

光生物反应器中光强和 Fe^{3+} 浓度对铜绿微囊藻生长和毒素合成的影响

张宜峰^{1,2}, 康瑞娟¹, 丛威¹, 马润宇²

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 在 2.5 L 光生物反应器中考察了光强、通气量等对铜绿微囊藻生长的影响, 确定了最佳生长条件. 在此条件下考察不同 Fe^{3+} 浓度(0~500 $\mu\text{mol/L}$)对铜绿微囊藻的生长、叶绿素及微囊藻毒素(MC-LR)含量的影响, 同时考察光照强度对铜绿微囊藻产毒素的影响. 实验结果表明, 在低铁($\text{Fe}^{3+}<0.1 \mu\text{mol/L}$)、缺铁($\text{Fe}^{3+}<0.01 \mu\text{mol/L}$)及高铁($\text{Fe}^{3+}>100 \mu\text{mol/L}$)环境下, 微囊藻生长、叶绿素及毒素合成均受到抑制. 生物量和叶绿素在 Fe^{3+} 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时含量最高, 毒素在 Fe^{3+} 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、光强为 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时含量最大.

关键词: Fe^{3+} 浓度; 光反应器; 铜绿微囊藻; 微囊藻毒素; 光照强度

中图分类号: TQ225.18 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)06-1192-05

1 前言

水体中氮、磷等营养物质含量增高导致水体富营养化程度日趋加重, 造成藻类异常繁殖而出现水华现象, 对生态系统的平衡有很大的破坏. 我国湖泊发生水华时的优势种群主要是铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)^[1], 它分泌的微囊藻毒素(Microcystins, MCs)可以致人畜死亡, 在淡水藻类分泌的毒素中毒性最强, 污染最广^[2].

近年来的研究表明, 微量元素对铜绿微囊藻的生长和产毒作用有不同的影响, Lukac 等^[3]研究了 Fe^{3+} , Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 等对微囊藻毒素合成的影响, 结果表明, Fe^{3+} 明显影响生长和产毒量. 缺铁能降低藻细胞内酶的活性进而影响藻对硝酸盐的利用^[4]、固氮过程^[5]、电子传递和光合作用. Ame 等^[6]、连民等^[7]都报道铁离子浓度与藻毒素的合成呈正相关性.

光照强度对微囊藻的生长有重要影响, 对于微囊藻毒素合成的影响, 不同的研究者得出的结果却并不一致, 如 Watanbe 等^[8]认为随着光强增加, 毒性增加 4 倍; Van der Westhuizen 等^[9]报道光强对毒素的影响很小, 随着光强的增加, 毒素含量先增加后减少; Song 等^[10]报道增加光强, 藻毒素含量减少. 本实验室在 Fe^{3+} 浓度对铜绿微囊藻的生长和生化组成方面进行了初步研究^[11], 表明 Fe^{3+} 是铜绿微囊藻生长的重要限制因子. 与以往文献报道用摇瓶培养研究不同, 本工作在可以对蓝藻细胞进行高密度规模化培养的光生物反应器中进行, 在模拟自然水华爆发的生态状况下考察并分析 Fe^{3+} 对铜绿微

囊藻生长、毒素含量的影响及光照强度对微囊藻产毒素的影响, 以期来控制湖泊中微囊藻水华现象的发生提供理论依据.

2 材料与方法

2.1 藻种

所用藻种为铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC7806 标准藻种, 来自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB), 保存在 pH 7.1 的 BG-11 培养基中.

2.2 器皿处理

具体方法详见文献[11].

2.3 培养条件和实验组设计

2.3.1 藻种培养

在 BG-11 培养基中接种 *Microcystis aeruginosa* PCC7806, 置于摇床上光照培养, 温度 25℃, 光照强度为 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 摇床转速为 130 r/min. 藻细胞密度经镜检计数超过 10^6mL^{-1} 时, 即可作为实验藻种.

2.3.2 光反应器培养

反应器为自制的内环流式气升光生物反应器, 总体积 2.5 L, 工作体积 2.0 L, 材质为耐热耐压的硅硼玻璃, 可进行高温高压灭菌. 罐体下部的夹套中可通入恒温水以维持培养温度. 3 个反应器为一组, 放置在控制箱内, 由安装在罐体前后的光源板提供光照, 每块光源板横向平行排列 6 支日光灯管(18 W, National, 北京), 光照强度为 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. 空气由孔径为 0.2 μm 的空气过滤器(购自 PALL 公司)除菌后通过进气管进入罐内(用气体

收稿日期: 2006-12-29, 修回日期: 2007-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20676139); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2002CB412306)

作者简介: 张宜峰(1976-), 男, 河南省宜阳县人, 硕士研究生, 生物化工专业; 康瑞娟, 通讯联系人, E-mail: rjkang@home.ipe.ac.cn.

流量计控制流速). 将 2.5 L 气升式反应器(含 2 L 培养液)在高压蒸汽灭菌锅中高温灭菌, 冷却至室温, 在超净台内将 150 mL 种液倒入, 开始培养.

2.3.3 实验设计

(1) Fe^{3+} 浓度影响实验设计

将柠檬酸铁铵配制成 Fe^{3+} 浓度为 20 mmol/L 的储备液, 采用梯度稀释的办法, 加入无铁的 BG-11 培养基中, 使 Fe^{3+} 在光反应器中浓度分别为 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 和 500 $\mu\text{mol/L}$, 实验编号分别为 1~7, 灭菌备用. 将待接种的藻液在 3000 r/min 离心 5 min, 收集藻细胞, 用无铁的 BG-11 培养基洗涤 2 次去铁, 将藻细胞重新悬浮在 150 mL 的无铁 BG-11 培养基中, 转接入光反应器中. 培养条件为温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度和空气流量由实验确定. 每天在相同时间取样, 测定藻细胞密度和叶绿素 a 的含量, 在对数生长末期测定毒素含量.

(2) 光照强度影响实验设计

在 BG-11 培养基中 Fe^{3+} 浓度与上节设计相同, 得到铜绿微囊藻产毒素最高的铁离子浓度, 灭菌备用. 接种方法同上节. 培养条件为温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 空气流量由实验确定, 光照强度分别为 15, 30, 45 和 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 考察不同光照强度对藻细胞内毒素的影响.

2.4 藻生长曲线测定

本实验使用 721 分光光度计测定 750 nm 的吸光值 (A_{750})以确定藻的生长曲线. 藻的干重标准曲线制作方法是: 用新鲜的培养基将藻细胞等比例稀释, 分别测定在 750 nm 下藻的光吸收值, 然后在 105 $^{\circ}\text{C}$ 下分别烘干至恒重, 即可得到干重和吸光值之间的线性关系 $\rho = 0.4776A_{750} + 0.0034$ (方差 $R^2 = 0.9873$).

2.5 叶绿素的测定

叶绿素的测定方法详见文献[11].

2.6 毒素的提取和测定方法

参照文献[6, 12], 取 0.5 g 冷冻干燥的藻细胞加入 20 mL 5% 乙酸溶液中, 超声破碎(400 W, 3 min), 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液. 在沉淀中加入 15 mL 80% 的甲醇溶液, 重复上述操作 1 次, 合并 2 次上清液. 用 100% 的甲醇和蒸馏水分别对 SPE 固相萃取柱(500 mg/3 mL, 购自艾杰尔公司)进行预处理, 将得到的上清液以 3~5 mL/min 的速度流过 SPE 固相萃取柱, 用 20% 的甲醇溶液淋洗, 然后用 10 mL 100% 的甲醇洗脱. 将洗脱液在旋转蒸发器上蒸干, 用 1 mL 甲醇定容, 待分析.

用高效液相色谱对藻毒素进行分析, 以 Hypersil BDS C18 分析色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)为分离柱, 流动相采用 0.1% 三氟乙酸水溶液与甲醇的混合液(40:60, ϕ), 检测波长为 238 nm, 进样量为 10 μL . 依据

保留时间定性, 外标法定量.

毒素的标准样品由中国科学院水生生物研究所宋立荣老师惠赠.

3 结果与讨论

3.1 光照强度对铜绿微囊藻在光反应器中生长的影响

温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、空气流量 0.4 L/min, 在标准 BG-11 培养基中(Fe^{3+} 浓度为 12.3 $\mu\text{mol/L}$)考察了光照强度为 35, 45 和 55 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时铜绿微囊藻在光反应器中的生长状况. 每天在相同的时间取样, 测定藻细胞密度、叶绿素 a 的含量, 结果如图 1 所示. 由图可见, 光照强度对铜绿微囊藻的生长有显著影响. 当光强从 35 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 增加到 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 藻细胞的生长速率从 0.076 g/(L·d)提高到 0.135 g/(L·d), 培养 9 d 后细胞密度增加了 72%. 继续将光强增加至 55 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 藻细胞的生长速率和密度反而均有下降, 表明该光强下藻细胞的生长受到抑制. 35, 45 和 55 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光照强度下生长的藻细胞密度分别为 0.75, 1.29 和 0.47 g/L. 结果表明, 在本实验条件下, 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 是较适宜的光照强度.

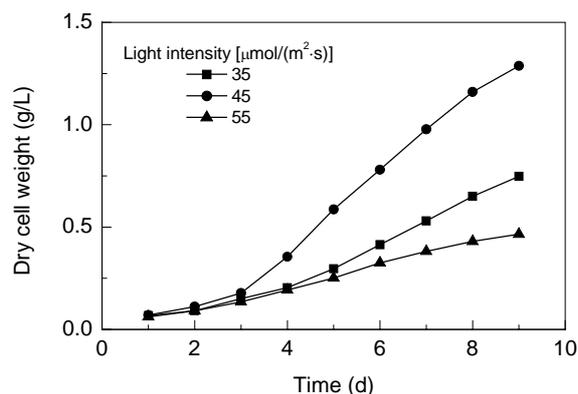


图1 铜绿微囊藻在不同光照强度下的生长曲线
Fig.1 Growth curves of *Microcystis aeruginosa* under different light intensities in photobioreactor

3.2 通气量对铜绿微囊藻在光反应器中生长的影响

温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的情况下, 在标准 BG11 培养基中(Fe^{3+} 浓度为 12.3 $\mu\text{mol/L}$)考察不同通气量对铜绿微囊藻生长的影响, 结果见图 2. 如图所示, 当通气量从 0.4 L/min 增加至 0.5 L/min 时, 藻细胞生长速率从 0.107 g/(L·d)提高到 0.171 g/(L·d), 培养 9 d 后细胞密度增加了 55.8%. 但继续增大通气量至 0.6 L/min 后, 藻细胞的增殖速率比 0.5 L/min 时有所下降. 至培养结束时, 在 0.4, 0.5 和 0.6 L/min 通气量下生长的铜绿微囊藻的细胞密度分别为 1.04, 1.62 和 1.23 g/L. 结果表明, 在本实验条件下, 通气量取 0.5 L/min 较适宜.

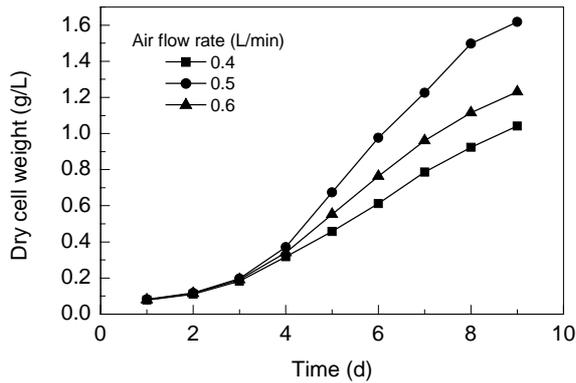


图2 铜绿微囊藻在不同空气流量下的生长曲线
Fig.2 Growth curves of *Microcystis aeruginosa* under different air flow rates in photobioreactor

3.3 Fe^{3+} 浓度对铜绿微囊藻在光反应器中生长的影响

在无铁的培养基中添加适量的柠檬酸铁铵,使 Fe^{3+} 在反应器中的浓度不同,灭菌后接种.培养条件为温度 25°C 、光强 $45\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,通气量 $0.5\ \text{L}/\text{min}$.每天在

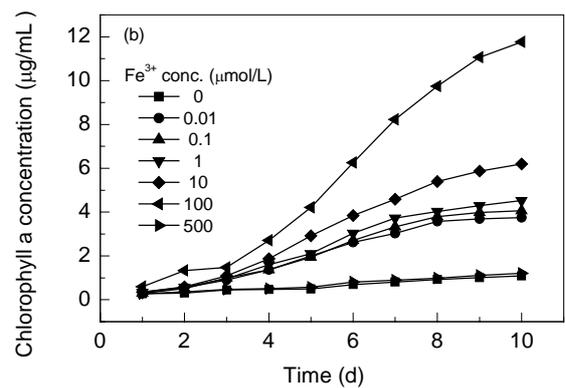
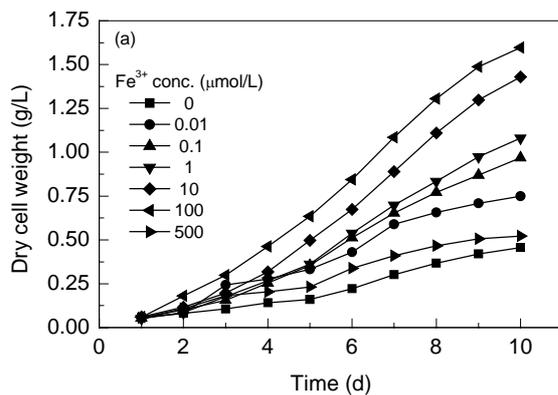


图3 铜绿微囊藻在光反应器中不同铁离子浓度下的生长和叶绿素 a 含量变化曲线

Fig.3 Growth curves and chlorophyll a concentration of *Microcystis aeruginosa* under different Fe^{3+} concentrations in photobioreactor

3.4 Fe^{3+} 浓度对铜绿微囊藻细胞内毒素含量的影响

在对数生长末期收集不同 Fe^{3+} 浓度中生长的微囊藻细胞,提取和分析藻毒素(MC-LR).在光生物反应器中,藻细胞在不同 Fe^{3+} 浓度下培养后,毒素的分析结果如图4所示.当 Fe^{3+} 浓度为 $0, 0.01$ 和 $0.1\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时,细胞内毒素相对于细胞干重的含量分别为 $1.91, 3.08$ 和 $5.43\ \mu\text{g}/\text{g}$.藻细胞中毒素含量在 Fe^{3+} 浓度增加至 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时达到最大,为 $56.95\ \mu\text{g}/\text{g}$.继续增加 Fe^{3+} 浓度,则毒素含量明显下降,当 Fe^{3+} 浓度为 $500\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时,毒素含量仅为 $3.64\ \mu\text{g}/\text{g}$.Utkilen等^[14]认为,MC分子能结合由水中 Fe^{3+} 经光照后产生的 Fe^{2+} ,使细胞内 Fe^{2+} 浓度升高,而结合了 Fe^{2+} 的MC分子又能使多肽合成酶活性增强,促进MC的合成加速.因此,适量增加 Fe^{3+} 浓度有利于微囊藻毒素的合成.

相同时间取样,测定藻细胞密度和叶绿素 a 的含量,结果见图3.随着 Fe^{3+} 浓度的增加,藻细胞的生长速率逐渐增大,至 Fe^{3+} 浓度 $100\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时,藻细胞的生物量和叶绿素 a 的含量达到最大值,分别为 $1.60\ \text{g}/\text{L}$ 和 $11.77\ \mu\text{g}/\text{mL}$.当 Fe^{3+} 浓度继续增加至 $500\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 时,藻细胞生物量和叶绿素 a 浓度急剧降低,分别为 $0.52\ \text{g}/\text{L}$ 和 $1.21\ \mu\text{g}/\text{mL}$,仅高于无 Fe^{3+} 时的结果(生物量和叶绿素 a 分别为 $0.46\ \text{g}/\text{L}$ 和 $1.19\ \mu\text{g}/\text{mL}$).表明适量的 Fe^{3+} 可以促进微囊藻的生长,但过高的 Fe^{3+} 浓度对微囊藻的生长有明显的抑制.

Fe^{3+} 对叶绿素 a 和细胞生长的影响规律相同,但叶绿素对 Fe^{3+} 浓度的变化更敏感. Fe^{3+} 浓度从 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 增加到 $100\ \mu\text{mol}/\text{L}$,生物量从 $1.43\ \text{g}/\text{L}$ 增加到 $1.60\ \text{g}/\text{L}$,增长了 11.9% ;叶绿素 a 的含量从 $6.19\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 增长到 $11.77\ \mu\text{g}/\text{mL}$,增长了 90.1% .原因是铁离子能通过影响叶绿素酸酯的合成以及控制 δ -氨基乙酸丙醇的合成来调节叶绿素的合成^[13].

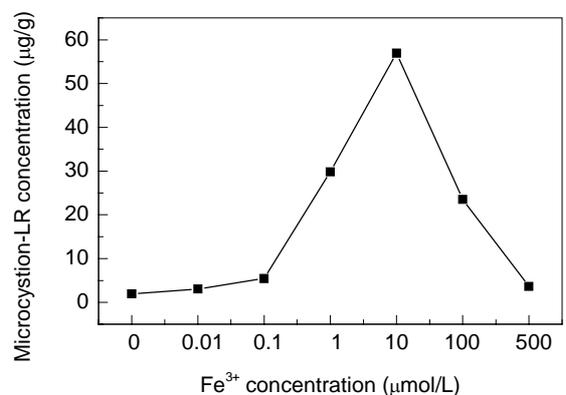


图4 铜绿微囊藻在不同的铁离子浓度下毒素的含量
Fig.4 Microcystin-LR concentrations of *Microcystis aeruginosa* under different Fe^{3+} concentrations in photobioreactor

3.5 光强对铜绿微囊藻细胞内毒素含量的影响

在上述实验确定的最佳培养条件(培养基中 Fe^{3+} 浓度 $10\ \mu\text{mol/L}$, 培养温度 $25\ ^\circ\text{C}$, 通气量 $0.5\ \text{L/min}$)下, 考察不同光强对藻细胞产毒素的影响, 结果如图5所示。从图可以看到, 光强变化对微囊藻毒素有显著影响。当光照强度从 $15\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 增加至 $30\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 毒素相对于细胞干重的含量从 $49.28\ \mu\text{g/g}$ 增加至 $66.55\ \mu\text{g/g}$ 。光强继续增加, 毒素浓度逐渐下降, 当光强提高到 $60\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 毒素浓度为 $32.69\ \mu\text{g/g}$ 。

上述实验结果表明, 铜绿微囊藻生长和产毒的最佳条件不同, 产毒的最适光强和铁离子浓度低于生长所需的最适条件。原因可能是由于在较高光强和铁离子浓度下, 藻细胞的化学组成发生了改变, 产生了较多的多糖类组分^[15], 使胞内蛋白的比例相对减少, 单位细胞干重中的毒素含量降低。Utkilen等^[16]曾经研究了不同光强对藻毒素合成的影响, 发现当光强高于 $40\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时, 单位干重的毒素含量逐渐降低, 但单位总蛋白的毒素含量却维持不变。

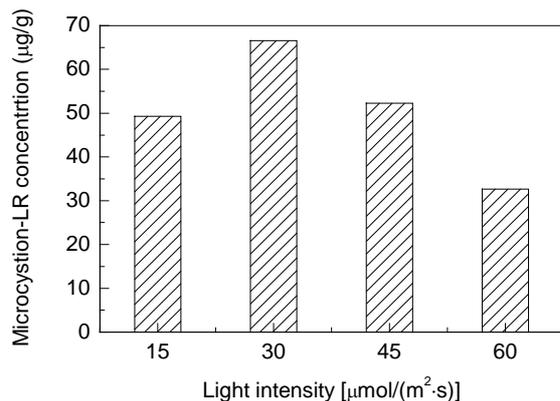


图5 铜绿微囊藻在不同光强下毒素含量的变化

Fig.5 Microcystin-LR concentrations of *Microcystis aeruginosa* under different light intensities in photobioreactor

4 结论

在光生物反应器中, 重点考察了光强和 Fe^{3+} 浓度对铜绿微囊藻生长和毒素合成的影响。结果表明, 光强和 Fe^{3+} 浓度是影响铜绿微囊藻生长的重要因素, 同时对微囊藻毒素的合成有显著影响。本实验条件下, 铜绿微囊藻生长的最适光强是 $45\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 较适宜的通气流量是 $0.5\ \text{L/min}$ 。在 Fe^{3+} 浓度低于 $100\ \mu\text{mol/L}$ 条件下, 藻细胞的生物量和叶绿素含量随 Fe^{3+} 浓度增加而增大。

Fe^{3+} 浓度低于 $0.1\ \mu\text{mol/L}$ 或高于 $100\ \mu\text{mol/L}$ 时, 铜绿微囊藻生长和叶绿素的合成均受到明显的抑制。光强和 Fe^{3+} 浓度对于毒素合成的影响也遵循相同的规律, 只是最适值较低。毒素含量达到最大值时的光强为 $30\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, Fe^{3+} 浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 。

参考文献:

- [1] 蔡启明. 太湖环境生态研究 [M]. 北京: 气象出版社, 1998. 2-3.
- [2] 胡宗达, 周元清. 水华蓝藻毒素研究概述 [J]. 云南环境科学, 2004, 23(3): 21-24.
- [3] Lukac M, Aegerter R. Influence of Trace Metals on Growth and Toxin Production of *Microcystis aeruginosa* [J]. Toxicon, 1993, 31: 293-305.
- [4] Artin J H, Coale K H, Johnson K S. Testing the Iron Hypothesis in Ecosystems of the Equatorial Pacific Ocean [J]. Nature, 1994, 371(64): 123-129.
- [5] Martin J H. Iron Deficiency Limits Phytoplankton Growth in Antarctic Waters [J]. Global Biogeochem. Cycles, 1990, 4(1): 5-12.
- [6] Ame M V, Daniel A W. Effects of Ammonium and Temperature on Microcystin Content by a Natural Concentrated *Microcystis aeruginosa* Population [J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2005, 168: 235-248.
- [7] 连民, 刘颖, 俞顺章. 氮、磷、铁、锌对铜绿微囊藻生长及产毒的影响 [J]. 上海环境学报, 2001, 20(4): 166-170.
- [8] Watanabe M F, Oishi S. Effects of Environmental Factors on Toxicity of Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under Culture Conditions [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49: 1342-1344.
- [9] Van der Westhuizen A J, Eloff J N. Effect of Temperature and Light on the Toxicity and Growth of the Blue-green Alga *Microcystis aeruginosa* (UV-600) [J]. Planta, 1985, 163: 55-59.
- [10] Song L R, Sano T, Li R H, et al. Microcystin Production of *Microcystis viridis* (Cyanobacteria) under Different Culture Conditions [J]. Phycological Research, 1998, 46(Suppl.): 19-23.
- [11] 吕秀萍, 张栩, 康瑞娟, 等. Fe^{3+} 对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响 [J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(1): 27-30.
- [12] 张维昊, 肖邦定, 方涛, 等. 天然水华蓝藻中微囊藻毒素的提取和净化研究 [J]. 环境污染与防治, 2003, 25(5): 265-267.
- [13] 李东侠, 丛威, 蔡昭铃, 等. 铁胁迫诱导的赤潮异弯藻细胞生化组成变化 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1185-1187.
- [14] Utkilen H, Gjolme N. Iron-stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(2): 797-800.
- [15] Borowitzka M A, Borowitzka L J. Micro-algal Biotechnology [M]. New York: Cambridge University Press, 1988. 13-15.
- [16] Utkilen H, Gjolme N. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* as a Function of Light in Continuous Cultures and Its Ecological Significance [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58: 1321-1325.

Effects of Light Intensity and Fe^{3+} Concentration on *Microcystis aeruginosa* Growth and Microcystin Production in a Photobioreactor

ZHANG Yi-feng^{1,2}, KANG Rui-juan¹, CONG Wei¹, MA Run-yu²

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The optimal conditions of *microcystis aeruginosa* cultured in a photobioreactor were established. The effects of light intensity and Fe^{3+} concentration on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production in the photobioreactor were studied. The Fe^{3+} concentration in the culture medium changed between 0~500 $\mu\text{mol/L}$. The results showed that the cells growth and microcystin-LR production were both affected by changing Fe^{3+} concentration and light intensity. Biomass and chlorophyll were limited when Fe^{3+} concentration was below 0.1 $\mu\text{mol/L}$ and reached the maximum when Fe^{3+} concentration was 100 $\mu\text{mol/L}$. Then they both dropped down when Fe^{3+} concentration was further increased. The maximum production of microcystin-LR was obtained at 10 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{3+} concentration. The effect of light intensity on microcystin-LR production was also studied under the optimal Fe^{3+} concentration. The results showed that the optimal light intensity for microcystin-LR production was 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$.

Key words: Fe^{3+} concentration; photobioreactor; *Microcystis aeruginosa*; microcystin-LR; light intensity