

藻红外辐射测试环境农药残留急性毒性研究

郭蔚华¹, 王翔¹, 张智¹, 王斌², 游童先²

(1. 重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045; 2. 重庆桃花溪市政建设有限公司, 重庆 400051)

摘要: 基于微生物检测毒害物质的重要性和选材困难对其检测技术发展的制约, 开展了环境中农药残留急性毒性与藻红外辐射变化研究。试验在同一叶绿素 a 含量下用红外测温仪进行测试。结果表明, 8 种藻对 10 种农药均产生快速的红外辐射变化响应, 平均最大温差为 0.12 ℃, 平均响应时间为 3.2 min; 对除草剂响应纤细裸藻平均温差为 0.19 ℃, 比其他 7 种藻平均温差组中最大值高出 0.05 ℃; 对杀菌剂响应水华鱼腥藻平均温差为 0.20 ℃, 比其他 7 种藻平均温差组中最大值高出 0.05 ℃; 对杀虫剂响应纤细裸藻平均温差为 0.20 ℃, 比其他 7 种藻平均温差组中最大值高出 0.05 ℃; 水华鱼腥藻为杀菌剂的敏感藻, 纤细裸藻为除草剂和杀虫剂的敏感藻; 2 种藻响应农药的灵敏度均在 0.003~5 mg·L⁻¹ 之间, 达到发光细菌的测试灵敏度。

关键词: 环境; 农药残留; 急性毒性测试; 藻红外辐射; 敏感藻

中图分类号: X839.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)05-2039-04

Determination of the Acute Toxicity of Pesticide Residues in Environment by Algae Infrared Radiation

GUO Wei-hua¹, WANG Xiang¹, ZHANG Zhi¹, WANG Bin², YOU Tong-xian²

(1. Three Gorges Reservoir Area's Ecology and Environment Key Laboratory, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China; 2. Taohuaxi limited company of municipal construction, Chongqing 400051, China)

Abstract: Because microorganism detecting poisonous materials is of essentiality and the difficulty of material selection restricts the development of the detection technology, the test had been studied on the relationship between the acute toxicity of pesticide residues in environment and the changes of algae infrared radiation. Experiment were carried out at the same chlorophyll a content by infrared thermometer in order to find out the algae which would be sensitive to different pesticide and sensitivity. The results indicated that infrared radiation of eight algae responded quickly in each of ten pesticide, and the average of maximum difference in temperature was 0.12 ℃, and the average of respond time was 3.2 minute. Referring to the herbicide and insecticide, the average of maximum differences in temperature of *Euglena gracilis* were separately 0.19 ℃ and 0.20 ℃, which were more 0.05 ℃ than the average of maximum difference in temperature of other algae. As referring to the bactericide, the average of maximum difference in temperature of *Anabaena flos-aquae* was 0.20 ℃, which was more 0.05 ℃ than the average of maximum difference in temperature. *Euglena gracilis* was sensitive algae to the herbicide and insecticide, and *Anabaena flos-aquae* was sensitive algae to the bactericide. The sensitivity of *Anabaena flos-aquae* and *Euglena gracilis* responding the pesticide was between 0.003 and 5 mg·L⁻¹, which reached the sensitivity of luminescent bacteria testing the pesticide.

Keywords: environment; pesticide residue; acute toxicity bioassay; algae infrared radiation; sensitive algae

环境中农药残留威胁着环境安全和人类健康^[1-3]。随着生活水平不断提高, 对其毒性的快速检测越来越重要。有毒有害物质的微毒测试常采用生物检测法等^[4-7], 其中底栖软体动物测试法^[8]、鱼类测试法^[9]测试慢性毒

性, 微生物测试法^[10, 11]测试急性毒性。在微生物法中发光细菌法在测试物质急性毒性中被广泛应用^[12-14], 由于其发光本质差异较大, 操作繁琐, 重现性低, 误差较大^[15], 加之传感器携带不便, 难以现场检测。鉴于目前有关藻红外辐射检测急性毒性的研究未见国内外报道和微生物检测法的不足, 研究环境农药残留急性毒性的藻红外辐射响应, 探索技术更简便、操作性更强的藻红外检测法具有重要意义。藻红外检测法不仅可用于水环境、土壤、蔬菜、水果等农药残留的毒性检

收稿日期: 2007-11-11

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC, 2005BB7254); 重庆市科技攻关计划项目(CSTC, 2006AB7054)

作者简介: 郭蔚华(1956—), 男, 副教授, 主要研究方向为水处理生物技术, 水环境微生物等。E-mail: gwhchl@yahoo.com.cn

测,还可用于农药毒性评价和农药筛选。

本文通过选择供试藻种、药品,设计测试藻量、药量、时间等,分析环境农药残留与藻红外辐射变化关系,探寻对农药残留急性毒性响应的敏感藻。

1 材料与方法

1.1 材料

藻种:根据试验要求中国科学院水生生物研究所 在查阅大量资料、研究分析后提供对水环境污染敏感的 8 种供试藻:1 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、2 羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)、3 纤细裸藻 (*Euglena gracilis*)、4 双尖菱板藻(*Nitzschia hantzschia amphioxys* (Her.)Grun)、5 水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)、6 斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kutz)、7 蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa* Chick.)和 8 短线脆杆藻(*Fragilaria brevistriata*)。1、2、6、7 为绿藻,3 为裸藻,5 为蓝藻,4、8 为硅藻。

藻种培养:光强 2 000 lx,温度 25 ℃,光暗比为 12 h:12 h,静止培养。试验用所有培养基及试验容器都经过高压灭菌,藻类转接均在无菌环境中进行。藻种培养基配方由中国科学院水生生物研究所提供。

药品:除草剂类百草枯 ($C_{12}H_{14}N_2Cl_2$)、盖草能 ($C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$)、草甘膦 ($C_3H_8NO_3P$);杀菌剂类多菌灵 ($C_{14}H_{18}N_4O_3$)、三唑酮 ($C_{14}H_{16}ClN_3O_2$)、井冈霉素 ($C_{20}H_{35}O_{13}N$)、克菌康 ($C_{19}H_{34}O_8N_8$)、青雷霉素 ($C_{14}H_{25}N_3O_9$)、杀虫剂类杀虫单($C_3H_{12}NO_6S_2Na \cdot H_2O$)、灭扫利($C_{22}H_{23}NO_3$)10 种为供试药品。农药样品由西

南大学农药研究室提供。

仪器设备:便携式红外测温仪,型号 ST60,分辨率 0.1 ℃,重量 320 g;LRH-250A 生化培养箱;DR/4000U 分光光度计;EBA21 离心机;数码显微镜。

1.2 研究方法

测试原理:微生物中藻类同时具有光合磷酸化和氧化磷酸化的能量代谢系统,对毒害物质毒性响应的能量变化强于其他微生物,各种藻对毒性响应不同,藻细胞能量变化的红外辐射用红外线测温仪测试。

研究时间:2006 年 5 月—2007 年 9 月。

测试环境:室内,自然光照,20~28 ℃。

测试藻量标准:藻种间细胞大小、形态差异很大,为了相同条件测试比较,经试验研究分析,用叶绿素 a^[19]作为测试藻量标准,供试藻液叶绿素 a 值 4.0 mg·L⁻¹。

试验组 3 重复,对照组 2 重复。20 mL 绝热容器中加入 5 mL 藻液,试验组滴加药液,对照组滴加等量蒸馏水;藻类对农药急性毒性响应试验中,藻液农药浓度为 10 mg·L⁻¹,滴加药前后分别进行藻液温度测试,加药后立即测试,每隔 1.5 min 测试 1 次,直到温度变化停止。通过分析比较从 8 种测试藻中确定敏感藻;确定敏感藻后,以敏感藻作为测试藻,每种农药分别做浓度梯度,试验方法同前,找出每种农药的最低响应浓度。

2 结果与讨论

2.1 藻类对农药毒性响应

测试结果经处理分析,将藻类对农药响应的平均最大温差(℃)及其响应时间(min)整理为表 1,将水

表 1 藻类的农药响应

Table 1 The results of algae response to pesticide

药品		莱茵衣藻		羊角月芽藻		纤细裸藻		双尖菱板藻		水华鱼腥藻		斜生栅藻		蛋白核小球藻		短线脆杆藻	
		温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min	温差/℃	时间/min
除草剂	百草枯	-0.10	9.0	0.17	6.0	-0.13	9.0	0.13	7.5	0.10	1.5	-0.13	3.0	-0.07	6.0	0.13	立即
	盖草能	-0.10	1.5	0.10	3.0	0.20	6.0	0.07	立即	0.20	1.5	-0.07	3.0	-0.10	立即	-0.10	1.5
	草甘膦	0.03	3.0	-0.10	4.5	0.23	6.0	0.10	7.5	-0.13	6.0	0.10	立即	0.13	立即	0.10	1.5
		0.07*	4.5*	0.12*	4.5*	0.19*	7.0*	0.12*	5.0*	0.14*	3.0*	0.10*	2.0*	0.10*	2.0*	0.11*	1.0*
杀菌剂	多菌灵	-0.20	立即	-0.10	4.5	-0.10	3.0	0.10	4.5	0.17	1.5	0.17	4.5	0.17	6.0	0.07	3.0
	三唑酮	0.07	3.0	0.07	立即	-0.13	3.0	0.13	1.5	-0.30	7.5	-0.07	1.5	-0.10	4.5	0.07	立即
	井冈霉素	0.13	1.5	-0.27	立即	-0.13	4.5	0.07	4.5	0.20	1.5	0.17	7.5	-0.07	1.5	-0.03	3.0
	克菌康	0.13	1.5	0.10	4.5	0.13	立即	0.07	3.0	-0.23	7.5	0.07	3.0	-0.10	3.0	0.07	6.0
	青雷霉素	0.07	3.0	-0.20	1.5	-0.10	3.0	0.07	1.5	0.10	3.0	-0.13	4.5	-0.13	1.5	-0.13	1.5
		0.12*	1.8*	0.15*	2.1*	0.12*	2.7*	0.09*	3.0*	0.20*	4.2*	0.12*	4.2*	0.11*	3.3*	0.07*	2.7*
杀虫剂	杀虫单	0.13	6.0	0.13	4.5	0.17	1.5	-0.10	1.5	-0.20	7.5	0.13	1.5	-0.13	1.5	-0.10	3.0
	灭扫利	0.10	3.0	0.07	4.5	-0.23	1.5	0.17	3.0	0.10	立即	0.10	6.0	0.03	4.5	0.17	立即
		0.12*	4.5*	0.10*	4.5*	0.20*	1.5*	0.14*	2.2*	0.15*	3.8*	0.12*	3.8*	0.08*	3.0*	0.14*	1.5*
平均绝对值		0.11	3.2	0.13	3.6	0.15	3.8	0.10	3.4	0.17	3.6	0.11	3.4	0.10	2.8	0.10	2.0

注: *”数字为同类农药数据平均绝对值。

水华鱼腥藻、纤细裸藻响应农药的灵敏度、最大温差整理为表 2。

表 2 敏感藻响应农药灵敏度

Table 2 The sensitive concentration of sensitive algae to response pesticide

药品		水华鱼腥藻		纤细裸藻	
		最低浓度/ mg·L ⁻¹	最大温差/ ℃	最低浓度/ mg·L ⁻¹	最大温差/ ℃
除草剂	百草枯	0.5	0.15	5.0	-0.15
	盖草能	0.003	0.20	0.10	-0.15
	草甘膦	0.01	0.35	0.01	-0.15
杀菌剂	多菌灵	0.05	0.15	0.50	-0.15
	三唑酮	0.6	-0.15	1.0	-0.15
	井冈霉素	0.02	-0.15	0.50	0.15
	克菌康	3.0	0.15	1.0	-0.15
	青雷霉素	0.05	-0.15	0.10	0.15
杀虫剂	杀虫单	0.003	-0.20	0.10	-0.15
	灭扫利	2.0	-0.20	0.10	0.20

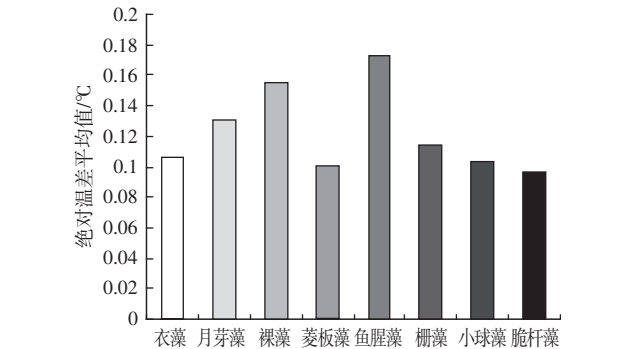


图 1 温度响应
Figure 1 Temperature response

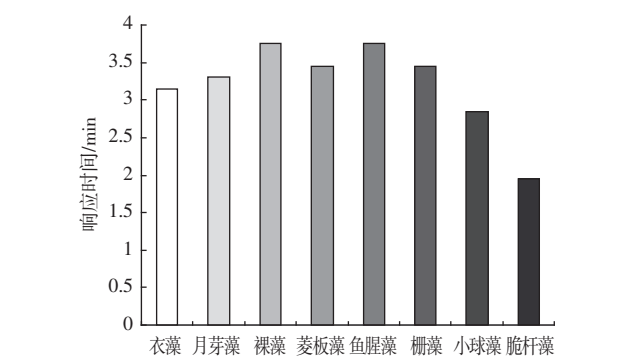


图 2 时间响应
Figure 2 Time response

温度响应：由表 1 中平均温差绝对值作图 1 可知,8 种藻对农药产生温度响应，最大平均值为 0.12℃,其中水华鱼腥藻为 0.17℃,纤细裸藻为 0.15℃,

分别高出其他 6 种藻平均温差 0.05℃、0.03℃。

时间响应：由表 1 中平均时间作图 2 可知，供试藻对农药产生最大温度变化的时间响应较快，最大响应时间 3.8 min,平均 3.2 min;水华鱼腥藻平均响应时间 3.6 min,纤细裸藻平均响应时间 3.8 min。

响应药品：对除草剂响应,纤细裸藻平均温差为 0.19℃,高出其余藻组中最大值(0.14℃)0.05℃,对杀菌剂响应,水华鱼腥藻平均温差为 0.20℃,高出其余藻组中最大值(0.15℃)0.05℃,对杀虫剂响应,纤细裸藻响应平均温差为 0.20℃，高出其余藻组中最大值(0.15℃)0.05℃(表 1)。

根据敏感藻产生温度响应、时间响应和响应药品多的 3 个条件,以及温度优先原则,确定试验中水华鱼腥藻为杀菌剂的敏感藻,纤细裸藻为除草剂和杀虫剂的敏感藻。

2.2 敏感藻响应农药的敏感浓度

从表 2 敏感藻的敏感浓度试验结果可知，水华鱼腥藻响应各农药最低浓度范围在 0.003~3 mg·L⁻¹,其顺序为盖草能 0.003、杀虫单 0.003、草甘膦 0.01、井冈霉素 0.02、多菌灵 0.05、青雷霉素 0.05、百草枯 0.5、三唑酮 0.6、灭扫利 2.0、克菌康 3.0。平均最大温差响应时间 3.8 min；纤细裸藻响应各农药最低浓度范围在 0.01~5 mg·L⁻¹,其顺序为草甘膦 0.01、盖草能 0.10、青雷霉素 0.10、杀虫单 0.10、灭扫利 0.10、多菌灵 0.50、井冈霉素 0.50、三唑酮 1.0、克菌康 1.0、百草枯 5.0。平均最大温差响应时间 3.6 min；响应各农药最低浓度范围,水华鱼腥藻低于纤细裸藻。

2.3 敏感藻、发光细菌的农药灵敏度比较

由表 3 可知,有机磷类敏感藻最小限量低于发光细菌 2 个数量级^[16],吡啶类敏感藻最小限量低于发光细菌 2 个数量级^[17],抗生素类敏感藻最小限量低于发光细菌 3 个数量级^[18]。

表 3 敏感藻与发光细菌灵敏度比较

Table 3 The sensitivity of sensitive algae compared with luminescent bacteria		
	测定对象	最小限量/mg·L ⁻¹
敏感藻	草甘膦(有机磷类)	0.01
	百草枯(吡啶类)	0.5
	青雷霉素(抗生素)	0.05
	井冈霉素(抗生素)	0.02
	敌敌畏(有机磷类)	3.0
发光细菌	吡啶	50
	庆大霉素(抗生素)	1.0
	卡那霉素(抗生素)	1.0

3 结论

(1)农药可引起藻类红外辐射变化,并被红外测温仪测试。

(2)藻类对农药响应的平均绝对最大温差在0.10~0.17℃,响应时间2.0~3.8 min。

(3)在8种藻、10种农药中,水华鱼腥藻为杀菌剂的敏感藻,纤细裸藻为杀虫剂和除草剂的敏感藻。

(4)水华鱼腥藻、纤细裸藻响应农药的灵敏度在0.003~5 mg·L⁻¹之间,达到发光细菌的测试灵敏度。

参考文献:

- [1] 王泰,张祖麟,等. 海河与渤海湾水体中溶解态多氯联苯和有机氯农药污染状况调查[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 730-735.
WANG Tai, ZHANG Zu-lin, et al. Occurrence of dissolved polychlorinated biphenyls and organic Ochlordinated pesticides in the surface water of Haihe River and Bohai Bay[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(4): 730-735.
- [2] 张国印,陆启玉. 农药残留与食品安全 [J]. 粮油食品科技, 2007, 15(1): 55-57.
ZHANG Guo-yin, LU Qi-yu. The pesticide residue and food safety[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2007, 15(1): 55-57.
- [3] 何光好. 我国农药污染的现状与对策[J]. 安徽农业, 2003, 19(6): 57-59.
HE Guang-hao. Pesticide polltuion status and countermeasures in China[J]. *Anhui Agriculture*, 2003, 19(6): 57-59.
- [4] 单国民,钱传范,等. 三氮苯类除草剂的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法研究[J]. 中国农业大学学报, 1996, 19(2): 52-58.
SHAN Guo-min, QIAN Chuan-fan, et al. Study on enzyme linked immunosobent assay (ELISA) for residue determination of triazine herbicides[J]. *Journal of China Agricultural University*, 1996, 19(2): 52-58.
- [5] Silva J, Troncoso L, Bay-Schmith E, et al. Utilization of *odontesthes regia*(atherinidae) from the South Eastern pacific as a test organismfor bioassaya :study of its sensitivity to six chemicals[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2001, 5(66): 570-575.
- [6] LUO Chunhua, LIU Mengqin, MO Yunchun, et al. Thickness-shear mode acoustic sensor for atrazine using molecularly imprinted polymer as recongnition element[J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 428(1): 143-148.
- [7] Mallat E, Barzen C, Abuknesha R, et al. Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis ultraviolet detection [J]. *Anal Chim Acts*, 2001, 427(2): 165-171.
- [8] Wong M H. Sewage sludge as conditioner for improving soils affected by sulfur dioxide[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1979, 23(6): 717-724.
- [9] Sastry K V, Gupta P K. The in vivo effect of mercuric chloride on some digestive enzymes of a fresh water teleost fish, *Channa punctatus*[J]. *Bull*

Environ Contam Toxicol, 1979, 22(1): 9-16.

- [10] Shao C Y, Howe C J, Porter A J, et al. Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(10): 5026-5033.
- [11] Liu D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity[J]. *Bull Environ ContamToxicol*, 1981, 26(2): 145-149.
- [12] Thomulk K W, McGee D J, Lange J H. Use of the bioluminescent bacterium *photobacterium phosphoreum* to detect potentially bio-hazardous materials in water[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1993, 51(4): 538-544.
- [13] 王兆群,王芹,丁长春. 发光细菌法监测工业废水综合毒性[J]. 仪器仪表与分析监测, 2002, 14(1): 33-35.
WANG Zhao-qun, WANG Qin, DING Chang-chun. Using the method of photobacteria to monitor wastewater comprehensive toxicity [J]. *Instrumentation Analysis Monitoring*, 2002, 14(1): 33-35.
- [14] 吴伟,胡庚东,火春英. 发光细菌在渔业水域污染物急性毒性快速检测中的应用[J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(2): 20-23.
WU Wei, HU Geng-dong, HUO Cun-ying. Application of luminescent bacteria in rapid determination of acute toxicity of the pollutants in the fisheries water[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 1998, 18(2): 20-23.
- [15] 阎鹏,孙礼. 利用发光细菌快速检测环境污染物急性毒性的研究概况[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(4): 250-252.
YAN Peng, SUN Li. Survey of study on rapid determination of acute toxicity of environmental pollutants by luminescent bacteria[J]. *Environ Health*, 2001, 18(4): 250-252.
- [16] 国家环境保护总局.《水与废水监测分析方法》编委会. 水与废水监测分析方法[M] (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration of China, "Water and Wastewater Monitoring Analysis Method" Editorial Board. *Water and Wastewater Monitoring Analysis Method*[M]. (The fourth version), Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [17] 袁东星,邓永智,林玉晖. 蔬菜中有机磷农药残留的发光菌快速测试[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 77-81.
YUAN Dong-xin, DENG Yong-zhi, LIN Yu-hui. Determination of organophosphorous pesticide residues in vegetables with photobacterium *phosphoreum*[J]. *Environmental Chemistry*, 1997, 16(1): 77-81.
- [18] 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): 931-934.
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): 931-934.
- [19] 李国发. 发光细菌检测法及其在环境监测与评价中的应用[J]. 黄石高等专科学校学报, 1995, 11(1): 13-16.
LI Guo-fa. Luminous bacteria method and its application in the environment monitoring and evaluation [J]. *Journal of Huangshi College*, 1995, 11(1): 13-16.