

腐植酸对四溴双酚 A 在金鱼藻体内的富集及氧化胁迫的影响

曹璐¹, 孙媛媛¹, 王晓蓉², 吴吉春¹

(1.污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学水科学系, 江苏 南京 210093; 2.污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏 南京 210093)

摘要:通过室内静态模拟实验,研究了在不同浓度的腐植酸(Humic acid, HA)条件下,四溴双酚 A(tetrabromobisphenol A, TBBPA)在金鱼藻中的生物富集及对金鱼藻氧化胁迫的影响。结果表明,HA 的存在降低了 TBBPA 在金鱼藻中的富集;低浓度 HA 及 0.5 mg·L⁻¹ TBBPA 共存条件下,金鱼藻组织中自由基强度、还原型谷胱甘肽(GSH)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)活性均恢复到对照水平;加入高浓度的 HA 及 0.5 mg·L⁻¹ TBBPA,金鱼藻组织中自由基强度显著增加,GSH 含量受到抑制,SOD 活性受到显著诱导;氧化型谷胱甘肽含量没有显著差异。考虑 TBBPA 的生物有效性和生态毒性时,不能忽视环境因子如 HA 的影响。

关键词:四溴双酚 A;腐植酸;金鱼藻;生物富集;氧化胁迫

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)03-0476-05

Effects of Humic Acid on Bioaccumulation and Oxidative Stress Induced by Tetrabromobisphenol A in Coontail *Ceratophyllum demersum* L.

CAO Lu¹, SUN Yuan-yuan¹, WANG Xiao-rong², WU Ji-chun¹

(1.State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Department of Hydrosociences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2.State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Under simulated static conditions in laboratory, the effects of humic acid (HA) on bioaccumulation of tetrabromobisphenol A (TBBPA) and oxidative stress induced by TBBPA in Coontail *Ceratophyllum demersum* L. were studied. Eight gram fresh weight of *C. demersum* were exposed to 0.5 mg·L⁻¹ TBBPA in glass beakers with 3 L 10% Hoagland's solution containing 0, 0.04, 0.20, 0.40, 0.80 and 2.0 mg·L⁻¹ (DOC)HA, respectively, for 14 d under laboratory conditions. Controls were beakers containing only 10% Hoagland's solution without TBBPA and HA addition. The results showed that the presence of HA reduced the bioaccumulation of TBBPA in *C. demersum*, by 25.2% at 2.0 mg·L⁻¹ HA. In the absence of HA, 0.5 mg·L⁻¹ TBBPA increased signal intensity of free radicals and activity of superoxide dismutase (SOD) and decreased Glutathione (GSH) content in *C. demersum*. At low concentrations of HA and TBBPA, the signal intensity of free radicals, GSH content, and SOD activity resumed to the control level. At higher concentrations of HA and TBBPA, the signal intensity of free radicals and SOD activity increased significantly, whereas the GSH content decreased significantly, as compared to the control. The oxidized glutathione (GSSG) contents were not significantly different at the various concentrations of HA.

Keywords: tetrabromobisphenol A; humic acid; *Ceratophyllum demersum* L.; bioaccumulation; oxidative stress

天然可溶性有机质广泛存在于水生环境中,腐殖质是淡水水体中可溶性有机质的主要成分,一般占 50%~80%。众多研究证实了可溶性的腐殖质可以与有机污染物和重金属发生作用,改变了它们的生物有

效性,进而影响了对靶标和非靶标生物的毒害作用^[1-5]。

四溴双酚 A(tetrabromobisphenol A, TBBPA)是目前全球使用量最大的溴化阻燃剂^[6],在水体、底泥、贝类组织至人体血液中已发现它的存在^[7-10],其对环境生物的毒性是令人非常关心的问题。据报道, TBBPA 对哺乳动物的毒性较低,而对水生生物如藻、软体动物、甲壳类生物及鱼具有较强的急性毒性^[11-12]。体外实验证明, TBBPA 具有免疫抑制效应和弱雌激素效应,尤其是与甲状腺素运载蛋白具有极强的结合

收稿日期:2008-05-26

基金项目:国家重点基础研究资助项目(2003CB415002);国家杰出青年基金(40725010)

作者简介:曹璐(1985—),女,硕士研究生,主要从事水环境化学研究。E-mail:lu_lu_415@163.com

联系作者:王晓蓉 E-mail:ekxr@nju.edu.cn

能力^[13],是一种潜在的甲状腺激素干扰物^[14-15]。最近有研究表明,TBBPA能通过诱导组织产生活性氧而引起水生生物的氧化胁迫^[16-18]。然而,对于环境中腐殖质的存在对TBBPA毒性效应的影响鲜见报道。本研究中以沉水植物金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)为实验对象,研究不同浓度腐植酸(Humic acid,HA)对TBBPA在金鱼藻中的生物富集及对金鱼藻氧化胁迫的影响,为研究TBBPA污染对水生生态环境的影响提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:高效液相色谱 HP1100,RE52 旋转蒸发器,Bruker EMX 10/12 型电子自旋共振(EPR)谱仪,UV1600 紫外可见分光光度计,J2-HS 高速冷冻离心机(Beckman),岛津 RF-5000 型荧光分光光度计,Lab-conco 冷冻干燥仪,岛津 TOC 500 总有机碳测定仪。

试剂:均采用色谱纯或分析纯。四溴双酚 A (TBBPA,97%)购自 Aldrich 公司,Florisil(60~100 目)购自 ACROS Organics 公司,腐植酸购自 Fluka 公司。

1.2 实验材料及暴露条件

实验植物为采自南京江心洲的金鱼藻,挑选生长良好、生长状况一致的金鱼藻,清水洗净,放入 3 L 烧杯,每杯中放 8 g 左右,10 % Hoagland 营养液中预培养 7 d,光强 $115 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间 14 h,pH 值为 7.5 ± 0.3 ,水温 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

实验分为对照组和实验组。每组 3 个平行。对照组暴露于改良 10 % Hoagland 营养液,实验组分别暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA-10 % Hoagland 营养液以及 $0.04, 0.2, 0.4, 0.8$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HA- $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA-10 % Hoagland 营养液中 14 d。每天换水 1 次。培养条件同上。HA 浓度用总溶解有机碳(DOC)表示。

14 d 后收获植株样品,收获时反复用自来水冲洗,再用去离子水冲洗干净,用吸水纸将植株根叶表面的水吸干,根据所测指标的需要,分别称取一定的鲜样组织,用液氮迅速固定,放在 -40°C 冰柜中保存,用于生理生化指标的分析测定。

1.3 TBBPA 在植物中富集量分析

称取一定量的样品冷冻干燥,磨成粉末,用甲醇溶液超声萃取 20 min,重复 3 次,合并上清液,旋转浓缩,过柱,柱中上层装无水硫酸钠,下层装 Florisil,二氯甲烷淋洗。过柱后浓缩至 1 mL,甲醇定容,HPLC 分析。

HPLC 分析条件:ZORBAX Eclipse XDB-C₈ ($4.6 \times 150 \text{ mm}$) 色谱柱,流动相为甲醇:水=80:20,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 28°C ,检测器 DAD,检测波长 210 nm,外标法定量。

3 份空白和 3 份空白添加标样的植物样品,按照上述前处理及分析方法进行分析,空白样品结果均为未检出,回收率为 $(88.2 \pm 3.7)\%$ 。

1.4 自由基的测定

取样后的植物叶片立刻冷冻干燥,剪碎称量,装入内径为 3 mm 石英管中进行 EPR 分析,过程中避免水分沾入^[19-20]。EPR 的操作参数:测试温度室温,微波功率(SP)20 MW,微波频率(SF)X-band,调制频率(MF)100 kHz,调制幅度(MA)1.0 G,中心磁场(CF)3 470 G,扫描时间(TI)84 s,时间常数(TC)41 ms,扫场宽度(SW)200 G,信号为 2 次叠加。

1.5 谷胱甘肽含量的测定

采用荧光分光光度法,参照 Gupta 等^[21]以及 Hissin 和 Hilf^[22]的方法测定。

1.6 SOD 活性和蛋白含量的测定

粗酶提取液^[23]:称取 0.5 g 冻存的样品,加入 2 mL Tris-硼酸缓冲液 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3BO_4 , $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \mu\text{L}$ 95% 巯基乙醇),冰浴中抽提 10 min, 4°C 离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 20 min, -20°C 保存上清液,待测。

SOD 活性采用邻苯三酚自氧化法测定^[24]。

蛋白质含量用色素结合法测定,以小牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白^[25]。

1.7 统计分析

实验结果表示为平均数 $\pm$ 标准误差(Mean $\pm$ SDE);单边 t 检验法对组间数据进行差异性显著分析, $P < 0.05$ 被认为是差异显著, $P < 0.01$ 表明差异极显著。

2 结果与分析

2.1 HA 对 TBBPA 在金鱼藻中富集的影响

HA 对 TBBPA 在金鱼藻中富集量的影响见表 1。总体上 HA 的存在降低 TBBPA 在金鱼藻中的富集。当 HA 的浓度为 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (DOC) 时, TBBPA 在金鱼藻中的富集量就显著降低, HA 的浓度为 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (DOC) 时,富集量略有回升,随后随着 HA 浓度增加, TBBPA 在金鱼藻中的富集量显著降低。HA 的浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,金鱼藻体内 TBBPA 量降低 25.2%。

2.2 HA 对 TBBPA 诱导自由基强度的影响

用 EPR 未经捕获测得的金鱼藻组织内自由基谱

表 1 HA 对金鱼藻中 TBBPA 富集量的影响
Table 1 Effect of HA on concentrations of TBBPA
in *Ceratophyllum demersum*

HA 浓度/mg·L ⁻¹ (DOC)	金鱼藻组织 TBBPA 含量/mg·g ⁻¹ (DW)
Control	未检出
0	0.58±0.037
0.04	0.53±0.012*
0.20	0.58±0.016
0.40	0.54±0.056
0.80	0.52±0.035*
2.0	0.44±0.030**

注: **P*<0.05, ***P*<0.01, 下同。

图为一单峰(图 1)。经计算机拟合分析, *g* 因子为 2.005 9, 峰宽平均 6.5 Gauss。自由基信号强度随 HA 浓度变化见图 2。HA 的浓度为 0.04 mg·L⁻¹(DOC) 时, 自由基信号强度显著降低, 恢复到对照水平。可能是由于低浓度 HA 的存在降低了 TBBPA 在金鱼藻中的富集, 因而诱导产生的自由基强度也随之降低; 但当 HA 浓度继续增加, HA 也有可能诱导金鱼藻产生自由基, 因而自由基信号强度显著增加。

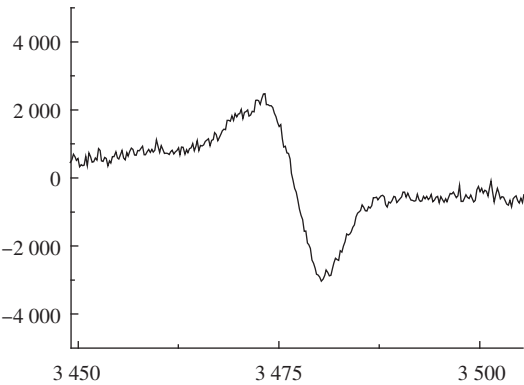


图 1 金鱼藻组织中自由基 EPR 谱图

Figure 1 EPR spectra of free radicals in *Ceratophyllum demersum*

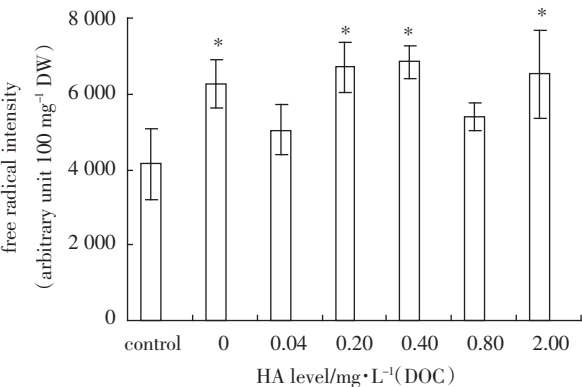


图 2 HA 对自由基信号强度的影响

Figure 2 Effect of HA on free radical signal intensity
in *Ceratophyllum demersum*

2.3 HA 对金鱼藻谷胱甘肽的影响

外源性加入 HA 后, 对金鱼藻组织中的还原性谷胱甘肽(GSH)含量产生不同程度的影响(图 3)。未加 HA 的实验组, 0.5 mg·L⁻¹ TBBPA 显著降低金鱼藻组织中 GSH 含量(*P*<0.05), 加入 0.04 mg·L⁻¹ HA(DOC), GSH 含量恢复到对照水平, 而加入高浓度的 HA 后, GSH 含量则继续受到抑制(*P*<0.05)。HA 对金鱼藻组织中氧化性谷胱甘肽(GSSG)含量没有产生显著影响。

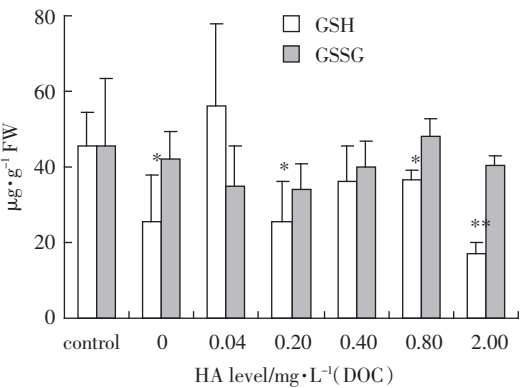


图 3 HA 对金鱼藻中的 GSH 和 GSSG 含量的影响

Figure 3 Effect of HA on GSH and GSSG contents
in *Ceratophyllum demersum*

2.4 HA 对金鱼藻 SOD 活性的影响

未加入 HA, 0.5 mg·L⁻¹(DOC) 的 TBBPA 显著诱导金鱼藻的 SOD 活性(*P*<0.05); 加入低浓度的 HA 后, SOD 活性降低, 与对照相比没有显著差异; 而加入高浓度的 HA 后, SOD 活性继续受到显著诱导(*P*<0.05)(图 4)。这可能是低浓度的 HA 缓解了 TBBPA 对金鱼藻的氧化胁迫, 但高浓度的 HA 自身也对金鱼藻产生损伤, 与 TBBPA 共同作用加重了氧化胁迫, 导致 SOD 活性继续增加。

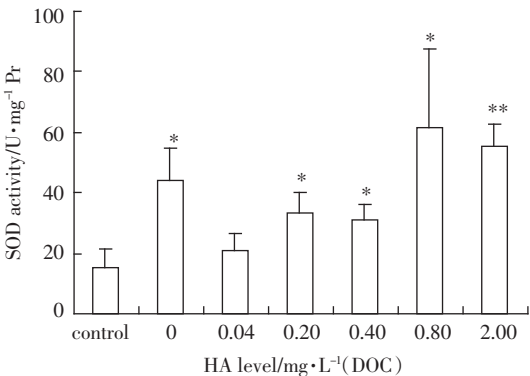


图 4 HA 对金鱼藻中 SOD 活性的影响

Figure 4 Effect of HA on SOD activity
in *Ceratophyllum demersum*

3 讨论

污染物的生物有效性对于生物毒性是非常关键的因素。研究报道表明许多环境因子包括 pH 和 HA 会改变重金属和有机物的生物有效性^[26]。HA 是水体中一类重要的溶解性有机质,含有一系列功能团,如羟基(OH)、羧基(COOH)、酚羟基、烯醇羟基等,它们对含各种基团的化合物有极强的吸附和配合能力,尤其对有机化合物在环境中的行为会产生重要影响。

本实验中,我们发现 HA 浓度在 $0.04\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (DOC) 范围内,基本降低了金鱼藻对 TBBPA 的富集,与前人的研究结果是一致的^[1,27]。有研究表明 HA 降低有机物的生物有效性归结为 HA 对有机物的吸附与配合作用^[1,28]。本研究中 HA 对 TBBPA 在金鱼藻中富集量的影响可能是因为在水溶液中 HA 和 TBBPA 作用,影响了 TBBPA 的形态,进而影响了金鱼藻对它的吸收。即加入 HA 后,TBBPA 与 HA 相互作用,可能形成了 HA-TBBPA 络合大分子,降低了游离态的 TBBPA 浓度,而 TBBPA·HA 结合物分子太大或极性太大不能渗透穿过生物膜进入金鱼藻组织中。因此,金鱼藻对 TBBPA 的富集随 HA 浓度增加而降低。

HA 影响了金鱼藻对 TBBPA 的富集,进而影响到 TBBPA 对金鱼藻的氧化胁迫。当生物暴露于污染物中,可能诱导生物体内产生大量的活性氧,正常情况下活性氧会被抗氧化系统酶和 GSH 清除,若活性氧产生量大于清除能力,则会引起脂质过氧化等一系列损伤。本实验中,从产生的自由基信号强度、SOD 活性以及 GSH 含量来看,低浓度的 HA 缓解了 TBBPA 对金鱼藻的氧化胁迫。当 HA 的浓度为 $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,自由基的信号强度下降,SOD 活性和 GSH 水平得以恢复,与对照组相比没有显著差异;未加 HA 的实验组则与对照相比具有显著性差异,产生了氧化胁迫。可能是因为加入 $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ HA,TBBPA 对金鱼藻的生物有效性降低,因而减缓了氧化胁迫。相反的,随着 HA 浓度的继续提高,金鱼藻组织中的氧化胁迫有上升趋势,可能是因为高浓度的 HA 和 TBBPA 联合作用加重了金鱼藻的氧化胁迫。有研究表明高浓度 HA 自身亦会对生物产生毒性效应^[29-32]。

综上所述,HA 影响 TBBPA 在金鱼藻组织中的富集和相应的氧化胁迫。考虑 TBBPA 的生物有效性和生态毒性时,不能忽视环境因子如 HA 的影响。

参考文献:

- [1] Fent K, Looser P W. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: influence of pH and humic acids[J]. *Water Research*, 1995, 29(7): 1631-1637.
- [2] Guerrero N R V, Taylor M G, Wider E A, et al. Influence of particle characteristics and organic matter content on the bioavailability and bioaccumulation of pyrene by clams[J]. *Environmental Pollution*, 2003, 121(1): 115-122.
- [3] Meems N, Steinberg C E W, Wiegand C. Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna*) by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin [J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 319(1-3): 123-136.
- [4] Dobranskyte A, Jugdaohsingh R, McCrohan C R, et al. Effect of humic acid on water chemistry, bioavailability and toxicity of aluminium in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*, at neutral pH[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 140(2): 340-347.
- [5] Tsiridis V, Petala M, Samaras P, et al. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 63(1): 158-167.
- [6] Alaei 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.
- [7] Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. The flame retardant tetrabromobisphenol A and its metabolite found in river and marine sediments in Japan[J]. *Chemosphere*, 1983, 12(11-12): 1533-1539.
- [8] 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.
- [9] Thomsen C, Lundanes E, Becher G. Brominated flame retardants in archived serum samples from Norway: a study on temporal trends and the role of age[J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(7): 1414-1418.
- [10] Morris S, Allchin C R, Zegers B N, et al. Distribution and fate of HBCD and brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs[J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(21): 5497-5504.
- [11] De Wit C A. An overview of brominated flame retardants in the environment[J]. *Chemosphere*, 2002, 46(5): 583-624.
- [12] Damerud P O. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife[J]. *Environment International*, 2003, 29(6): 841-853.
- [13] Meerts IATM, Letcher R J, Hoving S, et al. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(4): 399-407.
- [14] Kitamura S, Jinno N, Ohta S, et al. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(1): 554-559.
- [15] Kitamura S, Kato T, Iida M. Anti-thyroid hormonal activity of tetra-

- bromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds; affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis[J]. *Life Sciences*, 2005, 6(14): 1589–1601.
- [16] Ronisz D, Finne E F, Karlsson, et al. Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 69(3): 229–245.
- [17] Shi H H, Wang X R, Luo Y, et al. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 74(4): 365–371.
- [18] Sun Y Y, Guo H Y, Yu H Y, et al. Bioaccumulation and physiological effects of tetrabromobisphenol A in coontail *Ceratophyllum demersum* L. [J]. *Chemosphere*, 2008, 70(10): 1787–1795.
- [19] Garnczarska M, Bednarski W. Effect of a short-term hypoxic treatment followed by reaeration on free radicals level and antioxidative enzyme in lupine roots[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2004, 42(3): 233–240.
- [20] Morkunas I, Bednarski W, Kozłowska M. Response of embryo axes of germinating seeds of yellow lupine to *Fusarium oxysporum* [J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2004, 42(3): 493–499.
- [21] Gupta M, Chandra P. Bioaccumulation and toxicity of mercury in root–submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* [J]. *Environmental Pollution*, 1998, 103(2–3): 327–332.
- [22] Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for the direct determination of oxidized and reduced glutathione in tissues[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 74(1): 214–226.
- [23] Kong F X. Influence of copper, manganese and pH on the growth and several enzyme activities in mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* [J]. *Chemosphere*, 1995, 30(1): 199–207.
- [24] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3): 469–474.
- [25] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1–2): 248–254.
- [26] Meador J P. The interaction of pH, dissolved organic carbon and total copper in the determination of ionic copper and toxicity[J]. *Aquatic Toxicology*, 1991, 19(1): 13–32.
- [27] Slaveykova V, Wilkinson K J, Ceresa A, et al. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii* [J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(6): 1114–1121.
- [28] Chiou C T, Malcolm R L, Brinton T I, et al. Water solubility enhanced of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acid[J]. *Environmental Science and Technology*, 1986, 20(5): 502–508.
- [29] Steinberg C E W, Hoss S, Bruggemann R. Further evidence that humic substances have the potential to modulate the reproduction of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2002, 87(1): 121–133.
- [30] Steinberg C E W, Paul A, Pflugmacher S, et al. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals—a review[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2003, 12(5): 391–401.
- [31] Timofeyev M A, Wiegand C, Burnison B K, et al. Impact of natural organic matter (NOM) on freshwater amphipods[J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 319(1–3): 115–121.
- [32] Janošek J, Bittner M, Hilscherová K, et al. AhR-mediated and antiestrogenic activity of humic substances[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(6): 1096–1101.