

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160317002

邓祥元, 胡小丽, 成婕, 等. 纳米二氧化铈对蛋白核小球藻的生物学效应研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(5): 111-116

Deng Y X, Hu X L, Cheng J, et al. Effects of nanoparticle CeO₂ on the physiology of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(5): 111-116 (in Chinese)

纳米二氧化铈对蛋白核小球藻的生物学效应研究

邓祥元^{*}, 胡小丽, 成婕, 马志欣, 高坤

江苏科技大学生物技术学院, 镇江 212018

收稿日期: 2016-03-17 录用日期: 2016-05-16

摘要: 纳米二氧化铈(CeO₂)在被广泛使用的同时,其潜在的环境效应也受到人们越来越多的关注。以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)为实验材料,研究纳米 CeO₂的生物学效应,为探索纳米材料对微藻的生物学效应提供理论基础和数据支持。研究结果显示:1)纳米 CeO₂在低浓度(≤80 mg·L⁻¹)时可促进蛋白核小球藻的生长及色素、可溶性蛋白等的合成,但在高浓度(>80 mg·L⁻¹)下具有毒性效应;2)低浓度纳米 CeO₂可诱导藻细胞合成超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等可溶性蛋白,以抵御纳米 CeO₂的胁迫;但在高浓度时又会降低 SOD 活力;3)随着纳米 CeO₂浓度的升高,藻细胞中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量显著增加,说明藻细胞中活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)过量积累,这将破坏藻细胞的膜结构与功能,使细胞遭受严重损伤。

关键词: 纳米二氧化铈;蛋白核小球藻;生物学效应;色素;可溶性蛋白

文章编号: 1673-5897(2016)5-111-06 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Effects of Nanoparticle CeO₂ on the Physiology of *Chlorella pyrenoidosa*

Deng Xiangyuan^{*}, Hu Xiaoli, Cheng Jie, Ma Zhixin, Gao Kun

College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China

Received 17 March 2016 **accepted** 16 May 2016

Abstract: Nanoparticle cerium oxide (CeO₂) has been widely used in industries and material sciences. Its toxicity on the aquatic environment has been increasingly concerned recently. This study is aimed to explore effects of nanomaterials CeO₂ on the physiology of a microalga, *Chlorella pyrenoidosa*. Results showed that low concentrations of nanoparticle CeO₂ (≤80 mg·L⁻¹) resulted in an increase of growth, pigments and soluble protein contents in *C. pyrenoidosa*, but high concentrations CeO₂ (>80 mg·L⁻¹) significantly inhibited the growth and synthesis of the pigments, and decreased soluble protein in *C. pyrenoidosa*. The superoxide dismutase (SOD) activity was enhanced in the treatment of low concentrations of the nanoparticle CeO₂, while SOD activity decreased in the treatment of high concentrations of nanoparticle CeO₂. Malondialdehyde (MDA) contents in *C. pyrenoidosa* were significantly increased with an increase of the nanoparticle CeO₂ concentrations, indicating that an excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) may result in damage of the structure and function of the microalgal cell membrane.

Keywords: cerium dioxide nanoparticle; *Chlorella pyrenoidosa*; biological effects; pigments; soluble protein

随着纳米材料的大量生产与广泛应用,其不可避免地进入周围环境及生命体中,由此引发的生物安全性及生态毒理学问题已引起了广泛关注^[1-2]。其中,纳米二氧化铈(CeO_2)是一类用途最为广泛的稀土氧化物纳米材料,具有独特的晶体结构、较高的储放氧能力、较强的氧化还原性能等优点,现已被广泛应用于固体氧化物燃料电池(solid oxide fuel cells, SOFCs)的电极、光催化剂、防腐涂层、气体传感器、燃料电池、离子薄膜等领域^[3]。

纳米 CeO_2 的广泛应用,大大增加了其进入生态系统的可行性,它可在大气、土壤及水环境中迁移,并通过食物链间的传递,对生态系统中的个体、群体甚至整个生态系统产生安全性问题^[4]。目前有关纳米 CeO_2 生物学效应的研究已成为科学家们关注的热点。研究表明,纳米 CeO_2 可促使生物体细胞内产生并积累活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),造成对细胞的毒性效应^[5-7];但也有研究发现,纳米 CeO_2 具有清除氧自由基的能力,对细胞起到保护作用^[8-10]。但至今有关其生物学效应的机制尚不清晰,对其毒性的界定比较模糊^[11]。

微藻作为水生生态系统的初级生产者,其种类的多样性直接影响着水生生态系统的结构与功能^[12]。此外,微藻细胞具有对多种毒物敏感、生长周期短、易分离培养和可直接在细胞水平上观察等特点^[13],使得许多国家都采用微藻进行化学品的风险评价,并已建立了多个标准测试方法。其中蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)就是一种常用的毒性指示物种,也是中国推荐的环境监测试验藻种^[14]。

本文通过研究纳米 CeO_2 对蛋白核小球藻比生长速率、色素含量、蛋白含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量等的影响,探讨纳米 CeO_2 对蛋白核小球藻可能的生物学效应机制,为评估纳米 CeO_2 对藻类的生物学效应及其环境风险积累提供数据资料 and 科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料与试剂

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-1220)购自中国科学院野生生物种质库(淡水藻种库)。在无菌条件下,将藻种转接到 BG-11 培养基^[15]中,培养条件为:温度 25 ℃,光强度 3 000 lux,光周期为 12 h L:12 h D。

纳米 CeO_2 (纯度 97%,粒径 20 nm)购自杭州万景新材料有限公司,将纳米 CeO_2 加入到无菌水中,配制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,实验处理前置于超声波清洗器中处理 15 min,使悬浊液稳定均匀。SOD 及 MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 藻种的活化、培养

首先要对藻种进行同步化培养,将 *C. pyrenoidosa* 在无菌条件下转移至 BG-11 培养基中,于光照培养箱中驯化培养 7 d,至对数生长期后进一步扩大培养,培养条件为:温度 25 ℃,光强度 3 000 lux,光周期为 12 h L:12 h D,静置培养,每天定时人工摇动 3 次。

1.2.2 暴露试验

预实验结果表明纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 的半数效应浓度(EC_{50})为 $131.52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此本文参照 OECD201 藻类生长抑制实验的方法,在 *C. pyrenoidosa* 接种后(初始密度为 $2.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$)加入纳米 CeO_2 ,使其终浓度分别为 0、40、80、120、160 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,暴露时间为 96 h。每组试验设置 3 个平行组,实验重复 3 次。

1.2.3 比生长速率的测定

接种之日起每 24 小时取样,用血球计数板法测定藻细胞密度 $X(\text{cells mL}^{-1})$ 。然后,利用如下公式进行比生长速率的计算。

$$\mu(\text{d}^{-1}) = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

式中, μ 为比生长速率(d^{-1}); X_t 和 X_0 分别表示暴露时间为 t 时的藻细胞密度和初始藻细胞密度; t 为暴露时间(d)。

1.2.4 色素含量的测定

纳米 CeO_2 暴露 96 h 后,取 5 mL 藻液,参照 Deng 等^[16]的方法测定藻细胞中叶绿素 *a* 及类胡萝卜素的含量。

1.2.5 可溶性蛋白含量、SOD 活力及 MDA 含量的测定

纳米 CeO_2 暴露 96 h 后,取 20 mL 藻液,于 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min 收集藻细胞,加入 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值 7.8 的磷酸缓冲液 1 mL,利用超声波细胞破碎仪冰浴破碎细胞 10 min(其间工作 5 s,间隙 5 s),镜检无完整细胞后于 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心下 10

min,上清液即为粗酶液。可溶性蛋白含量的测定采用 Bradford 法^[17],取 100 μL 粗酶液,加入 3 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液($0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),摇匀,静置 5 min 后,用 1 cm 光径比色皿在 595 nm 下比色测定吸光值;以牛血清白蛋白为标准蛋白,计算藻细胞中可溶性蛋白的含量。SOD 活力及 MDA 含量的测定参照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行。

1.3 数据分析

采用 SPSS 18.0 对数据进行方差分析(one way ANOVA)及 Turkey's test 分析, $P<0.05$ 表示有显著性差异,并用* 来表示。采用 Origin 进行相应图片的绘制。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 生长的影响

图 1 显示了纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 比生长速率的影响。由图 1 可知,与对照组相比,*C. pyrenoidosa* 在 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米 CeO_2 处理组中暴露 72 h 内的生长未表现出明显差异($P>0.05$),但在暴露 96 h 时有显著下降趋势($P<0.05$);而在 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米 CeO_2 处理组中,*C. pyrenoidosa* 的生长较对照组低,尤其是在暴露 72 h 和 96 h 后,纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 的生长表现出一定的抑制作用($P<0.05$);而在高浓度处理组(120 、 160 和 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米 CeO_2)中,*C. pyrenoidosa* 的生长受到明显的抑制($P<0.05$),最小比生长速率(-0.51 d^{-1})出现在 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米 CeO_2 暴露 24 h 后的处理组中。这与纳米 CeO_2 对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)生长的影响结果基本一致^[3],这是由于低浓度的纳米 CeO_2 可在水体中解离出少量 Ce^{3+} ,可为 *C. pyrenoidosa* 的生长提供营养元素或引起应激反应,而高浓度的纳米 CeO_2 可通过遮光效应、聚集效应、毒性离子(Ce^{3+})等引起藻细胞

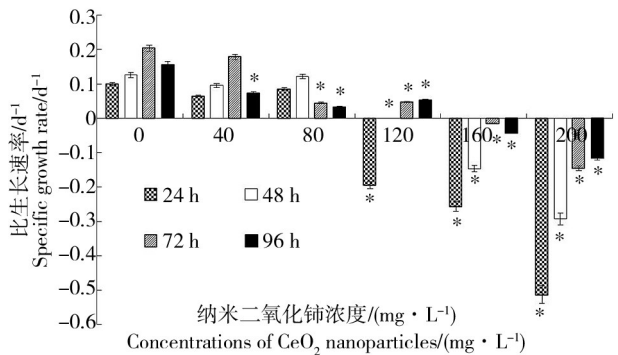


图 1 不同浓度纳米 CeO_2 对蛋白核小球藻生长的影响
Fig. 1 Effects of nanoparticle CeO_2 on the growth of *C. pyrenoidosa*

内色素含量、蛋白质含量以及酶活力等的改变,从而对微藻生长产生毒性效应^[18-19]。

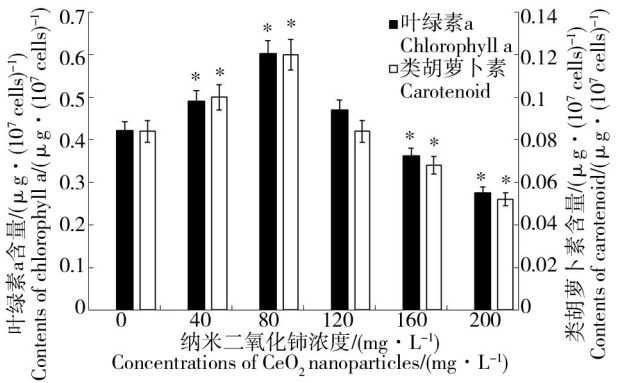


图 2 不同浓度纳米 CeO_2 对蛋白核小球藻中叶绿素 a 和类胡萝卜素含量的影响
Fig. 2 Effects of nanoparticle CeO_2 on the contents of chlorophyll a and carotenoid in *C. pyrenoidosa*

2.2 纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 中色素及可溶性蛋白含量的影响

色素是微藻进行光合作用的主要细胞组分,色素的破坏或降解都会直接导致光合作用效率的降低,因此藻细胞内色素含量的变化直接影响其生长状态,图 2 显示了纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 中叶绿素 a 和类胡萝卜素含量的影响。由图 2 可知,在低浓度纳米 CeO_2 处理组($\leq 80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)中,藻细胞中叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量随纳米 CeO_2 浓度的增大显著升高($P<0.05$),最高含量分别为 0.60 和 $0.12\text{ }\mu\text{g}\cdot(10^7\text{ cells})^{-1}$;而在高浓度纳米 CeO_2 处理组($>80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)中,叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量随纳米 CeO_2 浓度的增大而逐渐降低。这与纳米 CeO_2 对 *S. obliquus* 中色素含量的影响结果基本一致^[3],说明低浓度纳米 CeO_2 可促进 *C. pyrenoidosa* 中叶绿素 a 及类胡萝卜素等的合成,使其生长加快,而高浓度纳米 CeO_2 可使色素分子受损或其合成代谢受到抑制,当其浓度进一步增大时,可能会形成大量的 ROS,进一步破坏色素的结构及功能^[16]。

可溶性蛋白是生物细胞内重要的渗透调节物质和营养物质,对细胞的生命活动起到保护作用,是植物逆境生物学研究中的重要指标。图 3 揭示了纳米 CeO_2 对 *C. pyrenoidosa* 中可溶性蛋白含量的影响。由图 3 可知,随着纳米 CeO_2 浓度的增加,*C. pyrenoidosa* 中可溶性蛋白含量先上升后下降,在 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米 CeO_2 处理组中获得最大值为 $0.94\text{ }\mu\text{g}\cdot$

(10^7 cells) $^{-1}$ 。由于部分具有抗氧化或生物转化活性的酶均属于可溶性蛋白,因此可溶性蛋白的增加,表明在纳米 CeO_2 胁迫下, *C. pyrenoidosa* 中积累了 ROS,从而使藻细胞通过增加抗氧化酶等的含量来抵御该胁迫^[20]。

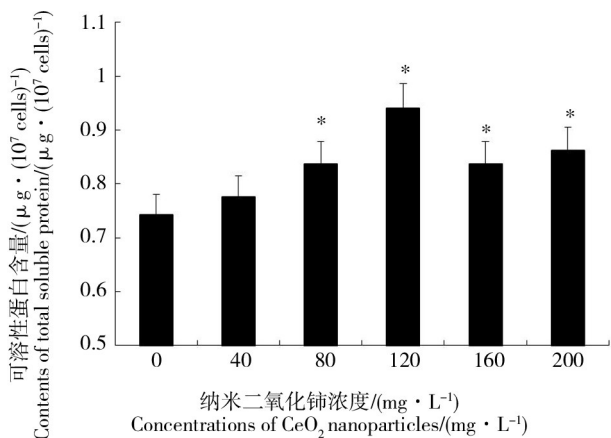


图 3 不同浓度纳米 CeO_2 对蛋白核小球藻中可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effects of nanoparticle CeO_2 on the contents of total soluble protein in *C. pyrenoidosa*

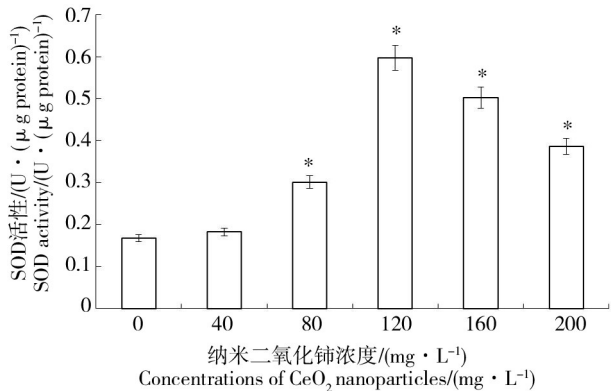


图 4 纳米 CeO_2 胁迫下蛋白核小球藻中 SOD 活力变化

Fig. 4 The SOD activity in *C. pyrenoidosa* under the stress of nanoparticle CeO_2

2.3 SOD 活力对纳米 CeO_2 胁迫的响应

SOD 是生物体内重要的活性氧防护酶,可与生物体内过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽等组成了过氧化防御系统,催化生物细胞中的 ROS 发生歧化反应,生成过氧化氢,再由过氧化氢酶转化为无害的分子氧和水,从而有效地清除 ROS,防止细胞膜系统过氧化作用的发生。由图 4 可知,随着纳米 CeO_2 浓度的增加,SOD 活力先上升后下降,当纳米 CeO_2

浓度为 $120\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,藻细胞中 SOD 活力达到最高 ($0.65\text{ U} \cdot (\mu\text{g protein})^{-1}$),表明在低浓度纳米 CeO_2 胁迫下,藻细胞中 SOD 活力增加以清除过量的 ROS,使藻细胞内 ROS 处于平衡状态;但高浓度纳米 CeO_2 胁迫下,藻细胞受到的 ROS 伤害超出了自身所能调节的范围,导致 SOD 活力显著下降,从而对细胞产生损伤^[3]。

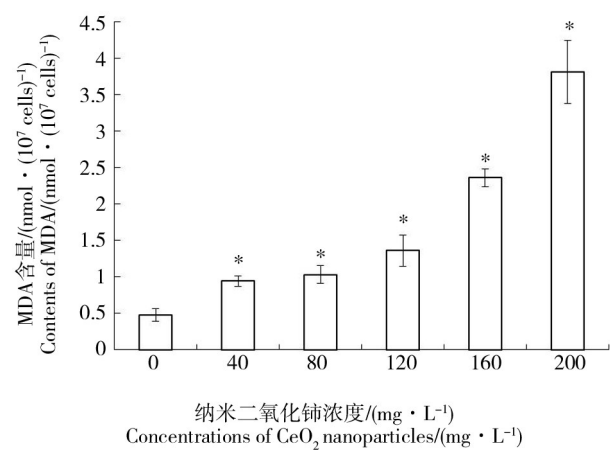


图 5 不同浓度纳米 CeO_2 对蛋白核小球藻中 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effects of nanoparticle CeO_2 on the MDA content of *C. pyrenoidosa*

2.4 纳米 CeO_2 胁迫下 *C. pyrenoidosa* 中 MDA 含量的变化

在环境胁迫条件下,生物体内的 ROS 平衡被打破,过多的 ROS 会引起膜脂过氧化,并产生丙二醛(MDA)。因 MDA 是膜脂氧化的产物,现已被广泛用作衡量膜脂过氧化损伤的指标。纳米 CeO_2 胁迫对 *C. pyrenoidosa* 中 MDA 含量的影响如图 5 所示。由图 5 可知,随着纳米 CeO_2 浓度的增加,细胞中 MDA 含量逐渐升高,在 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米 CeO_2 处理组中,藻细胞内 MDA 含量达到最大值($3.81\text{ nmol} \cdot (10^7\text{ cells})^{-1}$),表明随着纳米 CeO_2 浓度的升高,膜脂过氧化加剧,细胞损伤严重。有研究显示,纳米 CeO_2 可能是通过氧化还原的方式使藻细胞内产生并积累大量 ROS,破坏细胞内有序结构和正常的代谢功能,引起藻细胞内叶绿素含量、蛋白质含量以及酶活力等发生改变,从而影响藻类的生长、发育过程^[21-22]。

综上,研究结果显示低浓度纳米 CeO_2 ($\leq 80\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对 *C. pyrenoidosa* 的生长及色素的合成具有一定的促进作用,而高浓度($>80\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时表现出毒性效应。此外,纳米 CeO_2 胁迫下,藻细胞内会发生显

著的生理生化反应,如 SOD 活力先上升后下降,MDA 含量逐渐升高,表明藻细胞中 ROS 的产生和消除间的平衡被破坏,ROS 的积累导致细胞膜被破坏,从而抑制了 *C. pyrenoidosa* 的生长。

通讯作者简介:邓祥元(1982—),男,海洋生物学博士,副教授,主要研究方向为微藻环境生物学,发表学术论文 30 余篇。

参考文献(References):

[1] 白伟,张程程,姜文君,等. 纳米材料的环境行为及其毒理学研究进展[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(2): 174-182
Bai W, Zhang C C, Jiang W J, et al. Progress in studies on environmental behaviors and toxicological effects of nanomaterials [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4 (2): 174-182 (in Chinese)

[2] 李晶,胡霞林,陈启晴,等. 纳米材料对水生生物的生态毒理效应研究进展[J]. 环境化学, 2011, 30(12): 1993-2002
Li J, Hu X L, Chen Q Q, et al. Ecotoxicology of nanomaterials on aquatic organisms [J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(12): 1993-2002 (in Chinese)

[3] 钟秋,何桢,戴安琪,等. 纳米二氧化铈对斜生栅藻的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(2): 299-305
Zhong Q, He Z, Dai A Q, et al. Toxicities of nanoparticulate CeO₂ on *Scenedesmus obliquus* Kütz [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(2): 299-305 (in Chinese)

[4] 熊道文,李政,方涛. 纳米材料的水生态毒理学研究进展[J]. 环境污染与防治, 2009, 31(4): 71-77
Xiong D W, Li Z, Fang T. The advancement of aquatic ecotoxicological research of nanomaterials [J]. Environmental Pollution and Control, 2009, 31(4): 71-77 (in Chinese)

[5] Fang X H, Yu R, Li B Q, et al. Stress exerted by ZnO, CeO₂ and anatase TiO₂ nanoparticles on the *Nitrosomonas europaea* [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 348: 329-334

[6] Zhang H F, He X, Zhang Z Y, et al. Nano-CeO₂ exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations [J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45: 3725-3730

[7] Mittal S, Pandey A K. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: Role of ROS mediated DNA damage and apoptosis [J]. BioMed Research International, 2014: Article ID 891934

[8] Amin K A, Hassan M S, Awad E S T, et al. The protec-

tive effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline [J]. International Journal of Nanomedicine, 2011, 6: 143-149

[9] Xue Y, Luan Q F, Yang D, et al. Direct evidence of hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115: 4433-4438

[10] Cassee F R, van Balen E C, Singh C, et al. Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2011, 41: 213-229

[11] Leung Y H, Yung M M N, Ng A M C, et al. Toxicity of CeO₂ nanoparticles — The effect of nanoparticle properties [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015, 145: 48-59

[12] 邓祥元,樊玲波,高坤,等. 汞胁迫下蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)的生理生化响应[J]. 环境化学, 2012, 31(12): 2012-2013
Deng X Y, Fan L B, Gao K, et al. Physiological and biochemical responses of *Chlorella pyrenoidosa* to the stress of mercury [J]. Environmental Chemistry, 2012, 31(12): 2012-2013 (in Chinese)

[13] Kobraei M E, White D S. Effects of 2,4-dichlorohenoxyacetic acid on Kentucky aglae: Simultaneous laboratory and field toxicity testings [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1996, 31(4): 571-580

[14] Anthony G D, David B, Scott F, et al. Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides* [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009, 55(2): 166-180

[15] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*) [J]. Bacteriological Reviews, 1971, 35(2): 171-205

[16] Deng X Y, Cheng J, Gao K, et al. Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the growth, photosynthetic activity and antioxidant enzymes of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. International Journal of Ecological Science and Environmental Engineering, 2015, 1(1): 1-10

[17] 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: 248-254

[18] Van Hoecke K, Quik J T K, Mankiewicz-Boczek J, et al. Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 43(12): 4537-4546

[19] Angel B M, Vallotton P, Aptea S C. On the mechanism of nanoparticulate CeO₂ toxicity to freshwater algae [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 168: 90-97

[20] Deng X Y, Cheng J, Hu X L, et al. Physiological and biochemical responses of a marine diatom *Phaeodactylum tri-cornutum* exposed to 1-octyl-3-methylimidazolium bromide [J]. Aquatic Biology, 2015, 24(2): 109-115

[21] 张宁, 金星龙, 李晓, 等. 人工纳米材料对藻类的毒性效应研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 6000-6003

Zhang N, Jin X L, Li X, et al. Progress of toxic effects of artificial nano materials on alga [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(10): 6000-6003 (in Chinese)

[22] Röhder L A, Brandt T, Sigg L, et al. Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium (III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152: 121-130 ◆