氟对花背蟾蜍急性不良反应研究*

宋 晶** 曹谨玲

(山西农业大学动物科技学院,山西 太谷 030801)

摘要:为了解氟对花背蟾蜍(*Bufo raddei*)的受精卵及蝌蚪的急性不良反应. 本研究以花背蟾蜍为研究对象,观察不良反应行为并测量氟对不同发育期花背蟾蜍(受精卵,10、30 和 50 日龄)的半致死质量浓度(LC_{50})和安全质量浓度(SC). 结果显示,随着质量氟浓度的增高,其对受精卵发育的抑制作用增强. 96 h 后,氟对 10、30 和 50 日龄花背蟾蜍的 LC_{50} 分别为 333、493 和 678 mg/L,SC 分别为 3、5 和 7 mg/L. LC_{50} 和 SC 均随花背蟾蜍日龄的增加而不断升高,花背蟾蜍的受精卵及幼体对氟不良反应较敏感.

关键词:花背蟾蜍;受精卵;蝌蚪;氟;急性不良反应

中图分类号:X835 **DOI**:10. 19789/j. 1004-9398. 2020. 03. 007

0 引 言

氟是地球上蕴藏量最丰富的元素之一,氟与人体健康的关系非常密切,国际上饮用水中氟的规定质量浓度为 1 mg/L,适当的氟含量可以减少龋齿的发生,然而高氟也会带来一系列慢性疾病[1-3]. 农业化工的发展和石化燃料的燃烧等活动都增加了物种在高氟下暴露的机率,城市建设和工业的高速发展导致部分地域地下水氟含量超标,食物和饮用水中氟超标[4]. 水生生物是极易受氟影响的靶生物之一,国内外学者以水生无脊椎动物和鱼类为研究对象做了大量研究[5-7],但两栖类的氟不良反应效应的研究还较少,仅以非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)、中国林蛙(*Rana chensinesis*)、黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)和紫泽蛙(*Euphlyctis cyanophlyctis*)为对象进行了毒理学研究[8-11].

水生生物可用来监测水质环境的变化,两栖动物就常被作为水体污染的指示生物. 原因在于一方面其皮肤辅助呼吸能够增强对污染物的积累;另一方面幼体在水中生长,成体也必须在水中繁殖等,所以其非常适合进行水体污染物监测[12]. 但不是所有两栖类都能够作为指示生物,有研究指出尽可能地选择发育迅速且分布广的常见两栖类的幼体作为实验动物[13]. 花背蟾蜍(*Bufo raddei*)主要分布在海拔 600 ~ 2 700 m 地带,多分布于我国东北区和华北区,少量分布于蒙新区和青藏区东缘,在半荒漠、林间草地、自然水域和农耕区都较容易采集到花背蟾蜍. 其中,东北区和华北区是我国煤炭、冶金和机械等重工业最集中的地区,以花背蟾蜍作为该区域水体中氟污染的指示生物有其独特的优势. 本实验以花背蟾蜍的受精卵和蝌蚪为研究对象,通过考察氟对其急性不良反应,旨在通过生物监测对工业区水质氟超标研究提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物亲本捕于晋中市太谷县的山西农业大学思想湖,所有受精卵由同一对亲本同批次产出,蝌蚪也由同批卵培育得到. 分别对破膜 10、30 和 50 日龄的蝌蚪进行急性不良反应实验. 培养早期,每次只换 1/2 体积缸里的水;蝌蚪长大后,全缸换水并及时清除死亡个体及残饵以保证缸内清洁. 饲养食物为骨粉、蛋黄渣和煮软的纤维少的叶菜. 注:实验室饲养蝌蚪,水质条件较好且无天敌;野外种群则有丰富的生物饵料;两者的生长发育速度并不完全一致,自繁殖种群的优势在于个体差异小、取材方便和易控制日龄.

1.2 实验药品和仪器

分析纯氟化钠(NaF)购自天津北辰方正试剂

收稿日期:2019-06-20

* 山西农业大学创新基金(2014016);山西农业大学“人才引进项目”(2013YJ13)

** 通信作者:songjingoak@ 163. com

厂.溶液配制用水均为双蒸水.利用 Image J 1.44 e 软件进行蝌蚪的体长(total length,TL)测量.利用分析天平(OHAUS CP213,美国奥豪斯公司)测量蝌蚪体质量(body weight,BW),测量精确度 ±0.001 g.

1.3　实验条件

实验用水为经过滤、生物排氨、曝气的自来水,养殖容器为 1 L 的玻璃烧杯,每个容器盛实验液 1 L,并分别随机放入活力良好的花背蟾蜍蝌蚪10 ~ 20 只(其中 10 和 30 日龄 20 只,50 日龄10 只).实验期间,采用便携式多参数水质分析仪(YSI 6600V2,美国维赛公司)监测每天的水质,水温(20 ±1)℃、溶解氧(DO)质量浓度≥4.0 mg/L、硬度(32 ±3) mg/L($CaCO_3$ 当量),pH(7.2 ±0.1).每天投饵并换实验液 1 次,投饵后 30 min 全部更换实验液,实验期间光照时间比为 t(光照):t(黑暗) = 12 h∶12 h.

1.4　NaF 对受精卵发育的影响

选用 2 h 以内产出的受精卵,在直径 150 mm 的培养皿中加入 5 种不同质量浓度的 NaF 溶液(100、200、400、800、1 600 mg/L),对照组加入无氟溶液.每皿放 40 粒受精卵,NaF 溶液 100 mL(按照每粒受精卵 2 ~3 mL 的溶液估算),相邻组的质量浓度比为1∶2,最低组质量浓度为 100 mg/L.每组设 3 个平行实验,以两侧鳃盖完全闭合为判定标准,观察受精卵发育到 25 期时的时间[14],以及最终能够存活到 25 期的百分率,%.

1.5　NaF 对不同发育期蝌蚪的急性不良反应

共设置 8 个质量浓度组(200、300、400、500、600、700、800 和 900 mg/L),对照组加入无氟溶液.鉴于不同日龄蝌蚪对氟的耐受差异,用其中 5 ~ 6 个梯度进行急性不良反应实验(以个体全部存活的最高质量浓度到个体全部死亡的最低质量浓度作为计算半致死质量浓度的区间),每组设 3 个平行实验,暴露后前 8 h 每隔 2 h 通过视频(LSA HD01,盛鼎电子科技有限公司)观察蝌蚪的运动行为、不良反应症状及死亡情况,之后每隔 12 h 观察 1 次,直至暴露后 96 h.蝌蚪停止游动、沉于水底,用玻璃棒触碰仍不运动,则判断为死亡,观察到的死亡个体即时捞出,统一处理.同时记录 24、48、72 和 96 h 的死亡只数.

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示.采用独立样本 t 检验进行组间体长和体质量数据比较.半致死质量浓度(LC_{50})用 Bliss 法求取.采用 SPSS 18.0 进行回归分析,以质量浓度(c)的对数为横坐标,死亡百分数的概率单位(P)为纵坐标进行拟合,求取氟对花背蟾蜍蝌蚪作用后 96 h 的 LC_{50} 及其 95% 可信限,安全质量浓度(SC) = 0.01 × LC_{50}.$P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2　结　果

2.1　实验动物参数

用于实验的 10、30 和 50 日龄花背蟾蜍蝌蚪的只数分别是 300、300 和 180 只,平均体长分别为(9.53 ±0.09)、(16.47 ±0.93)和(33.41 ±2.06) mm,平均体质量分别为(0.011 ±0.008)、(0.075 ±0.020)和(0.519 ±0.054) g.

2.2　氟对花背蟾蜍受精卵孵化的影响

所有组别中的绝大多数受精卵均能存活,仅在 800 和 1 600 mg/L 质量浓度组分别出现了 2.5% 和 3.3% 的致死受精卵,受精卵到达 25 期的时间随着氟质量浓度的增高而不断延长,在 0、100、200、400、800 和 1 600 mg/L 受精卵到达 25 期的时间分别是(189.7 ± 1.5)、(192.3 ± 1.5)、(198.0 ± 1.3)、(201.3 ±3.2)、(203.7 ±1.2)和(208.3 ±2.5) h.结果表明,氟质量浓度的增高,对花背蟾蜍受精卵发育有明显的抑制作用.

2.3　花背蟾蜍蝌蚪的氟不良反应

破膜 10 日龄的花背蟾蜍蝌蚪,暴露于 800 mg/L 下,6 h 后大多丧失自主运动能力,只能停留在烧杯底部,尾向单侧蜷曲、抽搐,几乎不进行垂直运动.30 日龄花背蟾蜍蝌蚪,暴露于 1 000 mg/L 下,6 h 后活动能力明显减退,很少进行自主游动,每组均发现死亡 6 ~8 只,其余个体在受到玻璃棒触碰后,会游动一下,然后继续呆在杯底.

2.4　氟对不同发育期花背蟾蜍蝌蚪的急性不良反应

按照预实验对不同发育时期的花背蟾蜍蝌蚪进行急性不良反应实验,不同浓度暴露不同时间的花背蟾蜍蝌蚪存活率列于表 1.对照组不同日龄氟花背蟾蜍蝌蚪的存活率均为 100%.10 日龄蝌蚪在 200 mg/L 质量浓度下未出现死亡,600 mg/L 下暴露 72 h 全部死亡;30 日龄蝌蚪在 300 mg/L 下未出现死亡,700 mg/L 下暴露 96 h 全部死亡;50 日龄蝌蚪在 400 mg/L 质量浓度下未出现死亡,900 mg/L 下暴露 96 h 全部死亡.蝌蚪存活率显示出明显的剂量-时间效应,其对于氟的耐受性随着日龄而增加.

氟对不同日龄花背蟾蜍蝌蚪的 LC_{50} 急性不良反应作用结果如表 2 所示. 10、30 和 50 日龄花背蟾蜍蝌蚪 96 h 的 LC_{50} 分别为 333、493 和678 mg/L,SC 分别为 3、5 和 7 mg/L. 结果表明,氟急性不良反应作用随蝌蚪发育时期不同而有所差异,LC_{50} 和 SC 均随花背蟾蜍蝌蚪日龄的增加而不断升高.

3 讨 论

3.1 氟对花背蟾蜍受精卵的急性不良反应

Shibuya 和 Masui[14] 的研究表明,将 NaF 和三磷酸腺苷(ATP)添加到北美豹蛙(*Rana pipiens*)和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的细胞液中,可减慢细胞静止因子(cytostatic factor)的失活速度,而作为一种特殊细胞质复合体的细胞静止因子与细胞的早期分裂密切相关. 对爪蟾的研究显示,胚胎早期细胞分裂会受到 NaF 的抑制,表现为体长显著短于对照组;受精后 5 ~ 15 h,胚胎会对低质量浓度的 NaF 产生适应性,生长抑制表现的不再明显[8]. 依据 Gosner 分期标准[15],对两栖动物发育,25 期是呼吸生理上最重要的阶段,两侧鳃盖的闭合意味着蝌蚪能够良好地使用鳃进行呼吸,降低了对混合呼吸的依赖,而且这种变化与氟对动物体的不良反应密切相关. 本实验结果表明,氟质量浓度的增高,其对花背蟾蜍受精卵发育的抑制作用增强. 高质量浓度氟溶液对花背蟾蜍受精卵发育产生一定影响,表现为受精卵发育到 25 期的时间随氟质量浓度增高而不断延长,800 mg/L 以上出现 5.0% 左右的死卵,而中、低质量浓度能够全部发育到 25 期. NaF 对蝌蚪发育的慢性毒性还有待研究,但其减缓卵裂,提高畸形率已得到证实[8].

3.2 不同日龄花背蟾蜍蝌蚪对氟的耐受性

氟及氟化物的急性不良反应,主要在于遇水生成气态氟化氢和液态氢氟酸,两者对呼吸道黏膜和皮肤均有强烈刺激和腐蚀作用,短期暴露于高质量浓度氟下还可引起反射性窒息,氟主要通过破坏糖酵解和蛋白合成等生物化学反应来影响动物的正常代谢[16]. 蝌蚪是无尾两栖类动物生活于水中的幼体,其有着鱼一样的呼吸方式,兼具两栖类的皮肤呼吸,而在其准备变态登陆的时期鳃的逐步退化,皮肤呼吸起到更重要的作用. 实验结果显示,LC_{50} 和

表 1 不同氟质量浓度溶液对暴露不同时间花背蟾蜍蝌蚪的存活率/%

日龄/d	暴露时间/h	质量浓度/(mg · L^{-1})							
		200	300	400	500	600	700	800	900
10	24	100	100	95	70	30	—	—	—
	48	100	100	70	40	5	—	—	—
	72	100	85	40	10	0	—	—	—
	96	100	65	20	5	0	—	—	—
30	24	—	100	100	90	90	65	55	—
	48	—	100	95	80	55	35	30	—
	72	—	100	90	70	40	20	5	—
	96	—	100	90	50	10	0	0	—
50	24	—	—	100	100	100	90	100	80
	48	—	—	100	100	80	90	90	30
	72	—	—	100	90	80	80	60	10
	96	—	—	100	90	70	50	30	0

注:—表示无数据.

表 2 氟对不同日龄花背蟾蜍蝌蚪的急性不良反应作用

日龄/d	回归方程	R^2	LC_{50}/(mg · L^{-1})	95% 置信区间/(mg · L^{-1})	SC/(mg · L^{-1})
10	$P = 10.44 \lg c - 21.33$	0.996	333	306 ~ 363	3
30	$P = 15.40 \lg c - 36.48$	0.998	493	466 ~ 522	5
50	$P = 11.27 \lg c - 26.91$	0.981	678	624 ~ 737	7

注:P 为死亡百分数的概率单位;c 为氟质量浓度;R^2 为线性相关系数;LC_{50} 为半数致死质量浓度;SC 为安全质量浓度.

SC 均随花背蟾蜍蝌蚪日龄的增加而不断升高,50 日龄花背蟾蜍蝌蚪 96 h 的 LC_{50} 甚至高达 678 mg/L,可能正是由于其呼吸方式的转变导致了蝌蚪对氟的耐受性增强.

3.3　蝌蚪与仔鱼、受精卵的氟耐受性的差异

仔鱼和蝌蚪具有相似的代谢机制和氟敏感性. 2 月龄的虹鳟、褐鳟鱼苗 96 h 的 LC_{50} 分别为 164 和 108 mg/L[6],呆鲦和刺鱼的鱼苗具有更高的氟耐受性,96 h 的 LC_{50} 分别为 315 和 340 mg/L[17],西伯利亚鲟仔鱼 96 h 的 LC_{50} 为 181 mg/L[18]. 柴丽红等[9]的研究显示,23 ~ 36 期的中华大蟾蜍蝌蚪均表现出较高的氟耐受性,96 h 的 LC_{50} 为 541 ~ 689 mg/L. 本实验得出,氟离子对 10、30 和50 日龄花背蟾蜍蝌蚪 96 h 的 LC_{50} 分别为 333、493 和 678 mg/L,与同等大小的各种仔鱼相比,有更强的氟耐受性. 可见两栖类的蝌蚪比各种仔鱼有更强的氟耐受性. 蝌蚪对氟的敏感性弱于仔鱼,花背蟾蜍的受精卵对氟的敏感性弱于蝌蚪. 这可能是由于两栖类受精卵有丰富的卵胶膜,卵胶膜和卵膜能对早期胚胎起到一定的保护作用,而孵化期蝌蚪破膜后将直接与环境接触,对毒物敏感性会显著提高.

4　结束语

氟中毒多以长期作用产生慢性不良反应效应的形式出现,生物监测可以一定程度上简化理化监测的取样和测定. 无尾两栖类蝌蚪用于生物监测环境中的氟具有一定的优越性,一些低浓度的氟污染物进入环境后,在能直接检测或人类直接感受到以前,蝌蚪可迅速做出反应,显示出不良反应症状. 本项研究不仅可为两栖动物的环境毒理学研究积累资料,还可以为两栖动物的保护、环境评价及治理提供理论依据.

参 考 文 献

[1] GUI C Z, RAN L Y, LI J P, et al. Changes of learning and memory ability and brain nicotinic receptors of rat offspring with coal burning fluorosis[J]. Neurotoxicol Teratol, 2010, 32(5): 536 – 541.

[2] GE Y M, NING H M, GU X L, et al. Effects of high fluoride and low iodine on thyroid function in offspring rats[J]. J Integr Agric, 2013, 12(3): 502 – 508.

[3] PERUMAL E, PAUL V, GOVINDARAJAN V, et al. A brief review on experimental fluorosis[J]. Toxicol Lett, 2013, 223(2): 236 – 251.

[4] WARREN J J, LEVY S M. Systemic fluoride: sources, amounts, and effects of ingestion[J]. Dent Clin North Am, 1999, 43(4): 695 – 711.

[5] DUNNE K, PAUL V. Acute effects of exposure to sodium fluoride on the red compost earthworm *Eisenia fetida*: lethality and avoidance behavior[J]. Fluoride, 2011, 44(4): 210 – 214.

[6] CAMARGO J A. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review[J]. Chemosphere, 2003, 50(3): 251 – 264.

[7] CAO J L, CHEN J J, WANG J D, et al. Tissue distributions of fluoride and its toxicity in the gills of a freshwater teleost, *Cyprinus carpio*[J]. Aquat Toxicol, 2013, 130 – 131: 68 – 76.

[8] GOH E H, NEFF A W. Effects of fluoride on *Xenopus embryo* development[J]. Food Chem Toxicol, 2003, 41(11): 1501 – 1508.

[9] 柴丽红, 王宏元, 吴民耀, 等. 氟对不同发育时期中华大蟾蜍蝌蚪的急性毒性研究[J]. 安全与环境学报, 2013, 13(4): 5 – 9.

[10] CHEN J, CHAI L, ZHAO H, et al. Effects of fluoride exposure on the growth, metamorphosis, and skeletal development of *Rana chensinesis* and *Rana nigromaculata* larvae[J]. Fluoride, 2016, 49(2): 128 – 142.

[11] PAL S, SAMANTA P, KOLE D, et al. Acute toxicity and oxidative stress responses in tadpole of skittering frog, *Euphlyctis cyanophlyctis* (Schneider, 1799) to sodium fluoride exposure[J]. B Environ Contam Tox, 2018, 100(2): 202 – 207.

[12] 徐士霞, 王跃招, 李旭东. 两栖动物在环境污染生物监测中的应用前景[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(6): 814 – 820.

[13] 林晓倩, 戴强. 应用无尾两栖类蝌蚪进行污染物毒理实验设计的常见问题[J]. 四川动物, 2010, 29(5): 640 – 646.

[14] SHIBUYA E K, MASUI Y. Stabilization and enhancement of primary cytostatic factor (CSF) by ATP and NaF in amphibian egg cytosols[J]. Dev Biol, 1988, 129(1): 253 – 264.

[15] GOSNER K L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification[J]. Herpetologica, 1960, 16: 183 – 190.

[16] KESSABI M. Métabolisme et biochimie toxicologique du fluor: une revue[J]. Rev Méd Vét, 1984, 135: 497 – 510.

[17] SMITH L R, HOLSEN T M, IBAY N C, et al. Studies on the acute toxicity of fluoride ion to stickleback, fathead minnow, and rainbow trout[J]. Chemosphere, 1985, 14(9): 1383 – 1389.

[18] 庄平, 王瑞芳, 石小涛,等. 氟对西伯利亚鲟仔鱼的急性毒性及安全浓度评价[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 440 – 445.

Study on Acute Adverse Reactions of Fluoride on *Bufo raddei*

SONG Jing Cao Jinling

(College of Animal Science and Technology, Shanxi Agriculture University, Taigu Shanxi 030801)

Abstract: In order to analyze the acute toxicity of fluoride to the fertilized eggs and tadpoles of *Bufo raddei*, the *Bufo raddei* of different ages (fertilized eggs, 10, 30 and 50 day-old) were selected to study the fluorosis behavior, semi-lethal mass concentration (LC_{50}) and safe mass concentration (SC). The results showed that its inhibition on the development of the fertilized eggs increased with the increase of fluoride concentration. After 96 h, the LC_{50} concentration of fluoride to 10, 30 and 50 day-old *Bufo raddei* was 333, 493 and 678 mg/L, and the SC was 3, 5 and 7 mg/L, respectively. The LC_{50} and SC increased with age, suggesting that the fertilized eggs and tadpoles of *Bufo raddei* were sensitive to fluoride adverse reactions.

Keywords: *Bufo raddei*; fertilized egg; tadpole; fluoride; acute adverse reactions