

不同营养方式下小球藻生长与光合作用的变化* Variation of Growth and Photosynthesis in *Chlorella sorokiniana* Under Different Trophic Modes

王超¹, 孙春晓², 乔洪金^{2**}, 丛超^{2,3}, 王际英², 张利民²

WANG Chao¹, SUN Chunxiao², QIAO Hongjin², CONG Chao^{2,3}, WANG Jiying², ZHANG Limin²

(1. 青岛大学生命科学学院, 山东青岛 266071; 2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东烟台 264006; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

(1. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266071, China; 2. Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai, Shandong, 264006, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China)

摘要:【目的】研究小球藻在自养条件下和以乙酸为碳源的异养、混养条件下生长以及光合作用的变化。【方法】以小球藻 *Chlorella sorokiniana* 为研究对象, 通过测定 OD_{550} 和光系统 II (PS II) 叶绿素荧光研究其生长情况和光合作用的变化。【结果】小球藻在初始接种浓度为 5×10^6 个/mL 的条件下, 异养和混养的生长速度显著快于自养, 到达稳定期仅需 1.5 d, 而自养生长需要 9 d; 叶绿素荧光参数自养大于混养, 而混养又大于异养, 有效光量子产量混养比自养降低 21.5%, 异养比自养降低 98.1%; 混养的 Rubisco 酶基因 mRNA 表达量最高, 分别是异养和自养的 3.2 倍和 1.8 倍。【结论】小球藻在混养条件下光系统仅受到微弱抑制, 生长速度和最高细胞密度均高于其它营养方式, 适合规模化培养。

关键词: 小球藻 自养 异养 混养 光合作用

中图分类号: Q945.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)02-0115-05

Abstract: 【Objective】The variation of growth and photosynthesis of microalgae was studied and compared under autotrophic condition and hetero- and mixotrophic conditions with acetate as carbon source. 【Methods】With *Chlorella sorokiniana* as material, the changes of growth and photosynthesis were reflected by determining the OD_{550} and the chlorophyll fluorescence from photosystem II (PS II). 【Results】The growth rates of hetero- and mixotrophic conditions were significantly higher than that of autotrophic condition. It was only 1.5 d for cells reaching stationary phase under hetero- and mixotrophic conditions, but 9 d for cells under autotrophic condition. The parameters of chlorophyll fluorescence under autotrophic condition were significantly higher than that under hetero- and mixotrophic conditions, and that under mixotrophic condition were significantly higher than that under heterotrophic condition. The effective PS II quantum yield under mixo- and heterotrophic condition was reduced 21.5% and 98.1%, re-

duced 21.5% and 98.1%, re-

收稿日期: 2016-02-21

修回日期: 2016-04-05

作者简介: 王超 (1982-), 女, 讲师, 主要从事藻类生物技术研究。

* 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (BS2013HZ018), 国家自然科学基金青年基金项目 (31201973), 海洋生物产业——水生动物营养与饲料研发创新示范平台项目 (201303003) 和山东省科技发展计划项目 (2014GHY115006) 资助。

** 通讯作者: 乔洪金 (1983-), 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事藻类生物技术研究, E-mail: hongjinqiao@hotmail.com。

spectively, compared with that of autotrophic condition. The mRNA expression of Rubisco gene under mixotrophic condition were highest, and 3.2-fold and 1.8-fold of that under hetero- and autotrophic conditions, respectively. **【Conclusion】**The photosystems of *Chlorella* under mixotrophic condition only slightly inhibited. In addition, the growth rate and maximal cell density under mixotrophic condition were higher than other conditions. Therefore, mixotrophic growth mode is suitable for large-scale cultivation.

Key words: *Chlorella sorokiniana*, autotrophic, heterotrophic, mixotrophic, photosynthesis

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160512.001

0 引言

【研究意义】小球藻是一种可进行多种营养方式的单细胞绿藻,其营养方式主要分为3种:一是利用光能和CO₂进行光合自养生长;二是在黑暗条件下利用有机碳源和O₂进行异养生长,类似于微生物的发酵作用^[1-2];三是在光照条件下利用有机碳源进行混养生长,光合作用和发酵作用同时进行^[3-4]。由于营养方式多样,生长快,光合效率高,且富含蛋白、脂肪和多糖等物质,小球藻在光合作用机理研究^[5-6],抗生素与抗肿瘤等药物的开发^[7-8],食品和水产饲料^[8-9],高密度规模化培养与生物柴油炼制^[10-12],以及污水处理^[13-14]等方面都有应用。**【前人研究进展】**乙酸是一种很多种类的微藻都可以利用的碳源,可显著促进微藻在异养和混养条件下快速生长。早在1960年,Pringsheim等^[15]就报道乙酸能引起衣藻的不正常光合作用,并微弱地抑制小球藻的光合活性。接着,Eppley等^[16]在衣藻中发现光合作用产生的ATP和还原力被直接用于同化乙酸。此后,许多学者以衣藻作为材料对乙酸的效应进行研究。一方面,乙酸抑制衣藻光反应及其相关过程:减少氧气释放^[17],抑制光捕获蛋白的表达^[18];另一方面,乙酸降低衣藻暗反应的相关活性:降低碳酸酐酶活性^[19],抑制Rubisco酶的表达^[20]和光合固碳^[17]。**【本研究切入点】**尽管在20世纪60年代乙酸被成功地应用于研究小球藻的乙醛酸循环^[21-23],但是之后有关此方面的研究报道很少。随着小球藻规模化生产的开展,需进一步研究小球藻在乙酸条件下的光合营养机制。**【拟解决的关键问题】**以小球藻为材料,研究其在添加乙酸的条件下,自养、异养和混养条件下的生长变化,以及光合作用光反应和暗反应的变化,旨在为小球藻的异养和混养规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与培养条件

所用小球藻藻种(*Chlorella sorokiniana*)由中国科学院海洋研究所馈赠。细胞培养在光照恒温摇

床中,转速150 r·min⁻¹,温度30℃,由冷荧光灯管提供的光照强度为80 μmol·m⁻²·s⁻¹,光暗比12 h:12 h。自养(AT)培养采用BBM培养基^[24],异养(HT)和混养(MT)培养则采用BBM培养基加上30 mmol/L的乙酸钠,初始接种浓度为5×10⁶个/mL,其中异养培养瓶以黑色塑料布包裹避光,每种处理均重复3次。

1.2 细胞生长的测定

微藻的生长通过在紫外分光光度计上(Shimadzu UV-1800,日本)测量550 nm处吸光度的变化来反映。同时用血球计数板进行细胞计数,得到细胞个数与OD₅₅₀的标准曲线,根据OD₅₅₀值就可以转换成每毫升细胞数。自养培养每天取样一次,异养和混养培养每隔半天取样一次。

1.3 光系统II(PSII)叶绿素荧光的测定

使用具有调制荧光技术的Imaging-PAM系统(Heinz Walz,德国)测量PSII的原位叶绿素荧光,该系统连接到一台安装有视窗软件的PC获取数据。使用慢速动力学程序自动诱导叶绿素荧光。分别取自养、异养和混养条件下对数生长期中期的藻液,首先暗适应15 min,然后使用饱和脉冲激发藻液,立即测量最小(F₀)和最大(F_m)荧光值,计算出PSII的最大光化学量子产量(F_v/F_m)。然后,光化光被打开,藻液开始光合作用,光照样品的最大荧光值(F_m')被记录。PSII的有效光化学量子产量Y(II)、相对电子传递速率rETR,非光化学淬灭NPQ按照下列公式计算:

$$Y(II) = (F_m' - F) / F_m', \quad (1)$$

$$rETR = Y(II) \cdot PAR \cdot 0.84 \cdot 0.5, \quad (2)$$

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'. \quad (3)$$

其中,PAR是光合有效辐射,0.84是植物的经验性吸光系数,0.5是假设植物吸收的光能被两个光系统均分。

1.4 Rubisco酶mRNA表达量的测定

分别取自养、异养和混养条件下对数生长期中期的藻液,离心收集后采用Trizol法提取总RNA,并反转录为cDNA。使用定量PCR,设计引物扩增Rubi-

sco 大亚基上的片段(正向引物: 5'-CAGCGG-TAGCGGCAGAATC-3'; 反向引物: 5'-CTTCAC-CAGGAACAGGCTCG-3')和内参基因 18S rRNA 上的片段(正向引物: 5'-CTGAGAAACGGCTAC-CACATC-3'; 反向引物: 5'-CCCCACCCGAAATC-CAAC-3'), PCR 体系包含: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 0.5 μL 、无菌双蒸水 10.5 μL 和 PCR mix (SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 大连宝生物公司) 12.5 μL 、待测样品 cDNA 1 μL 、每个样品重复 3 次。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min, 35 个循环, 然后进行 55~95 $^{\circ}\text{C}$ 的熔解曲线分析, 荧光波长为 490 nm, 在 icycler real-time quantity PCR 仪(BIO-RAD 公司, 美国)上进行反应。数据处理采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 相对定量法。

1.5 数据处理

采用 SPSS 11.0 (SPSS Inc., 美国) 对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVAs), 结果用平均数 \pm 标准差 ($M \pm SD$) 表示。若存在显著差异, 则应用 Duncan 多重比较法确定组间差异, 当 $P < 0.05$ 时, 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同营养方式下小球藻的生长情况

经测定, 小球藻藻液 OD_{550} 值与细胞个数的换算公式为 $y = 2 \times 10^7 x$ ($R^2 = 0.99$, y 是每毫升细胞个数, x 是 OD_{550} 值)。小球藻在自养条件下经历 0.5 d 的延滞期后进入对数生长期, 9 d 左右结束对数生长期, 然后进入一个缓慢生长的稳定期; 在异养和混养条件下, 经历 0.5 d 的延滞期后迅速进入对数生长期, 在 1.5 d 左右完成对数生长进入稳定期, 混养生长基本维持细胞密度不变, 而异养生长出现细胞密度缓慢下降的现象(图 1)。混养生长最高细胞密度可达 $(3.0 \pm 0.2) \times 10^7$ 个/mL, 显著高于异养生长的最高细胞密度 $(2.7 \pm 0.4) \times 10^7$ 个/mL ($P < 0.05$), 混养和异养生长的最高细胞密度又显著高于自养生长的最高细胞密度 $(2.3 \pm 0.2) \times 10^7$ 个/mL ($P < 0.05$)。

2.2 不同营养方式下小球藻的叶绿素荧光参数

如表 1 所示, 小球藻在自养条件下的各项叶绿素荧光参数均显著高于异养和混养条件 ($P < 0.05$), 而混养条件的各项参数又显著高于异养条件 ($P < 0.05$)。在异养条件下, F_v/F_m 、 $Y(II)$ 和 rETR 值均

不到自养和混养条件下的 10%, NPQ 值分别是自养和混养条件下的 21.7% 和 36.0%。混养条件下 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、rETR 和 NPQ 分别比自养条件下下降 13.2%、21.5%、21.9% 和 40.0%。

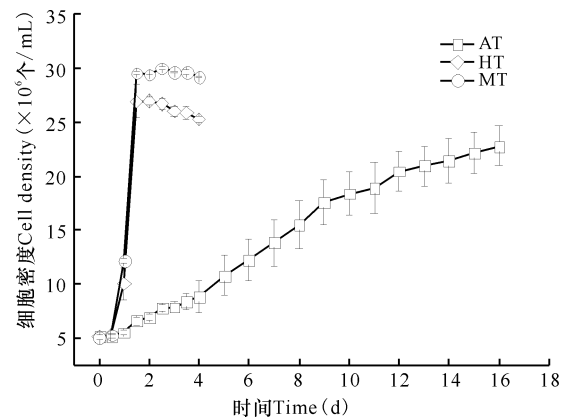
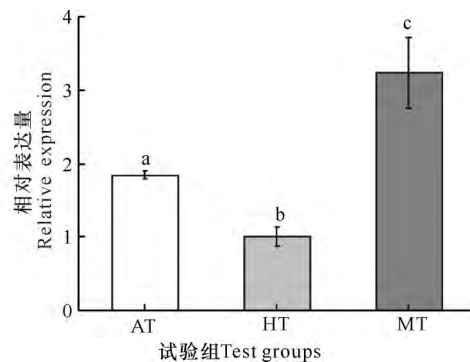


图 1 不同营养方式下小球藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *Chlorella sorokiniana* under different trophic modes

2.3 不同营养方式下小球藻 Rubisco 酶的 mRNA 表达量

如图 2 所示, 以 Rubisco 酶大亚基基因 (*rbcl*) mRNA 的表达量代表 Rubisco 酶的表达量, 小球藻在混养条件下 Rubisco 酶的表达量最高, 分别是异养和自养条件下的 3.2 倍和 1.8 倍, 而自养条件下的表达量是异养条件的 1.8 倍, 三者之间的差异显著 ($P < 0.05$)。



以 HT 组为参照进行归一化处理, 标注不同英文字母的组具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Transcript level of *rbcl* in AT and MT is normalized to that in HT. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

图 2 不同营养方式下小球藻 *rbcl* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 2 Messenger RNA expression of *rbcl* gene under different trophic modes in *Chlorella sorokiniana*

表 1 不同营养方式下小球藻叶绿素荧光参数的比较

Table 1 Comparison of chlorophyll fluorescence parameters under different trophic modes in *Chlorella sorokiniana*

样品 Sample	F_v/F_m	$Y(II)$	rETR	NPQ
AT	0.713±0.003 ^a	0.538±0.009 ^a	18.000±0.265 ^a	0.060±0.012 ^a
HT	0.061±0.010 ^b	0.010±0.004 ^b	0.250±0.212 ^b	0.013±0.004 ^b
MT	0.619±0.005 ^c	0.422±0.008 ^c	14.067±0.252 ^c	0.036±0.003 ^c

注:同一列中上标英文字母不同的组与同组数据相比差异显著, $P < 0.05$

Note: Values within the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

3 讨论

小球藻在无光和有光条件下均可以利用乙酸进行生长,并且生长速度显著快于自养生长,对数生长期显著缩短,据报道,混养条件下的细胞生长速率可以大约看作是自养和异养生长速率之和^[3,25-26],这与文章的结果基本一致(图 1)。许多研究者证明乙酸主要是经过乙醛酸循环被利用^[21,23,27],而乙醛酸循环是独立于光合作用的,因而乙酸可以在黑暗条件下被小球藻利用。

小球藻在异养条件下表现出极低的光合效率(表 1,图 2),表明其光系统已经大部分失去活性,暗反应的关键酶 Rubisco 酶也仅维持本底表达量,在此条件下小球藻完全依赖发酵作用产生的能量维持生长和分裂,表现出类似于真菌的营养特性。而在混养条件下,其光合效率与自养条件相比也受到一定的抑制(表 1),其中代表潜在最大光合作用效率的 F_v/F_m 以及实际光合作用效率的 $Y(II)$ 均低于自养条件,这与 Pringsheim 等^[15]、Heifetz 等^[17]、Kroymann 等^[28]的报道一致。然而,混养条件下的 Rubisco 酶的 mRNA 表达量要显著高于自养条件,表明至少在转录水平上 Rubisco 酶未受到抑制。但是 mRNA 表达量不能代表最终蛋白表达量,因此需要进一步研究 Rubisco 酶活性以确定暗反应是否也受到混养条件的抑制。

4 结论

小球藻在乙酸为碳源的异养和混养条件下均能极快生长,仅 1.5 d 就可以到达稳定期,但异养条件下光系统已大部分失去活性,而混养生长光系统仅受到微弱抑制,既保留异养发酵生长的特性,又可以进行自养条件下的光合作用,因此生长速度和最终的生物量均高于其它营养方式,适合规模化放大培养。

参考文献:

[1] GRIFFITHS D A, GRIFFITHS D J. The fine structure of autotrophic and heterotrophic cells of *Chlorella vulgaris* (Emerson strain)[J]. Plant Cell and Physiology, 1969, 10(1): 11-19.

[2] WALTER J, RICKERT M, AACH H. The role of glucose on the enzymes involved in the release of mature spores of *Chlorella fusca* [J]. Physiologia Plantarum, 1987, 71(2): 219-223.

[3] ENDO H, SANSAWA H, NAKAJIMA K. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light-intensity and acetate concentration [J]. Plant and Cell Physiology, 1977, 18(1): 199-205.

[4] 吴庆余, 匡梅, GRANT N G. 小球藻两个品系在自养与异养条件下的生长、能荷与色素差异 [J]. 植物生理学报, 1992, 18(3): 293-299.

WU Q Y, KUANG M, GRANT N G. Growth, AEC and pigments of *Chlorella protothecoides* in two strains under the autotrophic and heterotrophic conditions [J]. Acta Phytophysiological Sinica, 1992, 18(3): 293-299.

[5] BASSHAM J A, CALVIN M. The Path of Carbon in Photosynthesis [M]. Berkeley: Interscience Publishers, 1960: 1-66.

[6] LEY A, MAUZERALL D. Absolute absorption cross-sections for photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella vulgaris* [J]. BBA-Bioenergetics, 1982, 680(1): 95-106.

[7] 江红霞, 郑怡. 微藻的药用、保健价值及研究开发现状 [J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(1): 68-72.

JIANG H X, ZHENG Y. A review of pharmaceutical and health care value of microalgae and their current status of research and development [J]. Subtropical Plant Science, 2003, 32(1): 68-72.

[8] BOROWITZKA M A. Microalgae source of pharmaceuticals and other biologically active compounds [J]. Journal of Applied Phycology, 1995, 7(1): 3-15.

[9] PULZ O, GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(6): 635-648.

[10] 贺立燕, 韩笑天, 俞志明. 基于熵权的产物柴油微藻开发潜力评价 [J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(2): 305-310.

HE L Y, HAN X T, YU Z M. Evaluation of microalgae potential for biodiesel production in entropy weight theory [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(2): 305-310.

[11] RODOLFI L, ZITTELLI G C, BASSI N, et al. Microal-

- gae for oil; Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(1):100-112.
- [12] 尹继龙,唐小红,郑洪立,等.不同光质对小球藻光自培养积累油脂的影响[J]. *生物加工过程*, 2014, 12(05):62-68. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2014.05.011.
YIN J L, TANG X H, ZHENG H L, et al. Effect of light wavelengths on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in photoautotrophic culture[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(05):62-68. DOI:10.3969/j.issn.1672-3678.2014.05.011.
- [13] 胡沅胜,刘斌,郝晓地,等.微藻处理污水中的絮凝分离/采收研究现状与展望[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(1):12-29.
HU Y S, LIU B, HAO X D, et al. Current status and outlook of microalgae flocculation in wastewater treatment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(1):12-29.
- [14] ASLAN S, KAPDAN I K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae[J]. *Ecological Engineering*, 2006, 28(1):64-70.
- [15] PRINGSHEIM E G, WIESENER W. Photo-assimilation of acetate by green organisms [J]. *Nature*, 1960, 188:919-921.
- [16] EPPLEY R W, MACIAS F M. Role of the alga *Chlamydomonas mundana* in anaerobic waste stabilization lagoons [J]. *Limnology and Oceanography*, 1963, 8(4):411-416.
- [17] HEIFETZ P B, FORSTER B, OSMOND C B, et al. Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(4):1439-1445.
- [18] KINDLE K L. Expression of a gene for a light-harvesting chlorophyll-a-binding chlorophyll-b-binding protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of light and acetate[J]. *Plant Molecular Biology*, 1987, 9(6):547-563.
- [19] FETT J P, COLEMAN J R. Regulation of periplasmic carbonic anhydrase expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate and pH [J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(1):103-108.
- [20] GOLDSCHMIDT-CLERMONT M. The two genes for the small subunit of RuBP Carboxylase/oxygenase are closely linked in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1986, 6(1):13-21.
- [21] SYRETT P J, MERRETT M J, BOCK S M. Enzymes of glyoxylate cycle in *Chlorella vulgaris* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1963, 14(2):249-264.
- [22] SYRETT P J. Kinetics of isocitrate lyase formation in *Chlorella* — Evidence for promotion of enzyme synthesis by photophosphorylation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1966, 17(53):641-654.
- [23] GOULDING K, MERRETT M. The role of glycollic acid in the photoassimilation of acetate by *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1967, 18(4):620-630.
- [24] BISCHOFF H W, BOLD H C. *Phycological Studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species*[M]. Austin: University of Texas Publication, 1963.
- [25] OGAWA T, AIBA S. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1981, 23(5):1121-1132.
- [26] MARQUEZ F J, SASAKI K, KAKIZONO T, et al. Growth-characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, 76(5):408-410.
- [27] LALIBERTÉ J, NOÛÉ J. Auto-, hetero- and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on acetate [J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29(5):612-620.
- [28] KROYMANN J, SCHNEIDER W, ZETSCHKE K. Opposite regulation of the copy number and the expression of plastid and mitochondrial genes by light and acetate in the green flagellate *Chlorogonium* [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(4):1641-1646.

(责任编辑:米慧芝)