

铜绿微囊藻磷代谢过程研究

杨柳燕^{1,2}, 王 勤², 史小丽^{1,2}, 蒋丽娟², 肖 琳², 秦伯强¹

(1.中科院南京地理与湖泊研究所, 江苏 南京 210008; 2.南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘 要:将铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)接入不同磷浓度的培养基中进行光照培养,在分析水中溶解性磷浓度的同时,测定铜绿微囊藻的生长曲线和微囊藻中总磷、聚磷、可溶性磷以及糖原含量的变化过程,了解不同外源性磷浓度下铜绿微囊藻的生长和磷代谢过程。结果表明,在较高的初始磷浓度培养液中铜绿微囊藻的生长没有显著性差异,已不再限制微囊藻的生长。处于延迟期的铜绿微囊藻能从水环境中吸收外源性磷,在对数生长初期,藻利用体内的磷进行代谢,满足其生长的需要,即使外界还有较高的磷,铜绿微囊藻中总磷浓度也随着其生长而不断下降;在稳定期的初期微囊藻中可溶性磷含量达到最高值,藻中聚磷含量在对数期末明显增加,随后下降,而铜绿微囊藻中糖原含量在衰亡期显著增高,以细胞内聚磷变化趋势相反,从而与聚磷互补储存能量。

关键词:铜绿微囊藻; 总磷; 聚磷; 可溶性磷

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0686-04

Phosphorus Metabolism of *Microcystis aeruginosa* During Its Growth Process

YANG Liu-yan^{1,2}, WANG Qin², SHI Xiao-li^{1,2}, JIANG Li-juan², XIAO lin², QIN Bo-qiang¹

(1.Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2.State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: *Microcystis aeruginosa* was cultured in medium containing different phosphorus concentrations under light condition. The function parameters of cyanobacterium were measured including growth curve, total phosphorus contents, polyphosphate contents, and soluble phosphate contents in *M. aeruginosa*, as well as aqueous phosphorus concentrations, in order to explore phosphorus metabolism of *M. aeruginosa* under different phosphorus concentrations. The results showed that the growth of *M. aeruginosa* had little difference under the high initial phosphorus concentrations, and the aqueous phosphorus concentration was not the limited factor in our experiment because they were high enough for the growth of *M. aeruginosa*. And they may adsorb the exogenous phosphorus from the water circumstances at the lag period for growth of *M. aeruginosa*, it then use up intracellular phosphorus to grow in the early exponential phase, thus, total phosphorus decreased with the growth of *M. aeruginosa*. The intracellular soluble phosphorus was the highest at stationary phase, and there was an evident increase for the polyphosphate content in *M. aeruginosa* at the late exponential phase. But, glucogen contents increased in the lag phase and the decline phase of *M. aeruginosa*. Chemical energy is deposited in glucogen and polyphosphate alternately for its survival.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*; total phosphorus; polyphosphate; soluble phosphate

由于工农业生产废水和生活污水大量排入水体,使其营养盐浓度不断升高,导致我国的许多水体经常暴发大面积的水华。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)是水华中优势种^[1],它是一种原核生物,现归属

于蓝细菌(Cyanobacteria)。铜绿微囊藻在湖泊中的异常增殖表明其具有适应环境的特殊机制,虽然对铜绿微囊藻利用外源性磷进行了大量研究^[2],但是,在细胞内磷代谢过程研究还很少。为了有效地研究铜绿微囊藻磷代谢的行为,将铜绿微囊藻加入到较高磷浓度的培养基中进行光照培养,测定铜绿微囊藻的生长曲线以及细胞内总磷、聚磷、可溶性磷、糖原的含量变化,分析外源性磷对铜绿微囊藻的生长及其体内磷代谢的影响,探索其异常增殖形成水华的机理。

收稿日期:2004-11-03

基金项目:“973”项目(2002CB412307);中国科学院知识创新项目

(KZCX2-403 和 KZCX2-311);国家自然科学基金(40371102)

作者简介:杨柳燕(1963—),男,副教授,博士后,研究方向为环境微生物学。E-mail:yly@niglas.ac.cn

1 材料与方法

1.1 试验藻种

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)由中科院武汉水生生物研究所提供。用改良的 MA 培养基培养^[3],初始 pH8.6,培养在 25 ℃和 2 200 lx 光照培养箱中。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

采用 MA 培养基预培养铜绿微囊藻至对数生长期末,试验用培养基为用 NaH_2PO_4 代替甘油磷酸钠的改良 MA 培养基,并设不同的磷浓度梯度,将铜绿微囊藻加入到这种改良的 MA 培养基中,25 ℃时在 Thermoforma4586 光照控温培养箱中进行 12 h:12 h 光照黑暗交替培养。隔日取样,测定铜绿微囊藻的生长曲线,以及藻中总磷、可溶性磷、聚磷、糖原和水中可溶性磷浓度,了解铜绿微囊藻磷代谢过程。不同磷形态的标准曲线绘制方法如下:用 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷标准储备液配制不同浓度的磷酸盐标准溶液,并按不同磷形态的预处理方法进行处理,最后显色测定。试验设 2 个平行,平均值为试验结果。

1.2.2 藻中总磷的测定

取 3 mL 藻液, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液用于测定水体中可溶性磷。将沉淀物从离心管中用蒸馏水取出,加入 1 mL 5%(m/v)过硫酸钾,121 ℃消化 30 min。放入 10 mL 比色管中加水至 10 mL,加入 0.25 mL 10%抗坏血酸和 0.5 mL 钼酸盐溶液后,显色 15 min,在可见光 700 nm 处,用 752 紫外光栅分光光度计比色。

1.2.3 藻中可溶性磷酸盐的测定

取 3 mL 藻液, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液,加入 1 mL 10%三氯乙酸抽提, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。加入 1 滴酚酞,加 NaOH 直到溶液呈粉红色,然后加 1 滴 H_2SO_4 使溶液呈无色,此时溶液呈中性,再进行比色。

1.2.4 藻中聚磷的测定

取 38 mL 藻液, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液,加入 5.4%碱性高氯酸,在 30 ℃恒温培养箱中放置 90 min。然后, $16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 0.5 h,用 $1 \text{ mL } 1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl} + 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{EDTA}$ 溶液洗涤 2 次,每次均以 $16\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min。加入 0.5 mL 蒸馏水抽提 2 次,每次 $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。取出上清液,加入 3 mL 无水乙醇, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,弃上清液,烘干后加入 2 mL 蒸馏水溶解。取出 1

mL 作为空白样供比色用。另 1 mL 样品中加入 1 mL $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ 水浴加热 15 min,取出后将 pH 值调至中性,进行比色。

1.2.5 藻中糖原的测定

取 20 mL 藻液, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液,加入 1 mL 三氯乙酸抽提, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,加入 3 mL 无水乙醇,在冰箱中放置。隔夜取出后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,弃上清液。烘干后,加入 1 mL 蒸馏水,溶解后加入 4 mL 0.2%蒽酮溶液,水浴加热 15 min。在 620 nm 处比色。糖原的标准曲线:取 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准储备液配制成不同浓度的葡萄糖标准溶液,加入 4 mL 蒽酮溶液,水浴加热 15 min 后,在 620 nm 处比色。

1.2.6 水中可溶性磷的测定

藻液离心后取上清液,放入比色管比色。

1.2.7 生长曲线

本试验用 Nikon102 型显微镜,取 10 个不重叠的视野,计数藻细胞数目,求其平均值,再计算出培养液中藻密度。

2 结果与讨论

2.1 铜绿微囊藻的生长过程

在本试验条件下,铜绿微囊藻的生长过程分 4 个时期, 0~4 d 为延迟期, 5~28 d 为对数期, 29~41 d 为稳定期, 41 d 后开始进入衰亡期,见图 1。同已有的研究相比,其生长周期较长。本试验不同起始磷浓度对铜绿微囊藻生长的影响没有显著性差异,其最大藻浓度均达到 $2.5 \times 10^7 \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上。在天然水体中,通常磷是影响微囊藻生长的限制性因子,在一定的磷浓度范围内,外源性磷浓度越高,藻生长的就越旺盛,但本试验设计的起始磷浓度较高,使磷不再成为铜绿微囊藻生长的限制性因子。

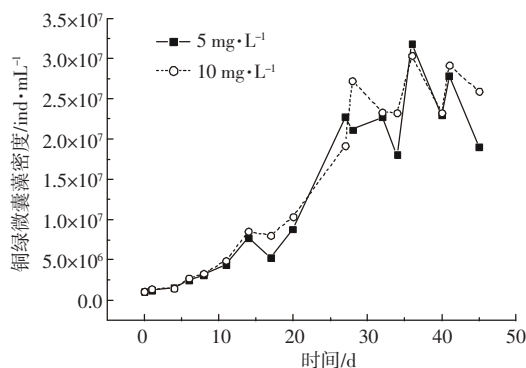


图1 铜绿微囊藻的生长曲线

Figure 1 Growth curve of *Microcystis aeruginosa*

2.2 水中溶解性磷浓度的变化过程

铜绿微囊藻生长对水体中溶解性磷浓度的影响见图2。铜绿微囊藻加入后水体中可溶性磷浓度由初始的5和10 mg·L⁻¹分别下降到1.46和2.39 mg·L⁻¹,表明藻有一个快速吸磷的过程。随后在藻生长处于延迟期时,水中溶解性磷的浓度有所上升,并小幅波动。因此,在微囊藻生长延迟期的后期存在放磷过程。从铜绿微囊藻生长的对数期开始到稳定期末期,水中磷浓度呈缓慢下降趋势。因此,在批式培养过程中铜绿微囊藻利用外源磷有快速吸磷和缓慢吸磷两个过程,随着铜绿微囊藻的大量繁殖,使水体中大量的磷转移到藻细胞中^[1]。

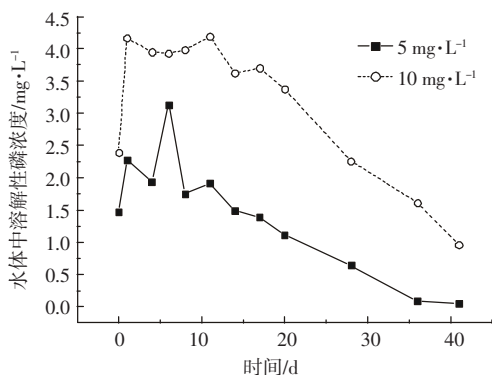


图2 水体中溶解性磷浓度的变化过程

Figure 2 Soluble phosphorus in aqueous solution

2.3 铜绿微囊藻中总磷浓度变化过程

为了分析铜绿微囊藻对磷的利用,首先观察藻细胞中总磷浓度的变化过程。在铜绿微囊藻生长的延迟初期,藻中总磷含量有大幅上升,随后藻中总磷含量有较大幅度的下降;当藻处于对数期后期时藻中总磷浓度基本保持稳定;当藻处于衰亡期时,藻中磷含量略有下降,见图3。因此,在铜绿微囊藻的生长过程中,对磷的利用具有特殊性,在其生长的延迟期,从水体中大量吸收磷,然后就主要依靠细胞内的磷进行生长,从而导致其细胞内磷含量不断下降。当细胞内磷含量降到一定程度后,才吸收外界磷进行生长,使水体中溶解性磷浓度不断下降。但是当铜绿微囊藻处于稳定期后期或衰亡期,即使外界水体中还含有可溶性的磷,也不吸收磷进行生长。

2.4 铜绿微囊藻中可溶性磷的变化过程

在铜绿微囊藻生长的对数期,藻中可溶性磷的含量逐渐上升,到衰亡期,藻中可溶性磷含量缓慢下降,同时初始磷浓度低,细胞中可溶性磷浓度反而高,见图4。因为在对数期,微囊藻大量增殖,代谢活性高,

因此,需要大量的可溶性磷合成细胞组成部分和进行各种生理活动,使其细胞内可溶性磷的含量比较高。在生长衰亡期,微囊藻总的代谢活性下降导致细胞可溶性磷下降。因此,铜绿微囊藻细胞内可溶性磷的含量与其生长密切相关,同时与外界磷浓度有关,外界磷浓度越低,细胞内可溶性磷含量越高。

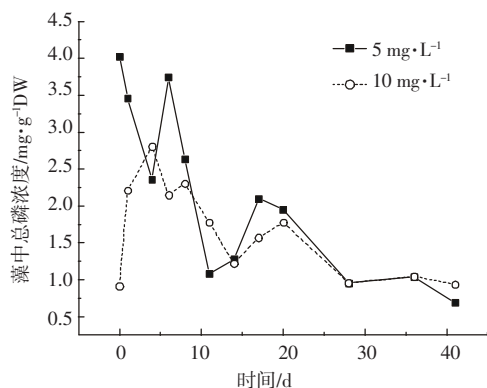


图3 铜绿微囊藻中总磷变化过程

Figure 3 Total phosphorus of *Microcystis aeruginosa*

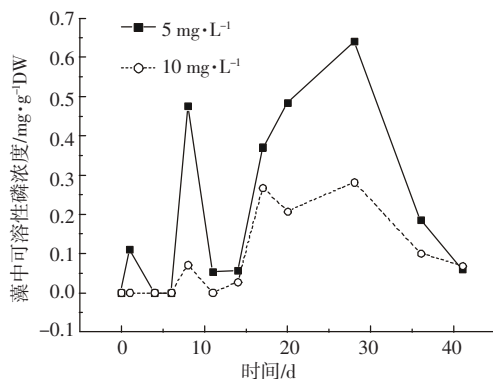


图4 铜绿微囊藻中可溶性磷变化过程

Figure 4 Soluble phosphorus in *Microcystis aeruginosa*

2.5 铜绿微囊藻中聚磷的变化过程

为了了解铜绿微囊藻中磷储存的方式,分析了藻细胞中聚磷的含量。在微囊藻生长的延迟期和对数期,细胞内聚磷含量比较低。在铜绿微囊藻生长对数末期,细胞内聚磷含量不断上升。如果水体中溶解磷浓度高,细胞内聚磷含量也高,见图5。铜绿微囊藻细胞内的总磷主要分为可溶性磷酸盐和不溶性磷两部分,藻吸收的外源性磷都是以可溶性磷酸盐的形式进入藻体内的,大部分以可溶性的磷存在于细胞质内,部分在细胞内转化为聚磷、磷脂以及其他细胞组成部分。许多微生物和藻类都可以在细胞内形成聚磷,用于储存能量,并作为磷源^[4,5],铜绿微囊藻也能在稳定期末合成聚磷,是次级代谢产物,成为铜绿微囊藻储

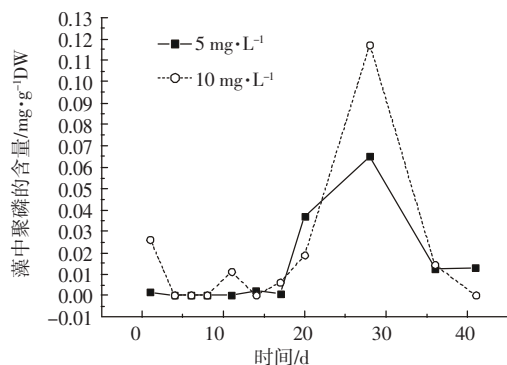


图5 铜绿微囊藻中聚磷的变化过程

Figure 5 Polyphosphate in *Microcystis aeruginosa*

存能量的一种形式,同时,也可以防止细胞内溶解性磷外流到细胞外。但是在铜绿微囊藻衰亡期,细胞中聚磷被分解利用,从而使聚磷含量下降。

2.6 铜绿微囊藻中糖原的变化过程

微生物在进行磷代谢的时候,常常伴随着有机碳的代谢,因此,在分析铜绿微囊藻磷代谢的过程中,也有必要分析细胞内糖原的变化过程。在生长延迟期,铜绿微囊藻中糖原含量比较高,在对数期及稳定期前期有所下降,只有到了稳定期末期,糖原含量又有一个大幅的上升,见图6。糖原是铜绿微囊藻的能量和碳源的储存物,在细胞开始大量繁殖时,通过光合作用将大量的光能转换为化学能储存在糖原中,在对数期,细胞需要大量的碳源和能源合成细胞组成部分,使细胞糖原含量下降,同时部分化学能储存在聚磷

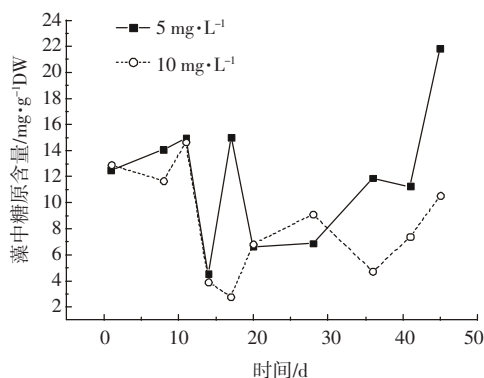


图6 铜绿微囊藻中糖原的变化过程

Figure 6 Glucogen in *Microcystis aeruginosa*

中。因此,在对数期的后期和平衡期,聚磷含量上升。在铜绿微囊藻生长的稳定期末期,糖原又明显增加,并且外界磷浓度越低,细胞内糖原含量越高。因此,铜绿微囊藻在不同生长时期,以不同的方式储存能量,聚磷和糖原能互补储存化学能,从而度过不利的环境。

3 结论

(1)在初始磷浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,铜绿微囊藻的生长没有显著性差异,此时水体中磷已经不成为其生长的限制因子。最大藻浓度可以达到 $2.5 \times 10^7 \text{ ind} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上。

(2)在生长延迟期和对数期铜绿微囊藻细胞内总磷含量较高,吸收的磷有的以可溶性磷形态存在,有的以聚磷形态存在。细胞内聚磷的变化趋势与可溶性磷相似,在微囊藻的稳定期末期均有明显的升高。

(3)铜绿微囊藻中糖原含量的变化过程与藻的生长相相关,在延迟期和对数期细胞内糖原含量较高。在稳定期的初期有所下降,到稳定期末期又有一明显的增加,同细胞内聚磷含量变化过程相反,因此,聚磷和糖原以互补的形式储存能量。

(4)铜绿微囊藻能大量吸收外源性磷,然后利用细胞内磷进行生长,藻细胞还可以聚磷的方式储存磷,使其有可能更好地摄取并利用外界磷,从而大量繁殖形成蓝藻水华。

参考文献:

- [1] 史小丽,王凤平,蒋丽娟,等. 扰动对外源性磷在模拟水生态系统中迁移的影响[J]. 中国环境科学, 2002, 22(6): 537-541.
- [2] 张民,史小丽,蒋丽娟,等. 两种外源性磷及振荡对铜绿微囊藻生长的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 507-510.
- [3] Oh H M, Lee S J, Jang M H, et al. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-limited chemostat[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 176-179.
- [4] Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T. New Aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function[J]. *Journal of Bioengineering*, 1999, 88(2): 111-129.
- [5] Rao N N, Roberts M F, Torriani A. Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162: 242-247.