

# 稀土元素 La 和 Ce 对小球藻生长的影响

陈爱美, 施庆珊, 欧阳友生, 陈仪本

(广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东广州 510070)

**摘要:** 本文以普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为受试藻种, 研究了硝酸镧和硝酸铈对其生长的影响, 旨在探讨稀土化合物用于小球藻培养的方法和效果。具体实验包括: 在藻类培养基中添加不同浓度的稀土硝酸盐, 定时取样测定培养物光密度, 绘制生长曲线并计算比生长速率( $\mu$ ), 测定细胞密度最大时的干物质含量、叶绿素含量、类胡萝卜素含量以及可溶性糖含量。通过实验得出:  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  mM 的稀土元素在培养早期能够促进小球藻的细胞增殖, 但随着培养时间延长促进作用减弱, 比生长速率与对照组的差异逐渐缩小;  $10^{-3}$  mM La 可将叶绿素 a 和 b 的含量分别提高 24.46% 和 28.51%,  $10^{-4}$  mM 的 Ce 可将其分别提高 50.76% 和 38.92%; 此外,  $10^{-3}$  mM La 或 Ce 可分别将胞内可溶性糖含量提高 13.83% 和 34.88%。上述研究表明: 在藻类培养基中添加一定浓度的 La 或 Ce, 可以加快小球藻细胞的早期增殖速度, 缩短获得最大生物量的培养时间, 同时还可提高叶绿素、类胡萝卜素以及可溶性糖的含量, 但是两种稀土元素的效应浓度范围略有差异。

**关键词:** 普通小球藻; 稀土; 促生长作用

文章编号: 1673-9078(2013)10-2401-2404

## Effect of Lanthanum and Cerium on Growth and Physiological Properties of *Chlorella vulgaris*

CHEN Ai-mei, SHI Qing-shan, OUYANG You-sheng, CHEN Yi-ben

(Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** In order to study the biological effects of La and Ce on *Chlorella vulgaris*, growth curve was plotted, and the biomass, contents of chlorophyll a and b, carotenoid and soluble sugar were tested. The results showed that La and Ce at  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  mM stimulated algae cell proliferation at early stage, and their growth promoting effect weakened as time was increased. Compared with blank control, the contents of chlorophyll a and b increased by 24.46% and 28.51%, respectively, when cultured with La at  $10^{-3}$  mM while they were raised by 50.76% and 38.92%, respectively, with Ce at  $10^{-4}$  mM. In addition,  $10^{-3}$  mM La and Ce could increase the soluble sugar content by 13.83% or 34.88%, respectively. In conclusion, certain amounts of La or Ce could efficiently promote the algae cell growth at early stage, shorten the lag stage, and increase the contents of chlorophyll and soluble sugar.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*; rare earth; growth promoting effect

小球藻(*Chlorella sp.*)是一类普生性单细胞绿藻, 种类繁多, 生态类型多样, 在淡水、海水中均有分布, 我国常见的种类有蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)和普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)。小球藻具有旺盛的光合作用, 在自养生长的同时能够有效同化  $\text{CO}_2$ , 积累丰富

收稿日期: 2013-06-28

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(10251007002000000), 广东省科技计划项目(2010B010800042), 广东省科学院青年科学研究基金(qnj201008), 佛山市院市合作项目(2012HY100115)

作者简介: 陈爱美(1982-), 女, 助理研究员, 研究方向为稀土生物效应及机制

通讯作者: 施庆珊(1966-), 男, 研究员

的多糖、脂类、蛋白质等物质, 在人工培养基中也能良好生长, 具有很高的应用价值, 并且作为营养功效食品近年来已得到普遍认可<sup>[1-2]</sup>。

我国自 70 年代起, 广泛开展了稀土的农业应用及植物生理效应研究, 国内外大量研究资料表明在适宜的条件下, 稀土对植物的许多生理功能都有积极的影响, 近年来, 针对藻类的一些实验和研究也显示出类似的生物效应。目前, 已有学者先后研究了不少稀土元素对一些藻类生长的效应浓度范围, 例如水华鱼腥藻(*Anabaena flosaquae*)<sup>[3]</sup>、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)<sup>[4]</sup>、小球藻(*Chlorella sp.*)<sup>[5-9]</sup>、螺旋藻(*Spirulina sp.*)<sup>[10]</sup>、隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)<sup>[11]</sup>、牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、球等鞭金藻

(*Isochrysisgalbana*)、满江红鱼腥藻(*Anabaenaazollae*)、雨生红球藻(*Haematococcuspluvialis*)等;结果表明,稀土元素的添加对藻类生长以及某些胞内活性物质(如DHA、虾青素等)的合成均有促进作用,但是高浓度作用下,藻细胞的生长则被抑制甚至杀死,并且不同稀土化合物与不同藻种之间对应的效应浓度范围不同,甚至差异很大。

本文通过研究硝酸镧和硝酸铈对普通小球藻(*C. vulgaris*)的细胞增殖、比生长速率、干物质含量、叶绿素含量、类胡萝卜素含量,以及可溶性糖含量的影响,确定了这两种稀土元素对普通小球藻(*C. vulgaris*)生长及生理特性影响的效应浓度范围,为进一步了解稀土元素对藻类的生物效应以及应用于微藻培养的方法、效果和前景积累实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

藻种:普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)FACHB-26 购自中国科学院淡水藻种库(Freshwater Algae Culture Collection of the Institute of Hydrobiology, FACHB-collection)。

藻类培养基及配制:本实验采用 OECD/OCDE-201 和 GB/T 21805-2008 中的 OECD 藻类培养基,所需试剂均为分析纯,将配制好的 4 种储备液经 0.2 μm 滤膜过滤或高压灭菌(121 °C, 15 min), 4 °C 避光冷藏保存,使用时按比例用灭菌去离子水稀释得到 OECD 藻类培养基。

稀土硝酸盐储备液及配制:  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 均为 99.9% metals basis, 购自阿拉丁, 将其配制成 100 mM 浓度的储备液, 高压灭菌(121 °C, 15 min), 备用; 本研究在藻类培养基中添加的终浓度依次为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  mM, 对照组为灭菌去离子水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 藻种的培养和收集

在 300 mL 锥形瓶中加入 100 mL 的 OECD 藻类培养基, 接入一定量处于对数生长期的藻细胞, 使其初始浓度为  $10^6$  cells/mL, 用四层灭菌纱布封口, 置于光照培养箱中静置培养, 培养条件为温度  $24 \pm 1$  °C, 光照 4440~8880 lux, 光暗比 12:12 h, 每日定时摇动 3 次并随机调整位置以减少误差。藻细胞的收集参考钱芸等<sup>[12]</sup>的方法, 采用 0.45 μm 滤膜, 经抽滤收集藻细胞, 用于测定干物质、叶绿素、类胡萝卜素和可溶性

糖含量。

#### 1.2.2 藻细胞增殖情况的测定及参数计算

(1)绘制藻细胞生长曲线:每日定时取样,采用分光光度计测定培养物在 650 nm 处的吸光度( $A_{650}$ ),以培养时间为 X 轴,  $A_{650}$  为 Y 轴,绘制对照组和各浓度处理组的藻细胞生长曲线。

(2)计算比生长率( $\mu$ ):采用公式:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

注:从  $i$  时间到  $j$  时间的比生长率,单位为每天( $\text{d}^{-1}$ );  $X_i$  为  $i$  时间的  $A_{650}$ ;  $X_j$  为  $j$  时间的  $A_{650}$ 。

#### 1.2.3 干物质含量测定

将收集到的藻细胞经过 105 °C 烘干至恒重,称量并计算干物质,计算公式为:

藻细胞单位体积干物质(mg/L)=[抽滤后滤膜重量(mg)-抽滤前滤膜重量(mg)]/培养物体积(L)

#### 1.2.4 细胞色素含量测定

采用热乙醇法。步骤如下,将收集有藻细胞的滤膜剪碎后放入 20 mL 离心管中,加入 10 mL 90% 乙醇溶液,震荡混合均匀,用黑布包裹并置于 4 °C 冰箱中萃取 24 h; 于 75 °C 水浴箱中提取 15 min, 4000 r/min 离心 15 min, 取上清液用分光光度计同时测定 470 nm、649 nm、665 nm 以及 750 nm 处的吸光度。细胞色素浓度(mg/L)计算公式为:

$$C_a = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$$

$$C_b = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$$

$$C_{x.c} = (1000 \times A_{470} - 2.05 \times C_a - 114.8 \times C_b) / 245$$

注:  $C_a$  和  $C_b$  分别为叶绿素 a 和 b 的浓度,  $C_{x.c}$  为类胡萝卜素的浓度; 细胞色素含量(mg/L)=[细胞色素浓度(mg/L)×提取液体积(mL)]/培养物体积(mL)。

#### 1.2.5 可溶性糖含量测定

采用蒽酮比色法。步骤如下,将收集有藻细胞的滤膜剪碎后放入玻璃试管中,加入 5 mL 去离子水,用塑料薄膜封口,于沸水中提取 30 min(提取 2 次),将提取液过滤入 15 mL 带刻度的玻璃管中,漂洗试管及藻细胞残渣,定容至 15 mL。取 2 mL 样品提取液于 20 mL 的比色管中,加入 0.5 mL 乙酸乙酯和 5 mL 浓硫酸,沸水浴 1 min,自然冷却至室温后测定  $A_{630}$ 。根据标准曲线方程求出糖的量(μg)。

样品中可溶性糖含量(μg/mL)=[标准曲线求得糖的量(μg)/2(mL)×15(mL)]/培养液体积(mL)。

### 1.3 数据分析

实验所得数据采用 Origin7.5 计算标准偏差并进行差异显著性分析,当  $P < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 La 和 Ce 对普通小球藻细胞增殖的影响

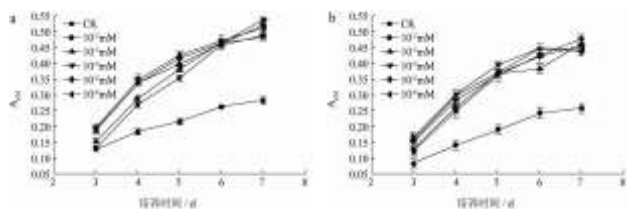


图1 稀土硝酸盐对普通小球藻生长的影响

Fig.1 Influence of rare earth nitrate on *Chlorella vulgaris*

growth

注: a: La, b: Ce.

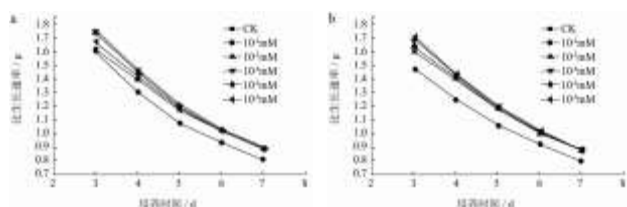


图2 稀土硝酸盐添加后普通小球藻的比生长速率 ( $\mu$ )

Fig.2 Specific growth rate of *Chlorella vulgaris* with rare earth nitrate treatment

注: a: La, b: Ce.

在藻类培养基中添加不同浓度的硝酸镧或硝酸铈, 定时取样测定培养物的吸光度( $A_{650}$ ), 代表培养物中的藻细胞密度。图1表示添加不同浓度的稀土硝酸盐后, 普通小球藻细胞的生长曲线, 藻细胞初始接种量为  $10^6$  cells/mL, 且延迟期生长缓慢, 吸光度较低, 因此从实验第3 d开始以24 h为间隔取样测定。由生长曲线可见, 添加  $10^{-2}$  mM La 或 Ce, 藻细胞生长明显受到抑制 ( $P < 0.01$ ), 随着培养时间延长, 其细胞数量虽然持续增长, 但是在整个培养周期一直低于对照组和其他浓度处理组。当稀土硝酸盐添加浓度小于  $10^{-2}$  mM时, 藻细胞密度在第3 d时已明显高于对照组, 其中La添加组中  $10^{-5}$  mM最高, 而Ce添加组中则是  $10^{-6}$  mM最高, 但是随着培养时间延长, 处理组与对照组之间的差距逐渐缩小。图2表示各实验组的比生长速率 ( $\mu$ ), 除了  $10^{-2}$  mM组,  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  mM处理组与对照组的差异主要体现在培养早期, 而随着培养时间延长, 这种“优势”逐渐减弱, 在第7天时与对照组相比基本一致。

### 2.2 La 和 Ce 对普通小球藻细胞干物质含量的影响

在本研究培养条件下, 通过生长曲线测定发现藻

细胞增殖在第7 d时达到最大密度, 之后藻细胞培养液的光密度逐渐降低, 藻细胞进入衰亡期, 为了测定稀土对藻细胞最大生物量的影响, 本实验于第7 d时收集培养物, 测定各实验组的干物质含量(图3)。由图可见, 与对照相比, 处理组的藻细胞干物质含量并未明显提高, 甚至  $10^{-3}$  mM处理后较对照组低。结合生长曲线(图1)和比生长速率(图2), 推测La和Ce的添加可在培养初期促进藻细胞增殖, 但是随着培养时间延长比生长速率( $\mu$ )降低, 因此对最大生物量的影响不大。

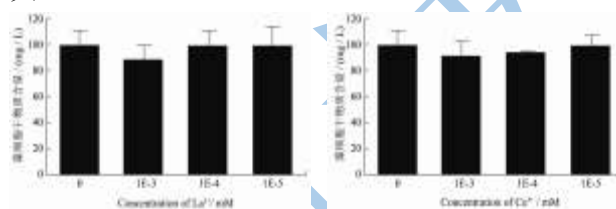


图3 稀土硝酸盐添加后第7 d藻细胞干物质含量测定

Fig.3 Dry matter content of *Chlorella vulgaris* with rare earth nitrate treatment at 7<sup>th</sup> day

### 2.3 La 和 Ce 对普通小球藻叶绿素和类胡萝卜素含量的影响

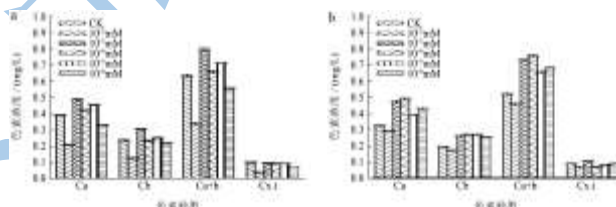


图4 稀土硝酸盐添加后第7 d藻细胞色素含量测定

Fig.4 Cytochrome content of *Chlorella vulgaris* with rare earth nitrate treatment at 7<sup>th</sup> day

注: a: La, b: Ce.

不同实验组培养第7 d时藻细胞内叶绿素( $C_a$ 和 $C_b$ )和类胡萝卜素( $C_{x-t}$ )含量见图4。  $10^{-2}$  mM La或Ce处理后, 叶绿素和类胡萝卜素含量均明显低于对照组, 这与生长曲线测定结果一致, 进一步说明这一添加浓度对于普通小球藻的生长起到了明显的抑制作用。由图可见, 当处理浓度小于  $10^{-2}$  mM时, 一定浓度范围的La或Ce可提高叶绿素( $C_a$ 和 $C_b$ )的含量; 其中  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  mM的La可将 $C_a$ 含量提高7.76~24.46%,  $C_b$ 含量提高5.93~28.51%, 且二者的最大含量均由  $10^{-3}$  mM处理组测得,  $10^{-6}$  mM处理后两种叶绿素含量则略低于对照组; Ce具有促进作用的浓度范围较大,  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  mM可将 $C_a$ 含量提高19.56~50.76%,  $C_b$ 含量提高31.35~38.92%, 最大含量均由  $10^{-4}$  mM处理组测得。而对于类胡萝卜素, 只有  $10^{-3}$  mM Ce处理组略高

于对照组, 其余处理组均与对照组差异不大。叶绿素含量通常作为藻类光合作用能力的指标之一, 本实验表明一定浓度范围内的 La 和 Ce 均可提高其含量, 结合生长曲线也可看出在这一浓度范围内, 藻细胞的增殖较对照组快, 因此推测 La 和 Ce 通过增加藻细胞内叶绿素含量促进其光合作用, 从而加速藻细胞生长繁殖。

## 2.4 La 和 Ce 对普通小球藻细胞可溶性糖含量的影响

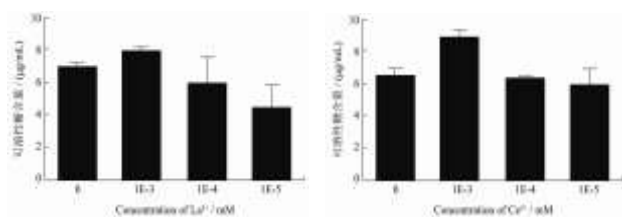


图5 稀土硝酸盐添加后第7 d 藻细胞可溶性糖含量测定

Fig.5 Soluble sugar content of *Chlorella vulgaris* with rare earth nitrate treatment at 7<sup>th</sup> day

不同实验组培养第7 d时藻细胞内可溶性糖含量见图5。10<sup>-3</sup> mM 浓度处理后可溶性糖含量较对照组高, 其中 La 可提高13.83%, Ce 可提高34.88%, 而其他浓度并未明显促进可溶性糖含量的增加, 甚至10<sup>-5</sup> mM 的 La 处理后明显低于对照组。上述实验表明由于一定浓度范围的 La 或 Ce 能够增加藻细胞叶绿素含量(图3), 促进光合作用和细胞内生物大分子合成, 糖作为胞内一种重要的生物大分子, 其合成和积累也在一定程度上得到了提高。

## 3 结论

胡勤海等<sup>[7-9]</sup>曾以椭圆小球藻(*C.ellipsoidea*)和蛋白核小球藻(*C.pyrenoidosa*)作为受试藻种, 研究了 La、Ce、Pr、Nd、Sm 和 Y 等多种稀土元素以及混合稀土对其生长和生理特性的影响, 结果表明低浓度(2 mg/L)在短期内(1~3 d)对细胞的生长和 C<sub>a</sub> 含量的增长都有轻微的刺激作用, 但随着处理浓度的提高和时间延长则表现出明显的抑制作用。本文以普通小球藻(*C.vulgaris*)作为受试藻种, 通过实验发现, 在藻类培养基中添加10<sup>-3</sup>~10<sup>-6</sup> mM 浓度范围的 La 或 Ce 均可在一定程度上促进藻细胞增殖, 但这种促进作用在培养早期比较明显, 随着培养时间延长, 处理组的比生长速率( $\mu$ )降低, 与对照组趋于相同, 这一现象与之前的报道类似, 即稀土对藻类细胞增殖的促进作用与培养时间有关; 干物质含量测定结果则表明处理组与对照组的最大生物量无明显差异; 叶绿素含量在处理组和

对照组之间则存在比较明显的差异, 其中 10<sup>-3</sup>~10<sup>-5</sup> mM La 或 10<sup>-3</sup>~10<sup>-6</sup> mM Ce 处理组叶绿素含量均比对照组高, 效应浓度范围与之前的报道略有不同, 可能与藻种、培养基以及培养条件等因素有关; 同样, 对于可溶性糖, 10<sup>-3</sup> mM 的 La 或 Ce 均可明显提高其含量。上述研究结果表明, 在藻类培养基中添加一定量的稀土元素, 可提高藻细胞叶绿素含量, 促进糖类的合成, 从而加速细胞的生长繁殖, 但随着培养时间延长, 处理组的比生长速率逐渐减慢, 与对照组的差异减小, 使得最终的最大生物量在处理组和对照组之间差异不大。通过研究推测, 一定浓度范围内的稀土元素能够缩短小球藻培养的延迟期, 加快进入对数生长期, 并促进其生长代谢并提高胞内某些生物大分子的合成和积累, 更早获得最大生物量, 从而在一定程度上缩短了整个培养周期。

## 参考文献

- [1] John Rojan P, Anisha G S, Nampoothiri K Madhavan, et al. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 186-193
- [2] 赵华,董晓宇,夏媛媛,等.氮源对小球藻光合作用和色素积累的影响[J].现代食品科技,2012,4:367-370  
ZHAO Hua, DONG Xiao-yu, XIA Yuan-yuan, et al. Effects of Nitrogen Source on Photosynthesis and Pigment Accumulation of *Chlorella* sp. TCCC45058 [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 4: 367-370
- [3] Yingjun Wang, Jia Li, Yun Lu, et al. Effects of cerium on growth and physiological characteristics of *Anabaena flosaqua* [J]. Journal of Rare Earths. 2012, 30(12): 1287-1292
- [4] Yingjun Wang, Hangbiao Jin, Shihuai Deng, et al. Effects of neodymium on growth and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Rare Earths. 2011, 29(4): 388-395
- [5] Dongfeng Wang, Haiyan Li, Liyuan Wang, et al. Effects of chitosan-RE<sup>3+</sup>-bentonite on growth of *Chlorella vulgaris* [J]. Journal of Rare Earths, 2010, 28(S1): 149-153
- [6] 刘世名,梁世中.La<sup>3+</sup>对小球藻异养生长及叶绿素含量的影响[J].稀土.1999,20(3):53-56.  
LIU Shi-ming, LIANG Shi-zhong. Effects of La<sup>3+</sup> on Growth and the Chlorophyll Contents of *Chlorella* in Heterotrophic Culture [J]. Chinese Rare Earths. 1999, 20(3): 53-56
- [7] 胡勤海,管丽莉,叶兆杰.稀土元素对小球藻生长的影响[J].环境科学,1996,17(02):37-38,63  
HU Qin-hai, GUAN Li-li, YE Zhao-jie. Effect of Rare-Earth

- Elements on Growth and Reproduction of *Chlorella pyrenoides* [J]. Environment Science, 1996, 17(2): 37-38, 63
- [8] 胡勤海,管丽莉,叶兆杰,等.稀土元素对小球藻叶绿素(a)含量及其亚显微结构的影响[J].中国环境科学,1996,16(3): 204-207
- HU Qin-hai, GUAN Li-li, YE Zhao-jie, et al. Effect of rare-earth elements on Chlorophyll(a) contents and ultrastructure of *Chlorella ellipsoidea* [J]. China Environmental Science, 1996, 16(3): 204-207
- [9] 胡勤海,郑苏平,汤曙明,等.稀土元素钐和钇对小球藻生长的影响[J].农业环境保护,2001,20(6):398-400,404
- HU Qin-hai, ZHENG Su-ping, TANG Shu-ming, et al. Effect of Sm and Y on Growth of *Chlorella ellipsoidea*[J]. Agro-environmental Protection, 2001, 20(6): 398-400, 404
- [10] 余绍蕾,鸭乔,张瑶,等.稀土元素应用于培养高含量DHA螺旋藻的试验研究[J].云南中医学院学报,2012,35(2):21-23
- YU Shao-lei, YA Qiao, ZHANG Yao, et al. Study on Using Rare Earth Elements to Cultivate Spirulina with High - content DHA [J]. Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 35(2): 21-23
- [11] 梅志刚,柯志,王菊芳.稀土元素对隐甲藻生长和产DHA的影响[J].食品工业科技,2011,32(7): 157-159.
- MEI Zhi-gang, KE Zhi, WANG Ju-fang. Effects of rare earth elements on growth and DHA production of *Cryptocodinium. cohnii* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(7): 157-159
- [12] 钱芸,戴树桂,刘广良,等.硝酸镧对铜绿微囊藻生长特性的影响[J].中国环境科学,2003,1:8-12
- QIAN Yun, DAI Shu-gui, LIU Guang-liang, et al. Effect of lanthanum nitrate on growth characteristics of *Microcystis aeruginosa* [J]. China Environmental Science, 2003, 1: 8-12