

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20181224002

郭宝元, 张洋, 王松雪. 啮氧菌酯对斑马鱼的安全性评价及其生物富集行为研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 317-321

Guo B Y, Zhang Y, Wang S X. Study on the biotoxicity and bioaccumulation of picoxystrobin in *Brachydanio rerio* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(6): 317-321 (in Chinese)

## 啮氧菌酯对斑马鱼的安全性评价及其生物富集行为研究

郭宝元<sup>1,2,\*</sup>, 张洋<sup>1</sup>, 王松雪<sup>1</sup>

1. 国家粮食和物质储备局科学研究院, 北京 100037

2. 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院环境生物技术重点实验室, 北京 100085

收稿日期: 2018-12-24 录用日期: 2019-06-04

**摘要:** 啮氧菌酯是一种新型的内吸性杀菌剂, 本研究对其水生生物的毒性和累积风险进行了评估。啮氧菌酯原药对斑马鱼的急性毒性试验结果显示, 96 h-LC<sub>50</sub>为 0.0509 mg a.i.·L<sup>-1</sup>。设置 0.005 mg·L<sup>-1</sup>(1/100 LC<sub>50</sub>)和 0.05 mg·L<sup>-1</sup>(1/10 LC<sub>50</sub>)2 个浓度 8 d 生物累积试验。在 0.005 mg·L<sup>-1</sup>组, 第 8 天斑马鱼体内啮氧菌酯浓度达到 0.48 mg·kg<sup>-1</sup>, 生物富集系数(BCF<sub>8d</sub>)缓慢增长到 80.00。而在 0.05 mg·L<sup>-1</sup>组, 第 8 天斑马鱼体内的啮氧菌酯浓度为 5.27 mg·kg<sup>-1</sup>, BCF<sub>8d</sub>值为 99.42。研究表明, 啮氧菌酯对斑马鱼为有剧毒, 同时具有中等生物累积效应。因此在使用过程中, 需要考虑其对水生生物的毒性和水生食物链的放大效应。

**关键词:** 啮氧菌酯; 斑马鱼; 急性毒性; 生物累积

文章编号: 1673-5897(2019)6-317-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Study on the Biototoxicity and Bioaccumulation of Picoxystrobin in *Brachydanio rerio*

Guo Baoyuan<sup>1,2,\*</sup>, Zhang Yang<sup>1</sup>, Wang Songxue<sup>1</sup>

1. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China

2. Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 24 December 2018 accepted 4 June 2019

**Abstract:** Picoxystrobin is a broad-spectrum fungicide and will be used extensively in China in the future. To evaluate its risk in aquatic environment, the biotoxicity and bioaccumulation in *Brachydanio rerio* were studied in the present work. The 96 h-LC<sub>50</sub> was 0.0509 mg a.i.·L<sup>-1</sup> by acute toxicity test with *Brachydanio rerio*. 0.005 mg·L<sup>-1</sup>(1/100 LC<sub>50</sub>) and 0.05 mg·L<sup>-1</sup>(1/10 LC<sub>50</sub>) were used to evaluate the biological availability of picoxystrobin in *Brachydanio rerio*. In the 0.005 mg·L<sup>-1</sup> group, the concentration of picoxystrobin increased on the first day and increased moderately later. The concentration was 0.48 mg·kg<sup>-1</sup> in *Brachydanio rerio* and the bioaccumulation factor (BCF<sub>8d</sub>) was 80.00. In the 0.05 mg·L<sup>-1</sup> group, the concentration of picoxystrobin increased in the first few days and reached stable in 96 h. The concentration was 5.27 mg·kg<sup>-1</sup> in *Brachydanio rerio* and BCF<sub>8d</sub> was 99.42. The results showed that picoxystrobin was of high toxicity to *Brachydanio rerio* and medium bioconcentration in

基金项目 “十三五”国家科技重大专项(2017ZX07107); 北京市科技计划课题项目(Z181100005418010)

作者简介: 郭宝元(1976—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为农药环境科学和生态毒理学, E-mail: gby@chinagrains.org; guoby@rcees.ac.cn

*Brachydanio rerio*. Therefore, the toxicity, bio-accumulation and magnification of picoxystrobin in food chain should be considered during its application.

**Keywords:** picoxystrobin; *Brachydanio rerio*; acute toxicity; bioaccumulation

啉氧菌酯,化学名为(E)-3-甲氧-2-[2-[6-(三氟甲基)-2-吡啶氧甲基]苯基]丙烯酸甲酯,英文名为 picoxystrobin, CAS 号为 117428-22-5, 结构式如图 1 所示。熔点为 75 °C, 水中溶解度为 0.128 mg · L<sup>-1</sup>, LogK<sub>ow</sub>(20 °C)为 4.48<sup>[1]</sup>。啉氧菌酯主要用于防治麦类的叶面病害如叶枯病、叶锈病、颖枯病、褐斑病和白粉病等,与其他甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂相比,其对小麦叶枯病、网斑病和云纹病有更好的效果<sup>[2-3]</sup>。啉氧菌酯最早由先正达公司于 2001 年在欧洲推出,随后在全球得到广泛应用。但在之后的研究中发现,啉氧菌酯对水生生物存在着比较大的毒性,同时,其代谢产物具有潜在的致癌性,因此给其应用前景带来一层阴影。

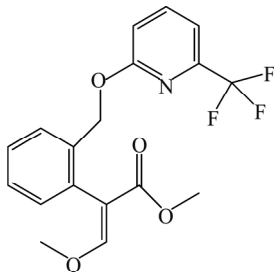


图 1 啉氧菌酯结构式

Fig. 1 The structure of picoxystrobin

农药施用的目的是达到病虫害的防治作用,而农药施用后,只有少部分可到达靶标,大部分则进入土壤,同时即使达到靶标的农药,也会通过雨水冲刷而进入土壤,后通过地表径流,进入水体,从而危害到水生生物的安全<sup>[4]</sup>。因此,对于农药安全评价的一个重要环节是考察其对水生动植物的安全性。同时,考虑到啉氧菌酯 logK<sub>ow</sub>为 4.48,具有强疏水性,可能在水生生物体内存在累积作用,从而对水生生物造成更大危害,乃至通过食物链传导到食物链的其他环节<sup>[5]</sup>。

国内啉氧菌酯的登记工作刚刚开始,至 2018 年,在国内已经有 8 家企业成功登记该农药<sup>[1]</sup>。而对啉氧菌酯的研究,已经涉及到其合成工艺优化<sup>[6]</sup>、药效评价<sup>[7]</sup>、残留检测方法<sup>[8-10]</sup>以及在水土界面的环境行为等方面,对于其环境安全评价的研究还比较少。

因此,本文开展啉氧菌酯对生物斑马鱼的安全性和风险研究,并考察其在生物体内的生物累积效应,以评估啉氧菌酯施用后,对水生食物链的风险。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 材料与试剂

TSQ Quantum Access MAX 液相色谱-质谱联用仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; HZQ-C 空气浴振荡器购自哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; 湘仪离心机 1850 购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Mettler Toledo pH 计购自瑞士苏黎世的梅特勒-托利多集团; 上海雷磁 JPB-607A 型溶解氧分析仪购自上海仪电科学仪器股份有限公司。

乙腈(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司(北京); 乙腈(色谱纯)和甲酸(色谱纯)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。95% 啉氧菌酯原药由农业部农药鉴定所惠赠,啉氧菌酯标准品(99.5%)购自 Sigma-Aldrich。涉及流动相、提取等过程的用水采用 Millipore 超纯水设备制备。暴露用水为经曝气的自来水。

### 1.2 分析方法

流动相为 V(0.33% 甲酸水溶液) : V(乙腈) = 10 : 90, 流速 0.2 mL · min<sup>-1</sup>; 色谱柱型号 Hypersil GOLD25002-102130 (100 mm × 2.1 mm), 柱温 30 °C, 样品室温度 20 °C; 进样方式为自动进样,进样体积 5 μL; 保留时间为 1.75 min; 离子源类型为 ESI<sup>-</sup>, 离子源温度 350 °C。

水样前处理方式: 5 mL 样品,用 5 mL 二氯甲烷漩涡振荡 3 min,重复提取一次,合并二氯甲烷。取 5 mL 二氯甲烷浓缩近干,用 5 mL 乙腈定容,超声 3 min,过 0.22 μL 有机滤膜,待测。

鱼体样品前处理方式: 1 g 鱼体样品研磨(湿重),加 20 mL 乙腈,浸泡振荡过夜,离心 5 min,取上清液过膜,待测; 如有浓度高的样品,稀释后进样。

### 1.3 急性毒性试验

取 95% 啉氧菌酯原药 0.3065 g,以适量二甲基亚砜作为助溶剂,以吐温 80 为稳定剂,用去离子水溶解定容至 100 mL,得 3.00 g a.i. · L<sup>-1</sup> 储备液。用曝气自来水稀释得到浓度为 0.0300、0.0390、0.0507、0.0658 和 0.0856 mg a.i. · L<sup>-1</sup> 的 5 组试验处理药液,以

曝气自来水为空白对照,以与最高浓度中二甲基亚砷和吐温 80 含量相同的溶液为溶剂对照,对照组和各处理组均只设 1 个重复。每个烧杯中装有 2 L 药液,分别放入 10 尾斑马鱼。试验期间不曝气、不喂食。分别于 24、48、72 和 96 h 观察斑马鱼中毒症状和死亡情况。

分别在试验开始后 0 和 24 h 更换试验溶液之前从各处理组取 100 mL 的供试物溶液,于冰箱中保存,用于啶氧菌酯水体浓度检测。

计算各浓度组在试验开始后 24、48、72 和 96 h 试验鱼的累计死亡率。采用 SPSS 软件的 Probit 法计算各时间点的半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)及其 95% 置信区间。

#### 1.4 斑马鱼生物富集

称取 1.4 g 95% 啶氧菌酯原药,用水定容于 1 000 mL 容量瓶中,得到浓度为 1 330 mg·L<sup>-1</sup> 的储备液,过膜后浓度为 204 mg·L<sup>-1</sup>。

经斑马鱼急性毒性试验得到 96 h-LC<sub>50</sub> 为 0.0509 mg·L<sup>-1</sup>。试验溶液配制浓度分别为 96 h-LC<sub>50</sub> 的 1/100 和 1/10,即 0.0005 和 0.005 mg·L<sup>-1</sup>。

根据设定浓度,配制 2 L 试验水,每种浓度各 16 缸,每缸放置 5 条斑马鱼,同时设置空白对照。每 24 h 更换药液。

于 0、24、48、96、144 和 192 h 分别从各处理中取水样与鱼样,测定水样与鱼样中的供试物含量。

检测试验过程中鱼体内啶氧菌酯浓度,啶氧菌酯的生物富集系数按公式(1)计算:

$$BCF = \frac{C_{fs}}{C_{ws}} \quad (1)$$

式中: BCF 为生物富集系数(bioconcentration factor); C<sub>fs</sub> 为鱼体内的啶氧菌酯含量(mg·kg<sup>-1</sup>); C<sub>ws</sub> 为水体中的啶氧菌酯含量(mg·L<sup>-1</sup>)。

## 2 结果(Results)

### 2.1 LC-MS/MS 分析方法

使用 LC-MS/MS 测定样品,其线性范围为 0.001 ~ 1.5 mg·L<sup>-1</sup>, 标准曲线回归方程为  $Y = 37739475398x + 509582745$ ,  $R^2 = 0.9920$ ; 色谱图中,在啶氧菌酯出峰的位置没有干扰峰; 在水中加入啶氧菌酯原药储备液,使其浓度为 1.0 和 0.001 mg·L<sup>-1</sup> 2 个浓度,平均添加回收率为 88.99% ~ 105.10%, 相对标准偏差(RSD)为 4.83% ~ 5.5%, 最低检测浓度为 0.001 mg·L<sup>-1</sup>; 在鱼体中加入啶氧菌酯原药储备液,使其浓度为 0.004 和 5.2 mg·kg<sup>-1</sup> 2 个浓度,平均添加回收率为 72.07% ~ 108.16%, RSD 为 2.53% ~ 7.44%, 最低检测浓度为 0.004 mg·kg<sup>-1</sup>; 该方法能够满足水中/鱼体啶氧菌酯的测定的要求。

### 2.2 啶氧菌酯对斑马鱼的急性毒性

试验期间 pH 值范围为 7.6 ~ 8.1, 水温范围为 23.0 ~ 25.0 °C, 溶解氧在 65% ~ 77% 范围内,符合试验要求。啶氧菌酯的设定浓度为 0.300、0.390、0.507、0.658 和 0.856 mg a.i.·L<sup>-1</sup>, 0、24 h 后对应的试验用水中啶氧菌酯浓度降低 1.58% ~ 6.75%, 啶氧菌酯浓度均大于设定浓度的 80%。试验期间空白对照试验用水并未出现异常情况。各啶氧菌酯处理组斑马鱼均表现出兴奋,尤其高浓度处理组的斑马鱼,随着时间的延长,鱼开始游动失衡,鱼体侧翻,游速缓慢,反应迟钝,严重的出现死亡。

表 1 95%啶氧菌酯原药对斑马鱼(*Brachydonio rerio*)急性毒性试验结果

Table 1 Acute toxicity test results of 95% picoxystrobin in *Brachydonio rerio*

处理 Treatment	浓度/(mg a.i.·L <sup>-1</sup> ) Concentration (/mg a.i.·L <sup>-1</sup> )	死亡数 Number of deaths				死亡率/% Mortality rate/%			
		24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
空白 CK Blank CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0
溶剂 CK Solvent CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.0300	0	0	0	1	0	0	0	10
2	0.0390	1	2	3	3	10	20	30	30
3	0.0507	3	4	4	6	30	40	40	60
4	0.0658	4	5	6	7	40	50	60	70
5	0.0856	7	7	8	8	70	70	80	80

依据表1的实验结果,计算啶氧菌酯对斑马鱼的急性毒性,96 h- $LC_{50}$ 为  $0.0509 \text{ mg a.i.} \cdot \text{L}^{-1}$ ,95%置信区间为  $0.0314 \sim 0.0641 \text{ mg a.i.} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据国家标准《化学农药环境安全评价试验准则》中对鱼类的毒性等级划分标准,95%啶氧菌酯对斑马鱼急性毒性指标  $96 \text{ h-}LC_{50} < 0.1 \text{ mg a.i.} \cdot \text{L}^{-1}$ ,属“剧毒”级。

### 2.3 啶氧菌酯在斑马鱼体内的生物累积效应

啶氧菌酯对斑马鱼的毒性属剧毒,而它同时还可能存在着生物累积效应,因此,啶氧菌酯对斑马鱼等水生生物形成更大安全风险。根据  $LC_{50}$  设置啶氧菌酯的生物富集试验浓度,采用  $1/10$  和  $1/100 LC_{50}$  啶氧菌酯进行生物富集的试验,结果如图2所示。结果表明,啶氧菌酯在斑马鱼体内存在明显的生物富集效应。从暴露开始,啶氧菌酯在斑马鱼体内有一个快速累积的过程,在  $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $1/100 LC_{50}$ ) 水平下暴露 24 h 后,斑马鱼体内的啶氧菌酯的浓度就达到  $0.037 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $BCF_{24\text{h}}$  达到 61.67,随后,斑马鱼体内的啶氧菌酯增加速度变得缓慢。到第2天(48 h)时,斑马鱼体内的啶氧菌酯浓度基本达到平衡,  $BCF$  达到 73.33,到第8天(192 h)时,斑马鱼体内的浓度达到  $0.048 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $BCF_{8\text{d}}$  缓慢增长到 80.00。

在更高浓度的暴露环境中,在  $1/10 LC_{50}$  ( $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 水中,24 h 后,斑马鱼体内啶氧菌酯浓度就达到平衡,约为  $0.553 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $BCF_{24\text{h}}$  基本达到 106.35。随后斑马鱼体内的啶氧菌酯浓度维持平衡,生物富集因子也小幅波动,到 192 h 后,斑马鱼体内的啶氧菌酯浓度为  $0.527 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $BCF_{8\text{d}}$  值为 99.42。

农药等化学品的生物富集性,一般认为是与其  $K_{ow}$  相关。通常  $K_{ow}$  越大,生物累积性越高,如葱的  $\log K_{ow} = 4.45$ ,其在斑马鱼体内的生物累积大约是  $2.48 \times 10^4 \sim 6.14 \times 10^4$  [11-13]。啶氧菌酯的  $\log K_{ow} = 4.48$ ,虽然与葱接近,但其在斑马鱼体内的富集效应在 80.00~99.43 之间,相差达 2~3 个数量级。此结果表明,一方面,啶氧菌酯可以在生物体内富集;另外一方面,其在生物体内存在代谢过程,使其在富集平衡时,生物富集因子远远低于多环芳烃的富集因子。

### 3 讨论(Discussion)

根据《化学农药环境安全评价试验准则》,啶氧菌酯对斑马鱼有剧毒。啶氧菌酯在水体中水解缓慢,而在生物体内也具有比较高的稳定性,同时,其疏水性强,在生物体内的降解速度比累积速度慢,容易在

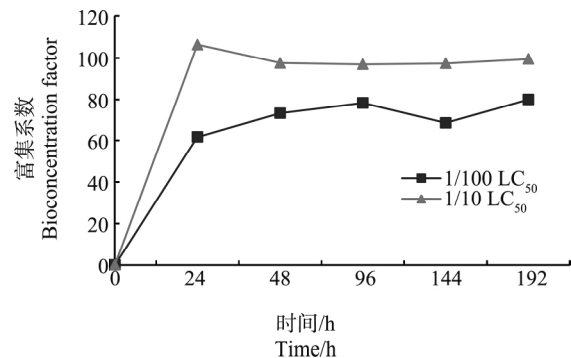


图2 斑马鱼体内啶氧菌酯富集系数(BCF)的变化规律

Fig. 2 Variation of picoxystrobin bioconcentration factor (BCF) in *Brachydanio rerio*

生物体内累积。经过 8 d 暴露,在低浓度下,生物富集因子可以达到 80.00,而在比较高的环境浓度下,生物富集因子也可以达到 99.42。根据 GB/T 31270.7—2014《化学农药环境安全评价试验准则 第7部分:生物富集试验》中农药生物富集性评价标准,在  $10 < BCF \leq 1000$ ,富集等级为中等富集性。因此,在啶氧菌酯的推广和使用的过程中,应该考虑到其潜在的食物链放大风险。

致谢:本研究得到国家“十三五”国家科技重大专项(2017ZX07107)和北京市科技计划课题项目(Z181100005418010)的资助。

通讯作者简介:郭宝元(1976—),男,博士,研究员,主要研究方向为农药环境科学和生态毒理学。

#### 参考文献(References):

- [1] 刘刚. 啶氧菌酯原药产品登记企业达到 8 家[J]. 农药市场信息, 2018(9): 40
- [2] 宋晓兵, 彭埃天, 凌金锋, 等. 新型杀菌剂啶氧菌酯对香蕉叶斑病的防治效果[J]. 生物安全学报, 2017, 26(4): 327-330  
Song X B, Peng A T, Ling J F, et al. The effectiveness of a new fungicide, picoxystrobin against the banana sigatoka disease [J]. Journal of Biosafety, 2017, 26(4): 327-330 (in Chinese)
- [3] 陆军良, 陈宇博, 冯新军, 等. 啶菌酯等 7 种药剂对榨菜白锈病的防治效果[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(7): 1202-1203
- [4] 刘维屏. 农药环境化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 1  
Liu W P. Pesticide Environmental Chemistry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 1 (in Chinese)

- [5] 李丽, 林爽, 邹来阳, 等. 啮氧菌酯原药毒性评价[J]. 农药, 2017, 56(4): 283-284  
Li L, Lin S, Zhou L Y, et al. Toxicity evaluation of picoxystrobin TC [J]. Agrochemicals, 2017, 56(4): 283-284 (in Chinese)
- [6] 李爱军, 雷玉马. 啮氧菌酯的合成工艺优化[J]. 农药, 2016, 55(4): 253-255  
Li A J, Lei Y M. Synthesis of picoxystrobin [J]. Agrochemicals, 2016, 55(4): 253-255 (in Chinese)
- [7] 徐伟松, 周振标, 黄怡林. 啮氧菌酯对香蕉黑星病田间药效试验研究[J]. 农药科学与管理, 2014, 35(7): 59-62  
Xu W S, Zhou Z B, Huang Y L. Study on the field efficacy of picoxystrobin 250 g/L SC against *Macrophoma musae* in Guangdong [J]. Pesticide Science and Administration, 2014, 35(7): 59-62 (in Chinese)
- [8] 胡秀卿, 朱亚红, 张昌朋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法分析啮氧菌酯在葡萄果实和园地土壤中的消解动态[J]. 果树学报, 2016, 33(5): 624-628  
Hu X Q, Zhu Y H, Zhang C P. Degradation of picoxystrobin in grape fruit and grapery soil by UPLC-MS/MS [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(5): 624-628 (in Chinese)
- [9] 孙扬, 秦旭, 赵立杰, 等. 露地黄瓜啮氧菌酯的残留分析及黄瓜个体残留水平的差异[J]. 河南农业科学, 2016, 45(3): 98-101  
Song Y, Qin X, Zhao L J, et al. Residue analysis of picoxystrobin in cucumber under field condition and individual variations of residue levels [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2016, 45(3): 98-101 (in Chinese)
- [10] 付岩, 王全胜, 张亮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定铁皮石斛中啮氧菌酯残留[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(10): 1903-1905
- [11] Wang H, Li Y, Xia X, et al. Relationship between metabolic enzyme activities and bioaccumulation kinetics of PAHs in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Environmental Sciences, 2017, 65: 43-52
- [12] van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 13(2): 57-149
- [13] Jonker M T O, van der Heijden S A. Bioconcentration factor hydrophobicity cutoff: An artificial phenomenon reconstructed [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(21): 7363-7369 ◆