

# 氰氟草酯对斑马鱼的急性毒性和生物富集效应

涂杰<sup>1,2</sup>, 沈艳<sup>2</sup>, 刘晓敏<sup>2</sup>, 武健<sup>2</sup>, 董旭<sup>2</sup>, 朱伟华<sup>2</sup>, 张勇<sup>2\*</sup>

(1. 合肥学院, 安徽合肥 230031; 2. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽合肥 230031)

**摘要** [目的] 评价 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的急性毒性和生物富集效应。[方法] 参考《化学农药环境安全评价试验准则》, 测定 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的急性毒性和生物富集效应, 计算半效应浓度  $LC_{50}$  和生物富集系数 BCF。[结果] 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼急性毒性为中毒, 生物富集等级属于中等富集性。[结论] 在实际应用过程中, 氰氟草酯应严格控制其用量, 尽可能减少对斑马鱼和水生生态系统的危害。

**关键词** 氰氟草酯; 斑马鱼; 急性毒性; 生物富集

中图分类号 X 503.225 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)18-0084-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.18.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Acute Toxicity and Bioconcentration of Cyhalofop-butyl in *Brachydanio rerio*

TU Jie<sup>1,2</sup>, SHEN Yan<sup>2</sup>, LIU Xiao-min<sup>2</sup> et al (1. Hefei University, Hefei, Anhui 230031; 2. Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract** [Objective] To evaluate the acute toxicity and bioenrichment effects of 97% cyhalofop-butyl on *Brachydanio rerio*. [Method] The acute toxicity and bioaccumulation effect of 97% cyhalofop-butyl on *Brachydanio rerio* were determined. The median effective concentration  $LC_{50}$  and bioconcentration factor BCF were calculated by reference to *Test Guidelines on Environmental Safety Assessment for Chemical Pesticides*. [Result] The acute toxicity of 97% cyhalofop-butyl on *Brachydanio rerio* was middle toxic; cyhalofop-butyl was a kind of medium bioconcentration pesticide. [Conclusion] The cyhalofop-butyl should be strictly controlled to minimize the damage to zebrafish and aquatic ecosystem.

**Key words** Cyhalofop-butyl; *Brachydanio rerio*; Acute toxicity; Bioaccumulation

我国是世界范围内最大的农药生产国和使用国之一, 每年施用大量的化学农药用于防治农作物病虫害<sup>[1]</sup>。2015 年农业部公布我国农药利用率仅为 36.6%<sup>[2]</sup>。其余大部分未被利用的化学农药则进入自然环境中, 不仅对水体、土壤等生态系统造成污染, 也会导致非靶生物受到不同程度的毒害作用。

水生生物是在农药污染的水环境中的非靶标生物<sup>[1]</sup>。鱼类作为水生生物中的重要物种, 所受到的农药污染危害最大, 水质污染会对渔业造成巨大损失<sup>[3]</sup>。蓝色斑马鱼是一种小型杂食性淡水热带鱼, 成鱼体长 3~4 cm, 染色体数为 50 条<sup>[4]</sup>。斑马鱼饲养方法简单, 对水质要求不高, 水温 25~31 °C 为宜, pH 7~8 为最适宜<sup>[5]</sup>。因此, ISO 和 OECD 已将斑马鱼作为毒理学测试标准的推荐测试物种, 用于测试化合物对生物体的毒性。目前研究最多的是斑马鱼的急性毒性试验。

氰氟草酯是水稻田应用最广泛的除草剂之一, 目前因用量大而使杂草对其产生抗性, 其对水生物及水体环境的影响同样值得关注。笔者选用 97% 氰氟草酯原药, 研究其对斑马鱼的急性毒性和生物富集效应, 旨在为更全面评价氰氟草酯在环境中的安全性提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验生物** 蓝色斑马鱼 (*Brachydanio rerio*), 购自合肥市裕丰花鸟虫鱼市场。试验用水, 曝气自来水(24 h 以上), 水温为 21~25 °C, pH 为 6.0~8.5, 溶解氧含量不低于空气饱

和值的 60%, 水质硬度为 10~250 mg/L (以  $CaCO_3$  计)。试验前预养 7 d (与试验相同的环境条件下), 且试验前 24 h 内不喂食。

**1.2 试验药剂** 97% 氰氟草酯原药由安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所提供。氰氟草酸标准品购自上海皓元生物医药科技有限公司。99.8% 重铬酸钾、助溶剂丙酮(分析纯)、乳化剂吐温-80 等均购自国药集团化学试剂有限公司。乙腈、甲醇、乙酸铵、甲酸均为色谱纯, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

**1.3 主要仪器** 万分之一电子天平、温度计、水质硬度计、溶解氧分析仪、移液器、便携式 pH 计、日本岛津 SHIMADZULC-MS-8030 液相色谱-串联质谱仪、高速离心机、涡旋振荡器等。

## 1.4 试验方法

**1.4.1 斑马鱼急性毒性试验。** 采用半静态法研究 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的急性毒性效应<sup>[6]</sup>。设置 2.000、2.500、3.125、3.906、4.883、6.104、7.629 mg/L 7 个浓度组, 同时设空白和助溶剂对照组, 每隔 24 h 更换试验溶液。试验时, 先向试验鱼缸内加入经活性炭吸附后的曝气自来水配制的各试验溶液, 然后将预养的斑马鱼放入试验鱼缸内, 每缸 7 条, 不设重复。试验开始时及每隔 24 h 观察鱼死亡和中毒状况, 并测定各处理浓度和空白对照组鱼缸内水的 pH、溶氧量及温度等。

**1.4.2 斑马鱼生物富集试验。** 采用半静态法研究 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的生物富集效应<sup>[7]</sup>。根据急性毒性试验的 96 h- $LC_{50}$ , 设置  $3.9 \times 10^{-2}$  mg/L (1/100) 和 0.39 mg/L (1/10) 2 个浓度组, 同时设空白和助溶剂对照组。每组设 4 个重复, 每重复 40 条鱼。每隔 24 h 更换试验药液, 并于 0、

**作者简介** 涂杰(1993—), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 农药环境毒理。\* 通信作者, 副研究员, 从事除草剂、杀菌剂药效及安全性评价研究。

**收稿日期** 2020-12-21; **修回日期** 2021-02-19

24、48、96、144、192 h 从各处理组中取 50 mL 试验药液和 5 条鱼样,用于检测其中的供试药物及其代谢产物的含量,同时测定 pH、水温、溶解氧含量等并观察鱼中毒和死亡情况。

**1.4.3 样品前处理。**水样:取 2.000 mL 离心后的水样至 10 mL 塑料离心管,加入 2.000 mL 色谱纯乙腈,涡旋混匀 1 min,静置 10 min,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜,待测。

鱼样:称取已匀浆试样 2 g 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈溶液,振荡提取 40 min,加入 1~2 g 氯化钠,振摇 2 min,以 5 000 r/min 离心 3 min,取上层溶液 2 mL 过 0.22  $\mu\text{m}$  有机系微孔膜,待测。

**1.4.4 仪器分析方法。**SHIMADZULCMS-8030 液相色谱-串联质谱仪检测条件:色谱柱 Shim-pack XR-ODS-III, 2.0 mm $\times$ 50 mm, 1.6  $\mu\text{m}$ ;流动相 A-5 mmol/L 乙酸铵水溶液+0.02% 甲酸;B-甲醇;流速 0.4 mL/min;进样体积 2  $\mu\text{L}$ ;柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.4.5 标准曲线的绘制。**用甲醇配制 1.000、0.800、0.500、0.100、0.080、0.050、0.010、0.005 mg/L 氰氟草酯标准品系列标准工作溶液按上述条件进样分析,以浓度-峰面积绘制氰氟草酯标准曲线,其回归方程为  $y = 17\ 993x + 61.584$ ,  $r^2 = 0.994\ 1$ 。用甲醇配制 1.000、0.800、0.400、0.100、0.080、0.040、0.010、0.008 mg/L 氰氟草酸标准品系列标准工作溶液按上述条件进样分析,以浓度-峰面积绘制氰氟草酸标准曲线,其回归方程为  $y = 89\ 109x - 459.7$ ,  $r^2 = 0.999\ 6$ 。结果表明,氰氟草酯和氰氟草酸分别在 0.005~1.000 mg/L 和 0.008~1.000 mg/L 浓度范围内线性良好。

**1.4.6 氰氟草酯和氰氟草酸在水样中添加回收率测定。**分别向试验用水中添加氰氟草酯和氰氟草酸的标准溶液,浓度均配制为 0.2、0.5、1.0 mg/L,采用上述前处理方法和仪器分析方法,测定试验溶液浓度,每个浓度设 3 个重复。氰氟草酯平均回收率为 81.6%~85.3%,相对标准偏差(RSD)为 1.8%~2.8%;氰氟草酸平均回收率为 79.0%~82.4%,RSD 为 2.3%~3.7%。

**1.4.7 氰氟草酯和氰氟草酸在鱼样中添加回收率测定。**在鱼样中分别添加氰氟草酯和氰氟草酸标准溶液,均配制为 0.01 和 0.50 mg/L 2 个添加浓度,每个浓度设 3 个重复。氰氟草酯平均回收率为 85.8%~86.0%,RSD 为 3.5%~3.8%;氰氟草酸平均回收率为 78.7%~81.7%,RSD 为 2.7%~3.9%。

**1.5 数据方法** 统计分析:用统计软件 SPSS 20.0 计算斑马鱼急性毒性试验  $\text{LC}_{50}$  及 95% 置信区间。

氰氟草酯残留总量计算方法:氰氟草酯总量=氰氟草酯含量+氰氟草酸含量 $\times R$ ,其中系数  $R = 1.186$  为母体分子量与代谢物分子量比值。

生物富集系数(BCF)计算公式为  $\text{BCF} = \text{Cfs} / \text{Cws}$ ,其中,  $\text{Cfs}$  为平衡时鱼体内的供试物含量,  $\text{Cws}$  为平衡时水体中的供试物含量。依据《准则》判定氰氟草酯对斑马鱼的毒性等级与生物富集等级(表 1、2)。

## 2 结果与分析

**2.1 参比试验结果** 为了解选用斑马鱼的生长状况及敏感性情况,试验之前用重铬酸钾进行斑马鱼参比试验。重铬酸

钾对斑马鱼的参比试验结果显示,其半效应浓度 24 h- $\text{LC}_{50}$  为 245.515 mg/L,95% 置信限为 212.990~284.946 mg/L。

表 1 农药对鱼类的毒性等级划分

Table 1 The classification of toxicity grades of pesticides to fish

序号 No.	毒性等级 Toxicity grade	$\text{LC}_{50}$ (96 h) mg/L
1	剧毒	$\text{LC}_{50} \leq 0.1$
2	高毒	$0.1 < \text{LC}_{50} \leq 1.0$
3	中毒	$1.0 < \text{LC}_{50} \leq 10$
4	低度	$\text{LC}_{50} > 10$

表 2 农药生物富集等级划分

Table 2 The classification of pesticide bioenrichment grade

序号 No.	富集等级 Enrichment grade	BCF
1	低富集性	$\text{BCF} \leq 10$
2	中等富集性	$10 < \text{BCF} \leq 1\ 000$
3	高富集性	$\text{BCF} > 1\ 000$

**2.2 氰氟草酯对斑马鱼的急性毒性** 试验过程中空白对照组以及助溶剂对照组的斑马鱼死亡情况与试验开始时比较无明显变化。根据 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的急性毒性试验结果,按照理论浓度计算,采用统计软件 SPSS 20.0 分析其半致死浓度 96 h- $\text{LC}_{50}$  和 95% 置信限。97% 氰氟草酯原药对斑马鱼急性毒性的 96 h- $\text{LC}_{50}$  为 3.964 mg/L,95% 置信限为 3.327~4.737 mg/L(表 3)。试验结果的毒性等级参照《化学农药环境安全评价试验准则》进行划分,97% 氰氟草酯原药对斑马鱼毒性等级为“中毒”。

表 3 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的致死率(96 h)

Table 3 The mortality rate of *Brachydanio rerio* induced by 97% cyhalofop-butyl(96 h)

处理组 Group	质量浓度 Mass concentration mg/L	总数 Total number 条	96 h 死亡数 96 h number of deaths 条	96 h 校正死亡率 96 h adjusted mortality rate//%
CK	0	7	0	0.000
CK <sub>助溶剂</sub>	0	7	0	0.000
C1	2.000	7	0	0.000
C2	2.500	7	1	10.000
C3	3.125	7	2	20.000
C4	3.906	7	3	30.000
C5	4.883	7	5	50.000
C6	6.104	7	6	60.000
C7	7.629	7	7	70.000

**2.3 氰氟草酯对斑马鱼的生物富集效应** 根据 97% 氰氟草酯原药对斑马鱼的生物富集性试验结果,按照生物富集系数计算公式,97% 氰氟草酯原药 96 h- $\text{LC}_{50}$  的 1/100 试验处理组中,6 d 时水体及鱼体中氰氟草酯含量达到平衡,斑马鱼对氰氟草酯的生物富集系数( $\text{BCF}_{6d}$ )为 16.3(表 4)。97% 氰氟草酯原药 96 h- $\text{LC}_{50}$  的 1/10 试验处理组中,6 d 时水体及鱼体中氰氟草酯含量达到平衡,斑马鱼对氰氟草酯的生物富集系数( $\text{BCF}_{6d}$ )为 28.6(表 5)。依据《化学农药环境安全评价试验准则》中的标准,判断氰氟草酯对斑马鱼的富集效应等级为

中等富集性。

表4 97%氰氟草酯原药在斑马鱼体内的生物富集性(氰氟草酯溶液初始浓度为0.039 mg/L)

Table 4 The bioconcentration of 97 % cyhalofop-butyl in *Brachydanio rerio* ( the original concentration of cyhalofop-butyl is 0.039 mg/L)

时间 Time//h	水样中氰氟草酯含量 Cyhalofop-butyl concentration in water//mg/L	鱼体内氰氟草酯含量 Cyhalofop-butyl concentration in fish//mg/kg	生物富集性 Bioncentration factor(BCF)
0	0.038 8	0	0
24	0.041 8	0.506	12.1
48	0.041 1	0.505	12.3
96	0.043 2	0.600	13.9
144	0.042 6	0.694	16.3
192	0.043 4	0.582	13.4

表5 97%氰氟草酯原药在斑马鱼体内的生物富集性(氰氟草酯溶液初始浓度为0.39 mg/L)

Table 5 The bioconcentration of 97 % cyhalofop-butyl in *Brachydanio rerio* ( the original concentration of cyhalofop-butyl is 0.39 mg/L)

时间 Time//h	水样中氰氟草酯含量 Cyhalofop-butyl concentration in water//mg/L	鱼体内氰氟草酯含量 Cyhalofop-butyl concentration in fish//mg/kg	生物富集性 Bioncentration factor(BCF)
0	0.376	0	0
24	0.351	5.47	15.6
48	0.317	6.88	21.7
96	0.302	7.10	23.5
144	0.294	8.40	28.6
192	0.361	8.08	22.4

### 3 结论与讨论

鱼类不仅是生态系统中的重要生物,也是人类的主要食物之一,农药的合理施用对鱼类的生存乃至人类的健康至关重要。因此,农药对鱼类的毒性评价工作一直是农药环境评价的重点<sup>[8]</sup>。斑马鱼急性毒性试验是检测环境污染物急性毒性的常用方法之一<sup>[1]</sup>。而鱼类生物富集试验对农药的环境风险评估及其慢性毒性研究具有非常重要的意义<sup>[9]</sup>。吴迟等<sup>[10]</sup>和李如美等<sup>[11]</sup>分别研究了戊唑醇和叶菌唑对斑马鱼的急性毒性及生物富集效应,均表明农药对斑马鱼有一定的毒害效应。

该研究选用97%氰氟草酯原药,研究了其对斑马鱼的急性毒性和生物富集效应。结果表明,97%氰氟草酯原药对鱼类急性毒性表现为中等毒性,生物富集性为中等富集性。

近年来,除草剂在农业生产中的使用量逐年增大,不同种类除草剂对水生生物的研究也越来越受到重视。廖艺钰等<sup>[12]</sup>研究了草甘膦农药对斑马鱼的毒性,急性毒性试验结

果表明草甘膦属于高毒农药;研究表明,西草净对斑马鱼的急性毒性为中毒<sup>[13]</sup>,五氟磺草胺对3月龄幼鱼也表现为中等毒性<sup>[14]</sup>;Al-Sawafi等<sup>[15]</sup>将斑马鱼分别暴露在0.957、1.913 mg/L的莠去津药液中,结果表明斑马鱼能迅速富集该除草剂;何健等<sup>[16]</sup>报道了二甲四氯和二甲四氯异辛酯在斑马鱼体内均有富集效应。这表明除草剂对斑马鱼有一定的毒性并能在鱼体内不同程度的富集。

该研究是在实验室条件下进行的,氰氟草酯作为水稻田除草剂在水田施用,不可避免会进入水体,自然环境下农药的毒性效应更为复杂。若要更全面地评估该除草剂在鱼体内的累积毒性及对环境的风险,仍需进一步开展鱼类生命周期或水生生态模拟系统等方面的研究。因此氰氟草酯在田间使用时,仍应注意选择毒性较低的剂型,严格控制用药量等,科学合理的使用,尽量减少其对水体环境以及水生生物的影响。

### 参考文献

- [1] 朱丽珍.两种芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂对斑马鱼毒性效应及作用机制研究[D].北京:中国农业大学,2016.
- [2] 吴向辉,何难.农业部首次公布化肥,农药利用率数据[J].农化市场十日讯,2016(3):7.
- [3] 钟文武,王文玉,孙映,等.云南省淡水渔业环境现状及保护对策[J].现代农业科技,2014(17):290-292.
- [4] 徐立利,徐永学,闫艳春.斑马鱼及其胚胎在毒理学研究中的应用[J].生物技术通报,2010(11):35-39.
- [5] 李浩斐,李卫华,金泰虞,等.斑马鱼及其在环境毒理学中的应用[J].环境与职业医学,2005,22(5):460-463.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.化学农药环境安全评价试验准则 第12部分:鱼类急性毒性试验:GB/T 31270.12—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.化学农药环境安全评价试验准则 第7部分:生物富集试验:GB/T 31270.7—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [8] 邹积鑫,何雄奎,陶传江,等.乙炔氟草醚对斑马鱼的急性毒性和生物富集性研究[J].农药学报,2006,8(4):375-378.
- [9] 刘娜.戊唑醇等3种典型三唑类手性农药在斑马鱼中的选择性生物富集及生物毒性差异[D].沈阳:沈阳农业大学,2016:53-64.
- [10] 吴迟,刘刚刚,何明远,等.戊唑醇对斑马鱼的急性毒性及生物富集效应[J].生态毒理学报,2017,12(4):302-309.
- [11] 李如美,戴争,王维,等.叶菌唑对斑马鱼的急性毒性及生物富集效应[J].生态毒理学报,2019,14(5):326-330.
- [12] 廖艺钰,惠吕佳,严吉祥,等.草甘膦农药对斑马鱼的急性毒性和慢性毒性研究[J].广州化工,2020,48(21):66-68.
- [13] 蒋利生,吴晓峰,康杰.西草净对斑马鱼的急性毒性研究[J].安徽农业科学,2020,48(18):63-64,69.
- [14] 朱少杰,臧传江,李晨雨,等.五氟磺草胺对斑马鱼的毒性效应[J].农药,2019,58(8):601-603.
- [15] AL-SAWAFI A G A, YAN Y J. Bioconcentration and antioxidant status responses in zebrafish (*Danio rerio*) under atrazine exposure [J]. International journal of chemical engineering and applications, 2013, 4(4): 204-208.
- [16] 何健,周艳,孔德洋,等.2甲4氯和2甲4氯异辛酯在斑马鱼体内生物富集性[J].农药,2015,54(11):822-824.

(上接第83页)

- [10] 李峻,孙世群.基于BP网络模型的青弋江水质预测研究[J].安徽工程科技学院学报(自然科学版),2008,23(2):23-26.
- [11] 胡晨琦,胡春生,刘永婷,等.青弋江泾县段最高阶地的ESR年代及其构造气候意义[J].山地学报,2017,35(4):469-476.
- [12] 杨海江,王建宇,石磊,等.模糊数学评价法在芦河水水质评价中的应用[J].现代农业科技,2016(10):178-180.

- [13] 杜军凯,傅尧,李晓星.模糊-主成分分析综合评价法在地下水水质评价中的应用[J].中国环境监测,2015,31(4):75-81.
- [14] 王红,姚君兰,李艳蕾,等.基于主成分分析法的梁子湖水水质评价分析[J].湖北大学学报(自然科学版),2017,39(6):601-608.
- [15] 任芳玲,张亚楠.基于主成分分析法的用电量预测模型[J].徐州工程学院学报(自然科学版),2016,31(2):50-53.
- [16] 李成,李海波,高丹丹,等.主成分分析在城市大气环境质量评价中的应用[J].湖北大学学报(自然科学版),2016,38(6):567-571.