

环境浓度扑草净存在下聚苯乙烯纳米塑料对隐秘小环藻的毒性效应

刘旻昊, 张振忠, 刘 聪, 崔旭梦, 汝少国, 王 军

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘 要: 纳米塑料 (nanoplastics, NPs) 与除草剂扑草净是海洋环境中的常见污染物, 但是它们同时存在对海洋微藻的潜在危害尚不清楚。本文探究了环境浓度扑草净 (500 ng/L) 与聚苯乙烯纳米塑料 (70 nm, 20 µg/L, 200 µg/L 和 2000 µg/L) 对隐秘小环藻 (*Cyclotella cryptica*) 的联合毒性作用。结果表明, 20 µg/L、200 µg/L 和 2000 µg/L NPs 能够显著降低隐秘小环藻的光合色素含量、损伤藻细胞结构、抑制隐秘小环藻的种群增长, 而 500 ng/L 扑草净单独暴露并未对隐秘小环藻的早期生长产生显著影响。在 500 ng/L 扑草净存在下, NPs 暴露对隐秘小环藻生长抑制作用会增强, 尤其是扑草净与 2000 µg/L NPs 联合暴露 24 h 后的藻密度比 2000 µg/L NPs 单独暴露组降低了 19.4%。环境浓度扑草净的存在还会加重 NPs 对藻细胞的损伤, 使膜通透性增大至对照组的 1.6 倍。细胞膜受损降低了藻细胞对 NPs 的抵御能力, 从而加重了 NPs 对隐秘小环藻的毒性作用。与 2000 µg/L NPs 单独暴露组相比, 扑草净与 2000 µg/L NPs 联合暴露下的藻细胞在暴露 144 h 后的死亡率与异形细胞比例分别升高了 4.1% 和 3.4%。本文研究结果可为评估 NPs 和除草剂污染对海洋初级生产力的危害提供参考。

关键词: 纳米塑料; 扑草净; 隐秘小环藻; 联合暴露; 细胞损伤

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2024)04-0627-10

Toxic effects of polystyrene nanoplastics on *Cyclotella cryptica* in the presence of environmental concentrations of prometryn

LIU Minhao, ZHANG Zhenzhong, LIU Cong, CUI Xumeng,

RU Shaoguo, WANG Jun

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Nanoplastics (NPs) and herbicide prometryn are common pollutants in the marine environments, but their joint impacts on marine microalgae is unclear. In this study, we investigated the toxic effects of environmental concentrations of prometryn (500 ng/L) and polystyrene nanoplastics (70 nm, 20, 200, and 2000 µg/L) on *Cyclotella cryptica*. The results showed that 20, 200 and 2000 µg/L NPs significantly reduced photosynthetic pigment content, damaged algal cell structure, and hindered the population growth of *C. cryptica*. Whereas 500 ng/L prometryn had no significant effect on the early growth of *C. cryptica*. In the presence of environmental concentrations of prometryn, NPs-induced growth inhibition was significantly enhanced, especially after 24 h of exposure; algal density in the prometryn and 2000 µg/L NPs combined

收稿日期: 2023-09-25, 修订日期: 2023-12-04

基金项目: 国家重点研究发展计划项目 (2018YFC1407603); 中央高校基本科研业务费项目 (201964025)

作者简介: 刘旻昊 (1999—), 男, 山东临沂人, 硕士, 研究方向为污染生态学, E-mail: 89016696@qq.com

通信作者: 王 军 (1986—), 男, 山东青州人, 教授, 主要从事海洋污染物的生物毒性效应与生态风险评估相关研究, E-mail: wangjun@ouc.edu.cn

exposure groups was reduced by 19.4% compared with that of the 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs single exposure group. Moreover, the environmental concentrations of prometryn aggravated the damage of NPs to the algal cells, which increased the membrane permeability to 1.6 times that of the control group ($P < 0.05$). Damage to the cell membrane reduced the ability of algal cells to resist the NPs and thus exacerbated the toxicity of NPs to *C. cryptica*. Compared to the 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs single exposure, the combined exposure of prometryn and 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs increased the mortality and proportion of anomalous cells by 4.1% and 3.4%, respectively. The results of this study provide a reference for assessing the hazards of NPs and herbicide pollution on marine primary productivity.

Key words: nanoplastics; prometryn; *Cyclotella cryptica*; combined exposure; cell damage

人类活动产生的塑料垃圾会通过地表径流汇入海洋,在海洋环境中不断裂解为微塑料(MPs, $1\ \mu\text{m} \sim 5\ \text{mm}$)和纳米塑料(NPs, $<1\ \mu\text{m}$),并且MPs还会继续破碎形成新的NPs,导致NPs污染水平不断升高^[1-2]。目前,NPs已成为海洋中广泛存在的一种污染物,在南极海冰中的检出浓度高达 $52.3\ \mu\text{g/L}$ ^[3-5]。MPs能够抑制浮游动物和浮游植物的生长,并对机体产生损伤。暴露于 $50\ \mu\text{g/L}$ $20\ \mu\text{m}$ 的MPs会损伤大型溞(*Daphnia magna*)的肠道,导致肠道微环境紊乱;在 $200\ \text{mg/L}$ $5\ \mu\text{m}$ 的PS-MPs暴露下,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的生长抑制率可达 50.41% ^[6-7]。与MPs相比,NPs具有更高的细胞亲和力,可能会对海洋生物产生更严重的伤害^[8]。例如, $20\ \text{mg/L}$ 的 $200\ \text{nm}$ PS-NH₂暴露 $96\ \text{h}$ 能够使铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的叶绿素 a 含量降低 6.1% ^[9]。另外,NPs具有很大的比表面积,对疏水性有机污染物具有很强的吸附能力,可能会成为其他污染物进入生物体的载体,从而产生联合毒性^[10-11]。因此,NPs与常见污染物联合对海洋生态系统的潜在危害值得关注。

扑草净是一种常见的三嗪类除草剂,在全球范围内被广泛用于田间杂草清除等,因具有性质稳定、半衰期长等特点,容易在环境中残留^[12-13]。扑草净在我国黄海、渤海表层海水中的浓度约为 $627.5\ \text{ng/L}$;扑草净在大连市海水养殖区的平均浓度为 $2.1\ \mu\text{g/L}$,最高浓度可达 $5.4\ \mu\text{g/L}$ ^[14-15]。作为除草剂,扑草净会对海洋藻类产生危害。研究发现, $12.5\ \mu\text{g/L}$ 扑草净能够显著抑制斜生栅藻(*Scenedesmus vacuolatus*)光系统II(PSII)的活性,从而影响其种群生长^[16],提示扑草净可能会

对海洋初级生产力造成不利影响。考虑到NPs对其他污染物具有吸附作用^[10-11],环境中的扑草净可能会被NPs所吸附,并与NPs一同与海洋生物发生接触。因此,我们推测扑草净可能会影响NPs对海洋生物的毒性效应。

隐秘小环藻(*Cyclotella cryptica*)具有较高的营养价值与优良的异养生长能力,是海洋微藻生理学和生物技术研究常用的模式物种^[17-18]。本文选择隐秘小环藻作为实验对象,研究不同浓度NPs单独暴露以及与环境浓度扑草净联合暴露,对隐秘小环藻种群生长、形态结构和光合作用等指标的影响,以探究在扑草净存在下NPs对隐秘小环藻的毒性效应,以期为评估NPs和除草剂污染对海洋生态系统的危害提供参考。

1 材料与方法

1.1 纳米塑料与扑草净

聚苯乙烯纳米塑料微球[NPs, $70\ \text{nm}$, 水 $1:1$ 乳浊液, 2.5% (w/v)]购自天津市倍思乐色谱技术开发中心,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下储存。实验前,用超纯水将NPs稀释成 $2\ \text{mg/mL}$ 的悬浊液,经超声后用于暴露实验。扑草净(分析标准品,纯度 $>99\%$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,使用二甲基亚砜(DMSO)溶解后待用。

1.2 微藻培养

隐秘小环藻采用经过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤、 $121.5\ ^\circ\text{C}$ 高压灭菌 $40\ \text{min}$ 并添加 $f/2$ 培养基的天然海水培养。隐秘小环藻于光照培养箱(GXZ-500, 宁波江南仪器厂)中养殖,温度为 $(25 \pm 1)\ ^\circ\text{C}$,光照强度为 $6000\ \text{lx}$,光/暗周期为 $12\ \text{h}:12\ \text{h}$ 。每天定时摇藻3次,以防止藻细胞贴壁和沉降。

1.3 暴露实验与样品采集

1.3.1 NPs 单独暴露

选取处于指数增长期的隐秘小环藻接种于250 mL锥形瓶中,初始藻密度为 5×10^4 cells/mL,接种体积为100 mL。NPs单独暴露实验共设置4个处理组,分别为对照组(Control)、20 $\mu\text{g/L}$ NPs、200 $\mu\text{g/L}$ NPs和2000 $\mu\text{g/L}$ NPs暴露组,每组设置3个平行。

1.3.2 扑草净单独暴露以及与 NPs 联合暴露

实验共设置5个处理组,包括对照组(Control)、500 ng/L扑草净单独暴露组、扑草净与NPs的3个联合暴露组(扑草净+20 $\mu\text{g/L}$ NPs暴露组、扑草净+200 $\mu\text{g/L}$ NPs暴露组和扑草净+2000 $\mu\text{g/L}$ NPs暴露组),每组设置3个平行。

1.3.3 样品采集

整个暴露周期为144 h,每隔24 h取样1 mL,用于测定藻密度、死亡率等指标;在暴露72 h和144 h后,分别取样10 mL、50 mL或100 mL用于测定光合色素含量、叶绿素荧光参数、营养物质含量等指标;在暴露144 h后,对照组和2000 $\mu\text{g/L}$ NPs暴露组各取样15 mL用于扫描电子显微镜分析。

1.4 藻细胞密度测定和形态拍照

在光学显微镜(Nikon ECLIPSE 50i,日本)下,利用血细胞计数板计数藻细胞,同时利用光学显微镜对暴露48 h、96 h和144 h的各组藻细胞进行拍照,观察藻细胞形态变化。

1.5 流式细胞仪分析

1.5.1 微藻死亡率与异形细胞比例

使用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS-XL,美国)分析藻细胞大小,前向散射(FS)和侧向散射(SS)分别反映藻细胞的大小和聚集程度。采用激发波长为488 nm、最大发射波长为670 nm的FL4通道检测藻细胞的荧光,依据荧光检测结果分析藻细胞的死亡率,荧光强度高于1.0的为活细胞,荧光强度低于1.0的为死细胞^[19]。

1.5.2 细胞膜通透性和酯酶活性

选择碘化丙啶(PI, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, Sigma)作为荧光探针,对暴露后的各组藻细胞进行染色,室温下暗孵育10 min,利用流式细胞仪的FL2通道

(564 ~ 606 nm)检测PI荧光,通过荧光强度反映细胞膜通透性的变化^[20]。

通过二乙酸荧光素(FDA)测定酯酶活性^[19]。暴露后每24 h从各锥形瓶中取样10 mL,在4000 rpm下离心10 min,浓缩至1 mL,用灭菌海水洗涤3次。利用二甲基亚砜(DMSO)溶解FDA,加入样品中,终浓度为10.4 $\mu\text{g/mL}$ 。室温下暗孵育30 min,通过流式细胞仪的FL1通道(绿色荧光)检测FDA荧光,通过荧光强度反映酯酶活性的变化。

1.6 光合色素含量和叶绿素荧光参数测定

将10 mL样品在4000 rpm下离心10 min,弃去上清液后加入5 mL 90%丙酮,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光提取色素24 h。再次在4000 rpm下离心10 min,收集上清液使用紫外分光光度计(UV6000,上海元析仪器有限公司)测定在630 nm、647 nm、664 nm、750 nm波长下的光密度(OD)值,参照《海洋监测规范 第7部分:近海污染生态调查和生物监测》(GB 17378.7—2007)的方法计算叶绿素a(Chl a)和叶绿素c(Chl c)的含量。

样品室温避光孵育20 min后,利用藻类叶绿素荧光仪(WATER-PAM-II,德国)测定隐秘小环藻PSII的最大量子产量(F_v/F_m)、非光化学淬灭(NPQ)、光化学淬灭(qP)和表观电子传递速率(ETR)。

1.7 蛋白质和可溶性糖测定

将100 mL样品在4000 rpm下离心10 min,弃去上清液,用灭菌海水重悬沉淀,以清洗藻细胞,再次离心弃去上清液,重复两次,浓缩至1 mL。经液氮速冻后,使用冷冻干燥机干燥48 h,干燥结束后称量样品的干重,使用南京建成生物工程研究所的总蛋白定量测定试剂盒和植物可溶性糖检测试剂盒,通过BCA法和蒽酮比色法测定蛋白质和可溶性糖含量。

1.8 丙二醛和超氧化物歧化酶测定

将50 mL样品通过匀浆机匀浆后,在4000 rpm下离心10 min,取上清液待测。使用南京建成生物工程研究所的丙二醛(MDA)测定试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)测试盒进行测定。

1.9 扫描电子显微镜分析

将15 mL样品在4000 rpm下离心10 min,

浓缩至 1 mL。将其加入含 2.5% 戊二醛的 0.2 mol/L PBS 缓冲液 (pH=7.0) 中, 在 4 °C 条件下固定细胞 48 h, 固定好后用去离子水冲洗, 分别以 60%、70%、80%、90%、100% 的酒精进行梯度脱水, 干燥后进行喷金, 使用扫描电镜 (SEM, VEGA 3 LMH/LMU, TESCAN, 捷克) 观察并拍照。

1.10 统计分析

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准偏差 (mean $\pm$ standard deviation, SD) 表示, 通过 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 在经过正态分布和方差齐性检验后, 使用单因素方差 (One-Way ANOVA)、邓肯法 (Duncan) 等分析比较对照组和各暴露组之间的差异性。以 “*” 标记表示暴露组与对照组之间的差异性, 其中, 当 $*P < 0.05$ 时, 认为差异显著; 当 $**P < 0.01$ 时, 认为差异极显著。不同的字母标记表示各组之间具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度 NPs 暴露对隐小环藻的影响

2.1.1 藻密度变化

与对照组相比, 20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露下的隐小环藻的藻密度均显著降低 ($P < 0.05$)。其中, 200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 在整个暴露培养期间对隐小环藻的生长始终表现出抑制作用, 至暴露 144 h 时 200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的藻密度仅为对照组的 79.2% 和 76.0% (图 1A)。可见, NPs 暴露能够显著抑制隐小环藻的生长, 降低藻细胞生长速率^[21]。NPs 暴露浓度越高, 隐小环藻受到的生长抑制作用越显著, 这在暴露 120 ~ 144 h 时表现得最为明显。我们推测, 随着暴露时间的延长, 微藻与 NPs 的接触频率不断增加, 导致藻细胞活性降低与生长抑制程度加重。

2.1.2 死亡率和异形细胞比例变化

NPs 单独暴露 24 h 后, 隐小环藻的死亡率升高得最显著, 20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的死亡率分别比对照组高出 1.5%、2.2% 和 1.7% ($P < 0.05$, 图 1B)。随着暴露实验的延长, 20 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的死亡率有所降低, 但 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的死亡率

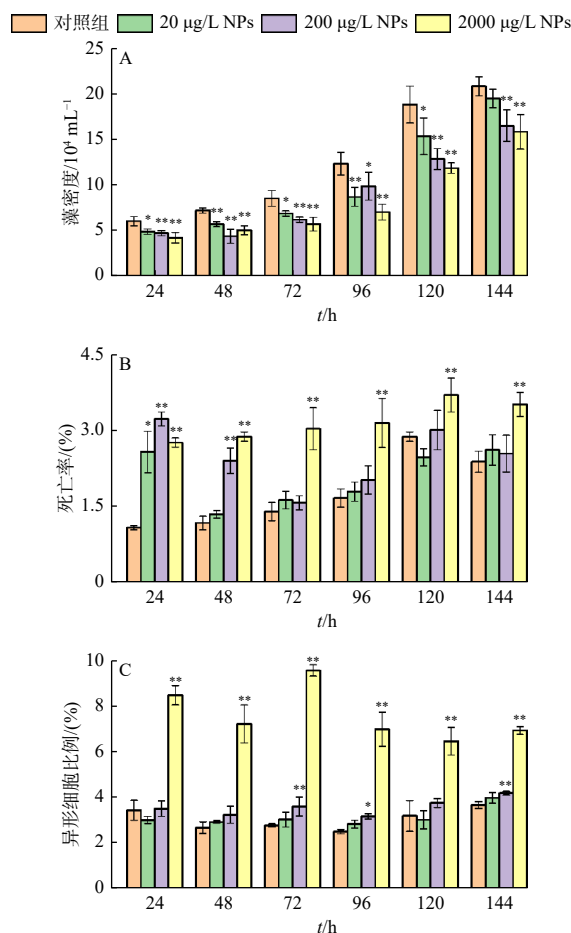


图 1 纳米塑料单独暴露下隐小环藻的藻密度、死亡率和异形细胞比例

Fig. 1 Algal density, mortality and proportion of anomalous cells of *C. cryptica* under NPs single exposure

在整个暴露周期内均极显著地高于对照组 ($P < 0.01$)。此外, 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的异形细胞比例在整个暴露周期内也极显著升高 ($P < 0.01$, 图 1C), 在暴露 72 h 时异形细胞比例比对照组高出 6.8%。死亡率和异形细胞比例的显著升高, 是 NPs 暴露下隐小环藻生长受到抑制的重要原因之一, 这也说明 NPs 影响了隐小环藻的细胞活性^[21]。

2.1.3 细胞膜通透性和酯酶活性变化

20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组隐小环藻的细胞膜通透性在暴露 24 ~ 48 h 均显著增大 ($P < 0.05$, 图 2A), 200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的膜通透性在暴露 72 h 后分别为对照组的 1.16 倍 ($P < 0.05$) 和 1.24 倍 ($P < 0.01$),

200 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的膜通透性在暴露 96 h 后达到对照组的 1.92 倍 ($P < 0.01$)。暴露 48 h 后, 200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的酯酶活性降低最显著, 为对照组的 80.8% 和 68.4% ($P < 0.01$, 图 2B)。暴露 144 h 后, 各暴露组的酯酶活性有所恢复, 但 200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的酯酶活性只有对照组的 85.5% 和 80.8% ($P < 0.01$)。以上结果表明, 20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露能够显著增大隐秘小环藻细胞的膜通透性, 并降低其酯酶活性。聚苯乙烯 NPs 亲脂性的苯环结构使其易于与细胞膜发生相互作用^[22], 膜通透性和酯酶活性的变化说明 NPs 确实对隐秘小环藻的细胞膜结构产生了损伤, 这在一定程度上解释了暴露组死亡率和异形细胞比例为何显著升高。

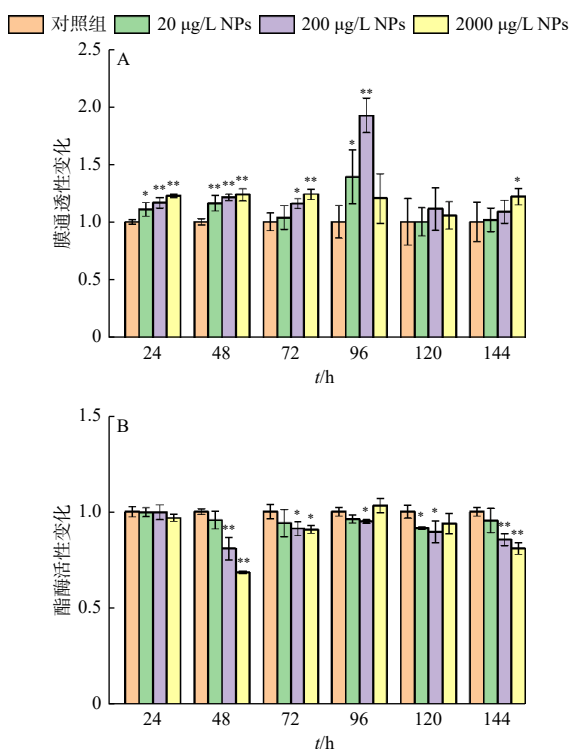


图2 纳米塑料单独暴露下隐秘小环藻的膜通透性和酯酶活性

Fig. 2 Membrane permeability and esterase activity of *C. cryptica* under NPs single exposure

2.1.4 光合色素含量和叶绿素荧光参数变化

Chl *a* 和 Chl *c* 的含量在所有浓度 NPs 单独暴露 72 h 后均极显著降低 ($P < 0.01$)。其中, 200 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的 Chl *a* 和 Chl *c* 含量仅为

对照组的 29.9% 和 26.0% ($P < 0.01$, 图 3A 和图 3B)。叶绿素荧光参数的测定结果显示, 光系统 II (PSII) 的最大量子产量 (F_v/F_m) 在暴露 72 h 和 144 h 后并无显著差异 ($P > 0.05$, 图 3C)。光化学淬灭 (qP) 值则在 20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露 72 h 后, 分别降低至对照组的 92.5%、91.6% 和 90.6% ($P < 0.01$, 图 3D)。200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的 NPQ 值在暴露 72 h 后极显著降低 ($P < 0.01$, 图 3E), 暴露 144 h 后 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的 NPQ 值则升高至对照组的 1.35 倍 ($P < 0.01$)。与 qP 相类似, 20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的 ETR 值在暴露 72 h 后均极显著降低 ($P < 0.01$, 图 3F)。

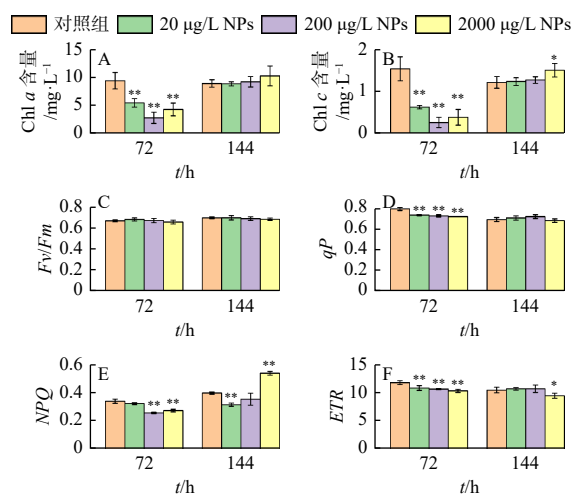


图3 纳米塑料单独暴露下隐秘小环藻的 Chl *a* 含量、Chl *c* 含量、 F_v/F_m 、 qP 、 NPQ 和 ETR

Fig. 3 The Chl *a* content, Chl *c* content, F_v/F_m , qP , NPQ and ETR of *C. cryptica* under NPs single exposure

NPs 暴露显著降低了隐秘小环藻光合色素的含量, 这可能会影响叶绿体对光能的吸收, 从而抑制光合作用, 阻碍隐秘小环藻的生长^[23]。这与 Sendra 等^[24]研究发现 50 mg/L 100 nm 的 NPs 会通过抑制三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 的光合作用来抑制其生长的结果相类似。光合色素含量对 PSII 的活性至关重要, 尤其是 Chl *a* 含量的降低会直接导致光合效率下降^[25]。叶绿素荧光参数常用于评估光合作用效率和生理状态^[26-27], 其中 F_v/F_m 表示最大量子产率, 可反映 PSII 的光能转换效率, qP 和 NPQ 则反映 PSII 反应中心的相对开放程度, 而 ETR 则

体现 PSII 的电子捕获效率^[25-27]。NPs 暴露导致藻细胞 *qP* 和 *NPQ* 值显著降低,表明藻细胞的光合活性下降、光保护能力减弱,从而使藻细胞捕获光的能力受到限制;*ETR* 值的降低进一步表明 NPs 暴露组的藻光合效率降低^[28]。叶绿体受到的不良影响和光合效率的降低会影响微藻细胞的活力^[29],这可能是导致暴露组藻细胞死亡率和异形细胞比例升高的原因之一。

2.1.5 蛋白质和可溶性糖含量变化

与对照组相比,20 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的蛋白质含量在暴露 72 h 后显著升高($P < 0.05$),其中 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的蛋白质含量达到对照组的 4.4 倍($P < 0.01$,图 4A)。可溶性糖含量在 NPs 暴露下则显著降低(图 4B),暴露 72 h 后,20 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的可溶性糖含量分别降低至对照组的 60.8% 和 9.4% ($P < 0.05$)。暴露 144 h 后,3 个浓度 NPs 暴露组的可溶性糖含量均极显著降低,分别为对照组的 23.3%、53.0% 和 20.8% ($P < 0.01$)。蛋白质和可溶性糖含量的变化与隐秘小环藻光合效率的降低密切相关。NPs 暴露阻碍了藻细胞对光能的吸收利用,影响了营养物质的产生和积累,从而影响隐秘小环藻的生长和发育^[30]。

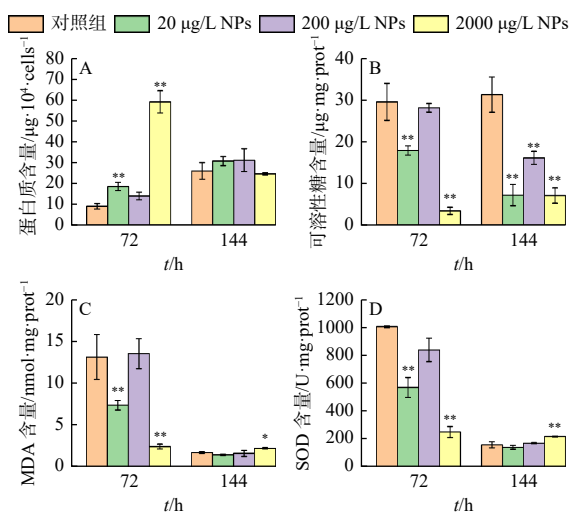


图4 纳米塑料单独暴露下隐秘小环藻的蛋白质、可溶性糖、MDA 和 SOD 含量

Fig. 4 The content of protein, soluble sugar, MDA and SOD of *C. cryptica* under NPs single exposure

2.1.6 丙二醛和超氧化物歧化酶含量变化

暴露 72 h 后,20 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 两个

暴露组的 MDA 含量分别降低至对照组的 56.1% 和 18.4% ($P < 0.01$,图 4C)。暴露 144 h 后,2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的 MDA 含量则显著升高($P < 0.05$)。暴露 72 h 后,20 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 两个暴露组的 SOD 含量也极显著降低($P < 0.01$,图 4D);暴露 144 h 后,2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的 SOD 含量则升高至对照组的 1.4 倍($P < 0.01$)。MDA 是细胞膜脂质过氧化的重要产物,其含量能在一定程度上反映细胞膜过氧化作用的强弱^[31]。暴露组 MDA 和 SOD 含量的变化说明在 20 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 胁迫下隐秘小环藻的氧化应激系统出现异常,这进一步说明隐秘小环藻的膜结构受到了损伤。

2.1.7 藻细胞形态变化和扫描电镜分析结果

20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露均导致藻细胞出现藻体聚集、藻细胞畸形等变化,在暴露 48 h、96 h 和 144 h 时均观察到藻细胞增大、细胞质颜色加深、藻细胞聚集成团等现象(图 5)。暴露 144 h 后,2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的藻细胞表面出现褶皱、破损等机械损伤。与对照组相比,2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组的藻细胞聚集成团现象更加明显,藻体受到的损伤更加严重。2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 暴露组藻细胞表面出现的破损和褶皱表明 NPs 能够对隐秘小环藻产生直接的结构损伤,这与膜通透性和酯酶活性的测定结果相吻合。作为抵御外部环境污染物的重要屏障,细胞膜对保护微藻细胞和维持正常的细胞代谢具有重要意义^[32]。NPs 所造成的细胞膜结构损伤降低了藻细胞活性,这也是暴露组隐秘小环藻的生长受到抑制的重要原因之一。

2.2 扑草净存在下 NPs 对隐秘小环藻的影响

2.2.1 藻密度变化

500 ng/L 扑草净单独暴露下,隐秘小环藻的早期生长并未受到显著影响,只是在暴露 96 h 后藻密度出现显著降低($P < 0.05$,图 6A)。暴露 24 h 后,20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 2000 $\mu\text{g/L}$ NPs 单独暴露组的藻密度分别为对照组的 80.6%、77.8% 和 69.4% ($P < 0.05$),而在引入扑草净后,联合暴露组隐秘小环藻的藻密度降低更显著,藻密度分别降低至对照组的 57.4%、46.3% 和 50.0% (图 6A)。以上结果表明,环境浓度的扑草净会

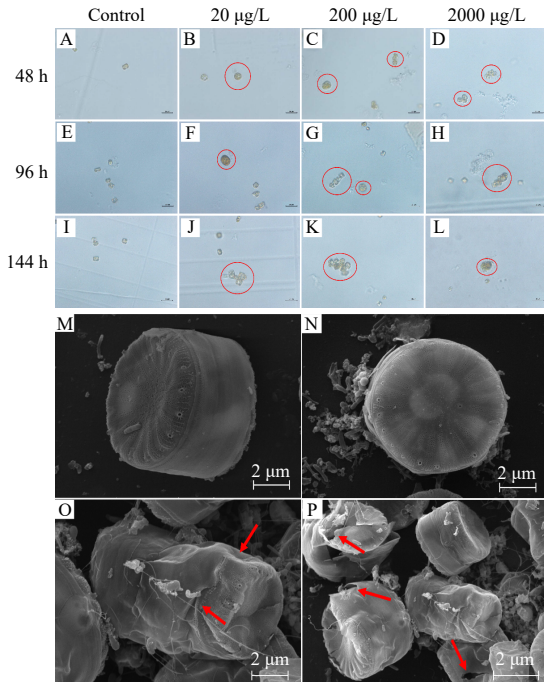


图5 纳米塑料单独暴露下隐秘小环藻的藻细胞形态(A-L)以及对对照组(M-N)和2000 µg/L NPs暴露组(O-P)的扫描电镜照片

Fig. 5 Algal cell morphology of *C. cryptica* under NPs single exposure (A-L), and SEM images of control group (M-N) and 2000 µg/L NPs exposure group (O-P)

显著增加 NPs 暴露对隐秘小环藻的生长抑制作用,这可能是由于扑草净能够附着在 NPs 上,并与藻细胞接触,扑草净影响隐秘小环藻细胞的活性,从而降低藻细胞对 NPs 的抵御作用^[23]。

2.2.2 死亡率和异形细胞比例变化

当扑草净与 NPs 联合暴露 72~144 h 时,隐秘小环藻的死亡率相比 NPs 单独暴露进一步升高(图 6B)。联合暴露组的死亡率相比 NPs 单独暴露升高了 1.19%~4.94%,这一现象在暴露 120 h 后最明显,3 个联合暴露组的死亡率分别为 6.62%、7.95% 和 8.43%,相比其对应的 NPs 单独暴露组分别升高了 4.15%、4.94% 和 4.73%。而扑草净的引入也升高了 NPs 暴露下隐秘小环藻的异形细胞比例。在暴露 144 h 后,3 个联合暴露组的异形细胞比例相比 NPs 单独暴露组分别升高了 7.46%、7.51% 和 7.86% (图 6C)。扑草净引入后,藻细胞死亡率和异形细胞比例的显著升高说明隐秘小环藻受到的不良影响加重,这可能

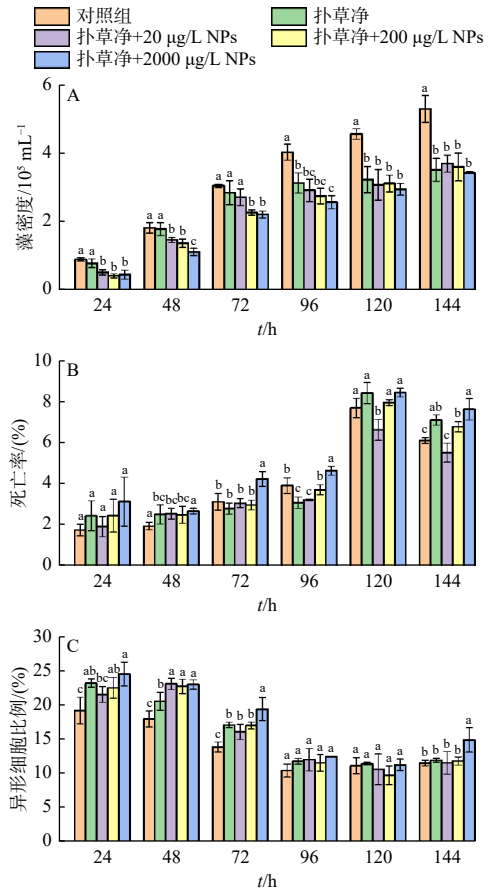


图6 加入扑草净后不同浓度纳米塑料暴露下隐秘小环藻的藻密度、死亡率和异形细胞比例

Fig. 6 Algal density, mortality and proportion of anomalous cells of *C. cryptica* under exposure to different concentrations of NPs after the addition of prometryn

是联合暴露组的隐秘小环藻生长缓慢的一个重要原因^[33]。

2.2.3 细胞膜通透性和酯酶活性变化

扑草净与 200 µg/L NPs 联合暴露组的膜通透性在 24 h 后增大至对照组的 1.6 倍 ($P < 0.05$, 图 7A), 而 200 µg/L NPs 单独暴露下的膜通透性仅升高至对照组的 1.2 倍 ($P < 0.05$, 图 2A)。在暴露 24~72 h 时,扑草净与 NPs 联合暴露组的酯酶活性的降低相比 NPs 单独暴露组更加显著。在暴露 24 h 后,20 µg/L、200 µg/L 和 2000 µg/L NPs 单独暴露组的酯酶活性分别为对照组的 99.7%、99.7% 和 96.8% ($P > 0.05$), 而 3 个联合暴露组的酯酶活性则分别降低至对照组的 94.8%、88.1% 和 91.7% ($P < 0.05$, 图 7B)。扑草

净的引入使得隐小环藻的膜通透性和酯酶活性受到的不良影响加重,而膜通透性的增大和酯酶活性的进一步降低表明在扑草净存在下 NPs 暴露会对隐小环藻产生更加严重的结构损伤^[34]。细胞膜结构受损加重会进一步降低细胞膜的保护作用,使得细胞抵御能力下降,从而导致隐小环藻受到的毒性作用增强^[35]。这也解释了为何联合暴露组的隐小环藻在暴露早期藻密度更低^[36-37]。

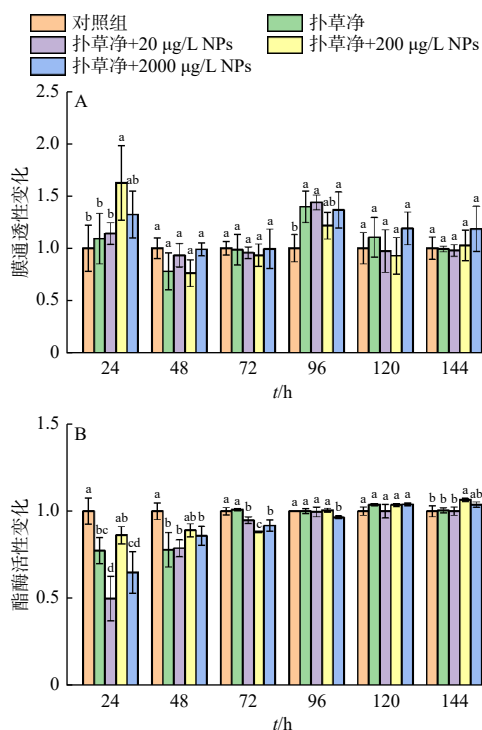


图 7 加入扑草净后不同浓度纳米塑料暴露下隐小环藻的膜通透性和酯酶活性

Fig. 7 Membrane permeability and esterase activity of *C. cryptica* under exposure to different concentrations of NPs after the addition of prometryn

2.2.4 光合色素含量和蛋白质含量变化

扑草净与 20 μg/L NPs 联合暴露组、扑草净与 200 μg/L NPs 联合暴露组的 Chl *a* 含量在暴露 72 h 后仍显著降低(图 8A)。扑草净与 NPs 联合暴露下蛋白质含量的变化相比 NPs 单独暴露更加显著(图 8C),扑草净与 20 μg/L NPs 联合暴露组在暴露 72 h 时的蛋白质含量为 20 μg/L NPs 单独暴露组的 50.0%,扑草净与 2000 μg/L NPs 联合暴露组在暴露 72 h 时的蛋白

质含量则仅达到 2000 μg/L NPs 单独暴露组的 17.1%。在暴露 144 h 后,扑草净与 NPs 联合暴露组的蛋白质含量仍然低于对应的 NPs 单独暴露组。

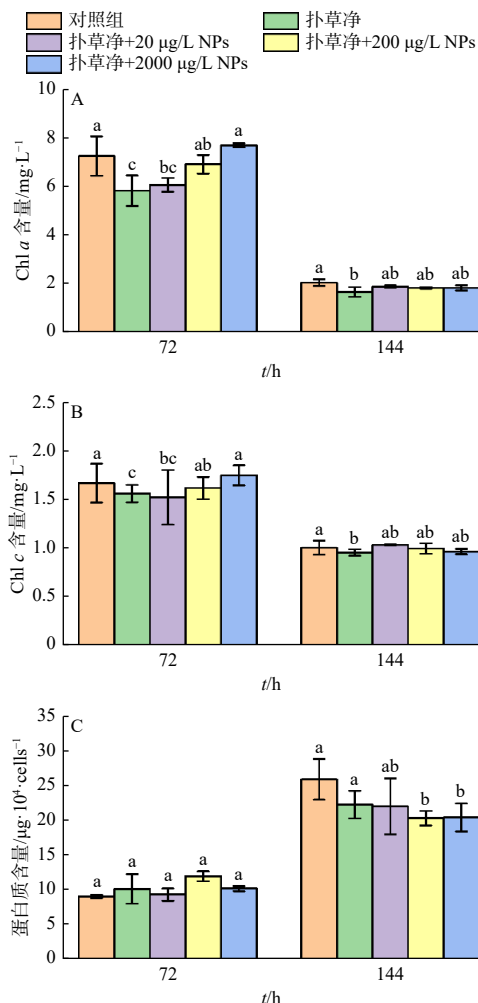


图 8 加入扑草净后不同浓度纳米塑料暴露下隐小环藻的 Chl *a*、Chl *c* 和蛋白质含量

Fig. 8 The content of Chl *a*, Chl *c* and protein of *C. cryptica* under exposure to different concentrations of NPs after the addition of prometryn

在暴露 144 h 后,20 μg/L、200 μg/L 和 2000 μg/L NPs 单独暴露组并未观察到蛋白质含量的显著变化,而扑草净与 200 μg/L NPs、扑草净与 2000 μg/L NPs 两个联合暴露组的蛋白质含量则显著降低。可见,在环境浓度的扑草净存在下, NPs 对隐小环藻营养物质积累的不利影响更加严重。此外,20 μg/L、200 μg/L 和 2000 μg/L NPs 单独暴露组的 Chl *a* 和 Chl *c* 含量在 72 h 后

均极显著降低,在引入环境浓度扑草净后,光合色素含量的降低程度有所减弱,但扑草净与20 $\mu\text{g/L}$ NPs联合暴露组的Chl *a*和Chl *c*含量在72 h后仍呈现显著降低。光合色素含量的降低、营养物质含量的进一步下降都导致联合暴露组隐秘小环藻受到的生长抑制作用增强^[30]。

3 结论

(1)20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和2000 $\mu\text{g/L}$ NPs单独暴露能够显著抑制隐秘小环藻的生长,对细胞膜等结构造成损伤,降低藻细胞的抵御作用,并能够通过降低光合色素含量影响光合效率,从而影响营养物质的含量。而500 ng/L的扑草净单独暴露对隐秘小环藻的早期生长无显著影响,但会降低其酯酶活性并提高异形细胞比例。

(2)在环境浓度的扑草净存在下,20 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和2000 $\mu\text{g/L}$ NPs对隐秘小环藻的生长抑制作用有所增强,暴露组的死亡率和异形细胞比例显著升高,藻密度显著降低。同时,扑草净还能够增强NPs暴露下隐秘小环藻所受到的结构损伤,降低藻细胞对污染物的抵御作用,从而加重了NPs对隐秘小环藻的毒性作用。

参考文献:

- [1] TIMILSINA A, ADHIKARI K, YADAV A K, et al. Effects of microplastics and nanoplastics in shrimp: Mechanisms of plastic particle and contaminant distribution and subsequent effects after uptake[J]. The Science of the total environment, 2023, 164999.
- [2] 康子歌, 林健晖, 杨 涛, 等. 不同官能团纳米塑料在波纹巴非蛤体内的蓄积特征及毒性效应[J]. 海洋环境科学, 2023, 42(3): 362-368.
- [3] DAWSON A L, KAWAGUCHI S, KING C K, et al. Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by *Antarctic krill*[J]. Nature communications, 2018, 9(1): 1001.
- [4] KIRAN B R, KOPPERI H, VENKATA MOHAN S. Micro/nano-plastics occurrence, identification, risk analysis and mitigation: challenges and perspectives[J]. Reviews in environmental science and bio/technology, 2022, 21(1): 169-203.
- [5] MATERIĆ D, KJÆR H A, VALLELONGA P, et al. Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice[J]. Environmental research, 2022, 208: 112741.
- [6] WANG M, WANG W X. Accumulation Kinetics and Gut Microenvironment Responses to Environmentally Relevant Doses of Micro/Nanoplastics by Zooplankton *Daphnia Magna*[J]. Environmental science & technology, 2023, 57(14): 5611-5620.
- [7] LI Z, DONG S, HUANG F, et al. Toxicological Effects of Microplastics and Sulfadiazine on the Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Frontiers in microbiology, 2022, 13: 865768.
- [8] SARASAMMA S, AUDIRA G, SIREGAR P, et al. Nanoplastics Cause Neurobehavioral Impairments, Reproductive and Oxidative Damages, and Biomarker Responses in Zebrafish: Throwing up Alarms of Wide Spread Health Risk of Exposure[J]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(4): 1410.
- [9] 马新刚, 李时畅, 孙 逊, 等. 纳塑料与草甘膦对铜绿微囊藻的复合毒性机制[J]. 环境保护科学, 2021, 47(3): 82-90.
- [10] QI R, JONES D L, LI Z, et al. Behavior of microplastics and plastic film residues in the soil environment: A critical review[J]. The Science of the total environment, 2020, 703: 134722.
- [11] SERRÃO C, MARQUES-SANTOS L F. The genus *Artemia*, the nanoplastics, the microplastics, and their toxic effects: a review[J]. Environmental science and pollution research international, 2023, 30(35): 83025-83050.
- [12] SPILSBURY F D, WARNE M S J, BACKHAUS T. Risk Assessment of Pesticide Mixtures in Australian Rivers Discharging to the Great Barrier Reef[J]. Environmental science & technology, 2020, 54(22): 14361-14371.
- [13] SUPE TULCAN R X, OUYANG W, GU X, et al. Typical herbicide residues, trophic transfer, bioconcentration, and health risk of marine organisms[J]. Environment international, 2021, 152: 106500.
- [14] ZHANG R, DU J, DONG X, et al. Occurrence and ecological risks of 156 pharmaceuticals and 296 pesticides in seawater from mariculture areas of Northeast China[J]. The Science of the total environment, 2021, 792: 148375.
- [15] YANG L, LI H, ZHANG Y, et al. Environmental risk assessment of triazine herbicides in the Bohai Sea and the Yellow Sea and their toxicity to phytoplankton at environmental concentrations[J]. Environment international, 2019, 133(Pt A), 105175.
- [16] WILKINSON A D, COLLIER C J, FLORES F, et al. Acute and additive toxicity of ten photosystem-II herbicides to sea-grass[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 17443.
- [17] SLOCOMBE S P, ZHANG Q, ROSS M, et al. Unlocking nature's treasure-chest: screening for oleaginous algae[J]. Scientific reports, 2015, 5: 9844.
- [18] ROBERTS W R, DOWNEY K M, RUCK E C, et al. Im-

- proved Reference Genome for *Cyclotella cryptica* CCMP332, a Model for Cell Wall Morphogenesis, Salinity Adaptation, and Lipid Production in Diatoms (Bacillariophyta)[J]. G3 (Bethesda, Md.), 2020, 10(9): 2965-2974.
- [19] XUE Q, WANG R, XU W, et al. The stresses of allelochemicals isolated from culture solution of diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin on growth and physiology of two marine algae[J]. Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), 2018, 205: 51-57.
- [20] NOGUEIRA P F, NAKABAYASHI D, ZUCOLOTO V. The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*[J]. Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), 2015, 166: 29-35.
- [21] WANG S C, GAO Z Y, LIU F F, et al. Effects of polystyrene and triphenyl phosphate on growth, photosynthesis and oxidative stress of *Chaetoceros meülleri*[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 797: 149180.
- [22] 董晓, 丁海兵, 乔馨越, 等. 聚苯乙烯微塑料对杜氏盐藻生长及低分子量有机酸释放的影响研究[J]. 海洋环境科学. DOI: 10.12111/j.mes.2023-x-0108.
- [23] YI X, CHI T, LI Z, et al. Combined effect of polystyrene plastics and triphenyltin chloride on the green algae *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Environmental science and pollution research international, 2019, 26(15): 15011-15018.
- [24] SENDRA M, STAFFIERI E, YESTE M P, et al. Are the primary characteristics of polystyrene nanoplastics responsible for toxicity and ad/absorption in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*?[J]. Environmental Pollution, 2019, 249: 610-619.
- [25] NANDA M, JAISWAL K K, KUMAR V, et al. Micro-pollutant Pb(II) mitigation and lipid induction in oleaginous microalgae *Chlorella sorokiniana* UUIND6[J]. Environmental Technology & Innovation, 2021, 23: 101613.
- [26] LAZÁR D. Parameters of photosynthetic energy partitioning[J]. Journal of plant physiology, 2015, 175: 131-147.
- [27] SINGH R P, YADAV P, KUMAR A, et al. Salinity-Induced Physiochemical Alterations to Enhance Lipid Content in Oleaginous Microalgae *Scenedesmus* sp. BHU1 via Two-Stage Cultivation for Biodiesel Feedstock[J]. Microorganisms, 2023, 11: 2064.
- [28] GOMES T, ALMEIDA A C, GEORGANTZOPOULOU A. Characterization of cell responses in *Rhodomonas baltica* exposed to PMMA nanoplastics[J]. The Science of the total environment, 2020, 726: 138547.
- [29] CHAE Y, KIM D, AN Y J. Effect of fluoride on the cell viability, cell organelle potential, and photosynthetic capacity of freshwater and soil algae[J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 359-367.
- [30] DE ABREU F C, DA COSTA P N, BRONDI A M, et al. Effects of cadmium and copper biosorption on *Chlorella vulgaris*[J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2014, 93(4): 405-409.
- [31] MENG X, WANG F, LI Y, et al. Comparing toxicity and biodegradation of racemic glufosinate and L-glufosinate in green algae *Scenedesmus obliquus*[J]. The Science of the total environment, 2022, 823: 153791.
- [32] MANZI H P, ABOU-SHANAB R A I, JEON B H, et al. Algae: a frontline photosynthetic organism in the microplastic catastrophe[J]. Trends in plant science, 2022, 27: 1159-1172.
- [33] WANG S, LIU M, WANG J, et al. Polystyrene nanoplastics cause growth inhibition, morphological damage and physiological disturbance in the marine microalga *Platymonas helgolandica*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 158: 111403.
- [34] LEVAK ZORINC M, DEMIR-YILMAZ I, FORMOSA-DAGUE C, et al. Reconstructed membrane vesicles from the microalga *Dunaliella* as a potential drug delivery system[J]. Bioelectrochemistry, 2023, 150: 108360.
- [35] NAM S H, IL KWAK J, AN Y J. Quantification of silver nanoparticle toxicity to algae in soil via photosynthetic and flow-cytometric analyses[J]. Scientific reports, 2018, 8: 292.
- [36] ZHENG X, YUAN Y, LI Y, et al. Polystyrene nanoplastics affect growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa*[J]. Environmental science and pollution research international, 2021, 28: 13394-13403.
- [37] 韩典峰, 秦华伟, 张华威, 等. 黄河三角洲贝类养殖区海水中16种除草剂污染特征及评价[J]. 海洋环境科学, 2022, 41(5): 683-688.

(本文编辑: 胡莹莹)