

二元农药混合物对发光细菌的联合毒性研究

吴淑杭^{1,2}, 周德平¹, 徐亚同², 姜震方¹

(1. 上海市农业科学院环境科学研究所, 上海 201106; 2. 华东师范大学环境科学系, 上海 200063)

摘要: 采用二次二因子回归通用旋转组合实验设计, 以明亮发光杆菌(*photobacterium phosphoreum*)T₃ 变种作为毒性测试物种, 研究了多菌灵+氟硅唑、甲氨基阿维菌素+阿维菌素和二氯喹啉酸+莎稗磷等二元农药混合物的联合毒性和主因子作用, 建立了 3 个相应的数学模型。结果表明, 多菌灵、氟硅唑、甲氨基阿维菌素、阿维菌素、二氯喹啉酸和莎稗磷等农药对明亮发光杆菌的毒性有显著的正效应。3 个二元农药混合物的联合毒性作用不同, 总体上, 多菌灵与氟硅唑以拮抗作用为主, 而甲氨基阿维菌素与阿维菌素以相加作用为主, 二氯喹啉酸与莎稗磷以协同作用为主。从单因子作用效应的角度看, 对相对发光强度的影响: 多菌灵大于氟硅唑、阿维菌素大于甲氨基阿维菌素, 莎稗磷大于二氯喹啉酸。发光细菌法作为一种快速、操作方便、成本低廉的生物监测方法, 将在农产品污染物毒性评价和农产品安全快速检测中有着广泛的应用前景。

关键词: 发光细菌; 农药; 联合毒性; 快速检测技术

中图分类号: X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)05-2028-05

Joint Toxicity of Two Pesticides on Luminescent Bacteria

WU Shu-hang^{1,2}, ZHOU De-ping¹, XU Ya-tong², JIANG Zhen-fang¹

(1. Environmental Science Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; 2. Department of Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200063, China)

Abstract: The joint toxicity effects of two pesticides on luminescent bacteria *photobacterium phosphoreum* T₃ were investigated in this paper. The joint and integral toxicity of Carbendazim, Flusilazole, Emamectin, Avermectin, Quinclorac and Anilofos were tested by oceanic bacteria. The concentration of two pesticides in mixture was determined by one of statistical method called general regression circumrotate experimental design and the results were analyzed using software such as SAS, MINTAB etc. Three function models had been built which shows that the toxicity of each pesticide to luminescent bacteria was positive. The effects of toxicity to bacteria vary through concentration of two pesticides in mixtures. As for the three mixtures containing two pesticides was different due to concentrations. Generally speaking, the binary toxicity of Carbendazim and Flusilazole was antagonism, and the binary toxicity of Emamectin and Avermectin is additive. From the view of single pesticide effect, the toxicity effect of Carbendazim was outweighed over the Flusilazole in mixture, the toxicity effect of Avermectin was outweighed over the Emamectin in mixture. The determination of joined toxicity of various kinds of mixture of pollutants using luminescent bacteria is a rapid, cheap and easy biological method which can be used widely in the assessment of farm product pollution and the detection of product safety in the future.

Keywords: *Photobacterium phosphoreum*; pesticide; joint toxicity; rapid detection technology

收稿日期: 2007-12-17

基金项目: 国家“863”计划(2003AA601020); 上海市重大科技项目(05DZ19101); 上海市农业科学院发展基金(院科发 2006-05)

作者简介: 吴淑杭(1970—), 男, 浙江义乌人, 博士, 副研究员, 主要从事食品安全生物检测技术、环境微生物学等领域的研究。

E-mail: wushuhang88@163.com

在农业生产过程中,为了防治农作物病虫害发生,大量农药被使用,但绝大部分残留在农田生态系统中,对该系统的生态平衡和生物体造成危害,并通过食物链损害人类健康。在大多数情况下,农业环境和农产品中的农药往往以混合物形式存在,这些毒物共同作用于生物体,在机体内呈现十分复杂的联合作用,最终对机体引起综合的生物毒性^[1-3]。一般认为,当几种有害物质共同危害机体时,可发生协同作用、加和作用和拮抗作用等三类联合作用^[4-6]。协同作用是指总效应大于各有害毒物单独作用时的总和,这可解释为一种物质的毒性被另一种物质所增强。加和作用是指总效应等于各有害毒物单独作用时的总和。这种联合作用中的各化学物质如按一定比例,用一种化学物质代替另一种化学物质,其混合物的毒性不改变^[4,5]。拮抗作用指总效应小于各有害毒物单独作用时的效应总和,即毒性效应被 2 种或 2 种以上有毒物质的交互作用降低;从某种程度上讲,位点竞争是产生拮抗作用的直接原因^[5,6]。

发光细菌是一类在正常的生理条件下能够发射可见荧光的细菌。在一定条件下发光细菌的发光强度是恒定的,与外来受试物接触后,其发光强度将有所改变,在一定浓度范围内,有毒物浓度大小与发光细菌光强度变化成一定比例关系,用发光检测仪测出它与待测物作用前后的光强变化,就可以推算出综合毒性的^[7-16]。本研究采用二次二因子回归通用旋转组合实验设计,以明亮发光杆菌作为毒性测试物种,研究了多菌灵+氟硅唑、甲氨基阿维菌素+阿维菌素和二氯喹啉酸+莎稗磷等 3 种二元农药混合物的联合毒性,揭示了二种农药共存时产生的联合毒性作用、综合生物毒性和主因子作用,为这些混合物的急性毒性和危险性评价提供基础数据,也为农产品安全性评价和农产品卫生标准的制定提供基础数据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试农药

6 种农药,包括 2 种杀菌剂、2 种杀虫剂和 2 种除草剂。多菌灵,有机杂环类杀菌剂,95%粉剂,江苏永联集团公司生产;氟硅唑,有机杂环类杀菌剂,92.5%粉剂,杜邦公司生产;甲氨基阿维菌素,杀虫杀螨剂,96%粉剂,允发化工上海公司生产;阿维菌素,抗生索类杀虫、杀螨剂,95%粉剂,浙江钱江生化公司生产;二氯喹啉酸,激素型除草剂,85%粉剂,上海农药厂生产;莎稗磷,有机磷类除草剂,95%粉剂,上海农药厂生产。

1.2 供试发光细菌

明亮发光杆菌 (*photobacterium phosphoreum*)T₃ 变种,由中国科学院南京土壤研究所提供。

1.3 试验方法

1.3.1 发光细菌培养:培养基由酵母浸出汁 0.5 g、胰蛋白胨 0.5 g、NaCl 3 g、Na₂HPO₄ 0.5 g、KH₂PO₄ 0.1 g、甘油 0.3 g、蒸馏水 100 mL 配制而成,调节 pH 到 6.8,121 ℃灭菌 30 min 后备用。将 T₃ 冻干粉用适量 3%NaCl 溶解后接种于上述灭菌的新鲜斜面培养基中,20~25 ℃恒温培养 12~14 h;再将培养好的新鲜菌转接一环装有 25 mL 无菌培养液的 100 mL 三角瓶中,20~25 ℃恒温培养 12~14 h 后立即用于测定^[7-8]。

1.3.2 生物毒性测定

根据预试验的结果和试验设计配制待测样品,每个浓度设 3 重复,各吸取 2 mL 样品于圆形比色管中,用 2 mL 3%NaCl 作空白对照,迅速吸取 50 μL 稀释菌液于各比色管中,轻摇 5 次。在暴露 15 min 时用生物毒性测试仪测定发光强度,计算相对发光强度(相对发光强度=样品发光强度×100%/对照发光强度)^[7,8]。

1.3.3 试验设计

采用二次二因子回归通用旋转组合试验设计,各

表 1 因子水平表及其编码值
Table 1 Variable levels and coding value

因子	单位	间距	因子设计水平(r=1.414)				
			-r	-1	0	1	r
多菌灵	mg·L ⁻¹	5	0	2	7	12	14
氟硅唑	mg·L ⁻¹	7	0	3	10	17	20
甲氨基阿维菌素	mg·L ⁻¹	4	6	8	12	16	18
阿维菌素	mg·L ⁻¹	1.8	5	5.7	7.5	9.3	10
二氯喹啉酸	mg·L ⁻¹	6	0	3	9	15	18
莎稗磷	mg·L ⁻¹	14	0	6	20	34	40

因子水平和试验设计分别见表 1 和表 2。

1.3.4 数据处理与分析方法

利用 SPSS 10.0 和 MINITAB Release 14.13 统计软件进行数据处理和统计分析。

2 结果与讨论

2.1 多菌灵与氟硅唑混合物对明亮发光杆菌的联合毒性

试验结果显示(表 2),不同试验处理间发光细菌的相对发光强度有明显差异,即不同浓度的多菌灵与氟硅唑混合物对明亮发光杆菌的联合毒性不同。将各处理发光细菌相对发光强度的结果在 SPSS 10.0 上运行,运用强迫引入法得到相对发光强度与多菌灵和氟硅唑的浓度回归模型: $Y=102.171-6.938X_1-2.975X_2+0.039X_1X_2+0.256X_1^2+0.0724X_2^2$,回归模型检验极显著($P<0.01$),同时相关系数 r 为 0.965,表明回归模型的拟合效果好。

分析回归模型可知,多菌灵和氟硅唑对明亮发光杆菌的毒性有显著的正效应。将数学模型固定某一自变量的取值水平为 0,可求另一因子的水平变化,得如下模式: $Y_1=102.171-6.938X_1+0.256X_1^2$; $Y_2=102.171-2.975X_2+0.0724X_2^2$ 。从关系式可知,在试验因子设置的范围内,多菌灵(X_1)的变化导致相对发光强度的变化在 55.24%~100%之间变动,变幅达 44.76%;氟硅唑(X_2)的变幅为 28.37%(71.63%~100%)。从单因子作用效应的角度看,对相对发光强度的影响多菌灵大于氟硅唑。

根据毒物剂量-效应图可知联合毒性作用方式,如交互作用不显著,2 条量效曲线互相平行,则说明两个因素之间具有相加作用;如交互作用显著,二曲线随剂量增大而远离,两个因素之间具有协同作用;反之,如二曲线随剂量增大而靠近或交叉,两个因素之间具有拮抗作用。分析图 1 表明,在本试验条件下,混合物中两因子的联合毒性效应,因他们浓度区间而异,但总体上以拮抗作用为主,即多菌灵与氟硅唑混合物的总毒性小于多菌灵与氟硅唑单独作用时的总和。从某种程度上讲,多菌灵与氟硅唑间的位点竞争是产生拮抗作用的直接原因。

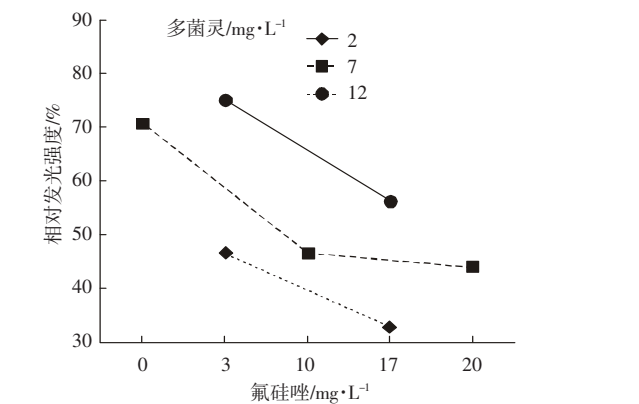


图 1 多菌灵和氟硅唑对明亮发光杆菌的剂量-效应图
Figure 1 The figure of dosage and reaction for Carbendazim and Flusilazole to *photobacterium phosphoreum*

2.2 甲氨基阿维菌素与阿维菌素混合物对明亮发光杆菌的联合毒性

试验结果显示(表 2),不同处理间发光细菌的相

表 2 试验设计与相对发光强度						
Table 2 Experimental plan and relative luminescent intensity						
实验号 (试验处理)	X_1	X_2	相对发光强度(Y)%			
			多菌灵(X_1)+氟硅唑(X_2)	甲氨基阿维菌素(X_1) +阿维菌素(X_2)	二氯喹啉酸(X_1)与莎稗磷(X_2)	
1	1	1	32.83	24.58	11.13	
2	1	-1	46.55	36.18	34.46	
3	-1	1	56.12	38.15	52.8	
4	-1	-1	75.26	51.97	63.64	
5	r	0	39.34	23.34	4.85	
6	$-r$	0	85.96	53.20	57.78	
7	0	r	43.82	26.67	11.92	
8	0	$-r$	70.54	55.84	59.17	
9	0	0	47.03	38.69	24.85	
10	0	0	43.60	39.84	29.28	
11	0	0	47.89	37.97	27.21	
12	0	0	41.44	38.65	27.89	
13	0	0	51.90	37.50	27.97	

对发光强度有明显差异,即不同浓度的甲氨基阿维菌素与阿维菌素混合物对明亮发光杆菌的联合毒性不同。将各处理发光细菌相对发光强度的结果在 SPSS 10.0 上运行,运用逐步回归法(剔除 $P>0.05$ 的变量)得到相对发光强度与甲氨基阿维菌素和阿维菌素浓度的回归模型: $Y=99.792-2.181X_1-4.661X_2$,回归模型检验极显著($P<0.01$),同时相关系数 r 为 0.972,表明回归模型的拟合效果好。

分析回归模型可知,甲氨基阿维菌素与阿维菌素对明亮发光杆菌的毒性有显著的正效应。将数学模型固定某一自变量的取值水平为 0,可求另一因子的水平变化,得如下模式: $Y_1=99.792-2.181X_1$; $Y_2=99.792-4.661X_2$ 。从关系式可知,在试验因子设置的范围内,甲氨基阿维菌素(X_1)的变化导致相对发光强度的变化在 60.53%~99.79%之间变动,变幅达 39.26%;阿维菌素(X_2)的变幅为 46.61%(53.18%~99.79%)。从单因子作用效应的角度看,阿维菌素对相对发光强度的影响大于甲氨基阿维菌素。

分析图 2 表明,在本试验条件下,不同曲线随着其它农药剂量的增大,量效曲线相互平行(近似),说明甲氨基阿维菌素与阿维菌素为相加作用,即混合物的毒性总效应等于甲氨基阿维菌素与阿维菌素单独作用时的总和。这可能是联合作用中的甲氨基阿维菌素与阿维菌素的结构比较接近,它们作用于机体的同一部位或组织的毒性作用近似,作用机理也类似,如按一定比例,用一种化学物质代替另一种化学物质,其混合物的毒性不改变。

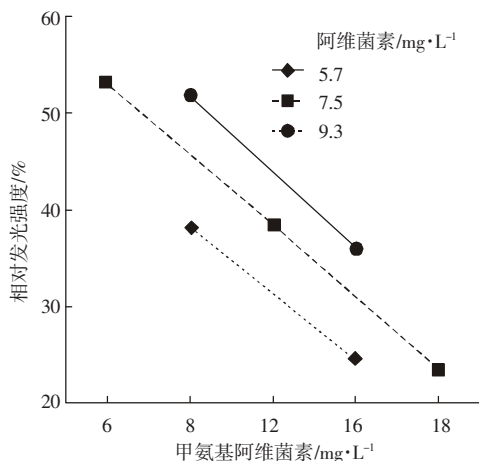


图 2 甲氨基阿维菌素与阿维菌素对明亮发光杆菌的剂量-效应图

Figure 2 The figure of dosage and reaction for Emamectin and Avermectin to *photobacterium phosphoreum*

2.3 二氯喹啉酸与莎稗磷混合物对明亮发光杆菌的联合毒性

试验结果显示(表 2),不同浓度的二氯喹啉酸与莎稗磷混合物对明亮发光杆菌的联合毒性不同。将各处理发光细菌相对发光率的结果在 SPSS 10.0 上运行,运用逐步回归法(剔除 $P>0.10$ 的变量)得到相对发光率与二氯喹啉酸和莎稗磷的浓度回归模型: $Y=59.818-1.175X_1-0.0885X_1X_2$,回归模型检验极显著,同时相关系数 r 为 0.928,表明回归模型的拟合效果好。

分析回归模型可知,二氯喹啉酸和莎稗磷对相对发光率有显著的负作用,即对明亮发光杆菌的毒性有显著的正效应。分析图 3 表明,在本实验条件下,二氯喹啉酸与莎稗磷混合物的毒性效应,因他们浓度区间而异,但总体上混合物的总效应大于二氯喹啉酸与莎稗磷单独作用时的总和,即以协同作用为主。

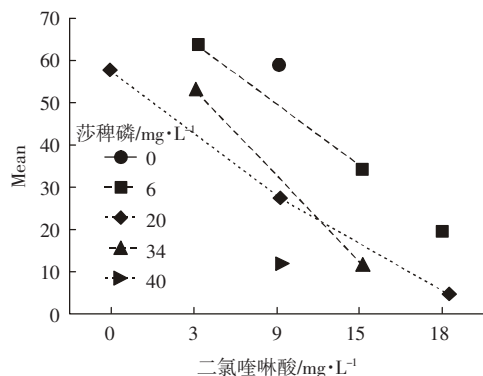


图 3 二氯喹啉酸和莎稗磷对明亮发光杆菌的剂量-效应图

Figure 3 The figure of dosage and reaction for Quinclorac and Anilofos to *photobacterium phosphoreum*

3 结论

(1)不同浓度的二元农药混合物对明亮发光杆菌的联合毒性不同,多菌灵、阿维菌素与阿维菌素对明亮发光杆菌的毒性有显著的正效应。根据试验结果,拟合出了 2 个相对发光强度与农药浓度的回归模型;分别为 $Y=102.171-6.938X_1-2.975X_2+0.039X_1X_2+0.256X_1^2+0.0724X_2^2$ (多菌灵和氟硅唑)、 $Y=99.792-2.181X_1-4.661X_2$ (甲氨基阿维菌素与阿维菌素), $Y=59.818-1.175X_1-0.0885X_1X_2$ (二氯喹啉酸与莎稗磷),经检验极显著 ($P<0.01$) 且拟合效果好 ($r=0.928\sim 0.972$)。

(2)本实验条件下,二元农药混合物中两个因素间的联合毒性效应因它们浓度区间而异,但总体上多菌灵与氟硅唑以拮抗作用为主,而甲氨基阿维菌素与阿维菌素为相加作用,二氯喹啉酸与莎稗磷以协同作

用为主。从某种程度上讲,多菌灵与氟硅唑的拮抗作用可能是由于二农药间的位点竞争产生的。甲氨基阿维菌素与阿维菌素的相加作用可能是甲氨基阿维菌素与阿维菌素的结构比较接近,它们作用于机体的同一部位或组织的毒性作用近似,作用机理也类似,如按一定比例,用一种化学物质代替另一种化学物质,其混合物的毒性不改变。二氯喹啉酸与莎稗磷间的协同作用可解释为二氯喹啉酸的毒性被莎稗磷所增强。从单因子作用效应的角度看,对相对发光强度的影响:多菌灵大于氟硅唑、阿维菌素大于甲氨基阿维菌素、莎稗磷大于二氯喹啉酸。

(3)以明亮发光杆菌 T_3 变种作为毒性测试物种,采用二次二因子回归通用旋转组合设计和统计学方法,运用 SAS 和 MINITAB 软件,构建了一套发光细菌法二元农药混合物的联合毒性快速检测方法,此法可揭示二种农药共存时产生的联合毒性作用、综合生物毒性和主因子作用。

(4)发光细菌法是一种快速筛选生物毒性的生物测试方法,作为一种速度快、操作方便、成本低廉的生物监测方法,发光细菌法将在农产品污染物毒性评价和农产品安全快速检测中有着广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 吴淑杭,凌云,徐亚同,等.生物发光法在农产品安全性检测中的应用前景[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊):421-424.
WU Shu-hang, LING Yun, XU Ya-tong, et al. Prospects of applying bioluminescence in monitoring agricultural product safety[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25s: 421-424.
- [2] 龙新宪, 杨肖娥, 倪吾钟. 重金属污染土壤修复技术研究的现状与展望[J]. 应用生态学报, 2002, 13(6):757-762.
LONG Xin-xian, YANG Xiao-e, NI Wu-zhong. Current situation and prospect on the remediation of soils contaminated by heavy metals [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(6):757-762.
- [3] 华小梅, 江希流. 我国农药环境污染与危害的特点及控制对策[J]. 环境科学研究, 2000, 13(3):40-43.
HUA Xiao-mei, JIANG Xi-liu. Characteristics and control countermeasures of pesticide pollution and its damage on environment in China[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2000, 13(3):40-43.
- [4] 郑振华, 周培疆, 吴振斌. 复合污染研究的新进展[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3):469-473.
ZHENG Zhen-hua, ZHOU Pei-jiang, WU Zhen-bin. New advances in research of combined pollution[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(3):469-473.
- [5] 童建, 冯致英. 环境化学物的联合毒作用[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1994. 14-56.

- TONG Jian, FENG Zhi-ying. Combination Toxicity of Environmental Chemicals[M]. Shanghai: shanghai scientific and technical literature press, 1994. 14-56.
- [6] 何勇田, 熊先哲. 复合污染研究进展[J]. 上海环境科学, 1994, 15(6):79-83.
HE Yong-tian, XIONG Xian-zhe. Advance in the study on compounded pollutions[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 1994, 15(6):79-83.
- [7] 申荣艳, 骆永明, 孙玉焕, 等. 长江三角洲地区城市污泥的综合生物毒性研究[J]. 生态与农村环境学报, 2006, 22(2):54-58, 70.
SHEN Rong-yan, LUO Yong-ming, SUN Yu-huan, et al. Synthetic biological toxicity of municipal sludges from the Yangtze River Delta region[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2006, 22(2):54-58, 70.
- [8] 江敏, 顾国维, 李咏梅. 6种含氮杂环化合物对发光细菌的毒性研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(12):931-935.
JIANG Min, GU Guo-wei, LI Yong-mei. Study on toxicity of six kinds of nitrogenous heterocyclic compounds to photobacteria[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2003, 22(12): 931-935.
- [9] Jennings V L K, Rayner-brandes M H, Bird D J. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium: A Comparison of three commercial systems[J]. *Water Research*, 2001, 35(14):3448-3456.
- [10] 谢思琴, 顾宗灏, 周德智. 工业固体废弃物的急性生物毒性研究[J]. 应用生态学报, 1994, 5(1):103-105.
XIE Si-qin, GU Zong-lian, ZHOU De-zhi. Acute biotoxicity of industrial solid wastes[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1994, 5(1): 103-105.
- [11] Fernandez A, Tejedor C, Cabrera F, et al. Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using photobacterium phosphoreum[J]. *Water Research*, 1995, 29(5):1281-1286.
- [12] Nina Immonen, Matti Karp. Bioluminescence-based bioassays for rapid detection of nisin in food[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007 (22) 9: 1982-1987.
- [13] Doris Hirmann, Andreas P Loibner, Rudolf Braun, et al. Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(6): 1236-1242.
- [14] Angela Ivask, Tal Green, Boris Polyak, et al. Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(7):1396-1402.
- [15] Tobias Frische, Heinrich Höper. Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in situ bioremediation of TNT-contaminated soils[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(3): 415-427.
- [16] Amadeo R Fernández-Alba, M D Hernando Guil, et al. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 451(2): 195-202.