

氨氮质量浓度和温度对雨生红球藻生长特性的影响

高桂玲, 杨雪薇, 成家杨*

(北京大学深圳研究生院环境与能源院, 广东深圳 518055)

摘要: 研究了不同氨氮(氯化铵)浓度(0.05~0.8 g/L)和生长温度(22、25、28 °C)对雨生红球藻生长特性的影响, 以及不同胁迫温度(30、35、38 °C)对虾青素积累的影响。测定了不同培养条件下雨生红球藻的 OD 值、干重、叶绿素以及虾青素含量。研究表明: 以氯化铵为氮源条件下, 雨生红球藻更适宜在低氨氮浓度下生长, 适宜的氨氮质量浓度是 0.1 g/L, 最适生长温度为 22 °C, 以高温胁迫时, 最佳胁迫温度为 35 °C。

关键词: 氨氮; 温度; 雨生红球藻

中图分类号: Q 93 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)02—0136—08

Effects of Ammonia Concentrations and Temperatures on *Heamatococcus lacustris* Growth

GAO Guiling, YANG Xuewei, CHENG Jiayang*

(Institute of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The effects on the growth characteristics of *Heamatococcus lacustris* of different ammonia concentrations (0.05~0.8 g/L) and different growth temperatures (22, 25, 28 °C) and the effects of stress temperatures (30, 35, 38 °C) on the astaxanthin accumulation were studied in this paper. The main parameters OD, dry weight, chlorophyll a and astaxanthin content were determined. The results show that *Heamatococcus lacustris* grows relatively better under lower concentration of ammonia nitrogen when using NH₄Cl as nitrogen source. Its suitable growth conditions are as follows: temperature: 22 °C, NH₄Cl: 0.1 g/L, whereas the suitable stress temperature is 35 °C.

Keywords: ammonia nitrogen, temperature, *Heamatococcus lacustris*

虾青素(Astaxanthin)又称“虾黄素”,是一种从虾蟹外壳、牡蛎、鲑鱼及藻类、真菌中发现的红色非维生素 A 源的酮类胡萝卜素^[1],具有极强的抗氧化性,在清除自由基、预防癌症、调节免疫活性等方面有其独特的作用与用途,虾青素还具有极高的经济价值,可用于水产动物及家禽、家畜的养殖,提高产

品质量。目前虾青素的销售额已达数亿美元,工业用虾青素每公斤售价 2 500 美元,市场前景十分广阔。雨生红球藻是一种淡水的单细胞绿藻,该藻中虾青素的含量最高可达细胞干质量的 2%~4%,被公认为自然界中天然虾青素含量最高的生物,是用来获取天然虾青素的理想材料^[2]。

收稿日期: 2014-03-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81130070); 中国博士后科学基金项目(2012M520106); 国家博士后特别资助项目(2013T60025); 深圳市战略新兴产业发展专项资金项目(CXZZ20120618111150009)。

* 通信作者: 成家杨(1962—), 江西都昌人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事环境工程方面的研究。E-mail: chengjy@pkusz.edu.cn

影响微藻生长的一个重要限制因子——氮,是合成藻体内蛋白质、核酸、叶绿素的基本元素^[3],它的浓度最终会影响微藻的生物量^[4]。研究表明, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 等还原态氮是浮游植物优先利用的氮形式,因为利用这些形式的氮消耗的能量更少,而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 等氧化态氮需要先在酶的作用下转化成还原态的氮才能被利用。因此在以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 作为氮源时,藻有更多的能量用于生长^[5-6],浮游植物利用无机氮的能力是氨氮>硝态氮>亚硝态氮^[7]。不同报道的适宜的氮质量浓度的差异较大。Morosa^[8]报道,24.7 mg/L的氮质量浓度适合雨生红球藻 34/7 生长;陆开形等^[9]报道,100 mg/L 氮浓度适合雨生红球藻生长(武汉水生所淡水藻种库);张京浦等^[10]研究雨生红球藻光合放氧速率确定适合其生长的氮质量浓度为 70 mg/L。

温度对雨生红球藻的生长和虾青素的累积有很大影响,Harker 等^[11]与 Borowizka 等^[12]认为雨生红球藻的最适生长温度约为 24~28 °C;Lu 等^[13]认为雨生红球藻的最适生长温度为 24~28 °C,当环境温度高于 28 °C 则其生长受到抑制。Ding 等^[14]认为 *H.lactstris* 的生长温度范围为 21~27 °C,最适温度为 25 °C;但是,对雨生红球藻进行高温胁迫的温度却鲜有报道。

寻找红球藻细胞生长和虾青素累积的最适条件,实现细胞生长和虾青素合成的有关调控,缩短培养时间和提高产量,仍是当今研究的重点,也是技术的关键。

作者就氨氮质量浓度、生长温度及胁迫温度对雨生红球藻生长及虾青素产量的影响进行研究,旨在探究雨生红球藻对氨氮的利用情况,为雨生红球藻的大规模商业化提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用雨生红球藻 *H5Haematococcus lacustris*:藻种由武汉水生所提供。

1.2 所用药品及仪器

硝酸钠(分析纯),氯化铵(分析纯),无水乙醇,二甲基亚砜,盐酸;紫外分光光度计 UV-1800:北京佳源兴业科技有限公司;离心机 5810R:深圳市万科科技有限公司;电热恒温水浴锅(HWS-12):上海一恒科学仪器有限公司;隔膜真空泵 GM-0.5B:天津市津腾实验设备有限公司;智能型人工气候箱

MGC-450HP-2:上海一恒科学仪器有限公司;Clever Chem 200 全自动间断化学分析仪 GRS-10705-01-B:深圳朗诚实业有限公司。

1.3 微藻培养

培养基选用 BG-11,所用试验器皿先经浸泡、高压灭菌、冷却后使用。试验操作均在超净工作台无菌条件下进行。将处于对数生长期的海洋微藻按 10%接种于 250 mL 三角瓶中,置于植物培养箱中培养,培养条件为光照强度约 1 500 lx、培养温度分别为 25、28 °C,每个温度设 3 个平行。另外,每个温度下都分别设 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 g/L 氯化铵的质量浓度梯度,每个质量浓度设 6 个平行。光暗比为 12 h 光照:12 h 黑暗。每天摇动三角瓶 3 次,以防止藻细胞附壁沉淀。每种海洋微藻重复培养 3 次。每个培养温度下各个浓度分别设胁迫温度 31、35、38 °C。

1.4 OD 值与生物量的标准曲线

预培养微藻 3~5 L,待其生长至对数生长期后,将其离心收获,用蒸馏水洗涤两次,把待测藻液分为 6 份,每份约 300 mL 左右,分别加入蒸馏水或者离心浓缩得不同浓度,测量每份藻液的吸光度 OD 值(A)。从各浓度梯度中取 100~400 mL 藻液(*v*),用玻璃砂芯真空抽滤,滤膜为 Whatman 玻璃纤维滤膜(GF/C Cat No.1822-47),孔径 1.2 μm。抽滤前对滤膜进行称质量 m_1 ,抽滤后将滤膜移至烘箱,65 °C 烘干 12 h 至恒质量,再次称质量 m_2 。用 $(m_2-m_1)/v$ 得到吸光度为 A 时每升微藻的干质量 m 。根据各梯度浓度的 A 与对应的 m 值,利用 excel 软件绘制 OD-干质量标准曲线。

1.5 藻液叶绿素 a 的测定——超声辅助热乙醇提取法测定叶绿素 a

取对数生长期的铜绿微囊藻藻液 10 mL 过 0.45 μm 的混合纤维素膜,将带藻细胞的膜冷冻过夜,取出后迅速用 8 mL 热乙醇(80 °C)于热水浴(80 °C)中萃取 2 min,将萃取液超声破碎 5~20 min 后,于暗处静置 2~6 h,4 °C、5 000 r/min 离心 5 min,取上清液 3.5 mL 置于比色皿中,于 665 nm 和 750 nm 处测吸光值,然后滴加 200 μL 的 1 mol/L 盐酸酸化,5 min 后于波长 665 nm 和 750 nm 处再测吸光值^[15]。

根据 Lorenzen 公式计算单位样品中叶绿素 a 质量浓度:

$$a (\mu\text{g/L}) = AK (E_{665b} - E_{665a})v/VL, E_{665b} = D_{665b} - D_{750b}, E_{665a} = D_{665a} - D_{750a}$$

其中, A 为不同萃取溶剂中叶绿素 a 的比吸光系数; K 为常数, 为纯叶绿素 a 酸化前的光密度与酸化前后的光密度变化的比值; v 为提取液体积 (mL); V 为样品的体积 (L); L 为比色杯光程长度 (cm); D_{665b} 为加酸前 665nm 波长处 OD 值; D_{750b} 为加酸前 750 nm 波长处 OD 值; D_{665a} 为加酸后 665 nm 波长处 OD 值; D_{750a} 为加酸后 750 nm 波长处 OD 值。

采用热乙醇为萃取溶剂, A 为 11.5, K 为 2.43, 比色皿光程为 1 cm, 则公式(1)可简化为:

$$\text{叶绿素 } a (\mu\text{g/L}) = 27.9(E_{665b} - E_{665a})v/V$$

1.6 虾青素的测定

移取 5 mL 孢子态的藻体, 5 000 r/min 离心 10 min, 除上清液, 收集藻体。加入 1 mL 甲醇/KOH 溶液 (30% 甲醇和 5% KOH 混合液) 振荡, 使藻种均匀分散后置 65 °C 恒温水浴中加热 15 min, 4 000 r/min 离心 15 min, 除上清液; 沉淀加蒸馏水离心洗涤 2 次, 去除残留碱液。上述藻体, 加入 5 mL 二甲基亚砷, 200 W 超声波破碎 10 min, 40 °C 振荡提取 20 min, 离心收集上清液, 沉渣加入二甲基亚砷重复提取, 直至藻体沉淀变白, 取红色上清液测 OD₄₉₀^[16]。

$$\text{虾青素含量 } : c = 4.5 \times A_{490} \times V_a / V_b$$

其中: c 为虾青素质量浓度 (mg/L); A_{490} 为上清液在 490 nm 吸光值; V_a 为提取液体积 (mL); V_b 为藻液体积 (mL)。

1.7 NH₄⁺的测定

每隔 5 天取 2 mL 藻体液于离心管, 4 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 采用 Clever Chem200 全自动间断化学分析仪进行 NH₄⁺ 测定, 以蒸馏水为标准。

1.8 数据统计与分析

采用 EXCEL 2000 和 SPSS 11.5 进行统计, 数据采用平均值±标准差 (mean±SD) 的形式表示, 显著水平为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 不同温度、氨氮质量浓度对雨生红球藻生长的影响

通过研究雨生红球藻的生长 OD 值与干质量之间的线性关系, 可为量化评估生物量提供计算依据。如图 1 所示, 雨生红球藻生长 OD 值与其干质量

之间的关系, 可用线性方程 $y = 0.996 0x + 0.292 7$ 来表征, 其中 y 表征干重 (g/L), x 表征藻液在 680 nm 处吸光度, R^2 值为 0.999 4, 线性拟合度较好。以下研究中所涉及生物量均通过测定 OD 值并进行线性拟合所得。

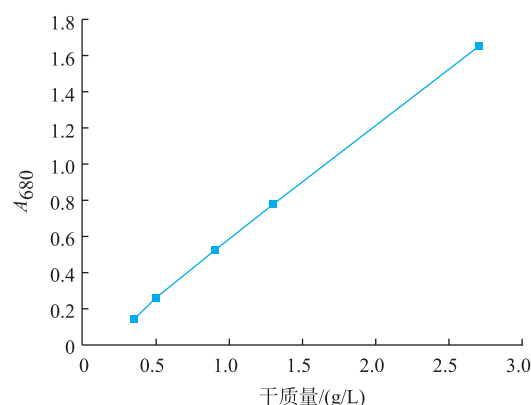


图 1 OD 值与细胞干重标准曲线

Fig. 1 Standard curve of OD and dry cell weight

如图 2 所示, a、b、c 分别表示在 22、25、28 °C 下各氨氮质量浓度组的生长曲线, 经过 11 d 的培养, 各组生长出现明显差异 ($P < 0.05$)。22 °C 下最高生物量在 0.65~3.51 g/L 范围内, 25 °C 下最高生物量在 0.84~2.41 g/L 范围内, 28 °C 下最高生物量在 0.89~1.13 g/L 范围内。雨生红球藻在低温下较高温下生长要好, 表现为生物量较高, 且在 25 °C 与 28 °C 下均出现藻体发白的现象。22 °C 下最高生物量是 28 °C 时最高生物量的 3.95 倍。由此说明雨生红球藻的最适生长温度为 22 °C, 这与 Ding 等^[17]的报道相一致。

氨氮质量浓度对雨生红球藻生物量的影响也不同。0 氮组在培养第 3 天开始变红, OD 值开始下降, 说明缺氮已经影响了藻体正常生长。其他各组变化趋势一致, 其中, 0.1 组干质量明显高于其他组 ($P < 0.05$)。另一方面, 在 0.05~0.1 g/L 范围内, 藻体干质量随着氨氮质量浓度升高而升高, 且对数期随着氨氮质量浓度的升高略有提前, 而在 0.2~0.8 g/L 范围内随着氨氮质量浓度的升高干质量反而递减, 并且培养液颜色随时间推移开始变淡, 甚至出现白色, 说明雨生红球藻开始死亡。这可能是由于高质量浓度的氨氮抑制藻细胞的生长或对其产生了毒副作用, 从而导致雨生红球藻的死亡。因此, 雨生红球藻对氯化铵的耐受质量浓度为 0.4 g/L (氨氮质量浓度 141 mg/L), 当氨氮质量浓度高于此值时, 雨生

红球藻不能较好地生长,这与李博等^[8]研究氨氮对钝顶螺旋藻生长影响的结果一致。有研究表明,高质量浓度的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 对浮游植物有毒害作用,当环境中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度过高时,浮游植物的生长就会受到抑制^[9]。对照组中,在完全无氮条件下,藻细胞仍表现有微弱生长,表明藻细胞自身有一定的氮储备功能,当生长环境中氮素匮乏时,细胞将储备的氮释放并利用。

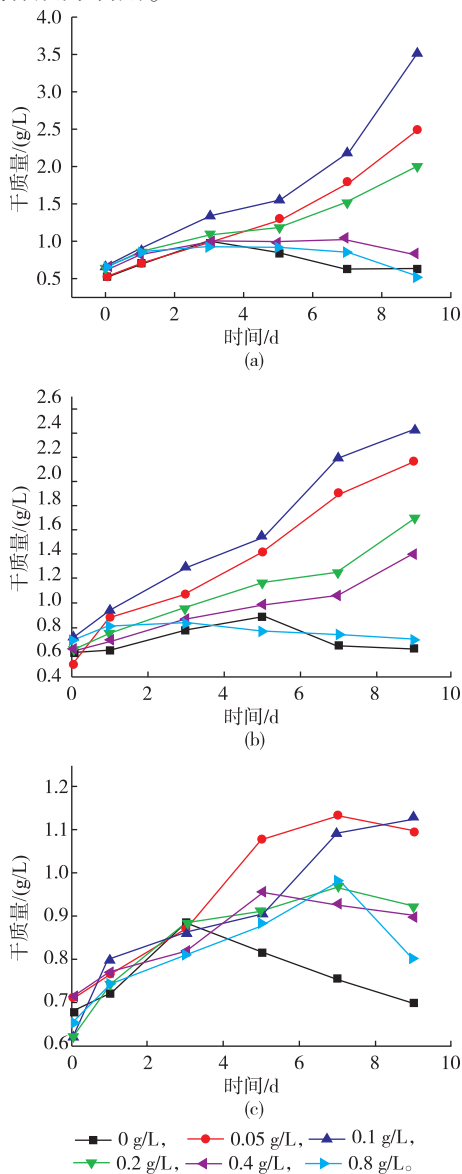


图2 不同温度、不同氨氮质量浓度下细胞生长情况

Fig. 2 Cell growth condition under different temperature and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration

2.2 不同温度、氨氮质量浓度对雨生红球藻叶绿素产生的影响

如图 3, a、b、c 分别表示在 22、25、28 °C 下各氮

质量浓度组叶绿素 a 的变化图。可以看出,在对数期(即培养第 5 天)叶绿素 a 质量浓度均达到最大值。22 °C 下各个质量浓度组(除 0 组)最高值差别不大 ($P>0.05$), 最高叶绿素 a 质量浓度可达 1 059.3 $\mu\text{g/L}$, 25 °C 下最高叶绿素 a 质量浓度可达 435 $\mu\text{g/L}$, 28 °C 条件下最高叶绿素 a 质量浓度可达 303 $\mu\text{g/L}$ 。

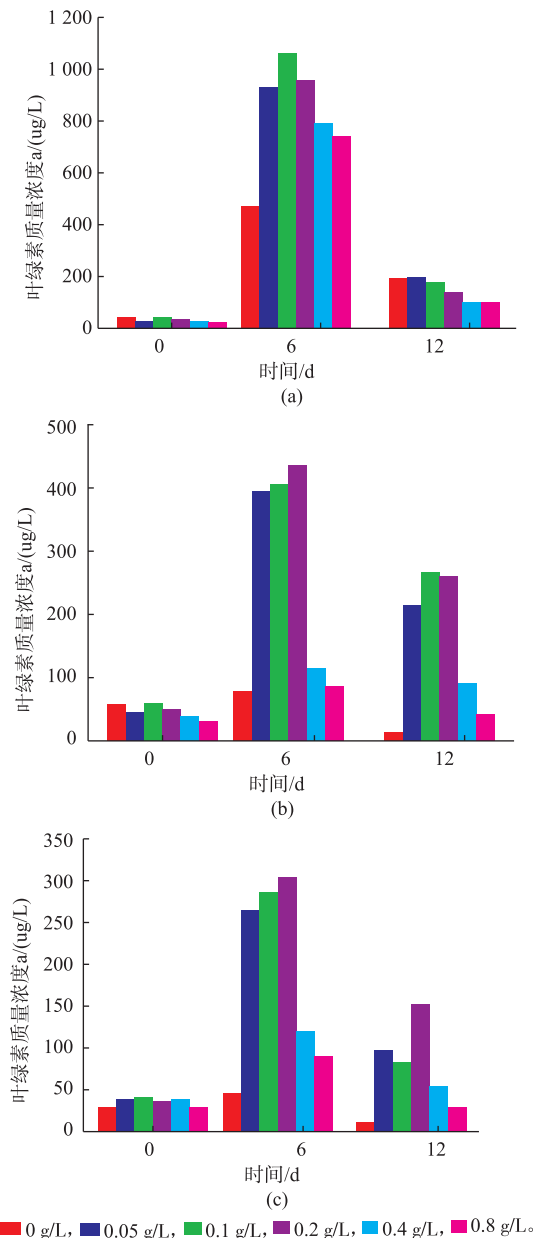


图3 不同温度、不同氨氮质量浓度下细胞中叶绿素 a 质量浓度的变化

Fig. 3 Chlorophyll a content change under different temperature and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration
在 22 °C 下, 在低质量浓度范围内 (0.05~0.1

g/L), 叶绿素 a 质量浓度随着氨氮质量浓度的升高而增加,在高质量浓度范围内(0.1~0.8 g/L),叶绿素 a 质量浓度随着氨氮质量浓度的升高而减小,对数期之后叶绿素 a 质量浓度开始减少,在此温度下较适宜的氨氮质量浓度是 0.1 g/L,此时的生物量和叶绿素 a 质量浓度均为最高。在 25 °C 和 28 °C 培养条件下,叶绿素 a 的变化趋势是一致的,即在低质量浓度范围内(0.05~0.2 g/L),叶绿素 a 质量浓度随着氨氮质量浓度的升高而增加,在高质量浓度范围内(0.2~0.8 g/L),叶绿素 a 质量浓度随着氨氮质量浓度的升高而减小。且叶绿素 a 质量浓度最高值均出现在对数期,即培养第 5 天左右,对数期之后叶绿素 a 的质量浓度均开始下降。对于氨氮为 0.4 g/L 和 0.8 g/L 组,由于藻体出现发白现象,所以叶绿素 a 均降至很小甚至是 0,而在 22 °C 条件下各组均未出现藻体发白现象,说明在低温条件下高质量浓度氨氮对藻细胞生长的毒害作用不明显。而且低质量浓度氨氮有利于促进叶绿素 a 的合成,而高质量浓度氨氮却抑制了叶绿素 a 的合成,这是由于高质量浓度氨氮对藻细胞的毒害作用,使光合作用受到影响所致。

综合图 3 可知,雨生红球藻较宜在低质量浓度氨氮下生长,高质量浓度氨氮不仅会影响藻体生长,甚至会产生毒害作用而使藻细胞死亡,另一方面雨生红球藻在低温下生长较高温好,且最适宜的生长温度为 22 °C,在此温度下最适宜的氨氮质量浓度为 0.1 g/L,比 25 °C 时最适宜的 0.2 g/L 所需氨氮少,这为以后定向供给氮源提供依据。并且在低温下生长的最高叶绿素 a 质量浓度远远大于高温条件下的最大叶绿素 a 质量浓度,分别为 25 °C 和 28 °C 的 2.5 倍和 3.2 倍。说明温度过高同样会抑制藻细胞的光合作用,从而影响生物量及叶绿素 a 质量浓度。

2.3 不同温度、氨氮质量浓度对虾青素产生的影响

如图 4 所示,a、b、c 分别表示在三种(22、25、28 °C)生长温度下,各个胁迫温度对虾青素积累产生的影响。在 22 °C 条件下,由 a 可以看出,3 种胁迫温度(30、35、38 °C)下均有虾青素产生,虾青素质量分数范围在 3.134~25.327 mg/g,35 °C 胁迫温度较适宜虾青素积累,最高虾青素质量分数可达 2.53%(干质量)。在 25 °C 和 28 °C 条件下,由 b、c 可以看出,30 °C 胁迫下各组均有虾青素积累,但虾青素质量分数

差别较大($P<0.05$),35 °C 和 38 °C 胁迫条件下,只有 0.2 g/L 组有虾青素产生,其余组藻体均死亡、变白、沉淀,没有变红。另外,25 °C 培养温度下各组虾青素质量分数都明显高于 28 °C($P<0.05$)。

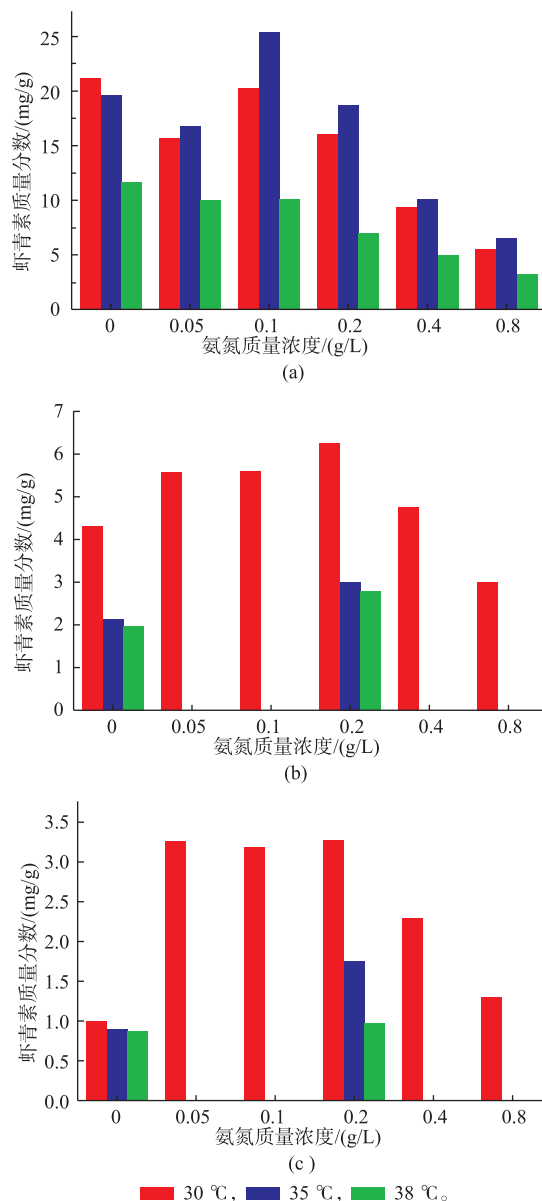


图 4 不同生长温度、不同氨氮质量浓度下虾青素的质量分数
Fig. 4 Astaxanthin content under different growth temperature and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration

22 °C 生长条件下,各组虾青素质量分数规律一致,即在低质量浓度范围内(0.05~0.1 g/L),虾青素质量分数随着氨氮质量浓度的升高而增加。在高质量浓度范围内(0.1~0.8 g/L),虾青素质量分数随着氨氮质量浓度的升高而减小。0.4 和 0.8 组虽然在

22 ℃条件下生物量较高,但在胁迫阶段出现藻体死亡现象,也就是说,在低温生长条件下,高氨氮对藻体抑制作用可以得到缓解,但在高温条件下,这种抑制作用明显,不仅抑制藻细胞生长,即 OD 值下降,藻体变黄沉淀,还抑制了虾青素的积累,表现为虾青素质量分数不高,说明在 22 ℃下,最佳胁迫温度为 35 ℃。

25 ℃和 28 ℃生长温度下,30 ℃胁迫时,在低质量浓度范围内(0.05~0.2 g/L),虾青素质量分数随着氨氮质量浓度的升高而增加,但差别不大($P>0.05$)。在高质量浓度范围内(0.2~0.8 g/L),虾青素质量分数随着氨氮质量浓度的升高而减小,差别相对较大。

22 ℃生长条件下 35 ℃胁迫,0.1 组最高虾青素质量分数为 25 mg/g,是 25 ℃生长条件下 30 ℃胁迫 0.2 组的 4 倍,是 28 ℃生长条件下 30 ℃胁迫 0.2 组的 8 倍。

2.4 雨生红球藻在不同温度下对不同质量浓度氨氮的利用情况

如表 1 所示,A、B、C 分别表示在 22、25、28 ℃下各组对铵根离子的消耗情况。在低质量浓度范围

内(0.05~0.1 g/L),随着铵根离子质量浓度的升高,指数末期铵根离子的消耗率随之升高,在高质量浓度范围内(0.1~0.8 g/L),随着铵根离子质量浓度的升高,指数末期铵根离子的消耗率随之降低,到最终实验结束各胁迫温度(30、35、38 ℃)组均变红,且最终铵根离子消耗率均大于 90%。说明雨生红球藻细胞利用铵根离子主要在营养生长阶段,消耗了大多数铵根离子(80%~87%),而在高温胁迫阶段,虽然藻细胞生长受到抑制但仍消耗铵根离子,说明虾青素积累阶段仍需要氮源。

在指数期末期,各组铵根离子消耗情况,低质量浓度范围内(0.05~0.2 g/L),随着铵根离子质量浓度的升高,指数末期铵根离子的消耗率随之升高,在高质量浓度范围内(0.2~0.8 g/L),随着铵根离子质量浓度的升高,指数末期铵根离子的消耗率随之降低,但利用率明显低于同期的 22 ℃,说明高温下细胞生长受到影响的同时吸收铵根离子也受到影响。在胁迫阶段,30 ℃和 38 ℃胁迫温度下藻体细胞变白,细胞死亡,至实验结束,离子检测结果显示铵根离子利用率未有较大变化。而对于 30 ℃胁迫条

表 1 不同培养温度下雨生红球藻对 NH_4^+ 消耗情况

Table 1 Consumption of ammonia nitrogen by *Haematococcus lacustris* at different temperatures

	初始质量浓度/(mg/L)		指数末期/(mg/L)	消耗率/%	变红-30 ℃/(mg/L)	利用率/%
A	0	0.945±0.115	0.115±0.011	87.801	0.065±0.002	93.121
	0.05	20.727±0.451	3.517±0.125	83.032	0.366±0.015	98.232
	0.1	46.454±0.811	6.457±0.112	86.109	1.092±0.112	97.653
	0.2	95.908±0.546	13.812±0.534	85.604	1.822±0.091	98.104
	0.4	196.816±0.877	30.281±0.665	84.613	2.871±0.128	98.535
	0.8	396.631±0.877	78.929±1.004	80.102	10.093±0.144	97.466
B	0	1.118±0.098	0.155±0.101	86.121	0.097±0.005	91.302
	0.05	21.447±0.182	3.969±0.202	81.523	0.622±0.112	97.117
	0.1	45.012±0.334	7.517±0.441	83.331	0.945±0.098	97.901
	0.2	92.213±0.119	13.926±0.778	84.908	1.844±0.579	98.071
	0.4	187.991±0.998	37.415±0.587	80.102	4.512±1.001	97.616
	0.8	365.584±1.132	91.395±0.997	75.117	11.395±0.164	96.911
C	0	1.918±0.058	0.456±0.071	76.212	0.148±0.005	92.301
	0.05	23.457±0.082	5.184±0.052	77.971	3.026±0.212	87.117
	0.1	48.022±0.234	10.133±0.151	78.991	5.816±0.198	87.901
	0.2	96.213±0.319	33.770±0.478	64.971	21.167±0.479	78.001
	0.4	177.994±0.398	88.820±0.287	50.102	57.677±0.601	67.621
	0.8	345.784±0.132	189.838±0.197	45.141	149.381±0.264	56.917

注:初始质量浓度(mg/L)表示初始时培养基中氮质量浓度(mg/L);指数末期(mg/L)表示对数末期时培养基中氮质量浓度(mg/L);消耗率(%)表示到对数末期时微藻消耗初始氮的百分率(%);变红-30℃(mg/L)表示在最佳胁迫温度 30 ℃下微藻变红时培养基中剩余的氮质量浓度(mg/L);利用率(%)表示到变红为止微藻消耗初始氮的百分率(%)。

件下,藻细胞最终变红,积累虾青素,且铵根离子利用率均在90%以上。

28℃培养条件下,细胞生长受到明显抑制,尤其是0.4和0.8组,藻细胞出现发黄变白的现象,至第5天,铵根离子利用率只有50%,在低质量浓度范围内的最高利用率也只有78%,明显低于22℃和25℃,在35℃和38℃胁迫温度下藻体最终均变白,没有虾青素积累,说明高温已经使藻细胞死亡。而在30℃胁迫条件下,0.4和0.8组由于受到高氨氮的毒害作用,藻细胞生长也受到影响,不能有效利用铵根离子,至实验结束,两组仍有铵根离子剩余。

3 结语

雨生红球藻细胞在环境胁迫时会由绿色游动细胞变为红色不动细胞,并开始积累虾青素,藻细胞会有这些变化由于在逆境胁迫条件下,细胞的一些基因表达会发生改变,导致正常基因表达受到抑制,加强或者诱导一些特异基因的表达,表现为对不利环境的抗逆反应。

作者以氯化铵为氮源,研究了不同氨氮质量浓度对雨生红球藻生长的影响。结果表明:对于雨生红球藻H5(*Haematococcus lacustris*),最适宜的生长条件为光照强度1500 lx、pH 8,温度22℃,且低氨氮质量浓度下生长较高氨氮质量浓度好,适宜的氨氮质量浓度是0.1 g/L,最大干重为3.51 mg/mL。以高温胁迫时,温度过高(38℃)导致藻体死亡,最佳胁迫温度为35℃,虾青素质量分数最高为2.5%(干质量)。

雨生红球藻对氨氮质量浓度有一个耐受值,本研究结果显示耐受质量浓度为0.2 g/L,在这个质量浓度范围内生长较好,超过这个质量浓度,藻细胞积累NH₄⁺过多而产生单盐毒害作用,生长受到抑制甚至导致死亡。研究^[20]表明,高氨能抑制细胞蛋白质的合成,在高氨条件下,过氧化物酶POD活性下降,而POD活性与生长素的含量有关,从而进一步影响藻细胞生长,反映在生物量的下降。对照组0氮胁迫组结果说明,在完全无氮条件下,藻细胞仍表现有微弱生长,表明藻细胞自身有一定的氮储备功能,当生长环境中氮素匮乏时,细胞将储备的氮释放并利用。但只能维持很短的时间,之后藻细胞便不能正常生长甚至死亡。

温度是影响细胞生长的另一个重要因素。就光合作用来讲,高温抑制卡尔文循环的活性,阻碍同化产物代谢^[21],更容易影响光合电子传递^[22]。雨生红球藻最合适的生长温度为22℃,此结果与Lu等^[13]的实验结果相一致。温度对虾青素的积累也有影响,胁迫温度为30℃时虾青素质量分数最高,胁迫温度为35℃和38℃时,大部分藻体死亡。说明藻细胞有一定的耐受温度,虽然虾青素的积累可以在高温条件下产生,但是过高温会破坏藻细胞的结构,导致细胞死亡。

这些工作为以后的实验提供了经验,便于后期实验的设计,为实现雨生红球藻的大规模培养及工业化提供基础数据和科学依据。作者所在实验室将继续针对影响雨生红球藻生长及虾青素积累的其他因素及影响机理进行深入的探究。

参考文献:

- [1] Tso M, Lam T. Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage:US Patent:5527533 [P]. 1996-01-07.
- [2] 魏东,臧晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J]. 中国海洋药物,2001(5):4-8.
WEI Dong,ZANG Xiaonan. Research progress and current situation of industrialization of large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis* and the production of natural astaxanthin [J]. **Chinese Journal of Marine Drugs**,2001 (5):4-8. (in Chinese)
- [3] 邹景忠,李福东,黄长江. 赤潮生物的营养生理[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [4] 石岩峻,胡晗华,马润宇,等. 不同氮磷浓度水平下微小原甲藻对营养盐的吸收及光和特性[J]. 过程工程学报,2004,4(6):554-560.
SHI Yanjun,HU Hanhua,MA Runyu,et al. The nutrient absorption and optical properties of *Prorocentrum minimum* under different nitrogen and phosphorus levels[J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**,2004,4(6):554-560. (in Chinese)
- [5] Gardner W S,Lavrentyev P J,Cavaletto J E, et al. Distribution and dynamics of nitrogen and microbial plankton in southern Lake Michigan during spring transition.1999-2000[J]. **Journal of Geophysical Research**,2004, 109: 1-16.

- [6] Paerl H W, Xu H, McCarthy M J, et al. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient(N & P)management strategy[J]. **Water Research**, 2011, 45: 1973-1983.
- [7] Dortch Q, Clayton J J R, Thoresen S S. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton[J]. **Marine Biology**, 1984, 81: 237-250.
- [8] Orosa M, Franqueira D, Cid A, et al. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth[J]. **Biotechnology Letters**, 2001, 23: 373-378.
- [9] 陆开形, 蒋霞敏, 翟兴文. 不同条件下雨生红球藻生长的研究[J]. 水利渔业, 2003, 23(1): 17-19.
LU Kaixing, JIANG Xiamin, ZHAI Xingwen. The research of *pluvialis* under different conditions[J]. **Reservoir Fisheries**, 2003, 23(L): 17-19. (in Chinese)
- [10] 张京浦, 刘建国. 营养盐对雨生红球藻光合作用影响的研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(4): 14-17.
ZHANG Jingpu, LIU Jianguo. Study of the effect of the nutrient on photosynthesis of *Haematococcus pluvialis* [J]. **Industrial Microbiology**, 1997, 27(4): 14-17. (in Chinese)
- [11] Harker M, Alex J, Tsavalos A J. Young use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*[J]. **Appl Phycol**, 1995, 7: 399-406.
- [12] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn H Ann. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. effects of nutrients on growth and cell type[J]. **Appl Phycol**, 1991, 3: 295-304.
- [13] Lu F, Vonshak A, Boussiba S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)[J]. **Phycol**, 1994t 30: 829-833.
- [14] 苗凤萍, 李夜光, 耿亚红, 等. 温度对雨生红球藻生物量和虾青素产量的影响[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(1): 73-76.
FENG Pingmiao, LI Yeguang, GENG Yahong, et. The effect of temperature on the *Haematococcus pluvialis* biomass and astaxanthin yield[J]. **Journal of Wuhan Botanical Research**, 2005, 23(1): 73-76. (in Chinese)
- [15] 梁兴飞, 郭宗楼. 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素 a 的方法优化[J]. 水生生物学报, 2010, 4: 856-861.
LIANG Xingfei, GUO Zonglou. Study on optimization method for the determination of phytoplankton chlorophyll a by ultrasonic assisted hot ethanol extraction method[J]. **Acta Hydrobiologica Sinica**, 2010, 4: 856-861. (in Chinese)
- [16] Boussiba S, Fan L, Vonshar A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. **Methods Enzymology**, 1992, 213: 386-391.
- [17] 李博, 康瑞娟, 张栩, 等. 铵盐对螺旋藻生长的影响[J]. 过程工程学报, 2005, 5(6): 684-685.
LI Bo, KANG Ruijuan, ZHANG Xu, et al. Effect of ammonium on the growth of *Spirulina*[J]. **Journal of Process Engineering**, 2005, 5(6): 684-685. (in Chinese)
- [18] Azov Y, Goldman J C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1982, 43(4): 735-739.
- [19] 崔克辉, 何之常. 模拟 N、P 污水对水稻幼苗过氧化物酶和超氧化物歧化酶的影响[J]. 环境科学学报, 1995, 15(4): 447-453.
CUI Kehui, HE Zhichang. Effects of simulated wastewater contained N and P on peroxidase and superoxide dismutase of rice seedlings[J]. **Journal of Environmental Science**, 1995, 15(4): 447-453. (in Chinese)
- [20] Jiao J, Grodzinski B. The effect of leaf temperature and photorespiratory conditions on export of sugars during steady-state photosynthesis in *Salvia splendens*[J]. **Plant Physiol**, 1996, 111: 169-178.