

氧苯酮对龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)光合作用和呼吸作用的影响

田琳¹, 李祥蕾²

(1.中国海洋大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100; 2.山东省烟台生态环境监测中心, 山东 烟台 264000)

摘要:本文以野生龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)为受试材料,测定氧苯酮(BP-3)胁迫下龙须菜的快速叶绿素荧光、光合放氧/呼吸耗氧速率及活性氧含量的变化,研究了不同浓度的氧苯酮对龙须菜光合作用和呼吸作用的影响,分析了氧苯酮对水生植物的伤害机理。结果表明,用5~30 μmol/L的BP-3在黑暗条件下处理30 h后,龙须菜的呼吸作用不受影响,但光合作用PSII受体侧电子传递受到明显抑制。在80 μmol/(m²·s)光下,5~30 μmol/L的BP-3可导致光合作用光能吸收与利用的失衡并诱发活性氧的大量产生,且抑制作用随胁迫浓度升高而加剧。活性氧测定结果进一步显示,光下BP-3诱导的氧化胁迫加剧了龙须菜光合作用PSII受体侧的破坏,并进一步损伤其呼吸作用过程和光合作用PSII供体侧。**关键词:**氧苯酮; 龙须菜; 光合作用; 呼吸作用; 光合电子传递

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2021)05-0760-06

Effect of oxybenzone on the photosynthesis and respiration of *Gracilaria lemaneiformis*

TIAN Lin¹, LI Xiang-lei²

(1.College of Environmental Science & Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.Yantai Center of Ecology and Environment Monitoring of Shandong Province, Yantai 264000, China)

Abstract: The effect of oxybenzone (BP-3) on the photosynthesis and respiration of wild *Gracilaria lemaneiformis* was investigated by determining the response of the rapid chlorophyll fluorescence, photosynthetic oxygen evolution rate, respiratory oxygen uptake rate, and active oxygen content in this alga exposed to 0 to 30 μmol/L of this reagent. Results showed that 5~30 mol/L BP-3 had a slight effect on respiration after 30 hours treatment without light, but could directly inhibit the electron transfer of PSII receptor side of photosynthesis in *G. lemaneiformis*. At 80 μmol/m²/s light, BP-3 caused an imbalance of photosynthetic light energy absorption and utilization, and further induced the over-production of reactive oxygen species. The inhibition was intensified with the increase of BP-3 concentration. The oxidative stress induced by BP-3 would aggravate the damage of PSII receptor side of photosynthesis, and further damage the respiration process and photosynthetic PSII donor side in the seaweed.

Key words: oxybenzone; *Gracilaria lemaneiformis*; photosynthesis; respiration; photosynthetic electron transport

氧苯酮(BP-3)作为一种广谱性的紫外线吸收剂、增香剂和阻聚剂,被广泛应用于化学防晒

霜、化妆品、洗发水等个人护理用品中^[1-3]。据估算,欧盟每年生产大约1000 t BP-3,有3500种防

收稿日期:2021-02-19, 修订日期:2021-03-23

基金项目:江苏省高校自然科学基金项目(19KJB170010)

作者简介:田琳(1980—),男,山东青岛人,硕士,主要研究方向为海洋化学与环境毒理学, E-mail: tianlin@ouc.edu.cn

防晒霜会添加 BP-3^[4]。从化学特性上, BP-3 具有亲脂性特点, 进入环境后很容易被生物吸收并沿食物链传递蓄积。有研究证实, BP-3 是一种雌性激素类似物, 对生物内分泌系统具有一定的干扰作用, 可以引起神经紊乱及发育异常, 影响动物胚胎发育等过程^[5-8]。BP-3 主要通过游客日常的淋浴、冲洗等活动进入地下水和海水系统, 全球海洋以及联通的湖泊、河流中几乎无处不在^[9]。在夏威夷近岸海域的研究表明, 涂抹在皮肤上的防晒霜有 25% 会在浸泡 20 min 内被洗掉, 每年有 4000 ~ 6000 t 进入周围珊瑚礁水域^[10], 并加剧了珊瑚白化和其他海洋生物基因的损伤^[11]。因此, 夏威夷州已经通过法案从 2021 年 1 月起禁止使用含有 BP-3 的防晒霜^[12]。

BP-3 对生物的毒性作用已经受到国内外越来越多学者的关注。有研究表明, BP-3 可抑制陆生植物的光合作用和呼吸作用, 并造成细胞的氧化损伤^[13]。对淡水微藻的研究显示, BP-3 降低了其光合色素含量^[14-15]。但是, BP-3 对海洋生物的影响尚不清楚, 尤其是针对海洋生态系统初级生产者的大型海藻, 目前未见有关 BP-3 毒性作用的研究报道。光合作用和呼吸作用是植物能量代谢和物质代谢的中心枢纽, 为植物细胞提供各种代谢所需要的 ATP 和碳骨架。这两条途径中的任意一条受到伤害, 都会对植物的生长和代谢造成巨大影响甚至死亡。本研究以野生龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 为受试材料, 利用快速叶绿素荧光及光合放氧/呼吸耗氧测定, 结合活性氧等生化指标来研究 BP-3 对龙须菜初级代谢过程的影响, 旨在明确 BP-3 对海生植物的伤害作用及影响机制, 为保护海洋环境和维持生态平衡提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

龙须菜于大潮低潮时采集于青岛第二海水浴场, 当日用泡沫箱低温 (10 °C 左右) 运至中国海洋大学实验室。选择表皮完整, 大小均一的藻体, 在洁净海水浸泡下手工去除表层附着物, 用煮沸后冷却至室温的海水冲洗干净。将洗净后的藻株置于装有 20 L 清洁海水 (pH 8.2, 盐度 32) 的水

槽中, 按 F/2 培养基补加营养盐, 于室温 (20 °C 左右) 下、光照强度 (LED 白光射灯) 为 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光暗周期为 14 h : 10 h 的条件暂养 10 d, 暂养期间, 持续通入空气。氧苯酮购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国)。

1.2 材料处理

将 BP-3 溶于酒精并加入清洁海水中, 使 BP-3 终浓度分别为 0 (对照)、5、10、30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。取暂养后的 *G. lemaneiformis* 藻段 (每段约 2.0 g), 按 5 段/L 海水的比例置于海水中, 分别在无光条件下 (黑暗) 和 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强 (光暗周期 24 h : 0 h) 下室温连续处理 30 h。处理过程中, 每隔一段时间轻轻晃动容器, 保证藻段受光均匀。海水在配置 BP-3 时, 按 F/2 配方一次性加入营养盐。

1.3 净光合放氧速率和呼吸速率的测定

取龙须菜片段, 用清洁海水冲洗干净, 按照祁峰等^[16]的方法, 利用黑白瓶法测定海藻的呼吸耗氧速率和净光合放氧速率。设置 3 个生物学平行, 溶解氧浓度用温克勒法滴定, 其他条件同处理条件。

1.4 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线的测定与分析

快速叶绿素荧光诱导曲线 (OJIP 曲线) 使用手持式叶绿素荧光仪 (FluorPen FP110, 捷克) 测定。OJIP 曲线在 K 点荧光的相对变化 (W_K)、J 点荧光的相对变化 (V_J) 及光合电子传递量子产额 (ϕ_{E_0}) 等叶绿素荧光参数按照文献 [17] 计算。每个处理组重复 6 次。

1.5 H_2O_2 和丙二醛含量 (MDA) 的测定

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒方法测定。

2 结果与讨论

2.1 氧苯酮对净光合放氧速率和呼吸速率的影响

黑暗条件下经 5 ~ 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 BP-3 处理后, 龙须菜的净光合放氧速率明显下降, 且随着 BP-3 浓度增加, 净光合放氧速率降幅增大 (图 1A)。5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 BP-3 处理 8 h 后, 海藻净光合放氧速率分别为对照组的 88.7%、83.8% 和 73.9%, 说明 BP-3 破坏了龙须

菜的光合机构。光照条件下, BP-3 对龙须菜光合机构的破坏更为严重(图 1B)。在 $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强下, 龙须菜经 $5 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $30 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 BP-3 处理 8 h 后, 其净光合放氧速率分别仅为对照组的 79.8%、65.2% 和 46.2%。与光合作用不同, 龙须菜的呼吸耗氧速率在黑暗条件下不

受 BP-3 影响(图 1C), 仅在光照条件下明显下降, 且随着 BP-3 浓度的增加, 降幅增大(图 1D)。 $5 \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $30 \mu\text{mol}/\text{L}$ 光下处理 8 h 后, 呼吸耗氧速率降幅分别达 12.8%、19.2% 和 36.5%。以上结果说明, BP-3 在黑暗条件下可直接损伤龙须菜的光合作用过程。

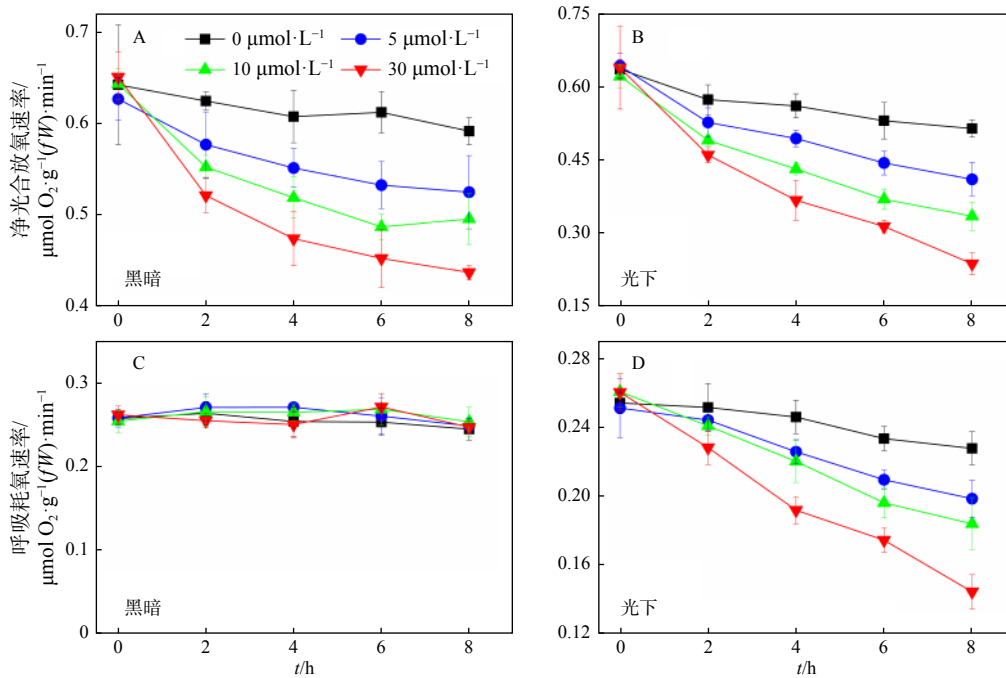


图 1 不同浓度氧苯酮对龙须菜净光合放氧速率和呼吸耗氧速率的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of oxybenzone on the net photosynthetic O₂ evolution rate and respiratory O₂ uptake rate in *Gracilaria lemaneiformis*

2.2 氧苯酮对光合作用光反应活性的影响

OJIP 曲线包含着大量关于光合作用光反应的信息, 如 PSII 供体侧、受体侧活性及光能的吸收、利用效率等, 能够灵敏反映植物光合作用的受损位点^[17-18]。无论在黑暗还是光照条件下, BP-3 处理后的龙须菜 OJIP 曲线都发生了明显的变化, 且随着 BP-3 浓度的增加, 变化幅度增大(图 2A、图 2B), 说明 BP-3 影响了龙须菜的光反应活性。为了更清晰地展示 OJIP 曲线的变化幅度, 以对照组为 0 点对 BP-3 处理组进行标准化分析(图 2C、图 2D)。可见, 与黑暗条件相比, 光照条件下 BP-3 处理引起的 OJIP 曲线的变化更明显。

W_K 代表光合作用 PSII 供体侧放氧复合体

(OEC) 被破坏的程度, W_K 越高 PSII 供体侧受损越严重^[19]。计算 OJIP 曲线相关参数发现(图 3): 黑暗条件下, 不同浓度的 BP-3 处理均未影响龙须菜的 W_K (图 3A), 说明 PSII 供体侧并非 BP-3 的直接伤害位点; 而光照条件下, BP-3 处理后 W_K 升高(图 3B), 表明 OEC 的损伤在有光条件下才出现。无论黑暗还是光照条件下, 暴露于 BP-3 的龙须菜 V_j 均明显上升(图 3C、图 3D), 且随着 BP-3 浓度的增加上升幅度增大, 表明龙须菜光合电子传递链中的还原型质体醌(Q_A^-) 积累增加, PSII 受体侧相对电子传递能力下降^[18,20]。黑暗和光照条件下 $30 \mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度 BP-3 处理 8 h 后, V_j 值分别比对照组升高了 43.2% 和 47.9%。由此认为, BP-3 处理可以直接伤害龙须菜 PSII

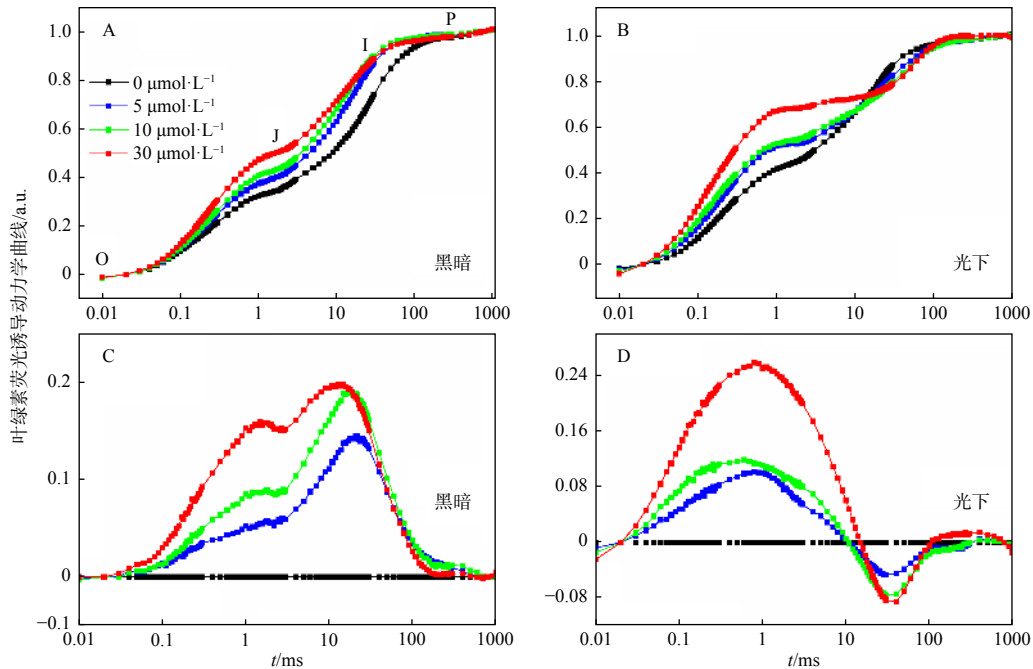


图2 不同浓度氧苯酮对龙须菜快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP曲线)的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of oxybenzone on chlorophyll *a* fluorescence transient (OJIP curve) in *Gracilaria lemaneiformis*

受体侧电子载体,造成 Q_A^- 的大量积累和受体侧过度还原。

与 V_j 的变化相反,无论在黑暗还是光照条件下,BP-3处理后龙须菜的 φ_{E_0} 均明显下降(图3E、图3F),且随着BP-3浓度的增加下降幅度增大。最大浓度BP-3处理8h后,黑暗和光照条件下龙须菜的 φ_{E_0} 值分别比对照组下降了22.2%和66.7%,表明BP-3直接抑制PSII受体侧后光合电子传递受阻,引起光能吸收与利用的失衡。前人研究显示,BP-3可以破坏黄瓜类囊体膜上PSII受体侧电子载体质体醌(PQs)或细胞色素b6f,限制PSII到PSI的电子传递^[9]。本研究通过龙须菜的活体试验,证实了BP-3的抑制位点为PSII受体侧这一结论。

2.3 氧苯酮对龙须菜中 H_2O_2 和MDA含量的影响

BP-3暴露8h后,黑暗条件下龙须菜 H_2O_2 及MDA含量并未发生变化(图4),表明龙须菜细胞内未发生氧化损伤。这进一步佐证了基于光合放氧速率的分析结果,即BP-3能够直接破坏龙须菜的光合作用过程,不需要通过氧化胁迫。植物细胞中,光合电子传递和呼吸电子传递是产生活性氧的两个主要代谢过程^[21-22]。图1

显示,黑暗条件下经BP-3处理的龙须菜,其呼吸作用活性受到轻微影响(图1C),且细胞内 H_2O_2 和MDA含量变化不明显,说明BP-3并未通过抑制龙须菜的呼吸作用而诱发活性氧的积累,因此未发生氧化破坏。

光照条件下,龙须菜的 H_2O_2 和MDA含量均明显上升;且随着氧苯酮浓度的增加上升幅度增大,各浓度处理后生物体内 H_2O_2 含量分别比对照组升高了19.0%、35.2%和56.1%(图4A);MDA含量分别比对照组升高了44.7%、57.9%和90.7%(图4B)。PSII反应中心和PSI受体侧是光合电子传递链产生活性氧的主要位点^[21]。一旦暴露于光照条件下,光能吸收与利用的失衡必然引起PSII反应中心的过度激发,诱导产生活性氧。光照条件下龙须菜中 H_2O_2 和MDA含量上升,表明BP-3除对龙须菜PSII受体侧产生直接破坏外,还引起了氧化胁迫的相伴发生,这将进一步加重对藻细胞的伤害。伤害具体表现为:与黑暗条件相比,光照条件下BP-3处理后龙须菜光合放氧速率下降更明显(图1B),PSII受体侧破坏更严重(图3D),光合电子传递受阻更突出(图3F);同时,光照条件下BP-3处理后抑制了

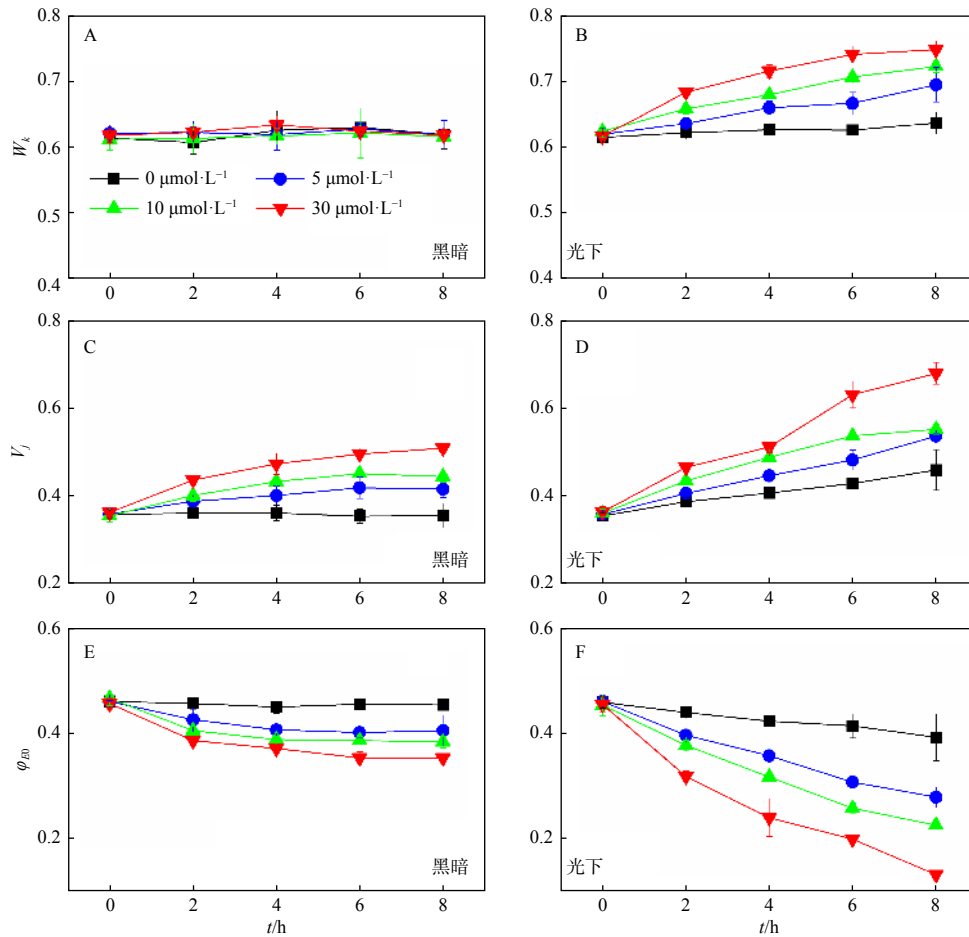


图3 不同浓度氧苯酮对龙须菜叶绿素荧光参数的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of oxybenzone on the chlorophyll fluorescence parameters in *Gracilaria lemaneiformis*

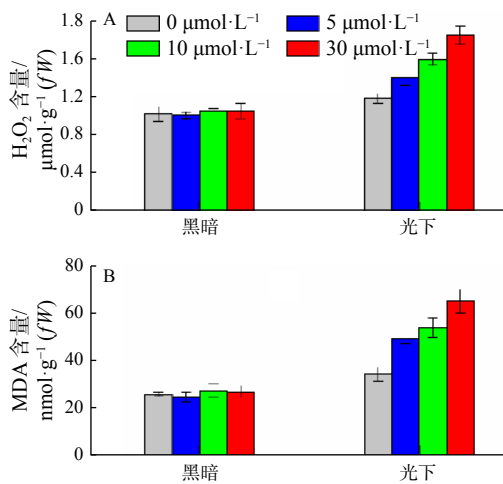


图4 不同浓度氧苯酮处理8 h后对龙须菜 H_2O_2 (A) 和 MDA(B) 含量的影响

Fig. 4 Effects of 8 h treatment with different concentrations of oxybenzone on the contents of H_2O_2 (A) and MDA (B) in *Gracilaria lemaneiformis*

龙须菜的呼吸作用(图1D),并导致PSII供体侧的破坏(图3B)。

3 结论

BP-3可以在暗处直接抑制龙须菜PSII受体侧电子传递,在光照条件下引起光合作用光能吸收与利用的失衡、诱发活性氧的大量产生并诱导PSII供体侧放氧复合体的损伤。氧化胁迫将进一步破坏龙须菜的光合作用和呼吸作用过程,最终破坏整个细胞代谢。

参考文献:

- [1] KASICHAYANULA S, HOUSE J D, WANG T, et al. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 223(2): 187-194.

- [2] BAKER L A, HORBURY M D, GREENOUGH S E, et al. Probing the ultrafast energy dissipation mechanism of the sunscreen oxybenzone after UVA irradiation[J]. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2015, 6(8): 1363-1368.
- [3] BALMER M E, BUSER H R, MÜLLER M D, et al. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(4): 953-962.
- [4] RASTOGI S C. UV filters in sunscreen products - a survey[J]. *Contact Dermatitis*, 2002, 46(6): 348-351.
- [5] BLÜTHGEN N, ZUCCHI S, FENT K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2012, 263(2): 184-194.
- [6] CORONADO M, DE HARO H, DENG X, et al. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 90(3): 182-187.
- [7] JANNESSON L, BIRKHED D, SCHERL D, et al. Effect of oxybenzone on PGE₂-production *in vitro* and on plaque and gingivitis *in vivo*[J]. *Journal of Clinical Periodontology*, 2004, 31(2): 91-94.
- [8] TSUI M M P, LEUNG H W, WAI T C, et al. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries[J]. *Water Research*, 2014, 67(5): 55-65.
- [9] 钟 昕. 氧苯酮伤害黄瓜植株的生理机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020: 3.
- [10] DANOVARO R, BONGIORNI L, CORINALDESI C, et al. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(4): 441-447.
- [11] SILLER A, BLASZAK S C, LAZAR M, et al. Update about the effects of the sunscreen ingredients oxybenzone and octinoxate on humans and the environment[J]. *Plastic Surgical Nursing*, 2018, 38(4): 158-161.
- [12] PORTRAISS K B, STEVENS M A, TRASK C N, et al. Exposure to the ultraviolet filter benzophenone-3 (BP3) interferes with social behaviour in male Siamese fighting fish[J]. *Animal Behaviour*, 2019, 158: 175-182.
- [13] ZHONG X, DOWNS C A, LI Y T, et al. Comparison of toxicological effects of oxybenzone, avobenzone, octocrylene, and octinoxate sunscreen ingredients on cucumber plants (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 714: 136879.
- [14] ZHONG X, DOWNS C A, CHE X K, et al. The toxicological effects of oxybenzone, an active ingredient in sunscreen personal care products, on prokaryotic alga *Arthrospira* sp. and eukaryotic alga *Chlorella* sp.[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 216: 105295.
- [15] MAO F J, HE Y L, KUSHMARO A, et al. Effects of benzophenone-3 on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 193: 1-8.
- [16] 祁 峰, 李晓东, 赵艳红, 等. 盐度、光照度和温度对漂浮刚毛藻光合作用的影响[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(5): 382-386.
- [17] 李鹏民, 高辉远, STRASSER R J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(6): 559-566.
- [18] YUSUF M A, KUMAR D, RAJWANSHI R, et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2010, 1797(8): 1428-1438.
- [19] STRASSER B J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients[J]. *Photosynthesis Research*, 1997, 52(2): 147-155.
- [20] KALACHANIS D, MANETAS Y. Analysis of fast chlorophyll fluorescence rise (O-K-J-I-P) curves in green fruits indicates electron flow limitations at the donor side of PSII and the acceptor sides of both photosystems[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 139(3): 313-323.
- [21] NOGUCHI K, YOSHIDA K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves[J]. *Mitochondrion*, 2008, 8(1): 87-99.
- [22] NIYOGI K K. Safety valves for photosynthesis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3(6): 455-460.