

苯酚胁迫下藻类光合活性参数的响应规律

陈敏^{1,2,3***}, 殷高方^{1,3*}, 赵南京^{1,3**}, 甘婷婷^{1,3}, 王翔^{1,2,3}, 华卉^{1,2,3}, 冯春^{1,2,3}, 刘建国^{1,3}

¹中国科学院安徽光学精密机械研究所中国科学院环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031;

²中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;

³安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031

摘要 以蛋白核小球藻为受试对象,以藻类光合活性参数为毒性评价指标,研究了在苯酚急性毒性作用下的 72 h 与 70 min 内,不同光合活性参数的响应规律。结果显示:苯酚对光合活性参数 Fv/Fm、rP、 α 、Ek、JVP II 的抑制效应显著;在苯酚急性毒性的作用下,光合活性参数的毒性响应可在短时间内达到稳定,5 min 可作为苯酚毒性分析的响应时间;Fv/Fm、rP、Ek、JVP II 对苯酚毒性具有良好的剂量响应关系,不同光合活性参数对苯酚的毒性响应程度不同,0.2~1.2 g/L 的苯酚对 Fv/Fm、rP、Ek、JVP II 的抑制率分别为-3%~19%,9%~67%,15%~74%,17%~37%。

关键词 生物光学; 苯酚; 蛋白核小球藻; 光合活性参数; 急性毒性

中图分类号 X832

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.1217002

Response of Photosynthetic Activity Parameters of Algae Under Phenol Stress

Chen Min^{1,2,3***}, Yin Gaofang^{1,3*}, Zhao Nanjing^{1,3**}, Gan Tingting^{1,3},
Wang Xiang^{1,2,3}, Hua Hui^{1,2,3}, Feng Chun^{1,2,3}, Liu Jianguo^{1,3}

¹Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Science, Hefei, Anhui 230031, China;

²University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

³Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment, Hefei, Anhui 230031, China

Abstract *Chlorella pyrenoidosa* is used as the subject and the photosynthetic activity parameters of this type of algae are used as a toxicity evaluation index. The responses of different photosynthetic activity parameters to the acute toxicity of phenol are studied over 72 h and 70 min. The results show that phenol has significant inhibitory effects on the photosynthetic activity parameters Fv/Fm, rP, α , Ek, and JVP II. Further, under the acute toxicity of phenol, the toxic responses of the aforementioned photosynthetic activity parameters are stable over a short time, where 5 min can be used as a response time for the toxicity analysis of phenol. Finally, the photosynthetic parameters Fv/Fm, rP, Ek, and JVP II show a good dose-response relationship to phenol toxicity and each parameter responds differently to the toxicity of phenol. Across a concentration range of 0.2-1.2 g/L, the inhibition rates of Fv/Fm, rP, Ek, and JVP II are -3%-19%, 9%-67%, 15%-74%, and 17%-37%, respectively.

Key words biotechnology; phenol; *chlorella pyrenoidosa*; photosynthetic activity parameters; acute toxicity

OCIS codes 170.1420; 260.2510; 260.5130; 260.2160

1 引 言

微藻作为水生生态系统的初级生产者,具有对毒性敏感、易于培养等特点,是毒性分析的理想受试生物^[1-2]。国际化学品毒性检测标准方法“藻类生长

抑制试验”,以 96 h 藻细胞生长密度的半数抑制效应浓度(EC50)表征急性毒性作用的程度,该方法准确可靠,但样品预处理过程复杂,且受细胞繁殖代谢周期限制,测量周期长。1991 年,Krause 等^[3]提出将叶绿素荧光作为光合机构损伤的早期敏感指标。

收稿日期: 2019-07-03; 修回日期: 2019-07-23; 录用日期: 2019-08-08

基金项目: 国家自然科学基金(61875207,61805254)、安徽省杰出青年科学基金项目(1908085J23)、中科院仪器设备功能开发技术创新项目(Y93H3g1251)

* E-mail: gfyin@aiofm.ac.cn; ** E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn; *** E-mail: mchen@aiofm.ac.cn

利用藻类叶绿素荧光可以快速、非侵入性地评价藻类光合性能并分析其保护反应,藻类叶绿素荧光不仅可用于测定自然环境中藻类光合作用的生理状态,还可用于生态生理学和毒理学研究,检验环境变化和污染物对藻类的影响^[4]。藻类叶绿素荧光实验的亚致死特征(与生态相关),使其比传统的生物量方法更敏感^[5]。1999年,Gensemer等^[6]对荧光变量与叶绿素浓度进行了比较,结果发现荧光变量对葱的反应较早。

随着荧光分析技术的发展,藻类更多的光合活性参数可用荧光动力学方法来获取,这些参数对应着光合作用电子输运流的不同过程。不少学者已经开展了基于藻类光合活性参数的毒性评估实验,如:Pérez等^[7]通过对比Cu对几种生物学变量和光合活性参数的影响,证明了所有测试变量中的可变荧光(Fv)是最敏感且最快速的;Kottuparambil等^[8]在苯酚对裸藻的急性毒性实验(1h)中发现苯酚能显著降低光系统(PS II)的最大量子产率(Fv/Fm)和最大光合电子传递速率(rETR_{max}),且对后者更敏感;Herlory等^[9]在铀暴露于莱茵衣藻的研究中证明了非光化学淬灭(qN)是最敏感的光合活性参数。但已有研究主要利用单一光合活性参数对毒性进行定性分析,尚未见利用不同光合活性参数对毒性敏感差异性、响应时间等的分析。

本文以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-5)为受试藻种,以藻类光合活性参数为毒性评价指标,选择工业废水中的典型污染物苯酚作

为研究对象,筛选苯酚胁迫下有明显变化的光合活性参数,研究苯酚胁迫下蛋白核小球藻光合活性参数的响应规律,探讨苯酚对蛋白核小球藻的生理影响,确定光合活性参数对苯酚毒性的最佳响应时间,并对比各参数对苯酚毒性响应程度的差异性。

2 材料与实验方法

2.1 藻种的培养与溶液配制

实验藻种选择采购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库的蛋白核小球藻,用BG11培养基进行接种,将接种后的藻液置于恒温摇床培养箱(MQD-S3R)中进行扩大培养,采用的光源为白色冷荧光灯管,设置温度为(25±1)℃,转速为120 r/min,光照强度为120 μmol·m⁻²·s⁻¹,光暗比12 h:12 h。实验前,保证藻液培养2 d,达到对数生长期。

胁迫实验采用的药剂为苯酚(分析纯),苯酚储备液用去离子水配制。实验在100 mL的三角锥形瓶中进行,藻液体积为50 mL,藻类初始叶绿素的质量浓度控制在100~200 μg·L⁻¹,苯酚胁迫物的添加体积为1 mL(排除藻液稀释造成的干扰)。根据美国生态毒理数据库(ECOTOX)提供的数据,以淡水小球藻为指示生物,以生长抑制率为毒性评价指标,得到苯酚对小球藻的96 h EC₅₀(抑制率达到50%对应的毒物浓度)为370 mg·L⁻¹。根据该数据设置实验的苯酚浓度范围,具体的实验条件如表1所示。

表1 实验条件

Table 1 Experimental conditions

Type	Phenol mass concentration / (g·L ⁻¹)	Stress time
Screening of parameter	0,0.1,0.2,0.4,0.8	24 h
Long-term stress experiment	0,0.1,0.2,0.4,0.8	1,13,24,48,72 h
Short-term stress experiment	0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2	5,10,20,30,40,50,60,70 min

2.2 光合活性参数的获取

光合活性参数由可变光脉冲诱导荧光分析仪(AGHJ-TPLIF-I,中国科学院安徽光学精密机械研究所)测得^[10-11]。整个测量周期约为3 min,将样品置于8个连续光化光水平下,光化光强度从0上升到800 μmol·photons·m⁻²·s⁻¹,构建快速光曲线,即对每一层光化光计算相对电子传递速率rP,并由其得到一系列光合活性参数,结果如表2所示。对于随光强变化的参数rP、JVP II,选取一系列光强下的最大值。

光合活性参数对苯酚的响应结果以抑制率的形式表示,抑制率Y的计算公式为

$$Y = \frac{X_0 - X_i}{X_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:Y为苯酚对光合活性参数的抑制率;X₀为对照组光合活性参数;X_i为实验组光合活性参数。

3 结果与讨论

3.1 参数筛选

测定苯酚胁迫24 h后对照组和实验组的多个

光合活性参数,包括 F_v/F_m (PS II 最大光化学量子产量)、 rP (相对光合电子传递效率)、 α (最大光利用系数)、 E_k (饱和光强)、 $JVP\ II$ (PS II 单位体积通量)和 σ_{PSII} (有效吸收截面),利用单因素方差分析(one-

ANOVA)和 T -检验方法分析实验组与对照组的显著性差异,确定苯酚胁迫下有明显变化的光合活性参数,结果如表 3 所示(“*”“**”分别表示在 0.05 和 0.01 水平上有差异)。

表 2 通过快速光曲线(RLCs)获取的参数^[12-13]

Table 2 Parameters acquired by fast light curves (RLCs)^[12-13]

Parameter	Designation	Physiological significance
F_v/F_m	Maximum photochemical quantum efficiency of PS II	Characterization of photosynthetic system PS II activity
rP	Relative photosynthetic electron transfer rate	Photosynthetic rate, which corresponds to the release of O_2 and the fixed rate of CO_2
α	Maximum light utilization coefficient, initial slope of rapid light curve RLCs	Capturing ability of photosynthetic system to light energy
E_k	Saturation light intensity	The minimum illumination required for saturated photosynthesis to characterize the photosynthetic system's tolerance to strong light
$JVP\ II$	PS II flux per unit volume	It is closely related to the generation of O_2 and is an important parameter for characterizing primary productivity
σ_{PSII}	Effective absorption cross sections	Absorption cross section of PSII photochemistry

表 3 不同浓度的苯酚胁迫 24 h 下各光合活性参数的变化

Table 3 Changes of photosynthetic activity parameters under phenol stress for 24 h

($g \cdot L^{-1}$)

Parameter	Phenol mass concentration				
	0(control)	0.1	0.2	0.4	0.8
F_v/F_m	0.535±0.0105	0.538±0.0086	0.52±0.0057*	0.496±0.0033**	0.335±0.0029**
rP	91.93±0.769	88.15±4.669	76.34±3.300*	63.95±3.505**	29.56±2.320**
α	0.508±0.0105	0.483±0.0177	0.428±0.0262**	0.382±0.0189**	0.255±0.0049**
E_k	209.1±1.04	206.2±8.28	190.0±3.35*	149.5±4.41**	103.5±3.66**
$JVP\ II$	2.495±0.2562	1.963±0.1114*	1.521±0.1330**	1.207±0.1650**	0.755±0.0196**
σ_{PSII}	4.496±0.0459	4.456±0.0529	4.643±0.1254	4.606±0.0594	4.556±0.0222

Note: “*” and “**” represent parameters at significant significance levels of 0.05 and 0.01.

由表 3 可知:苯酚对光合活性参数 F_v/F_m 、 rP 、 α 、 E_k 、 $JVP\ II$ 的抑制效应显著;当苯酚质量浓度为 $0.1\ g \cdot L^{-1}$ 时, $JVP\ II$ ($p < 0.05$) 表现出明显的抑制效应,其余参数与对照组无显著差异 ($p > 0.05$);当苯酚质量浓度为 0.2 、 0.4 、 $0.8\ g \cdot L^{-1}$ 时, F_v/F_m 、 rP 、 α 、 E_k 、 $JVP\ II$ 均表现出显著抑制 ($p < 0.05$) 或极显著抑制 ($p < 0.001$) 效应;而有效吸收截面 σ_{PSII} 在不同浓度苯酚胁迫下实验组与对照组结果无显著差异,表明苯酚对藻类光合系统 PS II 的吸收截面影响较小。因此,选择 F_v/F_m 、 rP 、 α 、 E_k 、 $JVP\ II$ 参数,进一步研究苯酚急性毒性作用下 72 h 与 70 min 内不同光合活性参数的响应规律。

3.2 长期胁迫下参数的响应规律

为了研究光合活性参数对苯酚长期毒性的响应规律,分别在胁迫 1, 13, 24, 48, 72 h 时获取光合活性参数,计算苯酚对各个光合活性参数的抑制率,得到不同浓度苯酚在不同胁迫时间下光合活性参数的响应值,如图 1~2 所示。

首先分析毒性测试常用参数 F_v/F_m 对苯酚毒性的响应规律。苯酚为强氧化剂,通过诱导活性氧(ROS)的形成来抑制微藻的光合系统 II 的活性(用参数 F_v/F_m 表征)。在整个实验周期内(72 h), F_v/F_m 对苯酚具有明显的毒性响应。从剂量效应关系分析,如图 1(a) 所示,苯酚浓度越高,对 F_v/F_m

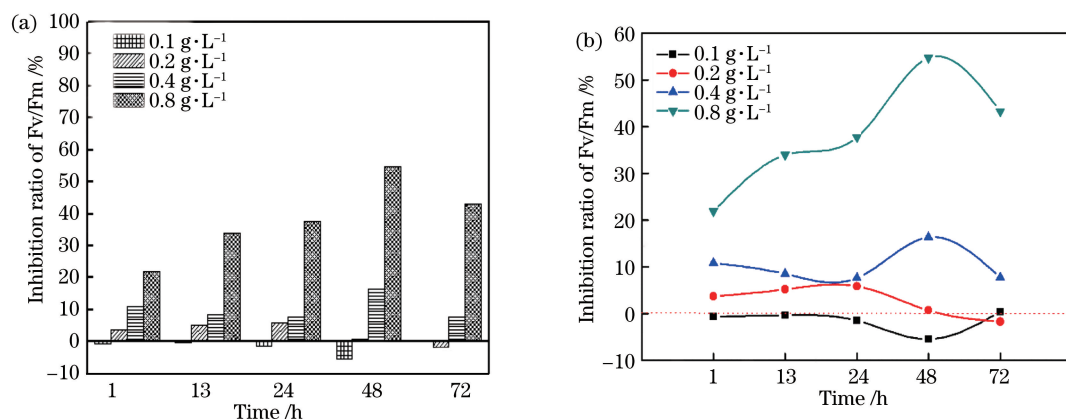


图 1 长期胁迫条件下光合活性参数 F_v/F_m 对不同浓度苯酚的响应规律。(a) 各时段 F_v/F_m 对苯酚的剂量效应; (b) F_v/F_m 对苯酚的时间效应趋势

Fig. 1 Response of photosynthetic activity parameters F_v/F_m to different phenol concentrations under long-term stress.

(a) Dose-effect of F_v/F_m on phenol at different time; (b) time-effect trend of F_v/F_m on phenol

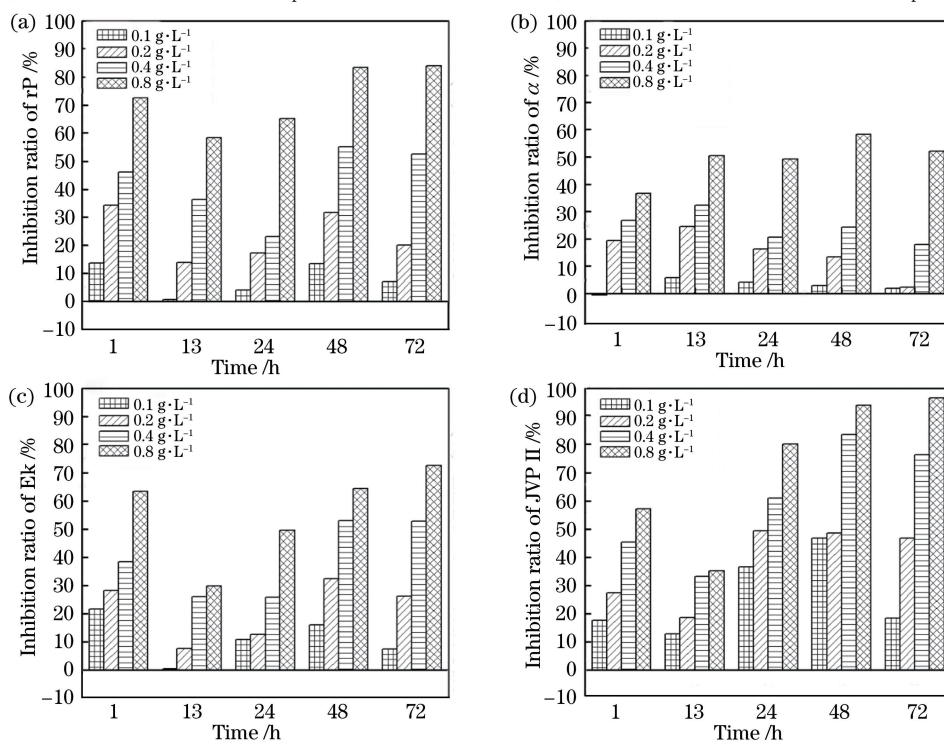


图 2 长期胁迫条件下光合活性参数对不同浓度苯酚的响应规律。(a) rP ; (b) α ; (c) E_k ; (d) $JVP II$

Fig. 2 Responses of photosynthetic activity parameters to different phenol concentrations under long-term stress.

(a) rP ; (b) α ; (c) E_k ; (d) $JVP II$

的抑制作用越强;低剂量($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)苯酚胁迫时,抑制率呈负值,说明低剂量苯酚对光合活性参数 F_v/F_m 有些许促进作用。从时间效应上分析,如图 1(b)所示,抑制作用呈现先上升后下降的趋势,以最高质量浓度($0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的苯酚为例,胁迫 48 h 后抑制率达到最高,为 55%,随后 72 h 降为 43%,而苯酚质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,胁迫 48 h 后,基本无明显的毒性响应。这说明后期光合活性出现了不同程度的恢复,这与 Zhou 等^[14]得到的微

藻对苯酚有一定耐受力、降解能力的结论相符。

光合活性参数 rP 、 α 、 E_k 、 $JVP II$ 对苯酚的响应规律如图 2 所示。图 2 表明,在苯酚胁迫下,蛋白核小球藻对光的捕获能力(用参数 α 表征)和耐受能力(用参数 E_k 表征)降低,对光能的利用效率(参数 $JVP II$ 与 rP 表征)减弱。从浓度效应上分析,苯酚浓度越高,相对电子传递效率、最大光利用系数、饱和光强、单位体积 PS II 通量受到的抑制作用越强,该结果与 F_v/F_m 的观察结果相似。从时间效应上

分析,4个参数对苯酚的响应均未呈现任何时间规律性,但胁迫1 h后具有明显的剂量效应,在高浓度苯酚胁迫下,rP、 α 、Ek、JVP II对毒性的响应值分别能达到72.5%、36.6%、63.6%、57.3%,均高于Fv/Fm。

3.3 短期胁迫下参数的响应规律

在胁迫1 h,可以观察到蛋白核小球藻光合活

性参数对苯酚敏感且有规律的毒性响应。因此,进一步研究70 min内各参数的响应规律。以5 min为最短测试时间,胁迫5,10,20,30,40,50,60,70 min后分别获取光合活性参数,计算苯酚对各个光合活性参数的抑制率,得到不同浓度苯酚对光合活性参数的抑制率随时间变化的趋势,结果如图3所示。

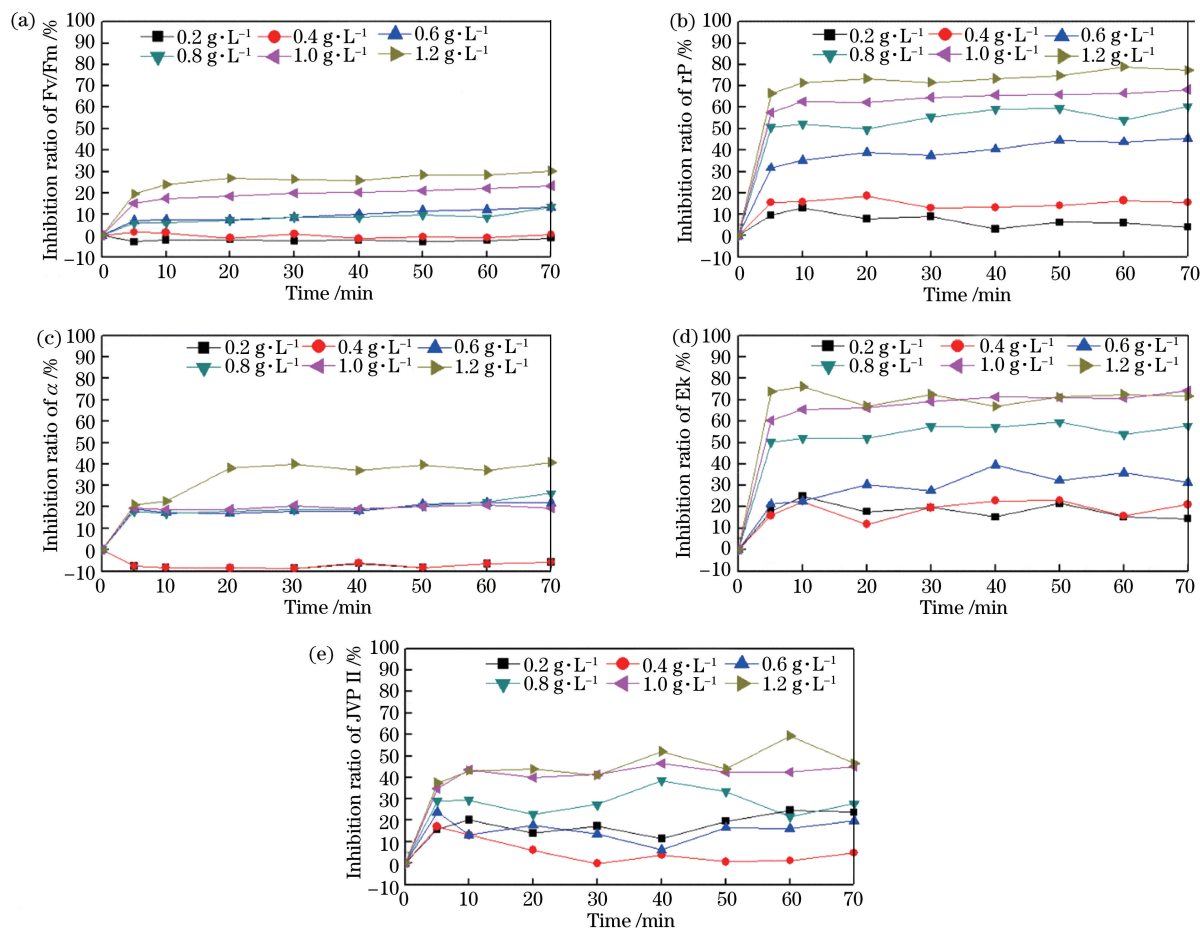


图3 短期胁迫条件下光合活性参数对不同浓度苯酚的响应规律。(a) Fv/Fm;(b) rP;(c) α ;(d) Ek;(e) JVP II

Fig. 3 Responses of different photosynthetic activity parameters to different phenol concentrations under short-term stress.

(a) Fv/Fm; (b) rP; (c) α ; (d) Ek; (e) JVP II

由图3可知,各光合活性参数对苯酚的响应呈相似的时间响应规律,即在胁迫5 min时表现出明显的抑制效应,随后,随着时间的推移抑制作用具有上升趋势,但整体而言,短期胁迫下,苯酚基本不会对光合活性参数造成持续性的抑制作用,各参数值也不会得到恢复。胁迫70 min内,5 min时各光合活性参数的抑制效率已经接近最大,且响应结果稳定。

3.4 短期胁迫下剂量效应分析

分别计算蛋白核小球藻被质量浓度为0.2~1.2 g·L⁻¹的苯酚胁迫5 min时各参数的抑制率以及胁迫70 min内不同时间点各参数抑制率的平均

值,得到两条剂量效应曲线,如图4所示。

图4结果表明,在苯酚的胁迫下,各参数5 min的剂量效应趋势与70 min的平均结果基本一致,在不影响毒性响应效果的前提下,响应时间越短越好,参数JVP II 5 min的剂量响应效果比70 min平均效果好,5 min的剂量效应曲线几乎呈线性关系,该曲线关系更适用于毒性分析。因此,5 min可以作为光合活性参数对苯酚毒性的响应时间,过长的胁迫时间不仅会导致毒性检测效率降低,还可能会引入更多的影响因素,例如代谢过程中PH的变化、培养环境温度和光照的变化等。胁迫5 min后,除了

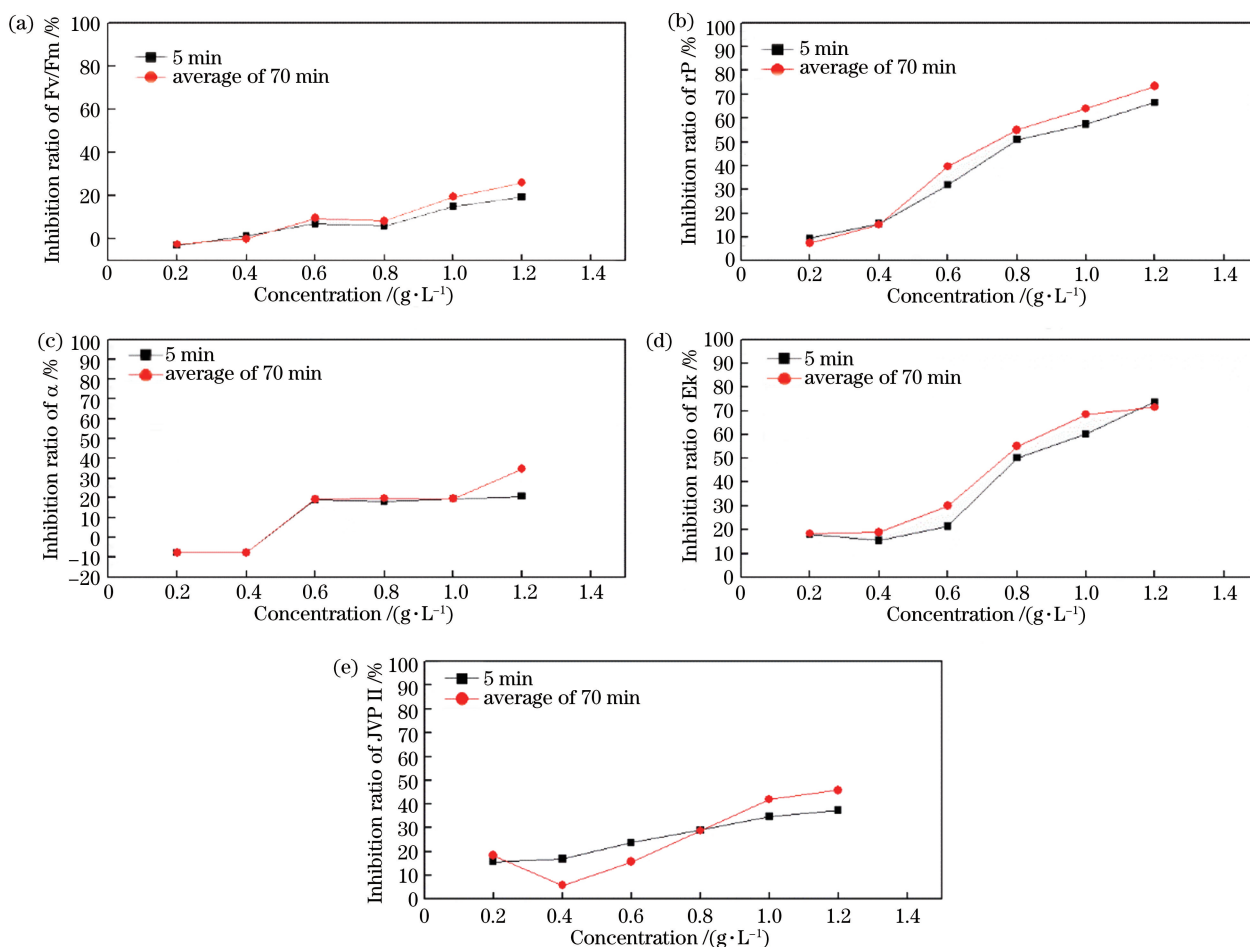


图4 蛋白核小球藻被苯酚胁迫 5 min 时各光合活性参数的抑制率以及胁迫 70 min 内各参数抑制率的平均值。

(a) Fv/Fm; (b) rP; (c) α; (d) Ek; (e) JVP II

Fig. 4 Comparison of dose-response trends of photosynthetic activity parameters under stress for 5 min and 70 min on average. (a) Fv/Fm; (b) rP; (c) α; (d) Ek; (e) JVP II

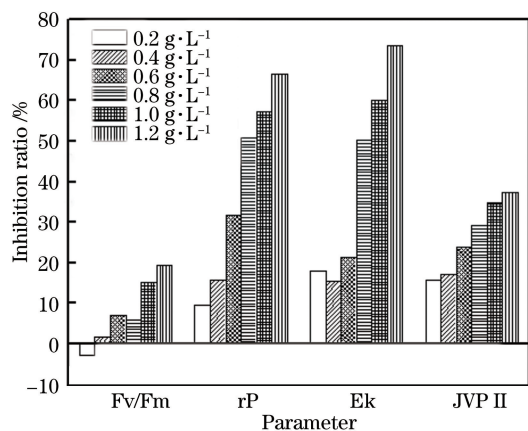


图5 蛋白核小球藻被苯酚胁迫 5 min 后光合活性参数 Fv/Fm、rP、Ek、JVP II 对苯酚响应程度的对比

Fig. 5 Comparison of responses of photosynthetic activity parameters Fv/Fm, rP, Ek, and JVP II to phenol under stress for 5 min

参数 α 外, 参数 Fv/Fm、rP、Ek、JVP II 响应值均随苯酚浓度升高呈稳步上升的趋势, 具有良好的剂量

效应关系。

进一步对比 4 个参数对苯酚的响应程度, 结果如图 5 所示, 胁迫 5 min 后, 质量浓度为 0.2 ~ 1.2 g · L⁻¹ 的苯酚对 Fv/Fm 的抑制率为 -3% ~ 19%, 对 rP 的抑制率为 9% ~ 67%, 对 Ek 的抑制率为 15% ~ 74%, 对 JVP II 的抑制率为 17% ~ 37%。从响应跨度上分析, rP 与 Ek 明显大于 Fv/Fm 与 JVP II, 说明参数 rP 与 Ek 对苯酚毒性更敏感。

4 结 论

在生态毒理学中, 毒性时间是一个关键因素, 研发能够快速产生毒性结果且不丧失敏感性的测试方法将是主要的发展趋势。基于藻类光合活性参数的生物毒性检测方法突破了传统“藻类生长抑制试验”毒性检测方法受细胞繁殖周期限制、测量周期长的瓶颈, 具有响应快速、参数丰富和测量简捷等特点, 是极具潜力的水体污染毒性快速检测预警手段。本

文以蛋白核小球藻为受试生物,研究了藻类光合活性参数对苯酚毒性的响应规律,结果表明:苯酚对光合活性参数 F_v/F_m 、 rP 、 α 、 E_k 、 JVP II 具有显著抑制效应,而对有效吸收截面 σ_{PSII} 的影响较小;在苯酚急性毒性的作用下,光合活性参数的毒性响应在短时间内可达到稳定,5 min 可作为苯酚毒性分析的响应时间;不同光合活性参数对苯酚毒性的响应程度不同,质量浓度为 $0.2 \sim 1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚对 F_v/F_m 、 rP 、 E_k 、 JVP II 的抑制率分别为 $-3\% \sim 19\%$ 、 $9\% \sim 67\%$ 、 $15\% \sim 74\%$ 、 $17\% \sim 37\%$ 。该研究结果为毒性物质快速检测以及生态毒理学研究提供了一种新方法。采用该方法进行毒性定量分析时,会受藻种、藻液浓度、温度、光照等各方面因素的影响,如何稳定实验条件是今后的研究重点。

参 考 文 献

- [1] Pérez P, Fernández E, Beiras R. Use of fast repetition rate fluorometry on detection and assessment of PAH toxicity on microalgae [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2010, 209: 345-356.
- [2] Duan J B, Liu W Q, Zhang Y J, *et al.* Study on a new method of fast monitoring toxicity of Cd^{2+} by algal in water [J]. *Environmental Science*, 2014, 35 (4): 1555-1560.
段静波, 刘文清, 张玉钧, 等. 藻类水体 Cd^{2+} 毒性快速监测新方法研究 [J]. *环境科学*, 2014, 35 (4): 1555-1560.
- [3] Krause H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42(1): 313-349.
- [4] Kumar K S, Dahms H U, Lee J S, *et al.* Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104: 51-71.
- [5] Pérez P, Fernández E, Beiras R. Toxicity of benzalkonium chloride on monoalgal cultures and natural assemblages of marine phytoplankton [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2009, 201: 319-330.
- [6] Gensemer R W, Dixon D G, Greenberg B M. Using chlorophyll a fluorescence to detect the onset of anthracene photoinduced toxicity in *Lemna gibba*, and the mitigating effects of a commercial humic acid [J]. *Limnology and Oceanography*, 1999, 44 (3part2): 878-888.
- [7] Pérez P, Beiras R, Fernández E. Monitoring copper toxicity in natural phytoplankton assemblages: application of fast repetition rate fluorometry [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73 (6): 1292-1303.
- [8] Kottuparambil S, Kim Y J, Choi H, *et al.* A rapid phenol toxicity test based on photosynthesis and movement of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155: 9-14.
- [9] Herlory O, Bonzom J M, Gilbin R. Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 140/141: 288-294.
- [10] Yin G F, Zhao N J, Shi C Y, *et al.* Phytoplankton photosynthetic rate measurement using tunable pulsed light induced fluorescence kinetics [J]. *Optics Express*, 2018, 26(6): A293-A300.
- [11] Qin Z S, Zhao N J, Yin G F, *et al.* Inversion method of plant photosynthesis parameter based on fast phase and relaxation fluorescence kinetics [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(7): 0730002.
覃志松, 赵南京, 殷高方, 等. 快相与弛豫荧光动力学植物光合作用参数反演方法 [J]. *光学学报*, 2017, 37(7): 0730002.
- [12] Oxborough K, Moore C M, Suggett D J, *et al.* Direct estimation of functional PSII reaction center concentration and PSII electron flux on a volume basis: a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate fluorometry (FRRf) data [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2012, 10 (3): 142-154.
- [13] Cummings B M, Needoba J A, Peterson T D. Effect of metformin exposure on growth and photosynthetic performance in the unicellular freshwater chlorophyte, *Chlorella vulgaris* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207041.
- [14] Zhou L, Yuan Y Z, Li X Y, *et al.* Exploration of phenol tolerance mechanism through antioxidative responses of an evolved strain, *Chlorella sp.* L5 [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(4): 2379-2385.