

# Effects of Artificial Light Source and Light Quality on the Growth of Two Species of Microalgae

Hongwu Cui, Fanping Meng\*, Yongfu Li, Yuejie Wang, Weiyan Duan

Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, China

## Email address:

hongwuc@tom.com (Hongwu Cui), fanpingm@tom.com (Fanping Meng), lyf\_qingdao@126.com (Yongfu Li), wyuejie@163.com (Yuejie Wang), duanweiyan@163.com (Weiyan Duan)

\*Corresponding author

## To cite this article:

Hongwu Cui, Fanping Meng, Yongfu Li, Yuejie Wang, Weiyan Duan. Effects of Artificial Light Source and Light Quality on the Growth of Two Species of Microalgae. *Science Discovery*. Vol. 4, No. 2, 2016, pp. 129-136. doi: 10.11648/j.sd.20160402.22

Received: May 3, 2016; Accepted: May 17, 2016; Published: May 18, 2016

**Abstract:** The effects of different kinds of artificial light source and light quality on two species of microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*) of high resistance of acid, heat and CO<sub>2</sub> concentration were investigated in this research, 9 light qualities (LR, LB, LW, FL, LR+LB, LW+LR, LW+LB, FW+LR and FW+LB) were set up with 4 kinds of light source (LED-Red (LR), LED-Blue (LB), LED-White (LW)) and Fluorescent lamp white (FW) to cultivate microalgae, while biological parameters and *P-I* curves were measured and drawn to evaluate the effect of light source and light quality on growth characteristics of microalgae, respectively. Results showed that  $\bar{P}_m$  of two microalgae were observed under the illumination of LED-W when 4 kinds of light source were employed. At the end of cultivation, maximum biomass of *C. vulgaris* were observed under the illumination of light qualities LW+LB, which were 0.19 g·L<sup>-1</sup>, however, the highest growth rate was obtained under the illumination of light quality LB by *D. salina*, which was 1.5 times as much as that in LR treatment. In addition, the nonuniformity between photosynthetic pigments content and  $\mu$  along with the changed light quality indicated that the variation of photosynthetic pigments content may not be the main cause of microalgae growth regulated by light quality, while the light absorption of living cells might be the primary reason affecting the growth of microalgae.

**Keywords:** Light Source, Light Quality, Light Emitting Diode (LED), Growth Characteristics, Photosynthetic Oxygen eVolution

## 人工光源和光质对2株微藻生长的影响

崔鸿武, 孟范平\*, 李永富, 王曰杰, 段伟艳

中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 环境科学与工程学院, 青岛, 中国

## 邮箱

hongwuc@tom.com (崔鸿武), fanpingm@tom.com (孟范平), lyf\_qingdao@126.com (李永富), wyuejie@163.com (王曰杰), duanweiyan@163.com (段伟艳)

**摘要:** 为探究不同人工光源及光质对2株耐高温、耐酸性、耐高浓度CO<sub>2</sub>特性的绿藻普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 和盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 生长的影响, 本研究采用4种人工光源 (LED红光 (LR)、LED蓝光 (LB)、LED白光 (LW)) 和荧光灯全光谱白光 (FW) 营造的9种光质 (LR、LB、LW、FL、LR+LB、LW+LR、LW+LB、FW+LR以及FW+LB) 对2株微藻进行连续培养, 通过多种生物学指标测定以及*P-I*曲线绘制等方法评价了不同光源、光质对微藻生长特性的影响。结果表明, 使用4种光源培养微藻, 最大光合放氧速率均出现在LED-W光源下; 至培养结束时, 普通小球藻以LW+LB光质照射下的藻生物量最高, 为0.19 g·L<sup>-1</sup>, 而在盐生杜氏藻培养期间, LB照射下的藻生物量一直高于其他光质, 为LR的1.5

倍；另外，光合色素含量与 $\mu$ 值随光质变化的非一致性说明光合色素变化可能不是光质调控微藻生长的主要原因，而藻细胞的活体光吸收可能是影响微藻生长的主要因素。

**关键词：**光源，光质，LED，生长特性，光合放氧

## 1. 引言

微藻在生物固碳、生物柴油、污水处理、水产养殖以及食品等领域有着广阔的应用前景。构建适于微藻生长的光生物反应器(PBR)是实现微藻快速培养、满足相关产业需要的重要课题[1]。目前，多采用敞开式大池(OP)和封闭式光生物反应器(PBR)两种形式用于微藻养殖[2]。与前者相比，封闭式PBR因具有培养条件稳定、可无菌操作、易于高密度培养等优点，成为微藻生物技术所需工程设备的发展方向[3]。

影响微藻生长的原因很多，其中，光照是影响封闭式PBR中微藻生长速率的关键因素之一。因此，研究光照作用及应用适当的光照技术培养微藻，加快其生长繁殖，调节其营养成分，是提高其产量和质量的重要途径[4]，在封闭式PBR设计时应首先考虑。近年来，发光二极管(light emitting diode, LED)作为一种新型冷光源因具有电源电压低、投光远、工作温度范围广、节能高效、稳定性强、多色、安全、高亮度、长寿命、体积小、发热少、响应快、无频闪、无污染、无辐射、无故障等优点[5]，已经在生态照明领域展现出非常广阔的应用前景[6]。柔性LED灯带因防水性好、几乎可以任意角度弯曲，有望成为封闭式PBR的新型内置光源。另外，根据微藻的光生态学，光合作用要求光源的峰值波长与微藻活体吸收峰值相对应[1]。单色蓝光或红光有利于提高光能利用率[7]，如蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) [8]在蓝光下的生长效果最佳。然而，也有研究表明，微藻需要一些微弱但必须的波长成分进行生长调节，因此，除蓝光和红光外的其他波段光对藻种也是有益的，例如，中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*) [9]和中华盒形藻(*Biddulphia sinensis*) [10]在荧光灯下生长情况优于单色蓝光、单色红光或红蓝组合光；沈银武等[11]研究蓝藻中华植水藻(*Richelia sinica* (Shen))时发现，白光和黄光对微藻生长最有利，绿光和红光次之，蓝光下较慢。这体现了光质对微藻生长影响的复杂性。因此，应根据实验确定适于不同藻种生长的光源类型及光质组成。

本研究以筛选出的耐高温(30℃)、耐酸性(pH 4.0)、耐高浓度CO<sub>2</sub>(5~15%)特性的2种微藻，即普通小球藻(*C. vulgaris*)和盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)为供试藻种，探究红光LED灯带(LED-R)、蓝光LED灯带(LED-B)、白光LED灯带(LED-W)和荧光灯(FL)这4种人工光源对微藻生长的影响，分析光质变化引起微藻生长速率差异的可能原因，以便为封闭式PBR中的光源设计提供依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 供试藻种

普通小球藻(*C. vulgaris*)购自中科院水生生物研究所；盐生杜氏藻(*D. salina*)由中国海洋大学微藻种质库提供。

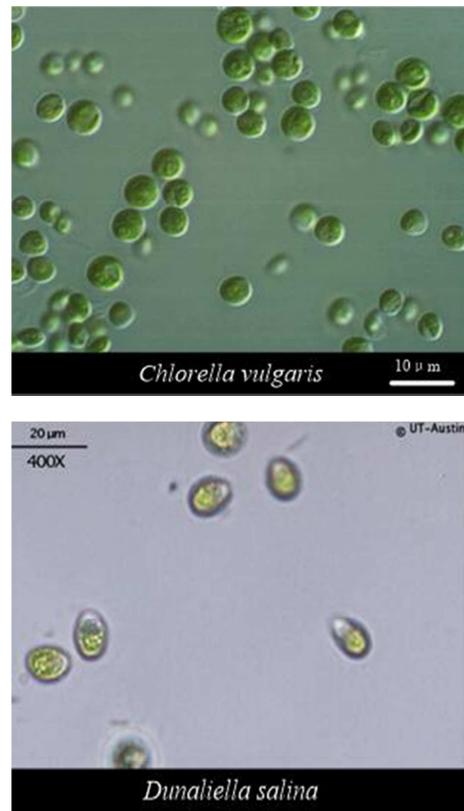


图1 2种受试微藻的细胞形态。

#### 2.1.2. 培养基

普通小球藻(*C. vulgaris*)与盐生杜氏藻(*D. salina*)分别采用SE和f/2培养基培养。

SE培养基每升蒸馏水中含有以下成分：250 mg NaNO<sub>3</sub>、75 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、75 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、25 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、175 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mg NaCl、5 mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、2.86 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1.86 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.22 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.39 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.049 mg Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、0.079 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、1 mL EDTA·Fe (将0.901g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O溶于10 mL的1 mol·L<sup>-1</sup>稀盐酸中，再与10 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的EDTA-Na<sub>2</sub>溶液混合，加入蒸馏水稀释至1 L)、40 mL土壤

浸出液(将200 g避光晾干的未施肥花园土溶于1 L去离子水中,水浴煮沸3 h,冷却沉淀24 h,重复煮沸3次。过滤取上清液,高压灭菌后4℃冷藏保存备用)。培养基在使用前于120℃下灭菌20 min。

f/2培养基每升海水中含有以下成分: 74.8 mg NaNO<sub>3</sub>、4.4 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.023 mg ZnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.012 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、3.9 mg FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O、4.35 mg Na<sub>2</sub>-EDTA、0.178 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.010 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.0073 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.0005 mg 维生素B<sub>12</sub>、0.100 mg 维生素B<sub>1</sub>以及0.0005 mg 维生素H。

### 2.1.3. 试剂

丙酮及培养基配制所用的试剂均为国产分析纯。SE培养基用去离子水配制, f/2培养基所用海水取自青岛石老人近岸海域,经0.45 μm混合纤维滤膜抽滤,高温灭菌后冷却备用。

### 2.1.4. 仪器

#### (1) 人工光源

LXHL-PM09型LED-R、LED-B、LED-W和F25T8/TL 950型FL由荷兰Philips公司生产,分别用于提供LED红光(LR)、LED蓝光(LB)、LED白光(LW)和荧光灯全光谱白光(FW)。各光源的主要光学参数见表1。

表1 4种光源的光学参数。

光源	波峰 (nm)	波段 (nm)	发射光强 (μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )
LED-R	627	620~645	30±3
LED-B	470	460~490	30±3
LED-W	627, 470, 530	620~645, 520~550, 60~490	60±3
FL	-	400~700	30±3

#### (2) 其他仪器

CXZ智能型光照培养箱(宁波江南仪器厂); LDZX-50KBS型高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂); 3415F型光量子计(美国Spectrum公司); UNICOUV-2600型紫外可见分光光度计(优尼科(上海)有限公司); T6型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); SX716型溶解氧测量仪(极谱型DO电极,上海三信仪表厂); Nikon YS2-H型电子显微镜(日本Nikon公司); Freezone2.5L型真空冷冻干燥机(美国Labconco公司); XW-80A型旋涡混合器(宁波新芝生物科技股份有限公司); GM-0.33A型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司); DHG-9030A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 微藻在4种光源下的 P-I曲线绘制

取经过FL预培养至指数生长期的2种微藻,在LED-R、LED-B、LED-W和FL四种光源,不同光量子通量密度下进行光合放氧测定,绘制P-I曲线。步骤如下:将处于指数生长期的藻细胞转移到100 mL碘量瓶中,在与培养温度

相同的环境中暗处培养2 h,测定呼吸作用的耗氧速率。然后,在持续照光条件下进行净光合放氧速率测定。期间,通过控制LED灯的数量或者碘量瓶与荧光灯管的距离,营造从20至120 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的6个光量子通量梯度。总光合放氧速率(μmol O<sub>2</sub>·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>)为净光合放氧速率与呼吸耗氧速率之和。最大总光合放氧速率(P<sub>m</sub>)及其他参数由Han模型计算[12]:

$$P = N \frac{\sigma_{PSII} I}{1 + \sigma_{PSII} I \tau + K(\sigma_{PSII} I)^2 \tau} \quad (1)$$

$$\bar{P}_m = \frac{N}{\tau + 2\sqrt{K}\tau} \quad (2)$$

$$\bar{I}_k = \frac{1}{\sigma_{PSII}(\tau + 2\sqrt{K}\tau)} \quad (3)$$

$$S_0 = N\sigma_{PSII} \quad (4)$$

$$\bar{I}_m = \frac{1}{\sigma_{PSII} \sqrt{K}\tau} \quad (5)$$

式中, P为总光合放氧速率(μmol O<sub>2</sub>·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>),  $\bar{P}_m$ 为最大光合作用速率(μmol O<sub>2</sub>·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>), I<sub>k</sub>为半饱和光强(μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), S<sub>0</sub>为初始斜率(μmol O<sub>2</sub>·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>·(μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>),  $\bar{I}_m$ 为最优光强(μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), N为单位叶绿素中光合单位的数量(mol O<sub>2</sub>·(mg Chl-a)<sup>-1</sup>), τ为电子传递链的周转时间(s), σ<sub>PSII</sub>为PSII的吸收截面积(m<sup>2</sup>·quantum<sup>-1</sup>), K为光破坏速率常数/修复常数的比值,反映了光抑制实现的程度, K值越大,说明光抑制的程度越强。通过最小二乘法进行曲线(式(1))的拟合优度检验,求得的可决系数R平均值为0.99。

### 2.2.2. 光质对微藻生长的影响研究

在恒温培养箱,FL照射下对2株微藻进行预培养,至指数生长期后定量接种于装有300 mL新鲜培养基的500 mL锥形瓶中,初始接种藻细胞密度为普通小球藻1.5×10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup>和盐生杜氏藻0.75×10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup>。25℃条件下,将微藻置于4种光源营造的9种光质(光量子通量密度均为60 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)条件下培养。

9种光质中,除LW、LB、LR和FW外,还包括以下5种混合光质: LR与LB混合光质(LR+LB)、LW与LR混合光质(LW+LR)、LW与LB混合光质(LW+LB)、FW与LR混合光质(FW+LR)、FW与LB混合光质(FW+LB),分别按光量子通量密度1:1由对应的两种光质混合而成。

各实验组设置三个平行,采用摇瓶批次培养模式,在恒温培养箱中进行。

### 2.2.3. 微藻生物量测定

采用细胞干重法[13]测定。取10 mL藻液,用0.45 μm混合纤维滤膜(预先在70℃烘干至恒重)抽滤。然后用蒸馏水冲洗3次,于70℃下烘至恒重,用感量0.1 mg天平准确称重。每组均进行滤膜空白校正。

2.2.4. 藻细胞密度测定与比生长速率计算

藻细胞密度：固定时间取样，用血球计数板个体计数法测定，平行三次。

指数生长期微藻的比生长速率按式 (6) 计算：

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \quad (6)$$

式中， $\mu$  为比生长速率 ( $d^{-1}$ )； $N_t$  为  $t(d)$  时刻的藻细胞数量 ( $cells \cdot mL^{-1}$ )， $N_0$  为初始藻细胞数量 ( $cells \cdot mL^{-1}$ )。

2.2.5. 藻细胞活体吸收谱

用UNICO UV-2600型紫外可见分光光度计测定藻细胞活体吸收谱。以新鲜培养基为空白扫描基线，然后在PAR波段 (400~700 nm) 内测试试样。光束为直射光，光谱带宽 1 nm，扫描速率 5  $nm \cdot s^{-1}$ 。

2.2.6. 光合色素分析

采用Sükran等[14]的方法测定叶绿素a (Chl-a)、叶绿素b (Chl-b)、类胡萝卜素 (Car) 的含量。收集20~60 mL藻液，20℃下3000 rpm离心10 min，用蒸馏水清洗三次脱盐，吸水纸吸干表层水分，称取湿藻泥的重量，以固液比 50  $mL \cdot g^{-1}$  (fw) 加入90%丙酮，漩涡混合1 min，4℃避光冷藏过夜。然后经双层纱布过滤后5000 rpm离心10 min，用紫外可见分光光度计读取上清液在450 nm, 630 nm, 647 nm, 664 nm, 691 nm处的吸光度，按Ritchie[15]的公式计算Chl-a和Chl-b含量，按Jensen[16]的方法计算Car含量。

$$Chl-a \text{ (mg} \cdot L^{-1}\text{)} = -0.3319A_{630} - 1.7485A_{647} + 11.9442A_{664} - 1.430 \quad (7)$$

$$Chl-b \text{ (mg} \cdot L^{-1}\text{)} = -1.2825A_{630} + 19.8893A_{647} - 4.8860A_{664} - 2.341 \quad (8)$$

$$Car \text{ (mg} \cdot L^{-1}\text{)} = A_{450} \times 10000/2500 \quad (9)$$

2.3. 数据统计与分析

每种处理下的  $\mu$  值、光合色素含量、 $P$  值分别用三次平行测定结果的平均值  $\pm$  标准偏差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。采用SPSS17.0软件 (SPSS Inc., USA) 进行统计分析。用单因素方差分析中Games-Howell (方差非齐性) 或Tukey (方差齐性) 两两比较方法进行不同处理条件下的指标显著性差异检验 ( $P < 0.05$ )。

3. 结果与讨论

3.1. 4种光源对微藻光合放氧的影响

光合放氧速率是植物光合强度的表征。为分析光源类型及其光强变化对微藻光合器官功能的影响，制作了2种微藻在不同类型光源照射下的  $P-I$  曲线，见图2。在4种光源下，2种微藻的  $P$  值随  $I$  的增强呈现出较为相似的变化规律：当  $I$  较低时， $P$  值快速上升；但是，当  $I$  高于某一值时， $P$  值随光强的增强而降低，即表现出光抑制效应。此时，曲线上的转折点对应的光强即为微藻的光饱和点。根据光抑制出现之前不同类型光源下的  $P$  值变化，4种光源对微藻

的光合强度影响顺序如下：普通小球藻为LED-W > FL > LED-B > LED-R；盐生杜氏藻为LED-B > FL > LED-W > LED-R。

根据  $P-I$  曲线计算2株微藻在4种光源下的光合放氧参数，见表2。光源对微藻的  $\bar{P}_m$  值和初始斜率  $S_0$  有着不同的影响，普通小球藻和盐生杜氏藻的  $S_0$  最大值分别出现在FL和LED-B光源下，而  $\bar{P}_m$  值则均出现在LED-W光源下，即：对于同一种微藻，某种光源下的  $S_0$  值最大，其  $\bar{P}_m$  值不一定最高。普通小球藻和盐生杜氏藻在LED-W光源下获得的  $\bar{P}_m$  最高值，分别比FL照射下的  $\bar{P}_m$  值提高71.39%和2.90%。这表明，与FL光源相比，LED-W照射能够一定程度上提高2种微藻对无机碳的利用程度[17]，从而合成更多的生物质，并可进一步提升微藻的减排能力。

表2 通过  $P-I$  曲线计算的微藻光合放氧参数。

微藻	光源	光合放氧参数		
		$\bar{P}_m$	$S_0$	$\bar{I}_m$
<i>C. vulgaris</i>	LED-B	407.25	2.45	45.14
	LED-R	286.58	2.65	68.68
	LED-W	529.80	4.35	47.94
	FL	309.12	8.92	47.35
<i>D. salina</i>	LED-B	436.83	11.93	64.73
	LED-R	416.67	5.00	100.00
	LED-W	468.57	5.74	93.35
	FL	455.36	7.36	82.40

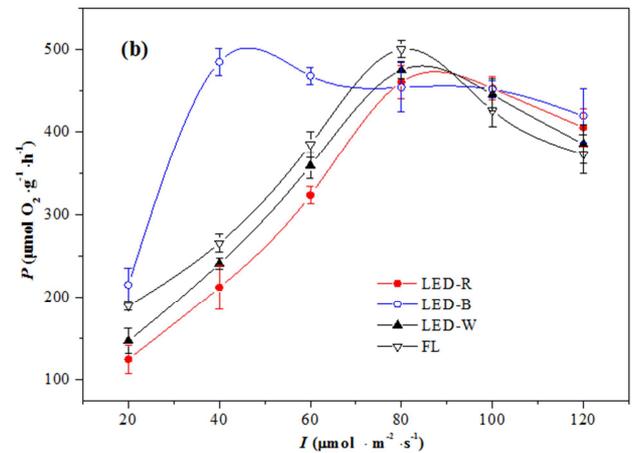
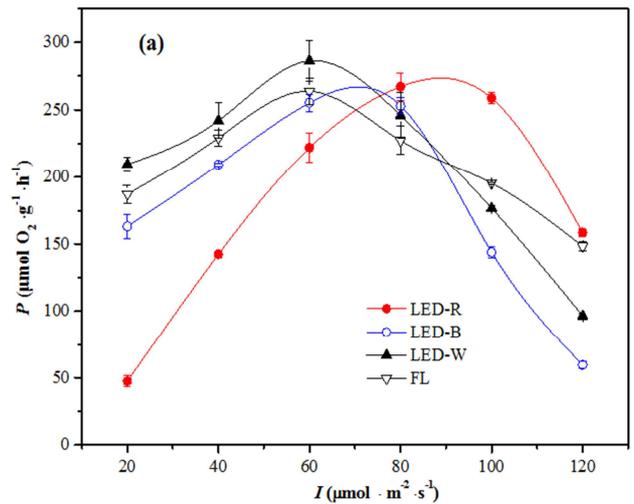


图2 微藻在4种光源下的  $P-I$  曲线 (a) 普通小球藻；(b) 盐生杜氏藻。

目前，国际上微藻培养所用的光源仍以FL为主 (>95%) [18]。作为日常照明光源，FL光源虽然具有节能、发光效率高、光线柔和等优点，但是，将其作为微藻培养的光源，存在耗电量偏高、光谱针对性不强、几何形状单一、易挥发汞蒸气等缺点。LED被称为“第四代光源”，其在微藻培养中的应用于近几年受到了越来越多的关注。主要原因为LED光源发射光谱能覆盖藻类生长所需的光谱能带，从而促进捕光合色素对光能的吸收，提高藻生物量与光合色素含量，同时，其能耗比FL光源减少38.75% [18, 19]，因此，在微藻培养方面的应用潜力高于FL。苗洪利等[7]以纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)和亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)为研究对象，发现LED集成光源作为微藻生长的照明光源比荧光灯更有优势。从本研究结果看，虽然4种光源对光合强度的影响顺序因藻种而异，但是，对于2种微藻而言，至少有1种LED光源对光合作用的促进效果优于FL光源，表明某些LEDs光源对微藻具有较好的促长效应。

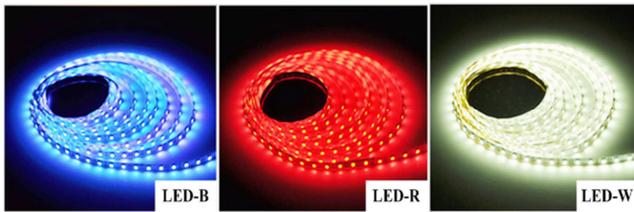


图3 不同颜色的LED条带灯。

### 3.2. 9种光质对微藻生长的影响

微藻在不同光质照射 (光强 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) 下的生长曲线见图4。可以看出，不同的光质条件，微藻的生长趋势存在很大差异。其中，普通小球藻 (图4-a) 的生长在经过2 d的适应期后进入指数生长期，至培养结束时，以LW+LB和LW照射下的藻生物量最高，分别为 $0.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而LR照射下的生物量最低。盐生杜氏藻 (图4-b) 则从第0 d直接进入指数生长期，至第6 d仍未结束，仅LW+LB、FW+LR、LR+LB、LR等少数光质下出现生长速率降低的现象；与LR不同，培养期间LB照射下的藻生物量一直高于其他光质，约为前者的1.5倍。

植物叶绿素的吸收波段主要是位于可见光区的蓝光和红光，因此，微藻的比生长率受到光谱特征的影响。由表3可见，不同种类光质对微藻生长的影响程度因藻种而异。9种光质下，普通小球藻的 $\mu$ 值变化范围在 $0.11\sim 0.22 \text{ d}^{-1}$ ，最大 $\mu$ 值对应的光质为LW+LB和LW，最低值出现在LB+LR、LR照射下。但是，同属绿藻门的盐生杜氏藻的 $\mu$ 值范围为 $0.41\sim 0.44 \text{ d}^{-1}$ ，高 $\mu$ 值出现在LB、FW、FW+LR三种光质下，最低 $\mu$ 值出现在LR光质下。前人的研究也观察到，绿藻门中不同藻种的最适宜光质不同。毛安君等[20]研究发现，直接用LED提供单色光质时，小球藻在LB下的生物量最大；而Yan等[21]认为LW最适于小球藻生长；栅藻(*Scenedesmus* sp. LX-1) [22]和亚心形扁藻[7]却在LR+LB下生长最快。一般认为，入射光的波长应与光合色素的吸收光谱相一致，本研究观察到2种微藻的比生长速

率对同种光质的响应存在差异，这可能与其光合生产中各自需要吸收不同波长的光有关。

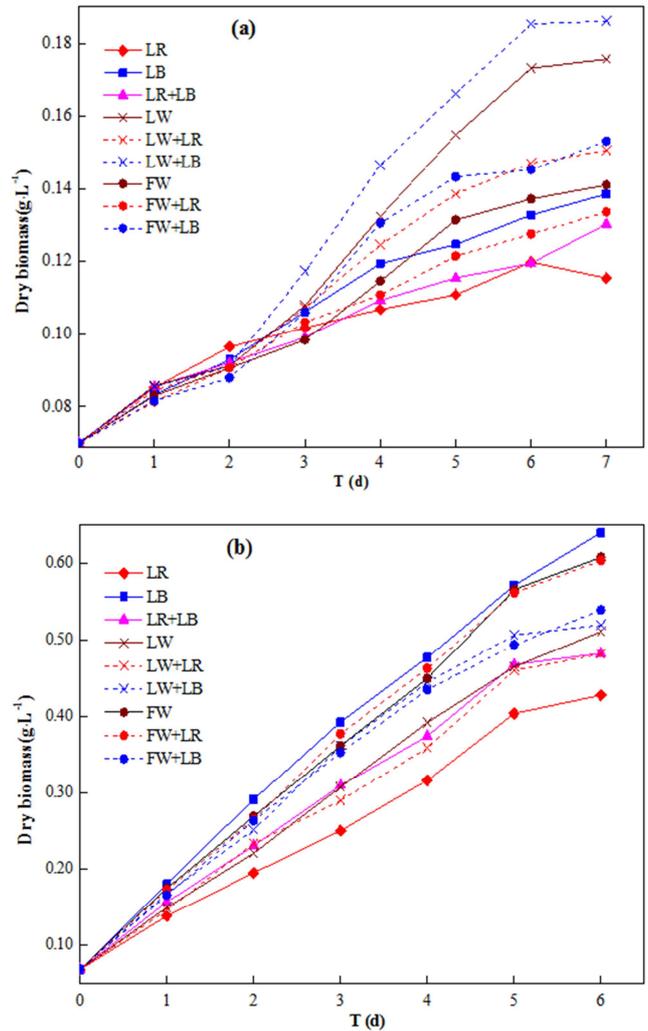


图4 2种微藻在不同光质中的生长曲线 (a) 普通小球藻；(b) 盐生杜氏藻。

### 3.3. 不同光质照射下微藻的光合色素含量

叶绿素是微藻光合作用的天线色素，参与光能的吸收和传递。绿藻中主要为Chl-a和Chl-b，其吸收光谱在红光区和蓝光区各有一个吸收峰，位于波长435 nm、676 nm处 [23]。此外，绿藻的另一种辅助色素是Car，主要吸收光谱中的蓝光 (400~550 nm)，主要功能有两个：一是在合成途径中产生的分子 (如 $\beta$ -胡萝卜素，叶黄素) 被运输到细胞内脂质体，脂质体分散在外围可以作为遮光剂，减少过剩的光照对叶绿体活性的影响 [24]；二是通过扩展微藻的吸收光谱以增加光能利用效率 [23]。

微藻光合作用中，PII和PSI由捕光色素蛋白复合体和反应中心色素蛋白复合体组成，捕光色素包括Chl-a、Chl-b、Car等；而反应中心色素主要为叶绿素分子P680和P700；捕光色素的吸收光谱在红光区和蓝光区各有一个吸收峰，意味着色素更容易吸收这两个波段的光，跃迁至第一单线态和第二单线态，继而推动整个非环式电子传递过程 [25]。其中，吸收蓝光的第二单线态有更多的能量用

于光合作用, 而吸收红光的第一单线态除进行光合作用外, 还会发出荧光甚至回落至一三线态后发出磷光, 能量更少, 这可能是LB比LR更有利于微藻生长的原因之一。由3.2节可知, 叶绿素对不同种类光质的吸收存在差异, 微藻表现出不同的比生长率。但是, 这种差异是否能够通过影响光合色素含量而实现尚不明确。因此, 本研究分别测定了2种微藻在不同光质下的光合色素含量, 结果列于表4。

表3 2种微藻在不同光质下指数生长期的比生长速率。

光质	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )*	
	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. salina</i>
LR	0.11±0.0042 <sup>a</sup>	0.40±0.0004 <sup>a</sup>
LB	0.15±0.0014 <sup>b</sup>	0.44±0.0004 <sup>d</sup>
LR+LB	0.12±0.0007 <sup>a</sup>	0.41±0.0016 <sup>b</sup>
LW	0.20±0.0024 <sup>de</sup>	0.42±0.0020 <sup>e</sup>
LW+LR	0.17±0.0016 <sup>c</sup>	0.41±0.0085 <sup>bc</sup>
LW+LB	0.22±0.0010 <sup>e</sup>	0.42±0.0042 <sup>e</sup>
FW	0.16±0.0019 <sup>f</sup>	0.44±0.0010 <sup>d</sup>
FW+LR	0.14±0.0022 <sup>e</sup>	0.44±0.0032 <sup>d</sup>
FW+LB	0.18±0.0018 <sup>b</sup>	0.42±0.0028 <sup>e</sup>

\* 字母不同表示  $\mu$  有显著性差异 ( $P < 0.05$ )

结果如下: 对普通小球藻而言, 在9种光质照射下, 以复合光谱FW+LR的色素含量最高, Chl-*a*、Chl-*c*、Car含量分别为9.87, 3.66, 4.90 mg·L<sup>-1</sup>; 明显高于FW照射下的色素含量, 表明在连续光谱基础上加大红光比率, 有利于光合色素合成。Mohsenpour等[26]用150 W的氙弧灯模拟阳光, 照射含紫、绿、橙、红色染料的亚克力板条产生所需波长的光, 作为普通小球藻生长的光源, 培养14 d后, 最大Chl-*a*含量发生于红光照射下, 并认为所提供的红光波段(650~700 nm)是Chl-*a*的吸收光谱, 因而对小球藻色素合成起促进作用。但是, 本研究发现蓝光在其中也起到重要作用, 表现为LW+LR的色素含量显著低于LW、LB、LW+LB以及LR与LB照射下的色素含量差异不明显。这

些现象说明, LR对色素合成的促进作用需要其他波段的光(尤其是LB)的参与[26]。在表4中, LR对色素积累的促进作用在盐生杜氏藻中较为明显, 这与Sa'nchez-Saavedra等[27]对盐藻的研究结果一致。本研究中, 盐藻光合色素含量对光质的响应为: LR下3种色素含量均最高(Chl-*a*、Chl-*c*、Car含量分别为21.14, 6.60, 10.10 mg·L<sup>-1</sup>), 尽管与LW、LW+LR照射下差异不显著, 但明显高于LB、LW+LB组; 在FW、FW+LR、FW+LB三种光质中, 色素含量也以FW+LR为高。与LR相比, LB对盐生杜氏藻的光合色素含量的调控作用不明显。综合以上结果发现, 载复合光谱基础上加大LR比例有利于提高普通小球藻与盐生杜氏藻的色素含量, 而在单色光质LR、LB下色素含量往往较低。可能的原因是, 微藻光合色素的合成需要多种光质的协同参与[28], 且红光是PSII和PSI优先吸收的光质[29], 这二者的作用共同引起了该现象。

### 3.4. 光质变化调控微藻生长的可能原因

对2种微藻在不同光质下的  $\mu$  值与光合色素含量进行相关性检验, 结果见表5。2种微藻的光合色素含量与  $\mu$  值均不相关, 即: 随光质种类的变化, 微藻的光合色素含量与  $\mu$  值表现出非一致性的响应特征。由此推断, 光合色素变化可能不是光质调控微藻生长的主要原因, 尚存在其他影响微藻的光能利用的机制。

图5为本研究所用2种微藻的活体吸收谱, 它们在蓝光区和红光区均有吸收峰, 分别位于430 nm左右和680 nm左右, 与Mouget等[28]的报道类似。已有研究发现, 微藻生长与比消光系数之间存在较好的一致性[30]。消光系数与入射光光强无关, 表明同样光量子通量密度下, 藻细胞会吸收更多的蓝光或红光光能, 这可能是LB或LR促进微藻生长的另一个原因。比较而言, 普通小球藻对LB的吸收系数明显高于LR, 而盐生杜氏藻对LB与LR的吸收系数相近, 因此在两种单色光下的盐藻  $\mu$  接近。

表4 光强60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的9种光质下2种微藻的光合色素含量。

光质	色素含量(mg·L <sup>-1</sup> )*					
	<i>C. vulgaris</i>			<i>D. salina</i>		
	Chl- <i>a</i>	Chl- <i>b</i>	Car	Chl- <i>a</i>	Chl- <i>b</i>	Car
LR	8.04±0.06 <sup>b</sup>	2.95±0.32 <sup>ab</sup>	4.09±0.27 <sup>b</sup>	21.14±0.14 <sup>d</sup>	6.60±0.18 <sup>d</sup>	10.10±0.10 <sup>c</sup>
LB	8.56±0.21 <sup>b</sup>	3.07±0.29 <sup>ab</sup>	4.60±0.20 <sup>c</sup>	16.28±0.70 <sup>bc</sup>	4.21±0.11 <sup>b</sup>	7.75±0.40 <sup>b</sup>
LR+LB	8.59±0.31 <sup>b</sup>	3.13±0.19 <sup>abc</sup>	4.48±0.16 <sup>bc</sup>	17.74±0.24 <sup>c</sup>	4.93±0.30 <sup>bc</sup>	8.38±0.10 <sup>b</sup>
LW	9.61±0.34 <sup>cd</sup>	3.53±0.23 <sup>bc</sup>	4.84±0.06 <sup>c</sup>	20.39±1.06 <sup>d</sup>	5.89±0.65 <sup>cd</sup>	9.54±0.44 <sup>c</sup>
LW+LR	6.99±0.15 <sup>a</sup>	2.68±0.23 <sup>a</sup>	3.58±0.13 <sup>a</sup>	20.53±1.03 <sup>d</sup>	6.07±0.15 <sup>d</sup>	9.86±0.63 <sup>c</sup>
LW+LB	8.43±0.26 <sup>b</sup>	3.07±0.07 <sup>ab</sup>	4.62±0.18 <sup>c</sup>	13.29±0.39 <sup>a</sup>	3.05±0.07 <sup>a</sup>	6.45±0.35 <sup>b</sup>
FW	8.73±0.25 <sup>bc</sup>	3.18±0.09 <sup>ab</sup>	4.42±0.15 <sup>bc</sup>	15.22±1.02 <sup>ab</sup>	4.03±0.10 <sup>b</sup>	7.24±0.64 <sup>ab</sup>
FW+LR	9.87±0.50 <sup>d</sup>	3.66±0.10 <sup>c</sup>	4.90±0.04 <sup>c</sup>	16.06±0.48 <sup>bc</sup>	4.16±0.64 <sup>b</sup>	7.76±0.02 <sup>b</sup>
FW+LB	8.66±0.48 <sup>bc</sup>	3.09±0.07 <sup>abc</sup>	4.75±0.21 <sup>c</sup>	15.48±0.25 <sup>b</sup>	4.09±0.18 <sup>b</sup>	7.28±0.36 <sup>ab</sup>

\* 字母不同表示色素含量有显著性差异 ( $P < 0.05$ )

表5 2种微藻比生长速率与色素含量间的相关性系数。

微藻	色素含量与 $\mu$ 之间的相关性系数		
	Chl- <i>a</i>	Chl- <i>b</i>	CD
<i>C. vulgaris</i>	0.0776	0.0702	0.2447
<i>D. salina</i>	-0.6137	-0.6458	-0.6174

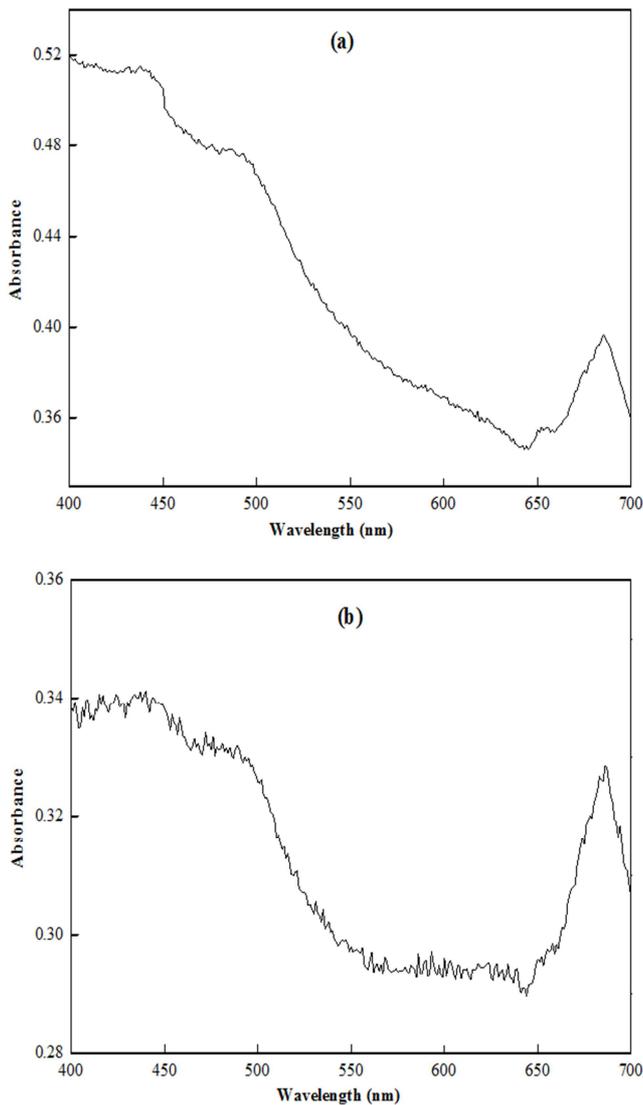


图5 2种微藻在PAR区的活体吸收谱。

#### 4. 结论

(1)用4种人工光源对微藻进行培养,普通小球藻、盐生杜氏藻的最大光合放氧速率均出现在LED-W照射下。LEDs对微藻光合作用的促进效果优于FL光源。(2)适宜微藻生长的光质条件存在种质差异性:普通小球藻的最适光质为LW+LB或LW;而盐生杜氏藻生长受光质调控不明显。(3)光合色素含量与 $\mu$ 值随光质变化的非一致性说明光合色素变化可能不是光质调控微藻生长的主要原因。藻细胞的活体光吸收可能是影响微藻生长的主要因素。

#### 致谢

本文为国家科技支撑计划课题(2011BAD14B04)资助的阶段性成果之一。

#### 参考文献

- [1] 李永富,孟范平,李祥蕾等.光照对光生物反应器中微藻高密度光自养培养的影响[J].中国生物工程杂志,2013,33(2):103-110.
- [2] Ugwu C U, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for masscultivation of algae [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4021-4028.
- [3] 李元广,谭天伟,黄英明.微藻生物柴油产业化技术中的若干科学问题及其分析[J].中国基础科学,2009(5):64-70.
- [4] Das P, Wang L, Aziz S S, et al. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light [J]. Bioresource Technology, 2001, 102(4): 3883-3887.
- [5] 郝洛西,杨秀.基于LED光源特性的半导体照明应用创新与发展[J].照明工程学报,2012,23(1):1-6.
- [6] Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, et al. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 102(5): 442-446.
- [7] 苗洪利,周晓光,刘逢学,等.LED光谱对纤细角毛藻和亚心形扁藻生长的影响[J].光学学报,2010,30(4):1101-1105.
- [8] 唐青青,方治国,嵇雯雯,等.光质对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长特征及生化组成的影响研究[J].环境科学,2014,35(11):4212-4217.
- [9] 苗洪利,孙丽娜,田庆震,等.LED单色光谱及复合光谱对赤潮优势种中肋骨条藻生长的作用[J].中国海洋大学学报,2011,41(10):107-110.
- [10] 王伟.光质对中华盒形藻生长及生化组成的影响[J].武汉植物学研究,1999,17(3):197-200.
- [11] 沈银武,朱运芝,刘永定.不同光质对中华植生藻的影响[J].水生生物学报,1999,23(3):285-287.
- [12] Han B P. A mechanistic model of algal photoinhibition induced by photodamage to photosystem-II [J]. Journal of Theoretical Biology, 2002, 214(4): 519-527.
- [13] Ge Y, Liu J, Tian G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO<sub>2</sub> concentration in photobioreactor [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 130-134.
- [14] Sükran D, Günes T, Sivaci R. Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents [J]. Turkish Journal of Botany, 1998, 22: 13-17.

- [15] Ritchie R J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents [J]. *Photosynthetica*, 2008, 46(1): 115-126.
- [16] Jensen A. Chlorophylls and carotenoids [J]. In: *Handbook of phycological methods*. Cambridge University Press, London, 1978, pp 59-70.
- [17] 许博, 周斌, 鞠青, 等. 海洋微藻光合作用对CO<sub>2</sub>加富的响应特征[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(006): 790-793.
- [18] 毛安君. LED光源促进微藻生长的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [19] Chen C Y, Yeh K L, Aisyah R, et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(1): 71-81.
- [20] 毛安君, 王晶, 林学政, 等. 光谱对小球藻和等鞭金藻生长的影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(5): 991-994.
- [21] Yan C, Zhang L, Luo X, et al. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios [J]. *Ecological Engineering*, 2013, 51: 24-32.
- [22] 李鑫, 胡洪营, 杨佳. LED红光/蓝光对栅藻LX1生长及产油特性的影响[J]. *环境科学*, 2010, 31(2): 244-250.
- [23] Lee E, Heng R L, Pilon L. Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels [J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2013, 114: 122-135.
- [24] Zhekisheva M, Boussiba S, Khozin - Goldberg I, et al. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters [J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(2): 325-331.
- [25] 韩博平, 韩志国, 付翔. 藻类光合作用机理与模型[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [26] Mohsenpour S F, Richards B, Willoughby N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 125: 75-81.
- [27] Sánchez-Saavedra M P, Jiménez C, Figueroa F L. Variable fluorescence of chlorophyll a in *Dunaliella bardawil* with different  $\beta$ -carotene content [J]. *Scientia Marina*, 1996, 60(1): 227-231.
- [28] Mouget J L, Rosa P, Tremblin G. Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities - confirmation of 'chromatic adaptation' in diatoms [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004, 75(1): 1-11.
- [29] 于贵瑞, 王秋凤. 植物光合、蒸腾与水分利用的生理生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [30] 刘春朝, 刘瑞, 王锋. 微藻培养过程的光特性研究进展[J]. *生物加工工程*, 2011, 9(6): 69-76.