

王洪斌, 成 群, 熊文超, 等. 2,2',4,4',5-五溴联苯醚(BDE-99)对巴夫藻和塔玛亚历山大藻的致毒胁迫效应[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 325-328.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.081

2,2',4,4',5-五溴联苯醚(BDE-99)对巴夫藻和塔玛亚历山大藻的致毒胁迫效应

王洪斌^{1,2}, 成 群¹, 熊文超¹, 胡业庆¹, 谢冰倩¹, 李士虎²

(1. 淮海工学院海洋生命与水学院, 江苏连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005)

摘要:以 2 种海洋微藻的生长量、丙二醛(MDA)含量及过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)活性为检测指标,在微藻对数生长期时加入不同浓度梯度的 2,2',4,4',5-五溴联苯醚(BDE-99),研究 BDE-99 对巴夫藻(*Pavloca viridis*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的致毒胁迫效应。结果显示:低浓度(1.67 μg/L)的 BDE-99 对 2 种微藻均有刺激生长作用,高浓度有强烈的抑制作用并具有明显的剂量效应,26.72 μg/L 浓度的 BDE-99 试验组对巴夫藻、塔玛亚历山大藻的生长抑制率分别为 73%、74%。用一定浓度(6.68 μg/L)的 BDE-99 处理 2 种微藻,2 种微藻的 CAT 活性在 24 h 开始升高,96 h 达最高值,巴夫藻与塔玛亚历山大藻分别增加 47%、31%;巴夫藻 AKP 活性于 72 h 达到最高值,与对照组相比,升高 43%,塔玛亚历山大藻的 AKP 活性于 48 h 达到最大值,与对照组相比,升高 40%;2 种微藻的 ACP 活性变化趋势不明显;随着培养时间的增加,2 种微藻 MDA 含量逐渐升高,特别是塔玛亚历山大藻升高趋势极其明显,巴夫藻、塔玛亚历山大藻均在 120 h 达最高值,与对照组相比,分别增加 56%、95%。研究结果可以为揭示多环芳烃化合物污染对水环境的危害程度提供参考。

关键词:2,2',4,4',5-五溴联苯醚(BDE-99);巴夫藻;塔玛亚历山大藻;毒性效应

中图分类号:X173 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0325-04

2,2',4,4',5-五溴联苯醚(BDE-99)是一种多溴联苯醚(PBDEs),也是一种溴代阻燃剂。PBDEs 拥有极为优异的阻燃性能、热稳定性等,因此被广泛用作电子电路、建筑家具、塑料制品、纺织等行业中。但是,这些产品在使用、焚烧和降解等过程中,不与 PBDEs 共价结合,这时 PBDEs 就会挥发到自然环境中^[1-2],之后经过大自然的各类循环进入海洋,并最终在沉积物和生物体内积累^[3]。大量研究和实证表明,PBDEs 的化学结构与多氯联苯(PCBs)极为相似,具有难降解、高脂溶性等特点,是一种新型的持久性有机污染物。2004 年,欧洲部分国家已禁止八溴联苯醚等 PBDEs 的投放使用。2006 年,欧盟颁布明令禁止欧盟各国在电子商品中使用多溴联苯醚^[4]。

我国为发展中国家,每年使用多溴联苯醚用作阻燃剂等

也十分多。随着 PBDEs 用量的增加,在大气、沉积物或污泥、鱼类、人体血液和脂肪组织、母乳等中均能检测到其存在,而在水、沉积物和生物体中含量最高的是以 BDE-47、BDE-99、BDE-100 为主的低溴联苯醚。

藻类作为海洋和陆地上的初级生产者,其价值在近几十年来被越来越多的研究人员和学者看重。关于藻类的研究更是不胜其数,其中微藻的生态价值已经渗透到工业、农业等各方面。BDE-99 一旦进入水体,开始“入侵”的对象就是浮游藻类。在“侵入”后便在食物链中传播,进入水体和人体,从而危害生物体健康。

本研究选用常见的巴夫藻(*Pavloca viridis*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)为供试材料,以它们的生长量等为检测参数,分析塔玛亚历山大藻和巴夫藻对不同浓度梯度 BDE-99 的致毒胁迫的响应,从而研究 BDE-99 对海洋微藻的毒性效应,以期证明多环芳烃化合物会对水环境带来严重的破坏性,揭示海洋微藻在水环境污染治理及修复中的潜在应用价值。

收稿日期:2017-08-07

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2014336)。

作者简介:王洪斌(1966—),男,江苏连云港人,博士,教授,主要从事环境微生物学及环境毒理学方面的研究。E-mail:lygwhbly@126.com。

物的分离及其作用[J]. 东北农业大学学报,2008,39(21): 204-206.

[34] Tang J C, Shibata A, Zhou Q, et al. Effect of temperature on reaction rate and microbial community in composting of cattle manure with rice straw[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(4): 321-328.

[35] 吴川福, 岛冈隆行, 小宫哲平, 等. 温度、pH 值对城市垃圾中有

机碳溶解及其降解特性的影响[J]. 中国环境科学, 2014, 34(4): 976-982

[36] Bu X, Ding J, Wang L, et al. Biodegradation and chemical characteristics of hot-water extractable organic matter from soils under four different vegetation types in the Wuyi Mountains, southeastern China[J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(2): 102-107.

1 材料与方法

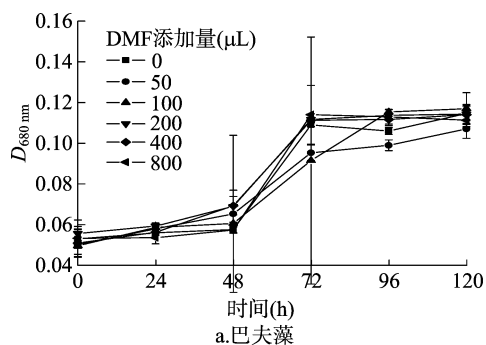
1.1 试验材料

巴夫藻和塔玛亚历山大藻藻种均由淮海工学院海洋生命与水学院藻类实验室保存;本试验中所用海水均取于江苏省连云港市连岛海域涨潮时,海水盐度为 31.00‰ ~ 32.00‰,经醋酸纤维素薄膜过滤后,于 121 ℃ 高压灭菌 20 min 后备用;BDE-99 购自上海源叶生物有限公司(纯度为 98%);二甲基甲酰胺(DMF)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;微藻培养采用通用的 f/2 营养液(自配);其他化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 微藻培养及微藻细胞破碎 在 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL f/2 营养液和 10 mL 藻种,混合均匀,置于光照培养箱中进行封闭式培养,光照度为 3 000 lx,培养温度为 (22 ± 1) ℃,光一暗周期为 12 h—12 h。培养过程中每天定时摇动 3 次,摇瓶过程中随机调换位置,以免光照不均匀。

量取 20 mL 待测藻液,于 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将沉淀物加入 10 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 7.8)中,采用超声波破碎藻细胞(破碎条件:功率为 195 W,超声波工作时间为 3 s,间歇时间为 7 s,超声波破碎强度为 65%,总工作时间为 10 min),镜检无完整细胞后,于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于检测 ACP、AKP、CAT 活性及 MDA 含量。



1.2.2 DMF 对微藻生长量的影响 BDE-99 溶液用 DMF 配制,BDE-99 母液浓度为 5 μg/mL,使用时根据需要稀释;在研究 BDE-99 对海洋微藻的影响时,可能会受到 DMF 的干扰。在藻类生长至对数生长期时,分别在巴夫藻、塔玛亚历山大藻试验组中加入 0、50、100、200、400、800 μL DMF 溶液;用吸光度法(检测波长为 680 nm)检测其生长量,24 h 测定 1 次,直至 120 h,试验设置 3 个平行。

1.2.3 BDE-99 对微藻生长量的影响 在微藻对数期添加不同浓度梯度的 BDE-99,根据文献[5],分别在巴夫藻和塔玛亚历山大藻试验组中加入 0、50、100、200、400、800 μL BDE-99 的 DMF 溶液,对应浓度分别为 0、1.67、3.34、6.68、13.36、26.72 μg/L;用吸光度法(检测波长为 680 nm)检测其生长量,24 h 测定 1 次,直至 120 h,试验设置 3 个平行。

1.2.4 ACP、AKP、CAT 活性和 MDA 含量的测定 在微藻对数期分别添加 0、6.68 μg/L 浓度的 BDE-99,对其 ACP、AKP、CAT 活性和 MDA 含量进行测定,时间间隔为 24 h,直至 120 h,试验设置 3 个平行。ACP、AKP、CAT 活性和 MDA 含量的测定按照试剂盒的说明书进行。

2 结果与分析

2.1 DMF 对 2 种海洋微藻生长量的影响

由图 1 可以看出,2 种海洋微藻的生长量均呈现快速增长的趋势,DMF 各添加量试验组与对照组的生长量几乎相等,增长趋势一致,可见 DMF 添加量增加对巴夫藻及塔玛亚历山大藻的生长没有抑制作用,DMF 作为 BDE-99 溶剂对本研究结果无明显影响。

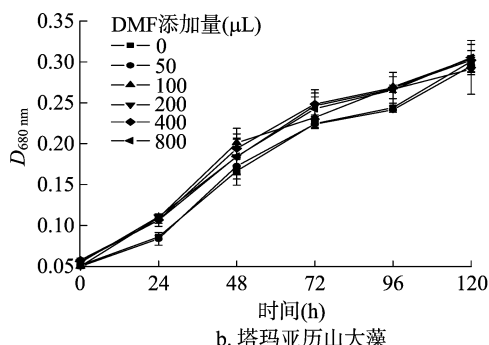


图1 DMF 对巴夫藻和塔玛亚历山大藻生长量的影响

2.2 BDE-99 对 2 种海洋微藻生长量的影响

如图 2 所示,随着处理时间增加,1.67 μg/L BDE-99 试验组的巴夫藻长得最好,说明低浓度的 BDE-99 对巴夫藻有一定的刺激生长作用,120 h 时 26.72 μg/L BDE-99 试验组的巴夫藻生长受到最大抑制,抑制率为 73%,与对照组相比,经 *t* 检验分析,差异极显著($P < 0.01$)。除 1.67 μg/L BDE-99 试验组外,BDE-99 对巴夫藻的抑制作用具有明显的剂量效应。随着 BDE-99 浓度的增加,对塔玛亚历山大藻生长的抑制强度增大。与巴夫藻不同的是,除了 1.67 μg/L BDE-99 试验组外,其他各个浓度试验组对塔玛亚历山大藻生长的抑制作用均很强,3.34、6.68、13.36、26.72 μg/L BDE-99 试验组对塔玛亚历山大藻生长抑制率分别为 64%、78%、74%、74%,与对照组相比,经 *t* 检验分析,差异极显著($P < 0.01$)。

2.3 BDE-99 对 2 种海洋微藻 CAT 活性的影响

按照第 1.2.4 节的方法,添加 6.68 μg/L 浓度的 BDE-99 处理 2 种微藻,0 ~ 120 h 后的 CAT 活性变化见图 3。可以看出,在同一时间条件下,BDE-99 对 2 种微藻 CAT 活性的影响有差异,巴夫藻 CAT 活性在处理 24 h 后开始升高,96 h 达到最高值,与对照组相比,增加了 47%,经 *t* 检验分析,差异显著($P < 0.05$),120 h 后几乎恢复至对照组水平;对于塔玛亚历山大藻,在同一时间条件下,自用 BDE-99 处理后 24 h 起,CAT 活性即有增加,增加趋势同巴夫藻,96 h 达最高值,与对照组相比,增加 31%,经 *t* 检验分析,差异显著($P < 0.05$),120 h 恢复至对照组水平,略低于对照组。

2.4 BDE-99 对 2 种海洋微藻 AKP 活性的影响

按照第 1.2.4 节的方法,用 BDE-99 处理 2 种微藻,0 ~ 120 h 后 AKP 的活性变化见图 4。可以看出,随着 BDE-99

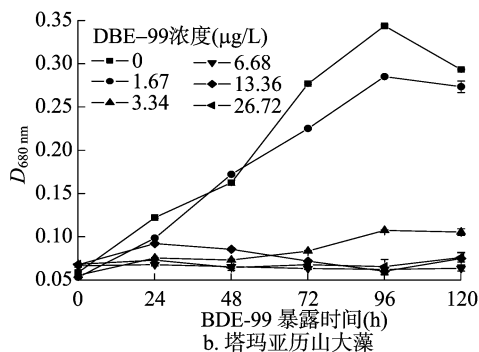
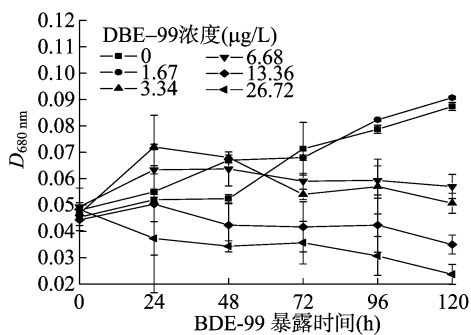


图2 BDE-99对巴夫藻和塔玛亚历山大藻生长量的影响

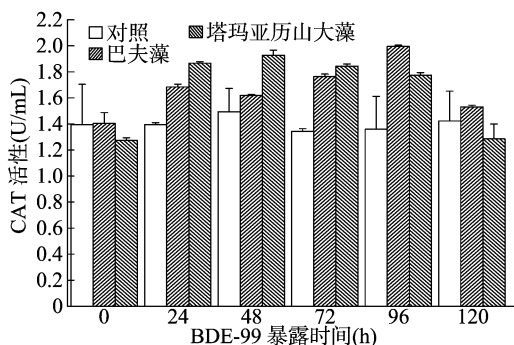


图3 BDE-99对巴夫藻和塔玛亚历山大藻 CAT 活性的影响

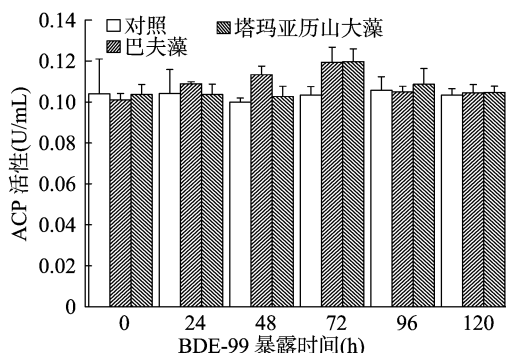


图5 BDE-99对巴夫藻和塔玛亚历山大藻 ACP 活性的影响

暴露时间的增加,巴夫藻、塔玛亚历山大藻的 AKP 活性先逐渐升高,巴夫藻的 AKP 活性于 BDE-99 处理 72 h 后达最高值,与对照组相比,升高 43%,经 t 检验分析,差异显著 ($P < 0.05$),以后逐渐降低,处理 120 h 后恢复至对照组水平;塔玛亚历山大藻的 AKP 活性变化趋势同巴夫藻,AKP 活性在处理 48 h 达到最大值,与对照组相比,升高 40%,经 t 检验分析,差异显著 ($P < 0.05$),处理 48 h 以后逐渐降低,处理后 120 h 恢复至对照组水平。

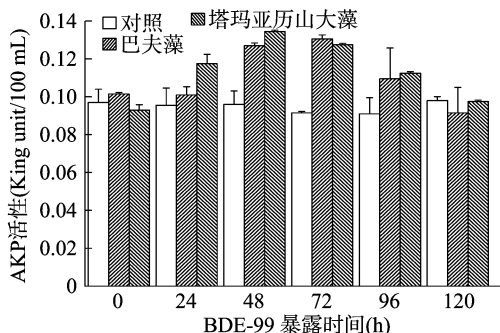


图4 BDE-99对巴夫藻和塔玛亚历山大藻 AKP 活性的影响

2.5 BDE-99 对 2 种海洋微藻 ACP 活性的影响

用 BDE-99 处理 2 种微藻 0~120 h 的 ACP 活性变化见图 5。可以看出,随着 BDE-99 暴露时间的增加,2 种微藻的 ACP 活性变化趋势不明显,巴夫藻、塔玛亚历山大藻的 ACP 活性均于 BDE-99 处理 72 h 达到最高值,与对照组相比,升高 15%,经 t 检验分析,差异不显著,以后逐渐降低,120 h 后恢复至对照组水平。

2.6 BDE-99 对 2 种海洋微藻 MDA 含量的影响

用 BDE-99 处理 2 种微藻 0~120 h 的 MDA 含量变化见图 6。可以看出,随着培养时间的增加,2 种微藻的 MDA 含量

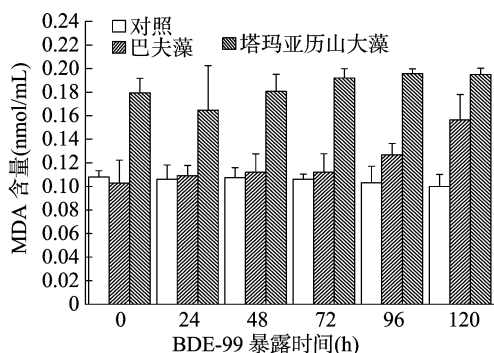


图6 BDE-99对巴夫藻和塔玛亚历山大藻 MDA 含量的影响

整体上逐渐升高,特别是塔玛亚历山大藻的升高趋势非常明显,巴夫藻则在 120 h 达最高值,与对照组相比,提高 56%,经 t 检验分析,差异极显著 ($P < 0.01$);塔玛亚历山大藻同样在 BDE-99 处理后 120 h 达最高值,与对照组相比,提高 95%,经 t 检验分析,差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

胡恒等进行了 BDE-99 等 5 种 PBDEs 对亚心型扁藻和盐生杜氏藻的毒性试验,结果显示:对照组的 2 种微藻生长较好,当加入不同浓度的 BDE-99 后,2 种微藻的生长均受到不同程度的抑制,高浓度的 BDE-99 等抑制盐生杜氏藻生长的作用特别明显^[6]。BDE-99 等对盐生杜氏藻的生长呈现特殊的“兴奋作用”^[7-8]。在本研究中,BDE-99 对 2 种海洋微藻的致毒胁迫也呈现出类似结果,低浓度 (1.67 $\mu\text{g/L}$) 的 BDE-99 对 2 种微藻均有刺激生长作用,高浓度的 BDE-99 有强烈的抑制作用并具有明显的剂量效应,26.72 $\mu\text{g/L}$ BDE-99 的试验组对巴夫藻、塔玛亚历山大藻生长的抑制率分别为 73%、74%。2 种微藻对 BDE-99 处理表现出相似的

时间-剂量效应:随着 BDE-99 浓度的增大,抑制作用显著增强。绿色巴夫藻表现为随着处理浓度的增大,出现缓慢生长的趋势,波动性较大,抑制作用较低。由此可见,BDE-99 对各种海洋微藻的致毒胁迫效应存在种属差异。

本研究设计添加固定浓度(6.68 $\mu\text{g/L}$)BDE-99 处理 2 种微藻,随着培养时间的递增,2 种微藻的 ACP 活性变化趋势不明显,巴夫藻和塔玛亚历山大藻的 ACP 的活性均于处理后 72 h 达到最高值,与对照组相比,分别提高 18%、15%。随着 BDE-99 暴露时间的增加,巴夫藻、塔玛亚历山大藻的 AKP 活性逐渐升高,巴夫藻于 BDE-99 处理后 72 h 达到最高值,与对照组相比提高了 43%,塔玛亚历山大藻的 AKP 活性变化趋势同巴夫藻,AKP 活性在 BDE-99 处理后 48 h 达到最大值,与对照组相比,提高了 40%。在同一时间条件下,BDE-99 对 2 种微藻 CAT 活性的影响有差异,处理后 96 h 巴夫藻、塔玛亚历山大藻的 CAT 活性分别增加 47%、31%;2 种微藻体内的 CAT 活性增加与 BDE99 的暴露时间呈正相关趋势,CAT 活性在高位持续至处理后 96 h,ACP、AKP、CAT 活性的变化反而说明 2 种海洋微藻对 BDE-99 的致毒胁迫产生应激响应,在短时间内刺激 ACP、AKP 和 CAT 活性升高,特别是 CAT 活性的剧烈变化程度明显,结果与生长量的变化一致。

张智华等指出,小新月菱形藻的 CAT 活性和 MDA 含量在萘菲苾作用下会有不同程度的升高,细胞损伤加剧^[9]。任加云等指出,进入生物体中的污染物在分解代谢过程中能够形成多种中间产物,并产生大量活性氧物质,造成生物体的氧化损伤,一些抗氧化防御系统能够转化超氧阴离子自由基,从而使得机体免受损伤^[10-11]。在本研究中,用 BDE-99 胁迫 2 种微藻,结果显示,2 种微藻 MDA 含量随着 BDE-99 暴露时间的增加而升高,特别是塔玛亚历山大藻的升高趋势非常明显,巴夫藻在处理 120 h 达到最高值,与对照组相比,提高了 56%,经 t 检验分析,差异极显著($P < 0.01$);塔玛亚历山大藻同样在处理 120 h 达到最高值,与对照组相比,提高了 95%,经 t 检验分析,差异极显著($P < 0.01$)。本研究结果显示,塔玛亚历山大藻对 BDE-99 的响应较巴夫藻强烈,与上述生长量变化结果一致。本研究设定时间为 120 h,由于 BDE-99 对巴夫藻和塔玛亚历山大藻致毒效应较强,120 h 后由于藻体本身的活性减弱,死亡率加剧而导致 MDA 含量

仍然维持在高位。王丽平等也指出,萘菲苾胁迫对藻细胞的膜脂质过氧化作用有明显增强的迹象,藻细胞的 MDA 含量对萘菲苾毒性较为敏感,是个潜在的有价值的参考指标^[5]。

本研究从浮游藻类的视角,通过研究绿色巴夫藻和塔玛亚历山大藻的生长、部分抗氧化酶活性及 MDA 含量对 BDE-99 的致毒胁迫的响应,旨在揭示多环芳烃化合物对水环境污染的重要性,并研究了海洋微藻在水环境污染治理及修复中的潜在应用价值。

参考文献:

- [1] Martin M, Lam P K, Richardson B J. An Asian quandary; where have all of the PBDEs gone? [J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 49(5/6): 375-382.
- [2] Alaae M, Arias P, Sjödin A, et al. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release [J]. Environment International, 2003, 29(6): 683-689.
- [3] 黄加乐, 朱军山, 洪在地, 等. 电子电气设备中塑料阻燃剂 PBDE 使用的危害性[J]. 家电科技, 2005, 10(7): 41-43.
- [4] 周政懋. 国内外阻燃剂现状及进展[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 142-146.
- [5] 王丽平, 郑丙辉, 孟伟. 萘菲苾对两种海洋硅藻生长、SOD 活力和 MDA 含量的影响[J]. 海洋通报, 2008, 27(4): 53-58.
- [6] 胡恒, 于腾, 孟范平, 等. 5 种多溴联苯醚同系物对海洋饵料藻(亚心型扁藻和盐生杜氏藻)的急性毒性[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(5): 654-660.
- [7] 李卓娜, 孟范平, 赵顺顺, 等. 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)对 4 种海洋微藻的急性毒性[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 435-439.
- [8] 杜青平, 黄彩娜, 贾晓珊, 等. 1,2,4-三氯苯对 3 种海洋微藻的毒性效应[J]. 生态环境学报, 2007, 16(2): 352-357.
- [9] 张智华, 蔡恒江, 张俊新. 萘、菲、苾对小新月菱形藻的毒性研究[J]. 广州化工, 2015, 43(19): 95-97.
- [10] 任加云, 潘鲁青, 苗晶晶. 苯并(a)苾和苯并(k)萘混合物对栉孔扇贝毒理学指标的影响[J]. 环境科学学报, 2006, 26(7): 1180-1186.
- [11] 沈忱. 苯并(a)苾对海洋微藻毒性和生理的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [12] 王云玉. 镉胁迫对不同水稻根系分泌有机酸和氨基酸及根系 Cd 含量的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [13] Baker A J M, Reeves R D, Hajar A S M. Heavy metal accumulation and tolerance in British population of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae) [J]. The New Phytologist, 1994, 127(1): 61-68.
- [14] 肖美秀, 林文雄, 陈祥旭, 等. 镉在水稻体内的分配规律与水稻镉耐性的关系[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 379-381.
- [15] 赵青青, 王海波, 夏运生, 等. 生物质炭对根际土壤中镉形态转化及水稻镉累积的影响[J]. 生态环境学报, 2016, 25(9): 1534-1539.

(上接第 320 页)

- [10] Guttormsen G, Singh B R, Jeng A S. Cadmium concentration in vegetable crops grown in a sandy soil as affected by Cd levels in fertilizer and soil pH[J]. Fertilizer Research, 1995, 41(1): 27-32.
- [11] Gussarsson M, Asp H, Adalstrinsson S, et al. Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO) [J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47(2): 211-215.
- [12] 曾翔, 张玉烛, 王凯荣, 等. 镉对水稻种子萌发的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(7): 1665-1668.