



## Abstract

The toxicity of Rac-metolachlor, S-metolachlor and butachlor on three algae was carried out. The results showed that these herbicides had inhibition action of different degrees on algae of *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. Preliminary toxicity assays using algae showed that sodium thiosulfate transformation largely eliminated the acute toxicity of Acetanilide herbicide to this organism. These results suggested that sodium thiosulfate transformation of Acetanilide herbicide was a benign chemical approach that may be used for mitigating environmental and health risks.

Results showed that S-metolachlor was more toxic than Rac-metolachlor and butachlor of algae. When the herbicides were presented in low concentrations, growth of algae was stimulated. The growth of algae were closely relative to the concentration of herbicides, results showed that the inhibition of algae was stronger with herbicides in higher concentration.

Sodium thiosulfate could eliminate the toxicity of Rac-metolachlor, S-metolachlor and butachlor to promote the growth of *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. When herbicides were below 96h-EC50, the *Chlorella pyrenoidosa* grew well with Sodium thiosulfate, while herbicides were above 96h-EC50, the Sodium thiosulfate was not effective.

Preliminary toxicity assays using *Chlorella pyrenoidosa* showed that Sodium thiosulfate transformation largely eliminated the acute toxicity of Rac-metolachlor and S-metolachlor to this organism. The study showed that 24 hours' pre-reaction of Sodium thiosulfate and S-metolachlor, the effect of inhibiting growth of *Chlorella pyrenoidosa* delayed. Results showed that 24 hours' reaction of Sodium thiosulfate and S-metolachlor could remediate the growth of *Chlorella pyrenoidosa* in 96 hours, however, the reaction of Sodium thiosulfate and Rac-metolachlor showed not effect.

**key word:** Acetanilide herbicide, algae, toxicity, sodium thiosulfate, remediation



## 第一章 文献综述

### 1.1 前言

随着人类文明的进步，社会的发展，农药已日益成为农业生产中不可缺少的生产资料。1957-1995年，美国经批准使用的农药活性成分已经从11种增加到了105种。1971-1987年间，美国的除草剂使用量增加了180%，加拿大增加了三倍。瑞典现在每年农药的使用量将近1700吨。我国每年农药施用面积达 $1.5 \times 10^8$ ha，施用量达到50-60万吨。农药的广泛使用也给环境带来了严重的污染。对瑞典9个小型农用集水区的地表水的监测表明，销售量最多的农药是最经常检测到的。监测研究表明，美国城市地表水普遍被杀虫剂污染，特别是有机磷酸酯和氨基甲酸酯类农药的污染，因其水生毒性而被特别关注（Bondarenko S, 2004），最近的研究表明，合成除虫菊酯能经由地表水进入水生系统（Lee S, 2004）。农药美国环保局预测，在美国已有165000公里的河流，830000公顷的湖泊和水库受到农业生产活动中农药的影响（USEPA, 1993）。

酰胺类除草剂是目前应用广泛的芽前除草剂，在近代农田化学除草剂中占居重要地位。由于其除草效果好、杀草谱较广、使用方便，主要用于大豆、谷物及其他几种阔叶草的优先控制（刘惠君等, 2004）。自1956年旱田除草剂二丙烯草胺开发成功后，酰胺类除草剂发展到目前已有53个品种商品化。1996-1997年平均年销售额达16亿美元，仅次于有机磷除草剂而居世界第二位，其应用作物种类与使用面积均居除草剂前列。丁草胺、乙草胺和草甘膦，是我国使用最多的三种除草剂。在氯代乙酰胺类除草剂中，用量最大的品种是乙草胺、甲草胺和异丙甲草胺，其年销售额分别为2.0、1.7、3.6亿美元。据估计酰胺类除草剂在美国每年的使用量超过453600000kg。

### 1.2 酰胺类除草剂的理化性质

酰胺类除草剂根据其化学结构和生理活性的不同分为两类：芳酰胺类和氯代乙酰胺类。芳酰胺类品种主要有：敌稗、萘丙胺、苯噻草胺等。氯代乙酰胺类品种主要有：甲草胺、乙草胺、丙草胺、丁草胺、异丙甲草胺等。

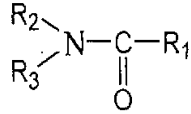


图 1.1 酰胺类除草剂的结构通式

酰胺类除草剂化学结构通式如图 1.1 所示。以不同的取代基来置换 R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>，而形成特性各异的酰胺类除草剂品种。

异丙甲草胺 (metolachlor)，化学名称为[2-乙基-6-甲基-N-(1-甲基-2-甲氧乙基)氯代乙酰替苯胺]，又名都尔、甲氧毒草胺、稻乐思等。属乙酰胺类芽前选择性除草剂，广泛用于旱作地和水田。异丙甲草胺是一个品质优良的选择性旱田芽前土壤处理除草剂，防除禾本科杂草非常有效，可用于十字花科、伞形花科、百合科、豆科、茄果类、马铃薯、生姜等蔬菜、果园、苗圃使用，防除牛筋、马唐、狗尾、稗草、画眉草等一年生禾本科杂草，马齿苋、藜、蓼等阔叶杂草以及碎米莎草、油莎草等，对棉花、花生、向日葵、马铃薯、甜菜和大多数的阔叶作物，混剂可用于蚕豆、胡萝卜、大麻、辣椒等。药剂主要通过幼芽吸收，单子叶杂草主要是芽鞘吸收，双子叶杂草主要通过幼芽及幼根吸收，向上传导，抑制幼芽与根的生长，敏感杂草在发芽后出土前或刚出土即中毒死亡。作用机制主要是抑制杂草蛋白质的合成。异丙甲草胺被美国环保局定为 C 类致癌物，表明致癌证据有限，该品急性经口 LD<sub>50</sub> 2780mg/kg，急性毒性比较高，对人、畜低毒，对皮肤有轻微刺激作用，对鸟类低毒，对蜜蜂有胃毒作用，但无接触毒性。然而它对温水和冷水鱼有中等毒性。此外由于异丙甲草胺在可食性鱼体内的生物富集，引起了人们对健康的广泛关注（徐军等, 2004）。

异丙甲草胺 (metolachlor) 因其含有两个手性中心：手性 N 轴和手性碳，而有 4 个立体异构体即 aR<sub>1</sub>'S-、aS<sub>1</sub>'R-、aR<sub>1</sub>'R-和 aS<sub>1</sub>'S-（如图 1.2 所示）。最初，市场上出售的异丙甲草胺为外消旋产品（张大同等, 2004），20 世纪 90 年代由瑞士先正达公司研制开发出异丙甲草胺高效异构体（1'S 对映体）—金都尔（英文通用名为 S-Metolachlor，英文商品名为 Dual Gold），其 96% 乳油的杀草谱和使用范围与 72% 都尔相同，活性比都尔提高 1 倍以上，大大减少了单位面积用量，减轻对环境的污染，从而逐步将外消旋体取代。

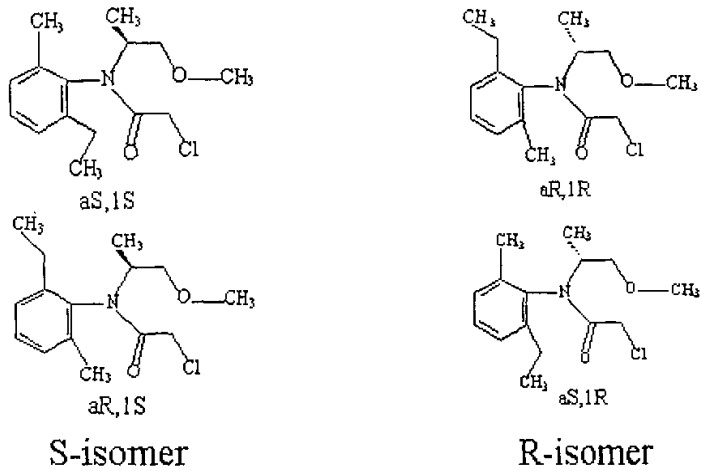


图 1.2 异丙甲草胺的四个对映体

丁草胺(butachlor), 化学名称为 N-(丁氧甲基)- $\alpha$ -氯- $\alpha'$ , 6'-二乙基乙酰替苯胺, 是一种内吸传导型苯乙酰胺类除草剂, 已逐步成为我国用量最大的三种除草剂之一(田芹等, 2004)。年产量达  $10^4$ t 以上, 且呈不断增加的趋势(胡笑形, 1998)。丁草胺在土壤中有明显的持留性(苏少泉, 1989), 对水生生物具有较高的毒性(Chen Y L et al, 1999; Chiang H C et al, 2001; Chiang H C et al, 1997)。

### 1.3 酰胺类除草剂的研究现状

除草剂是用来杀死或损伤植物的, 因而其作用机制往往与光合作用, 呼吸作用等, 以及蛋白质, 类胡萝卜素和脂类的合成有关。在自然界中, 除草剂或它们的代谢产物的修饰和生物浓缩是生态学所关心的问题。因为这些异生素可能会抵抗进一步的降解因此仍然对高等生物构成威胁。下面就从除草剂的作用机理, 水解及毒理学三个方面介绍目前的研究现状。

#### 1.3.1 酰胺类除草剂的作用机理

##### 1. 除草剂在植物体内的代谢

除草剂分子在植物体内通过其官能团或反应基的变化进行代谢。通常, 在芳环与杂环除草剂中经常存在的此类反应基有 -OH、-CH<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NO<sub>2</sub>、-OCH<sub>3</sub>、-SCH<sub>3</sub>、-C≡N、-CONH<sub>2</sub>、-COOH、-Cl、-Br、-F、-I 等; 包括这些反应基在内的



除草剂生物转变作用或代谢反应有氧化、还原、水解、脱水与脱卤、交换、酰化与脱烷基化反应、环化与异构化作用、以及环的裂解与缀合反应(苏少泉, 2003)。

## 2. 除草剂在植物体内的代谢机理

通常, 除草剂在植物体内通过三个阶段完成其全部代谢过程, 即代谢作用—缀合作用—分离, 从而使其生物活性完全丧失。第一阶段是氧化、还原与水解反应。通过引入-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH 与-COOH 等官能团, 促使化合物活性下降、极性增强, 为下一步代谢作准备。这一阶段代谢作用的生物化学反应主要是酶催化的反应以及非酶过程。酶促反应包括: a. 双功能氧化酶或过氧化物酶诱导的氧化作用; b. 硝基还原酶诱导的硝基还原作用; c. 水解酶诱导的除草剂分子的酰胺及酯的水解作用。第二阶段的代谢主要是合成过程, 即酶催化第一阶段产生的代谢产物与糖、三肽谷胱甘肽、氨基酸等进行缀合作用, 形成对植物无毒、高度水溶性、移动性很差的缀合物, 此类代谢反应主要是谷胱甘肽-S-转移酶及尿苷二磷酸葡萄糖转移酶诱导。第三阶段中, 分子在液泡膜或质膜内通过与 ATP 结合而产生的缀合物进一步进入液泡或非原质体。

另外, 一些除草剂品种实际上是前除草剂(pro-herbicide)本身不具备杀草活性, 而是在植物或土壤中通过酶或非酶催化的反应形成的代谢产物产生杀草作用。70 年代发现的苯氧丁酸类化合物如 2, 4-D 丁酸、2 甲 4 氯丁酸等即除草剂的代谢活化的典型(苏少泉, 2001)。在大多数情况下, 除草剂的选择性与其代谢作用密切相关, 抗性植物能够迅速代谢除草剂使其活性丧失。

## 3. 除草剂在植物体内代谢的研究

研究表明, 在除草剂的代谢过程中, 谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)与细胞色素 P450 单加氧酶两种酶系统起着重要作用。对于大多数除草剂来说, GSTs 的缀合作用对于其在植物体内的代谢非常重要。GSTs 是存在于植物与动物体内的一类多功能酶, 此类二聚体酶存在于植物发育的每个阶段, 它们催化一系列疏水、亲电子除草剂的缀合作用, 其功能是保护细胞免受氧化伤害, 在激素调控中也起作用。所有有机体都含有多种 GSTs 同工酶。从玉米体内分离出 8 种胞液 GST 同工酶, 7 种二聚体同工酶, 它们均参与除草剂的代谢(Cole, 1994)。三氯苯、氯代乙酰胺、芳氧苯氧丙酸、二苯醚、磺酰脲、硫代氨基甲酸酯等多种类型除草剂在作物体内均是由 GSTs 催化与还原性谷胱甘肽(GSH)或高谷胱甘肽(hGSH)进行不



可逆的缀合作用进行代谢的 (DeRidder et al, 2002)。

p450 酶系是结合在内质网膜上含硫醇血红素的氧化酶。在高等植物中执行着各种不同功能,包括植物正常生长发育所必需的初级代谢物和次级代谢物的生物合成,以及异生化合物的代谢作用等。对除草剂在作物体内的氧化代谢中亦起着重要作用。P450 诱导是使除草剂丧活性的主要代谢反应,反应及反应位点根据化合物类别及结构的差异有所不同。P450 可催化除草剂在植物体内主要发生芳基或烷基水解反应和 O, N-脱烷基作用 (欧晓明等, 2000)。前者是细胞色素 P450 羟基化酶诱导的除草剂最普遍的代谢反应。P450 诱导苯基脲除草剂绿麦隆,通过环-甲基羟基化作用及 N-脱甲基作用而解毒。

#### 4. 酰胺类除草剂的作用机理

农药可以根据它们的作用机理分类。如有机氯杀虫剂,有机磷杀虫剂和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用机理首先是破坏神经;除草剂攻击的则是光合作用路径 (DeLorenzo et al, 2000)。广泛使用的氯代苯氧型除草剂,包括 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid), 和 MCPA (4-chloro-o-toloxycetic acid), 作用机理基本是模仿植物生长素的作用 (Grossmann, 2000)。当除草剂以低浓度出现在细胞的作用位点时,通常能够刺激细胞的分裂和延长,但是当浓度增加时,24h 的诱导就能发现生长畸形 (Grossmann, 2000)。包括影响茎叶的弯曲,抑制芽和根的生长,还有对叶子色素沉着的强化。这些植物的变态也包括了生化反应,如乙烯基的生产过剩导致气孔关闭和随之而来的碳同化作用受抑制,暴露的最后结果就是干燥,坏死和植株的死亡。

酰胺类除草剂(如敌稗)在植物体内几乎不输导,只能在药剂接触部位起作用,不仅破坏植物的光合作用,而且还抑制呼吸作用,干扰核酸与蛋白质合成等。酰胺类除草剂的作用机理一般是抑制脂类合成或抑制细胞分裂与生长,对植物呼吸具有抑制作用,主要是抑制呼吸作用中含硫基酶的活性。一些酰胺类除草剂可作为电子传递抑制剂、解偶联剂对植物的光合作用产生抑制,如异丙甲草胺可显著地抑制小球藻在叶绿体形成之前的光合作用,甲草胺、毒草胺等氯代乙酰胺类除草剂还可抑制蛋白质的合成,特别是抑制赤霉素诱导蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶的形成。氯代乙酰胺类除草剂的另一主要作用机制是对植物膜的影响,例如异丙甲草



胺可伤害形成的细胞器膜，破坏膜的结构和生物化学状况，从而抑制组织内养分的传导（秦瑞香等, 2003; 唐除痴, 1998）。

研究证明，酰胺类除草剂抑制脂类、类黄酮、类异戊二烯、角质层蜡质、脂肪酸与蛋白的生物合成，进而抑制细胞分裂和吸收，影响乙酸-CoA 的代谢作用（Boger et al, 1997）。试验证明，<sup>14</sup>C-油酸向非脂类部分的渗入作用对氯代乙酰胺类除草剂最敏感，酰胺类除草剂明显抑制油酸向非溶性细胞壁残留中渗入。5 $\mu$ mol 甲草胺或吡啶草胺（metazachlor）就能严重影响 *S. acutaus* 脂肪酸合成，使脂肪酸组成发生变化（Couderchet et al, 1980）。丙草胺与异丙甲草胺能抑制植物体内长侧链脂肪酸的合成及不饱和脂肪酸向非脂类部分的渗入（樊邦棠等, 1991）。

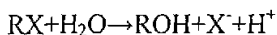
### 1.3.2 酰胺类除草剂在环境中的水解

农药的水解是农药及其降解产物在环境中迁移转化的重要途径。水解反应与农药在水环境中的持久性密切相关，是影响农药在环境中归宿机制的主要判据之一，也是评价农药在水体中残留特性的重要指标（樊邦棠等, 1991）。水解反应是许多农药在环境中消解的主要途径，对预测农药在水体中的归宿机制，残留特性，迁移转化，对靶标和非靶标生物的毒理效应有重大的意义。

农药进入环境后的水解反应主要有三种类型：

#### 1. 化学水解

化学水解即农药分子 RX 与水分子发生化学作用，基团 R 与 X 间的键断裂，形成新的共价基团 OH。反应方程式（樊邦棠等, 1991）如下：



通常的水解反应为亲核取代反应，一个亲核基团(H<sub>2</sub>O 或 OH<sup>-</sup>)进攻亲电基团（C, P 等），并取代一个离去基团（F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>等）。由于亲电基团上离去基团的差异性，使得水解反应表现出不同的反应机理。

酰胺类除草剂水解反应的活性中心不是酰胺基功能基团，一般是脱去分子中的氯原子。郑和辉等研究了乙草胺和丁草胺两种除草剂在恒温 25℃, pH4、7、10 的蒸馏水和河水中的水解动力学。结果表明酰胺类除草剂的水解反应属于一级反应（郑和辉等, 2001）。



## 2. 生物水解

农药在动植物体或微生物体内通过酶的生物化学作用进行水解代谢即生物水解。水解代谢的部位通常在酯键，卤素，醚键和酰胺键，代谢产物一般都已失去毒性。已知水解酶是生物体内分布最广种类最多的一种酶（Wu J et al, 2000）。几乎所有的有机磷酸酯类农药，氨基甲酸酯类农药，除虫菊酯类农药都能在微生物中发生水解代谢。

## 3. 光水解

农药在光的催化作用下也能进行水解代谢，光解依然是水体中农药降解的主要途径。这类水解代谢通常为亲核取代反应。多数含醚键或酯类的农药化合物，在体系中有水或湿气存在时，用紫外光照射，就能发生水解反应，水解的部位一般在酸性最强的酯基或醚键上。研究丁草胺在氙灯、高压汞灯光照下于不同类型水中的光化学降解（花日茂, 1999），结果表明丁草胺在氙灯光照作用下，其光解速率为纯水> 河水> 塘水> 稻田水；丁草胺在氙灯光源下的光解速度比高压汞灯低；其光解率与浓度(剂量) 呈负相关；充 N<sub>2</sub> 脱 O<sub>2</sub> 使丁草胺的光解速度减缓。丁草胺的光解率与单位丁草胺分子接受的光能呈正相关，即当光能一定时，丁草胺分子数越多，单位丁草胺分子接受的光能就越少，分子裂解也就越少，其光解率就越小，符合农药降解的一般规律。

农药的水解反应活性与农药的结构，亲核试剂的类型和碱性，离去基团的性质，溶剂的类型和溶剂化因子等因素有关，另外，环境的 PH 值，温度等因素也影响着农药的水解。

丁草胺和乙草胺的水解动力学及水解产物的试验结果显示，酰胺类除草剂是不易水解的化合物，在 PH4~10 范围内，丁草胺和乙草胺的半衰期都在 600d 以上（Zheng H H et al, 2001）。酸性条件有利于水解，乙草胺和丁草胺在 PH=4 时的水解速率较 PH=7 时快将近一倍。乙草胺比丁草胺更难水解。王敏欣等研究了酰胺类除草剂异丙甲草胺在不同缓冲体系中水解的温度效应（王敏欣等, 2002）。当反应体系温度升高时，异丙甲草胺的水解速率显著加快，相应的水解半衰期明显缩短。强酸条件下，异丙甲草胺的水解活化能大于强碱条件，异丙甲草胺在碱性体系中的水解反应更容易进行。





### 1.3.3 酰胺类除草剂在环境中的光解

农药的光降解是农药及其中间体在环境中的一种重要的降解途径。通过对农药的光降解研究，能够较简单地获得一系列的光降解产物以推测其在环境中的降解途径，了解农药使用的安全性，并指导农药的设计合成（王琪全等, 1999）。

农药在环境中的光解过程可分为直接光解和间接光解。直接光解即农药分子直接吸收太阳光能而发生的分解反应，间接光解包括光敏化光解和光诱导降解。这是因为环境中存在的某些物质吸收光能呈激发状态，能够有发一系列农药参与反应，最终完成农药的光化学转化。光化学反应的类型包括以下五种：

#### 1. 光氧化反应

光氧化是农药光解的重要途径。在氧气充足的环境中，许多农药一旦有光照，就比较容易发生光氧化反应。发生光氧化的农药分子一般是较大的有机分子，含苯环。芳环上的烷基在水溶液中羟基自由基的作用下被氧化为羰基（Moza et al, 1992），或进一步被氧化为羧基。值得注意的是，某些农药氧化产物的毒性大于原药（刘维屏, 2006）。

#### 2. 光水解反应

大多数醚或酯类农药化合物在湿气环境中，以紫外线照射就能发生光水解反应。随着农药光水解研究的深入，人们开始研究光敏剂、催化剂和氧化剂对水解作用的加速。研究表明（王一茹, 1996），模拟太阳光的紫外光，水体中的丙酮可以加速丁草胺的光解，而水体的 pH 值和溶解氧对丁草胺的光解并无影响； $H_2O_2$  可诱发化学氧化和水解，同时加速光解反应。花日茂等研究表明，当水中含有腐殖质时，丁草胺的光解速度加快（花日茂, 1999）。不同农药的相互作用在农药光解中也有所体现，研究了苄嘧磺隆等 9 种常用除草剂、杀虫剂、杀菌剂对除草剂丁草胺在水中的光解作用影响（花日茂, 1999），结果表明：苄嘧磺隆等 9 种农药使丁草胺光解速度减缓，表现出显著的光猝灭降解效应，其中草甘膦、甲基对硫磷及乙草胺光猝灭效率较高，其光猝灭作用强度与甲基对硫磷和氟乐灵、草甘膦、苄嘧磺隆的剂量成正相关。

#### 3. 光还原反应

许多有机氯农药可以进行还原脱氯光化学分解。五氯酚在光照下能被羟基取代氯原子，2, 4-D 水溶液在紫外线下，环上的氯原子亦能逐步被羟基取代。在



日本，利用  $\text{TiO}_2$  光催化剂分解各类农药的研究已全面展开（文晨等, 2003）。诸多实验结果表明，无论分解效率如何，所有的农药都能够被  $\text{TiO}_2$  分解，只有三氮杂苯类化合物，例如除莠剂(莠去津)和除草剂(西玛津)类的农药光催化分解相对比较困难。

#### 4. 光促分子重排和光异构化

一般认为，许多农药化合物在光分解过程中本身会产生自由基，这样在一定条件下就会发生重排。

#### 5. 光敏化作用

光敏化光解属于间接光解的一种。自然界中存在着许多天然的光敏化剂和光促灭剂，如丙酮，鱼藤酮，色胺酸，腐殖质等，它们影响着农药在环境中的光化学反应过程。

研究影响烯草酮降解的因素（张浩, 1997），结果表明，施药后 72 h 的烯草酮在微生物，腐殖酸和单线态氧作用下，相对降解率分别为 31%，52.61%和 18.15%，而水溶性中的烯草酮在光和腐殖酸的作用下，不产生降解。研究了土壤，腐殖酸，粘土矿对绿草定的吸附及溶液中的光降解（刘维屏, 1995），郑和辉等采用实验室模拟实验研究了水分、pH 值和表面活性剂对乙草胺和丁草胺在土壤中的紫外光降解行为的影响（郑和辉等, 2002）。结果表明，在湿度 80% 的土壤中，丁草胺和乙草胺的光解深度及光解速率均大于无水条件。随土壤 pH 值的增大，丁草胺在土壤中的光降解速率加快和光解深度加深。低浓度的阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠（DDBS）促进丁草胺在土壤中的光解，使丁草胺在土壤中的光解深度增加。高浓度的 DDBS 对丁草胺在土壤中的光解有阻碍作用。阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵（HDTMA）对丁草胺在土壤的光解也有阻碍作用。

研究表明，磺酰胺类除草剂氯磺隆在酸性环境中容易水解，中性环境和碱性环境不利于水解反应的进行，在土壤和水体中的降解是遵循准一级动力学的双分子亲核取代反应；而微生物的降解对杂环更敏感；光化学降解是其在环境中消失的次要途径（李伟等, 2002）。



## 1.4 除草剂的毒理学研究

### 1.4.1 除草剂对土壤微生物的影响

土壤微生物是土壤生物群落中种类最多的一种，不仅对土壤的发生，发育，土壤肥力的形成和植物营养元素的迁移转化起重要作用，对土壤中有机污染物和农药的分解净化的作用亦不可忽视。因此，农药影响着土壤中的微生物，也影响着土壤的生化过程，最终影响土壤的肥力和植物生长。

#### 1. 除草剂对土壤中微生物群落和数量造成一定影响

于建垒等研究表明，除草剂苯黄隆在一定浓度下对土壤微生物种群数量及土壤中细菌、放线菌、真菌生长速率有一定的抑制作用（于建垒等, 2000）。农药的施用使土壤微生物群落趋于单一化，这种趋势将改变土壤原有的平衡状态，破坏其原有的生物功能，影响到物质循环和能量循环（刘维屏, 2006）。而且长期使用单一的除草剂，土壤中分解此种药剂的微生物增加，从而能缩短除草剂的残效期。研究了草甘膦在 5 种浓度下对土壤微生物种群数量及土壤中细菌、放线菌、真菌生长速率的影响（邓晓, 2005），结果表明，在供试浓度下，该除草剂对土壤微生物的种群数量及土壤中细菌、放线菌和真菌生长速率均具有一定的抑制作用。并随药剂浓度的升高抑制作用逐渐增强。随着加药时间的延长，对土壤微生物的抑制作用又逐渐减弱。研究了灭草松、莠去津、灭草松+莠去津及灭草松+莠去津+表面活性剂对土壤微生物活性的影响（李克斌, 2004）。结果表明，莠去津、灭草松在 10 倍推荐用量下会使土壤细菌数略有减小，真菌数略有增加，细菌/真菌数之比减小。也有研究表明，苯氧羧酸衍生物（2, 4-D、2-甲-4-氯）除草剂的用量即使高于通常田间剂量 100 倍，也不影响土壤微生物总量。草多索(endothal)和百草枯能短时间地增加土壤生物量。在灭草隆、敌草隆、茅草枯、毒莠定、三氯乙酸钠、敌草索(dacthal)、杀草敏(pyramin)和苯胺灵作用下，土壤微生物总量不会发生改变。可乐津(chlorazine)、环莠隆(cycluron)、地乐酚能先使土壤微生物量受到轻微抑制，而后促使其增加。使用五氯酚时也能观察到类似情况。增加地乐酚、茅草枯和扑草灭的用量，能抑制土壤微生物 2-3 个月的生长繁殖(Boeb, 1989)。国外早有有关氯乙酰胺类除草剂的微生物降解的研究报道（Stamper et al, 1998; Pothuluri et al, 1997）。乙草胺对土壤微生物种群数量及土壤中细菌、放线



菌和真菌生长速率均有一定的抑制作用(于建垒等, 2001)。罗海峰等研究了乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响(罗海峰等, 2004), 在实验室条件下, 将农田土壤分别用终浓度为 1.0mg、5.0mg 和 10.0mg/g 土壤的乙草胺处理 40d 后, 检测可培养的异养细菌的多样性和细菌物种多样性。结果显示乙草胺对土壤中的 Proteobacteria 的  $\alpha$ -Proteobacteria 和  $\gamma$ -Proteobacteria 影响明显, 表明乙草胺会在一定程度上改变土壤细菌多样性。甲磺隆除草剂在使用浓度较高时(10mg/kg)明显降低土壤微生物多样性, 并且这种抑制效果随时间而变化(姚斌等, 2004)。阿特拉津和丁草胺对水稻土微生物生物量和微生物群落结构的影响不大(姚斌等, 2004)。

## 2. 农药对土壤生化过程的影响

农药在土壤中生化过程的研究主要包括以下几个方面, 如研究农药对土壤呼吸作用, 氨化作用, 硝化作用, 固氮作用, 以及对土壤酶活性和土壤中有机残体降解的影响, 等等。徐建民研究了 3 种磺酰胺类除草剂(氯磺隆、甲磺隆、苄嘧磺隆)对微生物生物量碳、生物量氮和土壤矿化氮的动态影响(徐建民等, 2000), 研究表明, 用量为 1 mg/kg 的 3 种磺酰胺类除草剂均明显降低了微生物生物量和氮的矿化量, 尤其是施用后最初 10 d 降低幅度比较显著, 此后随着时间的增加, 除草剂的抑制效应逐步减小。在实验室条件下研究莠去津+灭草松与他们单用时对土壤呼吸的影响(李克斌, 2004), 结果表明无显著差别, 但添加表面活性剂后, 土壤呼吸增强且持续时间延长。前人对土壤氨化作用的研究表明, 除草剂和杀虫剂对氨化作用的影响甚微, 而杀真菌剂和熏蒸剂却往往可以导致土壤中氨态氮的增加。Shuka 等(1997)研究表明丁草胺主要作为胺化作用和硝化作用的 N 源, 被微生物进行降解。研究发现(张倩茹等, 2004), 乙草胺-铜复合污染比其单一污染更能降低细菌总数以及固氮菌、硅酸盐细菌和矿化磷细菌活菌量和土壤脱氢酶的活性, 更能促进土壤呼吸强度的增加。有关除草剂对土壤酶活性的影响的研究国内已有不少报道。微生物降解作用的实质是酶促反应, 微生物对农药的作用都是在酶的参与下完成的。研究了酰胺类除草剂丁草胺、乙草胺、丙草胺和异丙甲草胺(刘惠君等, 2005)在田间推荐用量下, 对土壤过氧化氢酶活性和脱氢酶活性的影响。结果表明, 培养初期, 4 种除草剂对 2 种酶活性有不同程度的抑制作用, 土壤过氧化氢酶活性于第 7d 就很快恢复, 而脱氢酶



活性在 13d 后得以逐渐恢复。土壤脱氢酶比过氧化氢酶活性变化大。

### 3. 土壤微生物对除草剂的降解

任何一种化学药剂，不管是持久的、短期的、活性的、非活性的、稳定的、迁移的，还是产生残留问题的，都可以被土壤的微生物代谢。可以说，微生物对农药的降解影响着土壤中农药的行为和归宿（刘维屏，2006）。

一般微生物对农药的降解可分为酶促作用和非酶促作用。酶促作用是微生物降解农药的主要方式，包括利用农药为碳源和氮源，通过共代谢和去毒代谢作用降解，非酶促作用则包括脱卤、脱烃、氧化、水解、还原、环裂解，以及缩合或共轭形成。最早有关微生物降解农药的报道是 Audus 研究土壤微生物对 2,4-D 的分解。瞿建宏从农田土壤中分离到可降解除草剂生产废水的 3 株假单胞菌 (*Pseudomonas spp.*)，这些菌株均能以除草剂生产废水为碳源和氮源进行生长(瞿建宏等, 2002)。前人的研究表明，有目的地接种菌群被证明是从水生和陆生环境中去除异丙甲草胺和它代谢产物的有效措施 (Liu S Y et al, 1989)。均三氮苯类除草剂在环境中的水解和光解非常缓慢，其降解和转化主要依靠微生物进行。多种细菌、真菌、放线菌、藻类可以降解和转化均三氮苯类除草剂，它们有些能以莠去津作为唯一碳源、氮源。围绕第一步反应是脱氯水解还是脱氨基、烷基，形成三种不同的微生物降解途径。但大多会转化成 2, 4, 6-三羟基一均三氮苯后再进行环的裂解（潘学冬等, 2001）。

含乙草胺的废水为高难处理有机废水，然而乙草胺在土壤中接种培养 35d 后，98.97% 被降解 (Walker et al, 1991)，Istvan 研究表明，微生物降解乙草胺的两个主要的代谢产物是氯乙酰基吡啶和脱乙氧甲基乙草胺，即 2-氯-N-(2-乙基-6-甲基苯)乙酰胺，生成的产物的植物毒性小于母体对玉米、燕麦和黑麦草(Istvan, 2000)。而 Ye 等在研究土壤微生物降解乙草胺的过程中鉴定的两个化合物是羟基乙草胺和 2-甲基-6-乙基苯胺，推测乙草胺生物降解的第一步可能是脱氯和羟基化，形成羟基乙草胺，在乙醚和羰基的 C 与 N 之间的键断裂形成 2-甲基-6-乙基苯胺 (Stamper et al, 1998)。甲草胺属于难降解有机化合物，在土壤中接种 28d 后，仅有不到 50% 被降解。和异丙甲草胺异样，目前还没有发现微生物能完全矿化甲草胺。微生物对丁草胺的降解是土壤中丁草胺迁移转化的主要途径 (田芹等, 2004)。丁草胺在土壤中微生物降解研究发现，绝大多数毛霉能有效降解丁草



胺，链霉 NTU-014 几乎无降解的作用，而 M:sufui NTU-358 则能将丁草胺转化为至少 12 种代谢产物，青霉与曲霉则吸收大量丁草胺。研究发现 (Lee et al, 2000) 球毛壳 (*Chaetomium globosum*) 可将丁草胺分解为至少 10 种代谢产物。*F. solani* 可将丁草胺降解至少 30 种衍生物，主要的降解途径包括:脱氯作用、羟基化作用、脱氢作用、甲氧基脱丁烷支链、碳端脱烷基作用、氧端脱烷基作用及环化作用。通过测定微生物的生长率 (Lee et al, 1992) 及研究细菌单独作用和细菌与真菌共同作用对丁草胺降解的影响,说明了微生物在丁草胺降解中的重要作用。

#### 1.4.2 除草剂对水生微生物的影响

微生物是水生生态系统的重要组成部分, 包括>50,000 个不同细菌,藻类,真菌和原生动物,是第一生产力,在主要营养循环和分解中扮演重要角色。水生的微生物和农药相互作用的研究多数是与藻类有关的,这一部分将在下文“三种藻类的研究背景及意义”中叙述。而有关农药和水生细菌,真菌和原生动物类的研究则较少。2001 年 DeLorenzo 等综述总结了农药对水生微生物的毒性。农药对微生物种群的作用机制可能和农药对靶生物的作用机制不同 (DeLorenzo et al, 2001)。研究显示,农药干扰呼吸,光合作用和生物合成反应和细胞的生长,分裂和分子合成 (DeLorenzo et al, 1999)。Widenfalk 等人 2004 年的研究显示,苯基脲类除草剂异丙隆 (isoproturon) 抑制了细菌的活动,并对微生物生物量产生消极影响。然而,观察显示,这种抑制作用和农药浓度并非反比的关系。研究者指出,预测低浓度农药对微生物环境的影响是比较困难的。

#### 1.4.3 除草剂对陆生动物的影响

生活在土壤中的动物是土壤污染的敏感指示生物 (Wang Z-Z et al, 2000)。试验证明 (Abdul et al, 1997), 农药污染对土壤动物新陈代谢及卵的数目和孵化能力均有影响,对大型土壤动物蚯蚓有很强的致死效应,低剂量杀虫剂即可致使蚯蚓行为异常和数量剧减。调查表明,大量施用农药的农田土壤中,土壤动物多样性明显减少,90%以上蚯蚓死亡;蚯蚓细胞超微结构观察发现有明显病理性变化 (Bruce et al, 1992; Tarrant et al, 1997)。谢志浩等研究了除草剂乙草胺在不同



体积分数和染毒时间对泥鳅红细胞微核形成和核异常的影响(周常义等, 2003), 结果表明部分试验组的乙草胺诱发泥鳅红细胞微核及核异常红细胞率显著提高, 96 h 达到最大诱变效应。梁继东等以赤子爱胜蚓 (*Eisenia 血粒*) 为例, 通过滤纸急性毒性试验法研究了东北黑土区普遍存在的甲胺磷、乙草胺对蚯蚓的毒性效应(梁继东等, 2003)。单一实验结果表明, 甲胺磷、乙草胺对蚯蚓均有毒性, 毒性顺序为乙草胺>甲胺磷, 半致死浓度分别为: 0.307 和 0.708mg·kg<sup>-1</sup>; 同时通过观察可知, 乙草胺通过皮肤渗入蚯蚓体的毒性效应较甲胺磷明显, 对土壤生态系统生态安全性和土壤健康质量存在潜在危害。

由于农业环境不断恶化, 导致农田生态系统中敏感物种减少, 耐污染生物种类相对增多。王振中等研究了有机磷农药乐果、敌敌畏、甲胺磷、杀虫双对土壤动物毒性的影响。试验结果表明, 土壤动物对农药毒性反应敏感, 4 种有机磷农药处理组的动物种类和数量明显减少。动物种类的减少主要是常见种和稀有种类; 动物数量变化则主要是优势类群的数量消长。毒性毒理试验表明, 农药对蚯蚓、鞘翅目幼虫和等足类鼠妇虫等大型动物的呼吸强度有显著抑制作用, 其呼吸代谢强度随着农药处理浓度增加与染毒历时的延长而迅速减弱(王振中等, 2002)。采用农药染毒的模拟试验方法, 研究了乙草胺对中型土壤动物生物多样性的影响。发现, 在经染毒处理的土样中, 土壤动物个体数量显著减少, 与乙草胺处理浓度呈明显负相关; 土壤动物的数量随农药处理浓度的递增而显著减少, 其中以弹尾目和甲螨亚目对乙草胺最为敏感(周常义等, 2003)。

#### 1.4.4 除草剂对水生动物的影响

水生生物是被农药污染的水生态环境中最直接的受害者。农药对水生生物的影响可以表现在分子、器官、组织、个体以及种群、群落不同水平上。多数情况下, 水生生物暴露在较低浓度(亚致死)农药下, 但不论长期或是短期都会产生影响。Ralf 等人发现将石蛾幼虫分别暴露于 0.001、0.01、0.1g/L 氰戊菊酯 1h 后进行 240d 观察, 结果产生不同程度的影响: 出现短暂异常现象, 成虫干重下降, 繁殖率降低(Ralf et al, 2000)。1997 年 11 月至 1998 年 4 月和 9 月, Guillemo 等在两个海岸带(Sinaloa, NW Mexico: Ensenada del Pabellon and Buhia de Santa Maria)生态系统中检测到艾氏剂、BHCa、DDT、硫丹、对硫磷和马拉硫磷等残



留物。并且发现，由于长期暴露于这些农药中(亚致死浓度)，导致水生生物发生了一些生理和生化变化：酶活性降低、蛋白质和糖原合成降低、呼吸率增加。同时这两个海岸带作为主要的虾生产基地，农药残留物造成了虾低生长率，多病原以及高死亡率的后果 (Guillemo et al, 1999)。Lehotay 等在美国的切萨匹克湾的水样品中检测到了阿特拉津、西马津、异丙甲草胺等除草剂，而牡蛎中并无；而另外一种除草剂氟乐灵在水样品和牡蛎中都有检测到 (Lehotay et al, 1998)。周常义等研究了三唑磷对小球藻、卤虫、南美白对虾、泥蚶四种水生生物的急性毒性作用，结果显示，三唑磷对小球藻、卤虫、南美白对虾为高毒农药，泥蚶对三唑磷有很强的耐受力。三唑磷对小球藻的 48h 的  $EC_{50}$  为  $24\mu\text{g}/\text{dm}^3$ ，72h 的  $EC_{50}$  为  $15\mu\text{g}/\text{dm}^3$  (周常义等, 2003)。戴家银等以真鲷和平鲷幼体为实验材料，研究了农药对真鲷和平鲷幼体的急性毒性 (戴家银等, 1997)。实验结果表明：甲胺磷和甲基异硫磷对真鲷和平鲷幼体的毒性顺序甲基异硫磷>甲胺磷。甲胺磷对真鲷和平鲷幼体毒性相同，而甲基异硫磷对真鲷的 96h $LC_{50}$  为  $0.02\text{mg}/\text{L}$ ，对平鲷幼体的 96h  $LC_{50}$  为  $0.0014\text{mg}/\text{L}$ 。前者是后者的 14 倍。甲基异硫磷对真鲷的毒性比甲胺磷大 175 倍，而对平鲷幼体甲基异硫磷的毒性比甲胺磷毒性大 2500 倍。联合毒性实验结果表明，甲基异硫磷-甲胺磷为协同作用。

农药还可以通过食物链的富集及生物放大作用对高级营养层生物产生不良影响。在环境的污染物传递到比较高的营养级(鱼，水鸟和人类)的过程中，深海底的生物群落扮演着重要角色。浮游植物在个体或是种群组成发生变化都会影响食草浮游动物的生长 (Marie et al, 2001)。

农药对水生生物的毒性大小主要与农药自身物理化学性质和水生生物种类、基因型、生命周期、出生时的大小有关，其次还受自然界如食物的贮存、氧气的消耗和捕食者的气味等因子的影响(Hanazato et al, 2001)。因此评价农药对水生生物的影响不能只根据农药登记环境标准准则中的规定( $LC_{50}>10\text{mg}/\text{kg}$  为低毒农药， $1.0\sim 10\text{mg}/\text{kg}$  为中毒农药， $<0.1\text{mg}/\text{kg}$  为高毒农药)。针对这些问题，人们不断改进水生生态毒理学的研究方法和研究手段，提出用微宇宙系统模拟自然条件下农药对水生生物在个体、种群、群落和生态水平上的毒性效应来评价农药对水生生态环境的影响；利用农药对水生生态系统食物链中各代表性生物如藻、蚤、鱼的急性毒性、亚致死毒性和慢性毒性实验数据，评价农药对水生生物影响。





## 1.5 农药与藻类的毒理学研究

### 1.5.1 研究背景及意义

藻类植物是地球上最重要的初级生产者，藻类能通过光合作用，为无脊椎动物、鱼类、水鸟等生物提供食物。其种类多样性和初级生产量直接影响水生态系统的结构和功能，对生态系统的平衡和稳定起着极其重要的作用。

在水生生态毒理研究中，藻类由于是单细胞生物，生长周期短，对毒物敏感、易获得、个体小、繁殖快，在较短时间内可得到化学物质对藻类许多世代及种群水平的影响评价，是一个很好的测试生物（聂湘平等, 2002）。许多国家在化学品风险测试中选用藻类进行生物测试，并建立了多个藻类生物测试标准方法（朱九生等, 2004; Chen Y L et al, 1999; Chiang H C et al, 2001）。藻类也是监测评价水环境质量的重要指标。

农业生产中使用的除草剂只有 1% 被植物吸收而产生药效（李雪芹等, 2005），更多的则通过喷洒漂移、吸附作用、地表径流、雨水冲刷等方式进入大气、土壤和水环境中，对环境造成一定的危害。研究表明，除草剂对藻类的作用可直接引起生态系统的结构和功能的变化。农药对藻类的毒性，与农药在环境中的降解密切相关（虞云龙等, 1996）。研究藻类对农药的降解，对于揭示农药在生态系统中的迁移、转化过程，具有重要的理论意义，同时为去除环境中包括农药在内的有机污染物提供一条新途径。

### 1.5.2 研究现状

农药对藻类的毒性主要由农药的化学结构和理化性质决定。不同的农药对藻类的毒性不同（严国安等, 1999）。谢荣等以三角褐指藻、盐藻和青岛大扁藻为实验材料，研究了有机磷农药对三种海洋微藻的急性毒性（谢荣等, 1999）。实验结果表明，丙溴磷农药对三种微藻毒性顺序为：三角褐指藻>青岛大扁藻>盐藻。盐藻对污染物表现出较强耐受性。测试了绿藻类(*Scenedesmus quadricauda* 和 *Selenastrum capricornutum*)，矽藻类 (*Nitzschia sp.* 和 *Cyclotella meneghiana*)，和蓝绿藻(*Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria sp.*, *Pseudoanabaena sp.*, *Anabaena*



*inaequalis* 和 *Aphanizomenon flos-aquae*)暴露在 23 种农药下的生长抑制(Peterson et al, 1994)。三嗪类除草剂测试证明,浓度为 2.7-2.9mg/L 的阿特拉津,氰草津,环嗪酮,嗪草酮,西马津和浓度为 0.7mg/L 的敌草快能抑制所有测试种>50%的生长。Peterson 等人之后的研究表明 (Peterson et al, 1997), 已经有 5%的 EEC 环嗪酮类除草剂(0.14mg/L)能抑制矽藻类和绿藻类 80%的生长。除此之外, 0.005-0.1mg/L 敌草快能抑制矽藻类和蓝绿藻 50%的生长 (Peterson, 1997)。Peterson 1994 年的研究也显示了草甘磷(2.8mg/L)对矽藻属高毒。相反则发现磺酰胺类除草剂(如氯磺隆)在 EECs 标准(0.003-0.020mg/L)下并未抑制任何海藻种的生长。与 Peterson 等人的研究结果相反, Nyström 等人(1999)发现两种磺酰胺类除草剂氯杀螨和甲黄隆,在低于 EEC 规定浓度的情况下严重抑制了蓝绿藻和蓝藻聚球藻的生长。农药对藻类的影响在很大程度上表现为浓度相关性。大量实验发现许多农药在低浓度时能刺激藻类生长。Patoran 在浓度低于 1.0mg/L 能刺激栅藻的生长(M. A. El~Dib et al, 1991); 2, 4-D 和杀螟松在低浓度(1.0mg/L)时促进莱哈衣藻生长(Wong P K et al, 1988)。磷胺在低浓度可作为颤藻的氮、磷源,刺激其生长(Perona et al, 1991)。二嗪磷在 1mg/L 时促进蛋白核小球藻和羊角月芽藻的生长(Doggett et al, 1991)。农药常使藻类细胞的形态发生改变,对于固氮蓝藻还能影响异形胞出现的频率。暴露于三嗪类除草剂下的念珠藻细胞转入无除草剂介质中后,其胞壁和细胞颗粒产生扭曲(Mohapatra et al, 1992)。在苯胺类农药环境中念珠藻丝状体呈现明亮的蓝绿色(Abou W.H., et al, 1993)。在阴暗的条件下,硫丹使鱼腥藻出现丝状团而不是通常的网状(Tandon et al, 1988)。敌百虫(E. Marco et al, 1992)杀虫灵(Marco et al, 1990)和胺磷(Perona et al, 1991)使鱼腥藻 PCC7119 细胞膨大,改变异形胞出现的频率。在氟乐灵和敌稗环境中三角褐指藻细胞也膨大(Okay et al, 1994),而单甲脞可使小球藻颜色变淡,个体变小,使栅藻细胞变细、变小且不规则,色素体模糊(高玉荣, 1995)。

农药对藻类毒性的研究表明,藻对农药的毒害作用可能有七种不同反应:(1)随着浓度增加藻类对农药的敏感性急剧增加;(2)在农药低浓度时有抗性,高浓度的敏感;(3)在农药存在之初较敏感,随后产生抗性,藻能继续生长;(4)在高浓度对也有抗性,随后则藻细胞受毒害、脱色;(5)农药在有限的低浓度范围内促进藻类生长;(6)农药在高浓度时藻类的生长明显受刺激;(7)对农药有完全抗



性。

藻类对农药毒害反应的多样性决定了必须进行大量的实验，测试不同农药对藻类的毒性。

## 1.6 本文研究内容及意义

农药对藻类生态毒理学的研究，不仅有助于深入了解农药对单种藻类和藻类群落的毒性效应，评价农药的生态风险，而且有助于认识农药对生态系统结构和功能的整体效应，揭示农药在生态系统中的迁移和转化规律，从而更好地维护生态系统的健康。

本文以三种常见的酰胺类除草剂 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺、丁草胺为对象，研究了它们对三种水藻体系的作用。研究了修复剂硫代硫酸钠对 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺在蛋白核小球藻液体系中毒性效应的影响。



## 第二章 酰胺类除草剂对三种藻类的毒性效应

### 2.1 前言

农业生产中使用的除草剂只有 1% 被植物吸收而产生药效(李雪芹等, 2005), 更多的则通过喷洒漂移、吸附作用、地表径流、雨水冲刷等方式进入大气、土壤和水环境中, 对环境造成一定的危害。已有报道发现, 在地表水中有除草剂残留(Richards et al, 1993)。

藻类是淡水水体中常见的类群, 对群落初级生产及富养水体的净化起着重要作用, 其中某些种类, 特别是小球藻属的存在与否可作为水质评价的指标(Mostafa et al, 1994)。藻类是水生环境中的初级固碳生物、氧气提供者, 藻类的数量与其它生物之间存在一个动态平衡关系, 在浮游动物、大型水生植物、鱼类之间起着非常重要的营养链接作用。欧美等国大量研究表明, 多数除草剂不仅会直接对水生动植物产生毒害(Cuppen et al, 1997; Kirby et al, 1994), 而且对藻类生长有明显的抑制作用 (Abou W. H., 1991; EL-Sheekh, 1994; Faust, 1994; Fahl, 1995), 使藻类的多样性指数下降, 进而影响藻类和浮游动物种群结构和功能, 对水生生态系统产生危害。

近年来, 随着对藻类在生态毒理学方面应用的日益重视, 对藻类致毒机理的研究也逐步深入, 藻类毒理实验也逐渐由简单的以获取生长量半抑制浓度等指标为目的转向从分子水平了解有毒物质对藻类的毒性作用机理。目前已经开展的机理性研究包括毒物对藻类生物膜、光合作用、呼吸作用、固氮作用以及生化组分的影响等几方面(严国安等, 1999)。

除草剂对藻类的作用可直接引起生态系统的结构和功能的变化。农药对藻类的毒性, 与农药在环境中的降解密切相关(虞云龙等, 1996)。研究藻类对农药的降解, 对于揭示农药在生态系统中的迁移、转化过程, 具有重要的理论意义, 同时为去除环境中包括农药在内的有机污染物提供一条新途径。

国外有关酰胺类除草剂甲草胺对不同藻类的敏感性(Fairchild et al, 1998; Fairchild et al, 1997)对水体自净作用的效应(Zagorc et al, 1996)及甲草胺对藻类群落的影响有少量报道(Spawn et al, 2002)。本章研究了酰胺类除草剂 Rac-异丙甲草胺(Rac-metolachlor), S-异丙甲草胺(S-metolachlor), 丁草胺 (butachlor) 对普通



小球藻(*Chlorella vulgaris*), 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*), 斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)的毒性效应, 为客观地评价除草剂的生态风险, 筛选高效, 低毒的绿色农药提供参考, 以减少有毒物质对生态环境的毒害。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 仪器与试剂

UV-2401PC 紫外-可见分光光度计(Shimadzu 公司); RXZ 人工智能气候箱(宁波江南仪器厂); BR100 和 BR1000 移液枪(Biorad 公司), 光学显微镜, 血球计数板, 微量进样器, 各种规格的容量瓶, 三角瓶等。

UV-2401PC 紫外-可见分光光度计测定条件为: 扫描速度(Scan Speed): 快速(Fast); 狭缝宽度(Slit Width nm): 1.0;

供试样品: Rac-异丙甲草胺(纯度 $\geq 97\%$ ), 由山东滨州农药厂提供; S-异丙甲草胺(纯度 $\geq 98\%$ ), 由美国 chemical service 提供; 丁草胺(纯度 $\geq 98\%$ ), 由杭州农药厂提供。原药溶于丙酮中, 配成 1000mg/L 的母液, 所用化学试剂如表 2.1 所示:

表 2.1 实验试剂纯度及来源

试剂名称	纯度	生产厂家
丙酮	A. R.	杭州大方化学试剂厂
无水乙醇	A. R.	杭州大方化学试剂厂
磷酸二氢钠	A. R.	上海化学试剂有限公司
氢氧化钠	A. R.	上海化学试剂有限公司
硫酸铵	A. R.	上海化学试剂有限公司
过磷酸钙	A. R.	上海化学试剂有限公司
硫酸镁	A. R.	上海化学试剂有限公司
碳酸氢钠	A. R.	上海虹光化工厂
氯化钾	A. R.	宁波化学试剂厂
氯化铁	A. R.	宁波化学试剂厂



## 2.2.2 材料与方法

普通小球藻、蛋白核小球藻和斜生栅藻的藻种取自中国科学院水生生物研究所。培养基为 4 号水生培养基，培养环境为 RXZ 人工智能气候箱。培养方法是使用 500ml 三角瓶，装 200~400ml 培养液，接种藻种使成淡绿色。四层纱布封口以防污染，温度为  $24 \pm 0.5$  °C，光照在 3000~4000lx 连续静止培养。每天摇动 5~6 次，经几天培养后藻液变为深绿色。

实验开始时接种于 100ml 三角锥形瓶中，总体积为 50ml，初始接种三种藻个数范围为  $7 \sim 8 \times 10^5$  个/mL。接种后对其进行一定浓度梯度的三种酰胺类除草剂处理，每个浓度设置 3 个平行<sup>[5]</sup>。测试指标为藻类生物量的变化，分析数据得到藻类的生长曲线及 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺对三种藻的 96h-EC50。

设定异丙甲草胺和丁草胺的浓度梯度为 0、0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1mg/L，S-异丙甲草胺浓度梯度为 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1、0.2、0.5mg/L。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 藻细胞数量与光密度的线性关系

接种普通小球藻、蛋白核小球藻和斜生栅藻，分别于培养 12、24、48、72、96、120h 后取样，在波长 680 nm 处测定藻类光密度，建立不同藻类细胞密度和光密度之间线性关系，以计数的藻细胞浓度和光密度表示藻生物量，通过二者线性关系进行检验。得到回归方程如表 2.2 所示。

表 2.2 三种藻类的显微镜计数与吸光度的线性关系

藻种	回归方程	R <sup>2</sup>
蛋白核小球藻	$y=129.86x+5.5784$	0.9669
普通小球藻	$y=109.56x+5.6491$	0.9746
栅藻	$y=162.1x+1.3463$	0.9934



在以上的基础上,我们通过测定吸光度来描绘以不同农药不同浓度处理的三种藻的生长曲线。抑制率=(对照吸光度—处理吸光度)/对照吸光度。建立抑制率(P%)和浓度的自然对数(LnC)的线性回归关系,并求解抑制率为 50%的浓度 EC<sub>50</sub> 值。

### 2.3.2 Rac-异丙甲草胺对三种藻类的毒性效应

Rac-异丙甲草胺抑制蛋白核小球藻生长的实验结果如图 2.1 所示。

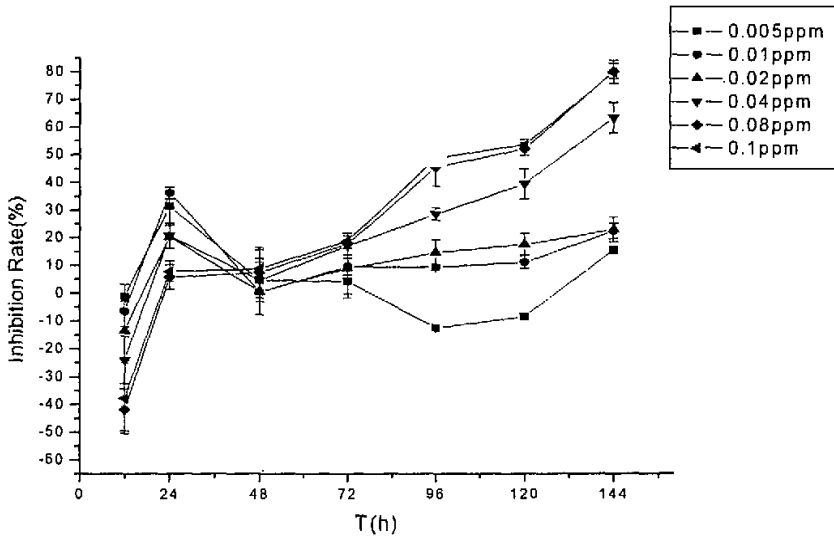


图 2.1 Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的抑制率

由图 2.1 可见,反应初期 12h 时,各个浓度的 Rac-异丙甲草胺均不同程度刺激了蛋白核小球藻生长,培养 24h,各个浓度对蛋白核小球藻生长有明显抑制的效应。低浓度组(0.005、0.01、0.02mg/L)的 Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的生长抑制率 24h 时达最大(31.2%, 36.1%, 20.2%),高浓度组(0.04、0.08、0.1mg/L) Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的生长抑制率 144h 达最大(63.3%, 80.0%, 79.7%);其中,最高浓度 0.08mg/L, 0.1mg/L 两组,蛋白核小球藻生长受抑制效应随时间增强,在 144h 后抑制效应略有减弱;实验记录显示,144h 后,蛋白核小球藻液呈黄色,出现混浊沉淀,有贴壁现象。紫外扫描藻液光密度,在 680nm 处无特定的峰。

Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻生长的影响基本表现为:刺激-抑制-抑制程



度增强。低浓度 (0.005mg/L) 的 Rac-异丙甲草胺能刺激蛋白核小球藻的生长；Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的影响表现为浓度相关性，如图 2.1 所示，Rac-异丙甲草胺浓度越高，蛋白核小球藻生长受抑制的程度越大。

Rac-异丙甲草胺抑制普通小球藻生长的实验结果如图 2.2 所示。

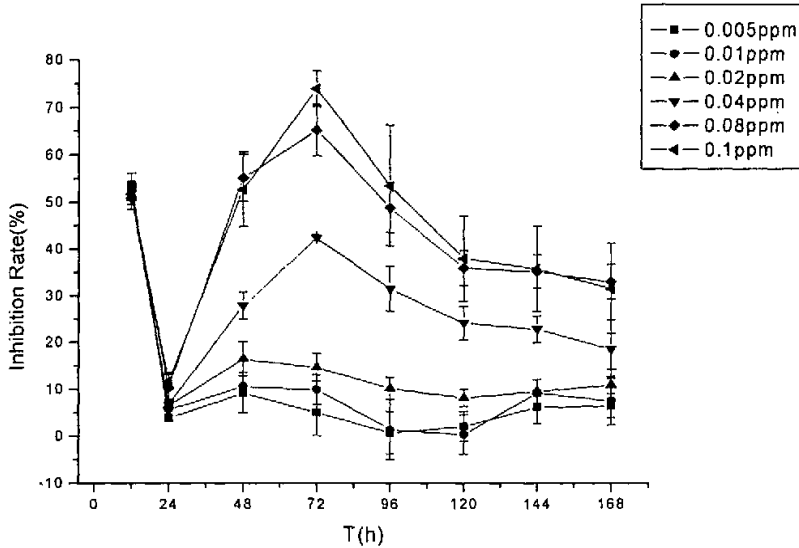


图 2.2 Rac-异丙甲草胺对普通小球藻的抑制率

由图 2.2 可见，整个 168h 培养周期中，各个浓度组的 Rac-异丙甲草胺均抑制了普通小球藻的生长。抑制效应随培养时间的增加逐渐明显，抑制率随 Rac-异丙甲草胺浓度增大而增大。如图 2.3 所示，0.1mg/L、0.08mg/L 两组在 72h 时抑制效应表现最强，之后受抑制程度逐渐减弱。Rac-异丙甲草胺 0.005mg/L、0.01mg/L、0.02mg/L、0.04mg/L 浓度组 12h 对蛋白核小球藻的生长抑制均达顶峰。

对比加入 Rac-异丙甲草胺培养的蛋白核小球藻和栅藻，Rac-异丙甲草胺各浓度组 12h 均抑制了普通小球藻的生长（如图 2.1 和图 2.3 所示），这与 Rac-异丙甲草胺刺激蛋白核小球藻和栅藻生长的现象相反。24h 之后，随着培养时间的延长，Rac-异丙甲草胺各个浓度组基本表现出抑制了三种藻类的生长。实验结果表明，Rac-异丙甲草胺浓度越高，普通小球藻生长受抑制程度越强。普通小球藻生长受抑制程度的强弱与 Rac-异丙甲草胺浓度密切相关。





Rac-异丙甲草胺抑制栅藻生长的实验结果如图 2.3 所示。

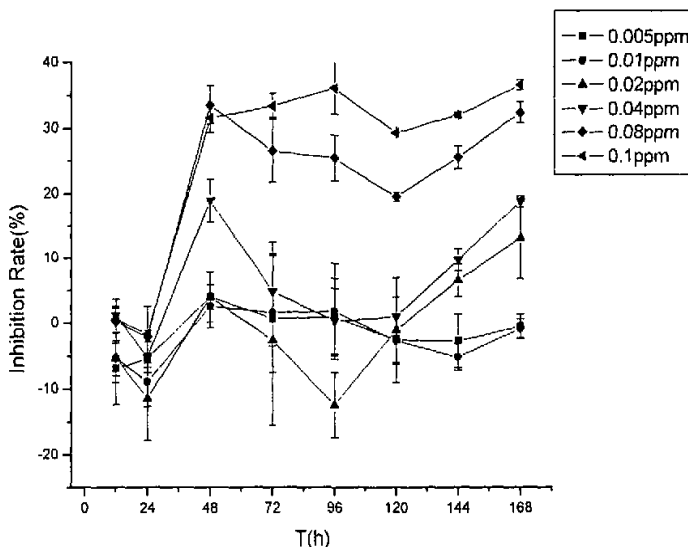


图 2.3 Rac-异丙甲草胺对栅藻的抑制率

由图 2.3 可见，在 24h，各个浓度的 Rac-异丙甲草胺均轻微刺激了栅藻的生长。其中，浓度较低的 0.005mg/L、0.01mg/L、0.02mg/L 三组刺激效应表现不明显，浓度为 0.04mg/L、0.08mg/L、0.1mg/L 三组的刺激效应表现比较明显；随着培养时间增长，Rac-异丙甲草胺不同程度的抑制了栅藻的生长。不同浓度组表现出不同程度的抑制效应，其中 Rac-异丙甲草胺为 0.08mg/L 和 0.04mg/L 两组在 24h 后栅藻生长始终受抑制，抑制程度随时间表现为：增强-减弱-增强；Rac-异丙甲草胺 0.02mg/L 浓度组对栅藻生长的抑制率在 168h 达顶峰。从图 2.3 可见，浓度为 0.02 mg/L、0.04mg/L、0.08mg/L、0.1mg/L 四组的 Rac-异丙甲草胺抑制栅藻的生长，Rac-异丙甲草胺浓度越高，栅藻生长受抑制的程度越大；0.005mg/L、0.01mg/L 两组的抑制率与 Rac-异丙甲草胺浓度关系表现不明显。

### 2.3.3 S-异丙甲草胺对三种藻类的毒性效应

S-异丙甲草胺抑制蛋白核小球藻生长的实验结果如图 2.4 所示。

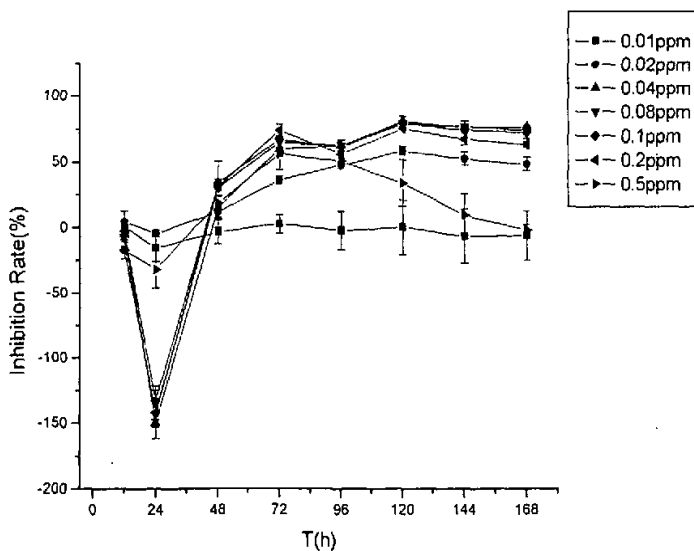


图 2.4 S-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的抑制率

由图 2.4 可见，培养 24h，各个浓度的 S-异丙甲草胺均不同程度的刺激了蛋白核小球藻生长，其中，除了浓度较低的 0.01mg/L、0.02mg/L 两组和浓度最高的 0.5mg/L 三组，其余浓度为 0.04、0.08、0.1、0.2mg/L 的各处理组测得生物量超过空白组分别为 150%，143.6%，133.5%，141.7%，表现出非常明显的刺激效应；随着培养时间增长，各个浓度组均表现出不同程度的抑制效应，其中 S-异丙甲草胺浓度为 0.02、0.04、0.08、0.1、0.2mg/L 的处理组，蛋白核小球藻生长受到抑制的效应随时间增强，在 120h 后抑制效应略有减弱；0.5mg/L 浓度组在 72h 时抑制效应表现最强，之后受抑制程度逐渐减弱。

S-异丙甲草胺影响蛋白核小球藻生长的基本表现为：刺激-抑制-抑制程度增强-减弱。24h 时，S-异丙甲草胺浓度为 0.04、0.08、0.1、0.2mg/L 的处理组强烈刺激了蛋白核小球藻的生长，24h 后，S-异丙甲草胺各浓度组均表现出不同程度抑制了蛋白核小球藻的生长，抑制效应随时间增强，随 S-异丙甲草胺浓度的增大而增强。

S-异丙甲草胺抑制普通小球藻生长的实验结果如图 2.5 所示。

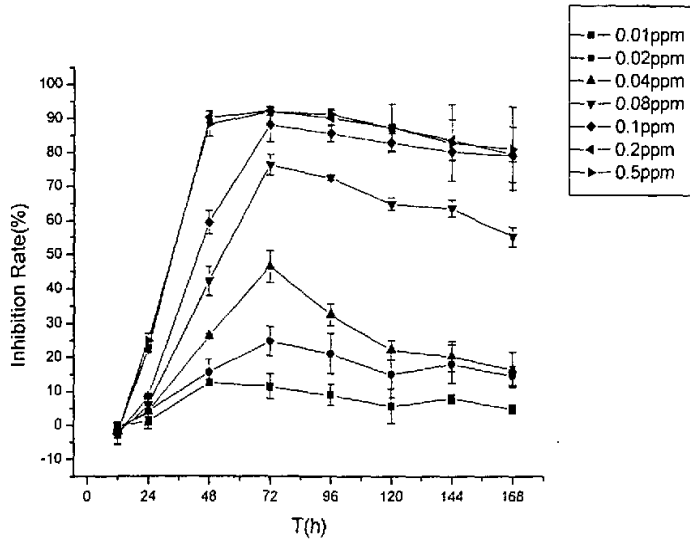


图 2.5 S-异丙甲草胺对普通小球藻的抑制率

如图 2.5 可见，普通小球藻生长受抑制程度的强弱与 S-异丙甲草胺浓度密切相关。在整个培养周期中，各个浓度组的 S-异丙甲草胺均抑制了普通小球藻的生长，抑制效应随着培养时间的增加逐渐明显，抑制率大小与 S-异丙甲草胺浓度呈正相关。72h 时，除 0.01mg/L 浓度处理组，其余各组 S-异丙甲草胺对普通小球藻的生长抑制均达顶峰。

S-异丙甲草胺在整个培养周期中未表现出刺激普通小球藻的生长，原因可能是 S-异丙甲草胺对普通小球藻的毒性效应远远大于 Rac-异丙甲草胺和丁草胺，故而一般在低浓度会出现的刺激效应，此处没有发现；实验结果表明，普通小球藻生长受抑制程度的强弱与 S-异丙甲草胺浓度密切相关，S-异丙甲草胺浓度越高，普通小球藻生长受抑制程度越强。

S-异丙甲草胺抑制栅藻生长的实验结果如图 2.6 所示。

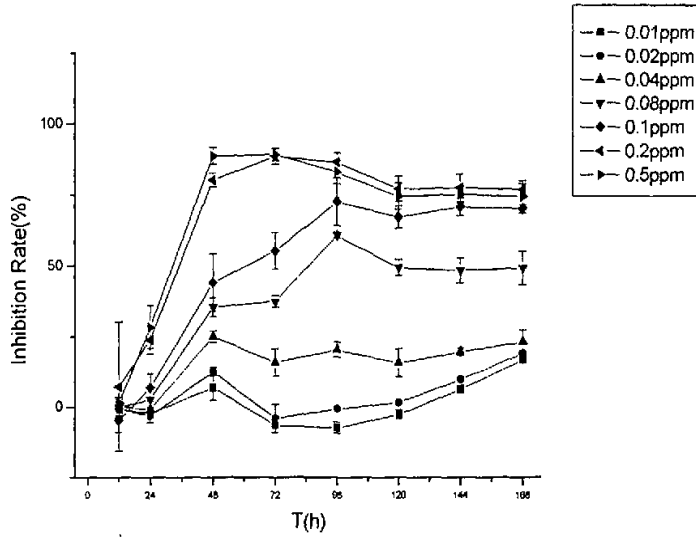


图 2.6 S-异丙甲草胺对栅藻的抑制率

由图 2.6 可见，浓度为 0.01mg/L，0.02mg/L 的 S-异丙甲草胺，在 24、72、96h 均刺激了栅藻的生长。这与 Nina Åkerblom2004 年报道许多农药在低浓度时能刺激藻类生长一致。在培养的前 48h，S-异丙甲草胺对栅藻生长的抑制率迅速增大，到 48h，S-异丙甲草胺浓度为 0.2mg/L，0.5mg/L 的两组，栅藻的生长抑制率超过 75%，S-异丙甲草胺浓度为 0.01mg/L、0.02mg/L、0.04mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L 的五组栅藻的生长抑制率均在 48h 达到顶峰。0.08mg/L 和 0.1mg/L 浓度组在 96h 抑制效应表现最强，之后受抑制程度逐渐减弱。

农药对藻类的影响在很大程度上表现为浓度相关性。从图 2.6 可见，S-异丙甲草胺对栅藻的生长抑制率与农药浓度密切相关。实验结果表明，S-异丙甲草胺浓度越高，栅藻生长受抑制程度越明显。

### 2.3.4 丁草胺对三种藻类的毒性效应

丁草胺抑制蛋白核小球藻生长的实验结果如图 2.7 所示。

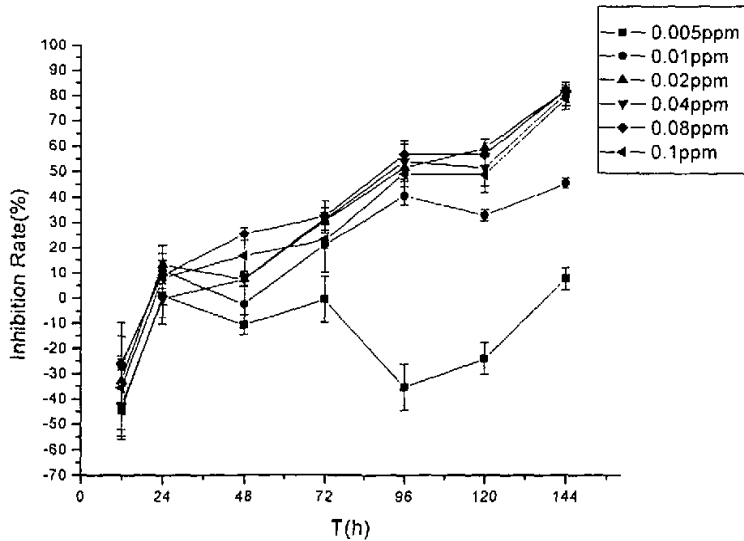


图 2.7 丁草胺对蛋白核小球藻的抑制率

由图 2.7 可见，各组浓度的丁草胺在作用初期 12h，均表现为刺激蛋白核小球藻的生长。最低浓度组 0.005mg/L 的丁草胺在整个 168h 的培养周期中基本表现为刺激着蛋白核小球藻的生长，随着培养时间的延长，其余各浓度组 0.01mg/L, 0.02mg/L, 0.04mg/L, 0.08mg/L, 0.1mg/L 的丁草胺开始抑制蛋白核小球藻的生长，抑制率随培养时间的增加增大，在 144h 各浓度组抑制效果均达顶峰（80%左右）。168h 的实验记录显示，蛋白核小球藻液呈黄色，出现混浊沉淀，有大量死亡藻体贴壁。紫外扫描藻液光密度曲线在 680nm 处无特定的峰。丁草胺影响蛋白核小球藻生长的基本表现为：刺激-抑制-抑制程度增强。

丁草胺抑制普通小球藻生长的实验结果如图 2.8 所示。

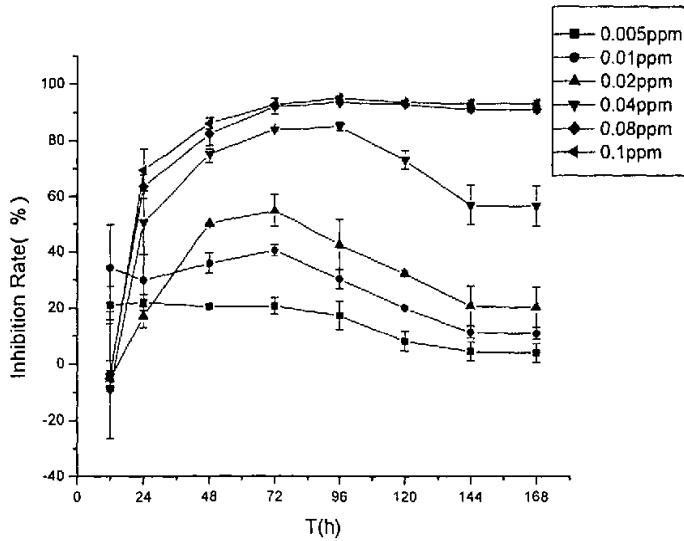


图 2.8 丁草胺对普通小球藻的抑制率

由图 2.8 可见,反应 24h 后,各浓度组的丁草胺均抑制了普通小球藻的生长。对于较低浓度组 0.01mg/L, 0.02mg/L, 抑制程度在 72h 达到顶峰, 之后逐渐降低, 表明普通小球藻已经逐步适应环境; 对于较高浓度组 0.04mg/L, 0.08mg/L, 0.1mg/L, 抑制率 96h 最大。其中 0.08mg/L, 0.1mg/L 两组小球藻的生长曲线相似, 在培养 48h 后抑制率持高 (>90%) 不变。

培养 24h, 各浓度组丁草胺均抑制了普通小球藻的生长。这与蛋白核小球藻和栅藻在 24h 生长受刺激的现象相反。24h 之后, 随着培养时间的延长, 丁草胺各个浓度组基本抑制了普通小球藻的生长。如图 2.8 所示, 丁草胺浓度越高, 普通小球藻生长受抑制程度越强。实验结果表明普通小球藻的生长抑制率与丁草胺浓度密切相关。

丁草胺抑制栅藻生长的实验结果如图 2.9 所示。

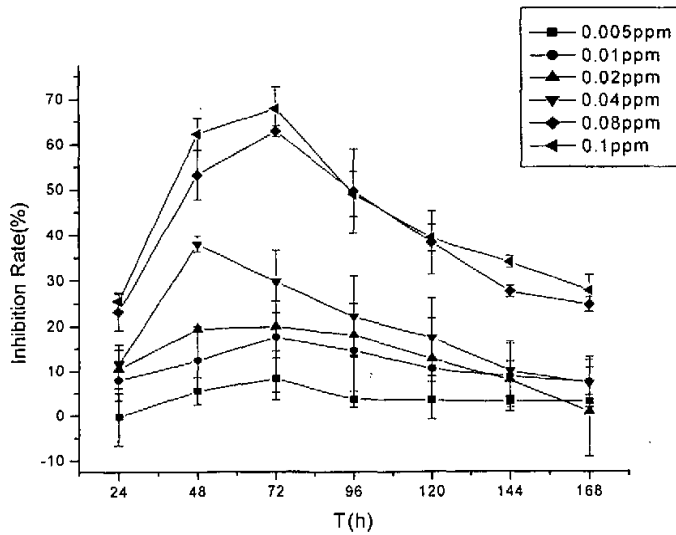


图 2.9 丁草胺对栅藻的抑制率

由图 2.9 所示，栅藻的生长与丁草胺浓度密切相关。丁草胺浓度越高，抑制程度越明显。加入 0.005mg/L 的丁草胺培养的栅藻，在整个 168h 周期中表现为受丁草胺轻微的抑制作用，加入 0.08mg/L，0.1mg/L 的丁草胺培养的栅藻，72h 时抑制率最高 (>60%)，之后抑制率迅速降低，在 168h 时抑制率回复到约 25%。

丁草胺对栅藻生长的抑制率与除草剂浓度密切相关。实验结果表明，除草剂浓度越高，栅藻生长受抑制程度越明显。丁草胺抑制栅藻生长的效应随时间表现为：先增强后减弱。

### 2.3.5 酰胺类除草剂对三种藻类的 $EC_{50}$ 及抑制方程

表 2.3 列出了 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺及其降解产物对普通小球藻、蛋白核小球藻和栅藻的  $EC_{50}$  及抑制方程。比较 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺对普通小球藻的 96h- $EC_{50}$ ，Rac-异丙甲草胺 0.14mg/L 是 S-异丙甲草胺 0.07mg/L 的 2 倍多；对蛋白核小球藻的 96h- $EC_{50}$ ，外消旋异丙甲草胺 0.105mg/L 是 S-异丙甲草胺 0.009mg/L 的 10 倍多；对栅藻的 96h- $EC_{50}$ ，外消旋异丙甲草胺 0.39mg/L 是 S-异丙甲草胺 0.07mg/L 的 5 倍多，以上数据说明 S-异丙甲草胺对三种藻类的毒性均远远大于 Rac-异丙甲草胺。由于 S 对映体具有除草活性，而 R 对映体没有除草活性，因此分离 Rac-异丙甲草胺，独立开发 S 对映体具有



重要的意义。

表 2.3 酰胺类除草剂对三种藻类的 EC<sub>50</sub> 及抑制方程

藻种	除草剂	回归方程	r	p	EC <sub>50</sub> (mg/L)
普球藻	Rac-异丙甲草胺	$Y = 84.62556 + 17.67234 * \ln c$	0.90896	0.01205	0.140956
	S-异丙甲草胺	$Y = 128.45224 + 28.91544 * \ln c$	0.9458	0.00128	0.066327
	丁草胺	$Y = 149.7234 + 22.79539 * \ln c$	0.93398	0.00639	0.012592
蛋白藻	Rac-异丙甲草胺	$Y = 94.61949 + 19.81507 * \ln c$	0.99667	<0.0001	0.10521
	S-异丙甲草胺	$Y = 106.47686 + 17.71215 * \ln c$	0.97114	0.00586	0.009407
	丁草胺	$Y = 131.12144 + 24.05182 * \ln c$	0.97838	0.000696	0.034294
栅藻	Rac-异丙甲草胺	$Y = 63.38609 + 14.13665 * \ln c$	0.97675	0.000804	0.387939
	S-异丙甲草胺	$Y = 147.8774 + 37.25411 * \ln c$	0.96983	0.000299	0.072274
	丁草胺	$Y = 78.88109 + 14.30035 * \ln c$	0.98099	0.000539	0.132708

比较丁草胺对三种藻类的 96h-EC<sub>50</sub>，如表 2.2 所示，栅藻 0.13mg/L > 蛋白核小球藻 0.03mg/L > 普通小球藻 0.013mg/L，这说明普通小球藻对丁草胺最敏感，其次为蛋白核小球藻，最后是栅藻。

分别比较三种酰胺类除草剂对三种藻类的 96h-EC<sub>50</sub>，发现 Rac-异丙甲草胺，S-异丙甲草胺和丁草胺对栅藻的 96h-EC<sub>50</sub> 均大于或远远大于它们对普通小球藻和蛋白核小球藻的 96h-EC<sub>50</sub>，估计可能是栅藻相对来说对酰胺类除草剂敏感度较低，抗药性较强的缘故。

## 2.4 小结

1. S-异丙甲草胺的毒性大于 Rac-异丙甲草胺和丁草胺；
2. 酰胺类除草剂 Rac-异丙甲草胺，S-异丙甲草胺丁草胺在低浓度时刺激了小球藻的生长；
3. 除草剂对藻类的影响在很大程度上表现为浓度相关性，一般来说，除草剂浓度越高，小球藻生长受抑制的程度越大；





## 第三章 STS 对酰胺类除草剂影响下的三种藻液体系的修复

### 3.1 前言

硫代硫酸钠 (sodium thiosulfate, 以下简称STS), 通常含有5个结晶水, 化学式为 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 是无色透明的晶体, 易溶于水, 俗名为海波、大苏打。化学式中一个S为-2价, 因而可作为一种还原剂(Smith et al, 1998)。STS溶液不稳定, 在空气中易被氧化。它同时又是一种很好的化学修复剂(Jack Z.X. et al, 1996), 可用作调节土壤性质和营养成分的化肥, 在临床上, STS是用作联合治疗癌症的辅助药物, 能降低其他抗癌药物的毒性(王则能等, 2003)。已经有研究表明STS能够取代多种含卤农药中的卤原子, 使其发生快速转化, 加快其降解速率(Gan J, et al. 1998; Wang Q, et al. 2000; Gan J, et al. 2002)。小球藻在经过漂白等消毒处理后, 往往也用STS恢复。2003年, 中国科学院光合作用与环境分子生理学重点实验室许亦农等利用分子生物学、生物化学和生物物理学等手段, 深入研究了光合膜脂的生物合成、分子结构和功能的关系及其与膜蛋白相互作用的机理, 研究发现, 合适比例的葡萄糖和硫代硫酸钠能有效的保护小球藻光合膜的功能, 促进光合产物的积累。

在第二章中, 作者研究了三种酰胺类除草剂Rac-异丙甲草胺, S-异丙甲草胺, 丁草胺对三种水藻体系的作用。结果显示, 除草剂对普通小球藻, 蛋白核小球藻, 栅藻具有很强的生长抑制现象。实验发现的酰胺类除草剂 $\text{EC}_{50}$ 很低, 说明酰胺类除草剂具有很高的毒性效应。本章工作以Rac-异丙甲草胺, S-异丙甲草胺, 丁草胺和乙草胺为研究对象, 研究了在除草剂-小球藻作用体系中加入修复剂硫代硫酸钠产生的影响。

### 3.2 材料与amp;方法

#### 3.2.1 仪器与试剂

硫代硫酸钠, 化学纯, 购自上海化学试剂有限公司。其余实验材料参照第二章。



### 3.2.2 小球藻培养

参照第二章。

### 3.2.3 除草剂毒性测定

经过预试验，选定硫代硫酸钠浓度 25mg/L，第一步实验设定 Rac-异丙甲草胺和丁草胺浓度梯度为 0, 0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1mg/L，S-异丙甲草胺浓度梯度为 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1、0.2、0.5mg/L，分别加入处于对数生长期的普通小球藻，蛋白核小球藻和栅藻，于 24h、48h、72h、96h、120h、144h、168h 时测 680nm 处 OD50，绘制生长曲线；

第二步实验，Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺采用预试验中所测得的 96h-EC50，分别为 0.04mg/L 和 0.03mg/L，STS 浓度梯度分别设置为：0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、10 mg/L 和 0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、10、25 mg/L，再加入处于对数生长期的蛋白核小球藻，于 24h、48h、72h、96h、120h、144h、168h 时测 680nm 处 OD50，绘制生长曲线；

实验开始时接种于 100ml 三角锥形瓶中，总体积为 50ml，初始接种小球藻个数范围为  $7\sim 8\times 10^5$  个/mL。接种后对其进行一定浓度梯度的三种酰胺类除草剂处理，每个浓度设置 3 个平行。测试指标为藻类生物量的变化，分析数据得到小球藻的生长曲线及 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺对小球藻的 96h-EC50。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 STS 对普通小球藻的修复

图 3.1 是在 25mg/L 的 STS 影响下，不同浓度的 Rac-异丙甲草胺对普通小球藻生长的影响。由图 3.1 可见，Rac-异丙甲草胺浓度为 0.04mg/L、0.08mg/L、0.1mg/L 的三组，72h 之前普通小球藻的生长受到了明显的抑制，且受抑制的程度与 Rac-异丙甲草胺浓度正相关，72h 之后小球藻进入对数生长期；与之不同的是，Rac-异丙甲草胺浓度为 0mg/L，0.005mg/L，0.01mg/L，0.02mg/L 四组，普



通小球藻的生长情况始终良好。如图 3.1 所示，STS 对较高浓度的 Rac-异丙甲草胺的脱毒效应可能需要一个预反应时间。这一点作者将在第四章验证。

图 3.2 是在 25mg/L 的 STS 影响下，不同浓度的 S-异丙甲草胺对普通小球藻生长的影响。由表 3.1，STS 修复下普通小球藻的 96h-EC50 为 0.03432mg/L，对照第二章的实验结果，发现 STS 对普通小球藻-S-异丙甲草胺体系的脱毒效果不明显。由图 3.2 可见，S-异丙甲草胺浓度为 0.01，0.02mg/L 的两组，72h 之前普通小球藻的生长受到了明显的抑制，72h 之后普通小球藻生长得到恢复；S-异丙甲草胺浓度较低的 0，0.005mg/L 两组，普通小球藻的生长情况始终良好，S-异丙甲草胺浓度较高的 0.04，0.08，0.1mg/L 的三组，普通小球藻基本不生长。

图 3.3 是在 25mg/L 的 STS 影响下，不同浓度的丁草胺对普通小球藻生长的影响。由图 3.3，对于加入 STS 作用下的普通小球藻-丁草胺体系，小球藻的生长情况良好。对比第二章的实验结论，丁草胺对普球藻的 96h-EC50 为 0.01259mg/L，而如表 3.1 所示，经过了 25mg/LSTS 处理的丁草胺对普球藻的 96h-EC50 为 0.020414mg/L，说明 STS 降低了丁草胺的毒性，起到了促进普通小球藻生长的作用。

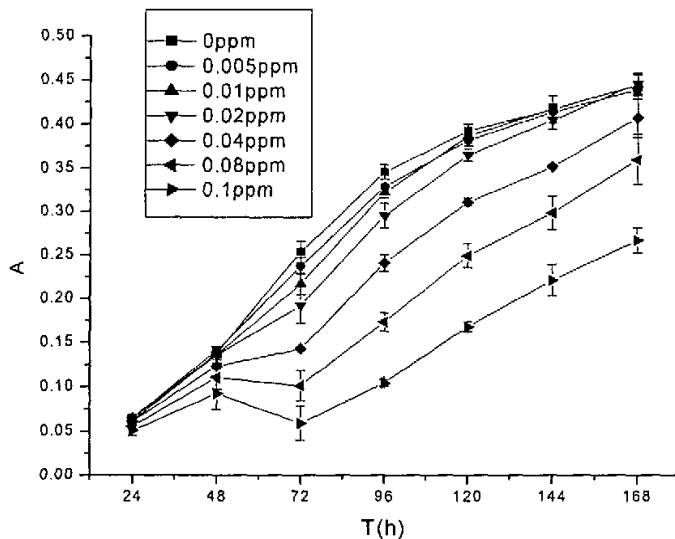


图 3.1 STS 对普通小球藻-Rac-异丙甲草胺体系的脱毒

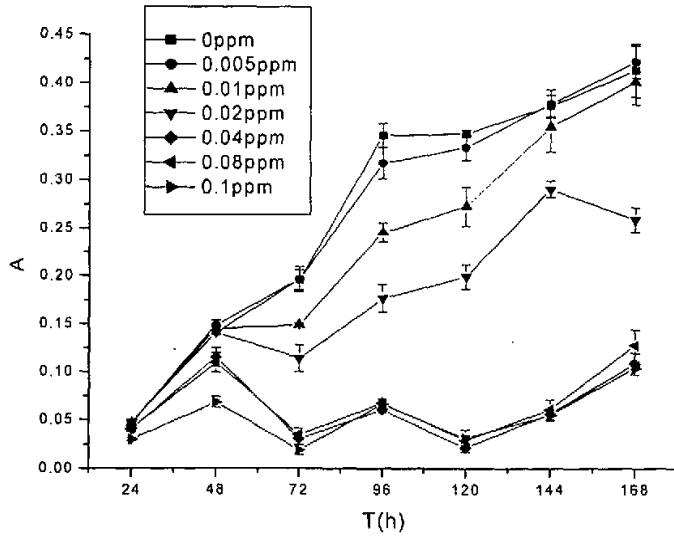


图 3.2 STS 对普通小球藻-S-异丙甲草胺体系的脱毒

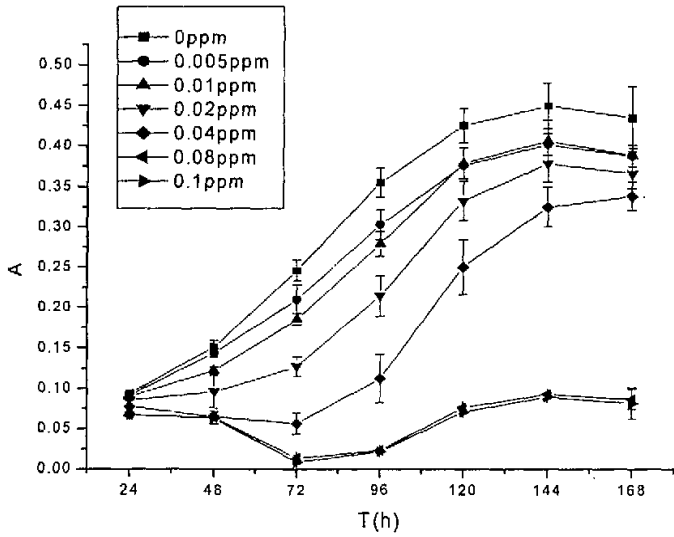


图 3.3 STS 对普通小球藻-丁草胺体系的脱毒

表 3.1 酰胺类除草剂在 STS 影响下对普球藻的 96h-EC<sub>50</sub> 及抑制方程

除草剂	回归方程	r	p	EC50(mg/L)
Rac-异丙甲草胺	$Y=104.65324+20.65205*\ln c$	0.93607	0.00600	0.07091
S-异丙甲草胺	$Y=164.25184+33.88276*\ln c$	0.96837	0.00672	0.03432



丁草胺

 $Y=173.1564+31.84225*lnx$ 

0.99374

0.00059

0.02041

### 3.3.2 STS 对蛋白核小球藻的修复

图 3.4 是在 25mg/L 的 STS 影响下,不同浓度的 Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻生长的影响。如图 3.4 所示,25mg/L 的 STS 对各个浓度(0 mg/L、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.04 mg/L、0.08mg/L) 异丙甲草胺下的蛋白藻均有修复效应,最高浓度 0.1mg/L 组表现不明显。由表 3.2 可见,STS 修复下蛋白核小球藻的 96h-EC50 为 0.04057mg/L,对比第二章数据,发现 STS 极大程度地恢复,甚至刺激了 Rac-异丙甲草胺 0~0.04mg/L 浓度组蛋白核小球藻的生长。由第二章 Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的 96h-EC50 为 0.105mg/L,推断 Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻作用的 96h-EC50 值 0.105mg/L,可能就是 STS 对蛋白核小球藻的修复是否起作用的临界值。

图 3.5 是在 25mg/L 的 STS 影响下,不同浓度的 S-异丙甲草胺对蛋白核小球藻生长的影响。由表 3.2,STS 修复下蛋白核小球藻的 96h-EC50 为 0.0304mg/L,对比第二章的实验结果可以看到,S-异丙甲草胺浓度为 0,0.01,0.02,0.04mg/L 的四组,加 STS 的小球藻生长情况好于不加,而超过 0.04mg/L 的 S-异丙甲草胺高浓度组,STS 修复效果不明显或没有。由第二章测得的蛋白藻-S-异丙甲草胺的 96h-EC50 为 0.03mg/L,这又支持了之前的假设,即 S-异丙甲草胺对蛋白核小球藻作用的 96h-EC50 值 0.03mg/L 可能是 STS 对蛋白核小球藻的修复是否起作用的临界值点。

图 3.6 是在 25mg/L 的 STS 影响下,不同浓度的丁草胺对蛋白核小球藻生长的影响。如图 3.6 所示,丁草胺浓度为 0,0.005,0.01,0.02mg/L 的四组,STS 对蛋白核小球藻的修复效果很明显;丁草胺浓度为 0.04,0.08,0.1mg/L 的三组,STS 修复效果不明显,蛋白核小球藻在 48h 后即生长缓慢或停止生长。由表 3.2 可见,STS 修复下蛋白核小球藻的 96h-EC50 为 0.0197mg/L,对比第二章丁草胺对蛋白核小球藻的 96h-EC50 为 0.034mg/L,推断除草剂对蛋白核小球藻作用的 96h-EC50 值,可能就是 STS 对蛋白核小球藻修复是否起作用的临界值。处理的丁草胺小于其 96h-EC50 值时,加入修复剂 STS 都能使小球藻的生长得到较



好的恢复；而当处理的丁草胺大于其 96h-EC50 值时，加入修复剂 STS 没有效果。

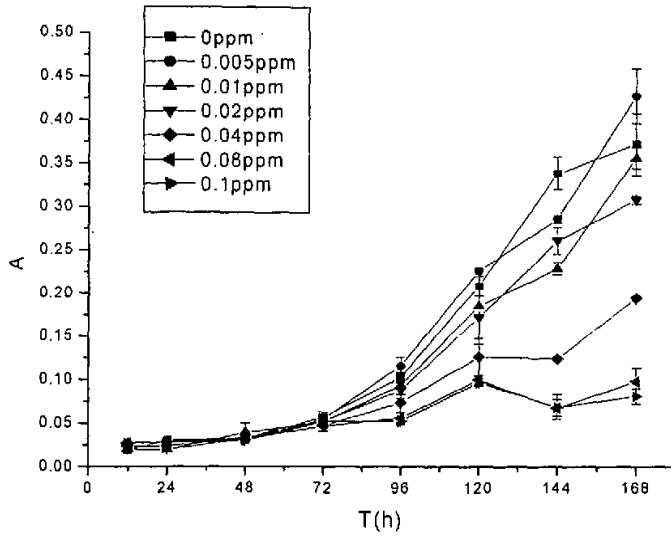


图 3.4 STS 对蛋白核小球藻-Rac-异丙甲草胺体系的脱毒

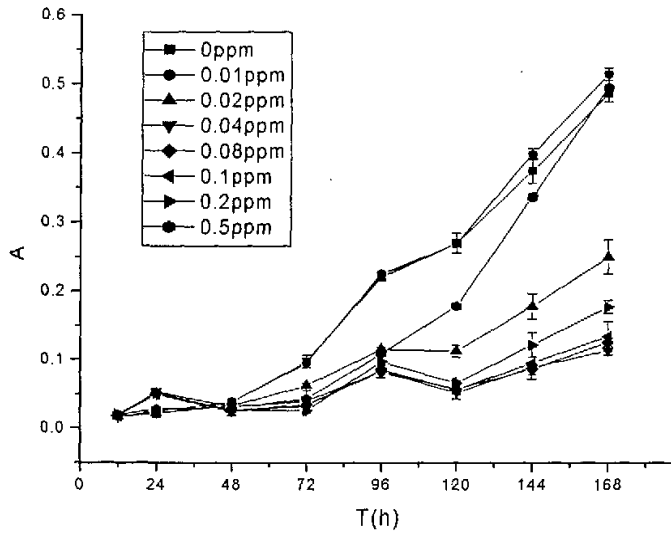


图 3.5 STS 对蛋白藻-S-异丙甲草胺体系的脱毒

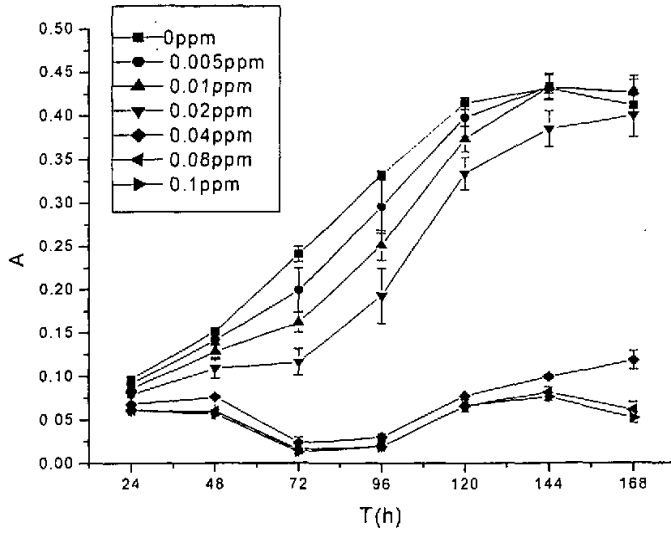


图 3.6 STS 对蛋白核小球藻-丁草胺体系的脱毒

表 3.2 酰胺类除草剂在 STS 影响下对蛋白藻的 96h-EC<sub>50</sub> 及抑制方程

除草剂	回归方程	r	p	EC50(mg/L)
Rac-异丙甲草胺	$Y=134.72432+26.43741*Inc$	0.93811	0.00563	0.04057
S-异丙甲草胺	$Y=106.40223+16.14506*Inc$	0.97115	0.00586	0.03040
丁草胺	$Y=174.01160+31.5940*Inc$	0.96510	0.00181	0.01965

### 3.3.3 STS 对栅藻的修复

图 3.7 是在 25mg/L 的 STS 影响下，不同浓度的 Rac-异丙甲草胺对栅藻生长的影响。如图 3.7 可见，加入 25mg/L STS 和不同浓度 Rac-异丙甲草胺的栅藻藻液体系在 0~96h 生长状况良好，96h 后藻类迅速衰亡。实验记录显示，96h 后栅藻藻液体系表现为出现混浊沉淀，藻液由绿变黄，出现藻细胞贴壁现象。

图 3.8 是在 25mg/L 的 STS 影响下，不同浓度的 S-异丙甲草胺对栅藻生长的影响。由图 3.8 可以看到，S-异丙甲草胺浓度为 0.04, 0.08mg/L 的两组，96h 之前栅藻的生长受到了明显的抑制，96h 之后栅藻生长得到恢复；与之不同的是，S-异丙甲草胺浓度较低的 0, 0.01, 0.02mg/L 的三组，栅藻的生长情况始终良好，



S-异丙甲草胺浓度较高的 0.1, 0.2, 0.5mg/L 的三组, 栅藻基本不生长。这和图 3.4 的结果可能都支持了作者的假设, 即: STS 对较高浓度的 S-异丙甲草胺的脱毒效应可能需要一个预反应时间。

图 3.9 是在 25mg/L 的 STS 影响下, 不同浓度的丁草胺对栅藻生长的影响。如图 3.9 所示, STS 作用下的栅藻-丁草胺体系, 栅藻的生长情况良好, 生长曲线表现为与除草剂浓度密切相关。丁草胺浓度越高, 相应的栅藻生长受抑制的情况越明显。整个生长过程中, STS 没有表现出对栅藻很大的修复作用。

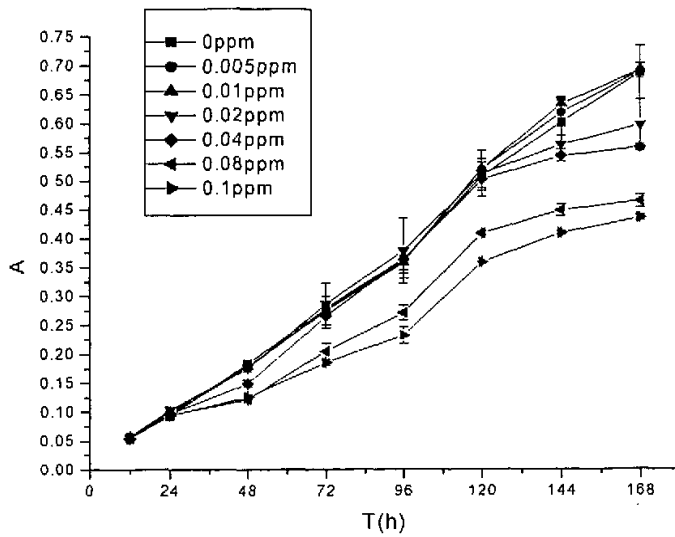


图 3.7 STS 对栅藻-Rac-异丙甲草胺体系的脱毒



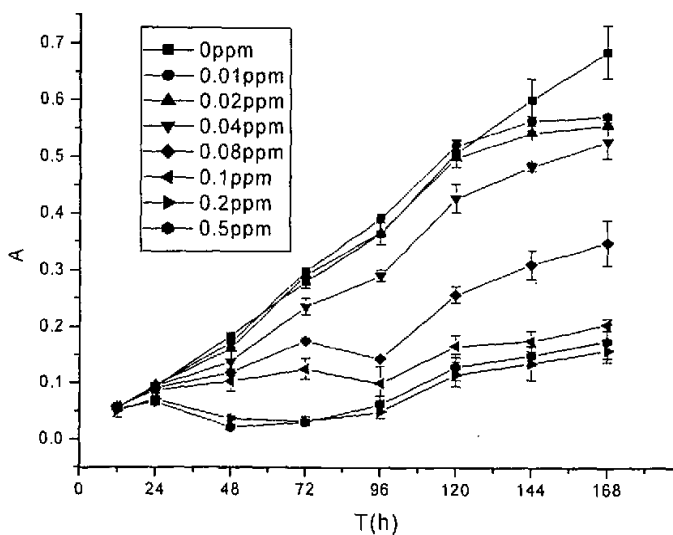


图 3.8 STS 对栅藻-S-异丙甲草胺体系的脱毒

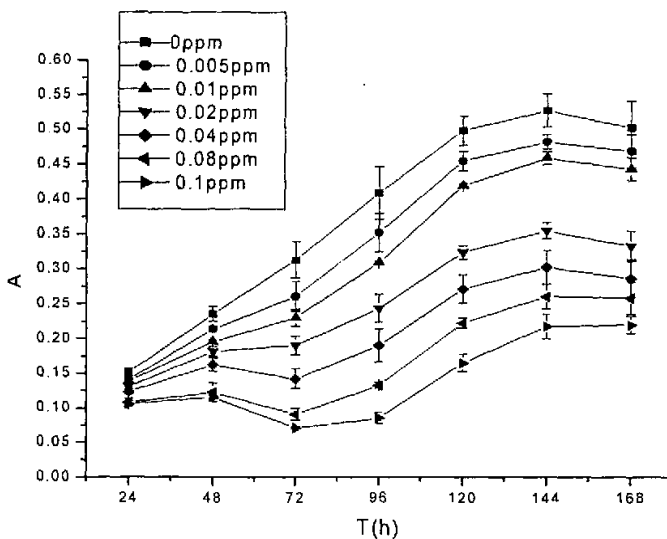


图 3.9 STS 对栅藻-丁草胺体系的脱毒

表 3.3 酰胺类除草剂在 STS 影响下对栅藻的 96h-EC<sub>50</sub> 及抑制方程

除草剂	回归方程	r	p	EC50(mg/L)
Rac-异丙甲草胺	$Y=102.89800+19.83255*Inc$	0.92148	0.00901	0.06944
S-异丙甲草胺	$Y=89.99277+16.51151*Inc$	0.96301	0.00050	0.08873



---

丁草胺	$Y=123.54438+21.3490*\ln c$	0.99403	<0.0001	0.03081
-----	-----------------------------	---------	---------	---------

---

### 3.4 小结

1. 脱毒剂 STS 能够降低丁草胺, Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺的毒性, 起到促进三种藻类生长的作用。藻类的生长曲线表现出与除草剂浓度密切相关。除草剂浓度越高, 相应的小球藻生长受抑制的情况越明显;

2. 除草剂丁草胺对蛋白核小球藻作用的 96h-EC50 值, 可能就是 STS 修复蛋白核小球藻是否起作用的临界值。处理的丁草胺小于 96h-EC50 值时, 加入修复剂 STS 都能较好的恢复使蛋白核小球藻的生长; 处理的丁草胺大于 96h-EC50 值时, 加入修复剂 STS 没有效果。同样, Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻作用的 96h-EC50 值 0.105mg/L, 也可能就是在 Rac-异丙甲草胺作用下 STS 对蛋白核小球藻的修复作用的临界值;

3. 根据 STS 作用下 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺对普通小球藻生长的影响, S-异丙甲草胺对栅藻生长的影响, 推断 STS 对较高浓度的除草剂的脱毒可能需要一个预反应时间作缓冲;



## 第四章 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺与 STS 作用对蛋白核小球藻液体体系的影响

### 4.1 前言

当前世界上使用的农药中，有 25%是具有手性中心的分子(Liu W.P., 2005)。以前在研究手性污染物的环境行为以及生态效应时，几乎把它们当作纯的单一化合物来看待，但事实上是，手性农药进入生态环境后，其不同对映体在环境中的持久性和对环境中微生物的生化过程的影响均存在差异。国外学者提出，对手性污染物的环境归宿应考虑其化学结构的立体选择性，应该从对映体水平上关注手性农药的环境行为。有关硫代硫酸盐对手性农药的转化和脱毒在对映体层面上的差异的研究，目前已有报道 (Wang Q,et al, 2001)。研究表明，手性杀虫剂 1,3-二氯丙烯在硫代硫酸铵的作用下能够很快的转化和脱毒。同样条件下，*cis*-1,3-D 与硫代硫酸盐的反应速度比 *trans*-1,3-D 快三倍多。

在前面的工作中，作者研究了在除草剂-小球藻作用体系中加入修复剂硫代硫酸钠产生的影响，结果证明，STS 作用下的酰胺类除草剂的转化，是一个 STS 取代酰胺类除草剂分子中氯原子的过程；这个转化过程具有脱毒作用，能有效地减少酰胺类除草剂对环境的毒害作用。

本章的目的是研究 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺在不同浓度的 STS 处理下对蛋白核小球藻毒性效应的影响，以及 STS 和 Rac-异丙甲草胺，S-异丙甲草胺经过 24h 预反应后对蛋白核小球藻的毒性效应，通过比较 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺对与 STS 作用 24h 毒性效应的变化，期望能在今后的实验里，研究 STS 和 Rac-异丙甲草胺，S-异丙甲草胺作用不同时间对蛋白核小球藻生长恢复的差别。

### 4.2 材料和方法

#### 4.2.1 仪器与试剂

参照第二章。



## 4.2.2 小球藻培养

参照第二章。

## 4.2.3 实验步骤

第一步实验，Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺采用预试验中所测得的 96h-EC<sub>50</sub>，分别为 0.04mg/L 和 0.03mg/L，STS 浓度梯度分别设置为：0，0.1，0.25，0.5，1，2，5，10mg/L 和 0，0.1，0.25，0.5，1，2，5，10，25mg/L，再加入处于对数生长期的蛋白核小球藻，培养 168h 测 680nm 处 OD<sub>50</sub>，绘制生长曲线；

第二步实验，Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺采用预试验中所测得的 96h-EC<sub>50</sub>，分别为 0.04mg/L 和 0.03mg/L，STS 浓度梯度设定为：0，0.1，0.5，25，50，150mg/L (J. GAN et al, 1998)，在与小球藻相同的培养条件下（温度：24±0.5 °C，光照：3000~4000lx）预反应 24h，然后加入处于对数生长期的蛋白核小球藻，培养 168h 测 680nm 处 OD<sub>50</sub>，绘制生长曲线。

## 4.3 结果与讨论

### 4.3.1 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺经不同浓度 STS 处理对蛋白核小球藻的毒性

图 4.1 为在 STS 存在条件下，Rac-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的毒性效应，用抑制率表示。

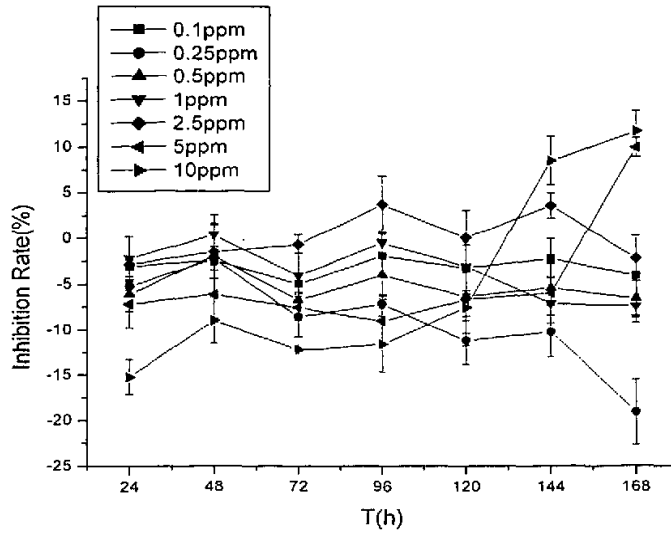


图 4.1 Rac-异丙甲草胺在 STS 影响下的毒性效应

由图 4.1 可以看出，在整个培养过程中，各浓度组小球藻生长受轻微的抑制或刺激作用，其中硫代硫酸钠最高浓度组（10mg/L）对 Rac-异丙甲草胺的修复作用表现较明显，抑制率在 24h 达到最高。144h 以后，实验记录显示蛋白核小球藻已基本死亡，表现为出现混浊沉淀，藻液呈黄色，有贴壁现象。紫外扫描藻液光密度，在 680nm 处无特定的峰。

图 4.2 为在 STS 存在条件下，S-异丙甲草胺对蛋白核小球藻的毒性效应，用抑制率表示。

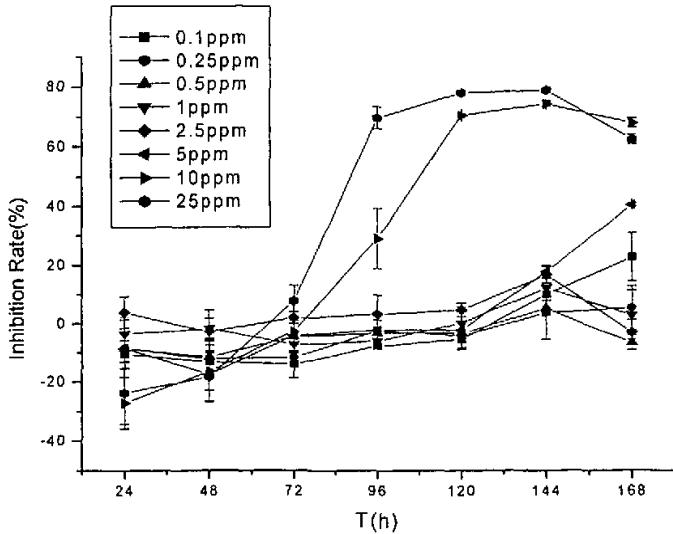


图 4.2 S-异丙甲草胺在 STS 影响下的毒性效应

由图 4.2 可以看出，在 24h，硫代硫酸钠高浓度组 25mg/L 和 10mg/L 均表现出了很好的修复作用。但是在 72h 后即转为抑制蛋白核小球藻的生长，且抑制效果非常明显。随着硫代硫酸钠浓度的降低，72h 之前的修复作用和 72h 之后的抑制作用程度都明显减弱。

另外，比较经过 STS 预处理 24h 的 S-异丙甲草胺和未经处理的 S-异丙甲草胺，发现未经预处理的组，在 72h 蛋白核小球藻生长开始受抑制，而经预处理 24h 的组，96h 时蛋白核小球藻生长开始转为受抑制。即经预处理 24h 的蛋白核小球藻的衰亡比之未经预处理的组推迟了 24h。

### 4.3.2 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺与 STS 预反应 24h 对蛋白核小球藻生长的影响

图 4.3 所示为 STS 和 Rac-异丙甲草胺经 24h 预反应后蛋白核小球藻的生长曲线。

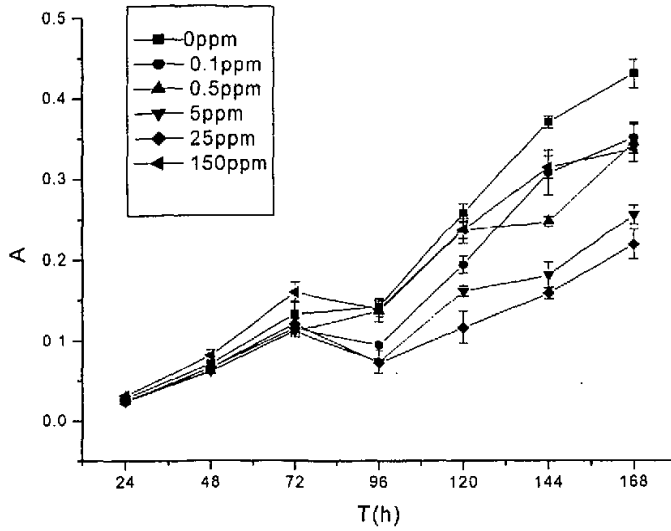


图 4.3 STS 和 Rac-异丙甲草胺经 24h 预反应后对蛋白核小球藻的毒性效应

从图 4.3 可见，STS 和 Rac-异丙甲草胺预处理 24h 后，加入蛋白核小球藻培养 168h，得出生长曲线。结果表明，预处理 24h 的 STS 对 Rac-异丙甲草胺的修复作用不明显。只有在 0~96h 之间，硫代硫酸钠最高浓度组（150mg/L）的小球藻生长情况较好。

图 4.4 为 STS 和 S-异丙甲草胺经 24h 预反应后蛋白核小球藻的生长曲线。

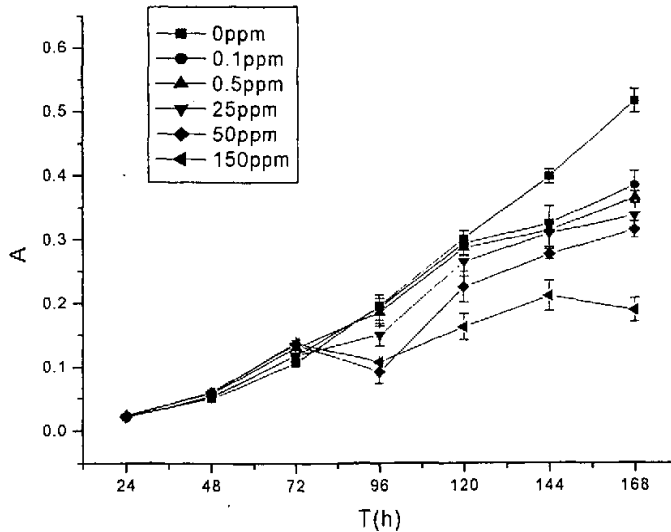


图 4.4 STS 和 S-异丙甲草胺经 24h 预反应后对蛋白核小球藻的毒性效应



由图 4.4 可以看出，在 96h 以前，各个浓度组的 STS 基本都表现出了对 S-异丙甲草胺良好的修复效果，S-异丙甲草胺抑制蛋白核小球藻生长的作用被减弱。在 72h 时，STS 浓度最高的两组（50，150mg/L）修复效果达到顶峰。之后发生转折，96h 以后，STS 的修复作用消失，在 S-异丙甲草胺初始浓度相同的情况下，发现 STS 浓度越高，蛋白核小球藻生长情况越差。

#### 4.4 小结

a. 硫代硫酸钠 25mg/L 和 10mg/L 浓度组对 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺表现出了很好的修复作用；

b. 经 STS 和 S-异丙甲草胺预处理 24h 的蛋白核小球藻的衰亡比之未经预处理的组推迟了 24h；

c. STS 对 Rac-异丙甲草胺预处理 24h 后，对蛋白核小球藻的修复作用不明显，而 STS 对 S-异丙甲草胺预处理 24h 后，各个浓度组对蛋白核小球藻在 96h 以前基本表现出了良好的修复效果；





## 第五章 结论与展望

### 5.1 主要结论

本论文研究了酰胺类除草剂 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺对三种藻类的毒性效应，急性毒性试验表明，S-异丙甲草胺的毒性比 Rac-异丙甲草胺和丁草胺大得多；Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺均存在明显的低浓度促进藻类生长的现象；研究发现，该三种除草剂对藻类的影响在很大程度上表现为浓度相关性，表现为除草剂浓度越高，小球藻生长受抑制的程度越大。

研究 STS 作用下酰胺类除草剂 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺对三种藻液体系的影响，结果表明，STS 能够降低 Rac-异丙甲草胺、S-异丙甲草胺和丁草胺的毒性，促进三种藻类的生长；当处理的丁草胺和 Rac-异丙甲草胺浓度小于其 96h-EC50 值，加入 STS 能较好的恢复蛋白核小球藻的生长，而当处理的丁草胺和 Rac-异丙甲草胺浓度大于其 96h-EC50 值，加入 STS 没有效果。

研究了 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺经不同浓度 STS 处理对蛋白核小球藻的毒性，结果表明，25mg/L 和 10mg/L 的 STS 很好的修复了 Rac-异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺的对蛋白核小球藻的抑制作用；进一步研究表明，STS 和 S-异丙甲草胺预反应 24h 后接种，蛋白核小球藻的衰亡比之未经预处理的组推迟了 24h；STS 与 Rac-异丙甲草胺预反应 24h 后接种蛋白核小球藻，修复作用不明显，而 STS 与 S-异丙甲草胺预反应 24h 后接种蛋白核小球藻，96h 以前表现出了良好的修复效果。

### 5.2 未来工作展望

随着农药的使用和推广，提高农药的利用率、在农药施用后促进农药的转化降解，都将是研究者关注的问题。手性农药的环境行为和毒理将是未来环境工作者研究的热点。就本工作而言，STS 是酰胺类除草剂转化降解的优良促进剂，研究 STS 和手性除草剂预处理不同时间后对小球藻的修复作用，以及小球藻对除草剂的转化及降解，将具有重要意义。



## 参考文献

- Abdul M. M., Abdul R., Marcel B.B. Earthworm toxicology: Form acute to chronic tests. *Soil. Biochem.*, 1997, 29(3/4): 699-703
- Abou W. H., Abou Setta M.M., Nigg H. N., et al. Growth response of fresh water algae, *Anabaena flosaquae* and *Selenastrum capricornatum* to atrazine and hexazinone herbicides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1991, 46: 223-229
- Abou W. H., Abou Setta M.M., Nigg H. N., et al. Dose-response relationship of *Anabaena flosaquae* and *Selenastrum capricornatum* to atrazine and hexazinone using chlorophyll(a) content and C14-uptake. *Aquat. Toxicol.*, 1991, 20: 195-20
- Abou W. H., Effat F., Shabana E. F. Recovery of *Nostoc muscorum* previously exposed to some triazine and phenylurea herbicides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 665-673
- Boger P. Finding the target site of chloroacetamides: A thorny subject. *Pestic. Sci.*, 1997, 22: 267-262
- Bondarenko S., Gan J., Degradation and sorption of selected organophosphate and carbamate insecticides in urban stream sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2004, 23(8): 1809-1814
- Bruce A., Edward B. B., Valuing environmental functions in developing countries. *Biodiv. Cons.*, 1992, 1: 34-50
- Chen Y. L., Chen S. J. Degradation and dissipation of herbicide butachlor in paddy fields. *Pestic. Sci.*, 1999, 4: 431-438
- Chiang H. C., Duh J. R., Wang Y. S. Butachlor, thiobencarb, and chlomethoxyfen movement in subtropical soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, 66: 1-8
- Chiang H. C., Yen J. H., Wang Y. S. Sorption of herbicides butachlor, thiobencarb and chlomethoxyfen in soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1997, 58: 758-763
- Cole D. J. Detoxification and Activation of Agrochemicals in plants. *Pestic. Sci.*, 1994, 42: 209-222
- Couderchet M., Boger P. Chloroacetamide-induced reduction of fatty acid desaturation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1980, 45: 91-97
- Cuppen J.G.M. van der Brink P.J, van der Woude H., et al. Sensitivity of macrophyte-Dominated freshwater microcosms to chronic levels of the herbicide linuron. *Ecotoxicol. Environ. Safty.*,



1997, 38: 25-35

- DeLorenzo M. E., Lauth J., Pennington P.L., et al. Atrazine effects on the microbial food web in tidal creek mesocosms. *Aquat. Toxicol.*, 1999b, 46, 241-251
- DeLorenzo M. E., Scott G. I., Ross P. E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2001, 20: 84-98
- DeRidder B. P. Induction of Glutathione S-Transferases in Arabidopsis by Herbicide Sareners. *Plant. Physiol.*, 2002, 130: 1497-1505
- Doggett S. M., Rhodes R. G. Effects of a diazinon formulation on unialgal growth rates and phytoplankton diversity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1991, 47: 36-42
- Marco E., Perona E., Orús M. I. Effects of acephate on N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium Anabaena PCC 7119. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, 48: 894-900
- EL-Sheekh M. M., Kotkat H. M., Hammouda O. H. E. Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Safty.*, 1994, 29: 349-358
- Fahl G. M., Kreft L., Altenbtrger R. et al. pH-dependent sorption, bioconcentration and algal toxicity of sulfonylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.*, 1995, 31(2): 175-187
- Faust M., Ahenburger R., Boedeker W., et al. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1994. 53: 134-141
- Grossmann K. Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends. Plant. Sci.*, 2000, 5: 506-508
- Guillermo G. R. Environmental Conditions and Pesticide Pollution of Two Coastal Ecosystems in the Gulf of California, Mexico. *Ecotoxicol. Environ. Safty.*, 1999, 44(3): 280-286
- Gan J., Yates S.R., Becker J.O., et al. Surface amendment of fertilizer ammonium thiosulfate to reduce methyl bromide emission from soil. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32: 2438-2441
- Gan J., Wang Q, Yates S. R., et al. Dechlorination of chloroacetanilide herbicides by thiosulfate salts. *PNAS.*, 2002, 99: 5189-5194
- Gan J., Yates S. R., Becker J. O., et al. Surface amendment of fertilizer ammonium thiosulfate to reduce methyl bromide emission from soil. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32(16), 2438-2441
- Jack Z. X., Chang H. L., Kilbane J. J., Removal and recovery of metal ions from wastewater using



- biosorbents and chemically modified biosorbents *Bioresourc. Technol.*, 1996, 57(2): 127-136
- Kirby M. F., Sheahan D. A. Effects of atrazine isoproturon, and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the algae *Scenedesmus subspicatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1994, 53(1): 120-126
- Lee J. K. A study on degradation of butachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*. Part 1: Identification of major metabolites by GLC-MS. *Hanguk. Nonhwa. Hakhoe. Chi.*, 1978, 21(1): 1-10
- Lee K. M., Lee H. S. Biodegradation of butachlor in purple non-bacteria. *Res. Photosynth, Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 1992, 9(3): 579-582
- Lee S., Gan J., Kim J.S., et al. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2004, 23(1): 1-6.
- Lehotay S. J., Harman-Fetcho J. A., McConnell L. L. Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake Bay tributaries. *Mar. Pollut. Bull.*, 1998, 37, 32-44.
- Liu S. Y., Zhang Z., Zhang R., et al. Sorption and metabolism of metolachlor by bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(3): 733-740
- Liu W. P., Gan J. Y., Shneak D., et al. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. *PNAS*, 2005, 102(3): 701-706
- Istvan J. Microbial and photolytic degradation of the herbicide acetochlor. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2000, 78(1): 1-8
- M. A. El-Dib, Salwa A. Shehata et al. Response of freshwater algae (*Scenedesmus spp.*) to phenylurea herbicides, *Water. Air. Soil. Pollut.*, 1991(55): 295-303
- Marco E., Martinez F., Ors Ml., Physiological alterations induced by the organophosphorus insecticide trichlorfon in *Anabaena* PCC 7119 grown with nitrates. *Environ. Exp. Bot.*, 1990, 30: 119-126
- Marie E., Delorenzo. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2001, 20: 84-98
- Mohapatra P. K., Mohanty R. C. Growth pattern changes of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena doliolum* due to toxicity of dimethoate and endosulfan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, 49: 576-581
- Mostafa M. Effect of atrazine herbicide on growth photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid



- composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 1994, 29(3): 349-358
- Nina Åkerblom., Agricultural pesticide toxicity to aquatic organisms-a literature review, 2004: 16, Department of Environmental Assessment, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Okay S. O., Morkoç E., Gaines A. Effects of two herbicidal wastewaters on *Chlorella sp.* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ. Pollut.*, 1994, 84, 1-6.
- Perona E., et al. Alteration of dinitrogen fixing and metabolism in cyanobacterium *Anabaena PCC7119* by phosphamidon. *Environ & Botany.*, 1991, 31(4): 479-488
- Peterson H. G., Boutin C., Freemark K. E., et al. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquat. Toxicol.*, 1997, 39: 111-134
- Peterson H. G., Boutin C., Martin P. A., et al. Aquatic phytotoxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquat. Toxicol.*, 1994, 28: 275-292
- Moza P.N., Hustert K., S. Paland P. Sukul. Photocatalytic decomposition of pendimethalin and alachlor. *Chemospher.*, 1992, 25(11), 1675-1682
- Pothuluri J. V., Evans F. E., Doerge D. R. Metabolism of metolachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1997, 32(2): 117-125
- Ralf Schulz, Matthias liess. Toxicity of fenvalerate to caddisfly larvae: chronic effects of 1 vs 10 pulse exposure with constant doses. *Chemospher.*, 2000, 41: 1511- 1517
- Richards R. P., Baker D. B. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie basin. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1993, 12: 13-26
- Shuka A. K., Mishra R. R. Effect of herbicide butachlor on nitrogen transformation and soil microbes. *Indian. Soc. Soil. Sci.*, 1997, 45(3): 571-574
- Spawn R. L., Hoagland K. D., Siegfried B. D. Effects of alachlor on an algal community from a Midwestern agriculture stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997, 16(4): 785-793
- Stamper D. M., Tuovinen O. H. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor and prppachlor. *Critical. Rev. Microbiol.* 1998, 24(1): 1-22
- Hanazato T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ. Pollut.*, 2001, 112: 1-10
- Tandon R. S. InteRaction of Endosulfan and Malathion with Blue-Green Algae *Anabaena* and



- Aulosira fertilissima*. *Environ. Pollut.*, 1988, 52(1): 1-9.
- Tarrant K. A., Field S. A., Langton S. D. Effects on earthworm populations of reducing pesticide use in arable crop rotations. *Soil. Biol. Biochem.*, 1997, 29(314): 657-661
- Walker A., Welch S.J. Enhanced degradation of some soil-applied herbicides. *Weed. Res.*, 1991, 31(1): 49-57
- Wang Q., Gan J., Papiernik S.K., et al. Transformation and detoxification of halogenated fumigants by ammonium thiosulfate. *Environ. Sci. Technol.*, 2000, 34: 3717-3721
- Wang Q., Gan J., Papiernik S.K., et al. Isomeric effects on thiosulfate transformation and detoxification of 1,3-dichloropropene. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2001, 20: 960-964
- Wang Z. Z., Zhang Y. M., Guo Y. C., Effect of organophosphorus pesticide pollution on soil animals. *Acta. Sci. Circ.*, 2000, 12(1): 47-56
- Widenfalk A., Svensson J. M., Goedkoop W. Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2004, 23: 1920-1927
- Wong P. K., Chang L. The effect of 2, 4-D herbicide and organophosphorus insecticides on growth, photosynthesis, and chlorophyll a synthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* (mt+). *Environ. Pollut.*, 1988(55): 179-189
- Wu J. Effects of Chloroacetanilide Herbicides on Membrane Fatty Acid Desaturation and Lipid Composition in Rice, Maize, and Sorghum Pestic. *Biochem. Physiol.* 2000, 66(3): 161-169
- Zagorc K. J., Nyholm N., Jacobsen B.N., et al. Effects of atrazine and alachlor on self-purification processes in receiving streams. *Water. Sci. Technol.*, 1996, 33(6): 181-187
- Zheng H. H., Ye C. M. *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35(14): 2889-2895
- Boeb A. B., 何希树. 除草剂对土壤微生物的影响. 农药译丛, 1989, 11(3): 23-26
- 戴家银, 郑微云, 干淑红. 重金属和有机磷农药对真鲷和平鲷幼体的联合毒性研究. 环境科学, 1997, 18(5): 44-46.
- 邓晓, 李雅琦. 草甘膦对土壤微生物影响的研究. 2005, 44(2): 59-62
- 樊邦荣. 《环境化学》 杭州: 浙江大学出版社, 1991: 457
- 高玉荣. 杀虫剂单甲胖对绿藻的毒性研究. 环境科学学报, 1995, 15(1): 92-97
- 胡笑彤. 我国农药工业的现状与发展方向. 农药, 1998, 37(6): 7-10



- 花日茂, 樊德方. 腐植酸对丁草胺在水中的光解效应研究. 安徽农业大学学报, 1999, 26(1): 63-67
- 花日茂, 李湘琼, 李学德等. 丁草胺在不同类型水中的光化学降解. 应用生态学报, 1999, 10(1): 57-59
- 花日茂. 酰胺类除草剂乙草胺、丁草胺在水中的光化学降解研究(博士论文) [D]. 浙江: 浙江大学, 1999
- 瞿建宏, 吴伟. 除草剂生产废水经微生物降解前后的毒理效应. 中国环境科学, 2002, 22(4): 297-30
- 孔军苗, 郑荣泉, 顾磊, 周丽泉. 乙草胺对中型土壤动物生物多样性影响的研究. 农业环境科学学报, 2005, 24(3): 576-58
- 李克斌, 蔡喜运, 刘维屏. 除草剂单用与混用对土壤微生物活性的影响. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 392-395
- 李伟, 范志金等. 氯磺隆的化学行为. 四川师范大学学报, 2002, 25(5): 521-524
- 李雪芹, 徐礼根, 马建议. 扑草净和渗透剂 OT 对蛋白核小球藻的联合毒性. 中国环境科学, 2005, 25(4): 432-436
- 梁继东, 周启星. 甲胺磷、乙草胺和铜单一与复合污染对蚯蚓的毒性效应研究. 中国应用生态学杂志, 2003, 14(4): 593-596
- 刘惠君, 刘维屏. 酰胺类除草剂与脲酶的相互作用机制研究. 浙江大学学报农业与生命科学版, 2004, 30(2): 210-214
- 刘惠君, 詹秀明, 刘维屏. 四种酰胺类除草剂对土壤酶活性的影响. 中国环境科学, 2005; 25(5): 611-614
- 刘维屏. 《农药环境化学》, 化学工业出版社: 2006
- 刘维屏, 王琪全等. 新农药环境化学行为研究-除草剂绿草定(Triclopyr)在土壤-水环境中的吸附和光解. 中国环境科学, 1995, 15(4): 311-315
- 罗海峰, 齐鸿雁等. 乙草胺对农田土壤细菌多样性的影响. 微生物学报, 2004, 44(4): 519-522
- 聂湘平, 蓝崇钰, 林里, 黄铭洪. 多氯联苯对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长影响的研究. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(1), 68-71
- 欧晓明, 唐德秀. 除草机作用机理研究的新进展. 世界农药, 2000, 10, 28-30
- 潘学冬, 花日茂. 均三氮苯类除草剂微生物降解与转化. 安徽农业大学学报, 2001, 28(3): 246-250



- 秦瑞香, 于世涛等. 酰胺类除草剂的研究进展. 青岛科技大学学报, 2003, 24: 21-23
- 苏少泉. 除草剂的代谢与新品种创制. 农药, 2001, 40(9): 1-3
- 苏少泉. 《除草剂概论》, 北京: 科学出版社, 1989
- 苏少泉. 除草剂在植物体内的代谢与选择性及使用. 现代农药, 2003, 2(6): 14-17
- 苏少泉. 除草剂中的手性化合物. 现代农药, 2005, 4(5): 1-5
- 唐除痴. 《农药化学》, 天津: 南开大学出版社, 1998
- 田芹, 周志强, 江树人, 任丽萍, 邱静. 丁草胺在环境中降解行为的研究进展. 2004, 43(5): 205-208
- 王敏欣, 李发生, 韩梅等. 异丙草胺在不同缓冲体系中水解的温度效应研究. 苏州城建环保学院学报, 2002, 15(4): 26-30
- 王琪全, 刘维屏. 除草剂乙草胺、异丙甲草胺的光降解及其致突变性. 中国环境科学, 1999, 19(1): 1-4
- 王一茹, 朱吕寿. 丁草胺在水体中的光解和稻田中归趋的研究. 环境科学学报, 1996, 16(4): 32-36
- 王则能等, 硫代硫酸钠及葡萄糖对蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 脂及光合器组成的影响. 植物学报, 2003, 45(5): 589-593
- 王振中, 张友梅, 李忠武, 邢协加. 有机磷农药对土壤动物毒性的影响研究. 应用生态学报, 2002, 13(12): 1663-1666
- 文晨等. TiO<sub>2</sub> 光催化剂在污水处理中的应用. 环境污染治理技术与设备, 2003, 4(3): 68-71
- 谢荣, 唐学玺, 李永琪. 有机磷农药和重金属对海洋微藻的联合毒性研究. 海洋环境科学, 1999, 18(2): 16-19
- 谢志浩, 黄剑锋, 陈国. 除草剂乙草胺对泥鳅血红细胞微核及核异常的诱导. 科技通报, 2003, 19(1): 77-79
- 徐建民, 黄昌勇. 磺酰胺类除草剂对土壤质量生物学指标的影响. 中国环境科学, 2000, 20(6): 491-494
- 徐军, 邱星辉, 曹宏, 杨敏, 许木启. 氯乙酰胺类除草剂微生物降解研究进展. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3): 389-393
- 严国安, 沈国兴, 严雪, 彭金良. 农药对藻类的生态毒理学研究 II(毒性机理及其富集和降解). 环境科学进展, 1999, 7(6): 132-140
- 严国安, 沈国兴等, 农药对藻类的生态毒理学研究. 环境科学进展, 1999, 7(5): 96-106





- 姚斌, 汪海珍, 徐建民, 张超兰. 除草剂对水稻土微生物的影响. 环境科学学报, 2004, 24(2): 349-354
- 姚斌, 徐建民, 张超兰. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. 土壤学报, 2004, 41(2): 320-322
- 于建垒, 宋国春, 万鲁长. 乙草胺对土壤微生物的影响研究. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(5): 61-65
- 于建垒, 宋国春. 苯黄隆对土壤微生物的影响研究. 微生物学杂志, 2000, 20(3): 63-64
- 虞云龙等. 农药微生物降解的研究现状与发展策略. 环境科学进展, 1996, 4(3): 28-36
- 张大同, 徐秀珠, 蔡小军, 何红梅, 潘春秀. 异丙甲草胺立体异构体在高效液相色谱手性固定相上的分离. 分析化学研究简报, 2004, 32(2): 191-194
- 张浩, 张成文. 影响烯草酮降解因素的研究. 农药科学与管理, 1997, 18(4): 20-22
- 张倩茹等. 乙草胺-铜离子复合污染对黑土农田生态系统中土著细菌群落的影响. 环境科学学报, 2004, 24(2): 326-332
- 郑和辉, 叶常明. 乙草胺和丁草胺的水解及其动力学. 环境化学, 2001, 20(2): 168-171
- 郑和辉, 叶常明. 乙草胺和丁草胺在土壤中的紫外光化学降解. 环境化学, 2002, 21(2): 117-122
- 周常义, 池信才, 黄成, 陈维权, 严重玲. 三唑磷对四种水生生物的毒性及安全评价研究, 台湾海峡, 2003, 22(3): 314-324



## 致 谢

本文是在刘维屏教授的悉心指导和不断鼓励下完成的。读研期间，刘老师在学术上给了我很大的帮助，老师深厚的学术功底、严谨的治学态度、丰硕的科研成果时刻教育和鼓舞着我；学术上大胆创新、拼搏进取的精神，不辞辛劳的工作作风为我树立了榜样；生活中宽厚待人、勤俭节约的处世原则，和蔼可亲、热情谦和的待人风格时时感染着我，教育着我，使我终身受益。师恩难忘，远非只言片语所能表达，在此，谨向刘老师表达我诚挚的敬意、深深的感谢和最美好的祝福！

我还要感谢我们实验室的老师们的帮助，在此要衷心感谢刘广深教授、刘惠君副教授、童裳伦副教授、文岳中副研究员、徐冬梅老师、马云老师。师兄师姐们严谨的治学态度、丰富的经验、悉心的指导和点拨，以及实验室同学们无私的帮助，让我的实验少走很多弯路。他们是：林坤德博士后、张安平博士、蔡喜运博士、陈胜文博士、王鲁梅博士、徐超博士、周珊珊博士、项光宏硕士、陈波硕士、胡洲硕士、褚华东硕士、詹秀明硕士。在此也谨向我们实验室的全体成员表示由衷的感激和深深的敬意！

在自己多年的求学生涯中，我的父母，朋友给了我很大的支持。没有他们的支持和帮助，我也不能完成学业。在此我衷心的祝愿他们身体健康、工作顺利、家庭幸福。

最后祝愿我的恩师身体健康，祝愿我的师兄师姐、师弟师妹们学业有成！

席 萌

2006-6-3