

学校编码: 10384
学号: 22620101151411

密级

廈門大學

硕士学位论文

典型溴代阻燃剂对海水青鳉(*Oryzias melastigma*)胚胎氧化胁迫及生物富集效应研究

Study on Oxidative stress and Bioaccumulation of Three
Typical Brominated Flame Retardants in *Oryzias melastigma*
Embryos

赵琰琰

指导教师姓名: 王新红教授
专业名称: 环境科学
论文提交日期: 2013年5月
论文答辩时间: 2013年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

摘 要.....	VII
Abstract.....	IX
缩略词表.....	XI
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 国内外研究动态与进展.....	2
1.2.1 BFRs 的污染现状.....	2
1.2.2 国内外 BFRs 的毒理学研究进展.....	7
1.2.3 氧化压力机制作为生物标志物的研究进展.....	13
1.2.4 鱼类胚胎生态毒理学研究.....	14
1.2.5 国内外研究存在的主要问题.....	16
1.3 研究内容和技术路线.....	16
1.3.1 研究目的和意义.....	16
1.3.2 研究内容.....	17
1.3.3 研究技术路线.....	17
第 2 章 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎生理机能的影响.....	19
2.1 材料与方法.....	19
2.1.1 实验动物.....	19
2.1.2 海水青鳉养殖及受精卵收集.....	19
2.1.3 仪器与试剂.....	20
2.1.4 暴露实验设计.....	20
2.1.5 生理机能观察方法.....	21
2.1.6 数据处理.....	21
2.2 结果.....	22
2.2.1 TBBPA 对海水青鳉胚胎死亡率影响.....	22
2.2.2 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎畸形率的影响.....	23
2.2.3 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎心搏率的影响.....	26
2.2.4 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎孵化率和孵化时间的影响.....	29

2.3 讨论.....	30
2.4 本章小结.....	31
第 3 章 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响.....	32
3.1 材料与方法.....	32
3.1.1 海水青鳉的养殖及胚胎的获取.....	32
3.1.2 仪器与试剂.....	32
3.1.3 暴露实验设计.....	33
3.1.4 样品的处理与测定.....	34
3.1.5 数据处理.....	35
3.2. 结果.....	35
3.2.1 BDE-47 对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响	35
3.2.2 TBBPA 对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响	38
3.2.3 HBCD 对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响.....	40
3.3 讨论.....	42
3.3.1 BDE-47 对海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应	43
3.3.2 TBBPA 对海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应	45
3.3.3 HBCD 对海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应.....	46
3.4 本章小结.....	48
第 4 章 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎的生物富集效应.....	49
4.1 材料与方法.....	49
4.1.1 海水青鳉的养殖及胚胎的获取.....	49
4.1.2 仪器与试剂.....	49
4.1.3 暴露实验设计.....	50
4.1.4 海水青鳉胚胎对 BFRs 生物富集系数计算.....	50
4.1.5 污染物的分析方法.....	51
4.1.6 质量控制.....	53
4.2 结果.....	54
4.2.1 海水青鳉胚胎中 BDE-47 蓄积浓度的变化	54
4.2.2 海水青鳉胚胎中 TBBPA 蓄积浓度的变化	57

4.2.3 海水青鳉胚胎中 HBCD 蓄积浓度的变化.....	61
4.3 讨论.....	66
4.3.1 海水青鳉胚胎对 BDE-47 富集效应	66
4.3.2 海水青鳉胚胎对 TBBPA 富集效应	67
4.3.3 海水青鳉胚胎对 HBCD 富集效应.....	68
4.4 本章小结.....	69
第 5 章 三种阻燃剂对海水青鳉胚胎致毒机制的初步探讨.....	70
5.1 BDE-47 对海水青鳉胚胎致毒机制初探	70
5.2 TBBPA 对海水青鳉胚胎致毒机制初探	72
5.3 HBCD 对海水青鳉胚胎致毒机制初探.....	73
5.4 海水青鳉胚胎对典型 BFRs 的敏感阶段探讨.....	75
5.5 本章小结.....	77
第 6 章 结论与展望	78
6.1 结论.....	78
6.2 展望.....	79

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	VII
Abstract.....	IX
Abbreviation.....	XI
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Background.....	1
1.2 Research progress in China and overseas.....	2
1.2.1 Pollution status of BFRs.....	2
1.2.2 Toxicology research progress of BFRs.....	7
1.2.3 Review of the toxicological mechanisms of BFRs.....	13
1.2.4 Fish embryos ecotoxicology.....	14
1.2.5 Problems in present study.....	16
1.3 Research contents and routes.....	16
1.3.1 Research objectives.....	16
1.3.2 Research contents.....	17
1.3.3 Research route.....	17
Chapter 2 Physiological impacts on the marine medaka embryos exposed to three typical BFRs.....	19
2.1 Material and methods.....	19
2.1.1 Experimental animal.....	19
2.1.2 Medaka culture and embryos collection.....	19
2.1.3 Instruments and reagents.....	20
2.1.4 Experimental design.....	20
2.1.5 Methods of morphology observation.....	21
2.1.6 Statistical analysis.....	21
2.2 Results.....	22
2.2.1 Mortality of marine medaka embryos exposed to TBBPA.....	22
2.2.2 Abnormal rates of marine medaka embryos exposed to three BFRs.....	23
2.2.3 Heart beats of marine medaka embryos exposed to three BFRs.....	26
2.2.4 Hatching rate and hatching time of marine medaka exposed to three BFRs.....	29
2.3 Discussion.....	30

2.4 Summary	31
Chapter 3 Antioxidant enzymes impact on marine medaka embryos exposed to three BFRs	32
3.1 Material and methods	32
3.1.1 Medaka culture and embryos collection	32
3.1.2 Instruments and reagents	32
3.1.3 Experimental design	33
3.1.4 Sample treatment and measurement	34
3.1.5 Statistical analysis	35
3.2 Results	35
3.2.1 Effects on antioxidant enzymes activities in marine medaka embryos exposed to BDE-47	35
3.2.2 Effects on antioxidant enzymes activities in marine medaka embryos exposed to TBBPA	38
3.2.3 Effects on antioxidant enzymes activities in marine medaka embryos exposed to HBCD	40
3.3 Discussion	42
3.3.1 Oxidative effect on marine medaka embryos exposed to BDE-47	43
3.3.2 Oxidative effect on marine medaka embryos exposed to TBBPA	45
3.3.3 Oxidative effect on marine medaka embryos exposed to HBCD	46
3.4 Summary	48
Chapter 4 Bioaccumulation of marine medaka embryos exposed to three BFRs	49
4.1 Material and methods	49
4.1.1 Medaka culture and embryos collection	49
4.1.2 Instruments and reagents	49
4.1.3 Experimental design	50
4.1.4 The method of BCF calculated	50
4.1.5 Sample preparation and analysis	51
4.1.6 QA/QC	53
4.2 Results	54
4.2.1 Variation of BDE-47 concentrations in marine medaka embryos exposed to BDE-47	54

4.2.2 Variation of TBBPA concentrations in marine medaka embryos exposed to TBBPA	57
4.2.3 Variation of HBCD concentrations in marine medaka embryos exposed to HBCD	61
4.3 Discussion	66
4.3.1 Bioaccumulation in marine medaka embryos exposed to BDE-47	66
4.3.2 Bioaccumulation in marine medaka embryos exposed to TBBPA	67
4.3.3 Bioaccumulation in marine medaka embryos exposed to HBCD	68
4.4 Summary	69
Chapter 5 Preliminary study on the toxicology mechanism of BFRs in marine medaka embryos.....	70
5.1 Toxicology mechanism of BDE-47 in marine medaka embryos	70
5.2 Toxicology mechanism of TBBPA in marine medaka embryos	72
5.3 Toxicology mechanism of HBCD in marine medaka embryos	73
5.4 Sensitive stage of marine medaka embryos to BFRs	75
5.5 Summary	77
Chapter 6 Conclusions and perspectives	78
6.1 Conclusions	78
6.2 Perspectives.....	79

摘要

多溴联苯醚 (Polybrominated diphenyl ethers, PBDE)、四溴双酚 A (Tetrabromobisphenol A, TBBPA) 和六溴环十二烷 (Hexabromocyclododecane, HBCD) 是目前世界上广泛使用的三大溴代阻燃剂 (brominated flame retardants, BFRs)。由于它们的亲脂性、环境稳定性、在生物体中的富集放大作用以及对水生生态系统和人体健康产生一定的毒性效应而受到各界的广泛关注和重视。本研究选取 BDE-47、TBBPA 和 HBCD 三种典型溴代阻燃剂, 研究其对海洋模式鱼类-海水青鳉 (*Oryzias melastigma*) 胚胎的毒性效应和可能的致毒机制。在不同浓度 BDE-47、TBBPA 和 HBCD 暴露下, 采用生理生化和化学分析相结合的方法, 从生理机能(胚胎的畸形率、心搏率、孵化率和孵化时间)、生化指标 (SOD 和 CAT 活力) 和富集程度三个层面研究这三类溴代阻燃剂对海水青鳉胚胎的毒性效应并进行致毒机制探讨, 为进一步研究这三种 BFRs 的生态毒理效应及其生态风险评价提供理论依据。取得如下结果:

(1) 通过对海水青鳉胚胎的生理机能影响研究发现, BDE-47、TBBPA 和 HBCD 均可造成海水青鳉胚胎发育毒性, 胚胎卵黄囊水肿是最明显的畸形效应, 同时对胚胎的心搏率、孵化率和孵化时间也有一定程度的影响, 获得的畸形 EC_{50} 分别为 127.5、19.65 和 24.15 nmol/L。

(2) 通过对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性影响研究发现, 三种阻燃剂均能造成海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应, 并且 SOD 和 CAT 活力与 BFRs 之间有明显的时间-剂量-效应关系。BDE-47、TBBPA 和 HBCD 对海水青鳉胚胎的 SOD 活性效应总体表现为: 随着暴露时间的延长而逐渐诱导。其中胚胎在 HBCD 高浓度暴露条件下, SOD 活性表现为先受到抑制而后诱导, 说明海水青鳉胚胎受到 BFRs 的氧化胁迫作用, 诱导 SOD 的产生以清除活性氧自由基 (ROS), 但并没有受到氧化损伤。CAT 则随着暴露时间的延长表现为不同的应激机制, 总体表现为先诱导后抑制。其中 BDE-47 暴露组和 HBCD 高浓度组 CAT 活性随着暴露时间的增加而表现出先诱导后抑制, 再诱导再抑制的趋势。在时间-效应上, CAT 诱导效应出现在 SOD 诱导之前, 说明 SOD 诱导存在明显的滞后性, CAT 的活性对 BFRs 的响应似乎更为灵敏。

(3) 海水青鳉胚胎在 BDE-47、TBBPA 和 HBCD 暴露期间均表现出一定的生

物富集作用。其中胚胎对 BDE-47 和 tHBCD 的富集作用呈现出较为显著的线性增加的趋势，而在高浓度的条件下，胚胎对 TBBPA 的富集趋于稳定。在低浓度 HBCD 暴露的初期，青鳉胚胎对 α 、 β -HBCD 存在选择性吸收，但并没有发现 γ -HBCD 的异构化趋势。在连续暴露 8 d 条件下，胚胎对 BDE-47、TBBPA 和 HBCD 的平均生物富集因子(BCF)分别为：37.52、17.88 和 23.84。由此可以看出，海水青鳉胚胎对这三种 BFRs 的富集能力大小为：BDE-47 > HBCD > TBBPA。

(4) 研究推断海水青鳉胚胎在三种 BFRs 体外暴露下，逐渐在体内富集的污染物含量是造成机体氧化胁迫的主要原因。研究也发现，胚胎的器官发育期对 BFRs 的氧化胁迫效应表现的更为敏感，抗氧化酶活性的变化更为显著，这种氧化胁迫效应可以明显指示 BFRs 对海水青鳉胚胎的毒性效应。

关键词：溴代阻燃剂；氧化胁迫；生物富集；海水青鳉胚胎

Abstract

Polybrominated diphenyl ethers (PBDE), tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD) are the most widely used brominated flame retardants (BFRs). As the additive or the reactive flame retardants, they are likely to release into the environment due to the rapid growth in their production and usage. They are concerned greatly due to their lipophilic, environmental stability and bioaccumulation, biomagnification through the food chain, and the toxicity to aquatic ecosystems and human health. In this study BDE-47, TBBPA and total HBCD were selected to investigate their ecotoxicological mechanism in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos. The physiological effect, antioxidant enzymes activities and bioaccumulation of marine medaka embryos were evaluated following BDE-47, TBBPA and HBCD waterborne exposure. The results would provide theoretical basis for further study of the ecotoxicological effects and ecological risk assessment of brominated flame retardants. The results were obtained as following:

- (1) Marine medaka embryos were very sensitive to BFRs exposure. The obviously dose-response relationship were observed between the deformity rate of marine medaka embryos and exposure concentrations, the calculated EC₅₀ for BDE-47, TBBPA and HBCD were 61.94, 10.69, 15.5 µg/L, respectively. All the three BFRs could also affect the heart beat, hatching rate and hatching time at different level, which revealed development toxicity. By analyzing the biomarker of the three kinds of BFRs, the acute toxicity to marine medaka embryos was following the order: TBBPA>HBCD>BDE-47.
- (2) The oxidative stress were caused by BDE-47, TBBPA and HBCD in marine medaka embryos significantly and showed clear time-dose-response relationship. SOD activities in marine medaka embryos gradually induced by three kinds of flame retardants as the exposure time increased. SOD activities inhibited after induced in the higher concentrations of HBCD to scavenging the ROS, which implied that marine medaka embryos exposure to oxidative stress within the present concentration. CAT activities in marine medaka embryos performance different stress mechanism, overall inhibited after induced as the exposure time increased. The activities of CAT showed a tendency of induction firstly and then inhibition, then induction again and at last inhibition in BDE-47 and high HBCD concentration group. We also found that CAT activities induced before the SOD,

and CAT showed inhibition in higher concentration, which implied that CAT activity seems to be much more sensitive than SOD activity.

- (3) Marine medaka embryos exposed to BDE-47, TBBPA and HBCD showed a certain amount of bioaccumulation. There was a linear uptake of BDE 47 and total HBCD over a concentration gradient but there was a trend to reach an equilibrium at 8 days in highest TBBPA concentrations. Marine medaka embryos could selectively absorb α 、 β -HBCD under the lower concentrations, but no indication that marine medaka embryos could biotransform γ -HBCD to α -HBCD. In this experiment, the bioconcentration factor of BDE-47, TBBPA and HBCD in marine medaka embryos for 8 days exposure were as following: 37.52, 17.88 and 23.84.
- (4) The results suggest that the three types of brominated flame retardants accumulation in marine medaka embryos induces oxidative stress which might be one of the important toxicity mechanisms of BFRs through analysing of the different biomarkers, and the organ development stage was more sensitive to the three BFRs. The change in oxidative stress caused by the three BFRs could greatly reflect toxic effects on the marine medaka embryos.

Key Words: Brominated flame retardants; oxidative stress; bioaccumulation; marine medaka embryos

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
BFRs	Brominated Flame Retardants	溴代阻燃剂
TBBPA	Tetrabromobisphenol A	四溴双酚 A
HBCD	Hexabromocyclododecane	六溴环十二烷
PBDE	Polybrominated Diphenyl Ethers	多溴联苯醚
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧自由基
EDCs	Endocrine Disrupting Chemicals	环境内分泌干扰物
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
POPs	Persistent Organic Pollutants	持久性有机污染物
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	多环芳烃
CYP450	Cytochrome P450	细胞色素 P450
BCF	Bioconcentration Factor	生物富集因子
BMF	Biomagnificant Factor	生物放大因子
BSEF	Bromine Science and Environmental Forum	溴科学与环境论坛

第 1 章 绪论

1.1 研究背景

为减少火灾的发生, 各种阻燃型的化合物越来越多地被添加到工业及生活产品中, 按阻燃元素的类别, 阻燃剂分为卤系(卤系又分为氯系和溴系)、磷系、锑系等, 其中主要以溴代阻燃剂(Brominated Flame Retardants, BFRs)为主。与其它阻燃剂相比, BFRs 因具有性能优越、制造工艺成熟、稳定性好且价格低廉等优点, 在世界范围内大量的被使用, 且保持相当快的增长速度。常用的 BFRs 主要有多溴联苯醚(Polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)、四溴双酚 A(Tetrabromobisphenol A, TBBPA)和六溴环十二烷(Hexabromocyclododecane, HBCD), 主要用在电子设备、塑料制品、纺织品、建筑材料等产品中。

由于 BFRs 的生产和使用量迅猛增长, 不管是添加型的还是反应型的阻燃剂都有可能释放到环境中(De Wit, 2002)。由于它们具有亲脂性、环境稳定性和一定的蓄积效应, 能够通过食物链和其它途径累积在生物体特别是水生生物中, 对水生生物具有内分泌干扰作用, 表现为生殖异常、胚胎毒性、发育障碍、代谢紊乱和癌症等(Hakk and Letcher, 2003), 被认为具有潜在的持久性有机污染物的特性, 对其环境问题的研究已成为当前环境科学的一大热点。2005 年联合国环境规划署(UNEP)将 PBDEs 列入持久性有毒化学污染物(Persistent Toxic Substances, PTS)研究清单中。欧盟宣布从 2006 年 7 月 1 日起开始在电子产品中停止使用 PBDEs。2008 年 7 月欧洲禁止了商用十溴二苯醚的生产, 美国部分州也禁止或限制使用十溴、八溴、五溴联苯醚。2009 年 5 月在瑞士日内瓦举行的斯德哥尔摩公约缔约方大会第四届会议上, 商用五溴和商用八溴联苯醚被列入持久性有机化合物(Persistent Organic Pollutants, POPs)清单, HBCD 也由于其持久性, 生物积累性和毒性于 2013 年列入 POPs 清单。TBBPA 和 HBCD 属于挪威 PoHS(消费性产品中禁用特定有害物质)管控的物质, 同时 HBCD 及其非对映异构体属于欧盟 REACH(化学品注册、评估、许可和限制)管控物质。TBBPA 由于其毒性作为危害物质被列在了《东北大西洋海洋环境保护条例》(OSPAR)的名录中, 在欧盟一些国家限制使用。

我国是斯德哥尔摩公约缔约国之一, 急需加大 BFRs 对我国环境和人体危害的研究, 制订和健全我国阻燃剂方面的相关法律、法规和规章。

BFRs 作为当今国际上备受关注的污染物，其在水域生态环境中的污染效应正日益受到重视。海洋是陆源排放有害物质的最终储库，海洋环境污染直接威胁到海洋生物，尤其是低剂量长期暴露所带来的潜在风险，因此有必要对 BFRs 对海洋生物的毒性效应进行深入、系统的研究。

1.2 国内外研究动态与进展

1.2.1 BFRs 的污染现状

BFRs 根据不同的添加途径可以分为添加型或反应型两大类，反应型的阻燃剂是根据化学键结合到材料中，不易从基质中逃逸；添加型的阻燃剂则是根据分子间作用力结合。PBDEs、HBCD 和部分 TBBPA 都是作为添加型阻燃剂使用的，所以在水体、大气、土壤、沉积物等各类环境介质以及水生生物体内普遍检测到这三大典型阻燃剂的存在，尤其是在东南沿海的电子制造业和电子垃圾处理区有较高的污染水平。资料显示，发达国家 80% 的电子垃圾进入中国、印度和巴基斯坦等国，其中中国又占了 90%。在我国一些地区形成了电子垃圾拆解集散地，原始的拆解手段(露天焚烧、烘烤和酸洗等)使多种持久性有毒污染物不断向周围释放，电子产品中添加的阻燃剂也会随之被释放出来，对周围环境造成污染。

1.2.1.1 PBDEs 的污染现状

PBDEs 作为早期使用最广泛的 BFRs 材料，主要应用于电子设备、塑料、纺织物、建筑材料以及地毯等产品中(Allchin et al, 1999, Sellström et al, 1993)，作为添加型的阻燃剂 PBDEs 可在高温状态下释放自由基，阻断燃烧反应。1992 年，PBDEs 的全球市场需求量为 4 万吨(Hale et al, 2001)，到 2001 年时已上涨到 6.7 万吨，近年来由于被限制使用，需求量有所下降(Voorspoels et al, 2003)。

与多氯联苯(PCBs)的结构类似，PBDEs 是一类包含有 209 种同系物的溴代二苯醚类化合物，其化学通式为 $C_{12}H_{(0-9)}Br_{(1-10)}$ ，化合物的结构式见图 1-1，依溴原子数量不同分为 10 个同系组，并且随着溴原子数的增加 PBDEs 的蒸汽压降低，在水中的溶解度减小， $\log K_{ow}$ 随溴含量的增加而增加(Tomy et al, 2001)。商用 PBDEs 根据苯环上溴取代程度的不同分为三类，分别是商用十溴联苯醚，其主要成分是十溴联苯醚(deca-BDE)，占总量的 97-98%；商用八溴联

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.