

水环境中草甘膦和三价砷对大型溞的联合毒性评价

许杨贵^{1,2,3}, 李晶^{1,2,3}, 秦俊豪^{1,2,3}, 李琦^{1,2,3}, 黎华寿^{1,2,3*}

(1.华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642; 2.农业部华南热带农业环境重点实验室, 广州 510642; 3.华南农业大学广东省高等学校农业生态与农村环境重点实验室, 广州 510642)

摘要:以大型溞(*Daphnia magna*)为试验生物,进行草甘膦和As(Ⅲ)对大型溞24、48 h的单一毒性和联合毒性评价。结果表明,草甘膦和As(Ⅲ)对大型溞24、48 h半致死浓度(LC₅₀)分别为54.12、51.12 mg·L⁻¹和7.47、6.07 mg·L⁻¹。基于单一草甘膦和As(Ⅲ)以及两者的等毒性混合的浓度-效应曲线,用Logistic regression模型和反应曲面模型对其单一和联合毒性的浓度-致死效应进行预测和曲面图的绘制,并用洛伊参数反应曲面模型(CARS)和反应添加剂反应面模型(RARS)预测Mix-LC₅₀的联合毒性;在等毒性比浓度条件下,草甘膦和As(Ⅲ)的联合毒性表现为拮抗作用。

关键词:草甘膦;As(Ⅲ);联合毒性;大型溞;模型

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)11-2076-07 doi:10.11654/jaes.2015.11.006

Joint Toxicity of Glyphosate and As(Ⅲ) to *Daphnia magna* in Aquatic Environment

XU Yang-gui^{1,2,3}, LI Jing^{1,2,3}, QIN Jun-hao^{1,2,3}, LI Qi^{1,2,3}, LI Hua-shou^{1,2,3*}

(1. Institute of Tropical and Subtropical Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Agro-Environment in the Tropics, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Key Laboratory of Agroecology and Rural Environment of Guangdong Regular Higher Education Institutions, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Here the single and joint toxicity of glyphosate and As(Ⅲ) to *Daphnia magna* was investigated by using acute toxicity test. The 24 h-LC₅₀ and 48 h-LC₅₀ values were 54.12 and 51.12 mg·L⁻¹ for glyphosate and 7.47 and 6.07 mg·L⁻¹ for As(Ⅲ), respectively. Logistic regression model and response surface model were suitable to predict the single effect and the joint toxicity effect of two chemicals at equivalent toxic concentration ratios, respectively. Two response surface models, namely Loewe Parametric Response Surface (CARS) model and Response Additive Response Surface (RARS) model, were employed to estimate the joint toxicity of two chemicals, and the result showed that the interaction of these two chemicals was antagonistic.

Keywords: glyphosate; As(Ⅲ); joint toxicity; *Daphnia magna*; model

随着现代农业的飞速发展,除草剂在农业的运用日益广泛。然而,在有效保障农作物产量稳定和降低劳动成本的同时,除草剂有效成分进入生物体内,可能引起急性和慢性中毒、畸形,并且可以通过径流、排污、挥发等途径进入土壤、大气和水体,进而通过食物

链的富集传递,影响人类的安全^[1]。近年来,草甘膦(Glyphosate)以其高效、广谱、低毒、易分解、低残留等特点,成为世界上应用最广、使用量最大的农药品种之一。此外,随着抗草甘膦转基因作物的推广^[2-3],仅在2014年全球草甘膦产量高达72万t,而中国的实际产量为45万t,占全球草甘膦产量的62.5%^[4-5]。草甘膦对生物及环境的影响越来越受到人们的关注,虽然有文献报道草甘膦对土壤没有影响或影响甚微,但也有文献表明草甘膦能抑制藻类的叶绿素前体5-氨基乙酰丙酸(ALA)的合成,高浓度草甘膦异丙胺盐(Glyphosate isopropylamine salt)显著降低球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)生长率、叶绿素a含量和超氧化物歧化酶活性,草甘膦制剂(ATANOR)能够引起小球

收稿日期:2015-06-25

基金项目:国家高技术研究发展(863)计划项目(2013AA102402);国家自然科学基金项目(41271469);地球观察(Earth Watch Institute)国际合作项目(Freshwater Watch of the HSBC Water Programme);广东省科技计划项目(2012A020100003, 2013B020303001)

作者简介:许杨贵(1988—),硕士研究生, E-mail: 781385157@qq.com; 李晶(1983—),博士后, E-mail: 135073593@qq.com, 研究方向均为污染生态学。

*通信作者:黎华寿 E-mail: lihuashou@scau.edu.cn

藻(*Chlorella kessleri*)的氧化应激,并且草甘膦对鱼类有一定的急性和基因毒性^[1]。

As(Ⅲ)被列为极具毒性和致癌作用的化学元素之一。人为活动如采矿和冶炼等产业产生的高浓度含As(Ⅲ)废水排放,严重污染当地的饮用水,印度、越南、孟加拉、阿根廷、中国等都报道了饮用水As(Ⅲ)中毒的现象,长期饮用含As(Ⅲ)的水,对人体的健康有潜在的危害^[6-10]。Brammer等^[11]报道了孟加拉、印度以及东南亚等地把砷污染的水用于灌溉,导致砷通过土壤进入大米,进而影响稻米的品质和人们的健康。此外,天然矿石中也含有浓度较高的砷,如毒砂,在厌氧的情况下可产生其氧化物、硫化物、磷酸盐、硅酸盐和碳酸盐等,这些产物与水以及金属氧化物可以通过解吸作用,经地表径流进入自然水体中。研究表明,水体中的As(Ⅲ)对斜生栅藻的叶绿素荧光产生的抑制作用大于As(V),并且能明显抑制兰州鲇组织中代谢酶的活性,导致组织细胞的RNA损伤和可溶性蛋白质减少^[12-13]。

鉴于草甘膦的使用以及As(Ⅲ)在人为或自然因素下的释放,其有可能共同存在于水环境中,造成联合毒性。研究发现,草甘膦在鱼塘施用后1 h达到峰值(2.84 mg·L⁻¹),在美国河流中检测到草甘膦浓度为2.2 mg·L⁻¹;一般情况下,淡水中砷的含量少于10 μg·L⁻¹,但在富含砷的地下水介质中砷的含量高达1~20 mg·L⁻¹^[14]。目前,对于草甘膦和类金属As(Ⅲ)的联合毒性的研究仍处在初级阶段。王云彪等^[15]报道了草甘膦与砷对秀丽隐杆线虫的联合毒性表现为协同作用。草甘膦与As(Ⅲ)对水生生物的联合毒性尚鲜有报道,其研究更具有环境相关性。

水环境中污染物的风险评估和水质基准的制定通常以单一化学物质的生态毒性数据为依据。然而通常情况下,水生生物所暴露的环境是多种化学物质组成的混合污染物而并不是单一污染物。研究表明,即使是在单一化学物质浓度低于无观测效应浓度(NOEC)时,在与其他污染物混合时也可能对水生生物产生显著的联合毒性^[16-17]。余言想等^[18]研究结果表明,纳米水稳型富勒烯增强了Zn²⁺和Cr⁶⁺对大型溞的毒性。由于环境污染物种类和数量的不同,即使相同化学物质组成的混合物,因其组分的浓度不同,也会产生不同的毒性效应^[19-22]。在实际的污染环境中,往往联合毒性更加能说明其毒性对水生生物的影响,从而更具有环境相关性,对环境标准的制定以及生态环境保护具有实际指导作用。

本文旨在研究草甘膦和类金属As(Ⅲ)的联合毒性机制,利用大型溞为模型生物,通过检测两类物质对大型溞的单一毒性和联合毒性,在模型的基础上,进一步评价草甘膦和As(Ⅲ)的联合毒性效应。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

草甘膦(98%)晶体固体,购于上海安谱科技有限公司,As₂O₃为分析纯,购于广州市丛源仪器有限公司。使用前先配制As(Ⅲ)母液,用棕色瓶置于4℃冰箱中避光保存。氯化钙(CaCl₂·2H₂O, 96.0%)、结晶硫酸镁(MgSO₄·7H₂O, 99.0%)、氯化钾(KCl, 99.5%)和碳酸氢钠(NaHCO₃, 99.5%)购于天津大茂化学试剂有限公司,用MilliQ超纯水配制成储备液备用。

草甘膦母液(1 g·L⁻¹)的配制:由于草甘膦在25℃的溶解度为13 g·L⁻¹,直接称取0.1 g草甘膦溶于水,并定容到100 mL;As(Ⅲ)标准液(100 mg·L⁻¹)的配制:由于As₂O₃微溶于水,先将As₂O₃在硅胶上干燥至恒重,然后称取0.066 g溶于2.5 mL的2 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液中,再加入5 mL的2 mol·L⁻¹硫酸溶液,转移到容量瓶,用稀释用水定容到500 mL。试验稀释用水的配制:294.0 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 123.0 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 64.8 mg·L⁻¹ NaHCO₃, 5.75 mg·L⁻¹ KCl。

1.2 供试生物

纯系大型溞(*Daphnia magna*)由香港浸会大学提供。培养及试验条件:温度为(20±2)℃,光强度为800 lx,光暗比为16 h:8 h,每次投喂10 mL密度约为6×10⁶ cells·mL⁻¹纯培养的淡水小球藻(*Chlorella vulgaris*),每周投喂3次,换水2次。挑选溞龄小于24 h的健康幼溞供试验(重铬酸钾标准物质对幼溞的EC₅₀=1.106 mg·L⁻¹,符合测试标准ISO 6314—2004),试验过程中不喂食。

1.3 试验方法

在毒理试验开始前,按照ISO 6314—2004标准,利用重铬酸钾标准物质检测大型溞的敏感性,试验条件与培养条件相同,不喂食,以24 h活动受抑制的半数效应浓度(EC₅₀)在0.6~2.1 mg·L⁻¹范围内为标准。收集<24 h的幼溞为试验动物。试验前24 h,选取怀卵的健康母溞放入试验稀释水进行培养,试验前6 h将母溞挑出,所收集幼溞进行急性毒理试验,试验期间不喂食。化学物质暴露时间结束后,用立体显微镜观察试验用溞,以心脏停止跳动判定个体死亡,并记录死亡个数。

1.3.1 单一毒性试验

首先进行预备试验: 设置 5 个试验浓度, 3 个平行, 观察 24、48 h 内大型蚤的死亡个数, 根据预测结果确定正式试验的浓度范围, 均匀覆盖单一化合物的浓度-效应曲线(致死效应水平 0~100%)。根据预试验结果, 设置 7 个浓度处理(甘草膦: 0、48、50、52、54、56、58、60 mg·L⁻¹; As(Ⅲ): 0、1、2、4、6、8、10、16 mg·L⁻¹), 每个试验浓度设 4 个平行, 试验在 150 mL 的烧杯中进行, 每个烧杯盛 100 mL 试验化学物质溶液或空白对照(曝过气的试验稀释用水), 每个烧杯随机放 10 只幼蚤, 用保鲜膜封口, 防止大气或其他物质沉降, 同时在封口膜上刺若干小孔, 保证水中溶解氧(DO=8~9 mg·L⁻¹)的供给。

1.3.2 联合毒理试验

根据草甘膦和 As(Ⅲ)两种物质对大型蚤的 24 h 和 48 h 的半致死浓度(LC₅₀), 采用等毒性比浓度的方法设计两种物质的混合物进行联合毒性试验, 见表 1。试验过程, 按照与单一污染物相同的方法, 开展联合毒性对大型蚤急性毒性的测试。

1.4 数据处理与统计

通过 Hill's model(公式 1), 采用 Graph Pad Prism 5 计算出单一毒性和联合毒性的 EC₅₀ 和 LC₅₀, 以及 95% 的置信区间。用 JMP8 软件的 Logistic regression 和 Weibull 函数对浓度-效应关系进行非线性最小二

表 1 等毒性比情况下草甘膦和 As(Ⅲ)的浓度设置

Table 1 Concentrations of glyphosate and As(Ⅲ) in mixture based on toxic equivalent concentration ratios

时间/ h	等毒性比 nLC ₅₀ 草甘膦:nLC ₅₀ As(Ⅲ)	草甘膦/ mg·L ⁻¹	As(Ⅲ)/ mg·L ⁻¹
24	0	0	0
24	0.125:0.125	6.77	0.93
24	0.25:0.25	13.50	1.91
24	0.50:0.50	27.1	3.73
24	0.75:0.75	40.60	5.60
24	1.00:1.00	54.10	7.47
24	1.25:1.25	67.70	9.33
24	1.50:1.50	81.20	11.20
48	0	0	0
48	0.5:0.5	25.56	3.02
48	0.625:0.625	31.94	3.78
48	0.75:0.75	38.33	4.54
48	0.825:0.825	44.72	5.92
48	1.00:1.00	51.11	6.05
48	1.50:1.50	76.11	9.08
48	2.00:2.00	102.22	12.10

乘拟合, 选择拟合相关系数高或均方根误差低的函数为最佳拟合函数, 并用 Sigmaplot 做观察值和模型拟合值的回归线性, 以及联合毒性(包含单一毒性)的 3-D 反应曲面图, 并用洛伊参数曲线反应模型(CARS, 公式 2)和反应添加剂反应面模型(RARS, 公式 3 和 4)算出参数 α 和 ρ ^[23]。

$$E_i = \frac{E_0 C_i^{m_i}}{C_i^{m_i} + (LC_{50(i)})^{m_i}} \quad (1)$$

式中, E_i 为联合毒性试验化学物质 i 的成活率, %; E_0 为空白组大型蚤的成活率, %; m_i 为基于化学物质成分 i 浓度-效应曲线的成活率斜率; C_i 为化学物质 i 的浓度, mg·L⁻¹; $LC_{50(i)}$ 为化学物质 i 的半致死浓度, mg·L⁻¹。

1.4.1 洛伊参数反应曲面模型(CARS)

$$1 = \frac{C_1}{LC_{50(1)} \left(\frac{E}{E_0 - E}\right)^{1/m_1}} + \frac{C_2}{LC_{50(2)} \left(\frac{E}{E_0 - E}\right)^{1/m_2}} + \frac{\alpha C_1 C_2}{LC_{50(1)} LC_{50(2)} \left(\frac{E}{E_0 - E}\right)^{1/2(m_1+m_2)}} \quad (2)$$

式中, C_1 为化学物质 1 的浓度, mg·L⁻¹; C_2 为化学物质 2 的浓度, mg·L⁻¹; $LC_{50(1)}$ 为化学物质 1 对大型蚤的半致死浓度, mg·L⁻¹; $LC_{50(2)}$ 为化学物质 2 对大型蚤的半致死浓度, mg·L⁻¹; E 为化学物质 1 和化学物质 2 联合毒性试验时大型蚤的成活率, %; m_1 为化学物质 1 的浓度-成活率曲线的斜率; m_2 为化学物质 2 的浓度-成活率曲线的斜率; α 为交互参数, 当 $\alpha=0$ 时为浓度加和作用, 当 $\alpha>0$ 时, 为协同作用, 当 $\alpha<0$ 时为拮抗作用。

1.4.2 反应添加剂反应面模型(RARS)

$$P_i = 1 - \frac{E_0 C_i^{m_i}}{C_i^{m_i} + LC_{50(i)}^{m_i}} \quad (3)$$

$$P = P_1 + P_2 - \rho P_1 P_2 \quad (4)$$

式中, P_i 为化学物质 i 的死亡率, %; P 为混合毒性试验大型蚤的预期的死亡率, %; ρ 为交互参数, 当 $\rho=1$ 时为加和作用, 当 $\rho>1$ 时为拮抗作用, 当 $\rho<1$ 时为协同作用。

2 结果

2.1 草甘膦和 As(Ⅲ)对大型蚤的单一毒性

图 1 为草甘膦和 As(Ⅲ)对大型蚤单一毒性的浓度-效应曲线, 均呈典型的 S 型。此外, 用 Logistic regression 函数模型对草甘膦和 As(Ⅲ)的单一毒性浓度-效应进行非线性拟合, 其观察值和模型预测值呈

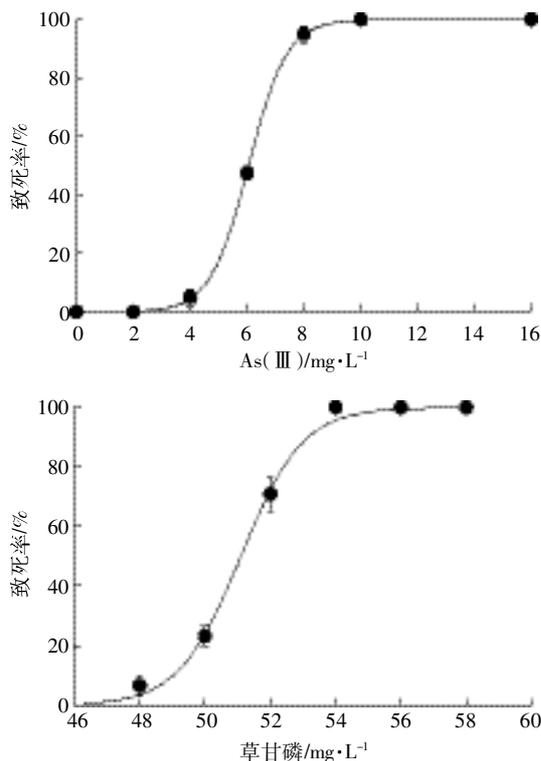


图1 As(III)和草甘膦单一毒性对大型溞48 h的浓度-效应图
Figure 1 Concentration response curves of single toxicity of glyphosate and As(III) to *Daphnia magna* at 48 h

高相关性, R^2 值分别为 0.990 1 和 0.994 0, 且由 F 检验求得 P 值 $< 0.000 1$ 。因此可见, Logistic regression 函数模型能很好地描述测试物质观察值与预测模型的相关性。

草甘膦和 As(III) 对大型溞 24 h 和 48 h 半致死浓度 (EC_{50}) 和半致死浓度 (LC_{50}) 以及 95% 的置信区间, 见表 2 和表 3。草甘膦的 24 h 和 48 h 的 LC_{50} 分别为 54.12、51.12 $mg \cdot L^{-1}$, As(III) 的 LC_{50} 分别为 7.47、6.07 $mg \cdot L^{-1}$ 。陆凌霄等^[24]对 As(III) 研究结果表明, 24 h 和 48 h 对大型溞的 LC_{50} 分别为 6.17、4.82 $mg \cdot L^{-1}$, 与本试验结果很接近。

2.2 草甘膦和 As(III) 二元混合联合毒性

应用与单一毒性物质相同的方法, 描绘草甘膦和

表 2 草甘膦对大型溞 24 h、48 h 半致死效和半致死浓度及其置信区间

Table 2 EC_{50} and LC_{50} values and confidence intervals of glyphosate acting on *Daphnia magna* at 24 and 48 h

毒性指标	暴露时间/h	浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	95%置信区间/ $mg \cdot L^{-1}$	R^2
EC_{50}	24	53.86	53.72~54.00	0.991
LC_{50}	24	54.12	53.96~54.28	0.989
EC_{50}	48	49.62	49.41~49.84	0.995
LC_{50}	48	51.12	50.93~51.31	0.975

表 3 As(III) 对大型溞 24、48 h 半致死效和半致死浓度及其置信区间

Table 3 EC_{50} and LC_{50} values and confidence intervals of As(III) acting on *Daphnia magna* at 24 and 48 h

毒性指标	暴露时间/h	浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	95%置信区间/ $mg \cdot L^{-1}$	R^2
EC_{50}	24	5.95	5.75~6.16	0.978
LC_{50}	24	7.47	7.21~7.73	0.972
EC_{50}	48	5.78	5.69~5.89	0.995
LC_{50}	48	6.07	5.96~6.14	0.994

As(III) 等毒性比浓度混合的浓度-效应对大型溞的影响(图 2), 呈典型 S 型。利用单一毒性物质相同的拟合方法, 用 Logistic regression 拟合函数进行混合物浓度-致死效应的非线性拟合, 并用 Sigmaplot 做观察值和模型拟合值的回归线性(图 3), 其 $R^2=0.966 4$, F 检验的 P 值 $= 0.004$, 能较好地说明二元混合物观察值与预测模型的吻合性。由表 4 可知, 二元混合物联合

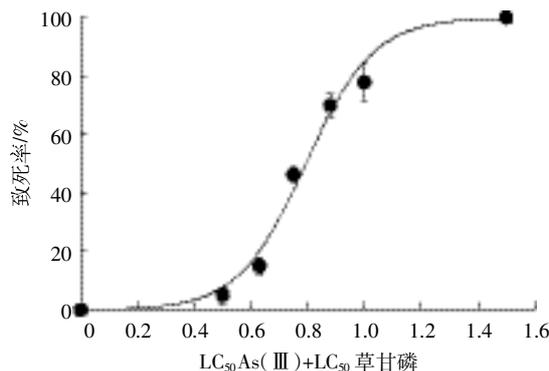


图 2 As(III) 和草甘膦联合毒性对大型溞 48 h 的浓度-效应图
Figure 2 Concentration response curves of joint toxicity of glyphosate and As(III) to *Daphnia magna* at 48 h

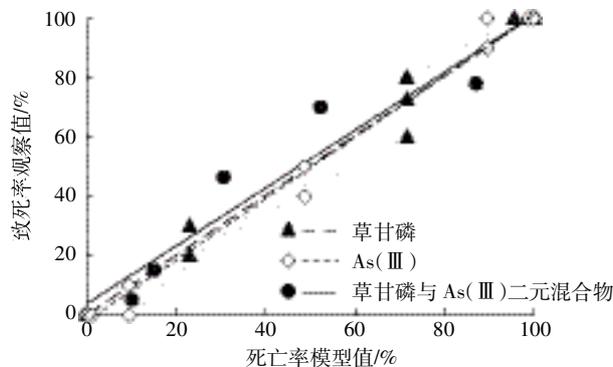


图 3 草甘膦和 As(III) 单一毒性和联合毒性的观察值与模型拟合值的线性回归结果

Figure 3 Linear regression of mortality values predicted by Logistic regression model and corresponding observations

表4 草甘膦和As(Ⅲ)对大型蚤24、48 h联合毒性的半致死浓度及CARS和RARS模型参数

Table 4 24 h- and 48 h-LC₅₀ values and CARS and RARS model parameters for joint toxicity of glyphosate and As(Ⅲ) to *Daphnia magna*

暴露时间/h	LC ₅₀ 及 95%置信区间/mg·L ⁻¹		模型参数		联合毒性
	草甘膦	As(Ⅲ)	α	ρ	
24	48.89(46.33~51.44)	6.75(6.39~7.10)	-0.81	1.96	拮抗
48	40.47(38.57~42.38)	4.79(4.57~5.02)	-0.96	1.91	拮抗

情况下草甘膦和As(Ⅲ)对大型蚤24 h的半致死浓度分别为48.89、6.75 mg·L⁻¹,对大型蚤48 h的半致死浓度分别为40.47、4.79 mg·L⁻¹,所测定的24 h和48 h的CARS模型参数 α 分别为-0.81、-0.96,24 h和48 h RARS模型参数 ρ 分别为1.96、1.91,两个模型结果都表明本试验等毒性条件下,草甘膦和As(Ⅲ)二元混合物联合毒性呈拮抗作用。此外,基于单一草甘膦和As(Ⅲ)以及两种物质等毒性比混合,利用曲面反应模型建立起来的三维浓度-致死效应图(图4),能简明地模拟二元毒性物质混合后的浓度与致死率的关系。因此,从曲面反应模型建立的三维浓度-致死效应图中可以简明地预测出不同浓度的草甘膦和As(Ⅲ)联合对大型蚤产生的毒性。

3 讨论

草甘膦原药是草甘膦酸,但因为杀草效果的需要,草甘膦制剂有不同的配方。周垂帆^[25]、Bernal等^[26]的研究结果表明,草甘膦对蚯蚓的生长和繁殖无明显的毒害,对发育中的蝌蚪也没有急性和亚急性的毒

性。Uchida等^[27]用DNA微阵列对日本青鳉鱼肝脏进行分析,结果表明草甘膦对日本青鳉鱼并无基因表达的改变。然而Tsui等^[28]研究表明,随着制剂配方不同和环境的变化,草甘膦会产生不同的毒性效果:农达>草甘膦酸>草甘膦异丙胺盐。添加悬浮颗粒高岭土以及提高pH值都可以使农达毒性更强,而草甘膦酸是因其酸度高而产生毒性。

本文研究了草甘膦和As(Ⅲ)对大型蚤的单一和联合急性毒性,以48 h-LC₅₀为毒性大小判断标准,其单一毒性为As(Ⅲ)>草甘膦。修瑞琴(《大型蚤系统生物测试技术——全国技术培训班讲义》,1987)根据大型蚤的48 h-LC₅₀结果将受试物的毒性分成五级:48 h-LC₅₀<0.1 mg·L⁻¹为剧毒,0.1~1 mg·L⁻¹为高毒,1~10 mg·L⁻¹为中毒,10~100 mg·L⁻¹为低毒,>100 mg·L⁻¹为微毒。从毒性分级中可以得出As(Ⅲ)属于中毒性物质,草甘膦属于低毒性物质。谢嘉华等^[21]研究表明,草甘膦对缢蛏、可口革囊星虫和大弹涂鱼成鱼的96 h-LC₅₀分别为233.60、1 267.00、1 068.01 mg·L⁻¹,均属于低毒;黄波平等^[29]研究表明,As(Ⅲ)对隆线蚤24、48 h的LC₅₀分别为3.50、3.16 mg·L⁻¹,属于中性毒,和本试验研究的结果一致。Bao等^[23]、张亚辉等^[30]采用Logistic regression和Weibull函数对其试验进行浓度-效应关系非线性最小二乘拟合,选择拟合相关系数高或均方根误差低的函数为最佳拟合函数。本研究联合毒性试验中,草甘膦和As(Ⅲ)的单一毒性试验以及两者混合的浓度-致死效应图都呈典型S型,三者的观察值和Logistic regression函数预测值得到的回归线性非常接近,能很好地预测三者的浓度-致死效应的关系;另外,本实验还采用Bao等^[23]的CARS模型和RARS模型对草甘膦和As(Ⅲ)对大型蚤的联合毒性进行预测,结果显示草甘膦和As(Ⅲ)以毒性1:1混合呈拮抗作用,据此在用毒性单位分析法评价草甘膦和As(Ⅲ)共存对水体的危害时,可考虑按小于相加作用预测其毒性效应。

周垂帆^[25]研究表明,草甘膦存在的条件能减轻蚯蚓对Cu、Cd的富集,缓解Cu、Cd对蚯蚓体内的超氧

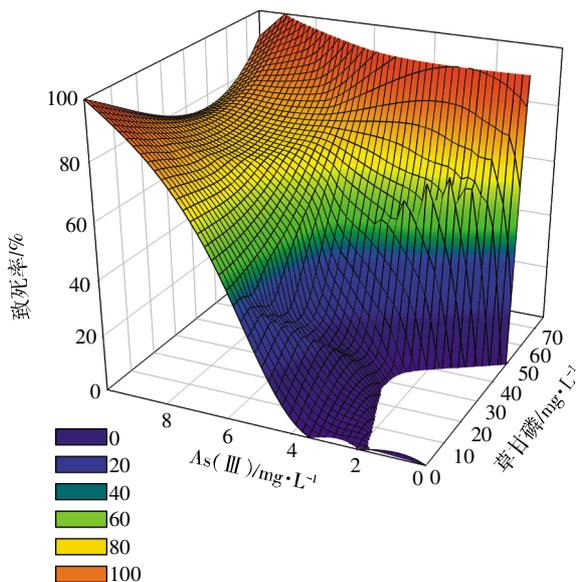


图4 联合毒性(包含单一毒性)浓度与死亡率的曲面反应图

Figure 4 Reaction surface based on concentration response of joint toxicity of glyphosate and As(Ⅲ) (including single toxicity)

化物歧化酶、过氧化氢酶的破坏。因为草甘膦中所含的羧基、氨基、磷酸基等配位基团对重金属阳离子和有机阳离子有很强的络合能力,络合后会形成稳定的Cu-草甘膦复合体和Cd-草甘膦复合体等无效态,从而降低Cu、Cd和草甘膦毒性^[31-33]。这表明,在草甘膦和重金属共存的水体或污染土壤中,草甘膦能够有效影响重金属的生物有效性和毒性。Bernards等^[34]发现在草甘膦溶液中添加Mn元素,会形成Mn-草甘膦复合体,从而能够减少草甘膦在植物体内的渗透和转移。此外Ca、Mg同样对草甘膦有拮抗作用,能够降低草甘膦的除草效率。其他研究亦表明,重金属对生物的毒性和有效性不仅取决于金属的总量,而且和自由态的金属离子密切相关,并强调有机配体的络合对金属的生物有效性、毒性、转移、分布和归宿。

Levy等^[35]研究结果表明,在生长培养基中添加磷酸盐,能和砷竞争被细胞吸收,从而减少砷对单针藻的毒害。As(V)能在磷酸化的能量传递中取代磷酸,产生ADP-砷酸,可能是导致As(V)急性中毒的原因之一,而As(III)易与含有巯基的分子作用,与蛋白质巯基有高度的亲和力,从而抑制一些重要的反应毒性;此外,砷酸比亚砷酸毒性小,且As(III)的甲基化也可以降低As(III)的毒性^[36]。本试验联合毒性试验所用的草甘膦是有机农药,其分子结构中的羧酸、氨基、磷酸基等集团基有较强的络合金属的能力,两种毒性物质二元混合的联合毒性降低可能由于As(III)氧化为As(V)致使中毒性的As(III)的毒性降低,也可能由于草甘膦分子结构致使其对类金属As(III)进行络合或甲基化,从而减弱As(III)的毒性,此外还有可能是草甘膦的磷酸基团和砷竞争被细胞的吸收,减少砷对大型溞的毒性。其毒性机理应从化学分析及细胞分子反应机制层面进行深入研究和探讨。

4 结论

单一毒性情况下,草甘膦和As(III)对大型溞的致死率随着浓度的增加呈S型增加,草甘膦属于低毒物质,As(III)属于中毒性物质,草甘膦24h-LC₅₀和48h-LC₅₀分别为54.12、51.12 mg·L⁻¹,As(III)24h-LC₅₀和48h-LC₅₀分别为7.47、6.07 mg·L⁻¹。

在等毒性比浓度下,草甘膦和As(III)对大型溞联合毒性呈拮抗作用。

致谢:感谢香港浸会大学梁士贤助理教授提供的试验生物大型溞,感谢华南农业大学骆世明教授帮助审阅英文摘要等。

参考文献:

- [1] 周垂帆,李莹,张晓勇,等.草甘膦毒性研究进展[J].生态环境学报,2013,22(10):1737-1743.
ZHOU Chui-fan, LI Ying, ZHANG Xiao-yong, et al. Research advance in ecotoxicity of glyphosate[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(10):1737-1743.
- [2] 刘健,肖雅文,芦佳,等.四个抗草甘膦基因的抗性比较[J].草业学报,2015,24(5):159-166.
LIU Jian, XIAO Ya-wen, LU Jia, et al. Comparison of four glyphosate genes[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(5):159-166.
- [3] 孙越,刘秀霞,李丽莉,等.抗亚洲玉米螟、抗草甘膦转基因玉米的培育[J].农业生物技术学报,2015,23(1):52-60.
SUN Yue, LIU Xiu-xia, LI Li-li, et al. Breeding of transgenic maize with resistance to the Asian corn borer (*Ostrinia furnacalis*) and tolerance to glyphosate[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(1):52-60.
- [4] 杨斌.从大数据分析透视全球草甘膦市场——全球草甘膦市场研究及出口市场分析(一)[J].农药市场信息,2015,30(2):31-32,37-38.
YANG Bin. Analysis perspective glyphosate markets around the world from a large data: Analysis of the glyphosate market research and export markets in the world(I) [J]. *Pesticide Market News*, 2015, 30(2):31-32, 37-38.
- [5] 林永东,孙彦龙,郑彤,等.MnO₂/Al₂O₃吸附草甘膦及微波紫外耦合降解再生工艺[J].环境工程学报,2015,9(4):1815-1822.
LIN Yong-dong, SUN Yan-long, ZHENG Tong, et al. MnO₂/Al₂O₃ adsorption of glyphosate and microwave UV coupling degradation and re-generation process[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(4):1815-1822.
- [6] Berg M, Tran H C, Nguyen T C, et al. Arsenic contamination of ground-water and drinking water in Vietnam: A human health threat[J]. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35(13):2621-2626.
- [7] Mukherjee A, Fryar A E. Deeper groundwater chemistry and geochemical modeling of the arsenic affected western Bengal basin, West Bengal, India[J]. *Applied Geochemistry*, 2008, 23(4):863-894.
- [8] Bundschuh J, Farias B, Martin R, et al. Groundwater arsenic in the chaco-pampean plain, argentina: Case study from robles county, santiago del estero province[J]. *Applied Geochemistry*, 2004, 19(2):231-243.
- [9] Guo H, Yang S, Tang X, et al. Groundwater geochemistry and its implications for arsenic mobilization in shallow aquifers of the Hetao Basin, Inner Mongolia[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 393(1):131-144.
- [10] Halim M A, Majumder R K, Nessa S A, et al. Hydrogeochemistry and arsenic contamination of groundwater in the Ganges Delta Plain, Bangladesh[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(2-3):1335-1345.
- [11] Brammer H, Ravenscroft P. Arsenic in groundwater: A threat to sustainable agriculture in South and South-East Asia[J]. *Environment International*, 2009, 35(3):647-654.
- [12] 吴旭东,连总强,侯玉霞,等.砷对兰州鲌组织中代谢酶活性及RNA和蛋白质含量影响[J].水生生物学报,2013,37(6):1073-1078.

- WU Xu-Dong, LIAN Zong-Qiang, HOU Yu-Xia, et al. Effects of arsenic on activities of the metabolic enzymes, contents of RNA and protein in several tissues of *Silurus lanzhouensis*[J]. *Journal of Aquatic Biology*, 2013, 37(6): 1073-1078.
- [13] 樊香绒, 尹黎燕, 李伟, 等. 不同价态砷对斜生栅藻生长及叶绿素荧光的影响[J]. *水生态学杂志*, 2013, 34(5): 60-64.
FAN Xiang-rong, YIN Li-yan, LI Wei, et al. Effect of arsenic species on the growth and chlorophyll fluorescence characteristics of *Scenedesmus obliquus*[J]. 2013, 34(5): 60-64.
- [14] Smedley P L, Kinniburgh D G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters[J]. *Applied Geochemistry*, 2002, 17(5): 517-568.
- [15] 王云彪, 李润琴, 邓茗芬, 等. 砷与农药草甘膦、敌敌畏对秀丽隐杆线虫的联合毒性[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(2): 262-267.
WANG Yun-biao, LI Run-qin, DENG Ming-qin, et al. Joint toxicity of arsenic, glyphosate and dichlorvos to *C. elegans*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(2): 262-267.
- [16] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants[J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 56(1): 13-32.
- [17] Walter H, Consolaro F, Gramatica P, et al. Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs)[J]. *Ecotoxicology*, 2002, 11(5): 299-310.
- [18] 余言想, 魏华, 陶贤继, 等. 纳米水稳型 $C_{60}(nC_{60})$ 促进 Zn^{2+} 和 Cr^{6+} 在大型溞体内的吸收、抗氧化性和急性毒性[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(3): 569-577.
YU Yan-xiang, WEI Hua, TAO Xian-ji, et al. Aqueous stable fullerene nanocrystals nC_{60} promoted the accumulation, anti-oxidation and acute toxicity of Zn^{2+} and Cr^{6+} on *Daphnia magna*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(3): 569-577.
- [19] Zhang Y, Liu S, Song X, et al. Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(3): 880-888.
- [20] Vera M S, Juárez Á B, Pizarro H N. Comparative effects of technical-grade and a commercial formulation of glyphosate on the pigment content of *Periphytic algae*[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 93(4): 399-404.
- [21] 谢嘉华, 林奕凡, 林敏, 等. 草甘膦对3种滩涂动物的急性毒性及安全评价[J]. *泉州师范学院学报*, 2014, 32(6): 1-4.
XIE Jia-hua, LIN Yi-fan, LIN Min, et al. Acute toxicity and safety evaluation of glyphosate to *Sinonovacula constricta lamark*, *Phascolosoma esculenta* and *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. *Journal of Quanzhou Normal University*, 2014, 32(6): 1-4.
- [22] 莫凌云, 刘海玲, 刘树深, 等. 5种取代酚化合物对淡水发光菌的联合毒性[J]. *生态毒理学报*, 2006, 1(3): 259-264.
MO Ling-yun, LIU Hai-ling, LIU Shu-shen, et al. Joint toxicity of 5 substituted phenols to freshwater photobacteria[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(3): 259-264.
- [23] Bao V W W, Leung K M Y, Lui G C S, et al. Acute and chronic toxicities of Irgarol alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*[J]. *Chemosphere*, 2013, 90(3): 1140-1148.
- [24] 陆霞, 梁雪梅, 林锦炎, 等. 汞、砷离子对大型溞的毒性试验报告[R]. 广州: 广东省卫生防疫站, 1993: 89-91.
LU Ling-xia, LIANG Xue-mei, LING Jin-yan, et al. Mercury, arsenic ion for *Daphnia magna* toxicity test report[R]. Guangzhou: Health Epidemic Prevention Station in Guangdong Province, 1993: 89-91.
- [25] 周垂帆. 重金属和草甘膦复合污染生态毒理研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013: 23-36.
ZHOU Chui-fan. Study of the ecology toxic effects of single and combined pollution between heavy metal and glyphosate[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013: 23-36.
- [26] Bernal M H, Solomon K R, Carrasquilla G, et al. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and cosmo-flux to larval and juvenile Colombian frogs: 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2009, 72(15-16): 966-973.
- [27] Uchida M, Takumi S, Tachikawa K, et al. Toxicity evaluation of glyphosate agrochemical components using Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and DNA microarray gene expression analysis[J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2012, 37(2): 245.
- [28] Tsui M T K, Chu L M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(7): 1189-1197.
- [29] 黄波平, 吴永贵, 申万敏, 等. 砷与氟对隆线溞的急性毒性及安全浓度分析[J]. *贵州农业科学*, 2011, 39(3): 106-110.
HUANG Bo-ping, WU Yong-gui, SHEN Wan-dun, et al. Acute toxicity and safe concentration of arsenic and fluoride to *Daphnia carinata*[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2011, 39(3): 106-110.
- [30] 张亚辉, 曹莹, 王一喆, 等. 3种氯酚化合物对大型溞的联合毒性[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(4): 403-409.
ZHANG Ya-hui, CAO Ying, WANG Yi-zhe, et al. Joint toxicity of three chlorophenols to *Daphnia magna*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(4): 403-409.
- [31] Heineke D, Franklin S J, Raymond K N. Coordination chemistry of glyphosate: Structural and spectroscopic characterization of bis(glyphosate) metal(III) complexes[J]. *Inorganic Chemistry*, 1994, 33(11): 2413-2421.
- [32] Subramaniam V, Hoggard P E. Metal complexes of glyphosate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36(6): 1326-1329.
- [33] Glass R L. Metal complex formation by glyphosate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1984, 32(6): 1249-1253.
- [34] Bernards M L, Thelen K D, Penner D, et al. Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation[J]. *Weed Technology*, 2009, 26(2): 167-176.
- [35] Levy J L, Stauber J L, Adams M S, et al. Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(10): 2630-2639.
- [36] 徐智, 黄可龙. 砷的代谢及其毒性机制的相关性研究[J]. *中国药业*, 2009, 18(12): 19-21.
XU Zhi, HUANG Ke-long. Correlation to metabolism and toxicity of arsenic[J]. *China Pharmaceuticals*, 2009, 18(12): 19-21.