

## 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻对不同形态有机磷的利用及其生长\*

钱善勤<sup>1,2</sup>, 孔繁翔<sup>1</sup>, 张 民<sup>1</sup>, 于 洋<sup>1</sup>, 史小丽<sup>1\*\*</sup>

(1: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘 要:** 本研究探索了铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)在单藻批式培养条件下对三种不同形态的可溶性有机磷化合物:1-磷酸-葡萄糖,环磷酸腺苷(c-AMP)和三磷酸腺苷(ATP)的利用及其生长.结果表明铜绿微囊藻和蛋白核小球藻能够利用这三种有机磷源进行生长.铜绿微囊藻对三种不同形态有机磷源的利用效率由高到低依次是:1-磷酸-葡萄糖,ATP和c-AMP,尤其是对磷酸单酯类磷源——1-磷酸-葡萄糖有极高的利用效率,在该磷源培养条件下微囊藻最大藻浓度能达到正磷酸盐培养条件下的最大藻浓度.小球藻对1-磷酸-葡萄糖和ATP的利用率略高于c-AMP.总体上铜绿微囊藻对这三种有机磷源的利用能力要高于小球藻.碱性磷酸酶与藻利用有机磷的能力有重要的关系,藻对有机磷的利用能力随着胞内酶活的增加而增强.随着富营养化程度的加剧,水体中可溶性有机磷在总磷中的比例也不断升高,铜绿微囊藻对可溶性有机磷的较强利用能力,可能促使其成为富营养化水体中优势种的原因之一.

**关键词:** 铜绿微囊藻;蛋白核小球藻;可溶性有机磷;碱性磷酸酶

## Utilization of dissolved organic phosphorus and the growth of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa*

QIAN Shanqin<sup>1,2</sup>, KONG Fanxiang<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, YU Yang<sup>1</sup> & SHI Xiaoli<sup>1</sup>

(1: State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China)

(2: Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

**Abstract:** The growth and the utilization of dissolved organic phosphorus (DOP) of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* were studied under unialgal batch culture condition. Three different forms of phosphorus sources: glucose-1-phosphate, cyclic 3'5'-adenosine monophosphate (c-AMP) and adenosine triphosphate (ATP), were examined in our study. The results imply that although both *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* were able to utilize those DOP, *M. aeruginosa* grew better than *C. pyrenoidosa*. Particularly, *M. aeruginosa* could effectively utilize glucose-1-phosphate, and its maximum cell abundance was as high as that under phosphate condition. Compared with c-AMP, glucose-1-phosphate and ATP were more efficiently uptake by algae. It demonstrated that alkaline phosphatase was very important for the utilization of DOP. The proportion of DOP to total dissolved phosphorus was pretty high in the eutrophic lake, therefore, the efficient utilization of dissolved organic phosphorus may be a competitive advantage for *M. aeruginosa* to become dominant species in this water environment.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*; *Chlorella pyrenoidosa*; dissolved organic phosphorus; alkaline phosphatase

磷作为许多水环境的限制性因子,其浓度与形态对水体中浮游藻类的生长有重要的影响.随着富营养化程度的加剧,水体中易被藻类吸收的正磷酸盐在总磷中的比例逐渐下降<sup>[1]</sup>.太湖是重富营养化湖泊,水体中溶解性无机磷浓度非常低,仅约占水体中总磷的10%(数据引自太湖湖泊生态系统研究站2005年报),有机磷源则占了相当大的比例.当水体中的无机磷浓度很低,且藻类大量生长时,藻类对有机磷的利用能力决

\* 国家自然科学基金项目(40601034)和国家重点科技计划“973”项目(2008CB418005)联合资助.2009-05-07收稿;2009-06-25收修改稿.钱善勤,男,1981年生,博士;E-mail:shqqian@niglas.ac.cn.

\*\* 通讯作者;E-mail:xlshi@niglas.ac.cn.

定了藻的竞争能力<sup>[2]</sup>. 因此在富营养化严重的水体中, 若有一些藻类能有效利用有机磷作为替代的磷源, 对于提高这些藻类的种间竞争能力并进而发展成为群落中的优势种无疑具有重要的意义.

水体中有机磷化合物的形态非常复杂, 人们对其具体的组成和比例还知之甚少<sup>[3-4]</sup>, 已经确定的含磷有机化合物主要是生物残体分解后的物质, 包括 DNA、RNA、环磷酸腺苷(c-AMP)、三磷酸腺苷(ATP)、肌糖六磷酸及一些磷酸单酯类化合物<sup>[5-9]</sup>. 水生浮游藻类对溶解性有机磷的利用程度与碱性磷酸酶有着十分密切的联系<sup>[10-11]</sup>, 通常认为碱性磷酸酶可以水解磷酸单酯类化合物, 及其它一些形态的磷化合物<sup>[12-13]</sup>. 在一些湖泊中, 有超过 60% 的溶解性有机磷可以被碱性磷酸酶水解后用于藻类的生长<sup>[14]</sup>, 这部分磷通常被称为生物可利用有机磷<sup>[3]</sup>.

本研究选用三种代表不同形态的有机磷源: 1-磷酸葡萄糖、c-AMP、ATP, 探索了铜绿微囊藻和蛋白核小球藻在不同有机磷源环境下的生长能力, 及碱性磷酸酶活性与藻类对有机磷源利用能力的关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)购自中国科学院水生生物研究所. 培养基为 BG-11<sup>[15]</sup>, 藻的培养条件为: 12h: 12h 光暗比, 2200lux 光照, 25℃. 3 种不同形态的有机磷源: 1-磷酸-葡萄糖、c-AMP、ATP, 均为国产分析纯试剂. 试验中磷浓度设定为 BG-11 培养基中的总磷浓度(5.54mg/L). 显微镜型号为 JNOEC XS-213.

### 1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 将经过磷饥饿培养(在无磷培养基中培养两个星期以上)的铜绿微囊藻和蛋白核小球藻分别接入以 1-磷酸-葡萄糖、c-AMP、ATP 为有机磷源的 BG-11 培养基中(磷浓度为 5.44mg/L), 并以磷酸氢二钾为无机正磷酸盐对照, 初始藻密度约为  $2 \times 10^5$  cells/ml. 藻的培养条件如 1.1, 每个处理设三个平行样.

1.2.2 生长曲线 在显微镜下用血球计数法跟踪藻的生长情况, 绘制生长曲线.

1.2.3 培养基中溶解性总磷浓度的测定 取 1ml 藻液, 10000r/min 离心 10min 后取上清液, 加入 1ml 50g/L 的过硫酸钾溶液并定容至 10ml, 121℃ 消化 30min, 再用磷钼蓝比色法测定磷酸盐浓度.

1.2.4 碱性磷酸酶活性的测定 取 2.5ml 藻液及 2.5ml 上清液(离心去除藻细胞), 分别加入 2.5ml Tris-HCl 缓冲液(pH 8.4), 混匀后再加入 1ml 反应底物对硝基苯磷酸二钠, 25℃ 避光反应 24h, 最后加入 4ml, 0.1mol/L 的 NaOH 溶液终止反应. 用 UV-1600 紫外光栅分光光度计在 410nm 处分别测定两个样品中反应产物对硝基苯酚(p-Nitrophenol, PNP)的产生量, 并计算单位时间内单个藻细胞所产生的硝基苯酚, 并以此作为细胞碱性磷酸酶活性的单位<sup>[16]</sup>, 测得的上清液酶活性为藻胞外酶活性, 扣除胞外酶活性的藻液酶活性为藻的胞内酶活性.

1.2.5 数据分析 显著性差异采用 One-way ANOVA 分析方法,  $P < 0.05$  为显著性差异.

## 2 结果

### 2.1 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻对不同形态有机磷的利用及其相应的生长

铜绿微囊藻能利用三种不同形态有机磷进行生长(图 1), 尤其是在 1-磷酸-葡萄糖培养条件下生长的最好, 在试验进行的第 10d 藻密度达到了  $5.73 \times 10^6$  cells/ml, 这与微囊藻在磷酸氢二钾培养条件下的最大藻密度持平. 此外铜绿微囊藻在 ATP 中的生长要略好于 c-AMP, 在这两种磷源中的最大藻密度分别达到了  $4.09 \times 10^6$  cells/ml 和  $3.25 \times 10^6$  cells/ml. 随着藻的生长, 水中溶解性总磷浓度逐渐下降, 藻生长的越快则磷浓度下降的越快. 这说明试验中微囊藻的确利用了培养基中的有机磷源, 而非藻细胞内自身贮存的磷.

蛋白核小球藻也可以利用这三种不同形态的有机磷进行生长(图 1), 利用效率从高到低依次是 1-磷酸-葡萄糖、ATP 及 c-AMP, 这一趋势与铜绿微囊藻相一致, 试验中最大藻密度依次达到  $3.88 \times 10^6$  cells/ml,  $3.87 \times 10^6$  cells/ml 和  $3.05 \times 10^6$  cells/ml. 在小球藻生长的同时, 水体中溶解性总磷浓度也呈不断下降的趋势.

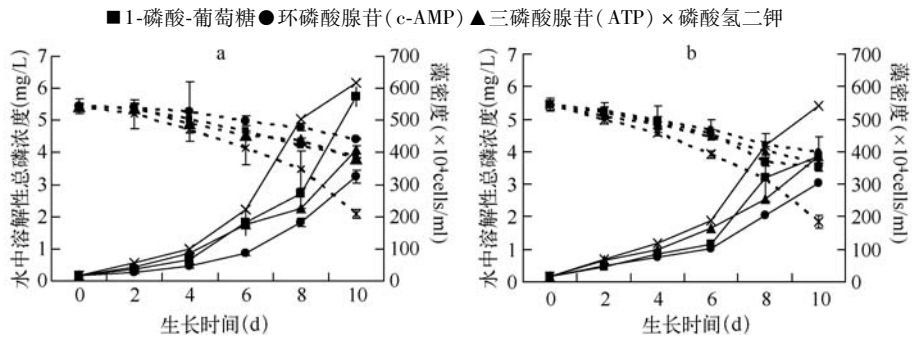


图1 铜绿微囊藻(a)和蛋白核小球藻(b)在不同有机磷源中的生长及水体中溶解性总磷的浓度 (实线代表藻密度,虚线代表水体中溶解性总磷浓度)

Fig.1 Cell abundance of *M. aeruginosa* and *C. pyrenoidosa* under different organic phosphorus and total dissolved phosphorous concentration

### 2.2 藻细胞内和细胞外碱性磷酸酶活性的变化

铜绿微囊藻的胞内碱性磷酸酶活性在试验中呈先上升后下降的趋势,在第4d达到最大值  $0.14 \times 10^{-10} \text{ mol}/(\text{cells}\cdot\text{h})$  (图2a). 铜绿微囊藻胞内碱性磷酸酶活性在1-磷酸-葡萄糖中达到最大值,其次是ATP,最后是c-AMP. 小球藻的胞内碱性磷酸酶活性的初始值较铜绿微囊藻高,在试验过程中逐渐下降,在第6d后稳定在一定水平. 小球藻胞内碱性磷酸酶活性在1-磷酸-葡萄糖培养基中最高,而在c-AMP和ATP中的活性无显著性差别(图2a). 铜绿微囊藻的胞内碱性磷酸酶活性在总体水平上高于小球藻.

微囊藻和小球藻释放的胞外碱性磷酸酶活性在试验进行的第2d达到了最大值,随后不断下降,在第6d达到相对稳定的状态. 铜绿微囊藻所释放的胞外碱性磷酸酶活性在总体上高于小球藻. 在不同有机磷形态下两种藻分泌的胞外酶活性无显著性差异(图2b).

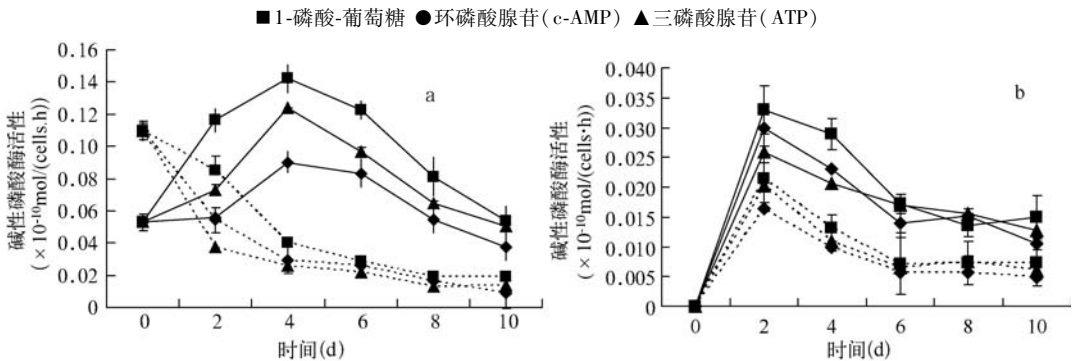


图2 铜绿微囊藻与蛋白核小球藻的胞内(a)和胞外(b)碱性磷酸酶活性 (实线代表铜绿微囊藻,虚线代表蛋白核小球藻)

Fig.2 Cellular(a) and extracellular(b) alkaline phosphatase activity under different organic phosphorus

## 3 讨论

### 3.1 碱性磷酸酶活性与藻对有机磷源利用能力的关系

铜绿微囊藻和小球藻的胞内碱性磷酸酶活性在有机磷源培养条件下的变化趋势与在无机磷酸盐条件下的相同. 微囊藻的胞内酶活性先上升,后下降,而小球藻的胞内酶活性在试验中不断下降. 两种藻的胞内碱性磷酸酶活性在有机磷源环境下要显著高于在无机磷源环境下的酶活<sup>[17]</sup>,一方面这可能由于藻在两批试验中的初始值有很大的差异,但另一方面特别对于铜绿微囊藻,有机磷环境促进了藻胞内酶活性的增加,碱性磷酸酶活性的大小与藻在不同形态有机磷源环境中的生长有密切的关系,酶活越高,则藻对有机磷的利

用能力越强,生长得也越好.

水生微生物对溶解性有机磷的利用程度与碱性磷酸酶有着十分密切的联系<sup>[10-11]</sup>,本研究表明碱性磷酸酶对磷酸单酯类有机磷的水解能力最高,其次也能水解三聚磷酸化合物和环聚磷酸化合物.

野外调查数据表明当藻类大量生长时太湖藻类细胞中的碱性磷酸酶活性最多占到水体中总碱性磷酸酶活性的80%以上.此外碱性磷酸酶分解磷酸单酯化合物的速度是非常快的,其速率甚至可以高于 $0.05\text{mmol/h}$ <sup>[18]</sup>.尽管本试验中铜绿微囊藻对磷酸单酯类化合物的分解速率约为 $0.006\text{mmol/h}$ ,藻密度仍然在试验中达到了一个很高的值.

最后试验表明虽然经过相同时间的磷饥饿预培养过程,小球藻胞内碱性磷酸酶的初始活性要高于微囊藻,这可能因为这两种藻在磷饥饿条件下具有不同的应对策略,微囊藻在磷饥饿环境下先利用细胞内的可溶性磷酸盐,随后利用藻体内贮存的聚合磷酸盐来维持低水平的生长<sup>[19]</sup>,因此胞内碱性磷酸酶没有被激活,而小球藻在磷饥饿环境下的磷代谢机理还未有报道.

### 3.2 铜绿微囊藻和小球藻在不同形态有机磷环境中的生长

本研究所选用的三种有机磷源的分子结构具有一定的代表性,如1-磷酸-葡萄糖代表简单的磷酸单酯类有机磷源,环磷酸腺苷代表环状磷酸类磷源,三磷酸腺苷代表直链的三聚磷酸类磷源,后两种都是生物体内的磷化合物,能从生物残体释放到水体中.试验结果表明铜绿微囊藻和小球藻能利用以上的三种有机磷源进行生长.通常认为正磷酸盐是浮游植物最易吸收利用的磷源,但试验结果表明铜绿微囊藻能有效的利用1-磷酸-葡萄糖这样单酯类的有机磷源,其最大藻密度已经达到了正磷酸盐培养条件下的最大藻密度,这与以前的研究结果相一致<sup>[20]</sup>,而小球藻对1-磷酸-葡萄糖的利用效率远远小于铜绿微囊藻,其最大藻密度也远远低于铜绿微囊藻.此外试验结果还表明两种藻对ATP的利用能力要略高于对c-AMP的利用能力.因此藻对不同结构的可溶性有机磷源的利用能力由高到低依次是:磷酸单酯类化合物,链状的三聚磷酸类化合物,环状磷酸类化合物.

藻类还能利用不同形态的无机磷酸盐如焦磷酸盐、三聚磷酸盐作为磷源进行生长<sup>[17]</sup>.本研究结果表明在相同的总磷浓度条件下,铜绿微囊藻更能有效的利用可溶性有机磷源,其最大藻密度远远大于在焦磷酸盐、三聚磷酸盐培养条件下的最大藻密度<sup>[17]</sup>.而小球藻对无机磷酸盐和可溶性有机磷化物的利用效率无显著性差别<sup>[17]</sup>.

不同藻类对不同形态磷源的利用能力有明显的区别,如塔马亚历山大藻 *Alexandrium tamarense* 在6-磷酸果糖、1-磷酸-葡萄糖、甘油磷酸等磷酸单酯类有机化合物中生长的不好,而在ADP和ATP的有机磷环境中很好的生长.链状裸甲藻 *Gymnodinium catenatum* 则能利用磷酸单酯类和磷酸二酯类有机磷化合物<sup>[21]</sup>.因此水体中存在的磷源形态的组成可能对藻类的种群结构产生重要的影响.随着水体富营养化程度的加剧,水体中有机磷化合物占水体中总磷的比例逐渐增大,当藻类大量生长时,由于水体中的无机磷浓度很低,藻类对有机磷的利用能力决定了藻的竞争能力<sup>[2]</sup>,本研究结果表明与小球藻相比较,铜绿微囊藻更能有效地利用水体中的有机磷源,特别是磷酸单酯类化合物,因此在富营养化的水体中具有更强的种间竞争能力.

## 4 参考文献

- [1] Hudson JJ, Taylor WD, Schindler DW. Phosphate concentration in lakes. *Nature*, 2000, **406**:54-56.
- [2] Spijkerman E, Coesel PFM. Alkaline phosphatase activity in two planktonic desmid species and the possible role of an extracellular envelope. *Freshwater Biology*, 1998, **39**:503-513.
- [3] Shan Y, Mckelvie ID, Hart BT. Determination of alkaline phosphatase-hydrolyzable phosphorus in natural water systems by enzymatic flow injection. *Limnol Oceanogr*, 1994, **39**:1993-2000.
- [4] Nanny MK, Kim S, Minear RA. Aquatic soluble unreactive phosphorus: HPLC studies on concentrated water samples. *Water Research*, 1995, **29**:2138-2148.
- [5] Hupfer M, Gachter R, Giovanoli R. Transformation of phosphorus species in settling seston and during early sediment diagenesis. *Aquatic Sciences*, 1995, **57**:305-324.
- [6] James B, Cotner J, Wetzel RG. 5'-Nucleotidase activity in a eutrophic lake and oligotrophic lake. *Hydrobiologia*, 1991, **57**:1306-1312.

- [ 7 ] Karl DM, Bailiff MD. The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. *Limnol Oceanogr*, 1989, **34**:543-558.
- [ 8 ] Franko DA, Wetzel RG. The isolation of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate(AMP) from lakes of differing trophic status; correlation with planktonic metabolic variables. *Limnol Oceanogr*, 1982, **27**:27-38.
- [ 9 ] Minear RA, Seagers JE, Elwood JW *et al.* Separation of inositol phosphates by high performance ion-exchange chromatography. *Analyst*, 1988, **113**:645-649.
- [ 10 ] Klotz RL. Cycling of phosphatase hydrolysable phosphorus in streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 1991, **48**:1460-1467.
- [ 11 ] Jansson M, Olsson H, Pettersson K. Phosphatases, origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, 1988, **170**:157-175.
- [ 12 ] Cotner JB, Wetzel RG. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol Oceanogr*, 1992, **37**:232-243.
- [ 13 ] Bentzen E, Taylor WD. The importance of dissolved organic phosphorus to phosphorus uptake by limnetic plankton. *Limnol Oceanogr*, 1992, **37**:217-231.
- [ 14 ] Hantke B, Fleischer P, Domany I *et al.* P-release from DOP by phosphatase activity in comparison to P excretion by zooplankton; studies in hardwater lakes of different trophic level. *Hydrobiologia*, 1996, **317**:151-162.
- [ 15 ] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979, **111**:1-61.
- [ 16 ] Berman T. Alkaline phosphatases and phosphorus availability in lake Kinneret. *Limnol Oceanogr*, 1970, **15**:663-674.
- [ 17 ] 钱善勤,孔繁翔,史小丽等. 不同形态磷酸盐对铜绿微囊藻和蛋白核小球藻生长的影响. *湖泊科学*, 2008, **20**:796-801.
- [ 18 ] 秦伯强,胡维平,陈伟民. 太湖水环境演化过程与机理. 北京:科学出版社,2004:223.
- [ 19 ] 杨柳燕,王勤,史小丽等. 铜绿微囊藻磷代谢过程研究. *农业环境科学学报*, 2005, **24**:686-689.
- [ 20 ] 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. *应用与环境生物学报*, 2002, **8**:507-510.
- [ 21 ] Oh SJ, Yamamoto T, Kataoka Y *et al.* Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fisheries Science*, 2002, **68**:416-424.