

全氟辛烷磺酸盐(PFOS) 替代品对家蚕大造的生态毒性

王瀛寰, 王会利, 张旭, 张艳峰, 李建中*

中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 以中国本地家蚕品种大造作为受试生物, 实现实验室规模化饲料饲养和初步实验动物化; 建立家蚕大造环境危害评价急性毒性测试方法; 对 4 种 PFOS 替代品包括: 50% 的全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂、用调聚法合成的织物三防整理剂(含固率 23.7%)、用电解氟化法合成的 C4 和 C6 织物三防整理剂, 进行了急性接触毒性、急性饲喂毒性及慢性饲喂毒性的安全风险评价。实验使用的 4 种 PFOS 替代品试验急性饲喂浓度均达到或超过 $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 家蚕未出现明显死亡; 在接触实验浓度达到 $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 家蚕未出现明显死亡, 以上结果证明, 4 种 PFOS 替代品对大造蚕种的急性饲喂毒性和接触毒性均为低毒。较低浓度的表面活性剂会严重影响到大造蚕种的结茧率, 当表面活性剂浓度为 $0.4\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 蚕种不能结茧, 其余 3 种化学品在浓度大于 $0.004\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对大造蚕种的结茧率产生一定的影响作用, 但抑制作用相对较为平缓。替代品均会降低家蚕茧层率, 表面活性剂在浓度为 $0.04\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 茧层率剧烈下降, 其他 3 种替代品抑制作用相对平缓。织物三防整理剂、C4 和 C6 织物三防整理剂几乎不会影响蚕卵孵化, 但表面活性剂会造成家蚕孵化率降低, 在 $0.04\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后孵化率为 0。

关键词: 大造蚕种; PFOS 替代品; 安全评价

文章编号: 1673-5897(2012)5-556-05

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Ecotoxicity of Alternatives of Pefluorooctane Sulfonate (PFOS) to *Bombyx mori* (Strain Dazao)

Wang Yinghuan, Wang Huili, Zhang Xu, Zhang Yanfeng, Li Jianzhong*

Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China.

Received 2 July 2010

accepted 10 September 2012

Abstract: *Bombyx mori* (Strain Dazao) was exposed to four alternatives of PFOS to test the toxic effects of these chemicals. *Bombyx mori* (Strain Dazao) was maintained in our laboratory as experimental animal and was fed with forage under laboratory conditions. Methods evaluating toxicity of chemicals to *Bombyx mori* (Strain Dazao) were built. *Bombyx mori* didn't appear obvious death until the acute feeding concentration was up to $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and contacting concentration was up to $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Both the contact and the acute oral toxicity results suggested that the four tested chemicals had low toxicity to *Bombyx mori*. Low concentration of surfactant would have serious negative effect on the cocooning rate of *Bombyx mori* which decreased to 0 at $0.4\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of surfactant. The other three chemicals influenced on the pupal rate at $0.004\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, while the inhibitory effects were smaller than that of the surfactant. All these chemicals influenced on the cocoon layer ratio. The cocoon layer ratio fell sharply at $0.04\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of surfactant, while the influences of other three chemicals on cocoon layer ratio were smaller than that of the surfactant. The surfactant also significantly influenced the hatching rate of *Bombyx mori* in the chronic feeding experiment. The hatching rate would decrease to 0 at 0.

收稿日期: 2012-07-02 录用日期: 2012-09-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2010AA065105)

作者简介: 王瀛寰(1990-), 男, 硕士, 研究方向: 化学品毒理学研究; E-mail: wang-yinghuan@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), 李建中, E-mail: jzli@rcees.ac.cn

04 g·kg⁻¹ of surfactant while other three chemicals had little influence on the hatching rate.

Keywords: *Bombyx mori* (Strain Dazao); PFOS alternative chemicals; safety evaluation

全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是一类重要的全氟表面活性剂,广泛用于近千种民用和工业产品生产中。由于具有高度稳定性,PFOS已成为新型持久性有机污染物^[1]。有研究表明,PFOS会对鼠类的繁殖产生严重影响,其通过缩短母体妊娠期的长度,减少小鼠的出生重量,造成小鼠身体缺陷、发育迟缓,增加小鼠的出生死亡率^[2]。并且PFOS能够影响小鼠甲状腺素水平从而不利于啮齿动物的发展^[3]。研发新型安全的PFOS替代品既是我国履行斯德哥尔摩公约的重大责任,同时也是《国家履约实施计划》所提出的重要任务。强化替代品的风险评价,使替代品在使用过程中不产生新的环境污染物是PFOS替代技术的关键。

桑蚕,又称家蚕,起源于中国,是一种具有很高经济价值的吐丝昆虫,对环境各种化学物质反应十分敏感。国家环境保护总局于1989年制订的《化学农药安全评价实验准则》推荐使用浸叶法研究农药对家蚕的毒理作用^[4]。2002年,国际无脊椎动物协会正式将家蚕确定为鳞翅目模式昆虫^[5]。2009年,我国科学家完成了家蚕基因组测序^[6],并构建了世界上第1个家蚕遗传数据库,此研究结果为以家蚕为模式生物的研究提供了基础和技术平台。目前,美国国家环保局(USEPA)与经济合作与发展组织(OECD)均缺乏化学品对家蚕安全风险评价的准则,因此本研究主要参照我国《化学农药安全评价实验准则》^[4]及相关文献^[11]建立了大造家蚕对化学品的安全评价毒性测定方法,包括家蚕的接触毒性、急性饲喂毒性及慢性饲喂毒性方法。家蚕在基础物质代谢、能量代谢和遗传方式上与人类有很大的相似性,因此,可以作为模式动物研究化合物的药物代谢行为^[7]。此外,英国和爱尔兰的科学家发现,哺乳动物与昆虫可以产生类似的抗病反应,以前用老鼠进行的药物试验,80%可用昆虫替代^[8]。家蚕作为典型的鳞翅目昆虫,具有易于在实验室内饲养和繁殖、世代短、子代群体大、遗传背景清楚和便于进行实验操作的特点,因此,家蚕是进行化学品安全风险评价的优良受试物种。

我国制定的《化学农药安全评价实验准则》中使用的家蚕品种为菁松×皓月,菁雷×镇珠和苏菊×明虎,这两种家蚕均为杂交体系。为保证遗传体

系的均一性,本实验选取国内优良蚕种大造作为实验蚕种。家蚕大造为中系二化性原种,具有生命力强,对人工饲料适应性好,蚕体健壮和生长快等优点;同时大造蚕种为非杂交种,保证了遗传体系的均一性。选取本地蚕种大造对化学品进行安全风险评价,有利于保护本地蚕种。此外《化学农药安全评价实验准则》中家蚕为桑叶饲养,但是桑叶供应受季节性影响不能满足随时进行化学品安全评价的要求。因此本实验采用人工饲料对家蚕大造进行实验室饲养,建立以喂食饲料为基础的毒性评价方法,并对4种PFOS化学品进行初步的环境安全评价。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

实验生物:家蚕大造卵由山东蚕业研究所提供。实验选用生长健壮,大小一致的2龄起蚕,此时期家蚕对药物最为敏感^[9]。

家蚕饲料:由山东蚕业研究所提供,饲料配方:40%桑叶粉、43.4%脱脂大豆粉、9.4%玉米淀粉、1.5%复合维生素B、1.5%维生素C、2.0%柠檬酸、0.4%巴豆酸和0.2%氯化胆碱。

1.2 实验器材

恒温培养箱(宁波市科技园区新江南仪器有限公司)和培养皿(直径10 cm)等玻璃器皿。

1.3 供试药剂

4种PFOS替代品:50%的全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂(以下简称阳离子表面活性剂)、用调聚法合成的织物三防整理剂(含固率23.7%)、用电解氟化法合成的C4和C6织物三防整理剂。

1.4 大造蚕种初步实验动物化

1.4.1 饲料加工

按饲料粉:水为1:2.5装入烧杯调匀,杯口覆盖保鲜膜,隔水蒸煮20 min冷却后,装入自封袋,贮放在4℃冰箱中。

1.4.2 家蚕实验室条件下的规模化饲养

催青:25℃,相对湿度85%。逐日观察蚕卵变化,当蚕卵转为黑色,可见到蚁蚕外形后,遮光处理24 h,次日早6点感光,2 h后收蚁。

收蚁:将加工好的饲料平放于收蚁网上,让蚁蚕爬于饲料上,收蚁结束后,将收蚁网一起转入塑料饲养盒(20×10×5 cm),盒底放1张合适大小的滤纸,

饲养盒口盖上保鲜膜防止饲料干燥。

1~2龄小蚕饲养: 饲料装入饲料加工器(自制), 挤压出合适的饲料条, 供家蚕食用, 每天给饲料1次。1龄眠除沙1次。光暗比14:10^[10]。饲育温湿度: 1~2龄温度为27℃, 相对湿度90%, 用保鲜膜覆盖饲养盒保湿, 每天打开换气2次。

3~5龄大蚕饲养: 3~5龄温度为26.5℃, 相对湿度80%。3~4龄蚕饲料根据采食情况添加, 一般每天给饵1次; 5龄蚕给饵每天2次, 每天换饲养盒及底网1次。龄蚕充分饱食, 提高蚕的抗性和结茧率。

眠起处理 50% 蚕入眠时停止饲料, 而后6~8小时加网提青, 温度眠中比喂食时低0.5℃, 湿度75%。饲食给饲料量是前龄盛食期的80%。

上簇: 熟蚕上簇密度为: 方格簇每只簇片上熟蚕150头左右, 由人工逐头拾取适熟蚕, 收集到一定数量后及时送到簇室, 均匀投放在簇具上。

羽化及产卵: 25℃条件下进行羽化。雌雄蛾在产卵纸上1:1进行交配, 交配4h后将雌雄蛾分开, 雄蛾被淘汰或放置5℃冰箱保存再用。雌蛾产卵后, 第2天下午收卵, 14℃保存1h, 5℃保存备用。

蚕卵的浸酸与孵化: 将卵纸在8%甲醛处理15min, 并在比重为1.075 kg·L⁻¹盐酸46℃液温中浸酸处理5min, 再经清水脱酸晾干, 冬天清水脱酸时要保证清水的温度最好在20℃左右, 卵纸晾干后, 于25~27℃、相对湿度75%~85%的条件下常规催青至孵化。形成一个世代的周期循环。

1.5 大造蚕种化学品风险评价毒性方法的建立

1.5.1 急性接触实验

药膜法: 将替代品用丙酮稀释5个梯度浓度, 用移液器取1mL溶液于9cm培养皿, 涂匀晾干后每皿接入10头健康的2龄起蚕, 对照组培养皿涂同体积丙酮, 每一处理均设3个重复, 让其自由爬行1h, 后转入正常环境培养, 观察24h后家蚕反应^[11]。统计死亡率, 并计算对应的LC₅₀值及其95%置信限。

1.5.2 急性饲喂实验

浸叶法: 参照《化学农药环境安全评价实验准则》^[4], 在预实验的基础上设置5个浓度组, 每组20头健康的2龄起蚕, 3次重复。以5g药液浸渍5g桑叶, 晾干后供蚕食用, 观察24、48和96h家蚕反应, 进食量及桑叶变化, 统计死亡率并计算对应的LC₅₀值及95%置信限。

饲料法: 在预实验的基础上, 以4mL药液浸渍

10g干饲料比例调制饲料, 配制成5个拌毒饲料浓度分别为0.004、0.04、0.4、2和4 g·kg⁻¹, 饲喂2龄起蚕, 并连续饲喂120h。观察家蚕中毒反应, 统计生长受抑制数和死亡率, 并计算对应EC₅₀或LC₅₀值。每组实验20头蚕, 3次重复。

1.5.3 慢性饲喂实验

根据急性饲喂实验结果, 确定慢性饲喂实验浓度为0.004、0.04、0.4、2 g·kg⁻¹。每组实验10头蚕, 3个重复, 同时设清水处理饲料作为对照。饲喂2龄起蚕, 并连续饲喂到结茧。3龄以后每隔3d观察统计家蚕体长、体重和生长情况, 结茧后调查结茧率和羽化率等评价家蚕长期摄入替代品对其经济性状的影响。并对其交配、产卵及孵化率进行调查, 以评价PFOS替代品对家蚕后代的影响。

1.6 数据处理

以药剂浓度的对数值为自变量(x), 以相应浓度下家蚕死亡率的几率值为因变量(y), 采用SPSS数据处理软件, 使用Probit进行回归分析, 建立“剂量-效应”线性方程, 并记录开方检验值、LC₅₀值及其95%置信限。

2 结果(Results)

2.1 急性接触实验

目前国内外均未有对家蚕急性接触毒性的等级划分标准, 本实验设计的最高化学品接触浓度为10 g·L⁻¹, 大造蚕种并未出现明显的死亡现象。本实验设计浓度值要远高于党建友等^[11]设计的家蚕接触毒性实验的浓度值, 因此判断4种PFOS替代品对大造蚕种的接触毒性为低毒。

2.2 急性饲喂实验

参照《化学农药环境安全评价实验准则》^[4]规定, 浸叶法喂养蚕种的化学品浓度上限为2000 mg·L⁻¹, 在96h的实验过程中, 大造蚕种均未出现死亡, 因此可以判断4种PFOS替代品对大造蚕种急性饲喂毒性为低毒。同时为了避免桑叶供应受季节性限制对家蚕毒理实验的影响, 本文使用“饲料法”对大造蚕种进行急性饲喂实验, 当化学品的浓度高达2 g·kg⁻¹时, 各组家蚕均未出现大量死亡, 但是家蚕的生长受到了一定程度的抑制, 因此本文采用半抑制浓度EC₅₀(即引起50%受试蚕种生长出现抑制的供试物浓度)表征4种PFOS替代品毒性。相较桑叶饲喂, 饲料饲喂会减缓蚕的生长, 因此“饲料法”延长受试蚕种进食饲料的时间, 本实验初步设定在120h。“饲料法”急性饲喂实验结果如表1所示。

表 1 “饲料法”4 种 PFOS 替代品对大造
蚕种 120 h 的半抑制浓度
Table 1 120 h-EC₅₀ values of 4 alternative
chemicals to Bombyx mori (Strain Dazao)
of “forage method”

化学品名称	120h-EC ₅₀ /(g·kg ⁻¹)	95% 置信区间 /(g·kg ⁻¹)
表面活性剂	0.35	0.01 ~ 1.09
织物三防整理剂	>4	
C4 织物三防整理剂	0.46	0.09 ~ 1.88
C6 织物三防整理剂	0.66	0.32 ~ 1.50

2.3 慢性饲喂实验

实验从结茧率、羽化率和孵化率 3 方面统计分析 4 种 PFOS 替代品对家蚕的慢性毒性。结果见图 1~3。其中结茧率 = 结茧数量/每个处理总蚕数 × 100%，茧层率 = 茧层质量/全茧质量 × 100%，孵化率 = 孵出蚕数量/每蛾产卵总量 × 100%。由图 1 可以看出,随着 4 种 PFOS 替代品浓度的增高,家蚕的结茧率均下降。替代品对家蚕结茧率抑制作用的顺序为: 表面活性剂 > 织物三防整理剂 > C4 织物三防整理剂 > C6 织物三防整理剂。家蚕结茧率随着表面活性剂浓度的升高出现剧烈下降,在表面活性剂浓度为 0.4 g·kg⁻¹ 时,家蚕不能顺利结茧。而织物三防整理剂、C4 织物三防整理剂与 C6 织物三防整理剂均在 0.004 g·kg⁻¹ 后开始对家蚕结茧率产生影响,在 3 种替代品浓度大于 2 g·kg⁻¹ 时,家蚕的结茧率均小于 50%。

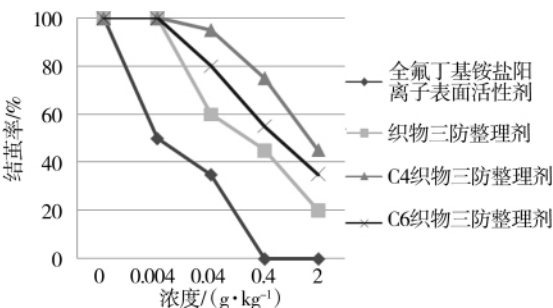


图 1 4 种替代品对大造蚕种结茧率的影响
Fig. 1 Effects of four alternative chemicals
on cocooning rate of Bombyx mori (Strain Dazao)

图 2 为茧层率随各替代品浓度变化图。由图 2 可以看出随化学品浓度增加,家蚕茧层率下降。其

中整理剂对家蚕茧层率影响最小,家蚕茧层率随药物浓度升高只有略微下降。当 C4、C6 织物三防整理剂的浓度高于 0.004 g·kg⁻¹ 时,茧层率下降趋势减缓。表面活性剂对家蚕茧层率的影响最为明显,当其浓度大于 0.04 g·kg⁻¹,茧层率随浓度增加呈直线下降,当药物浓度为 0.4 g·kg⁻¹ 时家蚕不能结茧。

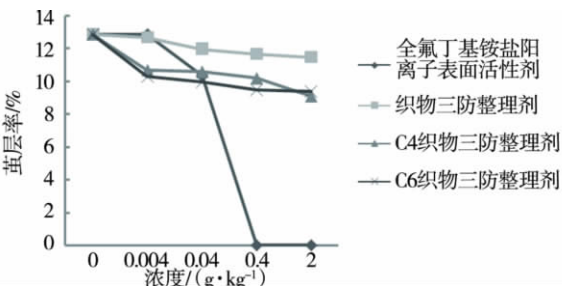


图 2 4 种替代品对大造蚕种茧层率的影响
Fig. 2 Effects of four alternative chemicals on
cocooning layer rate of Bombyx mori (Strain Dazao)

由图 3 可以看出 4 种替代品均会降低家蚕的孵化率。其中表面活性剂会严重阻碍家蚕结茧孵化,随着表面活性剂浓度升高,实验组家蚕孵化率直线降低,许多家蚕不能结茧,顺利化蛾的家蚕产卵不饱满且多数不能孵化。当表面活性剂浓度大于 0.04 g·kg⁻¹ 时,实验组蚕卵均不能孵化。而织物三防整理剂、C4 和 C6 织物三防整理剂浓度增加会降低家蚕孵化率但影响很小,对家蚕结茧率和茧层率影响较小。

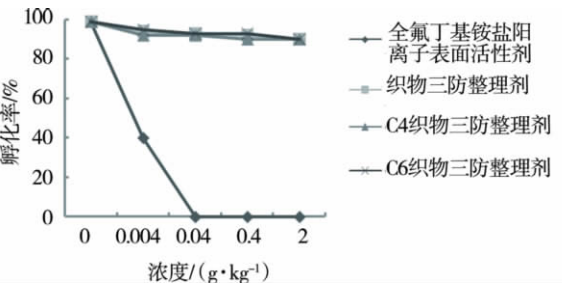


图 3 4 种替代品对大造蚕种孵化率的影响
Fig. 3 Effects of four alternative chemicals on
hatching rate of Bombyx mori (Strain Dazao)

通过上述实验结果可以判断,4 种 PFOS 替代品对大造蚕种的接触毒性及急性饲喂毒性均为低毒;4 种替代品对蚕种均表现出慢性毒性作用,表现为家蚕的结茧率、茧层率及孵化率降低,全氟丁基有机铵盐阳离子表面活性剂慢性毒性作用最为明显。

2.4 “浸叶法”与“饲料法”急性饲喂毒性的比较

“浸叶法”具有操作方便,桑叶比较容易获得,且用桑叶喂食家蚕生长迅速的优点,但是桑叶通过浸泡和晾干再对家蚕进行饲喂,无法测定家蚕摄入受试物的准确量,且桑叶采集受到季节性的影响,不能四季随时进行实验。“饲料法”的优势在于可以将准确量的受试物与一定量的饲料进行混匀后饲喂,能准确确定家蚕摄入受试物的量,但是在饲料准备阶段稍繁琐,且家蚕生长略微偏缓,通过改进饲料,调节生长环境等手段,有望改进这些弊端,其优势会在化学品安全评价体系建立过程中会逐渐显示出来。

通讯作者简介:李建中(1963—),男,研究员,主要研究方向为环境化学及环境毒理学。

参考文献:

- [1] Jensen A A, Leffers H. Emerging endocrine disrupters: Perfluoroalkylated substances [J]. *International Journal of Andrology*, 2008, 31(2): 161 – 169
- [2] Apelberg B J, Witter F R, Herbstman J B, et al. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(11): 1670 – 1676
- [3] Inoue K, Okada F, Ito R, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: Assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(11): 1204 – 1207
- [4] 蔡道基, 杨佩芝, 龚瑞忠, 等. 化学农药环境安全评价试验准则[S]. 北京: 国家环境保护局, 1989
- [5] 秦俭, 何宁佳, 向仲怀. 家蚕模式化研究进展[J]. *蚕业科学*, 2010, 36(4): 645 – 649
- Qin J, He L J, Xiang Z H. Advances in silkworm modeling research [J]. *Science of Sericulture*, 2010, 36(4): 645 – 649 (in Chinese)
- [6] Xia Q, Guo Y, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*) [J]. *Science*, 2009, 326(5951): 433 – 436
- [7] Asami Y, Horie R, Hamamoto H, et al. Use of silkworms for identification of drug candidates having appropriate pharmacokinetics from plant sources [J]. *BMC Pharmacology*, 2010, 10(1): 7
- [8] Renwick J, Kavanagh K. Insects as models for studying the virulence of fungal pathogens of humans [J]. *New Insights in Medical Mycology*, 2007, 45 – 67
- [9] 马惠, 姜辉, 陶传江, 等. 27 种农药对家蚕的毒性评价研究[J]. *农药学学报*, 2005, 7(2): 156 – 159
- Ma H, Jiang H, Tao C J, et al. Toxicity evaluation of twenty - seven pesticides to *Bombyx mori* [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2005, 7(2): 156 – 159 (in Chinese)
- [10] 闭立辉, 顾家栋, 苏红梅, 等. 家蚕品种“桂蚕 2 号”主要性状和饲养技术要点[J]. *广西蚕业*, 2010, 47(3): 18 – 20
- [11] 党建友, 李学锋. 4 种农药对蜜蜂和家蚕的安全性评价[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(1): 40 – 41
- Dang J Y, Li X F. Safety evaluation of four pesticides on honeybee and silkworm [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2005, 33(1): 40 – 41 (in Chinese) ◆