DOI:10.13671/j.hjkxxb.2014.0936
刘建梅,刘济宁,陈英文,等.2015.四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的急性和慢性毒性[J].环境科学学报,35(6):1946-1954
Liu J M, Liu J N, Chen Y W, *et al*. 2015.Acute and chronic toxicity of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol to *Daphnia magna*[J].Acta Scientiae Circumstantiae,35(6):1946-1954

四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的急性和慢性毒性

刘建梅[1,2],刘济宁[2],陈英文[1,*],王蕾[2,*],沈树宝[1]

1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009
2. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042

收稿日期:2014-07-08　　**修回日期**:2014-09-26　　**录用日期**:2014-09-27

摘要:为了明确四溴双酚 A 和三溴苯酚两种溴系阻燃剂对水生生物的生态危害,测定对比了四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的急性毒性(48 h-LC_{50},48 h 半数致死浓度)和慢性毒性(包括 21 d 繁殖量、内禀增长率、净生殖率毒性影响的 EC_5(5%效应浓度)或 NOEC(最高无效应浓度)等),在此基础上采用评估因子法外推四溴双酚 A 和三溴苯酚的预测无效应浓度(PNEC).毒性测试结果表明,四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞 21 d 敏感繁殖毒性终点 EC_5(内禀增长率、净生殖率)均比 48 h 急性毒性 LC_{50}低 2 个数量级,且低于其对繁殖量毒性影响的 NOEC.危害评估结果显示,三溴苯酚和四溴双酚 A 基于慢性毒性的 PNEC 低于基于急性毒性的 PNEC.以繁殖量、内禀增长率和净生殖率毒性危害的 EC_5值作为大型溞繁殖毒性指标可能比 NOEC 更能敏感地表征化学品对溞类的危害,四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的慢性繁殖毒性作用相比急性毒性作用更应引起关注,采用以慢性毒性数据为基础的危害评估结果可以较好地保护物种的安全.

关键词:四溴双酚 A;三溴苯酚;大型溞;危害评估

文章编号:0253-2468(2015)06-1946-09　　**中图分类号**:X171.5　　**文献标识码**:A

Acute and chronic toxicity of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol to *Daphnia magna*

LIU Jianmei[1,2], LIU Jining[2], CHEN Yingwen[1,*], WANG Lei[2,*], SHEN Shubao[1]

1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009
2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042

Received 8 July 2014; **received** in revised form 26 September 2014; **accepted** 27 September 2014

Abstract: To confirm the ecological hazard of two brominated flame retardants—Tetrabromobisphenol A(TBBA) and Tribromophenol(TBP) on *Daphnia magna*, the acute toxicity(48 h-LC_{50}) and the chronic toxicity(21 d-EC_5 or NOEC for reproduction, intrinsic rate of increase and net reproductive rate) were tested and compared. Depending on the test results, we applied assessment factors to extrapolate the predicted no effect concentration(PNEC) for both chemicals. Results of toxicity tests showed that for both TBBA and TBP, 21 d-EC_5 values for intrinsic rate of increase and net reproductive rate were one or two orders of magnitude lower than 48 h-LC_{50}, which were also lower than the 21 d-NOEC value for reproduction. Hazard assessment of TBBA and TBP indicated that the chronic toxicity-based PNEC value was lower than the acute toxicity-based PNEC. The indicator of EC_5 for reproduction, intrinsic rate of increase and net reproductive rate might be more sensitive in the toxicity characterization of TBBA and TBP on *Daphnia magna* than that of NOEC. More emphasis should be placed on the chronic toxicity of TBBA and TBP than the acute toxicity, the PNEC derived from chronic toxicity data can adequately protect the population of *daphnia magna*.

Keywords: Tetrabromobisphenol A;Tribromophenol;*Daphnia magna*;hazard assessment

1　引言(Introdution)

四溴双酚 A(Tetrabromobisphenol A,TBBA)是市场上使用最广泛的溴化阻燃剂,三溴苯酚(2,4,6-tribromophenol,TBP)是合成溴系阻燃剂、医药、农药和防霉防腐剂的化工中间体,两者广泛用于塑料、纺织、电子产品中.由于使用量大、用途广泛,这两种溴代酚类物质在环境介质和生物体内均被不同程度地检出(赵明东,2013; Yang *et al.*, 2012;杨苏文等,2012; Labadie *et al.*, 2010; Greens *et al.*, 2009;

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(No.2013AA06A308);科研院所技术开发研究专项

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(No.2013AA06A308) and the Specialized Research Fund for the Scientific Research Institutions of China

作者简介: 刘建梅(1990—),女,E-mail:liulaoda08@163.com; * **通讯作者(责任作者)**, E-mail:yw_chen@126.com, wanglei@nies.org

Biography: LIU Jianmei(1990—),female, E-mail:liulaoda08@163.com; * **Corresponding author**, E-mail:yw_chen@126.com, wanglei@nies.org

Sim *et al.*,2009).目前,已有多项高通量体外测试筛选研究证实四溴双酚 A 和三溴苯酚具有显著的甲状腺激素活性和雌激素效应(Kling *et al.*,2009; Strack *et al.*, 2007; Canesi *et al.*, 2005; Kitamura *et al.*,2002;2005).作为潜在的 PBT(持久性、生物蓄积性和毒性)物质,四溴双酚 A 和三溴苯酚的生物活体毒性亟需验证和补充.

近年来,针对四溴双酚 A 和三溴苯酚的水生生物毒性研究涉及藻类、丰年虫、鱼类等(Kuiper *et al.*,2007;Debenest *et al.*,2010;刘红玲等,2007),但这些研究主要集中在急性毒性效应方面,慢性毒性数据匮乏.由于四溴双酚 A 和三溴苯酚在水中的半衰期分别达到 182 d 和 50 d(Government of Canada,2013;OECD SIDS,2003),因此,这两种物质的水生生物慢性毒性、特别是内分泌干扰效应应当予以更多的关注和研究.

大型溞(*Daphnia magna Straus*)属于节肢动物门、甲壳纲、枝角类,是常见的小型浮游甲壳动物,对水环境胁迫非常敏感,是淡水食物链中不可缺少的组成成分.因大型溞具有生活周期短、生长快、生殖量高、易培养、对水环境胁迫敏感等特点使其成为国内外实验室广泛使用的水生态测试的模式生物.大型溞急性活动抑制和慢性繁殖试验结果也是欧盟、美国、日本等发达国家或地区和我国进行危险化学品分类、新化学物质危害性评估的重要指标.同时,由于溞类孤雌生殖及其生殖行为对环境胁迫的敏感性,大型溞慢性繁殖试验也成为验证化学物质对生殖系统内分泌干扰性的有效工具.然而,目前仅四溴双酚 A 对大型溞的急性毒性有所报道(Debenest *et al.*, 2010; 刘红玲等, 2007; Kuiper *et al.*,2007),四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞慢性繁殖毒性尚未得到确认.此外,生命表作为种群动态变化的记录和指示技术,已在大型溞繁殖毒性试验中获得探索性应用,其统计结果(如内禀增长率、净生殖率)可能为大型溞繁殖试验提供更加敏感的毒性指标(史文等,2009;陈艳等,2009).

评估因子法是进行化学物质生态危害初级评估的有效工具,因其数据需求少和较高的环境安全性而在欧盟、美国、日本等发达国家和我国的高环境危害类化学物质筛查中得到广泛应用.对于相同生物营养级别生物的急性毒性和慢性毒性,国内外评估因子法均对其设置不同的评估因子(或安全因子).对于四溴双酚 A 和三溴苯酚这类可能的 PBT 物质,利用评估因子法进行基于急性毒性数据和慢性毒性数据的危害评估是否能得到相似的结果,对于这类 PBT 物质的环境风险定量和管理有较大影响.

因此,本研究以大型溞为受试生物,在开展四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞急性毒性测试的基础上开展慢性繁殖毒性测试,利用生命表技术探讨两者对大型溞种群增长的影响,并对比不同毒性终点的敏感性;在此基础上利用评估因子法外推得到两种物质对水环境的预测无效应浓度(PNEC),旨在为四溴双酚 A 和三溴苯酚的生态危害评估提供基础数据;最后对比基于急性和慢性毒性数据的危害评估结果的差异性,以揭示大型溞在长期暴露情况下的敏感终点.

2　材料与方法(Materials and methods)

2.1　试验材料和仪器

试验所用大型溞(*Daphnia magna*)由本实验室驯养,驯养条件为 20~21 ℃,自然光照,采用 Elendt M4 作为驯养和试验介质.试验用溞为实验室培养的同一健康亲溞孤雌生殖 3 代以上的幼溞,溞龄 24 h 以内,为健康活泼、体型均匀的个体.以栅藻(*Scenedesumssubspicatus*)浓缩液投饵,投饵量(以碳计)为 0.1 ~0.2 mg·溞$^{-1}$·d^{-1}.

仪器:高效液相色谱串联质谱仪(LC-Agilent Technologies 1290 Infinity, MS-AB SCIEX QTRAP 4500,美国 AB 公司),生态培养箱(CLIMACELL 型,德国 MMM 公司),多功能水质参数测定仪(HQ40d,美国哈希公司),硬度计(16900 型,美国哈希公司).

试剂:四溴双酚 A 和三溴苯酚均购自百灵威试剂公司,纯度大于 97%;丙酮、乙腈均为色谱纯,购自德国 Merck 公司;氨水为色谱纯,购自国药集团;超纯水(电阻率为 18.2 MΩ·cm).

2.2　试验方法

2.2.1　TBBA 和 TBP 的稳定性分析　为确认 TBBA 和 TBP 在试验期间的稳定性、确认试验溶液更新频率,试验前分析两种物质在模拟试验条件下浓度的变化.由于 TBBA 和 TBP 较难溶于水,因此,采用丙酮助溶的方法配制试验溶液,其中,丙酮的浓度不超过 0.1‰.四溴双酚 A 和三溴苯酚均配制成 0.05 和 1.50 mg·L^{-1}两个浓度,每个浓度 3 个平行.在第 0 天和第 3 天取 5 mL 水样用乙腈稀释 1 倍进样.液质条件为:ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱(150 mm×

2.1 mm,3.5 μm,Agilent 公司,美国),ESI 源,流动相为乙腈和 0.02%氨水/水(V/V),柱温 40 ℃,流速为 0.5 mL·min^{-1},进样 5 μL.

2.2.2 大型溞急性毒性试验 参考国标"化学品 溞类急性活动抑制试验"(GB/T 21830—2008)(环境保护部化学品登记中心,2008b).预试验设置较大范围的 3 个测试浓度,得到对大型溞急性活动抑制 0~100%的受试物浓度范围.正式试验在预试验基础上设 5 个浓度,四溴双酚 A 为 5.0、6.0、7.2、8.64 和 10.37 mg·L^{-1},三溴苯酚为 1.0、1.6、2.5、3.2 和 4.0 mg·L^{-1},同时设空白对照组和助溶剂对照组.溶液配制方法与稳定性试验相同.在 100 mL 烧杯中加入 50 mL 受试物溶液,每个烧杯加入 5 只幼溞,每个浓度设 4 个平行.试验周期为 48 h,期间不投饵,不更新溶液.在试验开始后 24、48 h 时,观察记录各测试组中死亡的幼溞数.

2.2.3 大型溞慢性毒性试验 参考国标"化学品 大型溞繁殖试验"(GB/T 21828—2008)(环境保护部化学品登记中心,2008a).在急性毒性试验基础上设置 5 个浓度开展大型溞繁殖毒性试验,四溴双酚 A 和三溴苯酚均设 0.05、0.10、0.50、1.00 和 1.50 mg·L^{-1} 5 个浓度,同时设 1 个空白对照组和助溶剂对照组.溶液配制方法与急性试验相同,每个浓度设 10 个平行,每个烧杯中放入 1 只幼溞.试验开始后,每天记录死亡的亲溞数和出生的幼溞数,每 72 h 更新 1 次溶液以保证受试物浓度始终保持在初始浓度的 80%以上.每天观察亲溞繁殖率和存活率,观测周期为 44 d.在 60 d 和 90 d 时观测亲溞死亡率.

2.2.4 数据处理 急性毒性和慢性毒性的 EC_5、EC_{50}及 95%置信限采用概率单位法(Probit,SPSS17.0)进行分析(Ren *et al.*,2007).采用邓恩特检验(Dunnett′s tests,ANOVA,SPSS 17.0)多元对比分析受试组和对照组亲溞的繁殖率,确定最低显著效应浓度(LOEC)(p<0.05)与无显著效应浓度(NOEC).

大型溞的净生殖率(R_0,无量纲)、平均世代历期(T,d)及内禀增长率(r_m,无量纲)(史文等,2009)等指标的计算公式如下:

$$R_0 = l_x m_x \tag{1}$$

$$T = \frac{\sum x l_x m_x}{\sum l_x m_x} \tag{2}$$

$$r_m = \frac{\ln R_0}{T} \tag{3}$$

$$l_x = n_x / n_0 \ , \ m_x = c_x / n_{x-1} \tag{4}$$

式中,x 为日龄,n_x为 x 龄的存活个数,c_x为 x 龄组个体产生的雌性后代数.

PNEC 外推方法:利用本试验数据和文献调研数据,采用评估因子法(OECD,2011)对预测无效应浓度(PNEC)进行外推,即用最敏感生物的毒性数据除以适当的评价因子即得到 PNEC.评估因子选择见表 1.

表 1 推导水环境系统 PNEC 的数据要求和评估因子

Table 1 Assessment factors of aquatic toxicity data for estimating a PNEC

数据要求	评估因子
3 个营养级别生物每一级至少有 1 项短期 LC_{50}(EC_{50})	1000
1 项长期实验的 NOEC	100
2 个营养级别的 2 个种的长期 NOEC	50
3 个营养级别的至少 3 个种的长期 NOEC	10
野外数据或模拟生态系统	视情况而定(1~5)

3 结果和分析(Results and analysis)

3.1 TBBA 和 TBP 稳定性

四溴双酚 A(TBBA)和三溴苯酚(TBP)的稳定性分析结果见图 1.由图中可以看到,四溴双酚 A 和

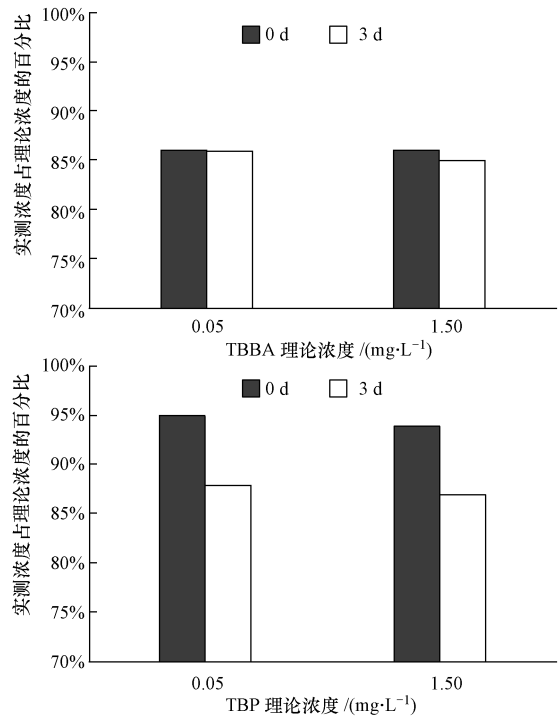


图 1 四溴双酚 A 和三溴苯酚的稳定性

Fig.1 Stability of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol

三溴苯酚试验溶液 0~72 h 的实测浓度都在设定值的 85%以上.因此,采用静态法开展 48 h 急性毒性试验、采用 72 h 更新溶液的半静态法开展长期繁殖毒性试验可以确保 TBBA 和 TBP 浓度的相对稳定.

3.2　大型溞的急性毒性效应

四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的急性抑制试验结果见表 2.试验过程中溶液 pH 在 7.7~8.2 范围内,溶解氧保持在饱和溶解氧的 88%~98%之间,温度控制在 20.1~21.5 ℃.大型溞的幼溞接触不同浓度四溴双酚 A 和三溴苯酚后活动受到明显抑制.三溴苯酚对大型溞的急性毒性比四溴双酚 A 略强,其中,四溴双酚 A 对大型溞的 48 h-LC_{50} 为 8.59 mg·L^{-1},三溴苯酚对大型溞的 48 h-LC_{50} 为 3.56 mg·L^{-1}.

表 2　四溴双酚 A 和三溴苯对大型溞的急性毒性

Table 2　Acute toxicity of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol to *D.magna*.

物质	暴露时间/h	概率单位-浓度对数方程	LC_5/(mg·L^{-1})	LC_{50}/(mg·L^{-1})	可决系数 R^2	LC_5 95%置信区间/(mg·L^{-1})	LC_{50} 95%置信区间/(mg·L^{-1})
TBBA	24	y= −15.62+16.18x	7.31	9.24	0.898	6.93~7.60	9.01~9.49
	48	y= −19.87+21.28x	7.19	8.59	0.996	6.89~7.42	8.41~8.77
TBP	24	y= −3.66+6.12x	2.14	3.97	0.988	1.91~2.33	3.76~4.20
	48	y= −3.54+6.72x	1.91	3.56	0.988	1.71~2.08	3.20~3.53

注:y 为几率值(单位为 1),x 为暴露浓度的对数值(lg$c$),下同.

3.3　大型溞慢性毒性效应

3.3.1　四溴双酚 A 和三溴苯酚对亲溞存活的影响

以龄期为横坐标,亲溞存活数(n_x)的对数为纵坐标作存活曲线(Martínez-Jerónimo *et al.*,2013).大型溞在不同浓度四溴双酚 A 和三溴苯酚暴露下的死亡率和存活曲线见图2和图3.空白对照组(ck)和

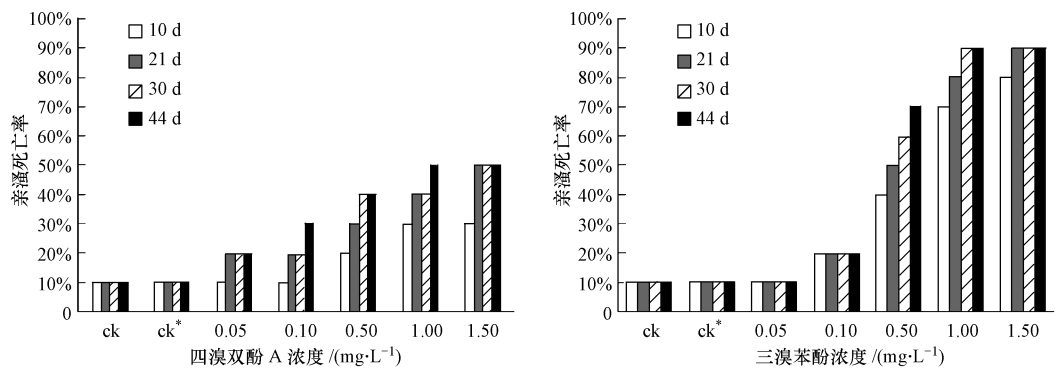


图 2　四溴双酚 A 和三溴苯酚对亲溞死亡率的影响(＊助溶剂对照组)

Fig.2　Effect of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol on the mortality of *D.magna*.

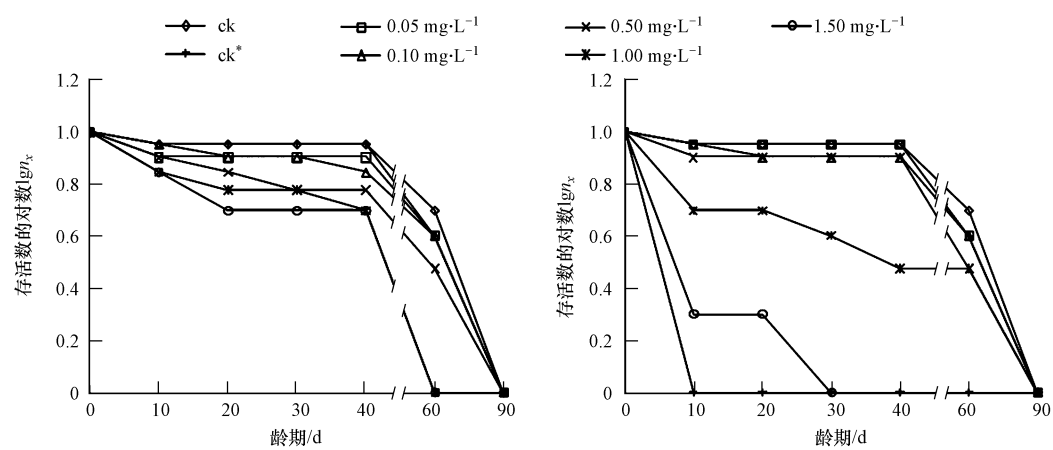


图 3　不同四溴双酚 A 和三溴苯酚浓度下亲溞的存活曲线(＊助溶剂对照组)

Fig.3　Survivorship curves of *D.magna*. exposed to different doses of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol

助溶剂对照组(ck*)均出现亲溞意外死亡,但 21 d 死亡率不超过 20%,因此,仍符合 OECD 大型溞繁殖毒性测试的有效性标准,本试验结果有效.由图 2 可以看出,随着四溴双酚 A 浓度的升高,亲溞死亡率不断上升,在最高浓度 1.50 mg·L^{-1}作用下,亲溞 44 d 的死亡率为 50%.当三溴苯酚浓度为 0.05 和 0.10 mg·L^{-1}时,亲溞在 10 d 内出现死亡,当三溴苯酚浓度由 0.10 mg·L^{-1}上升到 0.50 mg·L^{-1}时,亲溞死亡率明显增加,到 44 d 时,最高浓度(1.5 mg·L^{-1})下亲溞的死亡率为 90%,远大于暴露于同样浓度四溴双酚 A 中亲溞的死亡率.由此可见,三溴苯酚对大型溞的毒性高于四溴双酚 A,四溴双酚 A 和三溴苯酚对亲溞死亡率具有显著的浓度-效应关系,但同一浓度下的亲溞死亡率随暴露时间的延长并未有一致的增长规律.这可能是由于亲溞对毒性暴露产生的适应和抗性所致(Debenest *et al.*,2010).

由图 3 可以直观地看出,同对照相比,0.50 mg·L^{-1}及以上浓度的四溴双酚 A 和三溴苯酚均显著改变了大型溞的存活曲线:虽然不同四溴双酚 A 浓度下大型溞的存活曲线均为"凸"型,但高浓度下大型溞早期的死亡率更高;三溴苯酚对亲溞存活曲线的改变更为明显,当浓度大于 0.50 mg·L^{-1}时,存活曲线从对照的"凸"型变为了"凹"型.

表 3 中为 10、21、30 和 44 d 时四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的 5%致死浓度(LC_5)和半数致死浓度(LC_{50}).

表 3 四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的慢性毒性

Table 3 Chronic toxicity of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol to *D.magna*.

物质	暴露时间/d	概率单位-浓度对数方程	LC_5/(mg·L^{-1})	LC_{50}/(mg·L^{-1})	可决系数 R^2	LC_5 95%置信区间/(mg·L^{-1})	LC_{50} 95%置信区间/(mg·L^{-1})
TBBA	10	$y=-0.64+0.56x$	0.016	-	0.898	0.001~0.047	-
	21	$y=-0.27+0.56x$	0.004	-	0.881	0~0.014	-
	30	$y=-0.13+0.57x$	0.002	-	0.930	0~0.009	-
	44	$y=-0.059+0.58x$	0.002	-	0.932	0~0.008	-
TBP	10	$y=0.57+1.42x$	0.027	0.40	0.975	0.015~0.041	0.32~0.48
	21	$y=0.78+1.61x$	0.031	0.33	0.947	0.019~0.044	0.27~0.39
	30	$y=0.98+1.77x$	0.033	0.28	0.978	0.022~0.046	0.24~0.33
	44	$y=1.04+1.82x$	0.033	0.27	0.897	0.022~0.046	0.23~0.32

注:"-"表示因受试组亲溞最高死亡率未超出 50%,本计算方法无法得出准确 LC_{50} 值.

3.3.2 四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞繁殖的影响 通过 SPSS 多元对比分析对照组和受试组大型溞的繁殖数量,发现 0.50 mg·L^{-1}及更高浓度组繁殖量与对照组有显著差异($p=0.001$).由此得到四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞 21 d 繁殖的最低可观测浓度(LOEC)均为 0.50 mg·L^{-1},无可观测效应浓度(NOEC)均为 0.10 mg·L^{-1}.根据 44 d 内各浓度组亲溞的繁殖数量和幼溞出生时间计算了四溴双酚 A 和三溴苯酚暴露下大型溞的内禀增长率、净生殖率和世代时间,结果如图 4 和图 5 所示.由图 4 可以看到,当四溴双酚 A 浓度大于 0.10 mg·L^{-1}时,内禀增长率和净生殖率下降;而当四溴双酚A浓度大于

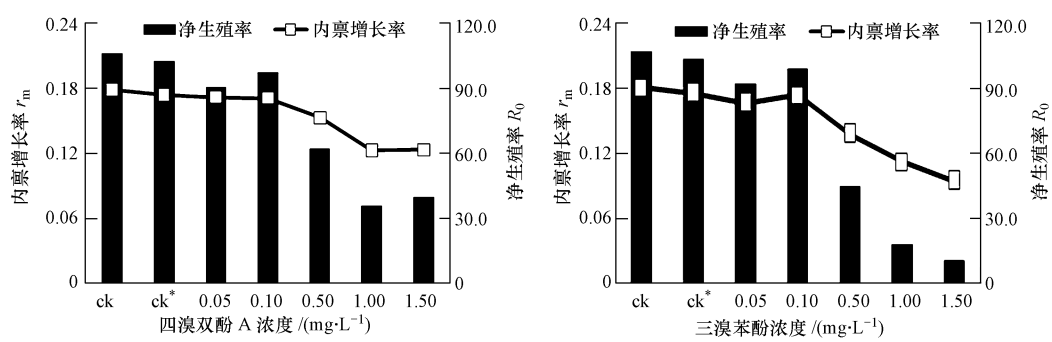


图 4 四溴双酚 A 和三溴苯酚对亲溞内禀增长率和净生殖率的影响(*助溶剂对照组)

Fig.4 Effects of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol on the intrinsic rate of population growth and the net eproductive rate of *D.magna*.

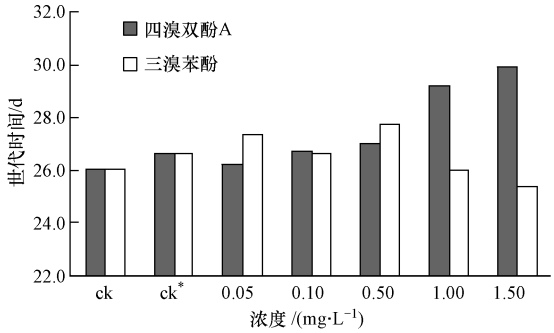


图 5　四溴双酚 A 和三溴苯酚对亲溞世代时间的影响(* 助溶剂对照组)

Fig.5　Effects of Tetrabromobisphenol A and Tribromophenol on the generation time of *D.magna*.

0.50 mg·L^{-1}时,大型溞种群的世代时间从空白对照组的 26 d 增加到最高浓度下的 30 d.同样在低浓度的三溴苯酚暴露下,亲溞的内禀增长率和净生殖率和对照相比变化不大,浓度大于 0.10 mg·L^{-1}时开始下降;而世代时间总的趋势是随着三溴苯酚浓度的升高而降低,在最高浓度时世代时间最短,为 25.3 d,其原因有待进一步研究.

以亲溞 21 d 的内禀增长率(r_m)、净生殖率(R_0)和繁殖数量(R)为终点,得到四溴双酚 A 和三溴苯酚的 EC_5及 95%置信区间如表 4 所示.

表 4　四溴双酚 A 和三溴苯酚对亲溞的繁殖毒性

Table 4　Population-level toxicity of TBBA and TBP to *D.magna*. at 21 days exposure

物质	终点	概率单位-浓度对数方程	EC_5/(mg·L^{-1})	可决系数 R^2	EC_5 95%置信区间/(mg·L^{-1})
TBBA	r_m	$y=-0.18+1.22x$	0.062	0.853	0.032~0.098
	R_0	$y=0.87+0.96x$	0.002	0.908	0.001~0.006
	R	$y=0.61+1.09x$	0.009	0.819	0.004~0.016
TBP	r_m	$y=0.30+1.58x$	0.058	0.921	0.029~0.092
	R_0	$y=1.21+1.75x$	0.023	0.921	0.015~0.033
	R	$y=1.00+2.64x$	0.099	0.792	0.072~0.127

3.4　PNEC 外推结果

用于外推 PNEC 的急性和慢性毒性数据及外推结果见表 5~6,鱼类和藻类的数据来自美国 ECOTOX 毒性数据库(http://cfpub.epa.gov/ecotox/)和 OECD eChemPortal-全球化学物质有害信息在线查询通道(http://www.echemportal.org/).由表 5 可以看出,在急性毒性测试中,对四溴双酚 A 最敏感的物种是斑马鱼,其 96h-LC_{50} 为 3.18 mg·L^{-1},对三溴苯酚最敏感的物种是羊角月牙藻,其 72 h-EC_{50}为 0.76 mg·L^{-1},选择评估因子 1000,得到四溴双酚 A 和三溴苯酚的预测无效应浓度分别为 3.18 和 0.76 μg·L^{-1}.在慢性毒性测试中,对四溴双酚 A 和三溴苯酚最敏感的物种均为大型溞,以净生殖率为测试终点的21d-EC_5分别为0.002和

表 5　推导四溴双酚 A 预测无效应浓度的毒性数据

Table 5　Toxicity data used to estimate PNEC of TBBA

	物种	测试终点	毒性终点	数值/(mg·L^{-1})	评估因子	PNEC/(μg·L^{-1})
急性毒性	羊角月牙藻 *Selenastrum capricornutum*	生长	72h-EC_{50}	>5.6[a]	1000	3.18
	大型溞 *Daphnia magna*	死亡	48h- LC_{50}	8.59		
	斑马鱼 *Danio rerio*	死亡	96h- LC_{50}	3.18[b]		
慢性毒性	黑头呆鱼 *Pimephales promelas*	体长	35d-NOEC	0.16[a]	10	0.20
	皮菱形藻 *Nitzschia palea*	生长	72h-NOEC	2.61[c]		
	大型溞 *Daphnia magna*	生殖量	21d-NOEC	0.1		
		生殖量	21d-EC_5	0.009		
		内禀增长率	21d-EC_5	0.062		
		净生殖率	21d-EC_5	0.002		

注:a.OECD,2012;选择标准:温度、pH 及溶氧等理化性质严格控制,试验用鱼处于幼龄;b.Kuiper *et al.*,2007;选择标准:温度、pH 及溶氧等理化性质严格控制;c.Debenest *et al.*,2011;选择标准:温度、pH 及溶氧等理化性质严格控制.

表 6 推导三溴苯酚预测无效应浓度的毒性数据

Table 6 Toxicity data used to estimate PNEC of TBP

	物种	测试终点	毒性终点	数值/($mg \cdot L^{-1}$)	评估因子	PNEC/($\mu g \cdot L^{-1}$)
急性毒性	羊角月牙藻 *Selenastrum capricornutum*	生长	72h-EC_{50}	0.76[a]	1000	0.76
	大型溞 *Daphnia magna*	死亡	48h- LC_{50}	3.56		
	黑头呆鱼 *Pimephales promelas*	死亡	96h- LC_{50}	6.25[b]		
慢性毒性	羊角月牙藻 *Selenastrum capricornutum*	生长	72h-NOEC	0.22[a]	50	0.46
	大型溞 *Daphnia magna*	生殖量	21d-NOEC	0.10		
		生殖量	21d-EC_5	0.099		
		内禀增长率	21d-EC_5	0.058		
		净生殖率	21d-EC_5	0.023		

注:a.OECD SIDS,2003;选择标准:温度、pH 及溶氧等理化性质严格控制;b.Broderius *et al.*,1995;选择标准:温度、pH 及溶氧等理化性质严格控制.

0.023 $mg \cdot L^{-1}$,选择评估因子 10 和 50,得到四溴双酚 A 和三溴苯酚的预测无效应浓度分别为 0.20 和 0.46 $\mu g \cdot L^{-1}$.

4 讨论(Discussion)

毒性终点 EC_x/LC_x 是根据浓度-效应曲线得到的在试验时间内引起 x%供试生物产生毒性响应/死亡的毒物浓度;而毒性终点 NOEC 则是假定存在的一个剂量浓度阈值,毒物低于此浓度即观察不到显著毒性影响,该阈值一般以 5%显著性水平的方差分析等统计方法获取.但由于并非所有化学物质的所有毒性终点都存在上述剂量浓度阈值,因此,NOEC 也可以由浓度-效应曲线的临界效应浓度取代,如 EC_5(LC_5)或 EC_{10}(LC_{10})(Van Leeuwen *et al.*, 2007).本研究针对四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞 24~48 h 急性毒性和 10~44 d 慢性毒性,对比了这两种物质对亲溞的短期和长期存活毒性(LC_{50}/LC_5),以及不同的慢性毒性终点(包括以繁殖量毒性影响的 NOEC、繁殖量、内禀增长率和净生殖率毒性影响的 EC_5).结果表明,四溴双酚 A 和三溴苯酚的 10~44 d 存活毒性 LC_{50}和 LC_5分别比 24~48 h 存活毒性 LC_{50}和 LC_5低 1 个和 2 个数量级,两者的 21 d 敏感繁殖毒性终点 EC_5(内禀增长率、净生殖率)均比 48 h 急性毒性 LC_{50}低 2 个数量级.因此,四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的慢性致毒作用相比急性毒性作用确实更应引起关注.

在慢性毒性测试中,四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞以内禀增长率和净生殖率毒性影响的 EC_5均低于其对繁殖量毒性影响的 NOEC,四溴双酚 A 对繁殖量毒性影响的 EC_5远低于 NOEC,而三溴苯酚对繁殖量毒性影响的 EC_5约等于 NOEC.这说明对于四溴双酚 A 和三溴苯酚而言,不会引起“统计显著”效应的浓度水平在长期暴露下依然会引发一定程度上的响应.

根据生态学理论,内禀增长率是指具有稳定年龄结构的种群,在食物与空间不受限制、环境中没有天敌、并在某一特定的环境条件下,种群的最大瞬时增长率.内禀增长率决定于种群的生育力、寿命和发育速率,是存活和繁殖的综合指标,而净生殖率则表示种群经过一个世代以后数量的净增长率(Xi *et al.*, 2005).本研究得出的四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞净生殖率毒性影响 EC_5值均低于以内禀增长率和生殖量为毒性终点的 EC_5或 NOEC 值,同时净生殖率与两种物质浓度呈现剂量-效应关系.这揭示了净生殖率可能更适于作为四溴双酚 A 和三溴苯酚等疑似生殖干扰作用物质的毒性终点,可以更好地揭示化学物质的生物繁殖毒性,这与胡方华等(2012)和吕林兰等(2012)的研究结果相似.

基于四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞急性和慢性毒性的测试结果,本研究使用评估因子法分别外推两种物质对水环境的预测无效应浓度(PNEC).鉴于 REACH 法规推荐的评估因子法对生物毒性数据的需求,本研究在推导 PNEC 时同时参考文献调研数据.从结果来看,基于慢性毒性数据的 PNEC 普遍低于基于急性毒性数据的 PNEC 值.

5 结论(Conclusions)

1)四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞的慢性毒性作用相比急性毒性作用更应引起关注:四溴双酚 A 和三溴苯酚的 10~44 d 慢性存活毒性 LC_{50}和 LC_5分别比 24~48 h 急性毒性 LC_{50}和 LC_5低 1 个和 2 个数量级.

2)四溴双酚 A 和三溴苯酚对大型溞以内禀增长率和净生殖率毒性影响的 EC_5 均低于其对繁殖量毒性影响的 NOEC,净生殖率毒性影响的 EC_5 值低于以内禀增长率和生殖量为毒性终点的 EC_5.以繁殖量、内禀增长率和净生殖率毒性危害的 EC_5 值作为大型溞繁殖毒性指标可能更能敏感地表征化学品对溞类的危害.

3)对四溴双酚 A 和三溴苯酚而言,基于慢性毒性数据的 PNEC 低于基于急性毒性数据的 PNEC 值.采用以慢性毒性数据为基础的危害评估结果可以较好地保护物种种群的安全.

责任作者简介:陈英文(1977—),男,博士,副教授,主要从事环境科学及工程的研究.E-mail: yw_chen@126.com.

王蕾(1983—),女,助理研究员,主要从事生态毒理学研究.E-mail:wanglei@nies.org.

参考文献(References):

Broderius S J, Kahl M D, Hoglund M D. 1995. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(9): 1591-1605

Canesi L, Lorusso L C, Ciacci C, *et al*. 2005. Effects of the brominated flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on cell signaling and function of Mytilus hemocytes: Involvement of MAP kinases and protein kinase C[J]. Aquatic Toxicology, 75(3): 277-287

陈艳,席贻龙,何忠文.2009.艾氏剂对连续三个世代多刺裸腹溞生命表统计学参数的影响[J].生态学报,29(10): 5358-5365

Debenest T, Gagné F, Petit A N, *et al*. 2010. Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 152(4): 407-412

Duchet C, Coutellec M A, Franquet E, *et al*. 2010. Population-level effects of spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*: comparison of laboratory and field microcosm exposure conditions[J]. Ecotoxicology, 19(7): 1224-1237

Government of Canada. 2013. Screening Assessment Report [EB/OL]. 2013-11-29. http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp? lang=En&n=BEE093E4-1#toc8

Greens T, Roosens L, Neels H, *et al*. 2009. Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium[J]. Chemosphere, 76(6): 755-760

环境保护部化学品登记中心.2008a.GB/T 21828-2008 化学品 大型溞繁殖试验[S].北京: 中国标准出版社

环境保护部化学品登记中心.2008b.GB/T 21830-2008 化学品 溞类急性活动抑制试验[S].北京: 中国标准出版社

胡方华,宋文华,丁峰,等.2012.三唑酮对大型溞 21 天慢性毒性效应[J].生态毒理学报,7(2): 162-170

Johnson-Restrepo B, Adams D H, Kannan K. 2008. Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecanes (HBCDs) in tissues of humans, dolphins, and sharks from the United States [J]. Chemosphere, 70(11): 1935-1944

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

Kitamura S, Kato T, Iida M, *et al*. 2005. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis[J]. Life Sciences, 76(14): 1589-1601

Kling P, Förlin L. 2009. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(7): 1985-1993

Kuiper R V, Van den Brandhof E J, Leonards P E G, *et al*. 2007. Toxicity of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in zebrafish (*Danio rerio*) in a partial life-cycle test[J]. Archives of Toxicology, 81(1): 1-9

Labadie P, Tlili K, Alliot F, *et al*. 2010. Development of analytical procedures for trace-level determination of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A in river water and sediment[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396(2): 865-875

刘红玲,刘晓华,王晓祎,等.2007.双酚 A 和四溴双酚 A 对大型溞和斑马鱼的毒性[J].环境科学,28(8): 1784-1787

吕林兰,杨家新,匡腾蛟,等.2012.氟他胺对萼花臂尾轮虫的毒性影响[J].淡水渔业,42(4): 63-65; 90

Martínez-Jerónimo F, Arzate-Cárdenas M, Ortiz-Butrón R. 2013. Linking sub-individual and population level toxicity effects in *Daphnia schoedleri* (Cladocera: Anomopoda) exposed to sublethal concentrations of the pesticide α-cypermethrin[J]. Ecotoxicology, 22(6): 985-995

OECD. 2011. Assessment of Chemicals Chapter 4. Initial Assessment of Data[EB/OL]. 2012-12-01. http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/chapter4initialassessmentofdata.htm

OECD. 2012. SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE[EB/OL]. 2012-08-01. http://webnet.oecd.org/Hpv/UI/SIDS_Details.aspx? id=5FB50F2D-FC85-4B33-887E-6D75937423F3

OECD, SIDS. 2003. 2, 4, 6-Tribromophenol [EB/OL]. 2013-11-11. http://webnet.oecd.org/Hpv/UI/SIDS_Details.aspx? id=127E2BB6-A158-412B-88BD-3DB4183A1F5A

Ren Z M, Zha J M, Ma M, *et al*. 2007. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 134(1/3): 373-383

史文,刘其根,吴晶,等.2009.不同藻类对大型溞存活和生殖的影

响[J].生态学杂志,28(6): 1128-1133

Sim W J, Lee S H, Lee I S, *et al*. 2009. Distribution and formation of chlorophenols and bromophenols in marine and riverine environments [J].Chemosphere,77(4): 552-558

Strack S, Detzel T, Wahl M, *et al*.2007.Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells [J].Chemosphere,67(9): S405-S411

Suter II G W.2006. Ecological Risk Assessment[M]. New York: CRC Press.329-330

USEPA.ECOTOX Database[EB/OL].http://cfpub.epa.gov/ecotox/

Van Leeuwen C J, Vermeire T G. 2007. Risk Assessment of Chemicals [M].The Netherlands: Springer Science & Business.217-218

Xi Y L, Hagiwara A, Sakakura Y.2005. Combined Effects of Food Level and Temperature on Life Table Demography of Moina macrocopaStraus (Cladocera) [J]. International Review of Hydrobiology,90(5/6): 546-554

Yang S W, Wang S R, Liu H L, *et al*.2012.Tetrabromobisphenol A: tissue distribution in fish, and seasonal variation in water and sediment of Lake Chaohu, China [J]. Environmental Science and Pollution Research,19(9): 4090-4096

杨苏文,王圣瑞,闫振广,等.2012.四溴双酚 A 在 5 种巢湖鱼类体内的组织分布与生物浓缩因子研究[J].环境科学,33(6): 1852-1857

赵明东.2013.洱海环境介质中四溴双酚 A 的暴露研究[D].长沙: 长沙理工大学