

研究报告

固定化过程对聚球藻生理生化特性的影响

田甜¹ 望克英¹ 梁广钰¹ 金玉勃¹ 李晶¹ 邵萱萱¹ 徐仰仓^{1,2*}

(1. 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457)

(2. 天津市海洋资源与化学重点实验室 天津 300457)

摘要: 【背景】聚球藻(*Synechococcus*)是一类生长于海水中的单细胞蓝细菌,因生长迅速被用来净化污水。为了降低成本,生产上采用了固定化措施,但聚球藻固定化后,细胞内的生理生化变化尚未见报道。【目的】研究聚球藻固定化后生理生化及净化能力的变化,为促进聚球藻的应用提供科学依据。【方法】以海藻酸钠和氯化钙为主要原料固定聚球藻;利用显微观察法计算聚球藻的生长速率;利用溶氧仪检测聚球藻的净光合效率;利用荧光法检测一氧化氮(NO)含量;利用分光光度计法检测叶绿素含量、蛋白含量、硝酸还原酶(NR)活性、Rubisco 羧化酶活性及水质指标。【结果】固定化过程使聚球藻的最大比生长速率降低 24.30%。固定化后聚球藻的净光合速率降低范围为 9.10%–29.10%,但固定化过程对叶绿素含量没有明显的影响。固定化使聚球藻 Rubisco 羧化酶活性、NO 含量和 NR 活性分别降低 25.70%、32.10%和 40.00%,使聚球藻去除红鳍东方鲀养殖废水中总氮、总磷、氨氮和亚硝酸盐的能力分别降低 30.00%、17.70%、20.20%和 21.20%,但对去除硝酸盐及化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)的能力没有影响。【结论】固定化过程抑制了聚球藻 NR 的活性,使其 NO 产量减少,NO 通过转录后修饰的方式降低了光合作用关键酶 Rubisco 的活性。Rubisco 的活性降低使光合效率降低,导致固定化聚球藻的比生长速率和净化污水的能力降低。

关键词: 聚球藻, 固定化, 生长速率, 光合作用, 硝酸还原酶

Effects of immobilization process on physiological and biochemical characteristics of *Synechococcus*

TIAN Tian¹ WANG Ke-Ying¹ LIANG Guang-Yu¹ JIN Yu-Bo¹ LI Jing¹
SHAO Xuan-Xuan¹ XU Yang-Cang^{1,2*}

(1. College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Background] The *Synechococcus* is a kind of single celled cyanobacteria grown in

Foundation items: Developing Ocean Economic Project by Science and Technology of Tianjin City (KJXH2012-14); Innovation and Entrepreneurship Program for Undergraduates (201810057115)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60601458; E-mail: xuyc@tust.edu.cn

Received: May 31, 2018; **Accepted:** August 01, 2018; **Published online** (www.cnki.net): August 07, 2018

基金项目: 天津市科技兴海项目(KJXH2012-14); 大学生创新创业训练计划项目(201810057115)

*通信作者: Tel: 86-22-60601458; E-mail: xuyc@tust.edu.cn

收稿日期: 2018-05-31; **接受日期:** 2018-08-01; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-08-07

ocean. Because of its rapid growth, it is used to purify sewage. In order to reduce the cost, the immobilized method has been adopted in production. However, what does happen in physiological and biochemical characteristics of *Synechococcus* after be immobilized? There is no report yet. **[Objective]** This paper studied the changes of physiological and biochemical characteristic and purifying sewage ability of *Synechococcus* after immobilization in order to provide scientific basis for promoting the application of *Synechococcus*. **[Methods]** The *Synechococcus* was immobilized by sodium alginate and calcium chloride. The growth rate of *Synechococcus* was determined by microscopic observation. The net photosynthetic efficiency of *Synechococcus* was detected by dissolved oxygen analyzer. The nitric oxide (NO) content was detected by fluorescence method. The content of chlorophyll and protein, the activity of nitrate reductase (NR) and Rubisco carboxylase and the index of water-quality were detected by spectrophotometer method. **[Results]** The maximum specific growth rate of *Synechococcus* was decreased by 24.30% by immobilization. The net photosynthetic rate of immobilized *Synechococcus* decreased from 9.10% to 29.10% in comparison with that of free *Synechococcus*. However, there was no significant difference in chlorophyll content between free and immobilizing *Synechococcus*. The activity of Rubisco carboxylase and NR were decreased by 25.70% and 40% respectively and the NO content was decreased by 32.10% by immobilization process. The removing to total nitrogen, total phosphorus, ammonia nitrogen and nitrite in *Takifug rubripes* culturing wastewater by *Synechococcus* were decreased by 30.00%, 17.70%, 20.20% and 21.20% respectively by immobilization process, but it had no effect on removing nitrate and chemical oxygen demand (COD). It is speculated that the immobilization process decreased Rubisco carboxylase activity in *Synechococcus* by decreasing NO content which regulating Rubisco carboxylase activity by post transcriptional modification. **[Conclusion]** The activity of NR was inhibited by immobilization process, which resulted in the decrease of NO content, and the latter inhibited the Rubisco activity, akey enzyme of photosynthesis, by posttranscriptional modification. The decrease of Rubisco activity led to the decrease of photosynthetic efficiency, and finally results in the decrease in growth rate and purifying sewage ability of immobilizing *Synechococcus*.

Keywords: *Synechococcus*, Immobilization, Growth rate, Photosynthesis, Nitrate reductase

聚球藻(*Synechococcus*)是一类生长于海水中的单细胞蓝细菌,广泛分布于地球各大海洋中,是海洋碳循环和初级生产力的主要贡献者之一,在海洋生态系统的光合作用、碳循环及食物链中扮演着十分重要的作用^[1]。聚球藻因生长迅速、生命周期短、能迅速利用环境中的营养物质且能进行光合作用,被认为是一种良好的污水净化生物,可用于废水的净化处理^[2]。但聚球藻的个体大小在 2 μm 之下^[1],净化污水后需要收集聚球藻,这增大了净化污水的成本。细胞固定化技术是利用物理或化学的方法将生物细胞固定在某一特定空间内,使其既不溶于水又能保留生物细胞固有的活性,从而能重复连续使用的生物工程技术。因此,可利用细胞固定化技术降低聚球藻净化污水的成本。已有

利用固定化聚球藻净化污水的研究报道^[3],但聚球藻固定化后,细胞内的生理生化变化尚未见报道。另外,陈丽萍等^[4]发现小球藻、栅藻固定化后净化人工污水的能力高于游离藻,聚球藻固定化后净化污水的能力发生的变化也未见报道。本文研究聚球藻固定化后生理生化的变化以及净化污水能力的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

聚球藻 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002)是本实验室保存种。养殖废水取自天津大港某红鳍东方鲀养殖公司。

1.2 主要试剂和仪器

聚乙烯醇购自 Amresco 公司;海藻酸钠、丙酮、

磺胺、 α -萘胺和氯化钙均为国产分析纯; NADH、磷酸肌酸、磷酸肌酸激酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油醛脱氢酶和 PMSF 均购自 Sigma-Aldrich 公司。光照培养箱, 宁波市科技园区新江南仪器有限公司; 生物显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 溶解氧测定仪, 北京东南仪诚实验设备有限公司; 荧光分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; 酸度计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.3 聚球藻培养

采用 BG-11 含氮培养基培养^[5], 接种量为 5% 左右(藻密度约为 2×10^6 个/mL), 将聚球藻放入恒温光照培养箱中培养, 培养条件: 光照 4 000–4 500 lx, 温度 25 ± 2 °C。

1.4 聚球藻的固定化及去固定化

将含 2×10^6 个/mL 聚球藻、4%海藻酸钠和 2% 聚乙烯醇的混合溶液 1, 滴入由 3%硼酸溶液和 2% 氯化钙组成的混合液 2 中, 室温下静置 2 h, 形成固定化小球。然后将固定化小球在 BG-11 含氮培养基、4 000–4 500 lx 光照强度、 25 ± 2 °C 下培养 8 d, 每天取相同数量的固定化藻珠放入 0.50 mol/L pH 6.50 的 NaH_2PO_4 溶液中, 振荡至藻珠完全溶解, 检测释放的藻细胞的各项生理生化指标。

1.5 生长速率测定

采用显微镜观察计数法, 根据公式(1)计算藻细胞的比生长速率^[6]。

$$\mu = \frac{\ln(C_2/C_1)}{T_2 - T_1} \quad (1)$$

μ 是比生长速率, C 是对应 T 时间的细胞数量。

1.6 叶绿素 a 含量

取 10 mL 藻液过 0.22 μm 的膜, 膜称重后用 10 mL 95%丙酮洗脱膜上的藻, 4 °C 提取藻中的叶绿素 24 h, 分别测定提取液在 664、647、630 nm 处的吸收值。根据公式(2)计算叶绿素 a 含量。

$$P_a(\text{mg/g}) = [(11.85A_{664} - 1.54A_{647} - 0.08A_{630}) \times V \times n] \div m \quad (2)$$

其中, V 是提取液体积(mL), n 是稀释倍数,

m 是样品鲜重(g)。

1.7 硝酸还原酶活性测定

藻液于 8 000 r/min 下离心 5 min 得沉淀, 加 5 mL 提取液(25 mmol/L 的磷酸缓冲液中含 12.1% 的半胱氨酸和 3.7%的 EDTA, pH 7.8)于沉淀中, 在冰浴中研磨后 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为酶提取液。取酶提取液 1 mL 加入 2 mg/mL 的 NADH 溶液 1 mL 和 0.10 mol/L 的 KNO_3 溶液 4 mL, 25 °C 下保温 30 min。加入 1%磺胺溶液 2 mL 和 0.20% α -萘胺溶液 2 mL 显色 15 min, 之后在 4 °C、8 000 r/min 下离心 15 min, 上清液于 520 nm 处测定光吸收值。硝酸还原酶的活性定义为每小时每毫克蛋白的藻生成 NO_2^- 的量 [$\mu\text{g NO}_2^-/(\text{h} \cdot \text{mg protein})$]。

1.8 净光合速率测定

利用 JPSJ-605F 型溶解氧测定仪测定藻液中的氧气含量, 聚球藻的净光合速率按公式(3)计算:

$$\text{净光合放氧速率}(\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chla} \cdot \text{h}) = \frac{\Delta DO \times 1000}{32 \times \text{Chla} \times t} \quad (3)$$

式中, Chla 是叶绿素 a 的浓度(mg/L), t 是持续时间(h), ΔDO 是一段时间内溶解氧变化的差值(mg/L)。

1.9 Rubisco 活性测定

参照 Lilley 等^[7]方法略加改动。将 2 g 收集的聚球藻置于 pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 冰浴研磨, 匀浆液于 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min。弃沉淀, 上清液为待测酶液。反应液总体积为 3 mL, 反应液中含有: 90 $\mu\text{mol/L}$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8), 10 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 , 0.36 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 0.30 $\mu\text{mol/L}$ NADH, 5 $\mu\text{mol/L}$ ATP, 7.50 $\mu\text{mol/L}$ Cr-P, 20 $\mu\text{mol/L}$ NaHCO_3 , 过量的磷酸肌酸激酶、磷酸甘油酸激酶和磷酸甘油醛脱氢酶。取 0.50 mL 待测酶液, 在 25 °C 保温 10 min, 加入终浓度为 3.75 $\mu\text{mol/L}$ 的 RuBP 溶液, 每 30 s 测定一次 340 nm 下的吸光度, 以 1 min 内的吸光度变化计算酶活力。

1.10 NO 含量的测定

采用 DAN 荧光分光光度计法^[8], 取聚球藻藻液

在 10 000 r/min 下离心 10 min 得藻泥, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 冲洗 3 遍, 然后加入溶液 [50 mmol/L pH 7.5 的 Tris/HCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L Dithiothreitol (DTT), 0.5% (体积比) Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 10% (体积比) 甘油], 反复冻融后加入 2 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 13 000 r/min 离心 15 min。上清液用允许 30 kD 以下分子通过的滤膜超滤, 取滤液 1 mL, 加入 60 μ L 硝酸还原酶和 NADH 的混合物, 25 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 然后加入 100 μ L EDTA (0.50 mol/L) 和 120 μ L DAN, 室温反应 10 min, 最后加入 60 μ L NaOH 和 2 660 μ L 蒸馏水至 4 mL。在 EX 365 nm、EM 405 nm、灵敏度 3、狭缝 10 nm 的条件下, 以蒸馏水为本底测定荧光值。根据标准曲线得出 NO 的含量。

1.11 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法。取藻提取液 1 mL, 加入考马斯亮蓝 G250 (0.01%) 4 mL, 混匀, 室温静置 3 min, 于波长 595 nm 处测吸光值。以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线, 根据标准曲线得出蛋白质的含量。

1.12 水质指标测定

废水中总氮、总磷、氨氮、硝氮、亚硝氮、COD 的测定参照《水和废水监测分析方法》^[9]。

2 结果与分析

2.1 固定化过程对聚球藻生长速率的影响

BG-11 是聚球藻的常用培养基, 如图 1 所示, 游离聚球藻在 BG-11 培养基中呈现“S”型生长趋势。培养至第 5 天时, 培养液中藻细胞数量的增加变缓, 游离聚球藻的最大比生长速率为 0.74, 最大藻密度为 9.8×10^8 个/mL。聚球藻固定化后, 生长曲线也呈“S”型, 但开始快速生长的时间比游离藻晚 1 d, 培养液中藻细胞数量达到最大值的时间也晚 1–2 d。固定化聚球藻的最大比生长速率为 0.56, 最大藻密度为 8.8×10^8 个/mL。说明聚球藻固定化后生长速率、最大密度都有所降低。

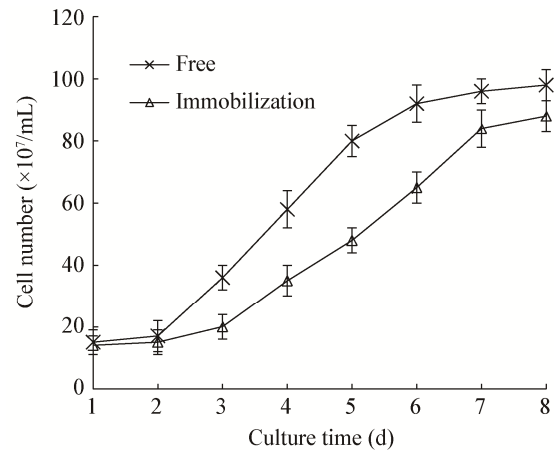


图 1 不同状态聚球藻的生长情况

Figure 1 The growth of *Synechococcus* sp. PCC 7002 in different form

2.2 固定化过程对聚球藻净光合速率的影响

净光合速率指单位时间内植物的总光合放氧量除去呼吸消耗氧量。如图 2 所示, 在光照强度低于 5 000 lx 时, 游离聚球藻的净光合速率随着光照强度的增大而增加; 若再增大光照强度, 则游离聚球藻的净光合速率开始下降, 说明在本实验条件下, 游离聚球藻的光饱和点为 5 000 lx, 超过此值, 光合作用会发生光抑制现象; 聚球藻固定化后, 净光合速率也随着光照强度的增大而增加, 当光照强度超过 6 000 lx 时, 固定化聚球藻的净光合速率增

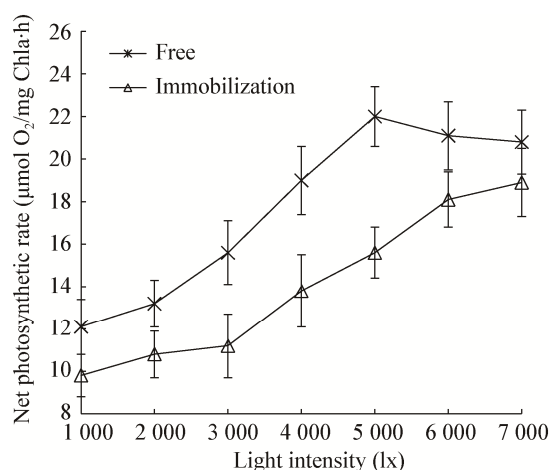


图 2 不同状态聚球藻的净光合速率

Figure 2 The net photosynthetic rate of *Synechococcus* sp. PCC 7002 in different form

长变缓,但未出现明显的光抑制现象。不论是低光照(1 000 lx)还是高光照(7 000 lx),固定化过程均降低了聚球藻的净光合速率,在 5 000 lx 时,降幅最大为 29.10%。

2.3 固定化过程对聚球藻叶绿素含量的影响

如前所述,聚球藻固定化后净光合速率降低了,固定化材料对光线的遮挡可能是导致其降低的原因之一,除此之外,我们探讨了引起光合作用变化的其它原因。首先检测了叶绿素含量的差异,如图 3 所示,游离聚球藻和固定化聚球藻在叶绿素含量方面没有大的差别,接种起初,游离藻细胞中的叶绿素含量略高于固定化的藻细胞,但二者没有统计意义的差别;培养 5 d 后,固定化藻细胞中的叶绿素含量略高于游离藻细胞。说明净光合速率的差异与叶绿素含量的差异关系不大。

2.4 固定化过程对聚球藻 Rubisco 活性的影响

Rubisco 是光合作用暗反应的关键酶,是一种含量较高的可溶性蛋白,可催化 RuBP 与 CO_2 反应, Rubisco 的催化效率较低且受多种内外因子的调控。如图 4 所示,固定化聚球藻的 Rubisco 活性仅为游离聚球藻的 74.30%。如果在 BG-11 培养基中添加终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 cPTIO (一种 NO 的清除剂),则游离聚球藻内的 Rubisco 活性降为原来的 57.10%,说明减少聚球藻体内的 NO 含量可以降低

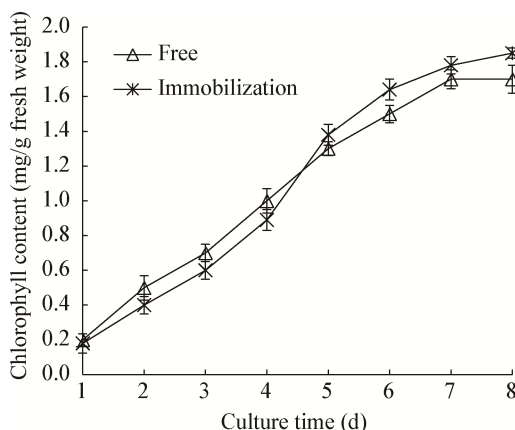


图 3 不同状态聚球藻的叶绿素含量

Figure 3 The chlorophyll content in *Synechococcus* sp. PCC 7002 in different form

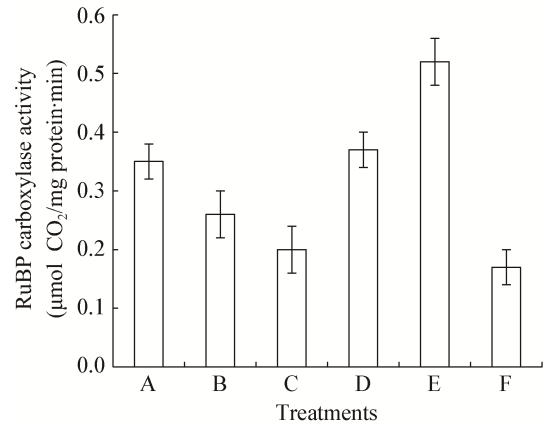


图 4 不同处理下聚球藻 Rubisco 活性的变化

Figure 4 The change of Rubisco activity in *Synechococcus* sp. PCC 7002 under different treatments

注: A: 游离聚球藻; B: 固定化聚球藻; C: 游离聚球藻+cPTIO; D: 固定化聚球藻+SNP; E: 酶提取液+SNP; F: 酶提取液+cPTIO.
Note: A: Free *Synechococcus*; B: Immobilization *Synechococcus*; C: Free *Synechococcus*+cPTIO; D: Immobilization *Synechococcus*+SNP; E: Enzyme extract+SNP; F: Enzyme extract+cPTIO.

其 Rubisco 的活性。如果在 BG-11 培养基中添加终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 SNP (一种 NO 的释放剂),则固定化聚球藻体内的 Rubisco 活性升为原来的 142.30%,这再一次说明 NO 具有刺激 Rubisco 活性的功能,这一结果与 Per 等^[10]的结果一致。如前所述, Rubisco 是一种可溶性蛋白,其活性的调控可通过两种途径:增减基因的表达量和对已有酶蛋白进行转录后修饰。为了确定 NO 是在哪个水平调控聚球藻 Rubisco 的活性,我们进行了体外试验。收集在对数生长期的聚球藻,离心提取 Rubisco,之后在反应液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 cPTIO 或 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 SNP,分别检测 Rubisco 的活性,结果发现 cPTIO 使酶活性降低 51.40%,而 SNP 使酶活性增高 48.60%,说明 NO 是通过蛋白的转录后修饰调节 Rubisco 活性的,这一结果与 Abat 等^[11]在 *Kalanchoe pinnata* 中得到的结果一致。

Rubisco 是植物体内含量最丰富的蛋白质,但是由于体内有 RuBP 等抑制物的存在,其活性会变得较低。植物体内的 Rubisco 只有经过活化之后才能催化底物发生反应。Rubisco 的体外活化依赖于 pH 值、 CO_2 浓度以及 Mg^{2+} 等,体内活化主要通过

Rubisco 活化酶(Rubisco activase)。Rubisco 活化酶与 Rubisco 结合后改变了后者的结构,使其变构为有利于同底物结合的结构形式^[12]。由此可见,体内 Rubisco 的活性受控于 Rubisco 活化酶。Khairy 等^[13]以烟草为对象研究了 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的活性与 NO 的关系,当烟草受到重金属 Cu 和 Cd 胁迫的时候,体内的 Rubisco 和 Rubisco 活化酶活性均降低了,但用 SNP 处理时发现 Rubisco 和 Rubisco 活化酶活性均提高了。说明烟草体内的 Rubisco 和 Rubisco 活化酶活性均受 NO 的正调节。

2.5 固定化过程对聚球藻 NO 含量的影响

如前所述,NO 可以调控聚球藻体内 Rubisco 的活性。为此,检测了聚球藻固定化后体内 NO 含量的变化。如图 5 所示,固定化使聚球藻体内的 NO 含量降低了 31.20%。

Sakihama 等^[14]研究了一氧化氮合酶(NOS)是否参与藻体中 NO 的合成,无论向藻液中加入 NOS 的底物还是抑制剂,均未发现 NO 的产生,推测微藻体内不存在类似动物体中 NOS 催化合成 NO 的途径。在黑暗条件下,当向藻液中加入 NO_2^- 时会有 NO 的产生,而且产生的 NO 浓度与加入的 NO_2^- 浓度成正比;当加入氰化钾(NR 的抑制剂)后,藻液中观察不到 NO 的产生;另外用绿藻的 NR 缺失变异体代替原有的绿藻进行实验也没有发现 NO 产

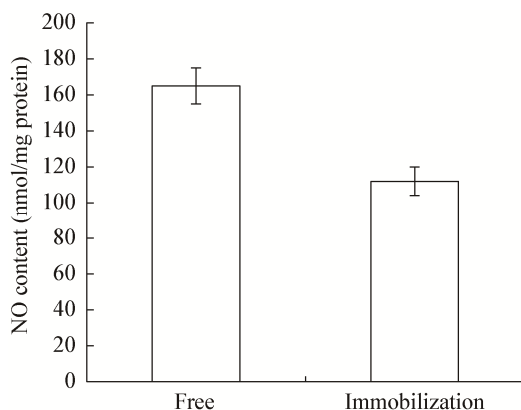


图 5 聚球藻在不同存在状态下 NO 含量的差异

Figure 5 The difference of NO content in *Synechococcus* sp. PCC 7002 under different form

生,因此推测 NR 是绿藻产生 NO 的唯一途径。由于固定化聚球藻的 NO 含量低于游离聚球藻,推测固定化过程可能影响了硝酸还原酶的活性。

2.6 固定化过程对聚球藻硝酸还原酶活性的影响

硝酸还原酶(NR)是植物氮代谢的关键酶和限速酶^[15]。如图 6 所示,聚球藻固定化后, NR 活性降低了 40%,说明固定化过程抑制了 NR 的活性。NR 是一种诱导酶,多种因素如光、硝酸盐、金属离子等都能影响其活性^[16-17]。聚球藻固定化过程中,海藻酸钠与氯化钙形成的海藻酸钙沉淀在一定程度上遮挡了光线,致使固定化小球内部的光线较弱。固定化藻株接收的光线少于游离藻,这在一定程度上降低了后者对 NR 的诱导能力,或许这是固定化聚球藻 NR 活性低于游离藻的原因之一。在生物体内硝酸还原酶催化 NO_3^- 生成 NO_2^- , NO_2^- 进一步在亚硝酸还原酶的作用下生成 NH_4^+ 。另外 NO_2^- 还可转变为 NO, NO 是一种极易扩散的第二信使信号分子,参与多种酶的后修饰,在动物、植物和藻类的生理活动中发挥着重要的作用。

2.7 固定化过程对聚球藻净化养殖废水能力的影响

分别将游离聚球藻和固定化聚球藻接种于红鳍东方鲀养殖废水中(最终密度为 2×10^5 个/mL),培

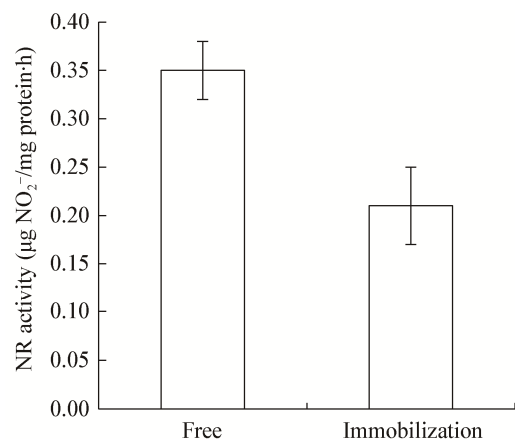


图 6 聚球藻在不同存在形式下 NR 活性的差异

Figure 6 The difference in NR activity in *Synechococcus* sp. PCC 7002 under different form

养到第4天时,检测养殖废水的各指标。如图7所示,游离聚球藻在清除总氮、总磷、氨氮及亚硝酸盐方面优于固定化聚球藻,后者在清除硝酸盐及COD方面与游离聚球藻相差不大。这与陈丽萍等^[4]的研究结果相反。聚球藻被固定化后,外界光线不能很好地照射到聚球藻,特别是处于胶球内部的聚球藻经常处于光饥饿状态,致使光合速率降低,不能为其它代谢提供足够的能量,致使生命活动有所降低。另外,虽然通过条件优化获得了固定聚球藻的最佳条件,胶球的传质阻力达到了最低,但海藻酸钠、聚乙烯醇等化合物在一定程度上仍然阻碍着物质的自由出入,致使固定化聚球藻不能自由地与周围环境进行物质的交换。这些因素可能是游离聚球藻净化污水的能力高于固定化聚球藻的原因所在。尽管如此,固定化聚球藻对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TP、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、COD 的去除率仍在50%以上,分别为71%、65%、52%、60%。在一个长的时间尺度上,固定化聚球藻可以反复使用,而且极大地降低了收藻的难度,因此,固定化聚球藻在工业化净化养殖污水方面仍有光明的前景。

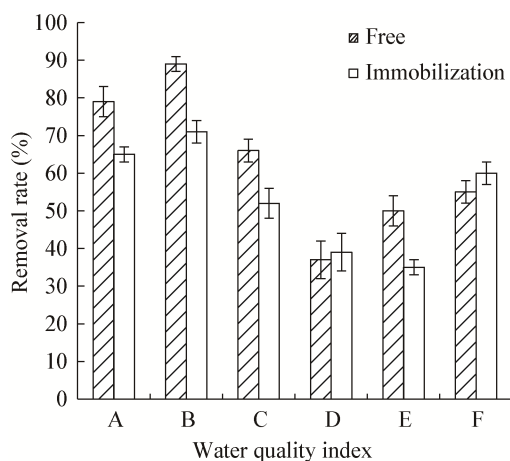


图7 游离聚球藻与固定化聚球藻对养殖废水的净化作用
Figure 7 The effect of free *Synechococcus* sp. PCC 7002 and immobilized *Synechococcus* sp. PCC 7002 on purifying aquaculture wastewater

注: A: 总磷; B: 氨氮; C: 亚硝酸盐; D: 硝酸盐; E: 总氮; F: COD.

Note: A: Total phosphorus; B: Ammonia nitrogen; C: Nitrite nitrogen; D: Nitrate nitrogen; E: Total nitrogen; F: COD.

3 讨论与结论

本试验以聚球藻 7002 为对象,研究了固定化过程对藻生理特性的影响。结果表明,固定化减缓了聚球藻的生长速率。为了探讨固定化过程抑制聚球藻生长的机理,我们比较了游离和固定化聚球藻的净光合速率,结果发现固定化过程抑制了光合作用,不同光照强度下抑制程度不同,最大抑制率为29.10%。说明固定化后聚球藻合成的糖类物质较少,无法为藻的快速生长提供充足的能量,从而使其生长速率降低。虽然固定化过程抑制了藻的光合速率,但却提高了耐受强光的能力,在较高的光照强度下固定化聚球藻不会发生光抑制现象。叶绿素是光合作用的基础,比较游离和固定化聚球藻的叶绿素含量时,发现二者没有明显的差异。说明固定化过程抑制光合作用的机理与叶绿素含量无关。

Rubisco 是光合作用暗反应的关键酶,固定化过程使该酶的活性降低25.70%,这可能是固定化过程抑制光合作用的原因之一。Rubisco 是植物体内含量最丰富的蛋白质,其体内的 Rubisco 只有经过活化之后才能催化底物发生反应,Khairy 等^[13]以烟草为对象研究了 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的活性与 NO 的关系。发现 NO 能提高 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的活性。本实验发现 NO 能提高聚球藻 Rubisco 的活性,而且通过转录后修饰的方式刺激 Rubisco 的活性。NO 是生物体内的一种信号分子,参与生物的生长、发育、代谢等多项生理过程的调控^[18]。比较游离和固定化聚球藻体内 NO 含量的差异可以发现,固定化过程减少了聚球藻 NO 的含量。生物体内有多条合成 NO 的途径,其中 NR 途径是光合生物合成 NO 的主要途径^[19],本实验发现固定化过程能抑制聚球藻 NR 的活性。综上所述,固定化过程抑制了聚球藻 NR 的活性,使其产生了较少的 NO,NO 通过转录后修饰的方式降低了光合作用关键酶 Rubisco 的活性,Rubisco 的活性降低使光合效率降低,合成较少的能源物质,最终使藻细胞的生长速率降低。

生物对污水的净化本质是吸收或吸附水体中的污染物,如氨氮、总磷、COD、重金属等,固定化过程使聚球藻对养殖废水中的主要污染物总氮、总磷、氨氮、亚硝氮的吸收能力降低,说明固定化过程降低了聚球藻净化养殖废水的能力,这可能与固定化过程降低聚球藻的生长速率有关。然而,固定化聚球藻不但可以反复使用且易于收集,这使固定化聚球藻在工业化净化养殖污水方面有可能优于游离聚球藻。

REFERENCES

- [1] Snoeijis-Leijonmalm P, Schubert H, Radziejewska T. Biological Oceanography of the Baltic Sea[M]. Dordrecht: Springer, 2017
- [2] Kube M, Jefferson B, Fan LH, et al. The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal[J]. Algal Research, 2018, 31: 478-488
- [3] Kesaano M, Sims RC. Algal biofilm based technology for wastewater treatment[J]. Algal Research, 2014, 5: 231-240
- [4] Chen LP, Shen QH, Fang WZ, et al. Removal of nitrogen and phosphorus and the lipid production by co-immobilized microalgae and bacteria in municipal wastewater[J]. Science & Technology Review, 2015, 33(14): 65-69 (in Chinese)
陈丽萍, 沈俏会, 方文哲, 等. 藻菌固定化用于市政污水深度脱氮除磷及藻体产油研究[J]. 科技导报, 2015, 33(14): 65-69
- [5] Richmond A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology[M]. Huang H, Gao Z, Song P, trans. Beijing: Science Press, 2014 (in Chinese)
Richmond A. 微藻培养指南: 生物技术与应用藻类学[M]. 黄和, 高振, 宋萍, 译. 北京: 科学出版社, 2014
- [6] Wang SL. Meaning on specific growth rate of microorganism[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Light Industry, 1993, 8(4): 6-9 (in Chinese)
王岁楼. 微生物比生长速率 μ 的含义[J]. 郑州轻工业学院学报, 1993, 8(4): 6-9
- [7] Lilley RM, Walker DA. An improved spectrophotometric assay for ribulosebisphosphate carboxylase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1974, 358(1): 226-229
- [8] Sonoda M, Kobayashi J, Takezawa M, et al. An assay method for nitric oxide-related compounds in whole blood[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 247(2): 417-427
- [9] State Environmental Protection Administration of China. Water and Wastewater Monitoring Analysis Method[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese)
国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- [10] Per TS, Masood A, Khan NA. Nitric oxide improves S-assimilation and GSH production to prevent inhibitory effects of cadmium stress on photosynthesis in mustard (*Brassica juncea* L.)[J]. Nitric Oxide, 2017, 68: 111-124
- [11] Abat JK, Mattoo AK, Deswal R. S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*-ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition[J]. FEBS Journal, 2008, 275(11): 2862-2872
- [12] He YF, Li X, Xie YF. Advances in molecular mechanisms of Rubisco and Rubisco activase[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(8): 3295-3301 (in Chinese)
何亚飞, 李霞, 谢寅峰. Rubisco 与 Rubisco 活化酶的分子机理研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(8): 3295-3301
- [13] Khairy AIH, Oh MJ, Lee SM, et al. Nitric oxide overcomes Cd and Cu toxicity in *in vitro*-grown tobacco plants through increasing contents and activities of rubisco and rubisco activase[J]. Biochimie Open, 2016, 2: 41-51
- [14] Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organism[J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(3): 290-297
- [15] Zhou X, Yang XL, Guo JY. Relationship between adaptability of nitrate Reductase to NaCl stress and substance metabolism in green alga *Dunaliella salina*[J]. Fisheries Science, 2014, 33(2): 119-122 (in Chinese)
周旭, 杨晓玲, 郭金耀. 盐藻硝酸还原酶的盐适应性及其与物质积累的关系[J]. 水产科学, 2014, 33(2): 119-122
- [16] Joseph L, Villareal TA. Nitrate reductase activity as a measure of nitrogen incorporation in *Rhizosolenia formosa* (H. Peragallo): internal nitrate and diel effects[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998, 229(2): 159-176
- [17] Lyu JY, Wang DZ, Hong HS, et al. Comparative studies on nitrate reductase activity of *Thalassiosira weissflogii* and *Dunaliella salina* cultured in two nitrate concentrations[J]. Journal of Jimei University (National Science), 2004, 9(1): 6-10 (in Chinese)
吕嘉扬, 王大志, 洪华生, 等. 两种硝酸盐浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻硝酸还原酶活力研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2004, 9(1): 6-10
- [18] Durner J, Klessig DF. Nitric oxide as a signal in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(5): 369-374
- [19] Xu YC, Zhao BL. The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41(9): 833-838