快相与弛豫荧光动力学植物光合作用参数反演方法

覃志松[1,2,3], 赵南京[1], 殷高方[1], 石朝毅[4], 甘婷婷[1], 肖 雪[1], 段静波[1]
张小玲[1,2], 陈 双[1,2], 刘建国[1], 刘文清[1]

[1]中国科学院安徽光学精密机械研究所安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;
[2]中国科学技术大学 安徽 合肥 230026;
[3]桂林电子科技大学计算机与信息安全学院, 广西 桂林 541004;
[4]合肥学院电子工程系, 安徽 合肥 230601

摘要 根据生物膜能流理论和电子传递模型,结合快相与弛豫两种激发条件,对复杂的光合作用过程进行分析并简化计算,提出植物光合作用参数反演方法。利用滑动窗口斜率判定法确定最大荧光产率;利用线性最小二乘算法解析快相荧光过程获得光化学量子效率和功能吸收截面;利用离散迭代算法解析弛豫荧光过程获得质体醌平均还原时间常数。对对数生长期以及铜离子胁迫条件下的平裂藻和斜生栅藻进行实验测量,结果表明该方法反演结果具有良好的稳定性和重复性,光化学量子效率、功能吸收截面和质体醌平均还原时间常数的测量结果相对标准偏差分别为 1.25%、1.50%和 1.83%,其中光化学量子效率与脉冲振幅调制技术的测量结果线性相关系数达到 0.9714。该方法为研究植物生理研究提供一种光学分析手段。

关键词 光谱学; 叶绿素荧光动力学; 光合作用参数反演; 线性最小二乘算法; 快相与弛豫荧光
中图分类号 X835 **文献标识码** A
doi: 10.3788/AOS201737.0730002

Inversion Method of Plant Photosynthesis Parameter Based on Fast Phase and Relaxation Fluorescence Kinetics

Qin Zhisong[1,2,3], Zhao Nanjing[1], Yin Gaofang[1], Shi Chaoyi[4], Gan Tingting[1], Xiao Xue[1], Duan Jingbo[1], Zhang Xiaoling[1,2], Chen Shuang[1,2], Liu Jianguo[1], Liu Wenqing[1]

[1]*Anhui Provincial Key Laboratory of Environmental Optical Monitoring Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics of Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui* 230031, *China*;
[2]*University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui* 230026, *China*;
[3]*Instituteof Computer and Information Security, Guilin University of Electronic Technology, Guilin, Guangxi* 541004, *China*;
[4]*Department of Electronic Engineering, Hefei University, Hefei, Anhui* 230601, *China*

Abstract According to the biological film energy flow theory and electron transfer model, the plant complex photosynthesis is analyzed and simplified by combining to the exciting conditions of fast phase and relaxation, so that an inversion method of plant photosynthesis parameter is proposed . The maximum fluorescence yield is calculated by using the determinate method of sliding window slope. The photochemical quantum efficiency and the functional absorption cross section are obtained by analyzing the fast phase fluorescence process with linear least square algorithm. The plastoquinone average reduction time constant is obtained by analyzing the relaxation fluorescence

收稿日期: 2017-01-23; **收到修改稿日期**: 2017-03-06
基金项目: 国家自然科学基金(31400317)、国家 863 计划 (2014AA06A509)、国家重点研发计划项目(2016YFC1400602)、安徽省科技重大专项(15CZZ04125)、安徽省自然科学基金青年项目(1708085QD87)、青岛海洋科学与技术国家实验室开发基金项目(QNLM2016ORP0312)
作者简介: 覃志松(1977—),男,博士研究生,讲师,主要从事荧光检测技术方面的研究。E-mail: zsqin@aiofm.ac.cn
导师简介: 赵南京(1976—),男,博士,研究员,主要从事环境污染光学与光谱学监测新技术与方法方面的研究。E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn(通信联系人)

process with discrete iterative algorithm. The experimental measurement results of the merismopedia and scenedesmu sobliquus grew in logarithmic phase and under the copper ion stress conditions show that the inversion has good stability and repeatability. The relative standard deviation of the photochemical quantum efficiency, the functional absorption cross section and the plastoquinone average reduction time constant are 1.25%, 1.50% and 1.83%, respectively. The linear correlation coefficient of the photochemical efficiency compared to the measuring result of the pulse amplitude modulation technology is 0.9714. The proposed inversion method provides an optical analysis means for the study of plant physiology.

Key words　spectroscopy; chlorophyll fluorescence kinetics; photosynthetic parameters inversion; linear least square algorithm; fast phase and relaxation fluorescence

OCIS codes　300.2530; 300.6390;040.5250; 040.3060

1　引　　言

叶绿素荧光动力学过程与植物光合作用状态密切相关，即植物细胞在暗适应后，重新照光要经过一个“光合诱导期”光合作用才能达到正常水平[1]。自 Mauzerall[2] 提出基于荧光动力学反演植物光合作用方法以来，已发展了多种光诱导荧光动力学解析方法，如 Schreiber 等[3] 研究了脉冲振幅调制(PAM)光诱导荧光动力学曲线的解析方法，研制了商业化测量仪器 Water-PAM 并应用到实际的光合作用参数测量中；Kolber 等[4] 研究了高速重复脉冲(FRR)光诱导单周转快相荧光动力学测量技术与解析方法；Stirbet 等[5] 建立了多周转模式快相叶绿素荧光动力学曲线的 OJIP-test 解析方法；邱晓晗等[6] 提出自适应最小误差逼近方法对光合系统 II(PSII)的快相荧光曲线进行解析和反演获得相关的光合作用参数。已有研究均是基于荧光动力学上升过程解析原初光能转化以及 PSII 的质体醌(PQ)和初级醌受体(QA)的能流过程，获得最小荧光产率 F_o，最大荧光产率 F_m，最大可变荧光产率 $F_v=F_m-F_o$，可对光化学量子效率 F_v/F_m、功能吸收截面 σ_{PSII} 进行解析。PAM 技术仅仅对 F_v/F_m 进行了解析，FRR、OJIP-test 和自适应逼近法还解析了另外一个参数 σ_{PSII}，而对弛豫荧光动力学的过程解析未见报道。在弛豫荧光过程中，PQ 平均还原时间 τ_{QA} 指的是电子传递经 QA、PQ 和 Cytb6/f 后到达 PSI 过程中，PQ 从氧化态到重新被还原的时间，τ_{QA} 还原时间越快，单位时间内传递的电子数量也越大，其与光合作用的速率密切相关。目前获得该参数的常用方法大多依靠化学试剂分析，操作过程较为复杂，不适用于现场测量。

荧光动力学过程是活体生物中的电子传递过程，容易受植物自身的生理状态影响，利用常规的测量手段不能获取完整的荧光动力学信息，更不能有效地对荧光动力学曲线进行反演并获得更多的光合作用参数。因此，如何利用新的测量手段获取荧光动力学信息并通过反演算法获得准确的光合作用参数是目前迫切需要解决的难题。本文以生物膜能流理论和电子传递过程为基础，研究了单周转快相与弛豫荧光动力学参数反演算法，除获得光化学量子效率 F_v/F_m 和功能吸收截面 σ_{PSII} 外，还获得另外一个参数 τ_{QA}，从而更加准确有效地挖掘叶绿素荧光动力学过程蕴含的光合作用状态信息，为植物光合作用参数测量及光化学反应科学研究提供先进技术手段。

2　实验系统

基于快相与弛豫荧光动力学的实验测量系统如图 1 所示。由 460 nm 的发光二极管(LED)阵列(3×3)

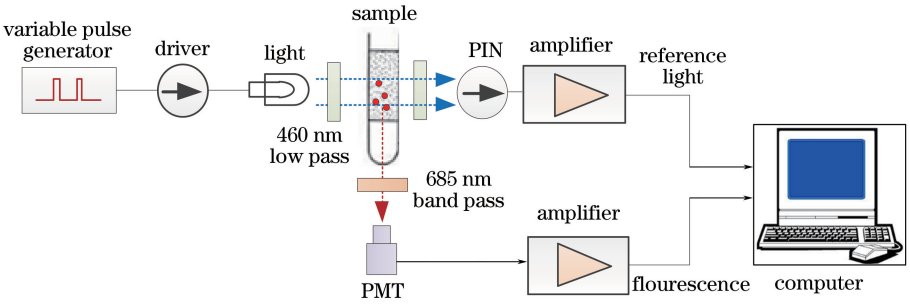

图 1　荧光动力学实验系统

Fig. 1　Fluorescence kinetics experimental system

作为激发光源(最大瞬时光强为 80000 μmol·quanta·m^{-2}·s^{-1}),通过可变脉冲信号控制产生快相和弛豫两种模式下的光强,其中快相激发光强最小分辨率为 12 μmol·quanta·m^{-2}·s^{-1},弛豫模式下的调光分辨率为 0.06 μmol·quanta·m^{-2}·s^{-1}。在光源方向上,激发光经带通滤波片后由光电二极管(PC10-6B,First Sensor)转换为电信号;荧光探测与光源方向呈 90°,685 nm 的荧光经过约 20 nm 带宽带通干涉滤光片(BP685,南通研华)后使用光电倍增管(HT6779-1,HAMAMATSU)进行光电转换,对两路信号经过放大器(OPA637,Texas Instruments)后进行高速模拟/数字(A/D)转换(ADS807E,Texas Instruments),获得激发光和荧光信号强度信息。

3　反演方法

3.1　荧光动力学分析过程

植物吸收光能并发生光化学反应,反应中心色素 P680 失去一个电子变为 $P680^+$,它的还原过程需约 100 μs。当使用人工调制的单脉冲强光激发后,PSII 大量吸收电子导致在 Q_A 处阻塞,反应中心关闭,无法再接收后续的能量用于光化学反应,其光能仅能以热量和荧光的形式耗散,引起荧光产率从静态最小荧光 F_o 上升并达到最大荧光产率 F_m,此过程即为快相上升过程。实验室培育下平裂藻的荧光动力学典型曲线如图 2 所示。

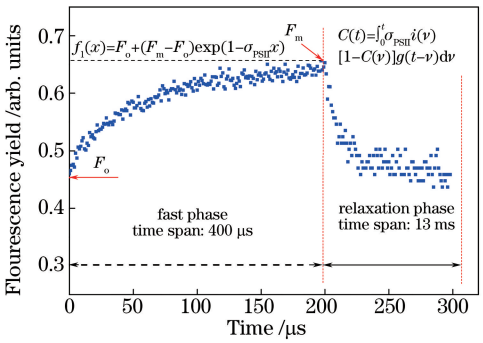

图 2　荧光动力学曲线

Fig. 2　Fluorescence kinetics curve

暗适应状态下,叶绿素荧光产率与激发光能量、PSII 的功能吸收截面 σ_{PSII} 及 Q_A 的氧化还原状态密切相关。激发过程中,t 时刻的荧光产率 $f(t)$ 可表示为[7]:

$$f(t)=F_o+(F_m-F_o)C(t)=F_o+F_vC(t),\tag{1}$$

式中 F_v 为最大可变荧光产率,F_m 为所有 PSII 反应中心都关闭时的最大荧光产率,F_o 为 PSII 的所有反应中心处于完全开放状态的初始荧光产率,$C(t)$($0\leqslant C(t)\leqslant 1$)为已关闭的反应中心比例。

$C(t)$ 由原初光化学反应速率决定,而原初光化学反应速率又与入射的激发光能量 I、PSII 功能吸收截面 σ_{PSII} 以及 Q_A^- 再氧化速率的乘积成正比。由原初光化学反应引起的 $C(t)$ 的变化可表示为:

$$\frac{\partial C(t)}{\partial I}=\sigma_{PSII}[1-C(t)]。\tag{2}$$

如果忽略 Q_A^- 的再氧化过程,(2)式可简化为:

$$\frac{dC(t)}{dt}=\sigma_{PSII}\frac{dI}{dt}[1-C(t)]=\sigma_{PSII}i(t)[1-C(t)],\tag{3}$$

式中 $i(t)$ 为激发光能量。对(3)式进行积分运算,可得到 $C(t)$ 的表达式为:

$$C(t)=\int_0^t\sigma_{PSII}i(v)[1-C(v)]dv,\tag{4}$$

式中 v 为积分变量,$C(v=0)$ 是在激发开始之前处于关闭状态的 PSII 反应中心的比例。当采用非常强的激发光能进行激发,Q_A^- 的再氧化过程可以忽略。(4)式可简化为:

$$f(x)=F_o+(F_m-F_o)\exp(1-\sigma_{PSII}x)=F_o+F_v\exp(1-\sigma_{PSII}x)。\tag{5}$$

在弛豫荧光过程中,Q_A^- 的再氧化能力非常显著,因此需要将(5)式进行修正,得:

$$C(t)=\int_0^t \sigma_{\mathrm{PSII}} i(v)[1-C(v)]g(t-v)\mathrm{d}v, \tag{6}$$

式中 $g(t-v)$ 描述了 Q_{A}^{-} 的再氧化过程，即：

$$g(t)=\exp(-t/\tau_{\mathrm{QA}}), \tag{7}$$

式中 τ_{QA} 为 Q_{A}^{-} 的平均再氧化时间常数。

虽然(6)式和(7)式没有方程解，但通过对(1)式的离散形式进行数值拟合，可以获取光合作用参数 τ_{QA}。(1)式的离散形式表示为：

$$f_n=F_{\mathrm{o}}+(F_{\mathrm{m}}-F_{\mathrm{o}})C_n, \tag{8}$$

式中 f_n 为第 n 采样点，C_n 为第 n 个采样周期后关闭的 PSII 反应中心的比例。C_n 的计算公式为：

$$C_n=C_{n-1}A_n+I_n\sigma_{\mathrm{PSII}}(1-C_{n-1}A_n), \tag{9}$$

式中 I_n 为第 n 个采样周期的激发能，A_n 的计算公式为：

$$A_n=(A_{n-1}+C_{n-1}/\sigma_{\mathrm{PSII}})\exp(-\Delta t/\tau_{\mathrm{QA}})。 \tag{10}$$

在光适应条件下，A_0 和 C_0 描述了环境光关闭的反应中心的比例，Δt 是信号采样周期。

通过采用(8)、(9)和(10)式对计算得到的荧光产率曲线进行拟合，即可获取 τ_{QA}，至此，通过对快相与弛豫荧光产率曲线的分段反演，获得光合作用参数 $F_{\mathrm{v}}/F_{\mathrm{m}}$、$\sigma_{\mathrm{PSII}}$ 和 τ_{QA}。

3.2　计算过程

为了获得叶绿素的光合作用参数，需要对采集的叶绿素荧光信号和激发光参考信号进行光谱处理，计算过程主要采用了滑动窗口斜率判定法、线性最小二乘(LLS)算法和离散迭代算法。滑动窗口斜率判定法主要为了消除单个测量数据计算误差所带来的影响，常用于模型的趋势分析；线性最小二乘法以误差的平方和最小作为线性模型的参数估计，根据本文的线性方程求解过程特点，选用它作为参数估计算法；而离散迭代算法是根据弛豫过程得到的一种特定分析算法。先利用快相荧光曲线采用滑动窗口斜率法对最大荧光稳定点进行判断；利用最小二乘拟合算法反演得到 F_{m}，步骤如图 3(a)所示；采用线性逼近拟合法解析获得 F_{o} 以及光化学量子效率参数 $F_{\mathrm{v}}/F_{\mathrm{m}}$；利用微分法对快相动力学曲线进行变换，获得线性拟合矩阵，通过最小二乘拟合求解功能吸收截面 σ_{PSII}，最后利用弛豫荧光曲线和快相荧光的 F_{m} 和 F_{o} 参数，采用迭代法建立线性方程组，再利用最小二乘算法反演得到 Q_{A} 平均还原时间常数 τ_{QA}，计算方法如图 3(c)所示。

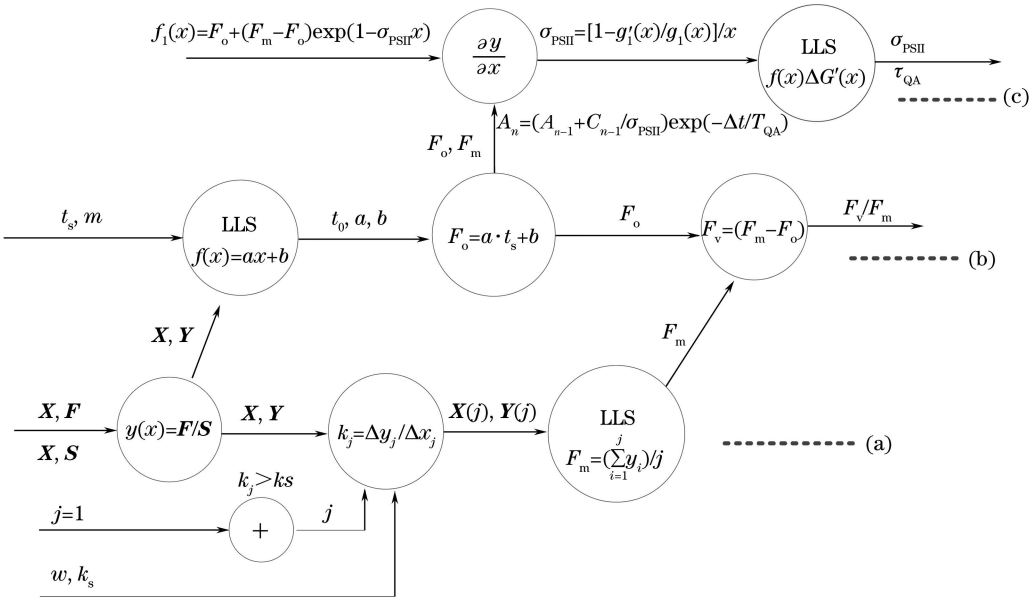

图 3　光合作用参数计算过程

Fig. 3　Calculation process of photosynthesis parameters

3.2.1　最大荧光产率 F_{m}

对快相荧光曲线按窗口宽度为 w 组成得到斜率方程组为：

$$\boldsymbol{K}=\begin{bmatrix}k_1\\k_2\\\vdots\\k_i\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}(y_2-y_1)/(x_2-x_1)\\(y_3-y_2)/(x_3-x_2)\\\vdots\\(y_{i+1}-y_i)/(x_{i+1}-x_i)\end{bmatrix},\tag{11}$$

根据(11)式，移动窗口 j 依次与算法设定的最大荧光产率的稳定斜率 k_s 比较，当 k_j 满足 $k_j<k_s$，把窗口 j 序号记录下来，将所有符合条件的快相荧光动力学曲线子集 $\boldsymbol{X}(j)$，$\boldsymbol{Y}(j)$ 组成矩阵，利用最小二乘算法求解获得 F_m。

3.2.2　荧光产率 F_o 和 F_v

根据快相荧光模型，当激发时间趋于零时的荧光产率即为最小荧光值 F_o。通过对诱导曲线的前 m 个荧光曲线数据和激发启动时间 t_s，采用线性最小二乘算法获得 F_o。最大可变荧光 F_v 即为 F_m 与 F_o 的差值。光化学量子效率参数 F_v/F_m 即可计算出来。

3.2.3　功能吸收截面 σ_{PSII}

通过代入求解获得的 F_o 和 F_m，(5)式转为 σ_{PSII} 单变量的非线性指数函数形式，不能直接计算出来，需要将它转变为线性形式。具体流程为：先将(5)式代入 F_o 和 F_m 后简化为：

$$g(x)=\exp(1-\sigma_{PSIIx}),\tag{12}$$

式中 $g(x)$ 为快相荧光曲线的离散点集合。通过对上式求导，得到微分函数：

$$g'(x)=[\exp(1-\sigma_{PSIIx})]'=(1-\sigma_{PSIIx})\exp(1-\sigma_{PSIIx})=(1-\sigma_{PSIIx})g(x)。\tag{13}$$

式中 $g'(x)$ 可通过求 g(x)离散导数形式计算获得，代入(13)式后获得线性矩阵，通过最小二乘法求解出 σ PSII。

3.2.4　PQ 平均还原时间 τ_{QA}

(8)、(9)和(10)式代入已求解的 F_o 和 F_v，利用迭代法建立线性方程组，再利用最小二乘法求解得到 τ_{QA}。

4　结果与讨论

藻类植物对环境胁迫具有敏捷性，是理想的光合作用研究对象。利用图 2 的实验系统分别对两种藻类植物暗适应后使用激发光诱导获得相应的荧光动力学曲线，利用本文反演方法获得光合作用细节参数 F_v/F_m、σ_{PSII} 和 τ_{QA}，其中将 F_v/F_m 与采用 PAM 技术的国外商业化仪器 Water-PAM 作对比分析，验证本文反演方法的正确性。

4.1　正常生理状态下的藻类光合作用参数反演

实验对象为蓝藻门的平裂藻和绿藻门的斜生栅藻，它们均来自实验室培养，其光照条件为 100 μmol·quanta·m^{-2}·s^{-1}，温度为 25 ℃。将处于对数生长期的藻种从培养箱中取出，稀释为 200 μg/L 即执行测量。其中，荧光动力学曲线如图 4 所示。

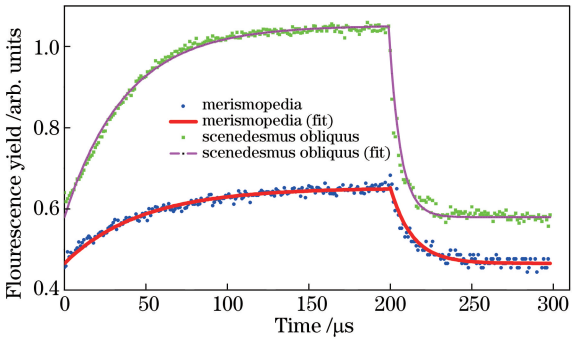

图 4　平裂藻和斜生栅藻荧光动力学曲线

Fig. 4　Fluorescence kinetics curves of merismopedia and scenedesmus obliquus

其中，快相荧光的采样点时间为 1.30 μs，弛豫过程的采样周期为 130 μs，计算得到斜生栅藻和平裂藻光合作用参数分别为 $F_o=0.2797$、$F_o=0.4633$，$F_m=0.7517$、$F_m=0.6378$，$F_v/F_m=0.6379$、$F_v/F_m=0.2736$，

$\sigma_{PSII}=20.51$、$\sigma_{PSII}=16.30$，$\tau_{QA}=903.31$、$\tau_{QA}=1905.47$。对平裂藻进行了 8 次测量，结果如表 1 所示，可以看出，该平裂藻的光合作用参数 σ_{PSII}、τ_{QA} 和 F_v/F_m 的相对标准偏差(RSD)分别为 1.50%、1.83%和 1.25%，具有很好的稳定性。

表 1　平裂藻正常生理状态下的反演结果

Table 1　Healthy merismopedia inversion results

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	RSD
$\sigma_{PSII}/10^{20}\,m^2\cdot quanta^{-1}$	16.68	16.85	16.32	16.37	16.08	16.42	16.45	16.01	1.50%
$\tau_{QA}/\mu s$	1908.52	1984.23	1963.87	1950.48	1993.62	1948.17	1902.73	1892.84	1.83%
F_v/F_m	0.291	0.286	0.281	0.288	0.285	0.284	0.283	0.279	1.25%

4.2　铜离子胁迫条件下藻类光合作用参数测量对比

平裂藻对重金属 Cu^{2+} 具有非常强的亲和性，当该藻吸收过量的 Cu^{2+} 后，引起叶绿体收缩、类囊体膨胀、基粒结构解体、基质减少以及质体小球大幅度增加等现象[8-11]，光合效率以及电子传递速率都显著下降。将处于对数生长期的平裂藻与 800 μmol/L 的 Cu^{2+} 溶液按体积比 1∶1混合，使得混合后 Cu^{2+} 溶液的浓度为 400 μmol/L。混合后每隔 2.5 min 测量一次，获得按时间变化的荧光动力学曲线如图 5 所示，对这些曲线进行反演后各参数变化趋势如图 6 所示。

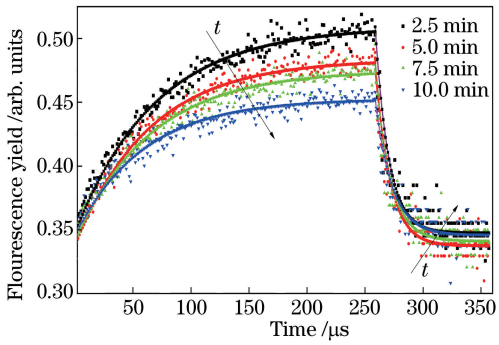

图 5　平裂藻在 Cu^{2+} 胁迫下的荧光动力学曲线变化趋势

Fig. 5　Fluorescence kinetics curve trend of merismopedia under Cu^{2+} stress

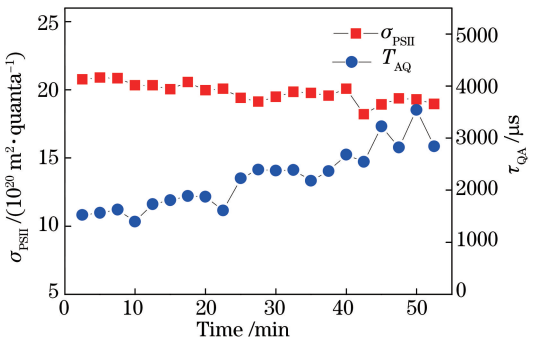

图 6　平裂藻在 Cu^{2+} 胁迫下 τ_{QA} 和 σ_{PSII} 变化趋势曲线

Fig. 6　τ_{QA} and σ_{PSII} trend curve and σ_{PSII} of merismopedia under Cu^{2+} stress

如图 6 所示，平裂藻在 Cu^{2+} 胁迫下，55 min 内 PQ 的平均还原时间 τ_{QA} 明显变长，从 1522.02 μs 延长至 3520.73 μs，而功能吸收截面 σ_{PSII} 从 20.76 变小为 18.65，其中光化学量子效率 F_v/F_m 如图 7(a)所示，从0.3175变化到 0.1332，与使用 Water-PAM 的测量结果趋势一致，其线性相关系数如图 7(b)所示，$R=0.9714$。

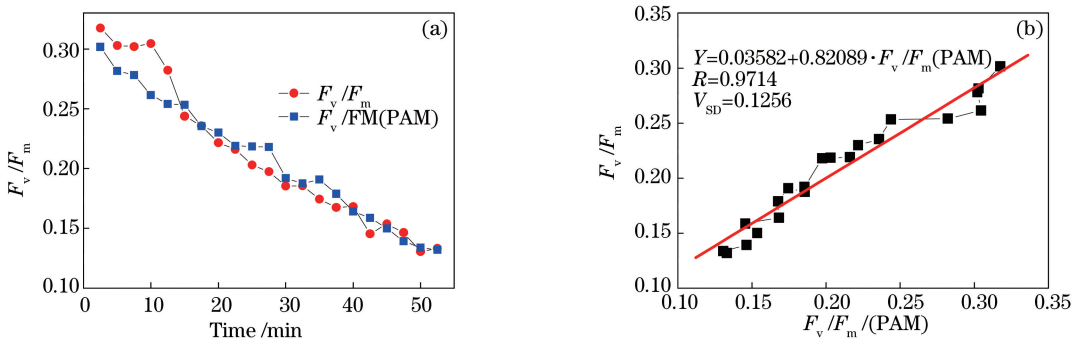

图 7　平裂藻在 Cu^{2+} 胁迫下(a) F_v/F_m 变化趋势曲线与(b)线性相关系数

Fig. 7　(a) F_v/F_m trend curve and (b) linear correlation index of merismopedia under Cu^{2+} stress

5　结　　论

根据植物光合作用的电子传递机理，对植物叶绿素荧光动力学曲线进行分段测量的快相与弛豫荧光动力学曲线进行反演解析，获得了光化学量子效率 F_v/F_m 和功能吸收截面 σ_{PSII}，以及 PQ 平均还原时间 τ_{QA}。

对平裂藻和斜生栅藻正常生长状态和 Cu^{2+} 胁迫下的荧光动力曲线进行反演，其结果正确地反映了光合作用变化过程，其中光化学量子效率参数 F_v/F_m 与采用 PAM 方法测量的结果进行了对比分析，验证了基于快相与弛豫荧光动力学的植物光合作用参数反演方法的有效性。另外，该方法在硬件结构上仅增加光脉冲激发和微弱信号处理单元，采用了简单的线性运算，可将其应用在常见的 ARM 或 DSP 等嵌入式系统中，为获取植物光合作用参数提供了一种有效手段。

致谢　衷心感谢中国科学院环境光学与技术重点实验室、国家环境保护环境光学监测技术重点实验室以及国家环境光学监测仪器工程技术研究中心为论文研究工作开展所提供的技术与平台支持。

参　考　文　献

[1] Han Boping, Han Zhiguo, Fu Xiang. Algae photosynthesis mechanism and models[M]. Beijing: Science Press, 2003.
韩博平，韩志国，付　翔. 藻类光合作用机理与模型[M]. 北京：科学出版社，2003.

[2] Mauzerall D. Light-induced fluorescence changes in chlorella, and the primary photoreactions for the production of oxygen[C]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1972, 69(6): 1358-1362.

[3] Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer[J]. Photosynthesis Research, 1986, 10: 51-62.

[4] Kolber Z S, Prasil O, Falkowski P G. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1998, 1367(1-3): 88-106.

[5] Stirbet A, Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a, fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient [J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2011, 104(1-2): 236-257.

[6] Qiu Xiaohan, Zhang Yujun, Yin Gaofang, *et al*. Photosynthetic parameters inversion algorithm study based on chlorophyll fluorescence induction kinetics curve[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(8): 2194-2197.
邱晓晗，张玉钧，殷高方，等. 基于叶绿素荧光诱导动力学曲线的光合作用参数反演算法研究[J]. 光谱学与光谱分析，2015，35(8)：2194-2197.

[7] Suggett D J . Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications[M]. Springer Science+Business Media B.V., 2010: 19-30.

[8] Ling Jingjin. The influence of environmental stress on the growth and photosynthesis of chlorella pyrenoidosa[D]. Shanghai: East China Normal University, 2009.
凌旌瑾. 环境胁迫对蛋白核小球藻 (chlorella pyrenoidosa) 生长和光合作用的影响[D]. 上海：华东师范大学，2009.

[9] Chen L, Zheng Q, Liu Z. Effects of different concentrations of copper ion on the growth and chlorophyll fluorescence characteristics of Scendesmus obliquus L[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(4): 1231-1235.

[10] Pinto E, Sigaud-Kutner T, Leitao M A S, *et al*. Heavy metal-induced oxidative stress in algae[J]. Journal of Phycology, 2003, 39(6): 1008-1018.

[11] Malik N, Biswas A K, Raju C B. Plankton as an indicator of heavy metal pollution in a freshwater reservoir of Madhya Pradesh, India[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, 90(6): 725-729.