

网络出版时间:2012-09-25 10:09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120925.1009.035.html>

双酚 A 与对硝基酚对泥鳅的联合毒性效应

雷 忻, 孙志宏, 延志莲, 苑彩霞

(延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000)

【摘 要】 【目的】探讨双酚 A(bisphenol A, BPA)与对硝基酚(p-Nitrophenol, p-NP)对泥鳅(*Misgurnus anguillicadatus*)的联合毒性效应, 为评价酚类化合物对水生生物的毒害作用提供理论依据。**【方法】**根据预试验确定的 BPA、p-NP 对泥鳅的最大耐受质量浓度和最小全致死质量浓度, 按等对数(常用对数)间距将 BPA 与 p-NP 分别设置 5 个质量浓度(BPA: 4.8, 5.8, 6.9, 8.3, 10.0 mg/L; p-NP: 11.6, 13.6, 15.8, 18.4, 21.5 mg/L)处理泥鳅, 同时设空白对照(加蒸馏水), 每处理 3 个重复, 每个重复放置 10 条泥鳅, 试验开始后, 连续 8 h 观察泥鳅的活动、中毒情况及体色变化, 每 24 h 统计 1 次泥鳅的死亡率, 计算 24, 48, 72 和 96 h 泥鳅的半数致死浓度(LC₅₀)。按 BPA 与 p-NP 单一毒性 96 h LC₅₀值进行毒性 1:1 的联合毒性试验, 并采用 Marking 水生毒理联合毒性相加指数(AI)法评价 2 种化合物对泥鳅的联合毒性效应。**【结果】**24, 48, 72 和 96 h 时, BPA 对泥鳅的 LC₅₀ 分别为 8.31, 8.02, 6.95 和 6.43 mg/L, p-NP 对泥鳅的 LC₅₀ 分别为 19.25, 17.58, 17.04 和 14.70 mg/L。不同染毒时间下, BPA 与 p-NP 对泥鳅的联合毒性作用 AI 均小于 0, 且随着时间的延长, AI 的绝对值逐渐变小。**【结论】**BPA 与 p-NP 均为高毒性污染物, 且前者比后者的毒性更大; 二者的联合作用表现为拮抗作用, 并且随着作用时间的延长拮抗作用逐渐减弱。

【关键词】 双酚 A; 对硝基酚; 泥鳅; 联合毒性; 拮抗作用

【中图分类号】 X171.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)10-0093-04

Joint toxicity of bisphenol A and p-Nitrophenol on *Misgurnus anguillicadatus*

LEI Xin, SUN Zhi-hong, YAN Zhi-lian, YUAN Cai-xia

(College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract: 【Objective】 This paper studied the joint toxicity of bisphenol A and p-Nitrophenol to *Misgurnus anguillicadatus*, which can offer reference for evaluating toxicity of phenolic compound to hydrobiont. **【Method】** In the single toxic tests, according to the maximum tolerance concentration and the minimal lethal concentration of bisphenol A and p-Nitrophenol to *Misgurnus anguillicadatus* in preliminary tests, the five mass concentrations of bisphenol A (4.8, 5.8, 6.9, 8.3, 10.0 mg/L) and p-Nitrophenol (11.6, 13.6, 15.8, 18.4, 21.5 mg/L) were set up, respectively, and LC₅₀ of 24, 48, 72 and 96 h to *Misgurnus anguillicadatus* was calculated. The joint toxic tests were done using the same methods with the single toxic tests, and the Marking's additive index method was taken to evaluate the joint toxicity of bisphenol A and p-Nitrophenol to *Misgurnus anguillicadatus*. **【Result】** The single toxic tests showed that LC₅₀ of 24, 48, 72 and 96 h for bisphenol A to *Misgurnus anguillicadatus* was 8.31, 8.02, 6.95 and 6.43 mg/L, respectively. That for p-Nitrophenol was 19.25, 17.58, 17.04 and 14.70 mg/L, respectively. The joint toxicity of bisphenol A and p-Nitrophenol was antagonism because the values of AI were less than zero at 24, 48, 72 and 96

【收稿日期】 2012-02-29

【基金项目】 教育部科学技术研究重点项目(206148); 陕西省自然科学基金研究计划项目(2012JM3012); 延安市科技局专项(YAKY200701); 生态学陕西省重点学科专项

【作者简介】 雷 忻(1972—), 女, 陕西延安人, 副教授, 博士, 主要从事环境毒理学及生态学研究。E-mail: leizz66@126.com

h, and the absolute values of *AI* decreased with the increasing exposure time. 【Conclusion】 Both bisphenol A and p-Nitrophenol had high toxicity to *Misgurnus anguillicadatus*, and bisphenol A had higher toxicity than p-Nitrophenol. The joint toxicity of bisphenol A and p-Nitrophenol was antagonistic which weakened with the increasing exposure time.

Key words: bisphenol A; p-Nitrophenol; *Misgurnus anguillicadatus*; joint toxicity; antagonism

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 和对硝基酚 (p-Nitrophenol, p-NP) 作为重要的化工原料, 被广泛应用于生产增塑剂、抗氧化剂、农药、染料、涂料等精细化工产品。BPA 和 p-NP 具有易富集、难降解等特点, 其引发的毒性可以通过食物链传递和放大, 除可对水生生物产生毒害作用外, 还可进一步危害陆生动物、鸟类和人类的健康, 是当今水环境污染中最常见的环境内分泌干扰物^[1-3]。

泥鳅 (*Misgurnus anguillicadatus*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鳅科 (Cobitidae) 泥鳅属 (*Misgurnus*)^[4], 系一种小型淡水鱼, 适应于淤泥、水体 2 种栖息环境, 抗病能力较强, 食性广, 易于驯养, 是一种良好的可用以检测土壤与水域环境污染的动物^[5]。近年来, 关于 BPA 与 p-NP 对鱼类的毒性作用已有一些报道, 但多集中于单一毒性以及 BPA 与其他酚类化合物的联合毒性作用方面^[6-10], 而有关 BPA 与 p-NP 联合毒性效应则鲜见报道。本研究以泥鳅为试验动物, 分析 BPA 与 p-NP 的急性单一毒性效应和联合毒性效应, 以期评价酚类污染物对水生生物的联合毒性作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用泥鳅购于延安市农贸市场, 在室温下, 用经 3 d 自然脱氯自来水驯养 2 周后, 挑选健康、强壮者用于试验, 试验前 1 d 和试验期间停止喂食。受试泥鳅体质量为 (11.0 ± 2.0) g/尾, 体长为 (12.0 ± 2.0) cm。

BPA, 分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。p-NP, 分析纯, 购自北京化工厂。

1.2 单一毒性试验

在正式试验之前先进行 2 次预试验, 确定 BPA 和 p-NP 的最大耐受质量浓度和最小全致死质量浓度。在最大耐受质量浓度和最小全致死质量浓度范围内, 按等对数 (常用对数) 间距, 将 BPA 与 p-NP 分别设置 5 个质量浓度处理 (BPA: 4.8, 5.8, 6.9, 8.3, 10.0 mg/L; p-NP: 11.6, 13.6, 15.8, 18.4, 21.5 mg/L), 同时设空白对照 (加蒸馏水), 每个处理设 3

个重复, 每个重复放置 10 条泥鳅。试验开始后, 连续 8 h 观察泥鳅的活动、中毒情况及体色变化; 每 24 h 统计 1 次泥鳅的死亡数, 更换 1 次受试药液, 以保证药液溶氧量、pH、水温及其他理化指标的稳定^[11], 并及时捞出死亡泥鳅, 计算死亡率, 试验共进行 96 h。应用概率单位法^[12] 计算各时间点的半致死浓度 (LC_{50}) 及其 95% 置信区间。

1.3 联合毒性试验

在单一毒性试验的基础上, 以单一化合物 96 h 的 LC_{50} 值作为一个毒性单位, 按照毒性单位 1:1 的混合比例和等对数 (常用对数) 间距 (参照毒性较大的物质设计), 设置 5 个不同的质量浓度组合 (BPA + p-NP 的质量浓度 (mg/L) 分别为: 2.07 + 4.81, 2.77 + 1.60, 4.15 + 9.62, 5.82 + 13.47, 6.65 + 15.40) 进行试验, 试验方法及其各时间点的 LC_{50} 值计算方法见文献^[13-14]。

根据单一毒性和联合毒性的试验结果, 采用 Marking 水生毒理联合效应相加指数 (Additive index, *AI*) 法^[15-16], 对 BPA 和 p-NP 的联合毒性进行评价。用下式计算生物毒性相加作用之和 (*S*):

$$S = (Am/A_1) + (Bm/B_1)。$$

式中: A_1 、 B_1 分别为 A、B 毒物的 LC_{50} 值; Am 、 Bm 分别为混合物中各毒物的 LC_{50} 。将 *S* 转换成相加指数 *AI*: 当 $S \leq 1$ 时, $AI = (1/S) - 1.0$; 当 $S > 1$ 时, $AI = -S + 1.0$ 。用 *AI* 评价毒物的联合效应, $AI > 0$ 为协同作用, $AI < 0$ 为拮抗作用, $AI = 0$ 为相加作用。

2 结果与分析

2.1 BPA、p-NP 对泥鳅的单一毒性

泥鳅在 2 种化合物中的中毒症状较为相似, 具体表现为: 游泳失衡, 在水中侧翻、打转, 并逐渐丧失运动能力, 呼吸减弱, 最后死亡, 死亡鱼体肛门、鳍的基部及鳃丝均出现中毒充血现象; BPA 中毒死亡鱼体呈红色, p-NP 中毒死亡鱼体呈黄色。对照处理泥鳅在试验期间未见死亡。

由表 1 可见, 泥鳅在 2 种化合物中的死亡几率与质量浓度常用对数之间具较好的相关性, 对相关

系数(R^2)的显著性检验表明,相关性均达显著水平,说明泥鳅在 2 种化合物中的死亡几率与其质量浓度常用对数之间存在显著的线性相关性。由表 1 还可见,对于同一种化合物而言,随着染毒时间的延长,泥鳅 LC_{50} 逐渐降低(24,48,72,96 h BPA 的 LC_{50} 分别为 8.31,8.02,6.95,6.43 mg/L;p-NP 的

LC_{50} 分别为 19.25,17.58,17.04,14.70 mg/L);且 BPA 的半致死浓度低于 p-NP,其安全浓度($SC=2.24$ mg/L)也低于 p-NP($SC=4.40$ mg/L)。说明 BPA 对泥鳅的毒性大于 p-NP。根据文献[17]的判定标准,可知 BPA 和 p-NP 均属于高毒污染物。

表 1 BPA 与 p-NP 对泥鳅的单一毒性效应						
Table 1 Single toxicity of BPA and p-NP on <i>Misgurnus anguillicadatus</i>						
受试药物 Compound	暴露时间/h Exposure time	回归方程 Regression equation	相关系数(R^2) Correlation coefficient	半致死浓度(LC ₅₀)/(mg·L ⁻¹) Median lethal concentration		安全浓度(SC)/(mg·L ⁻¹) Safe concentration
				测定值 Value	95%置信区间 95%credibility range	
BPA	24	$y=16.790x-10.444$	0.866 *	8.31	5.30~9.09	2.24
	48	$y=16.978x-10.348$	0.819 *	8.02	5.24~9.01	
	72	$y=8.853x-2.455$	0.909 *	6.95	5.31~9.03	
	96	$y=12.352x-4.986$	0.875 *	6.43	5.61~9.08	
p-NP	24	$y=24.469x-26.431$	0.894 5 *	19.25	17.17~20.93	4.40
	48	$y=22.453x-22.951$	0.907 7 *	17.58	15.35~19.94	
	72	$y=23.107x-23.457$	0.877 5 *	17.04	15.56~19.82	
	96	$y=15.625x-13.244$	0.935 9 *	14.70	11.48~17.96	

注:回归方程中, x 为药物质量浓度的常用对数值, y 为泥鳅死亡几率;* 表示显著相关($P<0.05$)。
Note:In the regression equations, x represents common logarithm value of compound mass concentration, y represents death probability of *Misgurnus anguillicadatus*. * Represents remarkably significant difference($P<0.05$).

2.2 BPA 与 p-NP 对泥鳅的联合毒性

由表 2 可知,在 BPA 和 p-NP 对泥鳅的联合毒性试验中,随着暴露时间的延长,2 种化合物的 LC_{50} 均逐渐下降;暴露时间为 24,48,72 和 96 h 时,S 值

均大于 1,对应的 AI 值分别为-0.41,-0.31,-0.27和-0.10,均小于 0,说明 2 种化合物表现为相互拮抗作用,且随着暴露时间的延长,AI 的绝对值逐渐变小,拮抗作用逐渐减弱。

表 2 BPA 与 p-NP 对泥鳅的联合毒性效应					
Table 2 The joint toxicity of BPA and p-NP on <i>Misgurnus anguillicadatus</i>					
暴露时间/h Exposure time	LC_{50} /(mg·L ⁻¹)		S	AI	作用方式 Action
	BPA	p-NP			
24	5.91	13.49	1.41	-0.41	拮抗 Antagonism
48	5.15	11.75	1.31	-0.31	拮抗 Antagonism
72	4.57	10.47	1.27	-0.27	拮抗 Antagonism
96	3.56	8.13	1.10	-0.10	拮抗 Antagonism

3 讨 论

在水体环境污染中,几种酚类化合物经常共存于水体中,因此仅采用单一污染物毒性试验往往不能准确而有效地反映某种污染物在多种污染物共存时的危害。在单一毒性试验的基础上,检测多种污染物之间的联合毒性效应,并将单一毒性效应与联合毒性效应结合起来进行综合分析,对于准确评价污染物的危害具有更重要的价值[18]。

评价环境污染物对水生生物单一毒性时,一般以 LC_{50} 值作为评价的依据。依据 96 h 的 LC_{50} ,可将化合物对鱼类的急性毒性分为 5 个等级: $LC_{50}<1$ mg/L 为剧毒, $1\leq LC_{50}<100$ mg/L 为高毒, $100\leq$

$LC_{50}<1\ 000$ mg/L 为中等毒性, $1\ 000\leq LC_{50}<10\ 000$ mg/L 为低毒, $LC_{50}\geq 10\ 000$ mg/L 为微毒[17]。本试验结果显示,在一定质量浓度范围内,BPA 和 p-NP 对泥鳅存在明显的急性毒性效应,其 96 h 的 LC_{50} 分别为 6.43 和 14.70 mg/L,均属于高毒污染物,且前者的安全浓度和不同时间点的 LC_{50} 均低于后者,说明 BPA 的毒性更强。本试验结果也说明,BPA 和 p-NP 对水生生物的毒害作用非常严重,环境容量非常有限,应引起高度重视。

修瑞琴等[19]研究了砷、镉、锌对斑马鱼的联合毒性作用,王春凤等[20]检测了汞和硒对剑尾鱼的复合毒性,王桂燕等[21]就二氯苯和镉对草鱼的联合毒性效应进行了研究,结果均显示,随着动物体染毒时

间的延长,污染物的联合毒性作用会发生变化。本研究中,在 BPA 和 p-NP 共同作用下,4 个时间点的 AI 值均小于 0,说明二者的联合毒性作用表现为相互拮抗,提示 BPA、p-NP 在水环境中共同存在时,毒性相互抑制,即 2 种化合物共存时对泥鳅产生的综合毒性小于单一化合物的毒性作用;且 AI 的绝对值随染毒时间的延长而逐渐变小,说明拮抗作用逐渐减弱,提示泥鳅受 2 种化合物共同作用的时间越长,受到的威胁越大。BPA 与 p-NP 的这种拮抗作用可以通过竞争位点理论^[22]来解释,当 2 种化合物共同作用于动物体时,由于 p-NP 在等毒性溶液中的质量浓度较高且分子量较小,更易穿过细胞膜,因此细胞内 p-NP 活性离子的浓度比 BPA 高,使得大量 p-NP 活性离子占据有限的结合位点,从而降低了 BPA 活性离子的结合效率,而 p-NP 的单一毒性小于 BPA,因此 2 种化合物的联合毒性降低,表现为相互拮抗作用。此外,拮抗作用还可能与 2 种酚类化合物的化学性质及参与生物化学反应的过程有关,其详细机理有待于进一步深入研究。

4 结 论

BPA 和 p-NP 对泥鳅的 96 h LC_{50} 分别为 6.43 和 14.70 mg/L,均属于高毒的酚类污染物,对泥鳅存在较强的急性毒性效应,且 BPA 的毒性更强。2 种酚类化合物的联合毒性作用表现为拮抗作用,但是随着染毒时间的延长,拮抗作用逐渐减弱。

[参考文献]

- [1] Rudel R. Predicting health effects of exposure to compounds with estrogenic activity: Methodological issues [J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105: 655-663.
- [2] 杜克久,徐晓白. 环境雌激素研究进展 [J]. *科学通报*, 2000, 45(21): 2241-2251.
Du K J, Xu X B. Advances in environmental estrogens [J]. *Chinese Sci Bull*, 2000, 45(21): 2241- 2251. (in Chinese)
- [3] 李瑞霞. 环境雌激素对动物的影响与对策 [J]. *四川动物*, 2006, 25(3): 673-675.
Li R X. Environmental estrogens effect on animals and countermeasure [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2006, 25(3): 673-675. (in Chinese)
- [4] 成庆泰,郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上、下册) [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
Cheng Q T, Zheng B S. Systematic synopsis of Chinese fishes [M]. Beijing: Science Press, 1987. (in Chinese)
- [5] 王万云,丁海华,毛治彦,等. 秦岭地区泥鳅生物学特性及人工繁殖技术研究 [J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2003, 31(S2): 153-157.
Wang W Y, Ding H H, Mao Z Y, et al. On biological characteristics and technology of artificial reproduction of loach in Qinling Mountain [J]. *Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition*, 2003, 31(S2): 153-157. (in Chinese)
- [6] 尹大强,胡双庆,朱坤宁,等. 双酚 A 和几种天然激素对鲫鱼淋巴细胞增殖的影响 [J]. *中国环境科学*, 2002, 22(5): 392-396.
Yin D Q, Hu S Q, Zhu K N, et al. Effects of bisphenol A and several natural hormones on lymphocyte proliferation of fish (*Carassius auratus*) [J]. *China Environmental Science*, 2002, 22(5): 392-396. (in Chinese)
- [7] 庄惠生,杨 光. 双酚 A 对鲤鱼急性和亚急性毒性的研究 [J]. *环境化学*, 2005, 24(6): 682-684.
Zhuang H S, Yang G. Study on the acute and subacute toxicities of bisphenol A on the carp [J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 24(6): 682-684. (in Chinese)
- [8] 端正花,朱 琳,王 平,等. 双酚 A 对斑马鱼不同发育阶段的毒性及机理 [J]. *环境化学*, 2007, 26(4): 491-494.
Duan Z H, Zhu L, Wang P, et al. Toxicities of bisphenol A on different developed stages of zebrafish (*Danio rerio*) and their mechanisms [J]. *Environmental Chemistry*, 2007, 26(4): 491-494. (in Chinese)
- [9] 张 辉,孔繁翔,王世和,等. 多种环境雌激素对淡水鱼联合毒性作用的预测和评价 [J]. *环境科学学报*, 2008, 28(6): 1178-1185.
Zhang H, Kong F X, Wang S H, et al. Prediction and assessment of the combination effects to amixture of estrogenic chemicals on freshwater fish [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(6): 1178-1185. (in Chinese)
- [10] 夏 勇,傅剑云,陈 苘,等. 双酚 A 对斑马鱼急性毒性及 P53 基因诱变性影响 [J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(3): 354-356.
Xia Y, Fu J Y, Chen Q, et al. P53 gene mutation and acute toxicity in zebrafish exposed to BPA [J]. *Chin J Public Health*, 2012, 28(3): 354-356. (in Chinese)
- [11] 沈洪艳,宋存义,甄芳芳,等. 对氯硝基苯对锦鲤鱼的急性毒性效应 [J]. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2007, 31(4): 514-516.
Shen H Y, Song C Y, Zhen F F, et al. The acute toxicity effect of P-NCB on *Brocarded carp* [J]. *Journal of Hebei Normal University: Natural Science Edition*, 2007, 31(4): 514- 516. (in Chinese)
- [12] 陈剑虹,杨保华,邓子云. 环境统计应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
Chen J H, Yang B H, Deng Z Y. Application of environmental statistics [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. (in Chinese)
- [13] 王 莹,郝家胜,陈 娜,等. 铅、镉和锌 3 种重金属离子对水螅的联合毒性研究 [J]. *生命科学研究*, 2006, 10(1): 91-94.
Wang Y, Hao J S, Chen N, et al. Joint toxicity test of heavy metal ions lead, cadmium and zinc to hydra [J]. *Life Science Research*, 2006, 10(1): 91-94. (in Chinese)