

液体悬浮培养条件下发菜细胞的光合速率与呼吸速率

苏建宇 何茜 贾士儒*

天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222

摘要 用液相氧电极测定离体悬浮生长发菜细胞的光合速率和呼吸速率的结果表明, 发菜细胞的光补偿点为 $15\sim 16\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光饱和点为 $90\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光抑制点为 $190\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。25℃下发菜细胞光合速率最高, 呼吸速率则在 $10\sim 50\text{℃}$ 范围内随温度升高而增强。发菜细胞光合作用的最适pH值为7.0~7.5, 呼吸作用最适pH值为9.0。BG11₀无氮培养基中添加 $30\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaNO}_3$, 发菜细胞的光合速率增加约20%。培养基中 Na_2HPO_4 浓度为 $1.75\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞光合速率和呼吸速率最大, 随后保持稳定。钾盐浓度变化对发菜细胞光合速率和呼吸速率的影响不显著。

关键词 发菜; 细胞培养; 光合速率; 呼吸速率

Photosynthetic and Respiratory Rates in Liquid Suspension Culture Cells of *Nostoc flagelliforme* Born. et Flah.

SU Jian-Yu, HE Qian, JIA Shi-Ru*

Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, School of Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China

Abstract Photosynthetic and respiratory rates of cells from *Nostoc flagelliforme* Born. et Flah. were determined by using an oxygen electrode. The results showed that photosynthetic light compensation point of cells was $15\sim 16\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, light saturation point was $90\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and light inhibition point was $190\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The optimum temperature for photosynthesis was 25℃. Respiratory rate was increased with the increase of temperature at range from 10℃ to 50℃. The optimum pH for photosynthesis was 7.0~7.5 and that for respiration was 9.0. Photosynthetic rate of cells was increased about 20% when $30\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaNO}_3$ was added into medium. Cells exhibited maximum photosynthetic and respiratory rates when $1.75\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ was in medium. The effect of change in potassium concentration on photosynthetic and respiratory rates of cells was inapparent.

Key words *Nostoc flagelliforme* Born. et Flah.; cell culture; photosynthetic rate; respiratory rate

发菜(*Nostoc flagelliforme* Born. et Flah.)是一种陆生多细胞丝状蓝藻, 藻体内有许多由念珠状细胞构成的藻丝体, 这些藻丝体平行纵向排列, 细胞分泌的胶质物质将其包被构成发菜藻体。发菜藻体的人工培养研究已有多年, 但藻体生长缓慢的问题并未解决, 迄今仍无法规模化人工培养生产(Gao 1998; 李运广和胡征宇 2003), 因此近年来, 从发菜藻体中分离发菜细胞进行液体悬浮培养逐渐受到研究者的重视(毕永红和胡征宇 2004; Gao和Ye 2003; Liu和Cheng 2003; Liu和Liang 1999), 但与此相关的液体培养条件下离体发菜细胞的生理特性尚缺少报道。为此, 本文测定了液体悬浮培养条件下离体发菜细胞的光合与呼吸特性, 以期能为发菜细胞的液体培养和大规模生产提供参考。

材料与方法

离体悬浮生长的发菜(*Nostoc flagelliforme* Born. et Flah.)细胞由我校生化工程研究室提供。以BG11为基本培养基, 于500 mL三角瓶中分装培养基150 mL, 接种发菜细胞液, 接种后培养液的750 nm吸光值(A_{750})控制在0.05左右。于25℃、120 r·min⁻¹下振荡培养。白色荧光灯连续光照, 培养瓶表面光强 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

测定光合速率和呼吸速率时, 取2.5 mL发菜

收稿 2005-10-18 修定 2006-03-03

资助 国家自然科学基金(20376061)和天津市科技发展计划重点基金(043801611)。

*通讯作者(E-mail: jiashiru@tust.edu.cn, Tel: 022-60270012, Fax: 022-60272218)。

细胞培养液于Oxy-Lab液相氧电极(Hansatech, 英国)反应室中, 以3~6 min为间隔, 交替进行光照和黑暗处理, 分别测定光照和黑暗期间发菜细胞液中溶解氧变化, 计算该时间段内发菜细胞的光合放氧或呼吸耗氧量。测定重复3次, 并根据下列公式计算: 光合速率 $[\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}] = \text{放氧量}[\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mL}^{-1}] \times 2.5 / [\text{叶绿素含量}(\text{mg}) \times \text{测定时间}(\text{h})]$; 呼吸速率 $[\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}] = \text{耗氧量}[\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mL}^{-1}] \times 2.5 / [\text{叶绿素含量}(\text{mg}) \times \text{测定时间}(\text{h})]$ 。

测定细胞叶绿素a含量(Hall和Rao 1994)时, 将氧电极反应室中发菜细胞液全部吸取于离心管中, 离心后弃去上清液, 加入3 mL甲醇, 盖严离心管, 于4℃、黑暗条件下过夜, 再离心, 取上清液, 于波长665 nm下, 以甲醇为参比液, 测定吸光值。叶绿素a含量按下式计算: 叶绿素a $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}) = 13.9 \times A_{665} \times V_{\text{甲醇}}$ 。

结果与讨论

1 不同光照强度下发菜细胞的光合速率

发菜细胞光合作用的光补偿点为 $15 \sim 16 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光饱和点为 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 达到光饱和时, 发菜细胞光合速率为 $121 \mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}$ 。 $190 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 是发菜细胞的光抑制点, 此后, 细胞光合速率开始随光照强度增加而下降。光照强度达到 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, 发菜细胞光合速率为 $42 \mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}$, 约为光饱和时的1/3(图1)。

离体发菜细胞的光饱和点和光抑制点远低于发菜藻体(光饱和点 $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光抑制点 $>1800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)而与一般蓝藻相似(光饱和点 $100 \sim 150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光抑制点 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (施定基等1992), 发菜藻体所表现出的强烈嗜光性可能是其藻丝外被的胶质鞘吸收和阻挡了大部分光照所致, 去除胶质鞘结构以后, 离体发菜细胞对光照的要求与其它蓝藻并无区别。由于在藻类的光自养培养中, 光照往往成为其生长的限制因子, 而离体发菜细胞不像发菜藻体那样需要强烈的光照, 这有利于开展发菜细胞的大规模和高密度培养。

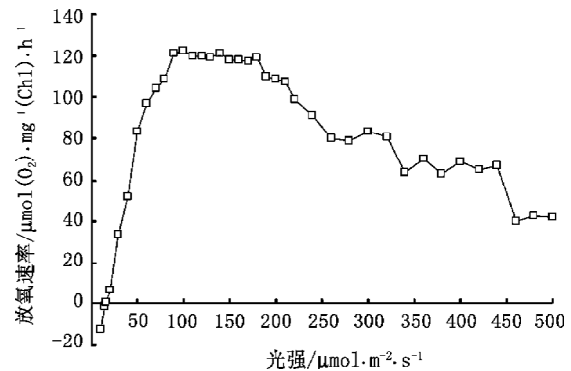


图1 不同光强下发菜细胞的光合速率
Fig. 1 Photosynthetic rate of *N. flagelliforme* cells at different light intensities
25℃、pH 7.5 下培养。

2 温度对发菜细胞光合速率和呼吸速率的影响

用恒温水浴控制氧电极反应室的温度, 分别测定不同温度下发菜细胞的光合速率和呼吸速率的结果表明, 温度在 $5 \sim 25 \text{℃}$ 范围内, 发菜细胞的光合速率随温度增高而上升, 25℃ 下最大, 之后随着温度升高而降低, 45℃ 时, 细胞光合速率为0。发菜细胞在 10℃ 时开始检测到有呼吸活性, 在 $5 \sim 50 \text{℃}$ 范围内, 呼吸速率随温度的升高而加强。据此认为, 发菜细胞培养的最适温度应为 25℃ (图2)。

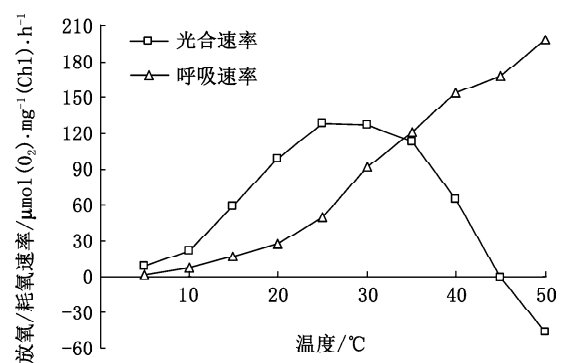


图2 不同温度下的发菜细胞光合速率和呼吸速率
Fig. 2 Photosynthetic and respiratory rates of *N. flagelliforme* cells at different temperatures
pH 7.5、光强 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下培养。

3 pH值对发菜细胞光合速率和呼吸速率的影响

图3表明, 发菜细胞光合速率在pH $7.0 \sim 7.5$

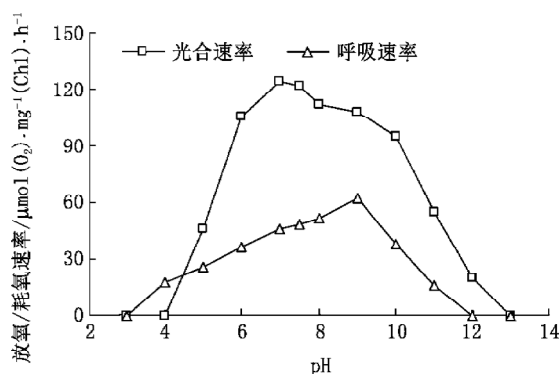


图3 不同pH值下发菜细胞光合速率和呼吸速率

Fig. 3 Photosynthetic and respiratory rates of *N. flagelliforme* cells at different pH values
25°C、光强 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下培养。

时最大, pH 7.0~9.0 之间一直维持较高水平; pH 值大于 9.0 时下降, pH 值为 13 时降为 0; 细胞光合速率在 pH 值低于 7.0 时迅速下降, 至 pH 4.0 时降为 0。在 pH 4.0~9.0 范围内, 发菜细胞呼吸速率与 pH 值几乎呈线性关系增长, pH 9.0 时最大, 以后随着 pH 值升高而下降, pH 12 时呼吸速率降为 0。发菜细胞光合和呼吸作用对酸性敏感而对碱性环境有较强的适应能力, 这与发菜耐碱的生态学特性(钱凯先等 1989)相一致。

4 培养基成分对发菜细胞光合速率和呼吸速率的影响

如图 4~6 所示:

(1) 发菜细胞在不含 NaNO_3 的 BG11₀ 培养基中

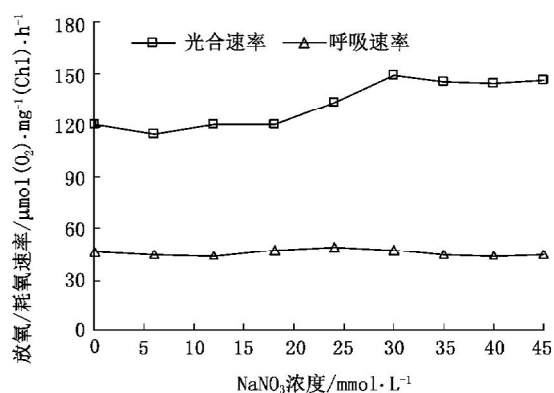


图4 不同浓度 NaNO_3 下发菜细胞光合速率和呼吸速率

Fig. 4 Photosynthetic and respiratory rates of *N. flagelliforme* cells at different NaNO_3 concentrations
25°C、pH 7.0、光强 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下培养。

培养 10 d 后, 离心收集细胞, 分别接入含不同浓度 NaNO_3 的 BG11 培养基中, 继续培养 24 h 后, NaNO_3 浓度为 6~18 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 发菜细胞的光合速率与无氮培养的无明显差异, 随着 NaNO_3 的浓度进一步增加, 细胞的光合速率增加, 在 NaNO_3 浓度为 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最大, 其后光合速率基本上保持稳定。 NaNO_3 浓度对呼吸作用无明显影响(图 4)。据此认为, 尽管发菜是固氮蓝藻, 在培养发菜细胞时, 培养基中应适当添加 NaNO_3 。

(2) BG11 培养基中去除 K_2HPO_4 , 代之以等摩尔 K^+ 浓度的 KCl , 制成无磷培养基。发菜细胞接种于无磷培养基中培养 10 d 后, 离心收集, 分别接种于含不同浓度 Na_2HPO_4 的 BG11 培养基中继续培养 24 h。无磷酸盐培养基中的细胞光合速率为 91.7 $\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}$; Na_2HPO_4 在 0~1.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 细胞光合速率随 Na_2HPO_4 浓度增加而升高; 之后, 基本上稳定在 135~145 $\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}$ 水平。呼吸速率的变化与光合速率相似, Na_2HPO_4 浓度大于 1.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 呼吸速率不再增加(图 5)。

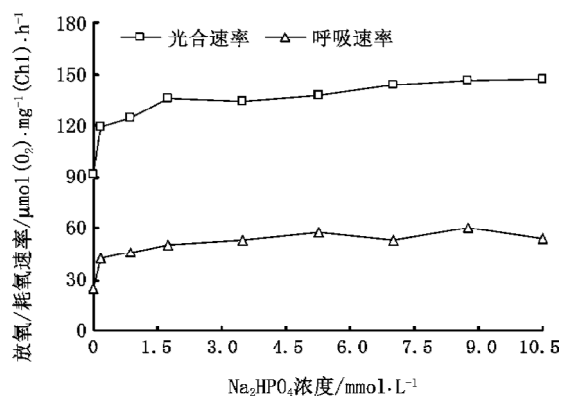


图5 不同浓度 Na_2HPO_4 下发菜细胞光合速率和呼吸速率

Fig. 5 Photosynthetic and respiratory rates of *N. flagelliforme* cells at different Na_2HPO_4 concentrations
25°C、pH 7.0、光强 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下培养。

(3) 发菜细胞于去除 K_2HPO_4 , 代之以等摩尔 PO_4^{3-} 浓度的 Na_2HPO_4 的无钾培养基中培养 10 d 后离心收集, 分别接种于含不同浓度 KCl 的 BG11 培养基中, 继续培养 24 h。无钾培养基中的细胞光合速率为 104.1 $\mu\text{mol}(\text{O}_2)\cdot\text{mg}^{-1}(\text{Chl})\cdot\text{h}^{-1}$; 添加 0.35 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl (标准 BG11 培养基的钾盐浓度) 的细胞

光合速率上升到 $119.7 \mu\text{mol} (\text{O}_2) \cdot \text{mg}^{-1} (\text{Chl}) \cdot \text{h}^{-1}$; 其后, KCl 浓度升高, 细胞光合速率无明显改变, 基本上稳定在 $120 \mu\text{mol} (\text{O}_2) \cdot \text{mg}^{-1} (\text{Chl}) \cdot \text{h}^{-1}$ 左右。呼吸速率随 KCl 浓度的升高而略有增加, 但变化不显著(图6)。钾盐浓度变化对发菜细胞光合速率和呼吸速率的影响没有磷酸盐显著。

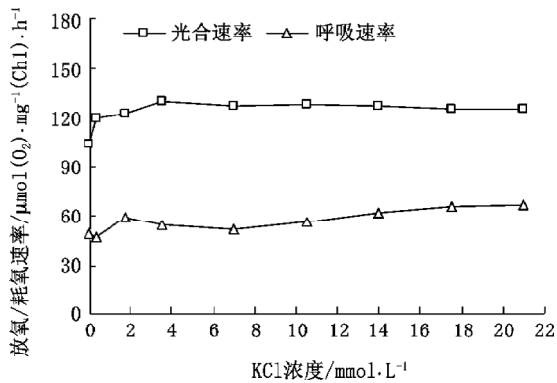


图6 不同浓度KCl下发菜细胞光合速率和呼吸速率
Fig. 6 Photosynthetic and respiratory rates of *N. flagelliforme* cells at different KCl concentrations
25°C、pH 7.0、光强 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下培养。

参考文献

- 毕永红, 胡征宇(2004). 温度、营养和光强对发状念珠藻生长的影响. 过程工程学报, 4 (3): 245~249
- 李运广, 胡征宇(2003). 发菜(*Nostoc flagelliforme*)培养条件的研究. 武汉植物学研究, 21 (5): 411~414
- 钱凯先, 朱浩然, 陈树谷(1989). 发菜的生态条件及其规律分析. 植物生态学与地植物学学报, 13 (2): 97~105
- 施定基, 周国飞, 方昭希, 仇媛媛, 钟泽濮, 崔志有(1992). 发菜光合作用、呼吸作用和形态学的研究. 植物学报, 34 (7): 507~514
- Gao KS (1998). Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. J Appl Phycol, 10: 37~49
- Gao KS, Ye CP (2003). Culture of the terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae), under aquatic conditions. J Phycol, 39: 617~623
- Hall DO, Rao KK (1994). Photosynthesis. 5th ed. Cambridge: The Press Syndicate of Cambridge, 43
- Liu SM, Liang SZ (1999). Effects of lanthanum on liquid culture and contents of amino acids of *Nostoc commune flagelliforme* cells. J Rare Earth, 17 (4): 298~302
- Liu XJ, Cheng F (2003). Cell differentiation and colony alteration of an edible terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*, in liquid suspension cultures. Folia Microbiol, 48 (5): 619~626