

基于藻类光合作用抑制效应的敌草隆毒性响应参数研究

胡丽^{1,2}, 陈敏^{2,3}, 殷高方^{2*}, 赵南京², 甘婷婷²

1. 合肥师范学院物理与材料工程学院, 安徽 合肥 230061
2. 中国科学院安徽光学精密机械研究所中科院环境光学与技术重点实验室, 安徽 合肥 230031
3. 中国科学技术大学研究生院科学岛分院, 安徽 合肥 230026

摘要 藻类作为单细胞生物, 其个体小、易培养、对毒物敏感、且能够观察细胞水平上的中毒症状, 是快速检测水质生物毒性的理想受试生物。“藻类生长抑制试验”依赖于藻类细胞的繁殖代谢过程, 测量周期长, 无法满足生物毒性快速检测的需求。藻类光合作用过程对污染物毒性的响应速度和灵敏度显著优于“藻类生长抑制试验”, 以藻类光合作用状态为毒性测试指标可大幅缩短毒性检测时间。现有“光合作用抑制实验”多采用可变荧光 F_v 或最大光化学量子产量 F_v/F_m 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, 造成生物毒性定量检测的灵敏度不高。以蛋白核小球藻为受试对象, 以叶绿素荧光作为藻类光合作用状态快速无损探针, 采用荧光动力学手段测量藻类光合荧光参数, 对典型除草剂 DCMU 抑制下的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 DCMU 胁迫效应的关键光合参数, 提高 DCMU 生物毒性检测的速度和灵敏度。结果显示: (1) DCMU 对光合荧光参数 F_0 , F_m , σ_{PSII} , τ_{QA} , F_v , F_v/F_m , Yield, rP , NPQ, α 响应显著, 其中参数 α , rP , F_v/F_m , yield 和 NPQ 在 5 min 即呈现出类似时长(96 h)的响应效应; (2) 参数 α , rP , F_v/F_m , yield 和 NPQ 的 5 min 抑制程度对 DCMU 浓度具有良好的剂量效应关系。其中, 参数 NPQ 的相关系数和 $EC_{50-5\ min}$ 分别为 0.998 5 和 $2.41\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著优于其他四个参数, 且优于 96 h 的测量结果。采用光合荧光参数 NPQ 作为 5 min 定量测量 DCMU 生物毒性的反应终点, 可极大缩短 DCMU 生物毒性的检测时间(从 96 h 缩短至 5 min), 并显著提高检测灵敏度(与光合抑制方法常规参数 F_v/F_m 相比, EC_{50} 降低了 81.4%)。实验结果为基于藻类光合抑制效应的 DCMU 生物毒性定量检测提供了基础数据, 研究方法也为其他污染物胁迫下的藻类光合荧光参数筛选提供了参考。

关键词 生物光学; 敌草隆; 蛋白核小球藻; 光合荧光参数; 毒性响应

中图分类号: X832 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)05-1519-06

引言

随着现代化农业的快速发展, 各种各样除草剂被过量使用, 大量残存的除草剂进入水环境中, 给流域生态环境、水产养殖和饮水安全带来巨大威胁^[1]。区别理化分析方法, 水质生物毒性检测方法利用生物在胁迫条件下的生理或行为等变化衡量污染物毒性, 能综合反映污染物对生态系统的危害程度, 满足生态环境风险评估需求^[2]。藻类作为单细胞生物, 其个体小、繁殖快、对毒物敏感、易于培养, 是水质生物

毒性检测的理想受试生物^[3], 国际经合组织将“藻类生长抑制试验”列为化学品毒性测试标准方法, 以 96h 作用下藻类细胞密度生长的半数抑制效应浓度(EC_{50})来表征急性毒性作用的程度。然而, “藻类生长抑制试验”依赖于藻类细胞的繁殖代谢过程, 毒性响应慢, 测量周期长^[4], 已有研究表明细胞形态结构破坏、细胞酶活性变化、遗传物质损伤等抑制细胞生长因素都会作用于光合作用过程^[5], 其响应速度和灵敏度明显优于“藻类生长抑制试验”^[6]。近年来, 人们开展了一些污染物毒性的藻类光合抑制实验, 荧光测量多跟随国外技术(如 PAM^[7]), 获得的光合荧光参数大多与可变荧光 F_v 或

收稿日期: 2020-05-11, 修订日期: 2020-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(61875204, 61805254), 安徽省科技重大专项(202003a0702007), 安徽省杰出青年科学基金项目(1908085J23), 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), 安徽高校联合重点实验室开放课题(2020GDTC04)资助

作者简介: 胡丽, 女, 1981年生, 合肥师范学院物理与材料工程学院副教授 e-mail: 442716134@qq.com

* 通讯作者 e-mail: gfyin@aiofm.ac.cn

最大光化学量子产量 F_v/F_m 有关。已有研究也多选用 F_v 或 F_v/F_m 表征藻类受胁迫程度^[8], 如 Mallick 等^[9] 实验证明 (F_0/F_v) 是评估重金属毒性的最佳参数; Pérez 等^[10] 研究认为可变荧光 (F_v) 对 Cu^{2+} 胁迫响应最为快速敏感; Tiam 等^[11] 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, 研究者发现不同类型污染物对藻类细胞产生毒性效应的光合作用位点和损伤程度具有明显差异, 与之对应的敏感荧光参数差异较大^[12]。现有研究采用单一、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, 造成生物毒性定量检测的灵敏度不高。因此, 针对特定污染物 (如除草剂), 在准确获得多个光合荧光参数的基础上, 如何从众多的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, 成为当前该领域急需解决的问题。

本研究以蛋白核小球藻为受试对象, 以叶绿素荧光作为藻类光合作用状态快速无损探针, 采用荧光动力学手段测量藻类光合荧光参数, 对典型除草剂敌草隆 (dichlorophenyl dimethylurea, DCMU) 抑制下的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 DCMU

胁迫效应的关键光合参数, 提高 DCMU 生物毒性检测的速度和灵敏度。

1 实验部分

1.1 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^[8], 实验在 100 mL 三角锥形瓶中进行, 量取藻液 50 mL, 实验藻类初始叶绿素浓度控制在 $100 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, DCMU 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, DCMU 抑制液浓度梯度设定为 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 和 $160 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个样品设置 3 个平行样。

1.2 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研制) 测量^[13]。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 (FLC 曲线), 能够在数十秒内准确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, 得到的光合荧光参数如表 1 所示。

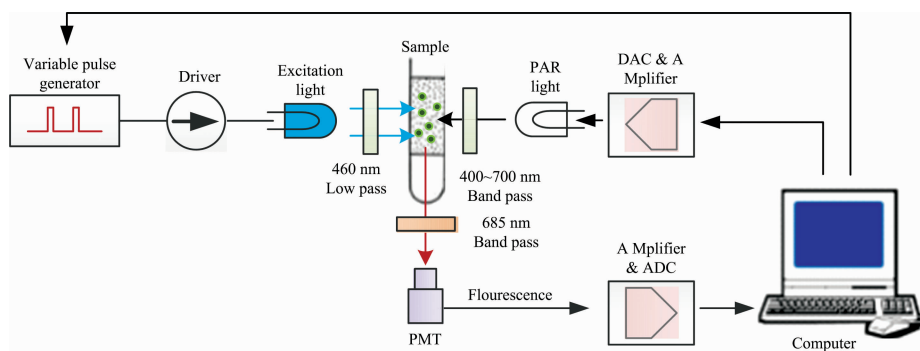


图 1 可变光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪结构示意图

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

表 1 可变光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪测量得到的光合荧光参数

Table 1 Photosynthetic fluorescence parameters acquired by the chlorophyll fluorescence analyzer

序号	参数	参数来源	名称及意义
1	F_0	荧光动力学曲线	初始荧光
2	F_m	荧光动力学曲线	最大荧光
3	σ_{PSII}	荧光动力学曲线	PS II 功能吸收截面
4	τ_{QA}	荧光动力学曲线	质体醌平均还原时间常数
5	F_v	$F_m - F_0$	可变荧光, QA 氧化还原状态和其他耗散能量途径
6	F_v/F_m	$(F_m - F_0)/F_m$	最大光化学量子产率, 是最大的 PS II 光能转化效率
7	Yield	$(F_m' - F_s)/F_m'$	光照状态下 PS II 的实际量子产率
8	rP	$\text{PAR} \cdot \text{Yield} \cdot 0.84 \cdot 0.5$	PS II 相对光合电子传递效率
9	JVP II	$K_R \cdot F_m \cdot F_0 \cdot F_q' / (F_m' \cdot F_v' \cdot E_{\text{LED}})$	单位体积的 PS II 通量, 与初级生产力相关
10	NPQ	$(F_m - F_m')/F_m'$	非光化学淬灭, 反映植物耗散过剩光能为热的能力
11	α	rP 光响应曲线	最大光利用系数, 反映光能的利用效率
12	Ek	rP 光响应曲线	饱和和光强, 反映样品对强光的耐受能力

光合荧光参数对 DCMU 的响应结果以抑制率和促进率表征, 分别用 $Y_{抑制}$ 和 $Y_{促进}$ 表示, 其计算公式见式(1)和式(2)^[14]

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

$$Y_{促进} = \frac{X_i - X_0}{X_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, 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。

2 结果与讨论

根据预实验结果, 选取 DCMU 胁迫 5 min 后的对照组和实验组 12 个光合荧光参数, 利用成对样本 T 检验得到实验组与对照组的显著性差异, 初步筛选有显著性响应的参数。结果表明, DCMU 在蛋白核小球藻的多个光合作用位点都产生了抑制, 10 个光合荧光参数 F_0 , F_m , σ_{PSII} , τ_{QA} , F_v , F_v/F_m , Yield, rP , NPQ, α 存在显著性差异; JVP II 和 E_k 在测量浓度范围内出现了中浓度区域显著响应, 但低浓度和高浓度区域非显著性响应, 不适宜作为生物毒性定量检测的响应指标。因此, 选取上述 10 个显著响应参数, 进一步研究

DCMU 毒性作用下的时间和剂量效应关系。

2.1 时间效应关系

根据预实验结果, 实验测试周期设置为 5 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 96 h, 得到 10 个显著响应参数在 DCMU 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, 以藻类叶绿素含量(chlorophyll, Chl, 可变光脉冲诱导叶绿素荧光分析仪测量)代替藻类生物量, 得到 DCMU 抑制下的藻类生物量随时间的响应规律。

结果表明, 10 个光合荧光参数可分为三类: 第一类为表征藻类生长状态的参数 α , rP , F_v/F_m , yield 和 NPQ, 各参数的时间-效应趋势大致相同, 如图 2 所示。样液的抑制率在测量周期内呈现出先下降的趋势, 6 h 后抑制率达到最低值; 后呈现上升趋势, 48 h 后基本趋于稳定, 且此时的抑制率值基本和 5 min 的测量值持平。6 h 内抑制率下降可能与受试藻类毒性胁迫自适应有关, 但藻类细胞自适应能力达到极限后, 毒性胁迫效应将随时间延长呈增加趋势, 直至稳定, 这与文献[8]研究结果一致。因此, 考虑到生物毒性快速测量需求, 可以选择 5 min 作为定量测量的时间节点, 此时的测量数据可以代表长期(如 96 h)抑制效果。

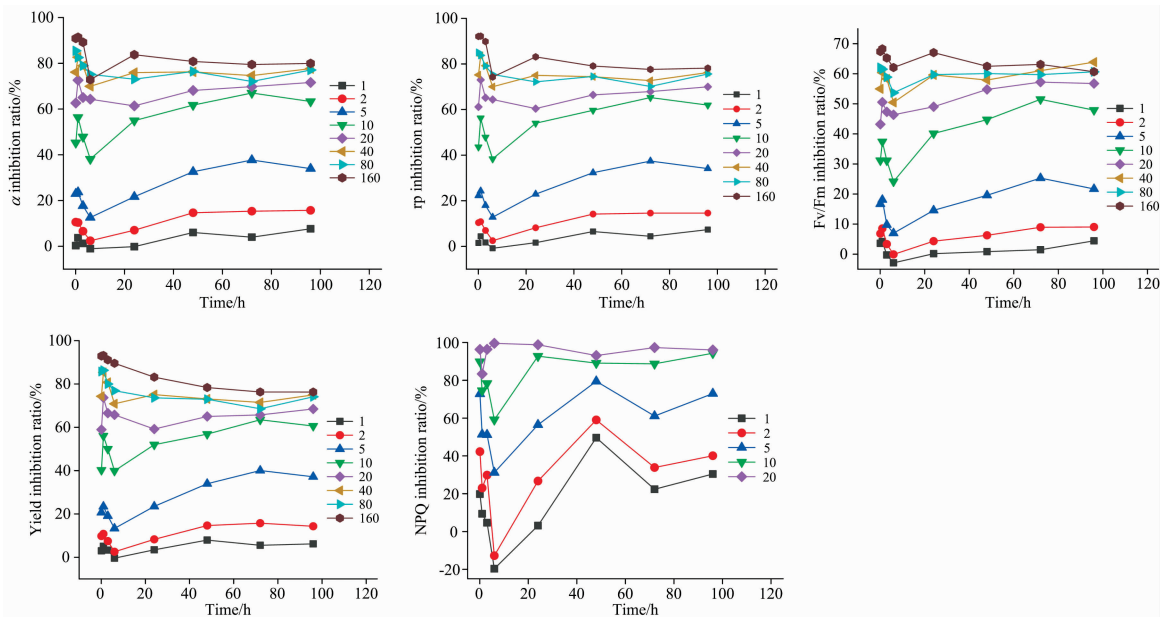


图 2 光合荧光参数 α , rP , F_v/F_m , yield 和 NPQ 时间响应变化趋势
Fig. 2 The variation trend of α , rP , F_v/F_m , yield and NPQ with time

第二类为 F_0 , F_m 和 F_v , 结果如图 3 所示。在整个测量周期内, 低浓度样液呈现出刺激生长效应, 在 48 h 后趋于稳定; 而中高浓度样液呈现先促进后抑制的效应, 6 h 为时间拐点, 之后抑制率随时间呈累积增长效应, 在 48 h 后趋于稳定, 这种先促进后抑制的趋势类似第一类参数, 与藻类毒性胁迫短期内的自适应效应和胁迫极限有关。同时, 对比上述参数和藻类生长抑制的时间响应规律(即 chl-a 含量随时间的变化趋势), 发现其响应规律类似, 说明参数 F_0 , F_m 和 F_v 除了与藻类的生长状态有关外, 还与藻类生物总量有关。因

此, 第二类参数同藻类生长抑制方法, 适合选取较长时间为定量测量的时间节点(如 48 h), 以获得较为稳定、精确的测试结果。

第三类为光合参数 σ_{PSII} 和 τ_{QA} , 此类参数的抑制率值在整个测量周期内都是负值, 为研究方便, 使用促进率表征参数对 DCMU 的响应规律, 如图 4 所示。样液的促进率在 6 h 内呈现出下降的趋势, 6 h 后随时间延长累积变化较小, 基本趋于稳定。因此, 可以选择 6 h 作为第三类参数毒性测量的时间节点, 确保此时的测量数据与长时间测量数据保持一

致, 避免短时测量出现假阳性的结果。

综合三类参数的时间响应规律, 考虑到 DCMU 生物毒性快速测量的需求, 选取 5 min 作为测量的时间节点, 第一

类参数 $Yield$, rP , α , Fv/Fm 和 NPQ 作为定量测量的关键光合参数, 进一步研究其剂量效应关系。

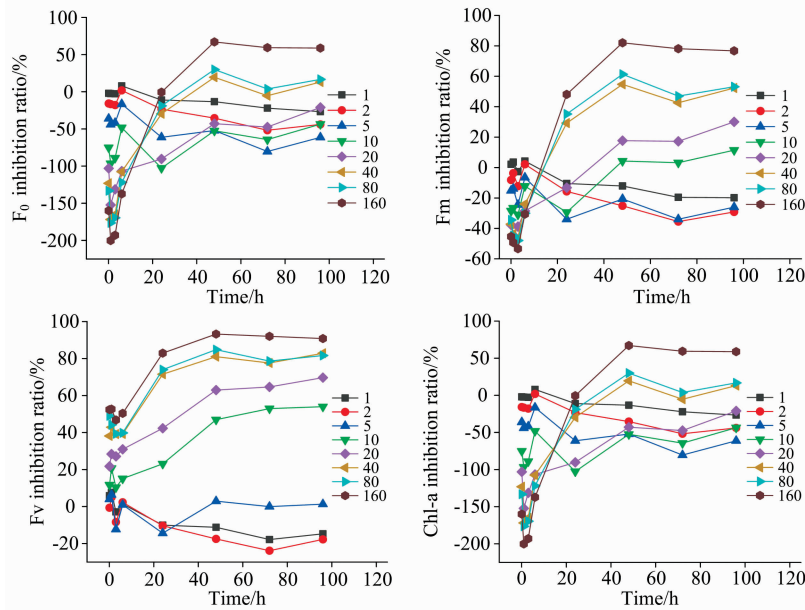


图 3 光合荧光参数 F_0 , F_m 、 F_v 和 Chl 时间响应变化趋势

Fig. 3 The variation trend of F_0 , F_m , F_v and Chl with time

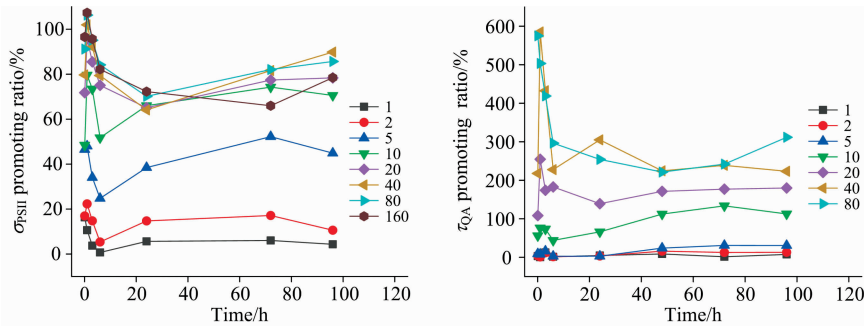


图 4 光合荧光参数 σ_{PSII} 和 τ_{QA} 时间响应变化趋势

Fig. 4 The variation trend of σ_{PSII} and τ_{QA} with time

2.2 剂量效应关系

根据 2.1 节, 进一步分析关键参数 $Yield$, rP , α , Fv/Fm 和 NPQ 在 DCMU 5 min 抑制时的剂量效应关系, 并与 96 h 长时抑制的剂量效应关系进行对比, 以确保短时测量结果的准确性和有效性。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)为基础进行非线性拟合^[15]。以抑制物浓度代表其毒性强度, 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, 得到对应的拟合相关系数及 EC_{50} 值。结果显示, DCMU 抑制 5 min 后, 参数 α , rP , Fv/Fm , $yield$ 和 NPQ 抑制率对 DCMU 浓度具有良好的剂量效应关系(如图 5), 拟合相关系数 R^2 分别为 0.996 9, 0.997 3, 0.998 5, 0.998 5 和 0.998 5, 由此得到的 $EC_{50-5 min}$ 值分别为 10.31, 11.59, 13.03, 13.94 和 2.41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 如

表 2 所示。对比 96 h 长时抑制的剂量效应关系, 结果表明参数 $Yield$, rP , α , Fv/Fm 的拟合相关系数短时效应优于长时

表 2 5 min 和 96 h 抑制的拟合相关系数和 EC_{50} 值

Table 2 The fitting correlation coefficient and EC_{50} value of 5 min and 96 h inhibition

参数	时间			
	5 min		96 h	
	R^2	$EC_{50-5 min}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	R^2	$EC_{50-96 h}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
α	0.996 9	10.31	0.993 0	6.50
rP	0.997 3	11.59	0.994 6	5.91
Fv/Fm	0.998 5	13.03	0.992 4	6.78
yield	0.998 5	13.94	0.997 2	5.21
NPQ	0.998 5	2.41	0.992 9	3.94

效应, 但 EC_{50} 值长时效应优于短时效应。同时, 实验还表明参数 NPQ 对 DCMU 毒性的响应灵敏度和响应速度极佳, 其 5 min 抑制对应的相关系数和 EC_{50} 优于其他四个参数, 且优

于 96h 的测量结果。因此, 可以选取参数 NPQ 作为 5min 定量测量 DCMU 生物毒性的响应指标, 既可大幅缩短检测时间, 还可以提高检测的灵敏度。

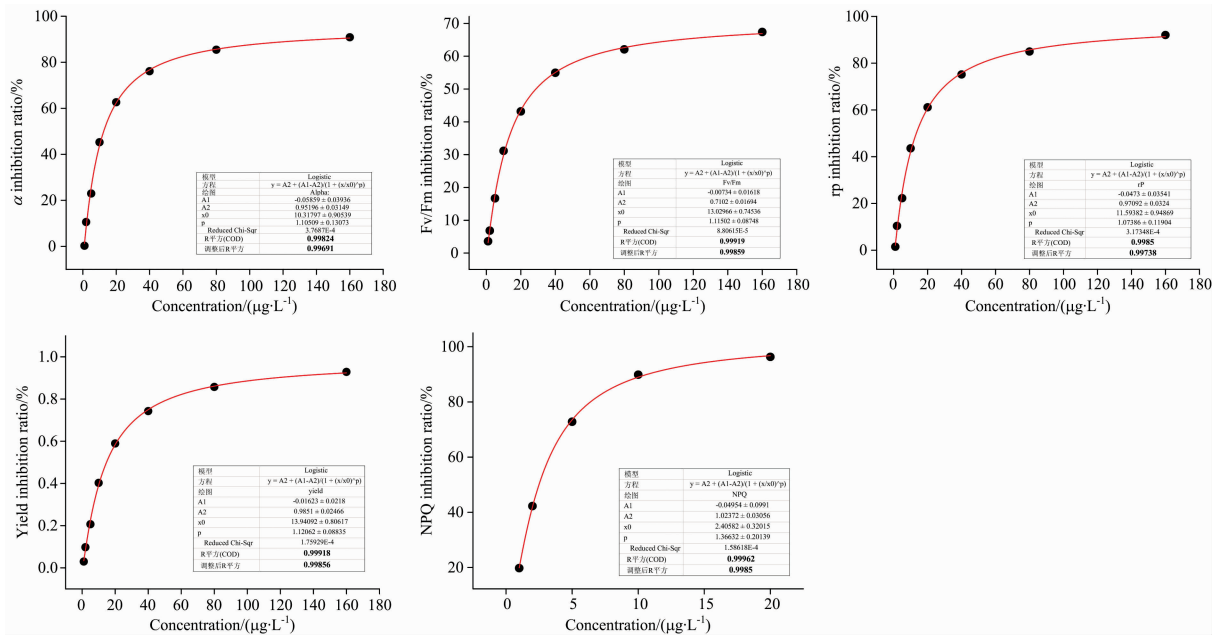


图 5 5 min 胁迫下 α , rP, Fv/Fm, yield 和 NPQ 值随 DCMU 浓度的变化趋势

Fig. 5 The trend of α , rP, Fv/Fm, yield and NPQ with DCMU concentration under 5 min stress

3 结论

基于藻类光合荧光参数的生物毒性监测方法, 具有响应快速、参数丰富、测量简捷的特点。对 DCMU 抑制下的多个光合荧光参数毒性响应敏感性进行了对比分析, 首先通过对样本 T 检验, 得到光合荧光参数 F_0 , F_m , σ_{PSII} , τ_{QA} , F_v , F_v/F_m , Yield, rP, NPQ, α 显著响应; 通过分析显著响应参数的时间-效应规律, 得到参数 α , rP, Fv/Fm, yield 和 NPQ 在 5 min 即体现出类似长时抑制效应的关系, 5 min 可作为 DCMU 毒性分析的时间测量节点; 最后, 研究 5 min 胁迫下 DCMU 浓度与参数 α , rP, Fv/Fm, yield, NPQ 抑制率

之间的剂量-效应关系, 利用 Logistic 函数进行拟合, 同时对 96 h 长时抑制的剂量效应关系, 结果显示参数 NPQ 的相关系数和 EC_{50} 分别为 0.998 5 和 2.41 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著优于其他四个参数, 且优于 96 h 的测量结果。因此, 采用光合荧光参数 NPQ 作为 5 min 定量测量 DCMU 生物毒性的反应终点, 可极大缩短 DCMU 生物毒性检测的检测时间(从数小时缩短至 5 min), 并显著提高检测灵敏度(与光合抑制方法常规参数 Fv/Fm 相比, EC_{50} 降低了 81.4%)。实验结果为基于藻类光合抑制效应的 DCMU 生物毒性定量检测提供了基础数据, 研究方法也为其他污染物胁迫下的藻类光合荧光参数筛选提供了参考。

References

[1] Malaj E, Peter C, Grote M, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(26): 9549.
 [2] Collins F S, Gray G M, Bucher J R. Science, 2008, 319(5865): 906.
 [3] WANG Ying-cai, WANG Shu-lei, HU Wen, et al(王英才, 王树磊, 胡文, 等). The Changjiang River(人民长江), 2017, 48(11): 21.
 [4] Puiseux-Dao S. "Phytoplankton Model" in Ecotoxicology, Chemical Rubber Company Press, 2018: 163.
 [5] XIE Yan, LI Zong-yun, FENG Lin, et al(谢艳, 李宗芸, 冯琳, 等). Environmental Science & Technology(环境科学与技术), 2008, (12): 83.
 [6] Beaulieu M, Cabana H, Huot Y. Science of the Total Environment 2020, 712: 136239.
 [7] Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method; An Overview. Springer-Verlag Press, 2004: 279.
 [8] CHEN Min, YIN Gao-fang, ZHAO Nan-jing, et al(陈敏, 殷高方, 赵南京, 等). Acta Optica Sinica(光学学报), 2019, 39(12): 1217002.
 [9] Mallick N, Mohn F H. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 55(1): 64.

- [10] Pérez P, Fernández E, Beiras R. Water, Air, & Soil Pollution, 2010, 209(1-4): 345.
- [11] Tiam S K, Laviale M, Feurtet-Mazel A, et al. Aquatic Toxicology, 2015, 165: 160.
- [12] Lysenko E A, Klaus A A, Kartashov A V, et al. Photosynthesis Research, 2019, 139(1-3): 337.
- [13] QIN Zhi-song, ZHAO Nan-jing, YIN Gao-fang, et al(覃志松, 赵南京, 殷高方, 等). Acta Optica Sinica(光学学报), 2017, 37(7): 073002.
- [14] DUAN Jing-bo, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, et al(段静波, 刘文清, 张玉钧, 等). Acta Optica Sinica(光学学报), 2013, 33(6): 295.
- [15] Gan Tingting, Zhao Nanjing, Yin Gaofang, et al. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2019, 197: 111551.

Toxicity Response Parameters of Diaquilone Based on Photosynthetic Inhibition Effect of Algae

HU Li^{1,2}, CHEN Min^{2,3}, YIN Gao-fang^{2*}, ZHAO Nan-jing², GAN Ting-ting²

1. Physics and Materials Engineering College, Hefei Normal University, Hefei 230061, China

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

3. University of Science and Technology of China, Graduate School of Science Island, Hefei 230026, China

Abstract As single-celled organisms, algae were small in size, easy to culture, sensitive to poisons, and able to observe toxic symptoms at the cellular level. They were ideal test organisms for rapid detection of biotoxicity in water quality. However, “algal growth inhibition test” relied on the reproductive and metabolic process of algal cells, and the measurement cycle was long, so it could not meet the needs of rapid detection of biological toxicity. The response speed and sensitivity of algae’s photosynthetic process to the toxicity of pollutants were significantly better than that of the “algal growth inhibition test”. The variable fluorescence F_v or maximum photochemical quantum yield F_v/F_m were mostly used as the endpoint of the biotoxicity reaction in the existing “photosynthesis inhibition experiments”, and the lack of comparative analysis on the sensitivity of response of multiple photosynthetic fluorescence parameters led to the low sensitivity of quantitative biotoxicity detection. Planktonic algae were ideal biotoxic test subjects, and *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 DCMU toxicity, to improve the speed of DCMU biological toxicity test and sensitivity, in this paper. The results showed: (1) The photosynthetic fluorescence parameters F_0 , F_m , σ_{PSII} , τ_{QA} , F_v , F_v/F_m , Yield, rP , NPQ, α under DCMU toxicity were significantly responsive, and the responses of α , rP , F_v/F_m , Yield, NPQ in 5 minute were similar to the responses in 96 hour. (2) The inhibitory effect of α , rP , F_v/F_m , Yield, NPQ had a good dose-effect relationship with DCMU concentration. The correlation coefficient of parameter NPQ and EC_{50} were 0.998 5 and $2.41 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, which are significantly better than the other four parameters and the measurement result of 96 hour. If the photosynthetic fluorescence parameter NPQ was used as the endpoint of 5 min quantitative measurement of DCMU biotoxicity, then the detection time of DCMU biotoxicity detection could be greatly shortened (from several hours to 5 min) and the detection sensitivity could be significantly improved (EC_{50} was 81.4% lower than the result which was calculated through the conventional parameter F_v/F_m). The experimental results provided basic data for the quantitative detection of DCMU biotoxicity based on the photosynthetic inhibition effect of algae, and the research method also provided a reference for the screening of photosynthetic fluorescence parameters of algae under the stress of other pollutants.

Keywords Biotechnology; Dichlorophenyl dimethylurea; *Chlorella pyrenoidosa*; Photosynthetic fluorescence parameters; Toxicity response

(Received May 11, 2020; accepted Aug. 26, 2020)

* Corresponding author