

斜生栅藻对农药氯氰菊酯的生物富集研究

熊 丽 吴振斌

中科院水生生物研究所,武汉市

摘 要

本文研究了斜生栅藻对氯氰菊酯农药的生物富集作用。结果表明,斜生栅藻对氯氰菊酯有很强的富集能力,其 10d 的 BCF 值为 1017.67。同时通过测定氯氰菊酯的正辛醇/水分配系数 (K_{ow}) 理论计算其 BCF 值,二者十分接近。可见, K_{ow} 是农药环境安全性评价研究中的一个必备参数。

关键词:斜生栅藻, 氯氰菊酯, 生物富集, 正辛醇/水分配系数

壹、前 言

拟除虫菊酯类杀虫剂是 20 世纪 80 年代崛起的一类高效、安全新型杀虫剂,目前用量仅次于有机磷类,氨基甲酸酯类,为杀虫剂中的第 3 大类,约占世界杀虫剂的 20%^[1]。氯氰菊酯 (Cypermethrin) 又称灭百可、兴棉宝,是拟除虫菊酯类的广谱性杀虫剂,为一种神经轴突毒剂,适用于棉花、水稻、蔬菜、果树和茶叶等多种作物上害虫的防治^[2]。施于环境中的农药,不仅作用于靶生物以防治病害,而且对非靶生物也产生影响,从而导致生态系统结构改变,功能破坏^[3,4]。氯氰菊酯对光、热稳定,在环境中不易自然降解。大量研究表明,藻类对农药等有机污染物有较强的富集和降解能力^[5,6]。本研究选择常见的淡水浮游藻类斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus* Kütz) 为实验生物,研究其在纯培养的条件下对氯氰菊酯的生物富集和降解性,为发展生物降解理论和农药废水生物处理应用等寻求科学依据,同时为国家制定水质标准提供参考。

贰、材料与方 法

一、实验材料和化学药品

斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus* Kütz) 由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供,编号 FACHB39。氯氰菊酯为白色晶体,纯度为 96.4%,由湖北省农业科学研究院国家农药检测中心提供。

二、实验步骤及方法

1、驯化培养

斜生栅藻在无菌条件下转移至水生 4 号(HB - 4)人工培养液中^[7], 培养至对数生长期进一步扩大培养。培养条件为: 温度 25~28℃; pH7~8; 荧光灯, 光暗比 12h:12h, 光强为 3000lux 左右; 静止培养, 每天定时人工摇动 3 次。

2、毒性实验

在进行富集和降解实验前, 先采用有毒化学品对藻类毒性实验的标准方法, 研究确定氯氰菊酯抑制斜生栅藻生长的 96h 半效应浓度(96h - EC_{50})为 112.81mg/L^[8]。这为富集和降解实验中氯氰菊酯初始浓度的确定提供了依据。富集实验所用的斜生栅藻藻种都经过培养基中初始 100mg/L 氯氰菊酯存在下 10d 以上的驯化。

3、氯氰菊酯的高效液相色谱(HPLC)的分析测定

有机污染物在藻类培养中, 最终的归宿有 4 个: (1) 培养基中残留; (2) 藻细胞富集; (3) 器皿壁吸附; (4) 完全降解为 CO_2+H_2O 。为定量测定氯氰菊酯在培养系统中的含量, 在样品处理中, 分别对培养基、细胞体及瓶壁用丙酮进行清洗, 抽提, 具体方法如下:

(1) 培养基处理

取藻液 20mL, 3000rpm 离心 5min, 沉淀部分待用, 取上清液 10mL, 加苯 5mL 在振荡器上充分振荡 1min 萃取, 静止分层, 有机相经 0.1 μ m 滤膜过滤, 再用无水硫酸钠干燥, 于 K - D 浓缩器上浓缩至干, 加 1mL 乙腈, 得待测样品。

(2) 藻细胞样品处理

取上述藻细胞, 在低温冰箱中反复冻融 4~5 次, 并用超声波破碎 30s, 加入苯 5mL 充分抽提, 离心 10min, 上清用无水硫酸钠干燥, 经 0.1 μ m 滤膜过滤并浓缩至干, 加 1mL 乙腈, 得待测样品。

(3) 瓶壁清洗

除去藻及培养基, 双蒸水清洗瓶壁 2~3 次, 加入苯 10mL, 超声波清洗 5min, 经 0.1 μ m 滤膜过滤, 无水硫酸钠干燥并浓缩至干, 加 1mL 乙腈, 得待测样品。

(4) HPLC 检测条件

Waters 600 - MS 型高效液相色谱仪, Waters 490 - MS 多波长检测器, Waters 745 数据处理工作站。YWG - C18 柱, 70%乙腈 - 水流动相, 流速 0.8mL/min, 紫外检测波长 254nm, 进样量 5 μ L。用外标法定量测定氯氰菊酯的含量。

4、氯氰菊酯的正辛醇/水分配系数的测定

准确称取一定量的农药于 250mL 具塞三角烧瓶中, 加入 50mL 被水饱和的正辛醇, 盖紧, 在(20±1)℃下恒温震荡至完全溶解。再加入 50mL 被正辛醇饱和的二次蒸馏水, 盖紧, 继续恒温震荡 1h, 使农药在正辛醇与水相中的分配达到平衡, 然后将平衡液转移到 150mL 分液漏斗中, 恒温静置, 使两相初步分离, 再将各相离心 6000~10000r/min, 20min, 使两相完全分离。正辛醇相用乙腈稀释, 水相用二次蒸馏水稀释, 进行 HPLC 测定^[9], 条件同前。

农药在正辛醇/水相中的分配系数计算公式:

$$K_{ow} = C_o/C_w \quad (1)$$

式中 K_{ow} ——农药在两相中的分配系数;

C_o, C_w ——分别为农药在正辛醇和水相中的浓度。

5、对照实验

为增加实验数据的可信性, 对照实验采用 HB-4 号培养基在无菌条件下配制成 100mg/L 的氯氰菊酯, 置于培养箱中保持与藻类降解实验完全相同的条件, 10d 后取样测定氯氰菊酯的浓度, 看是否会因非藻类降解而导致氯氰菊酯浓度有较大的变化。结果表明在 10d 时间内, 氯氰菊酯仅减少了不足 5%。因此可以认为在降解实验中, 氯氰菊酯浓度的减少主要是藻类富集的结果。

叁、结果与讨论

一、计算氯氰菊酯浓度的标准方程

通过 HPLC 测定 (表 1), 峰面积 (Y) 与氯氰菊酯的含量 (X) 的标准方程如下:

$$Y = 1.7209 + 1.6893X \quad r = 0.993 \quad (2)$$

在降解实验中, 通过上述方程, 利用实测的峰面积计算氯氰菊酯的含量。

表 1 氯氰菊酯含量与峰面积之间的关系

氯氰菊酯含量 (ng)	0	50	70	90	110	130
峰面积($\times 10^5$)	0	91.16	125.74	148.01	172.99	232.59

二、富集与降解实验结果

表 2 显示, 经过 10d 的实验, 发现斜生栅藻对氯氰菊酯有较强的富集能力。三组实验所得到的生物富集系数 (BCF) 分别为 1417.65, 607.66, 和 1027.70, 三次平均值为 1017.67。由于在藻细胞样品中除了停留时间为 13.50 的氯氰菊酯特征峰外, 未能检出其他物质峰, 故推测斜生栅藻对氯氰菊酯农药可能主要为富集作用。由表 2 还可看出, 藻细胞将所加入氯氰菊酯的 75% 以上都转移到细胞体中。培养基中仅检出 7% 左右, 瓶壁的吸附也占有相当一部分, 约为 17% 左右。说明在定量研究中, 培养容器的清洁程度, 材料质地等都是不容忽视的干扰因素。

当藻类开始接触有机污染物时, 首先表现为富集, 富集量的大小由有机污染物的疏水性、正辛醇/水分配系数等化学性质以及藻细胞内疏水性脂类的含量决定^[10]。氯氰菊酯在藻细胞内生物富集是它在环境中迁移转化的主要途径。氯氰菊酯在藻细胞中富集, 一方面与其分子结构有关, 分子结构的疏水性越强, 溶解度就越低, 其 BCF 值就相对越大; 另一方面与藻细胞中疏水性脂类含量有直接关系。许多资料表明^[11, 12], 生物富集的基本机制是有机化合物在脂类-水体系中的分配过程, 也就是说生物对有机化合物的富集程度与脂类的含量成正比。藻类对有机污染物的高富集能力与其含有高比例的脂类化合物, 以及脂类化合物在细胞中的分布状况有关。脂类是藻类细胞膜的主

要组成部分,而且藻细胞中脂类含量大大高于细菌。藻类高倍的生物富集量,在食物链中将会对下一个营养级产生极大的影响,并通过生物放大涉及到食物链的所有生物,所以藻类在水环境中对氯氰菊酯的迁移转化及其环境行为的重要作用不容忽视。

表 2 HPLC 分析结果

样品	停留时间 (min)	峰面积	绝对含量(ng)	残留量比 (%)	富集系数 BCF
藻细胞	13.51	84905049	501.59	79.82	1417.65
培养基	13.56	6149075	35.38	5.63	
瓶壁	13.61	12646653	73.84	11.75	
藻细胞	13.00	56169278	331.48	61.15	607.66
培养基	12.93	4779700	54.55	10.06	
瓶壁	13.33	26534001	156.05	28.79	
藻细胞	13.48	83854538	495.37	75.92	1027.70
培养基	12.95	4243447	48.20	7.39	
瓶壁	13.07	18577962	108.96	16.70	

三、农药氯氰菊酯的正辛醇/水分配系数的测定

参考经济合作与发展组织(OECD)制定的化学品试验指南及其他资料^[9]的标准方法,经测定氯氰菊酯农药的正辛醇/水分配系数(K_{ow})为13852。近年来,对农药在环境中的行为和归宿研究时,发现 K_{ow} 与农药的其他理化性质或环境行为参数,如水溶性(S_w)、土壤沉积物物吸附系数(K_{oc})、生物富集系数(BCF)、毒性(如半致死浓度 LC_{50} 、半效应浓度 EC_{50} 、无影响浓度NOEC等)以及生物降解等之间有很好的相关性^[13], K_{ow} 业已成为农药对环境影响研究的一个关键参数。Veith^[14]研究了84种化合物在四种不同生物内的BCF与 K_{ow} 的关系,发现有如下的线性关系:

$$\text{LogBCF} = 0.76 \log K_{ow} - 0.23 \quad (n = 84, r = 0.9072) \quad (3)$$

利用该关系预测的农药BCF值试验结果符合较好。根据本实验的 K_{ow} 值,用此公式推算出氯氰菊酯的BCF为1180。与实测值十分相近,由此可见,对于已知 K_{ow} 的,可用该公式或其他类似的相关方程,估测其在生物体内的BCF。

肆、结 论

一、斜生栅藻对氯氰菊酯有较强的生物富集能力,在氯氰菊酯浓度100mg/L的条

件下, 10d 后藻体中富集量为加入总量的 75% 以上。其 BCF 为 1017.67。而斜生栅藻对氯氰菊酯的降解作用不十分明显, 在 HPLC 图谱中未能检出降解产物峰。而在其它研究中发现, 斜生栅藻对苯酚有较强的降解能力, 小球藻能降解 LAS。这可能与有机污染物的种类有关, 苯酚和 LAS 均可溶于水, 易于藻细胞吸收和代谢, 而氯氰菊酯则难溶于水, 难于作为营养物进入藻细胞内, 只能被藻体中的脂类物质所富集。

二、农药在正辛醇与水相体系中的分配系数与农药进入环境后, 在空气、土壤、水和环境生物体等各种环境介质中的迁移、转化、分布和归宿有密切的关系, 利用分配系数, 可很好地预测农药在环境中的归宿。本实验中, 根据 K_{ow} 理论计算的 BCF 值与实验所测的 BCF 值十分接近。可见, K_{ow} 是农药对环境影响研究的一个关键参数, 同时又是农药评审登记与环境安全性评价研究中的一个必备参数。研究农药在正辛醇与水中的 K_{ow} , 对于农药环境安全评价具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 农药新品种及使用.北京: 化学工业出版社, 1985.106~159
- [2] 郑永权,等.拟除虫菊酯类农药的开发, 世界农业,1989,230:35~37
- [3] 龚瑞忠,等.拟除虫菊酯对水生生物的毒性评价研究.环境科学研究, 1988,1(4):39~44
- [4] 严国安, 沈国兴, 严雪,等.农药对藻类的生态毒理学研究 I: 毒性效应.环境科学进展,1999,7(5)
- [5] Mayer P, Bent HS, Dick THM, et al. Toxic cell concentrations of three polychlorinated biphenyl congeners in the green algae *Selenastrum capricornutum*. Environ Toxicol Chem,1998,17(9):1848~1851
- [6] Yan GA, Jiang JW, Wu G, et al. Disappearance of linear alkybenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp.HB1017. Bull Environ Contam Toxicol,1998, 60:329~334
- [7] 黎尚豪、朱蕙、夏宜琤,等.水生生物学集刊,1959,4:463~472
- [8] 熊丽, 吴振斌,等.氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究.水生生物学报 (出版中),2001
- [9] 刘建波, 钱传范.高效液相色谱法预测有机化合物在正辛醇/水的分配系数.环境化学, 1988,7(1):23~27
- [10] 孙红文, 黄国兰, 丛丽莉,等.藻类对偶氮染料的降解及定量结构-生物降解性研究.中国环境科学, 1999,19(4):289~292
- [11] 闫海, 弓爱君, 雷志芳.斜生栅藻降解苯酚的动力学研究.环境科学进展,1998,6(6):36~41
- [12] Tan Y Y, Thumm W, Jobelius-Korte M, et al. Fate of two phenylbenzoylurea insecticides in an algae culture system (*Scenedsmus subspicatus*). Chemosphere, 1993,26(5):955~962
- [13] Chiou C T, et al. Partition coefficient and bioconcentration of selected organic

chemicals. Environ Sci and Technol, 1977,11(5):475~478

[14] Vieth G D, DeFoe D L, Bergstedt B J. Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. J fish Res Board Can, 1979, 36: 1040~1048