

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.03.028

杀真菌化合物 SCU-2028 对环境生物的毒性与安全性评价

杨艺华, 张爱贵, 岳莹, 邓易明, 陶科, 金洪, 侯太平

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 通过参照《化学农药环境安全评价试验准则》中化合物对环境有益生物, 如鱼类、蚯蚓、家蚕、水藻类的急性毒性的测定方法, 进行化合物 SCU-2028 的环境安全性评价。结果表明化合物 SCU-2028 对斜生栅列藻 72 h 的 EC_{50} 值为 7.872 mg/L, 对斑马鱼 96 h 的 $LC_{50} > 12$ mg/L, 对蚯蚓 14 d 的 $LC_{50} > 40$ mg/kg 和对 3 龄家蚕 96 h 的 $LC_{50} > 4800$ mg/kg 桑叶。这显示出化合物 SCU-2028 对鱼类、蚯蚓、家蚕、藻类均为低毒。

关键词: 吡唑甲酰胺类化合物; 环境生物; 急性毒性; 安全性评价

中图分类号: S482.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)03-0553-05

Toxicity and safety evaluation of fungicidal compound SCU-2028 to the environmental organisms

YANG Yi-Hua, ZHANG Ai-Gui, YUE Ying, DENG Yi-Ming, TAO Ke,
JIN Hong, HOU Tai-Ping

(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment, Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: By referring to the assay for determining the acute toxicity of compounds to environmental organisms, such as fishes, earthworms, silkworms and algae in “environmental safety evaluation tests of chemical pesticides standards”, the environmental safety of compound SCU-2028 was evaluated. The results showed that the EC_{50} value against algae in 72 h was 7.872 mg/L, the LC_{50} value against fishes in 96 h was more than 12 mg/L, the LC_{50} value against earthworms in 14 d was more than 40 mg/kg and the LC_{50} value against silkworms in 96 h was more than 4800 mg/kg. This showed that compound SCU-2028 had low toxicity to environmental organisms.

Keywords: Pyrazolecarboxamide; Environmental organisms; Acute toxicity; Safety evaluation

1 引言

我国幅员辽阔、人口众多, 粮食的生产安全是全面建成小康社会的重要基石, 关系到社会稳定与国计民生。然而植物病害可引起作物病害, 不仅会

造成产量下降, 还会降低其品质, 更有甚者会产生毒素危害人畜安全, 严重影响到我国粮食生产安全。化学杀菌剂是目前最重要的作物病害的防治手段之一, 在保证粮食生产安全中发挥着不可替代的作用。目前常见杀菌剂多为单一位点药剂, 可在

收稿日期: 2018-05-07

基金项目: “十三五”国家重点研发计划课题(2016YFC0502004)

作者简介: 杨艺华(1994-), 女, 硕士研究生, 主要从事化学农药安全性研究。E-mail: 1522686454@qq.com

通讯作者: 侯太平。E-mail: houtplab@scu.edu.cn

短时间内使病原菌产生抗药性,导致药效降低、抗药性群体再猖獗以及农药残留问题,造成大量经济损失。因此,进行结构新颖、多作用位点、无交互抗性的新型杀菌剂的研究与开发,对作物病害的抗药性群体治理具有重大意义。

琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂是目前一类新型高效、广谱、高安全性的杀菌剂,现已成为当今世界杀菌剂市场最活跃、最有发展潜力的新一代杀菌剂^[1-2]。虽然琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂中的吡唑类农药品种相较于嘧啶及三唑类较少,但吡唑作为一个重要的药效基团,日益受到研究人员的关注^[3-5]。吡唑酰胺类化合物对于水稻纹枯病、灰霉病、锈病等各种植物病原真菌具有良好的抑菌效果^[6]。近年来,含有吡唑酰胺药效基团的各种化合物的设计、合成以及抑菌活性的研究已经成为寻求高效、低毒的新型绿色农用杀菌剂的研究热点之一。本实验室以琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂联苯吡菌胺为先导化合物创制出具有自主知识产权的含二芳胺基的吡唑甲酰胺类新型杀菌化合物 SCU-2028,对水稻纹枯病具有良好的防治效果^[7],并在 2017 年获得了国家发明专利^[8]。

随着人们对环境安全的重视和意识的提高,农药对环境有益生物的影响也越来越得到人们的重视。目前,农药对环境生物的毒性与安全性评价已成为农药进行示范推广的重要参考,也是开发新农药的重要依据。因此,本文为了评价新开发的化合物 SCU-2028 对环境生物的毒性和安全性,根据《化学农药环境安全评价试验准则》^[9]中对环境生物的测定方法以及毒性等级分级标准,分别测定其对鱼类、蚯蚓、家蚕、藻类的急性毒性,并对其进行安全性评价,这为正确评价其对环境生物可能造成的危害提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 供试化合物 SCU-2028,化学名称 *N*-[2-(3-氯苯基胺基)苯基]-3-二氟甲基-1-甲基-1*H*-吡唑-4-甲酰胺,由四川大学生命科学院实验室自主合成提供。

2.1.2 供试生物 斑马鱼 (*Brachydonio rerio*),平均体长 3~4 cm,平均质量在 30.0 ± 5.0 g,购于四川省成都市青石桥鱼市。试验前在室内预养 1 w,育养期间鱼类生长正常,无死亡,大小一致。试验前 1 d 停止喂食,试验中亦不喂食;赤子爱胜

蚯蚓 (*Eisenia foetida*),购自四川省成都市青石桥,挑选出环带明显且大小一致的健康成年蚯蚓,体重在 400~500 mg 之间的个体用于试验,购入后在室温 20 °C 左右条件下驯养;家蚕 (*Bombyx mori* L) 购于广东省养蚕公司。选择大小一致的家蚕,室内饲养至 3 龄起;斜生栅列藻 (*Scenedesmus obliquus*),由四川大学生命科学院藻类培养室提供,无菌条件下转接至 chu10 培养液培养,培养温度 (22 ± 2 °C),连续光照 (光强 4000 lx),连续转接 3 次以上,使水藻基本达到对数生长期。

2.2 方法

2.2.1 化合物 SCU-2028 对斑马鱼的毒性 采用半静态毒水放养法^[10,11]。试验用水为经过存放并曝气去氯处理 24 h 以上的自来水,试验容器为 10 L 的玻璃缸。正式试验时,在预试验的化合物浓度范围内设置 5 组不同质量浓度药液,在每个试验缸中投入 10 条斑马鱼,每种浓度药液处理重复 3 次。以清水和溶剂处理为对照,处理后调节室温使水温保持在 27 °C 左右,每隔 24 h 换药水一次,以保证水中的药剂浓度,于药剂处理 24、48、72 和 96 h 观察并记录斑马鱼的中毒症状和死亡数。

2.2.2 化合物 SCU-2028 对蚯蚓的毒性 参照《化学农药环境安全评价试验准则》^[9]及冯磊、陈爱梅等对蚯蚓毒性测定的试验方法^[12-14]。土壤为从学校采回的土壤(蚯蚓聚集地的土壤),0~15 cm 表层土壤,土壤采回后,在阴凉处风干研细。根据预试验结果,将药剂设置 7 个浓度组,每个浓度组均设 3 个重复。在 1 L 标本瓶中放 500 g 土壤(标本瓶中土壤厚度不低于 8 cm),加入药剂溶液后充分搅拌用丙酮助溶,待丙酮挥发后。每个处理放入蚯蚓 10 条,用保鲜膜封口,将标本瓶置于培养箱中。试验时长两周,观察记录蚯蚓的中毒症状和死亡数(用针刺刺激蚯蚓尾部,蚯蚓无反应则为死亡),及时清除死亡蚯蚓。对照不加药剂,其它与正式试验相同。

2.2.3 化合物 SCU-2028 对家蚕的毒性 采用浸叶法^[15-17]。在预试验确定的药剂使用浓度范围内,将供试药剂设置 9 个试验浓度,将采摘的健康桑叶,擦净叶面后切成小块,用不同浓度的药液均匀浸润,自然晾干后放入直径 15 cm 的培养皿内,每皿接入 20 头 3 龄家蚕,每种浓度药液处理重复 3 次。以清水和溶剂浸渍桑叶为对照。处理后幼虫置于温度为 25~30 °C 的室内连续取食毒叶 96 h。

2.2.4 化合物 SCU-2028 对藻类的毒性 参照

《化学农药环境安全评价试验准则》^[9]及赵玉艳、沈艳等对藻类毒性测定的试验方法^[18-20]. 在预实验确定的质量浓度范围内, 设置 6 个不同质量浓度组, 药液配制成 2 倍质量浓度药液; 在无菌条件下, 用无菌水和 Chu10 培养液将斜生栅列藻配制成 1.0×10^5 个/mL 的 2 倍质量浓度供试藻液. 50 mL 的 2 倍浓度药液与 50 mL 的 2 倍质量浓度藻液在 250 mL 三角瓶中混合. 每个质量浓度组进行 3 次重复, 设置空白对照组. 摇匀后放入人工气候箱培养, 定时摇动. 试验温度 (22 ± 2 °C), 连续均匀光照, 光强 4000 lx. 于 24、48、72 h 取处理组和对照组藻液用血球计数板计藻细胞数.

3 结果与分析

3.1 化合物 SCU-2028 对鱼类的影响

试验设置 3.5、5、6.5、9、12 mg/L 及空白对照和溶剂对照 7 个药液质量浓度, 试验表明空白对照组和溶剂对照组的斑马鱼全部生长正常, 无死亡, 处理组斑马鱼出现不同死亡情况, 中毒鱼表现为活动迟缓、侧翻沉底、浮于水面、腹部肿胀、颜色苍白. 各处理组中斑马鱼死亡率见表 1, 均未超过 50%, 可见药剂对斑马鱼 96h 的 $LC_{50} > 12$ mg/L.

表 1 化合物 SCU-2028 对斑马鱼的毒性

Tab. 1 Toxic effects of compound SCU-2028 to zebrafish

药液质量浓度 (mg/L)	死亡率 (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照	0	0	0	0
溶剂对照	0	0	0	0
3.5	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6.5	0	0	0	0
9	0	0	3.33	3.33
12	0	0	10	10

根据农药对鱼类毒性等级标准, 96h LC_{50} 值 > 10.0 mg/L 为低毒, $1.0 \sim 10.0$ mg/L 为中毒, $0.1 \sim 1.0$ mg/L 为高毒. 可见, SCU-2028 对斑马鱼低毒.

3.2 化合物 SCU-2028 对蚯蚓的影响

试验设置 2.5、5、10、20、40 mg/kg 及空白对照和溶剂对照 7 个药液质量浓度. 蚯蚓刚开始接触到混有药剂的土壤后, 蚯蚓没有明显的中毒症状, 很快钻入到土壤中. 在试验期间, 蚯蚓取出, 可观察到蚯蚓的中毒症状, 身体呈现伸长状态, 针刺无反应, 身上沾有一层泥土, 干枯, 部分糜烂中部变

黑. 各处理组中蚯蚓的死亡率见表 2, 均未超过 50%. 可见 SCU-2028 对蚯蚓的 $LC_{50} > 40$ mg/kg.

表 2 化合物 SCU-2028 对蚯蚓的毒性

Tab. 2 Toxic effects of compound SCU-2028 to earthworm

药液质量浓度 (mg/L)	死亡率 (%)				
	24 h	48 h	72 h	7 d	14 d
空白对照	0	0	0	0	0
溶剂对照	0	0	0	0	0
2.5	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	3.33	3.33
40	0	0	3.33	3.33	6.67

根据农药对蚯蚓毒性等级划分标准, 对蚯蚓的毒性大小按照 LC_{50} 值的大小划分为三个等级: < 1 mg/L 的为高毒, $1 \sim 10$ mg/L 的为中毒, > 10 mg/L 的为低毒. 由试验结果可见, SCU-2028 对蚯蚓低毒.

3.3 化合物 SCU-2028 对家蚕的影响

试验设置 4800、2400、1200、600、300、150、75 mg/L 及空白对照和溶剂对照 9 个药液质量浓度. 各处理组中家蚕的死亡率见表 3. 试验结果表明: 家蚕食用药液浸泡过的桑叶后, 所有处理组中低质量分数组家蚕无明显中毒症状; 高质量分数组家蚕移动缓慢, 与对照相比较蚕体尾部颜色发黄.

表 3 化合物 SCU-2028 对家蚕的毒性

Tab. 3 Toxic effects of compound SCU-2028 to silkworm

药液质量分数 (mg/kg 桑叶)	死亡率 (%)		
	24 h	48 h	96 h
空白对照	0	3.33	6.67
溶剂对照	0	3.33	8.33
4800	0	10.00	16.67
2400	0	6.67	11.67
1200	0	3.33	8.33
600	0	1.67	6.67
300	0	0	3.33
150	0	0	1.67
75	0	0	1.67

应用 SPSS 统计软件进行分析处理, 得出 96 h 的毒力回归式为 $y = 0.0031x + 2.9031$, $R^2 = 0.9209$. LC_{50} 远大于 4800 mg/kg 桑叶. 根据农药对家蚕的毒性等级划分标准, $LC_{50} > 200$ mg/kg 桑叶为低毒, $20 \sim 200$ mg/kg 桑叶为中毒, $0.5 \sim$

20mg/kg 桑叶为高毒.由此可见 SCU-2028 对家蚕低毒.

3.4 化合物 SCU-2028 对藻类的影响

试验设置 1.0、2.0、3.8、7.6、15.2 mg/L 及空白对照 6 个药液质量浓度.各处理组中斜生栅列藻的抑制率见表 4 和 5.

表 4 化合物 SCU-2028 对斜生栅列藻的抑制率

Tab. 4 Inhibitory rate of compound SCU-2028 to *Scenedmus obliquus*

药液质量浓度(mg/L)	72 h 抑制率(%)
空白对照	0
1.0	6.92
2.0	17.32
3.8	27.44
7.6	48.52
15.2	69.83

生物量增长抑制率(%)=

$$\frac{\text{对照组藻细胞浓度}-\text{处理组藻细胞浓度}}{\text{对照组藻细胞浓度}} \times 100$$

表 5 化合物 SCU-2028 对斜生栅列藻的 EC_{50} 值

Tab. 5 EC_{50} value of compound SCU-2028 to *Scenedmus obliquus*

回归方程 (y=)	R^2	72 h- EC_{50} (mg · L ⁻¹)	95%置信限 (mg · L ⁻¹)
4.5445x+5.9186	0.9537	7.872	6.599~9.716

根据农药对藻类毒性等级划分标准, $EC_{50} \geq 3.0$ mg/L 的农药为低毒农药,3.0~0.3 mg/L 的农药为中毒农药,<0.3 mg/L 的农药为高毒农药.由表 4、5 中试验组的生物量增长的抑制率可见,SCU-2028 对斜生栅列藻的 EC_{50} 为 7.872,为低毒.

4 讨论

随着农药使用量的增加,残留农药进入水体对水环境的污染日益严重,对水生物的危害也越来越大.通过农药对鱼类和藻类的急性毒性可评价农药对水生物的影响.Zhang 等以斑马鱼为受试生物,研究了两种有机磷酸酯类和 4 种拟除虫菊酯类杀虫剂以及它们的二元混合物对斑马鱼的急性毒性,对比了两类杀虫剂对水生生物的生态毒性^[21].本文研究了药剂对斑马鱼和斜生栅列藻的急性毒性试验,为进一步研究提供了依据.但在其对斑马鱼的慢性、亚慢性及其分子毒性试验方面应进一步展开,另外斑马鱼的胚胎发育也已成为毒性试验的

热点^[22,23].林琏不仅研究了氟吡菌胺对斑马鱼、斜生栅列藻等常规环境生物的急性毒性,也着重研究了斑马鱼的慢性及胚胎发育试验^[24].

蚯蚓急性毒性试验作为评价农药对土壤中非靶标生物影响的重要指标,被广泛应用.王彦华等也以蚯蚓为受试生物,采用不同方法研究了新烟碱类和阿维菌素类药剂对蚯蚓的急性毒性效应^[25].农药对蚯蚓急性毒性效应的测试,简单、快速、可大致确定农药对蚯蚓的毒性高低和潜在毒性,为慢性毒性试验提供依据和参考.

家蚕是我国重要的经济昆虫,其唯一的饲料桑叶在生长过程中容易受周围农业生态环境或桑园内使用的污染,导致各种各样的中毒事件发生.据《浙江省蚕桑志》记载,随着农药种类和使用量的不断增加,导致了家蚕中毒事件频发,而造成了蚕桑业遭受了重大损失^[26].陈伟国等比较了氯虫苯甲酰类等 5 种双酰胺类杀虫剂对家蚕的毒性^[27].在我国南方地区稻-桑-蚕农业生态系统较为普遍,稻田使用的农药容易漂移到附近的桑树上造成家蚕中毒.本实验室合成的新化合物由于对水稻纹枯病具有较好的效果,因此对家蚕的家蚕的毒性与安全性评价试验也相对重要.

研究表明:SCU-2028 对斑马鱼 96 h 的 $LC_{50} > 12$ mg/L,对蚯蚓 14 d 的 $LC_{50} > 40$ mg/kg,对 3 龄家蚕 96 h 胃杀毒性的 $LC_{50} > 4800$ mg/kg 桑叶.对斜生栅列藻 96 h 的 $EC_{50} = 7.872$ mg/L,评价其对环境生物的安全性,SCU-2028 对鱼、蚯蚓、蚕、藻类等环境生物无实际危害.在计算 LC_{50} 时并没有能够计算出详细的数值,因为在《化学农药环境安全评价试验准则》中对待测药剂所加溶剂的量有明确的要求,而该药剂在具体的毒性试验中试验剂量已达到最大,已无法配置更高的浓度^[9].

合理正确的使用农药是保证生态平衡的重要措施.随着农药科学的发展和人们环境意识的增强,农药对环境有益生物毒性的研究也越来越多.农药对环境生物的毒性研究不应局限于急性毒性方面,还应从慢性毒性研究上深入展开.本文仅限于 SCU-2028 对环境生物的急性毒性研究,而其对鱼、蚯蚓、家蚕、水藻等环境生物的慢性影响尚需进一步研究.

参考文献:

- [1] 蒲桃,王宏宇,刘英,等.新型 2-甲基-3-咪喃甲酰胺类化合物的设计、合成及抑菌活性研究[J].四川

- 大学学报:自然科学版,2017,54:178.
- [2] 王宏宇,张肖肖,高续恒,等.二芳胺基咪唑甲酰胺类化合物的合成设计及抗菌活性研究[J].四川大学学报:自然科学版,2017,54:845.
- [3] 陈晓明,王陈龙,薄瑞.中国农药使用现状及对策建议[J].农药科学与管理,2016,37:4.
- [4] 曹瑾,张一宾.吡唑类农药的研究进展[J].精细化工中间体,2007,37:1.
- [5] 梁英,贺红武.具有杀菌活性的吡唑类衍生物的研究进展[J].农药,2005,44:14.
- [6] 贾新彦,徐端红.吡唑酰胺类化合物的合成及杀菌活性研究进展[J].河南农业,2016,06:43.
- [7] Zhang X X, Jin H, Deng Y J, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel pyrazole carboxamide with diarylamine-modified scaffold as potent antifungal agents [J]. *Chin Chem Lett*, 2017, 28: 1731.
- [8] 侯太平,张肖肖,金洪,等.含二芳胺基的吡唑甲酰胺类化合物及其在农药中的应用:ZL201610019343.1[P].2016-10-01.
- [9] 国家环保局.化学农药环境安全评价试验准则:GB/T31270.11-2014[S].北京:中国标准出版社,2015:22.
- [10] 雷斌,常晓春,张波,等.18.6%拌·福·乙酰甲悬浮种衣剂对环境生物的毒性与安全性评价[J].农药,2011,50:903.
- [11] 党建友.农药对有益生物安全性评价生测方法研究[D].北京:中国农业大学,2003.
- [12] 冯磊.三种新烟碱类杀虫剂对蚯蚓的影响[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [13] 陈爱梅,王金花,夏晓明,等.不同剂型吡虫啉对蚯蚓和斑马鱼的急性毒性评价[J].农业环境科学学报,2013,32:1758.
- [14] 孙仕仙,张庆,薛涛,等.杀虫双对蚯蚓的单一及其复合毒性试验[J].现代农业科学,2009,16:13.
- [15] 张中霄,王开运,姜莉莉,等.新型杀虫剂甲硫丁醚对家蚕的毒性与安全性评价[J].蚕业科学,2017,43:704.
- [16] 池艳艳,乔康,姜辉,等.氯虫苯甲酰胺对家蚕的毒性与安全性评价[J].蚕业科学,2014,40:694.
- [17] 陈伟国,鲁兴萌.农药对家蚕的毒性与安全性评价研究[J].蚕业科学,2012,38:329.
- [18] 赵玉艳,蔡磊明.几种藻类毒性试验统计方法的差异[J].农药,2004,43:298.
- [19] 沈艳,陈亮,孙如意,等.噻呋酰胺对3种水生物的急性毒性与安全性评价[J].农药,2016,55:817.
- [20] 李祥英,梁惠君,何裕坚,等.5种杀菌剂对3种水生生物的急性毒性与安全性评价[J].广东农业科学,2014,16:125.
- [21] Zhang Z Y, Yu X Y, Wang D L, *et al.* Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures [J]. *Pest Manag Sci*, 2010, 66: 84.
- [22] Scholz S, Fischer S, EKüster, *et al.* The zebrafish embryo model in environmental risk assessment applications beyond acute toxicity testing [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2008, 15: 394.
- [23] Embry M R, Belanger S E, Braunbeck T A, *et al.* The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research [J]. *Aquat Toxicol*, 2010, 97: 79.
- [24] 林璉.氟吡菌胺的环境安全性及其在黄瓜和土壤中的残留动态研究[D].泰安:山东农业大学,2015.
- [25] 王彦华,陈丽萍,赵学平,等.新烟碱类和阿维菌素类药剂对蚯蚓的急性毒性效应[J].农业环境科学学报,2010,29:2299.
- [26] 蒋猷龙,陈清其,冯家新,等.浙江省蚕桑志[M].杭州:浙江大学出版社,2004:160.
- [27] 陈伟国,戴建忠,董瑞华,等.5种双酰胺类杀虫剂对家蚕的毒性比较和安全性评价[J].蚕业科学,2016,42:288.

引用本文格式:

中文:杨艺华,张爱贵,岳莹,等.杀真菌化合物 SCU-2028 对环境生物的毒性与安全性评价[J].四川大学学报:自然科学版,2019,56:553.

英文:Yang Y H, Zhang A G, Yue Y, *et al.* Toxicity and safety evaluation of fungicidal compound SCU-2028 to the environmental organisms [J]. *J Sichuan Univ; Nat Sci Ed*, 2019, 56: 553.