

## 清塘净对鱼类等生物的毒性研究

倪朝辉 翟良安 叶雄平

李 谷 赵小春 李 蕾 刘志刚

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州市 434000)

**摘 要** 清塘净对鱼类等水生生物具有较强的毒性,对鲤鱼、草鱼、鳊鱼、泥鳅、大型蚤、田螺和钉螺的96hLC<sub>50</sub>分别为0.38、0.41、3.39、3.04、0.52、2.33和1.27ppm;浓度4ppm具有明显的消毒灭菌作用;应用Ames试验、黄鳝微核试验和白鲢染色体畸变试验结果表明,清塘净浓度1.5ppm对鱼类不产生诱变效应。

**关键词** 清塘净,淡水鱼类,水生生物,毒性,细菌,致突变

我国传统养鱼清塘剂有茶粕、生石灰、氨水等,近来有人使用五氯酚钠和农药清塘,其用量大,成本高,作用单一,甚至造成对渔业生态环境的污染,有的能在水生生物体内富集,或引起鱼类遗传变异。随着水产养殖发展和保护渔业生态环境,需研制安全、多功能、高效率的新型清塘剂。清塘净为新型清塘剂,它高效、低毒、触杀性能强,具有除野、灭菌等多种功能。为了进一步探讨其对渔业环境的风险性,应用系统的现代生态毒理学理论和方法,对该药的水生态安全性进行了研究,并探讨了该药在血防灭螺及鱼病防治方面的综合利用性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 试验药物** 清塘净由抚顺市农药化工厂生产提供,主要成份是次氯酸钙(50%),苯酚(1%)以及生石灰等填充剂。

**1.1.2 试验生物** 试验鱼类、螺类均采自本所试验场,栅藻和大型蚤为本所实验室培育纯化品系,微生物菌种由同济医科大学提供。规格见表1。

#### 1.2 方法

**1.2.1 急性毒性试验** 试验用稀释水为经曝气3天以上自来水,pH6.5~7.5,总硬度6.3~7.0德国度,碱度2.3~2.5mN/L,电导率200s/cm,实验水温25±1℃。

被试水生生物经实验室驯养三天,选择健康正常个体,随机分组染毒,每24小时更换一次新配试液,急性毒性结果用概率单位法计算LC<sub>50</sub>值及95%置信区间<sup>[1]</sup>。

收稿日期:1996-12-31.

表 1 试验用生物

Table 1 The aquatic organisms in the experiment

试验内容 Item	种 类 Species	规 格 Size
急性毒性 Acute toxicity	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	1.72 ± 0.5cm
	草鱼 <i>Ctenopharygodon idella</i>	1.71 ± 0.5cm
	鳊鱼 <i>Monopterus albus</i>	23.6 ± 2.5cm
	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	11.52 ± 2.0cm
	田螺 <i>Viviparus guadratus</i>	成体螺 Adult
	钉螺 <i>Oncomelania</i>	成体螺 Adult
	大型溞 <i>Daphnia magna</i>	3-4 日龄 Three - four days old
	栅藻 <i>Scenedesmus</i>	指数生长期 Stage of exponential growth
残留分析 Remnant analysis	鳊鱼 <i>Monopterus albus</i>	20 ± 25cm
灭菌抑菌试验 Sterilization and inhibition tests	金黄色葡萄球菌 ATCC6538 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	
	大肠杆菌 8099 <i>E. coli</i> 8099	
遗传毒理 Test of Genetic toxicolog	鳊鱼 <i>Monopterus albus</i>	23.6 ± 2.5cm
	白鲢 <i>H. molitrix</i>	22~25g
	鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型 TA98 <i>S. typhimurium</i> TA98(his <sup>-</sup> )	
	鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型 TA100 <i>S. typhimurium</i> TA100(his <sup>-</sup> )	

胚胎毒性试验选择发育到原肠中期的正常胚胎,染毒后统计其出膜率,畸形率和死亡率<sup>[2]</sup>。

栅藻在实验前培养3~4天,以获得指数生长期的藻种,荧光灯为光源,光照强度2500~3100Lux,12小时光周期,镜检统计的栅藻细胞数作为检测指标。

大型溞试验前,溞种经重铬酸钾法判明其敏感性符合ISO标准,用ISO标准稀释水,在恒温培养箱中进行试验<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 环境残留与生物富集试验** 试验用水为经曝气20天的自来水,实验容器为1.8×1.2×1.0米的塑料水族箱,箱底铺垫塘泥,盛液2000升,设置1.5ppm实验浓度组和空白对照。富集实验生物为鳊鱼<sup>[3]</sup>。

**1.2.3 灭菌抑菌试验** 取6~14代的金黄色葡萄球菌ATCC6538与大肠杆菌8099菌种接种于营养琼脂表面,置37℃培养24小时,用磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗下菌苔,将菌种转接于营养肉汤培养基,37℃培养24小时,获得实验菌种。实验中设培养基和缓冲液盐水空白对照组,残留药物用0.28%硫代硫酸钠中和去除<sup>[4]</sup>。

灭菌结果判断方法为:菌种与不同稀释度试验药物接触不同的时间后,各取0.5ml染毒菌液,加入到含足够量中和剂的营养肉汤中,置30℃培养24~28小时,发生混浊示有菌生长,澄清透明示灭菌效果。

抑菌结果判断方法为:接种培养皿中,于蘸样滤纸片周围,出现环状抑菌斑即为抑菌现象,试验中设置石碳酸阳性对照。

**1.2.4 Ames 试验** 利用 TA98 检出移码型致变效应;利用 TA100 检出碱基置换型致变效应。两菌株分别经过自发回复突变( $his^+$ )、组氨酸营养缺陷( $his^-$ )、R 因子、 $rfa$ 、 $\Delta uvrB$  突变五项性状鉴定合格后进入试验。

试验中不加 S9 活化系统。每档浓度组设置三个平行试验组,设阴性及阳性对照,结果以 MR 值表示,凡  $MR \geq 2$ ,并获得剂量效应关系者为致突变阳性结果<sup>[5]</sup>。

**1.2.5 鳊鱼微核出现率试验** 设置 1.5ppm 和 0.5ppm 两试验组和空白对照,染毒后的第 1、3、5、9、15 天分别采血涂片吉姆沙染色,统计红细胞微核出现率。

**1.2.6 白鲢染色体畸变试验** 腹腔注射染毒,清塘净注射液浓度 0.4ppm,注射剂量分别为:试验组 I 0.4ml/尾,试验组 II 0.2ml/尾,以注射生理盐水 0.5ml/尾作为空白对照,以注射 1000ppm 浓度环磷酰胺 0.4ml/尾作为阳性对照,整体培养 48 小时,取肾组织进行染色体制片,统计染色体畸变率。

## 2 结果与分析

### 2.1 清塘净对鲤鱼等急性毒性

染毒后,高浓度试验组的泥鳅游动不安,逐渐出现浮头,体表粘液分泌增多,体表充血,抽搐,死亡;中毒死亡鳊鱼肛门红肿外翻,口腔、鳃部、鼻孔出血;鲤、草鱼苗染毒初期兴奋乱窜,继而浮头,离群独游,行动迟缓,体色发黑,最后死亡。

表 2 清塘净对部分鱼类急性毒性作用结果

Table 2 The acute toxicity of QTJ on fishes

种类 Species	LC <sub>50</sub> 及 95% 置信区间(ppm) LC <sub>50</sub> and 95% Confidence limit				安全浓度(ppm) S. con.
	24h	48h	72h	96h	
鲤鱼 <i>C. carpio</i>	0.86 0.81~0.91	0.53 0.61~0.65	0.55 0.52~0.58	0.38 0.37~0.39	0.038
草鱼 <i>C. idella</i>	0.71 0.62~0.82	0.71 0.62~0.82	0.44 0.38~0.51	0.41 0.35~0.47	0.041
泥鳅 <i>M. anguilliacudatas</i>	3.77 3.53~4.02	3.08 2.75~3.46	3.08 2.75~3.46	3.04 2.09~3.67	0.30
鳊鱼 <i>M. albus</i>	6.61 5.68~7.59	4.33 3.81~4.93	3.82 3.34~4.36	3.39 2.97~3.87	0.34

由表 2 可知,清塘净对鲤鱼和草鱼苗种的 96hLC<sub>50</sub>分别为 0.38 和 0.41ppm,对成体鳊鱼和泥鳅的 96hLC<sub>50</sub>分别为 3.04 和 3.39ppm。据此清塘净应划分为对鱼类强毒,其浓度 0.038ppm 对所试鱼类均是安全的。

### 2.2 清塘净对田螺、钉螺的急性毒性

染毒后,低浓度染毒组的田螺紧附试验容器壁,被拿离水面时,腹足收缩迅速,而高浓度组的螺腹足收缩缓慢。田螺在染毒 72h 后才出现死亡,这可能是田螺受到药物刺激后,其厣紧闭,能部分时间内回避毒物的作用。

表 3 清塘净对田螺、钉螺的急性毒性作用结果

Table 3 The acute toxicity of QTJ on *V. guadratus* and *Oncomelania*

种 类 Species	LC <sub>50</sub> 及 95% 置信区间(ppm) LC <sub>50</sub> and 95% Confidence limit				安全浓度(ppm) S. con.
	24h	48h	72h	96h	
田 螺 <i>V. guadratus</i>	—	—	—	2.33 2.07~2.62	0.23
钉 螺 <i>Oncomelania</i>	2.54 2.47~2.61	1.60 1.52~1.68	—	1.27 1.19~1.35	

从表 3 知,清塘净对田螺的 96h LC<sub>50</sub>值分别为 2.33 和 1.27ppm,在保护淡水螺的水域,清塘净的 MATC 不得高于 0.23ppm。清塘净对钉螺的 NOEC 为 0.1ppm, LOEC 为 0.32ppm, 96h LC<sub>50</sub>为 1.27ppm,说明清塘净对钉螺有一定的杀灭作用,在血吸虫流行的渔区,使用该药清塘具有水产生产和血防的双重效果。

### 2.3 清塘净对大型溞的急性毒性

清塘净对大型溞的急性毒性结果见表 4。

表 4 清塘净对大型溞的急性毒性作用结果

Table 4 The acute toxicity of QTJ on *Daphnia magna*

种 类 Species	LC <sub>50</sub> 及 95% 置信区间(ppm) LC <sub>50</sub> and 95% Confidence limit				安全浓度(ppm) S. con.
	24h	48h	72h	96h	
大型溞 <i>D. magna</i>	1.67 1.58~1.91	1.35 0.97~1.91	0.94 0.73~1.20	0.52 2.07~2.62	0.052

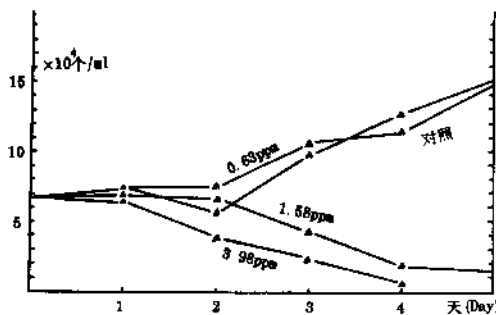


图 1 清塘净对栅藻的急性毒性

Fig. 1 The acute toxicity of QTJ to *scenedesmus*

浮游动物是水生态系统中的重要组成部分,是鱼类等水生生物的饵料基础,在具渔业功能的水域中,清塘净的 MATC 不得超过 0.052ppm,才能有效保护淡水类。

### 2.4 清塘净对栅藻的急性毒性

实验表明,高于 1.58ppm 浓度的清塘净造成栅藻细胞萎缩,色素颜色变淡;低浓度组如 0.63ppm 和对照组栅藻细胞饱满,色素很深。对栅藻细胞计数统计分析表明(见图 1),1.58 和 3.98ppm 试验组,分别在染毒的第 3 和第 2 天,便与空白对照组有明显差异,而 0.63ppm 试验组和空白对照组无显著

性差异。说明高于 0.63ppm 时,清塘净会对栅藻造成生长不利影响。

### 2.5 清塘净对草鱼胚胎发育的影响

由表 5 可知,在染毒 17h 内,各试验组的胚胎死亡率为零,染毒 24h,高于 0.66ppm 浓度的染毒胚胎出现死亡,尤以 4.0ppm 浓度染毒组死亡严重。至染毒 41h 后,各染毒组胚胎死亡率相继增高,并与浓度的高低呈正相关。此期为胚胎破膜期,说明出膜期胚胎对清塘净的敏感性增强,这与胚胎失去膜的保护相关。从 0.06ppm 已造成胚胎 50% 以上死亡率来看,清塘净对草鱼胚胎具有很强的毒性。

表 5 清塘净对草鱼存活数的影响结果

Table 5 The acute toxicity of QTJ on embryonic development of *C. idella*

浓度 (ppm)	孵化结果(存活数 单位:个)									
	Hatched individuals									
Con	5h	17h	24h	41h	66h	100h	134h	158h	168h	212h
0.018	20	20	20	19	19	19	18	18	16	16
0.060	20	20	20	19	18	13	11	9	9	9
0.110	20	20	20	17	16	14	6	5	5	5
0.20	20	20	20	17	15	5	2	1	0	—
0.36	20	20	20	17	5	3	0	—	—	—
0.66	20	20	18	14	0	—	—	—	—	—
1.20	20	20	19	0	—	—	—	—	—	—
2.19	20	20	19	—	—	—	—	—	—	—
4.00	20	20	7	—	—	—	—	—	—	—
对照	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19
Contra										

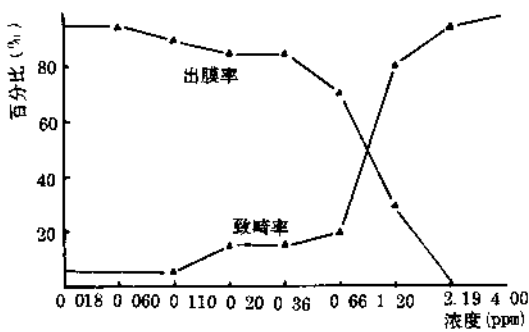


图 2 清塘净对草鱼胚胎出膜率、致畸率的影响  
Fig. 2 The effect of QTJ on rate of hatch and deformity for embryo of *ctenophary* - *godon idella*

### 2.6 清塘净中酚在环境及鱼体内的残留分析

由表 6 可知,试验鱼体内富集的酚在染毒后短时间内有较快的增加,其酚含量高于染毒水体,随后便向水环境释放及体内降解,使富集酚迅速降低,在染毒后第 3 天降至 0.002ppm,比染毒 24h 时的酚含量降低了 2.5 倍,到染毒后第 5 天时,鳙鱼体内检不出酚。水环境酚在染毒后的 5 天内,有逐步升高的趋势,浓度从 0.018 升至 0.046ppm,这与清塘净的溶解过程相

表 6 清塘净中所含酚在水体、底泥及鱼体中的残留分析

Table 6 The remnant of phenol contained in QTJ in the water, soil and fish body

浓度 Con.	样品 Sample	酚残留分析结果(ppm) The result of phenol remnant				
		24h 24h	3 天 3(days)	5 天 5(days)	9 天 9(days)	15 天 15(days)
1.5ppm	水样 Water	0.018	0.030	0.046	—	—
	鳙鱼 <i>M. albus</i>	0.053	0.002	—	—	—
	底泥 Soil	0.038	0.038	—	—	—
对 照 Contral	水样 Water	0.001	—	—	—	—

“—”为未检出 “—” undetected

表 7 清塘净对大肠杆菌灭菌试验结果

Table 7 The sterilization effect of QTJ on E.coll.

药 物 浓 度 Con.	暴 露 时 间 Oxposure	30'	1h	3h
		40ppm	-	-
20ppm	+	-	-	
10ppm	+	+	-	
5ppm	+	+	+	
2.5ppm	+	+	+	
缓冲液 Buffer	+	+	+	
对 照 Contral		-	-	

注：“+”代表有菌生长，“-”代表无菌生长 “+” represents bacterial growth, “-” represents non bacterial grwoth

表 8 清塘净对金黄色葡萄球菌的灭菌试验结果

Table 8 The inhibition effect of QTJ on *S. aureus* ATCC6538

药 物 浓 度 Con.	暴 露 时 间 Oxposure	30'	1h	3h
		40ppm	-	-
20ppm	+	-	-	
10ppm	+	+	-	
5ppm	+	+	-	
2.5ppm	+	+	-	
缓冲液 Buffer	+	+	+	
对 照 Contral		-	-	

注：“+”代表有菌生长，“-”代表无菌生长 “+” represents bacterial growth, “-” represents non bacterial grwoth

关。9 天后, 水体酚全部降解。底泥也吸富一定量的酚, 5 天后全部被降解。以上说明清塘净中酚在水体、底泥及鱼体内均有短时期残留, 但不会对渔业环境和渔业生产造成长远的危害。

表 9 清塘净对大肠杆菌抑菌效果

Table 9 The sterilization effect of QTJ on *E. coli*. 8099

药物浓度 (ppm) Con.	抑菌圈直径(cm) Diameter
0.4	0
4	1.3
40	1.8
400	2.9
5% 石碳酸 5% Carbonic acid	2.8

表 10 清塘净对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Table 10 The sterilization effect of QTJ on *S. aureus* ATCC6538

药物浓度 Con.	抑菌圈直径(cm) Diameter
0.4	0
4	1.1
40	1.3
400	1.6
5% 石碳酸 5% Carbonic acid	1.5

表 11 清塘净的 Ames 试验结果

Table 11 Ames test of QTJ

样品 Sample	浓度(ppm/皿) Con. (ppm/plate)	MR		致变性 Mutagenicity
		TA98	TA100	
清塘净 QTJ	0.01	1.0	1.1	阴性 Negative
	0.05	1.1	0.9	阴性 Negative
	0.1	0.8	1.1	阴性 Negative
	1	抑菌 Sterilization	抑菌 Sterilization	—
	2	抑菌 Sterilization	抑菌 Sterilization	—
敌克松 DKS	100ug/皿	++++	++++	阳性 Positive
DMSD	100ug/plate	1.0	0.9	阴性 Negative

### 2.7 清塘净的抑菌、灭菌试验

由表 7、表 8 可知, 清塘净具有杀灭细菌效果, 40、20 和 10ppm 浓度水平将大肠杆菌全

部杀死的暴露时间分别为 30min、1h 和 3h;40、20 和 2.5ppm 浓度水平将金黄色葡萄球菌全部杀死的暴露时间分别为 30min、1h 和 3h。清塘净对金黄色葡萄球菌的毒性强于大肠杆菌。由表 9,表 10 可知,清塘净浓度在 4ppm 时,已对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌产生明显的生长抑制效果。以上试验结果表明清塘净具有较好水体消毒功能,这在防治鱼病方面有积极意义。

### 2.8 清塘净的 Ames 试验

从表 11 可知,清塘净浓度在 0.1ppm 以下时对 TA98 和 TA100 两种菌株均无明显致突变性,当浓度大于 1.0ppm 时,产生抑菌作用,不再适应用 Ames 试验来检测其致变性。

### 2.9 清塘净诱发黄鳍红细胞微核试验

由表 12 可知,染毒组鳊鱼与空白对照组鳊鱼相比较,其红细胞微核出现率无显著性差别。随染毒时间的延长,鳊鱼红细胞微核出现率也无明显变化。由此表明清塘净诱发鳊鱼红细胞产生不明显。

表 12 清塘净诱发黄鳍红细胞微核率结果

Table 12 The erythrocyte micronucleus rate of *M. albus* induced by QTJ

暴露天数 Exposure days	红细胞微核率(‰) Erythrocyte micronucleus rate		
	对照组 Control	1.5ppm	0.5ppm
1	0.84	1.04	1.24
3	0.64	1.08	0.96
5	0.68	0.68	0.92
9	0.68	0.76	0.60
15	0.92	0.88	1.20

### 2.10 白鲢染色体畸变试验

从表 13 可知,染毒组白鲢与空白对照组白鲢相比较,其肾细胞的染色体畸变细胞率无显著差异,表明清塘净对白鲢肾细胞染色体无明显诱变效应。

表 13 清塘净诱发白鲢肾细胞染色体畸变试验结果

Table 13 The chromosome mutagenesis of *H. molitrix* kidney cell induced by QUT

分组 Groups	观察细胞(个) Observed cells	畸变细胞数(个) N. of aberrated cells	畸变细胞率(‰) Rate of aberrated cells	P 值
试验 I Group one	248	6	2.4	<0.05
试验 II Group two	230	5	2.2	
空白对照 Control	200	4	2.0	
阳性对照 Positive control	200	19	9.5	>0.05

## 3 小结

1. 清塘净对鱼类等水生生物具有较强毒性,对鲤、草鱼苗、成体鳊鱼、成体泥鳅、大型蚤、田



螺和钉螺的 96h  $LC_{50}$  分别为 0.38、0.41、3.39、3.04、0.52、2.33 和 1.27ppm。

2. 清塘净对草鱼胚胎有较强的毒性, 0.06ppm 的浓度, 便造成胚胎死亡率高达 50% 以上; 浓度 0.66ppm 时, 明显对胚胎产生致畸效应, 并造成高比例的膜内死亡。

3. 清塘净明显抑制栅藻生长的浓度在 1.58ppm 以上。

4. 施药浓度为 1.5ppm 时, 清塘净中酚在水体残留期不超过 5 天, 在底泥及鱼体残留期不超过 3 天。

5. 清塘净具有一定的灭菌和抑菌效果。

6. 清塘净的实际使用浓度不超过 1.5ppm 时, 对鱼类不会产生明显的诱变效应。

### 参 考 文 献

- [1] 翟良安等, 1990. 溴氰菊酯对鱼类毒性的研究. 淡水渔业, (4): 10-13.
- [2] 倪朝辉等, 1992. 浸螺杀对鱼类等水生生物急性毒性作用. 淡水渔业, (3): 24-26.
- [3] 国家环保局等, 1989. 水和废水监测分析方法, 78-83. 中国环境科学出版社.
- [4] 北京微生物研究所细菌分类组, 1978. 一般常用细菌鉴定方法. 科学出版社.
- [5] 黄幸纾等, 1985. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法, 13-52. 浙江科学技术出版社.
- [6] Zhai Langan et., 1990. Toxicity of Iprothiolane to Fishes 321-326 Fish Physiology, Fish Toxicology and Fisheries Management. Proceedings of an International Symposium, Guangzhou, PCR, September 14-16, 1988 U.S. EPA

## APPRAISE ON THE TOXICITY OF QTJ TO FISHES

Ni Zhaohui Zhai Liangan Yie Xiongping Li Gu Zhao Xiaochun Li Lei Liu Zhigang  
(Yangtze River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery sciences, Jingzhou 434000)

**ABSTRACT** QTJ is very toxicity to aquatic organisms including fishes. The 96h  $LC_{50}$  to *Cyprinus carpio*, *Ctenopharygodon idella*, *Monopterus albus*, *Misgurnus anguillicaudatas*, *Daphnia magna*, *Viviparus quadratus* and *Oncomelania* spp. are 0.38, 0.41, 3.39, 3.04, 0.52, 2.33 and 1.27ppm. It has sterile effect at the concentration of 4ppm, The studies using Ames test, micronucleus test of *Monopterus albus* and chromosome mutagenic test of *Hypophthalmichthys molitrix* showed that 1.5ppm concentration of QTJ has no mutagenic effect to fishes.

**KEYWORDS** QTJ, Freshwater fishes, Aquatic organism, Toxicity, Bacteria, Mutagens