

# 微生物絮凝剂对小球藻细胞氧化应激研究

李祎<sup>1</sup>, 许艳婷<sup>1</sup>, 宋瑞雪<sup>1</sup>, 田聪琦<sup>1</sup>, 王海磊<sup>1</sup>, 郑天凌<sup>2</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 小球藻作为能源藻, 可以提供产生物柴油, 但是小球藻生物质的获取成为能源藻发展的瓶颈. 目前研究藻细胞生物质收集的方法很多, 但不同收集方法对能源藻细胞的氧化应激研究却很少. 分别研究絮凝功能细菌 xn-1 所产生物絮凝物质和离心法对能源藻——小球藻生物质在收集过程中对藻细胞的氧化应激, 以期确定絮凝微生物对小球藻细胞的生物安全性. 采用涂布划线法从藻际分离纯化絮凝功能微生物; 通过梯度醇沉法获得絮凝物质; 分别用絮凝微生物所分泌絮凝物质和离心法收集藻细胞生物质, 并对藻细胞内蛋白含量、总糖含量、丙二醛含量(MDA)、过氧化氢酶(CAT)活性、谷胱甘肽(GSH)含量和抗坏血酸(AsA)含量进行测定; 以分光光度计测定其吸光度值. 经过测定并经过统计学显著性分析, 发现离心作用下收集的藻细胞内的MDA、GSH和AsA含量显著高于利用絮凝物质絮凝得到的藻细胞. 离心作用相对于絮凝作用造成藻细胞膜发生更高的脂质过氧化, 产生大量的活性氧自由基, 诱导非酶抗氧化系统响应. 因此, 离心法收集藻生物质相对于微生物絮凝对藻细胞的伤害更大, 絮凝微生物比离心法更适用于收集能源藻生物质.

**关键词:** 小球藻; 生物质收集; 絮凝微生物; 离心法; 氧化应激

**中图分类号:** Q939.9

**文献标志码:** A

现如今经济高速发展, 加上化石燃料等不可再生能源的过量开采和过度消耗, 能源危机问题愈发突出<sup>[1]</sup>. 生物燃料被认为是一种适合于化石燃料的可持续替代品. 藻类是生物燃料的可再生原料, 因其具有生产率高、不占用耕地并能在废水中生长等优势, 被认为是最有价值 and 最有前景的可再生能源之一<sup>[2]</sup>. 其中小球藻个体微小(几微米至十几微米)、分布广泛、种类繁多且生存能力强, 可以用来发酵生产清洁燃料, 也可作畜牧水产养殖的饲料和饵料<sup>[3-4]</sup>. 然而, 微藻的培养和收集是影响工业应用的最大瓶颈, 尤其是微藻的低成本、高效率收集<sup>[5-6]</sup>.

目前研究藻细胞收集的方法有很多, 如化学方法主要利用化学试剂来达到絮凝藻的效果, 但是化学药品难以降解, 不仅影响小球藻的使用价值, 还会对环境造成二次污染<sup>[7-8]</sup>. 物理方法主要有离心、电絮凝和超声波絮凝, 虽不会造成二次污染, 但是操作环境受限, 耗能大, 不适于大规模应用<sup>[9]</sup>. 生物方法主要利用微生物本身或其代谢产生的絮凝物质, 使藻细胞相互聚集沉降, 对微藻进行采收<sup>[10]</sup>. 生物絮凝不仅可以有效地收获微藻生物质, 而且还可以避免与化学和物理方法相比的污染<sup>[11]</sup>. 虽然生物法在收集藻类生物质的过程中有诸多优势, 但关于生物法中利用微生物絮凝剂对小球藻生物质收集过程中对细胞的氧化应激的研究并没有开展, 对用不同方法收集后对小球藻细胞的氧化应激研究却很少.

由于小球藻具有丰富的营养价值和诸多的优点, 所以保证采收后小球藻的完整性尤为重要, 故对不同方法采收后的藻细胞氧化应激问题的研究很有必要, 特别是不同的方法采收的藻细胞的细胞膜完整性和细胞活力需要进一步研究. 因此, 本文分别比较了絮凝菌株 xn-1 所分泌絮凝物质作用于藻细胞和离心法收集藻细胞后, 对该两种方法对藻细胞的损伤程度进行研究.

**收稿日期:** 2017-08-23; **修回日期:** 2018-04-10.

**基金项目:** 国家自然科学基金(51008119; 41576109); 河南省高等学校重点科研项目计划(17A610002).

**作者简介(通信作者):** 李祎(1988-), 男, 河南滑县人, 河南师范大学副教授, 博士, 研究方向为环境微生物, E-mail: liyi@htu.edu.cn.

## 1 材料与方法

### 1.1.1 菌种、藻种

菌种:絮凝菌株 xn-1 分离于铜绿微囊藻 7820 藻际。

藻种:小球藻(*Chlorella vulgaris*)购于武汉水生生物研究所,采用 BG11 培养基,于光强  $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,昼夜比  $L : D = 12 \text{ h} : 12 \text{ h}$  的条件下培养。

### 1.1.2 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 30 g,pH 7.2,1 L 蒸馏水。

BG11 培养基质量浓度: $\text{NaNO}_3$  1.500 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.040 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.075 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.036 g/L, $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.020 g/L,柠檬酸 0.006 g/L,柠檬酸铁 0.006 g/L,微量元素溶液 A5 1.0 mL,EDTA 0.001,蒸馏水 1 L,用于小球藻的培养。微量元素混合溶液 A5 质量浓度(g/L): $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.860, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.810, $\text{ZnSO}_4$  0.222, $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.390, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.079, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.490。絮凝培养基质量浓度(g/L): $\text{NaCl}$  24, $\text{NH}_4\text{Cl}$  1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  6.5, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,葡萄糖 10,酵母粉 0.6,pH 调至 7.0。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 絮凝菌株 xn-1 的分离

取铜绿微囊藻 7820 的藻液 20 mL,通过  $0.2 \mu\text{m}$  的聚碳酸膜过滤,获得游离和黏附的细菌样品<sup>[12]</sup>。采取逐级稀释法将样品分别涂布在 LB 固体培养基表面,置于  $28^\circ\text{C}$  培养 2~3 d。挑取不同类型单菌落划线于 LB 固体平板,置于  $28^\circ\text{C}$  温度下培养 2~3 d,重复该步骤直到得到纯培养。分别将 0.5 mL 的不同纯培养的发酵产物接种于 10 mL 小球藻藻液中,于 120 r/min 的摇床上摇 5 min 后,静置 10 min,并设置对照组,处理组和对照组分别设置 3 个平行;观察处理组中对小球藻有絮凝作用的菌株,从而筛选出絮凝菌株 xn-1。用 20% 甘油将其保存在  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中,待用。

### 1.2.2 絮凝物质的提取

絮凝物质提取方法:将培养至对数期的菌株 xn-1 的发酵液,6 000 r/min,离心 20 min 后收集上清;加入二倍体积预冷的无水乙醇, $4^\circ\text{C}$  放置 24 h 后于 6 000 r/min,离心 30 min,收集沉淀;将沉淀用适量蒸馏水溶解,在离心机中 6 000 r/min,离心 10 min,收集上清;再次向沉淀中加适量水溶解,相同条件下离心,合并上清;向合并上清中,加入二倍体积的预冷乙醇  $4^\circ\text{C}$  放置 24 h 后在 6 000 r/min,离心 30 min,收集沉淀,重复上述操作;将合并后上清在冷冻干燥机中进行冷冻干燥后称重。

### 1.2.3 藻细胞裂解液制备

取装有 20 mL 小球藻的锥形瓶,均加入 90  $\mu\text{L}$  絮凝物质质量浓度(10 mg/L),絮凝时间分别为 5 min 和 30 min;另取装有 20 mL 小球藻的锥形瓶,分别在转速为 3 000 r/min 和 10 000 r/min 的离心机中离心 5 min 和 30 min,均设置 3 组平行。将所有处理组的藻细胞收集,并用 pH 7.4,浓度 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次。加入 1.5 mL PBS 重悬藻细胞,在  $4^\circ\text{C}$  下用超声破碎仪在功率 180 W(工作 3s,间隔 3s)破碎 15 min,样品破碎后于 10 000 r/min 离心 5 min,收集上清。上清分装于离心管中保存在  $-80^\circ\text{C}$  冰箱待用。将获得的细胞裂解液用于测定胞内蛋白、总糖含量、MDA 含量,酶抗氧化系统及非酶抗氧化系统的含量。

### 1.2.4 藻细胞的胞内蛋白测定

根据考马斯亮蓝法,利用南京建成总蛋白定量试剂盒对胞内蛋白含量进行测定。取 1.5 mL 考马斯亮蓝显色液于 2 mL 离心管中,其中加入 0.025 mL 方法 1.2.3 中制备好的细胞裂解液为样品组,加入 0.025 mL 质量浓度为 0.536 g/L 标准液为标准组,加入等体积的蒸馏水为对照组。将各个测定管混匀,静置 10 min,在波长 595 nm 处,1 cm 光径,蒸馏水调零,用分光光度计测量各管吸光度值。为减少实验误差,每组实验做 3 个生物学重复。

### 1.2.5 藻细胞的胞内总糖含量测定

根据苯酚硫酸法对胞内总糖含量进行测定。以质量浓度 1 mg/mL 的葡萄糖溶液作为糖的标准溶液,用

蒸馏水稀释成总体积为 0.5 mL 的不同质量浓度,其中每管依次加入 0.5 mL 质量分数的 5% 苯酚、2.5 mL 浓硫酸,盖上盖子后迅速混匀,静置 20 min 后,于波长为 490 nm 处测吸光度值,以相同体积蒸馏水代替糖溶液作为空白对照组,以糖含量( $\mu\text{g}$ )为横坐标、吸光度值  $\text{OD}_{490}$  为纵坐标绘制标准曲线。取方法 1.2.3 制备好的细胞裂解液 50  $\mu\text{L}$  加入到试管中,加入蒸馏水至 0.5 mL,然后加入 0.5 mL 质量分数 5% 的苯酚,2.5 mL 的浓硫酸。用分光光度计在波长 490 nm 处测量所有样品的吸光度值。根据绘制的标准曲线,计算不同样品中的总糖含量。

### 1.2.6 藻细胞内 MDA 含量测定

取方法 1.2.3 制备好的藻细胞裂解液,利用南京建成微量丙二醛(MDA)测试盒对藻细胞的胞内 MDA 含量进行测定。按照操作说明利用漩涡振荡器将样品与试剂混匀,用保鲜薄膜扎紧试管口,用针头在盖子上穿一个小孔,95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 40 min,取出后流水冷却,用分光光度计在 532 nm 处,1 cm 光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。MDA 含量测定按照以下公式进行:

样品中 MDA 物质的量/蛋白质量 = (测定管 OD - 对照管 OD) / (标准管 OD - 空白管 OD)  $\times$  标准品质量浓度 / 待测样本蛋白质量浓度。

### 1.2.7 藻细胞过氧化氢酶(CAT)含量测定

取方法 1.2.3 制备好的藻细胞裂解液,利用南京建成过氧化氢酶(CAT)测试盒对藻细胞的胞内过氧化氢酶含量进行测定。按照操作说明将样品混匀后,用分光光度计在 405 nm 处,0.5 cm 光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。按照以下公式计算 CAT 酶活力:

样品中 CAT 活力/(U/mL) = (对照管 OD - 测定管 OD)  $\times$  271  $\times$  样品测试前稀释倍数 / (60  $\times$  取样量)。

### 1.2.8 藻细胞还原性谷胱甘肽(GSH)含量测定

取方法 1.2.3 制备好的藻细胞裂解液,利用南京建成 GSH 含量测定试剂盒对藻细胞还原性谷胱甘肽(GSH)含量测定,方法参照说明书。上清液制备:取待测样本 0.5 mL 加试剂一应用液 2 mL 混匀,3 500 ~ 4 000 r/min,离心 10 min 取上清液 1 mL。按照操作说明测定上清液中的 GSH 含量。将样品与试剂混匀,静置 5 min,用分光光度计在波长 420 nm 处,1 cm 光径,双蒸水调零,测各管吸光度值。GSH 含量计算按照试剂盒说明书进行计算。

### 1.2.9 藻细胞抗坏血酸(AsA)含量测定

取方法 1.2.3 制备好的藻细胞裂解液,利用南京建成抗坏血酸(AsA)测定试剂盒对藻细胞内 AsA 含量进行测定,方法参照说明书。上清液制备:取样本 0.15 mL 加试剂一 0.45 mL,混匀,放置 15 min 后,3 500 ~ 4 000 r/min 离心 10 min,上层液体为上清液。将上清液按照操作说明与试剂混匀,放置 10 min,1 cm 光径,双蒸水调零,用分光光度计在波长 536 nm 处测各管的吸光度值。AsA 含量按照说明书进行计算。

## 2 实验结果

### 2.1 藻细胞的胞内蛋白及总糖测定

藻细胞膜完整性的失去会造成细胞膜的破损,进而造成胞内物质的流失,胞内物质含量会受到影响。为了研究絮凝作用与不同离心力作用下的藻细胞内含物的含量变化,我们测定了细胞内总蛋白含量及总糖含量变化(图 1)。结果如图 1 所示,当处理时间为 5 min 时,转速为 3 000 r/min 和 10 000 r/min 离心收集的藻细胞的蛋白质量浓度分别为 0.29 g/L 和 0.32 g/L,与絮凝处理组的蛋白质量浓度 0.21 g/L 之间无显著性差异。随着处理时间延长至 30 min 时,虽然转速为 3 000 r/min 和 10 000 r/min 离心收集的藻细胞的蛋白质量浓度升高至 0.46 g/L、0.29 g/L,但与絮凝物质絮凝藻细胞的蛋白质量浓度 0.23 g/L 之间仍无显著性差异。将不同处理组的总糖含量进行测定,结果如图 2 所示,无论处理时间为 5 min 或者 30 min,转速为 3 000 r/min 和 10 000 r/min 离心收集的藻细胞的总糖含量与絮凝物质絮凝的藻细胞的总糖含量质量浓度均在 13  $\mu\text{g}/\text{L}$  左右,无显著性差异。

### 2.2 藻细胞内 MDA 含量测定

为了定量研究细胞膜的损伤程度,测定了细胞膜的脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量,以此来表征细胞膜的完整性的情况(图3).在处理时间为5 min时,测得3 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中MDA物质的量浓度为1.39 nmol/mg prot与絮凝物质絮凝藻细胞的处理组相差不大,无显著性差异,且均处于较低水平.而在10 000 r/min离心收集藻细胞的裂解液中,测得MDA含量高于絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液(P<0.05),且是絮凝处理组的6.77(P<0.05)倍.在处理时间延长至30 min时,3 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中MDA含量高于絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液(P<0.05),是絮凝处理组的7.68(P<0.05)倍.而10 000 r/min离心处理组中MDA含量与絮凝处理组无显著性差异.

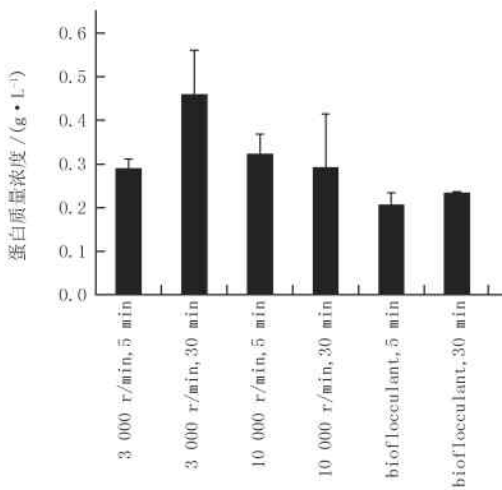


图1 不同处理组上清对藻细胞胞内蛋白含量的影响

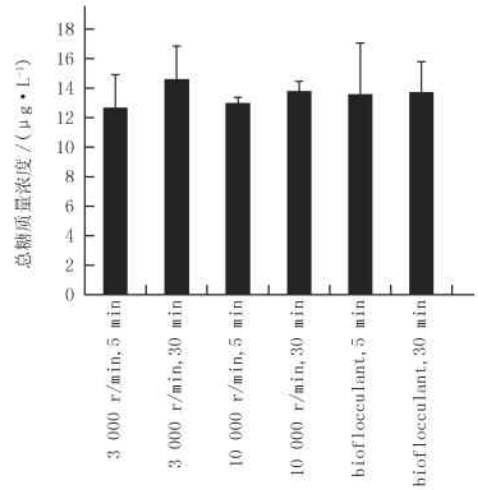


图2 不同处理组上清对藻细胞胞内总糖含量的影响

### 2.3 酶抗氧化系统

为了研究小球藻细胞内酶抗氧化系统对絮凝及离心作用的响应,检测了藻细胞内过氧化氢酶(CAT)含量变化(图4).在处理时间为5 min时,测得絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液中CAT含量为17.59 U/mg prot,略高于3 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中CAT含量(11.34 U/mg prot),略低于10 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中CAT含量(20.03 U/mg prot),但无显著性差异.随着处理时间延长至30 min,利用絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液中CAT含量为20.8 U/mg prot略高于3 000 r/min和10 000 r/min处理组的16.33 U/mg prot、16.77 U/mg prot,但仍无显著性差异.总而言之,不同处理组间CAT含量无明显差别.

### 2.4 非酶抗氧化系统

藻细胞的非酶抗氧化系统包括谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)对絮凝及离心作用的响应进行研究.如图5所示,在处理时间为5 min时,3 000 r/min及10 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中GSH含量显著高于絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液(P<0.01),分别是絮凝处理组的4.28(P<0.01)和3.3(P<0.01)倍.随着处理时间延长至30 min,在同一转速或者絮凝条件下,测得GSH含量均高于5 min时的各处理组.并且在30 min时,3 000 r/min及10 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中GSH含量仍然显著高于絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液(P<0.01),分别是絮凝处理组的4.33(P<0.01)和3.27(P<0.01)倍.

如图6所示,在处理时间为5 min时,3 000 r/min离心收集的藻细胞的裂解液中AsA含量显著高于絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液(P<0.01),是絮凝处理组的36.39(P<0.01)倍.而且10 000 r/min离心处理组中AsA含量也高于絮凝物质絮凝藻细胞的裂解液(P<0.05),是絮凝处理组的14.07(P<0.05)倍.但随着处理时间延长至30 min时,3 000 r/min与10 000 r/min离心处理组中AsA含量与絮凝处理组接近,无显著性差异.

### 3 讨 论

现如今经济高速发展,能源危机问题愈发突出,亟待解决.小球藻是一种能源藻,可用来发酵生产清洁燃料,且藻体本身也可作畜牧水产养殖的饲料和饵料<sup>[4]</sup>.目前,对藻细胞的采收方法的研究很多,如物理方法,生物方法等.但对不同方法采收后的藻细胞氧化应激问题的研究却不多,特别是不同的方法采收的藻细胞的细胞膜完整性及细胞活力是否相同等.

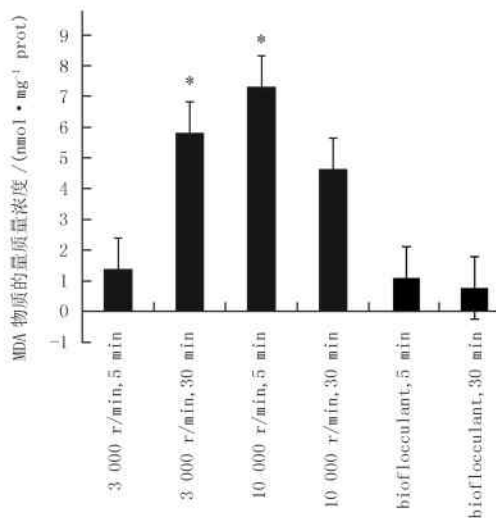


图3 不同处理组上清对藻细胞胞内MDA含量的影响

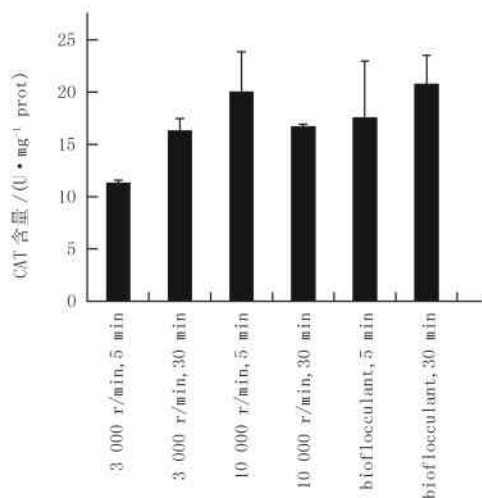


图4 藻细胞内的CAT对不同处理组上清的响应

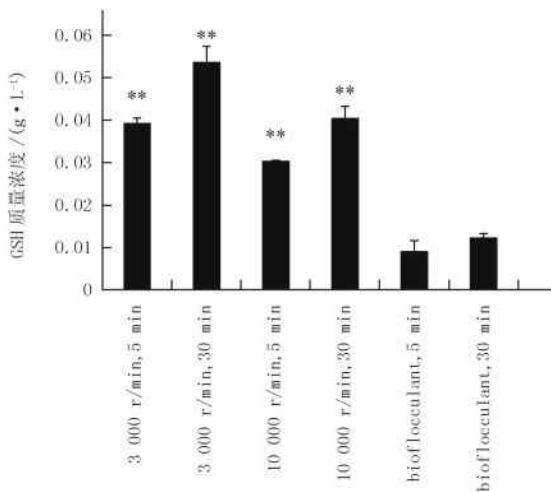


图5 藻细胞内的GSH对不同处理组上清的响应

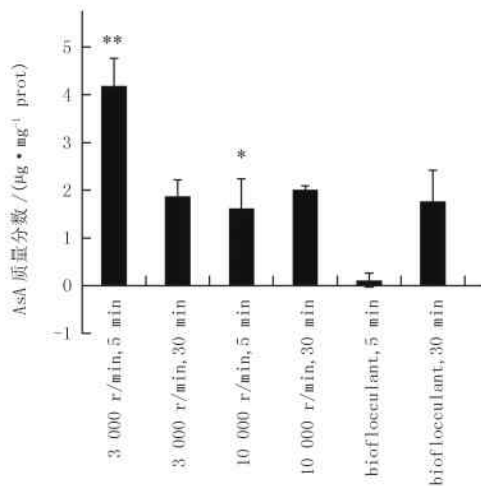


图6 藻细胞内的AsA对不同处理组上清的响应

为了探究细菌分泌的絮凝物质絮凝的小球藻藻细胞与不同转速离心收集的藻细胞相比是否具有更小的氧化应激,我们全面地研究了不同处理方法对小球藻细胞膜完整性的影响;细胞活力响应的影响包括酶抗氧化系统及非酶抗氧化响应。

已有研究表明,藻细胞在受到胁迫时,会造成细胞膜脂质过氧化损伤<sup>[13]</sup>,导致藻细胞胞内物质大量流失,细胞器形态结构遭到破坏等<sup>[14]</sup>.丙二醛(MDA)作为细胞膜脂质过氧化的副产物,可以反映细胞膜脂质过氧化程度.Draper等首次报道了MDA可以作为脂质过氧化的标志物<sup>[15]</sup>.因此,我们通过测定离心和絮凝作用下藻细胞内的MDA含量变化来表征细胞膜的脂质过氧化程度.在我们的研究中发现,10 000 r/min离心的处理组,在处理时间为5 min时,MDA含量远高于絮凝物质絮凝藻细胞的处理组( $P < 0.05$ ),这说明,高速离心相对于絮凝物质絮凝得到的藻细胞更容易遭到胁迫,造成细胞膜脂质过氧化,破坏藻细胞.而在

30 min时,却与絮凝处理组无明显差别,这可能是藻细胞的抗氧化系统的响应来缓解离心作用的胁迫。3 000 r/min离心处理组,在处理时间为5 min时,MDA含量与絮凝物质絮凝藻细胞的处理组无显著性差异,而在处理时间延长至30 min时,MDA含量却高于絮凝物质絮凝藻细胞的处理组( $P < 0.05$ ),这说明短时间低速离心对藻细胞膜脂质过氧化损伤相对较小,但长时间的离心作用会造成细胞膜的不可逆损伤。

细胞壁、细胞膜的破损会造成胞内物质大量的流失,藻细胞受到胁迫压力时,能够与胞内物质包括蛋白质、DNA、脂质或者碳水化合物进行反应<sup>[16]</sup>,造成其含量的下降。因此为了确定在絮凝作用和不同转速离心作用下藻细胞胞内物质含量的变化,我们研究了主要的两种胞内物质——蛋白质和碳水化合物的含量变化。在我们的研究中发现,无论处理时间为5 min还是30 min,转速为3 000 r/min和10 000 r/min离心收集的藻细胞的总蛋白含量与用絮凝物质絮凝藻细胞的处理组相比均无明显差别。不同处理组总糖含量的变化与蛋白含量相似,即不同转速收集的藻细胞与絮凝物质絮凝的藻细胞测得的总糖含量没有明显差异。该实验结果表明利用絮凝物质絮凝的藻细胞的胞内物质含量与离心法收集的藻细胞比较接近。

细胞内的活性氧自由基是细胞代谢的副产物,特别是当细胞处于外界压力的情况下,会产生大量的活性氧自由基<sup>[17]</sup>。细胞结构的破坏会造成藻细胞内产生大量的活性氧自由基,过量的活性氧自由基又会造成细胞膜脂质过氧化,再次造成细胞结构的损伤,影响细胞结构的完整性<sup>[18-19]</sup>。而且胞内活性氧自由基含量的升高会诱导藻细胞内抗氧化系统的响应,用于保护藻细胞避免胁迫压力。抗氧化系统包括酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统。酶抗氧化系统我们主要研究了过氧化氢酶(CAT)含量的变化,CAT的作用是将过氧化氢分解成水和氧气,从而清除藻细胞内的活性氧自由基。在实验中发现无论处理时间为5 min还是30 min,利用絮凝物质絮凝藻细胞与不同离心收集的藻细胞的裂解液中CAT含量均无显著性差异。该结果表明,在絮凝作用和不同转速离心作用下使藻细胞内活性氧自由基含量升高,但藻细胞内的过氧化氢酶(CAT)被诱导响应,以保护藻细胞。且絮凝作用和不同转速离心作用所诱导藻细胞的酶抗氧化系统响应程度接近。非酶抗氧化系统包括谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)。GSH是一种低分子清除剂,可清除氧气、过氧化氢和活性氧自由基等。GSH结构中含有巯基,巯基自身氧化后能够将活性氧自由基清除,同时巯基变成GSSG<sup>[20]</sup>。研究结果中发现在处理时间为5 min和30 min时,3 000 r/min及10 000 r/min处理组藻细胞内的GSH含量相对于絮凝处理组显著升高( $P < 0.01$ )。该结果表明,离心法收集的藻细胞比絮凝物质有更高水平的非酶抗氧化系统的响应,离心处理组相对于絮凝处理组能对藻细胞造成更为严重的外界胁迫,使之产生大量的活性氧自由基。活性氧自由基的升高会诱导GSH的响应,所以GSH含量高用来清除活性氧自由基。AsA可以作为GSH的辅助,通过自身的氧化将GSSG转化成GSH<sup>[21]</sup>。研究结果中发现在处理时间为5 min时,3 000 r/min及10 000 r/min处理组藻细胞内的GSH含量相对于絮凝处理组显著升高( $P < 0.01$ )。该结果表明,离心处理组相对于絮凝处理组能在短时间内对藻细胞造成严重的胁迫作用,产生活性氧自由基诱导AsA的响应。但随着处理时间延长至30 min时,不同转速离心处理组相对于絮凝处理组AsA含量却无显著性差别。有两方面的原因,一方面是随着胁迫时间延长至30 min,GSH清除活性氧自由基使GSSG含量升高的同时,AsA通过与其反应而使自身含量下降。另一方面在持续的离心作用胁迫下非酶抗氧化系统的响应已经过度消耗了藻自身的能量,超出了藻细胞的自我保护能力,造成了藻细胞的氧化损伤。

## 4 结 论

在我们的研究中,从MDA含量、CAT含量、GSH含量和AsA含量的变化可知离心作用相对于絮凝作用会导致藻细胞膜发生脂质过氧化、诱导酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统的响应。虽然酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统能够部分缓解活性氧自由基造成的氧化压力,但是过量的活性氧自由基和持续的离心作用超过了藻细胞的抗氧化能力,最终造成了藻细胞的氧化损伤。离心法收集的藻细胞中MDA含量及非酶抗氧化系统含量高于絮凝物质收集的藻细胞,表明离心法相对于絮凝物质对藻细胞膜的完整性损伤更为严重,且诱导了藻细胞的非酶抗氧化系统的响应。絮凝物质相对于离心法对藻细胞具有更小的氧化应激,可更好的用于能源微藻生物物质的收集,有广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] BARNHAM K W J, MAZZER M, CLIVE B, et al. Resolving the energy crisis: nuclear or photovoltaics? [J]. *Nature Materials*, 2006, 5(3), 161-164.
- [2] SINGH B, GULDHE A, RAWAT I, et al. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae [J]. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, 2014, 29(7), 216-245.
- [3] WAN Chun, ZHANG Xiaoyue, ZHAO Xinqing, et al. Harvesting microalgae via-flocculation: a review [J]. *Chin J Biotech*, 2015, 31(2): 161-171.
- [4] ZHAO Baisuo, MA Jingwei, ZHAO Quanbao, et al. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161: 423-430.
- [5] MUNOZ R, GUIEYSSE B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review [J]. *Water Research*, 2006, 40(15), 2799-2815.
- [6] CHEN Zhangran, ZHANG Bangzhou, ZHANG Jingyan, et al. A lytic bacterium's potential application in biofuel production through directly lysing the diatom *Phaeodactylum tricornutum* cell [J]. *Algal Research*, 2015, 12, 197-205.
- [7] YANG Zhen, SHANG Yabo, HUANG Xin, et al. Cationic content effects of biodegradable amphoteric chitosan-based flocculants on the flocculation properties [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(8): 1378-1385.
- [8] AGUNBIADE M O, HEERDEN E V, POHL C H, et al. Flocculating performance of a bioflocculant produced by *Arthrobacter humicolain* sewage waste water treatment [J]. *Bmc Biotechnology*, 2017, 17(1): 51.
- [9] SUN Pengfei, HUI Cai, BAI Naling, et al. Revealing the characteristics of a novel bioflocculant and its flocculation performance in *Microcystis aeruginosa* removal [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17465.
- [10] LI Yi, XU Yanting, LIU Lei, et al. First evidence of bioflocculant from *Shinella albus* with flocculation activity on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 807-815.
- [11] JAKOB G, STEPHENS E, FELLER R, et al. Triggered exocytosis of the protozoan *Tetrahymena* as a source of bioflocculation and a controllable dewatering method for efficient harvest of microalgal cultures [J]. *Algal Research*, 2016, 13, 148-158.
- [12] 苗祯, 杜宗军, 李会荣, 等. 5 株北极微藻藻际环境的细菌多样性 [J]. *生态学报*, 2015, 35(5): 1587-1600.
- [13] TANG Shuishui, LIN Weitie, LI Jingyuan, et al. Isolation and algicidal characteristics of the algicidal components from actinomycete strain L74 [J]. *Microbiology China*, 2011, 5.
- [14] WANG Xiulin, GONG Liangyu, LIANG Shengkang, et al. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Harmful Algae*, 2005, 4: 433-443.
- [15] DRAPER H, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation [J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 421-431.
- [16] HALIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2004, 142: 231-255.
- [17] GILL S S, TUTRJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48: 909-930.
- [18] AHMAD P, JALEEL C A, Salem M A, et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010, 30: 161-175.
- [19] BAYR H. Reactive oxygen species [J]. *Critical Care Medicine*, 2005, 33: S498-S501.
- [20] MAUGHAN S C, PASTERNAK M, CAIRNS N, et al. Plant homologs of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107: 2331-2336.
- [21] CHEN Zhong, YOUNG T E, LING Jun, et al. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100: 3525-3530.

## Oxidative stress of *Chlorella vulgaris* induced by bioflocculant

Li Yi<sup>1</sup>, Xu Yanting<sup>1</sup>, Song Ruixue<sup>1</sup>, Tian Congqi<sup>1</sup>, Wang Hailei<sup>1</sup>, Zheng Tianling<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Chlorella vulgaris*, as an energy producing algae, can produce biodiesel, but harvest of *C. vulgaris* biomass is the bottleneck of the development of algal biodiesel. At present, there are many methods to harvest the algal biomass, but

there are few studies on the oxidative stress of algae cells induced by different harvest methods. To investigate the oxidative stress of algae cells induced bioflocculant which produced by flocculation bacterium xn-1 and centrifugation in the process of harvesting algal biomass, in order to ensure the safety of microbial bioflocculant on algal cells. The isolation and purification of flocculation microorganism from phycosphere was performed by spread plate and streak plate methods; the bioflocculant was obtained by gradient ethanol precipitation method; the protein content, total sugar content, the content of MDA, catalase (CAT) activity, glutathione (GSH) and the content of ascorbic acid (AsA) content in algae cell were determined by spectrophotometer. Through the measurement and statistical analysis, it was found that the content of MDA, GSH and AsA in the algae cells collected by centrifugation was significantly higher than that obtained by bioflocculant. Compared with the bioflocculant, the centrifugation caused higher lipid peroxidation on the algal cell membrane, and resulted in a great deal of reactive oxygen species, which induced the non-enzymatic antioxidant system response. Therefore, harvest of algae biomass by centrifugation is more harmful to the algal cells than the flocculation microorganisms, and the flocculating microorganism is more suitable than centrifugation to harvest algal biomass.

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*; harvest of biomass; flocculating microorganism; centrifugation; oxidative stress

[责任编辑 王凤产]