

低功率高频超声抑制蓝藻生长的研究

郝红伟¹, 陈以方¹, 吴敏生¹, 汤娇雯², 吴庆余²

(1. 清华大学机械工程系, 北京 100084; 2. 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要: 为防治蓝藻水华, 从超声的生物效应出发提出了新的抑藻思路。低功率高频 (1.7 MHz) 超声高效节能地破坏藻胆体和叶绿素等蓝藻天线复合物的关键组分, 或抑制其生物合成, 导致光合作用受阻, 从而抑制蓝藻生长。在钝顶螺旋藻对照实验中, 5 min 超声辐照为最佳处理时间, 可显著降低蓝藻浓度, 并使其生长速度大大减缓。实验发现藻蓝蛋白受到的超声破坏作用尤其强烈, 即高频超声对蓝藻细胞不同成分的破坏具有选择性, 据此提出了高频超声量子效应的解释。

关键词: 蓝藻; 高频超声; 藻蓝蛋白; 叶绿素; 光合作用

中图分类号: Q681 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2003)01-0101-04

富营养化的湖泊和水库中, 因蓝藻生长而引起的水污染已成为全球性困扰的问题。水体富含 P、N 等营养元素, 使自养型浮游藻类(特别是蓝藻)在水中逐渐建立优势, 大量繁殖生长, 甚至在水表聚集成数厘米厚的蓝绿色的藻浆, 即“水华”^[1]。在藻体大量死亡分解的过程中, 不但散发恶臭, 而且大量消耗水中溶解氧, 使鱼类等窒息死亡; 并释放生物毒素类次级代谢产物, 危害人类和其他生物的安全^[2]。

从本质上讲, 水华是以蓝藻为载体的物质和能量转换的结果。在蓝藻的光合器内, 有两类天线复合物: 类囊体膜内的叶绿素 *a* (Chlorophyll *a*, Chl*a*)蛋白复合物和类囊体膜外的藻胆体, 它们协同作用使蓝藻有效地进行光合作用, 将太阳能转换成化学能并储存于细胞中, 这些能量被进一步用来将无机物合成为细胞内的各种有机成分^[3], 如果营养和光照条件适宜, 蓝藻大量繁殖, 就可能爆发水华。

超声具有生物效应: 机械振动、声流和空化效应能够造成生物细胞组织的损伤、断裂或粉碎; 声致自由基能够影响细胞结构, 使生物组分发生物理和化学变化; 超声的触变效应能够引起组织结合状态的改变^[4]。因此, 可以利用超声波的生物效应, 高效节能地破坏蓝藻天线复合物的关键组分, 或抑制其生物合成, 从而抑制光合作用的进行, 达到抑制蓝藻生长、防止水华爆发的目的。

1 材料和方法

1.1 藻种选择及培养

实验选用的钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)生长迅速, 可作为“丝状体”形态水华蓝藻的代表。藻种由清华大学生物系微藻实验室提供, 用 Zarrouk 培养液进行培养^[5], 控制温度 28±2 °C、光强 1500±50 lx、摇床摇速 150 rpm。

钝顶螺旋藻的生长曲线与一般微生物类似, 呈 S 型, 有停滞期、对数期和稳定期三个阶段, 藻浓度达到 0.1 以上 (以 560 nm 处吸光值表示浓度) 即进入对数生长期, 本文取生长最迅速的对数期藻液进行实验。

1.2 超声实验装置

自行研制的实验装置由自激式超声发生器、超声换能器和超声反应器三部分组成。杯式超声反应器由化学稳定性好的不锈钢材料制作, 在杯的底部紧密粘帖圆片式换能器, 透过底面向反应器内辐照超声。

一般功率超声多选用几十 kHz 的频率和几至十几 W/cm² 的声强。本实验装置选择低功率参数,

收稿日期: 2002-3-28

基金项目: 三峡工程库区移民科技研究项目(2000-004)

作者简介: 郝红伟, 1975 年生, 博士生, 电话:(010)62795110, E-mail: hhw99@mails.tsinghua.edu.cn

最大声强约 0.6 W/cm²，以使本研究更具有经济性和工程放大性；而 1.7 MHz 的超声频率已进入高频段，以研究高频超声的生物效应。

1.3 生物指标的测定

(1)活细胞生物量：用 752 型分光光度计测定 560 nm 处吸光度 (A_{560})，实验数据取自三个平行样的均值。

(2)吸收光谱：用 Ultra-Spec 2000 紫外 / 可见分光光度计扫描得到。

(3)叶绿素含量：取 3 ml 藻液，10000 rpm 离心 10 min，弃上清；弱光下向细胞加入 3 ml 无水甲醇，充分重悬，静置 3 min；10000 rpm 离心 10 min，取上清。在 Ultrospec2000 紫外 / 可见分光光度计上扫描其吸收谱。浓度计算公式：叶绿素 a 浓度(mg/g)=(13.9× A_{660})/(0.5036× A_{560})^[6]。

2 结 果

2.1 蓝藻生长对比实验

每次取 800 ml 藻液放入反应器内，分别超声辐照 1、3、5、7、9 min 后，和没有超声辐照的对照组进行相同条件的培养，每天测定一次 A_{560} ，得到生长曲线，如图 1 所示。

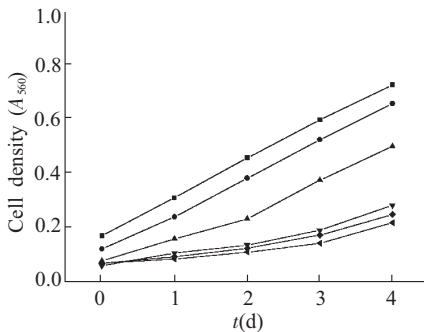


Fig.1 Growth curves of *Spirulina platensis*

—■— control —●— ultrasound 1 min —▲— ultrasound 3 min
—▼— ultrasound 5 min —◆— ultrasound 7 min
—◀— ultrasound 9 min

图中曲线均呈上升趋势，说明蓝藻一直在生长，但是三处不同体现出超声对蓝藻生长的抑制作用：

(1) 对照组起始 A_{560} 为 0.168，而五个超声组为 0.119~0.057 不等，即经过 1~9 min 的超声处理，藻液中活细胞生物量下降约 30%~66%，说明超声杀死了部分蓝藻细胞。

(2) 超声辐照 5 min 以上的三条生长曲线比对照组曲线斜率小，即蓝藻生长速度慢，说明超声破

坏了活细胞某些成分，抑制了光合作用的进行。

(3) 随超声辐照时间的加长，蓝藻生长受抑制的程度也随之加大，但超过 5 min 后变化并不明显，说明超声辐照对蓝藻的生长抑制进入饱和区，因此在本文实验条件下 5 min 是最有效而经济的处理时间。

2.2 高频超声对藻胆体的破坏作用

藻胆体是超分子捕光色素蛋白复合体，其主要成分为藻蓝蛋白，能将捕收的光能高效率传递给类囊体膜内的叶绿素 a，有效地协同叶绿素 a 进行光合作用。钝顶螺旋藻的吸收光谱有三个吸收峰，其中位于蓝光区的 438 nm 和位于红光区的 680 nm 处的峰是叶绿素的两个吸收主峰；625 nm 处的峰为该藻的特征，代表藻蓝蛋白的吸收峰，藻蓝蛋白在螺旋藻的生命活动中占据重要地位，突出体现其生长状况^[7]。测定 5 min 超声辐照前后完整活细胞的吸收光谱，如图 2 所示。

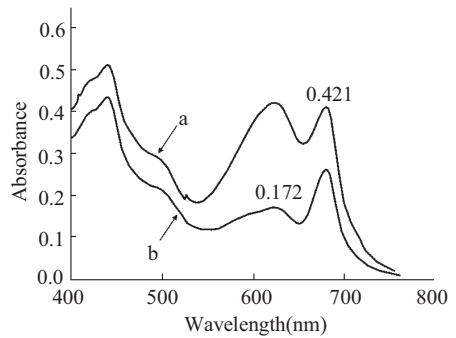


Fig.2 Absorption spectra of *Spirulina platensis* cells

a: control; b: ultrasound 5 min

和对照组相比，5 min 超声辐照后 625 nm 的藻蓝蛋白吸收峰由 0.421 下降到 0.172，降幅近 60%，说明高频超声对藻胆体的关键成分藻蓝蛋白具有强烈的破坏作用，使螺旋藻加速衰老，生长被极大抑制。

比较而言，438 nm 和 680 nm 这两个叶绿素吸收峰的降幅分别只有 14%和 37%，即 1.7 MHz 超声辐照对蓝藻细胞不同组分的破坏能力是不同的，这说明高频超声对生物大分子的破坏具有选择性。从这个角度看，高频超声体现出出某种量子效应，称声场中的量子为声子，声子等价于一个频率为 ω 的量子谐振子，能量为 $h\omega$ ，即与频率成正比。生物大分子的组分和结构决定了它对某种频率的声子具有特定的选择性，容易吸收该频率声子的能量，进入激发态而发生组分和结构的变化，即被有效破坏。那么，针对不同的生物大分子，优选合

适的特定超声频率,将能够取得事半功倍的效果,大大提高处理效率。

2.3 高频超声对叶绿素的破坏及合成抑制作用

叶绿素 *a* 是蓝藻光合作用的作用中心色素,测定对照组和 5 min 超声处理组的叶绿素 *a* 浓度,结果如图 3 所示。

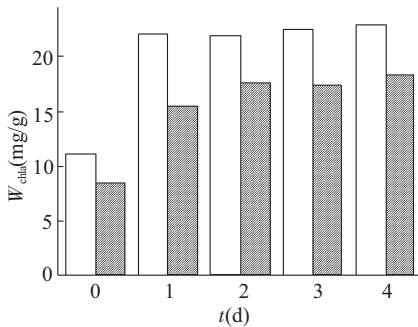


Fig.3 Chla concentration of *Spirulina platensis* cells
□ control ■ ultrasound 5 min

5 min 超声处理后叶绿素 *a* 浓度由 11.08 下降到 8.4,降幅达 24%,说明超声对叶绿素有明显的破坏作用。另一方面,在叶绿素合成过程中起关键作用的一些酶也附着于类囊体膜上^[8],超声组的活细胞叶绿素浓度始终明显低于对照组,可能是因为这些酶被破坏,从而抑制了叶绿素的合成。

3 讨 论

基于超声的生物效应,低强度的 1.7 MHz 超声对蓝藻细胞中类囊体膜上的藻蓝蛋白和某些酶具有强烈的破坏作用,因此破坏了藻胆体和叶绿素 *a* 这两类天线复合物,并抑制了叶绿素 *a* 的生物合成,从而极大影响光合作用的进行,导致蓝藻生长被大大抑制。

1.7 MHz 超声对蓝藻细胞不同成分的破坏具有选择性,在某种程度上体现出高频超声的量子效应,根据不同的处理对象优选合适的超声频率,可大大提高抑制蓝藻的效率。

治理蓝藻水华时,无论何种物理或化学方法,均对其它水生生物有或多或少的负面影响。在水中,高频超声波长短(1.7 MHz 超声的波长约 0.88 mm),散射强,传播距离短,在本文实验条件下超声能量基本集中在 10 cm 以内。高频超声的这种能量集中特性,尤其适合治理浮游水面的蓝藻水华,对其它水生生物影响较小,而且超声方法具有设备简单、维护方便、运行费用低、无二次污

染等优点,因此在抑制蓝藻生长、防治水华、净化水体等环境保护领域,具有广阔的应用价值。

参考文献:

- [1] 陈水勇,吴振明,俞伟波. 水体富营养化的形成、危害和防治[J]. 环境科学与技术, 1999,22:11~15.
- [2] 张维昊,徐小清,丘昌强. 水环境中微囊藻毒素研究进展[J]. 环境科学研究, 2001,14:57~61.
- [3] 张景民. 藻类光合作用原初反应内能量传递途径及其机制研究[D]. 中国科学院感光化学研究所博士论文, 1997.6~10.
- [4] 袁易全. 近代超声原理与应用[M]. 南京: 南京大学出版社, 1996.170~171.
- [5] Rao SR, Tripathi U, Ravishankar GA. Biotransformation of codeine to morphine in freely suspended cells and immobilized cultures of *Spirulina platensis*[J]. *World J Microb Biot*, 1999,15:465~469.
- [6] MacKinney G. Absorption of light by chlorophyll solution[J]. *J Biol Chem*, 1941,140:315~322.
- [7] 武宝珩,陈贻竹,臧汝波. 钝顶螺旋藻的光谱特征及耐热的荧光研究[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 1994,15:119~124.
- [8] 许晓明,戴新宾,陆巍,等. 细胞核、细胞质基因与光合作用的关系[J]. 生物学通报, 1999,34:5~6.

STUDIES ON THE INHIBITION OF CYANOBACTERIA'S GROWTH BY LOW-POWER AND HIGH-FREQUENCY ULTRASOUND

HAO Hong-wei¹, CHEN Yi-fang¹, WU Min-sheng¹, TANG Jiao-wen², WU Qing-yu²

(1. Department of Mechanical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: To prevent water bloom, a new method of inhibiting cyanobacteria's growth was presented based on the bio-effect of ultrasound. The key components of antenna complexes, such as phycobilisome and chlorophyll, are damaged or biosynthetically inhibited by low-power and high-frequency (1.7 MHz) ultrasound efficiently and energy-savingly, so the photosynthesis is restrained and cyanobacteria's growth is inhibited. In the experiments with *Spirulina platensis*, after the most economic and effective ultrasonic irradiation of 5 min, the concentration was decreased obviously and the rate of growth was slowed down greatly. It was found that phycocyanin was damaged intensely in the experiments, i.e., a selective damage of high-frequency ultrasound on different cell components was found. The explanation was presented based on the quantum effect of high-frequency ultrasound.

Key Words: Cyanobacteria; High-frequency ultrasound; Phycocyanin;
Chlorophyll; Photosynthesis