

# 蛋白核小球藻光合荧光参数对 $\text{Cu}^{2+}$ 毒性响应特性研究

胡丽<sup>1,2</sup>, 殷高方<sup>2\*</sup>, 赵南京<sup>2</sup>, 陈敏<sup>2,3</sup>, 甘婷婷<sup>2</sup>

<sup>1</sup>合肥师范学院物理与材料工程学院, 安徽 合肥 230061;

<sup>2</sup>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;

<sup>3</sup>中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026

**摘要** 以蛋白核小球藻为受试对象,以藻类光合荧光参数为毒性评价指标,研究  $\text{Cu}^{2+}$  毒性作用下多个光合荧光参数的响应规律。结果显示: $\text{Cu}^{2+}$ 对光合荧光参数  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v$ 、 $F_v/F_m$ 、Yield、 $rP$ 、 $JVP\ II$ 、 $\alpha$  和  $E_k$  抑制效应显著,其中 Yield、 $rP$ 、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  在 24 h 内体现出稳定的抑制效应,可作为 24 h 分析  $\text{Cu}^{2+}$  毒性的评价指标;Yield、 $rP$ 、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  抑制程度对  $\text{Cu}^{2+}$  浓度具有良好的剂量效应关系,logistic 函数拟合相关系数  $R^2$  分别为 0.9989, 0.9992, 0.9991, 0.9977, 由此得到  $EC_{50-24h}$  值分别为 61.05, 66.31, 69.41, 99.61  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,参数 Yield、 $rP$ 、 $\alpha$  的拟合相关系数优于常规参数  $F_v/F_m$ ,其对应的  $EC_{50-24h}$  分别降低了 38.7%, 33.45%, 30.3%。研究结论可为基于藻类光合抑制效应的生物毒性测试指标选择提供参考。

**关键词** 生物光学;  $\text{Cu}^{2+}$ ; 蛋白核小球藻; 光合荧光参数; 毒性响应

中图分类号 X832

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202040.1217001

## Response of Photosynthetic Fluorescence Parameters of *Chlorella Pyrenoidosa* to $\text{Cu}^{2+}$ Toxicity

Hu Li<sup>1</sup>, Yin Gaofang<sup>2\*</sup>, Zhao Nanjing<sup>2</sup>, Chen Min<sup>2,3</sup>, Gan Tingting<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Physics and Materials Engineering, Hefei Normal University, Hefei, Anhui 230061, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230061, China;

<sup>3</sup>University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China

**Abstract** Herein, *Chlorella pyrenoidosa* was taken as the subject, and photosynthetic fluorescence parameters of algae were used as toxicity evaluation indexes to study the response law of multiple photosynthetic fluorescence parameters under  $\text{Cu}^{2+}$  toxicity. The results are as follows: the inhibition effect of  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_m$ , Yield,  $rP$ ,  $JVP\ II$ ,  $\alpha$  and  $E_k$  on  $\text{Cu}^{2+}$  toxicity is significant, and yield,  $rP$ ,  $\alpha$  and  $F_v/F_m$  could be used as the evaluation indexes for  $\text{Cu}^{2+}$  toxicity analysis at 24 h; the inhibitory effect of Yield,  $rP$ ,  $\alpha$  and  $F_v/F_m$  has a good dose-effect relationship with  $\text{Cu}^{2+}$  toxicity. The fitting correlation coefficient  $R^2$  of the logistic function is 0.9989, 0.9992, 0.9991 and 0.9977, and the resulting  $EC_{50-24h}$  is 61.05, 66.31, 69.41 and 99.61  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The parameters Yield,  $rP$  and  $\alpha$  have higher fitting correlation coefficients than the conventional parameter  $F_v/F_m$ , and their  $EC_{50-24h}$  values decrease by 38.7%, 33.45% and 30.3%, respectively. The experimental results could provide reference for the detection of biological toxicity based on photosynthetic inhibition effect of algae.

**Key words** biotechnology;  $\text{Cu}^{2+}$ ; *chlorella pyrenoidosa*; photosynthetic fluorescence parameters; toxicity response

**OCIS codes** 170.1420; 260.2510; 260.5130; 260.2160

收稿日期: 2020-02-18; 修回日期: 2020-03-11; 录用日期: 2020-03-23

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1400600)、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)、中国科学院环境光学与技术重点实验室开放基金项目(2005DP173065-2017-01)、中国科学院院长基金项目(YZJJZX202006)

\* E-mail: gfyin@aiofm.ac.cn

## 1 引 言

藻类作为生态系统初级单细胞生物,对毒物敏感,世代周期短,易于培养,可直接观察细胞水平上的中毒症状,是理想的生物毒性受试生物<sup>[1]</sup>。区别于生长抑制方法采用细胞密度、细胞产量和生长速率为反应终点<sup>[2]</sup>,光合荧光参数能够实时反映活体细胞光合作用的状态,是能够快速敏感测试藻类生物毒性的反应终点<sup>[3]</sup>。目前,已有研究多选取可变荧光  $F_v$  或最大光化学量子产量  $F_v/F_m$  来表征藻类受胁迫程度<sup>[4]</sup>,如:Mallick 等<sup>[5]</sup>研究表明  $F_0/F_v$  可用于评估重金属对斜生栅藻的毒性;Pérez 等<sup>[6]</sup>研究认为可变荧光  $F_v$  是海洋藻类急性生态毒理学试验的合适反应终点;Tiam 等<sup>[7]</sup>研究表明快速光响应曲线的反演参数 Yield(光照状态下 PS II 的实际量子产量)对农药毒性更敏感,是较好的藻类生物毒性反应终点。然而,随着研究的深入,学者发现不同种类污染物对藻类细胞发生效应的光合作用位点和作用效果具有明显的不同,与之响应的光合荧光参数也存在差异<sup>[8]</sup>。现有研究多采用单一、固定的光合荧光参数作为生物毒性反应终点,缺乏对多个光合荧光参数响应敏感性的对比分析,致使某些污染物生物毒性定量检测的灵敏度不高。因此,针对某一种污染物,如何从多个光合荧光参数中筛选出能够精确反映其抑制效应的关键参数,已成为当前该领域急需解决的问题。

本文以蛋白核小球藻为受试藻种,以藻类光合荧光参数为毒性评价指标,选择工业废水中典型重金属污染物  $Cu^{2+}$  作为研究对象,进行藻类光合抑制实验,对多个光合荧光参数的毒性响应敏感性进行对比分析,得到适用于快速、定量评价  $Cu^{2+}$  胁迫效应的关键光合参数,提高了  $Cu^{2+}$  生物毒性检测的灵敏度。

## 2 实验与方法

## 2.1 藻种培养与溶液配制

实验选取的蛋白核小球藻选种及扩大培养方法同参考文献<sup>[4]</sup>,胁迫实验采用固体  $CuSO_4$  添加去离子水配制。实验在 100 mL 三角锥形瓶中进行,藻液体积为 50 mL,实验藻类初始叶绿素质量浓度控制在  $100\sim 200 \mu g \cdot L^{-1}$ , $Cu^{2+}$  胁迫物的添加体积为 1 mL(排除藻液稀释造成的干扰),根据预实验结果, $Cu^{2+}$  抑制液浓度梯度设定为 250,100,50,25,10,5,2.5,1,0.5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。每个样品设置 3 个平行样品。

## 2.2 光合荧光参数及获取

藻类光合荧光参数通过可变光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪(AGHJ-TPLIF-I,中国科学院安徽光学精密机械研究所)进行测量<sup>[9]</sup>。该仪器通过测量水体藻类叶绿素荧光动力学曲线及光合响应曲线(即光合电子传递速率-光强关系曲线,FLC 曲线),反演获得表征藻类光合作用过程特征的光合荧光参数,仪器主要功能结构如图 1 所示。

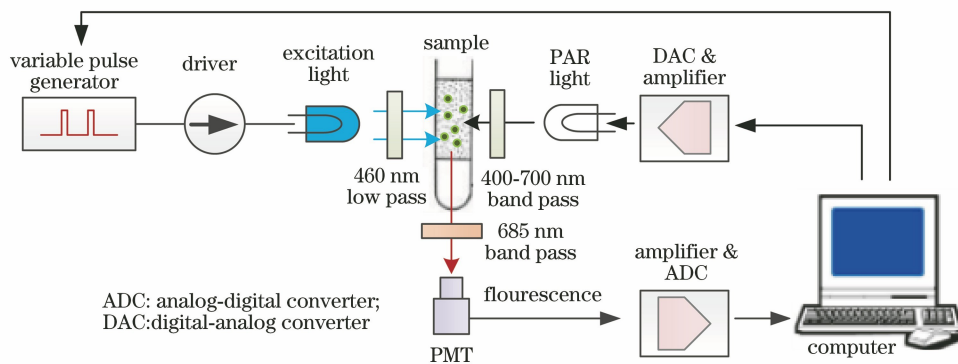


图 1 可变光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of chlorophyll fluorescence analyzer induced by variable light pulse

仪器内设有 460 nm 半导体激光器,通过可变快速脉冲控制激发光的强度和激发时间,产生可变饱和脉冲光,激发活体细胞,促使光合反应中心裂解水分子,释放大电子,调控光合作用电子传递链阻塞位点,跟踪不同诱导模式下叶绿素荧光的变化过程,测量获得了藻类快相和弛豫叶绿素荧光动力学

曲线,根据叶绿素荧光动力学曲线反演可获得光合荧光参数  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $\sigma_{PSII}$  和  $Q_A$ ,进一步计算可得参数  $F_v$ 、 $F_v/F_m$ 、Yield、rP、JVP II、NPQ。同时该仪器还内设光合有效辐射(PAR)白光光源以模拟环境自然光,通过设置 PAR 光源的强度获得不同环境光照强度下样品的叶绿素荧光诱导动力学曲线,形成

被测样品的光合响应曲线(FLC 曲线),根据 FLC 光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪能够测量的光合荧光曲线可反演获得  $\alpha$ 、 $E_k$ 、 $rP_{max}$  等光合荧光参数。可变参数如表 1 所示。

表 1 由可变光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪测得的光合荧光参数<sup>[9]</sup>

Table 1 Photosynthetic fluorescence parameters acquired by the chlorophyll fluorescence analyzer

Serial number	Parameter	Source of parameter	Name and significance
1	$F_0$	Fluorescence kinetic curve	The initial fluorescence
2	$F_m$	Fluorescence kinetic curve	The biggest fluorescence
3	$\sigma_{PSII}$	Fluorescence kinetic curve	Functional absorption cross section of PSII
4	$Q_A$	Fluorescence kinetic curve	Average reduction time constant of plastoquinone
5	$F_v$	$F_m - F_0$	The variable fluorescence, which reflects the redox state of $Q_A$ and other dissipated energy pathways
6	$F_v/F_m$	$(F_m - F_0)/F_m$	Maximum photochemical quantum yield, which is the biggest light energy conversion efficiency of PS II
7	Yield	$(F_m' - F_0')/F_m'$	Actual quantum yield of PS II under light
8	rP	Yield $\times 0.84 \times 0.5$	Relative photosynthetic electron transfer efficiency of PS II
9	JVP II	$K_R \times F_m \times F_0 \times F_q' / (F_m' \times F_v' \times E_{LED})$	PS II flux per unit volume, which is associated with primary productivity
10	NPQ	$(F_m - F_m')/F_m'$	Non photochemical quenching, which reflects the ability of plants to dissipate excess light energy into heat
11	$\alpha$	Fast light curve	The maximum light utilization coefficient, which reflects the light energy utilization efficiency
12	$E_k$	Fast light curve	The saturation light intensity, which reflects the strong light tolerance of the sample

光合荧光参数对  $Cu^{2+}$  的响应结果以抑制率的形式表示,抑制率  $Y$  表示为<sup>[10]</sup>

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

式中: $Y$  为  $Cu^{2+}$  对光合荧光参数的抑制率; $X_0$  为对照组光合荧光参数数值; $X_i$  为实验组光合荧光参数数值。

### 3 结果与分析

#### 3.1 光合荧光参数显著性差异及分析

根据预实验结果,选取  $Cu^{2+}$  胁迫 24 h 后的对照组和实验组中的 12 个光合荧光参数(如表 1 所示),利用单因素方差分析(one-ANOVA)得到实验组与对照组的显著性差异,初步筛选有显著性变化的响应参数,结果如表 2 所示, $Cu^{2+}$  对光合荧光参

数  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v$ 、 $F_v/F_m$ 、Yield、rP、JVP II、 $\alpha$ 、 $E_k$  的抑制效应显著,其中, $F_m$ 、 $F_v$  和  $E_k$  在  $Cu^{2+}$  浓度为  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时表现出极显著抑制( $P < 0.01$ ),而参数  $\sigma_{PSII}$ 、 $Q_A$ 、NPQ 在测量浓度范围内实验组与对照组并无显著差异。因此,选取光合荧光参数  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v$ 、 $F_v/F_m$ 、Yield、rP、JVP II、 $\alpha$ 、 $E_k$ ,进一步研究  $Cu^{2+}$  毒性作用下的时间和剂量响应规律。

#### 3.2 光合荧光参数的时间响应规律

根据预实验结果,实验测试周期设置为 4, 24, 48, 72, 96 h, 得到 3.1 节中显著性响应参数在  $Cu^{2+}$  抑制下的时间-效应变化规律。同时,为了比较光合抑制和生长抑制的差异,本实验以藻类叶绿素含量(AGHJ-TPLIF-I 分析仪测量)代替藻类生物量,得到  $Cu^{2+}$  抑制下的藻类生物量随时间的响应规律。

表 2 Cu<sup>2+</sup> 胁迫 24 h 下光合荧光参数测量值及显著性差异结果

Table 2 Measured values and significant difference of photosynthetic fluorescence parameters under 24 h Cu<sup>2+</sup> stress

Cu <sup>2+</sup> concentration / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0	0.5	1	2.5	5	25	50	100	250
F <sub>0</sub>	143.1	136.8	125.9*	111.8**	101.8**	79.35**	68.12**	26.13**	5.033**
F <sub>m</sub>	310.2	286.1**	271.3**	236.1**	206.1**	140.3**	100.7**	32.68**	5.116**
F <sub>v</sub>	167.1	149.3**	145.4**	124.3**	124.3**	60.95**	32.58**	6.55**	0.083**
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0.539	0.522	0.536	0.527	0.501*	0.435**	0.324**	0.2**	0.016**
Yield	0.497	0.476	0.489	0.481	0.451	0.4*	0.281**	0.157**	0.01**
rP	18.16	18.28	18.13	17.89*	16.76*	14.4**	10.04**	5.576**	0.854**
JVP II	4.707	4.446	4.101	3.647*	3.307*	2.606**	2.111**	0.731**	0.11**
Ek	417.2	401.1**	391.8**	405.1**	411.4*	372.5**	330.1**	217.2**	155.4**
$\alpha$	0.541	0.545	0.542	0.534	0.531*	0.431**	0.302**	0.173**	0.027**

Note: "\*" and "\*\*" indicate differences at the level of 0.05 and 0.01, respectively. The experimental data of  $\sigma_{\text{PSII}}$ ,  $Q_A$ , NPQ have no significant difference in the concentration area, so it is not listed in the table.

结果表明,9 个光合荧光参数可分为三类:第一类为 Yield、rP、 $\alpha$  和 F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>,它们的时间-效应变化趋势大致相同,如图 2 所示。低浓度样液的抑制率值都在 20% 以下,而且从 4 h 到 24 h 时呈现一定的下降趋势,后续测量数据比较稳定,说明经过 24 h 后,藻类的光合活性出现了不同程度的恢复;而中高浓度样液的抑制率在 24 h 时出现了一个相对峰值,

后续测量值有小幅下降,但整体变化不大,说明胁迫效应不会随着时间的推移得到恢复,损伤过程为不可逆过程。因此,可以选择 24 h 作为最佳的时间测量节点,该时间节点后所有浓度样本的抑制率比较稳定,此时的测量数据已经可以代表长期(如 96 h)抑制效果,也避免了测量低浓度抑制液时出现假阳性的结果。

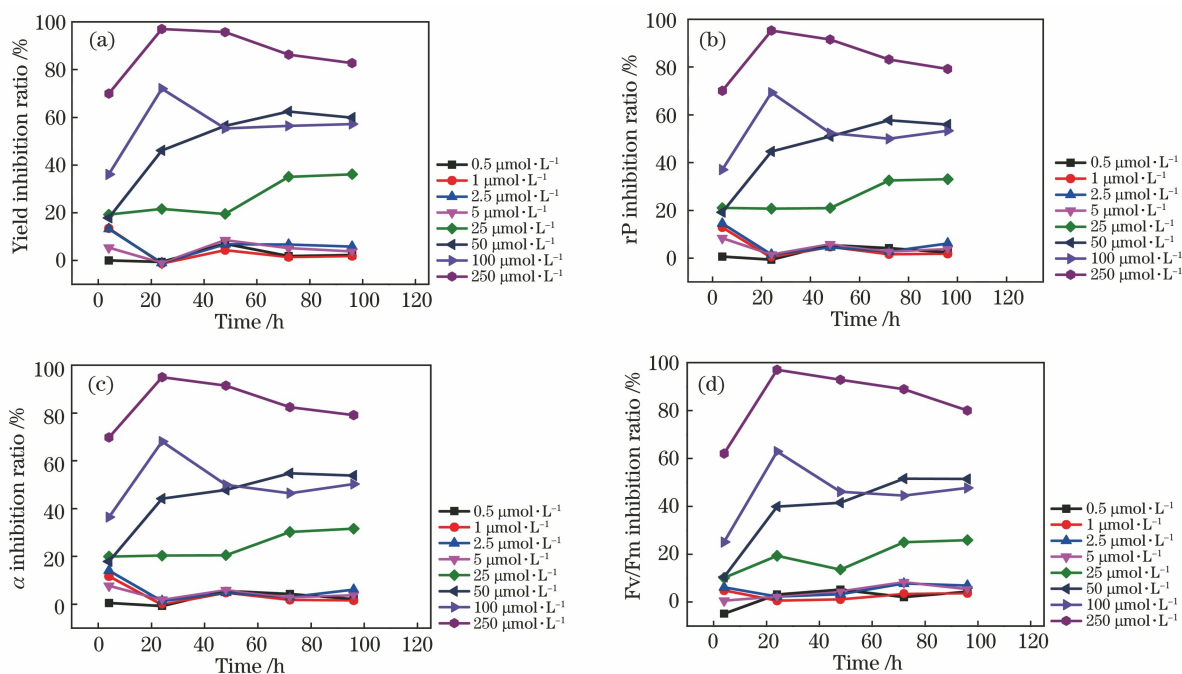


图 2 不同 Cu<sup>2+</sup> 浓度下光合荧光参数随时间响应变化趋势。(a) Yield;(b) rP;(c)  $\alpha$ ;(d) F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>

Fig. 2 Variation trend of fluorescence parameters with time under different Cu<sup>2+</sup> concentrations. (a) Yield; (b) rP; (c)  $\alpha$ ; (d) F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>

第二类为 F<sub>0</sub>、F<sub>m</sub>、F<sub>v</sub> 和 JVP II,它们的时间-效应曲线趋势大致相同,如图 3(a)、(b)、(c)、(d)所

示。低浓度样液的时间响应规律同第一类参数,但在测量周期内曲线波动大于第一类参数;而中高浓

度样液的抑制率随时间推移呈现上升趋势,没有明显的时间节点,具有时间累积性。同时,对比上述参数和藻类生长抑制的时间响应规律[见图 3(e)],发

现其响应规律类似。因此,第二类参数与生长抑制法类似,适合选取较长时间为定量测量的时间节点[如 96 h],以获得较为稳定、准确的测试结果。

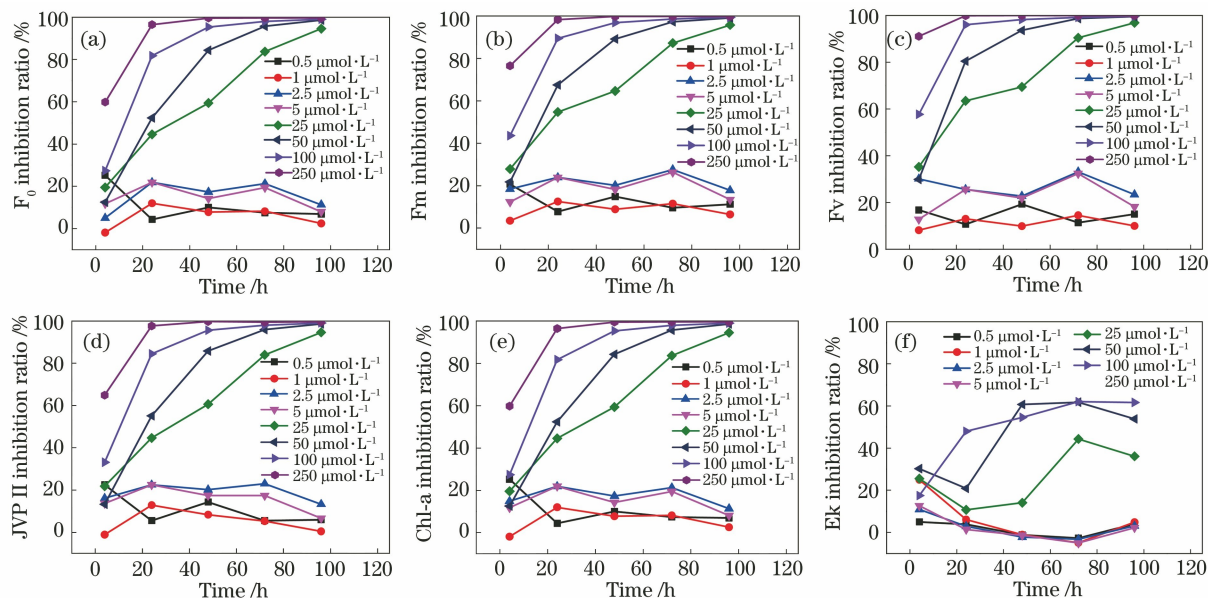


图 3 不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度下光合荧光参数随时间响应变化趋势。(a)  $F_0$ ; (b)  $F_m$ ; (c)  $F_v$ ; (d) JVP II; (e) Chl-a; (f) Ek

Fig. 3 Variation trend of fluorescence parameters with time under different  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations.

(a)  $F_0$ ; (b)  $F_m$ ; (c)  $F_v$ ; (d) JVP II; (e) Chl-a; (f) Ek

第三类为光合参数 Ek,该参数的抑制率值在整个测量周期内都低于其他 8 个参数,其对应的时间变化趋势也无明显的时间节点,如图 3(f)所示。在低浓度区域,该参数的抑制率整体先缓慢下降,在 96 h 后,有一定程度上升;中高浓度区域,抑制率随时间呈现出了一定的上升趋势,但在 96 h 后,出现了一定程度的恢复。

综合三类参数的时间响应规律,考虑到藻类生物毒性快速测量的需求,选取 24 h 为时间测量节点, Yield、rP、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  作为 Cu 生物毒性定量测量的关键光合参数。

### 3.3 光合荧光参数剂量-效应响应规律

根据 3.2 节,进一步分析 4 个关键参数 Yield、rP、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  在  $\text{Cu}^{2+}$  毒性抑制 24 h 时的剂量-效应关系,如图 4 所示。通常生物毒性实验获取的毒性强度与受试生物受抑制程度间的剂量-效应曲线呈现反“S”形,一般以阻滞增长模型(logistic 函数)为基础进行非线性拟合<sup>[11]</sup>。以抑制物浓度代表其毒性强度,以光合参数的抑制率代表受试生物受抑制程度,利用 logistic 函数进行拟合。结果显示参数 Yield、rP、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  抑制率对  $\text{Cu}^{2+}$  浓度具有良好的剂量效应关系,拟合相关系数  $R^2$  分别为 0.9989, 0.9992, 0.9991, 0.9977, 由此得到的  $\text{EC}_{50-24\text{h}}$

值分别为 61.05, 66.31, 69.41, 99.61  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Yield、rP、 $\alpha$  参数的拟合相关系数及  $\text{EC}_{50-24\text{h}}$  都优于目前常用的光合参数  $F_v/F_m$ , 因此可以选取前三个参数作为  $\text{Cu}^{2+}$  生物毒性定量检测的测试指标。

## 4 结 论

基于藻类光合荧光参数的生物毒性检测方法,具有响应快速、参数丰富、测量简捷的特点。对多个光合荧光参数毒性响应敏感性进行了对比分析,实验结果表明参数 Yield、rP、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  在 24 h 内体现出稳定的抑制关系,与生长抑制方法 96 h 的检测时长相比,显著缩短了检测时间,为  $\text{Cu}^{2+}$  生物毒性的快速评估提供了反应终点。进一步通过单因素方差分析实验组与对照组的显著性差异,参数 Yield、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$  在  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下体现的显著性差异,参数 rP 在 2.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下体现的显著性差异,能够满足 II 类水中  $\text{Cu}^{2+}$  的检测要求<sup>[12]</sup>。最后,利用 logistic 函数拟合参数 (Yield、rP、 $\alpha$  和  $F_v/F_m$ ) 抑制率和  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的剂量-效应关系,相关拟合系数  $R^2$  分别为 0.9989, 0.9992, 0.9991, 0.9977, 对应的  $\text{EC}_{50-24\text{h}}$  值分别为 61.05, 66.31, 69.41, 99.61  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从拟合相关系数和  $\text{EC}_{50-24\text{h}}$  评估,参数 Yield、rP、 $\alpha$  的相关拟合系数均

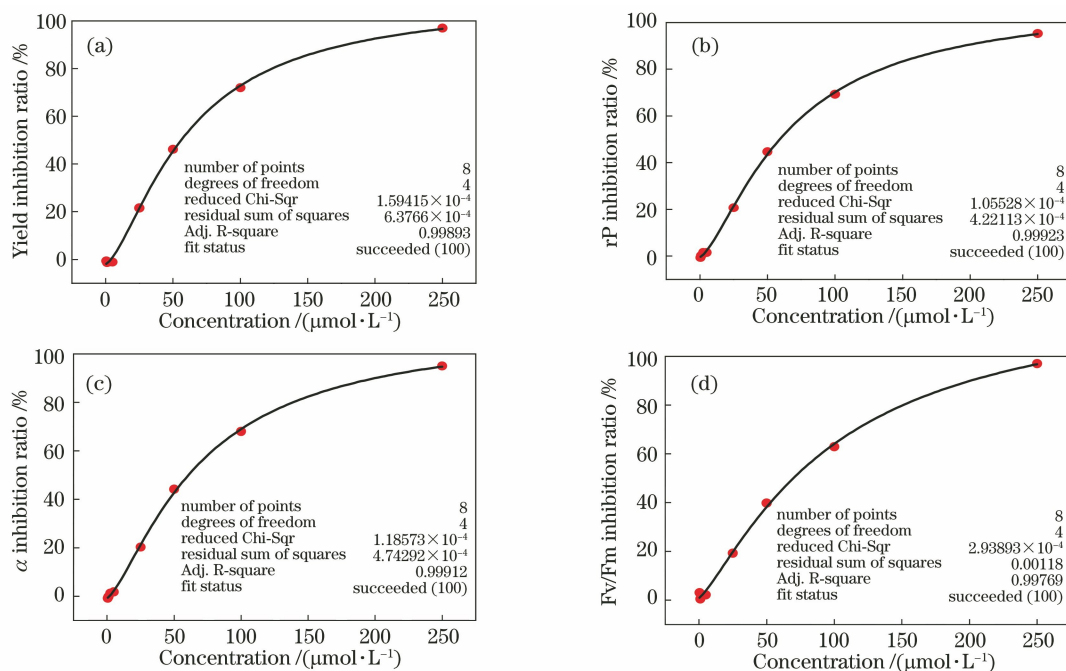


图 4 24 h 胁迫下不同参数的抑制率随  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的变化趋势。(a) Yield; (b) rP; (c)  $\alpha$ ; (d) Fv/Fm

Fig. 4 Inhibition ratio for different parameters versus  $\text{Cu}^{2+}$  concentration under 24 h stress.

(a) Yield; (b) rP; (c)  $\alpha$ ; (d) Fv/Fm

优于生物毒性光合抑制方法的常规参数 Fv/Fm, 其中  $\text{EC}_{50-24\text{h}}$  分别降低了 38.7%, 33.45%, 30.3%。因此, 采用光合荧光参数 Yield、rP 和  $\alpha$  作为反应终点, 可有效提高  $\text{Cu}^{2+}$  生物毒性检测的灵敏度。实验结果为  $\text{Cu}^{2+}$  生物毒性的藻类光合抑制效应研究提供了基础数据, 也为其他污染物毒性胁迫下藻类光合荧光参数响应规律研究提供了方法以供参考。

### 参 考 文 献

- [1] EH/3/5. Water quality. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae: BS EN ISO 8692—2004 [S]. [S. 1.]: Britain Standard Institute, 2004: 1-24.
- [2] Wang Y C, Wang S L, Hu W, et al. Progress of biological toxicity test and construction of multi-biomonitor early-warning system[J]. Yangtze River, 2017, 48(11): 21-26.  
王英才, 王树磊, 胡文, 等. 生物综合毒性监测技术进展与多源生物预警体系[J]. 人民长江, 2017, 48(11): 21-26.
- [3] Falkowski P G, Woodhead A D, Vivirito K. Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea[M]. Boston, MA: Springer US, 1992.
- [4] Chen M, Yin G F, Zhao N J, et al. Response of photosynthetic activity parameters of algae under phenol stress[J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(12): 1217002.  
陈敏, 殷高方, 赵南京, 等. 苯酚胁迫下藻类光合活性参数的响应规律[J]. 光学学报, 2019, 39(12): 1217002.
- [5] Mallick N, Mohn F. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 55(1): 64-69.
- [6] Pérez P, Fernández E, Beiras R. Use of fast repetition rate fluorometry on detection and assessment of PAH toxicity on microalgae [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2010, 209(1/2/3/4): 345-356.
- [7] Tiam S K, Laviale M, Feurtet-Mazel A, et al. Herbicide toxicity on river biofilms assessed by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 165: 160-171.
- [8] Lysenko E A, Klaus AA, Kartashov A V, et al. Distribution of Cd and other cations between the stroma and thylakoids: a quantitative approach to the search for Cd targets in chloroplasts [J]. Photosynthesis Research, 2019, 139(1/2/3): 337-358.
- [9] 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.
- [10] Duan J B, Liu W Q, Zhang Y J, et al. Study on sensitivity of microalgal stressed by heavy metals based on chlorophyll fluorescence [J]. Acta Optica Sinica, 2013, 33(s1): s130001.  
段静波, 刘文清, 张玉钧, 等. 叶绿素荧光的藻类对重金属胁迫敏感性研究[J]. 光学学报, 2013, 33(s1): s130001.
- [11] Gan T T, Zhao N J, Yin G F, et al. Optimal chlorophyll fluorescence parameter selection for rapid and sensitive detection of lead toxicity to marine microalgae *Nitzschia closterium* based on chlorophyll fluorescence technology [ J ]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2019, 197: 111551.
- [12] State environmental protection administration. Environmental quality standards for surface water: GB3838-88[S]. Beijing: Standards Press of China, 2002.  
国家环境保护总局. 地表水环境质量标准: GB3838-88 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.