

# 复合肥对花背蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响<sup>\*</sup>

王 懿<sup>1</sup> 李丕鹏<sup>1</sup> 陆宇燕<sup>1\*\*</sup> 代辰飞<sup>2</sup> 王 勇<sup>1</sup> 杨皓月<sup>1</sup> 马媛媛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>沈阳师范大学辽宁省生物进化与生物多样性实验室, 沈阳师范大学两栖爬行动物研究所, 沈阳 110034; <sup>2</sup>中国医科大学, 沈阳 110001)

**摘 要** 以花背蟾蜍蝌蚪外周血红细胞微核及核异常作为毒理监测指标, 对 Gosner 31、42 和 46 期蝌蚪进行观察, 研究了复合肥对水生生物的毒性效应。结果表明: 用复合肥溶液浓度为 1、1.5、2、2.5 和 3 g · L<sup>-1</sup> 进行染毒时, 红细胞出现了大、小 2 种类型的微核, 在核异常类型中出现了严重的核分叶和双核类型; 在 3 个被观察的蝌蚪发育期中, 42 期蝌蚪红细胞微核细胞率和核异常细胞率数值明显低于其他两个发育期; 在 5 个浓度的染毒中, 2.5 g · L<sup>-1</sup> 浓度组在微核、双核和核分叶与对照组间无显著性差异; 花背蟾蜍不同发育时期的蝌蚪, 对生境中不良因素的抵抗能力存在着明显的差别, 且微核和核异常与复合肥浓度之间没有明显的剂量-效应关系。

**关键词** 复合肥; 花背蟾蜍蝌蚪; 微核; 核异常

**中图分类号** Q958 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2011)12-2843-06

**Toxicity effects of compound fertilizer on erythrocytes micronuclei and nuclear anomalies of *Bufo raddei* tadpoles.** WANG Yi<sup>1</sup>, LI Pi-peng<sup>1</sup>, LU Yu-yan<sup>1\*\*</sup>, DAI Chen-fei<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>1</sup>, YANG Hao-yue<sup>1</sup>, MA Yuan-yuan<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Liaoning Key Laboratory of Evolution and Biodiversity, Shenyang Normal University, Institute of Herpetology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China, <sup>2</sup>China Medical University, Shenyang 110001, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(12): 2843–2848.

**Abstract:** In order to understand the toxicity effect of compound fertilizer on aquatic organisms, the erythrocytes of *Bufo raddei* tadpoles at Gosner stages 31, 42 and 46 were taken as the test materials to observe their micronuclei and nuclear anomalies under effects of compound fertilizer. When exposed to the compound fertilizer at concentrations of 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 g · L<sup>-1</sup>, two types of micronuclei, a big one and a small one, appeared in the erythrocytes of the tadpoles, and in the nuclear anomalies, serious nuclear lobulation and double-nuclei appeared. The frequencies of appearing micronuclei and nuclear anomalies were obviously lower at stage 42 than at stages 31 and 46. Among the five experimental groups, the group exposed to 2.5 g · L<sup>-1</sup> of compound fertilizer had no significant differences in the micronucleus, double-nucleus, and nuclear lobulation with the control group. The results suggested that the tadpoles at their different development stages had obvious difference in resisting the adverse factors in habitats, and no obvious dose-effect correlation existed between the micronuclei and nuclear anomalies and the concentration of compound fertilizer.

**Key words:** compound fertilizer; *Bufo raddei* tadpole; micronuclei; nuclear anomaly.

随着工业化进程的加速和人口的急速增加, 对农作物的产量提出了更高的要求, 化肥的使用在这方面起着举足轻重的作用。化肥的不合理使用, 在

造成化肥大量浪费的同时, 也直接导致了土壤固有的团粒结构遭到破坏和肥力下降, 由于渗透和雨水的冲刷, 土壤中的化肥成分以不同途径进入水体中, 长期积累后将引起严重的水环境污染。据资料报道, 发达国家为了防止化肥对水体的污染设置了 225 kg · hm<sup>-2</sup> 的化肥使用安全上限, 美国年平均使

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金项目(30470206 和 30870276) 和辽宁省优秀人才培养计划和教育厅科研项目资助。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 E-mail: luyuyan2001@yahoo.com

收稿日期: 2011-05-06 接受日期: 2011-08-16

用量为  $108.4 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 而中国化肥平均使用量达  $375 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 其中山东省在 2007 年平均达  $500.34 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 宁波市在 2004 年达到了  $587.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ , 而三峡库区的秭归高达  $757.8 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$  (薛旭初, 2006; 曹彦龙等, 2008; 王玉梅等, 2009)。如此大量的使用化肥, 不仅使中国农田面临着严重的化肥污染, 同时对水体富营养化的影响也进一步加剧。对化肥用量的有效控制和农产品产量之间的平衡已成为农业可持续发展的巨大挑战之一。

在农业生产施用的各种化肥中, 氮肥的用量占首位, 对环境造成的污染也最为严重。研究显示, 各种氮肥在地表水中溶解时均能产生  $\text{NO}_3^-$ , 生物体吸收后被还原成  $\text{NO}_2^-$ , 其可将红细胞内的血红蛋白氧化成高铁血红蛋白, 降低其携带氧气的能力, 使生物体因为缺氧而导致代谢紊乱, 直至死亡 (苗德志和李松梧, 2007)。氮素肥料对蝌蚪活动行为、存活率、发育速率、肝脏显微和亚显微结构以及甲状腺和白细胞数量等方面也都显示出了明显的损伤现象 (李贞等, 2010)。

自微核技术创建以来 (Heddle, 1973; Schmidt, 1975), 由于其方法的简单快捷和有效性得到了全球研究机构的认可, 已被确定为新药、食品添加剂、农药、化妆品等毒理安全性评价的必做实验之一 (苑宇哲等, 2004; 杜峰涛和李林, 2007)。由于蝌蚪的皮肤极薄, 具有极好的渗透性, 且在变态前有外鳃暴露于水环境中。因此, 水环境中的污染物能很快地作用于其机体。同时, 蝌蚪数量多、易于在实验室条件下饲养和观察, 且红细胞染色后胞核结构特别清晰。因此, 蝌蚪红细胞微核实验成为检测水中污染物一种比较理想的方法 (汤新慧, 1998; 耿德贵等, 2000; 林玲等, 2009)。国内外学者利用两栖类动物的蝌蚪进行了大量的有关环境污染因子的毒性效应研究 (南旭阳等, 2000; Hyaes *et al.*, 2003; 苑宇哲等, 2005), 证实通过观察红细胞微核及核异常, 可监测这些污染因子的诱导作用, 进而评估它们对环境的影响。

花背蟾蜍 (*Bufo raddei*) 是中国北方的广布种, 在发育生物学和环境污染检测等方面已被广泛作为实验动物 (龙静等, 2004; 何米雪等, 2006; 魏仲梅等, 2008)。本文选用花背蟾蜍蝌蚪作为实验对象, 探讨实验室条件下不同浓度的复合肥对其红细胞的遗传损伤作用, 以初步确定可以保证花背蟾蜍蝌蚪正常发育, 同时不影响农作物生长前提下的化肥安全

施用浓度, 为水环境保护及农业的可持续发展提供可参考的科学资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

实验动物: 花背蟾蜍蝌蚪, 将从沈阳昭陵采回的抱对的花背蟾蜍放在  $41 \text{ cm}(\text{L}) \times 29.5 \text{ cm}(\text{W}) \times 21.5 \text{ cm}(\text{H})$  的整理箱中, 向整理箱中加 4 L 曝气 2 d 的自来水, 让其在室内产卵。

复合肥: 湖北洋丰股份有限公司产硫酸钾型复合肥,  $\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$  (12-20-13) 总养分  $\geq 45\%$ , GB 15063—2001, 鄂农肥 (2009) 准字 0086 号, 鄂农 XK 13-001-00003。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 急性实验** 用曝气 2 d 的自来水配制 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和  $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的复合肥的水溶液, 并搅拌促其充分溶解后取其上清液, 依据 Gosner (1960) 分期标准选取 31 期蝌蚪, 将它们暴露在不同浓度的复合肥溶液中 96 h, 每组 20 只, 每天记录其死亡数量。按照改良的寇氏法计算出 LD50 为  $8.76 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 故取 1、1.5、2、2.5 和  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  作为慢性实验的浓度, 以  $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  作为对照组。

**1.2.2 慢性实验** 配制 5 和  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的化肥工作母液, 取其上清液稀释至实验所需浓度, 将 500 枚花背蟾蜍的受精卵放入盛有 12 L 不同浓度复合肥溶液的整理箱中进行慢性染毒实验。对照组和实验组花背蟾蜍的孵化率均在 95% 以上, 相互之间没有显著性差异。待其孵化后每天上午喂以熟鸡蛋黄、经开水烫过的菠菜叶及鱼虫。每隔 1 d 完全更换一次培养箱中的水。

在每个浓度组中选取发育至 31、42、46 期的蝌蚪各 7 只, 断尾取血做涂片或印片。一般 31 期一只蝌蚪做一张血涂片, 42 和 46 期一只蝌蚪做 1~2 张血涂片。甲醇固定, Wright 染色液染色。参照耿德贵等 (2000) 和楼允东和吴萍 (1994、1996) 对微核和核异常判断标准进行计数, 并结合本实验的实际情况作了部分调整 (表 1)。每张血涂片计数细胞数大于 1000 个, 同时选取染色效果好的血涂片照相, 利用 Olympus-BX50 多功能显微镜观察并照相。

### 1.3 数据处理

观察结果以千分率 (%) 表示。计算公式如下:  
微核细胞率 = 具有微核的细胞总数 / 观察细胞总数  $\times 1000\%$

核异常细胞率=每种类型的核异常数/观察细胞总数×1000‰

所得数据经 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析分析,结果表示为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 复合肥对花背蟾蝌蚪红细胞微核的诱导

不同浓度组复合肥染毒后,大多数表现出对花背蟾蝌蚪外周血红细胞微核有极明显的诱导作用(表 2)。而且发现不仅有大小为主核的 1/10 左右的小型微核(图 1-1),还有大小为主核 1/3 左右的大型微核(图 1-2)的出现,但在数量上大型微核数仅占微核总数的 1/10 左右。花背蟾蝌蚪红细胞微核呈圆形,大多脱离主核,存在于胞质中。2 种微核的染色特征与主核基本一致。

由表 2 可见,首先在对照组中,所观察的 3 个发育期蝌蚪外周血红细胞微核细胞率呈“U”型的变化规律,即 31 期为最高,42 期最低,46 期略有上升,且不同浓度组处理后的微核细胞率也具有同样的变化趋势。其次,在处理组中,2.5 g · L<sup>-1</sup> 染毒后蝌蚪的微核细胞率在 3 个发育期中均呈最低数值,虽均高于对照组,但与对照组间没有显著性差异。第三,红细胞微核率的最高值虽然与对照组间均呈极显著性差异,但在 31、46 期出现在 1 g · L<sup>-1</sup> 浓度组,而在 42 期则出现在 2 g · L<sup>-1</sup>。

2.2 复合肥对花背蟾蝌蚪红细胞核异常的诱导

经不同浓度化肥染毒后,花背蟾蝌蚪外周血

表 1 核异常的分类标准  
Table 1 Classification standard of nuclear anomalies

核异常类型	判断标准
双核	细胞内有 2 个大小形状相差不大的核
核分叶	细胞内有至少 3 个核,核的形状和大小不一
核空泡	细胞核上有一明显的没有染色质的空泡
核不规则	细胞核的边缘十分不整齐,有的向内凹陷,有的向外突出,使细胞核呈现出各种不规则的形状

红细胞中均出现多种类型的核异常现象(表 1,图 1),主要可分为双核、核分叶、核空泡和核不规则(核内凹和核突出)。其中双核和核分叶属于核在整体结构上发生了重大的变化,且在计数和数据分析中占有明显的重要作用,故将其划分为第 1 类核异常;而核不规则只是细胞核整体结构不变的情况下,由于外在的因素引起的核膜结构的局部改变,致使细胞核边缘形态的改变或者核内染色质分布发生改变,因此,将其划为第 2 类核异常。在后续的统计数据中可以显示出第 1 类和第 2 类核异常之间存在着比较明显的诱导差异。

由表 2 可见,在 4 种核异常的对照组中,只有核不规则细胞率在所观察的 3 个发育期间数值比较接近,而空泡细胞率由 31 期、42 期到 46 期呈下降的趋势,核分叶细胞率和双核细胞率与微核细胞率一样,呈现前降后升的趋势,即呈“U”型变化。实验结果提示,在对照组中,存在一个基础的核异常数值,即核异常本底数值,并且在蝌蚪不同发育期存在着一定的变化趋势。

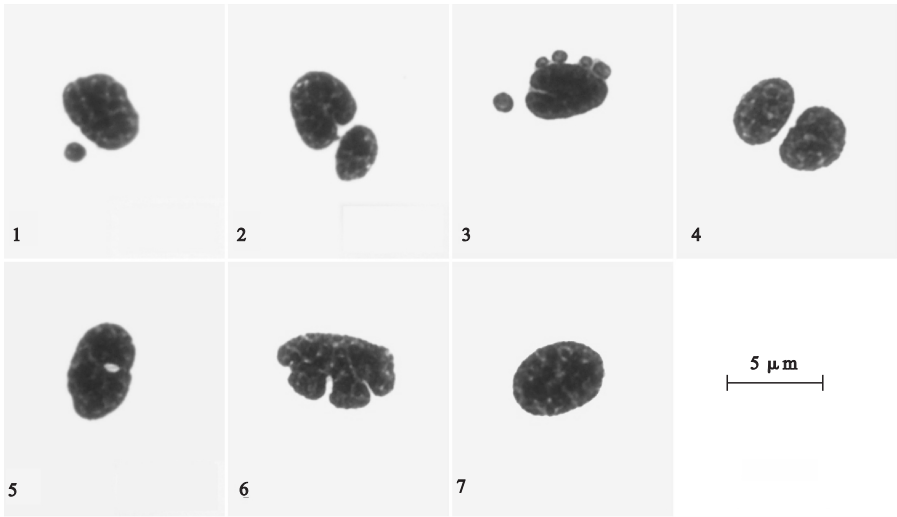


图 1 花背蟾蝌蚪红细胞的异常核和正常核  
Fig. 1 Normal and abnormal nuclear of *Bufo raddei* tadpoles  
1,小微核;2,大微核;3,核分叶;4,双核;5,核空泡;6,核不规则;7,正常核。

表 2 不同复合肥浓度下花背蟾蝌蚪的微核及核异常率  
Table 2 Change in ratio of micronuclei and nuclear anomalies

发育期 (期)	浓度 (g · L <sup>-1</sup> )	蝌蚪数 (只)	微核细胞率 (‰)	双核细胞率 (‰)	核分叶率 (‰)	核空泡率 (‰)	核不规则率 (‰)
31	0	7	86.35±17.91	10.90±4.01	16.92±2.27	39.07±7.25	221.37±41.96
	1	7	175.65±30.83 **	23.76±6.54	55.03±12.56 **	16.82±5.93	290.98±32.28
	1.5	7	161.17±33.33 **	48.99±18.38 **	47.29±5.65 **	33.25±4.85	484.06±96.81 **
	2	7	139.59±13.29 *	18.59±11.68	59.73±16.75 **	34.65±5.33	432.44±123.91 **
	2.5	7	106.54±24.87	23.60±14.03	9.16±4.84	87.47±32.69 **	441.52±71.32 **
	3	7	151.46±32.66 **	32.87±14.87 **	54.59±14.08 **	59.57±19.09	518.28±18.94 **
42	0	7	18.41±5.42	1.60±0.52	0.63±0.54	21.52±9.77	241.43±125.94
	1	7	69.86±13.26 *	8.65±3.25	21.44±12.10 *	42.62±27.70	542.05±32.57 **
	1.5	7	92.47±18.46 **	23.21±14.59 *	26.79±12.22 **	58.81±9.95 *	485.70±43.77 **
	2	7	119.54±46.39 **	16.28±10.64	29.41±17.33 **	29.70±16.44	480.66±18.27 **
	2.5	7	42.08±24.10	11.44±9.25	1.31±0.52	33.61±19.34	462.87±88.55 **
	3	7	109.47±40.36 **	20.52±10.82 *	10.34±6.32	45.36±11.22	391.88±67.01 *
46	0	7	38.77±17.40	20.08±1.93	3.61±2.67	10.79±5.18	197.38±50.83
	1	7	195.99±19.82 **	31.06±8.28	43.02±14.34 **	49.03±11.36	328.66±56.30 *
	1.5	7	94.28±20.17 *	31.74±9.30 *	11.52±7.50	74.96±37.36 *	410.31±21.92 **
	2	7	140.57±37.77 **	26.86±7.96	17.54±8.93	42.88±15.78	417.67±85.59 **
	2.5	7	69.27±32.08	20.30±4.15	1.83±0.48	71.87±37.75 *	336.74±51.85 **
	3	7	117.57±40.90 **	14.73±1.69	14.5±7.12	54.83±32.48	438.95±31.82 **

\* 与对照组间呈显著性差异( $P<0.05$ ); \*\* 与对照组间呈极显著性差异( $P<0.01$ )。

在第 1 类的核异常中,31 期蝌蚪最为严重,42 期次之,46 期最轻微。在 31 期中,核分叶细胞率在 2.5 g · L<sup>-1</sup> 处理组最低,并与对照组间无显著性差异,其他 4 个处理组均与对照组呈极显著性差异;双核细胞率在 1.5 和 3 g · L<sup>-1</sup> 浓度组与对照组间呈极显著性差异,其他均无显著性差异。42 期的核分叶细胞率在 2.5 g · L<sup>-1</sup> (最低值) 和 3 g · L<sup>-1</sup> (次低值) 浓度组与对照组间无显著性差异,其余 3 个浓度组与对照组间呈显著或极显著性差异;双核细胞率仅在 1.5 和 3 g · L<sup>-1</sup> 浓度组与对照组间呈显著性差异,其他均无显著性差异。而 46 期只在 1 g · L<sup>-1</sup> 浓度组中核分叶细胞率与对照组间呈极显著性差异,其余浓度组的核分叶细胞率和双核细胞率均与对照组间无显著性差异。

在第 2 类核异常中,31 期受损伤最轻,46 期次之,42 期最重,与第 1 类核异常不同。在核内空泡细胞率中,31 期的最高值出现在 2.5 g · L<sup>-1</sup> 浓度组,并与对照组间呈极显著性差异,42 期和 46 期的最高值均出现在 1.5 g · L<sup>-1</sup> 浓度组,虽然与相应的对照组间仅呈显著性差异,但与 31 期相比较却降低了 2 个浓度等级;而且 46 期在 2.5 g · L<sup>-1</sup> 浓度组还有一个次高值的出现,也仅与对照组间呈显著性差异。在核不规则细胞率中,31 期和 46 期的最高值均出现在 3 g · L<sup>-1</sup> 浓度组,与对照组间呈极显著性差异,而 42 期的最高值却仍然出现在 1 g · L<sup>-1</sup> 浓度组,并

与对照组呈极显著性差异。但与前 2 个发育期相比,降低了 4 个浓度级别。

3 讨 论

3.1 复合肥染毒后对花背蟾红细胞微核的诱导作用

对于微核的生成机制,多数学者认为微核主要是由于细胞受外界因素损伤后染色体畸变中的无着丝粒断片和单条或多条染色体,在分裂过程中脱离原有的细胞核所致。一般将由于断裂产生的无着丝粒染色体断片形成的体积只有原核 1/10 左右的微核称为小微核;由于纺锤体损伤导致一条或多条染色体脱离主核而形成体积为主核 1/3 左右的微核称为大微核(贺维顺和王蕊芳,1992;耿德贵等,2000;符英丽和曾雪爱,2002)。但也有学者通过实验证实,在细胞分裂间期,细胞核可以通过出芽的方式生成微核,并指出部分微核具有一定的结构,且具有 DNA 的复制能力(曹佳等,2000;耿德贵等,2000;杜峰涛和李林,2007)。本实验中观察到 2 种类型的微核,说明复合肥溶液作用于花背蟾蝌蚪后,对染色体和纺锤体的结构均有一定的破坏作用,但从 2 种微核所占的比例看,复合肥溶液的毒性作用主要是对染色体的损伤。另外,实验结果也显示出不同发育期的蝌蚪,对复合肥诱导微核的应激性存在着明显的差异。如 31 期和 46 期在 1 g · L<sup>-1</sup> 浓度时就出



现了微核细胞率的最大值,而42期蝌蚪在 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度组中才出现微核细胞率的最大值,且在数值上小于前二者,并呈显著或极显著差异。本实验结果与用硝酸铵化肥溶液处理不同孵化期锄足蟾(*Pellobates cultripes*)蝌蚪的结果相同(Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2006)。进一步说明在蝌蚪的不同发育时期,由于体内各种器官构建进程不同,功能完善的程度不同,对外界因素的敏感性及通过自身的防御功能抵御外界损伤和修复能力也有着显著的差异。

### 3.2 复合肥染毒对花背蟾蜍红细胞核异常的诱导作用

复合肥染毒后花背蟾蜍外周血红细胞,不仅出现了一般研究中常见的核突起、核凹陷等核异常类型(楼允东和吴萍,1994,1996;耿德贵等,2000),还出现了较多的核分叶和双核现象。核分叶即在染毒的花背蟾蜍蝌蚪的红细胞中,同时存在3个以上小于正常核,且相互之间独立或有一定连接点的核结构,而此时的红细胞外形仍为正常的椭圆形。有研究表明,微核是细胞受外界因素影响启动细胞凋亡后, $\text{Ca}^{2+}$ 依赖性内切酶对DNA进行切割,所形成的细胞核碎片(杜峰涛和李林,2007)。因此,作者认为核分叶现象应属于细胞凋亡初期的现象。同时,从表2看,微核细胞率和核分叶细胞率之间似乎存在着一定的关系,但还需后续实验的证实。

在磷酸二铵化肥的染毒实验中,花背蟾蜍肝细胞内主要抗氧化酶活性呈现明显升高趋势(李贞等,2010),说明磷酸二铵染毒能引起细胞内氧自由基的过量产生。氧自由基不仅对生物膜结构有着明显的破坏作用,还破坏包括细胞骨架在内的蛋白质结构,最终导致细胞骨架结构的解体(凌亦凌和刘艳梅,2004)。在两栖类外周血中,红细胞存在少量的无丝分裂现象。因此,在血涂片上常看到胞质和胞核均呈“8”字形的细胞(王晓茹等,2010)。但复合肥染毒后,在血细胞中很少能观察到呈“8”字形的细胞,却能发现较多数量的双核细胞。这种现象的出现,是否与复合肥刺激引起氧自由基的增加,从而破坏了细胞分裂过程中各种骨架成分结构之间的协调作用,或者与复合肥染毒刺激引起了蝌蚪红细胞分裂增多有关,还有待深入探讨。

### 3.3 不同发育时期对复合肥染毒的敏感性

在蟾蜍的胚胎发育和变态发育过程中,各器官结构和功能上的完善具有一定的顺序,且不同的发育时期,对外界环境因素刺激的应激性也具有一定

的差异性(赵振芳,1991;陈伟庭和李东风,2005;陈伟庭等,2007)。本实验观察到在3个发育期中,31期蝌蚪在微核细胞率和第1类核异常细胞率2项均显示出了对外界污染因素极高的敏感性,46期次之。而42期则显示出了外界污染因素较强的抵抗能力。从蝌蚪发育时期的划分上看,42期的蝌蚪前肢已经伸出,开始尝试由前肢支撑着抬头、登陆,此时其呼吸逐渐由鳃呼吸转变为肺呼吸。正是由于呼吸方式的改变和逐步登陆脱离水环境,导致了水环境中污染因子对其的作用有所降低或减弱。而31期和46期分别是后肢发育旺盛期和尾部通过程序性死亡自我吸收的过程。此时蝌蚪体内进行着复杂的形态结构和生理功能的重建,故表现出对外界环境极为敏感的状态。

既然复合肥对花背蟾蜍蝌蚪外周血细胞具有明显的毒性作用,那么在由卵到幼蟾的整个发育过程中,各个脏器结构和功能的构建,尤其是生殖腺的正常发育是否也会受到复合肥的影响进而对两栖动物种群的稳定具有潜在的威胁作用;即使是完成发育的幼蟾,各系统功能是否正常,能否安全渡过即将面临的严冬等问题,还有待进一步的探讨。

另外,在实验设置的5个浓度组中, $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组在微核细胞率和第一类核异常细胞率两项显著低于2和 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组。这种不符合剂量-效应关系的现象,是复合肥对花背蟾蜍蝌蚪外周血微核和核异常诱导本身存在的特性,还有由于实验中观察的个体数量有限而产生的现象也有待于后续实验的验证。

### 参考文献

- 曹佳,林真,余争平等. 2000. 微核试验:原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用. 北京:军事医学科学出版社.
- 曹彦龙,李永红,汪立飞,等. 2008. 三峡库区农业化肥流失污染及其成因分析. 江苏环境科技, **21**(1): 4-8.
- 陈伟庭,范玉琴,李东风. 2007. 中国林蛙早期胚后发育观察. 华南师范大学学报(自然科学版), (1): 104-109.
- 陈伟庭,李东风. 2005. 中国林蛙早期胚胎发育观察. 华南师范大学学报(自然科学版), (3): 36-41.
- 杜峰涛,李林. 2007. 细胞微核形成机理探讨. 现代检验医学杂志, **22**(4): 19-22.
- 符英丽,曾雪爱. 2002. 化学农药对蝌蚪染色体微核形成的影响. 海南师范学院学报(自然科学版), **15**(1): 89-92.
- 耿德贵,张大生,程伟,等. 2000. 四种除草剂对中华大

- 蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响. 动物学杂志, **35**(1): 12-16.
- 何米雪, 陈沃洪, 刘木养, 等. 2006. 几种化学物质对蟾蜍蝌蚪生存及生长发育的影响. 生命科学研究, **10**(2): 156-161.
- 贺维顺, 王蕊芳. 1992. 污水和污水土地处理系统中各种水质对华西蟾蜍蝌蚪红细胞微核率的影响. 动物学研究, **13**(3): 275-279.
- 李贞, 李丕鹏, 徐齐艳, 等. 2010. 农药和化肥对无尾两栖类蝌蚪的毒性效应研究进展. 生态毒理学报, **5**(2): 287-294.
- 林玲, 姚丹, 钟碧瑾, 等. 2009. 丁草胺对中华大蟾蜍蝌蚪的遗传毒性. 福建师范大学学报(自然科学版), **25**(6): 65-70.
- 凌亦凌, 刘艳梅. 2004. 低氧血症与组织缺氧时细胞的损伤及其机制. 国外医学呼吸系统分册, **24**(2): 110-112.
- 龙静, 张迎梅, 赵东芹, 等. 2004. 铅对花背蟾蜍受精卵出膜及蝌蚪生长的影响. 甘肃科学学报, **16**(2): 47-49.
- 楼允东, 吴萍. 1994. 两种农药对泥鳅红细胞微核及核异常的诱导. 上海水产大学学报, **3**(3): 104-110.
- 楼允东, 吴萍. 1996. 亚硝基胍对泥鳅红细胞微核及核异常的诱发. 中国环境科学, **16**(4): 275-278.
- 苗德志, 李松梧. 2007. 谈谈化肥对水域的污染及其防治. 农业环境与发展, (2): 58-60.
- 南旭阳, 陈浩, 张碧双, 等. 2000. 除草剂“甘草膦”对蟾蜍外周血红细胞微核及核异常的影响. 温州师范学院学报(自然科学版), **21**(6): 57-58.
- 汤新慧. 1998. 除草剂诱发蟾蜍蝌蚪红细胞微核的研究. 中国环境科学, **18**(2): 162-165.
- 王晓茹, 陆宇燕, 聂颖, 等. 2010. UVA 对花背蟾蜍微核及核异常的诱导. 四川动物, **29**(3): 357-362.
- 王玉梅, 任丽军, 霍太英, 等. 2009. 山东省化肥流失状况及其对水环境污染的影响. 鲁东大学学报(自然科学版), **25**(3): 263-266.
- 魏仲梅, 陈玉琴, 俞诗源. 2008. 花背蟾蜍肺发生及转化生长因子- $\beta$ 的表达. 解剖学报, **39**(4): 566-572.
- 薛旭初. 2006. 化肥、农药的污染现状及对策思考. 上海农业科技, (5): 37-40.
- 苑宇哲, 徐士霞, 姚春生, 等. 2005. 阿特拉津对弹琴蛙 (*Rana adenopleura*) 蝌蚪微核和核异常的影响. 应用与环境生物学报, **11**(3): 333-336.
- 苑宇哲, 徐仕霞, 姚春生, 等. 2004. 应用蝌蚪快速检测环境变异的两种方法——微核试验和单细胞凝胶电泳. 四川动物, **23**(1): 74-76.
- 赵振芳. 1991. 花背蟾蜍胚胎发育的初步观察. 动物学杂志, **26**(2): 11-16.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, **16**: 183-190.
- Heddle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **18**: 187-190.
- Hyaes T, Haston K, Tsui M, et al. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*, **111**: 568-575.
- Ortiz-Santaliestra ME, Marco A, Fernández MJ, et al. 2006. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**: 105-111.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **31**: 9-15.

---

作者简介 王懿,男,1985年11月生,硕士研究生。主要从事细胞毒理学研究。E-mail: wangyiwangyi121@163.com  
责任编辑 李凤芹

---