

窄食单胞菌对微藻在高浓度甲酸条件下光合生长的促进作用

邢蒙蒙^{1,2}, 郑伟杰^{1,2}, 王旺银¹, 曹旭鹏^{1,2*}, 李灿^{1,2*}

1 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

2 中国科学院大学, 北京 101408

邢蒙蒙, 郑伟杰, 王旺银, 曹旭鹏, 李灿. 窄食单胞菌促进微藻高浓度甲酸条件下光合生长[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 230-241.

XING Mengmeng, ZHENG Weijie, WANG Wangyin, CAO Xupeng, LI Can. Promotion of *Stenotrophomonas* sp. on the photosynthetic growth of microalgae exposed to high concentrations of formate[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 230-241.

摘要: 甲酸是一种重要的太阳燃料, 具有很高的生物转化应用前景, 尤其是与光合微藻相结合, 理论上能最大化人工与生物光合成的优势。然而甲酸对微藻光合电子传递具有明显的抑制, 限制了其应用, 常规的改造和定向进化策略耗时且普适性不高。本文介绍了一条新的甲酸在光合微藻培养过程中的应用路线, 通过将一株分离自微藻高甲酸进化过程的窄食单胞菌或其发酵产物与微藻进行共培养, 解除了 50 mmol/L 甲酸根对莱茵衣藻光合活性的抑制, 促进其光合生长, 极大提升了胞内蛋白含量(约 50%)。初步测试表明, 这一策略也同样适用于小球藻和集胞藻, 具有普适性。这一策略的提出有望打破甲酸介导的人工-生物杂化光合成技术瓶颈, 建立更普适和高效的太阳光能驱动二氧化碳还原制备蛋白质的大宗生物质工艺。

关键词: 太阳燃料; 甲酸; 蛋白质; 食品供给安全; 藻菌互作

Promotion of *Stenotrophomonas* sp. on the photosynthetic growth of microalgae exposed to high concentrations of formate

XING Mengmeng^{1,2}, ZHENG Weijie^{1,2}, WANG Wangyin¹, CAO Xupeng^{1,2*}, LI Can^{1,2*}

1 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

Abstract: Formate is an important solar fuel, with large application potential in bioconversion.

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC3401802, 2021YFC2103500); 国家自然科学基金(21878285, 22088102)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC3401802, 2021YFC2103500) and the National Natural Science Foundation of China (21878285, 22088102).

*Corresponding authors. E-mail: CAO Xupeng, c_x_p@dicp.ac.cn; LI Can, canli@dicp.ac.cn

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-04-24; Published online: 2024-04-29

Especially, the win-win collaboration is achieved when formate is applied to the cultivation of microalgae, which combines the advantages from both artificial and natural photosynthesis. However, the inhibition of formate on the photosynthetic electron transport hinders the application of formate at high concentrations. The engineering or directed evolution of the regulation pathway is a case-by-case and time-consuming strategy. Here, we developed a new strategy by introducing a *Stenotrophomonas* sp. strain which was isolated and identified from the long-term self-evolution process of *Chlamydomonas reinhardtii* for adapting to high concentrations of formate. The co-culture with the strain or the fermentation broth relieved the inhibition of formate (50 mmol/L) on *C. reinhardtii* and promoted the growth of the microalga. Especially, the protein content increased significantly to nearly 50% of the dried weight. In addition, the co-culture also benefited the growth of both *Chlorella pyrenoidesa* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 exposed to formate, which indicated broader applicability of this strategy. This strategy provides the opportunity to overcome the bottleneck in the formate-mediated artificial-natural hybrid photosynthesis and to aid the development of technologies for solar energy-driven production of bulk biomass, including proteins, by carbon dioxide reduction.

Keywords: solar fuels; formate; protein; security of food supply; bacterium-microalga interaction

随着全球温室气体的过量排放, 导致极端气候频发, 减少碳排放已经成为全球共识^[1]。为此我国提出“双碳”目标, 一方面减少碳的排放, 另一方面增加碳的固定^[2]。另外由于我国人口众多, 粮食资源缺乏, 进口依存度高。例如, 据国家统计局和中国海关总署统计, 2023年我国主要的蛋白质来源——大豆的83%来自于进口, 存在着严重的粮食供给安全问题^[3], 因此迫切需要大规模、低成本的非粮技术来弥补蛋白质方面的缺口。

微藻一直被认为可以利用太阳能高光效地生长, 微藻每年固定的CO₂约占全球净光合产量的40%, 太阳能利用效率可达3%–5%^[4], 但实际上大规模培养的微藻却很少, 目前主要工业用藻株包括螺旋藻(*Spirulina*)、小球藻(*Chlorella*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)等, 以及合成生物学技术的平台生物, 如集胞藻(*Synechocystis*)^[5]。微藻规模培养面临的最大问题是成本太高, 影响成本的因素很多, 从生产角度看, 其实际1%左右的光合生产效率与实验室3%–5%甚至更高的水平差距较大, 主要原因

是在水生环境下光能和CO₂的传递都很受限^[6–8], 局部优化常规工艺的光能和CO₂传递强化, 通常会带来更高的能耗或者更复杂的设备需求, 难以真正用于规模生产。近年来, “液态阳光技术”快速发展, 即以太阳能为驱动, 催化CO₂和水生成有机物, 达到固碳和储能的目的^[9]。Jiang等^[10]和Yao等^[11]提出, 利用甲酸这种太阳燃料为碳传递和能量传递的中间载体, 来提高整体的太阳能利用效率。有研究表明, 使用2 mmol/L甲酸处理水稻叶片时, 植物获得了最大的抗光抑制能力, 推测甲酸可能参与了清除内源性自由基, 然而50 mmol/L高浓度甲酸根会抑制光合作用^[12]。同样, 当甲酸盐作为底物用于莱茵衣藻培养时, 20 mmol/L便会对其生长产生抑制^[11]。如图1所示, 光系统II上的色素分子捕获光能, 为光合作用的发生提供驱动力, 但是甲酸会对光系统II的供体侧和受体侧产生抑制^[13–14], 与初级电子受体Q_A、次级电子受体Q_B之间的非血红素铁结合阻断电子传递^[15–16], 同时还抑制质体醌(plastoquinone, PQ)的还原^[17], 10–100 μmol/L的甲酸根也会抑制水氧化中心

复合物的功能^[18-20]。因此要想实现以甲酸盐作为光合碳能强化载体的目标,一方面要解除高浓度甲酸根对光合作用的抑制,另一方面要提升甲酸的生物转化。对藻种进行大量的自适应进化或者改造,极大限制了甲酸在微藻培养中的应用,目前不具有普适性,且基因改造耗时较长,又不能保证一定起效,因此希望能够找到一种更广谱的方法来实现甲酸作为底物用于微藻培养这一目标。

本研究在前期甲酸利用藻株构建和筛选工作的基础上,从长时间甲酸培养微藻系统中分离到了一株窄食单胞菌,发现该菌株尽管无法在甲酸盐为唯一碳源体系下生长,但是通过藻菌共培养方式,能够显著提升多种微藻对甲酸的耐受及其在甲酸培养基下的光合生长,有望简单有效地解决甲酸抑制光合微藻生长的问题,推进基于太阳燃料的人工-生物光合系统,

更高效地实现太阳光驱动从 CO_2 到生物质的转化。同时,无论是使用藻菌共培养,还是菌发酵液进行纯藻培养,所获得生物质中蛋白质含量显著提升了约 50%。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养基

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) P3, 为之前构建的过表达了叶绿体型磷酸甘油醛脱氢酶的藻株^[21], 在磷酸三乙酸酯(tris-acetate-phosphate, TAP)培养基中传代培养, 另一种培养基为磷酸三甲酸酯(tris-formate-phosphate, TFP), 将 TAP 中的碳源替换为甲酸盐, 浓度约为 50 mmol/L^[10], pH 值同 TAP, 为 7.5。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidesa*)来源于中国科学院淡水藻种库, 集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC 6803) 来源于天津大学张卫文团队, 培养基为 BG-11^[22],

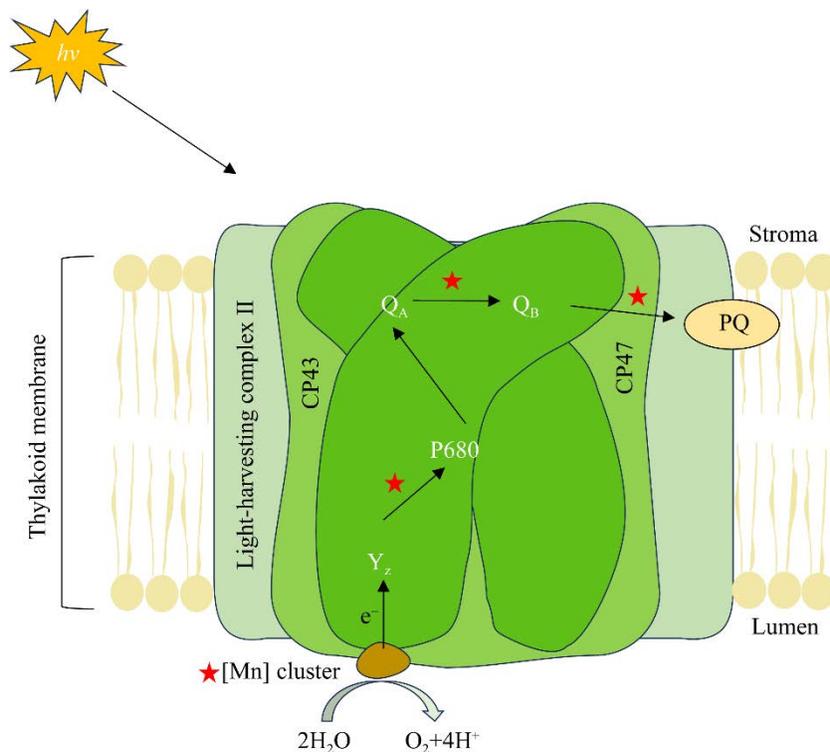


图 1 甲酸在光系统II中的抑制位点示意简图

Figure 1 The schematic diagram of the inhibitory site of formate in photosystem II.

甲酸作为底物时,向其添加甲酸钠至终浓度约为 50 mmol/L, pH 值同 BG-11, 为 7.4。培养基使用前, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 菌种及培养基

窄食单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)分离自 *C. reinhardtii* P3 培养过程中。利用 16S rDNA 鉴定方法, 确定该菌株为窄食单胞菌, 培养基为添加甲酸钠至终浓度约为 50 mmol/L 的 LB (Luria-Bertani)^[23], pH 值为 7.2。培养基使用前, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 培养体系

培养体系为含 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶。

1.3.1 *C. reinhardtii* P3 和 *Stenotrophomonas* sp. 单独培养及共培养

吸取一定量的 *C. reinhardtii* P3 种子液, 2 500×g 离心 5 min, 使用 TFP 培养基重悬, 起始 OD_{750} 为 0.2 左右接种(记为 C 组)。藻菌共培养时, *Stenotrophomonas* sp. 先在含 50 mmol/L 甲酸盐的 LB 培养基中培养, 起始 OD_{600} 为 0.05 左右, 1 d 后 OD_{600} 约为 3, 得到足够生物量, 4 500×g 离心 5 min 收集菌体, 洗涤 3 次后转入 TFP 培养基中培养 1 d, 1 d 后 $OD_{600} < 2$, 培养基中甲酸根浓度为 0, 按照藻 OD_{750} 为 0.2、菌 OD_{600} 为 0.1 (对应 OD_{750} 为 0.08) 接种在 TFP 培养基中共培养(记为 CS 组)。8 500×g 离心 15 min 收集 *Stenotrophomonas* sp. 的 TFP 发酵液, 用 0.22 μm 的膜过滤 3 次得到滤液, 补充甲酸钠至终浓度为 50 mmol/L, 之后用于 *C. reinhardtii* P3 培养(记为 CSV 组)。培养过程中调节 pH 维持在 7.5 左右。温度为 26 °C, 湿度为 30%, 24 h 光照, 转速为 80 r/min, 光强为 50 μmol/(m²·s), 连续培养 7 d。

Stenotrophomonas sp. 单独培养时, 吸取一定量的种子液, 起始 OD_{600} 为 0.1, 接种在 TFP

培养基中, 温度为 30 °C, 转速为 150 r/min。

1.3.2 其他藻单独培养及共培养

共培养菌液的预处理、培养条件与上述一致。在 BG-11 培养基中培养的为对照组, 在添加甲酸钠的 BG-11 (记为 +F) 以及添加单胞菌和甲酸钠的 BG-11 中(记为 +F+S) 培养为实验组。

1.4 生长、叶绿素荧光动力学参数以及氨的测定

采用 UV/VIS 分光光度计(JASCO 公司)测定 *C. reinhardtii* P3 在 750 nm 处的吸光度 OD_{750} , 测定 *Stenotrophomonas* sp. 在 600 nm 处的吸光度 OD_{600} , 混合培养时测定 750 nm 处的吸光度^[10]。采用叶绿素荧光仪(WALZ 公司测定光系统 II 最大量子产率 F_v/F_m 和实际量子产率 F_v'/F_m')^[10]。采用纳氏试剂测定培养基中氨的含量^[11]。

1.5 叶绿素 a 和叶绿素 b 总含量的测定

取新鲜藻液 1 mL, 10 000×g 离心 2 min 收集藻泥, 避光加入无水乙醇, 萃取 2 d 以上, 使残渣发白, 以无水乙醇为对照, 使用多功能微孔板检测仪(TECANg 公司)测定 665 nm 和 649 nm 处的吸光度^[11]。根据公式(1)得出叶绿素 a 和叶绿素 b 的总含量:

$$\text{Chl (a+b)} = 18.08A_{649} + 6.63A_{665} \quad (1)$$

式中: Chl (a+b) 为叶绿素 a 和叶绿素 b 的总含量, 单位为 μg/mL; A 为吸光度(absorption, Abs)。

1.6 甲酸的测定

采用高效液相色谱(Agilent 公司)对甲酸进行定性定量。进样量 10 μL, 流动相为 5 mmol/L H₂SO₄, 柱温 65 °C, 流速 0.6 mL/min, 分析时间为 30 min, 测定在 280 nm 处的吸光度。

1.7 生物质组成的测定

培养结束后, 2 500×g 离心 5 min 收集藻泥, 冷冻干燥 1 d 得到藻粉, 研磨后, 取适量的藻粉进行生物质组成的测定。以牛血清白蛋白为标准蛋白溶液, 采用考马斯亮蓝 G250 染色液,

测定 595 nm 处的吸光度, 得出蛋白质含量^[11]。以葡萄糖为标准溶液, 采用蒽酮试剂(30 mL 超纯水, 87 mL 浓硫酸, 0.1 g 蒽酮, 100 °C 加热 2–3 min 溶解)测定 621 nm 处的吸光度, 得到总糖含量^[11]。向样品中加入 C17:0 内标, 加入 2% 硫酸甲醇溶液, 70 °C 油浴 1 h 进行转酯化, 利用气相色谱仪(Agilent 公司)进行脂质的定性定量分析^[11]。

1.8 统计与分析

实验设有 3 个生物学重复。在数据分析中, 采用 Origin 软件, 根据生物学重复计算每个数据点的平均值及标准差, 并比较数据间的 *P* 值。

2 结果与分析

2.1 *Stenotrophomonas* sp. 的确认

长时间在 TFP 培养基中传代的 *C. reinhardtii* P3 藻液上清呈现浑浊, 疑似被细菌污染, 考虑到该菌可能具有耐受高浓度甲酸的能力, 因此对其进行了分离。通过 16S rDNA 基因鉴定, 使用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCM TGGCTCAG)和 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT)^[24], 对 PCR 产物进行了测序。通过序列比对发现, 该菌株属于窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*), 与已完成基因组测序的嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia* GYH 和 *Stenotrophomonas maltophilia* STEN0024)具有很高的相似性。通过对 *S. maltophilia* 基因组进行检索, 发现其能够编码内源性甲酸脱氢酶。

2.2 *C. reinhardtii* P3 和 *Stenotrophomonas* sp. 单独培养

如图 2 所示, 单独培养 *C. reinhardtii* P3 时, 其呈现出缓慢的生长趋势, 7 d 培养过程中, OD_{750} 增加了 0.3 ± 0.0 , 消耗氨约 1 mmol/L; 甲酸基本不消耗, 维持在 50 mmol/L 左右。由于

甲酸对电子传递链的抑制, *C. reinhardtii* P3 的 F_v/F_m 和 F_v'/F_m' 在接种 1 d 后分别下降至 0.7 和 0.5 以下, 随后缓慢下降。同样, 单独对 *Stenotrophomonas* sp. 在 TFP 中进行 7 d 培养时, 发现该菌生物量基本没有变化(图 3), 但能消耗约 15 mmol/L 的甲酸, 说明该菌尽管具有一定的转化甲酸的能力, 但难以在甲酸作为唯一碳源、铵盐为氮源条件下生长, 这也与其具有甲酸脱氢酶的推测相吻合。

为了获得足够生物量考察 *Stenotrophomonas* sp. 的影响, 将 *Stenotrophomonas* sp. 使用添加甲酸钠的 LB 培养基中进行培养, 之后离心收获, 用 TFP 清洗后转入 TFP 进行适应性培养。

2.3 *C. reinhardtii* P3 与 *Stenotrophomonas* sp. 共培养

将 *C. reinhardtii* P3 与 *Stenotrophomonas* sp. 在 TFP 中共同培养 7 d, 结果如图 4 所示, CS 组的 OD_{750} 增加了 2.5 ± 0.1 , 相比 C 组(0.5 ± 0.1)增加了约 4 倍。由于 CS 组中 OD_{750} 包含了 *Stenotrophomonas* sp. 的贡献, 因此测定叶绿素 a 和叶绿素 b 的总含量来表示 *C. reinhardtii* P3 生物量的变化。CS 组叶绿素 a 和叶绿素 b 的总含量增加了 (16.3 ± 1.4) $\mu\text{g/mL}$, 相比 C 组 (2.7 ± 0.3) $\mu\text{g/mL}$ 增加了约 5 倍。消耗了约 6.4 mmol/L 的氨, 相比 C 组(约 1.0 mmol/L)增加了约 5.4 倍。消耗了 (38.2 ± 2.0) mmol/L 的甲酸, 而 C 组基本无消耗。培养全程, 培养物的 $F_v/F_m > 0.7$, $F_v'/F_m' > 0.5$, 表明 *C. reinhardtii* P3 的光合活性维持在高水平, 高浓度甲酸没有如 *C. reinhardtii* P3 单独培养那样对其光合作用产生明显的抑制。结果显示, 引入 *Stenotrophomonas* sp. 大大促进了莱茵衣藻 *C. reinhardtii* P3 在 TFP 中的生长, 缓解了甲酸对光合系统电子传递链的抑制, 维持了光合活性。

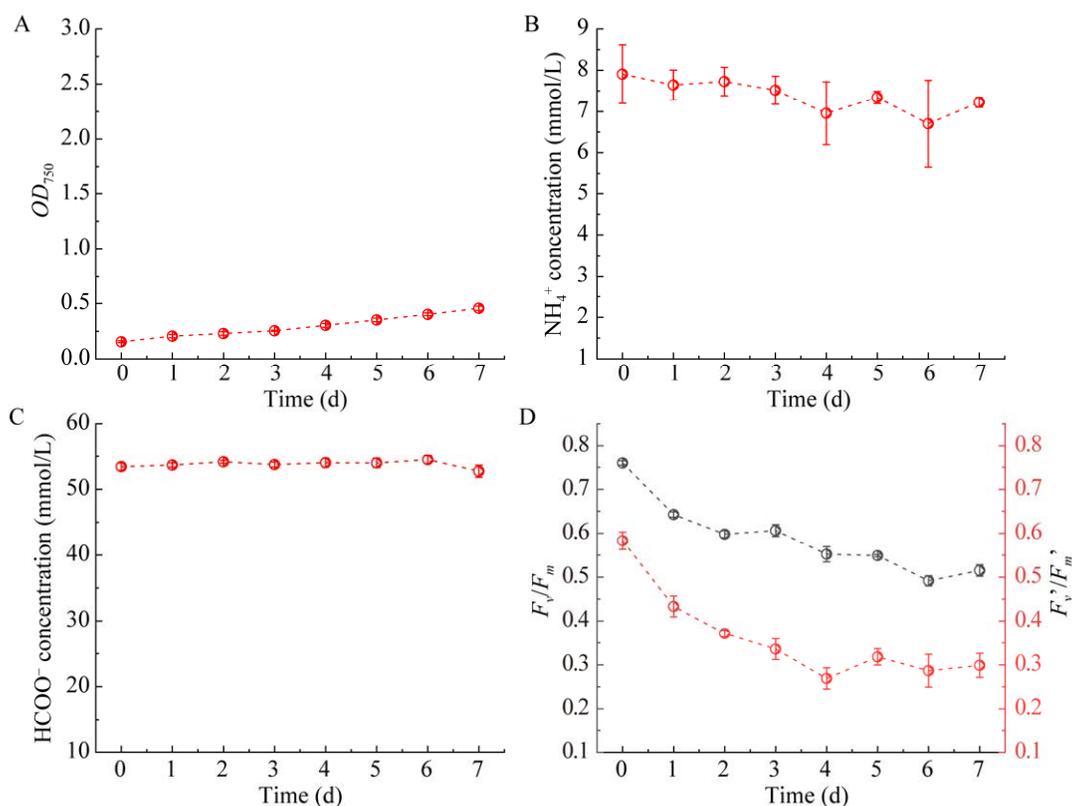


图 2 *Chlamydomonas reinhardtii* P3 单独培养过程中生物量、营养消耗与光合活性的变化 A: *C. reinhardtii* P3 在 TFP 培养基中的生长曲线; B: 氨的消耗量; C: 甲酸的消耗量; D: 最大量子产率(F_v/F_m)和实际量子产率(F_v'/F_m')。

Figure 2 Changes in biomass, nutrient consumption and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* P3 during mono-culture. A: Growth curve of *C. reinhardtii* P3 in TFP medium. B: Ammonia consumption. C: Formate consumption. D: The maximum quantum yields (F_v/F_m) and the actual quantum yield (F_v'/F_m').

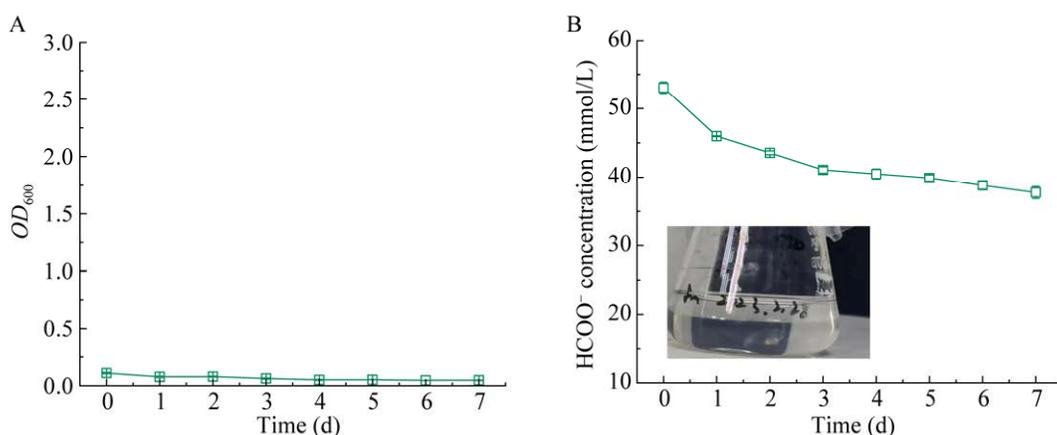


图 3 *Stenotrophomonas* sp. 单独培养过程中生物量与甲酸含量的变化 A: *Stenotrophomonas* sp. 在 TFP 培养基中的生长曲线。B: 甲酸的消耗量。图片拍摄于培养第 12 天。

Figure 3 Changes in biomass, the content of formate of *Stenotrophomonas* sp. during mono-culture. A: Growth curve of *Stenotrophomonas* sp. in TFP medium. B: Formate consumption. The picture was taken on the 12th day of culture.

由于在共培养初期, 甲酸消耗并不明显, 系统仍然保持着较高的甲酸浓度, 因此推测此时 *C. reinhardtii* P3 高光合活性应该与 *Stenotrophomonas* sp. 产生的产物有关, 因此, 通过滤除菌获得 *Stenotrophomonas* sp. TFP 的发酵液, 替代菌液进行培养考察, 即 CSV 组实验。

2.4 *C. reinhardtii* P3 在 *Stenotrophomonas* sp. 发酵液中培养

在培养初期(前 2 天), *C. reinhardtii* P3 光合系统中甲酸产生的抑制得到解除, 其生物量、叶绿素含量、铵根的消耗和叶绿素荧光动力学参数的变化与共生培养无明显差异, 最大的不同在于甲酸根并没有明显消耗(图 4)。结果显示, CSV 组培养 7 d 后 OD_{750} 增加了 0.8 ± 0.2 ,

相比 C 组(0.5 ± 0.1)增加了约 0.6 倍。叶绿素 a 和叶绿素 b 的总含量增加了(5.2 ± 0.6) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相比 C 组(2.7 ± 0.3) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加了约 0.9 倍。消耗了约 2.5 mmol/L 的氨, 相比 C 组(约 1 mmol/L)增加了约 1.5 倍。基本不消耗甲酸。

进一步分析培养前 2 天的变化, 发现该阶段 CSV 组叶绿素含量 a 和 b 的含量与 CS 组相当, 其光合活性甚至略高于 CS 组(对应的光合活性 $F_v/F_m > 0.7$, $F_v'/F_m' > 0.6$), 生长速度较快, 铵根的消耗也主要发生在这一阶段。推测 *Stenotrophomonas* sp. 在 TFP 培养基中释放了某种(或某些)有效成分, 可以解除甲酸对光合电子传递的抑制, 进而促进生长。而在实验条件下, 该物质大约在 2 d 内耗尽。

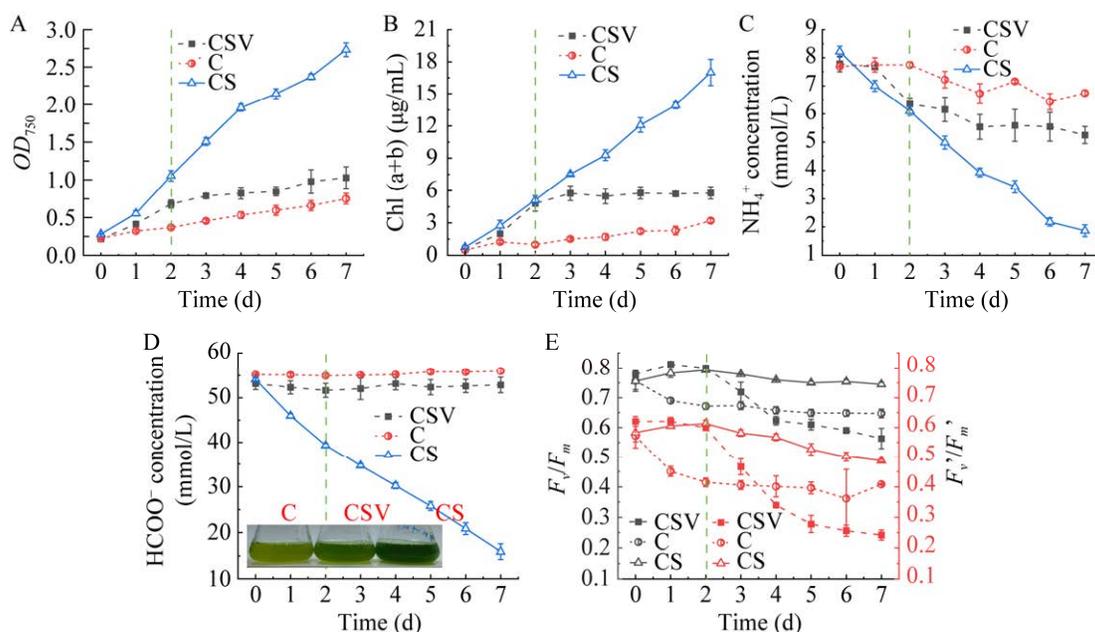


图 4 *Chlamydomonas reinhardtii* P3 与 *Stenotrophomonas* sp. 共培养过程中生物量、色素、营养消耗及光合活性的变化 A: *C. reinhardtii* P3 和 *Stenotrophomonas* sp. 在 TFP 培养基中的生长曲线。B: 叶绿素 a 和叶绿素 b 的总量。C: 氨的消耗量。D: 甲酸的消耗量。图片拍摄于培养第 4 天。E: 最大量子产率(F_v/F_m)和实际量子产率(F_v'/F_m')。

Figure 4 Changes in biomass, pigments, nutrient consumption and photosynthetic activity during the co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Stenotrophomonas* sp.. A: Growth curves of *C. reinhardtii* P3 and *Stenotrophomonas* sp. in TFP medium. B: Total amount of chlorophyll a and chlorophyll b. C: Ammonia consumption. D: Formate consumption. The picture was taken on the 4th day of culture. E: The maximum quantum yields (F_v/F_m) and the actual quantum yield (F_v'/F_m').

2.5 C、CS、CSV 组微藻生物质成分测定

在培养结束时,分别对 C、CS、CSV 这 3 组的生物质组成进行了测定,其中 CS 组中为藻菌共混生物质的测定结果。如图 5 所示,CS 组与 C 组蛋白含量具有极显著差异($P<0.01$),CS 组蛋白含量最高,为 52.3%,相比 C 组(蛋白含量为 33.7%)提高 55.2%,但是作为藻菌共同培养,无法准确判定 *Stenotrophomonas* sp.对蛋白含量的贡献。不过,即便是经过 7 d,CSV 组与 C 组蛋白含量仍具有显著差异($P<0.05$),蛋白含量为 49.6%,相比 C 组提高了 47.2%,表明 *Stenotrophomonas* sp.释放的有效成分显著促进微藻细胞中蛋白含量提升了约 50%。值得注意的是,*C. reinhardtii* 在使用 TAP 进行光合培养或者以乙酸作为碳源进行发酵时,其蛋白含量约占干重的 30%。甲酸条件下能够促进蛋白含量的提升,C 组的结果与之前其他报道的工作相当^[10],然而引入 *Stenotrophomonas* sp.或其发酵液后,蛋白含量出现了巨大的提升。

如图 5 所示,3 组的可溶性总糖含量不具有显著差异,C、CS、CSV 组的总糖含量分别是 17.7%、20.6%、20.7%。总脂肪酸含量 3 组

之间均具有极显著差异($P<0.01$),CSV 组含量最高,为 8.3%,其次是 C 组,为 5.7%,CS 组最低,为 3.6%。CSV 组 3 种主要生物质含量之和占干重 78.6%,CS 组占 76.5%,C 组占 57.1%。表明 *Stenotrophomonas* sp.或其代谢物结合甲酸能够有效地促进 *C. reinhardtii* 产生更高质量的生物质。为了证明这一发现的普适性,进一步测试了 *Stenotrophomonas* sp.与其他常见微藻在甲酸条件下的共培养。

2.6 其他藻与 *Stenotrophomonas* sp.的共培养

由于莱茵衣藻 *C. reinhardtii* P3 与 *Stenotrophomonas* sp.进行共培养时,没有经过实验室自适应进化以及基因改造,推测该菌普遍能与微藻建立良好的协同作用,所以将 *Stenotrophomonas* sp.与其他常见微藻进行共培养实验。如图 6 所示,在添加甲酸的情况下,第 7 天时,小球藻 *C. pyrenoidesa* OD₇₅₀降低约 0.6,引入 *Stenotrophomonas* sp.共培养后,OD₇₅₀升高约 0.3,培养物整体颜色更绿。如图 7 所示,在添加甲酸的情况下,培养 7 d,集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 OD₇₅₀没有变化,引入 *Stenotrophomonas*

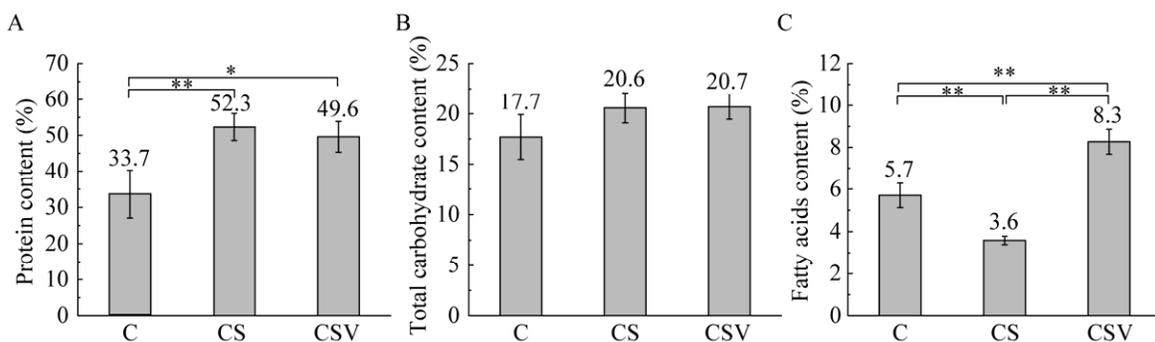


图 5 C、CS、CSV 的生物质组成 A: 蛋白质含量; B: 可溶性总糖含量; C: 脂肪酸含量。** $P<0.01$ 表示各数据点间具有极显著差异; * $P<0.05$ 表示各数据点间具有显著差异。

Figure 5 Biomass composition of C, CS, CSV. A: Protein content; B: Total soluble carbohydrate content; C: Fatty acid content. When $P<0.01$, it is considered that there is a extremely significant difference between the data, shown as **; When $P<0.05$, it is considered that there is a significant difference between the data, shown as *.

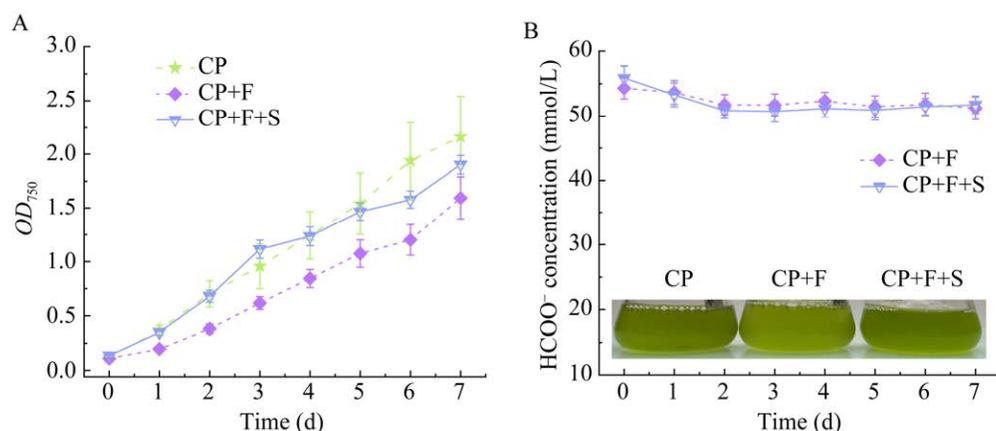


图6 *C. pyrenoidesa* 的甲酸为底物以及 *Stenotrophomonas sp.* 共培养对照实验 A: 生长曲线; B: 以甲酸为底物培养时甲酸的消耗量(照片拍摄于培养后第6天)。

Figure 6 Formate as substrate (or not), *Stenotrophomonas sp.* as the partner (or no) of co-culture experiment of *C. pyrenoidesa*. (A) The growth curve of *C. pyrenoidesa*. (B) The consumption of formate when formate as the culture substrate (The picture was taken on the 6th day of culture).

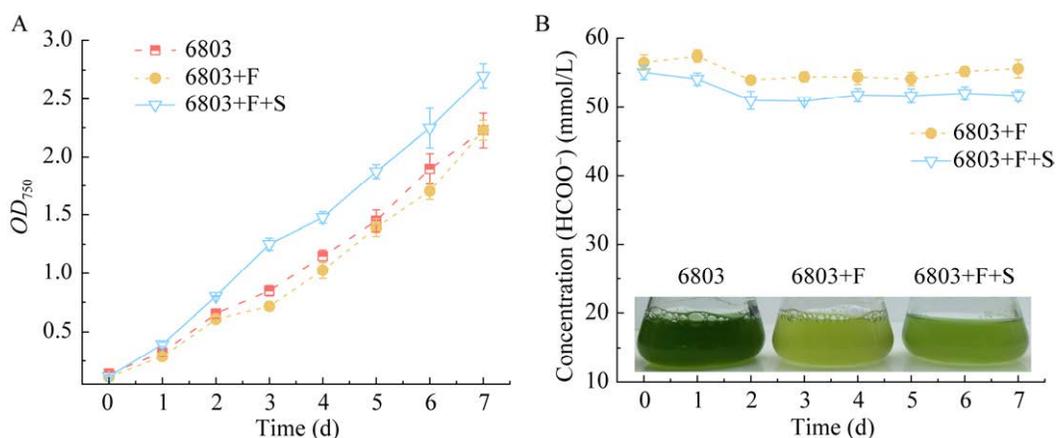


图7 *Synechocystis sp. PCC6803* 的甲酸为底物以及 *Stenotrophomonas sp.* 共培养对照实验 A: 生长曲线; B: 以甲酸为底物培养时甲酸的消耗量(照片拍摄于培养后第6天)。

Figure 7 Formate as substrate (or not), *Stenotrophomonas sp.* as the partner (or no) of co-culture experiment of *Synechocystis sp. PCC6803*. (A) The growth curve of *Synechocystis sp. PCC6803*. (B) The consumption of formate when formate as the culture substrate (The picture was taken on the 6th day of culture).

sp. 共培养后, OD_{750} 升高约 0.5, 同样培养物颜色更深。从图 6、图 7 与图 4 相接近的变化推测, 对于小球藻和集胞藻, 当以甲酸作为底物进行微藻培养时, 引入 *Stenotrophomonas sp.* 同样在一定程度上能够起到缓解抑制、促进微

藻生长的作用, 后续将对 *Stenotrophomonas sp.* 对其他藻株的影响进行细致的分析。

3 讨论与结论

以微藻作为甲酸的生物转化对象, 优势在

于甲酸中碳为+2价,需要额外的还原力到生物质(-1-0价),而光合作用恰好可以直接提供符合人们期望的绿色能量。窄食单胞菌是一种革兰氏阴性菌,能够利用复杂碳源包括乙酸等多碳有机酸,并且其碳源的选择性与氮代谢密切相关^[25-26],然而本研究之前,尽管基因组注释表明其含有甲酸脱氢酶,但是较少人关注到其对甲酸转化的巨大影响。

通过C、CS、CSV这3组的对比实验,发现*Stenotrophomonas* sp.及其发酵液都具有明显缓解甲酸根对*C. reinhardtii* P3的光合作用活性抑制的作用,这种缓解甲酸抑制的效果可能对于真核和原核光合微藻都有效果。早在20世纪80年代,研究人员就对甲酸对光合作用的抑制和解除进行了探索,认为其抑制作用主要是由于甲酸根化学结构与碳酸氢根相似,因此对部分碳酸氢根结合位点形成了竞争性抑制^[27-28],而这种抑制可以在一定程度上通过提升碳酸氢根的浓度加以缓解^[15,19],但是对于过高的甲酸根浓度,例如25 mmol/L以上,缓解作用不明显。然而这些认识无法解释本研究发现的*Stenotrophomonas* sp.及其发酵液对甲酸根抑制的解除。甲基代谢,尤其是甲酸根的代谢和调控直到近年来才逐渐受到研究人员的关注,然而目前甲酸的整体利用率和利用规模都处于起步阶段。未经甲酸驯化的*C. pyrenoidesa*(真核生物)、*Synechocystis* sp. PCC 6803(原核生物)与*Stenotrophomonas* sp.的共培养结果表明,在以甲酸为底物时,*Stenotrophomonas* sp.均能与其建立良好的协同关系,推测该活性成分对于微藻普遍具有促生长作用。*Stenotrophomonas* sp.缓解高甲酸条件下对微藻光合活性抑制的机制,可能需要后续开展包括基因组、蛋白、代谢等多个层面的研究才能加以揭示,同时也可以借助质谱等技术鉴定出在其发酵液中影响微藻生理

活性的物质。明确该活性成分,有望实现纯藻培养,提高对甲酸抑制光合系统的机制的认识,以及拓展甲酸在微藻培养方面的应用。

基于微藻在不同培养系统的生长变化,推测*Stenotrophomonas* sp.与微藻在高甲酸根条件下可能存在如下互作机制(图8)。*Stenotrophomonas* sp.能够转化甲酸并释放了某种活性物质,缓解了甲酸对微藻光合系统电子传递链的抑制,使微藻能够顺利进行光合作用,同时,*Stenotrophomonas* sp.将甲酸转化为CO₂,强化了微藻的碳供给;而*C. reinhardtii*释放到培养基中的有机物,也为*Stenotrophomonas* sp.的生长提供了必需的营养,例如氨基酸或蛋白质。

从应用角度,即使不清楚真正的活性物质及其作用机制,仍然可以通过藻菌共生培养,或者以*Stenotrophomonas* sp.发酵液作为添加剂进行培养。相比而言,直接使用共生培养或其发酵液可能具有其优势,尤其是在开发普适性的微藻光合转化甲酸方面。由于大多数微藻缺乏明确的高效的甲酸利用途径,传统的基因工程和定向进化技术在应用过程中存在诸多限制,因此引入藻菌共生培养,更容易将液态阳光技术与微藻规模培养技术相结合。

在天然微生物中,有一类能够利用甲酸脱氢酶将甲酸氧化释放CO₂同时获得还原力,然后将获得能量用于推动卡尔文本森循环,对释放的部分CO₂进行同化,比较典型的代谢就是真氧产碱杆菌(*Ralstonia eutropha* H16)^[29-30]。而通过引入*Stenotrophomonas* sp.,借助于物种间的协同,能够更加快速地构建一个人工-生物光合成级联体系,加速太阳光能驱动CO₂向蛋白质等大宗化学品的高效绿色转化,有望成为真正可以大规模应用的基于太阳燃料的生物质转化过程(图8)。

本研究以微藻高甲酸根驯化过程中鉴定到

的一株 *Stenotrophomonas* sp. 为出发菌株, 对该菌株及其发酵液对微藻高甲酸根条件下光合培养的影响进行了探索, 发现该菌株能够有效缓解甲酸根对光合活性的抑制, 促进微藻生长, 显著提高微藻胞内蛋白质含量水平, 并具

有在现有真核和原核工业化微藻培养过程中应用的潜力, 有望降低微藻高效光合转化甲酸生产蛋白质等大宗生物质的开发瓶颈, 同时也为认识光合作用调控以及甲基代谢提供了新的方向。

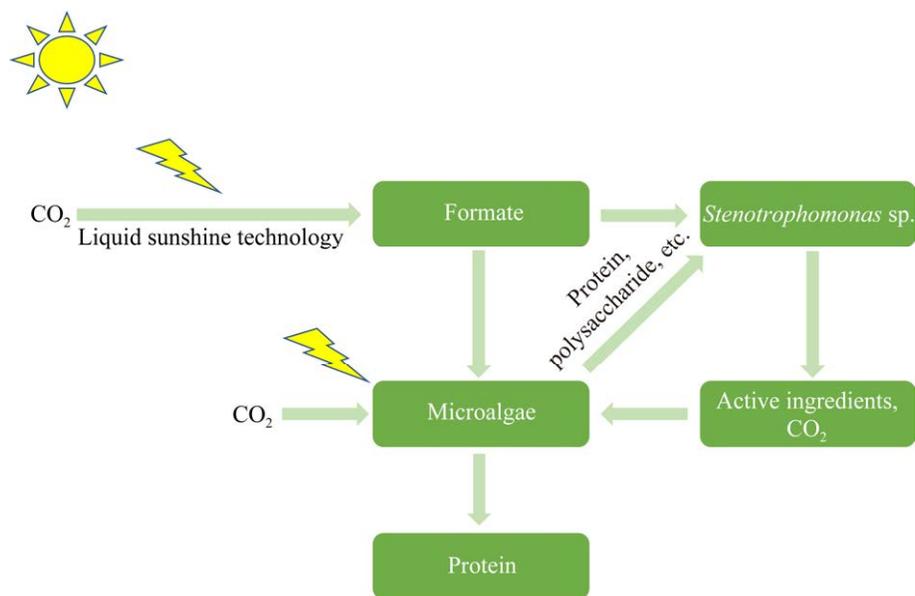


图 8 基于藻菌共培养方式生产蛋白质的固碳策略

Figure 8 Carbon-fixed strategy for protein production based on microalgae-bacteria co-culture.

REFERENCES

- [1] 冯迪凡. 联合国呼吁更强硬减排措施以控温[N]. 第一财经日报, 2023-11-23(A05).
- [2] 张梦楠, 曹楠楠, 朱雪莲. 典型国家“双碳”目标实现路径解析及中国借鉴[J]. 河北地质大学学报, 2024, 47(1): 119-126.
ZHANG MN, CAO NN, ZHU XL. Analysis of the realization path of the “dual carbon” target in typical countries and China’s reference[J]. Journal of Hebei GEO University, 2024, 47(1): 119-126 (in Chinese).
- [3] 2024 政府工作报告[EB/OL]. [2024-03-18]. https://www.gov.cn/yaowen/liebiao/202403/content_6939153.htm
- [4] 杨晓秋, 吴寅嵩, 闫金定, 宋海刚, 范建华, 李元广. 基于文献计量学的微藻生物技术发展趋势[J]. 生物工程学报, 2015, 31(10): 1415-1436.
YANG XQ, WU YS, YAN JD, SONG HG, FAN JH, LI YG. Trends of microalgal biotechnology: a view from bibliometrics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(10): 1415-1436 (in Chinese).
- [5] 高嘉玮, 朱晓飞, 孙韬, 陈磊, 张卫文. 实验室适应性进化技术在光合蓝细菌底盘工程中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3075-3094.
GAO JW, ZHU XF, SUN T, CHEN L, ZHANG WW. Advances in using adaptive laboratory evolution technology for engineering of photosynthetic cyanobacteria[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3075-3094 (in Chinese).
- [6] WÄGNER DS, VALVERDE-PÉREZ B, PLÓSZ BG. Light attenuation in photobioreactors and algal pigmentation under different growth conditions-model identification and complexity assessment[J]. Algal Research, 2018, 35: 488-499.
- [7] YAMANO T, SATO E, IGUCHI H, FUKUDA Y, FUKUZAWA H. Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(23): 7315-7320.
- [8] ZEEBE RE. On the molecular diffusion coefficients of dissolved CO_2 , HCO_3^- and CO_3^{2-} and their dependence on isotopic mass[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2011, 75(9): 2483-2498.
- [9] ZHAI SL, JIANG SC, LIU CC, LI Z, YU T, SUN L, REN GQ, DENG WQ. Liquid sunshine: formic acid[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2022, 13(36): 8586-8600.
- [10] JIANG J, LI XW, YANG KG, WANG Y, YE ML, WANG WY, CAO XP, LI C. Formate for enhancing the growth of microalgae and accumulating high-value

- products[J]. *Algal Research*, 2023, 75: 103261.
- [11] YAO SY, CAO XP, WANG YC, LI DY, WANG WY, CHEN RY, LI C. Enhancing overall carbon fixation and energy conversion with formate in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2023, 72: 103108.
- [12] SHIRAIISHI T, FUKUSAKI E, MIYAKE C, YOKOTA A, KOBAYASHI A. Formate protects photosynthetic machinery from photoinhibition[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89(6): 564-568.
- [13] JAJOO A, BHARTI S, KAWAMORI A. Interactions of chloride and formate at the donor and the acceptor side of photosystem II[J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2005, 37(1): 49-54.
- [14] ALLAKHVERDIEV SI, YRUELA I, PICOREL R, KLIMOV VV. Bicarbonate is an essential constituent of the water-oxidizing complex of photosystem II[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 5050-5054.
- [15] SHEVELA D, KLIMOV V, MESSINGER J. Interactions of photosystem II with bicarbonate, formate and acetate[J]. *Photosynthesis Research*, 2007, 94(2): 247-264.
- [16] PETROULEAS V, DELIGIANNAKIS Y, DINER B A. Binding of carboxylate anions at the nonheme Fe(II) of PS-II. 2. competition with bicarbonate and effects on the Q_A/Q_B electron-transfer rate[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1994, 1188(3): 271-277.
- [17] SAITO K, RUTHERFORD AW, ISHIKITA H. Mechanism of proton-coupled quinone reduction in photosystem II[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(3): 954-959.
- [18] KLIMOV VV, BARANOV SV. Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1503(1/2): 187-196.
- [19] STEMLER A, MURPHY JB. Bicarbonate-reversible and irreversible inhibition of photosystem II by monovalent anions[J]. *Plant Physiology*, 1985, 77(4): 974-977.
- [20] JAJOO A, KATSUTA N, KAWAMORI A. An EPR study of the pH dependence of formate effects on photosystem II[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(4): 186-192.
- [21] 朱振, 曹旭鹏, 苑广泽, 刘娇, 薛松, 田晶. 莱茵衣藻叶绿体型磷酸甘油醛脱氢酶过表达对其储能物质生产的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(9): 50-58.
- ZHU Z, CAO XP, YUAN GZ, LIU J, XUE S, TIAN J. Studies on the effect of overexpressed chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on carbohydrate and fatty acid contents of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(9): 50-58 (in Chinese).
- [22] LI DY, DONG H, CAO XP, WANG WY, LI C. Enhancing photosynthetic CO₂ fixation by assembling metal-organic frameworks on *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 5337.
- [23] NAZ I, BANO A. Assessment of phytohormones producing capacity of *Stenotrophomonas maltophilia* SSA and its interaction with *zea mays* L[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2012, 44(1): 465-469.
- [24] FRANK JA, REICH CI, SHARMA S, WEISBAUM JS, WILSON BA, OLSEN GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2461-2470.
- [25] 李昱龙, 韩正敏. 嗜麦芽窄食单胞菌在环保和农业生产上的应用[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(8): 35-43.
- LI YL, HAN ZM. The applicatiion of *Stenotrophomonas maltophilia* in environmental remediation and agriculture[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(8): 35-43 (in Chinese).
- [26] JIA YT, ZHOU MM, CHEN YC, LUO J, HU YY. Carbon selection for nitrogen degradation pathway by *Stenotrophomonas maltophilia*: based on the balances of nitrogen, carbon and electron[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 294: 122114.
- [27] STEMLER A. Absence of a formate-induced release of bicarbonate from photosystem II[J]. *Plant Physiology*, 1989, 91(1): 287-290.
- [28] STEMLER A. Inhibition of photosystem II by formate-possible evidence for a direct role of bicarbonate in photosynthetic oxygen evolution[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, 593(1): 103-112.
- [29] MAO W, YUAN QQ, QI HG, WANG ZW, MA HW, CHEN T. Recent progress in metabolic engineering of microbial formate assimilation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 6905-6917.
- [30] JIANG W, HERNÁNDEZ VILLAMOR D, PENG HD, CHEN J, LIU L, HARITOS V, LEDESMA-AMARO R. Metabolic engineering strategies to enable microbial utilization of C1 feedstocks[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17: 845-855.