

聚球藻、盐藻荧光特性研究

蔡尽忠¹, 庄峙厦^{1,2}, 谢增鸿³, 王小如⁴ (1. 厦门华厦职业学院食品药品安全检测实验室, 福建厦门 361024; 2. 厦门大学化工学院, 福建厦门 361000; 3. 福州大学化学化工学院, 福建福州 351000; 4. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东青岛 266000)

摘要 [目的] 研究聚球藻和盐藻的荧光特性, 确定其在特征激发、发射波长下藻浓度和荧光强度的关系, 寻找一种确定藻类浓度的简便方法。[方法] 以岛津 RF5301型荧光分光光度计分析检测聚球藻和盐藻的激发和发射光谱, 并获得它们的荧光强度与以血球计数板计数的藻浓度之间的关系。[结果] 聚球藻和盐藻的激发、发射光谱有着明显的不同。在它们特征的激发、发射波长下, 其浓度与荧光强度呈良好的线性关系。[结论] 通过测定藻类的荧光强度就可推算出特定藻类的浓度, 且该方法比血球计数板计算藻类的浓度更为便捷。

关键词 聚球藻; 盐藻; 荧光强度; 激发光谱; 发射光谱

中图分类号 Q 949.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2010)17-08838-02

Research on the Fluorescence Characteristics of *Synechococcus* sp and Salt Algae

CAI Jin-zhong et al (Laboratory of Food and Drug Safety Test, Xiamen Huaxia Vocational College, Xiamen, Fujian 361024)

Abstract [Objective] A simple determining method of the concentration of the known algae *Synechococcus* sp and salt algae was formed through the confirmation of the relationship between its concentration and fluorescence intensity under its characteristics of excitation and emission wavelength based on research on its fluorescence characteristics. [Method] The excitation and emission spectra of *Synechococcus* sp and salt algae was measured with the fluorescence spectrophotometer (RF5301) and the relationship between the fluorescence intensity and the concentration of algae based on the number at blood counting plate was gotten. [Results] There was a marked difference in the excitation and emission spectra between *Synechococcus* sp and salt algae and there was good linear relationship between its concentration and the fluorescence intensity under its special excitation and emission wavelength. [Conclusion] The concentration of specific algae could be calculated through the determination of its fluorescence intensity, and the method was more convenient in the concentration-testing of algae than that of the blood cell counting sheet.

Key words *Synechococcus* sp; Salt algae; Fluorescence intensity; Excitation spectra; Emission spectra

藻类是由多种色素组成的海洋生物, 这些色素组成了藻类的光合色素系统, 其中叶绿素 a 是负责光合作用的主要色素, 叶绿素 b、叶绿素 c、类胡萝卜素和藻胆色素等都作为辅助色素, 在接受光照的能量后, 高效率地将光能传递给叶绿素 a 荧光来自于不能被光合作用系统利用和吸收的光能^[1]。研究发现 2 个特性: 一是同一种藻类受到不同波长单位强度激发光激发时, 发出的荧光强度不同; 二是不同藻类的荧光光谱特征随细胞色素组成 (叶绿素、藻胆色素、类胡萝卜素) 和光能在其中传输过程的不同而异^[2]。聚球藻和盐藻分别属于蓝藻门和绿藻门的藻类, 它们所含的特征色素不同: 蓝藻含有叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素; 绿藻含叶绿素 a、藻胆蛋白^[3]。海藻中含有的特征色素叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和藻胆蛋白的特征激发波长分别为 440、470、530 和 560 nm^[3-6]。

笔者通过改变激发、发射光的波长, 用荧光分光光度计分析聚球藻、盐藻的发射、激发光谱图。在特征激发、发射波长下, 获得它们的荧光强度与以血球计数板计数的藻浓度之间的关系。结果表明, 聚球藻和盐藻的激发、发射光谱有着明显的不同。在它们特征的激发、发射波长下, 其浓度与荧光强度呈良好的线性关系。建立了通过测定藻类的荧光强度推算出特定藻类浓度的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 聚球藻、盐藻均来自集美大学水产学院。仪器: 岛津 RF5301 型荧光分光光度计。

1.2 荧光分光光度计工作参数设置 激发、发射单色器狭缝宽度为 5 nm, 1 cm 的标准四通石英比色皿, 扫描步长为 1 nm。

1.3 激发波长的选择 分别以聚球藻和盐藻含有的特征色素的特征激发波长作为其发射光谱, 发射光谱扫描范围 600 ~ 750 nm。

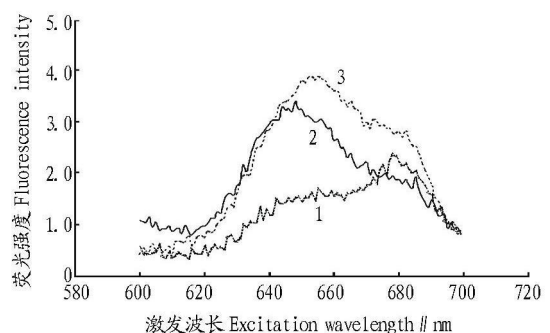
1.4 发射波长的选择 以出现最高荧光发射峰处的波长作为发射波长作激发光谱, 激发光谱的扫描范围为 300 ~ 550 nm。

1.5 确定浓度与其荧光强度关系的试验方法 用血球计数板分别计算 2 种藻浓度^[7]。不同浓度的藻类, 测其最佳激发、发射波长下的荧光强度。

2 结果与分析

2.1 聚球藻

2.1.1 荧光特性。 聚球藻的发射、激发光谱分别如图 1、2 所示。聚球藻在波长 650 nm 处有荧光发射峰, 与叶绿素 b 的荧光发射峰一致^[3]。聚球藻在 340 ~ 380 nm 处有荧光激发峰, 在 365 nm 处荧光强度就大。与其特征色素的最佳激发光的波长均不一致, 可能是藻类中含有的色素共同作用的结果, 导致其最佳激发波长发生了红移。



注: 1 EX=440 nm; 2 EX=470 nm; 3 EX=530 nm。

Note: 1 EX=440 nm; 2 EX=470 nm; 3 EX=530 nm.

图 1 聚球藻发射光谱图

Fig 1 *Synechococcus* emission spectra

作者简介 蔡尽忠 (1979-), 男, 福建厦门人, 助理实验师, 从事环境微生物方面的研究。

收稿日期 2010-03-22

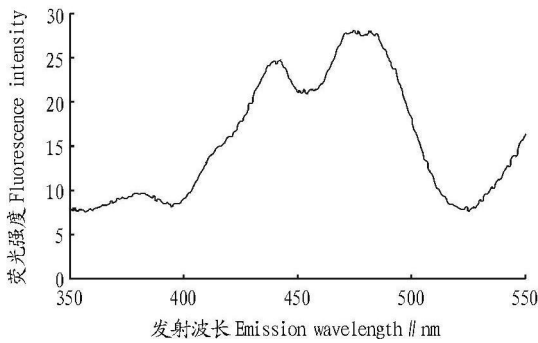


图 2 聚球藻激发光谱图

Fig 2 *Synechococcus* excitation spectra

2.1.2 浓度与其荧光强度关系。用血球计数板计算聚球藻浓度,以 EX = 365 nm, EM = 650 nm 测浓度为 51、112、225、550、1100、2200 个/ μ l 聚球藻的荧光强度,结果得出,聚球藻的荧光强度与浓度成正比,计算公式为 $y = 0.0030x + 0.3531$ (图 3)。

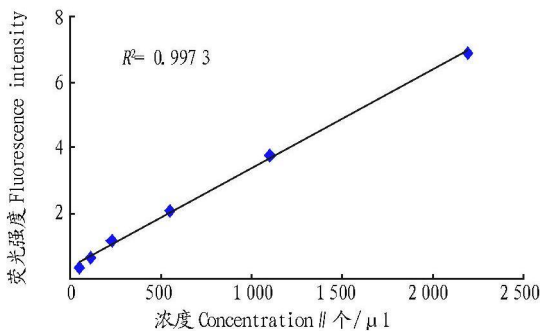
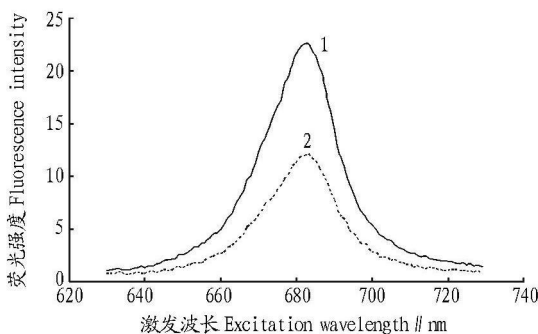


图 3 聚球藻浓度与荧光强度关系

Fig 3 The relationship between concentration and fluorescence intensity of *Synechococcus*

2.2 盐藻

2.2.1 荧光特性。盐藻的发射、激发光谱如图 4、5 所示。盐藻在波长 683 nm 处有荧光发射峰,与叶绿素 a 的荧光发射峰一致^[3]。盐藻在 442 和 479 nm 处有荧光激发峰,其中在 479 nm 处的荧光强度最大,分别与叶绿素 a、叶绿素 b 的最佳激发波长相近。盐藻属绿藻门,绿藻中含有的主要色素不包括叶绿素 b,因此藻类的荧光特性和其所含的色素不完全一致。



注: 1 EX = 440 nm; 2 EX = 560 nm.

Note: 1 EX = 440 nm; 2 EX = 560 nm.

图 4 盐藻发射光谱图

Fig 4 *Dunaliella salina* emission spectra

2.2.2 盐藻浓度与其荧光强度关系。用血球计数板计算盐藻浓度,以 EX = 480 nm, EM = 683 nm 测浓度为 44、88、175、

350、700、1400、2800、5600 个/ μ l 盐藻的荧光强度,结果得出盐藻的荧光强度与浓度成正比,计算公式为 $y = 0.0103x + 0.14025$ (图 6)。

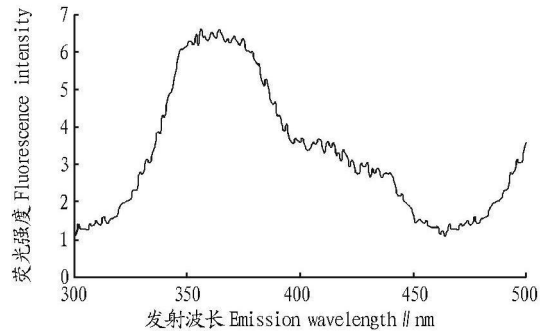


图 5 盐藻激发光谱图

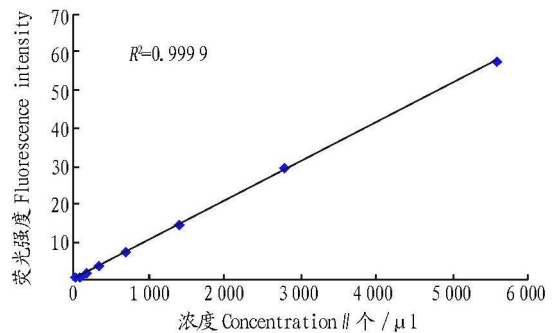
Fig 5 *Dunaliella salina* excitation spectra

图 6 盐藻浓度与荧光强度关系

Fig 6 The relationship between concentration and fluorescence intensity of *Dunaliella salina*

3 结论

聚球藻和盐藻属于不同门的藻类,其荧光特性有所不同:发射、激发光谱图不同,特征激发,发射波长也不相同,这点与文献[2]报道的相符。藻类的荧光特性受到其所含色素的影响,但又与其所含色素的荧光特性不完全一致,不能简单地以其所含有的色素的最佳激发、发射波长来确定藻类的荧光特性,两者之间的关系有待进一步的研究。

聚球藻和盐藻在最佳激发、发射波长下,浓度与荧光强度呈良好的线性关系,以此可以确定其浓度与荧光强度的关系式。对于某种已知藻类,在其最佳激发、发射波长下只要通过测定其荧光强度,就可以推算出藻的浓度,比血球计数板计算藻的浓度更为便捷。因为每种藻的最佳激发、发射波长都有一定的差异,只要测定海水中各主要藻类的最佳激发、发射波长,并且找出其浓度与荧光强度之间的关系,通过建立方程式,就可以测定海水中各种藻类的数量,这为测定海水中藻类的浓度提供了一个简便的方法。

参考文献

- [1] CATHARNA C L. Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophylls-cycle pigments [J]. *Photosynthesis Research* 1998, 56: 277-289.
- [2] 赵南京,刘文清,李宏斌,等. 水体溶解有机物的激光诱导荧光与浊度的激光散射实验研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(9): 1460.
- [3] 陈峰,姜锐. *微藻生物技术* [M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999: 1-36.
- [4] 温少红,徐春野,鞠宝,等. 紫球藻藻红蛋白的分离纯化及光谱特性 [J]. *海洋通报*, 2000, 19(6): 90-94.
- [5] 王勇,钱凯先,董强. 高纯度藻蓝蛋白分离纯化及光谱特性研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26(5): 457-460.

(下转第 8846 页)

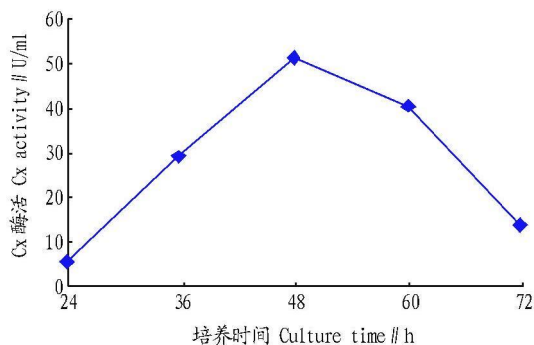


图3 培养时间对产酶的影响

Fig 3 Effects of culture time on enzyme production

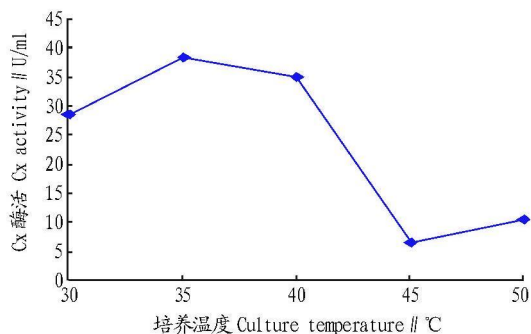


图4 培养温度对产酶的影响

Fig 4 Effects of culture temperature on enzyme production

2.3.3 摇床转速对产酶的影响。优化后的发酵培养基中接入种子液, 37 °C下分别以不同转速振荡培养 48 h, 测定酶活, 结果如图 5所示。

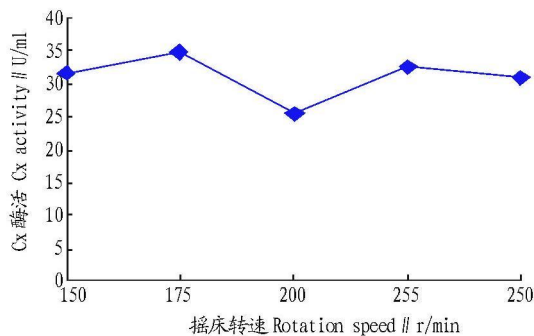


图5 摇床转速对产酶的影响

Fig 5 Effects of rotation speed on enzyme production

摇床转速较低时, 通气量不够, ZJJ-1生长较慢, 菌株菌体稀疏, 产酶量较低。当摇床转速过快时, 菌株菌体密集, 且细菌体积较小, 产酶量也不高, 这可能是由于培养基中的营养主要被菌体用于自身的生长所致。测定结果表明, 摇床转速以 175 r/min 为最佳。

2.3.4 发酵液初始 pH 对产酶的影响。在优化后的发酵培养基中分别添加不同浓度的 Na_2CO_3 , 研究不同初始 pH 值对产酶的影响, 于 37 °C、175 r/min 振荡培养 48 h 结果如图 6所示。

Na_2CO_3 对许多嗜碱菌的生长是必需的, 并对培养基 pH

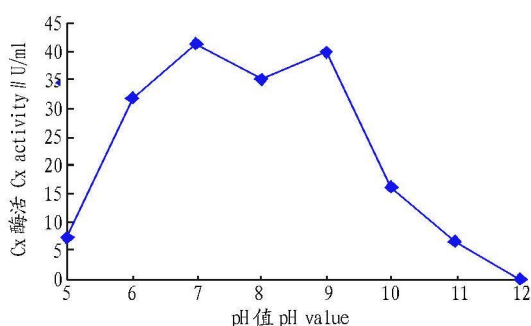


图6 发酵液初始 pH 对产酶的影响

Fig 6 Effects of initial pH value on enzyme production

值具有一定的缓冲作用。从图 6可以看出, ZJJ-1 菌株的最适产酶 pH 为 7.0, pH 为 5.0 时, 菌体量极少, 酶活性低; pH 高于 7.0 时, 菌体生长旺盛; 当 pH 为 9.0 时, ZJJ-1 的产酶量仍能够达到最高产酶量的 96%。

3 结论与讨论

该研究对 ZJJ-9 的产酶进程进行了研究, 并在发酵过程中定期取样测试 pH 值、残糖浓度、碱性纤维素酶活。发酵初期, 残糖浓度升高, 这可能是由于液体培养基中的麸皮和大豆粉中含有一定的淀粉, 在发酵初期淀粉被利用, 残糖浓度升高; 随着菌体的生长, 残糖浓度开始下降, 至 24 h 左右消耗殆尽。与此同时, 纤维素酶逐渐大量生成, 到大约 48 h 时酶活力达到最大, 之后由于环境不适, 菌体开始老化, 且形成芽孢, 并伴有自溶现象发生, 纤维素酶活力有所降低。此外, 发酵液 pH 值在延滞期略有下降, 之后保持相对稳定。从产酶进程分析, 残糖浓度变化与纤维素酶的生成有很大关系。残糖消耗殆尽后, 菌体即进入快速产酶期。

通过与相关文献报道的菌株产酶活性进行比较, 该试验筛选出的菌株 ZJJ-1 的产酶活性较高, 其最佳培养基配方为: 麸皮 0.5%, 大豆粉 2%, KH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.7%; 最优产酶条件为: 37 °C, 175 r/min 培养 48 h 初始 pH 值为 7。在此条件下, 菌株 ZJJ-1 最高酶活水平达 51.20 U/ml 为后续研究提供了较好的试验材料。

参考文献

- [1] HORKOSH IK, NAKAOM, KURONO Y, et al Cellulases of an alkalophilic Bacillus strain isolated from soil [J]. Can J Microbiol, 1984, 30: 7774-7794
- [2] 徐卿, 高红亮, 黄静, 等. 洗涤剂用碱性纤维素酶的研究进展 [J]. 微生物学报, 2002, 29(6): 90-94
- [3] 张颖. 纤维素酶与碱性纤维素酶的研究进展 [J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2005, 26(2): 13-21
- [4] 叶姜榆. 一种纤维素分解菌鉴别培养基 [J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251-252
- [5] 夏黎明, 萧庆, 余世凯. 碳源对固定化里氏木霉合成纤维素酶产生条件的研究 [J]. 纤维素科学与技术, 1994, 2(3): 72-77
- [6] 管斌, 谢来苏. 里氏木霉纤维素酶高产菌株发酵特性的测试 [J]. 中国酿造, 2005(1): 14-16
- [7] 邱雅临. 纤维素酶活的影响因子初探 [J]. 湖北农业科学, 2003(5): 93-95
- [8] 上海市科学技术交流站. 正交试验设计法 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1975: 31-45

(上接第 8839 页)

- [6] 夏达英, 王振英, 张士魁. 荧光技术在海洋环境学上的应用研究 [J]. 海洋学报, 1999, 21(3): 66-71
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 90-92

- [8] KNOWLES D S, LIEBERMAN S H. Field results from the SCAPS laser-induced fluorescence (LIF) sensor for in-situ subsurface detection of petroleum hydrocarbons [J]. SPE, 1995, 2504: 297-307