

纳米氧化锌对细叶蜈蚣草(*Egeria najas*)光合作用的影响

乔金, 徐长山*, 张海娇, 邵海玲, 郑博文, 何惠敏

东北师范大学紫外光发射材料与技术教育部重点实验室, 吉林 长春 130024

摘要 采用细叶蜈蚣草(*Egeria najas*)作为受试植物, 分别用不同浓度的 ZnO NPs 处理细叶蜈蚣草六天, 通过 OJIP 荧光动力学曲线和脉冲瞬态荧光动力学曲线评估暴露在不同浓度的 ZnO NPs 悬浮液中的细叶蜈蚣草的光合性能。当细叶蜈蚣草暴露在 ZnO NPs 悬浮液中, 光系统 II 关闭的净速率(M_0)、J 点的相对可变荧光强度(V_j)和单位反应中心用于热能耗散的能量(DI_0/RC)有明显的下降趋势($p < 0.05$), 最大光化学量子效率(Φ_{P_0})、捕获的激子中用来推动电子传递的效率(Ψ_0)、电子传递的量子产额(Φ_{E_0})、实际光化学量子效率(ϕ'_{PSII})有上升的趋势($p < 0.05$)。表明 ZnO NPs 增强了光系统 II 反应中心之间的连通性、促进了光系统 II 受体侧的电子传递和光能的利用, 即 ZnO NPs 在某些方面促进了细叶蜈蚣草的光合作用。用相应浓度的 Zn^{2+} 溶液来处理细叶蜈蚣草, 当细叶蜈蚣草暴露在 Zn^{2+} 溶液中, 光系统 II 关闭的净速率、J 点的相对可变荧光强度和单位反应中心用于热能耗散的能量有明显的上升趋势($p < 0.05$), 最大光化学量子效率、捕获的激子中用来推动电子传递的效率、电子传递的量子产额、实际光化学量子效率有下降的趋势($p < 0.05$), 单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)、捕获的光能(TR_0/RC)和非调节性能量耗散量子产量(ϕ'_{NO})有明显的上升趋势($p < 0.05$), 即 Zn^{2+} 降低了光系统 II 反应中心之间的连通性、抑制了光系统 II 受体侧的电子传递和光能的利用并使反应中心失活, 即 Zn^{2+} 抑制了细叶蜈蚣草的光合作用。在 ZnO NPs 处理细叶蜈蚣草的实验中并没有发现光合作用受抑制情况, 表明 ZnO NPs 的促进作用强于其释放的游离 Zn^{2+} 的抑制作用。

关键词 ZnO 纳米粒子; 细叶蜈蚣草; 叶绿素 a 荧光; 光系统 II

中图分类号: Q945.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)05-1495-08

引言

由于氧化锌纳米粒子(ZnO NPs)具有大比表面积效应和较强的氧化还原能力, 因此 ZnO NPs 已经被广泛地用于化妆品、橡胶、医学、化学纤维、电子工业和其他领域^[1]。人们将 ZnO NPs 加入到防晒霜中, 使其能有效地吸收长波紫外线^[2]。ZnO NPs 有抗衰老、抗摩擦、低消耗和长寿命等优点, 因此它可以作为高速耐磨橡胶制品的添加剂^[3]。ZnO NPs 有抗菌、脱臭和自清洁等特点, 被用于卫浴产品当中^[4]。然而, 在生产、使用和处理过程中, ZnO NPs 不可避免地释放到环境当中。据统计, ZnO NPs 每年的生产总量在 550~5 550 t, 其产量大约是任何其他纳米材料的 10~100 倍^[5]。在欧洲, 天然水和海水中 ZnO NPs 的含量分别是 10 和 430 ng · L⁻¹^[5]。有研究表明, ZnO NPs 能够抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的生长^[6], 能明显地抑制黑麦草、萝卜和油菜根

生长^[7], 影响斑马鱼的发育^[8]。ZnO NPs 对植物的毒性主要表现在抑制种子的萌发、产生基因毒性从而影响 DNA 的表达、影响光合系统、降低叶绿素的含量和减少植物的生物量^[9]。ZnO NPs 对水生高等植物的毒性研究相对较少^[10], 细叶蜈蚣草(*Egeria najas*)属于水蟹科蜈蚣草属, 是广泛分布在南美一带的沉水植物, 后作为一种观赏性水草引入中国。很多研究已经证实细叶蜈蚣草具有净化水质的功能。我们采用细叶蜈蚣草作为受试植物, 研究 ZnO NPs 对其光合作用的影响。

叶绿素 a 荧光检测在过去的几十年已经被广泛地应用到光合作用研究中, 对于分析光合生物对各种因素的生理反应。这一技术是具有便捷、可靠、对生物体没有影响的优点。叶绿素 a 荧光检测是通过测量光系统 II 发出的叶绿素 a 荧光的变化来分析植物光合作用受到的影响^[11]。光系统 II 的荧光产量主要受到两方面的影响, 一方面是光系统 II 反应中心绑定的醌受体的氧化还原(光化学荧光猝灭, qP), 另一方面

收稿日期: 2018-03-24, 修订日期: 2018-08-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(11374046, 11074030)资助

作者简介: 乔金, 1991年生, 东北师范大学紫外光发射材料与技术教育部重点实验室硕士研究生 e-mail: qiaoj338@nenu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: csxu@nenu.edu.cn

是在光系统天线色素分子中发生的热能耗散。在适应光照的过程中,这种耗散性能的增强来源于非光化学荧光猝灭(NPQ)。目前,人们一般用两种不同的方法来测量叶绿素 a 荧光:(1) 经过暗适应处理后,用一个短的饱和脉冲光来测量快速荧光动力学曲线。(2) 在几分钟的光化光适应后,叶绿素 a 荧光达到稳态,通过加饱和脉冲光的方法测量荧光产量从而分析稳态下的光合作用情况^[12]。通过用脉冲振幅调制荧光仪(PAM)测量非光化学荧光猝灭可以得到发生在光系统 II 中的调节性能量耗散量子产量、非调节性能量耗散量子产量和实际光化学效率^[13]。通过用植物效率分析仪(PEA)测量快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP 曲线)可以获得更多的信息。OJIP 曲线反应了光系统 II 受体侧电子从微秒级到秒级的电子传递情况,曲线中可以得出一些重要信息。例如在光系统 II 中的能量捕获、电子传递、天线复合体上的激发能依靠质子梯度的热能耗散等^[14]。因此本文就通过这两种叶绿素 a 荧光检测法研究 ZnO NPs 对细叶蜈蚣草光合作用的影响。

有研究者认为 ZnO NPs 的毒性是由其悬浮液中溶解释放的 Zn^{2+} 造成的^[9-10, 15], 故配置了相应浓度的 Zn^{2+} 用来处理细叶蜈蚣草,检测 Zn^{2+} 对细叶蜈蚣草光合作用的影响,并与 ZnO NPs 作对照。结果表明 ZnO NPs 在某些方面促进了细叶蜈蚣草的光合作用,而当 Zn^{2+} 浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Zn^{2+} 就已经抑制了细叶蜈蚣草的光合作用。

1 实验部分

1.1 原料

ZnO NPs 购买于 Sigma-Aldrich, 粒径范围 $< 50 \text{ nm}$ (BET), 纯度 $> 97\%$ 。 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 购买于天津市福晨化学试剂厂。细叶蜈蚣草 (*Egeria najas*) 购买于水族养殖场。挑选生长良好,粗细、长度均匀,生长状况一致的细叶蜈蚣草,用去离子水冲洗干净,置于 10 L 的玻璃鱼缸中,在室温下用去离子水(UPH-IV-10T, 四川优普超纯科技有限公司)培养,并且用植物生长灯(SY-ZWD-1200W, 广西三熠照明电器有限公司)每天光照 8 h, 光强大约 $100 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$ 。

1.2 制备 ZnO NPs 悬浮液和 Zn^{2+} 溶液

用分析天平(XS205DU, Switzerland)称取 15 mg 的 ZnO NPs 加入到 150 mL 的去离子水中水浴超声(KQ-250DB, 350 W, 昆山市超声仪器有限公司)5 min, 得到 150 mL 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZnO NPs 悬浮液。然后用去离子水将 150 mL 的悬浊液稀释成 50 mL 的 20, 40, 60, 80 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的悬浮液分别置于 5 个 100 mL 的烧杯中。用分析天平称取 2.0 mg 的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 加入到 226 mL 的去离子水中, 得到浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $ZnSO_4$ 溶液, 然后用去离子水将其稀释成 50 mL 的 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液分别置于 5 个 100 mL 的烧杯中。

1.3 细叶蜈蚣草的培养

随机挑取三根生长良好,长短、粗细相同,生长状况一致的细叶蜈蚣草作为受试植物。将每一根的根部与顶部切掉,剩下的中间部分均匀地分成十二段。将这十二段随机抽

取,每两段为一份,每一根细叶蜈蚣草分为六份,一共三根,共计三组。将这三组细叶蜈蚣草分三种方式进行处理。处理一,将一组细叶蜈蚣草分别放置到六个盛有 50 mL 去离子水的烧杯中。此处理用于研究每一根细叶蜈蚣草的不同部分的光合性能是否有差别。处理二,将另一组细叶蜈蚣草分别暴露在浓度为 0, 20, 40, 60, 80 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZnO NPs 悬浮液中($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 50 mL 的去离子水)。处理三,将最后一组细叶蜈蚣草分别暴露在浓度为 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液中。用封口膜将烧杯口封住,用光强约为 $100 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$ 的植物灯,将以上三组细叶蜈蚣草在室温下每天光照 8 h, 培养 6 d。然后从每一个烧杯中的两段蜈蚣草各摘取三片叶片,随机将每段中两枚叶片分为一组,每段中剩余的叶片组成一组,共分为三组,从而对每个烧杯中的细叶蜈蚣草进行三次叶绿素荧光探测。测试前,将样品放入叶夹内进行暗适应 15~20 min。

1.4 叶绿素 a 荧光探测

1.4.1 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线的测量

利用便携式叶绿素荧光仪(Yaxin-1161G, 北京雅欣理仪科技有限公司)在室温下测量快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP 曲线)。470 nm 的蓝光 LED 作为激发光源,采用性能优异的 PIN 硅光电二极管探测波长为 685 nm 的叶绿素 a 荧光。激发光的持续时间设置为 10 s, 光强为 $3\ 500 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$ 。采样速率分别为:在 300 μs 以前每 10 μs 一次, 300 s~30 ms 每 100 s 一次, 30~300 ms 每 10 ms 一次, 300 ms~1 s 每 100 ms 一次, 1~10 s 每 1 s 一次。一般将 20 μs 处的荧光强度标记为 O 值(F_0), 分别把 2 和 30 ms 的荧光强度标记为 $J(F_J)$ 和 $I(F_I)$ 点, 饱和光照条件下的最大荧光值标记为 $P(F_M)$ 点。图 1 是光系统 II 能量流简化模型。吸收的能量(ABS)表示天线叶绿素吸收的光子。一部分激发能以荧光和热能的方式耗散, 另外一部分被反应中心所捕获, 即捕获的能量(TR)。一般把 Q_A 还原成 Q_A^- 的激发能看成是氧化还原能, 这些能量被用于电子传递(ET), 从而维持光 and 机构的新陈代谢。

为了分析 OJIP 暂态, Strasser 引入了 JIP 测定^[16]。表 1 列举了一些 JIP 测定参数, 参数的计算公式和简单的解释说明。

1.4.2 脉冲瞬态荧光动力学曲线的测量

将叶绿素荧光仪的测量方式设置成脉冲瞬态荧光动力学曲线测量模式。在此测量模式下, 首先光源会发射出一束持续时间为 1 s 的蓝光饱和脉冲, 波长为 470 nm、光强为 $3\ 500 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$, 可以测得叶片的最大叶绿素荧光(F_M)。接着用蓝色的光化光, 强度为 $100 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}$, 可以测得稳态荧光(F_S), 在荧光处于稳态的基础上用饱和脉冲可以测得稳态下的实际最大叶绿素荧光(F'_M)。

一条完整的荧光动力学曲线包括 O-J-I-P 快速上升的过程和 P-S-M-T 缓慢下降最终达到稳态的过程。P-S-M-T 缓慢下降过程的变化情况反应了两方面的调整。一方面, 光合机构通过使用光和磷酸化产物(ATP, NADPH), 卡尔文循环能力增强。另一方面, 吸收的能量主要用于光化学电子传递和天线色素的热能的耗散。热能的耗散主要以非光化学猝灭

的形式进行, 这种形式一般受类囊体的质子梯度和玉米黄素的数量调控^[11]。因此我们可以通过脉冲瞬态荧光动力学曲

线的测量, 从中得到光系统 II 能量耗散的几个参数。表 2 列举了这几个参数, 参数的计算公式和简单的解释说明。

表 1 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线 (O-J-I-P) 分析中使用的参数

Table 1 Formulae and terms used in the analysis of the O-J-I-P fluorescence induction dynamics curve

$V_J = (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$	J 点的叶绿素 a 相对可变荧光强度
$ABS/RC = \frac{M_0}{V_J} \times \frac{F_M}{F_M - F_0}$	单位反应中心吸收的光能
$ET_0/RC = \frac{M_0}{V_J} \times (1 - V_J)$	单位反应中心用于电子传递的能量
$TR_0/RC = \frac{M_0}{V_J}$	单位反应中心捕获的光能
$DI_0/RC = ABS/RC - TR_0/RC$	单位反应中心用于热耗散的能量
$\Phi_{P_0} = TR_0/ABS = \frac{F_M - F_0}{F_M}$	最大光化学量子效率
$\Phi_{E_0} = ET_0/ABS = \frac{F_M - F_0}{F_M} \times (1 - V_J)$	电子传递的量子产额
$\Psi_0 = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$	捕获的激子中用来推动电子传递的效率
$RC/CS = F_M \times \left(\frac{F_M - F_0}{F_M} \right) \times \frac{V_J}{M_0}$	单位面积含有活性反应中心的数量
$M_0 = 4(F_{300\ \mu s} - F_{50\ \mu s}) / (F_p - F_{50\ \mu s})$	光系统 II 关闭的净速率

表 2 脉冲瞬态荧光动力学曲线分析中使用的参数

Table 2 Formulae and terms used in the analysis of the pulse transient fluorescence induction dynamics curve

$\phi'_{PSII} = 1 - \frac{F_S}{F'_M}$	实际光化学量子效率
$\phi'_{NPQ} = \frac{F_S}{F'_M} - \frac{F_S}{F_M}$	调节性能量耗散量子产量
$\phi'_{NO} = \frac{F_S}{F'_M}$	非调节性能量耗散量子产量

1.5 数据处理

每组实验均重复三次以上, 数据处理采用 SSPS 23.0 软件进行方差分析, 采用 ANOVA 方法对实验数据进行差异显著性分析(检验标准为, $p < 0.05$)。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 。实验结果表示方式为平均值 ± 标准差。

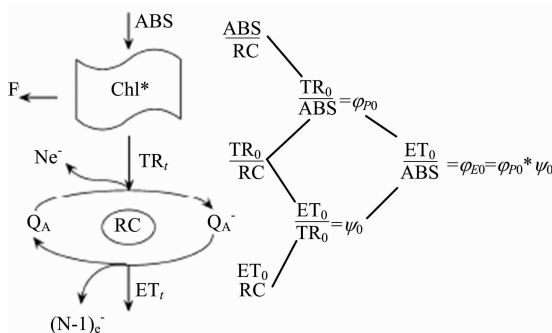


图 1 光系统 II 能量流模型^[17]

Fig. 1 Schematic of energy-flux model for PS II^[17]

2 结果与讨论

通过对去离子水中培养的细叶蜈蚣草进行叶绿素 a 荧光的探测, 经统计分析后, 发现反映植物光合作用的一系列荧光参数并没有发生明显的变化且显著性水平 p 均大于 0.05。从而说明同一根细叶蜈蚣草不同部分的光合作用情况并没有明显的差别。

细叶蜈蚣草在经过 ZnO NPs 和 Zn²⁺ 处理 6 d 之后, 光合作用的变化如图 2 所示, 我们可以看到 O, J, I 和 P 点大致发生在 20 μs, 2, 30 和 400 ms 处。在图 2(a)中可以明显看出, 细叶蜈蚣草经过 ZnO NPs 处理之后, 初始荧光的斜率和 J 点的相对可变荧光强度随着浓度的增加有减小的趋势。在图 2(b)中, 当细叶蜈蚣草经过 Zn²⁺ 处理之后, 初始荧光的斜率和 J 点的相对可变荧光强度随着浓度的增加有增大的趋势。

通过 JIP 测定计算出相应的荧光参数来分析 ZnO NPs 和 Zn²⁺ 对光系统 II 的影响。从图 3(a)中可以看出, 当 ZnO NPs 的浓度处于 20~80 mg · L⁻¹, 光系统 II 关闭的净速率 (M₀) 和 J 点的叶绿素 a 相对可变荧光强度 (V_J) 有明显降低的趋势 ($p < 0.05$), 当浓度处于 80 mg · L⁻¹ 时, M₀ 降低了 33.4%, V_J 降低了 20.5%, 但是当浓度达到 100 mg · L⁻¹, M₀ 和 V_J 降低的趋势并不明显 ($p > 0.05$)。这可能是由于 ZnO NPs 处于高浓度时, 团聚增强, 从而影响了其对细叶蜈蚣草的作用^[8, 18]。在图 3(b)中, 当 Zn²⁺ 浓度处于 0.4~2.0 mg · L⁻¹ 时, M₀ 和 V_J 会随着浓度的增加有明显增加的趋势 ($p < 0.05$), 当 Zn²⁺ 浓度处于 2.0 mg · L⁻¹ 时, M₀ 增加了 89%, V_J 增加了 47.6%。

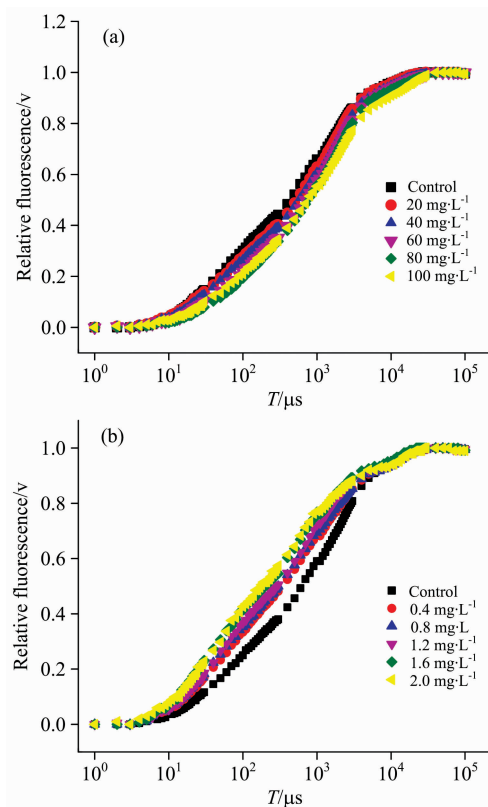


图 2 经过 ZnO NPs(a)和 Zn²⁺(b)处理 6 d 后的细叶蜈蚣草快速叶绿素荧光诱导动力学曲线(OJIP), 将叶绿素 a 荧光强度在 O 和 P 之间进行归一化处理, 记作 $V = (F_t - F_o) / (F_M - F_o)$

Fig. 2 Chl-a fluorescence transient(OJIP) of *Egeria najas* exposed six days to ZnO NPs (a) and Zn²⁺ (b), Chl-a fluorescence level normalized between O and P fluorescence levels as $V = (F_t - F_o) / (F_M - F_o)$

图 4 描述了经过 ZnO NPs 和 Zn²⁺ 处理之后, 单位反应中心吸收的光能 (ABS/RC)、捕获的光能 (TR₀/RC)、用于电子传递的能量 (ET₀/RC) 和用于热耗散的能量 (DI₀/RC) 都有不同程度的变化。在图 4(a) 中, ABS/RC, TR₀/RC 和 DI₀/RC 随着 ZnO NPs 的浓度增加有降低的趋势。当 ZnO NPs 浓度处于 40 和 60 mg · L⁻¹ 时, ABS/RC 降低明显 ($p < 0.05$); TR₀/RC 只在浓度处于 60 mg · L⁻¹ 时有明显的降低 ($p < 0.05$); 当 ZnO NPs 的浓度处于 20~80 mg · L⁻¹ 时, DI₀/RC 有明显的降低 ($p < 0.05$)。但是经过 ZnO NPs 处理后, ET₀/RC 几乎保持恒定, 没有发生明显变化 ($p > 0.05$)。在图 4(b) 中, ABS/RC, TR₀/RC 和 DI₀/RC 随着 Zn²⁺ 浓度的增加有明显的增加的趋势 ($p < 0.05$); 而 ET₀/RC 仍然几乎保持恒定, 并没有发生明显的变化 ($p > 0.05$)。当 Zn²⁺ 浓度处于 2.0 mg · L⁻¹ 时, ABS/RC 增加了 45.8%, TR₀/RC 增加了 28.6%, DI₀/RC 增加了 107.7%。

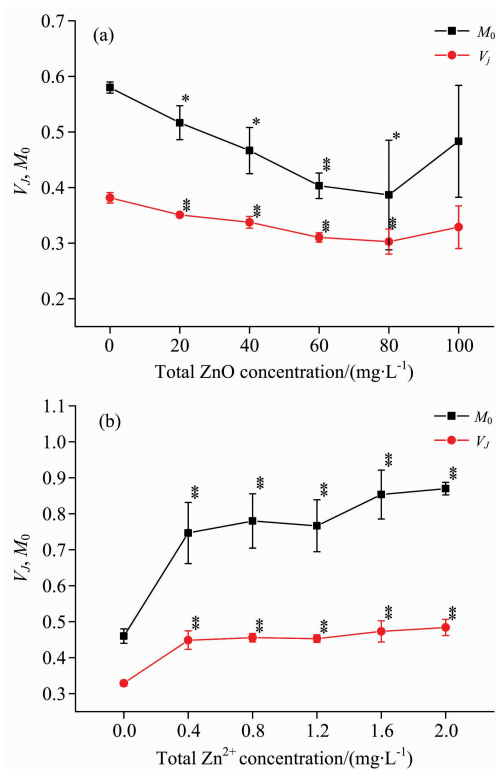


图 3 ZnO NPs(a)和 Zn²⁺(b)对光系统 II 关闭的净速率和 J 点的叶绿素 a 相对可变荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of ZnO NPs (a) and Zn²⁺ (b) on the net rate of PS II closure and chl-a relative variable fluorescence at J-step

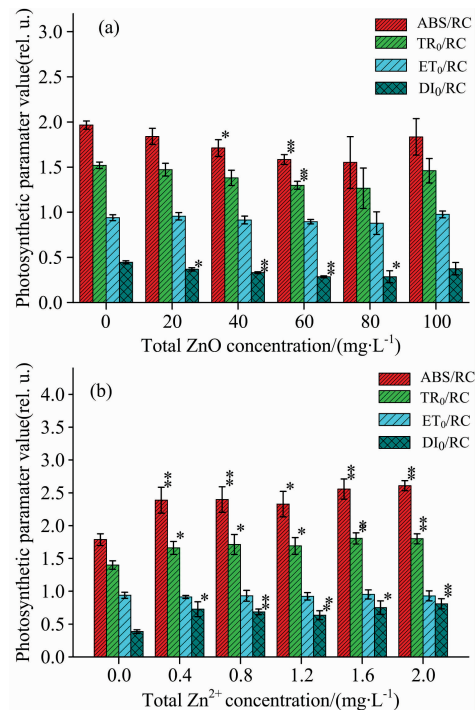


图 4 经过 ZnO NPs(a)和 Zn²⁺(b)处理后, 细叶蜈蚣草光系统 II 的能量流发生的变化

Fig. 4 Change in the energy fluxes within PS II for *Egeria najas* exposed to ZnO NPs (a) and Zn²⁺ (b)

图 5 描述了经过 ZnO NPs 和 Zn^{2+} 处理之后, 细叶蜈蚣草光系统 II 能量利用率的变化。在图 5(a)中, 随着 ZnO NPs 浓度的增加, 最大光化学量子效率(Φ_{P_0})、捕获的激子中用来推动电子传递的效率(Ψ_0)和电子传递的量子产额(Φ_{E_0})有上升的趋势, 浓度在 $20 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间有明显的上升趋势 ($p < 0.05$), 当浓度处于 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Φ_{P_0} , Ψ_0 和 Φ_{E_0} 分别上升了 5.6%, 12.8% 和 19%。在图 5(b)中, 随着 Zn^{2+} 浓度的增加, Φ_{P_0} , Ψ_0 和 Φ_{E_0} 有明显的下降的趋势 ($p < 0.05$)。当 Zn^{2+} 浓度在 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Φ_{P_0} , Ψ_0 和 Φ_{E_0} 分别下降了 11.9%, 23.1% 和 32.3%。

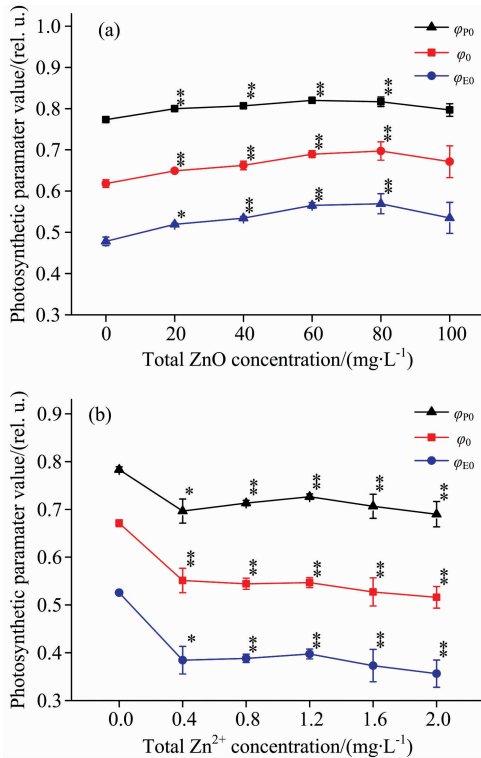


图 5 经过 ZnO NPs(a)和 Zn^{2+} (b)处理后, 细叶蜈蚣草光系统 II 能量利用率的变化

Fig. 5 Change of energy fluxes ratios of PS II in *Egeria najas* exposed to ZnO NPs (a) and Zn^{2+} (b)

图 6 描述了经过 ZnO NPs(a)和 Zn^{2+} (b)处理后, 细叶蜈蚣草单位面积含有活性反应中心的数量(RC/CS)发生的变化。在图 6(a)中, 随着 ZnO NPs 浓度的增加, RC/CS 几乎保持恒定, 没有发生明显的变化 ($p > 0.05$)。在图 6(b)中, 随着 Zn^{2+} 浓度的增加, RC/CS 有明显的下降趋势 ($p < 0.05$), 当浓度在 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, RC/CS 降低了 66.1%。

通过脉冲瞬态荧光动力学曲线的测量, 我们可以得到光系统 II 吸收光能的耗散分配的几个参数, 其中包括光化学能量耗散的方式、调节性能量耗散方式和非调节性能量耗散方式。图 7 描述了经过 ZnO NPs(a)和 Zn^{2+} (b)处理后, 细叶蜈蚣草光系统 II 吸收能量的耗散过程的变化。在图 7(a)中, 随着 ZnO NPs 浓度的增加, 光系统 II 的实际光化学量子效率(ϕ'_{PSII})有增加的趋势, 当浓度处于 $40 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增加的趋势比较明显 ($p < 0.05$); 而调节性能量耗散量子产量

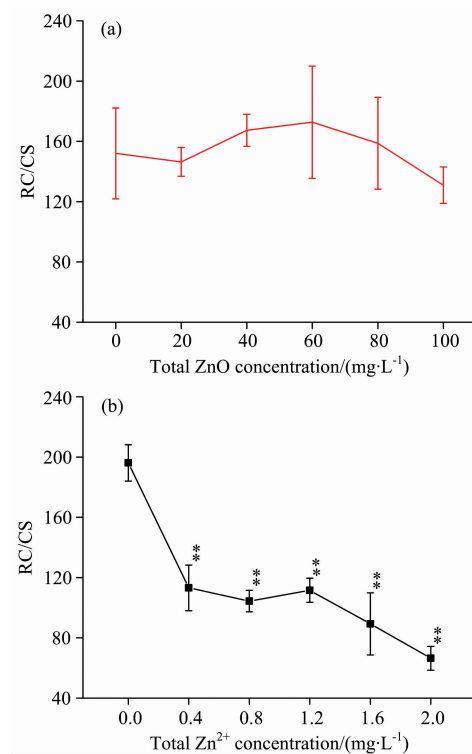


图 6 经过 ZnO NPs(a)和 Zn^{2+} (b)处理后, 细叶蜈蚣草单位面积含有活性反应中心的数量发生的变化

Fig. 6 Change of the amount of active PS II reaction centers per cross section for *Egeria najas* exposed to ZnO NPs (a) and Zn^{2+} (b)

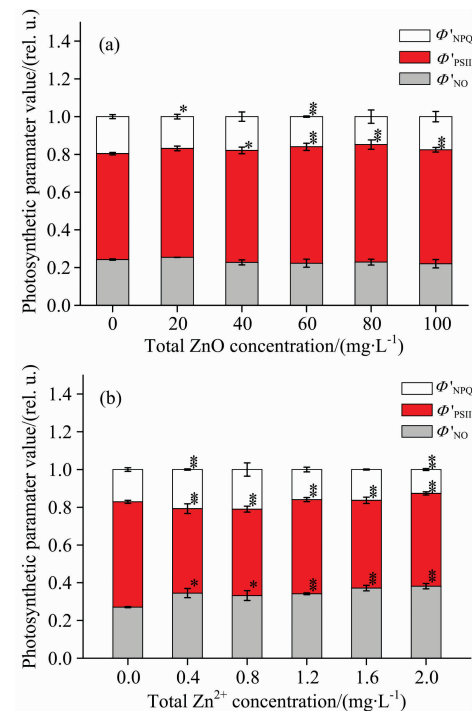


图 7 经过 ZnO NPs(a)和 Zn^{2+} (b)处理后, 细叶蜈蚣草光系统 II 吸收能量的耗散过程的变化

Fig. 7 Change of energy dissipation processes for PS II in *Egeria najas* exposed to ZnO NPs (a) and Zn^{2+} (b)

(ϕ'_{NPQ})和非调节性能量耗散量子产量(ϕ'_{NO})有降低的趋势,但降低趋势不明显。在图 7(b)中,随着 Zn^{2+} 浓度的增加, ϕ'_{PSII} 降低明显($p < 0.05$), ϕ'_{NO} 升高明显($p < 0.05$),而 ϕ'_{NPQ} 有先增加后降低的趋势。

经过快速叶绿素荧光诱导动力学曲线和脉冲瞬态荧光动力学曲线的测量以及相应光合作用荧光参数的统计分析,可以得出 ZnO NPs 和 Zn^{2+} 对细叶蜈蚣草光合作用的影响。当细叶蜈蚣草经过 ZnO NPs 处理后,光系统 II 关闭的净速率和 J 点的叶绿素 a 相对可变荧光强度有明显的下降趋势,最大光化学量子效率、电子传递的量子产额、捕获的激子中用来推动电子传递的效率、光系统 II 的实际光化学量子效率有明显的上升趋势,这表明在电子传递和吸收光能的利用方面,ZnO NPs 对细叶蜈蚣草的光合作用有促进的作用;当细叶蜈蚣草经过 Zn^{2+} 处理后,通过分析光系统 II 受体侧的变化、光系统 II 单位反应中心能量流的变化和光系统 II 能量耗散的变化,得到 Zn^{2+} 抑制了细叶蜈蚣草光合作用的影响。

已有研究表明,ZnO NPs 会对植物产生有毒的影响。这些影响可能来源于氧化锌纳米粒子产生的活性氧(ROS)对细胞产生氧化胁迫,ZnO NPs 悬浮液中 Zn^{2+} 的释放以及氧化锌纳米粒子对细胞造成的物理损伤^[19]。Lin 等^[18]用 ICP 的方法测得 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZnO NPs 悬浮液中 Zn^{2+} 的浓度大约在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Shaymurat 等^[20]对浓度在 $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ZnO NPs 悬浮液中的 Zn^{2+} 浓度进行了检测,结果表明,其浓度为 $0.353 \sim 1.936 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所以本实验将 Zn^{2+} 溶液的浓度配置成 $0.4, 0.8, 1.2, 1.6$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别用 ZnO NPs 和 Zn^{2+} 对细叶蜈蚣草(*Egeria najas*)进行处理,通过快速荧光动力学曲线和脉冲瞬态荧光动力学曲线的测量,分析比较二者对细叶蜈蚣草光合作用的影响。

首先,OJIP 曲线反映了光系统 II 电子受体库的一系列变化。很多实验结果和理论模拟已经表明,J 点与 $\text{Q}_\text{A}^- \text{Q}_\text{B}$ 形式的积累有关。相应地,I 和 P 点分别与 $\text{Q}_\text{A}^- \text{Q}_\text{B}^-$ 和 $\text{Q}_\text{A}^- \text{Q}_\text{B}^{2-}$ 形式的积累有关。因此,OJIP 曲线可以用来检测电子传递的状态。通过 JIP 测定参数的分析,发现经过 ZnO NPs 和 Zn^{2+} 的处理,光系统 II 受体侧的电子传递发生了不同的变化。 V_j 反应了光照 2 ms 时活性反应中心关闭的程度, M_0 反应了光系统 II 反应中心关闭的净速率。在图 3 中可以看出,细叶蜈蚣草经过 ZnO NPs 处理后,光系统 II 受体侧的电子传递和光系统 II 反应中心之间的连通性得到了增强,而 Zn^{2+} 则抑制了光系统 II 受体侧的电子传递和降低了光系统 II 反应中心之间的连通性。 Φ_{P_0} 反映了暗适应后光系统 II 的最大光化学量子效率; Ψ_0 反映了在光系统 II 反应中心捕获的激子中,用来推动电子传递链中位于 Q_A 下游的其他电子受体还原的激子数目与推动 Q_A 还原的激子数目的比率,即开始光照 2 ms 时活性反应中心的开放程度; Φ_{E_0} 表示反应中心吸收的光能用于电子传递的量子产额,即反应中心吸收的光能有多少用于将电子传递到电子传递链中 Q_A 下游的其他电子受体。在图 5 中可以看出 ZnO NPs 促进了光系统 II 对吸收光能的利用,而 Zn^{2+} 则抑制了光系统 II 对吸收光能的利用。图 6 可看出 ZnO NPs 并没有改变活性反应中心数量(RC/CS),而 Zn^{2+} 则在很大程度上减少了活性反应中心数量,失活

中心只是作为一个能量陷阱,它们吸收了光能,但并不能将吸收的光能用于电子传递。结合图 4 和图 6,经过 ZnO NPs 处理后,单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)和捕获的光能(TR_0/RC)都有减少的趋势,可能是由于 ZnO NPs 抑制了叶绿素的合成,这与赵桂琦等报道的 ZnO NPs 降低了叶绿素含量的结果相一致^[9];单位反应中心用于热能耗散的能量(DI_0/RC)的减少可能是由于 ZnO NPs 增加了吸收光能的利用率。由于 Zn^{2+} 减少了活性反应中心的数量,因此单位反应中心吸收的光能(ABS/RC)和捕获的光能(TR_0/RC)有增加的趋势。单位反应中心用于热能耗散的能量的增加可能是由于 Zn^{2+} 降低了吸收光能利用率的关系。经过 ZnO NPs 和 Zn^{2+} 处理之后,单位反应中心用于电子传递的能量没有发生明显的变化。当 ZnO NPs 浓度在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,这个浓度没有使很多荧光参数相对于对照组发生明显的变化,这可能是由于纳米粒子在高浓度下发生团聚所致^[8, 18]。

其次,通过脉冲瞬态荧光动力学曲线的测量,我们可以发现,光系统中的电子传递经过光合机构的一系列调控,进入了平稳状态,即叶绿素 a 荧光达到了稳态。这些调控机制包括叶黄素循环和卡尔文循环等。结合图 6 和图 7,经 ZnO NPs 处理后,反应中心并没有失活,实际光化学量子效率(ϕ'_{PSII})增加而调节性能量耗散量子产量(ϕ'_{NPQ})和非调节性能量耗散量子产量(ϕ'_{NO})有不同程度的减少,说明 ZnO NPs 促进了光系统 II 反应中心将吸收的光能用于光合电子传递的效率;经过 Zn^{2+} 处理后,一些光系统 II 反应中心失活,而非调节性能量耗散量子产量(ϕ'_{NO})的增加也反映了光系统 II 反应中心受到了损伤,可见这两者的结果是相一致的,而非调节性能量耗散量子产量(ϕ'_{NO})出现先增加后降低的趋势,这可能是由于调节性能量耗散这种保护机制不能应对更高浓度的锌离子。实际光化学量子效率(ϕ'_{PSII})的减少就说明了 Zn^{2+} 抑制了光系统 II 反应中心将吸收的光能用于光合电子传递的效率。

3 结 论

用去离子水、ZnO NPs 和 Zn^{2+} 分别培养细叶蜈蚣草(*Egeria najas*),然后对其进行快速叶绿素荧光诱导动力学曲线和脉冲瞬态荧光动力学曲线的测量。经过去离子水培养后,细叶蜈蚣草不同部分光合作用情况没有明显差异。经过 ZnO NPs 处理后,ABS/RC 和 TR_0/RC 降低,表明 ZnO NPs 抑制了细叶蜈蚣草叶绿素 a 的合成,从而影响了其对光能的吸收; M_0, V_j 降低表明 ZnO NPs 增强了光系统 II 反应中心之间的连通性并促进了光系统 II 受体侧的电子传递; DI_0/RC 的降低, $\Phi_{\text{P}_0}, \Psi_0, \Phi_{\text{E}_0}$ 和 ϕ'_{PSII} 的上升,表明 ZnO NPs 促进了光系统 II 对吸收光能的利用。所以 ZnO NPs 在某些方面促进了细叶蜈蚣草的光合作用。经过 Zn^{2+} 处理后,ABS/RC, TR_0/RC 和 ϕ'_{NO} 增加,表明部分光系统 II 反应中心失活,这与 RC/CS 随 Zn^{2+} 的浓度的升高而减少一致。 M_0, V_j 上升,表明 Zn^{2+} 降低了光系统 II 反应中心之间的连通性,并且抑制了光系统 II 受体侧的电子传递。 DI_0/RC 的升高, $\Phi_{\text{P}_0}, \Psi_0, \Phi_{\text{E}_0}$ 和 ϕ'_{PSII} 的降低,表明 Zn^{2+} 抑制了光系统 II 对吸收光

能的利用。因此 Zn^{2+} 抑制了细叶蜈蚣草的光合作用。

很多研究已经表明, ZnO NPs 对植物的影响除了来自 ZnO 纳米粒子自身的性质, 还有可能来自 ZnO NPs 悬浮液中 Zn^{2+} 的释放。从本工作结果来看, 尽管 Zn^{2+} 对细叶蜈蚣

草的光合作用有明显的抑制, 但暴露于 ZnO NPs 悬浮液中的细叶蜈蚣草的光系统 II 反应中心电子传递效率依然得到了增强, 从而促进了其光合作用。这可能是由于 ZnO NPs 对光合作用的促进要强于其释放的 Zn^{2+} 对光合作用的抑制。

References

- [1] Serpone Nick, Dondi Daniele, Albini Angelo. *Inorganica Chimica Acta*, 2007, 360(3): 794.
- [2] Nohynek G J, Lademann J, Roberts M S. *Critical Reviews in Toxicology*, 2007, 37(3): 251.
- [3] Klingshirn C. *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics*, 2007, 244(9): 3027.
- [4] Moezzi Amir, McDonagh A M, Cortie M B. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 185-186: 1.
- [5] Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, et al. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14(9): 1109.
- [6] Reddy K M, Feris Kevin, Bell Jason, et al. *Applied Physics Letters*, 2007, 90: 2139021.
- [7] Lin D H, Xing B S. *Environmental Pollution*, 2007, 150(2): 243.
- [8] Bai W, Zhang Z Y, Tian W J, et al. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 12(5): 1645.
- [9] ZHAO Gui-qi, ZHOU Yan, YIN Ying, et al(赵桂琦, 周 燕, 尹 颖, 等). *Journal of Nanjing University(南京大学学报·自然科学)*, 2017, 53(5): 894.
- [10] Chen X, O'Halloran J, Jansen M A. *Aquatic Toxicology*, 2016, 174: 46.
- [11] LIU Lei-zhen, WU Jian-jun, ZHOU Hong-kui, et al(刘雷震, 武建军, 周洪奎, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2017, 37(9): 2780.
- [12] Fratamico A, Tocquin P, Franck F. *Photosynthesis Research*, 2016, 128(3): 271.
- [13] Perreault F, Samadani M, Dewez D. *Nanotoxicology*, 2014, 8(4): 374.
- [14] Antal T K, Matorin D N, Ilyash L V, et al. *Photosynthesis Research*, 2009, 102(1): 67.
- [15] Franklin N M, Rogers N J, Apte S C, et al. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(24): 8484.
- [16] LI Peng-min, GAO Hui-yuan(李鹏民, 高辉远). *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology(植物生理与分子生物学学报)*, 2005, 31(60): 559.
- [17] XIA Jian-rong, TIAN Qi-ran(夏建荣, 田启然). *Journal of Environmental Sciences(环境科学学报英文版)*, 2009, 21(11): 1569.
- [18] Lin D, Xing B. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(15): 5580.
- [19] Hou J, Wu Y Z, Li X, et al. *Chemosphere*, 2018, 193: 852.
- [20] Shaymurat T, Gu J X, Xu C S, et al. *Nanotoxicology*, 2012, 6(3): 241.

Effects of ZnO NPs on the Photosynthetic Processes of *Egeria najas*

QIAO Jin, XU Chang-shan*, ZHANG Hai-jiao, SHAO Hai-ling, ZHENG Bo-wen, HE Hui-min

Key Laboratory of UV-Emitting Materials and Technology, Ministry of Education, Northeast Normal University, Changchun 130024, China

Abstract In this study, we selected *Egeria najas* as the sample plant, which was exposed to different concentrations of Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) suspensions for six days. The effects of different concentrations of ZnO NPs on photosynthetic processes of *Egeria najas* were explored respectively, by analyzing the O-J-I-P fluorescence induction dynamics curve and the pulse transient fluorescence induction dynamics curve. ZnO NPs strengthened the connectivity between photosystem II (PS II) units, promoted the efficiency of the electron transport at the acceptor side of PS II and the utilization of the absorbed light energy, indicated by the significant decrease ($p < 0.05$) in the net rate of PS II closure (M_0), the relative variable fluorescence intensity at phase J (V_J) and the effective dissipation of an active RC (DI_0/RC), and the significant increase ($p < 0.05$) in the maximum quantum yield of primary photochemistry (Φ_{P_0}), the efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain further than Q_A^- (Ψ_0), the quantum yield of electron transport (Φ_{E_0}) and the effective quantum yield of electron transport at PS II (ϕ'_{PSII}) after exposure to ZnO NPs suspensions. These results suggested that ZnO NPs improved the photosynthetic performance to some degree. Corresponding concentrations of Zn^{2+} solution was also used to cultivate *Egeria najas*. Zn^{2+} lowered the connectivity between PS II units, inhibited the electron transport at the acceptor side of PS II and the utilization of absorbed light energy and damaged the PS II reaction centers, as indicated by the significant increase ($p < 0.05$) in the net rate of PS II closure, the relative variable fluorescence intensity at phase J, the effective dissipation of an active RC, the ef-

fective antenna size of an active RC (ABS/RC), the energy trapping capacity per active PS II RC (TR_0/RC), and the quantum yield of dissipation through fluorescence and basal thermal processes (ϕ'_{NO}) and the significant decrease ($p < 0.05$) in the maximum quantum yield of primary photochemistry (Φ_{P_0}), the efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain further than $Q_A^- (\Psi_0)$, the quantum yield of electron transport (Φ_{E_0}) and the effective quantum yield of electron transport at PS II (ϕ'_{PSII}) after exposure to Zn^{2+} solution. These results suggested that Zn^{2+} inhibited photosynthetic processes of *Egeria najas*. When the sample plant was exposed to ZnO NPs suspensions, the effect of the Zn^{2+} released from ZnO NPs suspensions on the sample plant was not obvious, which meant that the enhancement was stronger than the inhibition.

Keywords Zinc oxide nanoparticle; *Egeria najas*; Chlorophyll a fluorescence; Photosystem II

(Received Mar. 24, 2018; accepted Aug. 10, 2018)

* Corresponding author