

[OMIm]Br 对蛋白核小球藻的致毒效应*

杨兆壬 周作明**

(华侨大学环境科学与工程系, 福建厦门 361021)

摘要 通过急性毒性实验考察了溴化 1-辛基-3-甲基咪唑([OMIm]Br) 离子液体对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) 的致毒作用。结果表明: 经过[OMIm]Br 处理 96 h, 藻细胞生物量(包括藻细胞密度、叶绿素和蛋白质含量) 发生改变, 呈现正相关的剂量-效应关系; [OMIm]Br 抑制蛋白核小球藻生长的半最大效应浓度(EC_{50}) 为 $14.95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 藻细胞的抗氧化机制受到破坏, 超氧化物歧化酶(SOD) 和过氧化物酶(POD) 活性均下降, 膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA) 的含量增加, 且 SOD、POD、MDA 三者的变化幅度与受试物剂量呈正相关; [OMIm]Br 通过直接损伤蛋白质和破坏抗氧化机制系统等途径对蛋白核小球藻产生致毒机制, 运用流式细胞仪等手段证实藻细胞周期被[OMIm]Br 阻滞在 S 期和 G_2/M 期, 并导致藻细胞坏死, 阻滞程度和坏死程度与[OMIm]Br 剂量呈正相关。

关键词 离子液体; 抗氧化机制; 流式细胞术; 毒理

中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2014)6-1539-07

Toxic effect of [OMIm]Br on *Chlorella pyrenoidosa*. YANG Zhao-ren, ZHOU Zuo-ming**
(Department of Environmental Science & Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(6): 1539–1545.

Abstract: The toxicity of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ([OMIm]Br) ionic liquid on *Chlorella pyrenoidosa* was investigated by acute toxicity tests. The results showed that under [OMIm]Br stress for 96 h, algal biomass (algal cell density, chlorophyll and protein contents) changed with the [OMIm]Br dosage in a positive correlation. The concentration for 50% of maximal effect (EC_{50}) of [OMIm]Br to *C. pyrenoidosa* was $14.95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) decreased, whereas the malondialdehyde (MDA) content increased with the increasing [OMIm]Br dosage. The direct harm of [OMIm]Br to protein and antioxidant system was the main cause of toxicity to *C. pyrenoidosa*. It was proved that, owing to the damage of [OMIm]Br revealed by flow cytometry (FCM) detection, *C. pyrenoidosa* cell cycle stopped at S phase and G_2/M phase, and [OMIm]Br resulting in necrosis. The degree of cell retardation and necrosis was positively correlated with the [OMIm]Br dosage.

Key words: ionic liquid; antioxidant mechanism; flow cytometry; toxicology.

离子液体被认为是环境友好型溶剂, 在化学合成 (Yang & Huang, 2012)、催化 (Welton, 2004; Moosavi-Zare *et al.*, 2013)、电化学 (Wongittharom *et al.*, 2013)、分离纯化 (Huddleston *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2011)、重金属回收 (Egorov *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2011) 和碳捕集 (Rao & Rubin, 2002;

Mangalapally, 2009) 等方面得到广泛应用。

但其环境友好特性仅针对大气环境污染而言, 而高热稳定性 (Xu *et al.*, 2008)、强水相溶解性 (Welton, 1999; Zhang *et al.*, 2011) 及低生物降解性 (Garcia *et al.*, 2005; Peric *et al.*, 2013) 等特性使其排放到环境中可能造成水体污染及对生态的潜在危害。Latala 等 (2005) 发现, 不同海藻对咪唑类离子液体反应不同: *Oocystis submarina* 在低浓度毒物作用下最后能恢复生长, 而 *Cyclotella meneghiniana* 生长在高低浓度毒物作用下均受到强烈抑制; 并且咪

* 福建省自然科学基金项目 (2011J01050)、华侨大学博士科研启动基金项目 (11BS119) 和中央高校基本科研业务费专项 (JB-ZR1111) 资助。

** 通讯作者 E-mail: zzm1975@126.com

收稿日期: 2013-10-30 接受日期: 2014-01-22

唑类离子液体生长抑制作用跟培养液盐浓度有关。Docherty 和 Kulpa (2005) 报道了溴化 1-辛基-3-甲基咪唑 ([OMIm] Br)、溴化 1-己基-3-甲基咪唑 ([HmIm] Br) 对大肠杆菌、酿酒酵母等的抑制作用, 他们指出, 增加阳离子烷基侧链长度能增强其抑制作用。Kumar 等 (2009) 指出, 离子液体阳离子烷基侧链越长, 毒性越强。Yu 等 (2008) 考察了 [OMIm] Br 对老鼠肝脏抗氧化酶的毒性作用, 结果表明, [OMIm] Br 能破坏抗氧化系统, 并导致老鼠死亡, 半数致死量 (LD_{50}) 为 $35.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。Zhang 等 (2013) 在研究 4 种溴化 1-烷基-3-甲基咪唑离子液体 ([AMIm] Br) 对淡水光合细菌 (Q67) 致毒作用时发现, 侧链较短的溴化 1-乙基-3-甲基咪唑 ([EMIm] Br) 和溴化 1-丁基-3-甲基咪唑 ([BMIm] Br) 的 EC_{50} 值、破坏抗氧化系统能力随受试时间延长而显著增大, 而侧链较长的 [HmIm] Br 和 [OMIm] Br 的 EC_{50} 值、破坏抗氧化系统能力随受试时间延长而基本不变, 这说明 [AMIm] Br 的生物毒性作用受时间、烷基侧链共同影响。离子液体致毒机理主要有: 使酶失活 (Pham *et al.*, 2010)、破坏细胞膜 (Bernot *et al.*, 2005)、抑制生长 (Docherty & Kulpa 2005; Pretti *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009)、诱导微生物进化导致水生生态系统被破坏 (Calabrese, 2008)。水生生态系统对咪唑类离子液体有一定的防御能力, 水体沉积物能吸附这类离子液体 (Beaulieu *et al.*, 2008), 使能对水体致毒的游离态离子液体含量降低, 进而减弱水体环境被破坏程度 (Escher & Hermens, 2004; Zhang *et al.*, 2011)。

目前, 针对咪唑类离子液体的研究较多, 主要应用方面 (Zhang *et al.*, 2013), 而关于毒理方面的研究较为匮乏 (Pham *et al.*, 2010)。本文针对 [OMIm] Br 离子液体, 选择蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 作为指示物种 (Lin *et al.*, 2007; Liu & Xiong, 2009), 考察 [OMIm] Br 对蛋白核小球藻生长、蛋白质和叶绿素含量、抗氧化机制和细胞生命周期的影响, 探索其对藻细胞的主要致毒机制。

1 材料与方法

1.1 实验藻种和主要试剂

蛋白核小球藻购自中国科学院淡水藻种库。SOD 试剂盒、POD 试剂盒及 MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Hoechst33342/PI 双染试剂盒购自南京凯基生物公司。溴化 1-辛基-3-甲基咪

唑 ([OMIm] Br) 离子液体购自上海笛柏化学品技术有限公司, 纯度 $\geq 99\%$ 。

1.2 藻种的培养和藻细胞浓度的测定

培养基配制方法参照 OECD201 (OECD, 2011), 先将培养基 pH 值调至 6.0 ~ 6.5, 灭菌备用。向洁净容器中加入培养基, 接入藻种, 置于人工气候箱中静置培养 (温度 $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光强 3000 lx、光暗比 14 h : 10 h), 每隔 6 h 摇动一次, 并随机更换容器位置。通过观察, 选择对数生长期将藻种转接到新鲜培养基中, 应确保不被污染。藻试验液所选藻种要求生长健壮且处于对数生长期, 藻试验液采用血球计数板法测定藻细胞浓度 (李如亮, 1998), 并测定不同浓度藻试验液的吸光度 OD_{686} , 以藻细胞浓度和其对应的吸光度表示藻生物量, 通过二者的线性关系进行检验。

1.3 实验方法

1.3.1 藻类生长抑制试验及 96h- EC_{50} 值确定 接种对数期的藻种并培养, 使其浓度达到 $1 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分装至 7 个培养瓶中, 1[#] ~ 7[#] 瓶培养液中 [OMIm] Br 浓度依次为 0、5、10、15、30、50、80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 于人工气候箱中静置培养 (工况见 1.2)。接种后开始计时, 每隔 24 h 取样分析, 设 3 组平行样。通过测定藻细胞浓度, 绘制各浓度组对数生长曲线, 并计算 96h- EC_{50} (以下简称 EC_{50})。

1.3.2 藻细胞叶绿素含量测定 采用叶绿素荧光仪 (德国 WALZ, Phyto-PAM) 直接测定叶绿素含量。

1.3.3 藻细胞蛋白质含量测定 于 0、24、48、72、96 h 时刻取适量藻液于具塞离心管中, 离心 10 min ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 倒掉上清液, 加入 10 mL 0.05 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液 (pH = 7.8), 振荡混匀, 直至离心管壁上的藻全部溶于液相中, 超声破碎 (400 W, 5 s/5 s, 15 min) 至镜检无完整细胞存在为止, 再将破碎完的藻液离心 10 min, 此时上清液即为藻蛋白粗提液。以牛血清蛋白为标准, 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法 (Bradford, 1976)。

1.3.4 SOD 酶活、POD 酶活和 MDA 含量测定 超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活、过氧化物酶 (POD) 酶活和脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量的测定实验按照试剂盒说明书进行。

1.3.5 细胞生命周期测定 采用流式细胞仪测定 (美国 Beckman Coulter, Quanta SC, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光)。

1.4 数据处理

用 EXCEL 处理原始数据,计算结果以平均值±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示。用 EXCEL 绘图。藻类生长抑制实验中 EC_{50} 值的计算方法(OECD,2011)如下:

平均比生长速率

$$\mu_{i-j} = (\ln B_j - \ln B_i) / (t_j - t_i)$$

式中: t_i 和 t_j 分别为实验的开始与结束时刻, B_i 和 B_j 分别为*i*时刻与*j*时刻的生物量浓度,在本例中为藻细胞密度。

生长抑制百分率

$$I = (\mu_c - \mu_T) / \mu_c \times 100\%$$

式中: μ_c 为未加离子液对照组的 96 h 平均比生长速率, μ_T 为离子液处理组的 96 h 平均比生长速率。

确定抑制百分率与[OMIm]Br 浓度间的关系,进而计算受试物对蛋白核小球藻生长抑制的 EC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 [OMIm]Br 对藻细胞生长抑制及 EC_{50} 值

不同浓度的[OMIm]Br 胁迫下的藻细胞对数生长曲线见图 1,曲线上观察点间连线的斜率表示相应时间段的平均比生长速率(OECD,2011)。由图可知,平均比生长速率随接触时间的延长和[OMIm]Br 浓度的增加呈现下降趋势,即抑制作用增强,说明[OMIm]Br 对蛋白核小球藻的生长抑制呈现剂量-效应关系和时间-效应关系。其 EC_{50} 值为 $14.95\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,据毒性分级标准(Cho *et al.*,2007),[OMIm]Br 属中毒等级。

2.2 [OMIm]Br 对藻细胞叶绿素含量的影响

叶绿素含量的测定可反映蛋白核小球藻量及其存活情况(Lundsgaard & Olesen,1997;Kumari *et al.*,

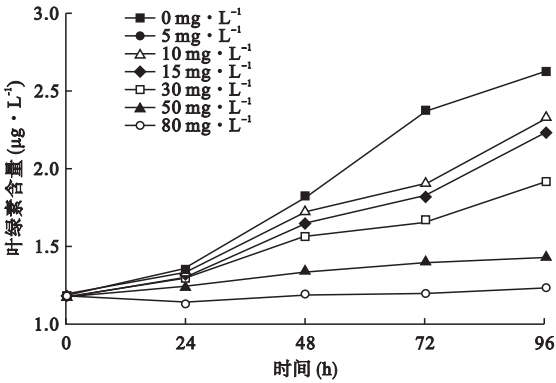


图2 [OMIm]Br 对叶绿素含量的影响
Fig.2 Effect of [OMIm]Br on total chlorophyll contents of *Chlorella pyrenoidosa*

2009)。从图 2 可知,叶绿素含量变化与图 1 所示细胞浓度的变化趋势一致,随着[OMIm]Br 浓度的增大,叶绿素含量增长趋缓,浓度达 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶绿素含量增长停顿。且添加了[OMIm]Br 的培养瓶中有大量无色或泛白色的藻细胞沉积,导致原因是藻细胞叶绿素损伤以及生物合成受到抑制,发生藻细胞白化而坏死或凋亡(Kumari *et al.*,2009)。

2.3 [OMIm]Br 对藻细胞蛋白质含量的影响

蛋白质不仅是藻细胞体的主要有机成分,而且部分蛋白质能够作为酶和调节成分,是藻细胞实施正常生理功能以及适应环境变化的重要物质保障(Baba *et al.*,2011;Campos *et al.*,2013)。从图 3 可知,添加了[OMIm]Br 的培养体系中,藻细胞蛋白质含量在最初 24 h 表现出明显下降趋势,下降幅度与[OMIm]Br 浓度相关, $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时浓度趋于 0。此后,除 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组外,其他各组蛋白质含量呈现恢复增长趋势。

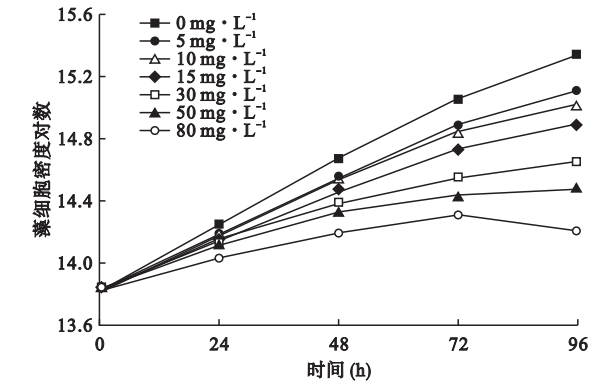


图1 [OMIm]Br 对蛋白核小球藻生长的影响
Fig.1 Effect of [OMIm]Br on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*

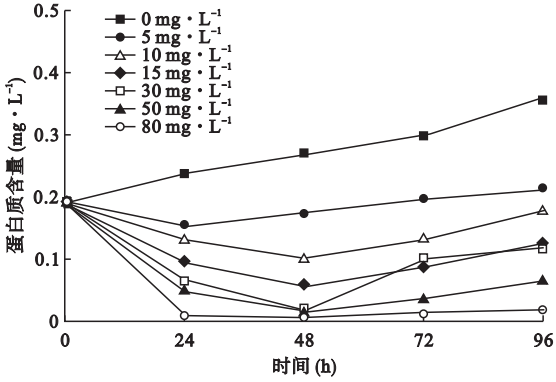


图3 [OMIm]Br 对蛋白质含量的影响
Fig.3 Effect of [OMIm]Br on total protein contents of *Chlorella pyrenoidosa*

2.4 [OMIm]Br 对藻细胞抗氧化机制的影响

藻细胞抗氧化机制取决于 SOD、POD 等酶,这些酶能及时清除活性氧。当藻细胞受到毒害,抗氧化酶活性下降,造成活性氧积累,发生细胞损伤 (Campos *et al.*, 2013),膜脂质过氧化产物(MDA)含量增加,细胞膜通透性增大。图 4 显示,随着 [OMIm]Br 浓度升高,蛋白核小球藻 SOD、POD 活性均出现下降趋势,呈剂量-效应关系,且低浓度的 [OMIm]Br 也能引起 SOD 和 POD 酶活下降。同时 MDA 含量增加,高浓度处理组 (50 和 80 mg · L⁻¹ 组) 的 MDA 含量较对照组均有极显著差异 ($n=3$, $P<0.01$)。

2.5 [OMIm]Br 对细胞周期的影响

由图 5 可知,蛋白核小球藻经投毒后,G₀/G₁期细胞所占比例减少,S 期和 G₂/M 期的细胞所占比例增加,并显示出显著的剂量依赖效应。由图 6 可知,随着 [OMIm]Br 浓度增加,PI 单染峰由 G₀期向 S

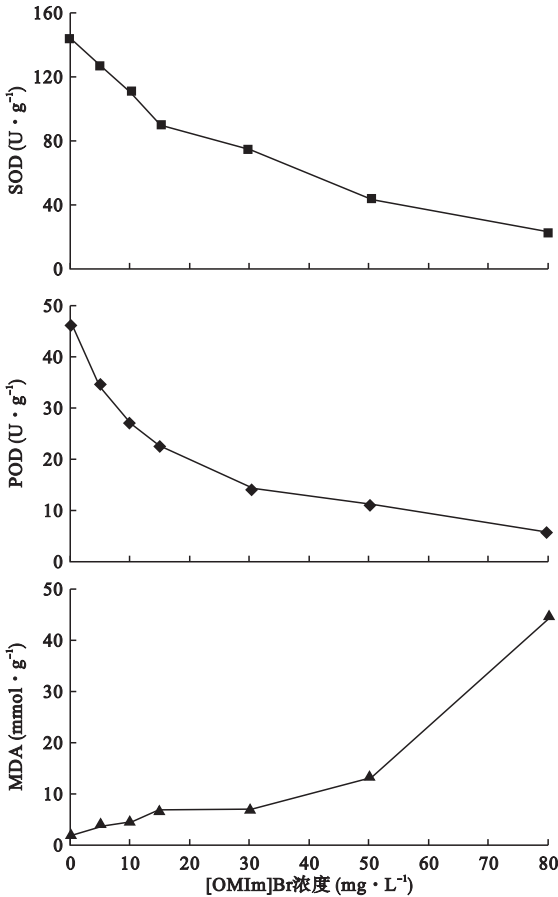


图 4 [OMIm]Br 对蛋白核小球藻 SOD、POD 和 MDA 的影响
Fig.4 Effect of [OMIm]Br on SOD and POD activities, and MDA contents of *Chlorella pyrenoidosa*

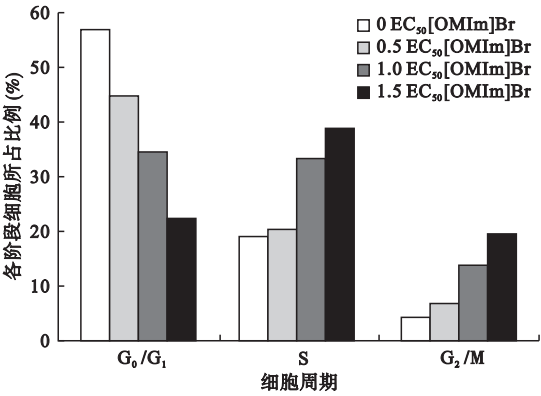


图 5 不同浓度[OMIm]Br 作用下蛋白核小球藻的细胞周期变化
Fig.5 Cell-cycle analysis of *Chlorella pyrenoidosa* exposed to different concentrations of [OMIm]Br

期移动,这说明 G₀期细胞量减少,S 期和 G₂/M 期细胞量增加,细胞周期阻滞于 S 期和 G₂/M 期,与图 5 的结果吻合。由于流式细胞仪流动系统的特性,样品中粘连体细胞经过流路时,其信号宽度至少为两个颗粒或者细胞的直径之和,导致 PI 单染峰拖尾现象 (Díaz *et al.*, 2010)。

2.6 [OMIm]Br 引起藻细胞的坏死

图 7 是流式细胞仪检测蛋白核小球藻经不同浓度 [OMIm]Br 处理 96 h 后的双参数散点图。以空白对照的藻细胞为界,设定门 G_{TE},即图示方框内区域,门内为正常细胞,门外为凋亡和坏死的细胞。从图 7 可以看出,随着 [OMIm]Br 浓度增大,前散射光 (EV) 增大,由于细胞凋亡时因细胞体积变小而前散射光变小,坏死时因细胞肿大而前散射光变大,所以离子液体诱导了藻细胞坏死。同时处于门外的细胞数量增多,即坏死的细胞增多。从图 6 可以看出, a 表示细胞碎片 (Veal *et al.*, 2000),其 DNA 含量少于正常细胞 (二倍体) DNA 含量,且 [OMIm]Br 浓度越大,细胞碎片越多,即坏死的细胞越多。总之, [OMIm]Br 离子液体能够诱导藻细胞坏死,且呈现正相关的剂量-效应规律。

3 讨论

3.1 [OMIm]Br 对蛋白核小球藻细胞生物量影响

对浮游植物而言,细胞中叶绿素和蛋白质含量被广泛认为是生物量的指标 (Lundsgaard & Olesen, 1997; Baba *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013)。蛋白质和叶绿素的含量,可以用来间接表征藻细胞的存活情况和生物量的多少。[OMIm]Br 对藻类生理生

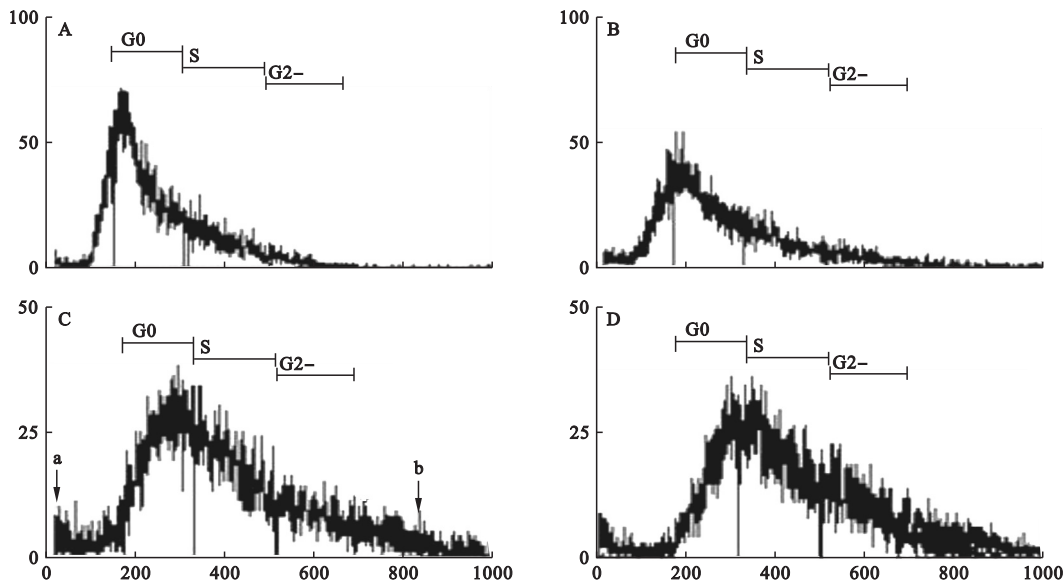


图 6 投加不同浓度的[OMI_m]Br 96 h 后的 PI 单染图
Fig. 6 PI simple staining diagrams of *Chlorella pyrenoidosa* cells exposed to different concentrations of [OMI_m]Br
A. CK; B. 0.5 EC₅₀; C. EC₅₀; D. 1.5 EC₅₀。 (a) 细胞磷片, (b): 超二部体细胞。

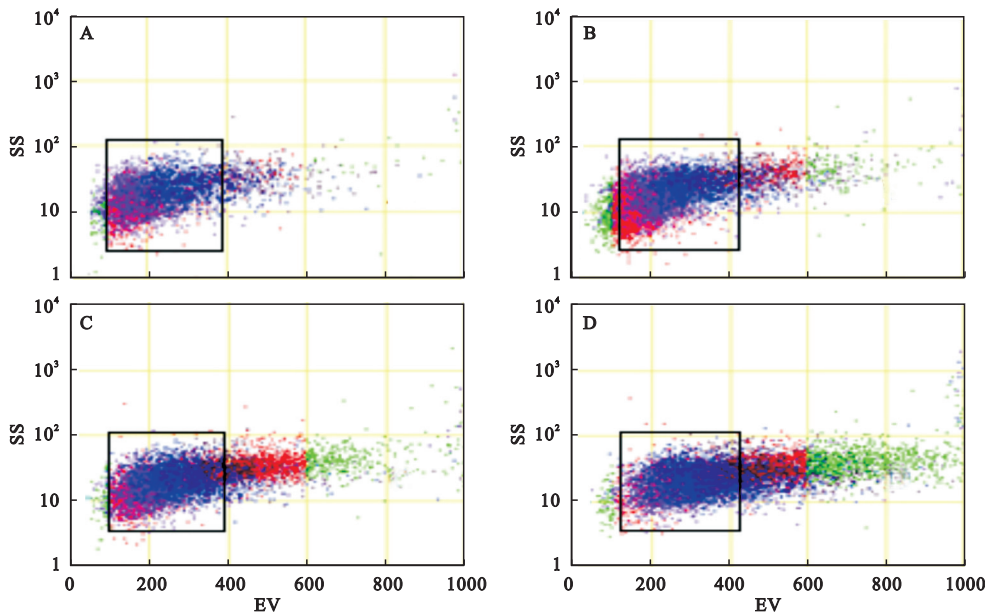


图 7 投加不同浓度的[OMI_m]Br 96 h 后的 SS-EV 双参数散点图
Fig. 7 SS-EV two-parameter scatter plots of *Chlorella pyrenoidosa* exposed to different concentrations of [OMI_m]Br for 96 h
A. CK; B. 0.5 EC₅₀; C. EC₅₀; D. 1.5 EC₅₀。

化指标的影响主要表现在蛋白质和叶绿素含量的下降,下降幅度与受试物剂量呈正相关。叶绿素含量的变化表明[OMI_m]Br 破坏了叶绿体结构的完整性,使光合作用等生理功能发生异常,从而加速了藻细胞蛋白质的损伤和生物量的减少;而蛋白质不仅是藻细胞的结构(包括叶绿体)成分,而且还是藻细胞实现各种生物功能(如光合作用,抗氧化机制等)

的载体,蛋白质含量的降低表明[OMI_m]Br 引起藻细胞结构和功能的损伤,而藻细胞结构和功能的损伤反过来影响到叶绿素功能的正常发挥(张彬等, 2010)。

3.2 [OMI_m]Br 对蛋白核小球藻细胞致毒机理

正常细胞中会产生活性氧(ROS),低浓度的活性氧对细胞的某些生理现象起着重要的调节作用,

特别是胞内信号转导方面(Soares *et al.*, 2011)。活性氧主要包括 O_2^- (超氧阴离子)、 1O_2 (单重态氧)、 H_2O_2 (过氧化氢)、 $\cdot OH$ (羟自由基), 活性氧的氧化性比氧气强而能氧化损伤藻细胞(Wang *et al.*, 2011)。藻细胞在长期的进化过程中, 通过自然选择而发展了抗活性氧损伤的保护系统, 包括 SOD、CAT (过氧化氢酶) 和 POD 等抗氧化酶和一些抗氧化剂。抗氧化酶能及时清除活性氧, 从而使机体中的活性氧不会积累到损伤机体的浓度(Halliwell, 1996)。但是, 当藻细胞处于不利环境中时, 抗氧化酶遭到破坏, 活性氧积累, 藻细胞受到氧化损伤; 这一结论可以从图 1、图 4 所示实验结果得到印证, 即 [OMIm]Br 作用蛋白核小球藻时, SOD 和 POD 活性下降, 藻种生长被抑制, MDA 含量增加。Wu 等 (2013) 用 8 种咪唑类离子液体处理秀丽隐杆线虫, 线虫体内 ROS 和脂褐素 (由 MDA 诱导产生) 含量, 以及致死率随毒物剂量增大而升高; 再用二甲基亚砜 (DMSO) 清除线虫体内的 ROS, 发现存活率显著提高, 这说明抗氧化机制系统被破坏可导致受试生物死亡。

氧化损伤可引起细胞坏死 (Rubiolo & Vega, 2008; Barna *et al.*, 2012)。之前提到 [OMIm]Br 对蛋白核小球藻细胞造成了结构和功能上的损伤, 如叶绿素损伤、酶蛋白失活、细胞膜通透性增大等, 这些都是藻细胞坏死时所发生的病理性转变。[OMIm]Br 诱导蛋白核小球藻细胞坏死的过程可能经历了细胞凋亡阶段, 即 [OMIm]Br 诱导了继发性坏死 (Silva, 2010)。藻细胞继发性坏死的原因有多方面, 但最主要的原因是已经启动凋亡机制的细胞不能被及时清除, 且进一步受到毒物毒害, 导致细胞膜结构破裂而坏死。本研究中, 藻细胞坏死也可能是原发性坏死 (不经历细胞凋亡阶段), 还有可能是原发性坏死和继发性坏死同时存在。建议后续研究采取双染法区分凋亡细胞和坏死细胞, 并检测投毒后不同时间凋亡细胞和坏死细胞的数量变化, 从而探明藻细胞坏死的具体过程。

参考文献

- 李如亮. 1998. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社.
- 张彬, 郭劲松, 方芳, 等. 2010. 植物化感抑藻的作用机理. 生态学杂志, **29**(9): 1846–1851.
- Baba M, Suzuki I, Shiraiwa Y. 2011. Proteomic analysis of high- CO_2 -inducible extracellular proteins in the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & Cell Physiology*, **52**: 1302–1314.
- Barna B, Fodor J, Harrach BD, *et al.* 2012. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, **59**: 37–43.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Beaulieu JJ, Tank JL, Kopacz M. 2008. Sorption of imidazolium-based ionic liquids to aquatic sediments. *Chemosphere*, **70**: 1320–1328.
- Bernot RJ, Brueske MA, Evans-White MA, *et al.* 2005. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**: 87–92.
- Calabrese EJ. 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**: 1451–1474.
- Campos A, Araújo P, Pinheiro C, *et al.* 2013. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **94**: 45–53.
- Cho CW, Pham TPT, Jeon YC, *et al.* 2007. Toxicity of imidazolium salt with anion bromide to a phytoplankton *Selenastrum capricornutum*: Effect of alkyl chain length. *Chemosphere*, **69**: 1003–1007.
- Díaz M, Herrero M, García LA, *et al.* 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, **48**: 385–407.
- Docherty KM, Kulpa JCF. 2005. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chemistry*, **7**: 185–189.
- Egorov VM, Djigailo DI, Momotenko DS, *et al.* 2010. Task-specific ionic liquid trioctylmethylammonium salicylate as extraction solvent for transition metal ions. *Talanta*, **80**: 1177–1182.
- Escher BI, Hermens JLM. 2004. Peer reviewed: Internal exposure: Linking bioavailability to effects. *Environmental Science & Technology*, **38**: 455–462.
- Fischer L, Falta T, Koellensperger G, *et al.* 2011. Ionic liquids for extraction of metals and metal containing compounds from communal and industrial waste water. *Water Research*, **45**: 4601–4614.
- Garcia MT, Gathergood N, Scammells PJ. 2005. Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chemistry*, **7**: 9–14.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, **16**: 33–50.
- Huddleston JG, Willauer HD, Swatoski RP, *et al.* 1998. Room temperature ionic liquids as novel media for ‘clean’ liquid-liquid extraction. *Chemical Communications*, **16**:

- 1765–1766.
- Kumar RA, Papaiconomou N, Lee JM, *et al.* 2009. In vitro cytotoxicities of ionic liquids: Effect of cation rings, functional groups, and anions. *Environmental Toxicology*, **24**: 388–395.
- Kumari M, Clarke HJ, Small I, *et al.* 2009. Albinism in plants: A major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **28**: 393–409.
- Latala A, Stepnowski P, Nedzi M, *et al.* 2005. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae *Oocystis submarina* and *Cyclotella meneghiniana*. *Aquatic Toxicology*, **73**: 91–98.
- Lundsgaard C, Olesen M. 1997. The origin of sedimenting detrital matter in a coastal system. *Limnology and Oceanography*, **42**: 1001–1005.
- Lin KC, Lee YL, Chen CY. 2007. Metal toxicity to *Chorella pyrenoidosa* assessed by a short-term continuous test. *Journal of Hazardous Materials*, **142**: 236–241.
- Liu HJ, Xiong MY. 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology*, **93**: 100–106.
- Mangalapally HP, Notz R, Hoch S, *et al.* 2009. Pilot plant experimental studies of post combustion CO₂ capture by reactive absorption with MEA and new solvents. *Energy Procedia*, **1**: 963–970.
- Moosavi-Zare AR, Zolfirol MA, Zarei M, *et al.* 2013. Design, characterization and application of new ionic liquid 1-sulfofpyridinium chloride as an efficient catalyst for tandem Knoevenagel-Michael reaction of 3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5(4H)-one with aldehydes. *Applied Catalysis A: General*, **467**: 61–68.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2011. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test [EB/OL]. (2011-07-28). http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en.
- Peric B, Sierra J, Marti E, *et al.* 2013. Ecotoxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. *Journal of Hazardous Materials*, **261**: 99–105.
- Pham TPT, Cho CW, Yun YS. 2010. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research*, **44**: 352–372.
- Pretti C, Chiappe C, Baldetti I, *et al.* 2009. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 1170–1176.
- Rao AB, Rubin ES. 2002. A technical, economic, and environmental assessment of amine-based CO₂ capture technology for power plant greenhouse gas control. *Environmental Science & Technology*, **36**: 4467–4475.
- Rubiolo JA, Vega FV. 2008. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **62**: 606–612.
- Silva MT. 2010. Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters*, **584**: 4491–4499.
- Soares NC, Wojtkowska J, Jackson PA. 2011. A proteomic analysis of the wound response in *Medicago* leaves reveals the early activation of a ROS-sensitive signal pathway. *Journal of Proteomics*, **74**: 1411–1420.
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, *et al.* 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, **243**: 191–210.
- Wang J, Zhu JY, Liu SP, *et al.* 2011. Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes. *Chemosphere*, **85**: 977–982.
- Welton T. 1999. Room-temperature ionic liquids: Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*, **99**: 2071–2083.
- Welton T. 2004. Ionic liquids in catalysis. *Coordination Chemistry Reviews*, **248**: 2459–2477.
- Wongittharom N, Lee TC, Hsu CH, *et al.* 2013. Electrochemical performance of rechargeable Li/LiFePO₄ cells with ionic liquid electrolyte: Effects of Li salt at 25 °C and 50 °C. *Journal of Power Sources*, **240**: 676–682.
- Wu X, Tong ZH, Li LL, *et al.* 2013. Toxic effects of imidazolium-based ionic liquids on *Caenorhabditis elegans*: The role of reactive oxygen species. *Chemosphere*, **93**: 2399–2404.
- Xu SS, Zhang J, He AH, *et al.* 2008. Electrospinning of native cellulose from nonvolatile solvent system. *Polymer*, **49**: 2911–2917.
- Yang Z, Huang ZL. 2012. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids. *Catalysis Science & Technology*, **2**: 1767–1775.
- Yu M, Li SM, Li XY, *et al.* 2008. Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**: 903–908.
- Zhang Z, Liu JF, Cai XQ, *et al.* 2011. Sorption to dissolved humic acid and its impacts on the toxicity of imidazolium based ionic liquids. *Environmental Science & Technology*, **45**: 1688–1694.
- Zhang J, Liu SS, Yu ZY, *et al.* 2013. Time-dependent hormetic effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide on *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67: Luminescence, redox reactants and antioxidantases. *Chemosphere*, **91**: 462–467.

作者简介 杨兆壬,男,1987年生,硕士研究生,研究方向为离子液体生态毒理学。E-mail: yang8zr@126.com
责任编辑 李凤芹