

新除草剂 HNPC-C9908 对小球藻生长的影响研究

欧晓明^{1*}, 雷满香¹, 黄明智¹, 王跃龙¹, 王晓光¹, 樊德方²

(1. 湖南化工研究院 国家南方农药创制中心湖南基地, 湖南 长沙 410007;

2 浙江大学 农药环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: HNPC-C9908 [2-(4-甲氧基-6-甲硫基嘧啶-2-基)氨基甲酰基氨基磺酰基苯甲酸甲酯] 是国家南方农药创制中心湖南基地研制成功的具有自主知识产权的一种新型磺酰脲类除草剂, 主要用于小麦田各种阔叶杂草和一些禾本科杂草的防除。以蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* Chick 为对象, 研究了 HNPC-C9908 对藻类的毒性效应及其致毒机理。实验结果表明, HNPC-C9908 对蛋白核小球藻生长具有明显影响, 在低浓度 (1 mg/L) 时具有刺激藻细胞生长的作用, 高浓度 (> 25 mg/L) 时表现出明显的抑制作用, 其对蛋白核小球藻生长的 96 h-EC₅₀ 值为 29.12 mg/L。参照国家有关建议评价标准, HNPC-C9908 对蛋白核小球藻属于低毒。同时, HNPC-C9908 对蛋白核小球藻叶绿素含量也有影响。藻细胞叶绿素含量随药剂浓度的增加而下降, 表现出良好的剂量-效应关系。在 HNPC-C9908 作用下, 蛋白核小球藻细胞中可溶性蛋白质含量和两种清除活性氧自由基的关键性酶——超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性均有明显的变化, 低浓度时表现出应激性上升, 而高浓度时明显受到抑制, 其对藻细胞可溶性蛋白质含量、SOD 和 POD 活性的 96 h-IC₅₀ 值分别为 26.27、15.25 和 13.76 mg/L, 说明 SOD 和 POD 活性的降低是 HNPC-C9908 的存在使蛋白核小球藻产生过量活性氧自由基而引起膜脂过氧化及细胞膜伤害的原因之一。

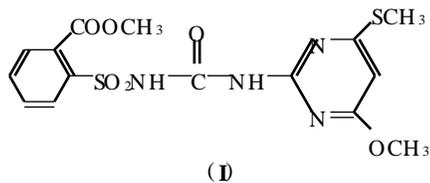
关键词: 磺酰脲类除草剂; HNPC-C9908; 蛋白核小球藻; 急性毒性; 致毒机理

中图分类号: S482.4; S481.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2003)03-0016-08

藻类是以吸收无机营养, 通过光合作用来合成细胞物质而使生命得以维持和生长的, 即光能无机营养, 其在水域中是鱼类饵料的重要来源, 在农田中是影响土壤肥力的一个因素^[1]。藻类在水生生态系统中占有十分重要的地位, 不少研究业已证实^[2-8], 农药的广泛使用会对藻类生长和繁殖带来一定影响。

HNPC-C9908 (I), 是国家南方农药创制中心湖南基地研制成功的具有自主知识产权的一种新型除草剂^[9,10], 主要用于小麦田各种阔叶杂草和一些禾本科杂草的防除, 在使用剂量 (a.i., 下同) 为 15 g/hm² 时, 其对双子叶和单子叶杂草的防治效果优于或相当于

甲磺隆 (10 g/hm²) 和扑草净 (375 g/hm²), 且对作物安全^[10]。作者以蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* Chick 为对象, 研究了 HNPC-C9908 对藻类的急性毒性, 探讨了其对藻类细胞蛋白质含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性的影响, 一则可为该新农药的环境安全性评价提供科学依据, 二则对于揭示磺酰脲类除草剂对藻类的致毒机理及开发高效低毒的环境友好农药具有重要意义。



作者简介: 欧晓明 (1964-), 男, 湖南宁远人, 副研究员, 浙江大学在读博士生, 研究方向为新农药创制、农药环境毒理和农药剂型加工技术

基金项目: 国家十五科技攻关项目 (2001BA310A14)。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料与amp;主要仪器设备

蛋白核小球藻购自中国科学院水生生物研究所, 在无菌条件下移至水生 4 号(HB-4)人工培养液^[1]中, 于植物生长箱中培养至对数生长期进一步扩大培养。培养条件为: 温度 25~28 ℃, pH 7~8, 白色日光灯, 光暗比 12 h/12 h(L/D), 光强 3 000 lx, 静止培养, 每天定时人工摇动 3 次。本研究中实验藻细胞的初始浓度为 2.29×10^6 个/mL。

试验所需的主要器材设备为 YS2-H 型显微镜带照相系统(日本 Nikon)、MR3001 型磁力搅拌机(德国 Heidolph)、515HD 型植物生长箱(美国 Scitech)、Lambda20 型紫外可见分光光度计带 UV WinLab 操作软件(德国 Perkin-Elmer)、MIKRO 22R 型高速冷冻离心机(德国 Hettich)、VC70 型细胞破碎仪(美国 Sonic & Materials Inc)、pHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)、灭菌锅、三角瓶(100 mL)等。

1.2 试剂与amp;化学药品

考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司产品, 上海化学试剂站分装); 小牛血清蛋白、氮蓝四唑(NBT)、D-蛋氨酸和 EDTA(上海华美生物工程公司); 核黄素 97.5%, 愈创木酚 99.0%(中国医药集团上海化学试剂公司); 30% 过氧化氢, 分析纯(上海桃浦化工厂产品); 碳酸镁, 化学纯(上海试剂一厂产品); 磷酸二氢钾和磷酸氢二钾均为分析纯(广东西陇化工厂产品); 二甲基甲酰胺(DMF)和丙酮为分析纯(湖南师范大学化学试剂厂产品)。

HN PC-C9908 为白色晶体, 纯度(质量分数)为 95%, 由国家南方农药创制中心湖南基地合成, 其结构经 LC-MS、IR、NMR 和元素分析仪表征^[10]。原药先溶于 DMF, 配成 2 000 mg/L 的母液, 使用时再用培养液或重蒸水配成所需浓度。

1.3 生物量测定

根据欧晓明等^[6]以前的研究结果, 不同藻细胞浓度与光密度(OD₆₈₀)之间表现出良好的线性关系。因此本文以藻液光密度值表示生物量。

1.4 溶剂 NOEC 值的测定

以 DMF 为母液溶剂设置 7 个浓度组和 1 个空白对照处理小球藻, 96 h 后在 680 nm 波长下测定光密度值, 计算各溶剂的无明显效应浓度值(no observed effect concentration, NOEC)。本文采用以下方法确定 NOEC, 即通过方差分析, 与空白试验组无显著性差异的最高浓度被认定是 NOEC 值。

1.5 急性毒性测定

以 DMF 为溶剂配制 HN PC-C9908 母液, 根据预备试验的结果设置 5~7 个浓度组和一个空白对照, 每个组设 2 个平行样, 测定 HN PC-C9908 对小球藻的急性毒性。每隔 24 h 取样测定 OD₆₈₀。用抑制率机率值(Y)-浓度对数值(X)法计算 96 h 时抑制率为 50% 的浓度值(96 h-EC₅₀)。根据抑制率的机率单位与相应的浓度对数, 用直线回归法得到浓度效应方程, 并将回归方程进行 F 检验, P < 0.05 表示结果可靠。抑制率的计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = [(\text{对照组 OD}_{680} - \text{处理组 OD}_{680}) / \text{对照组 OD}_{680}] \times 100$$

1.6 叶绿素含量测定

参照郎波等^[11]的方法进行。将藻细胞培养液摇匀, 取适量藻液加入 0.2 mL MgCO₃ 悬浮

液(1 000 mL 蒸馏水中加入 1 g MgCO₃ 配制而成),在减压下用孔径为 0.45 μm 的滤膜抽滤收集藻细胞,转入离心管(10 mL)中加入 3 mL 90% 丙酮液,超声波破碎 3 min,定容至 10 mL,振荡,离心(4 000 r/min) 15 min,静置 1~2 min。以上操作均在暗处进行。取上清液用光径为 1 cm 的比色皿在 750、663、645、630 nm 波长处分别测定其光密度。为了减少试剂和操作引起的误差,取上述制备的上清液(无培养物)作为比色测定时调节零点的空白对照。750 nm 处测得的 OD 值用于校正浊度。叶绿素 a 和 b 的含量按以下公式计算:

$$C_{ab} = 11.64OD_{663} - 2.16OD_{645} + 0.10OD_{630}; C_b = 20.91OD_{645} - 3.90OD_{663} - 3.66OD_{630}$$

式中, C_a 和 C_b 分别为提取液中叶绿素 a 和 b 的含量(μg/L), OD_{645} 、 OD_{630} 和 OD_{663} 均为校正后的 OD 值。

1.7 蛋白质含量测定

小球藻可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝法^[12]测定,以小牛血清蛋白作标准曲线。将已测定光密度的藻液放入离心管(50 mL)中在 4 000 r/min 下离心 5 min,倒出离心清液,将离心管倒置滴干,加入 3 mL 丙酮或 0.05 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液,用超声波细胞破碎仪破碎 3 min,直到镜检无完整藻细胞存在为止,定容到 5 mL,离心,取上清液进行可溶性蛋白质含量测定。单位以每克藻细胞新鲜质量所含有的蛋白质毫克数(mg/g FW)表示。

1.8 超氧化物歧化酶(SOD)的活性测定

取藻细胞加入 0.05 mol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液,超声波破碎,定容到 5 mL,4 000 r/min 离心 15 min,上清液用作 SOD 测定。SOD 测定采用 Beauchamp^[13]所建立, Bewley 等^[14]改进的氮蓝四唑光化学还原反应法。反应体系总体积为 3 mL,其中含 5×10^{-3} mol/L 的磷酸缓冲液(pH = 7.8)、 13×10^{-3} mol/L 的 D-蛋氨酸、 75×10^{-3} mol/L 的氮蓝四唑(NBT)、100 mmol/L 的 EDTA 和 2×10^{-6} mol/L 的核黄素。实验中加入蛋白核小球藻细胞中的酶提取液 0.1 mL。在荧光灯下光照 20 min。光照时反应体系中产生的活性氧自由基使 NBT 还原,形成蓝色的产物甲偈(blue formazan)。SOD 作为活性氧自由基清除剂可抑制此反应。光照后利用紫外可见分光光度计在 560 nm 波长处比色测定光吸收值(OD)。测定时用 0.1 mL 磷酸缓冲液代替酶提取液测得对照组的 OD 值。一个 SOD 活力单位定义为能引起反应初速度(指不加酶提取液时)半抑制时的酶用量。按(2)式求得:

$$\text{SOD 单位} = [(\text{对照组 OD 值} - \text{样品 OD 值}) / 50\% \text{ 对照组 OD 值}] \times \text{样品稀释倍数}$$

1.9 过氧化物酶(POD)的活性测定

POD 测定参照 Chance & Mathly^[15]建立, Srivestava 等^[16]改进的愈创木酚法。取藻细胞加入 5 mL 0.1 mol/L 的 Tris-磷酸缓冲液,超声波破碎,10 000 r/min 离心 15 min,上清液为粗酶液。反应体系包括 2.80 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液、1.0 mL 2% H₂O₂、1.0 mL 0.05 mol/L 愈创木酚和 0.2 mL 酶提取液,反应 15 min 后,于 470 nm 下测定反应体系吸光度变化。酶活性单位定义为每分钟内 ΔA₄₇₀ 变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活力单位。ΔA₄₇₀ nm 为反应时间内吸光度的变化, W 为藻类新鲜质量(g), t 为反应时间(min)。

$$\text{酶比活力} = (\Delta A_{470} / 0.01Wt) \times \text{样品稀释倍数}$$

1.10 统计分析

所有试验数据的统计分析均采用唐启义等^[17]的 DPS 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 DMF 对小球藻的 NOEC 值测定

分别以体积分数为 0.01%、0.05%、0.10%、0.25% 和 0.50% 的 DMF 处理蛋白核小球藻, 结果表明, 与对照组相比, 0.25% 以上浓度的 DMF 对蛋白核小球藻表现出一定的抑制作用, 而 0.10% 以下的 DMF 对蛋白核小球藻的生长抑制作用不明显, 甚至还有略微的促进作用。经方差分析, DMF 对蛋白核小球藻的 NOEC 值为 0.1%。

2.2 HNPC-C9908 对小球藻的急性毒性

用不同浓度的 HN PC-C9908 处理蛋白核小球藻, 以光密度值 (OD_{680}) 为指标所作的生长曲线见图 1。可见, 随着 HN PC-C9908 浓度的加大, 藻细胞量呈逐渐下降趋势, 藻类生长逐渐受到抑制。在较低浓度时 (1 mg/L) 表现出明显的刺激生长作用, 而高浓度 ($> 25 \text{ mg/L}$) 则使藻细胞生长缓慢, 外观上藻液变黄, 显微镜下观察藻细胞叶绿体解体, 畸形细胞比率较高。

HN PC-C9908 对蛋白核小球藻细胞的生长抑制作用表现出明显的浓度-效应相关性。经统计分析, HN PC-C9908 在不同时间内对蛋白核小球藻的 EC_{50} 值及其 95% 置信限见表 1。随着培养时间的延长, EC_{50} 值逐渐下降, 其 96 h- EC_{50} 值为 29.12 mg/L , 明显高于同类商品化除草剂甲磺隆、烟嘧磺隆和苄嘧磺隆^[5,7]。参照有关建议标准^[4]评价, 凡 96 h- EC_{50} 值大于 3.00 mg/L 的为低毒农药, 按此标准, HN PC-C9908 对蛋白核小球藻属于低毒。

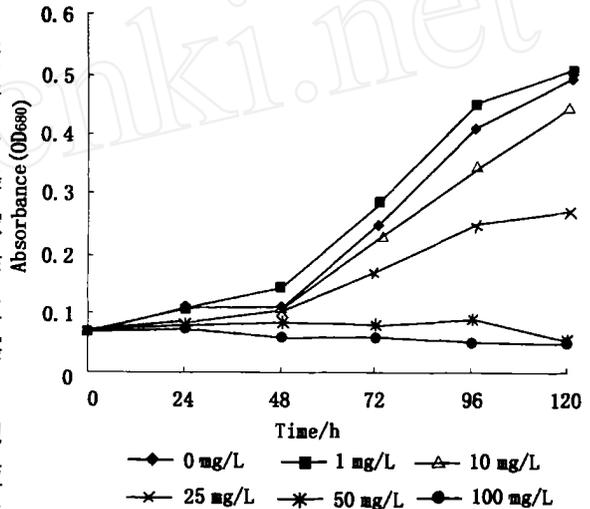


Fig. 1 Effect of HN PC-C9908 on growth of *C. pyrenoidosa*

Table 1 Toxicity of herbicide HN PC-C9908 in DMF solvent to *C. pyrenoidosa*

Time/h	Regression equation	EC_{50} (95% CL) $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	F test	Significant level P
24	$Y = 3.4239 + 0.5786x$	529.7 (151.2~3887)	96.46	2.24×10^{-3}
48	$Y = 0.4622 + 2.2165x$	111.5 (96.19~130.4)	121.57	5.20×10^{-5}
72	$Y = 1.4446 + 2.2348x$	38.99 (22.93~78.10)	152.08	1.15×10^{-3}
96	$Y = 1.4690 + 2.4117x$	29.12 (19.57~47.42)	263.72	5.08×10^{-4}
120	$Y = 0.3200 + 3.3397x$	25.20 (17.92~37.87)	222.42	6.54×10^{-4}

2.3 HNPC-C9908 对小球藻光合色素的影响

以 HN PC-C9908 处理蛋白核小球藻 96 h 之后测定藻液中的叶绿素 a (C_a) 和叶绿素 b (C_b) 含量, 结果见表 2。可看出, 低浓度 (1 mg/L) 的 HN PC-C9908 能使藻细胞光合色素增加, 而高浓度时则明显降低蛋白核小球藻的光合色素含量, 且该作用随药剂浓度的提高而增强, 表现出良好的剂量-效应变化。从叶绿素 a/b 比值看, HN PC-C9908 对其也具有一定的影响, 说明

HN PC-C9908 对蛋白核小球藻叶绿体结构具有一定的伤害作用。

Table 2 Effect of HN PC-C9908 in DM F on chlorophyll content of *Chlorella pyrenoidosa* at 96 h

Concentration /mg · L ⁻¹	OD ₇₅₀	OD ₆₆₃	OD ₆₄₅	OD ₆₃₀	C _a /μg · L ⁻¹	C _b /μg · L ⁻¹	C _{a+b} /μg · L ⁻¹	C _a /C _b
0	0.8055	0.0016	0.9379	0.9391	2.01	1.52	3.52	1.33
1	0.6923	1.0380	0.8777	0.8415	3.64	1.98	5.62	1.84
10	0.6342	1.1027	0.9169	0.8514	4.87	3.27	8.14	1.49
25	0.5606	0.9065	0.7006	0.6736	3.73	1.17	4.89	3.20
50	0.4679	0.5424	0.5413	0.5414	0.72	0.98	1.69	0.73
100	0.2183	0.2910	0.2709	0.2551	0.74	0.68	1.42	1.08

2.4 HN PC-C9908 对小球藻可溶性蛋白含量的影响

结果见图 2。可见,在培养基含有 HN PC-C9908 的情况下,蛋白核小球藻细胞中蛋白质含量会发生变化,低浓度的 HN PC-C9908 使蛋白质含量上升,而高浓度则引起蛋白质含量的降低,并且随着浓度的加大,蛋白质的含量越来越低,其 96 h-IC₅₀ 值为 26.27 mg/L (见表 3)。这与前人^[3,8]的研究结果一致。已有研究发现不少除草剂如敌稗、莠去津、特丁津(商品名 Gardoprim)、杀草丹和丁草胺等均能抑制藻类细胞蛋白质的生物合成,进而减少蛋白质含量^[3,8],说明在被农药污染的环境中,藻类可通过改变生长和蛋白质合成模式来适应改变了的环境。

Table 3 Inhibition of novel herbicide HN PC-C9908 in DM F to protein content, SOD and POD activity in the green algae cells at 96 h

Biochemical index	Regression equation	IC ₅₀ (95% CL) /mg · L ⁻¹	F test	Significant level P
Protein	$Y = 1.9147 + 2.1737x$	26.27(20.82~34.12)	946.29	7.50×10^{-5}
SOD	$Y = 3.3844 + 1.3654x$	15.25(7.03~55.74)	99.95	2.13×10^{-3}
POD	$Y = 3.3340 + 1.4631x$	13.76(5.80~67.51)	56.05	4.94×10^{-3}

2.5 HN PC-C9908 对小球藻 SOD 活性的影响

结果见图 3。可见,不同浓度的 HN PC-C9908 对小球藻 SOD 具有明显的影响,在低浓度时小球藻 SOD 活性有所增加,随着浓度的加大,其活性逐渐降低,而其对照组在无 HN PC-C9908 作用下培养 96 h 的全过程中 SOD 活性相对较高,并保持相对稳定,这与前人的研究结果一致^[3,8,18],说明 HN PC-C9908 的存在降低了小球藻细胞的 SOD 活性,造成藻细胞清除自由基的能力下降,使藻细胞内自由基过量积累,从而引起藻细胞的伤害。

在 0~96 h 的培养过程中,随着时间的延长,低浓度(1 mg/L)的 HN PC-C9908 使藻细胞 SOD 活性呈逐渐增加的趋势,72 h 后开始缓缓下降,到 96 h 时接近对照水平;高浓度(>25 mg/L)时 SOD 活性明显低于对照,表现出下降的趋势。HN PC-C9908 对蛋白核小球藻 SOD 活性的 96 h-IC₅₀ 值为 15.25 mg/L (见表 3)。

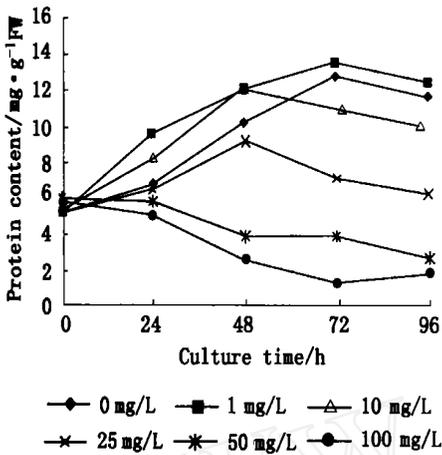


Fig. 2 Effect of HN PC-C9908 on protein content of *C. pyrenoidosa*

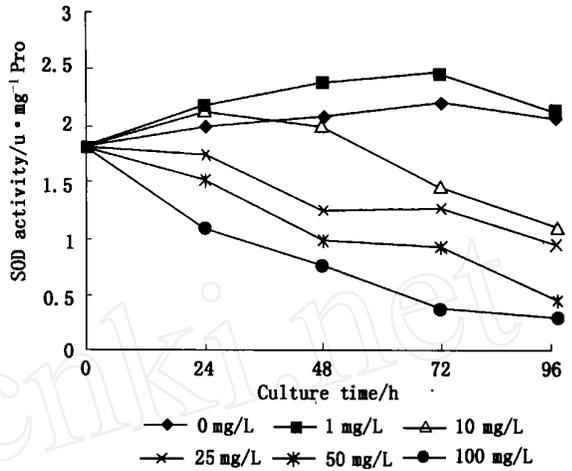


Fig. 3 Effect of HN PC-C9908 on SOD activity of *C. pyrenoidosa*

2.6 HN PC-C9908 对小球藻 POD 活性的影响

由图 4 可见, 在 HN PC-C9908 的作用下, 小球藻细胞 POD 活性表现出类似于 SOD 的变化趋势。在整个试验过程中, 低浓度 (1 mg/L) 的 HN PC-C9908 对 POD 表现出明显的刺激效应, 使之在 24 h 达到最大值, 此后迅速下降, 72 h 之后 POD 活性明显低于对照组; 大于 25 mg/L 的高浓度下, 藻细胞 POD 活性明显低于对照组, 始终表现出逐渐下降的趋势。HN PC-C9908 对蛋白核小球藻 POD 活性的 96 h-IC₅₀ 值为 13.76 mg/L (见表 3)。

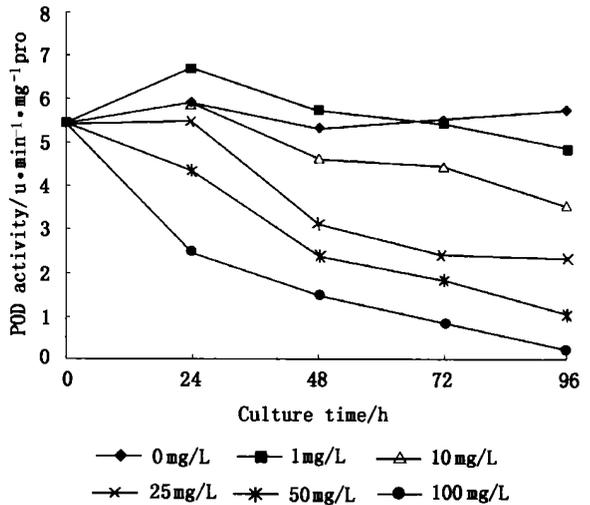


Fig. 4 Effect of HN PC-C9908 on POD activity of *C. pyrenoidosa*

POD 是藻细胞清除活性氧的关键性酶之一^[18], 其活性降低再次证明了培养液中 HN PC-C9908 的存在致使藻细胞清除活性氧自由基的能力有所下降。因此可以认为 SOD 和 POD 活性的降低是蛋白核小球藻在除草剂 HN PC-C9908 存在下产生过量的活性自由基进而引起膜脂过氧化及细胞膜伤害的原因之一。

不少研究表明, 某些逆境条件 (如低温、干旱、水渍以及盐胁迫等) 均会影响 SOD 和 POD 的活性, 破坏植物体内活性氧清除系统的平衡, 导致植物膜脂氧化的加快, 而造成细胞内膜系统和正常代谢的紊乱, 从而加速了植物的衰老和死亡^[14, 18]。对蛋白核小球藻而言, 在 HN PC-C9908 存在下, 藻细胞内 SOD 和 POD 活性的变化, 一方面说明 HN PC-C9908 对藻细胞生长具有一定影响, 另一方面也可能说明 HN PC-C9908 的存在严重影响了细胞内乙酰乳酸合成酶

(ALS)的活性,导致支链氨基酸合成受阻,蛋白质代谢发生改变,进而干扰了其正常生理生化代谢过程,SOD和POD的活性随之发生变化,从而加重对藻细胞的伤害,最终引起藻细胞死亡。关于这一点,尚有待于进一步研究。

3 小结

新型磺酰脲类除草剂HNPC-C9908对蛋白核小球藻的生长具有明显的影响。在低浓度(1 mg/L)时具有刺激藻细胞生长的作用,高浓度(> 25 mg/L)时表现出明显的抑制作用。其对蛋白核小球藻生长的96 h-EC₅₀值为29.12 mg/L,表明HNPC-C9908对小球藻的毒性属于低毒。此外,HNPC-C9908对蛋白核小球藻叶绿素含量也有影响,藻细胞叶绿素含量随药剂浓度的增加而下降,表现出良好的剂量-效应关系。

在HNPC-C9908作用下,蛋白核小球藻细胞中可溶性蛋白质含量和两种清除活性氧自由基的关键性酶——超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性均发生明显的变化,低浓度时表现出应激性上升,而高浓度时明显受到抑制,其96 h-EC₅₀值分别为26.27、15.25和13.76 mg/L,说明HNPC-C9908对蛋白核小球藻的毒性机理可能在于该药剂使SOD和POD活性下降,活性氧自由基过量积累导致藻细胞膜脂过氧化,进而引起对藻类细胞的伤害作用。

参考文献:

- [1] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京: 农业出版社, 1980
- [2] 严国安, 沈国兴, 严雪, 等. 农药对藻类的生态毒理学研究 I: 毒性效应[J]. 环境科学进展, 1999, 7(5): 96-106
- [3] 沈国兴, 严国安, 彭金良, 等. 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[J]. 环境科学进展, 1999, 7(6): 131-139
- [4] 张爱云, 蔡道基. 农药对藻类的毒性与危害性评估[A]. 蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999. 128-134
- [5] 马建义, 陈杰. 24种除草剂对蛋白核小球藻生长的效应[J]. 环境化学, 2000, 19(6): 518-522
- [6] 欧晓明, 雷满香, 王晓光, 等. 新杀虫剂HNPC-A 9908对蛋白核小球藻生长的毒性效应研究[J]. 农药学报, 2002, 4(4): 45-50
- [7] Wei L P, Yu H X, Sun Y, *et al*. The effects of three sulfonylurea herbicides and their degradation products on the green algae *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Chemosphere*, 1998, 37(4): 747-751.
- [8] DeBrenzo M E, Scott G I, Ross P E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2001, 20(1): 84-98
- [9] 黄明智, 黄路, 陈灿, 等. 具有除草活性的含烷硫基或丙烯(炔)氧基磺酰脲类化合物及其制备方法[P]. 中国专利: CN 1323789A, 2001-11-28
- [10] 黄明智, 赵利辉, 黄路, 等. 磺酰脲类化合物的合成与除草活性研究[J]. 新农药, 2001(特刊): 95-100
- [11] 郎波, 赵晓蕾. 灭藻剂评价方法的研究[J]. 工业水处理, 2001, 21(4): 27-29
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [13] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel [J]. *Anal Biochem*, 1971, 44: 276-278
- [14] Bewley R D. Physiological aspects of desiccation tolerance [J]. *Rev Plant Physiol*, 1979, 20: 195-238

- [15] Chance B, M athly A E. Method in Enzymology[M]. New York: Academic Press Inc, 1955. 764-771.
- [16] Srivastava O P, Van Huystee P B. Evidence for close association of POD polyphenol oxidase and IAA oxidase isoenzyme of peanut suspension culture medium [J]. *Can J Bot*, 1973, 51: 2207-2215.
- [17] 唐启义, 冯明光. 统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 648.
- [18] 聂湘平, 蓝崇钰, 林里, 等. 多氯联苯对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长影响的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 68-71.

Effects of Novel Sulfonylurea Herbicide HNPC-C9908 on Growth of Green Algae *Chlorella pyrenoidosa*

OU Xiaoming^{1*}, LEIM an-xiang¹, HUANG Ming-zhi¹
WANG Yue-long¹, WANG Xiao-guang¹, FAN De-fang²

(1. Hunan Branch of National Pesticide R&D South Center, Hunan Research

Institute of Chemical Industry, Changsha 410007, China;

2. Institute of Pesticide & Environmental Toxicology,

Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: HN PC-C9908 [2-(4-methoxy-6-methylthiopyrimidin-2-yl) carbamoyl sulfonyl benzoate] is a novel sulfonylurea herbicide discovered by Hunan Branch of the National Pesticide R&D South Center, Changsha, China, which is effective in controlling various broadleaf weeds and some grasses in the wheat field. Toxicity and toxic mechanism of HN PC-C9908 to the green algae, *Chlorella pyrenoidosa* Chick, were studied in the laboratory. The experimental results showed that HN PC-C9908 had obvious effects on the growth of the algae, depending upon the concentrations. The growth stimulation was observed under the low concentration of 1 mg/L HN PC-C9908, and the obvious inhibition of the growth of the green algae under the high concentration of more than 25 mg/L. Its 96h-EC₅₀ value of HN PC-C9908 against the algae growth was 29.12 mg/L, indicating that HN PC-C9908 was considered as a low toxic pesticide to the green algae. Meanwhile, HN PC-C9908 also exhibited some inhibitory influences on the photosynthesis pigments such as chlorophyll a and b. The chlorophyll content of the algae cells declined with the increasing concentration of HN PC-C9908, showing the good concentration-effect relationship. In the presence of HN PC-C9908, the soluble protein content, the two key enzymes responsible for eliminating the active oxygen superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activity in the algae cells exhibited the obvious changes. The irritable increases of the protein content, SOD and POD activity in the algae cells were observed under the low concentration, and significant inhibitions appeared under the high concentration with the 96 h-IC₅₀ values of 26.27 mg/L, 15.25 mg/L and 13.76 mg/L, respectively, demonstrating that HN PC-C9908 resulted in the decline of SOD and POD activity in the algae cells, making the active oxygen excessive and accumulative, algae cell membrane lipid peroxidation, and thus caused the damage of the algae cells.

Key words: novel sulfonylureas; HN PC-C9908; *Chlorella pyrenoidosa*; acute toxicity; toxic mechanism