

多菌灵杀菌剂对青海弧菌和斑马鱼的急性毒性研究

熊昭娣¹, 周梦颖², 高翔¹, 郭印¹, 谢剑^{3*} (1. 上海农林职业技术学院, 上海 201699; 2. 上海金山区农业技术推广服务站, 上海 201507; 3. 湖南省娄底市娄星区畜牧兽医水产局, 湖南娄底 417000)

摘要 [目的]研究农药对农田环境及非靶标有益生物的影响。[方法]选取青海弧菌 Q67 和斑马鱼作为受试生物, 研究多菌灵杀菌剂对其的急性毒性, 从而初步评价该杀菌剂农业生产应用中对水生生物的潜在风险。[结果]22% 多菌灵杀菌剂对青海弧菌 Q67 的 EC_{50} 为 7.70 mg/L, pEC_{50} 为 2.11; 22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼的 24、48、72、96 h LC_{50} 分别为 8.53、8.39、8.07 和 7.64 mg/L; 斑马鱼的安全浓度为 0.76 mg/L。[结论]根据《化学农药环境安全评价试验准则》“鱼类急性毒性试验”对鱼类毒性评价标准, 判断 22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼的毒性属中毒。

关键词 多菌灵; 青海弧菌 Q67; 斑马鱼; 急性毒性

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)33-0103-03

Acute Toxicity of Carbendazim to Q67 (*Vibrio qinghaiensis* sp) and Zebra Fish (*Brachydanio rerio*)

XIONG Zhao-di¹, ZHOU Meng-ying², GAO Xiang¹, XIE Jian^{3*} et al (1. Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201699; 2. Jinshan District Agricultural Technical Extension Station, Shanghai 201507; 3. Animal Husbandry and Fishery Bureau of Louxing District, Loudi, Hunan 417000)

Abstract [Objective] Effects of carbendazim on agriculture environment and non-target beneficial organisms were studied. [Method] Q67 and zebra fish were selected as a test organism to study the acute toxicity of carbendazim, thus the potential ecological risks of carbendazim to aquatic organisms was preliminarily evaluated. [Result] EC_{50} to Q67 of 22% carbendazim was 7.70mg/L, pEC_{50} was 2.11; the 24 h, 48 h, 72 h and 96 h LC_{50} of 22% carbendazim to the testing fish were 8.53, 8.39, 8.07 and 7.64 mg/L, respectively. The safe concentration of carbendazim to zebra fish was 0.76 mg/L. [Conclusion] Acute toxicity of 22% carbendazim to fish is medium according to the “Fish Acute Toxicity Test” of the *Chemical Pesticide Environmental Safety Evaluation Test Guidelines*.

Key words Carbendazim; Q67; Zebra fish; Acute toxicity

我国是农业大国,也是生产和消费农药的大国,农药在防治农作物病虫害草害方面发挥着重用作用,但在使用过程中 70%~80% 的农药未达到防治靶标的作用,而是直接分散到环境中,这其中又有部分随地表径流进入水环境,一旦农药进入水环境中,就会单独或与其他污染物混合共同对水体中动植物产生影响,并可能发生迁移转化进入土壤和农作物,在食物链的循环中进入人体,影响生态系统和人类健康^[1]。

多菌灵属于苯并咪唑类农药杀菌剂,是 1967 年由美国杜邦公司开发的杀菌剂苯菌灵的中间产物,主要用于防治水稻、蔬菜类的病害,化学性质稳定,具有高效低毒等特点^[2]。美国和欧盟国家已将多菌灵列为禁用农药,我国《食品中农药最大残留限量》(GB2763—2005)国家标准规定多菌灵在柑橘、香蕉和芒果中残留最大限量为 0.15 mg/kg,欧盟对柑橘和香蕉的规定分别为 5.00 和 1.00 mg/kg^[3]。近年来,对多菌灵的研究较多,如高浓度多菌灵对植物体内的多种酶存在影响^[4],广西和福建荔枝园土壤样本中,多菌灵残留的检出率分别为 48.1% 和 84.0%^[4];田间试验中在收获的水稻稻秆和谷壳中发现残存的多菌灵,以此作为饲料有一定的风险^[5];芝麻^[6]、食用菌^[7]、苹果^[8]等种植过程中使用多菌灵后会有少量残留。可以看出,目前关于多菌灵的研究主要集中在对农产品残留限量上,而多菌灵对水生生物的毒性研究较少,虽然在 Satapornvanit K 等^[3]的研究中涉及到多菌灵在水产养殖上的应用,但未能对其毒性进行量化。笔者选取青海

弧菌 Q67 和斑马鱼作为受试生物,通过微板毒性分析法和急性毒性试验,初步评定 22% 多菌灵杀菌剂对水生生物的潜在风险,旨在为多菌灵的安全使用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验菌种为青海弧菌 Q67,菌种的培养与保存参照文献^[9-10];急性毒性试验对象为 0~1 龄斑马鱼;试验用水位经过充分曝气且经过检测为无氯的自来水,试验容器为 47 cm × 58 cm × 77 cm 的蓝色塑料箱。

试验所用农药为含 22% 多菌灵、8% 戊唑醇的混合悬浮杀菌剂(江苏龙灯化学有限公司)。化学分子式: $C_9H_9N_3O_2$, 相对分子质量: 191.19, 其结构式如下^[1]:

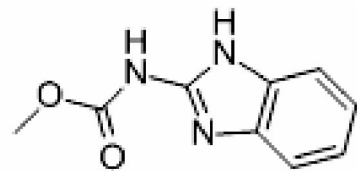


图 1 多菌灵的结构式

Fig. 1 Chemical structures of carbendazim

试验仪器为 Infinite M200 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)、DL-CJ-IF 超净工作台(哈东联)、150C 型恒温振荡培养箱(金坛市亿通电子有限公司)、高压灭菌锅(Sanyo 公司)、BT25S 型电子天平(赛多利斯公司)。

1.2 发光细菌毒性测试方法 多菌灵悬浮杀菌剂的毒性测定采用微板毒性分析法(MTA)^[11]。在 96 孔微板第 1 横排的 12 个孔中均加入 100 μ L milli-Q 水作为空白对照,在第 2 横排的 12 个孔中分别加入依据在预毒性试验中所得稀释因子稀释的 12 个浓度,浓度从大到小呈几何级数递减,尽可能

作者简介 熊昭娣(1988—),女,湖南沅江人,讲师,硕士,从事水环境调控研究。* 通讯作者,农艺师,硕士,从事水产养殖研究。

收稿日期 2017-09-13

地使各浓度产生的发光抑制率(E)比较均匀地分布在最高效应与最低效应之间,第3、4横排中13孔设为第2横排相应各孔样品的平行试验,每一个孔都用 milli-Q 水补足至 100 μL ,再用 12 道移液器依次从微板第 1~4 排各孔中加入 100 μL 培养好的菌液,使每孔内溶液总体积均为 200 μL 。15 min 后,在酶标仪上测定各孔相对发光度(I)。以空白对照组的发光强度(I_1)与各浓度梯度组的发光强度计算各浓度对青海弧菌 Q67 的发光抑制率(E)。为获得高精度毒性数据,重复 3 板。

1.3 急性毒性试验 据预备试验结果,按等对数间距设立 7 个浓度组,重复数 4 次。每个试验容器分别放入 15 尾受试斑马鱼,按设定浓度添加试验药物。试验期间,室内自然光照,连续微波充气,水温控制在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$,毒性试验时间分别为 96 h。

受试前 1 d 开始停食。试验过程中不投饵,不换水。定时观察斑马鱼的活动情况。沉底后鳃盖微张被视为昏迷,而经解剖针轻触后无明显反应的个体则被视为死亡,准确记录 24、48、72、96 h 的个体死亡数。

1.4 数据处理 青海弧菌 Q67 百分比发光抑制率的计算公式:

$$E(\%) = (1 - I_2/I_1) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, E 为发光抑制率; I_1 为空白组的发光强度; I_2 为与毒物作用后的发光强度。

斑马鱼校正死亡率的计算公式:

$$w(\%) = (q_0 - c)/(1 - c) \times 100 \quad (2)$$

式(2)中, q_0 为未校正死亡率, c 为对照组死亡率。

仔虾的安全浓度计算公式^[12]:

$$SC = 0.1 \times 96 \text{ h } LC_{50} \quad (3)$$

将校准死亡率换算成概率单位后与相应浓度的对数求

回归方程,根据回归方程计算斑马鱼的半致死浓度 LC_{50} 。

利用 Excel 和 Origin75 统计软件进行数据处理和统计,拟合剂量-效应曲线,根据拟合模型计算农药样品与青海弧菌 Q67 作用 15 min 的半效应浓度 (EC_{50}),并以此判断农药样品对青海弧菌 Q67 毒性的大小。

2 结果与分析

2.1 2 种多菌灵杀菌剂对青海弧菌 Q67 的毒性 作用时间 15 min 时,22% 多菌灵杀菌剂对 Q67 的剂量-效应拟合曲线见图 2。由图 2 可知,随着杀菌剂浓度质量分数的升高,青海弧菌 Q67 的发光抑制率逐步升高,两者呈正相关;22% 多菌灵杀菌剂对青海弧菌 Q67 的 EC_{50} 为 7.70 mg/L, pEC_{50} 为 2.11。

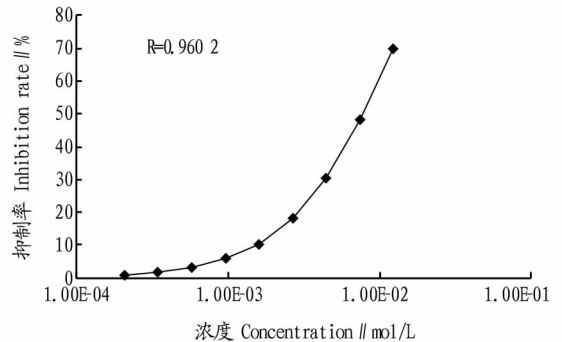


图 2 22% 多菌灵杀菌剂对 Q67 的剂量-效应拟合曲线

Fig. 2 Concentration-response relationship of 22% carbendazim to Q67

2.2 22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼的急性毒性作用 22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼的急性毒性试验结果见表 2。22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼 LC_{50} 值随时间延长而变小,毒性增加,其 24、48、72、96 h LC_{50} 分别为:8.53、8.39、8.07 和 7.64 mg/L;斑马鱼的安全浓度为 0.764 mg/L。

表 1 22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼的急性毒性结果

Table 1 Results of acute toxicity of 22% carbendazim to zebra fish

试验对象 Test objective	时间 Time/h	回归方程 Regression equations	R^2	LC_{50} mg/L	95% 可信限 95% confidence limit	安全浓度 Safe concentration/mg/L
1 龄斑马鱼 One-year Zebra fish	24	$Y = 7.6161x - 2.0907$	0.9993	8.53	6.808 ~ 10.687	0.764
	48	$Y = 8.9581x - 3.2675$	0.9465	8.39	6.728 ~ 10.463	
	72	$Y = 8.019x - 2.3447$	0.9882	8.07	6.474 ~ 10.110	
	96	$Y = 8.4504x - 2.4627$	0.9823	7.64	6.491 ~ 8.992	

试验观察发现,低质量浓度组的斑马鱼中毒症状不明显;高质量浓度组的斑马鱼鱼鳃充血,兴奋异常,尤其是高浓度处理,随着试验时间的增加,试验对象开始失衡,鱼体侧翻,身体扭曲变形,尾部痉挛,在水中上下翻滚,腹部朝上,鱼体发白,逐步出现死亡。

3 结论与讨论

目前,将发光细菌应用于污染物毒性测定是进行生物毒性检验的毒理学检测方法之一,发光菌主要有海洋费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 和淡水青海弧菌 Q67 (*Vibrio qinghaiensis* sp. - Q67)。青海弧菌 Q67 是 1985 年我国学者分离出的一种新型淡水发光菌^[13],在朱文杰等^[14]的共同努力下,建立了使用 Q-67 为菌种,以 Veritas TM 微孔板光度计为发光强度测试

设备的淡水发光菌毒性测试方法 (MTA 法),在 pH 范围为 6.5~11.0 时均能生长良好,对毒物的反应敏感。该方法具有应用范围广、易于操作、相关性好、反应快速等特点^[15]。国内研究学者利用青海弧菌 Q67 对取代酚类、重金属等环境污染物进行了急性毒性的研究,已取得较好地效果^[9]。通常认为发光细菌的光反应是在荧光素酶的催化作用下进行的,其还原形式 (FMNH₂) 结合分子中的 NO₂、-OH 和 -NH₂ 等氢键结合,发生氧化还原反应,生成黄素单核苷酸、核酸和水,并伴随着光的释放过程^[10]。当青海弧菌 Q67 接触到农药时,其正常的新陈代谢会受影响,其表现为发光强度受到抑制,从而反应农药的毒性效应^[11]。

根据试验,获得 22% 多菌灵杀菌剂对青海弧菌 Q67 的

EC₅₀ 为 7.70 mg/L; 若以 EC₅₀ 为毒性指标, 22% 多菌灵杀菌剂对青海弧菌 Q67 的毒性高于敌百虫 (1.06 × 10⁻² mol/L), 但低于吡虫啉 (2.64 × 10⁻⁴ mol/L)、抗蚜威 (5.12 × 10⁻⁴ mol/L)^[16]。姜丹等^[17] 报道磷酸三苯酯、亚磷酸二苯酯、眼磷酸二苯酯、亚磷酸三丁酯对青海弧菌 Q67 的 EC₅₀ 毒性为 1.91 × 10⁻⁵ ~ 3.11 × 10⁻⁵ mol/L, 其毒性均高于多菌灵, 这些有机磷酸酯中含有芳香环数为 2~3 个, 从多菌灵的化学结构可知, 多菌灵含有 1 个苯环结构, 由此可以进一步证实, 芳香环数越多, 污染物对发光菌 Q67 的急性毒性越大。邹立等^[18] 和汝少国等^[19] 也认为含苯环结构越稳定, 其取代基与苯环形成的离子域大 π 键越大, 电子云密度越大, 污染物毒性越强。

根据现行农药对鱼类毒性的分级标准 (剧毒, LC₅₀ 0.1 mg/L; 高毒 0.1 LC₅₀ 1.0 mg/L; 中毒, 1.0 LC₅₀ 10.0 mg/L; 低毒, LC₅₀ > 10.0 mg/L)^[20], 而 22% 多菌灵杀菌剂 96 h LC₅₀ 为 7.64 mg/L, 对斑马鱼毒性中毒; 研究发现, 22% 多菌灵杀菌剂对斑马鱼的毒性大于 25% 甲霜·霜霉威可湿性粉剂 (96 h LC₅₀ 为 120.0 mg/L)^[21]、300g/L 双酰草胺乳油 (96 h LC₅₀ 为 31.19 mg/L^[21]) 和 35% 吡·异可湿性粉剂 (96 h LC₅₀ 为 89.05 mg/L)^[21], 但小于 25% 氟虫腈悬浮剂 (96 h LC₅₀ 为 0.60~0.81 mg/L)^[20] 和 10% 吡唑草胺乳油 (96 h LC₅₀ 为 2.71 mg/L)^[21]。研究发现, 不同农药对斑马鱼的急性毒性没有规律可循, 这可能与药剂的活性特点和加工剂型有关。丁悦等^[22] 研究发现 50% 多菌灵悬浮剂对斑马鱼毒性为低毒; 刘彦良等^[23] 研究发现 20% 二甲戊灵微囊悬浮剂及 20% 二甲戊灵乳油对斑马鱼的 96 h LC₅₀ 分别为 57.81 和 0.31mg/L, 二者相差 186 倍。

参考文献

- [1] 魏中华, 徐娟, 郭明霞, 等. 国内多菌灵的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(3): 125-127.
- [2] 向月琴, 高春明, 庞国辉, 等. 土壤中多菌灵的降解动态及其对土壤微

- 生物群落多样性的影响[J]. 土壤学报, 2008, 45(4): 699-704.
- [3] SATAPORNVANIT K, BAIRD D J, LITTLE D C. Laboratory toxicity test and post-exposure feeding inhibition using the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Chemosphere, 2009, 74(9): 1209-1215.
- [4] 徐晓峰, 李娜, 柳开楼, 等. 多菌灵对 Cu 污染土壤酶活性和微生物氮含量的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(1): 60-63.
- [5] 刘双双, 杨仁斌, 陈海平, 等. 多菌灵在水稻及土壤中的消解动态和残留规律研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 31(2): 357-361.
- [6] 陈伟, 刘红彦, 范芳婷, 等. 芝麻中甲基硫菌灵及代谢物多菌灵残留测定及安全性评价[J]. 农药, 2011, 50(12): 909-911.
- [7] 董爱军, 杨鑫, 马莺, 等. 食用菌中多菌灵残留的分散固相萃取/高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 573-577.
- [8] 杨媛, 石磊, 李文生, 等. 高效液相色谱法测定苹果中多菌灵残留量的测量不确定度分析[J]. 农药学报, 2010, 12(3): 349-354.
- [9] 张瑾, 刘树深, 窈容妮, 等. 30 种离子液体对青海弧菌 Q67 的毒性效应[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1108-1113.
- [10] 杨洁, 张金萍, 徐亚同, 等. 11 种农药对淡水发光细菌青海弧菌 Q67 的毒性研究[J]. 环境污染与防治, 2011, 33(4): 20-24.
- [11] 刘树深, 刘芳, 刘海玲. 20 种水溶性有机溶剂对发光菌的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2007, 27(3): 371-376.
- [12] 郭永军, 白东清, 董少杰, 等. 3 种药物对凡纳滨对虾仔虾的毒性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1297-1299, 1302.
- [13] 刘保奇, 葛会林, 刘树深. 测定环境污染对青海弧菌发光强度抑制的微板发光法研究[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(2): 186-191.
- [14] 朱文杰, 汪杰, 陈晓耘, 等. 发光细菌一新种: 青海弧菌[J]. 海洋与湖泊, 1994, 25(3): 273-279.
- [15] ZHU X W, LIU S S, GE H L, et al. Comparison between the short-term and the long-term toxicity of six triazine herbicides on photobacteria Q67[J]. Water research, 2009, 43(6): 1731-1739.
- [16] 朱祥伟, 刘树深, 张琼, 等. 杀虫剂及抗生素对发光菌的短期毒性及长期毒性[J]. 环境科学研究, 2009, 22(5): 589-594.
- [17] 姜丹, 周建国, 李娜, 等. 有机磷酸酯对青海弧菌 Q67 毒性的构效关系[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(1): 71-80.
- [18] 邹立, 李永祺. 用 QSAR 法研究有机磷农药对海洋扁藻的构效关系[J]. 海洋与湖泊, 1999, 30(2): 206-211.
- [19] 汝少国, 李永琪, 敬永畅. 十种有机磷农药对扁藻的毒性[J]. 环境科学学报, 1996, 16(3): 337-341.
- [20] 蔡道基, 杨配芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[M]. 北京: 国家环保局, 1989.
- [21] 赵春青, 钱坤, 李学锋, 等. 同类型农药对斑马鱼的急性毒性与安全评价[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34): 15027-15028.
- [22] 丁悦, 吴若函, 郭晓瑜, 等. 甲基硫菌灵及其代谢产物对 2 种非靶标生物的急性毒性和安全评价[J]. 农药, 2013, 52(12): 896-898.
- [23] 刘彦良, 刘峰, 慕卫, 等. 20% 二甲戊灵微囊悬浮剂对斑马鱼的毒性研究[J]. 农药科学与管理, 2009, 28(6): 16-18.

(上接第 86 页)

株得率提高 19.87%。这一试验结果为可得然胶的工业化生产奠定了基础。

参考文献

- [1] 赵双枝, 吉武科, 张彦良. 放射性土壤杆菌产可得然胶最佳条件的研究[J]. 山东食品发酵, 2010(3): 28-32.
- [2] 陈艳燕, 孙瑾, 尹胜利, 等. 新型食品添加剂增稠剂—可得然胶在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(3): 134-138.
- [3] 张海龙, 关志伟, 杨俊杰. 可得然胶的性质及应用[J]. 中国食物与营养, 2010(1): 36-39.
- [4] YOSHIDA T, YASUDA Y, MIMURA T, et al. Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2[J]. Carbohydrate research, 1995, 276(2): 425-436.
- [5] YOSHIDA T, HATANAKA K, URYU T, et al. Synthesis and structural analysis of curdlan sulfate with a potent inhibitory effect in vitro of AIDS virus infection[J]. Macromolecules, 2002, 23(16): 322-327.
- [6] ALBAN S, FRANZ G. Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate[J]. Thrombosis research, 2000, 99(4): 377-388.
- [7] NA K, PARK K H, KIM S W, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: Characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2)[J]. Journal of controlled release official journal of the controlled release society, 2000, 69(2): 225-

- 236.
- [8] EVANS S G, MORRISON D, KANEKO Y, et al. The effect of curdlan sulphate on development in vitro of *Plasmodium falciparum*[J]. Transactions of the royal society of tropical medicine & hygiene, 1998, 92(1): 87-89.
- [9] 赵小辉, 陈影, 李易林, 等. 水溶性苯胺蓝与十六烷基三甲基氯化铵作用的共振光散射研究[J]. 分析试验室, 2015(1): 68-71.
- [10] 胡君荣. 灰树花 β-葡聚糖的高效提取及量化技术[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2008.
- [11] 王恬, 林永慧, 何兴兵, 等. 一种快捷直观的产酸真菌筛选方法[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2025-2029.
- [12] NAKANISHI I, KIMURA K, SUZUKI T, et al. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other P-1,3-glucan in microorganisms with aniline blue[J]. Journal of general & applied microbiology, 2006, 22(1): 1-11.
- [13] 吉武科, 董学前, 刘建军, 等. 可得然胶发酵生产的关键性因素[J]. 食品与发酵科技, 2014(1): 1-4.
- [14] LEE J H, LEE I Y, KIM M K, et al. Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by *Agrobacterium* species[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 1999, 23(2): 143-148.
- [15] 赵双枝, 吉武科, 张彦良. 一株放射性土壤杆菌 (*Agrobacterium cradi-abacter*) 产胞外多糖性质的鉴定及其发酵工艺条件初探[J]. 山东食品发酵, 2010(4): 18-29.
- [16] 袁方, 赵双枝, 苏理, 等. 响应面法优化可得然胶发酵培养基[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 150-154.
- [17] 袁方. 可得然胶发酵条件的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014.