补充 CO_2 对光生物反应器培养新月菱形藻的影响

王国栋[1], 张丽莉[1], 吴 垠[2], 孙建明[3]

(1. 集美大学水产学院水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021;
2 大连水产学院农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023;
3. 大连汇新海洋科技发展有限公司, 辽宁 大连 116033)

摘要: 为了优化光生物反应器培养微藻的条件, 研究了在充空气的基础补充 CO_2 对光生物反应器培养新月菱形藻 (*Nitzschiaceae closterium*)生长和光合作用的影响。实验表明, 补充 CO_2 (含 1 000μL/L CO_2的空气)促进新月菱形藻的生长, 藻细胞密度和生物量显著高于对照组 (CO_2含量 350μL/L) ($P < 0.05$)。补充 CO_2 也能够提高藻细胞叶绿素 a和类胡萝卜素的含量 ($P < 0.05$), 但是对叶绿素 b没有显著影响 ($P > 0.05$)。补充 CO_2 能够显著提高指数生长期的最大光合速率 (P_m)、光合作用效率 (α)和光合作用饱和光强 (I_k) ($P < 0.05$)。结果表明, CO_2 是光生物反应器培养微藻的限制因子之一, 补充 CO_2 能够提高微藻的生物量。

关键词: 新月菱形藻; 光生物反应器; CO_2; 生长; 光合作用
中图分类号: S969.24 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2008)02-0035-04

微藻生长繁殖快, 易于培养, 而且营养丰富, 富含微量元素和高度不饱和脂肪酸、色素等多种生物活性物质, 因此成为生产保健食品、食品添加剂、饲料、生物肥料、化妆品及其它天然产品的重要原材料; 而且在水产动物育苗时广泛使用各种微藻作为优良的生物饵料, 是影响幼苗成活率和质量的关键因素之一 (刘娟妮等, 2006)。能否有计划、稳定的供给直接关系到育苗的成败, 已经成为影响水产养殖业发展的关键因素之一; 此外, 利用微藻为宿主的基因产物的生产也日益受到关注。因此, 微藻大规模培养技术的研究一直是国内外许多学者和养殖工作者关注的课题 (Pisman et al, 2006; 孙建明等, 2003)。

光生物反应器是一种高效、稳定培养微藻的封闭式装置, 它克服了微藻室外开放式培养存在的占地面积大、培养效率低、生产不稳定、容易污染等问题。由于采用了封闭式培养系统, 其光能转化效率高、条件易于控制, 使微藻生产跨跃上了新水平。因此, 许多学者开始致力于用光生物反应器进行微藻培养的研究, 并已应用于生物工程和化工等领域 (刘晶瞒等, 1999; Zittelli et al, 1999; 吴垠等, 2004a; 吴垠等, 2004b)。但这种培养方式仍面临许多问题, 如这种封闭培养器容易造成溶解氧蓄积, 高密度培养时 CO_2 供应不足等 (吴垠等, 2004a)。本文研究了在光生物反应器封闭式培养中, 补充 CO_2 对重要海洋经济微藻——新月菱形藻 (*Nitzschiaceae closterium*)生长、光合色素和光合作用特征的影响, 为光生物反应器高效培养微藻提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

新月菱形藻 (*N. closterium*)是由辽宁省海洋水产科学研究院提供, 接种到光反应器之前, 在 3 000 mL的三角瓶中用 Conwey培养液进行扩大培养。

1.2 设备与方法

光生物反应器由大连汇新海洋科技发展有限公司提供 (专利号: ZL02283827.9), 整套设备包括培养器、水处理器、温控系统、CO_2 充气系统及人工光源等。容积为 350L, 采用自然光和人工光 (外置)连续照明, 光照强度为 1 500~8 000 lx, 水温 16~20℃。对照组通过滤空气, CO_2 浓度为 350 μL/L; 实验 A组和实验 B组分别在充过滤空气的基础上, 每天中午 12点补充 CO_2 浓度为 1 000 μL/L的空气 20 min和 10 min; 3组的充气量均为 300 mL/min, 均进行 3次重复。

1.3 测试指标

1.3.1 细胞数量及生物量测定 每天用血球计数板测量新月菱形藻细胞个数。培养结束时, 用 0.2 μm玻璃纤维滤膜 (whatman, GF/C)过滤 50 mL藻

收稿日期: 2008-02-22
基金项目: 辽宁省教育厅重点科研项目 (202130893); 大连市科技局复合性科技人才基金 (2004166)资助。

通讯作者: 张丽莉, 女, 主要从事微藻生理生态研究, E-mail: leelee79@163.com
作者简介: 王国栋, 1977年生, 男, 山东蒙阴人, 讲师, 博士, 主要从事水生生物生理生态研究。E-mail: gdwang@jmu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

液, 在 65°C下烘至恒重, 即得干重。先将玻璃纤维滤膜用 5% HCl浸泡 30 min, 450°C灼烧 4h, 称重得 W_0, 然后过滤藻液, 于 65°C 烘至恒重, 称重得 W_1。W_0 与 W_1 之差即为微藻干重。

1.3.2 光合色素测定 培养结束时, 测定叶绿素 a, 叶绿素 b和类胡萝卜素含量, 将藻液经 0.45 μm微孔滤膜过滤, 用 95% 丙酮萃取定容至 10 mL, 751型分光光度计测定 (吴垠等, 2004b)。

1.3.3光合作用对光强的影响曲线 (P-I曲线)测定 将培养至指数生长期的藻液低速离心收获细胞, 用新鲜的 Conwey培养液重悬, 调整各组藻液为相似的细胞密度, 取 200mL藻液至反应瓶, 通过调整碘钨灯与反应瓶的距离得到不同的光照强度, 温度为 20°C, 用氧电极测定光合放氧速率 (吴垠等, 2004a)。

2 结果

2.1 补充 CO_2 对新月菱形藻生长的影响

光生物反应器补充 CO_2 培养新月菱形藻的生长结果见图 1、图 2。新月菱形藻初始细胞密度为 14万 ~ 15万 cell/mL。单因素方差分析显示, 培养至 7d, 实验 A组的藻密度显著高于实验 B组和对照组 ($P < 0.05$); 培养至 11d, 实验 B组的藻密度才显著高于实验组 ($P < 0.05$)。在培养结束时 (16 d), 3个处理的藻密度差异显著 ($P < 0.05$)。经 LSD多重比较, 实验 A组的藻密度最高为 853.8万 cell/mL, 实验 B组的藻密度为 621.9万 cell/mL, 对照组藻密度最小为 573.1万 cell/mL ($P < 0.05$)。培养结束时, 微藻干重差异极显著 ($P < 0.01$)。LSD多重比较表明, 实验 A组最高, 为 0.95 mg/mL; 实验 B组次之, 为 0.77 mg/mL; 对照组最低, 为 0.68 mg/mL ($P < 0.05$)。

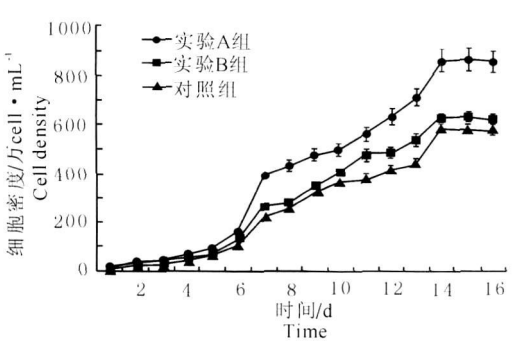

图 1 补充 CO_2 对新月菱形藻细胞密度的影响

Fig. 1 Effect of CO_2 concentration on cell density of *Nitzschiaceae closterium*

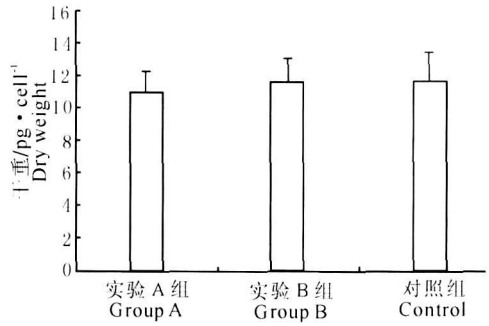

图 2 补充 CO_2 对新月菱形藻干重的影响

Fig. 2 Effect of CO_2 concentration on dry weight of *Nitzschiaceae closterium*

2.2 补充 CO_2 对新月菱形藻光合色素的影响

补充 CO_2 对新月菱形藻各种光合色素影响见图 3。藻细胞叶绿素 a和类胡萝卜素的含量有显著性差异 ($P < 0.05$), 藻细胞叶绿素 b含量没有差异。LSD多重比较方差分析表明, 实验 A组和实验 B组叶绿素 a含量 (分别为 0.17 pg/cell和 0.18pg/cell) 显著高于对照 (0.06 pg/cell) ($P < 0.05$)。藻细胞类胡萝卜素含量对照组 (0.10 pg/cell)显著高于实验 A组 (0.05 pg/cell)和实验 B组 (0.06 pg/cell) ($P < 0.05$)。

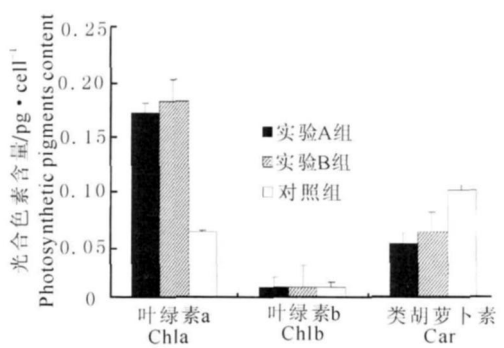

图 3 补充 CO_2 对新月菱形藻光合色素含量的影响

Fig. 3 Effect of CO_2 concentration on photosynthetic pigments of *Nitzschiaceae closterium*

2.3 补充 CO_2 对新月菱形藻光合作用的影响

补充 CO_2 对新月菱形藻 P-I曲线的影响见图 4。在光照小于 100 $\mu mol/m^2 \cdot s$时, 3条曲线混在一起, 当光照高于 100 $\mu mol/m^2 \cdot s$时, 实验 A组的 P-I曲线在最上面, 实验 B组位于中间, 而对照组则在最下面。其中各条曲线的参数见表 1。方差分析表明, 补充 CO_2 对新月菱形藻的最大光合速率 (*Pm*)、光合作用效率 (α)和光合作用饱和光强 (*Ik*) 都有显著性影响 ($P < 0.05$)。LSD多重比较表明, 实验 A组的 *Pm* 最高, 实验 B组次之, 对照组最低 ($P < 0.05$)。实验 A组的 α显著高于实验 B组和对照组 ($P < 0.05$), 实验 B组和对照组没有显著差

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

异 ($P > 0.05$)。实验 A组和实验 B组的 I_k 没有显著差异 ($P > 0.05$), 但是显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

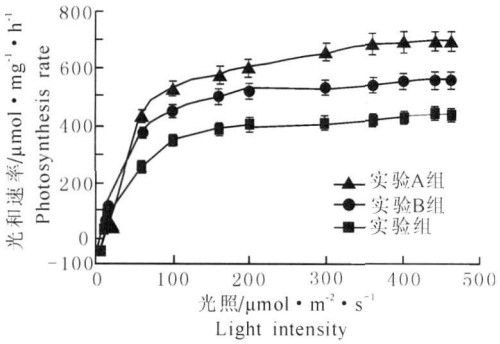

图 4　补充 CO_2 对新月菱形藻光合作用–光反应曲线 (P–I曲线)的影响

Fig. 4　Light response curves of photosynthetic oxygen evolution rate of *Nitzschiaceae closterium* cultured in different CO_2 concentration

表 1　不同 CO_2 浓度对新月菱形藻 P–I曲线各项参数的影响

Tab. 1　Parameters for photosynthetic–light response (P–I) curves of Nitzschiaceae closterium

组　别	P_m /μmol·mg^{-1}·h^{-1}	α /μmol·mg^{-1}·h^{-1}	I_k/μmol·m^{-2}·s^{-1}
实验 A组	617.2±23.1	8.02±0.39	76.92±3.80
实验 B组	550.0±22.6	6.96±0.52	79.03±3.80
对照组	428.8±19.1	7.35±0.59	53.90±2.90

3　讨论

已有很多研究表明 (Riebesell et al, 1993; Chen et al, 1994; Gao et al, 1991; Gao et al, 1993; 夏建荣和高坤山, 2001; 夏建荣等, 2002), 在自然条件下海洋硅藻和绿藻的生长在低浓度 CO_2 下受到限制, 提高 CO_2 的浓度会促进微藻的生长。吴垠等 (2004a)和于娟等 (2005)的报道表明, 提高光生物反应器中 CO_2 浓度培养叉鞭金藻、盐藻和小球藻、亚心型扁藻同样也能促进微藻的生长。这与我们补充 CO_2 能够促进光生物反应器中新月菱形藻生长的研究结果一致。在培养的初期 (静止期), 补充 CO_2 对新月菱形藻的生长影响不显著, 随着培养时间的延长, 藻液浓度的增加, 补充 CO_2 才对新月菱形藻生长产生影响。而且在试验浓度范围内, 多补充 CO_2 比少补充 CO_2 提高生长的幅度要大, 具有剂量依赖效应。这表明在培养初期, 藻细胞生物量低, 培养液中的 CO_2 浓度尚未构成藻细胞生长的限制因子。但是随着藻细胞数量的增加, 对 CO_2 需求加大, 对照组的 CO_2 供给已经满足不了微藻的生长, 成为光生物反应器培养微藻的限制因子。

本文的结果还显示, 与大气 CO_2 浓度条件下培养相比, CO_2 浓度的提高, 显著地提高了对数生长期的最大光合速率、光合作用效率和光合作用饱和光强, 这与 CO_2 浓度的提高导致藻细胞有较高的生物量是一致的。吴垠等 (2004a)的研究结果同样表明这一点。这一结果与 Shelp等 (1980)和 Watanabe等 (1997)认为小球藻能够有效利用外源 CO_2 而提高光合作用的结论一致。说明补充外源 CO_2 可以提高新月菱形藻对于光能的利用和转化, 提高光合效率, 为光合碳化提供充足的能量, 进而导致新月菱形藻营养成分的积累。CO_2 是植物光合作用的底物, 又是光合作用的主要限制因子之一。CO_2 浓度升高可在两个方面影响新月菱形藻的光合作用, 一方面增加了 CO_2 对 Rubisco结合位点的竞争从而提高羧化速度; 另一方面通过抑制光呼吸提高净光合效率 (吴垠等, 2004a; Kirk, 1983)。此外, 张其德等 (1996)认为这可能是因为 CO_2 加倍有利于藻光系统 II的光化学效率的提高, 光系统 II的光化学效率的提高有利于把捕获的光能以更高的效率转化为化学能, 为光合碳同化提供更充足的能量。这可能是补充 CO_2 有利于光合效率提高的原因之一。

参考文献:

刘晶瞒, 李元广, 张嗣良. 1999. 用管式光生物反应器培养螺旋藻的研究 [J]. 生物工程学报, 15(4): 525–528.

刘娟妮, 胡萍, 姚领, 等. 2006. 微藻培养中光生物反应器的研究进展 [J]. 食品科学, 27(12): 772–777.

孙建明, 吴垠, 桂远明, 等. 2003. 海洋微藻全封闭、连续式培养初步试验 [J]. 水产科学, 22(3): 22–24.

吴垠, 孙建明, 孙培海, 等. 2004a. CO_2 浓度对光生物反应器高效培养的湛江叉鞭金藻和盐藻的影响 [J]. 水产学报, 28(6): 742–744.

吴垠, 孙建明, 杨志平. 2004b. 气升式光生物反应器培养海洋微藻的中试研究 [J]. 农业工程学报, 20(5): 237–240.

夏建荣, 高坤山, 叶海波. 2002. 水华鱼腥藻生长与光合作用对大气 CO_2 浓度升高的响应 [J]. 植物生态学报, 26(6): 652–655.

夏建荣, 高坤山. 2001. 高浓度 CO_2 对极大螺旋藻生长和光合作用的影响 [J]. 水生生物学报, 25(5): 474–478.

于娟, 唐学玺, 张培玉, 等. 2005. CO_2 加富对两种海洋微绿藻的生长、光合作用和抗氧化酶活性的影响 [J]. 生态学报, 25(2): 197–202.

张其德, 卢从明, 冯丽洁, 等. 1996. CO_2 加富对紫花苜蓿光合作用原初光能转化的影响 [J]. 植物学报, 38(1): 77–82.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Chen C Y & Durbin E G. 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton [J]. Mar. Ecol. Prog. Ser. 109: 83-94.

Gao K, Aruga Y, Asada K. 1991. Enhanced growth of the red alga Porphyra yezoensis Ueda in high CO_2 concentrations [J]. J Appl Phycol. 3: 355-362.

Gao K, Y Aruga, K. Asada, M. Kiyohara. 1993. Influence of enhanced CO_2 on growth and photosynthesis of the red algae *Gracilaria* sp. and G. chilensis [J]. Journal of Applied Phycology. 5: 563-571.

Kirk JT. 1983. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems [M]. Cambridge: Cambridge University Press.

Pisman T I, Pechurkin N S, Somova L A. 2001. Competition between links in producer-ceonsumer trophic chains in an aquatic closed syetem with spatially separated components [J]. Advances in space research, 9: 1 599-1 603.

Riebesell U, Wolf-Gladrow DA, Smetacek V. 1993. Carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates [J]. Nature, 361: 249-251.

Shelp B J & Canvin DT. 1980. Utilization of exogenous inorganic carbon species in photosynthesis by Chlorella pyrinoidosa [J]. Plant Physi, 65: 774-779.

Watanabe Y & Saiki H. 1997. Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO_2 in stack gas [J]. Energy Convers Mgmt, 38: 499-503.

Zittelli G C, Lavista F, Bastianini A, et al. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors [J]. J Biotech, 70: 299-312.

(责任编辑 万月华)

Effects of CO_2 Enrichment on Growth and Photosynthesis of *Nitzschiaceae closterium*

Wang Guo-dong[1], Zhang Li-li[1], Wu Yin[2], Sun Jian-ming[3]

(1. Fisheries College, Institute of Aquaculture Biotechnology Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology Agriculture Ministry, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;
3. Dalian Huixin Ocean Science & Technology Development Co. Ltd, Dalian 116033, China)

Abstract: In order to optimize the parameter, the effects of CO_2 enrichment on the growth and photosynthesis of *Nitzschiaceae closterium* in air lift photobioreactors were investigated. The results showed that cell density and biomass of *N. closterium* significantly increased when culture medium was bubbled with enriched CO_2 (1 000 μL/L) compared to low CO_2 concentration (350 μL/L). Moreover, CO_2 enrichment increased the Chla and Car content of algae cell, and had no significantly effect on the Chlb content of algae cell. The maximum photosynthesis rate (*Pm*), the initial slope (α) and saturating irradiance level (*Ik*) in exponential growth phase rose with CO_2 enrichment. The results show that CO_2 is one of limiting factors for algae growth. The biomass of *Nitzschiaceae closterium* is improved by enriched CO_2.

Key words: *Nitzschiaceae closterium*; photobioreactor; CO_2 concentration; growth; photosynthesis

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net