

除草剂施田补对沼水蛙血细胞和 心肌收缩能力的影响

项君露¹,南旭阳^{1,2*},沃冬冬¹,王静静¹,沈江¹

(1.温州大学 生命与环境科学学院,浙江 温州 325035;
2.浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室,浙江 温州 325035)

摘要:以沼水蛙(*Hylarana guentheri*)为研究对象,研究了不同剂量的施田补溶液对沼水蛙的急性毒性效应及其外周血红细胞数/白细胞数、红细胞微核率、红细胞核异常率和总核异常率等的影响,同时利用 Powerlab 生物信号采集系统研究了施田补对沼水蛙心肌收缩能力的影响。结果显示,施田补对沼水蛙的 96 h 半致死剂量、安全剂量分别为 1.149 9 mL/L 和 0.115 0 mL/L。所有药物组(0.012 5~0.400 0 mL/L)沼水蛙的血红细胞微核率、核异常率、总核异常率等均高于对照组,而且大部分药物组与清水对照组差异显著或极显著。在较高剂量($\geq 0.050\ 0$ mL/L)中处理较长时间(192 h)时差异更加明显。所有药物组的外周血白细胞数/红细胞数与对照组相比差异均极显著。施田补对沼水蛙心肌收缩功能具有一定的毒害作用。综上,施田补对沼水蛙具有较大的毒害作用。
关键词:除草剂;蛙;外周血红细胞;心肌收缩功能;毒害
中图分类号:S858.99;S482.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2015)04-0149-05

Effect of Herbicide Pendimethalin on Hemocyte and Cardiac Contractility of *Hylarana guentheri*

XIANG Junlu¹,NAN Xuyang^{1,2*},WO Dongdong¹,WANG Jingjing¹,SHEN Jiang¹

(1. School of Life and Environment Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China; 2. Zhejiang Provincial Key Lab for Water Enviroment and Marine Biological Resources Protection, Wenzhou 325035, China)

Abstract: The herbicide (Pendimethalin) was taken as target drug, and the frog (*Hylarana guentheri*) was taken as the object. Using different doses of Pendimethalin, the acute toxicity reactions, the micronucleus rate, nuclear abnormal rate, total nuclear abnormal rate of erythrocytes and the leucocyte/erythrocytes (WBC/RBC) in the peripheral blood of *Hylarana guentheri* were studied. With the biological signal acquisition system of Powerlab, the effect of Pendimethalin on the frog's myocardial contraction ability was also studied. The results showed that the frog's 96 hours half lethal dose (LD_{50}) is 1.149 9 mL/L and the safe dose (SD) was 0.115 0 mL/L. In the groups treated with Pendimethalin, the frog's micronucleus rate, nuclear abnormal rate and total nuclear abnormal rate of erythrocytes were all higher than the control group. And there were significant differences ($P < 0.05$) or extremely significant differences ($P < 0.01$) between the control group and the most groups treated with Pendimethalin. When the dose was higher ($\geq 0.050\ 0$ mL/L) and the treated time was longer (192 h), the differences were more obvious. The WBC/RBC in all experimental groups contrasted with control group were all reached the level of extremely significant differences ($P < 0.01$). The result also showed that Pendimethalin had certain poison effection on myocardial contraction function of *Hylarana guentheri*. Overall, Pendimethalin

收稿日期:2014-11-02
基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY12C03007)
作者简介:项君露(1995-),女,浙江永康人,在读本科生,研究方向:动物生理生态学。E-mail:550825803@qq.com
* 通讯作者:南旭阳(1970-),男,浙江乐清人,副教授,硕士,主要从事动物生理生态学研究。E-mail:xyan@tom.com

had a great poison effect on *Hylarana guentheri*.

Key words: Pendimethalin; frog; peripheral blood erythrocyte; myocardial systolic function; toxicity effect

除草剂不易降解、残留高,污染环境,同时也可能危害动、植物,从而给农牧业生产等带来各种负面影响。研究^[1]表明,被除草剂草甘膦污染的饮用水会导致番鸭(*Cairna moschata*)和鹅(*Anser domestica*)等动物急性中毒甚至死亡;叶祖国等^[2]报道,化学除草剂会引起山羊(*Capra hircus*)流产及死亡。张淑花等^[3]研究发现,2,4-滴丁酯和乙草胺等除草剂会使土壤中小型动物个体数量显著减少,而且优势类群的个体数量减少最多;南旭阳^[4]、张民等^[5]研究表明,除草剂草甘膦和五氯酚分别对鲫鱼(*Carassius auratus*)的外周血红细胞微核率和血液淋巴细胞膜的完整性产生显著影响;邱福泉等^[6]研究发现,除草剂克无踪会导致鸡群逐渐瘫痪、腿软无力而趴伏于地,最后昏迷而死。

施田补是一种烟草腋芽抑制剂除草剂,具有抑芽增产增收的作用^[7],中文通用名为二甲戊乐灵,能有效地防除多种杂草。目前已有一些有关施田补及其环境残留物对生物毒害作用的报道^[8-9],但均未进行深入研究。为此,通过施田补对沼水蛙的急性致死毒性以及施田补对沼水蛙心肌收缩能力影响的研究,以进一步探讨施田补的危害,为客观评价除草剂对农牧业生产的影响,以及为环境污染的监测与评价等奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试沼水蛙捕自浙江温州茶山高教园区周边农田,要求蛙体型适中,雌雄不限,生长发育良好。沼水蛙体质量相近(平均 $25.844\ 3 \pm 3.604\ 7\text{ g}$)。

施田补(有效成分 330 g/L)购自江苏龙灯化学有限公司。其他化学试剂均为国产分析纯。任氏液参照文献[10]的方法配制。

AD PowerLab4/26 型生理数据采集分析系统、AD MLT-050/D 张力传感器购自澳大利亚生物仪器公司,改良型 Langendorff 心脏离体灌流装置购自南京美易科技有限公司,Bridge Amp 桥式放大器购自 ADINSTRUMENTS 公司,BS210S 电子天平购自北京赛多利斯天平有限公司,显微镜购自 OLMPUS 公司。

1.2 方法

1.2.1 驯养 将野外捕捉的沼水蛙放在盛有少量自来水(pH 值为 6.82~7.05,温度为 20~25 ℃,曝气 72 h 以挥发水中的氯成分)的水桶中驯养 3 d,挑

选健康的个体进行试验。

1.2.2 急性毒性试验 配制 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL/L 等不同剂量的施田补溶液进行急性毒性试验。同时,以蒸馏水为空白对照。每组 10 只沼水蛙,分别记录染毒 24、48、72、96 h 的死亡数,每剂量设 3 个平行样。计算施田补对沼水蛙的 72、96 h 半致死剂量(LD₅₀)和安全剂量(SD),从而确定合适的试验剂量。

1.2.3 血液指标的测定 将驯养后的沼水蛙分别暴露在 0、0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.200 0、0.400 0 mL/L 的施田补溶液中染毒 96 h、192 h。

用手术剪直接剪破蛙的心脏,用洁净的盖玻片取蛙血 1 滴,置载玻片一端,与载玻片保持 30°~45°,向前平稳均匀推动载玻片形成 1 层薄血膜。血涂片制成后,立即在空气中轻轻挥动使其迅速干燥,以免血细胞变形。滴加适量瑞氏染液染色,3 min 后用蒸馏水覆盖 1 min,用去离子水冲洗染液,自然晾干后在显微镜下观察、计数。

用计数器计数各剂量组沼水蛙外周血红细胞的微核率、核异常率、总核异常率和白细胞数/红细胞数等,每张玻片计数不少于 2 000 个细胞。

1.2.4 心肌收缩能力的测定 随机取染毒的沼水蛙,采用常规方法双毁髓,暴露心脏,测定并记录心率。用蛙心夹夹住少许心尖部的肌肉,将蛙心夹系线与张力传感器连接,将刺激电极安放在心室外壁,并与刺激输出端相连。打开计算机,启动 PowerLab 生物采集系统记录心搏曲线。连续测定 30 个心动周期,采集并保存数据。利用生物采集系统自带的程序计算蛙心肌最大收缩能力、最小收缩能力和心率等。

1.2.5 数据处理 用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,结果用平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。

2 结果与分析

2.1 急性毒性试验结果

2.1.1 施田补胁迫下沼水蛙的宏观中毒表现 当施田补的剂量较低($< 0.6\text{ mL/L}$)时,除个别试验组偶见少数沼水蛙有挣扎跳跃现象外,其他大部分试验组中的沼水蛙基本上没有明显的异常表现。但当施田补的剂量较高($> 0.8\text{ mL/L}$)时,沼水蛙就会出现比较剧烈的反应,不断挣扎向上跳跃,维持一段时间后才逐渐趋于静伏少动,甚至部分沼水蛙出现死亡。死亡后的沼水蛙肌肉僵硬、两腿伸直,少数呈蹲

坐状态,而且瞳孔变小。

2.1.2 施田补对沼水蛙的致死效应 由表 1 可知,当除草剂施田补溶液剂量低于 0.6 mL/L 时,在 72 h 内,沼水蛙均未出现死亡。当将沼水蛙暴露在中等剂量(0.6~1.4 mL/L)的施田补溶液中处理较短时间(24~48 h)时,沼水蛙未出现死亡。但当暴露时间较长(72~96 h)时,绝大部分处理组中的沼水蛙出现死亡现象,并且在 1.4 mL/L 的 96 h 组中死亡

率高达 70.0%。而在较高剂量(1.6~1.8 mL/L)施田补溶液的胁迫下,24 h 组就已经出现死亡,并且在 1.8 mL/L 的 96 h 组中死亡率达到 100.0%。出现上述结果的原因可能是较低剂量的施田补对沼水蛙的毒性较小,在短时间内沼水蛙具有一定抵御能力,而较高剂量的施田补溶液较长时间的胁迫对沼水蛙的毒害性渐渐增大,直至超出了沼水蛙的抵御能力,最终导致沼水蛙死亡。

表 1 施田补对沼水蛙的致死效应

施田补剂量 /(mL/L)	平均死亡率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0	0	0	0
0.2	0	0	0	0
0.4	0	0	0	0
0.6	0	0	0	10.0±0.00
0.8	0	0	13.3±5.77	23.3±5.77
1.0	0	0	20.0±10.00	40.0±10.00
1.2	0	0	26.7±7.07	50.0±14.14
1.4	0	0	33.3±7.07	70.0±0.00
1.6	13.3±7.07	36.7±7.07	53.3±7.07	83.3±14.14
1.8	20.0±14.14	50.0±14.14	80.0±28.28	100.0±0.00

2.1.3 施田补对沼水蛙的 LD₅₀及 SD 由表 2 可知,施田补对沼水蛙的 96 h LD₅₀为 1.149 9 mL/L,SD 为 0.115 0 mL/L。

表 2 施田补对沼水蛙的 96 h 半致死剂量、95%可信区间和安全剂量

胁迫时间/h	LD ₅₀	95%的可信限	SD
72	1.495 8	1.399 7~1.617 2	0.149 6
96	1.149 9	1.074 6~1.228 1	0.115 0

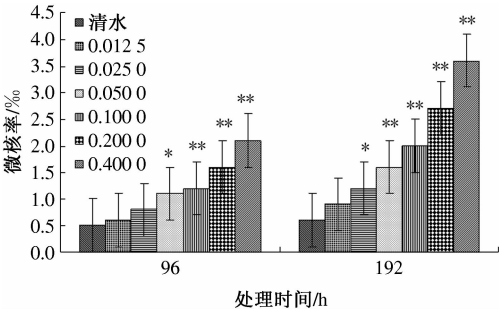
经统计分析,96 h、72 h 沼水蛙死亡率与施田补剂量的相关性方程分别为 $Y_{96} = -2.995 1 + 2.604 5X$ ($\chi^2 = 4.813, DF = 8, P = 0.777$, 拟合良好), $Y_{72} = -3.173 3 + 2.121 5X$ ($\chi^2 = 5.671, DF = 8, P = 0.684$, 拟合良好)。表明随着施田补剂量的增加,沼水蛙死亡率也随之上升,具有一定的剂量效应。

2.2 施田补对沼水蛙外周血细胞的影响

2.2.1 外周血红细胞微核率 由图 1 可知,当染毒时间相同时,随着施田补剂量逐渐升高(0.012 5~0.400 0 mL/L),沼水蛙血红细胞微核率也随之上升。但在施田补剂量较低(<0.050 0 mL/L)时,微核率的上升趋势并不明显。而在施田补剂量较高(0.050 0~0.400 0 mL/L)时,微核率的上升趋势则较为明显。同时,在相同剂量施田补的胁迫下,随着处理时间的增加,各处理组中的血红细胞微核率较对照组均有不同程度的升高。

当染毒时间为 96 h 时,0.012 5、0.025 0 mL/L 处理组与对照组相比无显著差异,而其他剂量(0.050 0~0.400 0 mL/L)处理组与对照组相比差异显著或极显著;染毒 192 h 时,除最低剂量(0.012 5 mL/L)组外,其

余各处理组的微核率与对照组相比差异均有显著或极显著,具有一定的剂量效应。



* 表示相同处理时间下与对照组比较差异显著(P<0.05), ** 表示差异极显著(P<0.01),下同

图 1 施田补对沼水蛙外周血红细胞微核率的影响

2.2.2 外周血红细胞核异常率 从图 2 可知,将沼水蛙暴露在施田补溶液中处理 96 h 和 192 h 后,所有处理组的核异常率均比对照组有较大的升高,而且随着处理时间的增加和施田补剂量的加大,各处理组的核异常率也随之增大,具有一定的时间效应和剂量效应。

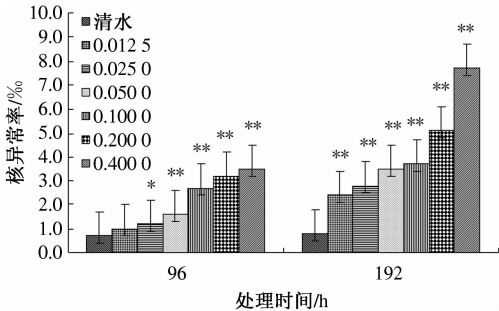


图 2 施田补对沼水蛙外周血红细胞核异常率的影响

在 96 h 和 192 h 的各处理组中,核异常率最高的是 0.400 0 mL/L 剂量组 (分别为 3.5‰ 和 7.7‰),分别是相应对照组的 5.0 倍和 9.6 倍。除 96 h 的 0.012 5 mL/L 组外,其他所有处理组的红细胞核异常率与对照相比差异均显著,而且绝大部分组差异极显著。

2.2.3 外周血红细胞总核异常率 从图 3 可知,各施田补处理组的总核异常率变化情况与核异常率基本相似。所有施田补处理组的总核异常率均比对照组高。所有 192 h 处理组与对照组相比差异均极显著;而在 96 h 处理组中,除 0.012 5 mL/L 组与对照组差异不显著、0.025 0 mL/L 组与对照组差异显著外,其他处理组的血细胞总核异常率与对照组相比差异均极显著。

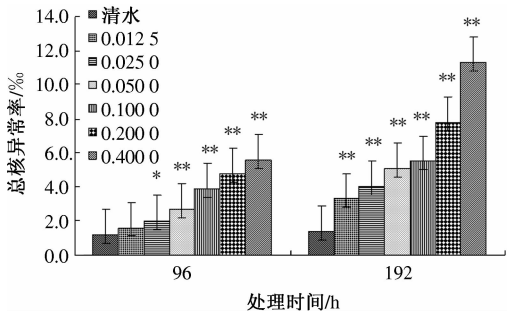


图 3 施田补对沼水蛙外周血红细胞总核异常率的影响

2.2.4 外周血中白细胞数/红细胞数 从图 4 可知,在施田补胁迫下,随着施田补剂量的增加,沼水蛙外周血中的白细胞数/红细胞数均出现先上升后下降的现象,而且都在 0.100 0 mL/L 剂量组达到高峰(96 h、192 h 组分别为 22.6‰、31.3‰)而后逐渐下降。所有施田补处理组均比对照组高,而且与对照相比差异均极显著。这可能是因为施田补的胁迫下,沼水蛙能产生更多的白细胞来抵御施田补对其的毒害作用。然而,随着施田补剂量的不断增加,沼水蛙所受到的毒害作用也逐渐增大,当沼水蛙所受到的毒害作用超过其承受能力时,其产生白细胞的能力也随之下降,从而导致白细胞数/红细胞数随之下降。

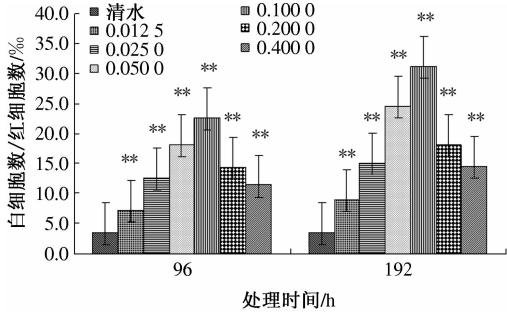


图 4 施田补对沼水蛙外周血中白细胞数/红细胞数的影响

2.3 施田补对沼水蛙心肌收缩能力的影响

2.3.1 染毒 96 h 后心肌收缩能力 从图 5 可以看出,在较高剂量 (>0.025 mL/L)施田补的胁迫下,虽然沼水蛙心肌收缩力变化较不规律,但是除 0.400 0 mL/L 组外,其余所有处理组的心肌最大收缩力、最小收缩力以及最大收缩力与最小收缩力之差都高于对照组,这说明除草剂施田补能在一定程度上增强沼水蛙心肌收缩能力。

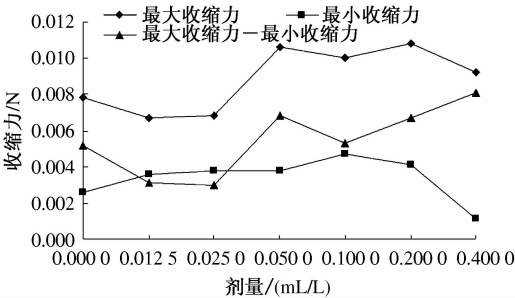


图 5 染毒 96 h 后对沼水蛙心肌收缩能力的影响

2.3.2 染毒 192 h 后心肌收缩能力 由图 6 可知,在用施田补胁迫较长时间(192 h)后,沼水蛙心肌收缩力变化情况不规律。沼水蛙心肌最大收缩力、最大收缩力与最小收缩力之差均是先在最低剂量(0.012 5 mL/L)时有所上升,然后逐渐下降,而后又逐渐上升。在所有施田补处理组中,沼水蛙最大心肌收缩力与最小心肌收缩力之差均比对照组大。说明除草剂施田补对沼水蛙的心肌收缩能力确实具有一定的影响,至于心肌收缩力变化不规律,其原因可能是因为沼水蛙正处在对施田补不断适应及调整过程中。

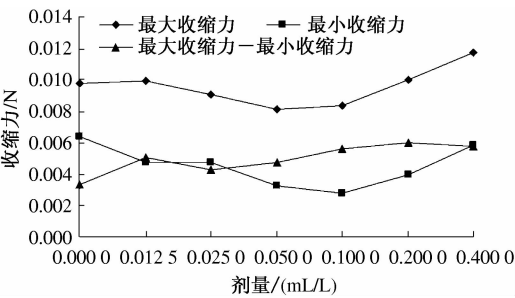


图 6 施田补染毒 192 h 后对沼水蛙心肌收缩能力的影响

3 讨论

3.1 施田补对沼水蛙的急性毒性作用

除草剂等农药虽然可以较大程度地提高农业产出水平,但是如果使用不当或过多就会对环境产生不良影响,可能会发生药害和人畜中毒事故^[11-12]。当除草剂等农药剂量达到一定剂量后就会迅速引起两栖类动物大量个体的死亡^[13]。本研究结果表明,施田补能引起沼水蛙大量死亡,与前述相关研究结

果具有相似性。施田补对沼水蛙的 96 h 的 LD_{50} 和 SD 分别为 1.149 9 mL/L 和 0.115 0 mL/L,均比较低,说明施田补对沼水蛙具有较大的毒性。如果再考虑到除草剂的不易降解性和高累积性,其对环境及相关动植物所造成的潜在危害影响就更应引起警觉。

3.2 施田补对沼水蛙外周血液生理指标及心肌收缩功能的影响

大多数农药已被证实既有染色体断裂剂作用,又具有纺锤体毒剂作用^[14]。贺维顺等^[15]用大观河污水处理华西大蟾蜍变态前蝌蚪,结果显示,污水可诱发蝌蚪外周血红细胞产生核固缩、核空泡、核碎裂和无丝分裂等核异常。耿德贵^[16]用除草剂乙草胺处理中华大蟾蜍变态期蝌蚪,结果表明,乙草胺可诱发红细胞产生小核、核碎裂和无核等核异常现象。本研究结果表明:施田补能引起沼水蛙外周血红细胞遗传方面的损伤,从而形成微核、双核,出现核碎裂、微核率和核异常率上升等现象,与上述相关研究结果相同。

生物体内白细胞参与机体的防御功能,白细胞具有的变形、游走、趋化、吞噬和分泌等特性是执行免疫功能的基础^[17],所以白细胞数量以及白细胞数/红细胞数的变化是反映生物免疫功能的重要指标之一。从本研究结果来看,除草剂施田补对沼水蛙外周血中的白细胞数/红细胞数有较大的影响。所有施田补处理组中的白细胞数/红细胞数均高于对照组,这说明沼水蛙能产生更多的白细胞来抵御除草剂施田补对其的毒害作用。这与南旭阳^[18]在研究铬离子对鲫鱼白细胞数影响时所得的结果一致。

相关研究^[19]表明,缺氧、酸中毒、能源物质缺乏以及兴奋-收缩耦联、肌肉内蛋白质或横桥功能特性的改变等,都可以降低肌肉收缩的效果。施田补是内吸传导型选择性除草剂,但其传导性能较差。研究^[20]表明,施田补对水生生态系统有很大影响,对水生生物具有高毒性。本研究结果显示,施田补会使沼水蛙心肌收缩能力出现不规律变化,而且除个别组外,其余所有施田补处理组的心肌最大收缩力与最小收缩力之差都高于对照组,这说明施田补对沼水蛙心肌收缩功能产生较大的毒害作用。

综上可知,除草剂施田补对沼水蛙具有较大的毒害作用,因此,在农牧业生产中使用施田补等除草剂时必须在使用剂量、使用时间和范围等方面加以控制,以避免可能的危害及对环境造成污染。

参考文献:

- [1] 李彬,顾雪清,施新华.除草剂引起鸭鹅中毒死亡的报告[J].医学动物防制,2009,25(1):61.
- [2] 叶祖国,蔡瑞峰.化学除草剂对畜禽的危害及防治[J].浙江畜牧兽医,2005(6):39.
- [3] 张淑花,高梅香,张雪萍,等.除草剂对农田中小型土壤动物群落结构的影响[J].河南农业科学,2012,41(10):70-73,99.
- [4] 南旭阳.除草剂“草甘膦”对鲫鱼外周血红细胞微核及核异常的影响[J].安徽师范大学学报,2001,24(4):329-331.
- [5] 张民,顾宇飞,顾颖,等.低浓度五氯酚对鲫鱼血液细胞毒性的体外研究[J].环境化学,2005,24(3):302-306.
- [6] 邱福泉,潘元宽.除草剂使用不当引起鸡群中毒[J].养禽与禽病防治,1997(3):43.
- [7] 李丽明.一药多用的新除草剂——施田补[J].新农业,1995(5):19.
- [8] 邵晨,蒋立琴,鲍伟利.除草剂施田补对鲫鱼红细胞核异常的诱导[J].农业环境保护,2002,21(3):266-268.
- [9] 施时迪,邵晨.二种除草剂对虎纹蛙蝌蚪的毒性研究[J].科技通报,2006,22(2):173-175.
- [10] 艾洪宾.人体解剖生理学实验教程[M].2版.北京:科学出版社,2010.
- [11] 张丽岩,宋欣,高玮玮,等. Cd^{2+} 对青蛤(*Cyclina sinensis*)的毒性及蓄积过程研究[J].海洋与湖沼,2010,41(3):418-421.
- [12] 徐汉红,张志祥,程东美.生物农药的发展优势及存在问题[J].世界农药,2004,26(2):5-10.
- [13] Loretta M C, Casida T E. Pyrethroid toxicology in the frog[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1983, 20(3):217-224.
- [14] 周宏治.农药甲基对硫磷污染环境的微核研究[J].四川大学学报:自然科学版,2000,37(增刊):62-66.
- [15] 贺维顺,王蕊芳.蝌蚪血细胞微核和核异常监测水质污染的研究[J].动物学研究,1990,11(1):1-5.
- [16] 耿德贵.除草剂乙草胺对蝌蚪红细胞微核及核异常的影响[J].环境与健康杂志,2000,17(1):36-38.
- [17] 蒋正尧,谢俊霞.人体生理学[M].2版.北京:科学出版社,2010:8,79.
- [18] 南旭阳.铬离子对鲫鱼红细胞核、血细胞数和血红蛋白量影响的研究[J].浙江师范大学学报,2002,25(3):303-307.
- [19] 周衍椒,张镜如.生理学[M].2版.北京:人民卫生出版社,1983.
- [20] 王军,朱鲁生,林爱军.二甲戊乐灵的残留毒理研究现状[J].农药,2001(6):8-11.