

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120410001

熊勤犁, 史雅娟, 吕永龙, 等. 2,2',4,4'-四溴二苯醚(BDE-47)对大型溞(*Daphnia magna*)的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(1): 97-104

Xiong Q L, Shi Y J, Lv Y L, et al. Toxic effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) to *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(1): 97-104(in Chinese)

2,2',4,4'-四溴二苯醚(BDE-47)对大型溞(*Daphnia magna*)的毒性效应

熊勤犁^{1,2}, 史雅娟^{1,*}, 吕永龙¹, 李秋爽^{1,2}, Gosens Jorrit^{1,2}

1. 中国科学院生态环境研究中心 城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 2,2',4,4'-四溴二苯醚(BDE-47)在水体及各种水生生物(鱼类、海洋哺乳动物以及水生无脊椎动物)中被广泛检出,但BDE-47对水生无脊椎动物毒性效应的研究还处于起步阶段。以大型溞(*Daphnia magna*)为受试生物,通过急性(48 h)和慢性(21 d)毒性暴露实验,考察了BDE-47对大型溞活动抑制率、心率、产仔情况和酶活性等指标的影响。结果显示,BDE-47对大型溞活动抑制率的48 h-EC₅₀为112.5 μg·L⁻¹;高浓度(>100 μg·L⁻¹)BDE-47显著诱导提高大型溞的心率。21 d慢性暴露实验中,8 μg·L⁻¹处理组中大型溞全部死亡;其他各浓度处理组(0.5、1、2、4 μg·L⁻¹)中,母溞第1胎产仔时间延后,第1胎子代数量减少,总产仔数量大幅减少,这表明大型溞的繁殖能力受到抑制。BDE-47在一定程度上抑制了母溞胆碱酯酶(ChE)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)的活性,大型溞体内的代谢机制没有被诱导,神经活性虽被抑制,但抑制率不高。BDE-47大幅诱导过氧化氢酶(CAT)的活性,并呈现一定的剂量效应关系,相对于ChE和GST,CAT对BDE-47暴露更为敏感,可作为BDE-47对大型溞慢性暴露毒性效应的潜在生物标志物。

关键词: 2,2',4,4'-四溴二苯醚; BDE-47; 大型溞; 心率; 繁殖率; 酶活性

文章编号: 1673-5897(2012)4-097-08 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Toxic Effects of 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47) to *Daphnia magna*

Xiong Qinli^{1,2}, Shi Yajuan^{1,*}, Lv Yonglong¹, Li Qiushuang^{1,2}, Gosens Jorrit^{1,2}

1. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Received 10 April 2012 **accepted** 30 May 2012

Abstract: 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) are widely detected in water and aquatic organisms (fish, marine mammals and aquatic invertebrates), however, there is still lack of research on its toxic effects on aquatic invertebrates. The acute (48 h) and chronic (21 d) tests were conducted to explore the effects of BDE-47 on *Daphnia magna* with several endpoints as immobilization rate, heart rate, reproduction rate, and the activities of ChE,

收稿日期: 2012-04-10 录用日期: 2012-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(41271487); 国家国际科技合作专项项目(2012DFA91150)

作者简介: 熊勤犁(1986-),男,博士研究生,研究方向为生态毒理效应及区域生态风险评价,Email: qinli.xiong@yahoo.com

* 通讯作者(Corresponding author),Email: yajuanshi@rces.ac.cn

GST and CAT. Results showed that the 48 HEC_{50} value of BDE-47 on the immobilization of *D. magna* was 112.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. An increase in the heart rate of *D. magna* was significantly induced by BDE-47 at high concentrations ($>100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). In chronic test (21 d), no survival of *D. magna* in 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 exposure group was observed. In the other BDE-47 exposure groups (0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), the first birth was delayed, and the first litter size as the total number of offspring per maternal *D. magna* were reduced. It was indicated that the fecundity of *D. magna* was inhibited by BDE-47. The activities of cholinesterase (ChE) and glutathione-S-transferase (GST) of maternal daphnids were inhibited by BDE-47, implying that the metabolism of *D. magna* was not induced by BDE-47, while neuro-activity was inhibited by BDE-47 in a relatively low extent. Catalase (CAT) activity of maternal *D. magna* was significantly induced by BDE-47 in a dose-response manner. CAT was more sensitive to BDE-47 than GST or ChE. The activity of CAT could become a potential biomarker to chronic BDE-47 exposure.

Keywords: 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether; BDE-47; *Daphnia magna*; heart rate; reproduction; enzyme activity

多溴联苯醚(PBDEs)是一种防火阻燃化学制剂。由于特殊的理化性质,被广泛应用于家用电器、计算机、电缆、建筑材料、纺织品等各种产品中^[1,2]。随着 PBDEs 使用量的逐年上升,环境中 PBDEs 的残留量在过去几十年中持续增长,并已经在水体及各种水生生物(鱼类、海洋哺乳动物以及水生无脊椎动物)中被广泛检出^[3-5]。

环境中的 2,2',4,4'-四溴二苯醚(2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, BDE-47, tetra-BDE)主要来源于溴化阻燃剂的溶解和挥发,以及含有 PBDEs 废弃物的焚化。BDE-47 多存在于水体中^[6],是环境中存在量最大,最频繁检出的 PBDEs 同系物^[7-8]。低溴代联苯醚具有一定的挥发性、水溶性和生物富集性,水生生物体内已检出的各种 PBDEs 同系物中以 BDE-47 比例最高,一般占总 PBDEs 的 50% 以上^[9]。溞为甲壳纲的枝角类浮游动物,广泛分布于淡水水域。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^[10-11]。水体中的 BDE-47 可通过大型溞传递到更高营养级生物体内,对其造成危害^[8]。所以研究 BDE-47 对水生生物的毒性效应意义重大,而通过研究 BDE-47 对大型溞的毒性,可以预测 PBDEs 对水生生物毒性。目前,国内外关于 BDE-47 的毒性研究还多局限在生物积累,以及对啮齿类和两栖类动物的神经毒性研究方面^[5,12-14]。BDE-47 对水生无脊椎动物毒性效应的研究还处于起步阶段,仅局限于急性、亚急性方面的生理生化指标测试^[15],需要为系统的研究。以大型溞(*Daphnia magna*)为实验生物,考察了急、慢性暴露后,不同生物标志物对 BDE-47 毒性的响应,旨在揭示 BDE-47 对大型溞的生态毒性效应,以便为

水环境管理提供借鉴和参考依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

大型溞(*D. magna*)由中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室提供。依照 OECD 211 实验方法,大型溞长期稳定地培养于 M4 培养液中^[16-18]。M4 培养液每周更换 2 次,培养温度为 $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照长度为 16 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,光强度为 18 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,培养密度为每只溞 40 mL 培养液。定期投放斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)作为饵料^[19-20]。每天饲喂密度为 90 000 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ (每只溞 100 ~ 200 μg),21 d 内每只母溞繁殖幼溞数量多于 60 只,可达到 OECD 的要求。

化学试剂:2,2',4,4'-四溴二苯醚(CAS No. 5436-43-1,纯度为 98%)购自美国 Chem Service 公司;二甲亚砜(DMSO,纯度为 99.9%)购自美国 Alfa Aesar 公司;1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)购于美国 Sigma Chemical 公司;蛋白质抽提试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物;胆碱酯酶试剂盒 DACE-100 购于美国 QuantiChrom。大型溞 M4 培养液均由分析纯药剂配置。所有工作液均现配现用。以 1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度溶于 DMSO 配制 BDE-47 母液。

1.2 实验仪器与设备

恒温培养振荡器(世光 SPH-200D,上海)、生物人工气候箱(江南 RXZ-500D,宁波)、体式显微镜(O-lympus SZ61,日本)、CCD 显微数码成像系统(O-lympus DP72,日本)、冷冻高速离心机(LABNET C2500,美国)和全光谱酶标仪(Thermo,美国)等。

1.3 大型溞毒性实验

所有实验均使用新生的幼溞(出生 24 h 内的幼

溞)。实验分为两部分,48 h 急性毒性实验和 21 d 慢性毒性实验。

(1)大型溞 48 h 急性毒性实验

在预实验基础上,确定大型溞急性毒性实验的浓度范围。按照 OECD 的标准方法进行急性毒性暴露实验^[21]。用 BDE-47 的 DMSO 母液溶于 M4 培养液配制出不同浓度,分别设置 12.5、25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 6 个浓度级,同时设置 1 个空白组(CK)以及溶剂空白组(CKs)。实验在 100 mL 的烧杯中进行,每个烧杯盛有 80 mL 溶液,随机放置 5 只幼溞,每个浓度设置 5 个平行,在急性毒性暴露过程中,不投饵,不更换试液。暴露实验结束后,记录大型溞的运动抑制率和心跳速率。整个急性暴露实验重复 2 次。

(2)大型溞 21 d 慢性毒性实验

大型溞 21 d 慢性毒性实验的培养条件与急性实验的培养条件基本相同,实验过程遵循 OECD 方法^[16-17]。根据急性毒性实验和 21 d 大型溞预实验结果,并且结合已报道的 BDE-47 在水体中的各种浓度,设置 5 个浓度级,分别是 0.5、1、2、4 和 8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,同时设置 1 个空白组(CK)以及溶剂空白组(CKs)。选用 100 mL 烧杯,烧杯内有 80 mL 暴露溶液,随机放置 1 只幼溞,每个处理设置 10 个平行。所有处理组的暴露溶液每 2 天在投饵前更换 1 次。每天投放斜生栅藻(90 000 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$),每隔 10 天更换烧杯以防止 BDE-47 及其衍生物附着在烧杯壁上影响实验结果。同时记录大型溞第 1 次产仔时间、个数、产仔总数和母溞的死亡率。21 d 暴露实验结束后,测定母溞的胆碱酯酶(ChE)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)以及过氧化氢酶(CAT)的酶活性。整个慢性暴露实验重复 2 次。

1.4 毒性评价终点

1.4.1 急性毒性评价终点

依照 OECD 的标准方法测定大型溞的活动抑制率。使用 Karber 法计算暴露 48 h 后大型溞活动抑制率,计算相应的 BDE-47 的 EC_{50} 值。

使用改进的 Baylor 法测定大型溞的心跳速率^[22]。经过 48 h 实验,从每个处理当中随机选择 5 只大型溞(存活的大型溞都被计算在内),通过体式显微镜和 CCD 显微影像设备以 AVI (50 fps)格式记录大型溞心跳影像至电脑内,通过慢速播放记录 1 min 内大型溞心跳次数。

1.4.2 慢性毒性评价终点

(1)大型溞的死亡率和繁殖情况

按照 OECD 标准方法的要求每天定时记录大型溞的死亡率。当大型溞开始繁殖后,记录繁殖时间、每胎繁殖个数,每天定时将新生的幼溞移除、计数,实验最后记录存活的幼溞总数^[16-17]。

(2)ChE、GST、CAT 酶活性测定

21 d 慢性毒性暴露实验结束后,从各个处理当中随机选取 9 只母溞,随机分为 3 组放入 1.5 mL 离心管,先用超纯水润洗 5 次,后加入 50 μL 蛋白质抽提试剂冰浴研磨后,静置 30 min,放入冷冻高速离心机 4℃ 下 10 000 g 离心 20 min,取上清液待测。

采用改进的 BCA 法测定蛋白质浓度^[23]。胆碱酯酶(ChE)活性采用改进的 Ellman 标准方法测定^[24],放置于 96 孔板于 412 nm 处比色,测定其第 2 和 10 分钟吸光值的变化,以此计算出 ChE 酶活性($\text{mU}\cdot\text{ng}^{-1}$)。

GST 酶活性测定采用 Habig 等^[25]提出的方法。由 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris(pH 7.5)、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CDNB、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 以及约 5 μg 蛋白质样品组成 150 μL 反应体系。反应开始前 25℃ 温浴,通过加入谷胱甘肽启动反应。96 孔板放入酶标仪 340 nm 下进行时间扫描,得出单位时间内吸光值的变化。酶活性的单位为 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ng}^{-1}$ 。

CAT 酶活性的测定基于已有的标准方法^[26]。150 μL 反应体系,包括 5 μg 左右的蛋白质样品, H_2O_2 -Tris 缓冲液的复合液(pH 7.4, 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2),在 240 nm 下进行时间扫描,得出单位时间内吸光度的变化。酶活性的单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ng}^{-1}$ 。

1.5 数据统计与分析

急性毒性实验中 BDE-47 对大型溞活动抑制率的 EC_{50} 通过 Karber 方法计算^[27-28],公式如下:

$$\ln \text{EC}_{50} = X_k - d \left(\sum_{i=1}^n P_i - 0.5 \right)$$

X_k 是大型溞活动抑制率为 100% 所对应 BDE-47 浓度的对数, d 是相邻两组对数量之差,是各个处理组活动抑制率的总和(以小数表示,包括 X_k 所在的处理组)。

对大型溞急性和慢性毒性效应数据进行正态分布检验(采用 Shapiro-Wilk test 检验)、方差齐性检验(采用 Levene's test 检验)。在数据符合正态分布且等方差性前提条件下,使用方差分析(ANOVA)检验其显著性差异,并利用多重比较检验(Post Hoc Tests)(LSD test,最小显著差异法)分析处理之间的差异显著性。若数据不符合正态分布或存在不等方差性时,采用非参数检验(Kruskal-Wallis test)分析其显著性差异。所有数据统计分析均在 SPSS 13.0 分

析软件中进行。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 BDE-47 对大型溞的急性毒性

由表1可知,DMSO(体积百分数为0.1%)溶剂空白对照组(CKs)与空白对照组(CK)中的大型溞活动抑制率无显著性差异($P > 0.05$),空白和溶剂空白组中的大型溞均未见不良反应,表明实验中0.1%的DMSO助溶剂没有对大型溞的活动造成明显的影响。根据48 h急性暴露实验数据,计算出BDE-47对大型溞48 h活动抑制率的 EC_{50} 为 $112.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

BDE-47对大型溞的心跳速率的影响见表1。ANOVA检验说明3个低浓度处理组中大型溞的心率和空白组无显著差异,多重比较检验显示暴露于100和 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47后,大型溞的心跳速率显著上升。

表1 大型溞暴露于BDE-47 48 h后活动抑制率和心跳速率
Table 1 Immobilization and heart rate of *D. magna* after exposure to BDE-47 for 48 h

BDE-47 浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	活动抑制率/%	心率/(次 $\cdot\text{min}^{-1}$)
CK	0	263 ± 13
CKs	0	259 ± 12
12.5	0	277 ± 13
25	0	274 ± 8
50	0	282 ± 14
100	45	$284 \pm 16^*$
200	85	$318 \pm 24^{**}$
400	100	-

注:大型溞心率为平均值 $\pm$ 标准差($n=10$);*表示与对照组差异显著($P < 0.05$);**表示与对照组差异非常显著($P < 0.01$)。

2.2 BDE-47 对大型溞的慢性毒性

大型溞21 d慢性毒性实验中母溞死亡率和产仔情况见表2。溶剂空白和空白对照中所有母溞在实验结束时均存活,产仔情况无明显差异。最高浓度处理($8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的大型溞全部死亡。各个浓度处理第1次产仔时间和空白对照相比,均有延迟。在实验设置的各浓度组中大型溞的繁殖能力受到明显抑制,生殖周期滞后,子代数量大幅减少($P < 0.01$)。

慢性暴露之后(21 d),由图1可见,溶剂空白和空白对照组中ChE、GST和CAT酶活性均无显著差异,说明大型溞长时间接触助溶剂DMSO,未出现不良反应。

表2 大型溞暴露于BDE-47 21 d后母溞死亡率和产仔数量
Table 2 Morality and fecundity of maternal *D. magna* after exposure to BDE-47 for 21 d

BDE-47 浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	死亡率/%	第1次产仔时间/d	第1次产仔数/(个/母溞)	产仔总数/(个/母溞)
CK	0	8 ± 0	8 ± 4	161 ± 19
CKs	0	8 ± 0	8 ± 4	158 ± 20
0.5	0	9 ± 0	$7 \pm 5^*$	$92 \pm 18^{**}$
1	0	9 ± 0	$6 \pm 3^{**}$	$67 \pm 13^{**}$
2	0	11 ± 2	$5 \pm 4^{**}$	$17 \pm 10^{**}$
4	30	14 ± 1	$1 \pm 3^{**}$	$4 \pm 6^{**}$
8	100	-	0^{**}	0^{**}

注:大型溞产仔数为平均值 $\pm$ 标准差($n=20$);*表示与对照组差异显著($P < 0.05$);**表示与对照组差异非常显著($P < 0.01$)。

2和 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BDE-47对大型溞的ChE活性产生显著影响($F=13.036$, $P=0.002 < 0.01$),0.5和 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BDE-47对大型溞ChE酶活性未产生显著影响(图1a)。多重比较显示,在 $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组中的母溞ChE酶活性水平显著低于空白对照($F=35.356$, $P=0.001$)。经过21 d慢性暴露,母溞的GST酶活性受到一定的抑制,其中 $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BDE-47对GST酶活性抑制显著(图1b)($P < 0.05$)。BDE-47慢性暴露21 d显著影响CAT活性水平($F=33.239$, $P=0.000$)(图1c)。在 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47的处理组中,母溞CAT酶活性水平比空白组高出2倍。

3 讨论(Discussion)

3.1 BDE-47 对大型溞的急性毒性效应

国内关于大型溞急性毒性的研究大多以大型溞的死亡作为评价终点^[15,26,29-30],研究结果 LC_{50} 与污染物在环境中的真实含量有较大差距。因而,本研究选取了OECD推荐的活动抑制率以及常用于药理学研究的心跳速率这2个参数,在污染物浓度相对较低的情况下,探究BDE-47对大型溞的毒性效应。

本研究测得的BDE-47对大型溞活动抑制率的48 h- EC_{50} 为 $112.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,与Tang等^[26]的报道结果相近。目前关于BDE-47对大型溞心率影响的研究较少,但可参考其他类似物质刺激大型溞心率的研究^[31-32]。BDE-47可诱导大型溞的心率,甚至在活动被抑制的个体中也存在心跳速率加快现象。彭颖等^[15]研究发现,BDE-47对大型溞的48 h- LC_{50} 为 $1.04 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,高于本研究BDE-47对大型溞活动抑制率的48 h- EC_{50} 以及大型溞心率诱导浓度($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),说明急性毒性实验中大型溞活动抑制率、心跳速率比致死率更为敏感。

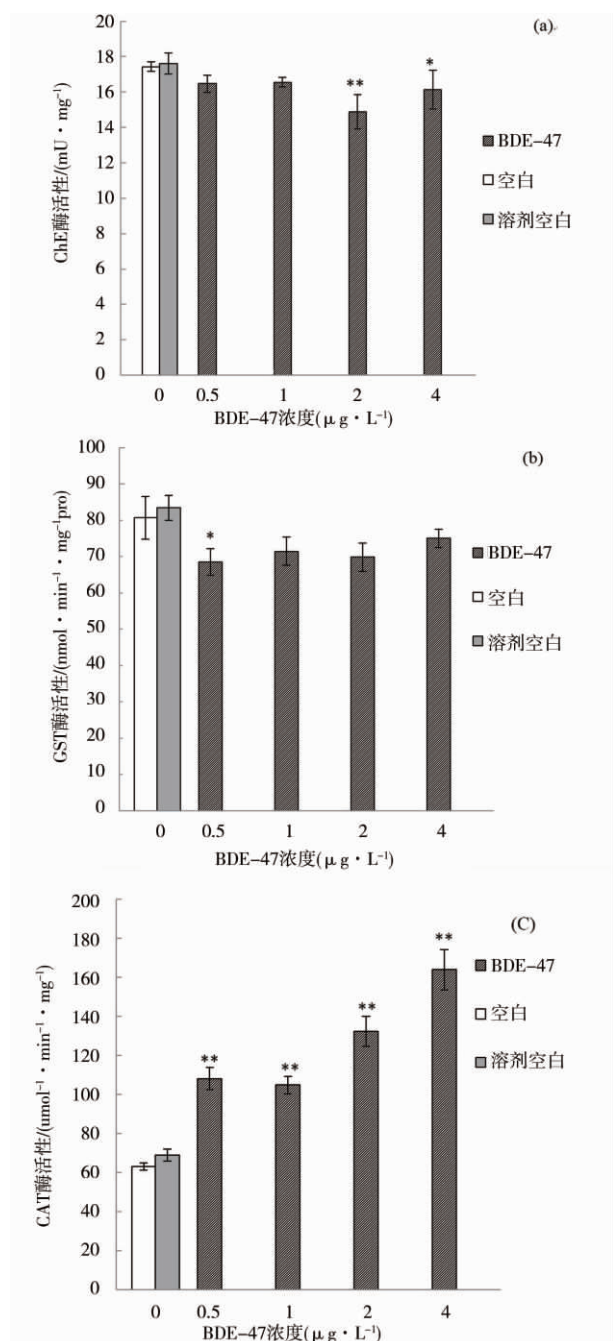


图1 21 d 慢性 BDE-47 暴露对大型溞 ChE、GST 和 CAT 酶活性的影响; (a) ChE 酶, (b) GST 酶, (c) CAT 酶

注: 大型溞各个酶活性表达为平均值 ± 标准差 (n = 6);

* 表示与对照组差异显著 (P < 0.05);

** 表示与对照组差异非常显著 (P < 0.01)。

Fig. 1 Effects of 21 d chronic exposure to BDE-47 on ChE, GST and CAT activities of *D. magna*; (a) ChE, (b) GST, (c) CAT

3.2 BDE-47 对大型溞存活和繁殖的影响

21 d 慢性暴露实验中, 大型溞死亡率和生殖率

是 OECD 标准中的传统指标^[16-17]。21 d 慢性暴露后, 浓度为 $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BDE-47 处理组中, 母溞的死亡率为 100%。类似地, Drottar 等^[33] 研究发现, 经过 21 d 慢性暴露, 浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PeBDPO 对大型溞的致死率为 100%。而在急性毒性实验中, BDE-47 的致死浓度远远高于 $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 这说明大型溞不能长时间抵抗 BDE-47 的毒性胁迫。21 d 暴露实验中, 空白组每只母溞的产仔总数为 (161 ± 19) 个/母溞, 这与其他有关大型溞生殖率的研究结果相似^[34-38]。本研究发现, 暴露于 BDE-47 各处理组中的母溞第 1 胎产仔时间延后, 每胎子代数量减少, 总子代数量大幅减少。类似地, 有研究发现母溞繁殖率在 $0.8 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BDE-47 处理组中受到抑制, 这可能是因为溞体在自我调整过程中用于生长繁殖的能量有所降低^[15-39]。

3.3 BDE-47 对大型溞酶活性的影响

类胆碱系统在生物体神经系统内起着很重要的作用, 胆碱酯酶 (ChE) 是类胆碱系统的关键组成成分, ChE 酶活性被抑制会增加乙酰胆碱, 乙酰胆碱的增加会导致神经突触的减少, 对神经系统造成器质性损伤^[40]。好氧生物自身进化出一系列的抗氧化防御机制来控制活性氧自由基 (ROS) 对细胞的氧化损伤^[41]。过氧化氢酶 (CAT, EC 1.11.1.6) 是重要的抗氧化酶类, 而谷胱甘肽硫转移酶 (GST, EC 2.5.1.18) 被认为是解毒机制中重要的酶, 在生物体内广泛存在, 具有消除体内自由基和解毒双重功效^[25]。

慢性毒性暴露 (21 d) 之后, 空白组母溞的 ChE、GST 和 CAT 酶活性分别为 $(17.43 \pm 0.26) \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $(80.63 \pm 8.90) \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、 $(63.19 \pm 1.79) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (图 1)。ChE 活性在以往研究所得的范围之内 ($2.5 \sim 62.3 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$)^[42-45]。GST 和 CAT 酶活性与 Tang 等^[26] 和 Jemec 等^[46] 研究结果基本一致。

慢性暴露实验测量大型溞 ChE 酶活性的研究较少, 本研究发现经过慢性毒性暴露, 高浓度 BDE-47 对胆碱酯酶活性明显抑制 (图 1a)。Han 等^[47] 研究 BDE-47 对鲫鱼 (*Carassius aurate*) 的 ChE 酶活性为抑制效应, 斑马纹贻贝 (*Dreissena polymorpha*) 体内也有相同的现象^[48], 这与本研究结果相近。但是也有一些研究结果显示, BDE-47 对胆碱系统以及 ChE 酶活性没有显著影响^[49]。可见, BDE-47 对不同生物体 ChE 酶活性的影响不同。这或许与各个机体应对 BDE-47 的机制不同有关。

关于 BDE-47 对大型溞 CAT 酶活性影响的报

道较少。但已有许多其他污染物对大型蚤 CAT 活性影响的相关研究^[50], 结果显示, 母蚤 CAT 活性会受到毒物的诱导。在 21 d 慢性暴露中, BDE-47 可诱导 CAT 活性, 且呈现一定浓度效应关系(图 1c)。其中, $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组比空白组母蚤 CAT 酶活性水平增加了约 2 倍, CAT 酶活性提高可能是由于 BDE-47 生物转化代谢过程中产生了过氧化氢所致。大型蚤在 $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理组中全部死亡, 说明 CAT 酶活性的提高没能对抗较高浓度 BDE-47 的毒性压力。

慢性暴露实验中对母蚤 GST 酶活性的测量相对较少。本研究发现, 大型蚤暴露于各浓度的 BDE-47 中 21 d 后, GST 活性基本没有变化, 低浓度稍有抑制(图 1b)。BDE-47 低浓度抑制母蚤 GST 的机理有待于进一步研究。

综上所述, 本研究考察了大型蚤在个体层次上(活动抑制率、存活率、生殖能力)和组织细胞层次上(神经、代谢、抗氧化)对 BDE-47 的毒性胁迫反馈。在急性毒性实验中, BDE-47 对大型蚤活动抑制率的 48 h-EC_{50} 为 $112.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。急性暴露后 BDE-47 可增加大型蚤的心率。慢性暴露(21 d)实验中, BDE-47 对大型蚤存活率和生殖能力均有较大影响。BDE-47 在一定程度上抑制了母蚤 ChE 和 GST 酶活性, 这说明大型蚤体内的代谢机制并没有被诱导, 神经活性也受到抑制, ChE 在高浓度下被抑制, GST 在低浓度下被抑制, 但总体而言, 抑制率均不高。BDE-47 大幅度诱导了 CAT 的活性, 并呈现一定的剂量效应关系。但是, 应该注意到大型蚤并没有在高浓度的 BDE-47 中存活, 说明大型蚤不能长时间抵抗高浓度 BDE-47 所带来的毒性胁迫。

通讯作者简介: 史雅娟(1971—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为污染生态学, 近期的研究重点为持久性有机污染物的生态效应、生态风险评价及管理对策。

参考文献:

- [1] Johnson-Restrepo B, Kannan K. An assessment of sources and pathways of human exposure to polybrominated diphenyl ethers in the United States [J]. *Chemosphere*, 2009, 76(4): 542–548
- [2] Jakobsson K, Thuresson K, Rylander L, et al. Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians [J]. *Chemosphere*, 2002, 46(5): 709–716
- [3] Munschy C, Héas-Moisan K, Tixier C, et al. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 1. Bioaccumulation and elimination kinetics of individual congeners and their debrominated metabolites [J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(1): 229–237
- [4] Munschy C, Héas-Moisan K, Tixier C, et al. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 2. Formation, bioaccumulation and elimination of hydroxylated metabolites [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(12): 3527–3533
- [5] Hu G C, Dai J Y, Xu Z C, et al. Bioaccumulation behavior of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the freshwater food chain of Baiyangdian Lake, North China [J]. *Environment International*, 2010, 36(4): 309–315
- [6] Hale R C, La Guardia M J, Harvey E, et al. Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media [J]. *Chemosphere*, 2006, 64(2): 181–186
- [7] Stapleton H M, Baker J E. Comparing polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl bioaccumulation in a food web in Grand Traverse Bay, Lake Michigan [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 45(2): 227–234
- [8] Damerud P O, Eriksen G S, Jóhannesson T, et al. Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(s1): 49–68
- [9] Om U, Klasson-Wehler E. Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether in rat and mouse [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28(2): 199–211
- [10] Ziarek J J, Nihongi A, Nagai T, et al. Seasonal adaptations of *Daphnia pulex* swimming behaviour: The effect of water temperature [J]. *Hydrobiologia*, 2011, 661(1): 317–327
- [11] 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 B-Biological Sciences*, 2011, 278(1704): 458–463
- [12] 夏涛, 何平, 王爱国, 等. PBDE-47 和 PCB153 染毒致大鼠神经毒性作用[J]. *中国公共卫生*, 2009, 25(5): 564–566
- Xia T, He P, Wang A G, et al. Combined neurotoxicity effect of PBDE-47 and PCB153 in SD rats [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2009, 25(5): 564–566 (in Chinese)
- [13] Qiu Y W, Zhang G, Guo L L, et al. Bioaccumulation and historical deposition of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Deep Bay, South China [J]. *Marine Environ-*

- mental Research, 2010, 70(2): 219 – 226
- [14] Staskal, D F, Diliberto J J, DeVito M J, et al. Toxicokinetics of BDE 47 in female mice: Effect of dose, route of exposure, and time [J]. Toxicological Sciences, 2005, 83 (2): 215
- [15] 彭颖, 范灿鹏, 廖伟, 等. 2,2',4,4'-四溴联苯醚对大型溞的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(1): 79 – 86
Peng Y, Fan C P, Liao W, et al. Toxic effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether on *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(1): 79–86 (in Chinese)
- [16] OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals/Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test [S]. Paris: OECD Publishing, 2008
- [17] OECD. *Daphnia magna* Reproduction Test. Test Guideline No. 211. OECD Guideline for Testing of Chemicals [S]. Paris: OECD Publishing, 1998
- [18] 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
- [19] 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
- [20] 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
- [21] OECD. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Test Guideline No. 202. OECD Guideline for Testing of Chemicals [S]. Paris: OECD Publishing, 2004
- [22] Baylor E R. Cardiac pharmacology of the cladoceran, *Daphnia* [J]. Biological Bulletin, 1942, 83(2): 165 – 172
- [23] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. Analytical Biochemistry, 1985, 150(1): 76 – 85
- [24] Ellman G L, Courtney K D, Featherstone R M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochemical pharmacology, 1961, 7(2): 88–90, IN1, 91 – 95
- [25] Baldwin W S, LeBlanc G A. Expression and induction of all immunologically related class of glutathione S-transferases in *Daphnia magna* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology, 1996, 113(2): 261 – 267
- [26] Tang B H, Zhu L Y, Zhou Q X. Joint effects of pentabromodiphenyl ether (PBDE) and heavy metals on *Daphnia magna* survival, its antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering in China, 2011, 5(1): 99 – 110
- [27] Hamilton M A, Russo R C, Thurston R V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays [J]. Environmental Science & Technology, 1977, 11(7): 714 – 719
- [28] Armitage P, Allen I. Methods of estimating the LD₅₀ in quantal response data [J]. The Journal of Hygiene, 1950, 48(3): 298 – 322
- [29] 刘洪翠, 袁丙强, 李少南. 三唑磷和毒死蜱对大型溞繁殖率的影响[J]. 浙江农业科学, 2012, (1): 81 – 82
- [30] 张亚辉, 曹莹, 王一喆, 等. 3种氯酚化合物对大型溞的联合毒性[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(4): 403 – 409
Zhang Y H, Cao Y, Wang Y Z, et al. Joint toxicity of three chlorophenols to *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(4): 403–409 (in Chinese)
- [31] Villegas-Navarro A. The heart of *Daphnia magna*: Effects of four cardioactive drugs [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003, 136(2): 127 – 134
- [32] Corotto F, Ceballos D, Lee A, et al. Making the most of the *Daphnia* heart rate lab: Optimizing the use of ethanol, nicotine & caffeine [J]. The American Biology Teacher, 2010, 72(3): 176 – 179
- [33] Drott R K, Krueger H O. Pentabromodiphenyl ether (PeBDPO): A Flow-through Life-cycle Toxicity Test with the Cladoceran *Daphnia magna* [R]. Wildlife International Ltd., Project No. 439A–109, 1998
- [34] Källqvist T, Grung M, Tollefsen K E. Chronic toxicity of 2,4,2',4'-tetrabromodiphenyl ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25 (6): 1657–1662
- [35] Palma P, Palma V, Fernandes R, et al. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(2): 344–350
- [36] Massarin S, Alonzo F, Garcia-Sanchez L, et al. Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(3): 309–319
- [37] Bridges T S, Wright R B, Gray B R, et al. Chronic toxicity of Great Lakes sediments to *Daphnia magna*: Elutriate effects on survival, reproduction and population growth [J]. Ecotoxicology, 1996, 5(2): 83 – 102

- [38] Ingle L, Wood T R, Banta A M. A study of longevity, growth, reproduction and heart rate in *Daphnia longispina* as influenced by limitations in quantity of food [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1937, 76(2): 325 – 352
- [39] Martin M, Lam P K S, Richardson B J. An Asian quandary: Where have all of the PBDEs gone? [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(5): 375 – 382
- [40] Jemec A, Drobné D, Tisler T, et al. Biochemical biomarkers in environmental studies—Lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, 17(3): 571 – 581
- [41] Winston G W, Regoli F, Dugas Jr A J, et al. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998, 24(3): 480 – 493
- [42] Day K E, Scott I M. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides [J]. *Aquatic Toxicology*, 1990, 18(2): 101 – 113
- [43] Guilhemino L, Lopes M C, Carvalho A P, et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 1996, 32(4): 727–738
- [44] Diamantino T C, Guilhemino L, Almeida E, et al. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute, chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45(3): 253 – 259
- [45] Barata C, Baird D J, Soares A, et al. Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 49(2): 155 – 163
- [46] Jemec A, Tisler T, Drobné D, et al. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2007, 68(8): 1408 – 1418
- [47] Han Z, Lv C, Zheng Z. Toxicological effects of PBDEs on *Carassius auratus* [J]. *Chinese Journal of Geochemistry*, 2010, 29(2): 217 – 222
- [48] Binelli A, Riva C, Provini A. Biomarkers in zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy) [J]. *Biomarkers*, 2007, 12(4): 349 – 368
- [49] Bull K, Basu N, Zhang S, et al. Dietary and in utero exposure to a pentabrominated diphenyl ether mixture did not affect cholinergic parameters in the cerebral cortex of ranch mink (*Mustela vison*) [J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 96(1): 115–122
- [50] Barata C, Varo I, Navarro J C, et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(2): 175 – 186 ◆