酯类除草剂具更强的诱突变活性。

参考文献

- 1 潘道一. 动物学杂志, 1990, 25(1): 32~34
- 2 Buckley J A. Fish Board Can., 1997, 34: 215~224
- 3 Hooftman R N, Raat W K de. Mutation Res., 1982, 104: 147~152.
- 4 Hooftman R N, Vink G J. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1981, 5: 261~269
- 5 贺维顺, 王蕊芳. 动物学研究, 1992, 13(3): 279
- 6 贺维顺, 王蕊芳, 丘翠芳. 环境科学学报. 1987, 7(4): 467~471
- 7 贺维顺, 王蕊芳, 张春芳. 环境科学学报, 1991, 11(3): 351~357
- 8 张瑞涛. 淡水渔业研究文集. 北京: 科学出版社, 1990. 16~20
- 9 楼允东, 吴萍. 中国环境科学, 1996, 16(4): 275~278
- 10 刘爱明等. 动物学研究, 1985, 6(1): 8~10
- 11 苏少泉. 中国农田杂草化学防治. 北京: 中国农业出版社, 1995. 452~456

作者简介

汤新慧 女, 1966 年 12 月生。现为盐城教育学院生物系讲师。主要从事细胞生物学等教学工作及水环境的生物监测的研究。发表论文 10 余篇。