

间苯二酚对小球藻生长特性的影响

王晓晓, 周天俊, 陈秀荣, 杨晨晨, 徐 鹏

(华东理工大学资源与环境工程学院 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制
重点实验室, 上海 200237)

摘 要: 为了考察间苯二酚毒性对普通小球藻生长特性的影响, 以为后续含酚废水低成本培养微藻提供理论依据, 通过考察其生物量、超氧化物酶活性以及淀粉、多糖、蛋白质含量等指标, 分析不同间苯二酚浓度条件下小球藻生长特性的差异。结果表明: 间苯二酚在低浓度水平下(初始浓度 ≤ 2 mg/L), 对普通小球藻的生长有促进作用; 而在高浓度水平下(初始浓度 ≥ 5 mg/L), 对普通小球藻细胞增殖有明显的抑制作用, 且浓度越高, 抑制作用就越强, 当间苯二酚初始浓度为 50 mg/L 时, 抑制率达到 72.24%。

关键词: 小球藻; 间苯二酚; 光合作用; 多糖; 蛋白质

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)11-0125-05

Effect of Resorcinol on Growth Characteristics of *Chlorella vulgaris*

WANG Xiao-xiao, ZHOU Tian-jun, CHEN Xiu-rong, YANG Chen-chen,
XU Peng

(State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The influence of resorcinol toxicity on the growth characteristics of common *Chlorella vulgaris* was investigated to provide a theoretical basis for the low-cost cultivation of microalgae feeding phenolic wastewater. The growth characteristics of *Chlorella vulgaris* in different groups were explored through analyzing microalgae biomass, superoxide enzyme activity, and starch, polysaccharide and protein content. The results showed that a low initial concentration of resorcinol (≤ 2 mg/L) promoted the growth of *Chlorella vulgaris*. However, a relative high concentration of resorcinol (≥ 5 mg/L) inhibited the growth of *Chlorella vulgaris*, and the inhibition extent was positively correlated with the resorcinol concentration. The maximum inhibitory effect with an inhibitory rate of 72.24% was reached when the initial concentration of resorcinol was 50 mg/L.

Key words: *Chlorella vulgaris*; resorcinol; photosynthetic; polysaccharide; protein

含酚废水具有污染物含量高、毒性强及难挥发
的水质特性, 若经过处理直接排放, 会造成严重的

水体污染。另外, 该废水大多为高浓度有机废水, 成分复杂, 难以生物降解, 因而处理难度较大。间苯二

酚属于典型的难降解酚类化合物,在含酚废水尤其是煤化工废水中含量较高。当前间苯二酚废水的处理方法主要有萃取法、吸附法、氧化法、生化法、絮凝法等,普遍存在处理成本高或处理效果不佳等缺点,其中,采用活性污泥法处理含酚废水时,存在毒性承受能力低及污泥产量大等缺点。针对活性污泥处理含酚等难降解、毒性有机废水时存在的弊端,从20世纪50年代开始,Oswald和Gotaas即提出以微藻代替活性污泥作为主体进行废水处理^[1],在废水得到有效处理的同时,也兼顾了微藻的低成本培养。刘建强等^[2]以市政废水培养普通小球藻,在培养8 d后生物质生长率最大,总的生物质产量日均最大积累速率为0.01 g/L;朱静静等^[3]以猪粪初级处理废水培养普通小球藻,生物量最大可达0.414 g/L;陈善佳等^[4]采用低浓度有机双酚A废水培养普通小球藻,发现当双酚A投加浓度低于20 mg/L时,对普通小球藻的增殖有促进作用。另外,藻类的蛋白质含量高,油脂含量和产率也很可观,在处理污水的同时可进行资源化回收。以上研究皆重点关注废水养藻的可行性,以藻细胞密度、生物量等常规指标来反映微藻的生长过程,关注点过于表面。为了考察利用含酚废水进行低成本培养微藻的可行性,同时关注酚类有机物对微藻生长特性的影响,笔者选取间苯二酚为目标污染物,采用藻细胞密度、超氧化物歧化酶(SOD)活性以及叶绿素a、淀粉、多糖、蛋白质含量等指标综合评价微藻的生长特性,旨在为微藻对酚类化合物的处理和含酚废水低成本养藻提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验藻种为普通小球藻(*Chlorella vulgaris*, FACHB-31),购自中国科学院武汉水生生物研究所,采用BG-11培养基光自养培养。选择生长对数期的普通小球藻接种于BG-11培养基中,初始接种密度约为 2×10^6 cells/mL,培养条件如下:温度为25℃、光暗比为14:10、光照强度为2 000 lx、培养15 d。设置6组试验,间苯二酚浓度分别为0、2、5、10、20、50 mg/L。

1.2 试验方法

为考察不同间苯二酚浓度对普通小球藻生长特性的影响,向BG-11培养基中投加不同浓度间苯二酚来培养普通小球藻,测定普通小球藻的生长指

标以及培养基中成分的变化。分析方法如下:

① 藻细胞密度:采用血球计数法测定。取5 mL藻液,离心后弃去上清液,加蒸馏水使其重新悬浮,混匀后取100 μ L藻液,在血球计数板上制好样品,稳定2 min,于400倍电子显微镜下观察计算藻细胞数目。

② 叶绿素a含量:用甲醇萃取藻液后测定叶绿素a含量^[5]。取样5 mL,在5 000 r/min下离心10 min,用去离子水洗涤两次,并将沉淀用5 mL的100%甲醇溶液重新悬浮,置于超声清洗仪中冰水浴避光超声20 min后,将样品于5 000 r/min下离心10 min,直至沉淀为白色,否则混匀后继续超声。将上清液于波长为653、666 nm处测定吸光度值。

③ 间苯二酚含量:采用高效液相色谱法进行测定。流动相甲醇:水=55:45,流速为1 mL/min,进样量为20 μ L,在270 nm波长下进样分析,总时长为6 min。

④ 其他指标的测定方法:淀粉含量采用硝酸钙提取碘显色法测定;SOD酶活性采用氮蓝四唑光化学还原反应法测定;多糖含量采用蒽酮-浓硫酸比色法测定;蛋白质含量采用Lowry法蛋白含量测定试剂盒(购自上海嘉达生物科技有限公司)测定。

2 结果与讨论

2.1 间苯二酚对普通小球藻生长特性的影响

2.1.1 对普通小球藻细胞密度的影响

在不同间苯二酚浓度条件下,普通小球藻细胞密度的变化如图1(a)所示。可以看出,当间苯二酚浓度分别为0、2 mg/L时,小球藻细胞密度表现出相似的增长趋势,0~2 d为适应期,2~10 d为对数增长期,10 d后生长速率变慢。另外,当间苯二酚为2 mg/L时,第10天的藻细胞密度达到了 $(23.46 \pm 2.25) \times 10^6$ cells/mL,比空白组超出了3.90%。这表明,较低浓度的间苯二酚会对小球藻的生长有一定的促进作用。分析认为,微藻在低间苯二酚浓度下可表现出“毒性兴奋效应”,符合“有毒物质在高剂量时抑制有机体的生长,而在低剂量时却促进有机体生长”的规律^[6]。随着间苯二酚浓度的不断升高,小球藻细胞密度不断下降,表明高浓度间苯二酚对小球藻的生长有明显的抑制作用。在第15天,间苯二酚初始浓度为0、2、5、10、20、50 mg/L试验组的藻细胞密度分别为 $(30.15 \pm 2.80) \times 10^6$ 、 $(29.48 \pm 2.83) \times 10^6$ 、 $(19.38 \pm 1.82) \times 10^6$ 、 $(16.85 \pm 1.57) \times$

10^6 、 $(13.42 \pm 1.26) \times 10^6$ 、 $(8.37 \pm 0.80) \times 10^6$ cells/mL,抑制率分别达到了2.22%、35.72%、44.11%、54.95%、72.24%。当间苯二酚浓度 >5 mg/L时,小球藻对毒性环境的适应期延长,由2 d延长至5 d,5 d后小球藻恢复快速增长。

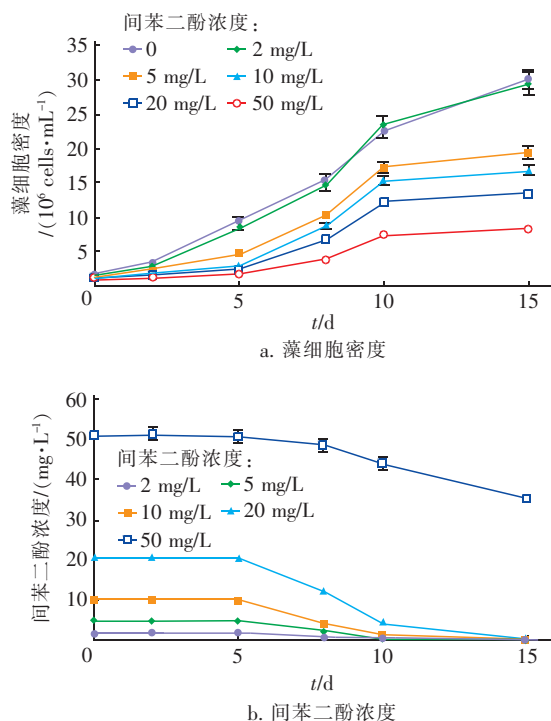


图1 普通小球藻细胞密度和间苯二酚浓度的变化
Fig.1 Variation of density of *Chlorella vulgaris* and resorcinol concentration

培养过程中,间苯二酚浓度的变化如图1(b)所示。可以看出,间苯二酚浓度前5 d内没有明显变化,而在5 d后迅速降低。培养初期,小球藻需要适应间苯二酚的毒性环境,培养至第15天时,间苯二酚浓度分别从初始的2、5、10、20 mg/L降至0.09、0.22、0.19、0.44 mg/L,去除率分别为95.57%、95.61%、98.13%、97.87%;而初始浓度为50 mg/L的试验组,间苯二酚浓度仅降至35.44 mg/L,去除率仅为29.12%。结合小球藻的生长状况,认为高浓度的间苯二酚抑制了小球藻的生长,同时也降低了小球藻对间苯二酚的降解能力。

2.1.2 对普通小球藻光合作用的影响

叶绿素是光合作用中重要的细胞色素,而淀粉是光合作用的最终产物,因此,本研究以小球藻的叶绿素a和淀粉含量为考察指标,分析不同间苯二酚浓度对小球藻光合作用的影响。结果表明,随着培

养的进行,各试验组小球藻的叶绿素总含量不断上升,至第15天,叶绿素总含量分别达到 (12.53 ± 0.56) 、 (12.83 ± 0.72) 、 (11.24 ± 0.37) 、 (9.32 ± 0.41) 、 (8.88 ± 0.42) 、 (6.44 ± 0.32) mg/L;而单位藻细胞的叶绿素a含量呈先上升后下降的趋势,并在第5天达到最大,分别为 (0.69 ± 0.03) 、 (0.70 ± 0.04) 、 (0.62 ± 0.03) 、 (0.88 ± 0.04) 、 (1.02 ± 0.04) 、 (1.15 ± 0.05) mg/ 10^6 cells。第5天各组小球藻进入对数增长期,此时小球藻分泌大量蛋白质和光合色素,加快光合速率和细胞繁殖;而培养至第10天,单位藻细胞的叶绿素a含量趋于稳定,此时小球藻进入稳定生长期。另外,随着间苯二酚初始浓度的升高,单位藻细胞的叶绿素a含量不断增加,分析认为是藻细胞为抵抗外部不利环境,加强了自身的光合作用。

另外,随着培养的进行,各试验组的淀粉总含量不断上升,在第15天时分别达到 (27.12 ± 0.98) 、 (29.15 ± 1.22) 、 (19.86 ± 0.77) 、 (17.92 ± 0.86) 、 (12.42 ± 0.56) 、 (10.93 ± 0.57) mg/L。单位藻细胞的淀粉含量总体也呈上升趋势,这与叶绿素a的变化规律不同。主要因为淀粉是储能物质,在小球藻的对数增长期仍会被大量消耗,用于细胞快速增殖,而进入稳定期的小球藻生长变慢,藻细胞中的淀粉开始出现积累。此外,在50 mg/L间苯二酚试验组,单位藻细胞的淀粉含量在第5天后显著高于其他组,并在第10天达到最大值,为 (1.36 ± 0.08) mg/ 10^6 cells,这可能是因为高浓度的间苯二酚抑制了小球藻的增殖,刺激小球藻分泌更多的淀粉抵御外界毒性的侵害。

2.2 普通小球藻对间苯二酚的应激反应特性

植物体内普遍存在抗氧化系统,当机体受到不适环境胁迫后,自身的防御系统便会通过清除自由基来抵抗不利环境,防止细胞被迫害,以此来维持体内环境的稳定。超氧化物歧化酶(SOD)对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能消除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)保护细胞免受损伤,杨洪等^[7]研究发现,几乎所有胁迫都能诱导SOD活性的增强。同时,在机体做出应激反应时,会对细胞内物质产生影响,其中促进蛋白质和多糖的分泌是主要的应激反应^[8]。本研究为了考察小球藻在间苯二酚毒性刺激下的应激响应特性,分析了不同浓度间苯二酚条件下小球藻的SOD活性以及多糖和蛋白

质含量的变化。

2.2.1 间苯二酚浓度对 SOD 活性的影响

不同浓度间苯二酚毒性刺激下小球藻的 SOD 活性变化如图 2 所示。可知,当小球藻遇到间苯二酚毒性刺激时,会迅速引起 SOD 活性的升高,这说明小球藻对毒性环境立即做出了应激反应,且不同试验组间小球藻的 SOD 活性随时间的变化趋势基本一致,均表现为:在 0~2 d 显著升高、2~5 d 迅速下降、5 d 后保持稳定。表明在前 2 d 普通小球藻对新环境的应激反应最为强烈,5 d 后适应了毒性环境。邹安琪^[9]指出,当细胞内氧自由基含量超过一定范围时,细胞内的抗氧化酶不能将其及时清理,就会导致 SOD 活性出现先升高后降低的现象,这与本研究结果一致。第 2 天时,空白对照组的 SOD 活性为 $(15.50 \pm 1.63) \times 10^{-6} \text{ U/mL}$,其他组的 SOD 活性分别为空白对照组的 1.06、3.67、4.29、4.54、5.44 倍,SOD 活性随间苯二酚初始浓度的升高而升高。

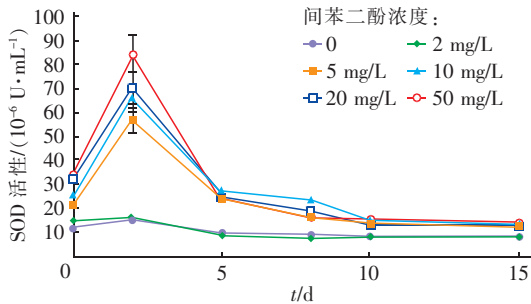


图2 不同间苯二酚浓度下 SOD 活性的变化

Fig. 2 Variation of SOD activity under different resorcinol concentrations

2.2.2 间苯二酚浓度对多糖含量的影响

在毒性环境下,多糖的分泌对小球藻有保护作用^[10],为此试验考察了不同浓度间苯二酚毒性刺激下小球藻的多糖含量变化。结果表明,随着培养的进行,各试验组小球藻的多糖总量呈上升趋势,15 d 后分别达到 (92.50 ± 4.26) 、 (98.50 ± 5.12) 、 (78.20 ± 3.68) 、 (72.00 ± 3.53) 、 (78.23 ± 3.60) 、 $(56.73 \pm 3.01) \text{ mg/L}$ 。单位藻细胞的多糖含量呈先上升后下降的趋势,在第 2 天达到最大值,分别为 (5.81 ± 0.27) 、 (5.39 ± 0.28) 、 (6.99 ± 0.33) 、 (8.25 ± 0.40) 、 (11.76 ± 0.54) 、 $(15.79 \pm 0.84) \text{ mg}/10^6 \text{ cells}$ 。随着间苯二酚初始浓度的增加,多糖总含量不断降低,而单位藻细胞的多糖含量却不断上升。分析认为,间苯二酚的毒害作用降低了小球

藻的数量,故多糖总量随着浓度的升高而降低;又由于在间苯二酚毒性的胁迫下,小球藻需要更多能量来抵抗不利环境,能量最终是由多糖提供,故分泌更多的多糖来应对不利环境^[11]。小球藻适应当前不利环境后,单位藻细胞的多糖含量开始下降。

2.2.3 间苯二酚浓度对蛋白质含量的影响

蛋白质是细胞中重要的结构物质,蛋白质含量的变化可以反映细胞内代谢活动的变化,为此,分析了不同浓度间苯二酚条件下小球藻蛋白质含量的变化。结果表明,随着培养的进行,小球藻的蛋白质总量不断上升,培养 15 d 后,分别达到了 (131.45 ± 6.44) 、 (140.03 ± 4.90) 、 (100.78 ± 5.14) 、 (84.59 ± 4.06) 、 (71.39 ± 3.36) 、 $(42.27 \pm 1.78) \text{ mg/L}$;另外,蛋白质总量随着间苯二酚初始浓度的升高而降低。单位藻细胞的蛋白质含量在 0~5 d 迅速上升,且随着间苯二酚初始浓度的升高而不断上升,分析认为:小球藻接种到新环境受到间苯二酚毒性胁迫时,需要产生大量的蛋白酶来抵抗外界的胁迫作用,分泌的部分蛋白质到胞外形成 EPS。适应环境后,单位藻细胞的蛋白质含量开始下降。单位藻细胞的蛋白质含量在第 5 天达到最大值,此时小球藻进入对数生长期,新陈代谢速率加快,分泌大量蛋白质完成相应的酶促反应。

3 结论

① 间苯二酚在低浓度水平下(初始浓度 $\leq 2 \text{ mg/L}$),对普通小球藻的生长有一定的促进作用;而在高浓度水平下(初始浓度 $\geq 5 \text{ mg/L}$),其毒性作用延长了小球藻生长的停滞期,抑制了小球藻的生长,且毒性抑制作用随着间苯二酚浓度的升高而增强。与空白对照组相比,经过 15 d 的培养,间苯二酚初始浓度为 5、10、20、50 mg/L 试验组的藻细胞密度分别下降了 35.72%、44.11%、54.95%、72.24%。

② 随着培养的进行,单位藻细胞的多糖和蛋白质含量均先迅速升高后下降,表现出小球藻对毒性的应激反应,与 SOD 活性的变化一致。在培养第 2 天单位藻细胞的 SOD 活性达到最大,间苯二酚初始浓度为 2、5、10、20、50 mg/L 试验组的 SOD 活性分别为对照组的 1.06、3.67、4.29、4.54、5.44 倍。

③ 小球藻在含有间苯二酚的培养基中,能够通过自身调节适应新环境,并在生长过程实现对间苯二酚的生物降解,培养 15 d 后,对初始浓度为 2、5、10、20、50 mg/L 的间苯二酚的去除率分别为

95.57%、95.61%、98.13%、97.87%、29.12%。

参考文献:

- [1] Oswald W J, Gotaas H B, Golueke C G, *et al.* Algae in waste treatment [J]. *Sewage and Industrial Wastes*, 1957, 29(4): 437–457.
- [2] 刘建强, 刘玉环, 阮榕生, 等. 利用市政污水培养 *Chlorella vulgaris* 生产生物柴油[J]. *生物加工过程*, 2011, 9(1): 10–14.
Liu Jianqiang, Liu Yuhuan, Ruan Rongsheng, *et al.* Cultivating *Chlorella vulgaris* as biodiesel feedstock by municipal wastewater[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2011, 9(1): 10–14 (in Chinese).
- [3] 朱静静, 杨巍, 纪九军, 等. 初级猪粪废水混合培养普通小球藻的研究[J]. *可再生能源*, 2014, 32(4): 499–504.
Zhu Jingjing, Yang Wei, Ji Jiujun, *et al.* Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* with primary piggery wastewater[J]. *Renewable Energy Resources*, 2014, 32(4): 499–504 (in Chinese).
- [4] 陈善佳, 陈秀荣, 闫龙, 等. 毒性有机物 BPA 与普通小球藻的相互影响特性研究[J]. *环境科学*, 2014, 35(4): 1457–1461.
Chen Shan-jia, Chen Xiurong, Yan Long, *et al.* Research on characteristic of interrelationship between toxic organic compound BPA and *Chlorella vulgaris* [J]. *Environmental Science*, 2014, 35(4): 1457–1461 (in Chinese).
- [5] 吴俊森, 万修志, 马永山. 小球藻中叶绿素 a 提取方法研究[J]. *山东师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 26(2): 79–81.
Wu Junsen, Wan Xiuzhi, Ma Yongshan. Research on a method of the extraction of chlorophyll-a in freshwater alga [J]. *Journal of Shandong Normal University: Natural Science*, 2011, 26(2): 79–81 (in Chinese).
- [6] Calabrese E J, Baldwin L A. Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2000, 19(1): 2–31.
- [7] 杨洪, 黄志勇. 锌胁迫对小球藻抗氧化酶和类金属硫蛋白的影响[J]. *生态学报*, 2012, 32(22): 7117–7123.
Yang Hong, Huang Zhiyong. Activities of antioxidant enzymes and Zn-MT-like proteins induced in *Chlorella vulgaris* exposed to Zn^{2+} [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(22): 7117–7123 (in Chinese).
- [8] Wei D, Wang Y, Wang X, *et al.* Toxicity assessment of 4-chlorophenol to aerobic granular sludge and its interaction with extracellular polymeric substances[J]. *J Hazard Mater*, 2015, 289: 101–107.
- [9] 邵安琪. 重金属 Cd^{2+} 对五种常见淡水浮游藻类的毒性效应研究[D]. 武汉: 长江科学院, 2016.
Kuai Anqi. Study on the Toxic Effect of Cd^{2+} to Five Common Freshwater Phytoplankton [D]. Wuhan: Changjiang River Scientific Research Institute, 2016 (in Chinese).
- [10] 康丽娟, 潘晓洁, 常锋毅, 等. 碱度增加对蛋白核小球藻光合活性与胞外多糖的影响[J]. *湖泊科学*, 2008, 20(2): 251–256.
Kang Lijuan, Pan Xiaojie, Chang Fengyi, *et al.* Effects of alkalinity variations on photosynthetic activity and exopolysaccharides of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2008, 20(2): 251–256 (in Chinese).
- [11] 蒯玉琴, 朱巧巧, 何文平, 等. 铜离子胁迫对小球藻生物量、蛋白质、多糖及 MDA 含量的影响[J]. *西北师范大学学报: 自然科学版*, 2015(5): 81–84.
Xi Yuqin, Zhu Qiaoqiao, He Wenping, *et al.* Effect of copper ions on *Chlorella vulgaris* biomass, protein, polysaccharide and MDA content [J]. *Journal of Northwest Normal University: Natural Science*, 2015(5): 81–84 (in Chinese).



作者简介: 王晓晓(1994–), 女, 安徽淮北人, 硕士研究生, 主要研究方向为废水处理及其资源化利用。

E-mail: 413007033@qq.com

收稿日期: 2019–03–01