

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20171213001

喻焱, 李巧玉, 董聪聪, 等. 4-壬基酚对拟柱胞藻生长、抗氧化酶和光合作用的影响及机理[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 259-267

Yu Y, Li Q Y, Dong C C, et al. Effect and mechanism of 4-nonylphenol on the growth, antioxidative enzymes and photosynthesis of *Cylindrospermopsis raciborskii* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 259-267 (in Chinese)

4-壬基酚对拟柱胞藻生长、抗氧化酶和光合作用的影响及机理

喻焱, 李巧玉, 董聪聪, 张红波, 向荣, 施军琼, 吴忠兴*

西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715

收稿日期: 2017-12-13 录用日期: 2018-03-19

摘要: 为探究 4-壬基酚对入侵水华蓝藻拟柱胞藻的影响, 对不同浓度(0.00、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mg·L⁻¹) 4-壬基酚处理 96 h 后的拟柱胞藻叶绿素 a、抗氧化酶和光合作用进行测定。结果表明, 4-壬基酚对拟柱胞藻 96 h 半数效应浓度(96 h-EC₅₀) 为 0.457 mg·L⁻¹。高浓度处理(>0.50 mg·L⁻¹) 时, 拟柱胞藻叶绿素 a 含量、最大光合效率(F_v/F_m)、光合效率(α)、最大相对电子传递速率(rETRmax)、半饱和光强(I_k)、RC/Cs₀、ET₀/RC、 Φ_{P_0} 、 Φ_{E_0} 、 ψ_0 和 $S_m/t(F_m)$ 均显著下降被显著抑制, 而光合系统 II 中 ABS/RC、DI₀/RC 和 TR₀/RC 均显著增加, 同时超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性随着浓度增加明显上升。而低浓度处理下(<0.10 mg·L⁻¹), 拟柱胞藻的叶绿素 a 含量、光合效率、最大相对电子传递速率和半饱和光强增加。这些结果表明高浓度 4-壬基酚处理下, 拟柱胞藻的叶绿素合成受阻, 光合色素减少, 光合反应中心结构受损, Q_A⁻大量累积, 光合效率下降, 抑制藻细胞的光合作用, 导致了拟柱胞藻生长受到阻碍, 而低浓度壬基酚处理下, 则可能表现出低剂量毒物兴奋效应。

关键词: 4-壬基酚; 拟柱胞藻; 叶绿素 a; 抗氧化酶; 光合作用

文章编号: 1673-5897(2018)6-259-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect and Mechanism of 4-Nonylphenol on the Growth, Antioxidative Enzymes and Photosynthesis of *Cylindrospermopsis raciborskii*

Yu Yi, Li Qiaoyu, Dong Congcong, Zhang Hongbo, Xiang Rong, Shi Junqiong, Wu Zhongxing*

Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research in Three Gorges Reservoir Region, Southwest University, Chongqing 400715, China

Received 13 December 2017 accepted 19 March 2018

Abstract: To explore the effect of 4-nonylphenol on the planktonic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, chlorophyll a, antioxidative enzymes activities and photosynthetic characteristic parameters were investigated after 96 h treatments of 0.00, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 and 2.00 mg·L⁻¹ 4-nonylphenol. The results showed that the 96 h-EC₅₀ values (effective concentration inducing 50% of growth inhibition after 96 h) of 4-nonylphenol in *C. raciborskii* was 0.457 mg·L⁻¹. Chlorophyll a content, the maximum photochemical efficiency of PS II in the dark (F_v/F_m), photosynthetic efficiency (α), the maximum relative electron transfer rate (rETRmax) and saturating light levels (I_k), RC/Cs₀, ET₀/RC, Φ_{P_0} , Φ_{E_0} , ψ_0 and $S_m/t(F_m)$ were significantly suppressed ($P < 0.05$), while a significant in-

基金项目: 中央高校基本业务费专项资金(XDJK2017B010); 西南大学博士基金(SWU110065)

作者简介: 喻焱(1993-), 男, 重庆云阳人, 硕士研究生, 研究方向为藻类生理学, E-mail: 122418802@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: wuzhx@swu.edu.cn

crease was found in ABS/RC, DI₀/RC and TR₀/RC when *C. raciborskii* was treated at the high concentrations (>0.50 mg·L⁻¹). In addition, the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were significantly increased as the 4-nonylphenol concentration increased. However, chl a, α , rETRmax and I_k showed significant increases when *C. raciborskii* was exposed to low concentrations of 4-nonylphenol (< 0.10 mg·L⁻¹). Therefore, these results indicated that the growth of *C. raciborskii* inhibited by high concentrations of 4-nonylphenol may be related to the blockage of chlorophyll synthesis, reduce of photosynthetic pigment, damage of PS II reaction center structure, large accumulation of Q_A⁻ and decrease of photosynthetic efficiency. *Cylindrospermopsis raciborskii* might show a “hormesis” at the low concentrations of 4-nonylphenol.

Keywords: 4-nonylphenol; *Cylindrospermopsis raciborskii*; chlorophyll a; antioxidative enzyme; photosynthesis

壬基酚(nonylphenol, NP)是非离子表面活性剂壬基酚聚氧乙烯醚(nonylphenol polyethoxylates, NPEOs)合成原料^[1],同时也是其降解代谢产物。壬基酚是一种环境激素类似物^[2],与1,7- β -雌二醇(雌激素的一种)具有相似的化学结构,因而具有雌激素的性质,能代替雌激素作用于雌激素的受体,从而抑制生物体内雌激素的作用,干扰生物体内正常代谢活动,因此被列入环境内分泌干扰物(EDCS)和33种优先污染物名录中^[3]。2005年美国环保局(EPA)指出壬基酚在淡水中的浓度应低于6.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,海水中浓度应低于1.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4]。然而,近些年来,在我国水体如天津河流^[5]、黄河^[6]、长江^[7]、胶州湾水体^[8]、湄洲海湾水域^[9]等均发现不同浓度的壬基酚,如嘉陵江和长江自然水样中壬基酚浓度为0.02~6.85 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,而胶州湾附近墨水河壬基酚浓度达28.656 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,其浓度远远高于EPA参考浓度。陈慰双^[10]的研究表明大辽河流域部分站位、黄河兰州段水体部分站位、海河流域部分站位及香港米埔湿地壬基酚的污染水平已经对该地区生态系统造成威胁,并危害水生动植物的生长。因此,探讨壬基酚的生态毒性和风险评估显得尤为重要。然而,目前关于壬基酚的毒性研究主要集中在哺乳动物^[11]、鱼类^[12-13]及其他水生动物^[14]的毒理研究上。研究表明壬基酚对小鼠的中枢神经系统有一定的损伤作用^[15];对鲫(*Carassius auratus*)肝细胞具有一定的毒性作用^[16];还能引起端足类河螺赢蜚(*Corophium acherusicum*)DNA的损伤,且损伤程度呈显著的剂量-效应关系^[17]。

藻类是水生生态系统食物链的起点,也是最重要的初级生产者,其可将无机营养元素转移至更高级的有机生命体,担负着物质循环和能量流动的重要任务^[18]。因此,开展壬基酚对微藻毒性效应的研究对壬基酚的生态风险评估具有重要意义。有研究

表明壬基酚对三角褐指藻(*Phaeodactylum triconutum*)的生长具有明显的毒性效应,并可以造成抗氧化酶系统和光合系统的损伤^[19];壬基酚能使微小环藻(*Cyclotella caspia*)细胞生长速率减慢,叶绿素a含量下降,细胞畸形率增大^[20]。虽有不少壬基酚对藻类的毒理学研究,但主要集中在硅藻和绿藻等真核藻类方面,而对水体浮游植物另一重要组成原核藻类—蓝藻的方面,特别是光合生理方面的研究相对较少。因此,为了探讨壬基酚对蓝藻的影响,本文以拟柱胞藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)为研究对象,本实验通过测定不同浓度下壬基酚对拟柱胞藻生长、光合系统II相关参数及抗氧化酶的影响,旨在探究壬基酚对拟柱胞藻毒性效应,为揭示壬基酚对浮游植物的致毒方式和机理以及生态风险评估提供一定的理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

拟柱胞藻(*C. raciborskii* FACHB-1096)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。将藻扩大培养至指数生长期,离心去上清后转接到250 mL锥形瓶150 mL MA培养基中,接种OD为0.15。实验采用丙酮(化学纯,中国国药有限公司)作为助溶剂,配制丙酮的6个体积浓度系列:0、1%、3%、5%、7%和10%,48 h培养后用浮游植物计数框显微计数,测定藻细胞的密度,计算得到丙酮对拟柱胞藻的不可见效应剂量(no observed effect level, NOEL)为5%。参考野外水体浓度和相关文献,并结合预实验结果,设定4-壬基酚(优级纯,中国国药有限公司)终浓度为0.00、0.05、0.10、0.50、1.00和2.00 mg·L⁻¹。培养条件为光照强度30 $\mu\text{E}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{S})^{-1}$,温度25 $^{\circ}\text{C}$,光暗比12 h:12 h。每个浓度设置3个重复,以不添加4-壬基酚(0.00 mg·L⁻¹)为对照组。每天定时摇动

3次,使藻细胞充分与培养液接触。取样测量0 h、24 h、48 h、72 h、96 h的藻液OD值,并测量暴露96 h后藻细胞的叶绿素a含量。根据实验数据,通过线性回归分析计算NP对拟柱胞藻的96 h-EC₅₀。

1.2 叶绿素a的测定

取不同浓度处理96 h的藻液各5 mL,离心后去上清,加入90%的丙酮进行提取,测定663 nm、645 nm下的OD值,用公式 $\text{Chl a} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (12.72 \times \text{OD}_{663} - 2.7 \times \text{OD}_{645}) \times V_t / V$ 计算叶绿素的浓度,其中 V_t 为提取后定容的体积, V 为提取所用的藻液体积^[21]。

1.3 快速光曲线(RLCs)和最大光化学效率

用浮游植物荧光分析仪(PHYTO-PAM, Waltz公司,德国)测定藻细胞的最大光化学效率及电子传递速率,测定方法参见Maxwell等^[22]的方法。快速光曲线数据采用以下等式的非线性曲线拟合过程拟合^[23]:

$$r\text{ETR} = r\text{ETRmax} [1 - e^{-(\alpha \cdot \text{PAR} / r\text{ETRmax})}] e^{-(\beta \cdot \text{PAR} / r\text{ETRmax})}$$

$r\text{ETRmax}$ 是最大相对潜在电子传递速率, α 是RLC的初始斜率,PAR是光照度, β 是在PSII下降的点上RLC的斜率,半饱和光强 $I_K = r\text{ETRmax} / \alpha$ ^[24]。

1.4 PSII快速叶绿素荧光动力学曲线(OJIP)的测定

藻体胁迫培养96 h后,每个处理各取2 mL藻液置黑暗中暗适应20 min后,测定快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP)。快速叶绿素荧光诱导动力学曲线采用植物效率分析仪(PEA,英国汉莎科技有限公司,英国)测定,测定光强为 $3\ 000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,最大激发波长650 nm,记录了从10 μs 到2 s叶绿素荧光的变化过程,从而准确记录O-J-I-P等相。快速叶绿素荧光动力学曲线由O点到P点的所有荧光需进行标准化,以对数形式进行表示。通过OJIP曲线的变化,获得了以下参数:单位受光面积有活性反应中心的数量(RC/CS₀), $t=0$ 时最大光化学效率(Φ_{p0}), $t=0$ 时捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过醌分子(Q_A)的其他电子受体的概率(ψ_0), $t=0$ 时用于电子传递的量子产额(Φ_{E0}),单位反应中心吸收的光能(ABS/RC), $t=0$ 时单位反应中心耗散掉的能量(DI₀/RC), $t=0$ 时单位反应中心捕获的用于还原Q_A的能量(TR₀/RC), $t=0$ 时单位反应中心捕获的用于电子传递的能量(ET₀/RC),从0到 t_{Fmax} 时间段 Q_A^-/Q_A 的平均氧化还原态($S_m/t(F_m)$)^[25]。

1.5 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的测定

酶液提取采用细胞冻融法,分别吸取不同浓度

处理96 h的藻液各50 mL,离心去除上清液,加入定量磷酸盐缓冲液(PBS) pH=7.5,置于-80 °C冷冻,经反复冻融后,离心提取酶液。蛋白质的测定参照考马斯亮蓝法^[26]、SOD和CAT活性的测定分别参照Wu等^[27]和Choo等^[28]的方法。

1.6 数据分析

实验数据处理使用SPSS 16.0进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及LSD法($P < 0.05$)检验处理组与对照组之间的差异,“*”、“**”、“***”表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$,差异显著。

2 结果(Results)

2.1 不同浓度4-壬基酚处理下拟柱胞藻叶绿素a含量的变化

不同浓度壬基酚处理96 h后,结果(图1)显示,与对照组叶绿素含量相比,0.05、0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组叶绿素a含量显著增加($P < 0.001$),分别增加了21.32%、27.27%。然而,在0.50、1.00、2.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 壬基酚中培养96 h后,各处理的叶绿素a显著低于对照组($P < 0.001$),分别减少了77.96%、88.77%、94.18%。当浓度 $> 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时培养瓶底部出现大量无色或白色的藻细胞沉淀物。根据回归曲线,4-壬基酚对拟柱胞藻的96 h半数效应浓度(96 h-EC₅₀)为 $0.457 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

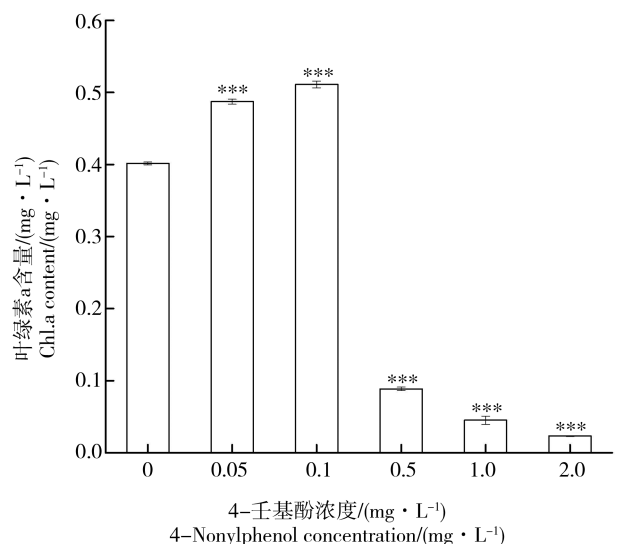


图1 不同浓度4-壬基酚处理后拟柱胞藻的叶绿素含量
注:与对照组比较,“***”表示 $P < 0.001$,差异显著,下同。

Fig. 1 Effect of different concentrations of 4-nonylphenol on chlorophyll a content in *C. raciborskii*

Note: compared with the control, “***” represents significant difference at $P < 0.001$. The same below.

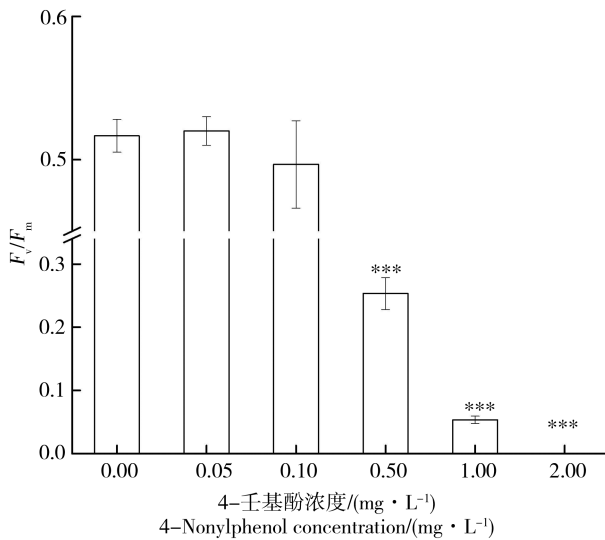


图2 不同浓度4-壬基酚对拟柱胞藻 F_v/F_m 的影响

Fig. 2 The maximum photochemical efficiency (F_v/F_m) for the responses of *C. raciborskii* to different concentrations of 4-nonylphenol

2.2 最大光化学效率 (F_v/F_m) 的变化

如图2所示,在不同浓度4-壬基酚处理96 h后,与对照组相比,0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的 F_v/F_m 无显著差异,而在 0.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理后, F_v/F_m 分别下降了 50.99%、88.08% 和 100%, 具有显著的差异 ($P < 0.001$)。

2.3 快速光响应曲线(RLC)

4-壬基酚处理96 h后,当壬基酚浓度大于 0.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,RLC 发生显著降低;当4-壬基酚浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,检测不出荧光值(图3)。与对照组相比,0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 α 值无明显变化,

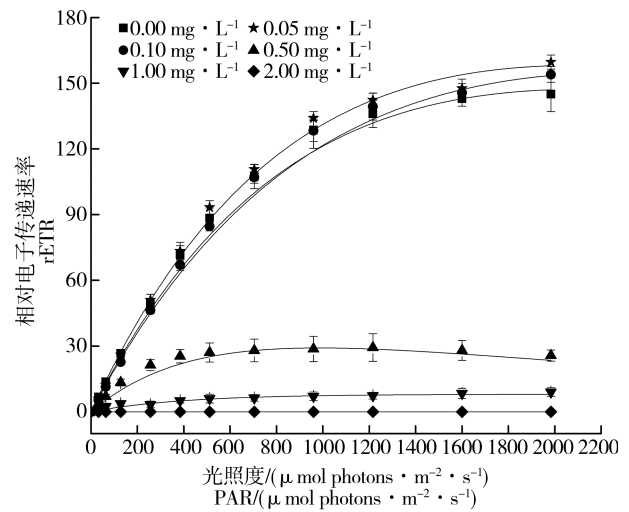


图3 不同浓度4-壬基酚对拟柱胞藻快速光曲线的影响

Fig. 3 Rapid light curves of *C. raciborskii* under the influence of different concentrations of 4-nonylphenol following 48-h treatment

Note: rETR stands for electron transport rates; PAR stands for photosynthetic active radiation.

当浓度大于 0.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着浓度增加, α 明显下降 ($P < 0.01$), 0.50、1.00、2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 α 值分别减少了 46.58%、77.17% 和 100%; 当浓度大于 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,处理组的 rETRmax 发生了明显变化 ($P < 0.01$), 其中 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的 rETRmax 增加了 5.36%, 0.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 rETRmax 分别减少了 78.43%、94.31%、100%; 所有处理组的 I_K 值均发生了明显变化 ($P < 0.01$), 其中 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的 I_K 值分别增加了 11.8%、17.19%, 0.50、1.00、2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 I_K 值分别减少了 61.16%、76.23%、100% (表1)。

表1 拟柱胞藻经4-壬基酚处理后的光合参数变化

Table 1 Changes in the photosynthetic parameters of *C. raciborskii* following treatment with 4-nonylphenol

壬基酚浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Nonylphenol concentration($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	α	rETRmax/ ($\mu\text{mol electrons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	I_K / ($\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
0.00	0.219±0.004	145.500±0.850	664.380±4.500
0.05	0.215±0.004	159.700±1.380*	742.797±4.510**
0.10	0.197±0.003*	153.267±1.004**	778.567±2.492**
0.50	0.117±0.010**	32.467±0.677**	279.133±4.619**
1.00	0.052±0.007**	8.564±0.834**	170.863±9.315**
2.00	0**	0**	0**

注:每个值是3个重复的平均值±标准误;**表示 $P < 0.01$,与对照组比较,下同。 α 表示斜率;rETRmax表示最大电子传递速率; I_K 表示饱和光强。
Note: Each value is the mean of three replicates ($\bar{x}\pm s$). **indicates $P < 0.01$, compared with the control; the same below. α stands for the initial slope of the rapid light curves (RLC); rETRmax stands for maximum electron transport rates; I_K stands for saturating irradiances.

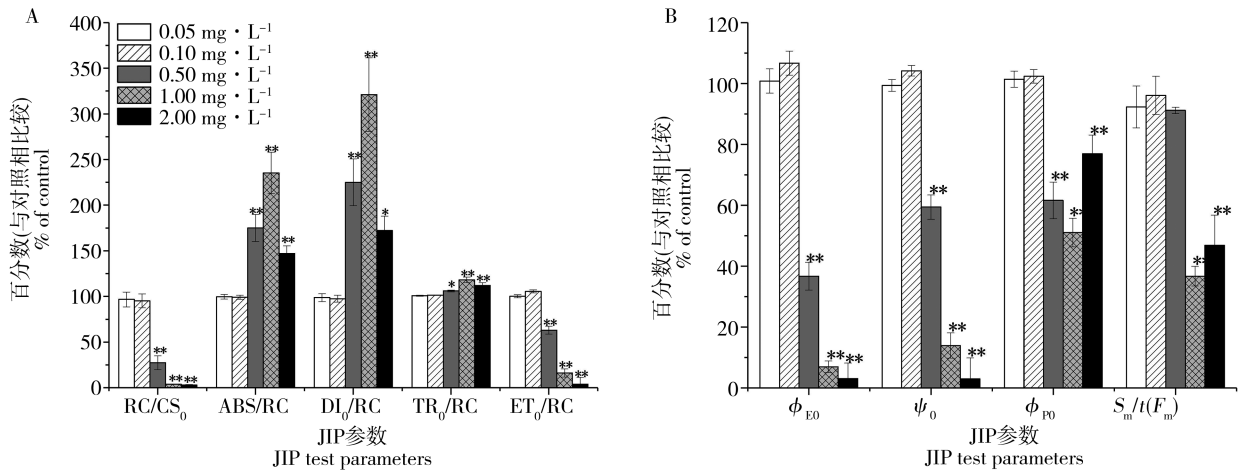


图 4 不同浓度 4-壬基酚对拟柱胞藻叶绿素荧光参数 (JIP-test) 的影响

注:RC/Cs₀、ABS/RC、DI₀/RC、TR₀/RC、ET₀/RC 分别表示单位受光面积有活性反应中心的数量、单位反应中心吸收的光能、单位反应中心耗散掉的能量、单位反应中心捕获的用于还原 Q_A 的能量、单位反应中心捕获的用于电子传递的能量;

Φ_{P0}、ψ₀、Φ_{E0}、S_m/t(F_m)分别表示最大光化学效率、捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其他电子受体的概率、用于电子传递的量子产额、从 0 到 t_{Fmax} 时间间隔 Q_A⁻/Q_A 平均氧化还原状态。*、**表示 P<0.05、P<0.01,与对照组比较,下同。

Fig. 4 Changes in the JIP test parameters and expressed as a percentage of the control when

C. raciborskii were exposed for 96 h to various concentrations of 4-nonylphenol

Note: RC/Cs₀, ABS/RC, DI₀/RC, TR₀/RC, ET₀/RC stand for density of reaction centers (RC), absorption flux per RC, dissipated energy flux per RC, trapped energy flux per RC, electron transport flux per RC, respectively; Φ_{P0}, ψ₀, Φ_{E0}, S_m/t(F_m) stand for maximum quantum yield of primary photochemistry, probability that a trapped exciton moves an electron into the electron transport chain beyond Q_A⁻, quantum yield of electron transport, the average redox state of Q_A⁻/Q_A in the time span from 0 to t_{Fmax}, respectively. *, ** indicate P<0.05, P<0.01, compared with the control; the same below.

2.4 PSII 叶绿素荧光参数的变化

不同浓度 4-壬基酚处理后,拟柱胞藻叶绿素荧光参数反应活性中心所捕获的光能(ABS/RC)、反应活性中心耗散掉的能量(DI₀/RC)、反应活性中心(RC)所捕获的激发能用于还原 Q_A 的能量(使 Q_A 减少从而还原成 Q_A⁻, TR₀/RC)、反应活性中心的捕获的光能用于电子传递的能量(Q_A⁻-Q_B⁻-PQ, ET₀/RC)、荧光参数单位受光面积的反应活性中心数量(RC/Cs₀)、最大光化学效率(Φ_{P0})、光照 2 ms 时有活性的反应中心开放程度(ψ₀)、反应中心吸收的光能用于电子传递的量子产额(Φ_{E0})及从 0 到 t_{Fmax} 时间段 Q_A⁻/Q_A 的平均氧化还原态 S_m/t(F_m)的变化情况如图 4 所示。与对照相比,当 4-壬基酚浓度小于 0.10 mg·L⁻¹,拟柱胞藻各参数未表现出明显的差异(P>0.05)。当浓度高于 0.50 mg·L⁻¹,拟柱胞藻 ABS/RC、DI₀/RC 和 TR₀/RC 均显著增加(P<0.05),而 RC/Cs₀、ET₀/RC、Φ_{P0}、Φ_{E0}、ψ₀ 和 S_m/t(F_m)均显著下降(P<0.05)。当 4-壬基酚浓度为 1.0 mg·L⁻¹时,ABS/RC、DI₀/RC 和 TR₀/RC 分别增加到对照组的 235.23%、321.05% 和 118.10%,而 RC/Cs₀、ET₀/RC、Φ_{P0}、Φ_{E0}、

ψ₀ 和 S_m/t(F_m) 则分别比对照下降了 96.19%、83.72%、93.02%、86.04%、48.95% 和 63.30%。

2.5 抗氧化酶活性的变化

在不同浓度 4-壬基酚处理 96 h 后,与对照组相比,0.05 和 0.10 mg·L⁻¹处理组 SOD 和 CAT 活性无明显变化。然而,当浓度大于 0.50 mg·L⁻¹时,随着浓度增加,SOD、CAT 的活性明显增加(P<0.01),0.50、1.00 和 2.00 mg·L⁻¹组 SOD 的活性分别是对照组的 3.65、13.78 和 15.65 倍,CAT 的活性分别是对照组的 2.02、3.14 和 3.49 倍。

3 讨论 (Discussions)

叶绿素是光合作用的重要组成部分,叶绿素含量与光合速率、营养状况等密切相关,测定叶绿素的含量是表征植物生长与光合作用状况重要标志^[29]。本次研究得到,低浓度 4-壬基酚处理下(<0.1 mg·L⁻¹),在高浓度(>0.5 mg·L⁻¹)处理下,叶绿素的合成受到明显抑制(图 1)。这与 Liu 等^[30]对 *Cyclotella caspia* 和 Gao 等^[31]对 *Chlorella vulgaris* 和 *Selenastrum capricornutum* 的结果相似。当浓度>1 mg·L⁻¹

时培养瓶底部出现大量无色或白色的藻细胞沉淀物,表明藻细胞叶绿素产生脱镁的效应,导致细胞中叶绿素失活,其大量产生说明藻类全部死亡。这表明与真核藻类相似,高浓度处理会使得拟柱胞藻藻细胞的叶绿体结构受到破坏,叶绿素的合成受阻,从而导致叶绿素含量降低,生长受抑制。4-壬基酚处理 96 h,拟柱胞藻的半致死浓度(EC_{50})为 $0.457 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,与球形棕囊藻 96 h- EC_{50} 相似($0.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[32]。然而,低于三角褐指藻、蛋白核小球藻的 96 h- EC_{50} ,分别为 $0.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[19]和 $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[31]。然而,低浓度处理 96 h 后,拟柱胞藻的叶绿素含量增加(图 1),表明低浓度的壬基酚促进拟柱胞藻的叶绿素的合成,这与 Liu 等^[30]、Gao 等^[31]和管超等^[32]对真核藻类的研究结果不同,表明在低浓度壬基酚暴露下,拟柱胞藻可能产生了毒物兴奋效应。目前,已报到水体中的壬基酚检测浓度均为低剂量^[6-9],蓝藻的 4-壬基酚毒物兴奋效应可能导致水体蓝藻的竞争优势。

光合作用为植物提供物质与能量,是植物生长发育的重要保障^[33-34]。当植物体遭受一定条件的胁迫,其叶绿体的膜结构遭到破坏,叶绿素含量将随叶绿体膜结构的解体而降低,进而降低植物的光合能力^[35]。 F_v/F_m 表示 PSII 最大光量子产量,当遭受外界胁迫时,该参数明显下降^[36]。Gao 等^[31]对 *C. vul-*

garis 和 *S. capricornutum*、Zhou 等^[37]对 *Scenedesmus obliquus* 研究也得到了高浓度处理下 F_v/F_m 受到明显抑制。本研究发现当浓度高于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,拟柱胞藻的 F_v/F_m 随浓度增加而减少(图 2),表明拟柱胞藻的光合作用受到抑制作用,其原因可能是叶绿素的合成受阻,导致了光量子的产量受到抑制。 $rETR_{max}$ 表示光合效率的大小,被用来描述 PSII 的最大光化学效率和开放氧化反应中心的比例^[38]。本次研究得到,在壬基酚浓度 $>0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,拟柱胞藻的 $rETR_{max}$ 随浓度增加而减小(表 1),这和 F_v/F_m 的结果一致,表明拟柱胞藻的光合作用受到了抑制。 α 是快速光曲线的初始斜率,表示藻的捕光能力^[39],本研究发现当浓度高于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,拟柱胞藻的 α 随浓度增加而减少(表 1),表明拟柱胞藻在高浓度壬基酚的胁迫下捕光能力减弱。 I_k 的大小表示植物耐受强光的能力^[39],本研究发现当浓度高于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,拟柱胞藻的 I_k 随浓度增加而减少(表 2),表明在高浓度壬基酚的胁迫下,拟柱胞藻耐受强光的能力减弱。当壬基酚浓度高于 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,拟柱胞藻叶绿素荧光不能检测,也支持了管超等^[32]对棕囊藻研究的结论。然而,与前人对真核藻类的研究不同,低浓度下,拟柱胞藻的 $rETR_{max}$ 和 I_k 增大,表明 4-壬基酚对拟柱胞藻产生了毒性兴奋效应,进一步支持了叶绿素的结果。

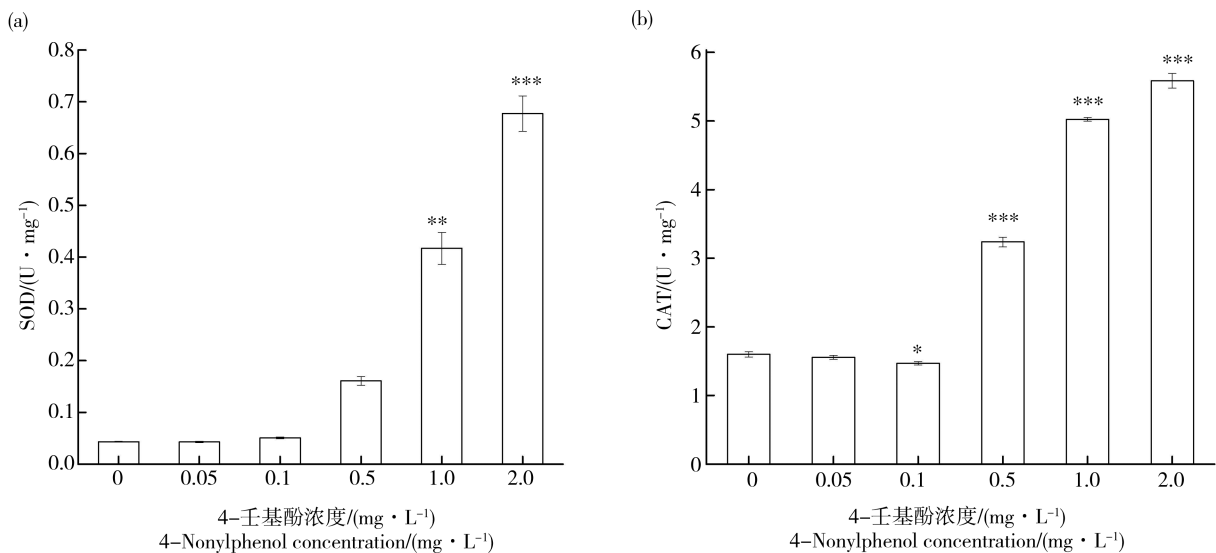


图5 不同浓度 4-壬基酚处理后拟柱胞藻抗氧化酶活性

注:(a)超氧化物酶(SOD),(b)过氧化氢酶(CAT)。

Fig. 5 Effect of different concentrations of 4-nonylphenol on the antioxidant activity of *C. raciborskii*

Note: (a) superoxide dismutase (SOD); (b) catalase (CAT).

由于叶绿素荧光曲线提供了大量关于 PSII 反应中心原初光化学反应的信息,因此叶绿素荧光参数被认为是分析环境胁迫条件光合系统 II(PSII)行为的敏感指标参数^[40]。本研究发现在高浓度 4-壬基酚处理下,拟柱胞藻的光合机构的比活性,即活跃的单位反应中心(RC)的各种量子效率(ABS/RC 、 DI_0/RC 、 TR_0/RC)均显著增加(图 4A),表明了高浓度 4-壬基酚处理增加了拟柱胞藻反应活性中心所捕获的光能,然而,这些捕获的能量主要被反应活性中心耗散掉,导致了 Q_A^- 的大量积累^[25]。同时,高浓度 4-壬基酚处理也导致了拟柱胞藻单位面积上的反应中心的数量(RC/Cs_0)、反应中心的最大光化学效率(Φ_{P_0})、反应中心用来推动电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其他电子受体的激子比率(ψ_0)、反应中心用来推动电子传递到电子传递链中超过 Q_A 的其他电子受体的概率(Φ_{E_0})及 Q_A^-/Q_A 的平均氧化还原态($S_m/t(F_m)$)均显著降低(图 4),进一步表明了高浓度 4-壬基酚破坏了拟柱胞藻的光合反应中心,导致了 PSII 供体侧的电子供体和受体侧电子受体受到了毒害作用,反应活性中心捕获的能量更多地用于 Q_A 还原为 Q_A^- ,减少了用于电子传递的能量,进而抑制了 Q_A 到 Q_B 的电子传递, Q_A^- 大量积累,增加质体醌(PQ)库的库容量,从而抑制了光合作用^[40],该结果与拟柱胞藻的 rETRmax 随浓度增加而减小的结论相一致。

植物在逆境胁迫下,会产生过量的氧自由基,抗氧化酶防御系统是植物保护自身免受氧自由基毒害的防御系统,其中 SOD 和 CAT 是 2 种重要的抗氧化损伤保护酶^[40],SOD 将氧自由基转变为 H_2O_2 和 O_2 ,CAT 进一步将 H_2O_2 转变为 H_2O 和 O_2 ,植物通过这 2 种酶的相互协作,消除或减少氧自由基和过氧化氢的毒性^[41-42]。本研究发现高浓度壬基酚处理后,拟柱胞藻的 SOD 和 CAT 活性均显著增加,支持了 Liu 等^[30]和 Gao 等^[31]的研究发现,表明高浓度壬基酚刺激藻细胞体内产生的大量氧自由基,植物为了生长必须清除这些氧自由基,因而合成大量 SOD 和 CAT,使得 SOD 和 CAT 活性增加。然而,低浓度处理组中,拟柱胞藻的 SOD 和 CAT 与对照没有显著性差异(图 5),表明低浓度对拟柱胞藻未产生毒害。

综上所述,与真核藻类一样,高浓度 4-壬基酚处理下,拟柱胞藻的叶绿素合成受阻,光合色素减少,光合反应中心结构受损, Q_A^- 大量积累,光合效率下降,抑制藻细胞的光合作用,导致了拟柱胞藻生

长受到阻碍。同时,高浓度处理导致藻细胞内产生大量氧自由基,为了清除氧自由基,细胞内抗氧化酶活性急剧增加。然而,与真核藻类不同,低浓度壬基酚处理下,拟柱胞藻则可能表现出毒物兴奋效应。因此,研究壬基酚对蓝藻的影响不仅需注意高浓度产生的急性毒理效应,也应该关注低浓度下产生的效应问题。

通讯作者简介:吴忠兴(1975-),男,环境科学博士,教授,主要研究方向为藻类生理生态,发表学术论文 50 余篇。

参考文献 (References):

- [1] Petrovic M, Borrull F, Marce R M. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzenesulfonates in coastal waters and sediments in Spain [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(1): 37-46
- [2] Lye C M, Frid C L J, Gill M E, et al. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees Estuaries [J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(7): 1009-1014
- [3] Ömeroglu S, Murdoch F K, Sanin F D. Investigation of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge samples from a metropolitan wastewater treatment plant in Turkey [J]. *Talanta*, 2015, 131: 650-655
- [4] Gao D W, Li Z, Guan J X, et al. Seasonal variations in the concentration and removal of nonylphenol ethoxylates from the wastewater of a sewage treatment plant [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 4(54): 217-223
- [5] Yu Y, Zhai H Y, Hou S G, et al. Nonylphenol ethoxylates and their metabolites in sewage treatment plants and rivers of Tianjin, China [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(1): 1-7
- [6] 侯绍刚, 徐建, 汪磊, 等. 黄河(兰州段)水环境中壬基酚及壬基酚聚氧乙烯醚污染的初步研究[J]. *环境化学*, 2005, 24(3): 250-254
Hou S G, Xu J, Wang L, et al. Primary study on nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in aquatic environment at Lanzhou Reach of Yellow River [J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 24(3): 250-254 (in Chinese)
- [7] 邵兵, 胡建英, 杨敏. 重庆流域嘉陵江和长江水环境中壬基酚污染状况调查[J]. *环境科学学报*, 2002, 22(1): 12-16
Shao B, Hu J Y, Yang M. A survey of nonylphenol in aquatic environment of Chongqing valley [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(1): 12-16 (in Chinese)
- [8] 褚春莹, 但丽霞, 蒋海威, 等. 胶州湾入海河流和排污口水体中壬基酚的污染状况调查及入海通量核算[J].

- 中国环境监测, 2013, 29(2): 29-33
- Chu C Y, Dan L X, Jiang H W, et al. Pollution status and flux of nonylphenol in the water of the rivers and drainage outlet entering the Jiaozhou Bay [J]. *Environmental Monitoring in China*, 2013, 29(2): 29-33 (in Chinese)
- [9] 胡晴晖. 湄洲湾海域环境雌激素的污染特征及生态风险评估[J]. *海洋环境科学*, 2014, 33(5): 745-751
- Hu Q H. Occurrence and ecological risk assessment of environmental estrogens in Meizhou Bay [J]. *Marine Environmental Science*, 2014, 33(5): 745-751 (in Chinese)
- [10] 陈慰双. 我国水环境中壬基酚的污染现状及生态风险评估[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 9-30
- Chen W S. The current pollution status and ecological risk assessment of nonylphenol in domestic water environment [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 9-30 (in Chinese)
- [11] Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard A M, et al. In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol [J]. *Reproductive Toxicology*, 2001, 15(5): 537-543
- [12] Tanaka J N, Grizzle J M. Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of the hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 57(3): 117-125
- [13] Pickford K A, Thomas-Jones R E, Wheals B, et al. Route of exposure affects the osteogenic response of fish to 4-*tert*-nonylphenol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65 (3): 267-279
- [14] Sun H H, Ye Y Z. Effect of nonylphenol on giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment: Toxicity and messenger RNA expression of hemolytic genes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91(3): 270-277
- [15] 毛缜. 环境激素壬基酚对小鼠神经毒性作用及其分子生物学机制研究[D]. 北京: 中国矿业大学, 2008: 72-78
- Mao Z. Study on the effects of environmental hormone nonylphenol on the neurotoxicity of mice and their molecular biological mechanisms [D]. Beijing: China University of Mining and Technology, 2008: 72-78 (in Chinese)
- [16] 郭彤, 张高峰, 朱宝长. 壬基酚或双酚 A 对原代培养鲫肝细胞毒性的影响[J]. *首都师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 30(2): 35-40, 73
- Guo T, Zhang G F, Zhu B C. The effects of nonylphenol or bisphenol A on the toxicity of hepatocyte in the primary culture crucian [J]. *Journal of Capital Normal University: Natural Science Edition*, 2009, 30 (2): 35-40, 73 (in Chinese)
- [17] 郑佳佳, 王睿睿, 林志浩, 等. 壬基酚、五氯酚及硝基苯对端足类河螺赢蜚 (*Corophium acherusicum*) 的毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(6): 1104-1111
- Zheng J J, Wang R R, Lin Z H, et al. The toxicity effect of nonylphenol, pentachlorophenol and nitrobenzene on the *Corophium acherusicum* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(6): 1104-1111 (in Chinese)
- [18] Stevenson R J, Pan Y D, Van Dam H. Assessing Environmental Conditions in Rivers and Streams with Diatoms [M]// Stoermer E F, Smol J P (Eds.). *The Diatom: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 57-85
- [19] 李根, 管超, 安民, 等. 壬基酚对三角褐指藻的毒性效应及其机理[J]. *生态科学*, 2013, 32(3): 298-302
- Li G, Guan C, An M, et al. The toxic effect of nonylphenol on the *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin and its mechanism [J]. *Ecological Science*, 2013, 32(3): 298-302 (in Chinese)
- [20] 代晓康. 壬基酚(NP)对微小环藻的毒性及其生物降解研究[D]. 广州: 中山大学, 2005: 58-63
- Dai X K. Toxicity of nonylphenol (NP) and its biodegradation by alga *Cyclotella caspia* [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2005: 58-63 (in Chinese)
- [21] Nusch E A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination [J]. *Archiv für Hydrobiologie-Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, 1980, 14: 14-36
- [22] Maxwell K, Johnson G N. Chlorophyll fluorescence—A practical guide [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(345): 659-668
- [23] Platt T, Gallegos C L, Harrison W G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton [J]. *Journal of Marine Research*, 1980, 38: 687-701
- [24] Henley W J. Measurement and interpretation of photosynthesis light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes [J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29(6): 729-739
- [25] Strasser R J, Srivastava A, Govinejee G. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transients in plants and cyanobacteria [J]. *Photochemistry Photobiology*, 1995, 61(1): 32-42
- [26] Bradford M 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 (s 1-2): 248-254
- [27] Wu Z X, Gan N Q, Huang Q, et al. Response of *Microcystis* to copper stress—Do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(2): 324-330
- [28] Choo K S, Snoeijs P, Pedersen M. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahleriana* [J]. *Journal of Experimental*

- Marine Biology and Ecology, 2004, 298(1): 111-123
- [29] 刘露, 丁柳丽, 陈伟洲, 等. 不同温度下 CO₂ 浓度增高对坛紫菜生长和叶绿素荧光特性的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(13): 3916-3924
- Liu L, Ding L L, Chen W Z, et al. The combined effects of increasing CO₂ concentrations and different temperatures on the growth and chlorophyll fluorescence in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(13): 3916-3924 (in Chinese)
- [30] Liu Y, Dai X K, Wei J. Toxicity of the xenoestrogen nonylphenol and its biodegradation by the alga *Cyclotella caspia* [J]. Journal of Environmental Sciences, 2013, 25(8): 1662-1671
- [31] Gao Q T, Tam N F. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress [J]. Chemosphere, 2011, 82(3): 346-354
- [32] 管超, 孙志伟, 安民, 等. 壬基酚对球形棕囊藻的生态毒性效应[J]. 生态环境学报, 2011, 20(4): 640-645
- Guan C, Sun Z W, An M, et al. The ecological toxic effects of nonylphenol on *Phaeocystis globosa* [J]. Ecology and Environmental Science, 2011, 20(4): 640-645 (in Chinese)
- [33] 叶子飘. 光合作用对光和 CO₂ 响应模型的研究进展[J]. 植物生态学报, 2010, 34(6): 727-740
- Ye Z P. A review on modeling of responses of photosynthesis to light and CO₂ [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(6): 727-740 (in Chinese)
- [34] 包先明, 顾东祥, 吴婷婷, 等. 藻华聚集的环境效应: 对漂浮植物水葫芦光合作用的影响[J]. 环境科学, 2015, 36(6): 2070-2076
- Bao X M, Gu D X, Wu T T, et al. Environmental effects of algae bloom cluster: Impact on the floating plant *Eichhornia crassipes* photosynthesis [J]. Environmental Science, 2015, 36(6): 2070-2076 (in Chinese)
- [35] Qian H F, Chen W, Li J J, et al. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris* [J]. Aquatic Toxicology, 2009, 92(4): 250-257
- [36] 李旭新, 刘炳响, 郭智涛, 等. NaCl 胁迫下黄连木叶片光合特性及快速叶绿素荧光诱导动力学曲线的变化[J]. 应用生态学报, 2013, 24(9): 2479-2484
- Li X X, Liu B X, Guo Z T, et al. Effects of NaCl stress on photosynthesis characteristics and fast chlorophyll fluorescence induction dynamics of *Pistacia chinensis* leaves [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(9): 2479-2484 (in Chinese)
- [37] Zhou G J, Peng F Q, Yang B, et al. Cellular responses and bioremoval of nonylphenol and octylphenol in the freshwater green microalga *Scenedesmus obliquus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 87(1): 10-16
- [38] Baumann H A, Morrison L, Stengel D B. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(4): 1063-1075
- [39] 韩志国. 20 种湿地植物的叶绿素荧光特性[D]. 广州: 暨南大学, 2006: 109-113
- Han Z G. The chlorophyll fluorescence characteristics of 20 wetland plants [D]. Guangzhou: Jinan University, 2006: 109-113 (in Chinese)
- [40] Appenroth K J, Stöckel J, Srivastava A, et al. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements [J]. Environmental Pollution, 2001, 115(1): 49-64
- [41] Kuang X, Gu J D, Tie B, et al. Interactive effects of cadmium and *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) on the growth, antioxidative responses and accumulation of cadmium and microcystins in rice seedlings [J]. Ecotoxicology, 2016, 25(8): 1-12
- [42] Shao J H, Wu Z X, Yu G L, et al. Allelopathic mechanism of pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (cyanobacteria): From views of gene expression and antioxidant system [J]. Chemosphere, 2009, 75(7): 924-928
- [43] Begović L, Mlinarić S, Antunović D J, et al. Response of *Lemna minor* L. to short-term cobalt exposure: The effect on photosynthetic electron transport chain and induction of oxidative damage [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 175: 117-126