

文章编号: 1009-6825(2015)17-0194-02

不同生长速率下水华束丝藻储磷能力研究

闫彬

(重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆 400044)

摘要: 对不同生长速率的水华束丝藻体内颗粒态聚合磷酸盐含量进行了分析, 讨论了藻种不同生长阶段对磷的储存特点, 促进对藻类储磷能力的进一步认识。

关键词: 水华束丝藻, 生长速率, 聚合磷酸盐

中图分类号: X131

DOI: 10.13719/j.cnki.cn14-1279/tu.2015.17.105

磷是浮游藻类细胞膜、核酸的主要组成元素, 藻类的生长与胞外磷浓度、胞内磷浓度均有关, 主要受胞内浓度的影响。栅藻的批次培养研究中发现胞外磷被耗尽的情况下, 栅藻仍能维持指数生长^[1]。藻类对磷存在“奢侈吸收”(luxury absorption)现象^[2], 并以聚合磷酸盐(polyphosphate, 以下简称为“PolyP”)的形式储存在体内, 用于维持外界磷匮乏时细胞对磷的需求。藻类对外部环境中不同形态磷酸盐的吸收利用特点已有大量研究, 然而藻细胞内部磷储存的研究相对较少。

本文以一种常见水华藻种——水华束丝藻为研究对象, 通过恒化培养的方式来获得处于不同生长速率阶段的藻种, 避免了批次培养后期营养物质限制及半连续培养过程中稳定期难以维持的问题^[3,4]。讨论处于不同生长速率状态的藻种对于磷的储存特点, 以期阐释该水华藻种的磷策略。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养

实验藻种为水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*, FACHB-1029) 购于中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库。藻种培养及实验开展均在光照培养箱中进行, 培养温度 25 °C, 光照强度 27 μmol/(m²·s), 光暗比为 12 h: 12 h, 培养基为 BG-11^[5]。

1.2 实验设计

藻种在实验前使用无磷的 BG11 培养基饥饿培养 1 周。藻种的培养分为间歇培养和连续培养两个阶段: 间歇培养即特定浓度的藻种(1.5 × 10⁷ cell/mL) 在 BG11 培养基中生长并达到稳定生长期; 连续培养则在间歇培养阶段达到稳定后对培养装置进行一定稀释速率的稀释, 稀释液为无菌 BG11 培养基。当叶绿素浓度连续 6 d 的数值变化在 ±5% 以内时, 认为系统达到稳定状态, 此时系统的稀释速率即为藻类的生长速率^[6]。藻种培养于 1 L 锥形瓶中, 连续培养阶段的培养体积为 600 mL, 稀释速率分别为 0.1 d⁻¹, 0.2 d⁻¹, 0.4 d⁻¹, 0.6 d⁻¹, 0.8 d⁻¹。为保证藻细胞在培养装置中的均匀分布, 培养过程中均连续通入针头过滤器(pore size: 0.22 μm) 过滤后的无菌空气, 同时提供藻类生长需求的无机碳。

叶绿素浓度每天检测, 采样时间为每天 8:00。当系统处于稳定状态时, 测定细胞总磷、颗粒态聚合磷酸盐含量, 同时使用荧光显微技术对藻类聚合磷酸盐进行定性分析。

1.3 测试方法

藻液的叶绿素浓度由叶绿素 a 代替, 根据酒精冷冻提取法测定^[7]。将藻液置于离心机(Eppendorf 5804R) 中离心收集(6 500 rpm, 10 min) 藻细胞, 蒸馏水离心清洗三次。向离心管中加入 4 mL 乙醇(95%) 并使藻种重新混匀。将上述处理后的样品放于 4 °C 冰

箱中提取 12 h, 离心收集上清液, 然后使用紫外分光光度计在 649 nm, 665 nm 波长下分别测定溶液吸光度。

文献标识码: A

细胞总磷(Total Cellular Phosphorus, 简称为“TCP”)的测定参考总磷的测定方法^[8]: 藻细胞收集及清洗后, 先用 5% 过硫酸钾氧化(120 °C, 30 min), 冷却至室温后使用 GF/F 滤膜滤去杂质, 使用钼锑抗分光光度法测定滤液中磷含量。文中各类磷酸盐的含量均以 P 计。

颗粒态聚合磷酸盐(Polyphosphate granules, 简称为“PolyP”)的测定使用热水提取方法。将藻液置于离心机(Eppendorf, 5804R) 中离心收集(6500 rpm, 10 min) 藻细胞, 蒸馏水离心清洗三次后转移至 50 mL 比色管, 蒸馏水定容至 25 mL, 使用配套的磨口塞封闭比色管, 并在管口使用纱布包裹, 将比色管放入高压灭菌锅中进行提取(105 °C, 30 min)。待提取液冷却至室温后使用 GF/F 滤膜(Whatman) 过滤并使用蒸馏水定容至 50 mL。将滤液均分为两份(a, b), 使用钼锑抗分光光度法^[8]在 700 nm 波长下测定 a 份中的正磷酸盐含量, 即可提取正磷酸盐(extracted Soluble reactive Phosphorus, 简称为“e-SRP”)。向 b 份中加入 4 mL 过硫酸钾(5%), 密封后放入高压灭菌锅消解(120 °C, 30 min), 冷却后按钼锑抗分光光度法^[8]测定消解后磷酸盐含量, 即为可提取的总磷酸盐(total extractable cellular phosphorus, 简称为“e-TCP”)。e-TCP 与 e-SRP 的差值即为颗粒态 PolyP 的含量。

PolyP 的荧光染色: 细胞中 PolyP 能够与 DAPI 结合后在紫外光激发下发出黄色荧光^[9]。具体操作如下: 取 1 mL 藻液, 离心并蒸馏水清洗三次后(6 500 rpm, 10 min) 加入 1 mL 2% 戊二醛, 固定 10 min; 离心后弃上清液, 取 10 μL 固定后的藻液, 然后加入 10 μL DAPI 试剂(DAPI 浓度为 50 mg/L), 染色 10 min 后以 330 nm ~ 385 nm 紫外光作为激发光, 在荧光显微镜(BX53FL + MP5.0, Olympus) 下观察 PolyP 染色情况。

2 结果与讨论

2.1 藻种培养过程

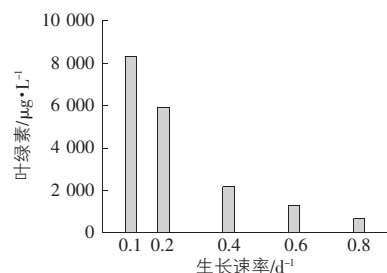


图1 不同生长速率时系统中叶绿素含量

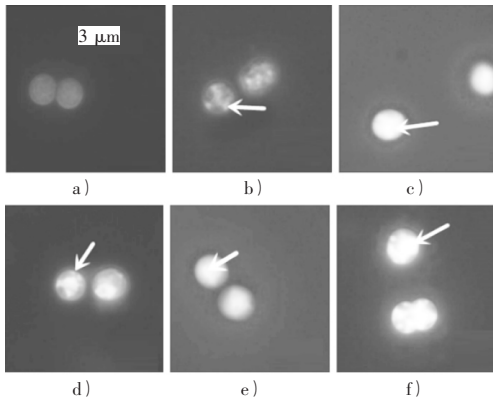
收稿日期: 2015-04-02

作者简介: 闫彬(1989-), 男, 在读硕士

连续培养开始后,系统中生物量受到培养基稀释和藻种生长的共同作用,藻种随着培养基的稀释而被大量冲走的同时,新补充的营养物质促进藻种的生长。本实验所涉及的稀释速率梯度中,系统中叶绿素浓度最终均能达到动态平衡,即实现该生长速率的长时间维持。在不同生长速率稳定阶段,装置内的叶绿素浓度随稀释速率的增加而降低(见图1),叶绿素浓度最大值和最小值为(8233±217) μg/L(0.1 d⁻¹)和(652±30) μg/L(0.8 d⁻¹)。

2.2 不同生长速率藻种 PolyP 的荧光显微分析

除磷饥饿处理的藻种以外,其他藻种的 DAPI 荧光染色图像均表现出黄色荧光(见图2)。说明在培养过程中,藻类出现对磷的“奢侈吸收”并以 PolyP 的形式储存在体内。



注:箭头指示处为 PolyP 的黄色荧光,所有图片放大倍数均为 100×10; a)-f) 依次代表磷饥饿处理后的藻种和生长速率为 0.1 d⁻¹, 0.2 d⁻¹, 0.4 d⁻¹, 0.6 d⁻¹, 0.6 d⁻¹, 0.8 d⁻¹ 的藻种

图 2 不同生长速率藻种的 PolyP 荧光染色效果

2.3 不同生长速率藻种 PolyP 的含量

水华束丝藻细胞内颗粒态 PolyP 含量随生长速率的升高呈缓慢增高现象(见图3)。在生长速率为 0.1 d⁻¹, 0.2 d⁻¹, 0.4 d⁻¹, 0.6 d⁻¹ 时,水华束丝藻细胞内颗粒态 PolyP 含量无明显差异($P > 0.05$),为(0.25±0.03) μgP/μgChl-a, (0.26±0.04) μgP/μgChl-a, (0.29±0.09) μgP/μgChl-a, (0.39±0.04) μgP/μgChl-a。在生长速率为 0.8 d⁻¹ 时,颗粒态 PolyP 含量大幅增加并达到最大值,为(0.49±0.07) μgP/μgChl-a。低生长速率阶段稳定期所存在的高生物量一方面加剧了藻种对营养盐的竞争。另一方面高浓度藻种自身造成的遮蔽效应不利于 PolyP 的合成,Kanai 等的研究表明在有光条件下,小球藻会快速吸收正磷酸盐并将以 PolyP 的形式储存;无光条件下, PolyP 的合成则会减弱^[10]。

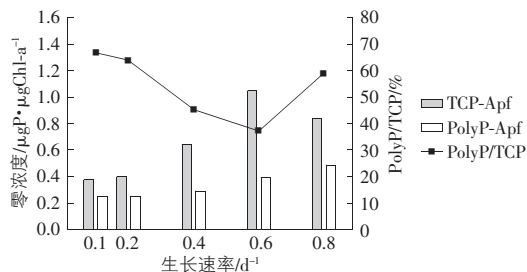


图 3 不同生长速率藻种的 TCP、颗粒态 PolyP 含量

藻细胞 TCP 含量随生长速率的提高而增加(见图3),颗粒态

PolyP 在 TCP 中的比例(颗粒态 PolyP/TCP)随着生长速率的提高呈现出先降低再升高的现象(见图3),在生长速率为 0.6 d⁻¹ 时达到最低值,为(37.33±3.63)%。

3 结语

恒化培养利于研究藻类在不同生长阶段的营养物吸收特点。水华束丝藻对磷的吸收与细胞自身所处的生长阶段有关,胞内颗粒态 PolyP 含量在高生长速率时略高于低生长速率,生长速率为 0.8 d⁻¹ 时颗粒态 PolyP 含量是所有实验梯度中最高的,为(0.49±0.07) μgP/μgChl-a。随着生长速率的增加,细胞含磷量不断增加,使得颗粒态 PolyP 在 TCP 中的比例(颗粒态 PolyP/TCP)呈现不同的变化趋势。在低生长速率时,细胞内磷含量以颗粒态 PolyP 为主(65%左右)。当生长速率为 0.6 d⁻¹ 时,藻细胞中颗粒态聚合磷酸盐在细胞总磷中的比例最小,为(37.33±3.63)%。高生长速率阶段的快速新陈代谢不利于藻种对磷的储存,在使用藻类处理高浓度含磷污水时需控制藻种的生长速率在较低水平。

参考文献:

- [1] Rhee G. Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate [J]. Limnology and Oceanography, 1972, 17(4): 505-514.
- [2] Powell N, Shilton AN, Pratt S, et al. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds [J]. Environ Sci Technol 2008, 42(16): 5958-5962.
- [3] 蒋礼玲, 张亚杰, 李潇萍, 等. 微藻培养模式研究进展 [J]. 可再生能源, 2010, 28(1): 56-62.
- [4] 王宗灵, 李瑞香, 朱明远, 等. 半连续培养下东海原甲藻和中肋骨条藻种群生长过程与种间竞争研究 [J]. 海洋科学进展, 2006, 24(4): 495-503.
- [5] 中国科学院武汉水生生物研究所. 淡水藻种库——淡水藻种培养基(BG11) [EB/OL]. <http://algae.ihb.ac.cn/Products/ProductDetail.aspx?product=4.html>, 2015-1-24/2015-01-24.
- [6] Droop MR. Vitamin B12 and marine ecology III. an experiment with a chemostat [J]. J mar bio Ass UK, 1966, 46(3): 659-671.
- [7] Farga ová A. Inhibitive effect of organotin compounds on the chlorophyll content of the green freshwater alga Scenedesmus quadricauda [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1996, 57(1): 99-106.
- [8] 魏复盛. 水和废水监测分析方法 [M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 243-250.
- [9] Eixler S, Selig U, Karsten U. Extraction and detection methods for polyphosphate storage in autotrophic planktonic organisms [J]. Hydrobiologia 2005(533): 135-143.
- [10] Franklin MH. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function [J]. Bacteriological Reviews, 1966, 30(4): 772-794.

Phosphorus storage capacity of Aphanizomenon flos-aquae living at different growth rates

Yan Bin

(Urban Construction and Environmental Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: The polyphosphate granules content in Aphanizomenon flos-aquae living at several growth rates were detected. Characters of phosphorus storage in algae were discussed. It made a further understanding on algae's phosphorus storage capacity.

Key words: Aphanizomenon flos-aquae, growth rate, polyphosphate