

文章编号:1000-0615(2007)03-0405-06

·研究简报·

激光辐射对两种饵料单胞藻的活化与复壮作用

庄惠如¹, 高如承¹, 陈 荣², 汪彦¹, 欧 琳², 郑梦思¹

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007;

2. 福建师范大学物理与光电信息科技学院, 福建 福州 350007)

关键词: 亚心型扁藻; 湛江叉鞭金藻; Nd:YAG 激光; 藻种复壮; 荧光光谱分析

中图分类号: Q 949.2; Q 631

文献标识码: A

The activation and rejuvenation effects of laser irradiation on two species of microalgae used in aquaculture

ZHUANG Hui-ru¹, GAO Ru-cheng¹, CHEN Rong², WANG Yan-yin¹, OU Lin², ZHENG Meng-si¹

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China;

2. College of Physics and Optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: The cultures of *Platymonas subcordiformis* and *Isochrysis zhangjiangensis* which had preserved for long time was irradiated by Nd:YAG laser(1.06 μm , 5 W) with different dose. Then, the effects of laser on algae growth, physiological and biochemical characteristic were investigated. The feasibility to utilize laser in the activation and rejuvenation of microalgae were discussed. The results showed that the optimal dosage to rejuvenate *I. zhangjiangensis* is 60 s, which the growth rate, cell biomass, the contents of chlorophyll, polysaccharides and protein increased by 27.59% - 43.44% after Nd:YAG radiation. For *P. subcordiformis*, the better results of rejuvenation by Nd:YAG laser was got when irradiation dose at both 60 s and 90 s. It is favourable to the growth of *P. subcordiformis* by using lower irradiation dose of Nd:YAG laser, which the growth rate and the contents of chlorophyll increased by 12.5% and 17.5% respectively. By contrast, the higher irradiation dose was favourable to the increase of other biomass of *P. subcordiformis*, which the contents of carotenoids, protein and polysaccharides increased by 87.7%, 15.5% and 36.8% respectively. The results of Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM) showed that the fluorescence spectra of the irradiated group is similar to control group with the maximum peak located at 682 nm which can be attributed to photosystem II. While the irradiated group which the growth had be promoted has a higher intensity at 682 nm than control group. In this paper, the possible mechanism of activation and rejuvenation effects on microalgae induced by laser irradiation was also discussed. These results can offer a theoretical foundation to utilize laser in breeding of microalgae species for aquiculture.

Key words: *Platymonas subcordiformis*; *Isochrysis zhangjiangensis*; Nd:YAG laser; rejuvenation; fluorescence spectra

收稿日期: 2006-08-28

资助项目: 福建省科技计划项目(K04031、2003N020); 福建省自然科学基金项目(B0510010); 光子技术福建省重点实验室开放课题(FP0407)

作者简介: 庄惠如(1957-), 女, 福建福州人, 教授, 主要从事藻类生物学研究。Tel: 0591-83432109, E-mail: hrzhuang@fjnu.edu.cn

单细胞藻类是鱼、虾、贝类等苗种生产的基础性活饵料,随着水产养殖业的快速发展,高产优质饵料藻种的选育已成为规模化人工育苗过程的关键性环节。目前,在微藻生物饵料的生产过程中,藻种常因种质衰退而出现生长缓慢,产量降低,抗逆性减弱等问题,因而造成饵料供应的严重不足。而应用传统方法进行藻种复壮或重新选育优良藻株的周期比较长且需要花费大量的人力。本文旨在通过探索一种适于微藻藻种快速活化与复壮的新方法,缩短饵料藻种选育的周期并提高微藻生物饵料的品质,从而为水产养殖中植物性饵料供应问题的解决开辟新的途径。

激光以其对生物体的热、压力、光和电磁等综合效应而广泛应用于生物、医学等研究领域。作为一种育种手段,激光育种具有简单方便、效果明显、无毒性、无污染等优点^[1]。近十年来,激光育种技术已在动植物及微生物的新品种选育中取得令人瞩目的成果^[2],但激光在饵料藻种选育中的应用研究甚少。我们曾对激光辐照微藻的生物效应进行过系列研究^[3-6],在此基础上,以饵料藻生产中的常用藻种为材料,应用激光对微藻细胞的生理刺激作用,对长期保存的饵料藻种进行激光活化与复壮,并首次利用激光共焦扫描显微镜(LSCM)对激光辐照产生的生理效应进行初步的探测,为激光技术在饵料藻种选育中的应用提供理论基础与试验依据。

1 材料与方 法

1.1 藻种及培养基

亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)、湛江叉鞭金藻(*Isochrysis zhangjiangensis*)由福建长乐漳港海蚌场提供藻种,经本院微藻研究室纯化培养保存。取天然海水,经过滤煮沸消毒并冷却后,采用 f/2 营养盐配方^[7]配制培养液。藻种置于 GXZ-260B 智能型光照培养箱保存,光强 650 ~ 1 000 lx,光暗周期为 12 h:12 h,温度为(20 ± 1) °C。

1.2 激光处理及培养条件

采用 Nd:YAG 100 型激光器,波长 1.06 μm,功率 5 W,激光照射剂量及其他参数的选择参照文献^[6]。选用保存 2 个月的藻液作为激光处理材料。取藻液 3 mL 于特制小玻璃管中进行激光处理,照射过程磁力搅拌保持藻液均匀。激光辐照后将藻液接入 50 mL 三角瓶中培养,一周后转

接至 150 mL 三角瓶。同法设置不经激光处理的对照组。每个处理组设置 3 个重复。

激光处理后的藻液于控温培养室静置培养,温度控制在 25 ~ 26 °C;冷白荧光灯提供顶光照,连续照明,光强为 3 000 ~ 6 000 lx。

1.3 生长速率测定

辐照后,隔天定时取样,用“血球计数板”进行细胞计数。生长速率根据微生物学通用公式计算: $k = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$ 。其中, k 为比生长速率常数,代表每天细胞分裂速率(单位: d^{-1}); N_t 是 t 时间的细胞数; N_0 是起始细胞数。

1.4 色素含量测定

取 10 mL 藻液,用 90% 丙酮提取藻细胞的色素。叶绿素 a 和类胡萝卜素的测定参照 Jensen^[8]的方法。

1.5 多糖含量的测定

参照文献^[9]采用“苯酚-硫酸法”测定多糖含量。

1.6 蛋白质含量的测定

参照文献^[9]采用考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量。

在测蛋白质和多糖的同时,取一定体积藻液离心获得藻泥,在 80 °C 下烘干 24 h 并求得单位体积藻液的细胞干重,进一步计算获得蛋白质和多糖的干重含量($mg \cdot g^{-1}$)。

1.7 激光共焦扫描显微镜(LSCM)的荧光分析

辐照物培养至 6 d 时,取藻液制片。用德国的 Zeiss LSM 510 和美国相干公司的钛宝石激光器,在 488 nm Ar⁺ 激光激发条件下,以及 Lambda 模式下采集 10 个藻细胞的自体荧光图像及其荧光光谱。进一步用 Origin 软件获得同一处理组不同观测细胞的平均荧光强度,同时获得样品平均荧光强度与发射波长之间的二维荧光光谱图。

2 结果与分析

2.1 激光辐照对藻种细胞生长增殖的影响

由图 1 和图 2 可知,湛江叉鞭金藻经激光处理后很快进入指数生长期(90 s 剂量组除外),尤其是幅照剂量为 30 s 和 60 s 的处理组,在接种 2 d 后,细胞生长迅速,其最大生长速率较对照组的分别提高约 30.6% 和 27.6%。辐照剂量为 90 s 的金藻处理组,在接种初期处于生长抑制状态,但其指数生长期明显延长。

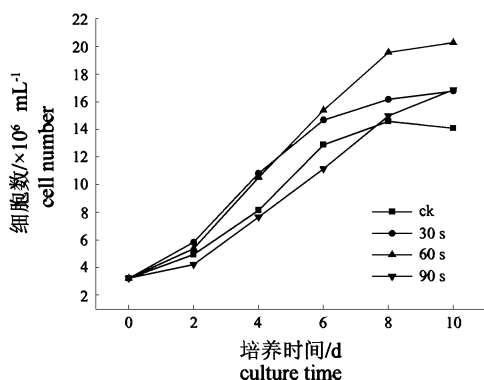


图 1 不同剂量 Nd:YAG 激光辐照后湛江叉鞭金藻的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *I. zhangjiangensis* treated with different dose by Nd:YAG irradiation

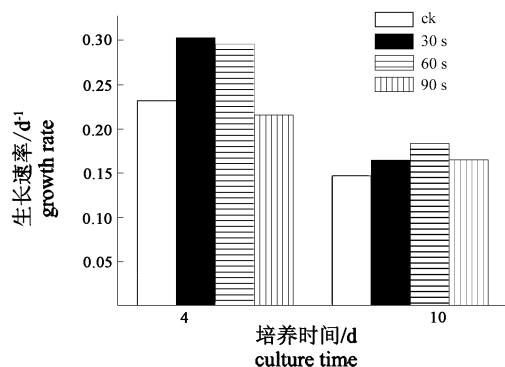


图 2 激光辐照后湛江叉鞭金藻在不同阶段的生长速率比较

Fig.2 The growth rate of *I. zhangjiangensis* irradiated by laser in different growth period

由图 3 和图 4 可以看出,亚心形扁藻在接种培养的前 2 天里,激光处理组(剂量为 60 s 的除外)体现生长抑制现象。但 2 d 后,激光处理的扁藻细胞均恢复活力并迅速进入指数生长期。与对照组相比,辐照剂量为 60 s 和 90 s 处理组的最大生长速率分别提高了 32.3% 和 12.5%。与上述湛江叉鞭金藻的情况类似,亚心形扁藻的高剂量组(120 s)在接种初期生长明显受抑,但后期的生长速率也接近对照组。

图 2 和图 4 还表明,Nd:YAG 激光辐照对饵料藻种产生的生理刺激效应,在不同生长期的体现有所不同。首先,激光的促长效果在指数生长期(2~5 d)较为明显,在生长后期(6~10 d)则不显著。其次,低剂量处理组(金藻 30 s,扁藻 60 s)

的促长效果主要表现在生长初期,而较高剂量组(金藻 60 s,扁藻 90 s)的促长效果在初期虽然不明显,但生长期较长。一般来说,藻细胞生物量的多少取决于平均生长速率和生长期的长短,因此,培养至稳定期时,两种实验藻种的较高剂量组的细胞生物量均高于低剂量组(图 1 和图 3 和表 1)。

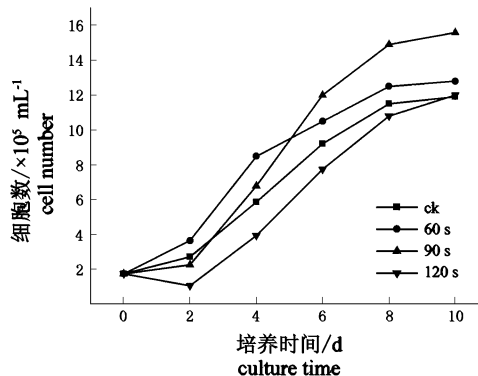


图 3 不同剂量 Nd:YAG 激光辐照后亚心形扁藻的生长曲线

Fig.3 The growth curve of *P. subcordiformis* treated with different dose by Nd:YAG irradiation

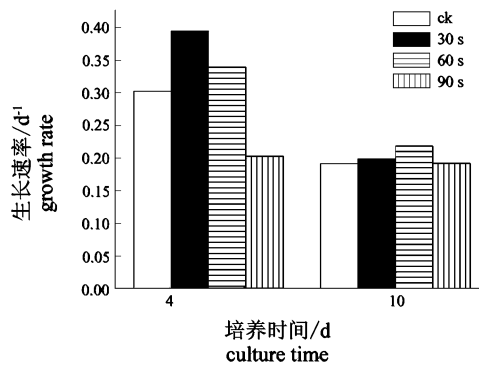


图 4 激光辐照后 *P. subcordiformis* 在不同阶段的生长速率比较

Fig.4 The growth rate of *P. subcordiformis* irradiated by laser in different growth period

由于高剂量激光辐照对藻细胞有致突、致死作用^[5],本实验中,当激光辐照剂量达到 90 s 以上时,湛江叉鞭金藻和亚心形扁藻的部分细胞因激光损伤致死,因此,接种培养初期,较高剂量处理组的藻细胞表现为生长抑制现象。

2.2 Nd:YAG 激光辐照对饵料藻种生理生化特性的影响 激光辐照后,藻种的品质是否得以提高,是本文需要进一步了解的问题。为此,我们

在辐照处理并扩养 10 d 后,对藻种的部分生理生化特性进行测定,结果如表 1 和表 2 所示。由测定结果可知,当辐照剂量在一定范围时,金藻和扁藻藻种的品质均获得不同程度的提高。

从金藻的测定结果看(表 1),60 s 剂量组的细胞干重、叶绿素及类胡萝卜素的含量达到最大值,与对照组相比分别增加了 30.3%、49.5% 和 46.3%。从蛋白质含量变化看,3 个辐照剂量组的均高于对照组,增幅在 32.8%~48.3%,但随剂量增加,增幅减少。多糖含量则是随辐照剂量增加而增加,剂量为 90 s 时多糖含量达最大值,较对照组提高了 25.3%。

从扁藻的测定结果看(表 2),较低剂量的激光辐照有利于提高叶绿素含量和细胞生物量,其中 60 s 和 90 s 剂量组在叶绿素含量上的增幅分别为 20.4% 和 17.5%;在细胞干重上的增幅分别为 10.3% 和 25.6%。但辐照剂量达 120 s 时,叶绿素含量和细胞生物量均低于对照组。类胡萝卜素的含量则随辐照剂量的提高而明显增加,当剂量为 90 s 和 120 s 时,类胡萝卜素含量分别增加了 48.4% 和 87.1%。从扁藻的蛋白质和多糖的测定结果看,较高剂量的激光辐照有利于蛋白质和多糖含量的提高,其中蛋白质含量的最大增幅为 28.1% (120 s),多糖的为 26.8% (90 s)。

表 1 Nd:YAG 激光辐照后湛江叉鞭金藻的部分生理生化特性比较

Tab.1 The comparison of the effects of Nd:YAG laser irradiation on some physiological and biochemical character of *I. zhangjiangensis*

辐照剂量(s) irradiation dose	0	30	60	90
生长速率(d^{-1}) growth rate	0.23 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.22 ± 0.01
细胞干重($g \cdot L^{-1}$) dry cell weigh	0.33 ± 0.02	0.40 ± 0.05	0.43 ± 0.01	0.36 ± 0.03
叶绿素($mg \cdot g^{-1}$) chlorophyll	5.13 ± 0.03	5.57 ± 0.08	7.67 ± 0.02	5.87 ± 0.05
类胡萝卜素($mg \cdot g^{-1}$) carotinoid	7.26 ± 0.05	8.40 ± 0.03	10.62 ± 0.02	9.62 ± 0.04
蛋白质($mg \cdot g^{-1}$) protein	42.91 ± 0.06	63.64 ± 0.04	61.55 ± 0.0	56.98 ± 0.03
多糖($mg \cdot g^{-1}$) polysaccharide	27.94 ± 0.08	25.20 ± 0.06	30.2 ± 0.07	35.01 ± 0.05

表 2 Nd:YAG 激光辐照后亚心形扁藻的部分生理生化特性比较

Tab.2 The comparison of the effects of Nd:YAG laser irradiation on some physiological and biochemical character of *P. subcordiformis*

辐照剂量(s) irradiation dose	0	60	90	120
生长速率(d^{-1}) growth rate	0.30 ± 0.06	0.40 ± 0.07	0.34 ± 0.05	0.20 ± 0.03
细胞干重($g \cdot L^{-1}$) dry cell weigh	0.39 ± 0.02	0.43 ± 0.05	0.49 ± 0.01	0.37 ± 0.03
叶绿素($mg \cdot g^{-1}$) chlorophyll	10.65 ± 0.03	12.82 ± 0.02	12.51 ± 0.01	10.42 ± 0.04
类胡萝卜素($mg \cdot g^{-1}$) carotinoid	6.22 ± 0.06	5.36 ± 0.10	9.23 ± 0.05	11.68 ± 0.04
蛋白质($mg \cdot g^{-1}$) protein	23.56 ± 0.02	25.33 ± 0.11	27.21 ± 0.06	30.18 ± 0.03
多糖($mg \cdot g^{-1}$) polysaccharide	35.49 ± 0.08	40.12 ± 0.04	45.00 ± 0.07	36.66 ± 0.04

2.3 Nd:YAG 激光辐照对饵料藻种荧光特性的影响

叶绿素是植物细胞的内在荧光探针,因此,可以利用叶绿素等物质的荧光变化探测植物光合生理以及各种外部因子对植物产生的作用效果。为了进一步探明不同剂量激光辐照对藻种生理效应的差异,本实验还另外设置了低剂量激光处理组(金藻 30 s,扁藻 60 s)和高剂量组(金藻 90 s,扁藻 180 s)。在激光辐照并接种培养至第 6 天时,利用激光共聚焦显微镜的荧光定量分析技术,获得藻种的自体荧光光谱。

由图 5 可知,湛江叉鞭金藻的激光处理组与

对照组在 682 nm 处均有荧光发射峰。比较不同处理组的荧光光谱可以看出,其荧光峰形基本相似,但荧光强度却有明显差异。在 682 nm 处,两个激光处理组的荧光强度均高于对照组。而低剂量组(30 s)的荧光强度又高于高剂量组(60 s)的。已知 682 nm 代表了光系统 II 的荧光发射^[10-11]。因此,上述的荧光测定结果表明,较低剂量的激光辐照可增强金藻细胞光系统 II 的生理活性。

此外,金藻低剂量组(30 s)在 511~532 nm 处还出现较小的发射峰与肩峰。查阅文献[12-13]。可知,一些维生素及其辅酶衍生物如黄素单

核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)在蓝光照射下会产生绿色荧光。低剂量激光辐照的金藻细胞在 511 ~ 532 nm 处的发射峰是否与这些脂类或脂蛋白物质的含量变化有关,则还有待于进一步的证实。

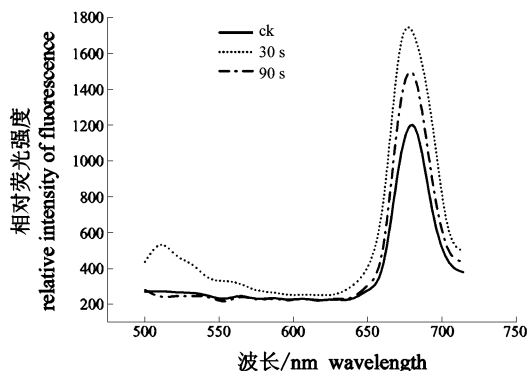


图 5 YAG 激光辐照后湛江叉鞭金藻的荧光光谱(激发光为 488 nm)

Fig. 5 The fluorescence spectra of *I. zhangjiangensis* induced by YAG laser (excited at 488 nm)

由图 6 可以看出,亚心形扁藻与湛江叉鞭金藻一样,在 682 nm 也有发射峰。剂量为 90 s 的激光处理组在 682 nm 处的发射峰高于对照组,但剂量为 180 s 的激光处理组则几乎没有荧光发射。此结果表明,低剂量的激光辐照能增强扁藻的光合活性,高剂量的激光辐照对叶绿素有伤害,从而影响扁藻的光合活性。此结果也与上述的生长测定结果基本吻合。

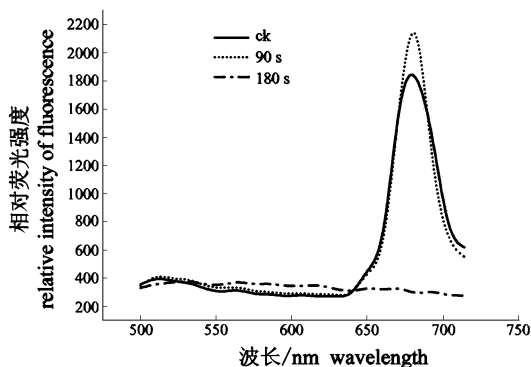


图 6 YAG 激光辐照后亚心型扁藻的荧光光谱(激发光为 488 nm)

Fig. 6 The fluorescence spectra of *P. subcordiformis* induced by YAG laser (excited at 488 nm)

3 讨论

近十年来,有关低功率激光对生物体有积极的生理刺激作用已有很多报道。我们以往的研究也初步证实了半导体激光、Nd:YAG 激光等在低剂量辐照情况下,对雨生红球藻及饵料微藻有生长促进作用^[3-5]。由于长期保存的藻种大多数置于低温、低光照条件,因此在育苗生产季节之前,藻种需要经过多次接种活化并逐级扩养才能进行生产性的培养。此外,多数藻种接种培养几代后,很容易发生种质衰退现象。因此,利用激光的生理刺激作用,加速长期保存藻种的活化过程,并使藻种得以复壮是本研究的主要目标。我们曾利用 Nd:YAG 等激光对长期保存的塔胞藻藻种进行辐照处理,获得良好的活化效果^[6]。本研究用一种绿藻类和一种金藻类为材料进行 Nd:YAG 激光处理,也获得相似的结果,具体表现为细胞生长速率的提高与生长期的延长。对藻种进一步的生理生化分析发现,一定剂量范围的 Nd:YAG 激光辐照,可提高细胞干重、叶绿素、蛋白质及胞内多糖的含量。此结果表明,激光辐照不仅对长期保存的藻种细胞具有活化作用,对衰退的藻种还具有复壮效果。

低功率激光对生物体辐照效应的主要机制包括光效应、热效应和电磁场效应等,其中光效应是通过一定波长的光子被吸收,跃迁到一定能级时在生物体内产生的一系列光化反应。这种光照活化效应可导致蛋白质合成作用的活性增强,同时可提高细胞利用氧及合成 ATP 的能力,从而刺激生物体新陈代谢加速,并使繁殖速度加快^[14]。利用叶绿素荧光特性的变化可以比较精确探测到各种外部因子对植物产生的生理影响。与其他显微镜相比,激光共聚焦扫描显微镜(LSCM)在活体荧光图像及荧光定量、定位分析研究方面具有明显的优势。本研究首次利用 LSCM 获得两种饵料单胞藻的自体荧光光谱。在 488 nm 激发光下,两种单胞藻在 683 nm 处均有荧光发射峰,而 683 nm 处的荧光峰属于微藻光系统 II 的荧光发射。从峰形、峰位上看,不同激光处理组与对照组的荧光光谱基本一致,但峰值有所不同。激光处理后,具有促长效应的处理组,其藻种细胞在 683 nm 处的荧光峰值均高于对照组。此结果显示,激光辐照对饵料单胞藻的活化作用,可能与辐照后微藻细胞

光系统Ⅱ的活性获得增强有关。本研究还发现低功率激光辐照会引起藻细胞光合细胞器及线粒体在数量与结构上的变化(另文报道)。这些结果均可作为激光活化微藻细胞的论断提供生理与细胞学方面的佐证。本研究还发现,受抑制的藻细胞表现为胞内多糖及类胡萝卜素含量的提高。Liu等^[15]曾报道盐胁迫会导致紫球藻多糖浓度的增加,由此产生耐盐性的提高,并有利于对其他逆境的适应。Davison等^[16]曾报道,强光诱导植物活性氧的产生和积累,导致细胞光氧化破坏,而类胡萝卜素的存在则可保护植物组织免受这种破坏。因此,当藻类处于逆境时,作为光合辅助色素的类胡萝卜素还具有保护光合系统的作用。本实验中,激光辐照后的两种饵料微藻在类胡萝卜素含量上均有显著的提高,此结果证实了上述的论断。

本研究中,激光辐照后藻种细胞的增殖生长往往呈现“先抑后扬”的现象。究其原因,作者认为,在接种初期发生的短暂生长抑制过程实际上起了淘汰衰弱个体的作用。传代培养后,由于培养物中主要由健壮个体构成,最终体现为群体细胞生长上的优势。作者认为,利用激光的这种“筛子”作用,可缩短饵料藻种的活化时间并提高复壮效果。因此,激光技术有望为饵料藻种优良藻株的选育提供一个高效省时的新方法。另一方面,蛋白质、多糖及脂类物质是微藻饵料生物品质的重要指标,而微藻营养物质的含量和组成往往与光强及光质以及营养盐等培养条件密切相关^[17-18]。本研究发现,激光辐照可提高藻细胞的蛋白质及多糖的含量,同时可诱导类胡萝卜素的积累。此结果提示在育种过程,利用激光有望提高微藻饵料生物的品质。

参考文献:

- [1] 向洋. 激光生物学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1995:127-134.
- [2] 陈云琳,刘晓娟,闻建平. 激光诱变微生物技术的研究进展[J]. 生物物理学报, 2003, 19(4):353-358.
- [3] 庄惠如,陈必链,卢海声,等. 不同激光对雨生红球藻的刺激效应[J]. 激光生物学报, 2000, 9(4):256-260.
- [4] 王丽姜,庄惠如,高如承,等. Ar⁺激光、Nd:YAG激光辐照亚心形扁藻生物学效应初探[J]. 激光生物学报, 2005, 14(5):331-335.
- [5] 林燊,庄惠如. 激光辐照对饵料微藻生长的影响[J]. 应用激光, 2005, 25(3):193-196.
- [6] 郑梦思,庄惠如,高如承,等. 应用激光活化饵料藻种的研究[J]. 应用激光, 2005, 26(1):45-48.
- [7] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京:农业出版社, 1986:295-305.
- [8] Jensen A. Chlorophyll and carotenoids handbook of physiological methods[M]//Hellebust J A, Craigie T S ed. Physiological and biochemical methods. New York: Cambridge University Press, 1978:59-70.
- [9] 张志良,翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2003:57-135.
- [10] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1991, 42:313-349.
- [11] Gitelson A. The peak near 700 nm on radiance spectra of algae and water: relationships of its magnitude and position with chlorophyll concentration[J]. Int J Remote Sensing, 1992, 13(17):3367-3373.
- [12] 陈国珍. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社, 1990:451-459.
- [13] 纪明候. 海藻化学[M]. 北京:科学出版社, 1997:356-367.
- [14] Ben-Dov N, Shefer G, Irinitchev A, et al. Low energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation *in vitro* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1448:372-380.
- [15] Liu X C, Avigad V. Modified responses of *Porphyridium* sp. cells with an increased polysaccharide level to stress [J]. Guihaia, 2004, 24(2):166-173.
- [16] Davison P, Hunter C N, Horton P. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2002, 418:203-206.
- [17] 马志珍. 常用微藻饵料效果的综合评价[J]. 现代渔业信息, 1992, 7(11):12-19.
- [18] Roessler P G. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions[J]. J Phycol, 1990, 26:393-399.