

· 研究论文 ·

氟虫腈对家蚕的急性毒性与安全评价研究

朱金文^{*}, 魏方林, 李少南, 张自强, 朱国念

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 氟虫腈是我国稻桑混栽地区水稻上普遍使用的杀虫剂。采用食下毒叶法、口器注入法与药膜法测定了不同条件下氟虫腈对家蚕的急性毒性。氟虫腈对 2 龄、3 龄、4 龄、5 龄家蚕的摄入 LC_{50} 值 (48 h, 下同) 分别为 4.89、6.46、9.47、11.59 mg/L; 对 5 龄家蚕的 LD_{50} 值为 1.38 μ g/蚕; 在 25、30、35 三个温度下, 氟虫腈对 2 龄家蚕的 LC_{50} 值分别为 4.81、4.59、2.05 mg/L; 桑叶浸药时间为 1 s、10 s、1 min、10 min、1 h 时, 氟虫腈对 3 龄家蚕的 LC_{50} 值分别为 9.12、6.46、4.39、3.68、2.80 mg/L; 家蚕在氟虫腈药膜上爬行 1、10、30、60 min 后, 对 4 龄家蚕的接触 LC_{50} 值分别为 2.82、2.35、2.05、1.57 μ g/cm²。研究表明, 胃毒是氟虫腈对家蚕的主要作用方式, 氟虫腈在桑园附近水稻上使用对家蚕有较大风险。

关键词: 氟虫腈; 家蚕; 毒性

中图分类号: S481.1; S884.96

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)01-0041-05

Acute Toxicity and Safety Evaluation of Fipronil to *Bombyx mori*

ZHU Jin-wen^{*}, WEI Fang-lin, LI Shao-nan, ZHANG Zi-qiang, ZHU Guo-nian
(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Fipronil is one of the insecticides popularly used in paddy rice and mulberry mix-cultivation area in China. Toxicity of fipronil to silkworm (*Bombyx mori*) in different situations were conducted by methods of feeding toxic mulberry leaves and injecting into the mouthparts, and methods of contacting with toxic membrane, respectively. For the second, third, fourth and fifth-instar larvae, the LC_{50} value (48 h) of fipronil to silkworm was 4.89, 6.46, 9.47 and 11.59 mg/L, respectively. The LD_{50} value for fifth instar was 1.38 μ g/silkworm. When environmental temperature was 25, 30 and 35, the LC_{50} value (48 h) to the second-instar larvae was 4.81, 4.59 and 2.05 mg/L, respectively. When immersion time of mulberry leaves in fipronil solution was 1 s, 10 s, 1 min, 10 min and 1 h, the LC_{50} value (48 h) to the third-instar larvae was 9.12, 6.46, 4.39, 3.68 and 2.80 mg/L, respectively. After contact of silkworm with filter paper treated by fipronil solution in time of 1, 10, 30 and 60 min, the LC_{50} value (48 h) to the fourth-instar larvae was 2.82, 2.35, 2.05 and 1.57 μ g/cm², respectively. The results indicated that the toxicity of fipronil to silkworm is caused mainly by mode of feeding and the risk of fipronil to silkworm is relatively high when fipronil is used near mulberry cultivation area.

Key words: fipronil; *Bombyx mori*; toxicity

收稿日期: 2005-10-10; 修回日期: 2006-01-18.

作者简介: 朱金文 (1967-), 男, 浙江人, 在职博士, 主要从事农药药理与环境毒理研究. 联系电话: 0571-86971220; E-mail: zhjw@zju.edu.cn

氟虫腈属苯基吡唑类杀虫剂,其杀虫机理独特,作用靶标是神经轴突-氨基丁酸调节的氯离子通道。该药剂杀虫谱广,对半翅目、鳞翅目、缨翅目及鞘翅目等害虫具有很高的生物活性,对已对菊酯类、环戊二烯类与氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗药性的害虫也有理想的防治效果,在全球70多个国家广泛应用于农业害虫与卫生害虫的防治^[1,2],近几年我国在水稻二化螟 *Chilo suppressalis*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 等害虫防治中大面积推广应用,是目前水稻上使用的主要杀虫剂之一^[3]。然而,我国南方地区稻桑混栽较为普遍,稻田使用的农药容易飘移到附近的桑树上造成家蚕中毒。稻田使用氟虫腈后5 d,从距稻田5 m的桑树上采摘的桑叶可使家蚕中毒。氟虫腈在桑叶上的残毒期长达30 d^[4],但有关不同生育期家蚕在不同温度条件下对氟虫腈的敏感性尚未见报道。另一方面,关于化学农药对家蚕的安全性,国内外主要采用食下毒叶法与药膜法等方法来评价农药对家蚕的胃毒与触杀毒性^[5-13],但是桑叶在药液中的浸渍时间与家蚕在药膜上的爬行时间对药剂毒性的影响机制尚不够明确,有关化学农药对家蚕毒性试验方法的基础研究仍较缺乏。笔者采用食下毒叶法、口器注入法及药膜法,就氟虫腈对家蚕的急性毒性进行了研究,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 供试生物

家蚕 *Bombyx mori* 品种为白玉秋丰,浙江省蚕种公司提供;桑树品种为荷叶白,浙江大学蚕桑系提供。

1.2 药剂与仪器

5% 氟虫腈悬浮剂 (fipronil 50 SC,德国拜耳公司)。电子天平 (Sartorius 公司),移液枪 (美国 GILSON 公司),光照培养箱 (宁波江南仪器设备公司)等。

1.3 不同龄期家蚕对氟虫腈的敏感性试验

采用食下毒叶法。分别用2龄、3龄、4龄与5龄家蚕的起蚕进行试验,选择健康且大小较为一致的个体。在预备试验的基础上,按一定的等比级差设计6个浓度,以清水处理为空白对照。将桑叶于不同浓度的药液中浸渍10 s,取出自然晾干,置于直径15 cm的培养皿中,移入家蚕后放入培养箱中微光培养,试验期间均喂以经药剂处理

过的桑叶。

选用5龄家蚕的起蚕进行口器注入法毒性试验:将药剂用去离子水配制成不同浓度药液,用5 μ L 气相色谱进样针向家蚕口器中注入1 μ L 药液,处理后的家蚕用新鲜无毒桑叶饲养。

每处理设3个重复,每重复20头家蚕。试验温度为(25 \pm 1),保持相对湿度80% \pm 5%。药剂处理后不同时间观察记录家蚕取食情况与中毒症状,24、48 h 观察记录家蚕死亡情况,利用 DPS 统计软件求出 LC₅₀ 或 LD₅₀ 值与95%置信限。

1.4 不同温度条件下氟虫腈对家蚕的毒性

采用食下毒叶法,用2龄家蚕的起蚕供试,试验在(25 \pm 1)、(30 \pm 1)与(35 \pm 1)3个温度条件下进行。其他试验方法同1.3。

1.5 桑叶不同浸药时间下氟虫腈对家蚕的毒性

采用食下毒叶法,用3龄家蚕的起蚕供试。配制不同浓度药液,桑叶浸渍时间分别设定为1 s、10 s、1 min、10 min、1 h。其他试验方法同1.3。

1.6 家蚕在药膜上爬行不同时间氟虫腈对其的接触毒性

选用4龄家蚕。配制不同浓度药液,将滤纸置于直径11 cm的培养皿中,取2 mL 药液均匀滴加于滤纸上,扩散均匀形成药膜。将家蚕移到该药膜上,待家蚕在药膜上分别爬行1 min、10 min、30 min、1 h后,再将其移至新鲜无毒桑叶上饲养观察。其他试验方法同1.3。

2 结果与分析

2.1 不同龄期家蚕对氟虫腈的敏感性

药剂处理后不同时间的观察结果表明,药后4 h 家蚕即出现氟虫腈中毒症状:头胸部不断左右摇摆或倒翻后扭动挣扎,吐出大量淡黄色液体;头胸部渐渐短缩,随后胸部略显膨大,体长慢慢缩短至正常家蚕的1/2左右;最后家蚕扭曲死亡,蚕体弯曲成S形或C形。

随龄期增大,家蚕对氟虫腈的敏感性降低(见表1)。药剂处理后24 h,氟虫腈对2龄家蚕的 LC₅₀ 值为9.63 mg/L,而对3、4、5龄家蚕的 LC₅₀ 值分别是2龄家蚕的1.36、2.01、2.38倍。药剂处理后48 h,氟虫腈对2龄家蚕的 LC₅₀ 值为4.89 mg/L,而对3、4、5龄家蚕的 LC₅₀ 值分别是2龄家蚕的1.32、1.94、2.37倍。从中可以看出,2~5龄家蚕对氟虫腈的敏感性较为接近,4龄以上高龄家蚕对氟虫腈的敏感性明显降低。

Table 1 Sensitivity of *Bombyx mori* to fipronil in different growth stages

Methods	Instar	Time after treatment/h	Regression equation	r	LC ₅₀ (95% CL) /mg · L ⁻¹	LD ₅₀ (95% CL) /μg · silkworm ⁻¹
Feeding toxic mulberry leaves	2	24	Y=1.6066+3.4505x	0.9592	9.63(7.64~13.77)	
		48	Y=2.6429+3.4188x	0.9428	4.89(4.02~5.94)	
	3	24	Y=0.9773+3.6051x	0.9854	13.06(10.44~17.02)	
		48	Y=2.1688+3.4933x	0.9614	6.46(3.30~8.98)	
	4	24	Y=-3.0167+6.2319x	0.9689	19.34(16.26~22.13)	
		48	Y=-0.9350+6.0800x	0.9206	9.47(6.01~12.10)	
	5	24	Y=0.6520+3.1963x	0.9413	22.93(18.12~29.90)	
		48	Y=-1.3361+5.9556x	0.9586	11.59(7.63~14.35)	
Injecting into mouthparts	5	24	Y=4.1230+2.4868x	0.9801		2.25(1.59~3.53)
		48	Y=4.5046+3.5727x	0.9975		1.38(0.84~1.78)

2.2 温度对氟虫腈毒性的影响

从图 1 可以看出,随着温度升高,氟虫腈对家蚕的毒力增强,尤其在 35℃ 时毒力明显增强。在 25、30、35℃ 三个温度下,药后 24 h 氟虫腈对 2 龄家蚕的 LC₅₀ 值分别为 10.27、9.23、7.28 mg/L; 药后 48 h, 氟虫腈对 2 龄家蚕的 LC₅₀ 值分别为 4.81、4.59、2.05 mg/L。

2.3 桑叶不同浸药时间下氟虫腈对家蚕的毒性

随浸渍时间延长,氟虫腈对家蚕的 LC₅₀ 值依次降低(表 2)。桑叶浸药时间在 1 s 至 1 min 范围内, LC₅₀ 值随时间急剧变化,药后 48 h 的 LC₅₀ 值从 9.12 mg/L 降低为 4.39 mg/L; 桑叶浸药时间在 1 min 至 1 h 范围内, LC₅₀ 值随时间变化较小,药

后 48 h 的 LC₅₀ 值从 4.39 mg/L 降为 2.80 mg/L。

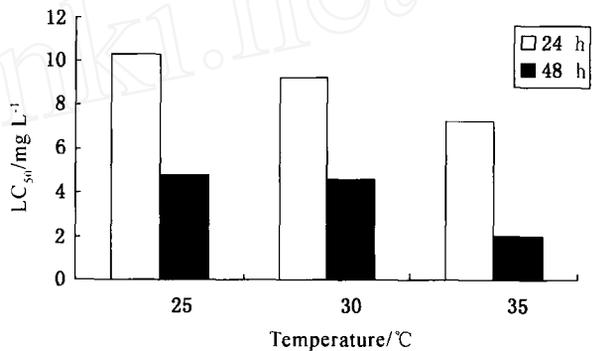


Fig. 1 Comparison of LC₅₀ of fipronil to *Bombyx mori* (second-instar) at different temperature

Table 2 Acute toxicity of fipronil to *Bombyx mori* (third-instar) with mulberry leaves being treated in different time

Immersion time of leaves	Time after treatment/h	Regression equation	r	LC ₅₀ (95% CL) /mg · L ⁻¹
1 s	24	Y=0.7791+3.2693x	0.9513	19.55(15.52~25.76)
	48	Y=0.1440+5.0583x	0.9711	9.12(6.09~11.40)
10 s	24	Y=1.9083+2.5232x	0.9850	16.80(12.69~22.50)
	48	Y=2.1688+3.4933x	0.9614	6.46(3.30~8.98)
1 min	24	Y=2.6358+2.5319x	0.9213	8.59(5.29~11.61)
	48	Y=0.9398+6.3220x	0.8917	4.39(0.86~7.11)
10 min	24	Y=1.4368+3.9883x	0.9536	7.82(5.59~9.73)
	48	Y=3.1271+3.3075x	0.9474	3.68(0.45~6.63)
1 h	24	Y=3.1851+2.3329x	0.9205	5.99(2.73~8.89)
	48	Y=3.2328+3.9578x	0.9371	2.80(2.23~3.49)

2.4 家蚕在药膜上爬行不同时间氟虫腈对其的接触毒性

随着家蚕在滤纸药膜上爬行时间的延长,氟虫腈对家蚕的接触 LC_{50} 值逐渐降低(表 3)。家蚕爬行 1 min 后移开,药剂处理后 24 h,氟虫腈对 4 龄家蚕的 LC_{50} 值为 $4.83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,而爬行 10 min、

30 min、1 h 后的 LC_{50} 值分别是爬行 1 min LC_{50} 值的 0.91、0.71、0.48 倍;药剂处理后 48 h,对 4 龄家蚕的 LC_{50} 值为 $2.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,而爬行 10 min、30 min、1 h 后的 LC_{50} 值分别是爬行 1 min LC_{50} 值的 0.83、0.73、0.56 倍。

Table 3 Toxicity of fipronil to *Bombyx mori* (fourth-instar) for different contact time

Contact time/min	Time after treatment/h	Regression equation	r	LC_{50} (95% CL) / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$
1	24	$Y=3.1672+2.6782x$	0.9996	4.83 (4.18~5.82)
	48	$Y=3.6717+2.9533x$	0.9857	2.82 (2.51~3.16)
10	24	$Y=3.0212+3.0855x$	0.9989	4.38 (3.86~5.10)
	48	$Y=3.5965+3.7913x$	0.9458	2.35 (2.11~2.59)
30	24	$Y=3.6180+2.5930x$	0.9842	3.41 (3.01~3.92)
	48	$Y=3.8572+3.6680x$	0.9994	2.05 (1.85~2.28)
60	24	$Y=3.6619+3.6725x$	0.9939	2.31 (2.07~2.56)
	48	$Y=4.4918+2.6022x$	0.9993	1.57 (1.32~1.80)

3 讨论

20 世纪 80 年代以来,我国开始了化学农药对家蚕的安全性评价研究,分别采用食下毒叶法、药膜法、熏蒸法、口器注入法等方法研究了克百威、杀虫单、甲基对硫磷、叶青双、溴氰菊酯、甲基异柳磷、嘧啶氧磷、单甲脒盐酸盐、克草胺、三唑磷、氟虫腈等农药对家蚕的毒性^[4~6,9~13]。农药对家蚕的毒性与家蚕的生育期密切相关,不同研究者对同一药剂的试验结果往往不同,其中供试家蚕的虫龄是重要的影响因素之一。本试验结果表明,不同龄期家蚕对氟虫腈的敏感性差异较大,2~3 龄家蚕个体较小,对外源化合物的解毒能力可能较弱,对氟虫腈尤其敏感。在进行触杀试验时,家蚕在药膜上的爬行时间对试验结果影响较大,家蚕与药膜应有足够的时间充分接触,试验结果才更接近生产上农药对家蚕的触杀毒性。我国颁布的“化学农药环境安全评价试验准则”中,关于供试桑叶在药液中的浸渍时间没有明确的规定^[7]。从本试验结果可以看出,在 1 min 以内,浸药时间长短对 LC_{50} 值的影响较大;浸药时间超过 1 min 后,可能药剂在桑叶上的吸附与吸收已趋于平衡,浸药时间对 LC_{50} 值的影响明显减小。因此,在进行农药对家蚕的胃毒试验时,考虑到试验误差与可操作性等方面的因素,建议桑叶在药液中

的浸渍时间以 1 min 为宜。农药对家蚕的毒性还受环境条件的影响,环境温度直接影响家蚕的体温与新陈代谢能力,温度过高会导致家蚕体内蛋白质凝固,酶系被破坏或细胞内线粒体被破坏^[14]。本试验结果表明,在 35℃ 高温条件下,氟虫腈对家蚕的毒性增强,其原因可能是高温胁迫下家蚕的代谢解毒能力减弱。因此在进行农药对家蚕的安全性评价时,应结合生产上使用农药时的气候条件全面评价其风险,尤其是对有熏蒸作用的药剂。

本试验结果表明,氟虫腈对家蚕的触杀毒性较低,前期试验表明该药剂对家蚕的熏蒸毒性也很低,说明胃毒是氟虫腈对家蚕的主要作用方式,对 5 龄家蚕 LD_{50} 值为每头 $1.38 \mu\text{g}$ (48 h)。夏季高温季节,正是氟虫腈防治水稻螟虫等害虫的主要用药时期,氟虫腈在水稻作物上的使用浓度一般超过 $32 \text{mg}/\text{L}$,是其对 2 龄家蚕 LC_{50} 值的 15 倍以上。因此,在稻桑混栽地区的水稻上使用氟虫腈对附近家蚕存在较大的风险。生产上在高温季节尤应注意防止家蚕中毒,一方面使用氟虫腈的稻田与桑园应保持一定间距,另一方面应注意施药技术,选择合适的喷头与施药液量,并注意风向与风力,以避免农药雾滴飘移造成家蚕中毒^[15]。

当然,全面的安全性评价还应考察药剂对家蚕

结茧与缫丝质量以及家蚕繁殖等方面的影响。

参考文献:

- [1] Tingle C C, Rother J A, Dewhurst C F, et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns [J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2003, 176: 1-66.
- [2] USEPA, EPA 737-F-96-005, Fipronil New Pesticide Fact Sheet US EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances [EB/OL]. http://www.fluoridealert.org/pesticides/fipronil/epa_facts_may_1996.htm. 1996.
- [3] XIE Zhi-hua(薛智华), ZHANG Xi-lin(张夕林), ZHANG Gu-feng(张谷丰), et al. 氟虫腈对多种水稻害虫的防治效果初探 [J]. *Jiangsu Agric Sci(江苏农业科学)* 1998, (4): 38-39.
- [4] ZHOU Hai-bing(周海冰), XIA Hong-kuan(夏宏宽), WANG Liang(王良), et al. 稻田应用锐劲特对家蚕的影响和残毒期测定的研究 [J]. *Shanghai Agric Sci(上海农业科技)*, 2003, (5): 50-52.
- [5] CHEN Yue(陈悦), ZHANG Ai-yun(张爱云), CAI Dao-ji(蔡道基), et al. 化学农药对生态环境安全评价研究——农药对家蚕毒性试验方法 [J]. *Rural Eco-environment(农村生态环境)*, 1986, 7(3): 12-15.
- [6] HAN Nong(韩农), CHEN He-xin(陈鹤鑫), HUANG Xin(黄欣), et al. 杀菌剂叶青双对家蚕毒性研究 [J]. *Environmental Pollution and Control(环境污染与控制)*, 1995, 17(2): 14-16.
- [7] 中国国家环保局. 化学农药环境安全评价试验准则 [J]. *Pesticide Science and Management(农药科学与管理)*, 1990, (4): 4-9.
- [8] Sreenivas A G, Ashoka J, Patil B V. Evaluation of the effects of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) commercial products against mulberry silkworm, *Bombyx mori* (L) [J]. *Indian J Sericulture*, 2002, 41(1): 54-56.
- [9] GONG Rui-zhong(龚瑞忠), CHEN Yue(陈悦), CHEN Liang-yan(陈良燕), et al. 溴氰菊酯对环境生物的安全评价研究 [J]. *Chin J Pestic Sci(农药学报)*, 2001, 3(2): 67-72.
- [10] CHEN Liang-yan(陈良燕), GONG Rui-zhong(龚瑞忠), CHEN Yue(陈悦). 三唑磷农药对三种非靶生物的毒性与安全评价研究 [J]. *Pesticide Science and Management(农药科学与管理)*, 1998, (2): 11-14.
- [11] DAI Zhen-ke(戴珍科), CHEN Yue(陈悦). 四种新农药对家蚕的毒性与评价研究 [J]. *Agriculture Environment Protection(农业环境保护)*, 1992, 11(5): 216-219, 233.
- [12] WU Sheng-gan(吴声敢), WANG Qiang(王强), ZHAO Xue-ping(赵学平), et al. 阿维菌素和氟虫腈对家蚕毒性与安全评价研究 [J]. *Acta Agriculture Zhejiangensis(浙江农业学报)*, 2004, 16(5): 309-312.
- [13] LI Bao-tong(李保同). 六种杀虫剂对家蚕的毒性与安全评价研究 [J]. *Chin J Pestic Sci(农药学报)*, 2001, 3(3): 83-85.
- [14] WU Fu-zhen(吴福桢), GUAN Zhi-he(管致和), MA Shi-jun(马世俊), et al. *Chinese Agriculture Encyclopedia · Insect Volume(中国农业百科全书·昆虫卷)* [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1990. 214-215.
- [15] ZHU Jin-wen(朱金文), WU Hui-ming(吴慧明), SUN Li-feng(孙立峰), et al. 叶片倾角、雾滴大小与施药液量对毒死蜱在水稻植株沉积的影响 [J]. *Acta Phytopythologica Sinica(植物保护学报)*, 2004, 31(3): 260-263.

(Ed. TANG J)