

双酚 A 和四溴双酚 A 对大型溞和斑马鱼的毒性

刘红玲, 刘晓华, 王晓祎, 王晓蓉, 于红霞*
(南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

摘要:采用静态生物急性试验的方法,研究了双酚 A 和四溴双酚 A 对大型溞和斑马鱼的急性毒性和生命早期阶段的生长发育影响.结果表明,大型溞的幼溞接触不同浓度的双酚 A 和四溴双酚 A,活动会受到抑制,甚至死亡,48 h 的 EC_{50} 分别为 8.91 和 0.69 $mg \cdot L^{-1}$;对斑马鱼也有明显的毒性作用,其 96 h 的 LC_{50} 分别为 9.06 和 1.78 $mg \cdot L^{-1}$.根据化学物质对鱼类和溞类的毒性评价标准,这 2 个化合物都属于高毒物质.双酚 A 和四溴双酚 A 对斑马鱼生命早期阶段毒性影响的研究结果表明,对斑马鱼胚胎发育有明显抑制作用,可以造成胚胎发育畸形甚至死亡,斑马鱼胚胎 72 h 孵化畸形是双酚 A 的最敏感指标, EC_{50} 为 2.90 $mg \cdot L^{-1}$,72 h 未孵化是四溴双酚 A 的最敏感指标, EC_{50} 为 0.14 $mg \cdot L^{-1}$.双酚 A 和四溴双酚 A 对鱼卵发育有显著影响,双酚 A 对鱼卵有致畸作用,四溴双酚 A 抑制了鱼卵孵化.

关键词:双酚 A;四溴双酚 A;大型溞;斑马鱼;毒性

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2007)08-1784-04

Toxicity of BPA and TBBPA to *Daphnia magna* and Zebrafish *Brachydanio rerio*

LIU Hong-ling, LIU Xiao-hua, WANG Xiao-yi, WANG Xiao-rong, YU Hong-xia
(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Acute toxicity of BPA and TBBPA to *Daphnia magna*, zebrafish (*Brachydanio rerio*) and development effects of zebrafish embryo were studied, and safety assessment was also made to *Daphnia magna* and zebrafish. The tested chemicals remarkably restrained the mobilization of *Daphnia magna*, which may cause them death. 48 h EC_{50} values for *D. magna* were 8.91 and 0.69 $mg \cdot L^{-1}$ respectively. In addition, the chemicals showed the toxicity effects on zebrafish, and 96 h LC_{50} values were 9.06 and 1.78 $mg \cdot L^{-1}$ respectively. BPA and TBBPA remarkably retarded the development of zebrafish embryos, which may cause embryo abnormality and death. And the most sensitive toxicological endpoints to BPA and TBBPA were found, 72 h EC_{50} (malformation and embryo do not hatch) values were 2.90 and 0.14 $mg \cdot L^{-1}$ respectively. The results showed that zebrafish embryo should be the most sensitive to the tested chemicals. The results indicated that BPA and TBBPA were the pollutants with high toxicity, in which TBBPA had the higher toxicity. BPA is a potential teratogen to zebrafish embryos, while TBBPA restrains embryo from hatch.

Key words: BPA; TBBPA; *Daphnia magna*; *Brachydanio rerio*; toxicity

双酚 A (Bisphenol A, CAS 80-05-7, BPA) 主要用于生成聚碳酸酯、环氧树脂,也用作聚氯乙烯的热稳定剂、橡胶的防老化剂、农用杀菌剂、油漆及油墨的抗氧化剂和增塑剂等,还用于阻燃剂四溴双酚 A 生产.四溴双酚 A (Tetrabromobisphenol A, CAS 79-94-7, TBBPA) 作为市场上的一种应用最广泛的含溴阻燃剂,用于环氧、聚碳酸酯、聚酯、酚醛等树脂中^[1].它们都是重要的有机化工原料,由于大量生产和广泛应用以致在水、沉积物、土壤和大气环境中,甚至在生物体内都已经检出 BPA^[2-7] 和 TBBPA^[8-11].

BPA 是一种环境内分泌干扰物^[12],对哺乳动物毒性很大^[13-15].TBBPA 的毒性研究,当前主要集中在哺乳动物,引起老鼠肝中毒^[16],可诱导幼鼠肾的多囊损害^[17],具有甲状腺激素活性和雌激素活性^[18].

BPA 和 TBBPA 导致的环境污染与它们对哺乳动物的毒性应引起我们的关注,尤其是这 2 种物质

在水环境中大量被检出^[2,5-7,11],势必对溞和鱼等水生生物造成危害.然而目前 BPA 和 TBBPA 对水生生物的影响还鲜见报道.为此,本文对比研究了它们对水生食物链大型溞和斑马鱼的急性毒性以及斑马鱼生命早期发育阶段的影响效应,得到的毒理学数据可以弥补水生生物毒性资料的短缺,以期为制定安全的环境影响评价浓度并对其进行生态风险评价与管理提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 化合物

BPA (Sigma 公司, AR), 白色至淡褐色粉末; TBBPA (Sigma 公司, AR), 灰白色粉末.其结构组成

收稿日期:2006-10-17;修订日期:2006-11-21
基金项目:国家自然科学基金重点项目(2037010, 20375015)
作者简介:刘红玲(1976~),女,博士,主要研究方向为有机污染物的生物成组毒理学,E-mail: njliuhl@yahoo.com.cn
* 通讯联系人,E-mail: yuhx@nju.edu.cn

见图 1. 均用丙酮配成浓度为 $10\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液.

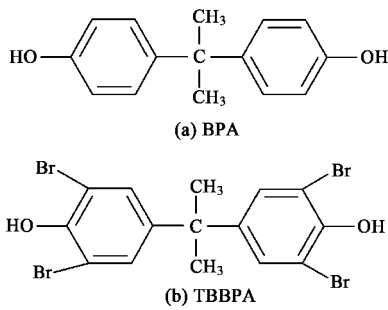


图 1 BPA 和 TBBPA 结构式
Fig. 1 Chemical formulas for BPA and TBBPA

1.2 试验生物

1.2.1 大型蚤 (*Daphnia magna*)

大型蚤为实验室连续培养 3 代以上的单克隆品系, 在曝气 24 h 以上的自来水中培养, 温度为 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$, 做试验的前 1 d 挑粗怀卵的大型蚤放入已配好的稀释水中. 待母蚤产出足够的幼蚤后, 选取 12 h 之内游动活泼的幼蚤待用.

1.2.2 斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)

斑马鱼体长 $(30\pm 5)\text{ mm}$, 体重 $(0.3\pm 0.1)\text{ g}$, 选自同一驯养池中规格大小一致的幼鱼. 试验前该鱼群处于试验环境条件下, 在连续曝气的水中驯养 3 周. 试验前 24 h 停止喂饲. 驯养期间死亡率不超过 10%, 无明显的疾病和肉眼可见的畸形.

1.2.3 斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 胚胎

将成年斑马鱼 (雌雄鱼数比 1:2) 饲养在经活性炭过滤并充分曝气的水体内, 水温保持 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.34$, 硬度以 CaCO_3 计约为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 每日喂食 2 次经紫外消毒处理过的冷冻鱼食 TetraMin (摇蚊幼虫). 光照/黑暗周期 (h) 14:10. 根据 Schulte 等人^[19]的方法收集受精卵, 用统一配制、充氧饱和、温度 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、恒定组分的稀释水^[20]迅速清洗鱼卵以除去残留物, 在倒置显微镜下挑选出分裂正常的受精卵, 用于毒性试验.

1.3 试验方法

参考文献[21]方法进行试验. 大型蚤、斑马鱼试验用曝气除氯自来水将储备液稀释成试验浓度, 斑马鱼胚胎发育影响试验用组分恒定的稀释水^[20]来配制试验浓度. 丙酮浓度不超过 0.3%.

根据预试验结果各设置一系列浓度梯度. 整个试验都设 1 个对照组 (空白对照). 大型蚤每个浓度设 4 个平行试验, 每个小烧杯中 20 mL 溶液, 移入 5 只幼蚤. 斑马鱼设 8 个浓度组, 3 个平行试验, 在 1 L

的烧杯中每一浓度放 5 尾鱼. 按照 OECD 指导^[22]设计胚胎毒性试验. 试验前配制 10 组浓度备用. 选用 24 孔板, 每孔的容积为 3 mL, 每孔加入 2 mL 试液, 放 1 枚受精卵. 每张多孔板为 1 个试验浓度组, 其中 4 孔为空白对照, 其余 20 孔为同一试验浓度. 铝箔封面以避免挥发改变试验浓度. 将密封好的多孔板放在温度恒定为 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱中孵化.

1.3.1 大型蚤急性抑制试验

大型蚤急性毒性试验参照文献[23]. 试验终点以大型蚤 48 h 和 72 h 半数活动抑制浓度 (EC_{50}) 表示. 试验对照的不活动大型蚤数应少于 10%, 不得有死亡. 最后根据美国环境保护局 TSK (trimmed spearman-karber method) 程序 (版本 1.5) 计算 24、48 和 72 h 的 EC_{50} .

1.3.2 斑马鱼急性毒性试验

鱼类急性毒性试验参照文献[24]. 每天测定 1 次各试验溶液的溶解氧、pH 和温度. 如果需要, 进行曝气以保证溶解氧的浓度大于 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 为防止饵料影响, 试验期间不喂食. $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温, pH 为 6.8~7.2, 光暗比 14 h:10 h. 观察 24、48、72、96 h 死亡数. 以浓度的常用对数为横坐标, 死亡率的概率单位为纵坐标, 求出 96 h 半致死浓度 (LC_{50})^[25].

1.3.3 斑马鱼生命早期发育影响效应试验

在受精卵产出后马上进行试验, 在倒置显微镜下观察胚胎发育, 记录发育过程中一些具有代表性的毒理学终点, 测定 BPA 和 TBBPA 对斑马鱼胚胎的毒性, 用浓度对数-概率单位法计算 EC_{50} 和 LC_{50} 等毒性数据^[25].

2 结果与分析

2.1 对蚤和鱼的急性毒性效应

在自然生态环境中, 蚤和鱼构成了 1 条重要的水生食物链. BPA 和 TBBPA 对大型蚤、斑马鱼的急性毒性值分别见表 1 和表 2. 大型蚤的幼蚤接触不同浓度的 BPA 和 TBBPA, 活动会受到抑制, 甚至死亡, 48 h 的 EC_{50} 值分别为 8.91 和 $0.69\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 对斑马鱼也有明显的毒性作用, 其 96 h 的 LC_{50} 值分别为 9.06 和 $1.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 对 BPA 和 TBBPA 大型蚤比斑马鱼的敏感性强.

2.2 对斑马鱼生命早期发育影响效应

该试验设计的 0 h 染毒 BPA 和 TBBPA 对斑马鱼胚胎发育的 4 h 囊胚和 8 h 外包阶段有显著影响 (见表 1 和表 2), 说明化合物对胚胎早期发育影响

比较大,BPA 和 TBBPA 都在 72 h 对斑马鱼胚胎产生了最大的毒性,BPA 对斑马鱼生命早期发育影响的敏感指标:孵化致畸作用>孵化率降低>心胞水肿.对于 BPA,斑马鱼胚胎最敏感的指标为孵化畸形, EC_{50} 为 $2.90\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,表明 BPA 对斑马鱼胚胎具有致畸效应.TBBPA 对斑马鱼早期发育影响的敏感指标:孵化延迟>停滞发育作用(12 h 外包完成)>心胞水肿、色素.斑马鱼胚胎最敏感的指标为发育 72 h 孵化障碍, EC_{50} 为 $0.14\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

表 1 双酚 A 对大型溞和斑马鱼的急性毒性效应及斑马鱼早期发育影响效应结果

Table 1 Acute toxicity values of BPA to *Daphnia magna*, zebrafish and the development of zebrafish embryo effects

受试物	终点	染毒时间/h	EC_{50} (LC_{50})/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% C.I.)
斑马鱼胚胎	凝结	4	> 30.0
斑马鱼胚胎	凝结	8	28.1
斑马鱼胚胎	外包完成	12	25.6(23.1~29.9)
斑马鱼胚胎	没有主动运动	24	20.6(15.6~27.3)
斑马鱼胚胎	凝结	24	20.6(15.6~27.3)
斑马鱼胚胎	水肿	48	7.3(6.7~8.0)
斑马鱼胚胎	心跳迟缓	48	11.9(10.3~13.9)
斑马鱼胚胎	色素	48	18.3(14.0~23.9)
斑马鱼胚胎	孵化延迟	72	3.9(3.7~4.1)
斑马鱼胚胎	畸形	72	2.9(2.8~3.0)
斑马鱼胚胎	凝结	72	4.1(3.9~4.3)
大型溞	不活动	24	16.21(13.14~20.00)
大型溞	不活动	48	8.91(7.953~9.99)
大型溞	不活动	72	8.84
斑马鱼	死亡	96	9.06(8.76~9.37)

表 2 四溴双酚 A 对大型溞和斑马鱼的急性毒性效应及斑马鱼早期发育影响效应结果

Table 2 Acute toxicity values of TBBPA to *Daphnia magna*, zebrafish and the development of zebrafish embryo effects

受试物	终点	染毒时间/h	EC_{50} (LC_{50}) / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (95% C.I.)
斑马鱼胚胎	凝结	4	1.21(0.33~4.54)
斑马鱼胚胎	凝结	8	1.30(0.47~3.66)
斑马鱼胚胎	外包完成	12	0.29(0.16~0.54)
斑马鱼胚胎	尾部延展	24	1.00
斑马鱼胚胎	凝结	24	0.92(0.56~1.53)
斑马鱼胚胎	水肿	48	0.81(0.56~1.17)
斑马鱼胚胎	色素	48	0.81(0.56~1.17)
斑马鱼胚胎	凝结	48	0.44(0.29~0.66)
斑马鱼胚胎	孵化延迟	72	0.14(0.09~0.23)
斑马鱼胚胎	凝结	72	0.39(0.29~0.54)
大型溞	不活动	24	2.70(2.47~2.95)
大型溞	不活动	48	0.69(0.43~1.09)
大型溞	不活动	72	0.24(0.20~0.29)
斑马鱼	死亡	96	1.78(1.70~1.88)

从表 1 和表 2 还可以看出,无论是大型溞和斑

马鱼还是斑马鱼胚胎,随着暴露时间的延长,化合物的毒性越来越明显,这表明化合物对生物体的毒性大小受污染物在体内积累量的影响,也有可能它们在生物体内代谢成活性更强的毒物.当然,这种推测还有待于今后对代谢机理的研究来证实.

2.3 安全性评价

有关化学品对生物毒性的安全性评价,国内尚未有统一的标准.本研究在关于试验生物的水环境安全性评价中,采用了文献[26]中的标准(表 3),确定了污染物对大型溞和斑马鱼的危害等级(表 4).

表 3 化学物质对鱼类和溞类的毒性等级评价标准/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 3 Criteria for evaluating and grading toxicity of chemicals to *Daphnia magna* and fish/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

毒性等级	鱼类 LC_{50}	溞类 EC_{50}
极毒	< 1.0	< 0.1
高毒	1.0~10.0	0.1~1.0
中毒	10.0~100.0	1.0~10.0
低毒	> 100.0	10.0~100.0
微毒	--	> 100.0

表 4 受试化合物对大型溞和斑马鱼的安全性评价

Table 4 Risk assessment for the tested chemicals to *Daphnia magna* and zebrafish

化合物	大型溞最敏感 终点 EC_{50} (LC_{50}) / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	斑马鱼最敏感 终点 EC_{50} (LC_{50}) / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	危害 水平	预测安全 浓度 ^[27] / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
双酚 A	8.84	9.06	高毒	8.84
四溴双酚 A	0.24	1.78	高毒	0.24

通过 BPA 和 TBBPA 对大型溞和斑马鱼的急性毒性试验,表明这 2 种物质都属于高等毒性的物质,对水生生物有一定的危害性,应该加强对其监管和评价.但如要对化学品或环境水体进行全面的安全性评价,还必须考虑慢性毒性、其他生物毒性,以及化合物降解与富集指标等.

3 结论

(1) BPA 和 TBBPA 对水生生物(大型溞、斑马鱼)属于高等毒性的物质.大型溞对它们具有较好的敏感性.

(2) 大型溞和鱼的急性毒性可以用作评价这类化学品或相关污染水体环境安全性的 1 种快速有效的初级筛选手段.

(3) 2 个化合物对斑马鱼早期生命发育阶段有明显抑制效应,可以造成胚胎发育畸形甚至死亡,BPA 72 h 畸形 EC_{50} 为 $2.90\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,TBBPA 72 h 孵化

障碍 EC₅₀ 为 0.14 mg•L⁻¹, 这是它们最敏感的指标. BPA 对幼鱼具有致畸作用, TBBPA 抑制鱼卵孵化.

(4) TBBPA 毒性高于 BPA, 但是 BPA 致畸性不容忽视. 斑马鱼早期生命发育影响试验可以作为致畸物质筛选手段之一.

参考文献:

[1] Bromine Science and Environmental Forum[EB/OL]. <http://www.bsef.com>, 2006.

[2] Lee H B, Peart T E. Determination of bisphenol A in sewage and effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 2000, **83**: 290 ~ 297.

[3] Staples C A, Dom P B, Klecka G M, *et al.* A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A [J]. Chemosphere, 1998, **36**: 2149 ~ 2173.

[4] Khim J S, Lee K T, Kannan K, *et al.* Trace organic contaminants in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2001, **40**: 141 ~ 150.

[5] Heemken O P, Reincke H, Stachel B, *et al.* The occurrence of xenoe strogens in the Elbe River and the North Sea [J]. Chemosphere, 2001, **45**: 245 ~ 259.

[6] 梁增辉, 何世华, 孙成均, 等. 引起青蛙畸形的环境内分泌干扰物的初步研究 [J]. 环境与健康杂志, 2002, **19**(6): 419 ~ 421.

[7] 杜兵, 张彭义, 张祖麟, 等. 北京市某典型污水处理厂中内分泌干扰物的初步调查 [J]. 环境科学, 2004, **25**(1): 114 ~ 116.

[8] Sellstrom U, Jansson B. Analysis of tetrabromobisphenol a in a product and environmental samples [J]. Chemosphere, 1995, **31**(4): 3085 ~ 3092.

[9] Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol A in the river and the mussel collected in Osaka [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1983, **31**(1): 48 ~ 52.

[10] Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. The flame retardant tetrabromobisphenol A and its metabolite found in river and marine sediments in Japan [J]. Chemosphere, 1983, **12**: 1533 ~ 1539.

[11] Morris S, Allchin C R, Zegers B N, *et al.* Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs [J]. Environ Sci Technol, 2004, **38**(21): 5497 ~ 5504.

[12] Vom Saal F S, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment [J]. Environmental Health Perspectives, 2005, **113**(8): 926 ~ 933.

[13] Koponen P S, Kukkonen J V. Effects of bisphenol A and artificial UVB radiation on the early development of Rana temporaria [J]. J Toxicol Environ Health, 2002, **65**: 947 ~ 959.

[14] Nieminen P, Lindstrom S P, Juntunen M, *et al.* In vivo effects of bisphenol A on the polecat (*Mustela putorius*) [J]. J Toxicol Environ Health, 2002, **65**: 933 ~ 945.

[15] Aloisi A M, Della Seta D, Rendo C, *et al.* Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats [J]. Brain Res, 2002, **937**: 1 ~ 7.

[16] Szymanska J A, Piotrowski J K. Hepatotoxicity of tetrabromobisphenol A in rats [J]. Toxicology letters, 1998, **95**(Supplement): 163.

[17] Naemi Fukuda, Yoshihiko Ito, Makiko Yamaguchi, *et al.* Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats [J]. Toxicology letters, 2004, **150**: 145 ~ 155.

[18] Kitamura Shigeyuki, Jinno Norimasa, Ohta Shigeru, *et al.* Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, **293**(1): 554 ~ 559

[19] Schulte C, Nagel R. Test acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results[J]. ATLA, 1994, **22**: 12 ~ 19.

[20] 刘红玲, 周宇, 许妍, 等. 氯代酚和烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎毒性效应的研究[J]. 安全与环境学报, 2004, **4**(4): 3 ~ 6.

[21] 国家环境保护局. 化学品测试准则[M]. 北京: 化学工业出版社, 1990.

[22] OECD. OECD guideline for testing of chemicals[M]. OECD, 1993.

[23] GB/T 13266-91, 水质-物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法[S].

[24] GB/T 13266-91, 水质-物质对淡水鱼急性毒性测定方法[S].

[25] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学[M]. 陕西: 陕西旅游出版社, 1993. 252 ~ 256.

[26] HJ/T 154-2004, 新化学物质危害评估准则[S].

[27] 王宏, 沈英娃, 卢玲, 等. 几种典型有害化学品对水生生物的急性毒性[J]. 应用与环境生物学报, 2003, **9**(1): 49 ~ 52.