

光照对细胞融合藻 *Tetraselmis* sp.-1 混合培养的影响

沈继红, 林学政, 李光友, 刘发义

(国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘 要:对细胞融合技术获得的1株新型融合微藻(*Tetraselmis* sp.-1)进行摇瓶混合培养,并分析光照强度对该培养条件下融合微藻的影响。结果表明:1)在培养基中添加葡萄糖对融合微藻的生长有强烈的促进作用,融合微藻生长速率为0.576 g/(L·d),是自养培养的7.38倍;2)在光照强度为3 000 lx混合培养时,葡萄糖消耗速率达最大值3 g/(L·d);3)在光照强度为2 000 lx混合培养时,藻细胞密度最大,为2.60 g/L,以葡萄糖计算的基质得率随光照强度的增加而显著下降;4)融合微藻叶绿素a含量在混合培养条件下,随光照强度的增大而增加;5)在混合培养条件下,光照对NH₄⁺的同化为正影响,融合微藻氮含量和C_C/C_N分别为5.68和6.06,均介于自养培养与异养培养之间。

关键词:光照强度;细胞融合藻;混合培养

中图分类号:S968.4

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0239-04

微藻是海洋中最重要的原始生产力。对微藻资源的开发利用,首先要解决微藻的大规模培养问题。目前,根据微藻营养方式的不同,采用自养、异养或者混合培养等方法培养微藻。由于混合培养或异养培养微藻的生长速度及最终浓度均远远高于光能自养培养,因此,混合或异养培养已成为国内外一种快速、大量培养微藻的有效方法和发展方向^[1]。本文以细胞融合技术获得的1株能进行混合的新型融合微藻(*Tetraselmis* sp.-1)为实验材料,研究不同光照强度对微藻生长和利用有机碳源的影响,以期为该藻株的大规模培养提供参考。

1 材料和方法

1.1 藻株

细胞融合藻(*Tetraselmis* sp.-1),系采用细胞融合筛选得到的1株能进行混合培养的新型微藻,其亲本藻为绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)和四鞭藻

(*Tetraselmis* sp.)^[2]。

1.2 培养基

混合培养培养基采用SK(1A)改良培养基^[3]。

1.3 实验设计

1.3.1 生长比较实验

(1)混合培养 在250 ml摇瓶中装入150 mL培养基,培养基初始葡萄糖质量浓度为30 g/L,按培养基10%的量接种微藻摇瓶培养。摇床转速为130 r/min,光照强度3 000 lx,25℃培养4 d。

(2)自养培养 培养基中不添加有机碳源,其余同上。

1.3.2 光照梯度实验 实验分为6个光强组,光照强度分别控制在约0、500、1 000、2 000、3 000和4 000 lx。每组取3个平行样。其余条件同1.3.1中混合培养实验。

以上各实验均设重复1次。

1.4 分析方法

1.4.1 藻细胞密度和生长速率的测定 分别取50 mL藻液,用预先称重的滤纸过滤,100℃使其完全干燥,冷却恒重后称重,藻细胞密度以每升培养液所得藻干细胞重量计算;生长速率以每天所得干细胞

收稿日期:2001-08-20。

基金项目:国家“八六三”高技术发展资助项目(863-819-Q-17)。

作者简介:沈继红(1972-),男,副研究员,在职博士生,从事海洋生物活性物质方面的研究。

重量表达。

1.4.2 光强的测定 采用JD-3型数字照度计(上海市嘉定学联仪表厂)测定。光照度计测定值(lx)与光合有效量子的辐射密度($\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)的关系为: $1\,000\text{ lx}=15.76\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.4.3 葡萄糖浓度测定^[4] 采用萘酚比色法测定。基质得率以每消耗1g葡萄糖所得到的藻细胞干重来表达。

1.4.4 藻液中叶绿素a的测定^[5] 取藻液 V_1 于3 000 r/min离心10 min, 去上清液, 加入 V_2 体积的甲醇, 于4℃冰箱储藏过夜, 再3 000 r/min离心10 min, 取上清液在665 nm下, 以甲醇为参比测定光吸收值 A_{665} , 藻液中叶绿素a计算公式为: 叶绿素a($\mu\text{g/mL}$) = $13.9 \times A_{665} \times V_2 / V_1$ 。

1.4.5 元素分析 藻细胞碳(C)、氮(N)元素含量用意大利 Carlo-riba1106 元素分析仪进行测定。

2 结果与讨论

2.1 融合微藻混合培养与光自养培养生长的比较

微藻的生长曲线如图1所示。在混合培养条件下, 融合微藻的平均生长速率为 $0.576\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$; 而在没有葡萄糖的光自养条件下, 其平均生长速率为 $0.078\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。混合培养融合微藻生长速率是自养培养的7.38倍, 可见在培养基中添加葡萄糖对融合微藻的生长有强烈的促进作用。

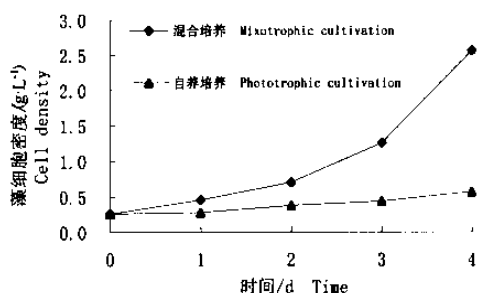


图1 融合微藻混合培养和自养培养的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of mixotrophic and phototrophic cultivation of *Tetraselmis* sp.-1

2.2 不同光照强度对葡萄糖消耗速率的影响

不同的光照强度对葡萄糖消耗速率的影响见图2。可以看出, 融合微藻在黑暗条件下培养(异养), 葡萄糖消耗速率相对较低 $0.75\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$; 但在500 lx的弱光条件下, 葡萄糖的消耗速率急剧上升, 达到 $2\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$; 随后消耗速率缓慢上升, 在

3 000 lx光照条件下达到最大值 $3\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$; 然后随着光照强度的增大, 葡萄糖消耗速率缓慢下降。可见在融合微藻的混合培养过程中, 光照对于葡萄糖的消耗是重要的影响因素之一, 光对融合微藻呼吸酶系的活性有一定的影响作用, 在一定程度上能激活或抑制呼吸酶系的活性。对于融合微藻 *Tetraselmis* sp.-1 的葡萄糖消耗速率来说, 当光照强度大于3 000 lx时, 出现了光饱和现象。

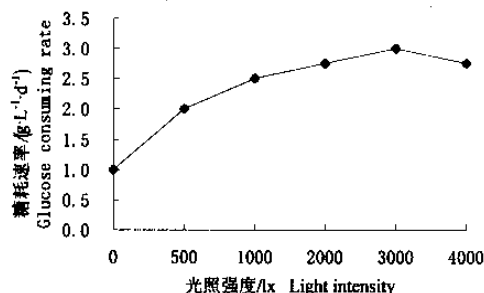


图2 不同光照强度对葡萄糖消耗速率的影响

Fig. 2 Influence of different light density on glucose consuming rate

2.3 不同光照强度对融合微藻生长的影响

由图3可以看出, 随着光照强度的增大, 藻细胞密度逐渐增加, 在光照强度2 000 lx时达到最大值 (2.60 g/L), 之后, 随着光照强度的增大藻细胞密度缓慢下降。以葡萄糖来计算的基质得率在暗培养(异养)条件下最大, 为 0.4675 g/g ; 在有光照条件下, 基质得率急剧下降, 并且下降趋势随着光照强度的增大逐渐变缓; 在3 000~4 000 lx时, 基质得率为 0.212 g/g , 只有异养条件下的45%左右。微藻的混合培养过程, 包括光能的吸收转化、 CO_2 的吸收固定、有机物的同化等比较复杂的生化过程^[6]。由于光照不仅能影响光合固碳速率, 也能影响藻细胞的呼吸强度和能荷水平, 在融合微藻 *Tetraselmis* sp.-1 的培养过程中, 藻细胞密度和葡萄糖的消耗速率随光照强度的变化趋势大致是相同的; 以葡萄糖消耗量计算的基质得率却随光照强度的增大呈现明显的下降趋势。这说明在葡萄糖吸收同化的过程中, 虽然葡萄糖的消耗随光照强度的增大呈现上升趋势, 但此时藻细胞内源呼吸旺盛, 呼吸强度加大, 葡萄糖氧化生成 CO_2 的量也加大, 致使消耗的葡萄糖转化为细胞的部分降低, 基质得率下降。在微藻的静置混合培养中, 随着光照强度的加大, 培养液明显有 CO_2 气泡出现, 能够说明这个问题。

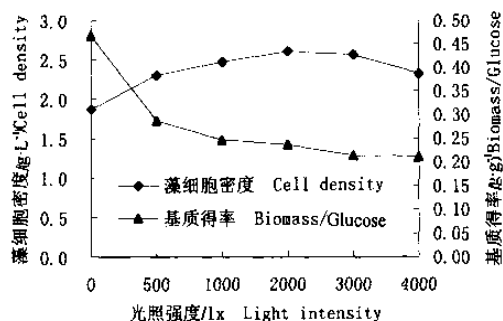


图3 光照强度对藻细胞密度和基质得率的影响

Fig. 3 Influence of light intensity on cell density and biomass/glucose yield

2.4 不同光照强度对融合藻叶绿素 a 含量的影响

由图4可见,能够反映光合作用速率高低的捕光色素叶绿素 a 含量随着光照强度的增大而增加,没有在3 000 lx 出现光饱和现象。这说明在融合微藻 *Tetraselmis* sp.-1 的培养过程中,微藻的光合自养和化能异养是同时且相对独立的过程。光照对2条代谢途径都有影响,但影响程度不同。

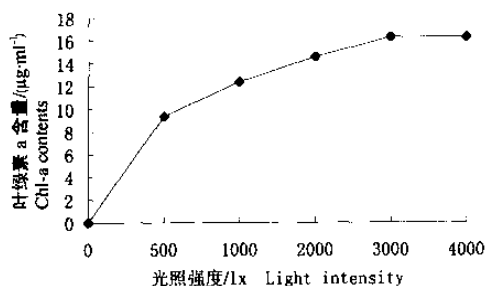


图4 光照强度对藻液中叶绿素 a 含量的影响

Fig. 4 Influence of light intensity on chlorophyll-a contents of cultural system

2.5 不同培养方式对微藻 C_C/C_N 的影响

表1可见,不同培养方式对微藻的碳含量影响较小,对氮含量影响较大;在异养培养方式下 C_C/C_N 最大,自养培养方式下 C_C/C_N 最小。微藻氮含量和微藻对 NH_4^+ 和 NO_3^- 等氮源的同化密切相关。光照能影响 NH_4^+ 和 NO_3^- 等氮源的同化,并且相互关系十分复杂^[7]。在本实验中,培养基中为 NH_4^+ ,光照对 NH_4^+ 的同化为正影响。对单位细胞来说,

自养时,由于细胞密度低,细胞之间对光线的遮掩作用较小,单个细胞受到的光照较多,微藻同化 NH_4^+ 效率相对较高,藻体氮含量高;而混合培养单个细胞得到的光线就相对较少,微藻同化 NH_4^+ 效率也相对较低,藻体氮含量低;在异养条件下,微藻同化 NH_4^+ 效率较有光照条件下低,所以藻体氮含量最低。

表1 不同培养条件对微藻 C_C/C_N 的影响Table 1 Influences of cultural conditions on C_C/C_N

培养条件 Cultural condition	碳/% Carbon	氮/% Nitrogen	C_C/C_N
自养 Autotrophic cultivation	34.57	6.04	5.85
混养 Mixotrophic cultivation	34.42	5.68	6.06
异养 Heterotrophic cultivation	34.75	5.22	6.66

3 结语

对于融合微藻 *Tetraselmis* sp.-1 的混合培养来说,光照是重要的影响因素之一,它不仅影响培养基中基质的消耗速率、藻细胞密度、基质得率,而且影响藻液中叶绿素 a 含量和微藻同化 NH_4^+ 的效率。在下一步微藻的光生物反应器培养中,光照条件是一个重要的考虑因素。

参考文献:

- [1] Chen F, Johns M R. A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates [J]. J Appl Phycol, 1996, 7: 43-46.
- [2] 沈继红,林学政,刘发义,等.细胞融合法构建 EPA 和 DHA 高产异养藻株的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 63-66.
- [3] Gladue R. Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds[A]. Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of an US Asia Workshop[C]. Hawaii: The Oceanic Institute, 1991. 279-281.
- [4] 李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997. 131-132.
- [5] Hall D O, Rao K K. Photosynthesis (5th ed) [M]. Cambridge: The Press Syndicate of Cambridge, 1994. 43.
- [6] 王永红, 李元广, 施定基, 等. 集胞藻 6803 的混合培养——光照强度和葡萄糖的影响[J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 193-197.
- [7] 董双林, 刘静雯. 海藻营养代谢研究进展——海藻营养代谢的调节[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(1): 21-28.

Influences of light intensity on mixotrophic cultivation of cell fused microalgae *Tetraselmis* sp.-1

SHEN Ji-hong, LIN Xue-zheng, LI Guang-you, LIU Fa-yi

(First Institute of Oceanography, State Ocean Administration of China, Qingdao 266061, China)

Abstract: A novel strain of cell fused microalgae *Tetraselmis* sp. -1 was obtained from *Pavlova viridis* and *Tetraselmis* sp. . Under different light intensity and with different culture medium, the *Tetraselmis* sp.-1 was incubated. The results show that: 1) glucose has obvious effects on growth of *Tetraselmis* sp.-1 and the growth rate is 0.576 g/(L·d), which is 7.38 times as much as that under autotrophic culture; 2) at 3 000 lx of light intensity, the glucose consuming rate is the highest, 3 g/(L·d); 3) at 2 000 lx of light intensity, the cell density gets to the maximum of 2.60 g/L, and the biomass/glucose yield decrease with the increase of light intensity; 4) the contents of chlorophyll-a increase with the increase of light intensity; 5) the assimilation of NH_4^+ is positively influenced by light intensity, and the content of nitrogen and the ratio of carbon to nitrogen are 5.68 and 6.06, respectively, which are both between those of autotrophic culture and heterotrophic culture.

Key words: light intensity; cell fused microalgae (*Tetraselmis* sp. -1); mixotrophic cultivation

欢迎订阅 2003 年《海洋与湖沼》

《海洋与湖沼》是由中国海洋湖沼学会主办、中国科学院海洋研究所承办的海洋湖沼科技领域的综合性学术刊物,于1957年创刊。现任主编为中国科学院院士、中国海洋湖沼学会理事长秦蕴珊研究员。《海洋与湖沼》主要刊载国家自然科学基金资助项目、国家重大攻关基础项目和各部委基金资助项目的研究成果。论文内容涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣等栏目。

本刊为双月刊,16开,国内外公开发行。每期定价:22.00元。国内统一刊号:CN37-1149;国际标准刊号:ISSN0029-814X。国内邮发代号:2-421;国外发行代号:BM69。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款到编辑部订阅。编辑部地址:山东省青岛市南海路7号,邮编:266071;联系电话:0532-2898753;E-mail:bsun@ms.qdio.ac.cn