

DOI: 10.20103/j.stxb.202402200354

黄中情, 沈剑, 封吉猛, 杨艳芬, 孙天阳, 熊雨院, 王欣泽. 不同浮游植物对 17 β -雌二醇的去除与降解. 生态学报, 2024, 44(23): 10650-10661.

Huang Z Q, Shen J, Feng J M, Yang Y F, Sun T Y, Xiong Y Y, Wang X Z. Removal and degradation of 17 β -estradiol by different phytoplankton. Acta Ecologica Sinica, 2024, 44(23): 10650-10661.

不同浮游植物对 17 β -雌二醇的去除与降解

黄中情^{1,2,3}, 沈 剑^{1,2,3,*}, 封吉猛^{1,2,3}, 杨艳芬^{2,3}, 孙天阳^{2,3}, 熊雨院^{2,3}, 王欣泽^{1,2,3}

1 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240

2 云南洱海湖泊生态系统国家野外科学观测研究站, 大理 671000

3 上海交通大学云南(大理)研究院, 大理 671000

摘要: 甾体雌激素 (SEs) 即使在低浓度 (ng/L) 级别, 也会干扰人类和水生生物内分泌系统的正常生理功能, 对水生态系统健康造成威胁。浮游植物是湖泊生态系统的重要组成部分, 藻细胞个体小、数量多、比表面积大, 具有去除和降解环境中类固醇雌激素的能力。筛选出适合修复 SEs 污染水体的浮游植物对降低 SEs 的生态风险具有重要意义。该研究以长孢藻 (*Dolichospermum* sp.)、水华束丝藻 (*Aphanizomenon flos-aquae*)、铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、盘星藻 (*Pediastrum* sp.)、四尾栅藻 (*Scenedesmus quadricauda*) 和直链藻 (*Melosira* sp.) 6 种洱海常见优势藻类为研究对象, 探讨了不同浓度梯度 (10、50、100 和 1000 ng/L) 的 17 β -雌二醇 (E2 β) 对不同藻类生长的影响, 以及不同藻类对 E2 β 的去除与降解能力。结果表明: 不同浮游植物对 E2 β 的生理响应存在明显差异。10、50 和 100 ng/L 的 E2 β 促进水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和四尾栅藻的光合作用和比生长速率升高, 1000 ng/L 的 E2 β 暴露体系则表现出抑制作用。不同浓度的 E2 β 对直链藻生长呈现“低抑高促”的影响。藻细胞对暴露试验浓度的 E2 β 具有较强的去除能力, 强化了 E2 β 的降解代谢作用, 促进活性高、危害性大的 E2 β 降解为活性较小的 E1 和 E3, 降低了水环境中 E2 β 的生态风险。相较于其他藻类, 长孢藻对 E2 β 的耐受性较弱, 不适用于修复 E2 β 污染水体。铜绿微囊藻对 10 和 50 ng/L 的 E2 β 的去除率达 88% 和 93%, 降解率达 60% 和 73%, 适用于修复 10 和 50 ng/L 的 E2 β 污染水体。水华束丝藻、盘星藻和四尾栅藻对 50 和 100 ng/L 的 E2 β 的去除率范围分别为 75%—76%、86%—89% 和 83%—89%, 降解率分别为 64%—66%、63%—64% 和 70%, 适用于修复 50 ng/L 和 100 ng/L 的 E2 β 污染水体。直链藻对 1000 ng/L 的 E2 β 的去除率和降解率分别达 84% 和 54%, 可作为修复 1000 ng/L E2 β 污染水体的优势藻种。

关键词: 17 β -雌二醇; 藻类; 生长; 去除; 降解

Removal and degradation of 17 β -estradiol by different phytoplankton

HUANG Zhongqing^{1,2,3}, SHEN Jian^{1,2,3,*}, FENG Jimeng^{1,2,3}, YANG Yanfeng^{2,3}, SUN Tianyang^{2,3}, XIONG Yuyuan^{2,3}, WANG Xinze^{1,2,3}

1 School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 National Observation and Research Station of Erhai Lake Ecosystem in Yunnan, Dali 671000, China

3 Yunnan Dali Research Institute of Shanghai Jiao Tong University, Dali 671000, China

Abstract: Steroid estrogens (SEs) can interfere with the normal physiological functions of the endocrine system in humans and aquatic organisms even at low concentrations (ng/L), and pose a threat to the health of aquatic ecosystems. Phytoplankton is an important part of the lake ecosystem. Algae cells are small, large in number and specific surface area, and have the ability to remove and degrade steroids and estrogens in the environment. Screening phytoplankton suitable for remediating SEs-contaminated water bodies is of great significance for reducing the ecological risks of SEs. The study

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1700400); 云南省基础研究计划 (202201AU070001, 202301AT070001)

收稿日期: 2024-02-20; **网络出版日期:** 2024-08-29

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: sjlnts@sjtu.edu.cn

investigated the effects of 17 β -estradiol (E2 β) on the growth of six common dominant algae in the Erhai Lake, including *Dolichospermum* sp., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Pediastrum* sp., *Scenedesmus quadricauda*, and *Melosira* sp., and explored the removal and degradation capacities of different algae for E2 β with different concentrations of 10, 50, 100, and 1000 ng/L. The findings indicated that there were notable differences in the physiological responses of various phytoplankton to E2 β . Specifically, 10, 50 and 100 ng/L E2 β promoted the photosynthesis and specific growth rate of *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Pediastrum* sp., and *Scenedesmus quadricauda*, while 1000 ng/L E2 β exposure system showed inhibitory effect. Different concentrations of E2 β exhibited a “low-suppressing, high-promoting” effect on the growth of *Melosira* sp.. Algal cells exhibited robust removal capabilities for E2 β at the exposure concentrations tested, thereby enhancing its metabolic degradation. This promoted the conversion of the highly active and potentially harmful E2 β into less reactive species such as E1 and E3, thereby reducing the ecological risks associated with E2 β in aquatic environments. In comparison to other phytoplankton species, *Dolichospermum* sp. demonstrated a weaker tolerance to E2 β and was not suitable for remediation of E2 β -contaminated water bodies. The removal rates of 10 and 50 ng/L E2 β by *Microcystis aeruginosa* were 88% and 93%, and the degradation rates were 60% and 73%, which was appropriate for the remediation of E2 β -contaminated water bodies at concentrations of 10 and 50 ng/L. The removal rates of 50 and 100 ng/L E2 β by *Aphanizomenon flos-aquae*, *Pediastrum* sp. and *Scenedesmus quadricauda* were 75%—76%, 86%—89%, and 83%—89%, respectively, and the degradation rates were 64%—66%, 63%—64%, and 70%, respectively, which were suitable for remediation of E2 β -contaminated water bodies at concentrations of 50 and 100 ng/L. The removal rate and degradation rate of 1000 ng/L E2 β by *Melosira* sp. were 84% and 54%, respectively, which could serve as a dominant species for the remediation of E2 β -contaminated water bodies at concentrations of 1000 ng/L.

Key Words: 17 β -estradiol; algae; growth; removal; degradation

甾体雌激素 (SEs) 如 17 α -乙炔雌二醇 (EE2)、17 β -雌二醇 (E2 β)、雌三醇 (E3) 和雌酮 (E1) 等因其强烈的雌激素效应,影响内源性激素的产生、活性和代谢等干扰人类和动物内分泌系统的正常生理功能的潜在危害而引起了全世界的关注^[1-2]。研究发现,工业生产、医疗和生活废水排放、畜禽养殖、粪便作为肥料的土地施用,以及农业生态系统的径流均会使得大量的 SEs 进入生态系统^[3,4]。以往的研究发现欧洲河流中的雌激素浓度范围为 0.1—10 ng/L^[1];在美国河流中,SEs 浓度范围为 0.31—41 ng/L^[5],在中国云南滇池湖泊水体中,E1 的浓度达到 471 ng/L^[6]。即使是低浓度的 SEs,也会破坏水生生物内分泌系统的正常功能^[2]。研究表明,环境雌激素会抑制浮游植物细胞生产光合色素,破坏细胞氧化平衡,干扰藻类群落结构和初级生产力^[7]。高浓度的 SEs 还会增加微囊藻毒素和藻类胞外聚合物的释放量,对水生态系统健康造成威胁^[8]。SEs 具有较高的生物富集因子,容易在生物体内蓄积^[9],可通过食物链富集作用影响高营养级生物的觅食效率和丰度,干扰食物链的结构和功能^[10-11]。SEs 自身的性质和周围环境直接影响其降解速率,部分低浓度的 SEs 的自然降解速率低于较高浓度。研究发现,浓度范围为 10—1000 ng/g 的 E2 β 降解速率随初始浓度增加而降低,10—400 μ g/L 的 E2 β 降解速率随初始浓度增加而增加^[12-13]。因此,低浓度 (ng/L) 的 SEs 对水环境的生态风险不容忽视。

浮游植物分布广泛,是湖泊生态系统的重要组成部分,也是水生生态系统中的重要初级生产者和食物链的重要环节,在水生生态系统的物质循环与能源流动过程中承担重要角色^[14]。已有研究发现,藻类对 SEs 有强耐受性,雌二醇 (E2) 对螺旋鱼腥藻 (*Anabaena spiroides*) 的 EC50 值可达 14 mg/L,远高于湖泊水体的 E2 值^[15]。藻细胞个体小、数量多、比表面积大,具有良好去除环境中雌激素的潜能^[7]。已研究证实,微藻具有去除和降解类固醇雌激素的能力^[16-17],且微藻对雌激素的降解速率与藻细胞总表面积和藻细胞浓度正相关^[18-19]。在 250 W 高压汞灯照射下,水环境中 EE2 基本不发生光降解,而一定量的小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 和柱胞鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*) 促进 EE2 的光降解率分别达

18.9%、17.6%和 20.3%^[19]。衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)对 E2 和 EE2 的去除率分别为 86%和 17%^[20]。可见,浮游植物适用于修复雌激素污染水体。

本研究通过室内模拟实验,通过调整水体 E2 β 浓度,考察藻细胞对 E2 β 的生理响应,以及藻细胞外部溶液中 E2 β 和其代谢产物浓度变化。目的在于:探究 E2 β 对不同种类藻细胞生长的影响规律,以及不同藻类对 E2 β 的去除与降解代谢的影响,将为合理利用浮游藻类修复 SEs 污染的水生态环境提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 藻细胞采集与鉴定

实验所用藻类采集自洱海(图 1),洱海(25°36′—25°58′N,100°5′—100°18′E)是中国云南省生态系统脆弱的典型高原淡水湖泊,洱海流域雌二醇(E2)的产生量为 55.97 kg/a^[21]。藻类通过 200 目,60 μ m 的浮游植物收集筛网收集。收集后,用纯净水冲洗几次,然后用干燥空气曝气。然后将 0.1 mL 的藻类样品转移到血球计数板中,用光学显微镜(BX43, Olympus, Japan)进行鉴定和分类。上述过程重复三次,以减少误差。

1.2 试验设计

跟踪监测了 2020 年 1 月至 2023 年 9 月洱海藻类群落分布特征和优势种生消演替规律,共检出浮游植物 7 门 98 属,分别为绿藻门(Chlorophyta)、蓝藻门

(Cyanophyta)、硅藻门(Bacillariophyta)、甲藻门(Pyrophyta)、金藻门(Chrysophyta)、隐藻门(Cryptophyta)和裸藻门(Euglenophyta)。总体上,洱海湖区藻类群落组成主要以绿藻、蓝藻和硅藻为主,它们的藻属数约占总藻属数的 89.80%。然后从混合藻液中分离出 6 种常见的优势藻种,分别为长孢藻(*Dolichospermum* sp.)、水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、盘星藻(*Pediastrum* sp.)、四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)和直链藻(*Melosira* sp.),进行室内模拟试验。

将分离出来的单一藻种转入改良 BG-11 培养基(表 1),于室内(25 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 进行扩增培养,设置光照强度为 2000 lx,光暗比为 16 h:8 h,定时振荡,每天振荡 2—3 次,以模拟真实环境。当各藻种细胞密度达 10⁶ 个/L 时,按照低浓度(10、50、100 ng/L)和高浓度(1000 ng/L)在对应培养瓶中添加 E2 β 标液,每个处理设置三个平行。并于第 1、2、3、4、5、6、7 天分别测定藻细胞叶绿素 a、最大光合活性(F_v/F_m)、细胞比生长速率和细胞膜通透性。并于暴露试验的第 7 天测定藻细胞外部溶液中的 E2 β 、E1 和 E3 浓度。

1.3 试验测定

1.3.1 仪器与试剂

固相萃取-酸催化解离-气相色谱质谱联用(SPE-GC/MS,德国 Thermo Fisher Scientific 公司),固相萃取柱(CNW HC-C18 SPE,中国上海安普公司),自动进样器(TriPlusRSH,中国赛默飞公司),固相萃取装置(SBAB-57044,中国上海安谱公司),氮吹仪(ND100-1,中国杭州瑞诚公司)。

标准品雌酮 3-硫酸钠(E1-3S, C₁₈H₂₁NaO₅S)、17 β -雌二醇 3-(β -D-葡萄糖苷)钠盐(E2-3G, C₂₄H₃₂O₈) (分析纯,加拿大 TLC 公司),标准品雌酮 3-(β -D-葡萄糖苷)钠盐(E1-3G, C₂₄H₂₉NaO₈)、17 β -雌二醇 3-硫酸钠盐(E2-3S, C₁₈H₂₃NaO₅S)、雌三醇-3-O- β -D 葡萄糖苷钠盐(E3-3G, C₂₄H₃₂O₉·Na) (分析纯,中国上海赛可锐生



图 1 藻类采集点位

Fig.1 Algae collection points

物公司)。标准品雌酮(E1, C₁₈H₂₂O₂, 分析纯)、17 α -雌二醇(E2 α , C₁₈H₂₄O₂, 分析纯)、17 β -雌二醇(E2 β , C₁₈H₂₄O₂, 分析纯)、雌三醇(E3, C₁₈H₂₄O₃, 分析纯)、及内标物灭蚁灵(Mirex, C₁₀Cl₁₂, 色谱纯)和无水吡啶(优级纯, 中国阿拉丁试剂公司)。

表 1 改良 BG-11 培养基的成分
Table 1 The components modified BG-11 medium

试剂 Reagent	浓度/(mg/L) Concentration	试剂 Reagent	浓度/(mg/L) Concentration
硝酸钠 NaNO ₃	1500	硼酸 H ₃ BO ₄	2.86
七水合硫酸镁 MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	四水合氯化锰 MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
柠檬酸 Citric acid	60	硫酸锌 ZnSO ₄	0.22
柠檬酸铁铵 Fe(NH ₄)C ₆ H ₅ O ₇ ·4H ₂ O	60	钼酸钠 Na ₂ MoO ₄	0.39
乙二胺四乙酸二钠 Na ₂ EDTA	1	五水合硫酸铜 CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
二水合氯化钙 CaCl ₂ ·2H ₂ O	36	六水合硝酸钴 Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049
磷酸氢二钾, 三水 K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40	硅酸钠 Na ₂ SiO ₄	30
碳酸钠 Na ₂ CO ₃	20		

1.3.2 测定方法

(1) 藻细胞叶绿素 a、最大光合活性、比生长速率和细胞膜通透性的测定

藻细胞叶绿素 a 和最大光合活性(F_v/F_m)用浮游植物荧光仪(PHYTO-PAM-II, 德国瓦尔茨仪器公司; 检测限值=0.2 $\mu\text{g/L}$ Chl)进行测量^[22]。

藻细胞比生长速率用紫外分光光度计测定 690 nm 下的波长, 按照公式(1)计算:

$$\text{藻细胞比生长速率} = [\ln(\text{OD}_{690\text{nm}, t}) - \ln(\text{OD}_{690\text{nm}, t_0})] / (t - t_0) \quad (1)$$

式中, $\text{OD}_{690\text{nm}, t_0}$ 为第一天的光密度, $\text{OD}_{690\text{nm}, t}$ 为选定一天的光密度。

细胞膜通透性用相对电导率计算, 取适量藻液于烧杯中, 用电导率仪测定电导率, 记为 R_1 , 然后将烧杯置于水浴锅中, 沸水浴 20 min, 冷却至室温后再次测定藻液电导率, 为总电导率, 记为 R_2 。用公式(2)计算^[23]:

$$\text{相对电导率}(\%) = R_1/R_2 \times 100\% \quad (2)$$

(2) 水质样品预处理及 SPE-GC/MS 分析

本研究采用固相萃取-酸催化解离-气相色谱质谱联用法(SPE-GC/MS, TRACE 1300-ISQ Series Quadrupole 气相色谱质谱联用仪, 中国赛默飞公司)测定 E2 β 、E1 和 E3。将适量藻液置于 10 mL 离心管, 于 5000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 8 min 分离藻细胞(台式高速冷冻离心机, HC-2062), 取上清液, 于 0.45 μm 滤膜过滤, 然后用固相萃取柱进行水质样品的固相萃取, 并使用 20 mL 浓度为 5 mmol/L 的三乙醇胺甲醇溶液对萃取柱中富集的一类固醇雌激素进行洗脱。然后将洗脱液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下通入温和高纯氮气吹至干燥, 加入 1 mL 配置好的酸催化试剂, 玻璃管盖好, 摇匀, 放入保持恒定温度的烘箱中反应一定时间(G 态: 反应温度 80 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 240 min; S 态: 反应温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 20 min), 待反应结束后玻璃管冷却至室温。继续在经酸催化解离后的溶液中加入 1 L 超纯水, 再次进行固相萃取, 将洗脱液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下通入温和高纯氮气吹至干燥, 加入 80 μL 的 N, O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺试剂(含 1% 质量分数的三甲基氯硅烷)和 50 μL 的无水吡啶溶液, 在微波 315 W 条件下衍生化加热 4 min, 冷却至室温后, 再次在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用氮气吹干, 立即加入 400 μL 浓度为 1 mg/L 的内标物灭蚁灵溶解类固醇雌激素, 然后转入 2 mL 进样瓶进行 SPE-GC/MS 分析测定^[19]。

SPE-GC/MS 分析方法为: 采用恒流模式, 以纯度 99.999% 的氦气为载气, 流速为 1.0 mL/min, 不分流进样, 采用全扫描模式(SCAN)定性。使用 Xcalibur 软件进行定性分析确定目标物、标准替代物及内标物所对应的标准谱图以及保留时间, 选择 3—4 个相对丰度较强、分子量较大的碎片离子作为定性离子。选择离子扫描模式(SIM)对丰度最强且与其他物质特征的离子进行定量, 以各目标物的定量离子峰与内标物的定量离子峰的峰面积比值为纵坐标, 以各目标物自由态浓度为横坐标进行线性回归分析, 得到目标物衍生化产物的线性

回归方程,计算分析得出目标物的浓度^[21]。

各藻种对 E2 β 的去除率按公式(3)进行计算:

$$\text{去除率} = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中, C_0 为 E2 β 的初始质量浓度, 单位为 ng/L; C_t 为任意某一时刻 E2 β 的质量浓度, 单位为 ng/L。

1.4 数据分析

使用 Microsoft © Excel 17.0 软件对数据进行分析与处理。考虑显著性阈值始终设置为 5%, 通过方差分析 (ANOVA) 评估平均浓度值之间差异的显著性。采用 SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 对方差分析的正态性和齐性假设进行检验, 均值差异采用 t 检验方法。使用 Origin Pro 2020 软件 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) 绘制图形。

2 结果与分析

2.1 叶绿素 a 和光合活性变化

与对照组相比, 低浓度的 E2 β 明显促进水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和四尾栅藻叶绿素含量增加 ($P < 0.05$), 高浓度 (1000 ng/L) 则呈现明显抑制作用 (图 2)。随暴露时间延长, E2 β 显著促进直链藻叶绿素 a 含量增加 ($P < 0.05$)。四种试验浓度的 E2 β 暴露条件下, 长孢藻光合活性波动变化, 水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和四尾栅藻的光合活性变化均不明显 ($P > 0.05$)。10 ng/L 的 E2 β 抑制直链藻的光合活性, 而高浓度 E2 β

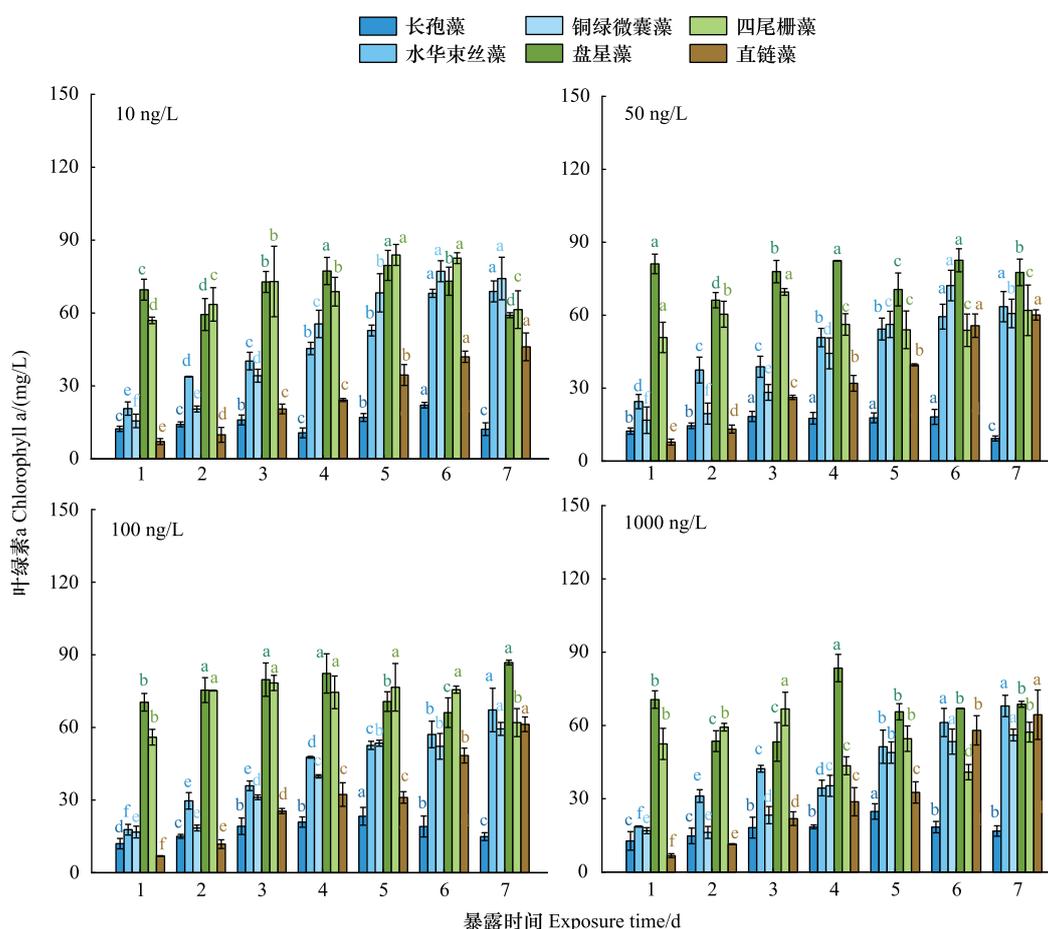


图 2 17 β -雌二醇 (E2 β) 暴露条件下藻细胞叶绿素 a 变化

Fig.2 Changes of chlorophyll a in algal cells under E2 β exposure

数据以平均值 \pm 标准差的形式表示, 小写字母不同表示 As (T) 差异显著 ($P < 0.05$)

暴露体系中,直链藻光合活性较为稳定(图 3)。

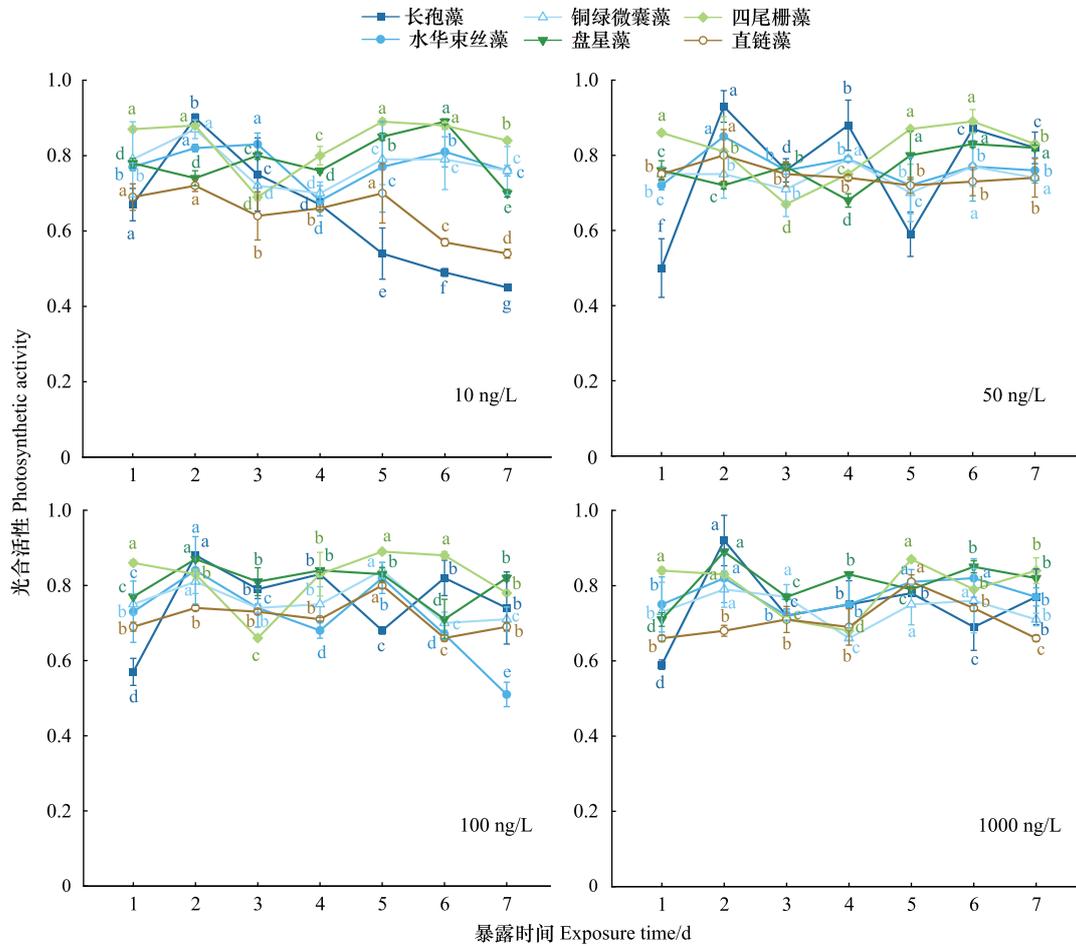


图 3 E2 β 暴露条件下藻细胞光合活性变化

Fig.3 Changes in photosynthetic activity of algal cells under E2 β exposure

2.2 藻细胞比生长速率和细胞膜通透性变化

暴露培养前期(1—3 d),直链藻细胞比生长速率的明显高于其他 5 藻类($P<0.05$),四尾栅藻细胞比生长速率显著低于其他藻类($P<0.05$)。第 5—6 天,E2 β 暴露条件下,水华束丝藻、铜绿微囊藻、直链藻细胞比生长速率均表现为负生长,暴露后期,6 种藻类的生长速率均出现缓慢升高的变化(图 4)。10 和 50 ng/L 的 E2 β 暴露条件下,第 2—5 天,长孢藻细胞膜通透性明显高于其他藻类($P<0.05$);第 4—7 天,10、100 和 1000 ng/L 的 E2 β 暴露使得四尾栅藻细胞膜通透性明显高于其他 5 种藻类。而 E2 β 暴露条件下,水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和直链藻细胞膜的通透性波动幅度较小,且水华束丝藻、铜绿微囊藻细胞膜通透性低于其他藻类(图 5)。

2.3 E2 β 及其代谢产物的浓度变化

暴露培养的第 7 天,在不存在藻细胞的 10、50、100 和 1000 ng/L 的 E2 β 暴露体系中检测到 E2 β 的浓度分别为 4.69、19.48、31.97 和 410.03 ng/L(表 2)。与对照组相比,藻细胞对外部溶液中的 E2 β 具有明显的去除率。铜绿微囊藻对低浓度 10 和 50 ng/L 的 E2 β 的去除率分别为 88%和 93%,明显高于其他 5 种藻类($P<0.05$),盘星藻对 50 和 100 ng/L 的 E2 β 去除率分别为 86 和 89%,水华束丝藻、四尾栅藻和直链藻对 1000 ng/L 的 E2 β 去除率高于其他藻类,直链藻和四尾栅藻对 10、50、100 和 1000 ng/L 的 E2 β 的去除率均大于 80%(图 6)。

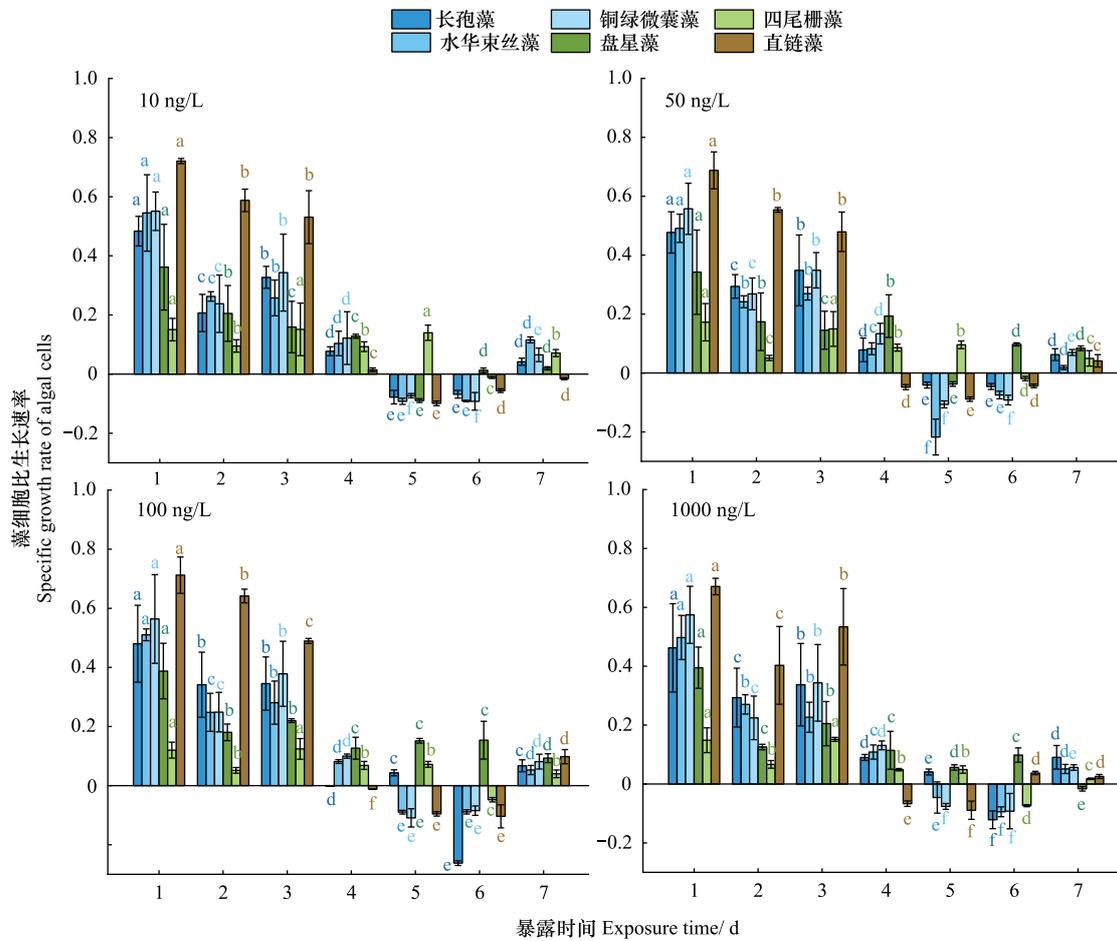


图 4 E2β 暴露条件下藻细胞比生长速率变化

Fig.4 Changes in growth rate of algal cell under E2β exposure

表 2 第 7 天藻细胞外部溶液中 E2β、E1 和 E3 浓度

Table 2 Changes in E2β, E1, and E3 concentrations in the external solution of algal cells on the 7th day

浓度 Concentration		对照组 control group	长孢藻 <i>Dolichosper- mum sp.</i>	水华束丝藻 <i>Aphanizomen-on flos-aquae</i>	铜绿微囊藻 <i>Microcysis aeruginosa</i>	盘星藻 <i>Pediastrum sp.</i>	四尾栅藻 <i>Scenedesmus quadricauda</i>	直链藻 <i>Melosira sp.</i>
10ng/L	E2β	4.69	2.61	2.30	1.20	2.80	2.02	1.80
	E1	0.10	1.91	1.38	0.69	0.93	0.39	0.77
	E3	0.25	1.85	0.92	1.14	1.45	0.56	0.77
50ng/L	E2β	19.48	17.50	12.49	3.51	7.02	5.53	5.49
	E1	1.95	2.39	2.57	1.69	1.95	4.06	1.77
	E3	6.40	19.89	21.67	7.80	10.53	8.85	10.45
100ng/L	E2β	31.97	27.01	23.98	25.13	10.87	16.95	16.00
	E1	3.20	3.68	4.94	12.10	3.02	12.43	7.62
	E3	10.50	30.69	41.61	55.84	16.31	27.12	52.57
1000ng/L	E2β	410.03	250.14	110.02	290.35	300.10	179.97	160.32
	E1	35.65	53.22	61.12	40.05	51.94	59.99	41.82
	E3	148.56	228.85	137.53	170.21	225.08	159.97	146.38

E2β: 17β-雌二醇; E3: 雌三醇; E1: 雌酮

暴露培养 6 d 后,在 6 种藻细胞外部溶液中检测到 E1、E2β 和 E3 三种物质,且藻细胞外部的 E3 占比均明显高于 E1($P<0.05$)。与对照组相比,藻细胞显著促进 E2β 的降解代谢作用($P<0.05$)。相较于其他藻类,

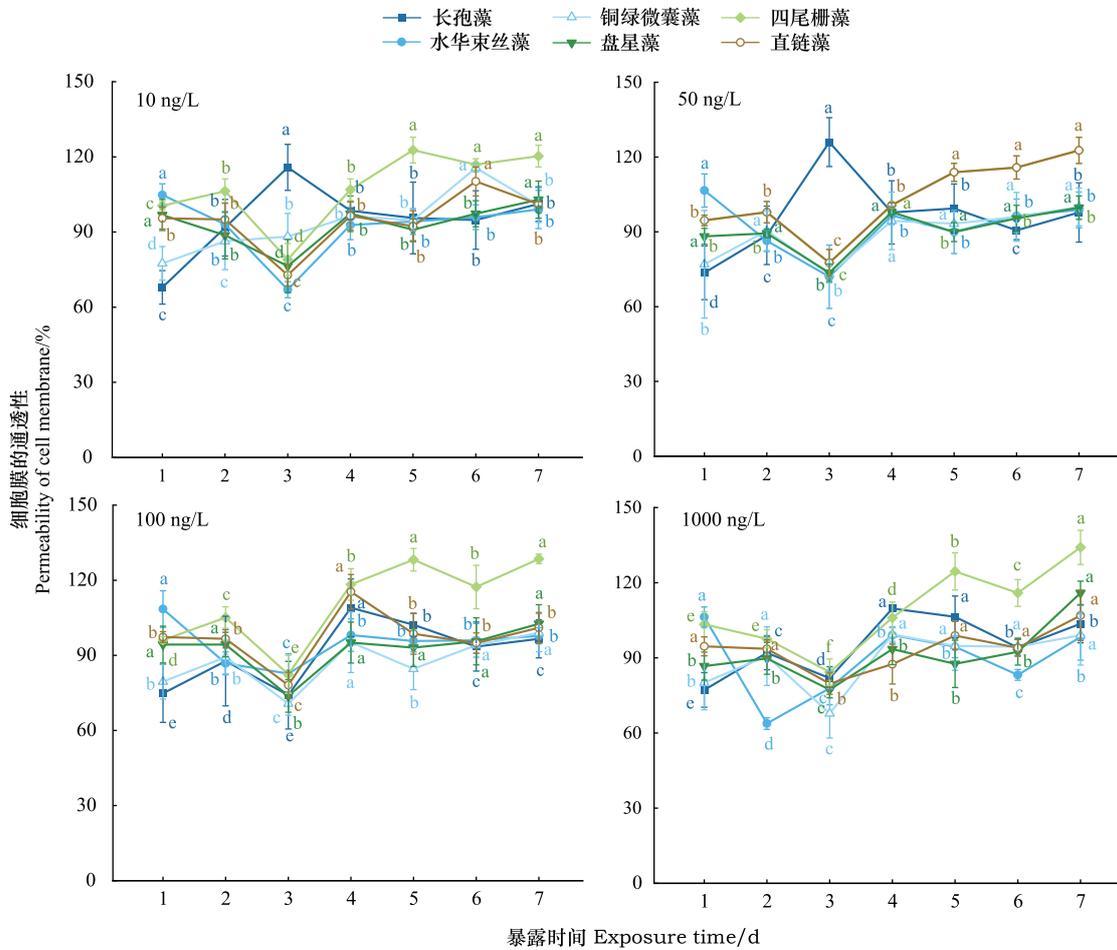


图5 E2 β 暴露条件下藻细胞膜通透性变化

Fig.5 Changes in membrane permeability of algal cells under E2 β exposure

铜绿微囊藻对 10 和 50 ng/L 的 E2 β 降解代谢的促进作用最强,细胞外部溶液中 E2 β 占比分别降至 27% 和 22%。100 ng/L 的 E2 β 暴露体系中,盘星藻细胞外部溶液中 E1 和 E3 的总占比较其他藻类高,达 78%。6 种藻类对高浓度 1000 ng/L 的 E2 β 的降解代谢作用弱于 50 和 100 ng/L 的 E2 β 暴露体系,但相较于其他藻类,水华束丝藻、四尾栅藻和直链藻对 1000 ng/L 的 E2 β 的降解作用明显强于其他藻类($P < 0.05$;图 7)。

3 讨论

3.1 E2 β 对藻细胞生长的影响

许多研究表明,类似于抗生素和微塑料等其他新兴污染物^[24-25],低浓度的 SEs 可被微藻吸收为营养源,并促进藻细胞生长^[20,26]。当 SEs 浓度过高时,细胞会发生氧化损伤,其修复和保护功能可能被破坏,从而影响细胞生长,甚至可能导致藻细胞的死亡^[19]。研究发现,随着 EE2 浓度(100 和 1000 ng/L)的增加,其对微藻生

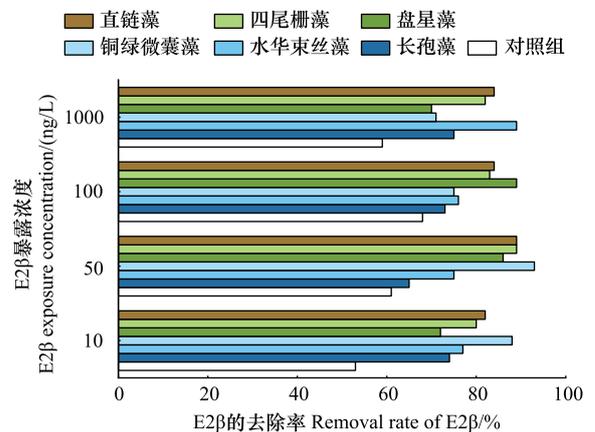


图6 不同种类藻细胞对外部溶液中 E2 β 的去除效率

Fig.6 Removal efficiency of E2 β from different species of algal cells in external solution

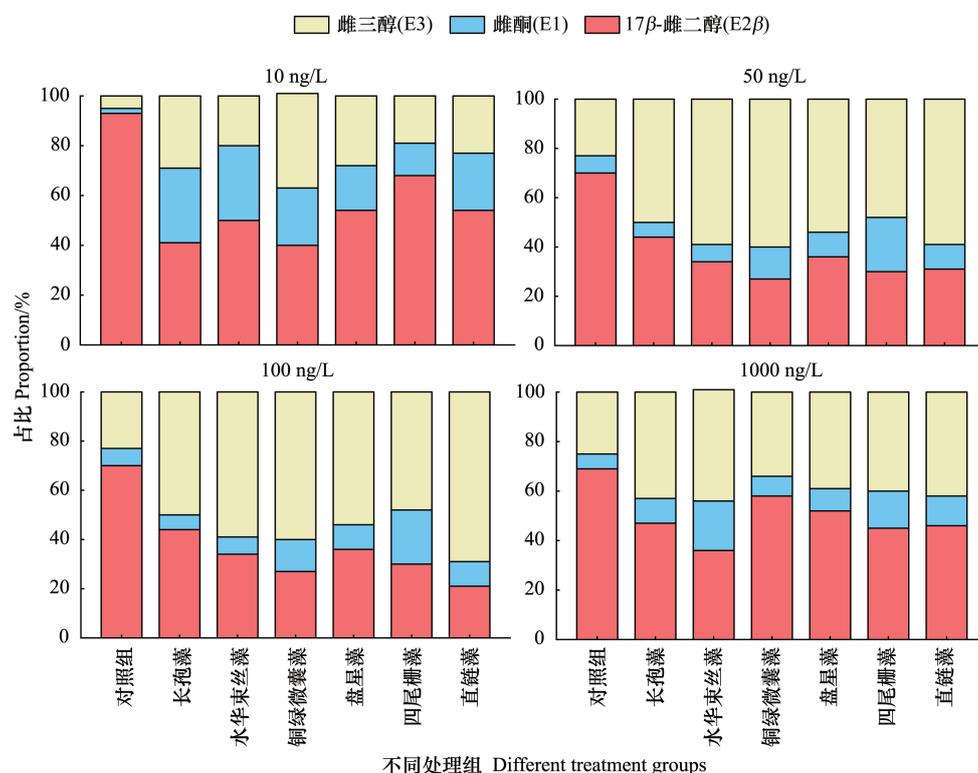


图7 藻细胞外部溶液中 E2 β 、E1 和 E3 浓度占比变化

Fig.7 Changes in the proportion of E2 β , E1, and E3 concentrations in the external solution of algal cells

长的抑制作用增强^[20,27]。由于不同微藻的细胞结构、大小、生长周期、生物活性、营养特性和适宜的培养特性不同^[28],不同微藻对 SEs 的响应存在显著差异^[29–30]。研究发现,双酚 A(BPA)促进微藻光合作用^[31],本研究中,E2 β 对水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和四尾栅藻的叶绿素 a 含量、光合活性表现出“低促高抑”作用,说明低浓度的 E2 β 刺激藻细胞的光合作用^[30,32]。E2 β 对直链藻叶绿素 a 含量表现出“低抑高促”的影响,与高浓度 SEs 促进海洋硅藻 (*Chaetoceros gracilis*) 生长的研究结果相似^[33]。

藻细胞生长速率可反应环境雌激素 (EEs) 对藻细胞生长的影响^[23],暴露前期,直链藻细胞比生长速率明显高于其他 5 种藻类,说明直链藻对高浓度 E2 β 具有较强的耐受性^[33]。暴露中期,水华束丝藻、铜绿微囊藻、直链藻细胞比生长速率表现为负生长,初始细胞部分死亡^[34]。随暴露时间延长,6 种藻类的生长速率均出现缓慢升高的变化,或可解释为暴露培养过程中部分 E2 β 被藻细胞去除与降解代谢,从而减弱了 E2 β 对藻细胞的迫害作用^[35–36]。藻细胞的细胞膜是细胞与外界进行物质交换的重要通道^[27,37],当藻细胞受环境因素迫害时,细胞膜会受到损伤,细胞膜稳定性下降,表现出流动性增强、选择透过性功能降低等反应^[38–39],故通常将细胞膜的通透性作为衡量细胞膜损伤的重要指标^[40]。研究发现,E2 β 暴露条件下,长孢藻和四尾栅藻细胞膜通透性增加,水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和直链藻细胞膜的通透性波动幅度较小,说明试验浓度的 E2 β 对长孢藻和四尾栅藻造成损害,而其他藻类受到 E2 β 的迫害作用较小,细胞膜受到的损伤小,膜功能相对较稳定^[41]。

3.2 藻细胞对 E2 β 的去除与降解

微藻对 SEs 的作用主要包括吸附、生物富集、生物降解、生物转化以及促进 SEs 光催化降解,这些过程通常可以降低水中 SEs 的浓度^[27,42]。研究发现,微藻通过光合作用增加水中溶解氧,有效提高 SEs 的降解速率,从而促进 SEs 的非生物光降解^[43];多糖、蛋白质和脂质等藻类分泌物,也可能在光降解中发挥作用^[42,44]。Liu 等研究发现,淡水微藻 (*Raphidocelis subcapitata*) 对 E2 β 和己烯雌酚 (DES) 的去除率分别达到 82% 和

89.9%^[45], Ruksrithong 等研究结果表明,小球藻(*Chlorella vulgaris*)对 E1 和 E2 的去除率达到 52%和 99%,斜小球藻(*Scenedesmus obliquus*)分别能去除 91%和 99%的 E1 和 E2^[46]。本研究,长孢藻、水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻、四尾栅藻和直链藻 6 种藻细胞对暴露试验浓度的 E2 β 均具有一定的去除能力。与对照组相比,铜绿微囊藻、四尾栅藻和直链藻存在条件下,50 ng/L 的 E2 β 暴露体系中 E2 β 的去除率分别提高了 32%、28%和 28%;水华束丝藻使得高浓度(1000 ng/L) E2 β 的去除率提高了 30%。

E1、E2 和 E3 都是人和动物体内产生的天然雌激素,其中,E2 是初级代谢产物,并具有最高的雌激素活性,E1 为次级代谢产物,E3 被认为是终极代谢产物,雌激素活性最低,E1、E2 和 E3 在明暗条件下可以相互转化^[47-49]。因此,或可将 E2 降解为 E1 和 E3 的过程认为是一个降低 E2 活性迫害作用的解毒过程^[50]。本研究中,在藻细胞外部溶液中检测到 E1、E2 β 和 E3 三种物质,且与对照组相比,藻细胞显著促进藻细胞外部溶液中 E1 和 E3 含量占比,说明藻细胞强化了 E2 β 在环境中降解代谢作用,使得活性高、危害性大的 E2 β 降解代谢为活性较小的 E1 和 E3,降低了水环境中 E2 β 的生态风险^[48-49]。Ma 等研究表明,未存在微藻的条件下,低浓度 SEs 的自然降解率低于高浓度^[12-13]。但本研究发现,铜绿微囊藻对 50 和 100 ng/L 的 E2 β 的降解率达到 73%,直链藻对 100 ng/L 的 E2 β 的降解率达到 79%,说明藻细胞强化了低浓度 E2 β 的降解速率,这与 E2 β 的初始暴露浓度越高,藻细胞对 E2 β 的生物降解性越低的研究结果类似^[51]。

由于不同浮游藻类细胞具有不同的形态和生理特征,其对 E2 β 去除能力也存在差异^[47]。研究发现,铜绿微囊藻对 10 和 50 ng/L 的 E2 β 的去除率达到 88%和 93%,降解率达到 60%和 73%,明显高于其他 5 种藻类,且低浓度的 E2 β 对铜绿微囊藻的生长表现出促进作用,说明铜绿微囊藻可作为修复低浓度 E2 β 污染水体的优势藻种。盘星藻对 50 和 100 ng/L 的 E2 β 具有较高的去除率和降解代谢能力,适用于修复中浓度 E2 β 污染水体。相较于 10 ng/L 的 E2 β 暴露体系,水华束丝藻和四尾栅藻对 50、100 和 1000 ng/L 的 E2 β 的去除率和降解作用较高,但 1000 ng/L 的 E2 β 暴露对水华束丝藻和四尾栅藻的生长表现出抑制作用,说明水华束丝藻和四尾栅藻更适用于修复 50 和 100 ng/L 的 E2 β 污染水体。直链藻对 50、100 ng/L 和 1000 ng/L 的 E2 β 的去除率达到 84%—89%,降解率为 54—59%,但 E2 β 对直链藻生长表现出“低抑高促”作用,表明直链藻是修复高浓度 E2 β 污染的优势藻种。弄清不同藻类对 E2 β 的去除率和降解效率,将为合理利用浮游植物修复 E2 β 污染水体和构建健康水生态系统提供重要的科学依据。

4 结论

将长孢藻、水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻、四尾栅藻和直链藻,6 种洱海常见优势浮游植物用于修复 10、50、100 和 1000 ng/L 的 E2 β 污染水体,发现不同浮游藻类对 E2 β 的生理响应存在明显差异。低浓度的 E2 β 促进水华束丝藻、铜绿微囊藻、盘星藻和四尾栅藻的光合作用和比生长速率,高浓度则表现出抑制作用,而 E2 β 对直链藻生长呈现“低抑高促”的影响。藻细胞对暴露试验浓度的 E2 β 具有较强的去除能力,强化了 E2 β 的降解代谢作用,促进活性高、危害性大的 E2 β 降解为活性较小的 E1 和 E3,降低了水环境中 E2 β 的生态风险。相较于其他藻类,长孢藻对 E2 β 的耐受性较弱,不适用于修复 E2 β 污染水体。铜绿微囊藻可用于修复 10 和 50 ng/L 的 E2 β 污染水体,水华束丝藻、盘星藻和四尾栅藻适用于修复 50 和 100 ng/L 的 E2 β 污染水体,直链藻是修复较高浓度 E2 β 污染水体的优势藻种。

参考文献(References):

- [1] Ciślak M, Kruszelnicka I, Zembrzuska J, Ginter-Kramarczyk D. Estrogen pollution of the European aquatic environment: a critical review. *Water Research*, 2023, 229: 119413.
- [2] Zhang Q Q, Xing C, Cai Y Y, Yan X T, Ying G G. How much do human and livestock actually contribute to steroids emission and surface water pollution from past to the future: a global research. *Science of the Total Environment*, 2021, 772: 145558.
- [3] 陈兴财, 张丰松, 李艳霞, 姜晓满, 张雪莲, 胡柏杨, 童心, 徐凯. 类固醇雌激素在土壤-植物体系中的迁移转化及其毒理效应. *生态学报*, 2021, 41(6): 2525-2535.

- [4] 李艳霞, 韩伟, 林春野, 李雌, 杨明, 张丰松. 畜禽养殖过程中雌激素的排放及其环境行为. 生态学报, 2010, 30(4): 1058-1065.
- [5] Conley J M, Evans N, Cardon M C, Rosenblum L, Iwanowicz L R, Hartig P C, Schenck K M, Bradley P M, Wilson V S. Occurrence and in vitro bioactivity of estrogen, androgen, and glucocorticoid compounds in a nationwide screen of United States stream waters. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(9): 4781-4791.
- [6] Huang B, Wang B, Ren D, Jin W, Liu J L, Peng J H, Pan X J. Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake Catchment, China. *Environment International*, 2013, 59: 262-273.
- [7] Yang W F, Gao X X, Wu Y X, Wan L, Lu C Y, Huang J Y, Chen H J, Yang Y Z, Ding H J, Zhang W H. Chemical- and species-specific toxicity of nonylphenol and octylphenol to microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2021, 81: 103517.
- [8] Medvedeva N, Zaytseva T, Kuzikova I. Cellular responses and bioremoval of nonylphenol by the bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii* 1113. *Journal of Marine Systems*, 2017, 171: 120-128.
- [9] 苏贝, 张琳钰, 陈玲, 余静, 吴兵. 市政尾水中环境雌激素对水生生态健康的影响. *安全与环境工程*, 2022, 29(5): 91-102.
- [10] Kidd K A, Paterson M J, Rennie M D, Podemski C L, Findlay D L, Blanchfield P J, Liber K. Direct and indirect responses of a freshwater food web to a potent synthetic oestrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2014, 369(1656): 20130578.
- [11] Hallgren P, Nicolle A, Hansson L A, Brönmark C, Nikoleris L, Hyder M, Persson A. Synthetic estrogen directly affects fish biomass and may indirectly disrupt aquatic food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(4): 930-936.
- [12] Ma L, Yates S R. Degradation and metabolite formation of 17 β -estradiol-3-glucuronide and 17 β -estradiol-3-sulphate in river water and sediment. *Water Research*, 2018, 139: 1-9.
- [13] Chen X, Hu J Y. Degradation of 17 β -estradiol and its conjugates: effects of initial concentration and MLSS concentration. *Process Biochemistry*, 2009, 44(12): 1330-1334.
- [14] Ding X K, Li X Y, Wang A B, Guo X Y, Xu X T, Liu C L, Qin X H, Xie Y X, Wei Y Q, Cui Z G, Jiang T. Unprecedented phytoplankton blooms in autumn/winter in the southern Bohai Sea (China) due to high Yellow River discharge: implications of extreme rainfall events. *Journal of Environmental Management*, 2024, 351: 119901.
- [15] 曹维, 陈建孟, 马建义, 王品维, 孙逸钊. MTBE 与雌二醇对螺旋鱼腥藻的联合毒性. *生态毒理学报*, 2007, 2(4): 450-455.
- [16] Belhaj D, Athmoui K, Frikha D, Kallel M, El Feki A, Maalej S, Zhou J L, Ayadi H. Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(8): 7392-7402.
- [17] Thacharodi A, Hassan S, Hegde T A, Thacharodi D D, Brindhadevi K, Pugazhendhi A. Water a major source of endocrine-disrupting chemicals: an overview on the occurrence, implications on human health and bioremediation strategies. *Environmental Research*, 2023, 231(Pt 1): 116097.
- [18] Della Greca M, Pinto G, Pistillo P, Pollio A, Previtera L, Temussi F. Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere*, 2008, 70(11): 2047-2053.
- [19] 邓欢欢, 葛利云, 吴峰, 邓南圣, 李建华, 赵建夫. 三种藻类引发水中 17 α -乙炔基雌二醇的光降解实验研究. *环境工程学报*, 2007, 1(6): 25-29.
- [20] Hom-Diaz A, Llorca M, Rodríguez-Mozaz S, Vicent T, Barceló D, Blázquez P. Microalgae cultivation on wastewater digestate: β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol degradation and transformation products identification. *Journal of Environmental Management*, 2015, 155: 106-113.
- [21] 沈剑. 洱海流域内分泌干扰物环境归趋与控制策略研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2021.
- [22] Karabashev G S. Thin chlorophyll layer concomitant of the thermohaline intrusion in the confluence of the Gulf Stream and Labrador Current (a case study). *Oceanologia*, 2019, 61(4): 527-533.
- [23] 杨璨. 三种环境内分泌干扰物对铜绿微囊藻生长及生理的影响[D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [24] Alshanti Adli N Y. Toxicity of single and mixtures of antibiotics to cyanobacteria. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, 2014, 5(3): 1-8.
- [25] Qu H, Ma R X, Barrett H, Wang B, Han J J, Wang F, Chen P, Wang W, Peng G L, Yu G. How microplastics affect chiral illicit drug methamphetamine in aquatic food chain? From green alga (*Chlorella pyrenoidosa*) to freshwater snail (*Cipangopaludina cathayensis*). *Environment International*, 2020, 136: 105480.
- [26] Polyak Y, Zaytseva T, Medvedeva N. Response of toxic *Cyanobacterium Microcystis aeruginosa* to environmental pollution. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2013, 224(4): 1-14.
- [27] Huang B, Tang J, He H, Gu L P, Pan X J. Ecotoxicological effects and removal of 17 β -estradiol in chlorella algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 174: 377-383.

- [28] 文世勇, 刘希真, 王紫竹, 余骏, 张丰收, 刘永健, 宋琍琍. 不同光照条件下米氏凯伦藻和东海原甲藻生长的温度生态幅. 生态学报, 2018, 38(14): 5187-5194.
- [29] Czarny K, Krawczyk B, Szczukocki D. Toxic effects of bisphenol A and its analogues on cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Microcystis aeruginosa*. Chemosphere, 2021, 263: 128299.
- [30] Xiao C Y, Wang L H, Zhou Q, Huang X H. Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: a systematic review of plant toxicology studies. Journal of Hazardous Material, 2020, 384: 121488.
- [31] Singh P K, Bhattacharjya R, Saxena A, Thakur I S, Tiwari A. Envisaging the role of pharmaceutical contaminant 17- β estradiol on growth and lipid productivity of marine diatom *Chaetoceros gracilis*. Bioresource Technology, 2022, 346: 126642.
- [32] Xiang R, Shi J Q, Zhang H B, Dong C C, Liu L, Fu J K, He X Y, Yan Y J, Wu Z X. Chlorophyll a fluorescence and transcriptome reveal the toxicological effects of bisphenol A on an invasive cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. Aquatic Toxicology, 2018, 200: 188-196.
- [33] 吴东墨, 王宏镜, 王海娟, 王忠振, 蔡文昌. 吡啶乙酸和激动素配合施用对蜈蚣草土壤砷提取效率的影响. 农业环境科学学报, 2018, 37(8): 1705-1715.
- [34] Liu Y, Guan Y T, Gao Q T, Tam N F Y, Zhu W P. Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. Chemosphere, 2010, 80(5): 592-599.
- [35] 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.
- [36] Abargues M, Giménez J, Ferrer J, Bouzas A, Seco A. Endocrine disrupter compounds removal in wastewater using microalgae: degradation kinetics assessment. Chemical Engineering Journal, 2018, 334: 313-321.
- [37] Xiang R, Shi J Q, Yu Y, Zhang H B, Dong C C, Yang Y J, Wu Z X. The effect of bisphenol A on growth, morphology, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity, and PS II in *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Scenedesmus quadricauda*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2018, 74(4): 515-526.
- [38] Salomão A L, Soroldoni S, Marques M, Hogland W, Bila D M. Effects of single and mixed estrogens on single and combined cultures of *D. subspicatus* and *P. subcapitata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2014, 93(2): 215-221.
- [39] Gu S R, Zheng H, Xu Q Q, Sun C Z, Shi M, Wang Z Y, Li F M. Comparative toxicity of the plasticizer dibutyl phthalate to two freshwater algae. Aquatic Toxicology, 2017, 191: 122-130.
- [40] Li R, Chen G Z, Tam N F Y, Luan T G, Shin P K S, Cheung S G, Liu Y. Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(2): 321-328.
- [41] Yang M, Fan Z Q, Xie Y J, Fang L, Wang X R, Yuan Y, Li R X. Transcriptome analysis of the effect of bisphenol A exposure on the growth, photosynthetic activity and risk of microcystin-LR release by *Microcystis aeruginosa*. Journal of Hazardous Materials, 2020, 397: 122746.
- [42] Wu P H, Yeh H Y, Chou P H, Hsiao W W, Yu C P. Algal extracellular organic matter mediated photocatalytic degradation of estrogens. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111818.
- [43] Zhang Q, Song Q, Wang C, Zhou C, Lu C S, Zhao M R. Effects of glufosinate on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa* at environmentally relevant concentrations. Science of the Total Environment, 2017, 575: 513-518.
- [44] Li L, Guo H C, Shao C, Yu S L, Yin D Q, Gao N Y, Lu N. Effect of algal organic matter (AOM) extracted from *Microcystis aeruginosa* on photo-degradation of Diuron. Chemical Engineering Journal, 2015, 281: 265-271.
- [45] Liu W J, Chen Q, He N, Sun K F, Sun D, Wu X Q, Duan S S. Removal and biodegradation of 17 β -estradiol and diethylstilbestrol by the freshwater microalgae *Raphidocelis subcapitata*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018, 15(3): 452.
- [46] Ruksithong C, Phattarapattamawong S. Removals of estrone and 17 β -estradiol by microalgae cultivation: kinetics and removal mechanisms. Environmental Technology, 2019, 40(2): 163-170.
- [47] Gao J, Chi J. Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species. Marine Pollution Bulletin, 2015, 99(1/2): 70-75.
- [48] Matsuoka S, Kikuchi M, Kimura S, Kurokawa Y, Kawai S. Determination of estrogenic substances in the water of muko river using *in vitro* assays, and the degradation of natural estrogens by aquatic bacteria. Journal of Health Science, 2005, 51(2): 178-184.
- [49] Xu Z X, Liu J, Gu L P, Huang B, Pan X J. Biological effects of xenoestrogens and the functional mechanisms via genomic and nongenomic pathways. Environmental Research, 2017, 25(3): 306-322.
- [50] Martyniuk C J, Feswick A, Munkittrick K R, Dreier D A, Denslow N D. Twenty years of transcriptomics, 17 α -ethinylestradiol, and fish. General and Comparative Endocrinology, 2020, 286: 113325.
- [51] Wang L Y, Xiao H, He N, Sun D, Duan S S. Biosorption and biodegradation of the environmental hormone nonylphenol by four marine microalgae. Scientific Reports, 2019, 9: 5277.