

藻类光合抑制法的水体综合毒性稳定测试条件研究

齐培龙^{1,2,3}, 殷高方^{2,3*}, 甘婷婷^{1,2,3**}, 赵南京^{2,3}, 谷梦园^{1,2,3}, 陈敏^{1,2,3},
丁志超^{1,2,3}, 贾仁庆^{1,2,3}, 刘津京^{1,2,3}, 马明俊^{1,2,3}, 杨瑞芳^{2,3}, 方丽^{2,3}

¹中国科学技术大学环境科学与光电技术学院, 安徽 合肥 230026;

²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;

³安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031

摘要 藻类光合抑制法是极具潜力的水体综合毒性快速检测预警手段, 并且稳定测量条件的确定对藻类光合抑制法毒性测试结果不可忽视。以蛋白核小球藻为受试藻种, 根据农药敌草隆(DCMU)对藻类光合活性具有抑制作用这一特点, 以 α 、Fv/Fm、Yield、rP 4 种光合荧光参数的抑制率为分析对象, 在不同质量浓度 DCMU 胁迫作用下, 分别研究受试藻类质量浓度、藻液与样品混合体积比、反应温度这 3 种测试条件对水体综合毒性测量的稳定性影响。结果显示: 当受试藻类在 $100\sim 600\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内时, 藻类质量浓度的变化对水体综合毒性测量没有显著影响; 受试藻液与样品的混合体积比对毒性检测灵敏度有较大影响, 受试藻液与样品的混合体积比为 2:8 时更有利于提高水体毒性检测的灵敏性; 反应温度对水体综合毒性检测也有重要影响, 其中 $20\sim 35\ ^\circ\text{C}$ 的温度范围更有利于提高水体综合毒性的检测精度。

关键词 生物技术; 水体综合毒性; 蛋白核小球藻; 光合抑制; 稳定条件

中图分类号 X832

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS202242.1217001

Conditions for Stably Detecting Comprehensive Toxicity of Water by Algal Photosynthesis Inhibition Method

Qi Peilong^{1,2,3}, Yin Gaofang^{2,3*}, Gan Tingting^{1,2,3**}, Zhao Nanjing^{2,3}, Gu Mengyuan^{1,2,3},
Chen Min^{1,2,3}, Ding Zhichao^{1,2,3}, Jia Renqing^{1,2,3}, Liu Jinjing^{1,2,3}, Ma Mingjun^{1,2,3},
Yang Ruifang^{2,3}, Fang Li^{2,3}

¹School of Environment Science and Optoelectronic Technology, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China;

²Key Laboratory of Environment Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, Anhui, China;

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

Abstract Algal photosynthesis inhibition method is a potential method for rapid detection and early warning of comprehensive toxicity of water, and stable test conditions are critical to the toxicity test results of the algae photosynthetic inhibition method. In this paper, *Chlorella pyrenoidosa* is used as the test algae, and according to the characteristic that pesticide Dailon (DCMU) has an inhibitory effect on the photosynthetic activity of algae, the inhibition rates of the four photosynthetic fluorescence parameters (α , Fv/Fm, Yield, and rP) are as the analysis

收稿日期: 2021-08-30; 修回日期: 2021-10-05; 录用日期: 2021-11-02

基金项目: 安徽省科技重大专项项目(202003a07020007)、安徽省杰出青年科学基金项目(1908085J23)、国家自然科学基金(61805254, 61875207)、中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(Y93H3g1251)、中国科学院合肥物质科学研究院院长基金“融合专项”(YZJJZX202013)

通信作者: *gfyin@aiofm.ac.cn; **ttgan@aiofm.ac.cn

objects. Under the stress of different mass concentrations of DCMU, the influences of the three test conditions, including the mass concentration of the tested algae, the mixed volume ratio of the algae liquid to the sample, and the reaction temperature, on the stability of detecting the comprehensive toxicity of water has been studied separately. The results show that when the mass concentration of the tested algae is in the range of $100 \sim 600 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the change of the algae mass concentration has no significant impact on the detection of comprehensive toxicity of water. However, the mixed volume ratio of the tested algae solution to the water sample has a great impact on the sensitivity of toxicity detection. When the mixed volume ratio of the tested algae solution to the water sample is 2:8, it is more conducive to improving the sensitivity of aquatic toxicity detection. In addition, the reaction temperature also has an important effect on the detection of comprehensive toxicity of water, and when the temperature is between $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, it is more conducive to improving the detection accuracy of comprehensive toxicity of water.

Key words biotechnology; comprehensive water toxicity; *Chlorella pyrenoidosa*; photosynthetic inhibition; stability conditions

1 引言

近年来,随着工农业的快速发展,进入水域环境的有毒污染物种类和数量日益增多,化学物质结构日趋复杂,因此水环境正面临着日趋严重的复合污染问题^[1]。水体综合毒性快速检测方法已成为当前我国复合污染形势下水环境污染风险检测和水质安全管理的重要需求。

目前水质毒性检测主要以发光细菌^[2-3]、跳蚤^[4-5]、鱼类^[6]和藻类^[7-9]等作为受试生物,基于这些受试生物的发光特性、运动行为和生长状况等方面对水体污染物的毒性响应特征,发展了一系列的水体综合毒性检测方法。其中,藻类作为水生态系统的初级生产者,具有个体小、繁殖快、容易获取、易于培养、对毒物敏感和可直接观测细胞水平上的中毒症状等特点,是一种较为理想的污染物毒性测试受试生物,在水体污染物毒性分析与检测方面具有广泛应用^[10-12]。藻类生长抑制实验是以藻类为受试生物进行毒性检测的国际化学标准方法,其以 96 h 藻细胞生长密度的半数抑制效应浓度(EC50)表征急性毒性的作用程度,这种方法虽然具有重复性好、准确可靠等优点,但是该方法以藻类细胞的生长与繁殖为毒性响应终点,受细胞繁殖周期限制,对污染物的毒性响应速度较慢,通常作用 24 h 以内不会显现出明显的毒性效应,不能满足现代水体污染的快速检测需求^[7]。

光合作用作为藻类的重要生理过程,是藻类生长与繁殖的重要基础。任何影响藻类生长与繁殖的污染物的毒性效应均会首先影响藻类的光合作用状态;陈敏等^[7]的研究表明苯酚物质在 5 min 时间内对蛋白核小球藻的光合荧光参数产生抑制作用;Herlory 等^[13]的研究表明铀物质在 1 h 时间内对莱茵衣藻荧光参数 Fv/Fm 产生抑制作用;Gan 等^[8]的

研究表明铅在 8 h 内对新月藻的 5 种光合荧光参数产生抑制作用;胡丽等^[14]的研究表明敌草隆物质在 5 min 时间内对蛋白核小球藻的光合荧光产生抑制作用。由此可见,藻类光合作用能够快速、灵敏地响应污染物的毒害作用,并能够真实反映出水体的水质状况和污染程度。因此,以藻类光合作用作为污染物毒性响应终点的藻类光合抑制法是水体综合毒性快速、灵敏检测的一种新的有效手段,其在水体综合毒性快速在线检测方面具有显著优势^[15]。近年来,很多研究学者基于多种光合荧光参数开展了水体不同污染物对藻类光合抑制效应的研究。然而,目前鲜有关于测试条件对藻类光合抑制法水体综合毒性检测的影响的详细报道。基于后期水质综合毒性在线检测仪器的研制,需要研究藻类质量浓度是否会影响水体综合毒性测量结果的稳定性。不同的藻液与样品的混合体积比更改了藻类环境,这种更改对基于藻类的毒性胁迫产生促进还是抑制作用需要进一步确定。由于一年四季温度的变化会影响藻类光合生化过程,故通过藻类光合抑制效应定量检测水质综合毒性需要明确环境温度所产生的影响程度,进而确定适宜范围。

基于此,本文以淡水中常见的蛋白核小球藻为受试藻种,根据典型农药敌草隆(DCMU)对藻类光合活性具有抑制作用这一特点,由 DCMU 对蛋白核小球藻的毒性胁迫预实验可得, α 、Fv/Fm、Yield、rP 4 种光合荧光参数的敏感性更高,规律性更强。因此,以 α 、Fv/Fm、Yield、rP 4 种光合荧光参数的抑制率为分析对象,研究受试藻类质量浓度、藻液与样品的混合体积比、反应温度 3 种最重要的测试条件对藻类光合抑制法检测水体综合毒性的影响规律,为开发高精度、高灵敏度的水体综合毒性快速检测方法提供稳定测试条件。

2 材料与方法

2.1 藻种培养与溶液配制

实验选取的蛋白核小球藻(FACHB-5)采购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库,用灭菌后的 BG11 培养基进行接种,将接种后的藻液置于恒温培养箱(上海旻泉仪器有限公司,MQD-S3R)中进行扩大培养,培养箱光源为白色冷荧光灯管,光照强度为 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光暗比为 12 h:12 h,培养温度设置为 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。蛋白核小球藻藻液的质量浓度采用测藻仪(德国,BBE Moldaenke GmbH,BBE II)进行测量。

本研究所用的 DCMU 购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,质量分数为 98%。首先用二甲基亚砜配制质量浓度为 4 g/L 的 DCMU 标准储备液,然后以去离子水进行稀释,配制不同质量浓度的

DCMU 标准工作液。将一定体积的蛋白核小球藻的原藻液与一定体积的 DCMU 标准工作液进行混合并摇匀,使得配制好的待测样品中 DCMU 的质量浓度分别为 0,5,10,20,40,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,每个样品设置 4 个平行样,并将待测样品置于恒温培养箱中进行培养,在一定胁迫反应时间下进行光合荧光参数测量。

2.2 光合荧光参数获取

光合荧光参数由快速重复荧光仪(FRRf,英国,Chelsea Technologies Group Ltd,16-0497-003)测得^[8]。该仪器配备有内径为 1.4 cm、长度为 10 cm 的原地光学玻璃样品池和 Act2Run 系统软件。在测量过程中,激发光源选择 450 nm 的 LED,并在 $0 \sim 800 \mu\text{mol} \cdot \text{photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的 8 个光化光强下测量相对电子传递速率,从而构建快速光响应曲线(FLC),每个样品的测量周期为 135 s,由此获得一系列光合荧光参数,具体参数和意义如表 1 所示。

表 1 通过快速光曲线(RLC)获得的参数^[16]

Table 1 Parameters acquired by rapid light curve (RLC)^[16]

Parameter	Designation	Physiological significance
α	Maximum light utilization coefficient or initial slope of rapid light curve	Capturing ability of photosynthetic system for light energy
Fv/Fm	Maximum photochemical quantum efficiency of PS II	Characterization of photosynthetic system PS II activity
Yield	Actual quantum yield of PS II under light	Photosynthetic rate
rP	Relative photosynthetic electron transfer rate	Photosynthetic rate, which corresponds to the release of O_2 and the fixed rate of CO_2

光合荧光参数对 DCMU 的响应结果通过抑制率的形式表示,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 DCMU 对蛋白核小球藻光合荧光参数的抑制率; X_0 为空白对照组的光合荧光参数; X_i 为实验组的光合荧光参数^[7]。

3 结果与分析

3.1 藻类质量浓度对光合抑制效应的影响

为研究基于藻类光合抑制效应的水体综合毒性检测中藻类质量浓度变化是否会对毒性测量结果产生影响,本研究分别测量了质量浓度为 100,200,400,600 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白核小球藻在质量浓度为 5,10,20,40,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCMU 中胁迫 1 h 时的 α 、Fv/Fm、Yield、rP 这 4 种光合荧光参数,在此基础上计算每种光合荧光参数的抑制率和当 DCMU 的质量浓度相同、藻类的质量浓度不同时每种光合荧光参数抑制率的相对标准偏差(RSD),结果如图 1

所示。由图 1 可以看出,对于 α 、Fv/Fm、Yield、rP 这 4 种光合荧光参数,当相同质量浓度的 DCMU 作用于不同质量浓度的藻类时,同种光合荧光参数的抑制率有一定程度的波动性变化,但是变化程度并不大,由藻类质量浓度的变化所引起的 α 、Fv/Fm、Yield、rP 这 4 种光合荧光参数抑制率的 RSD 最大值仅分别为 3.08%、3.10%、2.69% 和 2.22%。由此可认为,当藻类在 $100 \sim 600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度范围内时,受试藻种藻细胞质量浓度的变化对水体综合毒性测量没有影响。

通过利用齐性检验和单因素方差分析(one-ANOVA)研究各光合荧光参数在不同蛋白核小球藻质量浓度下的显著性(p)。由表 2 可知:在相同质量浓度的 DCMU 胁迫下,4 种光合荧光参数在不同蛋白核小球藻质量浓度下几乎无显著性差异,仅在 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下的 DCMU 中有个别组表现显著性差异($p < 0.05$, * 代表显著性水平为 0.05),即不同质量浓度的蛋白核小球藻在相同 DCMU 质量浓度下的测试结果无显著性影响。

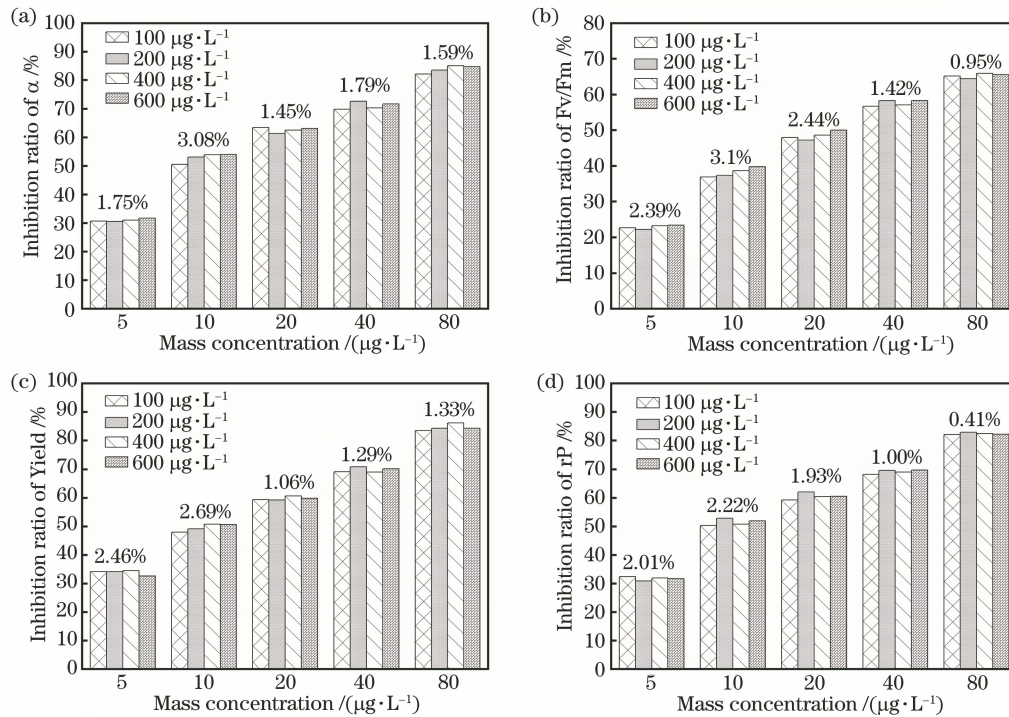


图 1 DCMU 对不同质量浓度的蛋白核小球藻胁迫 1 h 时 4 种光合荧光参数的抑制率。(a) α ; (b) Fv/Fm; (c) Yield; (d) rP

Fig. 1 Inhibition ratios of four photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* with different mass concentrations under stress by DCMU for 1 h. (a) α ; (b) Fv/Fm; (c) Yield; (d) rP

表 2 不同蛋白核小球藻质量浓度(C)、不同质量浓度的 DCMU 胁迫 1 h 下各光合活性参数的变化

Table 2 Variation of photosynthetic activity parameters for different mass concentrations (C) of *Chlorella pyrenoidosa* under stress of different mass concentrations of DCMU for 1 h

Mass concentration of DCMU / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Parameter	C=100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C=200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C=400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C=600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
0	α	0.5910±0.0078	0.5940±0.0113	0.6060±0.0078	0.6100±0.0085
	Fv/Fm	0.6320	0.6330±0.0035	0.6360±0.0035	0.6360±0.0028
	rP	60.7150±1.4354	61.2250±1.5627	61.7200±0.8061	60.7300±0.3394
	Yield	0.4380±0.0071	0.4550±0.0120	0.4560±0.0177	0.4320±0.0014
5	α	0.4160±0.0156	0.4250±0.0113	0.4180±0.0254	0.3970±0.0035
	Fv/Fm	0.5010	0.4920±0.0100	0.4900±0.0014	0.4950±0.0028
	rP	41.0790±1.3562	42.9050±0.5020	43.9100±0.3536*	40.2300±0.4525
10	Yield	0.2880±0.0144	0.3060±0.0028	0.3030±0.0028	0.2910±0.0029
	α	0.2870±0.0054	0.3070±0.0057*	0.2790±0.0085	0.2720±0.0028
	Fv/Fm	0.3990±0.0064	0.3970±0.0184	0.3910±0.0028	0.3900±0.0042
20	rP	31.9140±2.0739	32.8350±0.7707	32.8200±0.5940	29.1550±0.5440
	Yield	0.2270±0.0080	0.2305±0.0110	0.2390±0.0028	0.2130±0.0057*
	α	0.2190±0.0175	0.2310±0.0120	0.2270±0.0057	0.2090±0.0127
40	Fv/Fm	0.3620±0.0042	0.3570±0.0163	0.3530	0.3480±0.0035
	rP	28.4050±0.8132	30.5850±0.4738*	26.4200±0.5374	27.9600±1.8243
	Yield	0.2060±0.0049	0.2190±0.0078	0.1910±0.0070*	0.1940±0.0049
80	α	0.1630±0.0062	0.1600±0.0069	0.1800±0.0035*	0.1550±0.0057
	Fv/Fm	0.2900±0.0057	0.2640±0.0014*	0.2740±0.0127	0.2680±0.0021*
	rP	19.3190±0.1281	20.0050±0.6010	20.7000±0.3677*	18.4150±0.1626
80	Yield	0.1420±0.0016	0.1360±0.0049	0.1510±0.0021*	0.1290±0.0007*
	α	0.1070	0.0960±0.0057	0.0910±0.0021*	0.0950±0.0100
80	Fv/Fm	0.2200±0.0113	0.2280±0.0057	0.2180±0.0035	0.2210±0.0007
	rP	12.6600±0.1000	11.0650±0.8270	9.6610±0.9185*	10.7590±1.4722
80	Yield	0.0890±0.0021	0.0860±0.0014	0.0820±0.0141	0.0880

3.2 藻液与待测水样混合体积比对光合抑制效应的影响

当对水体综合毒性进行检测时,需要将受试藻类与待测水样进行混合。为获取最佳的受试藻液与待测水样的混合体积比,本文从两个方面研究了不同藻液与待测水样的混合体积比对藻类光合抑制效应的影响:1)混合后待测样品中藻类质量浓度相同;

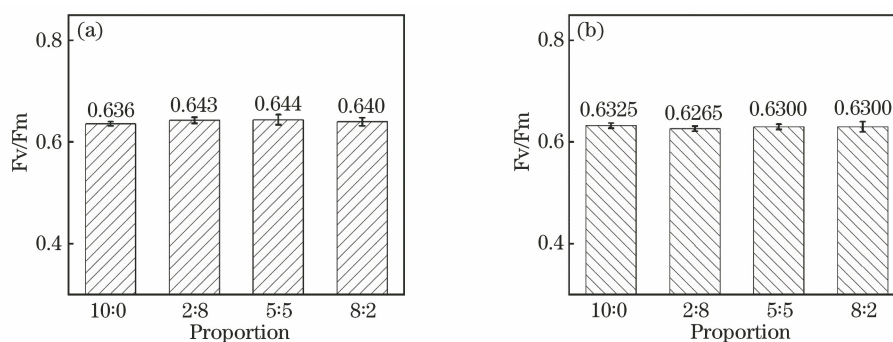


图 2 不同混合比条件下空白对照组的 F_v/F_m 。(a)混合后待测样品藻类浓度相同;(b)混合前受试藻类浓度相同

Fig. 2 F_v/F_m of blank control group for different mixing volume ratios. (a) Mixed samples to be tested with same algae concentration; (b) tested algae samples with same concentration before mixing

3.2.1 混合后待测样品藻类质量浓度相同条件下混合体积比的影响实验

为探究混合前受试藻类质量浓度不同而混合后待测样品藻类质量浓度相同的情况下,不同混合体积比对藻类光合抑制效应的影响,将蛋白核小球藻与不同质量浓度的 DCMU 水样进行混合,使原始受试藻类与 DCMU 水样的混合体积比分别为 10:0、8:2、5:5、2:8,并控制混合后待测样品中藻类的质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在质量浓度分别为 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCMU 胁迫 1 h 下,不同体积比混合下待测样品 α 、 F_v/F_m 、Yield、rP 四种光合荧光参数的抑制率,以及当 DCMU 浓度相同、混合体积比不同时,每种光合荧光参数抑制率的 RSD 如图 3 所示。由图 3 可以看出,当反应液中 DCMU 的质量浓度相同、获得该反应液的受试藻类与待测水样的混合体积比不同时,对于蛋白核小球藻的同一光合荧光参数,其抑制率会发生变化。然而,综合来看:DCMU 的质量浓度越低,混合体积比对光合荧光参数抑制率的影响越大;DCMU 的质量浓度越高,不同混合体积比所对应的光合荧光参数抑制率越接近,混合体积比对光合荧光参数抑制率的影响越小。由混合体积比所引起的 α 、 F_v/F_m 、Yield、rP 这 4 种光合活性参数抑制率的 RSD 最大值仅分别为 10.56%、12.53%、9.13%、7.67%,且都是在 $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度的 DCMU 胁迫下。同时,对于

2)混合前受试藻类质量浓度相同。当受试藻液与待测水样混合的体积比分别为 10:0、8:2、5:5、2:8(10:0 体积比代表受试藻液体积远大于待测水样体积),且没有毒性物质存在时,混合后待测样品的光合活性参数 F_v/F_m 值如图 2 所示。可以看出,在没有毒性物质存在下,空白待测样品的光合活性参数 F_v/F_m 并不受受试藻液与待测水样混合体积比的影响。

不同混合体积比下所获得的 $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度 DCMU 胁迫下的待测样品,当原始受试藻类与 DCMU 水样的混合体积比为 2:8 时,蛋白核小球藻的抑制率最高。因此,为提高水体综合毒性检测分析的灵敏性,在混合后待测样品藻类质量浓度相同的情况下,2:8 为最佳的受试藻类与待测水样的混合体积比。

3.2.2 混合后待测样品藻类质量浓度相同条件下混合体积比的影响实验

由于反应液中藻细胞质量浓度对光合抑制效应无显著影响,故为进一步探究混合前受试藻类质量浓度相同、混合后待测样品藻类质量浓度不同的情况下,不同混合体积比对藻类光合抑制效应的影响,将质量浓度为 $640 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蛋白核小球藻与不同质量浓度的 DCMU 水样进行混合,使原始受试藻类与 DCMU 水样的混合体积比分别为 10:0、8:2、5:5、2:8,则混合后待测样品中藻类质量浓度分别为 640, 512, 320, 128 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当质量浓度分别为 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCMU 胁迫 1 h 时,不同体积比混合下待测样品的 α 、 F_v/F_m 、Yield、rP 这 4 种光合荧光参数的抑制率如图 4 所示。由图 4 可以看出,当混合前受试藻类质量浓度相同、混合后待测样品藻类质量浓度不同时,受混合体积比的影响,各个光合荧光参数抑制率的变化特征与图 3 中混合前受试藻类质量浓度不同而混合后待测样品藻类质量

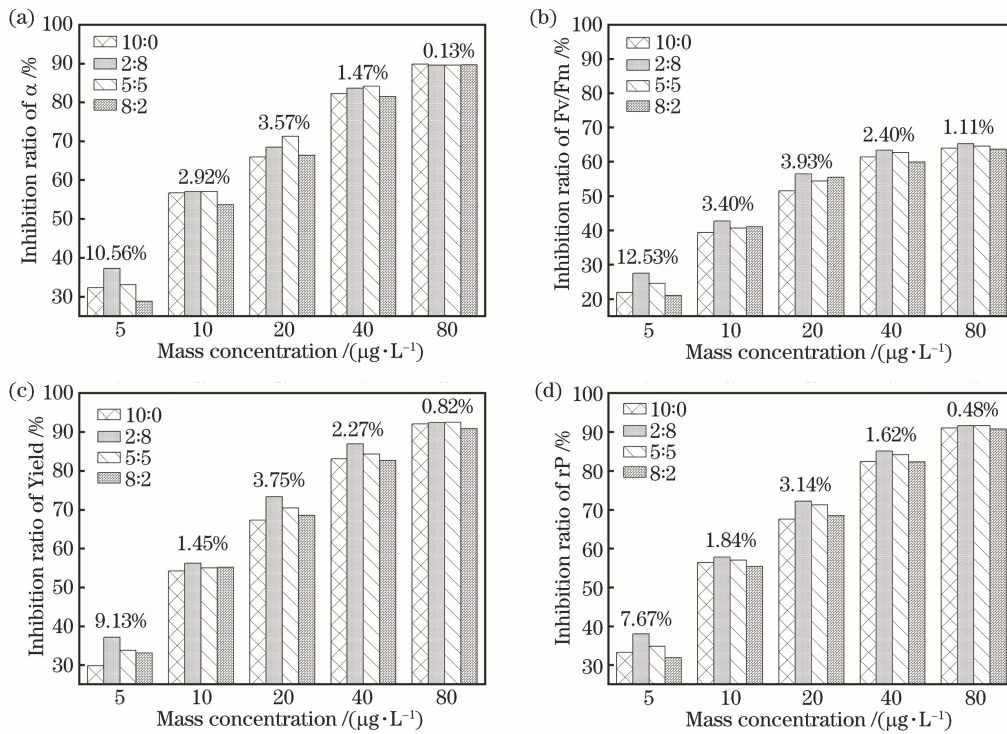


图 3 不同混合体积比条件下 DCMU 胁迫 1 h 对相同质量浓度的蛋白核小球藻的 4 种光合荧光参数的抑制率。(a) α ; (b) Fv/Fm; (c) Yield; (d) rP

Fig. 3 Inhibition rates of four photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* with same mass concentration under stress of DCMU with different mixed volume ratios for 1 h. (a) α ; (b) Fv/Fm; (c) Yield; (d) rP

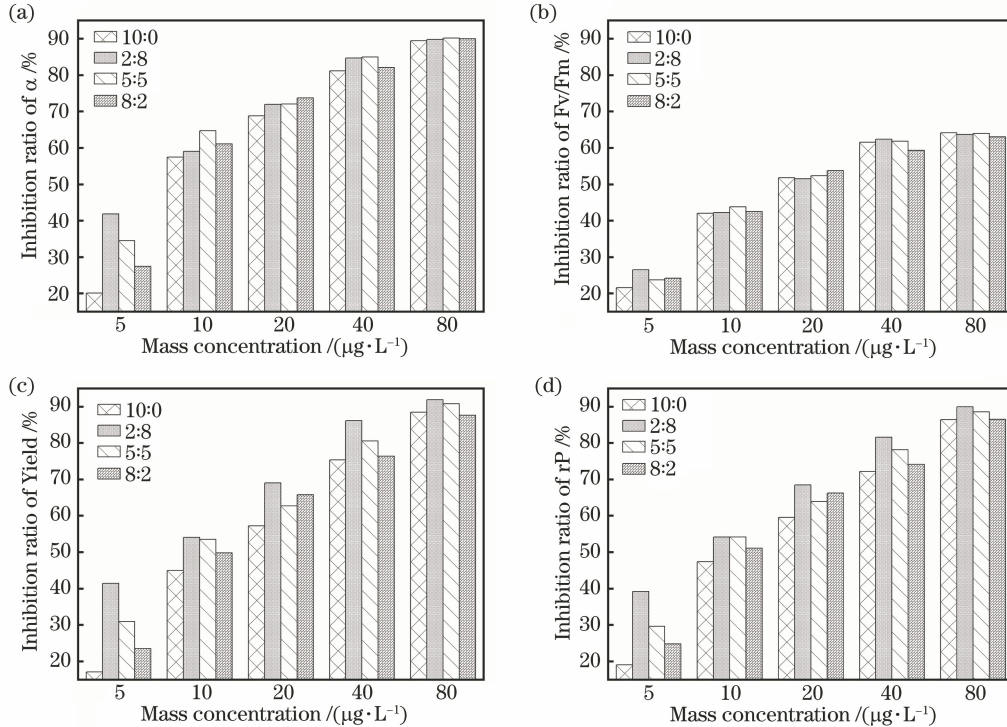


图 4 不同混合体积比条件下 DCMU 胁迫 1 h 对不同质量浓度蛋白核小球藻的 4 种光合荧光参数的抑制率。(a) α ; (b) Fv/Fm; (c) Yield; (d) rP

Fig. 4 Inhibition ratios of four photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* with different mass concentrations under stress of DCMU with different mixed volume ratios for 1 h. (a) α ; (b) Fv/Fm; (c) Yield; (d) rP

浓度相同情况下的光合荧光参数抑制率受混合体积比影响的变化特性相似,即对于光合荧光参数 Yield 和 rP,不同质量浓度 DCMU 胁迫下参数抑制率均表现为原始受试藻液与 DCMU 水样的混合体积比为 2:8 时参数抑制率最大。光合荧光参数 α 和 F_v/F_m 均表现为低质量浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) DCMU 胁迫下,原始受试藻液与 DCMU 水样的混合体积比为 2:8 时参数的抑制率最大,而较高质量浓度 ($>5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) DCMU 胁迫下,原始受试藻液与 DCMU 水样的不同混合体积比对 α 和 F_v/F_m 光合荧光参数抑制率的影响并不大。因此,从提高水体综合毒性检测分析的灵敏性方面考虑,在混合前受试藻类质量浓度相同的情况下,2:8 为最佳的受试藻液与待测水样的混合体积比。

综上所述,无论是混合前受试藻类质量浓度不同而混合后待测样品藻类质量浓度相同,还是混合前受试藻类质量浓度相同而混合后待测样品藻类质量浓度不同,基于藻类光合抑制效应对水体的综合毒性进行检测,得到的受试藻液与待测水样的最佳混合体积比均为 2:8。

3.3 反应温度对光合抑制效应的影响

环境中水域温度随着季节在不断变化,在基于藻类光合抑制效应的水体综合毒性检测方面,探究受试藻类与毒性物质的反应温度对藻类光合抑制效应的影响具有重要意义。为此,将一定质量浓度的 DCMU 样品分别置于 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C 环境中,使样品温度达到恒定,然后将蛋白核小球藻悬浮液与不同质量浓度的 DCMU 按照体积比为 2:8 进行混合,混合后待测样品中蛋白核小球藻的质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,将混合后的样品分别继续置于 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 °C 环境中,并控制 DCMU 的胁迫时间分别为 5 min、1 h、2 h 和 3 h。对于空白样品,置于不同温度下蛋白核小球藻的光合荧光参数 F_v/F_m 随时间的变化规律和相同温度、不同反应时间下测量的 F_v/F_m 的 RSD 如图 5 所示。可以看出,反应温度对蛋白核小球藻自身光合活性会有一定的影响,光合荧光参数 F_v/F_m 随着时间的推移而降低,且温度越低,相同时间下光合荧光参数 F_v/F_m 降低的程度也越大,从而导致不同时间下所获得的 F_v/F_m 的 RSD 值也越大。这说明低温对藻类光合活性有一定的抑制作用,但是随着温度的升高,这种抑制作用趋于平稳的时间越短,例如:在 5 °C 温度情况下,在 3 h 内蛋白核小球藻的光合荧光参数 F_v/F_m 一直处于降低趋势;当温度升高到

15 °C 时,2 h 以后蛋白核小球藻的光合荧光参数 F_v/F_m 不再变化;当温度升高到 20 °C 时,5 min 后蛋白核小球藻的光合荧光参数 F_v/F_m 已不再发生变化;当温度为 20~35 °C 时,不同时间下测得的 F_v/F_m 的 RSD 均不大于 1.11%,说明温度为 20~35 °C 时,蛋白核小球藻光合荧光参数 F_v/F_m 随时间的变化程度并不大。结果与藻类光合作用机理与模型^[17]中叙述的微藻光合作用过程对温度具有一定的依赖性,低温使光合作用的各个生化过程减缓、电子传递速度降低,导致 Q_A 处于还原态相一致。

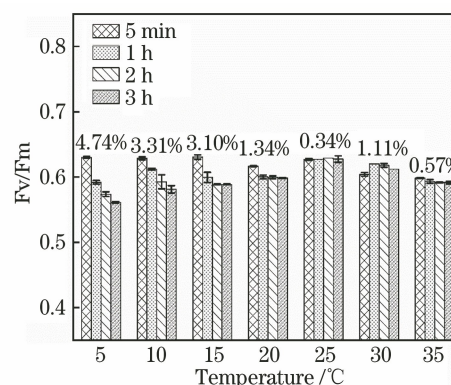


图 5 不同温度下蛋白核小球藻的 F_v/F_m 随时间的变化情况

Fig. 5 F_v/F_m of *Chlorella pyrenoidosa* varying with time under different temperatures

当不同质量浓度的 DCMU 对蛋白核小球藻胁迫 5 min 时,不同反应温度下 α 、 F_v/F_m 、Yield、rP 这 4 种光合荧光参数的抑制率相对 20 °C 时抑制率的变化率如图 6 所示。可以看出,在低质量浓度 ($\leq 20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 DCMU 胁迫下,反应温度的变化对 4 种光合荧光参数的抑制有重要影响,尤其是当温度为 5~20 °C 时,与温度为 20 °C 相比,4 种光合荧光参数抑制率的变化率均在 30% 以上,而随着 DCMU 质量浓度的增加,温度对 α 、 F_v/F_m 、Yield、rP 这 4 种光合荧光参数抑制的影响程度在减小。当温度在 20~35 °C 时,与温度为 20 °C 相比,4 种光合荧光参数抑制率的变化率均在 20% 以下,即 20~35 °C 的温度更有利于实现水体综合毒性的稳定检测。

4 结 论

藻类光合抑制法弥补了藻类生长抑制法测量周期长的缺点,具有响应快速、灵敏等特点,是极具潜力的水体综合毒性快速检测预警手段。在藻类光合抑制法水体综合毒性定量检测中,测量条件对其毒性测试结果的影响不可忽略。以蛋白核小球藻为受试藻种,以 DCMU 为毒性物质,以 α 、 F_v/F_m 、

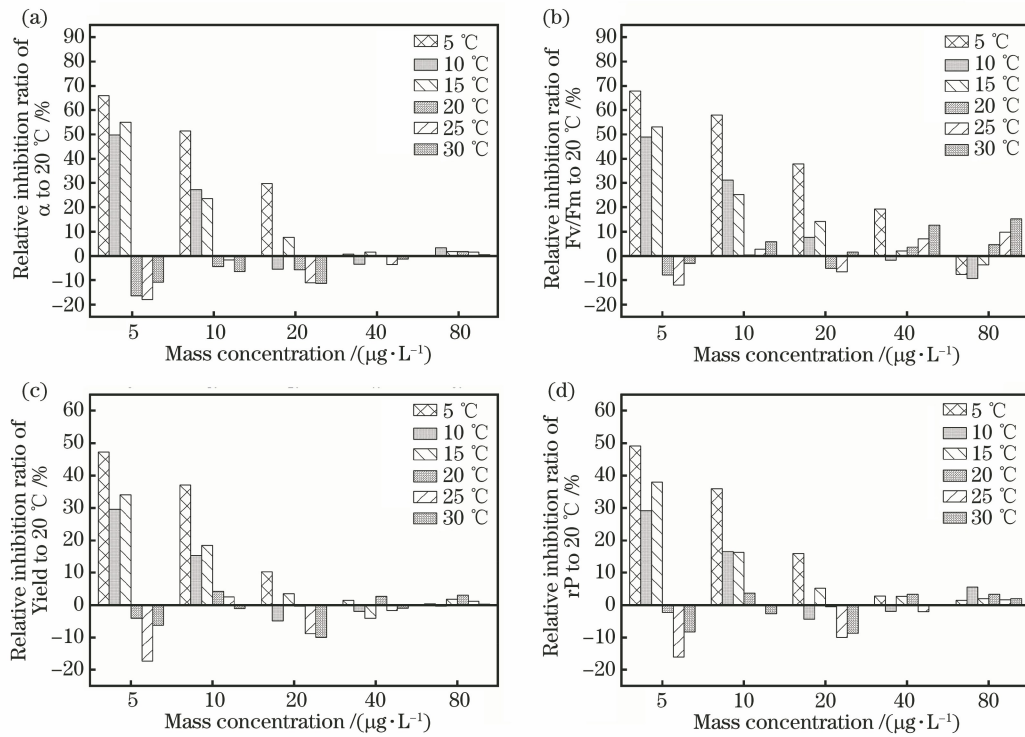


图 6 不同反应温度下 DCMU 胁迫 5 min 时蛋白核小球藻的 4 种光合荧光参数的抑制率相对 20 °C 时的变化率。(a) α ; (b) F_v/F_m ; (c) Yield; (d) rP

Fig. 6 Relative change rate of inhibition rate of four photosynthetic fluorescence parameters for *Chlorella pyrenoidosa* under DCMU stress for 5 min at different temperature compared with that at 20 °C. (a) α ; (b) F_v/F_m ; (c) Yield; (d) rP

Yield, rP 4 种光合荧光参数的抑制率为分析对象, 研究受试藻类质量浓度、藻液与样品混合体积比、反应温度 3 种最重要的测试条件对藻类光合抑制法检测水体综合毒性的影响规律。研究发现: 当藻类质量浓度在 $100 \sim 600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 受试藻种藻细胞质量浓度的变化对水体综合毒性测量并没有影响; 反应液温度会对水体综合毒性检测具有重要影响, $20 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 的温度更有利于提高水体综合毒性的检测精度。此外, 藻液与待测水样的混合体积比对水体综合毒性检测的灵敏度有重要影响, 从提高水体综合毒性检测分析的灵敏性方面考虑, 受试藻液与待测水样的最佳混合体积比为 2:8。该研究为开发基于藻类光合抑制效应的水质生物毒性快速检测技术设备提供了稳定可靠的测试条件。

参 考 文 献

[1] Gu M B, Gil G C, Kim J H. A two-stage minibioreactor system for continuous toxicity monitoring[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1999, 14(4): 355-361.
 [2] Masner P, Javůrková B, Bláha L. Rapid *in situ* toxicity testing with luminescent bacteria *Photorhabdus luminescens* and *Vibrio fischeri*

adapted to a small portable luminometer [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2017, 24(4): 3748-3758.

[3] Qambrani N A, Hwang J H, Oh S E. Comparison of chromium III and VI toxicities in water using sulfur-oxidizing bacterial bioassays [J]. Chemosphere, 2016, 160: 342-348.
 [4] Golding L A, McKnight K, Binet M, et al. Toxicity of dissolved and precipitated forms of Barium to a freshwater alga (*Chlorella* sp. 12) and water flea (*Ceriodaphnia dubia*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2018, 37(6): 1632-1642.
 [5] Cui R X, Kwak J I, An Y J. A novel method for preventing surface film entrapment of water fleas and its application for toxicity testing with heavy metals [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2017, 24(4): 4210-4219.
 [6] Robidoux P Y, Virginie B, Judith L, et al. Assessment of acute and chronic toxicity of unweathered and weathered diluted bitumen to freshwater fish and invertebrates [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 164: 331-343.
 [7] 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.

- 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.
- [8] 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*, 2019, 197: 111551.
- [9] 王翔, 殷高方, 赵南京, 等. 荧光动力学法藻类初级生产力测量中光合尺寸单元校正方法研究[J]. *光学学报*, 2021, 41(17): 1726002.
- Wang X, Yin G F, Zhao N J, et al. Correction method of photosynthetic size unit in algae primary-productivity measurement using fluorescence kinetics [J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(17): 1726002.
- [10] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42: 313-349.
- [11] 胡丽, 殷高方, 赵南京, 等. 蛋白核小球藻光合荧光参数对 Cu^{2+} 毒性响应特性研究 [J]. *光学学报*, 2020, 40(12): 1217001.
- Hu L, Yin G F, Zhao N J, et al. Response of photosynthetic fluorescence parameters of *Chlorella pyrenoidosa* to Cu^{2+} toxicity[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(12): 1217001.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 胡丽, 陈敏, 殷高方, 等. 基于藻类光合作用抑制效应的敌草隆毒性响应参数研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2021, 41(5): 1519-1524.
- Hu L, Chen M, Yin G F, et al. Toxicity response parameters of diaquilone based on photosynthetic inhibition effect of algae [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2021, 41(5): 1519-1524.
- [15] Falkowski P G, Woodhead A D, Vivirito K. Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea [M]. Boston: Springer, 1992.
- [16] Kolber Z S, Prášil O, Falkowski P G. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1998, 1367(1/2/3): 88-106.
- [17] 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.
- Han B P, Han Z G, Fu X. Algal photosynthesis: mechanisms and models[M]. Beijing: Science Press, 2003.