

抑食肼对大型溞的急慢性毒性效应研究

朱昱璇^{1,2}, 姜锦林^{1*}, 单正军¹, 卜元卿¹, 续卫利¹, 程燕¹

(1.环境保护部南京环境科学研究所, 国家环境保护农药环境评价与污染控制重点实验室, 南京 210042; 2.南京农业大学植物保护学院, 南京农业大学农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:选择 21%抑食肼可湿性粉剂为受试农药,研究其对大型溞(*Daphnia magna*)的急性毒性和 21 d 慢性毒性效应,观察大型溞各个繁殖和生长指标变化,建立毒物剂量-反应关系,并寻找其中的敏感生物学指标。急性毒性试验结果表明,21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞的 48 h-EC₅₀ 为 0.94 mg·L⁻¹;慢性毒性试验结果表明,抑食肼对大型溞的初次蜕壳时间、蜕壳次数、产卵时间、产幼溞数和产幼溞胎数等都有显著的影响,其中,0.135 mg·L⁻¹ 的暴露浓度可以显著减少大型溞蜕壳次数、产幼溞总数量和产幼溞胎数,综合各个繁殖毒性终点指标,21 d 无可见效应浓度(NOEC)为 0.045 mg·L⁻¹。此外,研究还发现低至 0.015 mg·L⁻¹ 的抑食肼暴露 21 d 可以使母溞体长显著性下降。研究结果表明,抑食肼胁迫在一定程度上对大型溞的生长和繁殖具有抑制效应。

关键词:抑食肼;大型溞;急性毒性;慢性毒性;繁殖

中图分类号:X503.23 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)12-2309-06 doi:10.11654/jaes.2014.12.005

Acute and Chronic Toxicity of RH-5849 to *Daphnia magna*

ZHU Yu-xuan^{1,2}, JIANG Jin-lin^{1*}, SHAN Zheng-jun¹, BU Yuan-qing¹, XU Wei-li¹, CHENG Yan¹

(1.Key Laboratory of Pesticide Environmental Assessment and Pollution Control, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China; 2.Key laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In the present study, 21% RH-5849 wettable powder was selected to assess the acute toxicity to *Daphnia magna* and the chronic effects on the growth and reproduction of *Daphnia magna* after 21 d exposure. The acute toxicity test showed that 21% RH-5849 wettable powder had high acute toxicity against *Daphnia magna* and 48 h-EC₅₀ was 0.94 mg·L⁻¹. The 21% RH-5849 wettable powder also had significant chronic impacts on the first molting time, the number of molting, offspring number and brood number of *Daphnia magna*. Exposure to RH-5849 at the concentration of 0.135 mg·L⁻¹ significantly lowered the number of molting, the number of total offsprings and broods per female of *Daphnia magna*. The 21 d non-observed effect concentration (NOEC) of the 21% RH-5849 wettable powder against the reproduction of *Daphnia magna* was 0.045 mg·L⁻¹. In addition, exposure to RH-5849 at the concentration of 0.015 mg·L⁻¹ significantly reduced the body length of the female. This study demonstrates that RH-5849 has inhibiting effects on the growth and reproduction of *Daphnia magna*.

Keywords: RH5849; *Daphnia magna*; acute toxicity; chronic toxicity; breeding

抑食肼,又名虫死净,化学名称:N-苯甲酰基-N'-特丁基苯甲酰肼,代号 RH-5849,1987 年由美国罗门哈斯公司首次合成^[1]。该药是一种新型的昆虫生长调节剂,其作用机制主要是通过降低或抑制幼虫和成虫取

食能力,加速昆虫蜕皮,减少产卵阻碍繁殖达到杀虫目的,对鳞翅目、鞘翅目、双翅目等害虫具良好的防治效果^[2],目前主要在水稻和叶菜上使用。另外,抑食肼对害虫有胃毒作用,并且具有内吸收性强、持效期长的特点,施药后 2~3 d 就能见效,对人、禽、畜、鱼毒性低,而且与其他农药无交互抗性,是一种可以取代高毒有机磷农药的低毒、无公害、无残留的优良杀虫剂,因而具有广阔的开发应用前景^[3]。然而,由于该药是一种具有蜕皮激素性能的昆虫生长调节剂,而且广泛在水稻田中喷雾使用,所以在达到杀虫目的的同时还可能对水

收稿日期:2014-06-26

基金项目:“十二五”科技支撑项目(2011BAE06B09-5);国家自然科学基金项目专项基金(31340017)

作者简介:朱昱璇(1991—),女,硕士研究生,研究方向为昆虫分子生物学及生理毒理学。E-mail:2013102112@njau.edu.cn

* 通信作者:姜锦林 E-mail:jjl@nies.org

体中的甲壳类生物带来一定的不利影响。

大型蚤(*Daphnia magna*)是世界范围内广泛分布的甲壳纲枝角类无脊椎动物^[4],它以浮游植物为食,同时又是鱼类和大型无脊椎动物的饵料,是水生态系统中物质循环和能量流动的重要环节^[5-6]。由于其分布广、繁殖快、生活周期短、易于培养和驯化,对环境中的毒物敏感且实验方法简便,在国内外被广泛用作试验生物进行有毒污染物的水质基准研究,也是制定排放标准和监督废水/污水排放的最常用试验生物。药剂对大型蚤急性毒性试验主要考察毒物的致死效应,慢性毒性试验则可以深入评价毒物的毒性强度^[4]。因此,通过研究抑食肼对大型蚤的毒性效应,可以预测该药剂对水生生物的毒性。

目前,国内关于以抑食肼为代表的苯甲酰肼类的毒性研究多局限于对靶标昆虫的毒理机制与抗药性研究,对小鼠的致突变性、急性和亚慢性毒性研究,以及对蚯蚓的急性毒性和生理生化效应研究^[7-8],而国外的相关研究主要集中在该类农药对甲壳纲生物蜕皮行为的影响,这些研究都较少涉及到受试生物的繁殖和生长指标的变化研究^[9-11],且鲜见对水生无脊椎动物的毒性效应研究。在此背景下,本研究主要考察21%抑食肼可湿性粉剂对大型蚤的急性毒性和21 d慢性毒性效应,观察大型蚤各个繁殖和生长指标变化,建立毒物剂量-反应关系,并寻找其中的敏感生物学指标,为评价抑食肼对水环境的污染效应和保护水生生态系统安全提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验生物

本研究采用的受试大型蚤(*Daphnia magna*)为本实验室连续培养三代以上的单克隆品系。依照OECD 211实验方法,大型蚤长期稳定地培养于M4培养液中^[12-14]。M4培养液每周更换2~3次,培养温度为 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光暗比为16 h:8 h,光强度为 $18\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,培养密度为每只蚤50 mL培养液。定期投放斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)作为饵料^[15-16]。每天饲喂密度约为 $90\ 000\ \text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ (每只蚤100~200 μg),21 d内每只母蚤繁殖幼蚤数量多于60只,可达到实验方法的要求。

试验前,挑选20~30只个体大、怀卵多、活动能力强的母蚤于1 L的烧杯内,精养喂以新鲜栅藻3周。这些母蚤产生的2~5代幼蚤可用于试验。挑选出生6~24 h健康活泼幼蚤用于毒性试验,其重铬酸钾敏感

度测定结果符合ISO标准^[17]。

1.2 供试药剂

供试物21%抑食肼可湿性粉剂取自国内某企业,外观为白至黄色粉末,有效成分为抑食肼,化学名称为N-苯甲酰基-N'-特丁基苯甲酰肼。助剂成分:萘磺酸甲醛(5.0%)、对甲氧基脂肪酰胺基苯磺酸钠(1.7%)、壬基酚聚氧乙烯醚(0.8%)、二氧化硅(2.5%)、高岭土(69%)。该药主要登记在水稻田喷雾使用,防治对象为稻纵卷叶螟,用量为有效成分 $10\sim 20\ \text{g}\cdot 667\ \text{m}^{-2}$ 。

1.3 急性毒性试验

按照OECD 202的标准方法^[18]进行急性毒性暴露试验。在预实验的基础上得出21%抑食肼可湿性粉剂对蚤类100%活动受抑制的最低浓度和全不抑制的最高浓度,以确定正式试验的浓度范围。根据预实验的结果,急性毒性试验设置0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6个浓度处理,同时设置1个空白对照组和一个最大二甲基亚砷浓度对照组(0.1%)。用40%的二甲基亚砷(DMSO)配制21%抑食肼可湿性粉剂的母液,然后将其溶于M4培养液配制出6个不同的浓度。试验时,在100 mL烧杯中装入50 mL不同浓度的抑食肼可湿性粉剂药液,每只烧杯放入5只幼蚤,幼蚤龄为6~24 h,每个浓度设置4个平行。在急性毒性暴露过程中不投饵、不更换试液,于24 h、48 h观察记录活动受抑制的幼蚤数。

1.4 慢性毒性试验

参考OECD 211方法^[13]进行21 d慢性毒性试验,根据急性毒性实验,获得供试药剂对大型蚤48 h的半数抑制浓度 EC_{50} ;试验浓度设置以急性48 h- EC_{50} 和预试验(48 h抑制中浓度)结果为基础,设置6个浓度水平,同时设置1个空白对照组和一个最大二甲基亚砷浓度对照组(0.1%)。每个浓度设置10个平行,选用100 mL的烧杯,放入50 mL暴露溶液,放入1只6~24 h幼蚤,于光暗比为16 h:8 h、 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内连续培养21 d。试验期间采用半静态实验系统^[19-20],每隔1 d更换1次实验溶液,保证试验期间药剂浓度为起始浓度的80%以上^[21],每天用新鲜的栅藻($90\ 000\ \text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$)喂养大型蚤。在试验过程中,每24 h观察一次,记录大型蚤的生存、蜕壳、怀卵、繁殖情况,并移除幼蚤,21 d培养结束时,在体视镜下对存活的大型蚤拍照,记录蚤体形态变化及其体长(从头盔至壳刺部的长度)。试验结束后,计算大型蚤的平均首次蜕壳时间、平均蜕壳次数、首次产幼蚤时间、平均

产幼溞数量和产幼溞胎数等。

1.5 数据处理

48 h 急性毒性试验数据用 SPSS 16.0 统计软件处理,得到 48 h-EC₅₀ 值。慢性毒性试验数据用 SPSS 16.0 和 Origin 8.5 统计软件对各慢性毒性终点值变化进行显著性分析,得到最敏感指标出现显著性变化的暴露浓度,并计算各个繁殖毒性终点指标的 NOEC 值,以便未来对该农药进行风险评价积累基础毒性数据。

2 结果与分析

2.1 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞的急性毒性

试验过程中试液溶解氧保持在 8.0 mg·L⁻¹ 以上, pH 在 7.5 左右。空白对照组和最大溶剂对照组的大型溞全部生长正常,无一受抑制。大型溞接触 21%抑食肼可湿性粉剂后,各浓度组受试溞活动受到不同程度抑制,抑制溞个体胀大,体色发白,沉于水底。参比物质试验结果表明,重铬酸钾对大型溞的 24 h-EC₅₀ 为 0.88 mg·L⁻¹,符合试验要求。

根据急性毒性的试验结果,调用 SPSS 16.0 统计软件中的 Probit 方法求得急性毒性 EC₅₀(表 1)。21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞的 48 h-EC₅₀ 为 0.94 mg·L⁻¹。按照国家环境保护局《化学农药环境安全评价试验准则》^[22]农药对大型溞的毒性分级标准,该药对溞类属于高毒农药。

2.2 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞的慢性毒性

2.2.1 抑食肼暴露对大型溞初次蜕壳时间的影响

由图 1 可见,21%抑食肼可湿性粉剂处理能提早大型溞的初次蜕壳时间,当其浓度大于 0.4 mg·L⁻¹ 时,初次蜕壳时间极显著提前($P<0.01$)。开始出现显著性差异的处理组是 0.8 mg·L⁻¹($P<0.01$)。

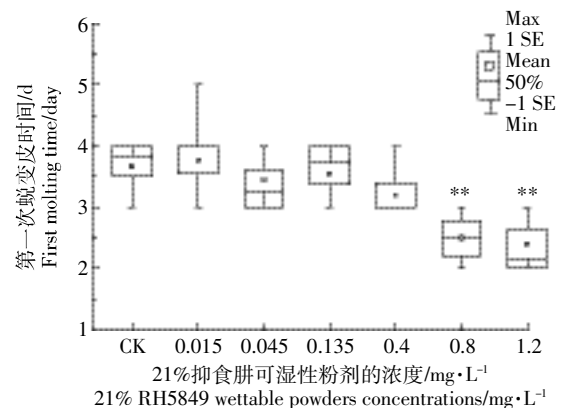
2.2.2 抑食肼暴露对大型溞蜕壳次数的影响

由图 2 可见,21%抑食肼可湿性粉剂暴露显著降低大型溞的蜕壳次数,当其浓度大于 0.045 mg·L⁻¹ 时,蜕壳次数显著下降($P<0.05$)。但是实验结束时,暴露浓度组 0.4、0.8、1.2 mg·L⁻¹ 的大型溞完全死亡(全部死亡的时间分别为第 18、9、7 d),因此该三个浓度

表 1 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞的急性毒性

Table 1 Acute toxicity of 21% RH5849 wettable powders to *D. magna*

21%抑食肼可湿性粉剂	24 h	48 h
EC ₅₀ /mg·L ⁻¹	1.34	0.94
95%可信限/mg·L ⁻¹	1.14~1.58	0.81~1.10



* 表示不同处理间差异显著($P<0.05$), ** 表示不同处理间差异极显著($P<0.01$); Max 和 Min 分别代表试验数据最大值和最小值; 1 SE 和 -1 SE 代表标准误差; 50% 代表试验数据的中位数(下同)
* and ** indicate significant differences between treatments at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively; Max and Min mean the maximum and minimum values of experimental data; 1 SE and -1 SE indicate the standard error; 50% indicates median of experimental data(similarly here in after)

图 1 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞初次蜕壳时间的影响

Figure 1 Effects of 21% RH5849 wettable powders on time of the first molting of *D. magna* after 21 d exposure

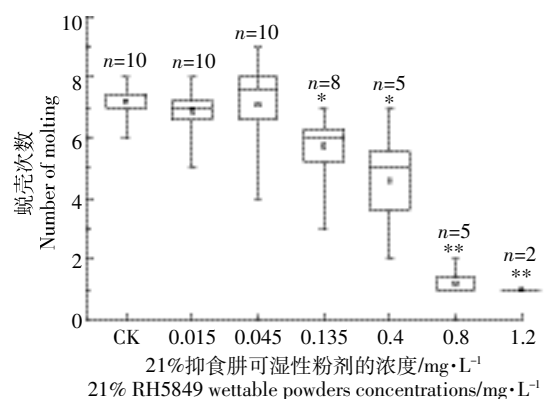


图 2 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞蜕壳次数的影响

Figure 2 Effects of 21% RH5849 wettable powders on number of molting of *D. magna* after 21 d exposure

组的蜕壳次数显著下降与大型溞过早死亡有关。出现显著性差异的暴露组是 0.135 mg·L⁻¹($P<0.05$)。

2.2.3 抑食肼暴露对大型溞首次产幼溞时间的影响

如图 3 所示,21%抑食肼可湿性粉剂暴露能延迟大型溞的首次产幼溞时间,当浓度为 0.4 mg·L⁻¹ 时,首次产幼溞时间显著延迟($P<0.05$)。

2.2.4 抑食肼暴露对大型溞存活个体产幼溞数量的影响

如图 4 所示,总体上 21%抑食肼可湿性粉剂暴露能降低平均每只大型溞的产幼溞数量,当浓度为 0.135 mg·L⁻¹ 时,平均每只大型溞的产幼溞数量显著下降($P<0.05$)。该项数据只统计存活至试验结束时的

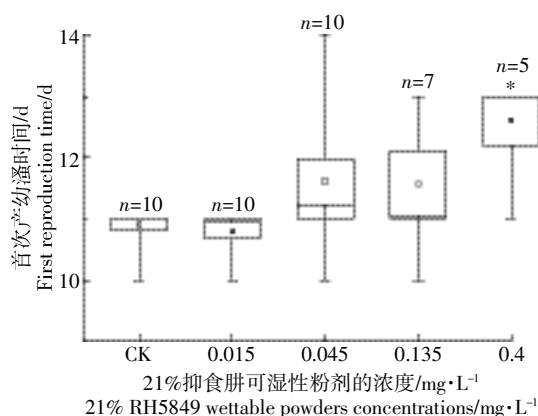


图3 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞首次产幼溞时间的影响
Figure 3 Effects of 21% RH5849 wettable powders on time of the first reproduction of *D. magna* after 21 d exposure

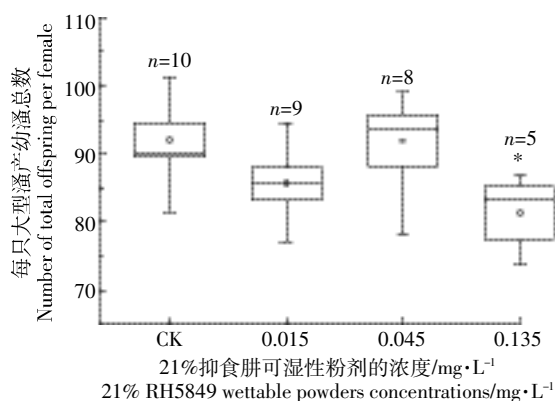


图4 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞产幼溞总数的影响
Figure 4 Effects of 21% RH5849 wettable powders on number of total offspring per female of *D. magna* after 21 d exposure

大型溞所产幼溞的数量。

2.2.5 抑食肼暴露对大型溞存活个体产幼溞胎数 (brood)的影响

如图5所示,当抑食肼活性成分浓度大于0.045

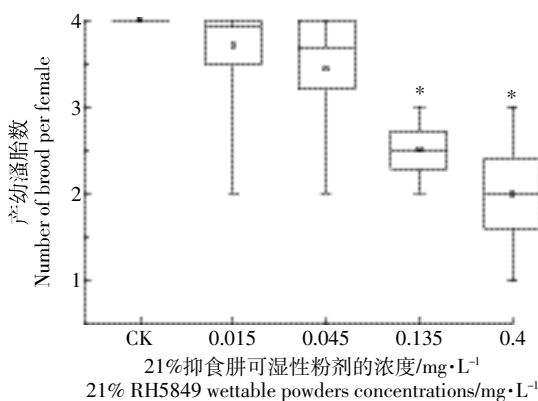


图5 21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞产幼溞胎数的影响
Figure 5 Effects of 21% RH5849 wettable powders on number of brood per female of *D. magna* after 21 d exposure

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均每只母溞产后代胎数开始出现显著下降($P<0.05$)。

2.2.6 抑食肼暴露对大型溞存活个体平均体长的影响

如图6所示,当抑食肼活性成分浓度为 $0.015\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,试验结束后大型溞母溞个体的平均体长显著下降,显著性差异分别出现在 $0.015\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.135\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露浓度组。

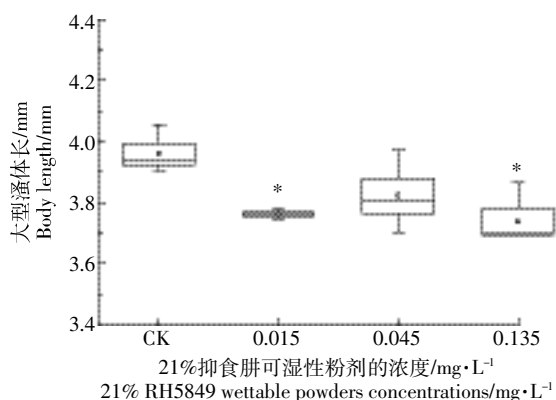


图6 21%抑食肼可湿性粉剂对暴露21 d后大型溞体长的影响
Figure 6 Effects of 21% RH5849 wettable powders on body length of *D. magna* after 21 d exposure

2.2.7 抑食肼对大型溞21 d暴露的 EC_{50}

经测试,试验过程中试液溶解氧保持在 $8.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上,pH在7.5左右。空白对照组和最大溶剂对照组的大型溞全部生长正常,无一死亡。21 d后统计大型溞活动受抑制情况,得出21%抑食肼可湿性粉剂对大型溞21 d- EC_{50} 值为 $0.095\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,相当于48 h- EC_{50} 的1/10。

3 讨论

抑食肼是1988年美国罗姆-哈斯公司开发的第一种非甾醇二酰基肼类杀虫剂,RH-5849对许多鳞翅目、一些双翅目、鞘翅目害虫有特效^[23]。非甾醇蜕皮激素类杀虫剂无论从宏观的中毒症状,还是在细胞、分子水平都表现出与蜕皮激素相同的症状和作用方式。但蜕皮激素诱导的是正常的蜕皮过程,而二酰基肼类化合物却导致早熟、致死的蜕皮^[24]。研究表明,抑食肼有很强的蜕皮致死作用^[25]。本试验过程中,高浓度组($0.4, 0.8, 1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)中均出现了蜕皮不成功致死现象,主要表现为大型溞在蜕皮过程中旧头壳下出现一个未鞣化的新头壳,但无法蜕去,保持这种濒死状态1~2 d,最后死于饥饿和壳未完全脱落。除此之外,抑食肼还表现出很强的杀卵活性^[26]。Trisyono等^[27]

的研究表明,欧洲玉米螟(*O. nubilalis*)和巨座玉米螟(*Diatraea grandiosella*)的卵块在含有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RH-2485 或 RH-5992 的药剂中浸蘸过后,95%以上的卵死亡;而 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度处理,虽然一些卵能够孵化,但存活率很低。本试验中也出现类似现象,在 21 d 慢性暴露试验的第 16 d 和 17 d 时, $0.015 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.045 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个浓度组均出现产下的幼蚤死亡的现象。非甾醇蜕皮激素类杀虫剂的神经中毒作用一般认为是阻碍了神经和肌肉上钾通道的传导^[28],而其具有的杀卵活性说明二酰基肼类化合物可能还存在其他的作用机制。

21%抑食肼可湿性粉剂对大型蚤的 48 h- EC_{50} 为 $0.94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,为高毒,其值远超过纯品抑食肼的急性毒性,表明农药剂型加工过程中添加的助剂可能会增加制剂的毒性。21%抑食肼可湿性粉剂对大型蚤的存活以及后代成活、卵的孵化有一定的影响,并且随着药剂浓度的升高,对各项指标的影响愈加显著。较高浓度的抑食肼药剂严重影响了母代大型蚤的产卵情况,包括产卵量、产卵的时间和产幼蚤的胎数;而且作为一种新型昆虫生长调节剂,该药剂对大型蚤的显著作用体现在对其蜕壳数和蜕壳时间的影响。由于药剂的影响,大型蚤初次蜕壳时间提前,蜕壳次数减少,即龄期减少,所以龄期之间的间隔延长,导致大型蚤生长缓慢,21 d 内产卵总数大幅度减少。

研究表明,21%抑食肼可湿性粉剂对大型蚤具有慢性毒性,而且后代畸形的高发生率值得人们关注。到目前为止,21%抑食肼可湿性粉剂的这些效应对环境风险评价的相关性还不清楚。OECD 准则的标准繁殖测试没有考虑后代的质量和胚胎发育,具有一定的局限性。实验过程中发现,在产卵过程中,各处理组都有幼蚤死亡或畸形的现象发生,而且推测抑食肼在大型蚤母体中富集并转移给子代个体中。因此,自然界中,大型蚤如果暴露在本实验浓度下,种群的数量将会下降。同时大型蚤发生畸形和流产的机理尚需进一步研究。同样正在广泛使用的其他蜕皮激素类杀虫剂所引起的环境风险亦应引起人们足够的重视。

4 结论

21%抑食肼可湿性粉剂对大型蚤活动抑制 EC_{50} (21 d)为 $0.095 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;21%抑食肼可湿性粉剂暴露能促进大型蚤提前蜕壳,降低其蜕壳次数;延迟大型蚤的首次产幼蚤时间,降低平均每只大型蚤的产幼蚤胎数和数量;此外,21%抑食肼可湿性粉剂暴露还能显

著影响大型蚤的个体尺寸,且该指标对农药暴露的敏感性最高,21%抑食肼可湿性粉剂在 $0.015 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,即显著降低大型蚤的体长。因此,综合考虑各项繁殖毒性终点指标,该农药对大型蚤的 NOEC 值为 $0.045 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

鉴于 21%抑食肼可湿性粉剂在较低浓度下便能显著影响大型蚤的各项生长和繁殖慢性毒性终点,建议对该农药登记大田使用前进行田间试验和环境生物影响风险评估,尤其要注意其对水生甲壳类生物的影响。

参考文献:

- [1] 徐 浩,李 振. 抑食肼(RH-5849)在水稻及土壤中的残留检测和消解动态[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1759-1763.
XU Hao, LI Zhen. Residue and degradation of RH-5849 in rice and soil [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1759-1763.
- [2] Bengochea P, Christiaens O, Amor F, et al. Insect growth regulators as potential insecticides to control olive fruit fly (*Bactrocera oleae* Rossi): Insect toxicity bioassays and molecular docking approach[J]. *Pest Management Science*, 2013, 69(1): 27-34.
- [3] Bagheri F, Talebi K, Hosseiniaveh V. Cellular energy allocation of pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to juvenoid pyriproxyfen[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(35): 5746-5753.
- [4] 国家环境保护局. 水生生物监测手册[M]. 南京: 东南大学出版社, 1993.
National Environmental Protection Agency. Aquatic biomonitoring manual[M]. Nanjing: Dongnan University Press, 1993.
- [5] Ziarek J J, Nihongi A, Nagai T, et al. Seasonal adaptations of *Daphnia pulicaria* swimming behaviour: The effect of water temperature[J]. *Hydrobiologia*, 2011, 661(1): 317-327.
- [6] Yokota K, Sterner R W. Trade-offs limiting the evolution of coloniality: Ecological displacement rates used to measure small costs[J]. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 2011, 278(1704): 458-463.
- [7] 芮昌辉,刘 娟,任 龙. 昆虫生长调节剂的毒理机制与抗药性研究进展[J]. 生物安全学报, 2012, 21(3): 177-183.
RUI Chang-hui, LIU Juan, REN Long. Toxicological mechanisms and resistance of insect growth regulators[J]. *Journal of Biosafety*, 2012, 21(3): 177-183.
- [8] 钟 远,臧 宇,罗 屿,等. 新型杀虫剂对蚯蚓的毒理学研究[J]. 农业环境保护, 1999, 18(3): 102-105.
ZHONG Yuan, ZANG Yu, LUO Yu, et al. Toxicological study of two new pesticides on earthworms[J]. *Agro-environmental Protection*, 1999, 18(3): 102-105.
- [9] Clare A S, Rittschof D, Costlow J D. Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, 262: 436-440.

- [10] Enmin Z, Milton F. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 38:281-285.
- [11] Ou J J, Zhu X K, Wang L, et al. Synthesis and bioactivity study of 2-acylamino-substituted N'-benzylbenzohydrazide derivatives[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60:10942-10951.
- [12] OECD. Test Guideline No. 211. Effects on biotic systems test; *Daphnia magna* reproduction test[S]. Paris: OECD Publishing, 2008.
- [13] OECD. Test Guideline No. 211. Test guidelines for testing of chemicals; *Daphnia magna* reproduction test[S]. Paris: OECD Publishing, 1998.
- [14] Elendt B P, Bias W R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing; Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*[J]. *Water Research*, 1990, 24(9):1157-1167.
- [15] Bogdan K G, Gilbert J J. Body size and food size in freshwater zooplankton[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81(20):6427-6431.
- [16] Stauber J L, Florence T M. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Water Research*, 1989, 23(7):907-911.
- [17] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- ZHOU Yong-xin, ZHANG Zong-she. Biological aquatic toxicity test method[M]. Beijing: Agriculture Press, 1989.
- [18] OECD. Test Guideline No. 202. Test guidelines for testing of chemicals; *Daphnia* sp. Acute immobilisation test[S]. Paris: OECD Publishing, 2004.
- [19] U. S. EPA guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organism and their uses[S]. Washington: National Technical Information Service, 1985.
- [20] Paul C F, Grothe D W, Scheuring J C. Chronic toxicity of 4-Nitrophenol to *D. magna* strains under static-renewal and flow-through conditions[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1957, 36(5):730-737.
- [21] 胡方华, 宋文华, 丁峰, 等. 三唑酮对大型蚤 21 天慢性毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(2):171-176.
- HU Fang-hua, SONG Wen-hua, DING Feng, et al. 21-d chronic toxicity of triadimefon to *Daphnia magna*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(2):171-176.
- [22] 国家环保局. 化学农药环境安全性评价试验准则[J]. 农药科学与管理, 1990(2):1-5.
- NEPA. Environmental safety assessment of chemical pesticides test guidelines[J]. *Pesticide Science and Administration*, 1990(2):1-5.
- [23] Darvas B, Polgar L, Eldin M H, et al. Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH5849[J]. *Journal of Economic Entomology*, 1992, 85(6):2107-2112.
- [24] Dhaddialla T S, Carlson G R, Le D P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity[J]. *Annual Review of Entomology*, 1998, 43:545-569.
- [25] Monthean C, Potter D A. Effects of RH5849, a novel insect growth regulator, in Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass[J]. *Journal of Economic Entomology*, 1992, 85(2):507-513.
- [26] 杜育哲, 刘安西. 非甾醇蜕皮激素类杀虫剂的研究进展[J]. 农药, 2002, 4(6):7-11.
- DU YU-zhe, LIU AN-xi. Research advance on nonsteroid ecdysone agonist[J]. *Pesticide*, 2002, 4(6):7-11.
- [27] Trisyono A, Chippendale G M. Effect of the nonsteroidal ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. *Journal of Economic Entomology*, 1997, 90(6):1486-1492.
- [28] Salgado V L. The neuro-toxic insecticidal mechanism of the nonsteroidal ecdysone agonist RH-5849; K⁺ channel block in nerve and muscle[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1992, 43:1-13.