doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2026.05.014

微藻胞外聚合物对聚苯乙烯和二氧化硅纳米颗粒环境行为和毒性效应的影响

张琦妍[1],杨婷婷[1],黄　彬[1,2],许晓晴[1],高　星[1],
张嘉欣[1],何　欢[1],张明栋[3],周浩然[4]

(1.南京师范大学环境学院/江苏省水土环境生态修复工程实验室,江苏 南京 210023)
(2.南开大学环境污染过程与基准教育部重点实验室,天津 300350)
(3.海南省检验检测研究院国家市场监督管理总局重点实验室(降解材料质量安全评价与研究),海南 海口 570203)
(4.长江水利委员会水文局,湖北 武汉 430010)

[**摘要**]　为探究纳米颗粒对藻类的毒性效应及胞外聚合物(extracellular polymeric substances,EPS)在该过程中的作用,本研究以聚苯乙烯(PS)和二氧化硅(SiO_2)纳米颗粒为代表,莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)为受试生物,测定添加纳米颗粒及外源 EPS 后藻细胞密度、特异生长率、色素含量、EPS 含量等生长及生理生化指标. 结果表明,PS 和 SiO_2 均显著抑制莱茵衣藻的生长,且小粒径颗粒的抑制作用更强,两种纳米颗粒对莱茵衣藻的色素含量影响整体较弱,仅 20 nm PS 可显著抑制色素生成. 经两种纳米颗粒胁迫 3 d 后,莱茵衣藻的 EPS 分泌量均显著增加. 外源 EPS 的加入可有效缓解 PS 和 SiO_2 对莱茵衣藻的毒性,具体表现为莱茵衣藻特异生长率的提升. 外源 EPS 添加 3 d 后,相应 20 nm PS、100 nm PS、20 nm SiO_2、100 nm SiO_2 处理组藻的特异生长率分别提升 33.3%、31.4%、12.0%、12.1%,且对小粒径 PS 的毒性缓解效果更显著,对大粒径的 SiO_2 的毒性缓解效果更佳. 此外,外源 EPS 还可提升莱茵衣藻的色素含量,增强其自身分泌 EPS 的能力.

[**关键词**]　纳米颗粒,二氧化硅,聚苯乙烯,莱茵衣藻,胞外聚合物,毒性效应
[**中图分类号**]R994.6　[**文献标志码**]A　[**文章编号**]1001-4616(2026)05-0130-12

Effects of Microalgal Extracellular Polymeric Substances on Environmental Behaviors and Toxicity of Polystyrene and Silica Nanoparticles

Zhang Qiyan[1], Yang Tingting[1], Huang Bin[1,2], Xu Xiaoqing[1], Gao Xing[1],
Zhang Jiaxin[1], He Huan[1], Zhang Mingdong[3], Zhou Haoran[4]

(1.School of Environment/Jiangsu Engineering Lab of Water and Soil Eco-remediation, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(2.Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300350, China)
(3.Key Laboratory of quality safe evaluation and research of degradable material, State Administration for Market Regulation, Hainan Academy of Inspection and Testing, Haikou 570203, China)
(4.Bureau of Hydrology, Changjiang Water Resources Commission, Wuhan, Hubei 430010, China)

Abstract: To explore the toxic effects of nanoparticles on algae and the function of extracellular polymeric substances (EPS) in this process, this study selected polystyrene nanoparticles (PS) and silica nanoparticles (SiO_2) as representative materials, with *Chlamydomonas reinhardtii* serving as the test organism. A series of growth, physiological and biochemical indicators, including algal cell density, specific growth rate, pigment content and EPS content, were determined following the supplementation of nanoparticles and exogenous EPS. The results demonstrated that both PS and SiO_2 markedly restrained the growth of *C. reinhardtii*, and smaller-sized particles generated stronger inhibitory impacts. Overall, these two types of nanoparticles exerted slight influences on the pigment content of *C. reinhardtii*; only 20 nm PS notably inhibited

收稿日期:2026-06-21.
基金项目:国家自然科学基金资助项目(41807479)、国家市场监督管理总局重点实验室(降解材料质量安全评价与研究)开放课题项目(KFKT202507)、环境污染过程与基准教育部重点实验室开放课题项目(2025b08).
通讯作者:黄彬,博士,副教授,研究方向:新污染物生态毒理. E-mail:huangb@njnu.edu.cn;张明栋,学士,高级工程师,研究方向:化学检测技术. E-mail:12468911@qq.com

pigment synthesis. After 3 days of stress exposure to the two nanoparticles, the EPS secretion level of *C. reinhardtii* rose significantly. Exogenous EPS addition effectively relieved the toxicity of PS and SiO_2 to *C. reinhardtii*, which was reflected in the elevation of the algal specific growth rate. After 3 days of exogenous EPS supplementation, the specific growth rates exposed to 20 nm PS, 100 nm PS, 20 nm SiO_2 and 100 nm SiO_2 increased by 33.3%, 31.4%, 12.0% and 12.1%, respectively. Exogenous EPS delivered a more remarkable detoxification effect on smaller-sized PS, while it achieved better toxicity mitigation for larger-sized SiO_2. In addition, exogenous EPS could raise the pigment content of *C. reinhardtii* and improve its intrinsic capacity to synthesize and secrete EPS.

Key words: nanoparticle, silica, polystyrene, *Chlamydomonas reinhardtii*, extracellular polymeric substances, toxic effects

随着社会经济的发展,人工纳米材料实现规模化生产与应用,并在生产和使用过程中不断被释放进入水环境[1],其中,有机纳米颗粒(如聚苯乙烯,polystyrene,PS)[2]与无机纳米颗粒(如二氧化硅,silica,SiO_2)[3]作为两类代表性污染物,常存在于天然水体环境并对水生生态系统构成潜在风险[4-6],影响水生生物的摄食、生长发育和繁殖等过程[7-10].微藻作为水生态系统的初级生产者,是 PS、SiO_2 纳米颗粒生态毒性的重要靶标生物[11]. 研究表明,PS、SiO_2 纳米颗粒对微藻的毒性由多种机制共同介导[12],主要包括改变微藻细胞成分、引起氧化应激损伤、影响光合作用、释放毒性物质和产生基因毒性等[13-14]. 多项研究已证实,PS、SiO_2 纳米颗粒对微藻的毒性具有显著的粒径依赖性[15]:小粒径颗粒因具有更大的比表面积与穿透能力,通常表现出更强的生物毒性. 但现有研究多针对单一纳米颗粒展开[16-18],对不同种类和性质的纳米颗粒(如疏水性 PS 与亲水性 SiO_2)的毒性效应差异及内在机制,学界尚未形成统一认识,尤其缺乏同一受试体系下不同纳米颗粒的平行对比研究.

胞外聚合物(extracellular polymeric substances,EPS)是藻类分泌至胞外的大分子有机物,主要成分为多糖与蛋白质[19]. 凭借独特的多孔网状结构[20]与多功能基团,EPS 可吸附于水体中的纳米颗粒,改变其环境行为与生物毒性. 已有研究多关注外源 EPS 对纳米颗粒毒性的整体调控效果[21],但对胁迫下微藻内源 EPS 的分泌情况关注不足. 此外,EPS 中蛋白与多糖组分在纳米颗粒胁迫下组分的变化规律,仍缺乏系统阐释. 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)属于绿藻门,是广泛存在于水体的初级生产者,具有生长迅速、比表面积大、细胞结构简单及对污染物敏感等特性[22],是开展水生生物毒理研究的理想模式生物[23].

基于上述研究空白,本研究以莱茵衣藻为受试生物,系统比较不同粒径(20 nm、100 nm)PS 和 SiO_2 的毒性效应,初步探讨二者的潜在致毒差异,揭示外源 EPS 对纳米颗粒毒性的调控作用. 研究有望为纳米颗粒的生态风险评估和治理提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 PS 和 SiO_2 纳米颗粒的合成

PS 的制备:采用乳液聚合法合成[24]. 将苯乙烯(St)、过硫酸钾($K_2S_2O_8$,KPS)和十二烷基磺酸钠(SDS)按不同比例混合,制成所需粒径的 PS. 即在三颈烧瓶中加入纯水并通过氮吹去除装置及水溶液中氧气,开启水浴加热与冷凝回流系统,然后向反应体系加入表面活性剂 SDS,搅拌均匀后加入纯化的 St 单体;待反应温度升至 70 ℃时加入 KPS 溶液,引发反应. 反应全程搅拌并通入氮气. 反应结束后自然冷却至室温,转移产物并使用超滤杯洗样,以去除未反应的单体及残余的表面活性剂,获得纯净的 20 nm 和 100 nm PS 悬浮液.

SiO_2 的制备:采用改进的 Stöber 法合成[25]. 去离子水中加入一定浓度的精氨酸,充分混合后加入一定体积的环已烷,置于水浴锅中,使用磁力搅拌器搅拌,溶液温度为 60 ℃时加入原硅酸四乙酯(TEOS),反应一定时间,得到 10 nm 的 SiO_2. 在此基础上进一步合成 20 nm 的 SiO_2. 即用超纯水稀释反应溶液直到精氨酸浓度为 1~2 mmol/L,加入环已烷,并在持续搅拌下将混合物加热至 60 ℃. 加入 0.35 mL TEOS 后,在黑暗中持续反应一段时间,通过超速离心纯化得到 20 nm 的 SiO_2. 取一定体积 20 nm SiO_2 溶液与乙醇和氨水混合反应,一段时间后重复加入 5 或 10 次 TEOS 和乙醇混合物. 在室温、避光条件下不断搅拌溶液,持续反应. 通过离心纯化得到 100 nm 的 SiO_2. 20 nm 和 100 nm 的 SiO_2 制取成功后均要分散在超纯水中,并在 4 ℃冰箱中避光储存.

1.2 材料的表征

配制不同浓度 20 nm 和 100 nm 的 PS 悬浮液(1、3、10、30 mg/L)及 SiO_2 悬浮液(5、10、20、50 mg/L),通过动态光散射纳米粒度仪(Nano-ZSE,Malvern,英国)测量其在 WC 培养基中的水合粒径. 在此基础上,以未添加 EPS 的纳米颗粒悬浮液作为对照,选取 10 mg/L 的 PS 和 20 mg/L 的 SiO_2,添加 EPS(30 mg/L)后测量纳米颗粒在培养基中的水合粒径变化. 10 mg/L PS、20 mg/L SiO_2 为本实验设计浓度区间的中等水平,既能保证 PS、SiO_2 纳米颗粒的毒性效应可被稳定观测,又可有效显示外源 EPS 的毒性调控效果;同时该浓度范围与国内外同类纳米毒理研究的常用暴露浓度一致,保证了研究结果的可比性. 实验所用外源 EPS 浓度为 30 mg/L,处于国内外现有研究的常用浓度区间内.

1.3 藻种培养

莱茵衣藻购自中国科学院水生生物研究所(武汉,中国),在 WC 培养基[26](pH 7.0)中无菌培养. 培养条件:光照强度 60 μmol/m^2/s,光暗比 12 h:12 h,温度 25 ℃,静置培养,每天定时摇动 3 次.

1.4 PS 和 SiO_2 纳米颗粒毒性实验

分别配制含不同浓度 PS(0、1、3、10、30 mg/L)和 SiO_2(0、5、10、20、50 mg/L)的 WC 培养基,将莱茵衣藻以 1×10^5 cells/mL 的初始密度接入并培养 3 d,每天取样测定溶液吸光度. 实验结束后测定样品细胞色素含量、EPS 含量等指标.

另分别设置浓度为 10 mg/L 20 nm PS、10 mg/L 100 nm PS、20 mg/L 20 nm SiO_2、20 mg/L 100 nm SiO_2 处理组,每组设置加入 30 mg/L EPS 和不加入 EPS 进行对比,同时设置不含纳米颗粒的对照组. 将莱茵衣藻以 1×10^5 cells/mL 的初始密度接入并培养,培养 3 d,每天取样测定溶液吸光度. 实验终点测定样品细胞色素含量、EPS 含量、荧光强度等指标.

1.5 指标测定

1.5.1 藻细胞密度与生长率

采用光密度法[27]测定藻细胞密度. 经紫外可见分光光度计(UV-1780,岛津,日本)波长扫描确定藻液的最大吸收峰波长为 680 nm,于 680 nm 处测定吸光度,即 OD_{680}. 利用血球计数板法进行显微镜计数,建立吸光度与藻密度的标准曲线. 每天取样测定溶液吸光度,计算藻密度和特异生长率 μ(式(1)).

$$\mu=\frac{lnC_t-lnC_0}{t}, \tag{1}$$

式中,C_0 为初始藻细胞浓度,C_t 为经过一段时间 t 后的藻细胞浓度.

1.5.2 色素含量

采用乙醇提取法测定叶绿素 a(Chl a)、叶绿素 b(Chl b)和类胡萝卜素(Caro)含量. 培养 3 d 时,取 10 mL 样品经玻璃纤维滤膜过滤,将滤膜用 95%乙醇溶液于 4 ℃避光浸提 48 h. 8 200 g 离心 15 min,取上清液测定 470 nm、649 nm 和 665 nm 波长处的 OD 值,以 95%乙醇溶液为参比,按如下公式计算色素含量:

$$\text{Chl a}=13.7\times OD_{665}-5.76\times OD_{649}, \tag{2}$$

$$\text{Chl b}=24.96\times OD_{649}-7.32\times OD_{665}, \tag{3}$$

$$\text{Caro}=(1\,000\times OD_{470}-2.05\times\text{Chl a})/245. \tag{4}$$

1.5.3 EPS 的含量测定及成分鉴定

采用离心-加热法提取 EPS,分为游离型 S-EPS 和附着型 B-EPS. 取适量藻液,8 200 g 下离心 15 min. 上清液经 0.45 μm 孔径滤膜过滤得到 S-EPS;下层藻细胞沉淀中加入等体积 0.05%的 NaCl 溶液,60 ℃水浴 30 min 后于 11 000 g 下离心 20 min,上清液经 0.45 μm 孔径滤膜过滤得到 B-EPS. 将样品酸化至 pH<2.0 后通过总有机碳/总氮分析仪(Multi N/C 3100,AnalytikJena,德国)测定 EPS 总量. EPS 中多糖和蛋白含量分别采用苯酚硫酸法和考马斯亮蓝法测定.

1.5.4 三维荧光光谱分析

利用荧光分光光度计(Lumina,Thermo Fisher,美国)测定样品的荧光激发发射矩阵(EEM). 激发波长(Ex)和发射波长(Em)扫描范围分别为 250~450 nm、200~650 nm. 扫描速率为 12 000 nm/min,激发和发射波长测定步长均为 10 nm. 数据扣除空白(超纯水)背景.

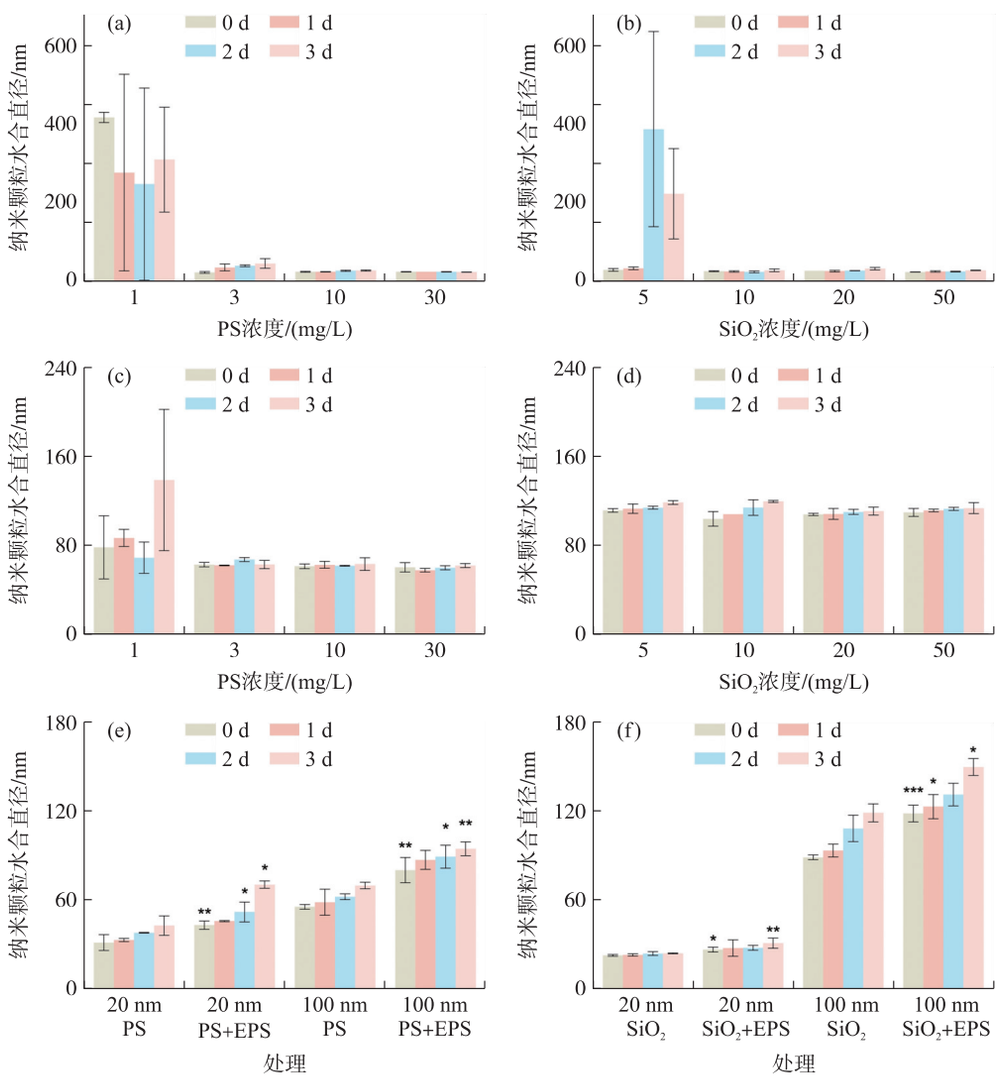
1.6 数据分析

实验数据以平均值±标准差表示,采用 SPSS 26 进行单因素方差分析(ANOVA)和独立样本 t 检验,*代表 $p<0.05$,差异显著;**代表 $p<0.01$,差异非常显著;***代表 $p<0.001$,差异极显著. 采用 Origin 2018、Prism 10 绘图.

2 结果与讨论

2.1 材料的表征

PS、SiO_2 纳米颗粒粒径较小、浓度较低时(1 mg/L PS 和 5 mg/L SiO_2),仪器检测效果较差,大粒径 PS、SiO_2 纳米颗粒稳定性更好(图 1). 100 nm PS 的稳定性整体优于 20 nm PS. 当浓度为 1 mg/L 时,PS 的粒径明显偏大且波动剧烈,浓度不小于 3 mg/L 时粒径趋于稳定. 20 nm PS 稳定后的粒径在 20~30 nm,100 nm PS 稳定后的粒径在 60 nm 左右. 5 mg/L 的 20 nm SiO_2 在 2、3 d 时粒径明显大于 0、1 d;其余浓度下粒径变化小,基本稳定. 100 nm SiO_2 粒径波动幅度较小,稳定性更佳. 20 nm SiO_2 稳定后的粒径在 20~30 nm,100 nm 的 SiO_2 稳定后的粒径在 110 nm 左右.



注:1、3、10、30 mg/L(a)20 nm PS 和(c)100 nm PS;5、10、20、50 mg/L(b)20 nm SiO_2 和(d)100 nm SiO_2;(e)10 mg/L PS+30 mg/L EPS;(f)20 mg/L SiO_2+30 mg/L EPS. *表示添加 EPS 前后的处理组间存在显著差异($p<0.05$);**表示添加 EPS 前后的处理组间存在非常显著差异($p<0.01$);***表示添加 EPS 前后的处理组间存在极显著差异($p<0.001$).

图 1 不同浓度不同粒径的 PS 和 SiO_2 及添加 EPS 前后的粒径变化

Fig. 1 Particle size changes of PS and SiO_2 with different concentrations and particle sizes before and after EPS addition

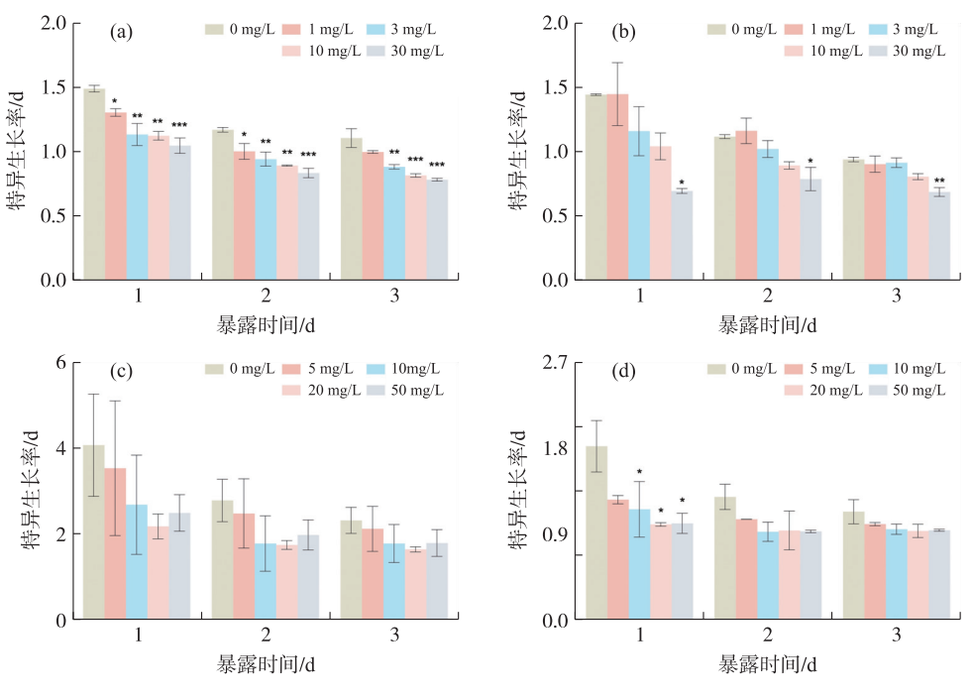
与未加 EPS 的对照组相比,添加 EPS 后两种纳米颗粒粒径均显著增大,且差异显著性随时间增加而增强;多分散指数(PDI)也相应增大,例如 20 nm 和 100 nm 的 PS 和 SiO_2 在添加 EPS 3 d 后,其 PDI 分别从 0.43、0.15、0.31、0.08 增加到 0.71、0.45、0.67、0.38. 这些表明 EPS 的添加促进了纳米颗粒的团聚(图 1(e)、1(f)).

2.2　PS 和 SiO_2 的毒性效应

2.2.1　PS 和 SiO_2 对莱茵衣藻生长的影响

PS 对莱茵衣藻的生长具有显著抑制作用,呈现明确的剂量-效应和时间-效应关系,其中,20 nm PS 对莱茵衣藻的生长抑制强于 100 nm PS(图 2(a)、2(b)). 10 mg/L 20 nm PS 胁迫下第 2 天莱茵衣藻生长受非常显著抑制($p<0.01$),而第 3 天时受极显著抑制($p<0.001$),说明 PS 对莱茵衣藻生长的抑制随时间增长而增强. 在 30 mg/L 20 nm PS 诱导下,莱茵衣藻第 3 天的特异生长率受到极显著抑制($p<0.001$),而同浓度下的 100 nm PS 仅表现为非常显著抑制($p<0.01$),这一粒径依赖的毒性差异归因于小粒径 PS 具有更大的比表面积:一方面增强了其表面反应活性,另一方面促进了其在藻细胞表面的吸附和积累.

SiO_2 同样对莱茵衣藻表现出生长抑制效应,且抑制作用同样随粒径减小而增强(图 2(c)、2(d)). 50 mg/L 20 nm SiO_2 处理 1 d 后抑制率达 79.85%,显著高于同浓度 100 nm SiO_2 处理组(51.74%),进一步证实了小粒径纳米颗粒具有更强的生物毒性,但其剂量-效应关系弱于 PS.



注:1、3、10、30 mg/L(a)20 nm PS 和(b)100 nm PS;5、10、20、50 mg/L(c)20 nm SiO_2 和(d)100 nm SiO_2. * 表示与对照组间存在显著差异($p<0.05$);** 表示与对照组间存在非常显著差异($p<0.01$);*** 表示与对照组间存在极显著差异($p<0.001$).

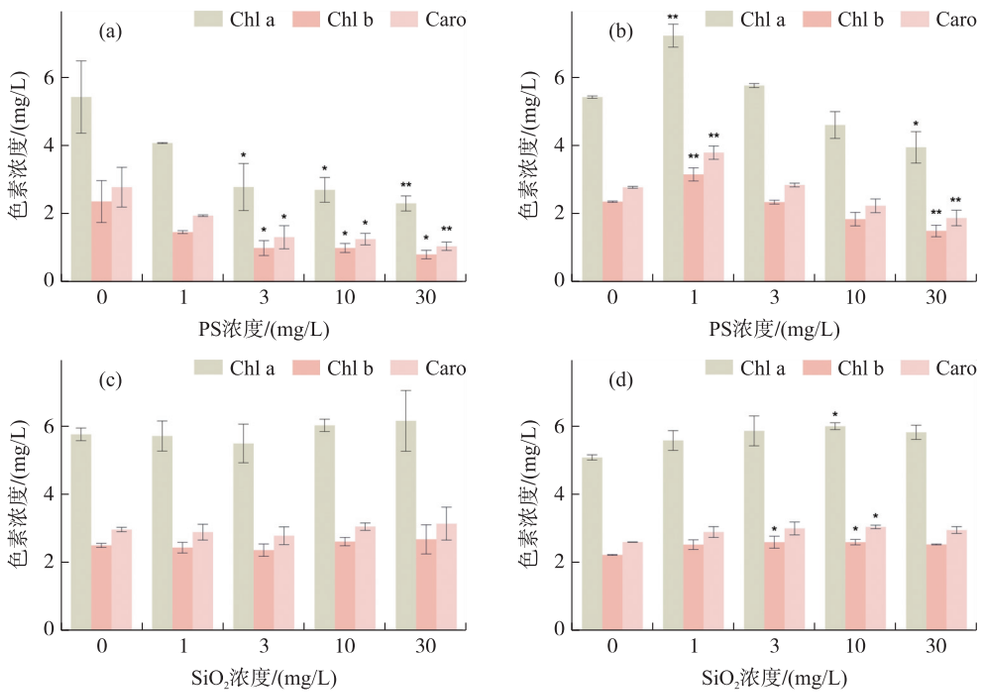
图 2　莱茵衣藻暴露于不同浓度不同粒径 PS 与 SiO_2 3 d 后的特异生长率变化

Fig. 2　Variations in the specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* after 3 days of exposure to PS and SiO_2 with different concentrations and particle sizes

2.2.2　PS 和 SiO_2 对莱茵衣藻色素含量的影响

20 nm PS 的胁迫可显著抑制莱茵衣藻色素合成,且抑制程度随浓度升高而增强,呈现一定的剂量-效应关系(图 3(a)). 其对 Caro 的抑制率最高(48.49%),其次是 Chl b(47.80%)、Chl a(40.75%). 100 nm 的 PS 对莱茵衣藻光合色素表现出典型的 Hormesis 效应:低浓度(1 mg/L、3 mg/L)下促进色素生成,高浓度(10 mg/L、30 mg/L)下则显著抑制色素合成(图 3(b)).

与 PS 不同,20 nm 和 100 nm 的 SiO_2 胁迫下,莱茵衣藻的色素含量均无显著变化,表明 SiO_2 对莱茵衣藻光合作用的干扰程度显著低于 PS(图 3(c)、3(d)).



注:1、3、10、30 mg/L(a)20 nm PS 和(b)100 nm PS;5、10、20、50 mg/L(c)20 nm SiO_2 和(d)100 nm SiO_2. * 表示与对照组间存在显著差异(p<0.05);** 表示与对照组间存在非常显著差异(p<0.01).

图 3　莱茵衣藻暴露于不同浓度不同粒径 PS 与 SiO_2 3 d 后的色素浓度

Fig. 3　Variations in the pigment content of *Chlamydomonas reinhardtii* after 3 days of exposure to PS and SiO_2 with different concentrations and particle sizes

2.2.3　PS 和 SiO_2 对莱茵衣藻 EPS 含量和组分的影响

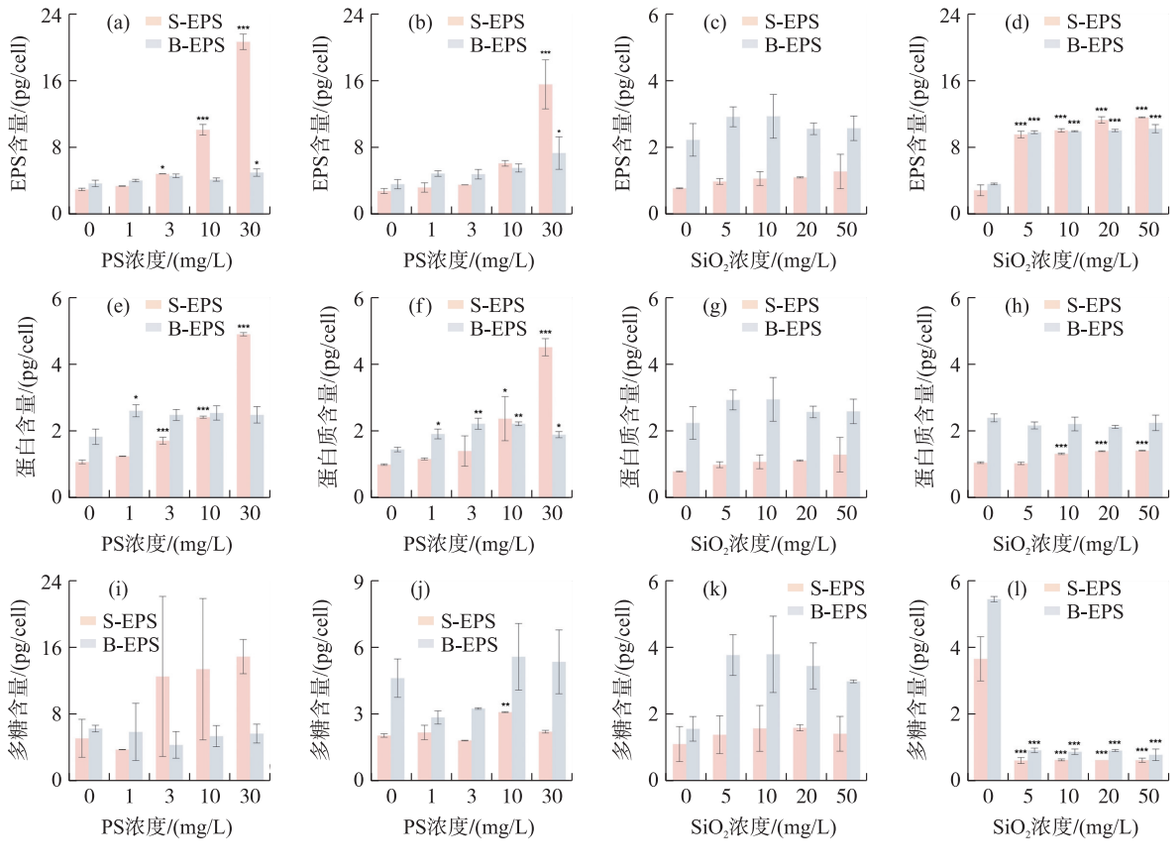
PS 可显著诱导莱茵衣藻分泌 S-EPS,且分泌量随浓度升高而增多,呈现剂量-效应关系(图 4(a)、4(b)). 10 mg/L 20 nm PS 处理 3 d 后,莱茵衣藻 S-EPS 含量极显著升高(p<0.001),最大增长率达 632.36%,而同浓度的 100 nm PS 处理组,最大增长率为 582.54%,表明小粒径 PS 对莱茵衣藻 S-EPS 的分泌有更强诱导作用. PS 的胁迫对 B-EPS 浓度影响不明显,仅 30 mg/L 处理组出现了显著促进作用. 组分分析显示,PS 胁迫主要增加 S-EPS 和 B-EPS 的蛋白含量(图 4(e)、4(f)),对多糖含量无显著影响(图 4(i)、4(j)). 可能机制是 PS 对藻细胞生长造成威胁,促使藻细胞分泌更多的 S-EPS 用于吸附 PS,而蛋白质表面存在大量官能团,能够促进 PS 的吸附,使其发生团聚沉降,减少 PS 与藻细胞的接触,降低 PS 的急性毒性.

20 nm SiO_2 的胁迫对 EPS 及其组分影响均不明显(图 4(c)、4(g)、4(k)). 各个浓度 100 nm SiO_2 的胁迫均会极显著促进 S-EPS 和 B-EPS 的分泌(图 4d). 当莱茵衣藻受到 100 nm SiO_2 胁迫时,S-EPS 的蛋白含量显著增加,而 B-EPS 的蛋白含量基本稳定(图 4(h)). 可能机制是 SiO_2 对藻细胞生长造成威胁,促使藻细胞分泌更多的 S-EPS 用于吸附 SiO_2,而蛋白质表面存在大量官能团,能够促进 SiO_2 的吸附,使其发生团聚,形成沉降,降低 SiO_2 的急性毒性. 对于多糖组分,各个浓度的 100 nm SiO_2 均对其有极其显著的抑制作用(图 4l). 这一现象可能存在两方面机制:一是 SiO_2 对多糖具有较强的吸附亲和力,导致分泌的多糖被快速消耗;二是在胁迫条件下,藻细胞将有限的能量优先用于合成蛋白质以增强防御能力,从而减少了多糖合成相关通路的表达.

2.3　EPS 对纳米颗粒毒性的调控

2.3.1　EPS 对纳米颗粒胁迫下莱茵衣藻生长的影响

与未加入 EPS 的对照组相比,加入 EPS 的处理组莱茵衣藻特异生长率显著提高,表明外源 EPS 能有效逆转 PS 和 SiO_2 对莱茵衣藻的生长抑制(图 5(a)、5(b)). 在第 3 天时,EPS 对暴露于 20 nm PS 的莱茵衣藻生长抑制具有极显著缓解作用(p<0.001),对暴露于 100 nm PS 的具有非常显著缓解作用(p<0.01);在第 3 天时,EPS 对暴露于 20 nm SiO_2 的莱茵衣藻生长抑制无显著缓解作用,对暴露于 100 nm SiO_2 的具



注:20 nm PS 处理组:(a)EPS、(e)蛋白、(i)多糖;100 nm PS 处理组:(b)EPS、(f)蛋白、(j)多糖;20 nm SiO_2 处理组:(c)EPS、(g)蛋白、(k)多糖;100 nm SiO_2 处理组:(d)EPS、(h)蛋白、(l)多糖. * 表示与对照组间存在显著差异(p<0.05);** 表示与对照组间存在非常显著差异(p<0.01);*** 表示与对照组间存在极显著差异(p<0.001).

图 4　莱茵衣藻暴露于 20 nm、100 nm 的 PS(1、3、10、30 mg/L)与 SiO_2(5、10、20、50 mg/L)3 d 后 EPS 及其组分(蛋白、多糖)的含量变化

Fig. 4　Variations in the contents of EPS and its components(proteins and polysaccharides) in *Chlamydomonas reinhardtii* after 3 days of exposure to 20 nm and 100 nm PS(1,3,10,30 mg/L) and SiO_2(5,10,20,50 mg/L)

有显著缓解作用(p<0.05),表明 EPS 对小粒径 PS 的毒性缓解作用优于大粒径的 PS,对 SiO_2 来说则相反. 这一差异可能与毒性强度的阈值有关:20 nm SiO_2 引发高强度胁迫造成的细胞损伤已超出 EPS 的修复能力范围;而 100 nm SiO_2 产生的胁迫强度相对温和,处于 EPS 的有效作用区间内,故缓解作用显著.

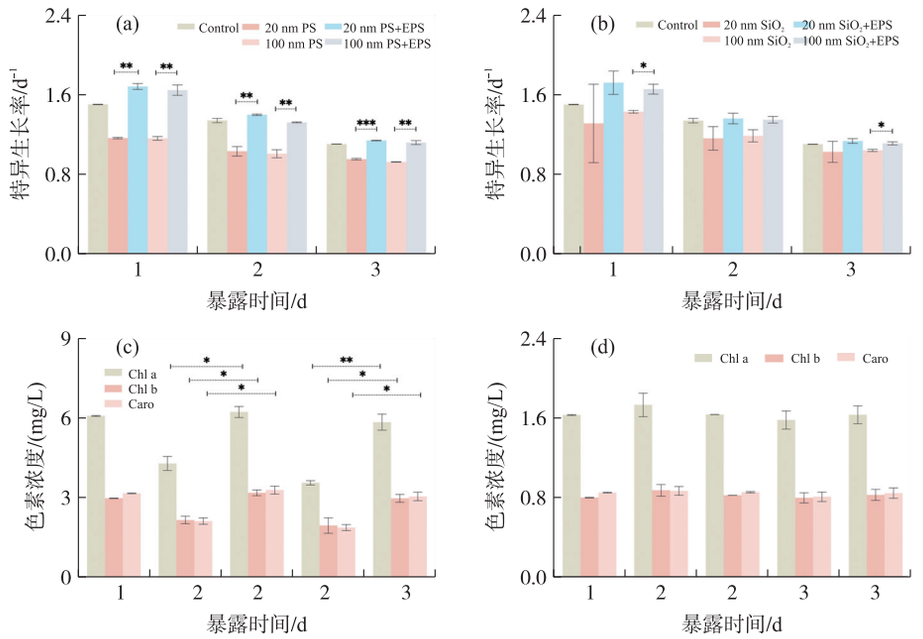
2.3.2　EPS 对 PS、SiO_2 纳米颗粒胁迫下莱茵衣藻色素含量的影响

外源 EPS 可显著提升 PS 胁迫下莱茵衣藻的色素含量(图 5(c)). 对于 100 nm PS 胁迫组,外源 EPS 添加后 Chl a 含量非常显著升高(p<0.01),其次是 Caro、Chl b(p<0.05),100 nm PS 胁迫下 Chl a 含量增长率为 64.32%,而 20 nm PS 胁迫下 Chl a 含量增长率为 45.35%,表明 EPS 对 100 nm PS 组 Chl a 含量的缓解作用优于 20 nm PS. 可能机制是 EPS 吸附 PS,使其团聚并沉降,减少 PS 对藻细胞的遮蔽从而增加藻细胞对光的吸收,促进光合色素的合成. 对于 SiO_2 体系,由于其本身对色素含量无显著影响,因此外源 EPS 的缓解作用并不显著.

2.3.3　EPS 对 PS、SiO_2 纳米颗粒胁迫下莱茵衣藻 EPS 组成的影响

外源 EPS 的添加使莱茵衣藻 EPS 总含量和相应组成均有不同程度的提升(图 6). 其中,加入外源 EPS 后 20 nm PS、SiO_2 胁迫组莱茵衣藻的 S-EPS 浓度显著升高(p<0.05),100 nm PS、SiO_2 胁迫组莱茵衣藻的 S-EPS 浓度非常显著升高(p<0.01);与未添加 EPS 的 PS 胁迫组相比,外源 EPS 的添加使 20 nm PS 胁迫组莱茵衣藻的 B-EPS 蛋白浓度显著升高(p<0.05),使 100 nm PS 胁迫组的 B-EPS 蛋白浓度极显著提升(p<0.001),这均表明了外源 EPS 对受大粒径纳米颗粒胁迫的莱茵衣藻自身 EPS 的分泌具有更强促进作用. 这一现象归因于小粒径纳米颗粒具有更大的比表面积,使其更容易被 EPS 吸附形成团聚并沉降,从而减少对莱茵衣藻的毒害,降低刺激,进而减少藻自身内源 EPS 的分泌;外源 EPS 对大粒径的纳米颗粒吸

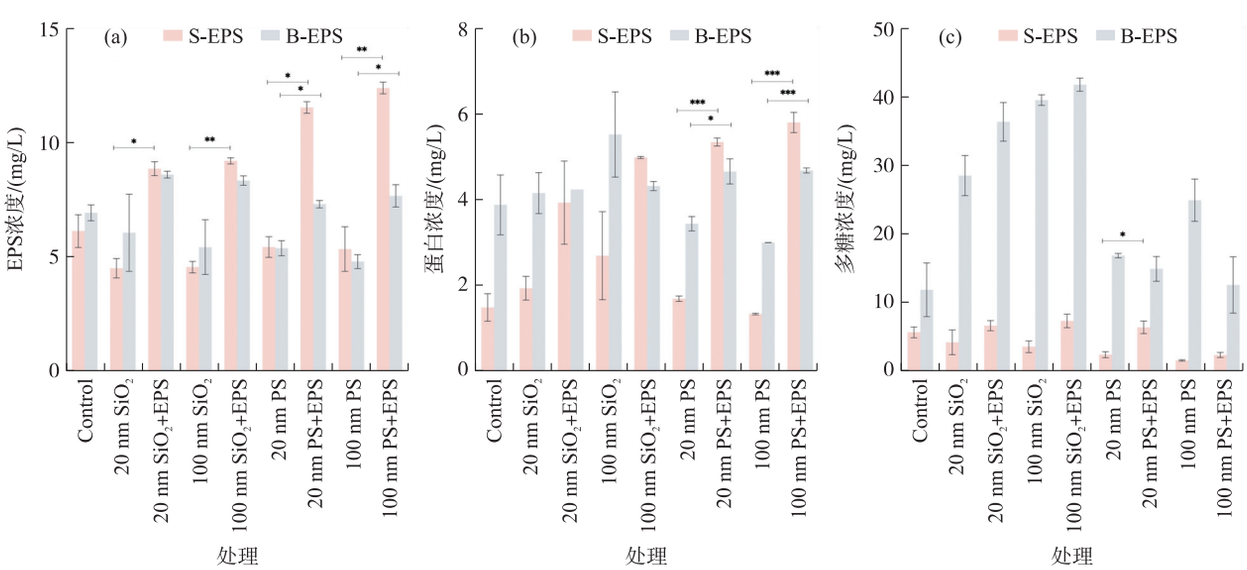
附与团聚效率相对较低,因此细胞仍需分泌更多 EPS 以增强自身防御. 对于多糖组分,在外源 EPS 添加下其整体浓度有一定程度的提升.



注:特异生长率:(a)PS、(b)SiO_2;色素含量:(c)PS、(d)SiO_2;* 表示添加 EPS 前后的处理组间存在显著差异(p<0.05);** 表示添加 EPS 前后的处理组间存在非常显著差异(p<0.01);*** 表示添加 EPS 前后的处理组间存在极显著差异(p<0.001).

图 5　外源 EPS 添加前后莱茵衣藻暴露于 20、100 nm PS(10 mg/L)与 SiO_2(20 mg/L)3 d 特异生长率及色素浓度的变化

Fig. 5　Variations in the specific growth rate(μ)and pigment content of *Chlamydomonas reinhardtii* after 3 days of exposure to 20 nm and 100 nm PS(10 mg/L)and SiO_2(20 mg/L),with and without exogenous EPS addition

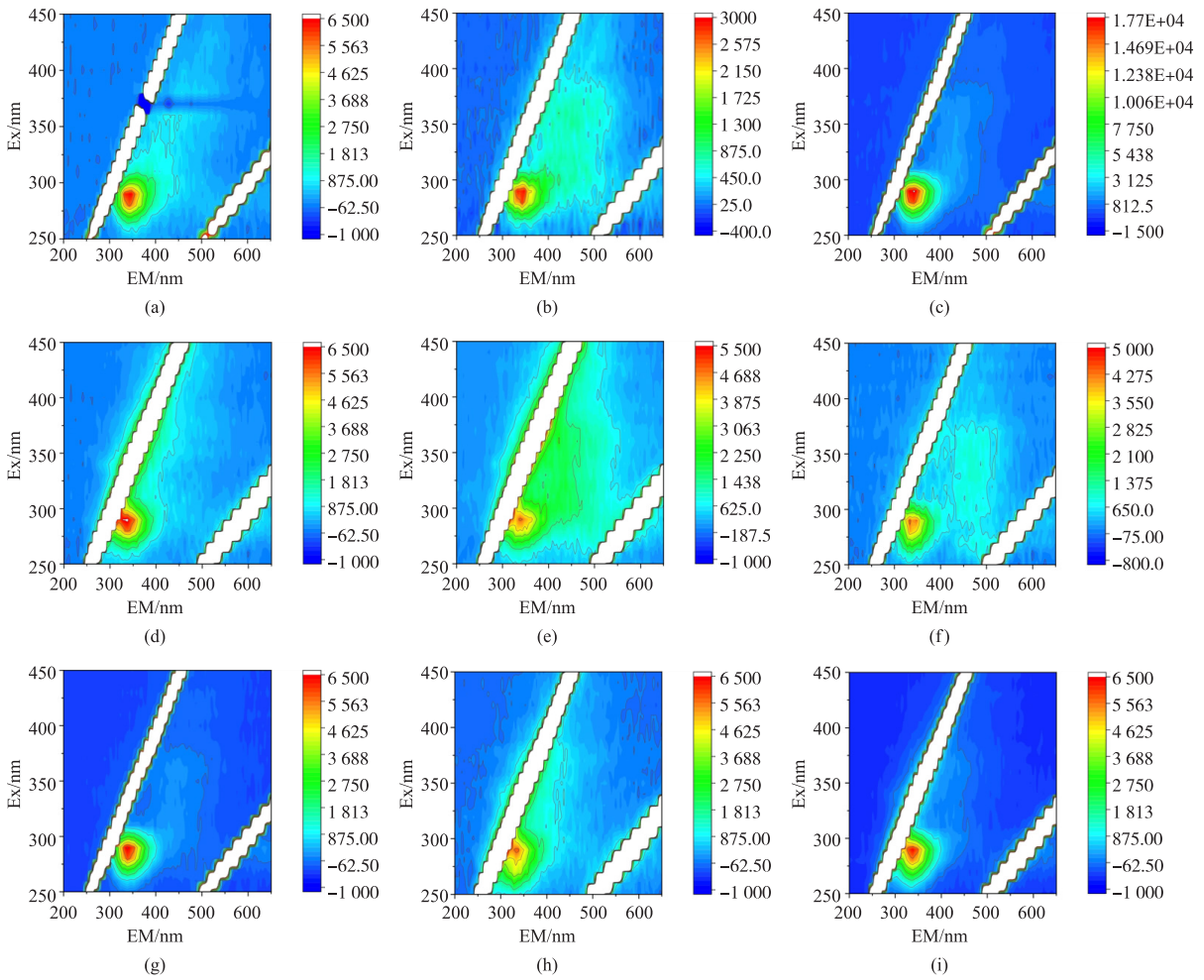


注:(a)EPS 浓度;(b)蛋白浓度;(c)多糖浓度. * 表示添加 EPS 前后的处理组间存在显著差异(p<0.05);** 表示添加 EPS 前后的处理组间存在非常显著差异(p<0.01);*** 表示添加 EPS 前后的处理组间存在极显著差异(p<0.001).

图 6　外源 EPS 添加前后莱茵衣藻暴露于 20、100 nm PS(10 mg/L)与 SiO_2(20 mg/L)3 d 后 EPS、蛋白、多糖浓度的变化

Fig. 6　Variations in the contents of EPS, proteins and polysaccharides in *Chlamydomonas reinhardtii* after 3 days of exposure to 20 nm and 100 nm PS(10 mg/L)and SiO_2(20 mg/L),with and without exogenous EPS addition

EEM 三维荧光光谱分析结果显示(图 7、8),受纳米颗粒胁迫的莱茵衣藻的 S-EPS、B-EPS 受到不同程度的诱导;受同一污染物胁迫时,外源 EPS 加入后莱茵衣藻的 S-EPS、B-EPS 荧光信号均存在不同程度增强,其中 20 nm SiO_2 及 20 nm、100 nm PS 胁迫组加入外源 EPS 后荧光信号增强明显,再次证明了外源 EPS 对纳米颗粒胁迫的莱茵衣藻自身 EPS 的分泌具有促进作用.



注:(a)0 mg/L;(b)20 mg/L 20 nm SiO_2;(c)20 mg/L 20 nm SiO_2+30 mg/L EPS;(d)20 mg/L 100 nm SiO_2;(e)20 mg/L 100 nm SiO_2+30 mg/L EPS;(f)10 mg/L 20 nm PS;(g)10 mg/L 20 nm PS+30 mg/L EPS;(h)10 mg/L 100 nm PS;(i)10 mg/L 100 nm PS+30 mg/L EPS.

图 7　暴露于不同污染物 3 d 后莱茵衣藻 S-EPS 的 EEM 图谱

Fig. 7　EEM spectra of S-EPS from *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to different pollutants for 3 d

2.4　讨论

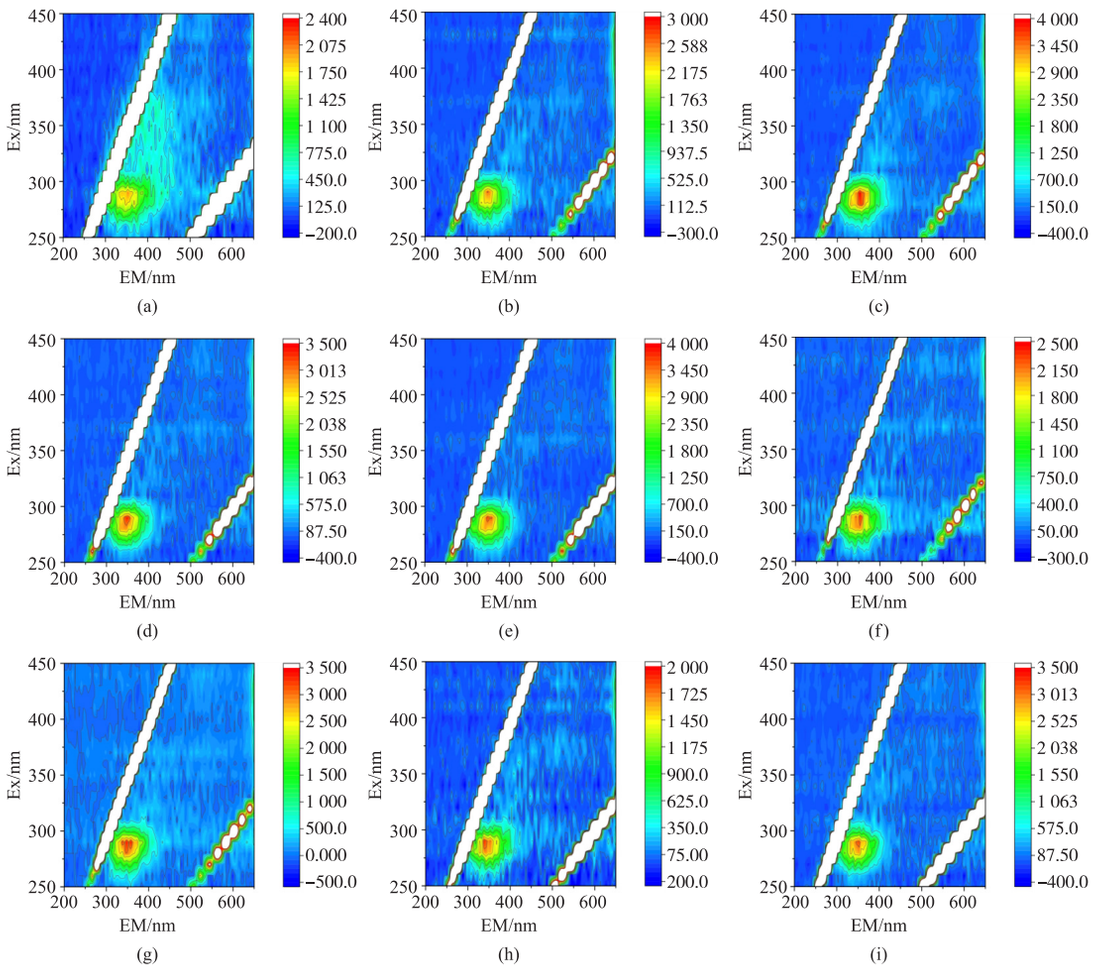
2.4.1　PS、SiO_2 纳米颗粒对莱茵衣藻生长及色素浓度的影响

本研究结果表明,PS 的总体毒性强于 SiO_2,小粒径纳米颗粒毒性大于大粒径纳米颗粒,这一粒径依赖性可从两方面解释:其一,小粒径颗粒更大的比表面积使其具有更大的能量与活性;其二,小粒径颗粒更有可能吸附在藻细胞表面,影响藻类摄取外部营养. 在不同粒径的两种纳米颗粒单独胁迫下,莱茵衣藻的生长均受到显著抑制,抑制强度随污染物浓度升高而增强,呈现明确的剂量-效应关系和时间-效应关系,这些结论均与已有研究结果一致[28-29].

值得注意的是,两种纳米颗粒对莱茵衣藻光合色素的影响存在差异:PS 可显著抑制色素合成,且 100 nm PS 呈现典型的 Hormesis 效应,这与 Xu 等[30]关于 Ag 纳米颗粒研究的结果一致,此现象的可能机制为:低浓度 PS 激活莱茵衣藻抗氧化系统和应激代谢通路,细胞主动上调叶绿素合成相关基因表达,色素含量代偿性升高. 而高浓度 PS 大量附着在细胞表面,对藻细胞产生遮蔽效应,直接抑制光合作用,抑制色素生成. SiO_2 的胁迫并未对莱茵衣藻色素含量造成显著影响. 这种材料特异性差异主要源于二者表面理化性质的不同:PS 疏水性强,更易在藻细胞表面形成致密的吸附层,产生遮蔽效应,直接干扰光合作用;而 SiO_2 亲水性较强,且更易被藻细胞分泌的 EPS 团聚沉降,对光合作用的直接干扰较弱.

2.4.2　PS、SiO_2 纳米颗粒对莱茵衣藻 EPS 分泌的影响

本研究中,PS 和 SiO_2 胁迫可诱导 EPS 的分泌,主要增加 S-EPS 与蛋白组分的含量,对多糖含量增加



注:(a)0 mg/L;(b)20 mg/L 20 nm SiO_2;(c)20 mg/L 20 nm SiO_2+30 mg/L EPS;(d)20 mg/L 100 nm SiO_2;(e)20 mg/L 100 nm SiO_2+30 mg/L EPS;(f)10 mg/L 20 nm PS;(g)10 mg/L 20 nm PS+30 mg/L EPS;(h)10 mg/L 100 nm PS;(i)10 mg/L 100 nm PS+30 mg/L EPS.

图 8　暴露于不同污染物 3 d 后莱茵衣藻 B-EPS 的 EEM 图谱

Fig. 8　EEM spectra of B-EPS from *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to different pollutants for 3 d

不显著,且 100 nm SiO_2 对其还有抑制作用. 这一现象可能存在两方面机制:一是 SiO_2 对多糖具有较强的吸附亲和力,导致分泌的多糖被快速消耗;二是在胁迫条件下,藻细胞将有限的能量优先用于合成蛋白质以增强防御能力,从而下调了多糖合成相关通路的表达[31]. 纳米颗粒诱导微生物优先分泌富蛋白 EPS 的现象在细菌体系中也得到了验证. Cao 等[32]研究发现,单独重金属 Cd 胁迫下细菌 EPS 以多糖为主,但当体系中存在铁氧化物纳米颗粒时,EPS 蛋白含量显著升高,蛋白多糖比值升至 1.2,表明纳米颗粒胁迫会特异性诱导蛋白类 EPS 的合成与分泌. Li 等[33]研究球形棕囊藻时却得到相反结果。在面对纳米颗粒胁迫时,棕囊藻多糖的含量显著增加,这可能是因为两类微藻生理结构与生存策略不同:球形棕囊藻分泌大量多糖类胶质,形成标志性的凝胶状囊体基质,多糖是其抵御外界胁迫的固有功能物质;而莱茵衣藻为单细胞绿藻,无多糖聚集防护的机制,蛋白分子携带更多羧基、氨基等活性官能团,对 PS 与 SiO_2 具备吸附络合能力,因此细胞会优先分配能量合成蛋白组分,阻断纳米颗粒接触莱茵衣藻.

2.4.3　EPS 对 PS、SiO_2 纳米颗粒毒性的调控

本研究中,外源 EPS 的添加可有效缓解 PS 与 SiO_2 对莱茵衣藻的毒性,表现为藻细胞生长速率与光合色素水平的显著恢复。同时仪器测定和三维荧光光谱分析结果均显示,与未加入 EPS 的胁迫组相比,外源 EPS 可提升莱茵衣藻分泌 EPS 的能力. 上述缓解效应具有明显的材料和粒径特异性:对小粒径的 PS 缓解效果更显著,对大粒径的 SiO_2 缓解效果更佳,已有研究同样证明了这一点[34]. 这种特异性主要源于 EPS 与不同纳米颗粒的相互作用差异:对于 PS 体系,小粒径颗粒更大的比表面积提供了更多的结合位

点,因此更易被 EPS 吸附团聚,毒性缓解效果更明显;对于 SiO_2 体系,20 nm SiO_2 的毒性强度过高,其引发的细胞损伤已超出 EPS 的修复能力范围,而 100 nm SiO_2 的毒性相对温和,处于 EPS 的有效作用区间,缓解作用显著.

本研究因未设置单独外源 EPS 对照组,无法完全区分 EPS 直接对提供营养促进生长效应与吸附团聚效应的贡献. 然而,结合本实验结果及已有研究分析[35-36],吸附团聚的解毒效应为外源 EPS 调控作用的核心主导因素,营养效应贡献低. 外源 EPS 加入 3 d 后,相应 20 nm PS、100 nm PS、20 nm SiO_2、100 nm SiO_2 胁迫组藻生长率分别提升 33.3%、31.4%、12.0%、12.1%。若 EPS 主要通过供给营养促进生长,则不同污染物胁迫组生长率提升幅度应处于同一水平,而该规律恰好符合上文所述的吸附团聚效应材料特异性规律.

3 结论

本研究结果表明,天然水体中广泛存在的 EPS 可显著调控纳米颗粒的环境行为与生物毒性,表现为 EPS 可显著缓解小粒径 PS 和大粒径 SiO_2 对莱茵衣藻的毒性效应,提升莱茵衣藻的生长率及光合色素浓度,同时促进莱茵衣藻自身 EPS 的分泌,增加蛋白或多糖组分. 上述发现对纳米颗粒的生态风险评估具有重要意义,但其在天然水环境这一复杂生态系统中的适用性仍需更深入的实验验证. 本研究仍存在一定局限:(1)未单独设置外源 EPS 对照组,无法区分直接营养促生长效应与纳米颗粒解毒效应的贡献,仅控制外源 EPS 总浓度,蛋白多糖组分表征缺失;(2)蛋白与多糖组分变化的机理解释基于已有文献推论,无分子生物学实验验证. 后续可进一步拓展研究深度、广度及周期,为纳米颗粒的生态风险评估提供更全面的依据.

[参考文献]

[1] Majumder S, Deloid G, Das M, et al. Lifecycle implications of poly(vinyl chloride)(PVC) micro(nano) plastics(MNPs): interactions with coexposed environmental pollutants(EPs) and impact on their toxicity and bioavailability[J]. Environmental Science & Technology, 2026, 60(20): 14248-14261.

[2] 哈梅,吴玲,唐万珍,等. 动物实验中微/纳米塑料毒理学机制的文献调研和综述[J]. 生态毒理学报,2026,21(2):222-232.

[3] Kamikubo Y, Sakairi H. Silica nanoparticle toxicity: cellular mechanisms, neurotoxicological concerns, and environmental perspectives[J]. Frontiers in Nanotechnology, 2025, 7: 1629722.

[4] Mohajerani A, Burnett L, Smith J V, et al. Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use[J]. Materials(Basel), 2019, 12(19): 3052.

[5] Huang B, Wei Z B, Yang L Y, et al. Combined toxicity of silver nanoparticles with hematite or plastic nanoparticles toward two freshwater algae[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(7): 3871-3879.

[6] Ekvall M T, Stabile F, Hansson L A. Nanoplastics rewire freshwater food webs[J]. Communications Earth & Environment, 2024, 5(1): 486.

[7] Shaoyong W, Wang W, Pan B, et al. Transgenerational inheritance effects of copper oxide nanoparticles(CuONPs) induced asthenospermia and infertility via gamete H3K9me3 insufficiency pathway in mice[J]. ACS Nano, 2024, 18(31): 20541-20555.

[8] Aloisi M, Rossi G, Colafarina S, et al. The Impact of metal nanoparticles on female reproductive system: risks and opportunities[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(21): 13748.

[9] Gao C, Xu B, Li Z, et al. From plankton to fish: the multifaceted threat of microplastics in freshwater environments[J]. Aquatic Toxicology, 2025, 279: 107242.

[10] Naz S, Chatha A M M, Khan N A, et al. Unraveling the ecotoxicological effects of micro and nano-plastics on aquatic organisms and human health[J]. Frontiers in Environmental Science, 2024, 12: 1390510.

[11] Ding J, Yang J, Song X, et al. Hetero-aggregation of nanoplastics with freshwater algae and the toxicological consequences: the role of extracellular polymeric substances[J]. Toxics, 2025, 13(11): 980.

[12] Gong N, Shao K, Che C, et al. Stability of nickel oxide nanoparticles and its influence on toxicity to marine algae *Chlorella*

vulgaris[J]. Marine Pollution Bulletin,2019,149:110532.
[13] Huang Y,Gao M,Wang W,et al. Effects of manufactured nanomaterials on algae:implications and applications[J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering,2022,16(9):122.
[14] 吴艳梅. 淡水微藻对水体微(纳米)塑料胁迫的响应研究[D]. 泉州:华侨大学,2020.
[15] Liu Y Y,Pan W,Wang M,et al. Silica nanoparticle size determines the mechanisms underlying the inhibition of iron oxide nanoparticle uptake by *Daphnia magna*[J]. Environmental Science & Technology,2023,58(1):751-759.
[16] Das S,Giri S,Jose S A,et al. Comparative toxicity assessment of individual,binary and ternary mixtures of SiO_2,Fe_3O_4,and ZnO nanoparticles in freshwater microalgae,*Scenedesmus obliquus*:exploring the role of dissolved ions[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology,2023,273:109718.
[17] Zhang Z C,Xu M K,Wang L,et al. Continuous oral exposure to micro-and nanoplastics induced gut microbiota dysbiosis,intestinal barrier and immune dysfunction in adult mice[J]. Environment International,2023,182:108353.
[18] Liu S B,Han J H,Ma X W,et al. Repeated release of cerium oxide nanoparticles altered algal responses:growth,photosynthesis,and photosynthetic gene expression[J]. Eco-Environment & Health,2024,3(3):290-299.
[19] 罗钦,徐军伟. 液体发酵灵芝胞外多糖和胞内多糖的单糖组成及抗氧化活性[J]. 食用菌学报,2021,28(6):135-142.
[20] 张锐. 胞外聚合物在盐胁迫下的变化规律及其环境应用[D]. 南京:南京林业大学,2023.
[21] Gao X,Zhang H,Zhang X,et al. Interactions between extracellular polymeric substances and engineered nanoparticles in aquatic systems and their environmental effects:a comprehensive review[J]. Environmental Science:Nano,2025,12(4):2177-2192.
[22] 赵志琳. 纳米银颗粒胁迫下莱茵衣藻的毒性效应及防御机制研究[D]. 泰安:山东农业大学,2022.
[23] 陶美,胡雨晴,赖金龙,等. 二氧化硅纳米颗粒暴露对莱茵衣藻生长及细胞代谢的影响[J]. 防化研究,2024,3(4):67-76.
[24] Wang F,Liu G Q,Meng H L,et al. Improved methane hydrate formation and dissociation with nanosphere-based fixed surfactants as promoters[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering,2016,4(4):2107-2113.
[25] Zang X M,Li J M,Wang Y,et al. A facile method to study the bioaccumulation kinetics of amorphous silica nanoparticles by quantum dot embedding[J]. Environmental Science:Nano,2018,5(12):2830-2841.
[26] 信宏颖,梁金燕,王馨彤,等. 盐度和 pH 对平凡舟形藻生长和油脂积累的影响[J]. 水生生物学报,2024,48(2):222-231.
[27] 王英娟,贺敬,李壮,等. 光密度法测定蛋白核小球藻生物量[J]. 西北大学学报(自然科学版),2012,42(1):60-63.
[28] Khoshnamvand M,Hanachi P,Ashtiani S,et al. Toxic effects of polystyrene nanoplastics on microalgae *Chlorella vulgaris*:changes in biomass,photosynthetic pigments and morphology[J]. Chemosphere,2021,280:130725.
[29] Li X,Chu Z,Feng C,et al. Unveiling the molecular mechanisms of size-dependent effect of polystyrene micro/nano-plastics on *Chlamydomonas reinhardtii* through proteomic profiling[J]. Chemosphere,2024,358:142220.
[30] Xu S,Gong S L,Zheng Y T,et al. Nanoparticle-induced hormesis in microalgae:Insights from transcriptomics and soft x-ray tomography[J]. Analytical Chemistry,2026,98(23):17236-17253.
[31] Chin W C,Santschi P H,Quigg A,et al. Micro-and nano-plastics induced release of protein-enriched microbial exopolymeric substances(EPSs)in marine environments[J]. Environments,2024,11(8):165.
[32] Cao X,Xu L,Chen Y P,et al. Contribution,composition,and structure of eps by in vivo exposure to elucidate the mechanisms of nanoparticle-enhanced bioremediation to metals[J]. Environmental Science & Technology,2022,56(2):896-906.
[33] Li Y,Xu D,Huang X,et al. Nanoplastics stimulate colony formation and bloom in *Phaeocystis globosa*[J]. Environmental Science & Technology,2025,59(26):13192-13203.
[34] Giri S,Mukherjee A. Ageing with algal EPS reduces the toxic effects of polystyrene nanoplastics in freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus*[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering,2021,9(5):105978.
[35] Zhou K,Hu Y,Zhang L,et al. The role of exopolymeric substances in the bioaccumulation and toxicity of Ag nanoparticles to algae[J]. Scientific Reports,2016,6:32998.
[36] Naveed S,Li C H,Lu X D,et al. Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s:a review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology,2019,49(19):1769-1802.

[责任编辑:杜忆忱]