

# 石油烃对浒苔生长发育和生理特性的影响

沈俊杰<sup>1</sup>, 崔芮菲<sup>1</sup>, 林佳宁<sup>2</sup>, 周晓见<sup>1</sup>, 刘青<sup>1,3,4</sup>

(1.扬州大学 环境科学与工程学院 海洋科学与技术研究所 江苏 扬州 225127; 2.山东大学 生态环境损害鉴定研究院 山东 青岛 266071; 3.江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室 江苏 连云港 222005; 4.北部湾大学 广西北部湾海洋灾害研究重点实验室 广西 钦州 535011)

**摘要:**为探讨石油烃对浒苔不同发育阶段的影响,本文在室内条件下研究了 0<sup>#</sup>柴油和原油水溶性组分在两种浓度下对浒苔孢子的附着和萌发、幼苗的生长、成体的生长和生理特性的影响。结果表明,对浒苔孢子而言,除了低浓度原油(3 mg/L)对其附着无显著影响外,其余处理均可抑制其附着,另外两种高浓度柴油和原油(12 mg/L)均可抑制孢子的萌发过程,而低浓度原油却对其早期萌发有一定的促进作用;对浒苔幼苗而言,两种浓度的柴油和高浓度原油均可抑制其生长,其中高浓度柴油在培养 8 d 时对幼苗抑制效应最大,幼苗长度仅为对照组的 23.69%;对浒苔成体而言,仅高浓度的柴油和原油对其生长有显著抑制作用,并且生长率均在 72 h 时最低,分别为-2.3%和-1.9%;另外浒苔体内的叶绿素 *a*、类胡萝卜素、可溶性蛋白均受到两种高浓度石油烃的抑制作用,而超氧化物歧化酶和过氧化氢酶却在其作用下表现出一定促进效果,最大增幅分别为 24.8%和 210.6%。因此,浒苔不同发育阶段对石油烃的敏感度为孢子>幼苗>成体,同时柴油对其各阶段的影响效应均高于原油,并且高浓度>低浓度。

**关键词:**柴油;原油;浒苔;发育阶段

中图分类号:X171

文献标识码:A

文章编号:1007-6336(2023)04-0502-09

## Effect of petroleum hydrocarbon on the growing development and physiological performance of *Ulva prolifera*

SHEN Junjie<sup>1</sup>, CUI Ruifei<sup>1</sup>, LIN Jianing<sup>2</sup>, ZHOU Xiaojian<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>1,3,4</sup>

(1.Marine Science and Technology Institute, College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 2.Institute of Eco-Environmental Forensics, Shandong University, Qingdao 266071, China; 3.Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 4.Guangxi Key Laboratory of Marine Disaster in the Beibu Gulf, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China)

**Abstract:** To study the effects of petroleum hydrocarbon on *Ulva prolifera* different development stages, the impacts of 0<sup>#</sup>diesel oil and crude oil water-soluble components on the adhesion and germination of spores, growth of seedlings, growth and physiological characteristics of *U. prolifera* thalli at two concentrations were tested in laboratory. The results showed that, for *U. prolifera* spores, the adhesion was not significantly affected by 3 mg/L crude oil, but could be significantly inhibited by other three oil treatments. Moreover, two high concentration diesel oil and crude oil (12 mg/L) could inhibit the germination of spores, but crude oil at low concentration promoted the early germination process. For *U. prolifera* seedlings, the growth could be inhibited by diesel oil and high concentration of crude oil. The greatest inhibitory effect on seedlings by 12 mg/L diesel

收稿日期:2022-07-09, 修订日期:2022-10-27

基金项目:江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放课题基金资助项目(SH20211206);广西北部湾海洋灾害研究重点实验室开放基金资助项目(2020KF03)

作者简介:沈俊杰(1998—),男,江苏苏州人,硕士,主要研究方向为海洋生态安全, E-mail: shenjunjie0504@163.com

通信作者:刘青(1988—),女,讲师,博士,主要研究方向为海洋环境保护与修复, E-mail: 006492@yzu.edu.cn

oil cultured on Day 8, which was only 23.69% compared with the control group. For *U. prolifera* thalli, diesel oil and crude oil only at high concentration showed significant inhibitions on growth, and the relative growth rates were -2.3% and -1.9% in 72 h, respectively. In addition, chlorophyll a, carotenoid and soluble protein of *U. prolifera* were all inhibited by two high concentration diesel oil and crude oil, while superoxide dismutase and catalase were promoted by these two petroleum hydrocarbons, with the maximum contents increased 24.8% and 210.6%, respectively. In conclusion, as to different development stages of *U. prolifera*, spore was most sensitive to petroleum hydrocarbon, while adult was the most tolerant. Meantime, the toxic effect of diesel oil on each stage of *U. prolifera* was higher than crude oil, and the toxicity of high concentration was greater than low concentration.

**Key words:** diesel; crude oil; *Ulva prolifera*; development stage

近年来,随着世界各国对石油的需求量不断增加,石油类产品在开采、炼制、贮运和使用过程中进入海洋的总量在不断增加<sup>[1]</sup>。我国每年有大量石油烃直接排入近海,污染物种类主要为原油和柴油等,污染海域主要分布在莱州湾、渤海湾等近岸海域<sup>[2]</sup>。目前石油烃已成为我国近海海洋环境中最主要的污染物之一。

石油烃组成成分复杂,含有烷烃、环烷烃、芳香烃等多种难以降解的有害物质,其水溶性组分(water-accommodated fractions, WAFs)是引起海洋生物毒性效应的主要组分,其中毒性最大的是微量溶于水的芳香烃类化合物和低分子量烷烃,如萘、蒽、芘、苯并芘等<sup>[3-4]</sup>。石油烃污染物入海,对生物和环境危害极大,会影响海洋生物的生长发育,进而导致生物多样性和生态系统的结构发生改变<sup>[5-6]</sup>。

目前关于石油烃对大型绿藻生长发育的影响已有一定报道。相关研究<sup>[7-11]</sup>指出,石油烃WAFs对孔石莼的生长以及叶绿素、脂肪酸等生理生化指标均有一定影响。董越等<sup>[12]</sup>更是认为浒苔会通过调节体内抗氧化酶的活性来适应石油烃污染。以上研究成果对于探讨石油烃对大型绿藻的毒性效应具有指导意义。然而,目前有关石油烃对大型绿藻不同发育阶段的毒性效应尚未见报道。大型藻生活史不同阶段对外界环境变化的响应不同<sup>[13]</sup>,不同发育阶段有何异同点,目前尚未明确,亟待开展相关工作。浒苔是石莼属的一种常见经济藻类,广泛分布于世界各地。由于生长的潮间带环境变化较为剧烈,会面临包括石油烃污染在内的各种胁迫,因此石莼属

绿藻常被用作海洋环境风险评估<sup>[14]</sup>。自2007年以来,浒苔更是作为我国黄海绿潮的肇事种,每年都在青岛沿岸大面积聚集<sup>[15]</sup>。作为致灾藻类,浒苔对生长环境具有极强的适应能力,所以研究其对外界环境的适应性机制,可能对揭示绿潮暴发有一定指导意义。因此,本文以浒苔为试验对象,在室内研究了柴油和原油水溶性组分对其不同阶段生长发育和各项生理指标的影响,以期评估石油烃污染对大型藻类的生理、生态影响提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 浒苔来源及培养

实验所用浒苔采集自青岛沿海,实验室内传代培养,培养基为f/2-si。光照培养箱培养条件为:温度( $24 \pm 2$ )℃,光照强度4000 lx,光照周期12 h : 12 h。

#### 1.1.2 浒苔孢子的获取

采用断裂的方法诱导浒苔释放孢子,将收集到的孢子迅速计数,用于实验。

#### 1.1.3 石油烃水溶性组分(WAFs)的制备

实验用油为原油和0#柴油,原油采集自江苏油田,0#柴油为加油站购买。将两种油分别和无菌海水按体积比1 : 10混合,搅拌,同时用超声处理6 h,将超声处理后的悬浊液转移至分液漏斗中,静置72 h,取下清液(即为WAFs母液)经0.22 μm醋酸纤维滤膜过滤,于4℃条件下避光保存滤液待用。

#### 1.1.4 WAFs的浓度测定

采用紫外分光光度法测定WAFs母液浓

度。分别配制 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L、8 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L 的石油类标准液,以正己烷为对照,225 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线  $y = 0.0267x - 0.0114$ ,  $R^2 = 0.9965$ 。根据标准曲线计算得出原油和 0# 柴油的 WAFs 母液浓度分别为 20 mg/L 和 26 mg/L,实验时按需稀释。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 WAFs 对浒苔孢子附着和萌发的影响

将浒苔孢子( $0.8 \times 10^4$  cells/mL)接种到 6 孔板中,内装 5 mL f/2 培养液。每个 6 孔板内放 1 片灭菌盖玻片,便于计数附着的孢子量。其中实验组为石油烃浓度分别为 12 mg/L、3 mg/L 的柴油水溶液和原油水溶液,对照组为不含石油烃的灭菌海水。每组设置 3 个平行,避光培养 24 h,以保证孢子的随机附着。24 h 后取出盖玻片,在灭菌海水中轻微震荡数次,洗去未附着的孢子。光学显微镜下随机观察 20 个视野( $40 \times 10$  倍),取其平均值计算附着的孢子量。

预先将浒苔孢子( $0.8 \times 10^4$  cells/mL)接种到内装 5 mL f/2 培养液的 6 孔板中,避光 24 h 以保证其随机附着。实验开始时将其转移至光照培养箱中,并分别加入石油烃浓度为 12 mg/L、3 mg/L 的柴油水溶液和原油水溶液作为实验组,对照组为不含石油烃的孢子单培养组。分别于 24 h、48 h、72 h、96 h 在光学显微镜下观察盖玻片上孢子的萌发率,每个盖玻片计数 20 个视野。萌发率计算公式如下:

$$G = Y/X \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $G$  为萌发率;  $X$  为一个视野中总的孢子数;  $Y$  为一个视野中萌发的孢子数。

### 1.2.2 WAFs 对浒苔幼苗生长的影响

将萌发 7 d 的幼苗(长度 2 mm 左右)接种于 6 孔板内,内装 8 mL f/2 培养液。实验组加入不同浓度的石油烃水溶液,对照组加入等量灭菌海水,每个处理设置 3 个平行,在光照培养箱中培养。试验周期为 8 d,每 2 d 用直尺测量幼苗长度。

### 1.2.3 WAFs 对浒苔成体生长及生理特性的影响

称取 0.5 g 浒苔藻体于装有 200 mL f/2 培养液的三角烧瓶中培养,实验组和对照组设置及培养条件均同 1.2.2 节,试验周期为 7 d,并分别在 12 h、24 h、72 h、168 h 测量以下各参数。

### (1) 生长率(RGR)测定

用吸水纸充分吸取藻体表面水分,称得鲜重,通过如下公式计算其生长率(RGR):

$$RGR = [\ln(W_t/W_0)/t] \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $W_0$  为初始鲜重(g);  $W_t$  为第  $t$  d 时鲜重(g);  $t$  为培养时间(d)。

### (2) 叶绿素 $a$ (Chl $a$ )和类胡萝卜素(Car)测定

取 0.1 g 藻体加入 10 mL 甲醇并于 4 ℃ 条件下提取 24 h,2500 r/min 离心 10 min,以甲醇为空白对照,测定 665 nm、652 nm、510 nm、480 nm 波长下的吸光值,计算公式如下:

$$Chla = (16.29 \times OD_{665} - 8.542) \times V/W \quad (3)$$

$$Car = 7.6 \times (OD_{480} - 1.49 \times OD_{510}) \times V/W \quad (4)$$

式中:  $V$  为甲醇含量(mL);  $W$  为藻体质量(g)。

### (3) 可溶性蛋白及可溶性糖含量测定

可溶性蛋白含量采用以牛血清蛋白为标准液的考马斯亮蓝法测定。可溶性糖含量采用以葡萄糖为标准液的苯酚—硫酸法测定。

### (4) 超氧化物歧化酶及过氧化氢酶测定

酶活性采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性的测定采用黄嘌呤氧化酶法,过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性的测定采用钼酸铵法。

### 1.2.4 数据处理

实验数据采用 Excel 2019 作图,采用 SPSS 20 软件对数据进行统计分析。采用双因素方差进行差异显著性分析,显著性水平设置为  $\alpha = 0.05$ 。图表中所得数据均为平均值 $\pm$ 标准差。

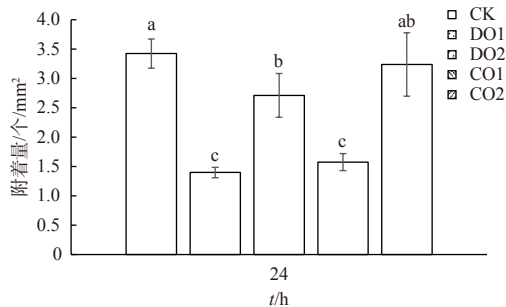
## 2 结果与讨论

### 2.1 WAFs 对浒苔不同生长发育阶段的影响

#### 2.1.1 WAFs 对浒苔孢子附着和萌发的影响

从图 1 可以看出,在柴油作用下,两浓度处理组中浒苔孢子的附着量均显著低于对照组( $P < 0.05$ ),且高浓度的影响效应大于低浓度。在原油处理下,仅高浓度组中浒苔孢子的附着量显著低于对照组( $P < 0.05$ ),而低浓度处理组的影响效应较小( $P > 0.05$ )。因此,不同石油烃对浒苔孢

子附着的毒性效应为高浓度柴油>高浓度原油>低浓度柴油>低浓度原油。



注:不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )

图1 不同石油烃对浒苔孢子24 h附着的影响

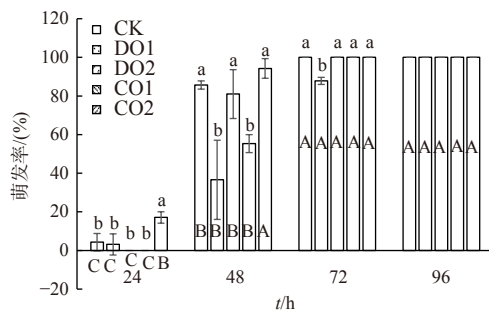
Fig. 1 Effects of different petroleum hydrocarbons on the adhesion of *Ulva prolifera* spores after 24 h

表1 不同石油烃处理和胁迫时间对浒苔孢子萌发和幼苗生长的双因素方差分析结果

Tab.1 Summary of two-way ANOVA results on the germination of *Ulva prolifera* spores and growth of *Ulva prolifera* seedlings exposed to different petroleum hydrocarbons and times

| 来源    | 孢子萌发率     |          |          | 幼苗长度      |          |          |
|-------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
|       | <i>df</i> | <i>F</i> | <i>P</i> | <i>df</i> | <i>F</i> | <i>P</i> |
| 处理    | 4         | 22.644   | 0.000    | 4         | 68.151   | 0.000    |
| 时间    | 3         | 846.113  | 0.000    | 4         | 147.597  | 0.000    |
| 处理×时间 | 12        | 11.178   | 0.000    | 16        | 11.576   | 0.000    |

注:*df*代表自由度;*F*表示*F*值,即方差分析求出的统计量;*P*表示*P*值,即显著性水平



注:不同小写字母表示同一时间下不同处理间差异显著;不同大写字母表示同一处理下不同时间差异显著( $P<0.05$ )

图2 不同石油烃对浒苔孢子萌发的影响

Fig. 2 Effects of different petroleum hydrocarbons on the germination of *Ulva prolifera* spores

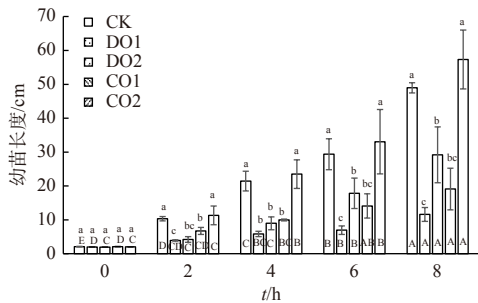
### 2.1.2 WAFs对浒苔幼苗生长的影响

表1的结果表明,不同石油烃处理、胁迫时间及二者交互作用对浒苔幼苗生长均有显著影响( $P<0.05$ )。从图3可以看出,柴油和原油对幼

苗的影响效应均为高浓度大于低浓度。对照组和处理组中浒苔幼苗长度均随胁迫时间呈增加的趋势,但不同处理下的幼苗增幅变化呈现出一定差异。其中两浓度柴油处理组均可抑制幼苗生长,在第2~8 d表现出显著影响。高浓度柴油在培养第8 d时对幼苗抑制效应达到最大,长度仅为对照组的23.69%。而在原油处理组中,仅高浓度组中幼苗的生长在第2~8 d受到抑制,在培养第8 d时幼苗长度为对照组的39.01%,而低浓度组原油对幼苗影响较小,甚至在第2~8 d促进了幼苗生长,但均未达到显著性差异。因此对于浒苔幼苗而言,柴油的影响作用同样高于原油。

2.1.3 WAFs对浒苔成体生长和生理特性的影响

表2的结果表明,不同石油烃处理、胁迫时间及二者交互作用对浒苔成体生长均有显著影响( $P<0.05$ )。图4表明,柴油和原油在高浓度下对浒苔生长的抑制作用均大于低浓度处理组,甚



注: 不同小写字母表示同一时间下不同处理间差异显著; 不同大写字母表示同一处理下不同时间差异显著 ( $P<0.05$ )

图 3 不同石油烃对浒苔幼苗生长的影响

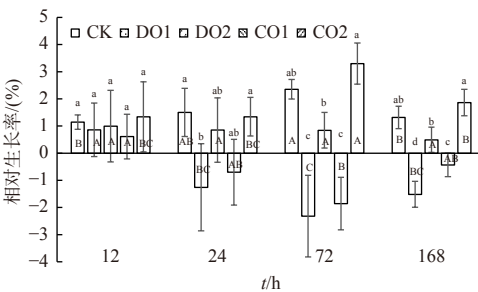
Fig. 3 Effects of different petroleum hydrocarbons on the growth of *Ulva prolifera* seedlings

表 2 不同石油烃处理和胁迫时间对浒苔成体生长和生理特性的双因素方差分析结果

Tab.2 Summary of two-way ANOVA results on the growth and physiological parameters of *Ulva prolifera* thalli exposed to different petroleum hydrocarbons and times

| 来源    | 生长率 |        |       | 叶绿素a   |       | 类胡萝卜素  |       | 可溶性蛋白  |       | 可溶性糖  |       | SOD酶   |       | CAT酶   |       |
|-------|-----|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|
|       | df  | F      | P     | F      | P     | F      | P     | F      | P     | F     | P     | F      | P     | F      | P     |
| 处理    | 4   | 24.363 | 0.000 | 12.397 | 0.000 | 17.073 | 0.000 | 28.451 | 0.000 | 9.702 | 0.000 | 15.408 | 0.000 | 13.765 | 0.000 |
| 时间    | 4   | 2.796  | 0.036 | 0.578  | 0.680 | 6.050  | 0.000 | 15.853 | 0.000 | 5.206 | 0.001 | 54.520 | 0.000 | 10.869 | 0.000 |
| 处理×时间 | 16  | 4.452  | 0.000 | 1.962  | 0.036 | 1.651  | 0.090 | 7.866  | 0.000 | 1.272 | 0.252 | 2.290  | 0.013 | 1.004  | 0.469 |

注:  $df$ 代表自由度;  $F$ 表示 $F$ 值, 即方差分析求出的统计量;  $P$ 表示 $P$ 值, 即显著性水平



注: 不同小写字母表示同一时间下不同处理间差异显著; 不同大写字母表示同一处理下不同时间差异显著 ( $P<0.05$ )

图 4 不同石油烃对浒苔成体生长的影响

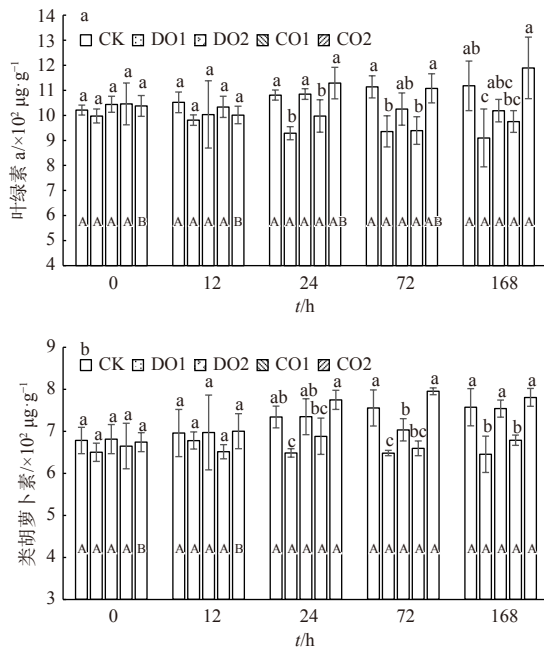
Fig. 4 Effects of different petroleum hydrocarbons on the growth of *Ulva prolifera*

不同石油烃处理下浒苔体内叶绿素  $a$  和类胡萝卜素含量的变化如图 5 所示。不同石油烃处理以及石油烃与胁迫时间的交互作用对叶绿素  $a$  有显著影响 ( $P<0.05$ ), 而胁迫时间对叶绿素  $a$  影响不显著 ( $P>0.05$ ) (表 2)。两种石油烃对

至使其呈现负增长。对照组中的浒苔生长率随胁迫时间呈现先增加后降低的趋势, 而两高浓度处理组则呈现先下降再回升的趋势。与对照组相比, 高浓度柴油组中浒苔的生长率在 24 ~ 168 h 均显著降低, 而高浓度原油仅在 72 h 和 168 h 降低了浒苔生长率, 但两处理组中的浒苔生长率均在 72 h 达到最低, 分别为 -2.3% 和 -1.9%。尽管低浓度柴油组中的浒苔生长率也有所降低, 但与对照组的差异不显著。低浓度原油组同样对浒苔生长的影响不显著, 甚至在 72 ~ 168 h 刺激了浒苔生长。因此对浒苔成体生长而言, 柴油的影响作用仍然高于原油, 并且高浓度的抑制作用更明显。

叶绿素  $a$  的影响效应均为高浓度大于低浓度, 并且柴油大于原油。在高浓度柴油胁迫下, 浒苔体内的叶绿素  $a$  含量在 24 ~ 168 h 显著低于对照组, 并且在 168 h 时达到最低, 为对照组的 81.4%。而在低浓度柴油胁迫下, 叶绿素  $a$  含量虽然有所降低, 但与对照组差异不显著。高浓度原油在 24 h 和 72 h 降低了叶绿素  $a$  的含量, 分别为对照组的 92.3% 和 84.3%。而低浓度原油对叶绿素  $a$  的影响不显著, 甚至高于对照组。

不同石油烃处理、胁迫时间对类胡萝卜素均有显著影响 ( $P<0.05$ ), 但二者交互作用对类胡萝卜素影响不显著 ( $P>0.05$ ) (表 2)。对照组中的类胡萝卜素含量随时间逐渐增加, 而高浓度柴油组中的类胡萝卜素含量却呈现下降的趋势。在高浓度柴油胁迫下, 类胡萝卜素含量在 24 ~ 168 h 显著降低, 并且胁迫时间越长, 含量降低越显著。在 168 h 时, 浒苔体内类胡萝卜素含量达到最低, 为对照组的 85.2%。低浓度柴油组中的



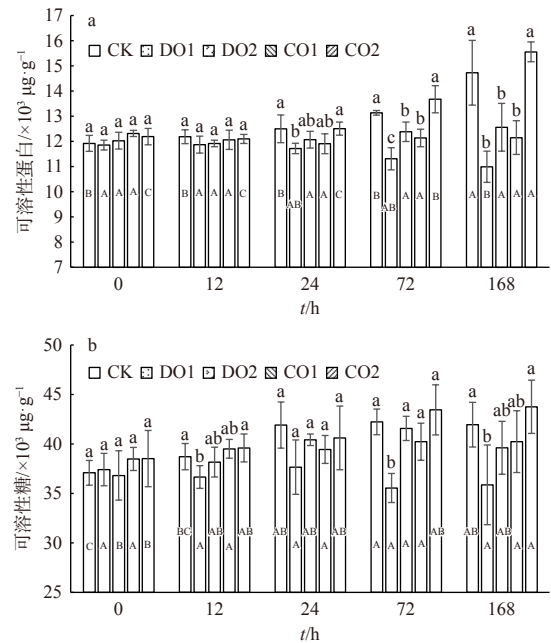
注:不同小写字母表示同一时间下不同处理间差异显著;不同大写字母表示同一处理下不同时间差异显著( $P < 0.05$ )

图5 不同石油烃对浒苔叶绿素a和类胡萝卜素的影

Fig. 5 Effects of different petroleum hydrocarbons on the chlorophyll a and carotenoids contents of *Ulva prolifera*

类胡萝卜素含量呈现波动变化,仅在72 h显著低于对照组,为对照组的93.1%。高浓度原油在72 ~ 168 h降低了类胡萝卜素的含量,分别为对照组的87.3%和89.6%。低浓度原油组中的类胡萝卜素含量也呈现波动变化,但与对照组差异不显著,甚至高于对照组。

不同石油烃处理下浒苔体内可溶性蛋白和可溶性糖含量的变化如图6所示。由表2的结果可知,不同石油烃处理、胁迫时间及二者交互作用对可溶性蛋白均有显著影响( $P < 0.05$ )。随培养时间的进行,对照组中浒苔体内的可溶性蛋白含量逐渐增加,而两柴油处理组却表现出不同的趋势,其中高浓度组中的蛋白含量逐渐降低,而低浓度组中的蛋白含量却逐渐增加。柴油浓度越高、胁迫时间越长,浒苔体内可溶性蛋白含量越低。对于原油而言,高浓度处理组中的可溶性蛋白含量呈现先升高再降低的趋势,在72 ~ 168 h显著低于对照组,但降幅低于同浓度柴油。而低浓度原油组中的可溶性蛋白含量呈现逐渐增加的趋势,甚至高于对照组。



注:不同小写字母表示同一时间下不同处理间差异显著;不同大写字母表示同一处理下不同时间差异显著( $P < 0.05$ )

图6 不同石油烃对浒苔可溶性蛋白和可溶性糖的影响

Fig. 6 Effects of different petroleum hydrocarbons on soluble protein and soluble sugar of *Ulva prolifera*

表2的结果表明,不同石油烃处理、胁迫时间对浒苔体内可溶性糖含量有显著影响( $P < 0.05$ ),而二者交互作用对其影响不显著( $P > 0.05$ )。柴油和原油对浒苔可溶性糖的影响作用均为高浓度大于低浓度,但仅高浓度柴油处理组在72 h和168 h显著降低了浒苔体内可溶性糖的含量,分别为对照组的84.2%和85.5%。

图7和表2是浒苔在石油烃胁迫下体内抗氧化酶活性的变化趋势。不同石油烃处理、胁迫时间及二者交互作用对SOD酶活性均有显著影响( $P < 0.05$ )。从图7a可以看出,柴油和原油处理对浒苔体内SOD酶活性的影响均为高浓度大于低浓度。在含油的处理组和无油的对照组中,SOD酶活性随时间均表现出先增加再降低的趋势,但柴油和原油处理组仅在高浓度下对SOD酶活性有显著影响。其中,高浓度柴油对SOD酶的刺激作用最显著,在24 ~ 168 h均增加了浒苔体内SOD酶的活性,并且在72 h时的促进率达到最大,与对照组相比增幅为24.8%;其次为高浓度原油,其在72 h时促进了SOD酶活性,增幅为18.4%。低浓度柴油和原油尽管也

在一定程度上刺激了 SOD 酶的活性,但均与对照组差异不显著。

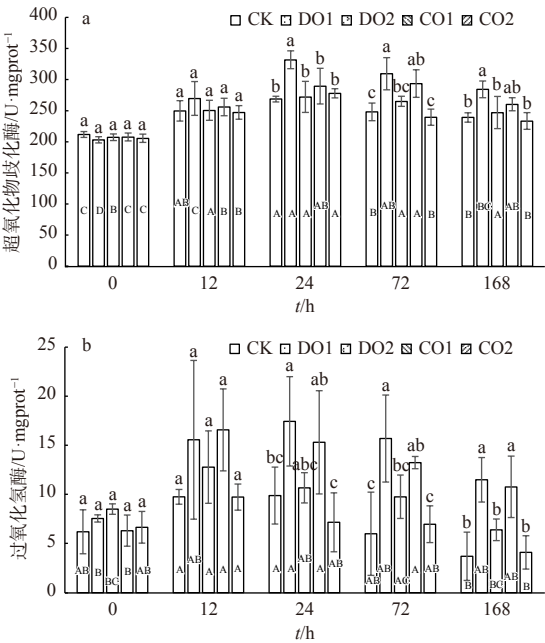
另外,不同石油烃处理、胁迫时间对浒苔体内 CAT 酶活性有显著影响( $P<0.05$ ),而二者交互作用的影响不显著( $P>0.05$ ) (表 2)。柴油和原油对浒苔 CAT 酶活性的促进作用,与其浓度呈现明显的正相关关系,但仅高浓度处理下有显著性差异( $P<0.05$ ) (图 7b)。其中,高浓度柴油在 168 h 时对 CAT 酶活性的促进率达到最大,与对照组相比增幅为 210.6%;其次为高浓度原油,其在 168 h 时对 CAT 酶活性的促进率比对照组增加 191.2%。尽管低浓度柴油和原油也在一定程度上刺激了 CAT 酶的活性,但均未达到显著性差异水平。

2.2 浒苔不同生长发育阶段对石油烃的耐受性差异

综上可见(表 3),低浓度原油仅对浒苔孢子的萌发过程有一定促进作用,对其他阶段的生长发育及各项生理指标均无显著影响。但高浓度原油对浒苔各阶段生长发育及除可溶性糖外的各项生理指标均有影响。低浓度柴油对浒苔孢子的附着、幼苗的生长有抑制作用,但对浒苔成体的生长影响不显著,并且仅对类胡萝卜素和可溶性蛋白这两项生理指标有一定抑制效应。而在高浓度柴油胁迫下,浒苔孢子的附着和萌发、幼苗和成体的生长均受到抑制,并且光合色素、可溶性蛋白、可溶性糖、抗氧化酶等生理指标均出现异常。因此,浒苔不同发育阶段对两种石油烃的敏感度为孢子>幼苗>成体,早期阶段对石油烃更敏感。并且两种石油烃对浒苔的毒性大小为柴油>原油,高浓度>低浓度。

浒苔在不同生长发育阶段对外界石油烃的响应存在明显差异。在早期阶段,对石油烃最为

敏感,随着藻体逐渐发育,其耐受能力不断增强。这一结果与目前已有研究报道相符<sup>[13,16-17]</sup>。例如,Han 等<sup>[13]</sup>指出绿藻的幼体或微观阶段对紫外线损伤更敏感。刘青<sup>[16]</sup>认为,微藻只能对附着阶段裸露的浒苔孢子/配子产生影响,而萌发期、幼苗期、成体期和死亡期的浒苔均会通过多种途径抑制微藻生长。蔡佳宸等<sup>[17]</sup>也认为铜藻腐烂液和培养液对浒苔萌发以及幼苗生长有不同的影响作用。浒苔在不同阶段对外界所表现出的差异性可能与自身的生长特性有关:刚释放的孢子是浒苔生活史中最简单的阶段,仅为裸露



注:不同小写字母表示同一时间下不同处理间差异显著;不同大写字母表示同一处理下不同时间差异显著( $P<0.05$ )

图 7 不同石油烃对浒苔 SOD 酶和 CAT 酶的影响

Fig. 7 Effects of different petroleum hydrocarbons on the SOD and CAT activity of *Ulva prolifera*

表 3 石油烃对浒苔不同阶段生长发育及生理指标的影响

Tab.3 Effect of petroleum hydrocarbon on the growing development and physiological performance of *Ulva prolifera* at different stages

| 不同石油烃浓度     | 浒苔不同生长发育阶段 |    |    |    |      |       |       |      |      |      |
|-------------|------------|----|----|----|------|-------|-------|------|------|------|
|             | 孢子         |    | 幼苗 | 成体 |      |       |       |      |      |      |
|             | 附着         | 萌发 | 生长 | 生长 | 叶绿素a | 类胡萝卜素 | 可溶性蛋白 | 可溶性糖 | SOD酶 | CAT酶 |
| 原油(3 mg/L)  | /          | +  | /  | /  | /    | /     | /     | /    | /    | /    |
| 原油(12 mg/L) | —          | —  | —  | —  | —    | —     | —     | /    | +    | +    |
| 柴油(3 mg/L)  | —          | /  | —  | /  | /    | —     | —     | /    | /    | /    |
| 柴油(12 mg/L) | —          | —  | —  | —  | —    | —     | —     | —    | +    | +    |

注: +代表促进;—代表抑制;/代表无影响

的单细胞,无细胞壁保护,大部分生理功能(如蛋白合成和光合作用)还没有完全建立。因此孢子比较脆弱,抵御外界环境能力较弱。而随着浒苔孢子的不断发育,细胞逐渐增多,细胞壁开始形成,其抵御外界环境的能力也不断增强<sup>[18]</sup>。

浒苔作为一种适应性较强的大型海藻,其复杂的繁殖方式被认为是黄海绿潮形成的重要原因之一。一些研究报道认为,自然环境中浒苔的快速繁殖主要以孢子/配子繁殖为主,所产生的孢子/配子分散于自然水体中,待条件合适后迅速生长繁殖,引起绿潮灾害<sup>[19]</sup>。蔡佳宸等<sup>[17]</sup>指出,浒苔微观繁殖体附着和萌发生长阶段是每年绿潮早期形成的重要环节,一旦浒苔微观繁殖体的附着和幼苗的生长受到影响,则可能不仅影响绿潮的早期形成,还会对绿潮的最终规模造成影响。所以石油烃污染对浒苔不同阶段的影响效应值得深入评估。

### 2.3 两种石油烃对浒苔生长发育及生理特性的影响效应

本研究结果表明,原油对浒苔呈现出“低促高抑”的影响效应。目前这一现象已在浮游植物中被证实<sup>[20]</sup>。同时董越等<sup>[12]</sup>的研究表明浒苔对原油有一定吸收,并且浒苔可以从海水中通过生物浓缩积累石油组分中的多环芳烃类物质<sup>[21]</sup>。一些研究结果显示海洋溢油可能引发大面积藻华,甚至发生多次藻华,且一般发生在溢油发生后几周或几个月内<sup>[22-24]</sup>。例如,2010年4月,美国 Deepwater Horizon 发生重大溢油事件,而 MODIS 图像显示此次溢油后间隔 20 d 左右此海域发生藻华<sup>[22-23]</sup>;2011年6月,渤海蓬莱溢油历时约3个月,同时在溢油附近海域连续发生了3次微藻藻华<sup>[22]</sup>。这可能是因为风化过程、生物分解过程以及有效的溢油处置措施使海水中的石油烃浓度降低<sup>[22,24]</sup>。而本文结果证实,在低浓度原油作用下,浒苔孢子可附着萌发、幼苗和成体均可正常生长发育。并且已有报道表明,石油烃经海洋微生物降解,可为藻类生长提供所需的营养盐和小分子有机碳,从而在溢油发生后促进藻体生长<sup>[24-25]</sup>。例如,2021年4月,青岛沿岸发生了严重的石油泄漏事件<sup>[26]</sup>,而同年夏天黄海暴发了自2007年以来规模最大的一次绿潮<sup>[15]</sup>。虽

然此次大规模绿潮的发生原因尚不明确,但2021年4月的溢油事件可能为该区域提供了一种促进浒苔藻体生长的环境条件。但总体而言,该溢油事件和溢油后大规模绿潮之间的关系,尚需进一步研究。

相同浓度下柴油对浒苔的毒性作用均高于原油,浒苔各个生长发育阶段均对柴油更敏感。这一结果与 Jiang 等<sup>[27]</sup>、张喆等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。张喆等<sup>[28]</sup>研究表明,原油对斑节对虾不同发育阶段幼体的毒性均小于 0<sup>#</sup>柴油。石油烃对生物的影响程度取决于石油烃种类、浓度及生物种类。各石油烃类的组成不同,会对不同生物产生不同的影响,甚至对同种生物不同发育阶段和各方面产生的影响也有差异。一般认为,人工炼制的油制品的毒性要远远大于原油。石油烃的毒性主要来源于芳香烃组分及其衍生物(如苯、萘、菲)以及低分子量烷烃及烷基衍生物,且毒性与其含量呈正相关关系<sup>[3]</sup>。而 0<sup>#</sup>柴油 WAFs 中芳香烃及其取代物、烷烃比例均高于原油<sup>[27]</sup>,因而 0<sup>#</sup>柴油 WAFs 的毒性更高,对浒苔的抑制效应更强。

本研究中,高浓度柴油对浒苔的毒性作用最显著。在高浓度柴油胁迫下,浒苔各阶段生长发育及光合色素、可溶性组分、抗氧化酶等生理指标均出现异常。石油烃对大型绿藻藻体生长的影响已有相关报道, Liu 等<sup>[9]</sup>、徐丹等<sup>[11]</sup>的研究均表明孔石莼的生长率会随着石油烃浓度的增加而降低。这与本研究结果相符。另外,石油烃还会对浒苔生理特性产生一定毒害,首先会降低其光合色素含量。这与王珊等<sup>[8]</sup>、Liu 等<sup>[9]</sup>、董越等<sup>[12]</sup>研究结果一致。其原因可能是,在石油烃作用下,藻类细胞质和叶绿体被瓦解,有关光合作用酶和色素合成酶失活,从而影响光合色素含量。其次,石油烃对浒苔可溶性蛋白的抑制作用大于可溶性糖,并且随胁迫时间而逐渐加强。最后,浒苔 SOD 与 CAT 酶的活性在高浓度柴油作用下均显著升高,这与徐丹等<sup>[11]</sup>的研究结果相似,即高浓度石油烃胁迫可诱导藻体体内抗氧化酶的合成,从而降低对藻体的毒性,这可能是浒苔为了应对环境中过量石油烃毒害而产生的自我保护机制。

### 3 结论

(1) 浒苔在不同生长发育阶段对石油烃的敏感度为孢子>幼苗>成体。随着浒苔的生长发育,其耐受能力不断增强。

(2) 两种石油烃对浒苔的毒性效应为柴油>原油,且高浓度>低浓度。在高浓度柴油(12 mg/L)胁迫下,浒苔孢子的附着和萌发、幼苗和成体的生长均受到抑制,并且光合色素、可溶性蛋白、可溶性糖、抗氧化酶等生理指标均出现异常。

### 参考文献:

- [1] HELLE I, MÄKINEN J, NEVALAINEN M, et al. Impacts of oil spills on arctic marine ecosystems: a quantitative and probabilistic risk assessment perspective[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(4): 2112-2121.
- [2] 宫云飞, 赵鹏飞, 兰冬东, 等. 我国海洋溢油事故特征与趋势分析[J]. *海洋开发与管理*, 2018, 35(11): 42-45.
- [3] JIANG Z B, HUANG Y J, XU X Q, et al. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 30(1): 8-15.
- [4] FAKSNESS L G, ALTIN D, NORDTUG T, et al. Chemical comparison and acute toxicity of water accommodated fraction (WAF) of source and field collected Macondo oils from the Deepwater Horizon spill[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 91(1): 222-229.
- [5] DENG Y W, ADZIGBLI L. Assessing the impact of oil spills on marine organisms[J]. *Journal of Oceanography and Marine Research*, 2018, 6(1): 1000179.
- [6] BEYER J, TRANNUM H C, BAKKE T, et al. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: a review[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 110(1): 28-51.
- [7] STEPANIYAN O V. Effects of crude oil on major functional characteristics of macroalgae of the Barents Sea[J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2008, 34(2): 131-134.
- [8] 王 珊, 刘 瑀, 张 松. 石油烃对孔石莼生长及光合作用的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(5): 432-436.
- [9] LIU Y X, LIU Y, LOU Y D, et al. Toxic effect of oil spill on the growth of *Ulva pertusa* by stable isotope analysis[J]. *IOP Conference Series:Earth and Environmental Science*, 2019, 344: 012062.
- [10] LIU Y X, LIU Y, LI N, et al. Effect of oil spill stress on fatty acid stable carbon isotope composition of *Ulva pertusa*[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 649: 1443-1451.
- [11] 徐 丹, 郭远明, 李铁军, 等. 大型海藻对石油烃的降解技术研究[J]. *浙江海洋大学学报: 自然科学版*, 2020, 39(2): 167-171.
- [12] 董 越, 陈榕榕, 谢汶龙, 等. 石油烃污染对浒苔生长和抗氧化指标的影响[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(11): 288-292.
- [13] HAN T, KONG J A, HAN Y S, et al. UV-A/blue light-induced reactivation of spore germination in UV-B irradiated *Ulva pertusa* (Chlorophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2004, 40(2): 315-322.
- [14] 张忠山, 王晓梅, 刘 峰, 等. 石莼属绿藻应答环境胁迫的生理特征与机制研究进展[J]. *海洋环境科学*, 2020, 39(3): 473-479.
- [15] ZHENG L X, WU M Q, CUI Y T, et al. What causes the great green tide disaster in the South Yellow Sea of China in 2021?[J]. *Ecological Indicators*, 2022, 140: 108988.
- [16] 刘 青. 黄海绿潮浒苔与浮游植物间的相互作用研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2015: 102-105.
- [17] 蔡佳宸, 耿慧霞, 孔凡洲, 等. 铜藻金潮对浒苔绿潮和几种赤潮原因种生长影响的模拟研究[J]. *海洋与湖泊*, 2019, 50(5): 1050-1058.
- [18] CHRISTIE A O. Spore settlement in relation to fouling by *Enteromorpha*[C]//Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling. Evanston: Northwestern University Press, 1973: 674-681.
- [19] 杨 柳, 卓品利, 钟佳丽, 等. 水杨酸对浒苔生长和生理特性的影响[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(6): 1962-1968.
- [20] NAYAR S, GOH B P L, CHOU L M. Environmental impacts of diesel fuel on bacteria and phytoplankton in a tropical estuary assessed using *in situ* mesocosms[J]. *Ecotoxicology*, 2005, 14(3): 397-412.
- [21] LI J Y, YANG F Y, JIN L, et al. Safety and quality of the green tide algal species *Ulva prolifera* for option of human consumption: a nutrition and contamination study[J]. *Chemosphere*, 2018, 210: 1021-1028.
- [22] 周 利, 唐丹玲, 孙 景. 海洋溢油后浮游植物藻华观测分析和机制探讨[J]. *生态科学*, 2013, 32(6): 692-702.
- [23] GRAHAM W M, CONDON R H, CARMICHAEL R H, et al. Oil carbon entered the coastal planktonic food web during the Deepwater Horizon oil spill[J]. *Environmental Research Letters*, 2010, 5(4): 045301.
- [24] PARK B S, ERDNER D L, BACOSA H P, et al. Potential effects of bacterial communities on the formation of blooms of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum* after the 2014 Texas City "Y" oil spill (USA)[J]. *Harmful Algae*, 2020, 95: 101802.
- [25] RIBEIRO H, MUCHA A P, ALMEIDA C M R, et al. Bacterial community response to petroleum contamination and nutrient addition in sediments from a temperate salt marsh[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458/460: 568-576.
- [26] 中华人民共和国海事局. 青岛“4·27”船舶污染事故调查报告[R/OL]. (2022-01-28)[2022-06-24]. <https://www.msa.gov.cn/page/article.do?articleId=93D989DA-CA4B-4BBC-919A-8857DE4505DF>.
- [27] JIANG M, LI L, LI Y R, et al. Oxidative stress in shellfish *Sinonovacula constricta* exposed to the water accommodated fraction of zero sulfur diesel oil and Pinghu crude oil[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 73(2): 294-300.
- [28] 张 喆, 陈海刚, 温为庚, 等. 0#柴油和流花原油对斑节对虾(*Penaeus monodon*)幼体的急性毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(6): 242-251.