

# 激光辐照对不同饵料微藻生长的影响<sup>\*</sup>

林<sup>1</sup> 庄惠如<sup>1</sup> 高汝承<sup>1</sup> 陈 荣<sup>2</sup> 郑梦思<sup>1</sup>

(1. 福建师范大学生物工程学院; 2. 福建师范大学物理与光电信息科技学院 350007)

**提要** 利用 Nd:YAG 激光(波长 1.06 $\mu\text{m}$ , 功率 5 W, 照射时间 0.5 - 3 min)和 Ar<sup>+</sup> 激光(波长:488nm, 功率 70mw, 照射时间 5 - 20 min) 分别照射角毛藻和叉鞭金藻, 辐照后进行细胞增殖和生长速率的测定。实验结果表明:照射剂量为 1min 的 Nd:YAG 激光及剂量为 5min 的 Ar<sup>+</sup> 激光对叉鞭金藻有较明显的促长效果, 这两种激光处理组的细胞增殖量在辐照后的两天内较对照组分别高 42.9% 和 48.1%, 但这种促长效果随着时间的推移逐渐消失。不同剂量的两种激光辐照角毛藻后, 在延滞期均出现生长抑制现象, 但进入指数生长期或传代培养后, 剂量为 1min 的 Nd:YAG 激光及剂量为 10min 的 Ar<sup>+</sup> 激光对角毛藻有明显的促长效果, 其中在指数生长期 1min 剂量的 Nd:YAG 激光处理可促长 27.0%, 传代培养后 10min 的 Ar<sup>+</sup> 激光处理组生长速率提高达 51.2%。本文对不同激光及不同激光参数条件下, 两种饵料藻的耐受性及生长特性的差异也进行分析探讨。本实验结果不仅证实了已有研究的推论, 还展示出激光技术在饵料藻种选育中的应用前景。

**关键词** Nd:YAG 激光 Ar<sup>+</sup> 激光 饵料藻 生长影响

## Growth Effect of Laser on Different Bait - Microalgae

Lin Shen<sup>1</sup>, Zhuang Huiru<sup>1</sup>, Gao Rucheng<sup>1</sup>, Chen Rong<sup>2</sup>, Zheng Mengsi<sup>1</sup>

(1. Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007;

2. School of Physics and optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007 )

**Abstract** Nd:YAG laser (wavelength 1.06 $\mu\text{m}$ , power 5w, radiation time 0.5 - 3min) and Ar<sup>+</sup> (wavelength 488nm, power 70mv, radiation time 5 - 20min) laser were used to irradiate two kinds of bait - microalgae - *Chaetoceros calcitrorns* and *Dicrateria* sp. The proliferation and growth rates of irradiated cells were determined. The experimental result shows that the growth of *Dicrateria* sp was promoted after the irradiation of 1min Nd:YAG and 5min Ar<sup>+</sup> laser. The irradiated cell proliferation was promoted by 42.9% and 48.1% in two days, but the improving effects faded away as time going by. The growth was inhibited after the irradiation of different radiation time in lag phase, but the growth of *C. calcitrorns* was promoted after the irradiation of 1min Nd:YAG and 10min Ar<sup>+</sup> laser in exponential phase and generation. Among these, the growth rate was promoted by 27.0% after 1min Nd:YAG irradiation and by 51.2 after 10min Ar<sup>+</sup> laser irradiation. The different endurance and growth features were compared and analyzed among different lasers and parameters. The result proved conclusions from premises and reveal the prospect of appliance of lasers in bait - microalgae selection.

**Key words** Nd:YAG Laser, Ar<sup>+</sup> laser, Microalgae, Growth effect

单细胞藻类是鱼、虾、贝类等苗种生产的重要基础性活饵料。饵料藻的质量和数量往往直接影响养殖动物苗种的成活率、生长率和变态率等<sup>[1]</sup>。但天然饵料藻因受到藻种遗传特性、培养技术等的影响与限制, 加上水产养殖业的快速发展和育苗规模的扩大, 在生产中时常出现供不应求的局面。因此, 探索单细胞藻的培育新技术并选育生长繁殖快速、抗逆性强的优良饵料藻种对于解决饵料藻类生产中的诸多问题无疑具有重要的现实意义。

激光具有能量密度高、单色性好、方向性强的特点, 对生物有机体能产生光、热和电磁效应, 进而导致生物有机体的生物化学变化及遗传物质结构的改变<sup>[2]</sup>。激光技术已在动植物及微生物的新品种选育中取得令人瞩目的成果<sup>[3,4]</sup>, 但在饵料藻类领域的研究甚少。本文用 Ar<sup>+</sup> 激光和 Nd:YAG 激光照射两种饵料微藻, 探索激光辐照饵料藻的有效方法, 为激光技术的进一步应用提供实验参数。

\* 国家 863 计划课题(2004AA603140), 福建省科技计划项目(K04031)资助。 2005 年 3 月 5 日收稿

## 材料与方法

### 1. 藻种

叉鞭金藻 (*Dicrateria* sp.) 藻株从福建长乐漳港海区分离获得,经种类鉴定后藻种保存于本院的微藻实验室。角毛藻 (*Chaetoceros calcitrans*) 藻种由福建长乐漳港海蚌场提供。

我们在完成海蚌人工育苗的项目(国家 863 计划项目)中,上述两种藻均作为海蚌苗期的主要饵料。藻种经纯化后于 GXZ-260B 智能型光照培养箱保存,光强 650 - 1000Lux,光暗周期为 12:12h,温度为 23 ± 1。

### 2. 培养基及培养条件

保种及试验用的培养基为 f/2 培养基<sup>[5]</sup>: NaNO<sub>3</sub> - 75mg、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 4.4mg、f/2 微量元素溶液 - 1ml、f/2 维生素溶液 - 1ml 和海水 - 1L。

实验藻用 100ml 三角瓶为培养容器,于控温培养室的培养架上静置培养。冷白荧光灯顶光照,光强为 3000 - 5000Lux,连续照明,温度控制在 25°C - 26°C。

### 3. 激光器及辐照方法

氩离子激光器 (Ar<sup>+</sup>): 波长为 488nm、输出功率为 70mw、光斑直径为 1.5cm,辐照处理设置 4 个剂量组: 5min、10min、15min、20min。

Nd: YAG 激光器: 波长为 1.06μm、输出功率 5w、光斑直径为 1.5cm,辐照时间设置: 0.5 min、1min、2min、3min。

取对数生长期藻液 3ml 置于小称量瓶 (φ = 20mm, h = 21mm) 中进行辐照处理。照射过程磁力搅拌以保持照射均匀。用无菌培养液将辐照细胞冲洗入 50ml 三角瓶,内装 20ml 培养液。培养 6 天后再接入 100 ml 的三角瓶进行传代培养(6 天),每处理组设 2 个重复。

### 4. 生长速度测定

辐照后,隔天定时取样,用“血球计数板”进行细胞计数。生长速率按文献<sup>[6]</sup>中的通用公式计算;  $K = (\lg N_{t_2} - \lg N_{t_1}) / t$ 。其中 K 为生长速度常数, t 为培养天数, N<sub>t<sub>2</sub></sub> 为培养 t<sub>2</sub> 天时的细胞数, N<sub>t<sub>1</sub></sub> 为培养 t<sub>1</sub> 天时的细胞数。

## 结果与分析

### 1. 两种激光对饵料藻的致死效应

激光辐照后,每日取样用光学显微镜观察藻细胞的形态变化,结果发现不同剂量的 Nd: YAG 激光辐照当天及数日内,两种藻的部分细胞均发生不同

程度的褪色或原生质体解体的现象。照射剂量为 3min 时,金藻与角毛藻的致死率均高于 90%。当照射剂量降到 2min 及以下时,两种藻的致死率明显降到 10% 以下。

经 Ar<sup>+</sup> 激光辐照后,在 5 - 30 分钟的剂量范围内,两种藻的辐照物未见有明显的细胞死亡现象,但金藻细胞的运动能力在辐照后的两天内受到一定的影响。

### 2. 激光辐照对饵料藻生长延滞期的刺激作用

一般情况下,微藻在接种后的开始阶段,细胞增殖缓慢,即出现生长延滞现象。为了摸清不同激光及不同照射剂量对藻细胞生长延滞期的影响,我们通过细胞计数对辐照后两天内的细胞增殖情况进行观测,结果如图 1 和图 2 所示。

从图 1 可知, Nd: YAG 激光照射剂量为 0.5min 和 1min 的处理组,金藻延滞期的细胞数明显高于对照组,其两天的细胞增殖数较对照组分别高约 28.6% 和 42.9%,但随照射剂量的增加,细胞增殖明显受抑制。当照射剂量超过 2 分钟时,出现大量细胞死亡现象。在相同照射剂量范围内, Nd: YAG 激光照射对角毛藻生长延滞期的影响有所不同。其间角毛藻各处理组的细胞数均低于对照组,表明 Nd: YAG 激光照射后对角毛藻生长初期的细胞增殖有抑制效应。但由图 1 还可以看出,当照射剂量为 2 分钟时,角毛藻并未出现大量细胞死亡现象。由此可知,相对金藻而言,角毛藻对较高剂量 Nd: YAG 激光照射的耐受性较强。(照射剂量为 3 分钟的角毛藻因辐照物明显褪色,误以为细胞全部死亡,故未进一步进行相应的测定)

由图 2 可知,经 Ar<sup>+</sup> 激光照射的金藻各处理组,其延滞期的细胞数高于对照组,细胞增殖较对照组高约 7.1% - 48.1%。其中,照射剂量为 5 分钟的处理组细胞增殖最快。经 Ar<sup>+</sup> 激光照射 5 - 30 分钟的

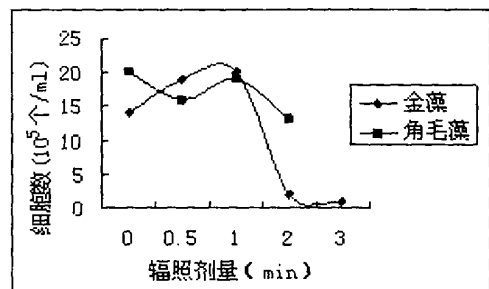


Fig. 1 Effects of Nd: YAG laser irradiation on microalgae proliferation in two days

角毛藻,在延滞期的细胞增殖情况与上述 Nd: YAG 激光辐照组的结果相似,即各处理组的细胞数均低于对照组。此结果表明,两种激光辐照对角毛藻生长初期的细胞增殖均有抑制作用。

### 3. 不同激光对饵料藻生长影响比较

生长速率是判断微藻生长情况的一个重要指标,我们对转接前后激光辐照物的平均生长速率进行测定,以期进一步分析比较不同激光照射对饵料藻生长影响是否存在时效性差异。

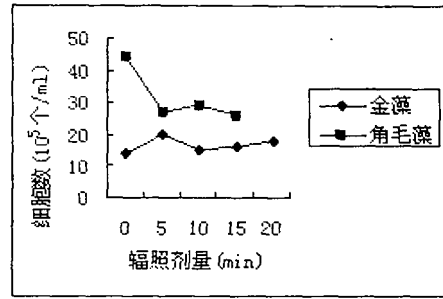


Fig 2 Effects of Ar<sup>+</sup> laser irradiation microalgae proliferation in two days

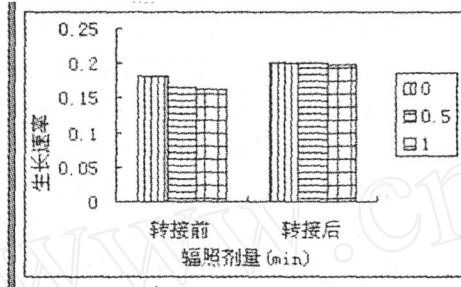


Fig 3. The compare of growth rates of *Dicteria* sp. after Nd: YAG laser irradiation between before and after transfer

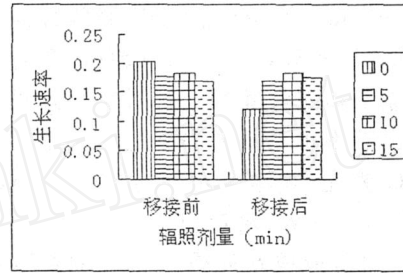


Fig 4. The compare of growth rates of *C. calcitrans* after Nd: YAG laser irradiation between before and after transfer

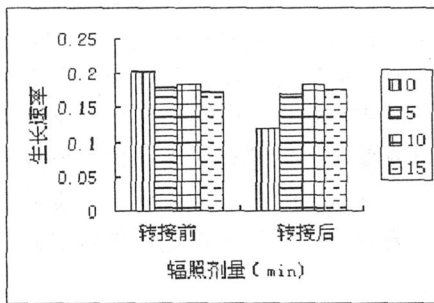


Fig 5. The compare of growth rates of *C. calcitrans* after Ar<sup>+</sup> laser irradiation between before and after transfer

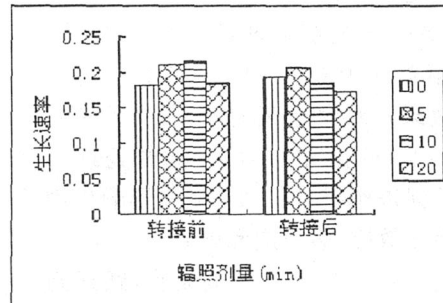


Fig 6. The compare of growth rates of *Dicteria* sp. after Ar<sup>+</sup> laser irradiation between before and after transfer

由图 3 可知,Nd: YAG 激光辐照后的 6 天(转接前)以及传代培养的 6 天(转接后),金藻各处理组的生长速率略低于对照组或与对照组相近。此结果表明 Nd: YAG 激光辐照对金藻传代前后生长速率的影响均不明显。由图 4 可知,Nd: YAG 激光辐照后的角毛藻,各处理组转接前的生长速率均高于对照组,增幅约为 13.2% - 27.0%,这表明激光照射后的 6 天内对角毛藻有生长促进作用,其中照射剂量为 1min 的处理组其生长促进作用较明显。但转接后各处理组与对照相比生长速率无明显差别。

比较转接前后的生长速率可知:Ar<sup>+</sup> 激光辐照后的角毛藻(图 5),在转接前,各处理组的平均生长

速率均低于对照组。但转接后角毛藻各处理组的生长速率均高于对照,增幅可达 40.5% - 51.2%,其中剂量为 10min 的处理组生长最快。与角毛藻的情况相反,经 Ar<sup>+</sup> 激光辐照过的金藻(图 6),转接前各处理组的生长速率高于对照组,增幅约为 2.2% - 19.9%,其中 5 - 10min 处理组的生长速率较快。转接后,除了剂量为 5min 的处理组生长速率略高于对照组外,其余处理组的生长速率均低于对照。

### 讨论与小结

有文献报道低功率的弱激光辐照对藻类有生长刺激作用。例如,庄惠如等<sup>[7]</sup>发现 He - Ne 激光和半导体激光对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* -

lis) 营养细胞的增殖具有明显的促进作用。陈必链等<sup>[8]</sup>用 Nd:YAG 激光辐照钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*), 发现 胡萝卜素含量提高 22.77%。本研究采用的两种激光分别是波长为 488 nm 的 Ar<sup>+</sup> 激光和波长为 1.06 μm 的 Nd:YAG 激光。在输出功率及照射时间等激光参数的选择上均考虑在相对低的致死剂量范围内。本研究结果不仅证实了已有研究的推论, 同时也发现有如下几个现象:

### 1. 两种激光对饵料藻的致死剂量差异显著

用 Nd:YAG 激光照射两种饵料藻后, 致死率达 90% 的剂量为 2 - 3 min, 而 Ar<sup>+</sup> 激光辐照两种藻达 30 min 之久仍未有致死现象。分析其原因, 笔者认为激光参数中, 除了辐照时间的长短对辐照效果有直接关系外, 输出功率也是重要参数之一。本实验采用的 Nd:YAG 激光, 其输出功率为 5W, 而 Ar<sup>+</sup> 激光的输出功率为 70mW, 两者相差近 100 倍。显然输出功率的不同是造成致死效应差异的主要原因。高剂量的 Nd:YAG 激光辐照对饵料藻的致死原因则可能与辐照后产生的瞬时高温直接有关。

### 2. 在一定的照射剂量范围内, 不同激光对两种饵料藻均有不同程度的生长刺激现象

在本实验中, Ar<sup>+</sup> 激光照射剂量为 5 - 10 min, Nd:YAG 激光照射剂量为 0.5 - 1 min 的处理对叉鞭金藻均有促长效果。对角毛藻而言, Ar<sup>+</sup> 激光照射 10 min 以及 Nd:YAG 激光照射 1 min 的处理同样具有明显的生长促进作用。低功率激光影响生物体的主要机制包括光效应、热效应和电磁场效应等, 其中光效应是通过一定波长的光子被吸收, 跃迁到一定能级时在生物体内产生的一系列光化反应。这种光照活化效应有可能导致核仁器抑制解除并使核糖体上蛋白质合成作用的活性增强, 同时可提高细胞利用氧及合成 ATP 的能力, 从而刺激生物体新陈代谢加速, 并使繁殖速度加快<sup>[9]</sup>。本实验中, 两种不同激光在一定剂量范围内对饵料藻产生的促长效应, 其作用机理是否相同? 是否均由光化反应所致? 这些问题还有待于进一步的深入研究。

### 3. 不同藻种的激光生物效应存在时效性差异

激光辐照后, 不同藻种在延滞期的反应截然不同, 而且随时间的推移, 这种效应也发生一定的变化。不同激光照射后, 在延滞期, 叉鞭金藻均表现为细胞增殖加速, 而角毛藻则出现生长抑制现象。两种激光对金藻的生长刺激作用总体上出现在生长初

期或传代培养前, 即当代效应比较明显。而两种激光对角毛藻的促长效果则主要发生在指数生长期或传代培养之后, 亦即, 对角毛藻而言激光的促长效应有一定的延滞现象。这种延滞现象我们还发现在扁藻等其他藻种的实验中。究其原因, 我们认为激光辐照后发生的短暂生长抑制过程实际上起了淘汰衰弱个体的作用。进入指数生长期乃至传代培养后, 由于培养物中主要由健壮的个体构成, 因此最终体现出群体细胞生长上的优势。

不同藻种对激光的生物效应差异还体现在对激光辐照的耐受能力上。实验结果表明, 在激光器以及激光参数不变的情况下, 角毛藻相对叉鞭金藻有更强的耐受力。本实验所用的角毛藻隶属于硅藻门, 其突出的形态学特征是具有硅质的细胞壁, 在体型上属于不运动的单细胞体。而叉鞭金藻则隶属于金藻门, 是一种无细胞壁, 具鞭毛能运动的单细胞藻。上述两种藻的激光生物效应的差异是否与其形态特征或其他遗传特性的不同有关也有待于进一步的探究。

综上所述, 不同激光在适宜的照射剂量范围内对饵料藻有不同程度的生长刺激作用, 激光对饵料藻生长的影响效果, 不仅视微藻种类的不同而异也与使用的激光类型以及选择的激光参数密切相关。

利用激光对饵料藻的生长刺激作用有可能缩短饵料藻接种后的延滞期并提高藻的生长速率和生物量, 同时, 激光的诱变效应及对衰弱藻体的淘汰作用也展现了激光技术在优良饵料藻种选育中的应用前景。

### 参考文献

- [1] 马志珍. 现代渔业信息, 1992, 7(11): 12
- [2] 王惠文. 激光与生命科学. 北京理工大学出版社, 1995
- [3] 胡卫红等. 激光生物学报, 1999, 8(1):
- [4] 陈有为等. 应用激光, 1996, 16(3):
- [5] 梁英等. 海水生物饵料培养技术, 青岛海洋大学出版社, 1998.
- [6] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用, 北京, 农业出版社, 1986.
- [7] 庄惠如等. 激光生物学报, 2000, 9(4): 256
- [8] 陈必链等. 激光生物学报, 2001, 10(3): 177
- [9] Chen YL, et al, *Acta Biophysica Sinica*, 2003, 19(4), 353