

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20191225002

李俊杰, 李玲, 黄沛玲. 乙草胺胁迫对水华微囊藻光合生理特性的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(5): 244-254

Li J J, Li L, Huang P L. Effects of acetochlor stress on photosynthetic physiology of *Microcystis flos-aquae* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(5): 244-254 (in Chinese)

乙草胺胁迫对水华微囊藻光合生理特性的影响

李俊杰, 李玲*, 黄沛玲

华侨大学化工学院, 厦门 361021

收稿日期: 2019-12-25 录用日期: 2020-04-18

摘要: 除草剂乙草胺(ACT)施用后会通过灌溉侵蚀或地表径流等方式进入水环境造成污染。为探究 ACT 对浮游植物的影响, 选择水华微囊藻作为受试生物, 测定叶绿素 a(Chl a)含量、叶绿素荧光参数、藻蛋白和藻胆蛋白相对含量的变化, 观察藻细胞超微结构的变化, 综合评估 ACT 对浮游植物光合作用的影响。结果表明, 当 ACT 浓度 $\geq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Chl a 含量开始显著降低 ($P < 0.05$); 在低浓度 ($0.01 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ACT 胁迫下, 水华微囊藻能够通过自身调节, 使得最大光合效率 (F_v/F_m)、PS II 的实际光合效率 ($Y(II)$) 和快速光响应曲线不受 ACT 影响; 而在高浓度 ($10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理组中, F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、快速光响应曲线、光响应曲线的初始斜率 (α) 和最大潜在相对电子传递速率 (ETR_{max}) 均显著降低 ($P < 0.05$); 别藻蓝蛋白 (APC)、藻蓝蛋白 (PC) 和藻红蛋白 (PE) 的相对含量分别在 ACT 浓度为 1 、 10 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时开始显著降低 ($P < 0.05$)。这些结果说明, 在高浓度 ACT 胁迫下, 水华微囊藻的叶绿素合成受阻, 光合色素减少, 捕光能力、光能转化效率及相对电子传递速率均下降, 光合活性降低, 且 ACT 对藻胆蛋白的抑制作用顺序为别藻蓝蛋白 > 藻蓝蛋白 > 藻红蛋白, 而半饱和光强 (I_k) 显著增加 ($P < 0.05$), 耐受能力增强, 从而使光合作用受到抑制。透射电子显微镜结果表明, 藻细胞结构会被 ACT 破坏, 细胞变形且出现质壁分离, 类囊体损伤且垂直于细胞壁, 气泡、藻青素小粒和糖原减少, 脂质颗粒增多, 细胞内部紊乱, 捕光色素减少, 导致光合作用受阻。上述研究结果为全面评价 ACT 环境风险及农药的合理利用提供科学依据。

关键词: 乙草胺; 水华微囊藻; 光合作用; 叶绿素荧光参数

文章编号: 1673-5897(2020)5-244-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Acetochlor Stress on Photosynthetic Physiology of *Microcystis flos-aquae*

Li Junjie, Li Ling*, Huang Peiling

College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

Received 25 December 2019 accepted 18 April 2020

Abstract: Because of extensive use, the herbicide acetochlor (ACT) has become a serious environmental pollutants by irrigation erosion or surface runoff, and the aquatic environment in our country has been severely polluted. In order to study the influences of ACT on phytoplankton, *Microcystis flos-aquae* was used as the model organism, and the changes of chlorophyll a content, chlorophyll fluorescence parameters, relative content of algal protein and phycobiliprotein, and the ultrastructure of algal cells before and after exposure to ACT were investigated, respec-

基金项目: 福建省中青年骨干教师科研项目(JAT160027); 石狮市科技计划项目(2016FS21); 华侨大学研究生科研创新能力培育计划资助项目(12BS108)

第一作者: 李俊杰(1995—), 男, 硕士, 研究方向为农药毒理学, E-mail: 474409289@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: liling19830826@hqu.edu.cn

tively. The results showed that the contents of Chl *a* significantly decreased when the concentrations of ACT were higher than $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The maximum photosynthetic efficiency (F_v/F_m), the actual photosynthetic efficiency of PS II ($Y(\text{II})$), and Rapid Light Curve of *Microcystis flos-aquae* were not affected through self-regulation under the stress of lower concentrations ($0.01 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) of ACT, but these parameters as well as the initial slope of the light response curve (α), and maximum potential relative electron transfer rate (ETR_{max}) were all significantly reduced ($P < 0.05$) under the higher concentrations ($10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) of ACT. The relative content of allophycocyanin (APC), phycocyanin (PC), phycoerythrin (PE), and phycoprotein significantly decreased in groups with ACT concentrations of 1, 10 and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The results indicated that chlorophyll synthesis of *Microcystis flos-aquae* was blocked under higher concentrations of ACT stress. The photosynthetic pigments, light-capturing capacity, light energy conversion efficiency, relative electron transfer rate, and photosynthetic activity were all reduced. The inhibition order of ACT on phycobiliproteins was allophycocyanin > phycocyanin > phycoerythrin. In addition, the semi-saturated light intensity (I_k) increased significantly ($P < 0.05$), and the tolerance was enhanced, which demonstrated that photosynthesis was suppressed. Transmission electron microscopy results showed that the cells were deformed, evident plasmolysis was observed, the thylakoids were disarranged and perpendicular to the cell wall, and gas vesicle, cyanophycin granules and glycogen were largely absent, the increase of lipid, the internal disorder of cells and the decrease of light-harvesting pigment were also observed, which proved that the structures of algae cells were destroyed by ACT and led to an inhibition of photosynthesis. These results will not only provide scientific basis for comprehensive environmental risk evaluation of ACT but also help to guide the application of pesticides in agricultural setting.

Keywords: Acetochlor; *Microcystis flos-aquae*; photosynthesis; chlorophyll fluorescence parameters

乙草胺(ACT)是一种氯乙酰胺除草剂,能够在杂草出苗前或出苗后施用,能被根和叶子吸收,可抑制光合作用的电子传递,是我国最广泛使用的除草剂之一^[1]。ACT施用后会通过灌溉侵蚀或雨水和地表径流冲刷进入水生环境中造成污染。在中国广西的甘蔗种植区,ACT在33.3%的测试水样中检出。ACT在中国东北地区的水产品中也有检出^[2]。在美国,春秋两季的地表水和饮用水中均能检出ACT,它是美国的中西部流域潜在生态风险的主要贡献者之一^[3]。

当ACT进入到环境中时,会对非靶标生物产生一定的毒性效应。Xie等^[4]的研究表明,ACT容易积聚在铜绿微囊藻中,会对藻类造成氧化损伤并且导致其释放藻毒素。李薪芳等^[5]的研究表明,高浓度的ACT会对铜绿微囊藻造成氧化损伤并抑制其生长。吴晓霞等^[6]研究发现,ACT对大型水生植物(浮萍和金鱼藻)的生长发育和生理生化指标具有显著影响。王秀红等^[7]的研究表明,ACT高浓度时会抑制藻类蛋白质的合成和 α -淀粉酶的活性从而导致其死亡。此外,接触ACT也可以致鱼类中甲状腺激素相关基因的组织特异性替代表达,导致基因变异^[8]。Xu等^[9]的研究表明,ACT会影响斑马鱼胚胎

发育且破坏甲状腺功能。有研究表明,长期接触ACT会诱发大鼠肝脏和肾脏损害,导致抗氧化系统功能障碍,并影响脂肪酸的合成^[10]。美国环境保护局将ACT列为B-2致癌物^[11];ACT的广泛存在已经对生态环境造成了巨大威胁。本文研究了在不同浓度ACT的胁迫下,水华微囊藻在染毒期间,叶绿素荧光参数、藻蛋白、藻胆蛋白和藻细胞结构受到的影响,综合评价ACT对浮游植物光合作用的潜在影响。此结果可为ACT环境风险评估及农药的合理利用提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂和仪器

供试药剂:乙草胺(2-乙基-6-甲基-N-乙氧基甲基- α -氯代乙酰替苯胺)原药由浙江大有化工有限公司提供,纯度>90%。

仪器:浮游植物分类荧光仪(Phyto-PAM, Walz公司,德国),透射电子显微镜(H-7650,日立公司,日本),切片仪(UC7, Leica公司,奥地利),酶标仪(SP-Max 2300A,上海闪谱生物科技有限公司,中国),人工气候箱(PYX-250Q-B,韶关科力仪器有限公司,中国)。

1.2 实验材料

蓝藻水华微囊藻(*Microcystis flos-aquae*)(FACHB-

1028)由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。水华微囊藻采用 BG11 培养基培养。置于人工气候箱中,培养条件为:温度 25 °C,湿度 60%,光暗比 12 h:12 h,光强为 3 700 lx 左右,静置培养,每天定时人工摇动 3 次。

1.3 实验方法

1.3.1 叶绿素相关荧光的测定

在水华微囊藻进入生长对数期($1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cell·mL⁻¹)后进行染毒,置于 250 mL 三角锥形瓶中培养。设置乙草胺对水华微囊藻藻液的染毒浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10 和 50 mg·L⁻¹。每组浓度设置 3 个平行,染毒 9 d。

试验使用浮游植物分类荧光仪(Phyto-PAM, Walz 公司,德国)测定水华微囊藻藻细胞的叶绿素 *a* 含量(Chl *a*)、光系统 II (PS II) 的最大光合效率(F_v/F_m)、PS II 的实际光合效率($Y(II)$)、快速光响应曲线(电子传递速率(rETR)、光合有效辐射(PAR))、光能利用率(α)、最大潜在相对电子传递速率(ETR_{max})、半饱和和光强(I_k)等叶绿素荧光参数。Chl *a* 每天测一次,其余参数隔天测一次。计算公式如下:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (1)$$

$$Y(II) = (F_m' - F)/F_m' \quad (2)$$

$$rETR = PAR \times Y(II) \times 0.84 \times 0.5 \quad (3)$$

$$I_k = ETR_{max}/\alpha \quad (4)$$

式中: F_0 表示初始荧光, F_v 表示可变荧光, F_m 表示最大荧光, F_m' 表示光适应最大荧光, F 表示实际荧光产量。

1.3.2 藻蛋白和藻胆蛋白的测定

蛋白的提取:设置乙草胺染毒浓度为 0、1、10 和 50 mg·L⁻¹,在染毒 3、6 和 9 d 时,取一定量的藻液在 4 °C 条件下冷冻离心 10 min,转速为 10 000 r·min⁻¹,去除上清液,藻细胞重悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS)(0.05 mol·L⁻¹,pH 7.8)中,冰浴破碎后,再在 4 °C 条件下冷冻离心 10 min,转速为 12 000 r·min⁻¹,取上清液用 PBS 定容,-80 °C 低温保存。

藻蛋白的测定:采用 Bradford 法^[12]。将标准蛋白质溶液和蛋白提取液加入考马斯亮蓝(G250)溶液,在 595 nm 处测定吸光度。

藻胆蛋白的测定:在 620 nm(A_{620})、650 nm(A_{650})和 565 nm(A_{565})处测定吸光度,计算公式如下^[13]:

$$\text{藻蓝蛋白(PC)} = (A_{620} - 0.7A_{650})/7.38 \quad (5)$$

$$\text{别藻蓝蛋白(APC)} = (A_{650} - 0.19A_{620})/5.65 \quad (6)$$

$$\text{藻红蛋白(PE)} = (A_{565} - 2.8PC - 1.34APC)/12.7 \quad (7)$$

1.3.3 藻细胞超微结构观察

设置乙草胺染毒浓度为 0 mg·L⁻¹ 和 10 mg·L⁻¹,在染毒 4 d 时,取一定量的藻液离心,去上清,藻细胞加入 2.5% 的戊二醛,在 4 °C 下固定 4 h,用 PBS 洗 3 次,每次 15 min。再加入 1% 四氧化锇固定 1 h,用乙醇的水溶液按 30%、50% 和 70% 的浓度梯度对样品进行脱水,每次 15 min,之后在 90% 乙醇、90% 乙醇:丙酮(V:V=1:1)和 90% 丙酮中脱水各 15 min,100% 丙酮脱水 2 次,每次 15 min。使用丙酮、Spurr 树脂包埋剂浸透与包埋,70 °C 加温聚合 24 h。用 Leica UC7 超薄切片机切成厚度 100 nm 的切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色,超纯水漂洗。最后在透射电子显微镜(TEM)中观察。

1.4 数据处理

试验数据采用 SPSS 17.0 软件的单因素分析及 Duncan 检验进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。所得数据利用 Origin 8.5 作图。

2 结果(Results)

2.1 Chl *a* 含量的变化

由图 1 可知,随着染毒时间的增加,同一浓度组的 Chl *a* 含量呈现上升趋势,但都低于对照组;在前 6 天,各浓度组与对照组均无显著性差异($P > 0.05$),从第 7 天起,除了 0.01 mg·L⁻¹ 浓度组以外,其余浓度组均显著低于对照组($P < 0.05$);到第 9 天时,0.1、1、10 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组中水华微囊藻 Chl *a* 含量

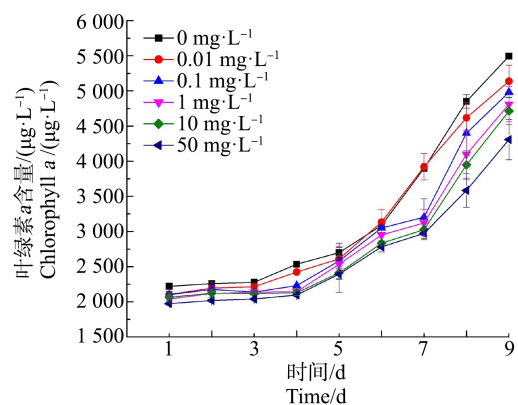


图 1 不同浓度乙草胺 (ACT) 对水华微囊藻叶绿素 *a* (Chl *a*) 含量的影响

注:*代表与对照组比较具有显著性差异, $P < 0.05$;下同。

Fig. 1 Effects of different concentrations of acetochlor (ACT) on chlorophyll *a* (Chl *a*) content of *Microcystis flos-aquae*
Note: * represents significant difference compared with the control group, $P < 0.05$; the same below.

分别为对照组的 91%、88%、86% 和 78%。

2.2 F_v/F_m 的变化

如图 2 所示,在前 3 天,各浓度组 F_v/F_m 都呈现增大的趋势,但是 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 F_v/F_m 低于对照组;从第 3 天起,50 mg·L⁻¹ 浓度组的 F_v/F_m 呈现下降趋势,时间越长, F_v/F_m 越小,显著低于对照组 ($P < 0.05$);而 10 mg·L⁻¹ 浓度组从第 5 天起也开始显著低于对照组 ($P < 0.05$)。第 9 天,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 F_v/F_m 值分别为对照组的 82% 和 27%。而其余浓度组在染毒期间与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 $Y(II)$ 值的变化

如图 3 所示,在前 3 天,所有浓度组 $Y(II)$ 值均呈现上升趋势,但是 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 $Y(II)$ 值增长速率低于对照组,从第 3 天起,50 mg·L⁻¹ 浓度组的 $Y(II)$ 值呈现下降趋势,时间越长, $Y(II)$ 值越小,显著低于对照组 ($P < 0.05$);而 10 mg·L⁻¹ 浓度组从第 5 天起也开始显著低于对照组 ($P < 0.05$)。第 9 天,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 $Y(II)$ 值分别为对照组的 82% 和 25%。而 0.01、0.1 和 1 mg·L⁻¹ 浓度组在染毒期间与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 快速光响应曲线的变化

如图 4 所示,在第 1 天时,各浓度组的快速光响应曲线与对照组并无显著性差异 ($P > 0.05$);在第 3 天时,随着 PAR 的增大,50 mg·L⁻¹ 浓度组的 rETR 开始显著低于对照组 ($P < 0.05$);在第 5 天时,随着 PAR 的增大,10 mg·L⁻¹ 浓度组的 rETR 也开始低于对照组;从第 7 天起,随着 PAR 的增大,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组 rETR 均显著低于对照组 ($P < 0.05$),而其余浓度组的 rETR 均与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 α 值、 ETR_{max} 值和 I_k 值的变化

ACT 对水华微囊藻 α 值的影响如图 5 所示,随着染毒时间的增加,0.01、0.1 和 1 mg·L⁻¹ 浓度组的 α 值与对照组的变化趋势一致,呈先上升后趋于相对平稳;而 10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组则呈先上升后降低,且从第 5 天起, α 值显著低于对照组 ($P < 0.05$)。到第 9 天时,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 α 值分别为对照组的 85% 和 25%。

ACT 对水华微囊藻 ETR_{max} 值的影响如图 6 所示,随着染毒时间的增加,0.01、0.1 和 1 mg·L⁻¹ 浓度组的 ETR_{max} 值保持相对稳定的上升趋势;而 10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组则随着染毒时间的增加,呈先增后减的趋势,从第 7 天起显著低于对照组 ($P <$

0.05)。到第 9 天时,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 ETR_{max} 值分别为对照组的 78% 和 22%。

ACT 对水华微囊藻 I_k 值的影响如图 7 所示,所有浓度组的 I_k 值随着染毒时间的增加而增大。从第 7 天起,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。到第 9 天时,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的 I_k 值分别为对照组的 108% 和 120%。

2.6 藻蛋白和藻胆蛋白的变化

ACT 对水华微囊藻藻蛋白的影响如图 8(a) 所示,藻蛋白相对含量随着 ACT 浓度的增加呈下降的趋势,从染毒第 6 天起,50 mg·L⁻¹ 浓度组的藻蛋白

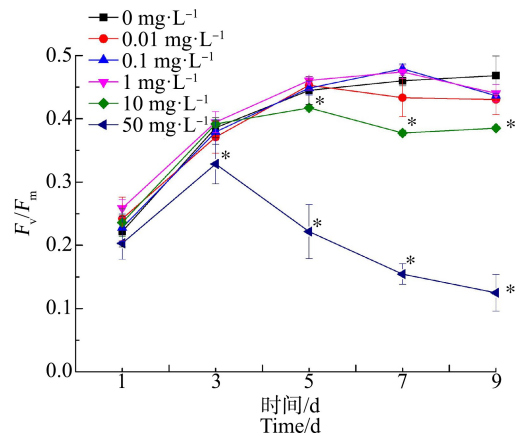


图 2 不同浓度 ACT 对水华微囊藻最大光合效率 (F_v/F_m) 的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of ACT on the maximum photosynthetic efficiency (F_v/F_m) of *Microcystis flos-aquae*

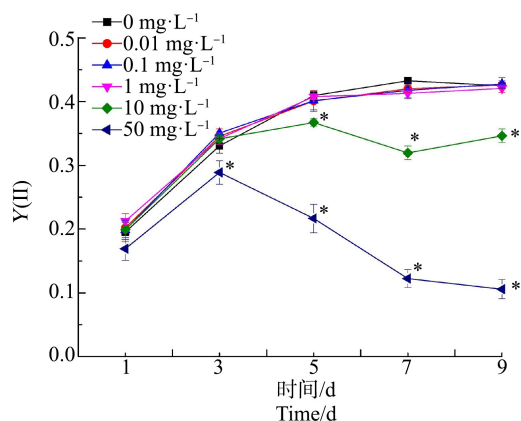


图 3 不同浓度 ACT 对水华微囊藻 PS II 的实际光合效率 ($Y(II)$) 的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of ACT on the actual photosynthetic efficiency of PS II ($Y(II)$) of *Microcystis flos-aquae*

相对含量开始显著低于对照组($P<0.05$);在第9天, $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的藻蛋白相对含量为 $59.29\% \pm 6.54\%$,且显著低于第3天和第6天时该浓度组的藻蛋白相对含量($P<0.05$);而其余浓度组与对照组之间未见显著性差异($P>0.05$)。

ACT对水华微囊藻藻蓝蛋白的影响如图8(b)所示,藻蓝蛋白相对含量随着ACT浓度的增加呈下降的趋势,在染毒第9天, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的藻蓝蛋白相对含量显著低于对照组($P<0.05$),相对含量分别为 $82.24\% \pm 11.06\%$ 和 $64.61\% \pm$

2.61% ,且 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的藻蓝蛋白相对含量与其余浓度组存在显著性差异($P<0.05$)。

ACT对水华微囊藻别藻蓝蛋白的影响如图8(c)所示,别藻蓝蛋白相对含量随着ACT浓度的增加呈下降的趋势。其中, 1 、 10 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的别藻蓝蛋白相对含量从第3天起就显著低于对照组($P<0.05$);且随着染毒时间的增加, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的别藻蓝蛋白相对含量在第9天时显著低于第3天和第6天($P<0.05$),其相对含量分别为 $77.48\% \pm 2.23\%$ 和 $57.61\% \pm 3.30\%$ 。

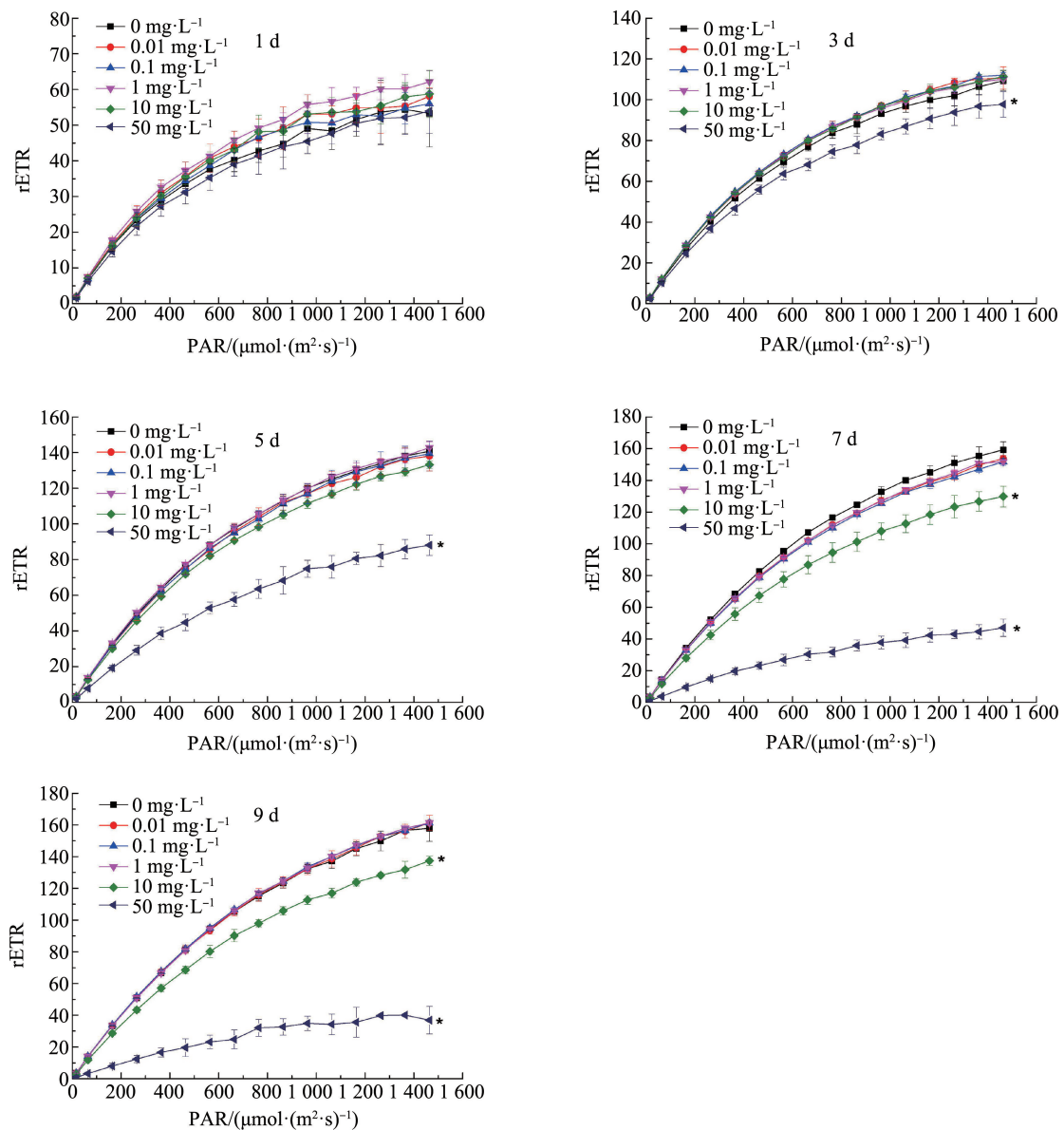


图4 不同浓度ACT对水华微囊藻快速光响应曲线的影响

注:PAR表示光合有效辐射,rETR表示电子传递速率。

Fig. 4 Effects of different concentrations of ACT on rapid light curves of *Microcystis flos-aquae*

Note: PAR is photosynthetically active radiation and rETR is electron transport rate.

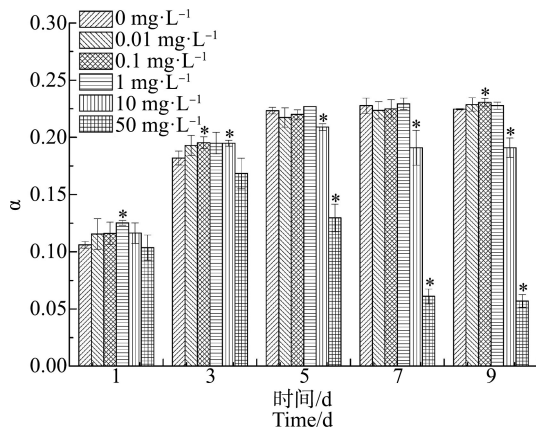


图 5 不同浓度 ACT 对水华微囊藻光响应曲线的初始斜率 (α) 值的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of ACT on the initial slope of rapid light curve (α) value of *Microcystis flos-aquae*

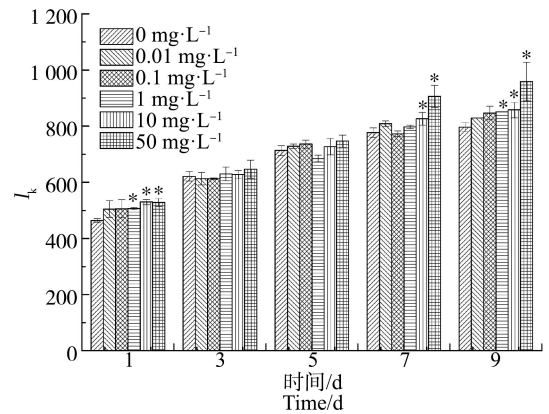


图 7 不同浓度 ACT 对水华微囊藻半饱和和光强 (I_k) 值的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of ACT on the semi-saturated light intensity (I_k) value of *Microcystis flos-aquae*

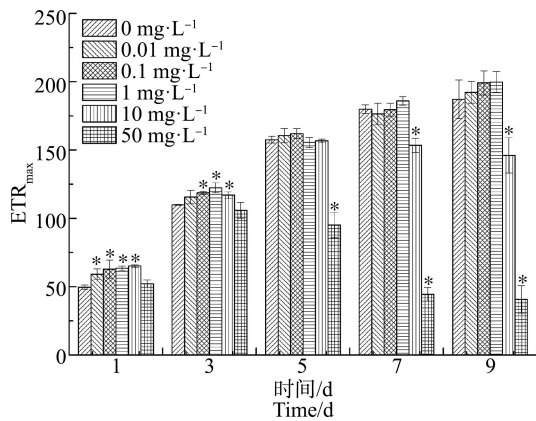


图 6 不同浓度 ACT 对水华微囊藻最大潜在相对电子传递速率 (ETR_{max}) 值的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of ACT on maximum potential relative electron transfer rate (ETR_{max}) value of *Microcystis flos-aquae*

ACT 对水华微囊藻藻红蛋白的影响如图 8(d) 所示,藻红蛋白相对含量随着 ACT 浓度的增加呈下降的趋势,从第 3 天起,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的藻红蛋白相对含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 在第 9 天时,10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 浓度组的藻红蛋白相对含量分别为 85.18% ± 7.59% 和 76.51% ± 7.35%。

2.7 超微结构观察

通过透射电子显微镜观察到 ACT 染毒前后水华微囊藻细胞的超微结构,如图 9 所示。图 9 I 为对照组经过 96 h 后的水华微囊藻细胞结构。细胞周围有一层黏液,核区、类囊体、藻青素小粒和气泡清晰可见(图 9 I (a)),类囊体之间存在少量糖原(图 9

I (b)); 图 9I(c) 和图 9I(d) 中展示的是处于细胞分裂的细胞,箭头指示的细胞壁层含有脂质颗粒,多 β 羟基丁酸和多面体也清晰可见。图 9II 为水华微囊藻暴露在 10 mg·L⁻¹ ACT 96 h 后的藻细胞结构。细胞整体变形,质壁分离明显(图 9II(a)),细胞壁被破坏,细胞质紊乱,类囊体数量减少,且大多与细胞壁垂直(图 9II (b)),细胞分裂不对称,气泡、藻青素小粒数量减少,多 β 羟基丁酸和脂质颗粒增多(图 9II(c) 和 II(d))。

3 讨论 (Discussion)

Chl *a* 是植物进行光合作用的主要色素,其含量反映光合作用的状况,也是衡量植物生长状况的重要指标之一^[14]。本研究中,随着 ACT 浓度的增加,水华微囊藻的 Chl *a* 含量逐渐降低,这可能是因为 ACT 对水华微囊藻光合色素的合成有抑制作用,从而导致 Chl *a* 含量的下降。以上结果与很多已有研究结果相似,例如, Wang 等^[15] 的研究表明,三角褐指藻的 Chl *a* 含量会随着对氯苯胺浓度的增加而减少,因为对氯苯胺降低了三角褐指藻光和色素合成酶的活性,导致光和色素合成受到抑制; Smythers 等^[16] 的研究表明,除草剂拿捕净暴露会导致小球藻的 Chl *a* 含量降低。

F_v/F_m 是表征 PS II 中藻类细胞损伤的快速指标,当藻类遭受非生物胁迫时,就会显著降低^[17-18]。本研究中,水华微囊藻的 F_v/F_m 随着 ACT 浓度的增加而减少,表明最大量子产量减少,最大光能转化效率受到抑制,这可能是因为高浓度 ACT 的胁迫下,水华微囊藻的光合作用过程受到破坏,光合电子

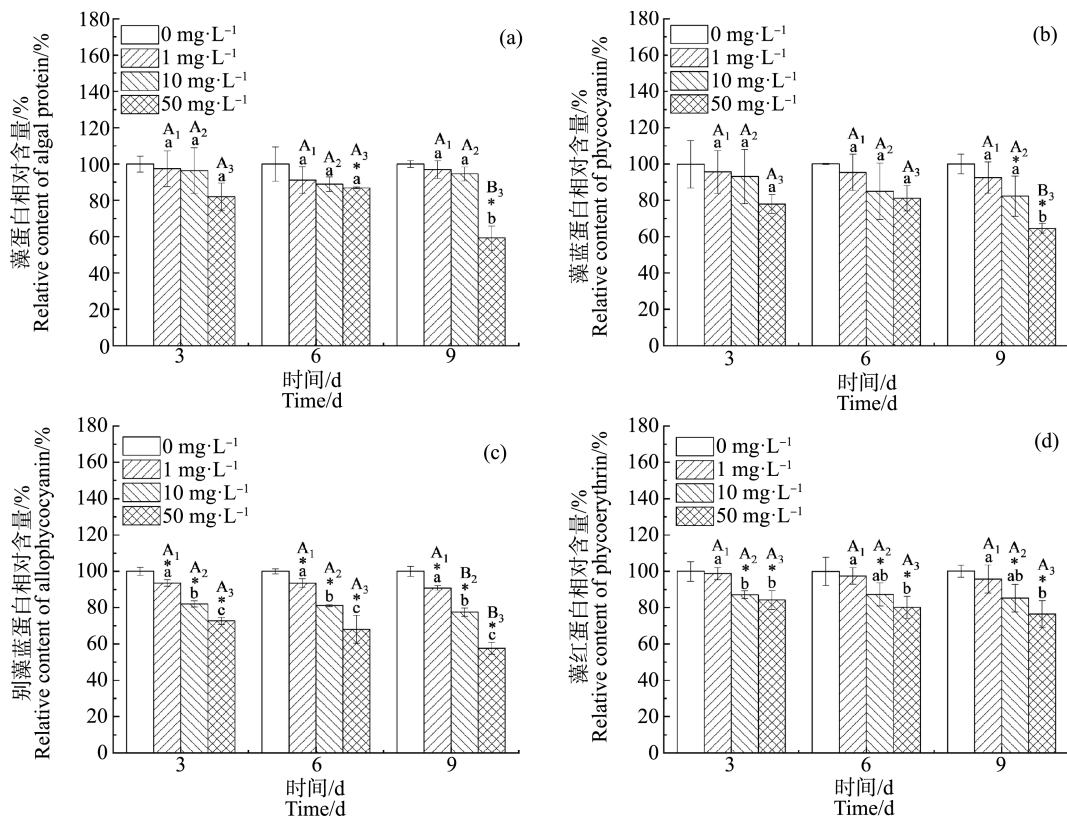


图8 不同浓度 ACT 对水华微囊藻藻蛋白和藻胆蛋白的影响

注:不同小写字母(a, b 和 c)表示相同暴露时间的不同浓度组之间存在显著差异($P<0.05$);不同大写字母(A 和 B)表示相同浓度组不同暴露时间之间存在显著差异($P<0.05$);大写字母的下标 1, 2 和 3 分别表示 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组。

Fig. 8 Effects of different concentrations of ACT on protein and phycobiliprotein of *Microcystis flos-aquae*

Note: Different lowercase letters (a, b and c) indicate significant differences ($P<0.05$) between different concentrations at the same exposure time; different capital letters (A and B) indicate significant differences ($P<0.05$) between different exposure time groups with the same concentration; the subscripts 1, 2 and 3 of capital letters respectively represent concentration groups of $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

传递过程中断,藻体利用光能转化为化学能的能力降低^[19]。Élise 等^[20]的研究也表明,草甘膦会造成蓝藻和绿藻的 F_v/F_m 降低。Khanama 等^[21]的研究表明,高浓度敌草隆会造成藻类光合性能降低。刘伟杰等^[22]的研究表明,羊角月牙藻的 F_v/F_m 随着壬基酚的浓度增加而下降,这证明壬基酚能降低羊角月牙藻的光合性能且抑制羊角月牙藻的生长。PS II 的 Y(II)反映了 PS II 的实际光能转换效率和实际量子产量^[23]。水华微囊藻 Y(II)随着 ACT 浓度的增加而减少,这表明,ACT 暴露会导致水华微囊藻 PSII 的实际量子产量减少,实际光能转化效率降低,从而影响光合作用。Zhao 等^[24]的研究报道了 4 种除草剂(莠去津、敌草隆、敌稗和灭草松)导致 3 种藻(小球藻、铜绿微囊藻和斜生栅藻)光合作用的最大光合效率和实际光合效率降低。王寿兵等^[25]的研究表明,高浓度 Cu^{2+} 暴露会导致铜绿微囊藻 PSII 的实际光能转换效率下

降,说明铜绿微囊藻的光化学性能受到抑制。

快速光响应曲线可以反映不同试验条件下浮游生物光合活性的相对变化^[26]。rETR 反映了相对电子传递速率,PAR 为有效光辐射强度。在 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ACT 浓度组中,随着 PAR 的增加,rETR 增加速率低于对照组,表明藻类的光合作用受到抑制,可能是因为高浓度的 ACT 破坏了光合作用的电子传递过程,使得光合作用受阻,净光合作用能力降低,从而影响藻类生长。Wu 等^[27]的研究表明,高浓度微塑料会阻碍藻类光合作用中的电子传递,导致光响应曲线的变化。王俊英^[28]用水胺硫磷(ICP)对水华微囊藻进行对映体选择性研究时发现(+)-ICP 降低了藻类的光合活性,原因是(+)-ICP 阻碍了 PS II 中电子的传递。Sandra 等^[29]的研究表明,当藻类受到胁迫时,光响应曲线会显著降低,光合作用受到抑制。

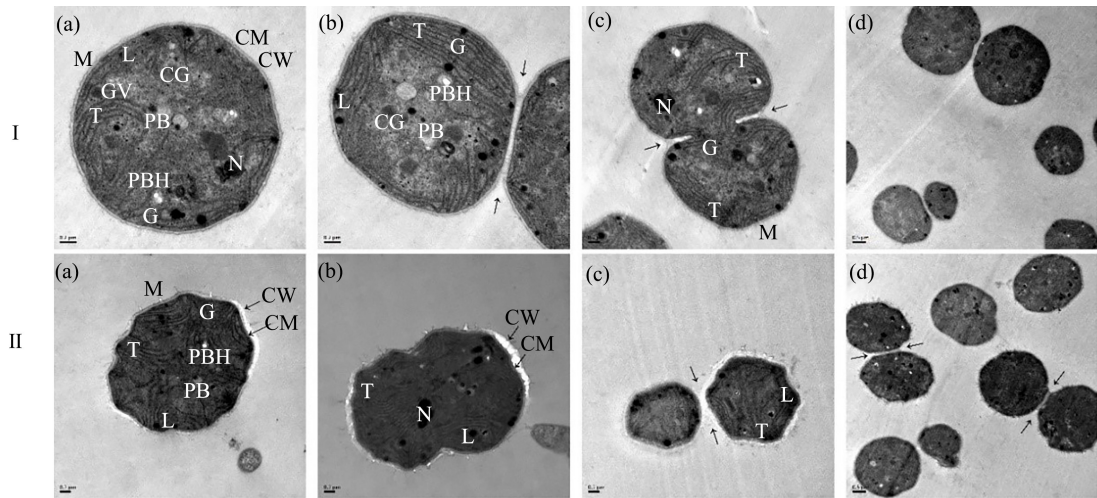


图 9 接种 96 h 后水华微囊藻超微结构的变化

注: I 对照组, II 10 mg·L⁻¹ ACT 组;超微结构包含类囊体(T)、黏液(M)、核区(N)、藻青素小粒(CG)、多面体(PB)、多β羟基丁酸(PBH)、脂质颗粒(L)、糖原(G)、气泡(GV)、细胞壁(CW)和细胞膜(CM)。

Fig. 9 Ultrastructure of *Microcystis flos-aquae* cell in sample (96 h after inoculation)

Note: I control, II 10 mg·L⁻¹ ACT group; ultrastructure includes thylakoids (T), mucilage (M), nucleoplasmic area (N), cyanophycin granules (CG), polyhedral body (PB), hydroxybutyrate (PBH), lipid (L), glycogens (G), gas vesicle (GV), cell wall (CW) and cell membrane (CM).

α 值反映了藻细胞对光能的利用效率,能直观反映藻类捕光色素对光能的吸收能力^[30]。ETR_{max} 值可反映一定光强下单位藻细胞内光合作用速率的快慢^[31]。I_k 表示浮游植物保持捕获光能和处理光能的最佳平衡点^[32],是浮游植物光适应能力的指标,能反映对强光耐性的大小。本研究结果表明,0.01、0.1 和 1 mg·L⁻¹ ACT 浓度组中,水华微囊藻的 α 值和 ETR_{max} 值呈上升趋势,其中,部分 α 值和 ETR_{max} 值与空白组呈现显著性差异。可能是因为在低浓度的 ACT 胁迫下,水华微囊藻通过增强捕光能力和电子传递能力来维持光合能力,从而避免机体受损;而在 10 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ ACT 浓度组中, α 值和 ETR_{max} 值的显著降低可能是因为水华微囊藻在高浓度 ACT 胁迫下,捕光能力和电子传递能力减弱,导致藻类机体受到损伤。所有 ACT 浓度组中,水华微囊藻的 I_k 值呈上升趋势且与对照组有显著性差异,可能是因为当 ACT 浓度增大时,水华微囊藻的生长受到胁迫,而耐受能力增强。已有研究表明,在除草剂的作用下,藻类的光合作用能力下降。例如,异丙隆会抑制斜生栅藻和衣藻 PS II 的活性^[33-34]。Deblois 等^[35]的研究表明,阿特拉津会影响藻类的电子运输、初级生产和光调节过程。Ni 等^[36]的研究表明,藻类的 α 值和 ETR_{max} 值会随着除草剂硝磺草酮浓度的增加而降低,表明藻类的光合能力受到抑制。

藻蛋白和藻胆蛋白都随着 ACT 浓度的增加呈下降趋势。蛋白含量的降低说明有毒物质能够抑制蓝藻蛋白质的合成^[37]。Chia 等^[38]的研究表明,类毒素会抑制铜绿微囊藻蛋白质的合成。藻胆蛋白包含藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蛋白,它们能附着在类囊体上,其作用是将光能传递给 Chl a,从而进行光合作用^[39]。ACT 染毒后蛋白质含量的降低可能与光合作用速率降低有关,因为当光合作用受到抑制会导致用于蛋白合成的碳骨架的缺乏^[40]。本研究结果表明,ACT 对藻胆蛋白的抑制作用顺序为别藻蓝蛋白>藻蓝蛋白>藻红蛋白。楼春^[41]的研究表明,酰胺类农药对铜绿微囊藻藻胆蛋白的抑制作用也表现为同样的顺序。林必桂等^[42]的研究表明,赖氨酸对铜绿微囊藻藻胆蛋白各组分有不同的抑制作用,使微囊藻的光合作用系统受到破坏。因此,推测 ACT 会抑制水华微囊藻蛋白质的合成,使蛋白质含量减少,导致水华微囊藻对光能的捕获能力降低,造成光合作用受到抑制,致使藻类营养供给不足,这又进一步使得蛋白质的合成受到抑制。

本研究中藻细胞的超微结构观察结果表明,对照组的类囊体是封闭的圆盘,围绕核仁区域并与之平行,而 ACT 暴露后,类囊体减少并且排列发生变化,与细胞壁垂直,这可能是一种保护细胞免受超氧阴离子攻击的机制^[43],类囊体中存在捕光色素,当类

囊体受到损伤时,藻类生长和光合作用也会受到抑制。气泡为水生原核生物提供浮力,气泡壁是由蛋白质形成的,ACT染毒后藻细胞气泡减少可能是由于蛋白质的合成受到抑制且气泡壁被破坏^[44]。染毒后细胞内也会出现较多的脂质颗粒,这可能也是藻细胞在受到胁迫时自身的解毒机制^[45]。藻青素小粒是一种氮储存物,染毒后数量减少,可能是因为藻细胞在胁迫条件下的生长和分裂过程消耗了细胞内部的氮供应^[46]。糖原是蓝藻光合作用的产物,主要存在于光合片层之间,ACT染毒后的水华微囊藻中的糖原减少,这可能是因为负责降解这种多糖的酶过度产生,或者是参与糖原生产和储存的酶数量减少^[47]。

综上所述,在低浓度($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)ACT的胁迫下,水华微囊藻Chl *a*含量虽然有所下降,但其能够通过增强捕光能力和电子传递能力使其光合作用不受影响;在高浓度($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)ACT的胁迫下,水华微囊藻Chl *a*含量、捕光能力、光能转化效率和相对电子传递速率均下降,从而导致藻体光合作用能力下降。此外,ACT的胁迫会导致藻蛋白和藻胆蛋白含量下降,且别藻蓝蛋白最为敏感,蛋白含量的下降会影响光能的传递。与此同时,ACT对藻细胞内部类囊体造成的损伤也会导致捕光色素含量降低,这也是导致光合作用能力下降的重要因素。综合本研究中各项指标测量结果可知,Chl *a*含量对ACT的胁迫最为敏感,但要整体评估藻体光合能力,还需结合藻体叶绿素荧光参数及相关蛋白含量等参数。

通讯作者简介:李玲(1983—),女,博士,讲师,主要研究方向为手性农药毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Nemeth K L, Fuleky G, Morovjan G, et al. Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil [J]. *Chemosphere*, 2002, 48(5): 545-552
- [2] Fu L, Lu X, Tan J, et al. Multiresidue determination and potential risks of emerging pesticides in aquatic products from Northeast China by LC-MS/MS [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 63(1): 116-125
- [3] Hladik M L, Bouwer E J, Roberts A L. Neutral chloroacetamide herbicide degradates and related compounds in Midwestern United States drinking water sources [J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 390(1): 155-165
- [4] Xie J Q, Zhao L, Liu K, et al. Enantiomeric environmental behavior, oxidative stress and toxin release of harmful cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* in response to napropamide and acetochlor [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 246: 728-733
- [5] 李薪芳, 索亚萍, 楼鸳鸯, 等. 酰胺类除草剂对铜绿微囊藻的生长影响及氧化损伤效应[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(1): 239-247
- Li X F, Suo Y P, Lou Y Y, et al. Effects of acetanilide herbicides on growth and oxidative damage of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(1): 239-247 (in Chinese)
- [6] 吴晓霞, 吴进才, 金银根, 等. 除草剂对水生植物的生理生态效应[J]. *生态学报*, 2004, 24(9): 2037-2042
- Wu X X, Wu J C, Jin Y G, et al. Impact of herbicides on physiology and ecology of hydrophytes [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(9): 2037-2042 (in Chinese)
- [7] 王秀红, 沈健英, 陆贻通. 稻田除草剂对固氮蓝藻的毒性研究[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2004, 22(4): 400-405
- Wang X H, Shen J Y, Lu Y T. Study on herbicides in rice field to toxicity of fixing blue-green algae [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 2004, 22(4): 400-405 (in Chinese)
- [8] Li W, Zha J, Li Z, et al. Effects of exposure to acetochlor on the expression of thyroid hormone related genes in larval and adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(2): 87-93
- [9] Xu C, Sun X H, Niu L L, et al. Enantioselective thyroid disruption in zebrafish embryo-larvae via exposure to environmental concentrations of the chloroacetamide herbicide acetochlor [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 1140-1148
- [10] Li L, Wang M, Chen S, et al. A urinary metabonomics analysis of longterm effect of acetochlor exposure on rats by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 128: 82-88
- [11] 徐雄, 李春梅, 孙静, 等. 我国重点流域地表水中29种农药污染及其生态风险评价[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(2): 347-354
- Xu X, Li C M, Sun J, et al. Residue characteristics and ecological risk assessment of twenty-nine pesticides in surface water of major river-basin in China [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(2): 347-354 (in Chinese)
- [12] Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle

- of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254
- [13] Martínez R E B, Martínez J F. Exposure to the herbicide 2,4-D produces different toxic effects in two different phytoplankters: A green microalga (*Ankistrodesmus falcatulus*) and a toxigenic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 619: 1566-1578
- [14] 邱伟建, 陈敏东, 葛顺, 等. 斜生栅藻对草甘膦异丙胺盐的毒性响应[J]. *环境科学与技术*, 2013, 36(12): 24-28
- Qiu W J, Chen M D, Ge S, et al. Acute and chronic response of *Scenedesmus obliquus* to glyphosate-isopropylammonium [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 36(12): 24-28 (in Chinese)
- [15] Wang X F, Miao J J, Pan L Q, et al. Toxicity effects of *p*-chloroaniline on the growth, photosynthesis, respiration capacity and antioxidant enzyme activities of a diatom, *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169: 654-661
- [16] Smythers A L, Garmany A, Perry N L, et al. Characterizing the effect of poast on *Chlorella vulgaris*, a non-target organism [J]. *Chemosphere*, 2019, 219: 704-712
- [17] Ramón M B, Consuelo A, Bryon R, et al. A protocol to assess heat tolerance in a segregating population of raspberry using chlorophyll fluorescence [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(3): 524-530
- [18] Zhou R, Yu X Q, Katrine H, et al. Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using F_v/F_m to reveal the physiological mechanism of heat tolerance [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 118: 1-11
- [19] Annick M M, Elisabeth P, Gérard T. Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161(1): 25-33
- [20] Élise S, Marc L, Michel L, et al. Phytoplankton growth and PS II efficiency sensitivity to a glyphosate-based herbicide (Factor 540®) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 192: 265-273
- [21] Khanama M R M, Shimasaki Y, Hosain M Z, et al. Diuron causes sinking retardation and physiochemical alteration in marine diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex [J]. *Chemosphere*, 2017, 175: 200-209
- [22] 刘伟杰, 吴孝情, 鄢佳英, 等. 壬基酚对羊角月牙藻的毒性效应研究[J]. *中国环境科学*, 2018, 38(6): 2329-2336
- Liu W J, Wu X Q, Yan J Y, et al. Toxic effects of nonylphenol on *Selenastrum capricornutum* [J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(6): 2329-2336 (in Chinese)
- [23] Liu D D, Liu H J, Wang S T, et al. The toxicity of ionic liquid 1-decylpyridinium bromide to the algae *Scenedesmus obliquus*: Growth inhibition, phototoxicity, and oxidative stress [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 622: 1572-1580
- [24] Zhao D H, Cui J S, Duan L L, et al. Study on biological toxicity response characteristic of algae chlorophyll fluorescence to herbicides [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(9): 2820-2827
- [25] 王寿兵, 徐紫然, 马小雪, 等. Cu^{2+} 对铜绿微囊藻生长及叶绿素荧光主要参数的影响研究[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(12): 3759-3765
- Wang S B, Xu Z R, Ma X X, et al. Effects of Cu^{2+} on the growth and main parameters of chlorophyll fluorescence of *Microcystis aeruginosa* [J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(12): 3759-3765 (in Chinese)
- [26] Ihnken S, Eggert A, Beardall J. Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae [J]. *Aquatic Botany*, 2010, 93(3): 185-194
- [27] Wu Y M, Guo P Y, Zhang X Y, et al. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 374: 219-227
- [28] 王俊英. 手性农药水胺硫磷对水生生物的对映体选择性毒理研究[D]. 厦门: 华侨大学, 2017: 34-42
- Wang J Y. Study on enantioselective toxicology of chiral pesticides isocarbophos to aquatic organisms [D]. Xiamen: Huaqiao University, 2017: 34-42 (in Chinese)
- [29] Sandra K T, Martin L, Agnès F M, et al. Herbicide toxicity on river biofilms assessed by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 165: 160-171
- [30] 杨宋琪, 王丽娟, 谢婷, 等. 氮源对杜氏盐藻生长及光合系统 II 的影响[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(7): 1397-1403
- Yang S Q, Wang L J, Xie T, et al. Effect of nitrogen on growth and photosystem II of *Dunaliella salina* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, 37(7): 1397-1403 (in Chinese)
- [31] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subject*, 1989, 990(1): 87-92
- [32] Olischläger M, Wiencke C. Ocean acidification alleviates low-temperature effects on growth and photosynthesis of the red alga *Neosiphonia harveyi* (Rhodophyta) [J]. *Jour-*

- nal of Experimental Botany, 2013, 64(18): 5587-5597
- [33] Dewez D, Didur O, Vincent H J, et al. Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isotoproturon toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus* [J]. Environmental Pollution, 2007, 151(1): 93-100
- [34] Bi Y F, Miao S S, Lu Y C, et al. Phytotoxicity, bioaccumulation and degradation of isotoproturon in green algae [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 243: 242-249
- [35] Deblois C P, Dufresne K, Juneau P, et al. Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 126: 77-84
- [36] Ni Y, Lai J H, Wan J B, et al. Photosynthetic responses and accumulation of mesotrione in two freshwater algae [J]. Environmental Science-Processes & Impacts, 2014, 16(10): 2288-2294
- [37] Carfagna S, Lanza N, Salbitani G, et al. Physiological and morphological responses of lead or cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae) [J]. Springer Plus, 2013, 2(1): 147-153
- [38] Chia M A, Cordeiro-Araújo M K, Bittencourt-Oliveira M D C. Growth and antioxidant response of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) exposed to anatoxin-a [J]. Harmful Algae, 2015, 49: 135-142
- [39] Hong Y, Huang J J, Hu H Y. Effects of a novel allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) on the ultrastructure and pigment composition of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 83(4): 502-508
- [40] Mathias A C, Promise K C, Wisdom S J. Lead induced antioxidant response and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brébisson under different nitrogen concentrations [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(1): 293-302
- [41] 楼春. 17 β -雌二醇与酰胺类除草剂和铜绿微囊藻的相互作用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2011: 40-43
- Lou C. Study on interaction of 17 β -estradiol and amide herbicides with *Microcystis aeruginosa* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2011: 40-43 (in Chinese)
- [42] 林必桂, 杨柳燕, 肖琳, 等. 赖氨酸抑制铜绿微囊藻生长的机理研究[J]. 农业环境科学学报, 2008(4): 1561-1565
- Lin B G, Yang L Y, Xiao L, et al. Mechanism of the inhibition effect of lysine on *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008(4): 1561-1565 (in Chinese)
- [43] Canini A, Leonardi D, Grilli C M. Superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* after *in vitro* induction and decay of a surface bloom [J]. New Phytologist, 2001, 152(1): 107-116
- [44] Walsby A E. Isolation and purification of intact gas vesicles from a blue-green alga [J]. Nature, 1969, 224(5220): 716-717
- [45] Viviana A, Carolina F, Yolanda Z, et al. Effects of chlorpyrifos on the growth and ultrastructure of green algae, *Ankistrodesmus gracilis* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 120: 334-341
- [46] Canini A, Pellegrini S, Grilli C M. Ultrastructural variations in *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyta) during a surface bloom induced by high incident light irradiance [J]. Plant Biosystems, 2003, 137(3): 235-248
- [47] Ye J, Wang L, Zhang Z, et al. Enantioselective physiological effects of the herbicide diclofop on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(8): 3893-3901 ◆