马乙洮,盛科梦,胥志祥,等.薄层二硫化钼对铜绿微囊藻的毒性效应及机制 [J]. 中国环境科学, 2025,45(7):3994-4002.
Ma Y T, Sheng K M, Xu Z X, et al. Toxic effects and mechanisms of thin-bedded molybdenum disulphide on *Microcystis aeruginosa* [J]. China Environmental Science, 2025,45(7):3994-4002.

薄层二硫化钼对铜绿微囊藻的毒性效应及机制

马乙洮[1,2],盛科梦[1],胥志祥[1,2*],李思沅[1],卢 浩[1],李彩情[1],熊金瑞[1],潘学军[1,2] (1.昆明理工大学环境科学与工程学院,云南 昆明 650500；2.西南联合研究生院,云南 昆明 650092)

摘要：本研究以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)为受试生物,探究薄层二硫化钼(MoS_2)的水生毒性效应及相关作用机制.结果表明,不同浓度 MoS_2 处理组(0.01~50mg/L)在短期内(0~7d)抑制藻胞生长,其中在培养 6d 后 50mg/L MoS_2 对藻胞生长达到最高抑制作用(75%).在 7d 内 MoS_2 对藻胞色素、有机物合成表现出较强抑制作用(色素低于0.5mg/L,多糖和蛋白质低于0.05mg/mL,脂质低于2×10^5FU),且浓度越高抑制作用越强.随暴露时间延长至14~21d,抑制作用相对减轻,但高浓度处理组(50,10mg/L)仍对藻胞生长存在较强毒害作用.MoS_2 光照产生 ROS 攻击藻胞使其发生急性/慢性氧化应激,0~7d 内藻胞活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶活性(SOD)以及胞外分泌物(EPS)升高,暴露 14~21d 后氧化应激水平逐渐恢复.然而,高浓度(50,10mg/L)暴露下,氧化应激反应超过藻胞的承载能力使其发生膜损伤.研究结果为 MoS_2 纳米材料的水生生态毒性和评估提供基础数据和理论支撑.

关键词：铜绿微囊藻；纳米二硫化钼；氧化应激；生长抑制；生态风险
中图分类号：X503 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)07-3994-09

Toxic effects and mechanisms of thin-bedded molybdenum disulphide on *Microcystis aeruginosa*. MA Yi-tao[1,2], SHENG Ke-meng[1], XU Zhi-xiang[1,2*], LI Si-yuan[1], LU Hao[1], LI Cai-qing[1], XIONG Jin-rui[1], PAN Xue-jun[1,2] (1.Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China；2.Southwest united Graduate School, Kunming 650092, China). *China Environmental Science*, 2025,45(7)：3994~4002

Abstract：This study investigated the aquatic toxicity effects and underlying mechanisms of thin-layer molybdenum disulfide (MoS_2) using the *Microcystis aeruginosa* as a model organism. The results demonstrated that various concentration of MoS_2 (0.01~50mg/L) significantly inhibited algal growth during short-term exposure (0~7 days), with the highest inhibition rate of 75% observed in the 50mg/L group after 6days of cultivation. Throughout the 7-day exposure phase, MoS_2 exhibited strong dose-dependent inhibitory effects on pigment biosynthesis and biomass accumulation, as evidenced by concentration-responsive reduction in pigment content (<0.5mg/L), polysaccharides and proteins (<0.05mg/mL), and lipids synthesis (<2×10^5 fluorescence units). When exposure duration extended to 14~21 days, the observed inhibitory effects gradually alleviated, though high-concentration treatments (50 and 10mg/L) still maintained substantial growth inhibition. Mechanistic analysis revealed that photoactivated MoS_2 nanoparticles generated reactive oxygen species (ROS), triggering acute/chronic oxidative stress in algal cells. During the initial 0~7 day exposure, intracellular ROS levels, superoxide dismutase (SOD) activity, and extracellular polymeric substances (EPS) secretion all significantly increased. These oxidative stress indicators progressively normalized during prolonged exposure (14~21 days). However, under high-concentration exposure conditions (50 and 10mg/L), the oxidative stress response exceeded cellular defense capacity, ultimately causing irreversible membrane damage. These findings provide fundamental data and theoretical support for ecological risk assessment of MoS_2 nanomaterials in aquatic environments.

Key words：*Microcystis aeruginosa*；molybdenum disulfide；oxidative stress；growth inhibition；ecological risk

纳米技术及其相关产业的迅速发展在给人们生产生活带来便利的同时,也加剧了其对水生生物可能产生的毒性风险[1].二维过渡金属硫化物(2D-TMDCs)作为一类由过渡金属和硫组成的二维材料,因其具有特殊能带结构,在众多领域有广阔的应用前景[2-3].其中,二硫化钼(MoS_2)作为 2D-TMDCs 中的代表性纳米材料,具有小尺寸(天然原子级厚度)、大比表面积、可调节带隙宽度、较强的电子磁性以及卓越的光电特性和机械性能等[4-5],因而被广泛应用于可持续化学工业、医学、储能、等众多领域[6].相较于多层块状 MoS_2,单层或薄层 MoS_2 具备更为优良的机械和化学性能,在环保和生物医学领域获

收稿日期：2024-12-02
基金项目：国家自然科学基金资助项目(42307500);昆明理工大学分析测试基金资助项目(2023T20220174);云南省大学生创新创业项目(S202210674068)
* 责任作者, 副教授, xuzhixiang@kust.edu.cn

得更为广泛的应用[7].由于 MoS_2 研究历史较短,目前更多集中于其材料制备与应用拓展,且多以 mg/L 为研究用量单位,关于其环境浓度,污染现状尚未报道[8-9].MoS_2 不仅会对水生生物产生直接毒性作用,还能通过食物链传递和生物富集作用最终危害人体健康[1,10-11].目前, MoS_2 在污染水平、环境行为和潜在风险等方面的研究较少[2,9].

微藻是水生环境系统食物链的基础单元,其在维持水生生态系统的养分循环和能量代谢扮演重要角色[12-13].有研究指出几乎所有常用的纳米材料在水体中均对藻类细胞展现出毒性[1].其主要通过诱导氧化应激反应、膜损伤、脂质过氧化和代谢调节等机制对藻类产生毒性效应.氧化应激是众多纳米材料发挥毒性作用的主要途径.氧化应激会导致藻细胞光合色素分泌改变,进而改变其能量代谢[1].藻类细胞通过刺激抗氧化系统来清除纳米材料诱导产生的活性氧,同时产生一定胞外分泌物保护自身免受伤害,进而表现出防御行为[14-15].尽管这些藻类在纳米材料暴露下的响应有相似之处,但不同藻类对纳米材料的敏感程度和反应差异性显著[13,16-17].

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)作为蓝藻水华的优势藻属,具有生长周期短、易获取、易培养观察以及对污染物的高敏感性等特点,被广泛用于污染物生态毒性评估[18-23].众多研究已证实纳米材料对 *M. aeruginosa* 存在显著的生态毒性影响.然而,不同纳米材料对藻类生理生态的影响存在显著差异.例如,纳米塑料短期暴露可刺激微囊藻毒素释放并加剧水华[21];低浓度纳米 TiO_2 则通过吸附重金属 Cd 促进铜绿微囊藻生长并缓解其毒性[19];而 MoS_2 通过诱导羊角月牙藻分泌胞外分泌物(EPS)并改变其组分特性,最终调控藻类生长动态[15].本研究选取 *M. aeruginosa* 为模式生物,从光合作用、胞内有机物含量、氧化应激以及 EPS 分泌四方面探究 MoS_2 对 *M. aeruginosa* 的生物效应与作用机制.旨在了解 2D−TMDCs 纳米材料对初级生产者的潜在风险.

1　材料与方法

1.1　实验材料

M. aeruginosa 购自中国科学院水生生物研究所(FACHB 905).MoS_2 纳米材料(货号 XF137,单层含量>99%,粒径范围 20~500nm,厚度 1~5nm)购自江苏先锋纳米材料科技有限公司.实验化学试剂包括:蒽酮(上海麦克林生化科技有限公司,分析纯)、葡萄糖(上海麦克林生化科技有限公司,分析纯)、丙酮(广东化学试剂工程技术研究开发中心,分析纯)、乙醇(天津市大茂化学试剂厂,分析纯)、尼罗红(上海易恩化学技术有限公司,荧光分析试剂纯度 95%)、BG11 培养基(青岛海博生物技术有限公司,HB8793).实验用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒(SOD)、过氧化氢酶试剂盒、PI 染料购自碧云天生物技术有限公司;丙二醛试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司;活性氧检测试剂盒购自亚科因生物技术有限公司.实验用超纯水(18.25MΩ/cm)由本课题组纯水机(美国 Millipore 公司)制备.

1.2　实验方法

1.2.1　铜绿微囊藻接种与培养　将 *M. aeruginosa* 藻种转移到 500mL 无菌锥形瓶中,按接种物:培养基=1:20(体积比)进行复活培养.培养条件设置如下:光照强度 3000lux、光/暗比 12h/12h、温度(25±1) ℃、转速为 120r/min.后续实验选取处于对数时期生长状态良好的铜绿微囊藻进行 MoS_2 毒理实验.

1.2.2　MoS_2 工作液的配制以及 MoS_2+铜绿微囊藻体系构建　根据相关研究所选浓度梯度变化[9,15,24],本研究选择以 50,10,5,1,0.01mg/L MoS_2 均质液为实验浓度,通过构建 MoS_2＋铜绿微囊藻的短期及长期培养体系,探究 MoS_2 对 *M. aeruginosa* 生长繁殖的影响.MoS_2 工作液的配制流程如下:超声波均质 MoS_2 于超纯无菌水中,制备储存液(2mg/mL),并避光常温保存.后续使用磷酸盐缓冲液(PBS)对 MoS_2 储备液进行梯度稀释配制工作液.将扩培后处于对数生长期且生长状态良好的铜绿微囊藻 80W 超声处理 30min,各取 200mL 加入到灭菌的 500mL 锥形瓶中,确保铜绿微囊藻的初始接种密度相同.向锥形瓶中加入配制好的 MoS_2 工作溶液,使铜绿微囊藻藻液与 MoS_2 体系内 MoS_2 终浓度为 50,10,5,1, 0.01mg/L(高浓度处理组:50,10mg/L;低浓度处理组:0.01,1mg/L),置于摇床中培养(培养周期 21d).实验需要设置对照组(无 MoS_2),且每组设置 3 个生物学重复样本.

1.2.3　MoS_2 胁迫下铜绿微囊藻生长趋势测定　已有研究表明 MoS_2 在光照下能够抑制菌、藻等水生生物生长繁殖[8,15].为探究 MoS_2 在短期、长期时间

内对 *M. aeruginosa* 增殖的影响进而反应其毒性效应,本研究测定了 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,14,17,21d 内不同浓度 MoS_2 胁迫下 *M. aeruginosa* 的藻密度,进一步分析其生长趋势并算出抑制率和比生长速率.在为期 21d 的藻类培养实验中,精确好每日取样时间,充分摇匀藻液后依次从设定的不同 MoS_2 浓度梯度的藻液里各取 1mL.使用旋涡振荡混合器充分震荡均匀后,各取 20μL 藻液,使用细胞计数仪(Countstar 细胞计数仪)计数.通过计算生长抑制率(IR)[18]和比生长速率(μ)以评估 MoS_2 对 *M. aeruginosa* 的生长影响.计算公示如下:

$$IR=(C-T)/C\times100\% \quad (1)$$

$$\mu=(P_t-P_0)/(t-t_0) \quad (2)$$

式中:C 和 T 分别表示对照组与实验组藻细胞密度(cells/mL);P_t 代表不同处理时间(t)后藻细胞数量(10^6 细胞数/mL)进行 ln 处理;P_0 代表初始时间(t_0)藻细胞数量(10^6 细胞数/mL)进行 ln 处理;t 单位为 d.

1.2.4 MoS_2 胁迫下铜绿微囊藻生理生化指标测定 光合作用是微藻生存和生长的基本过程,而光合色素是光合作用的物质基础[15,25-26].当藻细胞受到外部环境胁迫时,其光合色素含量改变将会影响藻细胞的生存繁殖[12].叶绿素 a 作为最重要的光合色素,能够直接吸收光能并将其转化为电能.类胡萝卜素则是一种有效抗氧化剂,可清除细胞体内的单线态氧 ($^1O_2$) 和其他 ROS[25,27]. 为评估 MoS_2 对 *M. aeruginosa* 光合作用的影响,本研究测定了叶绿素 a 以及类胡萝卜素的含量变化.采用乙醇提取法测定 *M. aeruginosa* 叶绿素 a 和类胡萝卜素含量,具体操作步骤如下:取 1mL 藻液,4℃、12000r/min 离心 10min,弃去上清液,得到藻泥沉淀;加入 1mL 的 99.9%乙醇,充分摇晃使乙醇与藻泥混合均匀,在 4℃下暗处理 8h 以充分提取色素;提取结束后再次于 4℃、12000r/min 条件下离心 10min,取上清液,以 99.9%乙醇溶液作为空白对照,分别在 649,665 和 470nm 波长下测定其吸光度值.叶绿素 a 和类胡萝卜素含量计算公式如下:

$$叶绿素\ a=13.7\times A_{665}-5.76\times A_{649} \quad (3)$$

$$类胡萝卜素=(1000\times A_{470}-2.05\times 叶绿素\ a)/245 \quad (4)$$

微藻细胞内含多种有机物质,如蛋白质、脂质等,这些物质在维持藻细胞生命活动中起到关键作用[16].当藻细胞受到外界环境胁迫时,其代谢活动会发生变化进而影响其生长繁殖[14].本研究通过测定培养 7,14,21d 的藻胞内多糖、蛋白质、脂质 3 类主要有机物含量,进一步探究不同浓度 MoS_2 对 *M. aeruginosa* 的毒性影响.首先进行总有机物的提取,方法如下:取暴露于不同浓度 MoS_2 内 7,14,21d 的 *M. aeruginosa*3mL,在 4℃下,以 12000r/min 离心 10min,弃上清液收集藻胞.在藻胞内加入 3mL PBS 溶液重悬,后使用细胞破碎仪冰浴破碎,超声工作时间 4s,间隔时间 9s,功率 160W,破碎 6min.破碎液在 4℃、以 12000r/min 离心 10min,取上清液作为待测样品.分别采用蒽酮-硫酸法测多糖含量,尼罗红染色法测脂质含量,BCA 蛋白浓度测定试剂盒分析蛋白质浓度[28].

1.2.5 铜绿微囊藻氧化应激相关指标测定 MoS_2 因其特殊的能带结构,在光照条件下表面会产生空穴与电子,进而将水中氧气转化为不同种类的 ROS[3,14].这些 ROS 会引发藻类细胞内部发生氧化应激,导致细胞膜通透性发生改变.为应对 ROS 压力,藻细胞会产生抗氧化应答(SOS)[29].基于此,本文检测了 MoS_2 胁迫下(7,14,21d) *M. aeruginosa* 胞内 ROS 产生、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA).同时,利用透射电子显微镜(TEM)分析 MoS_2 胁迫下 *M. aeruginosa*,的微观结构变化[30].MoS_2 胁迫下 *M. aeruginosa* 活性氧[14]、SOD 以及 MDA 分别采用相应的试剂盒进行测定.同时,利用 TEM 分析藻细胞膜及胞内细胞器损伤情况.

1.2.6 铜绿微囊藻胞外 EPS 检测分析 微藻 EPS(紧密层、松散层和粘液层)主要由多糖、蛋白质和脂质构成,其对保护微藻免受损伤具有重要作用[13,31-33].研究表明,藻类可以利用胞内代谢分泌 EPS 形成保护层以减少纳米材料的侵入[34].纳米材料的内化能力在 EPS 存在下可被最大限度降低,从而减少对藻细胞的损伤[35].本研究采用荧光分光光度计(日本日立,HITACHI F-7000)测定 MoS_2 处理前后 *M. aeruginosa* EPS.首先进行藻类分层 EPS 的提取:取 20mL 藻液在 4℃下以 4000r/min 离心 15min,上清液通过 0.45μm 滤膜,得到粘液层(SL-EPS);藻胞重悬浮于 20mL 0.05%的 NaCl 缓冲液中,在 4℃下以 5220r/min 离心 15min,上清液通过 0.45μm 滤膜,得到松散附着型胞外聚合物(LB-EPS);继续将藻胞重悬浮于 20mL 0.05%的 NaCl 缓冲液中,置于 60℃恒温

水浴 30min,冷却后在 4℃下以 10000r/min 离心 15min,收集通过 0.45μm 滤膜的上清液,得到紧密附着型胞外聚合物(TB-EPS)[31].LB-EPS 和 TB-EPS 中多糖和蛋白质采用蒽酮-硫酸法和 BCA 法进行测定.同时,将铜绿微囊藻中提取的各层 EPS,通过总有机碳分析仪(Elementar vario TOC cube,德国 Elementar),将样品定量为 5mgC/L.使用荧光分光光度计扫描提取后的 EPS,设置扫描速度 12000nm/min,激发波长[18]和发射波长[15]的扫描范围为 200~550nm,狭缝间距 5nm.在数据处理时,利用 MATLAB 中的 PARAFAC 分析进行拉曼矫正,以此消除水峰和不同荧光峰重叠对结果的影响.

1.2.7　数据统计与分析　实验数据采用平均值±标准误差表示,采用 IBM SPSS Statistics 27.0.1 统计分析软件进行单因素方差分析(ANOVA),采用 Tukey 法进行多重比较,$P<0.05$ 表示具有显著性差异,采用 Graphpad Prism 10.1.2 和 Origin 2024 绘图.

2　结果与分析

2.1　MoS_2 影响铜绿微囊藻生长

如图 1 所示,无论 MoS_2 处理与否,*M. aeruginosa* 在 21d 内均不断生长,但不同处理组之间的生长趋势存在差异.总体上,相较于对照组,MoS_2 处理组内藻类的生长在短期时间内均受到一定抑制,随时间延续抑制作用逐渐降低.其中,低浓度处理组抑制作用较小,而高浓度处理组抑制作用较明显.图 1(a, b)中 50mg/L MoS_2 处理组藻类浓度以及比生长速率随时间变化均低于其他组.同时,在培养 6d 后其对藻类生长达到最高抑制作用,而 10mg/L MoS_2 条件下藻类浓度、比生长速率以及生长抑制率相较于对照组也呈现一定变化趋势.低浓度处理组在短期时间内抑制藻类生长,但其抑制率较低且抑制时间较短,表明高浓度 MoS_2 处理组相较于低浓度 MoS_2 处理组对 *M. aeruginosa* 的生长抑制以及毒性效应更明显.

如图 1(c)所示,胁迫 1d 后,各处理组相较于对照组均受到了较明显抑制作用,高浓度处理组藻细胞密度明显低于对照组.其毒性效应可能包括如下 3 点:由于高浓度 MoS_2 堆叠覆盖在铜绿微囊藻表面,阻碍其进行光合作用等相关生理活动进而使得其生长受到抑制[15];高浓度 MoS_2 在光照下可能产生更多 ROS 使较多藻细胞氧化应激死亡[9,36];薄层 MoS_2 在水溶液中“切割”藻细胞膜使其内容物泄出死亡[23,37].当胁迫时间在 4d 之后,低浓度处理组甚至出现促进 *M. aeruginosa* 生长现象,说明适当的氧化应激可能刺激藻类生长繁殖,加重水体富营养化[20].随着暴露时间的增长,各处理组抑制率均有一定程度的减弱,比生长速也基本上保持一致(图 1(b)).这一结果表明,尽管纳米材料的添加在短时间内确实会对微藻产生一定毒性效应并影响微藻的生长,但随时间延续,微藻能够逐步适应这种不利环境,达到一种“解毒”效果.

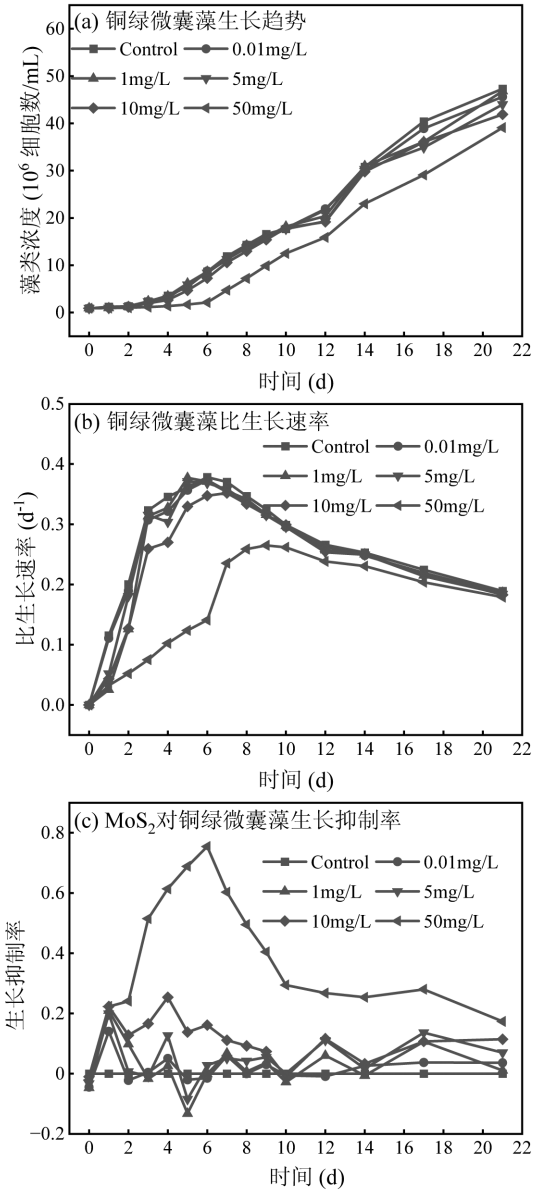


图 1　MoS_2 对铜绿微囊藻生长的影响

Fig.1　Effects of various concentrations of MoS_2 on the growth of *M. aeruginosa* at different incubation times

2.2 MoS_2 影响铜绿微囊藻光合色素合成

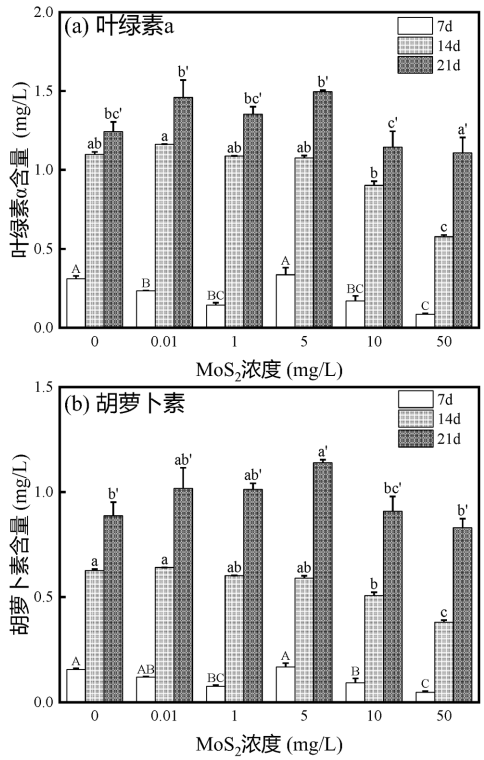


图 2 MoS_2 对铜绿微囊藻光合色素合成的影响

Fig.2 Effects of various concentrations of MoS_2 on photosynthetic pigment synthesis of *M. aeruginosa* at different incubation times

字母表示铜绿微囊藻暴露于不同浓度 MoS_2 不同时间下光合色素合成的差异性,字母相同表示差异性不显著(P>0.05),字母不同表示差异性显著(P<0.05)

如图 2 所示,随时间增长,两种光合色素含量均呈现上升趋势,这与藻胞生长曲线契合(图 1(a)).在暴露于 MoS_2 7d 时,两种光合色素均呈现相同趋势,即处理组相较于对照组出现降低趋势.这可能是由于短期急性暴露导致藻胞出现氧化应激等生理反应,进而抑制微藻生长,并导致光合色素合成降低.然而,随着暴露时间增加,藻胞逐渐适应 MoS_2 胁迫的环境,甚至在某些浓度的 MoS_2 长期慢性暴露下,藻会潜在地受到刺激而增殖,进而使相应的光合色素含量高于对照组[15,38].在暴露 21d 后,叶绿素 a 与类胡萝卜素含量在 MoS_2 低浓度处理组条件下高于对照组,其余低于对照组.有研究表明,MoS_2 作为一种光催化剂在光照条件下会产生 ROS 攻击细胞[8].同时,其低浓度条件下,MoS_2 更为均质,其粘附在细胞表面并通过与细胞的磷脂双分子层发生置换反应改变细胞膜结构使内溶物外泄[37].基于此,推测低浓度 MoS_2 对藻胞的毒性影响主要集中于短期急性氧化应激,且对光合作用影响较小.因此,随着时间延长,某些低浓度 MoS_2 刺激藻胞增殖,并使其光合色素产量高于对照组,高浓度 MoS_2 则由于其氧化应激产生较多 ROS,会对藻胞生存产生负面影响.同时,MoS_2 堆叠现象严重,其覆盖在藻胞表面会抑制光合作用的发生[30,39].因此,MoS_2 高浓度处理组胁迫下,其光合色素产生量始终低于对照组.

2.3 MoS_2 影响铜绿微囊藻胞内有机物合成

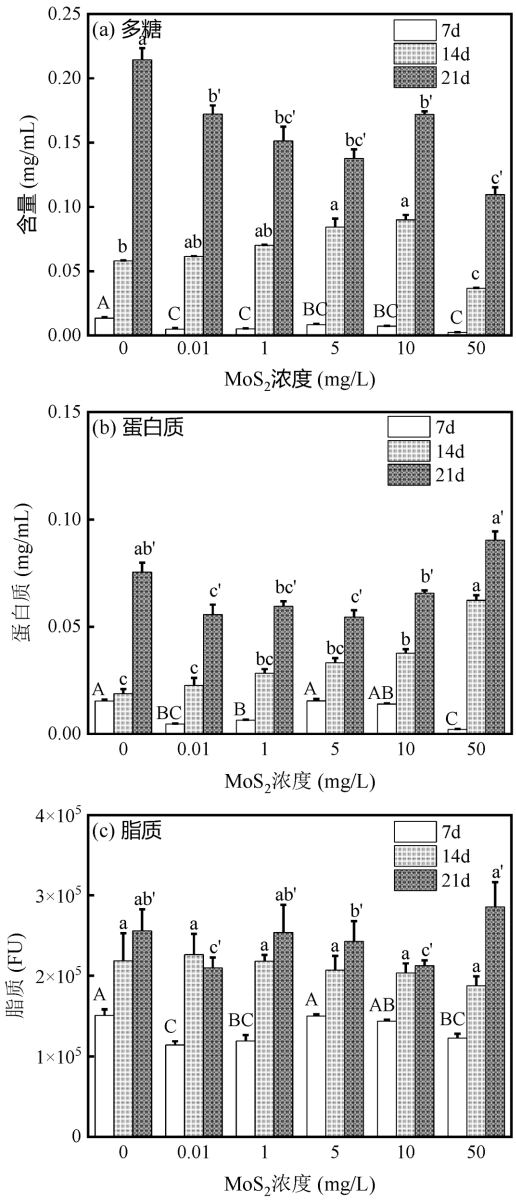


图 3 MoS_2 对铜绿微囊藻有机物合成的影响

Fig.3 Effects of various concentrations of MoS_2 on the synthesis of intracellular organic matter in *Microcystis aeruginosa* at different incubation times

字母表示铜绿微囊藻暴露于不同浓度 MoS_2 不同时间下胞内有机物合成的差异性,字母相同表示差异性不显著(P>0.05),字母不同表示差异性显著(P<0.05)

结果如图 3 所示,在整个培养时期内,不同浓度 MoS_2 胁迫下,*M. aeruginosa* 胞内多糖、蛋白质、脂质含量均随时间不断增加.这与其光合色素含量的变化趋势一致(图 2),进一步证明即使有 MoS_2 胁迫,*M. aeruginosa* 也会随时间延续不断生长繁殖.MoS_2 胁迫 7d 后,处理组的 3 种物质含量相较于对照组均有一定程度的下降,说明在短时间内,MoS_2 对 *M. aeruginosa* 产生一定毒性影导致藻胞死亡,有机物含量降低.同时,在 MoS_2 处理体系内,3 种物质均在 5mg/L 的 MoS_2 胁迫下达到最大值,呈现“倒 U”趋势,猜测 5mg/L 的 MoS_2 体系会以“选择性压力”形式潜在刺激 *M. aeruginosa* 生长并分泌有机物.

随着 MoS_2 暴露时间的延长,各处理组有机物含量均增加.在暴露 14d 后,多糖总体呈现先升高后降低的趋势,在 10mg/L 的 MoS_2 体系下达到峰值,而蛋白质呈现逐渐升高趋势,脂质则呈现逐渐降低趋势.当暴露 21d 时,各处理组的有机物含量均高于 14d,说明虽然 MoS_2 暴露在短时间内对 *M. aeruginosa* 的生长有一定抑制作用,但随着暴露时间的增长,该作用会有所减小.即长期 MoS_2 暴露条件下,*M. aeruginosa* 能适应不利的环境[21-22].相比于培养 7d,在培养 14,21d 内,3 种有机物存在处理组高于对照组的情况,证明 MoS_2 处理胁迫会间接刺激藻类细胞的相关生理活动,导致有机物大量分泌以保护藻细胞得以生存.

2.4　MoS_2 引起铜绿微囊藻氧化应激及细胞损伤

如图 4 所示,不同浓度 MoS_2 均对铜绿微囊藻细胞有破坏作用,且损坏作用与浓度正相关.MoS_2 可通过胞吞胞吐等方式进入藻细胞内部[40],导致质壁分离、类囊体解体、中央拟核区出现空洞、细胞膜完整性受损等.相比之下,对照组细胞完整且形态良好.

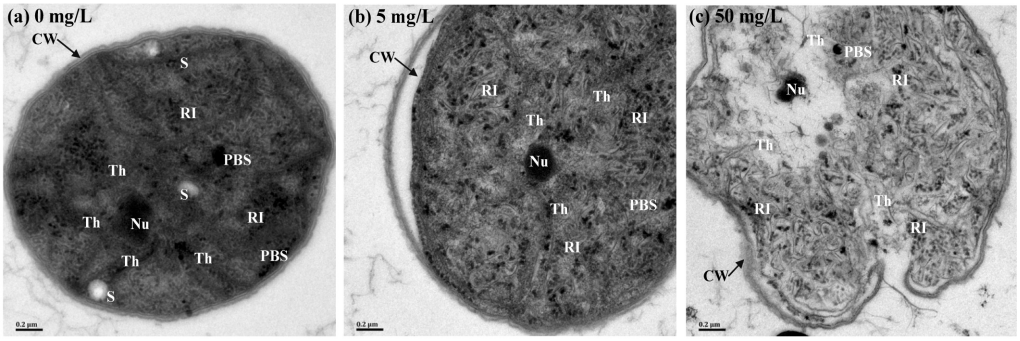


图 4　MoS_2 暴露损坏铜绿微囊藻细胞膜及内部结构

Fig.4　Algal surface or internal structure damage following exposure to different concentrations of MoS_2

Nu:拟核;S:淀粉粒;PBS:藻胆体;RI:核糖体;Th:类囊体;CW:细胞壁

ROS 热图结果进一步指出,细胞内 ROS 强度随时间延续逐渐降低,但高浓度 MoS_2(50mg/L)处理组内 ROS 强度始终较高(图 5(a)).这表明 MoS_2 在短期内会导致微藻细胞内产生 ROS,且产生量与浓度正相关.然而,随着微藻逐渐适应 MoS_2 胁迫环境,ROS 强度随时间增加而降低.

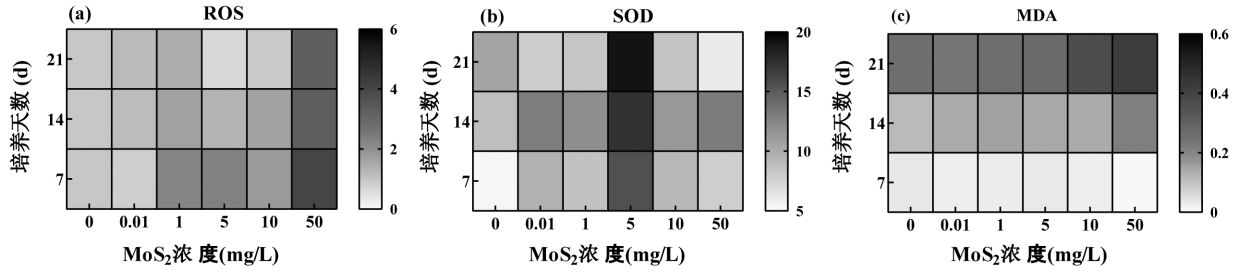


图 5　MoS_2 胁迫铜绿微囊藻产生氧化应激

Fig.5　MoS_2 induced oxidative stress in *Microcystis aeruginosa*

细胞 SOS 应答会分泌一系列还原酶或还原性物质以降低 ROS 水平至正常,从而维持细胞正常生

理活动[29,36,41].SOD 作为一种广泛存在于生物体内的酶,其主要清除超氧阴离子(O_2^-),减少氧化应激[40].如图 5(b)所示,对照组 SOD 活性随时间增加而增加,而实验组 SOD 随时间增加先升高后降低,表明 *M. aeruginosa* 先受胞外 MoS_2 产生 ROS 的影响发生氧化应激,然后逐渐适应并降低 SOD 应答.

MDA 是细胞氧化应激的直接产物,反映细胞膜脂质过氧化程度[28,42].在暴露初期,藻细胞膜损伤并不严重.随着暴露时间的增长,虽然微藻能够适应不利的环境,但过多积累的 ROS 仍会引起脂质过氧化,尤其高浓度 MoS_2 会导致脂质过氧化现象加剧(图 5(c)).

2.5 MoS_2 影响铜绿微囊藻 EPS 分泌

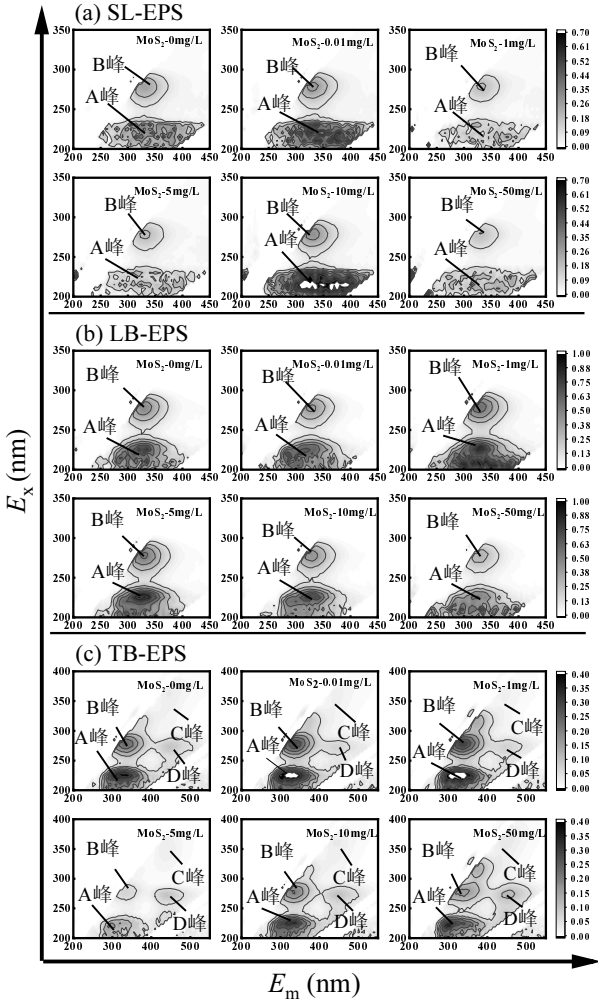


图 6 MoS_2 影响铜绿微囊藻 EPS 合成与分泌

Fig.6 MoS_2 affected EPS synthesis and secretion in *M. aeruginosa*

3 种 EPS 的三维荧光光谱主要分为 2 个区域:E_x/E_m=200~250/250~450nm (A)、250~300/300~400nm(B).除此之外,TB-EPS 在 E_x/E_m=250~300/400~500nm(C)、350~400/420~480nm(D)也有荧光响应值.A 峰和 B 峰为类酪氨酸和类色氨酸成分,通常被认为是蛋白类物质,C 峰和 D 峰是腐殖质物质[43].根据三维光谱图荧光响应信号强度变化,可以反映出不同浓度 MoS_2 胁迫下铜绿微囊藻 EPS 中蛋白质和腐殖质含量的变化情况.

总体而言,低浓度 MoS_2 暴露促进 EPS 分泌,而高浓度则抑制 EPS 分泌(图 6).具体地,SL-EPS 在 0.01 和 10mg/L 的 MoS_2 条件下蛋白响应信号强,而其余处理组相较于对照组呈现抑制作用(图 6(a)).对于 LB-EPS,其蛋白质荧光强度呈现先增高后降低趋势,且在 1mg/L MoS_2 处理浓度下最高(图 6(b)).

TB-EPS 在 MoS_2 浓度≤1mg/L 时,荧光强度逐渐增加,在 5mg/L MoS_2 处理组降低后又逐渐增加.同时,腐殖质物质呈现随浓度增加逐渐增加趋势(图 6(c)).产生上述结果的原因可能是因为低浓度 MoS_2 产生的 ROS 使得 *M. aeruginosa* 分泌更多 EPS 保护自身免受伤害,而高浓度 MoS_2 导致藻胞死亡,其胞内物质会释放到外部环境中.它们与胞外 EPS 混杂,导致荧光信号增强.此外,MoS_2 暴露下,SL-EPS、LB-EPS 和 TB-EPS 强度存在不同变化,表明不同 EPS 在保护藻胞免受 ROS 影响方面发挥的作用不同.

3 结论

3.1 MoS_2 胁迫抑制 *M. aeruginosa* 生长,且抑制作用随浓度呈正相关,随时间呈负相关.*M. aeruginosa* 在受到 MoS_2 的胁迫后,随时间延伸逐渐适应该环境,达到“解毒”效果.

3.2 MoS_2 短期暴露(0~7d)显著抑制 *M. aeruginosa* 光合色素和有机物质合成,同时导致藻胞内发生急性氧化应激,出现质壁分离现象;暴露 7~21d,藻细胞内 SOS 响应增加,胞外 EPS 分泌增加抵抗 MoS_2 的侵害,抑制作用减轻.

3.3 MoS_2 高浓度处理(10,50mg/L)条件下,藻细胞内 ROS 与 MDA 分泌增多,藻细胞质壁分离更明显.SOD 酶活性以及 EPS 分泌在低浓度 MoS_2(0.01,1,5mg/L)条件下较高,该条件下藻细胞自身 SOS 响应能抵御 MoS_2 的毒性侵害.

参考文献：

[1] Lau Z L, Low S S, Ezeigwe E R, et al. A review on the diverse interactions between microalgae and nanomaterials: Growth variation, photosynthetic performance and toxicity [J]. Bioresource Technology, 2022,351:127048.

[2] Xu Z, Zhao D, Lu J, et al. Multiple roles of nanomaterials along with their based nanotechnologies in the elimination and dissemination of antibiotic resistance [J]. Chemical Engineering Journal, 2023,455: 140927.

[3] Kalantar‐Zadeh K, Ou J Z, Daeneke T, et al. Two‐dimensional transition metal dichalcogenides in biosystems [J]. Advanced Functional Materials, 2015,25(32):5086‐5099.

[4] Wang Z Y, Mi B X. Environmental applications of 2D molybdenum disulfide (MoS_2) nanosheets [J]. Environmental Science & Technology, 2017,51(15):8229–8244.

[5] Tu C C, Peng P W, Lin L Y. Weight ratio effects on morphology and electrocapacitive performance for the MoS_2/polypyrrole electrodes [J]. Applied Surface Science, 2018,444:789–799.

[6] Ma Y, Li B, Yang S. Ultrathin two‐dimensional metallic nanomaterials [J]. Materials Chemistry Frontiers, 2018,2(3):456–467.

[7] Jia P, Bu T, Sun X, et al. A sensitive and selective approach for detection of tetracyclines using fluorescent molybdenum disulfide nanoplates [J]. Food Chemistry, 2019,297:124969.

[8] Mutalik C, Krisnawati D I, Patil S B, et al. Phase‐dependent MoS_2nanoflowers for light‐driven antibacterial application [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2021,9(23):7904–7912.

[9] Xu Z, Hu S, Zhao D, et al. Molybdenum disulfide nanosheets promote the plasmid‐mediated conjugative transfer of antibiotic resistance genes [J]. Journal of Environmental Management, 2024,358:120827.

[10] Li F M, Liang Z, Zheng X, et al. Toxicity of nano‐TiO_2on algae and the site of reactive oxygen species production [J]. Aquatic Toxicology, 2015,158:1–13.

[11] Zou W, Wan Z P, Zhao C X, et al. Impact of algal extracellular polymeric substances on the environmental fate and risk of molybdenum disulfide in aqueous media [J]. Water Research, 2021, 205:117708.

[12] Tang Y, Xin H, Yang S, et al. Environmental risks of ZnO nanoparticle exposure on *Microcystis aeruginosa*: Toxic effects and environmental feedback [J]. Aquatic Toxicology, 2018,204:19–26.

[13] Nguyen M K, Moon J Y, Lee Y C. Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020,201:110781.

[14] Dell'annunziata F, Folliero V, Giugliano R, et al. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of gram‐negative bacteria [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021,22(11):5985.

[15] Xu Z, Zhao D, Zheng X, et al. The ecotoxicity of single‐layer molybdenum disulfide nanosheets on freshwater microalgae Selenastrum capricornutum [J]. Process Safety and Environmental Protection, 2023,175:426–436.

[16] Chen F, Xiao Z, Yue L, et al. Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications [J]. Environmental Science‐Nano, 2019,6(4):1026–1042.

[17] Huang B, Tang J, He H, et al. Ecotoxicological effects and removal of 17β‐estradiol in *chlorella* algae [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019,174:377–383.

[18] Yalon E, Mcclellan C J, Smithe K K H, et al. Energy dissipation in monolayer MoS_2electronics [J]. Nano Letters, 2017,17(6):3429‐3433.

[19] 辛元元,陈金媛,程艳红,等.纳米 TiO_2 与重金属 Cd 对铜绿微囊藻生物效应的影响 [J]. 生态毒理学报, 2013,8(1):23–28.
Xin Y Y, Chen J Y, Cheng Y H, et al. Biological effects of nano‐TiO_2 and heavy metal Cd on *M. aeruginosa* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013,8(1):23–28.

[20] 张一卉,赵以军,程　凯.富营养化水体中微囊藻、菌、病毒数量关系初步研究 [J]. 环境科学与技术, 2010,33(4):20–23.
Zhang Y H, Zhao Y J, Cheng K. Quantitative relationship among *Microcystis aeruginosa*, *Bacteriaplankton* and *Virioplankton* in eutrophication water bodies [J]. Environmental Science & Technology, 2010,33(4):20–23.

[21] 冯阿伟,孙梓橦,王玥玮,等.环境浓度微/纳米塑料对铜绿微囊藻的毒性效应 [J]. 环境科学学报, 2023,43(10):362–370.
Feng A W, Sun Z T, Wang Y W, et al. Toxic effects of micro/ nanoplastics with environmental concentration onMicrocystis aeruginosa [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2023,43(10):362–370.

[22] 徐成龙,吴　培,陈　波,等.二类生物可降解微塑料对铜绿微囊藻的毒性效应研究 [J]. 中国环境科学, 2024,38(8):6495‐6503.
Xu C L, Wu P, Chen B, et al. Toxic effects of class II biodegradable plastics on Microcystis aeruginosa [J]. China Environmental Science, 2024,38(8):6495–6503.

[23] 孙　凤,吴　磊,叶　硕,等.活性炭对铜绿微囊藻胞外有机物的吸附规律 [J]. 中国环境科学, 2025,45(3):1546‐1555.
Sun F, Wu L, Ye S, et al. Adsorption properties of extracellular organic matters from *Microcystis aeruginosa* by activated carbon [J]. China Environmental Science, 2025,45(3):1546‐1555.

[24] 纪丽鹏,王　月,褚福浩,等.纳米材料对微藻的生态毒性效应及机理 [J]. 生态毒理学报, 2022,17(5):175‐189.
Ji L P, Wang Y, Chu F H, et al. Ecological effects and toxic mechanisms of nanomaterials to microalgae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022,17(5):175–189.

[25] Song C, Liu Z, Wang C, et al. Different interaction performance between microplastics and microalgae: The bio‐elimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC‐0025 [J]. Science of the Total Environment, 2020,723:138146.

[26] Simkin A J, Kapoor L, Doss C G P, et al. The role of photosynthesis related pigments in light harvesting, photoprotection and enhancement of photosynthetic yield in planta [J]. Photosynthesis Research, 2022,152(1):23–42.

[27] Fiedor J, Fiedor L, Haessner R, et al. Cyclic endoperoxides of β‐carotene, potential pro‐oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen [J]. Biochimica Et Biophysica Acta‐Bioenergetics, 2005,1709(1):1–4.

[28] Zheng X, Xu Z, Zhao D, et al. Double‐dose responses of *Scenedesmus capricornus* microalgae exposed to humic acid [J]. Science of the Total Environment, 2022,806:150547.

[29] Yan K, Liu Y, Yang Q, et al. Evaluation of the novel nanoparticle material ‐ CdSe quantum dots on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*: Concentration‐time‐dependent responses [J].

Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019,171:728–736.

[30] He M, Yan Y, Pei F, et al. Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles [J]. Scientific Reports, 2017,7:15526.

[31] 王 奇,葛姝洁,于恒国,等.重金属镉对铜绿微囊藻的分层胞外聚合物淬灭机制研究 [J]. 安庆师范大学学报(自然科学版), 2020,26(3): 76–83.
Wang Q, Ge S J, Yu H G, et al. Study on quenching mechanism of the layered extracellular polymer of microcystis aeruginosa by heavy metal cadmium [J]. Journal of Anqing Normal University (Natural Science Edition), 2020,26(3):76–83.

[32] Freixa A, Acuna V, Sanchis J, et al. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms [J]. Science of the Total Environment, 2018,619:328–337.

[33] Xiao R, Zheng Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications [J]. Biotechnology Advances, 2016,34(7):1225–1244.

[34] Xie Q, Liu N, Lin D, et al. The complexation with proteins in extracellular polymeric substances alleviates the toxicity of Cd (II) to *Chlorella vulgaris* [J]. Environmental Pollution, 2020,263:114102.

[35] Verneuil L, Silvestre J, Randrianjatovo I, et al. Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein−like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue [J]. Carbon, 2015,88:113–125.

[36] Liu T, Sun L, Zhang Y B, et al. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2022,36(1):e22942.

[37] Wu R, Ou X, Tian R, et al. Membrane destruction and phospholipid extraction by using two−dimensional MoS_2 nanosheets [J]. Nanoscale, 2018,10(43):20162–20170.

[38] Luo S−W, Alimujiang A, Balamurugan S, et al. Physiological and molecular responses in halotolerant *Dunaliella salina* exposed to molybdenum disulfide nanoparticles [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021,404:124014.

[39] Wu D, Yang S, Du W, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on *Microcystis aeruginosa* and microcystins production and release [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019,377:1–7.

[40] Ma J, Meng X, Zhang S, et al. Physiological regulation related to the decline of Alexandrium catenella [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013,33 (13):3978−3986.

[41] Nosaka Y, Nosaka A Y. Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis [J]. Chemical Reviews, 2017,117(17): 11302–11336.

[42] Gholamhosseini A, Banaee M, Zeidi A, et al. Individual and combined impact of microplastics and lead acetate on the freshwater shrimp (Caridina fossarum): Biochemical effects and physiological responses [J]. Journal of Contaminant Hydrology, 2024,262:104325.

[43] Zhou J, Wang J J, Baudon A, et al. Improved Fluorescence Excitation−Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Fluorescent Dissolved Organic Matter [J]. Journal of Environmental Quality, 2013,42(3):925–930.

作者简介：马乙洮(2001−),女,云南大理人,昆明理工大学硕士研究生,主要从事纳米材料生态安全与健康风险研究.发表论文 2 篇.2942169341@qq.com.