

水华束丝藻碳氮代谢的特征及相互作用

摘 要

蓝细菌通过光合作用利用太阳能固定无机碳并释放出氧气,是地球上氧、碳、氮、氢等元素循环的主要参与者,又是有机物的初级生产者。由于蓝细菌细胞结构简单,主要营养代谢方式与真核生物和高等植物相似,尤其某些蓝细菌具有特殊的固氮能力和方式。因此,采用蓝细菌作为细胞代谢研究模式,可以为生物学基础研究提供平台,也为微藻生物技术的发展奠定了基础。

本论文采用水华束丝藻 943 作为研究对象,测定了一系列生理、生化指标及代谢关键酶的变化,在细胞水平上考察不同影响因子的作用和效果,研究了不同无机碳源对蓝细菌细胞的生长、分化和衰亡的作用,以及对生长过程中氮源同化作用的影响,并结合文献报道对可能的调控方式进行了探讨。

实验首先对水华束丝藻 943 进行摇瓶培养,确定其生长条件。结果发现,水华束丝藻在温度为 21-22℃、起始 pH 值为 6.37,以及 0.4L/min 的通气量下有较好的生长,培养基中适合的无机碳源和氮源比例有利于蓝藻细胞维持碳氮代谢间平衡,单独提高氮源(NO_3^--N)或碳源(CO_2)都会影响藻细胞的生长。在实验条件下,铵根离子可彻底抑制水华束丝藻 943 生长。

培养基中的无机氮源对水华束丝藻的异形胞分化有一定抑制作用,但通入 CO_2 可以诱导水华束丝藻细胞分化产生异形胞。异形胞的

分化频率在一定时间内与 CO_2 的通入量有对应关系, 表现为随着 CO_2 通入量的增加而增加, 当 NaHCO_3 为无机碳源时, 异形胞的分化频率几乎没有变化。 CO_2 浓度的增加导致细胞内碳氮比例失衡后, 藻细胞没有增加吸收培养基中的结合态氮源, 而是产生异形胞固氮, 说明藻细胞的氮代谢存在多层次多途径的代谢调控。

为进一步考查碳氮代谢关系, 实验过程中测定了硝酸还原酶及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性。结果显示, 当 CO_2 含量增加时, 硝酸还原酶活性有所下降, 证明 CO_2 抑制藻细胞对 NO_3^- 的吸收利用。测定碳氮中间代谢产物 2-酮戊二酸在细胞中的积累发现, 2-酮戊二酸的含量与异形胞的发生频率有一定对应关系, 在异形胞发生频率较高的培养液中, 2-酮戊二酸的含量相应增高。

在上述结论的基础上, 考察了不同无机碳对其他经济藻种生长的影响。改变培养基中无机碳源含量, 测定三角褐指藻和小球藻的生长曲线、硝酸根吸收速率以及碳氮比等参数。三角褐指藻和小球藻分别在 1% 和 3% CO_2 含量下达到最高生长速率, 测定细胞中总糖、总蛋白的积累以及碳氮比, 发现细胞中总糖含量和碳氮比随着 CO_2 通入浓度的增加有一定增加, 可能是由于 CO_2 浓度升高后对细胞光合作用有一定的促进作用, 细胞中总糖含量升高, 总蛋白积累量变化不明显。

关键词: 水华束丝藻, 异形胞, 二氧化碳, 硝酸还原酶, 2-酮戊二酸

Characteristics and Regulation of Carbon and Nitrogen Metabolism in *Aphanizomenon flos-aquae*

Abstract

Cyanobacteria, a phylum of bacteria that obtain their energy through photosynthesis, is a main contributor of the global primary producer. As the main nutritional and metabolic models in cyanobacteria are similar to photosynthetic eukaryote and higher plants, cyanobacteria is a good metabolism research model for biology study.

In this work, *Aphanizomenon flos-aquae* 943 was chosen as research material. *Aphanizomenon flos-aquae* is a filamentous cyanobacterium capable of both photosynthesis and dinitrogen fixation under aerobic conditions. A series of physiological, biochemical and metabolic indicators were studied. Characteristics and regulation rules of carbon metabolism and other nitrogen assimilation pathway were investigated in the whole cell level.

The optimum condition for the growth of *Aphanizomenon flos-aquae* was studied in BG11 medium by examining effects of temperature, initial pH value, nitrogen sources and air flow during the cultivation. Results

showed that fittest circumstances for *Aphanizomenon flos-aquae* growth was: temperature of 21-22°C, the initial pH value of 6.37, 0.4l/min air flow. Improved nitrogen (NO_3^- -N) or carbon (CO_2) resources promoted the growth of algae cells only under the balance of inorganic carbon and nitrogen elements. Under the experimental conditions, the algal cells can not use ammonium nitrogen in the medium directly, and heterocyst of *Aphanizomenon flos-aquae* cells cultured in BG11 with ammonium can not be observed. It means that ammonium ion can inhibit the growth of *Aphanizomenon flos-aquae* completely.

In order to study the effect of inorganic carbon on heterocyst development, air with different CO_2 concentrations was bubbled to the medium. Comparing with air, CO_2 markedly improved the growth rate of *Aphanizomenon flos-aquae* and heterocyst differentiation, and heterocyst differentiation frequency in a certain time related to CO_2 concentration. However, the addition of NaHCO_3 did not induce the production of heterocysts. The increased CO_2 concentration in the medium caused the imbalance between carbon and nitrogen elements, which enhanced heterocyst frequencies rather than increasing the absorption of cells to nitrogen source. It means the algae cells nitrogen metabolism existence of a multi-level multi-channel metabolic regulation.

Nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were calculated respectively. Nitrate reductase activity decreased by the

addition of CO₂. The determination of 2-ketoglutarate showed that the accumulation of 2 - ketoglutaric acid was corresponding increased to the number of heterocyst cells.

The effects of different inorganic carbon on other species of micro-agle were studied. *Phaeodactylum tricornutum* and *Chlorella* cultured at 1% and 3%CO₂ content achieve the highest growth rate respectively. Total hydrocarbon, total protein and carbon nitrogen ratio were calculated, the hydrocarbon accumulated in the cell was increased as well as the C/N ratio compared with the access to the concentration of CO₂, due to increased CO₂ concentration promoted photosynthetic activities.

KEY WORDS: *Aphanizomenon flos-aquae*, heterocyst, carbon dioxide, nitrate reductase, 2-ketoglutarate

北京化工大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 王经纬 日期： 2008-6-5

关于论文使用授权的说明

学位论文作者完全了解北京化工大学有关保留和使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属北京化工大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以允许采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

保密论文注释：本学位论文属于保密范围，在 2 年解密后适用本授权书。非保密论文注释：本学位论文不属于保密范围，适用本授权书。

作者签名： 王经纬 日期： 2008-6-5
导师签名： 张树 日期： 2008-6-5

第一章 文献综述

1.1 水华束丝藻简介

1.1.1 水华束丝藻的形态特点

水华束丝藻是一种固氮蓝藻,可固定空气中游离氮为简单氮化合物以供藻细胞利用,其藻丝直或稍弯曲,单一或藻丝侧面相连成束状群体。藻丝中部细胞短柱形,呈方形。细胞内具假空泡,有遮强光和漂浮的功能。末端细胞尖细,延长成无色细胞。胶鞘模糊不清^[1],异形胞间生,异形胞由营养细胞特化而成,是丝状蓝藻类产生的一种与繁殖有关的特别类型的细胞。形状与一般细胞不同,圆形色淡,成熟的异形胞是透明的,其细胞壁在与相邻细胞相接处有钮状增厚部。水华束丝藻可在富营养水体中大量繁殖,形成水华,且细胞破裂后可释放贝蛤类毒素,对动物和人类有潜在危险^[2]。

水华束丝藻的细胞增殖主要靠藻丝的断裂和段殖体的形成进行。段殖体系蓝藻藻丝上两个营养细胞间生出的胶质隔片(凹面体)或由间生异形胞断开后形成的若干短的藻丝分段,又称藻殖段或连锁体。即在丝状群体中,有一段群体与其他丝状体部分脱离,再分裂增殖形成新丝状群体^[3],同时又能在细胞内产生孢子,这种孢子不经休眠而直接萌发形成新个体。除此以外也能形成厚壁孢子,即休眠孢子,由普通营养细胞增大体积,积累丰富营养,然后细胞壁增厚而成。厚壁孢子大多出现于丝状体类型的种类上,它的有无、形状、数目以及位置等,均为分类的依据。厚壁孢子有极强的生命活力,能在不利环境条件下长期休眠,当环境好转时孢子萌发成新的丝状体。有人报道,从已贮藏 70 年的干燥土壤中得出的孢子仍有萌发能力^[4]。

1.1.2 水华束丝藻的利用价值

Serena Benedetti等^[5]通过研究发现水华束丝藻的自然提取物对体外红血球和血浆样品有一定的抗氧化作用,对提取物利用氧化剂进行预温育,发现620nm下的吸光度显著下降,标志着该萃取物中含有一种可快速被氧化的蛋白,并证实该蛋白为藻蓝蛋白。藻蓝蛋白是一种属于光合作用体系的蛋白^[6],包含有两个生色团的 β 亚基和包含一个的 α 亚基,可利用hydroxyapatite column (ratio A620/A280 of 4.78)层析分离纯化。该蛋白的临床应用尚待进一步研究。Miyamoto等^[7]利用微生

物方法以及有内因子的化学发光方法测定水华束丝藻干细胞中维生素B₁₂的含量,其测定结果为616.3mg/100g,该化合物是否可被人体利用还需要进一步研究。

1.1.3 以水华束丝藻为主的蓝藻水华危害

水域中含氮和含磷化合物的增多,造成水体的富营养化,藻类大量繁殖后使水体变蓝或形成其他颜色,称之为水华。蓝藻为引起水华的主要藻类,此外还有绿藻、裸藻和硅藻等^[8]。我国近年来水华现象比较普遍,如滇池、巢湖、太湖等几大淡水湖泊的严重水华至今仍然没有得到有效控制,其中滇池中形成水华的主要是微囊藻属^[21] (*Microcystis Kutz*)和束丝藻属(*Aptmnizomenon Morr.*)。

蓝藻在长期进化中形成了极强的生态竞争优势,在适合的环境条件下即可获得最大生长率,并以指数级迅速增长。研究发现蓝藻具有自我强化机制作用的生态生长调节素^[10],可使其产生尽可能多的后代,从而使产毒菌株密度增加,获得竞争优势,形成种类少而数量大的蓝藻水华。蓝藻的大量生长可改变水体的理化环境,透明度降低,水体散发腥臭味,溶解氧减少。当水体中的营养素被蓝藻耗尽时,蓝藻大量死亡,各种有害气体及蓝藻毒素大量释放^[9],最终导致水生生态系统的迅速崩溃。此外,引起人们较大关注的是形成蓝藻水华后蓝藻毒素带来的危害。微囊藻属、鱼腥藻属、颤藻属和束丝藻属等都可以产生蓝藻毒素,水体中高浓度微囊藻毒素可影响水生植物种群的多样性^[12],也可使鱼卵变异,鱼类行为及生长异常,并威胁人类健康,有学者认为^[11]蓝藻毒素是引起我国南方肝癌高发的主要危险因素之一。

其中,水华束丝藻产生毒素使牛中毒死亡现象早在20世纪初就有报道,但只针对现象而言,无实质性研究进展。到20世纪60年代初,才真正对水华束丝藻毒素进行研究和探讨,并从水华束丝藻中分离出的具有四氢嘌呤结构的生物碱,经试验证明为水华束丝藻毒素 Aphantoxin I,药理实验表明^[13],Aphantoxin I 毒性较大,其半数致死量为10mg/kg(小鼠)不足5min足以致死。此种毒素是内毒素,藻类溶解后方可释放出,对鱼类毒性极大。

水华束丝藻常为春秋季节水体水华的优势藻种。Yoshimasa 的观察表明^[16]从当地人工优养湖中分离出的水华束丝藻种不能在 pH 7.1 及 11℃ 以下生长,其形成水华时间可从当地七月持续到十月。Shigeo Tsujimura 等^[17]研究了 1999 年 Biwa 湖和 Yogo 湖首次发生的以水华束丝藻为主的蓝藻水华现象。与这两个湖中的其他蓝藻如微囊藻和念珠藻相比,在夏季少部分的水华束丝藻可以继续生长到冬季,说明其对低温有一定的耐受性,并利用从 Biwa 湖分离得到的无菌藻株进行培养阐明温度对其生长的作用。该藻株可在 8℃ 以上生长,最适生长温度在 23℃ 至 29℃ 之间,

甚至在 5℃ 低光条件下也可存活至少 25 天。这些结果证实了其在晚秋和冬季产生水华的可能性，并说明不同地区的水华束丝藻种可适应不同的生长条件。

此外，金传荫等^[18]利用 BG11 培养基培养水华束丝藻 NH-5 藻株并提取毒素，采用 AOAC 小鼠生物检测法对纯种昆明小鼠腹腔注射，小鼠出现腹式呼吸，随后抽搐至死亡，证实水华束丝藻 NH-5 株能产生麻痹性的贝毒素。它是一种作用于细胞膜水平上的肌肉神经抑制剂，作用机理被认为是通过阻止钠离子流的作用势能，最后抑制神经传导。

William 等^[19]报道水华束丝藻毒素引起神经肌肉传导阻滞的机制是阻碍了细胞膜的钠通道传导，而对钾通道的传导无影响，且抑制作用有剂量效应关系，与河豚毒素、石房蛤毒素的作用相似，该阻滞作用是完全可逆的，即停止染毒后，会逐渐恢复到原来的动作电位。

胡智泉等^[21]用不同浓度的微囊藻毒素(MC-RR)处理自滇池分离的水华束丝藻，研究了 MC-RR 对水华束丝藻的生理特性和超微结构的影响。结果显示:10μg/L 的 MC-RR 可轻微促进水华束丝藻的生长，而 100μg/L 和 1000μg/L 的 MC-RR 对水华束丝藻表现为急性致死效应。藻的生理机能完全破坏，可溶性碳水化合物和蛋白质含量上升，光合系统 PS II 活性迅速降为零。藻丝在 48h 后开始断裂、解体，并逐渐溶解。其超微结构显示细胞膜受损，藻细胞内含物几乎完全渗漏。微囊藻毒素对水华束丝藻有显著的溶藻效应^[22]，微囊藻毒素在束丝藻与微囊藻的种群更替中发挥着重要的作用。

1.1.4 形成蓝藻水华的主要影响因素

影响水华发生的首要因子是营养盐，N、P 是藻类生长过程中必需的营养元素^[20]，它们在水体中的含量直接影响着藻类的生长，从而决定了水华的发生和可能形成的规模和程度。据报道^[23]在富营养化湖泊中，无风或微风时，水面平静，水温 20℃~30℃、pH6~9 时适于水华藻大量繁殖。

J Lehtimaki 等^[24]研究了环境条件对泡沫节球藻和水华束丝藻生物量和固氮能力的影响，同时测定泡沫节球藻生成的毒素浓度。较之泡沫节球藻，水华束丝藻较适合在低光照，低盐分以及较低温度的条件下生长。与细菌共同培养或提高磷酸盐浓度都可使两者的生物量提高，而过高的无机氮会使两者生物量下降。细胞和培养液中节球藻毒素的浓度以及氮固定化速率，通常在促进生长的条件下达到最大。在高温，高磷酸盐浓度以及强光照条件下细胞内节球藻毒素浓度增加，而高盐和高无机氮培养基中降低。培养基中节球藻毒素浓度随培养时间增加而增加，说明细胞内毒素随细胞破裂而释放到培养基中。

Eliska等^[25]提取水华中蓝藻并通过实验发现蓝藻固氮能力与培养基中氮元素含量和盐浓度呈负相关,而在低氮条件下,增加培养基中磷元素浓度可有效提高蓝藻固氮能力。Wurtsbaugh等^[14]对加利福尼亚的Clear湖水由水华束丝藻引起的水华现象进行了研究。加利福尼亚的Clear湖水温暖且较浅,杂质较多,富营养化严重。1975年,在水华束丝藻的大规模生长期,该湖泊的三大水域溶铁离子水平从原先的15-30 μg 降低到2 μg 。在实验条件下铁离子的增加可使蓝藻氮固定化速率提高500%,说明铁离子的增加可显著提高碳固定速率和叶绿素合成速率,且硝酸盐的加入促进了碳固定和叶绿素的合成但限制了氮的固定化。生物量的测定表明Clear湖中蓝藻和其他藻类的生长常常受到聚合氮源直接限制作用,偶尔也受到铁离子和磷含量的影响。通过限制氮固定化,环境铁离子含量的增加可降低蓝藻对氮源的利用,从而减少蓝藻生长。

1.2 蓝藻的光合碳代谢

蓝藻是一类分布广泛的原核光合自养生物,以叶绿素 a 为主要光合色素,通过 Calvin 循环固定 CO_2 光合作用过程释放氧,并生成还原糖供细胞利用。微藻的营养方式有光自养,混合培养,异养等三种^[26]。光自养是指藻细胞利用光能为能源,利用无机碳作为碳源进行光合作用的营养方式,混合培养是指藻细胞同时利用光和有机物为能源,同时利用有机物和无机碳为碳源的营养方式,异养是指藻细胞以有机物为能源和碳源的营养方式。混合营养与光自养相比,微藻的混合培养方式具有生长速率快,对光的依赖性减弱或提高光能利用率等特点,而与异养相比,能够以混合方式生长的微藻种类很多^[20],且能合成有光调节而生成的代谢物。

蓝藻在细胞内利用 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶-氧化酶(Rubisco)固定 CO_2 ,有些藻种也可直接利用 HCO_3^- 作为无机碳源。在淡水蓝藻种群的增长过程中,环境中无机碳浓度有可能下降至 $\mu\text{mol/L}$ 水平,由于 CO_2 在水体中扩散较慢,这种低浓度 C_i 可维持较长时间。在这种条件下,蓝藻细胞中 CO_2 浓缩机制(CO_2 concentrating mechanism,CCM)可被诱导出来^[27]。CCM 机制是某些水生植物为保证其光合作用的碳源供应所形成的提高细胞内 CO_2 浓度的生理机制。蓝藻是典型的 CCM 生物,其 CCM 机理得到了详尽的研究,并取得了显著进展。Reinhold 等^[28]提出的羧化体模型,成功的从原理上阐明了蓝藻 CCM 的基本过程。此模型由 3 个假设组成:

- (1) 位于细胞膜上的 C_i 泵(包括 CO_2 泵和 HCO_3^- 泵),将细胞外的 CO_2 和 HCO_3^- 主动转运到细胞内。无论 C_i 泵以何种形式的 C_i 为底物,释放到细胞内的是 HCO_3^- ;
- (2) C_i 在细胞内的主要存在形式是 HCO_3^- ,细胞质内无碳酐酶(Carbonic anhydrase,

简称CA), HCO_3^- 与 CO_2 处于不平衡状态, 因为 HCO_3^- 是离子, 细胞膜对它的通透性比 CO_2 低的多, 从而降低C_i的泄漏;

- (3) CA 和Rubisco全部位于羧化体内, 在CA的催化作用下, HCO_3^- 和 CO_2 在羧化体内进行快速转换, 由高浓度的 HCO_3^- 在Rubisco的活性位点附近生成高浓度的 CO_2 而使其固定反应以较快的速度进行。

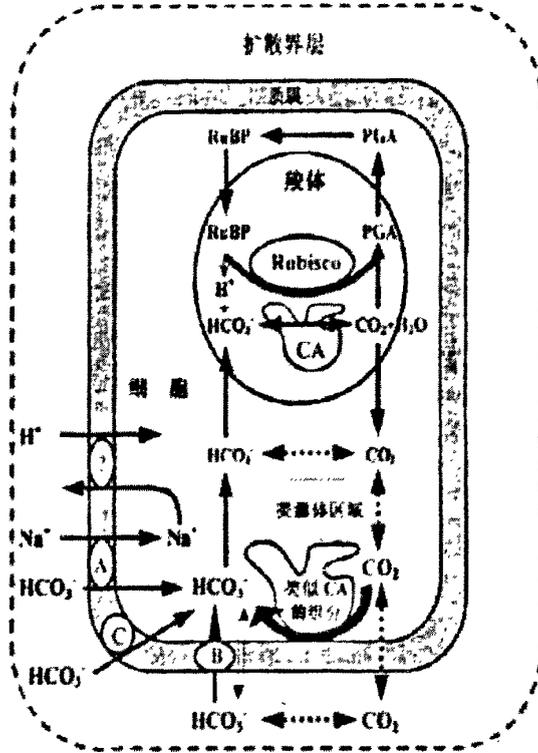


图 1-1 藻细胞中碳分子传递和代谢相关酶

Fig.1-1 The transport and assimilation of inorganic C in cyanobacterium cells

当环境中无机碳浓度较高时, 如自然的碱性淡水中浓度可达到 15-22mmol/L, 在这种条件下生长的蓝藻对 CO_2 的亲合力较低, CCM 机制受到抑制^[30]。此外, 浮游植物种群的增长还会引起环境 pH 值升高(可达到 10.0 以上)和溶解氧浓度的上升(可达到饱和水平的 100%~200%), 从而有利于浮游植物进行光合呼吸^[28]。

1.3 固氮蓝藻的氮代谢

氮是藻类生长的必需元素, 在地球上的存在形式有无机态和有机态两种。一般来说, 藻类较易吸收利用无机态氮, 主要有 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 和 NO_2^--N 。其中 NO_2^--N 在自然水体中含量很少, 部分蓝藻也可利用尿素和四氧化二氮及谷氨酸盐作为氮源^[31]。微藻对铵盐和硝酸盐的吸收利用速度受各种条件的影响。在能量不足时,

硝酸盐的利用率低于铵盐，即在低光强下细胞利用铵盐的速度比硝酸盐快，但对大多数蓝藻而言，培养液中较多的铵态氮是有害的^[33]。

蓝藻最普遍利用的是硝酸盐。硝酸盐在进入细胞后，经过由硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(NiR)催化的两步还原反应^[32]，转化为细胞可利用的铵离子形式。铵离子可在谷氨酸合成酶作用下合成谷氨酸参与代谢，但该途径能耗较高，一般通过谷氨酰胺-酮戊二酸氨基转移酶途径(GOGAT)，每生成一分子的谷氨酸耗去一分子的NADPH和ATP，如下图所示。

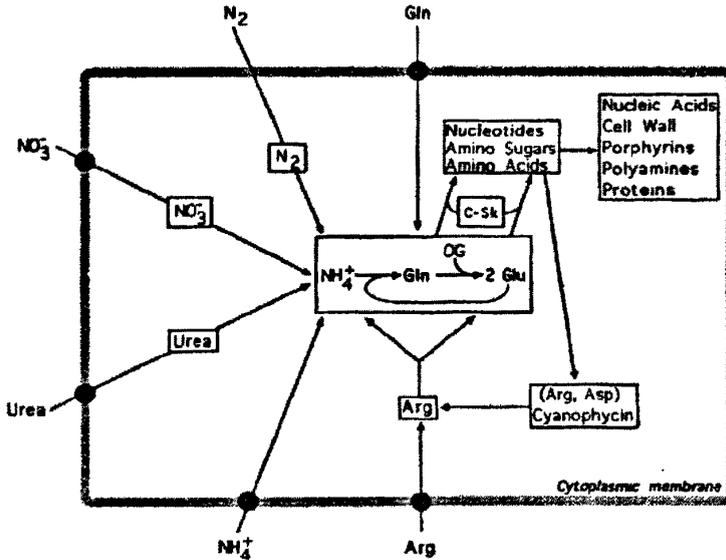
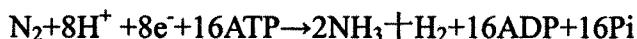


图1-2 蓝细菌对不同形式氮源的利用

Fig.1-2 inorganic and organic N can be used by cyanobacteria

1.3.1 异形胞的形态和作用

已知的固氮蓝藻除少数种类外，都是丝状体。固氮蓝藻在无化合态氮的条件下进行光合自养生长时，通过丝状体中的营养细胞分化成异形胞进行固氮，主要过程由固氮酶完成。蓝藻的固氮酶(Nitrogenase)包括多个固氮蛋白复合体^[34]，固氮酶复合体包括2个蛋白：固氮酶(Dinitrogenase)和固氮酶还原酶(Dinitrogenase reductase)。固氮酶 $\alpha_2\beta_2$ 是1个异源四聚体，分子量约为220~240kD。 α 亚基和 β 亚基分别由*nifD*和*nifK*基因编码^[35]。固氮酶还原酶是1个单酶，分子量约为67~70kD，在调节电子从电子供体到固氮酶的传递方面起作用，由*nifH*基因编码。除了这三个*nif*结构基因，还有很多的基因与固氮过程和调节固氮有关。固氮酶在将分子氮还原为 NH_3 的过程是1个高度吸能反应，需要ATP作为代谢能量，这一反应伴随着将质子 H^+ 还原为 H_2 ：



固氮酶对氧气高度敏感，所以许多固氮生物被限制生活在适合它们的厌氧微生态环境^[36]，而产氧的蓝细菌不得不演化，采取方法保护固氮酶的活性不受到自身代谢产生的氧破坏。有的可进化成一种产氧光合作用和固氮作用在时间上进行分离，白天进行光合作用，晚上进行固氮作用^[37]。然而，许多早期的丝状体蓝细菌可以演化，它们中间小部分细胞分化形成异形胞，营造合适的厌氧微环境，专一行使固氮作用^[38]。

在形态结构和生理功能上，异形胞有以下明显特点：异形胞体积通常比藻丝的营养细胞稍大，也有的无明显差异或较小，胞壁外有明显增厚而形成包被。在电镜下观察可看出增厚的包被分为3层，内层为糖脂层，中间层为多糖层，外层为较为疏松的多糖层^[39]。外层的富集是最早的形态上的变化，然后才是中间层，最后是内层。胞外的外包被层，特别是糖脂层，降低了气体向异形胞中的扩散，有利于维持细胞内的厌氧环境。

异形胞细胞的两极特别增厚，并形成一狭细孔道与相邻细胞相通，从而获得还原力和碳素营养。细胞质中的颗粒状物质溶解消失，光镜下观察呈均质状态，细胞常呈淡黄绿色或呈透明状。异形胞内不含藻胆素，但仍含叶绿素a。异形胞内原有的类囊体破碎，形成新的膜结构，在细胞中呈网状排列，彼此密贴或缠绕成螺旋状。成熟异形胞中的类囊体常集中在细胞的两端，形成半晶状的晶格结构，后期破裂，在两端形成折光性较强的极球^[40]。异形胞中的核物质不集中在细胞的中央区域，而是在细胞中呈漫散均一状态。

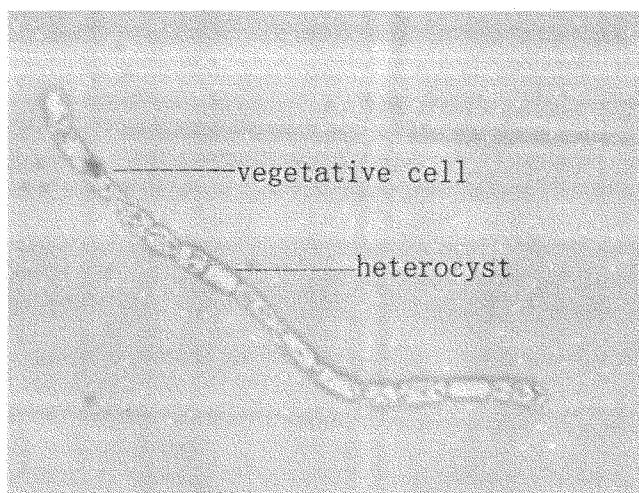


图1-3 40倍光学显微镜下水华束丝藻藻丝体中异形胞

Fig.1-3 heterocyst cells and vegetative cells of *Aphanizomenon flos-aquae*

由图1.3可见，水华束丝藻中异形胞形态较规则，胞内颗粒状物质基本不可见，

光折射率较高，细胞壁明显增厚，边缘光滑，一般在藻丝体中间出现。

异形胞在生理功能上仅具光系统 I (PS I)，而不具能放氧的光系统 II (PS II)；异形胞离体呼吸速率较高，约为 $230\mu\text{LO}_2/(\text{mgN}\cdot\text{hr})$ ，而藻丝体内营养细胞的呼吸速率为 $159.4\mu\text{LO}_2/(\text{mgN}\cdot\text{hr})^{[41]}$ ；异形胞不能固定碳，所需碳化合物需从邻近的营养细胞获得，且一经形成就不再分裂。衰老的异形胞常从藻丝上断离，不久即瓦解，但某些种类异形胞可以萌发产生新的藻体。有些种类异形胞与厚壁孢子的形成可能有关，从而影响藻细胞的生长繁殖。异形胞常将藻丝分隔为藻殖段，而且藻丝极易从异形胞处断离，每个藻殖段均可发育成一个新藻体。由此表明它在藻丝进行藻殖段营养繁殖上有重要作用。

1.3.2 异形胞中的生物代谢

在培养基中缺乏化合态氮源条件下，蓝细菌丝状体上大约有 5-10% 的细胞分化成异形胞^[42]，为营养细胞提供足够的氮源，以维持整个菌丝体的正常生长；同时营养细胞也会将生成的碳水化合物^[43]提供给异形胞，两个不同类型的细胞在丝状体上相互依存。因此，异形胞对丝状体可固氮蓝细菌的生长非常重要。

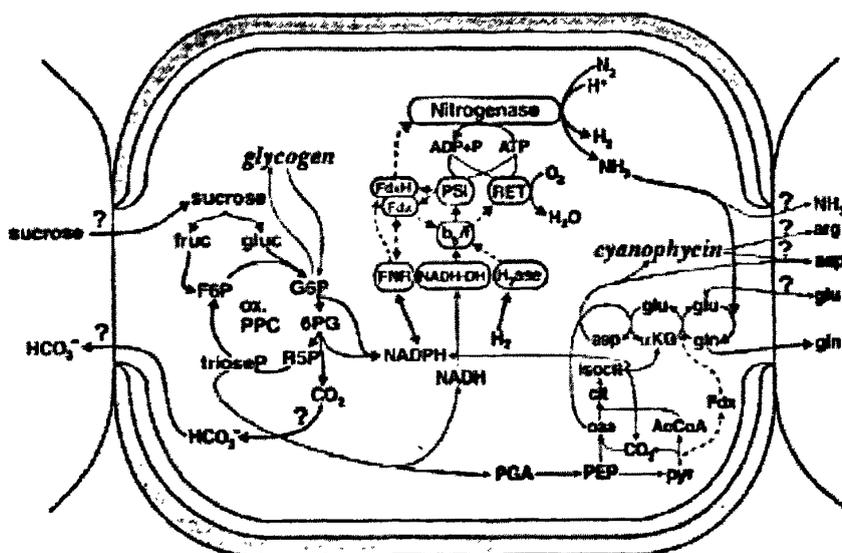


图1-4 异形胞中的主要代谢途径和营养输送

Fig.1-4 Carbonhydrate metabolism in heterocysts and the exchange of compounds between heterocysts and vegetative cells

异形胞在形成过程中可以诱导产生蛋白酶^[44]，这些蛋白酶可以降解藻胆蛋白和一些固定二氧化碳的酶类，异形胞中还可诱导产生氢化酶和氧化戊糖途径中的酶

类，并产生谷氨酰胺合成酶及谷氨酰胺合成酶的运输系统。

对鱼腥藻的基因研究证实，营养细胞中的碳源以蔗糖的形式运送到异形胞，其中编码蔗糖合酶的*susA*基因^[45]在固氮生长的条件下通常以较低的水平表达。其它类型的运送方式尚不清楚。细胞色素C氧化酶参与的呼吸作用在异形胞中发挥着重要的作用，可以为氮气固定提供ATP，并且可以为异形胞创造一个微氧的环境^[46]。在大多数蓝细菌中藻青素是氮源的储存物^[47]，但藻青素的代谢对于有氧条件下的生长不是必须的，藻青素也是异形胞向其它营养细胞输出氮源的方式之一，其输出形式尚不清楚。

1.3.3 异形胞发育的调控

异形胞的发育涉及到蓝细菌对细胞外界氮源缺乏信号的感应，对胞内生理或者细胞周期信号的感应，以及菌丝体上细胞之间的交流。在蓝细菌中，氮代谢途径最关键的步骤是谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸合成酶(GOGAT)催化的反应，即GS-GOGAT循环。而蓝细菌中因为缺少2-酮戊二酸脱氢酶^[44]，其三羧酸循环不完全，生成的2-酮戊二酸作为碳架直接参与谷氨酸的合成。所以，2-酮戊二酸作为一个重要的中间代谢产物将生物体中碳氮代谢有机的结合在一起。

HetR可能是最早调控异形胞发育的调控因子，也是异形胞发育的关键调控因子。缺乏*hetR*基因的突变体不能发育形成异形胞^[48]，*hetR*基因的超表达则能提高菌丝体在缺氮条件下异形胞形成的效率，并出现多个异形胞串连的表型，甚至在有化合态氮源的情况下，也可以形成异形胞。研究证实，HetR是一种不太常规的丝氨酸蛋白酶^[49]，可以自我降解，也可能降解其它的蛋白质。HetR是一种DNA结合蛋白，HetR的二聚体是DNA结合所需要的^[50]。HetR可以与*hetR*，*hepA*和*patS*基因的启动子结合，这意味着这些基因的表达可能受到HetR的直接调控。

在蓝细菌*Anabaena* PCC7120中，培养基中氮源的缺失可以诱导*hetR*基因的表达。缺氮后1至2小时内，*hetR*基因开始大量表达，3.5小时内即可发现*hetR*基因在一些间隔的细胞内大量表达，这些细胞即是正在分化的异形胞。研究表明，*hetR*具有正向的自我调控功能，而且*hetR*的表达受*ntcA*的正调控^[52]，受到*hetN*的超量表达抑制。在氮源缺失的条件下，*hetR*和*ntcA*的表达是一种相互依赖的关系。

固氮酶结构基因*nifD*和*nifK*的表达是在异形胞的发育过程中受到调控^[51]，除了缺氮和无氧的环境能引起它的表达外，还需要有异形胞发育的完成或部分完成。在有氧条件下，通常只有在异形胞完成形态发育后才能表达。由此可见，细菌细胞中有高度的组织性，不同的过程发生在一定的时候，碳元素和氮元素作为生物体中两大重要元素，不同的代谢过程必然有一定的相关性。

1.4 碳代谢与氮代谢的相互作用

碳元素和氮元素是植物体内两大重要元素，其代谢是植物体内最主要的代谢过程。蓝藻的特点是既能利用无机碳，有机碳，又能利用空气中的氮和结合态氮，情况更为复杂。碳氮代谢都需要消耗来自于 CO_2 同化和电子传递链的有机碳和能量，因此关系非常密切。从总体上看，光合碳代谢为氮代谢提供能量和碳架，氮素代谢同碳素代谢竞争光反应生成的同化力及其代谢的中间产物。

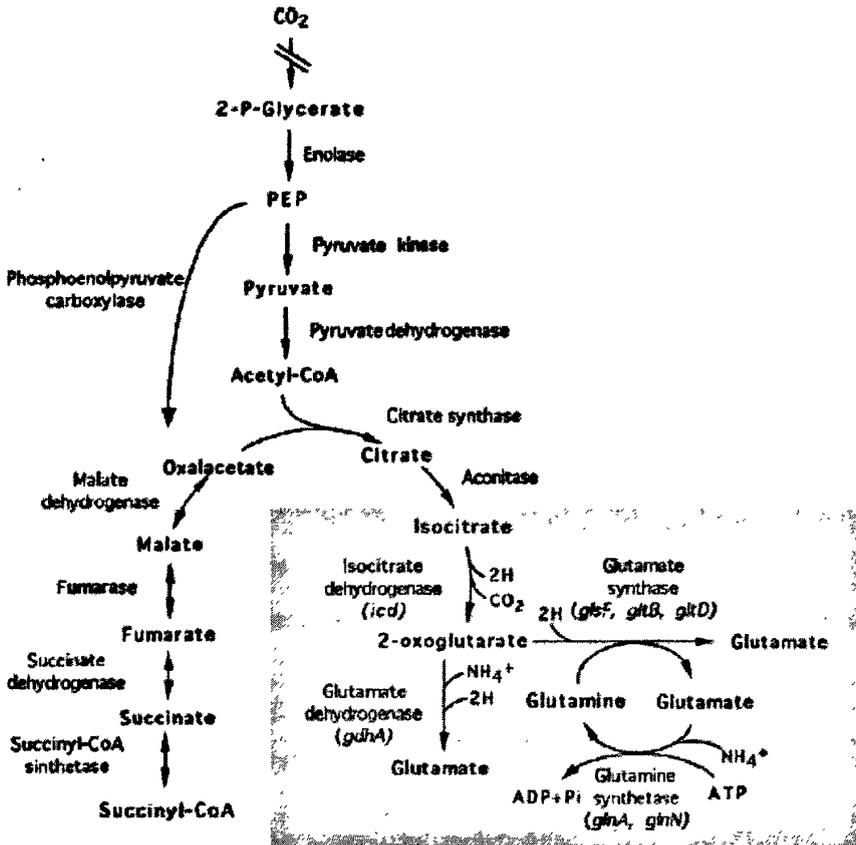


图 1-5 蓝细菌碳氮元素代谢相互作用

Fig.1-5 Interactions between nitrogen and carbon metabolism in cyanobacteria

光合碳代谢一方面通过光合链提供还原剂，一方面通过光合代谢产物提供还原剂。从氮代谢的整个过程看，从 NO_3^- 还原成 NO_2^- 需要由 NADH 提供两个电子，NADH 主要来自于光合碳代谢，而 NO_2^- 还原成 NH_4^+ 所需的 6 个电子直接来源于光反应形成的还原 Fd，与二氧化碳同化竞争光和电子；从氨离子到谷氨酰胺再到谷氨酸的转化，不仅需要 ATP 和还原 Fd，而且需要 α 酮戊二酸作碳架。

生物体中无机氮代谢消耗同化力，同时利用 CO_2 同化产物作为氨基受体形成

有机的碳—氮化合物。因此氮代谢可在两个水平上影响 CO_2 的同化，一方面通过参与还原力和 ATP 的竞争，降低 CO_2 同化的速率；另一方面，氨同化中消耗 α 酮戊二酸会减少 CO_2 同化产物。

1.5 本论文的主要内容

由水体富营养化引起的水体水华是目前世界各国面临的重要环境问题，大规模的蓝藻水华降低了水资源利用效能，引起严重的生态破坏及巨大的经济损失，而蓝藻毒素的产生给公众健康带来极大隐患。水华束丝藻因具有异形胞可进行固氮，pH适应范围广，生长温度偏低而常为春秋季节淡水水域水华的主要藻种，研究无机碳代谢对氮代谢的影响并由此得出不同条件下异形胞的形成，不仅对蓝藻的生命机理有重要的理论意义，更在控制水体水华和蓝藻固氮利用等方面有广泛的应用价值。

本文选择水华束丝藻943为主要研究对象，利用生理学、生物化学和生化工程的方法和手段，从细胞水平和分子水平研究蓝藻光合碳代谢对细胞氮代谢的影响和相互作用关系，以及环境因子对蓝藻细胞的生长分化作用。最后采用小球藻和三角褐指藻这两种经济藻种来探讨结论在工业生产中的理论指导作用。其中具体的研究内容如下：

(1) 以水华束丝藻943为研究对象，研究不同生长条件对该藻种生长繁殖的影响，以获得最佳生长条件，为下一步的反应器中培养确定依据。

(2) 在反应器中对水华束丝藻进行培养，改变无机碳的供给量，探讨光合碳代谢对氮代谢途径和细胞分化的影响。

(3) 以小球藻和三角褐指藻为研究对象，探讨在不同无机碳源条件下对氮源的利用和对最终收率的影响。

第二章 材料与方法

2.1 藻种

所用藻种水华束丝藻 943 由中国科学院水生生物所提供。

2.2 培养方法

2.2.1 培养基

水华束丝藻及小球藻培养基: BG11 培养基。将各种营养成分分别配制成储液 4°C 保存, 使用时将各储液按比例混合。

表 2-1 BG11 储备液组成成分和每升工作液的配比

Stock1	100ml	柠檬酸 0.3g; 柠檬酸铁氨 0.3g; EDTA 二钠 0.05g;		
Stock2	1000ml	NaNO ₃ 30g; K ₂ HPO ₄ 0.78g; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.5g;		
Stock3	100ml	CaCl ₂ 1.21g;		
Stock4	100ml	Na ₂ CO ₃ 2.00g;		
Stock5	1000ml	H ₃ BO ₄ 2.86g; MnCl ₂ ·4H ₂ O 1.81g; ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.222g; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0.391g; CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.070g; Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O 0.049g.		
Stock1	Stock2	Stock3	Stock4	Stock5
2ml	50ml	2ml	1ml	1ml

按比例配制好后, 补加去离子水到 1L, 调 pH 值为 7.5。其中无氮的 BG11 培养基组成为取同质量的 NaCl 取代储备液中 NaNO₃。

三角褐指藻培养基: 加富的人工海水培养基。

表 2-2 人工海水培养基的配制方法

	Mol.Wt	Molar concentration (mol)	g/L solution
NaCl	58.44	0.3267	21.1939
Na ₂ SO ₄	142.04	0.0250	3.5500
KCl	74.56	0.0080	0.5993
NaHCO ₃	84.00	0.0021	0.1735

KBr	119.01	7.249×10^{-4}	0.08627
H ₃ BO ₃	61.38	3.715×10^{-4}	0.02297
NaF	41.99	6.570×10^{-4}	0.00275
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.33	47.176	9.5922
CaCl ₂ ·6H ₂ O	147.03	9.139	1.3437
SrCl ₂ ·6H ₂ O	266.64	8.200×10^{-5}	0.02186

表 2-3 f/2 加富溶液营养元素、微量元素和维生素储备液的配制方法

	Mol. Wt	Molar concentration (μmol)	Stock solution (g/250ml solution)
NaNO ₃	84.99	1000	21.25
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	284.19	100	7.1
KH ₂ PO ₄	136.09	40	1.36
Fe-EDTA	335.03	2	0.837575
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.92	3	0.1485
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	3	0.1815
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	0.2	0.0119
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	0.2	0.0125
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	20	1.435
Chelate:metal		(52.8+6):28.4=2.07:1	
Cyanocobalamin		0.5 μg	
Biotin		0.5 μg	
Thiamine HCl		100 μg	

2.2.2 藻种的纯化

在 BG11 液体培养基中加入 1.5%~2.0%的琼脂粉，高温灭菌，冷却后倒入消毒的培养皿中，制成平板。在超净台将待分离的藻液通过涂布或者划线的方法接种于平板上，然后静止于光照培养箱内在适宜温度下培养到出现单藻落。

2.2.3 藻细胞的摇床培养

在无菌条件下,将适量藻液接入盛有 100ml 培养液的 250ml 摇瓶中,初始接种浓度一般为 10^6 个/ml,接种后,将藻液置于 HZQ-Q 光照摇床中培养,摇床转速为 100rpm,光源由 40W 日光灯提供连续光照,温度根据需要由摇床控制,瓶口处光照强度为 $62\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

2.2.4 藻细胞的气升式反应器培养

该反应器为内环流式气升光生物反应器,总体积为 2.5L,有效体积为 2.0L。反应器由罐体、取样管、气体分布器等部分组成,反应器温度由水浴通过循环水控制,光照由安装在罐体前后的光源板提供,每块光源板上横向平行排列六支日光灯管,通过控制面板的开关,可改变罐体表面接收光强。空气由微型气泵提供,通气量和二氧化碳浓度通过气体流量计控制,二氧化碳与空气定量混合后,通过孔径为 $0.2\mu\text{m}$ 的空气过滤器除菌后进入进气管,通过气体分布器分散为均匀细小的气泡,进入罐内。

2.3 试剂及分析测试仪器

实验中所用的分析测试仪器如下表。

表 2-4 实验中常用仪器列表

仪器名称	规格	厂家
光照摇床	HZQ-Q	东联电子技术开发有限公司
气升式光生物反应器	2.5L	
电子天平	FA2004	上海精密科学仪器有限公司
pH 计	Delta 320	Mettler Tdedo
冷冻离心机	Neofuge 15R	Heal-force
氧电极	DW2/2	英国 Hansatech 仪器公司
光学显微镜	BK300	奥特光学
分光光度计	723N	上海精密科学仪器有限公司
超声破碎仪	JY92-2D	宁波新芝科器研究所
光合有效辐射计	FGH-1	北京师范大学光电仪器厂

牛血清白蛋白	分析纯	Sigma 公司
冷冻干燥器	LGJ-10C	北京四环科学仪器厂
高效液相分析仪	Agilent 1200	Agilent
凯氏定氮仪	KDY-9820	北京通润源机电技术公司
离子色谱	761 Compact IC	metrohm
总有机碳分析仪	Primacs SLC Analyzer	Skalar 公司
光照培养箱	HPG-280B	哈尔滨东联电子技术公司
超净工作台		北京半导体制备一厂
恒温水槽	DC-1015	宁波市海曙天恒仪器厂

实验中使用无机盐和常用化学试剂为国产分析纯试剂。

2.4 生理指标的测定及常规分析

2.4.1 细胞干重

取相同培养条件下不同生长时期的藻细胞 10ml, 置于已知重量的离心管中, 12000rpm 离心, 弃上清, 沉淀用去离子水洗涤重悬浮后再离心, 弃上清直至充分洗去无机盐, 将藻体于 80℃干燥 8 小时, 在干燥器中冷却至室温后称重。

2.4.2 细胞叶绿素浓度

取待测藻液 3ml, 离心收集藻细胞, 加入等体积甲醇, 用移液器混匀, 4℃下避光浸泡 6~14 小时后, 12000rpm 离心 10 分钟, 取上清测定 OD₆₆₅ 值。根据公式: $\text{Chl}(\mu\text{g/ml})=13.9 \times \text{OD}_{665}$, 计算样品中叶绿素 a 的含量^[53]。

2.4.3 光合放氧测定

光合作用伴随着氧气的释放, 因此, 测定藻细胞单位时间内的放氧量可以衡量其光合作用活性。本试验采用氧电极法通过电极中扩散电流的大小来测定反应中氧气含量的变化。

氧电极(英国 Hansatech 公司生产)由 CB1-D 反应室, 磁力搅拌器, 光源, 数据采集等几部分组成。其 CB1-D 反应室为约 4ml 的密闭系统, 反应室温度由恒

温水浴槽通过循环水控制，光源为红色发光二极管。氧电极每次使用前都必须经过饱和氧，零氧标定，通过 OxyLab 软件预先设定试验过程中光强变化及光暗比时间，然后取不同条件下培养藻液 2ml 加入反应室中进行测定。光合放氧速率以单位时间、单位质量的叶绿素释放的氧气的质量数表示。在恒定温度下，每隔一定的光强，测定一个光合放氧速率和呼吸速率，实测的放氧速率则为光合作用减去呼吸作用的差数，称为净光合速率(Netphotosynthesis, NPS)，将呼吸速率(Respiration rate, RES)加上净光合速率，则得到真实光合速率(True photosynthesis rate, TPS)^[54]。根据 Henley 的方法以方程 $P=P_m \times \tanh(\alpha \times I/P_m) + R_d$ 对实验数据进行拟合并计算各参数。其中 P 为实测的净光合放氧速率，I 设定的光照强度， P_m 为最大真实光合放氧速率，可用来表示光合速率。饱和光强(I_k)和补偿光强(I_c)分别根据以下公式计算： $I_k=(P_m + R_d)/\alpha$ ； $I_c=R_d/\alpha$ 。其中饱和光强表示光合作用达到最大速率时的光强度，补偿光强表示当光合作用和呼吸作用相平衡时的光照强度。

2.4.4 光强测定

光强用 FGH-1 型光合有效辐射仪（北京师范大学光电仪器厂）测定。由于所用光源为日光型荧光灯，光照度计测定值与光合有效量子辐射密度关系为 $1\text{wm}^{-2} \approx 4.6\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1} \approx 250\text{lux}$ 。

2.4.5 异形胞出现频率

将不同培养条件下定时取出的样品置于光学显微镜下观察，分别对营养细胞和异形胞进行计数，并计算异形胞占细胞总数的百分比。每个样品做三次重复以减少误差。

2.5 化合物定量分析

2.5.1 蛋白质分析

取对数生长期的细胞，新鲜培养基洗涤三次，冰浴条件下超声破碎，破碎条件：超声时间 2s，间歇时间 5s，全程时间 10min，功率 80W。4000rpm 离心后收集上清液，采用修正的 Lowery 法^[55]测定蛋白浓度，以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

2.5.1.1 试剂

试剂 A：含 2%NaCO₃、0.4%NaOH、0.16 酒石酸钠和 1% (w/v) SDS。

试剂 B: 含有 4%CuSO₄ · 5H₂O。

试剂 C: 用前将试剂 A 和试剂 B 按 100 : 1 的比例混合。

福林酚试剂: 用前用蒸馏水稀释一倍。

标准蛋白: 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 浓度配制成 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1g/l 的水溶液。

2.5.1.2 标准曲线的绘制:

取 1ml 不同浓度的 BSA 标准溶液加入到不同编号的试管中, 分别加入 3ml 试剂 C 后室温静置 30min, 分别加入 0.3ml 稀释的福林酚试剂后, 在漩涡混合器上激烈混合, 室温静置 45min 后在分光光度计上, 测定 660nm 下的光吸收值, 得到标准曲线。

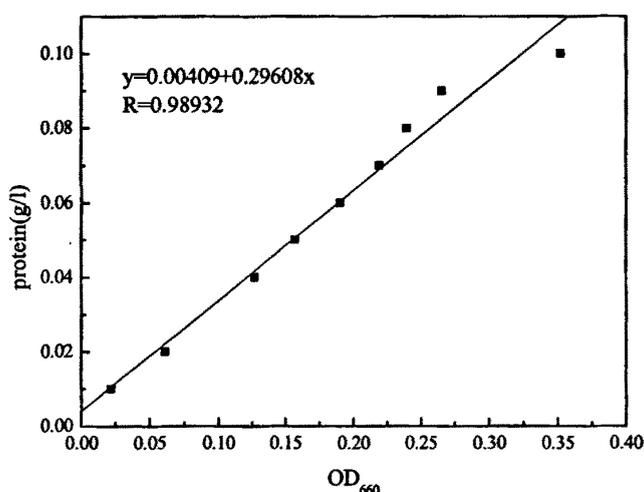


图 2-1 蛋白质浓度标准曲线

Fig.2-1 The standard curve for the determination of protein concentration

2.5.1.3 样品蛋白含量的测定

将处理好的待分析样品按上述方法测定样品的光吸收值, 再按回归方程计算出样品的蛋白含量。

2.5.2 氮源的利用

2.5.2.1 培养过程中 NO₃⁻ 的消耗

对不同培养条件下生长的藻细胞进行取样, 12000rpm 离心 10min 后, 在 220nm 波长下测定样品上清液的吸光度, 并通过标准曲线计算出样品中所含的硝酸根浓度^[56]。

2.5.2.2 NO₃⁻ 浓度对吸收速率的影响

收集不同条件下培养的藻细胞，以 BG11₀ 培养基清洗三次并重悬浮。分别加入终浓度为 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300mmol/l 的 NaNO₃，并根据不同的培养条件加入不同浓度的 NaHCO₃ 或通入不同比例的 CO₂，在光强为 100μmolm⁻²s⁻¹，温度为 21℃ 条件下放置 15min 后，离心除去藻体，测定上清中 NO₃⁻ 的浓度。样品中 NO₃⁻ 吸收速率以含有 1μg 叶绿素的藻细胞每分钟吸收的 NO₃⁻ 的摩尔数来表示。每个样品至少测定三次。

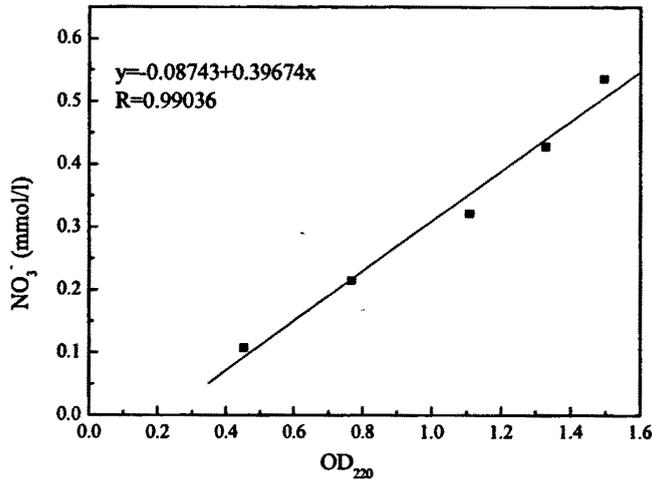


图 2-2 NO₃⁻ 浓度标准曲线

Fig.2-2 The standard curve of NO₃⁻ concentration

2.5.2.3 藻细胞对 NO₃⁻ 的转运速率

取对数生长期细胞，离心得藻细胞并于 Tris-HCl 缓冲液中洗涤三次，加入同体积 BG11 培养基，分别通入不同含量的 CO₂ 或 NaHCO₃，于原培养条件下分别放置 20、40、60、80、100、120min，离心去藻体，测定剩余 NO₃⁻ 含量，测定三次取平均值。

2.5.3 胞内可溶性总糖的测定

收集藻细胞于冰浴中超声破碎至细胞破碎完全，破碎液在 5000rpm 离心，取上清液，采用硫酚法^[57]测定可溶糖浓度，以葡萄糖为标品。

硫酚法测定可溶性总糖标准曲线的测定：取 1ml 不同浓度的葡萄糖标准溶液于 20ml 统一规格的玻璃试管中，加 5%(w/v)的苯酚溶液 1ml，取 5ml 浓硫酸加入后立即摇匀，室温放置 20min，利用分光光度计测定 470nm 下的吸光度。

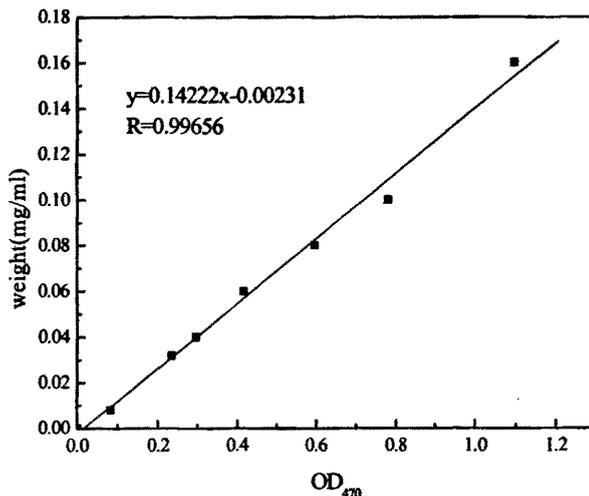
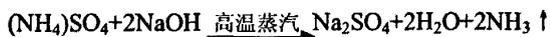


图 2-3 葡萄糖浓度标准曲线

Fig.2-3 The standard curve of glucose concentration

2.5.4 细胞中总氮的测定

收集反应器中藻细胞，12000rpm 离心去上清，沉淀藻泥经冷冻干燥后获得藻粉，利用 KDY-9820 凯氏定氮仪对样品进行总氮测定。取一定量样品置于消煮管，称取 3g 硫酸铜和硫酸钾组成的催化剂，滴加 10ml 浓硫酸，于控温消煮炉中 400℃ 消化 3 小时后，取被测样品上机完成下列化学反应：



反应中释放的氨气与水蒸气一起经冷凝管冷凝后，被收集到装有硼酸吸收液（含混合指示剂）的三角瓶中，用滴定管进行滴定，经过酸滴定量，可计算含氮量。其中凯氏定氮仪自动完成对样品的定量加碱、自动蒸馏过程。

$$\text{含氮量: } N(\%) = 1.401 \times M(V - V_0) / W$$

M 标准酸摩尔浓度；

W 样品重量；

V₀ 空白样滴定标准酸消耗量（毫升）；

V 样品滴定标准酸消耗量（毫升）。

标准酸配制好后摩尔浓度由烘干的碳酸钠进行滴定，采用溴钾酚绿的乙醇溶液为指示剂。

2.5.5 细胞中总碳的测定

收集干藻粉后用 TOC 分析仪对细胞内总有机碳进行测定, 以草酸为标品。Skalar TOC-Primacs-Slc 的标准分析范围为 0.05-1mg, 反应时间 7min, 载气为高纯度氧气, 反应温度: 1100℃。测定时将坩埚烘干至恒重, 称取一定量样品, 放入 TC 测定橱中, 利用 Skalar 操作系统程序设定开始测定并进行积分计算。

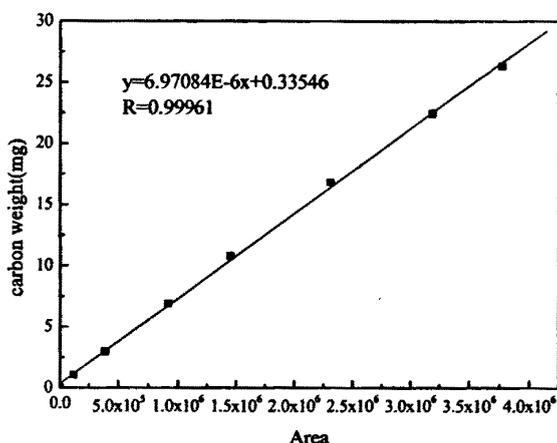


图 2-4 草酸含碳量与 TOC 测定面积标准曲线

Fig.2-4 The standard curve of oxalic acid concentration estimated by absorption peak area

2.5.6 2-酮戊二酸的测定

2-酮戊二酸的主要作用是作为铵根离子通过 GS-GOGAT 合成途径提供碳骨架, 在细胞内缺少结合态氮时 2-酮戊二酸可能会发生积累^[58], 同时细胞中不同的 2-酮戊二酸含量对 NO₃ 吸收和利用有一定影响, 且对异形胞早期分化有促进作用。藻细胞 2-酮戊二酸含量可用高效液相色谱法^[59]测定。方法如下: 收集一定量不同条件下培养的微藻溶液, 80℃水浴加热 10min, 冰浴 5min, 12000rpm 冷冻离心 10min 后过 0.45μm 滤膜待用。衍生体系包括: 0.2ml 0.02mol/l NaOH; 0.4ml 10mmol/l 盐酸苯肼; 0.4ml 0.1mol/l 磷酸缓冲液(pH=7.0)。室温反应 20 分钟后, 通过高效液相检测器进行检测。

分析柱: Agilent Eclipse XDB-C18

检测波长: 324nm

进样量: 10μl

流动相配比: A: 磷酸盐缓冲液: 13mmol/L KH₂PO₄

1 mmol/L K_2HPO_4

B: 100%甲醇

A:B=95:5

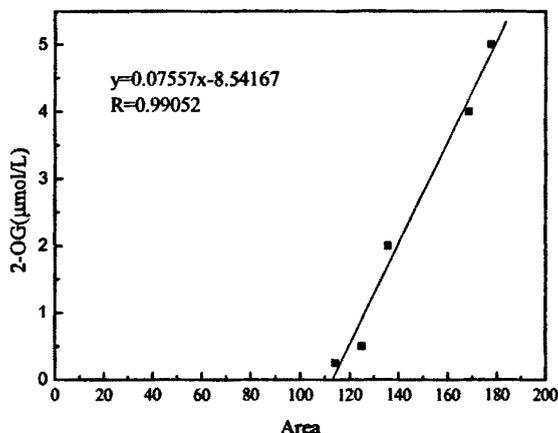


图 2-5 2-酮戊二酸的高效液相测定面积标准曲线

Fig.2-5 The standard curve of a-Ketoglutarate concentration estimated by absorption peak area

2.6 酶活性分析

2.6.1 硝酸还原酶活性

2.6.1.1 测定方法

取适量培养液于 12000rpm 离心 10min, 收集藻细胞并用 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5) 洗涤后重悬浮, 冰浴超声破碎, 8000rpm, 4℃ 冷冻离心, 收集上清液待测, 取 1ml 细胞粗提物加入 4ml 反应液中, 30℃ 保温 10min, 剧烈混合, 加入 0.8ml 1mol/L NaOH 和 0.4ml 1mol/L $ZnSO_4$ 混匀, 2500g 离心 10min 后去除细胞碎片, 取上清测定生成的亚硝酸根含量, 单位酶活定义为每分钟每单位质量(μ g) 蛋白质催化产生的 NO_2^- 的 μ mol 数^[60]。

测定酶活反应液包括: 0.8ml 0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH9.0); 0.5ml 0.8mol/L KNO_3 溶液; 0.5ml 4mmol/L 溴酚蓝(BPB); 0.4ml 0.01mol/L EDTA; 0.4ml 0.05mol/L $Na_2S_2O_4$ 。其中连二亚硫酸钠需溶于事先脱气的 50mmol/L 的 $NaHCO_3$ 溶液中, 实验前配制。

2.6.1.2 亚硝酸盐的含量测定^[61]

试剂: 称取 0.05g 磺胺(sulfanilamide), 溶解于 50ml 的 10%(v/v) 盐酸溶液中。

称取 0.05g 萘基乙烯二胺 (NED) 溶解于 50ml 热水。使用前将上述两种试剂同体积混合, 即为 Griess 反应液。

标准曲线: 将亚硝酸钠配制成浓度为 0.5、1、5、10、30、50、70、100 $\mu\text{mol/l}$ 的水溶液。取 2ml 不同浓度的标准溶液加入不同编号试管中。再分别加入 1ml Griess 试剂后室温静置 10min, 用分光光度计测定 540nm 下的光吸收值, 得到标准曲线。

样品测定: 将待分析的样品按上述方法测定样品的光吸收值, 根据回归方程可计算出样品中的亚硝酸根浓度。

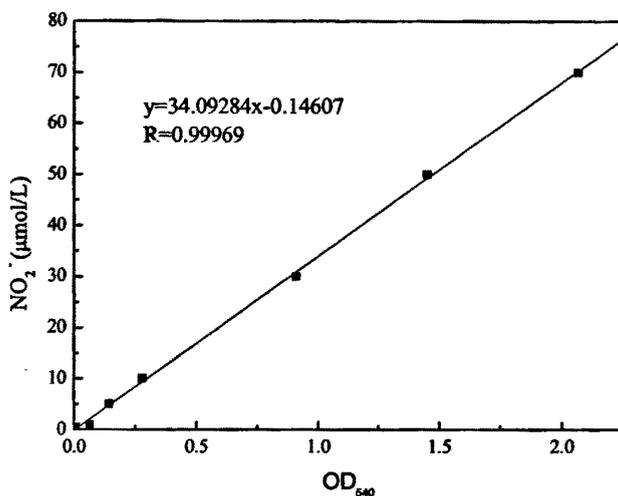


图 2-6 NO₂⁻ 浓度标准曲线

Fig.2-6 The standard curve of NO₂⁻ concentration

2.6.2 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性

适量的培养液于 4000rpm 离心 10min, 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 洗涤并定量悬浮藻细胞, 冰浴超声破碎后, 8000rpm, 4℃ 离心, 收集上清液待用。在总体积为 3ml 的反应液中含有 300 μM Tris-HCl (pH7.5), 2 μM NADP, 2.5 μM G-6-P 和 100 μL 细胞破碎液, 迅速混匀后放入可见分光光度计中, 于 25℃ 测定反应液在 340nm 光吸收值的增加速率, 每隔半分钟记录一次, 共记录 15 分钟。酶活计算取三次重复测定的平均值^[62]。

2.6.3 固氮酶的活性测定

采取通用的乙炔还原法进行测定。基本原理为固氮酶为多功能的氧化还原酶, 除了还原 N₂ 外, 还能还原多种类型的底物, 如乙炔, 氰化物, 联氨等。用气相色谱

谱仪可测定乙炔还原为乙烯的产生量。测定方法为：取 15ml 细胞悬浮液置于 25ml 的磨口容器中，用橡皮塞密封，抽出 10% 容器中空气用同体积的乙炔气体替代，原条件下培养 1 小时后取 0.5ml 气体样品测定其中的乙烯含量，并计算乙烯和乙炔的峰高比。

第三章 水华束丝藻 943 生长条件的优化

藻细胞的生长主要受底物浓度（碳，氮源）、光强，温度，pH 值，NaCl 浓度等因素的影响。因此分别考察了不同培养条件下藻细胞的生长，经分光光度计扫描，水华束丝藻 943 在 680nm 下有最大吸收峰，所以可以用该波长下的光吸收值表征细胞生长状态。

3.1 水华束丝藻静止生长曲线

挑取平板培养的水华束丝藻单菌落加入 50ml BG11 液体培养基中，22℃， $64\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照静止培养，待生长至 10^7 个/ml 的细胞密度后转接至 100ml 的培养基中，如此扩大转接获得种子液，同时配制 100mlBG11 培养基，灭菌 48h 后接种，接种量为 10%，光照培养箱中培养，固定时间取样测定生长密度并提取叶绿素，结果如下图所示。由水华束丝藻的生长曲线可以看出，该藻种的生长周期较长，停滞期较长，对数生长期不明显，叶绿素含量变化基本与细胞密度相符合，细胞生长易贴壁，在生长对数期以后培养液中有较为明显的藻丝及颗粒出现，显微镜下观察为众多藻丝体缠绕而成，培养液中营养较丰富时，藻丝体较长，内含物较多，细胞间间隔不明显。

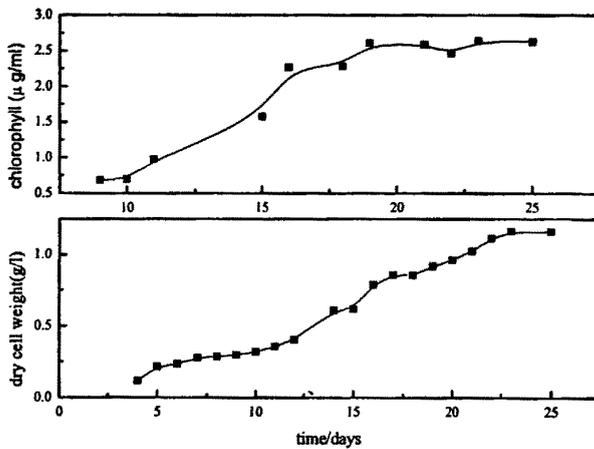


图 3-1 水华束丝藻静止培养生长曲线和叶绿素含量变化

Fig.3-1 Growth curve of *Aphanizomenon flos-aquae* cultured in BG11 medium

3.2 温度对藻细胞生长的影响

温度是影响藻类生长代谢的重要影响因素，一般在最适温度范围内，温度升高可提高藻体内酶活性，促进细胞生长，也有文献报道在束丝藻在较高温度下体内毒素含量增加。本实验对水华束丝藻进行摇瓶培养，摇床内光强为 $64\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，转速为 100rpm，温度条件分别设定为 21-22℃、23-24℃、24-25℃，每隔一定时间取样以测定细胞的生长。结果表明，在一定温度范围内，藻细胞的生长速率随着温度的增加相应提高，而当培养温度高于 28℃后，藻细胞生长基本处于停滞状态，显微镜下观察胞内色素减少，藻丝体断裂，培养液呈黄色，说明水华束丝藻对高温的耐受性不强，最适温度范围在 23-25℃之间，过高或过低的温度都不利于其生长。

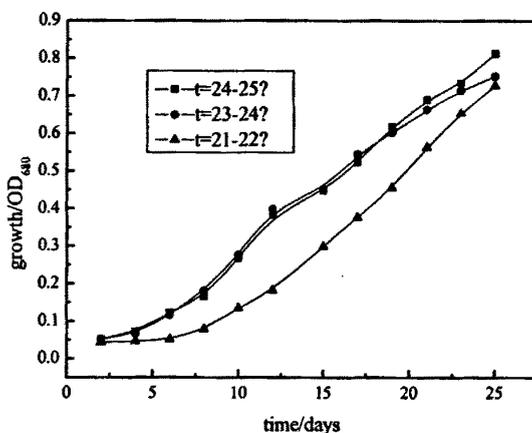


图 3-2 温度对水华束丝藻生长的影响

Fig.3-2 Effect of temperature on the growth of *Aphanizomenon flos-aquae*

3.3 起始 pH 值对生长的影响

pH 值不但影响培养液中营养基质的离解程度，而且对藻细胞的生长代谢都会造成显著作用。大部分藻类适宜生长在中性或偏碱性的水体中，当 pH 值大于 6.3 时，碳酸氢根占优势。将培养基的 pH 值分别设定为 6.37、7.37、8.37、9.37、10.37，接种后置于摇床培养，24℃连续培养，转速为 100rpm，光强为 $64\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，每日固定时间取样测定水华束丝藻的生长。由图可见，起始 pH 值在 6.37-10.37 之间时，水华束丝藻皆能维持较好的生长，pH 值较低时，藻细胞因碳源充足可维持长时间的高密度生长，pH 值较高时，藻细胞可较快适应生长环境并达到对数生长期，随着藻细胞中次级代谢产物的释放和硝酸根离子的利用，培养液 pH 值逐渐升高。

细胞增长缓慢时培养液中 pH 值有所下降, 可见培养液中 pH 变化与细胞生长有一定的对应关系。从最终生长密度看, 水华束丝藻在 pH 值较低环境下可获得较好的生长, 随着 pH 值上升, 生长密度降低, 所以在实验范围内, pH6.37 为水华束丝藻生长的最适条件。

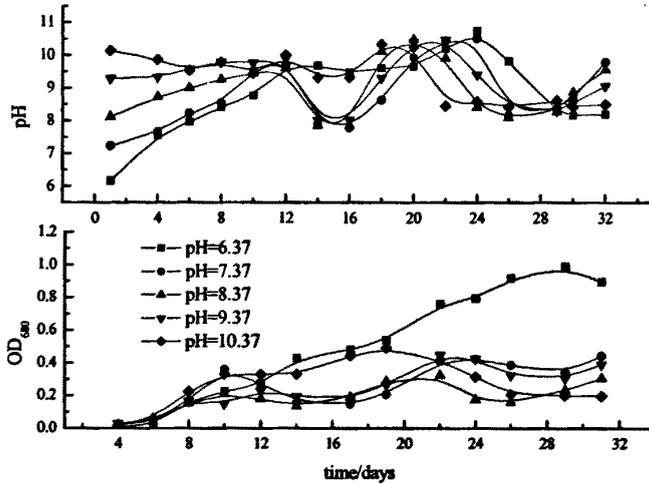


图 3-3 起始 pH 值对水华束丝藻生长的影响

Fig.3-3 Effect of initial pH value on the growth of *Aphanizomenon flos-aquae* and pH changes in the medium

3.4 氮源对生长的影响

氮元素大约占蓝藻细胞干重的 5-10%^[40], 对微藻的细胞组成和生长起着一份重要的作用。其他条件不变, 改变培养基中无机氮源的种类及浓度, 氮源浓度分别为: 0g/L NaNO_3 , 0.5g/L NaNO_3 , 1g/L NaNO_3 , 1.5g/L NaNO_3 (BG11), 以及 1g/L NH_4Cl , 考察其对水华束丝藻生长的影响。培养条件: 光强 $64\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 转速 100rpm, 24°C 连续培养, 固定时间测定细胞生长密度。结果如图所示。

由图可见, 含 NO_3^- -N 的培养条件下, 细胞生长速率和最终生物量都大大高于 BG11₀ 培养基中藻细胞, 但氮源浓度过高反而有一定的抑制作用, 由结果可见 0.5g/L NaNO_3 是比较适合的 NO_3^- -N 浓度。以铵基氮为氮源的生长条件下, 藻细胞无法直接利用培养基中 NH_4^+ , 几乎没有细胞生长。这可能与铵的积累抑制了藻类氨基酸的合成有关。有文献报道^[63], 当 NH_4^+ -N 的浓度达到 $30\text{-}46.5\mu\text{mol/L}$ 时, 高浓度的铵抑制了氮的同化作用。本实验结果则显示铵离子对水华束丝藻生长的抑制是彻底的, 说明 NH_4^+ 对水华束丝藻细胞有一定毒性。

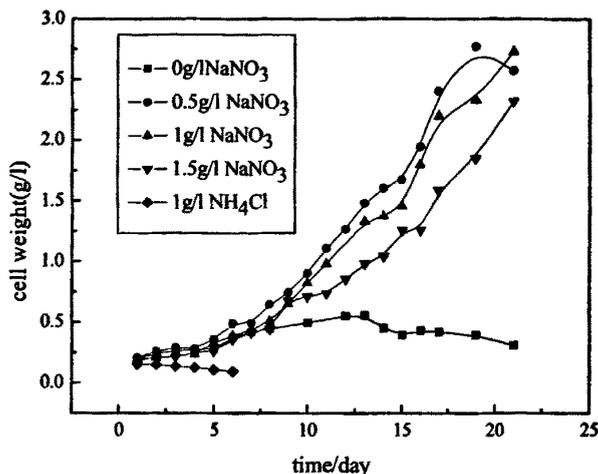


图 3-4 不同氮源对水华束丝藻生长的影响

Fig.3-4 Effect of nitrogen sources on the growth of *Aphanizomenon flos-aquae*

统计异形胞出现频率可见,水华束丝藻在培养基中氮源缺乏的条件下有一定的固氮能力,当培养基中氮源浓度为 0 时,藻丝体缺乏结合态氮供细胞代谢,调控分化异形胞进行固氮作用提供生长必需氮源。BG11₀ 培养基中生长第四天可观测到异形胞分化,随着 NO₃⁻ 浓度增加,异形胞出现频率降低,当 NaNO₃ 含量达到 1.5g/L 时,基本观测不到异形胞出现,说明培养液中的结合态氮对异形胞的分化有一定的抑制作用。

表 3-1 NO₃⁻-N 浓度与异形胞分化比例的关系Table 3-1 Effect of NaNO₃ concentrations on heterocyst frequency of *Aphanizomenon flos-aquae*

NaNO ₃	Heterocyst frequency(%)									
	6days	7days	8days	9days	10days	11days	12days	13days	14days	
0g/l	1.27	4.89	5.23	2.48	1.17	1.48	2.31	2.56	4.87	
0.5g/l	0.92	1.18	2.45	0.62	0.60	0.69	1.06	0.73	0.28	
1g/l	none	none	0.38	0.60	0.56	0.28	none	0.26	0.30	
1.5g/l	None									

3.5 不同通气量对水华束丝藻的影响

将藻种接种于装有 BG11 培养基的气升式光生物反应器中,光照强度 54.6 μmol m⁻²s⁻¹, 培养温度 24℃, 通过微型气泵提供空气, 改变气体流量, 在不同的通气条

件下培养，定时取样测定生物量，结果如图所示。由图可见，水华束丝藻在实验范围内皆能较好的生长，当通气量大于 1.0L/min 时，藻细胞生长速率减慢，可能由于过大通气对藻丝体产生了一定的剪切力，从细胞生长及耗能考虑，反应器培养采用 0.4L/min 通气量进行培养。

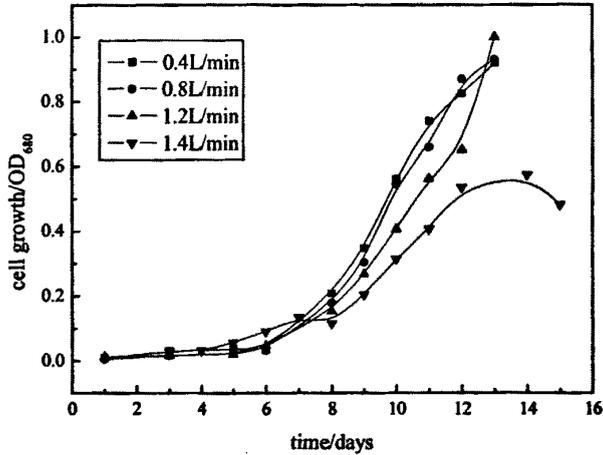


图 3-5 不同通气量对水华束丝藻生长的影响

Fig.3-5 Effect of air flow on the growth of *Aphanizomenon flos-aquae*

3.6 小结

不同培养条件下，水华束丝藻细胞的生长状态有所不同，本章主要探讨了温度、起始 pH 值、通气量等环境因素对水华束丝藻生长的影响，得出结论如下：

(1) 水华束丝藻在摇瓶中生长的可适应温度范围在 20-26℃ 之间，其中最佳生长温度为 23℃，该藻种的 pH 适应范围较广，当起始 pH 值在 6.37-10.37 之间时，水华束丝藻皆能维持较好的生长。利用气升式反应器对水华束丝藻进行培养，通气量为 0.4L/min 时，可获得较好的混合效果和较小的气体剪切力。

(2) 培养基中结合态氮源不足的条件下水华束丝藻可分化出异形胞进行固氮作用以维持细胞生长。含 NO_3^- -N 的培养条件下，细胞生长速率和最终生物量都大大高于 BG11₀ 培养基中藻细胞，但氮源浓度过高反而有一定的抑制作用，0.5g/L NaNO_3 是比较适合的 NO_3^- -N 浓度。

(3) 水华束丝藻无法直接利用培养基中的铵态氮，而且在含铵根离子培养基中不存在生长分化，说明培养基中铵根离子对水华束丝藻生长有较强的抑制作用。

第四章 光合碳代谢对氮代谢的影响及相互作用

水华束丝藻 943 是一种丝状体固氮蓝藻，同时具有光合放氧和厌氧固氮的功能。在氮源缺乏的情况下，可形成特定的固氮场所异形胞，直接固定大气中的分子态氮气，形成藻细胞可以利用的单质化合物。异形胞出现的位置不定，一般位于藻丝体中间。异形胞和营养细胞相互依赖，异形胞为营养细胞提供氮源，营养细胞为异形胞输送碳架化合物和还原力。

4.1 无机碳对水华束丝藻碳代谢的影响

4.1.1 无机碳种类和浓度对水华束丝藻生长和异形胞分化的调控

将水华束丝藻 943 接种于装有含氮的 BG11 培养基的气升式光生物反应器中，通入 CO_2 量分别为 0, 1%, 3%, 5% 以及在培养基中添加 10mmol/L NaHCO_3 ，并添加 20mmol/L HEPES-NaOH 缓冲剂维持培养基 pH 值，培养中光照强度为 $54.6\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，通气量为 0.4L/min，培养温度为 23°C ，定时取样，测定细胞生长速率和培养基中硝酸根的含量，并在显微镜下观察细胞形态，统计样品中异形胞出现频率。

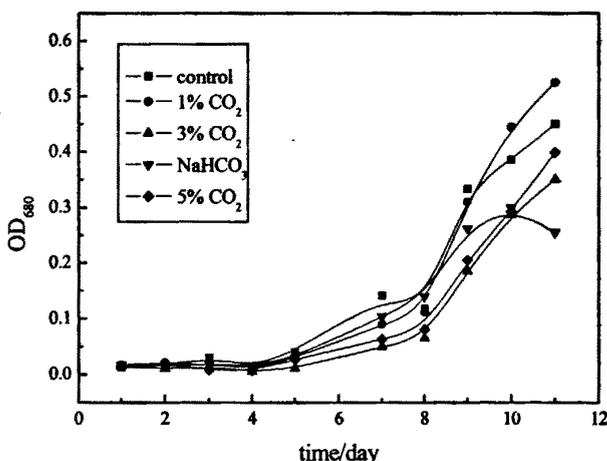


图 4-1 不同无机碳源对水华束丝藻生长的影响

Fig.4-1 The growth of *Aphanizomenon flos-aquae* cells during the cultivation under different carbon sources

不同条件下水华束丝藻 943 的细胞生长曲线如图所示。实验中发现，在生长初期，通入 CO_2 对藻细胞生长影响不大，随着生长过程中藻细胞密度增加，无机

碳的利用速度加快, CO_2 浓度可能成为生长限制因素, 表现为补加 CO_2 的培养罐细胞生长速率加快。但是通入过高的 CO_2 , 反而对细胞生长有所抑制。有可能是 CO_2 浓度升高加快了光和作用, 但是 Rubisco 活性位点都被底物包围后^[64], 即使再增加 CO_2 浓度, 可能也不会增加细胞的生长速率, 这时的 CO_2 浓度是微藻生长的饱和点, 而 CO_2 通入不可避免导致过低的 pH 值, 可能对藻细胞生长代谢相关酶活有一定抑制作用。说明蓝藻细胞只有维持碳氮代谢平衡时, 有利于藻细胞的生长。

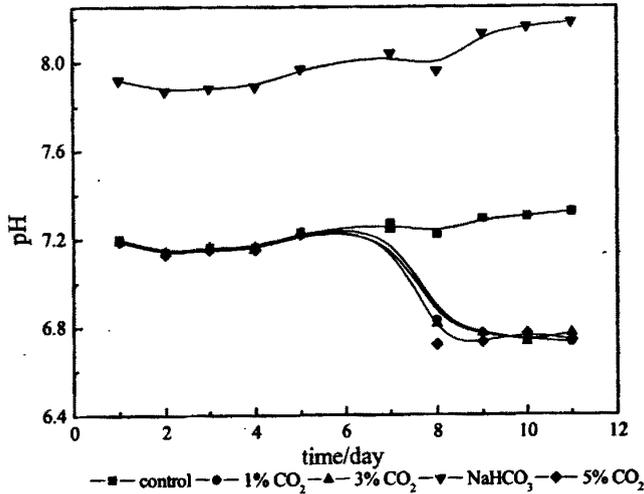


图 4-2 不同生长条件下藻液 pH 变化

Fig.4-2 Changes of pH of medium during different cultivate conditions

在培养过程中, 利用光学显微镜观察水华束丝藻细胞中异形胞的分化数量。流加 3% CO_2 条件下生长的藻细胞在生长第六天出现异形胞, 并在随后两天达到最大值, 与文献报道的鱼腥藻在缺氮条件下 8-12 小时分化异形胞相比, 分化时间较长, 且异形胞比例不高, 但仍可以看出, 高浓度 CO_2 条件下异形胞的分化比例较大, 而 NaHCO_3 对异形胞的分化作用很小, 说明藻细胞对 CO_2 和 NaHCO_3 这两种无机碳源在利用途径上有一定差异。

表 4-1 不同条件下水华束丝藻 943 异形胞的发生频率

Table 4-1 Heterocyst frequency of *Aphanizomenon flos-aquae* exposed to different concentrations of inorganic carbon

Conditions	Heterocyst frequency(%)					
	6d	8d	10d	13d	14d	15d
Air only	none	none	none	none	0.16	none
1% CO_2	none	0.28	0.35	none	0.50	0.27

3% CO ₂	0.54	3.12	0.60	0.85	0.34	0.19
5% CO ₂	0.32	0.78	1.25	3.31	3.04	2.64
NaHCO ₃	None					

同时测定不同碳源生长条件下藻液中 NO₃⁻含量, 结果如下。图中 NO₃⁻消耗曲线表明培养基中无机氮源供给充足, 至生长结束剩余浓度为 13mmol/L, 可见, 藻细胞在生长过程中仅消耗了小部分培养基中的结合态氮源, NO₃⁻消耗速率较低, 至反应结束培养基中仍有大量硝态氮剩余, 所以排除因环境中氮源不足而产生异形胞, 异形胞的分化原因只可能是由于胞内碳氮比的改变引起的。

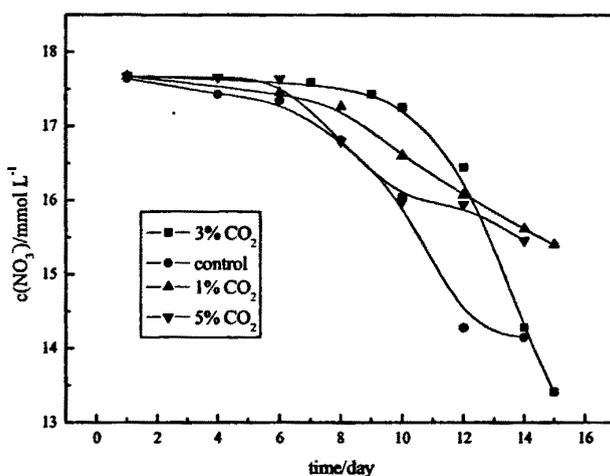


图 4-3 不同碳源含量下培养基中硝酸根消耗曲线

Fig.4-3 Changes of NaNO₃ concentrations in the medium during the cultivation of *Aphanizomenon flos-aquae* under different carbon sources.

4.1.2 无机碳对水华束丝藻硝酸根吸收速率的作用

藻细胞对培养液中氮源的利用首先须将结合态氮转运入细胞, 为具体考察不同浓度 CO₂ 对实验藻种对氮源的利用, 测定不同条件下水华束丝藻对培养基中 NO₃⁻的吸收速率。将水华束丝藻在不同的培养条件下于光生物反应器中培养, 收集对数期细胞, 分别加入浓度不同的 NaNO₃, 在原始培养条件下培养 60 分钟后, 离心除去藻细胞, 测定上清液中 NO₃⁻的浓度。

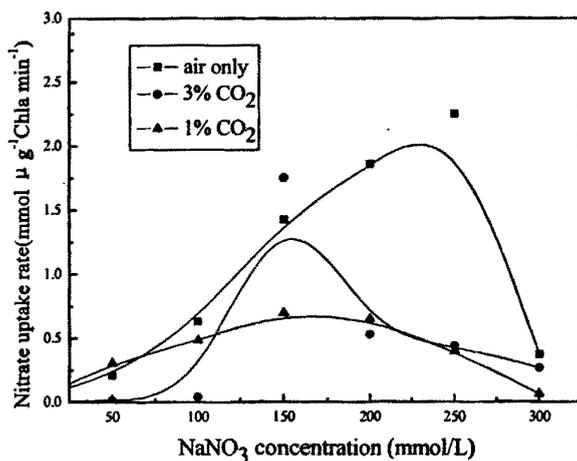


图 4-4 不同碳源下对藻细胞的 NO_3^- 吸收速率随 NaNO_3 浓度的变化曲线

Fig.4-4 Nitrate uptake rate of *Aphanizomenon flos-aquae* cultivated with different carbon sources

由图可以看出，在实验范围内，硝酸根浓度的增加可增加其吸收速率，但过高的底物浓度会降低微藻的吸收速率，无机碳的添加则可在一定范围降低 NO_3^- 的吸收，这可能是高 CO_2 浓度下细胞异形胞发生频率较高的原因。

同时，藻类对 N 源的吸收作用也受无机碳源的种类和浓度的影响。一般认为，氮源在蓝藻的氮代谢中，必须以氨的形式与藻细胞中的碳水化合物衍生的酮酸相作用，生成氨基酸^[31]，该利用过程要把高度氧化态的硝酸盐中的氮还原后才可供细胞利用，该反应需消耗藻类呼吸作用产生的能量，与 CO_2 竞争电子和能量方面处于劣势，由下图可以看出，随着 CO_2 浓度的增加，细胞 NO_3^- 吸收速率降低，可能是因为在低 N 的条件下， NO_3^- 同化所需的能量比高 N 的少。并且，无机碳浓度对硝酸根吸收速率的影响也因碳源种类的不同而不同。由图可见，随着二氧化碳含量的增加，藻细胞对硝酸根的吸收速率逐渐减少，当二氧化碳含量达到 5% 时，吸收速率有所增加。而 NaHCO_3 浓度较低时， NO_3^- 吸收速率随着 NaHCO_3 浓度的增加略有提高，但是过高的 NaHCO_3 浓度对 NO_3^- 吸收速率有较强的抑制作用。总的来说，添加无机碳源后的硝酸根吸收速率比正常条件下培养的藻细胞吸收速率有所下降。

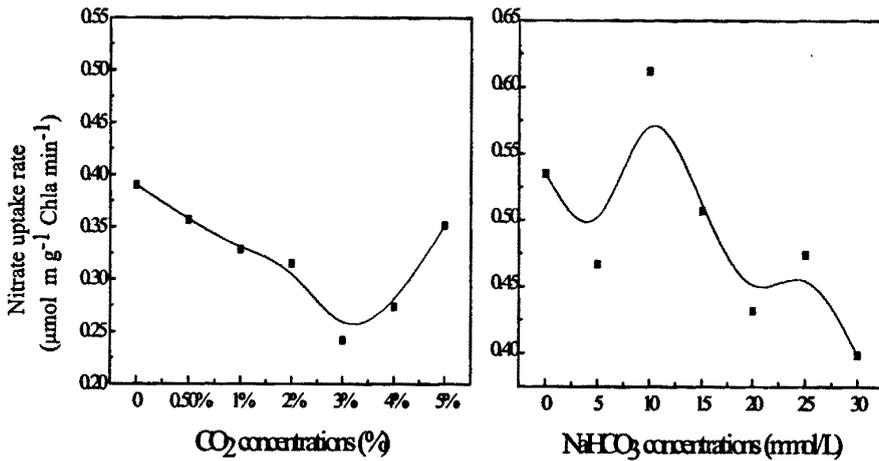


图 4-5 藻细胞的 NO_3^- 吸收速率随 CO_2 和 NaHCO_3 浓度的变化曲线

Fig.4-5 Initial rate of nitrate uptake rate by *Aphanizomenon flos-aquae* cells exposed to CO_2 or NaHCO_3

4.1.3 不同无机碳条件下水华束丝藻细胞中硝酸还原酶的活性

NO_3^- 被藻细胞吸收后, 先被硝酸还原酶催化还原为亚硝酸根, 再在亚硝酸还原酶的作用下还原为铵根离子, 与碳架结合为氨基酸, 供细胞利用。在此还原过程中, 每形成一个分子的 NH_4^+ 需要共给 8 个电子。其中主要限速酶为硝酸根还原酶^[65]。所以测定了不同碳源条件下藻细胞中硝酸还原酶活性。将水华束丝藻 943 接种于 BG11 培养基中, 气升式光生物反应器 $54.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 23°C 培养。细胞生长到对数期后收集部分细胞并制备细胞提取液测定其中的硝酸还原酶活性。

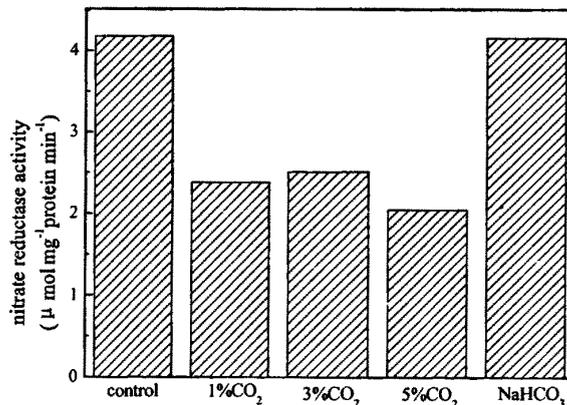


图 4-6 不同碳源条件下水华束丝藻 943 细胞中硝酸还原酶活性

Fig.4-6 Nitrate reductase activity of *Aphanizomenon flos-aquae* exposed cells to CO_2 or NaHCO_3

实验结果表明, 高 CO_2 浓度下生长的藻细胞中的硝酸还原酶活性与空气中生

长相比有所降低，而添加 NaHCO_3 对酶活影响较小，硝酸还原酶是一种诱导酶，其电子供体为铁氧还蛋白，细胞内硝酸根对硝酸还原酶活性有一定的正调控作用，根据 CO_2 浓度对硝酸根吸收速率的影响，可以推测，可能因为高浓度的 CO_2 对细胞吸收 NO_3^- 有一定的抑制作用，导致酶作用底物不足，从而使硝酸酶活性下降。

4.1.4 不同无机碳条件下水华束丝藻细胞中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性

蓝藻细胞中光合作用的产物代谢主要通过氧化的磷酸戊糖途径，其中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶为该途径的限速酶^[20]，测定不同培养条件下藻细胞中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性，并与异形胞出现频率进行比较。

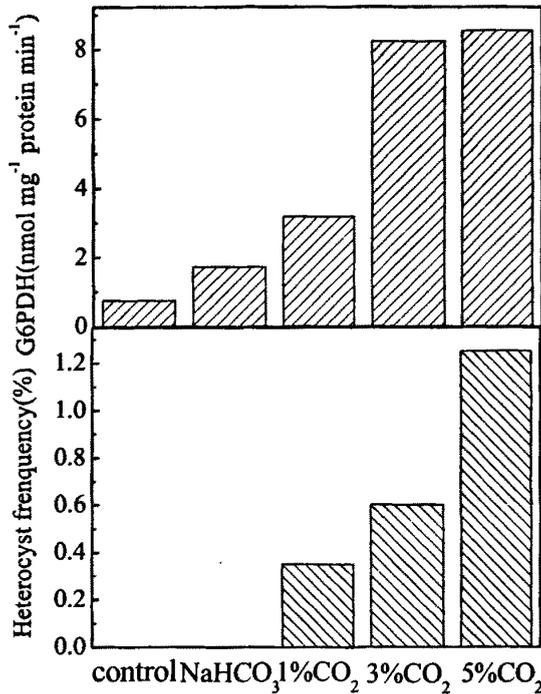


图 4-7 水华束丝藻异形胞出现频率与 6 磷酸葡萄糖脱氢酶活性关系

Fig. 4-7 The relevance between G6PDH activities and heterocyst frequency of *Aphanizomenon flos-aquae* exposed cells to different carbon conditions

将水华束丝藻 943 接种于 BG11 培养基中，改变无机碳源，在气升式光生物反应器对藻细胞进行培养，光照为 $54.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，温度 24°C 。培养进行到对数生长期(第 10 天)，取样进行测定。与异形胞发生频率对比可知，6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性变化较明显，随着异形胞频率增加而增高，可能由于较高的脱氢酶活性可使异形胞内保持严格的无氧或还原状态^[66]。

4.1.5 不同无机碳条件对水华束丝藻光合作用的影响

影响光合作用强度的因素主要有光照强度, CO_2 浓度, 温度及营养元素。 CO_2 是藻细胞进行光合作用的原料, 只有当环境中的 CO_2 达到一定浓度时, 藻细胞才能进行光合作用。在一定范围内, 植物光合作用的强度随 CO_2 浓度的增加而增加。利用光生物反应器对水华束丝藻 943 在不同无机碳源条件下培养, 取对数生长期细胞测定不同光强下的光合放氧速率。

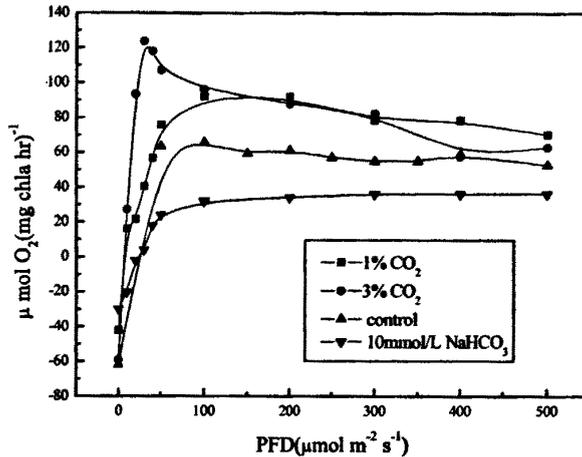


图 4-8 不同碳源条件下水华束丝藻细胞的光合作用强度

Fig.4-8 Representative curves of photosynthesis of *Aphanizomenon flos-aquae* exposed to different carbon conditions

由上图可以看出, 添加 NaHCO_3 对藻细胞的光合活性有所抑制, 但随着 CO_2 浓度的升高, 微藻最大净光合速率和光饱和点都升高了, 说明在一定范围内, 藻细胞的光合放氧速率随环境 CO_2 浓度增加而增加。且在低光强下对光合作用促进显著。有人认为^[30]提高植物光合速率的原因之一是 CO_2 浓度升高可显著改善光合作用原初光能转换, 使 PSII 光化学活性、PSII 原初光能转换效率、PSII 总的光化学量子产量得到提高, 并增加了 PSn 光合电子传递能力, 降低了非辐射能力耗散, 从而有利于把所捕获的光能较充分地转化为化学能, 为光合碳同化提供更充足的能量和还原力。随着光强的增加, CO_2 浓度为 3% 时, 藻细胞光合活性有所降低, 说明在本实验条件下, 1% CO_2 浓度是藻细胞较适宜的生长环境。

4.1.6 水华束丝藻细胞中总蛋白和总糖的测定

收集不同培养条件下藻细胞, 分别用 lowery 法和硫酚法测定藻细胞中总蛋白和总还原糖含量, 并分别计算总测定值与其在单位藻体重量中所占比例。许多研

究表明,培养基中氮的水平是影响微藻生化成分的最主要因素。当氮含量较低时,微藻细胞内蛋白质减少,而脂肪和碳水化合物增加。有下图可知,水华束丝藻 943 藻细胞中总蛋白质含量所占比例比可溶性总糖大得多,在 CO_2 作用下,细胞总糖含量有增加的趋势,但整体趋势不明显。

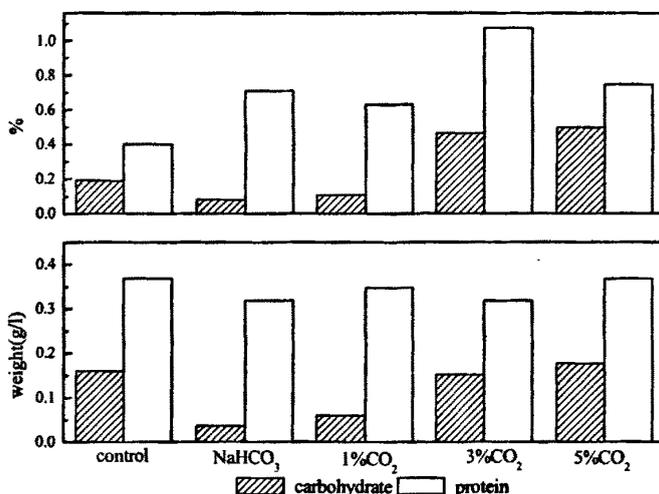


图 4-9 不同无机碳浓度下水华束丝藻的生化组成

Fig.4-9 Biochemical composition of *Aphanizomenon flos-aquae* cells exposed to different carbon conditions

4.1.7 水华束丝藻细胞的碳氮比测定

碳氮比又称“碳氮比率”、“碳氮比值”。有机物质中碳和氮含量的比例,以 C/N 表示。离心收集不同培养条件下生长的水华束丝藻细胞,经去离子水洗涤后取藻细胞进行冷冻干燥,获得冻干的藻粉,分别用凯氏定氮仪和 TOC 仪测定细胞中总碳和总氮的含量,每个样品重复三次实验,并分别计算单位质量藻粉中其碳氮摩尔比,得到结果如下图所示。可见水华束丝藻细胞的碳氮比一般在 2-8 之间,其中随着 CO_2 浓度的升高碳氮比有所增加。通入 5% CO_2 生长的藻细胞碳氮比结果对比高出 1 倍,细胞内碳氮比升高失衡是造成异形胞分化的主要原因,间接证明了藻细胞在高 CO_2 生长环境中胞内 N 吸收作用是受到抑制的。

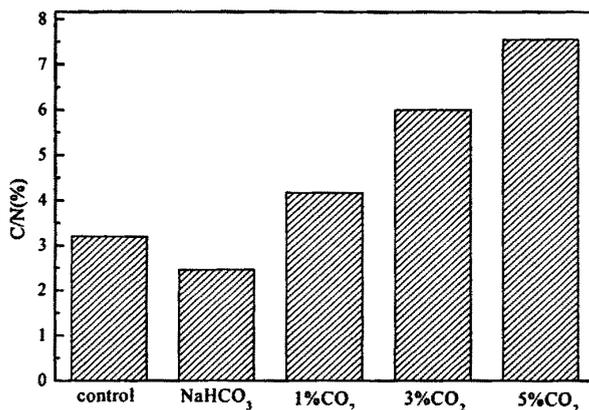


图 4-10 不同无机碳浓度下生长的水华束丝藻的碳氮比

Fig.4-10 The C/N ratio of *Aphanizomenon flos-aquae* exposed to different carbon conditions

4.1.8 水华束丝藻藻液中 2-酮戊二酸含量的测定

通过测定不同无机碳培养条件下水华束丝藻细胞中 2-酮戊二酸的积累量,并与异形胞分化频率进行比较,并除去叶绿素含量排除细胞数干扰,观察两者之间是否有一定的对应关系,结果如下图。可看出异形胞的分化频率与 2-酮戊二酸积累量有一定的相关性。其中二氧化碳浓度为 5% 和 3% 的 2-酮戊二酸积累量都大大高于对比条件下的藻细胞积累量,添加 NaHCO₃ 对酮戊二酸的积累基本无影响。

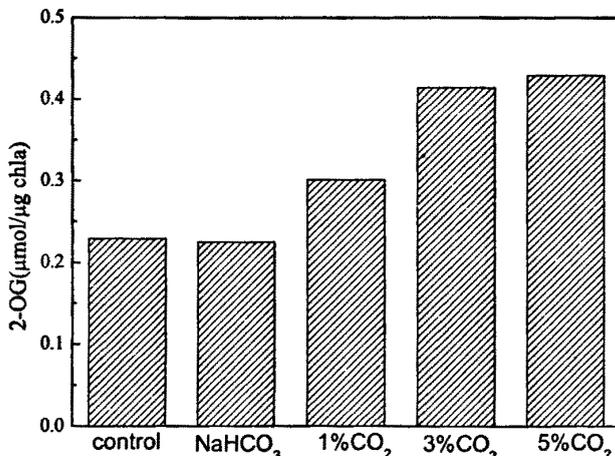


图 4-11 不同无机碳浓度下生长的水华束丝藻的 2-酮戊二酸含量

Fig.4-11 2-Ketoglutarate concentrations of *Aphanizomenon flos-aquae* exposed to different carbon conditions

2-酮戊二酸是蓝藻细胞碳代谢的重要中间产物。Muro-Pastor 等人^[68]发现在单细胞蓝细菌中,2-酮戊二酸水平可反应菌体氮源的可获得性。研究显示,在 *Anabaena*

PCC 7120中,通过2-酮戊二酸渗透酶来提高细胞2-酮戊二酸的浓度可以有效增加异形胞分化的现象^[69-70]。正常情况下,氮源的缺乏可诱导异形胞的分化,而8小时内恢复氮源,正在分化的异形胞可以回复为营养细胞,但如果过了这个时间段,异形胞的分化不再回复为营养细胞。研究表明,细胞内2-酮戊二酸水平的增加可以使分化的可逆时间段缩短。并且在异形胞的分化时期往培养基中加入2-酮戊二酸,可大大增加异形胞的分化量。说明细胞中2-酮戊二酸的积累对异形胞的发育有一定的调控作用。

4.2 盐浓度对异形胞分化的影响

4.2.1 不同碳源对高盐浓度下水华束丝藻的生长影响和异形胞分化

将水华束丝藻 943 接种于含 10mmol/L NaCl 的 BG11 培养液中,改变加入无机碳条件,分别通入 1%、3%CO₂ 及 10mmol/L NaHCO₃, 在光生物反应器中进行培养,定时取样并测定生长参数,结果如图所示。

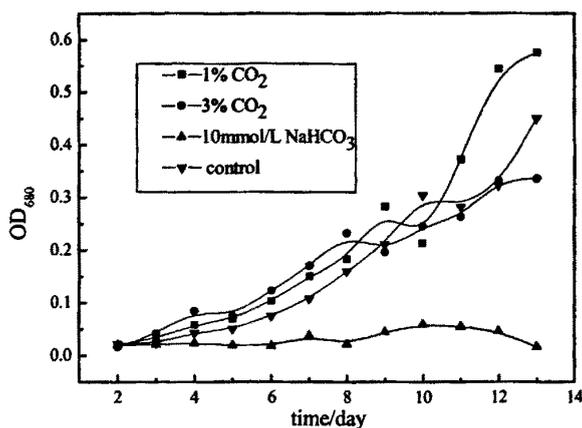


图 4-12 不同无机碳源对水华束丝藻在高盐浓度培养基中生长的影响

Fig.4-12 Growth of *Aphanizomenon flos-aquae* cells in the BG11 medium with high NaCl concentration during the cultivation under different carbon sources

取对数生长期样品计数并计算异形胞比例,并与正常 BG11 培养基中生长结果进行比较。经观察,显微镜下可见藻丝体中形成明显的异形胞,一般位于藻丝体中间,与 BG11 培养基中生长藻细胞相比异形胞数目略有增加。其中 NO₃⁻的吸收是由 Na⁺电化学梯度驱动的 Na⁺/NO₃⁻协同系统完成的^[71],NO₃⁻的吸收对 Na⁺浓度有较强的依赖性,当培养液中 Na⁺浓度较高时,细胞内过多的 Na⁺将会造成生物系统的伤害,生物体则会采用相应的机理阻止 Na⁺进入细胞^[72],如质膜对 Na⁺低的渗透

性，消耗能量主动排出 Na^+ 等。位于质膜上 Na^+/H^+ 传递体主动将 Na^+ 排出细胞质，同时 H^+ 进入细胞内，在蓝藻光合机构的盐适应过程中起着很重要的作用。

除此以外，盐浓度较高时，蓝藻象许多高等植物一样，积累一些渗透调节物质，如无机离子 K^+ ，有机溶质蔗糖等^[73,74]，这些渗透调节物质在植物和藻类的耐盐过程中起重要作用，因此，细胞内氮源缺乏可能是胞内为维持必要的渗透压积累渗透保护物质和质膜离子泵的共同作用造成的。

表 4-2 不同无机碳源含量对含 NaCl 培养基中异形胞出现频率的影响

Table 4-2 Heterocyst frequency of *Aphanizomenon flos-aquae* in the BG11 medium with high NaCl concentration during the cultivation under different carbon sources

Condition	Heterocyst frequency(%)	
	BG11	BG11+ NaCl
Air	None	Occasionally observed
1% CO_2	0.35	0.67
3% CO_2	0.60	1.15

4.2.2 不同盐浓度对硝酸根吸收速率的影响

取对数生长期藻细胞，BG11₀ 培养基洗涤三遍后测定不同盐浓度条件下细胞对 NO_3^- 的吸收速率。在盐浓度较高的生长条件下，有些蓝细菌能随着 Na^+ 供应的增加而增大对 N 元素的吸收，以保证能较好的保持营养元素的平衡。由下图可以看出，随着培养基中 NaCl 浓度的增加，藻细胞对 NO_3^- 的吸收速率逐渐增加，在 30mmol/L 处达到最大值，然后随盐浓度增加吸收速率下降，说明在盐浓度较高的生长条件下，由于细胞中渗透性物质的积累，对 N 元素的需求导致 NO_3^- 的吸收速率增加，但可能由于能量的载体的限制，仍有一部分营养细胞分化为异形胞固定游离态氮供细胞利用。

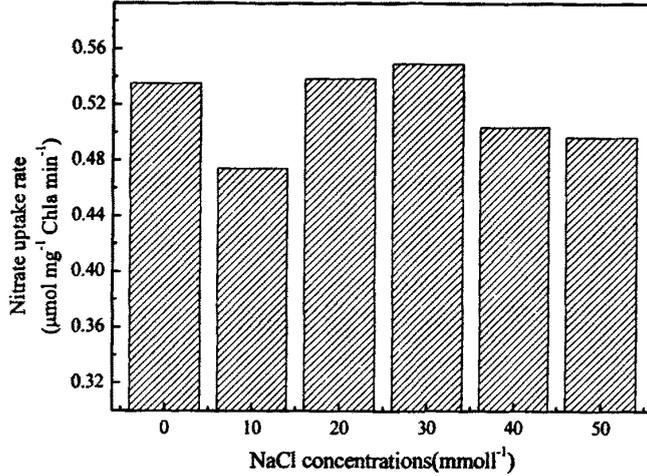


图 4-13 不同盐浓度对水华束丝藻细胞 NO₃ 吸收速率的影响

Fig.4-13 Initial rate of nitrate uptake rate by *Aphanizomenon flos-aquae* under different concentration of NaCl

4. 2. 3 不同无机碳对高盐浓度下藻细胞中硝酸还原酶活性的影响

收集对数生长期细胞，测定其硝酸还原酶活性。结果与在不含 NaCl 培养基中生长的藻细胞相比，硝酸还原酶活性有所增加，由于硝酸还原酶是一种底物诱导酶，所以可以说明在 Na⁺ 作用下，胞内吸收 NO₃⁻ 量与不加 NaCl 的 BG11 培养条件下有所增加，而通入一定量的 CO₂ 则对酶活性有抑制作用，具体通入 CO₂ 量与抑制效果之间的关系从图上看尚不明确。

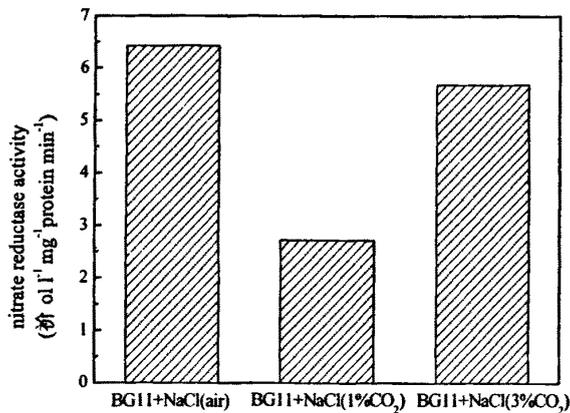


图 4-14 不同碳源对高盐培养基中藻细胞中硝酸还原酶活性的影响

Fig.4-14 Nitrate reductase activity of *Aphanizomenon flos-aquae* in the BG11 medium with high NaCl concentration during the cultivation under different carbon sources

4.2.4 不同无机碳对高盐浓度下藻细胞中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性的影响

收集对数生长期细胞测定其中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性。结果表明，仅通空气时，酶活几乎检测不到，增加 CO_2 通入量后，酶活随之增加。与异形胞出现频率进行比较，结果表明，6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性随着异形胞的数量相应变化，高 CO_2 浓度下生长的藻细胞中 6-磷酸葡萄糖活性较强，对应分化频率较高的异形胞比例，进一步证明了异形胞细胞内具有较高的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性。

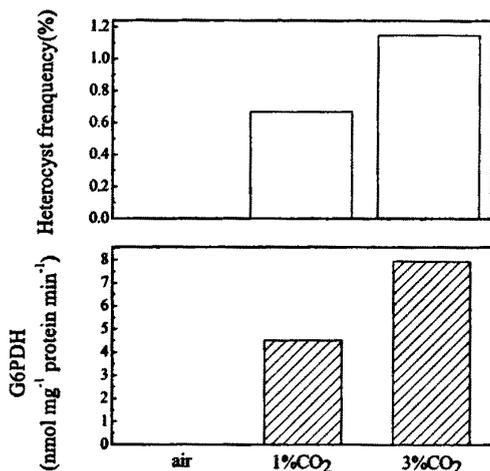


图 4-15 高盐培养基中水华束丝藻异形胞出现频率与 6 磷酸葡萄糖脱氢酶活性关系

Fig.4-15 The relevance between G6PDH activities and heterocyst frequency of *Aphanizomenon flos-aquae* in the BG11 medium with high NaCl concentration during the cultivation under different carbon sources

4.3 小结

固氮蓝藻在可利用氮源缺乏的环境条件下，可分化出异形胞专一执行固氮作用为营养细胞提供氮源。异形胞的分化受多种环境因素影响，最终表现为细胞内碳氮比失衡。通过测定不同碳源条件下水华束丝藻的生长状态，异形胞分化频率以及代谢过程关键酶等参数，探讨不同种类和含量碳源对实验藻中氮代谢的影响，主要得出结论如下：

(1) 在培养基中 NO_3^- 充足的条件下添加一定流量的 CO_2 ，随着 CO_2 浓度的增加，异形胞的出现频率有所增加，并测定不同 CO_2 浓度下藻细胞对硝酸根离子的吸收速率发现， CO_2 浓度升高时，硝酸根离子吸收受到抑制，同时 CO_2 扩散加剧

了藻细胞内碳氮比失衡，从而诱导异形胞分化。而 HCO_3^- 的诱导作用较弱，实验中没有观察到添加 NaHCO_3 的培养基中有异形胞产生。

(2) 通过测定不同无机碳培养条件下水华束丝藻细胞中 2-酮戊二酸的积累量，并与异形胞分化频率进行比较，随着异形胞发生频率的增加，2-酮戊二酸的细胞积累量也有所增加，说明两者之间有一定的对应关系。

(3) 测定不同无机碳条件下培养的藻细胞的光合放氧速率，结果发现随着 CO_2 浓度的升高，微藻最大净光合速率和光饱和点都有所升高，说明在一定范围内，藻细胞的光合放氧速率随环境 CO_2 浓度增加而增加。

(4) 增加培养基中的 NaCl 浓度可提高异形胞的分化频率，说明过高的盐浓度使细胞内碳氮比有所增加。

第五章 无机碳浓度对小球藻和三角褐指藻生长的影响

小球藻(*Chlorella spp.*)是一类普生性单细胞绿藻,属于绿藻门(*Chlorophyta*),绿藻纲(*Chlorophyceae*),绿球藻目(*Chlorococcales*),卵囊藻科(*Oocystaceae*),小球藻属(*Chlorella*)。小球藻种类繁多,生态类型多种多样,在淡水、海水中均有分布,在人工培养基中也能很好生长。小球藻呈球形或椭球形,直径 $2\sim 12\mu\text{m}$ ^[76]。小球藻有薄而坚固的细胞壁,细胞壁的外面一般无粘质,但有时也会分泌粘质而使多个细胞粘在一起,显微镜下观察多为单个圆形细胞,也有 $5\sim 10$ 个细胞粘在一起。小球藻具有丰富、全面的营养成分和一定的生物活性成分。通常小球藻蛋白含量较高($55\%\sim 67\%$),具有较多的糖类($15\%\sim 20\%$)及脂类($5\%\sim 10\%$),其中,含有具有生物活性的藻多糖、植物生长因子、糖蛋白、糖脂蛋白、膳食纤维等。

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)属于硅藻门(*Bacillariophyta*)、羽纹藻纲(*Pennatae*)、褐指藻目(*phaeodactylales*)褐指藻科(*phaeodactylaceae*)、褐指藻属(*Phaeodactylum*),单细胞,有放射形、梭形和卵形三种形态^[75],海岸生、浮生及底生,属于一种低温品种,它不仅是近海初级生产力的主要贡献者,而且具有个体小、培养周期短、生长速度快、产量高、容易在人工控制条件下生长繁殖等特点,长期以来人们一直把它作为一种人工育苗的常规优良基础饵料,又因其具有较高的 EPA 含量而备受重视,且有报道称国外已用三角褐指藻生产抗氧化剂,因此它是水产养殖饵料生产和高价值活性产物开发利用的优质经济微藻,其中海洋微藻在受到环境胁迫后,如氮限制条件下会对微藻的化学组成产生影响,因此探讨不同碳源条件下藻细胞的环境氮源的利用规律对指导经济微藻的开发利用具有广阔的前景。

5.1 无机碳的种类和浓度对三角褐指藻生长的影响

利用分光光度计对三角褐指藻藻液进行多波长扫描,发现在 680nm 处有最大吸收峰,并显微计数后确定该波长下的吸光度与细胞数有较好的线性关系,所以可用 680nm 处的吸光度表征细胞密度。

5.1.1 三角褐指藻生长曲线的测定

利用光生物反应器对三角褐指藻培养并控制无机碳源含量。培养液为加富的 $f/2$ 海水培养基,起始 pH 值为 8.2,接种量为细胞密度为 6×10^7 个/mL 种子液,体积为 10%,恒温水槽控温 21.3°C ,通气量为 $0.4\text{L}/\text{min}$,光照强度 $44.5\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$,

添加 20mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)为缓冲剂, 定时取样测定其细胞密度。由图可见, HCO_3^- 对藻细胞的早期生长有较小的促进作用, 很快达到稳定期随后细胞密度降低, 三角褐指藻细胞在 CO_2 通入量为空气的 1%时获得最佳生长状态, 随着 CO_2 通入量的增加, 细胞生长速率稍有降低, 当 CO_2 浓度为 5%时细胞密度一直低于仅通空气状态下培养的细胞, 可能是由于通入过量 CO_2 导致培养基 pH 值迅速下降, 藻细胞生长速度减慢, 至对数期后有较多代谢产物释放, pH 值有所回升, 生长速率加快。

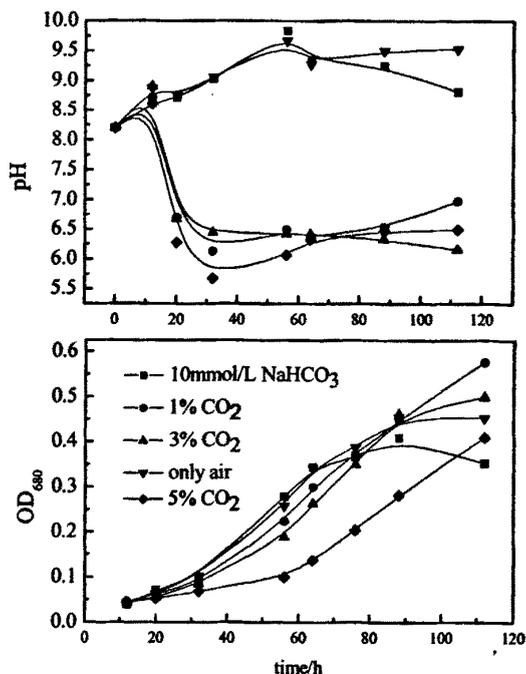


图 5-1 无机碳源对三角褐指藻生长的影响

Fig.5-1 The growth of *Phaeodactylum tricornutum* cells during the cultivation under different carbon sources

5.1.2 不同碳源下三角褐指藻细胞总蛋白和总糖的测定

收集不同培养条件下藻细胞, 分别用 lowery 法和硫酚法测定藻细胞中总蛋白和总还原糖含量, 分别获得总测定值与其在单位藻体重量中所占比例。由下图可以看出, 随着 CO_2 浓度的增加, 细胞中总糖含量有明显增加, 可见细胞对外加碳源利用较完全, 培养液中 HCO_3^- 对细胞中总糖生物合成的促进作用较大, 蛋白质变化趋势基本与总糖一致。

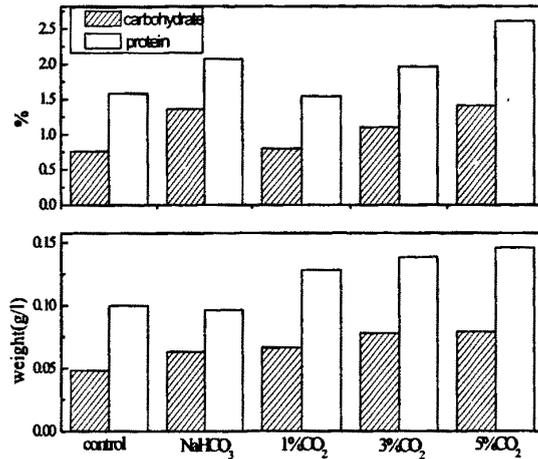


图 5-2 三角褐指藻细胞中总蛋白和总糖的含量比较

Fig.5-2 Biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* cells exposed to different carbon conditions

5.1.3 不同碳源下三角褐指藻细胞中碳氮比的测定

离心收集不同培养条件下生长的三角褐指藻细胞，经去离子水洗涤后取藻细胞进行冷冻干燥，获得冻干的藻粉，分别用凯氏定氮仪和 TOC 仪测定细胞中总碳和总氮的含量，每个样品做两个平行，并分别计算单位质量藻粉中其碳氮摩尔比，由图可以看出，与仅通入空气的对照相比，通入 3%和 5%二氧化碳的培养基中 C/N 有所增加。当 CO₂ 浓度为 1%时，藻细胞有较高的生长密度，而 C/N 较低。从整体看，CO₂ 通入量与细胞碳氮比关系规律性不强，可能由于 f/2 培养基中硝酸根含量仅为 1mmol/L，三角褐指藻细胞对环境中氮源利用率较低。

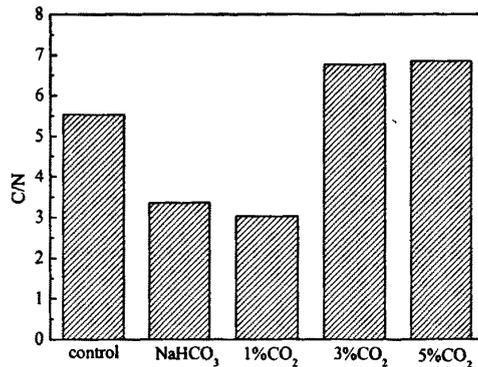


图 5-3 三角褐指藻在不同无机碳源条件下的细胞碳氮比

Fig.5-3 The C/N ratio of *Phaeodactylum tricornutum* cells exposed to

different carbon conditions

5.1.4 无机碳对三角褐指藻硝酸根吸收速率的作用

分别测定了不同含量的两种无机碳源对三角褐指藻硝酸根吸收速率的影响,其中测定条件下培养基中 NO_3^- 浓度为 1mmol/L 。由测定结果可以看出,随着通入 CO_2 浓度的增加,藻细胞对硝酸根的吸收速率呈下降趋势,说明高浓度的二氧化碳较强的抑制了藻细胞对硝酸根离子的吸收利用,与水华束丝藻的测定结果有一定的对应关系, HCO_3^- 对硝酸根的吸收利用作用不明显。

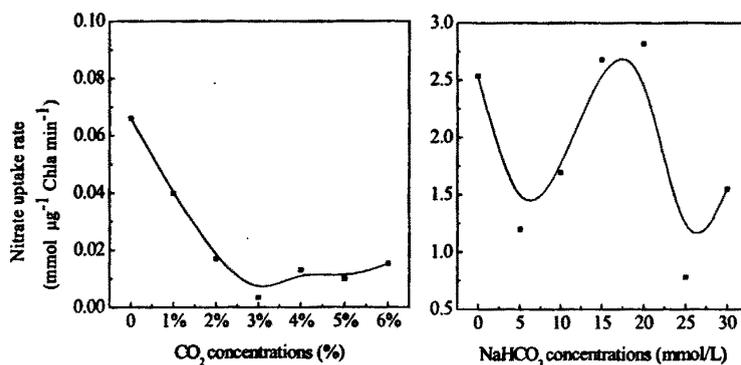


图 5-4 三角褐指藻细胞的 NO_3^- 吸收速率随 CO_2 和 NaHCO_3 浓度的变化曲线

Fig-5-4 Initial rate of nitrate uptake rate by *Phaeodactylum tricornutum* cells exposed to CO_2 or NaHCO_3

5.2 无机碳的种类和浓度对小球藻生长的影响

利用分光光度计对小球藻细胞溶液进行扫描,确定小球藻细胞溶液在 440nm , 630nm , 680nm 处都有吸收峰,其中 630nm 和 680nm 处的吸光度示数相同,且 630nm 处的吸光度和小球藻细胞密度有较好的对应关系。因此,选择小球藻细胞液在 630nm 处的吸光度表征藻细胞的生长状态。

5.2.1 小球藻生长曲线的测定

利用光生物反应器对小球藻培养,培养基为加氮的 BG11 培养基,起始 pH 值为 7.5,接种量为细胞密度 5×10^7 个/mL 的种子液,接种量为 10%,恒温水槽控温 23°C ,通气量为 0.4L/min ,光照强度 $44.5\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 连续培养,添加 20mmol/L

HEPES-NaOH(pH=7.5)为缓冲剂, 定时取样测定其细胞密度, 并作图可见, 无机碳源的添加对小球藻的细胞增殖有明显的促进作用, 随着通入 CO_2 浓度的增加, 小球藻细胞对数期繁殖速率升高, 在最适 CO_2 浓度下, 小球藻最大细胞密度可达到仅通空气的 1-2 倍, 而 HCO_3^- 的作用效果与 CO_2 类似。

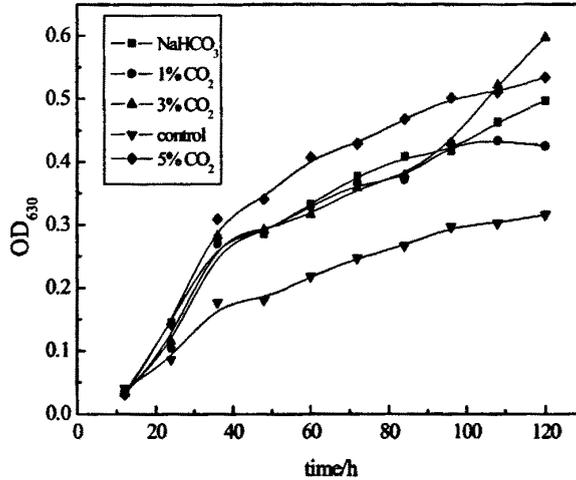


图 5-5 小球藻在不同无机碳源条件下的生长曲线

Fig.5-5 Growth of *Chlorella* cells during the cultivation under different carbon sources

5.2.2 不同碳源下小球藻细胞总蛋白和总糖的测定

胞内还原性总糖的测定: 收集不同无机碳源条件下培养的藻细胞, 离心并用新鲜的培养基洗涤后重悬浮, 冰浴超声破碎后, 破碎液在 5000rpm 离心后取上清液, 采用硫酚法测定可溶糖浓度, 通过标准曲线计算实际含量, 并计算出其在单位质量藻细胞中所占比例。胞内总蛋白的测定: 收集藻细胞并用不含缓冲剂的新鲜培养基洗涤后重悬浮, 冰浴超声破碎, 4000rpm 离心后取上清根据修正的 lowery 法测定。

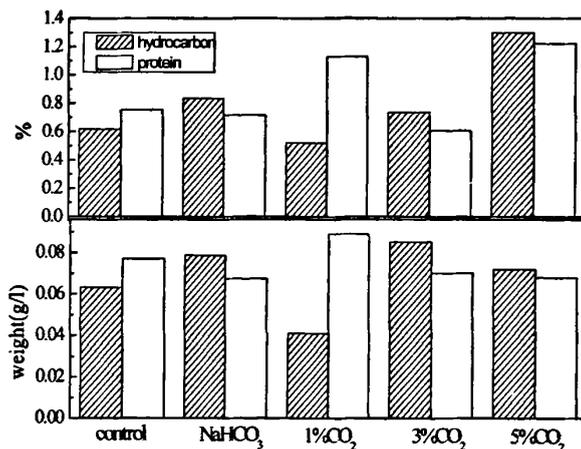


图 5-6 小球藻细胞中总蛋白和总糖含量及所占百分比

Fig.5-6 Biochemical composition of *Chlorella* cells exposed to different carbon conditions

可以看出, 小球藻中总还原糖的含量基本在 40-90 μ g/L 之间, 在细胞中所占比重随 CO₂ 浓度增加而升高。总蛋白含量则略高, 在 70-90 μ g/L 之间, 占细胞比重 0.6%-1.4%。蛋白质的生物合成与不同无机碳源之间的关系从图上看尚不明确。

5.2.3 不同碳源下小球藻细胞中碳氮比的测定

12000rpm 离心收集不同无机碳供给条件下生长的小球藻藻细胞, 经去离子水洗涤后取藻细胞进行冷冻干燥, 获得冻干的藻粉, 分别用凯氏定氮仪和 TOC 测定细胞中总碳和总氮的含量, 每个样品重复三次实验, 并分别计算单位质量占其碳氮摩尔比, 得出计算结果如图所示。可以看出, 不同条件下培养的小球藻细胞中 C/N 差异不大, 都在 3-5 之间, 在生长过程中补加无机碳源 CO₂ 的条件下, 随着 CO₂ 浓度的增加, 碳氮比略有增加, 可能是在 CO₂ 含量较高的条件下, 细胞的碳同化作用占有一定优势。

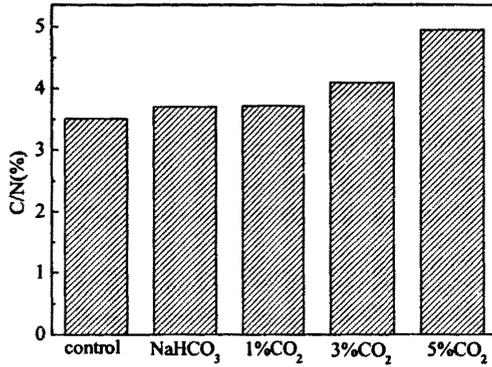


图 5-7 小球藻在不同无机碳源条件下的细胞碳氮比

Fig.5-7 The C/N ratio of *Chlorella* cells exposed to different carbon conditions

5.2.4 无机碳对小球藻硝酸根吸收速率的作用

控制二氧化碳流量和添加不同浓度的 NaHCO_3 ，分别测定这两种无机碳源对小球藻硝酸根吸收速率的影响，测定条件下培养基中 NO_3^- 浓度为 20mmol/L ，结果如下图所示。由图可以看出， CO_2 对小球藻的硝酸根吸收速率有明显的抑制作用，造成这一结果的原因可能是 CO_2 通过被动扩散进入小球藻细胞后，细胞内固定 CO_2 的速率升高，氮源同化与光合固碳过程存在竞争关系，从而导致藻细胞氮源利用速率降低。随着培养基中 NaHCO_3 浓度的增加，细胞对硝酸根吸收速率先达到最大值后呈下降趋势， HCO_3^- 和 NO_3^- 的吸收都有耗能的主动运输途径完成，所以可能 HCO_3^- 浓度的增加导致胞内碳氮比增加后，藻细胞增加硝酸根离子的吸收以维持稳定的碳氮比，但过高的 HCO_3^- 浓度对该吸收过程有反作用。

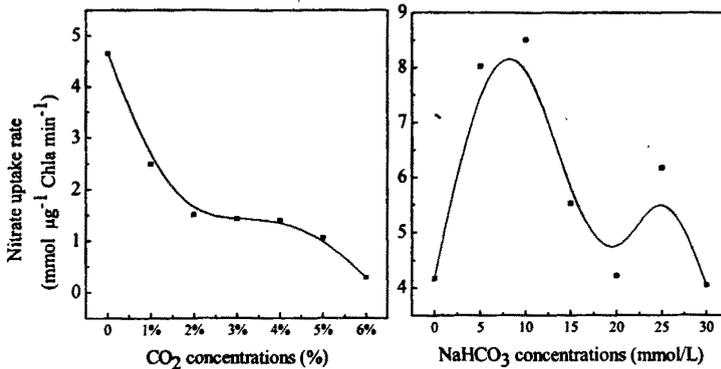
图 5-8 小球藻细胞的 NO_3^- 吸收速率随 CO_2 和 NaHCO_3 浓度的变化曲线

Fig.5-8 Initial rate of nitrate uptake rate by *Chlorella* cells exposed to CO₂ or NaHCO₃

5.3 小结

本章测定了不同无机碳条件下培养的三角褐指藻和小球藻的生物量、总碳、总氮、NO₃⁻吸收速率，探讨不同种类和含量的无机碳对这两种经济藻中生长的影响，并探讨通过测定水华束丝藻生理参数得出的结论的普遍性，得出结果如下：

(1) 在实验条件下，三角褐指藻细胞在 CO₂ 浓度为 1% 时细胞密度最大，随着 CO₂ 通入量的增加，细胞生长速率稍有降低，无机碳源的添加对小球藻的细胞增殖有明显的促进作用，小球藻细胞密度随 CO₂ 浓度的增加而增加，在最适 CO₂ 浓度下，小球藻最大细胞密度可达到仅通空气的 1-2 倍，同样 HCO₃⁻ 也有促进作用。

(2) CO₂ 对小球藻和三角褐指藻对硝酸根的吸收速率都有一定程度的抑制作用，说明这一结论有一定的普遍性。而 HCO₃⁻ 作用效果规律性不强，分别在 10mmol/L 和 20mmol/L 对小球藻和三角褐指藻的硝酸根吸收有最大促进作用。

第六章 结论与展望

本文以水华束丝藻 943 为研究对象,考察了不同无机碳源对蓝细菌细胞生长、色素积累、异形胞分化、蛋白质含量、光合作用特性以及某些碳氮代谢关键酶活性的影响,确定了二氧化碳浓度对可固氮蓝细菌异形胞分化频率的影响,比较了在不同浓度二氧化碳和碳酸氢钠为碳源条件下,藻细胞中碳氮代谢中间产物、碳氮比以及总蛋白、总糖等生理指数,并考查了不同无机碳源对经济藻种三角褐指藻和小球藻生长的影响,主要得出以下结论:

(1) 水华束丝藻在温度为 23-24℃、起始 pH 值为 6.37,以及 0.4L/min 的通气量下可以有较好的生长,培养基中适合的无机碳源和氮源比例有利于蓝藻细胞维持碳氮代谢间平衡,单独提高氮源(NO_3^- -N)或碳源(CO_2)都会影响藻细胞的生长。藻细胞无法直接利用培养基中的铵态氮,且在铵根离子存在的条件下细胞几乎不生长,说明铵根离子对细胞有较强的毒性。

(2) 在培养基中存在无机氮源条件下,通入 CO_2 可以诱导水华束丝藻细胞分化产生异形胞,异形胞的分化频率在一定时间与 CO_2 的通入量有对应关系,表现为随着 CO_2 通入量的增加而增加。同时测定硝酸还原酶及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性,结果显示,当 CO_2 含量增加时,硝酸还原酶活性有所下降,证明 CO_2 抑制藻细胞对 NO_3^- 的吸收利用。测定碳氮中间代谢产物 2-酮戊二酸在细胞中的积累,2-酮戊二酸的含量与异形胞的发生频率对应关系总趋势可表现为在异形胞发生频率较高的培养液中,2-酮戊二酸的含量相应增高。

(3) 提高培养基中 NaCl 浓度可以导致通入 CO_2 后异形胞频率提高。

(4) 改变无机碳源含量,对三角褐指藻和小球藻进行培养。三角褐指藻和小球藻分别在 1%和 3% CO_2 含量下达到最高生长速率, CO_2 对小球藻和三角褐指藻对硝酸根的吸收速率都有一定程度的抑制作用,说明该结论有一定普遍性。

本文通过测定异形胞的分化与碳氮条件变化的关系,通过流加无机碳 CO_2 测定细胞生理指数,进行了碳氮相互作用的研究,若能适用于其他经济藻种,并结论具有普遍性,将对微藻的生物利用和水华控制有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Jiri Komarek, L'ubomir Kovacik. Trichome structure of four *Aphanizomenon taxa*(Cyanophyceae) from Czechoslovakia, with notes on the taxonomy and delimitation of the genus[J]. Plant Systematics and Evolution,1989,164:47-64
- [2] Anderson D M. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In red tides: Biology[M]. Environment Science and Toxicology. New York: Elsevier, 1989,11-21
- [3] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, 3-6
- [4] 现代植物生理学指南[M], 科学出版社. 1999, 174-175
- [5] Serena Benedetti, Sara Rinalducci, Francesca Benvenuti, Sonia Francogli, Silvia Pagliarani, Luca Giorgi, Mauro Micheloni, Gian Maria D'Amici, Lello Zolla, Franco Canestrari. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*[J]. Life Sciences, 2004, 75:2353-2362
- [6] Serena Benedetti, Sara Rinalducci, Francesca Benvenuti, et.al. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*[J]. Journal of chromatography B. 2006, 833:12-18
- [7] Miyamoto E, Tanioka Y, Nakao T, Inui H, Fujita T, Watanabe F, Nakano Y. Purification and characterization of a corrinoid-compound in an edible cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* as a nutritional supplementary food[J]. J.Agric. Food Chem. 2006, 54(25): 9604-9607
- [8] 徐宁, 陈菊芳, 王朝晖. 广东大亚湾藻类水华的动力学分析(II)—藻类水华与营养元素的关系研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(4): 400-404
- [9] 张成武. 淡水蓝藻毒素研究概况[J]. 湖泊科学, 1992, 4(3): 75-78
- [10] Hans W Paerl, Joseph F. Ustach, Francesca Benvenuti. Blue-green algal scums: An explanation for their occurrence during freshwater blooms[J]. Limnol Oceanogr,27(2),1982: 212-217
- [11] Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, et al. Detection of microcystins, a blue-green algae hepatotoxin, in drinking water sampsed in hai men and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in china, by highly sensitive immunoassay[J]. Carcinogenesis, 1996,17:1317-1320
- [12] Shapiro J. Blue-green algae: Why they become dominant[M]. Science, 1973,179:382-384
- [13] 陈勇, 刘洁生, 杨维东. 水华束丝藻毒素对小白鼠血液学若干生理指标影响[J]. 卫生研究, 2003, 32(3): 195-198.
- [14] Wurtsbaugh, WA, et al. Iron in eutrophic Clear Lake, California: Its importance for algal nitrogen fixation and growth [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1983, 40(9):1419-1429.
- [15] Badger MR, Andrews TJ, Photosynthesis and inorganic carbon usage in the marine cyanobacterium[J]. Plant Physical, 1982, 70:517-523
- [16] Yoshimasa Yamamoto, Hiroyuki Nakahara. The formation and degradation of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* blooms: the importance of pH, water temperature, and day length[J]. Limnology,2005,6:1-6.
- [17] Shigeo Tsujimura, Kanako Ishikawa, Hajime Tsukada. Effect of temperature on growth of

- the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Biwa and Lake Yogo[J]. Phycological Research, 2001, 49(4):275-278
- [18] 金传荫, 何家菴, 朱家明等. 水华束丝藻 NH-5 株产生麻痹毒素几个相关问题的研究[J]. 水生生物学报, 2000, 24(1): 94-96
- [19] Adelama W Jr, et al. Sodium Channels Blocked by Aphantoxin Obtained From the blue-green Alga, *Aphanizomenon flos aquae* [J]. Toxicon, 1982, 20(20):513 -516
- [20] Michael A. Borowitzka, Lesley J. Borowitzka. Micro-algal biotechnology[M]. New York: Cambridge University Press, 1988. 135-151
- [21] 胡智泉, 刘永定, 何光源等. 微囊藻毒素对滇池水华束丝藻的溶藻效应研究[J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(9): 128-131
- [22] David J. Schaeffer, Phyllis B. Malpas, Larry L. Barton. Risk assessment of Microcystin in Dietary *Aphanizomenon flos-aquae*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 43: 73-80
- [23] Richard D. Robarts, Tamar Zohary. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1987, 21: 391-399
- [24] J Lehtimaki, P Moisander, K Sivonen and K Kononen . Growth, Nitrogen Fixation, and Nodularin Production by Two Baltic Sea Cyanobacteria[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1997, 63(5):1647-1656
- [25] Eliska Rejmankova , Jaroslava Komarkova . Response of cyanobacterial mats to Nutrient and salinity changes[J]. Aquatic Botany, 2005, 83: 87-107
- [26] 华汝成. 单细胞藻类的培养与应用[M]. 北京: 农业出版社, 1986. 3-13
- [27] Miller AG, Espie GS, Canvin DT. Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacteria : a review[J]. *Curr J Bot*, 1990, 68:1291-1302
- [28] Kaplan A, Reinhold L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms[J]. *Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50:539-570
- [29] Badger MR, Gallagher A. Adaptation of photosynthetic CO₂ and HCO₃⁻ accumulation by the cyanobacterium *synechococcus* PCC6301 to growth at different inorganic carbon concentrations[J]. *Plant Physiol*, 1987, 14:189-201
- [30] Jesus M. Mercado, F. Javier, L. Gordillo, F.Xavier Niell. Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 11:455-461
- [31] Flores E, Herrero A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation[M]. Kluwer Academic Publishers. 1994, 487-517
- [32] S.J. Temple, C.P. Vance, J.S. Gantt. Glutamate synthase and nitrogen assimilation[J]. *Trends Plant Sci*. 1998, 3: 51-56
- [33] J.C. Reyes, F.J. Florencio. A novel mechanism of glutamine synthetase inactivation by ammonium in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Involvement of an inactivating protein*. *FEBS Letter*. 1995, 367: 45-48
- [34] Gary S. Stacey, Robert Harza Burris, Harold J. Evans. Biological Nitrogen Fixation[M]. Springer, 1992: 166-175
- [35] Peter J. Lammers, Robert Haselkorn. Sequence of the *nifD* gene coding for the a subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 1983, 80 (15): 4723-4727

- [36] P T Pienkos, S Bodmer, F R Tabita. Oxygen inactivation and recovery of nitrogenase activity in cyanobacteria[J]. J Bacteriol, 1983, 153 (1): 182-190
- [37] Lucas J. Stal, Wolfgang E. Krumbein. Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. grown under alternating light-dark cycles[J]. Archives of Microbiology, 1985, 143 (1): 67-71
- [38] Bobme H. Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria[J]. Trends Plant Sci, 1998, 3:346-351
- [39] Kim J and Rees DC. Nitrogenase and biological nitrogen fixation[J]. Biochemistry, 1994, 33: 387 - 397
- [40] Herrero A, Muro-Pastor A M, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria[J]. J Bacteriol, 2001, 183:411-425
- [41] C.Peter Work, Anneliese Ernst, Jeff Elhai. The Molecular Biology of Cyanobacteria[M]. Springer Netherlands, 2006:769-823
- [42] Amar N. Rai, Birgitta Bergman. Modification of NO_3^- metabolism in heterocysts of the N_2 -fixing cyanobacterium *Anabaena* 7120 (ATCC27893)[J]. FEMS Microbiology Letters, 1986, 36 (2): 133-137
- [43] Wolk C P, Ernst A, Elhai J. Heterocyst metabolism and development[M]. The molecular biology of cyanobacteria, 1994, 769-823
- [44] Gupta M, Carr NG. Enzyme activities related to cyanophycin metabolism in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* sp[J]. J Gen Microbiol, 1981, 125: 17 - 23
- [45] L. Curatti, E. Flores, G. Salerno. Sucrose is involved in the diazotrophic metabolism of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp[J]. FEBS Letters, 2002, 513(2-3): 175-178
- [46] Kathryn M. Jones, Robert Haselkorn. Newly identified cytochrome *c* oxidase operon in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 specifically induced in heterocysts[J]. J Bacteriol, 2002, 184(9): 2491-2499
- [47] Valery M. Dembitsky, Ilia Shkrob, Ovadia Lev. Occurrence of volatile nitrogen-containing compounds in nitrogen-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*[J]. Journal of Chemical Ecology, 2000, 20: 1359-1366
- [48] William J. Buikema, Rorbert Haselkorn. Expression of the *Anabaena* hetR. gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions[J]. Microbiology, 2001, 98(5):2729-2734
- [49] Alicia M. Muro-Pastor, Ana Valladares, Enrique Flores, Antonia Herrero. Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development[J]. Molecular Microbiology, 2002, 44(5):1377-1385
- [50] Xu Huang, Yuqing Dong, Jingdong Zhao. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS[J]. Development biology, 2004, 101(14):4848-4853
- [51] Martí n-Nieto J, Herrero A , Flores E. Regulation of nitrate and nitrite reductases in dinitrogen-fixing cyanobacteria and Nif mutants[J]. Arch Microbiol, 1989, 151: 475-478
- [52] Jose E. Frias, Enrique Flores, Antonia Herrero. Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120[J]. Molecular Microbiology, 1994, 14(4): 823-832

- [53] Marker A M H, M. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin[J]. *Freshwater Biol*, 1972, 2: 361-385
- [54] Henley WJ. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1993, 29: 729-739
- [55] Markwell M A K, Hass S M, Bieber L L, Tolbert N E. A modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples[J]. *Anal. Biochem.*, 1978, 87(1): 206-210
- [56] Collos Y., Mornet F., Sciandra A., Waser N., *et al.* An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 11: 179-184
- [57] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal. chem.* 1956, 28(3): 350-356
- [58] E. Martin-Figueroa, F. Navarro, F.J. Florencio. The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts[J]. *FEBS Letter*. 2000, 476: 282-286
- [59] 刘立明, 李寅, 堵国成, 陈坚. 碳酸钙促进丙酮酸发酵过程中 2-酮戊二酸的形成[J]. *生物工程学报*, 2003, 19(6): 745-749
- [60] Kumar AP, Rai AN and Singh HN. Nitrate reductase activity in isolated heterocysts of the cyanobacterium *Nostocmuscorum*[J]. *FEBS Letters*, 1984, 179: 125-128
- [61] Gao Y, Smith G J, Alberte P S. Temperature dependence of nitrate reductase activity in marine phytoplankton: biochemical analysis and marine ecological implications[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 36(2): 304-313
- [62] Schaeffer, F., R. Y. Stanier. Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Anabaena* sp. Kinetic and molecular properties[J]. *Arch. Microbiol*, 1978, 116: 9-19
- [63] Merida A, Candau P and Florencio FJ. Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium[J]. *J Bacteriol*, 1999, 173: 4095 - 4100
- [64] Peterson R, McDonald AJS. Effects of elevated carbon dioxide concentration on photosynthesis and growth of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) at optimal nutrition[J]. *Plant Cell Environ*, 1992, 15: 911-919
- [65] Herrero A, Flores E and Guerrero MG. Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719[J]. *J Bacteriol*, 1981, 145: 175 - 180
- [66] Janos Udvardy, Gyorgy Borbely, Andras Juhasz, and Gabor L. Farkas. Thioredoxins and the redox modulation of Glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 vegetative cells and heterocysts[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 157(2): 681-683
- [67] Jesus M. Mercado, F. Javier, L. Gordillo, F. Xavier Niell. Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticte*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 11: 455-461
- [68] Muro-Paster, M.I., Reyes, J.C., Florencio, F.J. Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-ketoglutarate levels[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 38320-38328
- [69] Li J H, Laurent S, Konde V, Bedu S, Zhang C C. An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120[J]. *Microbiology*, 2003, 149: 3257-3263

- [70] M.F. Vázquez-Bermúdez, A. Herrero, E. Flores. 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter[J]. FEBS Letter.2002, 512:71-74
- [71] Shree Kumar Apte, Bontha Rajasekhar Reddy, Joseph Thomas. Relationship between Sodium influx and salt tolerance of nitrogen-fixing cyanobacteria[J]. Applied and Environmental microbiology, 1987,53(8):1934-1939
- [72] Joset F, Jeanjean R, Hagemann M. Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: deciphering the molecular events[J]. Physiol Plant, 1985, 96:738-744
- [73] Eliska Rejmankova, Jaroslava Komarkova. Response of cyanobacterial mats to nutrient and salinity changes[J]. Aquatic Botany, 2005, 83:87-197
- [74] Pratiksha Bhadauriya, Radha Gupta, Surendra Singh, Prakash Singh Bisen. Physiological and biochemical alterations in a diazotrophic cyanobacterium *Anabaena cylindrical* under NaCl stress[J]. Current Microbiology, 2007, 55:334-338
- [75] 陆开宏, 林霞, 钱云霞. 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)形态及其变异现象的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(1):61-68
- [76] 陈颖, 李文彬, 孙勇如. 小球藻生物技术研究应用现状及展望[J]. 生物工程进展, 1998, 18(6):12-6

致 谢

衷心感谢中科院课题组导师丛威老师和康瑞娟老师对我的悉心指导。感谢康老师对论文不厌其烦的修改。能够耳濡目染两位导师兢兢业业的治学态度，敏锐创新的科学思维和身体力行的工作作风是我获得的最大财富，在学术和为人两方面都获益颇多。在我进行课题研究的过程中，他们不仅给予我耐心细致的指导，更注重对学生思维方式和分析能力的培养，使我在今后的工作中受用无穷。

感谢导师张栩老师对我论文工作及学业的关心和帮助。

实验室杨成砚老师、吴霞老师、杨鹏波老师以及已毕业的张宜峰师兄在本论文的研究工作中提供了许多宝贵的建议和帮助，在此深表谢意。

感谢实验室苏贞峰、任洪艳、王倩、胡明、张勇、刘国梁等师兄师姐给予的热情指导和帮助，实验室团结融洽的氛围支持我不断前进。

感谢过程所曾建立师兄、化工大学俞建良同学、赵磊同学、李容平师姐为论文中部分样品测定提供的无私帮助。

刘阳、刘明、颜飞同学对论文修改提供了大量帮助，烟台大学的赵桂丽同学协助完成了部分实验，在此表示感谢。

感谢家人和朋友对我一贯的支持和鼓励。

研究成果及发表的学术论文

发表及已接受的论文

王佳平, 康瑞娟, 丛威, 张栩. 无机碳对水华束丝藻氮源利用代谢的影响. 过程工程学报 (已接受).

导师及作者简介

导师简介

姓名： 张栩

性别： 男

电子信箱： zhangxu@mail.buct.edu.cn

籍贯： 山东

教育经历：

1990—1994 华东理工大学生物化学工程专业学士学位；

1996—1999 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室海洋生物学专业硕士学位；

1999—2003 中国科学院过程工程研究所生物化学工程国家重点实验室生物化工专业博士学位。

工作经历：

1994—1996 国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室研究实习员；

2003.1—2005.1 北京化工大学生命科学与技术学院博士后；

2005年1月至今为北京化工大学教师。

主要研究领域：

能源微生物的筛选和培养，包括生物制氢、生物柴油、燃料乙醇。

代表性论文：

[1]Zhang X. Comparison of photobioreactors for cultivation of *Undaria pinnatifida* gametophytes.

Biotechnology Letters. 2002, 24(18) 1499-1503.

[2]Zhang X. A simple and low-cost airlift photobioreactor for microalgal mass culture. *Biotechnology*

Letters. 2002, 24(21) 1767-1771.

[3]Zhang X. Effects of light quality on growth, photosynthesis and reproduction of vegetative

gametophytes of *Undaria pinnatifida*. 2005, 27(20), 1467-1475

[4]薛飞燕, 张栩, 谭天伟.微生物油脂的研究进展与展望. *生物加工过程*, 2005, 3 (1): 23-27

[5]贾丽娜, 张栩, 谭天伟.谷氨酸废液培养莱茵衣藻的产氢研究. *生物加工过程*, 2005, (1):

45-48

[6]李兆鹏, 张栩, 徐斌, 宋礼华, 谭天伟 重组大肠杆菌高密度发酵中乳糖诱导表达 hBLyS. *过程*

工程学报, 2005, 5(4), 446-449

[7]蒋洁, 张栩, 谭天伟. 乙酸对 1, 3-丙二醇发酵的影响. *北京化工大学学报*, 2005, 32(5), 36-42

作者简介

姓名： 王佳平

性别： 女

电子信箱： wjjia@gmail.com

籍贯： 山西

教育经历：

2001.9—2005.7 北京化工大学制药工程专业学士学位；

2005.9—2008.6 北京化工大学发酵工程专业硕士学位。