

引用格式: CHEN Min, YIN Gaofang, ZHAO Nanjing, et al. Relationship between Photosynthetic Fluorescence Parameters of Algae and the Initial Biomass in the Measurement of Water Quality Biological Toxicity[J]. Acta Photonica Sinica, 2022, 51(5):0517001
陈敏,殷高方,赵南京,等. 水质生物毒性测量中藻类光合荧光参数与初始生物量的关系[J]. 光子学报, 2022, 51(5):0517001

水质生物毒性测量中藻类光合荧光参数与 初始生物量的关系

陈敏^{1,2,3}, 殷高方^{1,3}, 赵南京^{1,3}, 甘婷婷^{1,2,3}, 谷梦园^{1,2,3}, 亓培龙^{1,2,3},
丁志超^{1,2,3}, 王璐^{1,2,3}, 冯春^{1,2,3}, 张小玲⁴

(1 中国科学院合肥物质科学研究院 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,
合肥 230031)

(2 中国科学技术大学, 合肥 230026)

(3 安徽省环境光学监测技术重点实验室, 合肥 230031)

(4 安徽大学, 合肥 230039)

摘 要:藻类光合荧光参数易于测量, 对外来胁迫响应灵敏, 是水质生物毒性测量的重要指标。以蛋白核小球藻为受试生物, 研究了 DCMU 胁迫下 (1 h 和 3 h), 作为毒性测试终点的光合荧光参数与初始生物量的关系。结果表明: 光合荧光参数可分为两类, 第一类为 F_v/F_m 、Yield、 α 、 rP 、 σ_{PSII} 和 τ_{es} , 只表征光合系统信息; 第二类参数为 E_k 、 F_0 、 F_m 、 F_v 以及 JVP II, 其数值受生物量影响, 包含生物量信息; 当初始生物量发生变化时, 只表征光合系统信息的第一类参数在毒性测试过程中更稳定。参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、 rP 、 σ_{PSII} 、 τ_{es} 、 F_0 、 F_m 以及 F_v 与 DCMU 能建立良好的剂量效应关系, 根据 EC_{50} 、 EC_{20} 和相关系数 R^2 , 给出了光合荧光参数作为毒性测试终点时, 藻类初始叶绿素浓度的最佳范围: 对参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、 rP 、 σ_{PSII} 、 τ_{es} , 建议范围为 $10\sim 2\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 对于参数 F_0 、 F_m 与 F_v , 建议范围为 $200\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该结果可为基于光合荧光参数的生物毒性快速检测方法的建立提供重要依据。

关键词:生物光学; 初始生物量; 光合荧光参数; DCMU; 毒性检测

中图分类号: X832

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20225105.0517001

0 引言

微藻作为水生环境的初级生产者, 个体小、繁殖快, 对毒性反应敏感, 是评价污染化学品生物毒性极其重要的工具^[1-2]。但广泛使用的藻类生物测试指南, “淡水藻类和蓝细菌, 生长抑制试验”(OECD 201)规定的指数生长测试至少需要 72 h^[3], 无法满足水质安全预警和污染物应急监测的需求。

荧光动力学方法作为一种非破坏性、非侵入性的技术, 可在几分钟内获悉光合系统状态^[4], 在实时检测和水安全应用方面具有潜在应用价值^[5]。该技术提供了藻类光合活性的直接信息, 早期在除草剂(光合抑制剂)上进行了大量的研究^[6], 现在也被用于测试其他化学品的毒性, 如重金属^[7-8]、多环芳烃^[9]等。

通过监测藻类荧光动力学变化过程可获取与光合系统密切相关的一系列光合荧光参数。这些参数对应着光合作用电子输流的不同过程, 快速反映有毒物质对光合系统的影响, 是理想的生物毒性测试终点。目前基于这些参数的毒性数据也非常多, 但由于毒性测试方案的不同, 导致产生的毒性数据有较大差异^[10]。

基金项目:安徽省科技重大专项(No.202003a07020007), 安徽省杰出青年科学基金(No.1908085J23), 国家自然科学基金(No.61875207, 61805254, 62005001), 中科院仪器设备功能开发技术创新项目(No. Y93H3g1251), 中国科学院院长基金专项(No. YZJJZX202013), 深圳市可持续发展科技专项(No.KCXFZ20201221173007020)

第一作者:陈敏(1994—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境污染光学监测新技术与方法。Email: mchen@aiofm.ac.cn

导师(通讯作者):殷高方(1979—), 男, 研究员, 博士, 主要研究方向为水体污染物监测新技术与方法。Email: gfyin@aiofm.ac.cn

赵南京(1976—), 男, 研究员, 博士, 主要研究方向为环境污染光学与光谱学监测新技术与方法。Email: njzhao@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2021-10-13; 录用日期: 2021-12-09

http://www.photon.ac.cn

因此,有必要进行相关测试条件的分析,减少实验室间的可变性^[11-12]。在生长抑制试验中,因为需要生物量的积累,每个细胞的毒物可用性取决于毒物的初始浓度和细胞密度,初始生物量会显著影响藻类毒性试验的结果,所以“淡水藻类和蓝细菌,生长抑制试验”(OECD 201)中对初始微藻生物量有明确要求。SINGH P K等也推荐使用较低生物量的藻样来进行藻类生长抑制毒性测试^[13]。然而,这一结论在以光合荧光参数作为毒性测试终点时是否适用,至今无相关研究或可靠数据可证明。荧光动力学技术本质上是采用光学探测器来监测微藻体内的叶绿素荧光信号变化,所以本文以叶绿素浓度作为生物量的衡量,以蛋白核小球藻作为受试对象,分析在敌草隆短期暴露下,作为毒性测试终点的光合荧光参数与初始生物量的关系,为基于光合荧光参数的生物毒性快速检测方法建立提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种培养与溶液配制

蛋白核小球藻(*C.pyrenoidosa*, FACHB-5)为中国淡水水域的一种常见绿藻,具有分散均匀、不易粘壁的特性。因此本研究以蛋白核小球藻为受试藻种,采购于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。该藻种培养在恒温摇床(MQD-S3R)中进行,光源为白色冷荧光灯管,培养条件为:温度 25 ± 1 °C、转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、光照强度 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光暗比 12 h:12 h。待藻液培养 2~3 天,达到对数生长期,以其开展实验研究。

采用藻类分析仪(FluoroProbe,德国BBE公司)对培养至对数生长期的蛋白核小球藻进行叶绿素浓度(生物量)测量,并根据实验需要以灭菌后的BGII培养基对藻液进行稀释,获取一系列不同生物量的藻液,以开展不同生物量蛋白核小球藻对敌草隆(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea,DCMU)响应研究。由于胁迫物质敌草隆(DCMU,阿拉丁(中国上海),纯度99%)在水中溶解度很低,因此使用二甲基亚砜(DMSO,阿拉丁(中国上海),纯度>99%)作为溶剂配制DCMU胁迫下蛋白核小球藻的待测样品,最终单个样品体积为50 mL,DCMU的浓度分别为0、1、2、5、10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (样品中DMSO含量小于0.1%),所有样品以同样方式制得3份。

1.2 光合荧光参数获取

采用ACT2&FastOcean FRR藻类荧光系统(英国CTG公司)对DCMU胁迫下不同蛋白核小球藻的待测样品进行光合荧光参数测量,以分析DCMU对不同初始生物量蛋白核小球藻光合荧光参数的影响。该系统由FastOcean快速重复率荧光仪和ACT2实验室系统组成。测量过程中,激发光源选择450 nm的LED,光化光设置从0到800 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 共8个光强值,获取待测样品的快速光曲线(Fast Light Curve,FLC),并得到如表1所示的11个光合荧光参数,单个样品测量周期约为3 min。

表1 由FRRf获取的光合荧光参数^[14]
Table 1 Photosynthetic fluorescence parameters obtained from FRRf^[14]

Parameter	Description
F_0	Minimum fluorescence yield (measured at open reaction centres state)
F_m	Maximal fluorescence output (measured at closed reaction centres state)
F_v	Variable fluorescence yield, $F_v = F_m - F_0$
F_v/F_m	The maximum photochemical quantum yield of PSII
Yield	The effective quantum yield of PSII photochemical energy conversion
α	Maximal light utilization coefficient, initial slope of the rP-E curve
rP	Relative PSII electron transfer rate
Ek	The onset of light saturation
σ_{PSII}	Absorption cross section of PSII photochemistry (without ambient light)
τ_{es}	Time constant associated with the re-opening of a closed RCII with an empty Q_B site
JVP II	PSII flux per unit volume

2 结果与讨论

2.1 初始生物量变化时不同光合荧光参数毒性响应分析

图1(a)和图1(b)为10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ DCMU短期胁迫下(1 h和3 h),不同初始生物量样品对应光合荧光参数

的毒性响应情况,以处理组与空白组的比值(球型)表示。其中灰色实线(100%)表示空白组,球型分布于实线上方,表明该参数受到促进作用;球型分布于实线下方,表明该参数受到抑制作用。柱形指示的是不同光合荧光参数在初始生物量变化情况下获得毒性测试数据的相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)。

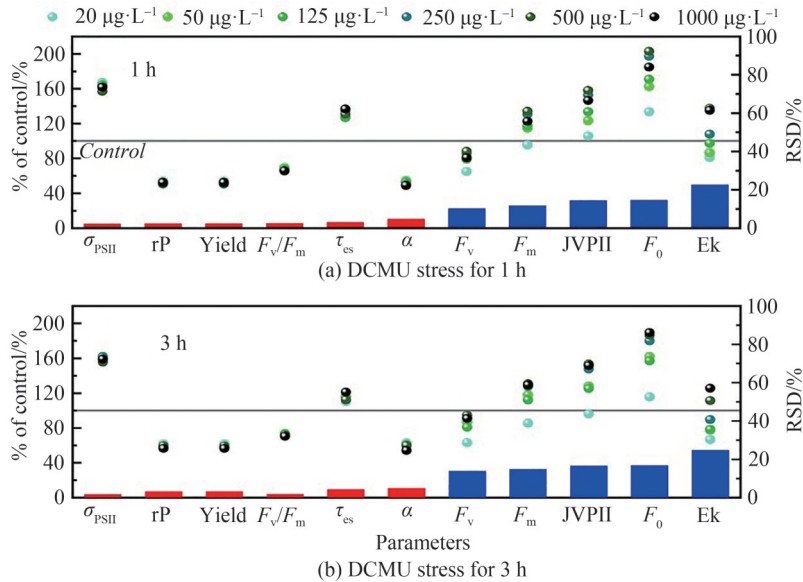


图1 短期胁迫下,不同初始叶绿素浓度对应的11个光合荧光参数对 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DCMU的毒性响应情况
Fig. 1 Under short-term stress, the toxic response of 11 photosynthetic fluorescence parameters corresponding to different initial chlorophyll concentrations to $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DCMU

由图1可知,参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 以及 τ_{es} 的毒性测试结果基本不随蛋白核小球藻初始生物量的变化而变化,当叶绿素浓度在 $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的区间内变化时, $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DCMU胁迫1 h与3 h时该六个参数测试结果对应相对标准偏差RSD均低于5%,对应平均值分别为2.74%与3.12%;而参数Ek、 F_0 、 F_m 、 F_v 和JVP II,其测试结果则明显受到初始生物量的影响,当叶绿素浓度在 $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 区间内变化时,DCMU胁迫1 h与3 h时五个参数测试结果对应相对标准偏差RSD均高于10%,对应平均值分别为14.66%与17.27%。以上结果表明,当叶绿素浓度在 $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的区间内变化时,短期胁迫下,光合荧光参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 以及 τ_{es} 对DCMU的毒性测试结果更为稳定,不受测试样品初始生物量的影响。

2.2 光合荧光参数与生物量的相关性分析

为充分了解光合荧光参数与生物量(叶绿素浓度)的关系,分析参数与生物量的相关性是否对毒性响应稳定性造成影响,进一步测试了当蛋白核小球藻叶绿素浓度在 $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的区间内变化时,未受胁迫状态下蛋白核小球藻11个光合荧光参数数值随叶绿素浓度变化的规律,并分别计算了同一光合荧光参数在不同藻生物量下的相对标准偏差RSD,结果如图2。

由图2可知,11个光合荧光参数可分为两类,第一类为 F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 和 τ_{es} ,其数值基本不随叶绿素浓度的变化而变化,当叶绿素浓度在 $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围变动时, F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 和 τ_{es} 测得数值的相对标准偏差RSD分别为3.00%、3.66%、3.80%、3.67%、0.09%和7.74%,具有很好的一致性,说明这类参数只表征蛋白核小球藻的光合信息,与藻类生物量变化不相关。第二类参数为Ek、 F_0 、 F_m 、 F_v 以及JVP II,这些参数随叶绿素浓度变化表现出一定的变化趋势,其数值受生物量影响,其中Ek与叶绿素浓度呈负相关, F_0 、 F_m 、 F_v 以及JVP II与叶绿素浓度呈现正相关,说明这些参数的数值变化除了包含光合系统信息,也反映了一定的生物量信息。结合2.1节所得结论,可知当初始生物量发生变化时,光合荧光参数与生物量的相关性会影响毒性测试结果的稳定,与生物量无关的第一类参数获取的毒性测试结果更稳定。

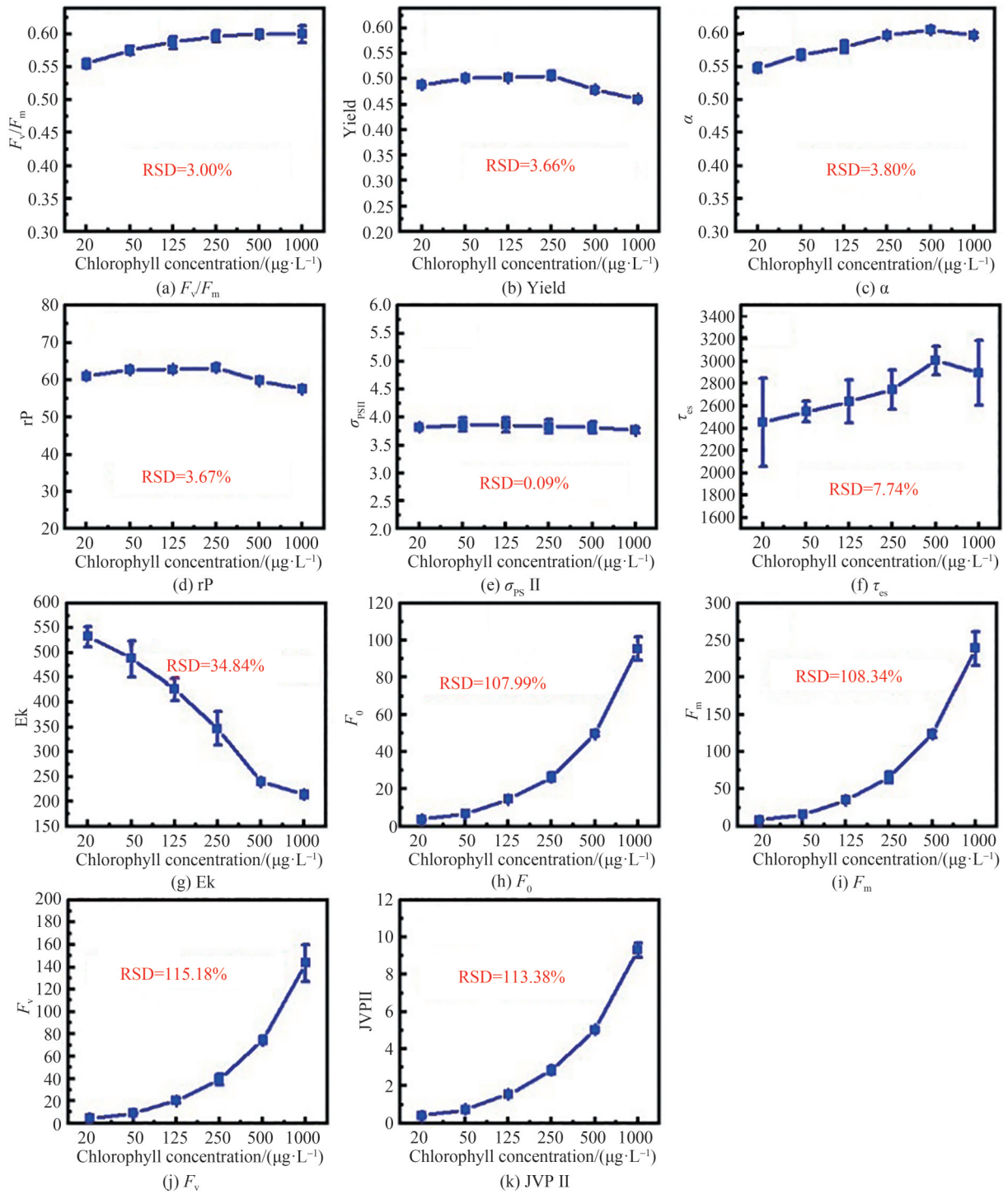


图2 11个光合荧光参数数值随叶绿素浓度的变化趋势

Fig.2 The trend of 11 photosynthetic fluorescence parameters with chlorophyll concentration

2.3 不同初始生物量对应光合荧光参数的毒性剂量效应分析

稳定敏感的毒性剂量效应分析是水质生物毒性测量的关键。由于涉及参数众多,为筛选出能与毒物建立良好剂量效应的参数,并针对该参数提出最佳的初始生物量区间,本研究以处理组与空白组的比值作为纵坐标,DCMU的浓度为横坐标,利用Logistic函数建立了不同初始生物量对应光合荧光参数的剂量效应曲线,得到了对应曲线的相关系数 R^2 以及毒性数据 EC_{20} (产生20%效应对应的毒物浓度)、 EC_{50} (产生50%效应对应的毒物浓度),如表2。并以参数 F_v/F_m 、 F_m 为例,展示了DCMU胁迫下,参数 F_v/F_m 、 F_m 及对应的毒性数据 EC_{20} 随测试样品初始生物量的变化趋势,如图3。

表2 不同初始生物量下光合荧光参数获得DCMU相关毒性数据($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)及剂量效应曲线拟合相关系数 R^2
 Table 2 DCMU-related toxicity data ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and dose-effect curve fitting effect (R^2) obtained by photosynthetic fluorescence parameters under different initial biomass

Parameter	Initial chlorophyll concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$									Recommended concentration/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	4	10	20	100	200	500	1 000	2 000		
F_v/F_m	EC ₅₀	>40	15.33	15.58	15.75	15.35	16.05	16.62	17.16	
	EC ₂₀	6.83	3.21	3.30	3.17	2.99	3.42	3.37	3.43	10~2 000
	R^2	0.987	0.998	0.999	0.997	0.997	0.994	1	1	
Yield	EC ₅₀	10.76	7.31	7.13	6.83	6.61	6.74	6.63	8.56	
	EC ₂₀	3.33	1.72	1.63	1.68	1.66	1.73	1.95	2.10	10~2 000
	R^2	0.999	0.997	1	0.987	1	0.998	1	0.996	
α	EC ₅₀	11.57	7.76	6.43	6.24	6.21	6.12	6.66	7.16	
	EC ₂₀	3.78	2.10	1.84	1.86	1.81	1.93	2.34	2.20	10~2 000
	R^2	0.999	0.989	0.999	0.987	1	0.994	1	0.998	
rP	EC ₅₀	10.96	7.84	7.13	6.83	6.61	6.71	6.64	8.54	
	EC ₂₀	3.33	1.75	1.66	1.68	1.64	1.73	1.96	2.21	10~2 000
	R^2	0.999	0.996	1	0.997	1	0.998	1	0.996	
σ_{PSII}	EC ₅₀	18.90	4.32	4.29	4.08	3.80	3.95	3.80	3.46	
	EC ₂₀	3.65	1.28	1.02	1.17	1.27	1.22	1.13	1.30	10~2 000
	R^2	0.988	0.979	0.998	0.984	0.982	0.924	0.900	0.976	
τ_{es}	EC ₅₀	8.94	5.13	4.854	4.85	4.43	4.45	4.68	4.65	
	EC ₂₀	5.18	2.02	1.93	1.92	1.76	1.99	2.24	2.34	10~2 000
	R^2	0.989	0.988	0.999	1	0.999	1	0.999	0.999	
Ek	EC ₅₀	>40	—	—	—	—	—	—	>40	
	EC ₂₀	20.518	—	—	—	—	—	—	2.084 88	—
	R^2	0.526	—	—	—	—	—	—	0.625	
F_0	EC ₅₀	8.11	7.85	6.27	5.49	2.25	2.35	2.66	—	
	EC ₂₀	2.16	2.43	2.53	2.56	<1	1.001	1.00	—	200~1 000
	R^2	0.876	0.887	0.972	1	1	0.993	0.991	—	
F_m	EC ₅₀	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	—	
	EC ₂₀	8.80	7.66	6.38	5.23	3.53	3.38	3.59	—	200~1 000
	R^2	0.867	0.834	0.810	0.879	0.986	0.983	0.962	—	
F_v	EC ₅₀	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	
	EC ₂₀	16.10	15.74	15.42	14.79	11.70	10.43	9.78	8.40	200~1 000
	R^2	0.991	0.984	0.995	0.986	0.967	0.952	0.998	0.650	
JVP II	EC ₅₀	—	—	>40	—	—	—	—	—	
	EC ₂₀	—	—	5.289	—	—	—	—	—	—
	R^2	—	—	0.666	—	—	—	—	—	

“—” Indicates that the curve can not be fitted

由表2可知,在DCMU胁迫下,第一类参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 、 τ_{es} 均呈现出良好的剂量效应关系($R^2>0.9$),第二类参数中只有 F_0 、 F_m 以及 F_v 呈现出良好的剂量效应关系($R^2>0.9$)。以EC₅₀、EC₂₀以及 R^2 作为主要的分析参考依据($R^2>0.9$,EC₅₀和EC₂₀数值较低),给出了当以参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 、 τ_{es} 、 F_0 、 F_m 以及 F_v 作为DCMU毒性测试终点时测试样品初始生物量的最佳范围。对第一类参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、rP、 σ_{PSII} 、 τ_{es} ,最佳的藻类初始叶绿素浓度(生物量)范围为10~2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,在此范围内所获取的毒性数据EC₂₀、EC₅₀数值低且稳定,符合2.1节所述结论,但是当初始叶绿素浓度为4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,EC₅₀与EC₂₀明显偏高,分析原因是由于藻种具有群体依赖性^[15],过低的生物量会影响藻种的光合生理状态,本研究中也确实发现当叶

绿素浓度降到 $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 藻光合活性 F_v/F_m 发生了突降(图3(a))。对第二类参数 F_0 、 F_m 与 F_v , 最佳的藻类初始叶绿素浓度(生物量)范围为 $200\sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在此范围内所获取的毒性数据 EC_{20} 、 EC_{50} 数值低且稳定。此外, 当初始叶绿素浓度为 $2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 剂量效应曲线的拟合效果较差; 当初始叶绿素浓度在 $4\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内时, 叶绿素浓度越低, EC_{50} 与 EC_{20} 越高。

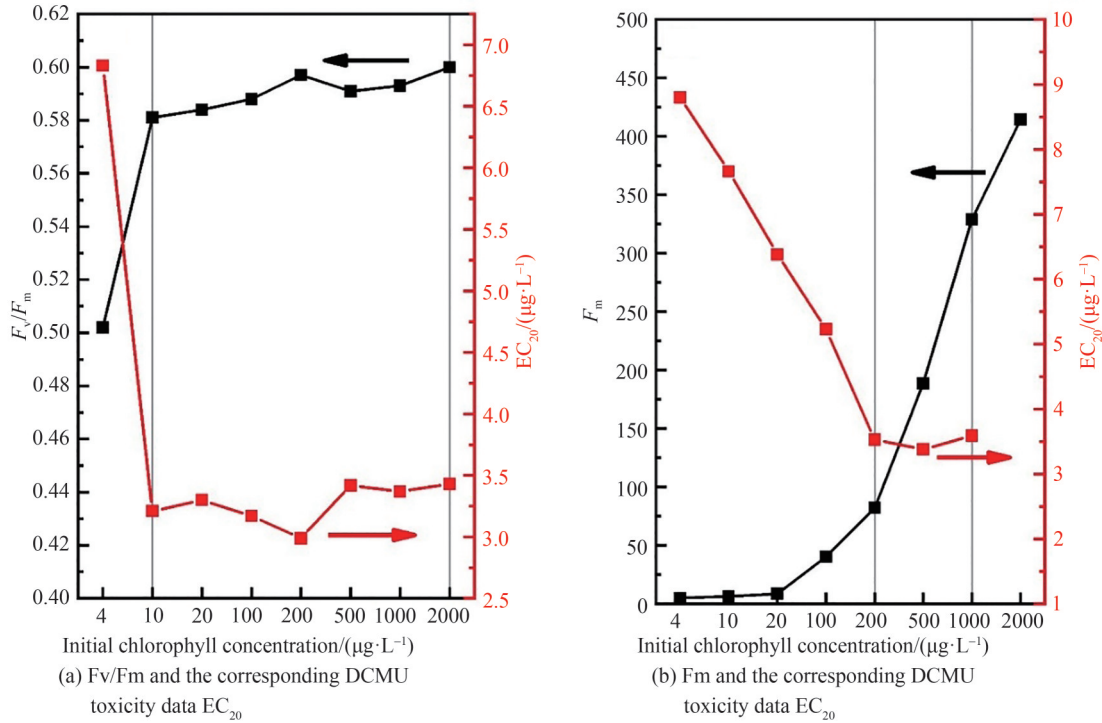


图3 参数数值及对应DCMU毒性数据 EC_{20} 随初始叶绿素浓度的变化趋势

Fig. 3 The value of the parameter and the corresponding DCMU toxicity data EC_{20} change trend with the initial chlorophyll concentration

3 结论

本文以蛋白核小球藻为受试生物, 研究了DCMU短期胁迫下, 作为毒性测试终点的光合荧光参数 (F_v/F_m , Yield, α , rP , σ_{PSII} , τ_{es} , Ek, F_0 , F_m , F_v , JVP II) 与初始生物量的关系。结果表明, 当初始生物量发生变化时, 光合荧光参数与生物量的相关性会直接影响到毒性测试结果的稳定性, 可将光合荧光参数分为两类, 第一类为 F_v/F_m 、Yield、 α 、 rP 、 σ_{PSII} 和 τ_{es} , 其数值与生物量变化不相关, 只表征蛋白核小球藻的光合系统信息, 该类参数获取的毒性测试结果不受初始生物量变化的影响, 当初始叶绿素浓度在 $20\sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的区间内变化时, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DCMU胁迫1 h与3 h时该六个参数测试结果对应相对标准偏差的平均值分别为2.74%与3.12%; 第二类参数为 Ek、 F_0 、 F_m 、 F_v 以及 JVP II, 其数值受生物量影响, 包含生物量信息, 这类参数的毒性测试结果明显受到生物量波动的影响, 稳定性变差, 当叶绿素浓度在 $20\sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 区间内变化时, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DCMU胁迫1 h与3 h时五个参数测试结果对应相对标准偏差的平均值分别为14.66%与17.27%。进一步的剂量效应分析结果表明, 参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、 rP 、 σ_{PSII} 、 τ_{es} 、 F_0 、 F_m 以及 F_v 在DCMU胁迫下呈现出良好的剂量效应关系。另外根据 EC_{50} 、 EC_{20} 以及相关系数 R^2 , 给出了不同光合荧光参数作为毒性测试终点时, 藻类初始叶绿素浓度的最佳范围: 对参数 F_v/F_m 、Yield、 α 、 rP 、 σ_{PSII} 、 τ_{es} , 建议范围为 $10\sim 2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 对于参数 F_0 、 F_m 与 F_v , 建议范围为 $200\sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该结果为基于光合荧光参数的生物毒性快速检测方法的建立提供了重要依据。

参考文献

- [1] POWER E A, BOUMPHREY R S. International trends in bioassay use for effluent management[J]. Ecotoxicology, 2004, 13(5): 377-398.
- [2] ARONSSON K A, EKELUND N G A. Effects on motile factors and cell Growth of *Euglena gracilis* after exposure to

- wood ash solution; assessment of toxicity, nutrient availability and pH-dependency [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2005, 162(1/4): 353-368.
- [3] GENERAL C. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test [J]. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, 2006, 1:1-25.
- [4] CHANG J C, BERGES J A, YOUNG E B. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae [J]. *Water Research*, 2012, 46(8):2615-2626.
- [5] DUAN Jingbo, LIU Wenqing, ZHANG Yujun, et al. Study on a new method of fast monitoring toxicity of Cd²⁺ by algal in water [J]. *Environmental Science*, 2014(4):1555-1560.
段静波, 刘文清, 张玉钧, 等. 藻类水体 Cd²⁺ 毒性快速监测新方法研究 [J]. *环境科学*, 2014(4):1555-1560.
- [6] CHANG J C, BERGES J A, YOUNG E B. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae [J]. *Water Research*, 2012, 46(8):2615-2626.
- [7] GAN Tingting, ZHAO Nanjing, YIN Gaofang, 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, 197:111551-111551.
- [8] PROTOPOPOV F F, MATORIN D N, SEIFULLINA N K, et al. Effect of methylmercury on the light dependence fluorescence parameters in a green alga *Chlamydomonas moewusii* [J]. *Microbiology*, 2015, 84(6):822-827.
- [9] 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.
- [10] SJOLLEMA S B, BEUSEKOM S, GEEST H, et al. Laboratory algal bioassays using PAM fluorometry: effects of test conditions on the determination of herbicide and field sample toxicity [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(5):1017-1022.
- [11] CAMUEL A, GUIEYSSE B, ALCÁNTARA C, et al. Fast algal eco-toxicity assessment: influence of light intensity and exposure time on *Chlorella vulgaris* inhibition by atrazine and DCMU [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 140: 141-147.
- [12] WHITEHOUSE P. Measures for protecting water quality: current approaches and future developments [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2001, 50(2):115-126.
- [13] SINGH P K, SHRIVASTAVA A K. Role of initial cell density of algal bioassay of toxic chemicals [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56: 812-819.
- [14] GORBUNOV M Y, FALKOWSKI P G, KOLBER Z S. Measurement of photosynthetic parameters in benthic organisms in situ using a SCUBA-based fast repetition rate fluorometer [J]. *Limnology & Oceanography*, 2000, 45(1):242-245.
- [15] YAN Ge, FU Liang, XIE Yutong, et al. The growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa* depend on cell density and its molecular mechanism [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(10): 3757-3763.
闫阁, 付亮, 谢雨彤, 等. 铜绿微囊藻生长代谢的密度依赖性特征及分子机制 [J]. *环境科学学报*, 2020, 40(10): 3757-3763.

Relationship between Photosynthetic Fluorescence Parameters of Algae and the Initial Biomass in the Measurement of Water Quality Biological Toxicity

CHEN Min^{1,2,3}, YIN Gaofang^{1,3}, ZHAO Nanjing^{1,3}, GAN Tingting^{1,2,3}, GU Mengyuan^{1,2,3},
QI Peilong^{1,2,3}, DING Zhichao^{1,2,3}, WANG Lu^{1,2,3}, FENG Chun^{1,2,3}, ZHANG Xiaoling⁴
(1 Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optic and Fine Mechanics,
Hefei Institutes of Physical Science, China Academy of Sciences, Hefei 230031, China)
(2 University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)
(3 Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment, Hefei 230031, China)
(4 Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract: The photosynthetic fluorescence parameters of algae are easy to measure and sensitive to external stress. It is an important indicator of water quality biological toxicity measurement. However, different toxicity test schemes would lead to great differences in the toxicity data, and the stability and comparability were uncertain. Since fluorescence dynamics technology for measuring photosynthetic fluorescence parameters essentially uses optical detector to monitor the change of chlorophyll fluorescence signal in

microalgae. In this paper, the concentration of chlorophyll was used as the measurement of biomass, and *Chlorella pyrenoidosa* was used as the test object to analyze the relationship between photosynthetic fluorescence parameters as the end point of toxicity test and the initial biomass of toxicity test algae samples under short-term exposure (1 h and 3 h) of diuron. The results showed that: 1) When the initial biomass changes, the correlation between photosynthetic fluorescence parameters and biomass would directly affect the stability of the toxicity test results. The photosynthetic fluorescence parameters could be divided into two categories. The first category was F_v/F_m , Yield, α , rP, σ_{PSII} and τ_{es} , whose values were not related to biomass changes and only represented the photosystem information of *Chlorella pyrenoidosa*. The toxicity test results obtained by these parameters were not affected by the change of initial biomass. When the initial chlorophyll concentration changed in the range of $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ diuron stress for 1 h and 3 h, the average values of the corresponding relative standard deviations of the six parameter test results were 2.74% and 3.12% respectively, and the toxicity test results were stable. The second category of parameters was E_k , F_0 , F_m , F_v and JVP II. Their values were affected by biomass and contain biomass information. Among them, E_k was negatively correlated with chlorophyll concentration, and F_0 , F_m , F_v and JVP II were positively correlated with chlorophyll concentration. The toxicity test results of these parameter were obviously affected by biomass fluctuation and their stability became worse. When the chlorophyll concentration changed in the range of $20\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the average values of relative standard deviation of the five parameter test results under $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ diuron stress for 1 h and 3 h were 14.66% and 17.27% respectively. 2) The Logistic model was selected for dose-effect analysis, and the photosynthetic fluorescence parameters F_v/F_m , Yield, α , rP, σ_{PSII} , τ_{es} , F_0 , F_m and F_v could establish a good dose-effect relationship with diuron. According to EC_{50} , EC_{20} and correlation coefficient R^2 , the optimal range of initial chlorophyll concentration of algae when photosynthetic fluorescence parameters were used as the end point of toxicity test were given. For parameters F_v/F_m , Yield, α , rP, σ_{PSII} , and τ_{es} , due to population dependence, too low biomass would affect the photosynthetic physiological state of algae species, the recommended initial chlorophyll concentration range was $10\sim 2\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; for parameters F_0 , F_m and F_v , more sensitive toxicity test results (lower EC_{20}) could be obtained due to higher initial biomass, the recommended range was $200\sim 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. This result provides an important basis for the establishment of a rapid detection method for water quality biological toxicity based on algal photosynthetic fluorescence parameters, and will be helpful for ecological risk assessment of the aquatic environment.

Key words: Bio-optics; Initial biomass; Photosynthetic fluorescence parameters; Diuron; Toxicity detection

OCIS Codes: 170.1420; 260.2510; 260.5130; 260.2160