

DOI: 10.5846/stxb201301310207

梁芳, 鸭乔, 杜伟春, 温晓斌, 耿亚洪, 李夜光. 微藻光密度与细胞密度及生物质的关系. 生态学报, 2014, 34(21): 6156-6163.

Liang F, Ya Q, Du W C, Wen X B, Geng Y H, Li Y G. The relationships between optical density, cell number, and biomass of four microalgae. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(21): 6156-6163.

## 微藻光密度与细胞密度及生物质的关系

梁 芳<sup>1,2</sup>, 鸭 乔<sup>3</sup>, 杜伟春<sup>3</sup>, 温晓斌<sup>1,2</sup>, 耿亚洪<sup>1</sup>, 李夜光<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院武汉植物园植物种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074; 2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 云南施普瑞生物工程有限公司, 昆明 650106)

**摘要:**以四种常见微藻, 小球藻 (*Chlorella* sp. XQ-20044)、栅藻 (*Scenedesmus* sp. SS-200716)、绿球藻 (*Chlorococcum* sp.) 和螺旋藻 (*Spirulina* sp. CH-164) 为实验材料, 用梯度稀释法测定对数生长期不同浓度藻液的光密度 (OD)、细胞密度和生物质干重 (DW), 在光自养分批培养模式下对 4 种微藻进行 OD-波长 (350—800 nm) 扫描, 同时测定细胞密度和生物质干重, 分析藻液 OD 与细胞密度、生物质干重的关系。结果表明: 在任何波长下, 对数生长期的 4 种微藻细胞密度与 OD 值、生物质干重与 OD 值的变化都不成比例, 波长不同其拟合曲线偏离直线的程度不同。但是, 在 435 nm 处这种关系最接近直线, 可以用直线方程近似描述 ( $R^2 > 0.98$ ), 其它波长处细胞密度-OD、干重-OD 的关系都可以用二项式方程很好地描述 ( $R^2 > 0.99$ )。因此, 光密度法适用于连续和半连续培养, 可以用 435 nm 处测得的 OD 值计算细胞密度与干重。但是在分批培养模式下, 4 种微藻 DW/OD 比值随着培养时间均逐渐上升。小球藻 DW/OD<sub>540</sub> 为 0.19—0.44 g/L, 栅藻 DW/OD<sub>540</sub> 为 0.36—0.53 g/L, 绿球藻 DW/OD<sub>540</sub> 为 0.48—0.75 g/L, 螺旋藻 DW/OD<sub>560</sub> 为 0.46—0.74 g/L, 因此分批培养模式下采用测定藻液 OD 值反映细胞密度和生物质的方法不适用, 只有直接测定细胞密度和生物质才是准确的。研究结果为正确使用分光光度法监测微藻生长提供依据。

**关键词:** 微藻; 光密度; 细胞密度; 干重

## The relationships between optical density, cell number, and biomass of four microalgae

LIANG Fang<sup>1,2</sup>, YA Qiao<sup>3</sup>, DU Weichun<sup>3</sup>, WEN Xiaobin<sup>1,2</sup>, GENG Yahong<sup>1</sup>, LI Yeguang<sup>1,\*</sup>

1 Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Speciality Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Yunnan Spirin Biotechnology CO. Ltd, Kunming 650106, China

**Abstract:** To establish spectrophotometry as a method for estimating cell number and biomass of microalgal cultures, the relationships between optical density (OD), cell number, and dry weight (DW) were investigated for four familiar algae, *Chlorella* sp. XQ-20044, *Scenedesmus* sp. SS-200716, *Chlorococcum* sp. and *Spirulina* sp. CH-164. Algal suspensions with different cell concentrations were obtained by serial dilution of cultures in exponential growth, and their ODs determined by scanning at wavelengths from 350 nm to 800 nm. The cell numbers were determined by cell counting, and biomass (as DW) was determined by weighing. Further, the ODs of the autotrophic batch cultures were scanned during the growth process, and correlated with cell numbers and DWs of the same samples. The results were as follows: for the four microalgae, cell numbers and biomass-dry weight did not change linearly with the changes in OD at all the wavelengths examined. However, the relationships could be approximately described by a linear regression equation ( $R^2 > 0.98$ ) at 435

**基金项目:** 国家“863”项目 (2013AA065805); 国家自然科学基金 (31272680); 国家科技部科技基础性工作专项 (2012FY112900)

**收稿日期:** 2013-01-31; **网络出版日期:** 2014-03-13

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yeguang@wbcas.cn

nm, and were well described by binomial regression equations ( $R^2 > 0.99$ ) at other wavelengths. In continuous and semi-continuous cultures, the OD at 435 nm was suitable for estimating cell number and biomass; however, in autotrophic batch cultures an increase of the DW to OD ratio was observed during culture growth for all four algae. The ratio (DW/OD) was 0.19 to 0.44 g/L for *Chlorella*, 0.36 to 0.53 g/L for *Scenedesmus*, 0.48 to 0.75 g/L for *Chlorococcum* and 0.46 to 0.74 g/L for *Spirulina*. Thus, spectrophotometry was not suitable for estimating biomass-DW in batch culture. This study should help guide the proper application of spectrophotometry in microalgae culture.

**Key Words:** microalgae; optical density; cell number; biomass dry weight

微藻是一种遍布全球水体的低等浮游植物,是水体中原初生产力的主要组成部分,由于富含蛋白质、人体必需氨基酸、高不饱和脂肪酸、色素及多种生物活性物质,而成为现代社会食品、医药、饲料和燃料等的重要来源。目前,世界上商业化生产的微藻主要有螺旋藻(*Spirulina*)、小球藻(*Chlorella*)、红球藻(*Haematococcus*)和杜氏藻(*Dunaliella*)等<sup>[1-4]</sup>。螺旋藻具有增强人体免疫力、抗疲劳、改善消化系统功能等作用,因而作为保健食品和药品被大规模生产<sup>[5]</sup>。小球藻含有高达50%的粗蛋白和人体必需氨基酸,既是一种优良的保健品,也被用做珍贵动物的饵料添加剂<sup>[6]</sup>。成熟的红球藻孢子中虾青素(Astaxanthin)含量可高达1%—3%,虾青素是一种类胡萝卜素,具有超强的抗氧化活性,可作为保健品和高档化妆品的有效成分,也是三文鱼等珍贵水产品养殖必不可少的饲料添加剂<sup>[7]</sup>。杜氏藻含有大量的 $\beta$ -胡萝卜素和甘油,前者是维生素A的前体物质,也是一种天然抗氧化剂,后者是重要的有机化工原料<sup>[8]</sup>。

在微藻的培养过程中,无论是室内的研究还是室外的大规模养殖,都需要不断地检测其生长状况,掌握细胞密度和生物质的变化。细胞密度可以通过细胞计数的方法测定<sup>[9]</sup>,生物质可以通过称重法测定<sup>[10-11]</sup>。由于细胞计数法和称重法操作都比较繁琐、耗时耗力,目前无论在微藻研究的实验室还是生产工厂,都普遍采用一种便捷、省时的方法—利用分光光度计测定藻液光密度(OD)来间接反映细胞密度和生物质干重<sup>[12-13]</sup>。光密度法也广泛应用于微生物生长的测定<sup>[14-15]</sup>。测定光密度采用的波长依微藻种类的不同而异,主要有500、540、560、680、730 nm和750 nm,甚至对于同一种微藻也使用几种不同的测定波长。不少文献描述微藻的干重或细胞密度与光密度成直线关系:Hsieh和Fan等报道了小球藻的

干重与藻液OD值呈直线关系<sup>[16-17]</sup>。沈萍萍研究了15种微藻,结果显示在680 nm处细胞密度与藻液OD值呈直线关系<sup>[18]</sup>。黄美玲的报道显示,在 $OD_{680} < 0.5$ 时,小球藻的干重与藻液OD值呈直线关系,细胞密度与OD也呈直线关系<sup>[13]</sup>。Liu等报道了小球藻在500 nm处的OD与细胞密度呈直线关系<sup>[9]</sup>。但是,也有不同的报道:刘学铭等研究了分批异养培养过程中小球藻在540 nm处的光密度值与干重的关系,结果表明干重与OD的比值受培养条件和培养过程的影响很大,DW/OD先升后降,变化范围0.53—0.28<sup>[19]</sup>。

研究发现,在多数微藻培养后期,藻液OD值达到基本稳定时,生物质(干重)持续增长,同时细胞密度却在下降或基本不变。在此情况下,如果利用OD值的变化表示细胞密度或生物质变化就会产生很大误差。微藻培养过程中,藻液OD变化与细胞密度、生物质变化是什么关系,这种关系是否受测定波长的影响?利用分光光度计测定藻液OD值变化间接反映细胞密度和生物质干重变化的方法是否适用?其适用性是否受微藻种类和培养模式(分批培养、连续培养和半连续培养)的影响?为了寻找以上问题的答案,本文选用大小、形态不同的4种微藻,通过梯度稀释法测定不同浓度藻液的OD值与细胞密度及生物质干重,在分批培养过程中测定4种微藻藻液的可见光吸收光谱,同时测定细胞密度和生物质干重,研究光密度与细胞密度、生物质的关系。研究结果为正确使用分光光度法监测微藻生长提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

本实验采用4种微藻:小球藻(*Chlorella* sp. XQ-20044)、栅藻(*Scenedesmus* sp. SS-200716)、绿球藻

(*Chlorococcum* sp.) 和螺旋藻(*Spirulina* sp. CH-164), 均由中国科学院武汉植物园经济微藻藻种库提供, 四种微藻的形态分类特征见表 1。螺旋藻是多细胞丝状蓝藻, 藻体最大; 栅藻是多细胞绿藻(藻体通常

由 4 个细胞组成); 绿球藻和小球藻都是单细胞绿藻, 小球藻藻体最小。4 种藻代表大小、形状不同的多细胞和单细胞微藻。

表 1 微藻的形态特征  
Table 1 Characteristics of microalgae

| 微藻 Microalgae  | 藻种 Species                             | 大小及形态 The size and shape                                        |
|----------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 绿藻 Chlorophyta | 小球藻 ( <i>Chlorella</i> sp. XQ-20044)   | 单细胞, 幼年期细胞椭圆形, 成年期球形; 大小 3—5 $\mu\text{m}$                      |
|                | 栅藻 ( <i>Scenedesmus</i> sp. SS-200716) | 1, 2 或 4 细胞; 单细胞长 10—16 $\mu\text{m}$ , 宽 3—6 $\mu\text{m}$     |
|                | 绿球藻 ( <i>Chlorococcum</i> sp.)         | 单细胞, 球形; 大小 9—13 $\mu\text{m}$                                  |
| 蓝藻 Cyanophyta  | 螺旋藻 ( <i>Spirulina</i> sp. CH-164)     | 多细胞, 规则螺旋卷曲; 螺距 120—190 $\mu\text{m}$ , 螺旋宽 40—60 $\mu\text{m}$ |

1.2 培养方法

3 种绿藻均采用改良的 BG-11 培养基<sup>[20]</sup>, 螺旋藻采用 Zarrouk 培养基, 其中  $\text{NaNO}_3$  浓度改为 0.1 g/L。本实验采用通气培养装置进行培养, 该装置主要由长方体水槽、300 mL 玻璃培养管、侧面平行排列的 10 只 40W 日光灯管、控温系统、水循环系统、充气系统和  $\text{CO}_2$  供给系统等组成<sup>[21]</sup>。

取旺盛生长的微藻, 3500 r/min 离心 8 min 收集藻细胞, 用新鲜培养基清洗后, 再次离心收集藻细胞, 接种于新鲜培养基中, 进行通气培养。每种微藻接种 3 个培养管, 每管装 200 mL 藻液。培养开始后的前 24 h 光照强度为  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 之后光照强度提高为  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。培养温度保持为  $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 光暗周期为 14/10 h。4 种微藻均在培养的第 0、2、4、6、7、8 天取样, 每次取样后在培养管外壁准确标出藻液液面位置, 下次取样之前先补加灭菌水至标记处, 以补充培养过程中蒸发掉的水分。每隔 24 h 向藻液中充入  $\text{CO}_2$ , 将螺旋藻藻液的 pH 降至 9.5 左右, 其它 3 种绿藻的 pH 值降至 7.0 左右。实验重复两次。

1.3 藻液 OD 值测定

取藻液 3 mL, 用紫外可见分光光度计 (UV 5800, 上海元析) 1 cm 光径比色杯, 进行 OD-波长扫描。波长范围 350—800 nm, 波长间隔为 5 nm, 获得不同波长下的 OD 值。

1.4 藻液细胞密度的测定

细胞计数: 向 3 种绿藻藻液(每个样品 2 mL)中分别加入 Logul 固定液 0.05 mL, 在显微镜下用血球细胞计数板对每个样品重复计数 3 次, 计算出细胞密度平均值。当藻液密度过大无法计数时, 可将藻

液精确稀释后进行计数, 乘以稀释倍数即得到原藻液细胞密度。小球藻和绿球藻是单细胞微藻, 直接计算个体数; 栅藻虽然是多细胞个体, 但是在通气培养条件下分散成单细胞, 细胞数目以单个细胞数计算。正在分裂的细胞若子细胞清晰可见则均需计数, 螺旋藻不计数。

1.5 藻液生物质干重的测定

准确量取藻液体积, 用事先干燥并已称重的孔径为  $0.45 \mu\text{m}$  的玻璃纤维膜过滤收获藻细胞, 用蒸馏水洗两次后, 放入真空干燥器中干燥至恒重。根据干藻重量和藻液体积计算出 1 L 藻液中的生物质干重(g/L)。为了减少实验误差, 培养开始时至少取 20 mL 藻液, 第 2、4 天取 10 mL 藻液, 第 6、7、8 天取 5 mL 藻液。

1.6 对数生长期藻液 OD 值、细胞密度和干重的测定及其关系分析

分别取对数生长期的 4 种微藻, 先用 3500 r/min 离心 8 min 浓缩获得高浓度的藻液( $\text{OD}_{680} \approx 2.5$ ), 测定生物质干重及细胞数目。然后再准确地将浓缩藻液进行稀释, 使得到的藻液浓度分别为浓缩藻液浓度的 1/2、1/4、1/6、1/8、1/10、1/20, 对各个不同浓度的藻液进行 OD-波长扫描。根据浓缩藻液的干重、细胞密度和稀释倍数, 计算稀释藻液的干重和细胞密度, 分析藻液 OD 值与细胞密度、干重的关系。

1.7 分批培养过程中藻液 OD 值、细胞密度和干重的测定及其关系分析

对 4 种微藻进行分批培养, 于培养的第 0、2、4、6、7、8 天取样, 进行 OD-波长扫描、细胞计数和测定干重, 分析藻液 OD 值与细胞密度、干重的关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 对数生长期的藻液光密度与生物质干重、细胞密度的关系

以 OD 值为横坐标,对应的生物质干重为纵坐标作图(图 1)。各种波长下,4 种微藻的干重与 OD 值都不是直线关系。当波长在 435 nm 时,可以用直线方程近似描述( $R^2 > 0.98$ ),具有较高的线性拟合度。4 种微藻在 435 nm 处生物质干重( $y$ , g/L)与 OD 值( $x$ )的直线方程如下:

$$\text{小球藻 } y = 0.1656x \quad (R^2 = 0.9832)$$

$$\text{栅藻 } y = 0.1799x \quad (R^2 = 0.9848)$$

$$\text{绿球藻 } y = 0.3686x \quad (R^2 = 0.9989)$$

$$\text{螺旋藻 } y = 0.3239x \quad (R^2 = 0.9986)$$

除了 435 nm,其它波长下 OD 值与干重的关系都远远偏离直线关系。但是,无论哪种波长下,这种关系都可以很好地用二项式方程描述( $R^2 > 0.99$ )。

三种绿藻细胞密度-OD 值曲线图与干重-OD 值曲线图相同(图未显示)。波长 435 nm 时,细胞密度与 OD 值的关系接近直线,可以用直线方程近似描述。3 种绿藻细胞密度( $y$ ,  $10^7$  个/mL)与 OD 值( $x$ )的直线方程如下:

$$\text{小球藻 } y = 1.747x \quad (R^2 = 0.9832)$$

$$\text{栅藻 } y = 0.8369x \quad (R^2 = 0.9848)$$

$$\text{绿球藻 } y = 1.5204x \quad (R^2 = 0.9989)$$

与干重-OD 关系一样,无论哪种波长下,细胞密度与 OD 值的关系都可以很好地用二项式方程描述( $R^2 > 0.99$ )。

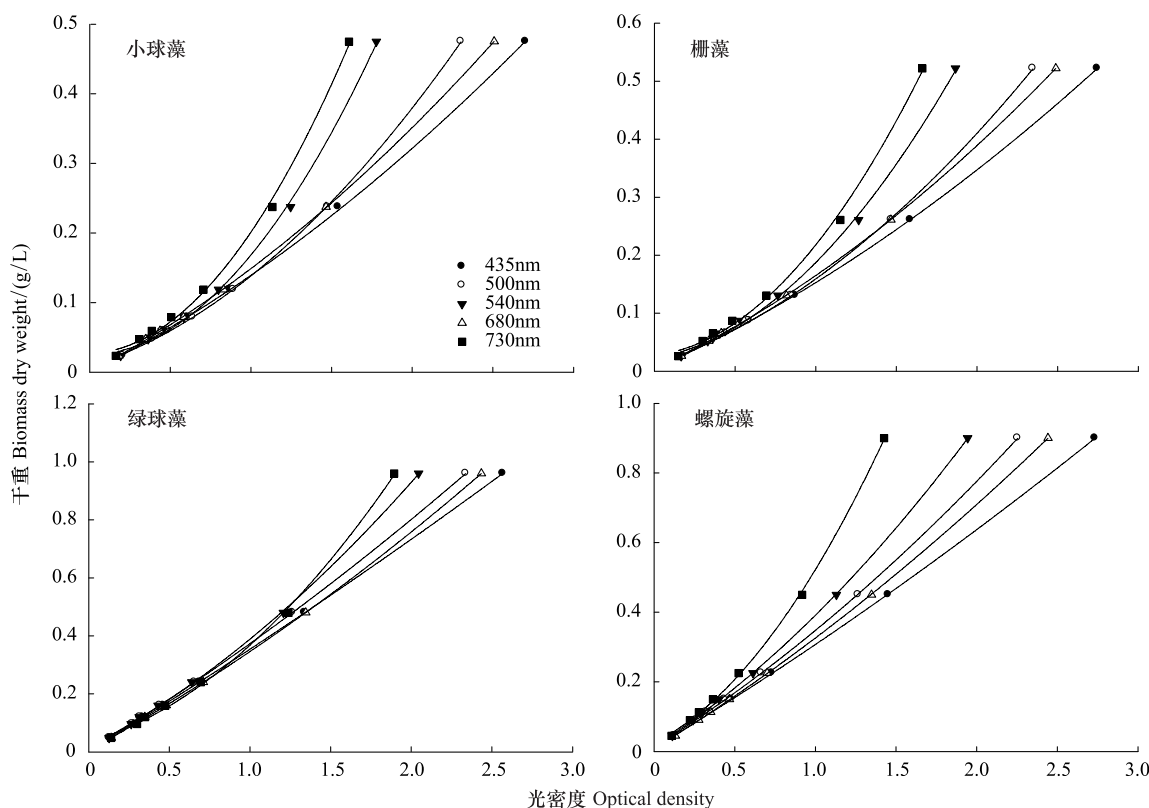


图 1 不同波长下干重与 OD 值的关系

Fig.1 The relationships between biomass dry weight and optical density at different wavelength

### 2.2 分批培养过程中藻液 OD 值、细胞密度及干重的变化

#### 2.2.1 4 种微藻藻液吸收光谱

4 种微藻分批培养过程中不同培养时间的藻液吸收光谱如图 2 所示。观察对数生长期(培养第 2—

4 天)藻液的吸收光谱,发现 4 种微藻光密度的两个最大吸收峰都在 435—440 nm 和 670—680 nm 处,是微藻细胞内所含色素(主要是叶绿素)的两处最大吸收波长。这两处的光密度值在培养末期相对降低,不再是最大值,这与生长后期细胞内的色素变化

有关。在培养后期小球藻的 OD 值稍有上升,栅藻和螺旋藻基本保持不变或略有下降,绿球藻 OD 明

显下降。

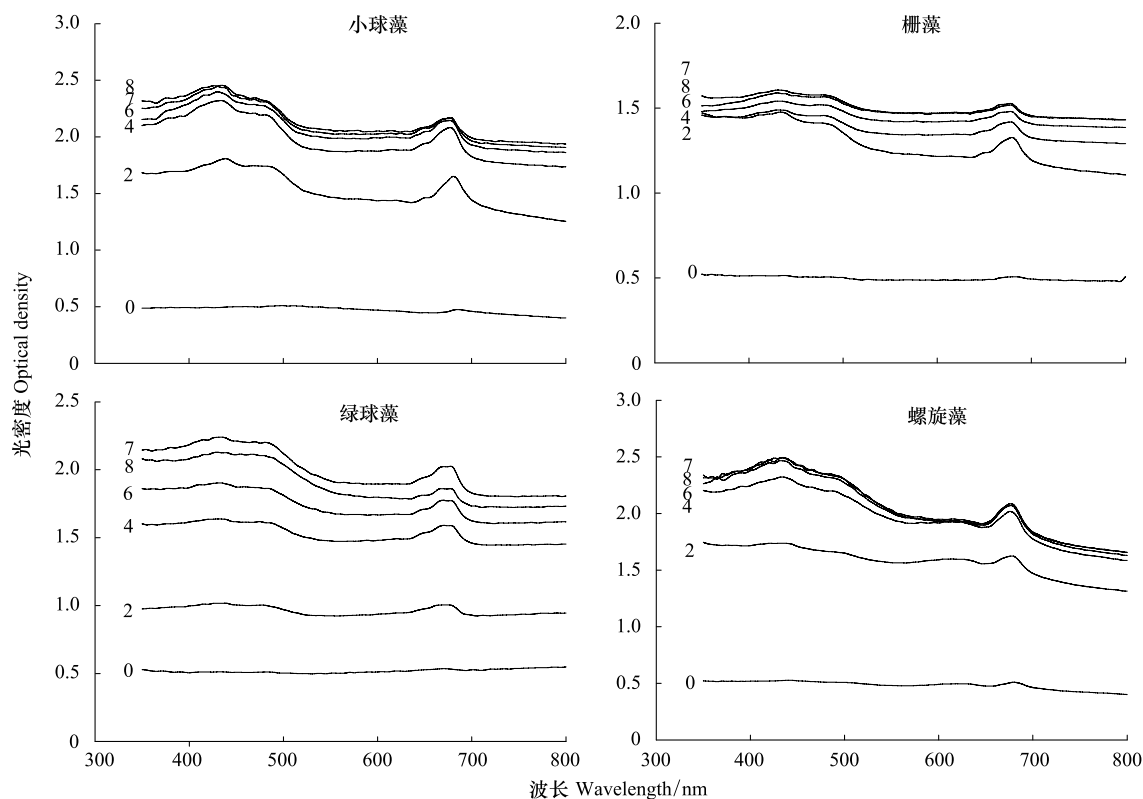


图 2 4 种微藻不同培养时间藻液的吸收光谱(曲线左端数字表示培养时间(d))

Fig.2 Optical spectrum of the four microalgae at different culture time (The numbers on the left of curves indicate culture time (d))

### 2.2.2 4 种藻液 OD 值、细胞密度及干重的变化

利用 OD-波长扫描获得的数据及对应的细胞密度和干重,对 4 种微藻分批培养过程中不同波长下 OD 值与干重、细胞密度的关系进行作图分析(图未显示)。结果表明分批培养模式下无论哪种波长,OD 值与细胞密度、干重都不呈直线关系,也不存在其它有规律的数量关系。因此,仅以惯用波长(绿藻为 540 nm,螺旋藻 560 nm)为例,对 4 种微藻光自养分批培养过程中藻液 OD 值、细胞密度和生物质干重的变化进行分析(表 2)。

小球藻的 OD 值随着培养时间不断增大,第 6 天进入稳定期,第 8 天达到最大为 2.067。栅藻的 OD 值在培养的前 7d 不断增大,第 7 天达到最大为 1.481,第 8 天基本保持不变。绿球藻和螺旋藻第 7 天 OD 值达到最大,分别为 1.944 和 1.995,第 8 天稍有下降。

小球藻在接种 48h 后细胞密度约增加了 4.4 倍,之后增加较缓慢。到培养结束时,增加到接种时的

5.6 倍。栅藻在接种 48h 后细胞密度增加了 1.8 倍,第 6 天达到最大值,为接种时的 3.3 倍,第 8 天细胞密度下降 14%。绿球藻在接种后第 4 天细胞密度进入稳定期,比接种时增加了 1.4 倍,之后增加缓慢,第 8 天细胞密度下降 6%。

小球藻在前 4d 干重急剧增加,接种 48h 后干重增加了 2.5 倍,从第 6 天开始增加较缓慢,到培养结束时生物量增加了 8.7 倍。栅藻在培养的第 2 天干重增加 1.8 倍,之后持续增加到接种时的 4.6 倍。绿球藻在前 6d 生物质增加较快,之后减慢,到第 8 天生物量增加了 5 倍。螺旋藻在接种 2d 后生物质增加 3.5 倍,从第 6 天开始基本不再增加,到培养结束时生物量增加了 5.6 倍。

### 2.2.3 藻液 OD 值与干重、细胞密度的关系

以第 0、2、4、6、7、8 天测得的 OD 值为横坐标,作 OD 与细胞密度、干重的关系曲线(图 3)。在分批培养的前期和中期,3 种绿藻的 OD 值、细胞密度和干重以及螺旋藻的 OD 值与干重都呈现一种增长的趋

表 2 分批培养过程中 OD 值、细胞密度和干重的变化

| Table 2 Changes of optical density, cell density and biomass dry weight of the four microalgae during culture |                                     |                            |                            |                            |                            |                            |                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 藻种<br>Species                                                                                                 | 指标<br>Index                         | 第 0 天<br>0 <sup>th</sup> d | 第 2 天<br>2 <sup>nd</sup> d | 第 4 天<br>4 <sup>th</sup> d | 第 6 天<br>6 <sup>th</sup> d | 第 7 天<br>7 <sup>th</sup> d | 第 8 天<br>8 <sup>th</sup> d |
| 小球藻 <i>Chlorella</i>                                                                                          | OD <sub>540</sub>                   | 0.497                      | 1.485                      | 1.884                      | 1.997                      | 2.038                      | 2.067                      |
|                                                                                                               | Cell density/(10 <sup>7</sup> 个/mL) | 3.58                       | 18.64                      | 19.30                      | 19.32                      | 19.45                      | 20.02                      |
|                                                                                                               | DW/(g/L)                            | 0.094                      | 0.332                      | 0.677                      | 0.793                      | 0.853                      | 0.913                      |
|                                                                                                               | DW/OD/(g/L)                         | 0.189                      | 0.224                      | 0.360                      | 0.397                      | 0.419                      | 0.442                      |
| 栅藻 <i>Scenedesmus</i>                                                                                         | OD <sub>540</sub>                   | 0.487                      | 1.249                      | 1.350                      | 1.425                      | 1.481                      | 1.477                      |
|                                                                                                               | Cell density/(10 <sup>7</sup> 个/mL) | 1.30                       | 3.69                       | 4.12                       | 4.33                       | 4.30                       | 3.70                       |
|                                                                                                               | DW/(g/L)                            | 0.174                      | 0.482                      | 0.587                      | 0.710                      | 0.750                      | 0.780                      |
|                                                                                                               | DW/OD/(g/L)                         | 0.357                      | 0.386                      | 0.435                      | 0.498                      | 0.506                      | 0.528                      |
| 绿球藻 <i>Chlorococcum</i>                                                                                       | OD <sub>540</sub>                   | 0.501                      | 0.927                      | 1.481                      | 1.693                      | 1.944                      | 1.867                      |
|                                                                                                               | Cell density/(10 <sup>6</sup> 个/mL) | 8.07                       | 8.21                       | 19.66                      | 19.87                      | 21.50                      | 20.29                      |
|                                                                                                               | DW/(g/L)                            | 0.240                      | 0.603                      | 0.903                      | 1.207                      | 1.377                      | 1.402                      |
|                                                                                                               | DW/OD/(g/L)                         | 0.479                      | 0.650                      | 0.610                      | 0.713                      | 0.708                      | 0.751                      |
| 螺旋藻 <i>Spirulina</i>                                                                                          | OD <sub>560</sub>                   | 0.478                      | 1.564                      | 1.926                      | 1.972                      | 1.995                      | 1.982                      |
|                                                                                                               | DW/(g/L)                            | 0.222                      | 0.998                      | 1.143                      | 1.430                      | 1.460                      | 1.467                      |
|                                                                                                               | DW/OD/(g/L)                         | 0.464                      | 0.638                      | 0.593                      | 0.725                      | 0.732                      | 0.740                      |

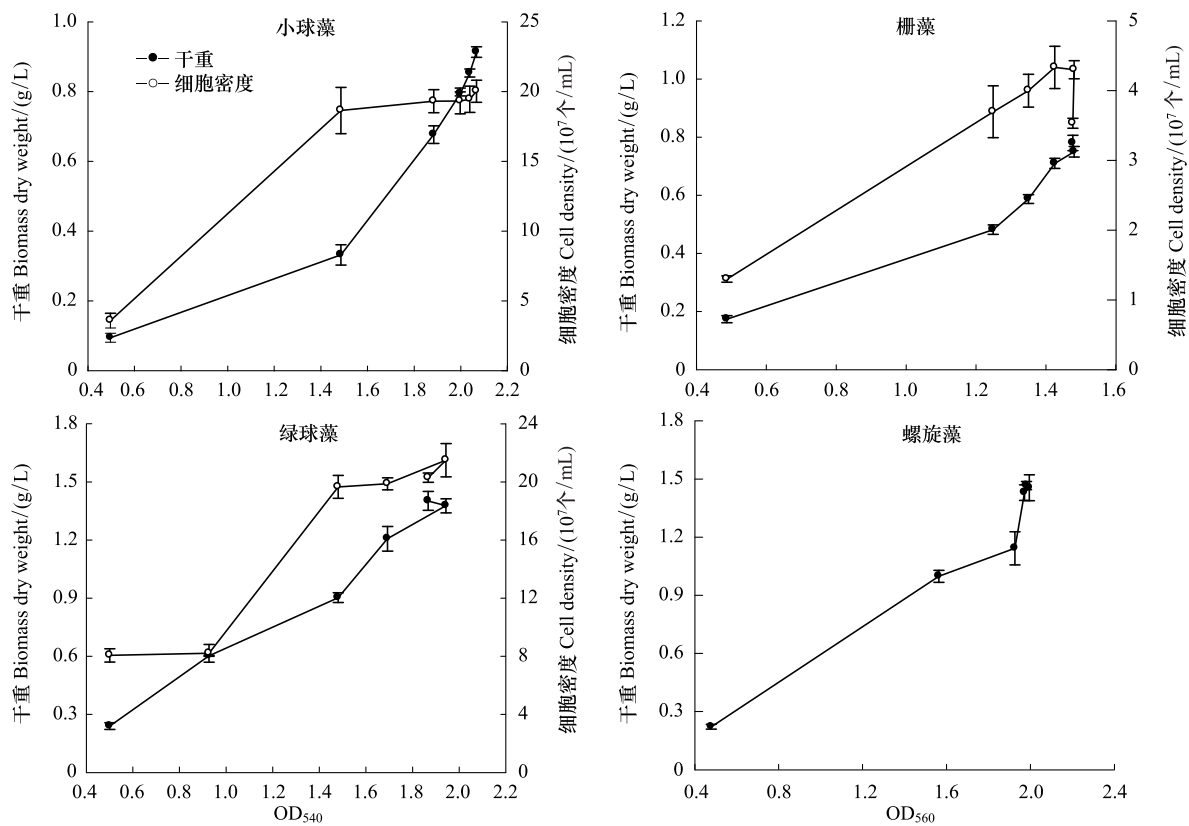


图 3 4 种微藻干重、细胞密度与光密度的关系

Fig.3 The relationships between biomass dry weight, cell density and optical density of microalga

OD<sub>540</sub>:在波长为 540 nm 下藻液的光密度值;OD<sub>560</sub>:在波长为 560 nm 下藻液的光密度值

势,但是在培养后期,OD 值、细胞密度和干重的变化趋势不一致。干重都保持增长,而栅藻和绿球藻的细胞密度均有不同程度的下降,OD 值则有各种变化:维持不变,稍有增长或稍有下降。3 种绿藻在培

养过程中 DW/OD 比值均逐渐上升,小球藻 DW/OD 比值范围为 0.19—0.44 g/L,栅藻为 0.36—0.53 g/L,绿球藻为 0.48—0.75 g/L。可见,对于同一种微藻,随着培养时间 DW/OD 不断增大;对于不同种微藻,细胞越大,DW/OD 比值越大。螺旋藻在分批培养过程中,DW/OD 为 0.46—0.74 g/L。

### 3 讨论

分光光度计的工作原理是朗伯-比尔定律,即物质在一定波长处的光密度与物质的浓度和光程呈正比。微藻藻液是由培养基和悬浮于其中的藻细胞组成,是一种悬浊液,不仅对入射光有吸收,还有反射、折射和散射<sup>[22]</sup>,不符合朗伯-比尔定律成立的条件。因此,利用分光光度计测定藻液的光密度,无论哪种波长,藻液 OD 值与细胞密度,OD 值与生物质干重都不是严格地按比例变化。

光密度法用于细胞浓度的测定最初应用于细菌的生长中,在一定浓度范围内,细菌浓度与光密度成正比,此时可以用光密度来表征生长量。早在 1949 年 Monod 就提出用光密度法测定细菌的生物量,该法较其它方法简便易行且有效<sup>[23]</sup>。后来,此方法除了用于细菌及单细胞微生物外,在微藻的培养中也得到广泛应用。但是,细胞悬浊液对光的吸收除了直接与生物量或细胞密度有关,还与细胞的大小、形状及折射率有关。当细胞形态及组成发生改变时,对光的吸收特性也会随之改变。由于在最大吸收峰处的信号最灵敏,因而此处的波长被广泛用来测定光密度。但是对于含有细胞色素的微藻而言,色素本身还具有吸光性,当细胞内色素含量发生变化时,就会干扰结果的测定,使测量值与实际值产生较大误差<sup>[24-25]</sup>。在分批培养条件下,微藻细胞色素含量占细胞干重的比例变化范围为 0.5%—5.5%,利用标准曲线得到的生物量干重与实际测得值在 680 nm 处误差为 9%—18%,在 750 nm 处为 5%—13%。因此 Griffiths 指出,当细胞内色素含量发生改变时光密度法是不准确的<sup>[24]</sup>。

图 1 显示,梯度稀释实验中在波长 435 nm 处干重与 OD 值的关系最接近直线(OD 值范围 0.1—2.7)。对于其它波长,只有在藻液浓度很小的范围内,干重与 OD 值才接近直线关系。这与已有的一些报道相似,如郝聚敏报道蛋白核小球藻在 680 nm

处 OD 在 0.07—0.12 时,细胞浓度与 OD 呈直线关系,OD 在 0.04—0.4 时,单位干重与 OD 呈直线关系;钝顶螺旋藻在 560 nm 处 OD 在 0.1—0.3 时,干重与 OD 呈直线关系<sup>[26]</sup>。王英娟报道蛋白核小球藻在 517 nm 处 OD 在 0.05—0.54 之间,干重与 OD 呈直线关系<sup>[12]</sup>。这些报道中藻液的 OD 值都很低,其适用性受到很大的限制。

梯度稀释实验使用的是对数生长期的藻液,其特征是细胞处于旺盛的分裂生长状态,细胞状态和形态基本一致。只有在这种情况下,干重、细胞密度与在 435 nm 处测得的 OD 的关系可以用直线方程描述。连续或半连续模式下培养微藻,藻细胞快速分裂增殖,细胞的状态和形态也基本一致,可以在 435 nm 处测定光密度,利用比例关系简便、快捷地反映细胞密度和生物质变化。如果使用其它测定波长,就必须先建立干重-OD 值和细胞密度-OD 值的回归方程(非直线方程)。需要指出,对于非直线回归方程,当藻液经过稀释后,必须先根据稀释后测得的 OD 值计算稀释藻液的细胞密度或干重,然后乘以稀释倍数计算原藻液的细胞密度或干重,而不能根据稀释后藻液的 OD 值和稀释倍数计算原藻液的 OD 值,然后再利用回归方程计算原藻液的细胞密度或干重。

分批培养过程中,细胞经历了旺盛增殖期和衰老期,细胞形态、大小处于不断变化中。无论哪种测定波长,4 种微藻 DW/OD 的比值均随着培养时间不断变化(表 2)。藻液 OD 值与细胞密度、生物质干重之间不存在有规律的数量关系,不能用回归方程描述。所以,在分批培养模式下,测定藻液 OD 值反映细胞密度和生物质的方法不适用,只有直接测定的细胞密度和生物质才是准确的。用 OD 值绘制生长曲线,在稳定期以前,可以反映细胞密度或生物质变化的趋势,进入稳定期后,生长曲线不能反映细胞密度或生物质的变化。刘学铭等研究了分批异养培养过程中小球藻光密度与干重的关系,结果表明 DW/OD 的比值先升后降,变化范围 0.53—0.28<sup>[19]</sup>。可见,测定藻液 OD 值反映细胞密度和生物质的方法不仅不适用于光合自养分批培养,也不适用于异养分批培养。

### References:

- [1] Richmond A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and

- Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2004: 255-288.
- [ 2 ] Richmond A. *Spirulina* // Borowitzka M A, Borowitzka L J, eds. Micro-algal Biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1988: 85-121.
- [ 3 ] Zhang B Y, Geng Y H, Li Z K, Hu H J, Li Y G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture*, 2009, 295(3/4): 275-281.
- [ 4 ] Zhu Y H, Jiang J G. Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of  $\beta$ -carotene. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(3): 953-959.
- [ 5 ] Hu H J. *Spirulina* Biology and Biotechnology. Beijing: Science Press, 2003: 1-8.
- [ 6 ] Kong W B, Li L N, Z, Zhang J, Xia C G. Healthcare functions and applications in food industry of *Chlorella*. *Food Science*, 2010, 31(9): 323-328.
- [ 7 ] Naguib M A Y. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(4): 1150-1154.
- [ 8 ] Cheng F, Jiang Y. *Biotechnology of Microalgae*. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 156-161.
- [ 9 ] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4717-4722.
- [ 10 ] Lü J M, Cheng L H, Xu X H, Zhang L, Chen H L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17): 6797-6804.
- [ 11 ] Yang S L, Wang J, Cong W, Cai Z L, Ouyang F. Effects of bisulfite and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35(1): 46-50.
- [ 12 ] Wang Y J, He J, Li Z, Luo H Y. Determination of *Chlorella pyrenoidosa* biomass using optical density method. *Journal of Northwest University: Natural Science Edition*, 2012, 42(1): 60-63.
- [ 13 ] Huang M L, He Q, Huang J R, Li Z F. A rapid determination of *Chlorella* biomass. *Hebei Fisheries*, 2010, (4): 1-4.
- [ 14 ] Toennies G, Gallant D L. The relation between photometric turbidity and bacterial concentration. *Growth*, 1949, 13(1): 7-20.
- [ 15 ] Ma Y, Fan Y J. Monitoring changes in biomass using OD in the culture process of the fermentation with the oleaginous yeast. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(12): 7342-7343, 7346-7346.
- [ 16 ] Hsieh C H, Wu W T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology*, 2009, 100(17): 3921-3926.
- [ 17 ] Fan L H, Zhang Y T, Zhang L, Chen H L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science*, 2008, 325(1): 336-345.
- [ 18 ] Shen P P, Wang C H, Qi Y Z, Xie L C, Wang Y. An optical density method for determination of microalgal biomass. *Journal of Jinan University: Natural Science Edition*, 2001, 22(3): 115-119.
- [ 19 ] Liu X M, Yu R Q, Liang S Z. The relationship between optical density and dry weight of *Chlorella vulgaris* in batch heterotrophic culture. *Microbiology*, 1999, 26(5): 339-341.
- [ 20 ] Ouyang Z R, Wen X B, Geng Y H, Mei H, Hu H J, Zhang G Y, Li Y G. The effects of light intensities, temperature, pH and salinities on photosynthesis of *Chlorella*. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2010, 28(1): 49-55.
- [ 21 ] Zhang G Y, Wen X B, Liang F, Ouyang Z R, Geng Y H, Li Y G. The effects of physical and chemical factors on the growth and lipid production of *Chlorella*. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(8): 2076-2085.
- [ 22 ] Wen S H, Wang C H, Ju B, Xu C Y, Zheng L, Guo J L. Study on the light decline model of *Porphyridium cruentum* culture. *Marine Science Bulletin*, 2001, 20(2): 35-39.
- [ 23 ] Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 1949, 3(1): 371-394.
- [ 24 ] Griffiths M J, Garcin C, van Hille P R, Harrison S T L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 85(2): 119-123.
- [ 25 ] Moheimani R N, Borowitzka M A, Isdepsky A, Sing F S. Standard methods for measuring growth of algae and their composition // Borowitzka A M, Moheimani R N, eds. *Algae for Biofuels and Energy*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013: 265-284.
- [ 26 ] Hao J M, Zheng J, Li Z B, Lu B, Lin Y J, Wang B, Zhou W H. Study on the relationships between optical density at certain wavelength and cell dry weight and cell concentration of three microalgae. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(28): 17399-17401.

#### 参考文献:

- [ 5 ] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理. 北京: 科学出版社, 2003: 1-8.
- [ 6 ] 孔伟宝, 李龙因, 张继, 夏春谷. 小球藻的营养保健功能及其在食品工业中的应用. *食品科学*, 2010, 31(9): 323-328.
- [ 8 ] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 156-161.
- [ 12 ] 王英娟, 贺敬, 李壮, 罗海羽. 光密度法测定蛋白核小球藻生物量. *西北大学学报: 自然科学版*, 2012, 42(1): 60-63.
- [ 13 ] 黄美玲, 何庆, 黄建荣, 黎祖福. 小球藻生物量的快速测定技术研究. *河北渔业*, 2010, (4): 1-4.
- [ 15 ] 马勇, 樊永军. 用OD值监测产油酵母培养过程中的菌体生物量变化. *安徽农业科学*, 2011, 39(12): 7342-7343, 7346-7346.
- [ 18 ] 沈萍萍, 王朝晖, 齐雨藻, 谢隆处, 王艳. 光密度法测定微藻生物量. *暨南大学学报: 自然科学版*, 2001, 22(3): 115-119.
- [ 19 ] 刘学铭, 余若黔, 梁世中. 分批异养培养小球藻光密度值与干重的关系. *微生物学通报*, 1999, 26(5): 339-341.
- [ 20 ] 欧阳峥嵘, 温晓斌, 耿亚红, 梅洪, 胡鸿钧, 张桂艳, 李夜光. 光照强度、温度、pH、盐度对小球藻(*Chlorella*)光合作用的影响. *武汉植物学研究*, 2010, 28(1): 49-55.
- [ 21 ] 张桂艳, 温晓斌, 梁芳, 欧阳峥嵘, 耿亚红, 梅洪, 李夜光. 重要理化因子对小球藻生长和油脂产量的影响. *生态学报*, 2011, 31(8): 2076-2085.
- [ 22 ] 温少红, 王长海, 鞠宝, 徐春野, 郑丽, 郭尽力. 紫球藻培养液光衰减规律的研究. *海洋通报*, 2001, 20(2): 35-39.
- [ 26 ] 郝聚敏, 郑江, 黎中宝, 陆斌, 林耀江, 王博, 周文虹. 3种微藻在特定波长下的光密度与其单位干重·细胞浓度间的关系研究. *安徽农业科学*, 2011, 39(28): 17399-17401.