

DOI: 10.3969/j.issn.1673-6141.2023.02.005

# 光合抑制法水质毒性检测中藻类培养 光照与温度实验分析

陈金计<sup>1,3</sup>, 殷高方<sup>1,3\*</sup>, 赵南京<sup>1,3\*</sup>, 张小玲<sup>2</sup>, 甘婷婷<sup>1</sup>, 陈敏<sup>1</sup>,  
亓培龙<sup>1</sup>, 丁志超<sup>1</sup>, 谷梦园<sup>1</sup>, 王翔<sup>1</sup>, 董鸣<sup>1</sup>, 华卉<sup>1</sup>, 王璐<sup>1</sup>

(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,  
安徽 合肥 230031;

2 安徽大学物质科学与信息技术研究院信息材料与智能感知安徽省实验室, 安徽 合肥 230039;

3 合肥学院生物食品与环境学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:** 浮游藻类作为单细胞生物,其光合活性外界胁迫作用响应灵敏,是水质综合毒性检测的良好受试生物,因此认识受试藻种光合活性状态对温度和光照等主要环境因子的响应规律,掌握有效控制受试藻种光合活性状态和浓度的培养条件,对水质综合毒性检测至关重要。以模式受试生物蛋白核小球藻为研究对象,研究了不同温度梯度和光照强度下蛋白核小球藻光合活性变化规律。研究结果显示:蛋白核小球藻在不同梯度光照下,藻种光合活性和藻种浓度的变化非常明显。低光照下(75  $\mu\text{E}$ 、125  $\mu\text{E}$ )藻种平均光合活性在0.60左右但藻种浓度基本不增加;中光照下(175、225、300、375  $\mu\text{E}$ )藻种平均光合活性在0.57左右且此时藻种浓度有明显增加,其中,实验最佳光照为375  $\mu\text{E}$ ;高光照下(475  $\mu\text{E}$ 和600  $\mu\text{E}$ )藻种平均光合活性低于0.56(初始活性),会对藻种的生长状态产生胁迫。不同梯度温度下藻种光合活性和藻种浓度也有明显变化,中低温下(5、15、25  $^{\circ}\text{C}$ )藻种平均光合活性在0.59左右且藻种浓度随着温度的升高而增加,最佳温度为25 $^{\circ}\text{C}$ ;高温下(30、35、40  $^{\circ}\text{C}$ )藻种光合活性迅速下降直至失活。研究结果表明可以通过控制光照和温度来控制浮游藻类的光合活性和生长速度,为在线水质综合毒性测量仪提供标准的受试藻样培养方式,从而给便携式水质综合毒性测量仪的研发奠定基础。

**关键词:** 浮游藻类;光合活性;叶绿素荧光;环境因子

中图分类号: X853

文献标识码: A

文章编号: 1673-6141(2023)02-133-008

## Experimental analysis of illumination and temperature of algae culture in water toxicity detection by photosynthesis inhibition method

CHEN Jinji<sup>1,3</sup>, YIN Gaofang<sup>1,3\*</sup>, ZHAO Nanjing<sup>1,3\*</sup>, ZHANG Xiaoling<sup>2</sup>, GAN Tingting<sup>1</sup>,  
CHEN Min<sup>1</sup>, QI Peilong<sup>1</sup>, DING Zhichao<sup>1</sup>, GU Mengyuan<sup>1</sup>, WANG Xiang<sup>1</sup>,  
DONG Ming<sup>1</sup>, HUA Hui<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Environmental Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, HFIPS,

基金项目: 安徽省科技重大专项(202003a07020007),安徽省杰出青年科学基金项目(1908085J23),国家自然科学基金项目(61875207、61805254、62005001),中科院仪器设备功能开发技术创新项目(Y93H3g1251)

作者简介: 陈金计(1996-),安徽合肥人,硕士研究生,主要从事浮游藻类光生物反应器在线测控技术研究。E-mail: jinjichen@aiofm.ac.cn

导师简介: 殷高方(1979-),安徽安庆人,博士,研究员,博士生导师,主要从事水体生态/生物光学检测新方法与新技术研究工作。

E-mail: gfvn@aiofm.ac.cn

赵南京(1976-),安徽砀山人,博士,研究员,博士生导师,主要从事环境污染光学与光谱学监测新技术与方法研究。

E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2021-04-07; 修改日期: 2021-06-03

\*通信作者。

Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2 Anhui Laboratory of Information Materials and Intelligent Perception, Institute of Material Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230039, China;

3 College of Biological Food and Environment, Hefei University, Hefei 230601, China )

**Abstract:** Planktonic algae are single-celled organisms, and their photosynthetic activity responds sensitively to external stress, so they are good test organisms for the comprehensive toxicity test of water quality. Obtaining the response law of the photosynthetic activity state of the tested algae species to the main environmental factors such as temperature and light, and mastering the culture conditions that effectively control the photosynthetic activity state and concentration of the tested algae species are essential for the comprehensive toxicity detection of water quality. Taking the model test organism *Chlorella pyrenoidosa* as the research object, the changes of photosynthetic activity of *Chlorella pyrenoidosa* under different temperature gradients and light intensities were studied in this work. The results show that the changes of photosynthetic activity and concentration of the algae species under different gradient illuminations are very obvious. Under low light (75  $\mu\text{E}$ , 125  $\mu\text{E}$ ), the average photosynthetic activity of algae species is about 0.60 while the concentration of algae species basically does not increase. Under medium light (175, 225, 300, 375  $\mu\text{E}$ ), the average photosynthetic activity of algae species is around 0.57 and the concentration of algae species has increased significantly at this time. Among them, the best lighting for the experiment is 375  $\mu\text{E}$ . Under high light (475  $\mu\text{E}$  and 600  $\mu\text{E}$ ), the average photosynthetic activity of the algae species is lower than 0.56 (initial activity), which can stress the growth state of the algae species. It is also shown that the photosynthetic activity and concentration of algae species also changes significantly under different gradient temperatures. At medium and low temperatures (5, 15, 25  $^{\circ}\text{C}$ ), the average photosynthetic activity of algae species is about 0.59, the concentration of algae species increases with the increase of temperature, and the best temperature is 25  $^{\circ}\text{C}$ . Under high temperature (30, 35, 40  $^{\circ}\text{C}$ ), the photosynthetic activity of the algae species declines rapidly until inactivation. It is indicated that the photosynthetic activity and growth rate of planktonic algae can be controlled by controlling light and temperature, which can provide a standard method for cultivating the tested algae samples for a online water quality comprehensive toxicity meter, thereby laying a foundation for the development of the portable water quality comprehensive toxicity meter.

**Key words:** planktonic algae; photosynthetic activity; chlorophyll fluorescence; environmental factors

## 0 引言

浮游藻类个体小、繁殖快、对污染物响应灵敏,是检测水质综合毒性的理想受试生物<sup>[1,2]</sup>。藻类光合活性可以反映藻细胞的"生长潜力",常被用来表征自然水体综合毒性,反映水环境污染程度。已有研究表明藻类光合活性参数  $F_v/F_m$  对污染物毒性响应稳定且敏感<sup>[3]</sup>。但对毒性测试进行深入研究时<sup>[4-7]</sup>,发现利用藻类光合活性进行毒性测试在一定程度上受到受试藻种的初始光合活性和浓度的影响,而光照和温度是影响受试

藻类初始状态的主要因素。此外,作为毒性受试对象,受试浮游藻类样品需要保持适当的浓度和较高的光合活性<sup>[8]</sup>。因此,获得藻类生长环境因子,尤其是光照强度和温度等主要环境因子<sup>[9]</sup>,对研究藻种光合活性及生长速率变化的影响规律尤为必要,其中控制受试藻类状态对水质综合毒性测试是必不可少的。但是目前针对环境因子对受试藻种生长的影响规律方面的研究主要集中在实现浮游藻类大规模培养方面,如Kim等<sup>[10]</sup>通过控制藻类附着面板的倾斜角度使得浮游藻类生长速率达到实验最大值 $22\text{ g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ ,Cheng等<sup>[11]</sup>通过改进曝气器的孔径和长径比将培养96 h的节旋藻生物量从0.752 g增加到了1.297 g,而对于毒性测试受试藻类光合活性和浓度对光照和温度响应规律的研究却相当缺乏。

本文拟通过研究不同光照和温度对受试藻种光合活性和浓度的影响规律,为水质综合毒性检测方法寻找浮游藻类最佳培养和控制条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种培养与实验仪器

本研究采用武汉水生所淡水藻种库中的蛋白核小球藻作为实验对象,生长环境为BG11培养基。

研究所用仪器包含以下几种:多通道藻培养仪(MC1000-8,捷克PSI),一种具备8个在 $0\sim 1000\ \mu\text{E}$ 范围内光强独立可调的光源通道的光照控制调节设备;多层叠加式恒温振荡培养箱(IS-6L,美国精骐),一种在 $4\sim 60\ ^\circ\text{C}$ 范围内温度可控、误差为 $\pm 0.1\ ^\circ\text{C}$ 的温度控制调节设备;脉冲调制荧光测量仪(PAM, water-PAM,德国WALZ),一种光合荧光参数( $F_v/F_m$ )信号采集设备,测量前需进行5 min暗反应来保证测量准确度;紫外分光光度计(日本岛津UV2600),对藻液通过680 nm光波长下光密度(OD)的测量值进行标定,可测量叶绿素浓度的设备。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 蛋白核小球藻光合活性受光照因子影响规律研究

在无菌环境下,将培养至对数生长期的蛋白核小球藻按1:5稀释后,移液至8个可调节光源通道中,采用气泵24 h匀速泵气的方式保证光照均匀与藻类呼吸。实验中8个对照组光照强度从高到低依次调节为600、475、375、300、225、175、125、75  $\mu\text{E}$ ,光暗时间比为12 h:12 h;实验期间恒温 $25\ ^\circ\text{C}$ 。

实验开始前,对稀释后的样品进行测量,样品的初始浓度和初始活性分别为 $\text{OD} = 0.13$ 、 $F_v/F_m = 0.568$ ,样品每天的细胞浓度与光合活性需在同一时间点进行测量,间隔时间为24 h。为减小实验误差,每个样品设置3组平行组进行测量,取其平均值,实验周期设置为8 d。

#### 1.2.2 蛋白核小球藻光合活性受温度因子影响规律研究

在无菌环境下,将培养至对数生长期的蛋白核小球藻按1:5稀释后,移液至灭菌培养罐中,分别放置在多层恒温振荡培养箱的每一层,设置恒定光照强度 $120\ \mu\text{E}$ ,光暗时间比为12 h:12 h,转速 $80\ \text{rad}/\text{min}$ 。实验中6个对照组温度从高到低依次调节为 $40$ 、 $35$ 、 $30$ 、 $25$ 、 $15$ 、 $5\ ^\circ\text{C}$ ,实验周期设置为8 d。

同样,实验开始前,对稀释后的样品初始参数进行测量,样品每天的细胞浓度与光合活性需在同一时间点进行测量,间隔时间为24 h。为保证实验的可重复性,每组实验设置3个平行样品,取3组藻类平行样品的测量平均值作为实验数据。

## 2 结果分析

### 2.1 蛋白核小球藻对光照因子的响应规律

#### 2.1.1 藻种光合活性对光照的响应规律

蛋白核小球藻在600、475、375、300、225、175、125、75  $\mu\text{E}$  8个光源通道下光合活性变化趋势如图1所示。从图中可以看出,在实验设置的不同光源通道下,蛋白核小球藻 $F_v/F_m$ 值的阈值为0.5~0.7。其中,在低光照组(75  $\mu\text{E}$ 、125  $\mu\text{E}$ )下光合活性水平较高, $F_v/F_m$ 的值分别为0.632和0.616;在中光照组(175、225、300、375  $\mu\text{E}$ )下光合活性相对于初始 $F_v/F_m$ 值无明显变化, $F_v/F_m$ 的值分别为0.567、0.566、0.552、0.559;在高光照组(475  $\mu\text{E}$ 和600  $\mu\text{E}$ )下光合活性相对于初始 $F_v/F_m$ 值明显降低, $F_v/F_m$ 的值分别为0.544和0.529。

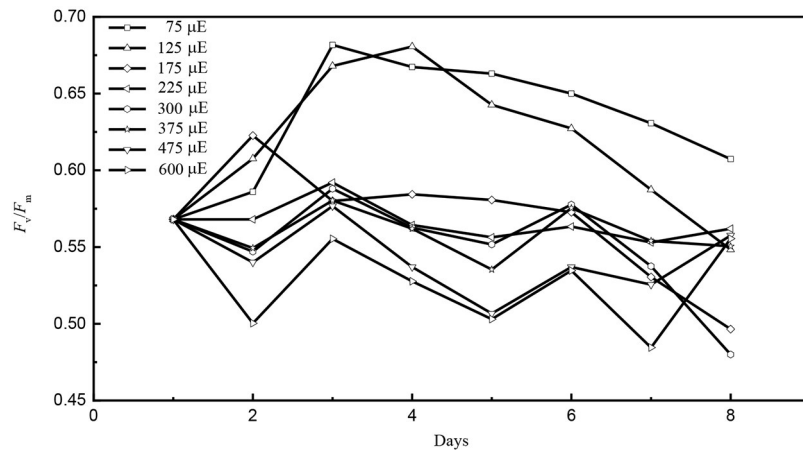


图1 不同光照下蛋白核小球藻光合活性变化趋势

Fig. 1 Change of photosynthetic activity of *Chlorella pyrenoidosa* under different light conditions

图1结果表明,低光照环境能够促进藻类的光合作用能力;中低光照环境下,藻类的光合作用能力能够维持在一个较为稳定的水平;高光照环境下,光照因子可能会抑制藻类的光合作用能力,具有一定的胁迫作用。这可能与藻类本身光合作用自我调节保护机制有关,即光强较弱的环境下,藻种细胞通过提高细胞内叶绿素a的含量,提高藻种细胞对光能的利用能力;在适当的光照范围内,藻种细胞能够通过这种调节机制增加自身的光合活性与环境抗逆性,但是超过这个光照范围,藻种细胞的自我调节能力就会逐渐失效<sup>[12-14]</sup>。

#### 2.1.2 藻种浓度对光照的响应规律

蛋白核小球藻在不同光源通道下细胞浓度的变化趋势如图2所示( $\text{OD}_{680}$ 为680 nm波长下的光密度)。由图可知,在低光照环境下,细胞浓度基本没有增加,在中高光照环境下,它的细胞浓度均有不同程度的增加。其中,在375  $\mu\text{E}$ 和475  $\mu\text{E}$ 光照环境下,藻种细胞浓度有明显增加;300  $\mu\text{E}$ 和600  $\mu\text{E}$ 次之,但在培养后期,藻种细胞在这四种光照环境下,细胞浓度的增长速率渐渐放缓;在175  $\mu\text{E}$ 和225  $\mu\text{E}$ 光照环境下,藻种细胞浓度呈持续缓慢增加趋势。

结合图1和图2分析发现,在375  $\mu\text{E}$ 和475  $\mu\text{E}$ 光照环境下,蛋白核小球藻细胞浓度增加最多,两种环境下的光合活性测量的值分别为0.559和0.544,通过对比图1和图2,可知375  $\mu\text{E}$ 是蛋白核小球藻实验的最适光照强度。在小于375  $\mu\text{E}$ 的光照环境下,蛋白核小球藻光合活性测量的值均高于初始活性,随着光照强度

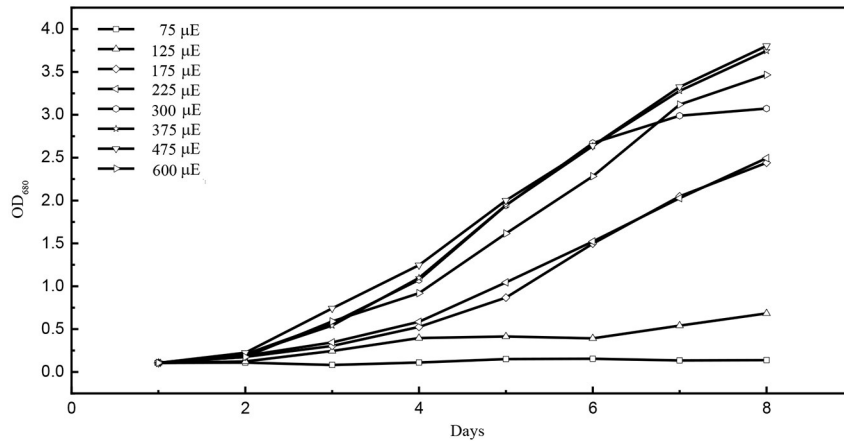


图 2 不同光照下蛋白核小球藻浓度变化趋势

Fig. 2 Change trend of *Chlorella pyrenoidosa* concentration under different illumination

的增加, 藻种细胞的浓度也随之增加, 因此, 当光强低于 375 μE 时, 它能保持一个较高的光合活性, 通过提高光强可以相应调节藻种细胞的细胞浓度。

## 2.2 蛋白核小球藻对温度因子的响应规律研究

### 2.2.1 藻种光合活性对温度的响应规律

蛋白核小球藻在 40、35、30、25、15、5 °C 六个不同温度下的光合活性变化趋势如图 3 所示。在不同温度下 *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* 测量值的变化范围为 0~0.6, 在中低温 (5、15、25 °C) 环境下, 其光合活性明显提高, *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* 的测量值分别为 0.598、0.592 和 0.584; 在高温 (30、35、40 °C) 环境下, 藻种细胞的光合活性呈现不断下降的趋势, 直到最后失去活性 (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* 接近于 0), 其中在 40 °C 环境下的下降速度最快。

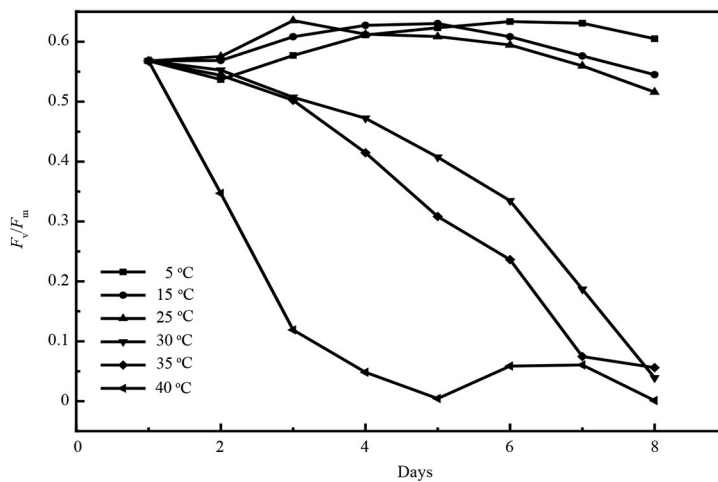


图 3 各梯度温度下光合活性变化趋势

Fig. 3 Change trend of photosynthetic activity at various gradient temperatures

图 3 结果表明, 在中低温环境下, 藻种细胞的光合作用能力维持在一个较为稳定的水平; 而在高温环境下, 温度则会抑制藻类的光合作用能力, 具有很强的胁迫作用。这可能与藻种细胞内光合作用酶的活性在高温环境下会降低有关, 长时间处于高温环境下的光合作用酶可能因为蛋白质变性而失活, 藻种细胞的细胞膜



也可能因此而破坏,从而导致光合活性的急剧下降直至失活<sup>[15]</sup>。

### 2.2.2 藻种浓度对温度的响应规律

蛋白核小球藻在不同温度环境下细胞浓度变化趋势如图4所示。由图可知,各个温度环境下藻种细胞浓度增长不一。在25℃温度环境下,藻种细胞浓度相比于其他温度上升速度最快;在5℃温度环境下,藻种细胞浓度相比于其他温度上升速度最慢;在15、30、35℃温度环境下藻种细胞浓度相比于其他温度上升速度几乎一样;在40℃温度环境下,藻类样品浓度相比于其他温度呈现先上升后下降的趋势。

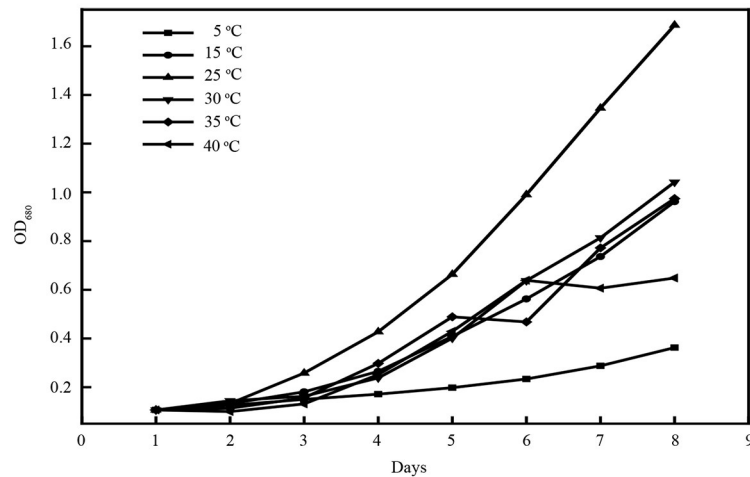


图4 各梯度温度OD值变化曲线

Fig. 4 OD value change curve of each gradient temperature

结合图3和图4分析发现,在5、15、25℃温度环境下,藻种细胞的光合活性保持在一个较高的水平,光合活性测量的值分别为0.598、0.592、0.584;同时,在该温度范围下,藻种细胞浓度与时间呈正相关,且在25℃温度环境下,细胞浓度上升速度最快,因此综合分析表明,藻种细胞的实验最佳温度为25℃。在低于25℃温度环境下,蛋白核小球藻的光合活性测量平均值普遍大于0.56,此时,温度对藻种细胞光合活性没有胁迫作用,且细胞浓度与温度有着明显的正相关关系。因此,当控制温度低于25℃时,蛋白核小球藻的光合活性状态维持在一个较高的水平,可以通过在一定范围内控制温度环境来控制藻种细胞的细胞浓度。

## 3 结论

研究了受试藻种在不同光照和温度环境下的光合活性和细胞浓度的变化规律,结果表明,一方面蛋白核小球藻的最佳实验光照为375 μE,在控制光强小于375 μE时,其光合活性测量平均值均高于初始活性0.56,说明蛋白核小球藻光合活性不受光照的胁迫作用,且光照强度增加的同时,藻种细胞浓度也随之增加;另一方面蛋白核小球藻的最佳实验温度为25℃,在控制温度小于25℃时,蛋白核小球藻的光合活性测量平均值均高于初始活性0.56,蛋白核小球藻光合活性不受温度的胁迫作用,且温度增加的同时,藻种细胞浓度也随之增加。因此,根据水质综合毒性在线测量仪的需求,可将受试藻类培养光照和温度分别控制375 μE、25℃以下,从而保证蛋白核小球藻处于较高光合活性状态,并且,可以根据测量需要,通过控制光照和温度的水平将藻样浓度控制在合适的水平。且实验过程中发现,光照对受试藻种光合活性及生物量的调节作用比温度更

明显、更高效, 方便研究人员为在线水质综合毒性测量快速提供合适的受试藻。

## 参考文献:

- [1] Seo D M, Shin S H, Oh S W, *et al.* Rapid eco-toxicity analysis of hazardous and noxious substances (HNS) using morphological change detection in *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Algal Research*, 2020, 51: 102063.
- [2] Yang G Y, Wan L L, Lei X Q, *et al.* Effects of lead and chromium on the growth, photosynthetic performance, and antioxidant activity of *Scenedesmus obliquus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(6): 1606-1614.  
杨国远, 万凌琳, 雷学青, 等. 重金属铅、铬胁迫对斜生栅藻的生长、光合性能及抗氧化系统的影响 [J]. 环境科学学报, 2014, 34(6): 1606-1614.
- [3] Wang S L, Chen S, Wang Y C, *et al.* Responses of *Chlorella pyrenoidosa* to stress of four heavy metals [J]. *Yangtze River*, 2018, 49(6): 19-25.  
王树磊, 陈珊, 王英才, 等. 蛋白核小球藻对 4 种重金属胁迫的响应研究 [J]. 人民长江, 2018, 49(6): 19-25.
- [4] Wang S B, Xu Z R, Ma X X, *et al.* Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on the growth and main parameters of chlorophyll fluorescence of *Microcystis aeruginosa* [J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(12): 3759-3765.  
王寿兵, 徐紫然, 马小雪, 等.  $\text{Cu}^{2+}$ 对铜绿微囊藻生长及叶绿素荧光主要参数的影响研究 [J]. 中国环境科学, 2016, 36(12): 3759-3765.
- [5] Du J. *Study on the Effect of Light Intensity on the Cadmium Toxicity and Screening of Cadmium Transporter in Synechocystis sp. PCC 6803* [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2017.  
杜娟. 光强对集胞藻 PCC 6803 镉毒害的影响及镉转运蛋白的筛选 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2017.
- [6] Yuan J, Liu S S, Wang L J, *et al.* Optimization of microplate toxicity analysis method based on *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(5): 553-558.  
袁静, 刘树深, 王丽娟, 等. 蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 微板毒性分析方法优化 [J]. 环境科学研究, 2011, 24(5): 553-558.
- [7] Fang Y. *Effects of Lysine on Photosynthesis and the Microcystin Production of Microcystis Aeruginosa Under Different Light Density* [D]. Nanjing: Nanjing University, 2012.  
方燕. 不同光强下赖氨酸对铜绿微囊藻光合作用系统及产毒的影响 [D]. 南京: 南京大学, 2012.
- [8] Chen J M. *Variations in the Toxic Effects of Petroleum Hydrocarbons to Two Marine Microalgae Species Under Different Environmental Factors* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.  
陈剑明. 不同环境因子下石油烃对两种海洋微藻毒性效应的变化 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [9] Xin X Y, Huang G, An C J, *et al.* Exploring the biophysicochemical alteration of green alga *Asterococcus superbus* interactively affected by nanoparticles, triclosan and illumination [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 398: 122855.
- [10] Kim S, Kim D, Ryu B G, *et al.* Design optimization of large-scale attached cultivation of *Ettlia* sp. to maximize biomass production based on simulation of solar irradiation [J]. *Applied Energy*, 2020, 279: 115802.
- [11] Cheng J, Liu S Z, Guo W B, *et al.* Developing staggered woven mesh aerator with three variable-micropore layers in recycling water pipeline to enhance  $\text{CO}_2$  conversion for improving *Arthrospira* growth [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 760: 143941.
- [12] 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): 265-271.

- 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): 265-271.
- [13] Lin Z X. *Effect of Environmental Factors and the Stress of Nutrients Deficiency on the Uptake Nitrogen and Chemical Compositions of Gracilaria Lemaneiformis* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2005.  
林贞贤. 环境因子和营养盐限制对龙须菜氮吸收及生化组分的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
- [14] Niu S N, Zhang P D, Zhang X M. Research progress in the effect of light intensity on the growth and photosynthesis of submerged aquatic vegetation [J]. *Modern Fisheries Information*, 2011, 26(11): 9-12.  
牛淑娜, 张沛东, 张秀梅. 光照强度对沉水植物生长和光合作用影响的研究进展 [J]. *现代渔业信息*, 2011, 26(11): 9-12.
- [15] 赵洋甬, 潘双叶, 陈元. 温度对羽纹藻光合作用的影响 [C]. 2010 中国环境科学学会学术年会论文集 (第三卷). 上海, 2010: 63-65.