

氯酸钾和重金属镉、砷对蝌蚪的单一和联合毒性

陈桂葵, 罗程, 黎华寿

(农业部生态农业重点开放实验室, 广东省高等学校农业生态与农村环境重点实验室, 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘要:以静水生物测试法研究了氯酸钾和重金属砷、镉对蝌蚪的单一与联合毒性,同时采用相加指数法对联合毒性进行了评价.单一毒性试验表明: KClO_3 、 Cd^{2+} 和 As^{3+} 对蝌蚪的毒性顺序为 $\text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{KClO}_3$, KClO_3 对蝌蚪24、48、96 h的半致死浓度(LC_{50})分别为7 459.93、6 459.65、5 753.19 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, As^{3+} 对蝌蚪24、48、96 h的 LC_{50} 分别为41.26、25.89、15.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cd^{2+} 对蝌蚪24、48、96 h的 LC_{50} 分别为8.16、6.32、4.98 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.联合毒性试验结果表明, KClO_3 与 Cd^{2+} 、 KClO_3 与 As^{3+} 共存时的联合毒性为协同作用,而 Cd^{2+} 与 As^{3+} 的联合毒性表现为拮抗作用.

关键词:氯酸钾;镉;砷;联合毒性;蝌蚪

中图分类号:X171.5

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)04-0059-04

Single and Joint Toxicity of Potassium Chlorate with Arsenic and Cadmium Ions to Tadpole

CHEN Gui-kui, LUO Cheng, LI Hua-shou

(Key Laboratory of Ecological Agriculture of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Key Laboratory of Agroecology and Rural Environment of Guangdong Regular Higher Education Institutions, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The single and joint toxicity of potassium chlorate with arsenic and cadmium ions to tadpole was determined by static test method, and the joint toxicity was evaluated by additive index method. The acute toxicities of potassium chlorate, Cd^{2+} and As^{3+} were in the sequence of $\text{Cd}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{potassium chlorate}$. LC_{50} of potassium chlorate to the tadpole during 24, 48, 96 h were 7 459.93, 6 459.65, 5 753.19 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively; LC_{50} of As^{3+} to the tadpole during 24, 48, 96 h were 41.26, 25.89, 15.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively, and LC_{50} of Cd^{2+} to the tadpole during 24, 48, 96 h were 8.16, 6.32, 4.98 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. When the tadpoles were exposed to toxic mixtures, the results showed that the joint toxicities of potassium chlorate with Cd^{2+} and potassium chlorate with As^{3+} were synergistic, while the joint toxicity of Cd^{2+} with As^{3+} was antagonistic.

Key words: potassium chlorate; cadmium; arsenic; joint toxicity; tadpole

氯酸盐在工业生产中用于制造亚氯酸盐及高氯酸盐化工产品,印染工业中用作苯胺染色的氧化剂和媒染剂,医药工业中用作收敛剂和消毒杀菌剂,二氧化氯生产中用作漂白剂,海水处理中用来提取溴和作为农药去除海藻,在农业生产中,氯酸盐也可作为除草剂、土壤消毒剂和农产品的干燥剂^[1-2].另外,高氯酸盐是制造炸药、烟火和火箭推进器燃料不可缺少的部分^[3-4],据 Motzer 等^[4]报道,从 20 世纪 50

年代至 21 世纪初,大约有 1 600 万 t 高氯酸盐排入环境.近年来,氯酸钾(KClO_3)作为龙眼产期调控剂在反季节龙眼生产中广泛应用^[5-6].据广东省茂名市估计,2006 年使用 KClO_3 的龙眼园达 1 556 hm^2 .以一般 1 hm^2 施用量 300 kg KClO_3 计,仅广东省茂名市龙眼园 2006 年施用 KClO_3 量就达 778 t.可见, KClO_3 的环境行为及其生态毒理问题已成为迫切需要回答的现实问题,也是龙眼产期调控技术能否应用推广

收稿日期:2009-04-30

作者简介:陈桂葵(1972—),女,副教授,在职博士研究生;通信作者:黎华寿(1964—),男,教授,E-mail:lihuashou@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30370289,30700099)

的关键^[7].高氯酸盐在合适的条件下,可以分解成氯酸盐,而(高)氯酸盐极易溶于水,其对水生生物的毒性不容忽视.

砷(As)、镉(Cd)等是目前水域污染常见的重金属元素,它们在水体中常相伴存在,对水生生物具有不同程度的毒性.通过各种途径进入水环境的氯酸盐也有可能和工矿业排污中的砷、镉相遇,形成复合污染.蝌蚪作为生活在水体中的代表类群,其生存、生长必然会受到这些污染物的种种不利影响,从而产生各种不良的生态效应.由于两栖类动物对环境更敏感,蝌蚪作为环境污染指示生物更具有特殊意义,因而被指定为化学品生态毒理试验的标准方法^[8].目前,有关重金属对蝌蚪的毒性及影响已有一些研究报告^[9-10],但关于氯酸盐与重金属复合污染对蝌蚪的影响研究鲜有报道.本文研究了氯酸钾与重金属砷、镉对蝌蚪的单一和联合毒性,为判断它们对水生生物可能造成的危害以及有关生态后果提供基础数据,为防治水环境的污染和保护水生生物提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

蝌蚪 *Rana limnocharis* Boie(大小一致,健康,同批次),从华南农业大学农场水沟中捕获,在试验用水[曝气 24 h 以上的自来水,水温(20 ± 1)℃,pH 6.5 ~ 7.0,溶解氧质量浓度 > 4.0 mg · L⁻¹]中驯养 3 d,死亡率小于 1%.

供试药品为 KClO₃、CdCl₂ · 2.5H₂O 和 NaAsO₂,都为分析纯,由广州试剂厂出产.用双蒸水配制母液,试验时将母液稀释成所需的质量浓度.

1.2 方法

采用静态试验法^[11],在 5 L 的试验桶中进行,试验期间不喂食.

1.2.1 预备试验 每桶中放入 20 尾驯化好的蝌蚪,分别加入不同质量浓度的 KClO₃、Cd²⁺ 和 As³⁺ 溶液(每个处理盛溶液 1 L),室内(20℃左右)培养,观察 48 h,探明 3 种污染物对蝌蚪的 100% 致死浓度和最大耐受浓度.

1.2.2 单因子毒性试验 根据预备试验结果,在最高安全浓度与最低全致死浓度之间按一定比例级差设 6 个处理,另设空白对照 1 个.每个浓度组放养 10 尾蝌蚪,每组重复 3 次,开始连续观察蝌蚪的中毒症状,记录其死亡数,试验期间及时打捞出死亡个体.试验结束后,以供试蝌蚪死亡率的概率值作为因变量(y),试验浓度的对数值作为自变量(x),用回归法求出 KClO₃、As³⁺、Cd²⁺ 暴露各时间对蝌蚪的 LC₅₀ 及其 95% 置信区间.

1.2.3 联合毒性试验 在完成单因子毒性试验的基础上,固定 KClO₃ 的质量浓度(5 000 mg · L⁻¹),分别研究 KClO₃ 与 Cd²⁺(质量浓度梯度为 3、5、7、9、11、13 mg · L⁻¹)以及 As³⁺(质量浓度梯度为 1、5、10、20、40、60 mg · L⁻¹)之间的联合毒性;固定 Cd²⁺ 质量浓度为 5 mg · L⁻¹,研究 Cd²⁺ 与 As³⁺(质量浓度梯度为 2、4、8、16、32、64 mg · L⁻¹)的联合毒性.其他同单因子毒性试验处理,用回归法求出联合毒性的 LC₅₀.

采用水生毒理联合效应 Marking 的相加指数法^[12-13]进行联合毒性大小的评价: $S = A_m/A + B_m/B + C_m/C$,式中: A 、 B 、 C 为单一毒性的 LC₅₀ 值; A_m 、 B_m 、 C_m 为混合毒性的 LC₅₀ 值; S 为生物毒性相加作用之和.由 S 求得相加指数(I_A):当 $S < 1$ 时, $I_A = 1/S - 1.0$;当 $S > 1$ 时, $I_A = S(-1) + 1.0$.用 I_A 判断联合毒性,当 $I_A = 0$ 时为毒性相加作用; $I_A < 0$ 时为拮抗作用; $I_A > 0$ 时为协同作用.

1.2.4 数据处理 采用 SPSS 13.0 进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 KClO₃、Cd²⁺、As³⁺ 对蝌蚪的单一毒性试验

KClO₃、Cd²⁺、As³⁺ 各自单一存在时,均能对蝌蚪产生致死效应,且随着浓度的增加和暴露时间的延长,蝌蚪的致死效应增强(表 1).

表 1 KClO₃、Cd²⁺ 和 As³⁺ 对蝌蚪的急性毒性

Tab.1 Acute toxicity of KClO₃, Cd²⁺ and As³⁺ to tadpole

污染物	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	蝌蚪死亡数/尾			
		24 h	48 h	96 h	
KClO ₃	0	0	0	0	
	4 000	0	0	0	
	5 000	0	1.67	3.67	
	6 000	0.67	3.33	5.33	
	7 000	2.67	4.67	7.67	
	8 000	6.33	9.33	9.67	
	9 000	9.67	10.00	10.00	
	Cd ²⁺	0	0	0	0
		3	0	0	0
5		1.67	2.67	6.33	
7		3.33	5.33	8.33	
9		5.33	9.33	9.67	
11		7.33	9.67	10.00	
13		9.33	10.00	10.00	
As ³⁺	0	0	0	0	
	10	0	1.00	2.67	
	15	0.67	2.33	4.67	
	25	2.33	4.67	7.33	
	35	3.33	6.33	9.67	
	55	6.67	8.00	10.00	
	75	8.67	10.00	10.00	

对表 1 数据进行回归和相关分析,结果(表 2)表明, KClO₃ 对蝌蚪 24 ~ 96 h 的 LC₅₀ 在 5 753.19 ~

7 459.93 mg · L⁻¹ 之间, Cd²⁺ 对蝌蚪 24 ~ 96 h 的 LC₅₀ 在 4.98 ~ 8.16 mg · L⁻¹ 之间, As³⁺ 对蝌蚪 24 ~ 96 h 的 LC₅₀ 在 15.24 ~ 41.26 mg · L⁻¹ 之间. 根据国际上通行的毒性分级标准^[14] 以及我国《化学农药环境安全评价试验准则》^[15] 中建议的农药对蛙类的毒性分级标准得知: LC₅₀ < 1 为剧毒, 1 ~ 100 为高毒,

100 ~ 1 000 为中等毒性, 1 000 ~ 10 000 为低毒, > 10 000 为微毒或无毒. 参照上述标准可以得出本研究中 KClO₃ 属于低毒物质, Cd²⁺ 和 As³⁺ 都属于高毒物质. 试验结果表明: 3 个因子对蝌蚪的毒性大小顺序为 Cd²⁺ > As³⁺ > KClO₃, 其中 KClO₃ 与 Cd²⁺ 对蝌蚪的急性毒性相差很大, 其 LC₅₀ 相差倍数达到 3 个数量级.

表2 KClO₃、Cd²⁺ 和 As³⁺ 对蝌蚪的毒性效应及 LC₅₀

Tab.2 Toxicity effects of potassium chlorate, Cd²⁺ and As³⁺ to tadpole and LC₅₀ value

污染物	t _{暴露} /h	回归方程 ¹⁾	相关系数	LC ₅₀ /(mg · L ⁻¹)	95% 置信限
KClO ₃	24	y = -74.83 + 19.32x	0.998	7 459.93	7 199.31 ~ 7 730.82
	48	y = -46.15 + 12.11x	0.920	6 459.65	5 672.26 ~ 7 277.48
	96	y = -43.04 + 11.45x	0.960	5 753.19	5 157.11 ~ 6 281.19
Cd ²⁺	24	y = -5.15 + 5.65x	0.971	8.16	6.79 ~ 9.70
	48	y = -6.43 + 8.04x	0.979	6.32	5.26 ~ 7.25
	96	y = -5.62 + 8.06x	0.983	4.98	3.98 ~ 6.58
As ³⁺	24	y = -6.19 + 3.83x	0.991	41.26	32.16 ~ 55.74
	48	y = -4.67 + 3.30x	0.999	25.89	19.12 ~ 34.24
	96	y = -4.93 + 4.16x	0.968	15.24	10.71 ~ 19.48

1) x 为以 10 为底的染毒浓度对数, y 为将死亡率转化成的概率单位.

2.2 双因子对蝌蚪的联合毒性试验

联合毒性试验结果(表3)表明,在 KClO₃ 存在的情况下, Cd²⁺、As³⁺ 对蝌蚪的毒性明显增大,其相应的 LC₅₀ 与单一毒性试验比降低了. 联合毒性分析发现其 I_A 大于 0, 说明 KClO₃ 和 Cd²⁺、As³⁺ 的联合毒性表现为协同作用,即 KClO₃ 的存在增加了重金属的毒性. 而且染毒时间越长, 协同作用越明显, 毒性越强. 所以, 生物体与毒物接触的时间越久, 威胁就可能越大.

Cd²⁺ 和 As³⁺ 的联合毒性试验结果表明, I_A 小于 0, 联合毒性效应表现为拮抗作用. 这与前人^[16-18] 的研究结果相似.

表3 双因子对蝌蚪的联合毒性

Tab.3 Joint toxic action of two factors to tadpole

联合因子	t _{暴露} /h	LC ₅₀ /(mg · L ⁻¹)	S	I _A	作用类型
KClO ₃ - Cd ²⁺	24	6.32 ± 0.02	0.78	0.29	协同作用
	48	4.38 ± 0.01	0.69	0.44	协同作用
	96	3.81 ± 0.05	0.77	0.31	协同作用
KClO ₃ - As ³⁺	24	30.84 ± 0.08	0.75	0.33	协同作用
	48	12.73 ± 0.04	0.49	1.03	协同作用
	96	6.32 ± 0.01	0.42	1.41	协同作用
Cd ²⁺ - As ³⁺	24	18.45 ± 0.04	2.71	-1.71	拮抗作用
	48	6.47 ± 0.03	1.27	-0.27	拮抗作用
	96	5.06 ± 0.01	1.35	-0.35	拮抗作用

3 讨论

3.1 单因子毒性机理探讨

在本研究中, 3 种污染物单独作用于蝌蚪时,

Cd²⁺ 的毒性最大. 关于镉、砷对生物的毒性机理现在也逐步为世人所揭示: 镉可通过与酶类巯基结合或替代作用, 置换出细胞内酶类金属, 降低机体抗氧化酶的活性, 使机体清除自由基的能力下降, 引起氧化损伤, 镉也能引起 DNA 单链断裂, 并损害 DNA 修复系统, 导致细胞凋亡^[19-20]; 砷可诱导脂质过氧化、影响蛋白质和酶的结构和活性、与核酸分子相互作用以及诱导细胞凋亡^[21].

KClO₃ 具有强氧化性, 动物毒理试验发现水中较高剂量 ClO₃⁻ 和 ClO₂⁻ 与动物的贫血症密切相关而被怀疑是贫血的诱因, 为此 ClO₃⁻ 和 ClO₂⁻ 被美国等许多国家列为消毒副产物控制指标. Rikken 等^[22] 调查发现, 氯酸盐对水生生物的毒害效应与生物物种有关. 其中 KClO₃ 对鱼类和大型无脊椎水生生物的多样性影响不大, 急性毒性质量浓度分别为 2 442 和 3 815 mg · L⁻¹, 但对藻类影响较大, 尤其对褐藻毒害效应最强^[7,23]. 本试验中测得的 LC₅₀ 大于以上结果, 说明蝌蚪对 KClO₃ 的毒性不敏感. Germgard^[24] 研究发现, 动物吸收 KClO₃ 后, ClO₃⁻ 强氧化作用可引起高铁血红蛋白血症、溶血性贫血和肾脏中毒, 鸟误食 KClO₃ 后会降低其产蛋的能力和数量, 但还未发现对蜜蜂有明显的毒害效应. 我们应用蚕豆根尖微核技术对 KClO₃ 毒性检测发现, 不同浓度的 KClO₃ 均会诱导蚕豆根尖细胞有丝分裂、微核率、染色体畸变率和污染指数的增加, 表明 KClO₃ 在一定浓度范围内对细胞有致畸和诱导效应^[25]. 氯酸盐对动物毒害效应的机理主要是 ClO₃⁻ 破坏了这些生物的新陈代谢, 导致其生命活动出现异常^[7,26-27].

3.2 联合毒性机理探讨

在实际环境条件下,污染物质的种类是多样的,它们之间的作用也是极其复杂的.因此,研究污染物之间的相互作用具有十分重要的理论意义和实际应用价值.如广西桂东南某矿区复垦农田,其中的重金属含量较高,其上游的氯酸盐化工厂污水就可能与重金属产生复合污染效应.在单因子污染胁迫下,污染物对水生生物的毒害效应基本上决定于污染物本身的理化性质.而在复合污染条件下,由于污染物的交互作用,其毒害效应可能会产生变化.除了各污染物的理化性质之外,各污染物的浓度水平的组合也起到重要作用.因此,复合污染生态毒理效应是相当复杂的.

Cd^{2+} 与 As^{3+} 共存时对蝌蚪的毒性效应表现为拮抗作用,这已为大多数研究者证实^[16-18],本试验结果进一步证实了这一点.金属之间的拮抗作用,其机制之一是相互置换^[19-20]. Cd^{2+} 与 As^{3+} 具有相似的结构,其化学反应与物理性质等都相近,因此有可能发生置换反应. $KClO_3$ 与 Cd^{2+} 以及 $KClO_3$ 与 As^{3+} 双因子对蝌蚪的联合毒性表现为协同作用,产生这种现象的原因可能是由于 $KClO_3$ 的强氧化性,使得生物膜系统受到氧化损害,导致 Cd^{2+} 、 As^{3+} 离子穿越生物膜的通透能力增加,对机体的毒性作用增强,所以 $KClO_3$ 与重金属离子 Cd^{2+} 、 As^{3+} 共存时表现为协同作用,关于其作用机理还有待深入研究.

参考文献:

- [1] DASGUPTA P K, MARTINELANGO P K, JACKSON W A, et al. The origin of naturally occurring perchlorate: The role of atmospheric processes [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39(6): 1569-1575.
- [2] COATES J D, ACHENBACH L A. Microbial perchlorate reduction: Rocket-fuelled metabolism [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(7): 569-580.
- [3] STOKSTAD E. Debate continues over safety of water spiked with rocket fuel [J]. *Science*, 2005, 307(5709): 507.
- [4] MOTZER W E. Perchlorate: Problem, detection, and solution [J]. *Environ. Foresics*, 2001, 2(4): 301-311.
- [5] 曾祥有,黎华寿,陆宏谋,等. 氯酸钾对龙眼产期的调控效应 [J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(5): 573-576.
- [6] SUBBADRABANDHU S, YAPWATTANAPHUN C. Regulation of flowering time for off-season production of Longan Thailand [J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 558: 193-198.
- [7] 黎华寿,张修玉,姜春晓. 氯酸盐生态毒理研究进展 [J]. *生态学杂志*, 2005, 24(11): 1323-1328.
- [8] VAN WIJK D J, HUTCHINSON T H. The ecotoxicity of chlorate to aquatic organisms: A critical review [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 32(2): 244-253.
- [9] 杨亚琴,贾秀英. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对蟾蜍蝌蚪的联合毒性 [J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(3): 356-359.
- [10] 王寿兵,郭锐,屈云芳,等. Cu 对中国林蛙蝌蚪的急性毒性 [J]. *应用生态学报*, 1998, 9(3): 309-312.
- [11] 周永欣,章宗涉. 水生生物毒性试验方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1989: 75-106.
- [12] 修瑞琴,许永香. 水生毒理联合效应相加指数法 [J]. *环境化学*, 1994, 13(3): 269-272.
- [13] MARKING L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures [J]. *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, 1977, 634: 99-108.
- [14] Joint IMCO/FAO/UNESCO/WMO Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Abstract of the reports of the first session [J]. *Water Research*, 1969, 3(12): 995-1005.
- [15] 蔡道基. 化学农药环境安全评价试验准则 [M]. 北京: 国家环境保护局, 1989.
- [16] 欧小兵,李海云,陈永煌,等. 铜、镉对水螅的急性和联合毒性作用 [J]. *环境污染与防治*, 2006, 28(8): 584-588.
- [17] 王桂燕,周启星,胡筱敏,等. 四氯乙烯和镉对草鱼的单一与联合毒性效应 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18(5): 1120-1124.
- [18] 修瑞琴,许永香,高世荣,等. 砷与镉、锌离子对斑马鱼的联合毒性实验 [J]. *中国环境科学*, 1998, 18(4): 349-352.
- [19] 刁书永,张立志,袁慧. 镉中毒机理研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2005, 26(5): 49-51.
- [20] 任继平,李德发,张丽英. 镉毒性研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2003, 15(1): 1-6.
- [21] 李友. 砷中毒机制研究进展 [J]. *国外医学: 卫生学分册*, 2001, 28(5): 261-314.
- [22] RIKKEN G B, KROON A G, GINKEL C G. Transformation of (per) chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: Reduction and dismutation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45(3): 420-426.
- [23] DOLF J W, SANDER G M, GARTTENER C M. Toxicity of chlorate and chlorite to selected species of algae, bacteria, and fungi [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1998, 40(3): 206-211.
- [24] GERMGARD U. Chlorate discharges from bleach plants: how to handle a potential environmental problem [J]. *Paperi Puu-Paper Timber*, 1989, 71(3): 255-260.
- [25] 黎华寿,张修玉. 氯酸钾污染对蚕豆根尖细胞的遗传毒性效应 [J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5): 1013-1017.
- [26] Environmental Protection Service of Canada. Sodium chlorate: Environmental and technical information for problem spills [M]. Wttawa: Technical Branch of the Environmental Protection Service, 1985.
- [27] AGAEV R, DANILOV V, KHACHATUROV V, et al. The toxicity to warm-blooded animals and fish of new defoliant based on sodium and magnesium chlorates [J]. *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal*, 1986, 1: 40-43.