文章编号:0254-0096(2020)08-0370-05

光强对小球藻生长及有机物含量的影响研究

唐　瑾，徐志昂，黄　斌，韩丰霞
（昆明理工大学环境科学与工程学院，昆明 650500）

摘　要：以小球藻为实验对象，研究不同光照强度对其生长情况和有机物含量的影响。结果表明：适量的光照可有效促进小球藻藻胞富集大量蛋白质等有机物；在3000 lx的光照强度条件下，小球藻生长情况良好，同时叶绿素、蛋白质和多糖的含量也达到最优，分别为8.500、0.130、0.056 mg/L；过高或过低的光照强度均不利于中性脂肪的合成，其适宜的光照强度为1000~2000 lx，其中2000 lx的光强条件下中性脂肪含量达到最大值2.51 μg/10^7cells。

关键词：叶绿素；多糖；蛋白质；中性脂肪；小球藻；光照强度
中图分类号：Q93；TK6　　　**文献标志码**：A

0　引　言

有报道提出[1]小球藻胞（*Chlorella* sp.）内中性油脂含有C16和C18碳链，与利用植物生产的生物柴油成分十分相似，具有潜在生物燃料价值，是过去10年中主要的生物燃料的候选藻类之一。此外，小球藻可将太阳能转化为生物质能（蛋白质、脂类和纤维等）并作为藻类有机物（algal organic matter，AOM）储存于藻胞内，具有重要的生物利用价值。在众多影响藻类生长和有机物含量的环境因素中，光照的影响最为直接，是影响微藻生长和生化组成的最重要因素之一。合理的光照强度不仅可提高藻类的有机物产量，还有利于光能资源的有效利用。已有学者在光照对藻类产油脂的影响开展了研究，Taleb等[2]通过调节光照周期，对凯氏拟小球藻在缺氮条件下产三酰甘油（TAG）的实验证明，光吸收效率会大幅影响微藻细胞代谢。

目前在国内外的研究中，针对光照强度对小球藻的藻类有机物（AOM）生物化学特性的影响研究还较少。本文研究不同光照强度对小球藻的生物量、比生长率和叶绿素的影响，以及分析不同光强下AOM的蛋白质、多糖以及中性脂肪含量的变化，选择在最佳光照条件下提高小球藻藻胞的有机物含量，从而为实现AOM中生物质的高产量提供参考。

1　材料与方法

1.1　主要实验试剂与仪器

试剂：小球藻（*Chlorella* sp.）[FACHB-1445]来自中国科学院淡水藻种库；硝酸钠、柠檬酸、柠檬酸铁铵、乙二胺四乙酸等配制BG11培养基药品购自Sigma Aldrich；磷酸盐缓冲盐水购自中国Beyotime公司；二甲基亚砜和其他未提及的试剂均为分析纯。

仪器：UV-2600可见分光光度计（岛津公司）；迅数F200浮游生物计数仪（杭州迅数科技有限公司）；贝克曼库尔特Allegra 64R台式高速冷冻离心机（贝克曼库尔特商贸（中国）有限公司）；可见分光光度计L5S（INESA上海仪电科学仪器股份有限公司）；scientz-IID型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；荧光分光光度计（F-7000，Hitachi，日本）。

1.2　藻种培养

复活培养：将购买的藻液摇匀倒出，在250 mL锥形瓶中按10%（接种量和培养基的体积比，后同）加入BG11培养基，全程无菌操作，在光照摇动培养箱中培养30 d。扩大培养：将生长指数期小球藻转移在500 mL锥形瓶中，以40%配制BG11培养基用量，在培养箱中培养15 d，扩大培养用于后续实验。

收稿日期：2018-03-07
基金项目：国家自然科学基金（21567014；21267012）
通信作者：韩丰霞（1983—），女，博士、讲师，主要从事污染物环境化学行为方面的研究。hanfengxia@kmust.edu.cn

1.3 实验设计

将扩大培养的藻液在 BG11 培养基中培养 4 d 至对数生长期后，分别接种至 5 组锥形瓶中。培养条件为：植物组织培养灯(5T 型 28 W 红蓝全光谱组培灯)光强为 500、1000、2000、3000、5000、8000 lx，培养温度为 20±1 ℃，光照时间为 14 h/8 h(模拟昆明夏至昼夜时长)。初始 OD_{680} 约为 0.8，每组实验设 3 个平行样，连续培养 10 d，24 h 或 48 h 取 1 次样。

1.4 小球藻的生长曲线测定

使用无菌 BG11 培养基稀释指数期的小球藻悬浮液，使用血球计数板和藻类细胞计数仪来确定藻细胞数量。通过取不同浓度的藻液，计数细胞数量，称量细胞干重，并测定波长 680 nm 下藻液的光密度，最后得到 *OD*-细胞数量和 *OD-DCW* 的关系曲线为：

$$DCW = 0.14 \times OD_{680} + 0.013,\quad R^2 = 0.99 \tag{1}$$

$$CN = 4.0 \times OD_{680} - 0.11,\quad R^2 = 0.99 \tag{2}$$

式中，DCW ——细胞干重，g/L；CN ——细胞数量，10^7cells/L；OD_{680} ——波长 680 nm 下藻液的光密度。

根据小球藻的生物量变化情况，进行初始分批实验筛选适宜浓度。6 组不同光照下的藻液测定吸光度，以确定其对微藻的比生长率。比生长率使用式(3)计算[3]：

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \tag{3}$$

式中，N_1 ——初始的生物量浓度；N_2 ——时间 t_2 时的生物量浓度；t_1 ——初始时间；t_2 ——培养时间。

1.5 叶绿素的提取及测定

将暴露于不同光照强度下的小球藻液取 10 mL，用 10 ℃冷却离心机以 10^4 r/min 离心 10 min，弃上清液，收集沉积的藻泥；将沉淀物重新悬浮于 10 mL，99.9%色谱级甲醇中，在 60 ℃黑暗中水浴 24 h，再 4500 r/min 离心 10 min；收集上清液，用可见分光光度计测定在 665.2、652.4、750.0 nm 处的吸光度，叶绿素浓度由式(4)~式(6)计算[4]，需要说明的是：在 652.4、665.2 nm 处的吸光度是通过减去在 750 nm 处吸光度校正浑浊度所得到的。

$$Chl_a = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4} \tag{4}$$

$$Chl_b = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2} \tag{5}$$

$$Chl = Chl_a + Chl_b \tag{6}$$

式中，Chl_a ——叶绿素 a 浓度，mg/L；Chl_b ——叶绿素 b 浓度，mg/L；$A_{665.2}$ ——在 665.2 nm 处的吸光度；$A_{652.4}$ ——在 652.4 nm 处的吸光度；Chl ——总叶绿素浓度，mg/L。

1.6 有机物的提取和蛋白质、多糖、中性脂肪的测定

将培养到指数生长期的小球藻溶液先通过 10^4 r/min 离心 10 min，收集上清液，然后用磷酸盐缓冲液重悬藻细胞再离心，反复 3 次。将得到的藻细胞在 400 W 超声波细胞粉碎机中破碎 30 min(冰浴)，再 12000 r/min 离心 10 min，取上清液。将得到的 AOM 样品在 −80 ℃冰箱中冷冻 24 h，再在冷冻真空干燥机(Themo，美国)中冷冻干燥 36 h 后保存于干燥器中备用。

采用蒽酮-硫酸法[5]处理样品测多糖含量；使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(Beyotime，中国)分析蛋白质浓度。用尼罗红法测定藻类中性脂肪，将经过不同强度光处理后提取的 AOM 样品重悬于 20%二甲基亚砜(DMSO)中，并在 40 ℃中水浴处理 20 min。再在上述液体中加入 0.1 mg/mL 尼罗红染料(NR)反应 5 min。最后，以 10 nm 的间隔在 500~700 nm 的激发波长和 575 nm 的发射波长下收集数据。

1.7 藻类有机物的三维荧光扫描

实验用 3000 lx 光照强度培养的小球藻产生的 AOM 样品加入适量磷酸盐缓冲盐水，使用荧光分光光度计(F-7000，Hitachi，日本)扫描藻细胞有机物溶液。激发波长的扫描范围为 300~500 nm，发射波长的扫描范围为 260~400 nm。5 nm 间隔以 1200 nm/min 的读数进行扫描。

2 结果与讨论

2.1 光照强度

将微藻暴露于不同光照强度(500、1000、2000、3000、5000、8000 lx)的组织培养灯下，评估光照强度对小球藻的生长影响。不同光照强度对小球藻生长的影响由干细胞干重(*DCW*)(图 1)和比生长速率(*SGR*)的变化(表 1)表示，小球藻在初始生长期，藻类生长较缓慢是为了在生长期开始时适应存活环境。

表 1 在不同光照强度下培养 10 d 的小球藻比生长率

Table 1 Specific growth rate of *Chlorella* sp. after 10 days cultivation at different light intensity

光强/lx	比增长速率/ $\mu \cdot d^{-1}$	光强/lx	比增长速率/ $\mu \cdot d^{-1}$
500	0.51	3000	0.93
1000	0.60	5000	0.88
2000	0.74	8000	0.47

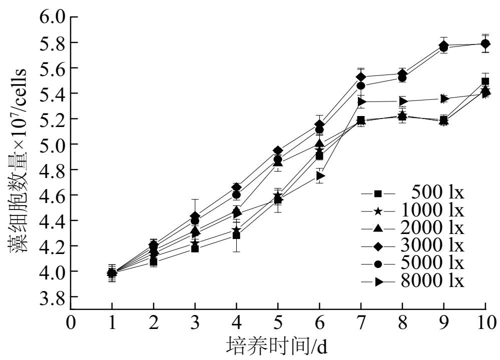


图1　光照强度对小球藻生物量的影响

Fig. 1　Effect of light intensities on biomass of *Chlorella* sp.

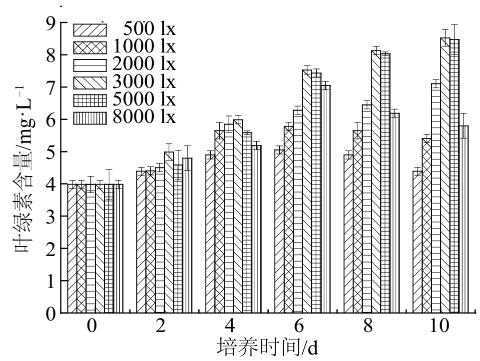


图2　小球藻的叶绿素含量随光照强度的变化情况

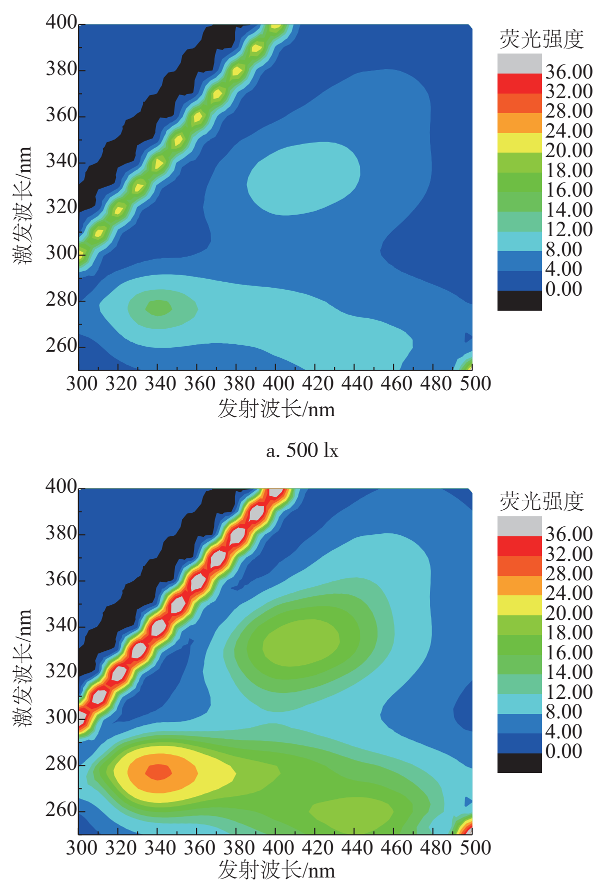
Fig. 2　Chlorophyll concentrations change with light intensities of *Chlorella* sp.

从图1和表1可知，细胞干重的减少与微藻的比生长速率结果互相对应，经过10 d的藻胞培养，在光照3000和5000 lx的光照强度下藻类细胞的生长趋势好，而更高的光照强度对小球藻的生长具有明显的抑制作用。高光照强度对小球藻的生长影响较大，连续暴露在高光照强度的生长条件下会使微藻生长情况恶化，导致生长缓慢。由于高强度的光照引起的藻类细胞膜损伤会导致小球藻的生理功能破坏甚至细胞死亡。小球藻培养10 d后，光照强度在3000和5000 lx时的生物量迅速积累。从表1还可看出，第10天的藻细胞比生长率在3000 lx的光照强度下达到最大值，即在此环境条件下的小球藻生长最适光照条件为3000 lx。

光合作用是光照损伤和自我恢复与所有辐射的动态平衡，而叶绿素则是光合电子传递活性的主要指标。本研究测量小球藻的光合色素（叶绿素a和叶绿素b），并以此来评估光照强度对小球藻光合作用的影响（图2）。叶绿素含量与生物量浓度和光的穿透有关。在控制初始生物量条件下，第6天之前，不同光照强度下小球藻中的叶绿素含量呈增大趋势；而在第6天后，3000和5000 lx光照下的叶绿素含量持续增大但增速减缓；而500、1000、8000 lx光照下的叶绿素开始呈减小趋势。这是因为在较低光强照射下，藻细胞接收光能较弱，导致小球藻光合作用不能正常进行，从而使其生物量较低，叶绿素含量也呈减小趋势，说明长期得不到充足光照的小球藻细胞逐渐趋于死亡。但高光照强度下的小球藻生长受到抑制则是由于高强度光照会导致过量的光吸收破坏叶绿素，对藻细胞造成潜在的伤害并抑制光合作用，以致降低最大光合速率而发生光抑制现象。同时，在长期的高强度光照下，小球藻藻液会逐渐由绿变黄最后浑浊变白。

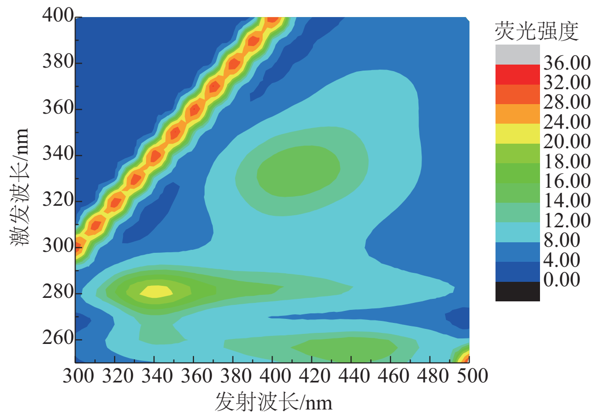
2.2　藻类有机物的三维荧光图分析

小球藻的AOM荧光光谱分析是为了验证有荧光响应的有机物质的存在。在去除破碎的小球藻藻胞碎片后对AOM样品进行荧光扫描，这意味着附着在藻细胞壁上有荧光信号的某些有机物质尚未检测到。图3分别为经500、3000、8000 lx光照10 d后AOM的各组分的三维荧光扫描图。可以发现，3个荧光峰出现的位



a. 500 lx

b. 3000 lx



c. 8000 lx

图3　小球藻藻胞有机物的三维荧光扫描图

Fig. 3　AOM three-dimensional fluorescence scanning of *Chlorella* sp.

置在 E_x/E_m=340/277、412/333、441/259 处。荧光光谱数据可通过荧光区域积分(FRI)方法[6]来解释，鉴定出最强峰出现在 E_x/E_m=340/277，峰值达到 25.86 mV，恰好落在溶解性微生物产物区域，此区域包括色氨酸、色氨酸类蛋白和酪氨酸类蛋白等蛋白物质。在 E_x/E_m=412/333 下观察到第 2 个高峰(15.5 mV)，代表类腐殖酸区域。而第 3 个峰 E_x/E_m=441/259 落在类富里酸区域。

2.3　不同光照强度下小球藻多糖及蛋白质含量的变化

藻类含有大量多糖，特别是在细胞壁结构上。从图 4 可看出，在不同光照强度下的前 4 天，多糖总量并未显著增加，而是维持较低水平，单位质量的多糖含量减小。对比上述小球藻的生长情况可知，小球藻在对数前期主要进行藻体的分裂，而多糖的合成有一定的延迟时间；在稳定期后，藻体开始逐渐积累多糖，此后多糖含量维持稳定。从图 4 中还可看出，在实验初期(1~4 d)不同光照强度对应的多糖含量差别不大，而在第 4 天以

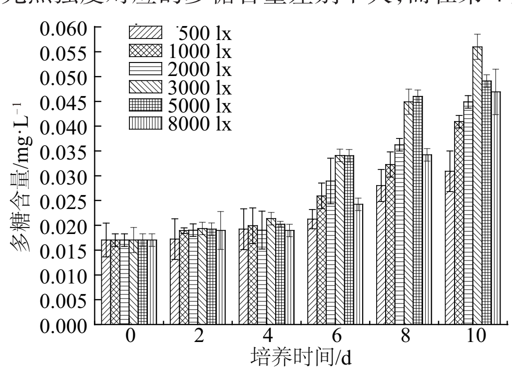


图4　光照强度对多糖含量的影响

Fig. 4　Effect of light intensity on polysaccharide content

后显现出明显差别，所以适合在光照强度为 3000 lx，且稳定期后对多糖进行采收。研究发现，在高光照强度(2000~8000 lx)下小球藻积累的蛋白质含量明显高于在 500、1000 lx 强度下(图 5)；在生长初期时，5000 lx 光照下的蛋白质积累量较大；但进入生长稳定期后，在 3000 lx 光照条件下蛋白质含量最高达 0.13 mg/L。实验证明高强度的光照有利于藻细胞的蛋白质积累。

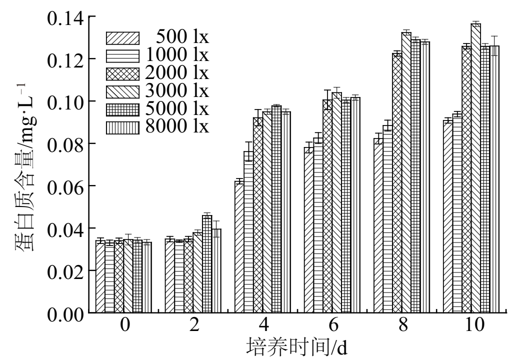


图5　光照强度对蛋白质含量的影响

Fig. 5　Effect of light intensity on protein content

2.4　光照对中性脂肪积累量的影响

不同光照强度对小球藻中性脂肪含量的影响如图 6 所示。研究表明，在(20±1)℃恒温和 14 h/8 h 光照周期条件下，光照强度的变化导致细胞脂类的积累变化明显，在小球藻生长初期(0~4 d)，1000、2000 lx 光强下，中性脂肪的增长最快，而 3000、5000、8000 lx 光强时相对较慢；在生长中后期(第 4~10 天)时，受光照强度影响非常明显，光照强度从 1000 lx 增至 8000 lx 的过程中，中性脂肪含量分别为 1.42、2.43、2.51、2.19、1.89、1.20 μg/10^7cells，在 2000 lx 光照条件下的中性脂肪含量比在 8000 lx 时提高 51.4%。这可能是由于光照强度的增强导致光合作用的能量供给藻类生长(结合 2.1 节

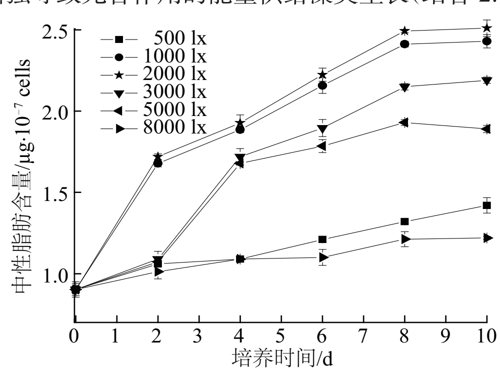


图6　不同光照强度对小球藻中性脂肪含量的影响

Fig. 6　Neutral lipids accumulation of *Chlorella* sp. under different light intensities

小球藻生长趋势),脂肪的合成受到影响,从而致使小球藻的脂肪含量较低,然而较低的光照强度(如 1000 和 2000 lx),光合作用向有利于脂肪合成的方向发展,但过低的光照强度不利于脂肪合成,从图 6 可看出 500 lx 光强下的脂质含量仅为 1.22 μg/10^7cells。因此,实验证明在 1000~2000 lx 的光强下更有利于小球藻有机物中脂肪的积累,而高强度或较低的光照均不利于脂肪的合成。

3　结　论

通过探究不同光照强度对小球藻的生物量、叶绿素、蛋白质、多糖和中性脂肪含量的影响,得到如下主要结论:

1)小球藻液在不同光照强度下的生长趋势大致相同;光供应不足时藻细胞生物量增长缓慢,但较高的光照强度则会发生光抑制现象并抑制藻类的生长;小球藻最佳的生长光照强度为 3000 lx。在不同光照强度下,小球藻叶绿素含量变化与生物量变化的趋势一致,高强度的光照会破坏叶绿素的合成。

2)小球藻细胞有机物的三维荧光扫描表明,确实存在溶解性的微生物产物;多糖的大量产出在细胞生长稳定期,在 3000 lx 光照条件下最高达到 8.5 mg/L;而在相同条件下蛋白质含量最高达 0.13 mg/L。

3)较低的光照强度适于小球藻藻类有机物的脂肪积累,2000 lx 的光强条件下性脂肪含量达到最大值 2.51 μg/10^7cells,随着光强的增加,脂肪含量反而减少,但过低光强不利于脂肪的合成。

[参考文献]

[1] 黄冠华,陈峰,任庆功. 应用小球藻制生物柴油[J]. 太阳能学报,2010,31(9):1085-1091.
HUANG G H, CHEN F, REN Q G. Research on biodiesel production from *Chlorella vulgaris*[J]. Acta energiae solaris sinica, 2010, 31(9): 1085-1091.

[2] TALEB A, LEGRAND J, TAKACHE H, et al. Investigation of lipid production by nitrogen-starved *Parachlorella kessleri* under continuous illumination and day/night cycles for biodiesel application[J]. Journal of applied phycology, 2017: 1-12.

[3] KABRA A N, JI M K, CHOI J, et al. Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green microalga, *Chlamydomonas mexicana*[J]. Environmental science & pollution research international, 2014, 21(21): 12270-12278.

[4] PANCHA I, CHOKSHI K, MAURYA R, et al. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077[J]. Bioresource technology, 2015, 189: 341-348.

[5] SIZUN G, DUKHAN D, GRIFFON J F. Carbohydrate research[J]. Carbohydrate research, 1986: C19-C21.

[6] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. Environmental science & technology, 2003, 37(24): 5701-5710.

EFFECT OF LIGHT INTENSITY ON GROWTH AND ALGAL ORGANIC MATTER CONTENT OF *Chlorella* sp. CULTIVATION

Tang Jin, Xu Zhiang, Huang Bin, Han Fengxia

(*Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming* 650500, *China*)

Abstract: In this work, the changes of growth situation and algal organic matter content in *Chlorella* sp. cultivation, including polysaccharides, protein and neutral fat is investigated under different light intensity. The results indicated that the appropriate light intensity can effectively promote bioconcentration of protein and other organic matter of *Chlorella* sp.. In addition, the best growth tendency of *Chlorella* can be obtained under light intensity of 3000 lx. Under this condition, the concentration of chlorophyll, polysaccharides and proteins reach 8.5 mg/L, 0.056 mg/L and 0.13 mg/L, respectively. Too high or too low light intensities are not conducive to the synthesis of neutral fat and the most suitable light intensity is 1000-2000 lx. The maximum value of neutral fat content (2.51 μg/10^7cells) can be obtained under 2000 lx light intensity.

Keywords: chlorophyll; polysaccharides; protein; neutral fat; *Chlorella* sp.; light intensity