

全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 替代品对中华蜜蜂的毒性

王会利, 王瀛寰, 张艳峰, 张旭, 李建中*

中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 选用中国蜂种中华蜜蜂工蜂作为受试生物, 建立其环境危害评价毒性测试方法, 用所建立的方法对全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 替代品进行了接触急性毒性及经口急性毒性风险评价, 并比较了“小烧杯法”和“饲喂管法”两种经口毒性方法的优缺点及对毒性结果的影响。研究表明, “小烧杯法”实验中 C4 织物三防整理剂对中华蜜蜂的 24 h- LC_{50} 为 $1\,435\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h- LC_{50} 为 $284.67\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 其余替代品在限度实验均未出现蜜蜂死亡, 4 种 PFOS 替代品对中华蜜蜂的接触毒性及经口毒性均为低毒, 但“小烧杯法”测得的经口毒性结果比“饲喂管法”高。

关键词: PFOS 替代品; 中华蜜蜂; 经口毒性; 接触毒性

文章编号: 1673-5897(2012)5-517-04 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxicity of Alternatives of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) to *Apis cerana cerana*

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

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

Received 3 July 2012 accepted 16 July 2012

Abstract: *Apis cerana cerana* were exposed to four alternative chemicals of PFOS to test the acute toxicity of these chemicals. Toxicity-evaluation methods of *Apis cerana cerana* to chemicals were built. Two methods of "small breaker" and "feeding tube" were used to measure the oral toxicity. The relative merits and the effects of two methods were compared. The results suggested that 24 h- LC_{50} and 48 h- LC_{50} values of C4 fabric three finishing agent to *Apis cerana cerana* of "small breaker" were 1435 and $284.67\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. No deaths of bee happened in the limited test of other three chemicals. The contact toxicity and the oral toxicity throughout two methods showed that four chemicals were all low toxic. While the oral toxicity throughout "small breaker" was higher than that of "feeding tube".

Keywords: PFOS alternative chemicals; *Apis cerana cerana*; oral toxicity; contact toxicity

2009 年在瑞士日内瓦召开的第 4 次 POPs 公约缔约方大会, 正式将全氟辛基磺酸盐 (PFOS) 列为新增的 9 种 POPs 之一。PFOS 由于其优异的表面性能, 已广泛涉及国民经济众多领域, 包括服装制造业、塑料制造与加工、皮革/纸张/织物整理和石材保

护等^[1]。PFOS 难以降解, 具有较高的生物蓄积性和人体多脏器毒性, 对环境和人体健康的影响备受关注。其可以通过呼吸和食物被生物体摄取, 有很高生物蓄积性 (易于在生物体内富集), 并可能具有内分泌干扰毒性、遗传毒性以及肝脏毒性等^[2]。因此

收稿日期: 2012-07-03 录用日期: 2012-07-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2010AA065105 和 2012AA06A302)

作者简介: 王会利 (1976-), 女, 博士, 研究方向: 环境化学及环境毒理学研究; E-mail: huiliwang@rcees.ac.cn;

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

开发新型安全的 PFOS 替代品,并对 PFOS 替代品展开安全评价研究已刻不容缓。

中国目前化学品的管理及安全评价尚处于混乱状态,没有一定的法规可依,也没有形成统一的毒性评判标准。而陆生生物安全评价是整个生物风险评价中不可或缺的一部分。昆虫作为地球上最大的生物家族,在陆生环境中广泛分布,与自然环境密切接触。化学品对哺乳动物及其他生物的生理和生态影响必然也能够体现在昆虫上。而蜜蜂(*Apis mellifera*)作为一类具有重要经济价值的有益昆虫^[3],可为人类提供大量蜂产品,如蜂蜜、花粉、王浆、蜂胶和蜂蜡等。此外,蜜蜂对人类的最大贡献在于其是一种重要的传粉昆虫,全世界有上万种植物可靠蜜蜂进行传粉^[4]。蜜蜂的广泛分布、周身被毛、易饲养和可移动性强等特性决定了它对环境十分敏感,常被称为环境污染生物指示器^[5-7]。1990 年至今,因农药等化学品中毒导致蜜蜂死亡、蜂群数量骤减的现象遍及北美、欧洲和亚洲等许多国家,已成为全球普遍关注的环境污染与生物安全问题^[8]。

经济合作与发展组织(OECD)以及国家环保总局 1989 年制订的《化学农药安全评价实验准则》,采用的实验蜂种均为成年意大利工蜂(*Apis mellifera* L 简称“意蜂”)。但在我国,中华蜜蜂为本土特有种,意大利工蜂属于外来物种。意大利工蜂的侵入造成中国特有蜂种如中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* 简称“中蜂”)的分布和数量锐减^[9]。同时农药等化学品的使用也是造成野生中华蜜蜂种群衰退的原因。本地种或特有种(endemic species)对环境的变化尤为敏感,易受环境干扰,能更好地反映环境变化,对维护生态系统稳定和保持生物多样性具有重要意义。选择本地生物种作为实验生物种,才能有效地保护本地种安全。此外,国家环保总局制订的《化学农药安全评价实验准则》^[10]推荐采用“小烧杯法”评价化学农药对蜜蜂的经口毒性,而许多国家和国际组织则采用了 OECD 推荐的“饲喂管法”^[11]。两种方法的优缺点至今一直存在争论。

因此,本文选用我国本地物种中华蜜蜂作为受试生物,参照我国《化学农药安全评价实验准则》及 OECD 建立的蜜蜂实验的相关准则,建立中华蜜蜂的安全评价毒性测定方法,对我国所研制的 4 种 PFOS 替代品进行风险评价。并对我国制定的蜜蜂经口毒性“小烧杯法”和 OECD 推荐的经口毒性“饲喂管法”进行比较。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

实验蜜蜂:中华蜜蜂成年工蜂(*Apis cerana cerana*)最初由北京市密云县中华蜜蜂谷提供,后由实验室自行饲养与繁育。全部实验用蜂取自同一蜂群,进行实验的蜜蜂个体选择身体健康、大小一致的工蜂。

1.2 实验蜂笼

蜂笼规格为:长、宽、高分别为 14.4 cm × 10.5 cm × 12.4 cm,上下以纱网衬里的木质蜂笼,木板厚度为 1 cm 左右,纱网孔径为 2.5 mm。

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(简称表面活性剂)、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 及 C6 织物三防整理剂。

1.4 中华蜜蜂实验室条件下的规模化饲养及初步实验动物化

1.4.1 规模化饲养

将由中华蜜蜂谷提供的中华蜜蜂蜂群置于实验室外搭建的简易敞口雨棚内饲养,定期查看蜜蜂酿蜜情况,酌情给予一定的蔗糖水防止食物短缺。冬季天冷后,于蜂箱内添加隔温板,往蜂排上添加一定量蜂蜜水以备蜂群过冬,并于蜂箱上添加稻草保暖。

1.4.2 实验驯化

饲养后的蜂群在实验前需要转入到实验用蜂笼进行为期一周的驯化,在驯化期间,没有出现明显死亡状况;且使用乐果标准品为参比实验时结果未出现明显波动时,再选取身体健康、大小一致的工蜂进行毒理实验。

1.5 中华蜜蜂化学品风险评价测定方法的建立

1.5.1 实验方法

蜜蜂接触毒性实验及“小烧杯法”经口毒性实验参照我国制定的《化学农药环境安全评价实验准则》^[10]，“饲喂管法”经口毒性实验参照 OECD 颁布的“化学品测试准则 No. 213”^[11]。实验在人工气候箱中进行,温度控制在(25 ± 1)℃,相对湿度控制在 60% 左右,于实验开始后第 24 和第 48 小时分别检查各浓度组蜜蜂中毒和死亡情况,每组实验平行重复 3 次,每次实验使用 20 只蜜蜂。

1.5.2 数据处理

以药剂浓度的对数值为自变量(x),以相应浓度

下蜜蜂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 (或 LD₅₀)值及其 95% 置信限。

1.5.3 参照标准

根据《化学农药安全评价实验准则》^[10]“小烧杯法”将农药对蜜蜂的经口毒性划分为 4 个等级: 48 h LC₅₀ ≤ 0.500 mg·L⁻¹ 为剧毒; 0.500 mg·L⁻¹ < 48 h LC₅₀ ≤ 20.0 mg·L⁻¹ 为高毒; 20.0 mg·L⁻¹ < 48 h LC₅₀ ≤ 200 mg·L⁻¹ 为中等毒性; 48 h LC₅₀ > 200 mg·L⁻¹ 为低毒。由美国国家环保局(USEPA)对蜜蜂和其他非目标昆虫的毒性标准^[12]。“饲喂管法”触杀毒性等级划分标准: 24 h LD₅₀ 值 ≤ 0.001 μg·蜂⁻¹ 的为剧毒农药; 0.001 μg·蜂⁻¹ < 24 h LD₅₀ ≤ 2.00 μg·蜂⁻¹ 的为高毒农药; 2.00 μg·蜂⁻¹ < 24 h LD₅₀ ≤ 11.0 μg·蜂⁻¹ 的为中毒农药; 24 h LD₅₀ > 11.0 μg·蜂⁻¹ 为低毒农药。“饲喂管法”触杀毒性等级划分标准的 LD₅₀ 值并非仅仅针对接触毒性,其他如农药的经口毒性,如果用“饲喂管法”进行测定,其结果也可以用 LD₅₀ 值来衡量^[3]。根据《化学农药安全评价实验准则》^[10]规定“小烧杯法”经口毒性的限度实验浓度为 2000 mg·L⁻¹,接触实验的限度实验浓度为 100 μg·蜂⁻¹,而 OECD 颁布的“化学品测试准则 No. 213”^[11]中规定“饲喂管法”的限度实验浓度为 100 μg·蜂⁻¹。

2 结果(Results)

2.1 “小烧杯法”经口毒性

《化学农药安全评价实验准则》^[10]中给出“小烧杯法”经口毒性的上限浓度为 2 000 mg·L⁻¹。表面活性剂、织物三防整理剂及 C6 织物三防整理剂 3 种替代品在上限浓度 2 000 mg·L⁻¹ 均未出现明显的死亡现象,因此这 3 种替代品对中华蜜蜂的“小烧杯法”经口毒性可判断为低毒。

C4 织物三防整理剂对中华蜜蜂的 24 和 48 h 小烧杯法急性半致死实验结果如表 1 和表 2 所示。从表中可以得出,在 48 h 内,随着 C4 织物三防整理剂质量浓度的升高,中华蜜蜂的死亡率也逐渐升高,二者呈现出线性关系。由 Spss 软件分析得出 C4 织物三防整理剂对中华蜜蜂“小烧杯法”24 h-LC₅₀ 为 1 435 mg·L⁻¹,48h-LC₅₀ 为 284.67 mg·L⁻¹。根据《化学农药安全评价实验准则》毒性分级标准,C4 织物三防整理剂对中华蜜蜂急性经口毒性亦为

低度。

表 1 “小烧杯法”C4 织物三防整理剂对中华蜜蜂 24 h 半致死浓度

Table 1 24 h-LC₅₀ values of C4 fabric three finishing agent to Apis cerana cerana of “small breaker”

项 目	浓度组/(mg·L ⁻¹)					
	100	200	400	800	1 600	3 200
死亡率/%	12.5	25.0	30.0	42.5	47.5	58.3
回归方程	y = - 2.871 + 0.395x 卡方: 0.805 显著性值: 0.938					
24 h-LC ₅₀	1 435					
/(mg·L ⁻¹)						
95% 置信区间	1 055 ~ 2 217					
/(mg·L ⁻¹)						

表 2 “小烧杯法”C4 织物三防整理剂对中华蜜蜂 48 h 半致死浓度

Table 2 48 h-LC₅₀ values of C4 fabric three finishing agent to Apis cerana cerana of “small breaker”

项 目	浓度组/(mg·L ⁻¹)				
	62.5	125	250	500	1 000
死亡率/%	25.0	35.0	50.0	62.5	67.5
回归方程	y = - 2.415 + 0.427x 卡方: 0.434 显著性值: 0.933				
24 h-LC ₅₀	284.67				
/(mg·L ⁻¹)					
95% 置信区间	218.92 ~ 376.62				
/(mg·L ⁻¹)					

2.2 “饲喂管法”经口毒性

OECD 颁布的“化学品测试准则 No. 213”^[1]中规定“饲喂管法”的上限浓度为 100 μg·蜂⁻¹,表面活性剂、织物三防整理剂、C4 和 C6 织物三防整理剂在上限浓度 100 μg·蜂⁻¹ 时均未出现明显死亡。因此,4 种替代品对中华蜜蜂经口毒性为低毒。

2.3 接触毒性实验

《化学农药安全评价实验准则》^[10]给出蜜蜂接触实验的上限浓度为 100 μg·蜂⁻¹,表面活性剂、织物三防整理剂、C4 和 C6 织物三防整理剂于上限浓度 100 μg·蜂⁻¹ 也未出现明显的死亡状况。因此,4 种替代品对中华蜜蜂接触毒性为低毒。

3 讨论(Discussion)

3.1 受试蜂种的确定及中华蜜蜂对化学品安全评价测试方法的建立

选取我国特有蜂种中华蜜蜂对化学品进行安全

风险评价,更有利于对本地蜂种的保护,同时,中华蜜蜂体型较意大利工蜂偏小,对农药等化学污染物更加敏感,更适合作为化学品风险评价的受试蜂种。

本研究实现了中华蜜蜂的实验室规模化养殖及初步实验动物化。并参照 OECD 相关准则^[11]及我国《化学农药安全评价实验准则》建立了中华蜜蜂环境安全毒性测定方法,包括蜜蜂的接触毒性及经口毒性,并依照所建立的方法评价了 4 种 PFOS 替代品对中华蜜蜂的急性毒性。

3.2 4 种替代化学品对中华蜜蜂的生态毒性

根据以上实验结果和所参照的毒性评判标准,4 种 PFOS 替代化学品中华蜜蜂的急性接触毒性和急性经口毒性均为低毒。这说明我国所研制的 4 种 PFOS 替代品对我国特有物种中华蜜蜂的生态毒性较低。

3.3 “小烧杯法”与“饲喂管法”经口毒性实验方法的比较

相比较“小烧杯法”经口毒性方法与“饲喂管法”经口毒性方法,“小烧杯法”对蜜蜂的接触面积大,接触时间也更长。在“饲喂管法”测定中,蜜蜂主要通过口器接触药剂,而在“小烧杯法”测定中,蜜蜂接触药剂的途径相对复杂:除了口器之外,蜜蜂还可能通过足或身体的其他部位接触药剂。如果供试药剂蒸汽压较高,其熏蒸作用也不可忽视。综上所述,“小烧杯法”测得的毒性结果要比“饲喂管法”高,这也是 C4 织物三防整理剂使用“小烧杯法”测定为低毒,而使用“饲喂管法”上限浓度仍未出现明显死亡的原因。“饲喂管法”能更准确地测得蜜蜂的经口接触毒性,而“小烧杯法”则更接近与田间等外界环境农药残留对蜜蜂的综合毒性。

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] Hansen K, Johnson H, Eldridge J, et al. Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(8): 1681 – 1685
- [2] Jensen A A, Leffers H. Emerging endocrine disruptors: Perfluoroalkylated substances [J]. *International Journal of Andrology*, 2008, 31(2): 161 – 169
- [3] 杨艳霞,金绍强,李少南,等. 五种杀虫剂对蜜蜂的经

口毒性及风险评价[J]. *农药学学报*, 2008, 10(2): 226 – 231

- Yang Y X, Jin S Q, Li S N, et al. Oral toxicity and risk of five insecticides to honeybees [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2008, 10(2): 226 – 231 (in Chinese)
- [4] Kearns C A, Inouye D W, Waser N M. Endangered mutualisms: The conservation of plant – pollinator interactions [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1998, 83 – 112
- [5] Celli G, Maccagnani B. Honey bees as bioindicators of environmental pollution [J]. *Bulletin of Insectology*, 2003, 56(1): 137 – 139
- [6] Porrini C, Sabatini A G, Girotti S, et al. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination [J]. *Apiacta*, 2003, 38: 63 – 70
- [7] 吴黎明,王勇,田晓薇. 蜜蜂及其产品作为环境污染生物指示器的研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(3): 18 – 23
- Wu L M, Wang Y, Tian X W. Research progress in bee and honeybee product as biological indicator for monitoring environmental pollution [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2008, 10(3): 18 – 23 (in Chinese)
- [8] 卜元卿,单正军,周军英,等. 农药对蜜蜂生物毒性及安全性评价研究回顾[J]. *农药*, 2009, 48(6): 399 – 401
- Bu Y Q, Shan Z J, Zhou J Y, et al. Research review on biological toxicity and safety assessment of pesticides to honeybee [J]. *Agrochemicals*, 2009, 48(6): 399 – 401 (in Chinese)
- [9] 杨冠煌. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响[J]. *昆虫学报*, 2005, 48(3): 401 – 406
- Yang G H. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48(3): 401 – 406 (in Chinese)
- [10] 蔡道基,杨佩芝,龚瑞忠,等. 化学农药环境安全评价实验准则[S]. 北京: 国家环境保护总局, 1989, 44 – 48
- [11] OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). No. 213, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test [S]. Paris: OECD, 1998
- [12] U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). Technical Overview of Ecological Risk Assessment [EP/OL]. http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_tocera_analysis_eco.htm#Ecotox. ◆