

高光限氮对莱茵衣藻响应环烷酸胁迫的影响

杨森¹, 雷恒萍¹, 杨子艺¹, 吴朦¹, 魏诗骐¹, 谢玺^{2*}, 官正^{1*}

1 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁省植物生物技术重点实验室, 辽宁 大连

2 辽宁省海洋水产科学研究院, 大连市海产贝类种质资源创新利用重点实验室, 农业农村部水产种质资源保护与发掘利用重点实验室, 辽宁 大连

杨森, 雷恒萍, 杨子艺, 吴朦, 魏诗骐, 谢玺, 官正. 高光限氮对莱茵衣藻响应环烷酸胁迫的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2252-2266.

YANG Miao, LEI Hengping, YANG Ziyi, WU Meng, WEI Shiqi, XIE Xi, GONG Zheng. High light and nitrogen deprivation affect the response of *Chlamydomonas reinhardtii* to naphthenic acid stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2252-2266.

摘要: 【目的】探究油脂积累型模式藻株莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)响应环烷酸胁迫的生理生化适应机制。【方法】通过研究高光富氮和高光限氮条件下, 典型环烷酸——环己烷甲酸(cyclohexanecarboxylic acid, CHCA)暴露对高初始密度培养的莱茵衣藻生长、光合活性、培养液pH值、氮磷元素吸收及脂质、碳水化合物、蛋白质、色素等生理生化组分的影响, 以全面评估莱茵衣藻对CHCA的耐受性。【结果】在高光富氮条件下, CHCA暴露显著促进了莱茵衣藻对磷元素的吸收, 同时显著增加了C16:0脂肪酸的相对丰度, 而降低了C18:3n3脂肪酸的相对丰度; 而在高光限氮条件下, CHCA暴露显著抑制了莱茵衣藻的光合活性以及对磷元素的吸收, 但并未对其脂肪酸组成产生显著影响。此外, 无论是高光富氮还是高光限氮条件下, CHCA暴露均未对莱茵衣藻的生长、培养液pH值以及脂质、碳水化合物、蛋白质和叶绿素含量产生明显影响。【结论】微藻对环境胁迫的耐受性可通过生长曲线直观表征, 并可通过藻细胞的生长、光合活性、氮磷吸收及关键生化组分综合考量进行评估。高光富氮条件通过促进磷元素吸收和改变脂肪酸组成, 增强了莱茵衣藻对环烷酸的耐受性; 而高光限氮条件则通过抑制光合活性和磷元素吸收, 减弱了莱茵衣藻对环烷酸的耐受性。这些发现可为筛选与构建高度耐受环烷酸的藻株培养策略提供借鉴。

关键词: 莱茵衣藻; 环烷酸; 高光限氮; 生长; 光合活性; 氮磷元素吸收; 脂肪酸标志物

资助项目: 辽宁省教育厅高等学校基本科研项目(LJKQZ20222365); 辽宁师范大学博士启动科研项目(2022BSL009); 国家自然科学基金(32402984); 辽宁省属本科高校基本科研业务费专项资金(LS2024Q004); 辽宁师范大学横向科技项目(H2022011)
This work was supported by the Basic Scientific Research Project of Education Department of Liaoning Province (LJKQZ20222365), the PhD Initiation Research Project of Liaoning Normal University (2022BSL009), the National Natural Science Foundation of China (32402984), the Special Funding for Basic Research Operating Expenses of Undergraduate Universities in Liaoning Province (LS2024Q004), and the Horizontal Science and Technology Project of Liaoning Normal University (H2022011).

*Corresponding authors. E-mail: XIE Xi, xiexim@163.com; GONG Zheng, gongzheng@lnnu.edu.cn

Received: 2024-10-08; Accepted: 2025-02-16; Published online: 2025-03-12

High light and nitrogen deprivation affect the response of *Chlamydomonas reinhardtii* to naphthenic acid stress

YANG Miao¹, LEI Hengping¹, YANG Ziyi¹, WU Meng¹, WEI Shiqi¹, XIE Xi^{2*}, GONG Zheng^{1*}

1 Key Laboratory of Plant Biotechnology of Liaoning Province, School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning, China

2 Dalian Key Laboratory of Genetic Resources for Marine Shellfish, Key Laboratory of Conservation and Exploitation of Aquatic Germplasm Resource, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To explore the physiochemical response mechanism of a model algal strain *Chlamydomonas reinhardtii* that hyper-accumulates oils to exposure of naphthenic acids (NAs). [Methods] The impacts of a typical NA, cyclohexanecarboxylic acid (CHCA), on the physiochemical parameters, including growth, photosynthetic activity, pH value of the culture, uptake of nitrogen and phosphorus, and biochemical constituents (lipids, carbohydrates, proteins, and pigments), of *C. reinhardtii* with high initial cell density under high light-nitrogen repletion (HL+N) and high light-nitrogen deprivation (HL-N) conditions were studied. [Results] The exposure to CHCA prominently promoted the uptake of phosphorus by *C. reinhardtii* under HL+N, while significantly increasing the relative abundance of saturated C16:0 and decreasing the relative abundance of polyunsaturated C18:3n3. In contrast, CHCA treatment significantly inhibited the photosynthetic activity and phosphorus uptake but did not affect the fatty acid profile of *C. reinhardtii* under HL-N stress. In addition, the growth, pH value of the culture, and content of lipids, carbohydrates, proteins, and pigments, in *C. reinhardtii* under both HL+N and HL-N conditions all remained relatively constant when subjected to CHCA exposure. [Conclusion] The tolerance of microalgae to environmental stress can be visualized by growth curves, photosynthetic activity, uptake of nitrogen and phosphorus, and key biochemical constituents. HL+N improves the tolerance of *C. reinhardtii* to NAs by promoting the uptake of phosphorus and altering the fatty acid profile, while the case was contrary under HL-N. These findings are beneficial for establishing strategies on effective cultivation of microalgae that highly tolerate NAs.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*; naphthenic acid; high light and nitrogen deprivation; growth; photosynthetic activity; uptake of nitrogen and phosphorus; fatty acid biomarker

环烷酸是环烷烃的羧基衍生物，以无环、单环和多环脂环族羧酸的复杂混合物形式天然存在油砂尾矿和原油采油废水中，能对细菌、藻类、原生动物、无脊椎动物、鱼类和哺乳动物等多种生物产生毒性作用^[1]。一直以来环烷酸都是采油废水典型石油烃修复去除的重点组分，

研究环烷酸的生态毒性对其污染的风险评估和生态修复具有重要意义^[2]。近年来，发掘利用能够有效降解环烷酸的生物资源已成为相关领域的研究热点^[3-6]。

Ruffell等^[5]研究表明，单细胞真核微藻能够对环烷酸进行生物降解。一些模式藻株因生长

周期短、光合固碳效率高、资源化利用潜力大等优势，成为理想的“细胞工厂”，符合低碳与绿色生产的需求，受到越来越多的关注。然而，有效降解环烷酸的前提在于这些微藻对环烷酸具有较强的耐受性，因此深入探究微藻对环烷酸污染的生理响应和适应机制非常重要。Woodworth 等^[7]率先考察了 21 株原生微藻对环烷酸的耐受性，其中 19 株微藻在 14 d 内可耐受 0–1 000 mg/L 的环烷酸。已知加拿大的油砂工艺影响水(oil sands process-affected water, OSPW)是一种典型环烷酸废水，通常具有独特的真核微生物群落^[8-9]，其中绿藻、蓝藻、硅藻、甲藻、裸藻、共球藻和黄群藻等典型类群都可以耐受背景浓度 20 mg/L 以上的环烷酸污染水体^[10]，并且微藻群落结构的演替与环烷酸环境浓度存在明显关联特征^[11]。由此推测，环烷酸污染水体中的原生微藻可能对环烷酸具有一定耐受性和降解潜力。然而，环境污染物只是造成了明显的物种局域特化，生物通过成为“已经是最适合的”或“还不是最适合的”2 种类型与环境条件相匹配。此后，众多学者先后报道了环烷酸对多株藻种保藏中心的绿藻、金藻、硅藻和甲藻的生长、光合活性、细胞形态、转录组畸变、抗氧化酶活性和生化组分等方面的影响^[12-19]。因此，通过耐受性检验筛选与特定生境(环烷酸污染水体)相匹配或精确匹配的潜在微生物(微藻)成为一种有效手段。有必要全面评估微藻对环烷酸暴露的耐受性能，以期构建高度耐受环烷酸的藻株培养策略，这将有助于加快筛选高效去除环烷酸的潜力修复藻株。

前期研究发现，在弱光富氮标准生长条件下，环己烷甲酸(cyclohexanecarboxylic acid, CHCA)暴露能显著抑制模式绿藻莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的生长和光合活性，还能显著改变其脂肪酸组成^[15]。户外采油废水的处理环境条件通常为高光强和氮限制，而高光限氮也是诱导微藻积累油脂的有效措施^[20]。此外，利用微藻处理废水通常需要优先培养出

高密度的藻细胞培养液以提高其废水处理效率。前期研究考察的是低初始密度培养体系下环烷酸对莱茵衣藻的生物毒性，而有关高初始密度培养体系下莱茵衣藻响应环烷酸暴露的氮磷去除效率和油脂积累等方面尚未见报道。

本研究以油脂积累型莱茵衣藻(淀粉合成缺陷株)为研究对象，分别在高光富氮和限氮条件下，对比表征 CHCA 暴露对高初始密度接种的藻细胞生长、光合活性、培养液 pH 值、色素组成、氮磷元素吸收、生化组分(脂质、碳水化合物和蛋白质)、脂肪酸组成及其生物标志物的影响。相关结果有助于进一步阐明莱茵衣藻对环烷酸暴露的响应机理，从而为环烷酸高效降解的机制解析和耐受藻种/株培养策略的构建提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 藻种(株)预培养

选用的莱茵衣藻淀粉合成缺陷株 BAFJ5 (cw15 sta6, CC4348)购自美国莱茵衣藻中心(<http://www.chlamycollection.org/>)。实验前，在三羟甲基氨基甲烷-乙酸盐-磷酸盐(Tris-acetate-phosphate, TAP)培养基中 25 °C、120 r/min 振荡培养，继代培养体积为 150 mL，培养周期为 3–4 d。培养条件为初始接种光密度值(OD_{750})为 0.1 (藻细胞密度约为 1×10^5 个/mL)，光周期为 12 h 光照:12 h 黑暗，光照强度为 80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。实验所用藻株培养代数不超过 10 代。

1.2 莱茵衣藻对 CHCA 的耐受性实验

考虑到某采油废水处理厂二级气浮出水的环烷酸浓度在 50 mg/L 左右，据文献报道，采油废水中环烷酸浓度通常不高于 100 mg/L^[12,21]，因此 CHCA (纯度 99%，上海阿拉丁生化科技股份有限公司)的梯度浓度设置为 0 (对照组)、50 和 100 mg/L^[15]，对照组为加有 0.1 mol/L NaOH 溶液的 TAP 培养基藻液，实验组为分别加有 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的 TAP 培养基藻液。

用 0.1 mol/L NaOH 溶解 5 g/L 和 10 g/L 的 CHCA 母液, CHCA 母液经稀释 100 倍后加入 TAP 培养基中, 并调整初始接种 OD_{750} 。

莱茵衣藻对 CHCA 的耐受性实验通过阶段培养实现: 第一阶段为弱光富氮条件 (LL+N) 下的低初始密度培养, 以收集足够藻细胞用于 CHCA 暴露实验; 第二阶段为高光富氮或限氮 (HL+N 或 HL-N) 条件下的高初始密度培养。第一阶段的光照强度为 $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 初始 OD_{750} 为 0.10 ± 0.02 , 25°C 、130 r/min 振荡培养, 光周期为 12 h 光照:12 h 黑暗, 培养体积为 350 mL (摇瓶体积为 500 mL, 光程为 6 cm), 培养时间为 3 d; 第二阶段的光照强度为 $600 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 用含相应浓度 CHCA 的富氮或限氮 TAP 培养基重悬第一阶段收集的浓缩藻液 (25°C 、4 000 r/min 离心 5 min), 并调整其 OD_{750} 至 0.70 ± 0.02 (约 7×10^6 个/mL)。在此接种密度下, 莱茵衣藻经高光限氮培养后能积累大量油脂^[20], 25°C 、140 r/min 振荡培养, 光周期为 24 h 光照, 培养体积为 200 mL (摇瓶体积为 200 mL, 光程为 5 cm), 培养时间为 6 d, 每组设 3 个生物学重复。

1.3 藻细胞生长、光合活性和培养液 pH 值测定

利用紫外-可见分光光度计 (PerkinElmer 公司) 测定藻细胞培养液在 750 nm 下的光密度值 (OD_{750}), 采用质量差法测定藻细胞干重密度: 将 2–10 mL 藻细胞培养液过滤至预称重的玻璃纤维滤膜 (孔径 $1.2 \mu\text{m}$, Whatman 公司), 60°C 烘干至恒重 (净生物质量 ≥ 2 mg)。

通过叶绿素荧光仪 (Water-PAM WALZ 公司) 测定藻细胞光系统 II (photosystem II, PS II) 的最大光量子产率 F_v/F_m 。采用 pH 计 (Mettler toledo 公司) 测定藻细胞培养液的 pH 值。

1.4 藻细胞色素含量测定

采用乙醇萃取法测定藻细胞色素含量^[22]。取 0.5–2 mL 藻细胞培养液, 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后加入 1.0 mL 无水乙醇。使

用超声波破碎仪 (昆山市超声仪器有限公司) 处理 10 min (250 W 、 25°C) 后再次离心, 收集上清液至刻度试管中。重复上述步骤 2 次后, 合并提取液并定容。在 470、649 和 665 nm 处测定色素提取液的吸光度 (A_{470} 、 A_{649} 和 A_{665})。根据公式 (1)–(4) 计算藻细胞的叶绿素和类胡萝卜素含量。

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mL}) = (13.95A_{665} - 6.88A_{649}) \times n \quad (1)$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mL}) = (24.96A_{649} - 7.32A_{665}) \times n \quad (2)$$

$$\text{Chl (a + b) (mg/g)} = (18.08A_{649} + 6.63A_{665}) \times n / \text{DCW} \quad (3)$$

$$\text{Car (mg/g)} = [(1\ 000A_{470} - 3.27\text{Chl a} - 104\text{Chl b}) / 229] \times n / \text{DCW} \quad (4)$$

式中: Chl 为叶绿素, Car 为类胡萝卜素, $18.08A_{649} + 6.63A_{665}$ 和 $(1\ 000A_{470} - 3.27\text{Chl a} - 104\text{Chl b}) / 229$ 分别为色素提取液中叶绿素和类胡萝卜素浓度 ($\mu\text{g/mL}$), n 为稀释倍数, DCW (dry cell weight density) 表示藻细胞干重密度 (mg/mL)。

1.5 藻细胞培养液氮磷元素浓度测定

藻细胞培养液中氮和磷元素浓度的测定参照《中华人民共和国国家环境保护标准》(HJ 535—2009 和 HJ 670—2013)^[23–24], 分别采用纳氏试剂法和钼酸铵分光光度法进行测定。每天吸取 1.0 mL 藻细胞培养液, 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min 后, 将上清液分别稀释 100 倍和 200 倍用于测定 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度。测定 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度时, 向 10.0 mL 稀释水样中加入 0.2 mL 酒石酸钾钠溶液和 0.2 mL 纳氏试剂, 静置 10 min 后在 420 nm 波长处测定吸光度; 测定 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度时, 向 10.0 mL 稀释水样中加入 0.2 mL 硫酸-钼酸铵-酒石酸锑钾混合溶液和 0.2 mL 抗坏血酸溶液, 混匀后静置 10 min 后于 700 nm 波长处测定吸光度。根据“浓度-吸光度”标准曲线回归方程和稀释倍数计算藻细胞培养液中氮和磷元素的浓度。

1.6 藻细胞脂肪酸分析

藻细胞脂肪酸分析参考改进后的一步酸化催化酯化法^[25], 将准确称重的藻粉 (2–5 mg, Mettler

toledo 公司)置于 10 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL 体积分数为 2% 的硫酸-甲醇, 在 70 °C 油浴下进行甲酯化反应 45 min。待冷却后, 加入 2 mL 正己烷和 0.75 mL 去离子水进行萃取并分层。充分混合后, 将上层含有脂肪酸甲酯的正己烷转移至 2 mL 色谱瓶中, 进行气相色谱(Bruker 公司)分析。以十七烷酸甘油三酯(Sigma-Aldrich 公司)为内标, 进样量为 1 μ L, 检测器为氢火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID), 载气为氮气(纯度 99%), 前进样口和前检测器温度均为 270 °C, 分流比为 30:1, 色谱柱为 DB23 (柱长 30 m, 内径 0.32 mm, 膜厚度 0.25 μ m, Agilent 公司)。升温程序: 初始温度 130 °C, 以 10 °C/min 升温至 170 °C, 再以 2.5 °C/min 升温至 195 °C, 运行时间为 14 min。

每种脂肪酸的相对含量计算如公式(5)所示, 绝对含量计算如公式(6)所示。

$$P_i = A_i / \sum A_i \times 100\% \quad (5)$$

$$M_i = (A_i / A_s \times M_s) / M_a \quad (6)$$

式中: P_i 为每种脂肪酸的相对质量; M_i 为每克藻细胞中某种脂肪酸的含量(mg/g), A_i 为每种脂肪酸的峰面积; $\sum A_i$ 为所有脂肪酸峰面积之和; A_s 为内标十七烷酸甲酯的峰面积; M_s 为内标十七烷酸甘油三酯的质量(mg); M_a 为藻细胞的质量(mg)。

1.7 藻细胞碳水化合物和蛋白质含量测定

藻细胞碳水化合物含量采用改进的蒽酮比色法^[26]进行测定。将准确称取的藻粉(约 2 mg)加入 2.0 mL 去离子水中, 使用超声破碎仪(SONICS 公司)对藻细胞进行超声破碎, 条件为: 超声 5 s, 间歇 5 s, 超声 10 次, 振幅为 20% (750 W)。超声完成后, 将样品悬浮液定容至 5.0 mL。取 1.0 mL 适当稀释倍数的样品, 加入 5.0 mL 蒽酮试剂, 充分振荡后置于沸水浴中加热 10 min。冷却后, 以去离子水为空白调零, 在 621 nm 处测定吸光度。根据“葡萄糖浓度-吸光度”标准曲

线回归方程、稀释倍数以及藻粉质量计算藻细胞碳水化合物含量, 计算如公式(7)所示。

$$\text{碳水化合物含量(mg/g)} =$$

$$\text{葡萄糖浓度(mg/mL)} \times \text{稀释倍数} \times$$

$$\text{样品定容体积(5.0 mL)} / \text{藻粉质量(g)} \times 100\% \quad (7)$$

藻细胞蛋白质含量采用改进的考马斯亮蓝比色法^[27]进行测定。将准确称取的藻粉(约 2 mg)加入 5 mL 离心管中, 加入 1.8 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液, 采用与碳水化合物相同的超声条件对藻细胞进行冰浴破碎。超声完成后, 将样品悬浮液转移至 2 mL 离心管中, 80 °C 水浴 10 min。水浴结束后 25 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液至 5 mL 刻度试管中, 再加入 1.0 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液, 重复 80 °C 水浴提取 10 min, 离心后合并上清液并定容至 5.0 mL。将藻粉样品提取液用 0.15 mol/L NaCl 溶液稀释 2 倍至 100 μ L, 加入 1.0 mL 考马斯亮蓝 G250 试剂(Bio-Rad 公司)振荡摇匀, 静置 5 min 在 595 nm 处测定吸光度。根据“蛋白质浓度-吸光度”标准曲线回归方程、稀释倍数以及藻粉质量计算藻细胞蛋白质含量, 计算如公式(8)所示。

$$\text{蛋白质含量(mg/g)} = \text{蛋白质浓度(mg/mL)} \times$$

$$\text{稀释倍数} \times \text{样品定容体积(5.0 mL)} /$$

$$\text{藻粉质量(g)} \times 100\% \quad (8)$$

1.8 数据处理

实验数据利用 Origin 2022 软件进行绘图, 并使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。结果以平均值 \pm 标准偏差($n=3$)表示。不同浓度 CHCA 处理组之间进行单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 当差异显著时, 采用 Tukey 多重比较分析, 以 * $P < 0.05$ 表示数据间差异显著。

2 结果与分析

2.1 CHCA 暴露对莱茵衣藻生长、光合活性及培养液 pH 值的影响

在高光富氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻 OD_{750} 均增

加了4倍, 细胞干重均增加了2倍、光合活性(F_v/F_m)保持稳定, 培养液pH值上升了11%–13% (图1)。然而, 在高光富氮条件下, CHCA暴露对莱茵衣藻的生长指标(包括 OD_{750} 和细胞干重密度)、最大光量子转化效率(F_v/F_m)以及培养液pH值几乎未产生显著影响。

在高光限氮条件下培养6d内, 暴露于0、50和100 mg/L CHCA的莱茵衣藻 OD_{750} 分别增加了25%、12%和13%; 在第2天和第3天,

暴露于100 mg/L CHCA的莱茵衣藻 OD_{750} 显著高于0 mg/L和50 mg/L CHCA; 而在第5天和第6天, 暴露于50 mg/L和100 mg/L CHCA的莱茵衣藻 OD_{750} 显著低于0 mg/L CHCA (下降了9%–11%) (图1A)。此外, CHCA暴露对莱茵衣藻的细胞干重密度和培养液pH值均未产生显著影响 (图1B、1D)。因此, 在高光限氮条件下, CHCA暴露对莱茵衣藻的生长未产生明显影响。

在高光限氮条件下培养6d内, 暴露于0、

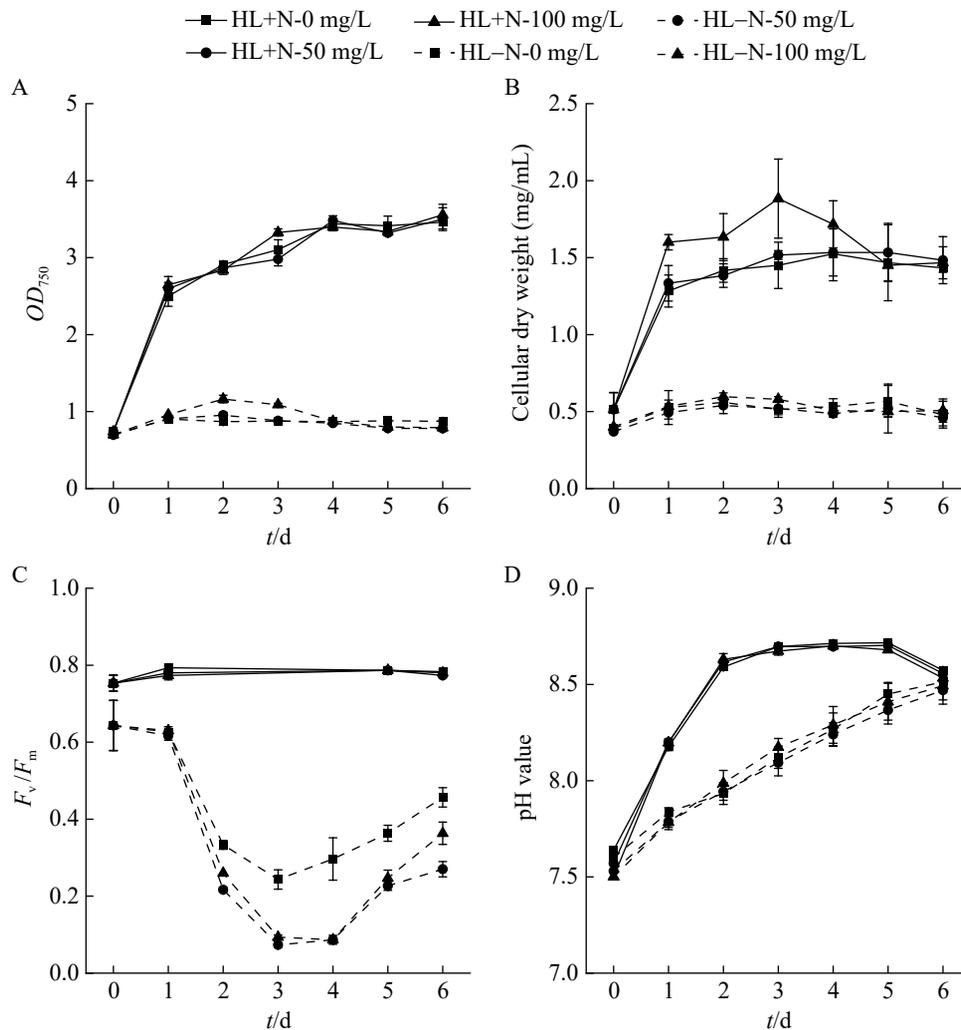


图1 CHCA暴露对莱茵衣藻生长(A、B)、光合活性(C)及其培养液pH值(D)的影响

Figure 1 Effects of CHCA exposure on growth (A, B), photosynthetic activity (C), and pH value of culture medium (D) in *Chlamydomonas reinhardtii*. HL+N: High light and nitrogen repletion; HL-N: High light and nitrogen depletion; CHCA concentrations include 0, 50 and 100 mg/L. Values are mean±SD (n=3).

50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻 F_v/F_m 分别降低了 21%、58% 和 49% (图 1C)。从第 2 天开始, 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻 F_v/F_m 均显著低于对照组(0 mg/L CHCA); 在第 2 天和第 6 天, 暴露于 50 mg/L CHCA 的莱茵衣藻 F_v/F_m 显著低于 100 mg/L CHCA (图 1C)。因此, 在高光限氮条件下, CHCA 暴露对莱茵衣藻的光合活性产生了显著的抑制作用。

2.2 CHCA 暴露对莱茵衣藻氮磷元素吸收的影响

在高光富氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻培养液中氮和磷元素浓度均先急剧降低, 随后缓慢降低。氮元素浓度降低了 96%–97%, 磷元素浓度降低了 45%–58% (图 2)。然而, CHCA 暴露并未对莱茵衣藻氮元素的吸收产生显著影响(图 2A)。从第 1 天开始, 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻培养液中磷元素浓度分别比 0 mg/L CHCA 显著低 15%–22% 和 17%–24% (图 2B)。因此, 在高光富氮条件下, CHCA 暴露显著促进了莱茵衣藻对磷元素的吸收。

在高光限氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻培养液中磷元

素浓度整体维持相对稳定(图 2B)。在第 1、2 和 6 天, 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻培养液中磷元素浓度分别比 0 mg/L CHCA 显著高 7%–10% 和 10%–13%。因此, 在高光限氮条件下, CHCA 暴露显著抑制了莱茵衣藻对磷元素的吸收。

2.3 CHCA 暴露对莱茵衣藻生化组分含量的影响

在高光富氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻脂肪酸总含量显著增加了 16%–22% (图 3A), 而其蛋白质和碳水化合物含量保持相对稳定(图 3B、3C)。色素含量在第 6 天增加至初始值的 2 倍(图 3D)。然而, 在第 6 天, CHCA 暴露对莱茵衣藻脂肪酸、蛋白质、碳水化合物和色素含量均未产生显著影响(图 3A–3C)。

在高光限氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻脂肪酸总含量增加至初始值的 2–3 倍(图 3A), 而其蛋白质和碳水化合物含量保持相对稳定(图 3B、3C)。然而, 色素含量显著降低至初始值的 46%–50% (图 3D)。在第 6 天, CHCA 暴露对莱茵衣藻脂肪酸、蛋白质、碳水化合物和色素含量均未产

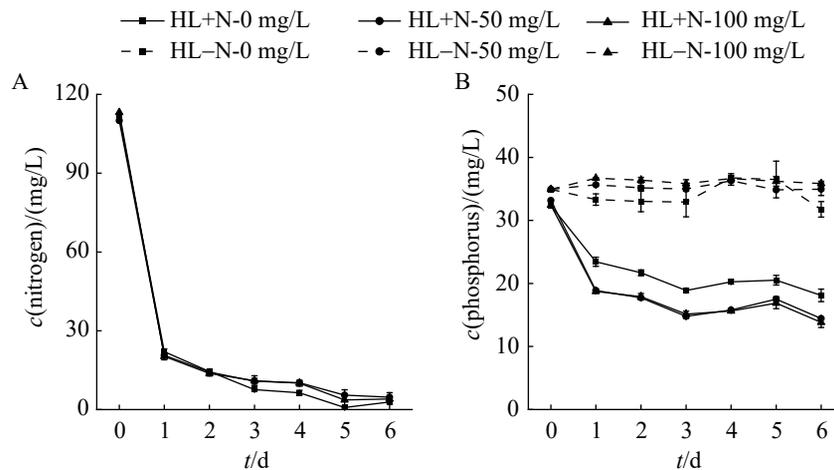


图2 CHCA暴露对莱茵衣藻氮元素(A)和磷元素(B)吸收的影响

Figure 2 Effects of CHCA exposure on uptake of nitrogen (A) and phosphorus (B) in *Chlamydomonas reinhardtii*. Values are mean±SD ($n=3$).

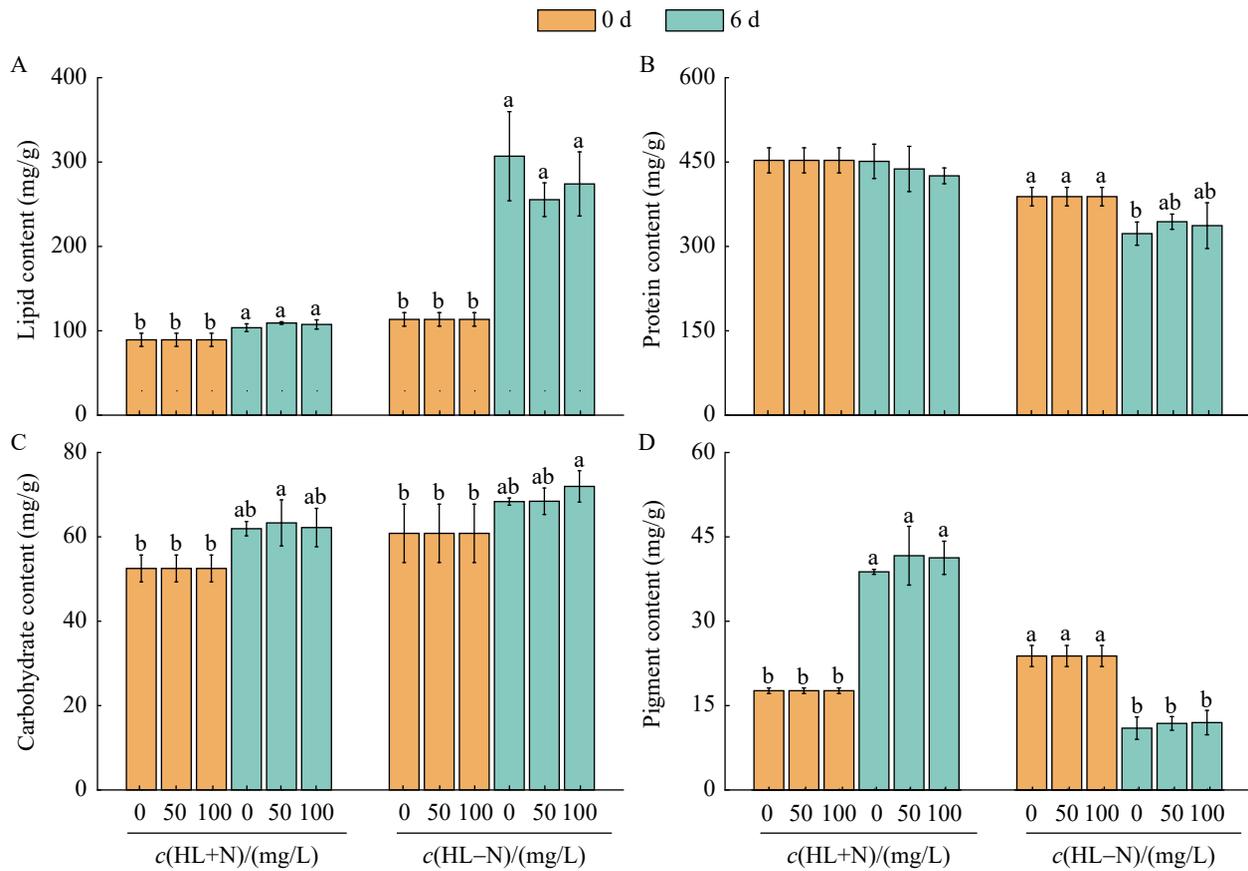


图3 CHCA暴露对莱茵衣藻生化组分含量的影响

Figure 3 Effects of CHCA exposure on contents of biochemical components in *Chlamydomonas reinhardtii*. Values are mean±SD ($n=3$). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

生显著影响(图 3A–3C)。

在高光富氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻叶绿素(图 4A)和类胡萝卜素(图 4B)含量先增加后保持稳定, 分别增加了 2–3 倍和 2 倍。相反, 在高光限氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻叶绿素和类胡萝卜素含量先降低后保持稳定, 分别降低了 55%–62% 和 29%–33%。然而, 在高光富氮或高光限氮条件下培养 6 d 时, CHCA 暴露均未对莱茵衣藻的叶绿素和类胡萝卜素含量产生显著影响(图 4)。

2.4 CHCA 暴露对莱茵衣藻脂肪酸组成的影响

在高光富氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、

50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻中, 主要脂肪酸 C16:0 的相对丰度显著增加了 18%–27%, 而 C18:3n3 的相对丰度显著降低了 26%–34%。此外, C16:2n6 和 C18:2n6 的相对丰度分别显著增加了 8–10 倍和 2 倍。在第 6 天, 暴露于 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻中, C16:0 的相对丰度较 0 mg/L CHCA 显著增加了 13%, 而 C18:3n3 的相对丰度显著降低了 11%。然而, 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻脂肪酸组成之间无显著差异(图 5A)。

在高光限氮条件下培养 6 d 内, 暴露于 0、50 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻中, 主要脂肪酸 C16:4n3 和 C18:3n3 的相对丰度分别显著降低 63% 和 38%–41%, 而 C18:1n9 和 C18:1n7 的相

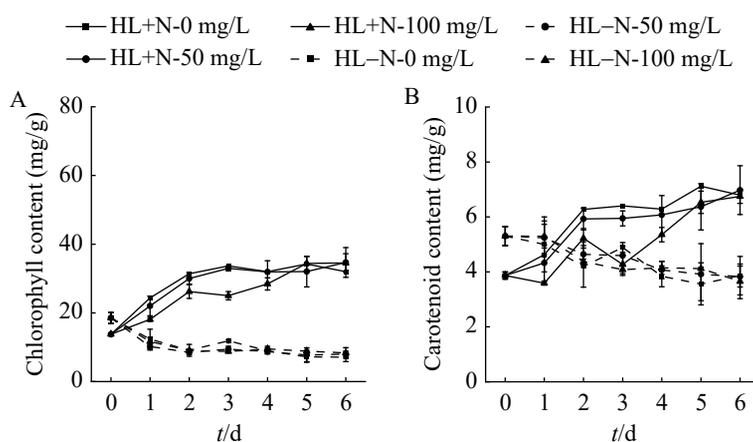


图4 CHCA暴露对莱茵衣藻叶绿素(A)和类胡萝卜素(B)含量的影响

Figure 4 Effects of CHCA exposure on contents of chlorophylls (A) and carotenoids (B) in *Chlamydomonas reinhardtii*. Values are mean \pm SD ($n=3$).

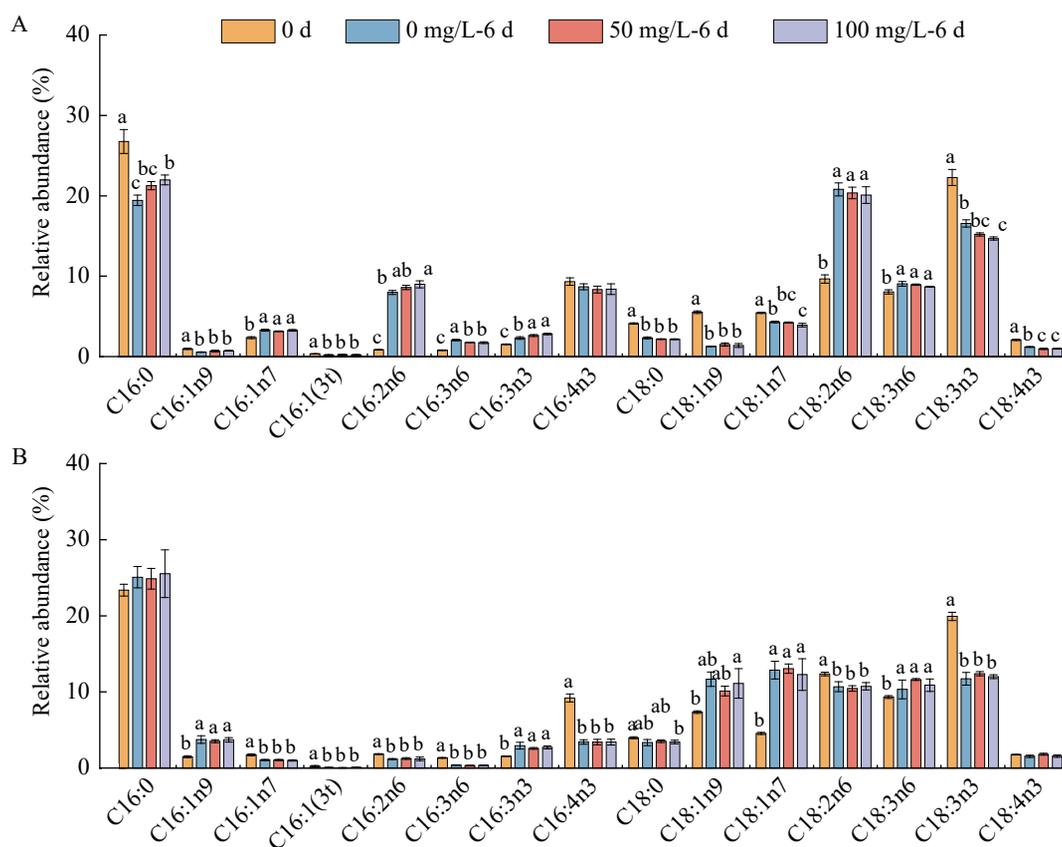


图5 CHCA暴露对莱茵衣藻脂肪酸组成的影响。A: 高光富氮; B: 高光限氮。

Figure 5 Effects of CHCA exposure on the fatty acid composition in *Chlamydomonas reinhardtii*. A: High light and nitrogen repletion (HL+N); B: High light and nitrogen depletion (HL-N). Values are mean \pm SD ($n=3$). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

对丰度分别显著增加 38%–59% 和 51%–54%。在第 6 天, 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻脂肪酸组成与 0 mg/L CHCA 无显著差异, 且不同浓度 CHCA 之间也无显著差异(图 5)。

3 讨论

环烷酸广泛存在于石油工业废水中, 对多种水生生物具有毒性作用。有效去除环烷酸是石油工业废水处理的关键挑战之一^[28]。臭氧化和微生物降解已成为当前去除环烷酸并降低其毒性的可行方法。目前已在环烷酸污染的水体中发现多种原生微藻^[8], 有关微藻的生长、光合活性、细胞形态、转录组畸变、抗氧化酶活性和生化组分等对不同类别环烷酸的耐受性能也有许多报道^[12–19]。前期研究发现, 在弱光富氮标准培养条件下, CHCA 暴露能显著抑制低初始密度莱茵衣藻的生长和光合活性, 还能显著改变其脂肪酸组成^[15]。本研究结合采油废水处理过程的户外高光环境及其外排达标前的低氮浓度水体性质, 进一步探究了高光限氮条件下高初始密度接种的莱茵衣藻对 CHCA 的耐受特性, 重点关注了氮磷去除效率和基于生理生化组分的有机碳分配特征。结果为进一步评估藻株资源化利用潜力以及筛选构建高度耐受环烷酸的藻株培养策略提供了科学参考。

3.1 环烷酸暴露对微藻生长的影响

微藻能够耐受环烷酸暴露环境条件的最直接和最有利表征是维持较高的生物质产率。前期研究表明, 在弱光富氮培养的 3 d 内, 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的低初始密度 BAFJ5 的 OD_{750} 分别降低至对照组的 72% 和 42%^[15]。本研究发现, 在高光富氮和高光限氮培养期间, CHCA 暴露均未对高初始密度接种莱茵衣藻(缺壁株 BAFJ5)的生长, 即 OD_{750} 和细胞干重密度产生显著影响(图 1); 但在高光限氮培养期间(第 2–6 天), 暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L

CHCA 的 BAFJ5, 其 OD_{750} 显然受到了不同程度的影响。由此推测, 莱茵衣藻缺壁株 BAFJ5 对 CHCA 的耐受性与藻细胞密度正相关, 同时高光与氮的添加也能在一定程度上促进其对 CHCA 的耐受性。

研究表明, 莱茵衣藻野生株暴露于 10–100 mg/L 油砂环烷酸组分(naphthenic acid fraction components, NAFCs)时, 其生长速率逐渐受到抑制; 而当 NAFCs 浓度高达 100 mg/L 时, 缺壁株 CC400 的生长速率才开始受到显著抑制; 类似地, 缺壁株 CC3395 的生长速率在 NAFCs \leq 100 mg/L 时也未受到明显影响^[13]。可见, 莱茵衣藻对环烷酸的耐受性与其藻株特性有关, 细胞壁的缺失与否是决定微藻对环烷酸耐受性强弱的一个关键因素。此外, 研究发现, 0.5–4 mg/L 环烷酸对莱茵衣藻野生株和普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)的生长无显著影响, 而 8–16 mg/L 环烷酸则开始产生抑制效应, 2 种微藻的初始接种密度分别为 2×10^6 个/mL 和 6×10^6 个/mL^[19]。前期研究发现, 低密度接种(约 2×10^5 个/mL)的蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)在 CHCA 浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L 时, 其生长也不受影响, 而低密度接种(约 1×10^5 个/mL)的莱茵衣藻缺壁株 BAFJ5 的生长却受到显著抑制^[15]。本研究选择的莱茵衣藻 BAFJ5 也属缺壁株, 其响应环烷酸胁迫的生长状态因培养策略的不同而异。BAFJ5 的初始接种密度约为 7×10^6 个/mL, 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 暴露对其生长几乎未产生明显影响。由此, 环烷酸暴露对莱茵衣藻野生株的生长抑制作用更为明显, 而对于莱茵衣藻缺壁株, 较高的初始密度有利于藻细胞生长免受抑制。综上, 莱茵衣藻初始接种密度在 $(1–20)\times 10^5$ 个/mL 范围内, 推测其对环烷酸的耐受性可能会显著降低; 其初始接种密度 $\geq 7\times 10^6$ 个/mL 时, 环烷酸胁迫对莱茵衣藻的抑制作用则会逐渐减弱, 甚至产生促进作用。相比之下, 海洋微藻, 包括颗石艾米里藻

(*Emiliana huxleyi*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、青岛大扁藻(*Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*)和赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)等,对环烷酸胁迫更加敏感,当环烷酸浓度 <50 mg/L时,其生长即受到不同程度的抑制^[12,14,16,18]。

3.2 环烷酸暴露对微藻光合活性的影响

叶绿素荧光参数 PS II 的最大光量子转化效率(F_v/F_m)能有效表征高等植物和藻类应对营养盐和高光强^[20]、重金属^[29]和多环芳烃^[30]等多种环境胁迫的光合活性。目前有关环烷酸暴露对微藻光合活性影响的研究报道还相对有限。已知当 OSPW 的酸性可提取有机物(the acid extractable organic fraction, AEO)组分以及 2 种环烷酸替代物[(4'-*n*-butylphenyl)-4-butanoic acid and (4'-*tert*-butylphenyl)-4-butanoic acid, *n*-和 *tert*-BPBA]浓度 ≤ 100 mg/L 时,普通小球藻的光合活性 F_v/F_m 均不受影响;而海洋颗石艾米里藻的 F_v/F_m 在 *n*-和 *tert*-BPBA 浓度 >10 mg/L 和 50 mg/L 时即受到显著抑制^[12]。当环烷酸浓度在 0.5–4 mg/L 范围内时,三角褐指藻、青岛大扁藻和赤潮异弯藻的 F_v/F_m 均呈现出毒物兴奋效应^[16,18,31];当环烷酸浓度在 2–32 mg/L 范围内,三角褐指藻的 F_v/F_m 维持相对稳定^[14]。由于叶绿素是与微藻光合作用最密切相关的一种色素,叶绿素 a 荧光动力学能表征微藻对环烷酸胁迫的耐受性能。前期研究发现,在弱光富氮培养的 3 d 内,BAFJ5 的 F_v/F_m 几乎未受到 CHCA 暴露的显著影响,尽管其生长抑制效应更为明显^[15]。在本研究中,高光富氮培养的 6 d 内,CHCA 暴露对莱茵衣藻 BAFJ5 的 F_v/F_m 均未产生显著影响(图 1C);但高光限氮培养的第 2–6 天内,暴露于 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 的 BAFJ5 F_v/F_m 却受到显著抑制,这些结果与生长和叶绿素合成抑制效应在不同程度上保持一致(图 1A–1C, 图 4A)。因此,与光照强度和藻细胞的初始接种密度相比,氮限制可能是环烷酸暴露导致莱茵衣藻光合活性受损的首要因素。考虑到高等植物叶片的光

合作用速率通常与氮浓度高度相关^[32],推测氮的可利用性有可能限制了微藻在光合作用中获得 CO₂ 和能量的能力,进而可能在不同程度上影响微藻的生长和光合活性。可见微藻对氮的利用与其生长和光合活性之间具有不同的相关性,共同反映了微藻对环烷酸胁迫的耐受性,然而相关机制有待于后续工作的深入探究。

3.3 环烷酸暴露对微藻吸收氮磷元素的影响

微藻的生长与氮磷吸收特性密切相关,其中氮是生命体的必需元素,是蛋白质和遗传物质的必备元素;磷是生物膜和遗传物质的重要组成部分,是微藻生长和增殖不可或缺的元素^[33]。然而,采油废水外排达标之前通常为低氮低磷浓度水体(氮和磷浓度分别在 15.0 mg/L 和 0.1 mg/L 以下),难以满足微藻生长的需要,因此,在实际处理采油废水过程中,可适当添加氮源和磷源^[34],以期利用微藻实现减污降碳协同脱氮除磷等资源化利用效果。由此可见,研究环烷酸暴露条件下微藻氮磷吸收的变化也能反映其生长性能的变化,进而反映其对环烷酸耐受性的变化,但目前关于环烷酸暴露影响微藻氮磷元素吸收的报道还非常有限。已有研究表明,CHCA、环己烷乙酸(cyclohexanacetic acid, CHAA)和环己烷丁酸(cyclohexane butyric acid, CHBA) 3 种典型环烷酸在 ≤ 300 mg/L 浓度范围内,均不影响凯氏小球藻(*C. kessleri*)和布朗葡萄球藻(*Botryococcus braunii*)对磷元素的正常吸收,而 300 mg/L CHCA、CHAA 和 CHBA 却均能显著降低 2 种微藻对氮元素的吸收;低浓度 100 mg/L CHCA 则能显著促进凯氏小球藻对氮元素的吸收,而 CHAA 和 CHBA 对 2 种微藻氮元素吸收均无显著影响^[6]。在本研究中,50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 不影响高光富氮培养的莱茵衣藻对氮元素的吸收,但能促进其对磷元素的吸收;相反,在高光限氮条件下,50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 均显著降低了莱茵衣藻对磷元

素的吸收。综上所述, 相比凯氏小球藻和布朗葡萄球藻的氮元素吸收受环烷酸影响更大而言, 环烷酸更能促进莱茵衣藻对磷元素的吸收作用。因此, 环烷酸暴露对微藻氮磷元素吸收的影响可能具有种属特异性, 同时还可能与培养液的氮磷本底值有关。

3.4 环烷酸暴露对微藻生化组分及脂肪酸组成的影响

微藻富含蛋白质、油脂、碳水化合物、色素等多样化的 高值营养成分, 是食品、化工、农业、转化医学及环境健康与生态工程应用领域的重要绿色原料或工具生物^[35]。目前有关微藻降解环烷酸耦合资源化利用的潜力还鲜有报道。已有研究发现, 在 0.5–16 mg/L 范围内, 莱茵衣藻野生株的叶绿素 a 含量随环烷酸浓度升高而逐渐降低, 而普通小球藻的叶绿素 a 含量呈低浓度促进、高浓度抑制的变化规律; 2 种微藻的粗脂肪含量变化趋势与普通小球藻叶绿素 a 含量相似, 其蛋白质含量在环烷酸处理 24 h 后均显著高于对照组, 96 h 后均显著低于对照组, 其多糖含量较对照组几乎均显著增加^[19]。在本研究中, 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 暴露 6 d 内, 莱茵衣藻缺壁株 BAFJ5 的脂肪酸、蛋白质、碳水化合物和色素含量均未受到显著影响(图 3), 脂肪酸总含量的结果与前期工作(低初始密度)的 BAFJ5 结果一致^[15]。由此推测, 在环烷酸暴露胁迫条件下, 莱茵衣藻缺壁株 BAFJ5 的生化组分较野生株更易维持稳定, 这与生长影响的结果相一致。

此外, 有机体脂肪酸对环境变化非常敏感^[36], 是生物响应环境胁迫的指示因子^[37], 脂肪酸生物标志物已广泛用于指示环境变化。在微藻中, 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)通常是结构脂质的主要组分, 而饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)和单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)主要构成贮能脂质部分^[20]。在光照和营养盐等非生物逆

境胁迫条件下, 微藻的脂肪酸组成会发生改变, 通常表现为 PUFA 相对丰度减少, 而 SFA 和 MUFA 相对丰度增加^[38]。因此, 微藻脂肪酸组成是其关键能量储备和膜结构适应环境变化的良好生物指标^[39]。前期研究发现, 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 暴露 6 d 后, 蛋白核小球藻的主要脂肪酸 C16:0 和 C18:3n3 相对丰度与对照组相比分别显著降低和增加, 而莱茵衣藻的 C18:3n3 相对丰度在 100 mg/L 环烷酸浓度下却显著降低, 其 C16:0 相对丰度则呈增加趋势, 同时其 C18:1n9 相对丰度显著增加^[15]。在本研究中, 高光富氮培养 6 d 后, 暴露于 100 mg/L CHCA 的莱茵衣藻主要脂肪酸 C16:0 和 C18:3n3 相对丰度不同于蛋白核小球藻, 分别显著增加 18%–27% 和降低 26%–34%, 与低初始密度的莱茵衣藻结果相一致; 此外, 高光限氮培养 6 d 后, 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 暴露均未影响莱茵衣藻的脂肪酸组成。因此, 氮元素是否受限可能是环烷酸暴露影响莱茵衣藻脂肪酸组成的重要因素, 进而能够调控莱茵衣藻对环烷酸的耐受性能。C16:0 和 C18:3n3 可以作为莱茵衣藻响应环烷酸胁迫的潜在生物标志物。

综上所述, 由图 1A 和 1B 可知, 50 mg/L 和 100 mg/L CHCA 暴露对莱茵衣藻的生长几乎未产生显著影响, 即在该培养体系下, 莱茵衣藻的生长与 CHCA 浓度无显著相关性。此外, 从图 1D、图 3 和图 4 可以看出, CHCA 暴露对莱茵衣藻的培养液 pH 值以及脂质、碳水化合物、蛋白质和叶绿素含量也几乎未产生明显影响。然而, 在高光富氮条件下, CHCA 暴露显著促进了莱茵衣藻对磷元素的吸收(图 2B), 同时分别显著增加了 C16:0 和显著降低了 C18:3n3 的相对丰度, 对其脂肪酸组成产生了显著影响(图 5A); 而在高光限氮条件下, CHCA 暴露显著抑制了莱茵衣藻的光合活性(图 1C)以及对磷元素的吸收(图 2B), 但并未对其脂肪酸组成产生显著影响(图 5B)。微藻对环境胁迫的耐受性可通过生长曲线直观表征, 并通过藻细胞的生

长、光合活性、氮磷吸收及关键生化组分等指标综合考量。因此，高光富氮和高光限氮条件分别通过促进磷元素吸收并改变脂肪酸组成，以及抑制光合活性和磷元素吸收，进一步提高和降低了莱茵衣藻对环烷酸的耐受性。

由此推测，莱茵衣藻对环烷酸胁迫的耐受性可能与氮元素浓度及藻细胞初始接种密度有关。微藻的光合作用速率受限于氮浓度，氮的可利用性会影响微藻在光合作用中获取 CO₂ 和能量的能力，进而导致其生长、光合活性甚至营养盐吸收能力受到不同程度的影响，从而调控其对环烷酸胁迫的耐受性。在低接种密度下，莱茵衣藻主要通过改变生长和脂肪酸组成来响应环烷酸胁迫^[15]；在高接种密度下，主要通过改变光合活性、磷元素吸收及脂肪酸组成来适应环烷酸胁迫。可见，在暴露于环烷酸期间，微藻能通过改变其脂肪酸组成实现脂质重塑，调控其对环烷酸的耐受性能，这可能是微藻响应环烷酸胁迫的潜在重要机制之一。

4 结论

在高光富氮培养条件下，CHCA 暴露能显著促进莱茵衣藻对磷元素的吸收，同时分别显著增加饱和脂肪酸 C16:0 和显著降低多不饱和脂肪酸 C18:3n3 的相对丰度，进而提高了其对环烷酸的耐受性；而在高光限氮培养条件下，CHCA 暴露未对其脂肪酸组成产生明显影响，但能显著抑制莱茵衣藻的光合活性以及对磷元素的吸收，导致其对环烷酸的耐受性有所降低。氮元素可能是莱茵衣藻耐受环烷酸的重要调控因素。这些结果可为筛选与构建高度耐受环烷酸的藻株培养策略提供借鉴。

作者贡献声明

杨森：研究构思和设计、实验操作、数据处理与分析、论文撰写与修改；雷恒萍：实验操作、数据处理与分析；杨子艺：实验操作；吴朦：实验操作；魏诗骐：协助实验操作；谢

玺：研究构思和设计、数据分析、论文修改；
宫正：研究构思和设计、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] MORANDI GD, WISEMAN SB, PEREIRA A, MANKIDY R, GAULT IGM, MARTIN JW, GIESY JP. Effects-directed analysis of dissolved organic compounds in oil sands process-affected water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(20): 12395-12404.
- [2] BROWN LD, ULRICH AC. Oil sands naphthenic acids: a review of properties, measurement, and treatment[J]. *Chemosphere*, 2015, 127: 276-290.
- [3] TANG JX, HOAGLAND KD, SIEGFRIED BD. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17(6): 1085-1090.
- [4] MILES SM, ASIEDU E, BALABERDA AL, ULRICH AC. Oil sands process affected water sourced *Trichoderma harzianum* demonstrates capacity for mycoremediation of naphthenic acid fraction compounds[J]. *Chemosphere*, 2020, 258: 127281.
- [5] RUFFELL SE, FRANK RA, WOODWORTH AP, BRAGG LM, BAUER AE, DEETH LE, MÜLLER KM, FARWELL AJ, DIXON DG, SERVOS MR, McCONKEY BJ. Assessing the bioremediation potential of algal species indigenous to oil sands process-affected waters on mixtures of oil sands acid extractable organics[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 133: 373-380.
- [6] YU XX, LEE K, ULRICH AC. Model naphthenic acids removal by microalgae and base mine lake cap water microbial inoculum[J]. *Chemosphere*, 2019, 234: 796-805.
- [7] WOODWORTH APJ, FRANK RA, McCONKEY BJ, MÜLLER KM. Toxic effects of oil sand naphthenic acids on the biomass accumulation of 21 potential phytoplankton remediation candidates[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 86: 156-161.
- [8] AGUILAR M, RICHARDSON E, TAN B, WALKER G, DUNFIELD PF, BASS D, NESBØ C, FOGHT J, DACKS JB. Next-generation sequencing assessment of eukaryotic diversity in oil sands tailings ponds sediments and surface water[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2016, 63(6): 732-743.
- [9] CUMULATIVE ENVIRONMENTAL MANAGEMENT ASSOCIATION (CEMA). End pit lakes guidance document 2012[Z]. 2012, <https://www.cclmportal.ca/resource/end-pit-lakes-guidance-document-2012>.
- [10] LEUNG SS, MacKINNON MD, SMITH REH. The ecological effects of naphthenic acids and salts on

- phytoplankton from the Athabasca oil sands region[J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 62(1): 11-26.
- [11] LEUNG SS, MacKINNON MD, SMITH RE. Aquatic reclamation in the Athabasca, Canada, oil sands: naphthenate and salt effects on phytoplankton communities[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(7): 1532-1543.
- [12] BEDDOW J, JOHNSON RJ, LAWSON T, BRECKELS MN, WEBSTER RJ, SMITH BE, ROWLAND SJ, WHITBY C. The effect of oil sands process-affected water and model naphthenic acids on photosynthesis and growth in *Emiliania huxleyi* and *Chlorella vulgaris*[J]. *Chemosphere*, 2016, 145: 416-423.
- [13] GOFF KL, HEADLEY JV, LAWRENCE JR, WILSON KE. Assessment of the effects of oil sands naphthenic acids on the growth and morphology of *Chlamydomonas reinhardtii* using microscopic and spectromicroscopic techniques[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 442: 116-122.
- [14] LIN ZH, ZHANG HX, ZHAO XY, QU TF, CHEN J, GUAN C, ZHONG Y, HOU CZ, TANG XX, WANG Y. ROS-mediated time-varying cytotoxic effects on *Phaeodactylum tricorutum* under the stress of commercial naphthenic acids[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 243: 114014.
- [15] YANG M, MA JY, YU SH, XIE KP, ZHANG WD, ZHANG ED, WANG QZ, XIE X, GONG Z. Glycerolipid remodeling is crucial for acclimation to naphthenic acid exposure in *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2023, 72: 103098.
- [16] ZHANG HX, TANG XX, SHANG JG, ZHAO XY, QU TF, WANG Y. The effect of naphthenic acids on physiological characteristics of the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* and *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis*[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 240: 549-556.
- [17] ZHANG HX, HU YR, YANG LK, LIN ZH, ZHAO XY, CHEN J, TANG XX, WANG Y. Transcriptome aberration in marine microalgae *Phaeodactylum tricorutum* induced by commercial naphthenic acids[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 268: 115735.
- [18] ZHANG HX, ZHOU YM, KONG Q, DONG WL, LIN ZH. Toxicity of naphthenic acids on the chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant enzyme activity of *Heterosigma akashiwo*[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(10): 1582.
- [19] 林治豪, 张焕新, 唐学玺, 王影. 环烷酸对淡水微藻生理生化特征的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2023, 54(1): 87-97.
- LIN ZH, ZHANG HX, TANG XX, WANG Y. Effect of naphthenic acid on physiological and biochemical characteristics of freshwater microalgae[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2023, 54(1): 87-97 (in Chinese).
- [20] YANG M, XIE X, KONG FT, XIE KP, YU SH, MA JY, XUE S, GONG Z. Differences in glycerolipid response of *Chlamydomonas reinhardtii* starchless mutant to high light and nitrogen deprivation stress under three carbon supply regimes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 860966.
- [21] SAMANIPOUR S, REID MJ, RUNDBERGET JT, FROST TK, THOMAS KV. Concentration and distribution of naphthenic acids in the produced water from offshore Norwegian north sea oilfields[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(5): 2707-2714.
- [22] JESPERSEN AM, CHRISTOFFERSEN K. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent[J]. *Archiv für Hydrobiologie*, 1987, 109: 445-454.
- [23] 环境保护部. 水质-氨氮的测定-纳氏试剂分光光度法: HJ 535—2009[S]. 中华人民共和国国家环境保护标准, 2009.
- MINISTRY OF ENVIRONMENT PROTECTION. Water quality-determination of ammonia nitrogen-Nessler's reagent spectrophotometry: HJ 535—2009[S]. National Environmental Protection Standards of the People's Republic of China, 2009.
- [24] 环境保护部. 水质-磷酸盐和总磷的测定-连续流动-钼酸铵分光光度法: HJ 670—2013[S]. 中华人民共和国国家环境保护标准, 2013.
- MINISTRY OF ENVIRONMENT PROTECTION. Water quality-determination of orthophosphate and total phosphorus-continuous flow analysis (CFA) and ammonium molybdate spectrophotometry: HJ 670—2013[S]. National Environmental Protection Standards of the People's Republic of China, 2013.
- [25] LIU J, LIU YN, WANG HT, XUE S. Direct transesterification of fresh microalgal cells[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 176: 284-287.
- [26] KLEIN U, BETZ A. Fermentative metabolism of hydrogen-evolving *Chlamydomonas moewusii*[J]. *Plant Physiology*, 1978, 61(6): 953-956.
- [27] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [28] WANG BL, WAN Y, GAO YX, YANG M, HU JY. Determination and characterization of oxy-naphthenic acids in oilfield wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(16): 9545-9554.
- [29] Dos REIS LL, de OLIVEIRA GONÇALVES ALHO L, de ABREU CB, GEBARA RC, da SILVA MANSANO A, da GRAÇA GAMA MELÃO M. Effects of cadmium and cobalt mixtures on growth and photosynthesis of *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2022, 244: 106077.
- [30] OTHMAN HB, LEBOULANGER C, FLOC'H EL, MABROUK HH, HLAILI AS. Toxicity of benz(a)anthracene and fluoranthene to marine phytoplankton in culture: does cell size really matter?[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 243: 204-211.
- [31] CALABRESE EJ, BALDWIN LA, HOLLAND CD. Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment[J]. *Risk Analysis*, 1999, 19(2): 261-281.
- [32] 史作民, 唐敬超, 程瑞梅, 罗达, 刘世荣. 植物叶片氮分配及其影响因子研究进展[J]. *生态学报*, 2015, 35(18): 5909-5919.
- SHI ZM, TANG JC, CHENG RM, LUO D, LIU SR. A

- review of nitrogen allocation in leaves and factors in its effects[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(18): 5909-5919 (in Chinese).
- [33] 俞群娣, 王亚军, 余新威, 刘寅政, 李叶, 方力, 陈成吉, 罗红宇. 微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)的氮磷吸收、生长、产毒动态变化[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(2): 346-351.
- YU QD, WANG YJ, YU XW, LIU YZ, LI Y, FANG L, CHEN CJ, LUO HY. Dynamics of absorption of nitrogen and phosphorus, growth and toxin productivity in *Alexandrium minutum*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(2): 346-351 (in Chinese).
- [34] 桂召龙, 李毅, 沈捷, 黄翔峰. 采油废水人工湿地处理效果及植物作用分析[J]. *环境工程*, 2011, 29(2): 5-9.
- GUI ZL, LI Y, SHEN J, HUANG XF. Treatment efficiency of oilfield produced wastewater by constructed wetland and the role of plants[J]. *Environmental Engineering*, 2011, 29(2): 5-9 (in Chinese).
- [35] 张萍, 方淳, 朱思涵, 韩松, 李凯, 王志康. 生活污水处理中微藻的优选及氮、磷转化研究[J]. *生态环境学报*, 2021, 30(8): 1706-1715.
- ZHANG P, FANG C, ZHU SH, HAN S, LI K, WANG ZK. Optimization of microalgae species and nitrogen and phosphorus conversion for domestic sewage treatment[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2021, 30(8): 1706-1715 (in Chinese).
- [36] GONÇALVES AMM, MESQUITA AF, VERDELHOS T, COUTINHO JAP, MARQUES JC, GONÇALVES F. Fatty acids' profiles as indicators of stress induced by of a common herbicide on two marine bivalves species: *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) and *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778)[J]. *Ecological Indicators*, 2016, 63: 209-218.
- [37] FILIMONOVA V, GONÇALVES F, MARQUES JC, TROCH MD, GONÇALVES AMM. Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review[J]. *Ecological Indicators*, 2016, 67: 657-672.
- [38] LI-BEISSON Y, THELEN JJ, FEDOSEJEVS E, HARWOOD JL. The lipid biochemistry of eukaryotic algae[J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 74: 31-68.
- [39] FAYYAZ M, CHEW KW, SHOW PL, LING TC, NG IS, CHANG JS. Genetic engineering of microalgae for enhanced biorefinery capabilities[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107554.